

การประเมินศักยภาพของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B)
ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัด
ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

ASSESSMENT OF ANTAGONISTIC ACTIVITY AND PLANT GROWTH
PROMOTING ABILITY OF NON-PATHOGENIC *FUSARIUM OXYSPORUM*
(F221-B) IN LETTUCE GROWN IN HYDROPONICS



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคำหลักสูตรปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AG-D-064-009

การประเมินศักยภาพของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B)

ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัด
ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

Assessment of antagonistic activity and plant growth promoting ability
of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B)
in lettuce grown in hydroponics



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

สาขาวิชา เกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AG-D-064-009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประเมินศักยภาพของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B)
ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัด
ที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์

Assessment of antagonistic activity and plant growth promoting ability
of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B)
in lettuce grown in hydroponics



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2016-AG-D-064-009

**ASSESSMENT OF ANTAGONISTIC ACTIVITY AND PLANT GROWTH
PROMOTING ABILITY OF NON-PATHOGENIC *FUSARIUM OXYSPORUM*
(F221-B) IN LETTUCE GROWN IN HYDROPONICS**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY PROGRAM IN AGICULTURE
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2016

KMITL-2016-AG-D-064-009

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 การประเมินศักยภาพของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์
Assessment of antagonistic activity and plant growth promoting ability of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) in lettuce grown in hydroponics

นักศึกษา นายริติ ทองคำงาม
รหัสประจำตัว 57604007
ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชา เกษตรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ถนิมฉันทน์ เจนอักษร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อำมร อินทร์สังข์		
รศ.ดร.ทรงยศ ต้นพิพัฒน์		
รศ.ดร.ถนิมฉันทน์ เจนอักษร		
ผศ.ดร.กัญจนา แซ่เตียว		
ผศ.ดร.ธีรวัฒน์ ศรุตโยภาส		

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 20 กันยายน 2559

สถานที่สอบ ห้องประชุมคณะเทคโนโลยีการเกษตร 2 (ชั้น 1 ตึกบุญนาถ L)

คณบดีรับรองแล้ว



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล แก่นมณี)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 28 เดือน กันยายน พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินศักยภาพของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์
ชื่อนักศึกษา	นาย ธิติ ทองคำงาม
รหัสประจำตัว	57604007
ปริญญา	ปรัชญาคุษุบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการผลิตพืช
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เน้นการใช้ประโยชน์ของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักสลัด (*Lactuca sativa* L.) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยมีวัตถุประสงค์หลัก ดังนี้ 1) เพื่อประเมินวิธีการเก็บรักษาเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* สายพันธุ์ F221-B ที่เพิ่งค้นพบใหม่ให้สามารถใช้ประโยชน์ได้เป็นระยะเวลานาน 2) เพื่อประเมินคุณสมบัติทั่วไปในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของ non-pathogenic F221-B ต่อเชื้อราหลายๆ ชนิดที่เป็นสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโปนิกส์ 3) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic F221-B ในรูปแบบ culture filtrate 4) เพื่อศึกษาลักษณะการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา F221-B 5) เพื่อตรวจสอบปริมาณการสร้าง gibberellin (GA) ของเชื้อ non-pathogenic F221-B และผลต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด และ 6) เพื่อประเมินคุณสมบัติโดยรวมของเชื้อ non-pathogenic F221-B ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังต่อไปนี้

ส่วนที่ 1 การศึกษาครั้งนี้เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ให้ยังคงมีชีวิตอยู่และมีคุณสมบัติไม่เปลี่ยนแปลงเป็นระยะเวลานาน เพื่อให้สามารถใช้ทดสอบได้ตลอดเวลา จากวิธีการเก็บรักษาเชื้อแบบ modified filter paper culture แล้วประเมินความอยู่รอด และคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในระหว่างการเก็บรักษาเชื้อ 24 เดือน โดยได้ทำการดัดแปลงเทคนิค Filter paper culture ใน 2 ประเด็น คือ ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อลงบนกระดาษกรองและการทำให้กระดาษกรองแห้ง ซึ่งขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อมี 4 กรรมวิธี คือ 1) วางชิ้นวุ้นเชื้อ 1 ชิ้นคว่ำหน้าลงตรงกลางจานอาหาร PDA ที่ไม่มีกระดาษกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Control) 2) วางชิ้นวุ้นเชื้อ 1 ชิ้นคว่ำหน้าลงตรงกลางกระดาษกรองขนาด 70 มิลลิเมตร 3) วางชิ้นวุ้นเชื้อ 5 ชิ้นคว่ำหน้าลงบนอาหาร PDA ห่างจากขอบกระดาษกรอง (ขนาด 70 มิลลิเมตร) เพียงเล็กน้อย 4) วางชิ้นวุ้นเชื้อ 6 ชิ้นคว่ำหน้าลงบนอาหาร PDA ห่างจากขอบกระดาษกรอง (ขนาด 70 มิลลิเมตร) เพียงเล็กน้อย ต่อจากนั้นทำการตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อบนกระดาษกรอง โดยตัดแผ่นกระดาษกรองออกเป็นชิ้นเล็กๆ จำนวน 5 ชิ้น นำไปวางบนอาหาร PDA บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 10 วัน พบว่าการเก็บรักษาเชื้อโดยใช้ชั้นตอนการเลี้ยงเชื้อบนกระดาษกรอง ทั้ง 4 กรรมวิธี ส่งผลให้เชื้อ F 221-B มีชีวิตรอดอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์และไม่มีการปนเปื้อน อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่วางชิ้นวุ้นเชื้อ 6 ชิ้นคว่ำหน้าลงบนอาหาร PDA ห่างจากขอบกระดาษกรอง เหมาะสมที่สุดต่อการเลี้ยงเชื้อ F221-B ในครั้งนี้ เพราะตรวจพบการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์มากที่สุด ส่วนขั้นตอนการทำให้กระดาษกรองแห้ง โดยนำกระดาษกรองไปลงในโถดูดความชื้นที่มี silica gel อยู่ที่ก้นของโถดูดความชื้น แต่ไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (non-vacuum dessicator) พบว่าใช้ได้ โดยมีประสิทธิภาพเพียงพอในการเก็บรักษาเชื้อ F 221-B และไม่มีการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ สำหรับการเก็บรักษาเชื้อในระยะเวลา 24 เดือน โดยวิธี modified filter paper culture ซึ่งทำการประเมินผลถึงความอยู่รอด ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ และการประเมินคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ (Biocontrol agent: BCA) และความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant growth promoting fungus: PGPF) ในทุกเดือน ผลการทดลองพบว่าหลังจากเก็บรักษาเชื้อ 24 เดือน เชื้อรา F221-B ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา หลังจากนั้นได้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ขนาดเส้นใยหลักอยู่ในช่วง 110-121x2.2-2.6 μm ขนาดปลายเส้นใยเท่ากับ 82.04-94.04x3.2-3.5 μm ส่วนขนาดของ macro conidia เท่ากับ 28.23-29.85x3.0-3.5 μm ส่วนการทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของ F221-B ในระหว่างการเก็บรักษาได้ทดสอบด้วยวิธีการ dual-culture พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Curvularia* sp. อยู่ในช่วง 45-47 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *Fusarium* sp. 29-45 เปอร์เซ็นต์ และพบการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในเชื้อรา *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 39-59 และ 33-37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับในเชื้อรา *Colletotrichum* sp. พบว่าในช่วง 6 เดือนแรกถูกยับยั้งมากที่สุดถึง 60 เปอร์เซ็นต์และเพิ่มขึ้นถึง 80 เปอร์เซ็นต์ในช่วงเดือนหลัง ในขณะที่เดียวกันจากการทดสอบ โดยวิธี agar well diffusion assay (ที่ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ของ Culture filtrate) พบว่า F221-B สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ระหว่าง 30-37 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของเมล็ดผักสลัด 2 พันธุ์ (Cos และ Red oak) ด้วย spore suspension ของเชื้อรา F221-B ความเข้มข้น (10^3 และ 10^6 spore/ml) พบว่าเมล็ดผักสลัดที่ปลูกเชื้อออกเร็วกว่าเมล็ดที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ 2 วัน ส่งผลทำให้ความเร็วในการงอกและความสูงของต้นกล้ามากกว่าการไม่ปลูกด้วยเชื้อ F221-B โดยสรุปหลังจากการเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลา 24 เดือน พบว่าการเก็บรักษาด้วยวิธี modified filter paper เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด โดยทำ

ให้เชื้อ F221-B มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชก็ไม่มีเปลี่ยนแปลง

ส่วนที่ 2 การประเมินศักยภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของ non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 10 ชนิด คือ *Curvularia lunata* (C11,12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia solani* (R11, R12), *Rhizoctonia* sp. (R111, R112, R113) ในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยวิธีการทดลอง dual-culture test บนอาหาร Potato dextrose (PDA) พบว่าเชื้อรา non-pathogen *F. oxysporum* (F221-B) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลทได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 36-56.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลไกการยับยั้งในช่วง 3 วันแรกพบกลไก antibiosis ซึ่งจะสังเกตเห็นขนาดของ clear zone แยกๆ หลังจากนั้นก็จะถูกปกคลุมด้วยกลไก competition ในเวลาต่อมา ในขณะที่เดียวกันพบความผิดปกติของเส้นใยและสปอร์ในบริเวณที่เชื่อมสัมผัสกัน ซึ่งน่าจะมีผลมาจากสารที่ไม่ระเหย และจากการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา F221-B ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) ในระบบไฮโดรโปนิกส์ พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อ F221-B สามารถลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 60-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรค ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัด Butter head, Cos และ Red oak ได้ โดยในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ F221-B (ไม่ใส่เชื้อสาเหตุโรค) ผักสลัดมีน้ำหนักสูงเป็น 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมโดยสรุปคือ F221-B มีความสามารถในการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักสลัด

ส่วนที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในสภาพห้องปฏิบัติการและการควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* ในระบบไฮโดรโปนิกส์ จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของ CF ของเชื้อ F221-B สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคทั้งหมดได้ 39 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ยิ่งไปกว่านั้น CF ทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในเชื้อรา F113, F221-R และ F422-G และความเข้มข้น 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Curvularia lunata* (C11, C12) ได้ดีที่สุด ในขณะที่เดียวกันพบความผิดปกติของสปอร์ เช่น เกิดการพองบวม และสลายตัวของสปอร์ เป็นต้น ส่วนการควบคุมโรครากเน่าในระบบไฮโดรโปนิกส์ ผลการทดลองเป็นที่น่าแปลกใจว่า เชื้อรา F221-B สามารถลดความรุนแรงของโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้มากกว่ากรรมวิธีที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตามในกรรมวิธีที่ใช้ Culture filtrate และ Spore suspension ของเชื้อรา F221-B ให้ผลในด้านการเจริญของผักสลัดไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนที่ 4 การศึกษาการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R และ F422-G) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองต่อเนื่องดังนี้ การทดสอบในรากผักสลัด Cos (*Lactuca sativa* L.) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ การทดสอบในกาบใบของกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* var. *chinesis*) และการทดสอบกับผักสลัด Cos, Frillice iceberg และ Rocket โดยประเมินการเข้าครอบครองแบบ epiphytic colonization และ endophytic colonization รวมไปถึงประเมินประชากรของเชื้อราในสารละลายธาตุอาหารพืช โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้กล้อง scanning electron microscope (SEM) และกล้องจุลทรรศน์พร้อมทั้งถ่ายภาพในทุกขั้นตอนของการศึกษา เพื่อบันทึกลักษณะการเข้าครอบครองในพืช พบว่าเชื้อรา F221-B สามารถเข้าครอบครองรากหลังการปลูกเชื้อได้ โดยพบการเข้าครอบครองแบบ epiphytic colonization ในสัปดาห์ที่ 1 และ 3 เท่ากับ 28.5 และ 54 CFU/ml และแบบ endophytic colonization เท่ากับ 60 และ 76 CFU/ml ไม่พบการเกิดโรค ส่วนการปลูกเชื้อใส่ F221-R และ F422-G ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรค พบการเข้าครอบครองรากพืชแบบ epiphytic colonization เพียงเท่านั้น สำหรับการทดลองในกาบใบของกวางตุ้งทำการตรวจสอบการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืช โดยดูจากภาพลักษณะอาการของแผล (top view), ภาพการตัดขวางเนื้อเยื่อพืช (cross-sectional view) และจากการลอกเนื้อเยื่อในชั้น epidermis ออก (top-view) ซึ่งจะบันทึกรายละเอียดต่างๆ เพื่อใช้ในการประเมินการเข้าครอบครองพืช ในการประเมินด้วยกล้อง SEM ถึงการเข้าครอบครองพืช ทั้ง epiphytic และ endophytic colonization ของเชื้อรา non-pathogenic F221-B ในรากผักสลัด 3 สายพันธุ์

ส่วนที่ 5 การทดลองในส่วนนี้จะแบ่งการทดลองย่อยออกเป็นหลายๆ การทดลอง เพื่อประเมินความสามารถของเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ในการผลิต gibberellins (GA) ในการทดลองแรก จะทำการประเมินความสามารถในการผลิต GA ของเชื้อรา non-pathogenic F221-B และเชื้อราสาเหตุโรคในอาหารที่บรรจุใน flask โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) หลังจากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณของ GA ซึ่งประเมินจากส่วนของเส้นใยและ CF ของเชื้อรา F221-B หลังจากการเลี้ยงเชื้อใน 3 ช่วงระยะเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุใน flask โดยทำการประเมินด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) และในการทดสอบ Crude extract ที่ได้จาก Culture filtrate ของเชื้อ F221-B ที่ 4 ความเข้มข้น (1, 3, 5 และ 10 ppm) ต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของผักสลัด Butter head และ Frillice iceberg ในระบบไฮโดรโปนิกส์ ผลการทดลองโดยวิธี TLC และ HPLC สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อรา F221-B และเชื้อราสาเหตุโรค (F221-R) สามารถผลิต GA ได้ โดยพบว่าปริมาณของ GA ในแต่ละชนิดเชื้อ และในแต่ละส่วนของ Crude extract (เส้นใยและ Culture filtrate) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนใน 30 วันหลังการบ่มเชื้อ พบ GA ในส่วนของ Culture filtrate มีปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่าในส่วนของเส้นใย โดยในเชื้อ F221-B มีปริมาณเท่ากับ 10.38 mg/l และ F221-R เท่ากับ 11.8 mg/l สำหรับผลการทดสอบอภิทธิพลของสาร GA ต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด พบว่าใน Crude extract ความเข้มข้น 3 และ 5 ppm ไม่ว่าจะใส่ในช่วงแรกตั้งแต่ปลูกเมล็ด หรือทั้งปลูกเมล็ด และฉีดพ่นเพิ่ม สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักสลัดในด้านของ จำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์และ น้ำหนักสด ไม่แตกต่างกันในผักสลัดทดสอบทั้ง 2 สายพันธุ์

ส่วนที่ 6 การทดลองในส่วนนี้ จะทำการประเมินความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B ในระบบไฮโดรโปนิคส์ โดยการใช้เชื้อ 3 รูปแบบ คือ spore suspension (SP), culture filtrate (CF) และ crude extract (CE) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และกรรมวิธีปลูกเชื้อในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวในผักสลัด 3 สายพันธุ์ คือ Butter head, Cos และ Frillice iceberg โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 3 ต้น ผลการทดลองพบว่า การใส่รูปแบบของเชื้อ F221-B ทั้ง 3 รูปแบบ สามารถลดเปอร์เซ็นต์ การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคในผักสลัดทั้ง 3 สายพันธุ์ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) สำหรับในผักสลัด Butter head การใช้รูปแบบ spore suspension สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ สูงถึง 72.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ รูปแบบ CF 68 เปอร์เซ็นต์ และ CE เท่ากับ 61.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกันผลการทดลองในผักสลัดอีก 2 สายพันธุ์ คือ Cos และ Frillice iceberg ก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน โดยสรุปจากทั้ง 3 รูปแบบของเชื้อ F221-B พบว่า รูปแบบของ spore suspension ทำให้ผักสลัดมีน้ำหนักสดสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีปลูกเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Thesis Title	Assessment of antagonistic activity and plant growth promoting ability of non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) in lettuce grown in hydroponics.
Student	Mr. Titi Thongkamngam
Student ID.	57604007
Degree	Doctor of Philosophy Program in Agriculture
Program	Plant Production Technology
Year	2016
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Tanimnun Jaenaksorn

ABSTRACT

This thesis concerned the use of biological control agent (BCA) as well as plant growth promoting fungus (PGPF) for controlling *Fusarium* root rot and wilt disease in hydroponics with emphasis on lettuce crop (*Lactuca sativa* L.). The main objectives were: *i*) to determine the proper preservation method for the long term use of the culture of a newly found, non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B), *ii*) to evaluate the general efficacy of non-pathogenic F221-B as BCA against plant pathogenic fungi *in vitro* and in hydroponics, *iii*) to assess the efficacy of its culture filtrate, *iv*) to study its colonization on plant tissue, *v*) to investigate the production of gibberellin (GA) by non-pathogenic F221-B and its effect on growth of lettuce, and *vi*) to determine the overall performance of non-pathogenic F221-B in hydroponics for controlling *Fusarium* root rot and wilt disease of lettuce. Therefore, a series of experiments was performed as follows:

Part I: In order to obtain the proper method for keeping the culture of non-pathogenic F221-B viable and unchanged for routine testing and future research, the modified filter paper culture method for maintenance its culture was evaluated. In addition, assessments of its viability and efficacy of as BCA and PGPF were made during 24 months preservation. The preservation method was modified onto 2 aspects, namely inoculation techniques on filter paper and drying technique. Four inoculation techniques onto PDA plates to be tested were as follows: 1) Inoculated with 1 piece of fungal plug by placing face down directly on PDA at the center without filter paper (as control), 2) Inoculated with 1 piece of fungal plug by placing face down on the center of 70 mm filter paper, 3) Inoculated with 5 pieces of fungal plugs by placing face down on PDA a few mm away from the circumference of 70 mm filter paper, 4) Inoculated with 6 pieces

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

of fungal plugs by placing face down on PDA a few mm away from the circumference of 70 mm filter paper. Then, the viability of the fungus was assessed by observing the fungal growth from five pieces of fungal filter paper discs placed on PDA after 10 days of incubation. The result showed that the cultures of F221-B preserved using this protocol with the 4 inoculation techniques remained one hundred percent viable and free from contamination. However, the modified dried filter paper culture method using 6 pieces of fungal plugs by placing face down on PDA a few mm away from the circumference of 70 mm filter paper was shown to be the most suitable for preserving F221-B since its mycelial growth and spore production were the highest. Regarding drying technique, this study demonstrated that dry method of filter paper culture in non-vacuum desiccator with blue indicating silica gel at the bottom was found to be effective in preserving the F221-B without contamination.

Regarding the 24 month preservation using modified filter paper technique, the assessment was monthly assessed on the basis of its viability, morphological characteristics and *in vitro* efficacy as biocontrol agent (BCA) and plant growth promoting fungus (PGPF). The results showed that the 24-month storage of F221-B was very satisfactory since its viability of cultures was still 100 percent until the end. Remarkable consistency in retaining its morphological characteristics was noted during preservation. Main hypha was in the range of $110\text{-}121 \times 2.2\text{-}2.6 \mu\text{m}$, hyphal tip was $82.04\text{-}94.04 \times 3.2\text{-}3.5 \mu\text{m}$ whereas macro conidia were $28.23\text{-}29.85 \times 3.0\text{-}3.5 \mu\text{m}$. The bio-control efficacy of F221-B slightly changed during preservation which was noted from dual culture test in the range of 45-74 percent against *Curvularia* sp and 29-45 percent against *Fusarium* sp., while 39-58 and 33-37 percent were noted for *Curvularia* sp. and *Fusarium* sp., respectively from agar well diffusion assay (at the 100 percent of culture filtrate concentration). For *Colletotrichum* sp., the efficacy of F221-B (noted from dual culture test) remained relatively constant and unchanged about 60 percent during the first 6 months and increased afterward to 80 percent while about 30-37 percent was noted from agar well diffusion assay (at the 100 percent of culture filtrate) throughout preservation period.

Regarding its effectiveness as plant growth promoting fungus, the treated seeds (Cos and Red oak) with spore suspension of F221-B at 10^3 and 10^6 spores / ml could germinate 2-day faster than non-treated seeds resulting in higher percentage of seed germination and seedling length. To conclude, 24-month preservation of F221-B using modified filter paper technique was successful with 100 percent viability, its slightly-changed efficacy as BCA and unchanged efficacy as PGPF.

Part II: Assessment of efficacy of the indigenous non-pathogenic F221-B as a possible biological control agent against 10 plant pathogenic fungi, namely, 2 isolates of *Curvularia* sp. (C11, C12), 1 isolate of *F. semitectum* (F113), 2 isolates of *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (F221-R, F442-G), 2 isolates of *Rhizoctonia solani* (R11, R12), 3 isolates of *Rhizoctonia* sp. (R111, R112, R113) was performed *in vitro* and in hydroponics. From dual culture test on potato dextrose agar, it revealed that F221-B had moderate ability to inhibit the mycelial growth of all tested fungal pathogens in the range of 36-56 percent. Regarding its antagonistic mechanism, antibiosis of non-volatile metabolite on PDA was more pronounced only at the early stage of incubation (day 3) then competition followed. No direct antagonism was observed while abnormalities of hyphae and spore of the tested fungi were still detected from the interaction zone probably due to non-volatile metabolite. The non-pathogenic F221-B was further evaluated for its ability in controlling lettuce wilt and root rot caused by F 442-G in hydroponics. The result showed that treatment using F 221-B could reduce disease incidence (DI) and severity (DS) about 60-80 percent compared to inoculated control, promoted the growth of Butter head, Cos and Red oak lettuce, and significantly increased the fresh weight over inoculated control and healthy control. Interestingly, treatment using only F 221-B (without pathogen inoculation) gave the significant highest fresh weight (twice over healthy control). To conclude, the results of this study hold important suggestion for further development of F221-B since it was shown to have ability of biological control agent and plant growth promoting fungi.

Part III: Culture filtrate (CF) of non-pathogenic F221-B was then further evaluated for its potential against above-mentioned plant pathogenic fungi *in vitro* and *Fusarium* root rot disease in hydroponics. *In vitro* antifungal activity analysis indicated that all test concentrations of F221-B culture filtrate could slightly inhibit mycelial growth of all tested fungal pathogens less than 39 % over control. Interestingly, the CF at all test concentrations revealed the greatest spore germination inhibition 100 percent over control against F113, F221-R and F422-G whereas spore germinations of C11 and C12 were completely inhibited by the CF at the concentrations of 60, 80 and 100 percent. In addition, spore abnormalities such as swelling and lysis were noted. Regard to antifungal analysis in hydroponics, the most striking and remarkable result was obtained. The non-pathogenic F221-B was proved to be efficient in reducing disease severity of *Fusarium* root rot in lettuce more than 90 percent and producing significantly better growth than that in non-treated lettuces.

Moreover, no significant degree of difference in terms of lettuce growth was noted between using culture filtrate and spore suspension of F221-B.

Part IV: Three consecutive experiments were conducted to assess the colonization of non-pathogenic F221-B and 2 pathogenic isolates (F221-R and F422-G) on plant tissues namely, roots of Cos lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in hydroponics, punctured surface tissue of pak choi (*Brassica chinensis* var. *chinensis*), and Cos, Frillice iceberg and Rocket lettuce. The colonization was assessed in terms of epiphytic and endophytic colonization. Besides, survival of the test fungi in nutrient solution was also determined. In addition, scanning electron microscope (SEM) and compound microscope equipped with camera were employed to study, visualize and record the colonization. The results showed that non-pathogenic F221-B could colonize on root surface (as epiphytic colonization with 28.5 and 54 CFU/ml in the 1st and 3rd week, respectively) as well as inside the root (endophytic colonization was about 60 CFU/ml in the 1st wk. and 76 CFU/ml in the 3rd wk) without producing any disease symptoms. Unexpectedly, the pathogenic F221-R and F422-G were found to colonize only on root surface as epiphytic colonization. Regarding the colonization on punctured surface tissue, the colonization of plant tissue on top-view, cross-sectional view and top-view of epidermal peel of a plant leaf were visualized and recorded. SEM revealed the epiphytic and endophytic colonization of non-pathogenic F221-B on roots of 3 tested varieties of lettuce.

Part V: This part consisted of a series of experiments concerning gibberellins (GA) production by *F. oxysporum*. Firstly, non-pathogenic F221-B as well as pathogenic F221-R and F422-G were assessed for their ability to produce GA in culture media in flask by thin layer chromatography (TLC). Then, the test *F. oxysporum* isolates were further investigated for quantitative estimation production of gibberellin in mycelium and culture filtrate in flask at 3 incubation periods by high performance liquid chromatography (HPLC). In addition, effects of 4 concentrations (1, 3, 5 and 10 ppm) of crude extract of F221-B culture filtrate were determined on seed germination and growth of Butter-head and Frillice iceberg lettuce in hydroponics. Results showed that TLC and HPLC separation confirmed the presence of GA in the samples. The amount of produced-GA was significantly varied amongst *Fusarium* isolates and types of crude extract (mycelium or culture filtrate). With 30 day incubation period, non-pathogenic F221-B produced 10.38 mg GA /l while pathogenic F221-R produced 11.8 mg/l. Culture filtrate seemed to contain more amount of GA than that in mycelium. Regarding GA effect on lettuce growth, 3 and 5 ppm

of crude extract of F221-B culture filtrate as either seed treatment alone or together with an addition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ภายนอก
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

into nutrient solution gave significant increase in growth (leaf number and size, SPAD value and fresh weight) of the two tested varieties of lettuce.

Part VI: In order to determine the overall performance in hydroponics of non-pathogenic F221-B, this experiment was carried out employing 3 forms of F221-B [i.e. spore suspension (SP), culture filtrate (CF) and crude extract of culture filtrate (CE)] for controlling *Fusarium* root rot and wilt of 3 varieties of lettuce (Butter head, Cos and Frillice iceberg). The experiment was arranged into CRD with 3 replications of 3 plants. The results revealed that all 3 forms of F221-B could significantly reduce DI and DS in all tested varieties of lettuce compared to inoculated control. For Butter head, applying F221-B in the form of spore suspension showed the best result in terms of percent inhibition in DS over control (72.4 percent) compared to those with CF (68 percent) and CE (61.3 percent). Similar results were obtained from Cos and Frillice iceberg. Amongst the 3 forms of F221-B, spore suspension was shown to be the best in promoting the growth parameters of all 3 varieties of lettuce and significantly increased fresh weight of lettuce over inoculated control and healthy control.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือจากหลายท่าน ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร อาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยให้คำแนะนำและปรึกษาทางด้านวิชาการและประสบการณ์ชีวิต ตลอดจนให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ทรงยศ ตันพิพัฒน์ ผศ.ดร. อัมร อินทร์สังข์ ผศ.ดร. กัญญา แซ่เตียว ผศ.ดร. ชีรวัฒน์ ศรีตโยภาส ที่ได้กรุณาช่วยตรวจสอบแก้ไขตลอดจนข้อเสนอแนะในการดำเนินการจัดทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงได้ดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ ดร. พรประพา คงตระกูล ที่ให้แนวคิดและประสบการณ์ในการดำเนินงานในระหว่างทำงานวิจัย

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้เงินทุนสนับสนุนการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร. จรงค์ศักดิ์ พูลนวน คุณสุริยสิทธิ์ สมนึก คุณศักรินทร์ บุญล้ำ คุณกณศ ใจเก่งกาจ พี่ๆ และน้องๆ ในภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือในการศึกษาทดลอง ประสบการณ์และข้อคิดต่าง ๆ ที่ทำให้การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้เป็นไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อวิชุด ทองคำงาม คุณแม่จำปี ทองคำงาม คุณเจษฎาเวศน์ ทองคำงาม และ คุณอาทิตย์ ทองคำงาม เป็นอย่างมาก ในความรัก ความเข้าใจ กำลังใจ การอุปการะเลี้ยงดู และสนับสนุนให้ทุนวิจัย ทุกสิ่งที่ท่านได้ให้ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ชิตี ทองคำงาม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	VI
กิตติกรรมประกาศ.....	XI
สารบัญ.....	XII
สารบัญตาราง.....	XVI
สารบัญภาพ.....	XVIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์.....	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	
2.1 โรคเหี่ยวของผักสลัด.....	4
2.1.1 เชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> สาเหตุโรคเหี่ยว.....	4
2.1.2 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อรา <i>Fusarium</i> spp.	4
2.1.3 ลักษณะอาการโรคเหี่ยว.....	5
2.2 การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรค.....	6
2.2.1 การใช้เชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i>	6
2.2.2 การใช้เชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium</i> species.....	8
2.2.3 การใช้เชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium</i> ร่วมกับการใช้เชื้อจุลินทรีย์ ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช.....	9
2.3 Gibberellins (GA).....	10
2.3.1 บทบาทของ Gibberellins (GA) ต่อพืช.....	11
2.3.2 การใช้ประโยชน์ของ Gibberellins (GA) ในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ของพืช.....	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ XII อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช.....	16
3.2 การประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) ในระหว่างการเก็บรักษาระยะยาว (Long term preservation).....	16
3.2.1 การเลือกวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม.....	16
3.2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> (F 221-B) โดยใช้เทคนิค Modified filter paper culture.....	17
3.2.1.2 การประเมินเทคนิค Filter paper (ตัดแปลง) ในการเก็บรักษาเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B).....	18
3.2.2 การประเมินความอยู่รอด.....	19
3.2.3 การประเมินคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์.....	19
3.2.4 การประเมินคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเมล็ดผักสลัด....	20
3.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค.....	
3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> (F 221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธีเลี้ยงเชื้อในอาหารร่วมกัน (Dual -culture antagonistic test).....	20
3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิคส์.....	21
3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate ของเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> (F 221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช.....	21
3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรอง Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Agar well diffusion assay.....	22
3.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรอง Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Spore germination test.....	22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรอง Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์	23
3.5 การศึกษาการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B).....	23
3.5.1 การศึกษาการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F221-R และ F422-G) ในผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	23
3.5.2 การศึกษาการเข้าครอบครองของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F221-R และ F422-G) ในกวางตุ้ง (<i>Brassica chinensis</i> var. <i>chinensis</i>).....	24
3.5.3 การศึกษาการเข้าครอบครองของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F221-R และ F422-G) ในผักสลัด 3 สายพันธุ์ (Cos, Frillice iceberg และ Rocket) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	25
3.6 การศึกษาการสร้างสาร Gibberellins (GA) ของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B)....	25
3.6.1 การตรวจสอบการสร้าง Gibberellins (GA) โดยวิธี Thin-layer chromatography (TLC).....	26
3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร Gibberellin (GA) โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC).....	26
3.6.3 การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> F221-B ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	27
3.7 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> F221-B ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดกับผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	31
4.1 การแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช.....	31
4.2 การประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในระหว่างการเก็บรักษาระยะยาว (Long term perservation).....	31
4.2.1 การเลือกวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม.....	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> (F 221-B) โดยใช้เทคนิค Modified filter paper culture.....	32
4.2.1.2 การประเมินเทคนิค Filter paper (ตัดแปลง) ในการเก็บรักษาเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B).....	33
4.2.2 การประเมินความอยู่รอดของเชื้อ.....	35
4.2.3 การประเมินคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์.....	36
4.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช.....	43
4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Dual-culture antagonistic test.....	43
4.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	48
4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช.....	53
4.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรอง Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Agar well diffusion assay.....	53
4.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรอง Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Spore germination test.....	54
4.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรอง Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	56
4.5 การศึกษาการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F221-B).....	59
4.5.1 การศึกษาการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F221-R และ F422-G) ในผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	59

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5.2 การศึกษาการเข้าครอบครองของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F221-R และ F422-G) ในกวางตุ้ง (<i>Brassica chinensis</i> var. <i>chinensis</i>).....	61
4.5.3 การศึกษาการเข้าครอบครองของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F221-R และ F422-G) ในผักสลัด 3 สายพันธุ์ (Cos, Frillice iceberg และ Rocket) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์.....	64
4.6 การศึกษาการสร้างสาร Gibberellins (GA) ของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B).....	72
4.6.1 การตรวจสอบการสร้าง Gibberellins (GA) โดยวิธี Thin-layer chromatography (TLC).....	72
4.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร Gibberellin (GA) โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC).....	73
4.6.3 การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> F221-B ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิคส์.....	75
4.7 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> F221-B ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดกับผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิคส์.....	77
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	90
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	104
บรรณานุกรม.....	109
ประวัติผู้เขียน.....	120
ภาคผนวก.....	123

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แหล่งที่เก็บ ชนิดของพืชอาศัยและการแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช.....	31
4.2	การประเมินผลของการเจริญทางเส้นใยและปริมาณสปอร์เชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) บนกระดาษกรอง โดยวิธี Filter paper.....	34
4.3	ความอยู่รอดและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) หลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 1-24 เดือน.....	35
4.4	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด (<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Curvularia</i> sp. และ <i>Fusarium</i> sp.) โดยวิธี Dual-culture test.....	37
4.5	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด (<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Curvularia</i> sp. และ <i>Fusarium</i> sp.) โดยวิธี Agar well diffusion assay.....	38
4.6	การประเมินคุณสมบัติของเชื้อ non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด (seed germination).....	42
4.7	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) ต่อการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Dual-culture test.....	45
4.8	ปริมาณความอยู่รอดของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค (F422-G) ในรากและสารละลายธาตุอาหารพืช.....	50
4.9	ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัด 3 ชนิดที่ใส่ด้วยเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค (F422-G) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์.....	52
4.10	ประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิคส์.....	57
4.11	การเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F221-R และ F422-G) ในกวางตุ้ง (<i>Brassica chinensis</i> var. <i>chinensis</i>).....	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.12	การเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F221-R และ F422-G) ในผักสลัด 3 สายพันธุ์ (Cos, Frillice iceberg และ Rocket) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์....	66
4.13	ค่า Retention factor (Rf) ของสาร gibberellins จากวิธีการทดลอง TLC.....	72
4.14	ผลของเชื้อรา F221-B และ F221-R ในการผลิต GA ในช่วงเวลาในการบ่มที่แตกต่างกัน.....	73
4.15	ผลของสารสกัด Crude extract ของเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> F221-B ต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด.....	76
4.16	การเจริญเติบโตของผักสลัด 2 สายพันธุ์ ที่ใส่ด้วยสารสกัด GA ของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> F221-B ในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	79
4.17	ประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> F221-B ใน 3 รูปแบบ (spore suspension, culture filtrate และ crude extract) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดที่มีสาเหตุจากเชื้อรา <i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F422-G) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ (aerated solution culture).....	83
4.18	การเจริญเติบโตของผักสลัด Butter head ที่ได้รับการใส่เชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> F221-B ใน 3 รูปแบบ (spore suspension, culture filtrate และ crude extract) และปลูกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F422-G) สาเหตุโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัด ในสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ (aerated solution culture) ที่อายุ 45 วัน.....	86
4.19	การเจริญเติบโตของผักสลัด Cos ที่ได้รับการใส่เชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> F221-B ใน 3 รูปแบบ (Spore suspension, Culture filtrate และ Crude extract) และปลูกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F422-G) สาเหตุโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัด ในสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ (aerated solution culture) ที่อายุ 45 วัน.....	87
4.20	การเจริญเติบโตของผักสลัด Frillice icebreg ที่ได้รับการใส่เชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> F221-B ใน 3 รูปแบบ (Spore suspension, Culture filtrate และ Crude extract) และปลูกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F422-G) สาเหตุโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัด ในสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ (aerated solution culture) ที่อายุ 45 วัน.....	88

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	ลักษณะรูปแบบการวางเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F 221-B) 4 แบบ.....	18
3.2	การวางแผ่นกระดาษกรองในโถดูดความชื้น แต่ไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (non-vacuum dessicator).....	18
3.3	ลักษณะรูปแบบการตัดแผ่นกระดาษกรองที่มีเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> (F 221-B) ในแต่ละระยะขอบ.....	19
3.4	โรงเรือนปลูกผักสลัดในสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ.....	30
4.1	ลักษณะรูปแบบการวางเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F 221-B) ที่อายุ 7 วัน...	33
4.2	การประเมินผลของการเจริญทางเส้นใยเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F 221-B) ในแต่ละกรรมวิธี โดยทำการเปรียบเทียบการวางใน 3 ระยะ (ขอบใน, ขอบกลาง และ ขอบนอก) ที่อายุ 9 วันหลังการปลูกเชื้อ.....	34
4.3	การทดสอบความสามารถของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด (<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Curvularia</i> sp. และ <i>Fusarium</i> sp.) โดยวิธี Dual-culture test (ที่ระยะเวลา 6, 8, 10, 14, 17 และ 24 เดือน).....	39
4.4	การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate ของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ที่ 6 ระดับความเข้มข้น (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด (<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Curvularia</i> sp. และ <i>Fusarium</i> sp.) โดยวิธี Agar well diffusion assay (ที่ระยะเวลา 3, 6, 10, 14, 17 และ 24 เดือน).....	40
4.5	การเจริญของต้นกล้าผักสลัดทั้ง 2 ชนิด ที่ใช้ spore suspension ของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ที่ความเข้มข้น 10^3 และ 10^6 spore/ml.....	43
4.6	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 10 ชนิด โดยเลี้ยงเชื้อ ร่วมกัน (Dual-culture antagonistic test) ที่ระยะเวลา 3, 5, 7 และ 9 วันหลังการปลูกเชื้อ.....	46
4.7	ลักษณะความผิดปกติของเส้นใยและสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค ที่บริเวณเส้นใยเชื้อรา F221-B และเชื้อราสาเหตุโรคซ้อนทับกัน ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual-culture).....	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.8	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์.....	49
4.9	ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัด 3 สายพันธุ์ ที่ได้ด้วยเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค (F422-G) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (ที่อายุพืช 45 วัน).....	51
4.10	ผลของ cell-free culture filtrate ที่ผลิตจากเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ที่ 5 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค 10 ชนิด โดยวิธี agar well diffusion assay.....	53
4.11	ผลของ cell-free culture filtrate ที่ผลิตจากเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ที่ 5 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค 5 ชนิด โดยวิธี spore germination test (ที่ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง).....	55
4.12	ลักษณะความผิดปกติของของสปอร์เชื้อรา <i>Curvularia</i> sp. (C11) และ <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F422-G) ในกรรมวิธีที่ได้ด้วย CF ของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> F221-B ที่ระดับความเข้มข้น 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง).....	55
4.13	ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัด ที่ได้ด้วย CF และ spore suspension เชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค (F422-G) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (ที่อายุพืช 45 วัน).....	58
4.14	อิทธิพลของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> F221-B (Culture filtrate และ spore suspension) ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (45 วันหลังการปลูกเชื้อ).....	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.15	การเข้าครอบครองของเชื้อรา non-pathogenic <i>Fusarium oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> (F221-R และ F422-G) ในรากของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (A): ปริมาณความอยู่รอดของเชื้อราภายในรากผักสลัดและสารละลายธาตุอาหารพืช (B): ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหาร TSM (ที่ 21 วันหลังการปลูกเชื้อ)..... 60
4.16	ลักษณะต้นรากของผักสลัดที่ใส่ด้วยเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค <i>F. oxysporum</i> (F221-R และ F422-G) ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (ที่ 7 และ 21 วันหลังการปลูกเชื้อ)..... 61
4.17	ลักษณะการเข้าครอบครองรากผักสลัด Cos โดยเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning electron microscope (SEM) พืชอายุ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ 67
4.18	ลักษณะการเข้าครอบครองรากผักสลัด Frillice iceberg โดยเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning electron microscope (SEM) พืชอายุ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ 68
4.19	ลักษณะการเข้าครอบครองรากผัก Rocket โดยเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning electron microscope (SEM) พืชอายุ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ 69
4.20	ลักษณะการเข้าครอบครองรากผักสลัด 3 ชนิด (Cos, Frillice iceberg และ Rocket) โดยเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope (พืชอายุ 21 วันหลังการปลูกเชื้อ)..... 70
4.21	ลักษณะต้นและรากของผักสลัด 3 ชนิด (Cos, Frillice iceberg และ Rocket) ที่ใส่ด้วยเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (พืชอายุ 21 วันหลังการปลูกเชื้อ)..... 71
4.22	Thin layer chromatography..... 72
4.23	HPLC chromatograms: A standard GA ₃ ; B สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา F221-B; C สารสกัดจาก Culture filtrate ของเชื้อรา F221-B; D สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา F221-R และ E สารสกัดจาก Culture filtrate ของเชื้อรา F221-R (ที่ระยะเวลา 30 วันหลังการปลูกเชื้อ)..... 74

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.24	ลักษณะต้นและรากของผักสลัด 2 ชนิด (Butter head และ Frillice iceberg) ที่ใส่ด้วย สารสกัด GA ของเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> (F221-B) ในความเข้มข้นที่แตกต่างกันในระบบไฮโดรโปนิกส์ (เก็บเกี่ยวพืชอายุ 45 วัน).....	80
4.25	ลักษณะต้นและรากของผักสลัด Butter head, Cos และ Frillice icebreg ในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่ใส่เชื้อและใส่ 3 รูปแบบเชื้อรา non-pathogenic <i>F. oxysporum</i> F221-B และปลูกเชื้อ <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> (F422-G) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร (solution culture) ที่วันเก็บเกี่ยวผลผลิต(พืชอายุ 45 วัน).....	89

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการป้องกันกำจัดโรคพืชถือว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความนิยมของเกษตรกรอย่างมาก ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมโรค นั้น ไม่เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อมและไม่มีพิษตกค้างกับพืชและผลผลิตต่างๆ อีกทั้งยังสามารถที่จะ ช่วยลดการเกิดโรคจากเชื้อราสาเหตุโรคได้หลายชนิด เช่น โรคเหี่ยวมะเขือเทศ โรคแอนแทรกโนสพริก และโรครากเน่าและโคนเน่าปืชรูท เป็นต้น (Kaur *et al.*, 2010; Howell, 2003; Song *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Kakvan *et al.*, 2013) แต่อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุม โรคส่วนใหญ่จะใช้ในพืชที่ปลูกในดิน เช่น มะเขือเทศ (Larkin & Fravel, 1998; Fravel *et al.*, 2003; Fuchs, *et al.*, 1997; Duijff *et al.*, 1998; Alabouvette *et al.*, 1993) แตงกวา (Mandee and Baker, 1991) ถั่วเหลือง (Hervas *et al.*, 1998; Dumrose *et al.*, 2012) โหระพา (Katsube and Alasaka, 1997; Minuto *et al.*, 1997; Honda and Kawakub, 1998) และ พริก (Fuchs *et al.*, 1999) เป็นต้น และในปัจจุบันได้พบ การระบาดของโรคเหี่ยวและรากเน่าและสร้างความเสียหายให้กับเศรษฐกิจและการส่งออกทั่วโลก (Benhamou *et al.*, 1989; Hervas *et al.*, 1998; Paul *et al.*, 1999; Kaur 2003; Kaur *et al.*, 2010) และในผัก สลัดที่ปลูกในต่างประเทศ (Chinta *et al.*, 2014) ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่ามีรายงานการเกิดโรคดังกล่าวใน ระบบไฮโดรโปนิคส์ที่ปลูกในประเทศไทย (ชิตติและคณะ 2555) และ ซึ่งหากไม่มีการค้นหาวิธีการ ควบคุมโดยเร็วและปล่อยให้เกิดโรคมักจะส่งผลต่อการผลิตผักสลัด เพราะเชื้อราดังกล่าวสามารถอยู่ รอดในระบบไฮโดรโปนิคส์ได้เป็นเวลานาน

ปัจจุบันได้มีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และสามารถที่จะ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งจากการรายงานในต่างประเทศถึงการใช้เชื้อ non-pathogenic *Fusarium* หลายๆ สายพันธุ์ เช่น Fo47, GF 191 เป็นต้น ที่มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Howell, 2003; Kaur *et al.*, 2010; Kakvan *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014) ขณะที่ในประเทศไทย ชิตติและคณะ (2556) ได้รายงาน การพบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ในระบบปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิคส์ ซึ่งเป็นเชื้อที่ นำสังเกตว่าสามารถช่วยกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในด้านของผลผลิต เช่น น้ำหนัก สดต้นและราก ได้ดีกว่าพืชปกติถึง 2 เท่า กับผักสลัดสายพันธุ์ Cos Green oak Red oak Butter head

คะน้ำ และ ถั่วเขียว รวมไปถึงสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวและรากเน่าของผักสลัดที่มีสาเหตุจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* ได้โดยพบว่า น้ำหนักของต้นผักสลัดที่เกิดโรคเมื่อใส่เชื้อ F221-B ยังมีน้ำหนักที่ค่อนข้างสูงอยู่ อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยจึงได้สืบค้นหาข้อมูลงานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องพบว่าลักษณะที่เกิดขึ้นแบบนี้อาจเกิดมาจากการสร้างสาร Gibberellic acid (GA) ของเชื้อที่ไปมีผลโดยตรงกับพืชทำให้กระบวนการพัฒนาของพืชเจริญดีกว่าปกติ รวมไปถึงการยึดตัวของเซลล์ การงอกของเมล็ด การติดดอก การขยายของช่อดอกและ การชักนำการสร้างเอนไซม์ ส่งผลโดยตรงทำให้ผลผลิตของพืชเพิ่มขึ้น (Bottini *et al.*, 2004) ซึ่งโดยทั่ว ๆ ไปแล้ว สารชนิดนี้พืชก็มีการสร้างอยู่แล้วแต่มีปริมาณที่ค่อนข้างน้อย โดยในปัจจุบันได้มีการสกัดสาร GA จากจุลินทรีย์หลายๆ ชนิดเพื่อนำมาใช้ในการช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชแต่เมื่อสกัดสารมาได้แล้วก็ยังมีปริมาณค่อนข้างน้อย จึงควรนำมาศึกษาและนำมาพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณของสารให้มากขึ้นเพื่อให้เหมาะสำหรับการนำมาใช้ต่อไป

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำเชื้อรา non-pathogenic F221-B มาใช้ในการควบคุมโรคพืช และกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 การทดลองใหญ่ๆ 1) การเก็บรักษาเชื้อ เพื่อคงคุณสมบัติที่ต้องการไว้และต้องมีชีวิตรอดไปตลอดระยะเวลาการทดลอง 2) การประเมินผลการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของ non-pathogenic F221-B ต่อเชื้อราสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโปนิกส์ 3) การประเมินผลของการใช้ Culture filtrate 4) ศึกษาการเข้าครอบครองในเนื้อเยื่อพืช 5) การตรวจสอบปริมาณการสร้าง gibberellin (GA) ของเชื้อ non-pathogenic F221-B และผลต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด และ 6) การประเมินรูปแบบของเชื้อ non-pathogenic F221-B ที่ได้ผลดีจากทุกการทดลองโดยนำมาใช้ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Fusarium* ในผักสลัด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตของพืชและลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้ต่อไป รวมไปถึงการพัฒนาเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชปลูกได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาให้ได้มาซึ่งวิธีการเก็บรักษาเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) ที่เหมาะสมให้คงความมีชีวิตรอด และยังคงคุณสมบัติที่ดีต่างๆ ครบถ้วนให้ได้ยาวนานที่สุด

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโปนิกส์

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ Culture filtrate ของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโปนิกส์

1.2.4 เพื่อศึกษาการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรคพืช

1.2.5 เพื่อศึกษาการสร้าง GA ของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B) และอิทธิพลของสาร GA ต่อการเจริญเติบโตของพืช

1.2.6 เพื่อศึกษารูปแบบการใช้เชื้อรา non-pathogenic (F221-B) ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าในระบบไฮโดรโปนิกส์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้จะทำการประเมินผลของวิธีการเก็บรักษาเชื้อรา ประเมินศักยภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโปนิกส์ อีกทั้งยังศึกษาคุณสมบัติในการเข้าครอบครองรากของผักสลัด ตลอดจนการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ศึกษาปริมาณการสร้าง Gibberellin (GA) ของเชื้อราซึ่งมีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยจะมีการวิเคราะห์ GA ที่สกัดได้จากเชื้อรา F221-B ด้วยวิธี TLC และ HPLC เพื่อจะได้ทราบถึงปริมาณของ GA ที่เชื้อราสร้างขึ้น รวมไปถึงการใช้สารสกัดที่มาทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และการทดลองสุดท้ายนำรูปแบบของเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีจากทุกวิธีการศึกษามาทดสอบในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าในระบบไฮโดรโปนิกส์

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเหี่ยวของผักสลัด (*Lactuca sativa* L.)

โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* พบระบาดและทำความเสียหายอย่างมากกับผักสลัดที่ปลูกทั้งในระบบดินและในระบบไฮโดรโปนิกส์ โดยเชื่อดังกล่าวเข้าทำลายท่อลำเลียงน้ำ อาการโรคเหี่ยวในแต่ละพืชจะมีลักษณะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดและระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการส่วนใหญ่ใบเริ่มเหลืองจากใบล่างขึ้นไป ใบและกิ่งก้านเริ่มเหี่ยว ใบร่วง เซลตามขอบใบตาย และหากระบาดมากจะทำให้ต้นตายในที่สุด

2.1.1 เชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยว

การจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อรา *F. oxysporum* (Kidane, 2008)

เชื้อรา *F. oxysporum* จัดอยู่ใน

Kingdom Fungi

Division Ascomycota

Class Sordariomycetes

Order Hypocreales

Family Nectriaceae

Genus *Fusarium*

Species *F. oxysporum*

การจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporum* มีหลายสี ตั้งแต่สีซีดขาว เหลือง ชมพู จนถึงม่วง และเจริญได้ดีในอาหารที่มี pH ระหว่าง 6.5 – 7.0 ตามปกติเชื้อราจะสร้าง microconidia จำนวนมาก ซึ่ง microconidia มี 1 เซลล์ หรือ 2 เซลล์ รูปร่างต่างกันไปตั้งแต่รูปกลมจนถึงรูปไข่หรือรูปโค้งและมีขนาดตั้งแต่ 5-12 × 2.5-3.5 ไมโครเมตร (Burgess *et al.*, 1994) conidia จะสร้าง phialides ซึ่งเจริญจากด้านข้างของเส้นใย หรือจาก phialides ที่เจริญมาจาก conidiophores สั้น ๆ ซึ่งแตกแขนงจากเส้นใย macroconidia จนกระทั่งเจริญเต็มที่พบว่ามี 3-5 septa รูปร่างส่วนใหญ่จะโค้งปลายเรียวส่วนน้อยจะยาวตรงและมีขนาดต่างกันไป ขนาดของ macroconidia ที่พบตั้งแต่ 3 septa มีขนาด 27-46 × 3.5 ไมโครเมตร 4 septa มีขนาด 35-60 × 3-5 ไมโครเมตร และ 6-7 septa มีขนาด 50-66 × 3.5-5 ไมโครเมตร macroconidia ที่พบมากที่สุดได้แก่ 3 septa ขนาด 27-46 × 3.5 ไมโครเมตร (Correll, 1991) การสร้าง chlamydospore จะสร้างจากส่วนปลายสุดหรือระหว่างกลางของเส้นใย อาจอยู่เดี่ยวหรือต่อกันเป็นสายมีสีใส ผนังเรียบหรือขรุขระ (Booth, 1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum*

เชื้อรา *Fusarium* spp. จะงอก germ tube ของสปอร์หรือเส้นใยเข้าไปในรากพืชผ่านทางปลายราก (root tip) หรือทางบาดแผล จากนั้นเชื้อราจะสร้างเอนไซม์สำหรับสลายผนังเซลล์ของพืช สาเหตุของการเหี่ยวจะเกิดเนื่องจากการเคลื่อนที่ของน้ำและธาตุอาหารในลำต้นไม่สะดวกหรือหยุดชะงักลง โดยเมื่อเชื้อนี้เข้าไปอยู่ในท่ออาหารแล้วจะสร้างเอนไซม์พวก pectic methyl-esterase (PME) และ depolymerase (DP) enzymes ทั้งสองชนิดนี้จะทำลาย pectic substances ที่อยู่ในผนังเซลล์แล้วจะเข้าไปในชั้น parenchyma ของ xylem แล้วจะเกิดเป็น colloidal mass อุดอยู่ที่นั่นยังทำให้อัตราการคายน้ำ (transpiration) ของพืชลดลงด้วยในระยะนี้ก็จะเกิดอาการเหี่ยวขึ้นแรก ต่อไปเชื้อราจะสร้างสาร lycoperasmin และ fusaric acid ขึ้น ทำให้เกิดอาการเหี่ยวตลอด (permanent wilting) (เสนห์ และอุดม, 2547) และจะเริ่มวงจรชีวิตของเชื้อเมื่อพืชเจริญเติบโตในดินที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ conidia ของเชื้อจะสร้าง germ tube และเส้นใยจะงอกแทงผ่านปลายราก โดยตรงหรือผ่านทางบาดแผล เส้นใยจะเจริญผ่าน cortex ของรากไปยังช่องว่างระหว่างเซลล์ และเมื่อเจริญมาถึงท่อลำเลียงก็จะแผ่ขยายไปถึง ลำต้น ยอด ของพืชในขณะที่อยู่ในท่อลำเลียง เส้นใยจะมีการแตกแขนงและสร้าง microconidia ซึ่งจะถูกปลดปล่อยและแพร่กระจายไปยังท่อลำเลียงของพืช เส้นใยจะแทงผ่านไปยังเซลล์ ที่อยู่ติดกันและจะผลิต microconidia ต่อไป โดยอาการของโรคเหี่ยวของพืชเกิดจากการอุดตันท่อลำเลียงน้ำทำให้แร่ธาตุอาหารเคลื่อนผ่านไปสู่อวัยวะไม่เพียงพอ ทำให้ปากใบปิด ใบเหี่ยวและตายในที่สุด การอุดตันเกิดจากเส้นใย สปอร์ เยล (galls) และยางเหนียว (gums) การเกิด tylose และการกดของท่อจากเซลล์ parenchyma ที่อยู่ถัดไป (Nelson *et al.*, 1983)

เมื่อเชื้อราผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์พืชแล้ว เส้นใยเชื้อราจะเจริญโดยแตกกิ่งก้านสาขาและสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า conidia ขึ้นภายในเซลล์พืช ซึ่งสามารถแพร่กระจายจากเซลล์สู่เซลล์ เมื่อเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสามารถแทงทะลุออกมาสู่ผิววนอกของพืชอาศัย จะมีการปลดปล่อยสปอร์ 3 ชนิดออกมาสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก เส้นใยบางส่วนและ chlamydospore ซึ่งเป็นสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมจะยังคงเหลือรอดอยู่ในพืชที่ตายแล้วและสามารถอาศัยอยู่ในดิน แม้ไม่มีพืชอาศัย เมื่อถึงฤดูเพาะปลูกอีกครั้งและมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม chlamydospore จะสร้าง germ tube เข้าไปในรากพืชเกิดสร้างเส้นใยและสปอร์ภายในพืชจนนำไปสู่การเกิดโรคเหี่ยว *Fusarium* spp. อีกครั้ง (Kidane, 2008)

2.1.3 ลักษณะอาการโรคเหี่ยว

อาการเริ่มแรกจะแสดงที่ใบล่างก่อนจะเกิดอาการเหลือง และอาจจะแสดงอาการเพียงด้านใดด้านหนึ่งของต้น เนื่องจากเชื้อราเข้าทำลายรากพืชเฉพาะ ซีกเดียวของต้นก่อน เมื่อรากถูกทำลายต้นก็จะเหี่ยวตาม หากเป็นระยะกล้าจะตายหลังจากเริ่มแสดงอาการให้เห็น ต้นแก่จะแคระแกรน ใบล่างเหลือง ใบและลำต้นเหี่ยว แตรรากเจริญด้านข้างมากขึ้น ใบร่วง ขอบใบแห้งตาย และ

ต้นตายในที่สุด หากตัดลำต้นตามขวางจะเห็นวงแหวนสีน้ำตาล ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อกลุ่มท่อลำเลียงตาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค

2.2 การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช

การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืชเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับค่านิยมในการนำมาใช้ลดปัญหาการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช เพราะการใช้สารเคมีนั้นมีข้อจำกัด อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตร และต่อตัวเกษตรกรและผู้บริโภคให้เกิดอันตราย ดังนั้น เกษตรกรควรพิจารณาใช้การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) เป็นหลัก เช่น การใช้เชื้อราปฏิปักษ์และการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ อาทิเช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp. และ non-pathogenic *F. oxysporum* อื่นๆ เป็นต้น เพราะการใช้เชื้อดังกล่าวสามารถป้องกันกำจัดเชื้อได้ยาวนานและไม่มีผลตกค้างของสารพิษทำให้ปลอดภัยทั้งต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม (Kaur *et al.*, 2010; Howell, 2003; Song *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Kakvan *et al.*, 2013)

2.2.1 การใช้เชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum*

ในอดีตที่ผ่านมาได้มีการใช้จุลินทรีย์หลากหลายชนิดในการป้องกันกำจัดและควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งการใช้เชื้อปฏิปักษ์ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช เพราะเชื้อดังกล่าวมีกลไกในการป้องกันกำจัดโรคได้หลากหลายชนิด เช่น การแข่งขัน การสร้างสารปฏิชีวนะ การเป็นปรสิต การชักนำให้พืชเกิดการต้านทาน และการช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช กลไกเหล่านี้ถือได้ว่าเป็นสิ่งสำคัญของเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งจากการรวบรวมผลงานวิจัยของหลายๆ ท่านที่ได้ทำการทดสอบการใช้เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* หลากหลายชนิด มาเพื่อควบคุมโรคพืชดังหลายละเอียดต่อไปนี้

ในปัจจุบันได้มีความนิยมในการใช้เชื้อ non-pathogenic กันมากเพราะไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช อีกทั้งยังมีกลไกหลายๆ อย่างที่ช่วยในการควบคุมโรคและการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ ซึ่งจากการรวบรวมผลงานวิจัยในต่างประเทศหลายๆ งานวิจัยพบว่าได้มีการใช้เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* ในการควบคุมโรคได้หลายชนิด เช่น โรครากเน่า และเหี่ยว (Benhamou *et al.*, 2002) โดยจากการทดลองของ Fuchs *et al.* (1997, 1999) ได้ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* สายพันธุ์ Fo47 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ทั้งในดินและในระบบไฮโดรโปนิคส์ พบว่าเชื้อรา Fo47 มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อถึงผลผลิตของมะเขือเทศก็พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (control) หลังจากนั้นได้มีการรายงานในทำนองเดียวกันคือ ได้ทำการทดสอบเชื้อ Fo47 ในการควบคุมโรครากเน่าใน

แตงกวาซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium ultimum* พบว่าผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ เชื้อ Fo47 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) และการสร้างเส้นใยมาพันรัดและแทงผ่านเข้าไปสู่คุณอาหารภายในเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรค ส่งผลทำให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และเมื่อทดสอบคุณสมบัติในการควบคุมโรคพบว่า Fo47 สามารถลดการเกิดโรคพืชได้ 50 เปอร์เซ็นต์ รวมไปถึงยังส่งผลในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคได้ (Benhamou *et al.*, 2002)

จากการรายงานในปี 2005 ของ Shishido *et al.* (2005) ได้ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* Fo-B2 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* CU1 พบว่าสามารถลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคเหี่ยวได้ ตั้งแต่ระยะกล้าไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยวโดยทำให้ผลผลิตที่ได้สูงกว่าผลผลิตที่ได้จากกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ Olivain *et al.* (2005) รายงานว่าการใช้เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* ในการควบคุมโรครากเน่าของมะเขือเทศที่ปลูกในดิน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคได้ อีกทั้งยังสามารถเข้าครอบครองรากของมะเขือเทศ ส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองของ Silva and Bettiol (2005) รายงานผลการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* จำนวน 9 สายพันธุ์ คือ 141/3, 223, 223/1, 245, 245/1, 251, 251/2, 251/5 และ 257 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้นมะเขือเทศ พบว่า เชื้อราทั้ง 9 สายพันธุ์ สามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวได้อยู่ในช่วง 60-80 เปอร์เซ็นต์

ส่วนในปีต่อมา 2006 จากการรายงานของ Abeyasinghe (2006) ได้รายงานการทดสอบเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* ที่แยกได้จากดิน โดยนำมาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรครากเน่าและลำต้นเน่า ที่เกิดกับแตงกวา พบว่าเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* สามารถควบคุมโรคได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และจากการรายงานในทวีปแอฟริกาถึงการใช้เชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* ที่แยกได้จากแปลงปลูกกล้วย ในการควบคุมโรคเหี่ยวของกล้วย ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* พบว่าสามารถการเกิดโรคในกล้วยได้ 87.4 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Paparu *et al.* (2006) ทดสอบเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยในกล้วย รายงานผลการทดลองว่า non-pathogenic สามารถเข้าครอบครองรากของกล้วยได้ 93 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังสามารถชักนำให้ต้นกล้วยเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยได้ และจากการรายงานของ Rodriguez *et al.* (2006) ทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* S6 ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* โดยทำการประเมินด้วยวิธี dual cultures test พบว่าสามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *S. sclerotiorum* ได้ 78 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบสาร cyclosporine A ในระหว่างการทดสอบ หลังจากนั้นได้ทดสอบการยับยั้งการงอกของ sclerotia พบว่าสารดังกล่าวนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของ sclerotia

จากการทดลองของ Nahalkova *et al.* (2008) ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* สายพันธุ์ Fo47 ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะเขือเทศที่ปลูกในระบบปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิกส์ พบว่า Fo47 สามารถเข้าครอบครองรากของ ต้นมะเขือเทศทำให้พืชเกิดการชักนำให้เกิดการต้านทาน โรคเหี่ยว โดย Fo47 ใช้เส้นใยเจริญอยู่ ภายในเนื้อเยื่อของรากพืชทำให้เป็นการสกัดกั้นการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค

ในขณะที่ Mwaura *et al.* (2009) รายงานถึงการทดสอบการสร้างสาร secondary metabolites ที่ผลิตจากเชื้อรา endophytic *F. oxysporum* จำนวน 5 ชนิด ในการควบคุมไส้เดือนฝอย *Helicotylenchus multincinctus* ของกล้วย พบว่า culture filtrate ของเชื้อราดังกล่าวที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยได้ในเวลา 3, 6 และ 24 ชั่วโมง และจากการ ทดลองของ Patil *et al.* (2011) ได้รายงานถึงการทดสอบเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* ทั้ง 6 ไอโซ เลท พบว่า เชื้อดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* ได้อยู่ในช่วง 24.19–40.32 เปอร์เซ็นต์ รวมไปถึงเมื่อทำการทดสอบในสภาพไร่ พบว่า สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวได้ถึง 70-100 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นสามารถทำให้เห็นค่าการ เจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศที่เพิ่มสูงขึ้นทั้งความสูงและน้ำหนักของต้นมะเขือเทศ รวมไปถึงการ รายงานของ Musavi and Balakrishnan (2014) ได้ทดสอบเชื้อรา endophytic *Fusarium oxysporum* NFX06 เป็นเชื้อราที่ไม่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยว อีกทั้งยังสามารถสร้างสาร secondary metabolites โดยได้ นำเอาสารดังกล่าวมาทดสอบในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) และ *Candida albicans* (ATCC 69548) โดยใช้อัตราความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด Minimum Bactericidal Concentration (MBC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) พบว่าความเข้มข้นที่ 30 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตรสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ ความเข้มข้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ได้

2.2.2 การใช้เชื้อรา Non-pathogenic *Fusarium* species

จากการรวบรวมผลงานวิจัยในต่างประเทศ พบว่านอกเหนือจากเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* แล้วยังมีเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* อีกหลายสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการควบคุม โรคและกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช อาทิเช่นจากการรายงานของ Siddiqui and Shaukat (2003) ทดสอบเชื้อ non-pathogenic *F. solani* FS5 ในการควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne javanica* พบว่า FS5 มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยโดยสามารถยับยั้งได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์

จากงานวิจัยในประเทศญี่ปุ่นได้ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium equiseti* GF 191 ที่มีคุณสมบัติการเป็นเชื้อราที่สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Fungus: PGPF) โดยได้ทำการทดสอบกับเชื้อรา *F.oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) ที่แยกได้จากระบบปลูกพืชไฮโดรโปนิกส์และระบบปลูกพืชในดิน พบว่าเชื้อรา GF 191 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ โดยความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 66.7-88.6 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยัง สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศได้ (Horinouchi *et al.*, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 การใช้เชื้อ Non-pathogenic *Fusarium* ร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ปัจจุบัน ได้มีการใช้เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* ร่วมกับการใช้เชื้อราและแบคทีเรีย เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางด้านคุณภาพและผลผลิตของพืช รวมไปถึงสามารถช่วยลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคได้ อาทิเช่นงานวิจัยของ Lemanceau *et al.*, 1993 ได้ใช้ pseudobactin 358 ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* WCS 358 ร่วมกับการใช้เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* สายพันธุ์ F047 ในการควบคุมโรคเหี่ยวที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* WCS 816 พบว่า Fo47 และ pseudobactin 358 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ เท่ากับ 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกัน (Kaur, 2003; Kaur *et al.*, 2007) ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* และ *Pseudomonas fluorescens* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้นถั่ว ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *ciceri* พบว่าเมื่อทำการใช้เชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 2 ร่วมกัน สามารถการเกิดโรคได้ 15-30 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 30 วันแรก แต่เมื่อระยะเวลาถึงวันที่ 60 พบว่าพืชแสดงการเกิดโรคเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีการที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีที่สุด

Horinouchi *et al.*, 2008 รายงานว่า การทดสอบเชื้อรา *F. equiseti* GF 191 และ biodegradable pots (BPs) ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *radices lycopersici* (FORL) ในแปลงปลูกมะเขือเทศ พบว่าการใช้ร่วมกันระหว่าง GF 191+BPs สามารถลดการเกิดสีกายในท่อลำเลียงน้ำและเนื้อเยื่อของต้นมะเขือเทศได้ 58 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึง 149 วัน สามารถลดการเกิดโรคสูงถึง 87 เปอร์เซ็นต์ และจากการรายงานของ Kidane (2008) ได้ทดสอบการใช้เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* และ *Ps. fluorescens* ในการควบคุมโรค รายงานว่าเชื้อรา 2 ชนิดนี้สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของกล้วยที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ได้

2.3 Gibberellins

ฮอร์โมนพืชเป็นสารเคมีภายในพืชซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชไม่เพียงแต่การเจริญของพืชทั้งต้นเท่านั้น หากแต่ยังอาจเกี่ยวข้องกับการเจริญของพืชแต่ละส่วนด้วย ในปัจจุบันทราบกันดีแล้วว่าฮอร์โมนพืชมีทั้งชนิดที่กระตุ้นการเจริญเติบโต และระงับการเจริญเติบโต ฮอร์โมนพืชที่พบในปัจจุบัน คือออกซิน Gibberellins ไซโตไคนิน กรดแอบซิกสิก หรือ ABA และเอทิลีน เป็นต้น

สารควบคุมการเจริญเติบโต (plant growth regulator) เป็นสารเคมีที่สำคัญในการเกษตร เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นมาได้ ซึ่งบางชนิดมีคุณสมบัติเหมือนฮอร์โมนพืช มนุษย์รู้จักการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตมานานแล้ว เช่นกระตุ้นให้มะม่วงหรือสับปะรดออกดอก ในประเทศไทยการใช้ฮอร์โมนพืชมีวัตถุประสงค์ในการเกษตรเพื่อให้มีผลผลิต เพื่อคุณภาพเพิ่มผลผลิต (Suralirajan and Sarbhoy, 2000)

Gibberellins การค้นพบกลุ่มของฮอร์โมนพืชที่ปัจจุบันเรียกว่า Gibberellins นั้น เกิดประมาณ ปี 1920 เมื่อนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น ได้ทำการศึกษาในต้นข้าวที่เป็นโรค Bakanae หรือโรคข้าวตัวผู้ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* หรือ *Fusarium moniliforme* ซึ่งทำให้ต้นข้าวมีลักษณะสูงกว่าต้นข้าวปกติ ทำให้ล้มง่าย จึงเป็นสิ่งที่แน่ชัดว่า เชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างสารบางชนิดขึ้นในต้นพืชซึ่งกระตุ้นให้ต้นข้าวเกิดการสูงผิดปกติได้ (Srivastava *et al.*, 2003; Bottini *et al.*, 2004) Gibberellins สามารถเคลื่อนย้ายไปทางท่ออาหารและท่อน้ำ โดยการเคลื่อนที่ของจิบเบอเรลลินจะเริ่มจากยอดอ่อนลงมาสู่ส่วนล่างของลำต้นนั้น ไม่ได้เกิดในท่อน้ำ ท่ออาหาร เพราะส่วนของยอดอ่อนเป็นส่วนที่ดึงอาหารและธาตุอาหารให้เคลื่อนที่ขึ้นไป อย่างไรก็ตามก็ยังไม่ทราบวิธีการเคลื่อนที่แน่ชัด

Gibberellins เป็นฮอร์โมนพืชซึ่งมีคุณสมบัติทางเคมีเป็นไดเทอร์เพนส์ (diterpenes) ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดตามธรรมชาติในพืช ในกลุ่มของเทอร์เพนอยด์ (Terpenoids) การสังเคราะห์ GA จึงเกิดมาจากวิถีการสังเคราะห์สารเทอร์เพนอยด์ โดยที่มีบางส่วนยังไม่เข้าใจเด่นชัดนัก การสังเคราะห์ GA สารเริ่มต้นเป็นกรดเมวาโลนิก (Mevalonic Acid) เปลี่ยนไปตามวิถีจนเกิดเป็นกรดคอรีโนอิก (Kaurenoic Acid) แล้วจึงเปลี่ยนไปเป็น GA ซึ่งวิถีในช่วงที่เปลี่ยนไปเป็น GA ชนิดต่าง ๆ นี้ยังไม่ทราบแน่ชัดนัก สารชนิดแรกที่มีวงแหวนของ Gibberellane คือ อัลดีไฮด์ของ GA₁₂ (Tsavkelova *et al.*, 2008)

2.3.1 บทบาทของ Gibberellins ต่อพืช

ผลในทางบวกของสาร Gibberellins

ก. กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชทั้งต้น โดยทำให้เกิดการยืดตัวของเซลล์ ซึ่งผลนี้จะต่างจากออกซินซึ่งสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนของพืชได้ พืชบางชนิดอาจจะไม่ตอบสนองต่อ Gibberellins อาจจะเป็นเพราะว่าในพืชชนิดนั้นมีปริมาณ Gibberellins เพียงพอแล้ว Gibberellins สามารถกระตุ้นการยืดตัวของช่อดอกไม้บางชนิดและทำให้ผลไม่มีรูปร่างยาวออกมา เช่น องุ่น และแอปเปิล เป็นต้น (Suralirajan and Sarbhoy, 2000)

ข. กระตุ้นการงอกของเมล็ดที่พักตัวและตาที่พักตัว ตาของพืชหลายชนิดที่เจริญอยู่ในเขตอบอุ่นจะพักตัวในฤดูหนาว เมล็ดของพืชหลายชนิดมีพฤติกรรมเช่นนี้ด้วย ซึ่งการพักตัวจะลดลงจนหมดไปเมื่อได้รับความเย็นเพียงพอ การพักตัวของเมล็ดและตา อันเนื่องมาจากการอุณหภูมิต่ำ วันยาว และต้องการแสงสีแดงจะหมดไปเมื่อได้รับจิบเบอเรลลิน

ค. การแทงช่อดอก การออกดอกของพืชเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อายุ และสภาพแวดล้อม Gibberellins สามารถแทนความต้องการวันยาวในพืชบางชนิดได้ และยังสามารถทดแทนความต้องการอุณหภูมิต่ำ (Vernalization) ในพืชพวกกะหล่ำปลี และแครอท

ง. Gibberellins สามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอาหารในเซลล์สะสมอาหารหลังจากที่เมล็ดงอกแล้ว เพราะรากและยอดที่ยังอ่อนตัวเริ่มใช้อาหาร เช่น ไนโตรเจน แคลเซียม และโพแทสเซียม จากเซลล์เนื้อเยื่อที่อยู่รอบๆ รากและยอด ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะตายและถูกย่อยสลายเป็นสารอาหารที่พืชสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้ Gibberellins ยังสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของน้ำและแร่ธาตุจากส่วนล่างของลำต้นไปยังส่วนบนของลำต้นได้

สะสมอาหาร Gibberellins จะกระตุ้นให้มีการย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็ก เช่น ซูโครสและกรดอะมิโน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์หลายชนิดดังกล่าวข้างต้น

จ. กระตุ้นให้เกิดผลแบบ Parthenocarpic ในพืชบางชนิด เปลี่ยนรูปร่างของใบพืชบางชนิด เช่น English Ivy และทำให้พืชพัฒนาการเพื่อทนความเย็นได้

ฉ. พืชที่มีดอกตัวผู้ และตัวเมียแยกกันไม่ว่าจะต้นเดียวกันหรือแยกต้นก็ตาม Gibberellins สามารถเปลี่ยนเพศของดอกได้ Gibberellins มักเร่งให้เกิดดอกตัวผู้ ส่วนออกซิน เอทิลิน และไซโตไคนิน มักจะเร่งให้เกิดดอกตัวเมีย ในแตงกวาดอกกลาง ๆ มักเป็นดอกตัวผู้ และดอกบนเป็นดอกตัวเมีย

ผลในทางลบของสาร Gibberellins

ก. การใช้ Gibberellins ในปริมาณมากกว่า 10,000 ppm ส่งผลทำให้การเจริญของเนื้อเยื่อพืชเกิดการผิดปกติ อันเนื่องมาจากการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติไปและอาจส่งผลทำให้ใบพืชเปลี่ยนรูปร่างไปจากพืชเดิม (Bottini *et al.*, 2004)

ข. มีผลต่อการพัฒนาของเมล็ดและการงอกของเมล็ด ในเรื่องของการเร่งการเจริญเติบโตของพืช รวมไปถึงการแตกหน่อและการติดดอกของไม้ผล เพราะ Gibberellins จะไปมีผลต่อกระบวนการต่างๆของพืช (Srivastava *et al.*, 2003)

2.3.2 การใช้ประโยชน์ของ Gibberellins ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช

Srivastana and Singh (1980) ได้ทำการทดสอบสาร GA₃ ความเข้มข้น 250 และ 500 ppm ในลีนี่หลังติดผล 4 สัปดาห์ พบว่า GA มีผลในการกระตุ้นขนาดของผลทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นโดยจะพบว่าในระดับความเข้มข้น 250 ppm เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตลีนี่

Srivastava *et al.* (2003) ได้ทำการทดสอบเชื้อรา *Fusarium* sp. จำนวน 90 ไอโซเลท ถึงการสร้าง GA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 สร้าง GA ต่ำกว่า 100 มิลลิกรัม กลุ่มที่ 2 สร้างปานกลาง 100-250 มิลลิกรัม และกลุ่มที่ 3 สร้างมากกว่า 250 มิลลิกรัม หลังจากการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC พบ GA₃, GA₄ และ GA₇ หลังจากนั้นได้นำมาทำการทดสอบกับข้าว พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ด้วย GA สามารถกระตุ้นให้ต้นพืชเจริญดีกว่าในกรรมวิธีควบคุม

Bottini *et al.* (2004) ได้ทำการรวบรวมผลงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสาร gibberellic acid (GA) จากจุลินทรีย์ โดยกล่าวถึงฮอร์โมนของพืชเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้ผลผลิตต่อพื้นที่เพิ่มขึ้น โดยสารจำพวก gibberellic acid เป็นสารที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรอย่างมาก ซึ่งมีผลต่อการยึดตัวของเซลล์ การติดผล การเกิดดอก และการเร่งการเจริญของต้น ซึ่งในธรรมชาติฮอร์โมนพืชดังกล่าว พืชมีการสร้างอยู่แล้วแต่มีการสร้างเพียงเล็กน้อย โดย GA₃ สามารถเร่ง หรือ

กระตุ้นการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ และการเจริญของดอก ซึ่ง gibberellin ประกอบด้วยสารหลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด เช่น gibberellic acid, gibberic acid, allogibberic acid และ gibberene แต่ที่สำคัญและแพร่หลายมากที่สุดคือ gibberellic acid (GA) ซึ่งสกัดได้จากเชื้อรา *Gibberella fujikuroi*, Saw (*Fusarium moniliforme*)

Chanpman (2006) รายงานการใช้ GA₃ ความเข้มข้น 5 และ 10 ppm ฉีดพ่นลงบนใบพืช พบว่าสามารถเพิ่มความยาวของใบและต้นของแก้วมังกรได้ รวมไปถึงสามารถเพิ่มขนาดของหัวมันฝรั่งได้ รวมไปถึงการแตกหน่อในแก้วมังกรได้

Hamayun *et al.* (2010) ได้ทำการทดสอบเชื้อ endophytic fungi จำนวน 19 ชนิด ในการผลิตสาร gibberellin acid และใช้ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช พบว่าสายพันธุ์ MH-6 ที่เลี้ยงใน culture filtrate (CF) สามารถกระตุ้นให้ลำต้นแตงกวายาวสูงถึง 12.9 เซนติเมตร และยังสามารถตรวจพบการสร้างสาร GA₃, GA₄, GA₇ และ GA₁₉ และเมื่อทำการจัดจำแนกแล้วพบว่าเป็นเชื้อรา *Cladosporium* sp.

Fagge and Manga (2011) ได้ทำการทดสอบผลของการใช้ gibberellic acid (GA₃) ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 100 ppm และ 200 ppm เปรียบเทียบกับการใส่ปุ๋ยกับพืช 2 ชนิดคือ ต้นเข็มและกุหลาบ พบว่าการใช้ GA₃ ความเข้มข้น 100 ppm สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของจำนวนราก น้ำหนักรากสดและแห้งได้มากกว่าการใส่ปุ๋ย และเมื่อทำการใส่ผสมรวมกัน พบว่าการเจริญของพืชทั้ง 2 ชนิด มีค่าการเจริญที่ดีกว่าการใช้เพียงอย่างเดียว

Dhupper (2013) ได้ทำการทดสอบสาร gibberellic acid ต่อการงอกของเมล็ดของทั้ง 3 พืช (จามจุรีม ไม้ยารอบ และกระถิน) โดยวิธีคลุกเมล็ดที่ระดับความเข้มข้น 0, 250, 500 และ 750 ppm พบว่าการรมวิธีใส่ด้วย GA สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ด ความสูงของต้น ขนาดลำต้น จำนวนใบ ขนาดใบ ความยาวราก ซึ่งถ้าหากเพิ่มระดับความเข้มข้นของ GA ให้สูงขึ้นก็สามารถทำให้ค่าการเจริญดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control)

Barani *et al.* (2013) ได้รายงานถึงการใช้ GA₃ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 0, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกระตุ้นการเจริญของหัวมันฝรั่งและการแตกหน่อใหม่ของมันฝรั่ง พบว่าระดับความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของหัวมันฝรั่งและการแตกหน่อใหม่ได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ไม่ได้ใส่ GA

Patel and Mankad (2014) ได้ทำการทดสอบ gibberellin ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 300 และ 500 ppm ต่อการงอกของเมล็ดเบญจมาศ โดยพบว่า GA ความเข้มข้น 500 ppm สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ GA ความเข้มข้นต่ำ คือ น้อยกว่า 300 ppm

Muddapur *et al.* (2015) ทำการสกัดจาก GA₃ จากเชื้อรา *Fusarium* sp. 4 ไอโซเลท คือ M101, M102, M104 และ M110 พบว่า ไอโซเลท M104 สามารถผลิต GA₃ ได้มากกว่าไอโซเลท

อื่นๆ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าหลังจากการนำ GA ที่สกัดได้มาทดสอบกับต้นข้าวพบว่า ไอโซเลทดังกล่าวให้ค่าการเจริญเติบโตของต้นที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม (Control)

สันติและคณะ (2551) ได้ทำการทดสอบ GA₃ ต่อการชะลอการออกดอกของสัปปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย โดยใช้ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ppm ฉีดพ่นทางใบกับต้นสัปปะรด พบว่าหลังจากการฉีดพ่นความเข้มข้นที่ 20 ppm สามารถส่งผลทำให้พืชมีจำนวนวันที่ใช้ในการออกดอกมากที่สุด และเมื่อสัปปะรดออกลูกแล้วพบว่าค่าการเจริญเติบโตของผลดีกว่าในกรรมวิธีอื่นๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

- เชื้อรา non-pathogenic (F221-B)
- เชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 10 ไอโซเลต
- ตู้เขี่ยเชื้อ
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)
- อาหารแยกเชื้อ water agar (WA)
- อาหารแยกเชื้อ Trichoderma selective agar medium (TSM)
- sodium hypochlorite, 70% alcohol และ 90% alcohol
- ethyl acetate
- test tub
- cork borer
- autopipette
- Haemocytometer
- กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
- กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope)
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)
- แผ่นสไลด์ กระจกปิดสไลด์
- แผ่น TLC
- เครื่อง rotary evaporator
- เครื่อง HPLC (ยี่ห้อ Hitachi รุ่น Chromaster)

อุปกรณ์ที่ใช้ในโรงเรือน

- วัสดุปลูกพืช เช่น ฟองน้ำ แก้วปลูก เมล็ดพันธุ์พืช
- สารละลายธาตุอาหาร
- เครื่องมือตรวจวัดค่า pH ความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องมือตรวจวัดความเข้มข้นของสารละลาย EC-meter
- เครื่องวัดคลอโรฟิลล์ (chlorophyll meter รุ่น SPAD-502)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิจัยครั้งนี้ จะมีขั้นตอนการดำเนินงานดังต่อไปนี้

- 3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช
- 3.2 การประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในระหว่างการเก็บรักษา 1-24 เดือน (long term preservation)
 - 3.2.1 การเลือกวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม
 - 3.2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อรา F221-B โดยใช้เทคนิค Modified filter paper culture
 - 3.2.1.2 การประเมินเทคนิค Filter paper (ตัดแปลง) ในการเก็บรักษาเชื้อรา F221-B
 - 3.2.2 การประเมินความอยู่รอด
 - 3.2.3 การประเมินคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์
 - 3.2.4 การประเมินคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเมล็ดผักสลัด
- 3.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช
 - 3.3.1 Dual-culture antagonistic test
 - 3.3.2 Hydroponics
- 3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate ของเชื้อรา non-pathogenic (F 221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช
 - 3.4.1 Agar well diffusion assay
 - 3.4.2 Spore germination test
 - 3.4.3 Hydroponics
- 3.5 การศึกษาการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B)
 - 3.5.1 การการศึกษาการเข้าครอบครองรากของผักสลัด โดยวิธี Root inoculation
 - 3.5.2 การศึกษาการเข้าครอบครองกาบใบผักกวางตุ้ง โดยวิธี Leaf test
 - 3.5.3 การศึกษาการเข้าครอบครองรากในผักสลัด โดยวิธี Scanning Electron Microscope (SEM)
- 3.6 การศึกษาการสร้างสาร Gibberellins (GA) ของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B)
 - 3.6.1 การทดสอบสาร Gibberellins (GA) โดยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)
 - 3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร Gibberellin (GA) โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)
 - 3.6.3 การทดสอบคุณสมบัติของ Crude extract ของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B) ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์
- 3.7 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดขึ้นกับผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีรายละเอียดวิธีการดำเนินงานวิจัยดังต่อไปนี้

3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากตัวอย่างผักสลัดสายพันธุ์ cos และ green oak ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ ที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวและรากเน่า อีกทั้งจากส่วนต่าง ๆ ของข้าว คือ เมล็ดและใบข้าว นำมาแยกโดยวิธีการ tissue transplanting technique ลงบนอาหาร water agar (WA) และ selective media สังเกตการเจริญของเชื้อราและย้ายลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคพืช และเก็บเชื้อราที่แยกได้เลี้ยงลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ (PDA slant)

3.2 การประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในระหว่างการเก็บรักษา 1-24 เดือน (Long term preservation)

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) เป็นเชื้อราที่มีคุณสมบัติในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช Plant Growth Promoting Fungus (PGPF) ได้หลายชนิด คือ Butter head, Cos, Green oak, Red oak , คะน้า และ ถั่วเขียว เป็นต้น (ชิตติและคณะ, 2556) อย่างไรก็ตาม ถ้าไม่มีการเก็บรักษาเชื้อราที่ดีก็อาจจะทำให้เชื้อรานั้นเสื่อมคุณภาพและตายลงได้ ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการเก็บรักษาเชื้อมากที่สุด เพื่อที่จะให้เชื้อยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ระยะเวลายาวนาน อีกทั้งยังสามารถที่จะนำเชื้อที่เก็บรักษาไว้กลับมาใช้ได้ตลอดเวลา โดยวิธีการเก็บรักษาเชื่อนั้นมีอยู่หลากหลายวิธีการจึงต้องคำนึงถึงชนิดและการสร้างสปอร์ของเชื้อ เพื่อที่จะได้เก็บรักษาเชื้อได้ถูกต้องและเหมาะสม โดยสิ่งสำคัญของการเก็บรักษาเชื่อนั้นมีหลักการสำคัญ คือ การหยุดหรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ อย่างเช่น อากาศ อุณหภูมิ สารอาหาร และ น้ำ การเก็บเชื้อราแต่ละวิธีต้องทำให้เชื้อรายังมีชีวิตรอดอยู่และคงลักษณะเดิมมากที่สุด โดยเฉพาะคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเชื้อ

3.2.1 การเลือกวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม

ปัจจุบันมีวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่นิยมใช้เก็บรักษาเชื้ออยู่หลากหลายวิธีการ คือ 1. การเก็บในอาหาร PDA slant 2. การเก็บภายใต้ไขมันพาราฟิน (paraffin oil) 3. การเก็บในกรีเซอร์อล 10 เปอร์เซนต์ 4. การเก็บเชื้อใน liquid nitrogen และ 5. การเก็บในกระดาษกรองฆ่าเชื้อ (filter paper) (ชารทิพและคณะ, 2551; Espinel-Ingroff, et al., 2004; Direkel and Otag 2013; Dahmen, et al., 1982; Fong, et al., 2000) โดยวิธีการรักษาเชื้อรามีข้อเสียหลาย ๆ อย่าง เช่น 1.วิธีการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร (PDA slant) ข้อดีคือไม่สามารถเลี้ยงเชื้อเก็บไว้ได้เป็นเวลานานได้ 2. วิธีการเก็บในไขมันพาราฟิน ข้อดีคือ เวลาเขี่ยเชื้อออกจากน้ำมันมีขั้นตอนยุ่งยาก ต้องทำให้เชื้อแห้งก่อนถึงจะเลี้ยงเชื้อได้ 3. การเก็บในกรีเซอร์อล 10 เปอร์เซนต์ ข้อดีคือต้องเก็บไว้ในอุณหภูมิที่ติดลบมาก อาจมีผลต่อเชื้อราและอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่น ๆ 4. การเก็บใน Liquid nitrogen มี ข้อดีคือ ลักษณะของเชื้อบางชนิดอาจไม่เหมาะสมกับอุณหภูมิที่เย็น มีผลทำให้เชื้อรานั้นตายได้ และ 5. การเก็บในกระดาษกรองฆ่าเชื้อ (filter paper) เป็นวิธีการหนึ่งที่ไม่ค่อยมีข้อเสียในการเก็บเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเพราะขั้นตอนในการเก็บเชื่อนั้นค่อนข้างง่าย ไม่ยุ่งยาก สะดวกในการเก็บรักษาได้เป็นเวลานานหลาย ๆ ปี และไม่มี การปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นๆ โดยดำเนินการคัดเลือก ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) โดยใช้เทคนิค Modified filter paper culture

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดของเทคนิค Filter paper ในการเก็บรักษาเชื้อรา F 221-B โดยทำการดัดแปลงวิธีการของ Fong *et al.* (2000) ใน 2 ประเด็น คือ 1) จำนวนชั้นวุ้นเชื้อที่วางเพื่อให้เชื้อเจริญครอบคลุมกระดาศกรอง จากวิธีการเดิมใช้ 6 ชั้น จะลดลง เป็น 5 ชั้นและ 1 ชั้น โดยตั้งสมมุติฐานว่าในกรณี 5 ชั้น เชื้อน่าจะเจริญเข้าครอบคลุมบริเวณจุดตรงกลางของกระดาศกรองได้ดีกว่า 6 ชั้น สำหรับกรณี 1 ชั้นที่วางบนจุดกึ่งกลางกระดาศกรองโดยตรง ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้เลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปและน่าจะครอบคลุมกระดาศกรองได้สม่ำเสมอครอบคลุมทั้งแผ่นกระดาศกรอง 2) ดัดแปลงขั้นตอนการทำให้กระดาศกรองแห้งโดยใส่ลงในโถดูดความชื้นที่มี silica gel อยู่ที่ก้นของโถดูดความชื้น แต่ไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (non-vacuum dessicator)

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 เซนติเมตร เจาะชั้นวุ้นเชื้อบริเวณขอบของโคโลนีเชื้อ วางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีกระดาศกรองวางอยู่ โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแบ่งเป็น 4 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ ขึ้นอยู่กับ จำนวนชั้นวุ้น+การวางชั้นวุ้นเชื้อ ดังนี้

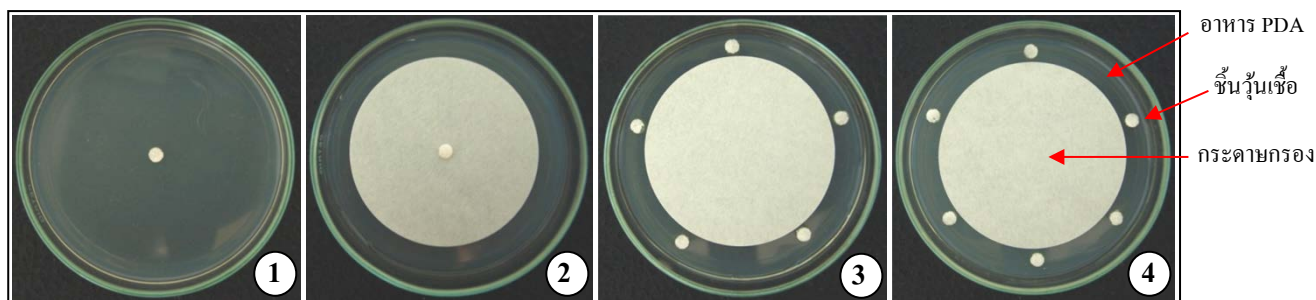
กรรมวิธี ที่ (1) 1 ชั้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA (ไม่มีกระดาศกรอง)

กรรมวิธี ที่ (2) 1 ชั้นวุ้นเชื้อ + วางบนกระดาศกรอง

กรรมวิธี ที่ (3) 5 ชั้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA ที่ตำแหน่งขอบนอกกระดาศกรอง

กรรมวิธี ที่ (4) ทำเหมือนกรรมวิธีที่ 3 แต่วางชั้นวุ้น 6 ชั้นวุ้นเชื้อ (อ้างอิง Fong *et al.*, 2000)

(ภาพที่ 3.1) บ่มเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นย้ายกระดาศกรองไปวางบนก้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในโถดูดความชื้น (dessicator) ที่ไม่ได้ต่อกับปั๊มสุญญากาศ (non-vacuum pump) (ภาพที่ 3.2) บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน รอให้แผ่นกระดาศกรองแห้งสนิทเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



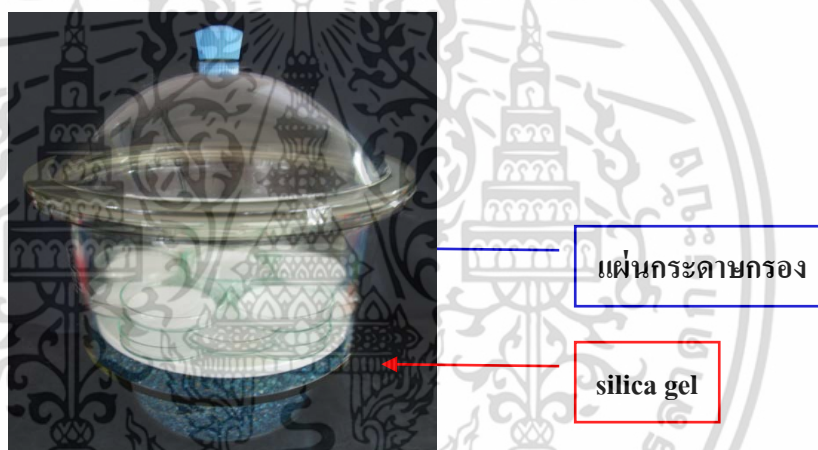
ภาพที่ 3.1 ลักษณะรูปแบบการวางเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) 4 แบบ ดังนี้

กรรมวิธี ที่ (1) 1 ชั้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA (ไม่มีกระดาษกรอง)

กรรมวิธี ที่ (2) 1 ชั้นวุ้นเชื้อ + วางบนกระดาษกรอง

กรรมวิธี ที่ (3) 5 ชั้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA ที่ตำแหน่งขอบนอกกระดาษกรอง

กรรมวิธี ที่ (4) ทำเหมือนกรรมวิธีที่ 3 แต่วางชั้นวุ้น 6 ชั้นวุ้นเชื้อ (อ้างอิง Fong *et al.*, 2000)

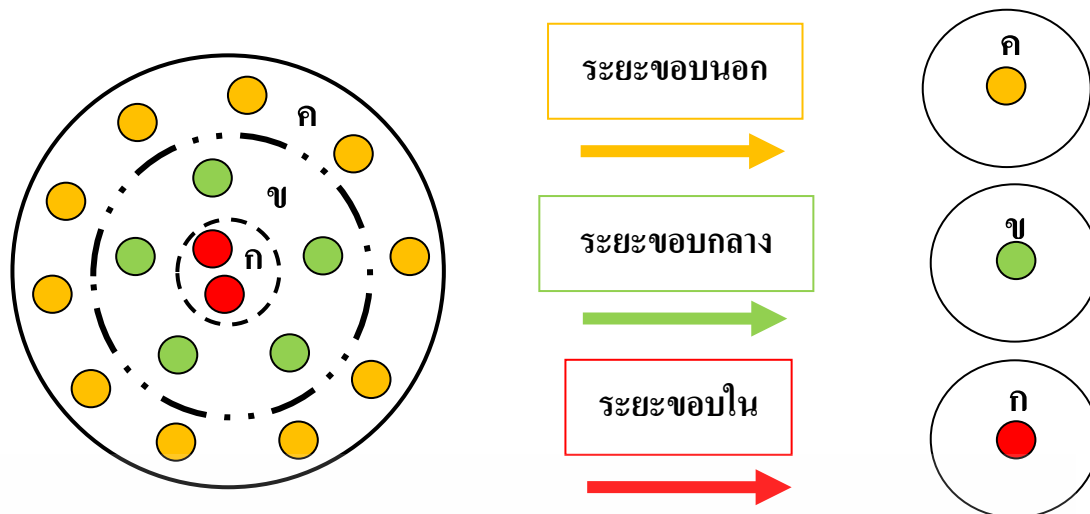


ภาพที่ 3.2 การวางแผ่นกระดาษกรองในโถดูดความชื้น แต่ไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (non-vacuum dessicator)

3.2.1.2 การประเมินเทคนิค Filter paper (ตัดแปลง) ในการเก็บรักษาเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B)

หลังจากเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวตามวิธีที่การข้างต้นที่ได้มาแล้ว ให้นำแผ่นกระดาษกรองที่แห้งสนิทมาตัดด้วยคีมเจาะกระดาษ โดยแบ่งการตัดแผ่นกระดาษออกเป็น 3 ระยะ คือ ขอบใน ขอบกลาง และ ขอบนอก (ภาพที่ 3.3) ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 กรรมวิธีๆละ 5 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อรา โดยค้ำแผ่นกระดาษกรองในแต่ละระยะขอบวางลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำนวน 1 ชั้น ส่วนในกรรมวิธีควบคุมให้ใช้ชั้นวุ้นเชื้อแทนแผ่นกระดาษกรอง สังเกตและบันทึกผลการทดลอง โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยของเชื้อในแต่ละกรรมวิธีเปรียบเทียบกับตัวควบคุม และเมื่อเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทำการตรวจนับปริมาณของสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ว่าในแต่ละระยะขอบมีการเจริญของเส้นใยเท่ากันหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.3 ลักษณะรูปแบบการตัดแผ่นกระดาษกรองที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ในแต่ละระยะขอบจำนวน 3 ระยะขอบดังนี้

- ก. ระยะขอบใน มีระยะห่าง 1-3 เซนติเมตร
- ข. ระยะขอบกลาง มีระยะห่าง 3-6 เซนติเมตร
- ค. ระยะขอบนอก มีระยะห่าง 6-9 เซนติเมตร

ในระหว่างการเก็บรักษาเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในช่วงระยะเวลา 1-24 เดือน จะแบ่งการประเมินออกเป็น 2 ช่วงเวลา กล่าวคือในช่วง 6 เดือนแรก โดยจะทำการตรวจคุณสมบัติทุกเดือน และช่วงหลังจะตรวจในเดือนที่ 10, 14, 17 และ 24 เดือน ซึ่งจะมีรายละเอียดการทดลองดังต่อไปนี้

3.2.2 การประเมินความอยู่รอด

นำแผ่นกระดาษกรอง (Filter paper) ที่ได้จากการทดลอง 3.2.1.2 จำนวน 50 ชิ้น วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ที่เจริญออกมาจากแผ่นกระดาษกรอง Filter paper โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อ หลังจากนั้นเมื่อครบเวลา 3 วัน ใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นเชื้อในแต่ละแผ่นกระดาษที่เจริญออกมามาทำ spore suspension เพื่อตรวจนับปริมาณสปอร์ที่เกิดขึ้น พร้อมทั้งวัดขนาดเส้นใยเชื้อทั้งบริเวณส่วนกลางและส่วนปลายของเส้นใย และวัดขนาดสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะของเชื้อรา *F. oxysporum* F221-B เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกันในแต่ละเดือนที่เก็บรักษาเชื้อ

3.2.3 การประเมินคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์

ในระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจะทำการประเมินคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุโรค 3 ชนิด (*Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp. และ *Fusarium* sp.) โดยทำการประเมินในช่วงเวลาเดียวกันกับการทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ ซึ่งวิธีการทดสอบ dual culture test จะทำการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ ในแต่ละเชื้อที่นำมาทำการทดลอง ส่วนในการทดสอบ agar well diffusion assay จะใช้ culture filtrate จำนวน 6 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้จากเชื้อรา F221-B มาใช้ในการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบในแต่ละเดือนที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ บันทึกรผลการทดลองโดย วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุโรค รวมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค (Growth inhibition; GI) และศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B)

3.2.4 การประเมินคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเมล็ดผักสลัด

นำ spore suspension ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ที่ได้จากข้อ 3.2.2 มาปรับความเข้มข้นให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^3 และ 10^6 spore/ml เพื่อใช้ในการประเมินคุณสมบัติในการช่วยกระตุ้นการเจริญของพืช ทำการทดลองกับเมล็ดผักสลัด 2 สายพันธุ์ คือ Cos และ Red oak จากนั้นจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาใส่ด้วยแผ่นกระดาษกรองฆ่าเชื้อ แล้วนำเมล็ดผักสลัดที่เตรียมไว้มาทำการคลุกเมล็ดด้วย spore suspension ของเชื้อดังกล่าว และวางเมล็ดพืชที่ผ่านการคลุกแล้วลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้จำนวน 5 จาน (10 เมล็ดต่อจาน) สำหรับกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อแทน จากนั้นให้ความชื้นกับเมล็ดโดยใส่น้ำนิ่งฆ่าเชื้อลงในแผ่นกระดาษกรอง ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อจาน บันทึกรผลการทดลองจากเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพืชเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ทำการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ ซึ่งได้ทำการทดสอบโดยวิธี dual-culture antagonistic tests และการทดสอบในระบบปลูกพืชแบบเป่าอากาศในระบบไฮโดรโปนิคส์ ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอนต่อไปนี้

3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธีเลี้ยงเชื้อในอาหารร่วมกัน (Dual-culture antagonistic test)

ทดสอบโดยวิธี dual-culture antagonistic tests (Dennis and Webster, 1971) ทำการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยเลี้ยงเชื้อ *Fusarium oxysporum* (F 221-B) และเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 10 ไอโซเลท ได้แก่ *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* sp. (R11, R12, R13) และ *R. solani* (R11, R12) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบของโคโลนีของเชื้อทั้งสอง ย้ายชิ้นส่วนของเชื้อราแต่ละชนิดจำนวน 1 ชิ้น วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในลักษณะตรงข้ามกัน ให้มีระยะห่างพอประมาณ สำหรับวิธีการเปรียบเทียบ (control) ให้เลี้ยงเชื้อทั้งสองแยกจากกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกรผลการทดลอง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุโรค รวมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค (Growth inhibition; GI) และศึกษากลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ทั้งกลไก competition, antibiosis และ mycoparasitism (exploitation) ของเชื้อที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืช รวมทั้งสังเกตความผิดปกติของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากสูตรของ (Dennis and Webster 1971) ดังต่อไปนี้

$$\%GI = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

โดย R1 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค ในจานอาหารเปรียบเทียบ (control)
R2 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม (dual-culture test)

3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น โดยเพาะเมล็ดผักสลัดจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ Butter head, Cos, Green oak บนฟองน้ำและรดน้ำนาน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้สารละลายธาตุอาหารที่มีค่า EC = 1 ms/cm², pH = 5.8-6.2 เมื่อต้นกล้ามีอายุครบ 2 สัปดาห์ จึงย้ายกล้าลงปลูกในกระบะพลาสติกที่บรรจุด้วยสารละลายธาตุอาหารพืช ปริมาตร 5 ลิตร หลังจากนั้นเตรียม spore suspension ของเชื้อ F 221-B ความเข้มข้น 1×10⁸ spore/ml ใส่ ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นอีก 3 วันปลูกเชื้อ ด้วย spore suspension (1×10⁶ spore/ml) ของเชื้อรา *F. oxysporum* 2 สายพันธุ์ (สาเหตุโรคพืช) ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช สังเกตและบันทึกผลพร้อมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคในกล้าผักสลัด

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ผลจากการทดลองที่ 3.3.1 เรื่อง dual-culture test ทำให้ทราบว่าเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ที่มีกลไกการยับยั้งเป็นแบบ antibiosis โดยกลไกดังกล่าวนี้จะประกอบด้วย เอมไซม์ สารปฏิชีวนะและสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นแล้วไปมีผลต่อกระบวนการต่างๆของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ส่งผลทำให้การเจริญผิดปกติไปจากเดิม โดยการศึกษาในครั้งนี้จะใช้ culture filtrate ของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) มาทดสอบกับเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยจะมุ่งเน้นศึกษาถึงประสิทธิภาพของ secondary metabolite ซึ่งเป็นทั้ง สารระเหย (volatile metabolite) และสารไม่ระเหย (non-volatile metabolite) ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

การเตรียม Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F 221-B)

ในการทดลองนี้จะมุ่งเน้นถึงประสิทธิภาพของ non-volatile extracellular metabolite ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 10 ชนิด ดังนั้นจึงเตรียม CF ของเชื้อราปฏิปักษ์โดยนำเชื้อ F221-B เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 7 วัน จากนั้นทำการเจาะขึ้นวุ้นเชื้อด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร บริเวณขอบของโคโลนี จำนวน 5 ชั้น มาเลี้ยงลงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน จากนั้นกรองเอาเส้นใยออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 นำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อตกตะกอนเส้นใยและสปอร์ออก หลังจากนั้นนำ CF ที่ได้มาทำให้ปราศจากเส้นใย และสปอร์ ใน 2 วิธี คือ กรองผ่าน microfilter ขนาด 0.20 ไมโครเมตร และการนำไป auto-clave เพื่อให้ได้เพียงแต่สารซึ่งเป็น secondary metabolite เพียงอย่างเดียวโดยไม่มียีสอื่น ซึ่งจากการแบ่งสารมาทำในลักษณะนี้ เพื่อที่จะนำไปพัฒนาและใช้งานได้ง่ายขึ้น โดยการทดสอบได้นำ CF ที่ได้จากทั้ง 2 ส่วนมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เพื่อทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคต่อไป โดยดำเนินการทดสอบออกเป็น 3 วิธี ซึ่งดัดแปลงมาจาก Lorito *et al.* (1994) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.4.1 การทดสอบ Culture filtrate (CF) ของเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* (F 221-B) ต่อการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี Agar well diffusion assay

นำ CF ที่ได้จากการเตรียมข้างต้นมาทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 10 ชนิด *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* sp. (R11, R12, R13) และ *R. solani* (R11, R12) วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ โดยเริ่มต้นจากการเลี้ยงเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ดัดแปลงวิธีการของ Fiddman and Rossall (1993) หลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.5 มิลลิเมตร เจาะขึ้นรู้นให้ห่างจากเชื้อ 2 เซนติเมตร จำนวน 6 จุด ตามความเข้มข้นวางเป็นวงล้อมรอบเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังกล่าว นำขึ้นรู้นที่เจาะออก ปล่อยให้ว่างนาน 2 ชั่วโมง หยด CF แต่ละความเข้มข้นในปริมาณ 30 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองโดยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อใน ทุก ๆ ความเข้มข้นของ CF และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

3.4.2 การทดสอบ Culture filtrate (CF) ของเชื้อ *F. oxysporum* (F221-B) ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Spore germination test

นำ CF ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ข้างต้น หยดลงบนสไลด์หลุมในปริมาณ 30 ไมโครลิตร ที่มี spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 5 ชนิด *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) ที่ความเข้มข้น 1×10^6 spore/ml อยู่แล้ว 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำสไลด์หลุมดังกล่าว ไปบ่มให้ความชื้นในกล่องพลาสติก เป็นเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของ conidia ได้กล้องจุลทรรศน์ โดยดัดแปลงวิธีการของ Steinkellner and Mammeler (2005) สังเกตการงอกของ conidia อย่างละ 100 สปอร์ เปรียบเทียบกับทุก ๆ กรรมวิธี เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 5 ชนิด ที่เป็นผลมาจากประสิทธิภาพของ CF ของ *F. oxysporum* (F 221-B) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิคส์

เพาะเมล็ดผักสลัด Cos บนฟองน้ำ และรดน้ำนาน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้สารละลายธาตุอาหารที่มีค่า $EC = 1 \text{ ms/cm}^2$, $pH = 5.8-6.2$ เมื่อต้นกล้ามีอายุครบ 2 สัปดาห์ ทำการย้ายกล้าลงระบบปลูกพืชแบบสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ ซึ่งประกอบด้วยกระบะพลาสติกที่บรรจุด้วยสารละลายธาตุอาหารพืช ปริมาตร 5 ลิตร หลังจากนั้นนำ CF ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ซึ่งได้ผลดีจากการทดลอง Agar well diffusion assay มาใช้ในการทดลอง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ทำการใช้ spore suspension ของเชื้อ F221-B มาเป็นตัวเปรียบเทียบกับอีกกรรมวิธีหนึ่ง เพื่อใช้เป็นการยืนยันผลในด้านการควบคุม โรครากเน่าและเหี่ยวอีกครั้งหนึ่ง โดยทำการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ซ้ำ ละ 3 ต้น ดังนี้

กรรมวิธี 1 Healthy control (ไม่ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธี 2 Inoculation control Pathogen (F422-G)

กรรมวิธี 3 Culture filtrate (F221-B)

กรรมวิธี 4 Culture filtrate (F221-B) + Pathogen (F422-G)

กรรมวิธี 5 Spore suspension 1×10^6 spore/ml F221-B

กรรมวิธี 6 Spore suspension 1×10^6 spore/ml F221-B + Pathogen (F422-G)

ใส่ CF และ spore suspension ของเชื้อ F221-B ลงในกระบะปลูกพืช ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นอีก 3 วันปลูกเชื้อ ด้วย spore suspension (1×10^6 spore/ml) ของเชื้อ Pathogen F422-G ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช สังเกตค่าการเจริญเติบโตของผักสลัดและบันทึกผลพร้อมทั้งคำนวณเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของการเกิดโรคในกล้าผักสลัด

3.5 การศึกษาการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B)

นำเชื้อ *F. oxysporum* (F221-B) ที่ผ่านการประเมินประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการและในระบบไฮโดรโปนิคส์ มาทำการเปรียบเทียบกับเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* 2 สายพันธุ์ โดยดูถึงการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชใน 2 ลักษณะ คือ การเข้าครอบครองภายนอกลำต้นพืช (epiphytic colonization) และ การเข้าครอบครองภายในพืช (endophytic colonization) เพื่อดูถึงลักษณะการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืช ดังรายละเอียดดังนี้

3.5.1 การศึกษาการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B)

และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R และ F422-G) ในผักสลัด Cos ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์

เพาะเมล็ดผักสลัดสายพันธุ์ Cos บนฟองน้ำ และรดน้ำนาน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้สารละลายธาตุอาหารที่มีค่า $EC = 1 \text{ ms/cm}^2$, $pH = 5.8-6.2$ เมื่อต้นกล้ามีอายุครบ 2 สัปดาห์ ทำการย้าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้าลงปลูกในกระบะพลาสติกที่บรรจุด้วยสารละลายธาตุอาหารพืช ปริมาตร 5 ลิตร โดยแบ่งกรรมวิธีออกเป็น 4 กรรมวิธี ทำการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำ ละ 3 ต้น ดังนี้

กรรมวิธี 1 Healthy Control (ไม่ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธี 2 Treated with F221-B

กรรมวิธี 3 Inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* สายพันธุ์ F221-R

กรรมวิธี 4 Inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* สายพันธุ์ F422-G

ทำการเตรียม spore suspension ของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ความเข้มข้น 1×10^8 spore/ml ใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นอีก 3 วันปลูกเชื้อสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* 2 สายพันธุ์ ด้วย spore suspension (1×10^6 spore/ml) ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างรากในแต่ละกรรมวิธี มาศึกษาถึงลักษณะการเข้าครอบครองรากพืช และตรวจนับปริมาณของเชื้อในแต่ละกรรมวิธี ดังรายละเอียดต่อไปนี้

1) การเข้าครอบครองภายนอกลำต้นพืช (Epiphytic colonization)

เก็บตัวอย่างรากพืช ล้างทำความสะอาดโดยผ่านน้ำไหล จากนั้นล้างด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที จากนั้นล้างด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 นาที ล้างออกด้วยน้ำมาเชื้อ นำน้ำที่ได้จากการล้างรากมาทำการ pour plate ลงบนอาหาร *Trichoderma* selective media (TSM) และนำชิ้นส่วนรากที่ผ่านการล้างรากมาทำการตัดให้มีขนาด 1-3 มิลลิเมตร (Mukhtar *et al.*, 2010) ย้ายมาเลี้ยงลงบนอาหาร WA สังเกตลักษณะเส้นใยของเชื้อที่เจริญ

2) การเข้าครอบครองภายในพืช (Endophytic colonization)

เก็บตัวอย่างรากพืช ล้างทำความสะอาดโดยล้างผ่านน้ำไหล จากนั้นล้างด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที จากนั้นล้างด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำมาเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นบดตัวอย่างรากที่ผ่านการล้างแล้ว (Pavithra *et al.*, 2012) มาทำการ pour plate ลงบนอาหาร *Trichoderma* selective media (TSM) บันทึกผลโดย นับโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้นบนอาหาร แล้วนำมาคำนวณหาจำนวนประชากรของเชื้อในแต่ละกรรมวิธี

3.5.2 การศึกษาการเข้าครอบครองภายในพืชของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) และ เชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R และ F422-G)

ในกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* var. *chinensis*)

นำกวางตุ้งมาล้างทำความสะอาดแล้ววางผึ่งให้แห้ง หลังจากนั้นเตรียมเชื้อรา F221-B และเชื้อราสาเหตุโรค 2 สายพันธุ์ F221-R และ F422-G ที่อายุ 7 วัน จากนั้นทำแผลด้วยเข็ม โดยจิ้มลงบนกวางตุ้ง จำนวน 2 แผลต่อกาบ (5 กาบต่อกรรมวิธี) วางชิ้นกวางตุ้งที่ทดสอบลงบนแผลที่ได้ทำไว้ ส่วนในกรรมวิธีควบคุมใช้ชิ้นกวางตุ้ง PDA แทน หลังจากนั้นนำกวางตุ้งที่ได้ทำการใส่เชื้อแล้วมาเก็บลงในถุงพร้อมทั้งฉีดน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกผลการทดลองโดย วัดขนาดแผลและคำนวณเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค รวมไปถึงลักษณะการเข้าครอบครองของเชื้อดังนี้ 1. คู่มือบนของเนื้อเยื่อพืช (top-view) 2. ดูจากการผ่าแนวขวางของเนื้อเยื่อแผล (cross-sectional view) 3. ดูจากเนื้อเยื่อที่ถูกลอกชั้น epidermis ซึ่งจากทั้ง 3 วิธีจะตรวจสอบภายใต้กล้อง stereo microscope และกล้องจุลทรรศน์

3.5.3 การศึกษาการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R และ F422-G) โดยวิธี scanning electron microscope (SEM)

เพาะเมล็ดผักสลัด 3 สายพันธุ์ (cos, frillice iceberg และ rocket) บนฟองน้ำ และรดน้ำนาน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้สารละลายธาตุอาหารที่มีค่า EC = 1 ms/cm², pH = 5.8-6.2 เมื่อต้นกล้ามีอายุครบ 2 สัปดาห์ ทำการย้ายกล้าลงปลูกในกระบะพลาสติกที่บรรจุด้วยสารละลายธาตุอาหารพืช ปริมาตร 5 ลิตร โดยแบ่งกรรมวิธีออกเป็น 4 กรรมวิธี ดังการทดลองที่ 3.5.1 หลังจากนั้นเตรียม spore suspension ของเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) ความเข้มข้น 1×10⁸ spore/ml ใส่ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นอีก 3 วันปลูกเชื้อ ด้วย spore suspension (1×10⁶ spore/ml) ของเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* 2 สายพันธุ์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างรากในแต่ละกรรมวิธี มาศึกษาถึงลักษณะการเข้าครอบครองรากพืชโดยตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM-Quanta400)

3.6 การศึกษาการสร้างสาร Gibberellins (GA) ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B)

การสร้างสาร GA เป็นฮอร์โมนพืชที่ใช้ในการควบคุมการเจริญเติบโตจัดเป็นสารกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ (diterpenoid) และมีอิทธิพลต่อกระบวนการทางพัฒนาการรวมทั้งการยืดของข้อ การงอก การพักตัว การออกดอก การแสดงเพศ การชักนำการสร้างเอนไซม์ (Bottini *et al.*, 2004) รวมทั้งการแก่ของดอกและซึ่งสารชนิดนี้มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งจากการรายงานของ ชิติและคณะ (2556) ได้พบเชื้อ non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B ในระบบปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิคส์ ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชในด้านของผลผลิต เช่น น้ำหนัก จำนวนใบ ขนาดใบ ได้ดีกว่าพืชปกติถึง 2 เท่า ในการทดลองนี้จะมุ่งเน้นการดำเนินงานทดลองออกเป็น 3 ขั้นตอน เริ่มจากการสกัด GA เปรียบเทียบกับเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว *F. oxysporum* 2 สายพันธุ์ ถึงคุณสมบัติของการสร้างสาร GA และปริมาณการสร้างว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ ดังนี้

การสกัดสาร Gibberellins (GA) จากเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B)

เลี้ยงเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* (F 221-B) และเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-R และ F422-G) ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหาร PDB บรรจุอยู่ 50 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อเอาเส้นใยและสปอร์เชื้อราออก หลังจากนั้นปรับค่า pH โดยใช้ 0.1 HCL/KOH ปรับให้อยู่ในช่วง 2.5-3 โดยใช้วิธีของ Rachev *et al.* (1993) แล้วนำไปสกัดแยกส่วนด้วย ethyl acetate 3 ครั้ง ปริมาณ 450, 150 และ 150 มิลลิลิตรตามลำดับ ด้วยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Separating Funnel ขนาด 1 ลิตร เขย่าให้เกิดการแยกชั้นเกิดขึ้น ทำการไขส่วนที่แยกชั้นสีใส ผ่าน Na_2SO_4 มาเก็บไว้ แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำไปลดปริมาตรด้วย rotary evaporator method ที่อุณหภูมิ 40 องศา ความเร็ว 10 รอบต่อนาที นำ crude extract ที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณของ GA ด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) และ High performance liquid chromatography (HPLC) ต่อไป

3.6.1 การตรวจสอบการสร้าง Gibberellins (GA) โดยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)

นำสารที่ได้จากการสกัดในส่วนแรก มา spot ลงบนแผ่น TLC โดยให้มีระยะห่างจากขอบล่าง 1.5 เซนติเมตร โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) จำนวน 5 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ซึ่งจากกรรมวิธีที่ใช้จะนำเอา Standard gibberellins GA_3 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าและสาร Acetonitrile ซึ่งเป็นสารที่ใช้สำหรับเป็นตัวละลายตัวอย่างทดสอบ ซึ่งจากกรรมวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้นจะนำมาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับสารตัวอย่างที่ได้จากการสกัดจากเชื้อ F221-B และเชื้อราสาเหตุโรคโดยมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

กรรมวิธี 1 Standard gibberellins GA_3

กรรมวิธี 2 Crude extract of gibberellins F221-B

กรรมวิธี 3 Crude extract of gibberellins F221-R

กรรมวิธี 4 Crude extract of gibberellins F422-G

กรรมวิธี 5 Acetonitrile

หลังจากนั้นนำมาวางในภาชนะแก้วที่บรรจุด้วย ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ isopropanol : water (อัตราส่วน 4:1) ทำตามวิธีการของ Cavell *et al.* (1967) โดยให้ตำแหน่งจุดอยู่เหนือตัวทำละลายเมื่อตัวทำละลายเคลื่อนขึ้นไปจนเกือบถึงขอบบน ให้นำแผ่น TLC ออกพร้อมกับขีดแนวของตัวทำละลาย (solvent front) ก่อนที่ตัวทำละลายจะแห้ง หลังจากนั้น พ่น ethanol: sulfuric acid (ความเข้มข้น 95:5) นำแผ่น TLC ไปส่องใต้แสง UV (254 nm) บันทึกค่าการเคลื่อนที่ของสารและระยะทางที่ตัวสารเคลื่อนที่ การคำนวณหาค่า Rf

ค่า Rf เป็นค่าประจำตัวของสารประกอบภายใต้สภาวะต่างๆ (ตัวดูดซับ ตัวทำละลายและความหนาของชั้นตัวดูดซับ) ที่กำหนด ค่านี้แปรเปลี่ยนได้ถ้าสภาวะในการทดลองเปลี่ยน

ค่า Rf ถูกนิยามไว้ดังนี้ :

$$Rf = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร Gibberellin (GA) โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

จากการทดสอบ crude extract (CE) ของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ (F221-B และ F221-R) โดยวิธี TLC แสดงให้เห็นว่า CE มีสาร GA เป็นองค์ประกอบอยู่ซึ่งจากวิธีการทดสอบดังกล่าวได้ใช้ CE ที่เลี้ยงอายุ 21 วันในการทดสอบ ทำให้รู้แค่เพียงว่ามีการสร้างสาร GA เพียงเท่านั้นแต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเอกลำต้นเป็นเอกลำต้นที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนไหนของเชื้อผลิตสารในปริมาณเท่าไร ด้วยสาเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงได้จัดกรรมวิธีการทดลองขึ้นใหม่เพื่อให้ตอบโจทย์กับข้อสงสัยดังกล่าว โดยได้จัดการทดลองใหม่ ซึ่งแบ่งระยะเวลาในการบ่มเชื้อออกเป็น 10, 15 และ 30 วัน เพื่อให้ทราบถึงระยะเวลาในการบ่มเชื้อว่ามีผลต่อการผลิต GA หรือไม่ รวมไปถึงการแยก 2 รูปแบบของเชื้อ คือ เส้นใยและculture filtrate อีกด้วย ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ 2×2 Factorial in CRD ดังนี้

ปัจจัย A คือ ชนิดของเชื้อทดสอบ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย

A1: เชื้อรา F221-B (เชื้อราปฏิปักษ์) A2: เชื้อรา F221-R (เชื้อราสาเหตุโรค)

ปัจจัย B คือ รูปแบบของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย

B1: เส้นใย (mycelium) B2: culture filtrate (CF)

นำ CE ที่ได้จากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 10, 15 และ 30 วันของเชื้อรา F221-B และ F221-R จาก 2 รูปแบบ คือ สารสกัดจากเส้นใยและสารสกัดจาก culture filtrate (CF) มาละลายด้วย acetonitrile HPLC grade หลังจากนั้นเตรียมเครื่อง HPLC (ยี่ห้อ Hitachi รุ่น Chromaster) โดยนำ stainless steel column ขนาด 250 × 4 มิลลิเมตร และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ acetonitrile : acidic water (ความเข้มข้น 0.01 % H₃PO₄ อัตราส่วน 60:40) โดยอัตราการไหลของ mobile phase ที่ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที 206 นาโนเมตร หลังจากนั้นฉีดตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC โดยทำการเปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้กับชุดควบคุมหรือ standard mixture of gibberellins (Barendes and Van De Weken 1980) เทียบกับกราฟข้อมูลมาตรฐาน standard GA₃ ที่เกิดขึ้น

3.6.3 การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

นำสาร CE ที่สกัดได้จากเชื้อ *F. oxysporum* F221-B และ Standard gibberellins (การค้ำ) เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสาร CE ที่มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่สาร CE โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ระยะ คือ การทดสอบการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของผักสลัด 2 สายพันธุ์ คือ butter head และ frillice iceberg ดังต่อไปนี้

3.6.3.1 การศึกษาอิทธิพลของ CE ต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด

ทำการทดลองแบบ CRD โดยนำเมล็ดผักสลัด 2 สายพันธุ์ butter head และ frillice iceberg จำนวนละ 50 เมล็ด คลุกกับ CE ที่สกัดได้จากเชื้อ *F. oxysporum* F221-B ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (1, 3, 5 และ 10 ppm) และ standard gibberellins 50 ppm (การค้ำ) ในปริมาณ 5 มิลลิลิตร ทั้งไว้ 5 นาที ส่วนในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำเป็นตัวคลุกเมล็ดแทน หลังจากนั้นนำเมล็ดที่ผ่านการคลุกแล้วใส่ในถาดเพาะเมล็ด เก็บไว้ที่มีดแล้วสเปรย์น้ำเพื่อให้ความชื้นแก่เมล็ด จากนั้นทำการบันทึกการงอกของเมล็ดพืช และคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด รวมทั้งบันทึกความยาวต้นกล้า โดย

เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่ได้ทำการใส่เชื้อ และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.05$

3.6.3.2 การศึกษาอิทธิพลของ CE ต่อการเจริญเติบโตของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์

นำกล้าผักสลัดที่ได้จากการทดลองที่ (3.6.3.1) มาอนุบาลในกระบะปลูกขนาด 25×34 เซนติเมตร ที่บรรจุด้วยสารละลายธาตุอาหารพืชค่า $EC = 1 \text{ ms/cm}^2$, $pH = 5.8-6.2$ (Benoit, 1992) ทำการทดลองแบบ CRD จำนวน 11 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ซึ่งระบบที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้จะใช้ระบบสารละลายธาตุอาหารพืชแบบเป่าอากาศ เมื่อพืชอายุ 3 สัปดาห์ ย้ายลงในกะละมังปลูกที่บรรจุสารละลายธาตุอาหารพืช $EC = 1.8-2.0 \text{ ms/cm}^2$ ปริมาณ 10 ลิตร ดังรายละเอียดกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธี 1 Healthy control (ไม่ใส่ gibberellins)

กรรมวิธี 2 Standard gibberellins (50 ppm)

กรรมวิธี 3 Crude extract of F221-B (1 ppm)

กรรมวิธี 4 Crude extract of F221-B (3 ppm)

กรรมวิธี 5 Crude extract of F221-B (5 ppm)

กรรมวิธี 6 Crude extract of F221-B (10 ppm)

กรรมวิธี 7 Crude extract of F221-B (1 ppm) + เพิ่ม 1 ppm

กรรมวิธี 8 Crude extract of F221-B (3 ppm) + เพิ่ม 3 ppm

กรรมวิธี 9 Crude extract of F221-B (5 ppm) + เพิ่ม 5 ppm

กรรมวิธี 10 Crude extract of F221-B (10 ppm) + เพิ่ม 10 ppm

กรรมวิธี 11 Crude extract of F221-B (50 ppm) + เพิ่ม 50 ppm

กรรมวิธีที่ 7-11 ทำ
การฉีดพ่น GA เพิ่ม

หลังจากนั้นทำการเตรียม GA ที่สกัดจากเชื้อรา F 221-B ที่ความเข้มข้น 1, 3, 5, 10 และ 50 ppm ฉีดพ่นลงบนต้นผักสลัดในกรรมวิธีที่ 7-11 ให้ทั่วทั้งต้น จำนวน 5 มิลลิลิตรต่อต้น (ยกเว้น กรรมวิธีที่ 1-6 ที่จะไม่ฉีดพ่น GA เพิ่ม) ส่วนในกรรมวิธีควบคุม ใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวควบคุมแทน ทำการบันทึกผลโดยวัดขนาดของใบ จำนวนใบ ค่าคลอโรฟิลล์ (SPAD value) โดยใช้เครื่อง (chlorophyll meter รุ่น SPAD-502 ของบริษัท Minolta Camera ประเทศญี่ปุ่น) เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการชั่งน้ำหนักสดและแห้งของต้นและราก

3.7 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดกับผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิคส์

นำรูปแบบของเชื้อรา *F. oxysporum* F221-B ที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการของทุก ๆ วิธีการที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดของทุก ๆ กรรมวิธี มาทดสอบว่ามีผลในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดกับผักสลัดพันธุ์ Frillice iceberg เนื่องจากพบปัญหาการระบาดของโรครากเน่าในระบบปลูกพืชในดินของต่างประเทศ (Scott *et al.*, 2014) และในปัจจุบันได้พบการระบาดของโรครากเน่าใน

ไฮโดรโพนิคส์ในประเทศไทย (ชิตติและคณะ 2555) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 8 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 5 ต้น ดังรายละเอียด ต่อไปนี้

กรรมวิธี 1 Healthy control (ไม่ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธี 2 Inoculation control (Pathogen)

กรรมวิธี 3 Spore suspension of F221-B

กรรมวิธี 4 Culture filtrate of F221-B

กรรมวิธี 5 Crude extract of F221-B

กรรมวิธี 6 Spore suspension of F221-B + inoculation pathogen (F422-G)

กรรมวิธี 7 Culture filtrate of F221-B + inoculation pathogen (F422-G)

กรรมวิธี 8 Crude extract of F221-B + inoculation Pathogen (F422-G)

เริ่มจากการเพาะเมล็ดผักสลัด บนฟองน้ำ และรดน้ำนาน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้สารละลายธาตุอาหารที่มีค่า $EC = 1 \text{ ms/cm}^2$, $pH = 5.8 - 6.2$ (Benoit, 1992) เมื่อต้นกล้ามีอายุครบ 2 สัปดาห์ ย้ายลงระบบปลูก (ภาพที่ 3.4) หลังจากนั้นใส่ทุกรูปแบบของเชื้อ *F. oxysporum* F221-B ดังกล่าวข้างต้น ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้นลงในสารละลายธาตุอาหารพืช จากนั้นอีก 3 วันจึงปลูกเชื้อ (inoculation) สาเหตุโรคด้วย spore suspension (1×10^6 spore/ml) ของเชื้อ Pathogen ปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อต้น ลงในสารละลายธาตุอาหารพืช บันทึกผล โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของการเกิดโรคในกล้าผักสลัด พร้อมทั้งวัดค่าการเจริญของพืช ดังต่อไปนี้

การบันทึกผล

1) บันทึกผลด้านโรค

- วัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และความรุนแรงของการเกิดโรค

2) บันทึกผลด้านการเจริญเติบโตของพืช

- วัดการเจริญเติบโตของพืช (growth of plant) จำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์

- น้ำหนักสดและแห้งของต้นและราก



ภาพที่ 3.4 การปลูกผักสลัดในระบบปลูกพืชแบบไร้สารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้


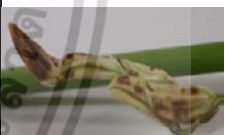



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช






จากการเก็บตัวอย่างผักสลัด (ต้นและราก) และ ข้าว (เมล็ดและใบ) จากแหล่งต่างๆ ที่แสดงอาการโรคมานำการศึกษาและแยกเชื้อราสาเหตุโรค พบเชื้อราจำนวน 10 ไอโซเลท ดังนี้ โดยในข้าวพบเชื้อราจำนวน 8 ไอโซเลท คือ *Curvularia* sp. (C11, C12), *Fusarium semitectum* (F113), *Rhizoctonia* sp. (R111, R112, R113) และ *R. solani* (R11, R12) ส่วน ในผักสลัด 2 ไอโซเลท คือ *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) โดยมีรายละเอียดของแหล่งที่เก็บ ชนิดของพืชอาศัย และลักษณะอาการของโรคดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่เก็บ ชนิดของพืชอาศัยและเชื้อราสาเหตุที่แยกได้

Pathogen	Source	Host	Isolation description	
				Symptom
1. <i>Curvularia lunata</i> C11	Ratchaburi	Rice (seed)	Seeds infected by dirty panicle disease showing black spot, small brown lesion, partial blackening and covered by fungal spores.	
2. <i>C. lunata</i> C12	Bangkok	Rice (seed)	Undeveloped kernels with severe black spots, brown lesions, partial browning and blackening.	
3. <i>Fusarium semitectum</i> F113	Ratchaburi	Rice (seed)	Undeveloped kernels with brown lesion or black spots covered with whitish spore mass.	
4. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> F221-R	Samutprakarn	Lettuce (Red oak)	Root rot, yellowing and wilting of basal leaves as well as stunting and plant death. The cortex of the crown and upper root of infected plants became reddish brown and decayed.	
5. <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i> F422-G	Chonburi	Lettuce (Green oak)	Disease symptoms included root rot, yellowing and wilting of basal leaves as well as stunting and plant death.	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

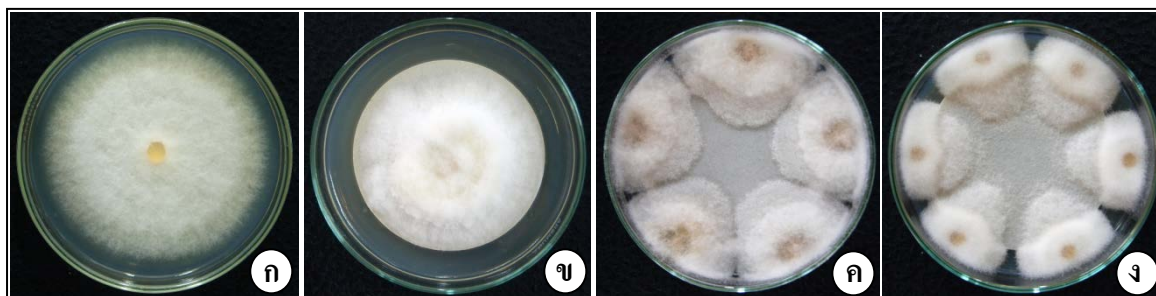
Pathogen	Source	Host	Isolation description	
			Symptom	
6. <i>R. solani</i> R11	Angthong	Rice (leaf)	Grayish leaf lesions (1x3 cm) with a red border.	
7. <i>R. solani</i> R12	Angthong	Rice (leaf)	Black and brown lesions (1x5 cm) or stripes on young leaf surrounded with red dots.	
8. <i>Rhizoctonia</i> sp. R111	Bangkok	Rice (leaf)	Brownish oval lesions (1x2 cm) on the leaf sheaths and leaf blades surrounded with yellow area.	
9. <i>Rhizoctonia</i> sp. R112	Bangkok	Rice (leaf)	Brownish oval lesions (1x3 cm) on leaf blades with darkening at the center.	
10. <i>Rhizoctonia</i> sp. R113	Nakornprathom	Rice (leaf)	Brownish oval lesions (1x1.5 cm) on leaf sheaths at the water level in the paddy field.	

4.2 การประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในระหว่างการเก็บรักษา 1-24 เดือน (Long term preservation)

4.2.1 การเลือกวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม

4.2.1.1 การเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) โดยใช้เทคนิค Modified filter paper culture

จากการเก็บรักษาเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) โดยวิธี modified filter paper culture ซึ่งได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Fong *et al.* (2000) ในวิธีการวางชั้นงุ่นเชื้อจากวิธีการเดิมทำการวางเชื้อ 6 ชั้น ลดลงเป็น 5 ชั้นและ 1 ชั้น พบว่า การเจริญของเชื้อในทุก ๆ กรรมวิธีที่ทำการทดลองสามารถเจริญครอบคลุมกระดาษกรองได้ดี (ดังภาพที่ 4.1)



Control

1 จุด

5 จุด

6 จุด

ภาพที่ 4.1 ลักษณะรูปแบบการวางเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ที่อายุ 7 วัน จำนวน 4 กรรมวิธี ดังนี้

- ก. กรรมวิธีที่ (1) Control 1 ชิ้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA (ไม่มีกระดาษกรอง)
- ข. กรรมวิธีที่ (2) 1 ชิ้นวุ้นเชื้อ + วางบนกระดาษกรอง
- ค. กรรมวิธีที่ (3) 5 ชิ้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA ที่ตำแหน่งขอบนอกกระดาษกรอง
- ง. กรรมวิธีที่ (4) ทำเหมือนกรรมวิธีที่ 3 แต่วางชิ้นวุ้น 6 ชิ้นวุ้นเชื้อ

4.2.1.2 การประเมินเทคนิค Filter paper (ตัดแปลง) ในการเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B)

จากการตรวจการมีชีวิตของเชื้อ (viability) ในแต่ละกรรมวิธีและในแต่ละขอบรัศมีของกระดาษกรองนั้นๆ พบว่าในช่วง 1-3 วันแรกของการปลูกเชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8 หลังการปลูกเชื้อ) ซึ่งเป็นวันที่ชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเจริญของเชื้อจากขอบในของกระดาษกรอง มีแนวโน้มที่จะเจริญน้อยกว่าเชื้อที่มาจากกระดาษขอบกลางและขอบนอกของทุกกรรมวิธีซึ่งให้ค่าการเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับชุดควบคุม (control) แต่อย่างไรก็ตาม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของทุกกรรมวิธีก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติและไม่ต่างไปจากกรรมวิธีควบคุม (control) ดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2 สำหรับปริมาณสปอร์ของเชื้อที่พบในทุกขอบรัศมีของกระดาษกรองในทุกกรรมวิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ในภาพรวมกรรมวิธีที่วางเชื้อ 1 ชิ้น มีปริมาณสปอร์น้อยกว่า 5 ชิ้น และ 6 ชิ้น โดยมีปริมาณสปอร์อยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 spore/ml สำหรับกรรมวิธีที่วางเชื้อ 5 ชิ้น และ 6 ชิ้น ปริมาณของสปอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อยู่ในช่วง 10^7 - 10^8 spore/ml แต่อย่างไรก็ตาม กรรมวิธีที่วางเชื้อ 6 ชิ้นมีแนวโน้มที่จะให้ผลดีกว่าในกรรมวิธี 5 ชิ้น

โดยสรุปจากการที่ได้ตั้งสมมุติฐานไว้ 2 ประเด็น 1) การตัดแปลงวิธีการวางชิ้นวุ้น 1 ชิ้น และ 5 ชิ้นมีแนวโน้มการสร้างสปอร์น้อยกว่ากรรมวิธีอ้างอิงของ Fong *et al.*, 2000 ที่วางชิ้นวุ้นจำนวน 6 ชิ้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เป็นการยืนยันอีกครั้งถึงวิธีการวางชิ้นวุ้น 6 ชิ้นนั้นสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการทดลอง long term preservation ได้ต่อไป เพราะได้ทราบว่าในแต่ละระยะขอบรัศมีของกระดาษกรองนั้นมีความสม่ำเสมอของเชื้อและการสร้างสปอร์ไม่มีความแตกต่างกัน 2) การตัดแปลงที่ 2 ไม่ใช่ปั๊มสุญญากาศดูดความชื้น (non-vacuum dessicator) พบว่า การ

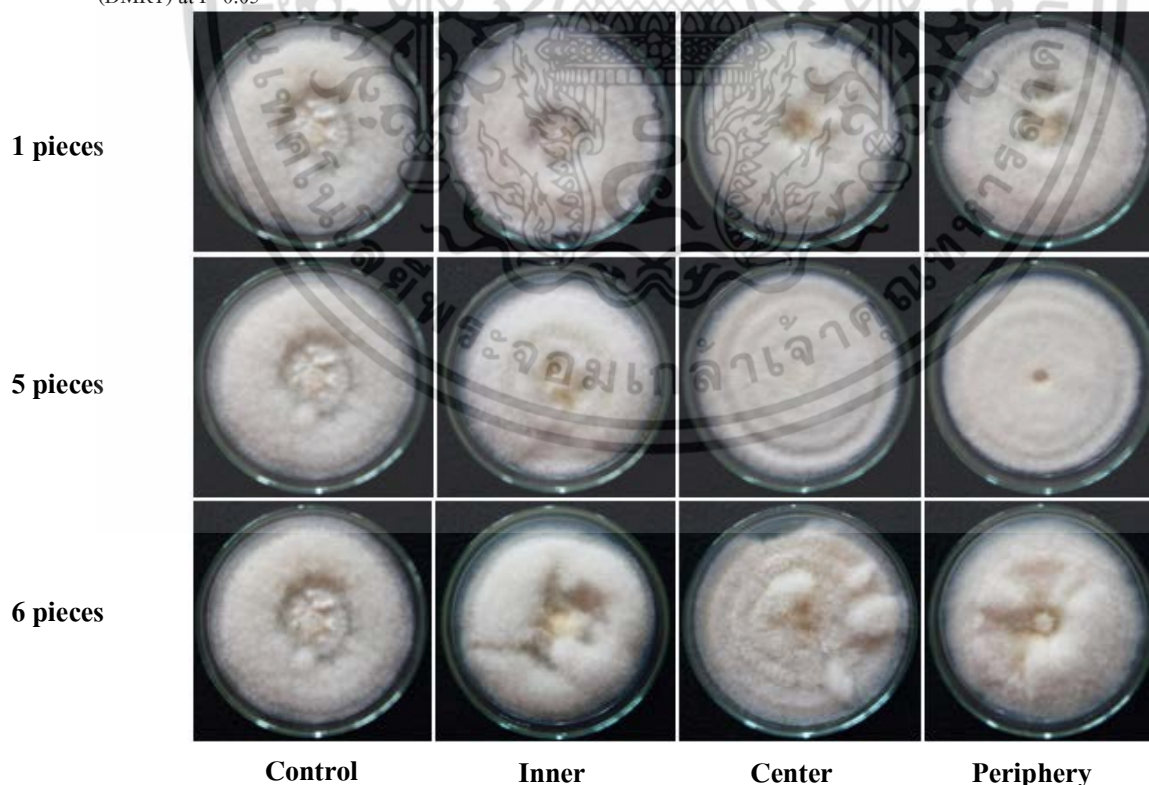
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่ยุ่งยากและลดความเสี่ยงที่จะเกิดกับเชื้อ อีกทั้งยังสามารถทำให้กระดาษกรองแห้งเร็วภายใน 7 วัน และไม่มีสารปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ เลย จึงเหมาะที่จะนำไปใช้เป็นวิธีการเก็บเชื้อในระยะยาวต่อไป

ตารางที่ 4.2 การประเมินผลของการเจริญทางเส้นใยและปริมาณสปอร์เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F 221-B) บนกระดาษกรอง โดยวิธี Filter paper

Treatment	Circumferences	Ø Colony of <i>F. oxysporum</i> (F 221-B) cm/day					Amount of spore(spore/ml) 8 day
		1 day	3 day	5 day	7 day	8 day	Macroconidia
Control	-	1.95a ^{1/}	3.87a	5.6a	7.82a	9a	0.8×10^8 a
1 pieces	inner	1.48a	3.03a	4.57a	6.85ab	7.24ab	1.9×10^5 c
	center	1.53a	3.28a	5.02a	7.45a	9a	2.2×10^6 b
	periphery	1.66a	3.41a	5.24a	7.64a	9a	3.6×10^6 b
5 pieces	inner	1.43a	3.25a	5.23a	7.42a	8.66a	0.2×10^7 ab
	center	1.56a	3.32a	5.28a	7.52a	9a	1.9×10^7 ab
	periphery	1.60a	3.37a	5.36a	7.84a	9a	1.1×10^8 a
6 pieces	inner	1.31a	2.77a	4.85a	6.44ab	7.82ab	1.8×10^7 ab
	center	1.52a	3.28a	5.30a	7.52a	9a	1.2×10^8 a
	periphery	1.71a	3.46a	5.42a	7.68a	9a	1.9×10^8 a

^{1/}Mean of 5 replications in a column followed by same letters are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05



ภาพที่ 4.2 การประเมินผลของการเจริญทางเส้นใยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F 221-B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารในแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบการวางใน 3 ระยะ (ขอบใน ขอบกลาง และ ขอบนอก) นำด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งที่อยู่ 9 วันหลังการปลูกเชื้อ นี้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การประเมินความอยู่รอด (ในระหว่างการเก็บรักษา 1-24 เดือน)

จากการเก็บรักษาเชื้อรา F221-B ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงแรกของการเก็บรักษา (ที่ระยะเวลา 6 เดือน) โดยวิธี modified paper method พบว่าเป็นวิธีการเหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อรา F221-B โดยตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 6 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแล้ว พบว่า ขนาดเส้นใย สปอร์ และปริมาณการสร้างสปอร์ ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.3) กล่าวคือขนาดเส้นใยที่เจริญออกมาจากชิ้นวัสดุ อยู่ในช่วง 110-121×2.2-2.6 ไมโครเมตร และปลายเส้นใยมีขนาด 82.04-94.04×3.2-3.5 ไมโครเมตร และขนาดของ macro conidia เท่ากับ 28.23-29.85×3.0-3.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ

สำหรับในช่วงต่อมาของการเก็บรักษา (10, 14, 17 และ 24 เดือน) ก็ยังพบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อคงเดิมเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อก็ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (ตารางที่ 4.3) กล่าวคือขนาดเส้นใยหลัก ที่เจริญแผ่ออกมาด้านนอกอยู่ในช่วง 114-119×2.2-2.6 ไมโครเมตร และปลายเส้นใยมีขนาด 85-93.04×3.2-3.6 ไมโครเมตร และขนาดของ macro conidia เท่ากับ 28.03-29.85×3.0-3.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ความอยู่รอดและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 1-24 เดือน

Month	Viability (%)	Colony color	Morphology of <i>Fusarium oxysporum</i> F221-B (at 3 day)			
			Length x Width (µm)		Macroconidia	
	1 Day	3 Day	Main hypha	Hyphal tip	Size (µm)	Amount (spore/ml)
0 (before storage)	100	yellow	117×2.6a ¹	86.7×3.4a	29.7×3.5	3.14×10 ⁴
1	100	”	116×2.2a	82.04×3.5a	29.85×3.2	3.26×10 ⁴
2	100	”	110×2.4a	87.42×3.2a	28.56×3.5	2.43×10 ⁴
3	100	”	112×2.6a	92.04×3.2a	28.85×3	3.26×10 ⁴
4	100	”	121×2.6a	90.04×3.2a	28.28×3.2	3.16×10 ⁴
5	100	”	118×2.4a	94.04×3.4a	29.03×3.4	2.88×10 ⁴
6	100	”	116×2.4a	85.13×3.4a	28.23×3.2	2.86×10 ⁴
10	100	”	114×2.4a	87.42×3.2a	28.76×3.5	2.43×10 ⁴
14	100	”	117×2.6a	89.32×3.6a	27.47×3	3.26×10 ⁴
17	100	”	118×2.2a	91.21×3.4a	28.29×3.2	3.16×10 ⁴
24	100	”	119×2.5a	93.04×3.5a	29.85×3.4	3.88×10 ⁴

¹Mean of 3 replications in a column followed by a same letters are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 การประเมินคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ (ในระหว่างการเก็บรักษา 1-24 เดือน)

จากการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. โดยวิธี Dual-culture test พบว่าในช่วงแรกของการเก็บรักษา (ที่ระยะเวลา 6 เดือน) เชื้อรา F221-B มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราทดสอบทั้งหมดอยู่ในช่วง 28.5-68.4 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือในเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ถูกยับยั้งอยู่ในช่วง 46.8-68.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในเชื้อรา *Curvularia* sp. เท่ากับ 43.5-64.1 เปอร์เซ็นต์ และในเชื้อรา *Fusarium* sp. พบการถูกยับยั้ง อยู่ในช่วง 28.5-45.6 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะไม่ค่อยแตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.3) ส่วนในการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบใน dual culture test โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ อยู่ในช่วง 31.6-48.2 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือในเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ถูกยับยั้งอยู่ในช่วง 7.5-40.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Curvularia* sp. เท่ากับ 7.3-58.6 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Fusarium* sp. เท่ากับ 9.6-37.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง CF ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้สูงที่สุด รองลงมาคือ CF ความเข้มข้น 80 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.4)

สำหรับการประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในช่วงหลังของการเก็บรักษา (10, 14, 17 และ 24 เดือน) พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิดโดยในวิธี dual-culture test ไม่มีความแตกต่างกันกับการทดสอบในช่วงแรกของการเก็บรักษา กล่าวคือสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวได้ 32.5-82.4 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือในเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ถูกยับยั้งอยู่ในช่วง 72.2-78.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Curvularia* sp. เท่ากับ 53.6-67.8 เปอร์เซ็นต์ และในเชื้อรา *Fusarium* sp. เท่ากับ 32.5-41.7 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราจะไม่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการเก็บรักษาเชื้อ (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.3) ส่วนในการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบใน dual culture test โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ อยู่ในช่วง 30.3-58.6 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือในเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ถูกยับยั้งอยู่ในช่วง 6.5-38.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Curvularia* sp. เท่ากับ 7.8-58.6 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Fusarium* sp. เท่ากับ 10.6-37.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง CF ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้สูงที่สุด รองลงมาคือ CF ความเข้มข้น 80 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.4)

สำหรับกลไกการยับยั้งที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้มี 2 กลไก กล่าวคือในระยะแรก (วันที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ) จะเริ่มสังเกตเห็นกลไกแบบ antibiosis โดยพบ clear zone ในเชื้อราสาเหตุทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. และเมื่อระยะเวลาผ่านไปกลไก antibiosis จะถูกปกคลุมด้วยกลไก competition (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด (*Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp.) โดยวิธี Dual-culture test

Month	<i>Colletotrichum</i> sp.		<i>Curvularia</i> sp.		<i>Fusarium</i> sp.	
	GI ^{1/} (%)	M ^{2/}	GI (%)	M	GI (%)	M
1	63.2	A	43.5	C	28.5	C
2	46.8	A	44.5	C	41.2	A
3	61.2	A	46.7	C	42.6	A
4	67.8	A	62.8	C	45.6	A
5	62.4	A	64.1	C	42.3	A
6	68.4	A	62.4	C	38.5	C
10	72.2	A	64.4	A	41.7	A
14	73.6	C	53.6	C	34.6	A
17	80.7	A	74.5	C	32.5	C
24	78.4	A	67.8	A	35.6	C

^{1/}Growth inhibition over control $GI = (D1-D2)/D1 \times 100$

Where, D1: diameter of colony growth of pathogen in control, D2: diameter of colony growth of pathogen in treatment.

^{2/}Mechanism of *F. oxysporum* F 221-B (A: Antibiosis, C: Competition)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

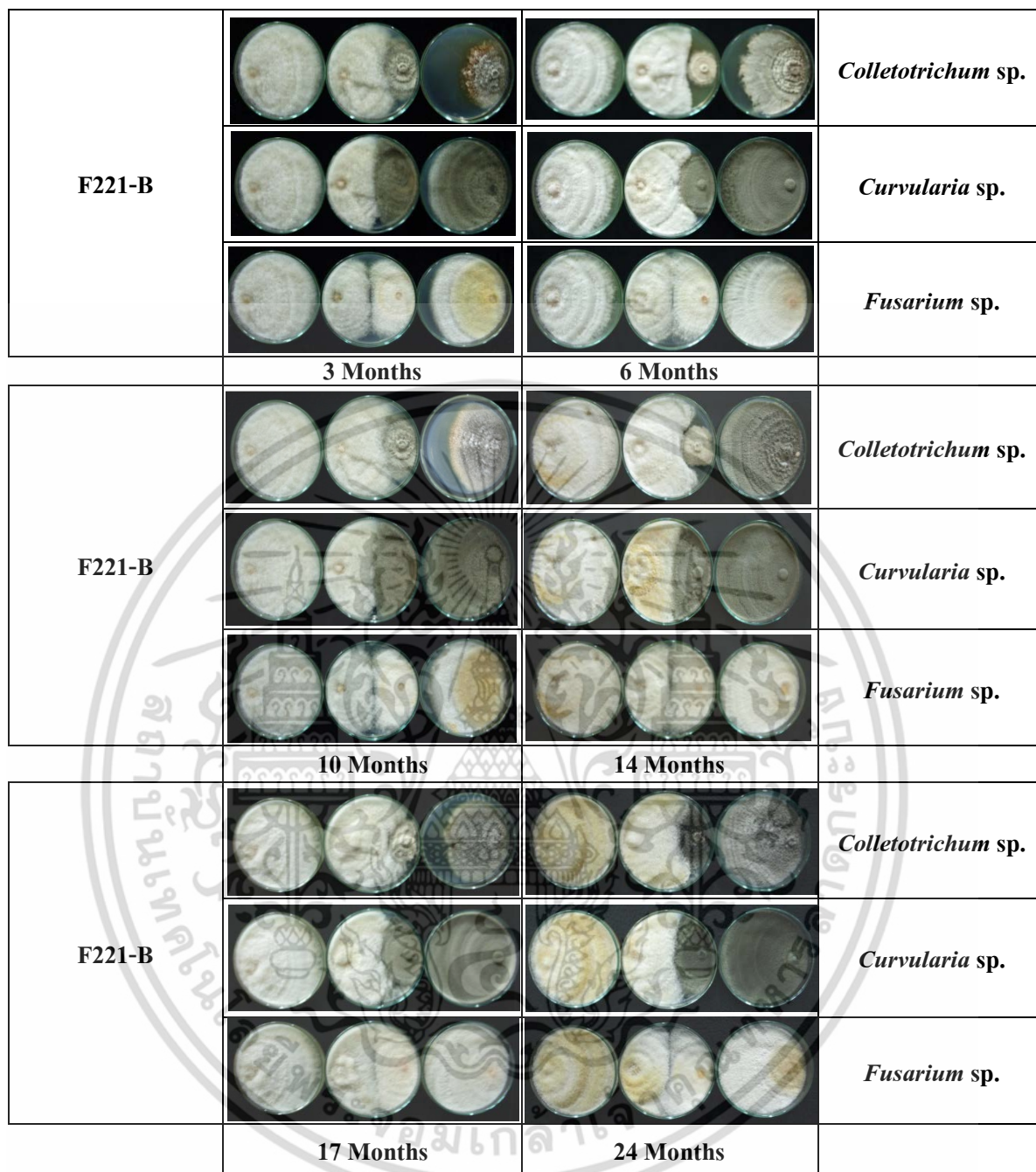
ตารางที่ 4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด (*Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp.) โดยวิธี Agar well diffusion assay (ในระหว่างการเก็บรักษา 1-24 เดือน)

Month	Growth inhibition (%) ^{1/}														
	<i>Colletotrichum</i> sp.					<i>Curvularia</i> sp.					<i>Fusarium</i> sp.				
	Culture filtrate of F221-B (%)					Culture filtrate of F221-B (%)					Culture filtrate of F221-B (%)				
	20	40	60	80	100	20	40	60	80	100	20	40	60	80	100
1	9.3 ^{1/}	15.6	29	35	36.4	7.8	17	17.4	34	38.2	12.6	16.7	27	30	34.4
2	6.8	15.2	22	36	38.2	8.3	12	18	44	47.5	10.6	17	25	35	35.1
3	8.3	10.1	22	37	39.6	8.3	14	16.2	43	47.4	11.8	23	27	36	37.8
4	7.5	15.2	21	38	37.2	9.8	15	17.4	46	58.6	10.9	19	27	35	33.4
5	8.5	14.2	24	31	38.8	8.3	15	19	44	44.4	12.6	20	28	32	35.8
6	7.8	19.2	24	39	40.2	7.3	13	16	38	40.2	9.6	18	28	28	30.3
10	9.3	12.6	24	34	37.4	8.3	11	15	33	45.5	10.6	19	27	27	33.4
14	6.5	11.2	22	36	38.2	7.8	17	17.4	34	38.2	12.6	20	28	32	35.8
17	9.3	16.6	25	34	36.4	8.3	12	18	44	47.5	10.6	19	27	35	37.4
24	8.9	11.2	24	32	38.2	9.8	15	17.4	46	58.6	12.6	20	28	36	37.2

^{1/}Growth inhibition over control $GI = (D1 - D2) / D1 \times 100$

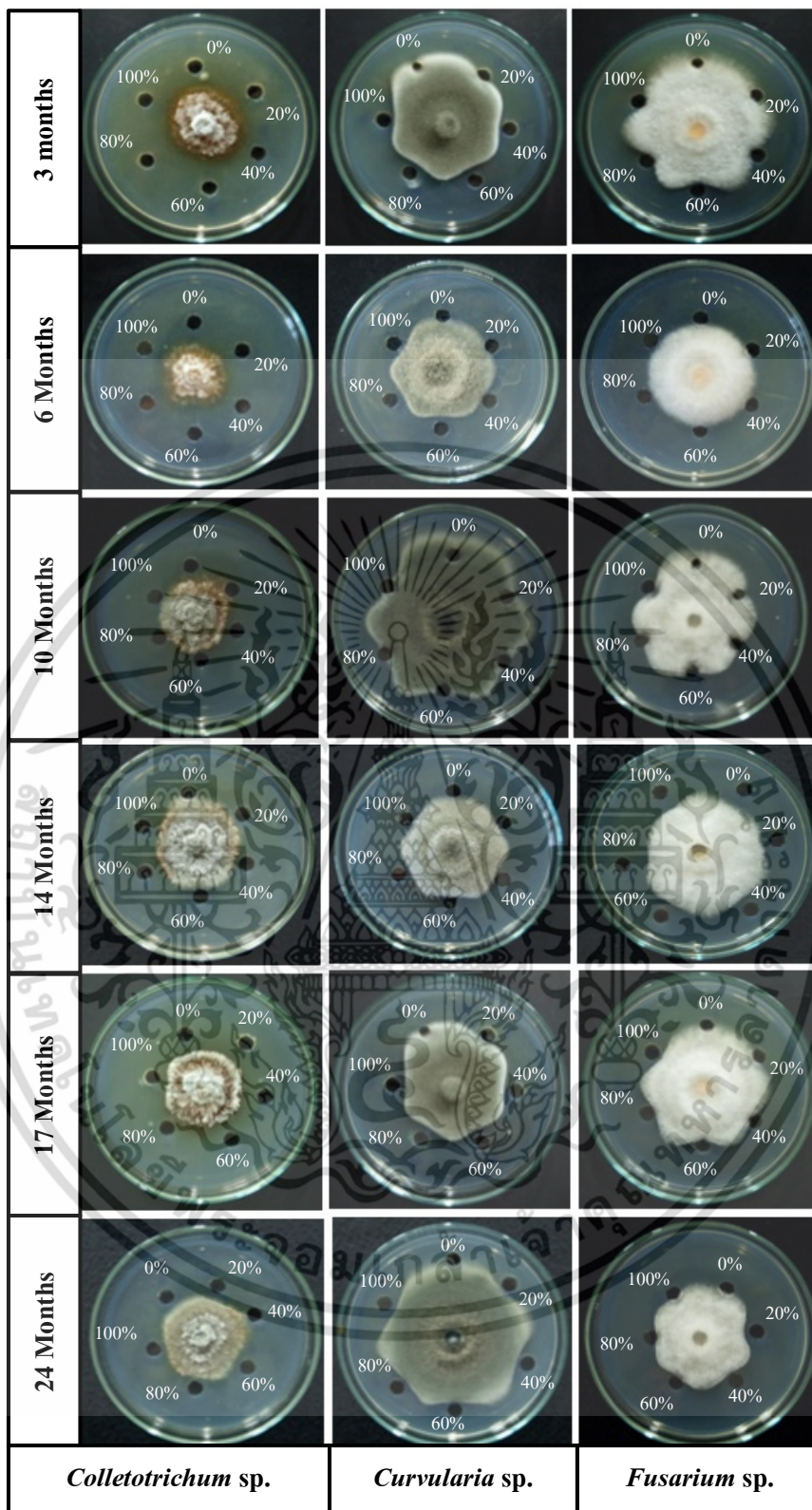
Where, D1: diameter of colony growth of pathogen in control, D2: diameter of colony growth of pathogen in treatment.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 การทดสอบความสามารถของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด (*Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp.) โดยวิธี Dual-culture test (ในระหว่างการเก็บรักษา 24 เดือน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate ของเชื้อรา non-pathogenic *F.oxysporum* (F221-B)

ที่ 6 ระดับความเข้มข้น (0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

สาเหตุโรคพืช 3 ชนิด (*Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp.) โดยวิธี Agar well

diffusion assay (ในระหว่างการเก็บรักษา 24 เดือน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับอาจารย์และบุคลากรในมหาวิทยาลัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การประเมินคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเมล็ดผักสลัด (ในระหว่างการเก็บรักษา 1-24 เดือน)

จากการทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในช่วงแรกของการเก็บรักษา (ที่ระยะเวลา 6 เดือน) โดยใช้ spore suspension ที่ความเข้มข้น 10^3 และ 10^6 spore/ml คลุกเมล็ดผักสลัด 2 ชนิด คือ cos และ red oak ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าการเก็บรักษาเชื้อ F221-B ยังคงคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชทดสอบได้ โดยในทุกๆ เดือนที่ทำการประเมินผลเมล็ด cos และ Red oak เมล็ดที่คลุกด้วย spore suspension ของ F221-B ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น สามารถงอกเร็วกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเชื้อ 2 วัน (ตารางที่ 4.6) และยังส่งผลให้ความยาวของต้นกล้าเฉลี่ยในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension เฉลี่ยสูงกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเชื้อ กล่าวคือในวันที่ 3 ต้นกล้าผักสลัด cos มีความยาวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.1-3.9 เซนติเมตร ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีความยาวเฉลี่ยเพียง 1.7 เซนติเมตร ส่วนเมล็ดผักสลัด Red oak ก็ให้ผลค่าเฉลี่ยความยาวต้นไปในทิศทางเดียวกันกับผักสลัด cos อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นที่ 10^6 spore/ml ก็ให้ผลในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของเมล็ดที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ความเข้มข้น 10^3 spore/ml และ กรรมวิธีควบคุม (healthy control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4.5)

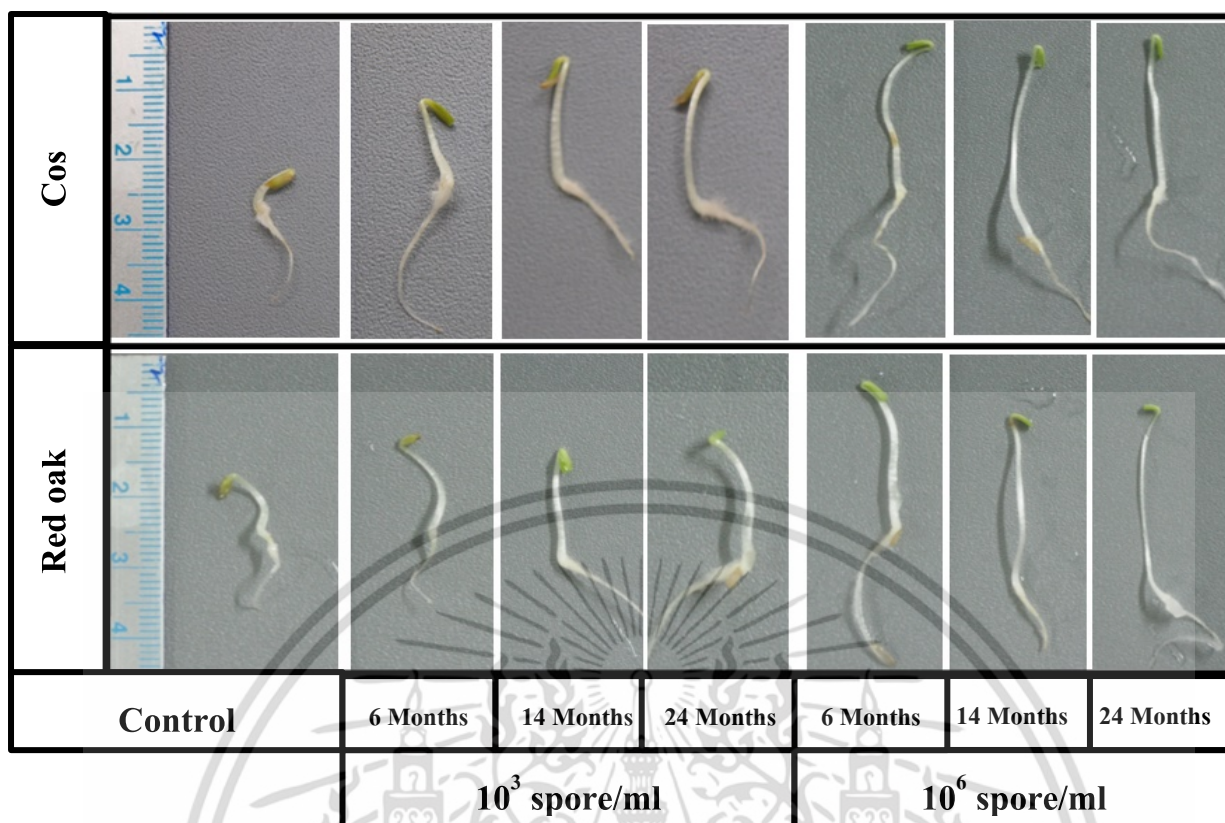
สำหรับการทดสอบในช่วงหลังของการเก็บรักษา (10, 14, 17 และ 24 เดือน) พบว่าจากผลการทดลองไม่มีความแตกต่างกันกับการทดลองในช่วง 6 เดือนแรก กล่าวคือเมล็ดที่ทำการคลุกด้วย spore suspension ของเชื้อรา F221-B ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น (10^3 และ 10^6 spore/ml) ทำให้เมล็ดงอกเร็วกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเชื้อ 2 วัน ในกรณีของผักสลัด cos ความยาวต้นกล้าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.5-4.2 เซนติเมตร ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีความยาวเฉลี่ยเพียง 1.3-1.8 เซนติเมตร ส่วนในผักสลัด Red oak ก็ให้ผลค่าเฉลี่ยความยาวต้นไปในทิศทางเดียวกันกับผักสลัด cos อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นที่ 10^6 spore/ml ก็ให้ผลในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเมล็ดที่ดีที่สุด (ตารางที่ 4.6 และ ภาพที่ 4.5)

ตารางที่ 4.6 การประเมินคุณสมบัติของเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในระหว่างการเก็บรักษา 1-24 เดือน ต่อการงอกของเมล็ดพืช (seed germination)

Month	Treatment	Seed germination (%)				Seedling length (cm)			
		Cos		Red oak		Cos		Red oak	
		2 day	3 day	2 day	3 day	2 day	3 day	2 day	3 day
1	Control	0	80	0	65	0c ¹	1.7c	0c	1.3c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.3ab	3.1ab	1.8ab	2.8ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.41a	3.74a	2.1a	3a
2	Control	0	80	0	60	0c	1.8c	0c	1.4c
	10 ³ spore/ml	100	100	85	100	2.1ab	3.2ab	1.9ab	2.6ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.56a	3.51a	2.3a	3.1a
3	Control	0	85	0	67	0c	1.65c	0c	1.1c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.1ab	3.1ab	1.7ab	2.5ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.41a	3.63a	2.4a	2.9a
4	Control	0	85	0	62	0c	1.7c	0c	1.3c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.3ab	3.4ab	1.8ab	2.8ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.46a	3.9a	2.1a	3a
5	Control	0	82	0	65	0c	1.7c	0c	1.4c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.1ab	3.1ab	1.6ab	2.7ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.5a	3.74a	2.5a	3a
6	Control	0	85	0	65	0c	1.7c	0c	1.3c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.2ab	3.5ab	1.5ab	2.9ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.41a	3.84a	2.6a	3.4a
10	Control	0	85	0	67	0c	1.65c	0c	1.1c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.1ab	3.1ab	1.7ab	2.5ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.41a	3.63a	2.4a	2.9a
14	Control	0	82	0	65	0c	1.7c	0c	1.4c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.1ab	3.1ab	1.6ab	2.7ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.5a	3.74a	2.5a	3a
17	Control	0	85	0	62	0c	1.7c	0c	1.3c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.3ab	3.4ab	1.8ab	2.8ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.46a	4.2a	2.1a	3a
24	Control	0	80	0	60	0c	1.8c	0c	1.4c
	10 ³ spore/ml	100	100	85	100	2.1ab	3.2ab	1.9ab	2.6ab
	10 ⁶ spore/ml	100	100	100	100	2.56a	3.51a	2.3a	3.8a

¹Means of 50 replications in a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การเจริญของต้นกล้าผักสลัด 2 ชนิด ที่ปลูกด้วย spore suspension ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ที่ความเข้มข้น 10^3 และ 10^6 spore/ml

4.3 การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยวิธี Dual-culture antagonistic test

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic F221-B ต่อการเจริญทางเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 10 ไอโซเลท คือ *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* spp. (R111, R112, R113) และ *R. solani* (R11, R12) โดยวิธี dual-culture antagonistic test พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์เบื้องต้น กล่าวคือในช่วง 3 วันแรก เชื้อรา F221-B มีความสามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราอยู่ในช่วง 1.72-13.3 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 5 และ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเพิ่มสูงขึ้น อยู่ในช่วง 15.3-36.3 เปอร์เซ็นต์ โดยในเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. และ *R. solani* ทั้ง 5 ไอโซเลท (R11, R12, R111, R112 และ R113) พบเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งสูงที่สุด อยู่ในช่วง 24.3-36.3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.6) และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 9 หลังการปลูกเชื้อ) พบว่าเชื้อรา F221-B สามารถยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. (R113) ได้ดีที่สุด เท่ากับ 56.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

R. solani (R11) 50.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา *Curvularia lunata* (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) และ *Rhizoctonia* sp. (R111, R112) ถูกยับยั้ง อยู่ในช่วง 36-43.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับกลไกการยับยั้งที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้มี 2 กลไก กล่าวคือในระยะแรก (วันที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ) จะเริ่มสังเกตเห็นกลไกแบบ antibiosis โดยพบ clear zone ใน dual plate ของเชื้อราสาเหตุ 6 สายพันธุ์ คือ R11, R12, R113, F113, F221-R และ F422-G (ภาพที่ 4.7) และเมื่อระยะเวลาผ่านไปกลไก antibiosis จะถูกปกคลุมด้วยกลไก competition สำหรับกลไก exploitation ได้ทำการตรวจสอบเมื่อวันที่ 9 หลังปลูกเชื้อ โดยตัดเส้นใยจากบริเวณที่เชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อรา F221-B เจริญมาทับซ้อนกันในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม (dual culture plate) มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์นั้น ไม่พบกลไก exploitation กับเชื้อราสาเหตุโรคต่างๆ ชนิดที่นำมาทำการทดสอบ อย่างไรก็ตามเมื่อมาพิจารณาถึงความผิดปกติของสปอร์เชื้อรา พบจำนวน 5 ไอโซเลต คือ C11, C12, F113, R11 และ R12 ที่ผิดปกติอาจจะมีผลมาจากการปลดปล่อยสารแบบไม่ระเหยของเชื้อรา F221-B ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงส่งผลทำให้ลักษณะเส้นใยเกิดความผิดปกติ คือ เกิดการบวม หักงอ ผิดรูปร่าง ในขณะที่เดียวกันความผิดปกติของสปอร์ คือ สปอร์บวม มีการรั่วไหลของไซโทพลาซึมภายในออกมาจากตัวสปอร์ (ภาพที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ต่อการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี Dual-culture test

Pathogen	Dimeter of colony of pathogen growth (cm)												Mechanism ^{3/}		
	3 DAI			5 DAI			7 DAI			9 DAI			3 DPI	5 DPI	9 DPI
	Control	Dual culture	GI% ^{2/}	Control	Dual culture	GI %	Control	Dual culture	GI %	Control	Dual culture	GI %			
<i>Curvularia lunata</i> C11	4.77a ^{1/}	4.52b	5.24	6.15a	4.96b	19.3	7.18a	4.96b	30.9	8.6a	4.96b	42.3	A	A	C
<i>Curvularia lunata</i> C12	5.12a	4.8b	6.25	6.83a	5.76b	17.1	7.62a	5.76b	24.4	9a	5.76b	36	A	A	C
<i>F. semitectum</i> F113	4.25a	3.79b	10.8	5.85a	4.38b	25.1	6.86a	4.38b	29.5	7.63a	4.38b	42.5	A	A	A
<i>F. oxysporum</i> F221-R	4.2a	3.7b	11.9	5.9a	4.4b	29	7.4a	5.2b	29.7	9a	5.2b	42	A	A	A
<i>F. oxysporum</i> F422-G	4.5a	3.9b	13.3	6.2a	4.7b	20.3	7.8a	5.5b	29.4	9a	5.5b	38.8	A	A	A
<i>R. solani</i> R11	3.02a	2.83b	6.29	4.24a	3.42b	19.3	4.89a	3.42b	30	6.9a	3.42b	50.4	A	A	A
<i>R. solani</i> R12	3.28a	3.11b	5.18	4.85a	3.82b	21.2	5.98a	3.82b	36.1	5.96a	3.82b	35.9	A	A	A
<i>Rhizoctonia</i> sp. R111	6.22a	5.73b	7.87	8.7a	5.73b	17.4	9.0a	5.73b	36.3	9.0a	5.73b	36.3	C	C	C
<i>Rhizoctonia</i> sp. R112	4.65a	4.48b	1.72	6.01a	5.09b	15.3	6.73a	5.09b	24.3	9a	5.09b	43.4	A	C	C
<i>Rhizoctonia</i> sp. R113	3.4a	3.1b	8.8	4.94a	3.71b	24.8	5.65a	3.71b	34.3	8.5a	3.71b	56.3	A	A	A

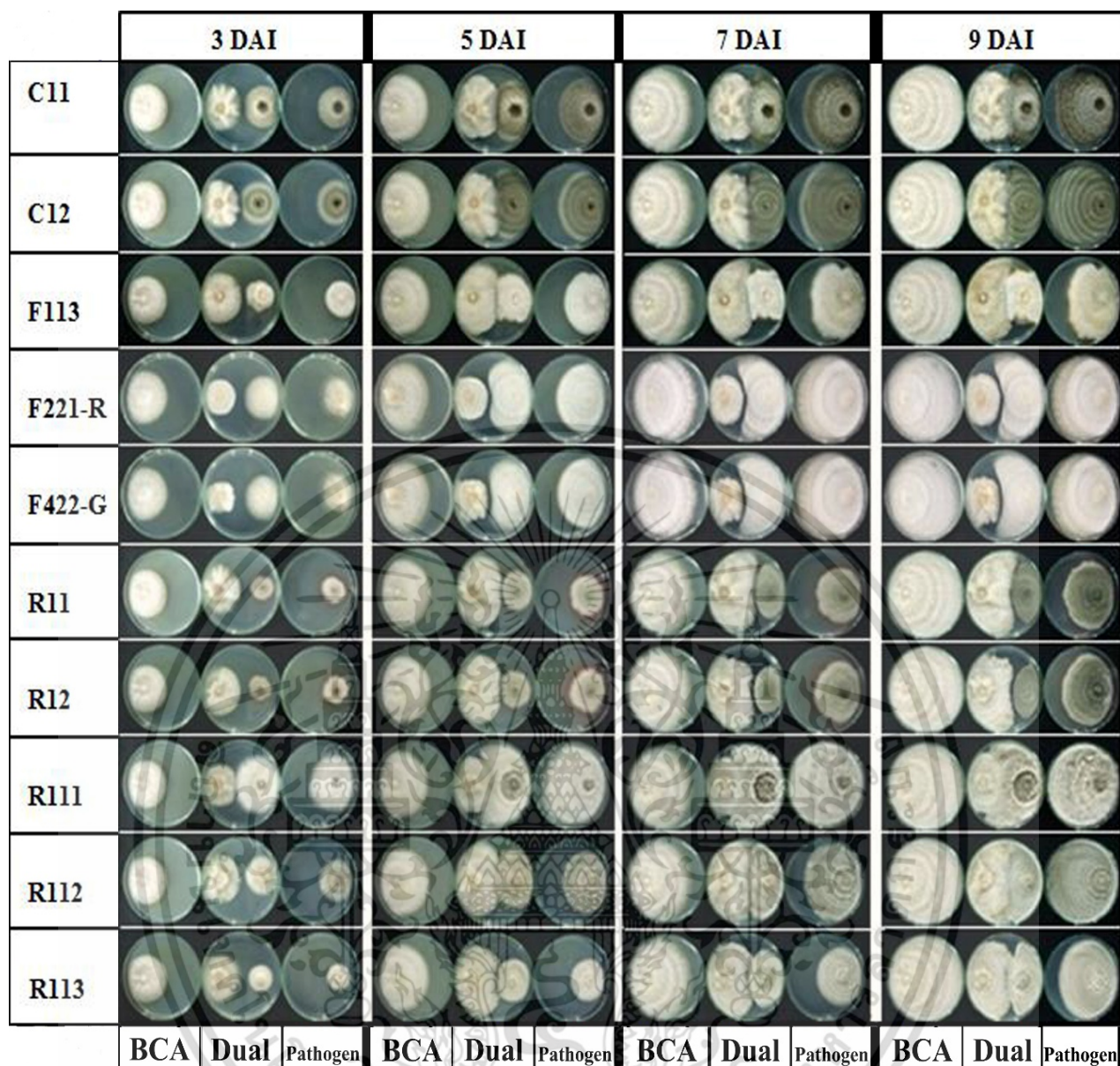
DAI = Day after inoculation

^{1/}Means of 5 replications in a row followed by a same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05.

^{2/}Growth inhibition over control (GI) = (D1-D2/D1) x100

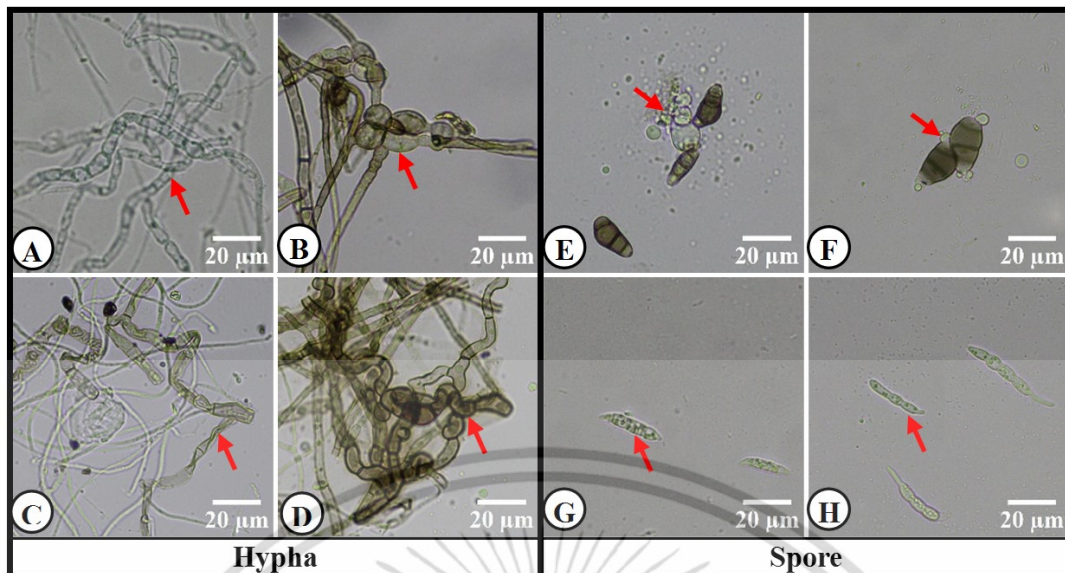
Where, D1: diameter of colony of pathogen growth in control, D2: diameter of colony growth of pathogen in treatment.

^{3/}Mechanism of *F. oxysporum* F 221-B (A: Antibiosis, C: Competition)



ภาพที่ 4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช จำนวน 10 ชนิด โดยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (dual-culture antagonistic test) ที่ระยะเวลา 3, 5, 7 และ 9 วันหลังการปลูกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ลักษณะความผิดปกติของเส้นใยและสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค ที่บริเวณเส้นใยเชื้อรา F221-B และเชื้อราสาเหตุโรคซ้อนทับกัน ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Dual-culture)

A = *F. semitectum* (F113): เส้นใย: บวม เส้นผนังกันขวางเส้นใยสั้น (yeast-like cell)

B = *C. lunata* (C11): เส้นใย: ฝิดรูปปร่าง บวมกลม โป่งพอง

C = *R. solani* (R11): เส้นใย: บิดเบี้ยว ฝิดรูปปร่าง

D = *C. lunata* (C12): เส้นใย: โป่งพอง ฝิดรูปปร่าง

E = *C. lunata* (C11): สปอร์: แตกสลาย, ไซโทพลาสซึมรั่วไหลออกจากเซลล์

F = *C. lunata* (C12): สปอร์: ไซโทพลาสซึมรั่วไหลออกจากสปอร์

G = *F. semitectum* (F113): สปอร์: มีขนาดใหญ่ขึ้นและพบไซโทพลาสซึมรวมตัวภายในสปอร์

H = *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G): สปอร์: มีขนาดใหญ่ขึ้นและพบไซโทพลาสซึมรวมตัวภายในสปอร์

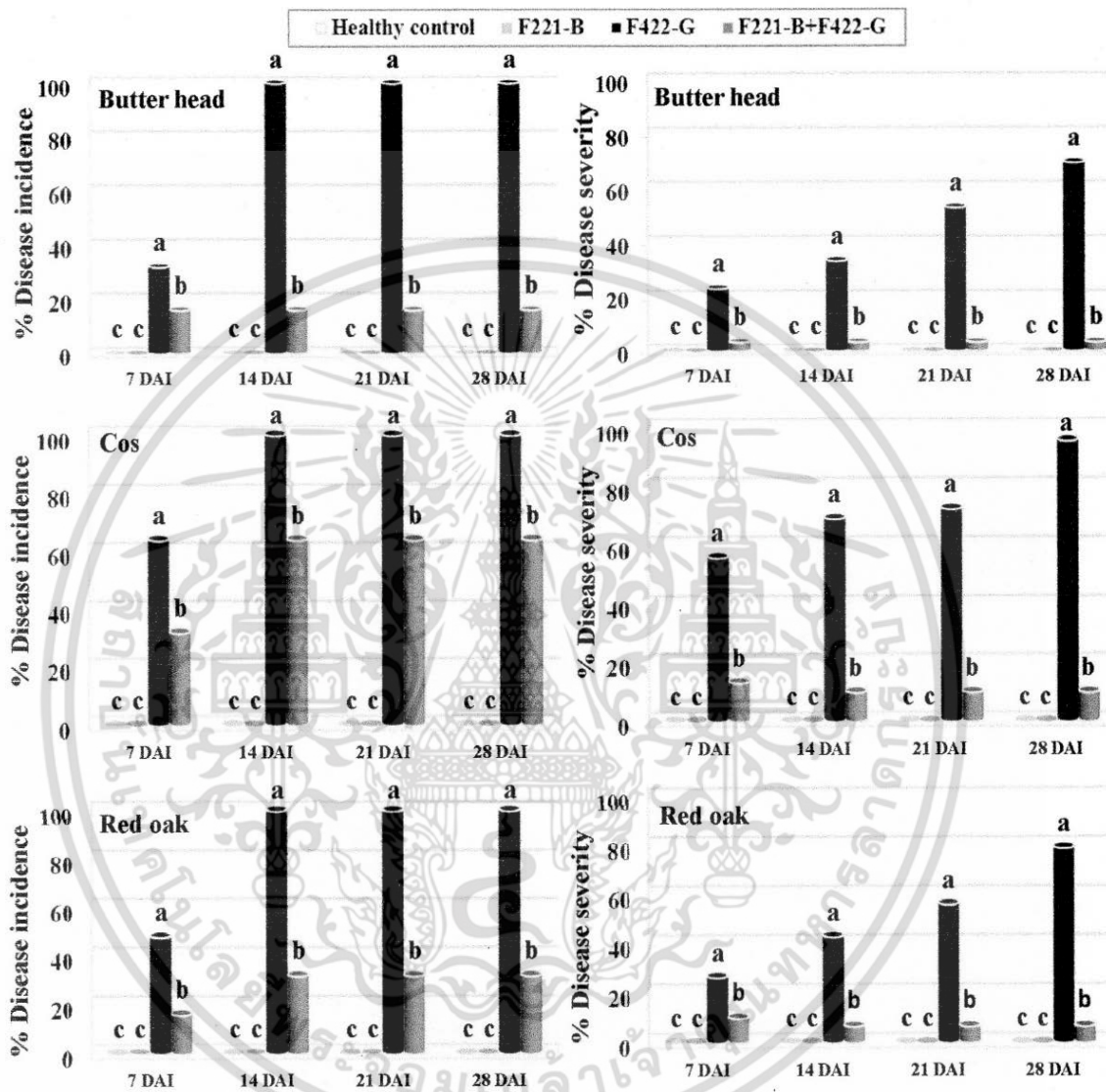
4.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) ในผักสลัด 3 ชนิด (butter head, cos และ red oak) ที่ปลูกในสารละลายแบบเป่าอากาศ โดยมีการประเมินระดับการเกิดโรค (Disease incidence) และความรุนแรงของโรค (Disease severity) รวมทั้งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในทุกสัปดาห์ มีรายละเอียดผลการทดลองดังนี้

จากการทดลองที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าในผักสลัดทั้ง 3 ชนิด เกิดโรค อยู่ในช่วง 32-64 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 23.1-56.1 เปอร์เซ็นต์ โดยผักสลัด Cos เกิดโรคมามากที่สุด สำหรับกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ไม่พบการเกิดโรคซึ่งไม่แตกต่างกับกรรมวิธี healthy control (พืชยังเจริญปกติ) ส่วนในกรรมวิธีที่ใส่ร่วมกัน (F221-B+F422-G) พบว่าเกิดโรคน้อยในทั้ง 3 พืช คือ Butter head, Cos และ Red oak เท่ากับ 3.3, 9.9 และ 13.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 28 หลังการปลูกเชื้อ (สิ้นสุดการทดลอง) พบว่าในกรรมวิธีปลูกเชื้อ F422-G ในทั้ง 3 พืชมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพิ่มสูงขึ้นถึง 100 เปอร์เซ็นต์และความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 69.3-95.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่ใส่ F221-B+F422-G พบการเกิดโรคอยู่ในช่วง 16-64 เปอร์เซ็นต์และความรุนแรงของโรค เท่ากับ 3.3-9.9 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรคในทั้ง 3 พืชทดสอบได้อยู่ในช่วง 64- 85.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ F221-B ในการควบคุมโรคและความรุนแรงโรคได้เป็นอย่างดี

สำหรับการประเมินปริมาณความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) นั้น หลังจากการปลูกเชื้อด้วยสปอร์ความเข้มข้น 10^6 spore/ml ลงในสารละลายธาตุอาหาร 5 ลิตร ส่งผลทำให้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นในกระบะปลูกพืชลดลงเป็น 9.5×10^3 spore/ml และเมื่อทำการตรวจนับปริมาณความอยู่รอดของเชื้อในวันสุดท้ายของการทดลอง (พืชอายุ 45 วัน) พบว่าปริมาณความอยู่รอดของเชื้อในกรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรค (inoculation) มีปริมาณความอยู่รอดของสปอร์เชื้อในผักสลัดทั้ง 3 สายพันธุ์ (butter head, cos และ red oak) ในส่วนของราก เท่ากับ $2.1-2.5 \times 10^5$ spore/ml และในสารละลายธาตุอาหารอยู่ในช่วง $1.8-2.2 \times 10^5$ spore/ml ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ด้วย Spore suspension ของเชื้อรา F221-B หลังจากการปลูกเชื้อด้วยสปอร์ความเข้มข้น 10^8 spore/ml ลงในสารละลายธาตุอาหาร 5 ลิตร ส่งผลทำให้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นในกระบะปลูกพืชลดลงเป็น 3×10^5 spore/ml โดยหลังจากการประเมินปริมาณความอยู่รอดของเชื้อในวันสุดท้ายของการทดลอง (พืชอายุ 45 วัน) พบว่าในส่วนของราก เท่ากับ $1.5-1.6 \times 10^5$ spore/ml และในสารละลายธาตุอาหารเท่ากับ $1.2-1.6 \times 10^5$ spore/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ร่วมกันระหว่าง F221-B และ F422-G พบว่าปริมาณของ

เชื้อราสาเหตุโรค F422-G มีปริมาณที่น้อยกว่าเชื้อรา F221-B โดยปริมาณความอยู่รอดของเชื้อจะพบมากสุดในรากพืชอันเนื่องมาจากการเข้าครอบครองรากของพืช (ตารางที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

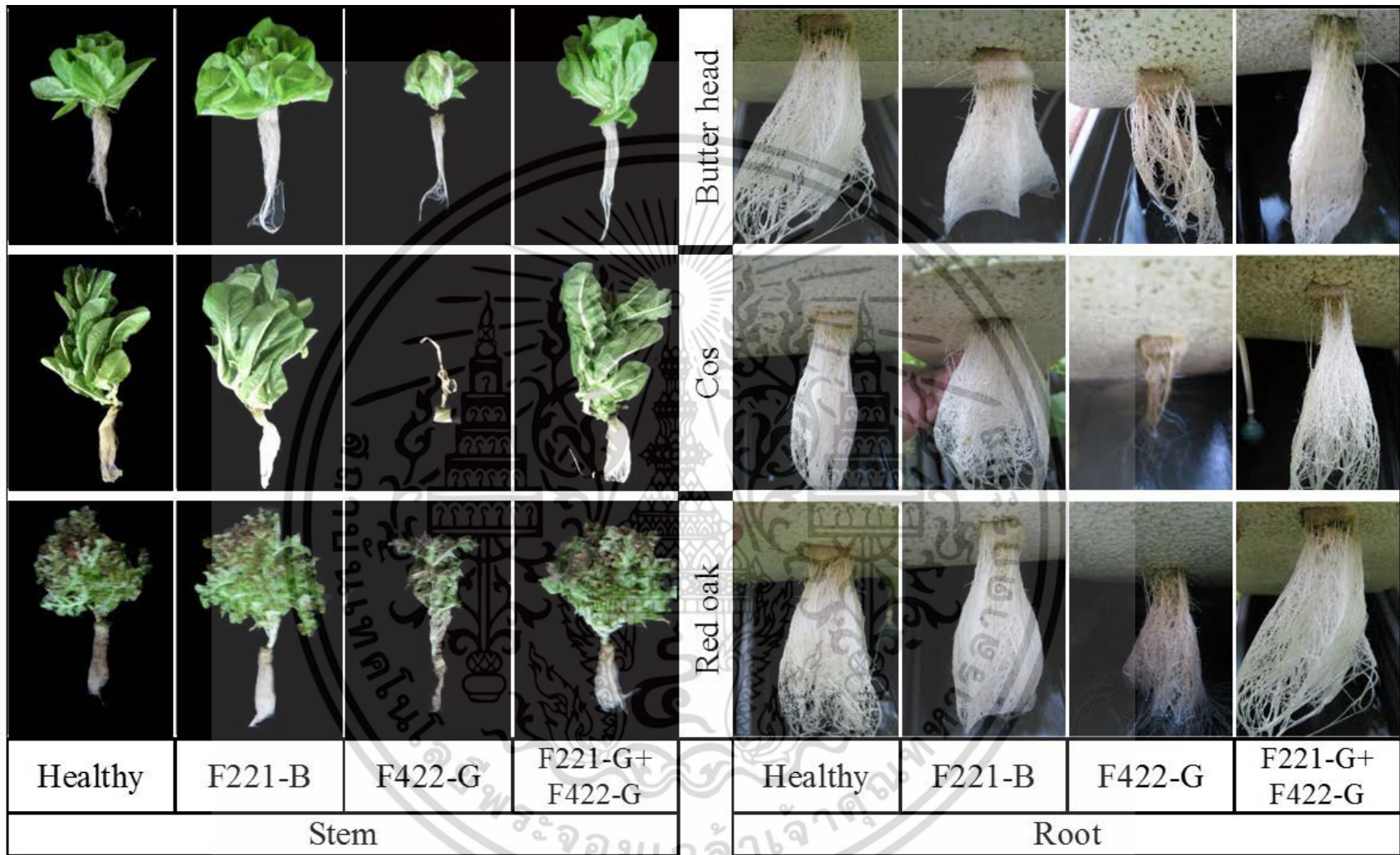
ตารางที่ 4.8 ปริมาณความอยู่รอดของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค (F422-G) ในรากและสารละลายธาตุอาหารพืช

Lettuce	Treatment	Original amount (spores/ml)	Survival of <i>F. oxysporum</i> (CFU/ml)			
			F221-B		F422-G	
			R ^{1/}	NS ^{2/}	R	NS
Butter head	F221-B	3×10^5	1.6×10^5	1.2×10^5	0	0
	F422-G	9.5×10^3	0	0	2.1×10^5	1.8×10^5
	F221-B+F422-G	$(3 \times 10^5) + (9.5 \times 10^3)$	2.2×10^5	1.1×10^5	1.3×10^4	0.3×10^4
Cos	F221-B	3×10^5	1.5×10^5	1.4×10^5	0	0
	F422-G	9.5×10^3	0	0	2.5×10^5	2.2×10^5
	F221-B+F422-G	$(3 \times 10^5) + (9.5 \times 10^3)$	2×10^5	1.7×10^5	1.1×10^4	1.2×10^4
Red oak	F221-B	3×10^5	1.5×10^5	1.6×10^5	0	0
	F422-G	9.5×10^3	0	0	2.2×10^4	2.1×10^4
	F221-B+F422-G	$(3 \times 10^5) + (9.5 \times 10^3)$	1.8×10^5	1.5×10^5	0.8×10^4	1.1×10^4

^{1/}R = Root; ^{2/}NS = Nutrient solution

สำหรับการเจริญเติบโตของผักสลัดที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) พบว่าในกรรมวิธีควบคุม (healthy control) พืชเจริญตามปกติ ส่วนในกรรมวิธีปลูกเชื้อ (F422-G) พืชมีการเจริญเติบโตน้อย ซึ่งมีผลสืบเนื่องจากการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคที่สูง ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ด้วยเชื้อรา F221-B พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในด้านจำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ (SPAD value) น้ำหนักสดและแห้งของต้นและราก ซึ่งให้ผลดีกว่ากรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) และกรรมวิธีควบคุม (healthy control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือในด้านน้ำหนักสดต่อต้นสูงที่สุดในทั้ง 3 พืชทดสอบคือ cos และ red oak (115.9, 192.8 และ 198.4 กรัม/ต้น) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (healthy control) (72.1, 101.7 และ 113.3 กรัม/ต้น) และกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) (24.5, 7.2 และ 37.6 กรัม/ต้น) ยิ่งไปกว่านั้นในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา F221-B+F422-G ก็ยังพบการเจริญด้านน้ำหนักสดที่ดีกว่าในชุดควบคุมถึง 2 เท่า คือ 107.7, 166.5 และ 151.1 กรัม/ต้น โดยสรุปจากผลการทดลองสามารถยืนยันคุณสมบัติในด้านการควบคุมโรคและความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (ตารางที่ 4.9 และ ภาพที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัด 3 สายพันธุ์ ที่ใส่ด้วยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค (F422-G) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (ที่อายุพืช 45 วัน)

ตารางที่ 4.9 ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัด 3 ชนิดที่ใส่ด้วยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค (F422-G) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

Lettuce	Treatment	Plant growth parameter												Total yield (g/plant)			
		Leaf number				Leaf size (cm)				Chlorophyll (SPAD value)				Fresh weight		Dry weight	
		24 d	31 d	38 d	45d	24 d	31 d	38 d	45d	24 d	31 d	38 d	45d	Stem	Root	Stem	Root
Butter head	Healthy control	4.2ab ¹	7.8b	14.2c	14.6c	3.2b	7.2b	16.2c	1.6c	21.3c	29.8b	29.6c	29.8b	72.1b	10.9b	1.69b	0.45b
	F221-B	4.1ab	9.5a	18.3a	23.4a	4.9a	8.7a	19.8a	28.4a	31.2a	33.4a	34.1a	35.9a	115.9a	19.3a	2.32a	0.66a
	F422-G	3.8b	4.3c	5.8d	7.6d	2.5c	3.4c	4.2d	5.25d	16.4d	14.9c	10.4d	8.5c	24.5c	3.2c	0.78c	0.12c
	F221-B+F422-G	4.8a	8.4b	16.9b	16.1b	4.5a	7.6ab	17.5b	21.2b	28.4b	30.8b	31.7b	34.8a	107.7a	15.1ab	2.03ab	0.54ab
Cos	Healthy control	4.4b	7.5b	12.4c	16.3c	4.2c	7.5c	14.2b	17.65b	24.5c	28.5b	29.8b	30b	101.7c	22.2a	4.14b	0.88b
	F221-B	5.8a	9.6a	18.6a	26.8a	6.3a	15.2a	21.6a	27.5a	31.6a	31.9a	32.4a	35.5a	192.8a	26.9a	5.45a	1.65a
	F422-G	2.7c	4.2c	5.5d	5.9d	2.6d	4.5d	4.9c	5.12c	8.4d	9.2c	10.4c	10.5c	7.2d	2.5b	0.3c	0.1c
	F221-B+F422-G	4.5b	8.5b	15.4b	18.3b	5.1b	9.8b	15.3b	19.2b	29.6b	30.8a	31.5ab	31.2b	166.5b	24.2a	5.13ab	1b
Red oak	Healthy control	4.1b	7.5b	14.4b	17.5b	4.2b	7.8c	12.2c	16.5c	20.4a	21.5b	22.8c	24.5b	113.3c	20.5b	5.76a	0.78c
	F221-B	4.6a	14.6a	18.1a	28.8a	5.3a	12.2a	18.3a	24.6a	21.6a	23.9a	26.4a	27.3a	198.4a	24.4a	6.35a	1.89a
	F422-G	3.1c	3.8c	4.1d	4.8c	3.3c	4.1d	4.3d	4.5d	10.5b	11.9c	14.2d	10.5c	37.6d	4.4c	1.1b	0.18d
	F221-B+F422-G	4.2ab	6.5b	13.5c	18.5b	4.7ab	8.9b	13.7b	18.6b	20.6a	21.8b	24.5b	25.2b	151.7b	21.9ab	6.13a	1.12b

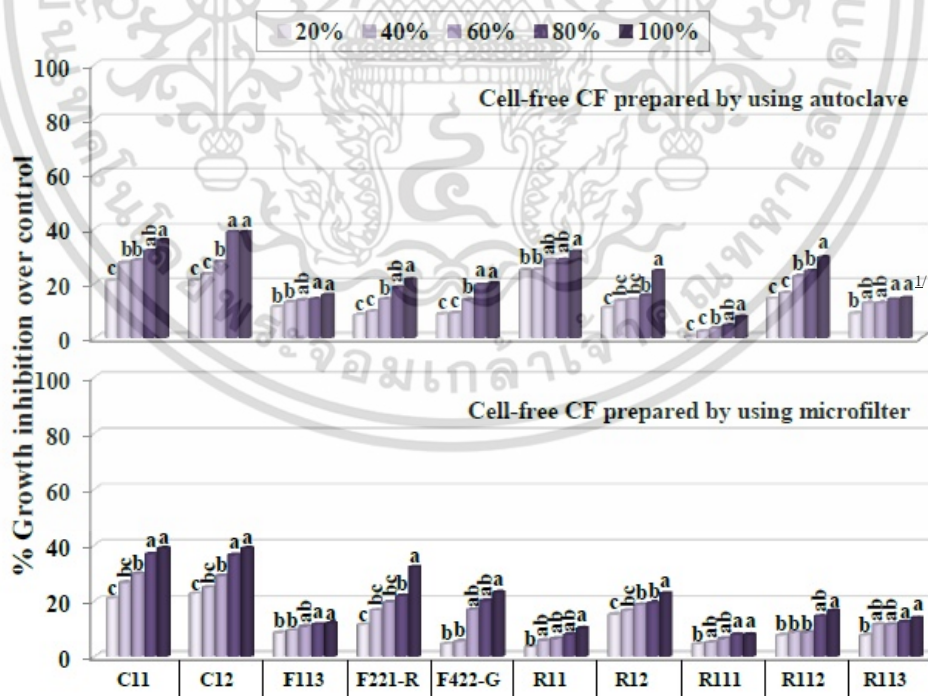
¹Means of 5 replications in a column within each variety of lettuce followed by the same common letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

4.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B)

ต่อการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 10 ชนิด โดยวิธี Agar well diffusion assay

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ CF ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ F221-B ต่อการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 10 ไอโซเลท คือ *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* spp. (R111, R112, R113) และ *R. solani* (R11, R12) โดยวิธี agar well diffusion assay จาก 2 ลักษณะของ CF ของเชื้อรา F221-B ถูกทำให้ปราศจากเส้นใยและสปอร์ (cell free culture) โดยใช้ micro-filter หรือ autoclave พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของ CF สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคทั้งหมดได้ โดยจะเห็นเด่นชัดสุดในเชื้อ R11 และ R112 (ภาพที่ 4.10) ในการศึกษาพบว่าสาร CF ที่ผลิตจากเชื้อรา F221-B ผลิตได้ในปริมาณคงที่ และเป็นที่น่าแปลกใจว่า CF ที่ผ่านความร้อน (autoclave) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา R11 และ R112 ได้ไม่ต่างกับ CF ที่ไม่ผ่านความร้อน (autoclave) โดยเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 6-39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และความเข้มข้นของ CF ที่ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อทั้งหมด คือความเข้มข้น 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อรา *Curvularia* spp. (C11 และ C12) เป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อ CF ของเชื้อรา F221-B มากที่สุด (ภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.10 ผลของ cell-free culture filtrate ที่ผลิตจากเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ที่

5 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ในการยับยั้ง

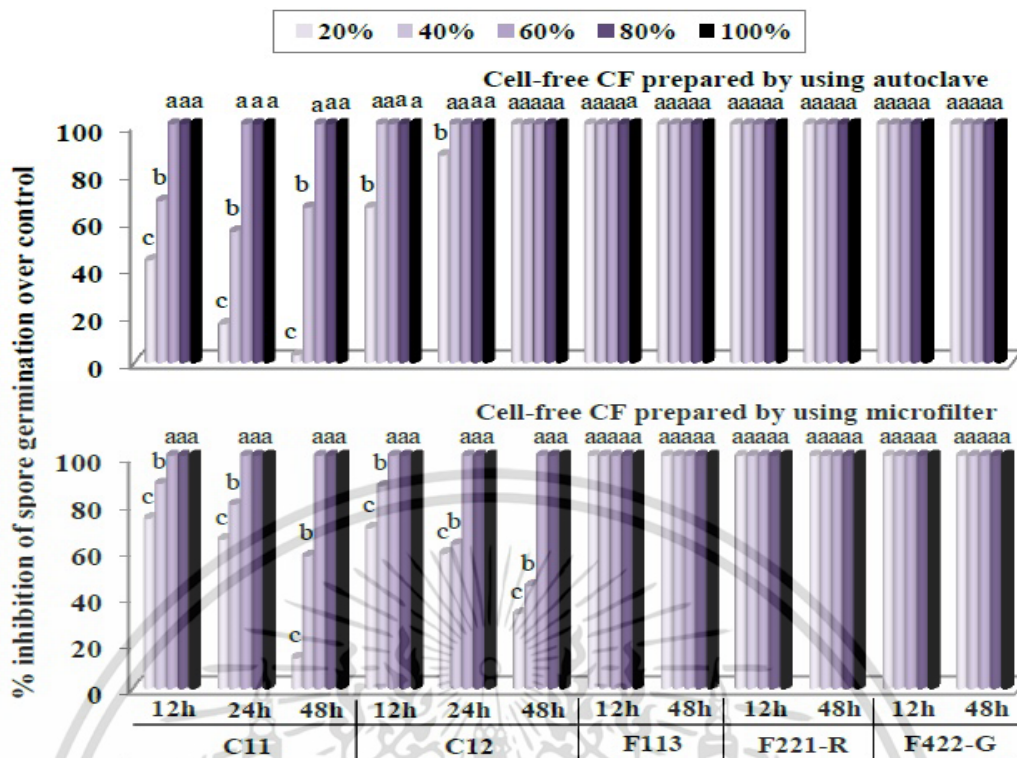
การเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค 10 ชนิด โดยวิธี agar well diffusion assay

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ในอินเทอร์เน็ตโดยไม่คิดค่าลิขสิทธิ์ การนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

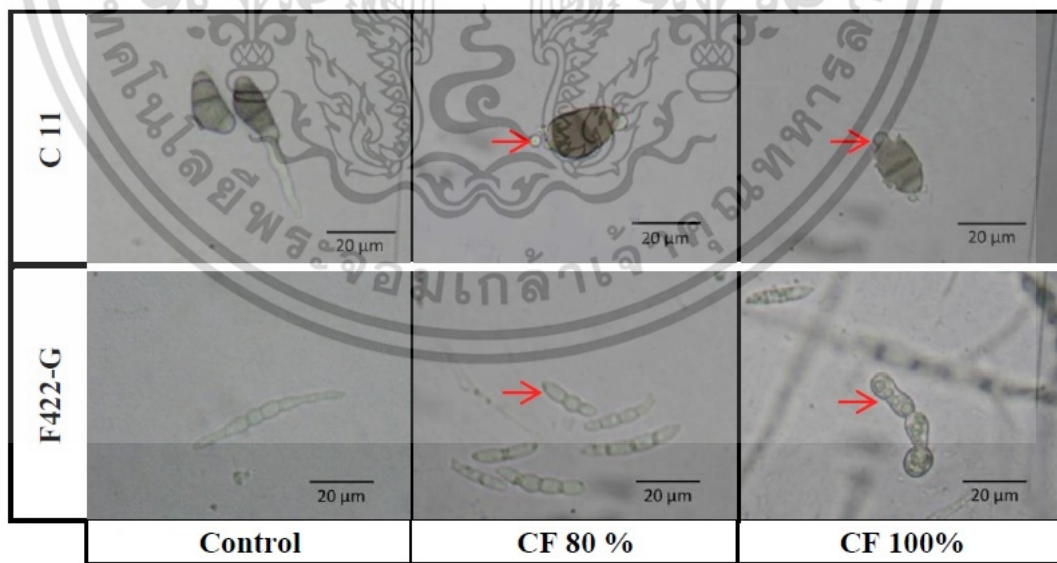
4.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืช 5 ชนิด โดยวิธี Spore germination test

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ CF ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 5 ชนิด คือ *Curvularia* spp. (C11,C12), *F. semitectum* (F113) และ *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) พบว่าผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลอง agar well diffusion assay ซึ่งจาก CF ใน 2 ลักษณะ (micro-filter หรือ autoclave) ทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคทั้งหมดได้ (ภาพที่ 4.11) ซึ่งจากการทดลองสามารถยืนยันอีกครั้งถึงสารที่อยู่ภายใน CF ของเชื้อรา F221-B ที่ไม่เสื่อมสลายไปหลังจากผ่านความร้อน โดยระดับความเข้มข้นของ CF ตั้งแต่ 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. semitectum* (F113) และ *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) ที่ระยะเวลา 12-48 ชั่วโมง เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามในส่วน of เชื้อรา *Curvularia* spp. (C11, C12) พบว่าระดับความเข้มข้นของ CF จากเชื้อ F221-B ที่ 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้น 20 และ 40 สามารถยับยั้งได้น้อยและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะค่อยๆ ลดลงขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการบ่มเชื้อเพิ่มขึ้น โดยเมื่อพิจารณาถึงลักษณะดังกล่าวอาจจะมีผลมาจากสารระเหย หลังจากนั้นพบว่าในแต่ละกรรมวิธีที่ใส่ด้วยสาร CF ในแต่ละระดับความเข้มข้น พบความผิดปกติของสปอร์ คือ บวม แตกสลาย เป็นต้น (ภาพที่ 4.12)

โดยสรุปจากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าทุกความเข้มข้นของ CF ที่ได้จากเชื้อ F221-B สามารถยับยั้งการงอกของเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญทางเส้นใย อันเนื่องมาจากการสัมผัสของสปอร์กับ CF จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเด่นชัด



ภาพที่ 4.11 ผลของ cell-free culture filtrate ที่ผลิตจากเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ที่ 5 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค 5 ชนิด โดยวิธี spore germination test (ที่ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง)



ภาพที่ 4.12 ลักษณะความผิดปกติของของสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. (C11) และ *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) ในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย CF ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ที่ระดับความเข้มข้น 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

จากการประเมินประสิทธิภาพของ CF ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) พบว่า 7 วันหลังการปลูกเชื้อผักสลัดในกรรมวิธีควบคุม (healthy control) พบว่าต้นพืชเจริญปกติดี (ไม่เกิดโรค) ส่วนในกรรมวิธีปลูกเชื้อราสาเหตุโรค (inoculated control) แสดงการเกิดโรค (Disease incidence : DI) เท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรค (Disease severity : DS) เท่ากับ 56.1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง (28 วันหลังการปลูกเชื้อ) พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพิ่มขึ้นเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเท่ากับ 93.6 เปอร์เซ็นต์

ส่วนกรรมวิธีที่ใส่ด้วย CF และ spore suspension ของเชื้อรา F221-B เพียงอย่างเดียว พบว่า ต้นพืชเจริญปกติ ไม่พบการเกิดโรค เช่นเดียวกับกรรมวิธีควบคุม (healthy control) ตั้งแต่ช่วงแรกจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ด้วย CF ของเชื้อ F221-B ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าในช่วงแรก (7 วันหลังการปลูกเชื้อ) เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคลดลงเหลือเพียง 32 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเท่ากับ 6.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (28 วันหลังการปลูกเชื้อ) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคยังคงที่กล่าวคือไม่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงสัปดาห์แรกของการทดลอง และเมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ในการลดโรค เท่ากับ 93.4 เปอร์เซ็นต์ และจากกรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ของเชื้อ F221-B ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าผลการทดลองในด้านการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคไปในทิศทางเดียวกันกับกรรมวิธีที่ใส่ด้วย CF โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 16 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเท่ากับ 3.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเปอร์เซ็นต์ในการลดโรคได้ 96.7 เปอร์เซ็นต์

โดยสรุปจากกรรมวิธีที่ใส่ด้วย CF สามารถยืนยันได้ถึงกลไก antibiosis ซึ่งใน CF มีเพียงแต่สารเพียงเท่านั้น ในขณะที่กรรมวิธี spore suspension สามารถใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดในผักสลัดได้ดีกว่า อาจจะมีผลมาจากการที่สปอร์ยังมีชีวิตอยู่หรืออาจมีกลไกอย่างอื่นร่วมกันอยู่ (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพของ Culture filtrate (CF) ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุม โรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

Treatment	% Disease incidence (DI)				% Disease severity (DS)				% Inhibition in DS over control
	7	14	21	28	7	14	21	28	28
	DAI ^{1/}	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Healthy control	0 ^{2/}	0	0	0	0	0	0	0	-
Inoculated control (F422-G)	64a	100a	100a	100a	56.1a	68.3a	74.6a	93.6a	0
F221-B (CF)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
F221-B (CF)+ F422-G	32b	32b	32b	32b	6.6b	6.6b	6.6b	6.6b	93.4
F221-B (Spore)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
F221-B (Spore)+F422-G	16b	16b	16b	16b	3.3b	3.3b	3.3b	3.3b	96.7

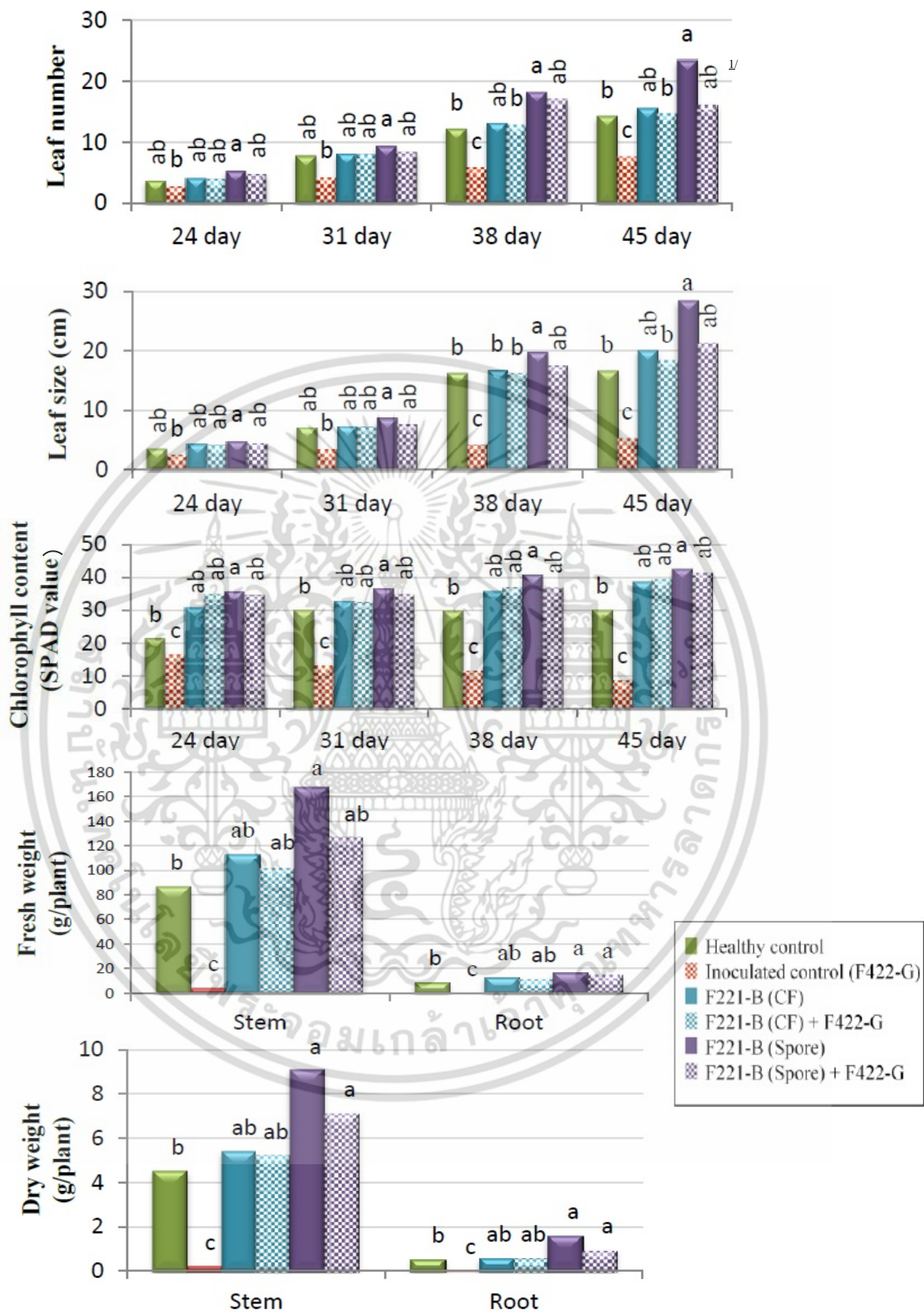
^{1/}DAI: Day after inoculation, Inoculation was made at the age of plant of 17 days.

^{2/}Means in a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at P=0.05.

สำหรับการเจริญเติบโตของผักสลัด ทำการประเมินจากค่าของจำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ (SPAD value) รวมทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งพบว่าช่วงแรกของการปลูกเชื้อ (พืชอายุ 24 วัน) ในกรรมวิธีควบคุม (healthy control) พืชเจริญได้ดีเป็นปกติ ส่วนในกรรมวิธีปลูกเชื้อราสาเหตุโรค (F422-G) ผักสลัดมีการเจริญเติบโตน้อยกว่ากรรมวิธีอื่นๆ โดยมีค่าจำนวนใบและ ขนาดใบ เท่ากับ 2.8 ใบ และ 2.5 เซนติเมตร ส่วนคลอโรฟิลล์ เท่ากับ 16.4 ในขณะที่น้ำหนักสดของต้นและราก 4.25 และ 0.82 กรัมต่อต้น และน้ำหนักแห้ง (0.21 และ 0.02 กรัมต่อต้น)

ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ด้วย culture filtrate และ spore suspension ของเชื้อ F221-B เพียงอย่างเดียวให้ผลในด้าน การเจริญเติบโตที่ดีที่สุด โดย ขนาดใบและจำนวนใบ ให้ผลไปทิศทางที่ดีกว่ากรรมวิธี ควบคุม (healthy control) และกรรมวิธีปลูกเชื้อ จำนวนใบเท่ากับ 17.4 และ 23.4 ใบ ขนาดใบเท่ากับ 20 และ 28.4 เซนติเมตร ส่วนค่าคลอโรฟิลล์ (SPAD value) เท่ากับ 38.4 และ 42.4 ส่วนน้ำหนักสดต้นและ รากใน CF เท่ากับ 112.9 และ 13.25 กรัมต่อต้นและน้ำหนักแห้ง 5.4 และ 0.58 กรัมต่อต้น ในขณะที่ Spore suspension มีค่าน้ำหนักสดต้นและรากเท่ากับ 167.62 และ 17.28 กรัมต่อต้น ส่วนค่าน้ำหนักแห้ง ของต้นและราก เท่ากับ 9.09 และ 1.6 กรัมต่อต้น

หลังจากนั้นเมื่อพิจารณาถึงกรรมวิธีที่ใช้ CF และ spore suspension ร่วมกับเชื้อสาเหตุโรคพบว่า ในวันสิ้นสุดการทดลอง (พืชอายุ 45 วัน) ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ culture filtrate และ spore suspension เพียงอย่างเดียว โดยมีผลทำให้ค่าการเจริญเติบโต ทั้งจำนวนใบ ขนาดใบ และ คลอโรฟิลล์ รวมไปถึงน้ำหนักสดของต้นและราก สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีปลูกเชื้อราสาเหตุ โรคพืช และมีค่าเทียบเท่ากับการใส่ CF เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4.13 และ 4.14)



ภาพที่ 4.13 ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัด ที่ได้ด้วย CF และ spore suspension เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค (F422-G) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ (ที่อายุพืช 45 วัน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่าการผลิตที่อื่น ๆ ที่มีเนื้อหาคล้ายคลึงกัน และต้องขออนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ก่อนพิมพ์ซ้ำ

^{1/2}Means of 5 replications in a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05



ภาพที่ 4.14 อิทธิพลของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B (Culture filtrate และ Spore suspension) ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ (45 วัน หลังการปลูกเชื้อ)

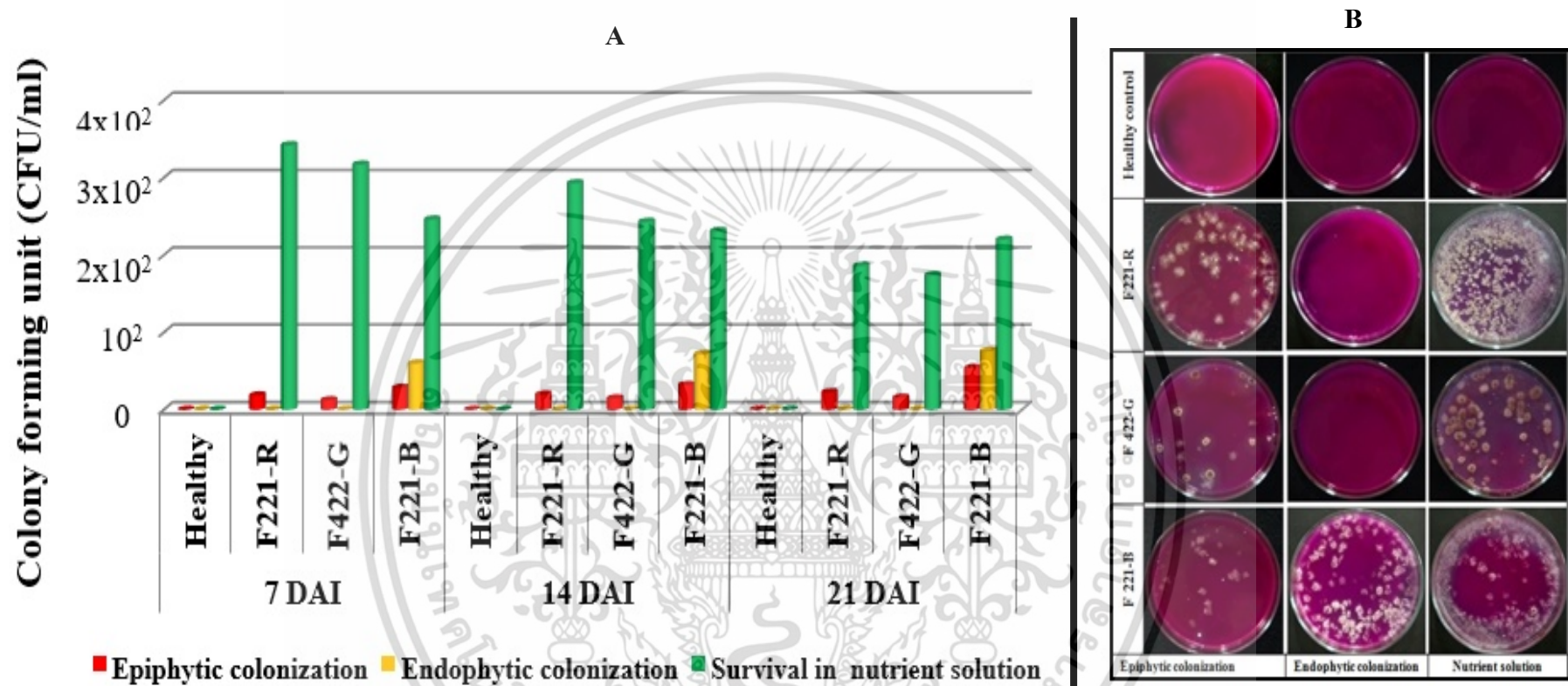
4.5 การศึกษาการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B)

4.5.1 การศึกษาการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R และ F422-G) ในผักสลัด *Cos* ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์

จากการศึกษาการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค F221-R และ F422-G ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์โดยตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในรากจาก 2 ลักษณะ (epiphytic colonization และ endophytic colonization) และในสารละลายธาตุอาหาร พบว่าเชื้อราทั้งหมดสามารถเจริญในสารละลายธาตุอาหารและเข้าครอบครองรากพืชได้ดี โดยสังเกตจากค่า colony forming unit (CFU/ml) ซึ่งในสัปดาห์ที่ 1 เชื้อรา F221-B สามารถเข้าครอบครองแบบ epiphytic colonization เท่ากับ 0.29×10^2 และ endophytic colonization 0.6×10^2 CFU/ml และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ พบการเข้าครอบครองแบบ epiphytic colonization เท่ากับ 0.54×10^2 CFU/ml และ endophytic colonization 0.8×10^2 CFU/ml

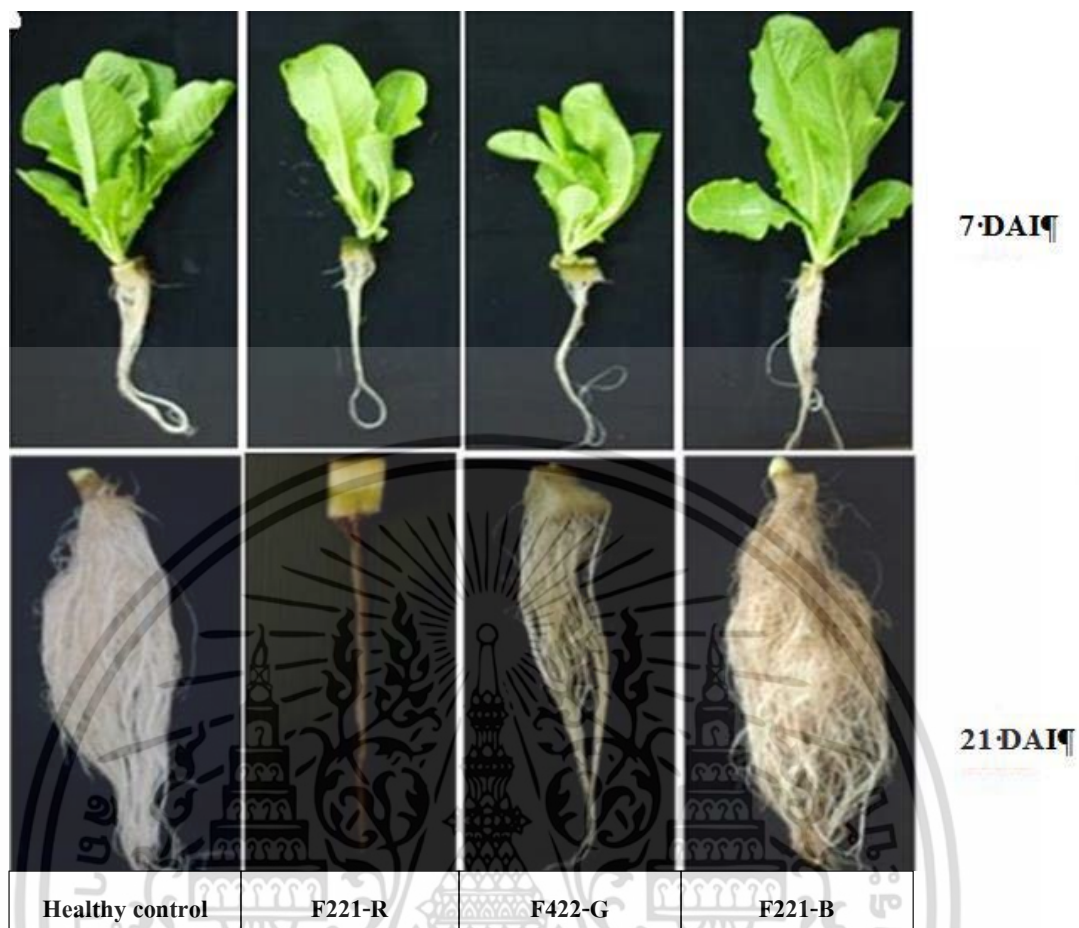
ส่วนในเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าสามารถเข้าครอบครองรากพืชได้น้อย โดยพบเป็นแบบ epiphytic colonization เพียงเท่านั้น จากการตรวจนับปริมาณของเชื้อในสัปดาห์ที่ 3 พบว่าใน F221-R เท่ากับ 0.23×10^2 และ 0.16×10^2 CFU/ml ใน F422-G โดยสรุปจากการทดลอง พบว่าเชื้อรา F221-B สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในสารละลายธาตุอาหารได้ดี ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าปริมาณของเชื้อในสารละลายธาตุอาหารจะลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งจากการทดลองนี้เป็นที่น่าสนใจว่าในกรรมวิธีที่ใส่ F221-B การเจริญของต้นเจริญดีกว่ากรรมวิธีควบคุม (healthy control) (ภาพที่ 4.16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



*DAI= Day after inoculation

ภาพที่ 4.15 การเข้าครอบครองของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* (F221-R และ F422-G) ในรากของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ A: ปริมาณความอยู่รอดของเชื้อรารากในรากผักสลัดและสารละลายธาตุอาหารพืช B: ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหาร TSM (ที่ 21 วันหลังการปลูกเชื้อ)



ภาพที่ 4.16 ลักษณะต้นและรากของผักสลัดที่ได้ด้วยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* (F221-R และ F422-G) ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ (ที่ 7 และ 21 วันหลังการปลูกเชื้อ)

4.5.2 การศึกษาการเข้าครอบครองกาบใบของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R และ F422-G) ในกวางตุ้ง (*Brassica chinensis* var. *chinensis*)

จากการตรวจสอบการเข้าครอบครองของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว 2 สายพันธุ์ คือ F221-R และ F422-G ในกาบใบของผักกวางตุ้ง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าในกรรมวิธีควบคุม กาบใบกวางตุ้งไม่เกิดแผล กาบใบเป็นปกติดี โดยเมื่อจะการผ่าตามขวางพืช และภาพการลอกเนื้อเยื่อของพืช พบว่าเนื้อเยื่อพืชยังปกติดี ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าในวันที่ 5 หลังการปลูกเชื้อ เกิดแผล ขนาด 3-4 เซนติเมตร โดยมีความรุนแรงของโรค เท่ากับ 82.5 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยจากภาพถ่ายอากาศ (Top view) พบว่าเนื้อเยื่อพืชเกิดอาการยุบตัวลงและมีเส้นใยปกคลุมบริเวณแผล หลังจากนั้นทำการผ่าตามขวางของจุดแผล (cross sectional view) พบว่าเนื้อเยื่อภายในของกาบใบถูกทำลายจนไม่พบลักษณะเดิม และเมื่อทำการลอกผิว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังผู้อื่นโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้









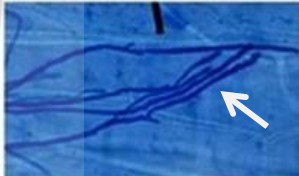
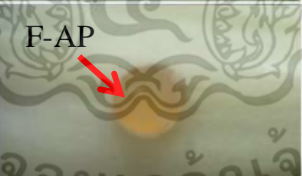

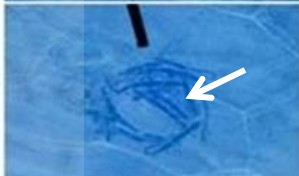
ของพืชในชั้น epidermis ออกพบว่าในทั้ง 2 เชื้อสาเหตุโรคพบการเข้าทำลายของเส้นใยภายในเนื้อเยื่อของพืช(intercellular tissue) ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อนั้นบิดเบี้ยว ไม่มีรูปร่าง (ตารางที่ 4.11)

ส่วนเชื้อรา F221-B ไม่พบอาการเกิดโรค สังเกตได้จากภาพถ่ายอาการโรค และการผ่าเนื้อเยื่อ กาบใบกว้างตุง พบให้ผลเหมือนกันกับกรรมวิธีควบคุม (healthy control) แต่เมื่อทำการลอกผิวหนังในชั้น epidermis ออก และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นที่น่าแปลกใจว่าพบ macroconidia ภายในเนื้อเยื่อของพืชบริเวณปากใบของพืช ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่ากาบใบพืชนั้น ไม่เกิดโรคตั้งแต่วันแรกจนวันถึงสิ้นสุดการทดลอง

โดยสรุปจากลักษณะที่พบใน F221-B น่าจะมีผลมาจากการเข้าครอบครองของเชื้อที่สามารถเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชและไม่ก่อให้เกิดโรคในพืช อีกทั้งอาจจะส่งผลให้พืชเจริญเติบโตดี



ตารางที่ 4.11 การเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R และ F422-G) ใน กวางตุ้ง (*Brassica chinensis* var. *chinensis*)

Treatment	Colonization of non-pathogenic <i>F. oxysporum</i>						
	Lesion size (Ø, cm) : %DS			5 DAI			
	1 DAI	3 DAI	5 DAI	Top-view	Cross-sectional view	Epidermal peel view	
Healthy control	0.5 : 0 ^{1/}	0.5 : 0	0.5 : 0				Normal cell tissue
F221-R inoculation	1.6 : 40	3.3 : 82.5	4 : 100				F221-R hyphae penetration were visible in intercellular and intracellular spaces
F422-G inoculation	1.4 : 35	2.5 : 62.5	3.3 : 82.5				F422-G hyphae penetration were visible in intercellular and intracellular spaces
F221-B treated	0.5 : 0	0.5 : 0	0.5 : 0				Macro conidia were observed in intercellular host tissue

DAI = Day after inoculation

AP: Agar plug, F-AP: Fungal-agar plug, S: Lesion with surface depression covered with white mycelia, N1-N2: No obvious disease symptom,

H1-H2: Severe disease symptom caused by F221-R and F422-G, respectively.

^{1/} % Disease severity (DS) = $\frac{\sum (\text{number of infected leaf sheath} \times \text{disease severity index})}{\text{number of total leaf sheath} \times \text{the highest index of disease severity}} \times 100$

4.5.3 การศึกษาการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R และ F422-G) ภายใต้กล้อง scanning electron microscope (SEM)

จากการตรวจสอบการเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* 2 สายพันธุ์ (F221-B และ F422-G) ในรากผักสลัด 3 สายพันธุ์ คือ cos, frillice iceberg และ rocket ในระบบไฮโดรโปนิคส์ พบว่าใน 7 วันแรกหลังการปลูกเชื้อ ในกรรมวิธีควบคุม (healthy control) พืชเจริญเป็นปกติดี และในทุกเชื้อที่นำมาทำการทดสอบสามารถเข้าครอบครองรากพืชใน 2 ลักษณะ คือ epiphytic colonization และ endophytic colonization ได้ โดยในกรรมวิธีที่ใช้ด้วยเชื้อรา F221-B พบลักษณะการเข้าครอบครอง ในปริมาณที่สูงกว่าในเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ไอโซเลท ในพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิดโดยใน epiphytic colonization อยู่ในช่วง $1.12-1.56 \times 10^2$ CFU/ml และ endophytic colonization อยู่ในช่วง $0.65-0.87 \times 10^2$ CFU/ml ซึ่งให้ผลแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม (ไม่พบการเจริญเชื้อ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.12)

และจากการนำตัวอย่างของพืชทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ 7 วันหลังการปลูกเชื้อไปตรวจสอบและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning electron microscope: SEM) พบว่าในพืชทดสอบทั้งหมดมีการเข้าครอบครอง epiphytic colonization และ endophytic colonization ซึ่งมีลักษณะของเส้นใยเชื้อเจริญอยู่แต่ไม่ก่อให้เกิดพืชเกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อราก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (healthy control) อย่างไรก็ดีตามเป็นที่น่าแปลกใจว่าในผักสลัดสายพันธุ์ cos พบ macroconidia ของเชื้อรา F221-B อยู่ระหว่างเนื้อเยื่อของพืช (ภาพที่ 4.18) และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 21 หลังการปลูกเชื้อ พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับช่วงแรกของการทดสอบ กล่าวคือใน F221-B ปริมาณของเชื้อราใน 2 ลักษณะมีปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น ใน epiphytic colonization อยู่ในช่วง $1.67-1.83 \times 10^2$ CFU/ml และ endophytic colonization อยู่ในช่วง $0.82-1.12 \times 10^2$ CFU/ml และจากการเข้าครอบครองในรากผักสลัด Frillice breg และ Rocket พบแต่เพียงการเข้าครอบครองโดยเส้นใยของเชื้อ F221-B ที่เป็นทั้ง epiphytic colonization และ endophytic colonization (ภาพที่ 4.18 และ 4.19) จากการเก็บตัวอย่างรากในกรรมวิธีที่ใส่ F221-B ในวันสิ้นสุดการทดลองมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตรวจสอบเนื้อเยื่อของราก พบทั้งเส้นใยและสปอร์ของเชื้อกระจายอยู่ภายในของเนื้อเยื่อราก ซึ่งเป็นที่น่าแปลกใจว่าเนื้อเยื่อของพืชทดสอบทั้งหมดยังเป็นปกติเหมือนในกรรมวิธีควบคุมจึงสรุปได้ว่าเชื้อรา F221-B สามารถเข้าครอบครองรากพืชได้และไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อพืช (ภาพที่ 4.18) อย่างไรก็ดีตามเมื่อสังเกตการเจริญเติบโตของต้นผักสลัด ก็พบว่าในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย F221-B สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดได้มากกว่ากรรมวิธีควบคุม (healthy control) และ กรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช (inoculated control) (ภาพที่ 4.21)

ส่วนในเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ไอโซเลท (F221-R และ F422-G) ตรวจสอบปริมาณลักษณะการเข้าครอบครองใน 2 ลักษณะที่น้อย โดยในช่วงแรกของการทดสอบ (7 วันหลังการปลูกเชื้อ) ปริมาณเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่ภายนอกมหาวิทยาลัยสุโขทัยวิทยาฯ ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทไม่มีความแตกต่างกัน ใน epiphytic colonization อยู่ในช่วง $0.32-0.74 \times 10^2$ CFU/ml และ endophytic colonization อยู่ในช่วง $0.06-0.16 \times 10^2$ CFU/ml และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสุดการทดลอง พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับช่วงแรกของการทดสอบ (ตารางที่ 4.20) หลังจากนั้นได้นำตัวอย่างของรากพืชมาทำเช่นเดียวกับใน F221-B พบว่าลักษณะของเนื้อเยื่อรากที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื้อเยื่อมีความผิดปกติไปจากกรรมวิธีควบคุม กล่าวคือใน F422-G ลักษณะของเนื้อเยื่อราก บิดเบี้ยว เหลือรูปร่างของเซลล์พืชเลย ส่วนใน F221-R มีความผิดปกติเพียงเล็กน้อยใน 2 พืช cos และ frillice iceberg ส่วนใน Butter head ผิดปกติ เช่นเดียวกับใน F422-G (ภาพที่ 4. 20)

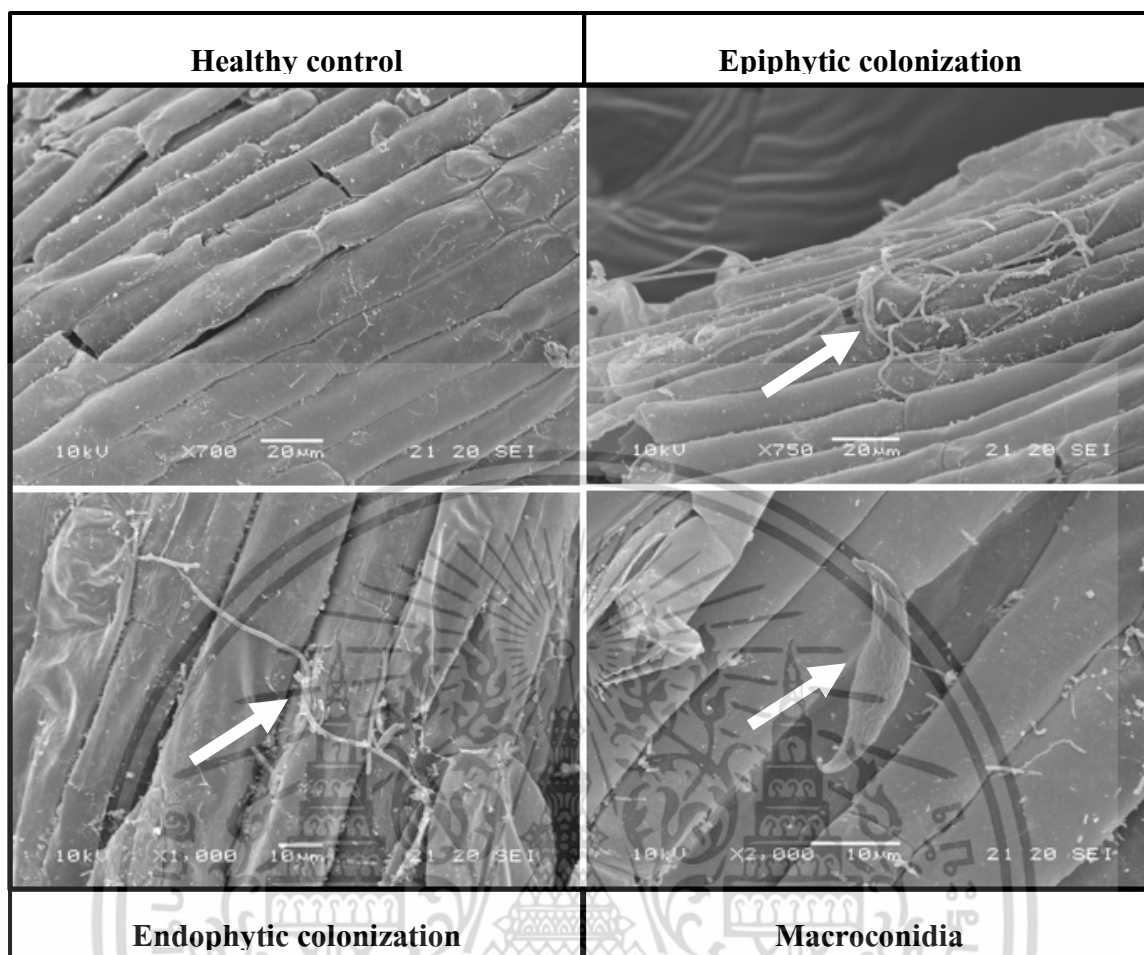


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 การเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R และ F422-G) ในผักสลัด 3 สายพันธุ์ (Cos, Frillice iceberg และ Rocket) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

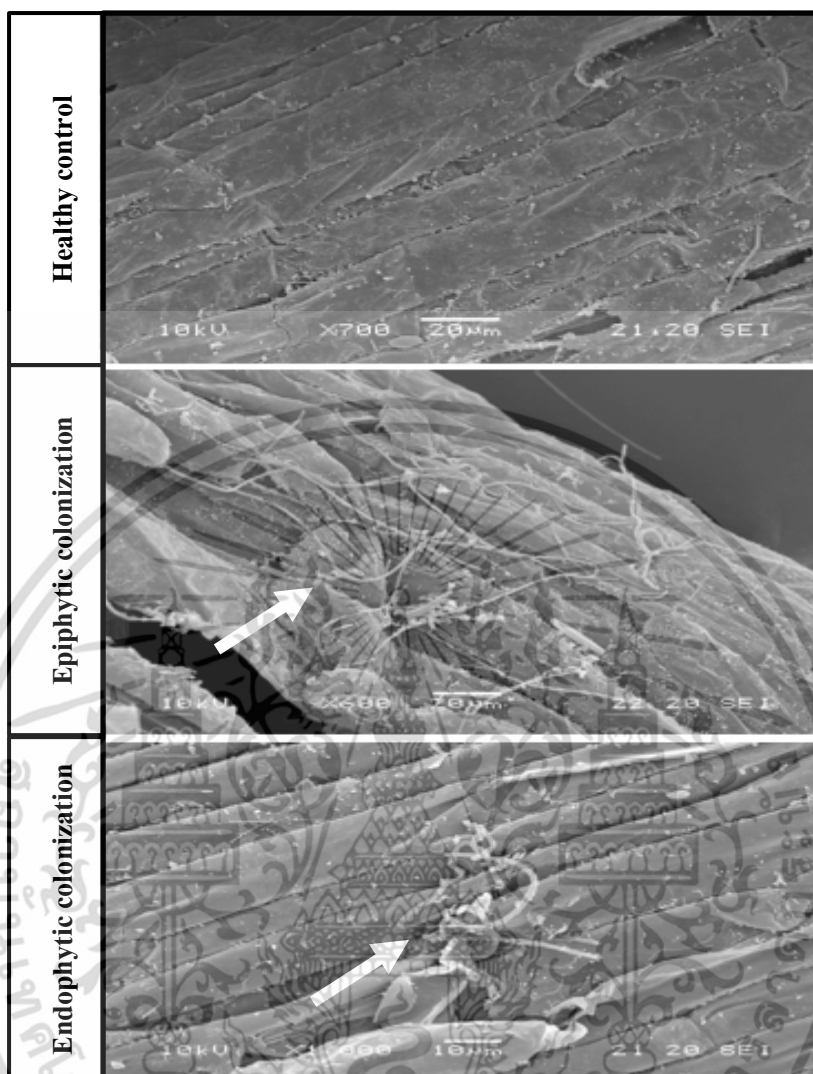
Plant	Treatment	Colonization of <i>F. oxysporum</i> (CFU/ml)								
		Epiphytic colonization			Endophytic colonization			NS		
		7 DPI	14 DPI	21 DPI	7 DPI	14 DPI	21 DPI	7 DPI	14 DPI	21 DPI
Cos	control	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d
	F221-B	1.12×10 ² a	1.34×10 ² a	1.67×10 ² a	0.65×10 ² a	0.74×10 ² a	0.82×10 ² a	2.31×10 ² a	2.24×10 ² a	2.12×10 ² a
	F221-R	0.56×10 ² b	0.78×10 ² b	0.98×10 ² b	0.07×10 ² c	0.17×10 ² c	0.22×10 ² c	2.00×10 ² b	1.86×10 ² b	1.67×10 ² b
	F422-G	0.42×10 ² c	0.57×10 ² c	0.87×10 ² c	0.16×10 ² b	0.21×10 ² b	0.28×10 ² b	1.98×10 ² c	1.73×10 ² c	1.52×10 ² c
Frillice Iceberg	control	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d
	F221-B	1.56×10 ² a	1.67×10 ² a	1.83×10 ² a	0.87×10 ² a	0.98×10 ² a	1.12×10 ² a	2.11×10 ² a	1.91×10 ² a	1.78×10 ² a
	F221-R	0.36×10 ² b	0.68×10 ² b	0.89×10 ² b	0.06×10 ² c	0.18×10 ² c	0.26×10 ² c	1.82×10 ² b	1.73×10 ² b	1.62×10 ² b
	F422-G	0.32×10 ² c	0.58×10 ² c	0.75×10 ² c	0.15×10 ² b	0.28×10 ² b	0.35×10 ² b	1.71×10 ² c	1.62×10 ² c	1.43×10 ² c
Rocket	control	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d	0d
	F221-B	1.35×10 ² a	1.56×10 ² a	1.76×10 ² a	0.75×10 ² a	0.89×10 ² a	1.10×10 ² a	2.44×10 ² a	2.14×10 ² a	1.89×10 ² a
	F221-R	0.68×10 ² c	0.83×10 ² c	1.15×10 ² b	0.08×10 ² c	0.17×10 ² c	0.21×10 ² c	1.98×10 ² b	1.86×10 ² b	1.57×10 ² b
	F422-G	0.74×10 ² b	0.93×10 ² b	1.19×10 ² c	0.12×10 ² b	0.24×10 ² b	0.37×10 ² b	1.87×10 ² c	1.65×10 ² c	1.55×10 ² c

^{1/}Means of 3 replication in row followed by the same letter were not significantly different (P<0.05) according to DMRT



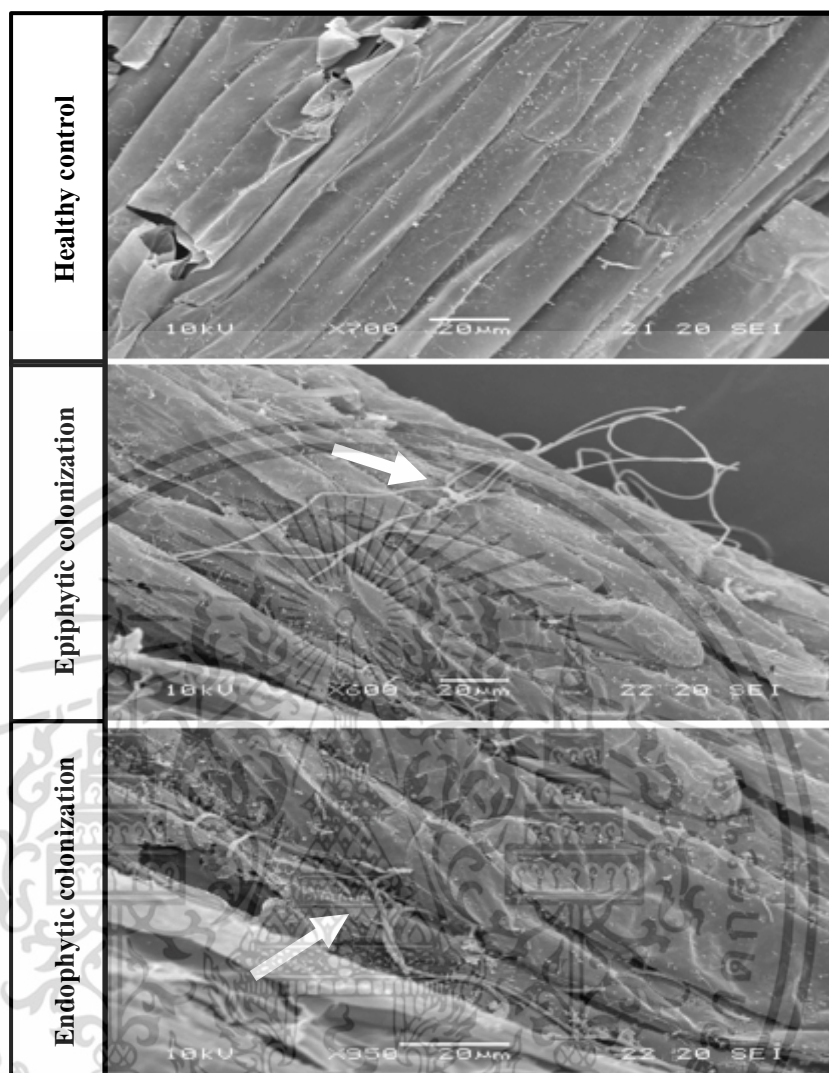
ภาพที่ 4.17 ลักษณะการเข้าครอบครองรากผักสลัด Cos โดยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning electron microscope (SEM) พืชอายุ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



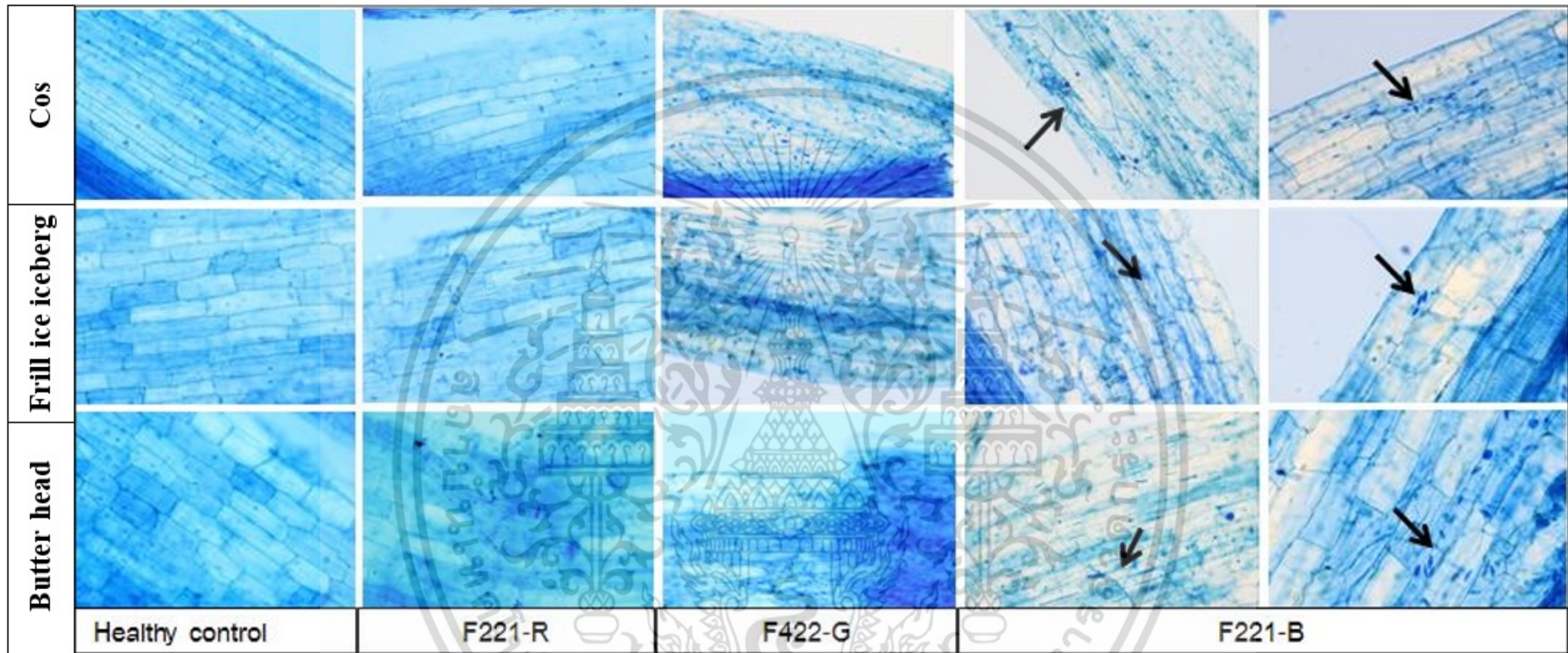
ภาพที่ 4.18 ลักษณะการเข้าครอบครองรากผักสลัด Frillice iceberg โดยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning electron microscope (SEM) พืชอายุ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

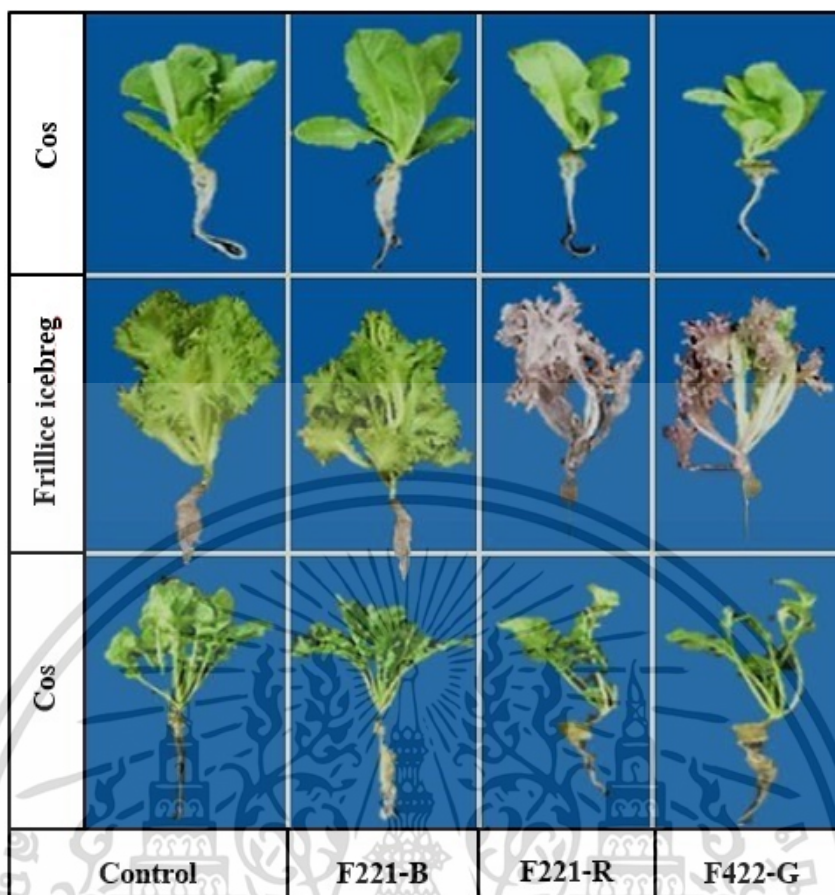


ภาพที่ 4.19 ลักษณะการเข้าครอบครองรากผัก Rocket โดยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Scanning electron microscope (SEM) พืชอายุ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 ลักษณะการเข้ารอบครองรากผักสลัด 3 ชนิด (Cos, Frill ice iceberg และ Rocket) โดยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope (พืชอายุ 21 วันหลังการปลูกเชื้อ)



ภาพที่ 4.21 ลักษณะต้นและรากของผักสลัด 3 ชนิด (Cos, Frillice iceberg และ Rocket) ที่ใส่ด้วยเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรคพืช ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ (พืชอายุ 21 วันหลังการปลูกเชื้อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การศึกษาการสร้างสาร Gibberellins (GA) ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B)

4.6.1 การทดสอบสาร Crude extract (CE) โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

จากการตรวจสอบเบื้องต้นถึงแนวโน้มในการสร้าง GA ของเชื้อรา F221-B และเชื้อราสาเหตุโรค 2 สายพันธุ์ (F221-R และ F422-G) เปรียบเทียบกับสาร GA มาตรฐาน โดยวิธี TLC พบว่า ในเชื้อทดสอบทุกๆ ไอโซเลท มีการเคลื่อนที่ของ spot สาร (ยกเว้น F422-G) โดยมีค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (Rf) ระหว่างจุดเริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุด จากกรรมวิธี STD, F221-B และ F221-R เท่ากับ 0.78, 0.84 และ 0.88 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13 และ ภาพที่ 4.22) ซึ่งมีสีค่าเมื่อส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร โดยลักษณะของ spot GA ที่พบนั้นจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับในกรรมวิธีที่ใช้ด้วย STD แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าลักษณะภายนอกจะคล้ายคลึงกันแต่เมื่อพิจารณาถึง GA ที่ตรวจพบนั้นน่าจะมีสารชนิดชนิดอื่นปนอยู่ในตัวอย่างที่นำมาทำการทดสอบ โดยสรุปจากผลการทดสอบดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่าไม่ว่าจะเป็นเชื้อราปฏิปักษ์หรือเชื้อสาเหตุโรคก็สามารถผลิตสารในกลุ่มของ GA ได้แต่จะมีปริมาณมากหรือน้อยก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ อุณหภูมิ สภาพแวดล้อม และปัจจัยอื่นๆ เข้าร่วมเป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบ TLC เป็นเพียงแค่การทดสอบเบื้องต้นเพื่อให้ทราบเพียงว่าสารที่ทดสอบนั้นใช่ GA หรือไม่

ตารางที่ 4.13 ค่า Retention factor (Rf) ของสาร gibberellins จากวิธีการทดสอบ TLC

Sample	Treatment	R _f
1	Standard GA ₃	0.78
2	F221-B	0.84
3	F221-R	0.88
4	F422-G	No
5	Acetonitrile	No



ภาพที่ 4.22 Thin layer chromatography: 1) Standard GA₃, 2) crude extract of F221-B, 3) crude extract of F221-R, 4) crude extract of F422-G 5) Acetonitrile

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

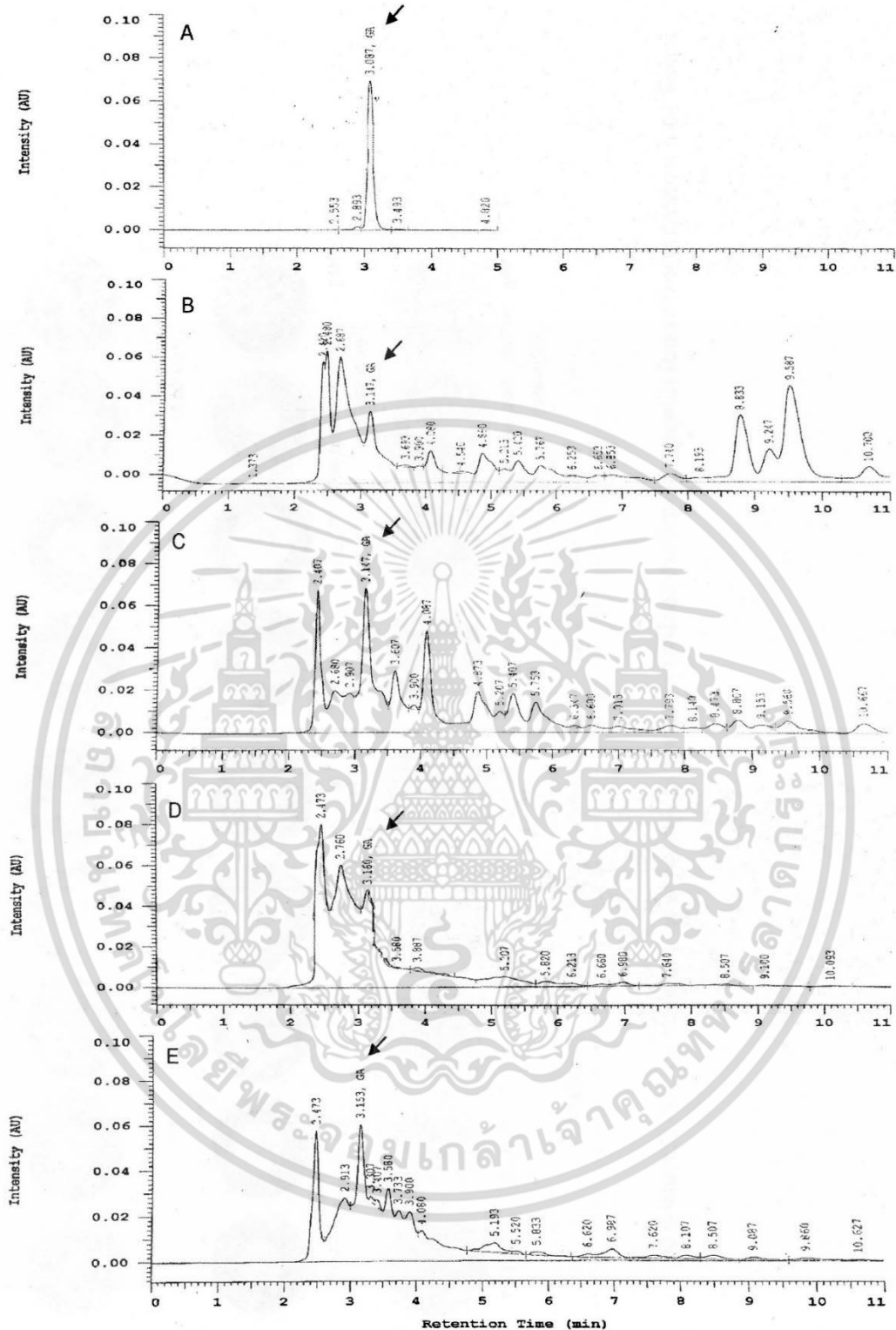
4.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร Gibberellins (GA) โดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

จากการนำสารสกัดหยาบของ culture filtrate ของเชื้อรา F221-B และเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อตรวจสอบปริมาณของ GA ใน crude extract ของเชื้อราดังกล่าว พบว่าการทดลองปริมาณ GA ที่เกิดมีความแตกต่างกันเป็นผลมาจากชนิดของเชื้อ และรูปแบบของเชื้อ รวมไปถึงผลร่วมกันระหว่างชนิดและรูปแบบของเชื้อ หลังจากนั้นเมื่อตรวจสอบ Retention time (Rt) ในกราฟโครมาโทแกรม (chromatogram) ที่พบใน crude extract ที่สกัดจากเชื้อรา F221-B และ F221-R ขึ้นอยู่ในช่วงระยะเวลาที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมมาตรฐาน standard GA₃ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 3.147-3.140 (ภาพที่ 4.23) โดยเมื่อพิจารณาถึงปริมาณ GA ในแต่ละระยะเวลาในการบ่มเชื้อพบว่า ในเชื้อรา F221-B หลังการบ่มเชื้อ 10 วัน พบการสร้าง GA ในส่วนของ CF มากกว่าใน mycelium เท่ากับ 4.29 mg/l ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรคก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน ปริมาณ GA จะพบมาสุดใน CE ที่สกัดได้จาก CF และเป็นที่น่าแปลกไปในวันที่ 15 หลังการปลูกเชื้อในกรรมวิธีของ F221-B กลับเปลี่ยนแปลงไปจากวันที่ 10 โดยพบว่าใน CF กับพบปริมาณ GA ที่น้อย (ทำการวิเคราะห์ผลใหม่ 5 ครั้ง ได้ผลเหมือนเดิม) ในกรณีนี้ยังอาจสรุปได้ไม่แน่ชัดว่ามีผลมาจากอะไร แต่จากการเปรียบเทียบค่าในกราฟโครมาโทแกรมพบว่า อาจจะมีผลมาจากสารชนิดอื่นที่ปนอยู่ค่อนข้างมาก (ไม่แสดงผลในข้อมูล) ส่วนในเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าปริมาณของ GA เพิ่มขึ้น แต่ก็ยังให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับ 10 วันหลังการบ่มเชื้อ

และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 30 หลังการบ่มเชื้อพบว่าในเชื้อ F221-B มีปริมาณการสร้างสาร GA กลับมาเป็นเหมือนในการทดลอง 10 วัน โดยปริมาณ GA ในเส้นใย เท่ากับ 7.08 mg/l และใน CF เท่ากับ 10.38 mg/l ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรค F221-R ปริมาณ GA ก็เพิ่มเช่นเดียวกันคือ 9.62 และ 11.8 mg/l ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อระยะเวลาในการบ่มเชื้อราเพิ่มขึ้นปริมาณ GA ก็เพิ่มสูงขึ้น โดยในเส้นใยมีแนวโน้มที่จะน้อยกว่าใน culture filtrate อันเนื่องจากการที่เชื้อราปลดปล่อยสารต่างๆ ลงในอาหารจึงทำให้เห็นปริมาณของสารมาก (ตารางที่ 4.14) โดยสรุปปริมาณสาร GA จะพบมากสุดในส่วนของ CF ยิ่งไปกว่านั้นระยะเวลาบ่มเชื้อที่เพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณการสร้างสารก็เพิ่มขึ้นตาม (ภาพที่ 4.23) ตารางที่ 4.14 ผลของเชื้อรา F221-B และ F221-R ในการผลิต GA ในช่วงเวลาในการบ่มที่แตกต่างกัน

Fungi (A)	Type (B)	Incubation period		
		Total GA ₃ content (mg/l)		
		10 Day	15 Day	30 Day
F221-B	Mycelium	3.44b	3.86a	7.08d
	Culture filtrate	4.29a	2.31c	10.38b
F221-R	Mycelium	1.92d	3.48b	9.62c
	Culture filtrate	3.12c	3.55b	11.8a
	A	**	**	**
	B	**	**	**
	A×B	**	**	**

^{1/} Means of 3 replications in a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P = 0.05



ภาพที่ 4.23 HPLC chromatograms ของ: A สารมาตรฐาน GA₃; B สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา F221-B; C สารสกัดจาก Culture filtrate ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B; D สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา F221-R และ E สารสกัดจาก Culture filtrate ของเชื้อราสาเหตุโรค F221-R (ที่ระยะเวลา 30 วันหลังการปลูกเชื้อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อรา *F. oxysporum* F221-B ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

4.7.1 การศึกษาอิทธิพลของ Crude extract (CE) ต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ CE ที่สกัดได้จากเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด 2 สายพันธุ์ คือ butter head และ frillice berg พบว่าในผักสลัด butter head ในวันที่ 2 กรรมวิธีควบคุม (healthy control) เมล็ดงอกเพียง 40 เปอร์เซ็นต์และจะงอกครบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ส่งผลทำให้ความยาวของต้นและรากต่ำ ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้ด้วย Std. 50 ppm พบว่าเมล็ดงอกครบ 100 เปอร์เซ็นต์ตั้งแต่วันที่ 2 ส่งผลทำให้ความยาวต้นกล้าเฉลี่ยในวันที่ 3 และ 5 เท่ากับ 2.6 และ 3.87 เซนติเมตร และความยาวรากเท่ากับ 2.3 และ 3.4 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้ CE ของเชื้อ F221-B ในแต่ละระดับความเข้มข้นพบว่า สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดผักสลัดและงอกเร็วกว่าปกติ 1 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวส่งผลทำให้ความยาวต้นและราก ในวันที่ 3 และ 5 มีแนวโน้มที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างในแต่ละความเข้มข้นของ CE ที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 4.15)

ส่วนในผักสลัด frillice iceberg พบว่า เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ butter head คือ กรรมวิธีควบคุม (healthy control) ในวันที่ 2 เมล็ดงอกเพียง 50 เปอร์เซ็นต์และจะงอกครบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 ส่งผลทำให้ความยาวของต้นและรากต่ำ ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้ std. 50 ppm พบว่าเมล็ดผักสลัดสามารถงอกได้ครบ 100 เปอร์เซ็นต์ตั้งแต่วันที่ 2 ของการทดลองซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองกับผักสลัด butter head ในขณะเดียวกันการใช้ CE ของเชื้อรา F221-B ในแต่ละระดับความเข้มข้นสามารถทำให้เมล็ดงอกเร็วกว่ากรรมวิธีควบคุม 1 วัน และจากผลการทดลองก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองในผักสลัด butter head อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของ CE ในแต่ละความเข้มข้นก็ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความยาวของต้นและราก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.15 ผลของสารสกัด Crude extract ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ต่อการงอกของเมล็ดผักสลัด

Lettuce	Treatment	% Seed germination		Seedling stage			
				Shoot length (cm)		Root length (cm)	
		2 Day	3 Day	3 Day	5 Day	3 Day	5 Day
Butter head	Healthy control	40	100	1.2b	2.8b	1.2b	2.8b
	50 ppm of standard GA	100	100	2.6a	3.87a	2.6a	3.87a
	1 ppm of CE of culture filtrate F221-B	100	100	2.12a	3.12a	2.12a	3.12a
	3 ppm of CE of culture filtrate F221-B	100	100	2.28a	3.57a	2.28a	3.57a
	5 ppm of CE of culture filtrate F221-B	100	100	2.41a	3.64a	2.41a	3.64a
	10 ppm of CE of culture filtrate F221-B	100	100	2.54a	3.7a	2.54a	3.7a
Frislice iceberg	Healthy control	50	100	2.1b	3.6b	2.1b	3.6b
	50 ppm of standard GA	100	100	3.8a	5.4a	3.8a	5.4a
	1 ppm of CE of culture filtrate F221-B	100	100	3a	4.1a	3a	4.1a
	3 ppm of CE of culture filtrate F221-B	100	100	3.3a	4.6a	3.3a	4.6a
	5 ppm of CE of culture filtrate F221-B	100	100	3.7a	4.8a	3.7a	4.8a
	10 ppm of CE of culture filtrate F221-B	100	100	3.8a	5.2a	3.8a	5.2a

^{1/} Means of 50 replications in a column within each variety of lettuce followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05

4.7.2 การศึกษาอิทธิพลของ CE ต่อการเจริญเติบโตของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ CE ที่สกัดได้จากเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ต่อการเจริญเติบโตของผักสลัด 2 สายพันธุ์ คือ butter head และ frillice berg พบว่าในช่วง 27 วันแรกของการปลูกเชื้อในผักสลัด butter head กรรมวิธีที่ใส่ด้วย CE ของเชื้อรา F221-B ใน 2 กรณี คือ กรณีแรกตั้งแต่ คลุกเมล็ด และกรณีที่ 2 คือฉีดพ่นเพิ่มเติมในระหว่างการปลูก มีแนวโน้มในการให้ผล ในด้านการเจริญเติบโตของผักสลัด เช่น จำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ น้ำหนักสดต้นและราก ที่ดีกว่า การใช้ std. 50 ppm และ CE ความเข้มข้นอื่นๆ กล่าวคือในกรรมวิธีที่ใช้ CE ความเข้มข้น 3 และ 5 ppm ไม่ว่าจะใช้คลุกเมล็ดในช่วงแรกหรือฉีดพ่นในช่วงหลัง ก็สามารถให้ค่าการเจริญที่สูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ กล่าวคือในวันที่ 45 (สิ้นสุดการทดลอง) พบว่าจำนวนใบ เท่ากับ 16.1 และ 16.9 ใบ ขนาดใบเท่ากับ 13.4 และ 14.7 เซนติเมตร รวมไปถึงค่าของคลอโรฟิลล์ ที่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อประเมินถึงค่าน้ำหนักสดของต้นและราก ใน 2 กรณี คือ กรณีแรกตั้งแต่ (คลุกเมล็ด) พบว่า ในกรรมวิธีที่ใช้ CE ความเข้มข้น 3 และ 5 ppm ในต้นมีค่าเท่ากับ 144.6 และ 137.4 กรัมต่อต้น และในราก เท่ากับ 12.7 และ 10.4 กรัมต่อต้น ส่วนในกรณีที่ 2 กรณีฉีดพ่นเพิ่มก็ให้ผลไปในทางเดียวกันกับกรณีที่ 1 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้ CE 1 ppm ไม่ว่าจะเป็กรณีที่ใช้ตั้งแต่ช่วงแรกหรือฉีดเพิ่มในช่วงหลังก็ให้ผลในด้านการเจริญของจำนวนใบและขนาดใบ ที่ค่อนข้างสูงกว่าใน std. 50 ppm และเมื่อดูถึงค่าน้ำหนักสดของต้นและราก ก็พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 126.7 กรัมต่อต้น ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมเท่ากับ 126.1 กรัมต่อต้น แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีแนวโน้มที่ค่อนข้างจะสูงกว่าเพียงเล็กน้อย ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้ CE ความเข้มข้น 10 ppm พบว่าให้ค่าการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักสดน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม แต่อย่างไรก็ตามก็ยังสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้ std. 50 ppm และใช้ CE ความเข้มข้น 50 ppm (ตารางที่ 4.16)

สำหรับการทดลองในผักสลัด frillice berg พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ ผักสลัด butter head คือจากกรรมวิธีที่ใช้ CE ความเข้มข้น 3 และ 5 ppm ไม่ว่าจะเป็กรณีที่ใช้ตั้งแต่ ช่วงแรกหรือฉีดเพิ่มในช่วงหลังก็ให้ผลในด้านการเจริญของจำนวนใบและขนาดใบ สูงกว่าในกรรมวิธี อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือหลังจากการใส่ CE ในวันที่ 45 (สิ้นสุดการทดลอง) มีจำนวนใบ เท่ากับ 15 และ 15.7 ใบ ในขณะที่ ขนาดใบเท่ากับ 15.5 1 และ 15.5 เซนติเมตร รวมไปถึงค่าคลอโรฟิลล์ ที่ไม่มีความแตกต่างกัน หลังจากนั้นทำการประเมินค่าน้ำหนักสดของต้นและราก ในกรณีที่ใส่ตั้งแต่แรก ในต้นเท่ากับ 165.6 และ 169.3 กรัมต่อต้น และในราก เท่ากับ 13.7 และ 14.8 กรัมต่อต้น และในกรณีที่ ฉีดเพิ่มเติม พบว่าผลไม่แตกต่างจากฉีดในช่วงแรก มีค่าน้ำหนักต้นเท่ากับ 172.4 และ 178.1 กรัมต่อต้น ในรากเท่ากับ 14.6 และ 17.5 กรัมต่อต้น (ภาพที่ 4.24)

สำหรับกรรมวิธีที่ใช้ CE ความเข้มข้น 1 ppm และ 10 ppm พบว่าให้ผลการทดลองไปในทิศทาง เดียวกันกับการทดสอบกับผักสลัด Butter head กล่าวคือ ไม่ว่าจะใส่ CE ในช่วงแรกหรือฉีดเพิ่มเติม ในช่วงหลังก็ให้ผลการเจริญของผักสลัด จำนวนใบ ขนาดใบ และ SPAD value ในส่วนของน้ำหนักสด

กล่าวคือ มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดเทียบเท่ากับกรรมวิธีควบคุม (healthy control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็ยังให้ผลที่ดีกว่าการใช้ std. 50 ppm และการใช้ CE ความเข้มข้น 10 ppm (ภาพที่ 4.24)

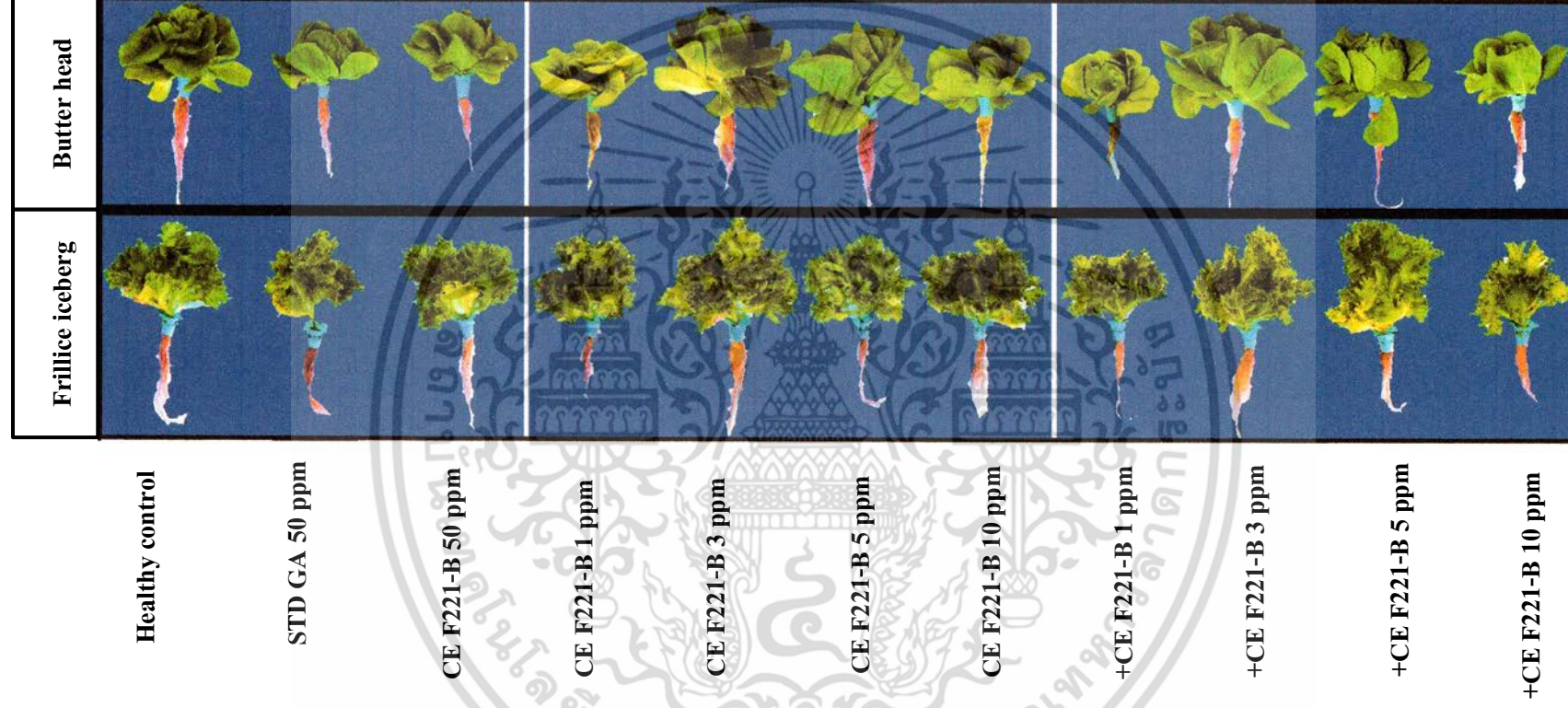


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 การเจริญเติบโตของผักสลัด 2 สายพันธุ์ ที่ใส่ด้วย Crude extract ของเชื้อรา non-pthogenic *F. oxysporum* F221-B ในระบบไฮโดรโพนิกส์

Lettuce	Applications	Treatment	Plant growth parameter										
			Leaf number			Leaf size (cm)			Chlorophyll content (SPAD Value)			Fresh weight (g/plant)	
			27 Day	36 Day	45 Day	27 Day	36 Day	45 Day	27 Day	36 Day	45 Day	stem	root
Butter head	Seed treatment	Healthy control	11.8ab ^{1/}	12.2ab	15.3ab	7ab	8.3ab	13ab	24.8ab	27.6ab	30.5ab	126.1ab	9.92ab
		STD GA 50 ppm	10b	11.6b	13.6b	6.2b	8b	11b	22.4b	27ab	30.1ab	93.5b	8.1b
		CE F221-B 50 ppm	10.7b	11.7b	14.2b	6b	8.1b	11.8b	22.4b	25.3b	28.5b	97.6b	8.2b
		CE F221-B 1 ppm	11.13ab	12.8ab	15.5ab	7.3a	8.16ab	12.1ab	24.5ab	28.6ab	30.4ab	126.7ab	9.12b
		CE F221-B 3 ppm	12.9a	14.3a	16.1a	7.4a	8.3a	13.4a	27.8a	30.9a	35.3a	144.6a	12.7a
		CE F221-B 5 ppm	13.2a	15.3a	16.9a	7.5a	8.5a	14.7a	29.7a	32.3a	36.6a	137.4a	10.4a
	Seed trt + Spray	CE F221-B 10 ppm	10.7b	12.5b	14.6b	6.9b	8b	11.9b	28.6ab	29.1ab	30.2ab	110.7b	9.7ab
		+ CE F221-B 1 ppm	12.8ab	14ab	15.7ab	7.33ab	8.16ab	12.3ab	28.8ab	30.7ab	35.8ab	128.2ab	10.1ab
		+ CE F221-B 3 ppm	13.6a	15.3a	16.8a	7.7a	8.5a	15.2a	30.2a	32a	38.3a	147.4a	14.3a
		+ CE F221-B 5 ppm	14a	16.5a	18a	7.9a	8.8a	15.8a	31.3a	33.6a	38.9a	141.2a	13.7a
Frislice iceberg	Seed treatment	+ CE F221-B 10 ppm	10.2b	12.6b	14.5b	7.5ab	8.16ab	13ab	28.6ab	30.8ab	33.9ab	116.9b	9.2ab
		Healthy control	8.4ab	9ab	11ab	7.1ab	8.5ab	13.5ab	26.4ab	27.2ab	31.1ab	138.1ab	11.7ab
		STD GA 50 ppm	8b	8.16b	9.8b	6.1b	8.3b	11.6b	23.3ab	27ab	30.8ab	93.9b	9.3b
		CE F221-B 50 ppm	8.4ab	9.13ab	13.3ab	7.3ab	8.9ab	13.6ab	25.7ab	27.1ab	29.5ab	113.3b	9.6b
		CE F221-B 1 ppm	8.4ab	8.7ab	12.6ab	7.2ab	8.8ab	12.3ab	24.5ab	28.5ab	30.9ab	140.9ab	11.4ab
		CE F221-B 3 ppm	11.4a	13.2a	15a	8.5a	9.4a	15.5a	28.5a	30.4a	32.5a	165.6a	13.7a
	Seed trt + Spray	CE F221-B 5 ppm	11.6a	13.6a	15.7a	8.6a	9.6a	15.8a	28.5a	31.4a	32.5a	169.3a	14.8a
		CE F221-B 10ppm	8.7ab	8.8ab	12.4ab	7.8ab	8.4ab	12ab	26.5ab	29.3ab	31.4ab	117.4ab	11.9ab
		+ CE F221-B 1 ppm	8.6ab	8.7ab	13.6ab	6.8ab	8.6ab	12.8ab	25ab	28.4ab	31.1ab	145.7ab	11.8ab
		+ CE F221-B 3 ppm	12.8a	13.6a	15.8a	8.8a	9.7a	15a	28.5a	29.4a	33.5a	172.4a	14.6a
		+ CE F221-B 5 ppm	12.1a	14.3a	15.6a	9.2a	10.5a	17.4a	28.8a	31.8a	35.4a	178.1a	17.5a
		+ CE F221-B 10 ppm	8.8ab	10.4ab	13.6ab	7.8ab	9ab	13ab	25.7ab	17.9ab	30.3ab	119.7ab	10.4ab

^{1/} Means of 15 replications in a column within each variety of lettuce followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05



ภาพที่ 4.24 ลักษณะต้นและรากของผักสลัด 2 ชนิด (Butter head และ Frillice iceberg) ที่ได้ด้วย สารสกัด GA ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ใน ความเข้มข้นที่แตกต่างกันในระบบไฮโดรโปนิคส์ (เก็บเกี่ยวพืชอายุ 45 วัน)

4.8 การประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดกับผักสลัดในระบบไฮโดรโพนิกส์

จากการคัดเลือกรูปแบบของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ที่มีประสิทธิภาพดีในทุกๆ วิธีการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยในส่วนของ การทดลองครั้งนี้จะนำรูปแบบของเชื้อที่เป็นทั้ง spore suspension, culture filtrate และ crude extract มาใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) กับผักสลัดทั้ง 3 ชนิด (butter head, cos และ frillice iceberg) ที่ปลูกในสารละลายแบบเป่าอากาศ โดยมีการประเมินระดับการเกิดโรค (Disease incidence) และความรุนแรงของโรค (Disease severity) รวมทั้งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในทุกสัปดาห์ที่มีรายละเอียดผลการทดลองดังนี้

จากการทดลอง หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) เป็นเวลา 7 วัน (พืชอายุ 24 วัน) พบว่าในผักสลัด **butter head** กรรมวิธี healthy control และกรรมวิธีที่ใส่ด้วยเชื้อ F221-B ทั้ง 3 รูปแบบ spore suspension, culture filtrate และ crude extract เพียงอย่างเดียว พืชยังเจริญเป็นปกติดี ไม่พบการเกิดโรค (Disease incidence : DI) ตั้งแต่ช่วงแรกของการทดสอบไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่กรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculated control) พบว่ามีการเกิดโรคถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ช่วงแรกของการปลูกพืช ยิ่งไปกว่านั้นด้านความรุนแรงของโรค (Disease severity : DS) ก็พบว่า ในช่วงแรก DS เท่ากับ 46.6 เปอร์เซ็นต์แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง DS เพิ่มขึ้นถึง 85.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ของเชื้อรา F221-B ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าเกิดโรคเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ตั้งแต่ช่วงแรกของการทดสอบไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ความรุนแรงของโรคก็ให้แนวโน้มเช่นเดียวกับการเกิดโรค โดยมีเปอร์เซ็นต์ DS เท่ากับ 13.3 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ในการลดโรค พบว่าสามารถลดโรคได้ 72.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้ CF และ CE พบเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งโรคเท่ากับ 68 และ 61.3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.17)

สำหรับในผักสลัด **cos** พบว่ากรรมวิธี healthy control และกรรมวิธีที่ใส่ด้วยเชื้อ F221-B ทั้ง 3 รูปแบบไม่พบการเกิดโรคตั้งแต่ช่วงแรกของการทดสอบไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ส่วนกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculated control) พบว่ามีการเกิดโรคถึง 100 เปอร์เซ็นต์ตั้งแต่ช่วงแรกของการปลูกพืช ยิ่งไปกว่านั้นด้านความรุนแรงของโรค ก็พบว่า ในช่วงแรก DS เท่ากับ 56.2 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง DS เพิ่มขึ้นถึง 94.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension พบว่าเกิดโรคเพียง 66 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปมีแนวโน้มในการลดลงของโรค เมื่อสิ้นสุดการทดลองเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ DS ที่ในช่วงแรกเท่ากับ 15.5 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปกลับลดลงเหลือ 13.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ในการลดโรคก็

พบว่ามีความเท่ากับ 80.9 ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้ CF และ CE เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งโรคเท่ากับ 78.7 และ 76.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.17)

ส่วนในผักสลัด **frillice berg** พบว่ากรรมวิธี healthy control และกรรมวิธีที่ใส่ด้วยเชื้อ F221-B ทั้ง 3 รูปแบบไม่พบการเกิดโรคตั้งแต่ช่วงแรกของการทดสอบไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง และในส่วนกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculated control) พบว่ามีการเกิดโรคถึง 100 เปอร์เซ็นต์ตั้งแต่ช่วงแรกของการปลูกพืช ยิ่งไปกว่าในด้านความรุนแรงของโรค ก็พบว่า ในช่วงแรก DS เท่ากับ 68.4 เปอร์เซ็นต์แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง DS เพิ่มสูงขึ้นถึง 97.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบในผักสลัดทั้ง 2 สายพันธุ์ (cos และ butter head) โดยพบว่าสามารถลดโรคได้เท่ากับ 79.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้ CF และ CE เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งโรคเท่ากับ 73.1 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.17)

โดยสรุปผลหลักที่พบคือ antibiosis เพราะว่าจากกรรมวิธีที่ใช้ culture filtrate และ crude extract ให้ผลในการยับยั้งโรคสูงถึง 68 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับการใช้ spore suspension ซึ่งมีทั้งสารและสปอร์ที่มีชีวิตรวมกันอยู่ภายในนั้นอาจส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งที่สูง

ตารางที่ 4.17 ประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ใน 3 รูปแบบ (spore suspension, culture filtrate และ crude extract) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัดที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ (aerated solution culture)

Lettuce	Treatment	% Disease incidence (DI) ^{2/}				% Disease severity (DS) ^{3/}				% Inhibition in DS over control
		7	14	21	28	7	14	21	28	28
		DAI*	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI	DAI
Butter head	Healthy control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Inoculated (F422-G)	100a ^{1/}	100a	100a	100a	46.6a	60a	75.5a	85.7a	0
	F221-B (spore suspension)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F221-B (culture filtrate)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F221-B (crude extract of CF)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F221-B (SP) + F422-G	33b	33b	33b	33b	13.3b	13.3b	13.3b	13.3b	72.4
	F221-B (CF) + F422-G	44b	66b	66b	100a	13.3b	13.3b	17.7b	17.7b	68
	F221-B (CE) + F422-G	66b	66b	100a	100a	13.3b	15.5b	24.4b	24.4b	61.3
Cos	Healthy control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Inoculated (F422-G)	100a	100a	100a	100a	56.2a	74.4a	85.5a	94.2a	0
	F221-B (spore suspension)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F221-B (culture filtrate)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F221-B (crude extract of CF)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F221-B (SP) + F422-G	66b	66b	33b	33b	15.5b	13.3b	13.3b	13.3b	80.9
	F221-B (CF) + F422-G	66b	66b	100a	100a	15.5b	15.5b	15.5b	15.5b	78.7
	F221-B (CE) + F422-G	66b	66b	100a	100a	17.7b	24.4b	24.4b	17.7b	76.5
Frislice iceberg	Healthy control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Inoculated (F422-G)	100a	100a	100a	100a	68.4a	79.4a	86.4a	97.5a	0
	F221-B (spore suspension)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F221-B (culture filtrate)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F221-B (crude extract of CF)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F221-B (SP) + F422-G	66b	44b	33b	33b	13.3b	13.3b	15.5b	17.7b	79.8
	F221-B (CF) + F422-G	44b	66b	66b	100a	17.7b	17.7b	17.7b	24.4b	73.1
	F221-B (CE) + F422-G	66b	66b	100a	100a	24.4b	32.4b	24.4b	24.4b	73.1

*DAI = Day after inoculation

^{1/} Means of 15 replications in a column within each variety of lettuce followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05

^{2/} % การเกิดโรค [Disease incidence, DI] = $\frac{\text{จำนวนต้นที่แสดงอาการโรค}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$

^{3/} % ความรุนแรงของโรค [Disease severity, DS] = $\frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นที่แสดงอาการโรค} \times \text{ระดับอาการโรค)}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด} \times \text{ระดับอาการสูงสุด}} \times 100$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับค่าการเจริญเติบโตของพืชในผักสลัด **butter head** พบว่าในกรรมวิธีควบคุม (healthy control) พืชเจริญตามปกติไม่เกิดโรค ส่วนในกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) พืชมีการเจริญเติบโตน้อย ซึ่งมีผลสืบเนื่องจากการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคที่สูง ส่งผลทำให้ค่าน้ำหนักต้นและรากสด เท่ากับ 8.9 และ 4.3 กรัมต่อต้น และน้ำหนักแห้งต้นและราก เท่ากับ 0.57 และ 0.1 กรัมต่อต้น ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ของเชื้อ F221-B เพียงอย่างเดียวพบว่าสามารถให้ค่าการเจริญเติบโตในด้าน จำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ และน้ำหนักสดต้นและรากสูงที่สุด กล่าวคือ ใน 45 วัน (วันสิ้นสุดการทดลอง) พบค่าจำนวนใบเท่ากับ 20.6 ใบ ขนาดใบเท่ากับ 27.3 เซนติเมตร และคลอโรฟิลล์ เท่ากับ 35.2 หลังจากนั้นเมื่อทำการพิจารณาถึงค่าน้ำหนักสดของต้นและราก เท่ากับ 46.2 และ 9.63 กรัมต่อต้น และน้ำหนักแห้งของต้นและราก เท่ากับ 3.2 และ 0.63 กรัมต่อต้น รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้ CF และ CE โดยมีค่าน้ำหนักต้นสดเท่ากับ 44.8 และ 45.1 กรัมต่อต้น อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่าการเจริญเติบโตในด้านของน้ำหนักแล้วพบว่าทั้ง 3 กรรมวิธีที่ใส่ด้วย 3 รูปแบบเพียงอย่างเดียว นั้นไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนในกรรมวิธีที่ใส่ 3 รูปแบบของเชื้อร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่าการเจริญของพืชในทั้ง 3 รูปแบบไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension จะให้ค่าการน้ำหนักสดที่ดีกว่าในกรรมวิธีอื่น โดยมีค่าเท่ากับ 40.7 กรัมต่อต้น ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ CF และ CE มีค่าเท่ากับ 38 และ 36.7 กรัมต่อต้น อย่างไรก็ตามเมื่อประเมินค่าน้ำหนักสดแล้วพบว่าในกรรมวิธีที่ใช้ทั้ง 3 รูปแบบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.18 และภาพที่ 4.25)

สำหรับในผักสลัด **cos** พบว่าในกรรมวิธีควบคุม (healthy control) พืชเจริญตามปกติไม่เกิดโรค ส่วนในกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) พืชมีการเจริญเติบโตน้อย ซึ่งมีผลสืบเนื่องจากการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคที่สูง ส่งผลทำให้ค่าน้ำหนักต้นและรากสด เท่ากับ 10.9 และ 3.62 กรัมต่อต้น และน้ำหนักแห้งต้นและราก เท่ากับ 1.67 และ 0.45 กรัมต่อต้น ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ 3 รูปแบบของเชื้อ พบว่า การเจริญเติบโตของพืชทั้งทางด้านจำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ SPAD value น้ำหนักสดต้นและราก รวมทั้งน้ำหนักแห้งต้นและราก ไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าน้ำหนักสดต้น เท่ากับ 74.1, 72.4 และ 71.9 กรัมต่อต้น ส่วนในกรรมวิธีที่ใส่ 3 รูปแบบเชื้อร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าการเจริญในด้านน้ำหนักสดไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 65, 64.2 และ 63.6 กรัมต่อต้น (ตารางที่ 4.19 และภาพที่ 4.25)

ส่วนในผักสลัด **frillice iceberg** ผลการทดลองมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบในทั้ง 2 พืช ในกรรมวิธีควบคุม (healthy control) พืชเจริญตามปกติไม่เกิดโรค ส่วนในกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) พืชมีการเจริญเติบโตน้อย ซึ่งมีผลสืบเนื่องจากการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคที่สูง ส่งผลทำให้ค่าน้ำหนักต้นและรากสด เท่ากับ 5.74 และ 1.23 กรัมต่อต้น และน้ำหนักแห้งต้นและราก เท่ากับ 0.28 และ 0.21 กรัมต่อต้น ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ 3 รูปแบบของเชื้อ พบว่า การเจริญเติบโตของพืชทั้งทางด้านจำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ SPAD value น้ำหนักสดต้นและราก รวมทั้งน้ำหนักแห้งต้นและราก ไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าน้ำหนักสดต้น เท่ากับ 24.6, 23.2 และ 23.1 กรัมต่อต้น ส่วนในกรรมวิธีที่ใส่ 3 รูปแบบเชื้อร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าการเจริญในด้านน้ำหนักสดไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 24.6, 23.2 และ 23.1 กรัมต่อต้น (ตารางที่ 4.20 และภาพที่ 4.26)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

22.5 กรัมต่อต้น ส่วนในกรรมวิธีที่ใส่ 3 รูปแบบเชื้อร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าการเจริญในด้านน้ำหนักสดไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 18.2, 17.7 และ 17.3 กรัมต่อต้น (ตารางที่ 4.20 และ ภาพที่ 4.25)

โดยสรุปจากการทดลองสามารถยืนยันประสิทธิภาพของรูปแบบเชื้อไม่ว่าจะใช้รูปแบบของเชื้อที่เป็นทั้ง spore suspension, culture filtrate และ crude extract ก็ให้ผลในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าในระบบปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิกส์ได้ไม่มีความแตกต่างกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 การเจริญเติบโตของผักสลัด Butter head ที่ได้รับการใส่เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ใน 3 รูปแบบ (Spore suspension, Culture filtrate และ Crude extract) และปลูกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) สาเหตุโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัด ในสารละลายธาตุอาหาร (solution culture) ที่อายุ 45 วัน

Lettuce	Treatment	Plant growth parameter															
		Leaf number				Leaf size (cm)				Chlorophyll content (SPAD Value)				Fresh weight (g/plant)		Dry weight (g/plant)	
		24d	31d	38d	45d	24d	31d	38d	45d	24d	31d	38d	45d	stem	root	stem	root
Butter head	Healthy control	7.5a ^{1/}	13.2a	14.8ab	15.6ab	9.6ab	11.5a	13.6b	22.6ab	23.9a	25.4a	33.3a	34.3a	32.9c	8.48ab	2.39ab	0.55ab
	Inoculation (F422-G)	6.4b	8.33b	4.66c	3.11c	7.2c	8.44b	7c	6.5c	16.8b	18.5b	17.9b	12.2b	8.9d	4.3d	0.57c	0.15c
	F221-B (SP)	7.9a	14a	16a	20.6a	10.7a	13.1a	16.3a	27.3a	28a	27.3a	35.5a	35.2a	46.1a	9.63a	3.2a	0.63a
	F221-B (CF)	7.6a	13.2a	15.4ab	19.6ab	10.5a	12.4a	14.5ab	25.4ab	25a	26.5a	33.4a	31.4a	44.8ab	7.84b	2.5ab	0.59ab
	F221-B (CE)	7.6a	13.2a	14.3ab	18ab	10a	12.1a	13.1b	23.6ab	24a	26.6a	31.6a	31.6a	45.1ab	7.35bc	2.22ab	0.54ab
	F221-B (SP) + F422-G	7.6a	13.1a	13.8ab	18.1ab	9.77ab	12.6a	13b	21.1ab	25.9a	25.8a	31.8a	31.8a	40.7b	7.04bc	2.62ab	0.59ab
	F221-B (CF) + F422-G	7.5a	12.8a	13.6b	16.8ab	9.77ab	12.2a	13b	20.4ab	24.6a	25.1a	31.5a	30.1a	38bc	6.86bc	2.37ab	0.48b
	F221-B (CE) + F422-G	7.6a	13a	13.4b	16.7ab	8.55ab	11.7a	13.4b	19.8ab	23.4a	23.2a	27.1a	28.3a	36.7bc	6.02bc	2.07b	0.47b

^{1/} Means of 9 replication in a column followed by the same common letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at P=0.05.

ตารางที่ 4.19 การเจริญเติบโตของผักสลัด Cos ที่ได้รับการใส่เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ใน 3 รูปแบบ (spore suspension, culture filtrate และ crude extract) และปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) สาเหตุโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัด ในสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ (aerated solution culture) ที่อายุ 45 วัน

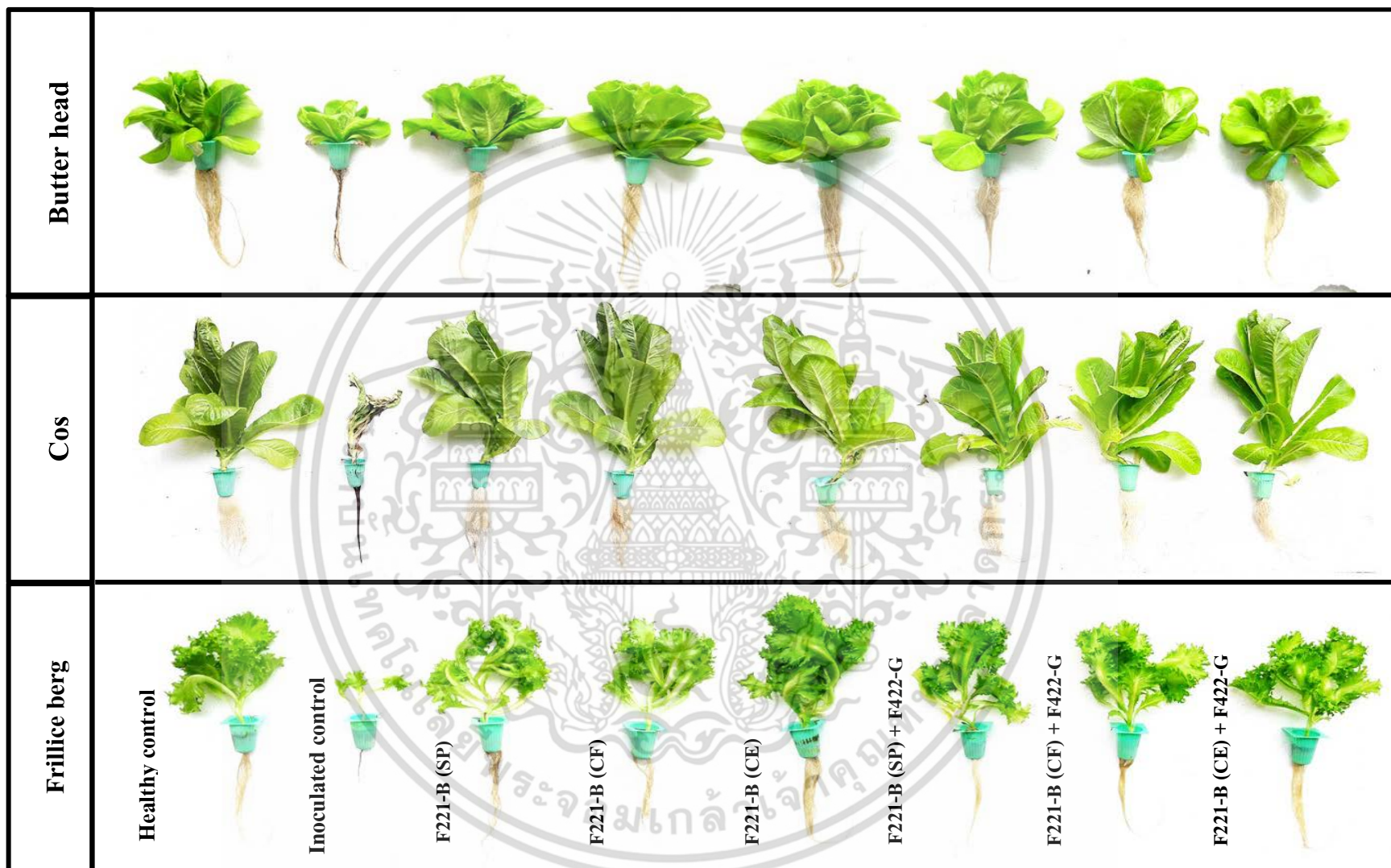
Lettuce	Treatment	Plant growth parameter															
		Leaf number				Leaf size (cm)				Chlorophyll content (SPAD Value)				Fresh weight (g/plant)		Dry weight (g/plant)	
		24d	31d	38d	45d	24d	31d	38d	45d	24d	31d	38d	45d	stem	root	stem	root
Cos	Healthy control	12.7a ¹	18ab	21.3a	23.5a	8.3a	11.5b	15.2ab	22.6ab	34.3ab	30.5b	36.8a	37.1ab	57.6ab	8.31b	3.5b	0.64ab
	Inoculation (F422-G)	6.8c	10.1c	8.8b	5.3b	7.2b	8.3c	6.7c	8.5c	29.6b	23.7c	24.7b	12.2c	10.9c	3.62c	1.67c	0.45b
	F221-B (SP)	12.7a	21.7a	22.2a	25.4a	9a	14.3a	17.2a	27.3a	36.6a	30.2b	37.3a	40.9a	74.1a	11.4a	5.96a	0.72a
	F221-B (CF)	11.8a	20.1ab	21.6a	24.5a	8.6a	12.4b	14.8ab	25.4ab	33.8ab	34.9ab	37.1a	37ab	72.4a	11.4a	4.81ab	0.69a
	F221-B (CE)	11.8a	19.8ab	20.8a	22.2a	8.5a	11.7b	12.4ab	23.6ab	32.5ab	38.5a	36.4a	35.2ab	71.9a	11.3a	4.59ab	0.68a
	F221-B (SP) + F422-G	10.1b	20.2ab	21.1a	22.6a	8.1ab	11.2b	13ab	21.1ab	35.4a	31.8b	38.5a	37.2ab	65ab	10.6a	4.48ab	0.69a
	F221-B (CF) + F422-G	11.8a	19.7ab	21a	22.2a	8.2ab	11b	12.7ab	20.4ab	34.4ab	33.7ab	35.1a	35.8ab	64.2ab	9.24ab	4.24ab	0.64ab
	F221-B (CE) + F422-G	11.8a	19.5ab	21.3a	22a	8.1ab	10.8b	12.4ab	19.8ab	33.9ab	32.3ab	34.6a	33.7ab	63.6ab	9.22ab	4.29ab	0.60ab

¹ Means of 9 replication in a column followed by the same common letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at P=0.05.

ตารางที่ 4.20 การเจริญเติบโตของผักสลัด Frillice icebreg ที่ได้รับการใส่เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B ใน 3 รูปแบบ (spore suspension, culture filtrate และ crude extract) และปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) สาเหตุโรครากเน่าและเหี่ยวของผักสลัด ในสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ (aerated solution culture) ที่อายุ 45 วัน

Lettuce	Treatment	Plant growth parameter															
		Leaf number				Leaf size (cm)				Chlorophyll content (SPAD Value)				Fresh weight (g/plant)		Dry weight (g/plant)	
		24d	31d	38d	45d	24d	31d	38d	45d	24d	31d	38d	45d	stem	root	stem	root
Frillice icebreg	Healthy control	7.5a ^{1/}	9a	13.4a	15.6ab	8ab	8.6a	13.6b	18.1b	22.2ab	22.5ab	25a	30a	15.5b	3.55ab	0.37bc	0.33ab
	Inoculation (F422-G)	6.8ab	6.1b	4.6b	3.1c	6.8c	5.6b	7c	5.4c	19.7b	14.8c	16.2b	12.2b	5.74c	1.23c	0.28c	0.21b
	F221-B (SP)	7.6a	9.1a	15.2a	20.6a	8.3a	8.6a	16.3a	23.7a	26.4a	27.4a	29.2a	35.2a	24.6a	4.8a	0.71a	0.39a
	F221-B (CF)	7.8a	9a	14.7a	19.6ab	8ab	9a	14.5ab	22.7ab	21.4ab	22.3ab	26.9a	31.4a	23.2a	4.27ab	0.67a	0.33ab
	F221-B (CE)	7.3a	9a	14.3a	18ab	8ab	8.6a	13.1b	21.2ab	19.2ab	19.6ab	25.5a	31.6a	22.5a	3.74ab	0.67a	0.28ab
	F221-B (SP) + F422-G	7.7a	9a	13.8a	18.1ab	8ab	8.5a	13b	21.1ab	22.6ab	22.6ab	24a	31.8a	18.2b	3.88ab	0.67a	0.32ab
	F221-B (CF) + F422-G	7.2a	8.8a	13.6a	16.8ab	7.8b	8.4a	13b	20.4ab	19.8ab	21.3ab	23.7a	30.1a	17.7b	3.74ab	0.63a	0.29ab
	F221-B (CE) + F422-G	7.3a	8.5a	13.4a	15.8ab	7b	9a	13.4b	19.8ab	18.4ab	20.7ab	23.3a	31.4a	17.3b	3.67ab	0.58ab	0.30ab

^{1/} Means of 9 replication in a column followed by the same common letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at P=0.05.



ภาพที่ 4.25 ลักษณะต้นและรากของผักสลัด Butter head, Cos และ Frillice berg ในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่ใส่เชื้อและใส่ 3 รูปแบบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B และปลุกเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) ที่ปลุกในสารละลายธาตุอาหารแบบเป่าอากาศ (aerated solution culture) ที่วันเก็บเกี่ยวผลผลิต(พืชอายุ 45 วัน)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการประเมินผลในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมไปถึงความสามารถในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* ในระบบไฮโดรโปนิคส์ โดยเน้นศึกษาในผักสลัด (*Lactuca sativa* L.) ซึ่งแบ่งการดำเนินงานดังต่อไปนี้

ส่วนที่ 1 จากการประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในระหว่างการเก็บรักษาระยะยาว (long term preservation) พบว่าวิธี modified filter paper culture ซึ่งทำการดัดแปลงวิธีการของ Fong *et al.* (2000) ในวิธีการวางชั้นวุ้นเชื้อจากวิธีการเดิมทำการวางเชื้อ 6 ชั้น ลดลงเป็น 5 ชั้นและ 1 ชั้น เชื้อราในทุก ๆ กรรมวิธีที่ทำการทดลองสามารถเจริญครอบคลุมกระดวยกรองได้ดี โดยจะพบว่าการวางชั้นเชื้อ 6 ชั้นเป็นวิธีการที่ดีที่สุด กล่าวคือปริมาณของการสร้างสปอร์ อยู่ในช่วง 10^7 - 10^8 spore/ml สอดคล้องกับงานวิจัยของ Stocco, *et al.*, 2010 ที่ใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อ 3 วิธี คือ น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ น้ำมัน และ filter paper culture เพื่อใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ *Trichoderma harzianum* พบว่าวิธีการเก็บแบบ filter paper culture เป็นวิธีการที่ดีที่สุด สามารถเก็บเชื้อดังกล่าวได้ 24 เดือน โดยไม่มีการเสื่อมสลายของเชื้อและยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ โดยสรุปจากการดัดแปลง 1)วิธีการวางชั้นเชื้อในครั้งนี้ สามารถยืนยันได้ว่าวิธีการวางชั้นเชื้อ 6 ชั้นนั้นสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการทดลอง long term preservation ได้ต่อไป เพราะได้ทราบว่าในแต่ละระยะของวัฏจักรของกระดวยกรองนั้นมีความสม่ำเสมอของเชื้อและการสร้างสปอร์ไม่มีความแตกต่างกัน 2) ดัดแปลงที่ 2 ไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศลดความชื้น (non-vacuum dessicator) พบว่า การดัดแปลงโดยไม่ใช้ปั๊ม ไม่ยุ่งยากและลดความเสี่ยงที่จะเกิดกับเชื้อ อีกทั้งยังสามารถทำให้กระดวยกรองแห้งเร็วภายใน 7 วันและไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ๆ แต่อย่างไร จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาการเก็บเชื้อในระยะยาวต่อไป

จากการประเมินความอยู่รอดของเชื้อ ในช่วงเวลา 1-24 เดือน พบว่าจากการเก็บรักษาเชื้อรา F221-B ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1-24 เดือน โดยวิธี modified paper method พบว่าเหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อรา F221-B โดยตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 24 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อดูถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแล้ว พบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.3) กล่าวคือขนาดเส้นใยที่เจริญออกมาจากชั้นวุ้นเชื้อ อยู่ในช่วง 110-121×2.2-2.6 ไมโครเมตร และปลายเส้นใยมีขนาด 85-93.04×3.2-3.6 ไมโครเมตร และขนาดของ macro conidia เท่ากับ 28.03-29.85×3.0-3.5 ไมโครเมตร สอดคล้องกับการรายงานของ Hu *et al.* (2014) ที่ได้ใช้วิธีการ sterile cellophane squares (CPS)

มาคัดแปลงเก็บรักษาเชื้อราในกลุ่ม Filamentous โดยพบว่าสามารถคงคุณสมบัติของเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาได้ดีไม่พบการเสื่อมคุณสมบัติในด้านต่างๆของเชื้อไป

สำหรับการประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) หลังจากผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1-24 เดือน พบว่าจากการทดสอบโดยวิธี dual-culture test เชื้อรา F221-B มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด คือ *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ได้ กล่าวคือในเชื้อรา *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. พบการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพียงเล็กน้อย โดยในช่วง 6 เดือนแรกของการทดสอบมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 43.5-64.1 และ 28.5-45.1 และในช่วงหลังกับพบว่ามีการเพิ่มสูงขึ้นอันเนื่องมาจาก อุณหภูมิห้องในช่วงทำการทดสอบนั้นค่อนข้างต่ำอยู่ในช่วง 23-25 องศาเซลเซียส จึงน่าจะมีผลทำให้เชื้อรา F221-B สามารถเจริญเติบโตและยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Marin *et al.* (1995) ที่ทดสอบเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *F. proloferatum* ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันระหว่าง 4-45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส ยิ่งไปกว่านั้นถ้าอุณหภูมิเกิน 40-45 องศาเซลเซียส เชื้อราทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในทิศทางเดียวกันในเชื้อ *Colletotrichum* sp. ก็ให้ผลการทดลองเหมือนกับเชื้อทั้ง 2 ชนิด แต่มีแนวโน้มที่ดีกว่ากล่าวคือในช่วงแรกมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 46.8-67.8 เปอร์เซ็นต์แต่เมื่อระยะเวลาถึงช่วงหลังการทดลอง พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับเพิ่มสูงขึ้น เท่ากับ 72-80.7 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีนี้น่าจะมีผลมาจากอุณหภูมิเช่นกัน เพราะจากการรายงานของ Thomas *et al.* (2008) ได้ทดสอบเชื้อรา *Colletotrichum lupine* โดยการเลี้ยงเชื้อไว้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 10-30 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิตั้งแต่ 10-25 องศาเซลเซียส มีผลต่อการเจริญทางเส้นใยของเชื้อ ต่ำยิ่งไปกว่านั้น การสร้างสปอร์ของเชื่อน้อย และหลังจากนั้นได้นำเชื้อไปทดสอบการเกิดโรคเพราะว่าการเกิดโรคลดต่ำลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าหากอุณหภูมิเพิ่มเป็น 26-30 องศาเซลเซียส เชื้อ *C. lupine* กลับเจริญเติบโต

ส่วนในการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบใน dual culture test โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อ อยู่ในช่วง 30.3-58.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้สูงที่สุด รองลงมาคือ ความเข้มข้น 80 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานของ Rodriguez *et al.* (2006) ที่ได้ทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* S6 สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* ได้ 78 เปอร์เซ็นต์ และจากการรายงานของ Patil *et al.* (2011) จากการทดสอบเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* 6 ไอโซเลท กับเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ได้อยู่ในช่วง 24.1- 40.32 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามจากการประเมินผลการทดลองของเชื้อ F221-B ให้ผลการทดลองไปในทิศทาง

เดียวกันกับการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* ชนิดอื่นๆ (Park *et al.*, 1988; Abeysinghe, 2006; Nel *et al.*, 2006)

ส่วนการประเมินคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเมล็ดผักสลัด ในระหว่างการเก็บรักษา 1-24 เดือน พบว่าเมล็ดที่ทำการคลุกด้วย spore suspension ของเชื้อรา F221-B ในทุกๆ เดือนที่ทำการเก็บรักษาทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น 10^3 และ 10^6 spore/ml สามารถทำให้เมล็ดงอกเร็วกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเชื้อ 2 วัน โดยส่งผลทำให้ความยาวของต้นกล้าเฉลี่ยในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ให้ผลดีกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเชื้อ กล่าวคือในวันที่ 3 ต้นกล้าผักสลัด cos มีความยาวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.5-4.2 เซนติเมตร ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีความยาวเฉลี่ยเพียง 1.3-1.8 เซนติเมตร และในผักสลัด Red oak ก็ให้ผลค่าเฉลี่ยความยาวต้นไปในทิศทางเดียวกันกับผักสลัด cos อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นที่ 10^6 spore/ml ก็ให้ผลในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของเมล็ดที่ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ความเข้มข้น 10^3 spore/ml และ กรรมวิธีควบคุม (healthy control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชิติและคณะ 2556 ที่ได้ทำการคลุกเมล็ดด้วย spore suspension ของเชื้อรา F221-B ความเข้มข้น 10^4 - 10^8 spore/ml กับพืชจำนวน 6 ชนิด พบว่าทุกความเข้มข้นสามารถส่งผลทำให้เมล็ดพืชทั้ง 6 ชนิดสามารถงอกได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม (control)

โดยสรุปวิธีการเก็บรักษาเชื้อราด้วยวิธี modified filter paper method เป็นวิธีการที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา โดยพบว่าทำให้เชื้อมีความอยู่รอดไม่เสื่อมสลาย อีกทั้งยังคงคุณสมบัติของเชื้อให้อยู่ได้ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (2 ปี) อาทิเช่น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคและการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ด้วยเหตุนี้วิธีการเก็บรักษาเชื้อดังกล่าวจึงน่าจะนำมาพัฒนาและปรับประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้อีกต่อไป

ส่วนที่ 2 การประเมินประสิทธิภาพการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) ที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการทดลองใน dual-culture antagonistic test พบว่าเชื้อรา F221-B มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้ง 10 ไอโซเลท คือ *Curvularia* sp. (C11,C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* spp. (R111, R112, R113) และ *R. solani* (R11, R12) โดยในช่วง 5-7 วันแรกอัตราการเจริญของเชื้อก่อนข้างต่ำจึงทำให้เห็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่เด่นชัดนัก อยู่ในช่วง 15.3-36.3 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 9 หลังจากการปลูกเชื้อ) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่เพิ่มสูงขึ้น อยู่ในช่วง 36-56.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานในต่างประเทศอีกหลายๆ งานวิจัยที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* ที่แยกได้จากบริเวณเขตรากพืชที่ปลูกในดินในการควบคุมเชื้อราสาเหตุ

โรคพืช (Alabouvette and Couteaudier, 1992; Benhamou *et al.*, 2002; Fravel *et al.*, 2003; Abeysinghe, 2006; Rodriguez *et al.*, 2006; Patil *et al.*, 2011) อาทิเช่นในประเทศศรีลังกาได้มีการรายงานการใช้เชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* 3 สายพันธุ์ ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *radices-cucumerinum* ได้เท่ากับ 34 เปอร์เซ็นต์ (Abeysinghe, 2006) ในขณะที่ Patil *et al.* (2011) ได้รายงานว่าการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* จำนวน 7 สายพันธุ์ พบว่าสามารถควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวได้อีกด้วย โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 24-40 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลไกการยับยั้งที่ตรวจพบจากการศึกษาครั้งนี้มี 2 กลไก กล่าวคือในระยะแรก (วันที่ 3 หลังการบ่มเชื้อ) จะเริ่มสังเกตเห็นกลไกแบบ antibiosis โดยพบ clear zone ในเชื้อราสาเหตุ 6 สายพันธุ์ คือ R11, R12, R113, F113, F221-R และ F422-G และเมื่อระยะเวลาผ่านไปกลไก antibiosis จะถูกปกคลุมด้วยกลไก competition หลังจากนั้นเมื่อเชื้อราในกรรมวิธีควบคุมเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อ (9 วันหลังการปลูกเชื้อ) ได้ทำการศึกษากลไก exploitation ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (dual-culture) ซึ่งเมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีการเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อรา F221-B กับเชื้อราสาเหตุโรคต่างๆ ชนิดที่นำมาทำการทดสอบ ในขณะเดียวกันก็ยังมีรายงานถึงเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* Fo47 ที่พบกลไก antibiosis และ mycoparasitism ที่มีผลในการเข้าทำลายเชื้อรา *Pythium ultimum* (Benhamou *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตถึงลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคโดยละเอียด ก็พบว่ามีความผิดปกติของสปอร์เชื้อรา จำนวน 5 ไอโซเลท คือ C11, C12, F113, R11 และ R12 โดยอาจจะมีผลมาจากการปลดปล่อยสารแบบไม่ระเหยของเชื้อรา F221-B ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงส่งผลทำให้ลักษณะเส้นใยเกิดความผิดปกติ คือ เกิดการบวม หักงอ ผิดรูปร่าง ในขณะที่เดียวกันความผิดปกติของสปอร์ คือ สปอร์บวม มีการรั่วไหลของไซโทพลาซึมภายในออกมาจากตัวสปอร์ เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rodriguez *et al.* (2006) ที่ได้ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* S6 พบว่าสามารถสร้าง cyclosporine A ซึ่งสารดังกล่าวที่เชื้อสร้าง อาจจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) ในผักสลัดทั้ง 3 ชนิด (butter head, cos และ red oak) ที่ปลูกในสารละลายแบบเป่าอากาศ โดยมีการประเมินระดับการเกิดโรค (Disease incidence) และความรุนแรงของโรค (Disease severity) รวมทั้งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในทุกสัปดาห์ จากการทดลองหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าในผักสลัดทั้ง 3 ชนิดเกิดโรค อยู่ในช่วง 32-64 เปอร์เซ็นต์และความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 23.1-56.1 เปอร์เซ็นต์ โดยผักสลัด Cos เกิดโรคมามากที่สุด สำหรับกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ไม่พบการเกิดโรคซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับกรรมวิธี healthy control (พืชยังเจริญปกติ) ส่วนใน

กรรมวิธีที่ใส่ร่วมกัน (F221-B+F422-G) พบว่าเกิดโรคน้อยในทั้ง 3 พืช (butter head, cos และ red oak) คือ 3.3, 9.9 และ 13.2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 28 หลังการปลูกเชื้อ (สิ้นสุดการทดลอง) พบว่าในกรรมวิธีปลูกเชื้อ F422-G ในทั้ง 3 พืชมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพิ่มสูงขึ้นถึง 100 เปอร์เซ็นต์และความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 69.3-95.7 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่ใส่ F221-B+F422-G พบว่าผลการทดลองให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับสัปดาห์ที่ 2 และ 3 โดยสรุปกรรมวิธีที่ใส่ด้วยสปอร์เชื้อ F221-B เพียงอย่างเดียวตั้งแต่ช่วงแรกจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ไม่พบการเกิดโรค ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ร่วมกับเชื้อสาเหตุโรคพบว่าเกิดโรคและความรุนแรงน้อยกว่าในกรรมวิธีปลูกเชื้อ โดยสามารถลดการเกิดโรคในทั้ง 3 พืช (butter head, cos และ red oak) ได้เท่ากับ 64, 70 และ 85.3 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการรายงานในต่างประเทศที่ได้ทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* สายพันธุ์อื่นๆ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในดินได้หลายชนิด เช่น โรคเหี่ยวที่เกิดในมะเขือเทศและเมลอนในฝรั่งเศส (Alabouvette, 1990, 1992; Alabouvette *et al.*, 1993, 1996, 1998) โรคเหี่ยวในผักและไม้ดอกไม้ประดับ (Fuchs *et al.*, 1997, 1999; Duijff *et al.*, 1998, 1999) และโรคเหี่ยวในกล้วย (Nel *et al.*, 2006)

เมื่อประเมินถึงปริมาณความอยู่รอดของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) พบว่าปริมาณเริ่มต้นของสปอร์ (3.2×10^6 spore/ml) และเมื่อทำการตรวจนับปริมาณความอยู่รอดของสปอร์ในวันสุดท้ายของการทดลอง (พืชอายุ 45 วัน) พบว่าปริมาณความอยู่รอดของเชื้อในกรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรค (inoculation) มีปริมาณความอยู่รอดของสปอร์เชื้อในผักสลัดทั้ง 3 สายพันธุ์ (butter head, cos และ red oak) อยู่ในช่วง $1.8-2.5 \times 10^5$ spore/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ร่วมกันระหว่าง F221-B และ F422-G พบว่าปริมาณของเชื้อราสาเหตุโรค F422-G มีปริมาณที่น้อยกว่าเชื้อรา F221-B โดยพบปริมาณความอยู่รอดเท่ากับ $0.3-1.3 \times 10^4$ spore/ml ในขณะที่เชื้อรา F221-B พบว่าปริมาณยังคงใกล้เคียงกับการใช้เชื้อรา F221-B เพียงอย่างเดียว ซึ่งมีปริมาณความอยู่รอดเท่ากับ $1.1-2.2 \times 10^5$ spore/ml ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของในต่างประเทศที่พบว่าเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* ยังคงอยู่ภายในระบบทั้งในสารละลายธาตุอาหารและในบริเวณเขตรากพืช (Ghini *et al.*, 2000; Paparu *et al.*, 2006)

สำหรับการทดลองที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) พบว่าในกรรมวิธีควบคุม (healthy control) พืชเจริญตามปกติ ส่วนในกรรมวิธีปลูกเชื้อ (F422-G) พืชมีการเจริญเติบโตน้อย ซึ่งมีผลสืบเนื่องจากการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคที่สูง และเมื่อดูถึงกรรมวิธีที่ใส่ด้วยเชื้อรา F221-B พบว่าส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางด้านจำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ SPAD value น้ำหนักสดและแห้งของต้นและราก ให้ผลดีและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) และกรรมวิธีควบคุม (healthy control) กล่าวคือ ให้ผลในด้านน้ำหนักสดต่อต้นสูงที่สุด ในทั้ง 3 พืชทดสอบคือ butter head, cos และ red oak มีน้ำหนัก 115.9, 192.8 และ 198.4 กรัม/

ต้น โดยกรรมวิธีควบคุม (healthy control) มีน้ำหนัก 72.1, 101.7 และ 113.3 กรัม/ต้น และกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) มีน้ำหนัก 24.5, 7.2 และ 37.6 กรัม/ต้น ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา F221-B+F422-G ให้ค่าการเจริญต้นน้ำหนักสดที่ต่ำกว่าในชุดควบคุม คือ 107.7, 166.5 และ 151.1 กรัม/ต้น สอดคล้องกับการรายงานในประเทศญี่ปุ่นที่ได้ทดสอบเชื้อรา *F. equiseti* GF191 พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศทำให้ต้นแข็งแรง (Horinochi *et al.*, 2008,2010) และยังมีอีกหลายๆ งานวิจัยที่ได้ทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อที่สามารถช่วยกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Patil *et al.*, 2011) ในขณะเดียวกันภายในประเทศไทยก็พบว่ามีการทดสอบความสามารถของเชื้อในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชจำนวน 6 ชนิด คือ ผักสลัด cos, green oak, butter head, red oak ค่ะน้า และ ถั่วเขียว ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ได้ (ธิดิและคณะ 2556)

ส่วนที่ 3 จากการทดสอบประสิทธิภาพของ CF ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ F221-B ต่อการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 10 ชนิด คือ *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* spp. (R111, R112, R113) และ *R. solani* (R11, R12) โดยวิธี agar well diffusion assay พบว่าจาก 2 ลักษณะของ CF ของเชื้อรา F221-B (cell free culture) โดยใช้ micro-filter หรือ การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้น ด้วยเครื่อง autoclave แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสาร CF มีผลในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราทั้งหมด โดยจะเห็นเด่นชัดสุดในเชื้อ R11 และ R112 ซึ่งเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อทั้งหมด เท่ากับ 6-39 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของ CF ที่ดีที่สุดคือ 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยในเชื้อรา *Curvularia* spp. (C11 และ C12) เป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อ CF ของเชื้อรา F221-B สอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัยที่ได้ทดสอบ CF จากเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช (Benhamou *et al.*, 2002; Halmann and Sikora, 1994; Khurshid *et al.*, 2014) และจากการรายงานของ Tayung *et al.* (2010) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Fusarium* สายพันธุ์ MTCC-9622 สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวจำนวน 3 ชนิด คือ *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* และ *Rhizopus stolonifera* ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

โดยสรุปจากวิธีการทดลองโดยการใส่ culture filtrate (CF) 5 ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จากการทดลองพบว่าวิธีการทำให้ CF ปราศจากสิ่งปนเปื้อน (เส้นใยหรือสปอร์) โดยใช้ auto-clave ไม่สามารถทำให้ประสิทธิภาพของสารที่อยู่ภายใน CF เสื่อมสลายไป ถึงแม้จะใช้ความร้อนสูงถึง 121 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้กันทั่วๆ ไปในห้องปฏิบัติการ (micro-filter) พบว่าประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมีแนวโน้มอยู่เพียง 40 เปอร์เซ็นต์ อาจจะเนื่องจากวิธีการวางเชื้อซึ่งมีระยะห่างกันประมาณ 2 เซนติเมตร จึงทำให้การที่สารจะเคลื่อนที่เข้าไปหาเชื้อราสาเหตุต้องใช้เวลาและระยะทางส่งผลทำให้สารนั้นระเหยหรือเสื่อมสลายก่อนที่จะถึงเชื้อสาเหตุโรค

ส่วนในการทดสอบ CF ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ต่อการงอกของสปอร์ เชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 5 ชนิด คือ *Curvularia* spp. (C11,C12) โดยวิธี spore germination test จากการทดลองในครั้งนี้ได้ใช้ CF จากการทดลองที่ 4.4.1 จาก 2 ลักษณะของ CF คือใช้ micro-filter หรือการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้น ด้วยเครื่อง autoclave พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของ CF ตั้งแต่ 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. semitectum* (F113) และ *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) ที่ระยะเวลา 12-48 ชั่วโมง เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามในส่วน ของเชื้อรา *Curvularia* spp. (C11, C12) พบว่าระดับความเข้มข้นของ CF จากเชื้อ F221-B ที่ 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้น 20 และ 40 สามารถยับยั้งได้ในช่วงแรก อันเนื่องมาจากสารระเหยที่น้อย ส่งผลทำให้ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้เพียงเล็กน้อย ยิ่งไปกว่านั้นสปอร์ที่พบในแต่ละกรรมวิธีที่ใส่ด้วยสาร CF ในแต่ละระดับความเข้มข้นพบความผิดปกติของสปอร์ คือ บวม แตกสลาย เป็นต้น อย่างไรก็ตามสอดคล้องกับงานวิจัยในต่างประเทศหลายๆ เรื่องที่ทดสอบ culture filtrate ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช (Aydi-Ben Abdallah *et al.*, 2014; Sonawane *et al.*, 2015) และจากการรายงานของ Ahmed Sheikh (2010) ที่ใช้ CF ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

จากการประเมินประสิทธิภาพของ CF ของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ที่ดีที่สุดในวิธีการ agar well diffusion assay โดยนำ culture filtrate ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์มาใช้ในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) พบว่าในช่วงแรก (7 วันหลังการปลูกเชื้อ) กรรมวิธีปลูกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว (F422-G) ก่อให้เกิดโรคเท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเท่ากับ 56.1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในผักสลัดที่ใส่ด้วย CF และ spore suspension ของเชื้อรา F221-B พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (32 และ 16 เปอร์เซ็นต์) และความรุนแรงของโรคน้อยเท่ากับ 6.6 และ 3.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึง 14 ในกรรมวิธีปลูกเชื้อ พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเพิ่มสูงขึ้นเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเพิ่มสูงขึ้นเป็น 68.3 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (28 วันหลังการปลูกเชื้อ) พบว่าความรุนแรงของโรคเท่ากับ 93.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย CF และ spore suspension ของเชื้อรา F221-B สามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวและรากเน่าได้ 90 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

สำหรับค่าการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งได้ทำการประเมินจากค่าของจำนวนใบ ขนาดใบและคลอโรฟิลล์ (SPAD value) พบว่าช่วงแรกของการปลูกเชื้อ (พืชอายุ 24 วัน) ในกรรมวิธีควบคุม (healthy control) พืชเจริญตามปกติ ส่วนในกรรมวิธีปลูกเชื้อรา (F422-G) พืชมีการเจริญเติบโตน้อยกว่ากรรมวิธีอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 2.8, 2.5 และ 16.4 ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ด้วย F221-B ใน 2 ลักษณะ (CF และ

spore suspension) เพียงอย่างเดียว และการใช้ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคให้ผลไปในทิศทางที่ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม (healthy control) และกรรมวิธีปลูกเชื้อ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (พืชอายุ 45 วัน) ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับช่วงแรกของการทดลอง กล่าวคือกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคพบค่าการเจริญที่น้อย โดยจะเห็นได้จากค่าน้ำหนักสดของต้นและราก (4.25 และ 0.82 กรัมต่อต้น) และน้ำหนักแห้ง (0.21 และ 0.02 กรัมต่อต้น) ในขณะที่กรรมวิธีที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคคือการใช้ culture filtrate และ spore suspension โดยมีผลทำให้ค่าการเจริญเติบโต ทั้งจำนวนใบ ขนาดใบและคลอโรฟิลล์ (SPAD value) เท่ากับ 23.4, 28.4 และ 42.4 ตามลำดับ และค่าน้ำหนักสดต้นและรากในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย culture filtrate เท่ากับ 112.9 และ 13.25 กรัมต่อต้น ส่วนน้ำหนักแห้งเท่ากับ 5.4 และ 0.58 กรัมต่อต้น และในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดสอบ 4.2.3 กล่าวคือค่าการเจริญของพืชในด้านน้ำหนักสดให้ผลที่ดีกว่ากรรมวิธีควบคุมมากกว่า 2 เท่า โดยมีค่าเท่ากับ 167.62 และ 17.28 กรัมต่อต้น ส่วนค่าน้ำหนักแห้งของต้นและราก เท่ากับ 9.09 และ 1.6 กรัมต่อต้น สอดคล้องกับการรายงานของ Patil *et al.* (2011) ที่รายงานว่าจากการใช้เชื้อ non-pathogenic *Fusarium oxysporum* 6 ไอโซเลทสามารถลดการเกิดโรคได้เทียบได้ 70-100 เปอร์เซ็นต์ ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถทำให้ต้นมะเขือเทศ มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

ส่วนที่ 4 จากการทดสอบการเข้าครอบครองรากของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค F221-R และ F422-G ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ พบว่าเชื้อรา F221-B สามารถเข้าครอบครองรากได้ดีกว่าเชื้อราสาเหตุโรคและไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช อย่างไรก็ตามลักษณะการเข้าครอบครองของเชื้อรา F221-B ที่มี 2 ลักษณะคือ epiphytic colonization และ endophytic colonization โดยหลังจากการนับปริมาณของเชื้อรา F221-B พบว่าปริมาณของเชื้อจะลดลงไปตามระยะเวลาของการบ่มเชื้อ epiphytic colonization เท่ากับ 0.29×10^2 และ 0.54×10^2 CFU/ml ส่วน endophytic colonization เท่ากับ 0.6×10^2 CFU/ml ในสัปดาห์ที่ 1 และ 3 หลังการปลูกเชื้อ ตามลำดับ สอดคล้องกับการรายงานของ Paparu *et al.* (2006) พบว่าเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium* สามารถเข้าครอบครองรากกล้วยได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุโรค โดยเชื้อ non-pathogenic สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในรากพืชได้ ในกรณีของเชื้อราสาเหตุโรคเข้าครอบครองได้น้อยกว่า F221-B โดยในสัปดาห์ที่ 3 ใน F221-R เท่ากับ 0.23×10^2 และ 0.16×10^2 CFU/ml ใน F422-G อย่างไรก็ตามปริมาณของเชื้อราทดสอบทั้งหมดก็ยังตรวจพบมากที่สุดในสารละลายธาตุอาหารพืช โดยมีค่าอยู่ในช่วง $1.74-2.2 \times 10^2$ CFU/ml สำหรับลักษณะต้นพืชที่พบในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย F221-B ต้นพืชปกติไม่เกิดโรค และมีลักษณะต้นที่ใหญ่กว่าในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ไอโซเลท คือ F221-R และ F422-G สอดคล้องกับการรายงานของ Olivain *et al.* (2003, 2005) ซึ่งได้ทำการทดสอบการเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* Fo47 และเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าเชื้อ Fo47

สามารถเข้าครอบครองรากได้ดีกว่าการใช้เชื้อสาเหตุโรค และจากการรายงานในอีกหลายๆ ประเทศก็เป็นไปในทิศทางเดียวกัน

จากการทดสอบการเข้าครอบครองของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว 2 สายพันธุ์ คือ F221-R และ F422-G ในกาบใบของผักกวางตุ้ง พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ ก่อให้เกิดโรคมามากที่สุด โดยมีความรุนแรงของโรค เท่ากับ 82.5-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา F221-B ไม่พบอาการเกิดโรค สังเกตได้จากภาพถ่ายอาการโรค และการผ่าเนื้อเยื่อเยื่อกาบใบกวางตุ้ง นอกจากนี้ขนาดแผลที่พบมีขนาด 3-4 เซนติเมตร โดยลักษณะอาการของแผลในวันที่ 5 หลังการปลูกเชื้อ มีอาการยุบลงของเนื้อเยื่อพืช และมีเส้นใยของเชื้อราทดสอบทั้งหมดปกคลุมบริเวณแผล กล่าวคือในเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ พบเส้นใยอยู่ทั้งภายในและภายนอกเนื้อเยื่อ (intracellular tissue) แต่เป็นที่น่าแปลกใจว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา F221-B พบ macroconidia ภายในเนื้อเยื่อของพืช สอดคล้องกับการทดลองของ Eparvier *et al.* (1994) ซึ่งได้ทดสอบเชื้อ non-pathogenic ร่วมกับ pathogenic โดยดูลักษณะการเข้าครอบครองรากของพืชพบว่า เชื้อทั้ง 2 ชนิดสามารถเข้าครอบครองรากพืชได้ แต่จากการทดสอบด้วยวิธี Elisa และ Gus transformed พบลักษณะการเข้าครอบครองรากของ non-pathogenic มากกว่าเชื้อราสาเหตุโรคแต่ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืชทดสอบ

จากการตรวจสอบการเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อรา non-pathogenic F221-B และเชื้อรา pathogenic 2 สายพันธุ์ (F221-R และ F422-G) ในรากผักสลัด 3 สายพันธุ์ คือ Cos, Frillice iceberg และ Rocket ในระบบไฮโดรโปนิคส์ พบว่าเชื้อราทดสอบทั้งหมดสามารถเข้าครอบครองรากผักสลัดใน 2 ลักษณะ คือ epiphytic colonization และ endophytic colonization ได้ สำหรับการทดสอบในช่วงแรก (7 วันหลังปลูกเชื้อ) ในผักสลัด Cos พบว่าเชื้อรา F221-B สามารถเข้าครอบครองรากได้ใกล้เคียงกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ไอโซเลท (F221-R และ F422-G) แต่มีแนวโน้มที่ดีกว่า โดยพบลักษณะการเข้าครอบครองแบบ epiphytic colonization เท่ากับ 1.12×10^2 CFU/ml สอดคล้องกับการรายงานของ Postma and Luttikholt (1996) ที่พบว่าเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* สามารถเข้าครอบครองรากของคานะขึ้นได้ทั้ง 2 ลักษณะ เช่นเดียวกับการรายงานของ Olivain and Alabouvette (1999) ที่กล่าวว่าเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* Fo47 สามารถเข้าครอบครองรากมะเขือเทศได้เหมือนกัน หลังจากนั้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง (21 วันหลังการปลูกเชื้อ) พบว่าการเข้าครอบครองรากเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 1.67×10^2 CFU/ml ในขณะที่การเข้าครอบครองแบบ Endophytic colonization ก็ให้ผลการทดลองเหมือนกับใน Epiphytic colonization ซึ่งมีการเข้าครอบครองในสัปดาห์ที่ 1 และ 3 เท่ากับ 0.65 และ 0.82×10^2 CFU/ml สอดคล้องกับการรายงานของ Olivain and Alabouvette (1999) ที่กล่าวว่าเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* Fo47 สามารถเข้าครอบครองภายในรากพืชได้ดีกว่าเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศที่ปลูกในดิน

เช่นเดียวกับการรายงานของ Nahalkova *et al.* (2008) ที่พบว่าเชื้อรา non-pathogenic Fo47 สามารถเข้าครอบครองรากของต้นมะเขือเทศได้ดีกว่าเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* Fo18 ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน สำหรับการทดสอบกับผักสลัด Frillice iceberg และ Rocket ก็ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบในผักสลัด Cos

โดยสรุปจากการพิจารณาการเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อรา non-pathogenic F221-B และเชื้อ pathogenic สามารถเข้าครอบครองพืชใน 2 ลักษณะ คือ epiphytic colonization และ endophytic colonization ได้ แต่จากการทดลองพบว่าปริมาณเริ่มต้นของเชื้อที่ใส่ในช่วงแรกของการปลูกเชื้อมีความเข้มข้นในทั้ง 2 เชื้อทดสอบไม่เท่ากัน กล่าวคือในเชื้อ non-pathogenic F221-B ใส่เชื้อ 10^8 spore/ml (เมื่อใส่ลงในสารละลายธาตุอาหารลดลง เหลือความเข้มข้น 10^5) และใน pathogenic 10^6 spore/ml (ในสารละลายธาตุอาหาร ลดลงเหลือ 10^3) โดยเมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการเข้าครอบครองในแต่ละเชื้อจะเห็นว่าในเชื้อรา pathogenic มีแนวโน้มที่จะสามารถเข้าครอบครองรากพืชได้ดีกว่า อันเนื่องมาจากเชื้อสาเหตุโรคนั้นแยกมาจากรากผักสลัดที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในระบบไฮโดรโปนิคส์ (ชิติและคณะ, 2555)

จากการตรวจสอบเพื่อยืนยันลักษณะการเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อ non-pathogenic F221-B โดยใช้ SEM พบว่าในพืชทดสอบทั้งหมดมีการเข้าครอบครองรากทั้ง 2 ลักษณะ คือ epiphytic colonization และ endophytic colonization กล่าวคือพบลักษณะของเส้นใยเชื้อเจริญอยู่บริเวณผิวด้านนอกของราก และภายในเนื้อเยื่อของราก สอดคล้องกับการรายงานของ Benhamou and Garand (2001) ที่กล่าวว่าจากการ cross section เนื้อเยื่อของรากแตงกวา พบเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* Fo47 สามารถเข้าไปเจริญอยู่ภายในและภายนอกของเนื้อเยื่อรากแตงกวาได้ และในทำนองเดียวกัน Olivain *et al.* (2006) ได้รายงานถึงการเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อ non-pathogenic Fo47 และเชื้อราสาเหตุโรค Fo18 ในรากต้นกล้ามะเขือเทศที่ปลูกในดิน โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ Confocal laser scanning พบว่าเชื้อราทดสอบทั้ง 2 ไอโซเลทเข้าครอบครองรากผิวยากตำแหน่งเดียวกัน ยิ่งไปกว่านั้นในไอโซเลท Fo47 สามารถเจริญได้เร็วกว่าเชื้อราสาเหตุโรค และจากการรายงานในประเทศญี่ปุ่นก็พบว่า เชื้อรา non-pathogenic GF191 และ GF 183 สามารถเข้าครอบครองเนื้อเยื่อของรากของต้นมะเขือเทศที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ได้เช่นกัน ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อ non-pathogenic สามารถเข้าครอบครองรากพืชได้

สำหรับการเก็บตัวอย่างรากในกรรมวิธีที่ใส่ non-pathogenic และ pathogenic ทั้ง 2 ไอโซเลท ในวันสิ้นสุดการทดลอง (21 หลังการปลูกเชื้อ) มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อเป็นการยืนยันอีกครั้งถึงการเข้าครอบครองรากผักสลัดทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์ พบว่าเชื้อราทดสอบทั้งหมดสามารถเข้าครอบครองเนื้อเยื่อของรากพืชทั้งหมดได้ ซึ่งในเชื้อ non-pathogenic F221-B พบเส้นใยและสปอร์ของเชื้อกระจายอยู่ภายในของเนื้อเยื่อราก ส่วนในเชื้อ pathogenic พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อพืชที่

บิดเบี้ยวผิดปกติรูปร่างไปจากปกติ รวมไปถึงพบแต่เพียงเส้นใยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืช สอดคล้องกับการรายงานของ Olivain *et al.* (2006) ที่กล่าวว่าเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol 8) สามารถเข้าครอบครองรากมะเขือเทศได้ โดยหลังจากตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยของเชื้ออยู่ภายในเนื้อเยื่ออีกทั้งยังพบว่าเนื้อเยื่อภายในรากมะเขือเทศนั้นผิดปกติ โดยหลังจากการลอกผิวของกาบใบพบ macroconidia เชื้ออยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืช ในขณะที่เดียวกันในเชื้อรา pathogenic ก็พบว่าการเข้าครอบครองด้วยเส้นใยในกาบใบกว้างตุ้ง โดยเนื้อเยื่อกว้างตุ้งนั้นเกิดความผิดปกติ ผิดรูปร่าง โดยสรุปพบว่าเชื้อรา non-pathogenic F221-B สามารถเข้าครอบครองพืชได้และไม่ทำให้พืชเกิดโรค

ส่วนที่ 5 จากการตรวจสอบเบื้องต้น ถึงแนวโน้มในการสร้าง GA ของเชื้อรา F221-B และเชื้อราสาเหตุโรค 2 สายพันธุ์ (F221-R และ F422-G) เปรียบเทียบกับสาร GA มาตรฐาน โดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) พบว่า มีการเคลื่อนที่ของ spot สาร (ยกเว้น F422-G) ซึ่งมีค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (Rf) เท่ากับ 0.78, 0.84 และ 0.88 ตามลำดับ จากวิธีการทดสอบ TLC สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อ F221-B และ F 221-R สามารถผลิตสาร GA ได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Fusarium* sp. ชนิดอื่นๆ เช่น *F. moniliforme*, *F. semitectum*, *F. solani* และ *F. pallidoroseum* ก็พบว่าโดยทั่วไปแล้ว GA จะตรวจพบที่ค่า Rf ประมาณ 0.7-0.94 (Muddapur *et al.*, 2015; Bhalla *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2003)

จากการวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่า Retention time (Rt) ในกราฟโครมาโทแกรม (chromatogram) ที่พบใน crude extract ที่สกัดจากเชื้อรา F221-B และ F221-R ขึ้นอยู่ในช่วงระยะเวลาที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมมาตรฐาน standard GA₃ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 3.147-3.140 สอดคล้องกับการรายงานของ Hasan (2002) ที่รายงาน GA₃ ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC จะพบค่าจากการทดลองปริมาณ GA ที่เกิดมีความแตกต่างกันเป็นผลมาจากชนิดของเชื้อ และรูปแบบของเชื้อ รวมไปถึงผลร่วมกันระหว่างชนิดและรูปแบบของเชื้อหลังจากนั้นเมื่อตรวจสอบ Retention time (Rt) ในกราฟโครมาโทแกรม (chromatogram) ที่พบใน crude extract ที่สกัดจากเชื้อรา F221-B และ F221-R ขึ้นอยู่ในช่วงระยะเวลาที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมมาตรฐาน standard GA₃ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 3.147-3.140) โดยเมื่อพิจารณาถึง GA ในแต่ละระยะเวลาในการบ่มเชื้อพบว่า ในเชื้อรา F221-B หลังการบ่มเชื้อ 10 วัน พบการสร้าง GA ในส่วนของ CF มากกว่าใน mycelium เท่ากับ 4.29 mg/l ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรคก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน ปริมาณ GA จะพบมาสุดใน CE ที่สกัดได้จาก CF และเป็นที่น่าแปลกไปในวันที่ 15 หลังการปลูกเชื้อในกรรมวิธีของ F221-B กลับเปลี่ยนแปลงไปจากวันที่ 10 โดยพบว่าใน CF ก็พบปริมาณ GA ที่น้อย (ทำการวิเคราะห์ผลใหม่ 5 ครั้ง ได้ผลเหมือนเดิม) ในกรณีนี้ยังอาจสรุปได้ไม่แน่ชัดว่ามีผลมาจากอะไร แต่จากการเปรียบเทียบค่าในกราฟโครมาโทแกรมพบว่า อาจจะมีผลมาจากสารชนิดอื่นที่ปนอยู่ค่อนข้างมาก (ไม่แสดงผลในข้อมูล) ส่วนในเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าปริมาณของ GA เพิ่มขึ้น แต่ก็ยังให้ผล

ไปในทิศทางเดียวกันกับ 10 วันหลังการบ่มเชื้อ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 30 หลังการบ่มเชื้อ พบว่าในเชื้อ F221-B มีปริมาณการสร้างสาร GA กลับมาเป็นเหมือนในการทดลอง 10 วัน โดยในเส้นใย 7.08 mg/l และใน CF เท่ากับ 10.38 mg/l ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรค F221-R ปริมาณ GA ก็เพิ่มขึ้นเดียวกัน คือ 9.62 และ 11.8 mg/l ตามลำดับ จากผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานของ Sunder and Satyavir (1998) รายงานถึงปริมาณการสร้าง GA ในเชื้อสาเหตุโรคจะสร้าง GA ปริมาณที่มากโดยขึ้นอยู่กับระยะเวลา ในการเลี้ยงเชื้อและความรุนแรงของเชื้อ ในทิศทางเดียวกันจากการรายงานของ Desjardins *et al.* (1995) ได้ ทดสอบเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ถึงการสร้างสาร GA และ Fumonisin B1 พบว่าในสายพันธุ์ที่เกิดโรค รุนแรงจะสามารถผลิตสารดังกล่าวได้ดีที่สุดและจากการทดลองของ Bomke *et al.* (2008) ก็พบว่าเชื้อ *Fusarium verticillioides* ก็สามารถสร้าง GA ได้มากเช่นกัน อย่างไรก็ตามเมื่อระยะเวลาในการบ่มเชื้อรา เพิ่มขึ้นปริมาณ GA ก็เพิ่มสูงขึ้น โดยในเส้นใยมีแนวโน้มที่จะน้อยกว่าใน culture filtrate อันเนื่องจากการที่ เชื้อราปลดปล่อยสารต่างๆ ลงในอาหารจึงทำให้เห็นปริมาณของสารมาก ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้อง กับการรายงานของ Hasan, 2002 ที่กล่าวว่าใน CF จะพบการสร้างสาร GA เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาในการ บ่มเชื้อรา แต่เป็นที่น่าแปลกใจว่าปริมาณสาร GA ในเส้นใยกับเป็นไปในทิศทางกลับกันคือ ยิ่งระยะเวลาบ่ม เชื้อเพิ่มขึ้นปริมาณการสร้างอาจจะผันแปรไป อย่างไรก็ตามถ้าหากถึงช่วงระยะเวลาหนึ่งการสร้างสารก็จะ คงที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือพุดอีกนัยหนึ่งว่าเชื้อดังกล่าวนั้นอาจจะเปลี่ยนไปผลิตสารในกลุ่มอื่นแทน ในขณะที่ Muddapur *et al.*, 2015 ได้ทดสอบเชื้อรา *F. moniliforme* ในการสร้าง GA โดยบ่มไว้เป็นเวลา 12 วัน พบว่าปริมาณ GA พบมากที่สุดในวันที่ 8 แต่เมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น GA ก็เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจากงานวิจัย ในต่างประเทศก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ CE ที่สกัดได้จากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* F221-B ต่อการ เจริญเติบโตของผักสลัด 2 สายพันธุ์ คือ Butter head และ Frillice berg พบว่าในช่วงแรก 27 หลังการใส่สาร CE ระดับความเข้มข้นของ CE ไม่มีผลต่อจำนวนใบและขนาดใบ ของผักสลัดที่นำมาทำการทดสอบ เมื่อ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (healthy control) แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 36 และ 45 วัน เริ่ม สังเกตเห็นอิทธิพลของระดับความเข้มข้นของสาร CE ต่อการเจริญเติบโตของพืช กล่าวคือ เมื่อระดับความ เข้มของ GA มากส่งผลทำให้ค่าการเจริญของพืชนั้นน้อย (ซึ่งอันเนื่องมาจากการทดลองที่ 2.1 ถ้าหากความ เข้มของ GA สูง ส่งผลทำให้ต้นกล้าพืชยึดและไม่มี ความแข็งแรง) และเมื่อคู่ถึงระดับความเข้มข้น 3 และ 5 ppm มีแนวโน้มให้ผลดีที่สุดทั้งในด้าน จำนวนใบ ขนาดใบ และคลอโรฟิลล์ สูงกว่าในกรรมวิธีอื่นๆ รวมทั้งชุดควบคุม healthy control ส่วนอิทธิพลของระดับความเข้มข้นของ CE ต่อค่า SPAD value ของผัก สลัดทั้ง 2 สายพันธุ์ จะเริ่มมีค่าสูงขึ้นเมื่อพืชอายุเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย CE 3 และ 5 ppm จะมีค่า SPAD value สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ CE ความเข้มข้นสูง (10 กับ 50 ppm)

และSTD GA (50 ppm) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar *et al.*, 2014 ที่ระบุถึงการใช้ GA ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้ง ความสูงต้น จำนวนใบ จำนวนผลผลิต น้ำหนักผล ปริมาณวิตามินซี และ ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ

ในส่วนของน้ำหนักสด ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับ จำนวนใบ ขนาดใบ และ SPAD value กล่าวคือการใช้ CE ความเข้มข้น 3 และ 5 ppm ไม่ว่าจะใส่ในช่วงแรก (คลุกเมล็ด) และฉีดพ่นเพิ่ม มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดทั้ง 2 สายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (healthy control) สอดคล้องกับการรายงานของ Hamayun *et al.*, 2010 ที่ทดสอบสาร GA ที่สกัดจากเชื้อรา *Cladosporium* sp. (MH6) กับแตงกวา พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของความสูงต้น ขนาดต้น น้ำหนักสดและแห้งของต้นและราก ขนาดใบ ดีกว่าในกรรมวิธีเปรียบเทียบอื่นๆ

ส่วนที่ 6 จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) จาก 3 รูปแบบ คือ spore suspension, culture filtrate และ crude extract (ที่ให้ผลดีในทุกๆ วิธีการในสภาพห้องปฏิบัติการ) ในการควบคุมโรคเหี่ยวและรากเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) ของผักสลัดทั้ง 3 ชนิด (butter head, cos และ frillice iceberg) ที่ปลูกในสารละลายแบบเป่าอากาศ โดยมีการประเมินระดับการเกิดโรค (Disease incidence) และความรุนแรงของโรค (Disease severity) รวมทั้งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในทุกสัปดาห์มีรายละเอียดผลการทดลองดังนี้

จากการทดลองหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคด้วยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) เป็นเวลา 7 วัน (พืชอายุ 24 วัน) พบว่าในผักสลัดทั้ง 3 สายพันธุ์ (butter head, cos, frillice iceberg) กรรมวิธี ที่ใส่ด้วย spore suspension ของ F221-B สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้สูงที่สุดในทั้ง 3 พืชทดสอบ ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 72.4, 80.9 และ 79.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับการรายงานของ Horinouchi *et al.* (2011) ที่ได้ทดสอบเชื้อ non-pathogenic *Fusarium* GF 191 ในรูปแบบ spore suspension ในการควบคุมโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์และระบบดินพบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 88.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในที่กรรมวิธี culture filtrate และ crude extract ก็สามารถลดการเกิดโรคได้อยู่ในช่วง 61.3-78.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในต่างประเทศที่พบว่าหลังจากการใส่ CF ของเชื้อ non-pathogenic ลงไปในพืชสามารถช่วยลดการเกิดโรคและยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้อีกด้วย (Larkin and Fravel, 1998,1999; Larkin *et al.*, 1996; Lemanceau *et al.*, 1992) ส่วนการทดลองในผักสลัด cos และ frillice iceberg พบว่าให้ผลการทดลองในด้านการเกิดโรคเหมือนกับในผักสลัด butter head แต่เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในผักสลัดทั้ง 2 สายพันธุ์จะเกิดโรคมากกว่า และเมื่อสังเกตถึงกรรมวิธีที่ทดสอบก็พบว่าในกรรมวิธี spore suspension ของ F221-B สามารถการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ

13.3 และ 17.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับการรายงานของ Abeyasinghe (2006) ที่ระบุว่า non-pathogenic *F. oxysporum* ที่แยกได้จากดิน สามารถในการควบคุมโรครากเน่าและลำต้นเน่า ที่เกิดกับแตงกวาได้ 60 เปอร์เซ็นต์ รวมไปถึงการรายงานของ Olivain *et al.* (2005) ที่พบว่าเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* สามารถควบคุมโรครากเน่าของมะเขือเทศที่ปลูกในดิน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคได้ อีกทั้งยังสามารถเข้าครอบครองรากของมะเขือเทศ ส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคลดลง 50 เปอร์เซ็นต์

สำหรับค่าการเจริญเติบโตของพืช พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ด้วยรูปแบบของเชื้อ F221-B ร่วมกับการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค พบว่า การเจริญเติบโตของพืชทั้งทางด้านจำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ SPAD value น้ำหนักสดต้นและราก รวมทั้งน้ำหนักแห้งต้นและราก ให้ผลดีและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) และ กรรมวิธีควบคุม (healthy control) กล่าวคือ ในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย F221-B ไม่ว่าจะใส่เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับเชื้อสาเหตุโรค ให้ผลในด้านน้ำหนักสดต่อต้นสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือในผักสลัด **butter head** ค่าการเจริญในด้านน้ำหนักสดต้น ในกรรมวิธีที่ใส่รูปแบบ F221-B เพียงอย่างเดียวมีค่าเท่ากับ 46.1, 44.8 และ 45.1 กรัมต่อต้น ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ร่วมกันเชื้อสาเหตุโรค พบว่าค่าการเจริญในด้านน้ำหนักสดก็ยังคงมากกว่าในกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 40.7, 38 และ 36.7 กรัมต่อต้น ส่วนในการทดลองในผักสลัด **cos** และ **frillice iceberg** ก็ให้ผลแนวโน้มการทดลองในด้านน้ำหนักสดไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองในผักสลัด **Butter head** โดยในผักสลัด **Cos** มีค่าเท่ากับ 74.1, 72.4, 71.9, 65, 64.2 และ 63.6 กรัมต่อต้น และในผักสลัด **Frillice iceberg** มีค่าเท่ากับ 24.6, 23.2, 22.5, 18.2, 17.7 และ 17.3 กรัมต่อต้น ผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานของ Shishido *et al.* (2005) ได้ระบุว่าเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* Fo-B2 สามารถทำให้ผลผลิตมะเขือเทศสูงกว่าผลผลิตที่ได้จากกรรมวิธีควบคุม และจากงานวิจัยในประเทศญี่ปุ่นได้ทำการทดสอบเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium equiseti* GF 191 ที่มีคุณสมบัติการเป็นเชื้อราที่สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Fungus: PGPF) โดยได้ทำการทดสอบกับเชื้อรา *F.oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL) ที่แยกได้จากระบบปลูกพืชไฮโดรโปนิคส์และระบบปลูกพืชในดิน พบว่าเชื้อรา GF 191 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ โดยความรุนแรงของโรคอยู่ในช่วง 66.7-88.6 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศได้ (Horinouchi *et al.*, 2011)

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาวិธีการเก็บรักษาเชื้อราที่เหมาะสมและการประเมินคุณสมบัติของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* F221-B ในระหว่างการเก็บรักษาระยะยาว (long term preservation) เป็นเวลา 2 ปี พบว่าวิธีการ modified filter paper culture เป็นวิธีการที่ดีที่สุด โดยเชื้อราดังกล่าวยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีการเสื่อมสลาย อีกทั้งการเจริญของเส้นใยและขนาดสปอร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนการประเมินคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช พบว่าจากการทดสอบ Dual culture test ของเชื้อรา F221-B สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด คือ *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. และ *Fusarium* sp. ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 32.5-82.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ อยู่ในช่วง 30.3-58.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระดับความเข้มข้น 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการเจริญทางเส้นใยได้สูงที่สุด ส่วนการประเมินคุณสมบัติในการกระตุ้นการงอกของเมล็ด พบว่าเมล็ดที่ทำการคลุกด้วย spore suspension ความเข้มข้น 10^3 และ 10^6 spore/ml ของเชื้อรา F221-B ในทุกๆ เดือนสามารถทำให้เมล็ดงอกเร็วกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเชื้อ 2 วัน โดยส่งผลทำให้ความยาวของต้นกล้าเฉลี่ยในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ให้ผลดีกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเชื้อ

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อรา non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 10 ไอโซเลท ด้วยวิธี Dual-culture antagonistic test พบว่าเชื้อรา F221-B สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งหมดได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 36-56.3 เปอร์เซ็นต์ กลไกการยับยั้งที่ตรวจพบมี 2 กลไก กล่าวคือในระยะแรก (วันที่ 3 หลังการบ่มเชื้อ) จะเริ่มสังเกตเห็นกลไกแบบ antibiosis โดยพบ clear zone และเมื่อระยะเวลาผ่านไปกลไก antibiosis จะถูกปกคลุมด้วยกลไก competition ส่วนในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *F. oxysporum* (F221-B) ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวในระบบไฮโดรโปนิคส์ พบว่าโดยสรุปกรรมวิธีที่ใส่ด้วยสปอร์เชื้อ F221-B เพียงอย่างเดียวตั้งแต่ช่วงแรกจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ไม่พบการเกิดโรค ในขณะที่กรรมวิธีที่ใส่ร่วมกับเชื้อสาเหตุโรคก็พบว่าเกิดโรคและความรุนแรงน้อยกว่าในกรรมวิธีปลูกเชื้อ โดยเมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการลดการเกิดโรคของในทั้ง 3 พืช (Butter head, Cos และ Red oak) สามารถการเกิดโรคได้เท่ากับ 64, 70 และ 85.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อพิจารณาถึงค่าการเจริญเติบโตของพืช พบว่าเชื้อรา F221-B สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชทั้งทางด้านจำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ SPAD value น้ำหนักสดและแห้งของต้นและราก ให้ผลดีและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีปลูกเชื้อ (Inoculation) และกรรมวิธีควบคุม (Healthy control) โดยสรุปจากการทดสอบสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อ

รา F221-B มีความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ อีกทั้งยังสามารถช่วยลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพของ CF ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ F221-B ต่อการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 10 ชนิด โดยวิธี agar well diffusion assay พบว่าจาก 2 ลักษณะของ CF ของเชื้อรา F221-B (cell free culture) โดยใช้ micro-filter หรือ การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนขึ้น ด้วยเครื่อง autoclave พบว่าไม่ว่าจะวิธีการใดก็ตามก็สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ อีกทั้งกรรมวิธีที่ใช้ด้วย CF ที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียส ก็สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่ต่างกับการใช้ micro-filter ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 6-39 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้น 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ทำให้ประสิทธิภาพดีที่สุด ส่วนในการทดสอบกับสปอร์ (spore germination test) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของ CF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. semitectum* (F113) และ *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) ที่ระยะเวลา 12-48 ชั่วโมง เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังพบความผิดปกติของสปอร์ คือ บวม แตกสลาย เป็นต้น ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของ CF ต่อการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวในระบบไฮโดรโปนิกส์พบว่าการกรรมวิธีที่ได้ด้วย CF และ spore suspension ของเชื้อรา F221-B สามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวและรากเน่าได้ 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม สำหรับค่าการเจริญเติบโตของพืชค่าน้ำหนักสดต้นและรากในกรรมวิธีที่ได้ด้วย culture filtrate เท่ากับ 112.9 และ 13.25 กรัมต่อต้น ส่วนน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 5.4 และ 0.58 กรัมต่อต้น และในกรรมวิธีที่ได้ด้วย spore suspension ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดสอบ 4.2.3 กล่าวคือค่าการเจริญของพืชในด้านน้ำหนักสดให้ผลที่ดีกว่ากรรมวิธีควบคุมมากกว่า 2 เท่า โดยมีค่าเท่ากับ 167.62 และ 17.28 กรัมต่อต้น ส่วนค่าน้ำหนักแห้งของต้นและราก เท่ากับ 9.09 และ 1.6 กรัมต่อต้น

ผลจากการศึกษาการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) และเชื้อราสาเหตุโรค F221-R และ F422-G ในผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ พบว่าเชื้อราทดสอบทั้งหมดสามารถเข้าครอบครองพืชใน 2 ลักษณะ คือ epiphytic colonization และ endophytic colonization ได้ แต่เมื่อพิจารณาแล้วกับพบว่าเชื้อรา F221-B สามารถเข้าครอบครองรากได้ดีกว่าเชื้อราสาเหตุโรค โดยหลังจากการนับปริมาณของเชื้อรา F221-B พบว่าปริมาณของเชื้อจะลดลงไปตามระยะเวลาของการบ่มเชื้อ epiphytic colonization เท่ากับ 0.29×10^2 และ 0.54×10^2 CFU/ml ส่วน endophytic colonization เท่ากับ 0.6×10^2 CFU/ml ในสัปดาห์ที่ 1 และ 3 หลังการปลูกเชื้อ ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรคเข้าครอบครองได้น้อยกว่า F221-B โดยมีค่าในสัปดาห์ที่ 3 หลังการปลูกเชื้อใน F221-R เท่ากับ 0.23×10^2 และ 0.16×10^2 CFU/ml ใน F422-G อย่างไรก็ตามปริมาณของเชื้อราทดสอบทั้งหมดก็ยังตรวจพบมากที่สุดในสารละลายธาตุอาหารพืช ส่วนในการทดสอบกับกาบใบกวางตุ้ง พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ ก่อให้เกิดโรคมามากที่สุด โดยมีความรุนแรงของโรค เท่ากับ 82.5-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา F221-B ไม่พบอาการเกิดโรค สังเกตได้จากภาพถ่ายอาการโรคและการผ่าเนื้อเยื่อกาบใบกวางตุ้ง พบเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ทั้งภายในและภายนอกเนื้อเยื่อ (intracellular tissue) แต่เป็นที่น่าแปลกใจว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา F221-B พบ macroconidia ภายในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อของพืช ส่วนในการทดสอบเพื่อยืนยันการเข้าครอบครองของเชื้อโดยส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Scanning electron microscope: SEM) พบว่าในพืชทดสอบทั้งหมดมีการเข้าครอบครองภายในและภายนอกเนื้อเยื่อของราก ซึ่งมีลักษณะของเส้นใยเชื้อเจริญเกาะอยู่แต่ไม่ก่อให้เกิดพืชเกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อราก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Healthy control) ในขณะเดียวกันกรรมวิธีที่ใส่ F221-B ในวันสิ้นสุดการทดลองมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการ cross section เนื้อเยื่อของราก พบทั้งเส้นใยและสปอร์ของเชื้อกระจายอยู่ภายในของเนื้อเยื่อราก จึงสรุปได้ว่าเชื้อรา F221-B สามารถเข้าครอบครองรากพืชได้และไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อพืช

ผลจากการศึกษาเชื้อรา non-pathogenic F221-B และเชื้อราสาเหตุโรค 2 ไอโซเลท (F221-R และ F422-G) ในการสร้าง GA และอิทธิพลของ GA ต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิคส์ จากการทดสอบเบื้องต้น ด้วย TLC พบว่า ในเชื้อทดสอบทุกๆ ไอโซเลทที่ทำการทดสอบ มีการเคลื่อนที่ของ spot สาร (ยกเว้น F422-G) โดยมีค่าระยะทางที่สารเคลื่อนที่ (Rf) ระหว่างจุดเริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุด เท่ากับ 0.78, 0.84 และ 0.88 ตามลำดับ โดยสรุปจากผลการทดสอบดังกล่าว สามารถยืนยันได้ว่าไม่ว่าจะเป็นเชื้อราปฏิปักษ์หรือเชื้อสาเหตุโรครักก็สามารถผลิตสารในกลุ่มของ GA ได้ แต่จะมีปริมาณมากหรือน้อยก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ ส่วนในการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC พบว่าใน crude extract ที่สกัดจากเชื้อรา F221-B และ F221-R มีค่า Retention time (Rt) ขึ้นอยู่ในช่วงระยะเวลาที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมมาตรฐาน standard GA₃ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 3.147-3.140 ซึ่งหลังจากการทดสอบพบว่า ส่วนที่พบ GA มากที่สุดคือ culture filtrate รวมไปถึงระยะเวลาในการบ่มเชื้อที่ 30 วัน พบการสร้าง GA มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่บ่ม เชื้อ 10 และ 15 วัน สำหรับการทดสอบ Crude extract ของเชื้อรา F221-B กับผักสลัด 2 สายพันธุ์ พบว่าในการทดสอบกับเมล็ด ในกรรมวิธีที่ใช้ CE คลุกเมล็ดสามารถกระตุ้นให้เมล็ดผักสลัดทั้งหมดงอกได้เร็วกว่าปกติ 1 วัน ทำให้แนวโน้มความยาวของรากและต้นกล้าที่น้อยกว่าต้นกล้าที่ได้จากเมล็ดที่คลุกด้วย CE ในแต่ละความเข้มข้น หลังจากนั้นนำต้นกล้าที่งอกแล้วปลูกลงในระบบไฮโดรโปนิคส์ และได้มีการฉีดพ่น crude extract (CE) เพิ่ม พบว่าในช่วงแรก 27 หลังการใส่สาร CE ระดับความเข้มข้นของ CE ไม่มีผลต่อจำนวนใบและขนาดใบ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 36 และ 45 วัน เริ่มสังเกตเห็นอิทธิพลของระดับความเข้มข้นของสาร CE ต่อการเจริญเติบโตของพืช อย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้น 3 และ 5 ppm สามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดทั้งจำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ และน้ำหนักสด ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยสรุปจากการทดลองโดยใช้ crude extract ของเชื้อ F221-B ทุกระดับความเข้มข้นสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของผักสลัดทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ โดยจะเห็นเด่นชัดสุดใน 3 และ 5 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (healthy control)

ผลจากการทดสอบคุณสมบัติโดยรวมของรูปแบบเชื้อรา *F. oxysporum* F221-B ที่ได้ผลดีที่สุดจากการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการ คือ spore suspension, culture filtrate และ crude extract มาใช้

ในการควบคุมโรครากเน่าและเหี่ยวที่เกิดกับผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิคส์ พบว่าในกรรมวิธีที่ใส่ด้วยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

F221-B สามารถลดการเกิดโรคได้แตกต่างกันออกไป กล่าวคือในช่วงแรกของการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค (7-14 วัน) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (DI) และความรุนแรงของโรคน้อย (DS) เท่ากับ DI: 33-66 เปอร์เซ็นต์ และ DS: 13.3-15.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคก็เพิ่มสูงขึ้น โดยในกรรมวิธีที่ใส่ด้วย spore suspension ของ F221-B สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้สูงที่สุดในทั้ง 3 พืชทดสอบ ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 72.4, 80.9 และ 79.8 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่าการเจริญเติบโตของผักสลัด พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดสอบการเกิดโรค กล่าวคือ ในกรรมวิธีที่ใส่ด้วยรูปแบบของเชื้อรา F221-B ทั้ง 3 รูปแบบ ให้ค่าการเจริญเติบโตทั้งด้านจำนวนใบ ขนาดใบ คลอโรฟิลล์ SPAD value น้ำหนักสดต้นและราก ให้ผลดีและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีปลูกเชื้อ (inoculation) และ กรรมวิธีควบคุม (healthy control)

โดยสรุปจากการประยุกต์ใช้รูปแบบของเชื้อรา F221-B ทั้ง 3 รูปแบบ คือ spore suspension, culture filtrate และ crude extract ในการควบคุมโรค สามารถยืนยันผลการทดลองได้อีกครั้งถึงศักยภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ตลอดจนความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ (plant growth promoting fungi: PGPF) ในระบบการปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิคส์

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อรา non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) สามารถผลิตสาร secondary metabolite ส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งทางด้านเส้นใยและสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค อีกทั้งยังสามารถควบคุมโรคพืช แต่อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับสารที่ผลิตให้ชัดเจนเพื่อที่จะได้นำมาใช้เป็นข้อมูลในการนำมาพัฒนารูปแบบของเชื้อ F221-B ต่อไป
2. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติของเชื้อ non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) ในด้านการส่งเสริมการเจริญเติบโตกับพืชชนิดอื่นๆ เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการนำมาพัฒนาต่อไป
3. ควรศึกษาคุณสมบัติ GA ที่ได้จากเชื้อ non-pathogenic (F221-B) โดยละเอียดถึงลักษณะโครงสร้างทางเคมี เพื่อให้ทราบถึงความแตกต่างระหว่าง GA ที่สกัดได้กับ GA ที่ได้จากเชื้อสาเหตุโรค, จากพืชสร้างขึ้นเอง และ standard GA รวมไปถึงการทดสอบในด้าน molecular ของเชื้อรา non-pathogenic (F221-B) เพิ่มเติมเพื่อใช้เป็นแนวทางในการนำมาทดสอบต่อไป

บรรณานุกรม

- เสนห์ นิลมณี และอุดม ภูพิพัฒน์. 2547. การศึกษาโรคเหี่ยวของมะเขือเทศเกิดจากเชื้อฟิวซาเรียม *Fusarium* Wilt of Tomato in Thailand. วารสารเกษตรศาสตร์ 4(4): 79-87.
- สันติ ช่างเจรจา, ยุทธนา เขาสุเมรุ, ชิติ ศรีตันทิพย์ และรุ่งนภา ช่างเจรจา. 2551. ผลของจิบเบอเรลลินต่อการชะลอการออกดอกของสับปะรด. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39(3) ฉบับพิเศษ: 174-177.
- ชารทิพ ภาสบุตร, อภิรัชต์ สมฤทธิ, ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และ พรพิมล อธิปัญญาคม. 2551. ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อรา *Colletotrichum* spp. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551 ฉบับที่ 3 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 1445-1463.
- ชิติ ทองคำงาม, พรหมมาศ คูหากาญจน์ และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2555. รายงานครั้งแรกของโรคเหี่ยวในผักสลัดที่ปลูกในระบบ NFT ที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* และการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับผักสลัด 4 สายพันธุ์. หน้า 71-81. ใน รายงานการประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยนเรศวร.พิษณุโลก
- ชิติ ทองคำงาม, พรหมมาศ คูหากาญจน์ และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2556. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* F 221-B ในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 6 ชนิด ในระบบไฮโดรโปนิกส์ และลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ. หน้า 46-51 ใน รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 6. โรงแรมชลจันทร์ พัทยา รีสอร์ท ชลบุรี.
- ชิติ ทองคำงาม และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2557. การประเมินเทคนิค Filter paper เพื่อเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) หน้า 33-39. ใน รายงานการประชุมวิชาการเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 12 มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก
- Abeyasinghe, S. 2006. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, the causal agent of root and stem rot of *Cucumis sativus* by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. **Ruhuna Journal of Science** 1:24-31.
- Agrios, G.N. 2005. **Plant Pathology** 5 ed. New York : Academic Press. 992 p.
- Ahmed Sheikh, H.M. 2010. Antimicrobial activity of certain bacteria and fungi isolated from soil mixed with human saliva against pathogenic microbes causing dermatological diseases. **Saudi Journal of Biological Sciences** 17(4): 331-339.

- Alabouvette, C. 1990. Biological control of *Fusarium* wilt pathogen in suppressive soil. *In: Hornby D (Eds.) Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*. Wallingford, UK. CAB International. 27-43.
- Alabouvette, C. and Couteaudier, Y. 1992. Biological control of *Fusarium* wilts with nonpathogenic *Fusaria*. *In: Tjamos, E.T., Cook, R.J., Pavizas, G.J. (Eds.) Biological Control of Plant Diseases*. Plenum press, New York. 415-426.
- Alabouvette, C., Lemanceau, P. and Steinberg, C. 1993. Recent advance in biological control of *Fusarium* wilt. *Pesticide Science* 37:363-373.
- Alabouvette, C., Lemanceau, P. and Steinberg, C. 1996. Use of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and fluorescent pseudomonads to control *Fusarium* wilts. *In: Tang, W., Cook, R.J., Rovira, A.D. (Eds.) Advances in Biological Control of Plant Diseases*. China Agricultural University Press. Beijing 155-164.
- Alabouvette, C., Steinberg, C., Lemanceau, P. and Bakker, P.A.H.M. 1998. Biological control of *Fusarium* wilt towards the development of commercial products. *In: Boland, G.C., Kuykendall, L.D. (Eds.) Plant Microbe Interaction and Biological Control*. Marcel Dekker, New York. 15-36.
- Aydi-Ben Abdallah, R., Hassine, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Haouala, R. and Daami-Remadi, M. 2014. Antifungal activity of culture filtrates and organic extracts of *Aspergillus* spp. against *Pythium ultimum*. *Tunisian Journal of Plant Protection* 9: 17-30.
- Bao, J.R. and G. Lazarovits. 2001. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence *Fusarium* wilt control. *Phytopathology* 91: 449-456.
- Barendse, G.W.M. and Van De Werken, P.H. 1980. High performance liquid chromatography of gibberellins. *Journal of Chromatography* 198: 449-455.
- Benhamou, N., Charest, P.M. and Jarvis, W.R. 1989. Biology and host-parasite relationships of *Fusarium oxysporum*. *In: Tjamos EC, Beckman CH (Eds.) Vascular Wilt Disease of Plant. Basic Studies and Control*, NATO AST Series, Springer-Verlag, Berlin. 95-105.
- Benhamou, N. and Garand, C. 2001. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Phytopathology* 91(8): 730-740.

- Benhamou, N., Garand, C. and Goulet, A. 2002. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. **Applied and Environmental Microbiology** 68: 4044-4060.
- Benoit, F. 1992. **Practical Guide for Simple Soilless Culture Techniques**. Sint-Katelijne Waver European Vegetable R&D Center. 72 p.
- Bhalla, K., Singh, S.B. and Agarwal, R. 2010. Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains. **Environmental Monitoring and Assessment** 167: 515-520.
- Booth, C. 1971. **The Genus *Fusarium***. The Eastern London : Press Limited. 237 p.
- Bomke, C., Rojas, M.C., Hedden, P. and Tudzynski, B. 2008. Loss of gibberellins production in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A) is due to a deletion in the gibberellic acid gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology** 74(24): 7790-7801.
- Bottini, R., Cassan, F. and Piccoli, P. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology Biotechnology** 65: 497-503.
- Briani, M., Akbari, N. and Ahmadi, H. 2013. The effect of gibberellic acid (GA₃) on seed size and sprouting of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). **African Journal of Agricultural Research** 8(29): 3898-3903.
- Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P. and Backhouse, D. 1994. **Laboratory Manual for Fusarium Research**. University of Sydney. Sydney 133 p.
- Cavell, B.D., Macmillan, J., Pryce, R.J. and Sheppard, A.C. 1967. Thin layer chromatography of gibberellic acids. **Photochemistry** 6: 867-874.
- Chapman, H.W. 2006. Tuberization in the potato plant. **Physiologia Plantarum** 11(2): 215-224.
- Chen, D., Liu, X., Li, C., Tian, W., Shen, Q. and Shen, B. 2014. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt. **Journal of Environmental Management** 137: 120-127.
- Chinta, Y.D., Kano, K., Widiastuti, A., Fukahori, M., Kawasaki, S., Eguchi, Y., Misu, H., Odani, H., Zhou, S., Narisawa, K., Fjiwara, K., Shinohara, M. and Sato, T. 2014. Effect of corn steep liquor on lettuce root rot (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*) in hydroponic cultures. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 94(11): 2317-2323.

- Correll, J.C. 1991. The relationship between formae specialis, races and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology** 81: 1061-64.
- Dahmen, H., Staub, T.H and Schwinn, F.J. 1982. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. **American Phytopathological Society** 73(2): 241-246.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nelson, T.C. and Leslie, J.E. 1995. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. **Applied and Environmental Microbiology** 61(1): 79-86.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*-III. Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society** 51:363-369.
- Dhupper, R. 2013. Effect of gibberellic acid on seed germination and seedling growth behavior in three desert tree species. **Journal of Biological and Chemical Research** 30(1): 227-232.
- Direkel, S. and Otag, F. 2013. Filamentous fungi isolated from clinical samples stored for a long time in the sand. **Clinical Microbiology** 2(1): 1-2.
- Duijff, B.J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C. and Lemanceau, P. 1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescent* WSC417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **European Journal of Plant Pathology** 104: 903-910.
- Duijff, B.J., Recorber, G., Bakker, P.A.H.M., Loper, J.E. and Lemanceau, P. 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. **Phytopathology** 89:1073-1079.
- Dumroese, R.K., Kim, M. and Jame, R.L. 2012. *Fusarium oxysporum* protects Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings from root disease caused by *Fusarium commune*. **The Plant Pathology Journal** 28:311-316.
- Eparvier, A. and C. Alabouvette. 1994. Use of ELISA and GUS transformed strains to study competition between pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. **Biocontrol Science Technology** 4: 35-47.

- Espinel-Ingroff, A., Montero, D. and Martin-Mazuelos, E. 2004. Long-Term preservation of fungal isolation in commercially prepared cryogenic microbank vials. **American Society for Microbiology** 42(3): 1257-1258.
- Fagge, A.A. and Manga, A.A. 2011. Effect of sowing media and gibberellic acid on the growth and seedling establishment of *Bougainvillea glabra*, *Ixora coccinea* and *Rosa chinensis* 2: root characters. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences** 4(2): 155-159.
- Fiddman, P.J. and Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology** 74: 119-126.
- Fong, Y.K., Anuar, S., Lim, H.P., Tham, F.Y. and Asnderson, F.R. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. **Mycologist** 14(3): 127-130.
- Fravel, D., Olivain, C. and Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist** 15:493-502.
- Fuchs, J.G., Moenne-Loccoz, Y. and Defago, G. 1997. Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt of tomato. **Plant Disease** 81: 492-496.
- Fuchs, J.G., Moenne-Loccoz, Y. and Defago, G. 1999. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 to protect tomato against *Fusarium* wilt. **Biological Control** 14:105-110.
- Ghini, R., Mezzalama, M., Ambrosoli, R., Barberis, E., Garibaldi, A. and Piedade, S.D. 2000. *Fusarium oxysporum* strains as biocontrol agents against *Fusarium* wilt: effects on soil microbial biomass and activity. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 35(1):93-101.
- Hallmann, J. and Sikora, R.A. 1994. Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. **Journal of Plant Disease and Protection** 101: 475-481.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Rehman, G., Kim, Y.H., Lgbal, L., Hussain, J., Sohn, E.Y. and Lee, I.J. 2010. Gibberellin production and plant growth promotion from pure culture of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Mycologia** 102(5): 989-995.
- Hasan, H.A.H. 2002. Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. **Rostlinna Vyroba Journal** 48(3): 101-106.
- Hervas, A., Landa, B., Datnoff, L.M. and Jimenez-Diaz, D.M. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. **Biological Control** 103:166-176.

- Honda, M. and Kawakub, Y. 1998. Control of *Fusarium* basal rot of rakkyo (*Allium chinense*) non-pathogenic *Fusarium moniliforme* and *Fusarium oxysporum*. **Soil Microorganisms** 51:13-18.
- Horinouchi, H., Katsuyama, N., Taguchi, Y. and Hyakumachi, M. 2008. Control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in a soil system by combination of a plant growth-promoting fungus, *Fusarium equiseti*, and biodegradable pots. **Crop Protection** 27:859-864.
- Horinouchi, H., Muslim, A. and Hyakumachi, M. 2010. Biocontrol of *Fusarium* wilt of spinach by the plant growth promoting fungus *Fusarium equiseti* GF 183. **Journal of Plant Pathology** 92(1): 249-254.
- Horinouchi, H., Watanabe, H., Taguchi, Y., Muslim, A. and Hyakumachi, M. 2011. Biological control of *Fusarium* wilt of tomato with *Fusarium equiseti* GF191 in both rock wool and soil systems. **Biocontrol** 56: 915-923.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease** 87: 4-10.
- Hu, X., Webster, G., Xie, L., Yu, C., Li, Y. and Liao, X. 2014. A new method for the preservation of axenic fungal cultures. **Journal of Microbiological Methods** 99: 81-83.
- Kakvan, N., Heydari, A., Zamanizadeh, H.R., Rezaee, S. and Naraghi, L. 2013. Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease. **Crop Protection** 53: 80-84.
- Katsube, K. and Alasaka, Y. 1997. Control of *Fusarium* wilt of spinach by transplanting seedling pretreated with non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. **Annals of the Phytopathological Society of Japan** 63: 389-394.
- Kaur, R. 2003. Characterization of Selected Isolates of Non-pathogenic *Fusarium oxysporum*, Fluorescent Pseudomonads and Their Efficacy Against Chickpea Wilt. Ph.D. Thesis, Punjab Agricultural University, Ludhiana. 170 p.
- Kaur, R., Kaur, J. and Singh, R.S. 2010. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. **Plant Pathology** 9: 79-91.
- Kaur, R., Kaur, J., Singh, R.S., and Alabouvette, C. 2007. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* by non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent pseudomonads. **International Journal of Botany** 3:114-117.

- Khurahid, S., Shoaib, A. and Javaid, A. 2014. *In vitro* toxicity evaluation of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on growth and physiology of tomato under chromium (VI) stress. **The Journal of Animal and Plant Sciences** 24(4): 1241-1245.
- Kidane, E.G. 2008. Management of Fusarium Wilt Diseases Using Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and Silicon. Ph.D. Thesis University of Kwazulu-Ntal, Pietermaritzburg. 210 p.
- Kim, H.J., Lee, E.J., Park, S.H., Lee, H. and Chung, N. 2014. Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gleosporioides*) in pepper and cherry tomato by *Streptomyces* sp. A1022. **Journal of Agricultural Science** 6:54-62.
- Kumar, A., Biswas, T.K., Singh, N. and Lal, E.P. 2014. Effect of gibberellic acid on growth, quality and yield of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science** 7(7): 28-30.
- Larkin, R. P., and Fravel, D. R. 1996. Efficacy of various biocontrol organisms in the control of *Fusarium* wilt of tomato. **Phytopathology** 86:83-86.
- Larkin, R.P. and Fravel, D.R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. **Plant Disease** 82: 1022-1028.
- Larkin, R.P. and Fravel, D.R. 1999. Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by non-pathogenic *Fusarium* spp. **Phytopathology** 89(12):1151-1161.
- Larkin, R.P., Hopkins, D.L. and Martin, F.N. 1996. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. **Phytopathology** 86:812-819.
- Lemanceau, P., Bakke, P.A.H.M., De kogel, W.J., Alabouvette, C. and Schippers, B. 1992. Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS 358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnation by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **Applied and Environmental Microbiology** 58:2978-2982.
- Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., De kogel, W.J., Alabouvette, C. and Schippers, B. 1993. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. **Applied and Environmental Microbiology** 59(1):74-82.

- Lorito, M., Hayes, C.K., Peterbauer, C. and Harmam, G.E. 1994. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compound enhances inhibition of spore germination. **Microbiology** 140: 623-629.
- Mandeel, Q. and Baker, R. 1991. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology** 81: 462-468.
- Marin, S., Sanchis, V. and Maqan, N. 1995. Water activity, temperature, and pH effect on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. **Canadian Journal of Microbiology** 41(12): 1063-1070.
- Minuto, A., Clematis, F., Gullino, M.L. and Garibaldi, A. 2007. Induced suppressiveness to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* in rockwool substrate used in closed soilless systems. **Phytoparasitica** 35:77-85.
- Minuto, A., Minuto, G., Migheli, Q., Mocioni, M. and Gullino, M.L. 1997. Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and of different commercial biofungicide formulations on *Fusarium* wilt of basil (*Ocimum basilium* L.). **Crop Protection** 16: 765-769.
- Muddapur, U.M., Gadkari, M.V., Kulkarni, S.M., Sabannavar, P.G., Niyonzima, F.N. and More, S.S. 2015. Isolation and characterization of gibberellic acid 3 producing *Fusarium* sp. from Belgaum agriculture land and its impact on green pea and rice growth promotion. **Aperito Journal of Advanced Plant Biology** 1(2): 106-112.
- Mukhtar, I., Mushtaq, S., Ali, A. and Khokhar, I. 2010. Epiphytic and endophytic phyllo sphere microflora of *Cassia filiformis* L. and its hosts. **Ecological Society** 17: 1-8.
- Musavi, S.T. and Balakrishnan, R.M. 2014. A study on the antimicrobial potentials of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* NFX 06. **Journal of Medical and Bioengineering** 3(3): 162-166.
- Mwaura, P.A.M., Kahangi, E., Losenge, T., Dubois, T. and Coyne, D. 2009. *In vitro* screening of endophytic *Fusarium oxysporum* against banana nematode (*Helicotylenchus multicinctus*). **African Journal of Horticultural Science** 2:103-110.
- Nahalkova, J., Fatehi, J., Olivain, C. and Alabouvette, C. 2008. Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differs from root colonization in soil. **Federation of European Microbiological Societies** 286: 152-157.

- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N. and Viljoen, A. 2006. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing *Fusarium* wilt of banana. **Plant Pathology** 55: 217-223.
- Nelson, P. E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. **Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification**. U.S.A. The Pennsylvania State University Press. 193 p.
- Olivain, C. and Alabouvette, C. 1997. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist** 137: 481-494.
- Olivain, C. and Alabouvette, C. 1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* discussed in comparison to a non-pathogenic strain. **New Phytologist** 141:497-510.
- Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., Haridon, F.L. and Alabouvette, C. 2005. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. **Applied and Environmental Microbiology** 72:1523-1531.
- Olivain, C., Trouvelot, S., Bint, M.N., Cordier, C., Pugin, A. and Alabouvette, C. 2003. Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cell inoculated with pathogenic and non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Applied and Environmental Microbiology** 69(9): 5453-5462.
- Paparu, P., Dubois, T., Gold, C.S., Niere, B., Adipala, E. and Coyne, D. 2006. Colonization pattern of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*, a potential biological control agent, in roots and rhizomes of tissue cultured *Musa* plantlets. **Annals of Applied Biology** 149:1-8.
- Park, C.S., Paulitz, T.C. and Baker, R. 1988. Biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions *Pseudomonas putida* and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology** 78: 190-194.
- Patel, R.G. and Mankad, A.U. 2014. Effect of gibberellins on seed germination of *Tithonia rotundifolia* Blake. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology** 3(3): 10680-10684.
- Patil, S., Sriram, S. and Savitha, M.J. 2011. Evaluation of non-pathogenic *Fusarium* for antagonistic activity against *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of Biological Control** 25(2):118-123.

- Paul, J., Singh, R.S., Kaur, J. and Alabouvette, C. 1999. Effect of inoculum density of nonpathogenic *Fusarium* in biological control of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. In: **Biological Control Based Pest Management for Quality Crop Protection in the Current Millennium**, Punjab Agricultural University, Ludhiana. 97-98.
- Pavithra, N., Sathish, L. and Ananda, K. 2012. Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolate from Tulsi. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS)** 16(12): 1-6.
- Postma, J. and Lutikholt, A.J.G. 1996. Colonization of carnation stems by a non-pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum* and its effect on *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. **Canadian Journal of Botany** 74: 1841-1851.
- Rachev, R.C.H., Rousava, R.P., Bojkova, S.V. and Gancheva, V.K. 1993. Isolate of gibberellic acid produce by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Natural Products** 56: 1168-1170.
- Rodriguez, M.A., Cabrera, G. and Godeas, A. 2006. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology** 100:575-586.
- Scott, J.C., Mcroberts, D.N. and Gordon, T.R. 2014. Colonization of lettuce cultivars and rotation crops by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*, the cause of *Fusarium* wilt of lettuce. **Plant Pathology** 63: 548-553.
- Shishido, M., Miwa, C., Usami, T., Amemiya, Y. and Johnson, K.B. 2005. Biological control efficiency of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. **Phytopathology** 95:1072-1080.
- Siddiqui, I.A. and Shaikat, S.S. 2003. Non-pathogenic *Fusarium solani* represses the biosynthesis of nematicidal compounds *in vitro* and reduces the biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas fluorescens* in tomato. **Letters in Applied Microbiology** 37: 109-114.
- Silva, J.C. and Bettioli, W. 2005. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolation for control of *Fusarium* wilt of tomato. **Fitopathologia Brasileira** 30: 409-412.
- Sonawane, A., Mahajan, M. and Renake, S. 2015. Antifungal activity of a fungal isolates against Pomegranate wilt pathogen *Fusarium*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 2: 48-57.
- Song, M., Yun, H.Y. and Kim, Y.H. 2014. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. **Journal of Ginseng Research** 38:136-145.

- Srivastana and Singh. 1980. Effect of ethephon – gibberellin combination on yield, size, and quality of fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science** 23: 366 – 370.
- Srivastava, A.C., Ahamad, S., Agarwal, D.K. and Sarbhoy, A.K. 2003. Screening of potential gibberellin producing *Fusarium* strains for the hybrid rice production. **Journal of Food, Agriculture and Environment** 1: 250-253.
- Stocco, M., Monaco, C. and Cordo, C. 2010. A comparison of preservation methods for *Trichoderma harzianum* cultures. **Revista Iberoamericana Micologia** 27(4): 213-215.
- Steinkellner, S.G. and Mammeler, R.W. 2005. Microconidia of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates. **Plant Interaction** 1(1): 23-30.
- Sunder, S. and Satyavir. 1998. Vegetative compatibility, biosynthesis of GA₃ and virulence of *Fusarium moniliforme* isolates from bakanae disease of rice. **Plant Pathology** 47(6): 767-772.
- Suralirajan, M. and Sarbhoy, A.K. 2000. Gibberellic acid production by *Fusarium moniliformae*. **Journal of Mycopathological Research** 38: 101-104.
- Tayung, K., Barik, B.P. and Jha, D.K. 2010. Antifungal activity and biocontrol potential of metabolite produced by an endophytic *Fusarium* (MTCC-9622) against some postharvest pathogens. **Journal of Agricultural Technology** 6(3): 409-419.
- Thomas, G.J., Sweetingham, M.W., Yung, H.A. and Speijers, J. 2008. Effect of temperature on growth of *Colletotrichum lupine* and on anthracnose infection and resistance in lupins. **Australasian Plant Pathology** 37(1): 35-39.
- Tsavkelova, E.A., Bomke, C., Netrusov, A.I., Weiner, J. and Tudzynski, B. 2008. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. **Fungal Genetics and Biology** 45: 1393-1403.

ภาคผนวก ก

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

1 Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. 2016. *Fusarium oxysporum* (F221-B) as biocontrol agent against plant pathogenic fungi *in vitro* and *in hydroponics*. (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์ใน **Plant Protection Science**)

2 Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. 2016. Efficacy of culture filtrate from *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi *in vitro* and *Fusarium* root rot and wilt disease in hydroponics. **Journal of Agricultural Technology** 12(3): 609-622.

Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. 2015a. Assessment of viability and efficacy of *Fusarium oxysporum* (F221-B) as BCA and PGPF during long term preservation. In **2nd International Symposium on Agricultural Technology** (2015) July 1-3, Chonburi, Thailand. 173-176.

Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. 2015b. Colonization of plant root and punctured surface tissue by non-pathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum*. In **2nd International Symposium on Agricultural Technology** (2015) July 1-3, Chonburi, Thailand. 157-160.

ชิตติ ทองคำงาม และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2557. การประเมินเทคนิค Filter paper เพื่อเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) หน้า 33-39. ใน รายงานการประชุมวิชาการเกษตรระดับนานาชาติ ครั้งที่ 12 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พิษณุโลก

*** หมายเหตุ

เปเปอร์ 1 และ 2 ใช้สำหรับเป็นหลักฐานในการขอจบการศึกษาระดับปริญญาเอก

***Fusarium oxysporum* (F221-B) as Biocontrol Agent Against Plant Pathogenic Fungi
in Vitro and in Hydroponics**

Titi Thongkamngam¹, Tanimnun Jaenaksorn^{1*}

¹ Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

*Corresponding Author: Jaenaksorn, T.

E-mail: kjtanimn@kmitl.ac.th

Abstract

Efficacy of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) was assessed as a possible biocontrol agent against fungal pathogens namely, *Curvularia lunata* (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (F221-R, F442-G), *Rhizoctonia solani* (R11, R12), *Rhizoctonia* sp. (R111, R112, R113) *in vitro*, F221-B showed moderate ability to inhibit the mycelial growth of tested fungi about 36-56 percent. Then, F221-B was further evaluated for its ability in controlling lettuce root rot and wilt caused by F442-G in hydroponics. It revealed that F221-B reduced disease incidence and severity about 60-80 percent compared to inoculated control and significantly promoted the growth of 3 varieties of lettuce. Interestingly, using only F221-B gave the significant highest fresh weight (twice over healthy control). Conclusively, this study hold important suggestion for further development of F221-B since it showed ability of biocontrol agent and plant growth promoting fungi.

Keywords: *Curvularia lunata* (C11, C12), *Fusarium semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F442-G), *Rhizoctonia* sp. (R111, R112, R113), *R. solani* (R11, R12), Dual-culture test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Introduction

Biological control offers a potential alternative control measure of plant diseases and becomes a promising tool to use in agricultural production which it reduces the release of polluting chemical pesticides to the ecosystem (KAUR *et al.* 2010). At present, quite a number of biocontrol agents (BCAs) are found to be able to manage the plant diseases effectively as well as they all ecologically sound proof (HOWELL 2003; KAUR *et al.* 2010; KAKVAN *et al.* 2013; CHEN *et al.* 2014; KIM *et al.* 2014; SONG *et al.* 2014). Ideally, the antagonist/BCA must be ecologically fit to survive and function with the particular condition of the ecosystem. Moreover, the antagonist/BCA must present at adequate level and be capable of effective interacting with the pathogen or host plant to provide acceptable disease control.

The wilt and root rot-inducing strains of *Fusarium oxysporum* cause a serious damage on many economically important agricultural crops worldwide (BENHAMOU *et al.* 1989; HERVAS *et al.* 1998; PAUL *et al.* 1999; KAUR 2003; KAUR *et al.* 2010) including lettuce grown in hydroponics in Thailand (THONGKAMNGAM *et al.* 2012). An effective control methods against *Fusarium* disease of plant in hydroponics are still limited in terms of environmentally safe method. Biological control of *Fusarium* wilt and root rot diseases have been reported in numerous crops in cultivated soil (ALABOUVETTE *et al.* 1993; FRAVEL *et al.* 2003) such as tomato (FUCHS *et al.* 1997, 1999; DUIJFF *et al.* 1998; LARKIN & FRAVEL 1998), cucumber (MANDEEL & BAKER 1991), watermelon (LARKIN *et al.* 1996), spinach (KATSUBE & ALASAKA 1997), basil (MINUTO *et al.* 1997), chickpea (HERVAS *et al.* 1998), and rakkyo (HONDA & KAWAKUB 1998) but not in crops grown in hydroponics especially the system without substrate.

Non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B recovered from roots of lettuce grown in hydroponics (THONGKAMNGAM *et al.* 2012) has shown to promote the growth and yield

of Cos, Green oak, Red oak, Butterhead lettuce, kale and mung bean in hydroponics significantly (THONGKAMNGAM *et al.* 2013). With the quite promising ability of F221-B, we therefore conducted the research to determine if 1) non-pathogenic F221-B could act *in vitro* as a potent BCA against 10 fungal plant pathogens 2) F221-B can potentially protect three varieties of hydroponically-grown lettuce against the virulent isolate of *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* (F442-G) (THONGKAMNGAM *et al.* 2012).

Material and Methods

Fungal isolates

Culture of F221-B was obtained from the previous experiment (THONGKAMNGAM *et al.* 2012, 2013).

The test fungal pathogens were isolated from rice (leaf, seed) and hydroponic-grown lettuce (Red oak, Green oak) showing disease symptoms from different places (Table 1) using tissue transplanting technique. *Curvularia lunata* (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *R. solani* (R11, R12), *Rhizoctonia* sp. (R111, R112, R113) were obtained accordingly, while the most virulent strains of *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) were obtained from the previous experiment (THONGKAMNGAM *et al.* 2012). Then, the fungi were transferred onto PDA slants and maintained as stock cultures for this experiment.

***In vitro* assessment of the antagonistic activity of non-pathogenic F221-B against mycelial growth of 10 plant pathogenic fungi by Dual-culture test.**

F 221-B was determined for its *in vitro* antagonistic activity against ten phytopathogenic fungi by dual culture method (DENNIS & WEBSTER 1971) using potato dextrose agar (PDA). A mycelia disc (5 mm) obtained from the peripheral region of the colony 7-day-old cultures of targeted fungal pathogens (C11, C12, F113, F221-R, F422-G,

R11, R12, R111, R112 and R113) was placed on PDA at the edge of each plate, 1.5 cm from the periphery. Then, disc of 5 mm diameter of mycelium cut from the growing edge of 7-day-old culture of F221-B was placed on each plate, opposite to the inoculum of the pathogen, 1.5 cm from the periphery. A completely randomized design (CRD) was used with five replicates for each isolate. In control plate, a sterile agar disc was inoculated on the side opposite to pathogen. All the inoculated plates were incubated at room temperature ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) for 9 days until the control plate was full. During incubation period, growth of pathogens was daily measured and the percent growth inhibition (GI) was calculated relative to the control as follows:

$$\text{GI} = ((D1-D2)/D1) \times 100$$

Where D1: diameter of pathogen colony in control

D2: diameter of pathogen colony in treatment

Evaluation of non-pathogenic F221-B for controlling Fusarium root rot of three varieties lettuce grown in hydroponics

F 221-B was further evaluated for its biocontrol efficacy against Fusarium root rot and wilt (caused by F422-G) of Butter head, Cos and Red oak lettuce grown in modified deep flow technique (DFT).

Hydroponic cultivation

Lettuce seeds were germinated in a seedling tray on moist sponge at room temperature. After 7 days, seedlings were moved to a new tray with nutrient solution (EC = 1 mS/cm, pH=5.8-6.2). Then, 14 day-old-seedlings were transplanted into mini DFT (plastic container: 17×42×13 cm) with nutrient solution (EC = 1.6 mS/cm, pH = 5.8-6.2) to be ready for being treated according to the treatments.

Experiment

Within each variety of lettuce, four treatments were arranged in CRD with five replications of two plants. Before transplanting the 14 day-old-lettuce seedlings into the DFT under outdoor condition, seedling roots were inoculated with F221-B by dipping into spore suspension (1×10^8 spore/ml and 5 ml per plant). Three days later, the plant roots were inoculated with spore suspension of pathogenic F422-G (1×10^6 spores/ml and 5 ml per plant), while sterile water was used for healthy control.

Disease severity was rated up to 6 levels (0: healthy root, 1: reddish brown root, 2: reddish brown root and became rotten, 3: rotten root, with slight wilting, 4: rotten root with severe wilting, 5: plant became dead). Disease incidence (DI) and disease index (DIn) were calculated as follow:

$$\% \text{ DI} = (\text{Number of plants showing infected root} / \text{Number of total plants}) \times 100$$

$$\% \text{ DIn} = \frac{\sum (\text{Number of plants showing infected root} \times \text{disease severity})}{\text{Number of total plants} \times \text{the highest disease severity}} \times 100$$

Evaluation was weekly made on DI, DS and plant growth (leaf number and size, SPAD value, stem and root fresh weight, stem and root dry weight). Survival of F221-B and pathogen was also monitored from nutrient solution and crop root at harvest by dilution plate on selective medium.

Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA). Treatment means were compared using Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

Results

***In vitro* assessment of the antagonistic activity of non-pathogenic F221-B against mycelial growth of ten plant pathogenic fungi using dual-culture test.**

It revealed that non-pathogenic F221-B significantly reduced the colony growth of all tested fungal pathogens at three days after inoculation (DAI) (Table 2). On 9 DAI, the inhibition percentage for *C. lunata* (C11 and C12) was 42.3 and 36 %, respectively; 42.5 % for *F. semitectum* (F113); 42 and 38.8 % for *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R and F422-G); 50.4 and 35.9 % for *R. solani* (R11 and R12); 36.3, 43.4 and 56.3 % for *Rhizoctonia* spp. (R111, R112 and R113). Considering the above-mentioned inhibition percentage, F221-B showed moderate ability to inhibit all fungal pathogens. Among the test fungi, R113 and R11 were the most susceptible and revealed highest percent of inhibition of mycelial growth of 50 and 56 percent, respectively. Growth inhibition of all test fungi during *in vitro* interaction with F221-B at 3, 5, 7 and 9 DAI was shown in Figure 1. Main mechanism of F221-B against the test fungi was attributed to antibiosis and competition. Antibiosis of non-volatile metabolite more pronounced at the early stage of incubation (3 DAI) and followed by competition could be involved in the antagonistic process against both strains of *C. lunata* and *Rhizoctonia* sp. R112. In the F221-B-pathogen (R111) combination, only competition was noted from 3 to 9 DAI based on microscopic observation of hyphal interaction, no mycoparasitism was detected. A clear zone of interaction was formed in the combination of F221-B with 6 pathogens, namely R11, R12, R113, F113, F221-R and F422-G. The presence of inhibition zone without physical contact between the F221-B and pathogen colony at 5-9 DAI suggested the secretion of diffusible non-volatile inhibitory substances. This was confirmed with the detection of abnormalities of hyphae and spore of the tested fungi (C11, C12, F113, F422-G and R11) from the interaction zone or nearby area (Figure 2.).

Evaluation of non-pathogenic F221-B for controlling *Fusarium* root rot of three varieties lettuce grown in hydroponics

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Root of all 3 varieties of lettuces (Butter head, Cos and Red oak) inoculated with non-pathogenic F221-B alone showed no disease symptoms throughout the trial as well as control (non-inoculated) (Figure 3.). The root inoculated with pathogenic F422-G alone was severely rotten with 100 % disease incidence (DI) and 69.3-95.7 % disease index (DIn) at 28 DAI and Cos was shown to be the most susceptible variety, whereas the treatment with F221-B significantly reduced the percentage of DIn of root rot with the degree of control efficacy (over inoculated control) of 64% for Butter head, 85.3 % for Cos and 70% for Red oak (Figure 3.). Interestingly, F221-B had a strong antagonistic activity against *Fusarium* root rot especially on Cos lettuce which was the most susceptible variety in our study (Figure 4.).

Considering plant growth parameters, results were in line with the disease control efficacy. That is, apart from having significant control efficacy, the treatment with F221-B (with being challenged with pathogen) could significantly increase the plant growth (e.g. leaf number and size, SPAD value, fresh and dry weight of stem and root) of tested lettuce over the inoculated control and similar to healthy control at 45 DAI (Table 3., Figure 4.). Most striking and interesting was the finding that treatment with only F221-B (in the absence of pathogen) gave the significant highest fresh weight per plant (115.9, 192.8 and 198.4 g for Butter head, Cos and Red oak, respectively) which were almost twice over healthy control (Figure 4.).

Apart from disease incidence and disease index, the survivals of biological control agent (BCA) and pathogen were also checked at harvest from nutrient solution and plant root in terms of colony forming unit (CFU/ml). F422-G alone increased its population compared to original amount while F221-B remained constant throughout the trial. Survivals of F422-G in treatment treated with F221-B were less than those of inoculated control (Table 4.). F221-B was detected at harvest in the ranging of 1.2×10^5 - 1.6×10^5 CFU/ml. In the BCA-pathogen co-treated treatment, the amount of F422-G was higher than original amount but still less

than that in F422-G alone treatment. In addition, survival of F221-B and F422-G was detected in root and nutrient solution (Table 4.).

Discussion

In this study, the non-pathogenic F221-B, recovered from roots of hydroponically grown lettuce, was assessed for its possible antagonistic activity against plant pathogenic fungi *in vitro* and in hydroponics. The F221-B could considerably inhibit the *in vitro* growth of 10 tested fungi and exerted a direct inhibitory effect e.g. antibiosis and competition. Unlike F221-B in our study, most of the non-pathogenic *F. oxysporum* which have been so far reported as promising BCA against fungal pathogens were isolated only from rhizosphere soils and roots of plants grown in suppressive soil (BENHAMOU *et al.* 2002; FRAVEL *et al.* 2003; ABEYSINGHE 2006; RODRIGUEZ *et al.* 2006; PATIL *et al.* 2011) but not from hydroponics. However, these results of the antagonistic activity and mechanisms of F221-B were still in line with those findings. Three non-pathogenic *F. oxysporum* isolates from suppressive soil in Sri Lanka was *in vitro* proven to have antagonistic potential against pathogenic isolate of *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (ABEYSINGHE 2006), while seven isolates from rhizosphere soils of tomato from Karnataka, India were reported to have the *in vitro* antagonistic potential against tomato wilt pathogen (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*) about 24-40% inhibition with competition mechanism (PATIL *et al.* 2011). *F. oxysporum* against plant pathogens dual culture assay provided the convincing evidence e.g. the nonpathogenic Fo47 exerted a direct inhibitory effect on *Pythium ultimum* through a combination of antibiosis and mycoparasitism (BENHAMOU *et al.* 2002) and the nonpathogenic S6 had a marked antagonistic capacity against the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* with the responsible metabolite cyclosporine A (RODRIGUEZ *et al.* 2006).

From our study, the differences in average responses to antagonism by F221-B between the different genera of pathogens implying that genes of pathogen might be involved in

regulating the different levels of antagonism. This was in confirmation with the other studies revealing that non-pathogenic isolates from suppressive soil, including Fo47 (LEMANCEAU *et al.* 1992, 1993) could differ in their efficacy as well as their mechanisms (NEL *et al.* 2006).

The other interesting result of this study was that F221-B and pathogenic *F. oxysporum* (F221-R, F422-G) reduced each other growth when grown together (Figure 1). This fungal antagonism appeared to be mainly associated with antibiosis. The result was in agreement with the finding of LEMANCEAU *et al.* (1993) from which was demonstrating the same pattern occurred in the co-inoculation experiment between pathogenic *F. oxysporum* (WCS816) and non-pathogenic Fo47.

In the current work, non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) was investigated as BCA against lettuce root rot and wilt caused by *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* F422-G in Deep flow technique. F221-B was found to reduce effectively Fusarium root rot and wilt of 3 varieties of lettuce in the range 64-85.3 % as well as to promote their growth and yield. So far, many reports have provided such an evidence of successfully using many strains of non-pathogenic *F. oxysporum* recovered from either the diseases rhizosphere soil or suppressive soil for controlling of soil-grown crops (ALABOUVETTE *et al.* 1993; FUCHS *et al.* 1997; DUIJFF *et al.* 1998; FRAVEL *et al.*, 2003) but not in hydroponics. Fo47 is the best known and most effective non-pathogenic strains of *F. oxysporum* which was isolated from a soil naturally suppressive to Fusarium wilt of tomato and melon in France (ALABOUVETTE 1990; ALABOUVETTE & COUTEAUDIER 1992; ALABOUVETTE *et al.* 1993, 1996, 1998; LARKIN & FRAVEL 1999) and has been extensively studied for the control of Fusarium wilt disease of several vegetables and flower crops such as tomato (FUCHS *et al.* 1997, 1999; DUIJFF *et al.* 1998), carnation (LEMANCEAU *et al.* 1992, 1993), flax (DUIJFF *et al.* 1999).

The result gives an important step for F221-B as biocontrol agent to be used in hydroponics. Few reports have been revealed the success of using non-pathogenic *F. oxysporum* for controlling plant grown in hydroponics only with the rockwool substrate (GHINI *et al.* 2000; MINUTO *et al.* 2007; HORINOUCI *et al.* 2008, 2010; NAHALKOVA *et al.* 2008) which is different from this system. Interestingly, F221-B could survive pretty well in such a system (in nutrient solution and plant root). This was in line with 2 findings from which one was demonstrating the ability of non-pathogenic *F. oxysporum* (V2w2 and III4w1) to penetrate intact host tissue and recolonize the host internally upon inoculation in nutrient solution (PAPARU *et al.* 2006) and the other was revealing about the capability of non-pathogenic *F. oxysporum* in colonizing the lower parts of plantlets such as root (Olivain & Alabouvette 1999).

The mechanism of action associated with non-pathogenic *F. oxysporum* can be divided into two broad categories: direct antagonism of the non-pathogenic strains to the pathogen and indirect antagonism mediated through the host plant such as induce resistance (FUCHS *et al.* 1997). The same non-pathogenic strain can express several modes of action either simultaneously or at different times. This is the case for F221-B for which antibiosis and competition were involved and could be observed in the *in vitro* experiment. However, its mechanism in hydroponics still could not be concluded.

Regarding this study, F221-B also showed its remarkable ability as plant growth-promoting fungus (PGPF) in addition to its potential in disease control. This was in confirmation with the previous work (THONGKAMNGAM *et al.* 2013) reporting its ability in significantly promoting growth and yield of Cos lettuce, Green oak lettuce, Red oak lettuce, Butterhead lettuce, kale and mung bean in hydroponics. Other strains of non-pathogenic *Fusarium* were reported as PGPF such as the isolate from rhizosphere soils of

tomato in India (PATIL *et al.* 2011), *F. equiseti* GF191 in Japan (HORINOUCI *et al.* 2008, 2010).

Conclusion and Suggestion

This study demonstrates that (i) non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) (THONGKAMNGAM *et al.* 2012, 2013) has the *in vitro* antagonistic ability against 10 plant pathogenic fungi and exerts a direct inhibitory effect namely antibiosis and competition (ii) F221-B can effectively reduce Fusarium root rot and wilt of lettuce especially on Cos which is the most susceptible variety with control efficacy of 85.3 % and (iii) the newly described F221-B remarkably promotes growth and yield of three varieties of lettuce grown in hydroponics twice over healthy control especially when it is treated in the absence of pathogen.

Taken together, the competent non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) has a great potential as a promising biocontrol agent and offers a good prospect for integrated management of root rot and wilt disease of lettuce in hydroponics and probably for other crops as well. However, additional research for F221-B is still needed in several areas including: its colonization pattern on plant root, its formulation and applications; repetition of *in vivo* studies with other crops and integration into production system; risk assessment such as its behavior and potential impact on hydroponic ecosystem; and probably its genetic improvement.

Acknowledgement

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The authors would like to thank the Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for providing all the facilities both in laboratory and in hydroponic greenhouse.

References

- Abeysinghe S. (2006): Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, the causal agent of root and stem rot of *Cucumis sativus* by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Ruhuna Journal of Science*, 1:24-31.
- Alabouvette C. (1990): Biological control of Fusarium wilts pathogen in suppressive soil. In: Hornby D. (eds): *Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*. Wallingford, CABI Publishing: 27-43.
- Alabouvette C., Couteaudier Y. (1992): Biological control of Fusarium wilts with nonpathogenic *Fusaria*. In: Tjamos E.C., Pavizas G.C., Cook R.J. (eds): *Biological Control of Plant Diseases*. Plenum Press. New York, Springer-US: 415-426.
- Alabouvette C., Lemanceau P., Steinberg C. (1993): Recent advance in biological control of Fusarium wilt. *Pesticide Science*, 37:365-373.
- Alabouvette C., Lemanceau P., Steinberg C. (1996): Use of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and fluorescent pseudomonads to control Fusarium wilts. In: Tang W., Cook R.J., Rovira A.D. (eds): *Advances in Biological Control of Plant Diseases*. China Agricultural University Press. Beijing: 155-164.
- Alabouvette C., Steinberg C., Lemanceau P., Bakker P.A.H.M. (1998): Biological control of Fusarium wilt towards the development of commercial products. In: Boland G.J., Kuykendall L.D. (eds): *Plant Microbe Interaction and Biological Control*. New York, Marcel Dekker, USA: 15-36.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Benhamou N., Charest P.M., Jarvis W.R. (1989): Biology and host-parasite relationships of *Fusarium oxysporum*. In: Tjamos E.C., Beckman C.H. (eds): Vascular wilt disease of plant. Basic Studies and Control: NATO ASI Series; Berlin Heidelberg, Springer-Verlag : 95-105.
- Benhamou N., Garand C., Goulet A. (2002): Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. Applied and Environmental Microbiology, **68**: 4044-4060.
- Chen D., Liu X., Li C., Tian, W., Shen Q., Shen B. (2014): Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt. Journal of Environmental Management, **137**: 120-127.
- Dennis C., Webster J. (1971): Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*-III. Hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society, **51**: 363-369.
- Duijff B.J., Pouhair D., Olivain C., Alabouvette C., Lemanceau P. (1998): Implication of systemic induced resistance in the suppression of Fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescent* WSC417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. European Journal of Plant Pathology, **104**: 903-910.
- Duijff B.J., Recorber G., Bakker P.A.H.M., Loper J.E., Lemanceau P. (1999): Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. Phytopathology, **89**: 1073-1079.
- Fravel D., Olivain C., Alabouvette C. (2003): *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist, **15**: 493-502.
- Fuchs J.G., Moenne-Loccoz Y., Defago G. (1997): Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to Fusarium wilt of tomato. Plant Disease, **81**: 492-496.
- Fuchs J.G., Moenne-Loccoz Y., Defago G. (1999): Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 to protect tomato against Fusarium wilt. Biological Control, **14**: 105-110.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ghini R., Mezzalama M., Ambrosoli R., Barberis E., Garibaldi A., Piedade S.M.S. (2000): *Fusarium oxysporum* strains as biocontrol agents against Fusarium wilt: effects on soil microbial biomass and activity. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, **35**: 93-101.
- Hervas A., Landa B., Datnoff L.E., Jimenez-Diaz, R.M. (1998): Effects of commercial and indigenous microorganisms on Fusarium wilt development in chickpea. *Biological Control*, **13**: 166-176.
- Honda M., Kawakub Y. (1998): Control of Fusarium basal rot of rakkyo (*Allium chinense*) nonpathogenic *Fusarium moniliforme* and *Fusarium oxysporum*. *Soil Microorganisms*, **51**: 13-18.
- Horinouchi H., Katsuyama N., Taguchi Y., Hyakumachi M. (2008): Control of Fusarium crown and root rot of tomato in a soil system by combination of a plant growth-promoting fungus, *Fusarium equiseti*, and biodegradable pots. *Crop Protection*, **27**: 859-864.
- Horinouchi H., Muslim A., Hyakumachi M. (2010): Biocontrol of Fusarium wilt of spinach by the plant growth promoting fungus *Fusarium equiseti* GF183. *Journal of Plant Pathology*, **92**: 251-256.
- Howell C.R. (2003): Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant disease: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, **87**: 4-10.
- Kakvan N., Heydari A., Zamanizadeh H.A., Rezaee S., Naraghi L. (2013): Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease. *Crop Protection*, **53**: 80-84.
- Katsube K., Alasaka Y. (1997): Control of Fusarium wilt of spinach by transplanting seedling pretreated with non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, **63**: 389-394.

- Kaur R. (2003): Characterization of selected isolates of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*, fluorescent Pseudomonads and their efficacy against chickpea wilt. [PhD Thesis.] Punjab Agricultural University, Ludhiana.
- Kaur R., Kaur J., Singh R.S. (2010): Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. *Plant Pathology*, **9**: 79-91.
- Kim H.J., Lee E.J., Park S.H., Lee H., Chung N. (2014): Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gleosporioides*) in pepper and cherry tomato by *Streptomyces* sp. A1022. *Journal of Agricultural Science*, **6**: 54-62.
- Larkin R.P., Hopkins D.L., Martin F.N. (1996): Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. *Phytopathology*, **86**: 812-819.
- Larkin R.P., Fravel D.R. (1998): Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Disease*, **82**:1022-1028.
- Larkin R.P., Fravel D.R. (1999): Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by non-pathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*, **89**: 1152-1161.
- Lemanceau P., Bakker P.A.H.M., De kogel W.J., Alabouvette C., Schippers B. (1992): Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS 358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnation by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 2978-2982.
- Lemanceau P., Bakker P.A.H.M., De kogel W.J., Alabouvette C., Schippers B. (1993): Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**: 74-82.

- Mandeel Q., Baker R. (1991): Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **81**: 462-468.
- Minuto A., Minuto G., Migheli Q., Mocioni M., Gullino M.L. (1997): Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and of different commercial biofungicide formulations on *Fusarium* wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Crop Protection*, **16**: 765-769.
- Minuto A., Clematis F., Gullino M.L., Garibaldi A. (2007): Induced suppressiveness to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* in rockwool substrate used in closed soilless systems. *Phytoparasitica*, **35**: 77-85.
- Nahalkova J., Fatehi J., Olivain C., Alabouvette C. (2008): Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differs from root colonization in soil. *Federation of European Microbiological Societies*, **286**: 152-157.
- Nel B., Steinberg C., Labuschagne N., Viljoen A. (2006): The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing *Fusarium* wilt of banana. *Plant Pathology*, **55**: 217-223.
- Olivain C., Alabouvette C. (1999): Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* discussed in comparison to a non-pathogenic strain. *New Phytologist*, **141**: 497-510.
- Paparu P., Dubois T., Gold C.S., Niere B., Adipala E., Coyne D. (2006): Colonisation pattern of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*, a potential biological control agent, in roots and rhizomes of tissue cultured *Musa* plantlets. *Annals of Applied Biology*, **149**: 1-8.
- Patil S., Sriram S., Savitha M.J. (2011): Evaluation of non-pathogenic *Fusarium* for antagonistic activity against *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Biological Control*, **25**: 118-123.

- Paul J., Singh R.S., Kaur J., Alabouvette C. (1999): Effect of inoculum density of nonpathogenic *Fusarium* in biological control of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. In: Biological Control Based Pest Management for Quality Crop Protection in the Current Millennium, Punjab Agricultural University, Ludhiana: 97-98.
- Rodriguez M.A., Cabrera G., Godeas A. (2006): Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Applied Microbiology*, **100**: 575-586.
- Song M., Yun H.Y., Kim Y.H. (2014): Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. *Journal of Ginseng Research*, **38**: 136-145.
- Thongkamngam T., Koohakan P., Jaenaksorn T. (2012): First report of *Fusarium* wilt of NFT-grown lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* in Thailand and its pathogenicity on four varieties of lettuce. In: 10th Naresuan Conference, Phitsanulok. July 24-25, Thailand. 72-81. (In Thai)
- Thongkamngam T, Koohakan P, Jaenaksorn T (2013) *Fusarium oxysporum* F221-B as plant growth-promoting fungus (PGPF) on six plants in hydroponics and its growth characteristics on different media. In: 6th Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Conference, Chonburi, Thailand. p. 46-51. (In Thai)

Efficacy of culture filtrate from *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi *in vitro* and Fusarium root rot and wilt disease in hydroponics

Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T*

Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. (2016). Efficacy of culture filtrate from *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi *in vitro* and Fusarium root rot and wilt disease in hydroponics. *Journal of Agricultural Technology* 12(3):609-622.

The purpose of this research was to evaluate the potential of culture filtrate (CF) of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) against 10 plant pathogenic fungi namely, *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* spp. (R111, R112, R113) and *R. solani* (R11, R12) *in vitro* and *Fusarium* root rot disease in hydroponics. *In vitro* antifungal activity analysis indicated that all test concentrations of F221-B culture filtrate could slightly inhibit mycelial growth of all tested fungal pathogens less than 39 % over control. Interestingly, the CF at all test concentrations revealed the greatest spore germination inhibition 100% over control against F113, F221-R and F422-G whereas spore germinations of C11 and C12 were completely inhibited by the CF at the concentrations of 60, 80 and 100%. In addition, spore abnormalities such as swelling and lysis were noted. Regarding antifungal analysis in hydroponics, the most striking and remarkable result was obtained. The non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B was proved to be efficient in reducing disease severity of *Fusarium* root rot in lettuce more than 90% and producing significantly better growth than that in non-treated lettuces. Moreover, no significant degree of difference in terms of lettuce growth was noted between using culture filtrate and spore suspension of F221-B.

Keywords: culture filtrate, non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B, *F. oxysporum* f.sp. *lactucae*

Introduction

Biological control of plant diseases including fungal pathogens has been considered as environmentally safe and viable alternative measure to chemical control (Baker, 1987; Cook, 1993; Tjamos *et al.*, 1992). Non-pathogenic species of the fungal genus *Fusarium* were numerous reported to successfully control *Fusarium* wilt of various crops worldwide (Elmer, 2004; Larkin and Fravel, 1998 and 2002; Nel *et al.*, 2006; Silva and Bettiol, 2005). In Thailand, non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B), originally isolated from root of lettuce grown in hydroponics, has shown its ability as plant growth promoting fungus (PGPF) on various crops such as

*Corresponding Author: Jaenaksorn, T; E-mail: tanimnun@gmail.com

Butterhead, Cos, Green oak, Red oak lettuces, kale and mung bean (Thongkamngam *et al.*, 2013; Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015a) and as biocontrol agent (BCA) against plant pathogenic fungi, namely *Curvularia* spp., *Colletotrichum* spp. and *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015a). Non-pathogenic F221-B showed remarkable consistency in retaining its morphology characteristics and its efficacy as BCA and PGPF during 24 months storage (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015a). In addition, F221-B was proved to be able to colonize on root surface (epiphyte) as well as inside the root of lettuce (endophyte) without producing any disease symptoms (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015b).

Fusarium root rot and wilt disease was regarded as one of the most seriously disease of lettuce grown in soil and hydroponic cultivation (Cabral *et al.*, 2014; Chinta *et al.*, 2014; Malbran and Mourellos, 2014; Scott *et al.*, 2014; Thongkamngam *et al.*, 2012). The disease was caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. Effective control methods against this disease are limited whereas chemical control has adverse effect to the consumer and environment. On this regard, non-pathogenic F221-B would be one of the strong candidates as biological control agent to solve this problem. Based on the above-mentioned good characteristics of F221-B as PGPR and BCA from which the feature of antibiosis was also observed in confrontation experiment between F221-B and test fungal pathogens at the early stage of incubation period (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2015a), it is interesting to further research on the antifungal ability of secondary metabolites in culture filtrate of non-pathogenic F221-B.

Therefore, the research was conducted to determine the potential of culture filtrate (CF) of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) against 10 plant pathogenic fungi namely, *Curvularia* sp. (C11, C12), *F. semitectum* (F113), *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G), *Rhizoctonia* sp. (R11, R12, R13) and *R. solani* (R11, R12) *in vitro* and Fusarium root rot disease in hydroponics.

Materials and methods

Fungal isolation

The test fungal pathogens were isolated from naturally infected disease plants i.e. *Curvularia* spp. (C11, C12) and *F. semitectum* (F113) from rice seeds showing dirty panicle disease, *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) from root of lettuce grown in hydroponics showing root rot disease, *Rhizoctonia* spp. (R111, R112, R113) from rice leaf sheath showing blight disease and *R. solani* (R11, R12) from rice seedling, by tissue transplanting technique on water agar. The fungi were purified and maintained on potato dextrose agar (PDA) and stored at 4°C.

Non-pathogenic *Fusarium* F221-B was obtained from the previous research of Thongkamngam *et al.* (2013).

Preparation of culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F221-B)

Regard to our research aiming at assessment for antifungal activity of secondary metabolites in culture filtrate of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B), only the complete cell-free culture filtrate has to be used in the experiment. Therefore, two types of preparation for obtaining the cell-free culture filtrate were carried out for this regard: i) using micro-filter (Minisart®; Sartorius stedim biotech, 0.2 µm) and ii) using moist-heat from autoclave.

To obtain filtrates of the fungal culture, 5 mycelial agar plugs (0.5 cm in diameter) of F221-B were inoculated into 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of potato dextrose broth (PDB) and the culture was incubated at room temperature. After 7 days, the biomass was separated from the broth, which contained the fungal metabolites, by filtering through Whatman filter paper no.1 before being centrifuged at 10,000 rpm for 15 minutes. Then, the filtrates were undergone through the process of getting the complete cell-free CF by 2 types of preparation procedure mentioned-above. After that, the obtained cell-free CF was diluted with sterile distilled water to give concentrations of 20, 40, 60 and 80 % ready to be used.

Effect of cell-free culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) against plant pathogenic fungi by agar well diffusion assay

To determine the antifungal activity of F221-B culture filtrate at different concentrations (0, 20, 40, 60, 80 and 100%) on mycelial growth of 10 plant pathogenic fungi, the experiment was conducted in duplicate; i) employing cell-free CF prepared by using micro-filter and ii) employing cell-free CF prepared by using moist heat of autoclave. Randomized Completely Block Design (RCBD) with 3 replications was employed.

Ten plant pathogenic fungi (C11, C12, F113, F221-R, F422-G, R11, R12, R111, R112, and R113) were cultured on PDA plate and incubated for 3 days. Then, 6 holes of 5 mm in diameter were punched with sterile cork borer aseptically into the agar outside the periphery of pathogen colony. 30 µl of each concentration of F221-B culture filtrate was introduced into each bored agar well. All plates were incubated at room temperature. The radial growths of tested pathogens were daily measured and the percentage of growth inhibition of tested pathogens was calculated.

Effect of cell-free culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) on spore germination of plant pathogenic fungi

To investigate the inhibitory effect of F221-B culture filtrates at different concentrations (0, 20, 40, 60, 80 and 100%) on spore germination of 5 fungal plant pathogens, namely C11, C12, F113, F221-R and F422-G,

the experiment was performed in duplicate; i) employing cell-free CF prepared by using micro-filter and ii) employing cell-free CF prepared by using moist heat of autoclave. Completely randomized design with 2 replications was employed. 30 μ l of the fungal spores (1×10^6 spore/ml) were placed onto concave glass slides in the presence of 30 μ l of culture filtrates (concentration of 0, 20, 40, 60, 80 and 100 percent) and incubated in the moist chamber in the dark at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). After 12, 24 and 48 h, the percentage of spore germination of fungal spores was determined by light microscopy. In addition, the occurrence of spore abnormalities was monitored.

Effect of culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) for controlling root rot of lettuce in hydroponics

Antifungal activity of F221-B culture filtrate was further determined for controlling *Fusarium* root rot disease of lettuce grown in hydroponics. The concentration of F221-B culture filtrate to be used in hydroponic experiment was selected from the agar well diffusion assay and spore germination test from which showing high potential of antifungal activity. The experiment was conducted using completely randomized design of 6 treatments with 3 replications and 3 plants per replication. Treatments comprised of:

Treatment 1: Healthy Control (Non-inoculated control)

Treatment 2: Inoculated control (with pathogen F422-G)

Treatment 3: Culture filtrate of F221-B

Treatment 4: Culture filtrate of F221-B + F422-G

Treatment 5: Spore suspension of F221-B

Treatment 6: Spore suspension of F221-B + F422-G

Seeds of Cos lettuce were sown in moistened sponge in seed tray and watered with tap water for a week and then moved into mini DFT system and fertilized with nutrient solution (EC=1 ms/cm², pH=5.8-6.2). After 2 weeks, 3 seedlings were transplanted into a rectangular plastic container (25×34×15 cm) containing 5 liters of nutrient solution (EC=1.6 ms/cm², pH=5.8-6.2).

At 14 days, lettuces were treated with non-pathogenic F221-B by immersing their root into either culture filtrate or spore suspension of F221-B (5 ml/plant) for 5 minutes and the rest of F221-B was poured back into the growing container. Sterile water was used for control. Three days later, pathogen inoculation was made by pouring 15 ml of spore suspension (10^6 spores/ml) of F422-G into a growing container. Sterile water was used for control.

Data collection and analysis

Disease index was rated up to 6 levels (0: healthy root, 1: reddish brown root, 2: reddish brown root and became rotten, 3: rotten root, with slight wilting, 4: rotten root with severe wilting, 5: plant became dead).

Disease incidence (DI) and disease severity (DS) of tested plant were calculated by equation 1 and 2, respectively.

$$\% \text{ DI} = \frac{\text{Number of plants showing infected root}}{\text{Number of total plants}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ DS} = \frac{\sum (\text{Number of plants showing infected root} \times \text{disease index})}{\text{Number of total plants} \times \text{the highest disease index}} \times 100 \quad (2)$$

DI, DS, as well as plant growth parameters such as leaf number, leaf size, chlorophyll content (SPAD value) on the leaf were weekly monitored after inoculation whereas fresh and dry weight of shoot and root were recorded at the end of trial.

All collected data were statistically analysed by analysis of variance. Treatment means were separated using Duncan's multiple range tests.

Results and Discussion

Effect of cell-free culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) against 10 plant pathogenic fungi by agar well diffusion assay

Culture filtrate of F221-B was checked for its effect against mycelial growth of 10 fungal plant pathogens by using agar well diffusion assay. Among 2 types of CF of F221-B, the results revealed that cell-free culture filtrate prepared by using either micro-filter or moist-heat from autoclave still showed the similar level of antifungal activity against all tested fungi except for R11 and R112 (Fig. 1). This indicated the thermo-stable nature of these antifungal metabolites in culture filtrate produced by F221-B. Surprisingly, autoclaved CF gave higher inhibition against R11 and R112 than those from non-autoclaved CF.

Results shown in Fig. 1 revealed that the cell-free culture filtrate of F221-B contained secondary metabolites such as some bioactive compounds that inhibited the *in vitro* fungal pathogen growth whereas this inhibitory effect varied depending on the concentrations of CF tested. F221-B culture filtrate at all tested concentrations exhibited slight inhibitory effect against mycelial growth of all tested fungal pathogens in the range of 6-39 percent over the untreated control. Overall, among the tested concentrations, culture filtrates at 80 and 100 % gave the significant highest inhibition. *Curvularia* spp. (C11 and C12) were shown to be most sensitive to F221-B culture filtrate.

The inhibitory effect of F221-B culture filtrate was in accordance with those of Benhamou *et al.* (2002); Halmann and Sikora, (1994); and Khurshid *et al.* (2014) who reported that various non-pathogenic *Fusarium* isolates have shown their ability to suppress plant pathogens. Tayung *et al.*

(2010) reported that the metabolite produced by endophytic *Fusarium* (MTCC-9622) showed significant antifungal activity against 3 postharvest pathogens including *F. oxysporum*.

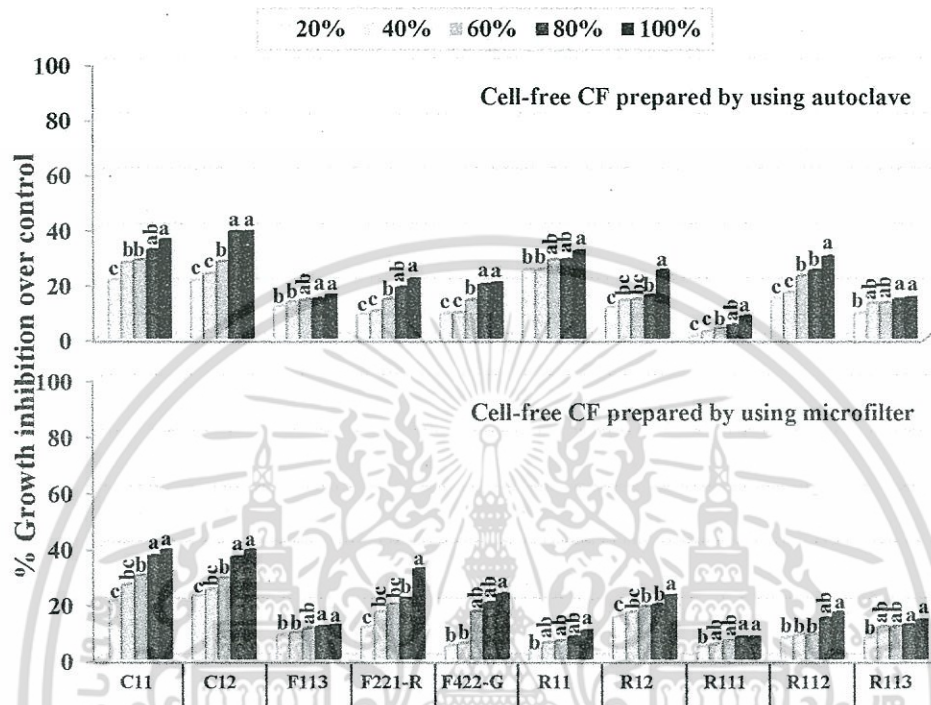


Fig. 1 Effect of cell-free culture filtrate produced by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B against mycelial growth of 10 plant pathogens by agar well diffusion assay. (C11, C12: *Curvularia* spp.; F113: *F. semitectum*; F221-R and F422-G: *F. oxysporum* f.sp. *lactucae*; R11 and R12: *R. solani*, R111, R112 and R113: *Rhizoctonia* spp.)

Effect of cell-free culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F221-B) on spore germination of 5 plant pathogenic fungi

Culture filtrate of F221-B was tested for its antifungal activity on spore germination of 5 fungal plant pathogens. The result was in line with the afore-mentioned experiment using agar well diffusion method that CF of F221-B prepared using either micro-filter or moist-heat from autoclave resulted in the same level of antifungal activity against the germination of test fungi (Fig. 2). This reconfirmed once again that the toxic metabolites in culture filtrate produced by F221-B are having thermo-stable nature.

A significant inhibitory effect (100 % inhibition over control) of all test concentrations (20, 40, 60, 80 and 100%) of cell-free culture filtrate of

F221-B on germination of spores of *F. semitectum* (F113) and *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F221-R, F422-G) was evident throughout the experiment (12-48 h) (Fig. 2). However, for the case of *Curvularia* spp. (C11 and C12), significant antifungal activity (100 % inhibition over control) of the CF of F221-B was observed only at the concentration of 60, 80 and 100 %. In addition, the level of inhibition of germination of their spores added to F221-B cell-free CF at the low concentration of 20 and 40 % declined with increasing time (Fig. 2). This decline could be held responsible for the decreasing levels of volatile sporostatic factors produced by F221-B. As soon as the appearance of volatile compound was ended, a persistent level of inhibition of spore germination caused by a stable inhibitor from non-volatile compound was shown. Furthermore, abnormalities of spores were detected such as swelling, lysis (Fig. 3).

In the current study, we observed the significantly higher degree of inhibitory activity of F221-B culture filtrates against spore germination of all tested fungi than those of their mycelial growth. This may be attributed to the direct exposure of spore to the culture filtrate.

Findings from *in vitro* experiments concerning the inhibitory effects of culture filtrates of F221-B are in agreement with several previous works by Aydi-Ben Abdallah *et al.* (2014); Lemanceau *et al.* (1993); Sonawane *et al.* (2015). In addition, the filtrate of non-pathogenic *F. oxysporum* was reported to counteract the growth of *Staphylococcus aureus* causing dermatological disease (Ahmed Sheikh, 2010).

On the basis of our findings from *in vitro* studies, it is assumed that the culture filtrate of F221-B tested may also contain antibiotics, toxins and/or enzymes against the test fungal plant pathogens. Although the antifungal metabolites in culture filtrate produced by F221-B have not been so far identified chemically, it is still noteworthy that thermo-stability of such metabolites has been observed from our *in vitro* experiments. Additional studies are required to identify the active antifungal compound in F221-B culture filtrate.

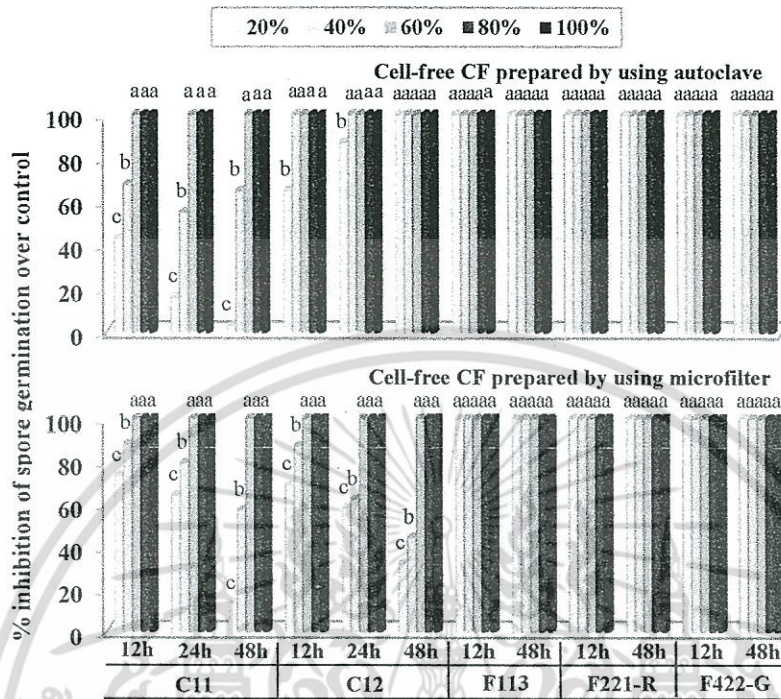


Fig. 2 Effect cell-free culture filtrate produced by non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B at different concentrations (20, 40, 60, 80 and 100 percent) against spore germination of 5 plant pathogenic fungi (3 days after inoculation).

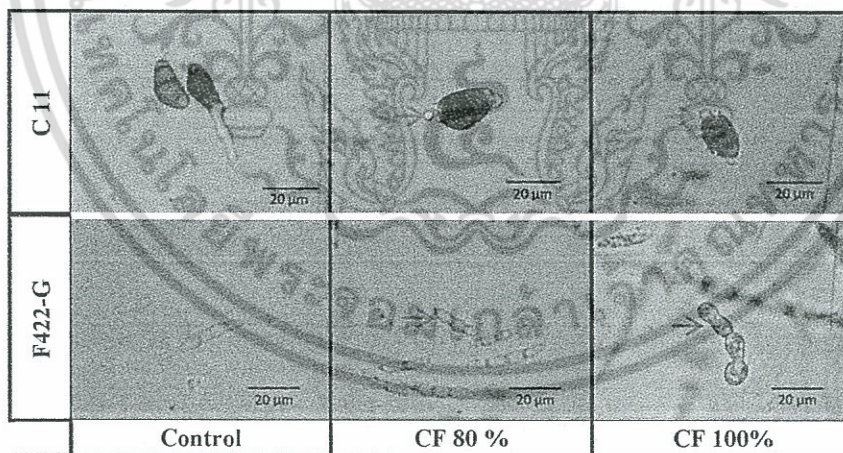


Fig. 3 Abnormal spores of *Curvularia* sp. (C11) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) occurred in culture filtrate of non-pathogenic F221-B at the concentration of 80 and 100 percent, at 48 h.

Effect of culture filtrate (CF) of *F. oxysporum* (F 221-B) for controlling *Fusarium* root rot disease of lettuce in hydroponics

The experiment was conducted to investigate the effect of culture filtrate of non-pathogenic F221-B in controlling *Fusarium* root rot disease of lettuce in hydroponics. The result showed that lettuce from non-inoculated (healthy) control grew and developed normally while lettuce treated only with F221-B (culture filtrate or spore suspension) did not show any disease symptoms throughout the trial (Table 1) and grew significantly better than that of non-inoculated control (Fig. 4).

At 7 days after inoculation (DAI), the inoculated lettuce with F422-G began to show symptoms of root rot with 64 % disease incidence (DI) and 56.1 % disease severity (DS) whereas the lettuce treated with culture filtrate and spore suspension of non-pathogenic *F. oxysporum* (F 221-B) prior to pathogen inoculation showed significant low percentage in DI and DS about 32, 16 and 6.6, 3.3 percent, respectively. Regarding inoculated control, percentage of DI and DS increased with increasing incubation time; lettuces showed severe symptoms of root rot and wilt with 100% DI at 14 DAI and DS reached highest of 93.6% at 28 DAI. At 28 DAI, pre-treatment with either culture filtrate or spore suspension of F221-B exhibited a significant inhibition over control of more than 90 % in DS (Table 1).

In terms of plant growth, the most pronounced and statistically significant reduction in all the growth parameters such as leaf number, leaf size and SPAD value was recorded only in lettuces in inoculated control throughout the trial (Fig. 4) while the treatments with F221-B (either CF or spore) prior to pathogen (F422-G) inoculation resulted in the same normal growth as that in non-inoculated control (healthy control) and in F221-B treated lettuce. For overall, non-pathogenic F221-B-treated lettuces showed a more vigorous root system without apparent of root rot symptom and finally resulted in significantly much better growth (fresh weight of stem and root) than that in non-treated lettuces. In addition, spore of F221-B tended to be more efficient than the culture filtrate since the fresh weight and dry weight of stem and root of lettuce treated with spore of F221-B was shown to be significantly greater than that in non-inoculated control (Fig. 4).

Based on our results, non-pathogenic *F. oxysporum* (F 221-B) was proved to be efficient in reducing disease severity of *Fusarium* root rot in lettuce and producing greater growth with no significant degree of difference between using culture filtrate or spore suspension of F221-B. These results are agreed with earlier reports of their success in using non-pathogenic *F. oxysporum* to control *Fusarium* wilt of various vegetables (Reddy, 2013) such as asparagus (Elmer, 2004), basil (Minuto *et al.*, 1997 and Larkin and Fravel, 2002), cucumber (Mandeel and Baker, 1991; Paulitz *et al.*, 1987), pea (Benhamou and Garand, 2001), radish (Toyota *et al.*, 1995), spinach (Katsube and Alaska, 1997), sweet potato (Ogawa and Komada, 1984) and tomato (Larkin and Fravel, 1996 and Silva and Bettiol,

2005). In addition, our result is similar to that of Horinouchi *et al.* (2010), who reported that Fusarium wilt of spinach was effectively controlled by PGPF *F. equiseti* GF183.

These results provide evidence of the antagonistic activity of F221-B in controlling root rot disease caused by *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (F422-G) and promoting the overall growth in lettuce.

Table 1 Effect of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) in controlling root rot of lettuce grown in hydroponics.

Treatment	% Disease incidence (DI)				% Disease severity (DS)				% Inhibition in DS over control
	7 DAI ^{1/}	14 DAI	21 DAI	28 DAI	7 DAI	14 DAI	21 DAI	28 DAI	
Healthy control	0 ^{2/}	0	0	0	0	0	0	0	-
Inoculated control (F422-G)	64a	100a	100a	100a	56.1a	68.3a	74.6a	93.6a	0
F221-B (CF)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
F221-B (CF)+ F422-G	32b	32b	32b	32b	6.6b	6.6b	6.6b	6.6b	93.4
F221-B (Spore)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
F221-B (Spore)+F422-G	16b	16b	16b	16b	3.3b	3.3b	3.3b	3.3b	96.7

^{1/}DAI: Day after inoculation, Inoculation was made at the age of plant of 17 days.

^{2/}Means in a column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at P=0.05.

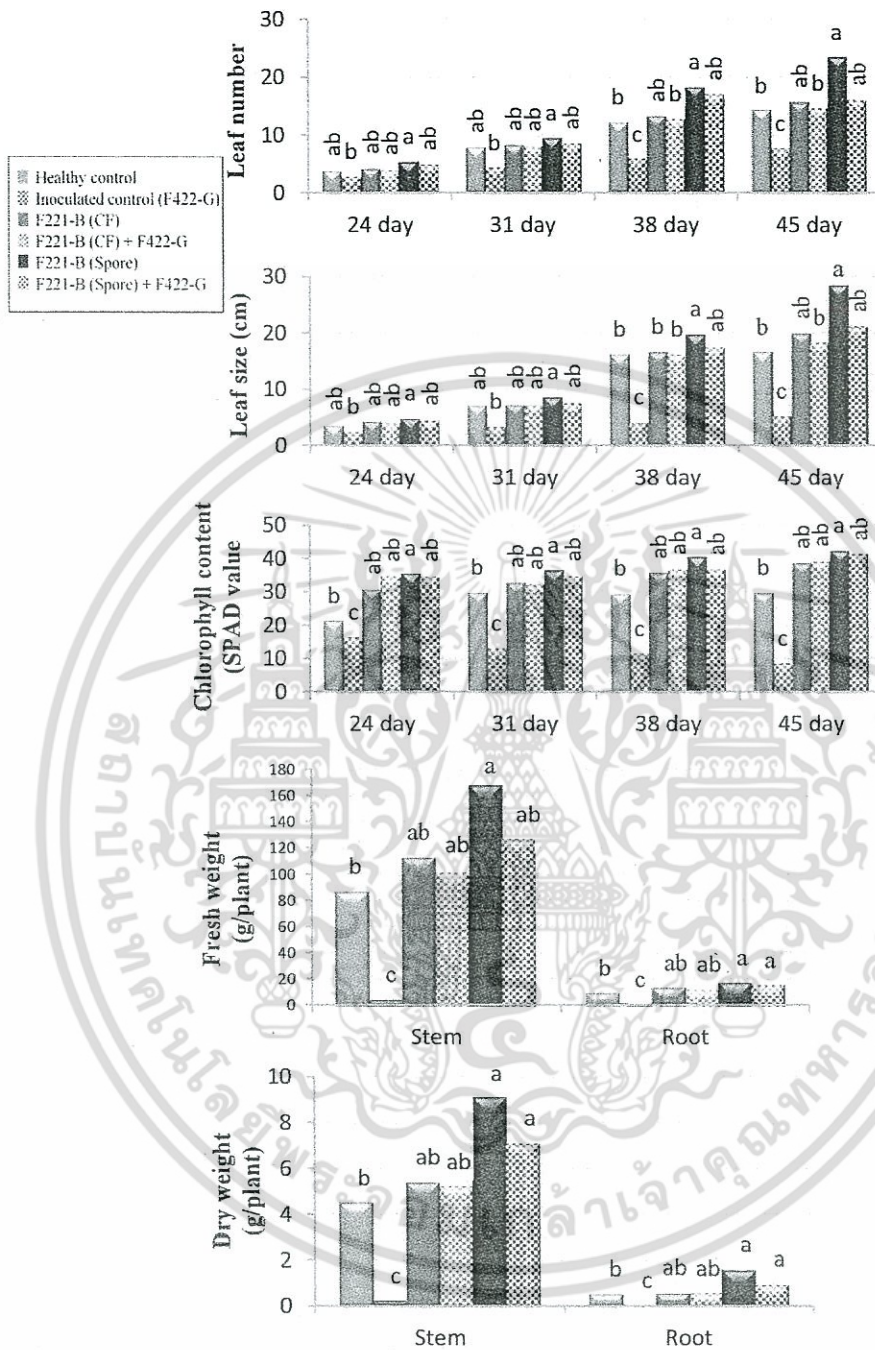


Fig. 4 Effect of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) on growth of lettuce in hydroponics.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

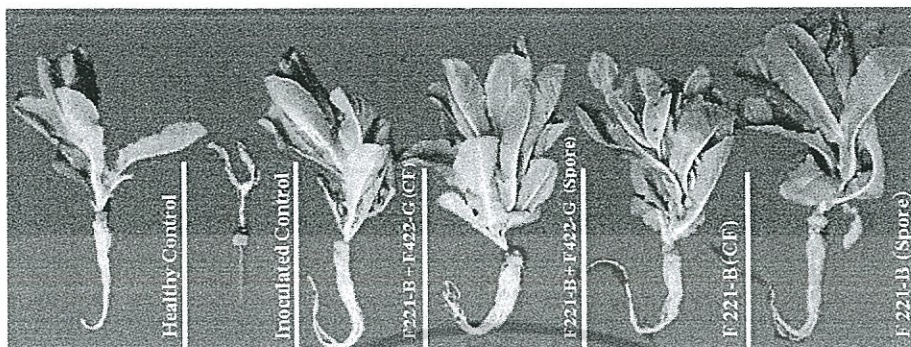


Figure 5 Effect of non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B (culture filtrate and spore suspension) for controlling root rot disease of lettuce grown in hydroponics (45 days after inoculation).

Conclusion

In this research, the potential of cell-free culture filtrate of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) was evaluated against 10 plant pathogenic fungi. Among 2 types of cell-free culture filtrate used, autoclaved CF for overall still exhibited the same level of antifungal activity against test fungi as those from non-autoclaved CF (using micro-filter). This should be noted that thermo-stability of antifungal metabolites in culture filtrate of F221-B has been observed from our *in vitro* experiments. For agar well diffusion assay, all test concentrations of culture filtrate could slightly inhibit mycelial growth (about 6-39 percent over control) of all tested fungal pathogens while the promising fungitoxic effect was recorded only at the concentrations of 80 and 100 percent of CF. Similar but more promising results were obtained from the spore germination test. F221-B culture filtrate at all test concentrations showed excellent spore germination inhibition 100 % over control against F113, F221-R and F422-G whereas only at 60, 80 and 100 % of F221-B culture filtrate were shown to completely inhibit the spore germination of C11 and C12.

Taken together, non-pathogenic *F. oxysporum* F221-B in the form of either culture filtrate or spore suspension was significantly efficient in controlling root rot disease of lettuce. In addition, it significantly exhibited beneficial effect on overall growth of lettuce.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand in year 2016 (grant number 2559-01-04-02).

Reference

- Ahmed Sheikh H.M. 2010. Antimicrobial activity of certain bacteria and fungi isolated from soil mixed with human saliva against pathogenic microbes causing dermatological diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17(4): 331-339.
- Aydi-Ben Abdallah, R., Hassine, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Haouala, R. and Daami-Remadi, M. 2014. Antifungal activity of culture filtrates and organic extracts of *Aspergillus* spp. against *Pythium ultimum*. *Tunisian Journal of Plant Protection* 9: 17-30.
- Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 25: 67-85.
- Benhamou, N. and Garand, C. 2001. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Phytopathology* 91(8): 730-740.
- Benhamou, N., Garand, C., and Goulet, A. 2002. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8): 4044-4060.
- Cabral, C.S., Brunelli, K.R., Costa, H., Fonseca, M.E., Boiteux, L.S. and Reis, A. 2014. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* race 1 as the causal agent of lettuce wilt in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 39(3): 197-202.
- Chinta, Y.D., Kano, K., Widiastuti, A., Fukahori, M., Kawasaki, S., Eguchi, Y., Misu, H., Odani, H., Zhou, S., Narisawa, K., Fjiwara, K., Shinohara, M. and Sato, T. 2014. Effect of corn steep liquor on lettuce root rot (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*) in hydroponic cultures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(11): 2317-2323.
- Cook, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31: 53-80.
- Elmer, W.H. 2004. Combining nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* with sodium chloride to suppress *Fusarium* crown rot of asparagus in replanted fields. *Plant Pathology* 53(6): 751-758.
- Hallmann, J. and R. A. Sikora. 1994. Occurrence of plant parasitic nematodes and nonpathogenic species of *Fusarium* in tomato plants in Kenya and their role as mutualistic synergists for biological control of root knot nematodes. *International Journal of Pest Management* 40:321-325.
- Horinouchi, H., Muslim, A. and Hyakumachi, M. 2010. Biocontrol of *Fusarium* wilt of spinach by the plant growth promoting fungus *Fusarium equiseti* GF 183. *Journal of Plant Pathology* 92(1): 249-254.
- Katsube, K. and Alaska, Y. 1997. Control of *Fusarium* wilt of spinach by transplanting seedlings pretreated with non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 63: 389-394.
- Khurshid, S., Shoaib, A. and Jayaid, A. 2014. In vitro toxicity evaluation of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on growth and physiology of tomato under chromium (VI) stress. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 24(4): 1241-1245.
- Larkin, R. P., and Fravel, D. R. 1996. Efficacy of various biocontrol organisms in the control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology* 86:83-86.
- Larkin, R.P. and Fravel, D.R. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Disease* 82: 1022-1028.
- Larkin, R.P. and Fravel, D.R. 2002. Reduction of *Fusarium* wilt of hydroponically-grown basil by *Fusarium oxysporum* strain CS-20. *Crop Protection* 21: 539-543.
- Lemanceau, P., Baker, P.A.H.M., De Kogel, W.J., Alabouvette, C. and Schippers, B. 1993. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Applied Environmental Microbiology* 59:74-82.

- Malbran, I. and Mourellos, C.A. 2014. Fusarium wilt of lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* in Argentina. *Plant Disease* 98(9): 1281-1281.
- Mandeel, Q. and Baker, R. 1991. Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt of cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 81: 462-468.
- Minuto, A., Minuto, G., Migheli, Q., Mocioni, M. and Gullino, M.L. 1997. Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and of different commercial biofungicide formulations on Fusarium wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Crop Protection* 16: 765-769.
- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N. and Viljoen, A. 2006. The potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing Fusarium wilt of banana. *Plant Pathology* 55: 217-223.
- Ogawa, K. and Komada, H. 1984. Biological control of Fusarium wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Annals of the Phytopathology Society of Japan* 50: 1-9.
- Paulitz, T.Z., Park, S. and Baker, B. 1987. Biological control of Fusarium wilt of cucumber with non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology* 33: 349-353.
- Reddy, P.P. 2013. *Recent Advances in Crop Protection*. Springer, London. 268p.
- Scott, J.C., Mcroberts, D.N. and Gordon, T.R. 2014. Colonization of lettuce cultivars and rotation crops by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*, the cause of Fusarium wilt of lettuce. *Plant Pathology* 63: 548-553.
- Silva, J.C. and Bettiol, W. 2005. Potential of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* isolation for control of Fusarium wilt of tomato. *Fitopatologia Brasileira* 30: 409-412.
- Sonawane, A., Mahajan, M. and Renake, S. 2015. Antifungal activity of a fungal isolates against Pomegranate wilt pathogen *Fusarium*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2: 48-57.
- Tayung, K., Barik, B.P. and Jha, D.K. 2010. Antifungal activity and biocontrol potential of metabolite produced by an endophytic *Fusarium* (MTCC-9622) against some postharvest pathogens. *Journal of Agricultural Technology* 6(3): 409-419.
- Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. 2015a. Assessment of viability and efficacy of *Fusarium oxysporum* (F221-B) as BCA and PGPF during long term preservation. In 2nd International Symposium on Agricultural Technology (2015) July 1-3, Chonburi, Thailand. 173-176.
- Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. 2015b. Colonization of plant root and punctured surface tissue by non-pathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum*. In 2nd International Symposium on Agricultural Technology (2015) July 1-3, Chonburi, Thailand. 157-160.
- Thongkamngam, T., Koohakan, P. and Jaenaksorn, T. 2012. First report of Fusarium wilt of NFT-grown lettuce caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* in Thailand and its pathogenicity on four varieties of lettuce. In: 10th Naresuan Conference, Phitsanulok, Thailand. 72-81. (In Thai)
- Thongkamngam, T., Koohakan, P. and Jaenaksorn, T. 2013. *Fusarium oxysporum* F221-B as plant growth-promoting fungus (PGPF) on six plants in hydroponics and its growth characteristics on different media. In: 6th Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Conference, Chonburi, Thailand. 46-51. (In Thai)
- Tjamos, E.C., Papavizas, G.C. and Cook, R.J. (ed). 1992. *Biological Control of Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future*. Plenum Press. New York. 462 p.
- Toyota, K., Kitamura, M. and Kimura, M. 1995. Suppression of *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* PEG-4 in soil following colonization by other *Fusarium* spp. *Soil Biology Biochemistry* 27(1): 41-46.

(Received: 31 March 2016, accepted: 16 April 2016)

Assessment of viability and efficacy of *Fusarium oxysporum* (F221-B) as BCA and PGPF during long term preservation

Titi THONGKAMNGAM* and Tanimnun JAENAKSORN

*Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

* Corresponding authors: Titi29950@hotmail.com

Abstract

Long term preservation of *Fusarium oxysporum* (F221-B) using modified filter paper technique was monthly assessed on the basis of its viability, morphological characteristics and *in vitro* efficacy as biocontrol agent (BCA) and plant growth promoting fungus (PGPF). The results showed that the 6-month storage of F221-B was very satisfactory since its viability of cultures was still 100 percent until the end. Remarkable consistency in retaining its morphological characteristics was noted during preservation. Main hypha was in the range of 110-121x2.2-2.6 μm , hyphal tip was 82.04-94.04x3.2-3.5 μm whereas macro conidia were 28.23-29.85x3.0-3.5 μm . The biocontrol efficacy of F221-B against *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. and *Fusarium* sp. remained relatively constant and unchanged during 6 months which was in the range of 36.1-74.8 percent from dual culture test and 31.6-48.2 percent in agar well diffusion assay (at the 100 percent of culture filtrate concentration). Regarding its effectiveness as plant growth promoting fungus, the treated seeds with spore suspension of F221-B at 10^3 and 10^6 spores / ml could germinate 2-day faster than non-treated seeds resulting in higher percentage of seed germination and seedling length. To conclude, 6-month preservation of F221-B using modified filter paper technique was successful with 100 percent viability and its unchanged efficacy as BCA and PGPF.

Keywords: *Fusarium oxysporum* (F221-B), modified filter paper technique, long term preservation, biocontrol agent, plant growth promoting fungus

Introduction

Fusarium oxysporum (F221-B) has shown its ability as PGPF on various plants such as Butterhead, Cos, Green oak, Red oak lettuce, kale and mung bean (Titi *et al.*, 2012) and as BCA against plant pathogenic fungi (unpublished). Therefore, it is necessary to employ the proper method for keeping the culture of F221-B as long as possible without any changes on its morphological characteristics and potentialities. Modified filter paper culture method was shown to be effective in preserving the F221-B viable without any contamination at the early stage of preservation (Thongkamngam and Jaenaksorn, 2014). However, its viability, morphological characteristics and *in vitro* efficacy as BCA and PGPF have not yet been assessed for long term period. Hence, the research was conducted to preserve the culture of F221-B using modified filter paper and kept at 4° C while assessment of its viability and efficacy as BCA and PGPF was monthly monitored during 6 months preservation.

Materials and methods

1. Assessment of viability of F221-B during 6 month storage

Viability, purity, mycelial growth, spore production and morphological characteristics of F221-B were monitored immediately after storage, at 1, 2, 3, 4, 5, and 6 months after storage. One piece of the inoculated filter paper was randomly removed from eppendorf tube from 4° C storage under aseptic conditions and then inoculated onto PDA (5 pieces per plate of 10 plates) for 3days at room temperature. All parameters were observed accordingly.

2. Assessment of biocontrol efficacy of F221-B during 6 month storage against plant pathogenic fungi

Biocontrol efficacy of F221-B against 3 plant pathogenic fungi, namely *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. and *Fusarium* sp. was monthly assessed during 6 month preservation by dual culture test and agar well diffusion assay.

2.1 Dual culture test (Dennis and Webster, 1971)

A mycelial disc (9 mm diameter) obtained from the 7 day old cultures of test pathogenic fungi and F221-B was placed simultaneously on the periphery, about 1 cm from the edges of the Petri-dishes (9 cm diameter) at opposite sides. Petri dishes containing PDA inoculated either with the test pathogens or F221-B alone served as control. All the plates were incubated at 28 °C. Radial growth of pathogen in dual plate was daily measured until the culture of control pathogen was full. The percentage growth inhibition of tested pathogens in presence of BCA was calculated over control using the formula: $C - T / C \times 100$, where C = pathogen growth in control and T = pathogen growth in dual plate.

2.2 Agar well diffusion assay (Fiddman and Rossall, 1993)

To prepare culture filtrate, 5 discs (5 mm diameter) of F221-B were cut from vigorously growing margin of 7 day old cultures and inoculated into flask containing 50 ml of sterile Potato dextrose broth (pH 5.6). Flasks were incubated at 28°C for 10 days. After incubation, the cultures were filtered first through Whatman filter paper No.1 and then through microfilter (0.2 µm) to obtain sterile culture filtrate. The culture filtrate was adjusted to different concentrations 0, 20, 40, 60, 80 and 100% by mixing with sterile water and ready to be used. Each pathogen was inoculated on PDA plate and incubated for 3 days. Then, six wells (5 mm diameter) were punched in the pathogen-inoculated plates and filled with 30 µl of each concentration of culture filtrate of F221-B. The medium devoid of culture filtrate served as control. All plates were kept in room temperature. The radial growth of tested pathogens was daily measured and the percentage of growth inhibition of tested pathogens was calculated.

3. Assessment of plant growth promoting ability of F221-B during 6 month storage

Plant growth promoting ability of F221-B was evaluated with Cos and Red oak lettuce seeds using completely randomized design. Fifty seeds of each were soaked into 5 ml of 2 concentrations (10^3 and 10^6 spore/ml) of F221-B spore suspension for 5 minutes before transplanting the inoculated-lettuce seeds onto Petri plate containing moistened-Whatman filter paper (No.1). Data collected as percentage of germinated seed and seedling length were statistically analyzed.

Results and discussions

Six month preservation of F221-B at 4° C by modified filter paper method was shown successfully. Regard to its viability, the result showed 100 percent viability since all pieces of inoculated paper were recovered each time from storage and showed the initial colony characteristics, and the same growth rate as the original culture (Table 1). Besides, remarkable consistency in retaining its morphological characteristics was noted throughout 6 month period. Main hypha was in the range of 110-121x2.2-2.6 µm, hyphal tip was 82.04-94.04x3.2-3.5 µm whereas macro conidia were 28.23-29.85x3.0-3.5 µm which were matched the original fungal identification documented for F221-B. These results are in agreement with that described by Fong *et al.* (2000) who could preserve *Fusarium oxysporum* for 4 years, *Marasmiellus inoderma* for 2 years and *Ganoderma* isolates for 5 months using a modified filter paper. In regard to this, another report by Hu *et al.* (2014) who described a success long-term preservation and fast revival of filamentous fungi using a novel, highly efficient method based simply on sterile cellophane squares (CPS) which is similar to modified filter paper method.

The biocontrol efficacy of F221-B during 6 month preservation period against *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp. and *Fusarium* sp. remained relatively constant and unchanged which was in the range of 36.1-74.8 percent from dual culture test (Figure 1, 2) and 31.6-48.2 percent in agar well diffusion assay (at the 100 percent of culture filtrate concentration). (Figure 1, 3). Since our research has focused on preservation of only a non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B), newly isolate BCA and PGPF, no related observation has

been made by others. However, the results of the current study provided evidence for the antagonistic ability of F221-B which was still in line with those described by Park *et al.* (1988) and Abeysinghe (2006) who revealed the ability of selected non-pathogenic *F. oxysporum*.

Regarding its potential as plant growth promoting fungus, the treated seeds with spore suspension of F221-B at 10^3 and 10^6 spores / ml could germinate 2-day faster than non-treated seeds resulting in higher percentage of seed germination and seedling length.

Taking into account, our present research confirmed that the potential of F221-B as BCA and PGPF remained unchanged during 6 month storage.

Table 1 Viability and morphological characteristics of *Fusarium oxysporum* (F221-B) during 6 month preservation

Month	Viability (%)	Colony color	Morphology of <i>Fusarium oxysporum</i> F221-B (at 3 day)			
			Length x Width (μm)		Macroconidia	
	1 Day	3 Day	Main hypha	Hypal tip	Size(μm)	Amount (spore/ml)
0 (before storage)	100	yellow	117×2.6a	86.7×3.4a	29.7×3.5	3.14×10^4
1	100	"	116×2.2a	82.04×3.5a	29.85×3.2	3.26×10^4
2	100	"	110×2.4a	87.42×3.2a	28.56×3.5	2.43×10^4
3	100	"	112×2.6a	92.04×3.2a	28.85×3	3.26×10^4
4	100	"	121×2.6a	90.04×3.4a	28.28×3.2	3.16×10^4
5	100	"	118×2.4a	94.04×3.4a	29.03×3.4	2.88×10^4
6	100	"	116×2.4a	85.13×3.4a	28.23×3.2	2.86×10^4

Figure 1 *In vitro* effectiveness of *Fusarium oxysporum* (F 221 -B) against 3 plant pathogen fungi during 6 month preservation

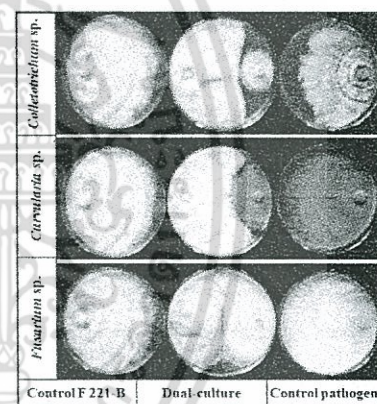
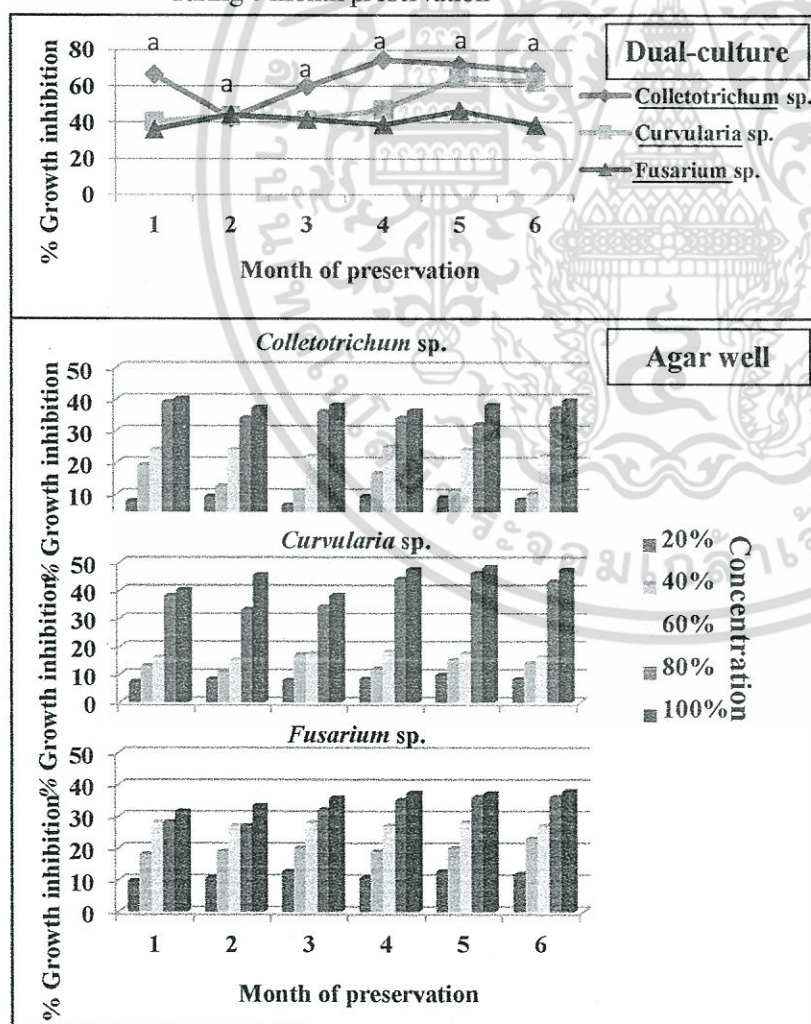


Figure 2 *In vitro* effectiveness of *Fusarium oxysporum* F221-B against 3 plant pathogen fungi by Dual culture test at 6 month of preservation

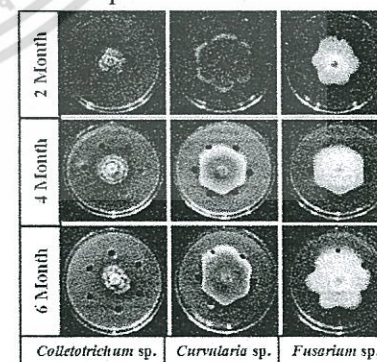


Figure 3 Effectiveness of *Fusarium oxysporum* F221-B concentration at 0, 20, 40, 60, 80 and 100 percent by Agar well diffusion assay at 2, 4 and 6 month of preservation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2 Assessment of plant growth promoting ability of F221-B during 6 month storage

Month	Treatment	Seed germination				Seedling length (cm)			
		Cos		Red oak		Cos		Red oak	
		2 day	3 day	2 day	3 day	2 day	3 day	2 day	3 day
1	Control	0	80	0	65	0c ¹	1.7c	0c	1.3c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.3ab	3.1ab	1.8ab	2.8ab
	10 ⁹ spore/ml	100	100	100	100	2.41a	3.74a	2.1a	3a
2	Control	0	80	0	60	0c	1.8c	0c	1.4c
	10 ³ spore/ml	100	100	85	100	2.1ab	3.2ab	1.9ab	2.6ab
	10 ⁹ spore/ml	100	100	100	100	2.56a	3.51a	2.3a	3.1a
3	Control	0	85	0	67	0c	1.65c	0c	1.1c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.1ab	3.1ab	1.7ab	2.5ab
	10 ⁹ spore/ml	100	100	100	100	2.41a	3.63a	2.4a	2.9a
4	Control	0	85	0	62	0c	1.7c	0c	1.3c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.3ab	3.4ab	1.8ab	2.8ab
	10 ⁹ spore/ml	100	100	100	100	2.46a	3.9a	2.1a	3a
5	Control	0	82	0	65	0c	1.7c	0c	1.4c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.1ab	3.1ab	1.6ab	2.7ab
	10 ⁹ spore/ml	100	100	100	100	2.5a	3.74a	2.5a	3a
6	Control	0	85	0	65	0c	1.7c	0c	1.3c
	10 ³ spore/ml	100	100	80	100	2.2ab	3.5ab	1.8ab	2.9ab
	10 ⁹ spore/ml	100	100	100	100	2.41a	3.84a	2.6a	3.4a

^{1/}Mean of 50 replications in a column followed by same letters are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at P=0.05

Conclusion

In conclusion, our current study provides evidence that 6 month storage of *F. oxysporum* (F 221-B) at 4° C using modified filter paper method was very satisfactory since its viability, stability of living cells, and morphological characteristics were remarkable consistency as same as that of the original culture. Besides, the potential of F221-B as antagonist and plant growth promoting fungi remained unchanged. Therefore, it would be worthwhile to extend this research for longer monitoring in order to validate the reliability of this preservation method and ensure the stability of living cells of F 221-B during longer period of preservation. Furthermore, the stability of F 221-B living cells should be assessed by molecular parameters.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for providing all the facilities both in laboratory and in hydroponic greenhouse. Thanks also go to KMITL for financial support on presenting this research at the Symposium.

References

- Abeysinghe, S. 2006. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* the casual agent of root and stem rot of *Cucumis sativus* by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Ruhuna Journal of Science* 1: 24-31.
- Dennis, C. and J. Webster. 1971. Antagonist properties of species group of *Trichoderma*; Production of volatile antibiotics. *Transactions British Mycological Society* 57: 41-78.
- Fiddman, P.J. and S. Rossall, 1993. The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* 74: 119-126.
- Fong, Y.K., S. Anuar, H.P. Lim, F.Y. Tham and F.R. Asnderson 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. *Mycologist* 14(3): 127-130.
- Hu, X., G. Webster, L. Xie, C. Yu, Y. Li and X. Liao 2014. A new method for the preservartion of axenic fungal cultures. *Journal of Microbiological Methods* 99: 81-83.
- Park, C.S., T.C. Paulitz and R. Baker. 1988. Biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions *Pseudomonas putida* and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 78: 190-194.
- Thongkamngan, T. and T. Jaenaksorn (2014). Evaluation of the modified filter paper culture method for maintenance the culture of *Fusarium oxysporum* (F221-B) The 12th Naresuan Research Conference. Naresuan University, 28 - 29 October 2014. (In Thai)
- Thongkamngan, T., P. Koohakan and T. Jaenaksorn 2013. *Fusarium oxysporum* F221-B as plant growth-promoting fungus PGPF on six plants in hydroponics and its growth characteristics on different media. In *Proceedings of 6th Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Conference* 46-51. (In Thai)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Colonization of Plant Root and Punctured Surface Tissue by Non-pathogenic and Pathogenic *Fusarium oxysporum*

Titi THONGKAMNGAM* and Tanimnun JAENAKSORN

*Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

*Corresponding authors: Titi29950@hotmail.com

ABSTRACT

Purpose of this research was to assess the colonization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain F221-B and pathogenic *F. oxysporum* strain F221-R and F422-G on roots of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in hydroponics and on punctured surface tissue of pakchoi (*Brassica chinensis* var. *chinensis*). The colonization was assessed in terms of epiphytic and endophytic colonization. Besides, survival of the tested fungi in nutrient solution was also determined. The results showed that non pathogenic F221-B could colonize on root surface (as epiphytic colonization with 28.5 and 54 CFU/ml in the 1st and 3rd week after inoculation, respectively) as well as inside the root (endophytic colonization was about 60 CFU/ml in the 1st wk. and 76 CFU/ml in the 3rd wk after inoculation) without producing any disease symptom. Unexpectedly, the pathogenic F221-R and F422-G were found to colonize only on root surface as epiphytic colonization. Regard to the colonization on punctured surface tissue, the top-view as well as cross-sectional view of colonization of plant surface tissue and top-view of epidermal peel of a plant leaf were visualized and recorded.

Keywords: non-pathogenic *Fusarium oxysporum* F221-B, epiphytic colonization, endophytic colonization, *Lactuca sativa* L., *Brassica chinensis* var. *chinensis*

Introduction

Plant disease management through the use of biocontrol agents (BCAs) could offer the prospect of an environmentally safe alternative (Sikora, 1997). Successful colonization in plant tissue is an important step for their suitability as BCA. In some instances, endophytes, normally live asymptotically inside the plant, could develop mutualistic relationships with plants, acting as antagonists to diseases (Sikora, 1992; Sikora, *et al.*, 2003; Paparu *et al.*, 2006). When endophytes are artificially reintroduced into the host plant, biological control of disease can be greatly enhanced (Clay, 1989). Hence, the potential of endophytes as BCA (such as protective strains of *Fusarium oxysporum*) has currently drawn attention to many researchers (Eparvier and Albouvette, 1994; Olivain and Albouvette, 1997; Bao and Lazarovits, 2001; Olivain *et al.*, 2006; Nahalkova *et al.*, 2008). Non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B), originally isolated from root of lettuce grown in hydroponics, has been proved so far as plant growth promoting fungus (Thongkamngam *et al.*, 2013) and BCA (unpublished). In order to maximize its biological control potential, it is essential that high initial colonization and subsequent persistence could occur. However, nothing has been known about the pattern of lettuce root colonization by this non pathogenic F221-B, such information is important in understanding its mechanism of protecting plant against disease. Therefore, the aim of this study was to assess the colonization (in terms of epiphytic and endophytic colonization) of non pathogenic F221-B compared to pathogenic *F. oxysporum* (F221-R and F422-G) on roots of lettuce grown in hydroponics and on punctured surface tissue of pakchoi. Besides, their patterns of surface tissue colonization were described.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Materials and Methods

Hydroponic cultivation

Seeds of Cos lettuce were germinated in a seedling tray on moistened sponge at room temperature. After 7 days, seedlings were moved to a new tray with nutrient solution (EC = 1 mS/cm, pH=5.8-6.2). Then, 14 day-old-seedlings were transplanted into DRFT (plastic container: 25x34x15 cm) with nutrient solution (EC = 1.8-2.0 mS/cm, pH = 5.8-6.2) to be ready for being treated according to the treatments.

1. Colonization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain F221-B and pathogenic *F. oxysporum* strain F221-R and F422-G on roots of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in hydroponics

To assess the colonization of non-pathogenic F221-B and 2 strains of pathogenic *F. oxysporum*, Completely Randomized Design (CRD) with 3 replications of 3 plants was employed. Before transplanting into the DRFT, each 14 day-old-lettuce seedling root was dipped into 5 ml of spore suspension of each tested *F. oxysporum* (1×10^8 spore/ml for F221-B and 1×10^6 spore/ml for F221-R and F422-G) while sterile water was used for healthy control. All the treated plants were grown in mini DFT under outdoor condition. Root colonization was assessed in terms of epiphytic and endophytic colonization at 1, 2 and 3 weeks after inoculation. Besides, survival of tested fungi in nutrient solution was also monitored accordingly.

1.1 Epiphytic colonization assessment (Osono, 2008)

Treated roots were washed under running tap water for 10 minutes and then were surface-sterilized by briefly in series with 70 percent ethanol for 30 seconds, 10 % sodium hypochlorite for 1-2 minutes and further cleaned by passing through two sets sterile water. Rinse water from the second rinse was kept and poured onto plate containing *Trichoderma* selective media (TSM). Culture plates were incubated at room temperature for 3 days then fungal colonies were counted.

1.2 Endophytic colonization (Elizabeth and Herre, 2003)

Treated roots were washed under running tap water for 10 minutes and then were surface-sterilized by briefly in series with 70 percent ethanol for 30 seconds, 10 % sodium hypochlorite for 10 minutes and finally rinsed 3 times with sterile water (3 minutes each). The sterile root was crushed in 1 ml sterile water with mortar. Sample solution was poured onto TSM plate and cultures were kept at room temperature for 3 days then fungal colonies were counted.

2. Colonization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) and two strains of pathogenic *F. oxysporum* (F221-R and F422-G) on punctured surface tissue of pakchoi (*Brassica chinensis* var. *chinensis*)

To study the colonization of non-pathogenic F221-B and 2 strains of pathogenic *F. oxysporum* on punctured surface tissue of pakchoi sheath leaf, two agar plugs from 7 day old culture of each tested strain of *F. oxysporum* were inoculated on 2 wounds per sheath leaf (5 leaves per tested strain). Sterile PDA plug was used as non-inoculated control. All inoculated sheath leaves were incubated at room temperature. The colonization of plant tissue on top-view, cross-sectional view and top-view of epidermal peel of a plant leaf were observed under stereomicroscopy and light microscopy and then photographed. Besides, disease lesion was measured and disease severity was calculated.

Results and discussion

1. Colonization of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) and pathogenic *F. oxysporum* (F221-R and F422-G) on root of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in hydroponics

Our result revealed that non pathogenic F221-B could successfully colonize both on surface and inside the root without producing any disease symptom (Figure 1 and 2). However, the amount of colonization was pretty low compared to those from original inoculated amount (epiphytic colonization was only 0.29×10^2 and 0.54×10^2 CFU/ml while endophytic colonization was about 0.6×10^2 CFU/ml in the 1st and 3rd week after inoculation, respectively.). Contrary to expectations, both isolates of pathogenic *F. oxysporum* were found to colonize

only on root surface with lower amount than that of non-pathogenic F221-B from beginning till the 3rd week after inoculation (0.23×10^2 CFU/ml for F221-R and 0.16×10^2 CFU/ml for F422). Furthermore, it was demonstrated that survivals of the three tested fungi in nutrient solution were much higher than those in plant tissue, this probably due to fungal inoculation method onto plant root and into nutrient solution at the same time. However, their survivals were decreased along with increasing incubation times. At the 3rd week after inoculation, survival amount of test fungi in nutrient solution were in the range of $1.74-2.2 \times 10^2$ CFU/ml (Figure 1). Our study confirming colonization ability of non-pathogenic F221-B as epiphyte and endophyte is in agreement with those described by Paparu *et al.* (2005); Olivain *et al.* (2006); Nahalkova *et al.* (2008) who stated that many strains of non-pathogenic *F. oxysporum* could colonize root surface and penetrate intact host tissues. Regard to our result on colonization ability of two isolates of pathogenic *F. oxysporum* as epiphyte, this contradicts to Scott *et al.* (2014) who described the intensity of pathogen colonization of the vascular stele of lettuce cultivars. However, endophytic colonization of the 2 strains of pathogenic *F. oxysporum* from this study could probably be detected if incubation period is set longer.

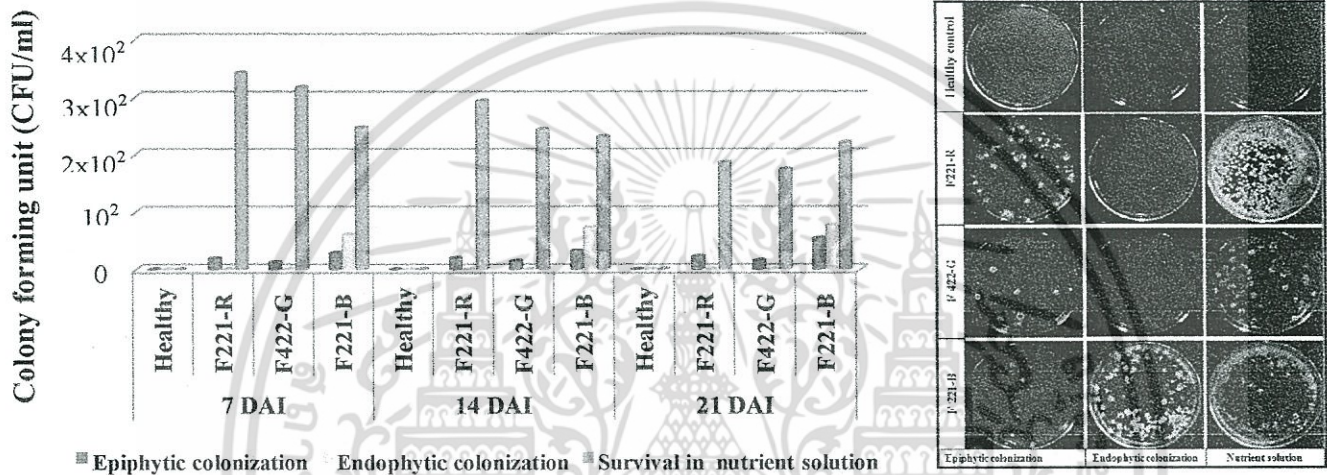


Figure 1 Colonization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) and pathogenic *F. oxysporum* (F221-R and F422-G) including on root of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in hydroponics their survival in nutrient solution(A) and colony on PDA at 21 DAI (B)

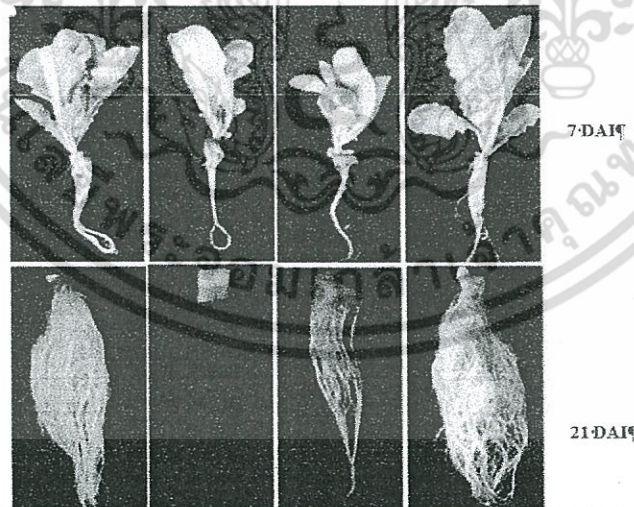


Figure 2 Colonization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) and pathogenic *F. oxysporum* (F221-R and F422-G) on root of lettuce grown in hydroponics (at 7 and 21 DAI)

Table 2 Colonization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) and pathogenic *F. oxysporum* (F221-R and F422-G) on punctured surface tissue of pakchoi (*Brassica chinensis* var *chinensis*).

Treatment	Colonization of non-pathogenic <i>F. oxysporum</i>				5 DAI			
	1 DAI	3 DAI	5 DAI	%DS	Top-view	Cross-sectional view	Epidermal peel view	
Healthy control	0.5 : 0 ^{1/2}	0.5 : 0	0.5 : 0	0.5 : 0				Normal cell tissue
F221-R Inoculation	1.6 : 40	3.3 : 82.5	4 : 100	4 : 100				F221-R hyphae penetration were visible in intercellular and intracellular spaces
F422-G Inoculation	1.4 : 35	2.5 : 62.5	3.3 : 82.5	3.3 : 82.5				F422-G hyphae penetration were visible in intercellular and intracellular spaces
F221-B Treated	0.5 : 0	0.5 : 0	0.5 : 0	0.5 : 0				Macro conidia were observed in intercellular host tissue

DAI = Day after inoculation

AP: Agar plug, F-AP: Fungal-agar plug, S: Lesion with surface depression covered with white mycelia, N1-N2: No obvious disease symptom,

HI-H2: Severe disease symptom caused by F221-R and F422-G, respectively.

^{1/2} % Disease severity (DS) = $\frac{\sum (\text{number of infected leaf sheath} \times \text{disease severity index})}{\text{number of total leaf sheath}} \times 100$

number of total leaf sheath × the highest index of disease severity

2. Colonization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (F221-B) and two strains of pathogenic *F. oxysporum* (F221-R and F422-G) on punctured surface tissue of pakchoi (*Brassica chinensis* var. *chinensis*)

Regard to the colonization on punctured surface tissue of pakchoi leaf by non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) and two strains of pathogenic *F. oxysporum* (F221-R and F422-G), the result showed that pattern of leaf surface tissue colonization was similar for both strains of pathogenic *F. oxysporum* with 82.5-100 % disease severity (DS) while no obvious disease symptom was noted with colonization of non-pathogenic F221-B (top-view and cross-sectional view of colonization) (Table 1). Besides, severe disease lesion (its size about 3-4 cm) was observed with the depression of the leaf surface at 5 DAI. Abundant white hyphae of three tested strains of *F. oxysporum* were found spreading on the epidermis while only hyphae of two pathogenic strains could be observed from internal tissues. Based on epidermal peel view, normal tissue was illustrated on non-inoculated tissue while hyphae of 2 strains of pathogenic *F. oxysporum* were visible in intercellular and intracellular spaces. Interestingly, only macroconidia of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) were observed on epidermal peel view. These results are in line with Paparu *et al.*, (2006) who provided the first *in situ* observation and quantification of endophyte colonization and also demonstrated the ability of *F. oxysporum* to penetrate intact host tissue. To the extent that such differences between colonization on lettuce root and on punctured surface tissue of pakchoi leaf by pathogenic *F. oxysporum* are probably due to rather short incubation period in lettuce experiment.

Conclusion

Our study reveals the first investigation of the endophytic and epiphytic colonization ability of non-pathogenic *F. oxysporum* (F221-B) on roots of lettuce grown in hydroponics. This information of its successful colonization internally would be worthwhile for further research in terms of potential development for exploiting an endophytic F221-B as a promise BCA and PGPF in the near future.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for providing all the facilities both in laboratory and in hydroponic greenhouse. Thanks also go to KMITL for financial support on presenting this research at the Symposium.

References

- Thongkamngan, T., P. Koohakan and T. Jaenaksom. 2013 *Fusarium oxysporum* F221-B as plant growth-promoting fungus PGPF on six plants in hydroponics and its growth characteristics on different media. In Proceedings of 6th Rajamangala University of Technology Tawan-ok Reserch Conference 46-51. (In Thai)
- Sikora, R.A. 1992. Management of antagonistic potential in agricultural ecosystems for the control of plantlet parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 12: 245-270.
- Sikora, R.A. 1997. Biological system management in the rhizosphere: an inside-out/outside-in perspective. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent 62: 105-112.
- Sikora, R.A., B. Niere and J. Kimenju. 2003. Endophytic microbial biodiversity and plantlet nematode management. In Biological control in IPM Systems in Africa 2nd edn, pp. 179-192.
- Pavithra, N., L. Sathish and K. Ananda. 2012. Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolate from Tulsi. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS) 16(12): 1-6.
- Eparvier, A. and C. Alabouvette. 1994. Use of ELISA and GUS transformed strains to study competition between pathogenic and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonization. Biocontrol Science Technology 4: 35-47.
- Olivain, C. and C. Alabouvette. 1997. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. New Phytologist 137: 481-494.
- Olivain, C., C. Humbert, J. Nahalkova, J., F. FatehiHaridon and C. Alabouvette. 2006. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. Applied and Environmental Microbiology 72: 1523-1531.
- Bao, J.R. and G. Lazarovits. 2001. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence Fusarium wilt control. Phytopathology 91: 449-456.
- Nahalkova, J., J. Fatehi, C. Olivain and C. Alabouvette. 2008. Tomato root colonization by fluorescent-tagged pathogenic and protective strains of *Fusarium oxysporum* in hydroponic culture differs from root colonization in soil. Federation of European Microbiological Societies 286: 152-157.
- Scott, J.C., D.N. Mcroberts and T.R. Gordon. 2014. Colonization of lettuce cultivars and rotation crops by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucaae*, the cause of fusarium wilt of lettuce. Plant Pathology 63: 548-553.
- Paparu, P., T. Dubois, C.S. Gold, B. Niere, E. Adipala and D. Coyne. Colonization pattern of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*, a potential biological control agent, in root and rhizomes of tissue cultured Musa plantlets. Annals of Applied Biology 149: 1-8.
- Elizabeth, A.A. and A.E. Herre. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). Mycological 95(3): 388-398.
- Osono, T. 2008. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age-dependent variations. Mycological 100(3): 387-391.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประเมินเทคนิค Filter paper เพื่อเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B)
Evaluation of the modified filter paper culture method for maintenance
the culture of *Fusarium oxysporum* (F221-B)

จิติ ทองคำงาม^{1*} และ ถนิมนันต์ เจนอักษร¹

Titi Thongkamngam^{1*} and Tanimnun Jaenaksom¹

Abstract

In order to obtain the proper method for keeping the culture of *Fusarium oxysporum* (F221-B) viable and unchanged for routine testing and future research, the modified dried filter paper culture method was evaluated. The preservation method was modified onto 2 aspects, namely inoculation techniques on filter paper and drying technique. Four inoculation techniques onto PDA plates to be tested were as follows: 1) Inoculated with 1 piece of fungal plug by placing face down directly on PDA at the center without filter paper (as control) 2) Inoculated with 1 piece of fungal plug by placing face down on the center of 70 mm filter paper 3) Inoculated with 5 pieces of fungal plugs by placing face down on PDA a few mm away from the circumference of 70 mm filter paper 4) Inoculated with 6 pieces of fungal plugs by placing face down on PDA a few mm away from the circumference of 70 mm filter paper. Then, the viability of the fungus was assessed by observing the fungal growth from five pieces of fungal filter paper discs placed on PDA after 10 days of incubation. The result showed that the cultures of F221-B preserved using this protocol with the 4 inoculation techniques remained one hundred percent viable and free from contamination. However, the modified dried filter paper culture method using 6 pieces of fungal plugs by placing face down on PDA a few mm away from the circumference of 70 mm filter paper was shown to be the most suitable for preserving F221-B since its mycelial growth and spore production were the highest. Regarding drying technique, this study demonstrated that dry method of filter paper culture in non-vacuum dessicator with blue indicating silica gel at the bottom was found to be effective in preserving the F221-B without contamination.

Keywords: Filter paper technique, *Fusarium oxysporum* (F 221-B), vacuum dessicator

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อ *Fusarium oxysporum* (F 221-B) ให้ยังคงมีชีวิตอยู่ คุณสมบัติของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงและเก็บไว้ใช้ได้ในระยะยาว รวมทั้งสามารถนำออกมาทดสอบได้ตลอดเวลา โดยทำการดัดแปลงเทคนิค Filter paper culture ใน 2 ประเด็น กล่าวคือ ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อลงบนกระดาษกรองและการทำให้กระดาษกรองแห้ง ซึ่งขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อมี 4 กรรมวิธี คือ 1) วางชิ้นวุ้นเชื้อ 1 ชิ้นคว่ำหน้าลงตรงกลางจานอาหาร PDA ที่ไม่มีกระดาษกรอง (Control) 2) วางชิ้นวุ้นเชื้อ 1 ชิ้นคว่ำหน้าลงตรงกลางกระดาษกรองขนาด 70 มิลลิเมตร 3) วางชิ้นวุ้นเชื้อ 5 ชิ้นคว่ำหน้าลงบนอาหาร PDA ห่างจากขอบกระดาษกรอง (ขนาด 70 มิลลิเมตร) เพียงเล็กน้อย 4) วางชิ้นวุ้นเชื้อ 6 ชิ้นคว่ำหน้าลงบนอาหาร PDA ห่างจากขอบกระดาษกรอง (ขนาด 70 มิลลิเมตร) เพียงเล็กน้อย ต่อจากนั้นทำการตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อบนกระดาษกรองนั้นๆ โดยตัดแผ่นกระดาษกรองออกเป็นชิ้นเล็กๆ และนำมา 5 ชิ้น เพื่อเลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน พบว่า การเก็บรักษาเชื้อโดยใช้ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อบนกระดาษกรอง ทั้ง 4 กรรมวิธี ส่งผลให้เชื้อ F 221-B ยังมีชีวิตรอดอยู่ 100 เปอร์เซ็นต์และไม่มีการปนเปื้อน อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่วางชิ้นวุ้นเชื้อ 6 ชิ้นคว่ำหน้าลงบนจานอาหาร PDA ห่างจากขอบกระดาษกรอง เหมาะที่สุดต่อการเลี้ยงเชื้อ F221-B ในครั้งนี้ เพราะตรวจพบการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์มากที่สุด

¹สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

*Corresponding author: E-mail : Titi 29950@hotmail.com

ส่วนขั้นตอนการทำให้กระดาษกรองแห้ง โดยนำกระดาษกรองใส่ลงในโถดูดความชื้นที่มี silica gel อยู่ที่ก้นของโถดูดความชื้น แต่ไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (non-vacuum dessicator) พบว่าใช้ได้ โดยมีประสิทธิภาพเพียงพอในการเก็บรักษาเชื้อ F 221-B และไม่มี การปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ

คำสำคัญ: Filter paper technique, *Fusarium oxysporum* (F 221-B), vacuum dessicator

คำนำ

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) เป็นเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช Plant Growth Promoting Fungus (PGPF) ได้หลายชนิด คือ Butter head, Cos, Green oak, Red oak, ค่ะน้ำ และ ถั่วเขียว เป็นต้น (ธิตและคณะ, 2556) อย่างไรก็ตาม ถ้าไม่มีการเก็บรักษาเชื้อราที่ดีก็อาจจะทำให้เชื้อรานั้นเสื่อมคุณภาพและตายลงได้ ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเก็บรักษาเชื้อมากที่สุด เพื่อให้เชื้อยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ระยะเวลายาวนาน อีกทั้งยังสามารถที่จะนำเชื้อที่เก็บรักษาไว้กลับมาใช้ได้ตลอดเวลา โดยวิธีการเก็บรักษาเชื้อนั้นมีอยู่หลากหลายวิธีการจึงต้องคำนึงถึงชนิดและการสร้างสปอร์ของเชื้อ เพื่อให้จะได้เก็บรักษาเชื้อได้ถูกต้องและเหมาะสม โดยสิ่งสำคัญของการเก็บรักษาเชื้อนั้นมีหลักการสำคัญ คือ การหยุดหรือลดการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยควบคุมปัจจัยที่จำเป็นในการเจริญ อย่างเช่น อากาศ อุณหภูมิ สารอาหาร และ น้ำ การเก็บเชื้อราแต่ละวิธีต้องทำให้เชื้อรามีชีวิตรอดอยู่มากที่สุด คงลักษณะเดิมมากที่สุด และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเชื้อ

ปัจจุบันมีวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่นิยมใช้เก็บรักษาเชื้ออยู่หลากหลายวิธีการ คือ 1. การเก็บในอาหาร PDA slant 2. การเก็บภายใต้ น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) 3. การเก็บในกรีเซอร์อล 10 เปอร์เซ็นต์ 4. การเก็บเชื้อใน Liquid nitrogen และ 5. การเก็บในกระดาษกรองฆ่าเชื้อ (filter paper) (ธารทิพย์และคณะ, 2551; Espinel-Ingroff, et al., 2004; Direkel and Otag 2013; Dahmen, et al., 1982; ATCC; Fong, et al., 2000) โดยวิธีการรักษาเชื้อรามีข้อเสียหลาย ๆ อย่าง เช่น 1.วิธีการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร (PDA slant) ข้อด้อยคือ ไม่สามารถเลี้ยงเชื้อเก็บไว้ได้เป็นเวลานานได้ 2. วิธีการเก็บในน้ำมันพาราฟิน ข้อด้อยคือ เวลาเชื้อเชื้อออกจากน้ำมันมีขั้นตอนยุ่งยาก ต้องทำให้เชื้อแห้งก่อนถึงจะเลี้ยงเชื้อได้ 3. การเก็บในกรีเซอร์อล 10 เปอร์เซ็นต์ ข้อด้อยคือ ต้องเก็บไว้ในอุณหภูมิที่ติดลบมาก อาจมีผลต่อเชื้อราและอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นๆ 4. การเก็บใน Liquid nitrogen มี ข้อด้อยคือ ลักษณะของเชื้อบางชนิดอาจไม่เหมาะกับอุณหภูมิที่เย็น มีผลทำให้เชื้อรานั้นตายได้ และ 5. การเก็บในกระดาษกรองฆ่าเชื้อ (filter paper) เป็นวิธีการหนึ่งที่ไม่ค่อยมีข้อเสียในการเก็บเชื้อเพราะขั้นตอนในการเก็บเชื้อนั้นค่อนข้างง่าย ไม่ยุ่งยาก สะดวก ในการเก็บรักษาได้เป็นเวลานานหลาย ๆ ปี โดยไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นๆ

ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการดัดแปลงวิธีการ Filter paper ของ Fong, et al., 2000 หลักใหญ่ ๆ อยู่ 2 ประเด็น คือ 1) การวางเชื้อ 1 จุดและ 5 จุด เปรียบเทียบกับ 6 จุด ในวิธีการอ้างอิง 2)การไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ต่อกับโถดูดความชื้น (dessicator) ซึ่งผลที่คาดว่าจะได้รับจากการดัดแปลงในครั้งนี้จะได้วิธีการที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อ *F. oxysporum* (F 221-B) และใช้ในการทดลองต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B)

เชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากงานวิจัยของ ธิตและคณะ (2556) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 6 ชนิด (Cos, Green oak, Red oak, Butter head, ค่ะน้ำ และ ถั่วเขียว) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

การเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) โดยใช้เทคนิค Modified filter paper culture

การศึกษาในครั้งนี้ทำเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดของเทคนิค Filter paper ในการเก็บรักษาเชื้อรา F 221-B โดยทำการดัดแปลงวิธีการของ Fong, et al. (2000) ใน 2 ประเด็นคือ 1) จำนวนชั้นวางเชื้อที่วางเพื่อให้เชื้อเจริญครอบคลุมกระดาษกรอง จากวิธีการเดิมใช้ 6 ชั้น จะลดลงเป็น 5 ชั้นและ 1 ชั้น โดยตั้งสมมุติฐานว่าในกรณี 5 ชั้น เชื้อน่าจะเจริญเข้าครอบคลุมบริเวณจุดตรงกลางของกระดาษกรองได้ดีกว่า 6 ชั้น สำหรับกรณี 1 ชั้นที่วางบนจุดกึ่งกลางกระดาษกรองโดยตรง ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้เลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปและน่าจะครอบคลุมกระดาษกรองได้สม่ำเสมอครอบคลุมทั้งแผ่นกระดาษกรอง 2) ดัดแปลงขั้นตอนการทำให้กระดาษกรองแห้งโดยใส่ลงในโถดูดความชื้นที่มี silica gel อยู่ที่ก้นของโถดูดความชื้น แต่ไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (non-vacuum dessicator)

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นเชื้อบริเวณขอบของโคโลนีเชื้อ วางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแบ่งเป็น 4 กรรมวิธีๆละ 3 ซ้ำ ขึ้นอยู่กับ จำนวนชิ้นวุ้น+การวางชิ้นวุ้นเชื้อ ดังนี้

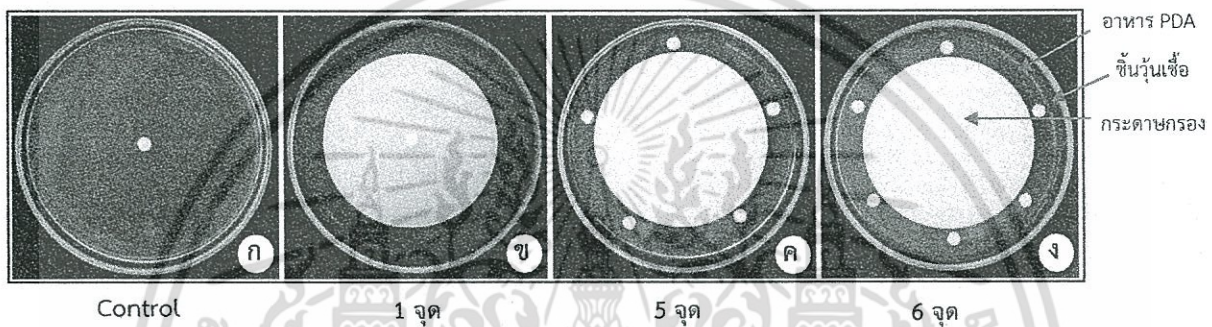
กรรมวิธี ที่ (1) 1 ชิ้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA (ไม่มีกระดาษกรอง)

กรรมวิธี ที่ (2) 1 ชิ้นวุ้นเชื้อ + วางบนกระดาษกรอง

กรรมวิธี ที่ (3) 5 ชิ้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA ที่ตำแหน่งขอบนอกกระดาษกรอง

กรรมวิธี ที่ (4) ทำเหมือนกรรมวิธีที่ 3 แต่วางชิ้นวุ้น 6 ชิ้นวุ้นเชื้อ (อ้างอิง Fong et al., 2000)

(ภาพที่ 1ก-1ง) บ่มเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อออก และย้ายจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่าส่วน ก้นของจานอาหารเลี้ยงเชื้อวางลงในโถดูดความชื้น (dessicator) ที่ไม่ได้ต่อกับปั๊มสุญญากาศ (non-vacuum pump) (ภาพที่ 2) บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน รอให้แผ่นกระดาษแห้งสนิทเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปแบบการวางเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) 4 แบบ ดังนี้
 กรรมวิธี ที่ (1) 1 ชิ้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA (ไม่มีกระดาษกรอง)
 กรรมวิธี ที่ (2) 1 ชิ้นวุ้นเชื้อ + วางบนกระดาษกรอง
 กรรมวิธี ที่ (3) 5 ชิ้นวุ้นเชื้อ + วางบนอาหาร PDA ที่ตำแหน่งขอบนอกกระดาษกรอง
 กรรมวิธี ที่ (4) ทำเหมือนกรรมวิธีที่ 3 แต่วางชิ้นวุ้น 6 ชิ้นวุ้นเชื้อ (อ้างอิง Fong et al., 2000)

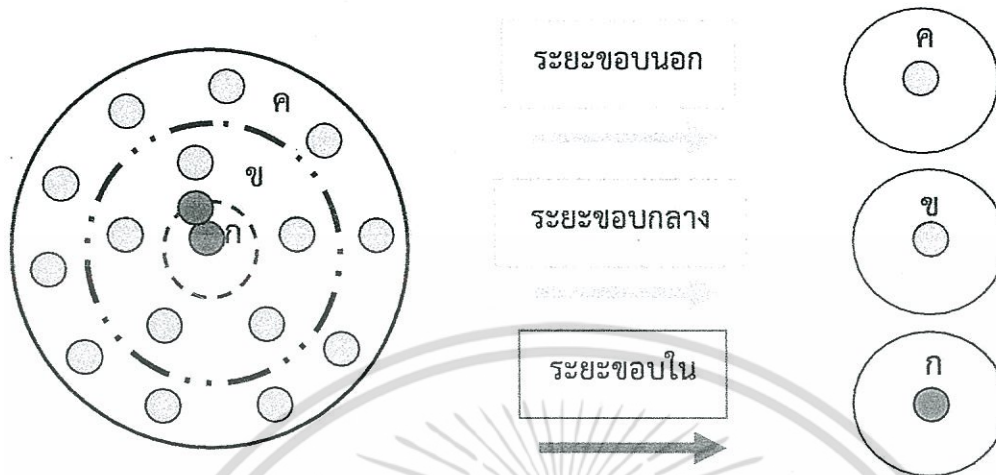


ภาพที่ 2 การวางแผ่นกระดาษกรองในโถดูดความชื้น แต่ไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (non-vacuum dessicator)

การประเมินเทคนิค Filter paper (ดัดแปลง) ในการเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B)

หลังจากเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวตามวิธีที่การข้างต้นที่ได้มาแล้ว ให้นำแผ่นกระดาษกรองที่แห้งสนิทมาตัดด้วยคีมเจาะกระดาษ โดยแบ่งการตัดแผ่นกระดาษออกเป็น 3 ระยะ คือ ขอบใบ ขอบกลาง และ ขอบนอก (ภาพที่ 3) ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 กรรมวิธีๆละ 5 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อราโดยคีบแผ่นกระดาษกรองในแต่ละระยะขอบวางลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำนวน 1 ชิ้น ส่วนในกรรมวิธีควบคุมให้ใช้ชิ้นวุ้นเชื้อแทนแผ่นกระดาษกรอง สังเกตและบันทึกผลการทดลอง โดยทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยของเชื้อในแต่ละกรรมวิธี

เปรียบเทียบกับตัวควบคุม และเมื่อเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทำการตรวจนับปริมาณของสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ว่าในแต่ละระยะขอบมีการเจริญของเส้นใยเท่ากันหรือไม่



ภาพที่ 3 ลักษณะรูปแบบการตัดแผ่นกระดาษกรองที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ในแต่ละระยะขอบจำนวน 3 ระยะขอบ ดังนี้

- ก. ระยะขอบใน มีระยะห่าง 1-3 เซนติเมตร
- ข. ระยะขอบกลาง มีระยะห่าง 3-6 เซนติเมตร
- ค. ระยะขอบนอก มีระยะห่าง 6-9 เซนติเมตร

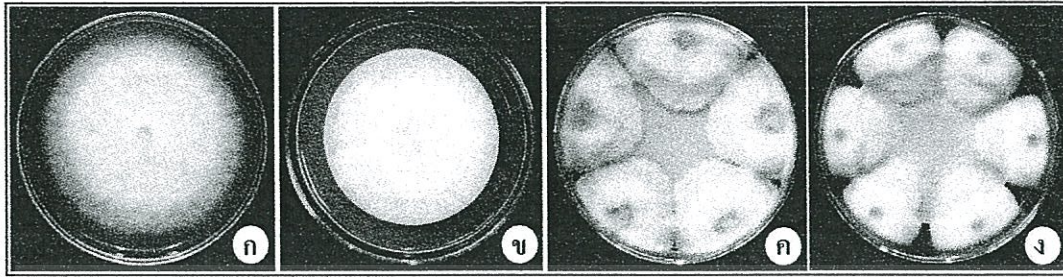
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของการประเมินการเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) โดยเทคนิค Filter paper (ดัดแปลง)

จากการเก็บรักษาเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) โดยวิธี modified filter paper culture ซึ่งทำการดัดแปลงวิธีการของ Fong, et al. (2000) ในวิธีการวางชั้นวันเชื้อจากวิธีการเดิมทำการวางเชื้อ 6 ชั้น ลดลงเป็น 5 ชั้นและ 1 ชั้น พบว่า การเจริญของเชื้อในทุก ๆ กรรมวิธีที่ทำการทดลองสามารถเจริญครอบคลุมกระดาษกรองได้ดี (ดังภาพที่ 4) และได้ตรวจการมีชีวิตของเชื้อ (viability) ในแต่ละกรรมวิธีและในแต่ละขอบรัศมีของกระดาษกรองนั้นๆ พบว่าในช่วง 1-3 วันแรกของการปลูกเชื้อ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8 หลังการปลูกเชื้อ) เป็นวันที่ชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเจริญของเชื้อจากขอบในของกระดาษกรอง มีแนวโน้มที่จะเจริญน้อยกว่าเชื้อที่มาจากกระดาษขอบกลางและขอบนอกของทุกกรรมวิธีซึ่งให้ค่าการเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับชุดควบคุม (control) แต่อย่างไรก็ตาม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของทุกกรรมวิธีก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติและไม่ต่างไปจากกรรมวิธีควบคุม (control) ดังตารางที่ 1 และภาพที่ 5 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Stocco, et al., 2010 ที่ใช้วิธีการเก็บรักษาเชื้อ 3 วิธี คือ น้ำมันฆ่าเชื้อ น้ำมัน และ filter paper culture เพื่อใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ *Trichoderma harzianum* พบว่าวิธีการเก็บแบบ filter paper culture เป็นวิธีการที่ดีที่สุด สามารถเก็บเชื้อดังกล่าวได้ 24 เดือนโดยไม่มีการเสื่อมสลายของเชื้อและยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ สำหรับปริมาณสปอร์ของเชื้อที่พบในทุกขอบรัศมีของกระดาษกรองในทุกกรรมวิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ในภาพรวม กรรมวิธีที่วางเชื้อ 1 ชั้น มีปริมาณสปอร์น้อยกว่า 5 ชั้นและ 6 ชั้น โดยมีปริมาณสปอร์อยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 spore/ml สำหรับกรรมวิธีที่วางเชื้อ 5 ชั้นและ 6 ชั้น ปริมาณของสปอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อยู่ในช่วง 10^7 - 10^8 spore/ml แต่อย่างไรก็ตาม กรรมวิธีที่วางเชื้อ 6 ชั้นมีแนวโน้มที่จะให้ผลดีกว่าในกรรมวิธี 5 ชั้นที่ได้ทำการดัดแปลงวิธีการวางเชื้อ

โดยสรุปจากการที่ได้ตั้งสมมุติฐานไว้ 2 ประเด็น 1) การดัดแปลงวิธีการวางชั้นวัน 1 ชั้น และ 5 ชั้นมีแนวโน้มการสร้างสปอร์น้อยกว่ากรรมวิธีอ้างอิง Fong et al., 2000 ที่วางชั้นเชื้อจำนวน 6 ชั้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เป็นการยืนยันอีกครั้งถึงวิธีการวางชั้นเชื้อ 6 ชั้นนั้นสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการทดลอง Long term preservation ได้ต่อไป เพราะได้ทราบว่าเป็นแต่ละระยะขอบรัศมีของกระดาษกรองนั้นมีความสม่ำเสมอของเชื้อและการสร้างสปอร์ไม่มีความแตกต่างกัน 2) ดัดแปลงที่ 2 ไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศดูดความชื้น (non-vacuum dessicator) พบว่า การดัดแปลงโดยไม่ใช้ปั๊ม

ไม่ยุ่งยากและลดความเสี่ยงที่จะเกิดกับเชื้อ อีกทั้งยังสามารถทำให้กระดาศกรงแห้งเร็วภายใน 7 วันและไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆแต่อย่างใด จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาการเก็บเชื้อในระยะยาวต่อไป



Control

1 จุด

5 จุด

6 จุด

ภาพที่ 4 ลักษณะรูปแบบการวางเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ที่อายุ 7 วัน จำนวน 4 กรรมวิธี ดังนี้

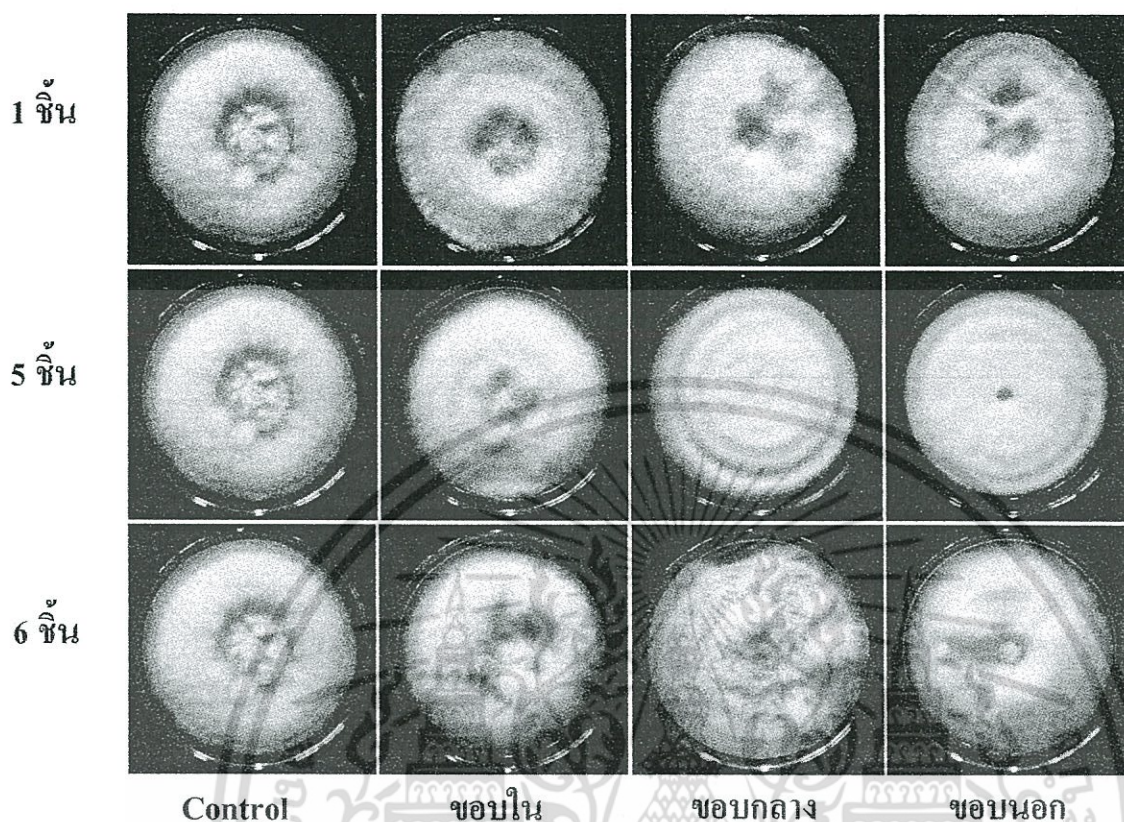
- ก. กรรมวิธีที่ (1) 1 ชั้นวันเชื้อ + วางบนอาหาร PDA (ไม่มีกระดาศกรง)
- ข. กรรมวิธีที่ (2) 1 ชั้นวันเชื้อ + วางบนกระดาศกรง
- ค. กรรมวิธีที่ (3) 5 ชั้นวันเชื้อ + วางบนอาหาร PDA ที่ตำแหน่งขอบนอกกระดาศกรง
- ง. กรรมวิธีที่ (4) ทำเหมือนกรรมวิธีที่ 3 แต่วางชั้นวัน 6 ชั้นวันเชื้อ

ตารางที่ 1 การประเมินผลของการเจริญทางเส้นใยและปริมาณสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) บนกระดาศกรง โดยวิธี Filter paper

กรรมวิธี	ระยะขอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อ <i>F. oxysporum</i> (F 221-B) ซม./วัน					ปริมาณสปอร์ (spore/ml) 8 วัน Macroconidia
		1 day	3 day	5 day	7 day	8 day	
Control	-	1.95a ^{1c}	3.87a	5.6a	7.82a	9a	0.8×10^8 a
1 ชั้น	ขอบใน	1.48a	3.03a	4.57a	6.85ab	7.24ab	1.9×10^5 c
	ขอบกลาง	1.53a	3.28a	5.02a	7.45a	9a	2.2×10^6 b
	ขอบนอก	1.66a	3.41a	5.24a	7.64a	9a	3.6×10^6 b
5 ชั้น	ขอบใน	1.43a	3.25a	5.23a	7.42a	8.66a	0.26×10^7 ab
	ขอบกลาง	1.56a	3.32a	5.28a	7.52a	9a	1.9×10^7 ab
	ขอบนอก	1.6a	3.37a	5.36a	7.84a	9a	1.18×10^8 a
6 ชั้น	ขอบใน	1.31a	2.77a	4.85a	6.44ab	7.82ab	1.88×10^7 ab
	ขอบกลาง	1.52a	3.28a	5.3a	7.52a	9a	1.26×10^8 a
	ขอบนอก	1.71a	3.46a	5.42a	7.68a	9a	1.92×10^8 a

^{1c} ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ ในแต่ละคอลัมน์ของแต่ละกรรมวิธีที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P= 0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 การประเมินผลของการเจริญทางเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* (F 221-B) ในแต่ละกรรมวิธี โดยทำการเปรียบเทียบการวางใน 3 ระยะ (ขอบใน, ขอบกลาง และ ขอบนอก) ที่อายุ 9 วันหลังการปลูกเชื้อ

สรุปผลการทดลอง

จากการประเมินเทคนิค Filter paper เพื่อใช้ในการเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) โดยแบ่งการวางเชื้อออกเป็น 4 กรรมวิธี 1.วางชิ้นวัน 1 ชิ้นบนอาหาร PDA (ไม่มีกระดาษกรอง) 2.วางชิ้นวัน 1 ชิ้นบนกระดาษกรอง (วิธีการตัดแปลง) 3. วางชิ้นวัน 5 ชิ้นวางบนอาหาร PDA ที่ตำแหน่งขอบนอกกระดาษกรอง (วิธีการตัดแปลง) 4.ทำเหมือนข้อ 3 แต่วางชิ้นวัน 6 ชิ้น (วิธีการอ้างอิง) สำหรับปริมาณสปอร์ของเชื้อที่พบในทุกขอบรัศมีของกระดาษกรองในทุกกรรมวิธีให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยในภาพรวม กรรมวิธีที่วางเชื้อ 1 ชิ้น มีแนวโน้มของปริมาณสปอร์น้อยกว่าในกรรมวิธีที่วางเชื้อ 5 ชิ้นและ 6 ชิ้น ซึ่งกรรมวิธีที่วางเชื้อ 5 ชิ้น และ 6 ชิ้น มีปริมาณสปอร์มากที่สุด อันเนื่องมาจากการวางชิ้นเชื้อเริ่มต้นที่มากกว่าจึงอาจมีผลทำให้ปริมาณสปอร์มากกว่าในกรรมวิธีที่วางชิ้นวัน 1 ชิ้น และเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมแล้ว พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยสรุปจากการที่ได้ตัดแปลงวิธีการ Filter paper ของ Fong *et al.*, 2000 หลักใหญ่ ๆ อยู่ 2 ประเด็นคือ 1) การวางเชื้อ 1 จุดและ 5 จุด เปรียบเทียบกับ 6 จุด ในวิธีการอ้างอิง 2) การไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ต่อกับโถดูดความชื้น (desiccator) พบว่ากรรมวิธีที่ตัดแปลงการวางเชื้อได้ผลไม่ดีเท่าวิธีการอ้างอิง ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ก็สามารถยืนยันได้ว่าวิธีการวางชิ้นวัน 6 ชิ้นยังคงใช้ในการเก็บรักษาเชื้อได้ดี ส่วนจากการตัดแปลง การไม่ใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) ต่อกับโถดูดความชื้น (desiccators) ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ คือแผ่นกระดาษกรองสามารถแห้งได้ภายใน 7 วัน แต่ในกรรมวิธีอ้างอิงที่ต่อกับปั๊มสุญญากาศ สามารถแห้งได้ภายในวันที่ 10 เนื่องจากปริมาณของแผ่นกระดาษที่ใส่อาจจะมีผลต่อการแห้งของแผ่นกระดาษได้ ซึ่งจากการทดลองได้วางแผ่นกระดาษจำนวน 24 แผ่นลงในโถดูดความชื้น ก็ยังสามารถแห้งได้ภายในเวลา 7 วัน ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธี Filter paper จึงเหมาะที่จะเก็บเชื้อรา F 221-B เนื่องจาก

ขั้นตอนการเก็บรักษาเชื้อนั้น ง่าย ไม่ยุ่งยาก อีกทั้งยังไม่พบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นในระหว่างการทดสอบ จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยของคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ธารทพย ภาสบุตร อภิรัชต์ สมฤทธิ์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และ พรพิมล อธิปัญญาคม. 2551. ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อรา *Colletotrichum* spp. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551 ฉบับที่ 3 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 1445-1463.
- ธิตี ทองคำงาม พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ ถนิมนันต์ เจนอักษร. 2556. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F 221-B) ในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 6 ชนิด ในระบบไฮโดรโปนิกส์ และลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ. ในการประชุมสัมมนาทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 6 หน้า 46-51.
- ATCC . 2011. Preservation and recovery of filamentous fungi . www.Atcc.org American type culture collection.
- Dahmen, H., Staub, T.H and Schwinn, F.J. 1982. Technique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. American Phytopathological Society 73(2): 241-246.
- Direkel, S. and Otag, F. 2013. Filamentous fungi isolated from clinical samples stored for a long time in the sand. Clinical Microbiology 2(1): 1-2.
- Espinel-Ingroff, A., Montero, D. and Martin-Mazuelos, E. 2004. Long-Term preservation of fungal isolation in commercially prepared cryogenic microbank vials. American Society for Microbiology 42(3): 1257-1258.
- Fong, Y.K., Anuar, S., Lim, H.P., Tham, F.Y. and Anderson, F.R. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. Mycologist 14(3): 127-130.
- Stocco, M., Monaco, C. and Cordo, C. 2010. A comparison of preservation methods for *Trichoderma harzianum* cultures. Revista Iberoamericana Micologia 27(4) : 213-215.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นาย ชิติ ทองคำงาม
วัน เดือน ปีเกิด	23 มีนาคม 2532
ภูมิลำเนา	143/21 ถนน คอนนง ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2550 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสุราษฎร์ธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี พ.ศ. 2554 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการ ศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2556 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการ ผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผลงานวิจัย

ชิติ ทองคำงาม พรหมมาศ คูหากาญจน์ และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2555. รายงานครั้งแรกของโรคเหี่ยวในผักสลัดที่ปลูกในระบบ NFT ที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* และการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรกับผักสลัด 4 สายพันธุ์. ในรายงานการประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 10 มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก หน้า 71-81.

ชิติ ทองคำงาม พรหมมาศ คูหากาญจน์ และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2556. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) ในด้านส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช 6 ชนิด ในระบบไฮโดรโปนิกส์ และลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 6 หน้า 46-51.

ชิติ ทองคำงาม พรหมมาศ คูหากาญจน์ และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2556. การประเมินความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพห้องปฏิบัติการของ *Trichoderma* ไอโซเลท ต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* สาเหตุโรคเหี่ยวของผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 31 (3): 57-67.

ชิติ ทองคำงาม และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2557. การประเมินเทคนิค Filter paper เพื่อเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (F221-B) การประชุมวิชาการเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก ประเทศไทย 28 - 30 ตุลาคม 2557.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถนิมนันต์ เจนอักษร **ชิตี ทองคำงาม** และ ฉัฐภรณ์ เหล็กสิงห์. 2557. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani*. การประชุมวิชาการเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 12 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก ประเทศไทย 28 - 30 ตุลาคม 2557.

ปิยาภรณ์ ทองบ้านไทร, **ชิตี ทองคำงาม** และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2559. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคมดัดค่างของข้าว (*Oryza sativa* L.). ในบทความวิชาการประชุมวิชาการวิทยากรหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติครั้งที่ 14 ณ โรงแรมเวียงอินทร์ เชียงราย 2-3 มิถุนายน 2559.

Thongkamngam T. and Jaenaksorn T. 2015. Colonization of plant root and punctured surface tissue by non-pathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum*. In Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology at A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand July 1-3, 2015.

Thongkamngam T. and Jaenaksorn T. 2015. Assessment of viability and efficacy of *Fusarium oxysporum* (F221-B) as BCA and PGPF during long term preservation. In Proceedings of 2nd International Symposium on Agricultural Technology at A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand July 1-3, 2015.

Thongkamngam, T. and Jaenaksorn, T. 2016. Efficacy of culture filtrate from *Fusarium oxysporum* F221-B against plant pathogenic fungi in vitro and *Fusarium* root rot and wilt disease in hydroponics. Journal of Agricultural Technology 12(3): 513-526.