รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เพื่อลดการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อฟูซาเรียม

Testing on the efficiency of endophytic bacteria as seed coating for Fusarium wilt disease reduction in tomato

รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์

ดร. พจนา สีขาว

นางสาว ปาณิศา ประสม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2561

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การทดสอบประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เพื่อลดการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อฟูซาเรียม

Testing on the efficiency of endophytic bacteria as seed coating for Fusarium wilt disease reduction in tomato

รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์

ดร. พจนา สีขาว

นางสาว ปาณิศา ประสม

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2561

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การทดสอบประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพื่อลดการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อฟูซาเรียม
แหล่งเงิน รายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร
ประจำปีงบประมาณ 2561 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 70,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2561
หัวหน้าโครงการ รศ.ดร พรหมมาศ คูหากาญจน์
ผู้ร่วมโครงการ ดร. พจนา สีขาว
นางสาวปาณิศา ประสม
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกและคัดเลือก endophytic bacteria โดยแยกจากส่วนต่างๆได้แก่ ราก ลำต้น และใบ ของต้นมะเขือเทศที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเด่นทางด้านการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช หรือสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช นำมาเคลือบเมล็ดพันธุ์เพื่อการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. และส่งเสริมการเจริญเติบโตมะเขือเทศ

ในการแยก endophytic bacteria สามารถแยกได้จำนวน 43 ไอโซเลท จากการศึกษาลักษณะเบื้องต้นพบว่าส่วนใหญ่เป็นแกรมบวก เมื่อนำไปทดสอบกับต้นกล้ามะเขือเทศพบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ในบางไอโซเลทยังพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ต่อมานำ endophytic bacteria ทั้ง 43 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ ด้วยวิธี dual culture test พบว่ามี 25 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าว และมีเพียง 3 ไอโซเลท ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ SuRW02, SuRW01 และ LbRW03 โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 71.94, 68.33 และ 68.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองจึงได้ทำการคัดเลือก endophytic bacteria ไอโซเลท SuRW02 มาใช้ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สูง และยังมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ามะเขือเทศอีกด้วย

จากนั้นได้นำมาทดสอบความสามารถในการลดการเกิดโรค พบว่าการใช้เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria (SuRW02) สามารถลดการเกิดโรคในห้องปฏิบัติการได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ และสามารถลดได้ใกล้เคียงกับเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วยสารเคมีแคปแทน โดยสามารถลดการเกิดโรคได้ 34.75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศได้อีกด้วย

ในการศึกษาถึงระยะเวลาในการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์เคลือบเป็นระยะเวลา 4 เดือน ในด้านคุณภาพเมล็ดพันธุ์ พบว่าการเคลือบเมล็ดพันธุ์ในแต่ละกรรมวิธีไม่ส่งผลกระทบต่อความชื้นของเมล็ดพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่า เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria สามารถรักษาความงอกของเมล็ดพันธุ์ได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นๆ โดยหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ 94 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ และเมล็ดพันธุ์เคลือบด้วยสารเคลือบเพียงอย่างเดียวมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ 91.5 และ 92.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ในส่วนของปริมาณ endophytic bacteria บนเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือจำหน่าย ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria มีปริมาณลดลงเรื่อยๆ จาก 5.15 เป็น 2.54 logcfu/กรัม เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหากเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานอาจทำให้ประสิทธิภาพของในการควบคุมโรคของเมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria ลดลง

คำสำคัญ : เอนโดไฟติกแบคทีเรีย การเคลือบเมล็ดพันธุ์ มะเขือเทศ โรคเหี่ยวจากฟูซาเรียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Testing on the efficiency of endophytic bacteria as seed coating for Fusarium wilt disease reduction in tomato

Researcher : Assoc. Prof. Dr. Prommart Koohakan

Dr. Potjana Sikhao

Ms. Panisa Prasom

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

ABSTRACT

In this study, endophytic bacteria were isolated from root, stem and leaf of healthy tomato, then they were screened for potential isolate based on their antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* and ability to promote plant growth. Consequently, the selected isolate was used for seed coating to reduce Fusarium wilt disease.

The result showed that 43 isolates of endophytic bacteria isolated from this experiment were gram-positive bacteria. Initially effects of endophytic bacteria on the growth of tomato seedlings were tested. The results showed that most endophytic bacteria did not affect the growth of tomato seedlings and some isolates could promote the growth of tomato seedling. Subsequently, the selected isolates were tested on the antagonistic activity against *F. oxysporum* by dual culture technique. It was found that 25 isolates were antagonistic activity on the pathogen significantly compared with control. Among of these, only three isolates showed the ability to inhibit the pathogen growth more than 60 percent, namely SuRW02, SuRW01 and LbRW03, with the highest inhibition percentage of 71.94, 68.33 and 68.19 percent, respectively. From this result, SuRW02 was selected for seed coating, because it had the highest ability to inhibit the growth of *F. oxysporum* and also had the ability to promote the growth of tomato seedlings.

Testing on tomato seed coated with endophytic bacteria (SuRW02) found that this method could reduce disease incidence in laboratory conditions. Disease reduction by bacterial seed coating was similar to seed coated with Captan. It could reduce disease incidence at 34.75 percent. In addition, seed coated with endophytic bacteria could promote the growth of tomato plants significantly.

Study on storage time of seed coated with endophytic bacteria, coated seed could be kept for 4 months, without any detrimental effect on seed quality such as seed moisture content. In addition, seed coated with endophytic bacteria could maintain seed germination higher than other treatment. After 4 months of storage, seed coated with endophytic bacteria had a germination rate at 94 percent, while uncoated seed and seed

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

coated without endophytic bacteria had a germination rate at 91.5 and 92.5 percent, respectively. However, the amount of endophytic bacteria content on seed coated with endophytic bacteria was decreased steadily from 5.15 to 2.54 logcfu / g at 4 months of storage. It indicated that long time storage of seed coated with endophytic bacteria might decrease the efficacy for controlling disease.

Keywords: endophytic bacteria, seed coating, tomato, Fusarium wilt disease

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) ในการสนับสนุนทุนวิจัยจากเงินรายได้คณะเทคโนโลยีการเกษตร ประจำปีงบประมาน 2561 รหัสโครงการ 2561-01-04-013 ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้โอกาสในการการดำเนินโครงการวิจัย ตลอดทั้งบุคลากรและผู้ที่เกี่ยวข้อง ทุกท่านในการช่วยติดต่อประสานงาน และสนับสนุนการดำเนินโครงการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**iii**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**v**
กิตติกรรมประกาศ	**vii**
สารบัญ	**viii**
สารบัญตาราง	**x**
สารบัญภาพ	**xi**
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	3
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 การแยกเชื้อ การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค	7
3.2 การแยกและคัดเลือก endophytic bacteria ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของมะเขือเทศ	7
3.3 การคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อโรค	8
3.4 การทดสอบความเหมาะสมของสารเคลือบเมล็ดพันธุ์ต่อความมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria และคุณภาพเมล็ดพันธุ์หลังการเคลือบ	8
3.5 การทดสอบความสามารถในการควบคุมโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเมล็ดเคลือบ endophytic bacteria ในห้องปฏิบัติการ	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1. เชื้อสาเหตุโรคและความสามารถในการก่อโรค	11
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ endophytic bacteria และผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศ	11
4.3 ประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา Fusarium oxysporum สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ	18
4.4 ความมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria และคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ระหว่างการเก็บรักษา	20
4.5 ประสิทธิภาพในการควบคุมโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเมล็ดเคลือบด้วย endophytic bacteria ในห้องปฏิบัติการ	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 วิจารณ์ผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง 24

5.2 สรุปผลการวิจัย 27

5.3 ข้อเสนอแนะ 27

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 การเผยแพร่ผลงาน 28

6.2 การผลิตบัณฑิต 28

เอกสารอ้างอิง 29

ภาคผนวก ก

- แบบรายงานการใช้จ่ายเงินในโครงการ 34

ภาคผนวก ข

- เอกสารผลผลิตงานวิจัย 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ endophytic bacteria ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นมะเขือเทศ	13
4.2	ผลของ endophytic bacteria ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศ	17
4.3	ประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของ *endophytic bacteria* จำนวน 43 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*	19
4.4	ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านและไม่ผ่านการเคลือบด้วยกรรมวิธีต่างๆ หลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน	21
4.5	ความงอกของเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านและไม่ผ่านการเคลือบด้วยกรรมวิธีต่างๆหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน	22
4.6	ความสามารถในการควบคุมโรค และ การเจริญเติบโตของเมล็ดเคลือบด้วย endophytic bacteria ในห้องปฏิบัติการ	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*	11
4.2	อาการเหี่ยวของต้นกล้ามะเขือเทศหลังจากการปลูกเชื้อ 7 วัน	11
4.3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ endophytic bacteria ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นมะเขือเทศ	13
4.4	ผลการทดสอบ Dual-culture ของ endophytic bacteria จำนวน 7 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์	18
4.5	เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศก่อนเคลือบและหลังเคลือบ	20
4.6	ปริมาณแบคทีเรียที่เคลือบบนเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน	21
4.7	ความยาวของต้นกล้ามะเขือเทศที่อายุ 7 วัน	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill) เป็นพืชที่ได้รับความนิยมในการนำมาบริโภค เนื่องจากมีคุณค่าทางสารอาหารมากมาย จึงมีประโยชน์ทั้งทางด้านครัวเรือน และทางด้านอุตสาหกรรม จึงนิยมนำมารับประทานทั้งผลสด และปรุงสุก ทั้งยังมีการแปรรูปเป็นอาหารอื่นๆ เช่น น้ำมะเขือเทศ ซอสมะเขือเทศ และมะเขือเทศอบแห้ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีคุณประโยชน์ด้านความงามอีกด้วย ซึ่งในการบริโภคมะเขือเทศในลักษณะรับประทานสดนั้นจะต้องมีความปลอดภัย ปราศจากสารเคมีตกค้างโดยในการผลิตพืชผักที่ปราศจากสารเคมีนั้นต้องเริ่มตั้งแต่การเลือกเมล็ดพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ ทีสำคัญต้องปราศจากโรค เนื่องจากโรคที่ติดมากับเมล็ดอาจเข้าทำลายพืชในระยะเพาะกล้าได้สร้างความเสียหายต่อผลผลิต โดยการเพาะกล้าเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตพืชผัก หากเชื้อโรคเข้าทำลายพืชแล้วจะส่งผลให้ผลผลิตลดลงได้ (พิศาล,2530) นอกจากโรคที่ติดมากับเมล็ดแล้วยังมีโรคทางดินที่สามารถเข้าทำลายพืชในระยะเพราะกล้าได้เช่นกัน ซึ่งในมะเขือเทศโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL) เป็นโรคที่สำคัญอีกโรคหนึ่ง โดยโรคดังกล่าวสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะ (วัชรา และคณะ, 2557) หากเชื้อดังกล่าวจะเข้าทำลายพืชในระยะต้นกล้าส่งผลกระทบทำให้ไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ดังนั้นการควบคุมโรคตั้งแต่เมล็ดพันธุ์จึงเป็นสิ่งสำคัญ ปัจจุบันมีการพัฒนาการผลิตเมล็ดพันธุ์ด้วยเทคโนโลยีการเคลือบ (seed coating) ขึ้นเพื่อเป็นการเพิ่มคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ และยังสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ให้ยาวนานขึ้น โดยการเคลือบเมล็ดจะเป็นการหุ้มเมล็ดด้วยฟิล์มบางๆ ลักษณะเมล็ดไม่มีการเปลี่ยนแปลง การเคลือบเมล็ดประกอบไปด้วยสารออกฤทธิ์ไม่ว่าจะเป็น สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ฮอร์โมนส่งเสริมการเจริญเติบโต รวมถึงธาตุอาหารต่างๆ ร่วมกับสารยึดเกาะที่จะเป็นตัวผสานสารออกฤทธิ์ให้ติดแน่นกับเมล็ด โดยสารเคลือบที่ใช้จะต้องไม่ส่งผลกระทบต่อเมล็ดพันธุ์ ทั้งยังสามารถเพิ่มสารออกฤทธิ์ต่างๆได้เช่นกัน (ภาณี และคณะ, 2540; ภาณี และ คณะ, 2541; จักรพงษ์ และบุญมี, 2557;สุริยา และบุญมี, 2557) เดิมการเคลือบเมล็ดเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคจะใช้การเคลือบด้วยสารเคมีเป็นส่วนใหญ่ ต่อมาได้มีการพัฒนาการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีอื่นๆเพื่อลดการใช้สารเคมี ซึ่งการใช้เชื้อจุลินทรีย์เคลือบเมล็ดแทนสารเคมีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจ ปัจจุบันได้มีการศึกษาการนำเชื้อจุลินทรีย์มาเคลือบเมล็ดกันมากขึ้น เช่น *Bacillus subtilis* ควบคุมเชื้อ *Acidovorax avenaec* และ *Pseudomonas fluorescence* หรือ *Trichoderma* sp. ควบคุมเชื้อ *Rhizoctonia solani* เป็นต้น นอกจากการควบคุมโรคแล้ว เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วย (สุพจน์ และคณะ, 2554; กุศล และพิศาล, 2555; Elad *et al*., 1982 and Tu *et al.*, 2016)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำ endophytic bacteria ที่แยกได้จากต้นมะเขือเทศที่สมบูรณ์ แข็งแรง และผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา FOL ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของมะเขือเทศ มาเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เพื่อเป็นแนวทางในการช่วยเพิ่มคุณภาพของเมล็ดพันธุ์และเป็นการป้องกันกำจัดโรคในระยะต้นกล้า สำหรับใช้เป็นแนวทางในการผลิตพืชปลอดภัยในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.เพื่อแยกและคัดเลือก endophytic bacteria ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของมะเขือเทศ

2 เพื่อแยกและคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อ *Fusarium* sp.

3.เพื่อเพิ่มคุณภาพเมล็ดพันธุ์ มะเขือเทศจากการเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย endophytic bacteria

4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเมล็ดเคลือบ endophytic bacteria ในการลดการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp.

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการใช้เชื้อ endophytic bacteria ที่แยกจากต้นมะเขือเทศที่แข็งแรง มาควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราฟิวซาเรี่ยมในมะเขือเทศ รวมทั้งคุณสมบัติในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต ด้วยวิธีการเคลือบเมล็ด โดยทำการทดลอง ณ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp. รวมทั้งพัฒนาสูตรที่เหมาะสมในการเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ตลอดจนความมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria ที่ส่งผลในการควบคุมโรค เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ผลิตผักปลอดภัยในอนาคต ตลอดจนนำผลงานวิจัยเผยแพร่ในวารสารวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การเคลือบเป็นเทคโนโลยีที่มีการพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งมีการพัฒนามาจากอุสาหกรรมการผลิตยา โดยจะหุ้มเมล็ดด้วยวัสดุลักษณะเป็นสารเหนียว ในลักษณะเป็นฟิล์มบางๆ ร่วมกับสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติต่างๆ เช่นสารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต ธาตุอาหาร สารบ่งบอกเอกลักษณ์ อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งเมล็ด รูปร่างของเมล็ดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Sharma *et al*., 2015) รวมทั้งสารป้องกันกำจัดแมลง (Kaufman, 1991) สารเหล่านี้จะยึดติดไปกับเมล็ดไม่ให้หลุดร่วง ทำให้ลดปริมาณการใช้สารเคมีให้น้อยลง ทั้งยังสามารถลดขั้นตอนการเตรียมเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกได้ (Hanssan *et al*., 1990) โดยวัตถุประสงค์ในการเคลือบนั้นจะขึ้นอยู่กับการนำไปใช้ประโยชน์

2.1.1 องค์ประกอบของสารเคลือบเมล็ดพันธุ์

1. สารออกฤทธิ์

ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์ สารออกฤทธิ์เป็นส่วนที่สำคัญ โดยสารออกฤทธิ์ที่ใช้จะขึ้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการเคลือบ เช่น การเคลือบเพื่อต้องการส่งเสริมการเจริญเติบโต สารออกฤทธิ์ที่ใช้จะเป็นสารจำพวกธาตุอาหาร ฮอร์โมนพืช หรือสารเร่งการเจริญเติบโต การเคลือบเพื่อป้องกันโรค สารออกฤทธิ์ที่ใช้จะเป็นสารเคมีป้องกันเชื้อโรค และแมลง และการเคลือบเพื่อป้องกันการปลอมแปลงเมล็ดพันธุ์ สารออกฤทธิ์ที่ใช้จะเป็นสารที่สร้างเอกลักษณ์แก่เมล็ดพันธุ์ เป็นต้น โดยเฉพาะสารเคมีฆ่าเชื้อราเป็นสารออกฤทธิ์ที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากคุณสมบัติที่สามารถป้องกันเมล็ดจากเชื้อราในโรงเก็บ และเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ (Sharma *et al*., 2015)

2. สารยึดเกาะ

สารยึดเกาะเป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นส่วนผสานให้สารออกฤทธิ์ยึดติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ไม่หลุดร่วงระหว่างการเคลื่อนย้าย ซึ่งหากมีการหลุดร่วงจะทำให้ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ลดลง นอกจากนี้สารเคลือบยังหน้าที่ในการห่อหุ้มเมล็ดพันธุ์ ป้องกันความชื้นจากภายนอกไม่ให้เข้าสู่เมล็ด ซึ่งเป็นสาเหตุให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพระหว่างเก็บรักษา (Pamuk, 2004) วิธีการดังกล่าวจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ให้ยาวนานขึ้น โดยชนิดของสารยึดเกาะได้แก่ starch, pregelatinized starch, gelatin, sugar, acacia, tragacanth, polyvinylpyrrolidone (PVP หรือ Kollidon), methylcellulose (MC), sodium carboxymethylcellulose, ethylcellulose, hydroxypopylmethyl cellulose (HPMC), polyacrylamides, polyvinyloxoazolidones, polyethylene glycol, precirol (เพียรกิจ, 2530) ซึ่งสารยึดเกาะแต่ละชนิดจะมีความยืดหยุ่น และความสามารถในการยึดเกาะกับเมล็ดที่แตกต่างกัน ทำให้มีการซึมผ่านของน้ำและความชื้นต่างกันด้วย ดังนั้นการเลือกใช้จะต้องคำนึงถึงความเหมาะสมด้วย จากรายงานดังกล่าวจะเห็นได้ว่าสารเคลือบแต่ละชนิดมีผลต่อประสิทธิภาพของเมล็ดแตกต่างกันไป ต้องเลือกใช้ให้เหมาะสม จากการงานวิจัยของ Kumar *et al*. (2007) ที่ศึกษาผลของ polymers ต่างๆในการเคลือบเมล็ดถั่วเหลืองได้แก่ gum acacia, gum tragacanth, rosin, ethyl cellulose, hydroxy ethyl cellulose, polyethyl methacrylate, methyl cellulose, polyethylene glycol, polyvinyl chloride, polyvinyl acetate, polyvinyl pyrrolidone, Agrimer VA 6, the clay bentonite และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

thiram 75 DS ต่อคุณภาพเมล็ดในการเก็บรักษา พบว่าเมล็ดที่มีการเคลือบด้วย polymers ต่างๆ มีผลต่อการเก็บรักษาเมล็ดในโรงเก็บ โดยเมล็ดที่มีการเคลือบจะมีการเสื่อมคุณภาพช้าลงหลังจากการเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 6 เดือนเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่มีการเคลือบ (control) ทั้งยังสารมารถป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อราในโรงเก็บได้ดีกว่า control นอกจากนี้จากผลการทดลอง Polymers ที่มีประสิทธิภาพที่สุดได้แก่ polyethyl methacrylate, polyvinyl acetate และ polyvinyl pyrrolidone

3. ตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ในการเคลือบเมล็ดนั้นจะมีลักษณะเป็นของเหลวที่ระเหยได้ โดยจะทำหน้าที่ละลายสารยึดเกาะที่เป็นของแข็งหรือมีความหนืดสูงให้เป็นเนื้อเดียวกัน และทำให้เกิดการกระจายตัวกับสารออกฤทธิ์และสารเติมแต่งอื่นๆ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่พาสารเหล่านี้ไปยังผิวของเมล็ดพันธุ์ที่จะเคลือบ (ปราโมทย์, 2534 และ พจนา, 2559) โดยตัวทำละลายที่ดีควรจะต้องมีความสามารถละลายหรือทำให้พอลิเมอร์และส่วนประกอบอื่นๆ เกิดการกระจายตัวในสารเคลือบเมล็ดพันธุ์ได้ ไม่มีความหนืดมากเกินไป ควรเป็นสารที่มีอัตราการทำให้แห้งเร็ว และไม่เกิดมลภาวะเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ น้ำ, ethanol, methanol, isopropanol, chloroform, acetone, methyl ethyl ketone และ methyl chloride (ปราโมทย์, 2534)

4. พลาสติกไซเซอร์

เป็นสารที่เติมลงในสารเคลือบเพื่อให้ฟิล์มที่ได้มีความอ่อนตัว ยืดหยุ่นดี มีความทนทานสูง และมีการยึดเกาะกับสารอื่นได้ดี (ปราโมทย์, 2534 และพจนา, 2559) โดยพลาสติกไซเซอร์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจะต้องมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของพอลิเมอร์ที่มีการปรับสภาพ ดังเช่น พอลิเมอร์ในกลุ่ม water-soluble cellulose ethers ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในสัดส่วนมาก สารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล เช่น polyols (glycerol, propylene glycol และ polyethylene glycols) จะเป็นพลาสติกไซเซอร์ที่ดีที่สุดให้กับพอลิเมอร์กลุ่มนี้ ในทางตรงกันข้ามสารกลุ่ม organic esters โดยเฉพาะอย่างยิ่ง citric acid และ phthalic acids จะเป็นพลาสติกไซเซอร์ที่ดีที่สุดให้กับพอลิเมอร์กลุ่ม cellulose ethers ที่มีขั้วน้อยกว่า ซึ่งได้แก่ cellulose acetate phthalate และ hydroxypropylmethylcellulose phthalate (พจนา, 2559)

5. สี

สีจะใช้ในการช่วยให้เมล็ดพันธุ์ที่เคลือบมีความสวยงามเป็นเอกลักษณ์ และสามารถบ่งบอกความแตกต่างของเมล็ดพันธุ์ เพื่อสำหรับจะนำไปใช้เพาะปลูกไม่ควรนำไปบริโภคหรือเลี้ยงสัตว์ สีที่ใช้ควรเป็น pigments หรือ insoluble dyes ที่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ใช้ เพราะทำให้ได้เมล็ดพันธุ์ที่มีสีไม่สม่ำเสมอ (พิสิทธิ์ และ ภารุณี, 2535 และพจนา, 2559)

6. สารเติมแต่ง

จะเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารห่อหุ้ม และเพิ่มความเนียน ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ที่มีผงละเอียดมาก ใช้เพื่อช่วยลดปริมาณของสี แต่จะใช้เมื่อไม่ต้องการให้ฟิล์มโปร่งแสงเท่านั้น สารห่อหุ้มและเพิ่มความเนียนที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ titanium dioxide เนื่องจากทำให้สีสะท้อนเป็นเงาสวย นอกนี้ยังมีสารอีกหลายๆชนิด เช่น silicate (talcum, aluminum silicate), carbonate (magnesium carbonate), sulfate (calcium sulfate), oxides (magnesium oxide) และ hydroxide (aluminium hydroxide) (พิสิทธิ์ และ ภารุณี, 2535; ปราโมทย์, 2534; พจนา, 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 วิธีการเคลือบเมล็ด

ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์นั้นจะมี 2 วิธีการ คือการเคลือบตามลักษณะของการปล่อยสารเคลือบของเครื่องพ่น ได้แก่ เครื่องเคลือบเมล็ดระบบจานหมุน และเครื่องเคลือบเมล็ดระบบการฉีดพ่น โดยมีกระบวนการคือในระบบจานหมุนจะเป็นการเคลือบเมล็ดโดยเติมสารเหนียวลงในเครื่องจานหมุน และความเร็วในการหมุนเป็นส่วนช่วยในการทำให้สารเคลือบเคลือบเมล็ดอย่างสม่ำเสมอ ในระบบการฉีดพ่นสารเคลือบจะถูกฉีดพ่นเป็นละอองออกจากหัวพ่นภายในเครื่อง และเคลือบลงบนเมล็ดที่กลิ้งอยู่ภายในเครื่องทำให้สารเคลือบเคลือบเมล็ดอย่างสม่ำเสมอ และรูปร่างเมล็ดจะไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากการเคลือบ (Kaufman,1991; Sharma *et al*., 2015)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 การใช้จุลินทรีย์เคลือบเมล็ดเพื่อลดการเกิดโรค

Georgakopoulos *et al.* (2002) รายงานว่าเมล็ดแตงกวาที่เคลือบด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens* และ *P. corrugata* มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคเน่าคอดินของแตงกวา และ sugar beet ที่เกิดจากเชื้อ *Pythium ultimum* ได้ และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ยังสามารถมีชีวิตรอดนานถึง 24 เดือน

Shweta *et al.* (2008) พบว่าการเคลือบเมล็ดด้วย *Pseudomonas fluorescens* สามารถลดการเกิดโรค charcoal rot ที่เกิดจากเชื้อ *Macrophomina phaseolina* ในถั่วลิสงได้ โดยสามารถลดอาการของโรคได้มากถึง 61-70 เปอร์เซ็นต์ ที่ 30-105 วันหลังจากปลูก นอกจากนี้เชื้อดังกล่าวยังสามารถเพิ่มผลผลิตของถั่วลิสงได้

Hu *et al.* (2011) ทดลองโดยปลูกเมล็ดผักกาดใน 2 พื้นที่ในประเทศจีนที่มีได้รับผลกระทบจากเชื้อ *Sclerotinia sclerotiorum* พบว่าเมล็ดที่ทำการพอกเมล็ดร่วมกับเชื้อ *Bacillus subtilis* Tu-100 มีประสิทธิภาพในการลดโรคที่เกิดจากเชื้อ *S. sclerotiorum* เห็นได้จาก น้ำหนักแห้ง ดัชนีการเกิดโรค อัตราการเกิดโรค และผลผลิต เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพอกเมล็ด และการพอกเมล็ดเพียงอย่างเดียว

กุศล และพิศาล (2558) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ต่อเชื้อรา *Botryophaeria rhodina* สาเหตุโรคยางไหล (gummosis) ของแตง จำนวน 14 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B006 สามารถควบคุมเชื้อดังกล่าวได้ ต่อมาได้นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวมาผสมกับสารเคลือบเมล็ด 4 สูตร ได้แก่ BS-coat1, BS-coat2, BS-coat3 และ BS-coat4 เมื่อตรวจสอบการคงมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ตลอดจนผลกระทบของสารเคลือบชีวภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อคุณภาพของเมล็ด พบว่าหลังจากการเก็บรักษาเมล็ดที่เคลือบและไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4 เดือน ยังคงพบเชื้อแบคทีเรียบริเวณผิวเมล็ดมีปริมาณแบคทีเรียที่ $7x10^5$ ถึง $10.78x10^6$ cfu/เมล็ด และเชื้อดังกล่าวยังคงมีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Botryophaeria rhodina* ไม่แตกต่างจากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B006 ดั้งเดิม ทั้งนี้ยังพบว่าสารเคลือบเมล็ดที่ผสมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่มีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดแตง โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 95-100 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างจากเมล็ดที่ไม่มีการเคลือบเมล็ด และยังพบว่าต้นกล้าของแตงที่ได้จากเมล็ดที่ทำการเคลือบเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ไม่พบการเจริญที่ผิดปกติอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การใช้เชื้อแบคทีเรียในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium* sp.

Larkin *et al.* (1998) ทำการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* และ *Burkholderia cepacia* ควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. ในระยะต้นกล้า ผลการทดลองพบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 30 ถึง 65 เปอร์เซ็นต์

Chandel *et al.* (2010) รายงานว่า เชื้อ *Brevibacillus brevis* ลดการเกิดโรคมะเขือเทศ ที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศได้อีกด้วย

Nandhini *et al.* (2012) ได้ทำการทดสอบการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ด้วย endophytic bacteria ที่แยกจาก ราก ลำต้น ใบ และ ผล จากการทดสอบพบว่า endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์ได้แก่ *Bacillus, Pseudomonas, Klebsiella* และ *Citrobacter*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อ การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

ทำการแยกเชื้อรา *Fusarium* oxysporum f. sp. *lycopersici* (FLO) สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศและการทดสอบโรคด้วยวิธี Tissue transplanting technique จนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นทำการตรวจสอบทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจัดจำแนกเชื้อ

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา FOL ทำโดยนำเชื้อที่แยกได้มาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อที่ความเข้มข้น 1×10^{6}spore/ml การทดสอบนำต้นกล้ามะเขือเทศที่มีอายุ 3 สัปดาห์ มาทำการตัดรากเพื่อทำแผล และจุ่มลงในสารแขวนลอยสปอร์ที่เตรียมไว้เป็นเวลา 20 นาที ย้ายปลูกลงในกระถาง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีจุ่มในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (control) จากนั้นประเมินความรุนแรงของโรค สัปดาห์ที่ 2 หลังจากการปลูกเชื้อโดยให้คะแนน 0-3 คะแนน (0 = ไม่แสดงอาการของโรค 1= พืชแสดงอาการเหี่ยวชั่วคราว/เฉพาะเวลากลางวัน (temporary wilt) 2= พืชแสดงอาการเหี่ยวถาวร (permanent wilt) 3= ต้นมะเขือเทศตาย)โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Marlattet al., 1996 เลือกสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมากที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิธีการละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น

3.2 การแยกและคัดเลือก endophytic bacteria ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของมะเขือเทศ

ทำการแยก endophytic bacteria จากมะเขือเทศที่มีความแข็งแรง โดยแยกจากราก ลำต้น กิ่งและแขนงใบ โดยการนำส่วนต่างๆ ของพืช มาฆ่าเชื้อบริเวณผิวโดยการใช้แช่ ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ตามด้วยแช่ Clorox 10 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง และซับด้วยกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมาบดด้วยโกร่ง แล้วนำสารแขวนลอยที่ได้มาเจือจางไปที่ 10^{-1}-10^{-4} และนำสารแขวนลอยแต่ละความเข้มข้นไปเพาะเชื้อด้วยวิธี pour plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Nutrient agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีโคโลนีเกิดขึ้นทำการย้ายโคโลนีเดี่ยวแต่ละโคโลนี ลงบนอาหาร NA ด้วยการ streak plate เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

การคัดเลือก endophytic bacteria ทำโดยเลี้ยง endophytic bacteria ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) นำไปเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนนำส่วนที่เป็น pellet มาใช้ในการทดลอง โดยปรับความเข้มข้นให้เท่ากับสารละลาย Mcfaland เบอร์ 0.5 หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยแบคทีเรียใส่ลงในกระถางที่เพาะต้นกล้ามะเขือเทศที่มีอายุ 3 วัน ด้วยพีทมอสที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางแผนการทดสอบแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ทำการตรวจนับต้นกล้าที่รอดชีวิตที่ระยะเวลา 7 วัน พร้อมทั้งเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตได้แก่ ความสูงของลำต้น น้ำหนักรวม น้ำหนักราก จำนวนใบ แล้วนำมาคำนวณหาค่าดัชนีการเจริญเติบโตของต้นกล้า seedling vigor index (svi) ดังสูตร

svi = ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอก x ค่าเฉลี่ยน้ำหนักรวมต่อต้น

$$\% \text{ svi} = \frac{\text{ค่า svi ทรีตเมนต์}}{\text{ค่า svi ชุดควบคุม}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

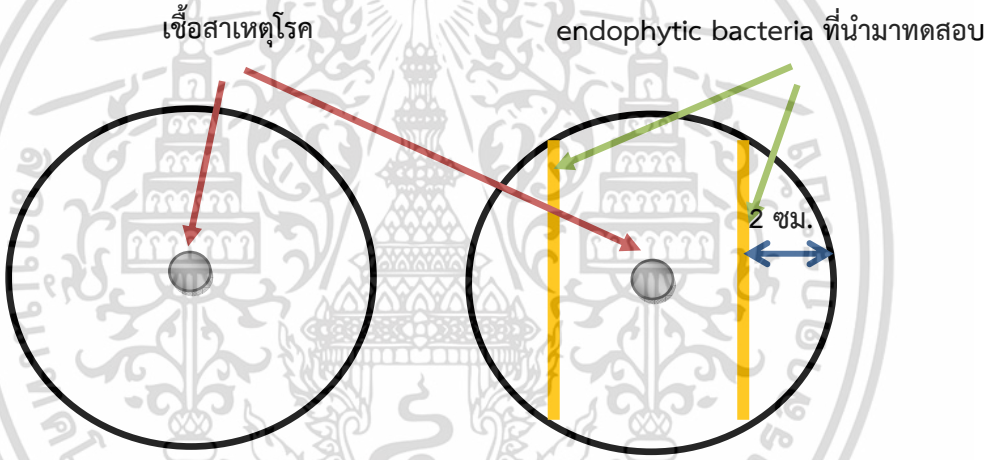
3.3 การคัดเลือก endophytic bacteria ที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อโรค

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ทำโดยเลี้ยงเชื้อรา FOL ในอาหาร PDA จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยง ในส่วนของ endophytic bacteria ทำการเลี้ยงบนอาหาร NA ทำการทดสอบด้วยวิธี dual culture test โดยเจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อก่อโรค วางบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นขีด endophytic bacteria บริเวณด้านบน ด้านซ้าย และด้านขวา ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ดังภาพ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบขนาดของโคโลนีเชื้อก่อโรคเมื่อกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการขีดเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (growth inhibition = GI) โดยใช้สูตร

$$GI = \frac{C-T \times 100}{C}$$

C = ขนาดโคโลนีของเชื้อราในจานอาหารควบคุม (control)

T = ขนาดโคโลนีของเชื้อราในจานอาหารทดสอบ



หลังจากได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดแล้วทำการตรวจคุณสมบัติเบื้องต้นของ endophytic bacteria เพื่อแบ่งกลุ่มเชื้อ และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 การทดสอบความเหมาะสมของสารเคลือบเมล็ดพันธุ์ต่อความมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria และคุณภาพเมล็ดพันธุ์หลังการเคลือบ

(1) การเตรียมผงชีวมวล endophytic bacteria

การเตรียมผงชีวมวล endophytic bacteria ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์ เตรียมตามวิธีของกุศล และพิศาล (2558) โดยนำ endophytic bacteria ที่จากการทดสอบในข้อ 1.2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ที่เติม กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย skim milk 10 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนตะกอนแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 กรัม ต่อ skim milk 5 มิลลิลิตร นำไประเหิดให้แห้งเพื่อให้ได้ผงมวลชีวภาพเชื้อ ตรวจนับจำนวนเซลล์จากผงชีวมวลต่อกรัม เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) การเคลือบเมล็ดพันธุ์

ในการเตรียมสารเคลือบเมล็ดพันธุ์ สารยึดเกาะที่ทำหน้าที่เป็นกาวที่ใช้ทดสอบมี 3 ชนิด ได้แก่ polyvinyl pyrrolidone (PVP-K30) 3 เปอร์เซ็นต์ polyvinyl pyrrolidone (PVP-K90) และ polyvinyl alcohol 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เติม polyethylene glycol (PEG) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่น และเพิ่มสีผสมอาหารเพื่อสร้างความแตกต่างของเมล็ดพันธุ์ในแต่ละกรรมวิธี ในการทดลองนี้จะใช้ endophytic bacteria เป็นสารออกฤทธิ์ โดยขั้นตอนในการเคลือบเมล็ดพันธุ์จะนำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมาทำความสะอาดด้วย sodium hypochlorite 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 รอบ ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ และเคลือบเมล็ดด้วยสารเคลือบแต่ละสูตรที่ผสมผงมวลชีวภาพของเชื้อ อัตราสารเคลือบเมล็ดพันธุ์ 150 มิลลิลิตรต่อเมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม ที่ปริมาณเซลล์แบคทีเรีย $1x10^8$ cfu/เมล็ดพันธุ์ ด้วยเครื่องเคลือบเมล็ดพันธุ์แบบจานหมุนนำเมล็ดพันธุ์มาลดความชื้นให้อยู่ในระดับเดิมเก็บรักษาเมล็ดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(3) การตรวจนับปริมาณ endophytic bacteria

ทำการสุ่มเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบแล้วจากข้อ 2.1 ตรวจนับ endophytic bacteria บริเวณเมล็ดพันธุ์ โดยนำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำน้ำที่ได้มานับจำนวนเชื้อด้วยวิธี serial dilution plating technique ด้วยอาหาร NA วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกับเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ผ่านการเคลือบ และเมล็ดพันธุ์เคลือบโดยไม่ใส่ endophytic bacteria

(4) การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากข้อ 2 มาตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ โดยสุ่มเมล็ดแต่ละกรรมวิธีมาตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ดังนี้ ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ ความงอกของเมล็ดพันธุ์ ดัชนีการงอก ความเร็วในการงอก และความแข็งแรงของต้นกล้าโดยมีลายละเอียดดังนี้

1) ความชื้นของเมล็ดพันธุ์

สุ่มเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการเคลือบแล้ว 5 กรัม มาอบด้วยเครื่อง Hot air oven จนน้ำหนักของเมล็ดมีความคงที่ จากนั้นนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความชื้นดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ-น้ำหนักเมล็ดหลังอบ)}}{\text{น้ำหนักเมล็ดก่อนอบ}} \times 100$$

2) ความงอกของเมล็ดพันธุ์

สุ่มเมล็ดพันธุ์ จำนวน 100 เมล็ด มาตรวจสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ โดยใช้กระดาษเพาะด้วยวิธี top of paper ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจนับต้นกล้าที่งอกปกติ หลังจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ 5 และ 14 วัน แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอกดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความงอก} = \frac{\text{(จำนวนต้นปกติที่งอก)}}{\text{จำนวนเมล็ดที่เพาะ}} \times 100$$

3) ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์

ตรวจนับตรวจนับต้นกล้าที่งอกปกติทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน และคำนวณดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์ดังสูตร

$$\text{ดัชนีการงอกของเมล็ดพันธุ์} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นกล้าที่งอกปกติ)}}{\text{จำนวนวันหลังเพาะ}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) ความเร็วในการงอกเมล็ดพันธุ์

ความเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์คำนวณได้ดังสูตร

ความเร็วในการงอกเมล็ดพันธุ์ = จ.น.ต้นกล้าปกติ 5 วันหลังเพาะ + จ.น.ต้นกล้าปกติ 14 วันหลังเพาะ

จ.น.วันที่ตรวจนับครั้งแรก (5 วัน) จ.น.วันที่ตรวจนับครั้งสุดท้าย (14 วัน)

หลังจากทำการตรวจสอบความเหมาะสมของสารเคลือบต่อความมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria และคุณภาพเมล็ดพันธุ์แล้ว คัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วยสารเคลือบที่เหมาะสมที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.5 การทดสอบความสามารถในการควบคุมโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเมล็ดเคลือบ endophytic bacteria ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบในห้องปฏิบัติการทำโดยเลี้ยงเชื้อรา FOL ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวมาเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ ที่ความเข้มข้น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อมานำเมล็ดพันธุ์แช่ลงในสารแขวนลอยเชื้อก่อโรคเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาเพาะด้วยวิธี top of paper จัดแผนการทดลองแบบ split plot in CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด ประกอบด้วย main plot ได้แก่ กลุ่มการทดลองที่ปลูกเชื้อ และไม่ปลูกเชื้อ

sub plot ได้แก่ ชนิดของเมล็ดพันธุ์

1) เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ
2) เมล็ดพันธุ์เคลือบไม่ใส่ endophytic bacteria
3) เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria
4) เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วยสารเคมี

ตรวจนับเมล็ดที่มีการงอกปกติหลังจากเพาะเมล็ดพันธุ์ 5 วัน และ 14 วัน คำนวณเปอร์เซ็นต์การงอก วัดการเจริญเติบโตของต้นกล้า โดยวัด ความสูง จำนวนใบ น้ำหนักต้น น้ำหนักราก คำนวณดัชนีความแข็งแรงของต้นกล้า (seedling vigour index : svi) ดังสูตร

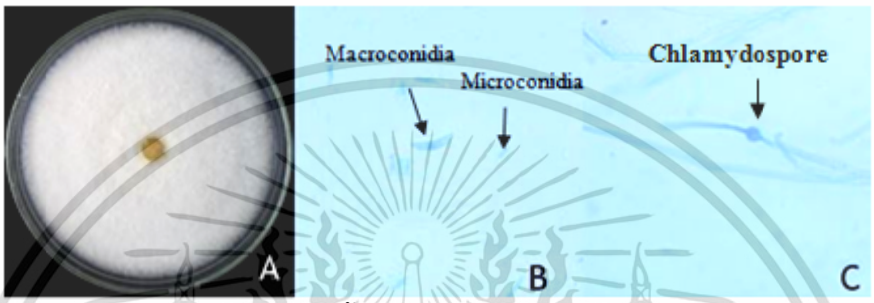
svi = [ความยาวของลำต้น(มิลลิเมตร) x ความยาวราก]xการอยู่รอด(%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

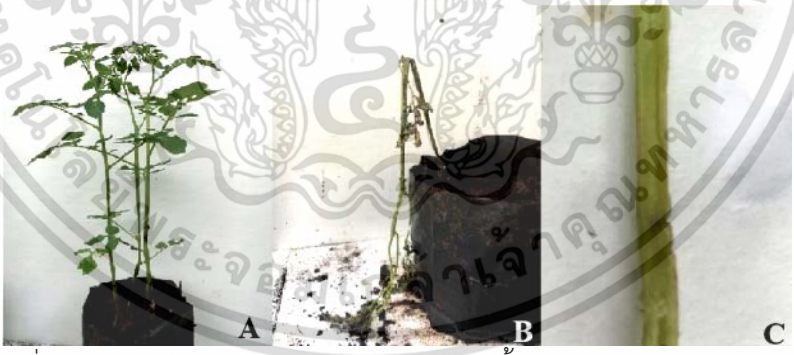
4.1. เชื้อสาเหตุโรคและความสามารถในการก่อโรค

จากการแยกเชื้อสาเหตุโรคจากต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคเหี่ยว พบเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว มีการสร้างเม็ดสี สีชมพูถึงสีม่วง บริเวณใต้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเส้นใยสีใส มีผนังกั้น และมีการสร้างสปอร์ 3 ชนิด ได้แก่ chlamydospore microconidia และ macroconidia (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (A =colonyบนอาหารPDA อายุ 7วัน B = microconidia และ macroconidia C = chlamydospore)

ในส่วนของความสามารถในการก่อโรคพบว่า เมื่อทำการปลูกเชื้อดังกล่าวลงบนต้นมะเขือเทศ ทำให้ต้นแสดงลักษณะอาการเหี่ยวถาวร และตายในที่สุด และเมื่อผ่าลำต้นพบสีน้ำตาลบริเวณท่อลำเลียง หลังจากการปลูกเชื้อ 7 วัน (ภาพที่ 4.2) โดยมีความรุนแรงของโรคอยู่ที่ 2.4 คะแนน และมีอัตราการเกิดโรคที่ 80 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.2 อาการเหี่ยวของต้นกล้ามะเขือเทศหลังจากการปลูกเชื้อ 7 วัน (A =กรรมวิธีควบคุม B = กรรมวิธีปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* C = ลักษณะท่อลำเลียงน้ำมีสีน้ำตาล)

4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ endophytic bacteria และผลต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศ

จากการแยก endophytic bacteria จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ (ราก ใบ และลำต้น) ของต้นมะเขือเทศที่มีความแข็งแรง สามารถแยกได้ทั้งหมด 43 ไอโซเลท มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย จากการทดสอบ gram stain พบว่าเป็นแกรมบวกจำนวน 34 ไอโซเลท ได้แก่ LaRW01, LaRW02, LaRW03, LaRY01, LaKY01, LaKY02, LaKY03, LaKW01, LaKW02, LaLY01, LaLY02, LaLY03, LaTY01,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LaTO01, SuLW01, SuLW02, SuLW03, SuLW04, SuLY01, SuLY02, SuLY03, SuLO01, SuRW01, SuRW02, SuRW03, SuRW04, SuRY01, SuRY02, SuRY03, SuRB01, SuRB01, SuKY01, LbTW01, LbLW01, LbRW01, LbRW02, และ LbRW03 เป็นแกรมลบ 9 ไอโซเลท ได้แก่ LaRW02, LaLW01, LaLW02, LaLW03, LaTY02, LaTW01, SuRY03, SuTW01 และ LbLW02 (ตารางที่ 4.1)

ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกพบลักษณะดังนี้

ลักษณะสีของโคโลนี

พบโคโลนีสีขาว จำนวน 5 ไอโซเลท สีขาวขุ่นจำนวน 8 ไอโซเลท สีเหลืองจำนวน 7 ไอโซเลท สีเหลืองใสจำนวน 9 ไอโซเลท สีส้มจำนวน 2 ไอโซเลท และสีไข่จำนวน 1 ไอโซเลท

ลักษณะรูปร่างโคโลนี

พบรูปร่างกลมจำนวน 25 ไอโซเลท และรูปร่างไม่แน่นอน จำนวน 9 ไอโซเลท

ลักษณะขอบโคโลนี

พบขอบแบบ entire จำนวน 23 ไอโซเลท ขอบแบบ erose จำนวน 6 ไอโซเลท และขอบแบบ undulate จำนวน 5 ไอโซเลท

ลักษณะผิวโคโลนี

พบผิวเมือกจำนวน 21 ไอโซเลท ผิวเรียบจำนวน 6 ไอโซเลท และผิวขรุขระจำนวน 7 ไอโซเลท

ลักษณะรูปร่างเซลล์

พบรูปร่างแบบ bacillus จำนวน 26 ไอโซเลท รูปร่างแบบ coccus จำนวน 4 ไอโซเลท รูปร่างแบบ coccobacilli จำนวน 4 ไอโซเลท

ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบพบลักษณะดังนี้

ลักษณะสีของโคโลนี

พบโคโลนีสีขาว จำนวน 5 ไอโซเลท สีขาวขุ่นจำนวน 1 ไอโซเลท สีเหลืองจำนวน 2 ไอโซเลท และสีเหลืองใสจำนวน 1 ไอโซเลท

ลักษณะรูปร่างโคโลนี

พบรูปร่างกลมจำนวน 7 ไอโซเลท และรูปร่างไม่แน่นอน จำนวน 2 ไอโซเลท

ลักษณะขอบโคโลนี

พบขอบแบบ entire จำนวน 7 ไอโซเลท และขอบแบบ erose จำนวน 2 ไอโซเลท

ลักษณะผิวโคโลนี

พบผิวเมือกจำนวน 6 ไอโซเลท ผิวเรียบจำนวน 2 ไอโซเลท และผิวขรุขระจำนวน 1 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.3)

ลักษณะรูปร่างเซลล์

พบรูปร่างแบบ bacillus จำนวน 1 ไอโซเลท รูปร่างแบบ coccus จำนวน 7 ไอโซเลท รูปร่างแบบ coccobacilli จำนวน 1 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

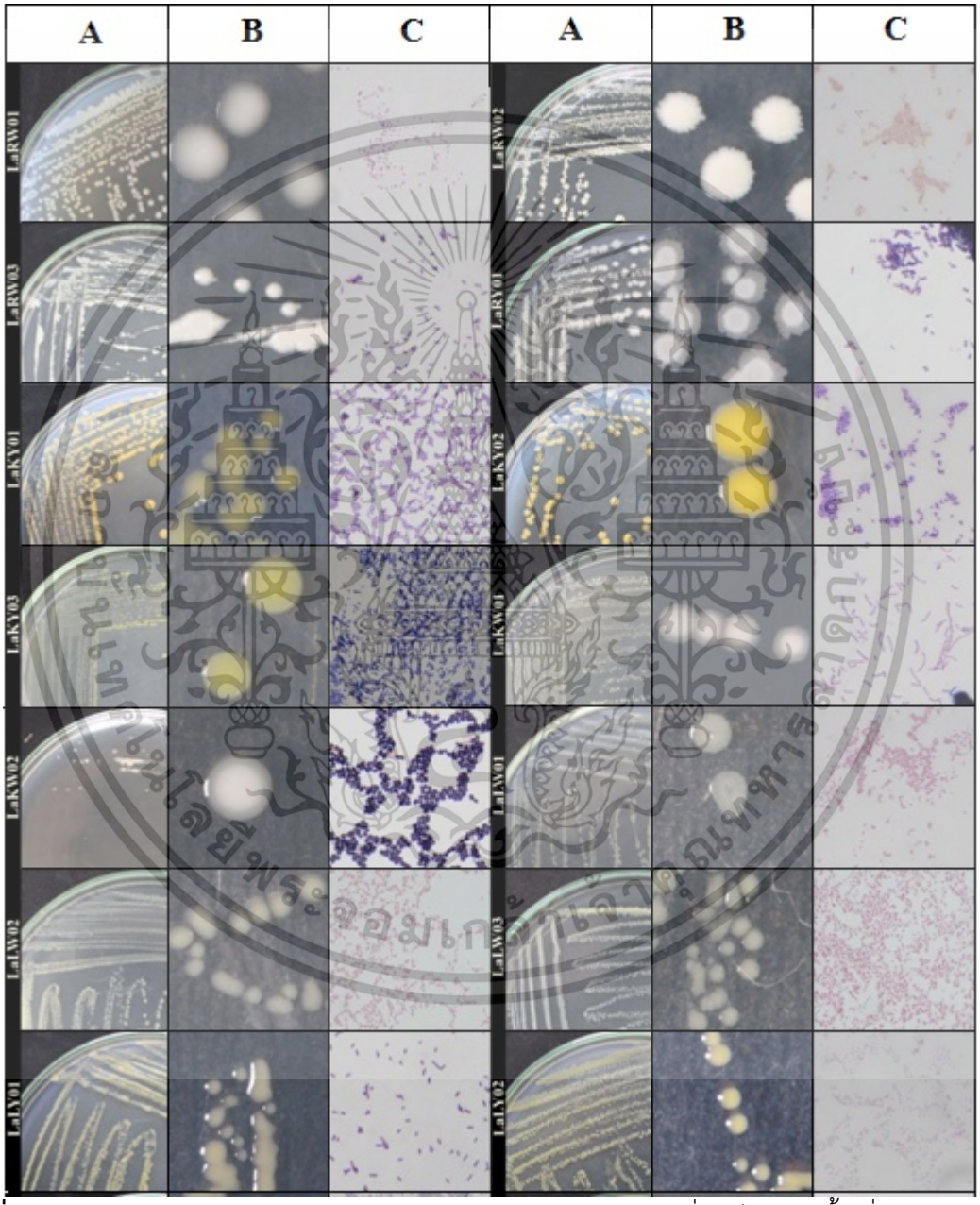
ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ endophytic bacteria ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นมะเขือเทศ

ไอโซเลท	โคโลนี				3%KOH test	Gram staining	รูปร่างเซลล์
	สี	รูปร่างโคโลนี	ขอบโคโลนี	ผิว			
LaRW01	ขาว	กลม	entire	เมือก	+	+	coccus
LaRW02	เหลือง	กลม	erose	เรียบ	-	-	coccus
LaRW03	ขาว	ไม่แน่นอน	undulate	เรียบ	+	+	bacillus
LaRY01	ขาว	กลม	erose	ขรุขระ	+	+	bacillus
LaKY01	เหลือง	ไม่แน่นอน	entire	เมือก	+	+	bacillus
LaKY02	เหลือง	กลม	entire	เมือก	+	+	coccobacilli
LaKY03	เหลืองใส	กลม	entire	เมือก	+	+	coccobacilli
LaKW01	ขาว	กลม	entire	เมือก	+	+	coccobacilli
LaKW02	ขาว	กลม	entire	เมือก	+	+	coccus
LaLW01	ขาว	กลม	entire	ขรุขระ	-	-	coccus
LaLW02	ขาว	กลม	entire	เมือก	-	-	coccus
LaLW03	ขาว	กลม	entire	เมือก	-	-	bacillus
LaLY01	เหลืองใส	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
LaLY02	เหลืองใส	กลม	entire	เมือก	+	+	coccus
LaLY03	เหลืองใส	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
LaTY01	เหลือง	กลม	entire	เมือก	+	+	coccus
LaTY02	เหลือง	กลม	entire	เมือก	-	-	coccus
LaTW01	ขาว	กลม	entire	เมือก	-	-	coccus
LaTO01	ส้ม	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
SuLW01	เหลือง	กลม	erose	เมือก	+	+	bacillus
SuLW02	เหลืองใส	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
SuLW03	เหลือง	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
SuLW04	เหลือง	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
SuLW03	เหลือง	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
SuLW04	เหลือง	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
SuLY03	เหลืองใส	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
SuLO01	ส้ม	กลม	entire	เรียบ	+	+	bacillus
SuRW01	ขาวขุ่น	กลม	undulate	ขรุขระ	+	+	bacillus
SuRW02	ขาวขุ่น	ไม่แน่นอน	undulate	ขรุขระ	+	+	bacillus
SuRW03	ขาวขุ่น	กลม	entire	เมือก	+	+	coccobacilli
SuRW04	ขาว	ไม่แน่นอน	undulate	ขรุขระ	+	+	bacillus
SuRY01	เหลืองใส	กลม	entire	เมือก	+	+	bacillus
SuRY02	เหลืองใส	กลม	entire	เรียบ	+	+	bacillus
SuRY03	เหลืองใส	กลม	entire	เมือก	-	-	coccus
SuRB01	เนื้อ	กลม	undulate	เรียบ	+	+	bacillus
SuTW01	ขาว	ไม่แน่นอน	entire	เมือก	-	-	coccobacilli
SuKY01	เหลืองใส	ไม่แน่นอน	entire	เมือก	+	+	bacillus
LbTW01	ขาวขุ่น	ไม่แน่นอน	erose	ขรุขระ	+	+	bacillus
LbLW01	ขาวขุ่น	ไม่แน่นอน	erose	ขรุขระ	+	+	bacillus
LbLW02	ขาวขุ่น	ไม่แน่นอน	erose	เรียบ	-	-	coccus

เอกสารนี้มีไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

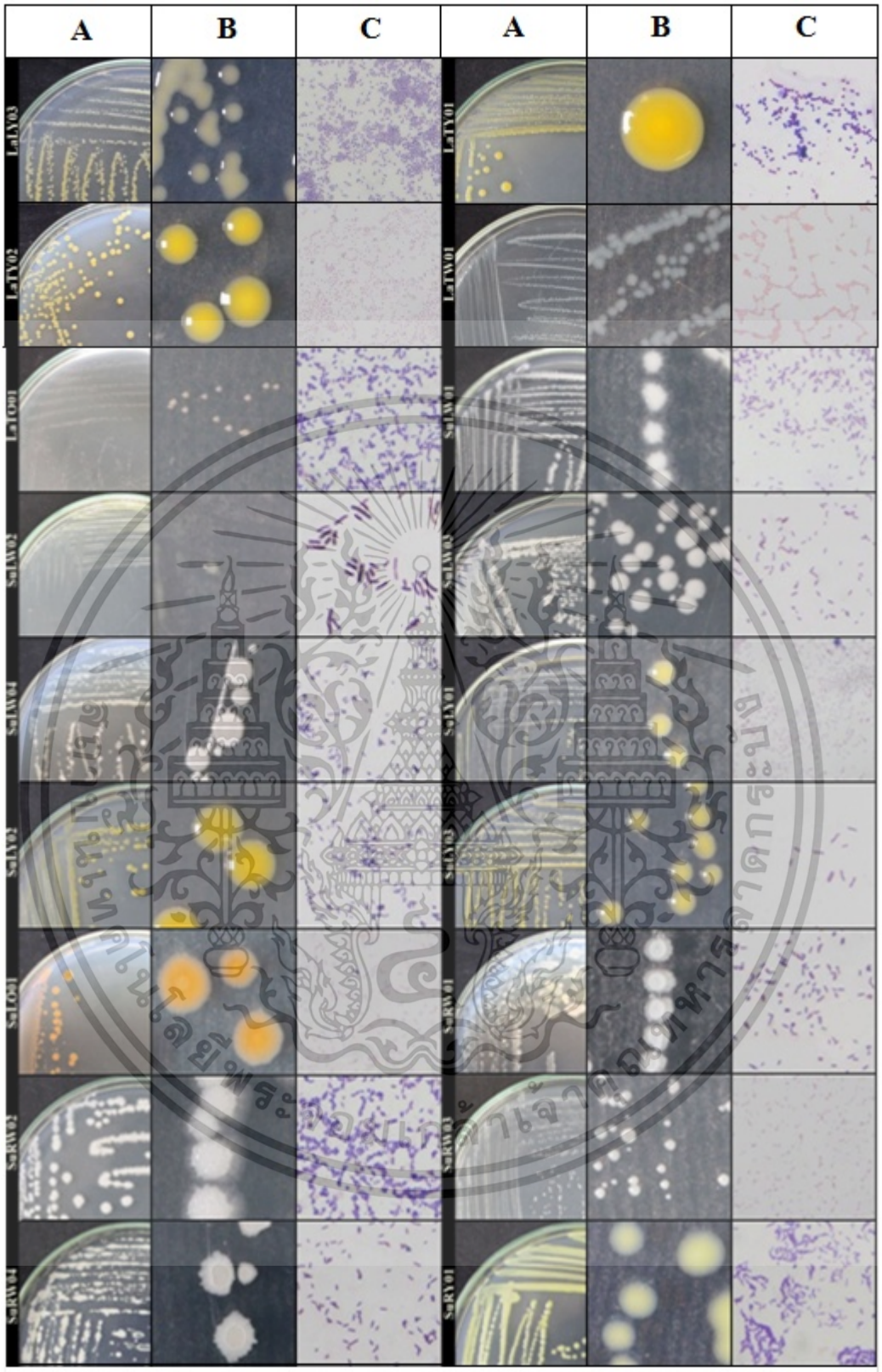
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ไอโซเลท	โคโลนี				3%KOH test	Gram staining	รูปร่างเซลล์
	สี	รูปร่างโคโลนี	ขอบโคโลนี	ผิว			
LbRW01	ขาวขุ่น	ไม่แน่นอน	erose	เรียบ	+	+	bacillus
LbRW02	ขาวขุ่น	ไม่แน่นอน	erose	ขรุขระ	+	+	bacillus
LbRW03	ขาวขุ่น	กลม	entire	เรียบ	+	+	bacillus



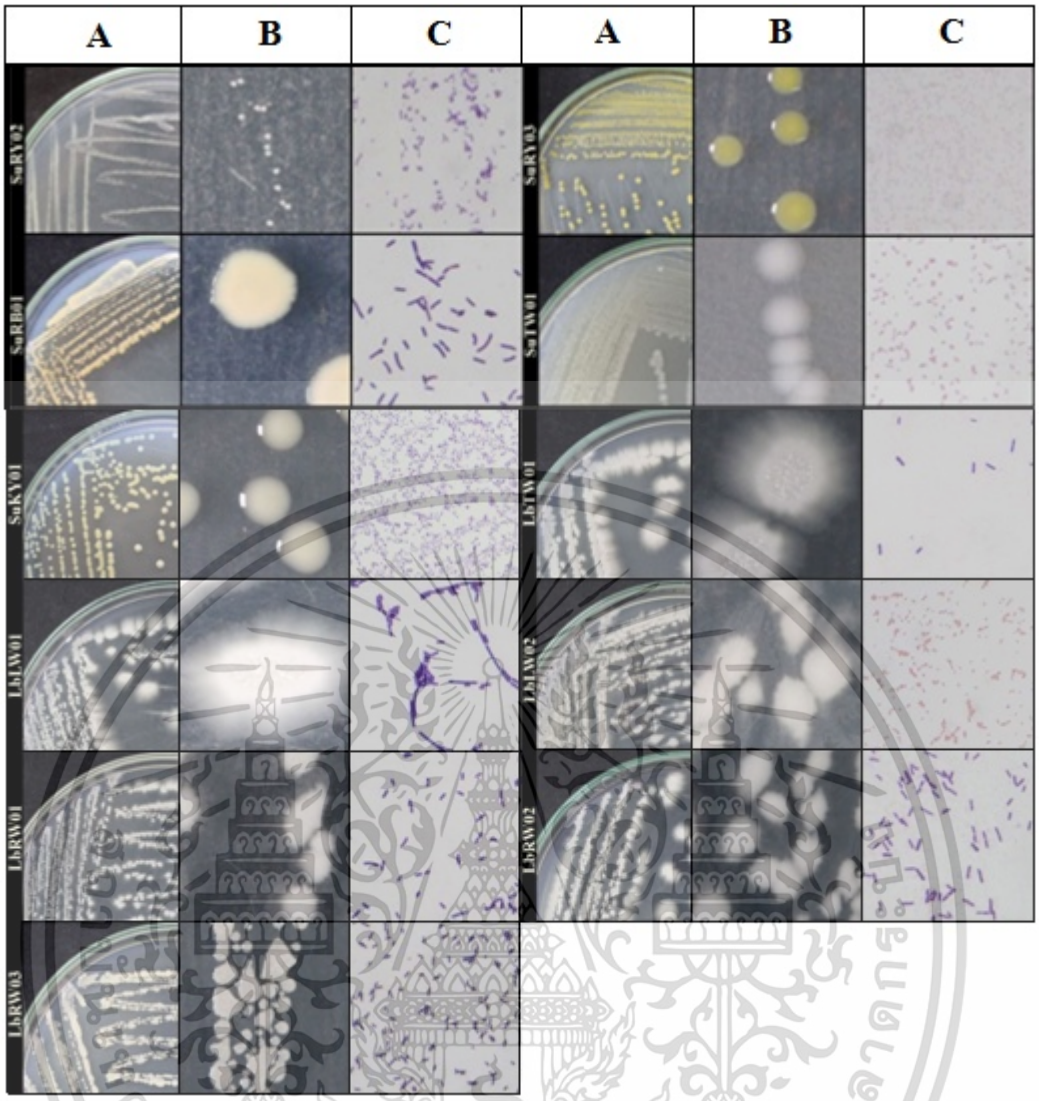
ภาพที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ endophytic bacteria ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นมะเขือเทศ (A=โคโลนีบนอาหาร NA, B =ลักษณะโคโลนีที่กำลังขยาย 6.7 เท่า และ C =การย้อมแกรมที่กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 (ต่อ)

ในการทดสอบผลต่อการเจริญเติบโต และความแข็งแรงของต้นกล้ามะเขือเทศ พบว่าเชื้อ endophytic bacteria ส่วนใหญ่ไม่ส่งผลกระทบทางลบต่อการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศ นอกจากนี้ยังพบว่ามี endophytic bacteria จำนวน 18 ไอโซเลท สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของและความแข็งแรงของต้นกล้าได้ประมาณ 120 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ SuRY01, LaTO01, SuLY03, SuTW01, LaRW01, LaTY02, SuRY02, LaLY02, LaLW02, LaTY01, LbLW02, LbRW02, SuKY01, SuRW04, SuRB01,SuLW01, LaKY03 และ SuRW02 ซึ่งมี %svi เท่ากับ 139.72, 138.10, 134.64, 130.24, 129.09, 128.63, 127.71, 127.02, 126.09, 125.40, 122.63, 122.40, 121.01,120.78, 120.78, 120.55, 119.63 และ 119.39 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลของ endophytic bacteria ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศ

ไอโซเลท	การรอดชีวิต (%)	จำนวนใบ	ความสูง (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)			%svi
				ราก	ต้น	ทั้งหมด	
Control	100a	2.00a	6.30ab	0.089cd	0.452f	0.541ghij	100.00
LaRW01	100a	1.95a	6.00 ab	0.136a	0.562bcd	0.698cbd	129.09
LaRW02	95ab	1.90a	5.37ab	0.095c	0.470ef	0.565ghij	99.16
LaRW03	95ab	2.00a	6.50ab	0.119ab	0.436 f	0.555ghij	97.41
LaRY01	100a	1.90a	5.50ab	0.073def	0.466ef	0.537ghij	99.30
LaKY01	100a	1.95a	5.50ab	0.073def	0.518de	0.591fgh	109.23
LaKY02	100a	1.90a	5.37ab	0.071def	0.437f	0.508j	93.99
LaKY03	100a	2.00a	5.62ab	0.086cdef	0.561bcd	0.647def	119.63
LaKW01	100a	1.90a	6.00ab	0.095c	0.465ef	0.560ghij	103.46
LaKW02	85c	1.90a	5.87ab	0.067f	0.437f	0.505j	79.30
LaLW01	100a	1.95a	5.87ab	0.121ab	0.443f	0.565ghij	104.38
LaLW02	100a	1.95a	5.50ab	0.120ab	0.562bcd	0.682cd	126.09
LaLW03	100a	1.90a	6.12ab	0.124ab	0.4675ef	0.591fgh	109.23
LaLY01	100a	1.90a	5.75ab	0.086cdef	0.436f	0.522ij	96.53
LaLY02	100a	2.00a	5.50ab	0.126ab	0.561bcd	0.687cd	127.02
LaLY03	100a	1.90a	5.25ab	0.095c	0.4385f	0.533hji	98.61
LaTY01	100a	2.00a	5.62ab	0.116b	0.562bcd	0.678cd	125.40
LaTY02	100a	1.95a	5.87ab	0.118ab	0.578bc	0.696cbd	128.63
LaTW01	100a	1.95a	6.12ab	0.069ef	0.428f	0.497j	91.91
LaTO01	100a	2.00	6.00ab	0.115b	0.632a	0.747ab	138.10
SuLW01	100a	1.95	6.37 ab	0.116b	0.536cd	0.652de	120.55
SuLW02	100a	1.95	5.87 ab	0.071def	0.441f	0.512j	94.68
SuLW03	100a	2.00	5.75 ab	0.121ab	0.476ef	0.597efg	110.39
SuLW04	100a	2.00	5.75 ab	0.0675f	0.477ef	0.545ghij	100.69
SuLY01	100a	1.85	6.00ab	0.079 cdef	0.4725ef	0.551 ghij	101.84
SuLY02	100a	1.95	6.00ab	0.086cdef	0.442f	0.528ij	97.69
SuLY03	100a	1.90	6.00ab	0.123ab	0.606ab	0.728abc	134.64
SuLO01	100a	2.00	6.37ab	0.0905c	0.466ef	0.561 ghij	103.69
SuRW01	95ab	2.00	5.75ab	0.068ef	0.442f	0.511j	89.73
SuRW02	100a	1.90	5.37ab	0.128ab	0.518de	0.646def	119.39
SuRW03	95ab	2.00	6.37ab	0.0685ef	0.437cd	0.506j	88.85
SuRW04	100a	2.00	6.00ab	0.115b	0.538cd	0.653de	120.78
SuRW03	95ab	2.00	6.37ab	0.0685ef	0.437cd	0.506j	88.85
SuRW04	100a	2.00	6.00ab	0.115b	0.538cd	0.653de	120.78
SuRY01	100a	1.95	6.25ab	0.126ab	0.630a	0.756a	139.72
SuRY02	100a	2.00	6.87a	0.086cdef	0.605ab	0.691cbd	127.71
SuRY03	100a	2.00	6.62ab	0.118ab	0.466ef	0.583ghi	107.85
SuRB01	100a	1.95	6.12ab	0.116b	0.537cd	0.653de	120.78
SuTW01	100a	1.90	6.12ab	0.128ab	0.577bc	0.705abcd	130.24
SuKY01	100a	2.00	6.62ab	0.118ab	0.537cd	0.655de	121.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

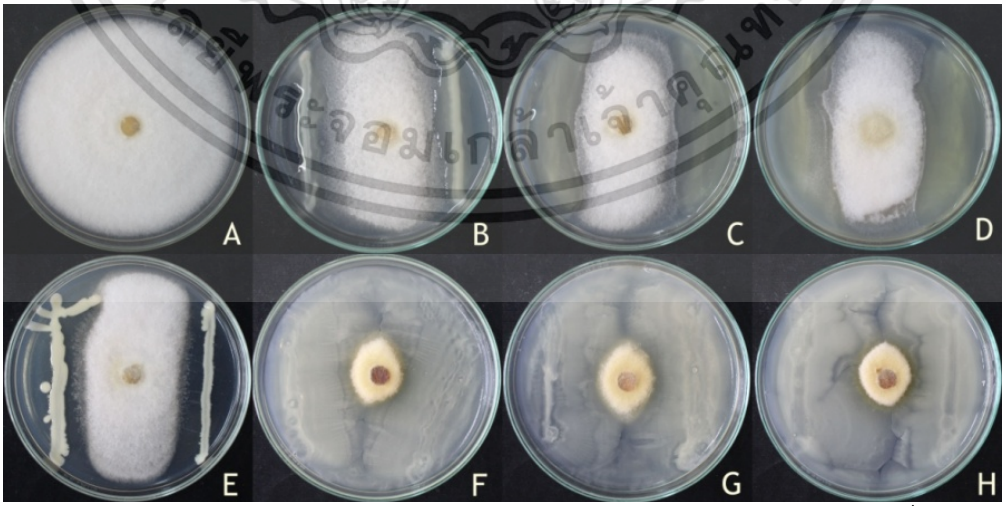
ตารางที่ 2 (ต่อ) ผลของ endophytic bacteria ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศ

ไอโซเลท	การรอดชีวิต (%)	จำนวนใบ	ความสูง (ซม.)	น้ำหนัก (กรัม)			%svi
				ราก	ต้น	ทั้งหมด	
LbTW01	100a	1.90	5.75ab	0.069ef	0.441f	0.510j	94.22
LbLW01	90bc	1.95	5.75ab	0.086cde	0.475ef	0.562 ghij	93.53
LbLW02	100a	1.90	5.75ab	0.126ab	0.537cd	0.663d	122.63
LbRW01	100a	1.85	5.7ab	0.071def	0.436f	0.507j	93.76
LbRW02	100a	1.95	5.87ab	0.086cdef	0.576bc	0.662d	122.40
LbRW03	100a	1.95	5.87ab	0.065ef	0.443f	0.512j	94.68
F-test	*[1/]	ns	*	*	*	*	-
C.V. (%)	3.83	4.68	13.45	11.06	6.61	6.08	-

[1/] ns =ไม่แตกต่างทางสถิติ * =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple range test (DMRT)

4.3 ประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* พบว่ามี endophytic bacteria จำนวน 25 ไอโซเลท ได้แก่ LaRW01, LaRW02, LaRW03, LaRY01, LaKW02, LaLW01, LaLW02, LaLW03, LaLY01, LaLY02, LaTW01, LaTO01, SuLW02, SuLW03, SuLY02, SuLY03, SuRW01, SuRW02, SuRW03, SuRY01, SuRB01, SuTW01, LbTW01, LbLW01, LbLW02, LbRW01, LbRW02, และ LbRW03 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 4.3) โดยมี 7 ไอโซเลท ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ LaLW03, LaLY01, SuLW03, LaRY01, SuRW01, SuRW02, และ LbRW03 ซึ่งไอโซเลทที่ดีที่สุดได้แก่ SuRW02 SuRW01 และ LbRW03 ที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งที่ 71.94, 68.33 และ 68.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 ผลการทดสอบ Dual-culture ของ endophytic bacteria จำนวน 7 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (A= กรรมวิธีควบคุม, B= LaRY01, C=LaLW03, D=LaLY01, E= SuLW03, F= SuRW01, G= SuRW02, H= LbRW03)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของ endophytic bacteria จำนวน 43 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

ไอโซเลท	การยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum*	
	ขนาดโคโลนี (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ
control	9.00	0.00k[1/]
LaRW01	7.00	22.22 defg
LaRW02	6.95	22.78defg
LaRW03	6.42	28.61cd
LaRY01	5.71	36.53b
LaKY01	8.77	2.50jk
LaKY02	8.95	0.00k
LaKY03	8.93	0.00k
LaKW01	8.75	2.72jk
LaKW02	8.23	8.47ij
LaLW01	7.62	15.28ghi
LaLW02	8.03	10.69hi
LaLW03	6.26	30.42bc
LaLY01	6.25	30.47bc
LaLY02	7.53	16.25fgh
LaLY03	7.50	16.67fgh
LaTY01	8.92	0.00k
LaTY02	8.87	0.00k
LaTW01	6.56	27.08cde
LaTO01	7.35	18.33fg
SuLW01	8.97	0.00k
SuLW02	7.15	20.56 efg
SuLW03	6.16	31.53bc
SuLW04	8.92	0.00k
SuLY01	8.87	0.00k
SuLY02	7.10	21.06efg
SuLY03	6.90	23.33def
SuLO01	9.00	0.00k
SuRW01	2.85	68.33a
SuRW02	2.52	71.94a
SuRW03	8.08	10.14hi
SuRW04	9.00	0.00k
SuRY01	7.00	22.22 defg
SuRY02	9.00	0.00k
SuRY03	8.76	0.00k
SuRB01	7.57	15.83fgh

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ

ไอโซเลท	การเจริญยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum*	
	ขนาดโคโลนี (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ
SuTW01	6.98	22.36 defg
SuKY01	9.00	0.00k
LbTW01	7.12	20.83 efg
LbLW01	7.28	19.028fg
LbLW02	6.97	22.50 defg
LbRW01	7.12	20.83 efg
LbRW02	7.15	20.56 efg
LbRW03	2.86	68.19a
F-test	*[1/]	*
C.V. (%)	15.39	25.75

[1/]ns =ไม่แตกต่างทางสถิติ * =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

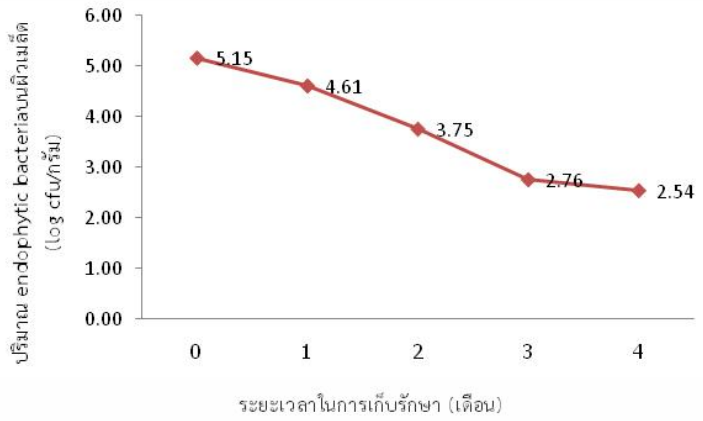
ซึ่งจากผลการทดลองที่ผ่านมาจึงได้ทำการเลือก endophytic bacteria ไอโซเลท SuRW02 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด และยังมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตไปใช้ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์ในการทดลองต่อไป

4.4 ความมีชีวิตรอดของ endophytic bacteria และคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ระหว่างการเก็บรักษา

หลังจากการเคลือบเมล็ดพันธุ์พบว่า สารเคลือบที่ทำการเคลือบเมล็ดมีความสม่ำเสมอทั่วทั้งเมล็ด (ภาพที่ 4.5) เมื่อตรวจสอบปริมาณ endophytic bacteria พบว่ามีปริมาณ endophytic bacteria อยู่ที่ 5.15 log cfu/กรัม การตรวจนับตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียลดลงเรื่อยๆ โดยมีปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ในแต่ละเดือนเท่ากับ 4.61 3.75 2.75 และ 2.54 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6)

ภาพที่ 4.5 เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศก่อนเคลือบและหลังเคลือบ (A=เมล็ดพันธุ์ก่อนเคลือบ และ B=เมล็ดพันธุ์หลังเคลือบ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ปริมาณแบคทีเรียที่เคลือบบนเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศตลอดการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน

ในการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือนพบว่า ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ และเมล็ดพันธุ์เคลือบในแต่ละกรรมวิธี เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในเดือนที่ 2 แต่หลังจากการเก็บรักษาเดือนที่ 4 ในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าการเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย endophytic bacteria และสารเคมีแคปแทน ไม่ส่งผลต่อความชื้นของเมล็ดพันธุ์ หลังจากเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน (ตารางที่ 4.4) ในส่วนของความงอกของเมล็ดพันธุ์พบว่า หลังจากการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ในเดือนที่ 3 ความงอกของเมล็ดพันธุ์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลง เมื่อสิ้นสุดการทดลองเดือนที่ 4 พบว่าเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วย endophytic bacteria มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ เมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วยสารเคมีแคปแทน เมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วยสารเคลือบเพียงอย่างเดียว และ เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ โดยมีความงอกที่ 93.5, 92.5, 91.25 และ 89.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.4 ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านและไม่ผ่านการเคลือบด้วยกรรมวิธีต่างๆ หลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน

กรรมวิธี	ความชื้นของเมล็ดพันธุ์ (%)				
	เดือนที่ 0	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4
NCS[1/]	6.56	7.78	7.88b	7.66b	7.96a
CS	6.60	7.86	8.073ab	8.10ab	8.17a
CS+B	7.18	7.62	8.32a	8.34a	8.39a
CS+C	7.44	8.08	8.33 a	8.44a	8.51a
F-test	ns[2/]	ns	*	*	ns
C.V. (%)	8.71	17.92	8.55	4.71	9.83

[1/] NCS = เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ, CS = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วยสารเคลือบเพียงอย่างเดียว, CS+B = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria และ CS+C = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย สารเคมีแคปแทน

[2/] ns =ไม่แตกต่างทางสถิติ, * =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ความงอกของเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านและไม่ผ่านการเคลือบด้วยกรรมวิธีต่างๆหลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน

กรรมวิธี	ความงอกของเมล็ดพันธุ์ (%)				
	เดือนที่ 0	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4
NCS[1/]	96.75	97.00	95.25	91.50b	89.50c
CS	97.00	96.75	94.75	92.25ab	91.25bc
CS+B	97.75	97.50	96.50	94.00a	93.75a
CS+C	98.50	97.50	95.25	93.25ab	92.50ab
F-test	ns[2/]	ns	ns	*	*
C.V. (%)	1.21	1.83	1.39	1.37	1.51

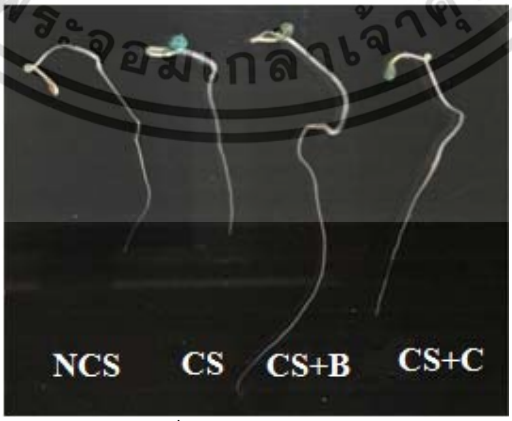
[1/] NCS = เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ, CS = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วยสารเคลือบเพียงอย่างเดียว, CS+B = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria และ CS+C = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย สารเคมีแคปแทน

[2/] ns =ไม่แตกต่างทางสถิติ, * =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4.5 ประสิทธิภาพในการควบคุมโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของเมล็ดเคลือบด้วย endophytic bacteria ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรค พบว่าการใช้เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria สามารถลดการเกิดโรคได้ เช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ใช้เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วยสารเคมีแคปแทน ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ และเคลือบด้วยสารเคลือบเพียงอย่างเดียว โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 65.5 และ 69.75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ และเคลือบด้วยสารเคลือบเพียงอย่างเดียว มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 30.75 และ 43.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

ในการตรวจสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโต พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria ในกรรมวิธีปลูกเชื้อก่อโรค มีความยาวต้น และความยาวราก และมี %svi สูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ความยาวของต้นกล้ามะเขือเทศที่อายุ 7 วัน (NCS = เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ CS = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วยสารเคลือบเพียงอย่างเดียว CS+B = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria CS+C = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย สารเคมีแคปแทน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการควบคุมโรค และ การเจริญเติบโตของเมล็ดเคลือบด้วย endophytic bacteria ในห้องปฏิบัติการ

กรรมวิธี		ความยาวต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)	การรอดชีวิต (%)	%svi
ปลูกเชื้อโรค	NCS[1/]	1.54cd	1.01b	30.75b	100.00
	CS	2.33b	1.26b	43.50b	153.48
	CS+B	3.79a	2.29a	65.50a	178.82
	CS+C	2.30b	1.10b	69.75a	155.96
F-test		*	*	*	-
C.V.(%)		24.36	25.59	25.25	-
ไม่ปลูกเชื้อโรค	NCS[1/]	3.63b	2.35b	97.00	100.00
	CS	3.83b	2.68ab	96.75	112.78
	CS+B	5.33a	3.06a	97.50	151.20
	CS+C	4.15a	2.47b	97.50	118.95
F-test		*[2/]	*	ns	-
C.V. (%)		15.68	19.09	1.21	-

[1/] NCS = เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ, CS = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วยสารเคลือบเพียงอย่างเดียว, CS+B = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย endophytic bacteria และ CS+C = เมล็ดพันธุ์เคลือบด้วย สารเคมีแคปแทน

[2/] ns =ไม่แตกต่างทางสถิติ, * =แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการของโรคเหี่ยว โดยเชื้อที่ได้คือ เชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีลักษณะสอดคล้องกับรายงานของ Nirmaladevi *et al.* (2016) ที่ได้รายงานว่า เชื้อรา *Fusarium oxysporum* จะมีลักษณะเส้นใยสีอ่อน โดยจะมีตั้งแต่สีขาวจนถึงสีชมพู บางครั้งอาจมีสีม่วง มีการสร้างสปอร์ 3 ชนิด ได้แก่ macroconidia, microconidia และ chlamydospores โดย macroconidia จะมีลักษณะเรียวยาวคล้ายเสี้ยวพระจันทร์ มีผนังกั้นสปอร์ 3-5 เส้น microconidia มีลักษณะเป็นรูปไข่ โดยปกติจะไม่มีเส้นกั้นสปอร์หรือมีเพียง 1 เส้น และ chlamydospores มีลักษณะทั้งผิวเรียบ และขรุขระ มักจะเกิดแบบเดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นห่วงโซ่ และเมื่อทำการทดสอบความสามารถในการทดสอบโรคพบอาการเหี่ยว และท่อลำเลียงน้ำเป็นสีน้ำตาลเช่นเดียวกับรายงานของ Abdallah *et al.* (2016)

การแยก endophytic bacteria จากเนื้อเยื่อ ลำต้น ราก และใบ ของต้นมะเขือเทศที่มีความแข็งแรง พบว่าสามารถแยกได้ทั้งหมดจำนวน 43 ไอโซเลท หลังจากตรวจสอบ gram stain พบว่ามีจำนวนแกรมบวก 34 ไอโซเลท และ แกรมลบ 9 ไอโซเลท เมื่อนำ endophytic bacteria ทั้งหมดที่แยกได้ไปทดสอบกับต้นกล้ามะเขือเทศพบว่า ไม่ส่งผลอันตรายต่อต้นกล้ามะเขือเทศ ซึ่ง Bacon และ White (2000) และ Hundley. (2005) ได้อธิบายเกี่ยวกับ endophytic bacteria ไว้ว่าเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชโดยไม่ส่งกระทบทางลบต่อพืช ในบางสายพันธุ์ยังพบว่าสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบแก่พืชได้อีกด้วย ซึ่งในการศึกษานี้ยังพบว่า ในบางไอโซเลทสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่ต้นกล้ามะเขือเทศ โดยพบว่ามี endophytic bacteria จำนวน 18 ไอเลท จากจำนวน 43 ไอโซเลท ได้แก่ SuRY01, LaTO01, SuLY03, SuTW01, LaRW01, LaTY02, SuRY02, LaLY02, LaLW02, LaTY01, LbLW02, LbRW02, SuKY01, SuRW04, SuRB01,SuLW01, LaKY03 และ SuRW02 ที่มี %svi ในช่วง 119-139 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Khan *et al.* (2014) ที่ได้รายงานว่าต้นมะเขือเทศที่มีการปลูก endophytic bacteria สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตได้ โดยสามารถเพิ่มความยาวราก ปริมาณคลอโรฟิลล์ ความสูง และน้ำหนักรากได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Kaewkham *et al.* (2016) ที่พบว่าการใช้เมล็ดพันธุ์แตงกวาเคลือบร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่ปริมาณ 1×10^{7} cfu สามารถทำให้เมล็ดมีความงอก ความยาวต้น ความยาวราก ดีมากกว่าเมล็ดไม่เคลือบ ซึ่งจากรายงานของ Abdallah *et al.* (2016) พบว่า endophytic bacteria สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศได้ โดยจากการตรวจสอบพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสารกระตุ้นการเติบโตของพืช ได้แก่ indole-3-acetic acid (IAA) โดยสารดังกล่าวจะช่วยกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (Shahab *et al.*, 2009) ส่งผลให้พืชเจริญได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตฮอร์โมนชนิดอื่นๆได้ เช่น Cytokinin, Ethylene, Gibberelin และ 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase เป็นต้น (Noel *et al.*, 1996) โดย Glick (2012) และธิดารัตน์ (2560) ได้รายงานว่านอกจากการผลิตฮอร์โมนพืชแล้ว ยังมีกลไกอื่นๆอีก ได้แก่ การตรึงไนโตรเจน การละลายธาตุอาหารพืช การสร้างซิเดอร์โรฟอร์ (siderophore) การสร้างสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อราโรคพืช ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. ในมะเขือเทศครั้งนี้พบว่า มี endophytic bacteria 25 ไอโซเลท จาก 43 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในการทดสอบด้วยวิธี dual culture test มีจำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ SuRW02, SuRW01 และ LbRW03 โดยเปอร์เซ็นต์ยับยั้งที่ 71.94, 68.33 และ 68.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีงานวิจัยหลายๆฉบับที่ศึกษาเรื่องการนำ endophytic bacteria มาใช้ในการควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Monda, 2002; Akköprü และ Demir, 2005; Moretti *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ยังพบว่า endophytic bacteria มีกลไกในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* คือ กลไกการสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiosis) สังเกตจากการพบบริเวณยับยั้ง (clear zone) ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคและ endophytic bacteria และกลไกการแข่งขัน (Competition) สังเกตได้จากการที่ endophytic bacteria สามารถเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างรวดเร็วทำให้เชื้อรา *F. oxysporum* ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ จากรายงานวิจัยของ Nandhini et al (2012) และ Patel *et al.* (2012) ที่ใช้ endophytic bacteria ที่แยกได้จากมะเขือเทศในการควบคุม *F. oxysporum* พบว่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีการสังเคราะห์สาร allelochemicals ต่างๆ ที่มีบทบาทการต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรค และอาจมีการสร้าง chitinase และ β -1,3-glucanase ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยผนังเซลล์เชื้อรา ซึ่งงานวิจัยของ Bibi *et al.* (2012) และ Wang *et al.* (2013) ได้รายงานว่า endophytic bacteria หลายชนิด ได้แก่ *Bacillus, Micrococcus, Microbacteruim, Pseudomonas, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Burkholderia, Enterobacter* และ *Serratia* สามารถผลิตสารดังกล่าวเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยที่พบว่า endophytic bacteria สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum capsici*, *Pythium* sp.และ *Verticillium dahlia* (Nejad and Johnson. 2000; Amaresan *et al*.,2012 and Nandhini *et al.*,2012)

การศึกษาในครั้งนี้ได้คัดเลือก endophytic bacteria ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* สูงที่สุด และ มีความสามารถในการช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต คือ ไอโซเลท SuRW02 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* 71.94 เปอร์เซ็นต์ และสามารถส่งเสริมการเจริญได้ 119 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์ โดยการเคลือบเป็นเทคโนโลยีที่มีการพัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเมล็ดพันธุ์ การนำ endophytic bacteria มาเคลือบเมล็ดจะช่วยให้แบคทีเรียยึดติดกับเมล็ด โดยไม่หลุดระหว่างการเคลื่อนย้าย ซึ่งหลังจากการทดลองเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเคลือบด้วย SuRW02 เป็นเวลา 4 เดือน พบว่ายังคงรักษาระดับของแบคทีเรียไว้ได้ระดับหนึ่ง แต่ปริมาณแบคทีเรียลดลงเรื่อยๆ จาก 4.61 เป็น 2.54 log cfu/กรัม ซึ่งเป็นผลมาจากการเคลือบเมล็ดนั้นส่วนประกอบของสารเคลือบไม่มีสารอาหารที่เพียงพอต่อกาดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ส่งผลให้ปริมาณของแบคทีเรียลดลง (ธิดารัตน์, 2560) อย่างไรก็ตามการคงให้ปริมาณความมีชีวิตรอดแบคทีเรียมีมากกว่านี้ อาจต้องใช้วิธีการพอกแทนการเคลือบ และอาจเสริมสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลงไปด้วย ในด้านคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ หลังจากการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน การเคลือบเมล็ดด้วยกรรมวิธีต่างๆไม่ส่งผลทางด้านลบต่อความชื้นของเมล็ดพันธุ์ ในส่วนของความงอกของเมล็ดพันธุ์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงในเดือนที่ 3 พบว่าในเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านเคลือบด้วย SuRW02 มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ สอดคล้องกับรายงานของ O'Callaghan *et al.* (2006) ที่ได้ทำการเคลือบเมล็ดพันธุ์หัวหอมด้วย *Pseudomonas fluorescens* F113 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 70 วัน พบว่าเมล็ดพันธุ์ยังคงมีความงอกที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ ซึ่งเป็นการยกระดับคุณภาพเมล็ดพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในห้องปฏิบัติการ พบว่า การใช้เมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วย endophytic bacteria สามารถลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคได้เช่นเดียวกับการเคลือบด้วยสารเคมีแคปแทน จากรายงานของ Wang *et al.* (2013) ได้รายงานว่า endophytic bacteria สามารถลดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp. ของมะเขือเทศได้อย่างน้อย 75% โดย endophytic bacteria สามารถยับยั้งเชื้อโรคทางอ้อม โดยจะทำการการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้พืชมีความแข็งแรง ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาผลการทดลองพบว่าการใช้เมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วย endophytic bacteria มีการเจริญเติบโตที่สูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ เป็นไปได้ว่าการที่ต้นพืชแข็งแรงจะช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อได้ นอกจากนี้ ธิดารัตน์ (2560) ยังได้อธิบายไว้ว่าการเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วยแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์จะสามารถช่วยลดการเกิดโรคได้ โดยจะช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคก่อนและหลังการงอกของเมล็ดพันธุ์ จากกลไกต่างๆที่เชื้อปฏิปักษ์สร้างขึ้นเช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ การสร้างสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา การสร้างเอนไซม์ต่าง การแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรค รวมทั้งเหนี่ยวนำความต้านทานในพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยหลายๆ ฉบับที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการใช้เมล็ดเคลือบจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมโรค โดยพบว่าการใช้จุลินทรีย์ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์สามารถลดการเกิดได้ โดยมี รายงานของ Hu *et al*. (2011) ได้ทำการทดลองโดยปลูกเมล็ดผักกาดใน 2 พื้นที่ในประเทศจีนที่ได้รับผลกระทบจากเชื้อ *Sclerotinia sclerotiorum* พบว่าเมล็ดที่ทำการเคลือบเมล็ดร่วมกับเชื้อ *Bacillus subtilis* Tu-100 มีประสิทธิภาพในการลดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotinia sclerotiorum* เห็นได้จากน้ำหนักแห้ง ดัชนีการเกิดโรค อัตราการเกิดโรค และผลผลิต เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการเคลือบเมล็ด และการเคลือบเมล็ดเพียงอย่างเดียว รายงานวิจัยของ Elad *et al*., 1982 ได้ระบุว่าการใช้เมล็ดฝ้ายเคลือบด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถลดการเกิดโรคที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ได้ถึง 83 เปอร์เซ็นต์ ในการปลูกภายในโรงเรือน และยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในสภาพแปลงปลูก โดยความรุนแรงของโรคลดลง 47-60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้ pentachloronitrobenzene นอกจากนี้รายงานของ สุพจน์ และคณะ (2554) ยังรายงานว่าการเคลือบเมล็ดข้าวโพดด้วยเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 สามารถลดการเกิดโรคใบขีดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. avenae (Aaa) ที่ปนเปื้อนในเมล็ดพันธุ์ และในสภาพแปลงปลูกข้าวโพดได้ โดยสามารถลดการเกิดโรคถึง 68.31 เปอร์เซ็นต์ และยังมีรายงานว่าการเคลือบเมล็ดด้วย *Pseudomonas fluorescent* สามารถลดการเกิดโรค Charcoal rot ที่เกิดจากเชื้อ *Macrophomina phaseolina* ในถั่วลิสงได้ โดยสามารถลดอาการของโรคได้มากถึง 61-70 เปอร์เซ็นต์ ที่ 30-105 วัน หลังจากปลูก นอกจากนี้เชื้อดังกล่าวยังสามารถเพิ่มผลผลิตของถั่วลิสงได้ (Shweta *et al*., 2008) งานวิจัยของ Kaewkham *et al.* (2016) ที่ได้ศึกษาการควบคุมเชื้อรา *Didymella bryoniae* สาเหตุโรค gummy stem blight ในเมล็ดพันธุ์แตงกวาด้วยการใช้เมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่าการเคลือบด้วยปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 1×10^5 และ 1×10^7 cfu สามารถลดการเกิดโรคระยะต้นกล้าได้ โดยพบว่ามีระดับความรุนแรงของโรคเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เมล็ดไม่ได้เคลือบมีระดับความรุนแรงการเกิดโรคสูงถึง 47 เปอร์เซ็นต์ และรายงานของ วรรณวิไล และคณะ (2554) พบว่าการเคลือบเมล็ดคะน้าด้วยเชื้อรา *Gliocladium virens* ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อลดโรคเน่าคอดินจากเชื้อ *Pythium aphanidermatum* เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 190 วัน สามารถควบคุมโรคเน่าคอดิน ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *P. aphanidermatum* ได้ดีเท่ากับการใช้สารเคมี metalaxyl ซึ่งนอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายอื่นๆที่ได้ผลเช่นเดียวกัน ได้แก่ การเคลือบเมล็ดแตงด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อป้องกันโรคยางไหลที่เกิดจากเชื้อ *Botryosphaeria rhodina* การเคลือบเมล็ดหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หอมด้วยเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* เพื่อป้องกันโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อ *Pythium ultimum* เป็นต้น (กุศล และพิศาล, 2555; O'Callaghan *et al*., 2006)

5.2 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการแยก endophytic bacteria จากราก ลำต้น และใบ ของต้นมะเขือเทศที่แข็งแรง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของต้นกล้ามะเขือเทศ ในบางไอโซเลทสามารถส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ามะเขือเทศได้ เมื่อนำ endophytic bacteria มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ พบว่าจากจำนวน endophytic bacteria 43 ไอโซเลท มี 3 ไอโซเลท ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ SuRW02, SuRW01 และ LbRW03 ในการทดลองครั้งนี้ endophytic bacteria มีกลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *F. oxysporum* 2 แบบ คือการสร้างสารปฏิชีวนะ และกลไกการแข่งขัน หลังสิ้นสุดการทดสอบได้ทำการคัดเลือก endophytic bacteria ไอโซเลท SuRW02 มาใช้ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์ต่อไป

ในการทดสอบความสามารถในการลดการเกิดโรคพบว่า ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่าเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วย endophytic bacteria สามารถลดการเกิดโรคได้มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วยสารเคมีแคปแทน แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เมล็ดพันธุ์ไม่เคลือบ นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วย endophytic bacteria สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศได้อีกด้วย

หลังจากการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์เป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่า endophytic bacteria ที่เคลือบบนเมล็ดพันธุ์มีปริมาณลดลงเรื่อย ในทุกๆเดือน ดังนั้นไม่ควรเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน ในส่วนคุณภาพเมล็ดพันธุ์การเคลือบเมล็ดพันธุ์ด้วย endophytic bacteria ไม่ส่งผลกระทบต่อความชื้นของเมล็ดพันธุ์ และยังมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ เมื่อทำการเก็บรักษามาแล้ว 4 เดือน

ดังนั้นจากผลการทดลองเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วย endophytic bacteria สามารถช่วยลดการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. ได้ และยังสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศได้อีกด้วย แต่ในการนำมาใช้ไม่ควรเก็บรักษาเป็นระยะเวลายาวนาน เนื่องจากปริมาณแบคทีเรียที่ทำการเคลือบมีปริมาณลดลง ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโต

5.3 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อเนื่องจากงานวิจัยที่รายงานไว้ในวิทยานิพนธ์ครั้งนี้อย่างน้อย 2 เรื่องคือ

1. ศึกษาวิธีการเคลือบเมล็ดพันธุ์ที่สามารถคงระดับจำนวนประชากร endophytic becteria ให้สามารถเก็บรักษาได้ยาวนานขึ้น

2. ศึกษาวิธีการนำ endophytic bacteria ไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มคุณภาพเมล็ดพันธุ์โดยวิธีการอื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตงานวิจัย

6.1 เผยแพร่ผลงาน และตีพิมพ์ในการประชุมวิชาการ

Prasom, P., Sikhao, P., and Koohakan, P. 2017. *In Vitro* Study of Endophytic Bacteria Isolated from Tomato Plant against *Fusarium oxysporum*. International Journal of Agricultural Technology.Vol. 13(7.1): 1217-1230

[ฐานข้อมูล TCI กลุ่ม 1]

6.2 การผลิตบัณฑิต

นางสาวปาณิศา ประสม

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กฤติยา ไชยนอก. 2547. มะเขือเทศกับไลโคพีน. จุลสารข้อมูลพืชและสมุนไพร 21(3).

กิตติวรรณ กล้ารอด และ บุญมี ศิริ 2557. การเปรียบเทียบชนิดของพอลิเมอร์ต่อการเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศลูกผสม. แก่นเกษตร 42(ฉบับพิเศษ 1): 53-60.

กุศล ถมมา และ พิศาล ศิริธร. 2558. ผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ในการเคลือบเมล็ด เพื่อควบคุมเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* สาเหตุโรคยางไหลของแตง. วารสารแก่นเกษตร 40: 53-60

จักรพงษ์ กางโสภา บุญมี ศิริ และ อนันต์ วงเจริญ. 2557. ผลของการพอกเมล็ดร่วมกับสารเคมีป้องกันเชื้อราต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ยาสูบเวอร์จิเนีย. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่15 ณ วิทยาลัยการปกครองท้องถิ่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น 594-602.

ฉวีวรรณ สุดจิตร. 2560. การเก็บข้อมูลองค์ประกอบผลผลิตมะเขือเทศราชินี ในงานทดลอง วิจัย ของส่วนการใช้น้ำชลประทาน. วารสารข่าวเกษตรชลประทาน: 1-29.

ชวาลา บุรณศิริ. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ

ธิดารัตน์ แก้วคำ. 2560. การยักระดับคุณภาพเมล็ดพันธุ์ด้วยแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช. วารสารแก่นเกษตร 45(1):197-208

บุญมี ศิริ, ชินานาตย์ ไกรนารถ, นงนุช แสงหิน และพจนา สีขาว. 2554. ผลของการกระตุ้นการงอกด้วย PEG6000 ร่วมกับสารเคมีชนิดต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศลูกผสม. วารสารแก่นเกษตร 39 (พิเศษ):104-111.

ปราโมทย์ ทิพย์ดวงตา. 2534. ยาเม็ดเคลือบฟิล์ม. ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พจนา สีขาว. 2559. การเคลือบเมล็ดเพื่อป้องกันการปลอมแปลงเมล็ดพันธุ์.วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 34 (3): 157-163

พิศาล ศิริธร 2530. โรคของเมล็ดพันธุ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พิสิทธิ์ สุทธิอารมณ์ และ ภารุณี ถนอมเกียรติ. 2535. Tablet Coating. แผนกวิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

เพียรกิจ แดงประเสริฐ. 2530. ยาเม็ด. ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาณี ทองพำนัก, วุฒิชัย ทองดอนแอ, ประภาส ประสิทธิสูงเนิน, กนิษฐา สังคะหะ และญาณี มั่นอ้น. 2540. การเคลือบและการพอกเมล็ดพันธุ์พืช และการใช้ประโยชน์. รายงานผลการวิจัยประจำปี ทุนอุดหนุนวิจัยปี 2540. ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 38 น.

ภาณี ทองพำนัก, วุฒิชัย ทองดอนแอ, ประภาส ประสิทธิสูงเนิน, กนิษฐา สังคะหะ, ญาณี มั่นอ้น และนันทนา ชื่นอิ่ม. 2541. การเคลือบเมล็ดพันธุ์พืช. รายงานการสัมมนาเมล็ดพันธุ์พืชแห่งชาติ ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มณีฉัตร นิกรพันธุ์. 2538. มะเขือเทศ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพ. 98 น.

วรรณวิไล อินทนูจิระเดช แจ่มสว่างภาณี ทองพำนัก และวุฒิชัย ทองดอนแอ (2554). การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Gliocladium virens* ที่เคลือบเมล็ดผักคะน้าในการป้องกันโรคเน่าระดับดินของต้นกล้า. *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 39. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ.

วัชรา นาทา วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์และ สุชีลา เตชะวงค์เสถียร. 2557. ประเมินสายพันธุ์มะเขือเทศรับประทานสดผลใหญ่ต่อโรคเหี่ยวเหลืองจากเชื้อ Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersicirace*). วารสารแก่นเกษตร 42 (ฉบับพิเศษ 3): 829-834.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 69 น.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัด. 2537. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ. ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 249 น.

สุพจน์ กาเซ็ม พรนภา คำกองแก้ว วราภรณ์ บุญเกิด และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2554. ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ชนิดใหม่สำหรับการรักษาคุณภาพเมล็ดพันธุ์และการปรับใช้ในแปลงเพื่อควบคุมโรคใบขีดของข้าวโพดหวาน. *ใน* การประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35 ณ โรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพ. 198-205.

สุริยา ตราชู และบุญมี ศิริ. 2557. ผลของการพอกเมล็ด ร่วมกับแมกนีเซียมซัลเฟตและโพแทสเซียมคลอไรด์ ต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ยาสูบ. *ใน* การประชุมทางวิชาการเมล็ดพันธุ์พืชแห่งชาติ ครั้งที่ 11. 399-408.

อรสา ดิสถาพร ธงชัย สภาพวรศักดิ์ และจิราภา จอมไธสง. 2540. การปลูกมะเขือเทศ. เอกสารคำแนะนำ กรมส่งเสริมการเกษตร. 35 น.

อนันต์ วงเจริญ. 2557. การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa L.*) ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งราสาเหตุโรคข้าว. วาสารแก่นเกษตร. 42: 385-396.

Abdallah, R. A. B., Mokni-Tlili, S., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., and Daami-Remadi, M. (2016). Biocontrol of Fusarium wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. Biological Control 97: 80-88.

Akköprü, A. and Demir, S., 2005. Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. Journal Phytopathology 153: 544–550.

Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K., and Thajuddin, N. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. Annals of Microbiology 62(2): 805-810.

Bibi, F., Yasir, M., Song, G.C., Lee, S.Y. and Chung, Y.R., 2012. Diversity and characterization of endophytic bacteria associated with tidal flat plants and their antagonistic effects on Oomycetous plant pathogens. Plant Pathology Journal 28: 20–31.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacon, C.W. and White, J.F. (2000). Microbial Endophytes, Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Cazorla, F.M., D. Romero., A. Perez-Garcıa., B.J.J. Lugtenberg., A. Vicente, and G. Bloemberg. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. J. Appl. Microbiol. 103: 1950-1959

Chandel, S., Allan, E. J., and Woodward, S. 2010. Biological control of *Fusarium oxysporum* f .sp. *lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. Journal of Phytopathology 158(78):470-478.

Compant, S., B. Duffy, and J. Nowak. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principle, mechanisms of action, and future prospects. Appl Environ Microb. 71: 4951-4959.

Cook, R.J. and R.F. Baker. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. An. Phythopathol. Soc.,St. Paul, Minnesota. 539

Elad, Y., Kalfon, A., and Chet, I. 1982. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton by seed-coating with *Trichoderma* spp. spores. Plant and Soil 66(2): 279-281.

Glick, B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica.16p.

Hanssan, Z.A., Young, S.D., Hepburn, C. and Arizal, R. 1990. An evaluation of urea rubber matrices as slow-release fertilisers. Fertilizer Research 22: 63-70.

Herrera, J.M., G. Rubio., L. Levy., J.A. Delgado., C.A. Lucho-Constantino., S. Islas-Valdez, and D. Pellet. 2016. Emerging and established technologies to increase nitrogen use efficiency of cereals. Agronomy 6(25): 1-19.

Hu, X., Roberts, D. P., Maul, J. E., Emche, S. E., Liao, X., Guo, X., and Liu, S. 2011. Formulations of the endophytic bacterium *Bacillus subtilis* Tu-100 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape and improve plant vigor in field trials conducted at separate locations. Canadian Journal of Microbiology 57(7): 539-546.

Hundley NJ. 2005. Structure Elucidation of bioactive compounds isolated from endophytes of *alstonia scholaris* and *acmena graveolens*. MS thesis. Univ. of Brigham Young : 99 p.

Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., and Lee, I. J. 2014. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. Journal of Microbiology 52(8), 689-695.

Kaewkham, T., R.K. Hynes, and B. Siri. 2016. The effect of accelerated seed ageing on cucumber germination following seed treatment with fungicides and microbial biocontrol agents for managing gummy stem blight by *Didymella bryoniae*. Biocontrol Science and Technology 26(8): 1048-1061.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kaufman, G. 1991. Seed coating: a tool for stand establishment; a stimulus to seed quality. HortTechnology 1(1): 98-102.

Kumar, J., Nisar, K., Arun Kumar, M. B., Walia, S., Shakil, N. A., Prasad, R., and Parmar, B. S. 2007. Development of polymeric seed coats for seed quality enhancement of soybean (Glycine max). Indian Journal of Agricultural Science. 77(11): 738-743.

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.

Lewis, J.A. and Papavizas, G.C. 1987. Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of Rhizoctonia damping-off. Plant Pathology 36: 438-446.

Liu, H., Y. He., H. Jiang., H. Peng., X. Huang., X. Zhang., L.S. Thomashow, and Y. Xu. 2007. Characterization of a phenazineproducing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broadspectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. Curr. Microbiol. 54: 302-306.

Marlatt, M.L., Correll, J.C., Kaufmann, P. and Cooper, P.E. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race3 in the United States. Plant Disease. 80 (12):1336-1342.

Mehnaz, S., D.N. Baig, and G. Lazarovits. 2010. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. Journal Microbiology Biology 20: 1614-1623

Monda, E.O. 2002. Biological control of Fusarium wilt of tomato. Journal of Tropical Microbiology 1: 74–78.

Moretti, M., Gilardi, G., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 2008. Biological control potential of *Achromobacter xylosoxydans* for suppressing Fusarium wilt of tomato. Int. Journal Botany 4, 369–375.

Nandhini, S., Sendhilvel, V., and Babu, S. 2012. Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici,* the wilt pathogen. Journal of Biopesticides 5(2): 178.

Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., and Chandra, N. S. 2016. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Scientific reports 6: 21367.

Nejad, P., and Johnson, P. A. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological control 18(3): 208-21

Noel, T.C., Sheng, C., Yost, C.K., Pharis, R.P., and Hynes, M.F.. 1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. Canadian Journal of Microbiology 42: 279-283.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nyoki, D. and Ndakidem, P.A. 2014. Effects of *Bradyrhizobium japonicum* inoculation and supplementation with phosphorus on macronutrients uptake in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). American Journal of Plant Science 5(4): 442-451.

O'Callaghan, M., Swaminathan, J. Lottmann., D. Wright, and T.A. Jackson. 2006. Seed coating with biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. NZ Plant Prot. 59: 80-85.

Patel, H.A., Patel, R.K., Khristi, S.K., Parikh, K., Rajendran, G., 2012. Isolation and characterization of bacterial endophytes from *Lycopersicon esculentum* plant and their plant growth promoting characteristics. Nepal Journal of Biotechnology 2: 37–52.

Praveen, K.G., Desai, S., Amalraj, E.L.D., Mir Hassan Ahmed, S.K. and Reddy, G. 2012. Plant growth promoting *Pseudomonas* spp. from diverse agro-ecosystems of India for *Sorghum bicolor* L. Journal Biofert Biopest. 7: 1-8.

Pamuk, S.G. 2004. Controlling water dynamic in Scots pine (*Pinus sylvertris* L.) seed before and during seedling emergence. Doctoral Thesis. Department of Silviculture, Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, SWEDEN :1-29.

Tank, N., and Saraf, M. 2009. Enhancement of plant growth and decontamination of nickel-spiked soil using PGPR. J. Basic Microbiol. 49: 195-204.

Taylor, A. G., Eckenrode, C. J., and Straub, R. W. 2001. Seed coating technologies and treatments for onion: challenges and progress. HortScience 36(2): 199-205.

Tu, L., He, Y., Shan, C., and Wu, Z. 2016. Preparation of microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 seed coating agents and their effects on the growth of cotton seedlings. BioMed Research International: 1-8.

Shahab, S., Nuzhat, A. and Nasreen, S.K. 2009. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. African Journal of. Agricultural Research 4: 1312-1316.

Sharma, K., Singh, U., Sharma, P., Kumar, A., and Sharma, L. 2015. Seed treatments for sustainable agriculture-A review. Journal of Applied and Natural Science 7(1): 521-539.

Shweta, B., Maheshwari, D. K., Dubey, R. C., Arora, D. S., Bajpai, V. K., and Kang, S. C. 2008. Beneficial effects of *fluorescent pseudomonads* on seed germination, growth promotion, and suppression of charcoal rot in groundnut (*Arachis hypogea* L.). Journal Microbiol Biotechnol 18: 1578-1583.

Wang, S., Wang, W., Jin, Z., Du, B., Ding, Y., Ni, T., and Jiao, F., 2013. Screening and diversity of plant growth promoting endophytic bacteria from peanut. African Journal of Microbiology Research 7 :875–884.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

แบบรายงานการใช้จ่ายเงินในโครงการ

(หน้าถัดไป)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รหัสโครงการ/รหัสสัญญา 2561-01-04-013

แบบรายงานการใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานการเงินครั้งสุดท้ายรอบ 12 เดือน ประจำปีงบประมาณ 2561

☐ แหล่งงบประมาณแผนดิน (แบบปกติ) ✓แหล่งเงินรายได้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การทดสอบประสิทธิภาพของ endophytic bacteria ในการเคลือบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เพื่อลดการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อฟูซาเรียม

(ภาษาอังกฤษ) Testing on the efficiency of endophytic bacteria as seed coating for Fusarium wilt disease reduction in tomato

ชื่อ-สกุลหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน/ผู้วิจัย รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี เดือนตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

ข้อมูลการรายงานค่าใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

1. การเบิกจ่ายงบประมาณ (กรณีการจ่ายเงินถ้าจ่ายงวดเดียวให้ลบข้อที่ไม่เกี่ยวข้องออก)

งวดที่ 1 59,500 บาท 85 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ป/ด/ว) 20 กันยายน 2560

งวดที่ 2 10,500 บาท 15 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ป/ด/ว) 28 กุมภาพันธ์ 2561

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน)
งบบุคลากร:ค่าจ้างชั่วคราว	60,000.00	60,000.00	0.00
งบดำเนินงาน			
ค่าตอบแทน	-	-	-
ค่าใช้สอย			
ค่าวัสดุ	10,000.00	10,100.00	(100.00)
ค่าสาธารณูปโภค	-	-	-
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
รวม	70,000.00	70,100.00	(100.00)

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

(.....)

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงิน/เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารผลผลิตงานวิจัย

(หน้าถัดไป)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

International Journal of Agricultural Technology 2017 Vol. 13(7.1):1217-1230
Available online http://www.ijat-aatsea.com
ISSN 1686-9141

In Vitro Study of Endophytic Bacteria Isolated from Tomato Plant against *Fusarium oxysporum*

Panisa Prasom, Potjana Sikhao and Prommart Koohakan *

Faculty of Agricultural Technology, King Mongut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Panisa Prasom, Potjana Sikhao and Prommart Koohakan (2017). In Vitro Study of Endophytic Bacteria Isolated from Tomato Plant against *Fusarium oxysporum*. International Journal of Agricultural Technology 13(7.1): 1217-1230.

In this study, 43 isolates of endophytic bacteria isolated from healthy tomato plants against *Fusarium oxysporum*, which causes Fusarium wilt disease of tomato, was studied. Initially effects of endophytic bacteria on the growth of tomato seedlings were tested. The results showed that most endophytic bacteria did not affect the growth of tomato seedlings. Characterization by gram staining revealed that most of them were gram-positive bacteria. Subsequently they were tested on the antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* by dual culture technique. It was found that only seven isolates showed the ability to inhibit the pathogen more than 30 percent. The best isolates including SuRW02 SuRW01 and LbRW03 were highest inhibition percentage of 71.94, 68.33 and 68.19%, respectively. The potential isolates found in this study will be further study and develop for coating tomato seed which an alternative method to control Fusarium wilt disease in the future.

Keywords: endophytic bacteria, *Fusarium oxysporum,* Tomato

Introduction

Fusarium oxysporum causes Fusarium wilt in tomato is a major pathogen affecting tomato production. The symptoms of this disease include wilting, chlorosis, and stunted seedling. As a result, the plants die or got lower yields (Hussain *et al.,* 2016). Agriculturists had many controlled measures by using several methods, including cultural technique and chemical application. Especially the use of chemicals has been widely used. Although the use of chemicals is effective in controlling the disease, this medthod is harmful to organisms and the environment. Therefore, safe strategies would be used in the management of this disease.

Biological control has been reported as a potential for the management of several disease. It consists of a variety of antagonistic microorganisms which have activity for controlling of various plant pathogens, including Fusarium

* **Corresponding Author:** Prommart Koohakan; **E-mail:** prommart.ko@kmitl.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

wilt pathogen (Larkin and Fravel., 1998). Among of that endophytic bacteria is one of the benefit microbial, which is a group of microorganisms that live in healthy plant tissue and did not negative effect on plant (Bacon and White, 2000; Hundley, 2005). Several studies of biological control by endophytic bacteria have shown that they were able to suppress the pathogen of bacterial wilt disease in tomato (Purnawati *et al.,* 2014). Also, inoculation with bacterial endophytes has been demonstrated to reduce disease symptoms caused by vascular wilt pathogens such as *Verticillium dahlia* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) (Nejad and Johnson., 2000). Nandhini *et al*. (2102) also reported that endophytic bacteria isolated from root, stem, leaves and fruits of healthy tomato plants can control *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici.* Therefore, this research presents the results of in vitro antagonistic activity of endophytic bacteria against *Fusarium oxysporum* and useful information for alternative biological control strategy in the future.

Objectives: Isolation and screening of endophytic bacteria that has potential to control *Fusarium oxysporum.* Selection potential isolate for further study as seed bio-coating of Fusarium wilt management in the future.

Materials and methods

Isolation of Fusarium oxysporum and pathogenicity tests

Fusarium oxysporum was isolated from tomato plant exhibiting symptoms of Fusarium wilt by tissue transplanting technique. Identification was checked based on morphological characteristics.

Pathogenicity tests: Fungal pathogens were grown for 7 days on Potato dextose agar (PDA). Then the spore suspension at concentration of 10^6 spore / ml was prepared for this test. Tomato seedlings at 3 weeks of age were test by root dip technique (cut roots and dip into the spore suspension for 20 minutes), before transplanted into planting bag, and compared with dipping in sterile distilled water (control). Disease severity was evaluated at 2 week after inoculation by 0-3 scoring which modified from Marlatt *et al.* (1996); where 0 = healthy, 1 = temporary wilt, 2 = Permanent wilt and 3= plant die. Most violent isolate was selected to be used in next experiments. The experimental design was completely randomized design (CRD) with 5 replications.

Isolation and screening of beneficial endophytic bacteria for tomato plant

Isolation of endophytic bacteria was done from root, stem and leaves of healthy tomato plants. All parts of plants were surface disinfected by soaking in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

70 % ethyl alcohol for 30 sec., washed with sterile distilled water, follow by soaking in 5% sodium hypochlorite for 2 min then washed again with sterile distilled water and dried on sterile filter paper. After surface disinfected, each sample was ground by sterile mortar and prepared the suspension to 10^{-1}-10^{-4}. Then each dilution of suspensions were cultured by pour plate technique on nutrient agar (NA) and incubated for 48 h at room temperature. Single colony occurred on the culture was move onto NA by streak plate technique to obtain pure colony. Morphological examination consists of colony shape, colony color, cell shape, and gram test by using 3%KOH and gram stain were also examined.

Screening for beneficial endophytic bacteria: All isolates obtained from healthy tomato plant was cultured in nutrient broth (NB) and incubated on rotary shaker for 48 hr. The culture was collected and centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes to obtain the bacterial pellet and prepared to bacterial suspension which adjusted the concentration equal to 0.5 Mcfarland standard solution turbidity. A 10 ml of bacterial suspensions were added to the pots of tomato seedlings at 3 day of age grown in sterilized peat moss. The experimental design was completely randomized design (CRD) with 4 replications. After 7 days of inoculation with endophytic bacteria, the seedlings survived and the growth data was collected. The growth data including stem height, stem weight, root weight, total weight and number of leaves. Data were calculated for growth index of seedling vigor index (svi) as following formula:

svi = Average germination percentage x Average weight per plants

$$\% \text{ svi} = \frac{\text{svi of treatment}}{\text{svi of control}} \text{ X } 100$$

In vitro antagonistic activity of endophytic bacteria against Fusarium oxysporum

Fusarium oxysporum was cultured on PDA for 7 days. Endophytic bacteria were cultured on NA for 2 days. Antagonistic activity was evaluated by using dual culture technique on petridis containing PDA medium. The agar plug of pathogen was placed at the center of culture medium and endophytic bacteria were parallel streaked on the left and right sides of the pathogen at 2 cm. length from the edge of the plate then incubated at room temperature. Control plates were streaked with sterile distilled water. Evaluation of mycelial growth inhibition when pathogen grown full in control plate. The mycelial growth inhibition rate (IR) was calculated using the formula as follow: [(C2-C1)/ C2 x 100 where C2: diameter of the pathogen colony on control plate. and C1: diameter of the pathogen colony on the antagonist plate. The experimental design was completely randomized design (CRD) with 4 replications.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Statistical analysis

The results were subjected to the analysis of variance and means were separated according to the Duncan's multiple range test at $P \leq 0.05$.

Results

Pathogen and pathogenicity

Fusarium oxysporum isolated from tomato wilt disease plants were found the mycelium is delicate white to pink and produce charmadospore microconidia and macroconidia. Macroconidia have three-septate. (Figure1). In pathogenicity tests, the tomato showed symptom of permanent wilting to dead and browning of the vascular tissues after 7 days of inoculation (Figure2). The evaluation showed that the disease severity was 2.4 and the disease incidence was 80%.

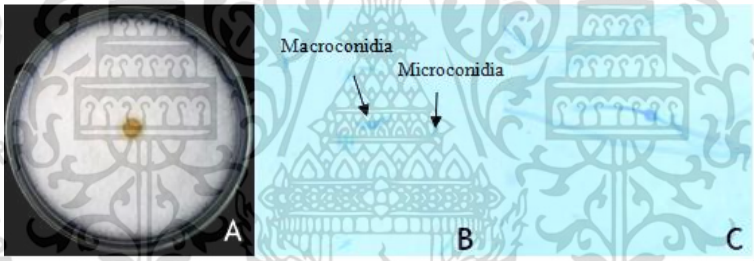


Figure 1. Morphology of *Fusarium oxysporum* (A =colony B = microconidia and macroconidia C = charmadospore)

Figure 2. Symptom of wilt disease on tomato seedling at 7 days after inoculation (A =control B = inoculation with *Fusarium oxysporum* C = browning of the vascular tissues)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Morphological characteristics and effects on growth and seedling vigor of endophytic bacteria

Fourty three isolates of endophytic bacteria isolated from each part of healthy tomato plants (root leaves and stem) was found to have a variety of morphological characteristics. Most of them were gram-positive bacteria, which was divers in colony characteristic as shown detail in Table 1 and Figure3.

In addition, 43 isolates of endophytic bacteria were tested on tomato seedlings. The results showed that most endophytic bacteria did not affect the growth of tomato seedlings. Several endophytic bacteria were found that can be growth promoting and had seedling vigor more than 20 percentages when compare with control. Those isolates including LaRW01, LaKY03, LaLW02, LaLY02, LaTY01, LaTY02, LaTO01, SuLW01, SuLY03, SuRW02, SuRW04, SuRY01, SuRY02, SuRB01, SuKY01, LbTW01, LbLW02, and LbRW02. The details of data were shown in Table 2.

Table 1. Characteristic of endophytic bacteria isolated from healhy tomato plants.

Isolate	colony				3%KOH test	Gram staining	shape
	color	shape	margin	surface			
LaRW01	white	circular	entire	mucoid	+	+	coccus
LaRW02	cloudy white	circular	erose	smooth	-	-	coccus
LaRW03	white	irregular	undulate	smooth	+	+	bacillus
LaRY01	white	circular	erose	rough	+	+	bacillus
LaKY01	yellow	irregular	entire	mucoid	+	+	bacillus
LaKY02	yellow	circular	entire	mucoid	+	+	coccobacilli
LaKY03	light yellow	circular	entire	mucoid	+	+	coccobacilli
LaKW01	white	circular	entire	smooth	+	+	coccobacilli
LaKW02	white	circular	entire	mucoid	+	+	coccus
LaLW01	white	circular	entire	rough	-	-	coccus
LaLW02	white	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
LaLW03	white	circular	entire	mucoid	-	-	bacillus
LaLY01	light yellow	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
LaLY02	light yellow	circular	entire	mucoid	+	+	coccus
LaLY03	light yellow	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
LaTY01	yellow	circular	entire	mucoid	+	+	coccus
LaTY02	yellow	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
LaTW01	white	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
LaTO01	orange	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
SuLW01	cloudy white	circular	erose	smooth	+	+	bacillus
SuLW02	light yellow	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
SuLW03	cloudy white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
SuLW04	cloudy white	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
SuLY01	light yellow	circular	entire	mucoid	+	+	coccus
SuLY02	yellow	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1. Characteristic of endophytic bacteria isolated from healhy tomato plants (continue).

Isolate	colony				3%KOH test	Gram staining	shape
	color	shape	margin	surface			
SuLY03	light yellow	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
SuLO01	orange	circular	entire	smooth	+	+	bacillus
SuRW01	cloudy white	circular	undulate	rough	+	+	bacillus
SuRW02	cloudy white	irregular	undulate	rough	+	+	bacillus
SuRW03	cloudy white	circular	entire	mucoid	+	+	coccobacilli
SuRW04	white	irregular	undulate	rough	+	+	bacillus
SuRY01	light yellow	circular	entire	mucoid	+	+	bacillus
SuRY02	light yellow	circular	entire	smooth	+	+	bacillus
SuRY03	light yellow	circular	entire	mucoid	-	-	coccus
SuRB01	egg	circular	undulate	smooth	+	+	bacillus
SuTW01	white	irregular	entire	mucoid	-	-	coccobacilli
SuKY01	light yellow	irregular	entire	mucoid	+	+	bacillus
LbTW01	cloudy white	irregular	erose	rough	+	+	bacillus
LbLW01	cloudy white	irregular	erose	rough	+	+	bacillus
LbLW02	cloudy white	irregular	erose	smooth	-	-	coccus
LbRW01	cloudy white	irregular	erose	smooth	+	+	bacillus
LbRW02	cloudy white	irregular	erose	rough	+	+	bacillus
LbRW03	cloudy white	circular	entire	smooth	+	+	bacillus

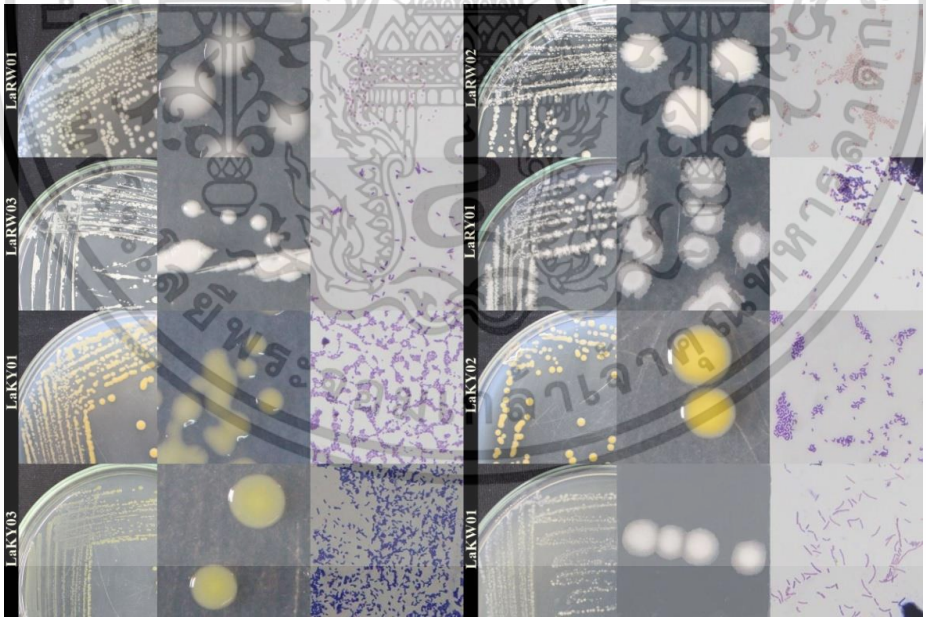


Figure 3. Morphology of endophytic bacteria isolated from healthy tomato plants (colony on NA (left), colony at 6.7X and gram staining (right)).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

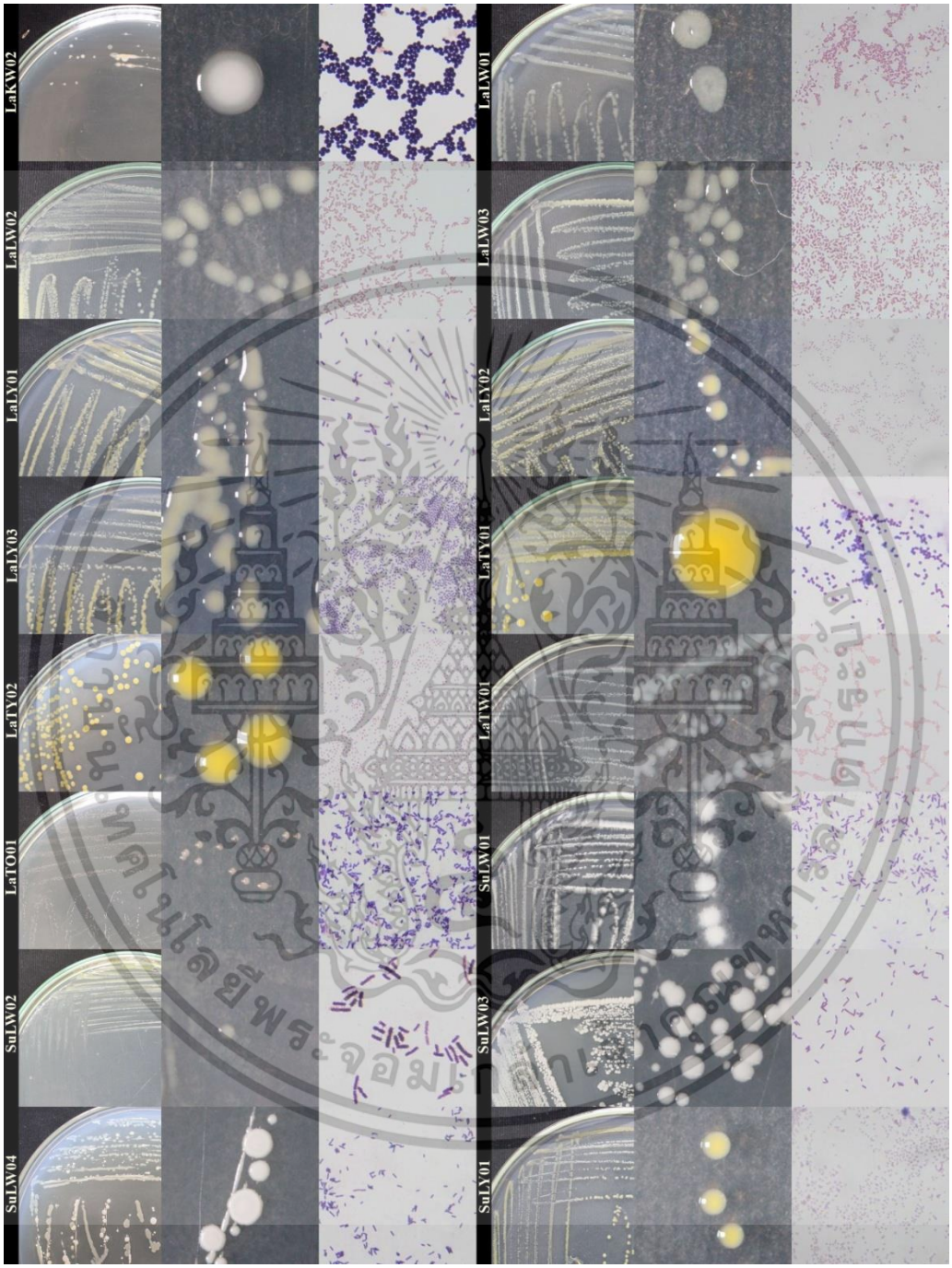


Figure 3. Morphology of endophytic bacteria isolated from healthy tomato plants (colony on NA (left), colony at 6.7X and gram staining (right)). (Continue).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

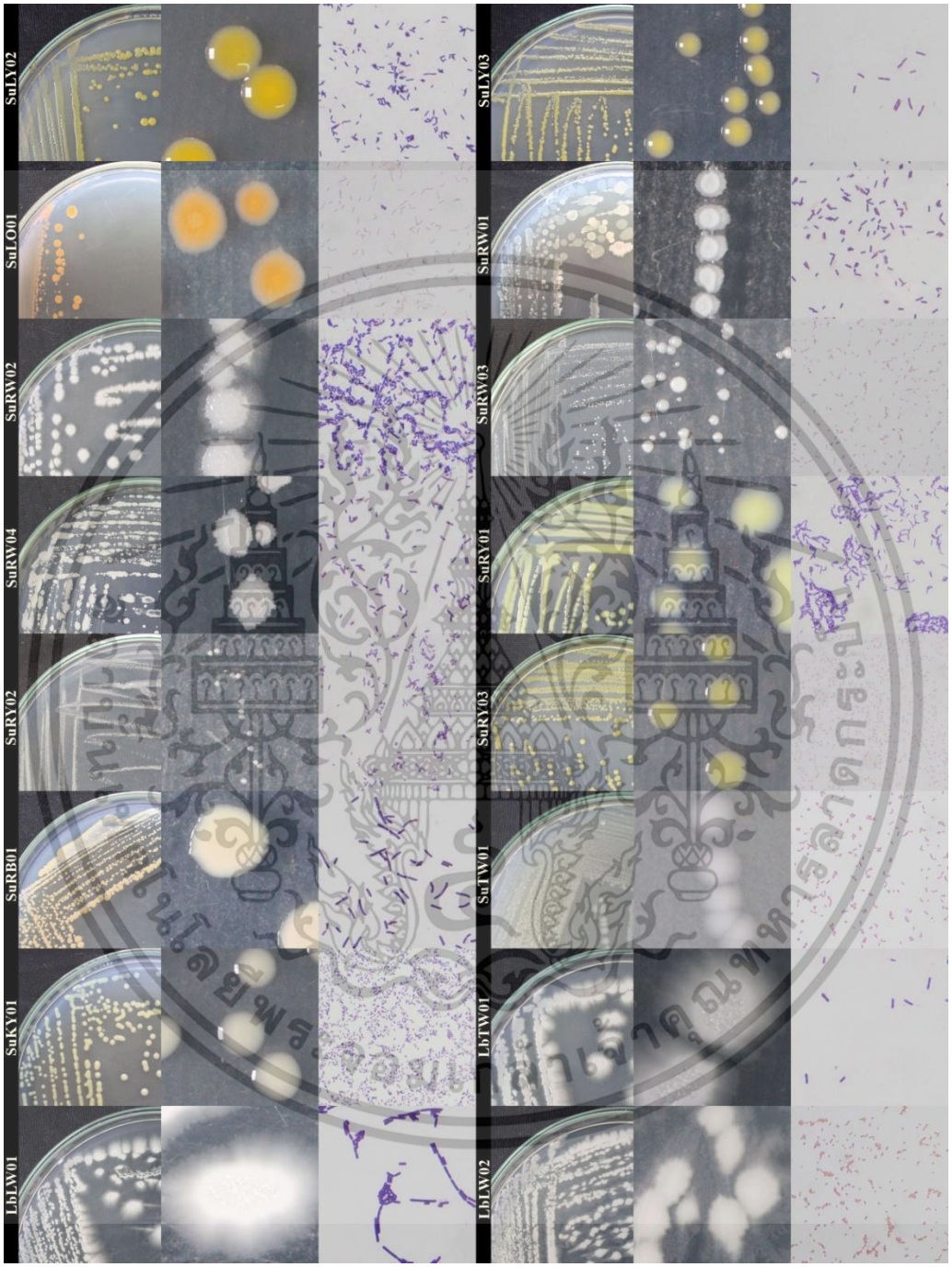


Figure 3. Morphology of endophytic bacteria isolated from healthy tomato plants (colony on NA (left), colony at 6.7X and gram staining (right)). (Continue)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

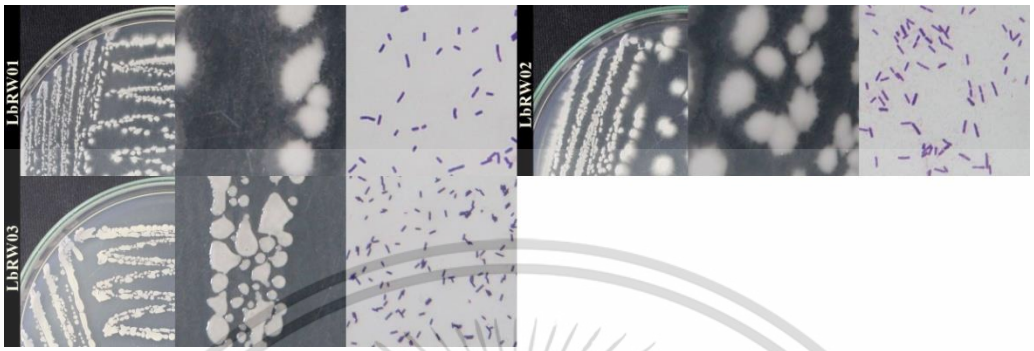


Figure 3. Morphology of endophytic bacteria isolated from healthy tomato plants (colony on NA (left), colony at 6.7X and gram staining (right)). (Continue)

Table 2. Effect of endophytic bacteria isolated from healhy tomato plants on the growth of tomato seedlings.

Isolates	Suvival of seedling	Number of leaves	Heigh of shoot (cm.)	Fresh weight (g)			% svi
				root	shoot	total	
control	100a[1/]	2.00a	6.30ab	0.089cd	0.452f	0.541ghij	100.00
LaRW01	100a	1.95a	6.00 ab	0.136a	0.562bcd	0.698cbd	129.09
LaRW02	95ab	1.90a	5.37ab	0.095c	0.470ef	0.565ghij	99.16
LaRW03	95ab	2.00a	6.50ab	0.119ab	0.436 f	0.555ghij	97.41
LaRY01	100a	1.90a	5.50ab	0.073def	0.466ef	0.537ghij	99.30
LaKY01	100a	1.95a	5.50ab	0.073def	0.518de	0.591fgh	109.23
LaKY02	100a	1.90a	5.37ab	0.071def	0.437f	0.508j	93.99
LaKY03	100a	2.00a	5.62ab	0.086cdef	0.561bcd	0.647def	119.63
LaKW01	100a	1.90a	6.00ab	0.095c	0.465ef	0.560ghij	103.46
LaKW02	85c	1.90a	5.87ab	0.067f	0.437f	0.505j	79.30
LaLW01	100a	1.95a	5.87ab	0.121ab	0.443f	0.565ghij	104.38
LaLW02	100a	1.95a	5.50ab	0.120ab	0.562bcd	0.682cd	126.09
LaLW03	100a	1.90a	6.12ab	0.124ab	0.4675ef	0.591fgh	109.23
LaLY01	100a	1.90a	5.75ab	0.086cdef	0.436f	0.522ij	96.53
LaLY02	100a	2.00a	5.50ab	0.126ab	0.561bcd	0.687cd	127.02
LaLY03	100a	1.90a	5.25ab	0.095c	0.4385f	0.533hji	98.61
LaTY01	100a	2.00a	5.62ab	0.116b	0.562bcd	0.678cd	125.40
LaTY02	100a	1.95a	5.87ab	0.118ab	0.578bc	0.696cbd	128.63
LaTW01	100a	1.95a	6.12ab	0.069ef	0.428f	0.497j	91.91
LaTO01	100a	2.00a	6.00ab	0.115b	0.632a	0.747ab	138.10
SuLW01	100a	1.95a	6.37 ab	0.116b	0.536cd	0.652de	120.55
SuLW02	100a	1.95a	5.87 ab	0.071def	0.441f	0.512j	94.68
SuLW03	100a	2.00a	5.75 ab	0.121ab	0.476ef	0.597efg	110.39
SuLW04	100a	2.00a	5.75 ab	0.0675f	0.477ef	0.545ghij	100.69

[1/]: Means in the same column with different letter are significant difference at P=0.05, according to Duncan's Multiple Range test.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2. Effect of endophytic bacteria isolated from healhy tomato plants on the growth of tomato seedlings (Continue).

Isolates	Suvival of seedling	Number of leaves	Heigh of shoot	Fresh weight			% svi
				root	shoot	total	
SuLY01	100a	1.85a	6.00ab	0.079 cdef	0.4725ef	0.551 ghij	101.84
SuLY02	100a	1.95a	6.00ab	0.086cdef	0.442f	0.528ij	97.69
SuLY03	100a	1.90a	6.00ab	0.123ab	0.606ab	0.728abc	134.64
SuLO01	100a	2.00a	6.37ab	0.0905c	0.466ef	0.561 ghij	103.69
SuRW01	95ab	2.00a	5.75ab	0.068ef	0.442f	0.511j	89.73
SuRW02	100a	1.90a	5.37ab	0.128ab	0.518de	0.646def	119.39
SuRW03	95ab	2.00a	6.37ab	0.0685ef	0.437cd	0.506j	88.85
SuRW04	100a	2.00a	6.00ab	0.115b	0.538cd	0.653de	120.78
SuRY01	100a	1.95a	6.25ab	0.126ab	0.630a	0.756a	139.72
SuRY02	100a	2.00a	6.87a	0.086cdef	0.605ab	0.691cbd	127.71
SuRY03	100a	2.00a	6.62ab	0.118ab	0.466ef	0.583ghi	107.85
SuRB01	100a	1.95a	6.12ab	0.116b	0.537cd	0.653de	120.78
SuTW01	100a	1.90a	6.12ab	0.128ab	0.577bc	0.705abcd	130.24
SuKY01	100a	2.00a	6.62ab	0.118ab	0.537cd	0.655de	121.01
LbTW01	100a	1.90a	5.75ab	0.069ef	0.441f	0.510j	94.22
LbLW01	90bc	1.95a	5.75ab	0.086cde	0.475ef	0.562 ghij	93.53
LbLW02	100a	1.90a	5.75ab	0.126ab	0.537cd	0.663d	122.63
LbRW01	100a	1.85a	5.7ab	0.071def	0.436f	0.507j	93.76
LbRW02	100a	1.95a	5.87ab	0.086cdef	0.576bc	0.662d	122.40
LbRW03	100a	1.95a	5.87ab	0.065ef	0.443f	0.512j	94.68

1/: Means in the same column with different letter are significant difference at P=0.05, according to Duncan's Multiple Range test.

Effect of endophytic bacteria against Fusarium oxysporum

The result of antagonistic activity of 43 isolates endophytic bacteria against *Fusarium oxysporum* were found that 25 isolates were significantly different compared with control. Among of these, only seven isolates showed the ability to inhibit the pathogen growth more than 30 percent, including LaLW03, LaLY01, SuLW03, LaRY01, SuRW01, SuRW02, and LbRW03 (Figuer 4). The best isolates were SuRW02 SuRW01 and LbRW03, which had the highest inhibition percentage of 71.94, 68.33 and 68.19%, respectively (Table 3).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

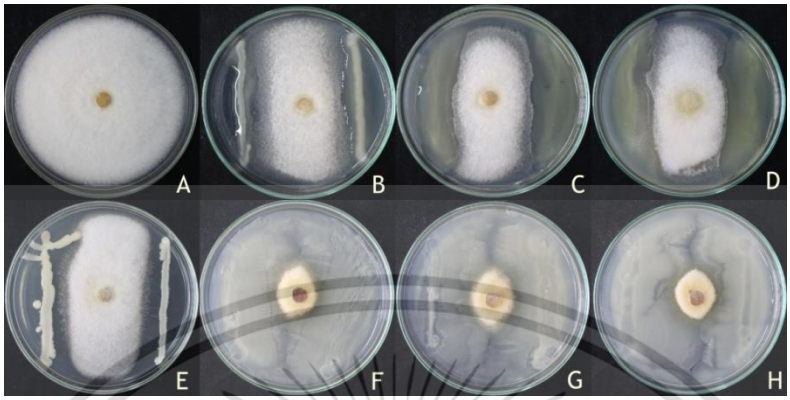


Figure 4. Dual-culture of seven isolates of endophytic bacteria that showed ability to inhibit the pathogen growth more than 30 percent (A= control, B= LaRY01, C=LaLW03, D=LaLY01, E= SuLW03, F= SuRW01, G= SuRW02, H= LbRW03)

Table 3. Antagonistic trait of 43 isolates of endophytic bacteria isolated from healthy tomato plants to suppress the growth of *Fusarium oxysporum*.

Isolates	Inhibitory agiast Fusarium oxysporum	
	Diameter of colony (cm.)	% Growth inhibition
control	9.00	0.00k[1/]
LaRW01	7.00	22.22 defg
LaRW02	6.95	22.78defg
LaRW03	6.42	28.61cd
LaRY01	5.71	36.53b
LaKY01	8.77	2.50jk
LaKY02	8.95	0.00k
LaKY03	8.93	0.00k
LaKW01	8.75	2.72jk
LaKW02	8.23	8.47ij
LaLW01	7.62	15.28ghi
LaLW02	8.03	10.69hi
LaLW03	6.26	30.42bc
LaLY01	6.25	30.47bc
LaLY02	7.53	16.25fgh
LaLY03	7.50	16.67fgh
LaTY01	8.92	0.00k
LaTY02	8.87	0.00k
LaTW01	6.56	27.08cde
LaTO01	7.35	18.33fg
SuLW01	8.97	0.00k
SuLW02	7.15	20.56 efg

[1/]: Means in the same column with different letter are significant difference at P=0.05, according to Duncan's Multiple Range test.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 3. Antagonistic trait of 43 isolates of endophytic bacteria isolated from healthy tomato plants to suppress the growth of *Fusarium oxysporum.* (Continue)

Isolates	Inhibitory agiast Fusarium oxysporum	
	Diameter of colony (cm.)	% Growth inhibition
SuLW03	6.16	31.53bc
SuLW04	8.92	0.00k
SuLY01	8.87	0.00k
SuLY02	7.10	21.06efg
SuLY03	6.90	23.33def
SuLO01	9.00	0.00k
SuRW01	2.85	68.33a
SuRW02	2.52	71.94a
SuRW03	8.08	10.14hi
SuRW04	9.00	0.00k
SuRY01	7.00	22.22 defg
SuRY02	9.00	0.00k
SuRY03	8.76	0.00k
SuRB01	7.57	15.83fgh
SuTW01	6.98	22.36 defg
SuKY01	9.00	0.00k
LbTW01	7.12	20.83 efg
LbLW01	7.28	19.028fg
LbLW02	6.97	22.50 defg
LbRW01	7.12	20.83 efg
LbRW02	7.15	20.56 efg
LbRW03	2.86	68.19a

[1/]: Means in the same column with different letter are significant difference at P=0.05, according to Duncan's Multiple Range test.

Discussion

The morphological characteristic of *Fusarium* sp. isolated in this research was similar to *Fusarium oxysporum* according to Nirmaladevi *et al.* (2016) reported that the mycelia of *Fusarium oxysporum* isolates appeared delicate, white to pink, often with purple tinge. The fungus produced macroconidia, microconidia and chlamydospores. Macroconidia have 3-5 septate. Microconidia usually has non-septate or single septate. Chlamydospores, both smooth and rough walled, were abundant and formed terminally or on an intercalary basis. They are generally solitary, but occasionally form in pairs or chains.

Endophytic bacteria are bacteria that live in plant tissues. This bacterium is not harmful to plants and some species can help promote plant growth. (Bacon and White, 2000; Hundley , 2005). The results in this research showed that most endophytic bacteria did not harm tomato seedlings, also

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

promote the growth and seedlings vigor. According to Khan *et al.* (2014), Tomato plants inoculated with endophytic bacteria showed significantly increased growth attributes (shoot length, chlorophyll contents, shoot, and root dry weights). In addition, this study has shown that endophytic bacteria can be inhibiting the growth of *Fusarium oxysporum.* Several researches have reported the use of endophytic bacteria for controlling many pathogens such as *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum capsici*, *Pythium* sp., *Verticillium dahlia*, include *Fusarium oxysporum* causes Fusarium wilt in tomatoes. (Nejad and Johnson. 2000; Amaresan *et al*., 2012 and Nandhini *et al.,* 2102)**.**

This research showed that endophytic bacteria isolated from healthy tomato plants tissue are capable of promoting the growth of tomato seedlings and inhibit the growth of Fusarium oxysporum. The results of this study are the guideline for further study on the control of Fusarium sp. by biological method.

Acknowledgement

This research was supported by Geduate Research Fund from Faculty of Agricultural Technology, King Mongut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

References

Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K., and Thajuddin, N. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. Annals of microbiology, 62(2), 805-810.

Bacon, C.W. and White, J.F. (2000). Microbial endophytes, Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Hussain, I., Alam, S. S., Khan, I., Shah, B., Naeem, A., Khan, N., and Shah, S. R. A. (2016). Study on the biological control of fusarium wilt of tomato. Journal of Entomology and Zoology Studies 4(2): 525-528.

Hundley NJ. (2005). Structure Elucidation of bioactive compounds isolated from endophytes of alstonia scholaris and acmena graveolens. MS thesis. Univ. of Brigham Young.

Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., and Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte Sphingomonas sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. Journal of Microbiology, 52(8), 689-695.

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(9): 1022-1028.

Marlatt, M.L., Correll, J.C., Kaufmann, P. and Cooper, P.E. (0991). Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race3 in the United States. Plant Disease .0332-0331:(02) 01.

Nandhini, S., Sendhilvel, V., and Babu, S. (2012). Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici,* the wilt pathogen. Journal of Biopesticides 5(2): 178.

Nejad, P., & Johnson, P. A. (2000). Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological control, 18(3): 208-215.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., and Chandra, N. S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Scientific reports, 6: 21367.

Purnawati1, A., Sastrahidayat, I. R., Latief Abadi, A., and Hadiastono, T. (2014). Endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. Journal of tropical life science. 4(1):33-36.

(Received: 22 October 2017; accepted: 25 November 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้