



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สุขภาพพืช)

ปริญญา

สุขภาพพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้นแตงกวา  
สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*

Efficacy of Antagonistic Bacteria for the Control of Fusarium Wilt of Cucumber  
Caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*

นามผู้วิจัย นางสาวดลลักษ์ณ์ ศรีถวิล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ค. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์จิระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้นแตงกวา  
สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*

Efficacy of Antagonistic Bacteria for the Control of Fusarium Wilt of Cucumber  
Caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*

โดย

นางสาววลัยลักษณ์ ศรีถวิล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สุภาพพีช)

พ.ศ. 2557

วลัยลักษณ์ ศรณวิไล 2557: ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้น  
แตงกวาสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต  
(สุขภาพพืช) สาขาสุขภาพพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์  
วรรณวิไล อินทนู, วท.ด. 103 หน้า

แยกเชื้อแบคทีเรีย 112 ไอโซเลต จากแปลงเกษตรกรในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยได้  
จากดินรอบรากแตงกวา 56 ไอโซเลต และจากใบแตงกวา 56 ไอโซเลต ด้วยวิธีเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution)  
บนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ nutrient glucose agar (NGA) King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH)  
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium*  
*oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) ด้วยวิธี dual culture test บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ใน  
ห้องปฏิบัติการ พบเชื้อแบคทีเรีย 19 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC ได้ 38.33 -  
50.21 เปอร์เซ็นต์ จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ได้ นำไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในระดับเรือนปลูก  
พืชทดลอง ด้วยการใช้เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น  $10^8$  CFU/มิลลิลิตร แช่เมล็ดแตงกวานาน 15 นาที  
ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรค ผลการทดลองพบว่าเมื่อต้นแตงกวามีอายุ 7 วัน ทุกกรรมวิธีที่แช่เมล็ดแตงกวา  
ในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์การงอกไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม 50 WP  
(อัตรา 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร) ยกเว้นกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต SDN-37 และ LBN2-1 เมื่อต้นแตงกวามี  
อายุ 14 วัน พบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต LBN1-5 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเทียบเท่า  
กับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และมีความยาวราก 18.83 เซนติเมตร ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีอื่นๆ และสูงกว่า  
กรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรค 20.01 และ 41.26 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม มีความ  
ยาวของรากเพิ่มขึ้น 10.65 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต SDN-9 ลดการเจริญครอบครองรากของเชื้อสาเหตุโรคได้เมื่อ  
เทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพมาพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ที่  
ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย  
เชื้อราสาเหตุโรคได้ M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 ไปพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จชนิดผงดิน ก่อน  
นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของแตงกวาในสภาพแปลงปลูกพืช พบว่ากรรมวิธีที่ใช้  
แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ 7 วัน และเปอร์เซ็นต์ ต้นรอดตายของต้นแตงกวาที่ 14  
21 วันและ 28 วันสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต  
M5-LBN 1-5 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่สูงสุดจากทั้ง 3 ไอโซเลต รวมทั้งมี  
เปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรค และดัชนีการเกิดโรคต่ำที่สุด โดยมีค่าต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม 32.69 และ 29.37  
เปอร์เซ็นต์ การเจริญครอบครองรากของเชื้อสาเหตุโรคลดลง และมีค่าน้ำหนักผลผลิตสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ  
กรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมด้วย

Walailak Sontawin 2014: Efficacy of Antagonistic Bacteria for the Control of Fusarium Wilt of Cucumber Caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* . Master of Science (Plant Health), Major Field: Plant Health, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Wanwilai Intanoo, Ph.D. 103 pages.

Total of 112 isolates of bacteria were isolated from root zone soil (56 isolates), and leaves (56 isolates) of cucumber at Kamphaeng Saen District in Nakhon Pathom Province by serial dilution on four media, including nutrient glucose agar (NGA), King's medium B (KB) and Thornston's medium. The isolated bacteria were evaluated by dual culture test on potato dextrose agar (PDA) medium for the efficacy to inhibit mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC), a causal agent of cucumber wilt. Results showed that 19 isolates of bacteria effectively inhibited mycelial growth of FOC by 38.33 - 50.21% as compared to the control. Selected bacteria were further tested for the efficacy to control under screenhouse condition by soaking seeds in bacterial cell suspension ( $10^8$  CFU/ml) for 15 minutes before sowing in the pathogen infested soil. The results indicated that germination percentages of 7-day-old seedlings in all bacterial treatments were not different to the use of carbendazim 50 WP (20g/20ml), except two treatments using bacteria isolates SDN-37 and LBN2-1. Bacterial isolate LBN1-5 was the most promising isolate to provide the highest percentage of survived seedlings (40 %) after planting for 14 days, which was comparable to the seeds treated with carbendazim. This bacterial isolate also promoted the longest root length of 14-day-old seedlings (18.83 cm.), which was higher than the other treatments and the control (with pathogen) by 20.01 and 41.26 %, while carbendazim provided the increased of root lengths by 10.65%. The bacteria isolate SDN-9 reduced the percentages of root colonized with pathogen, which was comparable to the seeds treated with carbendazim. Bacteria isolates were developed for resistant to rifampicin antibiotic, with the efficacy to inhibit mycelial growth of the pathogen were isolates M3-SDN-9, M5-SDN-23 and M5-LBN 1-5. All these isolates were developed as soil powder formulations and then were used for the efficacy test to control cucumber wilt under field condition. Results showed that three bacterial treatments provide significant higher germination percentage of 7-day-old seedlings and survived seedlings at 14, 21 and 28 days after planting than the seeds treated with carbendazim. Isolate M5-LBN 1-5 gave the highest percentages of germination and survived seedlings, the lowest percentages of disease incidence and disease index 32.69 and 29.37 % than the control reduced the percentages of root colonized and increased yield as compared to the carbendazim treated control

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณวิไล อินทนู อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.จิระเดช แจ่มสว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้อบรมสั่งสอน ให้คำแนะนำเรื่องงานวิจัย การดำเนินชีวิต และให้กำลังใจในทุกเรื่องๆ เสมอมา รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ อย่างดีจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.คณินิตย์ เจริญวรกร ประธานการสอบ และรองศาสตราจารย์ ดร.วาริน อินทนา ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกเป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทุกคนในครอบครัวศรณวิธ ทั้งคุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย และนายมานะ สุภร์เจริญทรัพย์ ที่คอยให้กำลังใจเสมอมาในทุกเรื่องๆ ตลอดจนให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน จนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จได้ในวันนี้ ขอขอบคุณนางสาวณัฐสุดา คำยอดและนายจาตุรงค์ ประทุมทอง ที่คอยช่วยเหลือกันในด้านต่างๆ ทั้งด้านการเรียน การทำการทดลอง เป็นกำลังใจให้กันและกันเสมอ และขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ แห่งห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ ที่คอยให้กำลังใจ ให้คำแนะนำ และคอยช่วยเหลือในด้านต่างๆ เป็นอย่างดีเสมอมา ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสนทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือเอื้อเฟื้อ และเป็นกำลังใจให้ตลอดในการทำวิทยานิพนธ์

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบแด่ครอบครัว ครูอาจารย์ ผู้ประสทาวิชา ความรู้ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้สนับสนุน เป็นกำลังใจตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

วลัยลักษณ์ ศรณวิธ

กรกฎาคม 2557



## สารบัญ

## หน้า

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| สารบัญ                     | (1) |
| สารบัญตาราง                | (2) |
| สารบัญภาพ                  | (5) |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ  | (6) |
| คำนำ                       | 1   |
| วัตถุประสงค์               | 3   |
| การตรวจเอกสาร              | 4   |
| อุปกรณ์และวิธีการ          | 23  |
| ผลและวิจารณ์               | 36  |
| สรุป                       | 82  |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง       | 83  |
| ภาคผนวก                    | 94  |
| ประวัติการศึกษาและการทำงาน | 103 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                       | หน้า |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1        | จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบราก และใบของแตงกวาด้วยการใช้อาหารแยกเชื้อ 3 ชนิด                                                                                                                                                                            | 38   |
| 2        | ไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน                                          | 41   |
| 3        | ประสิทธิภาพเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) และความกว้างบริเวณยับยั้ง (clear zone) ของแบคทีเรียปฏิชีวนะ บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน                        | 42   |
| 4        | อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ 7 วัน และเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 วันหลังปลูก ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น $10^8$ CFU/มิลลิลิตร นาน 15 นาที ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรค                                | 46   |
| 5        | อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อความสูงต้น และความยาวรากของต้นแตงกวาที่อายุ 14 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น $10^8$ CFU/มิลลิลิตร นาน 15 นาที ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรค                                                          | 49   |
| 6        | เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดินของต้นแตงกวาที่อายุ 14 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น $10^8$ CFU/มิลลิลิตร นาน 15 นาที ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรค                                     | 53   |
| 7        | ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน | 58   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                                   | หน้า |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 8        | ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) ด้วยวิธี paper disc method บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน | 61   |
| 9        | ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ในการยับยั้งการงอก และการพัฒนาเป็น germ tube ของสปอร์เชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) บนสไลด์หลุมที่ 24 ชั่วโมง                                           | 62   |
| 10       | อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ 7 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในแบคทีเรียสูตรสำเร็จชนิดผงดิน                                                                                                                                                         | 66   |
| 11       | อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 21 และ 28 วันหลังปลูกด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในแบคทีเรียสูตรสำเร็จชนิดผงดิน                                                                                                                                            | 69   |
| 12       | เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) เมื่อต้นแตงกวาอายุ 28 วัน หลังจากแช่ เมล็ดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกในสภาพแปลงปลูกพืชทดลอง                                                                                                                                               | 70   |
| 13       | เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบคลุมรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบคลุมรากของแบคทีเรียปฏิชีวนะของต้นแตงกวาที่อายุ 28 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาใน แบคทีเรียสูตรสำเร็จชนิดผงดิน                                                                                                       | 72   |
| 14       | เปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรค และดัชนีการเกิดโรค เมื่อต้นแตงกวามีอายุ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง)                                                                                                                                                                                            | 73   |
| 15       | เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบคลุมรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบคลุมรากของแบคทีเรียปฏิชีวนะของต้นแตงกวาที่อายุ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง)                                                                                                                                          | 77   |
| 16       | อิทธิพลของแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อน้ำหนักผลผลิตของต้นแตงกวาเก็บผลผลิต 20 วัน                                                                                                                                                                                                          | 80   |



## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่ | หน้า                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1            | ไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ<br>เส้นใยเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) ด้วยวิธี<br>dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 3 วัน 98 |
| 2            | ไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ<br>เส้นใยเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) ด้วยวิธี<br>dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 5 วัน 99 |
| 3            | ประสิทธิภาพเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา<br><i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) ของแบคทีเรีย<br>ปฏิชีวน์บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) 100                                     |

## สารบัญภาพ

| ภาพที่ |                                                                                                                                                                                                                                                                     | หน้า |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | ดินที่มีเชื้อโรค นำทดสอบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆในดิน โดยการโรยดินลงบนอาหาร PDA ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น                                                                                                                                              | 27   |
| 2      | ลักษณะอาการโรค ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค                                                                                                                                                                                                              | 37   |
| 3      | ประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ด้วยวิธี dual culture ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน                                               | 44   |
| 4      | ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคต้นแตงกวาในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง เมื่อต้นแตงกวามีอายุที่ 14 วัน                                                                                                                                                       | 51   |
| 5      | การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคของต้นแตงกวาที่อายุ 14 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น $10^8$ CFU มิลลิลิตร นาน 15 นาที ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรคบนอาหาร Nash and Snyder medium ในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง                      | 55   |
| 6      | โคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในดินที่ปลูกต้นแตงกวาในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง บนอาหาร Nash and Snyder medium                                                                                                                                                               | 55   |
| 7      | ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC) ด้วยวิธี paper disc method บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง | 63   |
| 8      | อิทธิพลของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i> (FOC)                                                                                               | 64   |
| 9      | รูปร่างเซลล์ และการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทั้ง 3 ไอโซเลต                                                                                                                                                                                           | 65   |
| 10     | ลักษณะการเกิดโรคเหี่ยวของต้นแตงกวาที่แสดงอาการใบไหม้ และเหี่ยว                                                                                                                                                                                                      | 75   |
| 11     | การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคของต้นแตงกวาบนอาหาร Nash and Snyder medium ในแปลงปลูกพืช                                                                                                                                                                      | 78   |

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

|      |   |                                                                     |
|------|---|---------------------------------------------------------------------|
| CFU  | = | จำนวนโคโลนีต่อหนึ่งหน่วย (colony forming unit)                      |
| FOC  | = | <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cucumerinum</i>                  |
| g    | = | กรัม (gram)                                                         |
| KB   | = | อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (King's medium B)                     |
| LBN  | = | แบคทีเรียที่แยกได้จากใบในจังหวัดนครปฐม ด้วยวิธีการบดใบ              |
| LWN  | = | แบคทีเรียที่แยกได้จากใบในจังหวัดนครปฐม ด้วยวิธีการล้างใบ            |
| ml   | = | มิลลิลิตร (milliliter)                                              |
| NGA  | = | อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose agar)               |
| NGB  | = | อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (nutrient glucose broth)              |
| nd   | = | ไม่ได้ตรวจผล (not determind)                                        |
| O.D. | = | ค่าความขุ่น (Optical density)                                       |
| PDA  | = | อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อรา (potato dextrose agar)                       |
| ppm  | = | ส่วนในล้านส่วน (part per million)                                   |
| SDN  | = | แบคทีเรียที่แยกมาจากดินในจังหวัดนครปฐม (soil dilution Nakhonpathom) |
| %    | = | เปอร์เซ็นต์                                                         |

# ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของต้นแตงกวา

สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*

## Efficacy of Antagonistic Bacteria for the Control of Fusarium Wilt of Cucumber Caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*

### คำนำ

พืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญของโลก และภายในประเทศ ส่วนใหญ่เป็นพืชเถาเลื้อย ถูคูเดียว ลำต้นขนาดปานกลาง มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่นของโลก และกระจายทั่วไปในเขตร้อนชื้น และกึ่งร้อนชื้น มีการปลูก และใช้ประโยชน์จากพืชตระกูลนี้มากมาย โดยทั่วไปรับประทานผล และใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ พืชตระกูลแตงหลายชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ แตงกวา แตงร้าน แตงไท แตงโม แตงแคนตาลูป มะระ บวบ ตำลึง ฟัก แฟง ฟักเขียว และ ฟักทอง เป็นต้น รายได้จากการขายผลผลิตพืชตระกูลแตงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่นๆ หลายชนิดแล้ว พืชตระกูลแตงเป็นพืชหนึ่งที่สามารถทำรายได้ดีให้แก่เกษตรกร จึงนับเป็นพืชผักเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย

แตงกวาเป็นหนึ่งในพืชตระกูลแตงที่มีบทบาทสำคัญต่อการค้าทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากเป็นพืชที่บริโภคส่วนของผล นิยมรับประทานเป็นผลสด หรือเป็นส่วนประกอบในอาหารประเภทอื่นๆ หลายชนิด ปลูกกันแพร่หลายในทั่วทุกภาคของประเทศไทย เป็นพืชที่มีอายุตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวสั้น ปลูกได้ง่าย ให้ผลผลิตเร็ว (ศรานนท์, 2551) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการปลูกแตงมักประสบปัญหาเกี่ยวกับศัตรูพืช และปัจจัยอื่นๆ ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตน้อยลง หรือมีคุณภาพของผลผลิตไม่ตรงกับความต้องการของตลาด โดยเฉพาะเรื่องโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรคหลากหลายชนิด จากการสำรวจโรคพบว่าโรคระบาดที่สำคัญ และเป็นอุปสรรคต่อการปลูกมีมากมายหลายโรคด้วยกัน โดยโรคหนึ่งที่มีความสำคัญมากที่สุดกับแตงกวา และเกิดขึ้นได้บ่อยๆ ก็คือ โรคเหี่ยว (Fusarium wilts) เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปทุกแห่ง เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. ทำให้พืชเกิดอาการเหี่ยว และโรคนี้อีกมักเกิดกับพืชที่เจริญเติบโตได้ทุกระยะตั้งแต่ต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว และเป็นมากในระยะที่แตงกำลังออกผล ซึ่งอาจจะทำให้ต้นเหี่ยวตายไปก่อนที่จะเก็บผล การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคนี้อาจไม่ประสบผลสำเร็จ และไม่คุ้มต้นทุนการผลิต เนื่องจากเชื้อนี้สามารถเจริญและพักตัวอยู่ในดินได้นาน และนอกจากนี้การใช้สารเคมียังส่งผลกระทบต่อเกษตรกร ผู้บริโภค

และสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นจึงได้มีการนำการควบคุมโรคโดยชีววิธีมาใช้ โดยการใช้จุลินทรีย์  
 ปฏิปักษ์ที่มีการคัดเลือกแล้ว เช่น *Trichoderma* spp. และ แบคทีเรีย *Bacillus* spp. ซึ่งมีความสามารถ  
 ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช และอาจยังสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานขึ้นได้  
 หรือการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากดิน และรากของพืชตระกูลแตงเองมาทดแทนการใช้สารเคมีเพื่อ  
 ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช ช่วยป้องกัน และควบคุมการเกิดโรค ทำให้เกษตรกรลดการใช้สารเคมี  
 และผลกระทบที่เกิดขึ้นได้ ดังนั้นการศึกษารั้วนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ใน  
 การควบคุมโรคเหี่ยว ทดแทนการใช้สารเคมี ลดต้นทุนการผลิต และปลอดภัยต่อเกษตรกร  
 ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมอีกด้วย



## วัตถุประสงค์

1. แยกเชื้อแบคทีเรียจากดินรอบรากและใบของแตงกวา มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวาในห้องปฏิบัติการ
2. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว ในการควบคุมโรคเหี่ยวของแตงกวาในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง
3. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกในระดับเรือนปลูกพืชทดลองแล้ว ในการควบคุมโรคเหี่ยวของแตงกวาในแปลงปลูกพืช

## การตรวจเอกสาร

### แตงกวา

แตงกวา เป็นพืชที่บริโภคส่วนของผล อยู่ในตระกูลเดียวกับแตงโม ฟักทอง บวบ มะระ เป็นพืชที่นิยมนำมารับประทานเป็นผลสด หรือเป็นส่วนประกอบในอาหารประเภทอื่นๆ หลายชนิด และปลูกกันแพร่หลายในทั่วทุกภาคของประเทศไทย เป็นพืชที่มีอายุตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวสั้น ปลูกได้ง่าย ให้ผลผลิตเร็ว นอกจากนี้แตงกวาสามารถนำไปปรุงอาหารได้หลายชนิด เช่น แกงจืด ผัด จิ้ม น้ำพริก หรืออาจแปรรูปเป็นแตงกวาดอง จึงเห็นได้ว่าแตงกวาเป็นพืชที่มีบทบาทต่อการค้าทั้งในและต่างประเทศด้วย และยังมีคุณสมบัติประโยชน์ในอีกหลายด้าน (ศรานนท์, 2551)

แตงกวาเป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Cucurbitaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cucumis Sativus Linn* แตงกวาเป็นพืชปีเดียว (annual) มีลำต้นเป็นเถาเลื้อยความยาวประมาณ 2-3 เมตร มีมือเกาะช่วยพยุงต้น บางพันธุ์มีเถาสั้น และสามารถปลูกเป็นพุ่มได้ โดยทั่วไปแตงกวามีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละดอกภายในต้นเดียวกัน มีอายุตั้งแต่หยอดเมล็ดจนถึงเก็บเกี่ยวผลไว้กินได้ประมาณ 30-40 วัน ขนาดของผลแตงกวาประมาณ 2.6x4-30 เซนติเมตร นอกจากนี้แตงกวาเป็นพืชที่ปลูกได้ตลอดปีในประเทศไทย แต่จะปลูกได้ดีที่สุดในช่วงเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม (อุดม, 2540; อรุณรักษ์, 2543)

### ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (ศรานนท์, 2551)

ราก ระบบรากเป็นระบบรากแก้ว (tap root system) มีรากแขนงเป็นจำนวนมาก

ลำต้น เป็นเถาเลื้อย เป็นเหลี่ยม มีขนขึ้นปกคลุมทั่วไป มีข้อยาว 10-20 เซนติเมตร มือเกาะเกิดออกมาตามข้อ

ใบ มีก้านใบยาว 5-15 เซนติเมตร ใบหยาบมีขนใบมีมุมใบ 3-5 มุม ปลายใบแหลม ใบใหญ่แบบ palmate มีเส้นใบ 5-7 เส้น

**ดอก** ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกกันอยู่คนละดอก ภายในต้นเดียวกัน ดอกมีสีเหลือง กลีบเลี้ยงสีเขียวมี 5 กลีบ กลีบดอกสีเหลืองมี 5 กลีบ รังไข่มีลักษณะกลมยาว 2-5 เซนติเมตร มีปมูนของหนามและขนชัดเจน ส่วนของยอดเกสรตัวเมียมี 2-5 แฉก ส่วนดอกเพศผู้อาจเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อ มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกเหมือนดอกเพศเมีย มีละอองเกสรตัวผู้ 3 อัน และมีก้านชูเกสรสั้นๆ

**ผล** มีลักษณะกลมยาวทรงกระบอก ความยาวผลระหว่าง 5-40 เซนติเมตร มีไส้ภายในผล สีของผล ขาว เขียวอ่อน เขียว และเขียวเข้ม

### พันธุ์แตงกวา

แตงกวาที่นิยมปลูกกันทั่วไปจำแนกได้ตามประโยชน์การใช้สอยได้ดังนี้

1. พันธุ์สำหรับรับประทานสด เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อบาง และไส้ใหญ่ สีเปลือกเป็นสีเขียวอ่อน ผลมีน้ำมาก เป็นพันธุ์ที่มีทั้งผลเล็กและผลใหญ่ เมื่อผลยังอ่อนอยู่จะมีหนาม แต่เมื่อโตเต็มที่หนามจะหลุดออกเอง พันธุ์รับประทานสดนี้ไม่เหมาะกับการนำไปดอง (สรานนท์, 2551)
2. พันธุ์อุตสาหกรรม เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อหนา ไส้เล็ก บางพันธุ์ก็ไม่มีไส้เลย เปลือกสีเขียวเข้ม เมื่อนำไปดองจะคงรูปร่างได้ดี ไม่ค่อยเหี่ยวยุบ แตงกวาพันธุ์นี้มักจะเป็นลูกผสม ผลมักมีรูปร่างพอมยาว (สรานนท์, 2551)

### สภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสม

แตงกวาสามารถเจริญได้ในดินแทบทุกชนิด แต่จะชอบดินร่วนปนทราย มีค่าความเป็นกรดต่ำ (pH) อยู่ระหว่าง 5.5-6.5 และดินที่มีความชื้นพอเหมาะ มีการระบายน้ำดี น้ำไม่ขังแฉะ เพราะหากน้ำขังแฉะจะทำให้เกิดโรคทางใบได้ง่าย เป็นพืชที่ไม่ต้องการน้ำมากแต่ขาดน้ำไม่ได้ ในกรณีสภาพดินที่เป็นดินทรายจัด หรือเหนียวจัด จำเป็นต้องปรับปรุงบำรุงดินก่อนการเพาะปลูก โดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์ เช่น ปุ๋ยคอก หรือปุ๋ยหมักที่สลายตัวแล้ว

แตงกวาเป็นพืชที่ต้องการอากาศอบอุ่นแต่ไม่ถึงกับร้อนจัด อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผสมเกสรนั้นอยู่ระหว่าง 17-25 องศาเซลเซียส ดังนั้นการปลูกแตงกวาให้ได้ผลดีควรเลือกปลูกในเวลาที่อากาศยังอบอุ่นอยู่ ถ้าอากาศร้อนเกินไปแตงกวาจะมีแต่ดอกตัวผู้ ทำให้ได้ผลผลิตน้อย อย่างไรก็ตามสภาพอุณหภูมิในประเทศไทยสามารถปลูกแตงกวาได้ตลอดปี แต่ผลผลิตที่ได้จะแตกต่างกัน (จิรวัดน์, 2551; ศรีนันท์, 2551)

### การเก็บเกี่ยว

อายุการเก็บเกี่ยวของแตงกวาคือประมาณ 30-40 วันหลังจากหยอดเมล็ด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ที่ใช้ปลูก และการดูแลรักษา การเก็บเกี่ยวแตงกวารับประทานผลสดให้เลือกเก็บขณะที่ผลยังอ่อน เนื้อแน่น กรอบ และก่อนที่เมล็ดภายในผลจะแข็ง สังเกตได้จากมีนวลสีขาวเกาะและยังมีหนามอยู่บ้าง การเลือกเก็บแตงกวารับประทานสดนั้นควรทยอยเก็บเรื่อยๆ อย่าปล่อยให้แตงกวาแก่คาต้น เพราะจะทำให้ผลผลิตโดยรวมลดลง ปกติจะเก็บเกี่ยวผลได้นานประมาณ 1 เดือน (จิรวัดน์, 2551)

### โรคเหี่ยว (Fusarium wilt)

โรคเหี่ยว (Fusarium wilt) เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปทุกแห่ง เป็นโรคที่สำคัญมากโรคหนึ่ง เป็นมากในระยะที่แตงกำลังออกผล ทำให้ต้นเหี่ยวแห้งตายไปก่อนที่จะเก็บผล มีสาเหตุมาเชื้อรา *Fusarium* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชชนิดหนึ่งที่ทำให้พืชเศรษฐกิจเกิดอาการกล้าไหม้ รากเน่า โคน ลำต้น หรือกอเน่าแห้ง ผลเน่า เป็นต้น แต่ความรุนแรงและความเสียหายเนื่องจากเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่ทำให้พืชเกิดอาการเหี่ยว (wilt) นับว่ามีความสำคัญมากที่สุด ทั้งนี้เพราะโรคนี้นักเกิดกับพืชที่เจริญเติบโต ได้ทุกระยะตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว การระบาดของโรคเกิดได้รุนแรง รวดเร็วและกว้างขวางมาก เชื้อรา *Fusarium* spp. สามารถอยู่ได้ทั้งในดิน บนดิน และเศษซากพืช ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะอยู่ในลักษณะของเส้นใยที่พักตัว (dormant hypha) หรือเจริญครอบครอง (colonize) เศษพืช ในรูปของสปอร์พืชที่มีชีวิต หรือโครงสร้าง chlamydospore จากเส้นใย macroconidia หรือ germ tube เนื่องจากเหตุนี้เชื้อนี้จึงมีคุณสมบัติในการเจริญหรือพักตัวอยู่ในดินได้นาน (จิระเดช, 2549)

**ลักษณะอาการของโรค** เชื้อเข้าทำลายต้นแตงได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ในระยะต้นกล้า อาการส่วนใหญ่จะคล้ายกันคือ ต้นกล้าหักพับล้ม และแห้งตายคล้าย damping off ส่วนในต้นโต อาจเกิดอาการชะงักงัน หยุดการเจริญเติบโต เหลือง เหี่ยวเฉาแล้วแห้งตายทั้งต้น โดยเชื้อจะเข้าทำลายส่วนโคน หรือรากแล้วไปเจริญอยู่ภายในท่อน้ำ (xylem) ก่อให้เกิดการอุดตัน ต้นแตงจะค่อยๆ เหี่ยวลงทีละน้อย โดยในตอนแรกจะเหี่ยวเฉพาะกลางวันที่มีอากาศร้อน และจะกลับมาสดอย่างเดิมในเวลากลางคืน อาการจะค่อยๆ ทวีความรุนแรงขึ้น ใบที่เหี่ยวจะเกิดอาการไหม้และแห้งขึ้นที่บริเวณขอบ ต่อมาเนื้อใบที่เหลืองจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้วแห้งจนในที่สุดเมื่อเกิดการเหี่ยวอย่างถาวร พืชก็จะตายทั้งต้นโดยทั้งหมดนี้ใช้เวลาตั้งแต่ 10-20 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมความรุนแรงของเชื้อ และพันธุ์ของพืช เมื่อถอนต้นที่แสดงอาการเหล่านี้ขึ้นมาแล้วผ่าดูจะเห็นเชื้อราเจริญอุดตันอยู่ในท่อ xylem สำหรับต้นที่ตายบางครั้งจะพบแผลสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้นที่บริเวณโคนต้นและราก ในกรณีที่มีความชื้นสูงจะปรากฏเส้นใย และสปอร์หรือโคนิเดียของเชื้อสีชมพูเรื่อๆ ให้เห็นอยู่ทั่วไปตามแผล สำหรับรากอาจถูกทำลายจนเสียหายหมด โดยจะเห็นได้จากเมื่อถอนต้นขึ้นมารากส่วนใหญ่จะขาดหลุดติดอยู่ในดิน (ศักดิ์, 2537)

#### **เชื้อรา *Fusarium* sp.**

เชื้อรา *Fusarium* sp. เป็นสาเหตุโรคของทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และใบเลี้ยงคู่ เชื้อรายังสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ทำให้ต้นกล้าพืชตายตั้งแต่เริ่มงอก หรือทำให้เกิดอาการเน่าที่ระดับดิน หรือเกิดอาการเหี่ยวที่บริเวณส่วนยอดของพืช แต่โดยส่วนมากแล้ว เชื้อราจะทำให้เกิดพืชเกิดอาการเน่าและเหี่ยว เชื้อราสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในดินได้นาน 4-14 ปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินเกษตรกรรม เชื้อจะเข้าทำลายต้นพืชทางระบบรากตั้งแต่ต้นพืชนั้นเริ่มงอก (อมรรัตน์ และ จงรักษ์, 2541)

เมื่อนำเชื้อรา *Fusarium* sp. มาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar จะสร้างเส้นใยละเอียดสีขาว ฟู เมื่อเจริญเต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีครีมหรือเหลืองอ่อน และถ้าสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมอาจสร้าง slime mass สีชมพูเรื่อๆ ในโคโลนี (ศศิธร, 2549)

เชื้อรา *Fusarium* sp. สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศ ซึ่งจัดเป็นพวก perfect stage และแบบไม่อาศัยเพศซึ่งจัดเป็นพวก imperfect stage (Booth, 1971)



Imperfect stage ของเชื้อถูกจัดจำแนกไว้ดังนี้

Division :Eumycota

Subdivision :Deuteromycotina

Class :Hyphomycetes

Order :Tuberculariales

Family :Tuberculariaceae

Perfect stage ของเชื้อถูกจัดจำแนกไว้ดังนี้

Division :Eumycota

Subdivision :Ascomycotina

Class :Euascomycetes

Order :Sphaeriales

Family :Hypocreaceae

เชื้อที่เป็น imperfect stage จะสร้าง asexual spore ที่เรียกว่า conidia ได้ 2 ลักษณะ คือ microconidia และ macroconidia มีหลาย species ที่สามารถสร้าง fruiting body แบบ sporodochia ซึ่งเป็นกลุ่มของเส้นใยที่มารวมตัวกันแน่น มีรูปร่างเป็น cushion shape รอบๆ ที่เกิดของ conidia (conidial mass) พบ sporodochia ทั้งบนแหล่งอาหารตามธรรมชาติ ใน culture เลี้ยงเชื้อทั่วไป ใน culture แรกๆจัดเป็น wild type (Booth, 1971, 1977; Puhalla, 1981) จากการศึกษาของ Booth (1971) พบว่าเชื้อสร้างสปอร์บน phialide ที่มี 2 ลักษณะ คือ monophialide และ polyphialide บน ก้านชูสปอร์ (conidiophore) โดยอาจพบลักษณะแบบกิ่งก้าน (branch) หรือไม่แตกกิ่งก้าน (unbranch) หรือพบทั้ง 2 กรณี และในหลายๆ species อยู่รอดในสภาพแวดล้อมในดินได้โดยสร้าง chlamydospore อาจสร้างระหว่างเซลล์ของเส้นใย (intercalary) หรือที่ปลายเส้นใย (terminal) โดยอาจสร้างเดี่ยว เป็นคู่ เป็นเส้นสาย หรือเป็นกลุ่มผนังหนา อาจมีลักษณะเรียบหรือขรุขระก็ได้ (Puhalla, 1981) ทำหน้าที่เป็นส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราโดยที่สามารถอยู่ข้ามฤดูได้ดี และเข้าทำลายพืชได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ในส่วนของ macroconidia มีรูปร่างโค้งเล็กน้อยคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว มี 3-5 เซลล์ ผนังบาง ค่อนข้างใส ไม่มีสี และ microconidia ลักษณะรูปไข่ มี 1-2 เซลล์ ผนังบาง ค่อนข้างใส ไม่มีสี (ศศิธร, 2549) ในระยะ perfect stage จะสร้าง fruiting body แบบ perithecia ภายในมี ascospore ในถุง ascus และโดยทั่วไปเชื้อจะสร้าง perithecia จำนวนมาก มีสี

สไต ลักษณะ perithecia และ ascospore ภายในจะแตกต่างกันไปบ้างในแต่ละเชื้อ (Booth, 1971; Messiaen and Cassini, 1981; Nelson *et al.*, 1983)

*Fusarium* sp. เป็นเชื้อราที่มีความผันแปรมาก เมื่อมีการ subculture หรือการย้ายเชื้อเป็นครั้งที่สอง หลังจากที่ยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จากดินหรือรากพืช การเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง (rich synthetic media) บนอาหารจำเพาะ เป็นการสร้างสภาวะแวดล้อมใหม่ให้กับเชื้อ เชื้อจึงมีการปรับตัวอย่างรวดเร็ว เพื่อให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ เกิดลักษณะที่ผันแปรไปจากลักษณะเดิม (wild type) (Booth, 1971; Puhalla, 1981) ลักษณะที่เกิดขึ้นใหม่จะแสดงความผิดปกติทางสัณฐานวิทยา เช่น การสร้าง macroconidia หรือ aerial mycelium มากหรือน้อยกว่าปกติหรือไม่สร้าง sporodochia ขึ้น รูปร่างของ conidia ผิดรูปไป การสร้าง pigment เปลี่ยนแปลงไป (Puhalla, 1981) และเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเชื้อ เชื้อลดความรุนแรงลง สร้าง toxin น้อย ทำให้ความสามารถในการเกิดโรคกับพืชลดลง จนไม่สามารถทำให้เกิดโรคกับพืชได้อีก (Nelson *et al.*, 1983) การที่จะหลีกเลี่ยงเกิดความผันแปรของเชื้อไม่ให้เกิดลักษณะผันแปรดังกล่าวนี้อาจทำได้โดยการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) ของ cultures แรกๆ (Toussoun and Nelson, 1975; Nelson *et al.*, 1983) เก็บรักษาเชื้อโดยวิธีที่ไม่ทำให้เชื้อผันแปรได้ง่าย เช่น วิธี lyophilization ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Nelson *et al.*, 1983) เก็บเชื้อไว้ในดิน รักษาอุณหภูมิตู้เย็น (Booth, 1971; Toussoun and Nelson, 1968)

โดยปกติเชื้อรา *Fusarium* sp. มักพบว่ามีชีวิตอยู่ได้ในดิน หรือบนดิน เป็น soil borne fungi เป็นส่วนมาก และแยกได้จากบริเวณรากพืช ในเนื้อเยื่อของพืชที่มีชีวิต เศษชิ้นส่วนพืช หรือบนผิวหน้าของดิน (Booth, 1971; Lim and Chew, 1970; Wearing and Burgess, 1978) ในกรณีที่มีแหล่งอาหาร หรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เชื้อจะคงอยู่ในดินด้วยลักษณะเส้นใยที่พักตัว (dormant hypha) ในเศษชิ้นส่วนพืชโดยการเข้าไปอาศัยอยู่ในพืช (colonized) แบบ parasite หรือ saprophyte หรือสร้าง chlamydospore จากเส้นใย macroconidia หรือจาก germ tube ของ chlamydospore ที่ได้รับการกระตุ้นให้งอกโดยสารที่ขับออกมาจากพืช (plant exudate) (Papavizas *et al.*, 1968; Kraff *et al.*, 1974)

*Fusarium* เป็นกลุ่มของเชื้อราที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั่วโลก ปกติสามารถเข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน และอยู่ใต้ดิน เป็นได้ทั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุโรค และเชื้อที่สามารถเข้าทำลายซ้ำเดิมได้ *Fusarium* บางสปีชีส์สามารถพบได้ทั่วไปในดิน มักพบเข้าทำลายรากพืชอยู่เสมอ ในบางครั้งมีการสรุปอย่างผิดพลาดที่ว่า *Fusarium* sp. เป็นเชื้อราสาเหตุโรค เนื่องจากว่าสามารถแยกได้จากส่วนของราก หัว และลำต้นของพืชที่มีอาการแห้งตาย เชื้อรา *Fusarium* หลายสปีชีส์มีความสามารถในการเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืช ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่แท้จริงได้ และในการเข้าทำลายซ้ำเดิม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับซับสเตรต (substrate) เชื้อรา *Fusarium* ส่วนมากเจริญเติบโตได้เร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่เชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญบางชนิดมีการเจริญเติบโตช้า ดังนั้นจึงมักพบเชื้อรา *Fusarium* ในเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคอยู่เสมอ (Nelson et al., 1983)

Nash and Snyder (1962) ได้ศึกษาวิธีการเก็บตัวอย่างดิน และชนิดของอาหารที่ใช้ในการแยกเชื้อรา *Fusarium* โดยตรงจากตัวอย่างดินที่เก็บมาใหม่ โดยการเทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ก่อน 3-5 วัน เพื่อรอให้ผิวหน้าอาหารแห้งสนิท และเก็บในที่เย็นและมีมืด ก่อนที่จะทำการ spread สารละลายเชื้อจากดินลงบนผิวหน้าอาหารวัน ซึ่งในสภาวะนี้จะช่วยลดการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราอื่นๆ ทำการบ่มเชื้อไว้ 2-3 วัน ภายได้แสงปกติ ต่อมา Papavizas (1964) ทำการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (antimicrobial agent) สำหรับใช้ในการแยกเชื้อรา *Fusarium* จากดิน พบว่าสูตรดัดแปลงของ peptone-PCNB (peptone-pentachloronitrobenzene) มีความเหมาะสมมากที่สุดในการใช้แยกเชื้อรา *Fusarium* จากดิน (Booth, 1971)

การแยกเชื้อรา *Fusarium* สามารถแยกได้โดยตรงจากดิน โดยใช้วิธี dilution plate หรือการวางเศษซากอินทรีย์วัตถุบน selective medium หรืออาจแยกเชื้อจากดินโดยทางอ้อม โดยวิธี root-baiting technique หรือการใช้เหยื่อล่อ (sterile baits) เช่น ชิ้นฟางของพวงกล้วยพืช อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (selective medium) ใช้สำหรับการแยกเชื้อรา *Fusarium* spp. ทั่วไป (Nash and Snyder, 1962) ในการแยกชนิด และปริมาณของเชื้อรา *Fusarium* spp. ในดิน อาศัยการสังเกตสี ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารจำเพาะ (Nash and Snyder, 1962) จะพบลักษณะของโคโลนี และ sporodochia ของเชื้อเด่นชัดขึ้นเมื่อย้ายเชื้อราลงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) บ่มไว้ครบ 7 วันในที่ที่มีแสง (Nash and Snyder, 1962)

การศึกษาชนิดและปริมาณของเชื้อรา *Fusarium* spp. ในดินรวมถึงความหนาแน่นของเชื้อรา (inoculum density) ช่วยในการประเมินความรุนแรงของการทำให้เกิดโรครากับพืชเนื่องจากระดับการเกิดโรคมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความหนาแน่นของเชื้อ ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การตอบสนองของพืช และอิทธิพลสภาพแวดล้อม เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อเพิ่มปริมาณการเจริญเติบโตในการเข้าทำลายพืชจนเกิดการแพร่ระบาดของโรค ทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงขึ้น (Baker, 1965; Baker *et al.*, 1967; Cook, 1968; Rao and Roa, 1963) นอกจากนี้ในการศึกษาความหนาแน่นของเชื้อที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงภายใต้สภาพแวดล้อมต่างๆ ภายในดิน จะทำให้ทราบถึงสภาพนิเวศวิทยาของเชื้อในดิน ทั้งเชื้อสาเหตุ *Fusarium* spp. และเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ในดินที่มีความสัมพันธ์ต่อกัน (Nash and Snyder, 1965; Benson and Baker, 1970)

### วงจรของเชื้อโรค

1. เชื้อโรคอยู่ข้ามฤดู ในรูปของเส้นใยหรือ asexual spore ทั้ง 3 แบบ คือ microconidia macroconidia และ chlamydospore โดยอาศัยอยู่ในดิน
2. primary infection spore ของเชื้อรา จะเกิดโดยการงอกเป็น germ tube หรือ mycelium แล้วเข้าสู่พืชทางรากขนอ่อนโดยตรง หรือเข้าทางบาดแผล หรือทางรอยแตกที่เกิดจากรากแขนง เมื่อเชื้อเข้าไปในลำต้นแล้ว จะเจริญและพัฒนาอยู่ในระบบท่อน้ำและท่ออาหารของพืช ซึ่งจากการเจริญของเชื้อดังกล่าวกีดขวางการเคลื่อนย้ายของน้ำ ทำให้น้ำที่พืชดูดขึ้นมาไม่สามารถเคลื่อนที่สู่ส่วนบนได้ พืชจึงเกิดอาการเหี่ยว
3. secondary infection เกิดจาก conidia ชนิด microconidia และ macroconidia ซึ่งงอกเป็น germ tube แล้วเข้าทำลายพืชตลอดฤดูปลูก โดยติดไปกับน้ำ ลม เครื่องมือ ที่ใช้ในทางเกษตรกรรม (ชวาลา, 2531)



กลไกที่ก่อให้เกิดพิษแสดงอาการเหี่ยว : การที่พืชแสดงอาการเหี่ยวก็เนื่องมาจากสาเหตุดังต่อไปนี้ (ชวาลา, 2531)

1. เชื้อราสร้างสารพิษ (toxin) ได้แก่ Fusaric acid, dehydrofusaric acid และ lyconmarasmin สารเหล่านี้ทำให้ความสามารถในการดูดซึมน้ำของ cell membrane หรือ cell wall ของ xylem parenchyma เปลี่ยนแปลงไป
2. เกิดการอุดตัน (plugging) ในระบบทางเดินของน้ำ เนื่องจาก
  - ก. มีเส้นใย และสปอร์ของเชื้อราอุดตันใน vessels
  - ข. มีสารละลายพวก cellulose และ pectin ของเซลล์บริเวณข้างเคียง vessels ถูกทำลายโดยน้ำย่อยของเชื้อราแล้วเข้าไปอุดตันอยู่ภายใน vessels
  - ค. เซลล์ของ ray parenchyma สร้างเป็นติ่งเข้าไป (out growth) ใน xylem เรียกลักษณะนี้ว่า Tyloses
3. เชื้อราสร้างน้ำย่อยชนิด pectolytic และ cellulolytic มีผลทำให้
  - ก. เยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของ vessels อ่อนแอ เกิดการยุบตัวเสียรูปทรง และลดขนาดลงกว่าเดิม
  - ข. เซลล์บริเวณข้างเคียง vessels ถูกทำลาย
4. เชื้อราสร้าง auxin ( Indole-3-acetic acid หรือ AA ) ขึ้นมาจำนวนมากเกินทำให้
  - ก. ผนังของ vessels บางและเสียรูปทรง
  - ข. xylem parenchyma มีการแบ่งตัวมาก เป็นผลทำให้ผนังเซลล์ไม่แข็งแรง และแตกยุบง่าย



## การแพร่ระบาดของเชื้อ

การแพร่ระบาดสามารถเกิดจากสปอร์ และเส้นใย ติดไปกับน้ำ ลม ดิน ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยพืชสดที่ได้จากพืชเป็นโรค หรือติดปะปนไปกับเมล็ด หรือส่วนที่ใช้ทำพันธุ์ต่างๆ และสามารถแพร่ระบาดติดไปกับปีก-ขาของแมลง เครื่องมือที่ใช้ในการเกษตร การเคลื่อนย้ายดินจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง หรือติดไปกับต้นกล้า เมื่อพืชตายลงเชื้อสาเหตุยังคงมีชีวิตอยู่ได้ในดินนานหลายปีในรูปของ chlamydospore ได้ด้วย (ศักดิ์, 2537; ศศิธร, 2549)

## สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค

เชื้อรา *Fusarium* sp. ก่อนข้างไวต่อระดับหรือการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมาก โดยตามธรรมชาติเชื้อเข้าทำลายพืชได้ดี และรุนแรงที่อุณหภูมิของดินช่วงระหว่าง 24-30 องศาเซลเซียส และจะไม่เกิดขึ้นถ้าอุณหภูมิของดินต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส หรือมีอุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในความชื้นของดินเท่าที่ต้นแดงต้องการ ชอบความชื้นของดินที่พอเหมาะ แต่ไม่ชอบดินแฉะหรือมีความชื้นสูง (ศักดิ์, 2537) เนื่องจากพืชมีการคายน้ำดีทำให้การแพร่กระจายของเชื้อโรคในดินพืชเกิดได้ดี เชื้อโรคสามารถเจริญบนแหล่งอาหารที่มี osmotic potential ต่ำถึง -100 ถึง -120 bars จึงทำให้เจริญเติบโตได้ดีในเศษซากพืชที่ตายไปแล้ว นอกจากนี้สภาพแวดล้อมของดินที่เป็นกรด ทำให้พืชเป็นโรคมก โดยชนิดของดินที่เป็นดินทรายเหมาะสมต่อการเกิดโรคมกกว่าดินเหนียว (Cook and Baker, 1983) การปฏิบัติทางการเกษตรที่มีการใช้ปุ๋ยเคมีมากๆ ทำให้เกิดการสูญเสียอินทรีย์วัตถุในดิน ซึ่งเพิ่มความเป็นกรดให้แก่ดิน ตลอดจนมีการสะสมสารพิษต่างๆ ในดินเกษตรกรรมมากขึ้น เป็นการสร้างสภาพให้เหมาะสมต่อการพัฒนาของเชื้อโรคพืชในดิน (Browning, 1983)

## การควบคุมโรคและเชื้อราสาเหตุของโรค

เนื่องจาก *Fusarium* sp. เป็น soil borne สามารถเจริญอยู่ในดินได้โดยไม่จำเป็นต้องอาศัยพืช หรือ host ที่มีชีวิตได้เป็นเวลานาน สปอร์หรือโคนิเดียก็ยังคงทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี ทำให้ยากต่อการควบคุม ป้องกัน และกำจัดให้หมดไป ไม่ว่าจะใช้สารเคมี หรือวิธีการอื่นใด ซึ่งการที่จะทำได้ผลจริงๆ มีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ไม่คุ้ม ค่าแนะนำในการลดความเสียหายที่เกิดจากโรคนี้ได้แก่ (ศักดิ์, 2537)

1. เลือกใช้เมล็ดพันธุ์ที่สะอาด ปราศจากเชื้อปะปนอยู่ แห่หรือคลุกเมล็ดด้วยสารเคมีก่อนปลูก

2. หมั่นเอาใส่ใจ ดูแลบำรุงรักษาพืชที่ปลูกให้แข็งแรงอยู่เสมอ อย่าให้ขาดน้ำ หรือขาดอาหารที่จำเป็น เพื่อเป็นการป้องกันการเกิดโรค

3. เลือกใช้พันธุ์ที่มีความต้านทาน

อีกวิธีการหนึ่งที่เหมาะสม และสามารถที่ช่วยในการควบคุมโรคได้ คือ การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

### การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณประชากรของเชื้อโรคพืช หรือลดกิจกรรมของเชื้อโรคอื่นจะก่อให้เกิดโรคน้อยในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืช โดยอาศัยสิ่งมีชีวิต (organism) ซึ่งรวมทั้งพืชชั้นสูง และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ตลอดจนพันธุกรรมหรือผลิตภัณฑ์จากพันธุกรรม (genes or gene products) แต่ยกเว้นผลจากการกระทำต่อเชื้อโรคโดยตรงจากมนุษย์ (จิระเดช และ วรณวิไล, 2542)

#### 1. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช

เชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราจำพวกซาโปรไฟต์ (saprophyte) ที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืช ซากสัตว์ และแหล่งอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไปในดินทุกแห่ง สามารถแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย เจริญได้รวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อราหลายชนิด สร้างเส้นใยสีขาวและผลิตโคนิเดีย (conidia) หรือสปอร์ (spore) มากมายรวมเป็นกลุ่มเห็นเป็นสีเขียว เชื้อรา *Trichoderma* เป็นปฏิปักษ์หรือศัตรูต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยวิธีการเป็นปรสิต (mycoparasite) ด้วยการพันรัดหรือแทงเข้าสู่ภายในเส้นใยเชื้อโรค แข่งขันการใช้อาหารกับเชื้อโรค (competition) สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) สารพิษ (toxin) น้ำย่อย (enzyme) และนอกจากนี้ยังพบว่าสามารถช่วยชักนำให้ต้นพืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรคพืชได้ (จิระเดช, 2549)

## 1.1 การเป็นปรสิต (parasitism)

การเป็นปรสิต (parasitism) เป็นกลไกในการควบคุมโรคพืช โดยการพันรัดหรือแทงเข้าสู่ภายในเส้นใยเชื้อโรค เชื้อราสาเหตุโรคพืชที่พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* เข้าทำลายโดยวิธีการเป็นปรสิตได้แก่ *Rhizoctonia* *Sclerotium* *Helminthosporium* *Fusarium* *Verticillium* *Pythium* *Phytophthora* *Colletotrichum* *Rhizopus* *Endothia* *Venturia* *Diaporthe* และ *Fusicladium* (จิระเดช, 2549) ในรายงานของ Weindlind (1932) ได้แสดงให้เห็นถึงการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* เข้าไปใกล้เส้นใยของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* แล้วเจริญพันรัดเส้นใย สัมผัสแนบชิด และเจริญเข้าสู่ภายในเส้นใยของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ทำให้เส้นใยสูญเสียความมีชีวิต ในปี 2540 แสงมณี และคณะ ได้รายงานว่า เชื้อรา *T. harzianum* สามารถสร้างเส้นใยพันเป็นวงรัดรอบเส้นของเชื้อรา *Phytophthora* spp. และเจริญแทงเข้าสู่ภายในเส้นใย ทำให้เกิดลักษณะว่างเปล่าภายในเส้นใย พันธ์เส้นใยถูกย่อยสลาย นอกจากเชื้อรา *Trichoderma* จะเข้าทำลายเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้แล้ว ยังสามารถเข้าทำลายไรโซมอร์ฟ (rhizomorph) และเม็ดสเคลอโรเทียม (sclerotium) ได้อีกด้วย (จิระเดช, 2549)

## 1.2 การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis)

การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นภาวะที่เชื้อรา *Trichoderma* ผลิตสารเคมีปลดปล่อยออกมาสู่สภาพแวดล้อม สารเคมีดังกล่าวอาจเป็นปฏิชีวนสาร (antibiotic) และสารจำพวกเอนไซม์ (extracellular enzymes) ซึ่งมีผลในการยับยั้ง และทำลายเชื้อสาเหตุโรค นอกจากนี้แล้วเชื้อรา *Trichoderma* บางชนิด หรือบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารประกอบที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วย (จิระเดช, 2549)

ในปี 1971 Dennis and Webster ได้รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma* สามารถผลิตสารอะเซตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ซึ่งเป็นปฏิชีวนสารที่ระเหยได้ (Volatile antibiotic) ในระยะต่อมามีการศึกษาปฏิชีวนสารที่เชื้อรา *Trichoderma* สร้างขึ้นได้อีกมากมาย ตัวอย่างเช่น สารไตรโคลิน (Tricholin) ที่ผลิตโดยเชื้อรา *T. viride* มีผลยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (Lin et al., 1994) สารไตรโคซิเนียนีนส์ (Trichozinianines) ที่ผลิตโดยเชื้อรา *T. harzianum* มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Sclerotium rolfii* (Correa, 1995)

การยับยั้งเชื้อโรคพืชด้วยเอนไซม์เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นๆ รวมทั้งเชื้อโรคพืชในการใช้อาหาร ตลอดจนช่วยในการเข้าทำลายเชื้อโรคพืชด้วยเอนไซม์ไลติก (lytic enzymes) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์โปรตีโอไลติก (proteolytic enzymes) ที่มีบทบาทในการทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อรา *S. rolfii* ที่ระดับ pH เป็นกลาง (Rodriguez-Kabana, 1969; Rodriguez-Kabana *et al.*, 1968, 1978) เอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydrolytic extracellular enzymes) สามารถช่วยให้เกิดการย่อยผนังเส้นใยของเชื้อโรคจนเป็นช่อง ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* เจริญเข้าไปได้ (Geremia *et al.*, 1991) เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) กลูคาเนส (glucanase) และเซลลูเลส (cellulases) เป็นเอนไซม์ที่ถูกผลิตขึ้นมาตรงบริเวณที่เชื้อรา *Trichoderma* เกาะติดหรือพักรออยู่บนเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfii*, *Pythium aphanidermatum* และ *R. solani* (Eladet *et al.*, 1983; Intana *et al.*, 2003)

### 1.3 การแข่งขัน (competition)

เป็นการแข่งขันการใช้อาหาร และการครอบครองพื้นที่ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อสาเหตุโรค เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างเส้นใยได้อย่างรวดเร็ว และสร้างสปอร์ได้ในปริมาณสูง โดยอาศัยอาหารจากเศษวัสดุต่างๆ จึงช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรค และจุลินทรีย์ต่างๆ ที่อยู่บริเวณเดียวกันได้ ตัวอย่างเช่น กรณีของเชื้อรา *T. koningii* สามารถเจริญครอบครองรากหอม และทำลายเชื้อสาเหตุโรค *Sclerotium cepivorum* ได้ (Danielson and Davey, 1973; Howell, 2003) และ Sivan and Chet (1989) ก็ได้แสดงให้เห็นว่าเมล็ดพันธุ์พืชที่คลุกด้วยเชื้อรา *Trichoderma* (*T. harzianum*) แล้วปลูกในดินที่มีความชื้นสม่ำเสมอช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* ในบริเวณรอบๆ ราก (rhizosphere) มีปริมาณสูงขึ้นมา ในขณะที่ปริมาณเชื้อรา *Fusarium* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเหี่ยวมีปริมาณลดลง

### 1.4 การชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค (induction of resistance in plant)

มีการศึกษาวิจัยถึงความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* หรือผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *Trichoderma* ต่อการชักนำให้พืชต้านทานโรคได้ โดยในปี 2003 Intana ได้รายงานถึงผลิตภัณฑ์ (culture filtrate) ของเชื้อรา *Trichoderma* ที่สามารถกระตุ้นให้ต้นแตงกวาด้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช (*Pythium irregular*) ได้ Bigirimana *et al.* (1997) แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-39 ลงไปในดินสามารถช่วยชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคบนใบของต้นถั่วที่เกิด



จาก *Botrytis cinerea* และเชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* ได้ ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* นั้นสามารถชักนำความต้านทานให้พืชได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และใบเลี้ยงคู่ (Harman *et al.*, 2004)

ตัวอย่างการศึกษาที่มีการนำเชื้อรา *Trichoderma* ใช้ในการควบคุมโรคพืช เช่น การศึกษาของ Locke *et al.* (1985) เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของเบญจมาศในเรือนทดลอง ใช้เชื้อจำนวน 4 isolates จากเชื้อ 22 isolates ที่แยกได้จากดิน ทั้งแบบเดี่ยวหรือหลายชนิดร่วมกัน หลังจากการปลูกพืชที่อ่อนแอต่อการเกิดโรคลงในดินที่มีเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* และเชื้อ antagonists ชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อรา *Trichoderma viride* (T-1) และ (T-1-R9) เป็น strain ที่ต้านทานต่อสารควบคุมเชื้อรา benomyl เมื่อใช้แบบเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับ *Aspergillus* sp. จะสามารถช่วยลดการเกิดโรคได้อย่างน้อยที่สุดร้อยละ 50

## 2. การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างแพร่หลาย เนื่องจากว่าเชื้อแบคทีเรียมีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค 4 ลักษณะ (นิพนธ์, 2546) ดังนี้

### 2.1 การแข่งขันกับเชื้อโรค (Competition)

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศและการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญ หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้แข็งแรง มีผลผลิตที่สูงขึ้น สำหรับการแข่งขันที่พบมากคือ การที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถนำธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเจริญได้ดีกว่าเชื้อโรค ทำให้เชื้อโรคขาดสารอาหาร ไม่สามารถเจริญเข้าทำลายพืชได้ เช่น การที่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* ผลิตสาร siderophore ที่ช่วยในการยึดจับธาตุเหล็ก (Iron,  $Fe^{+3}$ ) จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* สามารถใช้ธาตุเหล็กได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* สาเหตุโรค Take-all ของข้าวสาลี ทำให้เชื้อราไม่สามารถเข้าทำลายรากของข้าวสาลีได้ ส่งผลให้ข้าวสาลีเจริญเติบโต และมีผลผลิตดีขึ้น ซึ่งนิยมเรียกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีลักษณะนี้ว่า แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) โดยแบคทีเรียมักชอบอาศัยอยู่ในดินบริเวณผิวราก (rhizoplane) หรือบริเวณรอบราก (rhizosphere) (Schipper *et al.*, 1987)



## 2.2 การผลิตสารปฏิชีวนะ (Antibiosis)

เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะเป็นจุลินทรีย์ที่พบว่ามีสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะได้หลากหลายมากที่สุด เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ได้รับความสนใจคัดเลือกลำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยวิธีนั้น จะเน้นคุณสมบัติการเข้าทำลายชีวิตของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่ และนับว่าเป็นกลไกชนิดแรกที่น่าสนใจ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะนี้สามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่นำมาผลิตใช้เป็นยารักษาโรคกับมนุษย์ สัตว์ และพืชมากมายในปัจจุบัน นอกจากนี้กลไกนี้ยังเป็นกลไกแรกที่ประสบความสำเร็จในการควบคุมโรคพืชโดยวิธี นั้นคือการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 ซึ่งผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรค crown gall ของพืชช่วยป้องกันการเกิดโรคกับพืชได้ (Thomson, 1987; Penyalver et al., 2000) หรือในกรณีที่ใช้เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ 2-79 ที่ผลิตสารปฏิชีวนะ phenazine-1-carboxylate ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดโรค Take-all ของข้าวสาลีได้ถึง 50-90 เปอร์เซ็นต์ (Cook, 1993)

## 2.3 การเป็นปรสิต (Parasitism)

เชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) สามารถเข้าไปเจริญ ทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบไม่มากนักในปัจจุบัน และการใช้เพื่อควบคุมโรคพืชยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนกลไกการผลิตสารปฏิชีวนะ แต่มีรายงานการเป็นปรสิตของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia urediniolytica* ที่เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิม (rust) เชื้อแบคทีเรีย *Bdellovibrio bacteriovorus* ที่เป็นปรสิตของเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. *Glycinne* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วเหลือง หรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* (Syn. *B. penetrans*) ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม (Cook and Baker, 1983) เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ยังไม่ได้ได้รับความสนใจศึกษาปรับปรุงให้เกิดประโยชน์อย่างจริงจัง จึงนับว่าเป็นส่วนหนึ่งที่น่าสนใจศึกษาพัฒนานำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชต่อไป

## 2.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค

การชักนำให้เกิดความต้านทานโรคเป็นกลไกที่กำลังได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อรา หรือแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นเชื้อสาเหตุโรค เมื่อนำมาทำให้สูญเสียความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแล้ว สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ในยีนเดียวกันของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพวงแดง (cucurbit) จะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เจริญอยู่ในพืช และช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิม (wild type) ได้ หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรง (avirulent) สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine แล้วปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (Arwiyanto *et al.*, 1994)

การใช้แบคทีเรียเพื่อควบคุมโรคพืชเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งของการควบคุมโรคพืช โดยวิธีที่มีการนำมาใช้อย่างสนใจและกว้างขวาง ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการนำแบคทีเรียมาใช้ในการควบคุมโรคพืช เช่น มีการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* จากผิวน้ำของดินแดงที่เจริญเติบโตในเรือนปลูกพืชทดลองและแปลงปลูกพืช แยกเชื้อ *Bacillus* ได้ทั้งหมด 400 ตัวอย่าง และคัดเลือกโดยใช้ modified gnotobiotic system พบว่าในสายพันธุ์ B068150 แสดงให้เห็นว่ามีศักยภาพสูงในการควบคุมโรคเหี่ยว โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ถึง 50.68% ในระยะต้นกล้าในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง (Lihua *et al.*, 2012) และมีการแยกเชื้อ *Bacillus* จากแปลงปลูกแตงกวาในประเทศจีน พบ *B. subtilis* SQR-5 และ *B. subtilis* B579 มีประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมโรคเหี่ยวของแตงกวาได้ (Zhang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010)

จากการบันทึกผลการทดลองของ Kijima *et al.* (1988) ที่ใช้แบคทีเรีย *Pseudomonas gladioli* M-2196 ผสมกับดินปลูกที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศทั้งในสภาพกระถางและแปลงปลูก พบว่ามะเขือเทศมีอาการเหี่ยวลดลง 37.0-67.8 เปอร์เซ็นต์ และ 75-100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้เชื้อ *Pseudomonas* spp. ยังสามารถยับยั้งการงอกของ chlamydospore ของเชื้อรา *F. oxysporum* formae specialis ต่างๆ โดย fluorescent pseudomonas สร้าง siderophore ยึดจับกับธาตุเหล็กให้อยู่ในสภาพที่ chlamydospore ของเชื้อรา *F. oxysporum* ไม่สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ประโยชน์ในการงอกและการเจริญเติบโตได้ (Elad and Baker, 1985) เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescent* สายพันธุ์ GL20 ที่แยกได้จากดินบริเวณเขตอิทธิพลรอบราก (rhizosphere soil) ของโสม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นโสมได้ เชื้อ

แบคทีเรียสร้างสาร hydroxamate siderophore ในอาหารที่ขาดธาตุเหล็ก ซึ่งยับยั้งการงอกของสปอร์ และการยืดยาวของ germ tube ของเชื้อรา *Fusarium solani* การทดสอบในพืชที่ปลูกในกระถาง พบว่าสายพันธุ์ GL20 ช่วยลดระดับการเกิดโรคของถั่ว (kidney bean) ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *F. solani* ได้ถึง 68 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มการเจริญเติบโตของพืชได้ถึง 1.6 เท่า (Lim and Kim, 1977) De Boer *et al.* (2003) มีรายงานว่าเมื่อใช้สายพันธุ์ WCS358 ของเชื้อแบคทีเรีย *P. putida* ซึ่งสามารถผลิตสาร pseudobactin siderophore ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *P. putida* สายพันธุ์ RE8 ซึ่งสามารถชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *Raphani* พบว่าสามารถยับยั้งโรคเหี่ยวได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

มีการทดสอบของ Bochow (1988) และ Tahvonen (1988) พบว่าบาง strain ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Streptomyces griseovirides* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* ของคาร์เนชั่นและเขอบีราในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองได้ โดยกิจกรรมของแบคทีเรียไปยับยั้งการเกิดโรค และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเพิ่มขึ้น เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ทำให้เส้นใยของเชื้อรา *Fusarium udum* ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวของถั่ว pigeonpea เกิดการเหี่ยวสลาย (lysis) พร้อมกับสร้างสารปฏิชีวนะต่อต้านเชื้อโรคด้วย ส่งผลให้การเกิดโรคเหี่ยวลดลง (Singh and Singh, 1981)

### 3. การควบคุมโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมในดินยับยั้งเชื้อโรค

ดินยับยั้งเชื้อโรค (pathogen suppressive soil) หมายถึง ดินปลูกพืชที่ยังคงมีเชื้อโรคเจริญอยู่ แต่ก็ยังเกิดโรคในระดับต่ำ แม้ว่าพืชที่ปลูกจะอ่อนแอ และสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการพัฒนาของโรค ดินที่ยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* spp. เรียกว่า *Fusarium* suppressive soil ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดการยับยั้งโรค คือเชื้อรา *Fusarium* ที่ไม่ใช่สาเหตุโรคพืช (non-pathogen *Fusarium* spp.) เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อโรค โดยเชื้อรา *Fusarium* ที่ไม่ใช่เชื้อโรคนี้สามารถแยกได้จากดินยับยั้งโรค เมื่อนำไปใส่ลงในดินที่มีเชื้อโรคพบว่า ลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวลงได้ (จิระเดช, 2549) ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *F. oxysporum* ที่แยกได้จากดินในรัฐแคลิฟอร์เนีย เมื่อใส่ลงในดินที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *apii* สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวของขึ้นฉ่ายได้ (Schneider, 1984) และเชื้อรา *F. oxysporum* จากดินร่วนปนทรายในบริเวณ Salinas Valley สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมของพืชชนิดต่างๆ ได้ (Paulitz *et al.*, 1987) ส่วนจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นๆ ที่พบว่ามียับยั้งโรคเหี่ยวได้ ประกอบไปด้วย เชื้อแบคทีเรีย *Arthobacter* *Clostridium* *Bacillus* และเชื้อรา *Trichoderma* ซึ่งการใส่เชื้อดังกล่าวลงในดินที่ชักนำให้เกิดโรค แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งโรคได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Kloepper *et al.* (1980) ที่ได้กล่าวถึงบทบาทของเชื้อ

แบคทีเรีย *Fluorescent Pseudomonas* หรือสาร siderophore ซึ่งเป็นสารที่เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวสร้างขึ้นมา สามารถเปลี่ยนสภาพดินที่ชักนำให้เกิดโรคกลายเป็นดินยับยั้งโรคได้

#### 4. การควบคุมโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมโดยการสร้างภูมิคุ้มกัน

การสร้างภูมิคุ้มกันหรือที่เรียกว่า cross-protection นับเป็นวิธีควบคุมโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง (Baker *et al.*, 1987) วิธีการสร้างภูมิคุ้มกันให้กับยอดมันเทศโดยใช้เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogen *F. oxysporum*) เพื่อป้องกันโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* (Ogawa and Komada, 1985) โดยเพียงแค่ตัดยอดมันเทศ เอาด้านที่มีรอยตัดจุ่มลงไปในสปอร์หรือ bud-cell ของเชื้อรา *Fusarium* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งเตรียมไว้ในรูปสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ต่อจากนั้นจึงนำยอดมันเทศดังกล่าวไปปลูกในดิน พบว่าผลที่ได้มีค่าเท่าเทียมกับการจุ่มยอดมันเทศในสารเคมีเบนโนมิล นอกจากการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคในดินแล้ว วิธีการนี้ยังสามารถควบคุมการถ่ายทอดของเชื้อโรคผ่านทางหัวที่มีเชื้อโรคอยู่ด้วย ซึ่งการป้องกันจะประสบความสำเร็จต่อเมื่อมีการใช้เชื้อรา *Fusarium* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค และยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น

#### 5. การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* โดยการปลูกพืชแบบผสมผสาน

ในประเทศญี่ปุ่นนิยมใช้ ต้นน้ำเต้า (bottle gourd, *Lagenaria siceraria*) เป็นต้นตอของพืชตระกูลแตงซึ่งต้านทานโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมได้ โดยปกติแล้วต้นน้ำเต้ามักปลูกผสมปะปนไปกับต้นหอม Welsh onion (Japanese leer, *Allium fistulosum*) การปลูกลักษณะนี้แทบไม่พบการเกิดโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมซึ่งเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *lagenariae* ซึ่งภายหลังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas gladioli* ที่เจริญอยู่บนรากของต้นหอมมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งโรค (Arie *et al.*, 1987) แต่เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดโรคกับหัวของ Welsh onion จึงต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม จนในที่สุดก็พบเชื้อ *P. gladioli* สายพันธุ์ M-2196 จากเชื้อทั้งหมดกว่า 300 สายพันธุ์ที่สามารถที่เจริญเพิ่มปริมาณได้คืบรากของ Welsh onion และหอมอื่นๆ อีกหลายชนิด โดยไม่ก่อให้เกิดโรค และเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อ *F. oxysporum* 3 species, 24 formae specialis และเชื้อรา *F. solani* 3 formae speciales โดยได้มีการทดลองการขุดรากของ Welsh onion และ Chinese chive (*Allium tuberosum*) ในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย *P. gladioli* สายพันธุ์ M-2196 นาน 5 นาที ก่อนปลูกร่วมกับกล้าของน้ำเต้า พบว่าควบคุมโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งการทดลองในกระถางและสภาพไร่ และมีการทดลองที่กระทำแบบเดียวกันนี้สามารถควบคุมโรคราก



เน่าและลำต้นเน่าของมะเขือเทศได้ โดยสรุป กลไกของการควบคุมโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมโดยชีววิธี ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *P. gladioli* สายพันธุ์ M-2196 นี้ คือการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนรากของ Welsh onion หรือ Chinese chive แล้วผลิตสารปฏิชีวนะหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดซึมเข้าสู่ดิน รอบๆ รากไปยับยั้ง หรือทำลายเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยว ทำให้หมดความสามารถที่จะเข้าทำลายรากน้ำเต้า หรือมะเขือเทศที่ปลูกอยู่ร่วมกันได้





## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวจากต้นแตงกวา และการพิสูจน์โรค

#### 1.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวจากต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรค

แยกเชื้อราสาเหตุโรคจากต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวด้วยวิธี tissue transplanting technique โดยการตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อบริเวณรากจากต้นเป็นโรคเชื่อมต่อกับส่วนที่ไม่เป็นโรคเป็นชิ้นขนาดประมาณ  $0.5 \times 0.5$  เซนติเมตร แช่ชิ้นส่วนใน 0.525% sodium hypochlorite เป็นเวลานาน 3-5 นาที เพื่อกำจัดเชื้อบริเวณพื้นผิว นำไปล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งผืนจากนั้นนำชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin จำนวน 4 ช้อนต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน แยกเชื้อราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชย้ายมาไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเปรียบเทียบกับคู่มือของ Toussoun and Nelson (1968) แล้วนำเชื้อเก็บไว้เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 1.2 การพิสูจน์โรคของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวตามวิธีของ Koch (Koch's postulation)

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวที่แยกได้จากข้อ 1.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน จนเส้นใยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เตรียมสปอร์แขวนลอยด้วยการเทน้ำนิ่งฆ่าเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตร ใช้เข็มเจาะดูดสปอร์และเส้นใยของเชื้อรามารดลงบนเมล็ดของแตงกวาบนกระดาษทิชชูหนึ่งผืนฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจสอบการเกิดโรค และแยกเชื้อราสาเหตุโรคซ้ำอีกครั้ง ตามกฎการพิสูจน์โรคของ (Koch's postulation)

หลังจากทดสอบการเกิดโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว นำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกบริสุทธิ์บนอาหาร PDA มาเลี้ยงบนปลายข้าวสุกตามวิธีการของจิระเดช และวรรณวิไล (2545) เช่นเดียวกันกับวิธีการเตรียมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด โดยตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำไปใส่ในปลายข้าวสุก เมื่อเห็นเส้นใย และสปอร์เจริญคลุมปลายข้าวสุกแล้ว จึงนำไปผสมกับดินที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำมาปลูกเมล็ดแตงกวาในกระถาง ตรวจสอบลักษณะการเกิดโรคของต้นแตงกวาเมื่อมีอายุถึง 14 วัน และแยกเชื้อราสาเหตุโรคซ้ำอีกครั้ง

## 2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์

### 2.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินของแตงกวา

เก็บดินในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม จากแปลงที่ไม่ใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและไม่ปรากฏอาการของโรค โดยเก็บดินรอบรากของแตงกวามาแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ด้วยวิธีการ surface soil dilution plate (SSDP) บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ nutrient glucose agar (NGA) King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH) เตรียมตัวอย่างดิน โดยนำดินมาผึ่งให้แห้ง บดและร่อนผ่านตะแกรงให้ละเอียด ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ flask ที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที เพื่อให้จุลินทรีย์หลุดออกจากดิน เจือจางดิน (Serial dilution) ก่อนใช้ pipette ดูดดินแขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ย้ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยใช้ loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยว แล้วนำไป streak บนอาหาร NGA แล้วย้ายลงในหลอดอาหารเอียง (slant) NGA slant เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

### 2.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบของแตงกวา

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบด้วยการนำใบแตงกวามาล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ บดใบในโถงให้ละเอียด 1 กรัม ต่อน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ทำให้เจือจาง ดูดสารแขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร ไปหยดและเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารได้แก่ อาหาร nutrient glucose agar (NGA) King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH) บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว หรือเชื้อบริสุทธิ์ ย้ายลงในหลอดอาหารเอียง (slant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

แยกเชื้อจุลินทรีย์จากใบด้วยวิธีการล้างใบ โดยการตัดใบแตงกวาให้เป็นชิ้นเล็กๆ 1 กรัม แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้ผิวพืชสัมผัสกับน้ำ ทำให้เจือจาง ดูดสารแขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร ไปหยดและเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารได้แก่ อาหาร nutrient glucose agar (NGA) King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH) บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว หรือเชื้อบริสุทธิ์ ย้ายลงในหลอดอาหารเอียง (slant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

### 3. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระดับห้องปฏิบัติการ

#### ทดสอบด้วยวิธี dual culture technique

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวบนอาหาร PDA ก่อนตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำไปวางไว้ที่จุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จึงปลูกเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยใช้เข็มเจาะและเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทดสอบอายุ 48 ชั่วโมง มาแตะบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคไว้แล้ว 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาท และให้แต่ละจุดห่างจากเชื้อราสาเหตุโรค 3 เซนติเมตร บันทึกผลการทดลอง โดยวัดรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคที่ออกมาจากจุดศูนย์กลางทุกวันเป็นเวลา 7 วัน คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) หรือวัดความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (clear zone)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรค} = (R_1 - R_2 / R_1) \times 100$$

$R_1$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

$R_2$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

### 4. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดสอบ

#### 4.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปแบบเซลล์แขวนลอย เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ใช้ loop นำเชื้อด้วยเปลวไฟ และเชื่อบนอาหาร ใส่งลงในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้ vortex mixture นำเซลล์แขวนลอยมาปรับปริมาณเชื้อให้มีความเข้มข้น  $10^8$  หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง

spectrophotometer วัดค่าความทึบแสง optical density (OD) ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (นิชากร, 2553)

#### 4.2 การเตรียมเชื้อราปฏิปักษ์

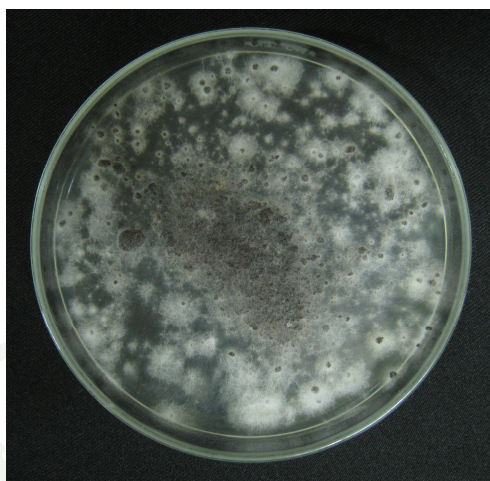
เตรียมเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ชนิดสด สายพันธุ์ CB-Pin-01 ตามวิธีของ จิระเดช และ วรณวิไล (2545) จนเห็นสปอร์สีเขียวของเชื้อรา *T. harzianum* นำปลายข้าวที่มีสปอร์สีเขียวดังกล่าว ผสมน้ำแล้วกรองเอาแต่น้ำสปอร์แขวนลอยในอัตรา เชื้อสด 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 200 ลิตร แล้วนำไปแช่เมล็ดแตงกวา

#### 4.3 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมดินผสมที่มีส่วนประกอบของ ดินขุยไผ่ และทรายละเอียด ในอัตราส่วน 6:5 โดยน้ำหนัก ผสมส่วนของดินแตงกวาและเมล็ดแตงกวาที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ อัตราส่วนอย่างละ 0.5 กรัม รวม 1 กรัมต่อดินผสม 100 กรัม คลุกเคล้าจนทั่ว บรรจุลงขวดแก้วประมาณครึ่งของปริมาตรในขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเจาะขึ้นรู้น PDA ที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จำนวน 1-2 ชิ้น ฝังลงในขวดดินผสมที่ได้เตรียมไว้ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อยเป็นเวลา 30 วัน จึงนำมาใช้ได้เพื่อเป็นดินที่มีเชื้อโรคที่จะเก็บไว้ทดสอบต่อไป ทดสอบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆในดินผสม โดยการโรยดินลงบนอาหาร PDA ซึ่งพบดินผสมที่ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น (ภาพที่ 1) โดยถือว่าเป็นดินมีเชื้อโรคที่จะเก็บไว้ทดสอบต่อไป (กิตติศักดิ์, 2549)

นำดินผสมที่มีเชื้อโรคเจริญอยู่มาเลี้ยงบนปลายข้าวสุกตามวิธีการของ จิระเดช และ วรณวิไล (2545) เช่นเดียวกันกับวิธีการเตรียมเชื้อรา *T. harzianum* ชนิดสด (ข้อ 4.2) จนเห็นเส้นใยและสปอร์เจริญคลุมปลายข้าวสุก จึงนำเชื้อราที่เจริญบนปลายข้าวไปผสมกับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยนำปลายข้าวสุกที่มีเชื้อเจริญดังกล่าวผสมดินนึ่งฆ่าเชื้อ อัตราปลายข้าวสุกที่มีเชื้อโรค 10 กรัมต่อดิน 1 กิโลกรัม ก่อนนำไปใช้ทดสอบต่อไป





ภาพที่ 1 ดินที่มีเชื้อโรค นำทดสอบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆในดิน โดยการโรยดินลงบนอาหาร PDA ไม่พบการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น

##### 5. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในระดับห้องปฏิบัติการ (ข้อ 3) ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง เปรียบเทียบกรรมวิธีควบคุม (control) กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม เตรียมเมล็ดแตงกวาพันธุ์ผสมเปิดทั่วไปของบริษัทฉางเซ่งพันธุ์พืช จำกัด ที่ไม่ได้คลุกสารเคมี โดยฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในสารละลาย 0.525% sodium hypochlorite นาน 3 นาที แล้วล้างเมล็ดแตงกวาด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง ก่อนนำเมล็ดแตงกวาแช่ในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้ความเข้มข้น  $10^8$  CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ปฏิบัติเช่นเดียว กันในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 กรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม 50 WP (อัตรา 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร) กรรมวิธีควบคุม (control) มีทั้งกรรมวิธีที่ดินไม่มีเชื้อราสาเหตุโรค (control นำไปปลูกในดินที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรค) และกรรมวิธีที่ดินมีเชื้อราสาเหตุโรค (control นำไปปลูกในดินปลูกที่มีเชื้อราสาเหตุโรค) โดยใช้ น้ำนิ่งฆ่าเชื้อแช่เมล็ดแตงกวา ก่อนนำไปปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรค การทดลองประกอบด้วยกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 1 กระจ่าง กระจ่างละ 5 เมล็ด กำหนดแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยมีทั้งหมด 23 กรรมวิธีในการแช่เมล็ดดังนี้



- กรรมวิธีที่ 1 : แช่เมล็ดในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ (control นำไปปลูกในดินที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรค)
- กรรมวิธีที่ 2 : แช่เมล็ดในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ (control นำไปปลูกในดินปลูกที่มีเชื้อราสาเหตุโรค)
- กรรมวิธีที่ 3 : แช่เมล็ดในสารเคมี carbendazim 50 WP
- กรรมวิธีที่ 4 : แช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01
- กรรมวิธีที่ 5 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-3
- กรรมวิธีที่ 6 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-8
- กรรมวิธีที่ 7 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-9
- กรรมวิธีที่ 8 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-23
- กรรมวิธีที่ 9 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-24
- กรรมวิธีที่ 10 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-34
- กรรมวิธีที่ 11 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-37
- กรรมวิธีที่ 12 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-41
- กรรมวิธีที่ 13 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-43
- กรรมวิธีที่ 14 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LBN 1-5
- กรรมวิธีที่ 15 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LBN 2-1
- กรรมวิธีที่ 16 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LBN 2-2
- กรรมวิธีที่ 17 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LWN 1-2
- กรรมวิธีที่ 18 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LWN 1-3
- กรรมวิธีที่ 19 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LWN 1-4
- กรรมวิธีที่ 20 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LWN 2-1
- กรรมวิธีที่ 21 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LWN 2-2
- กรรมวิธีที่ 22 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LWN 2-3
- กรรมวิธีที่ 23 : แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LWN 2-5

บันทึกผลการทดลอง นับเปอร์เซ็นต์การงอกหลังปลูก 7 วัน และจำนวนต้นรอดตายของต้น  
 แดงกวาหลังปลูก 14 วัน เมื่อต้นแดงกวาอายุได้ 14 วัน เก็บต้นแดงกวมาล้างรากให้สะอาด แล้ว  
 นำมาวัดความสูงของต้น และความยาวราก เก็บรากต้นแดงกวา และดินที่ปลูกไว้เพื่อใช้ทดสอบใน  
 ขั้นตอนต่อไป

## 5.1 การตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค

สุ่มรากแตงกวาจากแต่ละกรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ราก นำรากแตงกวาที่แสดงอาการเป็นสีน้ำตาล แต่ไม่เน่าและโคนต้นไม่นำมาล้างน้ำให้สะอาด แช่ในสารละลาย 0.525% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง ซับรากให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ ตัดรากให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร Nash and Snyder medium (Nash and Snyder, 1962) จำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยตรวจนับปริมาณเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค

## 5.2 การตรวจนับปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดิน

สุ่มดินหลังการปลูกจากแต่ละกรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ด้วยวิธีการ Surface Soil Dilution Plate (SSDP) เตรียมตัวอย่างดิน โดยนำดินมาผึ่งให้แห้ง บดและร่อนผ่านตะแกรงให้ละเอียด ชั่งดิน 1 กรัม ใส่หลอดทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที เจือจางดิน (serial dilution) ใช้ปิเปตดูดดินแขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร Nash and Snyder medium (Nash and Snyder, 1962) ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารบ่มเชื้อไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน บันทึกผลการทดลองนับปริมาณโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค (colony forming units (CFU)/g ของดิน)

## 6. การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ

### 6.1 การทำเครื่องหมายให้แบคทีเรียต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ผ่านการคัดเลือกและมีประสิทธิภาพ มาพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เพื่อใช้สำหรับการติดตามตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย โดยแต่ละเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะนำไป streak บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 1 ppm บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารดังกล่าว มา streak บนอาหาร NGA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ที่ความเข้มข้นเดิมซ้ำอีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้เกิดความคงตัว และเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะขึ้นเป็น 5 และ 10 ppm ตามลำดับ (จิรัสสา, 2547)

## 6.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์กลายในการเป็นปฏิชีวนะต่อเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการอีกครั้งตามวิธีในข้อ 3 และคัด เลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบในแปลงปลูกพืชต่อไป

## 6.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรอง (culture filtrate) ที่ได้จากแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์กลาย

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin และมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการมาเตรียมเป็นสารกรอง โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร/จานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นกวาดเซลล์แบคทีเรียใส่ลงในอาหาร nutrient glucose broth (NGB) ในอัตราแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตรต่อ NGB 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่อง shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปรับให้มีความเข้มข้น  $10^8$  CFU/ml โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.2 ( $OD_{600} = 0.2$ ) นำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร NGB ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Ultra Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำของเหลวที่ได้ไปกรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาดช่อง 0.22 ไมโครเมตร เก็บสารกรองไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทดสอบ (พราวมาศ, 2550)

นำสารกรองที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี paper disc method โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA ก่อนตัดด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำไปวางไว้ที่จุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำชิ้นกระดาษกรองที่ตัดเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางบนจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคไว้แล้ว 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาท แต่ละจุดห่างจากเชื้อราสาเหตุโรค 3 เซนติเมตร หยดสารกรองปริมาณ 0.03 มิลลิลิตรลงบนแผ่นกระดาษกรอง บันทึกผลการทดลอง โดยวัดรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคที่ออกมาจากจุดศูนย์กลางทุกวันเป็นเวลา 7 วัน คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ

เจริญของเชื้อโรคเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) หรือวัดความกว้างของบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (clear zone)

ส่วนการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ หยดสารกรองที่ได้ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตรลงในสไลด์หลุม (depression slide) หลังจากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรค ปริมาตรเท่ากันลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มเชื้อในกล่องพลาสติกขึ้น หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง นำสไลด์มาย้อมด้วยสี acid fuchsin นำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการณ์งอกของสปอร์ และ germ tube โดยนับ 10 สปอร์ต่อสไลด์ ทำ 4 ซ้ำ ในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำนิ่งมาเชื้อแทนสารกรอง (Fravel and Spurr, 1977)

#### 6.4 การทดสอบแกรมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือก

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกมาทดสอบแกรมของแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร NGA ศึกษาคุณลักษณะ รูปร่าง การสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทดสอบแกรมด้วย 3 % KOH และการย้อมสี (Suslow, 1982)

### 7. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวในแปลงปลูกพืช

#### 7.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากการพัฒนาสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้นที่ 10 ppm และมีประสิทธิภาพการยับยั้งเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ดี มาทำเป็นสูตรสำเร็จชนิดผงดิน โดยเตรียมดินร่วน 20 กิโลกรัม ผสมกับสารอาหารคลุกเคล้าให้เข้ากัน ใส่น้ำลงไปเล็กน้อยให้ความชื้น แล้วนำดินไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที 2 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยง ในอาหาร NGB และเขย่าบนเครื่อง rotary shaker 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และปรับให้มีความเข้มข้น  $10^8$  หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร (CFU/ml) ด้วยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.2 ( $OD_{600\text{ nm}} = 0.2$ ) มาใส่ในดินผสมสารอาหารที่เตรียมไว้ โดยใช้อัตราเชื้อ 10 มิลลิลิตรต่อดินผสมสารอาหาร 300 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากันบ่มไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปฝังลมให้แห้ง เพื่อให้ความชื้นในผงดินลดลงจนมีค่าไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ (วัดความชื้นโดย Moisture meter



จำหน่ายโดยบริษัท Sartorius) จากนั้นนำไปบรรจุลงในช่องตามปริมาตรที่ต้องการ เก็บไว้เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

## 7.2 การเตรียมแปลงปลูกพืช และกรรมวิธีทดสอบ

แปลงที่แปลงทดลอง ภาควิชาโรคพืชให้มีขนาดแปลงกว้าง 1 เมตร ยาว 5 เมตร ก่อนปลูกแตงกวา ระยะห่างระหว่างแถว 70 เซนติเมตร และระยะห่างระหว่างต้น 100 เซนติเมตร ปลูกเมล็ดแตงกวาหลุมละ 1 เมล็ด โดยปลูก 2 แถว แถวละ 5 เมล็ดรวมแปลงละ 10 เมล็ด มีทั้งหมด 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ (3 แปลง) วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCB) โดยมีกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 : แซ่เมล็ดในน้ำเปล่า (control ที่ปลูกในดินแปลงปลูกตามธรรมชาติ)

กรรมวิธีที่ 2 : แซ่เมล็ดในสารเคมี metalaxyl 35% SD และรดด้วยสารเคมี carbendazim 50 WP เมื่ออายุ 45 วันหลังปลูก

กรรมวิธีที่ 3 : แซ่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* CB-Pin-01

กรรมวิธีที่ 4 : แซ่เมล็ดในสูตรสำเร็จชนิดผงดินของเชื้อแบคทีเรีย M3-SDN-9

กรรมวิธีที่ 5 : แซ่เมล็ดในสูตรสำเร็จชนิดผงดินของเชื้อแบคทีเรีย M5-SDN-23

กรรมวิธีที่ 6 : แซ่เมล็ดในสูตรสำเร็จชนิดผงดินของเชื้อแบคทีเรีย M5-LBN 1-5

เตรียมเมล็ดแตงกวาพันธุ์ลูกผสมพาวเวอร์-ซี บริษัท SEEDLINE VEGETABLE SEEDS ที่ไม่ได้คลุกสารเคมี โดยฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในสารละลาย 0.525% sodium hypochlorite นาน 3 นาที แล้วล้างเมล็ดแตงกวาด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง ก่อนนำเมล็ดแตงกวาแช่ในสูตรสำเร็จชนิดผงดินของเชื้อแบคทีเรียปฏิบัติการ ใช้อัตราเชื้อแบคทีเรีย 20 กรัม ผสมน้ำ 20 ลิตร แช่เมล็ดแตงกวาเป็นเวลา 15 นาที ปฏิบัติเช่นเดียวกันในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 กรรมวิธีที่ใช้สารเคมีเมทาแลกซิล และกรรมวิธีควบคุม ที่ใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อแช่เมล็ดแตงกวา ก่อนนำไปปลูกในแปลงที่ได้เตรียมไว้แล้ว เมื่อต้นแตงกวาอายุ 45 วัน นำเชื้อแบคทีเรียมารดลงดินบริเวณโคนต้นแตงกวาอีกครั้ง โดยใช้อัตราเชื้อแบคทีเรีย 20 กรัม ผสมน้ำ 20 ลิตร เช่นเดิม และเปลี่ยนกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีจากเมทาแลกซิลมาเป็นคาร์เบนดาซิม โดยรดลงดิน 200 มิลลิลิตรต่อต้น

บันทึกผลการทดลอง นับเปอร์เซ็นต์การงอกหลังปลูก 7 วัน และจำนวนต้นรอดตายของ ต้นแตงกวาหลังปลูก 14 21 และ 28 วัน

7.3 การตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญการครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญการครอบครองรากของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อต้นแตงกวาอายุ 28 วัน

เมื่อต้นแตงกวามีอายุ 28 วัน สุ่มรากแตงกวาจากแต่ละกรรมวิธี นำมาล้างน้ำให้สะอาด แช่ในสารละลาย 0.525% sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง ซับรากให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อ ตัดรากให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน โดยการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญการครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค อาหาร PDA ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm ส่วนการตรวจการเจริญการครอบครองรากของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ใช้อาหาร NGA ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ใช้อาหาร Martin's medium บันทึกผลการทดลอง โดยตรวจนับปริมาณเปอร์เซ็นต์การเจริญการครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

7.4 การตรวจนับปริมาณเชื้อราสาเหตุโรค และปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในดิน เมื่อต้นแตงกวาอายุ 28 วัน

สุ่มดินจากแต่ละกรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ก่อนนำไปตรวจนับปริมาณเชื้อในดินด้วยวิธีการ surface soil dilution plate (SSDP) โดยนำดินมาผึ่งให้แห้ง บดและร่อนผ่านตะแกรงให้ละเอียด ชั่งดิน 1 กรัมใส่หลอดทดลองที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที เพื่อเจือจางดิน (serial dilution) ใช้ปิเปตดูดดินแขวนลอย 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร Nash and Snyder medium (Nash and Snyder, 1962) สำหรับตรวจนับเชื้อราสาเหตุโรค บนอาหาร NGA ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm สำหรับตรวจนับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และบนอาหาร Martin's medium สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 หลังจากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัว L ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารบ่มเชื้อไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยการนับปริมาณโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในดิน (colony forming units (CFU)/g ของดิน)

## 7.5 การประเมินโรคเหี่ยวของต้นแตงกวา

เมื่อต้นแตงกวามีอายุ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง) ประเมินการเกิดโรคเหี่ยวของต้นแตงกวาโดยวิธีการให้คะแนนเป็น 5 ระดับ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเป็นค่าดัชนีการเกิดโรค

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 แสดงอาการของโรค โดยมีใบเหี่ยวต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนใบทั้งต้น

ระดับ 2 แสดงอาการของโรค โดยมีใบเหี่ยว 11-20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนใบทั้งต้น

ระดับ 3 แสดงอาการของโรค โดยมีใบเหี่ยว 21-50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนใบทั้งต้น

ระดับ 4 แสดงอาการของโรค โดยมีใบเหี่ยว 50-100 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนใบทั้งต้น

ระดับ 5 แสดงอาการของโรค คือต้นตาย

คำนวณดัชนีการเกิดโรค (Disease index) ตามวิธีการของ Cirulii and Alexander (1966)

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค (\%)} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นที่แสดงอาการ x ระดับอาการ)} \times 100}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด} \times \text{ระดับอาการสูงสุด}}$$

7.6 การตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบครองรากของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อต้นแตงกวาอายุ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง)

ปฏิบัติเช่นเดียวกันข้อ 7.3 แต่สำหรับการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค วางลงบนอาหาร Nash and Snyder medium (Nash and Snyder, 1962)

7.7 การตรวจนับปริมาณเชื้อราสาเหตุโรค และปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในดิน เมื่อต้นแตงกวาอายุ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง)

ปฏิบัติเช่นเดียวกันข้อ 7.4

7.8 บันทึกน้ำหนักผลผลิต

### สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ และเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาโรคพืช  
คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน  
จ. นครปฐม

### ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2554 – พฤษภาคม พ.ศ.2557





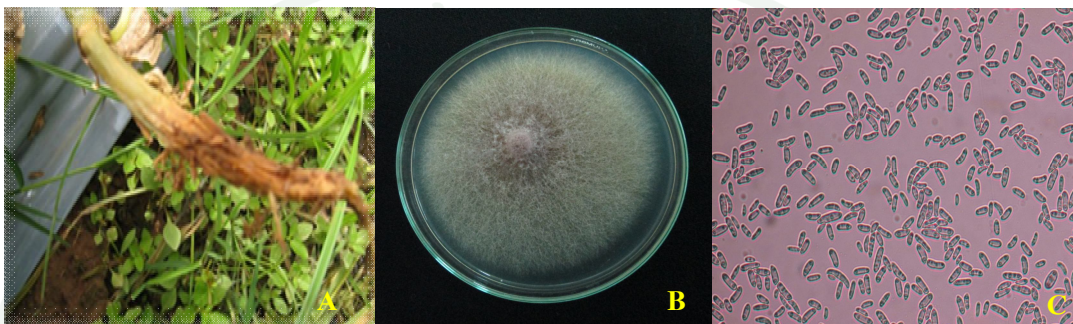
## ผลและวิจารณ์

### 1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวจากต้นแตงกวา และการพิสูจน์โรค

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวจากต้นแตงกวาที่แสดงอาการใบไหม้เหี่ยว ลำต้นเหี่ยว เหลือง มีแผลที่บริเวณโคนต้น รากกุดสั้นผิดปกติ เมื่อผ่าบริเวณโคนต้นออกพบภายในเป็นสีน้ำตาล ด้วยวิธี tissue transplanting technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานวิทยาดังกล่าวกับในคู่มือของ Toussoun and Nelson (1968) พบว่า เป็นเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) ซึ่งมีลักษณะเส้นใยเป็นสีขาว พู ต่อมาเส้นใยมีสีชมพูอ่อนถึงม่วงอ่อน เจริญได้ค่อนข้างช้า เมื่อนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ macroconidia รูปร่างเรียวยาว ลักษณะโค้ง หัวท้ายแหลม มีขนาด  $20.8 \times 3.7$  ไมครอน และพบ microconidia รูปร่างไข่ หัวท้ายมน และขนาด  $7.4 \times 2.8$  ไมครอน (ภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับศักดิ์ (2537) ที่พบว่าโรคเหี่ยวหรือรากเน่าของแตงเกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ซึ่งมีทั้ง microconidia ลักษณะกลม หรือกลมรี ขนาดเล็กไม่มีสี และ macroconidia ลักษณะโค้งเล็กน้อยคล้ายเป็นรูปจันทร์เสี้ยวค่อนข้างโต มีผนังกันแบ่งออกเป็นเซลล์ย่อย 4-5 เซลล์ต่อหนึ่งอัน และเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA จะสร้างเส้นใยละเอียดสีขาว พู ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมมีสีชมพูอ่อนหรือสีม่วงอ่อน (ศศิธร, 2549) เชื้อราสร้าง microconidia จำนวนมาก ขนาด  $1.5-2.7 \times 4.0-8.0$  ไมโครเมตร macroconidia มี 3-4 septate ขนาด  $4.0-5.0 \times 23.0-34.0$  ไมโครเมตร (ปริศนา, 2547)

จากการนำเชื้อรา FOC ที่แยกได้ไปปลูกเชื้อ โดยรดสปอร์แขวนลอยลงบนเมล็ดแตงกวาที่เตรียมไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่รองด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งผืนเพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตามวิธีของ Koch (Koch's postulation) พบว่าหลังจากการรดด้วยสปอร์แขวนลอย 7 วัน เมล็ดแตงกวาไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์ มีเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราขึ้นบนเมล็ดที่ไม่งอก ในขณะที่จาน control ซึ่งรดด้วยน้ำนิ่งผืนเชื้อ พบว่าเมล็ดแตงกวาออกทุกเมล็ด เมื่อนำเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอกมาแยกเชื้ออีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะเหมือนเดิม

หลังจากทดสอบการเกิดโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วได้นำเชื้อราสาเหตุโรคไปเลี้ยงบน ปลายข้าวสุกผสมกับดินนิ่งมาเชื้อ ก่อนปลูกเมล็ดแตงกวาลงในกระถางอีกครั้ง พบว่าเมล็ดแตงกวา ไม่งอก ส่วนต้นที่งอกมีลักษณะต้นแคระแกร็น ไม่เจริญเติบโต รากสั้น พบแผลสีน้ำตาลบริเวณโคน ต้นและราก เมื่อนำมาแยกเชื้ออีกครั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะเหมือนเดิม



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการโรค ลักษณะเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

- A. รากของต้นแตงกวาที่แสดงอาการเหี่ยว รากกุด
- B. เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* ที่เจริญบนอาหาร PDA
- C. ลักษณะ conidia

## 2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม จากแปลงที่ไม่ใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช และไม่ปรากฏอาการของโรค เก็บดินรอบรากของแตงกวา มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ด้วยวิธีการ Surface Soil Dilution Plate (SSDP) บนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ nutrient glucose agar (NGA) King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH) พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลต โดยได้จากอาหาร NGA 36 ไอโซเลต KB 13 ไอโซเลต และ TH 7 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ส่วนของจุลินทรีย์ที่แยกจากใบแตงกวา แยกจุลินทรีย์บนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ NGA , KB และ TH แยกเชื้อแบคทีเรียได้จากอาหาร NGA 27 ไอโซเลต KB 18 ไอโซเลต และ TH 11 ไอโซเลต รวม 56 ไอโซเลต รวมเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากดิน และส่วนของใบแตงกวาได้ 112 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) ซึ่งเห็นได้ว่าการแยกเชื้อจากดินบริเวณรอบราก และใบของแตงกวาในแปลงปลูก เขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ไม่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช และไม่ปรากฏอาการของโรค พบเชื้อแบคทีเรียเป็นจำนวนมาก และอาจมีเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถต่อต้านกับเชื้อสาเหตุโรคได้ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้รวดเร็ว และมีกลไกการควบคุมโรคของพืชหลายกลไก เช่น การแข่งขันกับเชื้อโรค การผลิตสารปฏิชีวนะ การเป็นปรสิต และการชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (นิพนธ์, 2546)

**ตารางที่ 1** จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่แยกได้จากดินรอบราก และใบของแตงกวา ด้วยการใช้อาหารแยกเชื้อ 3 ชนิด

| ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ | จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรีย     |                             |
|----------------------|------------------------------|-----------------------------|
|                      | แยกเชื้อจากดิน <sup>1/</sup> | แยกเชื้อจากใบ <sup>2/</sup> |
| NGA <sup>3/</sup>    | 36                           | 27                          |
| KB <sup>4/</sup>     | 13                           | 18                          |
| TH <sup>5/</sup>     | 7                            | 11                          |
| Total                | 56                           | 56                          |

<sup>1/</sup> เก็บดินรอบรากของแตงกวาแยกเชื้อบนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ nutrient glucose agar (NGA)

King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH) ด้วยวิธี surface soil dilution plate (SSDP)

<sup>2/</sup> เก็บใบแตงกวาแยกเชื้อบนอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ nutrient glucose agar (NGA) King's medium B (KB) และ Thornston's medium (TH) ด้วยวิธี surface soil dilution plate (SSDP)

<sup>3/</sup> NGA = nutrient glucose agar

<sup>4/</sup> KB = King's medium B

<sup>5/</sup> TH = Thornston's medium

### 3. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่แยกได้ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ 112 ไอโซเลต จากดินรอบราก และจากใบของแตงกวาในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคด้วย dual culture บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน โดยวางเชื้อราสาเหตุโรคก่อนเชื้อทดสอบเป็นเวลา 2 วัน ไม่พบว่ามีเชื้อทดสอบไอโซเลตใดที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ด้วยการสร้างสารปฏิชีวนะที่ทำให้เกิด clear zone จึงได้เลือกเชื้อทดสอบจำนวน 64 ไอโซเลตที่มีแนวโน้มว่าจะยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้ จากการสังเกตว่าเชื้อราสาเหตุโรคมีการยุบตัว หรือไม่สามารถเจริญคลุมทับไปบนโคโลนีของเชื้อทดสอบได้ นำมาทดสอบอีกครั้ง พบว่าแต่ละไอโซเลตของเชื้อทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC ได้แตกต่างกันโดยสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 7 กลุ่มคือ กลุ่มที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในช่วง ต่ำกว่า 0 0-10.00, 10.01-20.00, 20.01-30.00, 30.01-40.00, 40.01-50.00, 50.01-60.00 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0, 39, 3, 2, 2, 17 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

จากการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์โดยการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวาด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน พบเชื้อแบคทีเรีย 19 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC อยู่ในช่วง 30 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และมีความกว้างของบริเวณยับยั้ง (clear zone) ด้วย โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยของแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตอยู่ในช่วง 38.33 - 50.21 เปอร์เซ็นต์ และมีความกว้างของบริเวณยับยั้ง (clear zone) 0.00 - 0.50 เซนติเมตร เชื้อแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC ได้ดีที่สุดคือ ไอโซเลต SDN-9 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 50.21 เปอร์เซ็นต์ รองลงคือไอโซเลต SDN-41 (49.18 เปอร์เซ็นต์) และ LWN 2-5 (48.36 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ในขณะที่ไอโซเลต LWN 2-1 มีการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC ได้ต่ำที่สุดคือ 38.33 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ไอโซเลต SDN-9 ยังมีความกว้างของบริเวณยับยั้ง (clear zone) สูงที่สุดเท่ากับ 0.50 เซนติเมตร จึงนำแบคทีเรียทั้ง 19 ไอโซเลตนี้ไปทดสอบในระดับเรือนปลูกพืชทดลองได้แก่ SDN - 3, 8, 9, 23, 24, 34, 37, 41, 43 LBN 1 - 5, LBN 2 - 1, 2 LWN 1 - 2, 3, 4 LWN 2 - 1, 2, 3, 5 (ตารางที่ 3) ซึ่งการที่เชื้อราสาเหตุโรคมีการเจริญช้าลงหรือหยุดการเจริญ นอกจากเป็นผลมาจากกลไกการผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคแล้ว (Whipps, 1987) ยังมีกลไกในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่าทำให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญได้ (นิพนธ์, 2546) สอดคล้องกับการทดสอบ



ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จาก ใบ ช่อดอก และผิวผลของมะม่วง ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นการคัดเลือกในเบื้องต้นพบจุลินทรีย์จำนวน 74 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

*C. gloeosporioides* ได้โดยมีจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างบริเวณยับยั้ง (clear zone) จำนวน 55 ไอโซเลต และจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างบริเวณยับยั้งแต่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา

*C. gloeosporioides* ได้ดีจำนวน 19 ไอโซเลต (ประกอบ, 2547) และพจนา (2540) ได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะจากดินปลูกพืช พบแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถสร้างบริเวณยับยั้งเส้นใยเชื้อโรค (clear zone) บนอาหาร PDA ได้ จุฑารัตน์ (2554) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิชีวนะด้วยการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสขององุ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 0-55.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่จิรัชสา (2546) ได้คัดเลือกแบคทีเรีย 24 ไอโซเลตจากทั้งหมด 210 ไอโซเลต โดยอาศัยการที่แบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งการเจริญของของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ทำให้เกิด inhibition zone หรือ clear zone บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมที่ดีในการนำมาทดสอบเพื่อใช้ในการควบคุมโรคในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง หรือในแปลงปลูกพืช จึงควรจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีการสร้างสารยับยั้งได้ (เกิดบริเวณยับยั้งกว้าง) และมีโคโลนีใหญ่หรือเจริญได้เร็วควบคู่กันไปด้วย

**ตารางที่ 2** ไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

*Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

| ระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ<br>เส้นใยเชื้อรา FOC <sup>1/</sup> (%) | จำนวนไอโซเลต | ไอโซเลต                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0 - 10.00                                                                 | 39           | SDN - 1, 4, 7, 11, 12, 13, 15, 16, 17,<br>18, 20, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33,<br>35, 38, 39, 40, 44, 45, 46, 47<br>LBN 1 - 2, 3, 4, 7, 8, 11<br>LBN 2 - 3, 4, 5<br>LWN 1 - 1, 5, 6 |
| 10.01 - 20.00                                                             | 3            | SDN - 5, 22, 36                                                                                                                                                                        |
| 20.01 - 30.00                                                             | 2            | SDN - 10, 42                                                                                                                                                                           |
| 30.01 - 40.00                                                             | 2            | SDN - 25<br>LWN 2-1                                                                                                                                                                    |
| 40.01 - 50.00                                                             | 17           | SDN - 3, 8, 23, 24, 34, 37, 41, 43<br>LBN 1 - 5<br>LBN 2 - 1, 2<br>LWN 1 - 2, 3, 4<br>LWN 2 - 2, 3, 5                                                                                  |
| 50.01 - 60.00                                                             | 1            | SDN - 9                                                                                                                                                                                |

<sup>1/</sup> เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC คำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา} = (R_1 - R_2 / R_1) \times 100$$

R<sub>1</sub> คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R<sub>2</sub> คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) และความกว้างบริเวณยับยั้ง (clear zone) ของแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

| ไอโซเลต <sup>1/</sup> | รัศมีโคโลนีของเชื้อรา<br>FOC <sup>2/</sup> (ซม.) | การยับยั้งการเจริญเส้นใย<br>เชื้อรา FOC <sup>3/</sup> (%) | ความกว้างบริเวณยับยั้ง<br>(clear zones ) (ซม.) |
|-----------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| SDN-3                 | 2.41                                             | 42.88 c-h <sup>4/</sup>                                   | 0.25 c-f                                       |
| SDN-8                 | 2.48                                             | 44.88 a-f                                                 | 0.29 c-e                                       |
| SDN-9                 | 2.24                                             | 50.21 a                                                   | 0.50 a                                         |
| SDN-23                | 2.48                                             | 44.74 a-f                                                 | 0.00 g                                         |
| SDN-24                | 2.56                                             | 41.55 e-h                                                 | 0.00 g                                         |
| SDN-34                | 2.48                                             | 44.88 a-f                                                 | 0.34 a-d                                       |
| SDN-37                | 2.50                                             | 41.11 e-h                                                 | 0.11 fg                                        |
| SDN-41                | 2.29                                             | 49.18 ab                                                  | 0.33 b-d                                       |
| SDN-43                | 2.63                                             | 41.70 d-g                                                 | 0.31 b-d                                       |
| LBN 1-5               | 2.55                                             | 42.66 c-h                                                 | 0.22 c-f                                       |
| LBN 2-1               | 2.57                                             | 46.36 a-e                                                 | 0.38 a-c                                       |
| LBN 2-2               | 2.32                                             | 47.77 a-d                                                 | 0.29 c-e                                       |
| LWN 1-2               | 2.62                                             | 40.06 e-h                                                 | 0.12 e-g                                       |
| LWN 1-3               | 2.53                                             | 44.14 b-g                                                 | 0.16 d-g                                       |
| LWN 1-4               | 2.55                                             | 42.11 d-g                                                 | 0.19 d-f                                       |
| LWN 2-1               | 2.71                                             | 38.33 gh                                                  | 0.19 d-f                                       |
| LWN 2-2               | 2.54                                             | 42.59 c-h                                                 | 0.28 c-f                                       |
| LWN 2-3               | 2.51                                             | 44.29 a-g                                                 | 0.48 ab                                        |
| LWN 2-5               | 2.33                                             | 48.36 a-c                                                 | 0.28 c-f                                       |
| control5/             | 4.5                                              | -                                                         | -                                              |
| C.V. (%)              |                                                  | 19.45                                                     | 34.48                                          |

### ตารางที่ 3 (ต่อ)

- <sup>1/</sup> แสดงค่าเฉพาะไอโซเลตของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC ระดับ 30.00-60.00 เปอร์เซ็นต์จากตารางที่ 2
- <sup>2/</sup> รัศมีของเชื้อรา FOC วัดจากกึ่งกลางของโคโลนีถึงปลายเส้นใย (เซนติเมตร) ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ หลังจากวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วัน
- <sup>3/</sup> เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC คำนวณจากสูตร

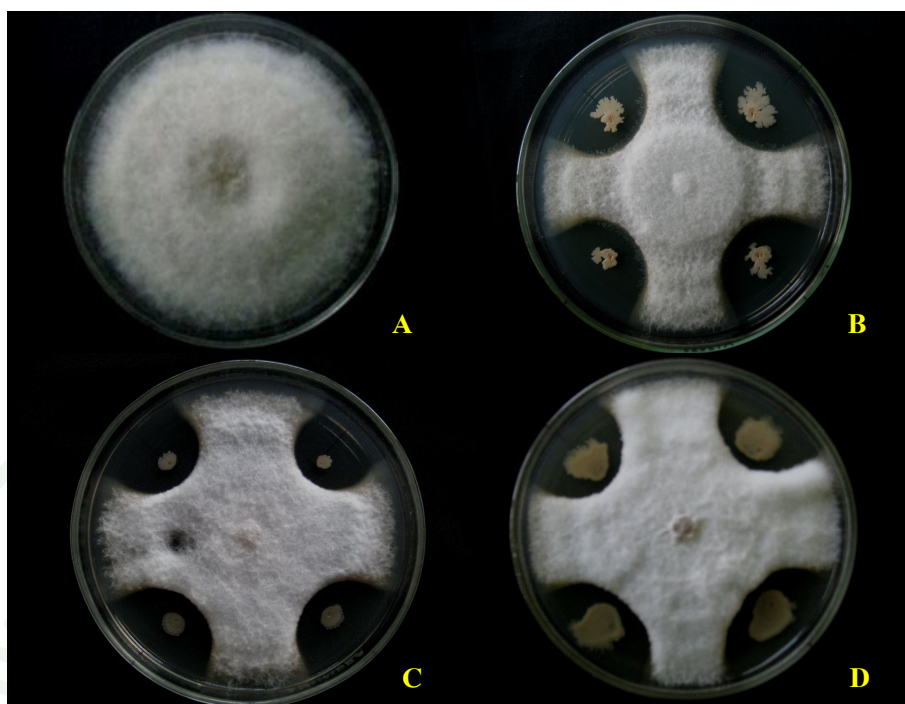
$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา} = (R_1 - R_2/R_1) \times 100$$

$R_1$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

$R_2$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

- <sup>4/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)
- <sup>5/</sup> กรรมวิธีควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค (เชื้อรา FOC)





ภาพที่ 3 ประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิบัฏในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ด้วยวิธี dual culture ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

- A. กรรมวิธีควบคุม (เชื้อรา FOC)
- B. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SDN-9
- C. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SDN-41
- D. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต LWN 2-5

#### 4. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่คัดเลือกได้จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในระดับห้องปฏิบัติการไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น  $10^8$  CFU/มิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรค เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรค (control -) และกรรมวิธีควบคุมที่ใส่เชื้อราสาเหตุโรค (control +) กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม พบว่าเมื่อต้นแตงกวามีอายุ 7 วัน กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรคมียาค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดแตงกวาสูงที่สุดกว่าในทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่แช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียมีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดอยู่ในช่วง 13.33-53.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต SDN-23 ไอโซเลต SDN-41 และ ไอโซเลต SDN-43 มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเท่ากับ 53.33 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมในทางสถิติ ส่วนกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต SDN-37 และไอโซเลต LBN 2-1 มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดต่ำที่สุดคือ 13.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

เมื่อต้นแตงกวามีอายุ 14 วัน ตรวจเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายของต้นแตงกวา พบแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต SDN-3 ไอโซเลต SDN-23 และไอโซเลต LBN 1-5 มีค่าเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 วันของต้นแตงกวาเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมคือเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่สูงกว่าในกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรคเท่ากับ 20.01 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงกว่าในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต SDN-8, ไอโซเลต SDN-34, ไอโซเลต SDN-24, ไอโซเลต SDN-37, ไอโซเลต LBN 2-1, ไอโซเลต LBN 2-2, ไอโซเลต LBN 2-1 และไอโซเลต LBN 2-5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ส่วนกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรคมียาค่าเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายสูงที่สุดกว่าในทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีค่าเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเท่ากับ 53.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ 7 วัน และเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 วันหลังปลูก ด้วยการแช่เมล็ดตากไว้ในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น  $10^8$  CFU/มิลลิลิตร นาน 15 นาที ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรค

| กรรมวิธี                      | เปอร์เซ็นต์การงอก 7 วัน (%) |                    | เปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย 14 วัน (%) |                         |
|-------------------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------------|
| control (-) <sup>1/</sup>     | 100 a <sup>2/</sup>         | -                  | 100 a                           | -                       |
| control (+) <sup>3/</sup>     | 53.33 bc                    | -                  | 33.33 b-d                       | -                       |
| สารเคมี carbendazim           | 53.33 bc                    | (0%) <sup>4/</sup> | 40.00 bc                        | (+20.01%) <sup>4/</sup> |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 60.00 b                     | (+12.50%)          | 53.33 b                         | (+60.00%)               |
| SDN-3                         | 33.33 b-d                   | (-37.50%)          | 40.00 bc                        | (+20.01%)               |
| SDN-8                         | 26.67 b-d                   | (-49.99%)          | 6.67 e                          | (-79.98%)               |
| SDN-9                         | 40.00 b-d                   | (-24.99%)          | 33.33 b-d                       | (0%)                    |
| SDN-23                        | 53.33 bc                    | (0%)               | 40.00 bc                        | (+20.01%)               |
| SDN-24                        | 20.00 cd                    | (-62.49%)          | 6.67 e                          | (-79.98%)               |
| SDN-34                        | 33.33 b-d                   | (-37.50%)          | 6.67 e                          | (-79.98%)               |
| SDN-37                        | 13.33 d                     | (-75.00%)          | 6.67 e                          | (-79.98%)               |
| SDN-41                        | 53.33 bc                    | (0%)               | 26.67 c-e                       | (-19.98%)               |
| SDN-43                        | 53.33 bc                    | (0%)               | 33.33 b-d                       | (0%)                    |
| LBN 1-5                       | 46.67 b-d                   | (-12.48%)          | 40.00 bc                        | (+20.01%)               |
| LBN 2-1                       | 13.33 d                     | (-75.00%)          | 6.67 e                          | (-79.98%)               |
| LBN 2-2                       | 20.00 cd                    | (-62.49%)          | 13.33 ed                        | (-60.00%)               |
| LWN 1-2                       | 40.00 b-d                   | (-24.99%)          | 26.67 c-e                       | (-19.98%)               |
| LWN 1-3                       | 40.00 b-d                   | (-24.99%)          | 26.67 c-e                       | (-19.98%)               |
| LWN 1-4                       | 40.00 b-d                   | (-24.99%)          | 20.00 c-e                       | (-39.99%)               |
| LWN 2-1                       | 26.67 b-d                   | (-49.99%)          | 13.33 ed                        | (-60.00%)               |
| LWN 2-2                       | 40.00 b-d                   | (-24.99%)          | 20.00 c-e                       | (-39.99%)               |
| LWN 2-3                       | 26.67 cd                    | (-49.99%)          | 20.00 c-e                       | (-39.99%)               |
| LWN 2-5                       | 20.00 cd                    | (-62.49%)          | 13.33 ed                        | (-60.00%)               |
| C.V. (%)                      | 47.70                       |                    | 46.41                           |                         |

#### ตารางที่ 4 (ต่อ)

- <sup>1/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่นำไปปลูกในดินที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรคแช่เมล็ดแตงกวาในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ
- <sup>2/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)
- <sup>3/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่นำไปปลูกในดินที่มีเชื้อราสาเหตุโรคแช่แตงกวาเมล็ดในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ
- <sup>4/</sup> เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของเปอร์เซ็นต์การงอกเมล็ด และเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรค คำนวณได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$

เมื่อต้นแตงกวาอายุได้ 14 วัน เก็บต้นแตงกวาแล้วล้างรากให้สะอาด แล้วนำมาวัดความสูงของต้น และความยาวราก จากการทดลองพบว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรค มีความสูงของต้นสูงที่สุดคือ 15.47 เซนติเมตร รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย ไอโซเลต SDN-9 มีความสูงต้น 10.83 เซนติเมตร และกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย ไอโซเลต SDN-43 มีความสูงต้น 9.50 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความสูงต้นสูงกว่าในกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรคซึ่งเท่ากับ 30.01 และ 14.04 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย ไอโซเลต SDN-37 มีความสูงต้นต่ำที่สุดคือ 0.60 เซนติเมตร (ตารางที่ 5)

ส่วนความยาวรากนั้น พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลตคือ ไอโซเลต LBN 1-5, ไอโซเลต LWN 1-4, ไอโซเลต SDN-41, ไอโซเลต SDN-9, ไอโซเลต SDN-43 และ ไอโซเลต LWN 2-2 มีความยาวรากที่สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรค กรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรค โดยมีความยาวรากเท่ากับ 18.83, 18.67, 18.00, 17.08, 16.92 และ 16.17 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย ไอโซเลต LBN 1-5 มีความยาวรากสูงที่สุด ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรคคือ 41.26 เปอร์เซ็นต์ และในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย ไอโซเลต LBN 2-2 มีความยาวรากต่ำที่สุดคือ 0.00 เซนติเมตร (ตารางที่ 5) นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย ไอโซเลต SDN-9 และ SDN-43 มีความสูงของต้น และความยาวรากสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม



และกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรคอีกด้วย โดยมีความสูงของต้น เท่ากับ 10.83, 9.50, 8.75 และ 8.33 เซนติเมตร ตามลำดับ และความยาวของรากเท่ากับ 17.08, 16.92 14.75 และ 13.33 เซนติเมตร ตามลำดับ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการมาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต LBN1-5 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และมีความยาวรากสูงที่สุด ในขณะที่ทั้งแบคทีเรียไอโซเลต SDN-9 และ ไอโซเลต SDN-43 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดไม่แตกต่างกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม แต่มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายน้อยกว่า และเมื่อพิจารณาถึงความยาวของรากและความสูงของต้น พบว่าทั้งความยาวรากและความสูงของต้นสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรคอีกด้วย (ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการเจริญเติบโต (plant growth promoting) เชื้อแบคทีเรียที่อยู่รอบรากสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (PGPR) เมื่อมีการปลูกเชื้อลงบนเมล็ดหรือในดิน นอกจากนี้การที่เชื้ออยู่ที่ผิวรากพืช ยังสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคทั้งบนใบและลำต้นพืชได้ สอดคล้องกับทีนิพนธ์ (2546) ได้รายงานไว้ว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร และสามารถครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญได้ ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโต และมีผลผลิตสูงขึ้น ซึ่งแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) นี้ชอบอาศัยอยู่ในดินบริเวณผิวราก (rhizoplane) หรือบริเวณรอบราก (rhizosphere) (Schippers *et al.*, 1987) กลไกสำคัญอันดับแรกของเชื้อ PGPR คือ จะทำให้พืชมีการเจริญเติบโตโดยไปช่วยเปลี่ยนหรือลดความสามารถครอบครองรากของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ (นิพนธ์, 2533) Van Loon *et al.* (1998) ใช้แบคทีเรียบริเวณรากพืช (rhizobacteria) เพื่อกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรค เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* และ *Serratia marcescens* ชักนำให้แสงกว่าต้านทานต่อโรค Fusarium wilt สาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (Liu *et al.*, 1995) มีการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ F2B44 ในการควบคุมโรคได้ดี ช่วยเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศ ช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และยังพบว่า PGPR สามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยว และโรคทางใบได้อีกด้วย (Grosh and Kofoet, 2001)

ตารางที่ 5 อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อความสูงต้น และความยาวรากของต้นแตงกวาที่อายุ 14 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น  $10^8$  CFU/มิลลิลิตร นาน 15 นาที ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรค

| กรรมวิธี                      | ความสูงต้นที่ 14 วัน (ซม.) |                        | ความยาวรากที่ 14 วัน (ซม.) |                         |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|
| control (-) <sup>1/</sup>     | 15.47 a <sup>2/</sup>      | -                      | 13.67 a-d                  | -                       |
| control (+) <sup>3/</sup>     | 8.33 bc                    | -                      | 13.33 a-e                  | -                       |
| สารเคมี carbendazim           | 8.75 bc                    | (+5.04%) <sup>4/</sup> | 14.75 a-c                  | (+10.65%) <sup>4/</sup> |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 7.58 b-d                   | (-9.00%)               | 8.63 a-g                   | (-35.25%)               |
| SDN-3                         | 6.36 c-f                   | (-23.64%)              | 11.92 a-g                  | (-10.57%)               |
| SDN-8                         | 2.50 d-g                   | (-69.98%)              | 1.50 d-g                   | (-88.74%)               |
| SDN-9                         | 10.83 ab                   | (+30.01%)              | 17.08 ab                   | (+28.13%)               |
| SDN-23                        | 6.83 b-e                   | (-18.00%)              | 12.50 a-f                  | (-6.22%)                |
| SDN-24                        | 4.33 c-g                   | (-48.01%)              | 7.67 a-g                   | (-42.46%)               |
| SDN-34                        | 1.83 e-g                   | (-78.03%)              | 3.00 c-g                   | (-77.49%)               |
| SDN-37                        | 0.60 g                     | (-92.79%)              | 0.90 fg                    | (-93.24%)               |
| SDN-41                        | 7.83 b-d                   | (-6.00%)               | 18.00 a                    | (+35.03%)               |
| SDN-43                        | 9.50 bc                    | (+14.04%)              | 16.92 ab                   | (+26.93%)               |
| LBN 1-5                       | 7.86 b-d                   | (-5.64%)               | 18.83 a                    | (+41.26%)               |
| LBN 2-1                       | 2.33 d-g                   | (-72.02%)              | 1.00 e-g                   | (-92.49%)               |
| LBN 2-2                       | 1.00 fg                    | (-87.99%)              | 0.00 g                     | (-100%)                 |
| LWN 1-2                       | 5.00 c-g                   | (-39.97%)              | 8.67 a-g                   | (-34.95%)               |
| LWN 1-3                       | 6.92 b-e                   | (-16.92%)              | 10.08 a-g                  | (-24.38%)               |
| LWN 1-4                       | 8.00 b-d                   | (-3.96%)               | 18.67 a                    | (+40.06%)               |
| LWN 2-1                       | 5.17 c-g                   | (-37.93%)              | 7.00 a-g                   | (-47.48%)               |
| LWN 2-2                       | 7.33 b-e                   | (-12.00%)              | 16.17 ab                   | (+21.30%)               |
| LWN 2-3                       | 7.43 b-e                   | (-10.80%)              | 13.07 a-f                  | (-1.95%)                |
| LWN 2-5                       | 2.50 e-g                   | (-69.98%)              | 5.17 b-g                   | (-61.21%)               |
| C.V. (%)                      | 45.70                      |                        | 60.80                      |                         |

## ตารางที่ 5 (ต่อ)

- <sup>1/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่นำไปปลูกในดินที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรคแซมลิ็ดแดงกวางในน้ำนิ่งมาเชื้อ
- <sup>2/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)
- <sup>3/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่นำไปปลูกในดินที่มีเชื้อราสาเหตุโรคแซมลิ็ดแดงกวางในน้ำนิ่งมาเชื้อ
- <sup>4/</sup> เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของความสูงต้น และความยาวราก เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรค คำนวณได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคต้นแตงกวาในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง เมื่อต้นแตงกวามีอายุที่ 14 วัน

- A. กรรมวิธีควบคุมที่นำไปปลูกในดินที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรค
- B. กรรมวิธีควบคุมที่นำไปปลูกในดินที่มีเชื้อราสาเหตุโรค
- C. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสารเคมีคาร์เบนดาซิม
- D. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเชื้อรา *Trichoderma harzianum* CB-Pin-01
- E. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-9
- F. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-23
- G. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย SDN-43
- H. กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย LBN 1-5



หลังจากวัดความสูงต้น และความยาวรากของต้นแดงกวางแล้ว สุ่มรากแดงกวาง นำรากแดงกวางมาล้างน้ำให้สะอาด ตัดรากให้มีมีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางลงบนอาหาร Nash and Snyder medium (Nash and Snyder, 1962) เพื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต SDN-9 มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค 93.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำที่สุดกว่าในทุกๆ กรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรคมียเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรคและกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมมีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) และจากการสุ่มดินหลังการปลูกเพื่อตรวจนับปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดิน ด้วยวิธีการ surface soil dilution plate (SSDP) พบว่าในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรคมีปริมาณของเชื้อราสาเหตุโรคในดินเท่ากับ 0 เช่นเดียวกับการวางรากเพื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคก็พบว่าเป็น 0 เช่นกัน โดยในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต LWN 2-3 และไอโซเลต LWN 2-1 มีปริมาณของเชื้อราสาเหตุโรคสูงที่สุดคือ  $2.3 \times 10^5$  และ  $2.2 \times 10^5$  CFU/g ตามลำดับ ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต LWN 2-2 และ SDN-23 มีปริมาณของเชื้อราสาเหตุโรคต่ำที่สุดคือ  $1.33 \times 10^3$  และ  $3.67 \times 10^3$  CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 6) ทั้งนี้เพราะการควบคุมโรคซึ่งเกิดจากเชื้อในดินมีนักวิจัยเห็นว่าควรนำเชื้อจุลินทรีย์จากดินมาใช้ควบคุมโรคมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์จากใบ แต่จากผลการทดลองครั้งนี้พบเชื้อแบคทีเรียจากใบที่ทำให้ปริมาณของเชื้อราสาเหตุโรคมียุ่สูงที่สุด และต่ำที่สุด โดยไอโซเลตที่มีปริมาณของเชื้อราสาเหตุโรคต่ำที่สุด สามารถลดปริมาณเชื้อในดินได้ดี ในอนาคตอาจเป็นไอโซเลตที่ดีที่สามารถนำมาใช้ได้ทั้งบนใบและดินได้ และจากการผลการทดลองการที่พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์บางไอโซเลตมีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อราสาเหตุโรคเป็นไปได้ว่าการทดลองโดยแช่เมล็ดในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนปลูก มีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้ควบคุมโรคพืชที่ติดมากับเมล็ด และเชื้อโรคพืชในดิน โดยจะช่วยแย่งอาหารที่เมล็ดปลดปล่อยออกมา ทำให้ไม่พอเพียงสำหรับเชื้อโรคพืชในดินที่จะใช้ดำเนินกิจกรรมเพื่อก่อให้เกิดโรค จุลินทรีย์ปฏิปักษ์อาจช่วยป้องกันโดยการเจริญครอบคลุมผิวรากพืช เพื่อป้องกันการเจริญเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อโรคได้ (จิระเดช, 2549)

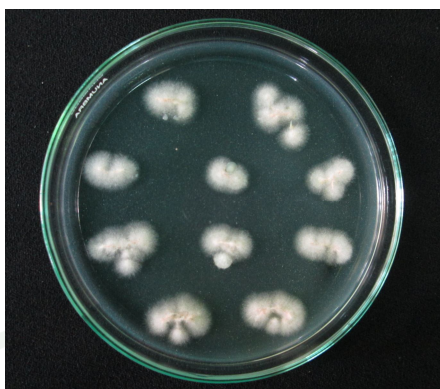
ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และปริมาณเชื้อราสาเหตุโรค  
ในดินของต้นแตงกวาที่อายุ 14 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรีย  
ความเข้มข้น  $10^8$  CFU/มิลลิลิตร นาน 15 นาที ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรค

| กรรมวิธี                      | การเจริญครอบครองรากของ<br>เชื้อราสาเหตุโรค <sup>1/</sup> (%) | ปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดิน <sup>2/</sup><br>$\times 10^3$ (CFU/g) |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| control (-) <sup>3/</sup>     | 0.00 d <sup>4/</sup>                                         | 0.00 k                                                             |
| control (+) <sup>5/</sup>     | 100.00 a                                                     | 14.17 f-k                                                          |
| สารเคมี carbendazim           | 100.00 a                                                     | 28.16 c-f                                                          |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 100.00 a                                                     | 12.34 f-k                                                          |
| SDN-3                         | 98.34 ab                                                     | 9.67 g-k                                                           |
| SDN-8                         | 100.00 a                                                     | 24.83 d-g                                                          |
| SDN-9                         | 93.33 c                                                      | 43.17 c                                                            |
| SDN-23                        | 100.00 a                                                     | 3.67 i-k                                                           |
| SDN-24                        | 100.00 a                                                     | 15.33 f-k                                                          |
| SDN-34                        | 100.00 a                                                     | 16.67 f-j                                                          |
| SDN-37                        | 100.00 a                                                     | 37.77 cd                                                           |
| SDN-41                        | 100.00 a                                                     | 8.17 h-k                                                           |
| SDN-43                        | 98.33 ab                                                     | 13.08 f-k                                                          |
| LBN 1-5                       | 100.00 a                                                     | 70.00 b                                                            |
| LBN 2-1                       | nd <sup>6/</sup>                                             | 21.50 e-h                                                          |
| LBN 2-2                       | nd <sup>6/</sup>                                             | 6.34 h-k                                                           |
| LWN 1-2                       | 98.34 ab                                                     | 62.17 b                                                            |
| LWN 1-3                       | 100.00 a                                                     | 18.17 f-i                                                          |
| LWN 1-4                       | 100.00 a                                                     | 16.34 f-k                                                          |
| LWN 2-1                       | 100.00 a                                                     | 218.67 a                                                           |
| LWN 2-2                       | 100.00 a                                                     | 1.33 jk                                                            |
| LWN 2-3                       | 100.00 a                                                     | 232.00 a                                                           |
| LWN 2-5                       | 95.00 bc                                                     | 36.50 c-e                                                          |
| C.V. (%)                      | 2.03                                                         | 21.27                                                              |

## ตารางที่ 6 (ต่อ)

- <sup>1/</sup> เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค โดยวางรากจำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Nash and Snyder medium
- <sup>2/</sup> ปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดิน นำดินมาทำ dilution plate บนอาหาร Nash and Snyder medium
- <sup>3/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่นำไปปลูกในดินที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรคแซมเมล็ดแตงกวาในน้ำนิ่งมาเชื้อ
- <sup>4/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดังไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ( $P=0.05$ )
- <sup>5/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่นำไปปลูกในดินที่มีเชื้อราสาเหตุโรคแซมเมล็ดแตงกวาในน้ำนิ่งมาเชื้อ
- <sup>6/</sup> nd = non-determined (ไม่ได้ตรวจสอบ)

ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดในระดับเรือนปลูกพืชทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกันกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการข้างต้นในกรณีแบคทีเรียโอโซเลต SDN-9 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา FOC ได้ดีที่สุด แต่พบว่าแบคทีเรียบางโอโซเลตที่มีประสิทธิภาพดีในห้องปฏิบัติการแต่เมื่อนำมาทดสอบในระดับเรือนปลูกพืชกลับมีประสิทธิภาพที่ไม่ดี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียมีการปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ซึ่งสภาพแวดล้อมจริงอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ การสร้างสารต่างๆ เช่น ปฏิชีวนสาร หรือสารพิษ หรือกิจกรรมต่างๆ จึงทำให้มีประสิทธิภาพลดลงได้ Registeri *et al.* (2012) พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากของเมล็ดอ่อนมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโต และลดโรคเหี่ยวได้โดยมีการผลิต siderophore หรือการสร้างสารปฏิชีวนะอย่างใดอย่างหนึ่ง และ Lihua *et al.* (2012) ได้มีรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* จากผิวยางของต้นแตงที่เจริญเติบโตในเรือนปลูกพืชทดลอง และแปลงปลูกพืช พบว่าแยกเชื้อ *Bacillus* ได้ทั้งหมด 400 ตัวอย่าง และเมื่อคัดเลือกโดยใช้ modified gnotobiotic system พบว่าในสายพันธุ์ B068150 แสดงให้เห็นว่ามีศักยภาพสูงในการควบคุมโรคเหี่ยว โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ถึง 50.68% ในระยะต้นกล้าในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง และมีการแยกเชื้อ *Bacillus* จากแปลงปลูกแตงกวาในประเทศจีน พบ *B. subtilis* SQR-5 และ *B. subtilis* B579 มีประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมโรคเหี่ยวของแตงกวาได้ (Zhang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010)



ภาพที่ 5 การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคของต้นแตงกวาที่อายุ 14 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียความเข้มข้น  $10^8$  CFU/มิลลิลิตร นาน 15 นาที ก่อนปลูกในดินผสมที่มีเชื้อโรคนอาหาร Nash and Snyder medium ในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง



ภาพที่ 6 โคลนิจของเชื้อราสาเหตุโรคในดินที่ปลูกต้นแตงกวาในระดับเรือนปลูกพืชทดลองบนอาหาร Nash and Snyder medium



## 5. การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ

จากการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่คัดเลือกได้จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในระดับห้องปฏิบัติการ ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพได้ 5 ไอโซเลต คือ เชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต SDN-23 มีเปอร์เซ็นต์การงอก และเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี เชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต SDN-3 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี เชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต LBN 1-5 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี และมีความยาวรากที่สูงที่สุด และเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต SDN-9 และ ไอโซเลต SDN-43 มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ไม่แตกต่างกับการใช้สารเคมี และเมื่อพิจารณาถึงความยาวของราก และความสูงของต้น พบว่าทั้งความยาวราก และความสูงของต้นสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมี และกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งจากผลการทดลองในระดับเรือนปลูกพืชทดลองให้ผลสอดคล้องกันกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ข้างต้นในกรณีเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต SDN-9 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา FOC ได้ดีที่สุดด้วย จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียนำมาพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm ก่อนนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะทุกไอโซเลตสามารถพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์กลายที่ต้านทานสารปฏิชีวนะไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยวิธี dual culture พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์กลายทุกไอโซเลตมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และไม่พบความกว้างของบริเวณยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลายทุกไอโซเลต ยกเว้นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลาย LBN 1-5 ที่มีความกว้างของบริเวณยับยั้งที่เพิ่มสูงขึ้นจากสายพันธุ์ดั้งเดิม จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะจาก 5 ไอโซเลต เหลือเพียง 3 ไอโซเลตสายพันธุ์กลาย คือ เชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลต M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราอยู่ในช่วง 35 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป คือ 35.56, 35.55 และ 38.52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ไปพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จชนิดผงดิน เพื่อนำไปทดสอบในแปลงปลูกพืชต่อไป (ตารางที่ 7) จึงเห็นได้ว่าการนำแบคทีเรียมานำมาพัฒนาให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เพื่อให้ง่ายแก่การติดตามตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคนี้ บางโคลนอาจสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราไป หรืออาจทำให้คุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป เช่น เจริญช้ากว่าเดิม ลักษณะโคโลนีเล็กกว่าเดิมได้ ซึ่งจากผลการทดลองนี้ได้ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของนิซากร (2553) และจุฑารัตน์ (2554) ที่พบว่าการพัฒนาเชื้อแบคทีเรียให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง

เส้นใยเชื้อรา *Helminthosporium oryzae*, *Trichoconis padwickii*, *Curvularia lunata* และ *C. gloeosporioides* ส่งผลให้บางไอโซเลตมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคลดลง บางไอโซเลตมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

เมื่อนำสารกรองของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี paper disc method พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 38.33, 33.88 และ 40.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความกว้างบริเวณยับยั้งเท่ากับ 0.34, 0.33 และ 0.44 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8) (ภาพที่ 7)

ส่วนการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ ที่หดยดสารกรองของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 และสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค ลงในสไลด์หลุมพร้อมกัน หลังจาก 24 ชั่วโมง พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้และแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม โดยมีการงอกของสปอร์เท่ากับ 80.0 , 87.50 และ 70.0 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวของ germ tube ที่ออกจากสปอร์มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 23.0, 47.68 และ 16.69  $\mu\text{m}$  ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีการงอกของสปอร์ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวของ germ tube โดยเฉลี่ย 67.20  $\mu\text{m}$  (ตารางที่ 9) (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับ พรามาส (2550) พบว่าสารกรองของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CG30 Lg1 TM04 และ PDA10-1 ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งการเจริญไปเป็น germ tube ของสปอร์เชื้อราได้ และอารีรัตน์ (2550) ที่พบว่าสารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ได้

หลังการศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยติดสีน้ำเงินของ crystal violet และมีปฏิกิริยาแบบลบไม่เกิดสารเหนียวยืดเมื่อใช้ 3% KOH มีการสร้างเอนโดสปอร์บริเวณกลางเซลล์ ติดสีเขียวของ malachite green ในแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 ส่วนในแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต M3-SDN-9 ไม่มีการสร้างเอนโดสปอร์บริเวณกลางเซลล์ โดยไม่ติดสีเขียวของ malachite green (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

| ไอโซเลต                 | การยับยั้งการเจริญเส้นใย<br>เชื้อรา FOC <sup>1/</sup> (%) | ความกว้างบริเวณยับยั้ง<br>(clear zones) (ซม.) |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| WT <sup>2/</sup> -SDN-3 | 42.88 a <sup>3/</sup>                                     | -                                             |
| M1 <sup>4/</sup> -SDN-3 | 7.70 b                                                    | -                                             |
| M2-SDN-3                | 6.60 b                                                    | -                                             |
| M3-SDN-3                | 5.07 b                                                    | -                                             |
| C.V. <sup>5/</sup> (%)  | 16.31                                                     |                                               |
| WT-SDN-9                | 50.21 a                                                   | -                                             |
| M1-SDN-9                | 22.22 d                                                   | -                                             |
| M2-SDN-9                | 26.67 c                                                   | -                                             |
| M3-SDN-9                | 35.56 b                                                   | -                                             |
| C.V. <sup>5/</sup> (%)  | 6.54                                                      |                                               |
| WT-SDN-23               | 44.74 a                                                   | -                                             |
| M1-SDN-23               | 25.55 d                                                   | -                                             |
| M2-SDN-23               | 28.89 c                                                   | -                                             |
| M3-SDN-23               | 6.60 e                                                    | -                                             |
| M4-SDN-23               | 30.00 c                                                   | -                                             |
| M5-SDN-23               | 35.55 b                                                   | -                                             |
| M6-SDN-23               | 27.78 cd                                                  | -                                             |
| M7-SDN-23               | 27.78 cd                                                  | -                                             |
| C.V. <sup>5/</sup> (%)  | 5.05                                                      |                                               |

ตารางที่ 7 (ต่อ)

| ไอโซเลต                  | การยับยั้งการเจริญเส้นใย<br>เชื้อรา FOC <sup>1/</sup> (%) | ความกว้างบริเวณยับยั้ง<br>(clear zones) (ซม.) |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| WT <sup>2/</sup> -SDN-43 | 41.70 a <sup>3/</sup>                                     | -                                             |
| M1 <sup>4/</sup> -SDN-43 | 24.44 c                                                   | -                                             |
| M2-SDN-43                | 22.22 d                                                   | -                                             |
| M3-SDN-43                | 27.41 b                                                   | -                                             |
| M4-SDN-43                | 28.89 b                                                   | -                                             |
| C.V. <sup>5/</sup> (%)   | 4.20                                                      |                                               |
| WT-LBN 1-5               | 42.66 a                                                   | 0.22 c                                        |
| M1-LBN 1-5               | 35.57 c-e                                                 | 0.43 ab                                       |
| M2-LBN 1-5               | 34.81 c-e                                                 | 0.40 b                                        |
| M3-LBN 1-5               | 35.56 c-e                                                 | 0.40 b                                        |
| M4-LBN 1-5               | 36.30 b-d                                                 | 0.40 b                                        |
| M5-LBN 1-5               | 38.52 b                                                   | 0.53 a                                        |
| M6-LBN 1-5               | 33.33 e                                                   | 0.47 ab                                       |
| M7-LBN 1-5               | 34.85 c-e                                                 | 0.47 ab                                       |
| M8-LBN 1-5               | 36.30 b-d                                                 | 0.50 ab                                       |
| M9-LBN 1-5               | 37.04 bc                                                  | 0.47 ab                                       |
| M10-LBN 1-5              | 33.33 e                                                   | 0.43 ab                                       |
| M11-LBN 1-5              | 34.07 ed                                                  | 0.50 ab                                       |
| M12-LBN 1-5              | 35.57 c-e                                                 | 0.50 ab                                       |
| M13-LBN 1-5              | 37.04 bc                                                  | 0.50 ab                                       |
| M14-LBN 1-5              | 37.04 bc                                                  | 0.50 ab                                       |
| M15-LBN 1-5              | 35.57 c-e                                                 | 0.47 ab                                       |
| control <sup>6/</sup>    | -                                                         | -                                             |
| C.V. <sup>5/</sup> (%)   | 3.81                                                      | 11.58                                         |



## ตารางที่ 7 (ต่อ)

- <sup>1/</sup> เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC คำนวณจากสูตร  
 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรค =  $(R_1 - R_2 / R_1) \times 100$   
 $R_1$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม  
 $R_2$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราโรคในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ
- <sup>2/</sup> WT = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิม
- <sup>3/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ( $P=0.05$ )
- <sup>4/</sup> M = เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm
- <sup>5/</sup> C.V. (%) แสดงของแต่ละไอโซเลตนั้นเพื่อเป็นการเปรียบเทียบกันในระหว่างเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ดั้งเดิม (WT) และเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้น 10 ppm (M)
- <sup>6/</sup> กรรมวิธีควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค (เชื้อรา FOC)

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) ด้วยวิธี paper disc method บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

| ไอโซเลต               | การยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา FOC <sup>1/</sup> (%) | ความกว้างบริเวณยับยั้ง (clear zones) (ซม.) |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| M3-SDN-9              | 38.33 a <sup>2/</sup>                                 | 0.34 b                                     |
| M5-SDN-23             | 33.88 a                                               | 0.33 b                                     |
| M5-LBN 1-5            | 40.55 a                                               | 0.44 a                                     |
| control <sup>3/</sup> | -                                                     | -                                          |
| C.V. (%)              | 13.68                                                 | 10.09                                      |

<sup>1/</sup> เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC คำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา} = (R_1 - R_2 / R_1) \times 100$$

$R_1$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

$R_2$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

<sup>2/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

<sup>3/</sup> กรรมวิธีควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค (เชื้อรา FOC)

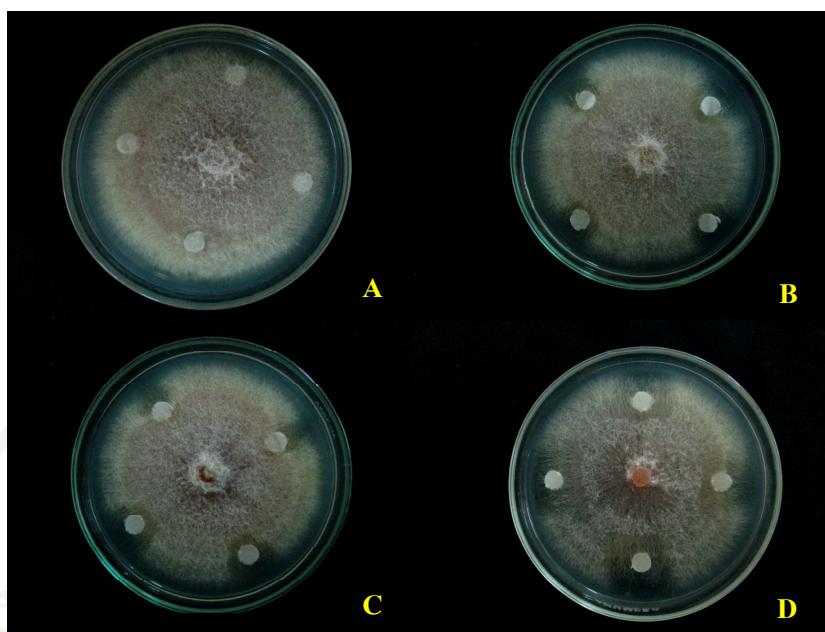
ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ในการยับยั้งการงอก และการพัฒนาเป็น germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) บนสไลด์หลุมที่ 24 ชั่วโมง

| ไอโซเลต    | การงอกของสปอร์<br>เชื้อรา FOC <sup>1/</sup> (%) | ความยาว<br>germ tube <sup>2/</sup> (μm) | ลักษณะ germ tube                                             |
|------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| M3-SDN-9   | 80.00 b <sup>3/</sup>                           | 23.00 c                                 | สปอร์โป่งพอง<br>พบ germ tube ทั้งที่งอก และ<br>ไม่งอกโป่งพอง |
| M5-SDN-23  | 87.50 b                                         | 47.68 b                                 | สปอร์โป่งพอง<br>พบ germ tube ทั้งที่งอก และ<br>ไม่งอกโป่งพอง |
| M5-LBN 1-5 | 70.00 c                                         | 16.96 c                                 | สปอร์โป่งพอง<br>พบ germ tube ทั้งที่งอก และ<br>ไม่งอกโป่งพอง |
| control    | 100.00 a                                        | 67.20 a                                 | สปอร์เจริญได้ตามปกติ                                         |
| C.V. (%)   | 7.45                                            | 17.44                                   |                                                              |

<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่ 24 ชั่วโมง หลังจากทำการหดยาสารกรองของเชื้อแบคทีเรีย

<sup>2/</sup> ค่าเฉลี่ยความยาวของ germ tube ที่งอกออกมาจากสปอร์ที่ 24 ชั่วโมง หลังจากหดยาสารกรองของแบคทีเรีย

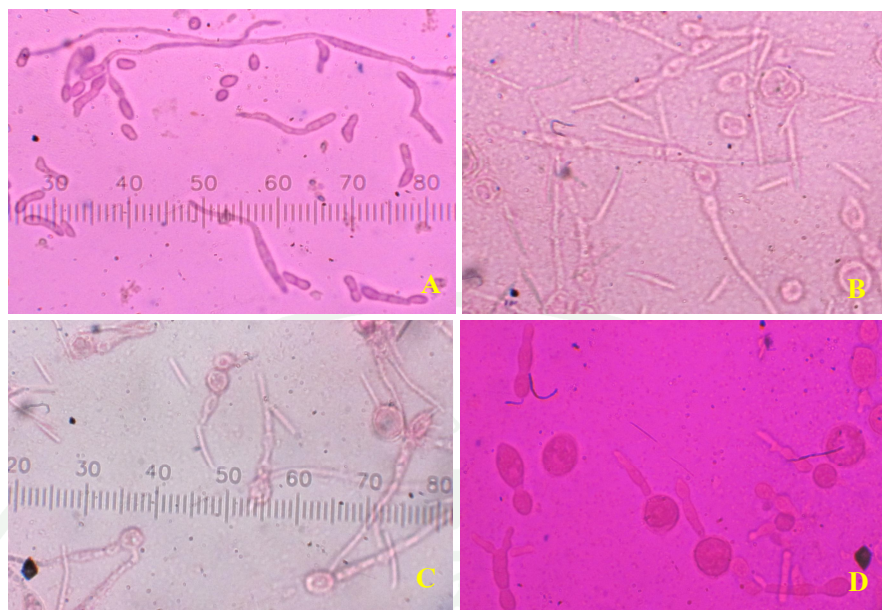
<sup>3/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)



ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) ด้วยวิธี paper disc method บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง

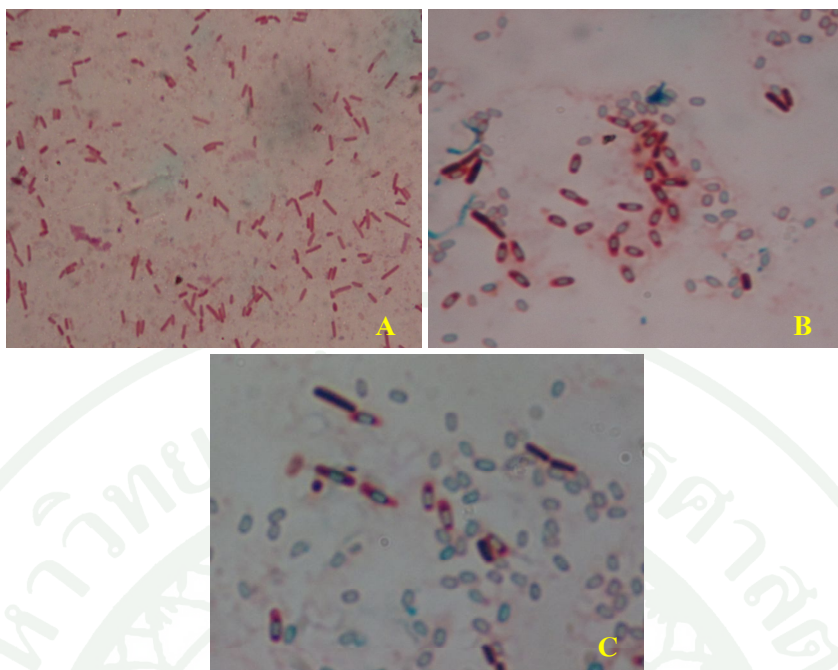
- A. กรรมวิธีควบคุม (เชื้อรา FOC)
- B. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M3-SDN-9
- C. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M5-SDN-23
- D. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5





ภาพที่ 8 อิทธิพลของสารกรองเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC)

- A. กรรมวิธีควบคุม (เชื้อรา FOC) สปอร์เจริญได้ตามปกติ
- B. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M3-SDN-9 สปอร์โป่งพอง
- C. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M5-SDN-23 สปอร์โป่งพอง
- D. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 สปอร์โป่งพอง



ภาพที่ 9 รูปร่างเซลล์ และการสร้างเอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิภูมิทั้ง 3 ไอโซเลต

- A. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M3-SDN-9
- B. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M5-SDN-23
- C. เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5

## 6. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคโรคราเหี่ยวในแปลงปลูกพืช

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิชีวนะที่คัดเลือกได้จากการพัฒนาสายพันธุ์กลายให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC และพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จชนิดผงดิน นำมาทดสอบการควบคุมโรคในแปลงปลูกพืช พบว่าเมื่อต้นแตงกวามีอายุ 7 วัน หลังปลูก กรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีค่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด สูงที่สุดเท่ากับ 70.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย *โอสเพลด* M3-SDN-9 และ M5-LBN 1-5 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเท่ากันคือ 56.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียทั้ง 3 *โอสเพลด* มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่สูงกว่าในกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี (26.67 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ 7 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในแบคทีเรียสูตรสำเร็จชนิดผงดิน

| กรรมวิธี                      | เปอร์เซ็นต์การงอก 7 วัน (%) |
|-------------------------------|-----------------------------|
| control <sup>1/</sup>         | 33.33 b <sup>2/</sup>       |
| สารเคมี <sup>3/</sup>         | 26.67 b                     |
|                               | (-19.98%) <sup>4/</sup>     |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 70.00 a                     |
|                               | (+110.02%)                  |
| M3-SDN-9                      | 56.67 a                     |
|                               | (+70.03%)                   |
| M5-SDN-23                     | 40.00 b                     |
|                               | (+20.01%)                   |
| M5-LBN 1-5                    | 56.67 a                     |
|                               | (+70.03%)                   |
| C.V. (%)                      | 15.78                       |

## ตารางที่ 10 (ต่อ)

- <sup>1/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่ปลูกในดินแปลงปลูกตามธรรมชาติโดยแช่เมล็ดแตงกวาในน้ำนิ่งมาเชื้อ
- <sup>2/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)
- <sup>3/</sup> แช่เมล็ดด้วยสารเคมี metalaxyl 35% SD (อัตรา 7 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม) ก่อนปลูกในแปลงทดลอง
- <sup>4/</sup> เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของเปอร์เซ็นต์การงอกเมล็ด เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม จำนวนได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$

เมื่อต้นแตงกวามีอายุ 14 วัน ตรวจเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายของต้นแตงกวา พบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 วันสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือแบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5, M3-SDN-9 และ M5-SDN-23 เท่ากับ 96.67, 93.33 และ 83.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย M3-SDN-9 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 วันเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เช่นกัน (ตารางที่ 11)

การตรวจเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายของต้นแตงกวาที่ 21 และ 28 วัน พบว่าทั้ง 2 ครั้งนี้มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเท่ากัน แต่มีค่าลดลงจากที่ 14 วัน ซึ่งกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่สูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกันกับที่ 14 วัน โดยกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 คือ 93.33 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M3-SDN-9 และ ไอโซเลต M5-SDN-23 เท่ากับ 83.33 และ 76.76 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 11) และจากผลการทดลองที่พบว่าเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายของต้นแตงกวาที่ 21 และ 28 วัน มีค่าลดลงจากเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 วัน อาจเนื่องมาจากเกิดโรคเน่าระดับดินของต้นกล้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* โดยเมื่อต้นกล้าแตงกวาถูกเชื้อเข้าทำลายจะแสดงอาการแผลน้ำเน่าบริเวณรากและลำต้นที่ใกล้กับระดับดิน ต้นกล้าจะหักพับลงในขณะที่ใบยอดยังเขียวอยู่ ต่อมาส่วนยอดจะเฉาและแห้งตายคล้ายถูกน้ำร้อน จึงขออ้างอิงผลการ



ทดลองในส่วนนี้จากนางสาวณัฐสุดา คำยอด ในการบันทึกผลการเกิดโรคน้ำระดับดิน (Damping-off) ในส่วนของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) เมื่อต้นแตงกวาอายุ 28 วัน ที่พบว่ากรรมวิธีที่เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ในกรรมวิธีที่เชื้อราในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์กับสายพันธุ์กลายไอโซเลต M5-LBN1-5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด คือ 3.70 เมื่อเทียบกับแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลต รองลงมาคือกรรมวิธีที่เชื้อราในผงเชื้อแบคทีเรียปฏิสัมพันธ์กับสายพันธุ์กลายไอโซเลต M3-SDN-23 และ M3-SDN-9 เท่ากับ 8.33 และ 12.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคถึง 39.28 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl 35 SD มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ 28 วัน เท่ากับ 13.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

เนื่องจากในการช่วง 1 เดือนแรกนี้ การตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ 7 วัน และการตรวจเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายของต้นแตงกวาที่ 14, 21 และ 28 วัน พบว่าเมล็ดแตงกวาไม่ค่อยงอก ส่วนต้นแตงกวาที่งอกออกมาแล้วไม่ค่อยเจริญเติบโต เนื่องจากสภาพอากาศในช่วงนั้นหนาวเย็นมาก ส่งผลต่อการงอกของเมล็ด และการเจริญเติบโตของต้นแตงกวา เนื่องจากแตงกวาเป็นพืชที่ต้องการอากาศอบอุ่นแต่ไม่ถึงกับร้อนจัด ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผสมเกสรนั้นอยู่ระหว่าง 17-25 องศาเซลเซียส (จิรวรรณ, 2551; ศรานนท์, 2551) และจากผลการทดลองสังเกตได้ว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่สูงที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายของต้นแตงกวาที่ 14, 21 และ 28 วันคงที่ไม่มีการลดลงจนถึง 28 วัน สอดคล้องกับในรายงานของ Intana (2003) ที่ว่าการเพาะเมล็ดในดินซึ่งปลูกหรือโรยด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ทำให้เมล็ดงอกเร็วกว่าปกติ 2-3 วัน และต้นกล้ามีขนาดใหญ่กว่าปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอก และจำนวนต้นรอดตายเพิ่มขึ้นอีกด้วย เช่นเดียวกับที่ จิระเดช (2549) กล่าวว่า การคลุมเมล็ดพืชด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ช่วยให้เมล็ดพืชมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงขึ้น ลดการเกิดโรคเมล็ดเน่า และโรคน้ำระดับดินลงได้มากนั้น เชื่อว่าเป็นผลมาจากการแข่งขันการใช้ธาตุอาหาร เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน รอบๆ ผิวของเมล็ดของเชื้อรา *Trichoderma* นอกเหนือจากกระบวนการเป็นปรสิตหรือการสร้างปฏิสัมพันธ์ที่ยับยั้งเชื้อโรค ดังนั้นถ้าคลุมเมล็ดด้วยจุลินทรีย์ปฏิสัมพันธ์ที่สามารถแข่งขันการใช้อาหารกับเชื้อโรคได้ จะช่วยยับยั้งเชื้อโรคที่เข้าทำลายเมล็ดพืชได้ด้วย Sivan and Chet (1989) ได้แสดงให้เห็นว่าเมล็ดพืชที่คลุมด้วยเชื้อรา *Trichoderma* (*T. harzianum*) แล้วปลูกลงในดินที่มีความชื้นสม่ำเสมอ

ช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* ในบริเวณรอบๆ ราก (rhizosphere) มีปริมาณสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณเชื้อรา *Fusarium* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวมีปริมาณลดลง

ตารางที่ 11 อิทธิพลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่ 14 21 และ 28 วันหลังปลูกด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในแบคทีเรียสูตรสำเร็จชนิดผงดิน

| กรรมวิธี                      | เปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย (%) |                         |                         |
|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                               | 14 วัน                   | 21 วัน                  | 28 วัน                  |
| control <sup>1/</sup>         | 96.67 a <sup>2/</sup>    | 70.00 b                 | 70.00 b                 |
| สารเคมี <sup>3/</sup>         | 56.67 b                  | 53.33 c                 | 53.33 c                 |
|                               | (-41.38%) <sup>4/</sup>  | (-23.81%) <sup>4/</sup> | (-23.81%) <sup>4/</sup> |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 93.33 a                  | 93.33 a                 | 93.33 a                 |
|                               | (-3.46%)                 | (+33.33%)               | (+33.33%)               |
| M3-SDN-9                      | 93.33 a                  | 83.33 ab                | 83.33 ab                |
|                               | (-3.46%)                 | (+19.04%)               | (+19.04%)               |
| M5-SDN-23                     | 83.33 a                  | 76.67 ab                | 76.67 ab                |
|                               | (-13.80%)                | (+9.53%)                | (+9.53%)                |
| M5-LBN 1-5                    | 96.67 a                  | 93.33 a                 | 93.33 a                 |
|                               | (0%)                     | (+33.33%)               | (+33.33%)               |
| C.V. (%)                      | 8.69                     | 10.93                   | 10.93                   |

<sup>1/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่ปลูกในดินแปลงปลูกตามธรรมชาติโดยแช่เมล็ดแตงกวาในน้ำนิ่งมาเชื้อ

<sup>2/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

<sup>3/</sup> แช่เมล็ดด้วยสารเคมี metalaxyl 35% SD (อัตรา 7 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม) ก่อนปลูกในแปลงทดลอง

<sup>4/</sup> เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตาย เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม จำนวนได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) เมื่อต้นแตงกวาอายุ 28 วัน หลังจากแช่เมล็ดเป็นเวลา 15 นาที ก่อนปลูกในสภาพแปลงปลูกพืชทดลอง

| กรรมวิธี                      | เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ 28 วัน <sup>1/</sup> |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|
| control <sup>2/</sup>         | 39.28 a <sup>3/</sup>                         |
| metalaxyl 35 SD               | 13.33 b<br>(-66.06%) <sup>4/</sup>            |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 0.00 b<br>(-100%)                             |
| M3-SDN-9                      | 12.50 b<br>(-68.17%)                          |
| M5-SDN-23                     | 8.33 b<br>(-78.79%)                           |
| M5-LBN1-5                     | 3.70 b<br>(-90.58%)                           |

<sup>1/</sup>เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Disease incidence) ดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ Disease incidence} = \frac{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่เกิดโรค (ซ้ำ)}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมดที่ไม่เกิดโรค (ซ้ำ)}} \times 100$$

<sup>2/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อราเป็นดินในแปลงปลูกธรรมชาติ

<sup>3/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตาม วิธี Duncan's New Multiple Range Test (P = 0.05)

<sup>4/</sup> เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คำนวณได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$

เมื่อต้นแตงกวามีอายุ 28 วัน สุ่มรากแตงกวานำรากแตงกวาล้างน้ำให้สะอาด ตัดรากให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบครองรากของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าในทุกกรรมวิธีไม่พบการเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคเลย ยกเว้นในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 เพียงกรรมวิธีเดียวที่พบเชื้อราสาเหตุโรคที่เข้าทำลายราก ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราสาเหตุโรคที่เข้าทำลายรากเท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 13)

เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบการเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกกรรมวิธี โดยกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีความสามารถในการครอบครองรากสูงที่สุดคือ 66.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M3-SDN-9, ไอโซเลต M5-LBN 1-5 และ ไอโซเลต M5-SDN-23 โดยมีการครอบครองรากได้เท่ากับ 65.55, 59.44 และ 58.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

จากการทดลองในครั้งนี้เมื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 เป็นกรรมวิธีเดียวที่มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค แต่เมื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากที่สูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-SDN-23 ที่ไม่พบเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถควบคุมหรือลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคได้ แต่ยังสามารถเจริญครอบครองรากได้ดี เพราะเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียนั้นมากกว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์อาจช่วยป้องกันโดยการเจริญครอบคลุมผิวรากพืช เพื่อป้องกันการเจริญเข้าครอบครองรากพืชของเชื้อโรค หรือไม่ให้เชื้อโรคได้มีโอกาสดูดสารปฏิชีวนะ และยังสามารถในการแข่งขันการใช้อาหารกับเชื้อโรคพืช เพื่อหยุดยั้งการเพิ่มปริมาณ หรือการขยายพันธุ์และการสืบพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช หรืออาจจะเป็นกลไกการสร้างสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งเชื้อโรคได้ (จิระเดช, 2549) ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีความสามารถในการครอบครองรากได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* สามารถแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชในการใช้อาหารบริเวณรอบๆ ราก รอบเมล็ด และบนผิวพืชได้ และยังจัดเป็นซาโพรไฟต์ที่มีความสามารถครอบครองราก และผิวพืชได้ดี (จิระเดช, 2549) สอดคล้องกับ เพ็ญภัก (2552) พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ครอบครองรากผักกาดหอมทั้งผิวด้านนอกและในรากได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกัน



แบคทีเรียสามารถเจริญครอบครองบริเวณในรากได้ และมีค่าเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากได้ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ

**ตารางที่ 13** เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ของต้นแตงกวาที่อายุ 28 วัน ด้วยการแช่เมล็ดแตงกวาในแบคทีเรียสูตรสำเร็จชนิดผงคิน

| กรรมวิธี                      | การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค <sup>1/</sup> (%) | การเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ <sup>1/</sup> (%) |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| control <sup>2/</sup>         | 0.00 b <sup>3/</sup>                                     | 0.00 b                                                    |
| สารเคมี <sup>4/</sup>         | 0.00 b                                                   | 0.00 b                                                    |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 0.00 b                                                   | 66.67 a                                                   |
| M3-SDN-9                      | 0.00 b                                                   | 65.55 a                                                   |
| M5-SDN-23                     | 0.00 b                                                   | 58.34 a                                                   |
| M5-LBN 1-5                    | 16.67 a                                                  | 59.44 a                                                   |
| C.V. (%)                      | 84.85                                                    | 36.72                                                     |

<sup>1/</sup> เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวางรากจำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้นที่ 10 ppm สำหรับเชื้อราสาเหตุโรค และบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้นที่ 10 ppm สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และบนอาหาร Martin's medium สำหรับเชื้อรา *T. harzianum*

<sup>2/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่ปลูกในดินแปลงปลูกตามธรรมชาติโดยแช่เมล็ดแตงกวาในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ

<sup>3/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

<sup>4/</sup> แช่เมล็ดด้วยสารเคมี metalaxyl 35% SD (อัตรา 7 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม) ก่อนปลูกในแปลงทดลอง

เมื่อต้นแตงกวามีอายุ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง) ประเมินการเกิดโรคเหี่ยวของต้นแตงกวา พบว่ากรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรคสูงที่สุดเท่ากับ 86.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 มีเปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรคต่ำที่สุดคือ 58.33 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าในกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี โดยในดัชนีการเกิดโรคมักพบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกันคือ กรรมวิธีควบคุมที่มีเปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรคสูงที่สุด ก็มีดัชนีการเกิดโรคสูงที่สุดด้วยเช่นกันเท่ากับ 84.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีที่มีดัชนีการเกิดโรคต่ำที่สุดคือ กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 เท่ากับ 59.33 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรคและดัชนีการเกิดโรคลดลงจากกรรมวิธีควบคุมเท่ากับ 32.69 และ 29.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรค และดัชนีการเกิดโรค เมื่อต้นแตงกวามีอายุ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง)

| กรรมวิธี                      | เปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรค (%) <sup>1/</sup> | ดัชนีการเกิดโรค (%) <sup>2/</sup>  |
|-------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|
| control <sup>3/</sup>         | 86.67 a <sup>4/</sup>                   | 84.00 a                            |
| สารเคมี <sup>5/</sup>         | 70.00 ab<br>(-19.23%) <sup>6/</sup>     | 62.00 b<br>(-26.19%) <sup>6/</sup> |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 61.67 b<br>(-28.84%)                    | 64.33 b<br>(-23.41%)               |
| M3-SDN-9                      | 68.33 ab<br>(-21.16%)                   | 60.00 b<br>(-28.57%)               |
| M5-SDN-23                     | 73.33 ab<br>(-15.39%)                   | 66.33 b<br>(-21.03%)               |
| M5-LBN 1-5                    | 58.33 b<br>(-32.69%)                    | 59.33 b<br>(-29.37%)               |
| C.V. (%)                      | 15.47                                   | 7.56                               |

## ตารางที่ 14 (ต่อ)

<sup>1/</sup> เปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรค คำนวณดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรค (\%)} = \frac{\text{จำนวนต้นเป็นโรค} \times 100}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}}$$

<sup>2/</sup> ดัชนีการเกิดโรค คำนวณหาค่าดัชนีการเกิดโรค (%) (Disease index) ดังนี้

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค (\%)} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นที่แสดงอาการ} \times \text{ระดับอาการ)} \times 100}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด} \times \text{ระดับอาการสูงสุด}}$$

โดยวิธีการให้คะแนนเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1 แสดงอาการของโรค โดยมีใบเหี่ยวต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนใบทั้งต้น

ระดับ 2 แสดงอาการของโรค โดยมีใบเหี่ยว 11-20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนใบทั้งต้น

ระดับ 3 แสดงอาการของโรค โดยมีใบเหี่ยว 21-50 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนใบทั้งต้น

ระดับ 4 แสดงอาการของโรค โดยมีใบเหี่ยว 50-100 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนใบทั้งต้น

ระดับ 5 แสดงอาการของโรค คือต้นตาย

<sup>3/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่ปลูกในดินแปลงปลูกตามธรรมชาติโดยแช่เมล็ดแตงกวาในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ

<sup>4/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

<sup>5/</sup> รดต้นแตงกวาด้วยสารเคมี carbendazim 50 WP (อัตรา 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร) เมื่ออายุ 45 วัน

<sup>6/</sup> เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของต้นเป็นโรค และดัชนีการเกิดโรค เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คำนวณได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม} \times 100}{\text{กรรมวิธีควบคุม}}$$



ภาพที่ 10 ลักษณะการเกิดโรคเหี่ยวของต้นแตงกวาที่แสดงอาการใบไหม้ และเหี่ยว

A, B ลักษณะอาการของโรคเหี่ยว

C, D เมื่อผ่าบริเวณโคนต้นแตงกวาออกพบภายในเป็นสีน้ำตาล

เมื่อต้นแตงกวามีอายุ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง) สุ่มรากแตงกวานำรากแตงกวามาล้างน้ำให้สะอาด ตัดรากให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบครองรากของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าในต้นที่เป็นโรคของกรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคสูงที่สุดเท่ากับ 56.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคต่ำที่สุดเพียง 20.00 เปอร์เซ็นต์ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมเท่ากับ 64.71 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นปกติให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับในกรรมวิธีควบคุมโดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคถึง 70.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-SDN-23 กลับมีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค ต่ำที่สุดเท่ากับ 41.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15) (ภาพที่ 11)



เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบการครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกกรรมวิธีโดยกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-SDN-23 ตรวจพบการเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียสูงที่สุดคือ 15.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์ของเชื้อราสาเหตุโรคที่เข้าทำลายรากที่ต่ำที่สุดในต้นปกติ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 ที่มีการเจริญครอบครองรากได้เท่ากับ 13.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M3-SDN-9 และกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีการเจริญครอบครองรากเท่ากัน คือ 10.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการลดเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อโรคโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์อาจมีผลมาจากกลไกในการควบคุมโรคทั้งการแข่งขันในด้านที่อยู่อาศัยเพื่อหยุดยั้งการเพิ่มปริมาณ หรือการขยายพันธุ์ และการสืบพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรค การสร้างสารปฏิชีวนะ สารทุติยภูมิ ตลอดจนชักนำให้พืชสร้างเอนไซม์ และกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานโรค เช่นเดียวกับงานทดลองของ Karen (2009) ที่ตรวจวิเคราะห์รากและดิน บริเวณผิวรากของแตงกวาที่ทำการปลูกเชื้อ *B. subtilis* QST 713 พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างสารพวก surfactin, iturin ภายใต้อาณัติที่มีการแข่งขันกันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นบริเวณรากของแตงกวา โดยตรวจด้วยวิธี chromatography (HPLC) and mass spectroscopy (MS) หรือแม้แต่การเจริญครอบครองพื้นที่ บริเวณผิวรากพืช ทำให้สามารถยับยั้งการเข้าทำลายและลดระดับความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นได้ หรือแม้แต่การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรคพืชโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยที่แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* มีการสร้างสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ protease, cellulase, chitinase,  $\beta$ -1,3 glucanase และ  $\beta$ -1,4 endoglucanase (Marten *et al.*, 2000; Wen *et al.*, 2003; Andre *et al.*, 2005)

จากการทดลองสุ่มรากแตงกวา เพื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคทั้งในต้นที่เป็นโรค และต้นปกติ เนื่องจากต้องการพิสูจน์ว่าในต้นปกติที่ไม่แสดงอาการของโรคนั้น ไม่มีเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ แต่จากผลการทดลอง พบว่าในต้นปกติที่ไม่แสดงอาการของโรคก็พบเชื้อราสาเหตุโรคอยู่เช่นกัน และต้นแตงกวาก็ยังสามารถเจริญเติบโตอยู่ได้ ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อ *Fusarium sp.* ที่เป็น non-pathogenic strain มาเจริญครอบครองรากมากกว่าเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งคล้ายกับในกรณีของดินยับยั้งเชื้อโรค (pathogen suppressive soil) ซึ่งหมายถึงดินปลูกพืชที่ยังคงมีเชื้อโรคเจริญอยู่แต่ก็เกิดโรคในระดับต่ำ แม้ว่าพืชที่ปลูกจะอ่อนแอ และสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการพัฒนาของโรค จุลินทรีย์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดการยับยั้งโรค คือเชื้อรา *Fusarium* ที่ไม่ใช่สาเหตุโรคพืช (non-pathogen *Fusarium spp.*) เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อโรค พบว่าลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวลงได้ (จิระเดช, 2549) ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *F. oxysporum* ที่แยกได้จากดินในรัฐแคลิฟอร์เนีย เมื่อใส่ลงในดินที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *apii*

สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวของขึ้นถ่ายได้ (Schneider, 1984) และเชื้อรา *F. oxysporum* จากดินร่วนปนทรายในบริเวณ Salinas Valley สามารถยับยั้งโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมของพืชชนิดต่างๆ ได้ (Paulitz *et al.*, 1987) แต่ในกรณีนี้ควรมีการพิสูจน์การเกิดโรคของเชื้อที่แยกได้จากต้นปกติด้วย เนื่องจากได้ปลูกลงในดินธรรมชาติ เพื่อเป็นการสนับสนุนว่าถ้ามีอยู่จริงจะไม่เกิดโรค แม้จะมีเชื้อโรคอยู่

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ของต้นแตงกวาที่อายุ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง)

| กรรมวิธี                      | การเจริญครอบครองรากของ<br>เชื้อราสาเหตุโรค <sup>1/</sup> (%) |                         | การเจริญครอบครอง<br>รากของแบคทีเรีย<br>ปฏิปักษ์ <sup>1/</sup> (%) |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                               | ต้นเป็นโรค <sup>2/</sup>                                     | ต้นปกติ <sup>3/</sup>   |                                                                   |
| control <sup>4/</sup>         | 56.67 a <sup>5/</sup>                                        | 70.00 a                 | 0.00 c                                                            |
| สารเคมี <sup>6/</sup>         | 30.00 b                                                      | 61.5 ab                 | 0.00 c                                                            |
|                               | (-47.06%) <sup>7/</sup>                                      | (-12.14%) <sup>7/</sup> |                                                                   |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 39.38 ab                                                     | 51.00 bc                | 10.00 b                                                           |
|                               | (-30.50%)                                                    | (-27.14%)               |                                                                   |
| M3-SDN-9                      | 29.58 b                                                      | 65.00 ab                | 10.00 b                                                           |
|                               | (-47.80%)                                                    | (-7.14%)                |                                                                   |
| M5-SDN-23                     | 35.00 b                                                      | 41.50 c                 | 15.33 a                                                           |
|                               | (-38.24%)                                                    | (-40.71%)               |                                                                   |
| M5-LBN 1-5                    | 20.00 b                                                      | 55.00 abc               | 13.00 ab                                                          |
|                               | (-64.71%)                                                    | (-21.43%)               |                                                                   |
| C.V. (%)                      | 30.28                                                        | 15.18                   | 23.95                                                             |

## ตารางที่ 15 (ต่อ)

- <sup>1/</sup> เพอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค และการเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยวางรากจำนวน 10 รากต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Nash and Snyder medium สำหรับเชื้อราสาเหตุโรค และบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) ผสมสารปฏิชีวนะ rifampicin ความเข้มข้นที่ 10 ppm สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และบนอาหาร Martin's medium สำหรับเชื้อรา *T. harzianum*
- <sup>2/</sup> ดัชนีเป็นโรค ดัชนีที่แสดงอาการของโรค
- <sup>3/</sup> ดัชนีปกติ ดัชนีที่ไม่มีการแสดงอาการของโรค
- <sup>4/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่ปลูกในดินแปลงปลูกตามธรรมชาติโดยแช่เมล็ดแตงกวาในน้ำนิ่งมาเชื้อ
- <sup>5/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ( $P=0.05$ )
- <sup>6/</sup> รดต้นแตงกวาด้วยสารเคมี carbendazim 50 WP (อัตรา 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร) เมื่ออายุ 45 วัน
- <sup>7/</sup> เพอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-) ของการเจริญครอบครองรากของเชื้อสาเหตุโรคเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คำนวณได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น (+) หรือลดลง (-)} = \frac{\text{กรรมวิธีทดลอง} - \text{กรรมวิธีควบคุม}}{\text{กรรมวิธีควบคุม}} \times 100$$



ภาพที่ 11 การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรคของต้นแตงกวาบนอาหาร Nash and Snyder medium ในแปลงปลูกพืช

การตรวจนับปริมาณเชื้อราสาเหตุโรค และปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในดิน เมื่อต้น  
 แตงกวาอายุ 28 วัน และ 75 วัน (สิ้นสุดการทดลอง) ไม่พบปริมาณเชื้อราสาเหตุโรค และปริมาณของ  
 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในดินเลย อาจเนื่องมาจากมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อเชื้อราสาเหตุโรค  
 และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ อาจเช่น อุณหภูมิ สภาพอากาศ ลักษณะของดิน แหล่งอาหาร ที่ไม่เหมาะ  
 ต่อการเจริญเติบโต และการอยู่อาศัย โดยอาจส่งผลต่อเชื้อที่อยู่ในดินได้ เพราะดินเป็นแหล่งที่อยู่  
 ของจุลินทรีย์ พืช และสิ่งมีชีวิตอื่นอีกมากมาย ดินเป็นวัตถุที่มีโครงสร้างซับซ้อน มีจุลินทรีย์หลาย  
 ชนิดอาศัยอยู่ จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินมีความแตกต่างกัน บางชนิดสามารถทนต่อสภาพแวดล้อม  
 ภายนอกที่เลวร้ายได้ดี เช่น ทนอุณหภูมิและความชื้นสูงได้ ดินที่มีสภาพแวดล้อมแตกต่างกันจะมี  
 ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์แตกต่างกัน ดินมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต  
 โดยเฉพาะกับเชื้อจุลินทรีย์ในดิน มีกิจกรรมหรือกระบวนการต่างเกิดขึ้นมากมายและมี  
 ความสัมพันธ์กันอย่างซับซ้อนระหว่าง พืช จุลินทรีย์ และสภาพแวดล้อม (นิพนธ์, 2533) ซึ่งใน  
 ความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนที่เกิดขึ้นในดินนี้อาจส่งผลต่อแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ โดยแบคทีเรีย  
 ปฏิปักษ์อาจต้องไปต่อสู้แข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีอยู่ในดินในด้านต่างๆเพื่อการอยู่รอด  
 นอกจากนี้แสงแดดโดยเฉพาะรังสี ultraviolet เป็นตัวการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย ส่วนเชื้อรา  
 สาเหตุโรค คือ เชื้อรา *Fusarium* sp. นั้นค่อนข้างไวต่อระดับหรือการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมาก  
 เกิดขึ้นรุนแรงเมื่ออุณหภูมิของดินอยู่ในช่วงระหว่าง 24-30 องศาเซลเซียส แต่จะไม่เกิดขึ้นถ้า  
 อุณหภูมิของดินต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส หรือมีอุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส สามารถใช้การ  
 เจริญเติบโตของแตงกวาที่มีผลมาจากความชื้นของดินที่พอเหมาะ แต่ไม่ชอบดินแฉะหรือมี  
 ความชื้นสูง (ศักดิ์, 2537) มีการศึกษาถึงชนิดและปริมาณของเชื้อ *Fusarium* sp. ในดิน พบว่าความ  
 หนาแน่นของเชื้อ สอดคล้องกับความรุนแรงของการเกิดโรคกับพืช โดยที่ระดับการเกิดโรคมี  
 ความสัมพันธ์โดยตรงกับความหนาแน่นของเชื้อ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ การตอบสนองของพืช และ  
 อิทธิพลของสภาพแวดล้อมด้วย (Baker, 1965; Baker *et al.*, 1967; Cook, 1968 ; Rao and Roa,  
 1963) การทดลองในสภาพแปลงปลูกพืชนี้ไม่ได้ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคลงไปด้วย จึงทำให้ตรวจไม่พบ  
 เชื้อราสาเหตุโรค และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในดินได้



ตารางที่ 16 อิทธิพลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อน้ำหนักผลผลิตของต้นแตงกวาเก็บผลผลิต 20 วัน

| กรรมวิธี                      | น้ำหนัก (กก.)        |
|-------------------------------|----------------------|
| control <sup>1/</sup>         | 0.70 b <sup>2/</sup> |
| สารเคมี <sup>3/</sup>         | 0.80 ab              |
| <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 | 1.15 a               |
| M3-SDN-9                      | 0.95 ab              |
| M5-SDN-23                     | 1.03 a               |
| M5-LBN 1-5                    | 0.99 ab              |
| C.V. (%)                      | 20.29                |

<sup>1/</sup> กรรมวิธีควบคุมที่ปลูกในดินแปลงปลูกตามธรรมชาติโดยแซมเมล็ดแตงกวาในน้ำนิ่งมาเชื้อ

<sup>2/</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

<sup>3/</sup> รดต้นแตงกวาด้วยสารเคมี carbendazim 50 WP (อัตรา 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร) เมื่ออายุ 45 วัน

เมื่อชั่งน้ำหนักผลผลิต พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีน้ำหนักผลผลิตสูงสุด เท่ากับ 1.15 กิโลกรัม รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-SDN-23, ไอโซเลต M5-LBN 1-5 และไอโซเลต M3-SDN-9 โดยมีน้ำหนักผลผลิตคือ 1.03, 0.99 และ 0.95 กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้ำหนักผลผลิตสูงกว่าในกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี (0.8 กิโลกรัม) และในกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีค่าน้ำหนักผลผลิตต่ำที่สุดคือเท่ากับ 0.7 กิโลกรัม (ตารางที่ 16) จากการทดลองกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีน้ำหนักผลผลิตสูงสุด อาจเนื่องจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 มีความสามารถครอบครองรากพืชได้ดี และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต เพิ่มผลผลิต และความสมบูรณ์ของรากพืช อีกทั้งยังช่วยให้พืชต้านทานต่อสภาวะเครียดที่เกิดจากสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น (Harman *et al.*, 2004) ส่วนกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-SDN-23 มีน้ำหนักผลผลิตที่สูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต คือไอโซเลต M5-LBN 1-5 และไอโซเลต M3-SDN-9 อาจเป็นผลมาจากการที่มีเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สูงที่สุด และพบเปอร์เซ็นต์การเจริญครอบครองรากของเชื้อราสาเหตุโรค ที่ต่ำที่สุดในต้นปกติ แม้จะพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรค และดัชนีการเกิดโรคที่สูงก็ตาม อาจเนื่อง จากในต้นปกติมีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคในด้านต่างๆ สามารถครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อสาเหตุโรค

ไม่สามารถเจริญ หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้แข็งแรง มีผลผลิตที่สูงขึ้น (นิพนธ์, 2546) Soleimani *et al.* (2005) รายงานว่าการจัดการเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่เพียงแต่ลดการเกิดโรคได้เพียงอย่างเดียว แต่ยังแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลในด้านการเจริญเติบโต และผลผลิตของข้าวสาลีได้สูงขึ้น และแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรอบรากอาจไปกระตุ้นหรือชักนำให้ต้นแตงกวาเกิดความต้านทานขึ้นได้ จึงทำให้ได้ผลผลิตที่ดี ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมด แนะนำว่าควรใช้ทั้งแบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 สลับกับการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 โดยใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ในการคลุกหรือแช่ไปกับเมล็ดก่อนปลูก หลังจากต้นงอกแล้วรดแบคทีเรียลงดินตามลงไป แต่ในการจะใช้ร่วมกันหรือสลับกัน ควรทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กันระหว่างเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ในห้องปฏิบัติการก่อนว่าเป็นปฏิปักษ์ต่อกันหรือไม่ และควรทดสอบระยะห่างในการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยเช่นกัน

## สรุป

จากการนำเชื้อแบคทีเรีย 112 ไอโซเลตที่แยกได้จากคินรอบราก 56 ไอโซเลต และใบของต้นแตงกวา 56 ไอโซเลต มาใช้ควบคุมโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) โดยนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC ในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อแบคทีเรีย 19 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC และมีความกว้างของบริเวณยับยั้ง (clear zone) โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต SDN-9 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา และความกว้างของบริเวณยับยั้งได้ดีที่สุด

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ไปทดสอบประสิทธิภาพในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าเมื่อต้นแตงกวามีอายุ 7 วัน ทุกกรรมวิธีที่แช่เมล็ดแตงกวาในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียมีเปอร์เซ็นต์การงอกไม่แตกต่างกับกรรมวิธีใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม ยกเว้นกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต SDN-37 และ LBN 2-1 ในกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต SDN-23 ไอโซเลต SDN-41 และไอโซเลต SDN-43 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม แต่เมื่อต้นแตงมีอายุ 14 วัน พบว่ากรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต LBN 1-5 มีเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และมีความยาวรากสูงสุดกว่ากรรมวิธีอื่นๆ ในขณะที่ทั้งไอโซเลต SDN-9 และ SDN-43 มีความยาวราก และความสูงต้นที่สูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม และกรรมวิธีควบคุมที่มีเชื้อสาเหตุโรค อีกทั้งในไอโซเลต SDN-9 ยังสามารถลดการเจริญครอบครองรากของเชื้อสาเหตุโรคได้อีกด้วยเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพมาพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ คือ M3-SDN-9, M5-SDN-23 และ M5-LBN 1-5 นำไปพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จชนิดผงดิน และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในแปลงปลูกพืช พบว่า กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดที่ 7 วัน และเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายของต้นแตงกวาที่ 14, 21 และ 28 วันสูงกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมี โดยกรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียไอโซเลต M5-LBN 1-5 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด และเปอร์เซ็นต์ต้นรอดตายที่สูงสุดในทั้ง 3 ไอโซเลต มีเปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรค และดัชนีการเกิดโรคต่ำที่สุด สามารถลดการเจริญครอบครองรากของเชื้อสาเหตุโรค และยังมีค่าน้ำหนักผลผลิตที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิตติศักดิ์ อินทร์เสวก. 2549. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากเน่าและลำต้นเน่าของงาสาเหตุจากเชื้อ *Fusarium oxysporum*. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการฉบับที่ 2. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู. 2545. การผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดด้วยเทคนิคอย่างง่ายเพื่อใช้ควบคุมโรครากเน่าระดับดินของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 40, 4-7 กุมภาพันธ์ 2545. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2549. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

จิรัสสา มีกลิ่นหอม, วรรณวิไล อินทนู และ จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก, น. 48. ใน รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 6, ขอนแก่น.

จิรวัดน์ ภูเสริมภูมิ. 2551. ผักกินผล. สำนักพิมพ์เกษตรสยามบุ๊คส์, กรุงเทพฯ.

จุฑารัตน์ เพชรแก้ว. 2554. ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสขององุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

ชวลา บุรณศิริ. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.



นิชากร แซ่ตั้ง. 2553. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตและลดโรคเมล็ดต่างของข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. การควบคุมโรคแบคทีเรียของพืชโดยชีววิธี. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2546. การควบคุมโรคแบคทีเรียของพืชโดยชีววิธี, น. 55-88. ใน จิระเดช แจ่มสว่าง, บรรณาธิการ. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปริศนา วิริยะจิตสมบุญ. 2547. ผลกระทบของสารโพแทสเซียมคลอเรตที่มีต่อเชื้อรา *Fusarium* ในสวนลำไย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พจนา ตระกูลสุขรัตน์. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรามาส เจริญรักษ์. 2550. การใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราใบดำของมะขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora fuligena* (Roldan) Deighton. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

แสงมณี ชิงดวง, ประเสริฐ เกร่งเปี่ยม และ สุชาติ วิจิตรานนท์. 2540. ผลของเชื้อรา *Trichoderma Harzianum* ที่มีผลต่อเชื้อรา *Phytophthora parasitica* และ *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริกไทย และโรคเน่าดำของวนิลลา. วาสารโรคพืช 12: 13-24.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ศรานนท์ เจริญสุข. 2551. ผักสวนครัว. สำนักพิมพ์เพชรกระรัต, กรุงเทพฯ.

ศศิธร วุฒินิชย์. 2549. โรคของผักและการควบคุมโรค. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

อารีรัตน์ เทียนขาว. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และลดการเกิดโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

อุดม โกสยสุก. 2540. การปลูกผักกินผล. สำนักพิมพ์อักษราพัฒนา, กรุงเทพฯ.

อรุณรักษ์ พ่วงผล. 2543. พืชผักสวนครัวเสริมรายได้. ห้างหุ้นส่วนจำกัด โรงพิมพ์อักษรไทย, กรุงเทพฯ.

อมรรัตน์ ภูไพบูลย์ และ จงรักษ์ จารุเนตร. 2541. โรคเหี่ยวของฝ้ายที่เกิดจากเชื้อรา. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. 8(3): 45-47.

Andre, O.S.L., M.C. Quecine, M.H.P. Fungaro, F.D. Andreote, W.M. Jr, W.L. Araújo, M.C. Silva-Filho, A.A. Pizzirani-Kleiner, and J.L. Azevedo. 2005. Molecular characterization of a  $\beta$ -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 68: 57-65.

Arie, T., S. Yamashita, S. Doi and T. Kijjima. 1987. Biological control of fusarium wilt of bottle gourd by mixed-cropping with Welsh onion or Chinese chive inoculate with *Pseudomonas gladioli* M-2196. **Ann. Phytopathol. Soc. Japan.** 53: 531-539.

Arwiyanto, T., K. Sakata, M. Goto, S. Tsuyamu and Y. Takikama. 1994. Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. **Ann. Phytopath. Soc. Japan.** 60: 288-294.

- Baker, R. 1965. The dynamics of inoculums, pp. 395-403. *In* K.F. Baker and W.C. Snyder (eds.) **Ecology of Soil-borne Plant Pathogens**. Univ. of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- Baker, R., C.L. Maurer and R.A. Maurer. 1967. Ecology of plant pathogens in soil. VII. Mathenatical models and inoculums density. **Phytopathology** 57: 662-666.
- Baker, R., P. Hanchey, and S. D. Dottarar. 1978. Protection of carnation against. *Fusarium* stem rot by fungi. **Phytopathology** 68: 1495-1501.
- Benson, D.M. and R. Baker. 1970. Rhizosphere competition in models soil system. **Phytopathology** 60: 1058-1061.
- Bochow, H. 1988. Biological control of soil-borne fungal disease in greenhouse crops by introduction of bacterial antagonists, p. 206. *In* **Abstracts of Papers 5<sup>th</sup> Internation Congress of Plant Pathology**, Kyoto, Japan.
- Booth, C. 1971. **The Genus *Fusarium***. Commonwealth Mycol. Inst., Kew, England.
- Booth, C. 1977. ***Fusarium* Laboratory Guide to the Identification of the Major Species**. CMJ, Key, Surrey, England. 58 p.
- Chen, F., M. Wang, Y. Zheng, J. Luo, X. Yang and X. Wang. 2010. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26: 675-684.
- Cirulii, M. and L.J. Alexander. 1966. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytopathology** 56: 1301-1304.

Cook, R.J. 1968. Influence of oat on soil-borne populations of *Fusarium rosium* f.sp. *cerealis* 'Clumorum'. **Phytopathology** 58: 957-960.

Cook, R.J. and R.F. Baker. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. **An. Phytopathol. Soc.**, St. Paul, Minnesota. 539 p.

Cook, R.J. 1993. The role of biological control in pest management in the 21<sup>st</sup> century. pp. 10-20. In R. D. Lumadon and J. L. Vaughn, eds. **ASD Conference proceedings Series. Pest Management: Biologically Based Technologies.**

Correa, A. 1995. *In vitro* inhibitory activity of trichozinianines on *Sclerotium rolfsii* Scc. **Cryptogamine Mycologia** 16(3): 185-190.

Danielson, R. M. and C. B. Davey. 1973. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* sp. Soil. **Biol. Biochem.** 5: 505-515.

De Boer, M., P. Bom, F. Kindt, J.J.B. Keurentjes, I. van der Sluis, L.C. van Loon and P.A.H.M. Bajer. 2003. Control of Fusarium wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease-suppressive mechanism. **Phytopathology** 93: 626-632.

Dennis, C. and J. Webster. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 157: 41.

Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Hennis. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology** 73: 85.



- Elad, Y. and R. Baker. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonas on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology** 75: 147-1052.
- Fravel, D.R. and H.W. Spurr. 1977. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controlled environment. **Phytopathology** 67: 930-932.
- Geremia, R.A., G.H. Goldman, D. Jacobs, M.V. Montagn and A. Herrera-Estrella. Hydrolytic extracellular enzymes of *Trichoderma* : specific induction of a basic proteinase, pp. 193-195. *In New approaches in biological control of soil-borne diseases*, Copenhagen, Denmark.
- Grosh, R., A. Kofoet and H. Junge. 2001. Biological control of rot pathogens in soilless culture. Using bacteria. **Acta Hort.** 548: 393-400.
- Harman, G.E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* speices opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews/Microbiology** 2: 43-56.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Dis.** 87: 4-10.
- Intana, W. 2003. **Selection and Development of *Trichoderma* spp. for High Glucanase, Antifungal Metabolite Producing and Plant growth Promoting Isolates for Biological Control of Cucumber Damping-off Caused by *Pythium* spp.** Ph.D. thesis, Kasetsart University. Bangkok.
- Karen, K., C.P. Schulthess, T.F. Morris, and J.D. Stuart. 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. **Soil Biol. Biochem.** 41: 374-379.

- Kijima, T., T. Arie, S. Namba, S. Yamashita and Y. Doi. 1988. Biological control of soil-borne *Fusarium* disease by mix-cropping with associate crop inculcate with *Pseudomonas gladioli*, p. 169. In **Abstracts of Papers 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology**, Kyoto, Japan.
- Kloepper, J.W., J.W. Leong, J. Teintze, and M.N. Schroth. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. **Current Microbiology** 4: 317-320.
- Kraff, J.M., F.J. Muehlbauer, R.J. Cook and F.M. Entermann. 1974. The reappearance of common wilt of pea in eastern Washington. **Plant Dis.** 58: 62-64.
- Lihua L., J. Ma, Y. Li, Z. Wang, T. Gao and Q. Wang. 2012. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. **Crop Protection** 35: 29-35.
- Lin, A. 1994. Trichodermin a new antifungal agent from *Trichoderma viride* and its action in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Journal of Antibiotic** 47(7): 799-805.
- Lim, G. and C.H. Chew. 1970. *Fusarium* in Singapore soils. **Plant soil** 33: 673-677.
- Lim, H.S. and S.D. Kim. 1997. Role of siderophores in biocontrol of *Fusarium solani* and enhanced growth response of bean by *Pseudomonas fluorescens* GL20. **J. Microbiol. Biotechnol.** 7: 13-20.
- Locke, T.C., J.J. Marois and C.C. Papavizas. 1985. Biological control of *Fusarium* wilt of greenhouse-grown chrysanthemums. **Plant Dis.** 69: 161-169.
- Marten P., K. Smalla, and G. Berg. 2000. Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. **J. Appl. Microbiol.** 89: 463-471.

- Messiaen, C.M. and R. Cassini. 1981. Taxonomy of *Fusarium*, pp. 427-455. In P.E. Nelson, T.A. Toussun and R.J. Cook (Eds.). **The Genus *Fusarium* : Disease, Biology, and Toxonomy**. The Pennsylv. State Univ. Press, London. Nash, S. M. and W. C. Snyder. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. **Phytopathology** 52: 567-572.
- Nash, S. M. and W. C. Snyder. 1965. Quantitative and qualitative comparisons of *Fusarium* population in cultivated field and noncultivated parent soil. **Can. J. Bot.** 43: 939-945.
- Nelson, P.E., T.A. Toussoun and W.H.O. Marasas. 1983. ***Fusarium* Pictorial Guide to Identification of *Fusarium* Species**. Pennsylv.State.Univ.
- Ogawa, K. and H. Komada. 1985. Biological of *Fusarium* Wilt of Sweet Potato with Cross-Protection by Nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. pp. 121-123. In Parker, C., A.D. Rovira, K. J. Moore, P T.W. Wong and J. F. Kollmorgen (eds), **Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens**. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minneste.
- Papavizas, G. C. 1964. Greenhouse control of *Aphanomyces* root rot of peas with aminobutyric acid and methyl aspartic acid. **Plant Disease Reporter** 48: 537-541.
- Papavizas, C.C., P.B. Adams and J.A. Lewis. 1968. Survival of root infecting fungi. V.S. saprophytic multiplication of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in soil. **Phytopathology** 58: 414-420.
- Paulitz, T.C., C.S. Park and R. Baker. 1987. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. **Can. J. Microbiol.** 33: 349-353.

- Penyalver, R., B. Vicedo and M. M. Lopez. 2000. Use of the genetically engineered *Agrobacterium* strain K1026 for biological control of crown gall. **Eur. J. Plant Pathol.** 106: 801-810.
- Puhalla, J.E. 1981. Genetic considerations of the gene *Fusarium*, pp. 291-305. In P.E. Nelson, T.A. Toussoun, and R.J. Cook (eds.). **the Genus *Fusarium* : Disease, Biology, and Taxonomy**. The Pennsylv. State Univ. Press, London.
- Rao, A.S. and M.V. Roa. 1963. Inoculum potential and the *Fusarium* wilt of cotton. **Nature (London)**. 200: 598-599.
- Registeri1, R., S. M. Taghavi1 and Z. Banihashemi. 2012. Effect of Root Colonizing Bacteria on Plant Growth and *Fusarium* Wilt in *Cucumis melo*. **J. Agr. Sci. Tech.** 14: 1121-1131.
- Rodriguez-Kabana, R. 1969. Enzyme interactions of *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma viride* in mixed soil culture. **Phytopathology** 59: 910.
- Rodriguez-Kabana, R. and E.A. Curl. 1968. Saccharase activity of *Sclerotium rolfsii* in soil and the mechanism of antagonistic action by *Trichoderma viride*. **Phytopathology** 58: 985.
- Rodriguez-Kabana, R., W.D. Kelley and E.A. Curl. 1978. Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed culture with *Sclerotium rolfsii* in soil. **Can J. Microbiol.** 59: 910.
- Schippers, B., B. Lugtenberg and P. J. Weisbeek. 1987. Plant growth control by fluorescent pseudomonads. pp. 19-40. In L. Chet, ed. **Inovative Approaches to Plant Disease Control**. John Wiley & Sons, New York.
- Schneider, R.W. 1984. Effects of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. apii and a novel use of the line weaver-burk double reciprocal plot technique. **Phytopathology** 74: 646-653.



- Singh, N. and R.S. Singh. 1981. Lysis of mycelium of *Fusarium udum* in soil amended with organic matter. **Plant Soil.** 80: 9.
- Sivan, A., and I. Chet. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* And *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. **Phytopathology** 79: 198.
- Soleimani, M.J., M. Shamsbakhsh, M. Taghavi and Sh. Kazemi. 2005. Biological Control of Stem And Root-rot of Wheat Caused by *Biopolaris* spp. by Using Antagonistic Bacteria, Fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* spp . **J. Biologic. Sci.** 5(3): 347-353.
- Suslow, T.V. and M.N. Schroth. 1982. Rhizobacteria of Sugar beet: Effects of seed application root colonization on yield. **Phytopathology** 72: 199-206.
- Tahvonen, R. 1988. Biological disease control with *Streptomyces*, pp. 209. **In Abstracts of Papers 5<sup>th</sup> Internation Congress of Plant Pathology**, Kyoto, Japan.
- Thomson, J. 1987. The use of agrocin-producing barteria in the biological control of crown gall. pp. 213-228. **In** L. Chet, ed. **Inovative Approaches to Plant Disease Control**. John Wiley & Sons, New York.
- Toussoun, T.A. and P.E. Nelson. 1968. **A Pictorial Guide to the Identification of *Fusarium* Species**. Pennsylv.State. Univ. Press, London.
- Wearing, A.H. and L.W. Burgess. 1978. Distridution and mode of survival of *Fusarium roseum* 'Graminear' Group 2 in maize soil of eastern Australia, Trans. Brjt. **Mycol. Soc.** 70: 480-486.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology** 22: 837.

Wen, T.C., C.S. Chen and S.L. Wang. 2003. An Antifungal Chitinase Produced by *Bacillus cereus* with Shrimp and Crab Shell Powder as a Carbon Source. **Curr. Microbiol.** 47: 102–108.

Whipps, M.J. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soilborne grasshopper pathogens and antagonistic fungi. **New Phytologist** 107: 127-142.

Zhang, S., W. Raza, X. Yang, J. Hu, Q. Huang, Y. Xu, X.Liu, W. Ran and Q. Shen. 2008. Control of Fusarium wilt disease of cucumber plants with the application of a bioorganic fertilizer. **Biol. Fertil. Soils.** 44: 1073-1080.



### สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สูตรอาหารเหล่านี้หลังจากเตรียมเสร็จให้นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำเท่ากับ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

#### 1. Potato dextrose agar (PDA)

|                          |       |      |
|--------------------------|-------|------|
| มันฝรั่ง (ปอกเปลือกแล้ว) | 200.0 | กรัม |
| Dextrose                 | 20.0  | กรัม |
| Agar                     | 15.0  | กรัม |
| Distilled water          | 1.0   | ลิตร |

#### 2. Nutrient glucose agar (NGA)

|                 |      |      |
|-----------------|------|------|
| Beef extract    | 5.0  | กรัม |
| Peptone         | 3.0  | กรัม |
| Glucose         | 2.5  | กรัม |
| Agar            | 15.0 | กรัม |
| Distilled water | 1.0  | ลิตร |

#### 3. Nutrient glucose agar (NGB)

|                 |     |      |
|-----------------|-----|------|
| Beef extract    | 5.0 | กรัม |
| Peptone         | 3.0 | กรัม |
| Glucose         | 2.5 | กรัม |
| Distilled water | 1.0 | ลิตร |



## 4. Thornton's medium

|                      |      |      |
|----------------------|------|------|
| $K_2HPO_4$           | 1.0  | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.2  | กรัม |
| $CaCl_2$             | 0.1  | กรัม |
| NaCl                 | 0.1  | กรัม |
| $KNO_3$              | 0.5  | กรัม |
| Asparagine           | 0.5  | กรัม |
| Mannital             | 1.0  | กรัม |
| Agar                 | 13.0 | กรัม |
| Distilled water      | 1.0  | ลิตร |

## 5. Martin's medium (Johnson and Curl, 1972)

|                      |       |      |
|----------------------|-------|------|
| $KH_2PO_4$           | 1.0   | กรัม |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.5   | กรัม |
| Bacto Peptone        | 5.0   | กรัม |
| Dextrose             | 10.0  | กรัม |
| Agar                 | 15.0  | กรัม |
| Distilled water      | 1.0   | ลิตร |
| Rose Bengal red (1%) | 0.032 | กรัม |
| Streptomycin         | 1.0   | กรัม |

\* ละลาย Rose Bengal ในน้ำก่อนผสมกับสารอื่น จากนั้นค่อยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave ส่วน Streptomycin เติวก่อนเทอาหาร ในขณะที่มีอุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส

## การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ชนิดสดตามวิธีการของจิระเดชและวรรณวิไล (2545)

### ขั้นตอนการผลิตเชื้อสดด้วยหม้อหุงข้าวไฟฟ้า

1. ใช้ปลายข้าวหรือข้าวสาร 3 แก้ว (1 แก้ว มีความจุประมาณ 250 ซีซี) ประมาณ 600 กรัม ใส่น้ำเปล่าสะอาด 2 แก้ว หรือประมาณ 0.5 ลิตร หุงด้วยหม้อหุงข้าวไฟฟ้า เมื่อสุกแล้วจะได้ข้าวสุกประมาณ 1 กิโลกรัม
2. เมื่อสวิตช์ของหม้อหุงข้าวตัดไฟ ใช้ทัพพีชुขข้าวในหม้อก่อนตักข้าวที่หุงสุกใหม่ๆ ใส่อุ้งพลาสติกทนร้อนขนาด 8 x 12 นิ้ว อุ้งละ 2 ทัพพี หรือ 3 ทัพพี (ประมาณ 250-300 กรัม) วางอุ้งข้าวตามแนวราบ ริดอากาศออกจากอุ้ง แล้วพับปากอุ้งไว้ รอให้ข้าวอุ่นหรือเกือบเย็น
3. เทหรือหยะหัวเชื้อราไตรโคเดอร์มาใส่ลงบนข้าวในอุ้งพลาสติกเพียงเล็กน้อย (หัวเชื้อราไตรโคเดอร์มา 1 ขวด บรรจุ 20 กรัม ใส่ในข้าวสุกได้ จำนวน 40-60 อุ้ง หรือประมาณ 10-15 กิโลกรัม)
4. หลังใส่หัวเชื้อราไตรโคเดอร์มาแล้ว มัดปากอุ้งด้วยหนังยางให้แน่น (มัดให้สุดปลายอุ้ง) เขย่าหรือขยำเบาๆ ให้หัวเชื้อคลุกเคล้ากับข้าวสุกทั่วทั้งอุ้ง รวบอุ้งให้มีลมพองตรงบริเวณปากอุ้งที่รัดยางไว้ แล้วใช้ปลายเข็มเจาะอุ้งพลาสติกได้หนังยางที่มัดไว้เล็กน้อย ประมาณ 15-20 จุดต่ออุ้ง (เพื่อให้มีอากาศถ่ายเทเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราไตรโคเดอร์มา) แล้วแผ่อุ้งข้าวสุกให้แบนราบ ดึงตรงส่วนกลางของอุ้งให้พองขึ้น เพื่อให้ภายในอุ้งมีอากาศพอเพียง ในกรณีที่ใช้ลวดเย็บกระดาษสำหรับเย็บปิดปากอุ้งแทนการใช้ยางรัด ให้พับปากอุ้งทบ 2-3 ชั้น ก่อนเย็บด้วยลวดเย็บ 3 จุด เจาะรูบริเวณปากอุ้งประมาณ 20 รู แล้วทำตามขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น
5. บ่มเชื้อไว้ในที่มีอากาศถ่ายเท มีแสงสว่างส่องถึง ไม่ตากแดด ปลอดภัยจาก มด ไร และสัตว์อื่นๆ เมื่อครบ 2 วัน ขยำอุ้งเบาๆ เพื่อให้เส้นใยของเชื้อกระจายทั่วทั้งอุ้ง บ่มอุ้งเชื้อต่ออีก 4-5 วัน ก่อนนำไปใช้ รวมระยะเวลาของการบ่มเชื้อคือ 6-7 วัน

**ตารางผนวกที่ 1** ไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 3 วัน

| ระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ<br>เส้นใยเชื้อรา FOC <sup>1/</sup> (%) | จำนวนไอโซเลต | ไอโซเลต                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ต่ำกว่า 0                                                                 | 2            | SDN - 1, 44                                                                                                                       |
| 0-10.00                                                                   | 26           | SDN - 5, 11, 12, 13, 18, 27, 29, 30,<br>33, 32, 35, 40, 46, 47<br>LBN 1 - 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11<br>LBN 2 - 3, 4, 5<br>LWN 1 - 5, 6 |
| 10.01 - 20.00                                                             | 12           | SDN - 3, 4, 7, 16, 17, 23, 25, 28, 36,<br>38, 39, 45                                                                              |
| 20.01 - 30.00                                                             | 10           | SDN - 9, 10, 15, 22, 26, 31, 34, 41<br>LWN 1-4<br>LWN 2-1                                                                         |
| 30.01 - 40.00                                                             | 14           | SDN - 8, 24, 31, 37, 42, 43<br>LBN 1-3, 5<br>LBN 2-1, 2<br>LWN 1-2, 4<br>LWN 2-2, 3                                               |
| 40.01 - 50.00                                                             | 0            | -                                                                                                                                 |
| 50.01 - 60.00                                                             | 0            | -                                                                                                                                 |

<sup>1/</sup> เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC คำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา} = (R_1 - R_2 / R_1) \times 100$$

$R_1$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

$R_2$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

**ตารางผนวกที่ 2** ไอโซเลตของเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 5 วัน

| ระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ<br>เส้นใยเชื้อรา FOC <sup>1/</sup> (%) | จำนวนไอโซเลต | ไอโซเลต                                                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ต่ำกว่า 0                                                                 | 1            | SDN - 40                                                                                                                                 |
| 0-10.00                                                                   | 28           | SDN - 1, 4, 5, 11, 12, 13, 16, 18, 20,<br>27, 28, 30, 32, 33, 44, 46, 47<br>LBN 1 - 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11<br>LBN 2 - 3, 4, 5<br>LWN 1 - 5 |
| 10.01 - 20.00                                                             | 11           | SDN -7,17, 26, 29, 31,35, 36, 38, 39,45<br>LWN 1-6                                                                                       |
| 20.01 - 30.00                                                             | 5            | SDN - 10, 15, 22, 25, 42                                                                                                                 |
| 30.01 – 40.00                                                             | 6            | SDN - 3<br>LBN 1- 5<br>LWN 1-2, 4<br>LWN 2- 1, 2                                                                                         |
| 40.01 – 50.00                                                             | 13           | SDN- 8, 9, 23, 24, 34, 37, 41, 43<br>LBN 2- 1, 2<br>LWN 1- 3<br>LWN 2- 3, 5                                                              |
| 50.01 – 60.00                                                             | 0            | -                                                                                                                                        |

<sup>1/</sup> เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC คำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา} = (R_1 - R_2 / R_1) \times 100$$

$R_1$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

$R_2$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ



**ตารางผนวกที่ 3** ประสิทธิภาพเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) ของแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร potato dextrose agar (PDA)

| ไอโซเลต  | การยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา FOC <sup>1/</sup> (%) |           |           |
|----------|-------------------------------------------------------|-----------|-----------|
|          | วันที่ 3                                              | วันที่ 5  | วันที่ 7  |
| SDN - 1  | -3.43 a-z <sup>2/</sup>                               | 5.25 n-v  | 0.00 o    |
| SDN - 3  | 14.39 n-q                                             | 39.17 c-e | 42.88 c-h |
| SDN - 4  | 13.99 o-r                                             | 9.99 k-p  | 0.00 o    |
| SDN - 5  | 2.46 w-z                                              | 9.78 k-q  | 11.18 lm  |
| SDN - 7  | 10.89 p-t                                             | 12.48 i-l | 2.96 no   |
| SDN - 8  | 30.91 c-f                                             | 44.88 a-c | 44.88 a-f |
| SDN - 9  | 29.19 d-h                                             | 45.88 ab  | 50.21 a   |
| SDN - 10 | 22.69 i-l                                             | 24.29 g   | 21.69 ij  |
| SDN - 11 | 7.65 r-x                                              | 2.15 r-v  | 1.85 o    |
| SDN - 12 | 9.30 p-v                                              | 7.62 l-s  | 0.00 o    |
| SDN - 13 | 1.16 x-z                                              | 2.81 r-v  | 0.00 o    |
| SDN - 15 | 21.40 i-m                                             | 20.22 gf  | 0.00 o    |
| SDN - 16 | 12.67 p-s                                             | 7.85 l-r  | 0.00 o    |
| SDN - 17 | 10.57 p-u                                             | 10.30 k-n | 8.58 mn   |
| SDN - 18 | 9.05 p-w                                              | 5.32 n-v  | 2.44 no   |
| SDN - 20 | 31.08 b-f                                             | 9.25 l-q  | 1.18 o    |
| SDN - 22 | 25.26 f-j                                             | 21.18 gh  | 19.18 jk  |
| SDN - 23 | 14.52 n-q                                             | 40.06 b-d | 44.74 a-f |
| SDN - 24 | 33.41 a-d                                             | 41.55 b-d | 41.55 e-h |
| SDN - 25 | 14.16 n-r                                             | 30.00 f   | 37.47 h   |
| SDN - 26 | 24.65 g-k                                             | 14.29 i-k | 0.00 o    |
| SDN - 27 | 9.24 p-v                                              | 3.81 q-v  | 3.77 no   |
| SDN - 28 | 18.33 k-o                                             | 9.47 k-q  | 0.00 o    |
| SDN - 29 | 7.69 r-x                                              | 11.51 i-m | 3.18 no   |

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

| ไอโซเลต   | การยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา FOC <sup>LV</sup> (%) |           |           |
|-----------|-------------------------------------------------------|-----------|-----------|
|           | วันที่ 3                                              | วันที่ 5  | วันที่ 7  |
| SDN – 30  | 3.88 u-y                                              | 2.59 r-v  | 0.00 o    |
| SDN - 31  | 20.13 j-o                                             | 16.96 hi  | 5.77 m-o  |
| SDN - 32  | 7.65 r-x                                              | 6.64 l-u  | 1.70 o    |
| SDN – 33  | 9.72 p-u                                              | 5.40 m-v  | 0.44 o    |
| SDN – 34  | 20.50 i-n                                             | 40.09 b-d | 44.88 a-f |
| SDN – 35  | 5.01 s-y                                              | 11.26 i-n | 3.18 no   |
| SDN – 36  | 19.19 j-o                                             | 16.74 h-j | 15.11 kl  |
| SDN – 37  | 35.92 a-c                                             | 41.11 b-d | 41.11 f-h |
| SDN – 38  | 15.35 m-p                                             | 14.14 i-k | 0.00 o    |
| SDN – 39  | 14.93 n-q                                             | 11.21 i-n | 6.36 m-o  |
| SDN – 40  | 1.49 x-z                                              | -0.55 v   | 0.00 o    |
| SDN – 41  | 26.70 e-i                                             | 44.76 a-c | 49.18 ab  |
| SDN – 42  | 30.58 c-g                                             | 29.99 f   | 24.88 i   |
| SDN – 43  | 34.57 a-d                                             | 41.70 b-d | 41.70 d-h |
| SDN – 44  | -7.51 a                                               | 0.53 t-v  | 0.00 o    |
| SDN – 45  | 18.10 m-o                                             | 12.64 i-l | 5.77 m-o  |
| SDN - 46  | 9.89 p-u                                              | 6.75 l-t  | 4.29 no   |
| SDN - 47  | 6.44 s-y                                              | 1.42 s-v  | 0.00 o    |
| LBN 1 - 1 | 0.45 yz                                               | 0.46 v    | 0.00 o    |
| LBN 1 – 2 | 7.18 s-x                                              | 3.97 p-v  | 3.40 no   |
| LBN 1 – 3 | 6.57 s-y                                              | 2.15 r-v  | 0.00 o    |
| LBN 1 – 4 | 7.28 s-x                                              | 5.64 m-v  | 4.22 no   |
| LBN 1 – 5 | 32.45 b-e                                             | 39.71 cd  | 42.66 c-h |
| LBN 1 - 7 | 5.40 s-y                                              | 1.55 s-v  | 0.00 o    |
| LBN 1 – 8 | 9.27 p-v                                              | 4.66 o-v  | 3.10 no   |

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

| ไอโซเลต    | การยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา FOC <sup>1</sup> (%) |           |           |
|------------|------------------------------------------------------|-----------|-----------|
|            | วันที่ 3                                             | วันที่ 5  | วันที่ 7  |
| LBN 1 - 11 | 8.37 r-w                                             | 3.75 q-v  | 4.22 no   |
| LBN 2 - 1  | 34.77 a-d                                            | 42.12 a-d | 46.36 a-e |
| LBN 2 - 2  | 39.29 a                                              | 47.77 a   | 47.77 a-d |
| LBN 2 - 3  | 6.28 s-y                                             | 3.66 q-v  | 0.00 o    |
| LBN 2 - 4  | 4.53 t-y                                             | 0.46 uv   | 0.00 o    |
| LBN 2 - 5  | 2.70 v-y                                             | 1.74 r-v  | 0.00 o    |
| LWN 1 - 2  | 33.33 a-d                                            | 36.53 de  | 40.06 f-h |
| LWN 1 - 3  | 34.37 a-d                                            | 41.42 b-d | 44.14 b-g |
| LWN 1 - 4  | 24.44 h-k                                            | 37.42 de  | 42.11 d-h |
| LWN 1 - 5  | 6.89 s-y                                             | 2.08 r-v  | 0.00 o    |
| LWN 1 - 6  | 5.84 s-y                                             | 10.95 j-n | 0.00 o    |
| LWN 2 - 1  | 23.55 h-l                                            | 33.98 ef  | 38.33 gh  |
| LWN 2 - 2  | 31.34 b-f                                            | 38.04 de  | 42.59 c-h |
| LWN 2 - 3  | 37.48 ab                                             | 44.29 a-c | 44.29 a-g |
| LWN 2 - 5  | 37.47 ab                                             | 44.28 a-c | 48.36 a-c |
| C.V. (%)   | 20.49                                                | 16.91     | 19.45     |

<sup>1</sup> เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC คำนวณจากสูตร

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา =  $(R_1 - R_2 / R_1) \times 100$

$R_1$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

$R_2$  คือ ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเส้นใยเชื้อราในจานเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

<sup>2</sup> ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (P=0.05)

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวลลิตลักษณ์ ศรีถวิล  
วัน เดือน ปี ที่เกิด วันที่ 18 มกราคม พ.ศ. 2531  
สถานที่เกิด จังหวัดนครปฐม  
ประวัติการศึกษา ปี 2553 ระดับปริญญาตรี ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน  
ประชุมวิชาการ/ผลงาน ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากเน่า  
ของต้นกล้าแตงกวาสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium* sp. ในรายงาน  
การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 11 24-28  
พฤศจิกายน 2556 โรงแรมเซ็นทาราคอนเวนชันเซ็นเตอร์ จังหวัด  
ขอนแก่น