

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย แผนงานวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

2. โครงการวิจัย การพัฒนาเทคนิคการควบคุมศัตรูพืชเพื่อลดการใช้สารเคมี

กิจกรรม การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคพืช (non-pathogenic *Fusarium*) ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Selection and Evaluation of the potential non-pathogenic *Fusarium oxysporum* for suppressing plant pathogenic *Fusarium oxysporum*

3. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นายอภิรักษ์ สมฤทธิ	สัดส่วนที่ทำวิจัย	70 %
ผู้ร่วมงาน	นายยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี	สัดส่วนที่ทำวิจัย	10 %
	น.ส.ธารทิพย์ ภาสบุตร	สัดส่วนที่ทำวิจัย	10 %
	น.ส.สุณิรัตน์ สิมะเดื่อ	สัดส่วนที่ทำวิจัย	10 %

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

50 ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 02-5795581

4. บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน จากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ ได้แก่ กล้วยน้ำว่า แก้วมังกร ข้าวโพด ค่ะน้าแดง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ นำตัวอย่างดินมาแยกเชื้อราด้วยวิธี soil dilution plate technique บนอาหาร PDA แล้วทำเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี single-spore technique บนอาหาร WA ได้เชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) จากดินปลูก 10 ชนิด จาก 15 จังหวัด ได้แก่ กล้วยน้ำว่า ข้าวโพด ค่ะน้าแดง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ เชื้อรา *F. oxysporum* ที่เก็บรวบรวมได้ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) มีลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA และ ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA ที่คล้ายกัน การตรวจสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยปลูกเชื้อรา *F.* ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35)

บนต้นพืช พบว่า มีเชื้อรา *F. oxysporum* 28 ไอโซเลท ทำให้พืช 8 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว่า ข้าวโพด แตงกวา เบญจมาศ ปาล์มน้ำมัน พริก ผักหวานบ้าน และมะเขือเทศ แสดงอาการโรคเหี่ยว ขณะที่เชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ FO4, FO5, FO6, FO12, FO23, FO34 และ FO35 ที่ไม่ทำให้พืชทดสอบ 8 ชนิด เกิดอาการโรคเหี่ยวหรืออาการท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาล เมื่อทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ทั้ง 7 ไอโซเลท ที่มีต่อการเจริญและการทำให้เกิดโรคเหี่ยวของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในโรงเรือน พบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวบนต้นมะเขือเทศได้

คำค้น : เชื้อรา *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคพืช, non-pathogenic *Fusarium*,
Fusarium oxysporum สาเหตุโรคพืช

Abstract

A survey and collection of soil samples were conducted in growing plantation of banana, dragon fruit, corn, Chinese kale, cucumber, chrysanthemum, chili, Pak wan ban, tomato, oil palm, basil and natural forest. Soil samples were isolated for *F. oxysporum* by soil dilution plate technique on PDA and an isolated *F. oxysporum* was purified to be single spore by single-spore technique on WA. Thrity five isolates of *F. oxysporum* (FO1 – FO35) were collected from growing area of 10 plants, banana, corn, Chinese kale, cucumber, chrysanthemum, chili, Pak wan ban, tomato, oil palm, basil and natural forest, in 15 provinces. All of them showed similar characteristics of their culture on PDA (Potato Dextrose Agar) and their morphological structures on CLA (Corn Leaf Agar). A pathogenicity test of 35 isolates of *F. oxysporum* on tested plants revealed that 28 isolates of *F. oxysporum* produced wilt symptom with discoloration inside vascular bundles of 8 plants, banana, corn, cucumber, chrysanthemum, chili, Pak wan ban, tomato and oil palm. Meanwhile, 7 isolates of *F. oxysporum*, FO4, FO5, FO6, FO12, FO23, FO34 and FO35, produced no wilt symptom on those plants. The ability test of 7 isolates of non-pathogenic *F. oxysporum* to suppress plant pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a causal agent of tomato wilt disease, in green house revealed that 7 isolates of non-pathogenic *F. oxysporum* had no ability to suppress the wilt pathogen or wilt symptom on tested tomato.

Keywords : non-pathogenic *Fusarium oxysporum*, plant pathogenic *Fusarium oxysporum*

6. คำนำ

Fusarium เป็นราอาศัยในดิน พบได้ทั่วไปทุกแห่ง หลายชนิดเป็นสาเหตุของโรคพืชที่สำคัญ ซึ่งระบาดทำความเสียหายแก่ พืชไร่ พืชหัว พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผลทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โรคสำคัญในต่างประเทศที่เกิดจากรา *Fusarium* และทำความเสียหายมาก ได้แก่ โรคเหี่ยวในกล้วย (Panama wilt) โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พริก ปอ (flax) ฝ้าย ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา หัวหอม มันฝรั่ง กล้วย ส้ม และแอปเปิล ในประเทศไทยพบราสกุลนี้หลายชนิด กระจายอยู่ทั้งในดิน และในพืชมากกว่าราชนิดอื่น โดยเป็นสาเหตุของโรคในพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ธัญพืชเมืองหนาว ฝ้าย ถั่วลิสง หัวหอม กะหล่ำปลี แตงโม มะเขือเทศ พริก ถั่วฝักยาว และ มันฝรั่ง โดยทำให้เกิดโรคเหี่ยว (*Fusarium wilt disease*) กับพืชล้มลุก และพืชผักหลาย ๆ ชนิด และโรคผลเน่า (*Fusarium fruit rot*) ที่ทำให้การระบาดทำความเสียหายให้กับผลผลิตพืชเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะพืชตระกูลแตง เนื่องจากเชื้อราที่มีพืชอาศัยจำนวนมากและสามารถดำรงชีพอยู่ในดินได้นานหลายปี เกิดความผันแปร (*variation*) ได้ง่าย และ เชื้อรานี้หลายชนิดมีการสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อพืชและสิ่งมีชีวิตที่บริโภคพืชที่มีเชื้อรา *Fusarium* ปนเปื้อน ปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดมากขึ้น เช่น โรคตายพรายของกล้วย ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* และโรคเหี่ยวที่เกิดกับพืชตระกูลแตง ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *melonis* เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชในการป้องกันกำจัดหรือควบคุมการระบาดของเชื้อราสาเหตุโรคแล้วก็ตาม แต่ก็ยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากเชื้อรา เป็นเชื้อราที่อาศัยในดิน และมีการอยู่รอดในเศษซากพืช ซ้ำมฤตดูได้ ทำให้การใช้สารเคมียังไม่ได้ผลดี คุ่มค่ากับค่าใช้จ่ายที่เสียไป แต่กลับทำให้เสียเงินลงทุนทำการเกษตรมากขึ้น ในขณะที่ราคาผลผลิตเกษตรยังคงตกต่ำอยู่ตลอด

จากปัญหาดังกล่าว ที่สอดคล้องกับการระบาดและเข้าทำลายของเชื้อรากลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นต้องหาวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น มีต้นทุนต่ำ และไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อเนื้อหลังการใช้ ทดแทนการใช้สารเคมีที่อาจตกค้างหรือมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมได้ ปัจจุบันในต่างประเทศมีรายงานการศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืช โดยเฉพาะในมะเขือเทศโดยการใช้เชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (*non-pathogenic F. oxysporum*) จากการเก็บรวบรวมเชื้อจากดินในธรรมชาติมากขึ้น โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคที่อาศัยอยู่ในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่มีผลกระทบต่อเจริญของพืชอาศัย

Benhamou และคณะ (2002) ศึกษาอิทธิพลของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค สายพันธุ์ Fo47 (*nonpathogenic Fusarium oxysporum* strain Fo47) ในการกระตุ้นให้เซลล์เนื้อเยื่อของแตงกวา สร้างระบบการปกป้องตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pythium ultimum*

Da Silva และคณะ (2005) ศึกษาผลของ เชื้อรา *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium oxysporum*) จำนวน 9 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, race 2 พบว่า *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรค และทำให้พืชเจริญพัฒนาได้ในระดับปกติ

Forsyth และคณะ (2006) ศึกษาพบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินบริเวณรากของกล้วย มีความสามารถในการลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวเนื่องจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ในกล้วยสายพันธุ์ Lady Finger และ สายพันธุ์ Cavendish cultivars ในสภาพการปลูกแบบโรงเรือนได้

Larkin (1996) ศึกษาพบว่า เชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลทที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *F. oxysporum*) แสดงผลการยับยั้งการเกิดโรคได้ เมื่อใส่สปอร์ผนังหนา หรือ คลามายโดสปอร์ (chlamydospores) ลงในดินปลูกอย่างน้อย 50 – 100 คลามายโดสปอร์ต่อน้ำหนักดิน 1 กรัม และพบว่า เชื้อรา *F. oxysporum* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *F. oxysporum*) หลาย ๆ ไอโซเลทที่แยกได้จากดินที่มีผลกระทบ (suppressive soil) ต่อการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงโม มีศักยภาพในเป็น ตัวควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุของโรคได้ (biocontrol agents).

Nel และคณะ (2006) ศึกษาพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* และ เชื้อรา *F. oxysporum* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (nonpathogenic *F. oxysporum*) จากตัวอย่างดินต่าง ๆ ในแอฟริกาใต้ สามารถยับยั้งการเกิดโรคตายพรายของกล้วยในโรงเรือนทดลองได้ โดยเชื้อรา *F. oxysporum* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (nonpathogenic *F. oxysporum*) จำนวน 2 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเกิดอาการโรคตายพรายในกล้วยได้ 87.4 และ 75.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากรายงานการศึกษาที่ได้ผลดีดังกล่าว จึงเป็นประเด็นที่น่าศึกษาวิจัยเก็บรวบรวม ทดสอบ และคัดเลือกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *F. oxysporum*) ในดินธรรมชาติ ดินบริเวณรากพืชอาศัย หรือในดินที่มีผลกระทบหรือยับยั้งการพัฒนาของโรค (suppressive soil) มาใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยว ซึ่งในต่างประเทศได้มีการศึกษาเอาไว้มากมายเกี่ยวกับปัจจัย หรือจุลินทรีย์ที่มีอิทธิพลในการชักนำหรือยับยั้งการเกิดโรค (suppressive soil) ผลการศึกษาที่ได้ผลดี สามารถนำมาจัดระบบการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* ร่วมกับวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F.oxysporum* ตามวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์เชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ที่มีศักยภาพในการควบคุมประชากรของเชื้อรา *F. oxysporum* ซึ่งคาดว่าผลการศึกษาและข้อมูล รวมถึงผลสรุปที่ได้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรในการป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนี้

อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นการลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช เพื่อสร้างระบบเกษตรกรรมของประเทศไทยให้ยั่งยืน และยั่งยืนสืบต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดินจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในประเทศไทย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ WA (Water Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), CLA (Corn Leaf Agar) และ KCL
3. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
4. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
5. วัสดุอุปกรณ์สำหรับปลูกต้นไม้ในโรงเรือนทดลอง เช่น กระถางปลูกต้นไม้ขนาดความจุ 10 ลิตร ดิน ปลูก บัวรดน้ำ ฯลฯ
6. เมล็ดพันธุ์ หรือต้นกล้าพืช สำหรับทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค
7. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการโรคพืช เช่น ตู้เชื้อเชื้อ เข็มเขี่ย จานแก้วเลี้ยงเชื้อ แผ่นแก้วสไลด์ พร้อมแผ่นแก้วปิดสไลด์ และตะเกียงแอลกอฮอล์
8. อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA), Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ Corn Leaf Ager (CLA)
9. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (Compound microscope) กล้อง Stereoscopic microscope และกล้องถ่ายภาพพร้อมอุปกรณ์
10. เอกสารและตำราเกี่ยวกับชนิดและภาพ (monograph) ของเชื้อรา
11. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

วิธีการ

1. การเก็บรวบรวมเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) มีวิธีการดังนี้

ทำการเก็บรวบรวมดินบริเวณรากของพืชที่มีลักษณะการเจริญสมบูรณ์ ไม่แสดงอาการเหี่ยวหรือต้นเน่า หรือเก็บรวบรวมดินในป่า บันทึกข้อมูลสภาพดิน และความเป็นกรด-ด่างของดิน

2. การแยกเชื้อ *F. oxysporum* จากดิน

ทำการแยกเชื้อรา *F. oxysporum* จากดินด้วยวิธี soil dilution plate technique โดยชั่งดิน 10 กรัม มาทำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าดินให้ละลาย แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4} หยดสปอร์แขวนลอยความแต่ละความเข้มข้น จำนวน 1

มิลลิลิตร ลงเกลี่ยบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตรวจสอบเบื้องต้น เมื่อพบว่าได้เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* จึงย้ายเส้นใยเชื้อลงบนอาหาร PDA ต่อไป

3. การศึกษาและการจำแนกชนิด

3.1 ทำเชื้อบริสุทธิ์โดยการใช้ single-spore technique

เขี่ยกลุ่มสปอร์ลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ทำสปอร์แขวนลอยให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10 สปอร์ ต่อ 1 loop ภายใต้ออบเจกทีฟ กำลังขยายต่ำ ใช้ห่วงลวด (loop) ที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสปอร์แขวนลอย แล้วลาก (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหาร WA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ตักสปอร์เดี่ยวที่งอก มาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม

3.2 การจำแนกชนิด

ทำการศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อรา ศึกษาการสร้าง pigment, sclerotium และ sporodochium ในอาหาร PDA
- ลักษณะและขนาดของ conidium, conidiophore บนอาหาร CLA อายุ 10-14 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 °ซ. ภายใต้อ่างแสง NUV
- ทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของ sporogenous cell, phialide, microconidium, macroconidium

4. ตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) และผลกระทบของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่แยกได้ต่อต้นมะเขือเทศ ตามวิธีการของ Da Silva และคณะ (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato โดยนำต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน มาล้างราก แล้วจุ่มรากลงในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำต้นกล้าไปปลูกในกระถางดินร่วน ขนาด 500 มิลลิลิตร เปรียบเทียบผลกับกรรมวิธีการไม่จุ่มรากมะเขือเทศในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา และ กรรมวิธีการจุ่มรากมะเขือเทศในอาหาร PDB (potato dextrose broth) ดูผลการเจริญเติบโตของมะเขือเทศในโรงเรือน และตรวจสอบการเกิดโรค และความสูงของต้นมะเขือเทศหลังย้ายลงปลูกในกระถางดิน 35 วัน

เมื่อพบว่า เชื้อรา *F. oxysporum* ไม่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศที่นำมาทดสอบ จึงเก็บเชื้อเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ห้องปฏิบัติการ มีวิธีการดังนี้

1. เตรียมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA

2. เตรียมเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค บนอาหาร PDA

3. ทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ด้วยวิธี Dual culture technique บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28 °C

4. บันทึกผล วัดขนาดของพื้นที่การยับยั้งการเจริญ วิเคราะห์และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค

5. การทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในโรงเรือน ตามวิธีการของ Da Silva et al. (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato มีวิธีการดังนี้

1. เพาะเมล็ดมะเขือเทศ ลงในกระถางเพาะต้นกล้า ดูแล การเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศ จนมีอายุ 30 วัน

2. เตรียมเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* บนอาหารวุ้น PDA โดยตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ขนาด 1x1 เซนติเมตร ที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* เจริญอยู่ ลงบนอาหารวุ้น PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำสปอร์แขวนลอย ที่ความหนาแน่น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร คลุกเคล้ากับดินปลูกพืช พักดินให้เชื้อราเจริญและปรับตัวเป็นเวลา 10 วัน

3. เตรียมเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค บนอาหารวุ้น PDA (ตามวิธีการในข้อ 1) แล้วเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ที่ความหนาแน่น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

4. นำต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน มาล้างราก แล้วแช่รากในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาปลูกในกระถางดินที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ดูแล การเจริญเติบโตของมะเขือเทศในโรงเรือน และตรวจสอบการเกิดโรค และ ความสูงของต้นมะเขือเทศหลังย้ายลงปลูกในกระถางดิน 35 วัน ดำเนินการทดลองตามกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

1. กรรมวิธีทดลอง : ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + แช่รากในเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy)

2. กรรมวิธีเปรียบเทียบ : ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่แช่รากในเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy)

3. กรรมวิธีเปรียบเทียบ 1 : ต้นมะเขือเทศ + ไมค์คลุกดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่แพร่รากในเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PathoFoxy) ไม่

4. กรรมวิธีเปรียบเทียบ 2 : ต้นมะเขือเทศ + ไมค์คลุกดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่แพร่รากในเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PathoFoxy) แต่แพร่รากในอาหาร PDB (potato dextrose broth)

ดำเนินการทดลองกับเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค 7 ไอโซเลท แต่ละกรรมวิธีมีต้นมะเขือเทศทดสอบจำนวน 20 ต้น (กระถาง) ดำเนินแผนการทดลอง แบบ RCBD

5. ตรวจสอบ และบันทึกผลระดับการเกิดโรคในพืชที่ทดสอบ

การบันทึกผลระดับการเกิดโรคบนมะเขือเทศ ใช้วิธีการตามทดลองของ Da Silva *et al.* (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato ดังนี้

1 = ต้นพืชปกติ ไม่แสดงอาการ

2 = บริเวณข้อแรกจากรากของต้นพืชมีอาการทอลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

3 = ทอลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลลุกลามขึ้นสูงถึงระดับใบแรก ใบพืชเหลืองอย่างน้อย 1 ใบ

4 = ทอลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลลุกลามถึงครึ่งของความสูงลำต้นพืช ใบพืชเหลือง 2 หรือมากกว่า 2 ใบ

5 = ทอลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลลุกลามเกือบถึงยอด ใบเกือบทั้งหมดมีอาการเหี่ยว ยกเว้นยอดของพืช

6 = พืชตาย หรือพืชแสดงอาการทอลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเหี่ยว จนลุกลามถึงยอดพืช

6. นำผลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการไม่แพร่รากมะเขือเทศในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา และ กรรมวิธีการแพร่รากมะเขือเทศในอาหาร PDB (potato dextrose broth)

เวลาและสถานที่

เวลา : เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2557

สถานที่ : กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูกพืชของเกษตรกร

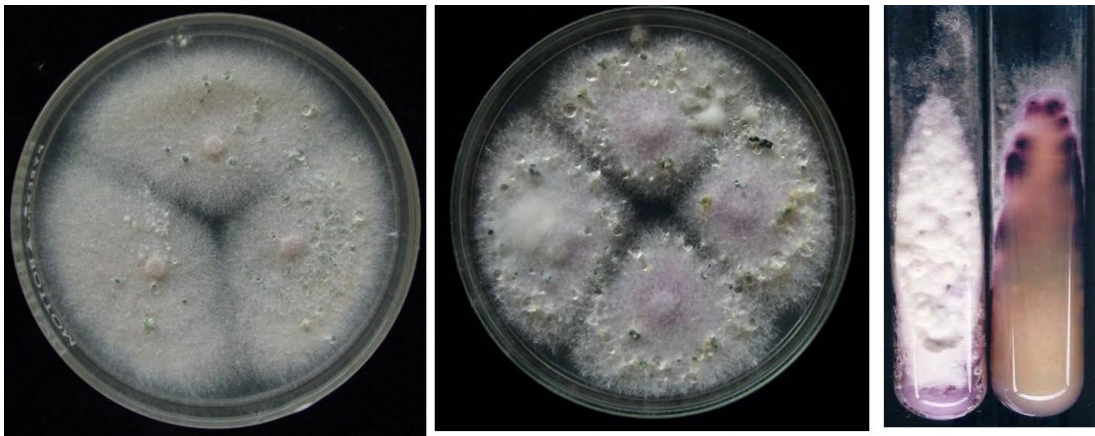
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างดิน การแยกเชื้อรา และการจำแนกชนิด

ได้ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน จากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ ได้แก่ กล้วยน้ำว้า แก้วมังกร ข้าวโพดแดง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ นำตัวอย่างดินมาแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหารวุ้น PDA (Potato Dextrose Agar) และจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่พบ

จากการแยกเชื้อด้วยวิธี soil dilution plate technique บนอาหาร PDA แล้วทำเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี single-spore technique บนอาหาร WA จากนั้นจำแนกชนิดเชื้อราที่พบ โดยศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ CLA ตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) พบว่าเชื้อราที่ได้คือ เชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 35 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ซึ่งแยกได้จากดินปลูก 10 ชนิด ได้แก่ กัลยน้ำว่า ข้าวโพด คะน้า แตง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์ม น้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ จาก 15 จังหวัด (ตารางที่ 1) เชื้อรา *F. oxysporum* ที่เก็บรวบรวมได้ทั้ง 35 ไอโซเลท มีลักษณะสำคัญที่เหมือนกันดังนี้

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เชื้อราสร้างเส้นใยฟู ละเอียด สีขาว สีขาวแซมม่วง สีชมพูม่วง สีม่วงอ่อน จนถึงสีม่วงเข้ม เจริญอย่างรวดเร็ว สร้าง sporodochium สีส้มจำนวนมาก โคโลนีด้านใต้ผิวอาหารมีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม หรือน้ำเงินเข้ม และสร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน



ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA



ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA

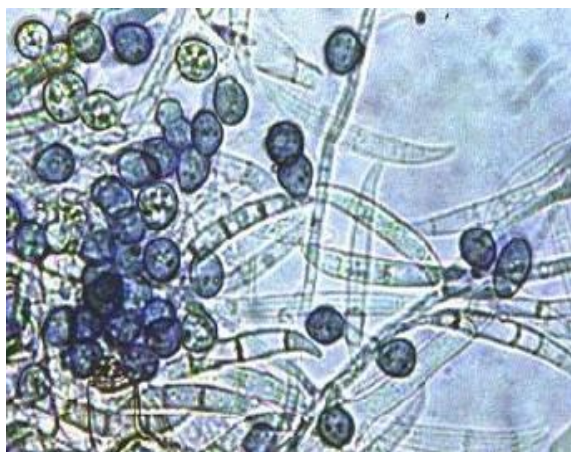
ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : เชื้อราสร้าง microconidium จำนวนมากเกาะเป็นกลุ่มแบบ false head บน monophialide ซึ่งเกิดจากด้านข้างของเส้นใย phialide รูปร่างคล้ายขวดหรือพินโบว์ลิ่ง ไม่มีสี มีขนาดสั้นกว่า phialide ของ *F. moniliforme* และ *F. solani* microconidia รูปไข่ ยาวรี สั้นป้อม จนถึงรูปทรงกระบอก ไม่มีสี มี 1-2 เซลล์ ส่วนใหญ่มี 1 เซลล์ macroconidia รูปร่างโค้งแบบ fusoid-subculate เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายเท้า (foot-shaped) เซลล์ที่ปลายเรียวแหลม หรือทู่มน ผนังบาง ไม่มีสี มี septum 3-5 ขนาด 24-26 x 3-4.5 ไมครอน เกิดบน conidiophore ที่แตกกิ่งก้านมากหรือเกิดบน sporodochium ที่มีลักษณะเป็นก้อน (tubercularia-like) เชื้อราชนิดนี้สร้าง chlamydospore รูปไข่ หรือทรงกลม ผนังเรียบหรือผนังขรุขระ เกิดที่บริเวณส่วนปลายเส้นใย (terminal) และส่วนกลางเส้นใย (intercalary) มักเกิดเดี่ยว แต่บางครั้งเกิดเป็นคู่ หรือเป็นลูกโซ่



ลักษณะ microconidia จำนวนมากเกาะเป็นกลุ่มแบบ false head บน monophialide



ลักษณะ macroconidia รูปร่างโค้งแบบ fusoid-subculate



chlamydospore รูปไข่ หรือทรงกลม

โดยปกติเชื้อราชนิดนี้ เป็นเชื้อราโรคพืชทำให้เกิดโรคเหี่ยว (vascular wilt) กับพืชหลายชนิด เป็นราที่มีพืชอาศัยกว้างมาก ทำความเสียหายกับพืชมากที่สุด และมีความสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะกับพืช โดยลักษณะของสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) ในพืชทดสอบต่อไป

ตารางที่ 1 เชื้อรา *F. oxysporum* (FO) จำนวน 35 ไอโซเลทที่เก็บรวบรวมได้จากดินปลูกพืชในประเทศไทย ระหว่างเดือนมกราคม 2555 – เดือนกันยายน 2556

ไอโซเลท	ดินจากพืช	สถานที่
FO1	ดินปลูกพริก	อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี
FO2	ดินปลูกมะเขือเทศ	อ.ฮอด จ.เชียงใหม่
FO3	ดินปลูกมะเขือเทศ	อ.ฮอด จ.เชียงใหม่
FO4	ดินป่า	อ.พบพระ จ.ตาก
FO5	ดินป่า	อ.แม่สอด จ.ตาก
FO6	ดินป่า	อ.แม่สอด จ.ตาก
FO7	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม
FO8	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
FO9	ดินปลูกแตง	อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี
FO10	ดินปลูกผักหวานบ้าน	อ.สว่างวีระวงศ์ จ.อุบลราชธานี

FO11	ดินปลูกเบญจมาศ	อ.แมริม จ.เชียงใหม่
FO12	ดินปลูกปาล์มน้ำมัน	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
FO13	ดินปลูกปาล์มน้ำมัน	อ.เวียงสระ จ.สุราษฎร์ธานี
FO14	ดินปลูกปาล์มน้ำมัน	อ.เมือง จ.ตรัง
FO15	ดินมะเขือเทศ	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
FO16	ดินเบญจมาศ	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
FO17	ดินปลูกผักหวานบ้าน	อ.สว่างวีระวงศ์ จ.อุบลราชธานี
FO18	ดินปลูกผักหวานบ้าน	อ.สว่างวีระวงศ์ จ.อุบลราชธานี
FO19	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.พพบพระ จ.ตาก
FO20	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.แม่สอด จ.ตาก
FO21	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.แม่สอด จ.ตาก
FO22	ดินปลูกเบญจมาศ	อ.แมริม จ.เชียงใหม่
FO23	ดินปลูกข้าวโพด	อ.แมริม จ.เชียงใหม่
FO24	ดินปลูกฝรั่ง	อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
FO25	ดินปลูกฝรั่ง	อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
FO26	ดินปลูกพริก	อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย
FO27	ดินปลูกพริก	อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย
FO28	ดินปลูกพริก	อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย
FO29	ดินปลูกมะเขือเทศ	อ.เมือง จ.บึงกาฬ

ตารางที่ 1 (ต่อ) เชื้อรา *F. oxysporum* (FO) จำนวน 35 ไอโซเลทที่เก็บรวบรวมได้จากดินปลูกพืชในประเทศไทย
ระหว่างเดือนมกราคม 2555 – เดือนกันยายน 2556

ไอโซเลท	ดินจากพืช	สถานที่
FO30	ดินปลูกมะเขือเทศ	อ.บึงคล้า จ.บึงกาฬ
FO31	ดินปลูกโหระพา	อ.นางรอง จ.บุรีรัมย์
FO32	ดินปลูกพริก	อ.เทพสถิต จ.ชัยภูมิ
FO33	ดินปลูกคะน้า	อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี
FO34	ดินป่า	อ.แมริม จ.เชียงใหม่

FO35	ดินป่า	อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี
------	--------	----------------------

2. การตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) และผลกระทบของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่แยกได้ต่อต้นมะเขือเทศ ตามวิธีการของ Da Silva และคณะ (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato

การตรวจสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยปลูกเชื้อรา *F.* ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) แยกได้จากดินปลูกพืชและดินตามป่าธรรมชาติ ได้แก่ กล้วยน้ำว่า ข้าวโพด คะน้าแดง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ บนต้นพืช จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว่า ข้าวโพด แตงกวา เบญจมาศ ปาล์มน้ำมัน พริก ผักหวานบ้าน และมะเขือเทศ ตรวจสอบการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ และการเกิดโรค พบว่า หลังจากย้ายต้นพืชลงปลูกเชื้อลงในกระถางดิน 35 วัน เชื้อรา *F. oxysporum* ส่วนใหญ่ทำให้กล้วยน้ำว่า ข้าวโพด แตงกวา เบญจมาศ ปาล์มน้ำมัน พริก ผักหวานบ้าน และมะเขือเทศ แสดงอาการใบล่างเริ่มเหี่ยว กลายเป็นสีเหลืองในวันต่อไป และหลังจากวันที่ 45 เป็นต้นไปใบที่เหลืองจะแห้ง พุ่มตัว ขณะเดียวกันใบด้านบนใบอื่น ๆ ก็เริ่มต้นอาการโรคในลักษณะเดียวกัน เมื่อผ่าดูด้านในต้นพืชที่เป็นโรค พบท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลดำ และร่วง ขณะที่ต้นพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* และต้นพืชที่ใช้ชิ้นวุ้น PDA แทนเชื้อรา มีการเจริญเป็นปกติ ไม่พบอาการเหี่ยวของใบหรือต้น และไม่พบอาการเน่าภายในท่อลำเลียงของพืช

มีเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ FO4, FO5, FO6, FO12, FO23, FO34 และ FO35 ที่ไม่ทำให้พืชทดสอบ 8 ชนิด เกิดอาการโรคเหี่ยวหรืออาการท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาล ซึ่งจะได้นำเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท รวมถึงไม่ได้ทำให้ต้นมะเขือเทศเกิดโรคเหี่ยว จึงนำไปทำการศึกษาต่อไป (ตารางที่ 2)

เมื่อนำเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) มาศึกษาผลที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ด้วยวิธี Dual culture technique บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28 °C พบว่า เชื้อราทั้ง 2 กลุ่มเจริญบนอาหาร PDA ได้ดี โดยเจริญคลุมกัน ไม่มีการแบ่งพื้นที่การยับยั้งการเจริญ จึงทำให้วิเคราะห์และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่มีต่อเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ไม่ได้

ตารางที่ 2 การตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ของ *F. oxysporum* บนพืชชนิดต่าง ๆ

	ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืช
--	------------------------------------

ไอโซเลท	หลังปลูกพืชในดินที่มีเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> เป็นเวลา 35 วัน ^{1/}							
	พริก	มะเขือเทศ	ปาล์ม	ผักหวานบ้าน	ข้าวโพด	แตงกวา	กล้วยน้ำว้า	เบญจมาศ
FO1	+	0	0	0	0	0	0	0
FO2	0	+	0	0	0	0	0	0
FO3	0	+	0	0	0	0	0	0
FO4	0	0	0	0	0	0	0	0
FO5	0	0	0	0	0	0	0	0
FO6	0	0	0	0	0	0	0	0
FO7	0	0	0	0	0	0	+	0
FO8	0	0	0	0	0	0	+	0
FO9	0	0	0	0	0	+	0	0
FO10	0	0	0	+	0	0	0	0
FO11	0	0	0	0	0	0	0	+
FO12	0	0	0	0	0	0	0	0
FO13	0	0	0	0	0	0	+	0
FO14	0	0	0	0	0	0	+	0
FO15		+	0	0	0	0	0	0
FO16	0	0	0	0	0	0	0	+
FO17	0	0	0	+	0	0	0	0
FO18	0	0	0	+	0	0	0	0
FO19	0	0	0	0	0	0	+	0
FO20	0	0	0	0	0	0	+	0
FO21	0	0	0	0	0	0	+	0
FO22	0	0	0	0	0	0	0	+
FO23	0	0	0	0	0	0	0	0
FO24	0	0	0	0	0	0	+	0
FO25	0	0	0	0	0	0	+	0
FO26	+	0	0	0	0	0	0	0

FO27	+	0	0	0	0	0	0	0
------	---	---	---	---	---	---	---	---

ตารางที่ 2 (ต่อ) การตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ของ *F. oxysporum* บนพืชชนิดต่าง ๆ

ไอโซเลท	ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืช หลังปลูกพืชในดินที่มีเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> เป็นเวลา 35 วัน ^{1/}							
	พริก	มะเขือเทศ	ปาล์ม	ผักหวานบ้าน	ข้าวโพด	แตงกวา	กล้วยน้ำว้า	เบญจมาศ
FO28	+	0	0	0	0	0	0	0
FO29	0	+	0	0	0	0	0	0
FO30	0	+	0	0	0	0	0	0
FO31	0	0	0	0	0	0	+	0
FO32	+	0	0	0	0	0	0	0
FO33		0	0	0	0	0	+	0
FO34	0	0	0	0	0	0	0	0
FO35	0	0	0	0	0	0	0	0
ไม่ปลูกเชื้อ	0	0	0	0	0	0	0	0
ใช้อาหาร PDB แทน เชื้อรา	0	0	0	0	0	0	0	0

^{1/} + = ต้นพืชแสดงอาการ โดยเมล็ดไม่งอก หรือต้นเหี่ยว

0 = ต้นพืชไม่แสดงอาการ โดยเมล็ดงอกปกติ หรือต้นไม่เหี่ยว

3. การทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในโรงเรือน ตามวิธีการของ Da Silva et al. (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato

หลังจากย้ายต้นพืชลงปลูกเชื้อลงในกระถางดิน 35 วัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ และการเกิดโรค พบว่า ต้นมะเขือเทศ ในกรรมวิธีที่ 1 -7 (ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F.*

oxysporum f. sp. *lycopersici* (FOL) + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) และกรรมวิธีที่ 8 (ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีการเจริญเติบโต ไม่ติดคล้ายกัน โดยอาการเหี่ยวของต้น เริ่มจากใบเหลืองตั้งแต่ใบล่าง แล้วทยอยเหลือง ตั้งแต่เดือนแรกที่ปลูกเชื้อ จนทั้งเหี่ยวทั้งต้นภายในเวลา 2 เดือน เมื่อผ่าดูเนื้อเยื่อภายในลำต้น พบว่า เนื้อเยื่อในท่อลำเลียงมีอาการเน่าเป็นสีน้ำตาลดำทุกต้น โดยต้นมะเขือเทศใน กรรมวิธีที่ 1 -7 และกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีระดับการเกิดโรคภายในต้น 3.35, 3.60, 3.55, 3.17, 3.33, 3.86, 3.20 และ 3.85 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเทียบระดับการเกิดโรคใน ต้นมะเขือเทศกรรมวิธีที่ 9 (ต้นมะเขือเทศ + ไม่คลุกดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่ คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) ซึ่งมีระดับ 1 เป็นระดับการเกิดโรคต่ำ อย่างมีความ แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 1 -8 ขณะที่การเจริญของต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ 9 มีการเจริญเติบโตดี มียอด แตกใบดี ไม่พบใบเหลืองหรือเหี่ยว (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) ที่มีต่อการเจริญของต้นมะเขือเทศ ที่ปลูกในดินที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ใน สภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	ระดับการเกิดโรคของต้นมะเขือเทศ ที่อายุ 35 วัน ^{1/}
1. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> FO4	3.35 b ^{2/}
2. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> FO5	3.60 b
3. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> FO6	3.55 b
4. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> FO12	3.17 b
5. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> FO23	3.33 b
6. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> FO34	3.86 b
7. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> FO35	3.20 b
8. ดินคลุกเชื้อรา FOL + ไม่คลุกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy)	3.85 b
9. ไม่คลุกดินคลุกเชื้อรา FOL + ไม่คลุกเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy)	1 a

CV (%)	5.7
--------	-----

^{1/} ค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดโรคจากจำนวน 20 ต้น

^{2/} ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแต่ละแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี

DMRT

จากผลการทดลองที่พบว่า กรรมวิธีที่ 1 -7 และกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีระดับการเกิดโรคภายในต้น 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคนี้อาจไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* หรือการทำให้เกิดโรคเหี่ยวบนต้นมะเขือเทศได้ อย่างไรก็ตาม หากได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินธรรมชาติหรือดินปลูกพืชให้มากขึ้น คาดว่าคงได้พบเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุของโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ในที่สุด

10. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การออกสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน จากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ ได้แก่ กล้วยน้ำว่า ข้าวโพด ค่ะน้า แดง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ นำตัวอย่างดินมาแยกเชื้อราด้วยวิธี soil dilution plate technique บนอาหาร PDA แล้วทำเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี single-spore technique บนอาหาร WA จากนั้นจำแนกชนิดเชื้อราที่พบ พบว่าเชื้อราที่ได้คือ เชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) ซึ่งแยกได้จากดินปลูก 10 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว่า ข้าวโพด ค่ะน้า แดง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ จาก 15 จังหวัด เชื้อรา *F. oxysporum* ที่เก็บรวบรวมได้ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) มีลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA และลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA ที่คล้ายกัน

การตรวจสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยปลูกเชื้อรา *F.* ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) แยกได้จากดินปลูกพืชและดินตามป่า บนต้นพืช จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว่า ข้าวโพด แดงกวาง เบญจมาศ ปาล์มน้ำมัน พริก ผักหวานบ้าน และมะเขือเทศ ตรวจสอบการเจริญเติบโตของพืช ทดสอบ และการเกิดโรค พบว่า หลังจากย้ายต้นพืชลงปลูกเชื้อลงในกระถางดิน 35 วัน เชื้อรา *F. oxysporum* ส่วนใหญ่ทำให้กล้วยน้ำว่า ข้าวโพด แดงกวาง เบญจมาศ ปาล์มน้ำมัน พริก ผักหวานบ้าน และมะเขือเทศ แสดงอาการใบล่างเริ่มเหี่ยว กลายเป็นสีเหลืองในวันต่อไป และหลังจากวันที่ 45 เป็นต้นไปใบที่เหลืองจะแห้ง พุ่มตัวขณะเดียวกันใบด้านบนใบอื่น ๆ ก็เริ่มต้นอาการโรคในลักษณะเดียวกัน เมื่อผ่าดูด้านในต้นพืชที่เป็นโรค พบท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลดำ และร่วง ขณะที่ต้นพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* และต้นพืชที่ใช้ชิ้นวัชพืชรื้อ PDA

แทนเชื้อรา มีการเจริญเป็นปกติ ไม่พบอาการเหี่ยวของใบหรือต้น และไม่พบอาการเน่าภายในท่อน้ำเลี้ยงของพืช มีเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ FO4, FO5, FO6, FO12, FO23, FO34 และ FO35 ที่ไม่ทำให้พืชทดสอบ 8 ชนิด เกิดอาการโรคเหี่ยวหรืออาการท่อน้ำเลี้ยงเน่าเป็นสีน้ำตาล

เมื่อนำเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) มาศึกษาผลที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ด้วยวิธี Dual culture technique บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28 °C พบว่า เชื้อราทั้ง 2 กลุ่มเจริญบนอาหาร PDA ได้ดี โดยเจริญคลุมกัน ไม่มีการแบ่งพื้นที่การยับยั้งการเจริญ จึงทำให้วิเคราะห์และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่มีต่อเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ไม่ได้

หลังจากย้ายต้นพืชปลูกเชื้อลงในกระถางดิน 35 วัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ และการเกิดโรค พบว่า ต้นมะเขือเทศ ในกรรมวิธีที่ 1 -7 (ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) และกรรมวิธีที่ 8 (ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีการเจริญเติบโต ไม่ติดคล้ายกัน โดยอาการเหี่ยวของต้นเริ่มจากใบเหลืองตั้งแต่ใบล่าง แล้วทยอยเหลือง ตั้งแต่เดือนแรกที่ปลูกเชื้อ จนทั้งเหี่ยวทั้งต้นภายในเวลา 2 เดือน เมื่อผ่าดูเนื้อเยื่อภายในลำต้น พบว่า เนื้อเยื่อในท่อน้ำเลี้ยงมีอาการเน่าเป็นสีน้ำตาลดำทุกต้น โดยต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ 1 -7 และกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีระดับการเกิดโรคภายในไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเทียบระดับการเกิดโรคในต้นมะเขือเทศกรรมวิธีที่ 9 (ต้นมะเขือเทศ + ไม่คลุกดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) ซึ่งมีระดับ 1 เป็นระดับการเกิดโรคต่ำ อย่างไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 1 -8 ขณะที่การเจริญของต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ 9 มีการเจริญเติบโตดี มียอดแตกใบดี ไม่พบใบเหลืองหรือเหี่ยว

จากผลการทดลองที่พบว่า กรรมวิธีที่ 1 -7 และกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีระดับการเกิดโรคภายในต้น 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* หรือการทำให้เกิดโรคเหี่ยวบนต้นมะเขือเทศได้ อย่างไรก็ตาม หากได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินธรรมชาติหรือดินปลูกพืชให้มากขึ้น คาดว่าคงได้พบเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุของโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ในที่สุด

11. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำข้อมูลเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และแหล่งที่มาของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* รวมถึงเทคนิคในการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ไปเผยแพร่ในวารสารของกรมวิชาการเกษตร และหนังสืองานวิชาการหรือการโปสเตอร์ วิชาการที่จัดโดยหน่วยงานอื่น ๆ และถ่ายทอดให้เกษตรกรผู้ประสบปัญหาโรคพืชเนื่องจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* นำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8

12. คำขอบคุณ (ถ้ามี) -

13. เอกสารอ้างอิง

- Benhamou, N., C. Garand, and A. Goulet. 2002. Ability of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strain Fo47 To Induce Resistance against *Pythium ultimum* Infection in Cucumber. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8): 4044-4060.
- Da Silva, J. C., and W. Bettiol. 2005. Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato. *Fitopatologia Brasileira* 30:409-412.
- Forsyth L. M., L. J. Smith, and E. A.B. Aitken. 2006. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing Fusarium wilt severity. [Mycological Research](http://www.sciencedirect.com/science) 110 (8): 929-935. <http://www.sciencedirect.com/science>
- Larkin, R. P. 1996. Suppression of Fusarium Wilt of Watermelon by Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and Other Microorganisms Recovered from a Disease-Suppressive Soil. *Phytopathology* 86:812-819.
- Nel, B., C. Steinberg, N. Labuschagne, and A. Viljoen. 2006. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. *Plant Pathology* 55 (2) : 217-223.