

# ผลของอุณหภูมิต่อเชื้อราปฏิปักษ์และการควบคุมเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schweinitz) โดยชีววิธี

## Effect of Temperature on Antagonistic Fungi and Their Biological Control of *Alternaria brassicicola* (Schweinitz)

ชวนพิศ บุญชิตศิริกุล<sup>1/</sup>  
Chuanpit Boonchitsirikul<sup>1/</sup>

**Abstract:** Epiphytic fungi for the biological control of *Alternaria brassicicola* (Schweinitz) causing agent of Chinese kale leaf spot were collected from healthy leaves of cabbage, Chinese cabbage, Chinese mustard, broccoli and Chinese kale from four different locations. Two hundred and twelve isolates were detected by hyphal tip isolation technique and only four isolates showed the best potential antagonistic to *A. brassicicola* in vitro using dual culture technique. They were identified as *Fusarium* sp. (isolate 011), *Fusarium* sp. (isolate 170), *Penicillium* sp. (isolate 075) and *Penicillium* sp. (isolate 173). Culture filtrates of these isolates were tested for their effects to *A. brassicicola* in terms of spore germination and spore production. The results revealed that *Penicillium* sp. (isolate 075) showed the highest inhibition of spore germination with the reduction of 76.72% whereas *Fusarium* sp. (isolate 011) gave the highest inhibition of spore production with the reduction of 98.23%. All other antagonistic isolates showed the effects on both spore germination and spore production with the reduction indicated more than 50%. The inhibition test of four antagonists to *A. brassicicola* by dual culture was also performed in different temperature conditions (19, 27 and 32 °C). The result showed that temperature had an effect on the strength of antagonistic isolates, antagonists were more vigorous when grown in warm condition, and the growth of the pathogen, there was the reduction of the number of spores and the spore size and the mycelia turned to lean as well. The most efficient antagonist of *A. brassicicola* was *Fusarium* sp. (isolate 011) when the dual culture test was performed at 32 °C with 48.24 % inhibition.

**Keywords:** Alternaria leaf spot, antagonistic fungi, crucifer, temperature

---

<sup>1/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

<sup>1/</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

**บทคัดย่อ:** จากการคัดเลือกเชื้อราผิวใบของพืชตระกูลกะหล่ำที่ไม่เป็นโรคคือ กะหล่ำปลี ผักกาดขาว ผักกาดเขียวปลี บร็อคโคลี่ และคะน้า จาก 4 แหล่งปลูก เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schweinitz) ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุด โดยวิธี hyphal tip isolation ได้ทั้งหมด 212 ไอโซเลท เมื่อทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *A. brassicicola* โดยวิธี dual culture สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดได้ 4 ไอโซเลทได้แก่ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) และ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 173) และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการงอก และจำนวนสปอร์ที่สร้างของเชื้อ *A. brassicicola* พบว่าเชื้อ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อสาเหตุได้ 76.72 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เชื้อ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) ให้ประสิทธิภาพสูงสุด สามารถยับยั้งจำนวนสปอร์ที่สร้างของเชื้อสาเหตุได้ถึง 98.23 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราปฏิปักษ์ทุกชนิดให้ผลในการยับยั้งเชื้อสาเหตุได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อในการควบคุมเชื้อ *A. brassicicola* โดยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 19, 27 และ 32 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิและเชื้อราปฏิปักษ์มีผลต่อเชื้อ *A. brassicicola* โดยทำให้เส้นใย ขนาดของสปอร์ และจำนวนสปอร์ที่สร้างลดลง เชื้อราปฏิปักษ์ที่ให้ผลดีที่สุดคือ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) โดยให้ผลในการยับยั้ง 48.24 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อราปฏิปักษ์มีแนวโน้มเจริญได้ดี และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

**คำสำคัญ:** โรคใบจุด *Alternaria*, เชื้อราปฏิปักษ์, พืชตระกูลกะหล่ำ, อุณหภูมิ

## คำนำ

โรคใบจุดของพืชตระกูลกะหล่ำที่เกิดจากเชื้อ *Alternaria brassicicola* (Schweinitz) เป็นโรคที่สำคัญ โรคหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดความเสียหายได้มาก โดยเชื้อสามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะต้นกล้าจะทำให้ต้นกล้าเน่าตาย หรือต้นกล้าแคระแกร็น และเมื่อย้ายลงในแปลงปลูก ต้นพืชจะไม่โต แต่ถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะต้นโต จะเกิดอาการเป็นจุดเล็ก ๆ ที่ใบในระยะเริ่มต้น และถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมกับการเกิดโรคคือ อากาศเย็นและความชื้นสูง จะทำให้แผลขยายออกเป็นวงกลมสีน้ำตาลหรือดำซ้อนกันหลายชั้น (concentric circle) (สกุลศักดิ์, 2540) และเมื่อมีการระบาดมากขึ้น เนื้อเยื่อกลางแผลจะบางคล้ายกระดาษทำให้มีขนาดไม่สม่ำเสมอ (Dixon, 1981) แผลเหล่านี้จะขยายและลามติดกัน ทำให้ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และแห้งกรอบ และถ้าเชื้อเข้าทำลายระยะดอก จะทำให้ดอกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และถ้าสภาพอากาศเหมาะสมก็จะทำให้เกิดอาการบนช่อดอก และฝักด้วย ส่วนฝักที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะแห้งและแตกก่อนกำหนด นอกจากนี้ยังทำให้เชื้อสามารถติดไปกับ

เมล็ดพันธุ์ ซึ่งสามารถทำให้เกิดความเสียหายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แก่ผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ในเขตภาคเหนือ และเป็นสาเหตุของโรคในระยะต้นกล้า รวมทั้งการแพร่ระบาดในแปลงปลูก อย่างไรก็ตามลักษณะอาการและความรุนแรงของโรค จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของผัก และความต้านทานโรคของสายพันธุ์ (จุมพล และอรพรรณ, 2540)

*A. brassicicola* เป็นเชื้อที่สามารถอาศัยข้ามฤดูอยู่บนซากพืช เมล็ด และ วัชพืช สปอร์จะถูกสร้างขึ้นบนใบพืชเก่า และบนจุดแผลของโรค อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์อยู่ในช่วง 24-28 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 16 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส การสร้างสปอร์จะลดลง แต่อย่างไรก็ตามถ้าใบพืชเปียกเป็นเวลา 20 ชั่วโมง หรือมากกว่า เชื้อสามารถสร้างสปอร์ได้จำนวนมาก (Agrios, 1997) โดยเฉลี่ยแล้วเวลาที่เชื้อใช้ในการสร้างสปอร์ คือ 13 ชั่วโมง ยกเว้นเมื่อฝนตกหรือมีความชื้นสูง การสร้างสปอร์จะใช้เวลาเพียง 9-18 ชั่วโมง (Humpherson-Jones and Phelps, 1989)

การผลิตสปอร์ส่วนใหญ่จะผลิตในช่วงเวลากลางคืน หรือช่วงที่มีดึกครึ้มติดต่อกันเป็นเวลานาน จะสังเกตพบว่าสปอร์จะสร้างบนใบที่แสดงอาการใบเหลือง สปอร์จะถูกปลดปล่อยออกมาในช่วงกลางวันซึ่งความชื้น

สัมผัสลดลง การเคลื่อนย้ายเครื่องมือต่าง ๆ หรือการเคลื่อนย้ายของคนงานในแปลง และลมจะช่วยให้เกิดการปลดปล่อย และการแพร่กระจายของสปอร์ (Butler and Jones, 1961)

สปอร์ของ *A. brassicicola* สามารถงอกในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 33-35 องศาเซลเซียส จากรายงานของ Degenhardt et al. (1982) พบว่า สปอร์ของ *A. brassicicola* เริ่มงอก 98 เปอร์เซ็นต์ ที่ 10 ชั่วโมง อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส

การเข้าทำลายกะหล่ำดอกของเชื้อเกิดที่อุณหภูมิ 10-35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 28-31 องศาเซลเซียส ส่วนการเข้าทำลายหัวของกะหล่ำนั้นเกิดที่อุณหภูมิ ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส ช่วงที่ใบพืชเปียกเป็นเวลานาน เนื่องจากน้ำค้างหรือฝนตกหนักต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน การเข้าทำลายของเชื้อจะรุนแรง และขนาดของแผลจะขยายใหญ่ขึ้น (Butler and Jones, 1961) จะเห็นได้ว่าเชื้อสามารถเข้าทำลายกะหล่ำได้ตั้งแต่อุณหภูมิต่ำจนถึงอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง

ในการนำเชื้อราปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรค มีปัจจัยหลายอย่างที่มีความสำคัญที่จะทำให้การควบคุมโรคโดยชีววิธีนั้นประสบความสำเร็จ อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะมีผลต่อกิจกรรมของเชื้อ จากการศึกษาโดย Pietikainen et al. (2005) พบว่าเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิสูงพบว่า การเจริญของเชื้อราจะลดลง และเชื้อราสามารถที่จะปรับตัวที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะมีผลต่ออัตราการหายใจของเชื้อราและแบคทีเรีย จากการศึกษาในเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคโคนเน่าในพืชหลายชนิด พบว่าเชื้อราทั้งสองมีระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญที่แตกต่างกัน เชื้อ *S. rolfsii* นั้นจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อ *Trichoderma* sp. เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เมื่อนำเชื้อมาทดสอบประสิทธิภาพที่อุณหภูมิแตกต่างกันโดยวิธี dual culture พบว่าที่อุณหภูมิมากกว่า

30 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. rolfsii* เจริญคลุมเชื้อ *Trichoderma* sp. ขณะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส เชื้อ *Trichoderma* sp. เจริญคลุมเชื้อ *S. rolfsii* (Mukherjee and Raghu, 1997) อย่างไรก็ตามในเขตภาคเหนือของประเทศไทยซึ่งมีการปลูกพืชตระกูลกะหล่ำอย่างกว้างขวาง อุณหภูมิเฉลี่ยในเขตภาคเหนือจะอยู่ระหว่าง 19-35 องศาเซลเซียส ดังนั้นเชื้อราปฏิปักษ์ที่ดีจึงควรเป็นเชื้อที่สามารถปรับตัวได้ดีที่ทุกอุณหภูมิ ก่อนนำมาใช้จริงจึงจำเป็นต้องทราบคุณสมบัติของเชื้อราปฏิปักษ์เหล่านั้นก่อน

วัตถุประสงค์ของการวิจัยก็เพื่อแยกหาเชื้อราปฏิปักษ์จากผิวใบจากพืชตระกูลกะหล่ำจากที่ต่าง ๆ ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *A. brassicicola* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดของคะน้า และผลกระทบของอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การแยกเชื้อราจากผิวใบพืชตระกูลกะหล่ำ

เก็บตัวอย่างใบพืชตระกูลกะหล่ำที่ไม่เป็นโรค 5 ชนิด ได้แก่ กะหล่ำปลี ผักกาดขาว ผักกาดเขียวปลี บร็อคโคลี่ และคะน้าจาก 4 แหล่งปลูก ได้แก่ 1) โครงการหลวงดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ 2) แปลงเกษตรกร อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน 3) แปลงพืชสวนคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ 4) แปลงผักเกษตรเขตชลประทาน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นำใบผักมาแช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อนาน 1 นาที เพื่อให้สปอร์ของเชื้อที่อยู่บนผิวใบตกลงในน้ำที่แช่ แล้วนำน้ำดังกล่าวมาทำการ streak plate บนอาหาร PDA ที่หยดกรดแลคติก จำนวน 10 หยดต่ออาหาร 1 ลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยวิธี hyphal tip isolation ก่อนนำไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์กับเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้าโดยวิธี dual culture

## การทดสอบเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการงอกและจำนวนสปอร์ที่สร้างของเชื้อ *A. brassicicola*

ทดสอบประสิทธิภาพการงอกของเชื้อ *A. brassicicola* โดยคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่ดีที่สุดจำนวน 4 ไอโซเลทเท่านั้น ที่ได้จากการทดสอบโดยวิธี dual culture มาเลี้ยงในอาหาร PDB (Potato Dextrose Broth) เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมากรองเอาเส้นใยและสปอร์ออก ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นนำสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อ *A. brassicicola* ความเข้มข้น  $0.1 \times 10^5$  สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีสารที่ได้จากการกรอง (culture filtrate) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย ที่เวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่เฉพาะสารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อ *A. brassicicola* ในอาหาร PDB

ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของเชื้อ *A. brassicicola* โดยทดสอบดูจำนวนสปอร์ที่สร้างในสารที่ได้จากการกรองของเชื้อราปฏิปักษ์ 4 ไอโซเลท ที่ได้ใช้ในการทดสอบการงอกของสปอร์ เตรียมสารที่ได้จากการกรอง เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพการงอก โดยนำสารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อ *A. brassicicola* ความเข้มข้น  $0.1 \times 10^5$  สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีสารที่ได้จากการกรอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วทำการนับจำนวนการสร้างสปอร์โดย haemocytometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยที่เวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใส่เฉพาะสารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อ *A. brassicicola* ในอาหาร PDB

## ศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *A. brassicicola* ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ทำการทดสอบวิธี dual culture โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ตัดชิ้นอาหาร PDA ที่เลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด *A. brassicicola* มาวางคู่กัน บนจานอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ วางให้ห่างกัน 4 เซนติเมตร และห่างจากขอบจานอาหารทั้งสองด้าน 2.5 เซนติเมตร นำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 19, 27 และ 32 องศาเซลเซียส ทุกอุณหภูมิ

กระทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเชื้อสาเหตุอย่างเดียว โดยวางห่างจากขอบจาน 2.5 เซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตผลการเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิต่าง ๆ และบันทึกผลการเจริญทุกวันเป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นจึงนำไปหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามวิธีการของเกษม (2532)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of rate growth หรือ PIRG)

$$\text{PIRG} = \frac{(R1 - R2) \times 100}{R1}$$

โดย R1 = รัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในชุดควบคุม

R2 = รัศมีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในจานอาหารเลี้ยงรวม

## ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *A. brassicicola* เมื่อทดสอบด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ใช้เข็มเย็บที่ปลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค *A. brassicicola* ในจานอาหารที่ทำทดสอบด้วยวิธี dual culture ที่อุณหภูมิ 19, 27 และ 32 องศาเซลเซียส ตรงบริเวณที่เส้นใยเจริญมาอยู่ใกล้กับปลายเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์มากที่สุด ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องและถ่ายภาพเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับเส้นใยของเชื้อ *A. brassicicola* ในจานอาหารชุดควบคุม

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### การแยกเชื้อราจากผิวใบพืชตระกูลกะหล่ำ

จากการแยกเชื้อราจากผิวใบของพืชตระกูลกะหล่ำทั้ง 5 ชนิดคือ กะหล่ำปลีเขียว ผักกาดขาว ผักกาดเขียวปลี และคะน้าจาก 4 แหล่งปลูกโดยวิธี hyphal tip isolation ได้เชื้อราทั้งหมด 212 ไอโซเลท และเมื่อทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อต่อเชื้อ *A. brassicicola* โดยวิธี dual culture ได้ทำการคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่ดีที่สุดได้จำนวน 4 ไอโซเลทเท่านั้น เมื่อทำการจำแนกเชื้อราทั้ง 4 พบว่าเป็นเชื้อ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011),

*Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170), *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) และ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 173) (ภาพที่ 1)

### การทดสอบเชื้อราปฏิปักษ์ที่ได้ต่อการงอกและจำนวนสปอร์ที่สร้างของเชื้อ *A. brassicicola*

เมื่อนำเชื้อราดังกล่าวไปทดสอบกับเชื้อ *A. brassicicola* โดยทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอก และจำนวนสปอร์ที่สร้างในสารที่ได้จากการกรองของเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลทคือ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) และ *Penicillium* sp. (isolate 173) พบว่าเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท ให้ผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์คิดเป็น 66.17, 65.12, 76.72 และ 53.43 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยเชื้อราปฏิปักษ์ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการงอกของสปอร์ ขณะเดียวกันให้ผลในการยับยั้งจำนวนสปอร์ที่สร้างคิดเป็น 98.23, 95.46, 92.94 และ 86.79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยที่เชื้อราปฏิปักษ์ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจำนวนสปอร์ที่สร้างสูงสุด แต่ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเชื้ออีก 2 ไอโซเลทคือ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) และ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) (ตารางที่ 1) ซึ่งเชื้อ *Penicillium* sp. โดยปกติจะเป็นเชื้อที่สร้างสารปฏิชีวนะได้แตกต่างกันตามชนิดของเชื้อ เช่น สารปฏิชีวนะ penicillin ผลิตโดยเชื้อ *Penicillium chrysogenum* หรือ สารปฏิชีวนะ griseofulvin ผลิตโดยเชื้อ *Penicillium griseofulvum* นอกจากนี้ยังเป็นเชื้อที่สามารถผลิตสารพิษได้แตกต่างกันด้วย (Harvey and Mason, 1988) จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Penicillium* sp. ทั้ง 2 ไอโซเลทให้ผลที่แตกต่างกันทั้งในการยับยั้งการงอกและจำนวนสปอร์ที่สร้าง ทั้งนี้ อาจเนื่องจากเชื้อผลิตสารปฏิชีวนะและสารพิษได้แตกต่างกัน สำหรับเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้มีการศึกษาและนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช เช่น *Penicillium oxalicum* นำมาใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) และ *Verticillium dahliae* ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Larena et al., 2003) ขณะเดียวกันเชื้อ

*Fusarium* sp. ก็เป็นเชื้ออีกชนิดหนึ่งที่สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิดเช่น vomitoxin, lycomarasin, fusariotoxin, fusaric acid และ fumonisin B1 ซึ่งอาจมีผลทำให้ไปยับยั้งการงอกของสปอร์ (Nelson et al., 1983) อย่างไรก็ตามสารพิษหรือสารปฏิชีวนะที่เชื้อทั้งสองผลิตขึ้นมายังต้องมีการศึกษาต่อไป

### ศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *A. brassicicola* ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

การที่จะนำเชื้อปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชนั้นจะต้องเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่สามารถปรับตัวได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุของโรคในกรณีที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น มีช่วงการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่างกัน หรือทนความเป็นกรดเป็นด่างได้ในระดับกว้าง นอกจากนี้ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพมากที่สุด เมื่อนำเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. brassicicola* ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ 19, 27 และ 32 องศาเซลเซียส โดยวิธี dual culture พบว่า ทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. brassicicola* มากนัก โดยดูจากการเลี้ยวเชื้อ *A. brassicicola* อย่างเดียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ (ชุดควบคุม) แต่เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลทพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งของเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยที่เชื้อ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011), *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) และ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) ให้ผลในการยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิสูงขึ้น โดยเชื้อ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) ให้เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งที่ 19, 27 และ 32 องศาเซลเซียส เท่ากับ 9.28, 25.95 และ 48.24 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เชื้อ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) ให้เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง 9.55, 31.94 และ 34.54 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) ให้เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง 12.15, 13.84 และ 45.98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 173) ให้ผลในการยับยั้งต่ำ ขณะที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola* ได้เลยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เชื้อราปฏิปักษ์ที่ให้ผลในการยับยั้งดีที่สุด

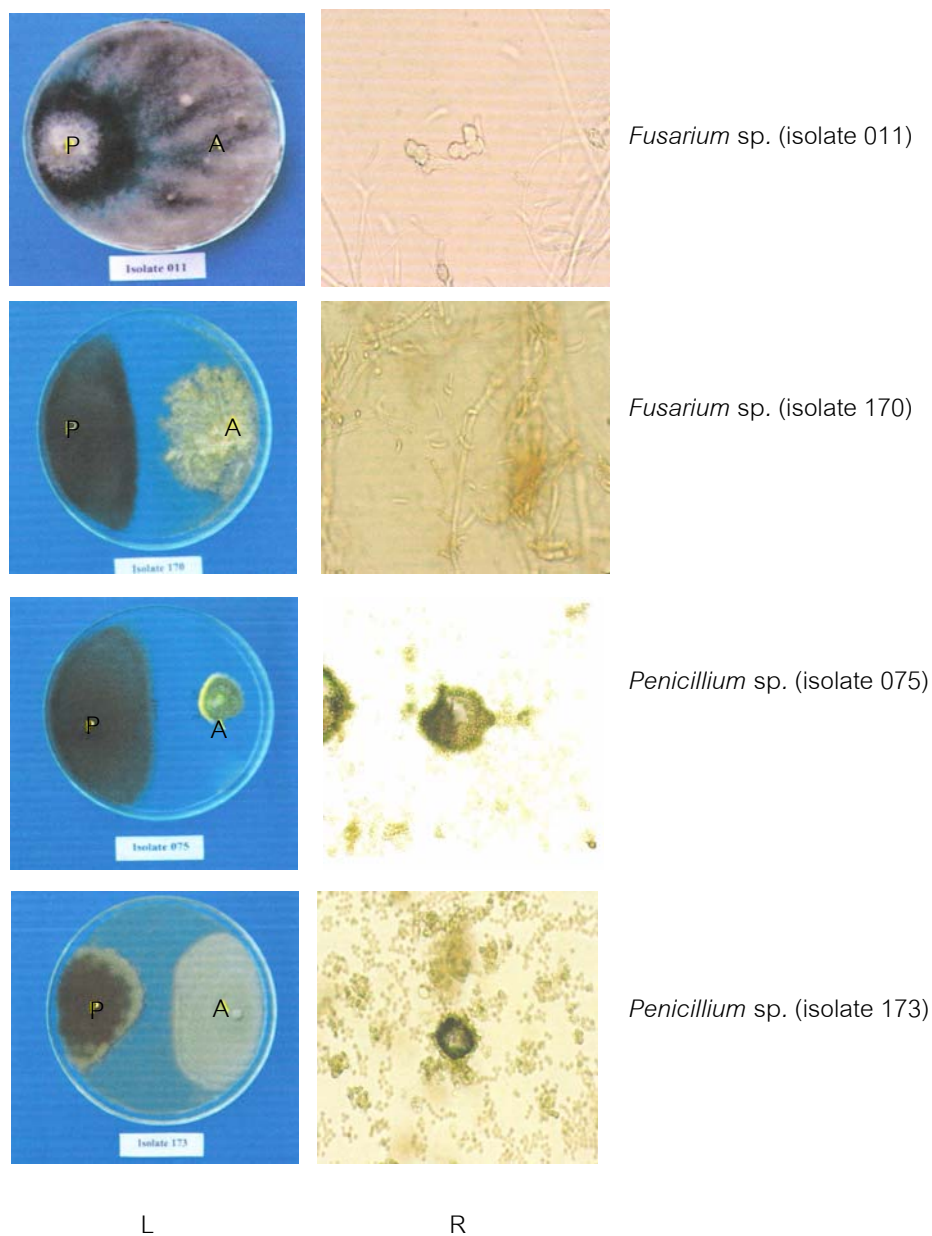


Figure 1 Four isolates of antagonistic fungi [*Fusarium* sp. (isolate 011), *Fusarium* sp. (isolate 170), *Penicillium* sp. (isolate 075) and *Penicillium* sp. (isolate 173)] showed the best potential antagonistic fungi to *Alternaria brassicicola* *in vitro* using dual culture technique.

L: Dual culture test; P = pathogen, A = antagonist

R: Spores and mycelia of each antagonistic fungi (40x)

Table 1 Percent inhibition of spore germination and spore production of *Alternaria brassicicola* in culture filtrate of four antagonistic fungi at 7 days.

| Antagonistic fungi                   | % inhibition of <i>A. brassicicola</i> <sup>1/</sup> |                                |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------|
|                                      | Spore germination <sup>2/</sup>                      | Spore production <sup>2/</sup> |
| <i>Fusarium</i> sp. (isolate 011)    | 66.17 b                                              | 98.23 a                        |
| <i>Fusarium</i> sp. (isolate 170)    | 65.12 b                                              | 95.46 a                        |
| <i>Penicillium</i> sp. (isolate 075) | 76.72 a                                              | 92.94 a                        |
| <i>Penicillium</i> sp. (isolate 173) | 53.43 c                                              | 86.79 a                        |

<sup>1/</sup> Each value is a mean of 3 replications.<sup>2/</sup> Means in column followed by the same letter are not significantly different at P=0.01 according to LSD.

คือ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) และ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) โดยให้เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้ง 48.24 และ 45.98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลในการยับยั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนเชื้อ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) ให้ผลดีรองลงมา (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 2) สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของเชื้อ *A. brassicicola* อยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส (Butler and Jones, 1961) ซึ่งประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการยับยั้งต่อเชื้อ *A. brassicicola* ได้ดีก็อยู่ระหว่าง 27-32 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะต่อการนำไปใช้ในการยับยั้งการงอกของสปอร์ซึ่งจะช่วยในการลดการเข้าทำลายของเชื้อ

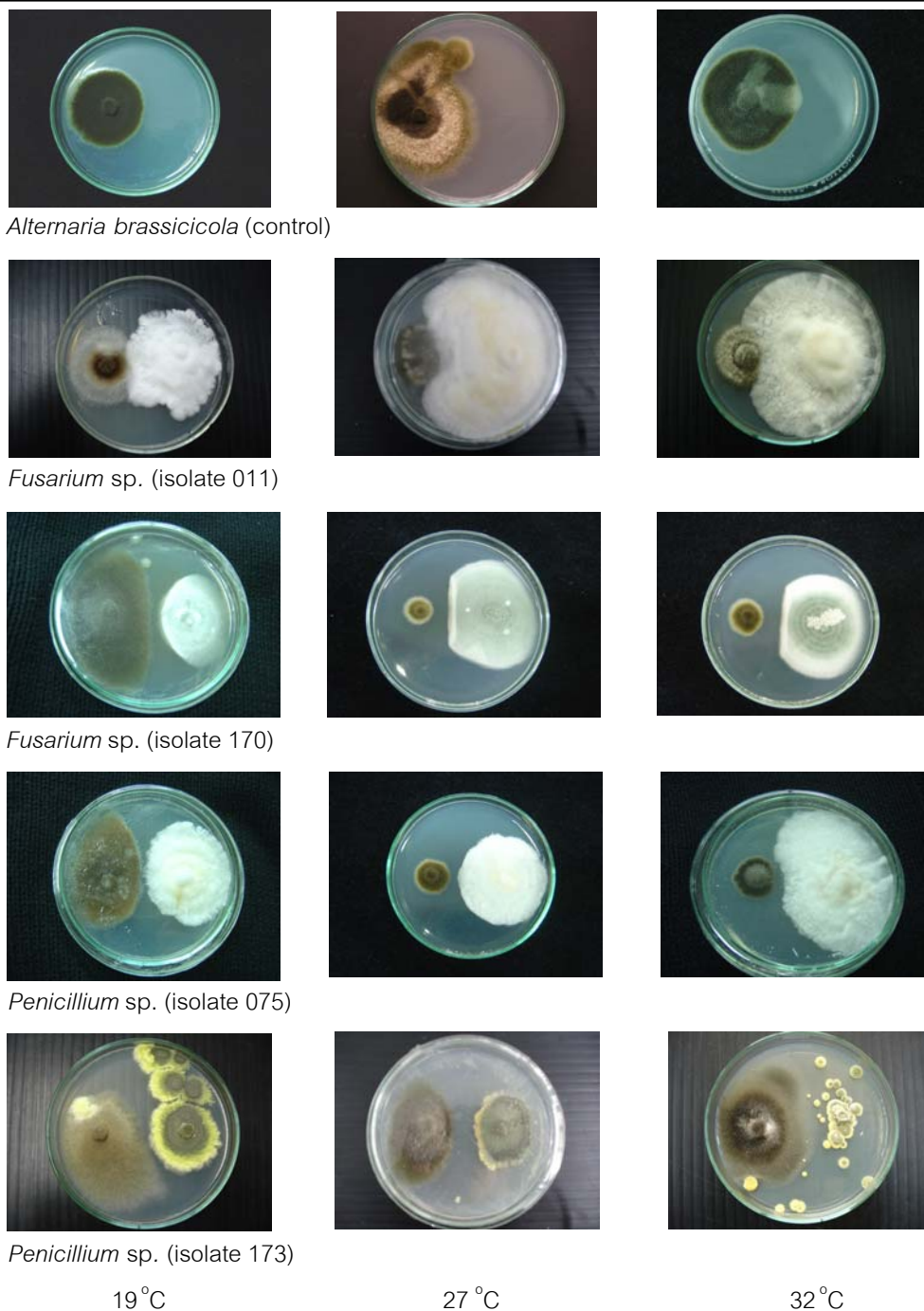
### ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *A. brassicicola* เมื่อทดสอบด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

เมื่อนำเส้นใยของเชื้อ *A. brassicicola* จากการทดสอบโดยวิธี dual culture มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า อุณหภูมิและชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์มีผลต่อเชื้อ *A. brassicicola* โดยมีผลต่อทั้งลักษณะของสปอร์ จำนวนสปอร์ที่สร้าง และลักษณะของเส้นใย คือเมื่อนำเชื้อ *A. brassicicola* ที่วางคู่กับเชื้อราปฏิปักษ์ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) มาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าที่อุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส ลักษณะของเชื้อ *A. brassicicola* ให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่ที่อุณหภูมิ 27 และ 32 องศาเซลเซียส

Table 2 Percent inhibition of 4 antagonistic fungi [*Fusarium* sp. (isolate 011), *Fusarium* sp. (isolate 170), *Penicillium* sp. (isolate 075) and *Penicillium* sp. (isolate 173)] to *Alternaria brassicicola* was analyzed by dual culture technique at different temperature.

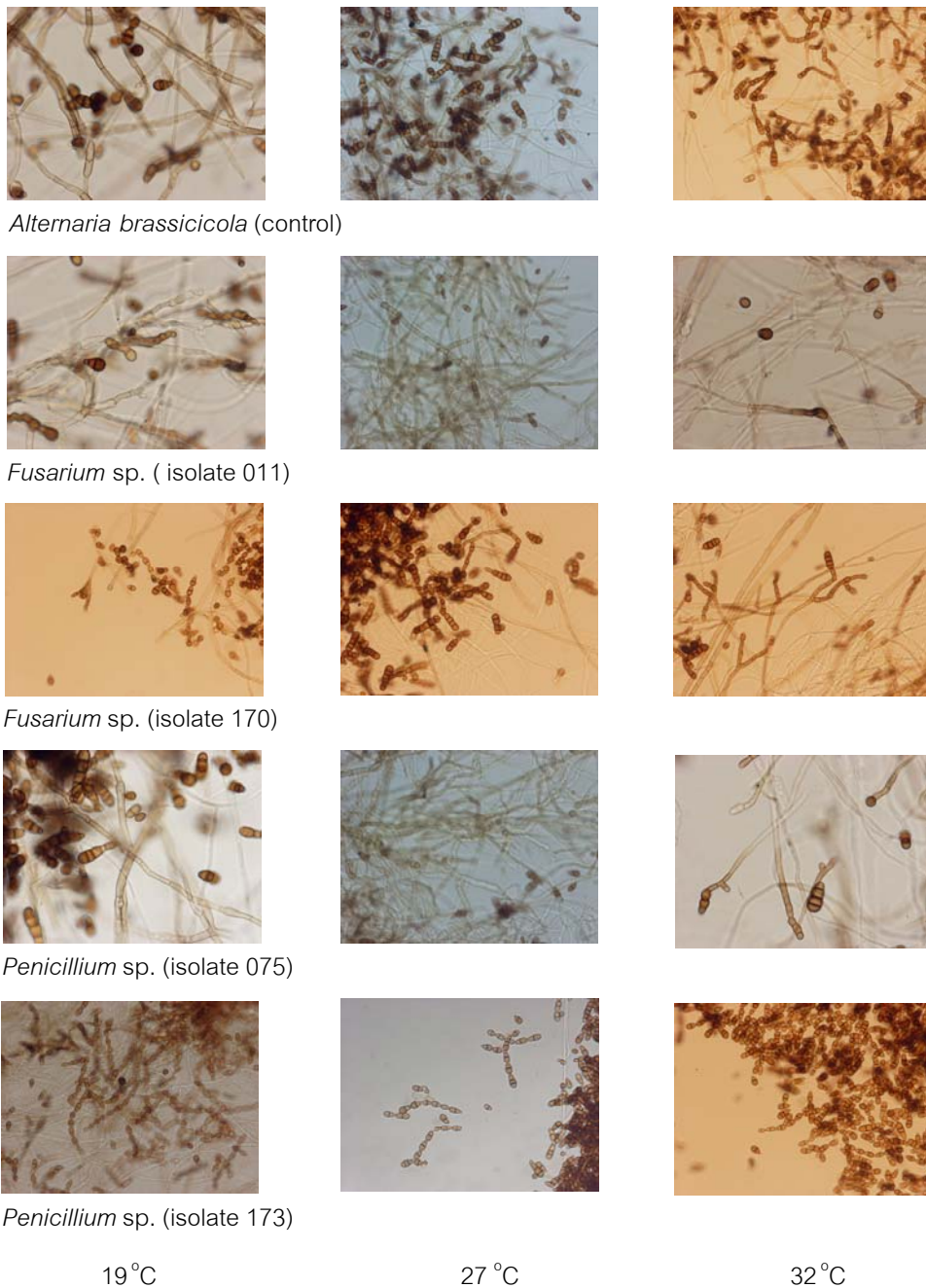
| Temperature (°C) | % inhibition of <i>A. brassicicola</i> <sup>1/</sup> |                                                 |                                                    |                                                    |
|------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                  | <i>Fusarium</i> sp. (isolate 011) <sup>2/</sup>      | <i>Fusarium</i> sp. (isolate 170) <sup>2/</sup> | <i>Penicillium</i> sp. (isolate 075) <sup>2/</sup> | <i>Penicillium</i> sp. (isolate 173) <sup>2/</sup> |
| 19               | 9.28 c                                               | 9.55 b                                          | 12.15 b                                            | 4.80 a                                             |
| 27               | 25.95 b                                              | 31.94 a                                         | 13.84 b                                            | 7.96 a                                             |
| 32               | 48.24 a                                              | 34.54 a                                         | 45.98 a                                            | 0.00 a                                             |

<sup>1/</sup> Each value is a mean of 3 replications.<sup>2/</sup> Means in column followed by the same letter are not significantly different at P=0.01 according to LSD.



**Figure 2** Reaction of 4 antagonistic fungi [*Fusarium* sp. (isolate 011), *Fusarium* sp. (isolate 170), *Penicillium* sp. (isolate 075) and *Penicillium* sp. (isolate 173)] to *Alternaria brassicicola* at different temperature was tested by dual culture technique and compared to the control. (Within each plate, Left = *Alternaria brassicicola*, Right = antagonistic fungi)





**Figure 3** Mycelia and spores morphological characteristics of *Alternaria brassicicola* when they were inhibited with 4 antagonistic fungi at different temperature under microscope (20x).

พบว่า มีผลทำให้จำนวนสปอร์ที่สร้างของเชื้อ *A. brassicicola* ลดลง สำหรับเชื้อราสาเหตุที่วางคู่กับเชื้อราปฏิปักษ์ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) พบว่าที่ 19 และที่ 27 องศาเซลเซียส จำนวนสปอร์ที่สร้าง ไม่แตกต่างกัน ส่วนที่ 32 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนสปอร์ที่สร้างลดลง ขนาดของสปอร์เล็กลง และที่ทุกระดับอุณหภูมิ พบว่าลักษณะของเส้นใยบางลง เมื่อนำเชื้อรามาวางคู่กับเชื้อราปฏิปักษ์ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) ที่ 19 องศาเซลเซียส พบว่าลักษณะของเส้นใยและลักษณะของสปอร์ ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ขณะที่อุณหภูมิ 27 และ 32 องศาเซลเซียส จำนวนสปอร์ที่สร้างลดลง และลักษณะของเส้นใยบางลง ในกรณีของเชื้อราสาเหตุวางคู่กับ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 173) ที่อุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *A. brassicicola* มีสปอร์ที่ขนาดเล็กกว่าที่อุณหภูมิ 27 และ 32 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 173) มีผลกระตุ้นการสร้างสปอร์ และทำให้เชื้อ *A. brassicicola* มีการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะต่อกันเป็นสายใยยาว และพบลักษณะดังกล่าวทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบดูการสร้างสปอร์ในสารที่ได้จากการกรอง ที่ให้ผลการจำนวนสปอร์ที่สร้างลดลง ทั้งนี้เนื่องจากผลของสารปฏิชีวนะ หรือสารพิษที่เชื้อราปฏิปักษ์สร้างขึ้นมานั่นเอง และเมื่อเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงก็ทำให้ปริมาณของสารดังกล่าวสามารถผลิตได้ดียิ่งขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้พบว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้วางคู่กับเชื้อราปฏิปักษ์มีการเจริญเติบโตช้า ซึ่งปกติเชื้อจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 14 วัน ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองได้กระทำในช่วงฤดูหนาวซึ่งอาจมีผลทำให้การเจริญของเชื้อช้าลง (ภาพที่ 3)

### สรุปผล

จากการแยกเชื้อราจากผิวใบของพืชตระกูลกะหล่ำที่ไม่เป็นโรค สามารถแยกได้ 212 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อราผิวใบดังกล่าวมาทดสอบดูประสิทธิภาพในการยับยั้งกับเชื้อ *A. brassicicola* โดยวิธี dual culture ได้

คัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์จำนวน 4 ไอโซเลทเท่านั้นที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อทดสอบในการยับยั้งการออกของสปอร์ และจำนวนสปอร์ที่สร้าง พบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทให้ผลในการยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อราปฏิปักษ์ที่ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการออกของสปอร์คือ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) โดยมีการยับยั้ง 76.72 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อที่สามารถยับยั้งจำนวนสปอร์ที่สร้างได้ดีที่สุดคือเชื้อ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งถึง 98.23 เปอร์เซ็นต์ แต่อย่างไรก็ตามก็ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเชื้ออีก 2 ไอโซเลทคือ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) และ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) และเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลท ให้ผลยับยั้งจำนวนสปอร์ที่สร้างสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

จากการทดสอบเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลทที่อุณหภูมิ 19, 27 และ 32 องศาเซลเซียส ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola* พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุของโรค ซึ่งเชื้อราปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคได้ดีทั้งที่ 27 และ 32 องศาเซลเซียส คือ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) และ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) และพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเชื้อราปฏิปักษ์ที่ให้ผลดีที่สุดคือ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 170) โดยให้ผลในการยับยั้ง 48.24 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 173) พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. brassicicola* ได้ และเมื่อได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและเชื้อราปฏิปักษ์ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทั้งอุณหภูมิและเชื้อราปฏิปักษ์มีผลต่อลักษณะของสปอร์และเส้นใยของเชื้อสาเหตุ เชื้อราปฏิปักษ์ที่ให้ผลชัดเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของสปอร์และเส้นใยคือเชื้อราปฏิปักษ์ *Fusarium* sp. (ไอโซเลท 011) และ *Penicillium* sp. (ไอโซเลท 075) ซึ่งพบว่า มีผลทำให้เชื้อราสาเหตุมีการสร้างสปอร์ลดลง สปอร์มีขนาดเล็ก และลักษณะของเส้นใยบางลง

## เอกสารอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 362 หน้า.
- จุมพล สารนาถ และ อรพรรณ วิเศษสังข์. 2540. โรคที่เกิดกับพืชผัก. วารสารเคหการเกษตร 70(5): 50-59.
- สกุลศักดิ์ โอฬารสกุล. 2540. โรคของพืชประเภทผักและการควบคุม. ภาควิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันราชภัฏรำไพพรรณี, ลำปาง. 542 หน้า.
- Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. 4<sup>th</sup> ed. Academic Press, San Diego. 635 pp.
- Butler, E.J. and S.G. Jones. 1961. Plant Pathology. Macmillan Company, New York. 250 pp.
- Degenhardt, K.J., G.A. Petrie and R.S.S. Morral. 1982. Effect of temperature on spore germination and infection of rape seed by *Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicae* and *Alternaria raphani*. Canadian Journal of Plant Pathology 4: 115-118.
- Dixon, G.R. 1981. Vegetable Crop Diseases. Macmillan Publishers Ltd., London. 404 pp.
- Harvey, J. and L. Mason, 1998. The Use and Misuse of Antibiotics in UK Agriculture. Part 1: Current Usage. Soil Association and British Organic Farmer, Bristol. 38 pp.
- Humpherson-Jones, F.M. and K. Phelps. 1989. Climatic factors influencing spore production in *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. Annals of Applied Biology 114: 449-458.
- Larena, I., P. Sabuquillo, P. Melgarejo and A. De Cal. 2003. Biocontrol of Fusarium and Verticillium wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. Journal of Phytopathology 151: 507-512.
- Nelson, P.E., T.A. Toussoun and W.F.O. Marasas (eds.). 1983. Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 pp.
- Pietikainen, J., M. Pettersson and E. Baath. 2005. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. FEMS Microbiology Ecology 52(1): 49-58.
- Mukherjee, P.K. and K. Raghu. 1997. Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*. Mycopathologia 139(3): 151-155.