สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์สำหรับการค้า

Formulation of Antagonistic Microorganism for Controlling Lettuce Leaf Spot Disease in Hydroponic System for Commercial Purpose

บุรฮานะฮ์ ใบยี

Burhanah Baiyee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์สำหรับการค้า

Formulation of Antagonistic Microorganism for Controlling Lettuce Leaf Spot Disease in Hydroponic System for Commercial Purpose

บุรฮานะฮ์ ใบยี

Burhanah Baiyee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University
2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์สำหรับการค้า

ผู้เขียน นางสาวบุรฮานะฮ์ ใบยี

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....
(รองศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

…….....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา)

คณะกรรมการสอบ

…….....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนัญชนก ไชยรินทร์)

…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วาริน อินทนา)

…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า)

..…….....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

……..……

(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(นางสาวบุรฮานะฮ์ ใบยี)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ยื่นขออนุมัติปริญญาใดในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวบุรฮานะฮ์ ใบยี)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์สำหรับการค้า

ผู้เขียน นางสาวบุรฮานะฮ์ ใบยี

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

โรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* และเชื้อรา *Curvularia aeria* เป็นโรคที่พบการระบาดรุนแรงในแปลงปลูกผักสลัดของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดสงขลา ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตเป็นจำนวนมาก การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีพบว่าเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากผักสลัดเป็นผักประเภทรับประทานสด อาจทำให้มีสารเคมีตกค้างและส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ดังนั้นการควบคุมโดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสม โดยเฉพาะการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ แต่การใช้ประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดเชื้อสดมีข้อจำกัดหลายอย่าง เช่น มีขั้นตอนยุ่งยากในการเตรียม และอายุการเก็บรักษาสั้น โดยการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์ที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรค *C. aeria* และ *C. cassiicola* โดยการใช้เชื้อ *Trichoderma* spp. 6 ไอโซเลท คือ *T. asperellum* T1, T76-14, *T. harzianum* TM2/1, *T. spirale* T76-1, T76-12/2, V76-12 และเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Culture Collection of Pest Management Department, คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมดมาทดสอบกลไกการเป็นปฏิปักษ์เพื่อคัดเลือกเบื้องต้นโดยใช้กลไกแก่งแย่งแข่งขันด้วยวิธี dual culture พบว่า มี 2 ไอโซเลท คือ T1 และ T76-1 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 80–95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการใช้กลไกการยับยั้งและทำลายโดยการสร้างสารระเหยของเชื้อรา ไอโซเลท T1 และ T76-1 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 30–45 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์สารระเหยโดย Gas chromatograph mass spectrometer พบสารระเหยกลุ่มแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ และ ไพราน ซึ่งมีฤทธิ์การต้านเชื้อรา และพบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase และปลดปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อย

สลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค จากการทดสอบการความรุนแรงของโรคในต้นกล้าผักสลัด โดยใช้สปอร์แขวนลอย พบว่าไอโซเลท T1 และ T76-1 สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ โดยมีดัชนีความรุนแรงของโรค 55–65 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้ต้นกล้าผักสลัดผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของพืช คือ β-1,3-glucanase, chitinase, polyphenol oxidase (PPO) และ peroxidase (POD) จึงนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท มาผลิตให้อยู่ในรูปแบบของสูตรสำเร็จต่าง ๆ ดังนี้ สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล ชนิดผงละลายน้ำ ชนิดอิมัลชัน และจากการทดสอบคุณสมบัติและประสิทธิภาพ พบว่าสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันมีประสิทธิภาพสูงกว่าสูตรสำเร็จชนิดอื่น ๆ อย่างมีนับสำคัญ และพบว่าการเก็บรักษาสูตรสำเร็จในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ดีกว่าการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง และเมื่อนำสูตรสำเร็จมาทดสอบการลดดัชนีความรุนแรงของโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์ พบว่าสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการลดดัชนีความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีดัชนีความรุนแรงเพียง 29–40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นสูตรสำเร็จชนิดนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดและพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์ทางการค้าได้ในอนาคต

Thesis Title	Formulation of Antagonistic Microorganism for Controlling Lettuce Leaf Spot Disease in Hydroponic System for Commercial Purpose
Author	Miss Burhanah Baiyee
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	2019

ABSTRACT

Leaf spot disease of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponics system caused by *Corynespora cassiicola* and *Curvularia aeria*, causing reduction of both quantity and quality for lettuce cultivation in Songkhla province. Controlling diseases using chemicals fungicide is unsuitable and can cause human health risks. As lettuce is often consumed as a fresh vegetable, biological control is an appropriate way to control leaf spot disease. However, the use of fresh antagonistic microorganisms was limited according to the preparation process and the short shelf life. This research aimed to select the effective antagonistic microorganisms to control leaf spot disease of lettuce in hydroponics systems caused by *C. cassiicola* and *C. aeria.* Six isolates of *Trichoderma* spp. namely *T. asperellum* T1, T76-14*, T. harzianum* TM2/1, *T. spirale* T76-1, T76-12/2, V76-12, and *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 were obtained from Culture Collection of Pest Management, Prince of Songkla University. Primary screening of antagonistic microorganisms by dual culture assay showed two isolates (T1 and T76-1) were effective in inhibiting mycelial growth of fungal pathogens with 80–95% inhibition. Volatile compounds emitted by both isolates inhibited mycelial growth of pathogens with 30–45% inhibition, and Gas chromatograph mass spectrometer profiling revealed the presence of antifungal compounds including alcohol, ester and pyran. *Trichoderma* T1 and T76-1 produced and released extracellular β-1,3-glucanase and chitinase into culture medium to degrade fungal cell wall. Spore suspension of T1 and T76-1 were effectively reduced the disease severity index (%DSI) of leaf spot disease in lettuce seedlings with 55-65%. In addition, inoculation of T1 and T76-1 induced the defense response in lettuce seedlings by producing defense-related enzymes such as β-1,3-glucanase, chitinase, polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD). Therefore, both T1 and T76-1 were selected to

develop in different formulations composed of wettable powder, granules, encapsulated granules and emulsion. The results showed emulsion formulation with coconut oil and soybean oil based was effective in inhibiting mycelial growth of *C. cassiicola* and *C. aeria* more than other formulations. For all formulations, storage at 10 °C extended the shelf-life in comparison with storage at room temperature. In field experiment, application of emulsion formulation in concentration 3% significantly ($P \leq 0.05$) reduced the diseases severity index caused by the 2 pathogens at 29–40%, compared with other treatments. This formulation is suitable to control leaf spot disease of lettuce and to develop for the commercial purpose in the future.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษา ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนัญชนก ไชยรินทร์ ประธานกรรมสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วาริน อินทนา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำชี้แนะและแนวทาง รวมถึงให้คำปรึกษาอันเป็นประโยชน์ต่อการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม และสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และบุคลากรภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่านที่กรุณาให้ความคำปรึกษาและความช่วยเหลือด้านวัสดุ อุปกรณ์ และสถานที่ ในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงงานด้านธุรการ

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจและความห่วงใยเสมอมา ขอบขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ จึงเป็นผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

บุรฮานะฮ์ ใบยี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(12)
รายการตารางภาคผนวก	(15)
บทที่ 1	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	19
บทที่ 2	
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	20
บทที่ 3	
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	34
บทที่ 4	
สรุปผลและข้อเสนอแนะ	63
เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก	77
ภาคผนวก ก	78
ภาคผนวก ข	80
ประวัติผู้เขียน	82

รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ส่วนผสมของสูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ	30
ตารางที่ 2	ส่วนผสมของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน	31
ตารางที่ 3	ประสิทธิภาพของสารระเหยต้านเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดโดยวิธี volatile antifungal bioassay	39
ตารางที่ 4	ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell-free CF) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดโดยวิธี agar diffusion assay	44

รายการภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	สัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด *Corynespora cassiicola*	5
ภาพที่ 2	วงจรการแพร่กระจายและระบาดของโรคใบจุดจากเชื้อราสาเหตุ *Corynespora cassiicola* ในระบบไฮโดรโปนิกส์	6
ภาพที่ 3	สัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด *Curvularia aeria*	7
ภาพที่ 4	วงจรการแพร่กระจายและระบาดของโรคใบจุดจากเชื้อราสาเหตุ *Curvularia aeria* ในระบบไฮโดรโปนิกส์	8
ภาพที่ 5	ระดับการประเมินโรคใบจุดของต้นผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์	29
ภาพที่ 6	สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp.	35
ภาพที่ 7	โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast malt extract agar	36
ภาพที่ 8	โคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด *Corynespora cassiicola* และ *Curvularia aeria*	36
ภาพที่ 9	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดโดยวิธี dual culture assay โดยใช้เชื้อ *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 และ *Trichoderma* spp. 6 ไอโซเลท	38
ภาพที่ 10	ประสิทธิภาพของสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด	39
ภาพที่ 11	GC/MS chromatography ของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1	41
ภาพที่ 12	GC/MS chromatography ของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1	42
ภาพที่ 13	ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell-free CF) ของ *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด	43

รายการภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 14	เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่เปลี่ยนแปลงเมื่อแช่ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1 ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)	45
ภาพที่ 15	กิจกรรมเอนไซม์ β-1, 3-glucanase และ chitinase ในน้ำเลี้ยงเชื้อ ของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1	46
ภาพที่ 16	กิจกรรมเอนไซม์ในต้นกล้าผักสลัด หลังจากกระตุ้นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เป็นเวลา 24 และ 48ชั่วโมง	48
ภาพที่ 17	ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค (DSI) จากเชื้อราสาเหตุโรค *Corynespora cassiicola* และ *Curvularia aeria* ควบคุมด้วยเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1	49
ภาพที่ 18	ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค (DSI) จากเชื้อราสาเหตุโรค *Corynespora cassiicola* และ *Curvularia aeria* ควบคุมด้วยเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1	50
ภาพที่ 19	สูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ (wettable powder formulation)	51
ภาพที่ 20	สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล (granule formulation)	52
ภาพที่ 21	สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลในแคปซูล (encapsulate granule)	52
ภาพที่ 22	สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน (emulsion formulation)	53
ภาพที่ 23	จำนวนโคโลนีที่กระจายตัวในสูตรสำเร็จหลังผลิต 24 ชั่วโมง	54
ภาพที่ 24	ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ของสูตรสำเร็จ	55
ภาพที่ 25	ความสามารถในการละลายน้ำ และความสามารถในการตกตะกอนของสูตรสำเร็จ	55
ภาพที่ 26	จำนวนโคโลนีในสูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	56
ภาพที่ 27	จำนวนโคโลนีในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	57

รายการภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 28 จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน 58

ภาพที่ 29 จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1 ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน 59

ภาพที่ 30 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งของสูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Corynespora cassiicola* เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dual culture 60

ภาพที่ 31 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งของสูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia aeria* เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dual culture 61

ภาพที่ 32 ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค (%DSI) จากเชื้อราสาเหตุโรค *Corynespora cassiicola* และ *Curvularia aeria* เมื่อควบคุมด้วยสูตรสำเร็จ 62

รายการตารางภาคผนวก

หน้า

ตารางภาคผนวกที่ 1 ชนิดและองค์ประกอบของสารระเหยที่ปลดปล่อยจากเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 โดยวิธี GC/MS analysis 80

ตารางภาคผนวกที่ 2 ชนิดและองค์ประกอบของสารระเหยที่ปลดปล่อยจากเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1โดยวิธี GC/MS analysis 81

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การปลูกพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์ (hydroponic system) เป็นการปลูกพืชในสารละลายแร่ธาตุและอาหาร ปัจจุบันคนหันมาสนใจสุขภาพโดยเลือกบริโภคผักปลอดสารพิษ โดยเฉพาะพืชในกลุ่มผักสลัด หรือผักกาดหอม (lettuce) ที่นิยมนำมาประกอบอาหารเป็นเครื่องเคียง อุตสาหกรรมการผลิตผักสลัดปลอดสารพิษในระบบไฮโดรโปนิกส์จึงมีอยู่แพร่หลาย จากข้อมูลของระบบตรวจรับรองแหล่งผลิตพืชอินทรีย์ กรมวิชาการเกษตร ปี 2561 พบว่าปัจจุบันมีฟาร์มผลิตผักสลัดแบบอินทรีย์คิดเป็นพื้นที่ปลูกประมาณ 200 ไร่ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี การปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์มีการให้ธาตุอาหารผ่านทางระบบน้ำ เมื่อเกิดการระบาดของโรค เช่น โรครากเน่า โรคใบจุด จะระบาดทั่วโรงเรือน โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อรา เชื้อราบางชนิดผลิตซูโอสปอร์อยู่ในน้ำ สามารถแพร่กระจายไปกับระบบน้ำอย่างรวดเร็ว และทำให้ผักสลัดเน่าทั้งโรงเรือน ไม่ได้ผลผลิต ส่วนโรคใบจุดสามารถระบาดไปกับระบบฉีดพ่นในโรงเรือนได้ ในช่วงเดือน เมษายน-พฤษภาคม 2559 ที่ผ่านมา ได้เกิดการระบาดของโรคใบจุดในผักสลัดที่แปลงสาธิตการปลูกผักสลัดของบริษัท ไทย แอดวานซ์ อะกรี เทค จำกัด จังหวัดสงขลา ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (Chairin et al., 2017) และนอกจากนี้ยังพบว่ามีการระบาดของโรคใบจุดในพื้นที่ปลูกผักสลัดอื่น ๆ ของจังหวัดสงขลา ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Curvularia aeria* (Pornsuriya et al., 2018) โดยเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด ถือเป็นการรายงานการระบาดครั้งแรกในประเทศไทยและส่งผลให้เกิดการสูญเสียในด้านคุณภาพและปริมาณในการผลิตผักสลัด

การใช้สารเคมีควบคุมโรคพืชในระบบไฮโดรโปนิกส์พบว่าไม่เป็นที่นิยมเนื่องอาจเกิดการปนเปื้อนของสารเคมีได้ การควบคุมโดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์ จากการคัดเลือกและศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดิน พบจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม คือ เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. และเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่นการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ควบคุมโรคไหม้ของข้าวซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ได้ถึง 88.30 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดความรุนแรงของโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ (Law et al., 2017) สำหรับเชื้อปฏิปักษ์อีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย คือเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่พบได้ง่าย เจริญได้ดีบน

อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด อีกทั้งยังช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตได้ (Ram et al., 2000) จากรายงานของ อรณิชา ตันติพลานนท์ และชนินันท์ พรสุริยา (2559) รายงานว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากใบปาล์มน้ำมัน มีประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี dual culture

ในภาคอุตสาหกรรมนิยมใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปแบบของเชื้อสด แต่เนื่องจากการใช้เชื้อสดมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น มีขั้นตอนยุ่งยากในการเตรียม อายุการเก็บรักษาสั้น จึงเป็นที่มาของโจทย์วิจัยที่ต้องการชีวภัณฑ์หรือสูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถแก้ปัญหาข้างต้นได้ โดยงานวิจัยนี้มุ่งไปที่การทดสอบการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในกลุ่ม *Trichoderma* (อรณิชา ตันติพลานนท์ และ ชนินันท์ พรสุริยา 2559) และ *Streptomyces* (สุภาภรณ์ พิทักษ์กิจ และคณะ 2557) ซึ่งได้จากงานวิจัยก่อนหน้าในรูปแบบหัวเชื้อสด และพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จ โดยวิเคราะห์ส่วนผสมต่าง ๆ ที่เหมาะสม วิเคราะห์การอยู่รอดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เมื่อเก็บไว้ในสูตรสำเร็จต่าง ๆ ประเมินประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จต่อการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์ เพื่อพัฒนาสูตรสำเร็จและชีวภัณฑ์ในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต

ตรวจเอกสาร

ผักสลัด (*Lactuca sativa* L.)

มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียและยุโรป โดยนิยมรับประทานเป็นผักสด และใช้ในการตกแต่งอาหารให้ดูสวยงาม ผักสลัดเป็นผักที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงซึ่งประกอบไปด้วยใยอาหารและสารประกอบอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น วิตามินซี วิตามินอี สารประกอบฟีนอล แคโรทีนอยด์ (Liorach et al., 2008) แอนโทไซยานิน และคลอโรฟิลล์ โดยเฉพาะแอนโทไซยานินนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าวิตามินซีและวิตามินอี (Li et al., 2010) โดยลักษณะของผักสลัดคือ ลำต้นเป็นข้อสั้น แต่ละข้อเป็นที่เกิดของใบ มีสีเขียวอ่อนจนถึงเขียวแก่ บางพันธุ์มีสีแดงหรือน้ำตาลปนอยู่ มีทั้งพันธุ์ที่ห่อหัวและไม่ห่อหัว ซึ่งพันธุ์ที่ห่อหัวมีใบหนาและเนื้อใบอ่อนนุ่ม ใบที่ห่ออยู่ด้านในมีลักษณะมันวาว ส่วนพันธุ์ที่ไม่ห่อหัวใบมีลักษณะม้วนงอ เห็นเส้นใบชัดเจน และขอบใบหยักเป็นคลื่น (สุนทร เรืองเกษม, 2540) สามารถปลูกได้ตลอดปีและทุกสภาพอากาศ (ระพีพรรณ ใจภักดี, 2544)

ผักสลัดสามารถปลูกได้ดีทั้งในระบบไฮโดรโปนิกส์และในดินเกือบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วนเป็นพิเศษ ความเป็นกรดเป็นด่างของดินควรอยู่ในช่วงที่พอเหมาะ คือ 6–6.80 ต้องการความชื้นสูง ได้รับแสงแดดตลอดวัน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับพันธุ์ใบ คือ 21–26.60 องศาเซลเซียส พันธุ์ห่อหัวต้องการอากาศค่อนข้างเย็น คือ 15.50–21 องศาเซลเซียส (อรุณรักษ์ พ่วงผล, 2543)

โรคของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

การปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์มักประสบปัญหาเรื่องการเข้าทำลายของโรค เนื่องจากเป็นการปลูกในโรงเรือน มีอุณหภูมิและความชื้นสูง ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของเชื้อโรค (Menzies et al., 1996) โรคของผักสลัดที่พบมากในระบบไฮโดรโปนิกส์มีดังนี้

โรครากเน่าส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. จากงานวิจัยของ Koohakarn และคณะ (2008) ได้ศึกษาโรคที่สำคัญของพืชโดยเฉพาะผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ในพื้นที่กรุงเทพมหานคร และจังหวัดใกล้เคียง ซึ่งโรคที่พบมากที่สุดคือ โรครากเน่าจากเชื้อ *P. myriotylum* โดยเชื้อชนิดนี้เข้าทำลายพืชทางราก ส่งผลให้พืชเกิดอาการรากเน่า ต้นเหี่ยว และตายในที่สุด

โรคใบจุดสามารถเกิดขึ้นได้ทุกฤดู โดยเฉพาะฤดูฝนซึ่งมีความชื้นในอากาศสูง แต่ในฤดูร้อนสามารถเกิดโรคใบจุดได้เช่นกัน ส่วนใหญ่เกิดจากการให้น้ำโดยการพ่นในแปลงปลูกมากเกิน รวมถึงการระบายอากาศในแปลงปลูกไม่ดีทำให้เกิดโรคใบจุดได้ (วิพรพรรณ เนื่องเม็ก และ

รัตนาภรณ์ นครไธสง 2557) โดยโรคใบจุดมีสาเหตุมาจากเชื้อสาเหตุหลายชนิด เช่น เกิดจากเชื้อรา และเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

โรคใบจุดจากเชื้อรา

โรคใบจุดจากเชื้อรา *Alternaria* spp. เป็นปัญหาในการปลูกผักสลัดแบบไม่ใช้ดิน โรคดังกล่าวระบาดรุนแรงโดยเฉพาะในฤดูฝนและช่วงที่มีความชื้นสูง ทำให้ผักมีคุณภาพลดลงและไม่เป็นที่ต้องการของตลาด แผลที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ มีลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลซ้อนกันหลายวง โดยในผักกาดชนิดต่าง ๆ จะเห็นได้ชัด บริเวณแผลอาจมีจุดดำ ซึ่งก็คือสปอร์ของเชื้อรา ถ้าอาการรุนแรง เนื้อเยื่อระหว่างเส้นใบจะแห้งตาย (วิพรพรรณ เนื่องเม็ก และ รัตนาภรณ์ นครไธสง, 2557)

โรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp. มักมีลักษณะอาการคือ เริ่มแรกแผลมีอาการฉ่ำน้ำและค่อย ๆ ขยายเป็นวงกลมขนาดใหญ่ แผลมีสีเทาในระยะแรกและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จากนั้นแผลลุกลามจนทั่วใบส่งผลให้เซลล์ตายและใบร่วงในที่สุด ซึ่งโรคนี้สามารถเกิดได้ทั้งบนใบอ่อนและใบแก่ (Szeto and Bau, 1975)

โรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* ในต้นผักสลัดที่ปลูกในแปลงระบบไฮโดรโปนิกส์ของเกษตรกรในจังหวัดสงขลา อาการเริ่มแรกมีลักษณะเป็นจุดบนใบและแผลขยายไปใต้ใบ แผลมีสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้มลักษณะเป็นวงแหวนหลายวงซ้อนกัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5–15 มิลลิเมตร หากติดเชื้อรุนแรงจุดเล็ก ๆ จะขยายจนเป็นแผลใหญ่และกระจายไปทั่วใบ ทำให้ใบไหม้และต้นตาย (Chairin et al., 2017)

โรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Curvularia aeria* ครั้งแรกในผักสลัดกรีนโอ๊คที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ระหว่างเดือนเมษายน ถึง พฤษภาคม 2560 โดยลักษณะแผลที่พบบนใบมีลักษณะเป็นจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลเข้ม มีเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลประมาณ 0.50–1 มิลลิเมตร เมื่อมีอาการรุนแรงแผลจะเชื่อมกันและขยายเป็นวงกว้าง (Pornsuriya et al., 2018)

ใบจุดจากแบคทีเรีย

Bull และ Koike (2005) รายงานว่าโรคใบจุดของผักสลัดที่พบการระบาดในแคลิฟอร์เนียร์ ประเทศสหรัฐอเมริกา เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* มีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ ฉ่ำน้ำ ส่วนใหญ่พบที่ผิวล่างของใบ หรือใบแก่ จากนั้นขนาดแผลขยายใหญ่ขึ้นแต่ถูกจำกัดด้วยเส้นใบ สีของแผลเปลี่ยนไปเป็นสีดำ หากอาการรุนแรงอาจส่งผลให้ใบเกิดอาการแห้งและเป็นสีดำ และเชื้อแบคทีเรียอาจเข้าทำลายได้ทั้งต้น ส่งผลให้ต้นตาย Ibrahim และ Molan (2011) รายงานการเกิดโรคใบจุดของผักสลัด ที่พบว่ามีการแพร่ระบาดในประเทศซาอุดิอาราเบีย ซึ่งเกิดจากเชื้อ

Pseudomonas viridiflava มีลักษณะแผลเป็นจุดเล็ก ๆ ขอบแผลไม่สม่ำเสมอ แผลมีสีเทาจนถึงสีดำเข้ม ส่งผลให้สูญเสียผลผลิตเป็นจำนวนมาก

โรคเหล่านี้นับเป็นปัญหาที่สำคัญและก่อให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้ปลูกผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์เป็นอย่างมาก เนื่องจากโรคเหล่านี้สามารถเข้าทำลายต้นผักสลัดได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตทำให้สูญเสียทั้งคุณภาพและปริมาณของผลผลิต

เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

เชื้อรา *Corynespora cassiicola* ลักษณะทั่วไปของราสกุลนี้มีโคโลนี (colony) สีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้ม เส้นใยฟูขึ้นจากหน้าอาหาร ก้านชูสปอร์ (conidiophore) มีลักษณะเป็นก้านเดี่ยวทรงกระบอกตรง ขนาด 94.50–162 × 2.70–4 ไมโครเมตร มีผนังกั้น 2–20 septate และมีสีน้ำตาลเข้ม โคนิเดีย (conidia) เป็นแบบเดี่ยวและสามารถต่อกันเป็นสายยาว ลักษณะเป็นกระบอกตรงหรือกระบอกโค้ง มีขนาด 62–127 × 5–8 ไมโครเมตร มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 1) (Chairin et al., 2017)

การจัดลำดับอนุกรมวิธานของเชื้อรา *C. cassiicola* (Berk & M.A.Curtis) C.T. Wei

อาณาจักร (Kingdom): Fungi

ไฟลัม (Phylum): Ascomycota

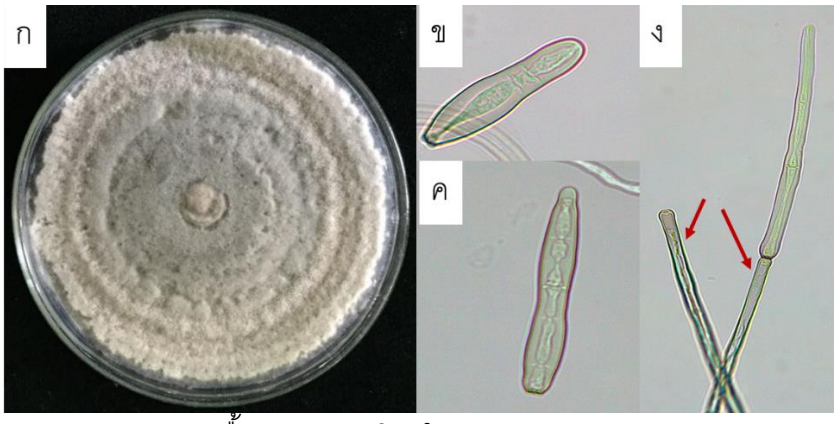
ชั้น (Class): Dothideomycetes

อันดับ (Order): Pleosporales

วงศ์ (Family): Corynesporascaceae

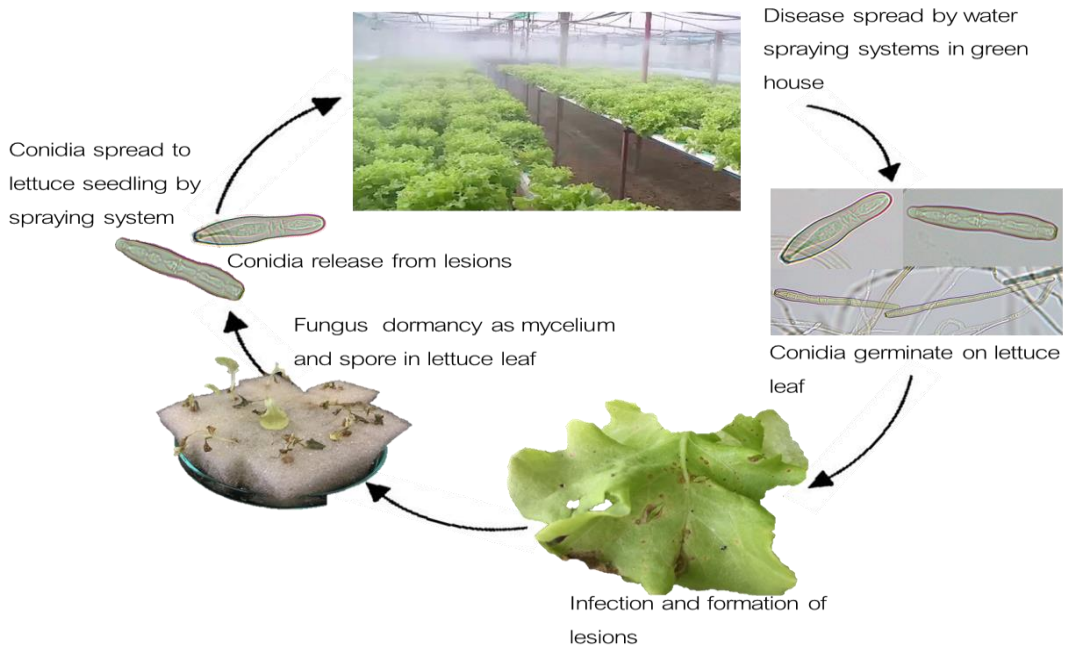
สกุล (Genus) *Corynespora*

ชนิด (Species): *Corynespora cassiicola*



ภาพที่ 1 สัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด *Corynespora cassiicola* ก. โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA ข. และ ค. โคนิเดีย ง. ก้านชูสปอร์ (ลูกศร)

การแพร่กระจายและกระบวนการเข้าทำลายของ *C. cassiicola* เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์ สามารถแพร่กระจายผ่านทางระบบน้ำ เนื่องจากมีการให้น้ำและแร่ธาตุผ่านทางระบบน้ำหมุนเวียน และแบบพ่นฝอย เป็นเหตุให้เชื้อสาเหตุโรคแพร่กระจายและพัฒนาได้เป็นอย่างดี เมื่อสปอร์ของเชื้อราสัมผัสกับผิวของใบผักสลัดจะงอกเส้นใย (germ tube) ออกมาเพื่อแทงเข้าไปยังผิวพืช และสร้าง appressorium และเจาะเข้าไปยังเซลล์พืช จากนั้นเส้นใยจะเจริญอยู่ระหว่างเซลล์พืชและสร้างสารพิษ cassiicolin ออกมาเพื่อทำลายเซลล์พืช ทำให้พืชแสดงอาการจุดและไหม้ (Barthe et al., 2007) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วงจรการแพร่กระจายและการระบาดของโรคใบจุดจากเชื้อราสาเหตุ *Corynespora cassiicola* ในระบบไฮโดรโปนิกส์

เชื้อรา *Curvularia aeria* ลักษณะทั่วไปของราสกุลนี้มีโคโลนีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม เส้นใยฟูขึ้นจากหน้าอาหาร และเจริญอย่างรวดเร็วบนอาหาร PDA ก้านชูสปอร์ เป็นแบบเดี่ยวมีลักษณะตรงหรือโค้งงอ และมีผนังกั้นสีน้ำตาล โคนิเดีย แบบไม่อาศัยเพศ มีรูปร่างแบบโค้งงอ มีขนาด 20–35 × 9–15 ไมโครเมตร และผนังกั้นมี 3–4 septate มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 3) (Pornsuriya et al., 2018)

การจัดลำดับอนุกรมวิธานของเชื้อรา *C. aeria* (Bat., J.A. Lima & C.T. Vasconc.) Tsuda

อาณาจักร (Kingdom): Fungi

ไฟลัม (Phylum): Ascomycota

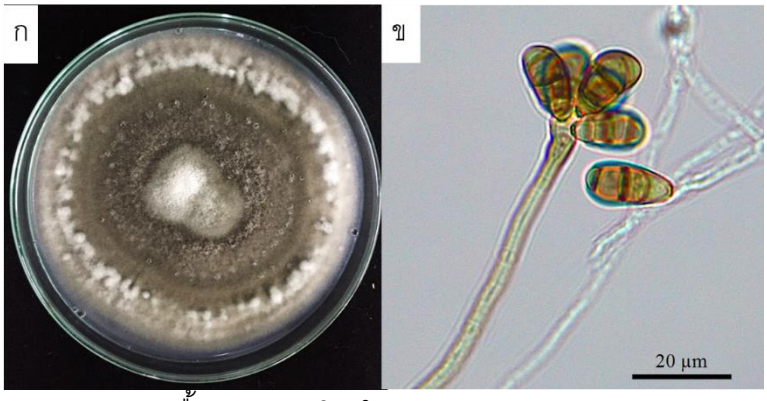
ชั้น (Class): Dothideomycetes

อันดับ (Order): Pleosporales

วงศ์ (Family): Pleosporaceae

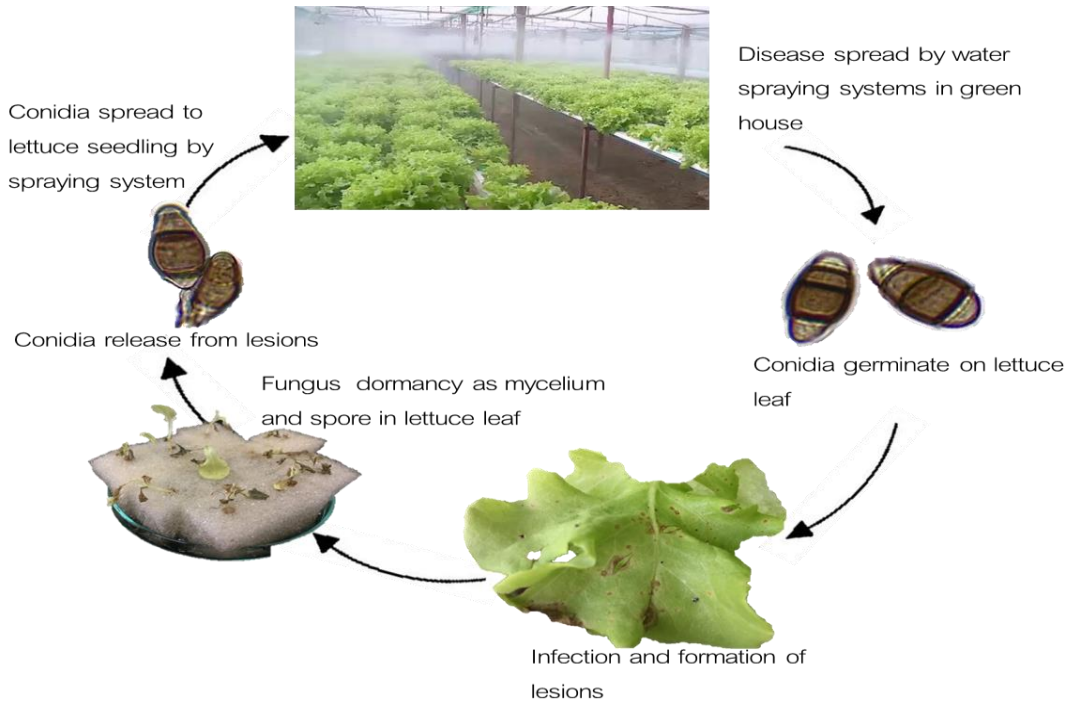
สกุล (Genus) *Curvularia*

ชนิด (Species): *Curvularia aeria*



ภาพที่ 3 สัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด *Curvularia aeria* ก. โคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA และ ข. โคนิเดีย

การแพร่กระจายของ *C. aeria* เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์ สามารถแพร่กระจายผ่านทางระบบน้ำ เนื่องจากมีการให้น้ำและแร่ธาตุผ่านทางระบบน้ำหมุนเวียน และแบบพ่นฝอย เป็นเหตุให้เชื้อสาเหตุโรคแพร่กระจายและพัฒนาได้เป็นอย่างดี เมื่อเชื้อราสัมผัสกับผิวของใบผักสลัดจะงอกเส้นใยออกมาจากโคนิเดียทั้ง 2 ด้าน (bipolar germination) เชื้อสร้าง appressorium และแทงเข้าสู่ผิวพืช โดยเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ระหว่างเซลล์เนื้อเยื่อใบ ส่งผลให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นถูกทำลายและแสดงอาการเป็นจุด ๆ โดยเชื้อราชนิดนี้แพร่ระบาดและพัฒนาได้ดีในสภาพอากาศร้อนและชื้น และยังพบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถมีชีวิตอยู่ในเศษซากพืช ทำให้สามารถระบาดได้ทุกเมื่อหากขาดการจัดการที่มีประสิทธิภาพ (จิตรา กิตติโมรากุล, 2557)



ภาพที่ 4 วงจรการแพร่กระจายและการระบาดของโรคใบจุดจากเชื้อราสาเหตุ *Curvularia aeria* ในระบบไฮโดรโปนิกส์

การควบคุมโรคใบจุด

การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี

การใช้สารเคมีในการควบคุมศัตรูพืชนับว่าเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเกิดโรค ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ (2554) ได้ทดสอบการยับยั้งและป้องกันเชื้อสาเหตุโรคพืชสกุล *Alternaria* สาเหตุโรคใบจุดของพืชในตระกูลกะหล่ำ คือ ผักคะน้าจีน ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก กะหล่ำปม บร๊อกโคลี่ โดยใช้สารเคมี 6 ชนิดคือ mancozeb, difenoconazole, iprodione, flusilazole, pyraclostrobin และ metalaxyl M+mancozeb ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชเหล่านี้มีประสิทธิภาพในระดับห้องปฏิบัติการที่สามารถคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบต่อในระดับเรือนทดลองได้ Kingsland และ Sitterly (2008) ได้ศึกษาการใช้สารเคมีชนิด Chlorothalonil และ Propane-1, 2- diol ร่วมกับ copper oxychloride ในการควบคุมโรคใบจุดของมะเขือเทศซึ่งเกิดจากเชื้อรา *C. cassiicola* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังพบว่า สารเคมีประเภท carboxamides สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. cassiicola* ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Miyamoto et al., 2009)

การควบคุมโรคโดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร

มีรายงานการใช้พืชสมุนไพรหลายชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (วรารัตน์ ศรีจันทร์ และ ชัยสิทธิ์ ปรีชา, 2555) เนื่องจากเกษตรกรได้คำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค และช่วยรักษาสภาพแวดล้อม จึงได้นำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ทดแทนสารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืชกันแพร่หลาย เพื่อผลิตอาหารที่ปลอดภัยในอนาคต (นุชนาถ จงเลขา, 2548) โดย วิพรพรรณ เนื่องเม็ก และ รัตนาภรณ์ นครไธสง (2557) ได้นำสารสกัดจากสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ กานพลู ว่านน้ำ อบเชย ขมิ้นชัน ไพล ข่า ชุมเห็ดเทศ หางไหล ฟ้าทะลายโจร และขิง มาทดสอบยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดในห้องปฏิบัติการ พบว่าหางไหลสามารถสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. ได้สูงสุด 29.70 เปอร์เซ็นต์ และผลการทดสอบสารสกัดสมุนไพรในการควบคุมการเกิดโรคในแปลงปลูก พบว่ากรรมวิธีที่มีการพ่นด้วยเชื้อ *Alternaria* sp. ทำให้เกิดโรค 2.10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นด้วยสารสกัดหางไหลไม่เกิดโรคเลย

การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือจุลินทรีย์ที่เป็นศัตรูของเชื้อสาเหตุโรคโดยสามารถอยู่ร่วมกันกับพืชและส่งผลดีให้กับพืช แต่ต้องไม่สร้างความเสียหาย ความผิดปกติหรือก่อโรคแก่พืช ส่วนใหญ่อาศัยอยู่บริเวณผิวของพืช (phylloplane) และเนื้อเยื่อพืช (endophyte) รากพืช (mycorrhiza) บริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) และเศษซากพืชและอินทรียวัตถุที่ถูกย่อยสลาย (saprophyte) โดยเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชได้ (อรณิชา ตันติพลานนท์, 2561)

Shikha และ Harsh (2014) แยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากบริเวณผิวพืช และนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *A. alternata* สาเหตุของโรคใบจุดของต้นผักคราดหัวแหวน (*Spilanthes oleracea*) ในห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธี dual culture assay ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคชนิดนี้ได้เป็นอย่างดี โดยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดคือ เชื้อ *T. harzianum* ISO-1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ Suárez-Estrellaa และคณะ (2007) ได้แยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Aspergillus* spp. จากกองปุ๋ยหมักทางการเกษตรและนำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* ในห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถยับยั้งและควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* f. sp. *melonis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ อรณิชา ตันติพลานนท์ และคณะ (2559) ได้แยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินบริเวณรอบรากต้นมะขามป้อมที่สมบรูณ์ไม่แสดงอาการโรคใด ๆ จำนวน 89 ไอโซเลท พบว่า 3

ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ด้วยวิธี dual culture ได้สูงถึง 76.07–87.11 เปอร์เซ็นต์

การควบคุมโรคพืชโดยเฉพาะการใช้เชื้อรากลุ่ม *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Streptomyces* spp. ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มนี้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้หลายชนิด และยังสามารถช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมี รวมถึงช่วยลดผลกระทบจากสารตกค้างของสารเคมีต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

ควบคุมโรคโดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืช ซากสัตว์และอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร สร้างเส้นใยสีขาวและผลิตส่วนขยายพันธุ์ที่ เรียกว่า โคนิเดีย หรือ สปอร์ จำนวนมากและรวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่นจนเห็นเป็นสีเขียว เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยมีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ 4 กลไก คือ การแข่งขัน (competition) ด้านปัจจัยการดำรงชีวิตกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช การเป็นปรสิต (parasitism) กลไกการยับยั้งและทำลาย (antibiosis) และกลไกการกระตุ้นความต้านทานให้แก่พืช (induced resistance) โดยเฉพาะการนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน (Howell, 2003; Vinale et al., 2008; Mohammad and Zahra 2013) การนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชนั้น มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

Jayasuriya และ Thennakoon (2007) ได้ศึกษาการใช้เชื้อรา *T. harzianum* T310 เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพาราในสภาพโรงเรือน พบว่าเมื่อใช้เชื้อรา *T. harzianum* T310 หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรครากขาว ส่งผลให้ต้นยางพาราแสดงอาการเป็นโรคเพียง 23.60 เปอร์เซ็นต์ และรากยังมีสภาพปกติ ไม่มีการติดเชื้อ

Izzati และ Abdullah (2008) รายงานว่า การพ่นเชื้อรา *Trichoderma* sp. ลงบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อควบคุมโรค พบว่าสามารถลดการเกิดโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ดีถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุม

Prajapati และคณะ (2012) ศึกษาการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรคปลายใบไหม้ของต้นพลับพลึงซึ่งเกิดจากเชื้อสาเหตุ *C. eragrostidis* พบว่า เชื้อรา *T. viride*, *T. longibrachyatum* และ *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ถึง 73.39, 71.76 และ 67.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

วิพรพรรณ เนื่องเม็ก และคณะ (2557) ได้ศึกษาผลของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ต่อการเจริญเติบโต และการควบคุมโรคแคนตาลูปในแปลง โดยการปลูกแคนตาลูปที่รองก้นหลุมด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. และการปลูกแคนตาลูปที่ไม่ใส่เชื้อรา *Trichoderma* sp. รองก้นหลุมก่อนปลูก พบว่า ต้นแคนตาลูปที่ใส่เชื้อรา *Trichoderma* sp. รองก้นหลุมก่อนปลูก มีการเจริญเติบโตทางลำต้นมากกว่าต้นแคนตาลูปที่ไม่ใส่เชื้อรา *Trichoderma* sp.

วาริน อินทนา และคณะ (2559) รายงานว่าการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. asperellum* ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศในโรงเรือน แบบการใช้เชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์เดียวและใช้ร่วมกัน 2 สายพันธุ์ พบว่าทุกวิธีการสามารถลดความรุนแรงในการเกิดโรคของต้นมะเขือเทศได้ โดยอยู่ในช่วง 38.50–68.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุม (ใส่เชื้อรา *Pythium* sp. อย่างเดียว) โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้เชื้อรา *T. asperellum* FR-NST-009+FR-NST-009-mt พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคได้สูงถึง 68.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้สารเคมี metalaxyl

Sagarika และคณะ (2016) รายงานว่า การใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่แยกได้จากตัวอย่างจากดินในแต่ละพื้นที่ของจังหวัดลูนูวีลา ภาคตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศศรีลังกา มีประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของเชื้อรา *Ceratocystis paradoxa* สาเหตุของโรค stem bleeding ของมะพร้าว ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ นอกจากการใช้ควบคุมโรคแล้ว คุณสมบัติพิเศษของเชื้อรา *Trichoderma* sp. อีกประการคือ สามารถช่วยละลายแร่ธาตุให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช จึงช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและชักนำให้ต้นพืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรค

การควบคุมโรคโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp.

เชื้อ *Streptomycetes* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สร้างเส้นใยแตกแขนงได้แบบเดียวกับเชื้อรา โดยเชื้อสร้างเส้นใยเรียกว่า aerial mycelium และยังสร้างเส้นใยที่เจริญลงไปในอาหารที่เรียกว่า substrate mycelium เชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* ส่วนใหญ่สามารถสร้างสปอร์ซึ่งเรียกว่าโคนิเดียได้ โดยสร้างขณะที่อายุของเชื้อมากขึ้น aerial mycelium ซึ่งชูขึ้นบนผิวของโคโลนีจะพัฒนาเป็น sporophores ที่มี nuclei หลายอัน และเกิดการสร้างผนังกั้น ทำให้แต่ละเซลล์พัฒนาไปเป็นโคนิเดียซึ่งมักเป็นสายยาว และมีลักษณะหลากหลายทั้ง sporophores และ conidia มีสีต่างกัน ทำให้สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อโดยอาศัยจากทั้งลักษณะและสีของ sporophores และโคนิเดียร่วมกับคุณสมบัติด้านอื่น โดยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย

Streptomyces spp. ได้จากดินเป็นส่วนใหญ่ บางครั้งก็สามารถพบในแหล่งน้ำได้บ้าง และยังพบเป็นเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ในพืช (endophytic *Streptomyces*) (Kieser et al., 2000)

Zarandi และคณะ (2009) รายงานถึงการใช้เชื้อ *S. sindeneusis* ในการควบคุมเชื้อรา *Pyricularia grisea* โดยวิธีการผสมสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคกับเชื้อ *S. sindeneusis* จากนั้นนำไปพ่นลงบนใบข้าว พบว่าต้นกล้าที่ถูกปลูกเชื้อแสดงอาการเป็นโรคเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว

ปวีณา สังข์แก้ว และคณะ (2555) ได้ศึกษาและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *S. griseus* จำนวน 258 ไอโซเลท จากแปลงยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อใช้ในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราซึ่งเกิดจากเชื้อ *Rigidoporus microporus* โดยการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *S. griseus* subsp. *formicus* มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชถึง 83.57 เปอร์เซ็นต์

Pithakkit และคณะ (2015) ได้แยกเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. จากดินบริเวณรอบรากปาล์มน้ำมัน และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคในปาล์มน้ำมันคือ *C. oryzae*, *Ganoderma boninense* และ *Schizophyllum commune* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคใบจุด โรคโคนเน่า และโรค brown germ ตามลำดับ โดยการทดสอบในห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด และจากการทดสอบการแช่เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคในน้ำเลี้ยงเชื้อ และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อสามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคได้ จากการทดลองสามารถระบุว่าได้ว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. สามารถสร้างสารบางอย่างที่มีคุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้

Lyu และคณะ (2017) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell-free CF) ของแบคทีเรีย *S. yanglinensis* 1307 เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคของสตรอเบอร์รี 4 ชนิดคือ *Botrytis cinerea*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus stolonifer* และ *Sclerotinia sclerotiorum* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Boukaew และคณะ (2011) ใช้เชื้อแบคทีเรีย *S. philanthi* และ *S. mycarofaciens* มาใช้ควบคุมโรคราเมล็ดผักกาดซึ่งเกิดจากเชื้อ *Sclerotium* sp. และโรคเหี่ยวเขียวของพริกขี้หนู ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ได้เป็นอย่างดี จึงมีการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จ เพื่อให้ใช้งานได้ง่ายขึ้น

กลไกการเป็นปฏิปักษ์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ในธรรมชาติจุลินทรีย์มีรูปแบบการดำรงชีวิตที่หลากหลาย โดยบางรูปแบบสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตรได้ โดยการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมโรคพืช ซึ่งอาจเป็นกลุ่มของ แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ หรือไวรัส ที่มีความสามารถในการควบคุมจำนวนประชากรหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคพืชได้ รวมทั้งไปลดกิจกรรมของเชื้อในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืชอาศัย โดยมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ที่แตกต่างกัน (Kawicha et al., 2013) โดยมีกลไกหรือวิธีการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช 4 รูปแบบ คือ

การแก่งแย่งแข่งขันพื้นที่ และธาตุอาหาร (competition)

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการเจริญแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชเพื่อความอยู่รอดได้ดี ทำให้เชื้อสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญจนก่อให้เกิดโรคพืช หรือทำให้เกิดโรคน้อยลง โดยเฉพาะเชื้อรา เนื่องจากเชื้อราสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว จึงสามารถแก่งแย่งอาหารและแข่งขันในด้านพื้นที่กับเชื้อสาเหตุโรค และยังสามารถดูดซับสารอินทรีย์ต่าง ๆ เพื่อใช้ในการเจริญ และการขยายพันธุ์ (Danielson and Davy, 1973)

เชื้อรา *Trichoderma* sp. บางสายพันธุ์สามารถผลิต siderophore ออกมาดูดซับธาตุเหล็ก (Chet and Inbar, 1994) โดยการแข่งขันด้านอาหารถือเป็นกลไกหลักที่ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ดี (Bae and Knudsen, 2005) โดย Nemes และคณะ (1996) รายงานว่า การผสมเชื้อรา *T. harzianum* และ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในวัสดุสำหรับปลูกส้ม มะเขือเทศ คื่นไฉ่ และฝรั่ง พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดสามารถเข้าครอบครองรากพืชได้เร็วกว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้ Danielson และ Davey (1973) พบว่า เชื้อรา *T. koningii* สามารถเจริญแก่งแย่งสารอาหารกับเชื้อรา *S. cepivorum* สาเหตุโรคโคนเน่า ส่งผลให้สามารถครอบครองพื้นที่บริเวณรากของต้นหอม และยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้เป็นอย่างดี

การเป็นปรสิตต่อเชื้อสาเหตุโรค (parasitism)

เป็นกลไกที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งเจริญอยู่ใกล้เคียงหรือบนส่วนของเชื้อโรคพืชเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารโดยตรง เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้กลไกนี้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้แก่ เชื้อรากลุ่ม *Trichoderma* spp. ซึ่งสามารถแทงเส้นใยเข้าไปดูดกินสารอาหารในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคจนตาย

จากรายงานของ ขจรเกียรติ ธิปทา และคณะ (2554) ซึ่งได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 120 ไอโซเลท เพื่อการควบคุมเชื้อรา *Pythium* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของ

โรคเน่าคอดิน เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี dual culture และนำเส้นใยที่ได้จากการทดสอบไปส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 16 ไอโซเลท สามารถแทงและพันรัดเส้นใยของเชื้อรา *Pythium* spp. ได้ รวมถึง Elad และคณะ (1980) ที่ได้ศึกษาการเป็นปรสิตของเชื้อรา *T. harzianum* ต่อเชื้อราสาเหตุโรค *Rhizoctonia solani* โดยการสร้างเส้นใยเข้าไปพันรัดและแทงเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค ส่งผลให้หยุดการเจริญ

การทำลายและยับยั้ง (antibiosis)

เป็นกลไกการสร้างผลิตผลจากกระบวนการเมทาโบลิซึมของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งมักมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotics) สารพิษ (toxins) หรือเอนไซม์ (enzyme) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ เช่น ทำให้เส้นใยและสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคเกิดการเหี่ยวหรือสลาย (lysis) หรือมีรูปร่างผิดปกติไปจากเดิมจนทำให้เกิดโรคพืชลดน้อยลง (นิพนธ์ ทวีชัย, 2550)

เชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถสร้างสารบางอย่างซึ่งอาจเป็นสารปฏิชีวนะ สารพิษ หรือ เอนไซม์ มายับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรค เช่น สารปฏิชีวนะที่ระเหยได้ (Dennis and Webster, 1971) และยังสามารถสร้างเอนไซม์ cellulase, chitinase และ glucanase ขึ้นในบริเวณที่เส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* พันรัดเส้นใยของเชื้อรา *B. cinerea* สาเหตุโรค grey mold ของแตงกวา (Elad et al., 1980) ซึ่งการผลิตเอนไซม์เหล่านี้ขึ้นมาเพื่อย่อยเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยตรงนับเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนอกจากนี้พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. สร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น chitinase และ cellulase เป็นต้น (จิระเดช แจ่มสว่าง และ วิไลวรรณ อินทนู, 2542)

Streptomyces spp. มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยการสร้างสารทุติยภูมิชนิดต่าง ๆ โดย Taechowisan และคณะ (2005) ศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างสารสร้างสารทุติยภูมิที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อยังยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. musae* และ *F. oxysporum* ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวคือ 5, 7-dimethoxy-4-p-methoxylphenylcoumarin และ 5, 7-dimethoxy-4-p-phenylcuomarin Prapagdee และคณะ (2008) พบว่า *S. hygroscopicus* SR A14 สร้าง chitinase และ β-1, 3-glucanase ในระยะ exponential phase ถึงระยะ stationary phase เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *S. rolfsii* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสและโรคโคนเน่าของพริก ส่งผลให้เซลล์ยุบตัวและของเหลวภายในเซลล์ไหลออกมาสู่ภายนอก

กลไกการชักนำให้เกิดความต้านทาน (induced resistance)

การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ซึ่งเป็นกลไกการต่อต้านการเกิดโรคของพืชเองและเกิดอย่างซับซ้อน (Harman et al., 2004) การเกิดความต้านทานของพืชอาจเกิดเฉพาะที่หรือเกิดทั่วทั้งต้นขึ้นอยู่กับชนิดแหล่งและปริมาณของสิ่งกระตุ้น Pal และ Gardener (2006) ได้รายงานว่า *Trichoderma* spp. T-22 ที่ใช้คลุกเมล็ดถั่วหรือราดดิน สามารถชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช *B. cinerea* และ *X. campestris* pv. *phaseoli* โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในมะเขือเทศ และต้านทานต่อ *C. graminicola* ในข้าวโพด หรือใช้ร่วมกับ *T. virens* T3 ช่วยให้แตงกวามีความต้านทานต่อ *Green-mottle mosaic virus* จากการศึกษาของ Khamna และคณะ (2010) พบว่า *Streptomyces* sp. มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืช เช่น เอนไซม์ chitinase, glucanase, peroxidase (POD) และ polyphenol oxidase (PPO)

จากการศึกษาของ Christopher และคณะ (2010) ได้ศึกษาบทบาทของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของต้นมะเขือเทศซึ่งชักนำด้วย *T. virens* ให้มีความต้านทานต่อโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบว่าการกระตุ้นด้วย *T. virens* พืชมีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืชเพิ่มขึ้นคือ POD, PPO และ phenylalanine ammonia lyase (PAL) จากวันที่ 7 ของการทดสอบและสูงสุดในวันที่ 14 ของการทดสอบ

Sabaratnam และคณะ (2002) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคเน่าคอดินสาเหตุจากเชื้อรา *R. solani* ในต้นมะเขือเทศ พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท Di-944 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดินได้ใน 10 วัน เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase, β-1,3-glucanase และ PAL ในต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อ *Streptomyces* sp. เพียงอย่างเดียวพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้มีค่าสูงกว่าต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* sp. มีความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ chitinase, β-1,3-glucanase และ PAL ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค

การผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยนำมาพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จและอยู่ในรูปแบบชีวภัณฑ์ ทำให้เกิดความสะดวกต่อการนำไปใช้ โดยการผลิตสูตรสำเร็จ

ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้นสามารถทำได้หลายรูปแบบ Ramanujam และคณะ (2010) ทดลองผลิตสูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เชิงการค้าในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อให้มีความสะดวกในการนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดยมีการผลิตให้อยู่ในหลายรูปแบบ เช่น รูปแบบเม็ด (Dubey et al., 2009) รูปแบบน้ำมัน (Ahamedemujtaba and Kulkarni, 2017) รูปแบบผง แกรนูล แกรนูลในแคปซูล และอิมัลชัน เป็นต้น (Pornsuriya and Sunpapao, 2014)

สารประกอบสูตรสำเร็จ

ในการเตรียมสูตรสำเร็จของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมโรคพืชนั้น นอกจากประกอบไปด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แล้ว ยังประกอบไปด้วยส่วนผสมต่าง ๆ ที่เป็นสารปรุงแต่ง (excipients) โดยสารแต่ละชนิดนั้นทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ สารเพิ่มปริมาณ (fillers) สารยึดเกาะ (binders) สารช่วยแตกกระจายตัว (disintegrants) และสารช่วยไหล (glindants) โดยส่วนประกอบเหล่านี้เป็นตัวเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์ฏิปักษ์สามารถมีชีวิตรอดและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (ทัดทรง ทั่วทิพย์, 2535; ปราโมทย์ ทิพย์ดวงตา, 2539)

สารเพิ่มปริมาณ

เป็นสารที่เติมลงไปในสูตรสำเร็จเพื่อเพิ่มขนาดหรือน้ำหนักของสูตรสำเร็จ โดยต้องมีคุณสมบัติที่สามารถเข้ากันกับสารประกอบอื่น ๆ ในสูตรสำเร็จ ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาใด ๆ มีความคงตัว ไม่ดูดความชื้น มีการไหลดี ราคาถูก และทำให้แตกตัวดี ตัวอย่างสารเพิ่มปริมาณที่นิยม ได้แก่ $Ca_3(PO_4)_2$, calcium, $CaSO_4$, cellulose, dextrose, lactose, mannitol, phosphate, starch เป็นต้น (มนต์ชุลี นิติพน, 2534)

สารยึดเกาะ

เป็นสารที่เพิ่มแรงเกาะกันของผง ทำให้เกิดการเกาะเป็นแกรนูลภายใต้แรงตอก ทำให้อัดแน่นเป็นเม็ดได้ มีความแข็งแรงพอเหมาะต่อการตอก โดยคุณสมบัติของสารยึดเกาะที่ดีต้องสามารถเข้ากันได้ดีกับสารตัวประกอบอื่น ๆ ในสูตรสำเร็จ ให้แรงยึดเกาะเพียงพอในการทำให้ผงจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการต่าง ๆ ในการผลิตได้ สารยึดเกาะที่นำมาใช้มีหลายชนิด ทั้งที่เป็นพวกน้ำตาลและสารประกอบเชิงซ้อนจากธรรมชาติ ได้แก่ acacia, gelatin, starch, sucrose, glucose และ gum tragacanth และสารที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น polyvinylpyrolidone (PVP) methyl cellulose เป็นต้น (มนต์ชุลี นิติพน, 2534)

สารช่วยแตกกระจายตัว

เป็นสารช่วยให้สูตรสำเร็จเกิดการแตกตัว หรือกระจายตัวได้ในเวลาอันสมควรเมื่อสัมผัสกับสารละลายหรือน้ำ การผสมสารช่วยในการแตกตัวทำได้โดยการผสมก่อนทำเป็นสูตร

สำเร็จหรือเป็นสูตรสำเร็จแล้ว สารช่วยแตกกระจายตัว ได้แก่ starch, alginate, gum เป็นต้น โดย starch เป็นสารที่นิยมใช้กันมาก โดยทั่วไปหากมีปริมาณของสารชนิดนี้อยู่มากยิ่งทำให้เกิดการแตกตัวเร็วขึ้น แต่ปัญหาที่ตามมาคือการเกาะตัวกันและความแข็งของสูตรสำเร็จจะน้อยลง ต่อมาคือ alginate ซึ่งสารตัวนี้จัดอยู่ในกลุ่ม hydrophilic colloid substances โดยจำหน่ายในรูปของ alginic acid หรือ เกลือของ alginic acid โดยเฉพาะในรูปของเกลือ sodium มีคุณสมบัติชอบน้ำมากกว่าสารจำพวกแป้ง โดยปริมาณที่ใช้ทั่วไปคือ 1–5 เปอร์เซ็นต์ และ gum เป็นสารที่สามารถพองตัวในน้ำ รวมถึงเป็นตัวช่วยยึดเกาะที่ดี ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ agar, pectin และ tragacanth เป็นต้น (จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์, 2538)

สารช่วยไหล

เป็นสารที่ผสมลงในสูตรสำเร็จเพื่อเพิ่มการไหลโดยการลดแรงเสียดทานระหว่างอนุภาค ทำให้แกรนูลไหลจาก hopper ลงมาสู่เบ้าได้อย่างสม่ำเสมอ ทำให้แกรนูลที่ได้มีความสม่ำเสมอ สารที่ช่วยในการไหล ได้แก่ starch, talcum, colloidal silicon dioxide, silicate และ calcium phosphate (มนต์ชุลี นิติพน, 2534) โดยสารดังกล่าวจะต้องไม่ทำให้คุณสมบัติในการคงตัวทั้งทางกายภาพและเคมีของสูตรสำเร็จเปลี่ยนแปลงไป (จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์, 2538)

การนำสารประกอบชนิดต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ในสูตรสำเร็จ

Sabaratnam และ Traquair (2002) ได้ผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces* sp. เพื่อใช้ในการควบคุมโรค Damping-off ในต้นมะเขือเทศซึ่งเกิดจากเชื้อ *R. solani* โดยใช้ alginate-Kaolin เป็นส่วนผสมหลัก และจากนั้นผสมด้วย Tween 20 เพื่อช่วยให้สูตรสำเร็จสามารถเกาะตัวกันได้ดี และ sodium alginate ซึ่งทำหน้าที่ให้สูตรสำเร็จสามารถแตกกระจายตัวเมื่อนำไปเจือจางได้ดี

Kumar et al. (2012) ได้ผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อรา *T. viride* โดยใช้สารเพิ่มปริมาณที่มีความแตกต่างกันคือ talcum และ ผงถ่าน โดยผสมกับสปอร์ของเชื้อรา *T. viride* ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันและนำมาเปรียบเทียบจำนวนของสปอร์ที่มีชีวิตรอดในแต่ละสูตร

Mbarga และคณะ (2014) ผลิตสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันของเชื้อรา *T. asperellum* โดยใช้น้ำมันถั่วเหลือง น้ำตาลกลูโคส และสาร emulsifier เพื่อควบคุมเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรคผลดำของโกโก้ และพบว่าสูตรสำเร็จชนิดนี้สามารถควบคุมโรคนี้ได้เป็นอย่างดี

การใช้ประโยชน์จากสูตรสำเร็จ

สูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ (wettable powder)

Sarabatman และ Traquair (2002) รายงานว่า สูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces* sp. ในรูปแบบผงละลายน้ำ มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมโรครากเน่าระดับคอดินของต้นมะเขือเทศได้ 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาสูตรชีวภัณฑ์เพื่อนำมาใช้ควบคุมโรคพืช เช่น mycostop® เป็นชีวภัณฑ์ทางการค้าที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *S. griseoviridis* โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตัวนี้จะเข้าไปอาศัยอยู่ในรากพืช และควบคุมการเจริญของเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *radices-lycopercici, F. oxysporum* f. sp. *lycopercici* สาเหตุโรคเน่าและโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Minuto et al., 2006)

Wijesinghe et al. (2011) ได้ทำการพัฒนาชีวภัณฑ์ชนิดผงละลายน้ำจากเชื้อรา *T. asperellum* โดยผลการศึกษาพบว่า สูตรสำเร็จชนิดนี้สามารถใช้ควบคุมเชื้อ *Thielaviopis paradoxa* สาเหตุโรคเน่าดำของสับปะรดได้อย่างมีประสิทธิภาพ อมรรัตน์ ชุมทอง (2547) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์จากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. firmus* ในรูปแบบผงคลุกเมล็ด ใช้ร่วมกับรูปแบบแกรนูลละลายน้ำสำหรับใช้พ่น พบว่าสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *R. solani* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วหรั่งได้ดี วานิด รอดเนียม (2552) ได้ทำการพัฒนาสูตรสำเร็จจากเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในรูปแบบแกรนูลละลายน้ำ เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *A. longipes* สาเหตุของโรคใบจุดผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์และสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุนี้ได้เป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์
2. เพื่อให้ได้สูตรสำเร็จที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound รุ่น Olympus cx22, และ Leica DM1000
2. กล้องถ่ายรูป (camera)
3. เครื่อง gas chromatography-mass spectrometer รุ่น SQ8, PerkinElmer Ltd
4. เครื่อง spectrophotometer รุ่น UV530, Metech
5. เรื่องเขย่าผสม (vortex mixture) รุ่น VM-10, Wise Mix®
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด (analytical balance) รุ่น ME204E, Mettler Toledo
7. เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer) รุ่น D160, Scillogex
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Combi 514R, Hanil science Industrial
9. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air-flow cabinet)
10. ตู้แช่ (refrigerator)
11. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น FED, Binder
12. ไมโครเวฟ (microwave) รุ่น R-250, Sharp
13. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) AC Series รุ่น AC-60, Hanyang Scientific
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น YCW-010E, Gemmyco
15. อุปกรณ์และเครื่องแก้ว ได้แก่ คอร์กบอเรอร์ กระจกปิดสไลด์ ฮีมาไซโตมิเตอร์ ไมโครปิเปต แผ่นสไลด์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ จานเลี้ยงเชื้อ แท่งแก้วคนสาร บีกเกอร์ หลอดทดลอง
16. อุปกรณ์สำหรับการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากคีบ กระดาษซับ และอื่น ๆ
17. อุปกรณ์พลาสติก ได้แก่ ถุงพลาสติก ยาง ตะแกรงร่อนแป้ง ขวดพลาสติกสีขาวขุ่น

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. Glucose yeast malt extract agar (GYMA)
3. Glucose ammonium nitrate agar (GANA)

วัสดุสำหรับเตรียมสูตรสำเร็จ

1. ทัลคัม (talcum)
2. ดินขาว (kaolin)
3. แป้งข้าวโพด (corn starch)
4. น้ำมันถั่วเหลือง (soy bean oil)
5. น้ำมันมะพร้าว (coconut oil)
6. น้ำมันคาโนลา (canola oil)
7. น้ำมันปาล์ม (palm oil)
8. กลีเซอรอล (glycerol)

อุปกรณ์วัสดุทางการเกษตร

1. กระบะสำหรับปลูกผักสลัด
2. โฟมพลาสติก
3. ฟองน้ำ
4. เครื่องให้ออกซิเจน
5. ปุ๋ยน้ำสูตร A และ B
6. เมล็ดผักสลัดกรีนโอ๊ค พันธุ์รอยัล

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีทั่วไป

1. Ethanol 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ บริษัท Merck
2. สารจับใบ Tween 20 บริษัท Merck
3. Glucose ยี่ห้อ Glucolin
4. Dextrose ยี่ห้อ Glucolin
5. Agar
6. K_2HPO_4 บริษัท Ajax
7. $MgSo_4$. $7H_2O$ บริษัท Merck
8. NaCl บริษัท Merck
9. NH_4NO_3 บริษัท Merck
10. Rose bengal

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

1. 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS) บริษัท Sigma
2. Catechol
3. O-Phenylenediamine (OPDA)
4. Colloidal chitin
5. Laminarin

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรคพืช

1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เตรียมเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท คือ *T. asperellum* T1, T76-14, *T. harzianum* TM2/1, *T. spirale* T76-1, T76-12/2 และ V76-12 (อรณิชา ตันติพลานนท์ และ ชนินันท์ พรสุริยา 2559) จากที่เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA slant มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28–30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำไปทำการทดลอง

เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *S. angustmyceticus* NR8-2 (Pithakkit et al., 2015) จากที่เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA slant มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ก่อนนำไปทำการทดลอง

1.2 เตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

C. cassiicola (Chairin et al., 2017) และ *C. aeria* (Pornsuriya et al., 2018) นำเชื้อราจากที่เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA slant มาเลี้ยงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปทำการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *T. asperellum* T1, T76-14, *T. harzianum* TM2/1, *T. spirale* T76-1, T76-12/2, V76-12 และ *S. angustmyceticus* NR8-2 และเชื้อราสาเหตุโรคพืช *C. cassiicola* และ *C. aeria* ได้รับความอนุเคราะห์จาก อรณิชา ตันติพลานนท์ และ ชนินันท์ พรสุริยา 2559; Pithakkit et al., 2015; Chairin et al., 2017 และ Pornsuriya et al., 2018 ตามลำดับ ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ Culture Collection of Pest Management Department, คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Corynespora cassiicola* และ *Curvularia aeria* โดยวิธี dual culture assay

เชื้อรา *Trichoderma* spp.

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. (เชื้อปฏิปักษ์) จำนวน 6 ไอโซเลท ที่เตรียมจากการทดลองที่ 1.1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดผักสลัด โดยวิธี dual culture assay โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 6 ไอโซเลท และเชื้อราสาเหตุโรค บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นวุ้นของเชื้อปฏิปักษ์บริเวณขอบโคโลนี นำไปวางบนอาหาร PDA โดยวางให้

ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และใช้ cork borer ขนาดเดียวกันตัดชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรค ไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางในแนวตรงข้ามกับเชื้อปฏิปักษ์ และห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เช่นเดียวกัน ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ กรรมวิธีควบคุมทำโดยตัดชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ และเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากนั้นวัดรัศมีโคโลนีของเชื้อราทั้งสองชนิด และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Vincent, 1927) ดังสมการ

Percentage of inhibition = [(R1–R2)/R1] ×100

R1 = รัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R2 = รัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

ประเมินความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด ซึ่งแปลผลเป็น 4 ระดับ (ปริศนา วงศ์ล้อม, 2548) คือ

≥ 75 เปอร์เซ็นต์ = ประสิทธิภาพสูงมาก

61–74 เปอร์เซ็นต์ = ประสิทธิภาพสูง

51–60 เปอร์เซ็นต์ = ประสิทธิภาพปานกลาง

≤ 50 เปอร์เซ็นต์ = ประสิทธิภาพต่ำ

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp.

ใช้ loop เขี่ยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *S. angustmyceticus* NR8-2 และขีด (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน และใช้ cork borer ขนาด0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรค ไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA โดยวางในทิศตรงข้ามกับเชื้อปฏิปักษ์ และห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เช่นเดียวกัน สำหรับชุดควบคุมตัดชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคอย่างเดียววางบนอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากขอบ 2 เซนติเมตร ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ และเชื้อราสาเหตุโรค และวัดรัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคเมื่อเชื้อในชุดควบคุมเจริญเต็มจาน และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคตามสูตรข้างต้น

3. การสร้างสารระเหยต้านเชื้อรา (volatile antifungal bioassay)

3.1 ประสิทธิภาพของสารระเหยต้านเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด

การทดสอบกลไกการสร้างสารระเหยที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการโดยใช้วิธี volatile antifungal bioassay

ดัดแปลงจากวิธีการของ Dennis and Webster (1971) โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เลี้ยงบนอาหาร PDA/GYMA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรค บนอาหาร PDA บ่มไว้ที่มืดอุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง จากนั้นเปิดฝาออกและนำจานเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 มาประกบกัน แล้วพันด้วย parafilm ให้แน่นเพื่อป้องกันการระเหยของสารออกมาภายนอกจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนกรรมวิธีควบคุมใช้จานอาหาร PDA/GYMA ที่ไม่ได้ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นตัวประกบแทน สังเกตการณ์เจริญของโคโลนีในชุดควบคุมเจริญเต็มจาน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางและคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรของ Parizi (2012) ดังสมการ

Growth inhibition (GI) = [(D1−D2)/D1] × 100

D1 = เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในกรรมวิธีควบคุม

D2 = เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุโรคในกรรมวิธีทดสอบ

3.2 การวิเคราะห์ชนิดของสารระเหยต้านเชื้อรา

เตรียมโดยการเทอาหาร PDA หรือ GYMA ลงในหลอดทดสอบ GC/MS ขนาด 20 มิลลิลิตร วางอาหารให้เอียง จากนั้นใช้ cork borer ตัดชิ้นส่วนของเชื้อรา *Trichoderma* sp. วางบนอาหาร ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *S. angustmyceticus* NR8-2 ใช้การขีด (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดที่เตรียมไว้ จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นส่งไปวิเคราะห์สารระเหยด้วยเครื่อง Gas chromatography mass spectrophotometer (GC/MS) ที่บริษัท PerkinElmer ประเทศไทย

4. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell-free culture filtrate) ต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด

นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เลี้ยงในอาหาร PDB หรือ GYMB ที่มีส่วนผสมของ 1% colloidal chitin โดยใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นวุ้นเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง จำนวน 5 ชิ้น จากนั้นใส่ลงในอาหารที่เตรียมไว้ นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 กรองเพื่อแยกเส้นใย แล้วกรองด้วย membrane filter ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วอีกครั้งเพื่อแยกสปอร์หรือเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี agar diffusion test โดยการเตรียมอาหาร PDA/GYMA เทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะวุ้น 3 จุด โดยในแต่ละจุดหยอดสารดังนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB หรือ GYMB น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และน้ำเลี้ยงเชื้อ นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใย

ของเชื้อสาเหตุโรควางลงตรงกลางของจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน และวัดรัศมีของเชื้อสาเหตุโรค คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตรของ (Mostapha, 2004) ดังสมการ

Growth inhibition (GI) = [(C−T)/C] ×100

C = รัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญจากจุดกึ่งกลางไปทางหลุมที่หยอด PDB/GYMB

T = รัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญจากจุดกึ่งกลางไปทางหลุมที่หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อ

คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพจากการทดลองนี้ไปทำการทดสอบในการทดลองต่อไป

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด

ศึกษากลไกการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคในผักสลัด โดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยด้วย cork borer ใส่ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้จำนวน 1 ชิ้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นตรึงเส้นใยโดยแช่เส้นใยในสารละลาย 2.5% glutaraldehyde จากนั้นล้างด้วย phosphate buffer (PB) และน้ำกลั่น 3–5 ครั้ง และล้างด้วย alcohol series ความเข้มข้น 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ล้าง 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างส่งศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เพื่อทำตัวอย่างให้แห้ง และศึกษาลักษณะเส้นใยที่ของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

5. วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ β-1, 3-glucanase และ chitinase ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในการทดลองที่ 4.1 มาวัดกิจกรรมเอนไซม์ดังนี้

5.1 กิจกรรมเอนไซม์ β-1, 3-glucanase

ทำการทดลองโดยดัดแปลงจากวิธีของ Miller (1959) โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสม 0.5% laminarin ละลายใน 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยใช้น้ำตาล glucose เป็นมาตรฐาน โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase หนึ่งหน่วยเทียบกับปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้น 1 μmol/min

5.2 กิจกรรมเอนไซม์ chitinase

ทำการทดลองตามวิธีการของ Miller (1959) โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสม 1% colloidal chitin ละลายใน 50 mM potassium phosphate buffer (KPB) pH 7.5 บ่มทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร โดยใช้ N-acetyl-D-glucosamine เป็นเป็นมาตรฐาน โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ chitinase หนึ่งหน่วยเทียบกับปริมาณของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ที่เพิ่มขึ้น 1 μmol/min

6. การตอบสนองของพืชโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของต้นกล้าผักสลัดพันธุ์กรีนโอ๊ครอยัล อายุ 14 วัน โดยพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ตามชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 พ่นด้วยน้ำกลั่น (ชุดการทดลองควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* T1 24 และ 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 3 พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. spirale* T76-1 24 และ 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 4 จุ่มด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. asperellum* T1 24 และ 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 5 จุ่มด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. spirale* T76-1 24 และ 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 6 พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรค *C. cassiicola* 24 และ 48 ชั่วโมง

ชุดการทดลองที่ 7 พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรค *C. aeria* 24 และ 48 ชั่วโมง

จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ β-1,3 glucanase, chitinase, peroxidase (POD) และ polyphenol oxidase (PPO)

6.1 การเตรียมสารสกัดจากต้นกล้าผักสลัด

เก็บต้นกล้าตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ มาชั่งให้ได้น้ำหนักทั้งต้น 1 กรัมต่อ 1 ตัวอย่าง นำไปบดในโกร่งซึ่งทำให้อยู่ในสภาพเย็น โดยใช้ 50 mM potassium phosphate buffer

(KPB) pH 7.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง จากนั้นนำต้นกล้าที่บดแล้วไปปั่นเหวี่ยง ที่ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป

6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase

ทดลองตามวิธีการของ Miller (1959) โดยผสมสารสกัดจากใบผักสลัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และทดลองตามวิธีในการทดลองที่ 5.1

6.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส (chitinase)

ทดลองตามวิธีการของ Miller (1959) โดยนำสารสกัดตัวอย่างผักสลัดปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และทดลองตามวิธีในการทดลองที่ 5.2

6.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ peroxidase (POD)

ทดลองตามวิธีของ Nagle และ Haard (1975) โดยนำสารสกัดตัวอย่างผักสลัด ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสม 0.2 M O-Phenylenediamine (OPDA) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร 0.01 M sodium acetate buffer pH 6.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม 0.3% H_2O_2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เป็นขั้นตอนสุดท้าย จากนั้นผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปทันทีที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยกิจกรรมของ POD หนึ่งหน่วยเทียบกับปริมาณ OPDA ที่ลดลง 1 μmol

6.5 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO)

ทดลองตามวิธีของ Mayer et al. (1966) โดยนำสารสกัดจากใบพืช ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 0.3 M catechol ในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร โดยกิจกรรมของ PPO หนึ่งหน่วยเทียบกับปริมาณ cathecol ที่ลดลง 1 μmol

7. การประเมินความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการลดดัชนีความรุนแรงของโรคใบจุดของต้นกล้าผักสลัด

นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยังยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคจากการทดลองที่ 4 มาทดสอบการเกิดลดดัชนีความรุนแรงของโรคใบจุดในต้นผักสลัด อายุ 14 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design :CRD) 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ (ต้นกล้าซ้ำละ 10 ต้น) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 พ่นด้วยน้ำกลั่น (ชุดการทดลองควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราก่อโรคเพียงอย่างเดียว (1×10^6 conidia/ml)

ชุดการทดลองที่ 3 พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (1×10^6 conidia/ml) 24 ชั่วโมง จากนั้นพ่นด้วยเชื้อราก่อโรค (1×10^6 conidia/ml)

ชุดการทดลองที่ 4 พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราก่อโรค (1×10^6 conidia/ml) 24 ชั่วโมงจากนั้นพ่นด้วย spore suspension ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (1×10^6 conidia/ml)

ชุดการทดลองที่ 5 พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียว (1×10^6 conidia/ml)

คลุมถุงพลาสติกไว้ 48 ชม. เพื่อเก็บความชื้น จากนั้นนำถุงพลาสติกออก และประเมินการเกิดอาการโรคใบจุดในวันที่ 7 หรือ 14 ตามความรุนแรงของโรค โดยแปลผลจากการประเมิน 5 ระดับ (ปริศนา วงศ์ล้อม, 2548) คือ

ระดับ 1 = แสดงอาการของโรค 0–20% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 2 = แสดงอาการของโรค 21–40% ของพื้นที่ใบ

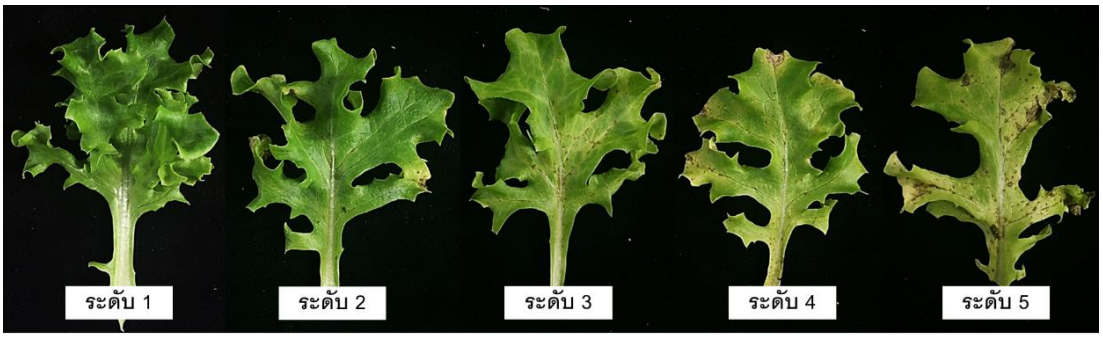
ระดับ 3 = แสดงอาการของโรค 41–60% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 4 = แสดงอาการของโรค 61–80% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 5 = แสดงอาการของโรค 81–100% ของพื้นที่ใบ

และนำค่าจากการประเมินระดับความรุนแรงของโรค มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีความรุนแรงของโรค (% disease severity index, DSI) (Ilias, 2000; Abdullah et al., 2003) ดังสมการ

$$\% \text{ Disease severity index} = \Sigma (\text{scale} \times \text{amount of plants}) / (\text{Max.level} \times \text{Total plants}) \times 100$$



ภาพที่ 5 ระดับการประเมินโรคใบจุดของต้นผักสลัดที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์

8. การเตรียมสูตรสำเร็จของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

8.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อผลิตสูตรสำเร็จ

ขูดสปอร์ด้วยแผ่นสไลด์จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อจานอาหาร และขูดเพียงเส้นใยและสปอร์โดยหลีกเลี่ยงการขูดติดวุ้น จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อแยกเส้นใย และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 อีกครั้งเพื่อเก็บสปอร์ จากนั้นนับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 1×10^{10} conidia/ml ด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อได้สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แล้วจากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อรอนำไปผสมกับสูตรสำเร็จในขั้นตอนต่อไป

8.2 สูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ (Wettable powder formulation)

ดัดแปลงจากวิธีของ Sabarratnam and Traquiar (2002)

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของสูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ

ส่วนผสม	ปริมาตร	
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2
1. สปอร์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	40–50 ml	40–50 ml
2. ดินขาว (kaolin)	60–80 g	60–80 g
3. เดกซ์โทส (dextrose)	10–20 g	10–20 g
4. ทัลคัม (talcum)	80–100 g	-
7. แป้งข้าวโพด (corn starch)	-	80–100 g

ผสมส่วนผสมต่าง ๆ ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม แล้วนำไปผึ่งลมในตู้ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นให้ละเอียดและกรองผ่านตะแกรงร่อนให้ได้ผงละเอียด

8.3 สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล (granule formulation)

นำสูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ มาเติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 60 มิลลิลิตร tween 20 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแร่งด้วยตะแกรงขนาดรูตะแกรงประมาณ 1.15 มิลลิเมตร (ดัดแปลงจากตะแกรงร่อนแป้ง) และนำไปตากให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ

8.4 สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน (emulsion formulation)

ดัดแปลงจาก Wijesinghe et al. (2011) Mbarga et al. (2014) และ Ahamedemujtaba and Shripad (2017)

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน

ส่วนผสม	ปริมาตร (มิลลิลิตร)				
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4	สูตรที่ 5
1. สปอร์ของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	20–40	20–40	20–40	20–40	20–40
2. น้ำมันมะพร้าว	-	50–100	-	-	50–100
3. น้ำมันถั่วเหลือง	-	-	50–100	-	50–100
4. น้ำมันคาโนล่า	50–100	50–100	50–100	50 –100	-
5. น้ำมันปาล์ม	-	-	-	50–100	-
6. Glycerol	50–100	-	-	-	-
7. Dextrose	10–20	10–20	10–20	10–20	10–20
8. Tween 20	10–20	10–20	10–20	10–20	10–20

จากนั้นแบ่งสูตรสำเร็จแต่ละสูตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28–30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

9. การประเมินสูตรสำเร็จของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในห้องปฏิบัติการ

9.1 การทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ

โดยตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งแรกหลังจากผลิตเสร็จ ด้วยวิธี dilution pour plate โดยสุ่มสูตรสำเร็จแต่ละสูตรจำนวน 5 จุด จุดละ 1 กรัม ส่วนสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันทำโดยสุ่มดูดตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร และนำสูตรสำเร็จที่เจือจางแล้วผสมกับอาหาร GANA หรือ GYMA โดยทำการทดสอบ 4 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งหมดในสูตรสำเร็จ

9.2 การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เตรียมสารแขวนลอยของสูตรสำเร็จแต่ละสูตรโดยการนำแต่ละสูตรสำเร็จมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ วัดค่า pH ด้วย pH meter โดยวัดจำนวน 5 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ย

9.3 การทดสอบการตกตะกอนและความสามารถในการละลายน้ำ

สูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำและชนิดแกรนูล ทำโดยการชั่งสูตรสำเร็จจำนวน 5 จุด จุดละ 1 กรัม ผสมกับน้ำปริมาตร 99 มิลลิลิตร และคนให้เข้ากัน จากนั้นจับเวลาการตกตะกอนของแต่ละสูตรและบันทึกเวลา ส่วนสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันทำโดยสุ่มดูดตัวอย่างจำนวน 5 ครั้ง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร แล้วนำมาละลายโดยใช้แท่งแม่เหล็กคน ตั้งความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งสูตรสำเร็จละลายน้ำ บันทึกระยะเวลาในการละลายน้ำแต่ละสูตรสำเร็จ โดยวัด 5 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

9.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด

ทดสอบโดยใช้วิธี dual culture ทำโดยเจาะอาหารวุ้น PDA หรือ GYMA ให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 1 หลุมโดยให้ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และนำสารแขวนลอยสูตรสำเร็จมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หยอดลงในหลุมจำนวน 50 ไมโครลิตร (หากหลุมแห้งควรหยอดเพิ่มตลอด ใน 24 ชั่วโมง) จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเดียวกัน ตัดชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด วางตรงข้ามกับสูตรสำเร็จห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ส่วนกรรมวิธีควบคุม วางชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวให้ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร จากนั้นวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตรดังแสดงในการทดลองที่ 2

9.5 การทดสอบความมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

โดยตรวจนับปริมาณเชื้อครั้งแรกหลังจากผลิตเสร็จ และตรวจนับทุกเดือนเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน โดยทำการชั่งสูตรสำเร็จสูตรละ 1 กรัม ส่วนสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันให้ดูดสูตรสำเร็จปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปทำ serial dilution แล้วตรวจนับโคโลนี โดยวิธี pour plate บนอาหาร GANA จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่งอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และหาค่าเฉลี่ย

10. การประเมินประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพโรงเรือน

ละลายสูตรสำเร็จชนิดที่มีประสิทธิภาพที่สุดในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ สูตรสำเร็จละ 10, 20 และ 30 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร สำหรับสูตรอิมัลชัน ตวงสูตรสำเร็จปริมาตร 10, 20, และ 30 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นนำไปพ่นลงบนผักสลัดในระบบไฮโดรโปนิกส์อายุ 21 วัน โดยวาง

แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (RCBD) 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ปลูกพืชตามปกติ

ชุดการทดลองที่ 2 ปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดเพียงอย่างเดียว

ชุดการทดลองที่ 3 ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดสดควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด

ชุดการทดลองที่ 4 ใช้สูตรสำเร็จชนิดที่มีประสิทธิภาพที่สุดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 5 ใช้สูตรสำเร็จชนิดที่มีประสิทธิภาพที่สุดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ชุดการทดลองที่ 6 ใช้สูตรสำเร็จชนิดที่มีประสิทธิภาพที่สุดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์

ประเมินการเกิดอาการโรคใบจุดในวันที่ 7 และ 14 ตามความรุนแรงของโรค โดยแปรผลจากการประเมิน 5 ระดับและคำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีความรุนแรงของโรค (%DSI) จากสูตรในข้อ 7

11. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำค่าเฉลี่ยแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) และ Student's t-test ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

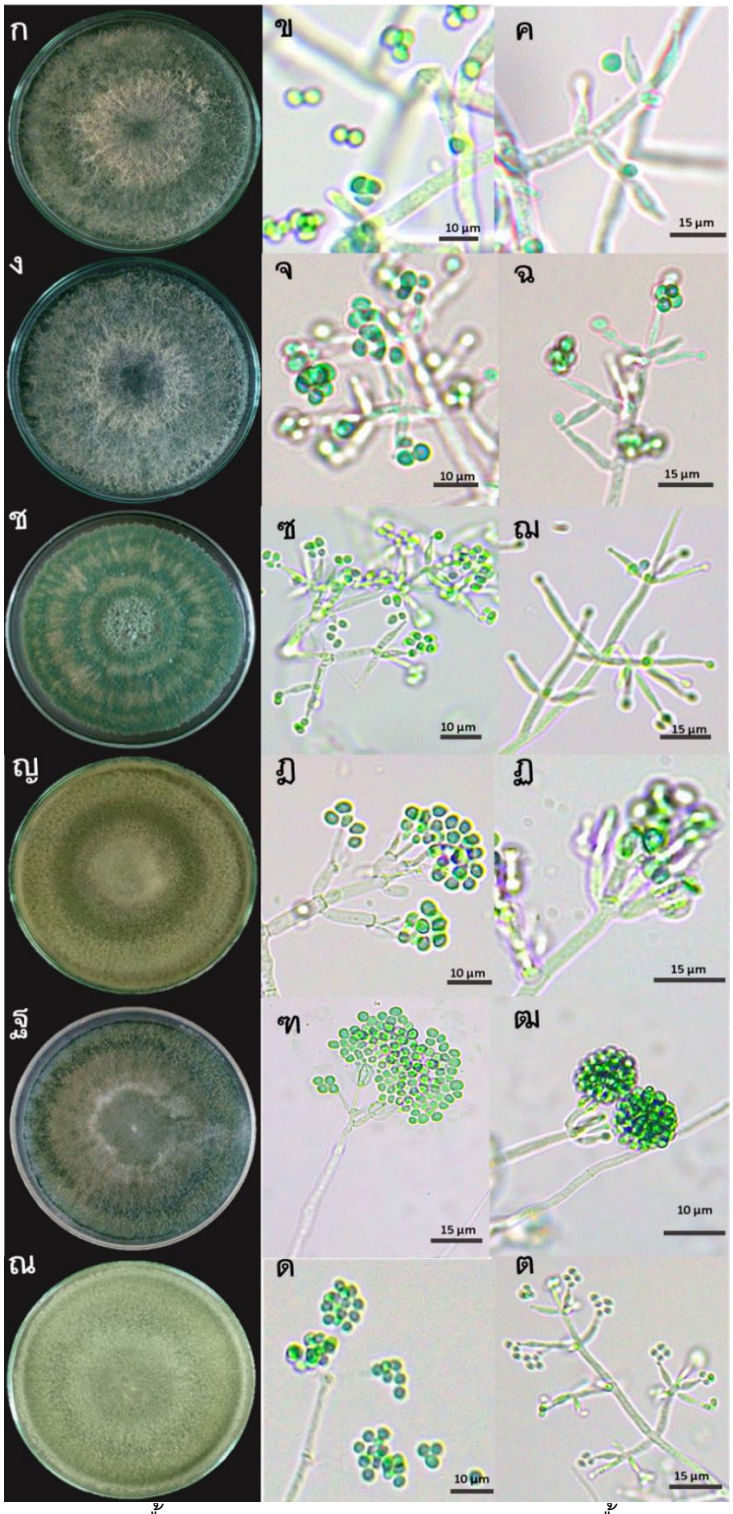
บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรคพืช

1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.

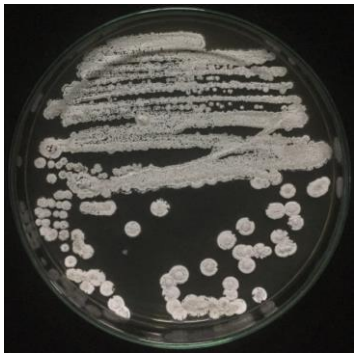
เตรียมเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 6 ไอโซเลท คือ *T. asperellum* T1, T76-14, *T. harzianum* TM2/1, *T. spirale* T76-1, V76-12 และ T76-12/2 บนอาหาร PDA มีความแตกต่างของโคโลนีอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 6) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับการศึกษาของ อรณิชา ตันติพลานนท์ (2561) ซึ่งเชื้อรา *T. asperellum* T1 และ T76-14 มีลักษณะโคโลนีสีเขียวและสีขาวปนเล็กน้อย เส้นใยฟูขึ้นจากหน้าอาหาร ก้านชูสปอร์ (conidiophore) มีผนังกั้น โคนิเดียมีสีเขียวเข้มและรูปร่างกลมรี ขนาดของโคนิเดีย 3–3.25 × 3.30–4.20 ไมโครเมตร และไฟอะลายด์เป็นกลุ่ม 2–4 ก้าน มีรูปร่างแบบ flask-shaped (ภาพที่ 5 ก-ฉ) และเชื้อรา *T. harianum* TM2/1 โคโลนีมีสีเขียวอ่อนจนถึงเข้ม สามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองบนอาหาร เส้นใยฟูจากหน้าอาหารเล็กน้อย ก้านชูสปอร์มีผนังกั้น โคนิเดีย มีสีเขียวเข้ม ขนาด 2.50–3.50 × 2–2.60 ไมโครเมตร และไฟอะลายด์เป็นกลุ่ม 2–4 ก้าน มีรูปร่างแบบ flask-shaped (ภาพที่ 5 ช-ฌ) และเชื้อรา *T. spirale* T76-1, T76-12/2 และ V76-12 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียวอ่อนจนถึงเข้ม เส้นใยฟูขึ้นจากหน้าอาหารเล็กน้อย ก้านชูสปอร์ มีผนังกั้น โคนิเดีย มีสีเขียวเข้มและรูปร่างกลมรี ขนาดของโคนิเดีย 2.50–5 × 3–5 ไมโครเมตร และไฟอะลายด์เป็นกลุ่ม 2–4 ก้าน มีรูปร่างแบบ flask-shaped (ภาพที่ 5 ญ-ต) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Samuels และคณะ (2010) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *T. asperellum* มีลักษณะของโคโลนี สีเขียวบนอาหาร PDA และไม่สร้าง pigment บนอาหาร และโคนิเดียมีลักษณะกลมรี ขนาด 3–3.50×3.5–4 ไมโครเมตร และ Gams และ Meyer (1998) พบว่า *T. harzianum* สามารถสร้าง pigment สีเหลืองบนอาหาร PDA โคนิเดียค่อนข้างกลมมีสีเขียว ขนาด 2.50–3×3.70–4.50 ไมโครเมตร และ Chaverri และคณะ (2003) รายงานถึงเชื้อรา *T. spirale* มีโคโลนีสีเขียว ไม่สร้าง pigment บนอาหาร โคนิเดียมีลักษณะกลมรีสีเขียว ขนาด 2–2.70×3.70–4.20 ไมโครเมตร



ภาพที่ 6 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ก.–ค. ลักษณะเชื้อรา *T. asperellum* T1, ง.–ฉ. ลักษณะของเชื้อรา *T. asperellum* T76-14, ช.–ฌ. ลักษณะเชื้อรา *T. harzianum* TM2/1, ญ.–ฏ. ลักษณะของเชื้อรา *T. spirale* T76-1, ฐ.–ฒ. ลักษณะเชื้อรา *T. spirale* T76-12/2 และ ณ.–ต. ลักษณะเชื้อรา *T. spirale* V76-12

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2

นำเชื้อที่เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA slant มาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร GYMA พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. angustmyceticus* NR8-2 มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น เมื่อเชื้อแก่มีการสร้างสปอร์เป็นสีเทาดำและมีกลิ่นคล้ายดิน (Wardecki et al., 2015) (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose yeast malt extract agar

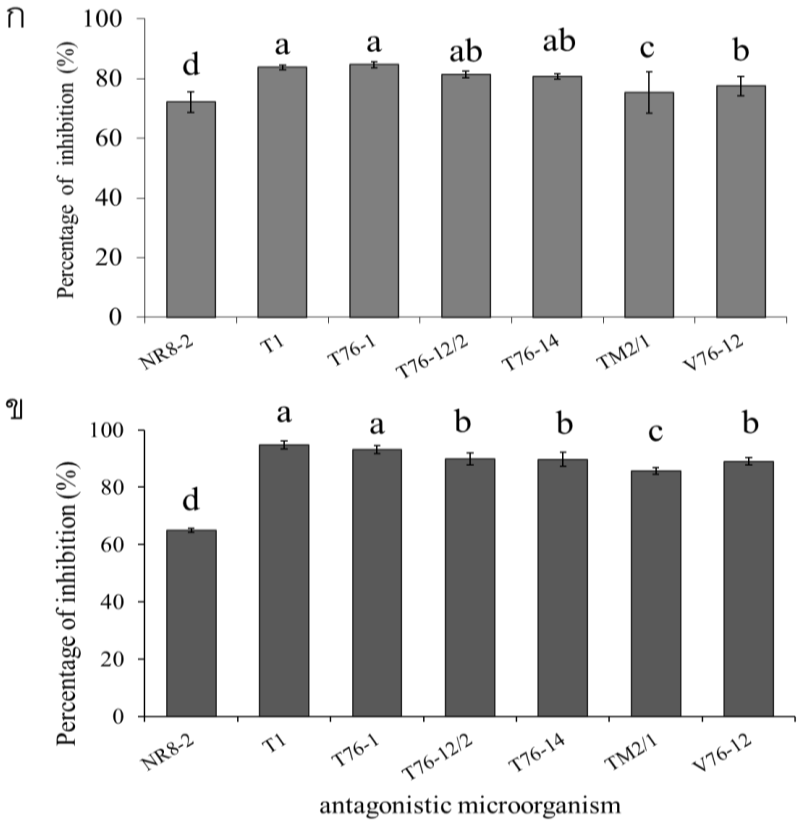
1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรค

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิด พบว่าเชื้อรา *C. cassiicola* มีลักษณะโคโลนีสีขาวถึงสีเทา เส้นใยฟูขึ้นจากหน้าอาหาร ส่วนเชื้อ *C. aeria* มีลักษณะโคโลนีสีเทาถึงสีเทาเข้ม เส้นใยฟูขึ้นจากหน้าอาหาร และเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 8)

ภาพที่ 8 โคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด *Corynespora cassiicola* (ซ้าย) และ *Curvularia aeria* (ขวา)

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อราของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Corymespora cassiicola* และ *Curvularia aeria* โดยวิธี Dual culture assay

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. cassiicola* และ เชื้อรา *C. aeria* สาเหตุโรคใบจุดผักสลัด โดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท *T. asperellum* T1, T76-14, *T. harzianum* TM2/1, *T. spirale* T76-1, V76-12, T76-12/2 และเชื้อแบคทีเรีย *S. angustmyceticus* NR8-2 โดยวิธี dual culture assay บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 6 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. cassiicola* ในช่วง 70–85 เปอร์เซ็นต์ โดย *T. asperellum* T1, T76-14, *T. spirale* T76-1 และT76-12/2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าไอโซเลทอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทดสอบกับเชื้อรา *C. aeria* พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. 6 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในช่วง 85–95 เปอร์เซ็นต์ โดย *T. asperellum* T1 และ *T. spirale* T76-1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าไอโซเลทอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เชื้อ *S. angustmyceticus* NR8-2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. aeria* ได้ 72.14 และ 65 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bae และคณะ (2011) ที่ได้แยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากเนื้อเยื่อพืชเขตร้อน และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. capsici* เชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของต้นพริก พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ อรณิชา ตันติพลานน์ (2561) รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของปาล์มน้ำมัน และนำมาคัดกรองด้วยวิธี dual culture พบว่ามีจำนวน 6 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. oryzae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 80–90 เปอร์เซ็นต์ และทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและปกคลุมเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้ ดังนั้นจึงคัดเลือก *T. asperellum* T1 และ *T. spirale* T76-1 ไปทดสอบประสิทธิภาพและกลไกการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. cassiicola* และ *C. aeria* ต่อไป เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่าไอโซเลทอื่น ๆ



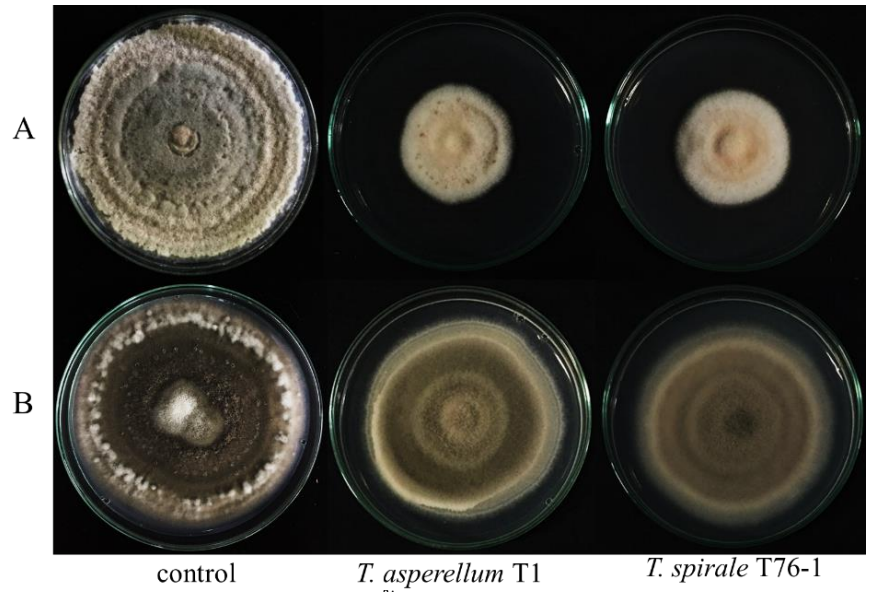
ภาพที่ 9 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดโดยวิธี dual culture assay โดยใช้เชื้อ *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 และ *Trichoderma* spp. 6 ไอโซเลท ก. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Corynespora cassiicola* และ ข. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Curvularia aeria* (ตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT))

3. กลไกการสร้างสารระเหยต้านเชื้อรา

3.1 ประสิทธิภาพของสารระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผัก

จากการศึกษาประสิทธิภาพสารระเหยของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. cassiicola* และ *C. aeria* โดยวิธี volatile antifungal bioassay พบว่าเชื้อรา *T. asperellum* T1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด โดยมีผลทำให้เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคหยุดการเจริญและเจริญได้น้อยกว่าชุดควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญคือ 37.37 และ 41.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อรา *T. spirale* T76-1 สามารถยับยั้งการเจริญ

เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้ 41.29 และ 42.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 10 และตารางที่ 3)



ภาพที่ 10 ประสิทธิภาพของสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด A =*Corynespora cassiicola* และ B =*Curvularia aeria* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธี volatile antifungal bioassay

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของสารระเหยต้านเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดโดยวิธี volatile antifungal bioassay

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง[1]	
	C. cassiicola	*C. aeria*
T. asperellum T1	37.37 ± 5.06a	41.08 ± 1.70a
T. spirale T76-1	41.29 ± 6.34a	42.35 ± 3.18a

[1]ค่าเฉลี่ย 5 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

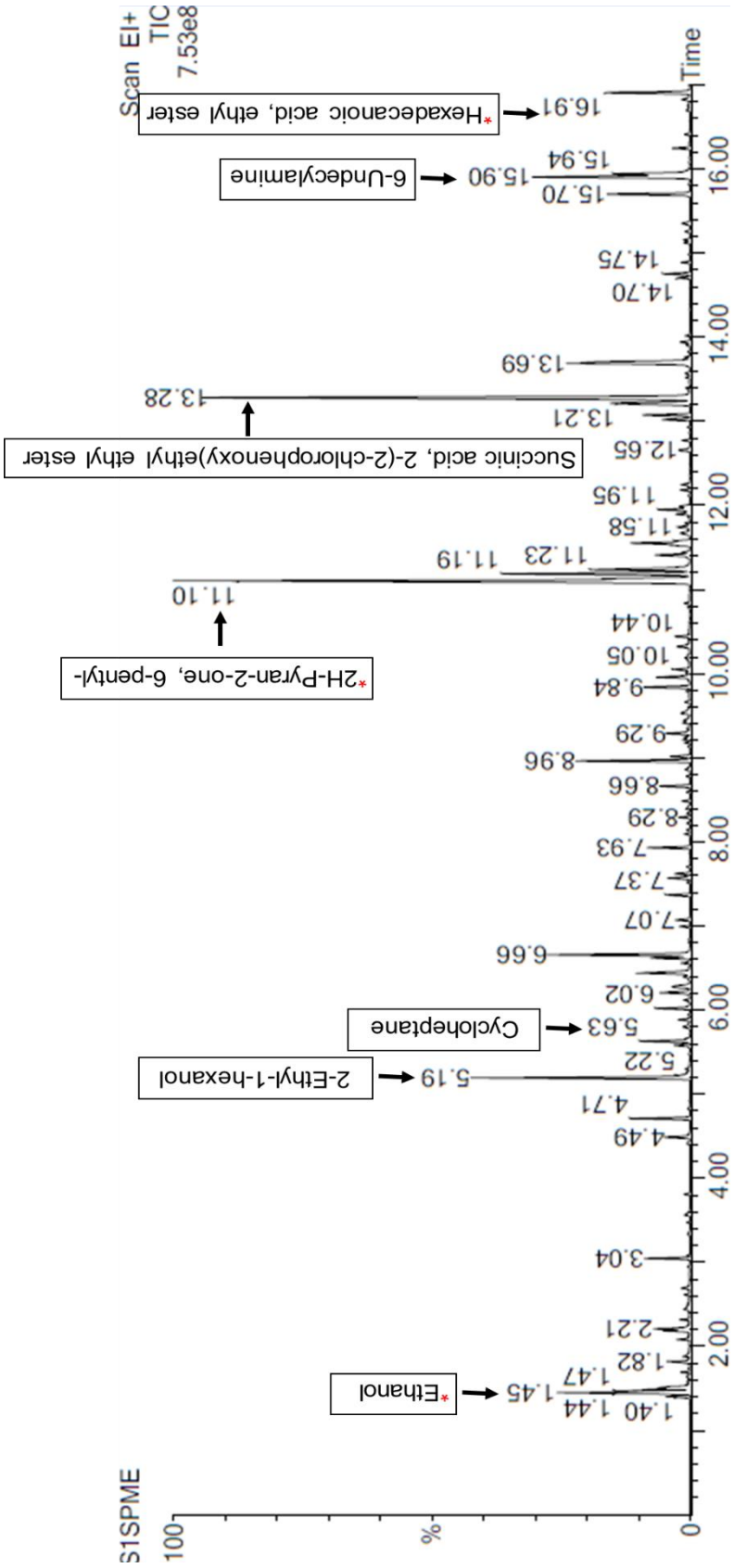
ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Student's t-test

สอดคล้องกับรายงานของ Raza และคณะ (2013) ในการศึกษาประสิทธิของสารระเหยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ SQR-T037 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

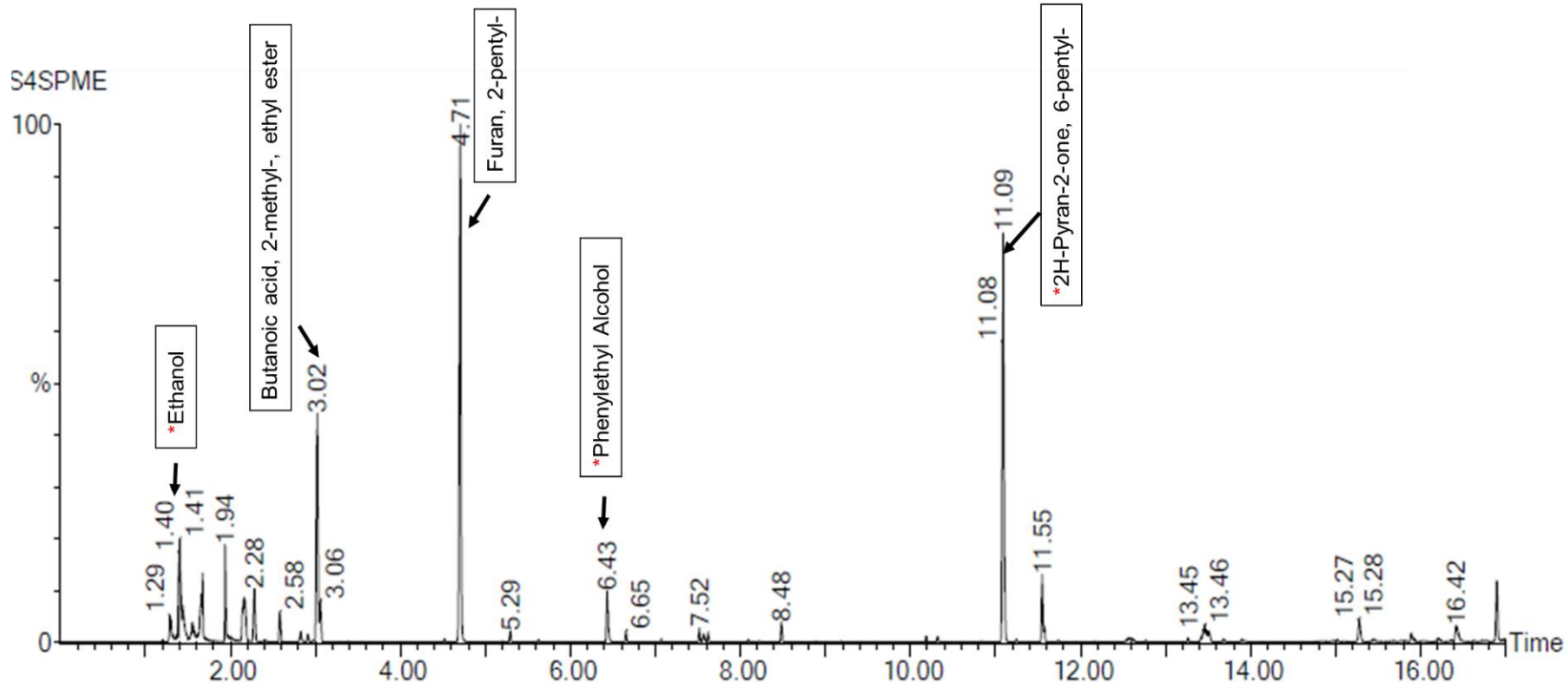
F. oxysporum ในห้องปฏิบัติการ พบว่าสารระเหยจากเชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์ SQR-T037 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *T. harzianum*-1 ยังสามารถสร้างสารระเหยเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. bataticola* ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีการยับยั้งสูงถึง 74 เปอร์เซ็นต์ (Singh et al., 2012) และ Amin และคณะ (2010) รายงานถึงการสร้างสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 6 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum*, *R. solani* และ *Sclerotium* sp. พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเหล่านี้ได้อยู่ในช่วง 40 เปอร์เซ็นต์

3.2 ชนิดของสารระเหยต้านเชื้อรา

จากการจำแนกชนิดของสารระเหยจากเชื้อรา *T. asperellum* T1 และ *T. spirale* T76-1 ด้วยเครื่อง GC/MS พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิดสามารถสร้างสารระเหยและปลดปล่อยออกมาได้หลายชนิด โดยพบว่าสารระเหยที่เชื้อรา *T. asperellum* T1 ปลดปล่อยออกมามีทั้งหมด 20 ชนิด และพบสารที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา ได้แก่ Ethanol, 6-pentyl-2H-Pyran-2-one (6-PP) และ Hexadecanoic acid, ethyl ester (ภาพที่ 11) และ *T. spirale* T76-1 ปลดปล่อยสารระเหยออกมา 18 ชนิด แต่พบเพียง 3 ชนิดที่มีรายงานว่ามีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา ได้แก่ Ethanol, Phenylethyl Alcohol และ 6-PP (ภาพที่ 12) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Medina-Romero และคณะ (2017) รายงานถึงการใช้สารระเหยกลุ่ม alcohol เพื่อยับยั้งการงอกของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* เชื้อสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะเขือเทศเชอรี พบว่าสามารถยับยั้งได้ 40–43 เปอร์เซ็นต์ โดยสารกลุ่มนี้มีผลทำให้การหายใจผิดปกติ และกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์หนา ทำให้ของเหลวภายในเซลล์ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปอีกเซลล์หนึ่งได้ นอกจากนี้ Pezet และคณะ (1999) รายงานว่า สารระเหยกลุ่ม pyran คือ 6-PP สามารถใช้เป็นสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *B. cineriae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสารชนิดนี้สามารถทำให้สปอร์หรือเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคผิดปกติ เนื่องจากการสะสมสารระเหยชนิดนี้ภายในเซลล์ และเข้าไปขัดขวางการทำงานของกระบวนการเมธาบอลิซึม เป็นผลทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติ (Ferreira et al., 1991) และนอกจากนี้ยังพบว่า 6-PP ที่ได้จากเชื้อรา *T. atroviride* ยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและช่วยกระตุ้นการงอกของราก (Garnica-Vergara et al., 2016) และ Choi และคณะ (2010) ยังรายงานถึงการใช้สารระเหยกลุ่ม alkyl fatty acid esters เพื่อควบคุมโรคราแป้งของข้าวบาร์เลย์ จากเชื้อ *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* ซึ่งสามารถควบคุมโรคได้มากกว่า 68 เปอร์เซ็นต์ โดย (Marinho et al., 2007) รายงานว่าสารในกลุ่มกรอดอินทรีย์สามารถแทรกซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดได้ จึงทำให้เซลล์ถูกทำลายเนื่องจากสภาวะความเป็นกรดภายในเซลล์



ภาพที่ 1 GC/MS chromatography ของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1, *= สารระเหยที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา

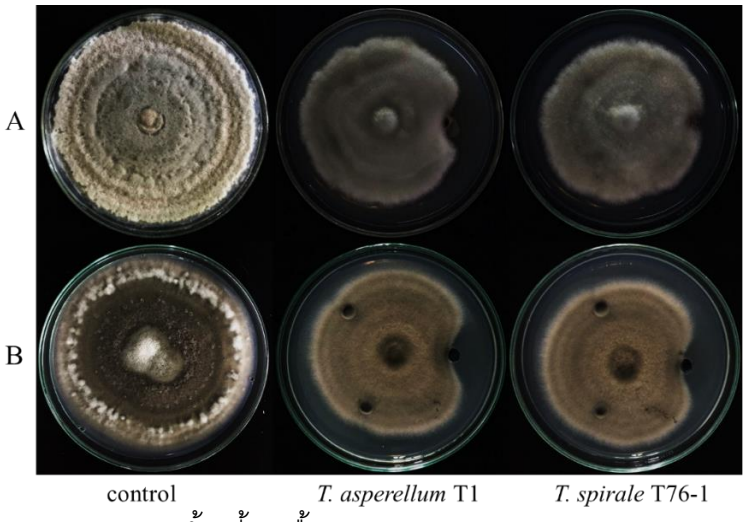


ภาพที่ 12 GC/MS chromatography ของสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1 *= สารระเหยที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา

4. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell free culture filtrate) **ต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค**

4.1 ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด

ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. cassiicola* และ *C. aeria* โดยวิธี agar diffusion บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า *T. asperellum* T1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด โดยหลุมที่มีการหยอดน้ำเลี้ยงเชื้อแสดงลักษณะการหยุดการเจริญของเส้นใยอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 13) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคือ 50.38 และ 53.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อรา *T. spirale* T76-1 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้ 48.47 และ 51.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ นิพนธ์ ทวีชัย (2550) ซึ่งรายงานว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ สารพิษ หรือเอนไซม์ที่สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืช โดย Asad และคณะ (2015) รายงานถึงการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. 3 สายพันธุ์ คือ *T. asperellum*, *T. harzianum* และ *Trichoderma* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ที่เข้าทำลายต้นถั่วลิสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. harzianum* Rifai และ *T. pseudo-koningii* Rifai สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว *Aspergillus niger* Tiegh ได้ 24.40 และ 45.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 13 ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell-free CF) ของ *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด A =*Corynespora cassiicola* และ B =*Curvularia aeria* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธี agar diffusion assay

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell-free CF) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดโดยวิธี agar diffusion assay

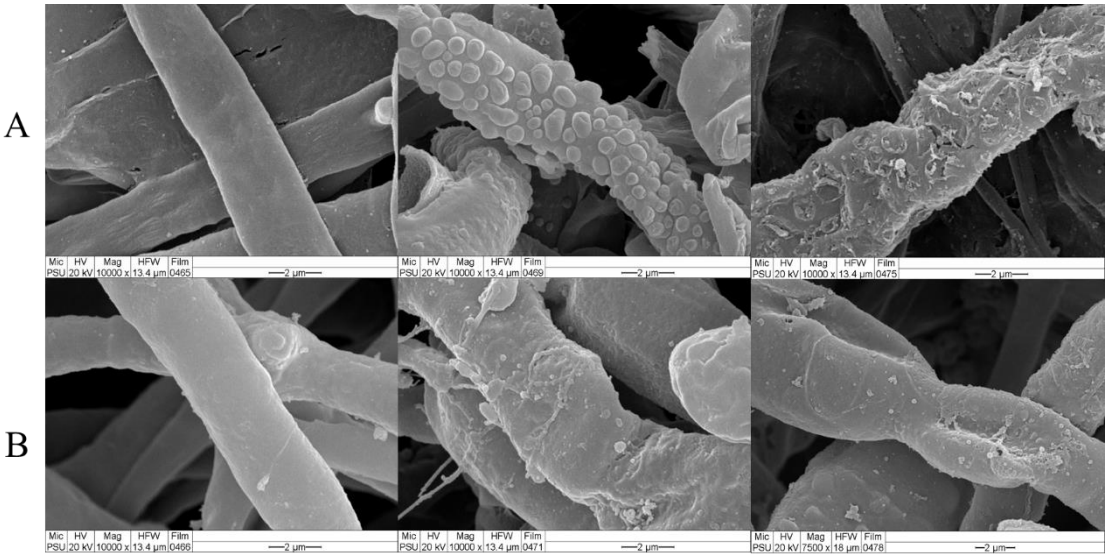
เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง[1]	
	C. cassiicola	*C. aeria*
T. asperellum T1	50.38 ± 3.05a	53.97 ± 2.50a
T. spirale T76-1	48.47 ± 6.35a	51.67 ± 7.60a

[1]ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Student's t-test

4.2 ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อสัณฐานวิทยาของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด

ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ของเชื้อราสาเหตุโรค *C. cassiicola* และ *C. aeria* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. asperellum* T1 และ *T. spirale* T76-1 ทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิดมีความผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่แช่ด้วยอาหารเหลว PDB โดยลักษณะผิวของเส้นใยที่ถูกแช่ด้วยน้ำเลี้ยง มีลักษณะ บวม พอง บิดเบี้ยว เป็นรูทะลุ เปื่อยยุ่ย และขรุขระ (ภาพที่ 14) อาจเป็นผลมาจากการสร้างเอนไซม์หรือสาร secondary metabolite บางชนิด ที่ทำให้เซลล์ของเส้นใยมีความ ผิดปกติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Balasubramanian (2003) รายงานว่าเชื้อรา *T. flavofuscum*, *T. harzianum* และ *T. viride* สามารถใช้กลไกการสร้างสาร antibiotics ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยลายผนังเซลล์ของเชื้อราคือ cellulase, chitinase, β-1,3-glucanase และ protease เป็นผลทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชถูกทำลาย เกิดความผิดปกติและไม่สามารถเจริญต่อได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสาร active compounds เพื่อใช้ในกระบวนการการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น alamethicins, gliotoxin, harzianic acid, trichoviridin, viridian และ viridiol เพื่อใช้ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคได้หลายชนิด (Benitez et al.,2004; Woo and Lorito, 2007; Vinale et al., 2008)

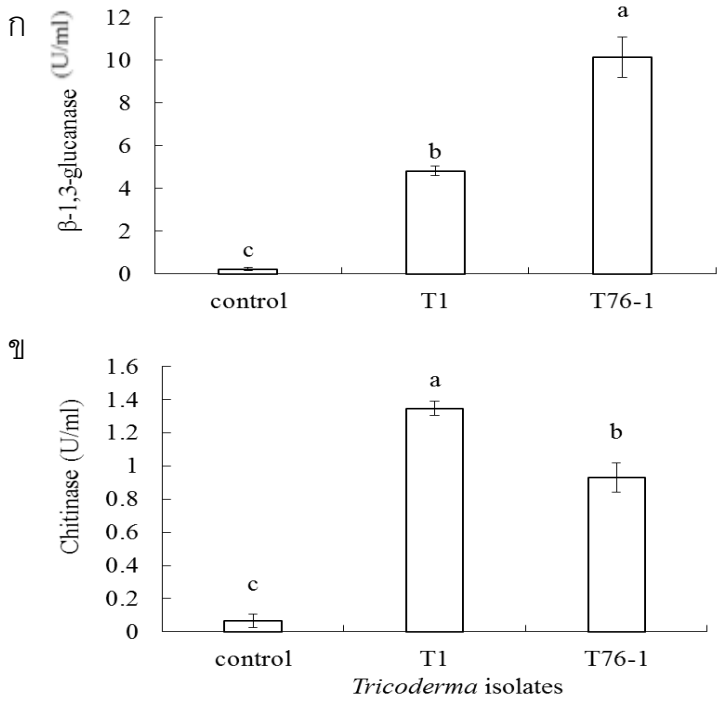


ภาพที่ 14 เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดที่เปลี่ยนแปลงเมื่อแช่ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1 ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) A = *Corynespora cassiicola* และ B = *Curvularia aeria*

5. กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase ในน้ำเลี้ยงเชื้อ

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase ในน้ำเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าเชื้อรา *T. asperellum* T1 มีกิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase เท่ากับ 4.82 U/ml และ chitinase เท่ากับ 1.35 U/ml และเชื้อรา *T. spirale* T76-1 มีกิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase เท่ากับ 10.13 U/ml และ chitinase เท่ากับ 0.93 U/ml โดย *T. asperellum* T1 มีกิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase สูงกว่า *T. spirale* T76-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ *T. spirale* T76-1 มีกิจกรรมเอนไซม์ chitinase สูงกว่า *T. asperellum* T1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 15) แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราเพื่อใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gajera และ Vakharia (2012) ที่คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา คือ β-1,3-glucanase และ chitinase เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *A. niger* สาเหตุโรค collar rot ในถั่วลิสง พบว่า *T. viride* สามารถสร้างเอนไซม์ทั้ง

สองชนิดได้ และนอกจากนี้เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับ เชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporurn* f. sp. *vasinfectum* และ *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *R. solani* และ *P. aphanidermatum* ในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของ substrate คือ laminarin และ colloidal chitin พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สร้างเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase ในปริมาณมาก โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด อยู่ในช่วง 70–90 U/ml (Sivan and Chet 1989) โดยเอนไซม์ดังกล่าวส่งผลให้เซลล์ของเชื้อราก่อโรคถูกย่อยสลายเนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วย glucan และ chitin เป็นผลให้ของเหลวภายในเซลล์ไหลออกสู่ภายนอก (Prapagdee et al., 2008)

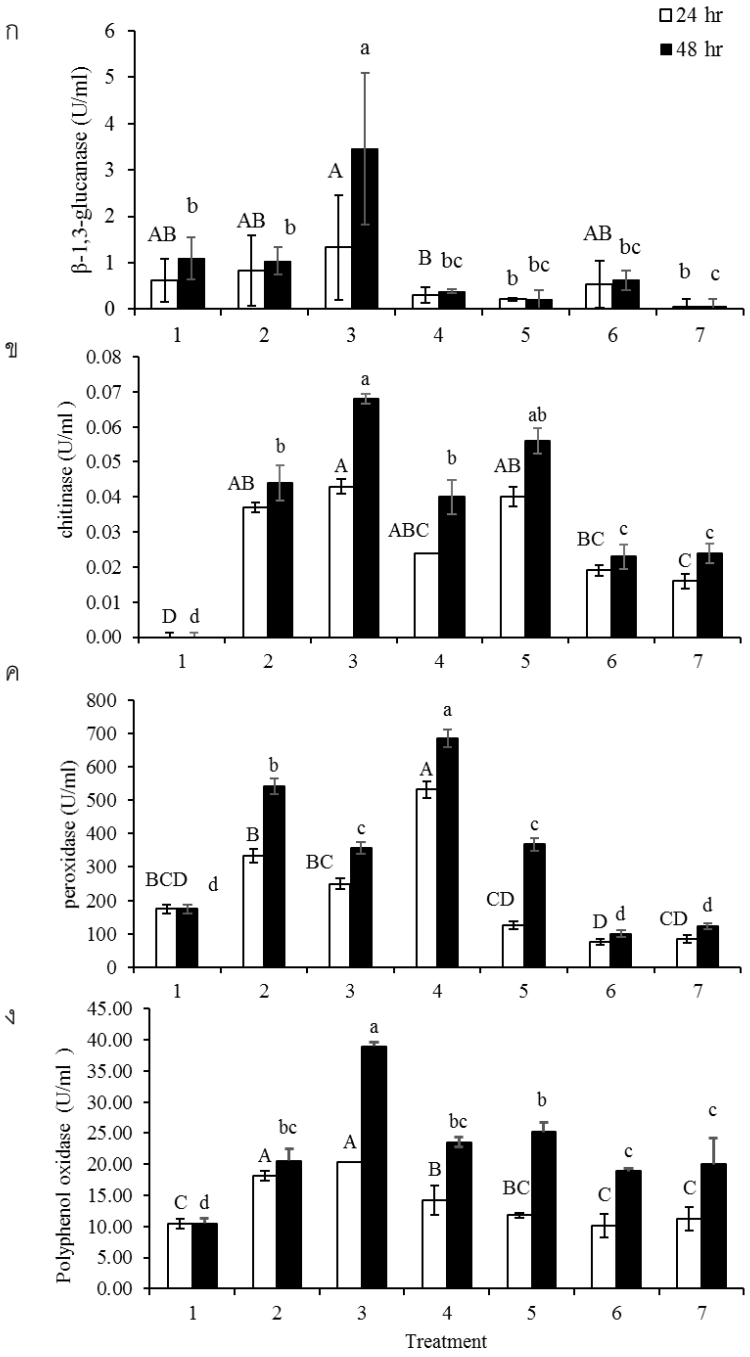


ภาพที่ 15 กิจกรรมเอนไซม์ β-1, 3-glucanase (ก) และ chitinase (ข) ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Trichoderma asperellum* T1 และ *Trichoderma spirale* T76-1 (ตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT))

6. การกระตุ้นกลไกการป้องกันตนเองของพืชโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. asperellum* T1, *T. spirale* T76-1, *C. cassiicola* และ *C. aeria* ในการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของพืช ได้แก่ β-1,3-glucanase, chitinase, peroxidase (POD) และ polyphenol oxidase (PPO) ระหว่าง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง พบว่าหลังจากปลูกเชื้อ ในแต่ละชุดการทดลองมีกิจกรรมเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อ

เทียบกับชุดการทดลองควบคุม โดยชุดการทดลองที่จุ่มรากด้วย *T. asperellum* T1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase, chitinase และ PPO ให้เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 3.46, 0.07 และ 38.93 U/ml ตามลำดับ ส่วนในการทดลองที่พ่นด้วย *T. spirale* T76-1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ POD ได้สูงสุดถึง 612.89 U/ml (ภาพที่ 16) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถกระตุ้นกลไกการป้องการตนเองโดยการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยการ oxidizes สารอินทรีย์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค และสามารถต้านทานระงับการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (Li and Steffens, 2002) Nurbailis และคณะ (2016) ได้ศึกษาการกระตุ้นความต้านทานของหน่อกล้วยเพื่อลดการเข้าทำลายของเชื้อ *F. oxyporum* f. sp. *cubense* สาเหตุของโรคเหี่ยว โดยใช้เชื้อรา *T. viride* –T1sk, *T. koningii*-S6sh, *T. koningii*-s6sh และ *T. harzianum*-P4sh โดยเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถกระตุ้นให้หน่อกล้วยสร้างเอนไซม์ chitinase และสามารถลดอัตราการเกิดโรคในหน่อกล้วยได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ Duc และคณะ (2017) รานงานถึงการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากรอบรากพืช คือ *Trichoderma* sp. ร่วมกับ arbuscular mycorrhizal และ *Pseudomonas fluorescens* มาใช้ประโยชน์ในการกระตุ้นความต้านทานให้กับพริกไทยจำนวน 3 สายพันธุ์ พบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ข้างต้นร่วมกันสามารถกระตุ้นกิจกกรมเอนไซม์ PPO, POD, superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) ได้เป็นอย่างดี เป็นผลให้พริกทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นจากเดิม

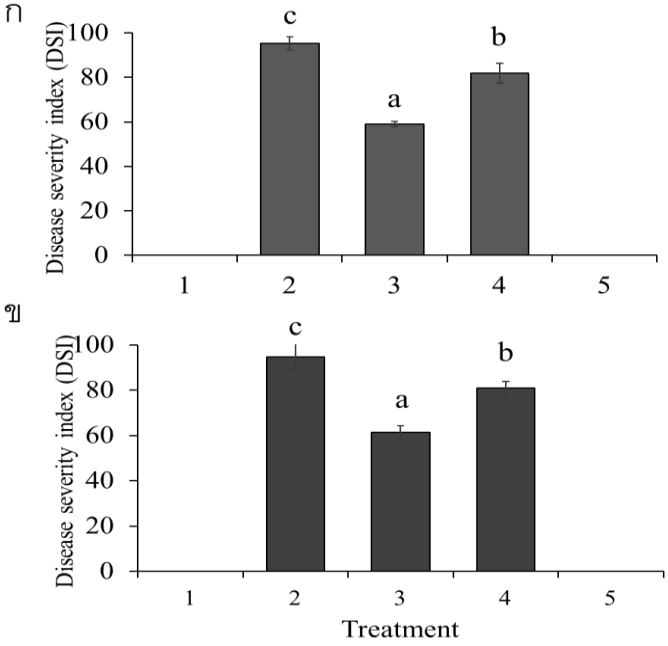


ภาพที่ 16 กิจกรรมเอนไซม์ในต้นกล้าผักสลัด หลังจากการกระตุ้นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 24 และ 48 ชั่วโมง ก. β-1,3-glucanase, ข. Chitinase, ค. POD และ ง. PPO โดยชุดการทดลองที่ 1=พ่นน้ำกลั่น , 2=พ่น *T. asperellum* T1, 3=จุ่มรากด้วย *T. asperellum* T1, 4=พ่น *T. spirale* T76-1, 5: จุ่มรากด้วย *T. spirale* T76-1, 6=พ่น *C. cassiicola* และ 6=พ่น *C. aeria* (ตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT))

7. ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการลดการเกิดโรคใบจุดของผักสลัด

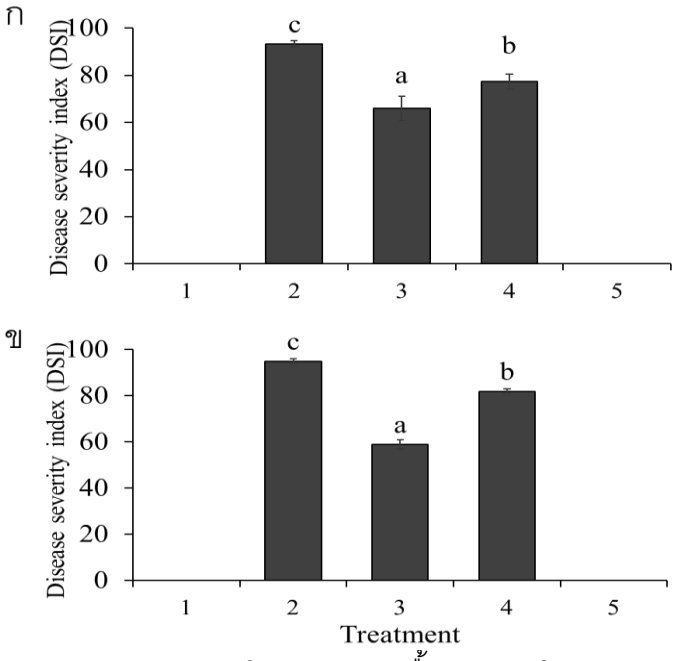
7.1 ความสามารถของเชื้อปฏิปักษ์ในการลดการเกิดโรคใบจุดของผักสลัดโดยวิธี foliar spray

เมื่อนำเชื้อรา *T. asperellum* T1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดในผักสลัด โดยวิธี foliar spray ในระยะต้นกล้าของผักสลัดอายุ 14 วันพบว่าเชื้อรา *T. asperellum* T1 สามารถลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ *C. cassiicola* และ *C. aeria* ซึ่งแสดงอาการของโรคเพียง 64 และ 62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยชุดควบคุมแสดงอาการของโรคถึง 94.47 และ 95.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ(ภาพที่ 17) ซึ่งผักสลัดแสดงอาการของโรครุนแรงที่สุดในชุดควบคุม แต่เมื่อพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ก่อน 24 ชม. และตามด้วยเชื้อราสาเหตุโรค สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวและการพ่นเชื้อราสาเหตุโรคก่อนเชื้อราปฏิปักษ์



ภาพที่ 17 ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค (DSI) จากเชื้อราสาเหตุโรค *Corynespora cassiicola* (ก) และ *Curvularia aeria* (ข), ควบคุมด้วยเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 โดยที่ 1=พ่นด้วยน้ำกลั่น, 2=ปลูกเชื้อด้วย *C. cassiicola* (ก) และ *C. aeria* (ข), 3=พ่นด้วยเชื้อรา *T. asperellum* T1 24 ชม. ตามด้วย *C. cassiicola* (ก) และ *C. aeria* (ข), 4=ปลูกเชื้อด้วย *C. cassiicola* (ก) และ *C. aeria* (ข) 24 ชม. และพ่นด้วย *T. asperellum* T1, และ 5=พ่นด้วย *T. asperellum* T1 เพียงอย่างเดียว (ตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT))

และเมื่อนำเชื้อรา *T. spirale* T76-1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดในผักสลัด โดยวิธี foliar spray ในระยะต้นกล้าของผักสลัดอายุ 14 พบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อ *C. cassiicola* และ *C. aeria* ซึ่งแสดงอาการของโรคเพียง 62 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยชุดควบคุมแสดงอาการของโรคถึง 94 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 18) ซึ่งผักสลัดแสดงอาการของโรครุนแรงที่สุดแต่การพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ก่อน 24 ชม. และตามด้วยเชื้อราสาเหตุโรคสามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวและการพ่นเชื้อราสาเหตุโรคก่อนเชื้อราปฏิปักษ์



ภาพที่ 18 ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค (DSI) จากเชื้อราสาเหตุโรค *Corynespora cassiicola* (ก) และ *Curvularia aeria* (ข), ควบคุมด้วยเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1 โดยที่ 1=พ่นด้วยน้ำกลั่น, 2=ปลูกเชื้อด้วย *C. cassiicola* (ก) และ*C. aeria* (ข), 3=พ่นด้วยเชื้อรา *T. spirale T76-1* ก่อน 24 ชม. ตามด้วย *C. cassiicola* (ก) และ *C. aeria* (ข), 4=ปลูกเชื้อด้วย *C. cassiicola* (ก) และ *C. aeria* (ข) ก่อน 24 ชม. และพ่นด้วย *T. spirale T76-1*, และ 5=พ่นด้วย *T. spirale* T76-1 เพียงอย่างเดียว (ตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT))

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jegathambigai และคณะ (2009) ที่นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท คือ *T. harzianum* 1, *T. harzianum* 2, *T. viride* 1,*T. viride* 2 และ *T. viride* 3 เพื่อควบคุมโรคใบจุดของต้นหมากเหลือง (*Chrysalidocarpus lutescens*) ซึ่งเกิดจากเชื้อสาเหตุ *Helminthosporium* sp. ในประเทศศรีลังกา พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ Perelló และคณะ (2008) ได้นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท มาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Septoria tritici* สาเหตุโรค blotch ของข้าวสาลีในประเทศอาร์เจนตินา พบว่า *T. harzianum* T2 และ *T. koningii* T4 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค โดยสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ การที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและควบคุมโรคที่มีความหลากหลาย เนื่องจากเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดนี้สามารถใช้กลไกการควบคุมโรคร่วมกันหลาย ๆ กลไก โดยเฉพาะการแก่งแย่งพื้นที่และอาหารกับเชื้อราสาเหตุโรค การสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลาย และการเป็นปรสิต ซึ่งกลไกเหล่านี้สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดนี้ได้เป็นอย่างดี (Haram et al. 1996; Zimand et al. 1996)

8. สูตรสำเร็จของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

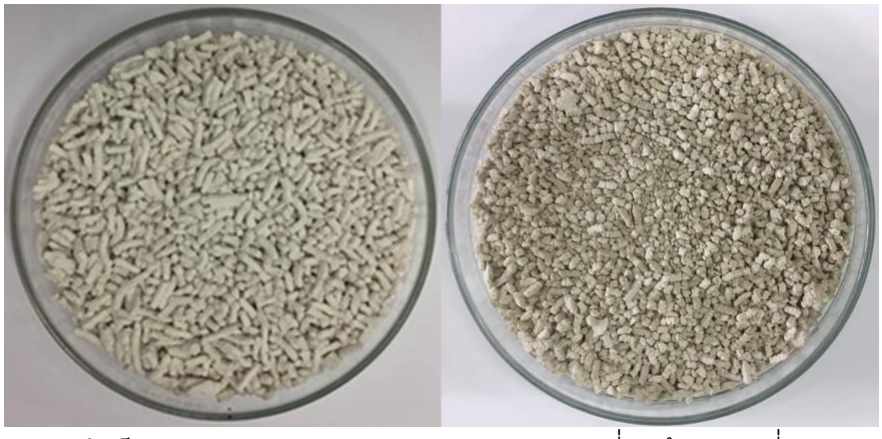
8.1 สูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ (wettable powder formulation)

สูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ สูตรที่ 1 มีส่วนผสมหลักคือ ทัลคัมและดินขาว ทำให้สีของสูตรสำเร็จมีสีเทาอ่อน และเนื้อสัมผัสมีความละเอียดคล้ายแป้ง สูตรที่ 2 มีส่วนผสมหลักคือแป้งข้าวโพดและดินขาว ทำให้สีของสูตรสำเร็จมีสีขาวเหลืองแต่มีความละเอียดน้อยกว่าสูตรสำเร็จที่ 1 และเมื่อผสมโคนิเดียของเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ในสูตรสำเร็จทำให้สีเปลี่ยนเป็นสีเข้มเล็กน้อย (ภาพที่ 19)

ภาพที่ 19 สูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ (wettable powder formulation) สูตรที่ 1 (ซ้าย) สูตรที่ 2 (ขวา)

8.2 **สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล** (granule formulation)

สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 1 มีส่วนผสมหลักคือ ทัลคัมและดินขาว ทำให้สีของสูตรสำเร็จมีสีเทาอ่อน แกรนูลอัดตัวกันแน่นและคงตัวเป็นเม็ดได้นาน สูตรที่ 2 มีส่วนผสมหลักคือแป้งข้าวโพดและดินขาว ทำให้สีของสูตรสำเร็จมีสีขาวเหลือง แกรนูลอัดกันเป็นเม็ดไม่แน่นและคงตัวเป็นเม็ดได้ไม่นาน (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล (granule formulation) สูตรที่ 1 (ซ้าย) สูตที่ 2 (ขวา)

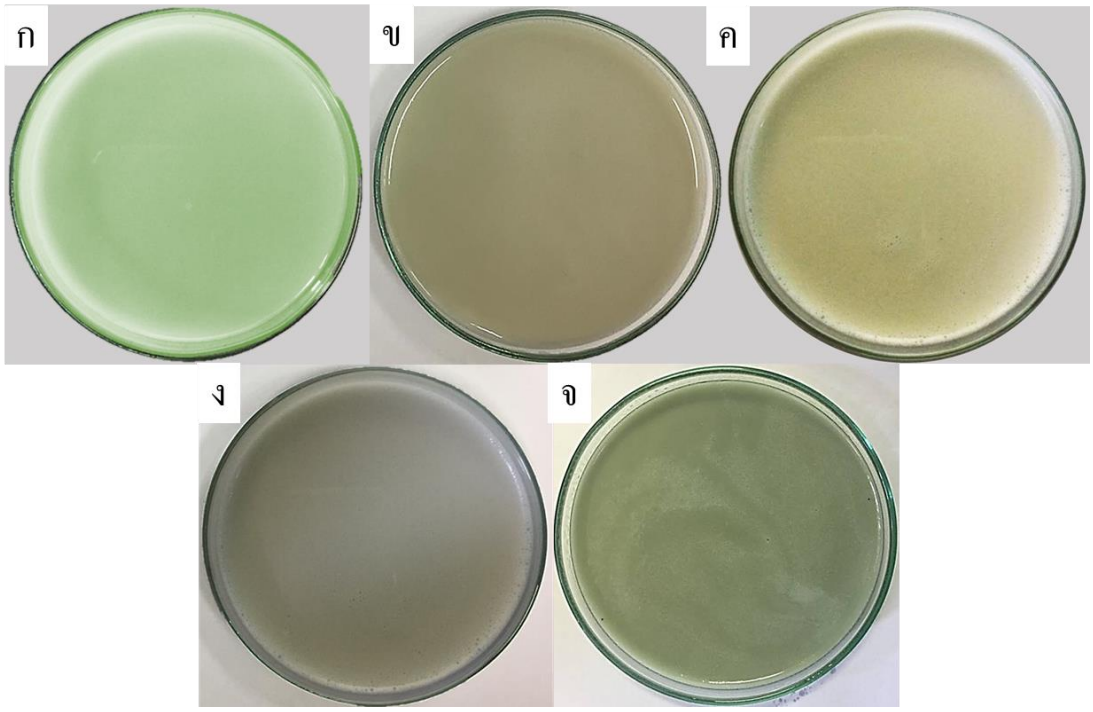
8.3 **สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลในแคปซูล** (encapsulated granule formulation)

สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลในแคปซูลสูตรที่ 1 มีส่วนผสมหลักคือ ทัลคัมและดินขาว ทำให้สีของสูตรสำเร็จมีสีเทาอ่อน แกรนูลอัดตัวกันแน่นและแข็ง สูตรที่ 2 มีส่วนผสมหลักคือแป้งข้าวโพดและดินขาว ทำให้สีของสูตรสำเร็จมีสีขาวเหลือง แกรนูลอัดกันเป็นเม็ดไม่แน่นและคงตัวเป็นเม็ดได้ไม่นาน เมื่อนำแกรนูลทั้ง 2 สูตรมาอัดลงในเจลาตินแคปซูลที่ทำให้แกรนูลหักและแตก (ภาพที่ 21)

ภาพที่ 21 สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลในแคปซูล (encapsulate granule) สูตรที่ 1 (ซ้าย) สูตรที่ 2 (ขวา)

8.4 **สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน** (emulsion formulation)

เมื่อผสมสปอร์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และส่วนผสมต่าง ๆ ครบแล้ว นำไปผสมด้วยเครื่อง homogenizer เพื่อให้น้ำมันและส่วนผสมอื่น ๆ เข้ากันและเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าในแต่ละสูตรมีสีที่แตกต่างกันเนื่องจากประเภทของน้ำมันที่เป็นส่วนผสมหลัก (ภาพที่ 22) และเมื่อนำไปเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง และ 10 องศาเซลเซียส มีลักษณะของเนื้อสูตรสำเร็จที่แตกต่างกัน โดยการเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง เนื้อสูตรสำเร็จยังคงเหลว แต่การเก็บรักษาในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ส่งผลให้สูตรสำเร็จเปลี่ยนเป็นเนื้อครีม และนอกจากนี้ยังมีการแยกชั้นกันระหว่างน้ำกับน้ำมัน แต่เมื่อนำมาเขย่าก็สามารถกลับมาผสมกันได้ดี

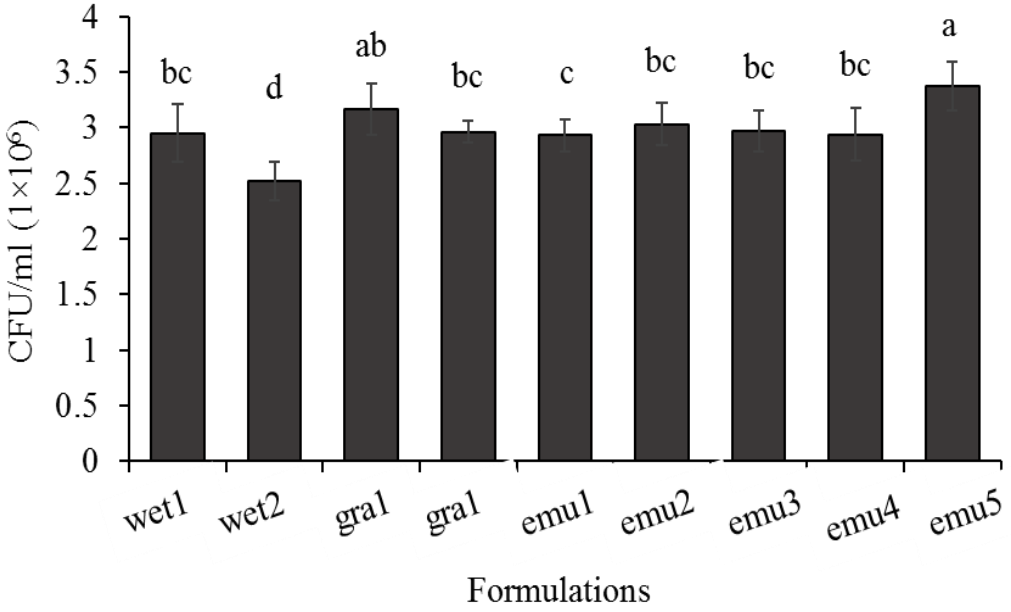


ภาพที่ 22 สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน (emulsion formulation) สูตรที่ 1 (กลีเซอรอลผสมน้ำมันคาโนลา) (ก) สูตรที่ 2 (น้ำมันคาโนลาผสมน้ำมันมะพร้าว) (ข) สูตรที่ 3 (น้ำมันคาโนลาผสมน้ำมันถั่วเหลือง) (ค) สูตรที่ 4 (น้ำมันคาโนลาผสมน้ำมันปาล์ม) (ง) และสูตรที่ 5 (น้ำมันมะพร้าวผสมน้ำมันถั่วเหลือง) (จ)

9. การประเมินสูตรสำเร็จของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในห้องปฏิบัติการ

9.1 ความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ

หลังจากการตรวจนับจำนวนเชื้อบนอาหาร GANA โดยนับจำนวนโคโลนีที่งอกบนหน้าอาหาร พบว่าสูตรสำเร็จแต่ละสูตรมีปริมาณเฉลี่ยของเชื้อที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 23) โดยสูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 มีจำนวนโคโลนีที่งอก 2.95×10^6 และ 2.52×10^6 CFU/ml ตามลำดับ สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 มีจำนวนโคโลนีที่งอก 3.17 และ 2.96×10^6 CFU/ml ตามลำดับ และสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน สูตรที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มีจำนวนโคโลนีที่งอก 2.93, 3.03, 2.97, 2.94 และ 3.34×10^6 CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 5) โดยในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสูตรที่ 5 มีปริมาณเชื้อที่กระจายตัวสูงสุดเมื่อเทียบกับสูตรสำเร็จอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

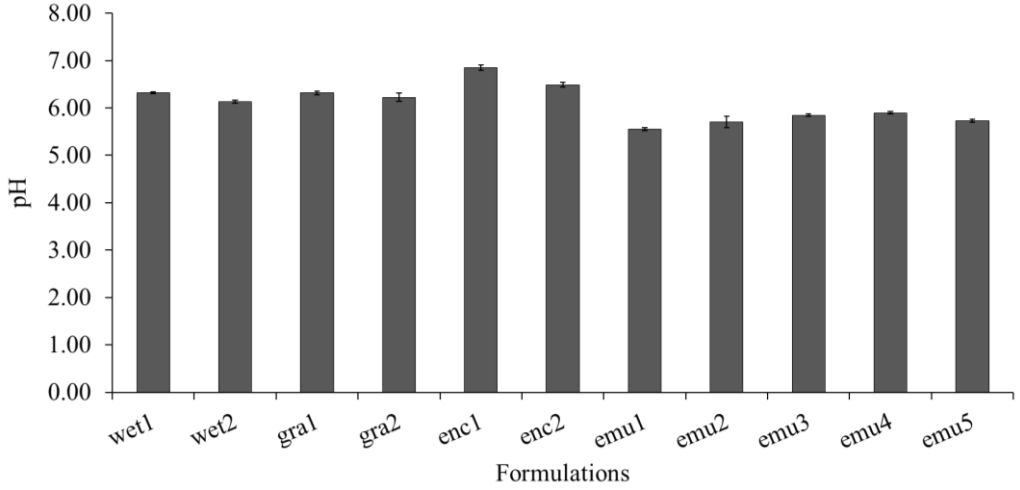


ภาพที่ 23 จำนวนโคโลนีที่กระจายตัวในสูตรสำเร็จหลังผลิต 24 ชั่วโมง (ตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT))

9.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากการวัดค่า pH ของสูตรสำเร็จแต่ละสูตร พบว่าสูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ แกรนูล แกรนูลในแคปซูล และอิมัลชันที่มีความเข้มข้น 1% มีค่า pH เฉลี่ยอยู่ในช่วง 5.5–7

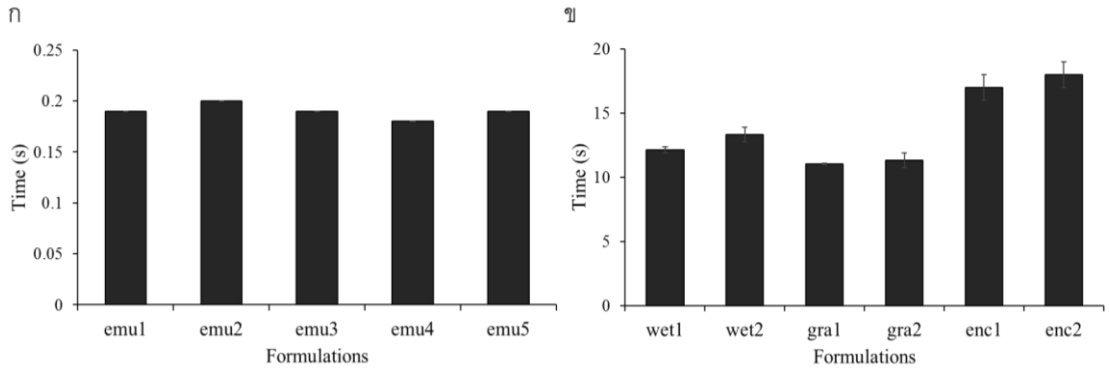
(ภาพที่ 24) ซึ่งเป็นค่าที่อยู่ในช่วงความเป็นกรดอ่อนถึงเป็นกลาง ทั้งนี้สูตรสำเร็จแต่ละสูตรมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลจากส่วนผสมที่ความแตกต่างกัน



ภาพที่ 24 ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ของสูตรสำเร็จ

9.3 **ความสามารถในการละลายน้ำและการตกตะกอน**

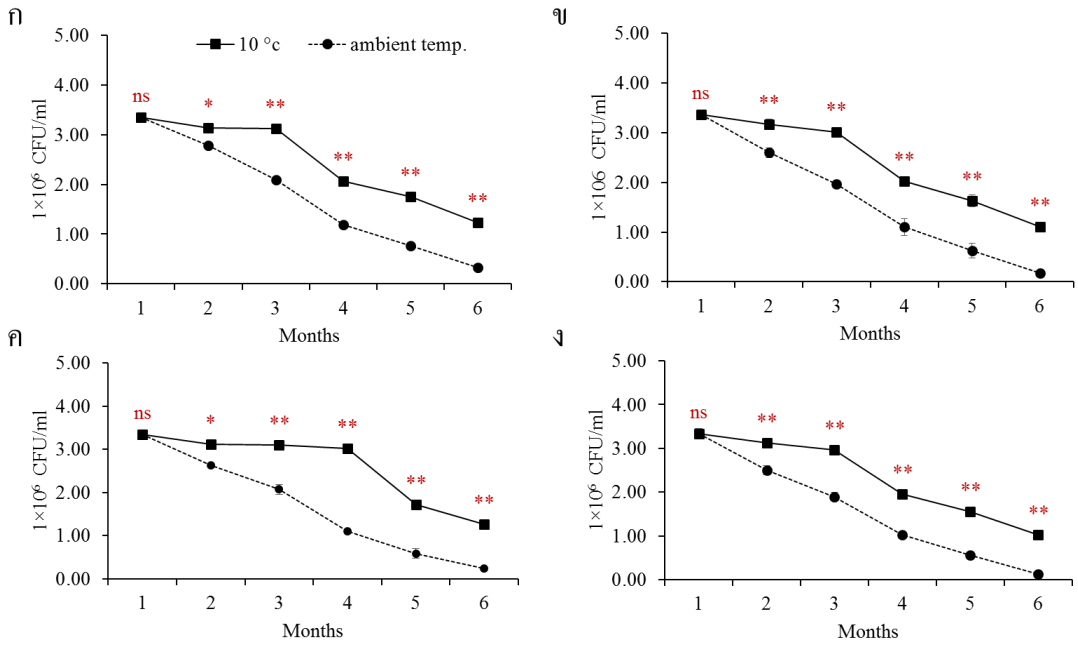
การทดสอบความสามารถการละลายน้ำของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันจำนวน 5 สูตร จากการบันทึกระยะเวลา พบว่าสามารถละลายน้ำได้ในช่วง 0.18–0.20 วินาที และบันทึกการตกตะกอนของสูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ สามารถตกตะกอนในช่วง 12–14 วินาที แกรนูล 11–12 วินาที และแกรนูลในแคปซูล 17–18 วินาที ตามลำดับ (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ความสามารถในการละลายน้ำ (ก) และความสามารถในการตกตะกอนของสูตรสำเร็จ (ข)

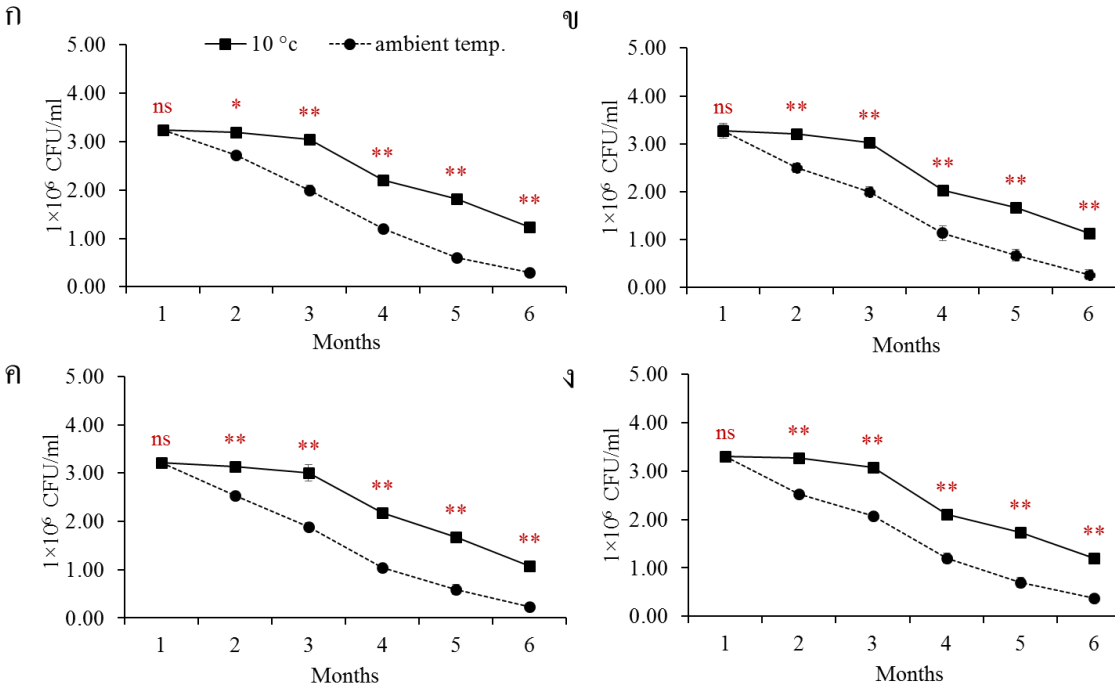
9.4 ความมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 10 °C เป็นเวลา 6 เดือน

เมื่อเก็บรักษาสูตรสำเร็จในขวดพลาสติกสีขาวขุ่น ปิดฝาสนิท และเก็บรักษาในอุณหภูมิอุณหภูมิห้อง และ 10 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน สูตรสำเร็จมีการแยกชั้นระหว่างน้ำกับน้ำมันอย่างเห็นได้ชัดเจน แต่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี และโคนิเดียของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตกตะกอน การเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องพบว่าจำนวนของเชื้อที่มีชีวิตรอดในสูตรสำเร็จแต่ละชนิดลดลงในทุก ๆ เดือน อย่างต่อเนื่อง โดยในเดือนที่ 6 มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในทุกสูตรสำเร็จ อยู่ในช่วง 0.20–0.80×10^6 CFU/ml ซึ่งแตกต่างจากการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่ลดลงอย่างช้า ๆ โดยในเดือนที่ 6 มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในทุกสูตรสำเร็จอยู่ในช่วง 1–1.60×10^6 CFU/ml โดยสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน 5 ของ *T. asperellum* T1 ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตมากที่สุด คือ 1.55×10^6 CFU/ml และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสูตรสำเร็จชนิดอื่น ๆ (ภาพที่ 26–29)



ภาพที่ 26 จำนวนโคโลนีในสูตรสำเร็จชนิดผงละลายน้ำ เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน (ก) ผงละลายน้ำ 1 ของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 (ข) ผงละลายน้ำ 2 ของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 (ค) ผงละลายน้ำ 1 ของเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1 และ (ง) ผงละลายน้ำ 2 ของเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1, ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ $P \leq 0.05$ ด้วยวิธี Student's t-test

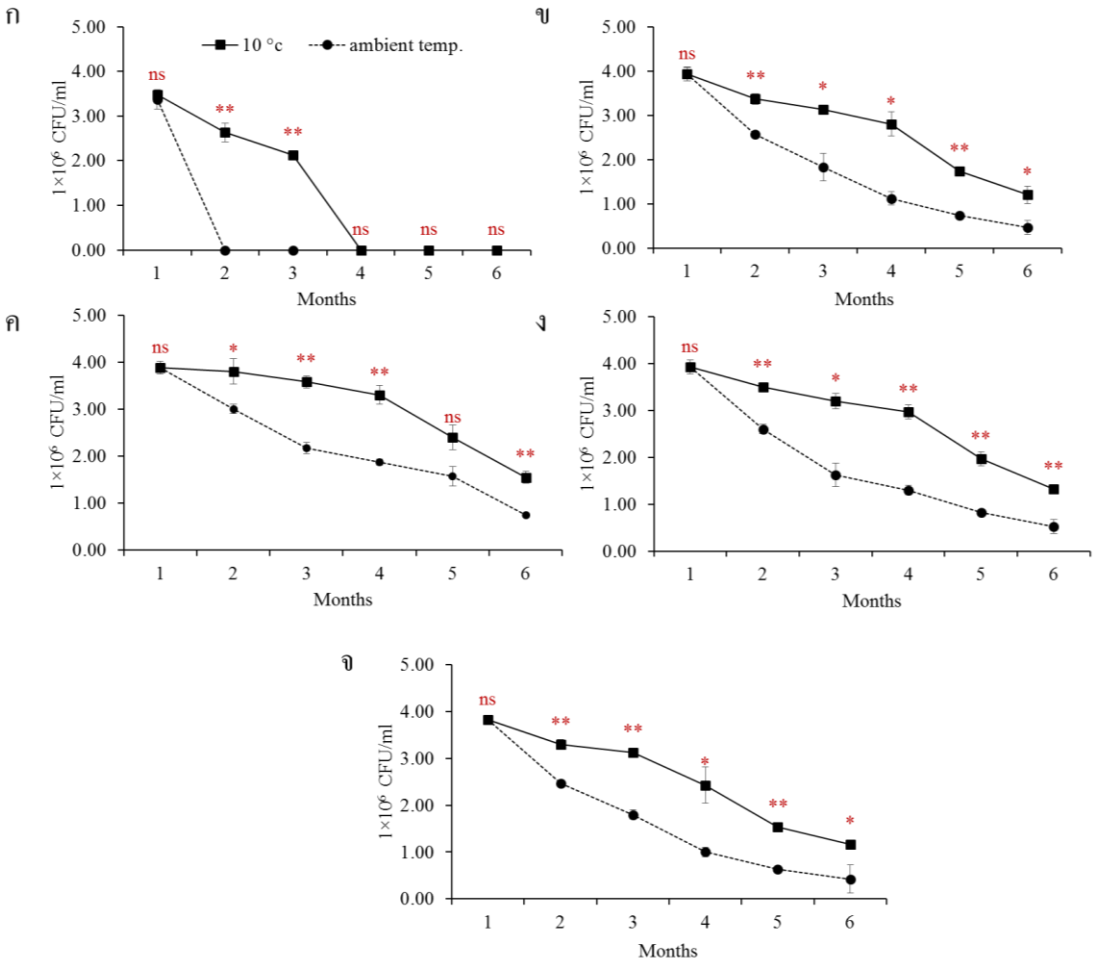
ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pornsuriya และ Sunpapao (2014) ที่ผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่างกันคือ ผงละลายน้ำ แกรนูล แกรนูลในแคปซูล และอิมัลชัน เก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเป็นเวลา 6 เดือนพบว่าสูตรสำเร็จอิมัลชันในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตของสูงสุด



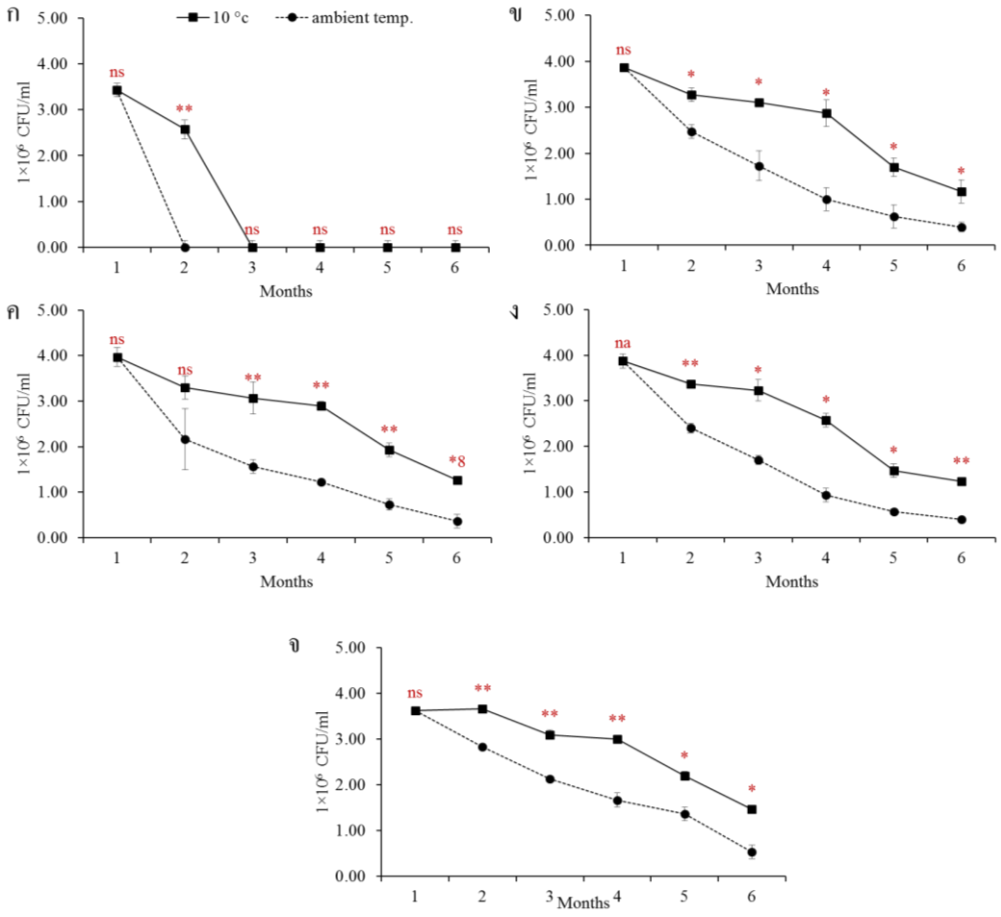
ภาพที่ 27 จำนวนโคโลนีในสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน (ก) แกรนูล 1 ของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 (ข) แกรนูล 2 ของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 (ค) แกรนูล 1 ของเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1 และ (ง) แกรนูล 2 ของเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1, ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ $P \leq 0.05$ ด้วยวิธี Student's t-test

และนอกจากนี้ Rai และ Tewari (2016) ที่รายงานถึงการเปรียบเทียบความมีชีวิตรอดของเชื้อรา *T. harzianum* Th14 ในสูตรสำเร็จชนิดต่างกัน คือ ผงละลายน้ำ อิมัลชัน ผงละลายน้ำผสมน้ำมัน และทัลคัม ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าในสูตรสำเร็จอิมัลชันที่มีส่วนผสมของน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันพาราฟินมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดสูงสุดมากกว่า 3×10^8 CFU/ml ทั้งนี้การมีชีวิตรอดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จแต่ละสูตร อาจขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสูตรสำเร็จ และเป็นผลจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของเชื้อลดลง

สภาพอุณหภูมิและความชื้นลดต่ำลง การใช้อากาศในกระบวนการนี้จึงลดลงทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในแต่ละสูตรสำเร็จต่างกัน (อรณิชา ตันติพลานนท์, 2561)



ภาพที่ 28 จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน (ก) สูตรที่ 1 (ข) สูตรที่ 2 (ค) สูตรที่ 3 (ง) สูตรที่ 4 (จ) สูตรที่ 5, ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางที่ $P \leq 0.05$ ด้วยวิธี Student's t-test

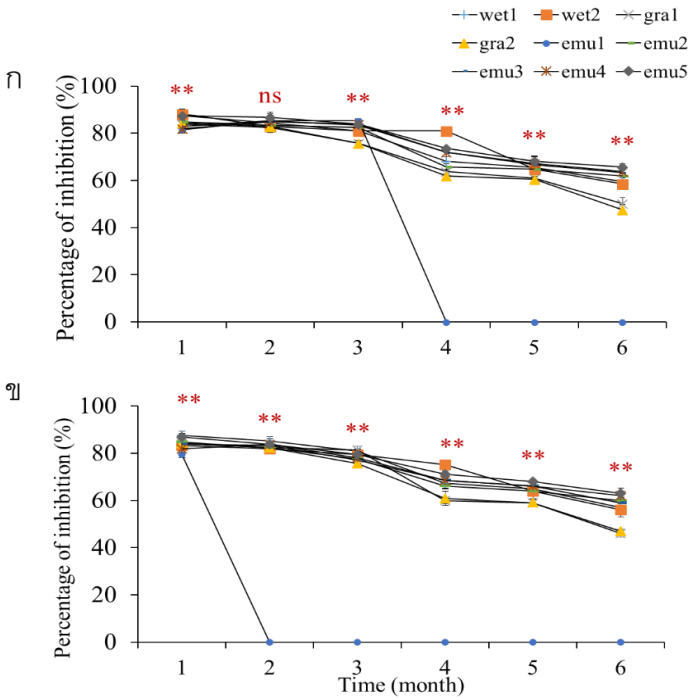


ภาพที่ 29 จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1 ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน เก็บรักษาในอุณหภูมิห้องและ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน(ก) สูตรที่ 1 (ข) สูตรที่ 2 (ค) สูตรที่ 3 (ง) สูตรที่ 4 (จ) สูตรที่ 5, ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ $P \leq 0.05$ ด้วยวิธี Student's t-test

9.5 ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด

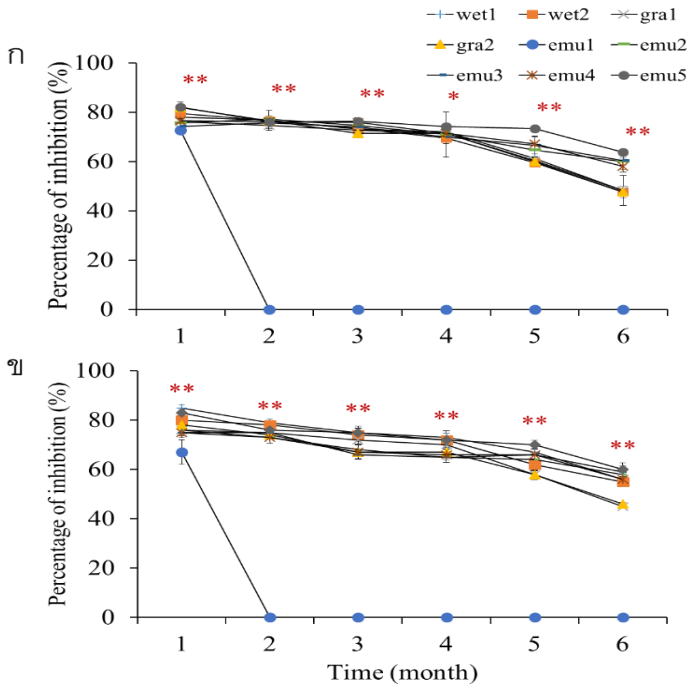
จากการนำสารแขวนลอยสูตรสำเร็จของเชื้อรา *T. asperellum* T1 และ *T. spirale* T76-1 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture ซึ่งการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *C. cassiicola* ทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าในเดือนที่ 1 ทุกสูตรสำเร็จมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 80–90 เปอร์เซ็นต์ และในเดือนต่อมามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยสูตรสำเร็จที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากที่สุดใน

เดือนสุดท้าย คือ สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสูตรที่ 5 ของเชื้อรา *T. asperellum* T1 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 65.72 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งของสูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 (ก) และ *Trichoderma spirale* T76-1 (ข) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Corynespora cassiicola* เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dual culture, ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ $P \leq 0.05$ ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ส่วนการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *C. aeria* ทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าในเดือนที่ 1 ทุกสูตรสำเร็จมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 70–85 เปอร์เซ็นต์ และในเดือนต่อมามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยสูตรสำเร็จที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากที่สุดในเดือนสุดท้าย คือ สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสูตรที่ 5 ของเชื้อรา *T. asperellum* T1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเท่ากับ 63.13 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 31) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Batta (2004) ในการนำสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันของเชื้อรา *T. harzianum* Rifai มาทดสอบการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว blue mold ของผลแอปเปิ้ล พบว่าสามารถลดขนาดของแผลบนผลได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Mbarga และคณะ (2014) ที่รายงานถึงการใช้สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันของเชื้อรา *T. asperellum* ควบคุมเชื้อรา *P. megakarya* สาเหตุโรคฝักดำของต้นโกโก้ในห้องทดลอง พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทำให้หยุดชะงักการเจริญ



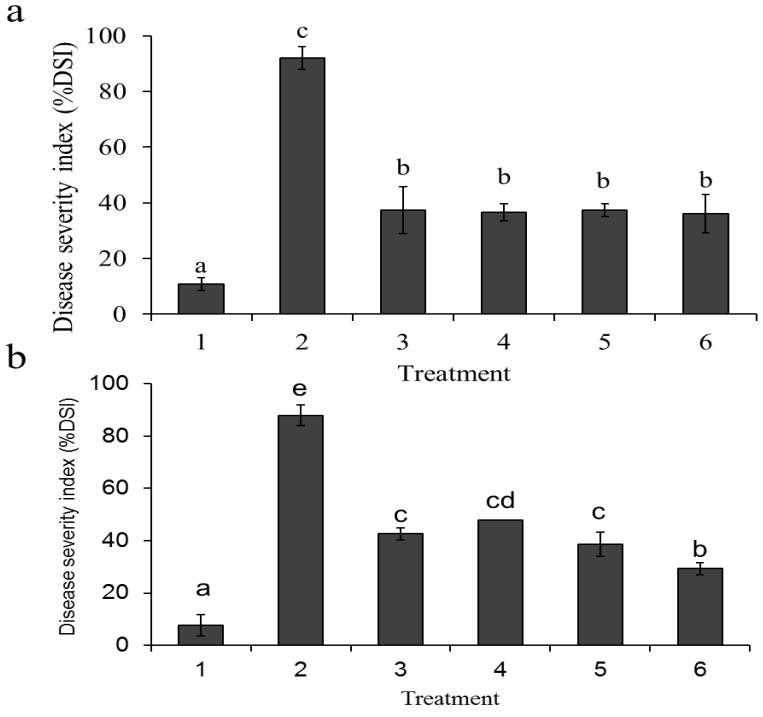
ภาพที่ 31 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งของสูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 (ก) และ *Trichoderma spirale* T76-1 (ข) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia aeria* เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dual culture assay, ns= ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ, * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ $P \leq 0.05$ ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

จากการทดสอบคุณสมบัติและประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จแต่ละสูตร พบว่าสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน 5 ของเชื้อรา *T. asperellum* T1 มีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อเทียบกับสูตรสำเร็จชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ จึงได้คัดเลือกสูตรสำเร็จนี้เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในสภาพโรงเรือนไฮโดรโปนิกส์ต่อไป

10. การประเมินประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพโรงเรือน

จากการประเมินประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า (ข้อที่ 9.5) ในการควบคุมโรคใบจุดของต้นผักสลัดอายุ 21 วัน ในสภาพโรงเรือนไฮโดรโปนิกส์ ด้วยวิธี foliar spray โดยใช้สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันที่ความเข้มข้นที่ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และนำมาเปรียบเทียบกับการพ่นด้วยเชื้อรา *T. asperellum* T1 ชนิดสด สูตรสำเร็จที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *T. asperellum* T1 ชนิดสด สามารถควบคุมเชื้อรา *C. cassiicola* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีดัชนีความรุนแรงของโรค (%DS) เพียง 37.33, 36.67, 37.33 และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความ

แตกต่างทางสถิติ และสูตรสำเร็จที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุม เชื้อรา *C. aeria* ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ และเชื้อสด โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีดัชนีความรุนแรงของโรคเพียง 29.33 เปอร์เซ็นต์ จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้สูตรสำเร็จเพื่อควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้เชื้อ *T. asperellum* T1 ชนิดสด (ภาพที่ 32) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mbarga และคณะ (2014) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จอิมัลชันของเชื้อรา *T. asperellum* ในการควบคุมโรคฝักดำของโกโก้ ซึ่งสามารถลดความเสียหายจากโรคได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ หลังพ่นด้วยสูตรสำเร็จ 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ Batta (2004) ใช้สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันของเชื้อรา *T. harzianum* Rifai เพื่อควบคุมโรคของผลไม้หลักการเก็บเกี่ยวจากเชื้อ *R. stolonifer, B. cinerea* และ *Penicillium expansum* โดยหลังจาก 2 เดือน สามารถลดอัตราการเกิดโรคและความเสียหายได้มากกว่า 86 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้ยังสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ได้นานยิ่งขึ้น



ภาพที่ 32 ดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรค (%DSI) จากเชื้อราสาเหตุโรค *Corynespora cassiicola* (ก) และ *Curvularia aeria* (ข) เมื่อควบคุมด้วยสูตรสำเร็จ, โดยที่ 1= พ่นด้วยน้ำกลั่น, 2= ปลูกเชื้อด้วย *C. cassiicola* (ก) และ *C. aeria* (ข), 3= พ่นด้วยเชื้อรา *T. asperellum* T1 ชนิดสด, 4= พ่นด้วย emu 1%, 5= พ่นด้วย emu 2% และ 6= พ่นด้วย emu 3% (ตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT))

บทที่ 4
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของผักสลัดและคัดเลือกโดยทดสอบกลไกต่าง ๆ พบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูง 2 ชนิด คือเชื้อรา *T. asperellum* T1 และเชื้อรา *T. spirale* T76-1 โดยเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถใช้กลไกการแก่งแย่งแข่งขัน (competition) โดยเจริญได้เร็วกว่าเชื้อราสาเหตุโรคและเข้าครอบครองพื้นที่บนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อได้เร็วกว่าทำให้เชื้อราสาเหตุโรคถูกจำกัดพื้นที่ นอกจากนี้ยังสามารถใช้กลไกการยับยั้งและทำลาย (antibiosis) โดยการสร้างเอนไซม์และหลั่งเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค (cell wall degrading enzymes) ชนิด chitinase และ β-1,3-glucanase สร้างสารระเหยที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา (volatile antifungal compounds) มายับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดทั้ง 2 ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ยังสามารถกระตุ้นกลไกการป้องกันตนเองให้พืช (defense response) โดยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืช (defense-related enzymes) ชนิด peroxidase, polyphenol oxidase, chitinase และ β-1,3-glucanase ในต้นผักสลัดทำให้ต้นผักสลัดมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด

เมื่อนำมาผลิตให้อยู่ในรูปแบบของสูตรสำเร็จ ซึ่งมีรูปแบบคือ ชนิดผงละลายน้ำ ชนิดแกรนูล ชนิดแกรนูลในแคปซูล และชนิดอิมัลชัน โดยเก็บรักษาในอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ อุณหภูมิห้อง และ 10 องศาเซลเซียส จากการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าการเก็บรักษาสูตรสำเร็จควรเก็บรักษาในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) สามารถยืดอายุของเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้นานกว่าที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันของเชื้อรา *T. asperellum* T1 ที่มีส่วนผสมของน้ำมันมะพร้าวและน้ำมันถั่วเหลือง มีจำนวนของเชื้อที่มีชีวิตรอดมากว่าสูตรสำเร็จชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดได้สูง เมื่อทดสอบการควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดในสภาพโรงเรือนระบบไฮโดรโปนิกส์โดยใช้ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีดัชนีความรุนแรงของโรคต่ำกว่าชุดการทดลองที่พ่นด้วยเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวและยังมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้เชื้อสด

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสามารถนำมาใช้ทดแทนเชื้อสดเพื่อควบคุมโรคใบจุดของผักสลัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยแนะนำให้ผู้ใช้ผสมสูตรสำเร็จในอัตราส่วน 30 มิลลิลิตร: น้ำ 1 ลิตร โดยสามารถพ่นในโรงเรือนอย่างน้อย 1 ครั้งต่อเดือน

เอกสารอ้างอิง

ขจรเกียรติ ธิปทา, จิรพรรณ โสภี และ พิภัทร เจียมพิริยะกุล. 2554. การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อการควบคุมเชื้อรา *Pythium* spp. สาเหตุโรคเน่าคอดิน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49, กรุงเทพฯ.

จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์. 2538. ยาเม็ด. การผลิต วิจัย และพัฒนา. เชียงใหม่: ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จิตรา กิตติโมรากุล. 2557. การควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมันโดยสารเคมีและชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช. โครงการเกษตรกู้ชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ทัดทรง ทั่วทิพย์. 2535. ยาเม็ด. กรุงเทพฯ: โอ เอส พริ้นติ้งเฮาส์.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2550. การควบคุมโรคพืชโดยวิธีธรรมชาติ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นุชนาถ จงเลขา. 2548. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของสมุนไพรบางชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในเมล็ดข้าว. Naresuan Phayao Journal 7: 135.

ปราโมทย์ ทิพย์ดวงตา. 2539. ยาเม็ด. เชียงใหม่: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปริศนา วงศ์ล้อม. 2548. การใช้พืชสมุนไพรและ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B012-022 ควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma harzianum* Rifai) ในเห็ดหูหนู และผลของกานพลู (*Eugenia aromatic* Ktze.) ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปวีณา สังข์แก้ว, เสมอใจ ชื่นจิตต์ และ วสันณ์ เพชรรัตน์. 2555. การคัดเลือกและเตรียมสูตรสำเร็จเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *Formicus* เพื่อควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 43: 21–24.

มนต์ชุลี นิติพน. 2534. ยาเม็ด. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮาส์.

ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี, อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ ธารทิพย ภาสบุตร. 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ระพีพรรณ ใจภักดี. 2544. ผักใบ. สำนักพิมพ์แสงแดดเพื่อนเด็ก, กรุงเทพฯ. 72 น.

วรารัตน์ ศรีจันทร์ และ ชัยสิทธิ์ ปรีชา. 2555. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อ *Pseudoidium nephelii* สาเหตุโรคราแป้งของเงาะ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 43 (ฉบับพิเศษ) 2: 257–260.

วานิด รอดเนียม, วิจิตร์ ตันมาละ, บุญมา ดีสง, ปฐมพงศ์ วงษ์เลี้ยง, มานะ กาญจนมณีเสถียร และ อัจฉรา เพ็งหนู. 2552. ผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* spp. ต่อเชื้อรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดหอมที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์. วารสารโรคพืช 23: 31–44.

วาริน อินทนา, อรรถกร พรมวี และ ปัณณวิชญ์ เย็นจิตต์. 2559. การใช้เชื้อรา *Trichoderma asperellum* สายพันธุ์ท้องถิ่นร่วมกับสายพันธุ์กลายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 47:351–362.

วิพรพรรณ เนื่องเม็ก และ รัตนาภรณ์ นครไธสง. 2557. การศึกษาการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของผักกาดหอมในระบบการปลูกแบบไฮโดรโปนิคส์ด้วยสารสกัดสมุนไพร. วารสารนเรศวรพะเยา 7: 131–136.

วิพรพรรณ เนื่องเม็ก, ประสิทธิ์ ผาผ่อง และมนัส ทิตย์วรรณ. 2557. ผลของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ต่อการเจริญเติบโต และควบคุมโรคแคนตาลูปในแปลงปลูก. วารสารแก่นเกษตร 42 ฉบับพิเศษ 3: 680–685.

สุนทร เรืองเกษม. 2540. ผักกินใบ. ม.ป.พ., กรุงเทพฯ. 88 น.

สุภาภรณ์ พิทักษ์กิจ, วสันณ์ เพชรรัตน์ และเสมอใจ ชื่นจิตต์. 2557. การคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากดินรอบโคนต้นปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทยสำหรับควบคุมเชื้อราก่อโรคปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 1 1: 77–81.

อมรรัตน์ ชุมทอง. 2547. การคัดเลือกและพัฒนาสูตรตำหรับของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kuhn. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

อรณิชา ตันติพลานนท์ และ ชนินันท์ พรสุริยา. 2559. การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกจากใบปาล์มน้ำมันเพื่อควบคุมรา *Curvularia oryzae* Bugnic. สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. แก่นเกษตร 44 (ฉบับพิเศษ) 1: 937–941.

อรณิชา ตันติพลานนท์, เอกพันธ์ หมะหมีน, ปัทมาศ อารีเอื้อ, กัลยา เหร็มล่า และชนินันท์ พรสุริยา. 2559. การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์เพื่อยับยั้งการเจริญของรา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ 9:43–48.

อรณิชา ตันติพลานนท์. 2561. การคัดกรองสูตรสำเร็จของรา *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรคใบจุด *Curvularia* ของกล้าปาล์มน้ำมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรุณรักษ์ พ่วงผล. 2543. พืชผักสวนครัวเสริมรายได้. บิ๊กบุ๊คส์ เซนเตอร์, กรุงเทพฯ. 109 น.

Abdullah, F., Ilias, G. N.M. Nelson, M. Izzati, N.A.M.Z. and Kalsom, Y.U. 2003. Disease assessment and the efficacy of *Trichoderma* as a biocontrol agent of basal stem rot of oil palms. Science Putra Research Bulletin 11: 31–33.

Ahamedemujtaba, V. and Shripad, K. 2017. Shelf Life of *Trichoderma harzianum* an antagonist in different oil based formulations. International Journal of Applied Sciences 6: 34–40.

Amin, F., Razdan, V.K., Mohidin, F. A. and Bhat, K. 2010. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *In-vitro*. Journal of Phytology 2: 34–37

Asad, S.A., Tabassum, A., Hameed, A., Hassan, F.U., Afzal, A., Khan S. A., Ahmed, R., and Shahzad, M. 2015. Determination of lytic enzyme activities of indigenous *Trichoderma* isolates from Pakistan. Brazilian Journal of Microbiology 46: 1053–1064.

Bae, H., Roberts, D.P., Lim, H.S., Strem, M., Park, S.C. and Ryu, C.M. 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease andinduce resistance against *Phytophthora capsici* in hotpepper using multiple mechanisms. Molecular Plant-Microbe Interactions 24; 336–351.

Bae, Y.S. and Knudsen, G.R. 2005. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. Biological Control 32: 236–242.

Balasubramanian, N. 2003. Strain improvement of *Trichoderma* spp. by protoplast fusion for enhanced lytic enzyme and biocontrol potential. Ph.D thesis, University of Madras, Chennai, India.

Barthe, P., Pujade-Renaud, V., Breton, F., Gargani D., Thai, R., Roumestand, C. and Lamotte, F. 2007. Structural analysis of Cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. Journal of Molecular Biology 367: 89–101

Batta, Y.A. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. International Journal of Food Microbiology 96: 281–288

Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. and Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7: 249–260.

Boukaew, S., Chuenchit, S. and Petcharat, V. 2011. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of Sclerotium root and stem rot and Ralstonia wilt of chili pepper. Biological Control 56: 365–74.

Bull, C.T. and Koike, S.T. 2005. Evaluating the efficacy of commercial products for management of bacterial leaf spot on lettuce. Online. Plant Health Progress DOI: 10.1094/PHP-2005-1121-01-RS.

Chairin, T., Pornsuriya, C., Thaochan, N. and Sunpapao, A. 2017. *Corynespora cassiicola* causes leaf spot disease on lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in hydroponic systems in Thailand. Australasian Plant Disease Notes 12: 1–3.

Chaverri, P., Castlebury, L.A., Overton, B.E. and Samuels, G.J. 2003. *Hypocrea*/*Trichoderma* species with conidiophore elongations and green conidia. Mycologia 95: 1100–1140.

Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied of Biochemistry Biotechnology 48:37–43.

Choi, G.J., Jang, K.S., Choi Y.H., Yu, J.H. and Kim, J.C. 2010. Antifungal activity of lower alkyl fatty acid esters against powdery mildews. Plant Pathology Journal 26: 360–366.

Christopher, D.J., Suthin, R.T., Usha, R.S. and Udhayakumar, R. 2010. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Biopesticides 3: 158–162.

Danielson, R.M. and Davey, C.B. 1973. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. Soil Biology and Biochemistry 5: 485–494.

Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma.* II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 41–48.

Dubey, C.S., Bhavani, R. and Birendra, M. 2009. Development of Pusa SSD for seed dressing and Pusa Biopellet 10G for soil application formulation *of Trichoderma harzianum* and their evaluation for integrated management of dry root rot of mungbean *(Vigna radiate)*. Biological Control 50: 231–242.

Duc, N.H., Mayer, Z., Pek, Z., Helyes, L. and Posta, K. 2017. Combined inoculation of beneficial microbes for enhancing defense enzymes and pepper yield of three pepper cultivars. Applied Ecology and Environmental Research 15:1815–829.

Elad, Y., Chet, I. and Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70:119–121.

Ferreira, J.G.S., Matthee, F.N. and Thomas, A.C. 1991. Biological control of Eutypa lata on grapevine by an antagonistic strain of Bacillus subtilis. Phytopathology 81: 283–287.

Gajera, H. and Vakharia, D. 2012. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* Isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. Brazilian Journal of Microbiology 43:43–52.

Gams, W., Meyer, W., 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum*. Mycologia 90:904–915.

Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L. and López-Bucio, J. 2016. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates Arabidopsis thaliana root morphogenesis via auxin signaling and Ethylene insensitive 2 functioning. New Phytologist 209: 1496–1512.

Haram, S., Schickler, H., Oppenheim, A. and Chet, I. 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. Phytopathology 86: 980–985.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - 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 disease: The history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4–10.

Ibrahim, Y. and Molan, Y. 2011. Occurrence of bacterial leaf spot disease on lettuce caused by *Pseudomonas viridiflava* in the Kingdom of Saudi Arabia. Plant Pathology 914: 47–51.

Ilias, G.N.M. 2000: *Trichoderma* and its efficacy as a bio-control agent of basal stem rot of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Ph.D. Thesis Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia.

Izzati, N.A.M.Z. and Abdullah, F. 2008. Disease suppression in *Ganoderma* infected oil palm seedlings treated with *Trichoderma harzianum*. Plant Protection Science 44: 101–107.

Jayasuriya, K.E. and Thennakoon, B.I. 2007. Biological control of *Rigidoporus microporus*, the cause of white root disease in rubber. Ceyon Journal of Science (Biology and Science) 36: 9–16.

Jegathambigai, V., Wilson Wijeratnam, R.S. and Wijesundera, R.L.C. 2009. *Trichoderma* as a seed treatment to control helminthosporium leaf spot disease of *Chrysalidocarpus lutescens*. World Journal of Agricultural Sciences 5: 720–728.

Kawicha, P. and Sangdee, A. 2013. Plant disease control using antagonistic microorganisms. Journal of Science and Technology Mahasarakham University 32: 220–29.

Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J.F. and Lumyong, S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. EurAsian Journal of Biology Sciences 4: 23–32.

Kieser, T., Bibb, M.J., Battner, M.J., Chater, K.F. and Hopwood, D.A. 2000. In Practical *Streptomyces* Genetics John Innes Centre, Norwick: England.

Kingsland. G.C. and Sitterly, W.R. 2008. Studies on fungicides for control of *Corynespora cassiicola* leaf spot of tomatoes in the Republic of Seychelles. International Journal of Pest Management 32:31–34.

Koohakan, P., Jeanaksorn, T. and Nuntagij, I. 2008. Major disease of lettuce grow by commercial nutrient film technique in Thailand. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Scince Technology Journal 8: 56–63.

Kumar, R., Kumar, S. and Upadhyay, J.P. 2012. Effect of different solid and liquid media on growth and sporulation of *T. viride.* Advances in Applied Science Research 4: 131–132.

Law, J.W., Ser, H.L., Khan, T.M., Chuah, L.H., Pusparajah, P., Chan, K.G., Goh, B.H. and Lee, L.H. 2017. The Potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice Blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). Frontiers in Microbiology 8: 3.

Li, L. and Steffens, J.C. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. Planta 215: 239–24.

Li, Z., Zhao, X., Sandhu, A.K. and Gu, L. 2010. Effects of exogenous abscisic acid on yield, antioxidant capacities, and phytochemical contents of greenhouse grown lettuces. Journal of Agriculture Food Chemistry 58: 6503–6509.

Liorach, R., Martínez-Sánchez, A., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I. and Ferreres, F. 2008. Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. Food Chemistry 108: 1028–1038.

Lyu, A., Liu, H., Che, H., Yang, L., Zhang, J. and Wu, M. 2017. Reveromycins A and B from *Streptomyces* sp. 3-10: antifungal activity against plant pathogenic fungi in vitro and in a strawberry food model system. Front Microbiology. 8:550.

Marinho-Soriano, E., Camara, M.R., Cabral, T.D. and Carneiro, M.A.D. 2007. Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial

substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. Aquaculture Research 38: 182–187.

Mayer, A.M., Harel, E. and Ben-Shaul, R. 1966. Assay of catechol oxidase a critical comparison of methods. Phytochemistry 5: 783–789.

Mbarga, J.B., Begoude, B.A.D., Ambang, Z., Meboma, M., Kuate, J., Schiffers, B., Ewbank, W., Dedieu, L. and Ten Hoopen, G.M. 2014. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control. Biological Control 77: 15–22.

Medina-Romero Y. M., Roque-Flores G. and Macías-Rubalcava M. L. 2017. Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. Microbiological and Biotechnology 101: 8209–8222.

Menzies, J.G., Ehret, D.L. and Stan, S. 1996. Effect of inoculum density of *Pythium aphanidermatum* on the growth and yield of cucumber plant grow in recirculating nutrient film culture. Canadian Journal of Plant Pathology 18: 50–54.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31: 426–428.

Minuto, A., spadaro, D., Garibaldi, A. ang Gullino, M.L. 2006. Control of soilborn pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. Crop Protection 25: 468–475.

Miyamoto, T., Ishii, H., Seko, T. and Kobori, S. 2009. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan. Plant Pathology 58:1144–1151.

Mohammad Reza, S.M. and Zahra, S. 2013. Evaluation of *Trichoderma* spp., as biological agents in some of plant pathogens. Annals of Biological Research 4: 173–179.

Mostapha, N.K. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistics bacteria in greenhouse and field conditions. Plant Pathology Journal 3: 88–96.

Nagle, N.E. and Haard, N.F. 1975. Fractionation and characterization of peroxidase from ripe banana fruit. Journal of Food Science 40:576–579.

Nemes, E., Datnoff, L.E. and Strandberg, J. 1996. Efficacy of biocontrol agenst in planting mixed to colonize plant root and control root disease of vegetables and citrus. Crop Protection 15: 735–742.

Nurbailis, M., Nasril, N., Abdi, D. and Trimurti, H. 2016. The chitinase activity in banana seedling that induced by *Trichoderma* spp. as resistance response to *Fusarium Oxyporum* f.sp.*cubense*. International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology 6: 2088–5334.

Pal, K.K. and Gardener. B.M. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02. APSnet. 25 p.

Parizi, T.E., Ansari, M. and Elaminejad, T. 2012. Evaluation of the potential of *Trichoderma viride* in the control of fungal pathogens of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*. Microbiology Pathogen 52: 201–205.

Perelló, A., Moreno, M.V., Mónaco, C. and Simón, M.R. 2008. Effect of *Thichoderma* spp. Isolates for biological control of tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis* under field conditions in Argentina. Biological Control 53: 895–904.

Pezet, R., Pont, V. and Tabacchi, R. 1999. Simple analysis of 6-pentyl-alphapyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. Phytochemical Analysis 10: 285–8.

Pithakkit, S., Petcharat, V., Chuenchit, S., Pornsuriya, C. and Sunpapao, A. 2015. Isolation of antagonistic actinomyces species from rhizopheres as effective biocontrol against oil palm fungal disease. Walailak Journal of Science and Technology 12: 481–490.

Pornsuriya, C. and Sunpapao, A. 2014. Formulations of *Streptomyces philanthi* RL-1-178 Biocontrol agent against Sclerotium root and stem rot of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). The Philippine Agricultural Scientist 97: 273–279.

Pornsuriya, C., Shin-Ishi, I. and Sunpapao, A. 2018. First report of leaf spot on lettuce caused by *Curvularia aeria*. Journal of General Plant Pathology 84: 296–299.

Prajapati, V.P.D., Joshi, M., Gajre, N.K. and Kansara, S.S. 2012. Antagonistic of some well-known bioagents against *Curvularia eragrostidis* (HENN.) J.A.MEY. an incitant of spider lilly leaf tip blight. The Bioscan 7: 701–703.

Prapagdee, B., Kuekulvong, C. and Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. International Journal of Biological Sciences 4: 330–337.

Rai, D. and Tewari, A.K. 2016. Shelf life studies of different formulations based on *Trichoderma harzianum* (Th14). Annals of Biological Research 7:1–5.

Ram, D.M., Kusum, B., Lodha, C. and Webstar, J. 2000. Evaluation of resident biocontrol rhizome rot. Indian Phytopathology 53: 450–454.

Ramanujam, B., Prasad, R.D. and Rangeswaran, R. 2010. Mass production, formulation, quality control and delivery of Trichoderma for plant disease management. The Journal of Plant Protection Sciences 2: 1–8.

Raza, W., Faheem, M., Yousaf, S., Rajer, F.U. and Yamee, M. 2013. Volatile and non-volatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Science letters journal 1: 21–24.

Sabaratnam, S. and Traquair, J.A. 2002. Formulatoin of Streptpmyces biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia damping-off in tomato transplants. Biological Control 23: 245–253.

Sagarika, K.R., Dharmarathna, M.G.C.S. and Jayarathna, D. L. 2016. Isolation, identification and characterization of *Trichoderma* species as a potential biocontrol agent against *Ceratocystis paradoxa*. Journal of Agricultural Science 11: 51–62.

Samuels, G.J., Ismaiel, A., Bon, M.C., De Respinis, S. and Petrini, O. 2010. *Trichoderma saperellum* sensu lato-consist of two criyptic species. Mycologia 102: 944–966.

Shikha, T. and Harsh, N.S.K. 2014. Phylloplane fungi as biocontrol agent against Alternaria leaf spot disease of (Akarkara) *Spilanthes oleracea*. Bioscience Discovery 5:139–144.

Singh, R., Maurya, S. and Upadhyay, R.S. 2012. Antifungal potential of *Trichoderma* species against *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Technology 8: 1925–1933.

Sivan, A. and Chet, I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum.* Journal of General Microbiology 135: 675–682.

Suárez-Estrellaa, F., Vargas-Garcíaa, C., Lópeza, M.J., Capelb, C. and Moreno, J. 2007. Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Crop Protection 26: 46–53.

Szeto, M. and Bau, Y.S. 1975. Some notes on leaf spot (*Cercospora longissima*) disease of lettuce. Agricuture Hong Kong 1: 278–285.

Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y.M. and Lumyong, S. 2005. 4-Arylcpumarins from endophytic Streptomyces aureofaciens CMUAc130 and their antifungal activity. Annals of Microbiological 55:63–66. ·

Taechowisan, T., Peberdy, J.F. and Lumyong, S. 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 19: 381–385.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L and Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology Biochemistry 40:1–10.

Vincent, T.M. 1927. Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. Nature 159: 850–856.

Wardecki, T., Brötz, E. and De Ford, C. 2015. Endophytic *Streptomyces* in the traditional medicinal plant *Arnica montana* L. secondary metabolites and biological activity. Antonie van Leeuwenhoek. 108: 391–402.

Wijesinghe, C.J., Wijeratnam, R.S.W., Samarasekara, J.K.R.R. and Wijesundera, R.L.C. 2011. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple cause by *Thielaviopsis paradoxa*. Crop Protection 30: 300–306.

Woo, S.L. and Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent

Enhancement and Management, Vurro M. and Gressel J. (eds.), Springer 107–130.

Zarandi, M.E., Shahidi Bonjar, G.H., Padasht Dehkaei, F., Ayatollahi Moosavi, S.A., Rashid Farokhi, P. and Aghighi, S. 2009. Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. American Journal of Applied Sciences 6: 194–199.

Zimand, G., Elad, Y., Chet, I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology 86: 1255–1260.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. Glucose ammonium nitrate agar (GANA)

Glucose	1 กรัม
NH_4NO_3	1 กรัม
Yeast extract	1 กรัม
K_2HPO_4	0.5 กรัม
Rose Bengal	0.5 กรัม
agar	15 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

แบ่งน้ำออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกใช้น้ำ 500 มิลลิลิตร ต้มผงวุ้นจนละลาย และอีกหนึ่งส่วนใช้ต้มส่วนผสมอื่น ๆ จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วนมาผสมกันและปรับปริมาตรน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร คนจนส่วนผสมทั้งหมดเข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. Glucose yeast malt extract agar (GYMA)

Glucose	4 กรัม
Yeast	4 กรัม
Malt extract	10 กรัม
Agar	17 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น จากนั้นต้มโดยใช้ไฟอ่อนและคนจนผงวุ้นละลายรวมกันเป็นเนื้อเดียว จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. Glucose yeast malt extract broth (GYMB)

Glucose	4 กรัม
Yeast	4 กรัม
Malt extract	10 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น จากนั้นต้มโดยใช้ไฟอ่อนจนส่วนผสมละลายเข้ากัน จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200 กรัม
Dextrose	4 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

ล้างมันฝรั่งที่ชั่งน้ำหนักแล้วให้สะอาดและปอกเปลือกออก จากนั้นหั่นมันฝรั่งเป็นลูกเต๋าขนาดเท่ากัน โดยแบ่งน้ำออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 500 มิลลิลิตร ส่วนแรกต้มมันจนสุก และกรองด้วยผ้าขาวบางใส่ภาชนะ จากนั้นเติมน้ำตาล dextrose และผงวุ้นที่ละลายในน้ำส่วนที่เหลือ ต้มอีกครั้งโดยใช้ไฟอ่อนคนจนส่วนผสมทั้งหมดเข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5. Potato dextrose broth (PDB)

Potato	200 กรัม
Dextrose	4 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

ล้างมันฝรั่งที่ชั่งน้ำหนักแล้วให้สะอาดและปอกเปลือกออก จากนั้นหั่นมันฝรั่งเป็นลูกเต๋าขนาดเท่ากัน นำไปต้มกับน้ำ 1,000 มิลลิลิตร จนสุก และกรองด้วยผ้าขาวบางใส่ภาชนะ จากนั้นเติมน้ำตาล dextrose ต้มอีกครั้งโดยใช้ไฟอ่อนคนจนส่วนผสมทั้งหมดเข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 ชนิดและองค์ประกอบของสารระเหยที่ปลดปล่อยจากเชื้อรา *Trichoderma asperellum* T1 โดยวิธี GC/MS analysis

Retention time (min)	Compound	%Relative peak area	Formula
1.450	Ethanol	3.853	C_2H_6O
2.211	o-n-Butylhydroxylamine	0.741	$C_4H_{11}NO$
3.042	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	0.811	$C_7H_{14}O_2$
5.193	2-Ethyl-1-hexanol	4.696	$C_8H_{18}O$
5.629	Cycloheptane	1.019	C_7H_{14}
6.017	2,4-Dihydroxybenzaldehyde, 2TMS derivative	0.679	$C_{13}H_{22}O_3Si_2$
7.928	Phosphonoacetic Acid, 3TMS derivative	0.831	$C_{11}H_{29}O_5PSi_3$
8.664	Sulfurous acid, 2-ethylhexyl isohexyl ester	0.637	$C_{14}H_{30}O_3S$
8.961	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl- 540-	2.252	$C_{12}H_{36}O_6Si_6$
9.837	N1,N1,N4-Tris(tert-butyldimethylsilyl)succinamide	0.955	$C_{22}H_{50}N_2O_2Si_3$
11.103	2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-	14.2	$C_{10}H_{14}O_2$
11.186	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	4.064	$C_{14}H_{20}O_2$
11.233	6-Undecylamine	2.175	$C_{11}H_{25}N$
13.212	2-(4a,8-Dimethyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-naphthalen-2-yl)propan-2-ol	2.409	$C_{15}H_{26}O$
13.28	Succinic acid, 2-(2-chlorophenoxy)ethyl ethyl ester	13.052	$C_{14}H_{17}ClO_5$
13.685	6-Undecylamine	4.229	$C_{11}H_{25}N$
15.699	2,5-diisopropylphenol, trifluoroacetate ester	1.831	$C_{14}H_{17}F_3O_2$
15.902	6-Undecylamine	3.856	$C_{11}H_{25}N$
15.942	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl)phenol	1.974	$C_{17}H_{26}O_2$
16.905	Hexadecanoic acid, ethyl ester	1.941	$C_{18}H_{36}O_2$

ตารางภาคผนวกที่ 2 ชนิดและองค์ประกอบของสารระเหยที่ปลดปล่อยจากเชื้อรา *Trichoderma spirale* T76-1 โดยวิธี GC/MS analysis

Retention time (min)	Compound	%Relative peak area	Formula
1.295	1,2-Propanediol, 3,3'-oxydi-, tetranitrate	1.286	$C_6H_{10}N_4O_{13}$
1.405	Ethanol	4.98	$C_4H_{11}NO$
1.938	Silanediol, dimethyl-	2.53	$C_2H_8O_2Si$
2.281	Propanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	2.51	$C_6H_{12}O_2$
2.581	Butanoic acid, ethyl ester	1.31	$C_6H_{12}O_2$
3.022	Butanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	10.52	$C_7H_{14}O_2$
3.059	1,2-Hydrazinedicarboxaldehyde	1.64	$C_2H_4N_2O_2$
4.706	Furan, 2-pentyl-	22.44	$C_9H_{14}O$
5.293	Cyclobutane, 1,3-diisopropenyl-, trans	0.39	$C_{10}H_{16}$
6.432	Phenylethyl Alcohol	2.25	$C_8H_{10}O$
6.652	Cyclopentane, 1,2-dimethyl-	0.33	C_7H_{14}
7.515	Furan, 2-hexyl-	0.44	$C_{10}H_{16}O$
8.481	Furan, 2-(1-pentenyl)-, (Z)-	0.72	$C_9H_{12}O$
11.091	2H-Pyran-2-one, 6-pentyl-	18.50	$C_{10}H_{14}O_2$
11.549	(1R,5R)-2-Methyl-5-((R)-6-methylhept-5-en-2-yl)bicyclo[3.1.0]hex-2-ene	2.44	$C_{15}H_{24}$
13.465	4-Amino-4,5(1H)-dihydro-1,2,4-triazole-5-one	1.27	$C_2H_4N_4O$
15.279	1-Undecyne	1.36	$C_{11}H_{20}$
16.418	4-Amino-4,5(1H)-dihydro-1,2,4-triazole-5-one	1.51	$C_2H_4N_4O$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวบุรฮานะฮ์ ใบยี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6010620017

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (พืชศาสตร์)	มหาวิทาลัยทักษิณ	2560

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

1. โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม

2. สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

บุรฮานะฮ์ ใบยี, ชนินันท์ พรสุริยา และ อนุรักษ์ สันป่าเป้า. 2561. การคัดกรองเชื้อรา *Trichoderma* spp. เบื้องต้น เพื่อควบคุมโรคใบจุดผักสลัด. แก่นเกษตร 46 ฉบับพิเศษ 1: 1098–1103.

Baiyee, B., Shin-ichi, I. and Sunpapao, A. 2019. *Trichoderma asperellum* T1 mediated antifungal activity and induced defense response against leaf spot fungi in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology 106: 96–101.

Journal impact factor = 1.678

Baiyee, B., Pornsuriya, C., Shin-ichi, I. and Sunpapao, A.2019. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aeria*. Biological Control 129: 195–200.

Journal impact factor = 2.607

รางวัลที่ได้รับ

1. **ผลงานเด่น** งานประชุมวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ประจำปี 2562 ณ รอยัล พารากอน ฮอลล์ ศูนย์การค้าสยามพารากอน วันที่ 8 สิงหาคม 2562

2. รางวัลการนำเสนอภาคโปสเตอร์ “**ระดับดีเด่น**” การประชุมวิชาการเกษตรครั้งที่ 20 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วันที่ 28–29 มกราคม 2562

3. รางวัลการนำเสนอภาคโปสเตอร์ “**ระดับชมเชย**” การประชุมวิชาการเกษตรครั้งที่ 19 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วันที่ 22–23 มกราคม 2561