

การศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา *Chaetomium* spp.
ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าในส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*)

Efficacy of nano elicitors from *Chaetomium* spp.
to control root rot disease of tangerine (*Citrus reticulata*)

นางสาวมงกุฎกานต์ อุดมพงษ์สุข
MONGKUTKARN UDOMPONGSUK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะศึกษาศาสตร์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-AG-M-065-316

การศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา *Chaetomium* spp.
ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าในส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*)

Efficacy of nano elicitors from *Chaetomium* spp.
to control root rot disease of tangerine (*Citrus reticulata*)

นางสาวมงกุฎกานต์ อุดมพงษ์สุข
MONGKUTKARN UDOMPONGSUK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกษตรศาสตร์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2563

KMITL-2020-AG-M-065-316

**Efficacy of nano elicitors from *Chaetomium* spp.
to control root rot disease of tangerine (*Citrus reticulata*)**

MONGKUTKARN UDOMPONGSUK

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

2020

KMITL-2020-AG-M-065-316

COPYRIGHT 2020

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าในส้มเขียวหวาน (<i>Citrus reticulata</i>)
นักศึกษา	นางสาวมงกุฎกานต์ อุดมพงษ์สุข
รหัสประจำตัว	60604002
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2563
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง

บทคัดย่อ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Chaetomium brasiliense*, *Chaetomium cochliodes* และ *Chaetomium elatum* ในการควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ไอโซเลท PN02 สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*) พบว่า ในการทดสอบเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม เชื้อรา *Ch. brasiliense* และ *Ch. elatum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยและ oospores ของเชื้อราไอโซเลท PN02 สูงที่สุด เมื่อนำเชื้อรา *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์มาสกัดและทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไอโซเลท PN02 พบว่าสารสกัดของเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่ 1000 ppm ไม่พบการเจริญของเชื้อราไอโซเลท PN02 ออกจากชิ้นวุ้น อีกทั้งยังตรวจพบ oogonia ที่มีลักษณะผิดปกติ เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพ nano-elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อราไอโซเลท PN02 มีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 2.69 – 12.88 ppm ส่วนในสภาพกระถางทดลอง ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อราไอโซเลท PN02 (inoculated control) มีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยอยู่ที่ระดับที่ 4 ส่วนทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อราไอโซเลท PN02 และฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. มีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยอยู่ที่ระดับที่ 2 – 2.75 เมื่อทำการประเมินการเจริญเติบโตของต้นส้มเขียวหวานในเดือนที่ 8 ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อราไอโซเลท PN02 มีความสูงเฉลี่ยต่ำที่สุด เท่ากับ 77.00 เซนติเมตร ส่วนทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อราไอโซเลท PN02 และฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. มีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 79.75 – 82.75 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ และได้ทำการสกัดสารจากต้นส้ม เพื่อตรวจสอบหาสาร phytoalexin เมื่อตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm ปรากฏเป็นสีฟ้าเรืองแสง และมีค่า Rf เท่ากับ 0.6

Thesis	Efficacy of nano elicitors from <i>Chaetomium</i> spp. to control root rot disease of tangerine (<i>Citrus reticulata</i>)
Student	Miss Mongkulkarn Udompongsuk
Student ID.	60604002
Degree	Master of Science
Program	Agriculture
Year	2020
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Kasem Soyong

ABSTRACT

The efficacy of *Chaetomium brasiliense*, *Chaetomium cochliodes* and *Chaetomium elatum* to control *Pythium aphanidermatum* PN02, which is a fungus that causes root rot in tangerines (*Citrus reticulata*), were exhibited in a bi-culture antagonistic test. *Ch. brasiliense* and *Ch. elatum* gave the highest significant inhibition of colony growth and oospore production of PN02. Crude extracts of the three species of *Chaetomium* spp. were produced and used for inhibiting growth of PN02. The crude extract from *Ch. brasiliense*, at the concentration 1000 ppm, had the ability to control the mycelia of PN02, which could not grow out from agar plug and exhibited abnormal oogonia. In vitro, testing of nano elicitors of *Chaetomium* spp. revealed high effectiveness of PN02 inhibition, with ED₅₀ 2.69 – 12.88 ppm. In pot experiment, the inoculated control treatment exhibited a disease severity of 4. However, the nano elicitor treatments exhibited disease severities in the range of 2 – 2.75. When plant growth was evaluated after 8 months, the inoculated control treatment showed the lowest significant growth, which 77.00 centimeter. In contrast, the nano elicitor treatments gave the highest significant, and results were in range of 79.75 – 82.75 centimeter. In phytoalexin testing, all extracts after chromatograph exhibited a fluorescent spot at R_f value of 0.6 under UV illumination at 254 nm.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สมยศ เศษภีร์คนมงคล รศ.ดร. มยุรา สุณย์วีระ และ ผศ.ดร. ศรายุทธ ผลโพธิ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและชี้แนะต่าง ๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณรุจิรา ทองอ่อน คุณ JiaoJiao Song คุณพลภักดิ์ ภัทรพุทธิเศรษฐ์ ตลอดจนเพื่อน พี่ น้อง ทุกคนที่ให้การปรึกษาความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ และกำลังใจเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณคนุภัทร ทองคำ และ คุณรัฐสิทธิ์ แซ่ลี ที่คอยให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ การเก็บผลการทดลอง วิเคราะห์ผลการทดลอง และคอยให้กำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวเป็นอย่างสูงที่ได้ให้โอกาสทางการศึกษา ให้แก่ข้าพเจ้า ไม่ว่าจะเป็นค่าศึกษาเล่าเรียน การให้กำลังใจจนทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์สำเร็จได้ด้วยดี

มงกุฎกานต์ อุดมพงษ์สุข

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวานในสภาพห้องปฏิบัติการ.....	2
1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวานในกระถางทดลอง.....	2
1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรครากเน่าโคนเน่าในส้มเขียวหวาน.....	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.3.1 สถานที่ดำเนินงาน.....	3
1.3.2 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของส้ม.....	3
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	3
2.3 พันธุ์ส้มเขียวหวานที่ปลูกเป็นการค้า.....	4
2.3.1 พันธุ์แหลมทองหรือสีทอง.....	4
2.3.2 พันธุ์ส้มบางมด.....	4
2.3.3 พันธุ์ฟริมองต์.....	4
2.3.4 พันธุ์ส้มโชกุน.....	4
2.4 โรคและแมลงที่สำคัญในส้มเขียวหวาน.....	5
2.4.1 โรครากเน่าโคนเน่า.....	5

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.2 โรคกรีนนึ่ง.....	5
2.4.3 โรคแคงเกอร์.....	6
2.4.4 โรคเมลานอส หรือ ราน้ำหมาก.....	6
2.4.5 โรคโรคแผลสะเก็ด หรือ โรคสะเก็บ.....	6
2.4.6 โรคทริสเตซ่า.....	7
2.4.7 โรคผลร่วง หรือ โรคขั้วผลเน่า.....	7
2.4.8 หนอนชอนใบ (<i>Phyllocnistis citrella</i> : Lepidoptera; Phyllocnistidae).....	7
2.4.9 เพลี้ยไฟ (<i>Scirtothrips dorsalis</i> : Thysanoptera; Thripidae).....	7
2.4.10 หนอนแก้วส้ม (<i>Papilio demoleus malayanus</i> : Lepidoptera; Papilionidae).....	7
2.4.11 ไรแดงและไรสนิม.....	7
2.5 การใช้เชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในการควบคุมโรคพืช.....	8
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	10
3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	10
3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง.....	10
3.1.2 เชื้อราควบคุมที่ใช้ในการทดลอง.....	10
3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวาน.....	10
3.2.1 วิธี baiting.....	10
3.2.2 วิธี tissue transplanting	10
3.3 การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology)	10
3.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรค.....	10
3.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp.....	11
3.4 การตรวจสอบเชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์.....	11
3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	11
3.4.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR).....	12
3.4.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis.....	12
3.4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	12

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)	12
3.5.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดอาการรากเน่าโคนเน่าบนใบ.....	12
3.5.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดอาการรากเน่าโคนเน่าบนต้น.....	12
3.6 การทดสอบด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม (bi-culture test).....	13
3.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในห้องปฏิบัติการ (crude extract test).....	13
3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors เชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในห้องปฏิบัติการ.....	14
3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในกระถางทดลอง.....	14
3.10 การตรวจสอบหา phytoalexin.....	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	16
4.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวาน.....	16
4.2 การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology).....	16
4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรค.....	16
4.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp.....	18
4.3 การตรวจสอบเชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์.....	21
4.4 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test).....	22
4.4.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดอาการรากเน่าโคนเน่าบนใบ.....	22
4.4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดอาการรากเน่าโคนเน่าบนต้น.....	23
4.5 การทดสอบด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม (bi-culture test).....	24
4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในห้องปฏิบัติการ (crude extract test).....	27
4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors เชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในห้องปฏิบัติการ.....	39
4.8 การทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในกระถางทดลอง.....	51
4.9 การตรวจสอบหา phytoalexin.....	62

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 วิจัยณ์ผลการทดลอง.....	63
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	66
บรรณานุกรม.....	68
ประวัติผู้เขียน.....	73
ภาคผนวก.....	74

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ไอโซเลทและวิธีการแยกเชื้อ ของเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้.....	16
4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา <i>Pythium</i> spp. บนใบส้มเขียวหวาน ส้มเขียวหวาน.....	22
4.3 ผลจากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ PN02 บนต้นส้มเขียวหวาน.....	23
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย และ oospores ของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture.....	25
4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. brasiliense</i> ในการยับยั้งการเจริญ ของ PN02.....	29
4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ในการยับยั้งการเจริญ ของ PN02.....	33
4.7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. elatum</i> ในการยับยั้งการเจริญ ของ PN02.....	37
4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัด เชื้อรา <i>Ch. brasiliense</i> ในการควบคุม PN02.....	41
4.9 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัด เชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ในการควบคุม PN02.....	45
4.10 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัด เชื้อรา <i>Ch. elatum</i> ในการควบคุม PN02.....	49
4.11 ระดับการเกิดโรคเฉลี่ยของต้นส้มที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เดือนที่ 1 – 8.....	52
4.12 ความสูงเฉลี่ยของต้นส้มที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เดือนที่ 1 – 8.....	52

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ PN01.....	16
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ PN02.....	17
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ PN03.....	17
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Ch. brasiliense</i>	18
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Ch. cochliodes</i>	19
4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Ch. elatum</i>	20
4.7 Phylogenetic tree ของเชื้อรา <i>Pythium</i> spp.....	21
4.8 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบส้มเขียวหวาน ไอโซเลท PN01.....	22
4.9 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบส้มเขียวหวาน ไอโซเลท PN02.....	23
4.10 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบส้มเขียวหวาน ไอโซเลท PN03.....	23
4.11 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนต้นส้มเขียวหวาน.....	24
4.12 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Ch. brasiliense</i> ในการยับยั้งการเจริญ ของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture.....	25
4.13 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ในการยับยั้งการเจริญ ของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture (10 วัน).....	26
4.14 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ในการยับยั้งการเจริญ ของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture (30 วัน).....	26
4.15 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Ch. elatum</i> ในการยับยั้งการเจริญ ของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture	27
4.16 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. brasiliense</i> ที่สกัดด้วย hexane ในการยับยั้งการเจริญของ PN02.....	30
4.17 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. brasiliense</i> ที่สกัดด้วย ethyl acetate ในการยับยั้งการเจริญของ PN02.....	30
4.18 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. brasiliense</i> ที่สกัดด้วย methanol ในการยับยั้งการเจริญของ PN02.....	31
4.19 เปรียบเทียบลักษณะของ oogonium.....	31

สารบัญญภาพ (ต่อ)

4.20 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ที่สกัดด้วย hexane ในการยับยั้งการเจริญของ PN02.....	34
4.21 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ที่สกัดด้วย ethyl acetate ในการยับยั้งการเจริญของ PN02.....	34
4.22 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ที่สกัดด้วย methanol ในการยับยั้งการเจริญของ PN02.....	35
4.23 เปรียบเทียบลักษณะของ oogonium.....	35
4.24 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. elatum</i> ที่สกัดด้วย hexane ในการยับยั้งการเจริญของ PN02.....	34
4.25 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. elatum</i> ที่สกัดด้วย ethyl acetate ในการยับยั้งการเจริญของ PN02.....	34
4.26 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. elatum</i> ที่สกัดด้วย methanol ในการยับยั้งการเจริญของ PN02.....	35
4.27 เปรียบเทียบลักษณะของ oogonium.....	35
4.28 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. brasiliense</i> ที่สกัดด้วย hexane.....	42
4.29 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. brasiliense</i> ที่สกัดด้วย ethyl acetate.....	42
4.30 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. brasiliense</i> ที่สกัดด้วย methanol.....	43
4.31 เปรียบเทียบลักษณะของ oogonium.....	43
4.32 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ที่สกัดด้วย hexane.....	46
4.33 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ที่สกัดด้วย ethyl acetate.....	46
4.34 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. cochliodes</i> ที่สกัดด้วย methanol.....	47
4.35 เปรียบเทียบลักษณะของเส้นใย.....	47

สารบัญญภาพ (ต่อ)

4.36 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. elatum</i> ที่สกัดด้วย hexane.....	50
4.37 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. elatum</i> ที่สกัดด้วย ethyl acetate.....	50
4.38 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Ch. elatum</i> ที่สกัดด้วย methanol.....	51
4.39 เปรียบเทียบลักษณะของ sporanium.....	51
4.40 ดัชนีสัมเจียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เป็นระยะเวลา 1 เดือน.....	54
4.41 ดัชนีสัมเจียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เป็นระยะเวลา 2 เดือน.....	55
4.42 ดัชนีสัมเจียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เป็นระยะเวลา 3 เดือน.....	56
4.43 ดัชนีสัมเจียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เป็นระยะเวลา 4 เดือน.....	57
4.44 ดัชนีสัมเจียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เป็นระยะเวลา 5 เดือน.....	58
4.45 ดัชนีสัมเจียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เป็นระยะเวลา 6 เดือน.....	59
4.46 ดัชนีสัมเจียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เป็นระยะเวลา 7 เดือน.....	60
4.47 ดัชนีสัมเจียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา <i>Chaetomium</i> spp. เป็นระยะเวลา 8 เดือน.....	61
4.48 โครมาโทแกรมของสารวัฏเคลื่อนที่ toluene : ethyl acetate, 1 : 1.....	62

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากสถิติการเกษตรของประเทศไทย รายงานว่า ปี 2555 – 2557 ประเทศไทย เป็น 1 ใน 10 ประเทศ ผู้ผลิตส้มเขียวหวานที่สำคัญของโลก แต่จากแนวโน้มการผลิตในปี พ.ศ. 2550 – 2558 จะเห็นได้ว่า มีการผลิตส้มเขียวหวานที่ลดลง จากเนื้อที่การผลิต 338,000 ไร่ มีผลผลิตสูงถึง 757,000 ตัน ในปี 2550 ลดลงเหลือเพียง 82,000 ไร่ มีผลผลิตเหลือเพียง 141,000 ตัน ในปี 2558 เป็นเหตุจากเกษตรกรประสบปัญหาต้นส้มเกิดอาการทรุดโทรมจากการระบาดของโรครากเน่าโคนเน่า ทำให้เกษตรกรประสบภาวะขาดทุนจากต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น และราคาผลผลิตที่ต่ำลงจนไม่คุ้มทุน จึงส่งผลให้พื้นที่การผลิตส้มเขียวหวานลดลง ในปี 2559 เกษตรกรเริ่มหันกลับมาฟื้นฟูสวนส้มเนื่องจากราคาที่เกษตรกรขายได้อยู่ในเกณฑ์ที่จูงใจในการผลิตส้ม (46.67 บาทต่อกิโลกรัม) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559)

โรครากเน่าโคนเน่าในส้ม มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. และ *Pythium* spp. (Maseko and Coutinho, 2002) ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ส้มในหลายระยะการเจริญเติบโต ในระยะกล้าทำให้เกิดอาการเน่าคอดินซึ่งมีความร้ายแรงมากที่สุด สำหรับในต้นที่ยังไม่โตเต็มที่และต้นแก่ทำให้เกิดอาการรากเน่า โคนเน่า มียางไหลและเน่าเป็นสีน้ำตาล แนวทางการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าที่เกษตรกรนิยมใช้ คือการใช้สารเคมีผสมน้ำราดดิน หรือทาแผลบริเวณโคนต้น เช่น สารเคมีเมทาแลคซิล ฟอเซทีลิด อะลูมิเนียม หรือแมนโคแซบ (Kean *et al.*, 2010, Graham, 2011 และ Mida *et al.*, 2015) ซึ่งได้ผลในระดับหนึ่ง แต่ก็มีข้อจำกัดในการใช้สารเคมี อีกทั้งการใช้สารเคมียังส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ทำให้ดินมีคุณภาพเสื่อมลง จึงได้มีการศึกษาการใช้เชื้อจุลินทรีย์เพื่อต่อต้านโรครากเน่าโคนเน่า เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. (Steddom *et al.*, 2002), *Bacillus subtilis* (Shinde and Sadgir, 2016), *Serratia marcescens* (Queiroz and Melo, 2006) และ *Trichoderma* spp. (Pente *et al.*, 2015) เป็นต้น มาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เพื่อแก้ปัญหาการคือยาและลดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม

เชื้อรา *Chaetomium* sp. จัดเป็นพวก saprophytes ที่จัดอยู่ในอาณาจักร Ascomycetes วงศ์ *Chaetomiaceae* ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดในอาณาจักรนี้ มีมากกว่า 300 สปีชีส์ทั่วโลก สามารถเจริญได้ดีในเศษซากพืชและสัตว์ที่เน่าเปื่อยผุพัง และอินทรีย์วัตถุต่าง ๆ (เกษม สร้อยทอง, 2531) ได้มีการศึกษาซึ่งประสิทธิภาพควบคุมเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในพืชตระกูลส้มมากมาย เช่น งานวิจัยของ Hung *et al.*, (2014, 2015a, 2015b) และ Quyet *et al.*, (2014, 2016) เป็นต้น

ในการวิจัยนี้ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา *Chaetomium brasiliense*, *Chaetomium cochliodes* และ *Chaetomium elatum* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่า ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการใช้ nano – elicitors ในการควบคุมโรคชนิดนี้ ด้วยเหตุผลนี้ผู้จัดทำงานวิจัย

จึงสนใจที่จะศึกษาวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราก่อโรคนิดนี้ เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคดังกล่าวต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวานในสภาพห้องปฏิบัติการ

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวานในกระถางทดลอง

1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitor จากเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรครากเน่าโคนเน่าในส้มเขียวหวาน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการราวิทยา ดึกเห็ดรา สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.3.2 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

2 ปี 4 เดือน

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของส้ม (จุฬามาศ อ่อนวิมล. 2546)

ส้ม (Citrus) เป็นไม้ที่จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae อยู่ในกลุ่มของไม้ผลกึ่งร้อน (Subtropical Fruit) พบได้ในเขตกึ่งร้อนและเขตนานหลายประเทศ เดิมมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียอาคเนย์ แต่ได้มีการนำไปปลูกอย่างแพร่หลายในหลายท้องถิ่นเป็นเวลานาน จนกลายเป็นพืชเศรษฐกิจของท้องถิ่นนั้น ๆ ไป ในประเทศไทย มีการปลูกพืชตระกูลส้มหลายชนิด เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะกรูด มะนาว เป็นต้น พันธุ์ส้มที่ได้รับความนิยมในการปลูกมากที่สุด คือ ส้มเขียวหวาน ซึ่งมีการปลูกมากกว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่ปลูกส้มทั้งหมด

ส้มเขียวหวาน (Tangerine) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Citrus reticulata* เป็นส้มเปลือกอ่อนชนิดหนึ่งในกลุ่มส้มแมนดาริน จัดเป็นชนิดของส้มที่ได้รับการปลูกและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศ ในประเทศไทย นิยมปลูกส้มกันมากในจังหวัดเชียงใหม่ สุโขทัย แพร่ กำแพงเพชร และ เชียงราย

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (จุฬามาศ อ่อนวิมล. 2546)

ลำต้น เป็นไม้ผลยืนต้น ทรงพุ่ม มีเส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่มประมาณ 4 – 6 เมตร ความสูงทรงพุ่มประมาณ 3 – 3.5 เมตร เป็นไม้เนื้อแข็ง ไม่มีหนาม เมื่อยอดกิ่งอ่อนมีลักษณะเป็นสีเขียวเข็ม กิ่งแก่มีสีเขียวเข้ม

ใบมีขนาดเล็กเป็นรูปไข่ค่อนข้างยาว หรือรูปไข่ ปลายและฐานมีลักษณะมน ส่วนปลายสุดของใบมีรอยเว้าเข้า ไม่มีขนใบ ผิวท้องใบมีสีเขียวอมเหลือง ผิวหลังใบเป็นมันสีเขียวเข้ม ก้านใบมีปีกแคบหรือไม่มีปีก ใบมีกลิ่น

ดอก มีขนาดเล็ก ขนาดของดอกตูม มีความยาว 0.5 – 0.7 เซนติเมตร ดอกบานมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 – 2.5 เซนติเมตร ส่วนของกลีบดอกมีสีขาว และมีต่อมน้ำมันกระจายอยู่ แต่ละดอกมีจำนวนเกสรตัวผู้อยู่ในลักษณะแยกกัน 18 – 23 อัน ออกดอกในตำแหน่งซอกใบเป็นดอกเดี่ยว หรือดอกช่อ

ผล มีรูปร่างกลมแบน ผิวเปลือกสีเขียว เขียวอมเหลือง หรือส้มอมเหลือง ลักษณะของผิวเปลือกจะเรียบ มีต่อมน้ำมันอยู่ภายใน ส่วนของเปลือกบางประมาณ 0.2 – 0.3 เซนติเมตร มีกลิ่นหอมแรง เปลือกด้านในมีสีเหลืองอ่อน ภายในหนึ่งผลประกอบด้วยกลีบผลจำนวน 10 – 15 กลีบ แต่ละกลีบมีผนังบาง เนื้อมีน้ำมาก มีสีส้ม รสหวานอมเปรี้ยว ก้านผลมีขนาดสั้น ขนาดผลแตกต่างกันไป เมื่อติดผลจะมีลักษณะหัวห้อยลง

เมล็ด รูปร่างแบนรูปไข่หัวกลับ เนื้อเยื่อส่วนสะสมอาหารมีสีเขียวอ่อน หรือสีเขียวอมเหลือง จำนวนเมล็ดมีแตกต่างกันไปในแต่ละกลีบ

อายุของต้น ต้นที่สามารถเริ่มให้ผลผลิตได้มีอายุประมาณ 4 – 5 ปีภายหลังจากการปลูก และเริ่มให้ผลผลิตเต็มที่ตั้งแต่ 5 – 6 ปี หลังจากปลูก

2.3 พันธุ์ส้มเขียวหวานที่ปลูกเป็นการค้า (เอกชัย พฤษอำไพ และสังสุข รัตนภรณ์. 2547)

2.3.1 พันธุ์แหลมทอง หรือแสงทอง

เป็นสายพันธุ์ที่ปลูกกันมากในเขตจังหวัดราชบุรี ลักษณะลำต้นขนาดใหญ่ มีทรงพุ่มใหญ่ ติดผลค่อนข้างยาก ผลไม่ดก มีขนาดปานกลาง แต่มีรสหวานจัด แต่ปัจจุบันมีปลูกกันน้อย เพราะคอกู้ส้มเขียวหวานธรรมดาไม่ได้

2.3.2 พันธุ์ส้มบางมด

แต่เดิมเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันในเขตบางมด บางขุนเทียน ปัจจุบันปลูกกันมากในเขตรังสิต นครปฐม และดำเนินสะดวก มีการนำไปปลูกในพื้นที่อื่น แล้วเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น ส้มผิวทอง ส้มสีทอง กล่าวได้ว่าเป็นพันธุ์ส้มเขียวหวานที่นิยมในประเทศไทย ผลมีขนาดกลางจนถึงโต ทรงผลค่อนข้างกลมแป้นเล็กน้อย ก้นผลราบหรือเว้าเล็กน้อย ผิวเปลือกมีต่อมน้ำมันใต้เต็มผิว เปลือกบาง ร่อน ผิวเรียบ มีสีเขียวอมเหลือง หรือเหลืองเข้มเมื่อปลูกทางภาคเหนือ เนื้อผลมีสีส้ม ชานนึ่งมัน กลิบบาง รกน้อย ตัวกิ่งมีขนาดสั้น น้ำน้ำ รสชาติหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย

2.3.3 พันธุ์ส้มพริมองต์

เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์คลีแมนไทน์และพันธุ์พองแกน เกิดในรัฐฟลอริดา มีการนำมาปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย สามารถปรับตัวได้ดี และมีการนำไปปลูกที่แหล่งอื่น ๆ ลักษณะพุ่มเป็นทรงสูงโปร่ง ใบสีเขียวเข้ม ออกผลเมื่อปลูกเพียง 20 เดือน ที่สำคัญคือทรงต้น กิ่ง แข็งแรง ใช้น้ำหนักผลได้ดี เปลือกค่อนข้างหนาและเหนียว ปอกยาก ผิวเปลือกขรุขระและมีสีส้มเข้ม เนื้อผลค่อนข้างแน่น รสชาติเปรี้ยวอมหวาน มีกลิ่นหอม การติดผลชุดแรก ๆ ขณะที่ยังอายุน้อยอยู่จะมีปัญหาผลแตกมาก โดยเฉพาะผลที่มีอายุ 3 – 5 เดือน แต่เมื่อต้นมีอายุมากขึ้นการแตกของผลจะลดลง

2.3.4 พันธุ์ส้มโชกุน

เป็นพันธุ์ที่ปลูกจากเมล็ดทางตอนใต้ของประเทศไทย ซึ่งได้นำพันธุ์มาจากประเทศจีน อาจรู้จักกันในนามของส้มสายน้ำผึ้ง หรือส้มเพชรยะลา เป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน ทรงพุ่มค่อนข้างแน่น กิ่งและใบจะตั้งขึ้น ใบมีสีเขียวเข้ม ใบมีกลิ่นหอมคล้ายส้มจินและส้มพองแกน มีสีของผลเป็นเอกลักษณ์พิเศษ เนื้อมีลักษณะแน่น ชานนึ่งและให้น้ำส้มปริมาณมาก รสชาติหวานแหลมอมเปรี้ยวเล็กน้อย

2.4 โรคและแมลงที่สำคัญในส้มเขียวหวาน (จุฑามาศ อ่อนวิมล. 2546)

ประเทศไทยมีสภาพอากาศร้อนชื้น อุณหภูมิเฉลี่ยค่อนข้างสูง ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยและความชื้นสัมพัทธ์มีมาก ทำให้เหมาะสมต่อการเกิดและระบาดของศัตรูพืชหลายชนิด โดยเฉพาะส้มเขียวหวานซึ่งมีการเจริญตลอดปี ไม่มีการพักตัว อีกทั้งเกษตรกรยังนิยมเพาะปลูกให้มีผลผลิตหลายรุ่นเพื่อให้สามารถเก็บเกี่ยวได้ตลอดปีหรือเก็บผลผลิตได้นอกฤดูกาล ต้นส้มเขียวหวานจึงมีระยะการเจริญเติบโตที่ไม่พร้อมกัน ทำให้ต้องประสบปัญหาการระบาดของศัตรูพืชตลอดปี โดยโรคและแมลงในส้มเขียวหวานสามารถเกิดได้ตั้งแต่ระยะแรก ตลอดจนทุกระยะการปลูก และเกิดได้กับพืชทุกส่วน โรคที่สำคัญของส้มเขียวหวาน ได้แก่

2.4.1 โรครากเน่าโคนเน่า

มีสาเหตุจากเชื้อราในกลุ่ม Pythiaceae แต่ที่สำคัญและรุนแรงที่สุดคือ *Phytophthora parasitica* (Maseko and Coutinho, 2002) เชื้อราแพร่ระบาดในดินที่มีน้ำขัง โดย zoospores เข้าทำลายที่รากและลูกกลามผู้โคนต้น สามารถแพร่ระบาดไปกับลม ฝน เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นส้ม โดยเฉพาะโคนต้นและระบบราก ต้นส้มที่เป็นโรคจะมีอาการทรุดโทรม ไม่แข็งแรง อาการเริ่มแรกเปลือกบริเวณโคนต้นจะเป็นจุด แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเน่า ระยะแรกมีอาการใบเหลืองซีดลง โดยเฉพาะเส้นกลางใบ แดกใบอ่อนน้อย ต้นที่มีอาการรุนแรงแสดงอาการเหี่ยวเฉาคล้ายขาดน้ำ ใบจะร่วง ผลแตก มีสีคล้ำ น้ำเน่า และอาจมียางไหล ร่วงหล่นง่าย เมื่อตากเปลือกตรงรอบแผล จะพบเนื้อไม้เป็นสีน้ำตาล จุดที่รากจะพบว่ารากเน่า เปลือกเป็นแผลเน่า ส่วนเนื้อรากตรงรอยแผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง เปื่อยและลูกกลามไปเรื่อย ๆ และตายในที่สุด

ลักษณะของเชื้อรา *Phytophthora parasitica* Dastur

Division Eumycota

Class Oomycetes

Order Peronosporales

Family Pythiaceae

Genus *Phytophthora*

Species *parasitica*

เส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกัน มีขนาดกว้าง 3 – 9 ไมโครเมตร ขอบเส้นใยไม่เรียบ sporangiophore มีลักษณะที่เรียวยาว มีการแตกกิ่งก้านแบบ sympodial sporangium มีรูปร่างค่อนข้างกลม รูปรีจนถึงรูปไข่ และรูป obpyriform ขนาด 38 × 30 ไมโครเมตร ถึง 50 × 40 ไมโครเมตร อัตราส่วนของความยาว : ความกว้าง (L:B) = 1:4 หรือต่ำกว่านี้ sporangium เป็นแบบ terminal หรือ intercalary chlamydospore เมื่อมีอายุ 1 – 2 สัปดาห์ มีขนาดได้ถึง 60 ไมโครเมตร ผนังหนา 3 – 4 ไมโครเมตร เมื่อแก่มีสีเหลืองอ่อน anthridium ไม่มีสี รูปกลมหรือไข่ ขนาด 10 × 20 – 40 ไมโครเมตร oogonium ขนาดเฉลี่ย 24 – 26 ไมโครเมตร เมื่อแก่ผนังหนามีสีเหลืองอมน้ำตาล anthridium เกาะกับ oogonium แบบ amphigynous oospore ขนาดเล็กและมีผนังหนา zoospore มีขนาด 8 – 12 × 5 – 8 ไมโครเมตร มีรูปร่างแบบ reniform มี flagella 2 เส้น สภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 – 32 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่เจริญได้คือ 10 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิสูงสุดคือ 37 องศาเซลเซียส

2.4.2 โรครินนิ่ง

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus liberibacter Asiaticus* เป็นโรคร้ายแรงที่เกิดเฉพาะในพืชตระกูลส้ม ซึ่งจะเติบโตและดูดกินอาหารของพืชอยู่ภายในท่อลำเลียงอาหารของต้นส้ม มีแมลงพาหะ คือ เพลี้ยไค้แจ้ส้ม (*Phylia diaphorina citri*) ลักษณะโดยทั่วไปบริเวณปลายยอดจะเหลือง มีอาการค้างเหลือง แทรกกระหว่างเส้นใบ หรือเส้นใบซีดเหลือง ต้นชะงักการเจริญ กิ่งตาย ผลมีขนาดเล็กและร่วง ส้มเขียวหวานเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ ใบจะซีดเหลืองและขนาดใบเล็กลง ใบมักช้ตั้งขึ้นคล้ายโรคใบแก้วจากการขาดธาตุสังกะสี ใบร่วงมาก กิ่งมักแห้งตายรวดเร็ว ผลมีขนาดเล็ก มีป็นสีเขียวบนผลสุก และร่วงก่อนสุก

2.4.3 โรคแคงเกอร์

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* มักพบระบาดในระยะผลิใบอ่อน จะยังระบาดและรุนแรงมากในฤดูฝน แต่อาจพบโรคนี้ในสวนที่ค่อนข้างรกทึบ มีการระบาดของหนอนซอนใบมาก หรืออาจพบในสวนที่ปลูกส้มในที่โล่งแจ้ง ไม่มีต้นไม้ใหญ่ล้อมสวน นอกจากนี้ยังพบมากในสวนที่มีการปลูกมะนาวหรือมะกรูดไว้ตามคันล้อมอีกด้วย เกิดได้ทุกส่วนของลำต้น ระยะแรกจะเห็นเป็นจุดใส ๆ ขนาดเท่าหัวเข็มหมุดสีขาวหรือเหลืองอ่อน กระจายทั่วบนใบอ่อน ต่อมาแผลขยายจนทั้งด้านบนและใต้ใบ แผลมีรูปร่างกลม รอบ ๆ แผลมีสีเหลือง ภายในแผลที่ชุ่มน้ำมีลักษณะขรุขระ เมื่อใบแก่ขึ้น แผลจะยุบลง แดกเป็นสะเก็ดและเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือแก่ ขนาดและสีแผลขึ้นอยู่กับพันธุ์ส้มและสภาพแวดล้อม โรคนี้เกิดทั้งบนแผ่นใบ เส้นใบ และก้านใบ ถ้ามีอาการรุนแรงใบอาจร่วงก่อนกำหนด ที่ผลและกิ่งมีอาการเช่นเดียวกัน เมื่อผลอ่อนแผลมักก้นกลม เมื่อผลโตขึ้นแผลมักเรียบเสมอผิวหรือบวมเล็กน้อย แผลเก่าจะแตกเป็นสะเก็ด ที่กิ่งแผลจะเรียวยาวไปตามกิ่ง มีลักษณะเป็นปุ่ม ทำให้กิ่งตาย

2.4.4 โรคเมลานอส หรือ ราน้ำหมา

เกิดจากเชื้อรา *Cercospora* spp. พบระบาดมากในฤดูแล้ง มักเกิดกับใบที่เริ่มเปสลาด โดยเกิดเป็นตุ่มคล้ายกระดาษทรายน้ำ หรือรอยเปื้อนคล้ายน้ำหมาบนใบ โดยเฉพาะด้านใต้ใบ อาจเกิดกับกิ่ง ทำให้กิ่งแห้งตายจากปลายได้ ด้านบนใบปรากฏจุดคล้ายหัวเข็มหมุดกระจายทั่วไป จุดจะนูนแข็งเป็นสีดำ เมื่อใบแก่เมื่อลูบจะรู้สึกสากมือ ใบที่มีจุดมากในขณะเจริญเติบโตจะบิดงอและร่วงในเวลาต่อมา ที่ผลอาการไม่เด่นชัดเท่าบนใบ มักพบมากที่ไหลผล ผลที่มีลายตกระมากจะดูเป็นสีน้ำตาลหรือม่วง อาการบนกิ่งจะทำให้กิ่งแห้งตาย เชื้อราพักตัวที่กิ่งที่ตายแล้ว แพร่กระจายทางลม ฝน ลูบใบอ่อนและส่วนอื่น ๆ ของพืช

2.4.5 โรคแผลสะเก็ด หรือ โรคสะเก็บ

เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma fawcetti* เกิดโรคได้ทั้งใบ กิ่งอ่อน และผล มักพบอาการของโรครุนแรงมากกับผลอ่อนอายุประมาณ 60 – 90 วันหลังดอกบาน ที่ใบ จะพบเป็นจุดนูนใสขนาดเล็ก แผลจะนูนด้านใดด้านหนึ่ง และอีกด้านเป็นรอยบวมเล็กน้อย ต่อมาแผลจะนูนแข็งตกระสะเก็ดคล้ายหูดสีน้ำตาลหรือเหลืองปนเทา ใบจะมีสีซีด แคระแกร็น บิดเบี้ยว หรือบวมเป็นรูปกรวย ผลอ่อน มีแผลตกระสะเก็บแข็งคล้ายหูดขรุขระ ผลมักเขียวและร่วงในที่สุด สปอร์จากบริเวณกิ่งที่เป็นโรคจะกระจายสู่ผล การรดน้ำขึ้นยอดในสภาพที่มีโรคจะส่งเสริมให้โรครุนแรงมากขึ้น

2.4.6 โรคทริสเตซ่า

เกิดจากเชื้อไวรัส Citrus Tristeza Virus แพร่กระจายโดยการถ่ายทอดทางเพลี้ยอ่อนส้ม *Toxoptera citricidus* การติดต่อกิ่ง ต้นตอ และยอดพันธุ์ ใบมีอาการซีดเหลืองหงิกงอ เส้นใบเป็นขีดโปร่งแสง ผลผลิตลดลงอย่างรวดเร็ว ผลมีขนาดเล็กและร่วงหล่น เนื้อไม้เป็นแอ่งนูนตามความยาว เมื่อดอกเปลือกออกจะมีเนื้อเยื่อคล้ายหนาม กิ่งตาย ลำต้นโทรมลงอย่างรวดเร็ว

2.4.7 โรคผลร่วง หรือ โรคขั้วผลเน่า

เกิดจากเชื้อราได้หลายชนิด ได้แก่ *Botryodiplodia* spp., *Phomopsis citri* ระบาดกับผลส้มเขียวหวานอายุประมาณ 8 – 9 เดือน ระบาดรุนแรงมากในฤดูฝน สภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงเป็นปัจจัยทำให้เกิดโรค สภาพต้นส้มที่อ่อนแอ มักเกิดโรคได้ง่าย บริเวณทรงพุ่มทึบแน่น หรือมีการค้ำกิ่งไม่ดี ทำให้เกิดผลร่วงมากขึ้น เชื้อราสาเหตุโรคจะเข้าทำลายผิวเปลือกบริเวณขั้วผล ทำให้เกิดแผลเน่า ผิวเปลือกบริเวณขั้วเปลี่ยนเป็นสีเหลือง อาจพบกิ่งแห้งติดกับขั้วผล ทำให้ผลเหี่ยวและแห้งติดอยู่กับกิ่งหรือเกิดการร่วงได้

2.4.8 ผีเสื้อหนอนชอนใบ (*Phyllocnistis citrella*: Lepidoptera; Phyllocnistidae)

เป็นผีเสื้อชนิดกลางคืนขนาดเล็ก หนอนมีสีเหลืองอ่อน มักเข้าทำลายใบอ่อนโดยการชอนไชอยู่ใต้ผิวใบ และดูดกินน้ำเลี้ยง ทำให้ใบส้มเกิดร่องรอยคดเคี้ยวเป็นทาง บิดเบี้ยว ม้วนงอ นอกจากจะทำให้ต้นส้มแคระแกร็นไม่เจริญเติบโตแล้ว บาดแผลที่เกิดจากการทำลายของหนอนชอนใบ จะเป็นช่องทางให้โรคแคงเกอร์เข้าทำลายซ้ำอีกด้วย สามารถระบาดในสวนส้มได้ตลอดปี หรือทุกครั้งที่ต้นส้มแตก หรือผลิใบอ่อน แต่มักมีการระบาดรุนแรงมาก ในช่วงฤดูฝน ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกันกับที่มีการระบาดของโรคแคงเกอร์

2.4.9 เพลี้ยไฟ (*Scirtothrips dorsalis*: Thysanoptera; Thripidae)

เป็นแมลงศัตรูที่มีขนาดเล็ก พบระบาดในสวนส้มทั่วไป ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงที่ยอด ใบอ่อน และผล ทำให้ยอดอ่อนหงิกงอ ใบอ่อนบิดเบี้ยว และไม่เจริญเติบโต ใบที่ถูกทำลายมักแข็งกระด้าง เปราะและฉีกง่าย ผลที่ถูกทำลายจะมีรอยเป็นวงหรือทางสีเทาเงินบริเวณขั้วผล ก้นผล และตามความยาวของผล หากถูกทำลายมาก ๆ ผลจะแคระแกร็น บิดเบี้ยว และจะดูดกินน้ำเลี้ยงของดอก ทำให้ดอกร่วง พบการระบาดในช่วงฤดูแล้ง ในฤดูฝนในระยะเวลาที่ฝนทิ้งช่วงได้ มักพบแมลงบริเวณโคนกลีบดอก และขั้วผล หรือบริเวณที่หล่อมซ้อนกัน

2.4.10 ผีเสื้อหนอนแก้วส้ม (*Papilio demoleus malayanus*: Lepidoptera; Papilionidae)

เป็นผีเสื้อกลางคืนปีกมีลายสีดำเหลือง ไข่มีรูปร่างกลมสีเหลือง ขนาดประมาณหัวเข็มหมุดเป็นฟองเดี่ยว ๆ บนใบส้ม เมื่อหนอนฟักออกจากไข่จะเริ่มกัดกินใบอ่อนและยอดอ่อน เมื่อขนาดใหญ่ขึ้น จะเข้าทำลายได้รวดเร็วมากและกัดกินใบได้ตั้งแต่ใบอ่อนจนถึงใบแก่ ทำให้ยอดส้มโกร๋น เหลือแต่ก้านใบ หรือกิ่งก้าน ถ้าเข้าทำลายในระยะต้นเล็ก อาจทำให้ต้นตายได้ และเข้าทำลายส้มมากในฤดูฝน

2.4.11 ไรแดงและไรสนิม

เป็นศัตรูทำลายส้ม ทำให้ยอดและใบแห้งกร้าน อาจทำให้เกิดอาการหงิกงอ บิดเบี้ยว พบการระบาดทำลายในช่วงฤดูหนาวจนถึงฤดูร้อน อาจพบในฤดูฝนระยะที่ฝนทิ้งช่วง

2.5 การใช้เชื้อรา *Chaetomium* spp. ในการควบคุมโรคพืช

Charoenporn *et al.* (2010) รายงานการใช้สารสกัด *Chaetomium* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบว่า สารสกัดเชื้อรา *Ch. globosum* ไอโซเลท N0802 ที่สกัดด้วย hexane มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศสีดา มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 157 µg/ml ส่วนสารสกัดหยาบเชื้อรา *Ch. lucknowense* ไอโซเลท CLT ที่สกัดด้วย hexane และสารสกัดเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลท PC01 ที่สกัดด้วย methanol มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 188 และ 192 µg/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ยังส่งผลให้สปอร์ของเชื้อก่อโรคมิรูปร่างที่ผิดปกติไปอีกด้วย การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดในแปลงทดลอง พบว่าไอโซเลท N0802, CLT และ PC01 มีผลทำให้โรคเหี่ยวของมะเขือเทศลดลง 44.68, 36.28 และ 41.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ prochloraz ซึ่งมีผลทำให้โรคเหี่ยวลดลง 21.95 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังมีผลต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตของมะเขือเทศเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองที่ควบคุมโรคด้วย prochloraz และการทดลองควบคุมที่ปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* เพียงอย่างเดียว

Sibounnavong *et al.* (2012) รายงานการศึกษาการใช้เชื้อรา *Ch. brasiliense* CB01 และ เชื้อรา *Ch. cupreum* ไอโซเลท CC03 ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พันธุ์สีดาและเชอริ ด้วยการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดของเชื้อรา *Ch. brasiliense* CB01 และ *Ch. cupreum* CC03 ที่สกัดด้วย hexane, EtOAc และ MeOH พบว่า สารสกัดของเชื้อรา *Ch. brasiliense* CB01 ที่สกัดด้วย hexane, EtOAc และ MeOH มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 29.87, 38.99 และ 2.99 µg/ml ตามลำดับ และสารสกัดของเชื้อรา *Ch. cupreum* CC03 ที่สกัดด้วย hexane, EtOAc และ MeOH มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 2.33, 2.38 และ 2.65 µg/ml ตามลำดับ

Kumar *et al.* (2013) ศึกษาการใช้สารสกัดเชื้อรา *Ch. globosum* ที่แยกได้จาก *Withania somnifera* ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotinia sclerotium* โดยการใช้สารสกัดเชื้อรา *Ch. globosum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate, methanol และ butanol พบว่า สารสกัดเชื้อรา *Ch. globosum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. sclerotium* สูงที่สุด มีค่า LC₅₀ เท่ากับ 35.4 µg/ml

Van Thiep *et al.* (2014) รายงานการใช้เชื้อรา *Chaetomium* spp. ในการเป็นเชื้อราควบคุมโรคในกาแฟ และชาในเวียดนาม พบว่า เมื่อทำการทดสอบเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วมเชื้อรา *Ch. gracile*, *Ch. bostrychoides* และ *Ch. cochliodes* กับเชื้อรา *F. roseum* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใย 32.96, 31.11 และ 28.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดสอบสารสกัดของเชื้อรา สารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย hexane, ethyl acetate และ methanol มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. roseum* และเชื้อรา *C. gloeosporioides* เท่ากับ 60.87, 78.16 และ 74.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ 74.76, 76.50 และ 67.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Phong *et al.* (2016) รายงานว่า การใช้เชื้อรา *Ch. cupreum* ไอโซเลท CC3003, *Ch. globosum* ไอโซเลท CG05, และ *Ch. lucknowense* ไอโซเลท CL01 ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลท NHP-Fusa-2

สาเหตุโรคเหี่ยวและรากเน่าของชา เมื่อทำการทดสอบโดยเลี้ยงบนอาหารร่วม พบมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย 31.69 – 34.03 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ 67.25 – 75.92 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย และการยับยั้งการสร้างสปอร์ โดย CC3003 ที่สกัดด้วย MeOH มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ที่ดีที่สุด ที่ ED₅₀ มีค่า 85.30 µg/ml ส่วน CG05 ที่สกัดด้วย hexane มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ที่ดีที่สุด ที่ ED₅₀ 49.32 µg/ml และ CL01 ที่สกัดด้วย EtOAc มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ที่ดีที่สุด ที่ ED₅₀ 62.17 µg/ml

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ส้มเขียวหวาน ที่ได้จากสวนส้มจากจังหวัดปทุมธานี

3.1.2 เชื้อราควบคุมที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา *Chaetomium brasiliense*, *Chaetomium cochliodes* และ *Chaetomium elatum* ที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. เกษม สร้อยทอง

3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวาน

3.2.1 วิธี baiting

เก็บตัวอย่างดินบริเวณโคนของต้นส้มเขียวหวานที่มีอาการรากเน่าโคนเน่า ที่ความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร จากผิวดิน นำดินแต่ละตัวอย่างบดให้ละเอียดและละลายกับน้ำกลั่น คนให้ดินละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ดินนอนก้น ตัดใบส้มให้มีขนาด 3×3 มิลลิเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำใบส้มไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบการเจริญของเส้นใย ใช้เข็มเย็บเชื้อ เย็บเส้นใยของเชื้อราวางบนอาหาร water agar (WA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมา ตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา ย้ายไปเลี้ยงไว้บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์

3.2.2 วิธี tissue transplanting

เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนพืชบริเวณโคนต้นและรากที่แสดงอาการของโรค ตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรค ให้มีขนาด 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อผิวภายนอกด้วย sodium hypochlorite 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนจานอาหาร WA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมา ตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา ย้ายไปเลี้ยงไว้บนอาหาร PDA จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์

3.3 การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology)

3.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวาน

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญจนเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อรา ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Chaetomium* spp.

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Ch. brasiliense*, *Ch. cochliodes* และ *Ch. elatum* บนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่แสงสามารถเข้าถึงได้ สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.4 การตรวจสอบเชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร potato dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) โดยประยุกต์จากวิธีการของ Ivors (2015) ทำการล้างเส้นใยที่เลี้ยงในอาหาร PDB ด้วย 25 มิลลิโมลาร์ EDTA จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างซ้ำ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาทีและเทส่วนใสทิ้งอีกรอบ บดส่วนของเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง ใสลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 2X CTAB buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 2 ชั่วโมง กลับหลอดทุก ๆ 15 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ทันที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส คูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม เอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม 10% CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร พลิกหลอดทันที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที คูดสารละลายส่วนใสด้านบนใสในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม isopropanol ที่เย็น ปริมาตรเท่ากับส่วนใสที่คูดมาได้ บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอน แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสออก ล้างด้วย absolute ethanol ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อระเหยเอทานอล เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 3 ชั่วโมง เมื่อตะกอนละลายหมด เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 – 5.8s – ITS2 ด้วยปฏิกิริยาอุกโชพอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์สากล คือ ITS6 และ ITS4 สารที่ใช้ในปฏิกิริยามีจำนวนทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 200 นาโนกรัม, dNTPs 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์แต่ละไพรเมอร์ 1 ไมโครลิตร, เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร (1 ยูนิต) และ 10X standard Taq reaction buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (1X) โดยมีสภาวะในกระบวนการ PCR (White *et al.*, 1990) ดังนี้

initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	จำนวน 1 รอบ
denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที	จำนวน 30 รอบ
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที	
final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	จำนวน 1 รอบ

3.4.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR มาตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel เปิดเครื่องให้มีความต่างศักย์ 100 volt เป็นเวลา 30 นาที เทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ marker ขนาด 100 bp จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยการแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที นำเจลไปส่องดูชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายใต้แสง ultraviolet

3.4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR ส่งบริษัทเพื่อวิเคราะห์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) และวิเคราะห์หาแผนภูมิความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) โดยโปรแกรม Mega X (Neighbor-joining method, NJ)

3.5 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)

3.5.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดอาการรากเน่าโคนเน่าบนใบ

ทำการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรค บนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราเจริญเต็มหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนี ย้ายชิ้นรูนที่มีเชื้อราสาเหตุโรคลงบนใบส้มเขียวหวานที่ทำแผลด้วยปลายเข็มฆ่าเชื้อ สำหรับการทดลองควบคุม (control) ปฏิบัติเช่นเดียวกัน โดยใช้รูนอาหาร PDA ที่ปราศจากเชื้อสาเหตุโรค บ่มใบส้มเขียวหวานไว้ในสภาพ moist chamber วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ เมื่อครบ 3 วัน ทำการวัดขนาดแผลที่เกิดขึ้นบนใบ

3.5.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดอาการรากเน่าโคนเน่าบนต้น

ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนต้นส้มพันธุ์เขียวหวานอายุ 2 เดือน โดยเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการล้างรากพืชให้สะอาด ทำแผลให้แก่รากพืชเล็กน้อยเพื่อให้แน่ใจว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ เชื้อรากพืชในสารแขวนลอยสปอร์ นาน 15 นาที (Quyet *et al.*, 2016) แล้วจึงนำปลูกลงกระถางเปรียบเทียบกับต้นส้มเขียวหวานที่แช่รากพืชในน้ำกลั่น วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จำนวน 4 ซ้ำ

เมื่อครบ 30 วัน ทำการประเมินการเกิดโรค โดยใช้เกณฑ์แบ่งออกเป็น 5 ระดับ (ดัดแปลงจาก EI-Mohamedy, 1998) ดังนี้

ระดับที่ 1 = ไม่เกิดอาการของโรค

ระดับที่ 2 = ต้นส้มมีอาการทรุดโทรมเล็กน้อย แสดงอาการของโรค 1 – 25 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 3 = ต้นส้มมีอาการทรุดโทรม ยอดอ่อนมีใบเล็กหงิก แสดงอาการของโรค 26 – 50 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 4 = ต้นส้มมีอาการโทรมลง มีกิ่งแห้งจากยอด แสดงอาการของโรค 51 – 75 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 5 = ต้นส้มมีอาการโทรมลง มีกิ่งแห้งจากยอด แสดงอาการของโรค 76 – 100 เปอร์เซ็นต์

3.6 การทดสอบด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม (bi-culture test)

ทำการทดลอง CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค และเชื้อรา *Chaetomium* spp. แล้วย้ายชิ้นส่วนของเชื้อราสาเหตุโรค และเชื้อรา *Chaetomium* spp. วางบนอาหาร PDA ในลักษณะตรงข้ามกันให้มีระยะห่างกันประมาณ 5 เซนติเมตร ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Chaetomium* spp. และเชื้อราสาเหตุโรค เพียงอย่างเดียวบนอาหาร PDA เป็นการทดลองควบคุม (control) แล้วนำไปป้อนไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคและนับจำนวนสปอร์ เมื่อเชื้อราในการทดลองควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้น คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition, GI)

โดยใช้สูตร $GI = (R1-R2)/R1 \times 100$

เมื่อ R1 = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคของการทดลองควบคุม

R2 = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคของจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

วิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ duncan multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.05$

3.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium spp.* ในห้องปฏิบัติการ (crude extract test)

เลี้ยงเชื้อรา *Chaetomium spp.* ในอาหาร potato dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบางเอาแต่เส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ในบริเวณที่มีแสง แต่ไม่ให้โดนแดด หลังจากนั้นนำเส้นใยแห้ง (fungal biomass) มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง blender แล้วนำไปแช่ในตัวทำละลาย hexane อัตราส่วน 1:1 (v/v) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองแยกกากออกจากสารละลาย นำสารละลายที่กรองได้ กลั่นตัวทำละลายออกแบบลดความดัน โดยใช้เครื่อง rotary vacuum evaporator เพื่อผลิตสารสกัด (crude extract) ส่วนที่เหลือจากการกลั่นตัวทำละลายออกเรียกว่า crude เก็บไว้ในภาชนะ นำกากที่ได้จากการกรองไปแช่ในตัวทำละลายต่อไป คือ ethyl acetate (EtOAc) และ methanol (MeOH) ตามลำดับ นำสารที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุ โดยทำการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 ความเข้มข้น 4 ชั่วโมง โดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารสกัด ดังนี้ 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm ละลายด้วย 2% dimethylsulfoxide (DMSO) ผสมในอาหาร PDA แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำ cork borer ตัดบริเวณส่วนขอบ โคโลนีของเชื้อราสาเหตุ โรค ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับสารสกัดในแต่ละระดับความเข้มข้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราในการทดลองควบคุมเจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และนับปริมาณสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเส้นใย การสร้าง sporangia ของเชื้อสาเหตุ และค่า effective dose (ED_{50}) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.05$

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา *Chaetomium spp.* ในห้องปฏิบัติการ

ทำการผลิต nano – elicitors จากเชื้อรา *Ch. brasiliense*, *Ch. cochliodes* และ *Ch. elatum* ตามวิธีการของ Dar และ Soyong (2014) ทำการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ความเข้มข้น 4 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของ nano – elicitors ดังนี้ 0, 3, 5, 10 และ 15 ppm ละลายด้วย 2% DMSO บนเครื่องให้ความร้อน ผสมกับอาหาร PDA และ chitosan ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำ cork borer ตัดส่วนขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนอาหาร PDA วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับ nano – elicitors ในแต่ละความเข้มข้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราในการทดลองควบคุมเจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และนับปริมาณสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเส้นใย การสร้าง sporangia ของเชื้อสาเหตุ และค่า effective dose (ED_{50}) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.05$

3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในกระถางทดลอง

เตรียมต้นส้มอายุ 2 เดือน และสารแขวนลอยสปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการล้างรากพืชให้สะอาด ทำแผลให้แก่รากพืชเล็กน้อยเพื่อให้แน่ใจว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ จากนั้นแช่รากพืชในสารแขวนลอยสปอร์ นาน 15 นาที (Quyet *et al.*, 2016) แล้วจึงนำปลูกลงกระถาง ออกแบบการทดลองแบบ RCBD มีจำนวน 6 วิธีการ วิธีการละ 4 ซ้ำ ดังนี้

วิธีการที่ 1 ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืช และฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (การทดลองควบคุม)

วิธีการที่ 2 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค และฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น

วิธีการที่ 3 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค และฉีดพ่นด้วย nano – elicitors จากเชื้อรา *Ch. brasiliense*

วิธีการที่ 4 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค และฉีดพ่นด้วย nano – elicitors จากเชื้อรา *Ch. cochliodes*

วิธีการที่ 5 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค และฉีดพ่นด้วย nano – elicitors จากเชื้อรา *Ch. elatum*

วิธีการที่ 6 ปลูกเชื้อสาเหตุโรค และราดด้วยเมทาแลกซิล

ทำการฉีดพ่น nano – elicitors ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm บริเวณรอบ ๆ โคนต้นทุก 15 วัน สังเกตอาการ และทำการเก็บผลการทดลองหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นระยะเวลา 8 เดือนทำการประเมินความสูงของต้น และระดับการเกิดโรค โดยใช้เกณฑ์ในการประเมินระดับเกิดโรคเหี่ยวแบ่งออกเป็น 5 ระดับ (ดัดแปลงจาก El-Mohamedy ,1998) ดังนี้

ระดับที่ 1 = ไม่เกิดอาการของโรค

ระดับที่ 2 = ต้นส้มมีอาการทรุดโทรมเล็กน้อย แสดงอาการของโรค 1 – 25 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 3 = ต้นส้มมีอาการทรุดโทรม ยอดอ่อนมีใบเล็กหงาย แสดงอาการของโรค 26 – 50 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 4 = ต้นส้มมีอาการทรุดโทรมลง มีกิ่งแห้งจากยอด แสดงอาการของโรค 51 – 75 เปอร์เซ็นต์

ระดับที่ 5 = ต้นส้มมีอาการทรุดโทรมลง มีกิ่งแห้งจากยอด แสดงอาการของโรค 76 – 100 เปอร์เซ็นต์

และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.05$

3.10 การตรวจสอบหา phytoalexin

เก็บตัวอย่างของใบส้ม จากทุกทริตเมนต์ นำมาสกัดสาร โดยดัดแปลงจากวิธีของ Afek and Szejnberg (1988) โดยบดใบส้มกับน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมน้ำ ethyl acetate แล้วเพิ่มความเข้มข้นด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และแยกสารด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยหยดสารสกัดที่ได้ลงบนแผ่น TLC plates silica gel แล้ววางใน developing chamber ที่บรรจุ toluene:ethyl acetate อัตราส่วน 1:1 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงเส้นขอบบน ตรวจสอบแถบสารสกัดที่ปรากฏบนแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และคำนวณหาค่าคงที่อัตราไหล (Rate of flow, Rf)

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

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวาน

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างดินและส่วนของพืชที่มีอาการของโรครากเน่าโคนเน่าของส้มเขียวหวานด้วยวิธี baiting และวิธี tissue transplanting เชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้ ดังนี้ ไอโซเลท PN01, PN02 และ PN03 โดยไอโซเลท PN01 แยกเชื้อราสาเหตุโรคได้จากวิธี tissue transplanting ส่วน ไอโซเลท PN02 และ PN03 วิธี baiting (ตารางที่ 4.1)

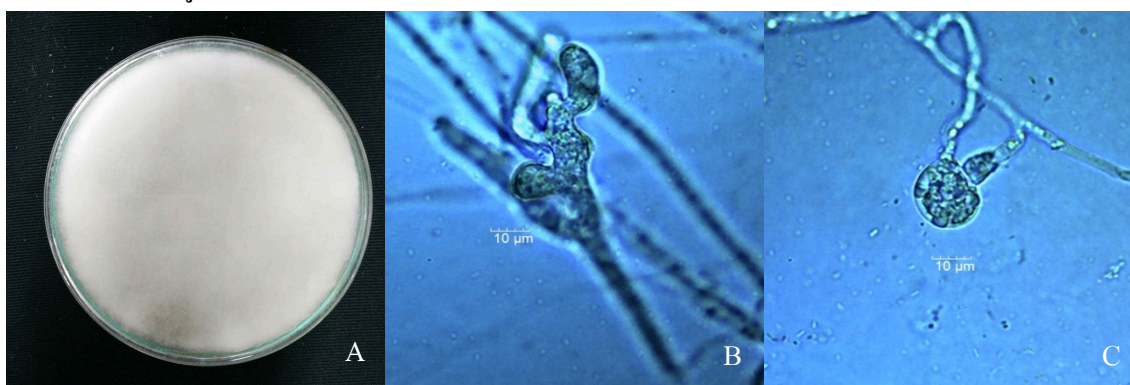
ตารางที่ 4.1 ไอโซเลทและวิธีการแยกเชื้อ ของเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้

ไอโซเลท	ตัวอย่าง	วิธีการแยกเชื้อ
PN01	โคนต้น	tissue transplanting
PN02	ดิน	baiting
PN03	ดิน	baiting

4.2 การศึกษาสัณฐานวิทยา (morphology)

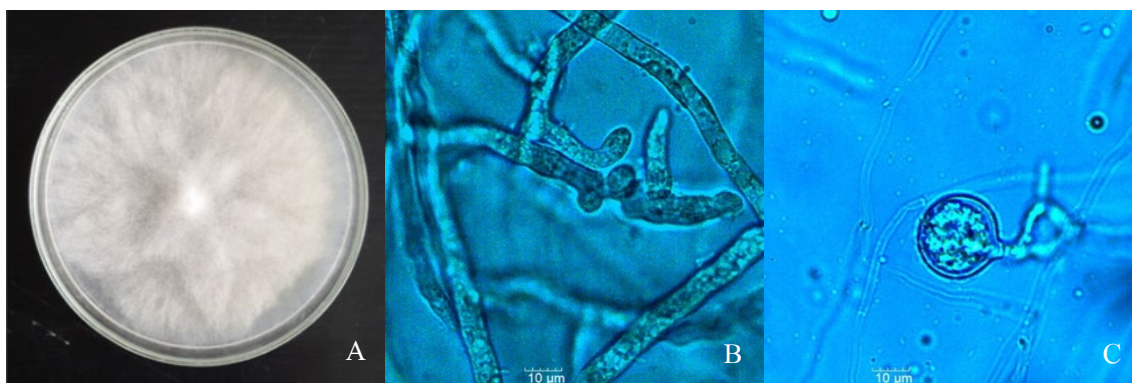
4.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคราก

จากการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA ไอโซเลท PN01 โคโลนีเจริญฟูเรียบคล้ายปุยฝ้าย (cottony pattern) เส้นใยมีสีขาว ค่อนข้างฟู (ภาพที่ 4.1, A) ระยะเวลาในการเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 – 3 วัน เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เส้นใยใสไม่มีสี (hyaline) ไม่มีผนังกั้น สร้าง sporangium แบบ filamentous inflated จำนวนมาก (ภาพที่ 4.1, B) oogonium มีลักษณะกลม ผิวเรียบ เกิดที่บริเวณปลายเส้นใย และระหว่างเส้นใย ส่วนใหญ่ oogonium และ antheridium เกิดจากเส้นใยเดียวกัน จะมี antheridium เกาะอยู่ 1 – 2 อัน และสร้าง oospores แบบ apherotic ลักษณะกลม (ภาพที่ 4.1, C)



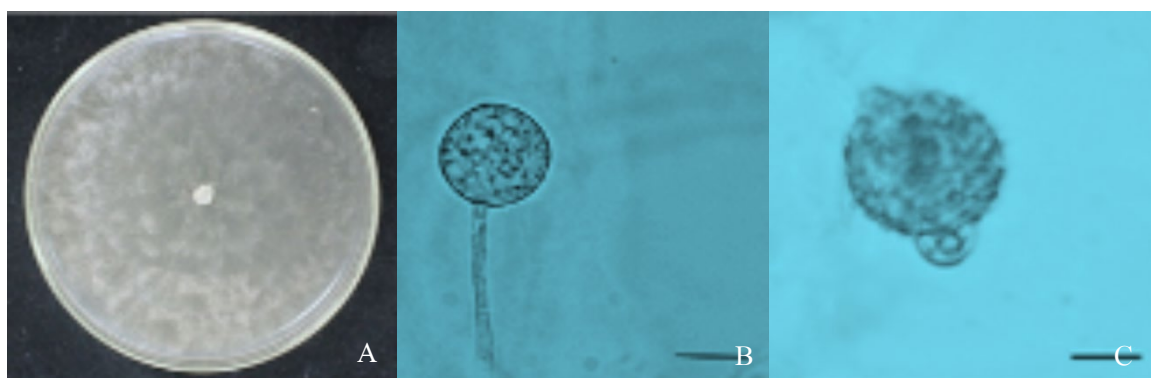
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ PN01; A = ลักษณะโคโลนีเจริญฟูเรียบคล้ายปุยฝ้ายบนอาหาร PDA ที่อายุ 3 วัน; B = sporangium (40x); C = oogonium และ antheridium(40x)

ไอโซเลท PN02 โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA เส้นใยมีสีขาวฟู โคโลนีเจริญเป็นแฉก 4 – 5 แฉก ออกจากจุดศูนย์กลางโคโลนี เส้นใยมีสีขาว ก่อนข้างฟู (ภาพที่ 4.2, A) ระยะเวลาในการเจริญเต็มจานอาหาร เลี้ยงเชื้อ 2 – 3 วัน เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เส้นใยใสไม่มีสี (hyaline) ไม่มีผนังกัน สร้าง sporangium แบบ filamentous inflated จำนวนมาก (ภาพที่ 4.2, B) oogonium มีลักษณะกลม ผิวเรียบ เกิดที่บริเวณปลายเส้นใย และระหว่างเส้นใย ส่วนใหญ่ oogonium และ antheridium เกิดจากเส้นใยเดียวกัน จะมี antheridium เกาะอยู่ 1 – 2 อัน และสร้าง oospores แบบ apherotic ลักษณะกลม (ภาพที่ 4.2, C)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ PN02; A = ลักษณะโคโลนีเจริญเป็นแฉก 4 – 5 แฉก บนอาหาร PDA ที่อายุ 3 วัน; B = sporangium (40x); C = oogonium และ antheridium (40x)

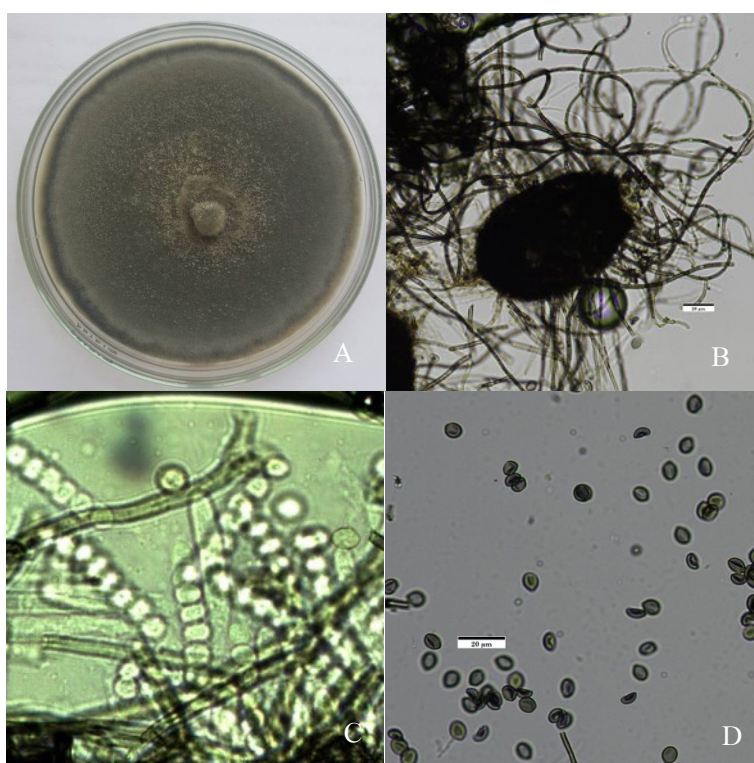
ไอโซเลท PN03 โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA เส้นใยมีสีขาว โคโลนีเจริญเรียบไปกับผิวหน้าอาหาร ลักษณะการเจริญคล้ายดอกกุหลาบ (rosette pattern) (ภาพที่ 4.3, A) ระยะเวลาในการเจริญเต็มจานอาหาร เลี้ยงเชื้อ 4 – 5 วัน เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เส้นใยใสไม่มีสี (hyaline) ไม่มีผนังกัน สร้าง sporangium แบบ subglobose จำนวนมาก (ภาพที่ 4.3, B) oogonium ผิวมีลักษณะคล้ายหนาม (ornamented oogonium) เกิดที่บริเวณปลายเส้นใย และสร้าง oospores แบบ pherotic ลักษณะกลม (ภาพที่ 4.3, C)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ PN03; A = ลักษณะโคโลนีเจริญเรียบไปกับผิวหน้าอาหาร คล้ายดอกกุหลาบ บนอาหาร PDA กุหลาบ ที่อายุ 5 วัน; B = sporangium (40x); C = oogonium และ antheridium (40x)

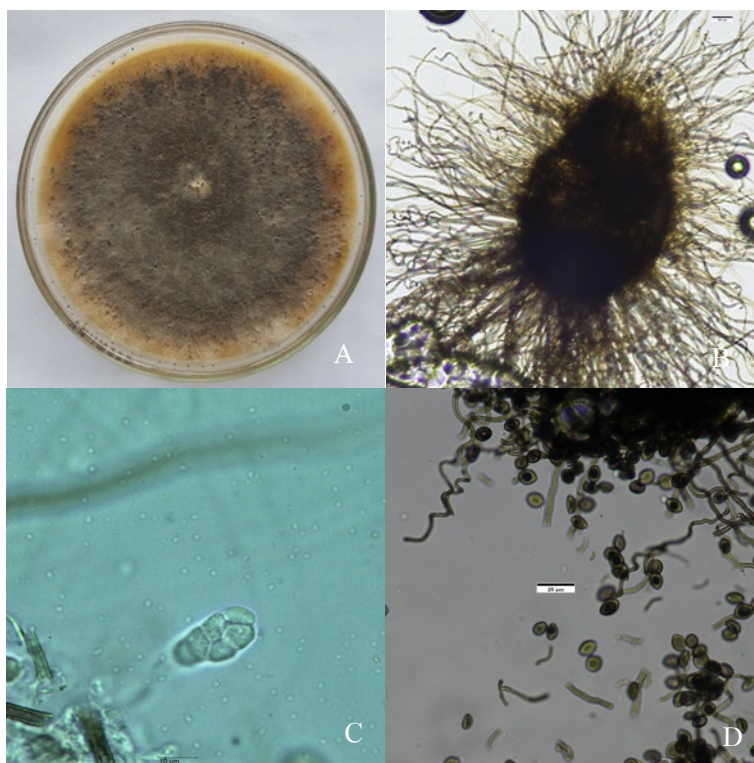
4.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Chaetomium* spp.

จากการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคลโณมีลักษณะเป็นปุย มีสีขาวปนเทาในระยะแรก เมื่อแก่ขึ้นจะมีสีเทาเข้ม จนถึงดำด้านใต้ฐานอาหารมีสีดำ โคลโณมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีสีดำและมีพนักสั้น ascocarp มีลักษณะค่อนข้างกลมถึงรูปไข่ มีปากเปิด (perithecium) มีสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ terminal hairs บริเวณปลายมีลักษณะเป็นเกลียวคลื่น asci มีลักษณะเป็นทรงกระบอก ภายในบรรจุด้วย 8 ascospore สีดำ ลักษณะกลมถึงรูปไข่ (ภาพที่ 4.4)



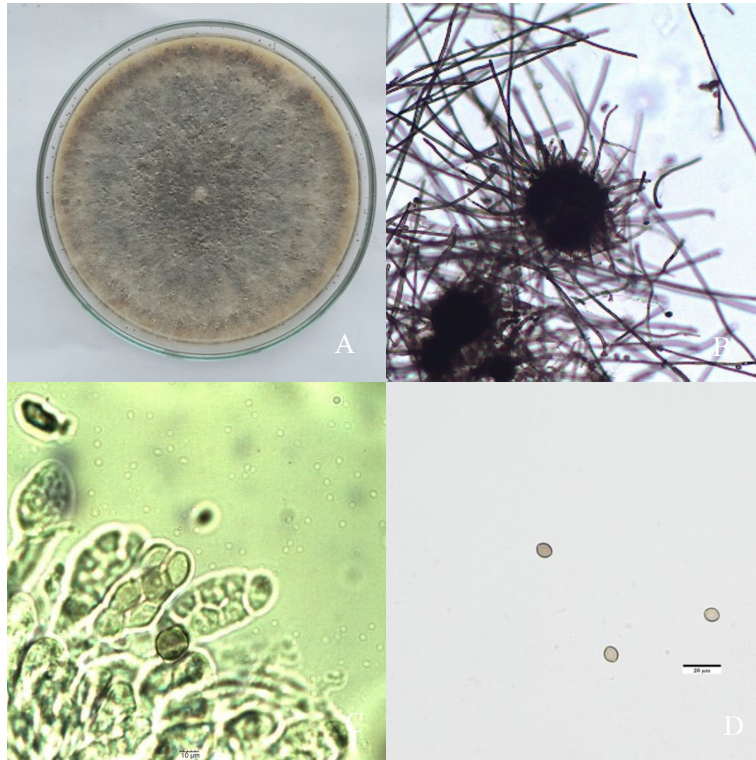
ภาพที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Ch. brasiliense*; A = ลักษณะ โคลโณเป็นปุยสีเทา บนอาหาร PDA; B = perithecium (10x); C = asci (40x); D: ascospores (10x)

เชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคลินี้มีลักษณะเป็นปุยสีเขียวมะกอก มีการเจริญค่อนข้างเร็ว มีการสร้างสารทุติยภูมิทำให้เกิดสีชมพูจนถึงม่วงที่อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีสีน้ำตาลและมีผนังกัน ascocarp มีลักษณะรูปร่างรีคล้ายรูปไข่ มีปากเปิด (perithecium) มีสีเขียวมะกอกจนถึงสีน้ำตาล terminal hair มีลักษณะหยิกเป็นเกลียว สีน้ำตาล asci มีลักษณะคล้ายกระบอง ภายในบรรจุด้วย 8 ascospore มีรูปร่างค่อนข้างกลม ปลายสองข้างมีติ่งแหลมคล้ายผลของเลมอน สีเขียวถึงน้ำตาล (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Ch. cochliodes*; A = ลักษณะโคโลนีเป็นปุยสีเขียวมะกอกบนอาหาร PDA; B = perithecium (10x); C = asci (40x); D: ascospores (10x)

เชื้อรา *Ch. elatum* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคลนนี้มีลักษณะเป็นปุยสีเขียวมะกอก มีการเจริญค่อนข้างเร็ว คล้ายคลึงกับ *Ch. cochliodes* เมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องพบว่าเส้นใยมีสีน้ำตาลและมีผนังกั้น ascocarp มีลักษณะรูปร่างรีคล้ายรูปไข่ มีปากเปิด (perithecium) มีสีเขียวมะกอกจนถึงสีน้ำตาล terminal hair มีลักษณะค่อนข้างตรงและมีการแตกแขนงแบบ dichotomously branched สีน้ำตาล asci มีลักษณะคล้ายกระบอง ภายในบรรจุด้วย 8 ascospore มีรูปร่างค่อนข้างกลม ปลายสองข้างมีติ่งแหลมคล้ายผลของเลมอน สีเขียวถึงน้ำตาล (ภาพที่ 4.5)

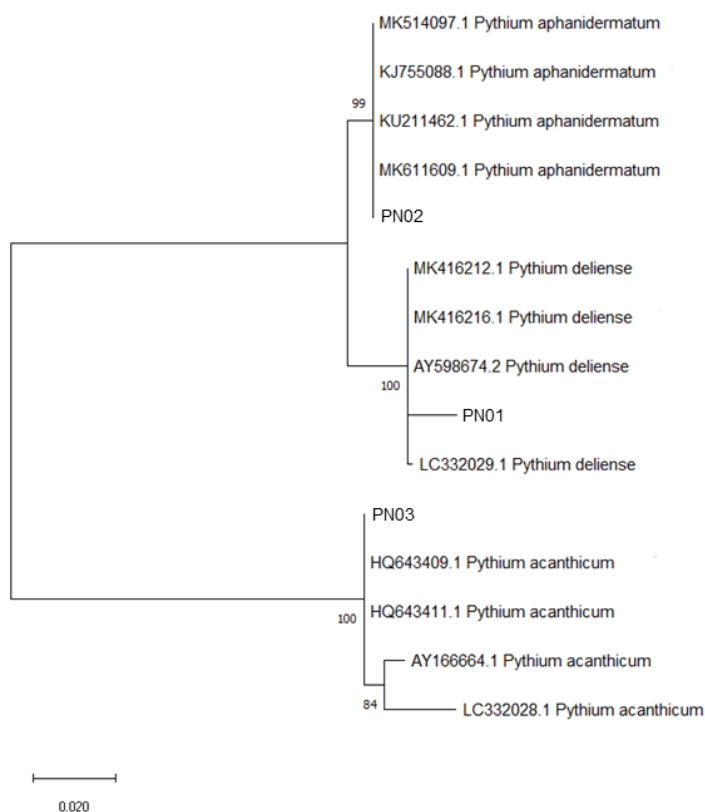


ภาพที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Ch. elatum*; A = ลักษณะโค โคลนนี้เป็นปุยสีเขียวมะกอก บนอาหาร PDA; B = perithecium (10x); C = asci (40x); D: ascospores (10x)

4.3 การตรวจสอบเชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการตรวจสอบเชื้อราที่แยกได้ ทั้ง 3 ไอโซเลท ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ BLAST พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา *Pythium* spp. โดยไอโซเลท PN01 มีความเหมือน (identity) กับไอโซเลท MK416212.1, MK416216.1, AY598674.2 และ LC332029.1 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นเชื้อรา *P. deliense* ไอโซเลท PN02 มีความเหมือนกับไอโซเลท MK514097.1, KJ55088.1, KU211462.1 และ MK611609.1 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นเชื้อรา *P. aphanidermatum* และ ไอโซเลท PN03 มีความเหมือนกับไอโซเลท HQ643409.1, HQ643411.1, AY166664.1 และ LC332028 97 – 98 เปอร์เซ็นต์ เป็นเชื้อรา *P. acanthicum*

การวิเคราะห์หาแผนภูมิกวามสัมพันธ์ (phylogenetic tree) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี neighbor-joining และทดสอบค่า bootstrap 1000 ซ้ำ ดังภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 Phylogenetic tree ของเชื้อรา *Pythium* spp.

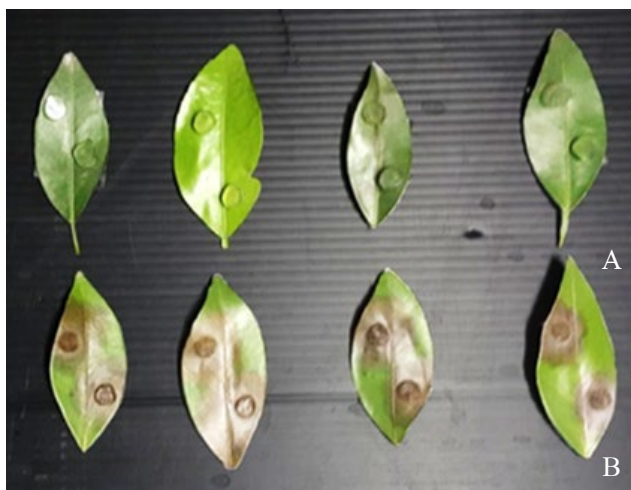
4.4 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test)

4.4.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดอาการรากเน่าโคนเน่าบนใบ

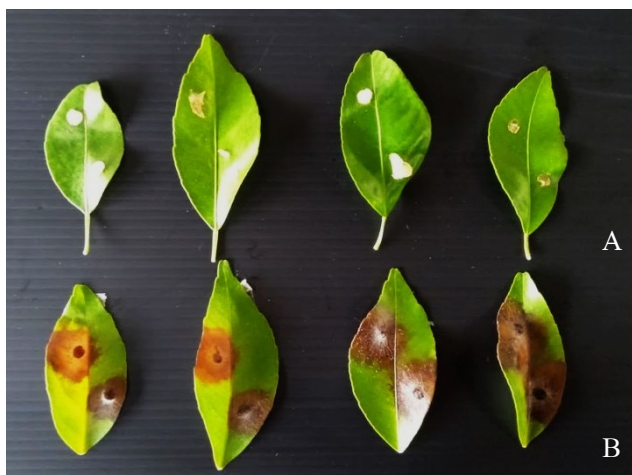
จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *Pythium* spp. ที่แยกได้บนใบส้มเขียวหวาน เมื่อครบ 3 วัน พบแสดงอาการวงสีน้ำตาลเทา มีลักษณะนูนๆ รอบบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* spp. โดยไอโซเลทที่ทำให้ขนาดแผลกว้างที่สุดได้แก่ ไอโซเลท PN02 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของขนาดแผลเท่ากับ 1.55 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท PN03 และ PN01 ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยของขนาดแผลเท่ากับ 1.45 และ 1.35 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม (control) ใบพืชยังคงมีสีเขียว ไม่แสดงอาการของโรค (ตารางที่ 4.2, ภาพที่ 4.8 – 4.10)

ตารางที่ 4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Pythium* spp. บนใบส้มเขียวหวาน

Treatments	ขนาดแผล (ค่าเฉลี่ย)
control	0.00d
PN01	1.30c
PN02	1.62a
PN03	1.45b



ภาพที่ 4.8 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรบบนใบส้มเขียวหวาน ไอโซเลท PN01; A = การทดลองควบคุม; B = ไอโซเลท PN01



ภาพที่ 4.9 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบส้มเขียวหวาน ไอโซเลท PN02; A = การทดลองควบคุม; B = ไอโซเลท PN02



ภาพที่ 4.10 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบส้มเขียวหวาน ไอโซเลท PN03; A = การทดลองควบคุม; B = ไอโซเลท PN03

4.4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดอาการรากเน่าโคนเน่าบนต้นส้มเขียวหวาน

ทำการคัดเลือกไอโซเลท PN02 ที่ก่อให้เกิดอาการบนใบรุนแรงที่สุด มาทดสอบการเกิดโรคบนต้นส้มในกระถางทดลอง โดยเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ พบว่า ต้นส้มที่ทำการปลูกเชื้อลงไปแสดงอาการใบเหลือง ใบร่วง มีกิ่งแห้งตาย ต้นมีอาการทรุดโทรม บริเวณโคนต้นส้มมีอาการฉ่ำน้ำ (ตารางที่ 4.3, ภาพที่ 4.11)

ตารางที่ 4.3 ผลจากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ PN02 บนต้นส้มเขียวหวาน

Treatments	ระดับการเกิดโรค (ค่าเฉลี่ย)
Non inoculated control	1.00 ^b
Inoculated control	3.00 ^a



ภาพที่ 4.11 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนต้นส้มเขียวหวาน; A = การทดลองควบคุม; B = ไอโซเลท PN02

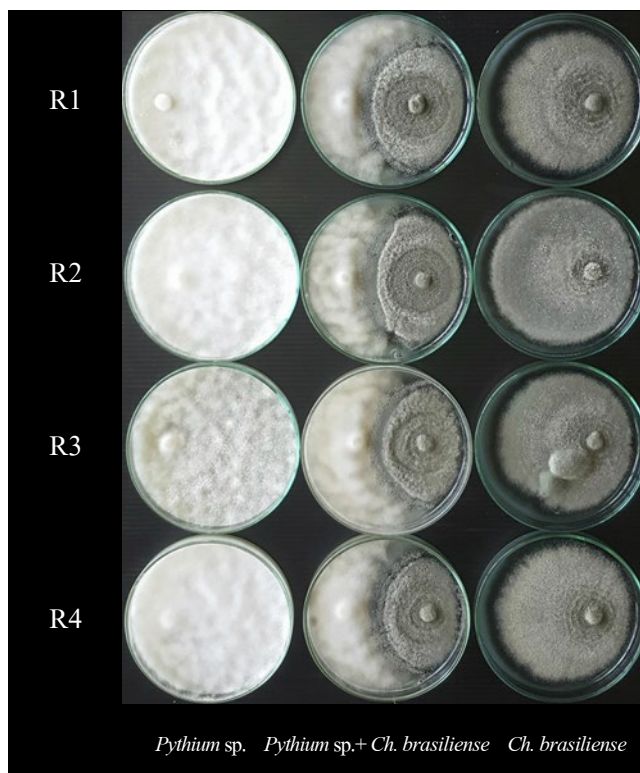
4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Chaetomium* spp. ด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม (bi-culture test)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Ch. brasiliense*, *Ch. cochliodes* และ *Ch. elatum* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02 ด้วยวิธี bi-culture แสดงให้เห็นประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี PN02 พบว่าเชื้อรา *Ch. brasiliense* และ *Ch. elatum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยของ PN02 สูงที่สุด และรองลงมาได้แก่เชื้อรา *Ch. cochliodes* โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี PN02 เฉลี่ยเท่ากับ 5.18, 5.43 และ 6.20 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยเท่ากับ 42.50, 39.72 และ 31.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4, ภาพที่ 4.12 – 4.15)

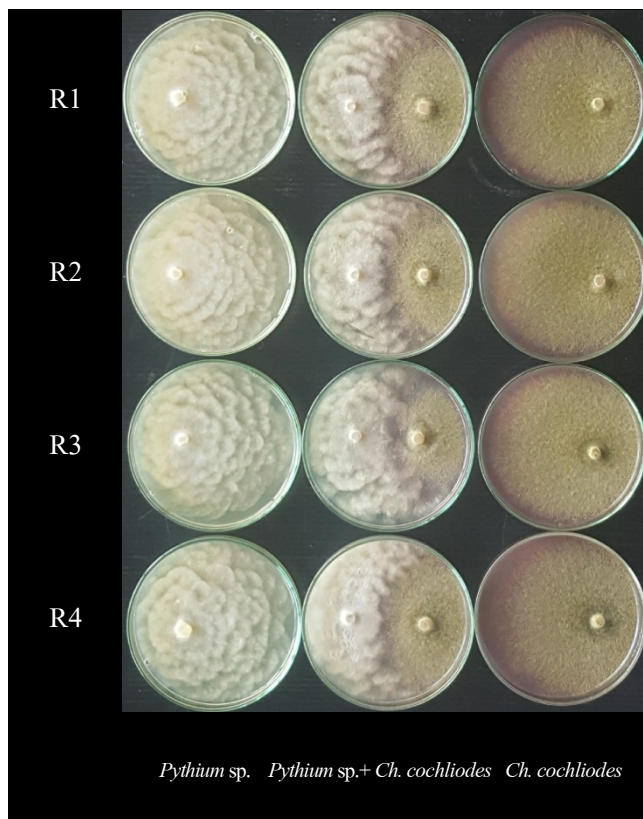
ส่วนผลการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores ของ PN02 โดยการนับปริมาณ oospores พบว่า oospores ในการทดลองควบคุมมีปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 80.44×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ *Ch. elatum*, *Ch. brasiliense* และ *Ch. cochliodes* ตามลำดับ โดยเชื้อรา *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 47.01, 48.41 และ 49.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและ oospores ของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture

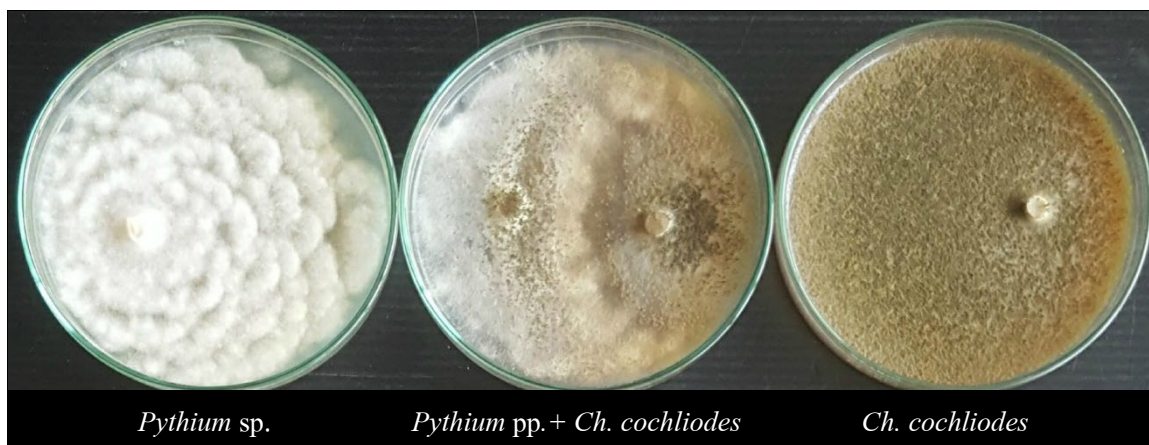
Treatments	เชื้อรา <i>Pythium</i> sp.			
	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ¹	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (%) ^{2,3}	ปริมาณ oospores (10 ⁴ สปอร์/มล.) ⁴	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores (%) ^{5,6}
Control	9.00a	-	80.44a	-
<i>Ch. brasiliense</i>	5.18c	42.50	41.50b	48.41
<i>Ch. cochliodes</i>	6.20b	31.11	40.75b	49.18
<i>Ch. elatum</i>	5.43c	39.72	42.63b	47.01
C.V. (%)	4.02		2.40	



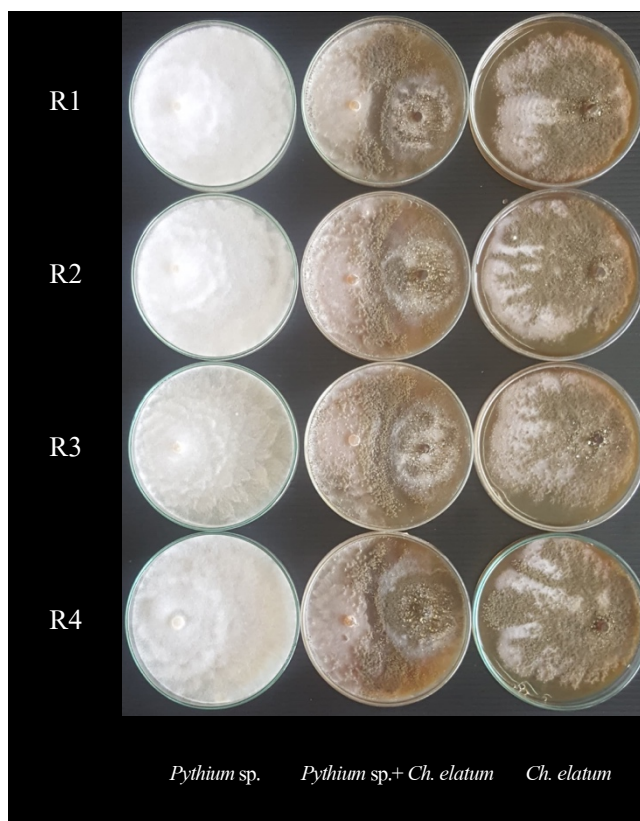
ภาพที่ 4.12 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Ch. brasiliense* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture



ภาพที่ 4.13 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Ch. cochliodes* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture (10 วัน)



ภาพที่ 4.14 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Ch. cochliodes* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture (30 วัน)



ภาพที่ 4.15 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Ch. elatum* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02 ด้วยวิธี bi – culture

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium spp.* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium sp.* ในห้องปฏิบัติการ (crude extract test)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02 ด้วยวิธี poisoned food technique เมื่อเชื้อราในการทดลองควบคุม เจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (2 วัน) พบว่าทุกสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm ไม่มีการเจริญของเชื้อราออกมาจากชิ้นวุ้นของเชื้อรา *Pythium sp.*

สารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm PN02 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 0.6, 1.18, 2.09 และ 3.29 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (5 เซนติเมตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 88.00, 76.50, 58.25 และ 34.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5, ภาพที่ 4.16) สารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 2.06×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 95.59 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 5.56×10^4 , 12.38×10^4 , 21×10^4 และ 31.75×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (46.81×10^4 สปอร์ต่อ

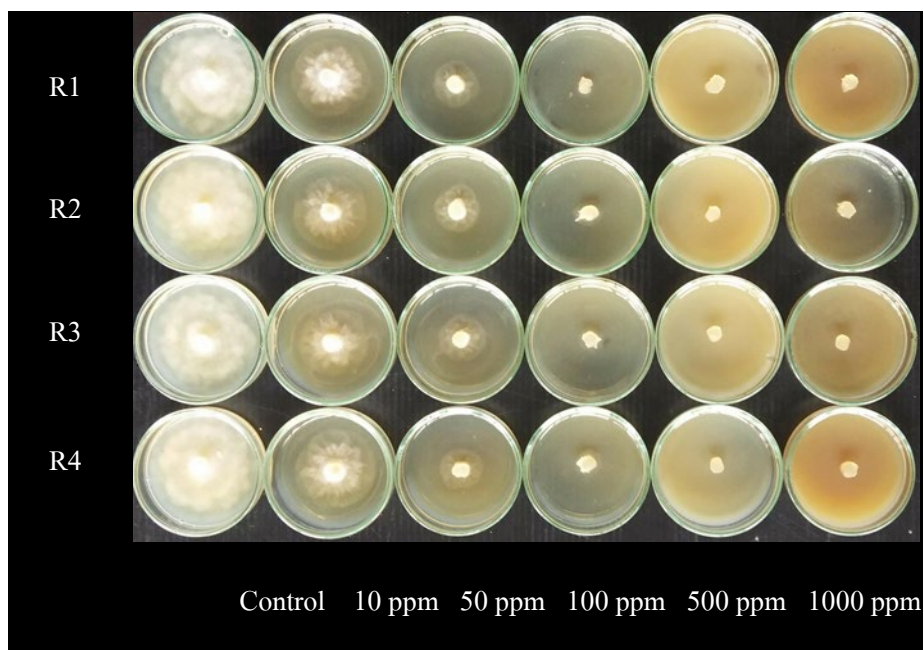
มิลลิลิตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 88.12, 73.56, 55.14 และ 32.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 30.15 µg/ml (ตารางที่ 4.5)

สารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 0.6, 1.54, 2.86 และ 3.63 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 88, 69.25, 42.75 และ 27.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5, ภาพที่ 4.17) สารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 2.19×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 95.33 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 5.75×10^4 , 19×10^4 , 30.25×10^4 และ 35×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 87.72, 59.41, 35.38 และ 25.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 58.71 µg/ml (ตารางที่ 4.5)

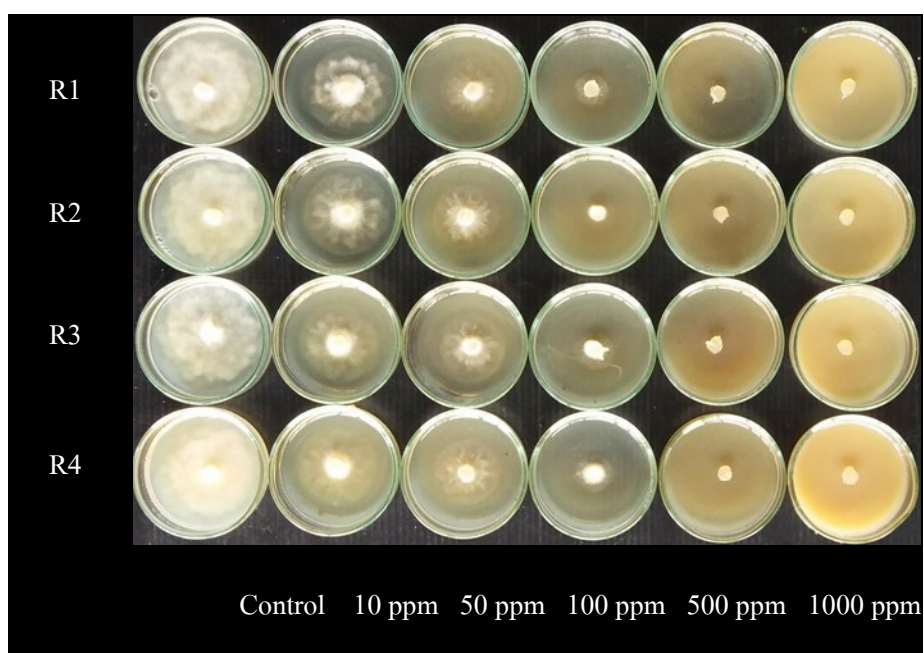
สารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100 และ 10 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 0.7, 1.45, 2.43 และ 2.8 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 86, 71, 51.5 และ 44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5, ภาพที่ 4.18) สารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 2.13×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 95.46 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 6.19×10^4 , 17×10^4 , 26.25×10^4 และ 29.5×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 86.78, 63.68, 43.92 และ 36.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 37.25 µg/ml (ตารางที่ 4.5) นอกจากนี้ยังพบการสร้าง oogonium มีลักษณะผิดปกติที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm จากทุกสารสกัดด้วย (ภาพที่ 4.19)

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02

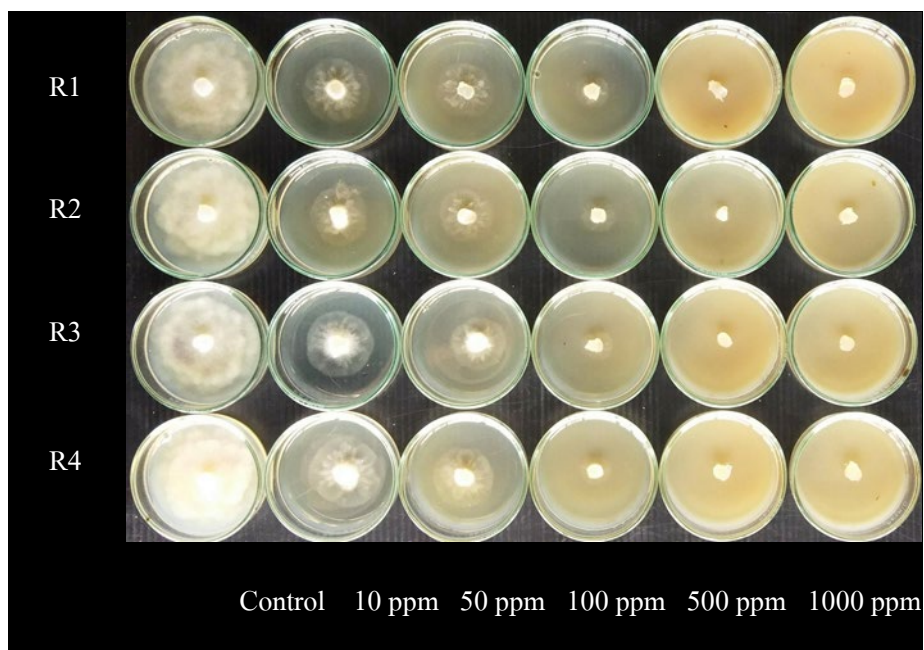
สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (ซม.) ^{/1}	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการ เจริญเติบโต ^{/2,3}	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์/ มล.) ^{/4}	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการสร้าง สปอร์ ^{/5,6}	ED ₅₀ (ppm)
hexane	0	5.00a	-	46.81a	-	30.15
	10	3.29c	34.25h	31.75c	32.18i	
	50	2.09f	58.25e	21.00f	55.14f	
	100	1.18h	76.50c	12.38i	73.56d	
	500	0.60ij	88.00ab	5.56j	88.12b	
	1000	0.50j	90.00a	2.06k	95.59a	
ethyl acetate	0	5.00a	-	46.81a	-	58.71
	10	3.63b	27.50i	35.00b	25.23j	
	50	2.86d	42.75g	30.25d	35.38h	
	100	1.54g	69.25d	19.00g	59.41e	
	500	0.60ij	88.00ab	5.75j	87.72b	
	1000	0.50j	90.00a	2.19k	95.33a	
methanol	0	5.00a	-	46.81a	-	37.25
	10	2.80d	44.00g	29.50d	36.98h	
	50	2.43e	51.50f	26.25e	43.92g	
	100	1.45g	71.00d	17.00h	63.68d	
	500	0.70i	86.00b	6.19j	86.78b	
	1000	0.50j	90.00a	2.13k	95.46a	
C.V. (%)		4.28		3.98		



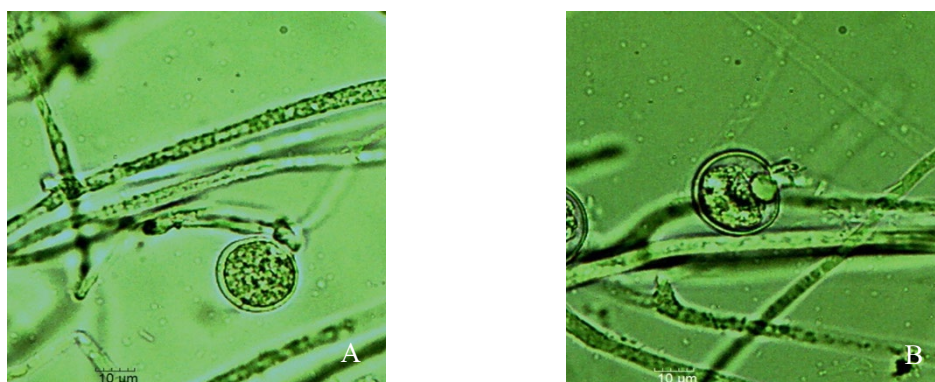
ภาพที่ 4.16 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย hexane ในการยับยั้งการเจริญของ PN02



ภาพที่ 4.17 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ในการยับยั้งการเจริญของ PN02



ภาพที่ 4.18 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย methanol ในการยับยั้งการเจริญของ PN02



ภาพที่ 4.19 เปรียบเทียบลักษณะของ oogonium; A = oogonium ที่มีลักษณะปกติ, B = oogonium ที่มีลักษณะผิดปกติ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02 ด้วยวิธี poisoned food technique เมื่อเชื้อราในการทดลองควบคุม เจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (2 วัน) พบว่าสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 2.71 เซนติเมตร และ 45.75 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาได้แก่ ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 3.19, 4.28, 4.43 และ 4.61 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (5 เซนติเมตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 36.25, 14.5, 11.25 และ 7.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6, ภาพที่ 4.20) สารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย hexane ที่

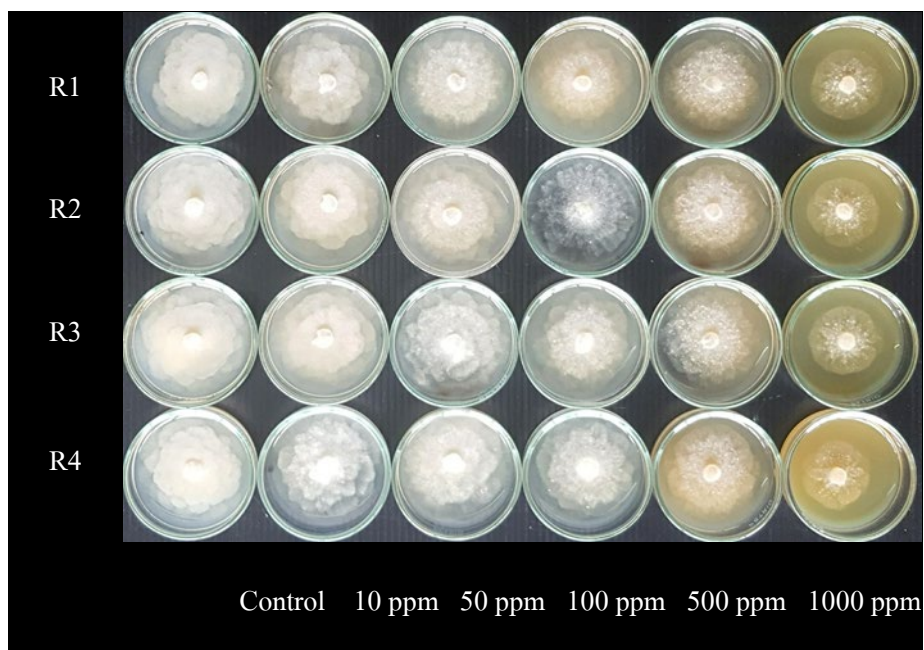
ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 10.25×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 78.84 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 19×10^4 , 29.5×10^4 , 32.94×10^4 และ 38.56×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม (48.44×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 60.78, 39.10, 32.00 และ 20.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

สารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต เท่ากับ 2.93 เซนติเมตร และ 41.50 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 100 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 4.14 และ 4.68 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 17.25 และ 6.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 10 ppm ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Pythium* sp. ได้ (ตารางที่ 4.6, ภาพที่ 4.21) สารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 13.94×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 71.23 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีปริมาณสปอร์ เท่ากับ 28.50×10^4 , 38.50×10^4 , 41.50×10^4 และ 46.69×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 41.16, 20.52, 14.33 และ 3.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

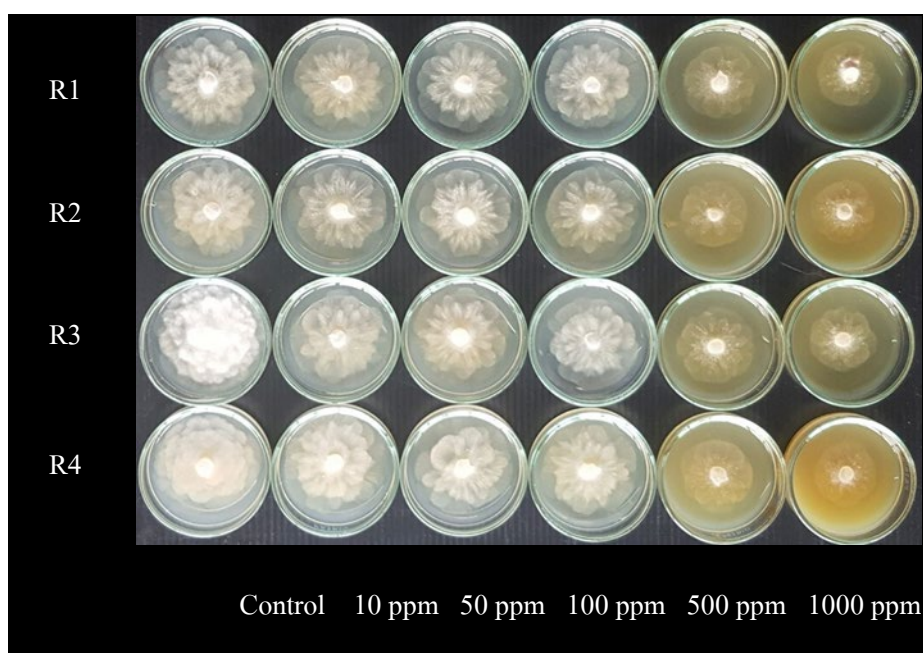
สารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต เท่ากับ 2.99 เซนติเมตร และ 40.25 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาที่ระดับความเข้มข้น 500, 100 และ 10 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 3.81, 4.29, 4.59 และ 4.65 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 23.75, 14.25, 8.25 และ 7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6, ภาพที่ 4.22) สารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 16.38×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 66.2 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 26.25×10^4 , 31.75×10^4 , 34.94×10^4 และ 40.5×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 45.81, 34.45, 27.87 และ 16.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) นอกจากนั้นยังพบ การสร้าง oogonium มีลักษณะผิดปกติที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm จากทุกสารสกัดด้วย (ภาพที่ 4.23)

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02

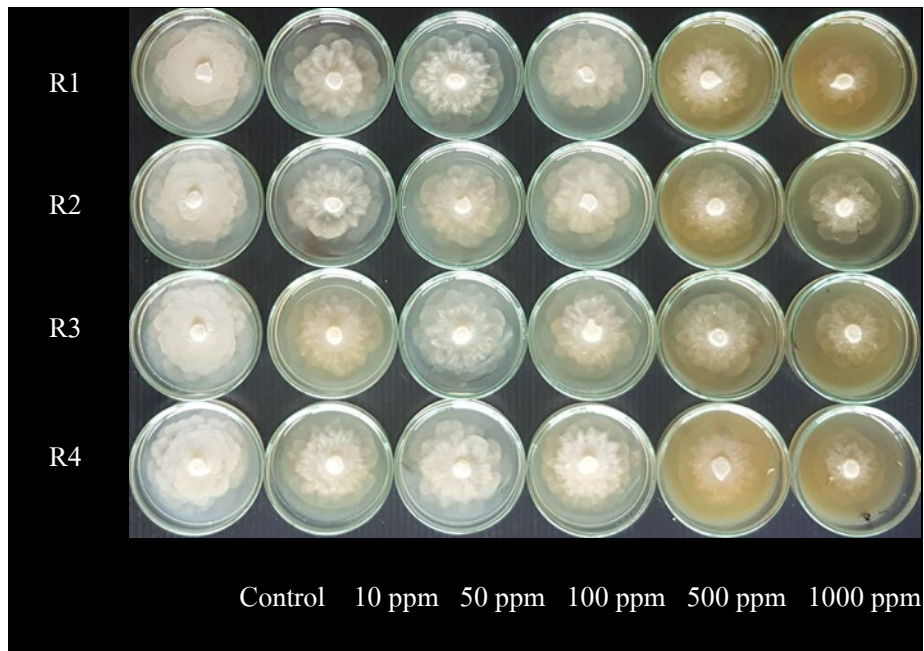
สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (ซม.) ¹	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการ เจริญเติบโต ^{2,3}	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์/ มล.) ⁴	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการสร้าง สปอร์ ^{5,6}	ED ₅₀ (ppm)
hexane	0	5.00a	-	48.44a	-	
	10	4.61b	7.75h	38.56d	20.39i	
	50	4.43c	11.25g	32.94f	32.00g	-
	100	4.28d	14.50f	29.50g	39.10f	
	500	3.19g	36.25c	19.00i	60.78d	
	1000	2.71i	45.75a	10.25l	78.84a	
ethyl acetate	0	5.00a	-	48.44a	-	
	10	5.00a	-	46.69b	3.62k	
	50	5.00a	-	41.50c	14.33j	-
	100	4.68b	6.50h	38.50d	20.52i	
	500	4.14e	17.25e	28.50g	41.16f	
	1000	2.93h	41.50b	13.94k	71.23b	
methanol	0	5.00a	-	48.44a	-	
	10	4.65b	7.00h	40.50c	16.39j	
	50	4.59b	8.25h	34.94e	27.87h	-
	100	4.29d	14.25f	31.75f	34.45g	
	500	3.81f	23.75d	26.25h	45.81e	
	1000	2.99h	40.25b	16.38j	66.20c	
C.V. (%)		2.18		2.66		



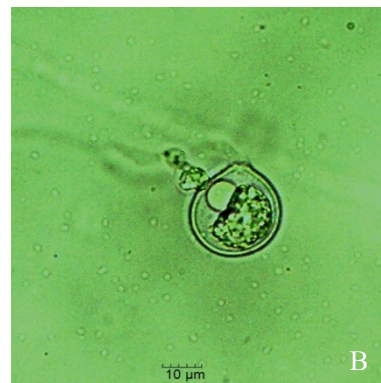
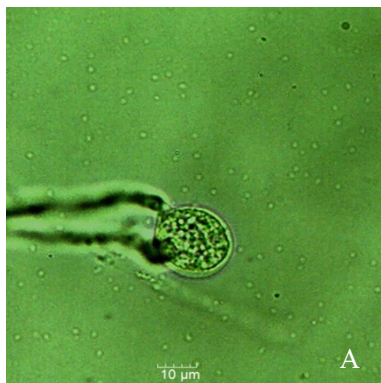
ภาพที่ 4.20 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย hexane ในการยับยั้งการเจริญของ PN02



ภาพที่ 4.21 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ในการยับยั้งการเจริญของ PN02



ภาพที่ 4.22 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย methanol ในการยับยั้งการเจริญของ PN02



ภาพที่ 4.23 เปรียบเทียบลักษณะของ oogonium; A = oogonium ที่มีลักษณะปกติ, B = oogonium ที่มีลักษณะผิดปกติ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อรา *Ch. elatum* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02 ด้วยวิธี poisoned food technique เมื่อเชื้อราในการทดลองควบคุม เจริญจนเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (2 วัน) พบว่าจากทุกสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* มีเพียงที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm และสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ระดับความเข้มข้น 500 ppm ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ได้ โดยสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 4.85 เซนติเมตร และ 3.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7, ภาพที่ 4.24) สารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์สูงสุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง

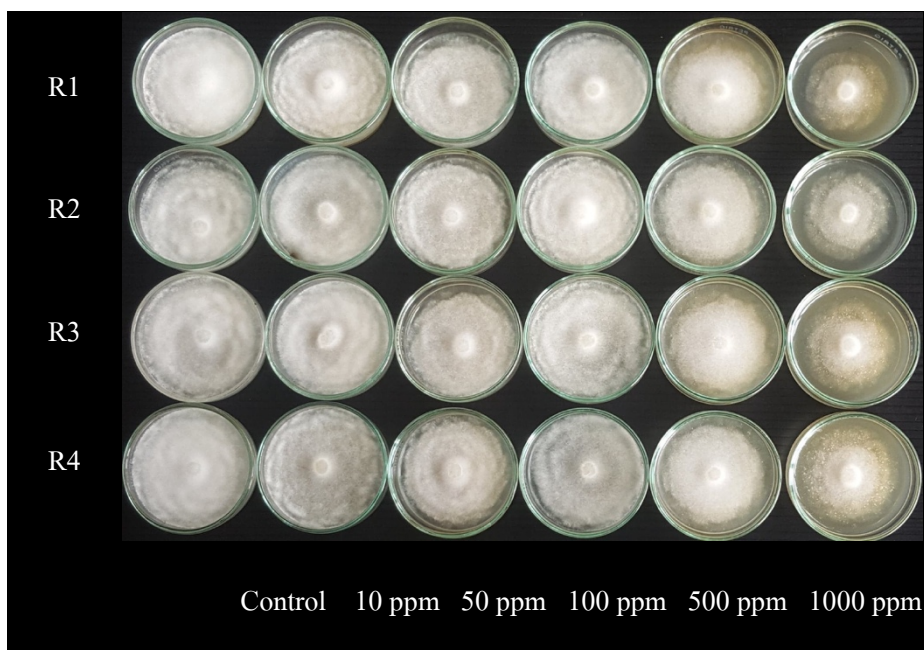
oospores เท่ากับ 40.88×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 21.30 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีปริมาณสปอร์ เท่ากับ 42.94×10^4 , 44.69×10^4 , 46.88×10^4 และ 48.31×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (51.94×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การสร้างสปอร์เท่ากับ 17.33, 13.96, 9.75 และ 6.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

สารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ระดับความเข้มข้น 1000 และ 500 ppm มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 3.95 และ 4.33 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (5 เซนติเมตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 21 และ 13.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7, ภาพที่ 4.25) สารสกัดจากเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 26.63×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 48.74 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 35.75×10^4 , 39.5×10^4 , 43.88×10^4 และ 46.75×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 31.17, 23.95, 15.52 และ 9.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7)

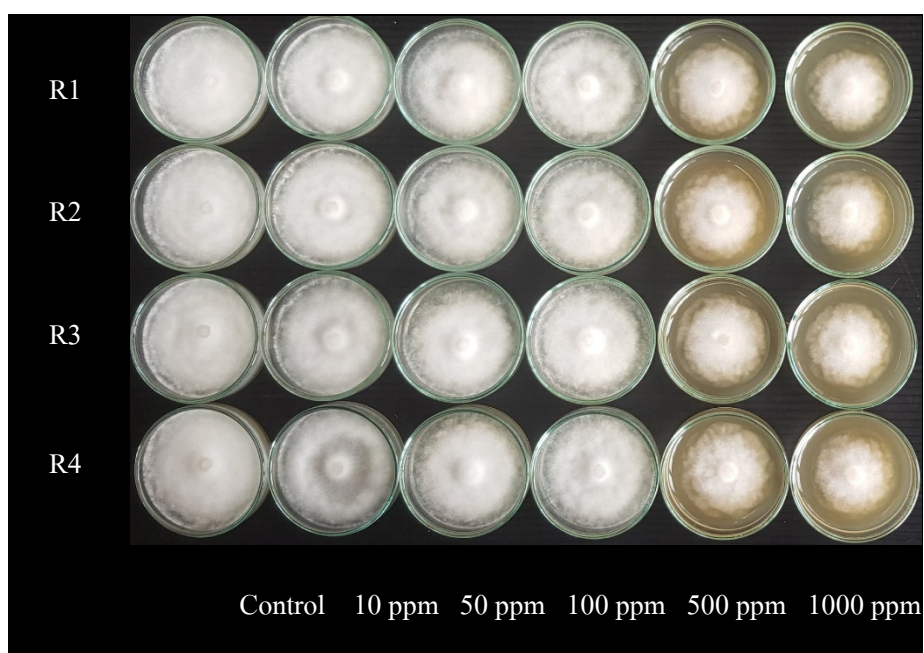
สารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนีเฉลี่ย 4.41 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การเจริญเติบโต 11.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7, ภาพที่ 4.26) สารสกัดจากเชื้อรา *Ch. elatum* ที่ สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 37.25×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 28.28 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 100, 50 และ 10 ppm มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 41.38×10^4 , 43.75×10^4 , 45.31×10^4 และ 47.63×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (51.94×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 20.34, 15.76, 12.76 และ 8.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) นอกจากนั้นยังพบการสร้าง oogonium มีลักษณะผิดปกติที่ระดับ ความเข้มข้น 1000 ppm จากทุกสารสกัดด้วย (ภาพที่ 4.27)

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02

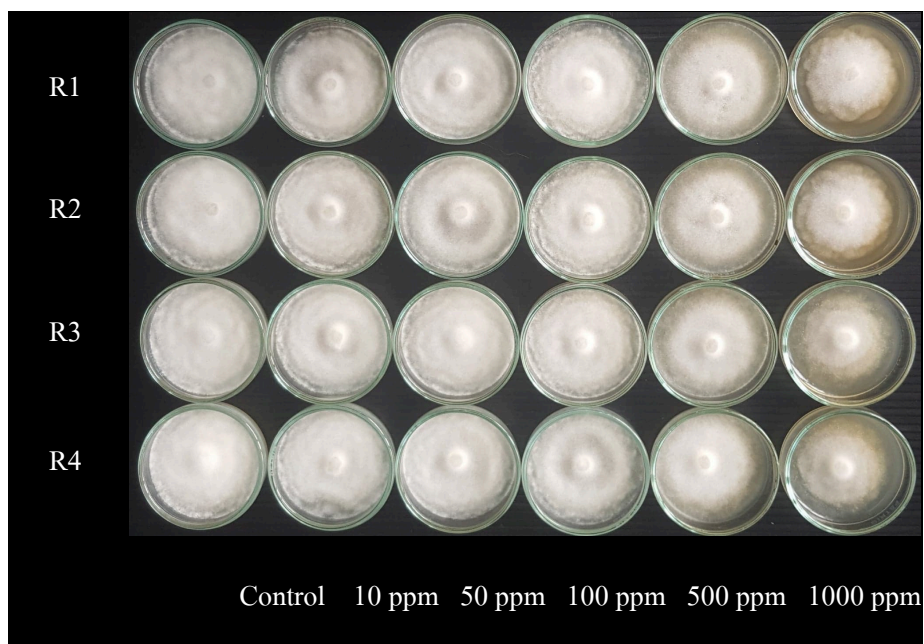
สารสกัด	ความเข้มข้น (ppm)	ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (ซม.) ¹	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการ เจริญเติบโต ^{2,3}	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์/ มล.) ⁴	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการสร้าง สปอร์ ^{5,6}	ED ₅₀ (ppm)
hexane	0	5.00a	-	51.94a	-	
	10	5.00a	-	48.31b	6.98	
	50	5.00a	-	46.88bc	9.75	
	100	5.00a	-	44.69de	13.96	-
	500	5.00a	-	42.94ef	17.33	
	1000	4.85b	3.00	40.88gh	21.30	
ethyl acetate	0	5.00a	-	51.94a	-	
	10	5.00a	-	46.75bc	9.99	
	50	5.00a	-	43.88de	15.52	
	100	5.00a	-	39.50h	23.95	-
	500	4.33d	13.50	35.75i	31.17	
	1000	3.95e	21.00	26.63j	48.74	
methanol	0	5.00a	-	51.94a	-	
	10	5.00a	-	47.63b	8.30	
	50	5.00a	-	45.31cd	12.76	
	100	5.00a	-	43.75de	15.76	-
	500	5.00a	-	41.38fg	20.34	
	1000	4.41c	11.75	37.25i	28.28	
C.V. (%)		0.89		2.03		



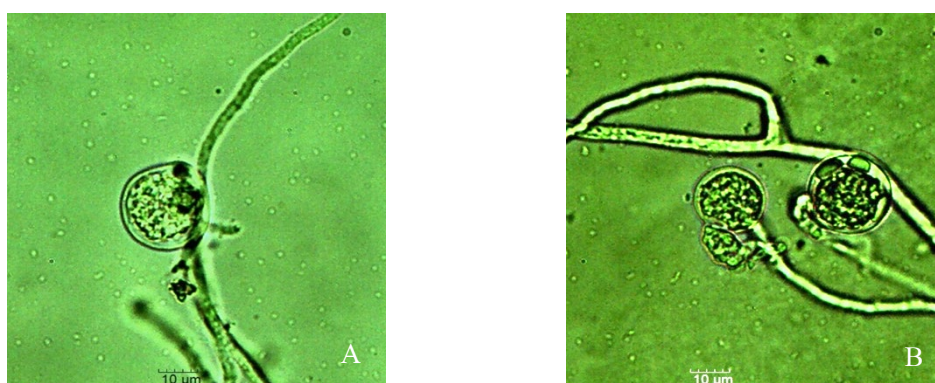
ภาพที่ 4.24 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย hexane ในการยับยั้งการเจริญของ PN02



ภาพที่ 4.25 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ในการยับยั้งการเจริญของ PN02



ภาพที่ 4.26 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย methanol ในการยับยั้งการเจริญของ PN02



ภาพที่ 4.27 เปรียบเทียบลักษณะของ oogonium; A = oogonium ที่มีลักษณะปกติ, B = oogonium ที่มีลักษณะผิดปกติ

4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium spp.* ในห้องปฏิบัติการ

nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงที่สุด ไม่มีการเจริญของเชื้อราออกมาจากชิ้นส่วนของ PN02 nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 1.11, 2.23 และ 2.91 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (5 เซนติเมตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 77.75, 55.5 และ 41.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8, ภาพที่ 4.28) nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย hexane

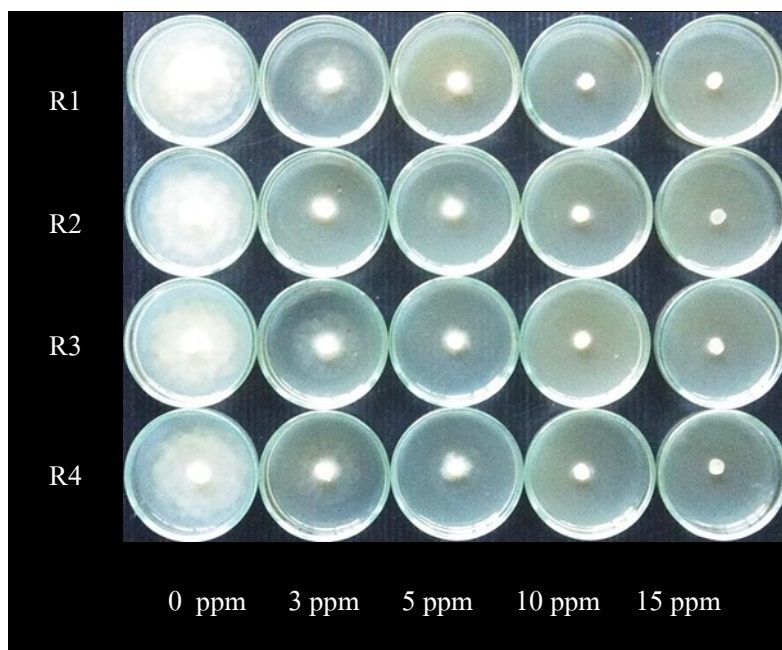
ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 2.06×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 95.13 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 5×10^4 , 13.44×10^4 และ 20.81×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม (42.38×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 88.20, 68.29 และ 50.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 3 µg/ml (ตารางที่ 4.8)

nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 1.63, 2.8 และ 3.88 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 67.5, 44 และ 22.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8, ภาพที่ 4.29) nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 2.13×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 94.99 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 5.75×10^4 , 19.31×10^4 และ 24.81×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 86.43, 54.42 และ 41.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 3.96 µg/ml (ตารางที่ 4.8)

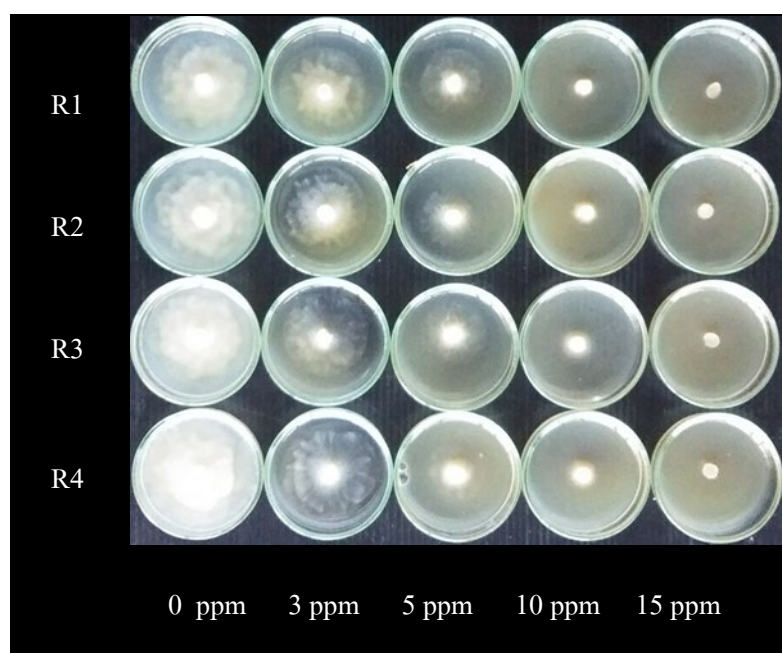
nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 1.09, 2.15 และ 2.64 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 78.25, 57 และ 47.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8, ภาพที่ 4.30) nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 1.94×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 95.43 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 4.5×10^4 , 12.63×10^4 และ 18.81×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 89.38, 70.21 และ 55.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 2.69 µg/ml (ตารางที่ 3) นอกจากนั้นยังพบการสร้าง oogonium มีลักษณะผิดปกติที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm จากทุกสารสกัดด้วย (ภาพที่ 4.31)

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ในการควบคุม PN02

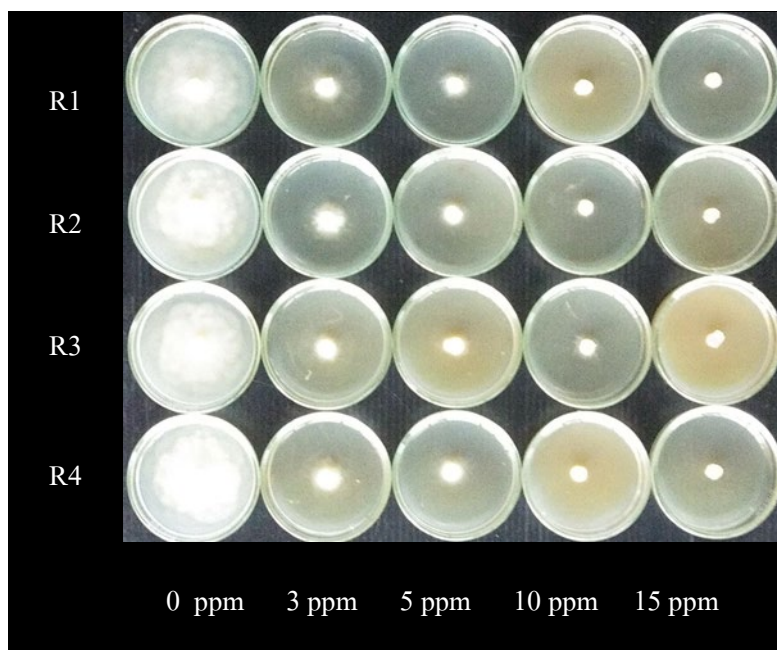
nano - elicitors	ความ เข้มข้น (ppm)	ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (ชม.) ^{/1}	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการ เจริญเติบโต ^{/2,3}	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์/ มล.) ^{/4}	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการสร้าง สปอร์ ^{/5,6}	ED ₅₀ (µg/ml)
hexane	0	5.00a	-	42.38a	-	
	3	2.91c	41.75f	20.81c	50.88e	
	5	2.23e	55.50d	13.44e	68.29c	3.00
	10	1.11g	77.75b	5.00f	88.20b	
	15	0.5h	90.00a	2.06g	95.13a	
ethyl acetate	0	5.00a	-	42.38a	-	
	3	3.88b	22.40g	24.81b	41.45f	
	5	2.80cd	44.00ef	19.31cd	54.42de	3.96
	10	1.63f	67.50c	5.75f	86.43b	
	15	0.50h	90.00a	2.13g	94.99a	
methanol	0	5.00a	-	42.38a	-	
	3	2.64d	47.25e	18.81d	55.60d	
	5	2.15e	57.00d	12.63e	70.21c	2.69
	10	1.09g	78.25b	4.50f	89.38b	
	15	0.50h	90.00a	1.94g	95.43a	
C.V. (%)		5.01		6.52		



ภาพที่ 4.28 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย hexane



ภาพที่ 4.29 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย ethyl acetate



ภาพที่ 4.30 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* ที่สกัดด้วย methanol



ภาพที่ 4.31 เปรียบเทียบลักษณะของ oogonium; A = oogonium ที่มีลักษณะปกติ, B = oogonium ที่มีลักษณะผิดปกติ

nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต เท่ากับ 1 เซนติเมตร และ 80 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 1.84, 2.33 และ 2.61 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (5 เซนติเมตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 63.25, 53.5 และ 47.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9, ภาพที่ 4.32) nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 6.75×10^4 สปอร์ต่อมิลลิเมตร และ 83.23 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับ

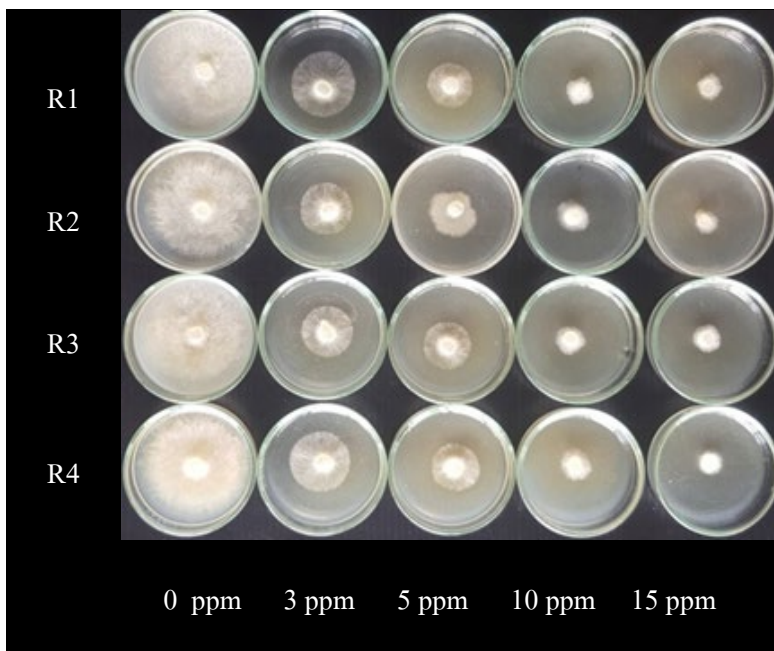
ความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 13.19×10^4 , 17.25×10^4 และ 21.5×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (40.25×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 67.24, 57.14 และ 46.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 3.68 µg/ml (ตารางที่ 4.9)

nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต เท่ากับ 0.7 เซนติเมตร และ 86 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 0.97, 1.26 และ 2.29 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 80.75, 74.75 และ 54.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9, ภาพที่ 4.33) nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 2×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 95.03 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 8.44×10^4 , 10×10^4 และ 16.63×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 79.04, 75.16 และ 58.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 2.17 µg/ml (ตารางที่ 4.9)

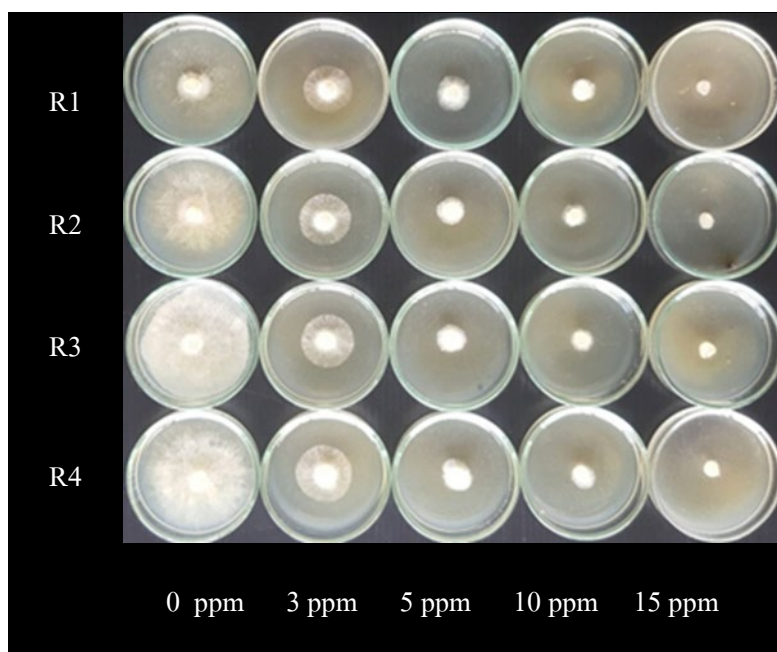
nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต เท่ากับ 0.95 เซนติเมตร และ 81 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 1.22, 1.71 และ 2.16 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 34.25, 29.75 และ 22.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9, ภาพที่ 4.34) nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณสปอร์และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 6.63×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 83.54 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 11.5×10^4 , 12.5×10^4 และ 15.13×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 71.43, 68.94 และ 62.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 3.8 µg/ml (ตารางที่ 4.9) นอกจากนี้ยังพบการเกิดเส้นใย ที่ปลายเส้นใยมีลักษณะผิดปกติที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm จากทุกสารสกัดด้วย (ภาพที่ 4.35)

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ในการควบคุม PN02

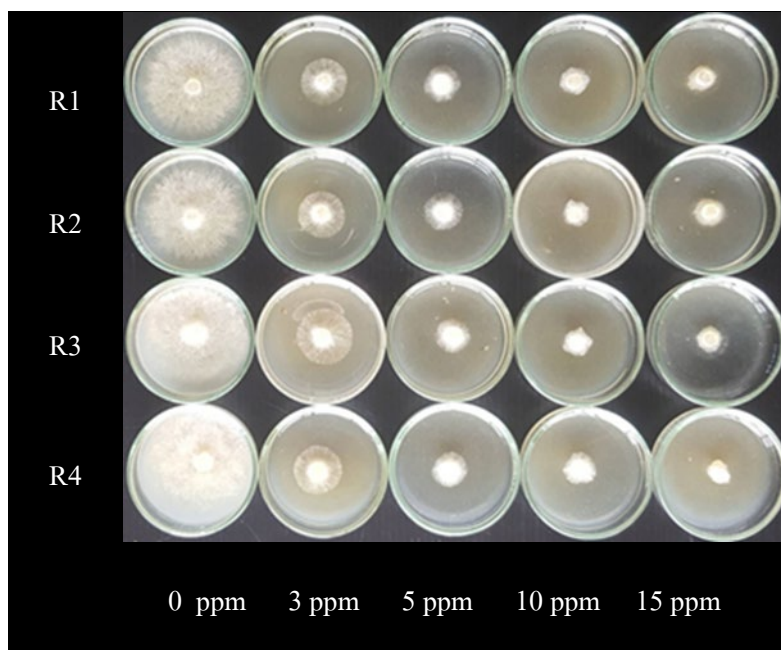
nano - elicitors	ความ เข้มข้น (ppm)	ขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง โคโลนี (ชม.) ¹	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการ เจริญเติบโต ^{2,3}	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์/ มล.) ⁴	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งการสร้าง สปอร์ ^{5,6}	ED ₅₀ (µg/ml)
hexane	0	5.00a ¹	-	40.25a	-	
	3	2.61b	47.75f	21.50b	46.58h	
	5	2.33c	53.50e	17.25c	57.14g	3.68
	10	1.84d	63.25d	13.19e	67.24e	
	15	1.00f	80.00b	6.75h	83.23b	
ethyl acetate	0	5.00a	-	40.25a	-	
	3	2.29c	54.25e	16.63cd	58.70fg	
	5	1.26e	74.75c	10.00fg	75.16cd	2.17
	10	0.97f	80.75b	8.44g	79.04c	
	15	0.70g	86.00a	2.00i	95.03a	
methanol	0	5.00a	-	40.25a	-	
	3	2.16c	56.75e	15.13d	62.42f	
	5	1.71d	65.75d	12.50e	68.94e	3.80
	10	1.22e	75.50c	11.50ef	71.43de	
	15	0.95f	81.00b	6.63h	83.54b	
C.V. (%)		6.03		6.53		



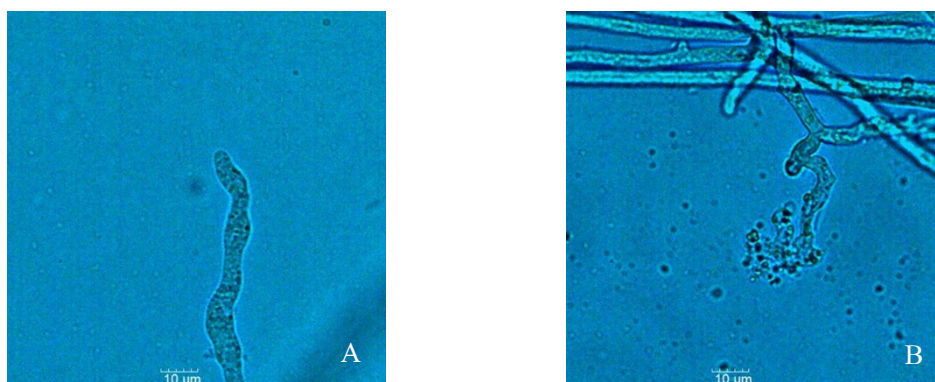
ภาพที่ 4.32 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitor จากเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย hexane



ภาพที่ 4.33 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitor จากเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย ethyl acetate



ภาพที่ 4.34 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitor จากเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย methanol



ภาพที่ 4.35 เปรียบเทียบลักษณะของเส้นใย; A = ปลายเส้นใยที่มีลักษณะปกติ, B = ปลายเส้นใยที่มีลักษณะผิดปกติ

nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต เท่ากับ 1.00 เซนติเมตร และ 80.00 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 1.84, 2.33 และ 2.61 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (5 เซนติเมตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 63.25, 53.5 และ 47.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10, ภาพที่ 4.36) nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 6.75×10^4 สปอร์ต่อมิลลิเมตร และ 83.23

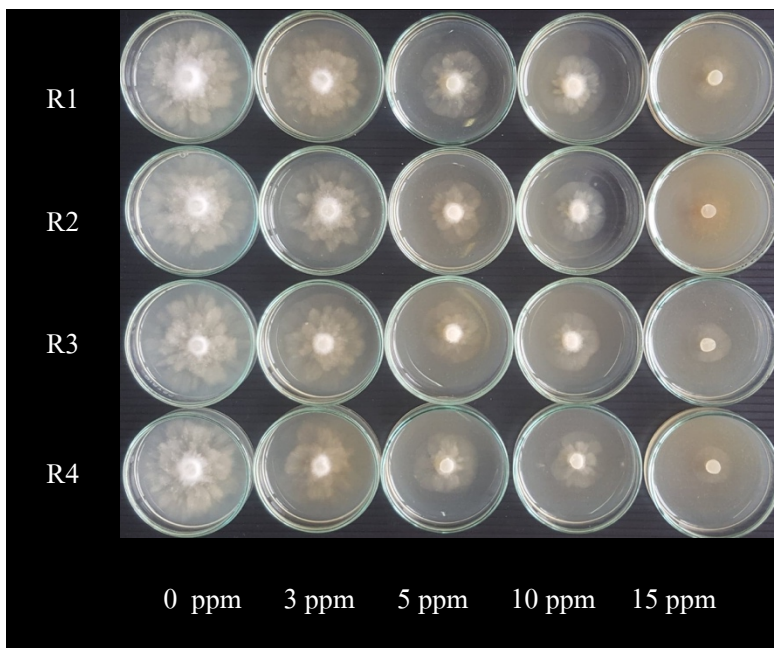
เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 13.19×10^4 , 17.25×10^4 และ 21.5×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (40.25×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 67.24, 57.14 และ 46.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า ED_{50} เท่ากับ 3.68 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 4.10)

nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต เท่ากับ 0.7 เซนติเมตร และ 86 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 0.97, 1.26 และ 2.29 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (5 เซนติเมตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 80.75, 74.75 และ 54.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10, ภาพที่ 4.37) nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณ oospores และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 2×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 95.03 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีปริมาณ oospores เท่ากับ 8.44×10^4 , 10×10^4 และ 16.63×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 79.04, 75.16 และ 58.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและมีค่า ED_{50} เท่ากับ 2.17 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 4.10)

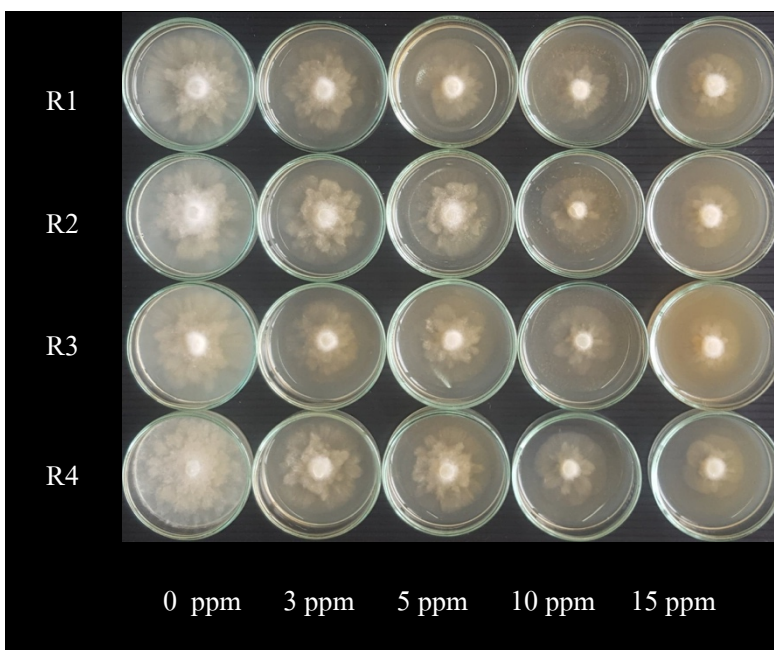
nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต เท่ากับ 0.95 เซนติเมตร และ 81 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาคือที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 1.22, 1.71 และ 2.16 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม (5 เซนติเมตร) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต 34.25, 29.75 และ 22.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10, ภาพที่ 4.38) nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง oospores สูงที่สุด มีปริมาณสปอร์และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 6.63×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 83.54 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5 และ 3 ppm มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 11.5×10^4 , 12.5×10^4 และ 15.13×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores เท่ากับ 71.43, 68.94 และ 62.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและมีค่า ED_{50} เท่ากับ 3.8 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 4.11) นอกจากนี้ ยังพบการสร้าง sporangium ที่มีลักษณะผิดปกติที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm จากทุกสารสกัดด้วย (ภาพที่ 4.39)

ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ในการยับยั้งการเจริญของ PN02

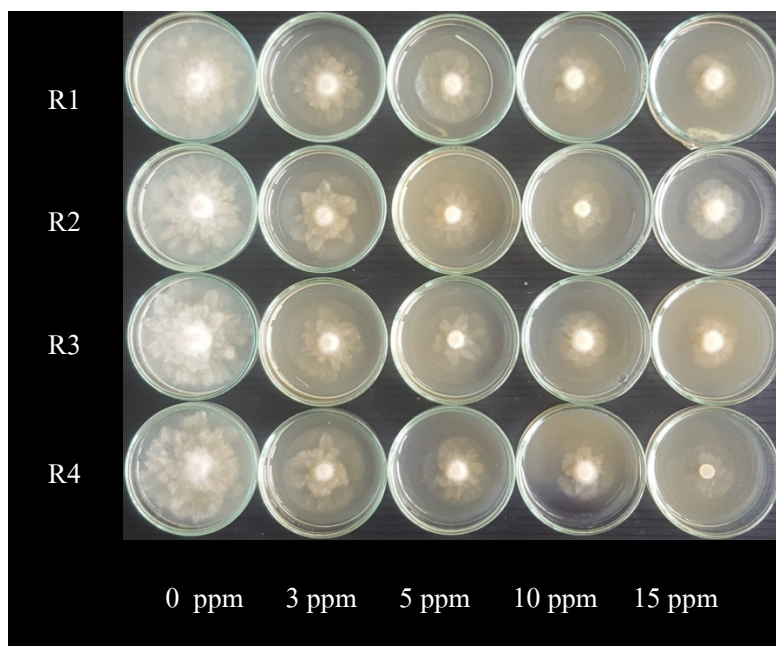
nano - elicitors	ความเข้มข้น (ppm)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ¹	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต ^{2,3}	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์/มล.) ⁴	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ ^{5,6}	ED ₅₀ (µg/ml)
hexane	0	5.00a ¹	-	45.00a	-	
	3	4.51b	9.75	26.25b	41.67	
	5	2.90ef	42.00	18.50ef	58.89	9.88
	10	2.68fg	46.50	15.88g	64.72	
	15	1.91h	61.75	6.69j	85.14	
ethyl acetate	0	5.00a	-	45.00a	-	
	3	3.83d	23.50	24.88c	44.72	
	5	3.04e	39.25	19.69e	56.25	12.88
	10	2.75f	45.00	17.38f	61.39	
	15	2.43g	51.50	10.13i	77.50	
methanol	0	5.00a	-	45.00a		
	3	4.11c	17.75	25.06bc	44.31	
	5	3.70d	26.00	21.88d	51.39	-
	10	3.15e	37.00	19.19e	57.36	
	15	2.75f	45.00	12.63h	72.94	
C.V. (%)		3.92		3.64		



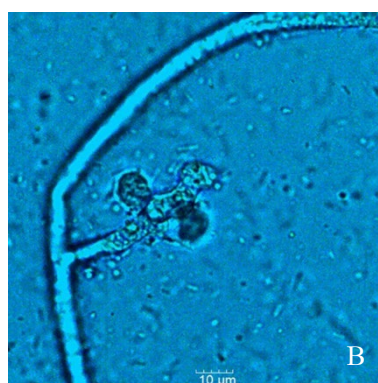
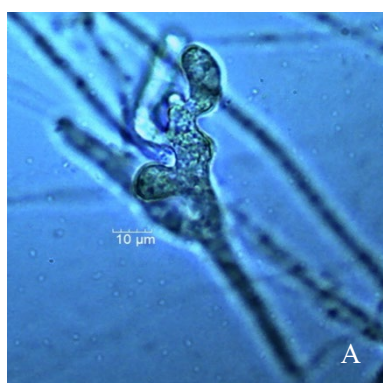
ภาพที่ 4.36 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย hexane



ภาพที่ 4.37 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate



ภาพที่ 4.38 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ PN02 โดยใช้ nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย methanol



ภาพที่ 4.39 เปรียบเทียบลักษณะของ sporangium; A = sporangium ที่มีลักษณะปกติ, B sporangium ที่มีลักษณะผิดปกติ

4.8 การทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในกระถางทดลอง

หลังฉีดพ่น nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense*, *Ch. cochliodes* และ *Ch. elatum* บริเวณรอบต้นส้มในกระถางทดลอง ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. ทุก 15 วัน เป็นเวลา 8 เดือน พบว่า ทริตเมนต์ที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. เริ่มแสดงอาการของโรคในเดือนที่ 4 โดยมีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยที่ระดับที่ 1.5 และมีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นทุกเดือนจนถึงเดือนที่ 8 เดือนละ 0.25 ระดับ ตามลำดับ และทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. แต่ไม่ได้ฉีดพ่นด้วย nano – elicitor เริ่มแสดงอาการของโรคใน

เดือนที่ 2 โดยมีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยอยู่ที่ระดับที่ 2 และมีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตั้งแต่เดือนที่ 3 จนถึงเดือนที่ 6 ตั้งแต่ระดับที่ 2 – 4 และคงระดับการเกิดโรคเฉลี่ยที่ระดับที่ 4 จนถึงเดือนที่ 8

ส่วนทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. และฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เริ่มแสดงอาการของโรคในเดือนที่ 3 มีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยอยู่ที่ระดับที่ 1.5 ทริตเมนต์ที่ฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* มีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยคงที่ที่ระดับที่ 2 ตั้งแต่เดือนที่ 4 ถึงเดือนที่ 8 ทริตเมนต์ที่ฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* มีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในเดือนที่ 4 และ 5 โดยมีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยเท่ากับ 2 และ 2.5 ตามลำดับ และมีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยคงที่ที่ระดับที่ 2.75 ตั้งแต่เดือนที่ 6 ถึงเดือนที่ 8 ทริตเมนต์ที่ฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* มีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยคงที่ที่ระดับที่ 2 ตั้งแต่เดือนที่ 4 ถึงเดือนที่ 7 และมีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นที่ระดับที่ 2.25 ในเดือนที่ 8

ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. และเริ่มแสดงอาการของโรคในเดือนที่ 4 โดยมีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยที่ระดับที่ 1.5 และมีระดับการเกิดโรคเฉลี่ยเพิ่มขึ้นทุกเดือนจนถึงเดือนที่ 8 เดือนละ 0.25 ระดับตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 ระดับการเกิดโรคเฉลี่ยของต้นส้มที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เดือนที่ 1 – 8

Treatment	ระดับการเกิดโรค (ค่าเฉลี่ย) ¹							
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่ 6	เดือนที่ 7	เดือนที่ 8
T1	1	1b	1b	1.5b	1.75b	2b	2.25b	2.5b
T2	1	1.75a	2a	3a	3.75a	4a	4a	4a
T3	1	1a	1.5ab	2b	2b	2b	2b	2b
T4	1	1a	1.5ab	2b	2.5b	2.75b	2.75b	2.75b
T5	1	1a	1.5ab	2b	2b	2b	2b	2.25b
T6	1	1a	1.5ab	2b	2b	2.5b	2.5b	3b
c.v.		21.76	28.11	11.31	15.28	17.47	19.14	24.22

ต้นส้มเขียวหวานทั้งหมดที่ได้รับการทดลอง เจริญเติบโตอย่างไม่แตกต่างกันทางสถิติใน 5 เดือนแรก โดยเดือนที่ 1 มีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 67.75 – 69.25 เซนติเมตร เดือนที่ 2 มีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 69.25 – 70.75 เซนติเมตร เดือนที่ 3 มีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 70.50 – 72.00 เซนติเมตร เดือนที่ 4 มีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 72.25 – 73.50 เซนติเมตร เดือนที่ 5 มีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 73.50 – 75.75 เซนติเมตร เดือนที่ 6 มีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 75.25 – 78.00 เซนติเมตร โดยทริตเมนต์ที่มีความสูงเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. เพียงอย่างเดียว มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 75.25 เซนติเมตร เดือนที่ 7 มีความสูง

เฉลี่ยอยู่ในช่วง 76.25 – 80.50 เซนติเมตร โดยทริตเมนต์ที่มีความสูงเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกและไม่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 76.25 และ 76.75 เซนติเมตร ตามลำดับ เดือนที่ 8 มีความสูงเฉลี่ยอยู่ในช่วง 77.00 – 82.75 เซนติเมตร โดยทริตเมนต์ที่มีความสูงเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. เพียงอย่างเดียว มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 77.00 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 ความสูงเฉลี่ยของต้นสั้มที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เดือนที่ 1 – 8

Treatment	ความสูงต้น (ซม.) ¹							
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4	เดือนที่ 5	เดือนที่ 6	เดือนที่ 7	เดือนที่ 8
T1	67.75a	69.25a	71.00a	72.75a	74.25a	75.75ab	76.75b	78.00bc
T2	69.25a	70.75a	72.00a	72.25a	73.50a	75.25b	76.25b	77.00c
T3	68.50a	69.75a	71.50a	73.50a	75.75a	78.00a	80.50a	82.75a
T4	68.50a	69.50a	70.50a	72.75a	75.00a	76.75ab	78.50ab	80.50ab
T5	69.25a	70.25a	71.50a	72.75a	74.75a	76.75ab	78.50ab	79.75abc
T6	68.50a	69.50a	71.50a	73.00a	75.50a	77.25ab	79.50ab	81.00ab
c.v.	2.35	2.07	1.87	1.62	1.95	1.93	2.69	2.41



ภาพที่ 4.40 ต้นส้มเขียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เป็นระยะเวลา 1 เดือน



ภาพที่ 4.41 ต้นส้มเขียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เป็นระยะเวลา 2 เดือน



ภาพที่ 4.42 ต้นส้มเขียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เป็นระยะเวลา 3 เดือน



ภาพที่ 4.43 ต้นส้มเขียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เป็นระยะเวลา 4 เดือน



ภาพที่ 4.44 ต้นส้มเขียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เป็นระยะเวลา 5 เดือน



ภาพที่ 4.45 ต้นส้มเขียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เป็นระยะเวลา 6 เดือน



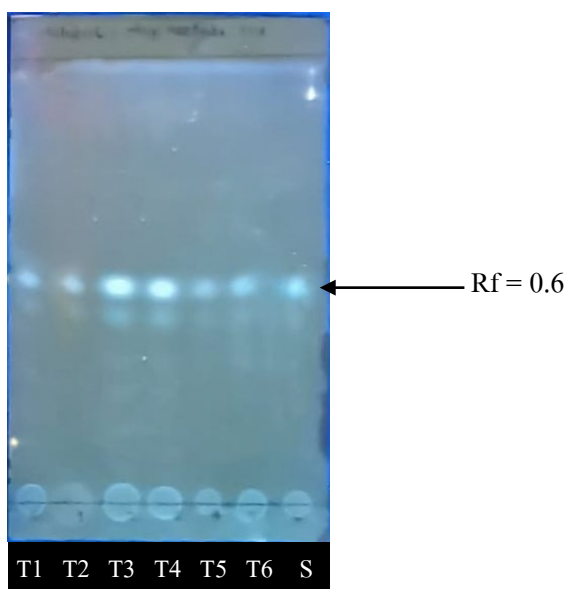
ภาพที่ 4.46 ต้นส้มเขียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เป็นระยะเวลา 7 เดือน



ภาพที่ 4.47 ต้นส้มเขียวหวานที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. เป็นระยะเวลา 8 เดือน

4.9 การตรวจหา phytoalexin

เมื่อตรวจสอบแถบสารสกัดที่ปรากฏบนแผ่น TLC ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm พบว่าสารที่ต้นส้มสร้าง เกิดเป็นสีฟ้าเรืองแสง และมีค่า Rf เท่ากับ 0.6 โดยที่ทริตเมนต์ที่ฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* และทริตเมนต์ที่ฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* มีการปรากฏแถบสีสว่างชัดเจนกว่าทริตเมนต์อื่น ๆ (ภาพที่ 4.47)



ภาพที่ 4.48 โครมาโทแกรมของสารวัฏเคลื่อนที่ toluene : ethyl acetate, 1 : 1

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและส่วนของพืชที่มีอาการของโรคด้วยวิธี baiting และวิธี tissue transplanting มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับรายงานของ Hung *et al.* (2014) ที่แยกและจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้นของเชื้อรา *Pythium intermedium* และ *Pythium aphanidermatum* จากสั้มโอที่มีอาการรากเน่าโคนเน่าด้วยวิธี baiting และรายงานของ Kean *et al.*, (2010) ที่แยกเชื้อรา *Pythium ultimum* จากสั้มที่มีอาการรากเน่าโคนเน่าในกัมพูชา ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าเป็นเชื้อรา *Pythium* spp.

ทำการตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราที่แยกได้ ด้วยวิธีการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็น เชื้อรา *P. aphanidermatum*, *P. deliense* และ *P. acanthicum* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Suksiri *et al.* (2018) ที่ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Phytophthora* spp. และ *Pythium* spp. ที่แยกจากสวนทุเรียนในจังหวัดชุมพร และ Henuk *et al.* (2018) ที่ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจัดจำแนกเชื้อรา *Phytophthora* spp. และ *Pythium* spp. ในพืชตระกูลสั้ม ประเทศอินโดนีเซีย

โดยเชื้อราที่แยกได้นั้นพบการรายงานการก่อโรครากเน่าโคนเน่าในพืชต่าง ๆ กล่าวคือ เชื้อรา *P. aphanidermatum* เป็นเชื้อรา *Pythium* sp. ที่สามารถพบได้ทั่วไป พบรายงานการก่อโรคในพืชวงกว้าง เช่น พืชตระกูลแตง (Postma *et al.*, 2009; Teimoori *et al.*, 2012) พืชตระกูลถั่ว (You and Tojo, 2017) ข้าวโพด (Broders, *et al.*, 2007), พริกหยวก (Garibaldi *et al.*, 2014) มะละกอ (Koffi *et al.*, 2010) อีกทั้งยังมีการรายงานพบการก่อโรคในสั้มอีกด้วย (Maseko and Coutinho, 2002; Benfradj *et al.*, 2017) เชื้อรา *P. deliense* มีการรายงานการก่อโรคในถั่วเหลือง (Yun and Kim, 2003) แตงกวา (Postma *et al.*, 1996) เมล่อน (de Cara *et al.*, 2008) และเชื้อรา *P. acanthicum* มีรายงานการก่อโรคในมันสำปะหลัง (พรปวีณ์ ชีวัฒนวรานิกุล, 2562)

ส่วนเชื้อราควบคุม *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Ch. brasiliense*, *Ch. cochliodes* และ *Ch. elatum* ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้น มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่สำคัญสอดคล้องกับรายงานของ Wang *et al.* (2018) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายและอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Chaetomium* spp.

เมื่อทดสอบการเกิดโรคบนใบสั้ม พบว่า ทุกไอโซเลทก่อให้เกิดอาการของโรคบนใบ โดยเกิดเป็นวงสีน้ำตาลเทา มีลักษณะฉ่ำน้ำ รอบบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* spp. ซึ่งมีอาการบนใบสอดคล้องกับรายงานของ Kean *et al.* (2010) ที่ทำการทดสอบการเกิดโรคของเชื้อรา *P. ultimum* บนใบของสั้ม และรายงานของ Mida *et al.* (2015) และ Yan *et al.* (2017) ทำการทดสอบการเกิดโรคของเชื้อรา *Phytophthora* spp. บนใบของสั้ม ทำการคัดเลือกเชื้อรา *Pythium* sp. ไอโซเลทที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคมามากที่สุดมาทำการเกิดทดสอบการเกิดโรคบนต้นสั้ม พบว่า ต้นสั้มมีอาการทรุดโทรม มีใบเหลือง ซึ่งมีลักษณะอาการของโรคสอดคล้องกับรายงานของ Quyet *et al.* (2014) และ Hung *et al.* (2015a) ที่ทำการทดสอบการเกิดโรคเชื้อรา *Phytophthora* spp. ในต้นกล้าของสั้ม

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ ในระยะแรกของการทดลองเลี้ยงบนอาหารร่วม เชื้อรา *Pythium* sp. เจริญได้อย่างรวดเร็ว และเกิด inhibition zone ขึ้นระหว่างเชื้อรา *Pythium* spp. และเชื้อรา *Chaetomium* spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่มีการเกิด inhibition zone อย่างชัดเจน เป็นการกลไกการควบคุมโรคของเชื้อรา *Chaetomium* spp. ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiosis) ขึ้นมา สอดคล้องกับรายงานของ Zhao *et al.* (2017) ที่พบการเกิด inhibition zone ในการทดลองเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วมของเชื้อรา *Ch. globosum* และเชื้อรากลุ่มโรคฟิช 9 ชนิด โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรากลุ่มโรคฟิช 21.5 – 81.7 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาเชื้อรา *Chaetomium* spp. มีการเจริญช้อนทับเชื้อรา *Pythium* spp. ซึ่งเป็นการกลไกในการแข่งขันพื้นที่ และสารอาหาร (competition) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hung, Pongnak and Soyong (2014) ที่ทำการศึกษากิจกรรมการเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วมของเชื้อรา *P. aphanidermatum* กับเชื้อรา *Chaetomium cupreum*, *Chaetomium globosum* และ *Chaetomium lucknowense* ซึ่งเชื้อรา *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ เจริญขึ้นช้อนทับเชื้อรา *P. aphanidermatum* ทั้งหมด

โดยกลไกการควบคุมโรคของเชื้อรา อาจเกิดร่วมกันหลายกลไกได้ เช่น การศึกษาของ Hung *et al.* (2015b) ที่พบการเกิด inhibition zone ในการทดลองเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วมของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Phytophthora nicotianae* ต่อมาเชื้อรา *Ch. cupreum* เจริญขึ้น ไปบนเชื้อรา *Phytophthora nicotianae* และพบการพันรัดและแทงเข้าไปในเชื้อรา *Phytophthora* spp. ของเชื้อรา *Chaetomium* spp. ซึ่งเป็นกลไกการเป็นปรสิต

จากกลไกการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อรา *Chaetomium* spp. จึงได้ทำการสกัดสารจากเชื้อรา *Chaetomium* spp. ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ hexane, ethyl acetate และ methanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้ว มีขั้วปานกลาง และมีขั้วสูง ตามลำดับ สารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. ที่ได้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยและ oospores ของเชื้อรา *Pythium* sp. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Quyet *et al.* (2014) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของส้มสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* โดยมีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 16 – 487 ppm และรายงานของ Hung *et al.* (2015b) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Ch. Cupreum*, *Ch. globosum* และ *Ch. lucknowense* ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora nicotianae* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในส้ม มีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 2.6 – 101.4 ppm นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสกัดบริสุทธิ์จากเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในการควบคุมโรคฟิชจากเชื้อรา เช่น การใช้สาร chaetoviridins จากเชื้อรา *Ch globosum* ในการควบคุมเชื้อรา *Pyricularia* sp. สาเหตุโรคไหม้ข้าว (Park *et al.*, 2005) การใช้สาร chaetoglobosin-c จากเชื้อรา *Ch globosum* ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในส้ม (Quyet *et al.* 2016)

อีกทั้งพบ sporangia, oogonia และเส้นใยที่มีลักษณะผิดปกติ ที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา *Pythium* sp. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pornsuriya *et al.* (2010) ที่ศึกษาการใช้สารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในการควบคุมเชื้อรา *P. aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่าในสับปะรด พบว่าสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่ทุกระดับความเข้มข้น มีผลให้เส้นใย oogonium และ oospores มีลักษณะผิดปกติ เช่นเดียวกับรายงานของ Soyong (2014) ที่ศึกษาการควบคุมเชื้อรา *Drechslera oryzae* ด้วยสารสกัดเชื้อรา

Ch cochliodes และรายงานของ Huyly and Soyong (2017) ที่ศึกษาการใช้สารสกัดเชื้อรา *Ch. cupreum* ในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia lunata* สาเหตุโรคใบจุดข้าว ในประเทศกัมพูชา อีกทั้งรายงานของ Vilavong and Soyong (2017) ที่ศึกษาการใช้สารสกัดเชื้อรา *Ch. cupreum* ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกาแฟ ในประเทศลาว ซึ่งพบการเกิดสปอร์ที่มีลักษณะผิดปกติในทุกความเข้มข้น โดยสปอร์ที่มีลักษณะผิดปกติเหล่านี้จะสูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคด้วย

ได้มีการทำให้สารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. อยู่ในรูปของอนุภาคนาโน และทำการศึกษาประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. พบว่ามีค่า ED₅₀ ที่ต่ำ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* spp. ที่ดี ดังรายงานของ Perlatti *et al.* (2013) ที่แสดงให้เห็นว่าสารที่อยู่ในรูปอนุภาคนาโนนั้น สามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้ดียิ่งขึ้น แม้ยังไม่เคยมีการศึกษาการใช้สารสกัดอนุภาคนาโนจากเชื้อรา *Chaetomium* spp. เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Pythium* sp. มาก่อน แต่มีรายงานการใช้สารสกัดอนุภาคนาโนจากเชื้อรา *Chaetomium* spp. เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคอื่น รายงานของ Song *et al.* (2018) ที่ได้ใช้สารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* อนุภาคนาโนในการควบคุมเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ข้าว โดยมีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 8.25 – 65.52 ppm รายงานของ Tongon and Soyong (2015) ที่ใช้สารสกัดอนุภาคนาโนจากเชื้อรา *Ch. globosum* ในการควบคุมโรคใบจุดในข้าวที่มีเชื้อสาเหตุโรคจากเชื้อรา *Curvularia lunata* มีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 1.21 – 1.93 ppm ตามลำดับ

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitors จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. ในสภาพกระถางทดลองพบว่าในทรีตเมนต์ที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. มีการแสดงอาการของโรค อาจเนื่องจากการติดเชื้อโดยธรรมชาติ และในทรีตเมนต์ที่ปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. และรดด้วยเมทาแลกซิล มีแนวโน้มการเกิดโรคที่สูงขึ้นต่อเนื่อง อาจเนื่องจากการเกิดการค้ำของเชื้อรา *Pythium* sp. สอดคล้องกับรายงานของ Grünwald *et al.* (2006) ที่ทำการศึกษาค้ำของเชื้อรา *Phytophthora infestans* ต่อสารกำจัดเชื้อรา

เมื่อตรวจสอบสารสกัดที่พืชสร้างขึ้นภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm สารที่ปรากฏมีสีฟ้าเรืองแสง มีค่า Rf เท่ากับ 0.6 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Afek and Szejnberg (1998) ที่ทำการตรวจหาสาร scoparone จากการกระตุ้นในต้นส้ม อีกทั้งยังศึกษาการสะสม scoparone ในต้นส้ม โดยรายงานว่าขนาดของผลที่ทำการปลูกเชื้อรา *Phytophthora citrophthora* มีขนาดแปรผกผันกับปริมาณของ scoparone ซึ่งสอดคล้องกับการที่ต้นส้มในทรีตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. และฉีดพ่นด้วย nano – elicitors มีแนวโน้มในการเพิ่มขึ้นของระดับการเกิดโรคต่ำกว่า ในทรีตเมนต์ที่ไม่ได้ฉีดพ่นด้วย nano – elicitors แม้จะมีการตรวจพบสารในทุกทรีตเมนต์ ซึ่งเกิดจากการที่พืชนั้นสามารถสร้างสาร phytoalexin ได้เองอยู่แล้ว อาจเกิดความเครียดภายในต้น หรือสภาพแวดล้อม จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบปริมาณของสารในแต่ละทรีตเมนต์

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

แยกเชื้อราจากตัวอย่างดินและส่วนของพืชที่มีอาการของโรคด้วยวิธี baiting และวิธี tissue transplanting ที่มีลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับเชื้อรา *Pythium* spp. ได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลท ดังนี้ ไอโซเลท PN01, PN02 และ PN03 เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็นเชื้อรา *P. delicense*, *P. aphanidermatum* และ *P. acanthicum* ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบการเกิดโรคบนใบพบว่า ไอโซเลท PN02 ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคมากที่สุด จึงได้ทำการคัดเลือกเพื่อนำมาทดสอบการเกิดโรคในดินและทำการทดลองต่อไป

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อรา *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์ เชื้อรา *Ch. brasiliense*, *Ch. cochliodes* และ *Ch. elatum* และศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมไอโซเลท PN02 ที่ได้ทำการคัดเลือกมาจากข้างต้น จากการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม เชื้อรา *Ch. brasiliense* และ *Ch. elatum* มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Pythium* sp. สูงที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยและเท่ากับ 42.50 และ 39.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการยับยั้งการสร้าง oospores เชื้อรา *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 สปีชีส์ สามารถควบคุม PN02 ได้อย่างไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores อยู่ในช่วง 47.01 - 49.18 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ hexane, ethyl acetate และ methanol แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* จากทุกสารสกัด ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ไม่มีการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ออกมาจากชิ้นวุ้น และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores อยู่ในช่วง 95.33 - 95.59 เปอร์เซ็นต์ มีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 30.15 - 58.71 ppm อีกทั้งสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย hexane ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. สูงสุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยและการสร้าง oospores เท่ากับ 45.75 และ 78.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีเพียงที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm และที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ที่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Pythium* sp. ได้ โดยสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย ethyl acetate มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. สูงที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยและการสร้าง oospores เท่ากับ 21 และ 48.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังตรวจพบ oogonia ที่มีลักษณะผิดปกติจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 ชนิดอีกด้วย

nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Pythium* sp. สูง มีค่า ED₅₀ อยู่ในช่วง 30.15 – 58.71 ppm *Ch. brasiliense* จากทุกสารสกัด ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm มีประสิทธิภาพสูงสุด ไม่มีการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. ออกมาจากชิ้นวุ้น และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง oospores อยู่ในช่วง 95.33 -95.59 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้ง nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. cochliodes* ที่สกัดด้วย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 15 ppm ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium* sp. สูงสุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยและการสร้าง oospores เท่ากับ 86 และ 95.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ของเชื้อรา *Pythium* sp. สูงที่สุด และ nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. elatum* ที่สกัดด้วย hexane มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยและการสร้าง oospores เท่ากับ 61.75 และ 85.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังตรวจพบ sporangia, oogonia และเส้นใยที่มีลักษณะผิดปกติจากการทดสอบประสิทธิภาพของ nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp. ทั้ง 3 ชนิดอีกด้วย

เมื่อนำ nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Chaetomium* spp มาทดสอบประสิทธิภาพในสภาพกระถางทดลอง โดยฉีดพ่นทุก 15 วัน เป็นเวลา 8 เดือน เมื่อเก็บผลการทดลอง ทริตเมนต์ที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ มีระดับการเกิดโรคเน่าอยู่ที่ระดับที่ 2.5 ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. ระดับการเกิดโรคเน่าอยู่ที่ระดับที่ 4 ส่วนทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. และฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense*, *Ch. cochliodes* และ *Ch. elatum* มีระดับการเกิดโรคเน่าอยู่ที่ระดับที่ 2, 2.75 และ 2.25 ตามลำดับ

ความสูงเฉลี่ยของต้นส้มเขียวหวานในเดือนที่ 8 แสดงให้เห็นว่า ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกและไม่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. มีความสูงเฉลี่ยต่ำที่สุด เท่ากับ 77.00 และ 78.00 เซนติเมตร ตามลำดับ ทริตเมนต์ที่ทำการปลูกเชื้อรา *Pythium* sp. และฉีดพ่นด้วย nano – elicitor จากสารสกัดเชื้อรา *Ch. brasiliense* . มีความสูงเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 82.75 เซนติเมตร โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติ

สารสกัดที่สกัดได้จากต้นส้ม เมื่อตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm ปรากฏเป็นสีฟ้าเรืองแสง และมีค่า Rf เท่ากับ 0.6

บรรณานุกรม

- เกษม สร้อยทอง. 2531. เทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- จุฑามาศ อ่อนวิมล. 2546. สัมเจียวหวาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โครงการหนังสือเกษตรชุมชน.
- พรปวีณ์ ชีวพัฒน์วานิกุล ภาณุวัฒน์ มูลจันทร์ วรรณวิไล อินทนู และจินตนา อันอาดมิ่งงาม. 2562. “การจำแนกชนิดและทดสอบการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคหัวและลำต้นเน่ามันสำปะหลัง.” *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า*. 37(2) : 239 – 249.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. *สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้า ปี 2559*. กรุงเทพมหานคร : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- เอกชัย พุกภัยอำไพ และสังสุข รัตนภรณ์. 2547. *คู่มือส้มโชกุน*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : เพ็ชร์ – แพลส্টิน พับลิชชิ่ง.
- Afek, U. and Szejnberg, A. 1988. “Accumulation of scoparone, a phytoalexin associated with resistance of Citrus to *Phytophthora citrophthora*.” *Phytopathology*. 78(12) : 1678 – 1682.
- Benfradj, N., Migliorini, D., Luchi, N., Santini, A., and Boughalleb-M’Hamdi, N. 2017. “Occurrence of *Pythium* and *Phytophythium* species isolated from citrus trees infected with gummosis disease in tunisia.” *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 50(5-6) : 286-302.
- Broders, K. D., Lipps, P. E., Paul, P. A., and Dorrance, A. E. 2007. “Characterization of *Pythium* spp. associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio.” *Plant disease*. 91(6) : 727-735.
- Charoenporn, C., Kanokmedhakul, S., Lin, F. C., Poeaim, S. and Soyong, K. 2010. “Evaluation of bio-agent formulations to control fusarium wilt of tomato.” *African Journal of Microbiology Research*. 9(36) : 5836-5844.
- Dar, J. and Soyong, K. 2014. “Construction and characterization of copolymer nanomaterials loaded with bioactive compounds from *Chaetomium* species.” *International Journal of Agricultural Technology* 10(4) : 823-831.
- de Cara, M., Santos, M., Herrero, M. L., Brurberg, M. and Marquina, J. 2008. “First report of *Pythium deliense* as a pathogen of melon in Honduras and Guatemala.” *Plant Pathology*. 57(4). 776 - 776.
- El-Mohamedy, R. S. R. 1998. “Studies on wilt and root rot disease of some citrus plants in Egypt.” Ph. D. Thesis of Ain Shams University.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Garibaldi, A., Gilardi, G., Ortu, G., and Gullino, M. L. 2014. "First report of root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in Italy." **Plant Disease**. 98(6) : 854-854.
- Graham, J. H. 2011. "Phosphite for control of Phytophthora diseases in citrus: model for management of *Phytophthora* species on forest trees." **New Zealand Journal of Forestry Science**. 41(1) : 49-56.
- Grünwald, N. J., Sturbaum, A. K., Montes, R. G., Serrano, G.E., Lozoya-Saldana, H., Fry, W. E. 2006. "Selection for fungicide resistance within a growing season in field populations of *Phytophthora infestans* at the center of origin." **Phytopathology**. 96(12) : 1397-1403.
- Henuk, J. B., Sinaga, M. S., and Hidayat, S. H. 2017. "Morphological and molecular identification of fungal pathogens causing gummosis disease of *Citrus* spp. in Indonesia." **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**. 18(3) : 1100-1108.
- Hung P. M., Pongnak, W., Soyong, K. and Poeaim, S. 2015a. "Biological control of *Phytophthora palmivora* causing root rot of pomelo using *Chaetomium* spp." **Mycobiology**. 43(1) : 63-70.
- Hung P. M., Pongnak, W., Soyong, K. and Poeaim, S. 2015b. "Efficacy of *Chaetomium* species as biological control agents against *Phytophthora nicotianae* root rot in citrus." **Mycobiology**. 43(3) : 288-296.
- Hung, P. M., Pongnak, W. and Soyong, K. (2014). "Biological control of pomelo diseases using *Chaetomium* spp." **Journal of Agricultural Technology**. 10(4) : 833-844
- Huyly, T. and Soyong, K. 2017. "Bioformulations and nano product from *Chaetomium cupreum* CC3003 to control leaf spot of rice var. Sen Pidoa in Cambodia." **International Journal of Plant Biology**. 7(1) : 59 – 63.
- Ivors K. L., 2015. **Laboratory Protocols for *Phytophthora* Species**. Minnesota : The American Phytopathological Society.
- Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Nasomjai, P., Louangsysouphanh, S., Soyong, K., Isobe, M., ... and Suksamrarn, A. 2006. "Antifungal Azaphilones from the fungus *Chaetomium cupreum* CC3003." **Journal of Natural Products**. 69(6) : 891-895.
- Kean, S., Soyong, K. and To-anun, C. 2010. Application of biological fungicides to control citrus root rot in Cambodia. **Journal of Agricultural Technology**. 6(2): 219-230.
- Koffi, C. N., Diallo, H. A., Kouadio, J. Y., Kelly, P., Buddie, A. G., and Tymo, L. M. 2010. "Occurrence of *Pythium aphanidermatum* root and collar rot of papaya (*Carica papaya* L.) in Côte d'Ivoire." **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**. 4(Special Issue 1) : 62-67.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Kumar, S., Kaushik, N., and Proksch, P. 2013. Identification of Antifungal Principle in the Solvent Extract of An Endophytic Fungus *Chaetomium globosum* from *Withania somnifera*. **SpringerPlus**. 2(1): 279 – 289.
- Maseko, B. O. Z., and Coutinho, T.A. 2002. “Pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species associated with citrus root rot in South Africa.” **South African Journal of Botany**. 68(3) : 327 – 332.
- Mida, D. K., Gade, R.M., and Mohod, Y.N. 2015. “Distribution, pathogenicity and efficacy of some fungicides against *Phytophthora parasitica*.” **Journal of Mycopathological Research**. 53(2) : 299-302
- Park, J. H., Choi, G. J., Jang, K. S., Lim, H. K., Kim, H. T., Cho, K. Y., and Kim, J. C. 2005. “Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*.” **FEMS Microbiology letters**. 252(2) : 309-313.
- Pente, R., Gade, R. M., Belkar, Y. K. and Shinde, P. 2015. “Evaluation of botanicals and bioagents against *Phytophthora* root rot in citrus.” **Trends in Biosciences**. 8(3) : 752 – 758.
- Perlatti, B., de Souza Bergo, P. L., das Graas Fernandes da Silva, M. F., Fernandes, J. B. and Forim, M. R. 2013. **Polymeric Nanoparticle-Based Insecticides: A Controlled Release Purpose for Agrochemicals**. Croatia : Books on Demand.
- Phong H. N., Pongnak W., Soyong K. 2016. “Antifungal activities of *Chaetomium* spp. against *Fusarium* wilt of tea.” **Plant Protection Science**. 52(1): 10 – 17.
- Pornsuriya, C., Soyong, K., Kanokmedhakul, S. and Lin, F.C. 2010. “Efficacy of antifungal metabolites from some antagonistic fungi against *Pythium aphanidermatum*.” **Journal of Agricultural Technology** 6(2) : 299 – 308.
- Postma, J., Stevens, L. H., Wieggers, G. L., Davelaar, E., and Nijhuis, E. H. 2009. “Biological control of *Pythium aphanidermatum* in cucumber with a combined application of *Lysobacter enzymogenes* strain 3.1 T8 and chitosan.” **Biological Control**. 48(3) : 301 – 309.
- Queiroz, B. P. V. and Melo, I. S. 2006. “Antagonism of *Serratia marcescens* towards *Phytophthora parasitica* and its effects in promoting the growth of citrus.” **Brazilian Journal of Microbiology** 37:448 – 450
- Quyêt, N. T., Cuong, T. H. V., Hong, L. T. and Soyong K. 2014. “Antagonism of *Chaetomium* spp. and their ability to control citrus root rot caused by *Phytophthora parasitica* in Vietnam.” **Journal of Agricultural Technology**. 10(5) : 1307 – 1316

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Quyet, N. T., Cuong, H. V., Hong, L. T. H. and Soyong, K. 2016. “Control mechanism of *Chaetomium* spp. and its biological control of citrus root rot in pot and field experiments in Vietnam.” **International Journal of Agricultural Technology**. 12(2) : 593 – 600.
- Shinde, S. B. and Sadgir, M. D. 2016. “Efficiency of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against *Phytophthora* spp. in citrus.” **International Journal of Plant Protection**. 9(1) : 15 – 20.
- Sibounnavong, P., Sibounnavong, P. S., Kanokmedhakul S. and Soyong, K. 2012. “Antifungal activities of *Chaetomium brasiliense* CB01 and *Chaetomium cupreum* CC03 against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2.” **Journal of Agricultural Technology**. 8(3) : 1029 – 1038.
- Song, J. J., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. and Soyong, K. 2018. “Application of nano – particles derived from *Chaetomium elatum* ChE01 to control *Pyricularia oryzae* causing rice blast.” **International Journal of Agricultural Technology**. 14(6) : 923 – 932.
- Soyong, K. 2014. “Bio-formulation of *Chaetomium cochliodes* for controlling brown leaf spot of rice.” **International Journal of Agricultural Technology**. 10(2) : 321 – 337.
- Steddom, K., Becker, O., and Menge, J. A. 2002. “Repetitive applications of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal and effects on populations of *Phytophthora parasitica* in citrus orchards.” **Phytopathology**. 92(8) : 850 – 856.
- Suksiri, S., Laipasu, P., Soyong, K. and Poeaim, S. (2018). “Isolation and identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from durian orchard in Chumphon province, Thailand.” **International Journal of Agricultural Technology**. 14(3) : 389 – 402.
- Teimoori, S., Hajian, S. M., Rahnama, K., and Afzali, H. 2012. “Identification and pathogenicity of *Pythium* species on cantaloupe in Khorasan Razavi province of IRAN.” **Journal of Crop Protection**. 1(3) : 239 – 247.
- Tongon, R., and Soyong, K. (2015). “Application of nano-particles from *Chaetomium globosum* to control leaf spot of rice.” **Journal of Agricultural Technology**. 11(8) : 1919 – 1926.
- Van Thiep, N. V., The Quyet N. and Soyong K. 2014. “*Chaetomium* spp. as biocontrol potential to control tea and coffee pathogens in Vietnam.” **Journal of Agricultural Technology**. 10(5) : 1317 – 1327.

บรรณานุกรม (ต่อ)

- Vilavong, S., and Soyong, K. 2017. "Application of a new bio-formulation of *Chaetomium cupreum* for biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* causing coffee anthracnose on Arabica variety in Laos." **Journal of Agricultural Science**. 39(3) : 303 – 310.
- Wang, X. W., Houbraken, J., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K. F., ... and Samson, R. A. 2016. "Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments." **Studies in Mycology**. 84(1): 145 – 224.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego : Academic Press.
- Yan, H., Zhong, Y., Jiang, B., Zhou, B., Wu, B., and Zhong, G. 2017. "Guanggan (*Citrus reticulata*) shows strong resistance to *Phytophthora nicotianae*." **Scientia Horticulturae**. 225(1) : 141 – 149.
- You, X., and Tojo, M. 2017. "First report of soybean damping off caused by *Pythium aphanidermatum* and *P. coloratum* in Japan." **New Disease Reports**. 36(1) : 14 – 14.
- Yun, S. C., and Kim, J. W. 2003. "First report of hypocotyl and root rot disease caused by *Pythium deliense* on soybean sprouts in Korea." **Plant Disease**. 87(11), 1399 – 1399.
- Zhao, S. S., Zhang, Y. Y., Yan, W., Cao, L. L., Xiao, Y., and Ye, Y. H. 2017. "*Chaetomium globosum* CDW7, a potential biological control strain and its antifungal metabolites." **FEMS Microbiology Letters**. 364(3) : 1 – 6.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวมณฑุกานต์ อุดมพงษ์สุข
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 25 พฤศจิกายน 2537
ที่อยู่	168/1 ซอยยาสูบ 1 ถนนวิภาวดีรังสิต แขวงจอมพล เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทร.	0909742983
ประวัติการศึกษา	
2555	มัธยมศึกษา โรงเรียนหอวัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร
2559	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง) สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2562	กำลังศึกษาในระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานวิจัย	
2559	Isolation, Identification, and Pathogenicity Test from <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> Causing Banana Wilt
2560	Efficacy of Nano Particles from <i>Chaetomium cochliodes</i> to Control <i>Pythium</i> spp. causing Root Rot of Tangerine (<i>Citrus reticulata</i>)
2561	In vitro efficacy of <i>Chaetomium brasiliense</i> against <i>Pythium</i> spp. causing root rot disease of tangerine

ภาคผนวก

***In vitro* efficacy of *Chaetomium brasiliense* against *Pythium* spp. causing root rot disease of tangerine**

Udompongsuk, M.¹ * , Soyotong, K.¹, Kanokmedhakul, S.² and Kanokmedhakul, K.²

¹Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok, Thailand; ²Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

Udompongsuk, M., Soyotong, K., Kanokmedhakul, S. and Kanokmedhakul, K. (2018). *In vitro* efficacy of *Chaetomium brasiliense* against *Pythium* spp. causing root rot disease of tangerine. International Journal of Agricultural Technology 14(7): 2181-2190.

Abstract Root rot is one of the most serious disease in Tangerine which caused by *Pythium* spp. This study tested efficacy of *Ch. brasiliense* to control *Pythium* sp. by bi – culture, crude extracts and nano particles testing from *Ch. brasiliense* to control *Pythium* sp., in vitro. The results from the bi – culture testing, *Ch. brasiliense* inhibited mycelium growth and sporangia production by 42.50% and 48.41%, respectively. In crude extracts from *Ch. brasiliense* gave ED₅₀ values of 30.15, 58.71 and 37.25 ppm for the hexane, EtOAc and MeOH, respectively. The efficacy of nano particles against *Pythium* sp. with the ED₅₀ values of 2.69, 3.00 and 3.96 ppm for the hexane, EtOAc and MeOH, respectively.

Keywords: *Chaetomium brasiliense*, Root rot, Tangerine

Introduction

Thailand office of agricultural economics reported in 2007 – 2015 tangerine production tends to decrease from 757,000 to 141,000 ton due to yield loss and decline of tangerine tree. The major problem is root rot disease (Molina *et al.*, 1998). Growers used fungicide for control this disease and were faced with high cost of production, poor yield and low prices. They quit cultivation of tangerines. In 2016, they turned to reactivate their orchards because the price hiked.

The symptoms after *Pythium* spp. infected, the leaves turn yellow and some drop, twinge and branch dieback. Roots turn soft and brown, sometimes bark cracks through which gum exudation. Plant will grow poorly, decline and die in the end (Vichitrananda, 1998). For controlling this disease has been applied chemical fungicides in orchards but application chemical fungicides have resulted in accumulation of toxics in environment and resistance of

* **Corresponding Author:** Udompongsuk, M.; **Email:** zw.mink@gmail.com

fungicides. To avoid them, there are many researches for alternative control by effective of biological control agents (BCAs) e.g. *Ch. globosum*, *Ch. cupreum* and *Ch. lucknowense* were reported to control *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora nicotianae* causing root rot in pomelo and citrus (Hung *et al.*, 2014; 2015). Chaetoglobosin – C that produce from *Ch. globosum* gave significantly inhibited colony and sporangia of *Phytophthora parasitica* (Quyet *et al.*, 2016). The aim of this study was to evaluation of efficiency of *Ch. brasiliense* to control *Pythium* spp. causing root rot of tangerine, in vitro.

Materials and methods

Isolation and identification

Soil samples, at a depth of 15 – 30 cm, were collected from the tangerine orchards and isolated by baiting method. The soil samples were ground and placed into sterilized petri dish, added sterilized distilled water above the soil and floated leaf pieces of tangerines (0.5 × 0.5 cm) on the water surface and incubated petri dish for 24-72 hours at room temperature. Place baits onto water agar (WA). When mycelia grown on WA agar were transferred to Potato Dextrose Agar (PDA) until get pure culture and incubated room temperature. For morphological studies, according to their cultural appearances and observation of sporangium and other structures of *Pythium* spp. Sporangia were produced by floating some mycelial discs in distilled water and sterilized grass blades.

Pathogenicity test

Pathogenicity was tested by detached leaf method from healthy leaves leaves of *Citrus reticulata*. The leaves were washed with distilled water, then surface sterilized with 70% ethyl alcohol and placed with the upper leaf surface in sterile petri dish moisture chambers. Wounding by sterile needle on the leaves for easy access of the fungus, then leaves were inoculated with mycelium discs of *Pythium* spp. on the wound. Non-inoculated controls were inoculated with an agar plug without the fungus. 4 replications of each treatment were used in the experiment. After inoculation petri dishes were incubated at room temperature and symptoms were observed after 3 days.

Bi-culture test

Mycelial disc (0.5 m in diameter) of *Pythium* spp. was placed on PDA at one side of petri dish and *Ch. brasiliense* was placed at the opposite side of

petri dish with 4 replications and incubated at room temperature. As control an agar disc of *Pythium* spp. and *Ch. brasiliense* was placed alone on PDA. All petri dishes were incubated at room temperature until the pathogen in control growing full. The data were collected as colony diameter and the number of sporangium. The inhibition of mycelial growth and sporangium formation of pathogen was calculated as a percentage according to the formula:

$$\text{Percent inhibition (I)} = C - T/C \times 100$$

Where, C = colony diameter / number of sporangium of the control

T = colony diameter / number of sporangium of the in bi-culture test

***In vitro* test of crude extract from *Ch. brasiliense* to control *Pythium* spp.**

Ch. brasiliense was cultured in potato dextrose broth (PDB) for 30 days. The fungal biomass was collected, air-dried, ground and extracted with hexane, ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH) to produce crude hexane, crude EtOAc and crude MeOH extract, respectively. The crude extract from *Ch. brasiliense* were tested to control *Pythium* spp. by poisoned food technique with different concentrations (0, 10, 50, 100, 500 and 1000 ppm). Each crude extract was dissolved in 2% dimethyl sulfoxide (DMSO), and mixed into PDA before autoclaving at 121°C, 15lbs/inch² for 20 min. Mycelial disc of *Pythium* spp. was placed on the center of PDA in plate (5 cm diameter) incorporated with each crude extract. All petri dishes were incubated at room temperature until *Pythium* spp. in control growing full. Experiment was designed by using 2 factors factorial experiment in Completely Randomized Design (CRD) with 4 replications. Factor A represented solvents and factor B represented concentrations

The data were collected as colony diameter and the number of sporangium. The inhibition of mycelial growth and sporangium formation of pathogen was calculated as a percentage and the effective dose (ED₅₀) value was then calculated using probit analysis. Data was statistically computed and analysis of variance. Treatment means were compared with Duncan's multiple range test (DMRT) (p=0.05)

***In vitro* test of nano particles from *Ch. brasiliense* to control *Pythium* spp.**

Nano particles were done using the method of Dar and Soyong (2014) to get Nano-CBH, Nano-CBE and Nano-CBM and were tested to control *Pythium* spp. by poisoned food technique. Experiment was designed by using 2 factors factorial experiment in CRD with 4 replications. Factor A represented nano particles and factor B represented concentrations at 0, 3, 5, 10 and 15 ppm.

Each nano particle was dissolved in 2% dimethyl sulfoxide (DMSO), and then mixed into PDA and added chitosan before autoclaving at 121°C, 15lbs/inch² for 20 min. Mycelial disc of *Pythium* spp. (7mm) was placed on the center of PDA in plate incorporated with each nano particles. All petri dishes incubated at room temperature until the pathogen in control plates growing full.

The data were collected as colony diameter and the number of sporangium. The inhibition of mycelial growth and sporangium formation of pathogen was calculated as a percentage and the effective dose (ED₅₀) value was then calculated using probit analysis. Data was statistically computed and analysis of variance. Treatment means were compare with Duncan's multiple range test (DMRT) (p=0.05).

Results

Pythium spp. was isolated from soil samples by baiting method and identified based on morphological characteristic. The cultural appearances were observed on PDA. Colony has a cottony aerial mycelium. The fungus grows fast, mycelium hyaline (Fig. 1, A). Sporangia formed on sterile grass blades in water cultures. Sporangia are of filamentous inflated (Fig. 1, B). Oogonia are smooth-walled, spherical, terminal, intercalary (Fig. 1, C-D). Oospores are aplerotic (Fig. 1, C-D).

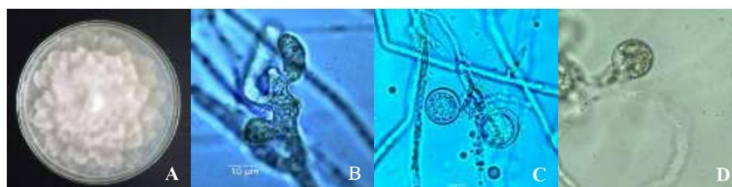


Figure 1. Colony patterns and morphology of *Pythium* spp. A; Colony patterns on PDA, B; Filamentous inflated sporangium, C; Oogonium with monoclinous antheridium, D; Oogonium with aplerotic oospores

Inoculated leaves under moist chamber condition showed water-soaked brownish lesions expand around agar plug of pathogen size 1.5 × 3.2 cm. Non-inoculated leaves showed no symptoms, leaves remained healthy.

In bi – culture test, result showed that *Ch. brasiliense* grew over and degraded *Pythium* spp. after inoculation 30 days. *Pythium* spp. was inhibited 42.5% growth colony and 48.1% sporangia production when compare to control.



Figure 2. Pathogenicity test of *Pythium* spp. on detached tangerine leaves. A; Inoculated control. B; Non-inoculated control



Figure 3. Growth of *Pythium* spp. in bi-culture test of *Pythium* spp. (at 30 days)

Efficacy of crude extract and nano particles from *Ch. brasiliense* to control *Pythium* spp. were tested by poisoned food technique with different concentrations when *Pythium* spp. in control petri dishes grew fully (2 days).

All of concentrations gave significantly different when compare to the control (0 ppm) and at 1000 ppm gave the best growth inhibition and sporangia inhibition and follow by 500, 100, 50 and 10 ppm. All of crude extracts at the concentrations of 1000 ppm, *Pythium* spp. did not grow from mycelial discs. The hexane extract of *Ch. brasiliense* at the concentrations of 500, 100, 50 and 10 ppm inhibited the colony growth of 88, 76.5, 58.25 and 34.25%, respectively when compared to the control. The EtOAc extract of *Ch. brasiliense* at the concentrations of 500, 100, 50 and 10 ppm inhibited the colony growth of 88, 69.25, 42.75 and 27.5%, respectively when compare to the control. The MeOH extract of *Ch. brasiliense* at the concentrations of 500, 100, 50 and 10 ppm inhibited the colony growth of 86, 71, 51.5 and 44 %, respectively when compared to the control (Table 1).

There is sporangia production 46.81×10^6 spore/ml in control. When calculated the sporangia inhibition at the concentrations of 1000, 500, 100, 50 and 10 ppm, the hexane extract of *Ch. brasiliense* inhibited the sporangia production of 95.59, 88.12, 73.56, 55.14 and 32.18%, respectively when compare to the control. The EtOAc extract of *Ch. brasiliense* inhibited the sporangia production of 95.33, 87.72, 59.41, 35.38 and 25.23%, respectively when compare to the control. The MeOH extract of *Ch. brasiliense* inhibited the sporangia production of 95.46, 86.78, 63.68, 43.92 and 36.98%, respectively when compare to the control (Table 1).

The crude extracts gave ED₅₀ values of 30.15, 58.71 and 37.25 ppm for the hexane, EtOAc and MeOH, respectively (Table 1).

Table 1. Effect of crude extracts from *Ch. brasiliense* to inhibit *Pythium* spp.

Crude extract	Concentration (ppm)	Colony diameter (cm)	Growth inhibition (%)	Number of sporangia ($\times 10^6$)	Sporangia inhibition (%)	ED ₅₀ (ppm)
hexane	0	5.00a	-	46.81a	-	30.15
	10	3.29c	34.25h	31.75c	32.18i	
	50	2.09f	58.25e	21.00f	55.14f	
	100	1.18h	76.50c	12.38i	73.56c	
	500	0.60ij	88.00ab	5.56j	88.12b	
	1000	0.50j	90.00a	2.06k	95.59a	
ethyl acetate	0	5.00a	-	46.81a	-	58.71
	10	3.63b	27.5i	35.00b	25.23j	
	50	2.86d	42.75g	30.25d	35.38h	
	100	1.54g	69.25d	19.00g	59.41c	
	500	0.60ij	88.00ab	5.75j	87.72b	
	1000	0.50j	90.00a	2.19k	95.33a	
methanol	0	5.00a	-	46.81a	-	37.25
	10	2.80d	44.00g	29.50d	36.98h	
	50	2.43c	51.50f	26.25c	43.92g	
	100	1.45g	71.00d	17.00h	63.68d	
	500	0.70i	86.00b	6.19j	86.78b	
	1000	0.50j	90.00a	2.13k	95.46a	
C.V. (%)		4.28		3.98		

¹Average of 4 replications. Means followed by the same letters in each antagonist were not significantly different by DMRT at P=0.05.

The nano particles were done from all crude extracts of *Ch. brasiliense* according to the method of Dar and Soyong (2014). All of concentrations gave significantly different when compare to the control and at 15 ppm gave the best growth inhibition and sporangia inhibition and follow by 10, 5 and 3 ppm.

All of nano particles at the concentrations of 15 ppm, *Pythium* spp. did not grow from mycelial discs. Nano-CBH at the concentrations of 10, 5 and 3

ppm inhibited the colony growth of 77.75, 55.5 and 41.75 %, respectively when compare to the control. Nano-CBE at the concentrations of 10, 5 and 3 ppm inhibited the colony growth of 67.5, 44 and 22.4 %, respectively when compare to the control. Nano-CBM at the concentrations of 10, 5 and 3 ppm inhibited the colony growth of 78.25, 57 and 47.25 %, respectively when compare to the control (Table 2).

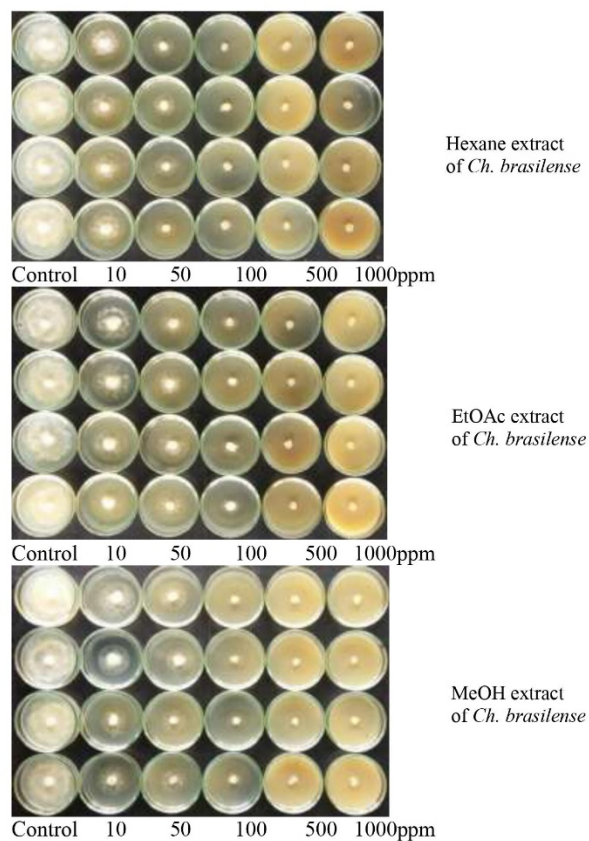


Figure 4. Testing crude extracts from *Ch. brasiliense* to inhibit *Pythium* spp.

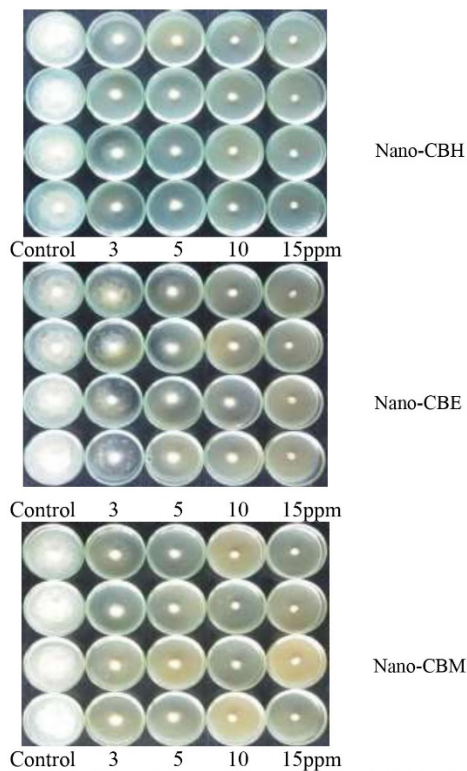


Figure 5. Testing the nano particles from *Ch. brasiliense* to inhibit *Pythium* spp.

In control, the number of sporangia was 42.38×10^6 spore/ml. When compare to the control, Nano-CBH at the concentrations of 15, 10, 5 and 3 ppm inhibited the sporangia production of 95.13, 86.43, 54.42 and 41.45 %, respectively. Nano-CBE at the concentrations of 15, 10, 5 and 3 ppm inhibited the sporangia production of 94.99, 86.43, 54.42 and 41.45 %, respectively when compare to the control. Nano-CBM at the concentrations of 15, 10, 5 and 3 ppm inhibited the sporangia production of 95.43, 89.38, 70.21 and 55.6 %, respectively when compare to the control (Table 2).

The nano particles of *Ch. brasiliense* gave ED_{50} values of 3, 3.96 and 2.69 ppm for the hexane, EtOAc and MeOH, respectively (Table 2).

Table 2. Effect of the nano particles from *Ch. brasiliense* to inhibit *Pythium* spp.

Nano product	Concentration (ppm)	Colony diameter (cm)	Growth inhibition (%)	Number of sporangia ($\times 10^6$)	Sporangia inhibition (%)	ED ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Nano-CBH	0	5.00a	-	42.38a	-	3.00
	3	2.91c	41.75f	20.81c	50.88e	
	5	2.23e	55.50d	13.44e	68.29c	
	10	1.11g	77.75b	5.00f	88.20b	
	15	0.50h	90.00a	2.06g	95.13a	
Nano-CBE	0	5.00a	-	42.38a	-	3.96
	3	3.88b	22.40g	24.81b	41.45f	
	5	2.80cd	44.00ef	19.31cd	54.42de	
	10	1.63f	67.50c	5.75f	86.43b	
	15	0.50h	90.00a	2.13g	94.99a	
Nano-CBM	0	5.00a	-	42.38a	-	2.69
	3	2.64d	47.25e	18.81d	55.60d	
	5	2.15e	57.00d	12.63e	70.21c	
	10	1.09g	78.25b	4.50f	89.38b	
	15	0.50h	90.00a	1.94g	95.43a	
C.V.(%)		5.01		6.52		

¹Average of 4 replications. Means followed by the same letters in each antagonist were not significantly different by DMRT at P=0.05.

Discussion

The most serious root rot disease of citrus in Thailand is caused by *Phytophthora parasitica* but *Pythium* spp. is reported that caused root rot disease of citrus (Maseko and Coutinho, 2001 and Kean *et al.*, 2010).

The obvious mechanisms of action of *Ch. brasiliense* in bi – culture test is competition because at first, *Pythium* spp. grew more than 50% of petri dish and faster than *Ch. brasiliense*. After 30 days *Ch. brasiliense* can grow over *Pythium* spp. moreover, *Pythium* spp. were degraded, mycelial deflated. There is probably antibiosis mechanism, therefore studying antifungal metabolite in terms of crude extract and nano particles from *Ch. brasiliense* to control *Pythium* spp. They gave high inhibition with low ED₅₀ values. The ED₅₀ values of crude extracts were 30.15 – 58.71 ppm and nano particles were 2.69 – 3.96 ppm. It was similar to the study of Tongon and Soyong (2016) studied using crude extracts of *Ch. brasiliense* to inhibit *Fusarium solani* and got effectively inhibition of *F. solani* with ED₅₀ were 66.66 – 288.94 ppm. Khumkomkhet *et al.* (2009) found many depsidones from *Ch. brasiliense* and tested to control *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Candida albicans*.

Nano particles have one dimension less than 100 nm at least and ability to adsorb and carry compounds. The nano particles gave stronger inhibition than

crude extracts with lower ED₅₀ values. It was similar to the report of Dar and Soyong (2014) tested nanomaterials derived *Ch. globosum* and *Ch. cupreum*. Moreover, Tongon and Soyong (2015) reported nano particles from *Ch. globosum* showed highly inhibitory effects on *Curvularia lunata* causing leaf spots of rice with low ED₅₀ values.

Acknowledgement

I would like to acknowledge the King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) to offer a research fund (2562-02-04-018) supported by Faculty of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok, Thailand. The financial support from Thailand Research Fund (Grant No RTA5980002) is also gratefully acknowledged.

References

- Dar, J. and Soyong, K. (2014). Construction and characterization of copolymer nanomaterials loaded with bioactive compounds from *Chaetomium* species. *Journal of Agricultural Technology*. 10:823-831.
- Hung, P. M., Wattanachai, P. and Soyong, K. (2014). Biological control of pomelo diseases using *Chaetomium* spp. *Journal of Agricultural Technology*. 10:833-844.
- Hung P. M., Wattanachai, P., Soyong K. and Poeam, S. (2015). Biological control of *Phytophthora palmivora* causing root rot of Pomelo using *Chaetomium* spp. *Mycobiology*. 43:63-70.
- Kean, S., Soyong, K. and To-anun, C. (2010). Application of biological fungicides to control citrus root rot in Cambodia. *Journal of Agricultural Technology*. 6:219-230.
- Khumkomkhet, P., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Hahnvajanawong, C., and Soyong, K. (2009). Antimalarial and cytotoxic depsidones from the fungus *Chaetomium brasiliense*. *Journal of natural products*. 72:1487-1491.
- Maseko, B. O. Z. and Coutinho, T. A. (2001). Pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species associated with citrus root rot in South Africa. *South African Journal of Botany*. 68:327-332.
- Molina, A. B., Roa, V. N., Bay-Petersen, J., Carpio, A. T. and Joven, J. E. A. (1998). Regional Workshop on Disease Management of banana and citrus through the use of disease-free planting materials held in Davao city, Philippines. pp. 14-16.
- Tongon, R. and Soyong, K. (2015). Application of nano-particles from *Chaetomium globosum* to control leaf spot of rice. *Journal of Agricultural Technology*. 11:1919-1926.
- Tongon, R. and Soyong, K. (2016). Fungal Metabolites from *Chaetomium brasiliense* to Inhibit *Fusarium solani*. *International Journal of Agricultural Technology*. 12:1463-1472.
- Quyet, N. T., Cuong, H. V., Hong, L. T. and Soyong, K. (2016). Control mechanism of *Chaetomium* spp. and its biological control of Citrus root rot in pot and field experiments in Vietnam. *International Journal of Agricultural Technology*. 12:329-336.
- Vichitranda, S. (1998). Disease Management of Citrus Orchards Planted with Disease-free Seedlings in Thailand. pp. 49-56. In: Proceedings of a regional workshop on disease management of banana and citrus through the use of disease free planting materials held in Davao City Philippines. October 14-16, 1998. Davao City, Philippines.

(Received: 25 August 2018, accepted: 7 October 2018)

Efficacy of Nano Particles from *Chaetomium cochliodes* to Control *Pythium* spp. causing Root Rot of Tangerine (*Citrus reticulata*)

Mongkutkarn Udompongsuk^{1*}, Kasem Soyong¹ and Somdej Kanokmedhakul²

¹Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok, Thailand, ²Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

Udompongsuk, M, Kanokmedhakul, S. and Soyong, K. (2017) Efficacy of nano particles from *Chaetomium cochliodes* to control *Pythium* spp. causing root rot of tangerine (*Citrus reticulata*). International Journal of Agricultural Technology 13(7.1): 1251-1257.

Tangerine (*Citrus reticulata*) is one of the most popular fruit in Asia. The seriously disease of tangerine is found to be root rot which caused by *Pythium* spp. and proved for pathogenicity. The tested nano particles derived from *Chaetomium cochliodes* to control the *Pythium* spp. *in vitro* was evaluated. The result showed that the tested nano particles exhibited antifungal activities against mycelial growth and sporangia formation of *Pythium* spp. with effective doses (ED₅₀) of 2.0~3.8 µg/mL and 1.2~3.7 µg/mL respectively. It is the first report of nano particles derived from *Ch. cochliodes* to control *Pythium* spp. causing root rot of *Citrus reticulata*.

Keywords: Root rot, *Pythium* spp., Tangerine, *Citrus reticulata*

Introduction

Tangerines (*Citrus reticulata*) are important fruit crops, being widely and commercially grown in Southeast Asia. In Thailand, tangerine trees mostly grow in the Northern provinces. The major causes of yield loss and decline of tangerine tree is root rot disease (Molina *et al.*, 1998). *Pythium* spp. is reported that caused root rot disease of citrus (Maseko and Coutinho, 2001 and Kean *et al.*, 2010). In some poor orchard sites, root rot is often presented with high population densities of *Pythium* spp. in the apparent absence of *Phytophthora* spp. and nematodes (Tsao *et al.*, 1978, Thompson *et al.*, 1995). When the pathogen infected near the ground level, infected bark cracks through which gum exudation. Roots turn soft and brown, the leaves turn yellow and may drop. The tree will grow poorly, stored energy reserves will be depleted, and production will decline (Vichitrananda, 1998). Chemical fungicides used to control root rot as reported by Davis (1982), Matheron and Matejka (1991)

* **Corresponding Author:** Mongkutkarn Udompongsuk; **E-mail address:** zw.mink@gmail.com

and Graham (2011) but they usually reduced soil quality, thus the biological control is an alternative practice to control these disease. The objective of the present study was to evaluation of efficiency of nano particles from *Ch. cochliodes* to control *Pythium* spp. causing root rot of tangerine.

Materials and methods

Isolation and identification

Soil and disease samples were collected from the tangerine orchards in Nan province, at a depth of 15 – 30 cm and stored at room temperature. Soil samples were isolated by baiting method. The soil samples were ground and placed into sterilized petri dish, then added sterilized distilled water and leaf pieces of tangerines (15 × 15 mm) and incubated at room temperature for 1 – 2 days. After the pathogen grew out from the leaf pieces of tangerines, the leaf pieces were placed on water agar (WA). When mycelium grown from the tissue sections were transferred to Potato Dextrose Agar (PDA) until get pure culture and incubated at 25° C. For morphological studies, according to their cultural appearances and observation of sporangium and other structures of *Pythium* spp. Sporangia were produced by floating some mycelial discs in 10 ml of distilled water and sterilized grass blades.

Pathogenicity test

The tangerine leaves were detached from healthy plant, and then surface sterilized with 70% ethyl alcohol and placed with the upper leaf surface in a sterile petri dish containing filter paper moist with distilled water to maintain high humidity. Wounding by sterile needle on the leaves for easy access of the fungus, then leaves were inoculated with mycelium discs of *Pythium* spp. on the wound. Non-inoculated controls were inoculated with an agar plug without the fungus. The petri dishes were incubated at room temperature for 3 days. Four replications of each treatment were used in the experiment.

In vitro test of nano particles from Chaetomium cochliodes to control Pythium spp. Causing root rot of Citrus reticulata

Ch. cochliodes was cultured in potato dextrose broth (PDB) for 30 days. The fungal biomass was collected, air-dried, ground and extracted with hexane, ethyl acetate (EtOAc) and methanol (MeOH) to produce crude hexane, crude EtOAc and crude MeOH extract, respectively. Nano particles were done using the method of Dar and Soyong (2014) to get Nano-CCOH, Nano-CCOE and

Nano-CCOM. The nano particles were tested to control *Pythium* spp. causing root rot of Citrus reticulata. Experiment was designed by using two factors factorial experiment in Completely Randomized Design (CRD) with four replications. Factor A represented Nano-CCOH, Nano-CCOE and Nano-CCOM and factor B represented concentrations at 0, 3, 5, 10 and 15 ppm. Each nano particle was dissolved in 2% dimethyl sulfoxide (DMSO), and then mixed into PDA and added chitosan before autoclaving at 121°C, 15lbs/inch² for 20 min. Mycelial disc of *Pythium* spp. (7mm) was placed on the center of PDA in plate (5 cm diameter) incorporated with each nano particles. All plates incubated at room temperature until the pathogen in control plates growing full.

The data were collected as colony diameter and the number of sporangium. The inhibition of mycelial growth and sporangium formation of pathogen was calculated as a percentage and the effective dose (ED₅₀) value was then calculated using probit analysis. Data was statistically computed and analysis of variance. Treatment means were compare with Duncan's multiple range test (DMRT) (p=0.05)

Results and discussion

The cultural appearances were observed on PDA. Colonies have a cottony aerial mycelium with chrysanthemum pattern. The fungus grows fast, mycelium hyaline (Fig. 1, A). Sporangia formed on sterile grass blades in water cultures. Sporangia are of filamentous inflated (Fig. 1, B). Oogonia are smooth-walled, spherical, terminal, intercalary (Fig. 1, C-D). Oospores are aplerotic (Fig. 1, C-D).

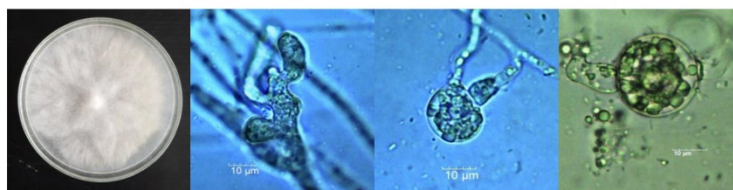


Fig. 1. Colony patterns and morphology of *Pythium* spp. A; Colony patterns on PDA, B; Filamentous inflated sporangium, C; Oogonium with monoclinous antheridium, D; Oogonium with aplerotic oospores.

Pathogenicity test on detached leaves after 3 days, infected leaves showed water-soaked grayish brown lesion expand around agar plug of pathogen. Non-inoculated leaves showed no symptoms, leaves remained healthy. The result

showed the fungus caused disease symptoms on tangerine leaves that were similar to the report of Mida *et al.* (2015) which reported pathogenicity test on detached leaves of *Citrus jambhiri*.

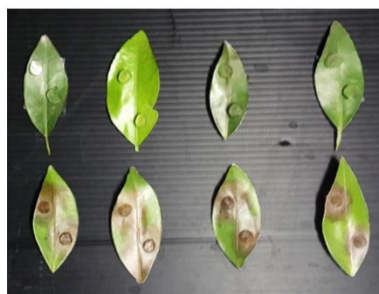


Fig.2. Pathogenicity test of *Pythium* spp. on detached tangerine leaves. A; Non-inoculated control. B; Inoculated control.

Nano particles of *Ch. cochliodes* were tested with different concentrations for colony growth inhibition and sporangium inhibition of *Pythium* spp. The nano particles from crude extracts of *Ch. Cochliodes* were done according to the method of Dar and Soyong (2014). Data were collected after 24 hours of experiment. Nano-CCOH at the concentrations of 3, 5, 10 and 15 ppm inhibited the colony growth of 47.75, 53.50, 63.25 and 80%, respectively when compare to the control (0 ppm). Nano-CCOE at the concentrations of 3, 5, 10 and 15 ppm inhibited the colony growth of 54.25, 74.75, 80.75 and 86%, respectively when compare to the control. Nano-CCOM at the concentrations of 3, 5, 10 and 15 ppm inhibited the colony growth of 56.75, 65.75, 75.50 and 81%, respectively when compare to the control. Nano-CCOH, Nano-CCOE and Nano-CCOM gave ED₅₀ values of 3.83, 2.62 and 2.01 µg/ml, respectively. Nano-CCOH at the concentrations of 3, 5, 10 and 15 ppm inhibited sporangium formation of 46.58, 7.14, 67.24 and 83.23%, respectively when compare to the control. Nano-CCOE at the concentrations of 3, 5, 10 and 15 ppm inhibited sporangium formation of 58.70, 75.16, 79.04 and 95.03%, respectively when compare to the control. Nano-CCOM at the concentrations of 3, 5, 10 and 15 ppm inhibited sporangium formation of 62.42, 68.94, 71.43 and 83.54%, respectively when compare to the control. Nano-CCOH, Nano-CCOE and Nano-CCOM gave ED₅₀ values of 3.68, 2.17 and 3.80 µg/ml, respectively. (Table 1, Fig.3). It is similar to the report of Soyong (2014) which studied Bio-formulation of *Ch. cochliodes* for controlling *Drechslera oryzae* gave good

result to inhibit *D. oryzae* and increased in plant growth. Moreover, Tongon and Soyong (2015) reported nano particles from *Ch. globosum* showed highly inhibitory effects on *Curvularia lunata* causing leaf spots of rice with low ED₅₀ values.

Table 1. Effect of nano particles from *Chaetomium cochliodes* to inhibit *Pythium* spp.

Nano product	Concentration (ppm)	Colony diameter (cm)	Growth inhibition (%)	ED ₅₀ (µg/ml)	Number of sporangia (×10 ⁶)	Sporangia inhibition (%)	ED ₅₀ (µg/ml)
Nano-CCOH	0	5.00a ¹	-		40.25a	-	
	3	2.61b	47.75f		21.50b	46.58h	
	5	2.33c	53.50e	3.83	17.25c	57.14g	3.68
	10	1.84d	63.25d		13.19e	67.24e	
	15	1.00f	80.00b		6.75h	83.23b	
Nano-CCOE	0	5.00a	-		40.25a	-	
	3	2.29c	54.25e		16.63cd	58.70fg	
	5	1.26e	74.75c	2.62	10.00fg	75.16cd	2.17
	10	0.97f	80.75b		8.44g	79.04c	
	15	0.70g	86.00a		2.00i	95.03a	
Nano-CCOM	0	5.00a	-		40.25a	-	
	3	2.16c	56.75e		15.13d	62.42f	
	5	1.71d	65.75d	2.01	12.50e	68.94e	3.80
	10	1.22e	75.50c		11.50ef	71.43de	
	15	0.95f	81.00b		6.63h	83.54b	
C.V.(%)		6.03			6.53		

¹Average of 4 replications. Means followed by the same letters in each antagonist were not significantly different by DMRT at P=0.05.

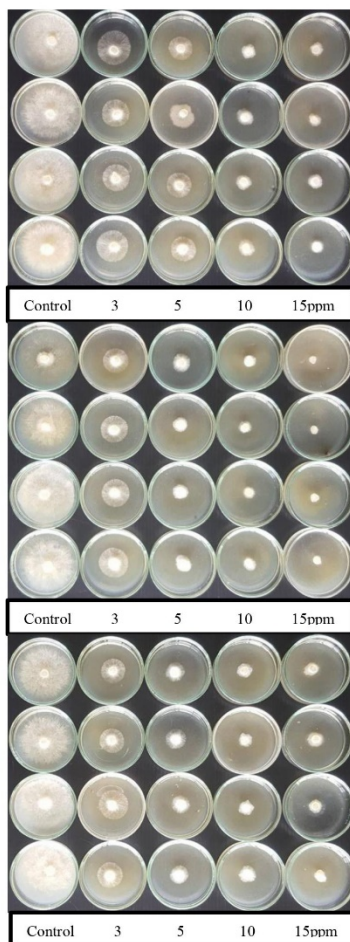


Fig. 3. Testing the nano particles from *Chaetomium cochliodes* to inhibit *Pythium* spp.

References

- Dar, J. and Soyong K. (2014). Construction and characterization of copolymer nanomaterials loaded with bioactive compounds from *Chaetomium* species. *Journal of Agricultural Technology* 10(4):823-831.
- Davis, R. M. (1982). Control of *Phytophthora* Root and Foot Rot of Citrus with Systemic Fungicides Metalaxyl and Phosethyl Aluminum. *American Phytopathological Society* 10:66-218.
- Graham, H. J. (2011). Phosphite for control of *Phytophthora* diseases in citrus: model for management of *Phytophthora* species on forest trees. *New Zealand Journal of Forestry Science* 41: 49-56.
- Kean, S., Soyong, K. and To-anun, C. (2010). Application of biological fungicides to control citrus root rot in Cambodia. *Journal of Agricultural Technology* 6(2): 219-230.
- Maseko, B.O.Z. and Coutinho, T.A. (2001). Pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species associated with citrus root rot in South Africa. *South African Journal of Botany* 68: 327–332.
- Matheron, M. and Matejka, J. (1991). Comparative Control of *Phytophthora* Root Rot of Citrus with Sodium Tetrathiocarbonate, Metalaxyl, and Doseyl-Al. *Citrus Reserch report* 10: 85-87.
- Mida, D. K., Gade, R.M. and Mohod, Y.N. (2015). Distribution, pathogenicity and efficacy of some fungicides against *Phytophthora parasitica*. *J. Mycopathol. Res.* 53(2):299-302.
- Molina, A. B., Roa, V.N., Bay-Petersen, J., Carpio, A.T. and Joven, J.E.A. editors (1998). Regional Workshop on Disease Management of banana and citrus through the use of disease-free planting materials held in Davao city, Philippines from 14-16.
- Soyong, K. (2014). Bio-formulation of *Chaetomium cochliodes* for controlling brown leaf spot of rice. *Journal of Agricultural Technology* 10(2):321-337.
- Thompson, A.H., Phillips, A.J.L., Nel, E. (1995). *Phytophthora* and *Pythium* spp. associated with feeder rot of citrus in the Transvaal Province of South Africa. *Phytopathology* 143: 37–41.
- Tongon, R. and Soyong, K. (2015). Application of nano-particles from *Chaetomium globosum* to control leaf spot of rice. *Journal of Agricultural Technology* 11(8): 1919-1926.
- Tsao, P.H., Martin, J.P., Davis, R.M. (1978). The citrus replant problem. In: Reuther W, Calavan EC, Craman GE (eds) *The Citrus Industry*. Vol IV. Crop Protection, University of California, Division of Agricultural Sciences, Berkeley, USA, pp 261–279.
- Vichitrananda, S. (1998). Disease Management of Citrus Orchards Planted with Disease-free Seedlings in Thailand. pp. 49-56. In: Proceedings of a regional workshop on disease management of banana and citrus through the use of disease free planting materials held in Davao City Philippines. October 14-16, 1998. Davao City, Philippines.

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