การคัดเลือกเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดผักตระกูลกะหล่ำ เพื่อนำมาใช้ในการควบคุม *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคที่แพร่โดยทางเมล็ดพันธุ์

(Selection of fungi associated with cruciferae seeds for control *Alternaria brassicicola* pathogenic seedborne fungi)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้างานวิจัย : รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์

ผู้ร่วมงานวิจัย : นางสาว อนงค์นาถ แต่เชื้อสาย

รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ตามโครงการที่ 3060-3360 งบประมาณปี 2546

เสนอต่อ

มูลนิธิโครงการหลวง

กุมภาพันธ์ 2547

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลการทดลอง	17
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	49

โครงการหลวง

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี ตรวจสอบโดยวิธีการเพาะบนกระดาษชื้น	18
2	ลักษณะที่พบจากการเพาะเมล็ดกะหล่ำปลีบนอาหาร WA ทั้งที่ฆ่าเชื้อและไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิว	28
3	ความงอกของต้นกล้ากะหล่ำปลี 3 พันธุ์ เปรียบเทียบระหว่างเมล็ดที่ไม่ปลูกเชื้อและเมล็ดที่ปลูกเชื้อด้วย *Alternaria brassicicola*	29
4	เปรียบเทียบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดกะหล่ำปลี ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* อายุ 14 วัน บนอาหาร PDA โดยวิธี Dual culture	31
5	ประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่ความเข้มข้น 3 ระดับ	34
6	เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเมล็ดกะหล่ำปลีของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และความงอกของเมล็ดกะหล่ำปลีในกรรมวิธีต่างๆ ทดสอบโดยวิธีการเพาะบนกระดาษชื้น	38
7	เปอร์เซ็นต์ความงอกโผล่พ้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาว shoot น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้ากะหล่ำปลีในกรรมวิธีต่างๆ ทดสอบโดยวิธีเพาะในดินฆ่าเชื้อ	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะอาการของโรคใบจุดกะหล่ำปลี สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*	4
2	ลักษณะ conidiophore และ conidia ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*	5
3	การวางเชื้อราทดสอบ และรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยวิธี Dual culture	12
4	ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เจริญบนใบและลำต้นของต้นกล้ากะหล่ำปลี โดยการเพาะบนกระดาษชื้น	19
5	ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เจริญบนเมล็ดกะหล่ำปลี	20
6	ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า	20
7	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* บนอาหาร PDA	24
8	แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เจริญร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ 15 ชนิด ทดสอบโดยวิธี Dual culture	32
9	ขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ความเข้มข้น 3 ระดับ	35
10	การเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* อายุ 14 วัน บนอาหาร PDA ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Daconil (A), Dithane M – 45 (B) และ Rovral (C) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ	36
11	แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเมล็ดกะหล่ำปลีของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และความงอกของเมล็ดกะหล่ำปลีในกรรมวิธีต่างๆ ทดสอบโดยวิธีการเพาะบนกระดาษชื้น	39
12	แผนภูมิแสดงความงอกโผล่พ้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาว shoot น้ำหนักสด และน้ำหนัก แห้งของต้นกล้ากะหล่ำปลีในกรรมวิธีต่างๆ ทดสอบโดยวิธีเพาะในดินฆ่าเชื้อ	42

Abstract

Detection of seedborne fungi in 3 cultivars cabbage seed samples was conducted by using Blotting Method. Fourteen fungal isolates were found and identified; *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* spp., *Phoma* sp., *Trichoderma harzianum*., *T. viride* and *Rhizopus* sp. Seedborne *A. brassicicola* decreased seed germination, increased abnormal seedling and damaged both young shoot and leaves of seedling.

All 13 isolates were tested *in vitro* on efficacy of being antagonist, to inhabit growth of *A. brassicicola*, using Dual Culture Technique. It was found that only isolate of *Trichoderma harzianum* gave the highest percentage of growth inhibition (73.96%).

Comparison on effectiveness of *T. harzianum* with biofungicide (Pretomium) and fungicide (Rovral®) in controlling seedborne *A. brassicicola* of cabbage seeds by seed dressing. It was found that *T. harzianum* gave the same results as Pretomium and Rovral® in reducing incidence of disease and enhancing the percentage of seed germination, shoot length, fresh and dry weight of seedling when compared with control.

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี 3 พันธุ์ โดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น พบเชื้อรา 14 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* spp., *Phoma* sp., *Trichoderma harzianum*., *T. viride*. และ *Rhizopus* sp. โดยพบว่าเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ติดมากับเมล็ดทำให้ความงอกของเมล็ดลดลง เมื่อเจริญคลุมทั้งเมล็ดทำให้เมล็ดไม่งอก ต้นอ่อนที่งอกมีอาการผิดปกติ เชื้อราเข้าทำลายทั้งส่วนของลำต้นอ่อนและใบ เมื่อนำเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดกะหล่ำปลีไปทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ *A. brassicicola* โดยวิธี Dual culture พบว่า *Trichoderma harzianum* ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด คือ 73.96%

ผลการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* สารชีวภัณฑ์ (Pretomium) และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (Rovral®) คลุกเมล็ดในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *A. brassicicola* บนเมล็ดกะหล่ำปลี เมื่อนำเมล็ดไปปลูกพบว่าทั้งเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum*, สารชีวภัณฑ์ (Pretomium) และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา (Rovral®) สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอก ลดการเกิดโรค ช่วยเพิ่มต้นกล้าปกติ ความยาวลำต้น น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้ากะหล่ำปลีได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

คำนำ

พืชตระกูลกะหล่ำจัดอยู่ใน Family Brassicaceae เป็นพืชที่ชอบอากาศเย็นจึงสามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอากาศหนาวหรือตามเทือกเขาสูง พืชในกลุ่มนี้มีหลายชนิดที่สำคัญได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดาว กะหล่ำปม และบล๊อคโคลี่ โดยมีผู้นิยมนำไปใช้บริโภคทั้งในรูปของผักสดและผักแปรรูป และในแต่ละปีมีการผลิตออกมาจำหน่ายเป็นจำนวนมาก พืชเหล่านี้ต้องใช้เมล็ดในการเพาะปลูก และเมล็ดพันธุ์ของพืชแต่ละชนิดมีราคาแพงมาก ดังนั้นถ้าได้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพต่ำ การเพาะปลูกพืชตระกูลนี้อาจได้ผลไม่มากนัก เชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากเมล็ดเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อโรคและจุลินทรีย์หลายชนิด แต่เชื้อรามีส่วนเกี่ยวข้องมากที่สุด และเมื่อนำเมล็ดไปเพาะปลูก เชื้อราสาเหตุโรคที่ติดมามักเข้าทำลายเมล็ดทำให้เมล็ดสูญเสียความงอก งอกขึ้นมาแล้วตายหรือต้นกล้าไม่แข็งแรง เกิดโรคกับต้นกล้าซึ่งจะเป็นแหล่งแพร่ระบาดและแพร่กระจายโรคต่างๆ ออกไปในแปลงเพาะกล้าหรือแปลงปลูก สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคที่มีรายงานเกี่ยวกับการทำลายความงอกและแพร่ระบาดทางเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลนี้ได้แก่ *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *Ascochyta oleracea*, *Botrytis cinera*, *Erysiphae* sp., *Fusarium* spp., *Mycosphaerella brassicicola*, *Phoma lingam*, *Perenospora parasitica*, *Plasmodiophora brassicae*, *Pseudocercosporella capsellae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium sclerotiorum* และ *Verticillium alboatrum* (คาราและคณะ 2521; Richardson, 1979; Neergaard, 1979) แต่ชนิดของเชื้อราเหล่านี้จะพบในเมล็ดพืชตระกูลกะหล่ำในแต่ละพื้นที่ แต่ละฤดูกาลและแต่ละพันธุ์แตกต่างกันไป และจากการที่ผู้เขียนได้ทำการศึกษาเรื่องระบาดวิทยาและการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคผักบางชนิดที่แพร่โดยทางเมล็ดพันธุ์ พบว่าในเมล็ดพืชตระกูลกะหล่ำที่ได้เมล็ดพันธุ์มาจากมูลนิธิโครงการหลวงมีเชื้อรา *Alternaria* spp. ติดไปกับเมล็ดทุกพันธุ์โดยเฉพาะ *A. brassicicola* ในกะหล่ำปลียอดดอยพันธุ์ New Jersey (Tokita) C.M. ซึ่งมีเชื้อรานี้ติดไป 15% และพบว่าเมล็ดส่วนใหญ่ที่มีเชื้อรานี้อยู่จะไม่งอกหรืองอกขึ้นมาแล้วตาย ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เมล็ดพันธุ์ที่ใช้เพาะปลูกมีคุณภาพต่ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อรา *A. brassicicola* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญซึ่งทำให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ในประเทศอังกฤษ (Moore, 1994; อ้างโดย สมพร, 2541) ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อรานี้สามารถติดไปกับพืชตระกูลกะหล่ำได้ถึง 40% โดยเมล็ดกะหล่ำปลีมีเชื้อราปนเปื้อนสูงถึง 50% ในประเทศไทยเคยมีรายงานจากฝ่ายกักกันพืชว่าเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีที่นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่นมีเชื้อรานี้ติดปนเปื้อนมาสูงถึง 90% ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความงอกของเมล็ดลดลงและต้นอ่อนไม่เจริญเติบโต (อรพรรณและจุมพล, 2531)

การป้องกันกำจัดเชื้อราต่างๆที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์อาจทำได้หลายวิธี เช่น การใช้รังสี การแช่น้ำร้อน รวมทั้งการคลุกหรือแช่เมล็ดพันธุ์ในสารเคมี แม้ว่าการใช้สารเคมีจะเป็นที่นิยมทั่วไป

เนื่องจากใช้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง รวมทั้งใช้ได้ง่ายกับเมล็ดพันธุ์ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีกับเมล็ดพันธุ์ก็มีข้อจำกัดหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับผู้ใช้และสภาพแวดล้อมทั่วไป ปัจจุบันจึงได้มีการนำวิธีการอื่นๆ เข้ามาใช้เพื่อทดแทน อาทิ การควบคุมเชื้อโรคโดยชีววิธีด้วยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิดคลุกเมล็ดก่อนปลูก และประสบผลสำเร็จในการช่วยลดการเกิดโรคกับเมล็ดและต้นกล้าในพืชหลายชนิด เช่น ในข้าว (Savathivel and Gnanamanickum, 1987; Mew and Rosales, 1986; นิลินีและคณะ, 2535) และถั่วเหลือง (Yeh and Sinclair, 1980; Mannandher *et al.*, 1987) แหล่งที่ได้มาของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ควบคุมโรคพืชส่วนใหญ่แยกมาจากดิน (Chang and Kommedahl, 1968; Baker and Cook, 1974) มีรายงานน้อยมากที่มีการศึกษาหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับเมล็ด เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในเมล็ด การวิจัยครั้งนี้จะเป็นการแยกเชื้อราต่างๆ จากเมล็ดพืชผักตระกูลกะหล่ำ เพื่อนำมาคัดเลือกความเป็นไปได้ในการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคและโรคที่ติดมากับเมล็ดและการถ่ายทอดสู่ต้นกล้า ตลอดจนผลกระทบต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า ซึ่งสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีทดแทนการใช้สารเคมี

การตรวจเอกสาร

กะหล่ำปลี (cabbage) เป็นพืชในตระกูลกะหล่ำ (crucifers) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica oleracea* var. *capitata* L. เป็นพืชผักที่มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจของประเทศไทยชนิดหนึ่ง ที่ส่งจำหน่ายต่างประเทศทั้งในรูปผักสดและผักแปรรูป ความสำคัญทางคุณค่าอาหารคือ ให้วิตามินซีและวิตามินเอสูง นอกจากนั้นยังมีธาตุอาหารที่สำคัญอีกหลายอย่าง เช่น โปรตีน แคลเซียม โปแตสเซียม และฟอสฟอรัส พื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดในปีเพาะปลูก 2533/34 รวมทั้งประเทศจำนวน 58,115 ไร่ แหล่งปลูกที่สำคัญคือ ภาคเหนือ ปลูกมากที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และเพชรบูรณ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือปลูกมากที่จังหวัด มหาสารคาม ขอนแก่น ชัยภูมิ นครพนม อุดรธานี และสกลนคร ภาคตะวันตก ปลูกมากที่จังหวัด เพชรบูรณ์ นครปฐม ประจวบคีรีขันธ์ และราชบุรี ในประเทศไทยในระยะแรกๆ ที่มีการนำกะหล่ำปลีเข้ามาปลูก พบว่าสามารถปลูกได้ผลดีในช่วงฤดูหนาวของภาคเหนือและภาคอีสาน ต่อมาได้มีการพัฒนาพันธุ์จนทำให้มีกะหล่ำปลีทนร้อนเหมาะกับสภาพดินฟ้าอากาศของประเทศไทย ปัจจุบันจึงสามารถปลูกกะหล่ำปลีได้ทุกฤดู (ไฉน, 2540)

โรคที่สำคัญของกะหล่ำปลีและเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด

ในการปลูกกะหล่ำปลีเพื่อการค้ามักพบปัญหาที่สำคัญมากคือ โรคและแมลงต่างๆ โดยทำให้เกิดการสูญเสียของผลผลิตคือ ทำให้ผลผลิตลดลงหรือไม่มีคุณภาพ และส่งผลกระทบทำให้เกษตรกรมีรายได้ลดลงอีกด้วย โรคสำคัญของกะหล่ำปลีมีหลายโรคที่พบในประเทศไทย ได้แก่ โรคใบจุด (*Alternaria brassicicola*), โรคเหี่ยว (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*), โรคแอนแทรกโนส (*Gloeosporium concentricum*), โรคแข้งดำ (*Phoma lingam*), โรคราน้ำค้าง (*Peronospora parasitica*), โรคโคนเน่า (*Pythium* sp.), โรคแคงเคอร์ (*Pythium* sp.), โรคเน่าเละ (*Erwinia carotovora*), โรคเน่าดำ (*Xanthomonas campestris*) และโรครากปม (*Meloidogyne* sp.) (มณีฉัตร, 2543) โรคที่สำคัญมากโรคหนึ่งของกะหล่ำปลี ซึ่งมักพบในแหล่งที่ปลูก คือ โรคใบจุดออลเทอนาเรีย (Alternaria leaf spot) ซึ่งเกิดจากเชื้อราสาเหตุคือ *Alternaria brassicicola* (Schw.) Witshire. เชื้อรานี้ก่อให้เกิดโรคกับพืชผักตระกูลกะหล่ำแทบทุกชนิด ได้แก่ กะหล่ำดอก กะหล่ำดาว กะหล่ำปม กะหล่ำปลี คะน้า บรอคโคลี่ ผักกาดกวางตุ้ง ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวปลี ผักกาดหัวและแรดิช โดยเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วนและทุกระยะการเจริญเติบโตและเป็นโรคสำคัญที่เป็นอุปสรรคต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ (สกุลศักดิ์, 2540)

สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคที่มีรายงานเกี่ยวกับการทำลายความงอกและแพร่ระบาดทางเมล็ดพันธุ์ของพืชตระกูลนี้ได้แก่ *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola*, *Ascochyta oleracea*, *Botrytis cinera*, *Erysiphae* sp., *Fusarium* spp., *Mycosphaerella brassicicola*, *Phoma lingam*, *Perenospora parasitica*, *Plasmodiophora brassicae*, *Pseudocercosporella capsellae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium sclerotiorum* และ *Verticillium alboatrum* (ดาราและคณะ 2521; Richardson, 1979; Neergaard, 1979) แต่ชนิดของเชื้อราเหล่านี้จะพบในเมล็ดพืชตระกูลกะหล่ำในแต่ละพื้นที่ แต่ละฤดูกาลและแต่ละพันธุ์แตกต่างกันไป

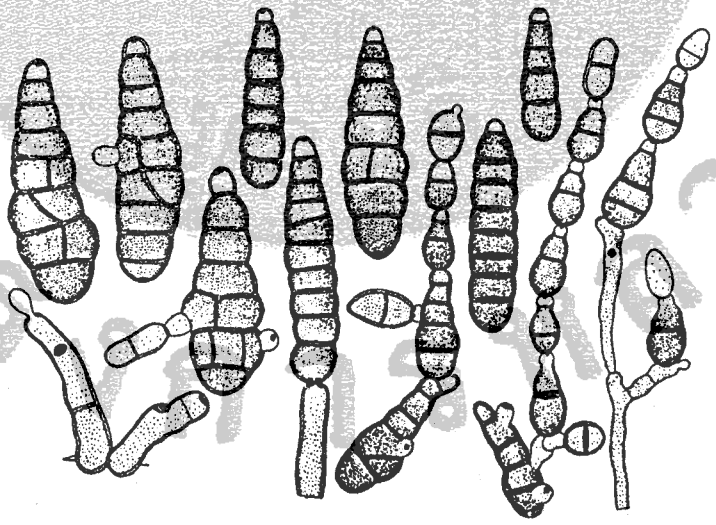
โรคใบจุดออลเทอนาเรีย สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

ลักษณะอาการของโรคใบจุดออลเทอนาเรียที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* โดยเชื้อราสามารถเข้าทำลายต้นกล้าทันทีที่งอกจากเมล็ด โดยปรากฏอาการจุดขนาดเล็กสีดำบนลำต้นบนลำต้นคล้ายกับโรคโคนเน่าระดับดิน (damping-off) ของต้นกล้า ทำให้ต้นกล้าเกิดอาการโคนเน่าหรือทำให้ต้นกล้าแคระแกร็น ชะงักการเจริญเติบโต เมื่อย้ายต้นกล้าที่เป็นโรคลงแปลงปลูกจะไม่เจริญเติบโตเหมือนต้นปกติทั่วไป อาการที่ใบจะเริ่มจากใบแก่ซึ่งอยู่ด้านล่างก่อน โดยปรากฏเป็นจุดแผลเนื้อเยื่อตายขนาดเล็กจนถึงขนาดแผลประมาณ 5 - 7.5 ซม. และมีสีเหลืองล้อมรอบแผล บริเวณแผลจะปรากฏกลุ่มโคโลนีสีเข้ม เรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้น (concentric circle) (สกุลศักดิ์, 2540) เมื่ออาการรุนแรงเนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลจะบางคล้ายกระดาษ แผลสามารถขยายขนาดลามติดกันได้ ทำให้มีขนาดไม่สม่ำเสมอ (Dixon, 1981) ดังแสดงในภาพที่ 1

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคใบจุดกะหล่ำปลี สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brasicicola*

ลักษณะของเชื้อราสาเหตุของโรค (*Alternaria brassicicola*)

การเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) คือ โคโลนีมีสีเขียวมะกอกอมเทา (greyish olive) ถึงสีน้ำตาลดำ มีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ เมื่อเชื้อราอายุได้ 5 วัน โคโลนีจะเป็นสีเขียวมะกอกอ่อน เมื่ออายุได้ 7 วัน โคโลนีจะกลายเป็นสีดำอมเขียวมะกอก (พัฒนา และคณะ, 2526) เส้นใยของเชื้อราแตกแขนงมีผนังกั้น ตอนแรกมีสีใส ต่อมาเป็นสีน้ำตาลหรือเขียวมะกอกอมเทา สร้างก้านชูสปอร์ (conidiophore) สีน้ำตาลอ่อน มักเกิดเดี่ยวๆ หรืออาจเกิดเป็นกลุ่ม 2-12 ก้านหรือมากกว่า มีลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย รูปร่างเป็นทรงกระบอกที่ปลายมีลักษณะพองออกเล็กน้อย มีผนังกั้นตามขวาง ขนาดกว้าง 5 -18 ไมครอน ยาว 50-20 ไมครอน หรืออาจมีความยาวถึง 70 ไมครอน สร้าง conidia ต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวมาก บางครั้งลูกโซ่แตกแขนงด้วย conidia มีรูปร่างทรงกระบอกหรือกระบองหัวกลับ มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ขนาดของ conidia กว้าง 8-30 ไมครอน ยาว 18-130 ไมครอน มีผนังกั้นตามขวาง (transverse septa) 1-11 อัน แต่ส่วนใหญ่จะพบน้อยกว่า 6 อัน มักไม่ค่อยพบผนังตามยาว (longitudinal septa) มีจงอย (beak) ยาวประมาณ 1 ใน 6 เท่าของความยาว conidia (Holliday, 1980; Dixon, 1981) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะของ conidiophore และ conidia ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

สภาวะที่เหมาะสมต่อการงอก การสร้างสปอร์ และการแพร่ระบาดของเชื้อราสาเหตุ

Humperson-Jones and Phelps (1989) ได้รายงานการศึกษาว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* คือ อุณหภูมิตั้งแต่ 8-30°C และเกิด mature spores หลังจากนั้น 43 และ 14 ชั่วโมง ตามลำดับ อุณหภูมิสูงสุดในการสร้างสปอร์อยู่ระหว่าง 18-30°C ค่าเฉลี่ยของช่วงเวลาการสร้างสปอร์คือ 13 ชั่วโมง และความชื้นจากน้ำฝน น้ำค้าง หรือความชื้นสูงจำเป็นมากสำหรับการเข้าทำลายของเชื้อรา นอกจากนั้น Degenhardt และคณะ (1982) รายงานว่าสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถงอกได้ดีที่อุณหภูมิสูงตั้งแต่ 7 - 31°C และสปอร์ของเชื้อราจะงอกได้ 98% เมื่อ incubate สปอร์ไว้ที่อุณหภูมิ 15°C นาน 10 ชั่วโมงและที่ 31°C นาน 3 ชั่วโมง Bassey and Gabrielson (1983) รายงานว่าแผลบนพืชที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายอาการของโรคจะพัฒนาอย่างรวดเร็วที่อุณภูมิ 25°C ในขณะที่ต้นกล้าที่เกิดจากเมล็ดที่ถูก infect อาการจะพัฒนาอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 30°C

กลไกการเข้าทำลายของเชื้อรา

เชื้อราเข้าสู่พืชผ่านทางปากใบ และผ่านทางเคลือบผิวโดยตรง เส้นใยเชื้อราแตกแขนงเป็นจำนวนมาก โดยเจริญอยู่ระหว่างเซลล์พืช เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะให้กำเนิด conidia รุ่นใหม่เพื่อขยายพันธุ์และเข้าทำลายพืชต่อไป ซึ่งการให้กำเนิด conidia ถูกกระตุ้นโดยแสงอัลตร้าไวโอเลต เชื้อจะเจริญเติบโตและให้กำเนิด conidia ได้ดีที่สุดในที่มีแสงสลับมืด แต่จะไม่ให้กำเนิดหากได้รับแสงอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา อุณหภูมิที่เจริญได้ดีที่สุดของเชื้อรา *A. brassicicola* คือ 25-27°C (สกุลศักดิ์, 2540)

เชื้อสาเหตุของโรคนี้มีชีวิตอยู่ข้ามฤดูในลักษณะเส้นใย เจริญอยู่ในเศษซากพืชที่เป็นโรคหรืออาศัยจำพวกวัชพืชตระกูลที่ใกล้เคียงกันและติดไปกับเมล็ดพันธุ์โดย conidia ติดไปกับส่วนผิวภายนอกเมล็ดหรือเส้นใยเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อเมล็ด ซึ่งในกรณีหลังเชื้ออาจเข้าทำลายเอ็มบริโอ เชื้อที่ติดไปกับเมล็ดจะมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน (สกุลศักดิ์, 2540) สปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ติดไปกับเมล็ดสามารถอยู่รอดได้นานถึง 2 ปี เมื่อเก็บเมล็ดไว้ที่อุณหภูมิ 10°C ความชื้นสัมพัทธ์ 50% ส่วนเส้นใยที่เจริญอยู่ภายในเนื้อเยื่อเมล็ดสามารถอยู่ได้นานถึง 12 ปี (Maude and Humpherson-Jones, 1980) ส่วนสปอร์ที่ติดอยู่กับเศษซากพืชสามารถอยู่ได้นาน 12 สัปดาห์ (Humpherson-Jones, 1989) นอกจากนี้เชื้อรา *A. brassicicola* ยังสามารถอยู่รอดได้ในรูปของ microsclerotia และ chlamydospores ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากใบพืชถูกเชื้อเข้าทำลาย (Tripathi and Kaushik, 1984) microsclerotia และ chlamydospores ของเชื้อรานี้สามารถอาศัยอยู่ภายใน conidial cell ได้ซึ่งทั้ง microsclerotia และ chlamydospores จะพัฒนาได้ดีที่อุณภูมิต่ำคือ 3°C

และต้านทานต่ออุณหภูมิเยือกแข็ง (freezing) นอกจากนั้น chlamydospores ยังสามารถพัฒนาจากเซลล์ของ conidia ที่งอกอยู่บนดินทั่วไปได้ที่อุณหภูมิห้อง (Tsuneda and Skoropad, 1977)

การป้องกันกำจัดโรคใบจุดกะหล่ำปลีสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

สำหรับการป้องกันกำจัดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* มีหลายวิธี ได้แก่ การกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยการแช่เมล็ดพันธุ์ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 - 25 นาที การปลูกพืชหมุนเวียน การทำลายวัชพืชในแปลงปลูก การทำลายตอซังและเศษซากพืชภายหลังการเก็บเกี่ยวทันที หลีกเลี่ยงการให้น้ำชลประทานระบบสปริงเกอร์ในพื้นที่ที่มีการเกิดโรค การใช้สารเคมีฉีดพ่นและคลุกเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกและการป้องกันกำจัด โดยชีววิธีโดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ ได้แก่ *Aureobasidium pullulans* และ *Epicoccum nigrum* ซึ่งเป็นปรสิตของเชื้อรา *A. brassicicola* (สกุลศักดิ์, 2540)

การควบคุมโรคพืชโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เป็นวิธีการนำจุลินทรีย์มาใช้เพื่อป้องกันกำจัดโรคพืช ซึ่งเป็นผลจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติซึ่งตามปกติจะมีการควบคุมปริมาณของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ด้วยกันเองอยู่แล้ว การศึกษาและค้นคว้ามีเพิ่มขึ้นเมื่อผลของสารเคมีที่ใช้ในปัจจุบันเพื่อการป้องกันกำจัดโรคพืช ทำให้เกิดมีผลตกค้างเป็นพิษต่อสภาพแวดล้อม ตลอดจนเชื้อโรคพืชเองสามารถปรับตัวต่อต้านหรือดื้อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช กลุ่มของเชื้อราที่นำมาศึกษาเพื่อการป้องกันกำจัดนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อราในดิน และโดยเฉพาะกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็น saprophytic behavior คือ สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้โดยอาศัยเศษซากสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้วเป็นอาหาร ตัวอย่างเช่น ใน genera *Trichoderma*, *Pennicillium*, *Chaetomium*, *Actinomyces* เป็นต้น คุณลักษณะของเชื้อราที่นิยมนำมาทดลองใช้ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมีคุณสมบัติของการสร้างสารพิษ เช่น toxic หรือ enzyme ซึ่งสามารถฆ่าทำลายเชื้อราอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราสาเหตุโรคพืช นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติในการเป็นปรสิต (parasite) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจ

ตัวอย่างของเชื้อราที่มีผู้นิยมใช้กันมากเพื่อศึกษาและเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น ใน genus *Trichoderma* ซึ่งประกอบด้วยสปีชีส์ต่างๆ เช่น *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum* เป็นต้น เชื้อราในตระกูลนี้มีคุณสมบัติครบถ้วนในการเป็นปฏิปักษ์ที่ดีกล่าวคือ สามารถสร้าง toxin, enzyme และเป็นปรสิตโดยตรงแล้วแต่สปีชีส์ ในต่างประเทศเชื้อรา *Trichoderma* ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยมีการนำเชื้อราดังกล่าวมาใช้ในรูปแบบต่างๆ เช่น การคลุกดินก่อนปลูก การคลุกเมล็ด รวมทั้งการใส่หลังปลูก ซึ่งเชื้อปฏิปักษ์สามารถแยกได้จากดินเพาะ

ปลูกโดยทั่วไป ดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ดินบริเวณผิวรากพืช (rhizoplain) หรือจากตัวอย่างพืชปกติและพืชที่เป็นโรค (ศิริ และรัศมี, 2539)

มีรายงานการใช้เชื้อราปฏิปักษ์มาควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราต่างๆ อย่างได้ผล โดย เกษม (2533) ได้นำเชื้อรา *Chaetomium cochliodes* และ *C. cuniculorum* คลุกเมล็ดข้าวก่อนปลูก เพื่อทำการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* พบว่าเชื้อรา *C. cochliodes* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้ที่เกิดในระยะกล้าของข้าวสายพันธุ์ IR 442 –2-58 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้ได้ดี และเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่ได้คลุกเมล็ดด้วย *C. cochliodes* ส่วน *C. cuniculorum* ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบไหม้

Howell (1991) ได้นำเชื้อรา *Gliocladium virens* มาเคลือบเมล็ดฝ้ายก่อนนำไปปลูก พบว่าสามารถช่วยลดอาการเน่าคอดินของต้นฝ้ายได้ และ Sivapalan (1993) ได้ทำการศึกษาผลของเชื้อราปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดและบริเวณ rhizophere ของรากบล็อคโคลี่จำนวน 10 ชนิด พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Gloiocladium roseum* และ *Trichoderma harzianum* มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลด germination ของสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ส่วน *Cladosporium cladosporioides* มีประสิทธิภาพต่ำที่สุด นอกจากนั้นยังได้ศึกษาผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการติดเชื้อของเมล็ดและการงอกของต้นกล้า พบว่าเมล็ดที่ปลูกเชื้อด้วย *A. brassicicola* และ treat ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ทุกกรรมวิธี พบว่าทำให้เมล็ดงอกได้ดีกว่าและถูกเข้าทำลายต่ำกว่าชุดควบคุม โดยพบว่า *G. roseu* และ *T. harzianum* มีประสิทธิภาพดีที่สุด ส่วน *C. cladosporioides* มีประสิทธิภาพต่ำที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี

เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีที่ใช้ในการทดลองมี 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ No. 1 ตราลูกโลก, พันธุ์ New Jersey (Tokita) C. M. และพันธุ์ Ruby Perfection T. K. ซึ่งได้จากมูลนิธิโครงการหลวง โดยนำเมล็ดพันธุ์มาตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) และเพาะบนอาหารวุ้น (Agar method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1996) เพื่อตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด

1.1 การเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น

สุ่มเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีแต่ละพันธุ์ไปเพาะบนกระดาษชื้น โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จำนวน 1 แผ่น วางบนกระดาษฟางขนาดเท่ากัน จำนวน 3 แผ่น นำไปจุ่มน้ำกลั่นให้ชุ่ม แล้ววางบนจานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) วางเมล็ดในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ จำนวน 20 เมล็ด/ 1 จานเลี้ยงเชื้อ โดยวางเมล็ดทั้งหมด 400 เมล็ด นำเมล็ดที่เพาะบนกระดาษชื้นไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้แสง NUV (Near Ultra Violet) สลับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 7 วัน ให้ความชื้นภายในจานทดลองโดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อลงไปที่กระดาษกรอง จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญอยู่บนผิวเมล็ดและต้นกล้าที่งอกออกมาจากเมล็ดภายใต้กล้อง stereomicroscope ตรวจผลเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดกะหล่ำปลีแต่ละพันธุ์

1.2 การเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้น

สุ่มเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีแต่ละพันธุ์ไปทำการเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) โดยนำเมล็ดกะหล่ำปลีมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เมล็ดใน Clorox 0.1% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อจากนั้นซับเมล็ดให้แห้งบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ forcep ลนไฟคีบเมล็ดวางลงบนจานเพาะเชื้อโดยวาง 20 เมล็ดต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้แสง Fluorescent สลับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 10 วัน จากนั้นนำมาจำแนกชนิดของเชื้อราจากลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เจริญออกมาจากเมล็ด หรือลักษณะของเส้นใย โครงสร้างพิเศษหรือสปอร์ของเชื้อราภายใต้กล้อง compound microscope แล้วทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์เป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

นำเมล็ดกะหล่ำปลีพันธุ์ New Jersey ซึ่งเป็นพันธุ์ที่พบว่ามีเชื้อรา *A. brassicicola* ติดมากับเมล็ดมากที่สุดทั้งที่ฆ่าเชื้อที่ผิวและไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิว ใช้ forcep ลนไฟคีบเมล็ดวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% WA (Water Agar) โดยวางเมล็ดในจานอาหารจานละ 20 เมล็ด วางทั้งหมด 20 จาน (กรรมวิธีละ 400 เมล็ด) จากนั้นนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้แสง Fluorescent สลับมืดช่วงละ 12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 10 วัน จากนั้นหาเปอร์เซ็นต์ความงอกและสังเกตลักษณะอาการที่เกิดขึ้นกับต้นอ่อน

3. ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุต่อความงอกของต้นกล้ากะหล่ำปลี (Germination Test)

สุ่มเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ No.1 พันธุ์ New jersey และพันธุ์ Ruby perfection พันธุ์ละ 600 เมล็ด ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสารละลาย Clorox 0.1% เป็นเวลานาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ชุด ๆ ละ 300 เมล็ด ชุดแรกปลูกเชื้อโดยแช่เมล็ดด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุความเข้มข้นสปอร์ $10^6 - 10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร นาน 1 ชั่วโมง ส่วนเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีชุดที่สองอีกพันธุ์ละ 300 เมล็ด ใช้เป็นชุดควบคุม โดยแช่เมล็ดในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อนาน 1 ชั่วโมงเช่นกัน เมื่อครบตามกำหนดเวลา นำเมล็ดผึ่งบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อโดยทิ้งนาน 1 ชั่วโมงในตู้ปลอดเชื้อ นำเมล็ดที่ได้ไปทดสอบโดยวิธี Standard Germination Test แบบ Between paper method ตามวิธีการของ ISTA (1979) จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน ตรวจนับจำนวนต้นที่งอก ต้นกล้าปกติและต้นกล้าผิดปกติหรือแสดงอาการของโรคจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุ

4. การคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดกะหล่ำปลีในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุด

4.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยวิธี Dual culture

นำเชื้อรา *A. brassicicola* และเชื้อราปฏิปักษ์จาก stock culture แต่ละชนิดมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA จากนั้นจึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบนอกของโคโลนีของเชื้อรา *A. brassicicola* แล้วนำไปวางลงในจานอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบของจานอาหาร 2 เซนติเมตร จากนั้นจึงวางเชื้อราปฏิปักษ์ลงไปอีกด้านหนึ่งของจานอาหาร ให้ห่างจากขอบของจานอาหาร 2 เซนติเมตร โดยทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ จากนั้นจึงนำจานอาหารทั้งหมดไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปยังเชื้อราปฏิปักษ์ในจานชุดทดสอบและวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานชุดควบคุม (ภาพที่ 3) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ (Percent Inhibition of Radial Growth : IPG) โดยเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิด ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} x\,100$$

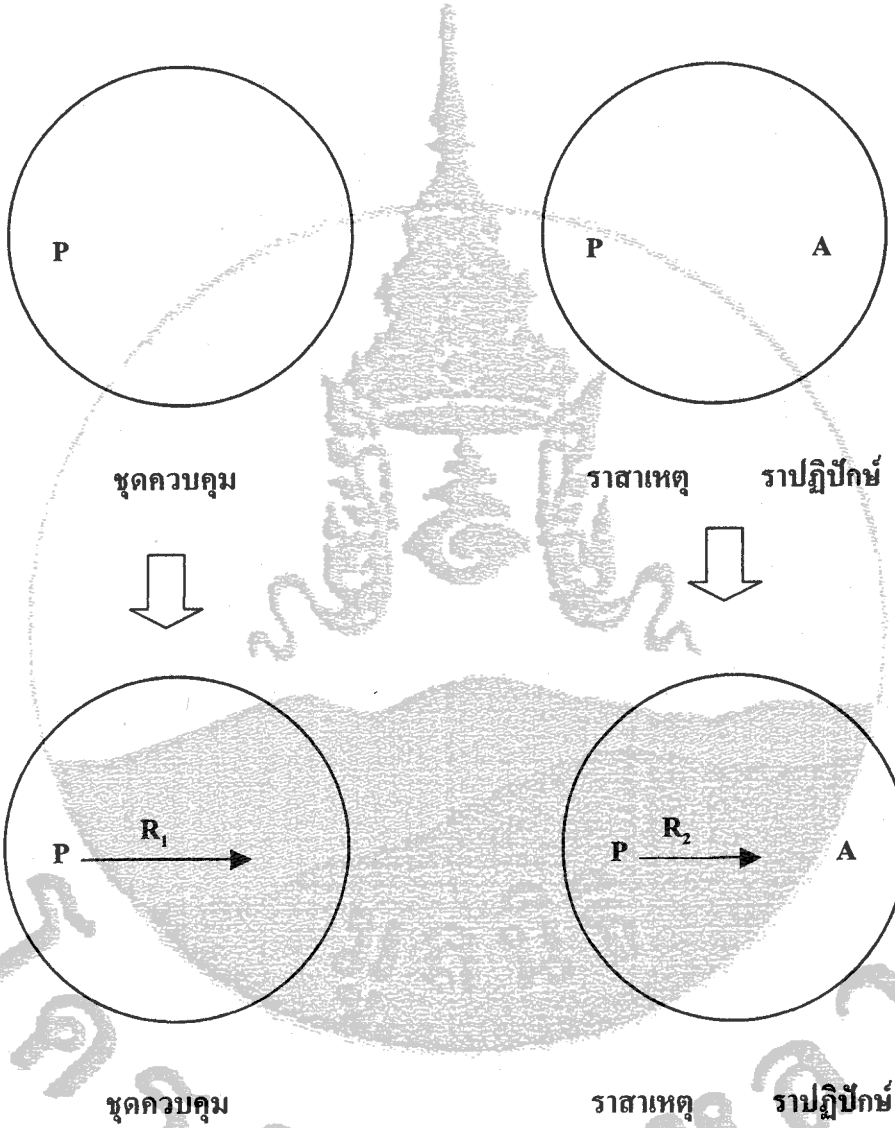
โดย R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *A. brasscicola* ในจานชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *A. brasscicola* ในจานชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (very high antagonists activity)
61 – 75%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (high antagonists activity)
51 – 60%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (moderate antagonists activity)
< 50%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง (low antagonists activity)

จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อราชนิดที่ให้ผลในยับยั้งในการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุในระดับสูงและสูงมาก (51 – 100%) ไปทำการทดลองต่อไป



P = เชื้อราสาเหตุ

A = เชื้อราปฏิปักษ์

R_1 = รัศมีการเจริญของเชื้อราในจานชุดควบคุม

R_2 = รัศมีการเจริญของเชื้อราด้านที่เจริญไปทางเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ภาพที่ 3 การวางเชื้อราทดสอบ และรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยวิธี Dual culture

4.2 ผลของเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีต่อความงอกของเมล็ดกะหล่ำปลี

นำเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีจากการทดลองที่ 1.2 ทุกชนิดมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA จนเชื้อราเจริญเต็มจานอาหาร จากนั้นจึงนำมาเตรียม spore suspension โดยใช้เครื่องมือ Haemacytometer นับจำนวนสปอร์ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^6 - 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นสุ่มเมล็ดมาจำนวนหนึ่งนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่เมล็ดใน Clorox 0.1% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แบ่งเมล็ด 200 เมล็ด แช่ลงใน spore suspension ของเชื้อราแต่ละชนิด นาน 1 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดนาน 30 นาทีในตู้ถ่ายเชื้อ จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะบนกระดาษชื้น เมื่อครบ 7 วันนำจานเพาะเมล็ดไปตรวจดูภายใต้กล้อง Stereomicroscope หาเปอร์เซ็นต์ความงอก ต้นอ่อนที่ปกติและผิดปกติ

5. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิดได้แก่ chlorothalonil (Daconil), iprodione (Rovral) และ mancozeb (Dithane M-45)

ชื่อการค้า	ชื่อสามัญ	สารออกฤทธิ์
1. Daconil	chlorothalonil	tetrachloroisophthalonitrile 75% WP
2. Dithane M-45	mancozeb	manganease ethylenebis (dithaiocarbarmate) polymeric complex with zinc salt 80% WP
3. Rovral	iprodione	3 – (3, 5-dichlorophenyl-N-isopropyl-2, 4- dioxoimidazolidine-carboximide 50% WP

อัตราความเข้มข้นที่ใช้ 3 อัตรา คือ ต่ำกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า, อัตราแนะนำตามฉลาก และ สูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า ดังนี้

	ระดับความเข้มข้น (ppm)
1. Daconil	562.5, 1125, 1687.5 ppm
2. Dithane M-45	1000, 2000, 3000 ppm
3. Rovral	375, 750, 1125 ppm

คำนวณสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละความเข้มข้น stock จากนั้นนำ stock solution ของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 มิลลิลิตรผสมกับอาหาร PDA ปริมาตร 150 มิลลิลิตรที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและหลอมจนกระทั่งอาหารอุ่นและยังไม่แข็งตัว ผสมให้เข้ากันจากนั้นเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 16 มิลลิลิตร

นำเชื้อรา *A. brassicicola* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นโดยรอบ ใช้ loop ลนไฟแตะชิ้นวุ้นแล้วนำไปวางลงบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดในแต่ละความเข้มข้น ส่วนชุดควบคุมให้วางบนอาหาร PDA โดยทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราทุกวันจนกว่าเชื้อบนอาหารผสมสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งจะเจริญเต็มจานอาหาร

6. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่มีต่อความงอกของเมล็ด และการเจริญของต้นกล้า

- **การเตรียม spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุ**

เชื้อราปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบมี 3 ชนิด *Chaetomium globosum*, *Trichoderma harzianum* และ *Trichoderma viride* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *A. brassicicola* สูง โดยนำเชื้อราทั้งสามชนิดมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA จนอายุ 5 วัน จึงนำมาเตรียม spore suspension ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^6 - 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ส่วนการเตรียม spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยทำการเลี้ยงบน

อาหาร PDA อายุ 14 วัน จากนั้นจึงนำมาเตรียม spore suspension ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^6 - 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร

- **การเตรียม suspension ของสารชีวภัณฑ์และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา**

สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิดคือ ลาร์มิน่า (*Bacillus subtilis*) ยูนิกรีน ยูเอ็น – 1 (*Trichoderma harzianum*) และพรีโตเมียม (*Chaetomium cupreum*) ส่วนสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ใช้คือ Rovral (iprodione) ในการเตรียม suspension ของสารชีวภัณฑ์และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยชั่งสารชีวภัณฑ์และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิด ๆ ละ 1 กรัมผสมลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้สารเคมีละลายและใช้เตรียมใช้ในการทดลองต่อไป

6.1 การเพาะบนกระดาษชื้น

ใช้ปิเปตดูด spore suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์และ suspension ของสารชีวภัณฑ์และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละชนิดๆ ละ 10 มิลลิลิตรมาผสมกับ spore suspension ของเชื้อราสาเหตุปริมาตรเท่ากัน เขย่าให้กันจากนั้นสุ่มเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีมาจำนวนหนึ่ง นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Clorox 0.1% และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แช่เมล็ดลงในแต่ละ suspension โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 9 กรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *Alternaria brassicicola*

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *A. brassicicola*

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *A. brassicicola* + เชื้อราปฏิปักษ์ *Chaetomium globosum*

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *A. brassicicola* + เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum*

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *A. brassicicola* + เชื้อราปฏิปักษ์ *T. viride*

กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *A. brassicicola* + สารชีวภัณฑ์พรีโตเมียม

กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *A. brassicicola* + สารชีวภัณฑ์ลาร์มิน่า

กรรมวิธีที่ 8 ปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *A. brassicicola* + สารชีวภัณฑ์ยูนิกรีน ยูเอ็น - 1

กรรมวิธีที่ 9 ปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *A. brassicicola* + สารเคมีป้องกันกันกำจัดเชื้อรา Rovral

นำเมล็ดจากแต่ละกรรมวิธี (กรรมวิธีละ 400 เมล็ด) แบ่งเมล็ดออกเป็นสองส่วน ส่วนแรก 300 เมล็ดนำไปเพาะบนกระดาษชื้น แบ่งออกเป็น 3 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด จากนั้นนำจานแก้วเพาะเมล็ดไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสง Fluorescent นาน 12 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 7 วัน จากนั้นทำการตรวจหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเมล็ดจากเชื้อรา *A. brassicicola* และเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด

6.2 การเพาะในดินฆ่าเชื้อ

นำเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีส่วนที่สองไปเพาะในดินฆ่าเชื้อที่บรรจุในถาดหลุม โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 9 กรรมวิธีเช่นเดียวกับข้อ 6.1 โดยเพาะเมล็ดกรรมวิธีละ 100 เมล็ด หลังจากนั้น 14 วันนับจำนวนต้นที่งอกและต้นกล้าที่แสดงอาการผิดปกติ จากนั้นเมื่อต้นกล้าอายุ 4 สัปดาห์สุ่มต้นกล้าจำนวน 30 ต้น ล้างทำความสะอาดแล้วนำไปผึ่งลมประมาณ 30 นาที จึงทำการชั่งน้ำหนักสด (fresh weight) และวัดความยาวของลำต้น (shoot length) จากนั้นนำต้นกล้าที่ผ่านการชั่งน้ำหนักสดไปตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำต้นกล้าไปชั่งน้ำหนักแห้ง (dry weight) นำผลข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อความแตกต่างทางสถิติ

ผลการทดลอง

1. การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดกะหล่ำปลี

จากการตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดกะหล่ำปลี 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ No. 1 พันธุ์ New Jersey และพันธุ์ Ruby Perfection โดยวิธีการเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้นและเพาะบนอาหารวุ้น พบว่าจากการเพาะบนกระดาษชื้นพบเชื้อรา 14 ชนิด (ตารางที่ 1) *Alternaria brassicicola*, A. *tenuis*, *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporiodes*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* spp., *Phoma* sp., *Trichoderma harzianum*., *T. viride*. และ *Rhizopus* sp. โดยพบในเมล็ดกะหล่ำปลีพันธุ์ New Jersey มากที่สุด ซึ่งเชื้อราที่พบติดมากับเมล็ดมากที่สุดคือ *A. brassicicola* รองลงมาคือ *F. oxysporum* และ *A. tenuis* ตามลำดับ ส่วนความงอกของเมล็ดเรียงตามลำดับคือ พันธุ์ Ruby Perfection (95.0%) พันธุ์ No.1 (92.0%) และพันธุ์ New Jersy (86.25%)

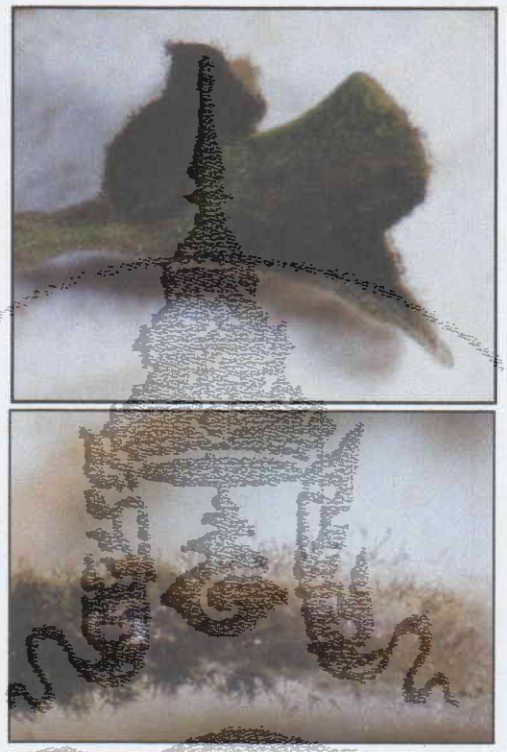
จากข้างต้นพบว่าเชื้อรา *A. brassicicola* เท่านั้นที่เป็นสาเหตุโรค โดยเชื้อรานี้จะสร้างเส้นใยและสปอร์บนเมล็ดหลังจากบ่มเชื้อไว้ 2 – 3 วัน เมื่อเชื้อราปกคลุมทั้งเมล็ดพบว่าทำให้เมล็ดเน่าไม่งอก และทำให้ต้นอ่อนที่งอกจากเมล็ดที่มีเชื้อรานี้เข้าทำลายผิดปกติ จากการส่องดูด้วยกล้อง stereomicroscope พบเชื้อราสร้างสปอร์บนราก ลำต้น และใบ (ภาพที่ 4) โดยทำให้เกิดจุดแผลสีน้ำตาลเข้มในบริเวณที่เข้าลาย เมื่อเชื้อรานี้ปกคลุมหมดทั้งต้นจะทำให้ต้นอ่อนตายในที่สุด

สำหรับการเพาะเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีทั้ง 3 พันธุ์ บนอาหารวุ้นพบเชื้อราทั้งหมด 13 ชนิด (ไม่ได้แสดงตาราง) โดยพบในพันธุ์ New Jersy มากที่สุด ได้แก่ *A. brassicicola* Isolate 1, *A. brassicicola* isolate 2, A. *tenuis*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp 3 isolate., *Cladosporium cladosporiodes*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Trichoderma harzianum*., *T. viride*. และ unknown 3 isolate นำเชื้อราทุกชนิดที่แยกนำไปเลี้ยงในอาหาร PDA slant เพื่อเก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี ตรวจสอบโดยวิธีการเพาะบนกระดาษชื้น

ชนิดของเชื้อรา	ปริมาณของเชื้อรา[1]		
	พันธุ์ No.1	พันธุ์ New Jersey	พันธุ์ Ruby Perfection
1. *Alternaria brassicicola*	8.50	15.50	2.75
2. *Alternaria tenuis*	2.50	4.00	1.25
3. *Alternaria* sp.	1.00	1.50	0.25
4. *Aspergillus flavus*	0.25	1.00	0.00
5. *Aspergillus niger*	0.25	0.25	0.00
6. *Cladosporium cladosporioides*	1.25	3.75	0.75
7. *Chaetomium globosum*	1.25	1.75	0.00
8. *Curvularia lunata*	0.75	0.25	0.50
9. *Fusarium oxysporum*	1.75	5.00	0.00
10. *Penicillium* spp.	0.50	0.75	0.00
11. *Phoma* sp.	0.75	1.25	0.00
12. *Trichoderma harzianum*	0.50	2.75	0.00
13. *Trichoderma viride*	0.25	0.75	0.00
14. *Rhizopus* sp.	0.00	0.50	0.00
ความงอก	**92.00**	**86.25**	**95.00**

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด

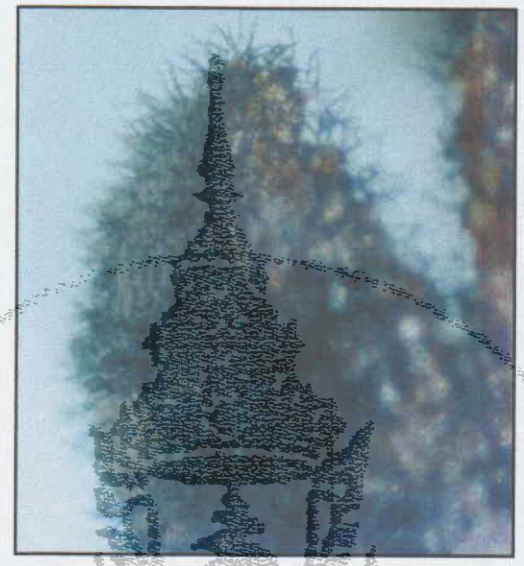


ภาพที่ 4 แสดงลักษณะของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เจริญบนใบและลำต้นของต้นกล้ากะหล่ำปลีโดยการเพาะบนกระดาษชื้น

1.1 ลักษณะของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี

1) *Alternaria brassicicola*

บนเมล็ดกะหล่ำปลีเชื้อราสร้าง conidiophore สีน้ำตาลอ่อน มักเกิดเดี่ยวๆ หรืออาจเกิดเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 5) มี2-12 ก้านหรือมากกว่า มีลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย รูปร่างเป็นทรงกระบอกที่ปลายมีลักษณะพองออกเล็กน้อย มีผนังกั้นตามขวาง เชื้อราสร้าง conidia ต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวมาก บางครั้งลูกโซ่แตกแขนงด้วย conidia มีรูปร่างทรงกระบอกหรือกระบองหัวกลับ มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาล มีผนังกั้นตามขวาง (transverse septa) 1-11 อัน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 3 ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เจริญบนเมล็ดกะหล่ำปลี

ภาพที่ 4 ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า

2) *Alternaria tenuis*

บนเมล็ดเชื้อราสร้าง conidia สีน้ำตาลติดต่อกันเป็น chain ยาว ส่วนที่ conidia ต่อกันเป็น chain จะเรียวและใสกว่าส่วนอื่น conidia เกิดบนก้าน conidiophore ซึ่งส่วนมากเป็นแบบ simple ลักษณะตั้งตรงหรือโค้งบ้างเล็กน้อย บางครั้งอาจพบว่า conidiophore มีการแตกกิ่งก้านได้บ้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ conidia มีสีน้ำตาลอ่อน ผนังเรียบ รูปร่างเป็นแบบ obovoid, obclavate, และ pyriform สีน้ำตาลอ่อนผนังเรียบ มี ผนังกั้น (septa) ทั้งตามยาวและตามขวาง และมีรอยคอดบริเวณ septa ส่วนปลายของ conidia มี beak สีอ่อนขนาดสั้นไปจนถึงบางอันยาวถึง 1 ใน 3 ของความยาวของ conidia

3) *Alternaria* sp.

บนเมล็ดเชื้อราสร้างเส้นใยสีน้ำตาลอ่อน conidia เกิดที่ปลาย conidiophore conidia มีสีน้ำตาลรูปร่างแบบ obclavate หรือ oblong เห็น septate ชัดเจน ลักษณะยาวเรียวและมี beak ยาวใส

4) *Aspergillus flavus*

บนเมล็ดเชื้อราจะสร้าง mycelium, condiophore และ conidia สีเขียว-เหลือง กลุ่ม conidia เกิดบนส่วนปลายของ conidiophore ที่เจริญโป่งออกเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า vesicle และมีรูปร่างหลายแบบ แต่ละกลุ่มเรียกว่า conidial head ซึ่งอาจมีรูปร่างกลมเป็นแท่งหลวมๆ หรือแตกออกเป็นแฉก conidiophore ไม่มีสี ผนังหนาและขรุขระ conidia รูปร่างกลม สีเขียวอ่อน ผนังขรุขระเล็กน้อย

5) *Aspergillus niger*

ลักษณะการเจริญบนเมล็ดคล้ายกับ *A. flavus* group แต่กลุ่มของ conidial head ที่เห็นจะเป็นสีน้ำตาลเข้ม-ดำ และส่วนใหญ่ขนาดของ conidial head ใหญ่กว่าของ *A. flavus* group

6) *Cladosporium cladosporiodes*

บนเมล็ดพบ colony ลักษณะฟู อ่อนนุ่ม แผ่บนเมล็ด มีสีเขียวมะกอกบางครั้งสีน้ำตาล หรือสีเทา condiophore มีสีน้ำตาลเข้มตั้งตรง conidia สีน้ำตาลอ่อนต่อเป็น chain และอยู่กระจุกที่ intercalary และ terminal ของ conidiophore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ conidiophore มี modose คือ conidiophore โป่งพองออกที่ปลายและระหว่างข้อ conidia รูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน ผนังเรียบ มีสีใสจนถึงสีน้ำตาลมะกอก

7) *Chaetomium globosum*

เชื้อราสร้าง perithecium สีเทาขนาดใหญ่ เกิดเดี่ยวๆ บนเมล็ดจะเห็น hair ส่วนบนม้วนเป็นเกลียวหลายเกลียว ส่วน hair บริเวณข้างๆ จะเป็นเส้นตรง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ perithecium มี hair สีน้ำตาล perithecium รูป subglobose มี hair ด้านบนม้วนเป็นเกลียว ส่วน hair ด้านข้างเป็นเส้นตรง ภายใน perithecium มี ascus และมี 8 ascospore

8) *Curvularia lunata*

บนเมล็ดเชื้อราจะสร้าง conidiophore สีน้ำตาลเข้มหรือดำเป็นก้านเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม conidia จะเกิดที่ปลายและด้านข้างของ condiophore conidia ผนังเรียบสีน้ำตาลมี 3 septa รูปร่างโค้ง ตรงกลางจะใหญ่มีสีเข้มและเรียวไปทางปลายทั้ง 2 ข้าง ซึ่งมีสีอ่อนกว่าส่วนอื่น โดยเฉลี่ยมีขนาด 22.54 x 11.19 ไมครอน

9) *Fusarium oxysporum*

บนเมล็ดเส้นใยสีสีขาวฟูเล็กน้อย เมื่อเขี่ยเส้นใยนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ macroconidia รูปร่างแบบ obclavate ปลายด้านหนึ่งจะมนเล็กน้อย ส่วนอีกข้างจะแหลม ลักษณะใส ไม่มีสี มี septate แบ่งออกเป็น 2-4 เซลล์ ส่วน microconidia รูปร่างแบบ obclavate ลักษณะใสไม่มีสี มี 1-2 เซลล์

10) *Penicillium* spp.

เชื้อราเจริญอยู่เดี่ยวๆ หรือรวมกันเป็นกลุ่มๆ เห็นเป็นสีเทาอ่อน conidia เจริญอยู่บนส่วนปลายของ phialides ซึ่งเจริญมาจาก conidiophore ของเส้นใยต่างๆ ที่เจริญตามผิวของเมล็ด เมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นกลุ่ม conidia ที่เจริญต่อกันเป็นลักษณะคล้ายๆ แปรงทาสี conidia ลักษณะกลมสีเขียวอ่อน ผนังขรุขระเล็กน้อย

11) *Phoma* sp.

บนเมล็ดพบ pycnidia สีดำเข้ม รูปร่างกลม พบเกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบ pycnidia สีน้ำตาลเข้ม conidiophore สั้นหรือไม่มีเลย ส่วน conidia มีขนาดเล็ก รูปไข่ เป็นเซลล์เดี่ยว ใสไม่มีสี

12) *Trichoderma* spp.

บนเมล็ดเชื้อราสร้าง mycelium, conidiophore และ conidia ขึ้นปกคลุมเมล็ด conidiophore และ conidia มีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม สร้างขึ้นเป็นกลุ่มหรือกระจายทั่วเมล็ด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบ conidia หรือ phialospore มีสีเขียวไม่มีผนังกั้น รูปไข่เกิดเป็นกลุ่มตรงปลาย conidophore มีลักษณะตั้งตรง แตกกิ่งก้าน ไม่มีสี

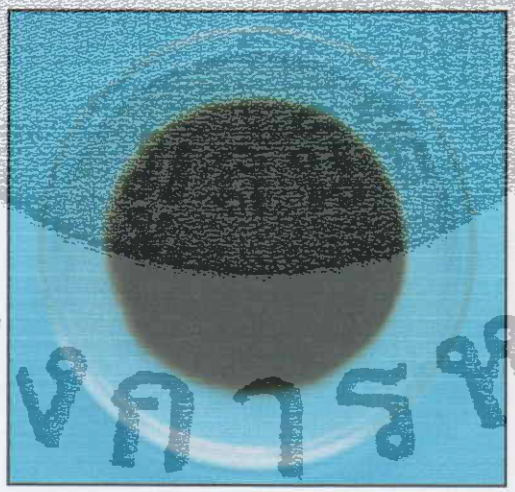
13) *Rhizopus* sp.

เชื้อเจริญปกคลุมเมล็ด เชื้อราสร้างเส้นใยและ sporangiophore เรียวยาวสีน้ำตาล อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือเรียวยาวเป็นกลุ่ม ตรงส่วนปลายเป็นที่เกิดของ sporangia รูปร่างกลมหรือเกือบกลม มีสีน้ำตาลดำ ภายในเป็นที่เกิดของ sporangiospore สีเทา รูปร่างแบบ ovoid โดยเฉลี่ยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11.4 ไมครอน

1.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดกะหล่ำปลีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

1) ***Alternaria brassicicola***

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวต่อมาโคโลนีมีสีเขียวมะกอกอมเทา (greyish olive) ถึงสีน้ำตาลดำขอบโคโลนีสีขาว โคโลนีมีลักษณะคล้ายกำมะหยี่ โคโลนีจะเป็นสีเขียวมะกอกอ่อนต่อมาจะกลายเป็นสีดำอมเขียวมะกอก เชื้อราใช้เวลาประมาณ 15- 18 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร (ภาพที่ 7) เมื่อเขี่ยเส้นใยไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยของเชื้อราแตกแขนงมีผนังกั้น ตอนแรกมีสีใส ต่อมาเป็นสีน้ำตาลหรือเขียวมะกอกอมเทา สร้าง conidiophore สีน้ำตาลรูปร่างเป็นทรงกระบอกที่ปลายมีลักษณะพองออกเล็กน้อย มีผนังกั้นตามขวาง ขนาดกว้าง 5-18 ไมครอน ยาว 50-20 ไมครอน หรืออาจมีความยาวถึง 70 ไมครอน สร้าง conidia ต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวมาก บางครั้งลูกโซ่แตกแขนงด้วย conidia มีรูปร่างทรงกระบอกหรือกระบองหัวกลับ มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ขนาดของ conidia กว้าง 8-30 ไมครอน ยาว 18-130 ไมครอน มีผนังกั้นตามขวาง (transverse septa) 1-11 อัน



ภาพที่ 7 ลักษณะของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* บนอาหาร PDA

2) *Alternaria tenuis*

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวบาง เจริญจากชิ้นวุ้น ต่อมาเส้นใยมีสีเทาโคโลนีขอบนอกสีขาว มีการเจริญเป็นรัศมี เชื้อรามีการเจริญค่อนข้างช้า ใช้เวลาประมาณ 11-12 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร เมื่อเขี่ยเส้นใยของเชื้อรานี้ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ conidia รูปร่างแบบ obovoid, obclavate และ pyriform สีน้ำตาลอ่อน ผนังเรียบ มี ผนังกั้น (septa) ทั้งตามยาวและตามขวาง และมีรอยคอดบริเวณ septa ส่วนปลายของ conidia มี beak สีอ่อนขนาดสั้นไปจนถึงบางอันยาวถึง 1 ใน 3 ของความยาวของ conidia

3) *Alternaria* sp.

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวต่อมามีสีน้ำตาลอ่อนและเป็นสีน้ำตาลเข้ม เชื้อราใช้เวลาประมาณ 10 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เชื้อราสร้างเส้นใยสีน้ำตาลอ่อน conidia รูปร่างกระบอง มีผนังกั้นทั้งตามยาวและตามขวาง มี beak ยาวใส เชื้อรามีการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย

4) *Aspergillus* sp. isolate. 1

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีเขียวอ่อนถึงเหลืองเข้ม เชื้อรามีการเจริญช้ามาก ประมาณ 20 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ conidia รูปไข่สีเหลืองอ่อน conidial มีขนาดเล็กไม่โป่งพองมาก มี phialides 2 ชั้น

5) *Aspergillus* sp. Isolate. 2

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวปนเทา เชื้อรามีการเจริญช้ามาก ประมาณ 14 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ conidia รูปร่างกลม มีสีใส เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่อยู่บน phalides ซึ่งต่อจาก conidial head

6) *Aspergillus* sp. Isolate. 3

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาว ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวปนเหลือง มีการเจริญค่อนข้างเร็วประมาณ 5 – 7 วัน ก็เจริญเต็มจานอาหาร ลักษณะภายใต้กล้องพบ conidia สีเขียวอ่อน รูปร่างกลม มี phialides 1 ชั้น conidial head โป่งพอง มีสีเขียวอ่อนใส

7) ***Cladosporium cladosporiodes***

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาว ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม เชื้อราเจริญค่อนข้างช้าประมาณ 8 – 10 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร เมื่อเขี่ยเส้นใยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ conidiophore โป่งที่ปลายหรือระหว่างข้อชัดเจน conidia ต่อกันเป็น chain มีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่หัวท้ายมน ellipsoidal หรือ subspherical ผนังเรียบ สีใสจนถึงสีน้ำตาลอ่อนเห็น scar ชัดเจน

8) ***Chaetomium globosum***

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 2 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวเจริญออกมา หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเทาอ่อน ฟูเล็กน้อย โดยเจริญเป็นวงซ้อนกันออกไป จากนั้นเชื้อราจะสร้างโครงสร้าง พิเศษคือ perithecium เชื้อราใช้เวลาประมาณ 8 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใน perithecium มี ascus สีใสรูปกระบอง และภายใน ascus มี 8 ascospore รูปร่างคล้ายลูกรักบี้มีสีน้ำตาล

9) ***Curvularia lunata***

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเสนใยสีขาวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม เชื้อราใช้เวลาประมาณ 10 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ conidia ผนังเรียบสีน้ำตาลมี 3 septa รูปร่างโค้ง ตรงกลางใหญ่มีสีเข้มและเรียวไปทางปลายทั้ง 2 ข้าง ซึ่งมีสีอ่อนกว่าส่วนอื่น

10) ***Fusarium oxysporum***

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวหรือสีชมพูอ่อน ชมพู เจริญราบเรียบไปบนอาหาร เส้นใยมีลักษณะฟูเล็กน้อย ต่อมาเชื้อราสร้าง pigment สีม่วงอ่อน เชื้อราใช้เวลาประมาณ 7-8 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร เมื่อเขี่ยเส้นใยไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ macroconidia รูปร่างแบบ obclavate ปลายด้านหนึ่งจะมนเล็กน้อย ส่วนอีกข้างจะแหลม ลักษณะใส ไม่มีสี มี septate แบ่งออกเป็น 2-4 เซลล์ ส่วน microconidia รูปร่างแบบ obclavate ลักษณะใสไม่มีสี มี 1-2 เซลล์

11) *Fusarium* sp.

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวค่อนข้างฟู ใช้เวลาประมาณ 6 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร และเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบ conidia รูปร่าง fusiform หรือ clavate ใสไม่มีสี macroconidia มี 2 – 6 เซลล์ รูปร่างโค้งปลายมน microconidia มีลักษณะเซลล์เดียว ใสไม่มีสี

12) *Trichoderma harzianum*

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวต่อมามีสีเขียวอ่อนและสีเขียวเข้ม มีการเจริญเร็วมากใช้เวลาประมาณ 3 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร

13) *Trichoderma viride*

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวต่อมามีสีเขียวอ่อนและสีเขียวเข้ม แต่สีของเส้นใยอ่อนกว่า *T. harzianum* เชื้อรามีการเจริญเร็วมากใช้เวลาประมาณ 3 วัน จึงเจริญเต็มจานอาหาร

14) Unknown Isolate 1

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวต่อมาสีสีเทา มีการเจริญเป็นรัศมี ขอบนอกโคโลนีสีขาว เชื้อราเจริญช้ามาก และเมื่อนำเส้นใยไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยมีสีเทาอ่อนใส และไม่สร้างสปอร์

15) Unknown Isolate 2

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีน้ำตาลอ่อนเจริญราบเรียบไปกับอาหาร เชื้อรามีการเจริญค่อนข้างช้า ต่อมาเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม และมีการสร้างรงวัตถุสีน้ำตาลล้อมรอบโคโลนี และเมื่อนำเส้นใยไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยมีสีน้ำตาลอ่อน และไม่สร้างสปอร์

16) Unknown Isolate 3

หลังทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA ได้ 1 วัน เชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวปนเทาฟูเล็กน้อย เชื้อรามีการเจริญค่อนข้างช้า มีการเจริญเป็นรัศมี ขอบนอกโคโลนีมีสีขาวและเมื่อนำเส้นใยไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อราไม่สร้างสปอร์

2. การหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

จากการนำเมล็ดกะหล่ำปลีพันธุ์ New Jersey ที่พบว่ามีเชื้อรา *A. brassicicola* ติดมากับเมล็ดในปริมาณมากที่สุด ทั้งที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิวและฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว เพาะบนอาหารวุ้น 2% WA (2% Water Agar) พบว่าเมล็ดที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิวมีความงอกเมล็ด 82.75% จำนวนเมล็ดไม่งอก 17.25% ต้นงอกปกติ 60.25% ต้นงอกผิดปกติ 22.50% และมีเชื้อรา *A. brassicicola* เจริญอยู่บนเมล็ดและต้นอ่อน 76.0% ส่วนในเมล็ดที่ฆ่าเชื้อที่ผิวมีความงอกเมล็ด 87.75% จำนวนเมล็ดไม่งอก 12.25% ต้นงอกปกติ 79.50% ต้นงอกผิดปกติ 8.25% และมีเชื้อรา *A. brassicicola* เจริญอยู่บนเมล็ดและต้นอ่อน 1.0% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ลักษณะที่พบจากการเพาะเมล็ดกะหล่ำปลีบนอาหาร 2% WA ทั้งที่ฆ่าเชื้อและไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ด

ลักษณะอาการที่พบ	จำนวนต้นอ่อนที่แสดงอาการ	
	ไม่ฆ่าเชื้อที่ผิว	ฆ่าเชื้อที่ผิว
1. ความงอกของเมล็ด	82.75	87.75
2. เมล็ดไม่งอก	17.25	12.25
3. ต้นงอกปกติ	60.25	79.50
4. ต้นงอกผิดปกติ	22.50	8.25
5. มีเชื้อรา *Alternaria brassicicola*	76.00	1.00

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุต่อความงอกของต้นกล้ากะหล่ำปลี

จากการนำเมล็ดกะหล่ำปลี 3 พันธุ์คือ พันธุ์ No.1 พันธุ์ New jersey และพันธุ์ Ruby perfection นำมาทดสอบความงอกโดยแบ่งเมล็ดพันธุ์แต่ละพันธุ์ออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดแรกฆ่าเชื้อที่ผิวและเพาะบนกระดาษม้วน (Between paper) และชุดที่สองปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *Atlernaria brassicicola* ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะบนกระดาษม้วนเช่นเดียวกัน เมื่อครบ 7 วัน นับจำนวนต้นกล้าที่งอกและจากการเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดกะหล่ำปลีพันธุ์ Ruby perfection ที่ไม่ปลูกเชื้อมีความงอกสูงสุด คือ 93.33% รองมาคือ พันธุ์ No.1 ไม่ปลูกเชื้อมีความงอก 90.00% และพันธุ์ New jersey ไม่ปลูกเชื้อมีความงอก 82.00% ตามลำดับ จากการปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วย *A. brassicicola* พบว่าพันธุ์ New Jersey มีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำสุด คือ 15.00% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความงอกของต้นกล้ากะหล่ำปลี 3 พันธุ์ เปรียบเทียบระหว่างเมล็ดที่ไม่ปลูกเชื้อและเมล็ดที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ความงอก[1]
พันธุ์ No.1 ปลูกเชื้อ	19.33 c[2]
พันธุ์ New jersey ปลูกเชื้อ	15.00 d
พันธุ์ Ruby perfection ปลูกเชื้อ	22.33 c
พันธุ์ No.1 ไม่ปลูกเชื้อ	90.00 a
พันธุ์ New jersey ไม่ปลูกเชื้อ	82.00 b
พันธุ์ Ruby perfection ไม่ปลูกเชื้อ	93.33 a
CV (%)	**3.73**
$LSD_{p=0.05}$	**3.56**

[1]ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด

[2]อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD

4. การคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดกะหล่ำปลีในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุด

4.1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยวิธี Dual culture

จากการทดสอบเลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA พร้อมกับเชื้อราปฏิปักษ์ชนิด 16 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus* sp. Isolate 1, *Aspergillus* sp. Isolate 2, *Aspergillus* sp. Isolate 3, *Alternaria* sp., *Alternaria tenuis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, Unknown 1, Unknown 2 และ Unknown 3 เมื่อวัดรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *A. brassicicola* ในด้านที่เจริญเข้าหาเชื้อราปฏิปักษ์พบว่ามีเชื้อรา 3 ชนิดได้แก่ *Trichoderma harzianum*, *T. viride* และ *Chaetomium globosum* ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ดี เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* และจากการเปรียบเทียบผลความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด รองลงมาได้แก่ *T. viride* และ *C. globosum* ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 73.96%, 71.05% และ 68.41% ตามลำดับ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 8)

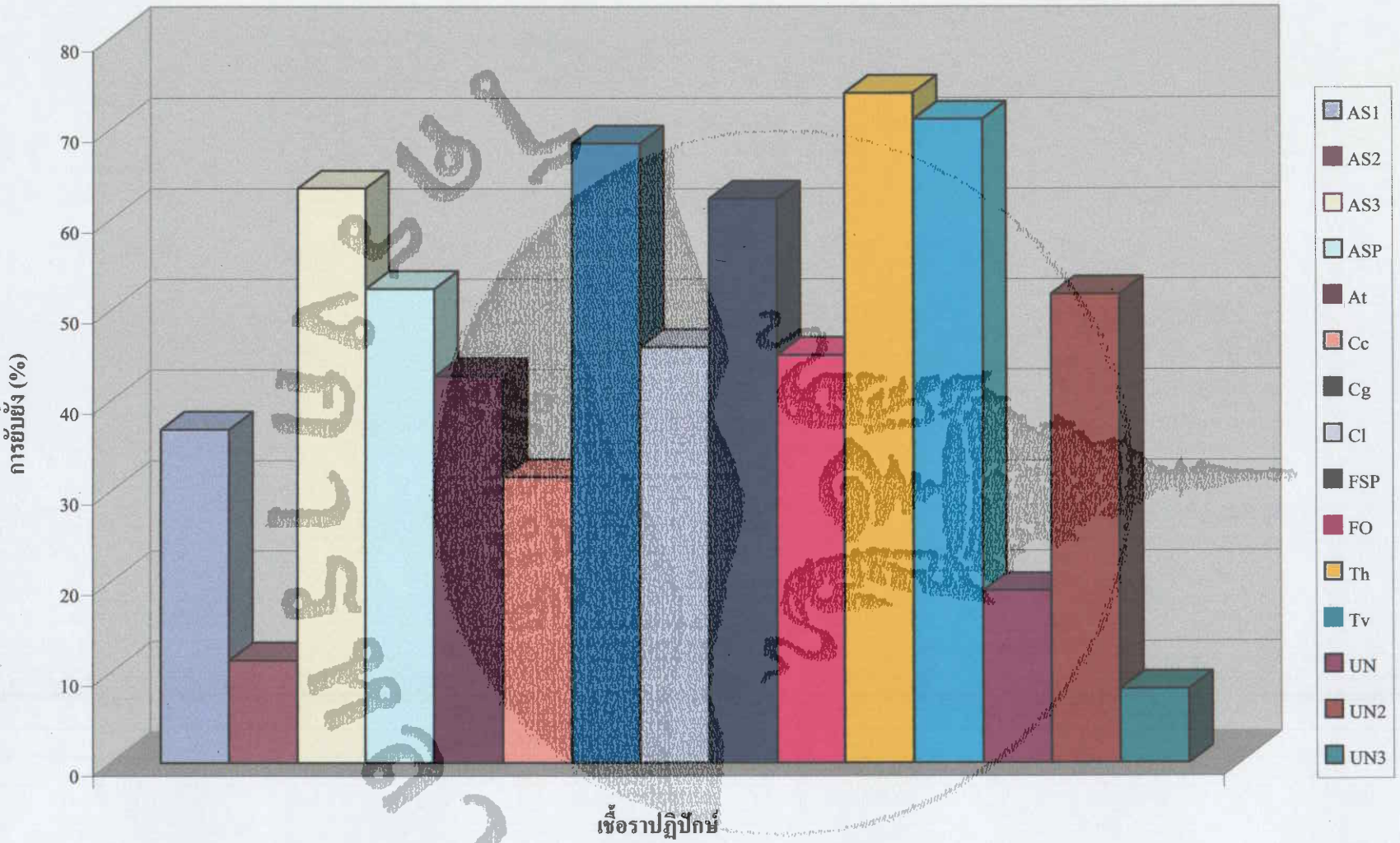
จากการสังเกตลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. viride* ทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุหยุดการเจริญและเชื้อราจะเจริญบนเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ ทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุแฟบไป ส่วนเชื้อรา *C. globosum* พบว่าทำให้เส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* หยุดการเจริญ

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดกะหล่ำปลี ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* อายุ 14 วัน บนอาหาร PDA

เชื้อราปฏิปักษ์	การยับยั้ง (%)[1]
Aspergillus sp. Isolate 1	36.83 h[2]
Aspergillus sp. Isolate 2	11.37 k
Aspergillus sp. Isolate 3	63.44 d
Alternaria sp.	52.34 c
Alternaria tenuis	42.69 g
Cladosporium cladosporioides	31.55 I
Chaetomium globosum	68.41 c
Curvularia lunata	45.88 f
Fusarium sp.	62.27 d
Fusarium oxysporum	45.04 fg
Trichoderma harzianum	73.96 a
Trichoderma viride	71.05 b
Unknown 1	18.99 j
Unknown 2	51.75 e
Unknown 3	8.16 l
CV (%)	**4.22**
$LSD_{p=0.05}$	**2.43**

[1]ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

[2]อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD



AS1 = *Aspergillus* sp. Isolate 1, AS2 = *Aspergillus* sp. Isolate 2, AS3 = *Aspergillus* sp. Isolate 3, ASP = *Alternaria* sp., AT = *Alternaria tenuis*, CC = *Cladosporium cladosporiodes*, CG = *Chaetomium globosum*, CL = *Curvularia lunata*, FSP = *Fusarium* sp., FO = *Fusarium oxysporum*, TH = *Trichoderma harzianum*, TV = *Trichoderma viride*, UN1 = Unknown 1, UN2 = Unknown 2, UN3 = Unknown 3

ภาพที่ 8 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เจริญร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ 15 ชนิด ทดสอบโดยวิธี Dual culture

5. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

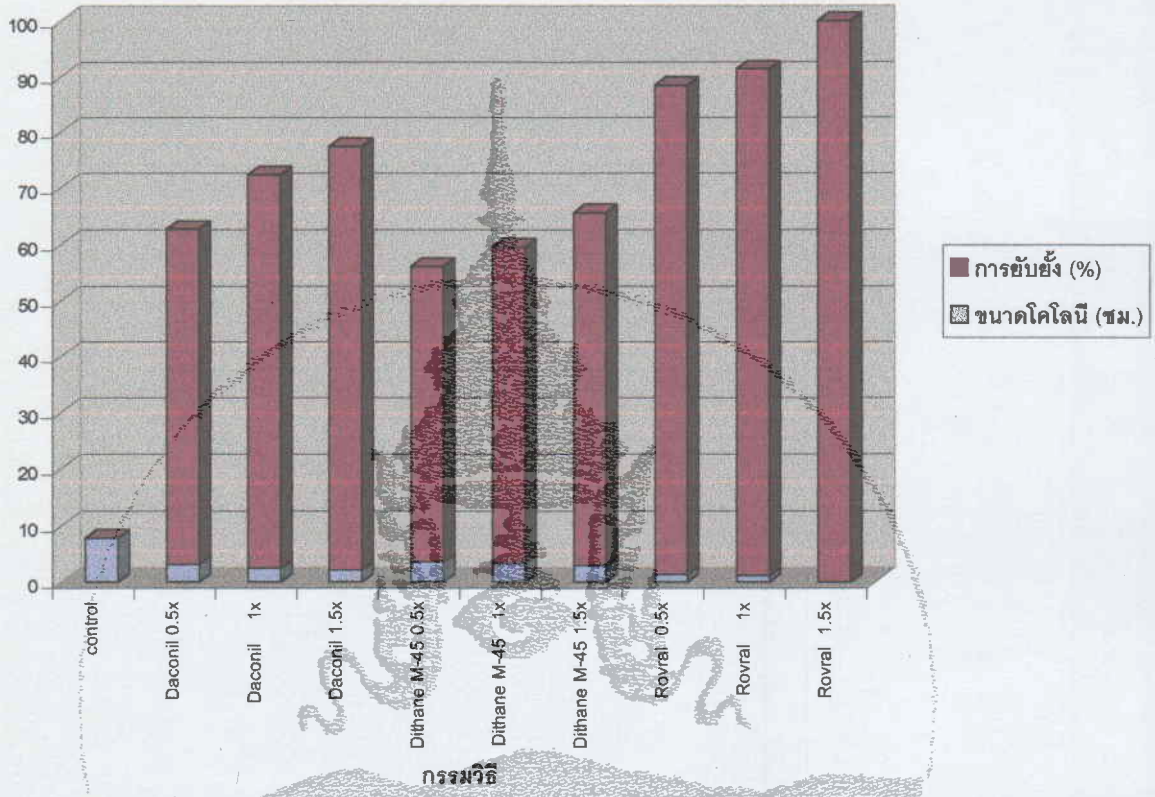
เมื่อนำเชื้อรา *Alternaria brassicicola* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ Daconil, Dithane M – 45 และ Rovral ที่อัตราความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า อัตราแนะนำตามฉลากและสูงกว่าอัตราแนะนำ 0.5 เท่า ผลจากการเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola* บนอาหารผสมสารเคมี Rovral ทั้งสามความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA ปกติและบนอาหารผสมสารเคมี Daconil และ Dithane M – 45 ทุกความเข้มข้น โดยพบว่า Rovral ทั้ง 3 ความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุได้ถึง 87 – 100% รองลงมาคือ Daconil สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุได้ 59 - 75% และ Dithane M – 45 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุได้ 52 - 63% ตามลำดับ (ตารางที่ 5 , ภาพที่ 9 - 10)

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

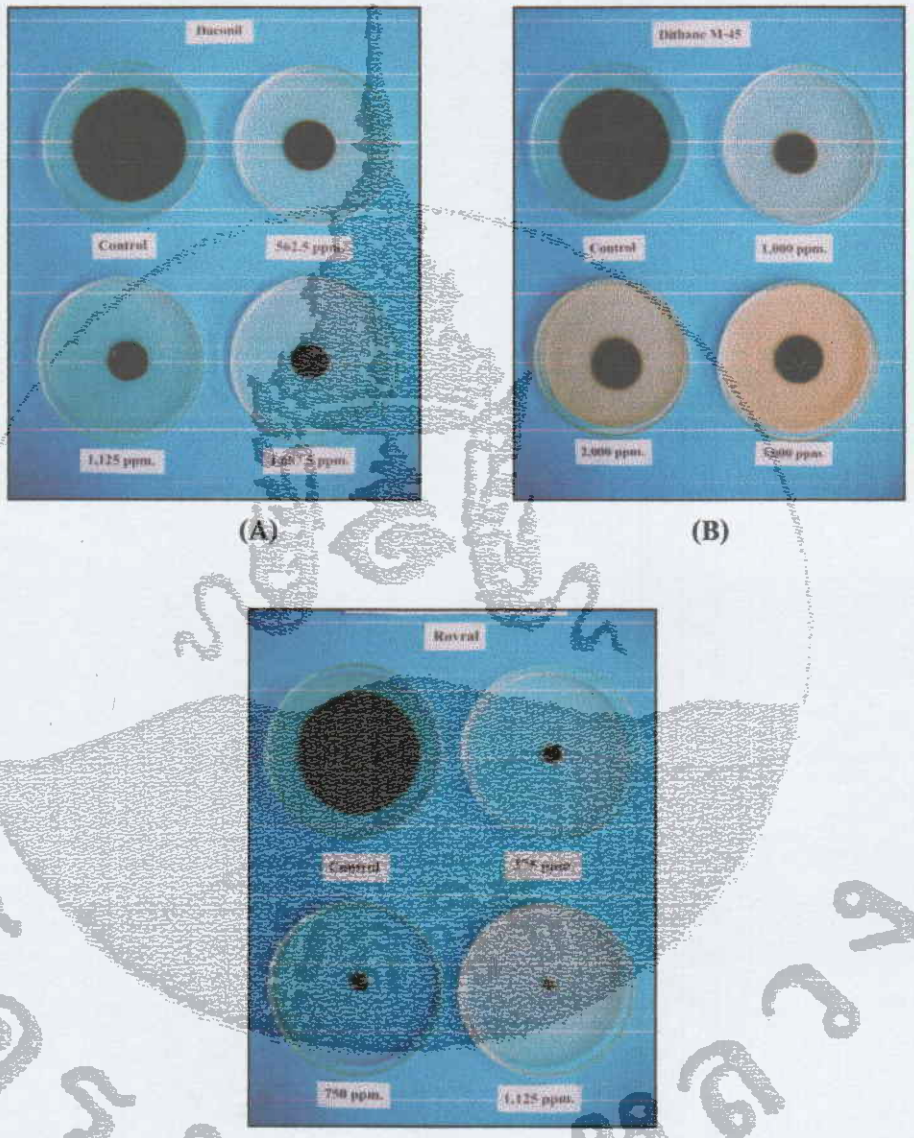
กรรมวิธี	ความเข้มข้น (ppm)	ขนาดของโคโลนี (ซม.)[1]	การยับยั้ง (%)[1]
PDA	-	7.84 a[2]	-
PDA + Daconil 0.5 เท่า	562.5	3.15 d	59.53 g
PDA + Daconil 1 เท่า	1,125	2.47 f	69.91 e
PDA + Daconil 1.5 เท่า	1,678.5	2.12 g	75.28 d
PDA + Dithane M – 45 0.5 เท่า	1,000	3.61 b	52.55 I
PDA + Dithane M – 45 1 เท่า	2,000	3.37 c	56.23 h
PDA + Dithane M – 45 1.5 เท่า	3,000	2.95 e	62.67 c
PDA + Rovral 0.5 เท่า	375	1.35 h	87.09 c
PDA + Rovral 1 เท่า	750	1.14 i	90.22 b
PDA + Rovral 1.5 เท่า	1,125	0.00 j	100.0 a
CV (%)		**4.91**	**2.68**
$LSD_{p=0.05}$		**0.18**	**2.88**

[1]ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

[2]ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD



ภาพที่ 9 ขนาดโคโลนีของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เจริญบนอาหารผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ความเข้มข้น 3 ระดับ



(A) (B)

(C)

ภาพที่ 10 การเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* อายุ 14 วัน บนอาหาร PDA ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Daconil (A), Dithane M – 45 (B) และ Rovral (C) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

6. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ต่อการงอกของต้นอ่อน (seedling emergence) และการเจริญของต้นกล้ากะหล่ำปลี

6.1 ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุ (seed infection) และการงอกของเมล็ด (seed germination) กะหล่ำปลีจากการเพาะบนกระดาษชื้น

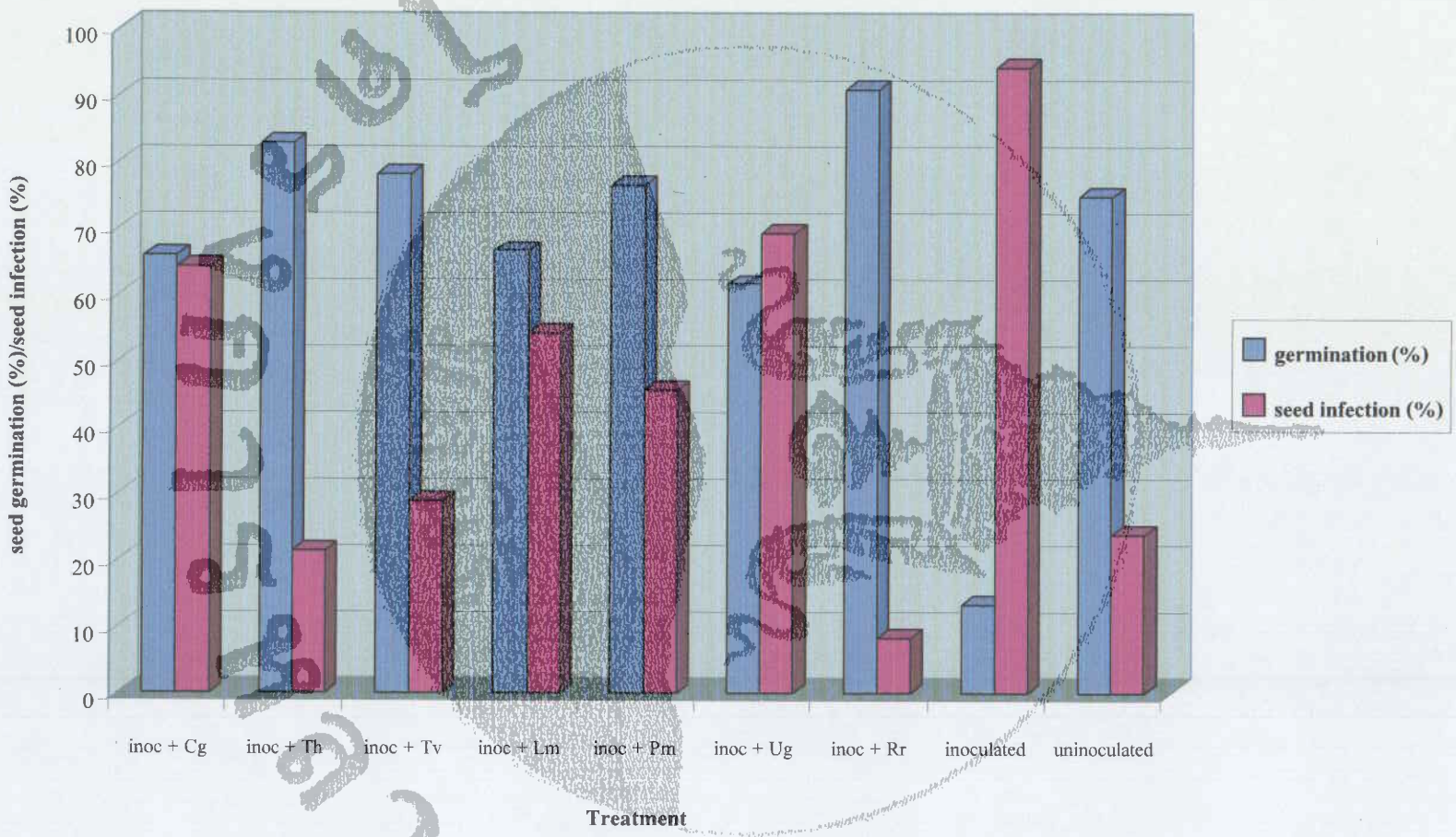
จากการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อความงอกของเมล็ดกะหล่ำปลี พบว่ากรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและ treat ด้วย Rovral มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มความงอกให้กับเมล็ดกะหล่ำปลีได้ดีที่สุด รองลงมาคือ กรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและ treat ด้วย *Trichoderma harzianum* และ กรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและ treat ด้วย Pretomium ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 กรรมวิธีให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่นๆ ส่วนผลต่อการเข้าทำลายเมล็ดของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* พบว่ากรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและ treat ด้วย Rovral มีประสิทธิภาพช่วยลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเมล็ดของเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด รองลงมาคือ กรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและ treat ด้วย *T. harzianum* และ กรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและ treat ด้วย *T .viride* ตามลำดับ (ตารางที่ 6, ภาพที่ 11)

ตาราง 6 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และความงอกของเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีหลังจากปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วยเชื้อ *A. brassicicola* และ treat เมล็ดด้วย suspension ของเชื้อรา, สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ทดสอบโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น

กรรมวิธี	ความงอก (%)[1]	การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* (%)[1]
ปลูกเชื้อ + *Chaetomium globosum*	66.00 d[2]	64. 33 b
ปลูกเชื้อ + *Trichoderma harzianum*	83.00 b	21.50 f
ปลูกเชื้อ + *Trichoderma viride*	78.33 bc	29.00 e
ปลูกเชื้อ + Larminar	66.67 d	54.33 c
ปลูกเชื้อ + Pretomium	76.67 c	45.67 d
ปลูกเชื้อ + Unigreen	61.67 d	69.33 b
ปลูกเชื้อ + Rovral	91.00 a	8.33 g
ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อที่เมล็ด)	13.33 e	94.33 a
ชุดควบคุม (ไม่ได้ปลูกเชื้อที่เมล็ด)	75.00 c	24.00 ef
$LSD_{(p = 0.05)}$	**5.04**	**6.89**
CV (%)	**4.32**	**8.80**

[1]ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด

[2]ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD



ภาพที่ 11 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเมล็ดกะหล่ำปลีของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และความงอกของกะหล่ำปลีในกรรมวิธีต่างๆ ทดสอบโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น

6.2 ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อความงอกโผล่พ้นดินของต้นอ่อน (seedling emergence) ต้นกล้าปกติ (Normal seedling) ความยาว shoot (shoot length) น้ำหนักสด (fresh weight) และน้ำหนักแห้ง (dry weight)

จากการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อความงอกโผล่พ้นดินของกะหล่ำปลี พบว่าเมล็ดกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Rovral มีความงอกโผล่พ้นดินสูงสุด คือ 85% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* มีความงอก 71% ส่วนสารชีวภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดให้ผลใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันมาก ส่วนชุดควบคุมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียวมีความงอกโผล่พ้นดินต่ำสุด นอกจากนั้นกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Rovral ยังทำให้มีต้นกล้าปกติสูงสุด รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ส่วนชุดควบคุมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียวมีความงอกและจำนวนต้นกล้าปกติต่ำสุด (ตารางที่ 7, ภาพที่ 12) โดยพบว่าต้นกล้าตายหลังงอก โดยมีอาการต้นแคระแกร็น เจริญบิดเบี้ยว และพบบนใบมีจุดแผลสีน้ำตาลขนาดเล็ก บางครั้งพบจุดแผลบริเวณโคนต้นอ่อนและจะเจริญลุกลามขึ้นไปสู่ใบอ่อน ต้นกล้าที่มีอาการของโรคเมื่ออาการรุนแรงขึ้นจะแห้งตายในที่สุด

สำหรับการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อความยาว shoot ของต้นกล้ากะหล่ำปลี จากการเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่าทุกกรรมวิธีช่วยเพิ่มความยาวของ shoot เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว ซึ่งในกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วยสารชีวภัณฑ์ Pretomium มีความยาวของ shoot สูงสุด รองลงมาคือ กรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย Rovral และกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ตามลำดับ แต่ทั้งสามกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 7, ภาพที่ 12)

จากการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการเจริญของต้นกล้ากะหล่ำปลีในโรงเรือน โดยวัดผลจากน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้ากะหล่ำปลี ที่อายุ 4 สัปดาห์ ผลการวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 7 เมื่อทำการบันทึกผลและชั่งน้ำหนักของต้นกล้ากะหล่ำปลี พบว่าน้ำหนักสดของต้นกล้ากะหล่ำปลีในชุดควบคุมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียวให้น้ำหนักสดต่ำสุด ในกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วยสารชีวภัณฑ์ Pretomium ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุดรองลงมาคือ กรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย Rovral และกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ตามลำดับ (ตาราง 7, ภาพที่ 12)

ตาราง 7 เปอร์เซ็นต์ความงอกโผล่พ้นดินและความยาว shoot ของต้นกล้ากะหล่ำปลีหลังจากปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วยเชื้อ*Alternaria brassicicola* และ treat เมล็ดด้วย suspension ของเชื้อรา, สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ทดสอบโดยวิธีเพาะในดินฆ่าเชื้อ

กรรมวิธี	ความงอกโผล่พ้นดิน (%)[1]	ต้นกล้าปกติ (%)	ความยาว Shoot (ซม.)[2]	น้ำหนักสด (กรัม)[3]	น้ำหนักแห้ง (กรัม)[3]
ปลูกเชื้อ + *Chaetomium globosum*	57	50	4.56 bc[4]	6.416	0.527
ปลูกเชื้อ + *Trichoderma harzianum*	78	71	4.97 a	6.475	0.580
ปลูกเชื้อ + *Trichoderma viride*	62	60	4.90 ab	5.881	0.497
ปลูกเชื้อ + Larminar	55	45	3.67 d	3.580	0.390
ปลูกเชื้อ + Pretomium	65	60	5.08 a	9.425	0.742
ปลูกเชื้อ + Unigreen	66	56	4.69 ab	5.744	0.508
ปลูกเชื้อ + Rovral	85	80	5.00 a	8.029	0.679
ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อที่เมล็ด)	42	16	3.11 e	5.288	0.476
ชุดควบคุม (ไม่ได้ปลูกเชื้อที่เมล็ด)	53	40	4.23 c	5.910	0.520
$LSD_{(p=0.05)}$	**	**	**0.39**	**	**
CV (%)	**	**	**17.20**	**	**

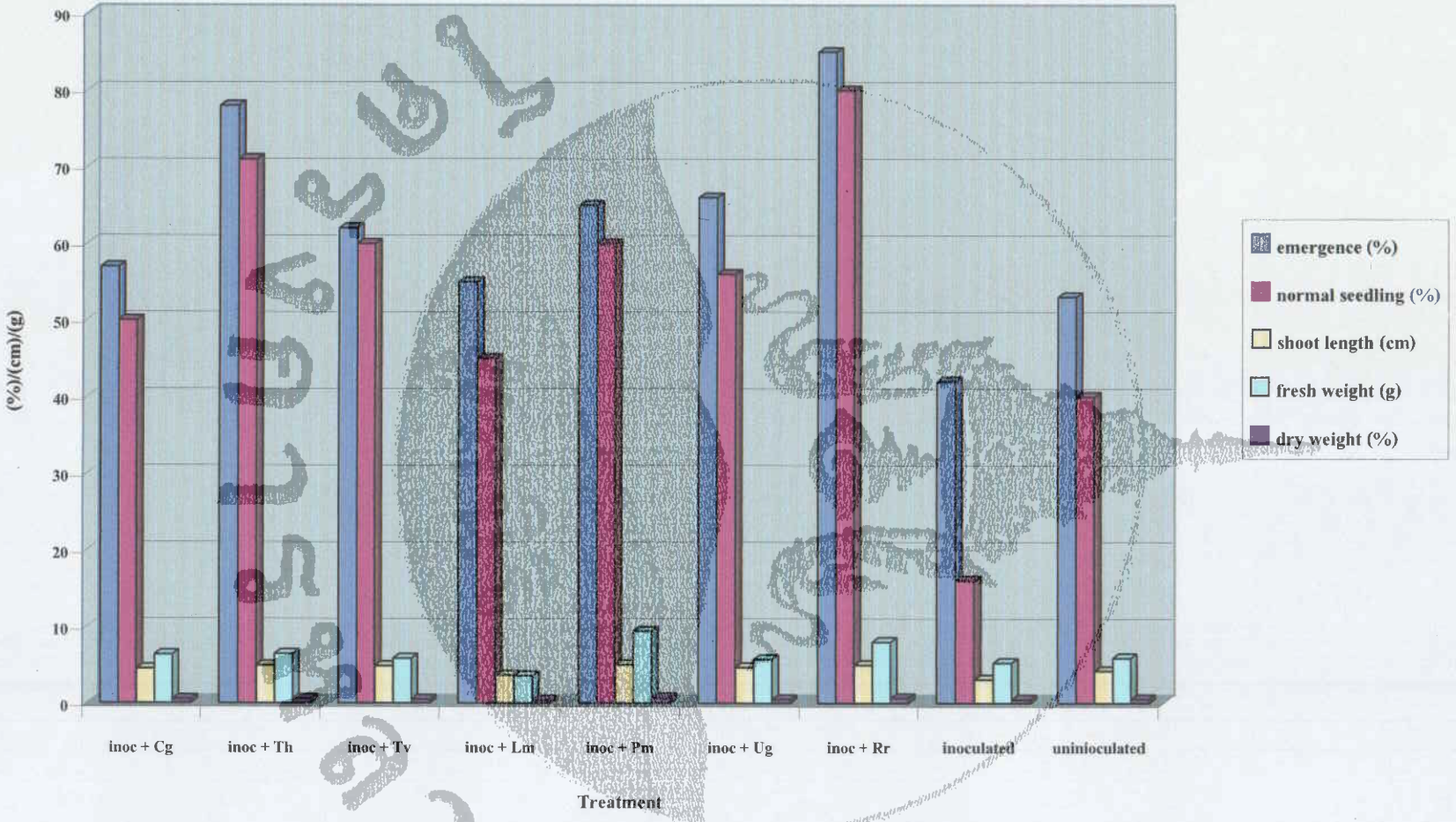
[1]จำนวนต้นงอกจากเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด

[2]ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้นของและกรรมวิธี

[3]ค่าจากต้นกล้าจำนวน 30 ต้นในแต่ละกรรมวิธี

[4]ตัวอักษรต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD

**ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบผลทางสถิติ



ภาพที่ 12 แผนภูมิแสดงความงอกโผล่พ้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาว shoot น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้ากะหล่ำปลีในกรรมวิธีต่างๆ ทดสอบโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดกะหล่ำปลี 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ No. 1 พันธุ์ New Jersey และพันธุ์ Ruby Perfection พบเชื้อราชนิดต่างๆ ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ในปริมาณที่แตกต่างกันของแต่ละพันธุ์ โดยพบเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พบเชื้อรา 14 ชนิด ได้แก่ *Alternaria brassicicola*, *A. tenuis*, *Alternaria* sp., *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* spp., *Phoma* sp., *Trichoderma harzianum*., *T. viride*. และ *Rhizopus* sp. โดยพันธุ์ New Jersey พบเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดมากที่สุด และพบเชื้อรา *A. brassicicola* ติดมากับเมล็ด 15.50% ส่วนความงอกของเมล็ดเรียงตามลำดับคือ พันธุ์ Ruby Perfection (95.0%) พันธุ์ No.1 (92.0%) และพันธุ์ New Jersey (80.25%) และจากการศึกษาการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราแต่ละชนิดมีการเจริญแตกต่างกัน โดยเชื้อรา *Trichoerma harzianum* และ *T. viride* มีอัตราการเจริญเร็วกว่าเชื้อราอื่นๆ โดยใช้เวลาประมาณ 2 – 3 วัน จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุต่อความงอกของต้นกล้ากะหล่ำปลีพบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดกะหล่ำปลีพันธุ์ New Jersey ที่ปลูกเชื้อที่เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำสุด คือ 15.00% จากการหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* ในกะหล่ำปลีพันธุ์ New Jersey ทั้งที่ไม่ฆ่าเชื้อและฆ่าเชื้อที่ผิว พบว่าเมล็ดที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อที่ผิวมีความงอกเมล็ด 82.75% ต้นงอกปกติ 60.25% และมีเชื้อรา *A. brassicicola* เจริญอยู่บนเมล็ดและต้นอ่อน 76.0% ส่วนในเมล็ดที่ฆ่าเชื้อที่ผิวมีความงอกเมล็ด 87.75% ต้นงอกปกติ 79.50% และมีเชื้อรา *A. brassicicola* เจริญอยู่บนเมล็ดและต้นอ่อนเพียง 1.0% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุนี้เจริญอยู่บน seed coat เมื่อเจริญคลุมทั้งเมล็ดจะทำให้เมล็ดไม่งอก ส่วนต้นอ่อนที่งอกมีอาการผิดปกติ พบเชื้อราทั้งส่วนของราก ลำต้นอ่อนและใบ

สำหรับการคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้จากพันธุ์กะหล่ำปลีมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโดยวิธี Dual culture พบว่า *Trichoderma harzianum* ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด รองลงมาได้แก่ *T. viride* และ *Chaetomium globosum* โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 73.96%, 71.05% และ 68.41% ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบลักษณะการยับยั้งระหว่างเชื้อราที่นำมาทดสอบกับเชื้อรา *A. brassicicola* มี 3 ลักษณะคือ เชื้อราหรือเชื้อราปฏิปักษ์จะเจริญชนกับเชื้อราสาเหตุแต่ไม่เจริญทับกัน ลักษณะที่สองคือ เชื้อราปฏิปักษ์เจริญทับเชื้อราสาเหตุ และลักษณะที่สามคือ จะเกิด clear zone ระหว่างเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุ โดยทั้งสามลักษณะจะส่งผลให้เชื้อราสาเหตุเจริญเติบโตช้าลงหรือถูกยับยั้งการเจริญเติบโต โดยเชื้อราหรือเชื้อราปฏิปักษ์มีคุณสมบัติมากน้อยแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การ

ยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งจากการทดลองนี้เชื้อราที่ให้ผลการยับยั้งแบบเจริญทับคือ *Trichoderma harzianum* และ *T. viride* ส่วน *Chaetomium globosum* ให้ผลในการเกิด clear zone ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะเจริญชนเชื้อราสาเหตุ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 3 ชนิดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่า Rovral มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของ *A. brassicicola* โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดคือ 87 – 100% จากการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อความงอกของเมล็ดกะหล่ำปลีและเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเมล็ดของเชื้อราสาเหตุ พบว่ากรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย Rovral ช่วยเพิ่มความงอกให้กับเมล็ดกะหล่ำปลีได้ดีที่สุด รองลงมาคือ กรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย *T. harzianum* และกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย Pretomium ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 กรรมวิธีให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่นๆ ส่วนผลต่อการเข้าทำลายเมล็ดของเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่ากรรมวิธีปลูกเชื้อและ treat ด้วย Rovral มีประสิทธิภาพช่วยลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเมล็ดของเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด รองลงมาคือ กรรมวิธีปลูกเชื้อและ treat ด้วย *T. harzianum* และ *T .viride* ตามลำดับ

จากการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อความงอกโผล่พ้นดินของกะหล่ำปลี พบว่ากรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย Rovral มีความงอกโผล่พ้นดินสูงสุด คือ 85% รองลงมาคือ กรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย *T. harzianum* มีความงอก 71% ส่วนสารชีวภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดให้ผลใกล้เคียง นอกจากนั้นกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย Rovral ยังทำให้มีต้นกล้าปกติสูงสุด รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย *T. harzianum* ส่วนชุดควบคุมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียวมีความงอกและจำนวนต้นกล้าปกติต่ำสุด โดยพบว่าต้นกล้าตายหลังงอก โดยมีอาการต้นแคระแกร็น เจริญบิดเบี้ยว และพบมีจุดแผลสีน้ำตาลเข้มขนาดเล็กบนใบ บางครั้งพบจุดแผลบริเวณโคนต้นอ่อนและจะเจริญลุกลามขึ้นไปสู่ใบอ่อน ต้นกล้าที่มีอาการของโรคเมื่ออาการรุนแรงขึ้นจะแห้งตายในที่สุด

สำหรับการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อความยาว shoot ของต้นกล้ากะหล่ำปลี พบว่าทุกกรรมวิธีช่วยเพิ่มความยาวของ shoot เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว ซึ่งในกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วยสารชีวภัณฑ์ Pretomium มีความยาวของ shoot สูงสุด รองลงมาคือ กรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย Rovral และกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย *T. harzianum* ตามลำดับ แต่ทั้งสามกรรมวิธีไม่มีผลแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับผลต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าพบว่ากรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วยสารชีวภัณฑ์ Pretomium ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุดรอง

ลงมาคือ กรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat ด้วย Rovral และกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ตามลำดับ

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ที่แยกได้จากเมล็ดกะหล่ำปลีมีประสิทธิภาพป้องกันกำจัดเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ดีรองมาจากสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Rovral ซึ่งสามารถช่วยลดการติดเชื้อจากเชื้อสาเหตุ โดยเป็นปรสิตกับเชื้อราสาเหตุและรวมทั้งมีการเจริญที่เร็ว ทำให้แย่งพื้นที่อาศัยของเชื้อราสาเหตุโรค นอกจากนั้นยังช่วยเพิ่มความงอกของเมล็ดจากการเพาะบนกระดาษชื้นและเพิ่มความงอกโผล่พ้นดินจากการเพาะในดินฆ่าเชื้อได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chang *et. al* (1986); Klefield and Chet (1992) กล่าวว่า การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถช่วยส่งเสริมให้เมล็ดพืชชนิดต่างๆ งอกได้เร็วขึ้นและจำนวนเมล็ดที่งอกมากขึ้น และเมื่อนำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดในระยะกล้าพบว่า ถึงแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารเคมี Rovral และสารชีวภัณฑ์ แต่ก็สามารถช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอก ต้นกล้าปกติ ตลอดจนช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นกล้ากะหล่ำได้ดีกว่าเมล็ดที่ไม่ได้ปลูกเชื้อและ treat เมล็ด ดังนั้นในงานวิจัยนี้สามารถนำเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีมาใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ ในการควบคุมโรคใบจุดกะหล่ำปลี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรค และเพื่อลดการใช้สารเคมี และเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในแปลงปลูกต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

พัฒนา สนธิรัตน์, วิรัช ชูบำรุง, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวันและ ปิยะ เกียรติก้อง. 2526. เชื้อรา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. วารสารโรคพืช. 3 (4) : 154 – 167.

มณีฉัตร นิกรพัณธุ์. 2543. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการผลิตผักสดและเมล็ดพันธุ์ผัก. โครงการฝึกอบรมการผลิตผักสดและเมล็ดพันธุ์ผัก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2542 – 2543. หน้า 188 – 189.

เกษม สร้อยทอง. 2533. ประสิทธิภาพของรา *Chaetomium cochliodes* และ *Chaetomium cuniculorum* ใช้ในการป้องกันโรคไหม้ของข้าว (Rice Blast) ที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae.* แก่นเกษตร 18 (2) : 89 – 96.

ดารา พวงสุวรรณ กัญจนา พุทธสมัย นพพร นภีรงค์ และ อนงค์นุช โตภาคงาม. 2521. รายชื่อเชื้อโรคของเมล็ดพันธุ์บางชนิดในประเทศไทย. สาขาโรคพืชผลิตผลเกษตร กองวิจัยโรคพืช กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

นลินี จาริกภากร พาณี หนูนิ่ม บุญมี วาริรสอาด และมนูญ เอกชัย. 2535. การควบคุมโรคข้าวโดยวิธีคลุกเมล็ดด้วย *Bacillus subtillis.* วารสารวิชาการเกษตร. 10: 85-89.

พัฒนา สนธิรัตน์, วิรัช ชูบำรุง, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวันและ ปิยะ เกียรติก้อง. 2526. เชื้อรา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. วารสารโรคพืช. 3 (4) : 154 – 167.

มณีฉัตร นิกรพัณธุ์. 2543. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการผลิตผักสดและเมล็ดพันธุ์ผัก. โครงการฝึกอบรมการผลิตผักสดและเมล็ดพันธุ์ผัก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2542 – 2543. หน้า 188 – 189.

สกุลศักดิ์ โอพารสกุล. 2540. โรคของพืชประเภทผักและการควบคุม. ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร สถาบันราชภัฏลำปาง. 542 หน้า.

สมพร แสนมณี. 2541. การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการควบคุมโรคใบจุดออลเทอนาเรียของกะหล่ำปลี. ปัญหาพิเศษหลักสูตรปริญญาตรี ภาควิชาโรคพืชคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 49 หน้า.

ศิริ คุ้มภัย และรัศมี ฐิติเกียรติพงศ์. 2539. การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี *ใน* เทคโนโลยีชีวภาพโรคพืชและจุลชีววิทยา หน้า 36 – 54. เอกสารเผยแพร่วิชาการโรคพืชและจุลชีววิทยาประจำปี 2539. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อรพรรณ วิเศษสังข์ และจุมพล สาระนาค. 2531. โรคใบจุดของพืชตระกูลกะหล่ำและการป้องกันกำจัด. วารสารโรคพืช. 8 (3 - 4) : 131 – 136.

ไฉน ยอดเพชร. 2542. พืชผักในตระกูลครูซิเฟอร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. ลินคอร์น. กรุงเทพฯ. 141 หน้า.

Ansari, N. A., M. Wajid Kahn, and A. Muheet. 1990. Evaluation of some fungicide for seed treatment and foliar application in management of damping – off seedling and blight of rapeseed caused by *Alternaria brassicae*. Mycopathologia 110 : 163 – 167.

Baker, K. F. and R. S. Cook. 1974. Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman Co., San Francises. 433 p.

Bassey, E. O., and R. L. Gabrielson. 1983. The effects of humidity, seed infection level, temperature and nutrient stress on cabbage seedling disease caused by *Alternaria brassicicola*. Seed Sci & Technol 11 : 403 – 410.

Chang, I. and T. Kornmendahl. 1968. Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. Phytopathology 58 : 1395-1401.

Chang, Y. C., R. Baker, O. Kletfeld. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent Trichoderma harzianum. Plant Disease 70 : 145 – 148.

Dixon, G. R. 1981. Vegetable Crop Disease. School of Agriculture. Aberdeen. 400 p.

Howell, C. R. 1991. Biological control of Pythium damping off cotton with seed coating preparations of *Gliocladium virens* . Phytopathology 81 : 738 – 741.

Humperson – Jones, F. M. 1989. Survival of *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola* on crop debris of oilseed rape and cabbage. Ann. Appl. Biol 115 : 45 – 50.

Kleifeld, O. and I. Chet. 1992. *Trichoderma harzianum* interaction with plants ane effect on growth response. Plant and Soil 144 : 267 – 272.

Mananghar, J. B., P. N. Thapliyal, K. L. Cavanaugh and J. B. Sinclair. 1987. Interaction between pathogenic and saprophytic fungi isolated from soybean roots and seeds. Mycopathologia 98 : 69-75.

Maude R. B. and F. M. Humperson – Jones. 1980. Studies on seed borne phase of dark leaf spot (*Alternaria brassicicola*) and grey leaf spot (*Alternaria brassicae*) of Brassicas. Ann. Appl. Biol 95 : 331 – 319.

Neergaard, P. 1977. Seed Pathology vol. I+II. The MacMillan Press Ctd. London.

Sivapalan, A. 1993. Fungi associated with broccoli seed and evaluation of fungal antagonists and fungicides for the control of seed-borne *Alternaria brassicicola*. Seed Sci & Technol 21 : 237 - 245.

Tripathi, N. N. and C. D. Koushik. 1984. Studies on the survival of *Alternaria brassicae* the causal organism of leaf spot of rapeseed and mustard. Madras Agric. J. 71 : 237 – 241.

Tsuneda, A. and W. P. Skoropad. 1977. Formulation of microsclerotia and chlamydospores from conidia of *Alternaria brassicae*. Can. J. Bot. 55 : 1276 – 1281.

Richardson, M. J. 1979. An annotated list of seed-borne diseases. 3th. ISTA. 319 p.

ภาคผนวก

โครงการหลวง

ตารางภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความงอกของต้นกล้ากะหล่ำปลี 3 พันธุ์ เปรียบเทียบระหว่างเมล็ดไม่ปลูกเชื้อและเมล็ดที่ปลูกเชื้อด้วย *Alternaria brassicicola*

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	5	2.2056×10^4	4,411.2	1,102.8	0.0000
REP (B)					
A * B	12	48			
Total	17	2.2104×10^4			
Grand average	1	5.1842×10^4			
$LSD_{(p = 0.05)}$	3.56				
CV (%)	3.73				

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดกะหล่ำปลีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* อายุ 14 วัน บนอาหาร PDA โดยวิธี Dual culture

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	14	3.1081×10^4	2,220.0	599.89	0.0000
REP (B)					
A * B	60	222.05	3.7008		
Total	74	3.1303×10^4			
Grand average	1	1.5584×10^5			
$LSD_{(p = 0.05)}$	2.434				
CV (%)	4.22				

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* บนอาหาร PDA ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	9	198.98	22.109	1,169 79	0.0000
REP (B)					
A * B	40	0.756			
Total	49	199.54			
Grand average	1	391.44			
$LSD_{(p = 0.05)}$	0.176				
CV (%)	4.91				

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	8	1.1126×10^4	1,390.7	318.26	0.0000
REP (B)					
A * B	36	157.31	4.3698		
Total	44	1.1283×10^4			
Grand average	1	2.3725×10^5			
$LSD_{(p = 0.05)}$	2.68				
CV (%)	2.88				

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความงอกของเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีหลังจากปลูกเชื้อที่เมล็ด และ treat เมล็ดด้วย suspension ของเชื้อรา, สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ทดสอบโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	8	1.2058×10^4	1,507.2	174.65	0.0000
REP (B)					
A * B	18	155.33	8.6296		
Total	26	1.2171×10^4			
Grand average	1	1.1907×10^5			
$LSD_{(p = 0.05)}$	5.04				
CV (%)	4.32				

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ของเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลีหลังจากปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat เมล็ดด้วย suspension ของเชื้อรา, สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ทดสอบโดยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	8	1.8305×10^4	2,288.1	142.02	0.0000
REP (B)					
A * B	18	290.0	16.111		
Total	26	1.8595×10^4			
Grand average	1	5.6124×10^4			
$LSD_{(p = 0.05)}$	6.89				
CV (%)	8.80				

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความยาว shoot ของต้นกล้ากะหล่ำปลีหลังจากปลูกเชื้อที่เมล็ดและ treat เมล็ดด้วย suspension ของเชื้อรา, สารชีวภัณฑ์ และสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ทดสอบโดยวิธีเพาะในดินฆ่าเชื้อ

Source	DF	SS	MS	F	P
TRT (A)	8	110.44	13.805	23.41	0.0000
REP (B)					
A * B	261	153.94	0.5898		
Total	269				
Grand average	1				
$LSD_{(p = 0.05)}$	0.39				
CV (%)	17.20				

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย