BRT T-646001

ความหลากชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และการประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

SPECIES DIVERSITY OF ANTAGONISTIC FUNGUS, *TRICHODERMA* SPP. IN TOMATO SEED PRODUCTION FIELDS AND THEIR APPLICATION FOR BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT DISEASES

นางสาวมาลัยพร เชื้อบัณฑิต

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2548

ISBN 974-284-485-3

0004/50

RECEIVED

BY | 31/01/50 DATE

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

ความหลากชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และการประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

SPECIES DIVERSITY OF ANTAGONISTIC FUNGUS, *TRICHODERMA* SPP. IN TOMATO SEED PRODUCTION FIELDS AND THEIR APPLICATION FOR BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT DISEASES

นางสาวมาลัยพร เชื้อบัณฑิต

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2548

ISBN 974-284-485-3

ความหลากชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และการประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

นางสาวมาลัยพร เชื้อบัณฑิต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2548

ISBN 974-284-485-3

SPECIES DIVERSITY OF ANTAGONISTIC FUNGUS, *TRICHODERMA* SPP. IN TOMATO SEED PRODUCTION FIELDS AND THEIR APPLICATION FOR BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT DISEASES

MISS MALAIPORN CHUEBANDIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN PLANT PATHOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2005

ISBN 974-284-485-3

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และการประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นางสาวมาลัยพร เชื้อบัณฑิต

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. พิศาล ศิริธร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. นิวัฒ เสนาะเมือง)

....

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมหมาย ปรีเปรม) (รองศาสตราจารย์ ดร. อัศนี ปาจีนบูรวรรณ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย คณบดีคณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

มาลัยพร เชื้อบัณฑิต. 2547. ***ความหลากชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ Trichoderma* spp. ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และการประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. [ISBN 974-284-485-3]

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, รศ.ดร.พิศาล ศิริธร, รศ.ดร.นิวัฒ เสนาะเมือง

บทคัดย่อ

ตัวอย่างดินจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพืชตระกูลแตงในจังหวัดขอนแก่นและมหาสารคาม จำนวน 70 ตัวอย่างเมื่อนำมาแยกเชื้อราในดิน โดยวิธี soil dilution plate บนอาหาร Martin's medium สามารถแยกเชื้อราได้ จำนวน 186 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบศักยภาพของเชื้อราในดินนั้นในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และพืชตระกูลแตงในห้องปฏิบัติการพบว่ามีเชื้อรา 62 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) สาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ เชื้อราจำนวน 28 ไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงเทศ และจำนวน 20 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวาได้ โดยเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลตนี้เป็นเชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ของทั้งเชื้อ FOL, FOM และ FOC สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงเทศ และแตงกวาได้ เส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะเจริญปกคลุมเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวจนไม่สามารถเจริญต่อไปได้อีก ภายใน 7 วันหลังจากการปลูกเชื้อ และเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศและแตงกวาในสภาพเรือนทดลองพบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ โดยไอโซเลตที่ไม่ทำให้มะเขือเทศเป็นโรคเลยเมื่อเทียบกับกรรมวิธีทดสอบ ได้แก่ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2701, *T. reesei* ไอโซเลต TKK1501, *T. koningii* ไอโซเลต TKK6701, *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2801 และ *T. piluliferum* ไอโซเลต TKK4002 ส่วนไอโซเลตที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของแตงกวาได้ดี ได้แก่ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2101, *T. koningii* ไอโซเลต TKK1802, TKK2203, TKK3702, TKK4301, TKK6201, *T. harzianum* ไอโซเลต KK2801 และ *T. piluliferum* ไอโซเลต TKK4002 จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว สามารถจำแนกและบ่งชี้ชนิดของเชื้อราได้ดังนี้ *T. harzianum*

จำนวน 5 ไอโซเลต *T. koningii* จำนวน 10 ไอโซเลต *T. piluliferum* จำนวน 1 ไอโซเลต *T. aureoviride* จำนวน 3 ไอโซเลต และ *T. reesei* จำนวน 1 ไอโซเลต เมื่อทดสอบกิจกรรมเชิงปริมาณ (quantitative assay) ของเอนไซม์ cellulase protease chitinase และ β-1,3-glucanase ของเชื้อรา ปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 20 ไอโซเลต พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2101 และ *T. koningii* ไอโซเลต TKK4301 พบกิจกรรมของเอนไซม์ celluase สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ และ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2701, *T. koningii* ไอโซเลต TKK2203, TKK2602, TKK4301, และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK3803 พบกิจกรรมของเอนไซม์ protease สูง ในขณะที่เกือบทุกไอโซเลตพบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ยกเว้น *T. koningii* ไอโซเลต TKK3702 และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK3803 ที่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase บนอาหารแข็ง เชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2801, *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1001 และ *T. koningii* ไอโซเลต TKK3501 มีกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase สูงที่สุด เชื้อราปฏิปักษ์ ทั้ง 20 ไอโซเลตได้นำมาทดสอบความทนทานต่อสารเคมีแค็บแตน แมนโคเซ็บ คาร์บอกซิน และคาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถทนทานต่อสารเคมีคาร์บอกซินได้ดี ทนทานต่อสารเคมีแค็บแตน และแมนโคเซ็บได้บ้าง แต่ไม่มีไอโซเลตใดเลยที่ทนทานต่อสารเคมีคาร์เบนดาซิม โดยไอโซเลตที่มีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีร่วมกับการใช้สารเคมี ได้แก่ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1001, *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2501, *T. koningii* ไอโซเลต TKK2602, TKK3501 และ TKK4701 การศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความหลากชนิด (species diversity) ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก ศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวและแนวทางการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศและพืชตระกูลแตงร่วมกับสารเคมีฆ่าเชื้อรา

Malaiporn Chuebandit. 2005. ***Species Diversity of Antagonistic Fungus, Trichoderma* spp. *in Tomato Seed Production Field and their Application for Biological Control of Plant Diseases.*** Master of Science Thesis in Plant Pathology, Graduate School, Khon Kaen University. [ISBN 974-284-485-3]

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Dr. Weerasak Saksirirat,
Assoc. Prof. Dr. Pisan Sirithorn,
Assoc. Prof. Dr. Niwat Sanoamuang

ABSTRACT

One hundred eighty six isolates of soil fungi were derived from tomato and cucurbit seed production fields of Khon Kaen and Maha Sarakam provinces by using Martin' s medium according to soil dilution plate method. The soil fungi were tested on antagonistic potential against Fusarium wilt pathogens of tomato and cucurbits, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *F. oxysporum* f.sp.*melonis* (FOM) and *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC). Sixty - two isolates of soil fungi were effective against FOL, 28 isolates against FOM and 20 isolates against FOC. These 20 isolates were members of the genus *Trichoderma* spp. and showed coincidently antagonistic property to all Fusarium wilt pathogens, when tested on potato dextrose agar. Colony of *Trichoderma* spp. occupied the colonies of FOL, FOM and FOC in 7 days after inoculation. Based on colony and microscopic characteristics, these 20 *Trichoderma* spp. isolates were identified as *Trichoderma harzianum*, *T. koningii* , *T. piluliferum*, *T. aureoviride* and *T. reesei* for 5, 10, 1, 3 and 1 isolate respectively. All 20 isolates of the fungi were evaluated on their extra cellular degrading enzyme activities (quantitative test), cellulolytic, proteolytic, chitinolytic and β-1,3-glucanolytic activities. The *T. aureoviride* (TKK2701) and *T.koningii* (TKK4301) show higher cellulolytic activity than other isolates. The *T. aureoviride* (TKK2701), *T. koningii* (TKK2602, TKK4301, TKK2203), and *T. harzianum* (TKK3803) expressed high activity of protease. Chitinolytic activity was detectable form most isolates except *T. koningii* (TKK3702) and *T. harzianum* (TKK3803). For β-1,3glucanolytic activity, it was found that *T. harzianum* (TKK2801), *T. aureoviride* (TKK1001) and *T. koningii* (TKK3501) produced high activity of β-1,3 glucanase.

The antagonistic fungi were tested on effect of fungicides at different concentrations of captan, mancozeb, carboxin and carbendazim, against hyphal growth under laboratory condition. All isolates of fungi were tolerant toward carboxin, captan, and slightly tolerant against mancozeb. However, there were sensitive to carbendazim. The high potential isolates for integrated use with fungicide for control of Fusarium wilt of tomato and cucurbit were *T. aureoviride* (TKK1001), *T. harzianum* (TKK2501), and *T. koningii* (TKK2602, TKK3501, TKK4701).

This study suggests the species diversity of antagonistic fungus *Trichoderma* spp. in vegetable seed production fields for export, the potential of the fungus to control Fusarium wilt and the integrated use of antagonist and fungicide in combination to control Fusarium wilt of tomato and cucurbit.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.พิศาล ศิริธร รองศาสตราจารย์ ดร.นิวัฒ เสนาะเมือง กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาช่วยเหลือให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตรวจแก้และให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ในด้านการเรียน การทำวิทยานิพนธ์ การเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิวิลัย ศิริมังครารัตน์ ที่สละเวลาช่วยเหลือให้คำปรึกษา พร้อมทั้งแนะแนวทางในการวิเคราะห์ข้อมูล และให้ข้อเสนอแนะต่างๆ อันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดรุณี โชติษฐยางกูร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและเสนอข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้ แนวความคิด ประสบการณ์ อบรม และชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย (BRT)รหัส BRT_T646001 และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ บริษัทเจียไต๋ จำกัด ที่เอื้อเฟื้อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* เพื่อใช้ในการทดลอง ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อบุญชุบ เชื้อบัณฑิต คุณแม่จันทร์เที่ยง เชื้อบัณฑิต คุณพิเชษฐ์ เชื้อบัณฑิต คุณสายฝน เชื้อบัณฑิต คุณเนตรดาว เชื้อบัณฑิต คุณชัชวาล เชื้อบัณฑิต คุณสุทัศน์ ทากุดเรือ และหลานๆ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจ ตลอดจนช่วยเหลือทางด้านเงินทุนเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณสิทธิพงศ์ ศรีสว่างวงค์ คุณอนันต์ วงเจริญ คุณรภีพร หีบแก้ว คุณเพ็ญนภา โสใหญ่ คุณอรวินทินี ชูศรี คุณยุวลักษณ์ ผายดี คุณวุฒิไกร บุญศรี คุณสุดาพร พลหงษ์ คุณสุวิตา แสไพศาล และ พี่ เพื่อน และน้องนักศึกษาภาควิชาโรคพืชวิทยา ภาควิชากีฏวิทยา และภาควิชาพืชสวนที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจและมีส่วนช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์และการเรียนระดับปริญญาโทเป็นอย่างดีตลอดมา

มาลัยพร เชื้อบัณฑิต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
2.1 โรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจของพืชตระกูลมะเขือ และตระกูลแตง	4
2.2 การจัดการและการควบคุมโรคพืช	10
2.3 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma* spp.	10
2.4 การจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	13
2.5 การจัดจำแนกชนิด (species)ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะการแตกกิ่งก้านของ conidiophore	14
2.6 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามวิธีการของ Samuels และคณะใน web site	15
2.7 งานวิจัยด้านการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 สถานที่และระยะเวลาดำเนินการวิจัย	21
3.2 แผนการดำเนินการวิจัย	21
3.3 การเก็บรวบรวมตัวอย่างดิน	21
3.4 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ แตงกวา และแตงเทศ ในสภาพห้องปฏิบัติการ	22
3.6 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ และแตงกวา ในสภาพเรือนทดลอง	22
3.7 การจัดจำแนก และบ่งชี้ในระดับชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์	23
3.8 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์	24
3.9 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมี	26
3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลในทางสถิติ	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การเก็บรวบรวมดินจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก	28
4.2 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน	28
4.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงกวา และแตงเทศ	38
4.4 การจัดจำแนกและบ่งชี้ในระดับชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีศักยภาพ การเป็นเชื้อราปฏิปักษ์	46
4.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพเรือนทดลอง	49
4.6 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma* spp.	52
4.7 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีฆ่าเชื้อรา	64
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการศึกษา	73
5.1 การเก็บรวบรวมและการแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดิน	73
5.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงกวา และแตงเทศ ในห้องปฏิบัติการ	73
5.3 การจัดจำแนกและบ่งชี้ในระดับชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.	74
5.4 การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพเรือนทดลอง	75
5.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์	75
5.6 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมี	77

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 6 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	80
เอกสารอ้างอิง	84
ภาคผนวก	89
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	90
ภาคผนวก ข การเตรียม buffer	93
ภาคผนวก ค อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์	95
ภาคผนวก ง สารเคมีและการคำนวณ	98
ภาคผนวก จ การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp.	101
ประวัติผู้เขียน	109

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium จากตัวอย่างดิน แปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม 30

ตารางที่ 2 แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน และจำนวนเชื้อราที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 38

ตารางที่ 3 ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อราในดินจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucurmerinum* (FOC) สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงโม และแตงกวา คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ 40

ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *F. oxysporum* f.sp. *cucurmerinum* (FOC) และ *F. oxysporum* f.sp. melonis (FOM) ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จำนวน 20 ไอโซเลต 44

ตารางที่ 5 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3-5 วัน 47

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และแตงกวาในสภาพเรือนทดลอง 51

ตารางที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อทดสอบการย่อย carboxymethyl cellulose-sodium salt ในอาหารแข็ง malt extract 53

ตารางที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อทดสอบการย่อย เจลลาติน ในอาหารแข็ง malt extract 54

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อทดสอบการย่อย colloidal chitin ในอาหารแข็ง PDA 58

ตารางที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ 60

ตารางที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ ไคติเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ 61

ตารางที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ 62

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ 63

ตารางที่ 14 การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ บนอาหาร PDA ที่ผสมสารฆ่าเชื้อราแค็บแตนผสมในอัตราความเข้มข้น 0-30,000 มิลลิกรัม ต่อลิตร ของสารออกฤทธิ์ (active ingredient) โดยวัดเป็นมิลลิเมตร 65

ตารางที่ 15 การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีสารเคมีฆ่าเชื้อราแมนโคเซ็บผสมอยู่ 0-40,000 มิลลิกรัม ของสารออกฤทธิ์ต่อลิตร ของสารที่ออกฤทธิ์ (actove omgredoemt) โดยวัดเป็นมิลลิเมตร 67

ตารางที่ 16 การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีสารเคมีฆ่าเชื้อราคาร์บอกซินผสมอยู่ 0-5,000 มิลลิกรัม ของสารออกฤทธิ์ต่อลิตร ของสารที่ออกฤทธิ์ (active ingredient) โดยวัดเป็นมิลลิเมตร 69

ตารางที่ 17 ข้อมูลศักยภาพของการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ 71

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา 29

ภาพที่ 2 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *F. oxysporum* f.sp. *cucurmerinum* (FOC), *F. oxysporum* f.sp. melonis (FOM) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วันหลังจากปลูกเชื้อ 45

ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และโครงสร้างทางจุลภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 48

ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และโครงสร้างทางจุลภาคของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 49

ภาพที่5 ลักษณะของต้นมะเขือเทศหลังจากปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ร่วมกับเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เป็นเวลา 10-14 วัน 50

ภาพที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulolytic activity) เมื่อตรวจสอบการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose-sodium salt (CMC) ในอาหาร malt extract agar pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วราดด้วย Lugol's iodine 55

ภาพที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (proteolytic activity) โดยใช้ culture filtrate ย่อยเจลลาติน ที่ผสมในอาหาร malt extract agar pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ประเมินจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณโปร่งแสงรอบโคโลนี 56

ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพการย่อยไคติน ในอาหาร PDA ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ โดยประเมินจากบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้น และให้ค่าคะแนนเป็นบวกในกรณีที่พบบริเวณโปร่งแสง และลบในกรณีที่ไม่พบบริเวณโปร่งแสง 57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ 9 ลักษณะการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2602 อายุ 5 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีฆ่าเชื้อราแค็บแตน ความเข้มข้นจาก 0, 30, 300, 3,000 และ 30,000 mg / L (เรียงตามลำดับ 1-5) 64

ภาพที่ 10 ลักษณะการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2602 อายุ 5 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีฆ่าเชื้อราแมนโคเซ็บ ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์จาก 0, 40, 400, 4,000 และ 40,000 mg / L (เรียงตามลำดับ 1-5) 66

ภาพที่ 11 ลักษณะการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2602 อายุ 5 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีฆ่าเชื้อราคาร์บอกซิน ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ จาก 0, 5, 50, 500 และ 5,000 mg / L (เรียงตามลำดับ 1-5) 68

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ในปัจจุบันของประเทศไทย มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) และพืชตระกูลแตง เป็นพืชผักที่สำคัญทางเศรษฐกิจและมีคุณค่าทางอาหาร ในปี พ.ศ. 2542 มีการส่งออกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศถึง 29,719.90 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 185.6 ล้านบาท (พิพัฒน์, 2544) ในปี พ.ศ. 2543 มีการส่งออกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเพิ่มมากขึ้นถึง 47,145 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าประมาณ 322 ล้านบาท และมีการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงโมประมาณ 145,820 กิโลกรัม มูลค่ารวมประมาณ 140.47 ล้านบาท (พิศาล, 2544) และในปี 2545 มีการส่งออกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปริมาณ 27,941 กิโลกรัม มูลค่าประมาณ 229.8 ล้านบาท (เกรียงศักดิ์, 2545) การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออกเป็นกิจกรรมที่เกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือทำหลังฤดูการทำนาทำให้มีรายได้และลดการเคลื่อนย้ายแรงงานไปยังภูมิภาคอื่นๆ แนวโน้มของจำนวนเกษตรกรและปริมาณการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชผักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆทุกปีแต่ข้อจำกัดของการส่งออกเมล็ดพันธุ์ลูกผสมอยู่ที่โรคต้องห้ามที่ประเทศผู้นำเข้าระบุไว้ โดยที่เมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่จะได้มาตรฐานต้องมีการตรวจแปลงเพื่อรับรองการปลอดโรคพืชตั้งแต่ขั้นตอนการปลูกจนได้มาซึ่งเมล็ดพันธุ์ หากขั้นตอนการตรวจโรคต้องห้ามในแปลงไม่ผ่าน เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้นั้นจะไม่ได้รับ การรับรองคุณภาพการปลอดโรคของเมล็ดพันธุ์ และไม่สามารถส่งออกไปยังประเทศที่รับซื้อเมล็ดพันธุ์ได้

โรคที่สำคัญที่อาจตรวจพบและเป็นปัญหาต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เช่น โรคเหี่ยวเขียว (Bacterial wilt) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum*; โรคราเม็ดผักกาด (Sclerotium wilt) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii*; โรคเหี่ยวเหลือง (Fusarium wilt) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 ; โรคเน่าคอดิน (Damping off) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* นอกจากมะเขือเทศแล้ว พืชตระกูลแตง เช่น แตงโม แตงกวา และแตงเทศเป็นพืชที่มีการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออก ซึ่งมีพื้นที่การผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นส่วนใหญ่ พืชตระกูลแตงเหล่านี้มีโรคพืชเข้าทำลายระบบรากหลายชนิด เช่น โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* และโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* เป็นต้น

การป้องกันกำจัดโรคเหล่านี้ การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นวิธีการหลักที่เกษตรกรผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ยังปฏิบัติอยู่ เช่น การใช้สารเคมีเบนเลท, ไดเทนเอ็ม 45, ไตรมิลต๊อก

ฟอร์เด้ เป็นต้น (จุมพล และอรพรรณ, 2543) การควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราติดต่อกันเป็นเวลานานอาจส่งผลให้เกิดสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม จึงได้มีการนำเชื้อราปฏิปักษ์มาทดลองใช้ควบคุมโรคพืช เพื่อลดอัตราการใช้สารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อมเพื่อการเกษตรแบบยั่งยืน

การใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคพืชเป็นวิธีการหนึ่งที่มีการศึกษาและมีรายงานว่าใช้ได้ผล (จิระเดช และวรรณวิไล, 2534; นิภาพร, 2538) เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่พบในดินและมีรายงานว่ามีศักยภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดินหลายชนิด เช่น *Sclerotium rolfsii*, *Ceratobasidium cornigerum*, *Phytophthora parasitica* f.sp. *nicotina*, *P. cactorum*, *Pytium aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *Rhizoctonia solani* และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* เป็นต้น(Bell et al., 1982)

แปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ผักลูกผสมมีความเป็นไปได้ที่จะมีเชื้อราปฏิปักษ์ ที่มีความสามารถทนทานต่อสารเคมีควบคุมโรคพืช เนื่องจากในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เหล่านั้นมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราเป็นปริมาณมาก และถ้ามีเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดใดสามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้ เชื้อราชนิดนั้นน่าจะมีศักยภาพในการทนทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราและสามารถนำไปใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชแบบประสมประสานร่วมกับการใช้สารเคมีได้ ประกอบกับยังไม่มีรายงานการศึกษาใดๆ ในประเทศไทยที่ศึกษาถึงความหลากชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ในแปลงที่ผลิตเมล็ดพันธุ์พืชผัก จึงสมควรศึกษาถึงความหลากชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชผักในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อทราบความหลากชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลมะเขือและตระกูลแตง

1.2.2 เพื่อทราบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยชีววิธี

1.2.3 เพื่อทราบแนวทางการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ร่วมกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ในการผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศและพืชตระกูลแตง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 เก็บรวบรวมเชื้อราปฏิปักษ์ จากตัวอย่างดินในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง ในเขตจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม

1.3.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความหลากชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ ตามลักษณะของเส้นใย สีของเส้นใย สปอร์ ลักษณะการสร้างสปอร์

1.3.3 ศึกษาความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์กับเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* และ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตง

1.3.4 ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราปฏิปักษ์กับเชื้อ *Fusarium oxysporum* โดยตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราปฏิปักษ์ ได้แก่ chitinase activity, proteolytic activity, cellulolytic activity และ β-1,3 glucanase activity

1.3.5 ศึกษาความทนทานต่อสารเคมีของเชื้อราปฏิปักษ์

1.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลในทางสถิติ โดยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของหน่วยทดลองโดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.4.1 ทราบชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

1.4.2 ได้เชื้อราปฏิปักษ์ชนิดที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศและแตง

1.4.3 ได้ชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ที่ทนทานต่อสารเคมีที่ใช้ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และ พืชตระกูลแตง

1.4.4 ได้แนวทางที่จะนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดิน โดยวิธีประสมประสาน

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

2.1 โรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจของพืชตระกูลมะเขือ และตระกูลแตง

พืชตระกูลมะเขือ และตระกูลแตง เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ทั้งในด้านการผลิตและส่งออกมะเขือเทศ แตงกวาผลสด แปรรูป และเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากเป็นพืชที่มีประโยชน์ในแง่ของคุณค่าทางโภชนาการ และยารักษาโรค (อนันต์, 2547) และในกระบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออก ซึ่งมีพื้นที่การผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นส่วนใหญ่ มักจะมีปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ส่งผลให้ผลผลิตลดลงและในบางกรณีไม่สามารถส่งออกเมล็ดพันธุ์ลูกผสมไปยังต่างประเทศได้ โดยเฉพาะโรคต้องห้ามที่เกิดจากเชื้อรา เช่น

2.1.1 โรคเหี่ยวเหลือง Fusarium wilt

2.1.1.1 ลักษณะของเชื้อสาเหตุ

Fusarium oxysporum จัดอยู่ใน Kingdom Fungi Phylum Ascomycota Sub Phylum Pyrenomycetes ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศสร้าง ascospore เชื้อราชนิดนี้เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จะสร้างเส้นใยละเอียดสีขาว ฟู เมื่อเจริญเต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีครีม และถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมอาจจะสร้าง slime mass สีชมพู ในโคโลนี ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสร้างสปอร์ได้ 3 แบบ คือ

1) macroconidia รูปร่างโค้งเล็กน้อย คล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว มี 3-5 เซลล์ ผนังบางค่อนข้างใส ไม่มีสี

2) microconidia รูปไข่ มี 1-2 เซลล์ ผนังบาง ค่อนข้างใส ไม่มีสี

ทั้ง macroconidia และ microconidia จะเกิดที่ปลาย conidiophore บน fruiting body แบบ sporodochium

3) chlamydospore เป็นสปอร์ที่เกิดจากการที่เซลล์บางเซลล์ในเส้นใยมีการสะสมอาหารและผนังหนาขึ้น ในที่สุดจะหลุดออกมาทำหน้าที่เป็นส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราที่สามารถอยู่ข้ามฤดูได้ดี และเข้าทำลายพืชได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม

2.1.1.2 ลักษณะอาการของโรคและการแพร่ระบาด

มักเกิดจากใบตอนล่างก่อน โดยใบและกิ่งก้านจะเหี่ยวห้อยลู่ลง มีลักษณะสีเหลืองซีด และร่วงที่ละก้านสองก้าน อาการจะลุกลามสู่ส่วนบน ในที่สุดใบจะเหลืองและแห้งตาย

ทั้งต้น เมื่อผ่าลำต้นดูจะพบบริเวณท่อน้ำท่ออาหารถูกทำลายกลายเป็นสีน้ำตาล อาจจะมีการสร้างรากแขนงขึ้นที่โคนต้นเป็นจำนวนมากแต่ไม่ค่อยเจริญเห็นเป็นปุ่มหรือรากสั้นๆ เท่านั้น บริเวณโคนต้นพืชที่เป็นโรคมักจะเหี่ยวแฟบ สีเหลืองซีดและอาจพบเส้นใยละเอียดสีขาวฟูของเชื้อราสาเหตุโรคเจริญอยู่ในบริเวณนั้น หรือพบได้หลังจากนำต้นพืชที่เป็นโรคไปบ่มไว้ในที่ชื้น

2.1.2 กลไกของการเกิดอาการเหี่ยวเนื่องจากเชื้อรา

2.1.2.1 เกิดจากการทวีจำนวนของเชื้อราสาเหตุโรค เมื่อเชื้อราเข้าไปอาศัยในท่อลำเลียงน้ำของพืชได้ จะดูดสารอาหารและสิ่งจำเป็นจากพืชมาใช้ในการเจริญเติบโต กลุ่มของเส้นใยที่แผ่ขยายมากขึ้นจะทำให้เกิดการอุดตัน พืชไม่สามารถลำเลียงน้ำได้ดี

2.1.2.2 เกิดจากเชื้อราสร้างเอนไซม์และสารพิษ เช่น lycomarasmine, fusaric acid และ dehydrofusaric acid ปล่อยออกมาทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของท่อลำเลียงน้ำ สูญเสียคุณสมบัติในการยึดเก็บกักน้ำ

2.1.2.3 เกิดจากกลไกในการป้องกันตนเองของพืช เมื่อมีเชื้อราเข้าทำลาย พืชจะสร้าง gums หรือ tylose เพื่อสกัดกั้นการลุกลามของเชื้อ ปฏิกิริยาการตอบสนองนี้ในพืชที่อ่อนแอต่อโรคมักจะเกิดช้ากว่าการลุกลามของเชื้อ ทำให้ยับยั้งเชื้อไม่สำเร็จ ในขณะเดียวกันสิ่งต่างๆ ที่พืชสร้างขึ้น ยิ่งก่อให้เกิดการอุดตันในท่อลำเลียงน้ำมากขึ้น พืชที่อ่อนแอต่อโรคจึงแสดงอาการเหี่ยวอย่างรุนแรงและตายในที่สุด

2.1.3 การแพร่ระบาดและการอยู่ข้ามฤดูของเชื้อ

เชื้อรา *F. oxysporum* สามารถมีชีวิตอยู่ในเศษซากพืชในดินได้นาน และอยู่ข้ามฤดูได้ดีในรูปของ chlamydospore หรือเส้นใยที่พักตัวติดอยู่ในส่วนขยายพันธุ์ของพืช เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เชื้อก็จะงอก germ tube เข้าทำลายพืชทางรากขนอ่อนหรือรอยแตกที่ราก จากนั้นจะลุกลามไปสู่ท่อลำเลียงน้ำของพืช เจริญเติบโตสร้างเส้นใยอยู่ในบริเวณนั้น เมื่อเส้นใยเจริญเต็มที่จะผลิต macroconidia และ microconidia เป็นจำนวนมาก และใช้เป็นแหล่งของเชื้อในการเข้าทำลายพืชตลอดฤดูปลูก โดยแพร่ระบาดไปตามน้ำ ลม ติดไปกับปีก-ขาของแมลง เครื่องมือที่ใช้ในการเกษตร การเคลื่อนย้ายดินจากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง หรือติดไปกับต้นกล้า เมื่อพืชที่เป็นโรคตายลงเชื้อสาเหตุยังคงมีชีวิตอยู่ในดินได้นานหลายปี ในรูปของ chlamydospore

2.1.4 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

โรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจาก *F. oxysporum* มักพบแพร่ระบาดในเขตร้อนชื้น ในสภาพดินปลูกที่ค่อนข้างแห้งและค่อนข้างเป็นกรด อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อและการเกิดโรคได้ดีอยู่ในช่วง 27-32 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส เชื้อจะไม่ค่อย

เจริญเติบโต ดังนั้นถ้าหลังการติดเชื้อแล้วอุณหภูมิลดต่ำลงอย่างรวดเร็วนกระทั่งเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โรคอาจไม่พัฒนาต่อไป พืชมีโอกาสฟื้นคืนเป็นปกติได้

เชื้อรา *F. oxysporum* เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพืชหลายชนิดที่ปลูกในเขตร้อนชื้น สามารถแยกได้เป็นหลาย form-specialist (f. sp.) ตามความสามารถในการก่อให้เกิดอาการเหี่ยวอย่างรุนแรงแก่พืชชนิดต่างๆ เช่น

F. oxysporum f.sp. *lycopersici*	เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ
F. oxysporum f.sp. *cubense*	เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย
F. oxysporum f.sp. *pisi*	เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของถั่ว pea
F. oxysporum f.sp. *lini*	เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของป่าน
F. oxysporum f.sp. *vasinfectum*	เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของฝ้าย
F. oxysporum f.sp. *melonis*	เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของแตงเทศ
F. oxysporum f.sp. *cucurmerinum*	เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวา

2.1.5 การควบคุมโรค

2.1.5.1 หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตพืชแต่ละรุ่น ควรกำจัดเศษซากพืชและวัชพืช นำออกจากแปลงเพื่อป้องกันการสะสมของเชื้อโรคในแปลง

2.1.5.2 เลือกซื้อเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตจากแหล่งที่ไม่มีโรคระบาด และควรคลุกเมล็ดด้วยสารเคมีควบคุมเชื้อรา เพื่อกำจัดเชื้อที่อาจจะติดมากับเมล็ดพันธุ์

2.1.5.3 เพาะกล้าในดินหรือวัสดุปลูกที่สะอาด หรือผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2.1.5.4 แปลงปลูกมะเขือเทศที่ยังไม่เคยมีปัญหาโรคระบาดมาก่อน ควรระมัดระวังการเคลื่อนย้ายดิน และควรทำความสะอาดเครื่องมือ จอบ เสียม ก่อนนำมาใช้ในแปลงเพื่อป้องกันการนำเชื้อโรคจากแหล่งอื่นเข้ามาในแปลง

2.1.5.5 ปรับสภาพดินให้เป็นกลาง ด้วยการเติมปูนขาว เปลือกหอยเผา และปุ๋ยอินทรีย์

2.1.5.6 การให้น้ำแก่พืชควรทำอย่างสม่ำเสมอ ไม่ควรปล่อยให้ดินแห้งนานๆ

2.1.5.7 เมื่อเริ่มพบต้นมะเขือเทศเป็นโรค รีบถอนนำไปเผา และคลุกดินบริเวณนั้นด้วยปูนขาว สารเคมี หรือชีวภัณฑ์ควบคุมเชื้อรา

2.1.5.8 การปลูกพืชชนิดเดิม หรือพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันหลายๆ รุ่นอย่างต่อเนื่อง

ซ้ำในแปลงเดิม โดยไม่มีการเขตกรรมที่ดีพอจะทำให้เกิดการสะสมเชื้อโรคในแปลง ซึ่งจะเกิดการระบาดของโรคอย่างรุนแรงได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ดังนั้นจึงควรเปลี่ยนไปปลูกพืชอื่นบ้างเพื่อตัดวงจรโรค

2.1.5.9 การไถกลับพลิกดินตากแดดนานๆ ในช่วงที่ไม่ได้ปลูกพืชจะช่วยลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในดินลงได้มาก

2.2.1 โรคราเม็ดผักกาด (Sclerotium wilt) หรือโรคโคนเน่า (Collar rot)

2.2.1.1 ลักษณะของเชื้อสาเหตุ

Sclerotium rolfsii เป็นราใน Kingdom Fungi กลุ่ม Deuteromycota ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเชื้อรานี้ไม่สร้างสปอร์ แต่จะสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่าเม็ด sclerotium ซึ่งเกิดจากการอัดตัวกันของเส้นใยกลายเป็นก้อนกลม ขนาดประมาณเมล็ดผักกาดหรือใหญ่กว่าเล็กน้อย ตอนเริ่มสร้างจะเป็นเม็ดสีขาว ต่อมาจะกลายเป็นสีน้ำตาลและสีเข้มขึ้นเมื่อเจริญเต็มที่ สามารถทนต่อความแห้งแล้ง การขาดแคลนอาหาร และสารเคมีได้ดีกว่าในสภาพเส้นใย มีชีวิตอยู่ข้ามฤดูในดินได้นานหลายปี

2.2.1.2 อาการโรค และการแพร่ระบาด

ถ้าเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายมะเขือเทศ ตั้งแต่ระยะกล้า หรือระยะที่ต้นมะเขือเทศยังเล็ก พืชจะแสดงอาการเน่าคอดิน คือโคนต้นเน่าช้ำ ต้นกล้าหักพับและแห้งตายอย่างรวดเร็ว ในมะเขือเทศที่โตแล้วจะพบอาการใบเหลืองเหี่ยวแห้งและอาจถึงตายได้ มักพบเชื้อราสาเหตุโรคสร้างเส้นใยหยาบๆ สีขาวอยู่ที่บริเวณโคนต้นและสร้างเม็ด sclerotium ขนาดเท่าเมล็ดผักกาด สีขาวและสีน้ำตาลปะปนอยู่กับเส้นใย ผลที่อยู่ใกล้ๆ พื้นดินอาจถูกเชื้อราเข้าทำลาย ทำให้ผลเน่าขุบอย่างรวดเร็ว สังเกตได้จากการพบเส้นใยหยาบๆ สีขาวและเม็ด sclerotium เจริญปกคลุมอยู่ในบริเวณที่เน่า

2.2.1.3 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

โรคนี้มักเกิดกับมะเขือเทศที่ปลูกในแปลงที่สภาพความชื้นสูง ซึ่งอาจเกิดจากการให้น้ำมากเกินไป หรือระยะปลูกชิด ต้นเบียด ทรงพุ่มหนา หรือใบปรกดิน เม็ด sclerotium ที่ตกค้างอยู่ในแปลงจะงอกและเข้าทำลายพืชได้ดี ในดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูง ความชื้นสูงแต่ไม่ถึงกับขังแฉะ เนื่องจากกาซออกซิเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยกระตุ้นการงอกของ sclerotium อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคอยู่ในช่วง 30-36 องศาเซลเซียส ในแปลงที่เคยมีโรคระบาดมาก่อน มักจะมีเม็ด sclerotium ตกค้างอยู่ในดิน ซึ่งสามารถก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคและสร้างความเสียหายมากขึ้น ถ้าปลูกพืชชนิดเดิม หรือพืชที่อ่อนแอต่อโรคซ้ำลงไป

2.2.1.4 การควบคุมโรค

2.2.1.4.1 หมั่นทำความสะอาดแปลงปลูก เก็บเผาทำลายผลหรือส่วนของพืชที่เน่าเสีย เพื่อลดการสะสมของเชื้อโรคในแปลง พร้อมทั้งกำจัดวัชพืช และตัดแต่งบริเวณโคนต้นให้โปร่ง

2.2.1.4.2 ให้น้ำแต่พอดวร อย่าให้ดินแฉะนานๆ พยายามหลีกเลี่ยงการให้น้ำตอนเย็นใกล้ค่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะที่พบโรคระบาดในแปลง

2.2.1.4.3 เมื่อพบต้นเป็นโรค รีบนำไปเผาทำลาย แล้วคลุกดินบริเวณนั้นด้วยสารเคมีควบคุมเชื้อราพวก carboxin หรือคลุกชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มา เพื่อสกัดกั้นการแพร่ระบาดของเชื้อ

2.2.1.4.4 ในแปลงที่เคยมีโรคระบาดมาก่อน อาจใช้วิธีไถพลิกกลับดินตากแดดนานๆ และพรวนดิน ให้เม็ด Sclerotium ขึ้นมาสัมผัสอากาศ และงอกในช่วงที่ไม่มีพืชปลูกอยู่ เมื่อไม่มีพืชอาศัย เส้นใยจะถูกแสงแดดและแห้งตาย หรืออาจใช้ชีวภัณฑ์ไตรโครเดอร์มาคลุกดินเพื่อลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคพืชก่อนจะปลูกพืชรุ่นต่อไป

2.3.1 โรคเน่าคอดิน (Damping off)

2.3.1.1 ลักษณะของเชื้อสาเหตุ

โรคเน่าคอดินเกิดจากเชื้อราในดินหลายสกุล ได้แก่ เชื้อรา *Pythium* sp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp. และ *Fusarium* sp. แต่ที่พบระบาดสร้างความเสียหายแก่ต้นกล้าผักชนิดต่างๆ ที่ปลูกในประเทศไทย ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม *Pythium* spp. มีหลายชนิดได้แก่ *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. vexans* และ *P. splendens*

Pythium spp. เป็นเชื้อราชั้นต่ำ อยู่ใน Kingdom Chromista Phylum Oomycota Family Pythiaceae เส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้นตามขวาง ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะสร้าง sporangium รูปร่างค่อนข้างกลม (spherical) อาจเป็นพู (lobe) หรือยืดออกเป็นเส้น (filamentous) อยู่ที่ส่วนปลายหรืออยู่ระหว่างเส้นใย เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะโป่งออกเป็นถุง เรียก vesicleและจะสร้าง zoospore อยู่ภายใน เมื่อ zoospore เจริญเต็มที่จะดันให้ผนัง vesicle แตกออก zoospore เป็น asexual spore รูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว มี flagella 2 เส้น จึงสามารถเคลื่อนที่ได้รวดเร็วในที่มีความชื้นสูง มันจะเคลื่อนที่อยู่ระยะหนึ่งถ้ายังไม่พบพืชอาศัยที่อ่อนแอจะสลัด flagella ทิ้งแล้ว encyst เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมและมีพืชอาศัยที่อ่อนแอ encyst จะงอก germ tube และแทงผ่านเข้าสู่พืชและก่อให้เกิดการติดเชื้อขึ้น

2.3.1.2 อาการโรค และการแพร่ระบาด

โรคเน่าคอดิน แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

1) อาการเน่าระยะก่อนงอก โดยเชื้อจะเข้าทำลายเมล็ดพืชตั้งแต่ก่อนงอก ทำให้เมล็ดเน่าก่อนงอกหรืองอกออกมาเล็กน้อยแล้วเน่าตายไปก่อนที่จะโผล่พ้นดินขึ้นมา ลักษณะที่พบเสมอในกระบะเพาะคือ มีต้นกล้างอกขึ้นมาไม่สม่ำเสมอ หายไปเป็นหย่อมๆ

2) อาการเน่าระยะหลังงอก โดยเชื้อโรคเข้าทำลายหลังจากที่ต้นกล้าที่งอกพ้นดินขึ้นมาแล้ว โดยอาการเริ่มแรกจะเกิดรอยช้ำใสๆ ที่บริเวณโคนของต้นกล้า รอยช้ำจะแผ่ขยายออกรอบโคนต้น และกลายเป็นสีน้ำตาล เนื้อเยื่อส่วนนี้จะคอดลง ทำให้ต้นหักพับที่ระดับผิวดิน หรือเกิดการเหี่ยวเฉาตาย ลักษณะที่พบในกระบะกล้าคือ ต้นกล้าจะเหลืองซีด และฟุบตายเป็นหย่อมๆ

2.3.1.3 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

1) ความชื้นในแปลงเพาะกล้าสูง เนื่องจากฝนตกชุก รดน้ำมากเกินไปและดินระบายน้ำไม่ดี หรือเพาะกล้าแน่นเกินไป ทำให้ความชื้นระหว่างต้นสูง ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะต่อการงอกของสปอร์ และการเข้าทำลายพืชของเชื้อรา

2) การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนแก่พืชในระยะกล้ามากเกินไป ปุ๋ยไนโตรเจนจะเร่งการเจริญเติบโตของต้นกล้า ทำให้ต้นกล้าอวบอ่อน เปราะบาง เหมาะต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา สาเหตุโรค

2.3.1.4 การควบคุมโรค

1) อบฆ่าเชื้อราในดินในแปลงเพาะกล้า ด้วยไอน้ำร้อนหรือสารเคมีชนิดอบดิน หรืออาจจะหว่านผงเชื้อแห้งไตรโคเดอร์มา อัตรา 25-50 กรัมต่อตารางเมตร คลุกเค้ากับดินที่ระดับลึก 5-10 เซนติเมตร ก่อนหว่านเมล็ด คลุมผิวหน้าแปลงด้วยฟาง รดน้ำพอสมควร

2) จัดการระบายน้ำในแปลงให้ดี รดน้ำแต่พอควร อย่าให้มีน้ำขังแฉะ และหลีกเลี่ยงการรดน้ำในเวลาเย็นใกล้ค่ำ

3) คลุกเมล็ดพืชก่อนปลูก เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ ด้วยสารเคมีควบคุมเชื้อรา หรืออาจคลุกด้วยชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มา อัตรา 10-20 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม โดยผสมกับสารจับใบเล็กน้อย

4) ไม่ควรเพาะกล้าแน่นเกินไป เพราะจะทำให้ความชื้นระหว่างต้นสูง การแบ่งกล้าออกเป็นแปลงย่อยๆ จะช่วยให้การถ่ายเทอากาศดี และง่ายต่อการดูแลรักษา

5) ในระยะกล้าไม่ควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากเกินไป

6) เมื่อพบโรค ควรรีบขุดต้นที่เป็นโรคและดินบริเวณรอบๆ ออกไปเผาทิ้งนอกแปลง คลุกหรือราดดินบริเวณนั้นด้วย metalaxyl ผสม mancozeb หรือใช้ชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มา

2.2 การจัดการและการควบคุมโรคพืช

การจัดการและการควบคุมโรคพืชเป็นขั้นตอนหนึ่งของขบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อช่วยลดปริมาณเชื้อสาเหตุโรคพืชให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชเกินระดับเศรษฐกิจซึ่งส่วนมากจะใช้สารเคมีในทุกขั้นตอนของการผลิต เริ่มตั้งแต่การเพาะปลูกไปจนถึงเก็บเกี่ยว ในปัจจุบันมีการป้องกันกำจัดโรคพืชหลายวิธี การจัดการโรคพืชโดยชีววิธีเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ เช่นการนำเชื้อปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เพื่อเป็นการอนุรักษ์สภาพแวดล้อม โดยเชื้อปฏิปักษ์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma* spp., *Streptomyces* spp. และ *Bacillus* spp. เป็นต้น สำหรับการควบคุมโรคพืชนั้น มีหลายแนวทาง ดังนี้ (วีระศักดิ์, 2542)

2.1 การปลูกพืชหมุนเวียน การเขตกรรม และการให้ธาตุอาหารแก่พืช เป็นวิธีการปฏิบัติต่อพืชเพื่อให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช

2.2 การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช เป็นวิธีที่นิยมกันมาก เพราะเชื้อว่าเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและได้ผลดีเพื่อก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในธรรมชาติและเป็นประโยชน์ต่อพืช

2.3 การใช้พันธุ์พืชที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช

2.4 การใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

2.3 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2.3.1 การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีการจัดอนุกรมวิธานดังนี้ (Domsch, 1980)

Kingdom Eucaryote

Division Deuteromycotina

Class Hyphomycetes

Family Moniliaceae

Genus *Trichoderma*

2.3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

โคโลนีเจริญเร็ว เส้นใยมีผนังกั้น ผนังเรียบ แตกแขนงมาก conidiophores มีสีจางหรือไม่มีสี พบ phialides เกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม รูปร่าง conidia เป็นแบบเซลล์เดียวรูปไข่ ไม่มีสี เกิดเป็นกลุ่มเล็กๆ ที่ปลาย phialides (Barnett and Hunter, 1972)

เชื้อรา *Trichoderma* spp. จัดเป็นเชื้อราชั้นสูงที่เจริญได้ดีในดิน เศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิต รวมทั้งจุลินทรีย์และอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ เชื้อบางสายพันธุ์สามารถเป็นปรสิต (parasite) โดยการพันรัดเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้วสร้างเอนไซม์ เช่น ไคติเนส (chitinase) โปรติเอส (protease) เบต้า-1,3 กลูคาเนส (β-1,3-glucanase) และเซลลูเลส (cellulase) ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อโรค จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยเชื้อโรคพืช เป็นเหตุให้เชื้อโรคพืชสูญเสียความมีชีวิต ส่งผลให้ปริมาณของเชื้อโรคพืชลดลง นอกจากนี้เชื้อราไตรโคเดอร์มาส่วนใหญ่เจริญ สร้างเส้นใยและสปอร์ได้ค่อนข้างรวดเร็ว จึงมีความสามารถสูงในการแข่งขันกับเชื้อโรคพืช ด้านการใช้อาหารและแร่ธาตุต่างๆ จากแหล่งอาหารในธรรมชาติ ขณะที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างปฏิชีวนสาร ชื่อ ไตรโคเดอร์มิน (Trichodermin) ออกมาเพื่อยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคจนเกิดการเหี่ยวสลาย (lysis) ได้

2.3.3 กลไกในการควบคุมเชื้อโรคพืช

Trichoderma spp. เป็นเชื้อราที่มีคุณสมบัติและศักยภาพสูงในการใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทั้งนี้เพราะเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีกลไกในการต่อสู้กับเชื้อโรคอยู่ 3 ประการ ประกอบด้วย

2.3.3.1 การแข่งขันกับเชื้อโรคพืช เพราะเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สร้างสปอร์ได้ปริมาณสูงมากโดยอาศัยอาหารจากเศษซากพืชและอินทรีย์วัตถุ ช่วยให้สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชหรือจุลินทรีย์ที่มีอยู่รอบข้างได้ดี (Nemes et al., 1996)

2.3.3.2 การเป็นปรสิตต่อเชื้อโรคพืช เชื้อรา *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์เป็นปฏิปักษ์โดยตรงต่อเชื้อโรคพืช โดยการพันรัด แล้วแทงส่วนของเส้นใยเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทำให้เส้นใยตาย (Inbar et al., 1996)

2.3.3.3 การสร้างปฏิชีวนสาร เชื้อรา *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์สามารถสร้างปฏิชีวนสาร หรือสารพิษเพื่อหยุดยั้ง หรือทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น chitinolytic enzyme จาก *T. harzianum* สายพันธุ์ P1 (Lorito et al., 1993)

2.3.4 ประโยชน์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2.3.4.1 เชื้อรา *Trichoderma* spp. ลดกิจกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดสามารถเจริญได้โดยอาศัยอาหารทั้งจากพืชอาศัยโดยตรงในขณะที่กำลัง

เข้าทำลายพืชอยู่ หรืออาศัยอินทรีย์วัตถุจำพวกเศษซากพืชที่กำลังย่อยสลาย ส่วน *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่ไม่ทำให้พืชเกิดโรคจึงไม่สามารถใช้อาหารจากพืชปกติได้ แต่จะอาศัยอาหารจากอินทรีย์วัตถุและเศษซากพืชในดินแต่เพียงอย่างเดียวเท่านั้น (จิรเดช และวรรณวิไล.2542) ดังนั้นเชื้อรา *Trichoderma* spp. จึงอาจมีผลกระทบต่อกิจกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เชื้อรา *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติในการลดกิจกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยการพันรัดเส้นใย แล้วปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาหลายชนิด เช่น ไคติเนส เซลลูเลส กลูคาเนส เพื่อสลายผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชก่อนที่จะแทงส่วนของเส้นใยเข้าไปภายในเส้นใยของเชื้อโรค เชื้อรา *Trichoderma* spp. จะเจริญอย่างรวดเร็วโดยใช้อาหารจากภายในเส้นใยของเชื้อโรค กิจกรรมด้านการเจริญของเส้นใยของเชื้อโรคจะลดลงอย่างมาก ส่งผลให้กิจกรรมเกี่ยวกับการสืบพันธุ์และการขยายพันธุ์ของเชื้อโรคลดลงไปด้วย นอกจากนี้กรณีที่เชื้อสาเหตุโรคพืชเข้าทำลายรากหรือส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น บริเวณแผล หรือรอยตัด เชื้อรา *Trichoderma* spp. จะทำหน้าที่ขัดขวางกิจกรรมการเข้าทำลายของเชื้อโรคบริเวณดังกล่าวได้ โดยการแข่งขันการใช้อาหารและรบกวนการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชทุกระยะ เช่น การงอกของสปอร์ การเจริญและการพัฒนาของเส้นใย การขยายพันธุ์และสืบพันธุ์ ผลจากการรบกวนและขัดขวางกิจกรรมต่างๆ จะส่งผลให้ความรุนแรงของการเกิดโรคลดลงได้ในที่สุด

2.3.4.2 เชื้อรา *Trichoderma* spp. ลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคพืช เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเข้าทำลายส่วนที่เป็นโครงสร้างของเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งถูกสร้างขึ้นเพื่อการสืบพันธุ์หรือเพื่อความอยู่รอดภายใต้สภาพแวด ล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น กรณีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เข้าทำลายเม็ดสเคลอโรเทียมของเชื้อ *Sclerctium rolfsii* ทำให้เม็ด sclerotium ฝ่อตายไปก่อนที่จะมีโอกาสงอกเป็นเส้นใยเพื่อเข้าทำลายพืช แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีบทบาทในการทำลายเชื้อโรคพืชส่งผลให้ปริมาณของเชื้อโรคพืชลดลง

2.3.4.3 เชื้อรา *Trichoderma* spp. เพิ่มการเจริญเติบโตของพืช เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต และการสร้างดอกของพืชหลายชนิด เช่น ไม้ดอกไม้ประดับที่ปลูกในกระถาง พืชผักต่างๆ กล้าไม้ผลที่เพาะด้วยเมล็ด ตลอดจนกิ่งปักชำ และพืชหัว โดยเพิ่มขนาดและความสูงของต้น น้ำหนักของต้นพืชทั้งต้น น้ำ หนักของหัว ตั้งแต่ 10% ถึง 60% เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่กลไกและคุณสมบัติในการเพิ่มการเจริญเติบโตยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน แต่มีผู้รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารเร่งการเจริญเติบโต (ฮอร์โมน) ต่างๆได้เอง ในบางกรณีเชื่อว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างสารไปกระตุ้นให้พืชสร้างสารเร่งการเจริญเติบโตมากกว่าปกติและบางกรณีพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ไปขัดขวาง หรือทำลายจุลินทรีย์ต่างๆ ที่รบกวนระบบรากของพืช ทำให้ระบบรากของพืชสมบูรณ์และแข็งแรง

2.3.4.4 เชื้อรา *Trichoderma* spp. เพิ่มความต้านทานของพืช ในปัจจุบันได้เริ่มมีการใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ฝังหรือฉีดเข้าลำต้นหรือระบบรากพืช เพื่อป้องกันโรคและรักษาพืชที่เป็นโรค โดยเฉพาะในไม้ผลยืนต้นจากการสังเกตุพบว่าพืชที่ได้รับเชื้อโดยวิธีนี้จะมีความแข็งแรงและต้านทานต่อการเกิดโรคได้เหมือนกับการฉีดวัคซีนในมนุษย์หรือสัตว์ แต่กลไกของการเพิ่มความต้านทานโรคขณะนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาในรายละเอียด

2.4 การจำแนก Genus ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัญฐานวิทยา (Samuels, 1996)

2.4.1 Colony มีลักษณะเป็นกลุ่มหลวมๆ หรือรวมตัวกันแน่น ส่วนมากจะมีสีเขียว สีของโคโลนีขึ้นอยู่กับสีของ conidia บาง species มีลักษณะที่เฉพาะ เช่น *T. viride* โคโลนีมีสีเขียวเข้ม แต่บางสายพันธุ์ของ species นี้อาจมีสีแตกต่างไปจากเดิม ซึ่งอาจจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อน สีเหลือง นอกจากนี้ยังพบว่าชนิด และ pH ของอาหารมีผลกับสีของโคโลนี (Rifai, 1969; Samuels, 1996)

2.4.2 Conidiophores มีลักษณะยาว แตกแขนงออกด้านข้างจากแขนงหลัก มีการนำลักษณะของ sterile elongation ของ conidiophores ตรงส่วนปลายมาใช้ในการจัดจำแนกชนิด เช่น *T. longibrachiatum* มีแขนงหลักยาวและแขนงข้างสั้น ซึ่งแตกต่างจาก *T. hamatum* และ *T. polysporum* ที่มีการแตกแขนงน้อย (Bissett, 1991)

2.4.3 Phialides ส่วนมากมีลักษณะเป็น flask หรือ nine-pin shaped บริเวณฐานจะแคบ ตรงกลางขยายใหญ่ขึ้น และเรียวเล็ดลงในส่วนปลาย การรัดเรียงตัวของ phialides รอบๆ แขนงมีรูปแบบไม่แน่นอน ซึ่งแบ่งเป็น 4 แบบ คือ viride - type, longobrachiatum - type, koningii - type และ hamatum – type แต่มีบาง species ที่มีการจัดเรียงตัวของ phialides เป็นแบบผสม เช่น *T. piluliferum* ที่มีการแตกแขนงข้างแบบ koningii – type แต่ลักษณะ phialides เป็นแบบ hamatum – type

2.4.4 Conidia (phialospores) มีลักษณะค่อนข้างกลม จนถึงรูปไข่ ขนาดเล็กกว่า 5 ไมโครเมตร มีสีเขียว หรือเหลืองเขียว หรือไม่มีสี ผิวอาจเรียบหรือขรุขระ ในการจัดจำแนกอาจจะมีข้อจำกัดอยู่บ้าง เช่น *T. viride* มี conidia รูปร่างค่อนข้างกลม แต่บางสายพันธุ์ของ species นี้อาจสร้าง conidia รูปกระสวยหรือรูปไข่ได้ แต่อย่างไรก็ตามลักษณะของ conidia ก็สามารถแยกความแตกต่างระหว่างบาง species ได้ เช่น *T. longibrachiatum* และ *T. hamatum* มี conidia ขนาดใหญ่

(4-9 ไมโครเมตร) ตรงข้ามกับ *T. harzianum* (2-7 ไมโครเมตร) และ *T. polysporum* (<4 ไมโครเมตร) ที่มี conidia ขนาดเล็ก ค่อนข้างกลม และมีผิวเรียบ

2.4.5 Chlamydospore ส่วนมากมีรูปร่างกลม หรือรูปกระสวย พบตรงกลางหรือปลายเส้นใย ขนาดและตำแหน่งที่เกิดไม่แน่นอน เป็นลักษณะที่ไม่คงที่ จึงไม่นิยมนำมาเป็นลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิด

2.5 การจัดจำแนกชนิด (species)ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะการแตกกิ่งก้านของ conidiophore (Rifai, 1969) มีดังนี้

2.5.1 การแตกกิ่งก้านแบบ hamatum-type

T. piluliferum โคโลนีเจริญช้า สีของอาหารใต้โคลนีไม่เปลี่ยนแปลง สร้างสปอร์สีขาวเป็นวงซ้อนกัน หรือกระจายไม่เป็นระเบียบ phialides มีขนาด 4.5-6.5 x 2.8-3.5 ไมโครเมตร phialospores มีขนาด 2.5-3.5 ไมโครเมตร ผนังเรียบ ไม่มีสี

T. polysporum โคโลนีเจริญช้า สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง สร้างสปอร์สีขาวเป็นวงซ้อนกัน phialides มีขนาด 4.5-6.5 x 2.8-3.5 ไมโครเมตร phialospores มีขนาด 2.8-3.7 x 1.8-2 ไมโครเมตร ผนังเรียบ ไม่มีสี

T. hamatum โคโลนีเจริญช้า สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง สร้างสปอร์สีขาว หรือเขียวปนเทาซ้อนกันเป็นวง phialides มีขนาด 4.5-6.5 x 2.8-3.5 ไมโครเมตร phialospores มีขนาด 3.8-6 x 2.2-2.8 ไมโครเมตร ผนังเรียบ สีเขียวอ่อน

2.5.2 การแตกกิ่งก้านแบบ koningii-type

T. koningii โคโลนีเจริญเร็ว สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง สร้างสปอร์สีขาวเป็นวงซ้อนกัน หรือกระจายทั่วไป phialides มีขนาด 5-12 x 2.5-3.5 ไมโครเมตร อันปลายสุดอาจยาวถึง 30 ไมโครเมตร phialospores มีขนาด 3.4-4.8 x 1.9-2.8 ไมโครเมตร ผนังเรียบ สีเขียว

T. aureoviride โคลนีเจริญช้า สีของอาหารใต้โคโลนีมีสีเหลือง-น้ำตาล เมื่ออายุมากขึ้น สร้างสปอร์สีขาวเป็นวงซ้อนกัน หรือกระจายทั่วไป phialides มีขนาด 7-18 x 2-2.5 ไมโครเมตร phialospores มีขนาด 3-4.3 x 2.3 ไมโครเมตร ผนังเรียบ สีขาวปนเหลือง เมื่ออ่อนอาจพบหยดน้ำมัน และหายไปเมื่ออายุมากขึ้น

T. harzianum โคโลนีเจริญเร็ว สีของอหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง สร้างสปอร์สีเขียวเป็นวงซ้อนกัน phialides มีขนาด 4.5-6.5 x 2.8-3.5 ไมโครเมตร phialospores มีขนาด 2.8-3.2 x 2.5-2.8 ไมโครเมตร ผนังเรียบ สีเขียวอ่อน

2.5.3 การแตกกิ่งก้านแบบ viride-type

T. viride โคโลนีเจริญเร็ว สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง เมื่ออายุมากขึ้น โคโลนีมีกลิ่นมะพร้าว สร้างสปอร์สีเขียวเข้มเป็นวงซ้อนกัน หรือกระจายทั่วไป phialides มีขนาด 8-14 x 2.4-3 ไมโครเมตร อันปลายสุดอาจยาวถึง 20 ไมโครเมตร phialospores มีขนาด 3.6-4.5 ไมโครเมตร ผนังขรุขระ สีเขียว

2.5.4 การแตกกิ่งก้านแบบ logibrachiatum-type

T. longibrachiatum โคโลนีเจริญเร็ว สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง สร้างสปอร์สีเขียวปนขาวถึงเขียวมะกอก กระจายทั่วไป phialides มีขนาด 6-14 x 2.5-3 ไมโครเมตร phialospores มีขนาด 3.6-6.5 x 2.2-3 ไมโครเมตร ผนังเรียบ สีเขียว เมื่ออ่อนพบหยดน้ำมัน และหายไปเมื่ออายุมากขึ้น

T. pseudokoningii โคโลนีเจริญเร็ว สีของอาหารใต้โคโลนีมีสีเหลือง สร้างสปอร์สีเขียวเป็นวงซ้อนกัน หรือบริเวณรอบโคโลนี phialides มีขนาด 5.8-8 x 2.7-3.5 ไมโครเมตร อันปลายสุดอาจจะยาวถึง 13 ไมโครเมตร phialospores มีขนาด 2.4-4.6 x 2-2.5 ไมโครเมตร ผนังเรียบ สีเขียว

2.6 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามวิธีการของ Samuels และคณะ ใน web site

Samuels และคณะ ได้จัดทำ interactive key สำหรับการบ่งชี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในระดับชนิด (species) โดยมีรายละเอียดและการอธิบายเกี่ยวกับลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 33 ชนิด ที่ได้มีการศึกษาถึงลักษณะโดยทั่วไปทางสัณฐานวิทยา และลักษณะของโคโลนี ตั้งแต่อดีตจนถึงการศึกษาในปัจจุบัน(web site http://nt. Ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.) พร้อมทั้งมีรูปภาพประกอบคำอธิบาย ระบบสืบค้นข้อมูลของผู้ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยเกี่ยวกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. นอกจากนี้ยังมีรายละเอียดอื่นๆ ที่เกี่ยวกับการจำแนกชนิดของพืชในระบบออนไลน์ด้วย ส่วนการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในระบบออนไลน์นั้น มีรายละเอียด ดังภาคผนวก จ

2.7 งานวิจัยด้านการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

Persoon ได้อธิบายลักษณะของเชื้อราสกุล (genus) *Trichoderma* ไว้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1794 ซึ่งยังขาดหลักการในการแยกความแตกต่างของชนิด (species) ทั้งนี้จะมีลักษณะที่คาบเกี่ยวระหว่างชนิดทำให้การจัดจำแนกค่อนข้างสับสน ต่อมา Rifai (1996) ได้แบ่งสกุล *Trichoderma* spp.

ออกเป็น 9 ชนิด ได้แก่ *T. piluliferum* Webster &Rifai, *T. polysporum* (Link ex Pers.) Rifai, *T. harmatum* (Bon.) Bain, *T. koningii* Oud., *T. aureoviride* Rifai, *T. harzianum* Rifai, *T. longibrachiatum* Rifai, *T. pseudokoningii* Rifai, *T. viride* Pers. ex S. F. Gray โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี conidia และ conidiophores เป็นต้น

Sivan และคณะ (1984) ได้รายงานเกี่ยวกับการเจริญของ *Trichoderma* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อ *Pythium aphanidermatum* บนเยื่อ cellophane ที่อยู่บนอาหารพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ปลดปล่อยเอนไซม์และสาร antibiotic ต่อเชื้อ *Pythium* sp. สารที่ปลดปล่อยออกมาส่งผลให้ความสามารถในการเข้าทำลายพืชของเชื้อ *Pythium* sp. ลดลงและเชื้อ *Trichoderma* spp. สามารถลดการเกิดโรค Damping-off ของถั่วลิสงที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าอุณหภูมิอื่นๆ (Lifshitz et. al., 1986)

วีระศักดิ์และระวีวรรณ (2529) ได้ศึกษาถึงการใช้เชื้อ *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ พริก กระเทียม และถั่วลิสง ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Sclertium rolfsii* โดยผลิตมวลชีวภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อ และพบว่าสามารถควบคุมโรคโคนเน่าได้เป็นที่น่าพอใจ

วรรณวิไล (2537) ได้ศึกษาการควบคุมโรค stem rot ของมะเขือเทศและโรค seedling blight ของข้าวบาร์เลย์ ที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* โดยคลุกเมล็ดข้าวบาร์เลย์ด้วยผงเชื้อรา *T. harzianum* ในอัตรา 1% โดยน้ำหนัก พบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่าการคลุกในอัตรา 0.5 และ0.1% ส่วนโรค stem rot ของมะเขือเทศใช้ในรูปผง alginate pellets ที่ประกอบด้วย *T. harzianum* 0.1 หรือ 1% โดยน้ำหนัก สามารถควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ได้เช่นเดียวกับการใช้ผง *T. harzianum* และ คาร์บอกซิน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการพัฒนาประสิทธิภาพของ *T. harzianum* โดยกระตุ้นด้วย UV ให้เกิดการกลายพันธุ์พบว่าพันธุ์กลาย M23 และ M4 สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่เติม benomyl และสามารถลดการสร้างเส้นใยและเม็ด sclerotia ของ *S. rolfsii* ได้และพบว่าพันธุ์กลายสามารถควบคุมโรค stem rot และ seedling blight ได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม

สุธามาศ (2537) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เมื่อใช้ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์และสารเคมีควบคุมเชื้อราต่อโรครากเน่าของส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* โดยใช้เชื้อรา 103 ไอโซเลต ทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. 9 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค และเมื่อใช้เชื้อปฏิปักษ์ในรูปของส่วนผสมซึ่งประกอบด้วยผงเชื้อ ผงไดอะตอมไมท์ รำข้าว และปุ๋ยอินทรีย์ ในอัตรา 1:8:5:16 โดยน้ำหนัก ร่วมกับสารเคมีควบคุมเชื้อรา ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่ากรรมวิธีที่ใช้เฉพาะ *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลต สามารถลดปริมาณเชื้อ

ในดินลงได้แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม (+) อย่างมีนัยสำคัญ การใช้ส่วนผสมผงเชื้อ *T. harzianum* (CB-PIN-01) ร่วมกับสาร metalaxyl 1,250 ppm

นิภาพร (2538) ได้ทดสอบการควบคุมเชื้อโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (T20) ในสภาพแปลงปลูกทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตาย 61.1% หากใช้ร่วมกับ สารเคมี mancozeb ความเข้มข้น 18,000 ppm ทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตายถึง 88.9 %

วีระศักดิ์และคณะ (2539) ได้ศึกษาผลของสาร metabolic products ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 18 ไอโซเลต ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน 3 ชนิด ได้แก่ *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* และ *Pythium aphanidermatum* พบว่าสาร metabolic product จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T 14-4 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* และ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ได้ และเมื่อนำสาร metabolic product ดังกล่าวมาศึกษาโดยใช้ thin layer chromatagraphy (TLC) พบว่ามีจำนวนจุดเรืองแสง UV ถึง 10 จุด ซึ่งมากกว่าไอโซเลตอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ

Benhamou และ Chet (1997) ได้ศึกษากลไกของเซลล์และมวลโมเลกุลของความสัมพันธ์ระหว่าง *T. harzianum* และ *Pythium ultimum* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* จะแทงทะลุผ่านเข้าไปในเส้นใยของเชื้อ *P. ultimum* ทำให้ส่วนประกอบของสารต่างๆ ภายในเส้นใยไหลออกนอกเส้นใย เนื่องจากพบว่าผนังเซลล์ของ *P. ultimum* ประกอบด้วย cellulose และ β-1,3-glucanase และในเชื้อ *T. harzianum* ก็มีเอนไซม์ β-1,3-glucanase อยู่ และยังพบอีกว่า *Trichoderma* spp. สามารถควบคุมโรค Pythium crown and root rot จาก *P. aphanidermatum* และ Fusarium crown and root rot โดย *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* ซึ่งโรคเกิดกับแตงและมะเขือเทศที่ปลูกในเรือนทดลองใน British columbia และ Canada ตามลำดับ (Menzies, 1993 อ้างตาม วีระศักดิ์, 2539)

สุมิตรา (2540) ได้ศึกษาการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์โดยเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* PC01 และ *T. harzianum* PC02 ซึ่งทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อร่วมกันบนอาหาร PDA ระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* IFF1 กับเชื้อราปฏิปักษ์ พบว่า *T. harzianum* PC01 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีและการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ 74.13 และ 97.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ *T. harzianum* PC02 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีและการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุได้ 63.24 และ 55.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทดสอบใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจาก *Chaetomium* spp. และ *Trichoderma* spp. ในแปลงของเกษตรกรเพื่อป้องกันโรคแอนแทคโนสของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ อายุ 5 ปี พบว่าใน

แปลงทดลองที่ใช้ผลิตภัณฑ์ Chaetomium ชนิดเม็ดในอัตรา 20 กรัมต่อต้น โดยหว่านรอบโคนต้นทุกๆ 4 เดือนร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ กทม. 5กิโลกรัมต่อต้น พบว่าสามารถลดการเกิดโรคและลดปริมาณเชื้อก่อโรคในดินได้ 55.93 และ 79.88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในแปลงทดลองที่ใช้ *Trichoderma* ชนิดเม็ดในอัตรา 40 กรัมต่อต้น หว่านรอบโคนต้นทุกๆ 4 เดือนร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์ กทม. 5กิโลกรัมต่อต้น พบว่าสามารถลดการเกิดโรคและลดปริมาณเชื้อก่อโรคในดินได้ 55.53 และ 91.26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงทดลองที่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ฉีดพ่นสลับกับทุก 7 วัน ได้แก่ carbendazim, zineb, manep และ copper oxychloride พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 50.16 เปอร์เซ็นต์ และลดปริมาณเชื้อก่อโรคได้ 23.83 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ

พงศ์พันธ์ (2540) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 6 ชนิด ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) โดยได้รับการฉายรังสี UV ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน พบว่า เชื้อรา *T. piluliferum* , *T. hamatum* และ *T. harzianum* ที่ผ่านการฉายรังสี UV นาน 30 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) จำนวน 49.48, 30.45 และ 28.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อราปฏิปักษ์มาทดสอบความทนทานต่อสารเคมีเบนโนมิล (เบนเลท 50%WP) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 20 และ 40 ppm บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรา *T. piluliferum* และ *T. hamatum* สามารถเจริญได้ดีที่ 0, 5 และ 10 ppm ส่วน *T. harzianum* เจริญได้ดีทุกความเข้มข้นของสารเคมี และการวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์ไคติเนส และเซลลูเลส พบว่า *T. harzianum* ที่ก่อนและหลังการฉายรังสี UV กับ *T. piluliferum* ที่ได้รับการฉายรังสีมีปริมาณเอนไซม์ไคติเนสและเซลลูเลสมากอย่างเห็นได้ชัดเจน

อมรรัชฎ์ (2541) ศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันโรครากเน่าของส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* (Dastur.) และติดตามปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* (M4) ไอโซเลตที่ต้านทานต่อสารเคมี benomyl ในวัสดุปลูก พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าวมีศักยภาพในการลดปริมาณเชื้อรา *P. parasitica* ในทรายปลูกภายใต้สภาพเรือนปลูกพืชทดลองได้ และสามารถอยู่รอดและเจริญเพิ่มปริมาณได้ดี เช่นเดียวกับเชื้อรา รา *T. harzianum* (CB-PIN-01) ไอโซเลตดั้งเดิมได้ การทดสอบในสภาพสวนโดยวิธีการหว่านส่วนผสมผงเชื้อราไตรโคเดอร์มากับอาหารเสริม (รำข้าว) และสารเสริม (ปุ๋ยหมัก)บริเวณใต้ทรงพุ่มของส้มในอัตรา 100 กรัมต่อตารางเมตร พบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาทั้งสองไอโซเลตช่วยให้ปริมาณเชื้อ *P. parasitica* ลดลงต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม และพบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาสามารถเจริญเพิ่มปริมาณและมีชีวิตอยู่ในดินได้ดี เป็นเวลานานกว่า 8 เดือน

พินิต (2542) ศึกษาการควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของพริกไทยที่เกิดจากเชื้อ *P. palmivola* โดยชีววิธีแบบผสมผสาน โดยทดสอบการเลี้ยงเชื้อร่วมกันบนอาหาร PDA ระหว่างเชื้อรา *P. palmivola* MF3 กับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *C. globosum* CG5, *C. cupreum* CC10, *T. harzianum* PO01 และ *T. harzianum* PC02 พบว่า *T. harzianum* PO01 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. palmivola* MF3 ได้ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการมีค่าเฉลี่ยการยับยั้งการเจริญเติบโต 78.45 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *T. harzianum* PC02, *C. cupreum* CC10 และ *C. globosum* CG5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวได้ 77.37, 65.68 และ 63.84 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนั้นยังศึกษากลไกการควบคุมโรค พบว่า *T. harzianum* PO01 และ *T. harzianum* PC02 สร้างเส้นใยพันรัดเส้นใยของเชื้อ *P. palmivola* MF3 ทำให้เส้นใยแตกหักเป็นท่อน ส่วน *C. globosum* CG5 และ *C. cupreum* CC10 สร้างสารปฏิชีวนะย่อยสลายเส้นใยของเชื้อรา *P. palmivola* MF3 ส่วนการทดสอบในเรือนทดลองโดยใช้เชื้อชนิดเม็ดได้แก่ *Trichoderma* (PC01+PC02), *Chaetomium* (CG5+CC10) การใช้เชื้อชนิดเม็ดร่วมกันสองชนิด (*Trichoderma* + *Chaetomium*) และการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าของพริกไทยพันธุ์มาเลเซีย พบว่าการใช้ *Chaetomium* ชนิดเม็ดในอัตรา 20 กรัมต่อต้น สามารถลดการเกิดโรคได้ 64.58 เปอร์เซ็นต์ การใช้ *Trichoderma* ในอัตรา 20 กรัมต่อต้นลดการเกิดโรคได้ 58.33 เปอร์เซ็นต์ และการใช้ *Trichoderma* ร่วมกับ *Chaetomium* ในอัตราชนิดละ 10 กรัมต่อต้นลดการเกิดโรคได้ 56.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ control ในขณะที่การใช้เชื้อ *Chaetomium* มีปริมาณเชื้อก่อโรคในดินลดลงมากที่สุด 52.38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่การใช้เชื้อ *Trichoderma* และเชื้อ *Trichoderma* ร่วมกับ *Chaetomium* มีปริมาณเชื้อก่อโรคลดลง เท่ากับ 54.76 และ 48.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบ กับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl ซึ่งมีปริมาณเชื้อก่อโรคลดลง 22.61 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ control มีปริมาณเชื้อก่อโรคในดินเพิ่มมากขึ้น

มานะและคณะ (2543) ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อจัดจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากดินป่าในภาคใต้ จำนวน 183 ไอโซเลต ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในภาคใต้ 3 ชนิด คือ *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclertium rolfsii* พบว่ามีเชื้อรา *Trichoderma* spp. 4 สายพันธุ์และเชื้อราที่มีลักษณะคล้าย *Trichoderma* spp. คือเชื้อรา *Gliocladium* spp. 2 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ทั้ง 3 ชนิด และเมื่อนำมาจัดจำแนกและบอกชนิดโดยใช้ลักษณะทาง

สัณฐานวิทยา พบว่า เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *T. harzianum* (สายพันธุ์ 0123) *T. viride* (สายพันธุ์ 0140) และ *G. virens* (สายพันธุ์ 0104 และ 0138)

ธวัชชัย (2543) ได้ ศึกษาการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าและรากเน่าของโป๊ยเซียนที่เกิดจากเชื้อ *P. nicotinae* var. *arasitica* โดยชีววิธีและเชื้อรา *Trichoderma* spp.จากดินปลูกและรากโป๊ยเซียนจำนวน 14 ไอโซเลตทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากแหล่งอื่นๆ อีก 5 ไอโซเลตโดยทดสอบการเป็นโรคกับต้นโป๊ยเซียนและทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อต้านเชื้อรา *P. nicotinae* var. *arasitica* โดยทำการทดสอบคุณสมบัติการเจริญแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรค การเป็นไมโครปรสิตกับเชื้อสาเหตุโรค การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค และประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต R1-1 มีประสิทธิภาพในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สูงที่สุด และไม่ก่อให้เกิดโรคกับต้นโป๊ยเซียน เมื่อทำการจำแนก species พบว่าคือเชื้อรา *T. koningii* Oudemans การทดสอบประสิทธิภาพทางชีววิธีของเชื้อรา *T. koningii* ในระดับเรือนทดลองเพื่อใช้ควบคุมโรคโคนเน่ารากเน่าของต้นโป๊ยเซียน ที่คลุกกล้าด้วยเชื้อรา *T. koningii* ใน diatomaceous earth ลงในดินใบก้ามปูที่มีการใส่เชื้อรา *P. nicotinae* var. *arasitica* พบว่าเชื้อรา *T. koningii* ให้ประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคโคนเน่าและรากเน่าของโป๊ยเซียน

จินตนา (2543) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium* sp. ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวน 40 ไอโซเลตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งจำแนกได้เป็น *T. harzianum* 26 ไอโซเลต *T. koningii* 5 ไอโซเลต *T. aureoviride* 1 ไอโซเลต *T. pseudokoningii* 2 ไอโซเลต และ *G. virens* 6 ไอโซเลต และทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของกล้าคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* พบว่าไอโซเลต T32-12 สามารถควบคุมโรคได้สูงสุดโดยมีจำนวนต้นกล้างอกและรอดตายมากที่สุด

สิทธิพงศ์ (2546) ได้ทำการศึกษาผลของการเคลือบเมล็ดด้วยสารเคมีป้องกันเชื้อราและเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการป้องกันโรคเน่าคอดินในต้นกล้ามะเขือเทศ พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* และ *T. asperellum* สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp. และ *Sclerotium rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ดีที่สุด และการเคลือบเมล็ดมะเขือเทศด้วย *T. asperellum* ร่วมกับสารเคลือบ PEG 6000 และ Sta-fresh 360 ในปริมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเมล็ด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดิน ทั้งสองชนิดได้ดี

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา เรือนทดลอง ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2 แผนการดำเนินการวิจัย

แบ่งงานทดลองออกเป็น 4 งานทดลอง ดังนี้ คือ

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความหลากชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์

การทดลองที่ 2 การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์กับเชื้อ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง

การทดลองที่ 3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อราปฏิปักษ์

การทดลองที่ 4 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีของเชื้อราปฏิปักษ์

3.3 การเก็บรวบรวมตัวอย่างดิน

สำรวจ เก็บตัวอย่างดินจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตงลูกผสมจาก อำเภอเมือง อำเภออุบลรัตน์ อำเภอหนองเรือ จังหวัดขอนแก่น และอำเภอเชียงยืน จังหวัด มหาสารคาม จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยมีขนาดแปลงประมาณ 1 งาน ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดิน 5 จุด กระจายทั่วทั้งแปลง เลือกเก็บดินใกล้บริเวณรากพืช โดยตักผิวดินบริเวณผิวหน้าออกเล็กน้อย จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างดินประมาณจุดละ 25 กรัม รวมตัวอย่างดินจากทั้ง 5 จุด ไว้ในถุงเดียวกัน เขย่าดินให้คลุกเคล้ากัน ก่อนนำมาแยกเชื้อ

3.4 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินมาผึ่งในที่ร่มให้แห้ง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งดินให้ได้น้ำหนัก 10 กรัม มาใส่ใน flask ที่บรรจุน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าบน shaker 20-30 นาที ทำ serial dilution โดย ดูดเอาสารแขวนลอยนั้น 1 มิลลิลิตร มาเจือจางในหลอดทดลองที่มีน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทำอย่างนี้อีกให้ได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-3} จากนั้นดูดสารแขวนลอยนั้น 100 ไมโครลิตร ไป spread บนอาหาร Martin's medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 $\pm$2 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อราเกิดขึ้น ทำการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.5 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ แตงกวา และแตงเทศ ในสภาพห้องปฏิบัติการ

เลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากดินบนอาหาร PDA ไว้ที่อุณหภูมิ 28 ±2 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จึงนำ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร มาเจาะบริเวณปลายเส้นใย นำไปวางบนอาหาร PDA โดยวางชิดขอบด้านใดด้านหนึ่งอีกด้านหนึ่งวางเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในแนวเส้นตรงที่ผ่านเส้นผ่าศูนย์กลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้เชื้อราทั้ง 2 ชนิดห่างกัน 70 มิลลิเมตร และแต่ละจุดห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิเมตร ใช้แผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (FOC) สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวา และ *F. oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) สาเหตุโรคเหี่ยวของเมล่อน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ±2 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดการเจริญของเชื้อทุกวัน จนครบ 7 วัน จึงนำค่าไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ไปทดสอบในขั้นต่อไป

3.6 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ และแตงกวา ในสภาพเรือนทดลอง

3.6.1 การควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ

3.6.1.1 การเตรียมเมล็ดมะเขือเทศ

นำเมล็ดมะเขือเทศมาแช่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดที่ได้ไปเพาะในวัสดุเพาะที่มีส่วนประกอบของแกลบดิบ ขี้เลื่อย ดิน ใบไม้ป่น และ มีการเติมปุ๋ย N-P-K ปรับสภาพความเป็นกรดด่าง ประมาณ 6.5-7 (สอบถามเกษตรกรผู้ผลิต) ที่เตรียมไว้แล้ว

3.6.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ *Trichoderma* spp.

เจาะชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 20 ไอโซเลต ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ลงในข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จึงนำไปใช้

3.6.1.3 การเตรียมต้นกล้ามะเขือเทศ

ปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาในกระถางขนาด 4 นิ้ว กระถางละ 4 ต้น ทำการ

ทดลอง 4 ซ้ำ เมื่อมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 20 ไอโซเลต ในอัตรา10% โดยน้ำหนักลงในกระถาง และปลูกเชื้อ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โดยการราดสารแขวนลอยเชื้อเข้าบริเวณโคนต้นๆ ละ 5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสารแขวนลอยเชื้อ 10^6CFU / ml หลังจากนั้น 10-14 วัน ตรวจนับจำนวนต้นที่ไม่เกิดโรค บันทึกข้อมูล และวิเคราะห์ผลทางสถิติ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 41 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

3.6.2 การควบคุมโรคเหี่ยวของแตงกวา

3.6.2.1 การเตรียมเมล็ดแตงกวา

นำเมล็ดแตงกวามาแช่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดที่ได้ไปเพาะในวัสดุเพาะที่เตรียมไว้แล้ว

3.6.2.2 การเตรียมต้นกล้าแตงกวา

ปลูกแตงกวาลูกผสมสายพันธุ์ญี่ปุ่น (japaness cucumber F-1 hybride) ในกระถางขนาด 4 นิ้ว กระถางละ 4 ต้น ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เมื่อแตงกวาอายุ 7 วัน ปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 20 ไอโซเลต ในอัตรา 10 % โดยน้ำหนัก และเชื้อรา *F. oxysporum* (FOC) สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวา โดยการราดสารแขวนลอยเชื้อเข้าบริเวณโคนต้นๆ ละ 5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสารแขวนลอยเชื้อ 10^6 CFU/ml หลังจากนั้น 10-14 วัน ตรวจนับจำนวนต้นที่ไม่เกิดโรค บันทึกข้อมูล และวิเคราะห์ผลทางสถิติ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 41 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

3.7 การจัดจำแนก และบ่งชี้ในระดับชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์

3.7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกไว้ทั้ง 20 ไอโซเลต บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จึงนำ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร มาเจาะบริเวณปลายเส้นใย เพื่อนำไปศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อโดย นำไปวางตรงกลางอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส วัดการเจริญเติบโตของเชื้อราจนครบ 7 วัน โดยสังเกตลักษณะของเส้นใย สีของโคโลนี ลีของ conidia และอีกส่วน นำไปทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ดูลักษณะของเส้นใย สีของเส้นใย สปอร์ วัดขนาดของ conidia ขนาดของ phialides ด้วย micrometer ที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ 40 และ 100 เท่า เพื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อรา โดยเปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐานที่มีอยู่ และเอกสารการจำแนกเชื้อรา (Domsch et al., 1980; Samuels, 1996; 2001; Rifai, 1969)

3.8 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

3.8.1 การทดสอบแบบกึ่งเชิงปริมาณ (semi-quantitative test)

3.8.1.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 20 ไอโซเลต บนอาหาร PDB อายุ 7 วัน จากนั้นกรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บ culture filtrate จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

3.8.1.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulose activity)

เตรียมอาหารเพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ cellulase โดยการเติม 4 % Carboxymethylcellulose - sodium salt ที่ละลายใน 0.1 M acetate buffer pH 5.0 ในอาหาร malt extract agar จากนั้นเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จำนวน 5 หลุม / จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หยอด culture filtrate จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 $\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ตรวจผลโดยราดด้วยสารละลาย Lugol's iodine ประมาณ 5-10 นาที ตรวจดูบริเวณวงใสรอบๆ หลุม ถ้ามีแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยสลายเซลลูโลส วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสทั้ง 2 ด้าน ในหน่วยมิลลิเมตร แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ culture filtrate นึ่งฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 20 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

3.8.1.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease activity)

เตรียมอาหารเพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease โดยการเติม 1% gelatin ที่ละลายใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 ในอาหาร malt extract agar จากนั้นเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จำนวน 5 หลุม / จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หยอด culture filtrate จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 $\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ตรวจผลโดยราดด้วยสารละลายอิ่มตัว NH_4SO_4 ประมาณ 5-10 นาที ตรวจดูบริเวณวงใสรอบๆ หลุม ถ้ามีแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยสลายเจลลาติน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสทั้ง 2 ด้าน ในหน่วยมิลลิเมตร แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ culture filtrate นึ่งฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 20 กรรมวิธี 3 ซ้ำ

3.8.1.4 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (chitinase activity)

เตรียมอาหารเพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase โดย เติม 2.4 % colloidal chitin ใน PDA pH 6 (ภาคผนวก) จากนั้นเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร จำนวน 5 หลุม / จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หยอด culture filtrate จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 $\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 5 วันตรวจดูบริเวณวงใสรอบๆ หลุม ถ้ามแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสออกมาย่อยสลายไคติน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสทั้ง 2 ด้าน ในหน่วยมิลลิเมตร แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้ culture filtrate นึ่งฆ่าเชื้อ

3.8.2 การทดสอบแบบเชิงปริมาณ (quantitative test)

3.8.2.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

เลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จำนวน 20 ไอโซเลต ในอาหาร PDB และ modified Czapex dox broth เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บ culture filtrate เพื่อมาตกตะกอนโปรตีนด้วย NH_4SO_2 60% (Giri et al., 1998) เก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 6.9 2 ครั้ง สุดท้ายละลายด้วย 0.1 M phosphate buffer นำไปเก็บที่ อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3.8.2.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase

ใช้ไมโครไปเปตดูดเอา enzyme solution 0.1 มิลลิลิตร นำมาผสมกับ substrate ที่ เตรียม จาก 0.09% laminarin 0.9 มิลลิลิตร ใน 0.1 M acetate buffer pH 5.0 ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดย จากการวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalents)ที่ถูกย่อยออกจาก laminarin โดยวิธีการของ Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (total activity) ประเมินจากปริมาณน้ำตาลริดิวซ์ (glucose equivalent) คิดเป็น μ-mole ที่ถูกย่อยจาก laminarin ใน 1 ชั่วโมงต่อมิลลิกรัมของโปรตีนใน culture filtrate สำหรับปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนจาก bovine serum albumin

3.8.2.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

ใช้ ไมโครไปเปตดูดเอา enzyme solution 1 มิลลิลิตร นำมาผสมกับ substrate ที่เตรียมจาก 0.55 ml colloidal chitin ใน Na-acetate buffer, pH 4.75 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดย จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (N-cetylglucosamine equivalents) ที่ถูกย่อยออกจาก colloidal chitin โดยวิธีการของ

Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (total activity) ประเมินจากปริมาณน้ำตาลริดิวซ์ (N-cetylglucosamine equivalent) คิดเป็น μ-mole ที่ถูกย่อยจาก colloidal chitin ใน 1 ชั่วโมงต่อมิลลิกรัมของโปรตีนใน culture filtrate สำหรับปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนจาก bovine serum albumin

3.8.2.4 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

ใช้ ไมโครไปเปตดูดเอา enzyme solution 1 มิลลิลิตร นำมาผสมกับ substrate ที่เตรียมจาก 0.2 % carboxymethylcellulose-sodium salt ใน acetate buffer, pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดย จากการวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalents)ที่ถูกย่อยออกจาก carboxymethylcellulose-sodium salt โดยวิธีการของ Somogyi (1952) กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (total activity) ประเมินจากปริมาณน้ำตาลริดิวซ์ (glucose equivalent) คิดเป็น μ-mole ที่ถูกย่อยจาก carboxymethylcellulose-sodium salt ใน 1 ชั่วโมงต่อมิลลิกรัมของโปรตีนใน culture filtrate สำหรับปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนจาก bovine serum albumin

3.8.2.5 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

ใช้ ไมโครไปเปตดูดเอา enzyme solution 1 มิลลิลิตร นำมาผสมกับ substrate ที่เตรียมจาก 1 % casein ใน phosphate buffer, pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย trichloro acetic acid จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (total activity) ประเมินจากปริมาณค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่เปลี่ยนแปลงไป

3.9 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมี

ผสมสารเคมีที่จะใช้ทดสอบความทนทานในอาหาร PDA โดยผสมสารเคมีสารเคมีที่ใช้ได้แก่ แค็บแตน แมนโคเซ็บ คาร์บอกซิน คาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้

ชนิดของสารเคมี	**ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ (mg / L)**				
แค็บแตน	30,000	3,000*	300	30	0
แมนโคเซ็บ	40,000	4,000*	400	40	0
คาร์บอกซิน	5,000	500*	50	5	0
คาร์เบนดาซิม	5,000	500*	50	5	0

* = ความเข้มข้นที่ผู้ผลิตแนะนำ (a.i.)

3.9.1 การเตรียมสารเคมี

ชั่งสารเคมีที่จะใช้ในการทดสอบระดับความเข้มข้นตามที่ต้องการ (ภาคผนวก ง) ผสมกับอาหาร PDA ก่อนเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนทำการทดสอบ 1 วัน

3.9.2 การเตรียมเชื้อราปฏิปักษ์

เลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์บนอาหาร PDA อายุ 3 วัน เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร นำมาเลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารเคมีความเข้มข้นต่างๆ กัน บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จึงนำมาวัดการเจริญของเส้นใยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีทดสอบ (control)

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูลในทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Mstat วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) สำหรับข้อมูลที่มีค่าเป็นศูนย์ แปลงข้อมูลโดยใช้สูตร (square-root transform) $x = (\sqrt{x + 0.5})$

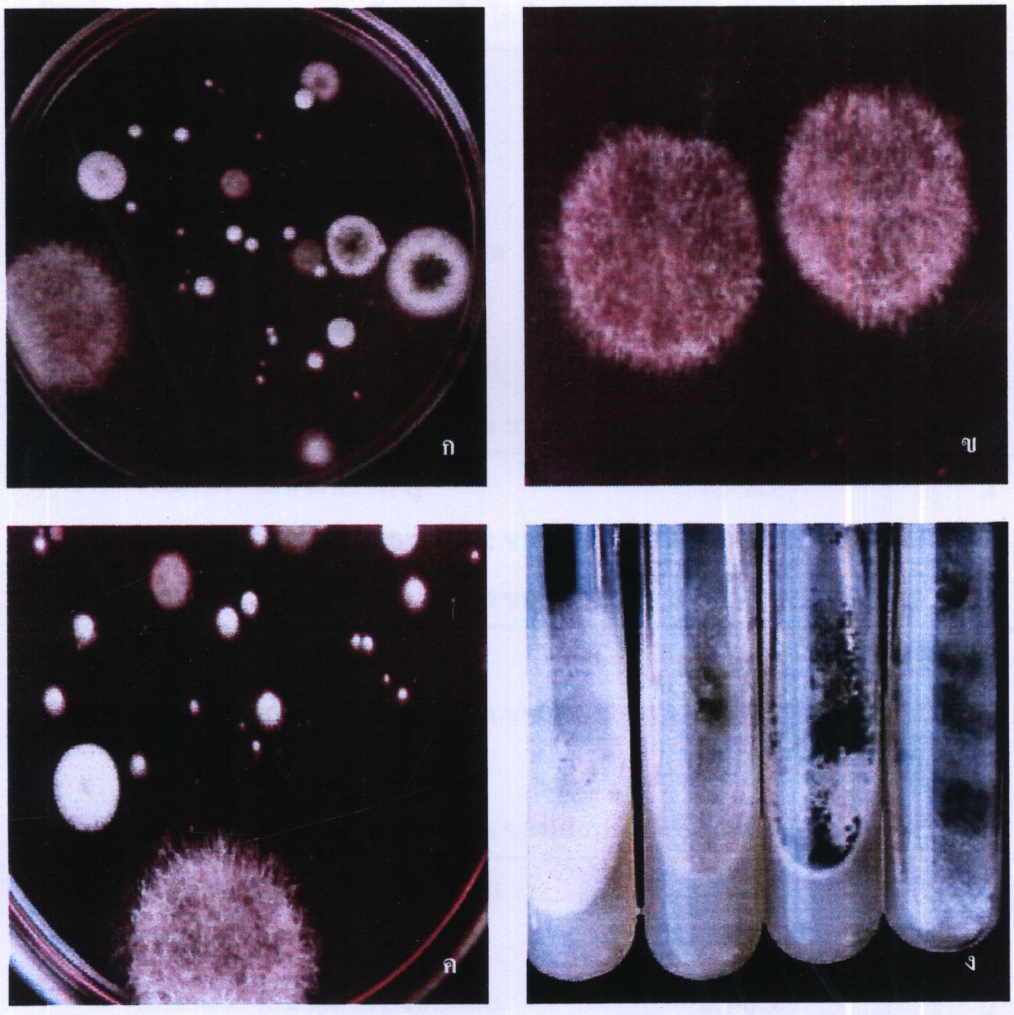
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การเก็บรวบรวมดินจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชผัก

ตัวอย่างดินจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ และแตงโม ในเขตจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม ซึ่งมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสภาพแปลงของเกษตรกร ชนิดของดินและความอุดมสมบูรณ์ มีทั้งลักษณะที่ร่วนซุย แห้ง เป็นดินเหนียว มีสีคล้ำ สีซีด ที่ได้ทำการสุ่มกระจายให้ทั่วทั้งแปลงๆ ละ 5 จุด โดยเก็บตัวอย่างดินใกล้บริเวณราก ได้ทั้งหมด จำนวน 70 ตัวอย่าง แบ่งเป็นตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่น 65 ตัวอย่าง และมหาสารคาม 5 ตัวอย่าง

4.2 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน

เมื่อนำตัวอย่างดินที่เก็บได้มาทำการแยกเชื้อราบนอาหาร Martin's medium ที่ผสม streptomycin (ภาพที่ 1) สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 186 ไอโซเลต จำแนกตามแหล่งที่เก็บและลักษณะอโคโลนีของเชื้อราไอโซเลตต่างๆ ซึ่งมีเส้นใยและสีของโคโลนีต่างๆ กัน เช่น ส่วนใหญ่มีเส้นใยสีขาว ขาวอมเหลือง มีขอบเขต สีขาวคล้ายกำมะหยี่ และมีพวกที่เข้าข่ายว่าจะเป็นเชื้อรา *Trichoderma* spp. ประมาณ 50 ไอโซเลต คือกลุ่มที่มีเส้นใยสีขาว ฟู ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 1.3-3.2 มิลลิเมตร รายละเอียด ตามตารางที่ 1 และภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา

ก-ค =โคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium

ง = เชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร PDA slant

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium จากตัวอย่างดินแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ϕโคโลนี	จำนวนโคโลนี / จานอาหาร
1	TKK101	เส้นใยสีขาว, ฟู	3.2	1
	TKK102	เส้นใยสีขาว, ไม่ฟู	0.3-0.7	8
	TKK103	เส้นใยสีเหลือง	0.7-1.1	3
	TKK104	เส้นใยสีขาว มีขอบเขต	0.6-0.8	1
	TKK105	เส้นใยสีขาว, ฟู	2.9-3.1	2
	TKK106	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	0.5-0.7	3
	TKK107	เส้นใยสีขาวอมเหลือง ขอบกลม	0.3-0.8	5
2	TKK201	เส้นใยสีขาว, ฟู	1.9-2.3	2
	TKK202	เส้นใยสีขาวอมเหลือง ขอบกลม	0.6-1.1	10
	TKK203	เส้นใยสีขาวอมเหลือง ขอบกลม	0.3-0.9	5
3	TKK301	เส้นใยสีขาว	0.7	1
	TKK302	เส้นใยสีขาวอมเหลือง ขอบกลม	0.9	1
	TKK303	เส้นใยสีขาว	0.6-1.1	2
	TKK304	เส้นใยสีขาวอมเหลือง ขอบกลม	0.7-1.0	5
4	TKK401	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.2-0.4	2
	TKK402	เส้นใยสีเทา	1.2	1
	TKK403	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.3-0.5	2
5	TKK501	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.6-0.7	3
	TKK502	เส้นใยสีขาว, ฟู	1.3	1
	TKK503	เส้นใยสีขาว ขอบเรียบ	0.2-0.6	38
	TKK504	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.3-0.9	18
	TKK505	เส้นใยสีขาว	0.3	1
	TKK506	เส้นใยสีขาว ขอบเรียบ	0.2-0.9	7

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium จากตัวอย่างดินแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม (ต่อ)

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ϕโคโลนี	จำนวนโคโลนี / จานอาหาร
6	TKK601	เส้นใยสีขาว, ฟู	1.1-1.9	4
	TKK602	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.5-1.2	67
	TKK603	เส้นใยสีขาว, ฟู	1.3-2.1	6
	TKK604	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.1-0.3	70
	TKK605	เส้นใยสีขาว ฟู ชี้ขึ้น	0.9-1.3	2
7	TKK701	เส้นใยสีขาว, ฟู	1.5	1
	TKK702	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.3-0.8	7
	TKK703	เส้นใยสีขาว ฟู ชี้ขึ้น	0.8	1
	TKK704	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	2.1-3.2	14
8	TKK801	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.7-1.2	8
	TKK802	เส้นใยสีขาว	0.6-0.8	2
9	TKK901	เส้นใยสีขาว ขอบเรียบ	0.7-1.1	6
	TKK902	เส้นใยสีขาว ฟู	2.1-3.4	2
	TKK903	เส้นใยสีขาว ขอบเรียบ	0.6-1.0	6
10	TKK1001	เส้นใยสีขาว ฟู	2.3	1
	TKK1002	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.6-1.2	19
	TKK1003	เส้นใยสีขาว ฟู ชี้ขึ้น	2.2	1
	TKK1004	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.7-1.4	17
11	TKK1101	เส้นใยสีขาว ฟู	1.3-2.2	2
	TKK1102	เส่นใยสีขาวอมเหลือง	0.1-0.3	93
	TKK1103	เส้นใยสีขาว สปอร์เหลือง	1.2	1
	TKK1104	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.2-0.4	17
	TKK1105	เส้นใยสีขาว ฟู	1.1-1.7	13
12	TKK1201	เส้นใยสีขาว ฟู	1.2-1.6	2
	TKK1202	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.1-0.5	12
	TKK1203	เส้นใยสีขาว ฟู	0.2-0.5	14

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium จากตัวอย่างดินแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม (ต่อ)

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ϕโคโลนี	จำนวนโคโลนี / จานอาหาร
13	TKK1301	เส้นใยสีขาว ฟู	1.2	1
	TKK1302	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.1-0.3	19
	TKK1303	เส้นใยสีขาว	0.3-0.5	18
	TKK1304	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.3-0.7	5
14	TKK1401	เส้นใยสีขาว ฟู	1.3	1
	TKK1402	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.2-0.7	4
	TKK1403	เส้นใยสีขาว ขอบเรียบ	0.3	1
15	TKK1501	เส้นใยสีขาว ฟู	1.7-1.9	2
	TKK1502	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.3-0.6	3
	TKK1503	เส้นใยสีขาว ฟู	1.3-1.7	3
16	TKK1601	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.3-0.6	3
	TKK1602	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.2-0.7	4
	TKK1603	เส้นใยสีเทา	0.7	1
17	TKK1701	เส้นใยสีขาว ฟู	1.4-1.7	4
	TKK1702	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.2-0.6	3
	TKK1703	เส้นใยสีขาว ฟู	1.1-1.6	5
18	TKK1801	เส้นใยสีขาว ฟู	0.3-0.9	12
	TKK1802	เส้นใยสีเหลือง	0.7	1
	TKK1803	เส้นใยสีขาว ฟู	1.5-3.2	35
19	TKK1901	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.6-0.7	2
	TKK1902	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.6-0.8	2
	TKK1903	เส้นใยสีขาว ฟู ใส	0.7-1.1	7
20	TKK2001	เส้นใยสีขาว ฟู	2.7-2.9	4
	TKK2002	เส้นใยสีขาว ฟู	2.9	1
21	TKK2101	เส้นใยสีขาวอมเขียว ฟู	3.2-4.7	7

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium จากตัวอย่างดินแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม (ต่อ)

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ϕโคโลนี	จำนวนโคโลนี / จานอาหาร
22	TKK2201	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.7-1.2	4
	TKK2202	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.4-1.1	12
	TKK2203	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.6-0.8	2
	TKK2204	เส้นใยสีขาวอมเขียว ฟู	3.2	1
23	TKK2301	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.4-0.7	2
	TKK2302	เส้นใยสีขาว	3.7	1
	TKK2303	เส้นใยสีขาว ฟู	2.9-3.2	2
24	TKK2401	เส้นใยสีขาว ฟู	5	1
	TKK2402	เส้นใยสีขาว กลม ขอบเรียบ	0.7-0.9	6
	TKK2403	เส้นใยสีขาว บางๆ	0.5	1
25	TKK2501	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	1.2	1
	TKK2502	เส้นใยสีขาว ฟู สปอร์น้ำตาลอมเทา	0.6	1
26	TKK2601	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	2.7-4.3	7
	TKK2602	เส้นใยสีขาว กลม เล็ก	0.4-0.9	21
27	TKK2701	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	1.1-1.9	30
28	TKK2801	เส้นใยสีขาว กลางเหลืองหยาบ	5.6	1
	TKK2802	เส้นใยสีขาว กลางเขียว เล็ก	3.6	1
	TKK2803	เส้นใยสีขาว กลางเหลือง ขอบหยัก	1.1-1.5	3
29	TKK2901	เส้นใยสีขาว ฟู เล็ก	1.2	2
	TKK2902	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	0.9-1.2	2
	TKK2903	เส้นใยสีเทา กลม เล็ก	0.5-0.7	11
	TKK2904	เส้นใยสีขาว ฟู เล็ก	0.3	2

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium จากตัวอย่างดินแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม (ต่อ)

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ϕโคโลนี	จำนวนโคโลนี / จานอาหาร
30	TKK3001	เส้นใยสีขาว กลางเขียว	4.7	1
	TKK3002	เส้นใยสีขาว ฟู เล็ก	0.3	1
	TKK3003	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	1.3-1.6	3
31	TKK3101	เส้นใยสีขาว ฟู กลางเหลือง	5.9	1
	TKK3102	เส้นใยสีขาว กลม	0.9-1.6	4
32	TKK3201	เส้นใยสีขาว ฟู ขอบไม่ชัดเจน	2.6	1
	TKK3202	เส้นใยสีขาว ฟู เล็ก	0.2-1.1	12
33	TKK3301	เส้นใยสีขาว ฟู กลางเหลือง	4.9-5.1	2
34	TKK3401	เส้นใยสีเขียวอมเทา	0.7-0.9	70
35	TKK3501	เส้นใยสีขาว ฟู กลางเหลือง	2.3-5.2	5
	TKK3502	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	1.3	2
36	TKK3601	เส้นใยสีขาว ฟู กลางเหลือง	4.3-6.7	2
	TKK3602	เส้นใยสีขาว ฟู	1.3	1
37	TKK3701	เส้นใยสีขาว ฟู	1.4	1
	TKK3702	เส้นใยสีขาว ฟู กลางเหลือง	3.4	1
	TKK3703	เส้นใยสีขาว เล็ก	0.2	1
38	TKK3801	เส้นใยสีขาว ฟู กลางเหลือง	2.1-2.9	2
	TKK3802	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	0.7-1.1	9
	TKK3803	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.6-0.8	5
39	TKK3901	เส้นใยสีขาว ฟู	3.1	1
	TKK3902	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.4-0.7	5
40	TKK4001	เส้นใยสีขาว ฟู	1.4	1
	TKK4002	เส้นใยสีขาว เล็ก ชี้ขึ้น	0.1-0.3	26
	TKK4003	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	0.6-0.7	2
	TKK4004	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.6	2

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium จากตัวอย่างดินแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม (ต่อ)

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ϕโคโลนี	จำนวนโคโลนี / จานอาหาร
43	TKK4301	เส้นใยสีขาว ฟู กลางเหลือง	3.7	1
	TKK4302	เส้นใยสีขาว เล็ก ชี้ขึ้น	0.2-1.2	7
	TKK4303	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.6	1
44	TKK4401	เส้นใยสีขาว ฟู	1.4	1
	TKK4402	เส้นใยสีขาว เล็ก ชี้ขึ้น	0.1-0.3	26
	TKK4403	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	0.6-0.7	2
	TKK4404	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.6	2
45	TKK4501	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.6-1.2	2
	TKK4502	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	0.5-1.1	3
46	TKK4601	เส้นใยสีขาว เล็ก ชี้ขึ้น	0.2-0.4	5
	TKK4602	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	0.4-0.6	10
47	TKK4701	เส้นใยสีขาว ฟู กลางเหลือง	2.9-3.6	6
	TKK4702	เส้นใยสีขาว ขอบหยัก	0.6-0.7	4
	TKK4703	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.7	6
50	TKK5001	เส้นใยสีขาว ขอบกลม	0.7-0.8	2
	TKK5002	เส้นใยสีขาว ฟู กลางหนา ขอบบาง	0.7-0.9	2
	TKK5003	เส้นใยสีขาวอมเหลือง	0.4-0.7	1
52	TMSK5201	เส้นใยสีขาว ฟู	1.5-3.2	5
	TMSK5201	เส้นใยสีขาวคล้ายกำมะหยี่	0.5-1.2	8
	TMSK5203	บริเวณกลางเส้นใยสีเขียวอมเหลือง	1.3	1
53	TMSK5301	บริเวณกลางเส้นใยสีเขียวอมเหลือง	0.6	1

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium จากตัวอย่างดินแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม (ต่อ)

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ϕโคโลนี	จำนวนโคโลนี / จานอาหาร
54	TMSK5401	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.3-0.6	4
	TMSK5402	เส้นใยสีขาว กลางสีเขียว	0.5-0.7	8
	TMSK5403	เส้นใยสีขาว ฟู เล็ก	0.2-0.3	3
55	TMSK5501	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.2-0.9	3
56	TMSK5601	เส้นใยสีขาว ฟู	2.9	1
	TMSK5602	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.4	1
57	TKK5701	เส้นใยสีขาว ฟู	2.0-2.2	3
	TKK5702	เส้นใยสีขาว เล็ก	0.2	1
58	TKK5801	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.2-0.4	3
	TKK5802	เส้นใยสีขาว เล็ก	0.2	3
59	TKK5901	เส้นใยสีขาว ฟู	3.3	1
	TKK5902	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.4-0.9	4
	TKK5903	เส้นใยสีขาว กลางสีเขียว	1.1-1.7	12
	TKK5904	เส้นใยสีขาว กลางสีเหลือง	0.9	1
60	TKK6001	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.1-0.7	2
	TKK6002	เส้นใยสีขาวบาง ฟู ชี้ขึ้น	0.3	1
	TKK6103	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.2-0.5	137
62	TKK6201	เส้นใยสีขาวบาง ฟู	0.4-0.7	7
	TKK6202	เส้นใยสีขาวบาง ฟู ชี้ขึ้น	0.6-1.0	2
	TKK6203	เส้นใยสีขาว กลางสีเหลือง	0.7	1
	TKK6204	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.2-0.5	10
63	TKK6301	เส้นใยสีขาวบาง	0.4-0.8	3
	TKK6302	เส้นใยสีขาว กลางสีเขียว	0.2-0.5	35
	TKK6303	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.2-0.6	11

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร Martin's medium จากตัวอย่างดินแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม (ต่อ)

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ϕ โคโลนี	จำนวนโคโลนี / จานอาหาร
64	TKK6401	เส้นใยสีขาวบาง	0.4-1.2	67
	TKK6402	เส้นใยสีขาวบาง ฟู ชี้ขึ้น	1.1-1.7	5
	TKK6403	เส้นใยสีขาว เล็ก ฟูเล็กน้อย	0.2-0.5	9
65	TKK6501	เส้นใยสีขาวบาง	0.4-1.0	10
	TKK6502	เส้นใยสีขาวบาง ฟู	0.2-0.7	5
	TKK6503	เส้นใยสีขาว กลางดำปนเหลือง	0.4-0.7	2
66	TKK6601	เส้นใยสีขาว ฟู	0.4-1.6	2
	TKK6602	เส้นใยสีขาว กลางสีเขียว	0.6	1
67	TKK6701	เส้นใยสีขาว ฟู	0.6-0.8	7
	TKK6702	เส้นใยสีขาวบาง	0.4-0.8	3
	TKK6703	เส้นใยสีขาวบาง ฟู ชี้ขึ้น	1.0-1.2	3
68	TKK6801	เส้นใยสีขาว ฟู	0.6-1.2	5
	TKK6802	เส้นใยสีขาวบาง	0.4-0.9	24
69	TKK6901	เส้นใยสีขาว ฟู	0.6-2.7	6
	TKK6902	เส้นใยสีขาว กลางสีเขียว	0.2-0.6	26
	TKK6903	เส้นใยสีขาว คล้ายกำมะหยี่	0.2-0.4	8
70	TKK7001	เส้นใยสีขาวบาง	0.6-1.2	7
	TKK7002	เส้นใยสีขาวอมเหลือง ชี้ขึ้น	0.9-1.4	4

จำนวนเชื้อที่สามารถแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 186 ไอโซเลตนั้น แบ่งเป็น 176 ไอโซเลต จากจังหวัดขอนแก่น และ10 ไอโซเลต จากจังหวัดมหาสารคาม ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน และจำนวนเชื้อราที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้

แหล่งที่เก็บ	จังหวัด	จำนวนไอโซเลต
1. ต. ห้วยยาง อ.อุบลรัตน์	จ. ขอนแก่น	28
2. บ. หนองเชียงซุย อ.เมือง	จ. ขอนแก่น	26
3. บ. โสกแต้ อ. เมือง	จ. ขอนแก่น	28
4. บ. ท่อนน้อย อ. เมือง	จ. ขอนแก่น	8
5. บ. โคกสี อ. เมือง	จ. ขอนแก่น	18
6. บ. หนองคลอง อ. เมือง	จ. ขอนแก่น	5
7. บ. โนนคูณ อ. เมือง	จ. ขอนแก่น	5
8. บ. หินตั้ง อ. เมือง	จ. ขอนแก่น	20
9. อ. อุบลรัตน์	จ. ขอนแก่น	10
10. อ. หนองเรือ	จ. ขอนแก่น	28
11. บ. หนองตุ่น อ. เชียงยืน	จ. มหาสารคาม	3
12. บ. แยก อ. เชียงยืน	จ. มหาสารคาม	7
รวม		**186**

4.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงกวา และแตงเทศ

4.3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL)สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองมะเขือเทศ

จากการทดสอบความสามรถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOL ของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่ามีเชื้อราจำนวน 62 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ FOL ได้ดังนี้ TKK101, TKK102, TKK201, TKK303, TKK506, TKK601, TKK603, TKK703, TKK902, TKK1001, TKK1003, TKK1201, TKK1301, TKK1501, TKK1503, TKK1802, TKK2101, TKK2203, TKK2204, TKK2401, TKK2501, TKK2601, TKK2602, TKK2701, TKK2801, TKK3002, TKK3101, TKK3201, TKK3202, TKK3301, TKK3501, TKK3601, TKK3701, TKK3702, TKK3801, TKK3803, TKK3901, TKK4001,

TKK4002, TKK4003, TKK4301, TKK4401, TKK4701, TMSK5201, TMSK5601, TKK5701, TKK5901, TKK6001, TKK6002, TKK6101, TKK6102, TKK6201, TKK6202, TKK6203, TKK6303, TKK6403, TKK6601, TKK6701, TKK6702, TKK6703, TKK6901 และ TKK7002 โดยมีระยะการเจริญของเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ เป็น 56, 49, 50, 47, 55, 46, 50, 52, 55, 58, 48, 53, 50, 52, 54, 55, 58, 56, 54, 52, 55, 56, 58, 57, 59, 51, 56, 52, 60, 55, 55, 56, 53, 53, 55, 53, 56, 57, 54, 54, 55, 57, 54, 52, 52, 55, 55, 48, 48, 52, 45, 55, 54, 54, 53, 52, 56, 53, 53, 50, 56 และ 54 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวสามารถเจริญได้ 14, 21, 20, 23, 15, 24, 20, 18, 15, 12, 22, 17, 20, 18, 16, 15, 12, 14, 16, 18, 15, 14, 12, 13, 11, 19, 14, 18, 10, 15, 15, 14, 17, 17, 15, 17, 14, 13, 16, 16, 15, 13, 16, 18, 18, 15, 15, 22, 22, 18, 25, 15, 16, 16, 17, 18, 14, 17, 17, 20, 14 และ 16 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

4.3.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงโม

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOM ของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดิน พบว่ามีเชื้อราจำนวน 28 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ FOM ได้ดังนี้ TKK703, TKK1001, TKK1501, TKK1802, TKK2101, TKK2203, TKK2204, TKK2501, TKK2601, TKK2602, TKK2701, TKK2801, TKK3101, TKK3202, TKK3501, TKK3702, TKK3803, TKK4002, TKK4301, TKK4701, TMSK5201, TKK5701, TKK6201, TKK6202, TKK6303, TKK6601, TKK6701 และ TKK6702 โดยมีระยะการเจริญของเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ เป็น 55, 54, 51, 51, 53, 54, 47, 53, 55, 54, 58, 55, 55, 55, 53, 54, 53, 50, 57, 52, 55, 45, 54, 53, 52, 49, 54 และ 56 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวสามารถเจริญได้ 15, 16, 19, 19, 17, 16, 23, 17, 15, 16, 12, 15, 15, 15, 17, 12, 17, 20, 13, 18, 15, 25, 16, 17, 18, 21, 16 และ 14 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

4.3.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cucurmerinum* (FOC) สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวา

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOC ของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดิน พบว่ามีเชื้อราจำนวน 20 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ FOC ได้ดังนี้ TKK1001, TKK1501, TKK1802, TKK2101, TKK2203, TKK2204, TKK2501, TKK2602, TKK2701, TKK2801, TKK3202, TKK3501, TKK3702, TKK3803, TKK4002, TKK4301, TKK4701, TMSK5201, TKK6201 และ TKK6701 โดยมีระยะการเจริญของเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ เป็น 59, 57, 56, 57, 56, 49, 55, 54, 57, 58, 56, 55, 60, 56, 58, 59, 59, 59, 54

และ 59 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวสามารถเจริญได้ 11, 13, 14, 13, 14, 21, 15, 16, 13, 12, 14, 15, 10, 14, 12, 11, 11, 11, 16 และ 11 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อราในดินจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucurmerinum* (FOC) สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงโม และแตงกวา คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

รหัสเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การเจริญของเส้นใยเชื้อรา									
	เชื้อราในดิน	FOL		เชื้อราในดิน		FOM		เชื้อราในดิน		FOC	
TKK101	100.0	21.0	I-Q	94.8	A-C	19.5	G-L	91.9	A-D	22.4	G-M
TKK102	100.0	31.0	B-E	91.9	A-D	28.1	C-G	89.5	A-E	27.6	D-G
TKK201	100.0	26.6	D-I	45.2	O	25.7	C-K	87.1	B-F	18.6	I-M
TKK303	100.0	31.9	BC	51.9	NO	36.6	B	58.5	PQ	39.0	BC
TKK506	100.0	21.0	I-Q	65.7	K-M	9.5	M	66.6	M-P	20.9	G-M
TKK601	100.0	34.8	B	89.1	B-E	19.9	G-L	90.4	A-E	19.5	H-M
TKK603	100.0	26.2	E-J	74.3	G-K	26.6	C-I	84.7	C-H	17.6	J-M
TKK703	100.0	25.7	E-J	100.0	A	21.9	E-L	86.6	B-F	18.1	J-M
TKK902	100.0	22.4	H-O	68.1	J-L	31.9	B-D	73.3	J-M	26.7	E-H
TKK1001	100.0	16.6	P-R	100.0	A	23.3	E-L	100.0	A	20.9	G-M
TKK1003	100.0	31.4	B-D	70.0	I-L	30.0	B-E	68.5	L-O	31.4	D-F
TKK1201	100.0	24.8	F-L	77.1	F-J	27.1	C-I	62.8	N-P	42.8	B
TKK1301	100.0	28.6	C-F	49.1	NO	26.6	C-I	47.1	R	25.7	F-J
TKK1501	100.0	25.3	F-K	100.0	A	27.1	C-I	100.0	A	15.7	LM
TKK1503	100.0	21.9	H-P	53.8	NO	25.2	C-K	47.6	R	22.8	G-L
TKK1802	100.0	21.9	H-P	100.0	A	27.6	C-H	100.0	A	22.4	G-M
TKK2101	100.0	17.6	N-R	100.0	A	24.3	C-L	100.0	A	19.0	H-M
TKK2203	100.0	19.5	L-Q	100.0	A	23.3	E-L	100.0	A	20.0	G-M
TKK2204	100.0	22.4	H-O	100.0	A	32.4	BC	100.0	A	31.4	D-F
F-test	ns	**		**		**		**		**	

ตารางที่ 3 ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อราในดินจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucurmerinum* (FOC) สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงโม และแตงกวา คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การเจริญของเส้นใยเชื้อรา									
	เชื้อราในดิน	FOL		เชื้อราในดิน		FOM		เชื้อราในดิน		FOC	
TKK2401	100.0	28.1	C-G	63.8	LM	20.9	F-L	60.4	OP	33.3	C-E
TKK2501	100.0	21.4	I-Q	100.0	A	24.8	C-K	100.0	A	18.5	I-M
TKK2601	100.0	20.0	K-Q	100.0	A	21.4	E-L	87.1	B-F	21.9	G-M
TKK2602	100.0	16.7	P-R	100.0	A	22.8	E-L	100.0	A	23.3	G-L
TKK2701	100.0	18.1	M-R	100.0	A	17.1	KL	100.0	A	19.5	H-M
TKK2801	100.0	16.2	QR	100.0	A	21.9	E-L	100.0	A	17.6	J-M
TKK3002	100.0	27.1	C-H	51.4	NO	43.8	A	50.0	QR	50.0	A
TKK3101	100.0	19.5	L-Q	100.0	A	21.9	E-L	92.8	A-D	22.9	G-L
TKK3201	100.0	26.2	D-J	89.0	B-E	19.0	H-L	96.6	AB	20.9	G-M
TKK3202	100.0	13.8	R	100.0	A	23.8	D-L	100.0	A	19.5	H-M
TKK3301	100.0	21.9	H-P	73.4	G-L	25.2	C-K	90.5	A-E	19.0	H-M
TKK3501	100.0	21.0	I-Q	100.0	A	24.7	C-K	100.0	A	21.9	G-M
TKK3601	100.0	21.0	I-Q	84.8	C-F	26.6	C-I	82.8	D-J	20.0	G-M
TKK3701	100.0	24.8	F-L	94.3	A-C	24.7	C-K	76.1	G-M	34.3	CD
TKK3702	100.0	23.8	F-L	100.0	A	23.3	E-L	100.0	A	19.0	H-M
TKK3801	100.0	22.9	G-N	77.1	F-J	21.4	E-L	80.9	E-K	19.0	H-M
TKK3803	100.0	23.8	F-L	100.0	A	24.3	C-L	100.0	A	20.0	G-M
TKK3901	100.0	19.5	L-Q	86.2	C-F	16.2	LM	84.7	C-H	16.6	K-M
TKK4001	100.0	18.1	M-R	72.9	G-L	27.1	C-I	71.9	K-N	24.3	F-K
TKK4002	100.0	23.8	F-L	100.0	A	29.0	B-F	100.0	A	17.6	J-M
TKK4003	100.0	22.9	G-N	58.6	MN	31.9	B-D	50.0	R	45.2	AB
TKK4301	100.0	21.0	I-Q	100.0	A	22.8	E-L	100.0	A	15.7	LM
F-test	ns	**		**		**		**		**	

ตารางที่ 3 ระยะการเจริญเติบโตของเชื้อราในดินจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucurmerinum* (FOC) สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงโม และแตงกวา คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การเจริญของเส้นใยเชื้อรา									
	เชื้อราในดิน	FOL		เชื้อราในดิน		FOM		เชื้อราในดิน		FOC	
TKK4401	100.0	17.1	O-R	86.2	C-F	23.3	E-L	91.4	A-D	22.8	G-L
TKK4701	100.0	23.4	F-M	100.0	A	26.1	C-J	100.0	A	16.1	K-M
TMSK5201	100.0	25.2	F-K	100.0	A	21.9	E-L	100.0	A	16.2	K-M
TMSK5601	100.0	26.2	D-J	79.5	E-I	18.5	I-L	67.1	M-P	27.6	D-G
TKK5701	100.0	21.0	I-Q	100.0	A	36.2	B	74.7	I-M	26.6	E-I
TKK5901	100.0	21.0	I-Q	91.9	A-D	27.6	C-H	93.3	A-C	15.7	LM
TKK6001	100.0	31.4	B-D	74.3	G-K	26.6	C-I	75.7	G-M	18.5	I-M
TKK6002	100.0	31.9	BC	81.9	D-H	20.9	F-L	84.2	C-I	20.9	G-M
TKK6101	100.0	22.9	G-N	86.2	C-F	21.9	E-L	91.4	A-D	16.1	K-M
TKK6102	100.0	39.5	A	72.4	H-L	32.3	BC	66.1	M-P	33.8	C-E
TKK6201	100.0	20.9	I-Q	100.0	A	21.9	E-L	100.0	A	23.3	G-L
TKK6202	100.0	22.4	H-O	97.6	AB	25.7	C-K	69.0	L-O	18.0	J-M
TKK6203	100.0	23.8	F-L	78.1	F-J	17.6	J-L	84.2	C-I	17.1	K-M
TKK6303	100.0	24.3	F-L	100.0	A	26.6	C-I	75.2	H-M	24.3	F-K
TKK6403	100.0	25.2	F-K	57.6	MN	26.2	C-J	85.7	C-G	14.3	M
TKK6601	100.0	20.0	K-Q	100.0	A	30.0	B-E	85.7	C-G	19.0	H-M
TKK6701	100.0	24.8	F-L	100.0	A	22.8	E-L	100.0	A	15.7	LM
TKK6702	100.0	25.7	E-J	90.5	A-D	20.4	F-L	88.5	B-E	18.1	J-M
TKK6703	100.0	26.2	D-J	78.6	F-I	23.3	E-L	77.1	F-L	27.6	D-G
TKK6901	100.0	20.0	K-Q	82.9	D-G	22.4	E-L	72.4	K-N	18.1	J-M
TKK7002	100.0	22.4	H-O	76.6	F-J	19.5	G-L	85.2	C-G	19.5	H-M
F-test	ns	**		**		**		**		**	
CV (%)	0	11.80		6.14		16.90		6.09		17.35	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

เมื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 เชื้อ คือ FOL, FOM และFOCแล้ว พบว่ามีเชื้อราจำนวน 20 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของทั้งมะเขือเทศแตงกวา และแตงเทศได้ คือ TKK1001, TKK1501, TKK1802, TKK2101, TKK2203, TKK2204, TKK2501, TKK2602, TKK2701, TKK2801, TKK3202, TKK3501, TKK3702, TKK3803, TKK4002, TKK4301, TKK4701, TMSK5201, TKK6201 และ TKK6701 โดยที่ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวได้นั้นมีลักษณะการยับยั้งในแนวทางที่เป็นปรสิตของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยดูจากลักษณะการเจริญปกคลุมบนเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคพืช ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าเป็นเชื้อราในสกุล *Trichoderma* spp. ทั้ง 20 ไอโซเลต ซึ่งแสดงการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกันกับเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของพืชผัก FOL, FOC และ FOM แล้วมีระยะทางการเจริญของเส้นใย ที่มากกว่าเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว ดังแสดงในตารางที่ 4

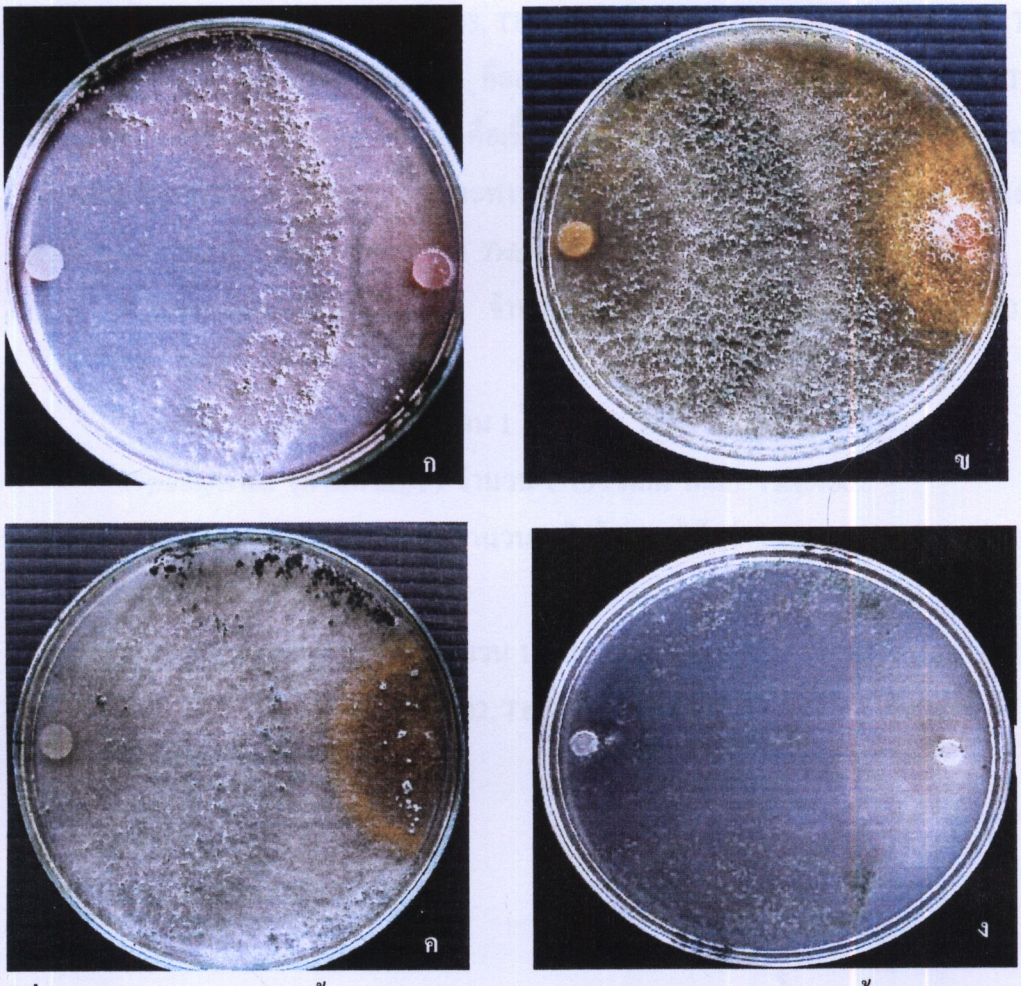
ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *F. oxysporum* f.sp. *cucurmerinum* (FOC) และ *F. oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จำนวน 20 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ระยะทางการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนหารเลี้ยงเชื้อ PDA (มม.) [1/]					
	Trichoderma sp.	FOL	*Trichoderma* sp.	FOC	*Trichoderma* sp.	FOM
TKK1001	100.0	16.6 P-R	100.0	23.3 E-L	100.0	20.9 G-M
TKK1501	100.0	25.3 F-K	100.0	27.1 C-I	100.0	15.7 LM
TKK1802	100.0	21.9 H-P	100.0	27.6 C-H	100.0	22.4 G-M
TKK2101	100.0	17.6 N-R	100.0	24.3 C-L	100.0	19.0 H-M
TKK2203	100.0	19.5 L-Q	100.0	23.3 E-L	100.0	20.0 G-M
TKK2204	100.0	22.4 H-O	100.0	32.4 BC	100.0	31.4 D-F
TKK2501	100.0	21.4 I-Q	100.0	24.8 C-K	100.0	18.5 I-M
TKK2602	100.0	16.7 P-R	100.0	22.8 E-L	100.0	23.3 G-L
TKK2701	100.0	18.1 M-R	100.0	17.1 KL	100.0	19.5 H-M
TKK2801	100.0	16.2 QR	100.0	21.9 E-L	100.0	17.6 J-M
TKK3202	100.0	13.8 R	100.0	23.8 D-L	100.0	19.5 H-M
TKK3501	100.0	21.0 I-Q	100.0	24.7 C-K	100.0	21.9 G-M
TKK3702	100.0	23.8 F-L	100.0	23.3 E-L	100.0	19.0 H-M
TKK3803	100.0	23.8 F-L	100.0	24.3 C-L	100.0	20.0 G-M
TKK4002	100.0	23.8 F-L	100.0	29.0 B-F	100.0	17.6 J-M
TKK4301	100.0	21.0 I-Q	100.0	22.8 E-L	100.0	15.7 LM
TKK4701	100.0	23.4 F-M	100.0	26.1 C-J	100.0	16.1 K-M
TMSK5201	100.0	25.2 F-K	100.0	21.9 E-L	100.0	16.2 K-M
TKK6201	100.0	20.9 I-Q	100.0	21.9 E-L	100.0	23.3 G-L
TKK6701	100.0	24.8 F-L	100.0	22.8 E-L	100.0	15.7 LM
F-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	2.53	9.66	1.74	7.30	1.87	6.01

หมายเหตุ [1/] = วัดระยะทางการเจริญของเส้นใยที่อายุ 5 วัน

FOL = *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, FOC = *F. oxysporum* f.sp. *cucurmerinum*, FOM = *F. oxysporum* f.sp. *melonis*

มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง ระยะทางของเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ และเชื้อราสาเหตุโรคพืช เมื่อเจริญมาบรรจบกันในวันที่ 5 แล้ว เชื้อราปฏิปักษ์จะเจริญปกคลุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชไม่สามารถเจริญต่อไปได้อีก และเมื่อวัดการเจริญของเส้นใยในวันที่ 7 พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์เจริญปกคลุมโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยวัดระยะทางการเจริญของเส้นใยได้ 70 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลตต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL), *F. oxysporum* f.sp. *cucurmerinum* (FOC), *F. oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 7 วันหลังจากปลูกเชื้อ ก = เชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลต TKK1001, ข = เชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลต TKK3202, ค = เชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลต TKK3501 และ ง = เชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลต TKK2501

4.4 การจัดจำแนกและบ่งชี้ในระดับชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีศักยภาพการเป็นเชื้อรา ปฏิปักษ์

เมื่อนำเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 20 ไอโซเลตที่คัดเลือกไว้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญเติบโตของเชื้อเพื่อบ่งชี้ถึงระดับชนิด (species) ได้ผล ดังนี้ คือ เชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลต TKK1001, TKK2101 และ TKK2701 คือเชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1501 คือเชื้อรา *T. reesei* ไอโซเลต TKK1802, TKK2203, TKK2602, TKK3202, TKK3501, TKK3702, TKK4301, TKK4701, TKK6201 และ TKK6701 คือเชื้อรา *T. koningii* ไอโซเลต TKK2204, TKK2501, TKK2801, TKK3803 และTMSK5201 คือเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลตTKK4002 คือเชื้อรา *T. piluliferum* (ตารางที่ 5) และจากลักษณะทางสัณฐาน ของโคโลนี conidia phialide และเส้นใยแล้ว สามารถจำแนก และบ่งชี้ชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้ 5 ชนิด (species) ดังนี้

T. aureoviride (ภาพที่ 3A, B) จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ TKK1001, TKK2101, TKK2701

T. reesei (ภาพที่ 3C, D) จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ TKK1501

T. piluliferum (ภาพที่ 3E, F) จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ TKK4002

T. harzianum (ภาพที่ 4A, B) จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ TKK2204, TKK2501, TKK2801, TKK3803, MSK5201

T. koningii (ภาพที่ 4C, D) จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ TKK1802, TKK2203, TKK2602, TKK3202, TKK3501, TKK3702, TKK4301, TKK4701, TKK6201, TKK6701

ตารางที่ 5 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3-5 วัน

ไอโซเลต	*ลักษณะโคโลนี*	*รูปร่าง สีและขนาดของ conidia*	*การบ่งชี้ในระดับชนิด*
TKK1001, TKK2101, TKK2701	ไม่พบ chlamydospore โคโลนีสีเหลือง สีขาวสีของอาหารใต้โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง-น้ำตาล หรือไม่เปลี่ยน	สีเหลือง สีขาว ผนังเรียบ รูปร่างกลม, กึ่งกลม กระจายอยู่ทั่วไป ขนาด 4.0-5.75 x 2.75-3.8 μm มี phialide จำนวน 3-5 อัน ขนาด 7.8-12.5 x 2.5-3 μm	*T. aureoviride*
TKK1501	พบ chlamydospore โคโลนีสีขาว สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง	สีเขียว ผนังเรียบ รูปร่างค่อนข้างกลม เจริญซ้อนกันเป็นวง ขนาด 3.9 x 3.6 μm มี phialide จำนวน 3-4 อัน ขนาด 12 x 2.5 μm	*T. reesei*
TKK1802, TKK2203, TKK2602, TKK3202, TKK3501, TKK3702, TKK4301, TKK4701, TKK6201, TKK6701	พบ chlamydospore โคโลนีสีขาว อาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง	สีเขียว ผนังเรียบ รูปร่างค่อนข้างกลม – ยาว เจริญเป็นวงซ้อนกัน หรือกระจายอยู่ทั่วไป ขนาด 2.7 -5.5 x 2.5-3.9 μm มี phialide จำนวน 2-5 อัน ขนาด 5-16 x 2.5-3.3 μm	*T. koningii*
TKK2204, TKK2501, TKK2801, TKK3803, TMSK5201	พบ chlamydospore โคโลนีสีขาว ฟู อาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง	สีเขียว ผนังเรียบ รูปร่าง กลม, กึ่งกลม เจริญซ้อนกันเป็นวง หรือกระจายอยู่ทั่วไป ขนาด 3.8-6.75 x 3.2-6.75 μm มี phialide จำนวน 2-4 อัน ขนาด 10-13.5 x 2.5 μm	*T. harzianum*
TKK4002	ไม่พบ chlamydospore โคโลนีสีขาว ฟู สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง	สีเขียว ผนังเรียบ รูปร่างค่อนข้างกลม กระจายอยู่ทั่วไป ขนาด 3.6 x 3.2μm มี phialide จำนวน 3-5 อัน ขนาด 6.5 x 2.75 μm	*T. piluliferum*

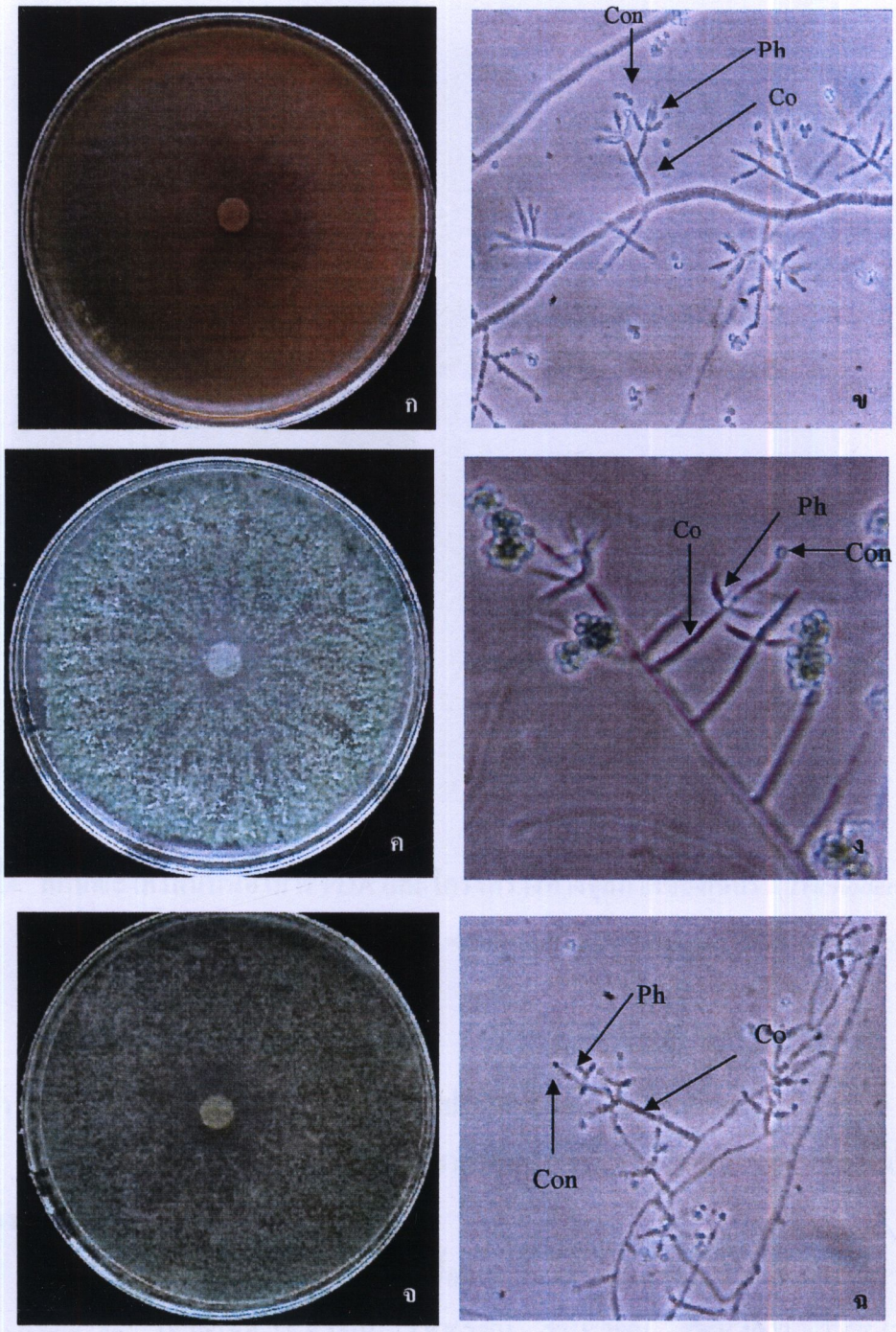
จากตารางที่ 5 สามารถแบ่งเชื้อราออกเป็น 4 กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานของโคโลนี ได้แก่

1) มีโคโลนีสีขาว เส้นใยไม่ฟู conidia สีเขียวเข้ม เส้นใยเจริญในลักษณะวงแหวนชัดเจน

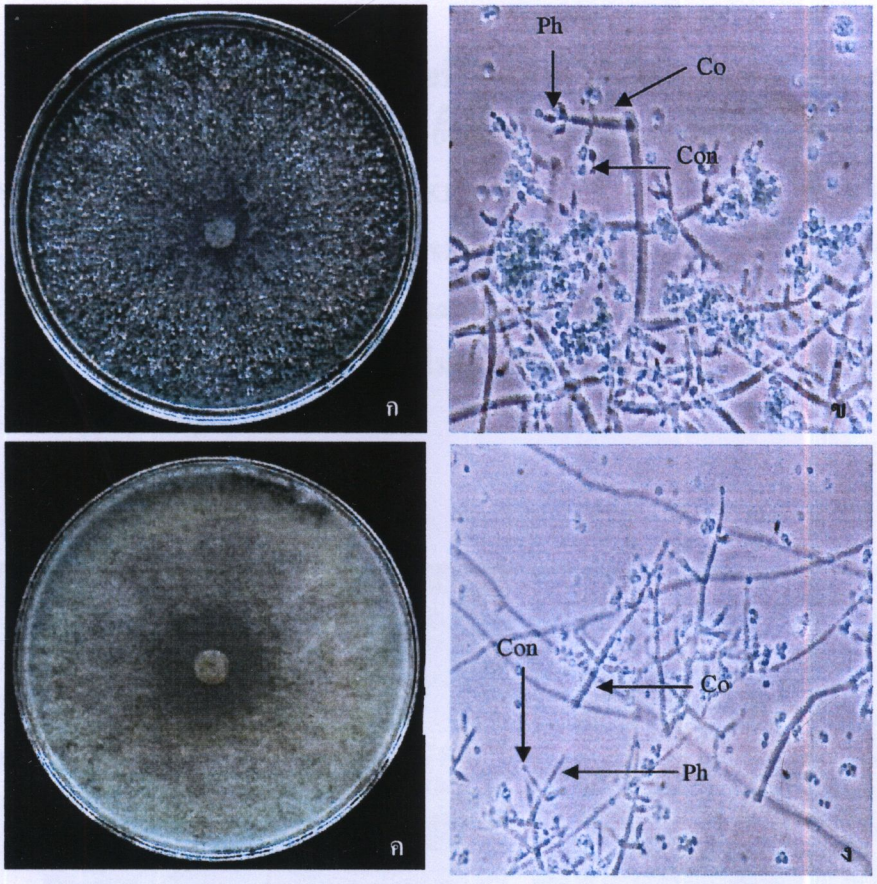
2) มีโคโลนีสีขาว เส้นใยฟู conidia สีเขียว เส้นใยไม่เจริญในลักษณะวงแหวน

3) มีโคโลนีสีเหลือง เส้นใยฟู conidia สีเขียว เส้นใยไม่เจริญในลักษณะวงแหวน และ

4) มีโคโลนีสีเหลือง เส้นใยไม่ฟู conidia สีเหลือง เส้นใยไม่เจริญในลักษณะวงแหวน



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และโครงสร้างทางจุลภาคของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ก, ข = *Trichoderma aureoviride*; ค, ง = *Trichoderma reesei*; จ, ฉ = *Trichoderma piluliferum*; Con = conidia, Ph = phialide, Co = conidiophore



ภาพที่4 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และโครงสร้างทางจุลภาคของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ก, ข = *Trichoderma harzianum*; ค, ง = *Trichoderma koningii*; Co = conidiophore, Ph = phialide, Con = conidia

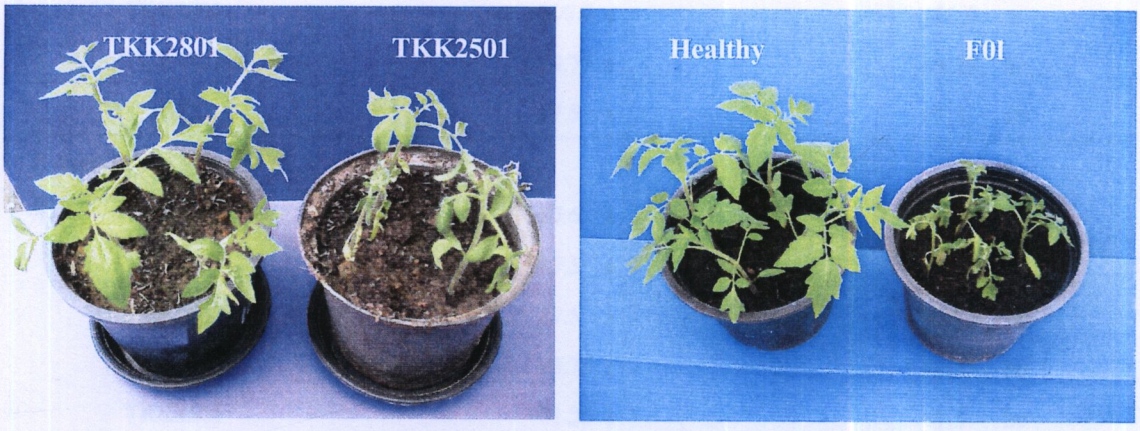
4.5 การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพเรือนทดลอง

4.5.1 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลอง

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TKK1501, TKK2701, TKK2801, TKK4002, TKK4701 และ TKK6701 มีศักยภาพที่จะสามารถนำไปใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ โดยเมื่อปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลตดังกล่าวร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยว มะเขือเทศไม่เป็นโรคเลย ในขณะที่เมื่อไม่ปลูกเชื้อ *Trichoderma* sp. มะเขือเทศเป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5 และตารางที่ 6)

4.5.2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวาในสภาพเรือนทดลอง

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวา พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TKK1802, TKK2101, TKK2203, TKK2801, TKK3702, TKK4002, TKK4301 และ TKK6201 มีศักยภาพที่จะสามารถนำไปใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวาได้ โดยเมื่อปลูกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลตดังกล่าวร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวแตงกวาจะไม่เป็นโรคเลย ในขณะที่เมื่อไม่ปลูกเชื้อ *Trichoderma* sp. แตงกวา เป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 5 ลักษณะของต้นมะเขือเทศหลังจากปลูกเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลตต่างๆ ร่วมกับเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* เป็นเวลา 10-14 วัน

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และแตงกวาในสภาพเรือนทดลอง

เชื้อรา *Trichoderma* spp.	ต้นมะเขือเทศปกต (%)[y]	ต้นแตงกวาปกต (%) [y]
T. aureoviride		
TKK1001	93.75 a	93.75 ab
TKK2101	93.75 a	100.0 a
TKK2701	100.0 a	87.5 bc
T. harzianum		
TKK2204	87.5 a	68.75 c
TKK2501	93.75 a	81.25 bc
TKK2801	100.0 a	100.0 a
TKK3803	93.75 a	81.25 bc
TMSK5201	87.5 a	87.5 ab
T. koningii		
TKK1802	87.5 a	100.0 a
TKK2203	87.5 a	100.0 a
TKK2602	87.5 a	93.75 ab
TKK3202	93.75 a	81.25 bc
TKK3501	81.25 a	87.5 bc
TKK3702	81.25 a	100.0 a
TKK4301	93.75 a	100.0 a
TKK4701	100.0 a	93.75 ab
TKK6201	87.5 a	100.0 a
TKK6701	100.0 a	93.75 ab
T. piluliferum		
TKK4002	100.0 a	100.0 a
T. reesei		
TKK1501	100.0 a	87.5 bc
Control (no *Trichoderma* spp.)	0.0 d	0.0 d
CV (%)	10.38	11.22

หมายเหตุ [y] = ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

4.6 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อรา *Trichoderma* spp.

4.6.1 การทดสอบแบบกึ่งเชิงปริมาณ (semi-quantitative test)

4.6.1.1 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

เชื้อราปฏิปักษ์ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2101 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด ซึ่งวัดบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นได้ 22.3 มิลลิเมตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่นๆ และ *T. koningii* ไอโซเลต TKK3202 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสน้อยที่สุด โดยวัดขนาดของบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นได้ 12 มิลลิเมตร (ตารางที่7)

4.6.1.2 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

เชื้อราปฏิปักษ์ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2701 และ *T. koningii* ไอโซเลต TKK2602 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด ซึ่งวัดบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นได้ 41.3 และ 40 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่นๆ และ *T. koningii* ไอโซเลต TKK1802 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสน้อยที่สุด โดยวัดขนาดของบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นได้ 13.6 มิลลิเมตร (ตารางที่ 8)

4.6.1.3 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

เชื้ อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลตมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ยกเว้น *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK3702 และ *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต TKK3803 ที่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (ภาพที่ 8 และตารางที่ 9)

ตารางที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อทดสอบการย่อย carboxymethyl cellulose-sodium salt ในอาหารแข็ง malt extract

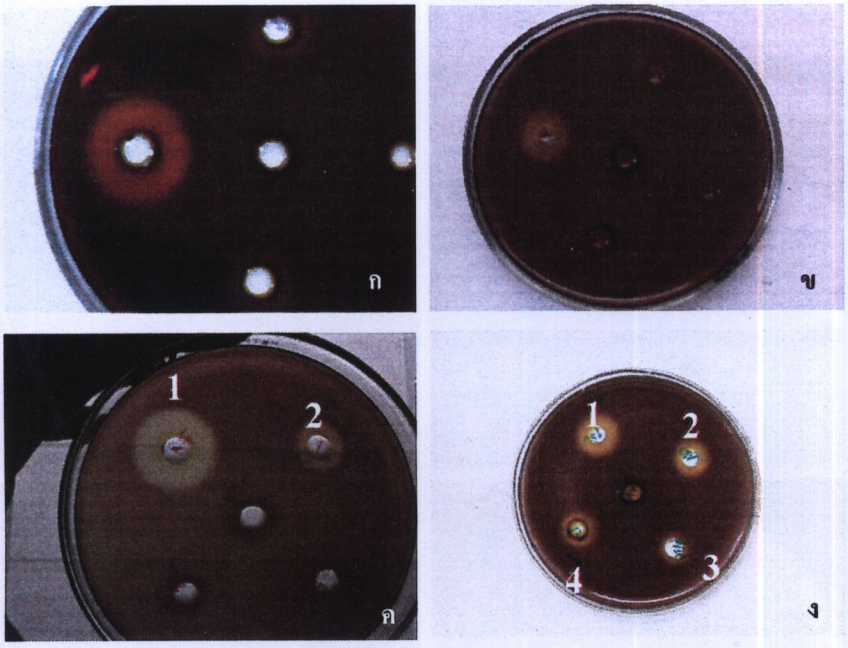
ไอโซเลต	ความสามารถในการย่อย cmc ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.	
	ขนาดของบริเวณโปร่งแสง (มม.)[y]	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (มิลลิกรัม)
T. aureoviride		
TKK1001	12.6 d	160
TKK2101	22.3 a	220
TKK2701	12.3 d	180
T. harzianum		
TKK2204	15.3 bc	250
TKK2501	12.3 d	200
TKK2801	12.6 d	180
TKK3803	12.3 d	200
TMSK5201	15.6 bc	230
T. koningii		
TKK1802	14.0 cd	260
TKK2203	13.6 cd	240
TKK2602	12.6 d	250
TKK3202	12.0 d	100
TKK3501	12.3 d	120
TKK3702	12.3 d	160
TKK4301	17.3 b	100
TKK4701	13.0 d	210
TKK6201	15.3 bc	180
TKK6701	13.6 cd	240
T. piluliferum		
TKK4002	12.3 d	190
T. reesei		
TKK1501	12.3 d	200
control	0.0 n	-
F-test	**	
CV (%)	9.10	

หมายเหตุ [y] = ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อทดสอบการย่อย เจลลาติน ในอาหารแข็ง malt extract

ไอโซเลต	ความสามารถในการย่อยเจลลาติน ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.		
	ขนาดของบริเวณโปร่งแสง (มม.)[ν]		น้ำหนักแห้งของเส้นใย (มิลลิกรัม)
T. aureoviride			
TKK1001	29.3	c-e	160
TKK2101	25.6	d-f	220
TKK2701	41.3	a	180
T. harzianum			
TKK2204	14.0	h	250
TKK2501	22.3	e-g	200
TKK2801	15.6	gh	180
TKK3803	36.6	a-c	200
TMSK5201	24.6	d-f	230
T. koningii			
TKK1802	13.6	h	260
TKK2203	35.3	a-c	240
TKK2602	40.0	a	250
TKK3202	31.6	b-d	100
TKK3501	15.0	gh	120
TKK3702	22.3	e-g	160
TKK4301	39.6	ab	100
TKK4701	25.6	d-f	210
TKK6201	30.3	c-e	180
TKK6701	30.3	c-e	240
T. piluliferum			
TKK4002	18.0	f-h	190
T. reesei			
TKK1501	24.0	d-f	200
control	0.0	n	-
F- test	**		
CV. (%)	18.80%		

หมายเหตุ [ν] = ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์



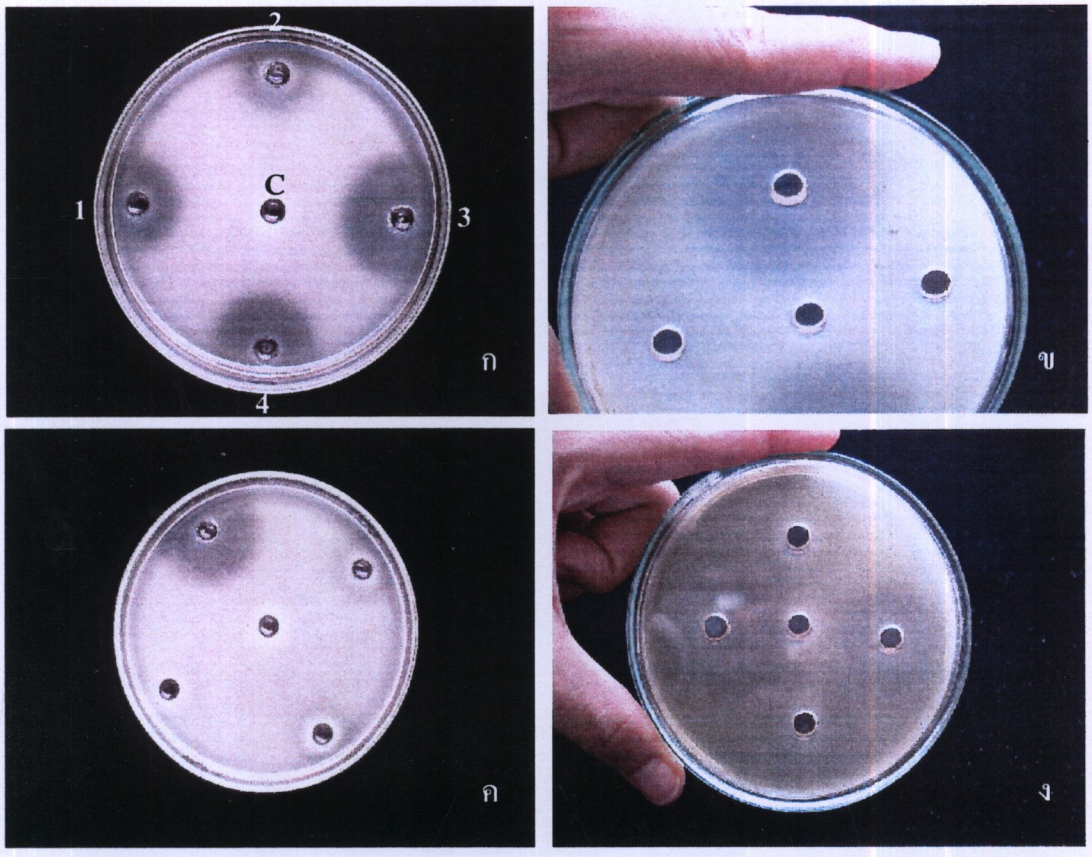
ภาพที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulolytic activity) เมื่อตรวจสอบการย่อยสลาย carboxymethyl cellulose-sodium salt (CMC) ในอาหาร malt extract agar pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 28 ±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วราดด้วย Lugol's iodine

ก= เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต TMSK5201

ข= เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK4701

ค= เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma aureoviride* ไอโซเลต TKK2101 (1), และ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK1802 (2)

ง= เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK4301 (1), TKK2203 (3), และ *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต TKK2204 (2), TKK2501 (4)



ภาพที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (proteolytic activity) โดยใช้ culture filtrate ย่อยเจลลาติน ที่ผสมในอาหาร malt extract agar pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 28 ±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ประเมินจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณโปร่งแสงรอบโคโลนี

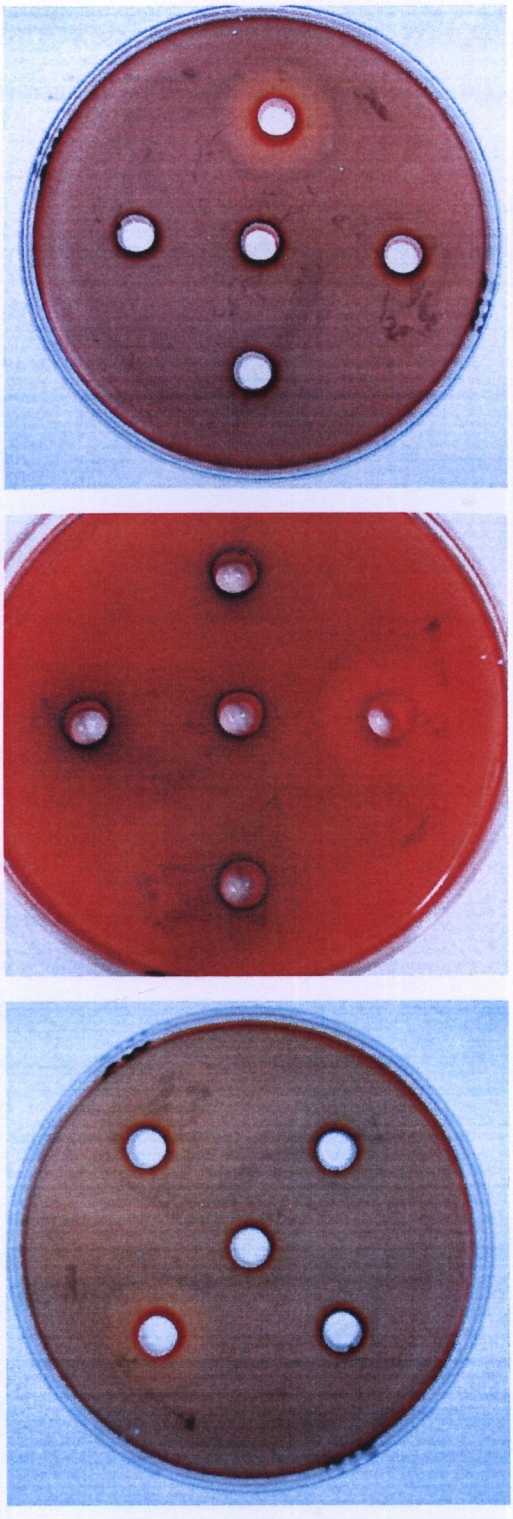
ก= เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2602 (1), TKK6201 (3) TKK6701 (4) และ *Trichoderma aureoviride* ไอโซเลต TKK2701 (2)

ข= เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต TKK2501

ค= เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianumi* ไอโซเลต TKK3803

ง= เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK4301

C= control



ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพการย่อยไคติน ในอาหาร PDA ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ โดยประเมินจากบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้น และให้ค่าคะแนนเป็นบวกในกรณีที่พบบริเวณโปร่งแสง และลบในกรณีที่ไม่พบบริเวณโปร่งแสง

ตารางที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อทดสอบการย่อย colloidal chitinในอาหารแข็ง PDA

ไอโซเลต	ความสามารถในการย่อย colloidal chitin ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.	
	การมี / ไม่มีบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้น [1/]	น้ำหนักแห้งของเส้นใย (มิลลิกรัม)
T. aureoviride		
TKK1001	+	160
TKK2101	+	220
TKK2701	+	180
T. harzianum		
TKK2204	+	250
TKK2501	+	200
TKK2801	+	180
TKK3803	-	200
TMSK5201	+	230
T. koningii		
TKK1802	+	260
TKK2203	+	240
TKK2602	+	250
TKK3202	+	100
TKK3501	+	120
TKK3702	-	160
TKK4301	+	100
TKK4701	+	210
TKK6201	+	180
TKK6701	+	240
T. piluliferum		
TKK4002	+	190
T. reesei		
TKK1501	+	200
control	-	-

+ = พบบริเวณ โปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้น, - = ไม่พบบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้น

4.6.2 การทดสอบแบบเชิงปริมาณ (quantitative test)

4.6.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase

เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2801, *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1001, *T. koningii* ไอโซเลต TKK3501 มีกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase สูงที่สุด คือ สามารถย่อย laminarin ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) 532.86, 89.36 และ 42.18 μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

4.6.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

เชื้อราปฏิปักษ์ *T. koningii* ไอโซลต TKK3202 และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2204 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส สูงที่สุด คือ สามารถย่อย colloidal chitin ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (N-cetylglucosamine equivalents) 27.12 และ 13.56 μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

4.6.2.3 กิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลส

เชื้อราปฏิปักษ์ *T. koningii* ไอโซลต TKK3202, *T. aureoviride* ไอโซลต TKK2101 และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK3803 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส สูงที่สุด คือ สามารถย่อย carboxymethylcellulose-sodium salt ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) 65.46, 51.06 และ 21.06 μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

4.6.2.4 กิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอส

เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลต TMSK5201, TKK2204 และ *T. aureoviride* ไอโซลต TKK2701 และ มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส สูงที่สุด คือ สามารถย่อย casein ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) 11.46, 11.46 และ 7.68 μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

ไอโซเลต	ความสามารถในการย่อย laminarin ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. วัดเป็น glu-μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง
T. aureoviride	
TKK1001	89.36
TKK2101	2.77
TKK2701	6.66
T. harzianum	
TKK2204	-
TKK2501	10.54
TKK2801	532.86
TKK3803	10.54
TMSK5201	-
T. koningii	
TKK1802	16.09
TKK2203	-
TKK2602	9.43
TKK3202	2.22
TKK3501	42.18
TKK3702	-
TKK4301	10.54
TKK4701	-
TKK6201	-
TKK6701	18.31
T. piluliferum	
TKK4002	3.33
T. reesei	
TKK1501	-

- = ไม่สามารถวัดปริมาณได้

ตารางที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ ไคติเนส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

ไอโซเลต	ความสามารถในการย่อย colloidal chitin ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. วัดเป็น GlcNAc-μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง
T. aureoviride	
TKK1001	-
TKK2101	-
TKK2701	5.76
T. harzianum	
TKK2204	13.56
TKK2501	1.92
TKK2801	-
TKK3803	-
TMSK5201	-
T. koningii	
TKK1802	5.76
TKK2203	-
TKK2602	11.58
TKK3202	27.12
TKK3501	5.76
TKK3702	-
TKK4301	-
TKK4701	7.74
TKK6201	-
TKK6701	-
T. piluliferum	
TKK4002	-
T. reesei	
TKK1501	-

- = ไม่สามารถวัดปริมาณได้

ตารางที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

ไอโซเลต	ความสามารถในการย่อย carboxymethylcellulose-sodium salt ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. วัดเป็น glu-μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง
T. aureoviride	
TKK1001	-
TKK2101	51.06
TKK2701	-
T. harzianum	
TKK2204	1.74
TKK2501	6.66
TKK2801	1.11
TKK3803	21.06
TMSK5201	10.32
T. koningii	
TKK1802	-
TKK2203	65.46
TKK2602	-
TKK3202	-
TKK3501	7.74
TKK3702	-
TKK4301	-
TKK4701	-
TKK6201	-
TKK6701	-
T. piluliferum	
TKK4002	-
T. reesei	
TKK1501	-

- = ไม่สามารถวัดปริมาณได้

ตารางที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอส ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

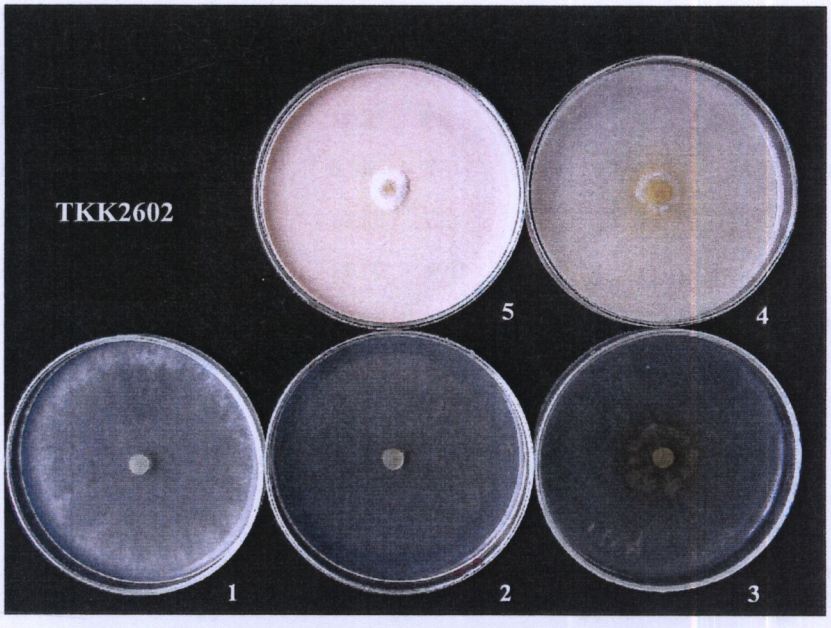
ไอโซเลต	ความสามารถในการย่อย casein ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. วัดเป็น glu-μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง
T. aureoviride	
TKK1001	-
TKK2101	2.7
TKK2701	7.68
T. harzianum	
TKK2204	11.46
TKK2501	4.26
TKK2801	1.98
TKK3803	1.62
TMSK5201	11.46
T. koningii	
TKK1802	1.38
TKK2203	2.46
TKK2602	-
TKK3202	1.02
TKK3501	-
TKK3702	4.38
TKK4301	-
TKK4701	-
TKK6201	-
TKK6701	-
T. piluliferum	
TKK4002	-
T. reesei	
TKK1501	6.96

- = ไม่สามารถวัดปริมาณได้

4.7 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีฆ่าเชื้อรา

4.7.1 ความทนทานต่อสารเคมีแค็บแตน

ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 30 mg / L เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ โดยไอโซเลตที่มีแนวโน้มเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ เชื้อรา *T. koningii* ไอโซเลต TKK2602 และ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2701 และที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 300 และ 3,000 mg / L เชื้อราปฏิปักษ์ทุกไอโซเลตยกเว้น *T. koningii* ไอโซเลต TKK3702 สามารถเจริญได้ และไอโซเลตที่มีแนวโน้มการเจริญได้ดี คือ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1001, *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2204, *T. koningii* ไอโซเลต TKK2602, TKK3501 บนอาหารที่ผสมสารเคมีแค็บแตน ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 30,000 mg / L เชื้อราปฏิปักษ์ทุกไอโซเลตเจริญได้เพียงเล็กน้อย โดยไอโซเลตที่มีแนวโน้มที่สามารถเจริญเติบโตได้ ได้แก่ *T. koningii* ไอโซเลต TKK1802 และ ไอโซเลตTKK3501 ส่วน *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2801, *T. koningii* ไอโซเลต TKK3702 และ ไอโซเลต TKK4301 ไม่สามารถเจริญได้เลย นอกจากนี้ยังพบลักษณะการเจริญของโคโลนีของเชื้อราปฏิปักษ์ผิดปกติไปจากที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผสมสารเคมีฆ่าเชื้อรา กล่าวคือบริเวณปลายเส้นใยมีการเจริญในลักษณะที่เป็นคลื่น เส้นใยหยาบ เหมือนมีความหนามากกว่าปกติ (ภาพที่ 9 และตารางที่14)



ภาพที่ 9 ลักษณะการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2602 อายุ 5 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีฆ่าเชื้อราแค็บแตน ความเข้มข้นจาก 0, 30, 300, 3,000 และ 30,000 mg / L (เรียงตามลำดับ1-5)

ตารางที่ 14 การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ บนอาหาร PDA ที่ผสมสารฆ่าเชื้อราแคปแทนผสมในอัตราความเข้มข้น 0-30,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสารออกฤทธิ์ (active ingredient) โดยวัดเป็นมิลลิเมตร

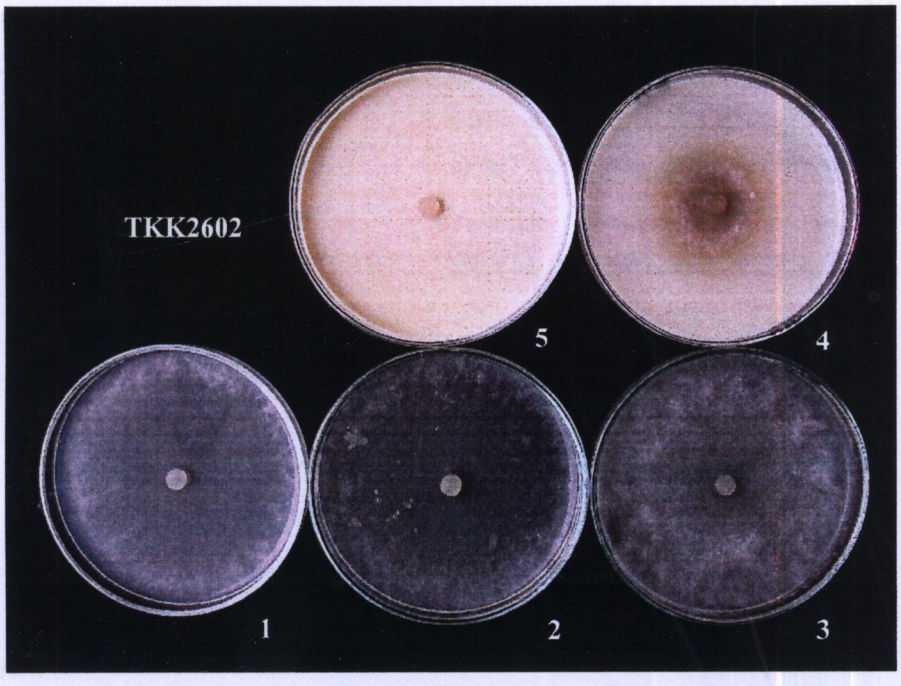
ไอโซเลต	การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหารที่มีสารเคมีแคปแทน									
	30,000 mg/L		3,000 mg/L		300 mg/L		30 mg/L		0 mg/L	
T. aureoviride										
TKK1001	13.62	y-D	31.75	n	31.37	n	57.12	fg	90.00	a
TKK2101	12.25	A-D	13.75	y-D	13.75	y-D	26.50	o-q	90.00	a
TKK2701	11.25	D	14.00	y-D	21.50	s-v	72.25	c	90.00	a
T. harzianum										
TKK2204	11.75	B-D	13.25	z-D	28.12	n-p	51.00	ij	90.00	a
TKK2501	11.50	CD	14.75	w-D	22.75	q-t	60.50	ef	90.00	a
TKK2801	0.00	E	12.50	A-D	14.25	y-D	26.25	o-r	90.00	a
TKK3803	11.00	D	12.50	A-D	14.50	x-D	36.00	m	90.00	a
TMSK5201	11.50	CD	13.75	y-D	15.50	w-D	49.50	j	90.00	a
T. koningii										
TKK1802	15.00	w-D	16.25	w-C	19.62	t-w	54.25	g-i	90.00	a
TKK2203	11.50	CD	13.12	z-D	17.62	u-z	52.75	h-j	90.00	a
TKK2602	12.75	z-D	17.00	v-A	28.50	n-p	76.75	b	90.00	a
TKK3202	11.00	D	13.50	z-D	15.00	w-D	44.50	k	90.00	a
TKK3501	14.25	y-D	19.25	t-x	24.75	p-s	62.25	e	90.00	a
TKK3702	0.00	E	0.00	E	0.00	E	16.87	v-A	90.00	a
TKK4301	0.00	E	11.50	CD	14.50	x-D	40.00	l	90.00	a
TKK4701	11.50	CD	15.00	w-D	22.00	r-u	56.25	gh	90.00	a
TKK6201	11.75	B-D	13.75	y-D	16.50	w-B	30.25	no	90.00	a
TKK6701	11.50	CD	13.25	z-D	18.50	t-y	66.25	d	90.00	a
T. piluliferum										
TKK4002	13.00	z-D	13.50	z-D	15.25	w-D	43.00	kl	90.00	a
T. reesei										
TKK1501	11.75	B-D	14.12	y-D	17.12	v-A	29.50	no	90.00	a
F-test	**		**		**		**		ns	

CV = 7.96%

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ** = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4.7.2 ความทนทานต่อสารเคมีแมนโคเซ็บ

ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 40 mg / L เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ดี ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 400 mg / L เชื้อราปฏิปักษ์ทุกไอโซเลต ยกเว้น *T. harzianum* ไอโซเลต TMSK5201 สามารถเจริญเติบโตได้ ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 4,000 mg /L เชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลตที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี ได้แก่ *T. koningii* ไอโซเลต TKK2602, TKK3202, TKK3501, TKK4701, TKK6701 และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2501, TKK2801 นอกจากนี้ยังมีไอโซเลตที่สามารถเจริญเติบโตได้บ้าง ได้แก่ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK3803, *T. koningii* ไอโซเลต TKK6201, TKK3702, *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2701 และ *T. piluliferum* ไอโซเลต TKK4002 นอกนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 40,000 mg / L ไม่มีเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลตใดที่สามารถเจริญเติบโตได้เลย นอกจากนี้ยังพบลักษณะการเจริญของโคโลนีของเชื้อราปฏิปักษ์ผิดปกติไปจากที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผสมสารเคมีฆ่าเชื้อรา กล่าวคือบริเวณปลายเส้นใยมีการเจริญในลักษณะที่เป็นคลื่น เส้นใยหยาบ เหมือนมีความหนามากกว่าปกติ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ลักษณะการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2602 อายุ 5 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีฆ่าเชื้อราแมนโคเซ็บ ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์จาก 0, 40, 400, 4,000 และ 40,000 mg/L (เรียงตามลำดับ1-5)

ตารางที่ 15 การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีสารเคมีฆ่าเชื้อราแมนโคเซ็บผสมอยู่ 0-40,000 มิลลิกรัมของสารออกฤทธิ์ต่อลิตร ของสารที่ออกฤทธิ์ (active ingredient) โดยวัดเป็นมิลลิเมตร

ไอโซเลต	การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหารที่มีสารเคมีแมนโคเซ็บ									
	40,000 mg/L		4,000 mg/L		400 mg/L		40 mg/L		0 mg/L	
T. aureoviride										
TKK1001	0.00	n	0.00	n	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK2101	0.00	n	0.00	n	62.25	cd	67.00	c	90.00	a
TKK2701	0.00	n	19.50	lm	90.00	a	90.00	a	90.00	a
T. harzianum										
TKK2204	0.00	n	0.00	n	78.75	b	90.00	a	90.00	a
TKK2501	0.00	n	45.25	g-i	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK2801	0.00	n	37.00	j	55.50	ef	90.00	a	90.00	a
TKK3803	0.00	n	21.25	l	51.62	fg	90.00	a	90.00	a
TMSK5201	0.00	n	0.00	n	0.00	n	47.75	gh	90.00	a
T. koningii										
TKK1802	0.00	n	0.00	n	59.50	de	90.00	a	90.00	a
TKK2203	0.00	n	0.00	n	65.50	cd	83.37	ab	90.00	a
TKK2602	0.00	n	41.50	h-j	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK3202	0.00	n	37.75	jk	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK3501	0.00	n	39.37	ij	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK3702	0.00	n	13.25	m	78.12	b	87.75	a	90.00	a
TKK4301	0.00	n	0.00	n	45.25	g-i	90.00	a	90.00	a
TKK4701	0.00	n	66.00	cd	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK6201	0.00	n	17.50	lm	29.50	k	90.00	a	90.00	a
TKK6701	0.00	n	30.25	k	90.00	a	90.00	a	90.00	a
T. piluliferum										
TKK4002	0.00	n	0.00	n	90.00	a	90.00	a	90.00	a
T. reesei										
TKK1501	0.00	n	14.50	m	51.75	fg	90.00	a	90.00	a
F-test	ns		*		*		*		ns	

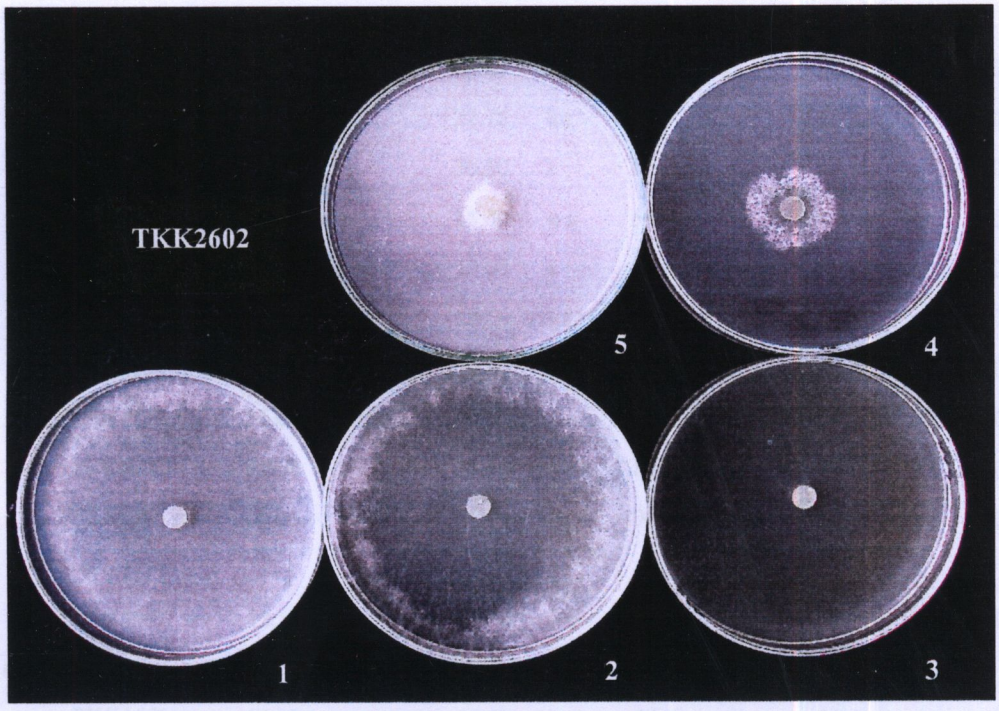
CV = 8.34 % หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT, * = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, ns= ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.7.3 ความทนทานต่อสารเคมีคาร์บอกซิน

ทุกระดับความเข้มข้นของสารออกฟทธิ์ของคาร์บอกซิน เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ดี โดยไอโซเลตที่มีแนวโน้มที่สามารถเจริญได้ดีที่สุด ได้แก่ *T. koningii* ไอโซเลต TKK4301, TKK4701, *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1001, *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2501 และ *T. reesei* ไอโซเลต TKK1501 นอกจากนี้ยังพบลักษณะการเจริญของโคโลนีของเชื้อราปฏิปักษ์ผิดปกติไปจากที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผสมสารเคมีฆ่าเชื้อรา กล่าวคือบริเวณปลายเส้นใยมีการเจริญในลักษณะที่เป็นคลื่น เส้นใยหยาบ เหมือนมีความหนามากกว่าปกติ (ตารางที่ 16 และภาพที่ 11)

4.7.4 ความทนทานต่อสารเคมีคาร์เบนดาซิม

ไม่มีเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลตใดที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหาร PDA ที่มีสารเคมีฆ่าเชื้อราคาร์เบนดาซิมผสมอยู่ 0-5,000 mg /L ของตัวยาที่ออกฤทธิ์ได้เลย (ข้อมูลไม่ได้แสดง)



ภาพที่ 11 ลักษณะการเจริญของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2602 อายุ 5 วัน บนอาหาร เลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีฆ่าเชื้อราคาร์บอกซิน ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ จาก 0, 5, 50, 500 และ 5,000 mg / L (เรียงตามลำดับ 1-5)

ตารางที่ 16 การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีสารเคมีฆ่าเชื้อราคาร์บอกซินผสมอยู่ 0-5,000 มิลลิกรัมของสารออกฤทธิ์ต่อลิตร ของสารที่ออกฤทธิ์ (active ingredient) โดยวัดเป็นมิลลิเมตร

ไอโซเลต	การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหารที่มีสารเคมีคาร์บอกซิน									
	5,000 mg/L		500 mg/L		50 mg/L		5 mg/L		0 mg/L	
T. aureoviride										
TKK1001	17.12	m-s	20.37	l-o	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK2101	11.62	s	13.12	q-s	90.00	a	71.37	e	90.00	a
TKK2701	13.25	q-s	20.25	l-p	90.00	a	90.00	a	90.00	a
T. harzianum										
TKK2204	15.37	n-s	24.25	l	72.87	de	90.00	a	90.00	a
TKK2501	14.75	o-s	38.00	j	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK2801	0.00	t	12.00	s	77.00	cd	90.00	a	90.00	a
TKK3803	11.75	s	21.37	l-n	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TMSK5201	0.00	t	19.00	l-q	55.00	g	74.50	de	90.00	a
T. koningii										
TKK1802	14.75	o-s	20.87	l-n	64.25	f	82.87	b	90.00	a
TKK2203	0.00	t	22.75	lm	44.37	i	65.12	f	90.00	a
TKK2602	12.50	rs	30.50	k	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK3202	12.25	s	15.50	n-s	56.00	g	81.00	bc	90.00	a
TKK3501	12.00	s	12.00	s	85.50	ab	90.00	a	90.00	a
TKK3702	14.25	p-s	18.50	l-r	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK4301	17.75	m-s	29.50	k	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK4701	16.00	n-s	22.50	lm	90.00	a	90.00	a	90.00	a
TKK6201	11.50	s	11.50	s	81.25	bc	90.00	a	90.00	a
TKK6701	12.25	s	21.00	l-n	90.00	a	90.00	a	90.00	a
T. piluliferum										
TKK4002	12.50	rs	14.50	o-s	49.37	h	90.00	a	90.00	a
T. reesei										
TKK1501	14.37	o-s	31.87	k	54.62	g	90.00	a	90.00	a
F-test	*		*		*		*		ns	

CV = 6.30 % หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความ เชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT, * = มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์, ns= ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิต

4.8 ศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดต่างๆ ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

เมื่อนำข้อมูลของกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โปรติเอส ไคติเนส และβ-1,3 glucanase ร่วมกับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองในสภาพห้องปฏิบัติการ ในเรือนทดลองและความทนทานต่อสารเคมีฆ่าเชื้อรา แค็บแตน แมนโคเซ็บ คาร์บอกซินและคาร์เบนดาซิม แล้ว พบว่า เชื้อรา *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK1802, TKK2203, TKK2602, TKK3702, TKK4301, TKK4701, TKK6201 และ TKK6701 เชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1001 และไอโซเลต TKK2101 และ เชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต TMSK5201 มีลักษณะของการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ได้ดี เมื่อพิจารณาจากข้อมูล ดังกล่าว ข้างต้น (ตารางที่ 17) สมควรที่จะเลือกใช้ทดสอบในสภาพแปลงปลูกต่อไป

ตารางที่ 17 ข้อมูลศักยภาพของการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

เชื้อรา	ไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์				การควบคุมโรคในเรือนทดลอง	
		เซลลูเลส	โปรติเอส	ไคติเนส	β-1,3 glucanase	FOL	FOC
T. aureoviride	TKK1001	A	2	+	+++	**	**
	TKK2101	C	2	+	+++	**	**
	TKK2701	A	3	+	+++	**	**
T. harzianum	TKK2204	B	1	+	+++	**	*
	TKK2501	A	2	+	+++	**	**
	TKK2801	A	1	+	+++	**	**
	TKK3803	A	3	-	+++	**	**
	TMSK5201	B	2	+	+++	**	**
T. koningii	TKK1802	B	1	+	+++	**	**
	TKK2203	A	3	+	---	**	**
	TKK2602	A	3	+	+++	**	**

A = ขนาด ϕ ของวงใสรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นมีค่าระหว่าง 12-15 มิลลิเมตร, B = ขนาด ϕ ของวงใสรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นมีค่าระหว่าง 15.1-18 มิลลิเมตร, C = ขนาด ϕ ของวงใสรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นมีค่ามากกว่า 18 มิลลิเมตร, 1 =ขนาด ϕ ของวงใสรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นมีค่าระหว่าง 13-20 มิลลิเมตร, 2 = ขนาด ϕ ของวงใสรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นมีค่าระหว่าง 21-28 มิลลิเมตร, 3 = ขนาด ϕ ของวงใสรอบรอยเจาะชิ้นวุ้นมีค่ามากกว่า 28 มิลลิเมตร, + = พบบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้น, - = ไม่พบบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้น

ตารางที่ 17 ข้อมูลศักยภาพของการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ (ต่อ)

เชื้อรา	ไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์				การควบคุมโรคในเรือนทดลอง	
		เซลลูเลส	โปรติเอส	ไคติเนส	β-1,3 glucanase	FOL	FOC
T. koningii	TKK3202	A	3	+	+++	**	**
	TKK3501	A	1	+	+++	**	**
	TKK3702	A	2	-	---	**	**
	TKK4301	B	3	+	+++	**	**
	TKK4701	A	2	+	---	**	**
	TKK6201	B	3	+	---	**	**
	TKK6701	A	3	+	+++	**	**
T. piluliferum	TKK4002	A	1	+	+++	**	**
T. reesei	TKK1501	A	2	+	---	**	**

+++ = มีกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase, --- = ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase, ** = สามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้มากกว่า 80%, * = ควบคุมโรคเหี่ยวได้น้อยกว่า 80%

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการศึกษา

5.1 การเก็บรวบรวมและการแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลมะเขือ และตระกูลแตง ในจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม จำนวน 70 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อรา สามารถแยกเชื้อราได้ 186 ไอโซเลต คิดเป็น 1 ตัวอย่างสามารถเชื้อราได้ประมาณ 3 ไอโซเลต ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมาก เนื่องจากแปลงที่เก็บตัวอย่างดินมานั้น เป็นแปลงที่เกษตรกรใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมให้กับบริษัทเอกชน ที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก จำเป็นต้องให้เมล็ดพันธุ์ปลอดจากโรคต้องห้ามที่ประเทศผู้รับซื้อระบุไว้ ส่งผลให้มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืชในปริมาณที่สูง (ข้อมูลจากการสอบถามเกษตรกร) จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อราทั้งที่มีประโยชน์และไม่มีประโยชน์ได้ถูกกำจัดไปบางส่วน ทำให้พบเชื้อราจากตัวอย่างดินในปริมาณที่น้อย อย่างไรก็ดี หากพิจารณาถึงโอกาสที่จะได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่ทนทานต่อสารเคมีปราบศัตรูพืช มีค่อนข้างสูง

5.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงกวา และแตงเทศ ในห้องปฏิบัติการ

และเมื่อนำเชื้อราทั้ง 186 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงกวา และแตงเทศ ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่ามีเชื้อราจำนวน 62 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOL ได้ 28 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา FOM ได้ และ 20 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อรา FOC ได้ และเป็น 20 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวได้ทั้ง 3 ชนิดได้ร่วมกัน ซึ่งคิดเป็น 11 % ของเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้จากดิน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราปฏิปักษ์ที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้นั้น ต้องมีกลไกในการควบคุมหลายวิธี ดังนี้ 1) การสร้างสารปฏิชีวนะ 2) การแข่งขัน และ 3) การเป็นปรสิต (วีระศักดิ์, 2544) เป็นไปได้ว่าสารเคมีที่เกษตรกรใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช ส่งผลต่อทั้งปริมาณและคุณภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ บางไอโซเลตอาจจะได้รับสารเคมีแล้วมีผลส่งเสริมประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีอยู่แล้วให้สูงยิ่งขึ้น ในขณะที่บางไอโซเลตสารเคมีกลับมีผลในการลดประสิทธิภาพการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ลง อีกทั้งเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินทั้ง 186 ไอโซเลตนั้น ไม่ใช่เชื้อราปฏิปักษ์ทั้งหมดทุกไอโซเลต

5.3 การจัดจำแนกและบ่งชี้ในระดับชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราออกเป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะสัณฐานของโคโลนี ได้แก่ 1) โคโลนีมีสีขาว เส้นใยไม่ฟู conidia สีเขียวเข้ม เส้นใยเจริญในลักษณะวงแหวนชัดเจน 2) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู conidia สีเขียว เส้นใยไม่เจริญในลักษณะวงแหวน 3) โคโลนีสีเหลือง เส้นใยฟู conidia สีเขียว เส้นใยไม่เจริญในลักษณะวงแหวน และ 4) โคโลนีสีเหลือง เส้นใยไม่ฟู conidia สีเหลือง เส้นใยไม่เจริญในลักษณะวงแหวน เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานของโคโลนี conidia phialides และเส้นใยมารวมกันในการจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของเชื้อรา ตามวิธีของ (Rifai, 1996 and Domsch et al., 1980) จำแนกได้เป็น *T. koningii* 10 ไอโซเลต *T. harzianum* 5 ไอโซเลต *T. aureoviride* 3 ไอโซเลต *T. reesei* และ *T. piluliferum* อย่างละ 1 ไอโซเลต

เชื้อรา *Trichoderma* spp. หลายชนิดที่สามารถพบในดินทั่วไป และส่วนใหญ่มีคุณสมบัติการเป็น antagonist สำหรับในประเทศไทย มีการศึกษาของ มานะและคณะ (2543) จำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากดินป่าในภาคใต้ จำนวน 183 ไอโซเลต ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในภาคใต้ 3 ชนิด คือ *Phytophthora palmivora, Rhizoctonia solani* และ *Sclertium rolfsii* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีเชื้อราปฏิปักษ์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *T. harzianum* (สายพันธุ์ 0123) *T. viride* (สายพันธุ์ 0140) และ *G. virens* (สายพันธุ์ 0104 และ 0138) จินตนา (2543) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium* sp. ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวน 40 ไอโซเลตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งจำแนกได้เป็น *T. harzianum* 26 ไอโซเลต *T. koningii* 5 ไอโซเลต *T. aureoviride* 1 ไอโซเลต *T. pseudokoningii* 2 ไอโซเลต และ *G. virens* 6 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนครั้งนี้ คือ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลาย และสามารถพบได้ในสภาพดินทั่วไป แต่ในการทดลองครั้งนี้ ไม่พบเชื้อรา *T. viride* ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเชื้อรา *T. viride* เป็นเชื้อราที่ชอบอากาศค่อนข้างเย็น ส่วนมากพบในแถบยุโรป บนท่อนไม้ที่เน่าปื้อย พบมากในดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูง จึงเป็นไปได้ที่จะไม่พบเชื้อรา *T. viride* ในการทดลองในครั้งนี้ ส่วนเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลตที่พบในการทดลองในครั้งนี้ ส่วนใหญ่จะสามารถพบได้ในทุกสภาพแวดล้อม เช่น เชื้อรา *T. harzianum* และ *T. koningii* สามารถ พบในดินทั่วไปในเกือบทั่วโลก (Domsch, 1980) เช่น เนเธอแลนด์ อิสราเอล แคนาดา อินเดีย นอรเวย์ โปแลนด์ ฝรั่งเศส ออสเตรเลีย เป็นต้น

5.4 การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพเรือนทดลอง

เมื่อนำเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 20 ไอโซเลตที่มีศักยภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวในห้องปฏิบัติการ มาเพิ่มปริมาณในหัวเชื้อข้าวฟ่าง เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และแตงกวาในสภาพเรือนทดลองพบ ไอโซเลตที่มีแนวโน้มที่จะสามารถควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศและแตงกวา ได้ดี เช่น *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2801, *T. koningii* ไอโซเลต TKK4301 *T. piluliferum* ไอโซเลต TKK4002 และ *T. aureovirede* ไอโซเลต TKK2101 หลังจากทดสอบ 10-14 วัน

เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพเรือนทดลอง จำเป็นต้องมีการควบคุมปัจจัยแวดล้อมหลายๆ ปัจจัยร่วมกัน เช่น ความชื้น อุณหภูมิ อายุ ความอุดมสมบูรณ์ แข็งแรงของต้นกล้ามะเขือเทศ และแตงกวา การจัดการต้นพืช การให้น้ำ การให้ปุ๋ย เพื่อให้มีผลกระทบต่อการทดสอบน้อยที่สุด ซึ่งการทดสอบครั้งนี้ ผลจากปัจจัยแวดล้อมอาจจะมีผลต่อประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของเชื้อราปฏิปักษ์

จากการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และแตงกวาในครั้งนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของวีระศักดิ์และระวีวรรณ (2529) ที่ศึกษาถึงการใช้เชื้อ *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ พริก กระเทียม และถั่วลิสง ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Sclertium rolfsii* พบว่าสามารถควบคุมโรคโคนเน่าได้เป็นที่น่าพอใจ นิภาพร (2538) ได้ทดสอบการควบคุมเชื้อโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (T20) ในสภาพแปลงปลูกทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตาย 61.1% เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวได้ในระดับที่จะสามารถนำไปใช้ในสภาพแปลงปลูกจริงได้

5.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

5.5.1 การทดสอบแบบกึ่งเชิงปริมาณ (semi-quantitative test)

5.5.1.1 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

พบว่าเชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2101, *T. koningii* ไอโซเลต TKK4301และ TKK6201 และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2204 และ TMSK5201 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูง โดยมีบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้น ขนาด 22.3, 17.3, 15.3, 15.3 และ 15.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ

5.5.1.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

พบว่าเชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2701, *T. koningii* ไอโซเลต TKK2203, TKK2602 และ TKK4301 และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK3803 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูง โดยมีขนาดของบริเวณโปร่งแสงรอบรอยเจาะชิ้นวุ้น คือ 41.3, 35.3, 40.0, 39.6 และ 36.6 มิลลิเมตร ตามลำดับ

5.5.1.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. เกือบทุกไอโซเลตมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ยกเว้น ไอโซเลต TKK3702 และ TKK3803 ที่ไม่สามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสได้

5.5.2 การทดสอบแบบเชิงปริมาณ (quantitative test)

5.5.2.1 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase

พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2801, *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1001 และ *T. koningii* ไอโซเลต TKK3501 มีกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase สูงที่สุด โดยสามารถย่อย laminarin ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) 532.86, 89.36 และ 42.18 μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง ตามลำดับ

5.5.2.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. koningii* ไอโซลต TKK3202 และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2204 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส สูงที่สุด คือ สามารถย่อย colloidal chitin ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (N-cetylglucosamine equivalents) 27.12 และ 13.56 μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง ตามลำดับ

5.5.2.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. koningii* ไอโซลต TKK3202, *T. aureoviride* ไอโซลต TKK2101 และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK3803 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส สูงที่สุด คือ สามารถย่อย carboxymethylcellulose-sodium salt ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) 65.46, 51.06 และ 21.06 μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง ตามลำดับ

5.5.2.4 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลต TMSK5201, TKK2204 และ *T. aureoviride* ไอโซลต TKK2701 และ มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส สูงที่สุด คือ สามารถ

ย่อย casein ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (glucose equivalent) 11.46, 11.46 และ 7.68 μmol / มิลลิกรัมโปรตีน / ชั่วโมง ตามลำดับ

เนื่องการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์มี 3 แบบได้แก่ 1) การทดสอบแบบเชิงคุณภาพ 2) การทดสอบแบบเชิงกึ่งปริมาณ และ 3) การทดสอบแบบเชิงปริมาณ

5.6 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมี

5.6.1 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีแค็บแตน

จากการทดสอบความทนทานต่อสารเคมีแค็บแตนของเชื้อราปฏิปักษ์ ทั้ง 20 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 0, 30, 300, 3,000 และ 30,000 mg / L พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1001 *และ T. koningii* ไอโซเลต TKK2602, TKK3501, TKK4701 มีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้ร่วมกับสารเคมีแค็บแตนได้ดี เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารที่เติมสารเคมีแค็บแตน

5.6.2 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีแมนโคเซ็บ

การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีแมนโคเซ็บของเชื้อราปฏิปักษ์ ทั้ง 20 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 0, 40, 400, 4,000 และ 40,000 mg / L พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2501, และ *T. koningii* ไอโซเลต TKK2602, TKK3202, TKK3501, TKK4701 มีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้ร่วมกับสารเคมีแมนโคเซ็บได้ดี

5.6.3 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีคาร์บอกซิน

การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีคาร์บอกซินของเชื้อราปฏิปักษ์ ทั้ง 20 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 0, 5, 50, 500 และ 5,000 mg / L พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2501, *T. koningii* ไอโซเลต TKK4301และ *T. reesei* ไอโซเลต TKK1501 มีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้ร่วมกับสารเคมีคาร์บอกซินได้ดี

5.6.4 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีคาร์เบนดาซิม

การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีคาร์เบนดาซิมของเชื้อราปฏิปักษ์ ทั้ง 20 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 0, 5, 50, 500 และ 5,000 mg / L พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ทุกไอโซเลต ไม่สามารถทนทานต่อสารเคมีคาร์เบนดาซิมที่ใช้ทดสอบทุกระดับความเข้มข้น

ไอโซเลตที่ทนทานต่อสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ น่าจะเป็นไอโซเลตที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชตระกูลมะเขือ และตระกูลแตงได้ดี การใช้เชื้อราปฏิปักษ์ร่วมกับสารเคมีจะเป็นการลดปริมาณการใช้สารเคมีในแปลงของเกษตรกรให้น้อยลงได้ ทำให้

สามารถลดต้นทุนในการผลิต เกษตรกรมีกำไรจากการทำการเกษตรเพิ่มมากขึ้น และเป็นการรักษาสภาพแวดล้อมอีทางหนึ่งด้วย

สารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมกลุ่มที่มีผลในการยับยั้งเชื้อราพวก Deuteromycetes เช่น สาร Benzimidazole ซึ่งเป็นสารดูดซึมที่มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อราได้อย่างกว้างขวาง สารที่รู้จักกันดี เช่น benomyl, carbendazim, thiabendazole และ thiophanate เป็นต้น ซึ่งการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้ จะยับยั้งการรวมตัวของ microtubules ในขบวนการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์แบ่งตัวไม่ได้ เชื้อราสาเหตุโรคพืชจึงไม่สามารถเจริญเติบโต และตายไปในที่สุด แต่มีสารเคมีหลายชนิดที่สามารถใช้ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เช่น สารประกอบทองแดง (copper compound) ที่ใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม Oomycetes เช่น *Phytophthora* spp. ได้ดี และสารในกลุ่มสารประกอบอินทรีย์กำมะถัน (oganic sulfur compound) ซึ่งสารประกอบกลุ่มนี้เป็นอนุพันธ์ของ dithiocarbamic acid เช่น thiram, ferbam, captan, maneb, และ zineb มีงานวิจัยที่สอดคล้องกับรายงานนี้ คือ งานวิจัยของนิภาพร (2538) ที่พบว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (T20) เพียงอย่างเดียวในสภาพแปลงปลูกทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตาย 61.1% หากใช้ร่วมกับ สารเคมี mancozeb ความเข้มข้น 18,000 mg / L ทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตายถึง 88.9 % ส่วนงานวิจัยในครั้งนี้พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma aureoviride* ไอโซเลต TKK2701 และ *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2602 ที่ทนทานต่อสารเคมีแค็บแตน ที่ระดับความเข้มข้น 30 mg / L โดยมีการเจริญได้มากกว่า 80% บนอาหารทดสอบที่ผสมสารเคมี และ *Trichoderma aureoviride* ไอโซเลต TKK1001, TKK2701, *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต TKK2501, *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2204, TKK2602, TKK3202, TKK3501, TKK3702, TKK4701, TKK6701 และ *Trichoderma piluliferun* ไอโซเลต TKK4002 ที่ทนทานต่อสารเคมีแมนโคเซ็บ ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 400 mg / L โดยมีการเจริญได้มากกว่า 80% บนอาหารทดสอบที่ผสมสารเคมี และ *Trichoderma aureoviride* ไอโซเลต TKK1001, TKK2701, *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต TKK2501,TKK2801, TKK3803, *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK2204, TKK2602, TKK3501, TKK3702, TKK4301, TKK4701, TKK6201, TKK6701 ที่ทนทานต่อสารเคมีคาร์บอกซิน ที่ระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 50 mg / L โดยมีการเจริญได้มากกว่า 80% บนอาหารทดสอบที่ผสมสารเคมี แต่ไม่พบไอโซเลตที่ทนทานต่อสารเคมีคาร์เบนดาซิม ทั้งนี้ เนื่องจากสารเคมีแต่ละ นิดที่นำมาใช้ในการทดสอบมีการออกฤทธิ์ต่อเชื้อราแตกต่างกันออกไป ได้แก่ 1) สารเคมีแคบแตน เป็นสารเคมีระเภทไม่ดูดซึม ที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในไม้ดอก พืชผัก ไม้ผล เชื้อราในดิน สามารถควบคุมเชื้อรา *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. ไดดี ไม่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถควบคุมโรคราสนิม (rust) ราแป้ง (powdery

mildew) และราน้ำค้าง (downy mildew) ได้ โดยวิธีการใช้ส่วนมากนิยมคลุกเมล็ดพืช หรือใช้ในการแช่รากก่อนปลูก ความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 10,000-15,000 mg/kg ตกค้างในดินไม่นาน ส่วนความเป็นพิษต่อเชื้อรา คือ ยับยั้งการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน และขบวนการฟอสเฟตเมตาบอลิซึม เมื่อสารเคมีแคบแตนเข้าไปสะสมในสปอร์ของเชื้อรา จะมีผลทำให้ขบวนการต่างๆ ภายในเซลล์หยุดลงและสุดท้ายทำให้สปอร์ตาย หรือไม่งอก (anonymous, 2005b) 2) สารเคมีแมนโคเซ็บ เป็นสารไม่ดูดซึม ความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 5,000 mg/kg ตกค้างในดินไม่นาน และมีผลต่อพืชบางชนิดเช่น ทำให้ดาวเรืองฝรั่งเศส แคระแกร็น มีผลต่อการงอกของละอองเกสรแตงไทย ความเป็นพิษต่อเชื้อราคือ ยับยั้งขบวนการสร้างพลังงาน (anonymous, 2005a) 3) สารเคมีคาร์บอกซิน เป็นสารดูดซึม ใช้ในการควบคุมโรคราสนิม และโรคไหม้ ของข้าว ข้าวบาร์เลย์ พืชผัก ฝ้าย ข้าวโพด เป็นสารเคมีที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อราใน Class Basidiomycetes ความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 3,820 mg/kg ตกค้างในดินไม่นาน ความเป็นพิษต่อเชื้อรา คือ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ succinic hydrogenase ซึ่งสำคัญต่อขบวนการหายใจของ mitochondria, ยับยั้ง glucose oxidation ของเชื้อรา (anonymous, 2005b) 4) สารเคมีคาร์เบนดาซิม เป็นสารเคมีชนิดดูดซึม ควบคุมโรใบจุดในถั่ว ผัก ไม้ดอกไม้ประดับ ลดแอนแทรกโนสของพริก ถั่ว ยาสูบ ฯลฯ เป็นสารเคมีที่สามารถดูดซึมผ่านทางรากและส่วนที่เป็นสีเขียวของพืช ความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (LD_{50}) มีค่าเท่ากับ 15,000 mg/kg ตกค้างในดินอย่างน้อย 2 ปี ความเป็นพิษต่อเชื้อราคือ ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ผยขบวนการแบ่งเซลล์แบบ mitosis และ meiosis โดยมีผลยับยั้งหน่วยย่อยของ mitochondria ที่จะสร้าง spindle fiber ทำให้ chromatid ไม่สามารถแยกออกจากันไปเป็นนิวเคลียสใหม่ได้ มีผลทำให้พันธุกรรมของเชื้อราเปลี่ยนแปลง ก่อให้เกิดการดื้อยาได้

บทที่ 6
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 สามารถแยกเชื้อราจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในเขตจังหวัดขอนแก่น และมหาสารคาม ได้ทั้งหมด 186 ไอโซเลต จากตัวอย่างดิน 70 ตัวอย่าง โดยเฉลี่ย 1 ตัวอย่างสามารถแยกเชื้อราได้ 3 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็น เชื้อที่สามารถแยกได้จากดินในเขตจังหวัดขอนแก่น 176 ไอโซเลต จากจังหวัดมหาสารคาม 10 ไอโซเลต

การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินควรลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ ให้ได้มากที่สุด โดยเทคนิคที่สามารถทำได้ง่ายๆ คือการผึ่งดินในที่ร่ม ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะสามารถลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลชีพอื่นๆ ได้มาก และในขั้นตอนการแยกเชื้อการเจือจาง และเติม streptomycin ลงในอาหาร martin's medium จะทำให้สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ง่ายกว่า เนื่องจากเป็นการเจือจางปริมาณเชื้อให้น้อยลง และการใช้อาหาร martin's medium ในการแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากตัวอย่างดินทำให้สามารถแยกเชื้อราบริสุทธิ์ได้ง่ายกว่าการใช้อาหารแยกเชื้ออื่นๆ เนื่องจาก เชื้อราจะเจริญเติบโตอย่างช้าๆ มองเห็นขอบเขตของโคโลนีได้อย่างชัดเจน จึงสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ง่ายและประหยัดเวลาในการทำงาน และรีบแยกเก็บโคโลนีของเชื้อราตั้งแต่ที่มีขนาดยังเล็ก

6.2 การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตงกวา แตงเทศ ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีเชื้อราจำนวน 20 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวทั้ง 3 ชนิด ได้ร่วมกัน ได้แก่ TKK1001, TKK1501, TKK1802, TKK2102, TKK2203, TKK2204, TKK2501, TKK2602, TKK2701, TKK2801, TKK3202, TKK3501, TKK3702, TKK3803, TKK4002, TKK4301, TKK4701, TMSK5201, TKK6201 และ TKK6701 ซึ่งคิดเป็น 11%ของเชื้อราทั้งหมดที่สามารถแยกได้จากดิน ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากในสภาพแปลงที่เกษตรกรใช้ผลิตเมล็ดพันธุ์นั้นมีการใช้สารเคมีเป็นจำนวนมาก ทำให้เชื้อราที่แยกได้มีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันออกไป

6.3 เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่มตามลักษณะสัณฐานของโคโลนี ได้แก่ 1) กลุ่มที่มีโคโลนีสีขาว เส้นใยไม่ฟู conidia สีเขียวเข้ม เส้นใยเจริญในลักษณะวงแหวนชัดเจน 2) โคโลนีสีขาว เส้นใยฟู conidia สีเขียว เส้นใยไม่เจริญในลักษณะวงแหวน 3) โคโลนีสีเหลือง เส้นใยฟู conidia สีเขียว เส้นใยไม่เจริญในลักษณะวงแหวน และ4) โคโลนีสีเหลือง เส้นใยไม่ฟู conidia สีเหลือง เส้นใยไม่เจริญในลักษณะวงแหวน นอกจากนี้การอาศัยลักษณะทางสัณฐาน

ของโคโลนี conidia, phialides และเส้นใย สามารถจำแนกเชื้อราออกเป็น 5 ชนิดได้แก่ 1) *T. koningii* จำนวน 10 ไอโซเลต 2) *T. harzianum* จำนวน 5 ไอโซเลต 3) *T. aureoviride* จำนวน 3 ไอโซเลต 4) *T. reesei* จำนวน 1 ไอโซเลต และ 5) *T. piluliferum* จำนวน 1 ไอโซเลต

การบ่งชี้ถึงระดับชนิด (species) ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี conidia, phialides และเส้นใย เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย สะดวกต่อการปฏิบัติ แต่ในบางครั้งขาดความแม่นยำ เนื่องจากต้องอาศัยความชำนาญ และประสบการณ์ ดังนั้นควรมีการนำข้อมูลระดับ sequence ของ rDNA มาประกอบในการจัดจำแนกด้วย จะทำให้เกิดความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

6.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 20 ไอโซเลต ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และแตงกวาในสภาพเรือนทดลอง พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2801 และ *T. piluliferum* ไอโซเลต TKK4002 สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของทั้งมะเขือเทศและแตงกวาได้ 100% (ไม่มีต้นเป็นโรค) เมื่อเทียบกับไอโซเลตอื่นๆ แต่ทั้งนี้ ก็ยังมีหลายๆ ไอโซเลตที่สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ในระดับที่น่าพอใจ ซึ่งการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพเรือนทดลองนั้น ควรคำนึงถึง 1) การจัดการต้นกล้าให้มีความอุดมสมบูรณ์ การให้น้ำ ปุ๋ยอายุและสายพันธุ์ของพืชต้องเหมือนกัน เหมาะแก่การเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช 2) อายุของหัวเชื้อราปฏิปักษ์ ต้องเหมาะสม โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เหมาะสมควรมีอายุตั้งแต่ 7 วันขึ้นไป และไม่ควรแก่เกินไป และไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ เพราะเชื้ออื่นๆ อาจมีผลต่อศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ และ 3) การนำเชื้อราปฏิปักษ์ไปใช้ในพื้นที่ปลูกจริง ควรมีการศึกษาถึงอายุของหัวเชื้อและวิธีการเก็บรักษา วัสดุที่นำมาผลิตหัวเชื้ออาจจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ขึ้นอยู่กับว่าในพื้นที่นั้นๆ วัสดุใดสามารถหาได้ง่าย ราคาถูก ขั้นตอนในการเตรียมไม่ยุ่งยาก

6.5 เมื่อนำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 20 ไอโซเลต มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โปรติเอส ไคติเนส และβ-1,3 glucanase พบว่า เชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลต มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด และมีกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป เช่น *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2101 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด, *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2701 และ *T. koningii* ไอโซเลต TKK2602 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด, ทุกไอโซเลตมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ยกเว้น *Trichoderma koningii* ไอโซเลต TKK3702 และ *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต TKK3803 และ *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2801, *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK1001, *T. koningii* ไอโซเลต TKK3501 มีกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3 glucanase สูงที่สุด

ซึ่งจากผลการทดสอบทำให้ทราบว่า ศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากการสร้างเอนไซม์ นั้น แต่ละไอโซเลต ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. อาจสร้างเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆ ได้มากน้อยแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิด และไอโซเลต นอกจากนี้ควรมีการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมด้วย เนื่องจากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในการทดลองครั้งนี้ ส่วนใหญ่เป็นการทดสอบเชิงปริมาณ (quantitative enzyme assay) ควรมีการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในเชิงคุณภาพ (quanlitative) ที่นอกเหนือจาก β-1,3 glucanase ด้วย เพื่อที่จะทำให้ได้ข้อมูลด้านการสร้าง degrading enzyme ของเชื้อราปฏิปักษ์ที่สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

6.6 การทดสอบความทนทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ แคบแตน แมนโคเซ็บ คาร์บอกซิน และคาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ ทั้ง 20 ไอโซเลต ไม่สามารถทนทานต่อคาร์เบนดาซิมทุกระดับความเข้มข้นได้ แต่สามารถทนทานต่อคาร์บอกซินได้ดี ทนทานต่อ แคบแตนและแมนโคเซ็บได้บ้าง โดยไอโซเลตที่น่าจะมีการนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชร่วมกับสารเคมี ได้แก่ *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2701, *T. koningii* ไอโซเลต TKK2602 ร่วมกับสารเคมีแคบแตน *T. aureoviride* ไอโซเลต TKK2701, *T. harzianum* ไอโซเลต TKK2501, *T. koningii* ไอโซเลต TKK2602, , TKK3202, TKK3501, TKK4701, TKK6701 และ *T. piluliferum* ไอโซเลต TKK4002 ร่วมกับสารเคมีแมนโคเซ็บ ทุกไอโซเลตสามารถใช้ร่วมกับสารเคมีคาร์บอกซินได้ ส่วนการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ต้องมีการศึกษาต่อไป โดยอาจจะต้องลดความเข้มข้นของสารเคมีลงให้มากกว่านี้

6.7 การนำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ไปใช้เพื่อควบคุมโรคพืชในสภาพพื้นที่เพาะปลูกจริง ควรคำนึงถึงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโต และการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อ อายุในการเก็บรักษาหัวเชื้อ มีการติดตามการอยู่รอดของเชื้อ *Trichoderma* spp. หลังจากการนำไปใช้ ซึ่งจะทำให้เราทราบว่าปริมาณของเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ ควรต้องมีการเพิ่มปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ลงไปในดินหรือไม่ อย่างไร นอกจากนี้การนำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. มาใช้ร่วมกับสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในสภาพแปลง จำเป็นคำนึงถึงปัจจัยหลายๆ อย่างรวมกัน ได้แก่ 1) การเก็บรักษาเชื้อราปฏิปักษ์ร่วมกับสารเคมี 2) เพื่อความสะดวกของเกษตรกรที่จะสามารถนำไปใช้งานได้ในสภาพความเป็นจริง ต้องคำนึงถึงรูปแบบและวัสดุที่นำมาใช้รวมทั้งต้นทุนในการผลิต 3) ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ 4) ความเป็นพิษต่อสภาพแวดล้อมและมนุษย์

6.8 การศึกษาครั้งนี้ เป็นการประเมินศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ จากความสามารถในการแข่งขัน (competition) และการสร้างเอนไซม์ เท่านั้น ต้องมีการศึกษาถึงการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อราปฏิปักษ์ด้วย เพราะสารปฏิชีวนะที่เชื้อราปฏิปักษ์สร้างขึ้นมามีบทบาทในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้เช่นกัน (antibiosis)

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ สุวรรณธราดล. 2545. อุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์พืชกำลังถูกทำลาย. ข่าวสารเมล็ดพันธุ์พืช. 9(2): 23-29.

จินตนา อิงคนินันท์. 2543. การจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* . วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์). สาขาวิชาโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2534. การผลิตและการทดสอบคุณภาพของผงเชื้อรา *Trichoderma harzianum.* วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์) 25 : 169-176.

จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช. โครงการเกษตรกู้ชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ.

จุมพล สาระนาค และอรพรรณ วิเศษสังข์. 2542. โรคที่สำคัญของมะเขือเทศ. หน้า 9-18. ในการประชุมโต๊ะกลม เรื่องการวิจัยและพัฒนามะเขือเทศเพื่ออุตสาหกรรม 23-25 กุมภาพันธ์ 2543.

ธวัชชัย เปรมศรี. 2543. การศึกษาเชื้อสาเหตุโรคโคนต้นเน่าและรากเน่าของต้นโป๊ยเซียนและการควบคุมโดยชีววิธีด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกจากดินปลูก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นิภาพร บุญศักดาพร. 2538. การคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่ต้านทานต่อสารเคมีเพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* sacc. โดยวิธีประสมประสาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พงศ์พันธุ์ เธียรหิรัญ. 2540. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *(Meloidogyne incognita)*. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต (โรคพืช). ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พินิต สคสะอาด. 2542. การควบคุมโรคเน่าและโคนเน่าของพริกไทยที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* Bult. โดยวิธีผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. (เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช). สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พิพัฒน์ แก้วปลั่ง. 2544. ธุรกิจพันล้านส่งออกเมล็ดพันธุ์. ข่าวสารเมล็ดพันธุ์พืช.8(1): 2-3.

พิศาล ศิริธร. 2544. โรคเมล็ดพันธุ์กับการส่งออก: กรณีศึกษาโรคใบจุดแบคทีเรียของมะเขือเทศ และโรคผลเน่าแบคทีเรียของแตงโม. โรคพืช มข.ปริทรรศน์. ศิริภัณฑ์ออฟเซ็ท ขอนแก่น. 69-81.

มานะ กาญจนมณี, อนงค์ หนูด้วง และสากล สุวลักษณ์.2543. การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ Trichoderma spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ.วารสารวิชาการเกษตร.18(1) : 4-13

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธามาศ อินต๊ะสอน. 2537. อิทธิพลของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เมื่อใช้ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์และสารเคมีควบคุมเชื้อราต่อโรครากเน่าของส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* (Dastur).วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เกษตรศาสตร์). ภาควิชาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมิตรา น้อยเอี่ยม. 2540. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์แบบผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การจัดการศัตรูพืช). สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สิทธิพงศ์ ศรีสว่างวงค์. 2546. การศึกษาผลของการเคลือบเมล็ดด้วยสารเคมีป้องกันเชื้อรา และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการป้องกันโรคโคนเน่าในต้นกล้ามะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพืชสวน. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วรรณวิไล เกษนรา. 2537. การศึกษาเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคของมะเขือเทศและข้าวบาร์เลย์ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยชีววิธี: เน้นความสำคัญของมวลชีวภาพจากกระบวนการหมัก. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต (โรคพืช). วิชาภาคโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และระวีวรรณ ศรีละเอียด. 2528. การศึกษาเชื้อ *Trichoderma* spp. เพื่อใช้ป้องกันโรคโคนเน่าของผักและถั่วลิสงโดยชีววิธ. แก่นเกษตร. 13: 278-282.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ นิวัฒ เสนาะเมือง และ ถาวร วินิจสานันท์. 2539. ผลของสาร metabolic products ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตของภาคตะวันออกเฉียงเหนือต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชในดิน. รายงานผลการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2539. ประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป .มหาวิทลัยขอนแก่น.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2542. การจัดการโรคพืช.ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2544. การควบคุมโรคโรคพืชโดยชีววิธี. มข.ปริทรรศน์. ศิริภัณฑ์ออฟเซ็ท ขอนแก่น. 69-81.

อนันต์ วงเจริญ. 2547. การจำแนกชนิดเชื้อ *Streptpmyces* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาโรคพืชวิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว. 2541. ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันโรครากเน่าของส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* (Dastur).วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เกษตรศาสตร์). โรคพืช (โรคพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Anonymous. 2005a. Pesticide Fact Sheet : Mancozeb. (cited on July, 14, 2005) Available from http://infoventures.com.

----------. 2005b. Extension Toxicology Network. Cornell University. (cited on Febuary 17, 2004) Available from http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/index.html.

Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minnesota.

Bell, D.K., H.D.Wells and C.R.Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. 72 : 379-382.

Benhamou, N. and I. Chet. 1996. Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* : Ultrastructural and Cytochemical aspects of the interaction. Phytopathology 86: 405-406.

Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*: II intragenetic classification. Can. J. Bot. 69: 2357-2372.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72 : 248-254.

Chet I. and J. Inbar. 1994. Bilogical control of fungus pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 48(1) : 37-43.

Domsch., K.H., W. Gams and T. H. Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Vol.I Academic Press, London.

Giri, A. P. A. M. harsulkar, A.G. Patankar, V. S. Gupta, M. N. Sainani, V. V. Deshpande and P. K. Ranjekar. 1998. Association of induction of protease and chitinase in chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. Pl. Pathol. 47 : 693-699.

Hankin,L. and S. L. Anagnostakis. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia. 67: 597-607.

Homer. D. W., D. K. Bell and C. A. Jaworki. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 62: 442-447.

Inbar, J., A. Menendez and I. Chet. 1996. Hyphal interaction between *T. harzianum* and *Sclerotium sclerotiorum* and its role in biological control. Soil. Biol. Biochem. 28: 757-763.

Ingold C. T., and H. J. Hudson. 1993. The biology of fungi. Chapman&Hall, London.

Johnson, L. E., E. C. Bernard and P. Qian. 1987. Isolation of *Trichoderma* spp. at low temperature from Tennessee and Alaska soil. Pl. Dis. 71: 137-140.

Lifshitz, R., Lifshitz, S & Baker, R. 1986. Decrease in incidence of *Rhizoctonia* preemergence damping-off by the use of integrated and chemical controls. Plant Disease. 69 : 4341-4344.

Lorito, M., G. E. Harman, C. K. Hayes, R. M. Broadway, A. Tronsmo, S. L. Woo and A. Di-Pietro. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *T. harzianum* antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology. 83 : 302-307.

Nemes, S., L. E. Datnoff and J. Strandberg. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixed to colonize plant root and and control root disease of vegetables and citrus. Crop Prot. Kidlington, Oxford, UK : Elsevier Science Ltd. 15 : 735-742.

Persoon, C. H. 1794. Dispositio methodica fungosum. Römer' s neues Magszin Botanische 1: 81-128.

Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. Papers. C. M. I. 116: 1-56.

Saksirirat, W. and H.-H. Hoppe. 1991. Secretion of extracellular enzymes by *Verticilium psalliotae* Treschow and *Verticilium lecanii* (Zimm.) Viégas during growth on uredospores of the soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in liquid cultures.J. Phytopathol. 131: 161-173.

Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma* : a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res. 100 : 923-935.

Samuels, G. J. 2001. Workshop on " The Taxonomy and Biotechnology Applications of *Trichoderma* and *Gliocladium*" Between 10-12 September 2001. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology Bangkok, Thailand.

Samuels, G. J. , Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E. B. (n.d.) *Trichoderma* online, systematic botany & mycology laboratory, ARS, USDA. (cited on June, 11, 2004) A vailable from http://nt. Ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.

Sivan, A., Y. Elad and I. Chet. 1984. Biological control effect a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology. 74: 498-501.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar -Potato Dextrose Broth (PDA และ PDB)

potato	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
agar	15- 20	กรัม
ditilled water	1	ลิตร

ชั่งมันฝรั่งหนัก 200 กรัม หั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋า ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มจนมันฝรั่งสุก นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง ละลายผงวุ้นในน้ำกลั่นเย็นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ต้มจนผงวุ้นสุก นำมาผสมกับน้ำต้มมันฝรั่ง เติมน้ำตาลกลูโคส ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ถ้าเตรียมเป็นอาหารเหลวไม่ต้องผสมผงวุ้น

2. modified Martn's medium

KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Rose bengal	0.032	กรัม
agar	15	กรัม
distilled water	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำไปต้มจนผงวุ้นสุก ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3. malt extract agar (MEA)

malt extract	20	กรัม
Agar	15- 20	กรัม
distilled water	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมต่างๆ ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร นำไปต้มจนผงวุ้นสุก ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

4. modified Czapex's dox medium

เส้นใยสดของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*	5	กรัม
$NaNO_3$	3	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1	กรัม
distilled water	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปปั่นจนเส้นใยของเชื้อราละเอียด ปรับ pH ให้ได้ 6.8 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียม buffer

1. 0.1 M acetrate buffer (pH 5.0)

ชั่งสาร sodium acetate trihydrate จำนวน 13.6 กรัม ใส่บิกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลาย ปรับ pH ให้ได้ pH 5.0 ด้วย glacial acetic acid จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0)

ชั่งสาร potassium phosphate monobasic จำนวน 13.6 กรัมใส่บิกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลาย ปรับ pH ให้ได้ pH 6.0 ด้วย sodium phosphate dibasic จำนวน 14.2 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
อาหารและสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

1. อาหารที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

carboxymethylcellulose - sodium salt	4 0	กรัม
malt extract	20	กรัม
agar	20	กรัม
distilled water	1	ลิตร

ละลาย CMC 40 กรัม ใน 0.1M acetate buffer ผสมในอาหาร malt extract agar นำไปต้มจนผงวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

2. อาหารที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

gelatin	10	กรัม
malt extract	20	กรัม
agar	20	กรัม
distilled water	1	ลิตร

ละลาย เจลลาติน 10 กรัม ใน 0.1 M phosphate buffer ผสมในอาหาร malt extract agar นำไปต้มจนผงวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

3. อาหารที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

colloidal chitin	24	กรัม
potato	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
agar	20	กรัม
ditilled water	1	ลิตร

ผสม colloidal chitin 24 กรัมในอาหาร PDA นำไปต้มจนผงวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

การเตรียม colloidal chitin

ชั่ง chitin 5 กรัม นำมาละลายใน HCl เข้มข้น 60 มิลลิลิตร กวนตลอดเวลานาน 2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาเติม 95% ethanal (ice-cold) ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ / นาที นาน 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.0 จะได้ colloidal chitin solution 5% จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

4. สารละลาย Lugol's iodine

$ZnCl_2$	20	กรัม
KI	6.5	กรัม
I	1.3	กรัม
distilled water	100	มิลลิลิตร

ผสมสารต่างๆ เข้าด้วยกันค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อย จนกระทั่งสารละลายหมด เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลาย NH_4SO_4 อิ่มตัว

ค่อยๆ เติมสารNH_4SO_4 ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ กวนสารละลายตลอดเวลา จนกว่า NH_4SO_4 ไม่สามารถละลายได้อีก

ภาคผนวก ง

สารเคมีและการคำนวณ

1. แคปแทน (captan)

ชื่อเคมี 3,4,7,7-tetrahydro-N-trichloromethane phenyl
ชื่อการค้า ออร์โธไซด์ แคปแทน
เป็นสารประกอบกลุ่มเบ็ดเตล็ด (Miscellaneous compounds)
สารออกฤทธิ์ (active ingradient, ai.) 50%
อัตราการใช้ 30-60 กรัม / น้ำ 20 ลิตร

2. แมนโคเซ็บ (mancozeb)

ชื่อเคมี complex of zince and maneb, bis-dithiocarbamate (containing 20%-manganese and 2.5% zince)
ชื่อการค้า ไดเทน เอ็ม-45, มานเซ็บ, เทน-เอ็ม 45
เป็นสารประกอบ คาร์บาเมต (carbamatees)
สารออกฤทธิ์ (active ingradient, ai.) 80% WP
อัตราการใช้ 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร

3. คาร์บอกซิน (carboxin)

ชื่อเคมี 2,3 dihydro-b-methyl-5-phenylcarbamoyl-1,4-oxathin
ชื่อการค้า ไวตาแว็กซ์ 75, ไวตาแว็กซ์
เป็นสารประกอบ คาร์บาเมต (carbamates)
สารออกฤทธิ์ (active ingradient, ai.) 75 % WP
อัตราการใช้ 10 กรัม / น้ำ 20 ลิตร

4. คาร์เบนดาซิม (carbendazim)

ชื่อเคมี methyl benzimidazole-2-yl carbamate
ชื่อการค้า คาร์เบนดาซิม, เดอโรซาล 60
เป็นสารประกอบ คาร์บาเมต (carbamates)
สารออกฤทธิ์ (active ingradient, ai.) 60%
อัตราการใช้ 6-10 กรัม / น้ำ 20 ลิตร

ตารางเปรียบเทียบ หน่วยความเข้มข้นสำหรับตัวยาออกฤทธิ์ (ai)

ppm	Mg / L (µg / ml)	g / l	%
1	1	0.001	0.0001
10	10	0.01	0.001
100	100	0.1	0.01
1,000	1,000	1	0.1
10,000	10,000	10	1
100,000	100,000	100	10

$$\text{ปริมาณสาร (กก.)} = \frac{\text{\% ความเข้มข้นที่ต้องการ}}{\text{\% ความเข้มข้นตัวยาออกฤทธิ์}} \times \text{ปริมาตร (ลิตร)}$$

ภาคผนวก จ

การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp.

การจัดจำแนกระดับชนิด (species) โดย Samuels (n.d.) ใน web site

http://nt.Ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.

Trichoderma **Key**

Conidia

Shape

Globose to subglobose

Subglobose to ovoidal

Ellipsoidal

Oblong

Clavate

Length µm

<2.7

2.8-3.4

3.5-4.1

4.2-4.8

4.9-5.5

5.6-6.2

> 6.2

Width (µm)

< 2.2

2.3-2.7

2.8-3.2

3.3-3.6

3.7-4.0

4.1-4.5

> 4.5

Length / Width

<1.2

1.3-1.5

1.6-1.8

1.9-2.1

2.2-2.4

>3.0

Ornamentation

Smooth

Finely warted (difficult to see warts)

Conspicuously warted to tuberculate

Pigmentation

Green or gray green

Colorless or white in mass

Yellow

White to yellow

Conidiophore

Conidiophore

Highly intricated, cottony with noting discrate to measure

Gliocladium-like

Sterile hair arising from conidiophore or pustule

Absent

Present siuous

Present spiralled

Present straight

Fertile hair arising from conidiophore or pustule

Absent

Present

Pustules

Absent on CMD or SNA

Present on CMD or SNA

Conidia dry or held in drops of clear liquid

Dry

Drops of clear liquid

Phialides

Length (µm)

< 3.4

3.4-5.1

5.2-6.8

6.9-8.5

8.6-10.2

10.3-11.9

> 13.6

Mid Point (µm)

< 1.3

1.4-2.0

2.1-2.4

2.5-3.2

3.3-3.5

> 3.5

no data

Base (µm)

< 2.0

2.1-2.6

2.7-3.1

3.2-3.6

3.7-4.1

4.2-4.7

> 5.2

Supporting cell (μm)

< 1.6

1.7-2.2

2.3-3.0

3.1-3.7

3.8-4.3

> 4.3

Length / Width point

< 2.3

2.4-4.2

4.3-6.1

6.2-8.0

> 8.0

Length / supporting cell

< 1.4

1.5-2.3

2.4-3.2

3.3-4.2

4.3-5.1

> 5.1

width point / width supporting

< 0.4

0.5-0.6

0.7-0.9

0.9-1.1

1.2-1.3

1.4-1.5

Intercalary phialides

Absent or infrequent

Common

Chlamydospore

Presence

Absent

Present

Width

< 2.1

2.2-5.2

5.3-8.3

8.4-11.4

11.5-14.5

> 14.5

chlamydospore form

unicellular, most terminal, solitary

unicellular, terminal and intercalary in hyphae in chains

Culture

PDA, radius at 30 c after 72 hr in darkness

< 14

15-27

28-41

42-67

> 67

PDA, radius at 35 c after 72 hr in darkness

< 2

2-19

20-37

38-55

> 56

SNA, radius at 35 c after 72 hr in darkness

< 2

2-17

18-32

33-43

44-63

> 63

Strong sweet (coconut) order

Absent

Present

No data

Growth on PDA at 40 c

Part-ascospores

Shape

Monomorphic

Dimorphic

Color

Green

Hyaline

นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับรูปภาพ ซึ่งปัจจุบันพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มี 33 ชนิด (species) ดังนี้

1. *Trichoderma aggressivum*
2. *Trichoderma andinensis*
3. *Trichoderma asperellum*
4. *Trichoderma atroviride*
5. *Trichoderma aureoviride*
6. *Trichoderma ceramica*
7. *Trichoderma citrinoviride*
8. *Trichoderma crassum*

9. *Trichoderma croceum*
10. *Trichoderma erinaceum*
11. *Trichoderma fasciculatum*
12. *Trichoderma fertile*
13. *Trichoderma ghanense*
14. *Trichoderma hamatum*
15. *Trichoderma harzianum*
16. *Trichoderma koningii*
17. *Trichoderma lighorum*
18. *Trichoderma longibrachiatum*
19. *Trichoderma minutisporum*
20. *Trichoderma oblongisporum*
21. *Trichoderma polysporum*
22. *Trichoderma parceramosum*
23. *Trichoderma pseudokoningii*
24. *Trichoderma pubescens*
25. *Trichoderma reesei*
26. *Trichoderma saturnisporum*
27. *Trichoderma spirale*
28. *Trichoderma strictipile*
29. *Trichoderma strigosum*
30. *Trichoderma stromaticum*
31. *Trichoderma tomentosum*
32. *Trichoderma virens*
33. *Trichoderma viride*

ประวัติผู้เขียน

นางสาวมาลัยพร เชื้อบัณฑิต เกิดเมื่อวันที่ 4 เมษายน 2519 ที่จังหวัดยโสธร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนยโสธรพิทยาคม จ.ยโสธร สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีจากภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น ในปีการศึกษา 2541 และศึกษาต่อในระดับปริญญาโทที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น สาขาวิชาโรคพืชวิทยา เมื่อวันที่ 1 มิถุนายน 2544 และสำเร็จการศึกษาในปี 2548