คุณสมบัติของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรค และชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดของผักสลัด ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

PROPERTIES OF *TRICHODERMA* SPP. FOR CONTROLLING AND INDUCING THE SYSTEMIC RESISTANCE TO LEAF SPOT OF HYDROPONICALLY GROWN LETTUCE (*LACTUCA SATIVA* L.)

มาลาตี ประดับญาติ

MALATEE PRADUBYART

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AG-M-101-225

คุณสมบัติของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรค และชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดของผักสลัด ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

PROPERTIES OF *TRICHODERMA* SPP. FOR CONTROLLING AND INDUCING THE SYSTEMIC RESISTANCE TO LEAF SPOT OF HYDROPONICALLY GROWN LETTUCE (*LACTUCA SATIVA* L.)

มาลาตี ประดับญาติ

MALATEE PRADUBYART

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AG-M-101-225

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PROPERTIES OF *TRICHODERMA* SPP. FOR CONTROLLING AND INDUCING THE SYSTEMIC RESISTANCE TO LEAF SPOT OF HYDROPONICALLY GROWN LETTUCE (*LACTUCA SATIVA* L.)

MALATEE PRADUBYART

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2016

KMITL-2016-AG-M-101-225

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2016

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ คุณสมบัติของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคและชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

Properties of *Trichoderma* spp. for Controlling and Inducing the Systemic Resistance to Leaf Spot of Hydroponically Grown Lettuce (*Lactuca sativa* L.)

นักศึกษา นางสาวมาลาตี ประดับญาติ

รหัสประจำตัว 54640805

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ฉนิมนันต์ เจนอักษร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.นงลักษณ์ เภรินทวงค์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ธีรวัฒน์	ศรุตโยภาส	
รศ.ดร.ทรงยศ	ตันพิพัฒน์	
รศ.ดร.พรหมมาศ	คูหากาญจน์	
ดร.นงลักษณ์	เภรินทวงค์	
รศ.ดร.ฉนิมนันต์	เจนอักษร	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 13 กรกฎาคม 2559

สถานที่สอบ ห้องประชุมคณะเทคโนโลยีการเกษตร 2 (ชั้น 1 ตึกบุนนาค)

คณบดีรับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล แก่นมณี)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 26 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	คุณสมบัติของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคและชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์
นักศึกษา	มาลาตี ประดับญาติ
รหัสประจำตัว	54640805
ปริญญา	วิทยาศาตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.ถนิมนันต์ เจนอักษร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.นงลักษณ์ เภรินทวงค์

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ (เช่น ดิน และ สารละลายจากระบบไฮโดรโปนิกส์) เพื่อยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด 3 ชนิด (*Alternaria* sp., *Cercospora* sp. และ *Curvularia* sp.) ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ ทั้งในห้องปฏิบัติการและสภาพแปลงปลูก จากการทดลองด้วยวิธี dual culture test พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลท มีความสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด *Alternaria* sp., *Cercospora* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ที่ระดับ 60-73 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกลไกหลักของการเข้าทำลาย คือกลไก competition และ exploitation ในขณะที่วันที่ 2 ของการทดสอบจะพบกลไกแบบ antibiosis ซึ่งโคโลนีของเชื้อโรคมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กลงโดยที่เชื้อราทั้งสองชนิดยังเจริญไม่สัมผัสกัน

การทดลองแบบ inverted petriplate test เพื่อศึกษาความสามารถการสร้างสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่าสารระเหยจากเชื้อทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้ที่ระดับ 3-25 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น โดยมีเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท คือ LK014, BR002 และ G003 มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค *Alternaria* sp., *Cercospora* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุด

การผลิตสารไม่ระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลท ที่ทดสอบด้วยวิธี cellophane test พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทสามารถผลิตสารไม่ระเหยลงสู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และส่งผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิดได้ โดยประสิทธิภาพของการยับยั้งจะขึ้นกับไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ *Curvularia* sp. พบว่าอยู่ในช่วง 15-55 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ในช่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2-39 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แสดงผลการยับยั้งได้ดีที่สุด (BR002, G003, G009, LK019, LK022 และ TR001) มาศึกษาต่อด้วยวิธี agar well diffusion เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยการใช้ culture filtrate (CF) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตลอดจนศึกษาการยับยั้งการเกิดโรคบนใบผักสลัดด้วยวิธี detached leaf test สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของ CF ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้เพียงเล็กน้อย โดย CF จากไอโซเลท BR002 ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ 15 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ CF ของไอโซเลท G003 ยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ 12.8 เปอร์เซ็นต์ ในทางตรงกันข้าม CF มีประสิทธิภาพที่โดดเด่นในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค โดยที่ระดับความเข้มข้น 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้สูงถึง 89-95 เปอร์เซ็นต์หลังบ่มเชื้อนาน 24-26 ชั่วโมง และไม่พบการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Alternaria* sp. เมื่อบ่มสปอร์กับ CF ที่ความเข้มข้น 60-100 เปอร์เซ็นต์ และจากผลการทดลองด้วยวิธี detached leaf test พบว่า CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 6 ไอโซเลทที่ความเข้มข้น 80-100 เปอร์เซ็นต์มีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดโรคใบจุดได้ แต่พบความเสียหายของใบผักสลัดจาก phytotoxicity ด้วยเช่นเดียวกัน

ในส่วนของการศึกษาในระบบไฮโดรโปนิกส์ การทดลองแรกได้คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* 3 ไอโซเลท (BR002, G003 และ LK019) และเชื้อราทางการค้า 1 ไอโซเลท เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคในผักสลัด (*Lactuca sativa* L.) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีน Pathogenesis Related 1 (*PR-1*), Plant defensing 1.2 (*PDF1.2*) และ Phytoalexin (*LTC1* และ *LTC2*) ในการทดลองนี้วางแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ที่มี 9 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 6 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเก็บใบผักสลัดที่ช่วงเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อที่รากและที่ใบ เมื่อปรับปริมาณเริ่มต้นของ cDNA โดยใช้ยีน *18s rRNA* พบว่าแถบของ cDNA มีความเข้มที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยการใช้ primer จำเพาะของแต่ละยีนนั้น พบมีการแสดงออกของยีน *PR-1* ในพืชที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. และไม่พบการแสดงออกของยีน *PR-1* ในกรรมวิธีควบคุม โดยระดับการแสดงออกของยีนนั้นขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และระยะเวลาของการปลูกเชื้อ โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* แบบ Local induced resistance ได้ และสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *PR-1* ในแบบ Systemic induced resistance ได้เช่นเดียวกัน แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *PDF1.2*, *LTC1* และ *LTC2*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท (LK019 ที่คัดแยกจากดิน, BR002 และ G003 ที่คัดแยกจากระบบไฮโดโปนิกส์ และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทางการค้า) เพื่อยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. สาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่รากและที่ใบของผักสลัด วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยปลูกผักสลัดจำนวน 2 ต้นต่อซ้ำ ผลการทดลองพบว่า หลังการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ส่งผลให้ผักสลัดเกิดโรคใบจุดช้าลงและมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 19-100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. 2 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากระบบไฮโดรโปนิกส์ (B002 และ G003) สามารถแสดงประสิทธิภาพได้สูงสุด โดยไอโซเลท BR002 สามารถยับยั้งการเกิดโรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้สูงถึง 88 และ 95 เปอร์เซ็นต์หลังจากปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่รากและใบของผักสลัดตามลำดับ และไอโซเลท G003 สามารถยับยั้งการเกิดโรคจากเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ 100 เปอร์เซ็นต์หลังจากปลูกเชื้อที่ใบผักสลัด สำหรับผลด้านการเจริญเติบโตของพืช (จำนวนใบ ขนาดใบ และ ค่าการสังเคราะห์แสง) พบว่าการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไม่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้อย่างแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis title	PROPERTIES OF *TRICHODERMA* SPP. FOR CONTROLLING AND INDUCING THE SYSTEMIC RESISTANCE TO LEAF SPOT OF HYDROPONICALLY GROWN LETTUCE (*LACTUCA SATIVA* L.)
Student	Malatee Pradubyart
Student ID.	54640805
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2016
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Tanimnun Jaenaksorn
Thesis Co-Advisor	Dr. Nonglak Parinthawong

ABSTRACT

The research was divided into 2 parts, namely *in vitro* and *in vivo* experiments. The *in vitro* study was performed with a series of experiments to investigate the antagonistic efficacy of *Trichoderma* species from different habitats (such as soil, hydroponic cultivation) against 3 plant pathogenic fungi (*Alternaria* sp. *Cercospora* sp. and *Curvularia* sp.) responsible for leaf spot disease of vegetable crops grown in hydroponics. Based on dual culture test, it revealed that all tested isolates *Trichoderma* showed an antagonistic potential against *Alternaria* sp. *Cercospora* sp. and *Curvularia* sp. having about 60-73 percent inhibition. Competition and exploitation were found as the main antagonistic mechanisms while antibiosis of non-volatile metabolites on PDA was observed only at the second day of incubation time as slender strips of fungal growth inhibition. Hyphal interactions were clearly noted under microscope.

Regard to volatile metabolites produced from 15 obtained isolates of *Trichoderma* spp., the inverted petriplate test was employed for this purpose. It showed that all *Trichoderma* isolates gave quite low percent inhibition about 3-25 percent. Three isolates of *Trichoderma* spp., namely LK014, BR002, and G003 were the most potential against *Alternaria* sp., *Cercospora* sp. and *Curvularia* sp.

Regarding the non-volatile compounds produced from all test isolates of *Trichoderma* spp., the first experiment was carried out using cellophane membrane test. The result revealed that

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

all tested *Trichoderma* spp. could produce non-volatile metabolites into the culture media and inhibited the mycelial growth of tested fungi. The inhibition varied depending on the *Trichoderma* isolates producing the metabolites; from 15-55 percent for *Curvularia* sp., from 2-39 percent for *Alternaria* sp. Amongst the tested *Trichoderma* spp., 6 isolates namely BR002, G003, G009, LK019, LK022 and TR001 exhibited the highest inhibition. Then, culture filtrates (CF) of the six potent isolates of *Trichoderma* sp. were further evaluated at the concentration of 0, 20, 40, 60 80 and 100 per cent by agar well diffusion assay (against mycelial growth and spore germination of the tested fungi) as well as by detached-leaf test. The antagonistic effect of CF in agar well assay was found less effective in suppressing the mycelial growth of tested fungal pathogens when compared to that in cellophane test. CF at 100 percent concentration from BR002 exhibited mycelial inhibition only 15 percent for *Curvularia* sp. meanwhile G003 showed 12.8 percent for *Alternaria* sp. In contrary, the CF effect was more pronounced on spore germination test. At 24-26 hrs of incubation, CF from all tested *Trichoderma* spp. at concentration of 40, 60, 80 and 100 percent were found to inhibit spore germination of *Curvularia* sp. in the range of 89-95 percent and spore abnormalities were occurred. While, no spore germination of *Alternaria* sp. was detected in CF of *Trichoderma* spp. at 60-100 percent concentration. Regarding the detached leaf test, antagonistic activity of 6 potent *Trichoderma* spp. was noted at the concentration of 80-100 percent. Unfortunately, phytotoxicity was also noted.

Regarding the *in vivo* study, 2 consecutive experiments were carried out in hydroponic system with the 3 selected potent isolates of *Trichoderma* (BR002, G003, and LK019) and one isolate from commercial product. First, experiment was conducted to study an induction of plant defensive mechanism by *Trichoderma* in lettuce (*Lactuca sativa* L.) being grown in hydroponics. Gene expression such as pathogenesis related protein (*PR1*), plant defensin (*PDF1.2*), phytoalexin (*LTC1* and *LTC2*) were analyzed accordingly. The experiment was arranged into Completely Randomized Design having 9 treatments with 3 replications of 6 plants. Gene expression was analyzed from lettuce leaf of each treatment at 0, 24, 48 and 72 hrs. Results revealed the total RNA extract and the presence of 18s bands were clearly observed. PR1 was clearly observed while no *PDF1.2, LTC1* and *LTC2* was detected from lettuce either treated with or without *Trichoderma* spp. Regarding *PR1* protein, it was observed mostly from treated lettuce but not from control. The expression level of *PR1* gene was variable linked to the isolation of *Trichoderma* and incubation period. Interestingly, *PR1* was shown to be local and systemic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

induced resistance since it was detected from leaves of lettuce having either leaf or root pre-treatment with *Trichoderma* isolates.

Second, experiment was conducted to evaluate the efficacy of 4 isolates of *Trichoderma* spp. (namely LK019 from soil, BR002 and G003 from hydroponics and 1 isolate from commercial product) for controlling *Alternaria* and *Curvularia* leaf spot on lettuce grown in hydroponics. *Trichoderma* application was performed as root and leaf treatment. Experiment was conducted in CRD with 3 replications of 2 plants. The results showed that in the pre-treated plants with *Trichoderma* isolates, progression of *Alternaria* and *Curvularia* sp. was slowed and degree of protection was in the range of 19-100 percent compared with the necrosis measured for plants infected by both pathogens without pre-treatment of *Trichoderma* isolates. Among the tested *Trichoderma* isolates, both isolates from hydroponic system (BR002 and G003) were proven to be the most potent isolates. Regard to *Alternaria* leaf spot, BR002 pre-treated on root and leaf could inhibit the disease about 88 and 95 percent, respectively. For *Curvularia* leaf spot, G003 pre-treatment on leaf could completely inhibit the disease 100 percent. No significant increase of plant growth treated with *Trichoderma* spp. was observed on the measured parameters (leaf number, leaf size and SPAD number) compared to the non-treated plants.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สามารถเสร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก รศ.ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำแนวทางต่างๆ ในการแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูง

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร.นงลักษณ์ เภรินทวงค์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอย่างดี

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ. ดร.พรหมมาศ คูหากาญจน์ ที่ให้ความกรุณาและอนุเคราะห์โรงเรือนและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทดลองครั้งนี้เป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาการศึกษาจนกระทั่งข้าพเจ้ามีโอกาสประสบความสำเร็จ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานและคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

ขอขอบคุณ คุณจุฬาลักษณ์ ตลับนาค และน้องๆ ปริญญาโททุกคน ที่ให้คำแนะนำเทคนิคต่างๆ ความช่วยเหลือ และกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดาและมารดาของข้าพเจ้า ที่คอยเลี้ยงดู เอาใจใส่และคอยให้กำลังใจในการเรียนครั้งนี้เสมอมา และสนับสนุนเรื่องทุนทรัพย์แก่ข้าพเจ้าจนถึงปัจจุบัน

มาลาตี ประดับญาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..…….. I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…….. IV
กิตติกรรมประกาศ……VII
สารบัญ…… VIII
สารบัญตาราง……... XII
สารบัญภาพ…….. XIV
รายการคำย่อและสัญลักษณ์…… XVI
บทที่ 1 บทนำ……... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย…….... 2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน……..2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ……...3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……... 4
2.1 การปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์……..... 4
2.1.1 วิธีการปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิกส์…… 4
2.1.2 โรคของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์…… 5
2.1.3 การป้องกันกำจัดโรคพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์..... 5
2.2 การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp……... 6
2.3 การกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยเชื้อ *Trichoderma* spp.……..……. 8
2.4 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. …….. 10
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ……..…… 10
3.1 การแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด…….…….13
3.1.1 การคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. …….. 13
3.1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคของผักสลัด butter heard …… 13
3.2 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในห้องสภาพห้องปฏิบัติการ……..14
3.2.1 Dual culture test……..... 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2 Inverted petriplate test…….. 15
3.2.3 Cellophane test…….. 16
3.2.4 Culture filtrate test…… 17
3.2.5 Detached leaf test…… 18
3.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์..……... 19
3.3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่กระตุ้นด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. …… 19
3.3.1.1 การปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์…… 19
3.3.1.2 การเติมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ลงในการทดสอบ…..……...20
3.3.1.2.1 การกระตุ้นพืชบริเวณราก…… 20
3.3.1.2.2 การกระตุ้นพืชบริเวณใบ…… 20
3.3.1.3 การเก็บตัวอย่างใบผักสลัดที่ผ่านการกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ……... 20
3.3.1.4 การเตรียม RNA ของผักสลัด……... 21
3.3.1.5 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ RNA ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟรีซิส……... 21
3.3.1.6 การกำจัด DNA ออกจาก RNA โดยใช้เอนไซม์ DNase I…….. 22
3.3.1.7 การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) จาก RNA โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase……... 22
3.3.1.8 การปรับความเข้มข้น cDNA เริ่มต้นให้เท่ากันด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง……22
3.3.1.9 การเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *PR-1*, *LTC1*, *LTC2* และ *PDF 1.2* ด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์……23
3.4. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์……24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.1 การเตรียมผักสลัดและเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบในระบบไฮโดรโปนิกส์..... 24
3.4.2 การกระตุ้นพืชโดยเติมเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ
การปลูกเชื้อราสาเหตุโรค.....25
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 26
4.1 ผลการแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด.....26
4.1.1 ผลการคัดแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.....26
4.1.2 ผลการแยกเชื้อราสาเหตุโรคของผักสลัด butter head..... 26
4.2 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็น
เชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในห้องสภาพ
ห้องปฏิบัติการ.....31
4.2.1 Dual culture test..... 31
4.2.2 Inverted petriplate test..... 41
4.2.3 Cellophane test..... 51
4.2.4 Culture filtrate test..... 57
4.2.5 Detached leaf test..... 65
4.3 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp.
ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของผักสลัด
ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์.....68
4.3.1 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PR-1* 69
4.4 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp.
ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์.....70
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 74
5.1 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.
ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด ในสภาพห้องปฏิบัติการ.....74
5.1.1 Dual culture test.....74
5.1.2 Inverted petriplate test..... 75
5.1.3 Cellophane Test..... 75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.1.4 Culture filtrate test……..…… 76
5.1.5 Detached leaf test…….…….. 77
5.2 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์……..…….. 77
5.3 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์…… 78
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง……... 82
6.1 ผลการแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด…….. 82
6.2 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในห้องสภาพห้องปฏิบัติการ…...…82
6.3 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์……86
6.4 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์……86
บรรณานุกรม……88
ภาคผนวก…… 93
ประวัติผู้เขียน……... 97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตางรางที่ หน้า

4.1 แหล่งที่มาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลท ที่คัดแยกเพื่อใช้ในการทดลอง……28

4.2 ประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test ……..…….. 33

4.3 ประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test…….……..... 36

4.4 ประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test……..... 39

4.5 ประสิทธิภาพในการผลิตสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธีการ inverted petriplate test……..43

4.6 ประสิทธิภาพในการผลิตสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ inverted petriplate test.……..46

4.7 ประสิทธิภาพในการผลิตสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ด้วยวิธีการ inverted petriplate test ……...49

4.8 ประสิทธิภาพในการผลิตสารแบบไม่ระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธีการ cellophane test.……. 52

4.9 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการผลิตสารแบบไม่ระเหย เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ cellophane test…..…….. 55

4.10 ประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ agar well diffusion ….. 58

4.11 ประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia* sp. ……..62

4.12 ประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. ……..……63

4.13 ประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. บนใบผักสลัดด้วยวิธีการ Detached leaf test……..…… 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตางรางที่ (ต่อ) หน้า

4.14 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์……..... 72

4.15 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์……..…74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

3.1 ตำแหน่งการวางชิ้นวุ้นของเชื้อรา *Trichoderma* spp. (T) และ เชื้อราสาเหตุโรค (P) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร..... 15

3.2 การวางใบผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วย CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในแต่ละความเข้มข้น และตำแหน่งการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุด จำนวน 5 แผลต่อใบ.....16

4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. อายุ 7 วัน ที่เจริญบนอาหาร PDA 29

4.2 ลักษณะอาการของโรคใบจุดและลักษณะโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด *Curvularia* sp., *Alternaria* sp. และ *Cercospora* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA.....30

4.3 การเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test เมื่อ DPI 2, DPI 6 และ DPI 13.....34

4.4 การเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test เมื่อ DPI 2, DPI 6 และ DPI 11 37

4.5 การเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อรา *Cercospora* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test เมื่อ DPI 2, DPI 11 และ DPI 21..... 40

4.6 กลไกการเข้าทำลายของเชื้อรา *Trichoderma* TR002 ใน dual culture test..... 41

4.7 การทดสอบอิทธิพลของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี inverted petriplate test 45

4.8 การทดสอบอิทธิพลของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธี inverted petriplate test 47

4.9 การทดสอบอิทธิพลของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี inverted petriplate test 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ (ต่อ) หน้า

4.10 การทดสอบอิทธิพลของสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี cellophane test (DPI 8)……53

4.11 การทดสอบอิทธิพลของสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธี cellophane test (DPI 8)……... 56

4.12 การทดสอบอิทธิพลของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (6 ไอโซเลท) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญทางเส้นใย ของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี agar well diffusion test (DPI 3) …….. 59

4.13 การทดสอบอิทธิพลของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (6 ไอโซเลท) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญทางเส้นใย ของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธี agar well diffusion test (DPI 3)……..... 60

4.14 ลักษณะความผิดปกติของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. หลังจากแช่ใน CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ……...64

4.15 ลักษณะอาการแผลของโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. บนใบผักสลัดที่ได้รับการพ่นด้วย CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และตามด้วยการปลูกเชื้อาเหตุโรคด้วยวิธี detached leaf test ……... 67

4.16 ผลการปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นของผักสลัดให้เท่ากันก่อนการประเมินการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง ……68

4.17 ความเข้มของแถบ cDNA ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผักสลัดที่ทาปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ primer ยีน *LTC1, LTC2, PDF1.2* และ *PR-1* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA* ……. 69

4.18 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ยับยั้งการเกิดโรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ ……73

4.19 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์……. 75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

PDA	=	Potato Dextrose Agar
CF	=	Culture Filtrate
Kb	=	Kilobase
RNA	=	Ribonucleic acid
cDNA	=	Complementary Deoxyribonucleic Acid
DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	=	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
mM	=	Millimolar
µM	=	Micromolar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันกระแสการบริโภคผักสลัดเพื่อสุขภาพกำลังได้รับความนิยม เนื่องจากผู้บริโภคใส่ใจในการดูแลสุขภาพมากขึ้น และการที่จะผลิตให้พืชผักให้มีคุณภาพตามความต้องการของผู้บริโภคนั้น ต้องผ่านกรรมวิธีที่ถูกต้องตามหลักการ ตั้งแต่การผลิตจนถึงระยะการเก็บเกี่ยว รวมทั้งการควบคุมคุณภาพของผลผลิต และต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคด้วย ซึ่งโรคใบจุดถือเป็นโรคที่สำคัญของพืชผัก และหากเป็นผักกินใบเมื่อเกิดโรคจะไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ซึ่งโรคใบจุดเกิดจากเชื้อราสาเหตุได้หลายชนิด เช่น *Alternaria* sp., *Curvularia* sp. และ *Cercospora* sp. เป็นต้น เชื้อราของโรคใบจุดจะเจริญได้ดีในอากาศอบอุ่น ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ (Houessou *et al*., 2011, French and Schultz, 2011, Sharma *et al*., 2011) โรคมักเกิดที่ใบแก่และแพร่กระจายไปยังใบอ่อน ลักษณะอาการของโรคเริ่มจากเป็นแผลจุดกลมขนาดเล็ก ขนาดตั้งแต่ 2-5 มิลลิเมตร แผลมีสีน้ำตาล น้ำตาลแดง ถึงดำ อาจพบวงสีเหลืองล้อมรอบแผล บางครั้งพบลักษณะแผลที่เป็นวงซ้อนกัน (concentric ring) และมักพบส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อโรคเจริญเป็นจุดนูนภายในวงที่ซ้อนกัน ในกรณีของเชื้อรา *Cercospora* sp. พบอาการตายของเนื้อเยื่อพืชบริเวณกลางแผลมีสีน้ำตาลอ่อนและขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้มลักษณะคล้ายตากบ (โรคใบจุดตากบ) บางครั้งเนื้อเยื่อกรอบและหลุดร่วงออกเป็นรู (Gallian, 2000) นอกจากนี้ในพืชตระกูลแตง ฟักทอง และไม้ประดับ พบแผลรูปวงรี หรือแผลค่อนข้างเหลี่ยมรูปร่างไม่แน่นอน บางครั้งแผลเจริญขยายออกรวมกันขนาดใหญ่เกิดเป็นโรคใบไหม้ได้ หากระบาดอย่างรุนแรงจะทำให้ใบร่วงหรือใบหงิกงอผิดรูปและเจริญเข้าทำลายผลได้ โดยในแตงโมและเมล่อนอาจทำให้ผลเน่าและสุกก่อนกำหนดได้ (Kuncharek, 2000) และหากเชื้อเข้าทำลายพืชตระกูลผักสลัด หรือผักกินใบโดยเฉพาะที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์นั้น พบว่าสร้างความเสียหายเป็นอย่างมาก เนื่องจากต้องตัดใบที่เป็นโรคทิ้ง ทำให้น้ำหนักสดก่อนส่งออกตลาดลดลง และส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผักสลัดโดยตรง (Koohakan *et al*., 2008)

สำหรับการกำจัดโรคใบจุดนั้น เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด โดยเลือกใช้สารเคมีต่างๆ เช่น ในเชื้อรา *Cercospora* sp. มักนิยมใช้ carbendazim, thiophanate methyl และ benomyl เป็นต้น (อรพรรณ, 2552) ซึ่งหากเกษตรกรใช้สารเคมีติดต่อกันเป็นเวลานานเชื้อ *Cercospora* sp. จะสามารถปรับตัวเพื่อความอยู่รอดและเกิดการต้านทานต่อสารเคมีขึ้นได้ โดยเชื้อ *Cercospora* sp. มีความสามารถต้านทานต่อสาร carbendazim ได้ ซึ่งสามารถต้านทานสารได้ในระดับสูงที่ 1,000 มิลลิกรัม (ณัฐพงษ์ และคณะ, 2553) นอกจากนี้เมื่อตรวจปริมาณสารพิษตกค้างของ carbendazim ในพืชผักหลายชนิด เช่น ต้นหอม ขึ้นฉ่าย และกุยช่าย พบว่า มีปริมาณสารตกค้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่อนข้างสูง เช่น ในต้นหอมพบอยู่ในช่วง 7.3-13.3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมากกว่าค่า Maximun Residue Limits (MRLs) ที่กำหนดโดยมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ถึง 2.4-4.4 เท่า ขณะที่ขึ้นฉ่ายพบ carbendazim อยู่ในช่วง 6.9-15.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภานุมาศ และคณะ, 2554) จากปัญหาการใช้สารเคมีดังกล่าว นักวิจัยมากมายจึงมุ่งเน้นศึกษาการควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็นเชื้อราที่ได้รับความนิยมมาก สามารถควบคุมโรคพืชแบบชีวภาพได้ดีและใช้กันอย่างกว้างขวาง สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินได้หลายชนิด เช่น *Fusarium* sp., *Phytophthora* sp. และ *Sclerotium* sp. เป็นต้น (Monte and Llobell, 2003) และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น จากการประยุกต์ใช้เชื้อราในพืชตระกูลหญ้า พบว่ามีปริมาณของรากที่หยั่งลึกลงไปในดินเพิ่มมากขึ้น ทำให้หญ้ามีความสามารถทนแล้งได้ดี และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ยังสามารถผลิตสารที่ชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคได้ นอกจากนี้ (จากความรู้เบื้องต้นของยีน) ยีนจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผลิตเอนไซม์ชนิด Endochitinase ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการชักนำการต้านทานของพืชต่อโรคทางใบ โดยทดลองใช้ในยาสูบและมันฝรั่ง พบว่าพืชมีความสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคทางใบได้ดี เช่น เชื้อรา *Alternaria alternata, A. solani* และ *Botrytis cinerea* รวมถึงโรคที่อยู่ในดิน เช่น *Rhizoctonia* spp. ด้วย (Ranasingh *et al*., 2006)

ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นควบคุมโรคแบบชีววิธี เพื่อลดและทดแทนการใช้สารเคมีในภาคเกษตรกรรม ที่ส่งผลกระทบต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค โดยศึกษากลไกต่างๆ ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคใบจุดทั้งในห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโปนิกส์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดแบบชีววิธี

1.2.2 เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการชักนำให้ผักสลัดเกิดความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการกลางโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านเกษตร และห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด

1.4.2 ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการชักนำให้ผักสลัดเกิดความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สำหรับประเทศไทย การผลิตพืชเชิงธุรกิจจะต้องมีการพัฒนาวิธีการผลิตให้ได้ตามเวลา ปริมาณ และคุณภาพที่ตลาดต้องการ ซึ่งการผลิตให้ปริมาณตามความต้องการของผู้บริโภคนั้น จะต้องใช้ปัจจัยในการผลิตที่เหมาะสม แต่ในความเป็นจริงแล้วเกษตรกรไทยมักใช้ปัจจัยต่างๆ อย่างไม่เหมาะสม เช่น การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชมากขึ้น ซึ่งนอกจากจะสูญเสียค่าใช้จ่ายสูงแล้ว สารเคมีดังกล่าวอาจตกค้างในผลผลิตทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและเกษตรกรเองด้วย แต่ในปัจจุบัน สามารถชดเชยปัญหาการตกค้างของสารเคมีได้ด้วยการปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ ที่เกษตรกรสามารถปลูกพืชให้ได้ผลผลิตมากขึ้นโดยใช้พื้นที่น้อยลงหรือปลูกในพื้นที่ที่ไม่เหมาะสมต่อการทำการเกษตรได้ นอกจากนี้ การปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ยังช่วยลดปัญหาจากการรบกวนของแมลงและการเกิดโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อโรคพืชในดินได้ เช่น เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่มักก่อให้เกิดโรคกล้าเน่า รากเน่า โคนเน่าและโรคเหี่ยว แต่อย่างไรก็ตาม การปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิกส์ก็มีโอกาสการแพร่ระบาดของเชื้อทางอากาศได้ (ดิเรก, 2546)

2.1 การปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์

จากการที่มนุษย์ค้นพบว่าสามารถปลูกพืชให้เจริญเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้ดิน เพียงแต่จัดการให้พืชได้รับ น้ำ ธาตุอาหาร ออกซิเจน และที่ยึดเกาะพยุงลำต้น จากภายนอกเพื่อทดแทนที่ไม่ได้รับจากดินนั้น ต่อมาจึงได้มีการพัฒนารูปแบบและวิธีการต่างๆในการที่จะให้น้ำ ธาตุอาหารแก่รากพืช การเพิ่มออกซิเจนให้แก่น้ำ และการให้ที่ยึดเกาะแก่ต้นและรากพืช ทำให้เกิดเป็นวิธีการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในรูปแบบต่างๆ ได้มากมาย

2.1.1 วิธีการปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิกส์

การปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิกส์ เป็นเทคนิคการปลูกพืชแบบไม่ใช้ดินรูปแบบหนึ่ง ซึ่งเป็นการปลูกพืชลงในสารละลายธาตุอาหาร ภาชนะที่ใช้อาจเป็นกระบะ ราง หรือรูปทรงอื่นๆ ภาชนะดังกล่าวทำหน้าที่ทั้งเป็นภาชนะปลูกและภาชนะใส่สารละลายธาตุอาหารด้วย ปริมาตรของสารละลายมีมาก และไม่หมุนเวียน วิธีการปลูกแบบนี้จึงต้องมีการเติมอากาศให้กับน้ำตลอดเวลา โดยการใช้ปั๊มลมซึ่งขนาดของปั๊มอากาศขึ้นกับขนาดของภาชนะและปริมาณน้ำที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 โรคของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

1. โรคใบจุด (Leaf spot) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria* sp., *Curvularia* sp. และ *Cercospora* sp. เป็นต้น พบระบาดในช่วงหน้าฝนในสภาพการปลูกที่แออัดเกินไปและมีการจัดการไม่ดีเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรครุนแรง อาการของโรค ใบจะมีแผลเป็นจุดสีเทาหรือสีน้ำตาล มักเกิดกับใบล่างก่อนและแพร่กระจายขึ้นสู่ยอดของพืชทำให้ใบเสียหายไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (Koohakan *et al*., 2008)

2. โรครากเน่า (Pythium root rot) มีสาเหตุจากเชื้อ *Pythium* spp. อาการของโรคจะคล้ายกับโรคที่เกิดกับพืชในดิน โดยพืชมีอาการเหี่ยว ผลผลิตลดลงเนื่องจากระบบรากถูกทำลาย เชื้อสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด โดยเชื้อจะปนเปื้อนและระบาดไปกับสารละลายธาตุอาหารหรือวัสดุที่ใช้ปลูก

2.1.3 การป้องกันกำจัดโรคพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์

การควบคุมโรคพืชไม่ว่าจะปลูกพืชในสารละลายแร่ธาตุแบบไฮโดรโปนิกส์หรือการปลูกในวัสดุอินทรีย์และอนินทรีย์ อาศัยหลักการเช่นเดียวกับการปลูกพืชในดิน แต่อาจมีข้อแตกต่างในวิธีปฏิบัติอยู่บ้าง การควบคุมโรคในระบบไฮโดรโปนิกส์ที่มักปลูกกันภายในโรงเรือน จะสามารถดำเนินการได้สะดวกกว่า และมีโอกาสประสบความสำเร็จได้ง่ายกว่าการควบคุมโรคของพืชที่ปลูกในดินนอกโรงเรือน

สำหรับการควบคุมโรคด้วยวิธีการทางชีวภาพนั้นจะประกอบด้วย การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งที่เป็นเชื้อแบคทรีเรียและเชื้อราเช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีการทางชีวภาพโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีนั้นควรมีกลไกการยับยั้งหรือควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช 4 รูปแบบหลัก คือ

1. การแข่งขัน (competition) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการเจริญเติบโตแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตหรือทำลายพืชได้ การแข่งขันที่พบมากคือ การนำเอาธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้น มาใช้ประโยชน์ในการเจริญเติบโต

2. การผลิตสาร (antibiosis) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ส่วนใหญ่มีความสามารถผลิตสารทั้งแบบระเหยและไม่ระเหยและสามารถทำลายหรือยับยั้งเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ออกมาเพื่อยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคจนเกิดการเหี่ยวสลายได้

3. การเป็นปรสิต (parasitism) เชื้อราปฏิปักษ์มีความสามารถในการเข้าไปเจริญอาศัยในเชื้อโรคพืชแล้วคอยดูดกินอาหารทำให้เชื้อโรคพืชอ่อนแอและตายในที่สุด

4. การชักนำให้พืชต้านทานต่อโรค (induced host resistance) เชื้อราปฏิปักษ์มีความสามารถในการกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ โดยเฉพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พวกที่เคยเป็นเชื้อสาเหตุโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้วสามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ (จิระเดช, 2538; นิพนธ์, 2553)

2.2 การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. จัดเป็นเชื้อราชั้นสูงที่เจริญได้ดีในดิน เศษซากพืช เชื้อบางสายพันธุ์สามารถเป็น parasite โดยการพันรัดเส้นใยเชื้อโรคแล้วสร้าง enzymes เช่น chitinase, cellulase, β-1, 3 glucanase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช จากนั้นจึงแทงเส้นใยผ่านผนังเซลล์เจริญภายในเส้นใยเชื้อโรคพืชและใช้ประโยชน์จากของเหลวภายในเซลล์ทำให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้เชื้อ *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่จะเจริญโดยสร้างเส้นใยและสปอร์ได้ค่อนข้างรวดเร็ว จึงมีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อโรคพืชด้านการใช้อาหารและแร่ธาตุต่างๆ จากแหล่งอาหารในธรรมชาติ ตลอดจนการใช้สารที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยได้เป็นอย่างดี ขณะที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคได้ (Klein, 1998) โดยมีรายงานการวิจัยดังนี้

Hanada *et al*. (2009) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma martiale* ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora palmivora* เชื้อสาเหตุโรคฝักเน่าของต้นโกโก้ โดยการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นของเชื้อรา *T. martiale* ที่ความเข้มข้นต่างกัน ส่งผลให้ความรุนแรงของโรคลดน้อยลงได้ ในขณะที่การใช้สารจำพวกน้ำมันสกัดจากพืชไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ และเมื่อใช้สารกำจัดเชื้อราที่มีองค์ประกอบของ copper ร่วมด้วยก็ไม่ส่งผลกระทบต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *T. martiale* ซึ่งยังคงมีเปอร์เซ็นต์การงอกอยู่ที่ระดับ 90 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การฉีดพ่นพืชด้วย *T. martiale* มีแนวโน้มในการลดความรุนแรงของโรคได้ตั้งแต่ครั้งแรกที่ฉีดพ่น

Liu *et al.* (2009) ศึกษาเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 39 ไอโซเลทที่คัดแยกจากวัสดุปลูกที่ผ่านการใช้งานแล้วจากระบบปลูกพืชแบบไม่ใช้ดิน (soilless culture) และเชื้อรา *Trichoderma* ทางการค้า 2 ไอโซเลท (*Trichoderma viride* TV1 และ RemedierWP) เพื่อยับยั้งเชื้อ *Pythium ultimum* เชื้อสาเหตุรากเน่าโคนเน่าของแตงกวา โดยปลูกเชื้อรา *Trichoderma* ลงในดินและจุ่มรากของแตงกวาในสปอร์แขวนลอยโดยตรง พร้อมทั้งศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชด้วย โดยการทดสอบที่เติมเชื้อลงในดินแสดงผลได้ดีที่สุด พบเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 12 ไอโซเลท คือ FC 1, 2, 6, 7, 12, 19, 24, 38, 39, 69, 72 และ 80 สามารถยับยั้งเชื้อ *P. ultimum* ได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงผลการยับยั้งได้ดีกว่าเชื้อราทางการค้า และบางไอโซเลทก็แสดงผลการส่งเสริมการเจริญของพืชได้ดีเช่นเดียวกัน

Siddiquee *et al*. (2009) ศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. hazianum* เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคโคนต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน ศึกษาด้วยวิธี dual culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

test โดยเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 48 ไอโซเลท ที่ได้จากการคัดแยกเชื้อจากดินบริเวณสวนปาล์ม สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *G. boninense* ได้สูงถึง 72 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลทที่แสดงประสิทธิภาพดีที่สุดจำนวน 8 ไอโซเลท มาศึกษาต่อถึงประสิทธิภาพการสร้างสารระเหยและสารไม่ระเหยที่ส่งผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *G. boninense* ผลคือ สารระเหยจาก *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ที่ระดับ 58 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารไม่ระเหยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ที่ระดับ 40 เปอร์เซ็นต์

Amin *et al*. (2010) ศึกษาเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท (*T. virens*, *T. harzianum* และ *T. viride*) ในการป้องกันเชื้อราสาเหตุโรคในดิน คือ *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* และ *S. sclerotiorum* ด้วยวิธี dual culture test โดยเชื้อรา *T. viride* มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิดได้ และสามารถลดการสร้าง sclerotia ได้เช่นเดียวกัน

Bagwan (2011) คัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 46 ไอโซเลท (*T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamanatum*, *T. ressei* และ *T. koningii*) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Aspergillus niger* van Teighem และ *A. flavus* เชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในถั่วลิสง โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไอโซเลท T043 และ T425 เป็นต้น

Abdollahi *et al.* (2011) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 4 สายพันธุ์ คือ *T. harzianum, T. longibrachatum, T. erinaceum* และ *T. koningii* เพื่อยับยั้งเชื้อ *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าในหัวบีท ด้วยวิธี dual culture test พบว่า *T. harzianum*-2733 และ *T. longibrachatum*-2734 มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้ดีที่สุด โดยยับยั้งได้ 57 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองควบคุม สำหรับประสิทธิภาพของสารระเหยจากเชื้อรา *T. longibrachatum*-2734 สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อโรคได้ที่ 66 เปอร์เซ็นต์ และสารไม่ระเหยสามารถส่งผลยับยั้งเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้ที่ 87 เปอร์เซ็นต์

Tancic *et al*. (2013) คัดแยกเชื้อรา *Trichoderna* spp. จากดินในที่ต่างๆ เพื่อทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* โดยทดสอบด้วยวิธี dual culture test ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* spp. แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ดี จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 9 ไอโซเลทมาศึกษาต่อถึงประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่า *Trichoderma* spp. จำนวน 9 ไอโซเลทสามารถส่งเสริมเจริญเติบโตให้แก่พืชได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในด้านเปอร์เซ็นต์การงอกของต้นกล้า ความยาวของราก รวมไปถึงยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคด้วย

Samuelian (2016) ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* ที่คัดแยกได้จากใบและผลกล้วย โดยพบเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. virens* สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค *Mycosphaerella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

musicola, *Cordana musae*, และ *Deightoniella torulosa* ได้ ซึ่งการปลูกกล้วยใน Northern Queensland มักใช้สารต่างๆ เพื่อเพิ่มผลผลิตรวมถึงการใช้กากน้ำตาล โดยการผสมกากน้ำตาลปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ในวัสดุสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* และนำไปฉีดพ่นต้นกล้วยส่งผลให้เชื้อรา *Trichoderma* สามารถอยู่รอดในสภาพแปลงปลูกได้

2.3 การกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยเชื้อ *Trichoderma* spp.

พืชมีกลไกป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของศัตรูพืช เช่นแบคทีเรีย และเชื้อราชนิดต่างๆ โดยเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรคพืชนั้น สามารถชักนำให้พืชสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) บางชนิดได้ เช่น phytoalexin ซึ่งมีประสิทธิภาพต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช การผลิตสาร phytoalexin นั้น พืชต้องได้รับการกระตุ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคก่อน หลังจากนั้นพืชจึงสามารถผลิตสารดังกล่าวและส่งผลให้พืชมีความต้านทานโรค สาร phytoalexin มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและเชื้อราสาเหตุที่เข้าทำลาย ทำให้มีชื่อเรียกสารดังกล่าวที่แตกต่างกันออกไป (Ishita *et al*., 2011) เช่น Camalexin ที่พบในพืชตระกูลกะหล่ำ เป็นต้น (Jeandet *et al*., 2014) โดยปริมาณการสร้าง phytoalexin ของพืชนั้นขึ้นกับความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคที่เข้าทำลายด้วย (Mert-Türk, 2002) สำหรับเชื้อรา *Trichoderma* นอกจากจะสามารถเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคต่างๆ แล้ว ยังมีความสามารถในการกระตุ้นพืชให้เกิดความต้านทานได้ที่เรียกว่า induced systemic resistance (ISR) ซึ่งมีการศึกษาว่าเชื้อรา *Trichoderma* สามารถกระตุ้นสารจำพวก jasmonic acid (JA), salicylic acid (SA), และ ethylene (ET) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานแบบ ISR ที่ส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ โดย SA และ JA สามารถกระตุ้นการทำงานของ resistance gene ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช เช่น *PR* gene ทำหน้าที่สังเคราะห์ PR-protein ที่มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น เอนไซม์ chitinase และ β-1,3 glucanase (Wasternack *et al*., 2006) แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการทางโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับเชื้อรา *Trichoderma* ในการกระตุ้นความต้านทานแบบ ISR ยังไม่แพร่หลายมากนัก

Meirelles *et al.* (2013) ศึกษาการแสดงออกของยีนแบบ ISR ในมะเขือเทศที่กระตุ้นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* เพื่อให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อ *Alternaria alternata* โดยศึกษายีน lipoxygenase (*LOXD*), ET-response factor1 (*ERF1*), defensin (*DEF1*) และ nonexpressor of pathogenesis related genes1 (*NPR1*) ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคของพืช โดยปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ร่วมกับเชื้อรา *A. alternata* และประเมินประสิทธิภาพหลังจากปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. แล้ว 14 วันและหลังจากปลูกเชื้อรา *A. alternata* 7 วัน ผลวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่บริเวณใบพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่าพืชที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. และเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A. alternata มีการแสดงออกของยีน *LOXD* และ *ERF1* ที่เกี่ยวข้องกับสาร JA และยังพบการแสดงออกของยีน *DEF1* และ *NPR1* ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นความต้านทานของพืชด้วย

สุมิสา และ วีระศักดิ์ (2556) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อชักนำให้แตงเทศมีความต้านทานต่อโรคต้นแตกยางไหล (gummy stem blight disease) ของแตงเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm. โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ผสมกับดินสำหรับปลูกแตงเทศก่อนปลูกเชื้อรา *D. bryoniae* พบว่า ต้นแตงเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T10 มีขนาดความยาวเฉลี่ยของแผลบนใบเล็กที่สุดคือ 3.17 และ 2.25 มิลลิเมตร ในสภาพโรงเรือนและแปลงปลูกขนาดเล็ก และลดการเกิดโรคได้มากถึง 80.36 และ 88.47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนต้นแตงเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T25 มีขนาดความยาวเฉลี่ยของแผลบนลำต้นน้อยที่สุดคือ 7.73 และ 9.12 มิลลิเมตร ทั้งในสภาพโรงเรือนทดลองและสภาพแปลงปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคลดลง 60.87 และ 35.77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นให้ต้นแตงเทศต้านทานต่อโรคต้นแตกยางไหลและทำให้การเกิดโรคลดลงได้

Hibar *et al.* (2007) ศึกษาการชักนำให้ต้นมะเขือเทศเกิดความต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) ด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยการแยกรากมะเขือเทศออกเป็น 2 ส่วนและแยกปลูกเป็นสองกระถาง ปลูกเชื้อทั้งสองลงในวัสดุปลูกภายในต้นเดียวกันแยกออกเป็น 3 วิธีการ คือ 1) ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ก่อนการปลูกเชื้อ FORL 1 สัปดาห์ 2) ปลูกเชื้อทั้งสองพร้อมกัน และ 3) ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. หลังจากการปลูกเชื้อ FORL 1 สัปดาห์ ผลที่ได้พบว่า การปลูกเชื้อตามวิธีการที่ 1 สามารถลดการเกิดโรคได้ดีที่สุด และเมื่อนำชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการปลูกเชื้อ *Trichoderma* sp. มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบโครงสร้างที่มีส่วนในการกีดขวางการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค โดยพืชสร้างผนังเซลล์หนาขึ้น และมีการอุดตันของพื้นที่ระหว่างเซลล์ ทำให้พืชสามารถป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคได้

Gallou *et al.* (2008) ศึกษายีนของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* Rifal MUCL 29707 ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้มันฝรั่งต้านทานต่อการเข้าทำลายจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* โดยการปลูกเชื้อที่บริเวณใกล้กับรากของต้นอ่อนมันฝรั่ง 3 กรรมวิธีคือ 1) ปลูกด้วยเชื้อ *T. harzianum* Rifai MUCL 29707 เพียงชนิดเดียว 2) ปลูกด้วยเชื้อ *R. solani* เพียงชนิดเดียวและ 3) ปลูกเชื้อทั้งสองพร้อมกัน และตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้พืชต้านทานโรคด้วยเทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์ ผลแสดงให้เห็นว่า กรรมวิธีที่ 1 เกิดการแสดงออกของยีน *PR1* (Pathogenesis Related 1) หลังจากปลูกเชื้อ 186 ชั่วโมง และเกิดการแสดงออกของยีน *PAL* (Phenylalanine ammonia lyase) หลังจากปลูกเชื้อ 96 ชั่วโมง ส่วนกรรมวิธีที่ 2 เกิดการแสดงออกของยีน *PR1*, *PR2 และ PAL* หลังจากปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง และกรรมวิธีที่ 3 เกิดการแสดงออกของยีน Lox (Lipoxygenase) หลังจากปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง และ *PR1*, *PR2*, *PAL* และ *GST1*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Gluthatione-S-transferase 1) หลังจากปลูกเชื้อ 72 ชั่วโมง จึงแนะนำให้ใช้เชื้อรา *T. harzianum* Rifai MUCL 29707 ในการชักนำความต้านทานของพืช ซึ่งยีน *Lox* และ *GST1* เป็นยีนที่สำคัญในมันฝรั่งก่อนที่จะถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อ *R. solani*

Saksirirat *et al.* (2009) ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* sp. จำนวน 15 ไอโซเลท ในการชักนำให้ต้นมะเขือเทศเกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดสีเทา (*Stemphylium solani*) และโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* โดยศึกษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ β-1, 3 glucanase โดยปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ลงในดินและสกัดเอนไซม์จากตัวอย่างใบพืชหลังจากปลูกเชื้อ 0, 5, 8, 11 และ 14 วัน พบว่าสารสกัดจากใบพืชหลังการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T1, T9, T13 และ T18 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงที่สุด และสารสกัดจากใบพืชที่ปลูกด้วยเชื้อราไอโซเลท T9, T13, T14 และ T17 มีค่ากิจกรรมของ β-1, 3 glucanase สูงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม หลังจากนั้นจึงนำ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T9 (*T. harzianum*), T13 (*T. asperellum*), T17 (*T. asperellum*) และ T18 (*T. asperellum*) มาศึกษาการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโดยปลูกเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทลงในดินก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคทั้งสองพบว่า T9 มีความสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ได้ดีที่สุด โดยสามารถลดจำนวนแผลลงถึง 69.32 เปอร์เซ็นต์ และ T18 สามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อ *Stemphylium solani* โดยลดจำนวนแผลลงได้ 19.23 เปอร์เซ็นต์

สุวิตา และคณะ (2011) ศึกษาเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 35 ไอโซเลท ทดสอบความสามารถในการชักนำให้ต้นมะเขือเทศมีความต้านทานต่อโรคใบจุดเป้ากระสุนที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* พบว่าต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยไอโซเลท T24, T17 และ 88 มีจำนวนแผลเฉลี่ยต่อต้นต่ำที่สุด คือ 41.0, 43.3 และ 55.7 แผลตามลำดับ เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย chitinase, protease และ β-1,3 glucanase จากใบมะเขือเทศ พบว่าต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท 162, T18 และ T13 มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงที่สุด ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase พบสูงในต้นมะเขือเทศที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท T4, 103 และ 106

2.4 การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

อัฐภรณ์ และคณะ (2558) ศึกษาเชื้อรา *Trichoderma* spp. 2 ไอโซเลท ได้แก่ *T. harzianum* (T9) และ *T. asperellum* (T13) เพื่อควบคุมและกระตุ้นความต้านทานโรคของต้นกล้ายูคาลิปตัสโดยผสมกับวัสดุเพาะกล้าพบว่า กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 2 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคและ ทำให้ความสูงของลำต้น น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง เพิ่มขึ้นในทุกสายพันธุ์ของยูคาลิปตัสที่ตรวจสอบเมื่อเปรียบเทียบ กับกรรมวิธีควบคุม (ไม่ใส่ *Trichoderma* spp.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังตรวจพบความมีชีวิตรอดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลท และพบการเจริญครอบครองรากต้นกล้ายูคาลิปตัส โดยมีอัตราการครอบครองอยู่บนผิวรากระหว่าง 92.50-100 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนชิ้นส่วนของรากที่ตรวจสอบ

Rabeendran *et al*. (2000) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ากะหล่ำและผักสลัด โดยการจุ่มรากลงในสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่น ผลที่ได้คือเชื้อรา *T. longipile* และ *T. tomentosum* มีประสิทธิภาพเพิ่มการเจริญเติบโตของกะหล่ำได้ โดยส่งผลให้ใบของกะหล่ำมีขนาดเพิ่มขึ้น 71 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักสดของผักสลัดก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

Ozbay and Newman (2004) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีต่อต้นมะเขือเทศ โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อราทางการค้าและเชื้อราจากธรรมชาติ ซึ่งใช้ต้นกล้ามะเขือเทศที่อายุ 18 วัน ปลูกเชื้อโดยจุ่มรากลงในสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่น หลังจากปลูกต้นมะเขือเทศนาน 6 สัปดาห์จึงบันทึกผลพัฒนาการของต้น เช่น จำนวนใบจริง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของลำต้นและราก ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพส่งเสริมให้มะเขือเทศเจริญได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์การวิจัย

- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- Erlenmeyer flask และเครื่องแก้วต่างๆ
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- Cork borer
- Hemacytometer counting chamber
- แผ่นกรองเชื้อ 0.22 ไมโครเมตร (Saetorius stedim biotech, Minisart, Germany)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- กล้อง Light microscope
- กล้อง Stereo microscope
- Micro centrifuge tube
- Micro pipette
- ตู้เขี่ยเชื้อ
- ตู้อบเครื่องแก้ว (Jouan, Innovens-118EU2, France)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy, ES-315, Japan)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Jouan, CR3i, France)
- เครื่องถ่ายเจล (Syngene, Genegenius, Japan)
- เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Biometra, T1 thermocycler, Germany)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Eppendrof, Model 6132, Germany)
- ชุดอะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟรีซีส (Biorad, PAC200, USA)
- ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sanden Intercool, SNH0303D11A, Thailand)
- ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Jouan, VXE380, Czech Republic)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องวัดค่าความเข้มเกลือของสารละลายธาตุอาหารพืช (EC Meter)
- ภาชนะสำหรับปลูกผักสลัด
- ฟองน้ำสำหรับปลูกผักสลัด
- สายยางและหัวทราย
- ปั๊มลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อรา

- Water Agar (WA)
- Potato Dextrose Agar (PDA)
- Potato Dextrose Broth (PDB)
- Matin's Agar (MA)

เมล็ดพันธุ์

- เมล็ดผักสลัด butter head

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด

3.1.1 การคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. การศึกษาครั้งนี้ จะคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาจากหลายๆ แหล่ง เพื่อให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ ได้แก่ ดินจากแหล่งธรรมชาติ รากพืชและสารละลายธาตุอาหารจากระบบไฮโดรโปนิกส์ เป็นต้น นำตัวอย่างทั้งหมดแยกเชื้อด้วยการเลี้ยงบนอาหารจำเพาะ Matin's agar (MA) โดยการคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินและรากพืชจะคัดแยกด้วยวิธี dilution plate โดยนำดินหรือรากพืชปริมาณ 1 กรัม บดรวมเข้ากับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 9 มิลลิลิตร จากนั้นดูดตะกอนแขวนลอยที่ได้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร MA และใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและสังเกตโคโลนีของเชื้อราที่เกิดขึ้น นำมาเลี้ยงต่อบนอาหาร PDA และการแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากสารละลายธาตุอาหาร ทำโดยใช้สารละลายธาตุอาหารปริมาณ 100 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร MA เช่นเดียวกัน สังเกตลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นและนำมาเลี้ยงต่อบนอาหาร PDA เก็บเชื้อราที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคของผักสลัด butter head ที่เป็นเชื้อราในกลุ่มสาเหตุโรคใบจุด ซึ่งแยกเชื้อราด้วยวิธี tissue transplanting technique โดยตัดชิ้นส่วนของใบบริเวณขอบแผลของผักสลัดที่แสดงอาการโรค ขนาด 5x5 มิลลิเมตร จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอก ด้วยการแช่ในสารละลายคลอร็อกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที จากนั้นนำชิ้นพืชแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อนาน 10 นาที และซับให้แห้ง นำชิ้นพืชดังกล่าววางบนอาหาร WA โดยวางจำนวน 5 ชิ้นต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องและสังเกตเส้นใยของเชื้อราที่เจริญออกจากชิ้นพืช คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยตัดชิ้นวุ้นไปเลี้ยงต่อบนอาหาร PDA สังเกตลักษณะโคโลนี พร้อมทั้งเขี่ยเส้นใยนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในสภาพห้องปฏิบัติการ

เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด โดยการทดสอบในขั้นต้นจะศึกษาด้วยวิธีการ dual culture test ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ค่อนข้างครอบคลุมทุกกลไก จากนั้นศึกษารายละเอียดของแต่ละกลไกของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรค ประกอบด้วยวิธีการ inverted petriplate test ซึ่งเป็นการศึกษาความสามารถสร้างสารระเหยเพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด หรือการศึกษาด้วยวิธีการ cellophane test จะเป็นการศึกษาถึงความสามารถสร้างสารไม่ระเหยเพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด นอกจากนี้ ศึกษาด้วยวิธีการ agar well diffusion โดยใช้ culture filtrate test (CF) ซึ่งเป็นการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค ทั้งการเจริญทางเส้นใยและการงอกของสปอร์ และศึกษาคุณสมบัติของ CF ในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบของผักสลัดด้วยวิธี detached leaf test โดยวิธีการต่างๆ นั้นมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.2.1 Dual culture test

เพื่อศึกษาถึงกลไกของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค ทดสอบโดยนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากขั้นตอนข้างต้น มาทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด โดยออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ในแต่ละชุดการทดลองจะมีจำนวนทั้งหมด 5 ซ้ำ ทดลองโดยเลี้ยงเชื้อราทั้งสองชนิดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่อายุ 7 วัน และเชื้อสาเหตุโรคที่อายุ 5 วัน เจาะชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จากนั้นย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อราทั้งสอง เลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน โดยวางชิ้นวุ้นตรงข้ามกันห่าง 4 เซนติเมตร ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร (ภาพที่ 3.1)

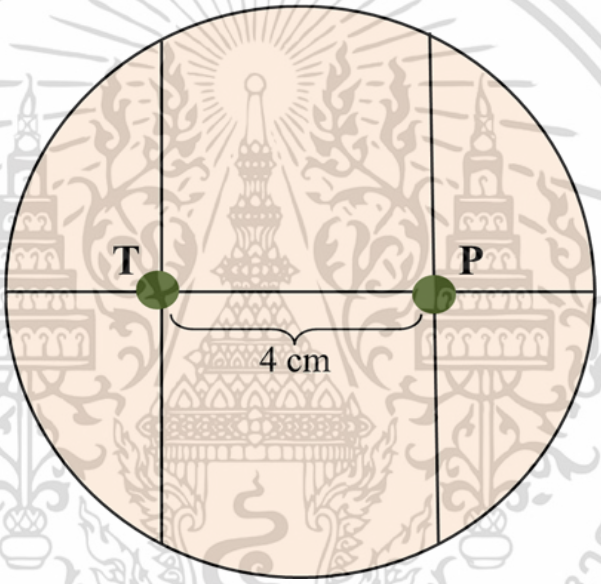
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการบันทึกผลการทดลอง โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในชุดการทดลองและชุดการทดลองควบคุมที่เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว และนำผลที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Growth Inhibition, GI) โดยใช้สูตรด้านล่าง พร้อมทั้งสังเกตกลไกต่างๆ ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

$$GI = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

โดย D1 = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

D2 = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดลอง



ภาพที่ 3.1 ตำแหน่งการวางชิ้นวุ้นของเชื้อรา *Trichoderma* spp. (T) และเชื้อราสาเหตุโรค (P) บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

3.2.2 Inverted petriplate test

เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการสร้างสารระเหยที่ส่งผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งเป็นอีกหนึ่งกลไกที่น่าสนใจของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่สังเกตจากการทดสอบด้วยวิธี dual culture test ในขณะที่เส้นใยของเชื้อราทั้งสองชนิดยังไม่สัมผัสกัน แต่กลับมีแนวโน้มการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคที่ลดลง โดยออกแบบการทดลองแบบ CRD ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะมีจำนวนทั้งหมด 5 ซ้ำ ทดลองโดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหาร PDA บริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อนาน 3 วัน จากนั้นจึงนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดที่มีอายุ 2 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกบเข้าด้วยกันให้แน่นและปิดขอบจานทั้งสองให้สนิทด้วยพาราฟิล์มและเทปปิดชนิดใส ในขณะที่ชุดทดลองควบคุมจะประกบจานอาหารเลี้ยงของเชื้อราสาเหตุโรคเข้ากับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA เท่านั้น และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับการบันทึกผลการยับยั้งการเจริญทางเส้นใย ทำโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุโรคในชุดทดลองและชุดทดลองควบคุม นำผลที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตร

$$GI = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

โดย D1 = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

D2 = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดลอง

3.2.3 Cellophane test

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการสร้างสารไม่ระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่สร้างสารซึมผ่านแผ่น cellophane ลงสู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง ซึ่งทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยในแต่ละชุดการทดลองมีจำนวน 5 ซ้ำ ทดสอบโดยตัดแผ่น cellophane ให้มีขนาดเท่ากับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปฆ่าเชื้อปนเปื้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อที่แรงดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำแผ่น cellophane วางลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวางอย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศระหว่างแผ่น cellophane และอาหารเลี้ยงเชื้อ และทิ้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแผ่น cellophane ไว้นาน 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้แผ่น cellophane แนบสนิทกับอาหารมากยิ่งขึ้น จากนั้นปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้ ลงบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยในชุดทดลองควบคุมวางเพียงชิ้นวุ้น PDA เท่านั้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 4 วัน จึงลอกแผ่น cellophane ที่มีเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญอยู่ออกอย่างระมัดระวัง ตั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นจึงปลูกเชื้อราสาเหตุโรคลงบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคทุกวัน เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม และนำผลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตร พร้อมทั้งสังเกตความผิดปกติของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคในระหว่างการทดลอง

$$GI = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

โดย D1 = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

D2 = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 Culture filtrate test

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารไม่ระเหยที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยการใช้ culture filtrate (CF) ทั้งนี้ทำการเจือจาง CF ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ โดยคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แสดงประสิทธิภาพที่ดีจากการทดลองด้วย cellophane test จำนวน 6 ไอโซเลท ทำการทดลองแบบ CRD ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะมีทั้งหมด 5 ซ้ำ โดยการใช้สารแต่ละความเข้มข้นมาทดสอบกับเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคใบจุด ด้วยเทคนิค agar well diffusion โดยเจาะอาหาร PDA ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 6 หลุม เป็นรัศมีห่างจากจุดศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ปิดก้นหลุมด้วย PDA เพื่อป้องกันการรั่วไหลของ CF ลงก้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยด CF (ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณ 40 ไมโครลิตรลงในหลุมดังกล่าว และนำชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคที่อายุ 5 วัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของ CF ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค ทดลองโดยผสมสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นของเชื้อราสาเหตุโรคที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เข้ากับ CF ในแต่ละความเข้มข้นปริมาน 300 ไมโครลิตร ในหลอด centrifuge tube และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

การบันทึกผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใย โดยวัดรัศมีของโคโลนีเชื้อที่เจริญออกมาทุกวันจนถึงบริเวณหลุมของ CF ในแต่ละความเข้มข้น และนำผลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรด้านล่าง และการบันทึกผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค โดยนับการงอกของสปอร์ที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงภายหลังการบ่มเชื้อ โดยการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งสังเกตความเสียหายที่เกิดขึ้นกับสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคอย่างละเอียด

$$GI = \frac{R1 - R2}{R1} X\ 100$$

โดย R1 = รัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2 = รัศมรของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดทดลอง

สำหรับการเตรียม CF นั้น เตรียมโดยการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในอาหารเหลว patato dextrose broth (PDB) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน นำเชื้อไปเขย่าต่อที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 1 วัน จากนั้นกรองเอาเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ออกด้วยกระดาษกรอง Watman No.1 นำ culture filtrate ที่ได้มากำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยการกรองโดยใช้แผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร (Minisart, Germany) จากนั้นปรับความเข้มข้นของ CF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

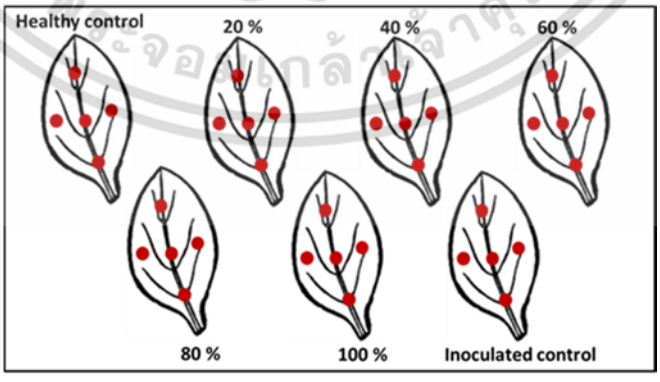
ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยความเข้มข้นของ CF ที่ใช้ในการศึกษาคือ 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีน้ำกลั่นเป็นชุดทดลองควบคุม (ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์)

3.2.5 Detached leaf test

ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ ออกแบบการทดลองเป็นแบบ CRD ในแต่ละชุดการทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ทดสอบด้วย CF ในแต่ละความเข้มข้นที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมข้างต้น ทดลองโดยฉีดพ่น CF แต่ละความเข้มข้นปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อหนึ่งใบ ลงบนผิวใบผักสลัดและทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำเข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลงบนใบผักสลัดเพื่อทำแผล จึงปลูกเชื้อราสาเหตุโรคลงบนใบพืช (agar plug inoculation) จำนวน 5 แผลต่อใบ โดยชุดการทดลองควบคุม (healthy control) วางเพียงชิ้นวุ้น PDA เท่านั้น และวางใบพืชในถาดที่ควบคุมความชื้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยแต่ละถาดจะมีผักสลัดจำนวน 7 ใบ ลักษณะการวางตามภาพที่ 3.2

สำหรับการบันทึกผล โดยให้คะแนนขนาดของแผลที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ inoculated control ซึ่งคะแนน 0 = ไม่เกิดโรค, 1 = เกิดแผลขนาด 0-0.5 เซนติเมตร, 2 = เกิดแผลขนาด 0.6-1 เซนติเมตร, 3 = เกิดแผลขนาด 1.1-1.5 เซนติเมตร และ 4 = เกิดแผลขนาด 1.6-2 เซนติเมตร คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease Incidence; DI) โดยคำนวณจากจำนวนแผลที่เกิดโรค (เกิดโรค 15 แผลคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค (Disease severity; DS) ตามสูตร

$$DS = \frac{\sum (\text{ระดับความรุนแรงของโรค x จำนวนของการเกิดโรคแต่ละระดับ})}{\text{จำนวนแผลทั้งหมด x ระดับสูงสุดของการเกิดโรค}}$$



ภาพที่ 3.2 การวางใบผักสลัดที่ฉีดพ่นด้วย CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในแต่ละความเข้มข้นและตำแหน่งการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุด จำนวน 5 แผลต่อใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของผักสลัดที่ปลูกในระบบโดรโปนิกส์

หลังจากทำการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยและการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคในกลไกต่างๆ แล้ว จึงคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ดีที่สุดจำนวน 3 ไอโซเลท มาศึกษาต่อถึงความสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนของผักสลัดที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเชื้อราทางการค้า โดยศึกษากับต้นผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ และตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ออกแบบการทดลองแบบ CRD ในแต่ละชุดการทดลองจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำๆ ละ 6 ต้น ดังนี้

Treatment 1 = Healthy control

Treatment 2 = Root treated with *Trichoderma* isolate 1

Treatment 3 = Root treated with *Trichoderma* isolate 2

Treatment 4 = Root treated with *Trichoderma* isolate 3

Treatment 5 = Root treated with commercial product

Treatment 6 = Leaf treated with *Trichoderma* isolate 1

Treatment 7 = Leaf treated with *Trichoderma* isolate 2

Treatment 8 = Leaf treated with *Trichoderma* isolate 3

Treatment 9 = Leaf treated with commercial product

3.3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่กระตุ้นด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่กระตุ้นด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองก่อนหน้า โดยเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทางการค้า ภายหลังการเติมด้วยสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. อายุ 7 วัน เทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบนโคโลนีของเชื้อราแล้วใช้แท่งแก้วขูดผิวหน้าอาหาร ตรวจนับสปอร์ด้วย hemacytometer และเชื้อรา *Trichoderma* ทางการค้า เตรียมตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

3.3.1.1 การปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

การเตรียมต้นกล้า เพาะเมล็ดผักสลัด butter head ในฟองน้ำสำหรับปลูกขนาด 2.5x2.5 เซนติเมตร รดด้วยน้ำสะอาดจนเมล็ดผักสลัดงอกและมีใบจริง 2-3 ใบ (อายุพืช 4-5 วัน) จากนั้นจึงรดด้วยสารละลายธาตุอาหารที่ค่า EC = 1-1.2 mS/cm ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 5.6-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 จนกระทั่งต้นกล้าอายุ 10 วัน จึงย้ายกล้าลงระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยใช้ภาชนะความจุสารละลายธาตุอาหาร 30 ลิตร ปิดปากภาชนะด้วยโฟมที่เจาะเป็นรูสำหรับใส่กล้าผักจำนวน 50 รูต่อแผ่น เพิ่มอากาศให้สารละลายธาตุอาหารด้วยการต่อหัวทรายเข้ากับปั๊มอากาศ เมื่อพืชอายุ 14 วันจึงย้ายปลูกในระบบเพื่อทดลองต่อไป

สำหรับการปลูกผักสลัดในระบบทดลอง ทำการย้ายกล้าผักสลัดที่เตรียมไว้ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ที่ประกอบไปด้วย ภาชนะสำหรับใส่สารละลายธาตุอาหารขนาดบรรจุ 15 ลิตร แผ่นโฟมที่เจาะรูสำหรับใส่ผักจำนวน 6 รู หัวทราย ปั๊มอากาศ และสารละลายธาตุอาหารที่มีค่า EC = 1-1.2 mS/cm ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.6-6.2

3.3.1.2 การเติมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ลงในการทดสอบ

หลังจากเตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลทแล้ว ปลูกเชื้อลงในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยปลูกเชื้อสองแบบคือ การปลูกเชื้อบริเวณรากของต้นผักสลัด เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนแบบ systemic resistance และการปลูกเชื้อบริเวณใบของผักสลัด เพื่อศึกษาการกระตุ้นการแสดงออกของยีนแบบ local resistance โดยมีรายละเอียดดังนี้

3.3.1.2.1 การกระตุ้นพืชบริเวณราก เมื่อผักสลัดอายุ 3 สัปดาห์ ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. บริเวณราก โดยแช่รากของผักสลัดกับสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น โดยแต่ละต้นจะแช่นาน 5 นาที จากนั้นเทสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นที่เหลือลงในสารละลายธาตุอาหารของแต่ละชุดการทดลอง โดยในชุดการทดลองควบคุมจะแช่รากลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเท่านั้น

3.3.1.2.2 การกระตุ้นพืชบริเวณใบ จากสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ฉีดพ่นลงบนผิวใบของผักสลัดอายุ 3 สัปดาห์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จำนวนหนึ่งใบต่อต้น หลังจากนั้นคลุมใบด้วยถุงพลาสติกใสเพื่อบ่มเชื้อให้สามารถเจริญได้ดียิ่งขึ้น โดยในชุดการทดลองควบคุมจะฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน

3.3.1.3 การเก็บตัวอย่างใบผักสลัดที่ผ่านการกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

สำหรับการเก็บตัวอย่างของใบผักสลัดที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยเก็บใบผักสลัดที่ช่วงเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากทำการปลูกเชื้อ โดยในชุดทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณรากนั้น เก็บตัวอย่างจำนวน 1 ใบต่อต้น ในแต่ละซ้ำของชุดการทดลอง และการทดลองที่ผ่านการปลูกเชื้อบริเวณใบจะเก็บตัวอย่างใบ 2 ใบต่อต้น ในแต่ละซ้ำของชุดการทดลอง เก็บตัวอย่างใบแยกกันโดยเก็บใบที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 1 ใบ และใบที่งอกใหม่ที่ไม่ผ่านการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 1 ใบ หลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นจึงนำตัวอย่างใบทั้งหมดของแต่ละช่วงเวลาแช่ในไนโตรเจนเหลวและเก็บไว้ในตู้ทำความเย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาต่อไป

3.3.1.4 การเตรียม RNA ของผักสลัด

บดตัวอย่างใบของผักสลัด butter head ที่ระยะเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ ด้วยไนโตรเจนเหลว สกัด RNA ด้วยน้ำยา TRIzol (Invitrogen, USA) โดยนำเนื้อเยื่อของแต่ละตัวอย่างปริมาณ 100 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำยา TRIzol 1 มิลลิลิตร ใน centrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงให้เนื้อเยื่อและน้ำยาเข้ากันดี และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นจึงเติม chloroform 200 มิลลิลิตร (ต่อ TRIzol 1 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งด้วยการพลิกหลอดไปมานาน 15 วินาที และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นย้ายส่วนใสด้านบน (ประมาณ 600 มิลลิลิตร) ใส่หลอดอันใหม่ แล้วจึงตกตะกอน RNA ด้วย isopropanal (isopropyl alcohol) ปริมาณ 500 มิลลิลิตร (ต่อ TRIzol 1 มิลลิลิตร) บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้ว RNA จะถูกอัดแน่นอยู่บริเวณก้นของหลอด จากนั้นเทส่วนใสที่เหลือทิ้งและล้าง RNA ด้วยแอลกอฮอลล์ 75 เปอร์เซ็นต์ (75% RNase free alcohol) และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นละลาย RNA ในน้ำ diethylpyrocarbonate- H_2O (DEPC-H_2O) ในปริมาณ 40 ไมโครลิตร และเก็บ RNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3.1.5 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ RNA ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตโฟรีซิส

วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) โดยเจือจาง RNA ที่สัดส่วน 2:48 (DEPC-H_2O ปริมาณ 48 ไมโครลิตร และ RNA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร) RNA ที่มีความบริสุทธ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เข้าใกล้ 2.0 (Sambrook *et al*., 1989) นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาปริมาณ RNA จากสมการ

ปริมาณ RNA (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) = A_{260} x 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x อัตราการเจือจาง

จากนั้นนำ RNA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดสารละลายทั้งหมดในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลของ RNA เคลื่อนที่ในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสที่แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที โดยมีสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.5X TAE buffer เป็นตัวกลางการนำกระแสไฟฟ้า ย้อมเจลในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที ตรวจดูแถบของ RNA ด้วยเครื่อง UV transilluminator

3.3.1.6 การกำจัด DNA ออกจาก RNA โดยใช้เอนไซม์ DNase I

นำ RNA ของใบผักสลัดที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1.3 กำจัด DNA ที่ปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ DNase I เตรียมปฏิกริยาในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X DNase I buffer ที่มี $MgCl_2$ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, 1 unit/µl RibolockTM RNase Inhibitor (Fermatas, USA) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, 1 unit/µl DNase I (Fermastas, USA) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ RNA ของผักสลัดความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ DEPC-H_2O ปริมาณ 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วบ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 50 mM Ethylene Diamine Tetraacetric Acid (EDTA) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกริยาและเก็บ RNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.1.7 การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) จาก RNA โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase

สังเคราะห์ cDNA จาก RNA ที่สกัดได้จากใบของผักสลัดตามวิธีการ RevertAid® Reverse Transcription (Fermantas, USA) เตรียมปฏิกริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X buffer RT ปริมาณ 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, 10 µM Oligo-dT primer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, 40 unit/µl RibolockTM RNase Inhibitor (Fermantas, USA) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, 200 unit/µl RevertAid Reverse Transcriptase ปริมาณ 1 ไมโครลิตร RNA ของใบผักสลัดความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ DEPC-H_2O ปริมาณ 11.5 ไมโครลิตร บ่มปฏิกริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีเพื่อหยุดปฏิกริยา เก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.1.8 การปรับความเข้มข้น cDNA เริ่มต้นให้เท่ากันด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นของ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากเนื้อเยื่อของใบผักสลัดในทุกระยะเวลาที่ทำการเติมเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรค โดยการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *18 rRNA* ซึ่งเป็นยีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์และมีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในเนื้อเยื่อพืชด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ cDNA ของตัวอย่างเนื้อเยื่อของใบผักสลัดข้างต้นปริมาณอย่างละ 2 ไมโครลิตร เป็น DNA ต้นแบบ เตรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกริยาในปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Taq buffer ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, 5 unit/µl Taq DNA polymerase (Fermantas, USA) ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, cDNA ของเนื้อเยื่อใบผักสลัดปริมาณ 2 ไมโครลิตร, 10 µM 18S-F primer ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร, 10 µM 18S-R primer ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ dH_2O ปริมาณ 11.8 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปทำปฏิกริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 24 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นของแถบ DNA กับแถบ DNA มาตราฐาน 1 Kb DNA ladder (Fermantas, USA) ด้วยเทคนิคเจลอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.3.1.9 การเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน *PR-1*, *LTC1*, *LTC2* และ *PDF 1.2* ด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์

ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR-1, LTC1*, *LTC2* และ *PDF 1.2* จากเนื้อเยื่อใบผักสลัดที่ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังการเติมเชื้อ ด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยควบคุมปริมาณของ cDNA เริ่มต้นให้เท่ากันโดยอ้างอิงจากการแสดงออกของยีน *18S rRNA* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าว ใช้ cDNA จากเนื้อเยื่อใบที่ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกด้วยเชื้อรา ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ในปฏิกริยาพีซีอาร์ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Taq buffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, 5 unit/µl Taq DNA polymerase (Fermantas, USA) ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร, 10 µM F-primer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (ยีน *PR-1*, *LTC1*, *LTC2* และ *PDF1.2*), 10 µM R-primer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (ยีน *PR-1*, *LTC1*, *LTC2* และ *PDF1.2*), cDNA ของผักสลัด 2 ไมโครลิตร และ dH_2O ปริมาณ 10.8 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดในหลอด 200 ไมโครลิตรให้เข้ากันดี แล้วนำไปทำปฏิกริยาด้วยเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2) ถึง 4) จำนวน 30 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แสดงประสิทธิภาพดีจากการทดลองก่อนหน้าในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเชื้อราทางการค้าในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มีทั้งหมด 10 กรรมวิธี โดยในแต่ละกรรมวิธีจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ จำนวนซ้ำละ 2 ต้น ดังนี้

Treatment 1 = Healthy control

Treatment 2 = Root Treated with *Trichoderma* isolate 1

Treatment 3 = Root Treated with *Trichoderma* isolate 2

Treatment 4 = Root Treated with *Trichoderma* isolate 3

Treatment 5 = Root Treated with commercial product

Treatment 5 = Leaf Treated with *Trichoderma* isolate 1

Treatment 7 = Leaf Treated with *Trichoderma* isolate 2

Treatment 8 = Leaf Treated with *Trichoderma* isolate 3

Treatment 9 = Leaf Tread with commercial product

Treatment 10 = Inoculated control

3.4.1 การเตรียมผักสลัดและเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบในระบบไฮโดรโปนิกส์

3.4.1.1 การเตรียมต้นกล้า ทำการเพาะเมล็ดผักสลัด butter head ในฟองน้ำสำหรับปลูกขนาด 2.5x2.5 เซนติเมตร รดด้วยน้ำสะอาดจนผักสลัดงอกและมีใบจริง 2-3 ใบ (อายุ 4-5 วัน) จากนั้นจึงรดด้วยสารละลายธาตุอาหารที่ค่า EC = 1-1.2 mS/cm ปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วง 5.6-6.2 จนกระทั่งต้นกล้าอายุ 10 วัน จึงย้ายต้นกล้าลงระบบอนุบาล โดยใช้ภาชนะความจุสารละลายธาตุอาหาร 50 ลิตร ปิดภาชนะด้วยโฟมที่เจาะเป็นรูสำหรับใส่กล้าผักจำนวน 50 รูต่อแผ่น เพิ่มอากาศให้สารละลายธาตุอาหารด้วยการต่อหัวทรายเข้ากับปั๊มลม เมื่อพืชอายุ 14 วันจึงย้ายปลูกในระบบจริงเพื่อทำการทดลองต่อไป

3.4.1.2 การปลูกผักสลัดในระบบทดลอง ย้ายกล้าผักที่เตรียมไว้ ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์สำหรับทดลอง ที่ประกอบไปด้วย ภาชนะพลาสติกสำหรับใส่สารละลายธาตุอาหาร ขนาดบรรจุ 17x4x10 เซนติเมตร ความจุสารละลายปริมาตร 5 ลิตร และปิดภาชนะด้วยแผ่นโฟม ขนาด 17x4 เซนติเมตร ที่เจาะช่องไว้ 2 ช่องสำหรับใส่ต้นกล้า และสารละลายธาตุอาหารที่ใช้มีค่า EC = 1.2-2 mS/cm ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.6-6.2 และเพิ่มอากาศให้สารละลายธาตุอาหารโดยผ่านหัวทรายที่ต่อกับปั๊มอากาศ

3.4.1.3 การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทำโดยเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 7 วัน ทำสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นโดยเทน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงบนโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อแล้วใช้แท่งแก้วขูดผิวหน้าอาหาร จากนั้นจึงปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นด้วยการทำ dilution tube ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วย hemacytometer โดยใช้ความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นเท่ากับ 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้ทดสอบต่อไป และเชื้อรา *Trichoderma* ทางการค้า เตรียมโดยทำตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์

3.4.1.4 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด โดยเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่แยกได้จากการทดลองก่อนหน้า โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA นาน 10 วัน จากนั้นจึงเจาะชิ้นวุ้นด้วย cork borror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่บริเวณปลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค เพื่อเตรียมปลูกเชื้อแบบ agar plug inoculation ต่อไป

3.4.2 การกระตุ้นพืชโดยเติมเชื้อรา *Trichoderma* spp. และการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค

3.4.2.1 การกระตุ้นพืชบริเวณราก เมื่อผักสลัดอายุ 3 สัปดาห์ ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. บริเวณราก โดยการแช่รากของผักสลัดกับสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 1 x10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น โดยแต่ละต้นจะแช่นาน 5 นาที จากนั้นจึงเทสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นที่เหลือลงในสารละลายธาตุอาหารของแต่ละชุดการทดลอง โดยในชุดการทดลองควบคุมจะแช่รากลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเท่านั้น

3.4.2.2 การกระตุ้นพืชบริเวณใบ ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นที่ได้เตรียมไว้จากขั้นตอนข้างต้น ลงบนผิวใบของผักสลัดอายุ 3 สัปดาห์ให้ทั่วทั้งต้นด้วยปริมาณ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงคลุมด้วยถุงพลาสติกใสเพื่อบ่มเชื้อให้สามารถเจริญได้ดียิ่งขึ้น โดยในชุดการทดลองควบคุมจะฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน

3.4.2.3 การปลูกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดลงบนใบผักสลัด หลังจากเติมเชื้อรา *Trichoderma* spp. 2 วัน ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี agar plug inoculation โดยวางชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงบนใบพืชจำนวน 3 ใบต่อต้น (1 แผลต่อใบ) หลังจากนั้นจึงคลุมต้นด้วยถุงพลาสติกใส เพื่อบ่มเชื้อให้สามารถเจริญได้ดียิ่งขึ้น โดยชุดการทดลองควบคุมวางเพียงชิ้นวุ้น PDA เท่านั้น

การบันทึกผลการทดลอง ทำโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลใบจุดที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับแผลใบจุดในชุดการทดลองควบคุม โดยนำผลที่ได้คำนวนหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคจากสูตร

$$GI = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

โดย D1 = เส้นผ่านศูนย์กลางของแผลในชุดควบคุม

D2 = เส้นผ่านศูนย์กลางของแผลในชุดทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด

4.1.1 ผลการคัดแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.

เพื่อให้เกิดความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ จึงได้คัดแยกเชื้อราดังกล่าวจากหลายๆ แหล่ง เช่น ดินธรรมชาติ สารละลายธาตุอาหาร และรากของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ ผลการคัดแยกได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลท โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินมีจำนวน 9 ไอโซเลท คือ LK001, LK006, LK010, LK011, LK012, LK014, LK017, LK019 และ LK022 (ตารางที่ 4.1) และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีจำนวน 6 ไอโซเลทคือ BR002, G003, G009, TR001, TR002 และ TR003 โดยลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างเส้นใยสีขาวฟูที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว สามารถเจริญได้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรโดยใช้ระยะเวลา 3-4 วัน และไม่พบการเปลี่ยนสีของอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเหลืองแกมเขียวถึงสีเขียว (ภาพที่ 4.1) ลักษณะของเส้นใยใสแบบมีผนังกั้น สร้าง conidiophore ค่อนข้างยาวประมาณ 16.74 ไมโครเมตร สร้าง phialide แตกแขนงเป็นกระจุกบริเวณปลายของ conidiophore โดยมีรูปร่างสั้นจนถึงยาวปานกลาง มีขนาดประมาณ 10.8 ไมโครเมตร สร้าง conidia สีเขียว ผิวเรียบ รูปร่างกลมถึงรีเล็กน้อยขนาดประมาณ 2.97 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.1)

4.1.2 ผลการแยกเชื้อราสาเหตุโรคของผักสลัด butter head

ลักษณะอาการของโรคใบจุดที่พบในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์เป็นแบบ necrosis โดยลักษณะอาการของโรคเริ่มจากเป็นแผลจุดกลมขนาดเล็ก ขนาดตั้งแต่ 2-5 มิลลิเมตร แผลมีสีน้ำตาล น้ำตาลแดงถึงดำ และพบวงสีเหลืองล้อมรอบแผล จึงคัดแยกเชื้อราสาเหตุ ด้วยวิธี tissue transplanting โดยการสังเกตลักษณะของเส้นใยที่เจริญออกมาจากชิ้นพืชและนำไปแยกเลี้ยงต่อบนอาหาร PDA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ พบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดกับผักสลัด butter head 3 ชนิด คือ เชื้อรา *Alternaria* sp., *Cercospora* sp. และ *Curvularia* sp. โดยโคโลนีของแต่ละเชื้อมีลักษณะดังนี้คือ

เชื้อรา *Alternaria* sp. มีโคโลนีสีน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลเข้ม เส้นใยเจริญฟู ใช้ระยะเวลาในการเจริญจนเตขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรนาน 7 วัน เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น สปอร์มีลักษณะคล้ายกระบอง มีผนังกั้นเซลล์ของสปอร์พบทั้งแบบตามยาวและตามขวางเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *Curvularia* sp. มีโคโลนีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ มีการเจริญออกเป็นแนวรัศมี เส้นใยเจริญค่อนข้างฟูบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 4.2) เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น สร้าง conidia รูปร่างทรงรี มี 4-5 เซลล์ โดยเซลล์กลางมักจะโป่งพองออกพบเพียงผนังกั้นตามขวางเท่านั้น

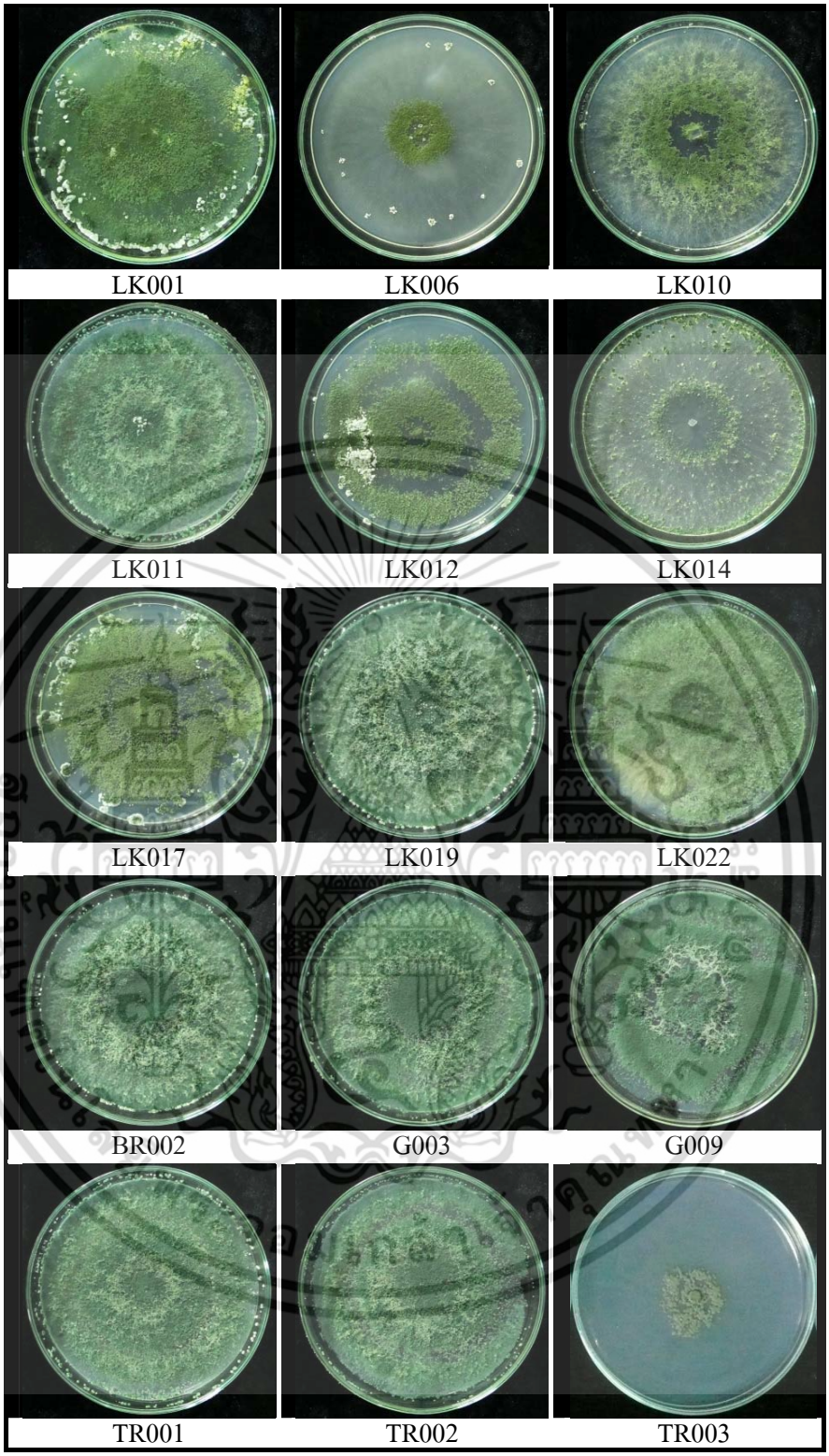
เชื้อรา *Cercospora* sp. มีลักษณะของโคโลนีกลม เส้นใยสีน้ำตาลอ่อนถึงดำ เจริญช้า และเส้นใยอัดกันแน่นเป็นก้อนแข็ง (ภาพที่ 4.2) เส้นใยเป็นแบบมีผนังกั้น สร้างโคนีเดียแบบเดี่ยว รูปร่างเรียวยาวและมีผนังกั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลท ที่คัดแยกเพื่อใช้ในการทดลอง

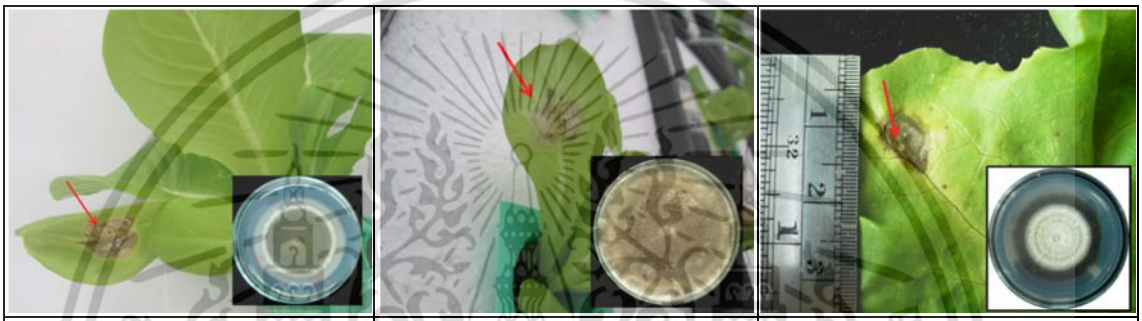
Trichoderma spp.	แหล่งที่มา	สถานที่
LK001	ดินจากแปลงปลูกผักคะน้า	แปลงปลูก เขตหนองจอก กทม.
LK006	ดินจากแปลงปลูกผักคะน้า	แปลงปลูก เขตลาดกระบัง กทม.
LK010	เศษใบและกิ่งไม้ผุ	จังหวัดนครนายก
LK011	ดินจากแปลงปลูกที่ผ่านการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp.	แปลงปลูกผัก จังหวัดนครนายก
LK012	เศษใบและกิ่งไม้ผุ	เขตลาดกระบัง กทม.
LK014	เศษใบและกิ่งไม้ผุ	อำเภอลำลูกกา ปทุมธานี
LK017	ดินจากแปลงปลูกกวางตุ้ง	แปลงปลูก อำเภอลำลูกกา ปทุมธานี
LK019	ดินจากแปลงปลูกที่ผ่านการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp.	แปลงปลูกผัก อำเภอลำลูกกา ปทุมธานี
LK022	เศษใบและกิ่งไม้ผุ	เขตหนองจอก กทม.
BR002	รากผักสลัด butter head ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์	ห้างสรรพสินค้าโลตัส เขตหนองจอก กทม.
G003	รากผักสลัด green oakที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์	ฟาร์มไฮโดรโปนิกส์ เขตร่มเกล้า กทม.
G009	รากผักสลัด green oakที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์	ห้างสรรพสินค้าโลตัส เขตลาดกระบัง กทม.
TR001	สารละลายธาตุอาหารในระบบไฮโดรโปนิกส์	ฟาร์มไฮโดรโปนิกส์ เขตมีนบุรี กทม.
TR002	สารละลายธาตุอาหารในระบบไฮโดรโปนิกส์	ฟาร์มไฮโดรโปนิกส์ จังหวัดนครราชสีมา
TR003	สารละลายธาตุอาหารในระบบไฮโดรโปนิกส์	ฟาร์มไฮโดรโปนิกส์ เขตร่มเกล้า กทม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. อายุ 7 วัน ที่เจริญบนอาหาร PDA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Curvularia sp.	*Alternaria* sp.	*Cercospora* sp.

ภาพที่ 4.2 ลักษณะอาการของโรคใบจุดและลักษณะโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด *Curvularia* sp., *Alternaria* sp. และ *Cercospora* sp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในห้องสภาพห้องปฏิบัติการ

4.2.1 Dual culture test

จากการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากดินธรรมชาติ สารละลายธาตุอาหาร และรากผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ทดสอบความสามารถเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด *Alternaria* sp., *Curvularia* sp. และ *Cercospora* sp. ในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี dual culture test พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลท มีความสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดทั้ง 3 ชนิดได้ โดยผลยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. พบว่า มีเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง ซึ่งโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria* sp มีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (ตารางที่ 4.2) และเมื่อบ่มเชื้อต่อในวันที่ 6 พบความแตกต่างของขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยเชื้อรา *Alternaria* sp. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเพียง 2.3-3.6 เซนติเมตรเท่านั้น ในขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 5.1 เซนติเมตร โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แสดงผลการยับยั้งได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท LK012 และเมื่อบ่มเชื้อต่อจนเชื้อรา *Alternaria* sp. ในชุดการทดลองควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 9 เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบเชื้อรา *Alternaria* sp. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพียง 2.3-3.5 เซนติเมตร และเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีประสิทธิภาพยับยั้งอยู่ที่ระดับ 49-73 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลทในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีความสามารถยับยั้งที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 49-73 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 60-69 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลทที่แสดงประสิทธิภาพยับยั้งได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท LK014 ที่คัดแยกได้จากดิน มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 73.56 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ต่ำที่สุดคือ ไอโซเลท LK022 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินเช่นเดียวกัน จากข้อสังเกตจะเห็นว่าเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินมีความหลากหลายมากกว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ และเมื่อศึกษาด้านกลไกการยับยั้งนั้น พบกลไกการเข้าทำลายแบบ antibiosis ได้ตั้งแต่วันที่ 1-2 ของการทดลอง (ภาพที่ 4.3) ซึ่งสังเกตได้ว่าในขณะที่เชื้อราทั้งสองชนิดยังไม่เจริญสัมผัสกันแต่โคโลนีของเชื้อรา *Alternaria* sp. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชุดการทดลองควบคุม ซึ่งผลนี้อาจเกิดจากสารระเหยหรือไม่ระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ก็ได้ หลังจากนั้นพบกลไกการเข้าทำลายแบบ competition คือเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทสามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อ *Alternaria* sp. ได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อนำเส้นใยบริเวณที่เชื้อราทั้งสองสัมผัสกัน มาส่องขยายด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีกลไกการเข้าทำลายแบบ exploitation ด้วยเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test

Treatment	Ø of Pathogen colony (cm)					% Inhibition (DPI 13)	Mode of action		
	DPI[4/] 1	DPI 3	DPI 6	DPI 9	DPI 13		Antibiosis	Competition	Exploitation
Control	1.32ab	3.62a[1/]	5.18a	6.56a	9.00a	0	-	-	-[2/]
Trichoderma spp. from soil									
LK001	1.28bcd	2.66de	2.90ef	2.90ef	2.92ef	67.56	-	+	+[3/]
LK006	1.38a	2.62de	2.82fg	2.90ef	2.96fg	68.22	-	+	+
LK010	1.22def	2.58de	2.60h	2.70fg	2.74g	68.67	+	+	-
LK011	1.18ef	2.64de	2.76fgh	2.86efg	2.86fg	64.67	+	+	+
LK012	1.16f	2.28f	2.36i	2.36h	2.38h	66.44	-	+	-
LK014	1.22def	2.50e	2.66gh	2.68fg	2.78fg	73.56	+	+	+
LK017	1.30bc	3.30b	4.00b	4.08b	4.54b	68.22	+	+	-
LK019	1.32ab	3.02c	3.18d	3.18d	3.18d	68.44	+	+	+
LK022	1.20ef	2.58de	2.68c	2.84efg	2.82fg	49.56	+	+	-
Trichoderma spp. from hydroponics									
BR002	1.24cde	2.66de	2.78fg	2.78fg	2.84fg	69.56	+	+	+
G003	1.28bcd	3.12c	3.32d	3.44c	3.54c	69.56	+	+	+
G009	1.30bc	2.66	2.74fgh	2.76fg	2.76g	69.33	+	+	+
TR001	1.28bcd	2.62de	2.66gh	2.66g	2.76fg	69.56	+	+	+
TR002	1.24cde	2.72d	3.04e	3.04de	3.06e	69.11	+	+	+
TR003	1.16f	2.62de	2.66gh	2.70fg	2.74g	60.67	+	+	+

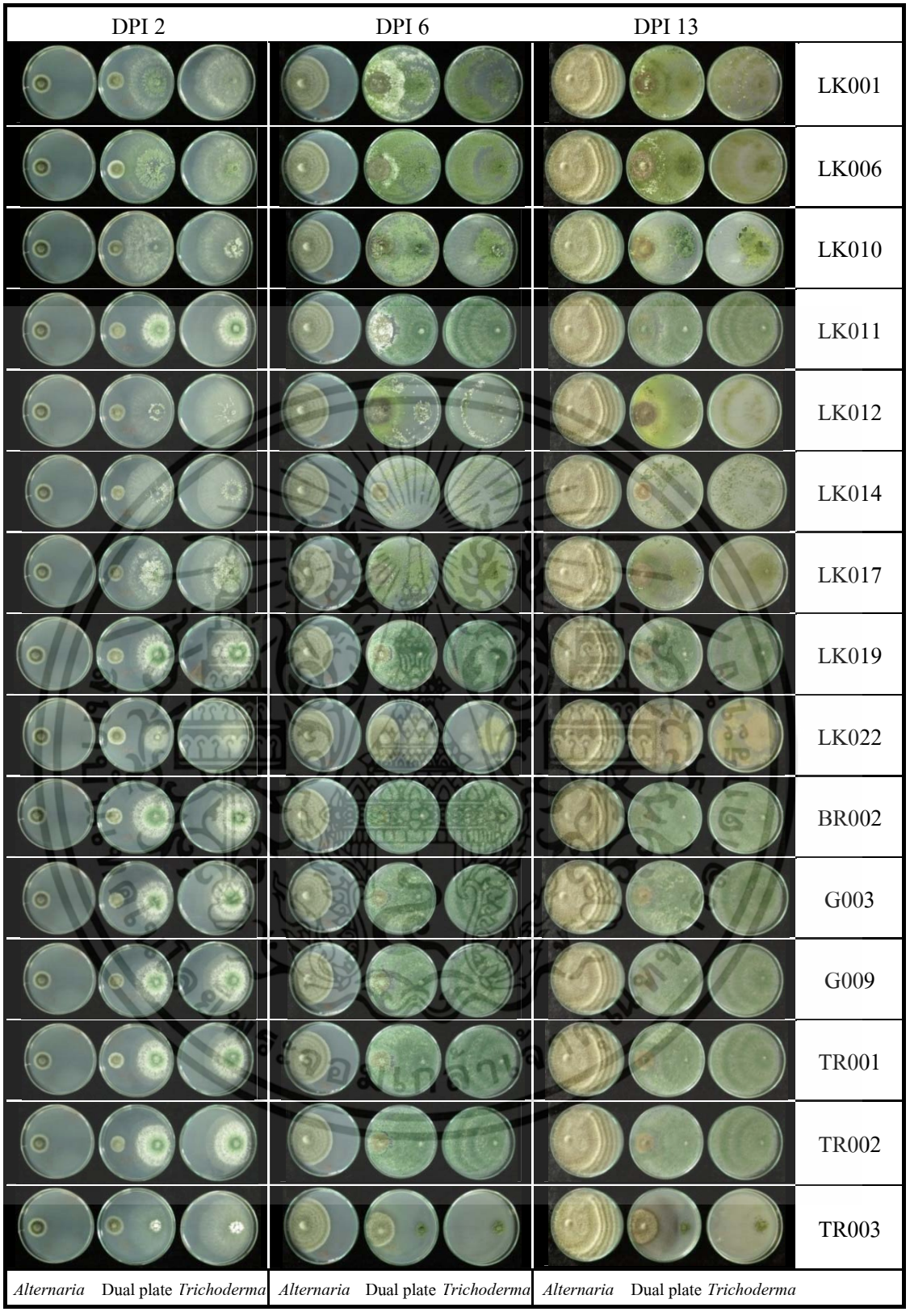
1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

2/ (-) ไม่พบการเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp.

3/ (+) พบการเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp.

4/ Day Post Inoculation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 การเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test เมื่อ DPI 2, DPI 6 และ DPI 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง (ตารางที่ 4.3) โดยเชื้อรา *Curvularia* sp. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคลนีคือ 1.8 เซนติเมตร ในขณะที่เชื้อรา *Curvularia* sp. ในชุดการทดลองมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1.5-1.7 เซนติเมตร และเมื่อบ่มเชื้อต่อจนถึงวันที่ 6 เชื้อรา *Curvularia* sp. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่เล็กลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเจริญได้เพียง 2-4 เซนติเมตรเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 5.52 เซนติเมตร และเมื่อบ่มเชื้อต่อจนเชื้อรา *Curvularia* sp. ในชุดการทดลองควบคุมเจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 11 พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. ในชุดการทดลองมีขนาดเพียง 2-4 เซนติเมตร เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. อยู่ที่ระดับ 45-68 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 61-67 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพยับยั้งดีที่สุดคือ ไอโซเลท LK019 ที่คัดแยกได้จากดิน และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งต่ำสุดคือ ไอโซเลท LK022 ที่คัดแยกได้จากดินเช่นเดียวกัน และไอโซเลท BR002 ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีประสิทธิภาพยับยั้งที่ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 67.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาด้านกลไกการเข้าทำลายพบกลไกการยับยั้งแบบ antibiosis ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง (ภาพที่ 4.4) เนื่องจากเชื้อราทั้งสองชนิดยังเจริญไม่สัมผัสกัน แต่ขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. มีขนาดที่เล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ซึ่งอาจเกิดจากสารระเหยหรือไม่ระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ก็ได้ ต่อมาพบกลไกการเข้าทำลายแบบ competition โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้อย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ของการทดลอง และเมื่อนำเส้นใยบริเวณที่เชื้อราทั้งสองสัมผัสกันมาส่องขยายด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีกลไกแบบ exploitation เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test

Treatment	Ø of Pathogen colony (cm)					% Inhibition (DPI 11)	Mode of action		
	DPI[4/] 1	DPI 3	DPI 6	DPI 9	DPI 11		Antibiosis	Competition	Exploitation
Control	1.80a[1/]	3.74a	5.52a	6.78a	9.00a	0	-	-	-[2/]
Trichoderma spp. from soil									
LK001	1.70ab	3.00fgh	3.00d	3.00fgh	3.02fg	64.44	+	+	+[3/]
LK006	1.66ab	2.94gh	3.00d	3.00fgh	3.06fgh	66.89	+	+	+
LK010	1.68ab	3.04fg	3.04d	3.08efgh	3.08fgh	66.22	+	+	-
LK011	1.70ab	3.02fg	3.06d	3.08efgh	3.08fg	64.67	+	+	+
LK012	1.66ab	2.60h	2.74e	2.86i	2.86h	64.22	+	+	-
LK014	1.70ab	3.10de	3.10d	3.12ef	3.18ef	68.22	+	+	+
LK017	1.70ab	3.58b	4.84b	4.90b	4.90b	66.44	+	+	-
LK019	1.58e	3.30c	3.32c	3.32de	3.32df	67.33	+	+	+
LK022	1.70ab	3.00fg	3.00d	3.10efg	3.14fg	45.56	+	+	-
Trichoderma spp. from hydroponics									
BR002	1.68ab	3.00fgh	3.02d	3.02ghi	3.02gh	67.33	+	+	+
G003	1.70ab	3.26cd	3.36c	3.42c	3.48c	67.11	+	+	+
G009	1.72ab	2.08ef	2.96d	2.96hi	2.94gh	66.67	+	+	+
TR001	1.72ab	3.02fg	3.06d	3.06fgh	3.06fg	66.89	+	+	+
TR002	1.72ab	3.20cd	3.20c	3.28d	3.28d	65.78	+	+	+
TR003	1.70ab	3.02fg	3.10d	3.18efgh	3.18fgh	61.33	+	+	+

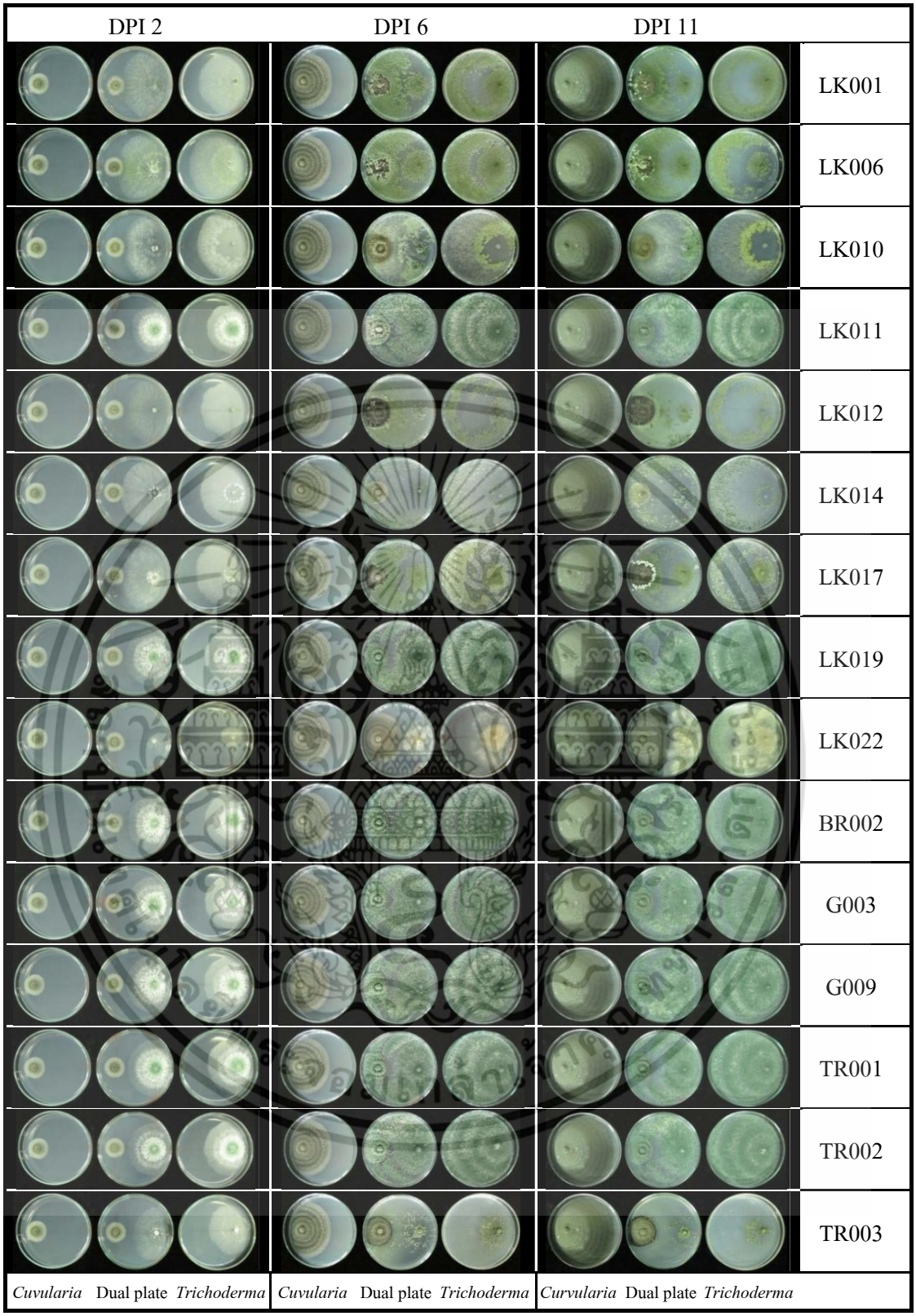
1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

2/ (-) ไม่พบการเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp.

3/ (+) พบการเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp.

4/ Day Post Inoculation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 การเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test เมื่อ DPI 2, DPI 6 และ DPI 11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ได้ โดยเชื้อรา *Cercospora* sp. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมในวันที่ 3 ของการทดลอง (ตารางที่ 4.4) และเมื่อบ่มเชื้อราทั้งสองชนิดต่อจนถึงวันที่ 9 สังเกตได้ว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Cercospora* sp. ในชุดการทดลองมีขนาดเล็กลงกว่าในชุดการทดลองควบคุมอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเชื้อรา *Cercospora* sp. ในชุดการทดลองมีการเจริญที่ช้ามากหรือไม่เจริญเลย และเมื่อบ่มเชื้อต่อจนเชื้อรา *Cercospora* sp. ในชุดการทดลองควบคุมเจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 21 และนำผลการทดลองที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora* sp. ได้สูง โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินมีประสิทธิภาพยับยั้งอยู่ที่ระดับ 65-70 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท LK006 สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ได้ 70.96 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีประสิทธิภาพยับยั้งอยู่ที่ระดับ 69-70 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน และไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำที่สุดคือไอโซเลท LK022 ซึ่งคัดแยกได้จากดินเช่นเดียวกัน โดยจะสังเกตได้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินมีความหลากหลายมากกว่าไอโซเลทที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มาก และเมื่อศึกษาถึงกลไกการยับยั้งพบกลไกแบบ antibiosis ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลองเช่นเดียวกัน ซึ่งเชื้อรา *Cercospora* sp. มีขนาดโคโลนีเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ในขณะที่เชื้อราทั้งสองชนิดยังไม่เจริญสัมผัสกัน หลังจากนั้นพบกลไกการเข้าทำลายแบบ competition โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *Cercospora* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ในวันที่ 2 เมื่อนำเส้นใยบริเวณที่เชื้อราทั้งสองสัมผัสกันมาส่องขยายด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบกลไกแบบ exploitation เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test

Treatment	Ø of Pathogen colony (cm)					% Inhibition (DPI 21)	Mode of action		
	DPI 1[4/]	DPI 3	DPI 6	DPI 9	DPI 21		Antibiosis	Competition	Exploitation
Control	2.20a	2.50a[1/]	3.68a	4.12a	8.54a	0	-	-	-[2/]
Trichoderma spp. from soil									
LK001	2.02bcd	2.26bcd	2.42fg	2.42e	2.42e	70.66	-	+	+[3/]
LK006	1.96cd	2.22bcd	2.46efg	2.48de	2.48de	70.96	-	+	+
LK010	2.00bcd	2.24bcd	2.48efg	2.50cd	2.50cde	70.72	-	+	-
LK011	1.92d	2.28bcd	2.56cde	2.56c	2.64c	69.72	+	+	+
LK012	2.08abcd	2.38bcd	2.62cd	2.62c	2.62cd	69.32	-	+	-
LK014	2.06abcd	2.28bcd	2.40g	2.48de	2.52cde	70.49	+	+	+
LK017	2.12abc	2.40ab	2.50cdef	2.50cd	2.52cde	70.49	-	+	+
LK019	2.06abcd	2.40ab	2.54cdef	2.54c	2.58cd	69.78	+	+	+
LK022	2.04abcd	2.26bcd	2.92b	2.96b	2.96b	65.33	+	-	+
Trichoderma spp. from hydroponics									
BR002	1.98bcd	2.22bcd	2.54cdef	2.50cd	2.56cde	70.02	+	+	+
G003	2.04abcd	2.34abcd	2.56cde	2.56c	2.56cde	70.02	+	+	+
G009	1.92d	2.20cd	2.54cdef	2.60c	2.62cd	69.32	+	+	+
TR001	2.14ab	2.40ab	2.52defg	2.54c	2.58cd	69.78	+	+	+
TR002	1.96cd	2.16d	2.50defg	2.50cd	2.62cd	69.32	+	+	+
TR003	2.08abcd	2.36abc	2.64c	2.64c	2.64c	69.08	+	+	+

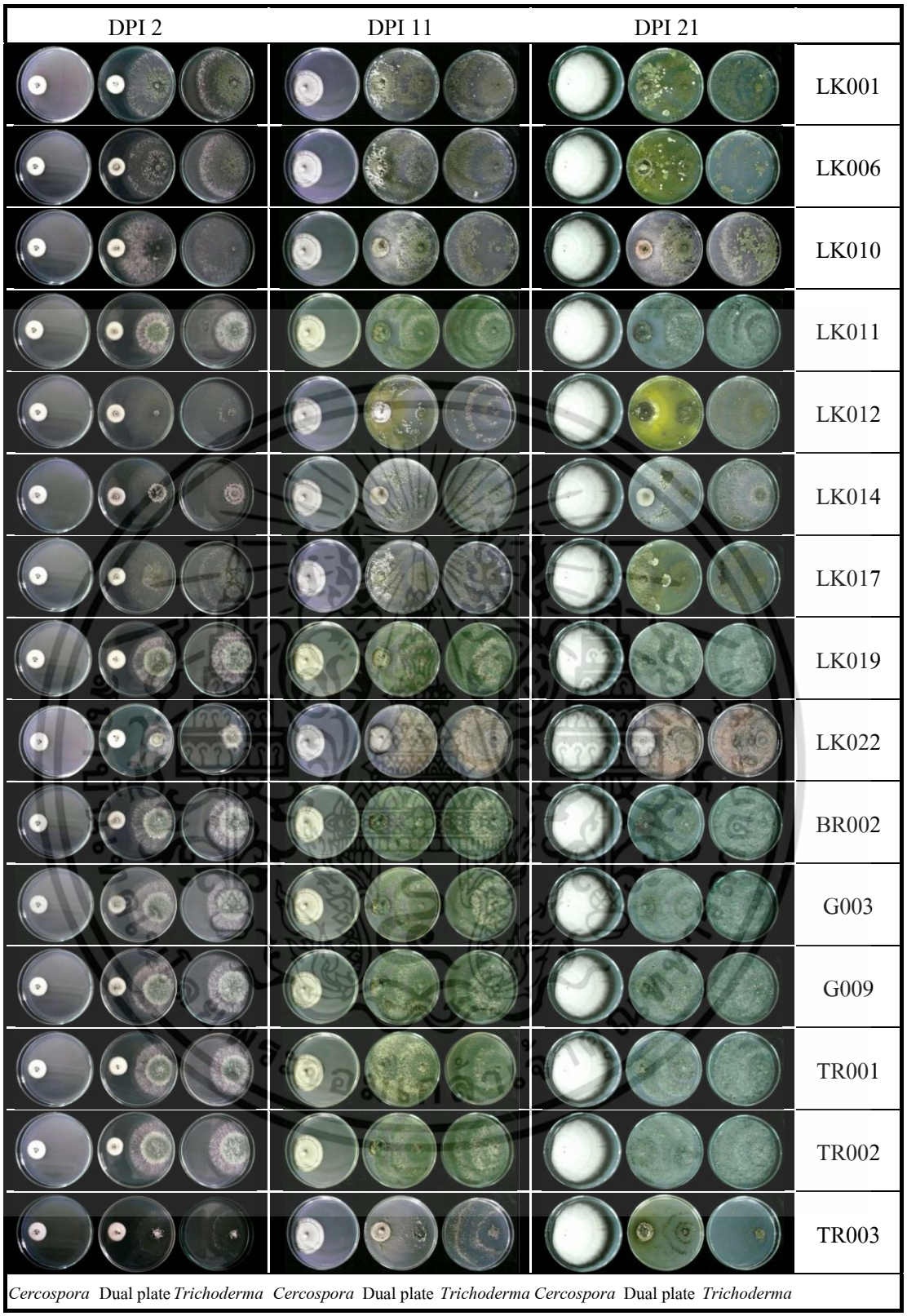
1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

2/ (-) ไม่พบการเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp.

3/ (+) พบการเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp.

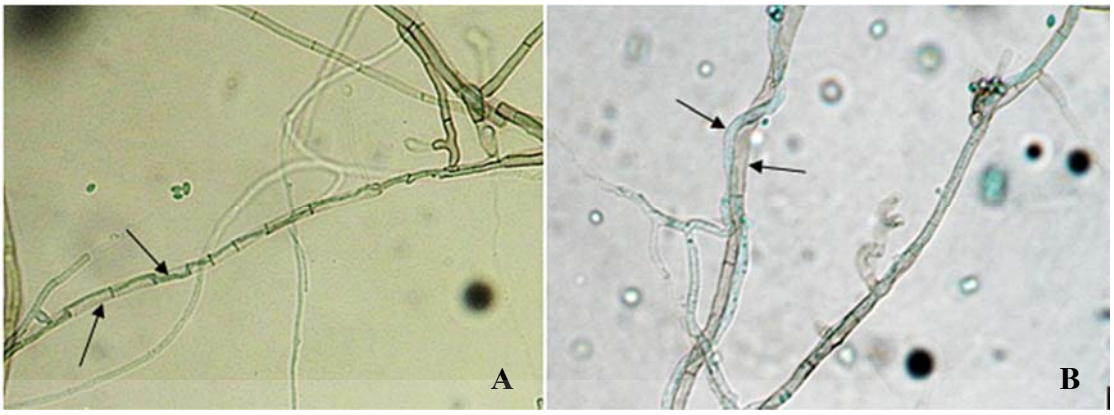
4/ Day Post Inoculation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อรา *Cercospora* sp. ด้วยวิธีการ dual culture test เมื่อ DPI 2, DPI 11 และ DPI 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 กลไกการเข้าทำลายของเชื้อรา *Trichoderma* TR002 ใน dual culture test โดยที่
A= กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *Alternaria* sp. แบบเจริญภายในเส้นใย
B= กลไกการเข้าทำลายเชื้อ *Curvularia* sp. แบบพันรัดเส้นใย

4.2.2 Inverted petripate test

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยวิธี dual culture test พบว่าขณะที่เชื้อราทั้งสองชนิดยังเจริญไม่สัมผัสกัน แต่กลับส่งผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคมีขนาดที่ลดลงได้ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารต่างๆ ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ส่งผลต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค ทั้งนี้สารดังกล่าวอาจเป็นสารระเหยหรือไม่ระเหยก็ได้ ซึ่งผลทดสอบประสิทธิภาพของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลท สามารถสร้างสารระเหยและส่งผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง แต่สามารถยับยั้งได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ตารางที่ 4.5) โดยเชื้อรา *Alternaria* sp. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม และบ่มเชื้อต่อจนเชื้อราในชุดการทดลองควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 4 และนำผลที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินมีมีประสิทธิภาพยับยั้งอยู่ที่ระดับ 7-18 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีประสิทธิภาพยับยั้งที่ระดับ 10-18 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน โดยไอโซเลท TR002 คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ สามารถสร้างสาระเหยและส่งผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุดโดยเชื้อรา *Alternaria* sp. เจริญมีขนาดเพียง 6.54 เซนติเมตรเท่านั้น ในขณะที่สารระเหยจากไอโซเลท LK001 มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคต่ำที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพียง 7.09 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งสารระเหยที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างนั้น สามารถส่งผลให้เกิดความผิดปกติที่กับโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria* sp. เช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม ในขณะที่ไม่พบความผิดปกติโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินสามารถสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความผิดปกติกับเชื้อรา *Alternaria* spp. ได้เพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น คือ ไอโซเลท LK019 และ LK022 และสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. 5 ไอโซเลท คือ BR002, G003, G009, TR001 และ TR002 ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์สามารถสร้างความผิดปกติกับเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ (ภาพที่ 4.7)

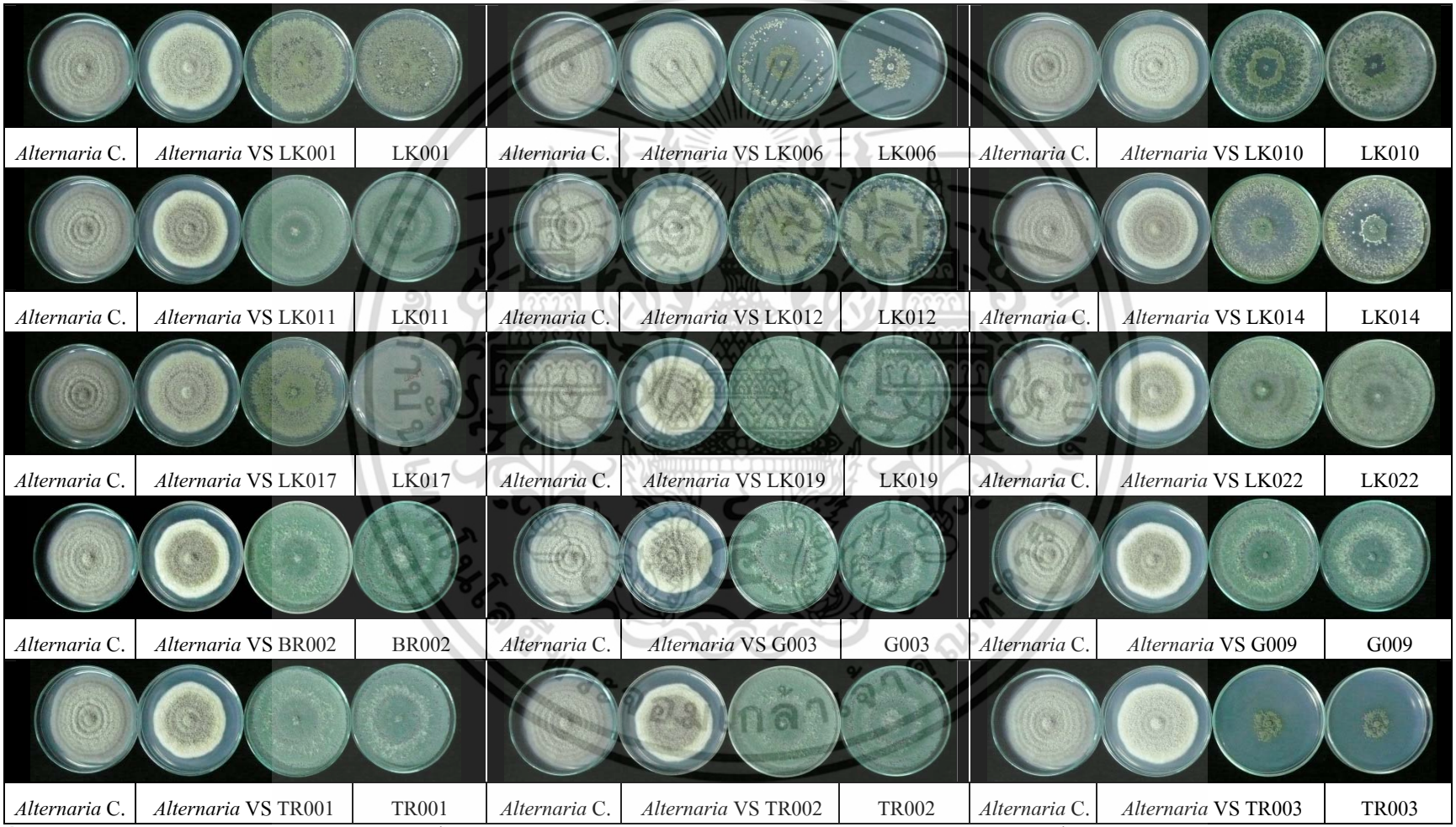
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพในการผลิตสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธีการ inverted petriplate test

Treatment	Ø of Pathogen colony (cm)				% Inhibition
	DPI 1	DPI 2	DPI 3	DPI 4	(DPI 4)
Control	5.51a[1/]	6.37a	7.22a	8.03a	0
Trichoderma spp. from soil					
LK001	5.33b	6.06b	6.81b	7.46b	7.09
LK006	5.16de	5.93cd	6.66cd	7.3bcd	9.09
LK010	5.08efg	5.81de	6.51e	7.23cd	9.96
LK011	5.03fg	5.66f	6.24f	6.81f	15.19
LK012	5.3bc	6.05bc	6.77bc	7.43b	7.47
LK014	5.22cd	5.87d	6.46e	7.02e	12.57
LK017	5.34b	6.01bc	6.77bc	7.40bc	7.84
LK019	5.04fg	5.62fg	6.18f	6.58h	18.05
LK022	5.14def	5.74ef	6.41e	7.13de	11.20
Trichoderma spp. from hydroponics					
BR002	4.97gh	5.53gh	6.00gh	6.57h	18.18
G003	4.89h	5.46h	6.00gh	6.57 h	18.18
G009	5.08efg	5.68f	6.25f	6.76fg	15.81
TR001	4.90h	5.45h	5.87h	6.63gh	17.43
TR002	5.12def	5.65fg	6.11fg	6.54h	18.55
TR003	5.17de	5.87d	6.53de	7.16de	10.83

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 การทดสอบอิทธิพลของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี inverted petriplate test

สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการสร้างสารแบบระเหยเพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลท มีความสามารถสร้างสารระเหยที่ส่งผลต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvuraria* sp. ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (ตารางที่ 4.6) แต่มีประสิทธิภาพยับยั้งที่ต่ำ กล่าวคือขณะที่เชื้อรา *Curvuraria* sp. มีอายุ 3 วัน และเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีอายุ 1 วัน ส่งผลให้เชื้อรา *Curvularia* sp. มีการเจริญทางเส้นใยลดลงได้ตั้งแต่วันที 1-4 ของการทดลอง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อ 6.67-8.6 เซนติเมตร ในขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีขนาดโคโลนี 8.93 เซนติเมตร โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินสามารถสร้างสาระเหยยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้ที่ระดับ 3-18 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ที่ระดับ 5-25 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท BR002 มีประสิทธิภาพยับยั้งได้ดีที่สุด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ 25.31 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลท LK001 ที่คัดแยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำที่สุดคือ 3.69 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และเมื่อเปิดจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกในวันที่ 4 ของการทดลอง จะสังเกตเห็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. ในขณะที่ไม่พบความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้นกับโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เมื่อเปรียบเทียบกับโคโลนีในชุดการทดลองควบคุม โดยมีสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินเพียง 3 ไอโซเลทเท่านั้น คือไอโซเลท LK017, LK019 และ LK022 สามารถส่งผลให้เกิดความผิดปกติแก่โคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. ในขณะที่สารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ 4 ไอโซเลท คือ BR002, G003, G009 และ TR002 ส่งผลให้เกิดความผิดปกติแก่โคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ (ภาพที่ 4.8)

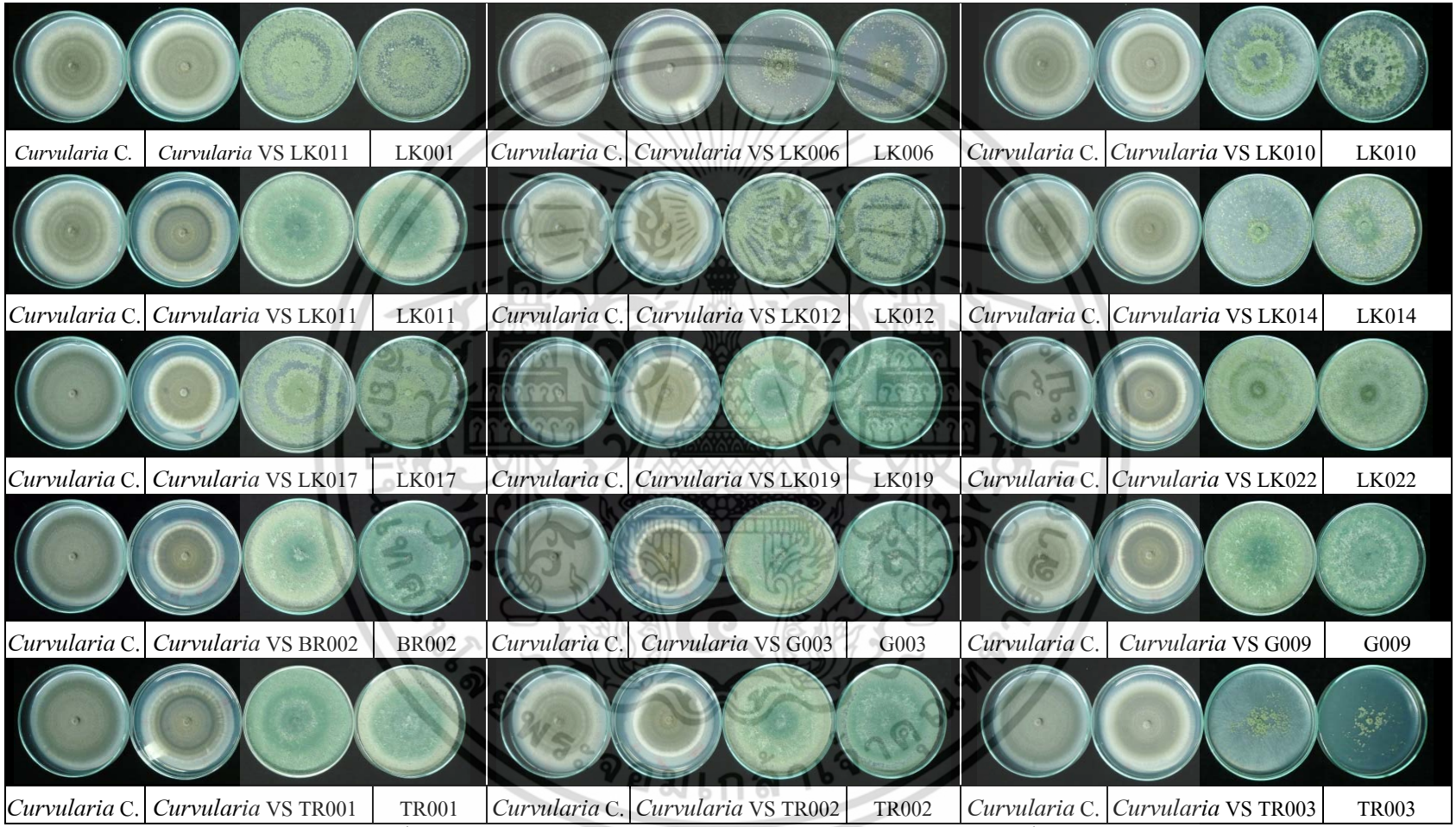
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพในการผลิตสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ inverted petriplate test

Treatment	Ø of Pathogen colony (cm)				% Inhibition
	DPI 1	DPI 2	DPI 3	DPI 4	(DPI 4)
Control	6.42a[1/]	7.43a	8.11a	8.93a	0
Trichoderma spp. from soil					
LK001	6.25abc	7.13bc	7.89ab	8.60ab	3.69
LK006	5.90de	6.91cd	7.73ab	8.21bcd	8.06
LK010	6.41a	7.38ab	7.66b	8.18bcd	8.39
LK011	6.00cd	6.64def	7.47bc	7.29e	18.37
LK012	6.39a	7.37ab	7.87ab	8.30bc	7.05
LK014	6.24abc	7.07c	7.64b	8.42ab	5.71
LK017	5.69ef	6.61ef	7.18cd	7.43e	16.79
LK019	6.27ab	6.89cde	7.54bc	8.09bcd	9.41
LK022	5.72ef	6.43f	6.89d	7.28e	18.48
Trichoderma spp. from hydroponics					
BR002	5.56f	5.97g	6.27e	6.67f	25.31
G003	5.99cd	6.43f	6.96d	7.34e	17.81
G009	6.02bcd	6.42f	6.79d	7.34e	17.81
TR001	5.57f	6.38f	6.95d	7.69de	13.89
TR002	6.36a	6.85cde	7.21cd	7.75cde	13.21
TR003	5.91de	6.87cde	7.69ab	8.42ab	5.71

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 การทดสอบอิทธิพลของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธี inverted petriplate test

สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการสร้างสารระเหยที่ส่งผลต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ซึ่งทำการทดลองด้วยการประกบจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองเข้าด้วยกัน โดยที่เชื้อรา *Cercospora* sp. มีอายุ 7 วัน และเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีอายุ 1 วัน พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลทสามารถสร้างสารระเหยได้ และส่งผลให้การเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.7) แต่เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง สารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ได้เพียงเล็กน้อย ทั้งนี้ เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 8-13 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 8-16 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ดีที่สุดคือเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ ซึ่งยับยั้งได้ 16.12 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ต่ำที่สุดคือไอโซเลท LK001 ซึ่งคัดแยกได้จากดินโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 8.35 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และเมื่อสังเกตโคโลนีของเชื้อรา *Cercospora* sp. เปรียบเทียบโคโลนีในชุดการทดลองควบคุม พบว่าเกิดความผิดปกติกับโคโลนีของเชื้อรา *Cercospora* sp. แต่ไม่พบความผิดปกติกับโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งนี้สารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท LK010 ที่แยกได้จากดินสามารถส่งผลให้โคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคเกิดความผิดปกติได้ แต่สารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ไม่สามารถส่งผลให้โคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคเกิดความผิดปกติได้ (ภาพที่ 4.9)

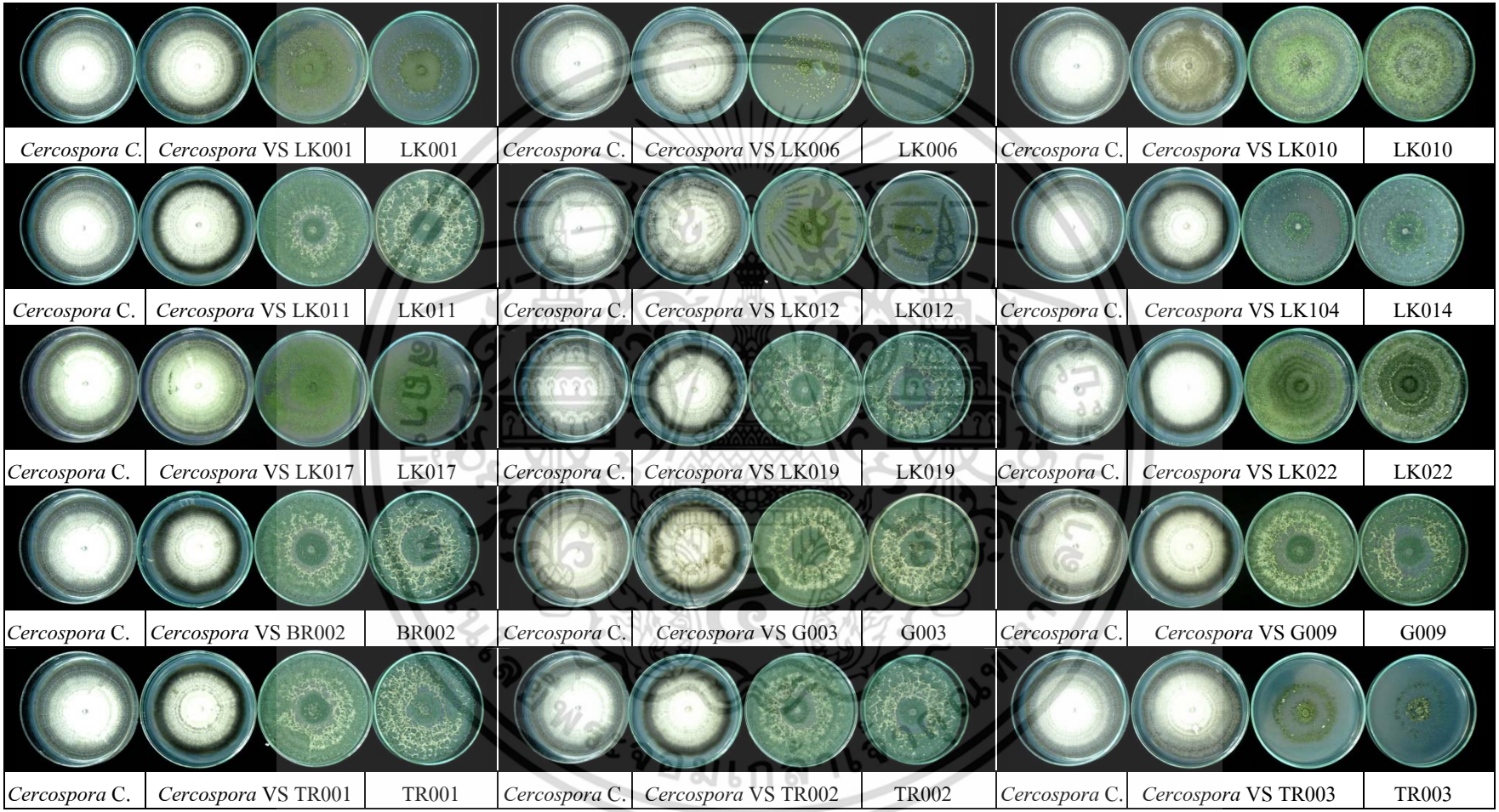
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพในการผลิตสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ด้วยวิธีการ inverted petriplate test

Treatment	Ø of Pathogen colony (cm)				% Inhibition
	DPI 2	DPI 4	DPI 6	DPI 8	(DPI 8)
Control	7.37a[1/]	7.91b	8.38a	8.62a	0
Trichoderma spp. from soil					
LK001	6.8b	7.41b	7.90b	7.90b	8.35
LK006	6.61b	7.14b	7.54bcd	7.54bcde	12.52
LK010	6.71b	7.26b	7.59bcd	7.59bcde	11.94
LK011	7.04ab	7.45b	7.70bc	7.70bcd	10.67
LK012	6.58b	7.16b	7.56bcd	7.56bced	12.29
LK014	6.77b	7.16b	7.44cd	7.44de	13.68
LK017	6.57b	7.08b	7.61bcd	7.61bcde	11.71
LK019	6.78b	7.22b	7.49cd	7.49cde	13.10
LK022	6.54b	7.10b	7.62bcd	7.62bcde	11.60
Trichoderma spp. from hydroponics					
BR002	6.54b	7.06b	7.41cd	7.41de	14.03
G003	6.58b	7.07b	7.23d	7.23e	16.12
G009	6.72b	7.16b	7.45cd	7.45de	13.57
TR001	6.89b	7.39b	7.65bc	7.65bcd	11.25
TR002	6.84b	7.32b	7.65bc	7.65bcd	11.25
TR003	6.74b	7.30b	7.80bc	7.88bc	8.58

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 การทดสอบอิทธิพลของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี inverted petriplate test

4.2.3 Cellophane test

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยวิธี cellophane test ซึ่งศึกษาถึงความสามารถการผลิตสารไม่ระเหยเพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. โดยสารที่สร้างจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะซึมผ่านแผ่น cellophane ลงสู่ผิวหน้าอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทมีความสามารถสร้างสารไม่ระเหยลงสู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อและส่งผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง โดยโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria* sp. มีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (ตารางที่ 4.8) และเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในวันที่ 9 ของการทดลอง พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินส่วนมากมีประสิทธิภาพยับยั้งที่ต่ำระดับ 0.45-27 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น โดยพบเพียงไอโซเลท LK022 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุดคือ 39.01 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ที่ระดับ 22-26 เปอร์เซ็นต์ มีเพียงไอโซเลท TR003 เท่านั้นที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ต่ำคือ 9.87 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบความผิดปกติของโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria* sp. ในการทดสอบกับสารไม่ระเหยจากไอโซเลท LK010, LK019 และ G003 เมื่อเปรียบเทียบกับโคโลนีในชุดการทดลองควบคุม โดยพบลักษณะของโคโลนีที่มีเส้นใยเจริญแบบหลวมๆ (ภาพที่ 4.10)

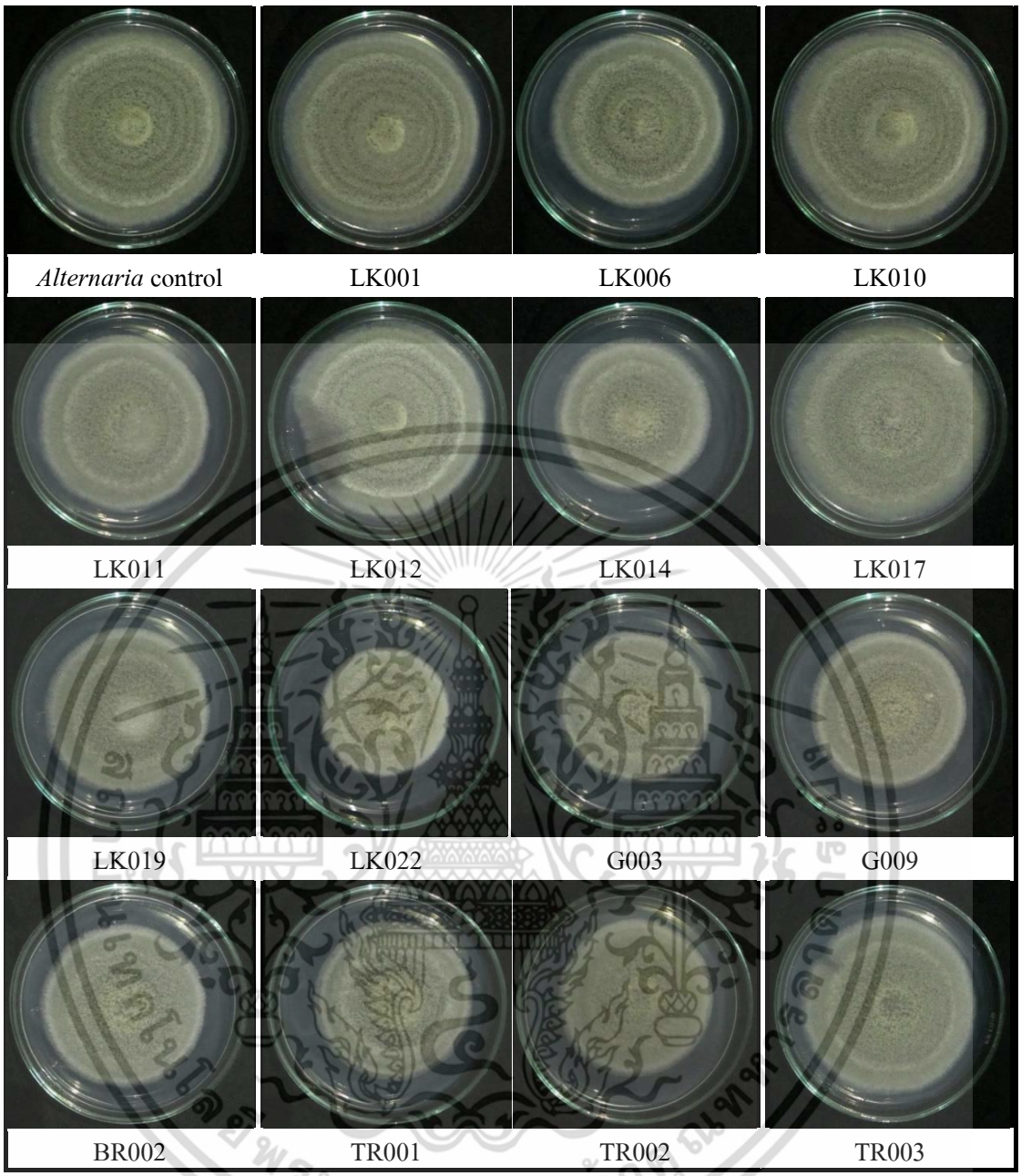
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ประสิทธิภาพในการผลิตสารแบบไม่ระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธีการ cellophane test

Treatment	Ø of Pathogen colony (cm)			% Inhibition	Remark
	DPI 1	DPI 3	DPI 5	(DPI 9)	
Control	1.36a[1/]	3.06a	5.00a	-	-
Trichoderma spp. from soil					
LK001	1.32ab	3.00a	5.00a	3.13	-
LK006	1.02d	2.24c	4.02c	15.91	-
LK010	1.28ab	3.00a	5.00a	2.46	เส้นใยเจริญหลวมๆ
LK011	0.82e	2.02d	4.00c	17.26	-
LK012	1.12c	2.48b	4.70b	0.45	-
LK014	0.58g	1.30g	3.04e	27.13	-
LK017	1.24b	3.00a	5.00a	0.67	-
LK019	0.74ef	1.46f	3.58d	21.30	เส้นใยเจริญหลวมๆ
LK022	0.68f	1.12h	2.64f	39.01	-
Trichoderma spp. from hydroponics					
BR002	0.72f	1.66e	3.48d	22.64	-
G003	0.74ef	1.44fg	3.12e	25.78	เส้นใยเจริญหลวมๆ
G009	0.70f	1.42fg	3.40d	25.78	-
TR001	0.72f	1.42fg	2.04g	28.92	-
TR002	0.72f	1.34fg	3.10e	26.46	-
TR003	1.10cd	2.38b	4.78ab	9.87	-

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 การทดสอบอิทธิพลของสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี cellophane test (DPI 8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับประสิทธิภาพของสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. พบว่าสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง โดยเชื้อรา *Curvularia* sp. มีขนาดที่ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (ตารางที่ 4.9) โดยเชื้อรา *Curvularia* sp. เจริญมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เพียง 0.5-1.2 เซนติเมตรเท่านั้น ในขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 1.5 เซนติเมตร และเมื่อบ่มเชื้อต่อจนเชื้อรา *Curvularia* sp. ในชุดการทดลองควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลที่ได้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง พบว่าสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่คัดแยกได้จากดินมีประสิทธิภาพยับยั้งได้ที่ระดับ 15-55 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีประสิทธิภาพยับยั้งอยู่ที่ระดับ 40-52 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าเชื้อราที่แยกได้จากดินมีประสิทธิภาพการยับยั้งที่หลากหลายมากกว่าเชื้อราที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยไอโซเลท LK022 ที่คัดแยกได้จากดินมีประสิทธิภาพยับยั้งสูงสุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.13 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดสอบสารไม่ระเหยจากไอโซเลท LK022 มีความสอดคล้องกับการทดสอบกับเชื้อรา *Alternaria* sp. กล่าวคือ กลไกหลักของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท LK022 คือกลไก แบบ antibiosis และเมื่อสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. เปรียบเทียบกับโคโลนีในชุดการทดลองควบคุมพบว่าเกิดความผิดปกติกับโคโลนีเชื้อรา *Curvularia* sp. เช่นเดียวกัน โดยพบลักษณะขอบโคโลนีที่เจริญอย่างไม่สม่ำเสมอและสีของโคโลนีหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีที่อ่อนลง (ภาพที่ 4.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

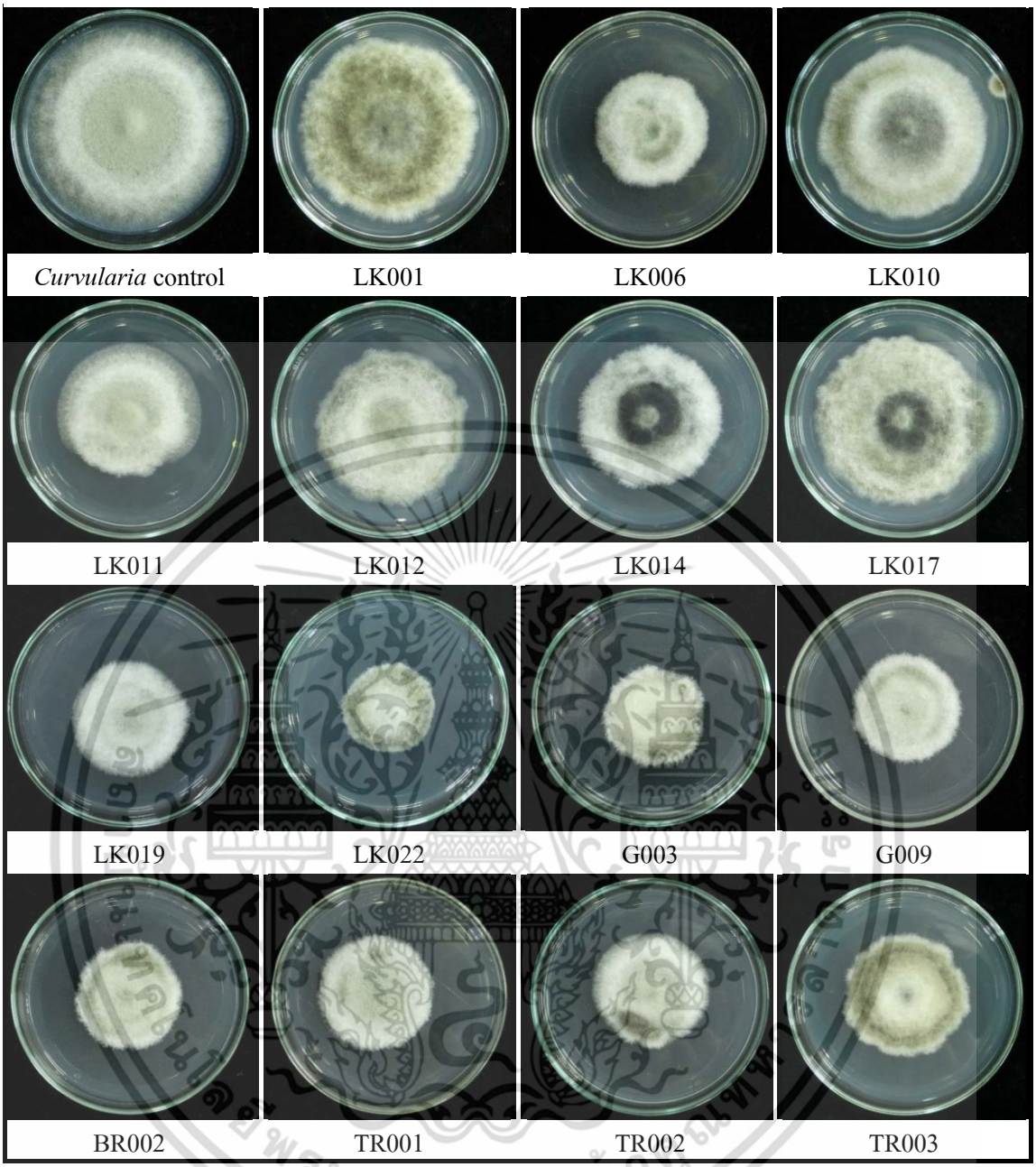
ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการผลิตสารแบบไม่ระเหย เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ cellophane test

Treatment	Ø of Pathogen colony (cm)			% Inhibition	Remark
	DPI 1	DPI 3	DPI 5	(DPI 8)	
Control	1.50 a[1/]	4.08 a	5.02 a	-	-
Trichoderma spp. from soil					
LK001	1.14 b	3.80 b	5.00 a	15.84	ขอบโคโลนีไม่สม่ำเสมอ
LK006	0.70 e	1.72 fg	2.20 fg	45.98	-
LK010	1.20 b	3.92 ab	4.92 a	17.41	ขอบโคโลนีไม่สม่ำเสมอ
LK011	0.60 ef	1.98 ef	2.62 de	29.46	-
LK012	0.88 cd	2.46 d	3.16 c	34.59	ขอบโคโลนีไม่สม่ำเสมอ
LK014	0.86 cd	3.16 c	4.22 b	26.33	เส้นใยเจริญหลวมๆ
LK017	0.92 c	2.70 d	4.10 b	19.86	โคโลนีสีอ่อน[2/]
LK019	0.50 g	1.68 g	2.56 ef	44.64	โคโลนีสีอ่อน
LK022	0.66 e	1.32 h	1.88 g	55.13	-
Trichoderma spp. from hydroponics					
BR002	0.50 g	1.68 g	2.36 ef	50.66	-
G003	0.80 d	1.60 g	2.18 fg	52.90	-
G009	0.80 d	1.62 g	2.20 fg	47.76	โคโลนีสีอ่อน
TR001	0.64 e	1.80 fg	2.48 ef	42.63	โคโลนีสีอ่อน
TR002	0.52 fg	1.54 gh	2.26 efg	40.84	โคโลนีสีอ่อน
TR003	0.82 cd	2.16 e	2.98 cd	40.84	ขอบโคโลนีไม่สม่ำเสมอ

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

2/ สีของโคโลนีหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 การทดสอบอิทธิพลของสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (15 ไอโซเลท) ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธี cellophane test (DPI 8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 Culture filtrate test

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แสดงประสิทธิภาพที่ดีในการสร้างสารไม่ระเหยจากการทดสอบด้วยวิธีการ cellophane test โดยคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp.จำนวน 6 ไอโซเลท คือ BR002, G003, G009, LK019, LK022 และ TR001 ทำการทดลองด้วยวิธีการ agar well diffusion โดยใช้ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงในอาหาร PDB นาน 11 วัน และเจือจางที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อหาว่าความเข้มข้นต่ำสุดใดที่สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ ผลการทดลองพบว่า CF ที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้น้อยกว่าการทดลองใน cellophane test ซึ่ง CF ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ของทุกไอโซเลท แสดงผลยับยั้งได้ดีที่สุด โดยการทดสอบกับเชื้อรา *Alternaria* sp. CF จากไอโซเลท G003 สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุดคือ 12.84 เปอร์เซ็นต์ ในขณะ CF จากไอโซเลต BR002 สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุดคือ 15.03 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.10) ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของ CF จากไอโซเลท G003 และ BR002 สอดคล้องกับการทดลองด้วยวิธี cellophane test แต่น่าแปลกใจที่ CF จากไอโซเลท LK022 แสดงผลไม่ดีในการทดลองด้วยวิธี agar well diffusion โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดที่ได้ที่ระดับ 6 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (ภาพที่ 4.12 และ 4.13) ซึ่งต่ำกว่าในการทดลองด้วยวิธี cellophane test มาก ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในวันแรกที่ทำการใส่สาร เชื้อราสาเหตุโรคและ CF ไม่ได้สัมผัสกันโดยตรง และสารดังกล่าวอาจแพร่กระจายลงสู่ก้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อและต้องใช้เวลาระยะหนึ่งกว่าเชื้อจะเจริญถึงระยะการแพร่กระจายของ CF เมื่อบันทึกผลรัศมีการเจริญของเชื้อราจึงเพิ่มตามไปด้วย ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งที่น้อยลง (ภาพที่ 4.12 และ 4.13)

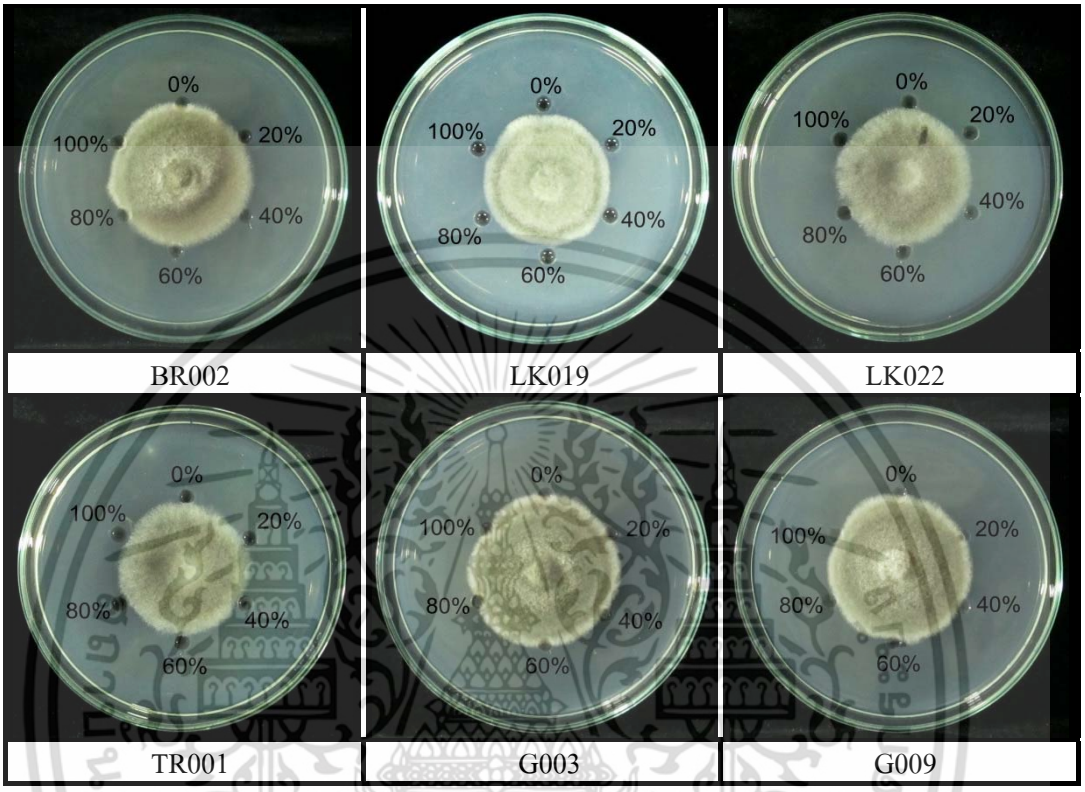
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ด้วยวิธีการ agar well diffusion

Treatment	CF (%)	*Alternaria* sp.		*Curvularia* sp.	
		Ø Colony (cm)	% Inhibition (DPI 3)	Ø Colony (cm)	% Inhibition (DPI 3)
BR002	0%	2.20 a[1/]	0	2.66 a	0
	20%	2.12 b	3.64	2.58 ab	3.00
	40%	2.12 b	3.64	2.52 bc	5.26
	60%	2.10 b	4.55	2.48 bc	6.76
	80%	2.10 b	4.55	2.42 c	9.02
	100%	2.08 b	5.45	2.26 d	15.03
G003	0%	2.18 a	0	2.66 a	0
	20%	2.18 a	0	2.60 ab	2.25
	40%	2.08 ab	4.58	2.52 bc	5.26
	60%	1.96 ab	10.09	2.44 cd	8.27
	80%	1.92 b	11.92	2.36 de	11.28
	100%	1.90 b	12.84	2.32 e	12.78
G009	0%	2.28 a	0	2.66 a	0
	20%	2.14 ab	6.14	2.62 a	1.50
	40%	2.10 ab	7.89	2.52 b	5.26
	60%	2.06 ab	9.64	2.52 b	5.26
	80%	2.06 ab	9.64	2.46 bc	7.52
	100%	2.02 b	11.40	2.40 c	9.77
LK019	0%	2.74 a	0	2.70 a	0
	20%	2.62 b	4.37	2.64 a	2.22
	40%	2.54 bc	7.29	2.56 b	5.18
	60%	2.54 bc	7.29	2.56 b	5.18
	80%	2.52 c	8.00	2.56 b	5.18
	100%	2.50 c	8.70	2.52 b	6.67
LK022	0%	2.66 a	0	2.64 a	0
	20%	2.58 ab	3.00	2.62 ab	0.75
	40%	2.54 b	4.50	2.58 ab	1.51
	60%	2.54 b	4.50	2.58 ab	2.27
	80%	2.52 b	5.26	2.54 ab	3.78
	100%	2.50 b	6.01	2.50 b	6.06
TR001	0%	2.72 a	0	2.70 a	0
	20%	2.54 b	4.40	2.64 b	1.48
	40%	2.50 b	8.08	2.64 b	1.48
	60%	2.48 b	8.82	2.62 b	2.96
	80%	2.48 b	8.82	2.60 bc	3.70
	100%	2.48 b	8.82	2.56 c	5.19

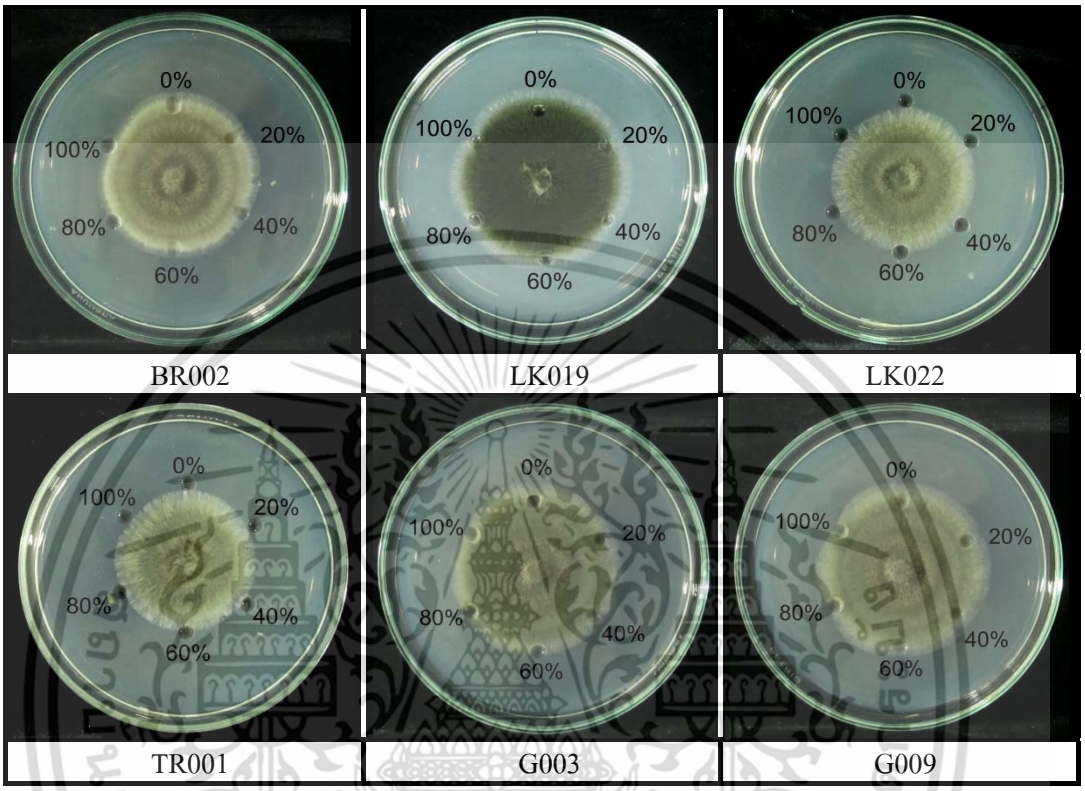
1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 การทดสอบอิทธิพลของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (6 ไอโซเลท) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ด้วยวิธี agar well diffusion test (DPI 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 การทดสอบอิทธิพลของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. (6 ไอโซเลท) ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ด้วยวิธี agar well diffusion test (DPI 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพ CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. พบว่า CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในทุกความเข้มข้นมีประสิทธิภาพสูงในการในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใย คือ หลังบ่มเชื้อเข้ากับ CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. นาน 26 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ CF จากทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้สูงถึงระดับ 89-95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.11) รวมทั้งพบความผิดปกติของสปอร์ ซึ่งผนังเซลล์ของสปอร์ถูกทำลายจนสูญเสียความสามารถในการงอกได้ (ภาพที่ 4.14)

สำหรับเชื้อรา *Alternaria* sp. นั้น CF สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้สูงเช่นกัน โดยสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมงหลังการบ่มเชื้อเข้ากับ CF มีความสามารถในการงอกได้ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 67-98 เปอร์เซ็นต์ และพบความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับสปอร์เช่นเดียวกัน โดยพบว่าเซลล์ของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. จะมีการโป่งพองออกและพบผนังเซลล์ของสปอร์ถูกทำลายด้วยเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4.12, ภาพที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia* sp.

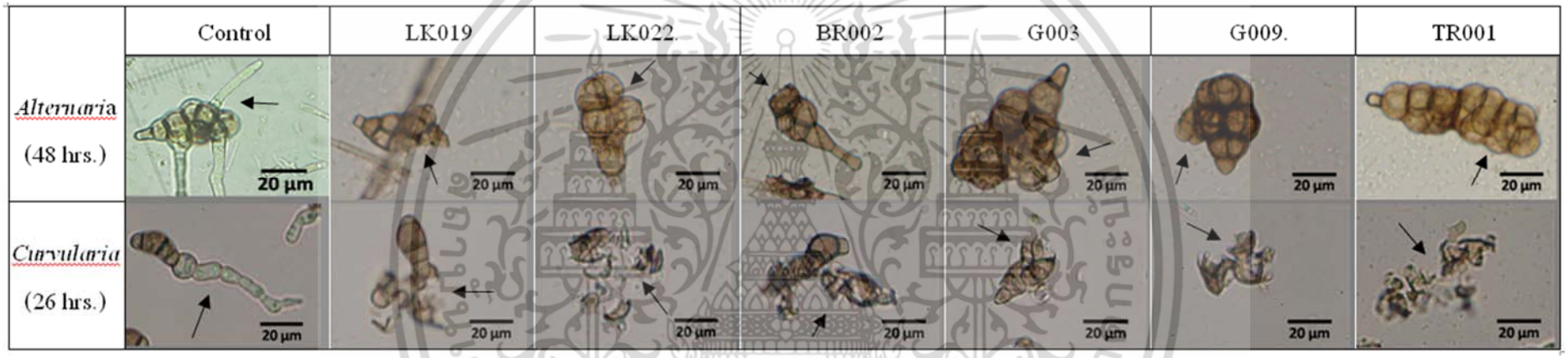
Treatment	CF (%)	Spore germination (%)				Inhibition (%)
		12 hrs.	26 hrs.	36 hrs.	48 hrs.	
Control	0	59.33	100	100	100	0
LK019	20	25	31	32	32	68
	40	14	16	16	16	84
	60	5	9	9	9	91
	80	2	7	7	7	93
	100	2	5	5	5	95
LK022	20	21	33	33	33	67
	40	9	19	19	19	81
	60	5	9	9	9	91
	80	6	7	7	7	93
	100	0	6	6	6	94
BR002	20	11	33	33	33	67
	40	8	10	10	10	90
	60	8	8	8	8	92
	80	4	8	8	8	92
	100	5	6	6	6	94
G003	20	8	29	29	29	71
	40	8	17	17	17	83
	60	7	14	14	14	86
	80	5	7	7	7	93
	100	4	6	6	6	94
G009	20	18	20	20	20	80
	40	9	13	13	13	87
	60	8	10	10	10	90
	80	8	8	8	8	92
	100	7	7	7	7	93
TR001	20	39	48	48	48	52
	40	23	22	22	22	72
	60	12	13	13	13	87
	80	11	13	13	13	87
	100	11	11	11	11	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp.

Treatment	CF (%)	Spore germination (%)				Inhibition (%)
		12 hrs.	26 hrs.	36 hrs.	48 hrs.	
Control	0	0	32	78	100	0
LK019	20	0	10	10	18	82
	40	0	2	5	7	93
	60	0	0	4	6	94
	80	0	0	4	6	94
	100	0	0	2	4	96
LK022	20	0	0	10	23	77
	40	0	0	8	11	89
	60	0	0	8	16	84
	80	0	0	7	8	92
	100	0	0	4	8	92
BR002	20	0	2	13	27	73
	40	0	0	12	16	84
	60	0	0	8	13	87
	80	0	0	5	9	91
	100	0	0	3	8	92
G003	20	0	1	8	8	92
	40	0	0	5	5	95
	60	0	0	6	6	94
	80	0	0	2	2	98
	100	0	0	2	2	98
G009	20	0	0	11	15	85
	40	0	0	10	11	89
	60	0	0	10	10	90
	80	0	0	7	7	93
	100	0	0	4	4	96
TR001	20	0	0	16	33	67
	40	0	0	14	27	73
	60	0	0	11	19	81
	80	0	0	9	18	82
	100	0	0	8	8	92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.14 ลักษณะความผิดปกติของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. หลังจากแช่ใน CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

4.2.5 Detached leaf test

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้จากการทดลองข้างต้น เพื่อยับยั้งการเกิดโรคใบจุดบนใบของผักสลัด butter head พบว่า การทดลองกับเชื้อรา *Alternaria* sp. CFจากไอโซเลท G003 ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ มีประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุด โดยสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการเกิดโรคในชุดการทดลองควบคุม และที่ความเข้มข้นของ CF 100 เปอร์เซ็นต์ เกิดโรคได้เพียง 40 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และมีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคได้เช่นเดียวกัน โดยที่ CF ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์จากไอโซเลท G003 สามารถเกิดโรคเพียง 16.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดการทดลองควบคุมเกิดโรคถึง 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ CF ที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท G003 ยังแสดงประสิทธิภาพยับยั้งการเกิดโรคใบจุดจากเชื้อรา *Cuvularia* sp. ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน โดยพบว่าเมื่อใช้ CF ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์เชื้อสามารถก่อโรคได้เพียง 40 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นยิ่งมีแนวโน้มในการลดการเกิดโรคที่ลดลง ซึ่งเชื้อสาเหตุสามารถก่อโรคได้เพียง 6.6 เปอร์เซ็นต์ และมีความรุนแรงของโรคเพียง 1.6 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งแสดงผลดีสอดคล้องกับการทดลองด้วยวิธี cellophane test และ agar well diffusion แต่ในไอโซเลท BR002 และ LK022 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ค่อนข้างต่ำ ซึ่งจากการทดลองฉีดพ่น CF ลงบนใบพืช พบว่า CF จาก BR002 และ LK022 ส่งผลให้เกิดอาการแผลจากกระบวนการ phytotoxicity สูง (ภาพที่ 4.15)

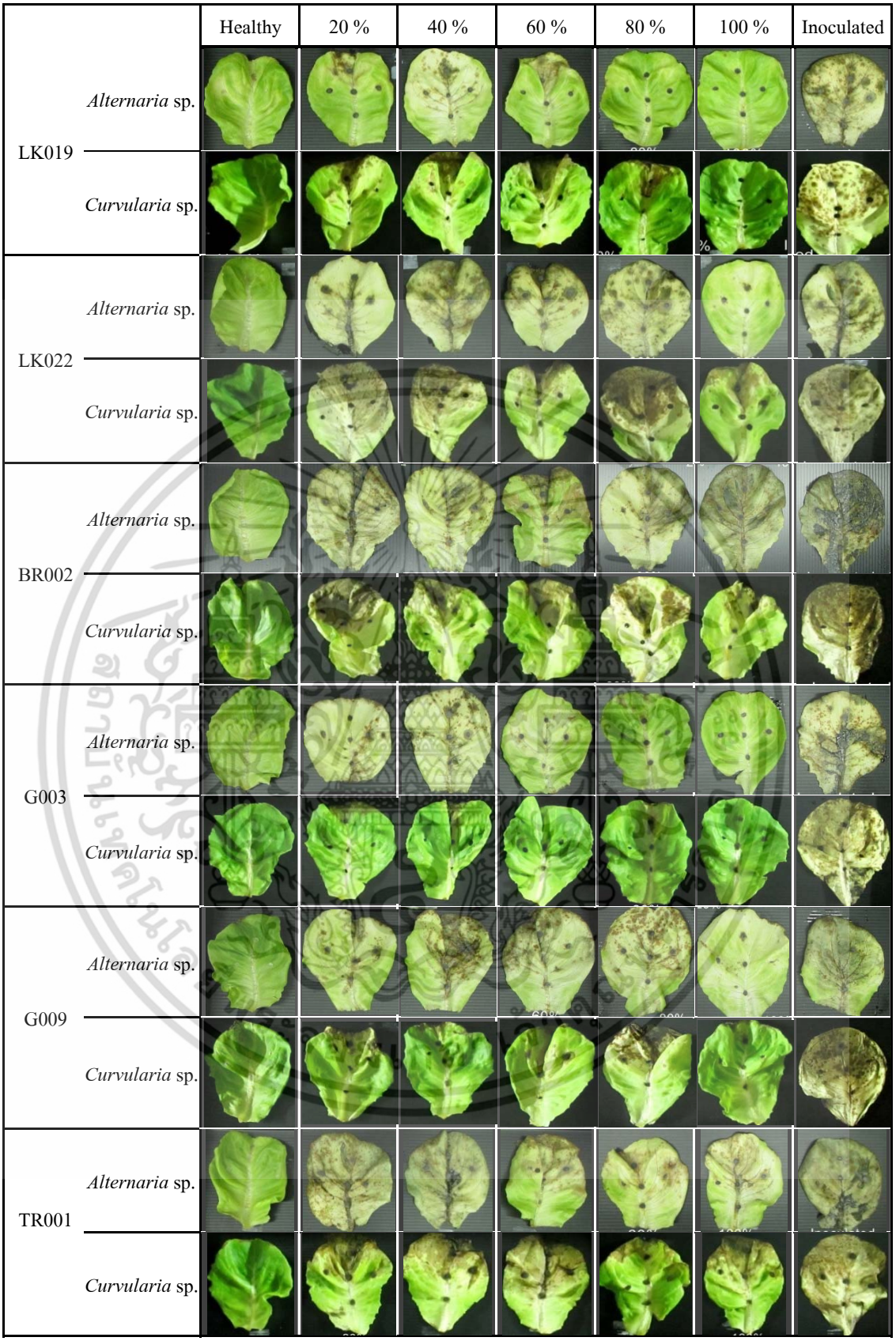
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. บนใบผักสลัดด้วยวิธีการ detached leaf test

Treatment	CF (%)	*Alternaria* sp. (DPI 4)		*Curvularia* sp. (DPI 6)	
		DI[1/] (%)	DS[2/] (%)	DI (%)	DS (%)
Healthy control	0	0	0	0	0
LK019	20	100	41.6	33.3	15.0
	40	80	25.0	33.3	15.0
	60	66.6	25.0	33.3	13.3
	80	53.3	13.3	33.3	11.6
	100	46.6	11.6	0	0
LK022	20	93.3	40.0	80.0	40.0
	40	93.3	45.0	73.3	38.3
	60	100	58.3	80.0	31.6
	80	100	85	66.6	33.3
	100	86.6	28.3	66.6	21.6
BR002	20	100	100	80.0	28.3
	40	100	100	66.6	26.6
	60	100	100	46.6	15.5
	80	100	100	53.3	20.0
	100	100	100	46.6	13.3
G003	20	86.6	65.0	40.0	11.6
	40	93.3	55.0	26.6	8.3
	60	73.3	50.0	13.3	3.3
	80	53.3	41.6	26.6	6.6
	100	40.0	16.6	6.6	1.6
G009	20	93.3	65.0	46.6	20.0
	40	93.3	51.6	26.6	8.3
	60	93.3	48.3	20.0	6.6
	80	93.3	46.6	46.6	15.0
	100	73.3	43.3	20.0	6.6
TR001	20	100	100	93.3	50.0
	40	100	100	93.3	51.6
	60	100	100	93.3	51.6
	80	100	100	73.3	33.3
	100	100	100	73.3	28.3
Inoculated control	0	100	100	100	100

1/ DI = Disease Incidence , 2/ DS = Disease Severity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

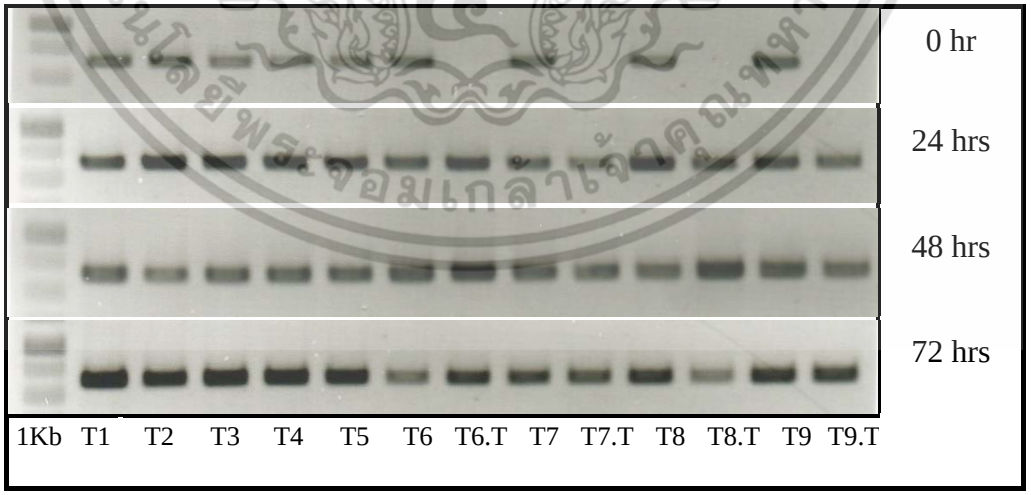


ภาพที่ 4.15 ลักษณะอาการแผลของโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. บนใบผักสลัดที่ได้รับการพ่นด้วย CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และตามด้วยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี detached leaf test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

ผลการปรับความเข้มข้น cDNA เริ่มต้นให้มีปริมาตรเท่ากันด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากเนื้อเยื่อของใบผักสลัดทุกระยะเวลาที่ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรค โดยที่ T1 = ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp., T2 = ตัวอย่างจากการปลูกเชื้อไอโซเลท LK019 ที่บริเวณรากของผักสลัด, T3 = ตัวอย่างจากการปลูกเชื้อไอโซเลท BR002 ที่บริเวณรากของผักสลัด, T4 = ตัวอย่างจากการปลูกเชื้อไอโซเลท G003 ที่บริเวณรากของผักสลัด, T5 = ตัวอย่างจากการปลูกเชื้อทางการค้าที่บริเวณรากของผักสลัด, T6-T6.T = ตัวอย่างจากการปลูกเชื้อไอโซเลท LK019 ที่บริเวณใบของผักสลัด, T7-T7.T = ตัวอย่างจากการปลูกเชื้อไอโซเลท BR002 ที่บริเวณใบของผักสลัด, T8-T8.T = ตัวอย่างจากการปลูกเชื้อไอโซเลท G003 ที่บริเวณใบของผักสลัด และ T-T9.T = ตัวอย่างจากการปลูกเชื้อทางการค้าที่บริเวณใบของผักสลัด ซึ่งการปลูกเชื้อที่ใบเก็บตัวอย่าง 2 แบบ คือ ใบที่ผ่านการปลูกเชื้อรา Trichosderma spp. (T6.T, T7.T, T8.T และ T9.T) และใบที่งอกใหม่หลังจากการปลูกเชื้อ (T6, T7, T8 และ T9) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน โดย *18S rRNA* เป็นยีนที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ซึ่งมีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในเนื้อเยื่อพืช ผลของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อปรับปริมาณเริ่มต้นของ cDNA พบว่า cDNA ดังกล่าวมีปริมาณเริ่มต้นใกล้เคียงกันในทุกๆ ตัวอย่าง โดยสังเกตจากความเข้มของแถบ cDNA ที่เกิดขึ้นมีความเข้มใกล้เคียงกัน

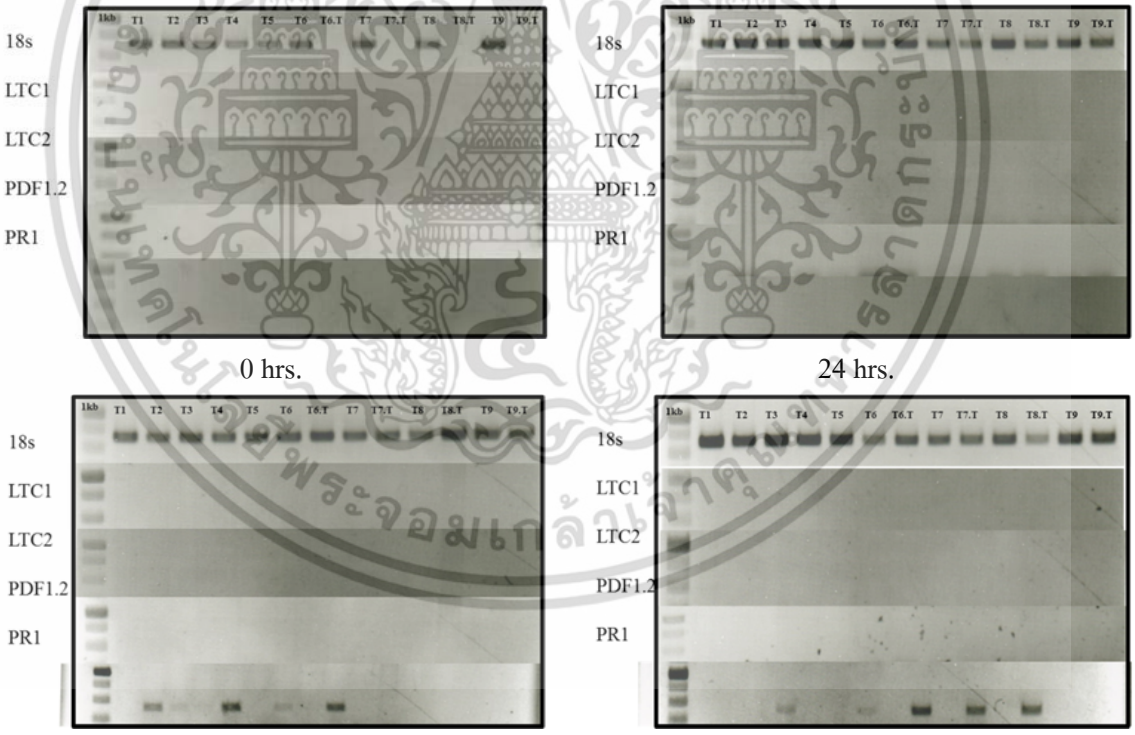


ภาพที่ 4.16 ผลการปรับความเข้มข้นของ cDNA เริ่มต้นของผักสลัดให้เท่ากันก่อนการประเมินการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ยีน *18S rRNA* เป็นยีนอ้างอิง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PR-1*

ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PR-1* ของผักสลัดที่ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่าผักสลัดมีการแสดงออกของยีน *PR-1* โดยมีการแสดงออกหลังจากทำการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. แล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยปริมาณการแสดงออกของยีน *PR-1* สามารถบ่งบอกได้จากขนาดและความเข้มของแถบ DNA ที่เกิดขึ้น โดยการกระตุ้นนี้จัดเป็นการกระตุ้นแบบ systemic resistance ซึ่งจะสังเกตได้จากเมื่อทำการปลูกเชื้อที่บริเวณรากของผักสลัดแต่พบการแสดงออกของยีนได้ที่ใบของผักสลัด (T2-T5) แต่การแสดงออกของยีนดังกล่าวสามารถคงอยู่ได้เพียงช่วงเวลาสั้นๆ เท่านั้น โดยจะพบว่าในชั่วโมงที่ 72 แถบของ DNA มีความเข้มที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เมื่อทำการปลูกเชื้อที่บริเวณใบของผักสลัดและทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนหลังจาก 48 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เช่นเดียวกันแต่มีปริมาณของยีนที่น้อยกว่าและมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้ในชั่วโมงที่ 72 สำหรับยีน *LTC-1, LTC-2* และ *PDF1.2* นั้น ไม่พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในผักสลัดเลย



ภาพที่ 4.17 ความเข้มของแถบ cDNA ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผักสลัดที่ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ primer ยีน *LTC1, LTC2, PDF1.2* และ *PR-1* เปรียบเทียบกับยีน *18S rRNA*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

สำหรับผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยทำการทดลองด้วยการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่บริเวณรากและใบของพืช โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้คัดแยกจากดิน คือ ไอโซเลท LK019 และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ คือ ไอโซเลท BR002 และ G003 ผลพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากทั้ง 2 แหล่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (inoculated control) ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท BR002 แสดงการยับยั้งได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.14) โดยในวันที่ 6 หลังจากการปลูกเชื้อ ผักสลัดมีขนาดแผลเท่ากับ 0.18 เซนติเมตรในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณราก และในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณใบพบว่าไม่เกิดแผลใบจุดกับผักสลัดเลย และเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีค่าอยู่ที่ระดับ 88.46 เปอร์เซ็นต์ในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณราก และยับยั้งได้สูงถึง 95.51 เปอร์เซ็นต์ในชุดการทดลองปลูกเชื้อที่ใบ นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท G003 มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงผลดีในการทดลองปลูกเชื้อที่ใบ โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 91.66 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท BR002 บริเวณใบของผักสลัด ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท LK019 ที่ได้จากดินแสดงประสิทธิภาพได้ไม่ดี (ภาพที่ 4.18)

สำหรับการเปรียบเทียบในด้านการเจริญเติบโตของพืชพบว่า *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทไม่สามารถส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (healthy control) ซึ่งเมื่อผักสลัดมีอายุได้ 35 วัน ผักสลัดสามารถเจริญเติบโตมีจำนวนใบโดยเฉลี่ยจำนวน 13-16 ใบ และเมื่อทำการชั่งน้ำหนักสดในวันเก็บผลผลิตพบว่า น้ำหนักสดของผักสลัดในชุดการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อโรค (inoculated control) ซึ่งมีน้ำหนักอยู่ที่ประมาณ 30 กรัม แต่ทั้งนี้น้ำหนักสดที่ได้นั้นน้อยกว่าในชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (healthy control) นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทางการค้าก็ไม่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ซึ่งน้ำหนักสดที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองในคอลัมน์เดียวกัน

สำหรับผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท BR002 ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดได้ดีในชุดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองด้วยการปลูกเชื้อบริเวณรากของผักสลัด โดยพบว่าเกิดแผลขนาด 0.42 เซนติเมตรเท่านั้น ซึ่งขนาดแผลที่ปรากฏมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (inoculated control) (ตารางที่ 4.15) แต่ในชุดการทดลองที่ทำการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ลงบริเวณใบของผักสลัด พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท G003 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีกว่า ซึ่งไม่พบอาการของแผลใบจุดเลย โดยสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบในด้านการเจริญเติบโตของพืช เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท G003 ไม่มีผลในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเช่นเดียวกัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (healthy control) (ภาพที่ 4.19) โดยการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. และเชื้อรา *Curvularia* sp. สาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่ เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้คัดแยกจากระบบไฮโดรโปนิกส์แสดงผลการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดได้ดีกว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกจากดิน ทั้งนี้ยังแสดงผลการยับยั้งได้ดีกว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทางการค้า

สำหรับผลการทดลองด้านการเจริญเติบโตของผักสลัดพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทไม่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนใบของผักสลัดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินก็แสดงประสิทธิภาพได้ไม่ดีทั้งในด้านจำนวนใบ ขนาดใบ และน้ำหนักสดหลังการเก็บเกี่ยว

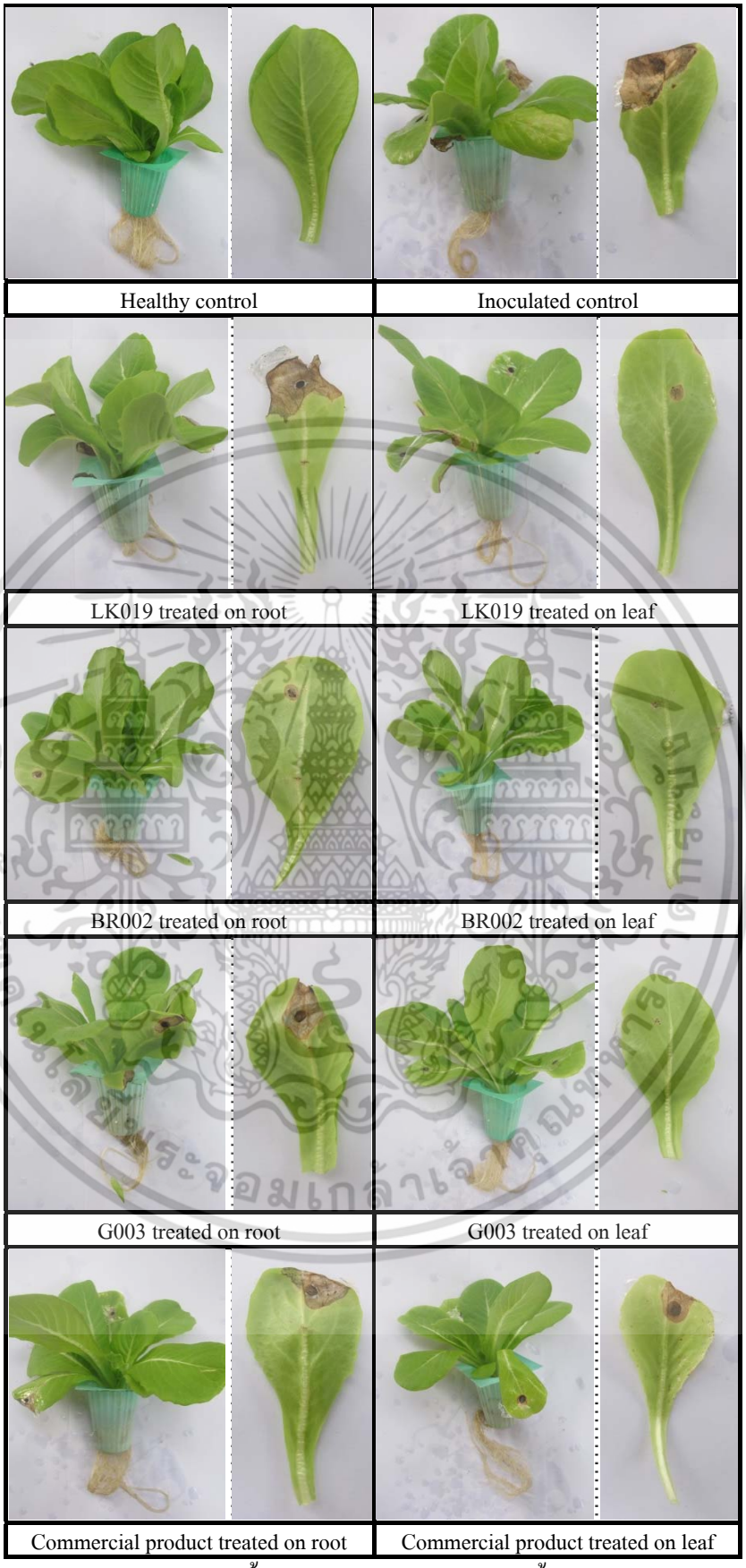
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

Treatment	Leaf lesion size (cm)			% DR[2/] (DPI6)	Plant growth									
					21 Days			28 Days			35 Days			
	DPI 2	DPI 4	DPI 6		Leaf number (No.)	Leaf size (cm)	Chlorophyll (SPAD)	Leaf number (No.)	Leaf size (cm)	Chlorophyll (SPAD)	Leaf number (No.)	Leaf size (cm)	Chlorophyll (SPAD v.)	Fresh wt. (g.) (Stem & Root)
Healthy Control	0.00b[1/]	0.00c	0.00e	100	9.16a	10.95b	62.90a	11.16a	22.05a	31.11a	16.16ab	47.18a	30.90a	38.51a
Inoculated Control	0.20a	0.47a	1.56a	0	8.33abc	10.62b	28.53b	9.66ab	15.00bc	29.96a	15.16ab	36.28b	29.71a	32.86abc
Treated on Root														
LK019	0.07ab	0.24abc	1.26ab	19.23	7.83cd	12.92ab	27.11b	10.83ab	15.46bc	29.35a	16.00ab	40.98ab	28.98a	32.60abc
BR002	0.05ab	0.12bc	0.18de	88.46	8.33abc	13.39ab	24.01b	10.83ab	16.02b	30.25a	15.66ab	40.49ab	28.91a	30.65bc
G003	0.11ab	0.48a	0.60cd	61.53	9.00bc	12.52ab	27.31b	10.16ab	16.42b	30.15a	16.66A	37.27b	28.53a	36.01ab
Com. product	0.05ab	0.24abc	0.69cd	55.76	8.00bcd	10.55b	27.66b	10.16ab	14.04bc	29.45a	14.83ab	39.26b	28.05a	30.86bc
Treated on Leaf														
LK019	0.05ab	0.14bc	0.23de	85.25	7.00d	11.53ab	27.10b	10.33ab	12.65bc	28.88a	13.50b	35.75b	28.11a	29.43bc
BR002	0.00b	0.03c	0.07e	95.51	7.33cd	11.74ab	26.80b	10.16ab	14.78bc	28.43a	15.00ab	37.87b	27.70a	27.85c
G003	0.04ab	0.08bc	0.13de	91.66	7.83cd	14.42a	25.08b	10.66ab	16.96b	30.48a	15.50ab	40.36ab	29.86a	32.31abc
Com. product	0.02ab	0.39ab	0.82bc	47.43	7.66cd	10.54b	23.73b	8.66b	11.43c	30.21a	14.66ab	34.50b	29.90a	28.08c

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

2/ %DR = Disease reduction over control



ภาพที่ 4.18 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ยับยั้งการเกิดโรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

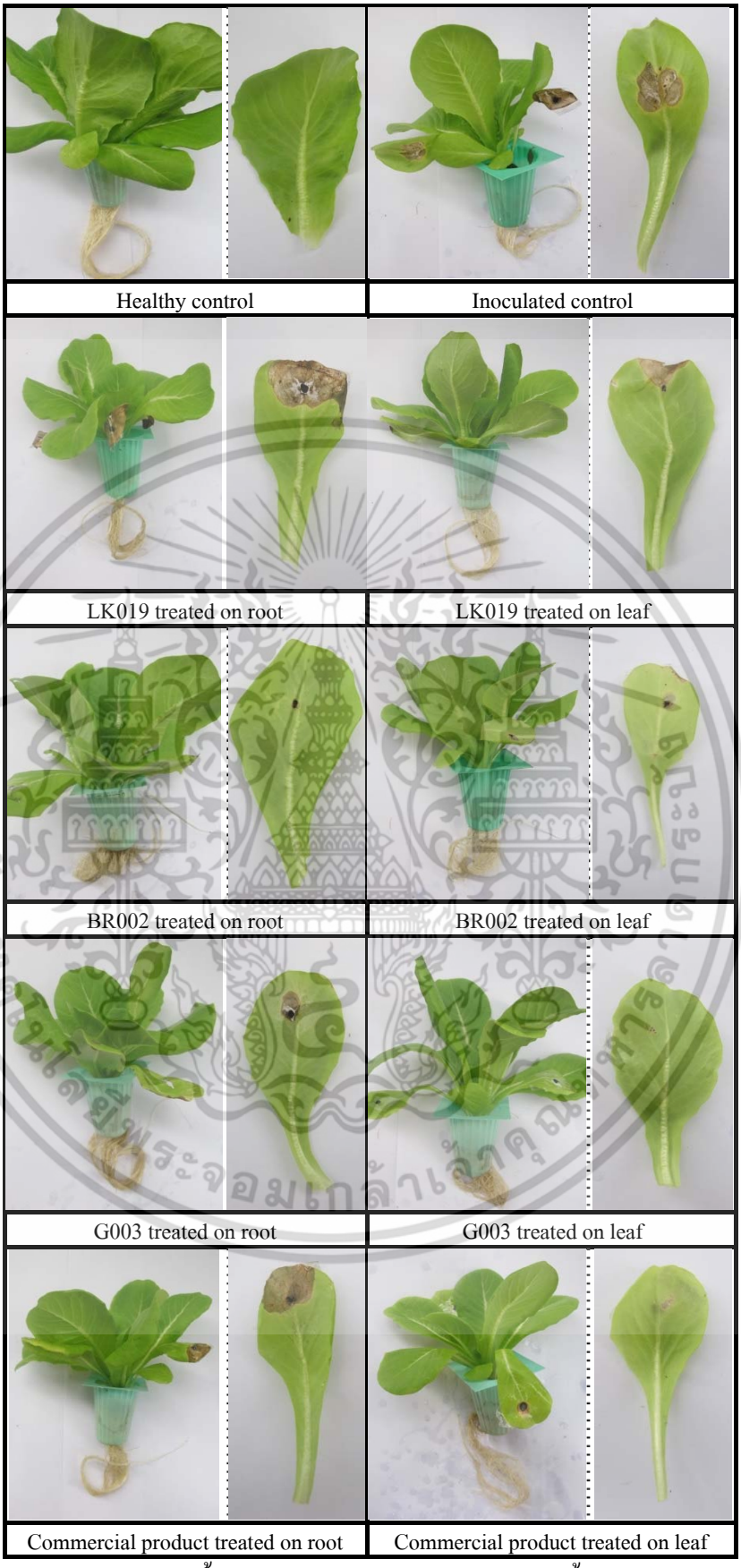
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดที่กิดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

Treatment	Leaf lesion size (cm)			% DR[2/] (DPI 6)	Plant growth									
					21 Days			28 Days			35 Days			
	DPI 2	DPI 4	DPI 6		Leaf number (No.)	Leaf size (cm)	Chlorophyll (SPAD)	Leaf number (No.)	Leaf size (cm)	Chlorophyll (SPAD)	Leaf number (No.)	Leaf size (cm)	Chlorophyll (SPAD v.)	Fresh wt. (g) (Stem & Root)
Healthy Control	0.00c	0.00b	0.00c	100	8.00ab	8.00ab	28.35ab	11.16a	11.16a	34.1a	16.66a	56.55a	33.83a	44.21a
Inoculated Control	0.14bc	0.84a	1.19a	100	7.66ab	7.66ab	28.36ab	11.16a	11.16a	31.28b	15.83a	44.70bc	30.90abc	36.56bc
Treated on Root														
LK019	0.43a	0.86a	1.36a	0	8.33a	8.33a	28.48ab	9.50bc	9.50bc	30.55b	14.83a	47.66b	31.21abc	34.36bc
BR002	0.13bc	0.39ab	0.42bc	64.70	7.83ab	7.83ab	28.05ab	10.66abc	10.66abc	31.53b	15.83a	44.68bc	30.78abc	37.51bc
G003	0.33ab	0.50ab	0.59bc	50.42	7.83ab	7.83ab	29.85a	9.83abc	9.83abc	30.41b	16.16a	45.70bc	28.41c	37.81b
Com. product	0.07bc	0.14b	1.18a	0.84	7.50ab	7.50ab	26.35abc	11.00ab	11.00ab	30.98b	15.50a	46.91bc	31.40abc	36.05bc
Treated on Leaf														
LK019	0.15bc	0.25b	0.77ab	35.29	7.66ab	7.66ab	22.76cd	9.50bc	9.50bc	29.71b	14.83a	46.9bc	30.63bc	32.65bc
BR002	0.01c	0.13b	0.13c	89.07	7.83ab	7.83ab	24.88bcd	9.83abc	9.83abc	30.86b	15.00a	38.41cd	32.33ab	35.70bc
G003	0.00c	0.00b	0.00c	100	7.50ab	7.50ab	23.03cd	10.83abc	10.83abc	31.38b	15.83a	40.50bcd	31.08abc	33.86bc
Com. product	0.01c	0.19b	0.34bc	71.42	7.16b	7.16ab	22.20d	9.33c	9.33c	31.46b	15.50a	33.33d	30.18bc	30.38c

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ค่า $P < 0.05$ (DMRT)

2/ %DR = Disease reduction over control



ภาพที่ 4.19 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในสภาพห้องปฏิบัติการ

5.1.1 Dual culture test

จากเชื้อรา *Trichoderma* spp 15 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากดินธรรมชาติ สารละลายธาตุอาหาร และรากผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ มาทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี dual culture test พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดทั้ง 3 ชนิดได้ โดยเริ่มสังเกตุเห็นกลไกแบบ antibiosis ในวันที่ 2 หลังจากบ่มเชื้อเป็นลักษณะแถบบริเวณแคบๆ ซึ่งแถบดังกล่าวเป็นผลมาจาก non-volatile metabolite ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างขึ้น ซึ่งกลไกแบบ antibiosis นี้ จะถูกบดบังด้วยกลไก competition อย่างรวดเร็ว โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 3 ยิ่งไปกว่านั้นยังพบกลไก exploitation โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 11 ไอโซเลทสามารถเจริญเป็น parasite เข้าทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้ แต่มีเพียง 1 ไอโซเลท คือ TR002 ที่เข้าทำลายแบบพันรัดเส้นใย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของวาริน และคณะ (2550) ที่พบว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* มีประสิทธิภาพในการเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ได้ 52.50 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือ กลไกหลักในการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. คือกลไก competition และ exploitation และจากรายงานการศึกษาของ Souna *et al*. (2012) ที่ได้ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* เชื้อสาเหตุโรคในต้นปาล์ม โดยการศึกษาด้วยวิธี dual culture test พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ถึง 65 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อทำการทดลองในสภาพแปลงปลูกก็ยังแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อโรคได้

สำหรับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่อเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด ที่ประเมินในวันที่ 13 พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลท มีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วง 60-73 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ BR002 และ G003 จากการทดลองครั้งนี้พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินอยู่ในช่วง 60-65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของอรรถกร และคณะ (2551) ที่รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินขุยไผ่จำนวน 65 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ได้ 21-60 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ถึง 69 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าไอโซเลทที่แยกได้จากดิน

5.1.2 Inverted petriplate test

สำหรับการทดสอบการผลิตสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *Alternaria* sp., *Curvularia* sp. และ *Cercospora* sp. โดยวิธี inverted petriplate test พบว่า *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทสามารถสร้างสารระเหยได้ และมีผลทำให้โคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด เจริญช้าลงในวันที่ 1-4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม แต่อย่างไรก็ตามถ้าประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในวันที่ 4 จะพบว่าการยับยั้งโดยกลไกนี้มีศักยภาพค่อนข้างต่ำ กล่าวคือ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 3-25 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kamala and Indira (2011) ที่ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. จากดินจำนวน 20 ไอโซเลท พบเพียง 4 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถสร้างสารระเหยและส่งผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้ และจากรายงานผลการทดลองของ Eziashi *et al*. (2006) พบว่า เชื้อ *T. viride, T. polysporum, T. hamatum* และ *T. aureoviride* มีประสิทธิภาพในการสร้างสารระเหยและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Ceratocystis paradoxa* ได้ อยู่ในช่วง 2-64 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ผลการทดลองของ Ratnakumari *et al*. (2011) แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* ที่ได้จากดินจำนวน 12 ไอโซเลทไม่มีความสามารถในการสร้างสารระเหยได้

5.1.3 Cellophane test

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผ่านการแยกเชื้อจากดินและในระบบไฮโดรโปนิกส์ทั้ง 15 ไอโซเลท ในการสร้างสารไม่ระเหย ด้วยวิธี cellophane test เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อบนแผ่น cellophane เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลตมีความสามารถสร้างสารเพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้ โดยสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *Curvularia* sp. ได้ตั้งแต่ 15-55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ผลที่ดีกว่าการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยในเชื้อ *Alternaria* sp. ที่ยับยั้งได้เพียง 2-39 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอไซเลท LK022 มีความสามารถดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราทั้งสองได้สูงที่สุดเท่ากับ 39.01 และ 55.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Siddiquee *et al*. (2009) ที่คัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* (18 ไอโซเลท) จากดินและทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคเน่าในต้นปาล์ม พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ที่เจริญบนแผ่น cellophane สามารถสร้างสารซึมผ่านแผ่น cellophane ได้เช่นกัน และสารดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อรา *G. Boninense* ได้ที่ระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

40.16 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้สูงตั้งแต่ 87-100 เปอร์เซ็นต์ด้วย (Jeyaseelan *et al*., 2012, Abdollahi *et al*., 2012)

5.1.4 Culture filtrate test

จากการทดสอบประสิทธิภาพ CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใย จากการทดสอบประสิทธิภาพของ CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้ผลดีจากวิธีการ cellophane test โดยคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท คือ BR002, G003, G009, LK019, LK022 และ TR001 โดยทดลองด้วยวิธีการ agar well diffusion พบว่า CF ที่ได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้น้อยกว่าการทดลองใน cellophane test ซึ่งความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นแสดงผลการยับยั้งได้ดีที่สุดใน *Trichoderma* spp. ทุกๆ ไอโซเลท โดยไอโซเลต G003 สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุดคือ 12.84 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลท BR002 ยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุดคือ 15.03 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าผลการยับยั้งในไอโซเลท G003 และ BR002 สอดคล้องกับการทดลองด้วยวิธี cellophane test แต่น่าแปลกใจที่ผลในไอโซเลท LK022 ไม่แสดงผลดีในการทดลองด้วยวิธีการ agar well diffusion โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้อยู่ในระดับเพียง 0-6 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งต่ำกว่าในการทดลองด้วยวิธี cellophane test อาจเป็นผลมาจากในวันแรกที่ทำการใส่สาร เชื้อรา และ CF ไม่ได้สัมผัสกันโดยตรงและต้องใช้เวลาระยะหนึ่งที่เชื้อจะเจริญถึงระยะการแพร่กระจายของ CF เมื่อบันทึกผลรัศมีการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราจึงเพิ่มตามไปด้วย ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งที่น้อย ซึ่งแตกต่างกับผลการทดลองของ Mishra *et. al*. (2011) ที่ได้ศึกษาผลของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* (Tr8) ด้วยวิธีการ poisoned food technique (ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์) โดยที่ความเข้มข้นของ CF เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Rhizoctonia solani, Sclerotium rolfsii, Macrophomina phaseolina* และ *Colletotrichum capsici* ได้ถึง 28-33 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับผลการทดลองของ Imtiaj and Lee (2008) ที่ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ *Alternaria porri* ได้สูงถึง 71 เปอร์เซ็นต์ และ Mishra *et al.* (2011) รายงานว่า CF จากเชื้อรา *T. viride* ไอโซเลท Tr8 ที่ความเข้มข้นสารเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *R. solani*, *S. rolfsii*, *M. phaseolina* และ *C. capsici* ได้เท่ากับ 61.5, 58.32, 63.45 และ 62.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

และจากการทดสอบประสิทธิภาพ CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ ของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. พบว่า CF ในทุกความเข้มข้นมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าในการทดสอบด้วยวิธีการ agar well diffusion กล่าวคือ ที่ระยะเวลา 26 ชั่วโมงหลังบ่มเชื้อกับ CF ของทุกไอโซเลทที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Curvularia* sp. ได้สูงถึง 89-95 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งตรวจพบความผิดปกติของสปอร์ซึ่งผนังเซลล์ของสปอร์ถูกทำลายจนสูญเสียความสามารถในการงอกได้ สำหรับการยับยั้งสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงหลังการบ่มกับ CF สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้สูงเช่นกันที่ระดับ 67-98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Imtiaj and Lee (2008) ที่สารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* สามารถยับยั้งการงอกของเชื้อรา *A. porri* ได้ที่ระดับ 55-88 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งเชื้อรา *A. brassicae* และ *A. brassicicola* ได้ที่ระดับ 24-72 เปอร์เซ็นต์ (Reshu and Mohd, 2012) โดยเป็นที่ทราบกันดีว่าผนังเซลล์ของเชื้อรามีองค์ประกอบที่สำคัญคือ ไคติน และ กลูเคน ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase, β-1, 3-glucanase และ β-1, 4-glucanase เพื่อย่อยองค์ประกอบดังกล่าวในกระบวนการเข้าทำลายแบบ mycoparasite ได้ สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้หลายชนิดเช่น *S. Sclerotiorum* และ *Crinipellis perniciosa* (Marco and Felix, 2007, Matroudi *et al*., 2009) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ซึ่งมีส่วนช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* เข้าทำลายเชื้อรา *Rizoctonia solani* ได้ (Padmaja *et al*., 2013)

5.1.5 Detached leaf test

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคบนใบผักสลัด พบว่า สารที่ได้จากไอโซเลท LK019 และ G003 ที่ความเข้มข้น 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 0-53 เปอร์เซ็นต์ และพบอาการของโรคใบจุดรุนแรงที่ระดับ 0-41 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลดีสอดคล้องกับผลการทดลองด้วยวิธีการ cellophane test และ agar well diffusion แต่ในไอโซเลต BR002 และ LK022 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ค่อนข้างต่ำ ซึ่งจากการทดลองด้วยการฉีดพ่น CF ลงบนผิวพืช พบว่า CF จาก BR002 และ LK022 เกิดอาการแผลจากกระบวนการ phytotoxicity สูง แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Sahile *et al*. (2011) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของ *Trichoderma* ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของถั่วที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis fabae* พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคใบจุดได้ที่ 43-47 เปอร์เซ็นต์

5.2 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *PR-1* ของผักสลัดที่ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่าผักสลัดมีการแสดงออกของยีน *PR-1* ได้ โดยมีการแสดงออกหลังจากทำการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. แล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการกระตุ้นนี้จัดเป็นการกระตุ้นแบบ systemic resistance ซึ่งจะสังเกตได้เมื่อทำการปลูกเชื้อที่บริเวณรากของผักสลัดแต่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแสดงออกของยีนได้ที่ใบของผักสลัด (T2-T5) แต่การแสดงออกของยีนดังกล่าวสามารถคงอยู่ได้เพียงช่วงเวลาสั้นๆ เท่านั้น โดยจะพบว่าในชั่วโมงที่ 72 แถบของ DNA มีความเข้มที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Gallou *et al.* (2008) ที่ศึกษาความสามารถในการชักนำให้มันฝรั่งเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *R. solani* การทดลองพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถชักนำให้พืชเกิดการแสดงออกของยีน *PR-1* ได้ในชั่วโมงที่ 48 หลังการปลูกเชื้อ ในขณะที่เมื่อทำการปลูกเชื้อที่บริเวณใบของผักสลัดและทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนหลังจาก 48 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เช่นเดียวกันแต่มีปริมาณของยีนที่น้อยกว่าและมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้ในชั่วโมงที่ 72 หลังการกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Trichderma* spp

5.3 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

สำหรับผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยทำการทดลองโดยปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่บริเวณรากและใบของพืช และเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท LK019 ที่ได้คัดแยกจากดิน และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท BR002 และ G003 ที่ได้จากการคัดแยกจากระบบไฮโดรโปนิกส์ พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากทั้ง 2 แหล่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (inoculated control) ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท BR002 มีประสิทธิภาพยับยั้งได้ดีที่สุด โดยในวันที่ 6 หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค พบผักสลัดมีขนาดแผลเท่ากับ 0.18 เซนติเมตรในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณราก และพบว่าไม่เกิดแผลใบจุดกับผักสลัดเลยในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณใบ และเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีค่าอยู่ที่ระดับ 88.46 เปอร์เซ็นต์ ในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณราก และยับยั้งได้สูงถึง 95.51 เปอร์เซ็นต์ในชุดการทดลองปลูกเชื้อที่ใบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Saksirirat *et al.* (2009) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อชักนำให้ต้นมะเขือเทศเกิดความต้านทางต่อโรคใบจุดสีเทา โดยการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ลงในดินสำหรับปลูก พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถชักนำให้มะเขือเทศเกิดความต้านทานต่อเชื้อ *Xanthomonas campestis* ได้ โดยมีปริมาณของแผลลดลงได้ดีถึง 69.32 เปอร์เซ็นต์ และลดปริมาณของแผลจากเชื้อ *Stemphylium solani* ได้ที่ 19.23 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการทดลองนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท G003 มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดเช่นเดียวกัน โดยแสดงผลดีในการทดลองปลูกเชื้อที่ใบ มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 91.66 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท BR002 บริเวณใบของผักสลัด ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท LK019 ที่ได้จากดินแสดงประสิทธิภาพได้ไม่ดี พบว่าผลไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาของ สุมิสา และ วีระศักดิ์ (2556) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อชักนาให้แตงเทศมีความต้านทานต่อโรคต้นแตกยางไหล (gummy stem blight disease) ของแตงเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm. โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดิน ผสมกับดินสาหรับปลูกแตงเทศก่อนปลูกเชื้อรา *D. bryoniae* นอกจากมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแล้ว เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นให้ต้นแตงเทศต้านทานต่อโรคต้นแตก ยางไหล และทาให้การเกิดโรคลดลงได้ดังนั้นหากต้องการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. กับใบของผักสลัด อาจต้องฉีดพ่นร่วมกับสารเสริมประสิทธิภาพด้วย ซึ่งจากผลการศึกษาของ Samuelian (2016) ที่ผสมกากน้ำตาลปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ในวัสดุสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* และนำไปฉีดพ่นต้นกล้วยส่งผลให้เชื้อรา *Trichoderma* สามารถอยู่รอดในสภาพแปลงปลูกได้

สำหรับผลการส่งเสริมการเจริญของผักสลัดนั้น เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทแสดงประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Celar *et al.* (2005) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium roseum* ในการกระตุ้นการงอกของพืชตระกูลผักและข้าวโพด พบว่า CF จากเชื้อรา *G. roseum* ไม่สามารถส่งผลในการเพิ่มการงอกของพืชได้ ทั้งนี้ CF จากเชื้อรา *T. koningii* ก็แสดงผลในทางลบต่อการงอกของต้นหอม ผักชีคคอรี่ และผักสลัด และ CF จากเชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. viride* ไม่สามารถส่งเสริมการงอกของต้นหอมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ CF จากเชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. harzianum* สามารถกระตุ้นการงอกของหัวบีทมะเขือเทศได้ แต่ไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

6.1 ผลการแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด

ผลการคัดแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.ที่ได้ทำการคัดแยกเชื้อราจากหลายๆ แหล่ง เช่น ดินธรรมชาติ สารละลายธาตุอาหารและรากของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ สามารถคัดแยกได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมดจำนวน 15 ไอโซเลท โดยที่แยกได้จากดินมีจำนวน 9 ไอโซเลท คือ LK001, LK006, LK010, LK011, LK012, LK014, LK017, LK019 และ LK022 และที่แยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีจำนวนทั้งหมด 6 ไอโซเลทคือ BR002, G003, G009, TR001, TR002 และ TR003

สำหรับผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดโดยลักษณะอาการของโรคใบจุดที่พบในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์เป็นแบบ necrosis พบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดกับผักสลัด butter head 3 ชนิดคือ เชื้อรา *Alternaria* sp., *Curvularia* sp. และ *Cercospora* sp.

6.2 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในห้องสภาพห้องปฏิบัติการ

สำหรับผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในห้องสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการ dual culture test พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดทั้ง 3 ชนิดได้ โดยผลการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลอง พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. อยู่ที่ระดับ 49 - 73 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 60-69 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น โดยไอโซเลทที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท LK014 ที่คัดแยกได้จากดินซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 73.56 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. เมื่อทำการบ่มเชื้อจนเชื้อรา *Curvularia* sp. ในชุดการทดลองควบคุมเจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 11 พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. ในชุดการทดลองมีขนาดเพียง 2-4 เซนติเมตรเท่านั้น เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 45-68 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 61-67 เปอร์เซ็นต์ โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท LK019 ที่คัดแยกได้จากดิน ทั้งนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ต่ำสุดก็เป็นไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินเช่นเดียวกัน คือ ไอโซเลท LK022 และเชื้อราที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ดีที่สุด คือไอโซเลท BR002 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 67.33 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับความสามารถในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cercospora* sp. ได้สูง โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 65-70 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท LK006 ซึ่งสามารถยับยั้งได้ 70.96 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 69-70 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน ทั้งนี้ไอโซเลทที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุดคือไอโซเลท LK006 ที่คัดแยกได้จากดิน และไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำที่สุดคือ ไอโซเลท LK022 ซึ่งคัดแยกได้จากดินเช่นเดียวกัน โดยจะสังเกตได้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินจะมีความหลากหลายมากกว่าไอโซเลทที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มาก และเมื่อทำการศึกษาด้านกลไกการยับยั้งนั้นจะพบกลไกการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิดแบบ antibiosis ได้ตั้งแต่วันที่ 1-2 ของการทดลอง ซึ่งจะสังเกตได้ว่าในขณะที่เชื้อราทั้งสองชนิดยังไม่เจริญสัมผัสกันแต่โคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคกลับมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กกว่าชุดการทดลองควบคุม ซึ่งผลนี้อาจเกิดจากการสร้างสารระเหยหรือไม่ระเหยก็ได้ หลังจากนั้นพบกลไกการเข้าทำลายแบบ competition คือเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทสามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อนำเส้นใยบริเวณที่เชื้อราทั้งสองสัมผัสกัน มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีกลไกการเข้าทำลายแบบ exploitation ด้วยเช่นเดียวกัน

สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดทั้ง 3 ชนิด พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลท สามารถสร้างสารระเหยและส่งผลในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้ตั้งแต่วันที่ 1 ของการทดลองแต่สามารถยับยั้งได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยผลในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีในชุดการทดลองมีขนาดโคโลนีที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม เมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 7-18 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ระดับ 10-18 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกัน โดยไอโซเลทที่สามารถสร้างสาระเหยและส่งผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลท TR002 ซึ่งคัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยสารระเหยจากเชื้อราที่แยกได้จากดินสามารถสร้างความผิดปกติกับเชื้อรา *Alternaria* spp. ได้เพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้น คือ ไอโซเลท LK019 และ LK022 ในขณะที่สารระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเชื้อราที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์สามารถสร้างความผิกปกติกับเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ถึง 5 ไอโซเลท คือ BR002, G003, G009, TR001 และ TR002 สำหรับผลการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้ที่ระดับ 3-18 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่เชื้อราที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดร-โปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 5-25 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุดคือ BR002 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้ถึง 25.31 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลท LK001 ที่คัดแยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำที่สุดคือ 3.69 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ทั้งนี้สังเกตเห็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับโคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. ในขณะที่ไม่พบความผิดปกติใดๆ เกิดขึ้นกับโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เลย เมื่อเปรียบเทียบกับโคโลนีในชุดการทดลองควบคุม และประสิทธิภาพของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* sp. ได้เพียงเล็กน้อย โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 8-13 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในขณะที่เชื้อราที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 8-16 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ดีที่สุดคือเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ยับยั้งได้ 16.12 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยวิธีการ cellophane test ซึ่งเป็นการศึกษาถึงความสามารถในการผลิตสารไม่ระเหยเพื่อยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทมีความสามารถสร้างสารไม่ระเหยลงสู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อและส่งผลยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ โดยผลในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. พบโคโลนีของเชื้อมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม และเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งพบสารแบบไม่ระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดินนั้นส่วนมากมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ต่ำระดับ 0.45-27 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น โดยพบเพียงไอโซเลท LK022 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูงที่สุดคือ 39.01 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 22-26 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการทดสอบสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อรา *Curvularia* sp. พบว่าสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่คัดแยกได้จากดินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Cuvularia* sp. ได้ที่ระดับ 15-55 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ระดับ 40-52 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าเชื้อราที่แยกได้จากดินจะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่หลากหลายมากกว่าเชื้อราที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดคือ ไอโซเลท LK022 ที่คัดแยกได้จากดิน มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 55.13 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดสอบสารไม่ระเหยจากไอโซเลท LK022 มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอดคล้องกับการทดสอบกับเชื้อรา *Alternaria* sp. คือ กลไกหลักของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท LK022 คือกลไก แบบ antibiosis และเมื่อสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Curvularia* sp. เปรียบเทียบกับโคโลนีในชุดการทดลองควบคุมพบว่าเกิดความผิดปกติกับโคโลนีเชื้อรา *Curvularia* sp. เช่นเดียวกัน

สำหรับการศึกษาสารไม่ระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยการใช้ CF เพื่อหาว่าความเข้มข้นต่ำสุดใดที่สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ ซึ่งผลการทดลองพบว่า CF ที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้น้อยกว่าการทดลองใน cellophane test ซึ่ง CF ของทุกไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์แสดงผลการยับยั้งได้ดีที่สุด โดยการทดสอบ CF กับเชื้อรา *Alternaria* sp. CF จากไอโซเลท G003 สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุดคือ 12.84 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลท BR002 ยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุดคือ 15.03 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของไอโซเลท G003 และ BR002 สอดคล้องกับการทดลองด้วยวิธี cellophane test และสำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพ CF ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. พบว่า CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในทุกความเข้มข้นมีประสิทธิภาพสูงในการในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด ได้ดีกว่าในการทดสอบด้วยวิธีการ agar well diffusion ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์นั้น เป็นการทดลองโดยการผสมสปอร์เข้ากับ CF ทำให้สปอร์ต้องสัมผัสกับสารโดยตรง

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของ CF จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดบนใบของผักสลัด butter head พบว่า ในการทดลองกับเชื้อรา *Alternaria* sp. สาร CF ที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท G003 ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้ดีที่สุด โดย CF ที่ได้สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการเกิดโรคในชุดการทดลองควบคุม และยังแสดงประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคได้เช่นเดียวกัน โดยที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์มีความรุนแรงของโรคเพียง 16.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดการทดลองควบคุมมีความรุนแรงของโรคถึง 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ CF ที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท G003 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. ได้ดีที่สุดเช่นเดียวกัน โดยพบว่า CF ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นการเกิดโรคได้เพียง 40 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นยิ่งมีแนวโน้มในการลดการเกิดโรคได้ ซึ่งที่ความเข้มข้นของ CF 100 เปอร์เซ็นต์ เกิดโรคเพียง 6.6 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งความรุนแรงของโรคก็เกิดขึ้นเพียง 1.6 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.3 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

ผลการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนของผักสลัดที่ผ่านการกระตุ้นการแสดงออกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่าผักสลัดมีการแสดงออกของยีน *PR-1* ได้ โดยมีการแสดงออกหลังจากทำการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. แล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยปริมาณการแสดงออกของยีน *PR-1* สามารถบ่งบอกได้จากความเข้มของแถบ DNA ที่เกิดขึ้น โดยการกระตุ้นนี้จัดเป็นการกระตุ้นแบบ systemic resistance ซึ่งจะสังเกตได้จากเมื่อปลูกเชื้อที่บริเวณรากของผักสลัดแต่พบการแสดงออกของยีนได้ที่ใบของผักสลัด แต่การแสดงออกของยีนดังกล่าวสามารถคงอยู่ได้เพียงช่วงเวลาสั้นๆ เท่านั้น โดยจะพบว่าในชั่วโมงที่ 72 แถบของ DNA มีความเข้มที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เมื่อทำการปลูกเชื้อที่บริเวณใบของผักสลัดและทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนหลังจาก 48 ชั่วโมง พบว่ามีการแสดงออกของยีน *PR-1* เช่นเดียวกันแต่มีปริมาณของยีนที่น้อยกว่าและมีปริมาณเพิ่มขึ้นได้ในชั่วโมงที่ 72 สำหรับยีน *LTC-1, LTC-2* และ *PDF1.2* นั้น ไม่พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในผักสลัดเลย

6.4 ผลการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

สำหรับผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* sp. ของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยทำการทดลองด้วยการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่บริเวณรากและใบของผักสลัด พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากทั้ง 2 แหล่ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (inoculated control) โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท BR002 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด โดยโรคใบจุดที่เกิดมีขนาดแผลเท่ากับ 0.05 เซนติเมตรในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณราก และพบว่าไม่เกิดแผลใบจุดกับผักสลัดเลยในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณใบ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีค่าอยู่ที่ระดับ 76 เปอร์เซ็นต์ในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อบริเวณราก และยับยั้งได้ 90 เปอร์เซ็นต์ในชุดการทดลองที่ปลูกเชื้อที่ใบ ทั้งนี้ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน ด้วยการปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท BR002 บริเวณใบของผักสลัด ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท LK019 ที่ได้จากดินแสดงประสิทธิภาพได้ไม่ดี แต่เมื่อเปรียบเทียบในด้านการเจริญเติบโตของพืชพบว่า *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทไม่สามารถส่งเสริมให้พืชมีการเจริญเติบโตได้แตกต่างจากชุดทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (healthy control) สำหรับผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. ของผัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท G003 สามารถยับยั้งการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดได้ดีที่สุด ในการปลูกเชื้อบริเวณใบของผักสลัด โดยพบว่าไม่เกิดแผลจากโรคใบจุดเลย ซึ่งผลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม สำหรับผลการทดลองในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในชุดการทดลองไม่สามารถส่งเสริมให้ผักสลัดมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ซึ่งรวมถึงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทางการค้า ก็ไม่สามารถส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตได้แตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้น จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในรูปแบบต่างๆ โดยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินและที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ พบว่า เชื้อรา *Trichoderm*a spp. ที่คัดแยกได้จากดินจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดได้ค่อนข้างแปรปรวนมากกว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากดิน ในแต่ละไอโซเลทจะมีกลไกหลักในการเข้าทำลายเพียงอย่างเดียวเท่านั้น ในขณะมี่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้จากระบบไฮโดรโปนิกส์จะมีกลไกการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรคได้หลากหลายมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม กลไกหลักที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. จากทั้งสองแหล่งมีประสิทธิภาพที่เท่าเทียมกัน คือกลไกการเข้าทำลายแบบ competition คือการเจริญทางเส้นใยเพื่อแย่งสารอาหารหรือครอบครองพื้นที่เจริญได้อย่างรวดเร็วนั้นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538. การผลิตและการประยุกต์ใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช. หน้า 151-167 ใน: สมคิด ดิสถาพร, (ผู้รวบรวม). การประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการ "เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช" Application of Microbial in Plant Pest Management. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

ดิเรก ทองอร่าม. 2546. **การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน: หลักการจัดการการผลิตและเทคโนโลยีการผลิตเชิงธุรกิจในประเทศไทย**. ซีเอ็ดยูเคชั่น. กรุงเทพฯ. 724 หน้า

นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ. หน้า 129-159. ใน: **สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน** โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. กรุงเทพฯ.

ณัฐพงษ์ นวลดี, พรประพา คงตระกูล, วรรษมน บุญยิ่ง และสรัญยา ณ ลำปาง. 2553. ลักษณะของเชื้อรา *Cercospora* ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดหอมในจังหวัดเชียงใหม่. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น** 1053-1060.

ภานุมาศ นาคเจือทอง, สุมิตรา ใจซื่อ, ชนิตสรา งามศักดิ์ประเสริฐ และภารดี ช่วยบำรุง. 2011. ปริมาณคาร์เบนดาซิมในผลผลิตการเกษตรและการกำจัดด้วยปฏิกิริยาโฟโตคะตะไลสิส. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น** 16(5): 454-467.

วาริน อินทนา, มนตรี อิสรไกรศิล, ศุภลักษณ์ เศรษฐสกุลชัย, ประคอง เย็นจิตต์ และทักษิณ สุวรรณโน. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาซิเอนั่ม สายพันธุ์กลายในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการลดปริมาณเชื้อราไฟทอพทอร่า พาล์มมิโวร่าในสวนทุเรียน. **วิทยาสารกำแพงแสน** 5(3): 1-9.

สุมิสา อรุณโน และวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2556. การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นความต้านทาน โรคต้นแตกยางไหลในแตงเทศ. **แก่นเกษตร** 41(2): 135-142.

สุวิตา แสไพศาล, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และพัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์. 2544. การชักนำให้มะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคใบจุดเป้ากระสุนโดยเชื้อ *Trichoderma* spp. และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น** 16(3): 261-270.

อัฐภรณ์ พันยา, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, ศิวิลัย สิริมังครารัตน์, พัฒนา ชมภูวิเศษ และสุวิตา แสไพศาล. 2558. การทดสอบใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมกระตุ้นการเจริญเติบโตและความต้านทานโรคในต้นกล้ายูคาลิปตัส. **แก่นเกษตร** 43(1): 182-188.

อรรถกร พรมวี สมชาย ชคตระการ และจิระเดช แจ่มสว่าง. 2551. การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. หลายสายพันธุ์ร่วมกันในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของปอโมโรเฮยะ. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 39(3): 282-285.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อรพรรณ วิเศษสังข์. 2552. **คู่มือการเลือกใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช**. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 142 หน้า

Abdullahi, M., Ommati, F. and Zaker, M. 2012. The *in vitro* efficacy of *Trichoderma* isolates against *Pythium aphanidermatum* , the causal agent of sugar beet root rot. **Journal of Research in Agricultural Science** 8(1): 79-87.

Benoit, F. 1992. **Practical guide for simple soilless culture techniques**. European Vegetable R&D Center. Sint-Katelijne-water, elgium 77 pp.

Celar F. and Valic N. 2005. Effects of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum* culture filtrateson seed germination of vegetables and maize. **Journal of Plant Diseases and Protection** 112(4): 343-350.

Klein, D., and Eveleigh, D.E. 1998. Ecology of *Trichoderma.* Pages 57-74 in: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. C. P. Kubicek and G. E. Harman, eds. Taylor & Francis, London

Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. **African Journal of Biotechnology** 5(9): 703-706.

French, R.D. and Schultz, D. 2011. ***Alternaria* leaf spot of cabbage**. [online]. Available: http://sickcrops.tamu.edu (July 13, 2016)

Gallian, J.L. 2000. *Cercospora* leaf spot of sugar beet : identification and control. **Pacific Northwest Extension Publications** 519 pp.

Gallou, A., Cranenbrouck, S. and Declerck, S. 2008. *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. **European Journal of Plant Pathology** 124(2): 219-230.

Hanada, R.E., Pomella, A.W.V., Soberanis, W., Loguercio, L.L. and Pereira, J.O. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. **Biological Control** 50: 143-149.

Hibar, K., Daami-Remadi, M., and El Mahjoub, M. 2007. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Trichoderma* spp. **Tunisian Journal of Plant Protection** 2: 47-58.

Houessou, J.H.H., Beed, F., Sikirou, R. and Ezin, V. 2011. First report of *Cercospora beticola* on lettuce (*Lactuca sativa*) in Benin. **New Disease Report** 23: 16-17.

Imtiaj, A. and Lee, T. 2008. Antagonistic effect of tree *Trichoderma* species on the *Alternaria porri* pathogen of onion blotch. **World Journal of Agricultural Sciences** 4(1): 13-17.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ishita, A., Ralph, K. and Atle, M.B. 2011. Phtytoalexins in defense against pathogens. **Plant Science** 17: 1360-1385.

Jeandet, P., Hébrard, C., Deville, M.A., Cordelier, S., Dorey, S., Aziz, A. and Crouzet, J. 2014. Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. **Molecules** 19: 18033-18056.

Jeyaseelan, E.C., Tharmila, S. and Niranjan, K. 2012. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp. against *Pythium aphanidermatum* isolated from tomato damping off. **Archives of Applied Science Research** 4(4): 1623-1627.

Kuncharek, T. 2000. *Alternaria* leaf spot of cucurbits. **Plant Pathology Fact Sheet** 32pp.

Koohakan, P., Jaenaksorn, T. and Nuntagij, I. 2008. Major disease of lettuce grown by commercial nutrient film technique in Thailand. **KMITL Sciences Technology Journal** 8(2): 56-63.

Kamala, T. and Indira, S. 2011. Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. **Biotechnology Journal** 1: 217-225.

Liu, J.B., Gilardi, G., Gullino, M.L. and Garibaldi, A. 2009. Effectiveness of *Trichoderma* spp. obtained from re-used soilless substrates against *Pythium ultimum* on cucumber seedlings. **Journal of Plant Diseases and Protection** 116(4): 156-163.

Marco, J.L. and Felix, C.R. 2007. Purification and characterization of a β-glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50(1): 21-29.

Matroudi, S., Zamani, M.R. and Motallebi, M. 2009. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, thecausal agent of canola stem rot. **Egyptian Journal of Biology** 11: 37-44.

Meirelles, G.B., Duarte, G.L. and Moraes, M.G. 2013. Analysis of gene expression in tomato plants inoculated with *Trichoderma harzianum* during induced systemic resistance to *Alternaria alternata*. **Sociedade Brasileira de Genética** 4: 15-15.

Mert-Türk, F. 2002. Phytoalexins: Defence or just a response to stress?. **Journal of Cell and Molecular Biology** 1: 1-6.

Mishra, B.K., Mishra, R.K., Mishra, R.C., Tiwari, A.K., Yadav, R.S. and Dikshit, A. 2011. Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L. **Archives of Applied Science Research** 3(2): 361-369.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Monte, E. and Llobell, A. 2003. *Trichoderma* in organic agriculture. **World Avocado Congress Proceedings** 725-733.

Ozbay, N., Newman, S.E. and Brown, W.M. 2004. Evaluation of *Trichoderma harzianum* strains to control crown and root rot of greenhouse fresh market tomatoes. **International Society for Horticultural Science** 79-85.

Padmaja, M., Swathi, J., Narendra, K., Sowjanya, K.M., Babu, P.J., Satya, A.K. 2013. *Trichoderma* sp. as a microbial antagonist againt *Rhizoctonia solani*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 5(4): 322-325.

Rabeendran, N. Moot, D.J., Jones, E.E. and Stewart, A. 2000. Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolate. **New Zealand Plant Protection** 53: 143-146.

Ranasingh, N., Saurabh, A. and Nedunchezhiyan, M. 2006. Use of *Trichoderma* in disease management. **Orissa Review** 68-70.

Ratnakumari, Y. R., Nagamani, A., Bhramaramba, S., kumar, R.S., Kumar, U.C. and Shaik, M. 2011. Non-volatile and volatile metabolites of antagonistic *Trichoderma* against collar rot pathogen of *Mentha arvensis*. **International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research** 2(2): 56-58.

Reshu, M.K. and Mohd, M.K. 2012. Role of different microbial–origin bioactive antifungal compounds agent *Alternaria* spp. causing left blight of Mustard. **Plant Pathology Journal** 11(1): 1-9.

Saksirirat, W., Chareerak, P. and Bunyatrachata, W. 2009. Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray leaf spot in tomatoes. **Asian Journal of Food and Agro-Industry** Special Issue: 99-104.

Siddiquee, S., Yusuf, U.K., Hossain, K. and Jahan, S. 2009. *In vitro* studies on the potential *Trichoderma harzianum* for antagonistic properties against *Ganoderma boninense*. **Journal of Food, Agriculture & Environment** 7(3-4): 970–976.

Sahile, S., Sakhuja, P.K., Fininsa, C. and Ahmed, S. 2011. Potential antagonistic fungal species from Ethiopia for biological control of chocolate spot disease of fafa bean. **African Crop Science Journal** 19(3): 213-225.

Samuelian, S. 2016. Potential of *Trichoderma harzianum* for control of banana leaf fungal pathogens when applied with a food source and an organic adjuvant. **Biotechnology** 6(8): 7-11.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sharma, P., Singh, N. and Verma, O.P. 2011. First report of *Curvularia lunata* associated with leaf spot of *Amaranthus spinosus*. **Asian Journal of Plant Pathology** 5(2): 100-101.

Souna, F., Himri I., Benabbas, R. Fethi, F., Chaib, C., Bouakka, M. and Hakkou, A. 2012. Evaluation of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol agent against vascular fusariosis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** 6(5): 105-114.

Tancic, S., Skrobonja, J., lalosevic, M., Jevtic, R. and Vidic, M. 2013. Impact of *Trichoderma* spp. on soybean seed germination and potential antagonistic effect on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticides and Phytomedicine** 28(3): 181-185.

Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I. and Miersch, O. 2006. The wound responce in tomato - Role of jasmonic acid. **Jounal of Plant Physiology** 163: 297-306.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย และอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียมสารละลาย

1.1 50X TAE buffer (Tris-acetate) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tris-borate	242	กรัม
Acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH8)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	700	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันและปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที Acetic acid เป็นกรดเข้มข้น ควรใส่ถุงมือกันกรด และเตรียมภายในตู้ดูดควัน

1.2 10X loading buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

0.25 %	Bromophenol blue
30 %	Glycerol
60 mM	EDTA

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Ethidium bromide ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตรให้เข้ากัน เก็บสารละลายในขวดแก้วทึบแสง Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ควรใส่ถุงมือในการเตรียม

1.4 Hydroponics nutrient solution (Benoit, 1992)

Stock solution A ปริมาตร 10 ลิตร

$CaNO_3$	670	กรัม
KNO_3	296	กรัม
Fe-EDDHA	50	กรัม

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ลิตร หลีกเลี่ยงการโดนแสง และเก็บในที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stock solution B ปริมาตร 10 ลิตร

KNO_3	296	กรัม
KH_2PO_4	177	กรัม
$MgSO_4$	160	กรัม
Microelements: NICK SPRAY	30	กรัม

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 10 ลิตร หลีกเลี่ยงการโดนแสง และเก็บในที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 Water agar

Agar powder	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมรวมกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 Potato dextrose agar

Potato	200	กรัม
Agar powder	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่น นำน้ำมันฝรั่งที่ได้ผสมกับผงวุ้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	มาลาตี ประดับญาติ
วัน เดือน ปีเกิด	9 สิงหาคม พ.ศ. 2531
ที่อยู่ปัจจุบัน	5/5 หมู่ 4 ตำบลบึงคอไห อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12150
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERODCHE)
ผลงานทางวิชาการ	มาลาตี ประดับญาติ นงลักษณ์ เภรินทวงค์ และณิมนันต์ เจนอักษร. 2556. “การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพห้องปฏิบัติการของ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์”. หน้า 52-57. ใน การประชุมวิชาการครั้งที่ 6 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้