



วิทยานิพนธ์

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา
Curvularia eragrostidis และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของ
กล้วยไม้สกุลหวาย

EFFICACIES OF *Trichoderma* spp. FOR THE INHIBITION OF
Curvularia eragrostidis AND THE CONTROL OF FLOWER
RUSTY SPOT ON *Dendrobium* ORCHID

นางสาวอารีรัตน์ เทียนขาว

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	ภาควิชา

เรื่อง ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย

Efficacies of *Trichoderma* spp. for the Inhibition of *Curvularia eragrostidis* and the Control of Flower Rusty Spot on *Dendrobium* Orchid

นามผู้วิจัย นางสาวอารีรัตน์ เทียนขาว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณวิไล อินทนู, วท.ค.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์กนกวรรณ รมยานนท์, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ, Dr.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจจงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis*
และควบคุมโรคดอกจุกดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย

Efficacies of *Trichoderma* spp. for the Inhibition of *Curvularia eragrostidis*
and the Control of Flower Rusty Spot on *Dendrobium* Orchid

โดย

นางสาวอารีรัตน์ เทียนขาว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2550

อารีรัตน์ เทียนขาว 2550: ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และควบคุมโรคดอกจูดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ปรชานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วรณวิไล อินทนู, วท.ค. 85 หน้า

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 14 สายพันธุ์ ในการควบคุมโรคดอกจูดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อโรคได้ 51.89 – 60.00 % โดยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01, 84-42 และ M23 มีอัตราการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อโรคค่อนข้างเร็ว (0.94 - 1.50 เซนติเมตร/วัน) จากการใช้เทคนิค dialysis membrane เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 14 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารทุยภูมิมายับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคได้ 43.93 - 71.57 % การฟ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ชนิดสดซึ่งได้จากการเลี้ยงบนเมล็ดข้าวสุกที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ลงบนดอกกล้วยไม้ 3 และ 5 วัน ก่อนการปลูกเชื้อโรคที่ 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร สามารถลดอาการจูดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายได้ 79.81 และ 77.64 % ตามลำดับ ซึ่งให้ผลดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี mancozeb (80 % WP) ที่ 1,200 ppm

การเติมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01 และ T50) อัตรา 1 กรัม/100 มิลลิลิตร พบว่าสารกรองที่ได้จากทุกกรรมวิธีที่เติม yeast extract 0.2 % colloidal chitin 1 % และ chitin 5 % เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกันสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 78.75 - 91.88 % และยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ไม่ใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา) โดยมีความยาวของเส้นใยเชื้อโรคลดลง 29.54 - 77.27 % ในสภาพโรงเรือนพบว่า การฟ่นสารกรองของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ และสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ก่อนฟ่นเชื้อโรคเป็นเวลา 3 วัน สามารถลดอาการจูดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายได้ คิดเป็น 57.98 - 76.91 % เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งให้ผลดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี mancozeb (80 % WP) ที่ 1,200 ppm

ภายหลังการฟ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) และเชื้อโรคในรูปสปอร์แขวนลอย กรณีฟ่นแบบเดี่ยว ฟ่นพร้อมกันหรือฟ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนดอกกล้วยไม้ก่อนฟ่นเชื้อโรคเป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3 glucanase และ chitinase ในดอกกล้วยไม้ทุกวัน ตลอดการทดลอง 12 วัน โดยในวันที่ 5 กรรมวิธีที่ฟ่นเชื้อโรคอย่างเดี่ยว มีปริมาณเอนไซม์ β -1,3 glucanase สูงที่สุด ขณะที่กรรมวิธีที่ฟ่นเชื้อรา *T. harzianum* อย่างเดี่ยวมีการสร้างเอนไซม์ chitinase ได้สูงที่สุดในวันที่ 4 ส่วนการฟ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พร้อมกับเชื้อโรค พบว่าเอนไซม์ chitinase ในดอกเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 10 ภายหลังการฟ่นเชื้อโรค แสดงว่าเชื้อรา *T. harzianum* และ/หรือเชื้อรา *C. eragrostidis* สามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคบนดอกกล้วยไม้ได้

Areerat Thieankhao 2007: Efficacies of *Trichoderma* spp. for the Inhibition of *Curvularia eragrostidis* and the Control of Flower Rusty Spot on *Dendrobium* Orchid. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Wanwilai Intanoo, Ph.D. 85 pages.

Efficacy of 14 isolates of *Trichoderma* spp. for the control of flower rusty spot on *Dendrobium* orchid caused by *Curvularia eragrostidis* was conducted under nursery condition. All isolates of *Trichoderma* spp. effectively inhibited mycelial growth of *C. eragrostidis* by 51.89 - 60.00 %. Three effective isolates of *T. harzianum* (CB-Pin-01, 84-42 and M23) rapidly grew over pathogen's mycelia by 0.94 -1.50 cm/ day. By using dialysis membrane technique, secondary metabolites produced by all isolates of *Trichoderma* spp. inhibited growth of pathogen's mycelia by 43.93 - 71.57 %. Spraying spore suspension of *T. harzianum* (CB-Pin-01) at 10^7 spore/ ml on orchid flowers at 3 and 5 days prior to pathogen's inoculation, effectively reduced rusty spot on flowers by 79.81 and 77.64 %, respectively. This efficacy was comparable to the use of mancozeb (80 % WP) at 1,200 ppm

Addition of chitinase elicitor into culturing substrates of *T. harzianum* isolates CB-Pin-01 and T50 at a rate of 1 g/100 ml revealed that culture filtrates derived from all treatments added solely or in combination with yeast extract (0.2 % w/w), colloidal chitin (1 % w/w) and chitin (5 % w/w) inhibited spore germination of *C. eragrostidis* on depression slide by 78.75 – 91.88 % and also significantly reduced mycelial length of pathogen by 29.54 – 77.27 % as compared to the control (with out *Trichoderma*). Under nursery condition, spraying of those culture filtrates and spore suspension of *T. harzianum* (CB-Pin-01) at 3 days prior to pathogen inoculation, caused the reduction of rusty spot on flowers by 57.98 – 76.91 % as compared to a control. This efficacy was comparable to the use of mancozeb (80% WP) at 1,200 ppm

Spraying spore suspensions of *T. harzianum* (CB-Pin-01) and pathogen on the flowers of *Dendrobium* orchid as solely, simultaneously or 3 days prior to pathogen inoculation revealed the changes of enzyme activities of β -1, 3 glucanase and chitinase in the flowers every day during 12 days of experiment. The highest activity of β -1, 3 glucanase was detected in plant at 5 days after inoculated with *C. eragrostidis*. The highest chitinase activity was induced in plant at 4 days after solely spraying of *T. harzianum* (CB-Pin-01). Simultaneous spray of antagonist and pathogen caused the increase of chitinase activity in flowers at 10 days after pathogen's application. This investigation demonstrates that enzyme activities related to disease resistance in orchid flowers can be induced after application of *T. harzianum* and/ or *C. eragrostidis*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. วรรณวิไล อินทนู ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่มอบความรัก ความเมตตา กรุณา พร้อมทั้งความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน คอยอบรมวิชาความรู้ และเอาใจใส่แก่ข้าพเจ้าเป็นอย่างดีมาโดยตลอด ผศ.ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ที่คอยให้ความห่วงใย กำลังใจ คอยแนะนำแนวทาง ประสบการณ์ที่ดีในการเรียนตลอดจนการดำเนินชีวิตในปัจจุบัน ดร. กนกวรรณ รมยานนท์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ที่คอยให้คำปรึกษากวดขันในเรื่องของการทำงาน การวางแผนวิจัย และการวางแผนในชีวิตจริง ผศ.ดร. เสริมสิริ จันทร์เปรม กรรมการวิชาการ และ ผศ.ดร.จุริรัตน์ ถีสมิทธิ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ความกรุณาในเรื่องของคำปรึกษาและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ตลอดด้วยความรัก และความเมตตาที่อาจารย์ทุกท่านมีให้กับข้าพเจ้าเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณคุณคณาจารย์ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่าน ที่คอยประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ พร้อมทั้งให้คำปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่สาว พี่หวัน พี่เจียบ พี่อึ้ง พี่ต๋อย พี่ซุม พี่จุ่ม พี่โอ้ เพื่อน ๆ พี่ ๆ และ น้อง ๆ ทุกคน ที่ให้ความรัก คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนดูแลเอาใจใส่จนการทดลองนี้เสร็จสิ้นไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณพ่อसानิตย์ แม่ถวิล เทียนขาว พี่ชาย พี่สะใภ้ อันเป็นที่รักของข้าพเจ้า ขอบคุณหลาน ๆ และคุณนิวัฒน์ แดงกระจ่าง ที่คอยเป็นแรงบันดาลใจให้เสมอสำหรับการศึกษาต่อในครั้งนี้ ขอขอบคุณกำลังใจอันอบอุ่นที่ได้รับจากครอบครัว คุณยาย อาจารย์ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่มอบให้แก่ข้าพเจ้าเสมอในยามที่อู่กับปัญหาต่าง ๆ ก็ยังเป็นกำลังใจให้สู้ต่อไป

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่บิดา-มารดา อาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุน เป็นกำลัง และแรงใจให้ตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

อารีรัตน์ เทียนขาว

เมษายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	64
สรุป	64
ข้อเสนอแนะ	66
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	75
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	76
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี	79
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	85

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งและอัตราการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ด้วยวิธี Dual culture technique	35
2	ประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ที่ซึมผ่านแผ่นเซลโลเฟนด้วย Dialysis membrane technique ภายหลังจากบ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> ที่ 3 วัน และ 6 วัน หลังจากการปลูกเชื้อ	41
3	การลดการเกิดโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย หลังจากพ่นเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01) ชนิดสด ภายใต้อุณหภูมิโรงเรือน	44
4	การลดการเกิดโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย หลังจากพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01) ที่เลี้ยงบนข้าวสุก และ <i>T. harzianum</i> (CB-Pin-01) ที่เลี้ยงบนข้าวสุกที่ผสมด้วย colloidal chitin 5% (c-chitin) พ่นลงบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ภายใต้อุณหภูมิโรงเรือน	46
5	ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01 และ T50) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนข้าวสุกผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 0.2 %) ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> ในสไลด์หลุมที่ 24 ชั่วโมง หลังการทดสอบ	48
6	ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01 และ T50) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนข้าวสุกผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 0.2 %) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> ในสไลด์หลุม	50
7	การเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> บนสไลด์หลุม เมื่อได้รับอิทธิพลของสารกรองจากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01 และ T50)	51

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01 และ T50) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนข้าวสุกผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 2%) ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> ในสไลด์หลุมที่ 24 ชั่วโมง หลังการทดสอบ	54
9	ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01 และ T50) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนข้าวสุกผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 2%) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> ในสไลด์หลุม	56
10	การลดการเกิดโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย หลังจากพ่นเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ชนิดสด สารกรองและสารกรองที่เติมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase เปรียบเทียบกับสารเคมี ในสภาพโรงเรือน	58

สารบัญภาพ

ตารางที่		หน้า
1	รูปแบบการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> แบบต่าง ๆ ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp	37
2	การพันรัดและแนบชิดเส้นใยเชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> ของเส้นใยเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01)	39
3	โคโลนีของเชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> บนอาหาร PDA เมื่อครบ 6 วัน หลังจากการนำเซลล์ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ออก	42
4	ลักษณะผิดปกติของสปอร์เชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> ที่ได้รับอิทธิพลจากสารกรองของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ที่เลี้ยงบนข้าวสุกผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพ	52
5	การเกิดจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ หลังการปลูกเชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i> 10 วัน	59
6	การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ β -1,3 glucanase หลังจากพ่นบนดอกกล้วยไม้ สกุลหวาย ระหว่างวันที่ 0-12	61
7	การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ chitinase หลังจากพ่นบนดอกกล้วยไม้ สกุลหวาย ระหว่างวันที่ 0-12	62
ภาพผนวกที่		
1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (A 750 nm)	81
2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (A 520 nm)	83
3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร (A 550 nm)	84

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	ค่าความดูดกลืนแสง (absorbance)
BSA	=	Bovine serum albumine
C	=	เชื้อรา <i>Curvularia eragrostidis</i>
c-chitin	=	colloidal chitin
Cont	=	กรรมวิธีควบคุม (Control)
cm	=	เซนติเมตร (centimeter)
ISR	=	การชักนำความต้านทาน (Induced systemic resistance)
M	=	โมลาร์ (Molar)
mg	=	มิลลิกรัม (milligram)
ml	=	มิลลิลิตร (milliliter)
nm	=	นาโนเมตร (nanometer)
NAG	=	N-acetyl glucosamine
PDA	=	อาหารแข็งเลี้ยงเชื้อรา (potato dextrose agar)
PDB	=	อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อรา (potato dextrose broth)
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน (part per million)
PR-protein	=	pathogenesis related protein
T	=	เชื้อรา <i>Trichoderma</i>
μg	=	ไมโครกรัม (microgram)
μm	=	ไมโครเมตร (micrometer)
V	=	ปริมาตร (volume)
W	=	น้ำหนัก (weight)
wp	=	ผงเปียกละลายน้ำ (wetable powder)
%	=	เปอร์เซ็นต์

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis*
และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย

**Efficacies of *Trichoderma* spp. for the Inhibition of *Curvularia eragrostidis* and
the Control of Flower Rusty Spot on *Dendrobium* Orchid**

คำนำ

กล้วยไม้ (orchid) พบในประเทศไทยประมาณ 1,100 ชนิด จาก 150 สกุล (จิตราพรธม, 2536) จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์ Orchidaceae (สมศักดิ์, 2540) มีสีสันหลากหลาย ดอกมีหลายรูปแบบ ทั้งที่เป็นดอกเดี่ยวและเป็นช่อ กล้วยไม้แบ่งตามลักษณะการเจริญเติบโตได้ 2 ประเภท คือประเภทที่เจริญเติบโตทางยอด (monopodial) ได้แก่ สกุลแวนด้า อะแรนด้า และมอคคาร่า อีกประเภทหนึ่งเจริญแบบแตกกอหรือเหง้า (sympodial) ได้แก่ สกุลหวาย และสกุลออนซิเดียม (กรมวิชาการเกษตร, 2548) แหล่งกำเนิดของกล้วยไม้ป่าที่สำคัญของโลกมี 2 แหล่งใหญ่ๆ ด้วยกันคือ ลาตินอเมริกาและเอเชียแปซิฟิก โดยที่แหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าในภูมิภาคเอเชียประเทศไทยเป็นศูนย์กลาง แหล่งปลูกกล้วยไม้ที่สำคัญของไทย ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นนทบุรี สมุทรสาคร กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ปทุมธานี เชียงใหม่ สระบุรี นครราชสีมา สงขลา ภูเก็ต สุราษฎร์ธานี และชลบุรี

ปัจจุบันกล้วยไม้จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้กล้วยไม้เป็น 1 ใน 4 ของพืช Product Champion เนื่องจากได้รับความนิยมทั้งภายในประเทศ (กรมวิชาการเกษตร, 2548) และมีปริมาณการส่งออกมากขึ้นทุกปี ทั้งที่เป็น ไม้ตัดดอก และต้นกล้วยไม้จำหน่ายไปต่างประเทศ ตลาดส่งออกที่สำคัญ คือ ประเทศญี่ปุ่น อิตาลี และสหรัฐอเมริกา ไม้ตัดดอกที่ส่งออกไปขายยังต่างประเทศสามารถทำรายได้เข้าประเทศได้ปีละหลายพันล้านบาท โดยสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร รายงานว่าผลผลิตดอกกล้วยไม้ ในปี 2547 มีประมาณ 44,080 ตัน เพิ่มจากปีก่อน 833 ตัน หรือคิดเป็นร้อยละ 1.93 แต่ปัญหาที่สำคัญในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ คือเรื่องโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคพืชที่เป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกของกล้วยไม้ตัดดอก คือ โรคดอกจุดสนิม (flower rusty spot) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Meyer ซึ่งมักจะแสดงอาการในระหว่างขนส่งและพบมากในกล้วยไม้สกุลหวาย การป้องกันกำจัดโรคนี้นี้ คือการเก็บดอกที่เป็นโรคออกจากแปลงให้หมดแล้วเผาทำลาย

เพื่อไม่ให้เป็นที่แหล่งสะสมของโรค และฉีดพ่นสารเคมี เช่น แมนโคเซบ หรือไดเทนเอ็ม 45 แม้ว่า การใช้สารเคมีสามารถควบคุมโรคนี้ได้ แต่มีข้อควรระวังเกี่ยวกับคราบยาที่เกิดบนกลีบดอก สุขภาพของเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้และผู้บริโภค รวมทั้งยังมีค่าใช้จ่ายสูง และทำลายสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) จึงเป็นแนวทางที่ได้รับความสนใจมากขึ้น เพราะช่วยลดปัญหาเรื่องสารพิษตกค้าง การฉีดต่อสารเคมีกำจัดเชื้อโรค และยังช่วยรักษาสมดุลของธรรมชาติได้ ทศนาพร (2545) รายงานการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้สาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butt) ด้วยการใส่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans* จากใบกล้วยไม้ (epiphytic microorganisms) ในระดับห้องทดลองและแปลงทดลองได้ผลดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี นับเป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในกล้วยไม้ต่อไปได้ในอนาคต

สำหรับในปัจจุบัน จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช คือ เชื้อรา *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารทุติยภูมิ เช่น pentyl pyrone และ harzinic acid เพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคได้ (Intana, 2003; Simon *et al.* , 1988) วารุณี (2546) ได้นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไคตินเนส และ กลูคาเนส ได้ดีมาใช้และพบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitsp. สาเหตุโรคเน่าระดับดิน (damping-off) และการควบคุมโรคในต้นกล้าได้ดีขึ้น

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวายมาก่อน ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวายในสภาพห้องทดลองและการควบคุมโรคในสภาพโรงเรือน เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการเรื่องโรคของกล้วยไม้ในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวาย ในสภาพห้องทดลอง
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผ่านการคัดเลือกมาใช้ควบคุมโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวาย ในสภาพห้องทดลองและสภาพโรงเรือน
3. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวายทั้งในสภาพห้องทดลองและสภาพโรงเรือน

การตรวจเอกสาร

1. โรคดอกจุดสนิม (Flower rusty spots)

เป็นโรคที่รู้จักกันดีในหมู่ผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อตัดดอกไปขายต่างประเทศ โดยพบว่าเป็นปัญหาสำคัญของกล้วยไม้ตัดดอกมากกว่าร้อยละ 90 เพราะดอกกล้วยไม้ถูกผสมบางสกุล หรือบางสายพันธุ์จะไม่แสดงอาการของโรคในโรงเรือน ถ้าเกษตรกรหรือผู้ส่งออกไม่สังเกตเห็นที่ดี จะมองเห็นไม่ชัดเจน แต่จะเริ่มแสดงอาการในระหว่างการขนส่ง และเห็นอาการของโรคชัดเจนเมื่อถึงปลายทาง (นิยมรัฐ, 2543) มักพบมากในกล้วยไม้สกุลหวาย โดยเฉพาะหวายมาดาม หวายขาว หวายชมพูและหวายชีซาร์

ลักษณะอาการ อาการปรากฏบนกลีบดอกกล้วยไม้ โดยอาการเริ่มแรกเป็นจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลเหลือง เมื่อจุดเหล่านี้ขยายโตขึ้นสีจะเข้มเป็นสีสนิม มีลักษณะค่อนข้างกลม หรือกลมรี ขนาด 0.1 - 0.3 มิลลิเมตร ตรงกลางแผลเป็นจุดสีเข้ม (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ชาวสวนกล้วยไม้นิยมเรียกว่า “โรคราสนิม”

เชื้อราสาเหตุ คือ *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. meyer เป็นเชื้อราที่แพร่กระจายได้ง่ายในอากาศ มักเข้าทำลายบนกลีบดอกของกล้วยไม้ทั้งด้านหน้าและด้านหลัง ลักษณะดังกล่าวจะปรากฏชัดเจนบนดอกหวายมาดาม แต่อาการบนหวายขาวจะเป็นแผลสีน้ำตาล ไม่เป็นแผลสีสนิมชัดเจนอย่างบนหวายมาดาม ดอกกล้วยไม้ที่ถูกทำลายไม่สามารถขายได้ และกลายเป็นแหล่งสะสมของเชื้อราสาเหตุของโรค ที่พร้อมจะเข้าทำลายดอกกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ ต่อไป

การจำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J. A. Meyer

Imperfect stage:

Kingdom Fungi
 Division Eumycota
 Subdivision Deuteromycotina
 Class Deuteromycetes
 Order Moniliales

Family Dematiaceae

Genus *Curvularia*

Species *eragrostidis*

Perfect stage: *Pseudocochiobolus eragrostidis* Tsuda & Ueyama

Kingdom Fungi

Division Eumycota

Subdivision Ascomycotina

Class Ascomycetes

Order Spaeiales

Genus *Cochiobolus*, *Pseudocochiobolus*

Species *eragrostidis*

ลักษณะเชื้อรา บนอาหาร PDA โคลโคนีมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ ลักษณะเส้นใยฟูเป็นปุย คล้ายกำมะหยี่ (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร เมื่ออายุ 14 วัน ที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้านใต้โคลโคนีสีน้ำตาลเข้ม ก้าน conidiophore ตั้งตรง ไม่แตกแขนง สีน้ำตาล มีการเจริญต่อไปได้อีก conidia ขนาด 12-13 x 26-33 (12-20.5) ไมครอน มีรูปร่างคล้ายถึง เบียร์ ผั่งเรียบ ตรงกลางป่องออก conidia มีผนังกัน แบ่งเป็น 4 เซลล์ บริเวณ 2 เซลล์ตรงกลางมีสี เข้มกว่าเซลล์หัวท้าย มีสีเข้มเกือบดำ

เชื้อรา genus นี้มีรายงานพบในดินและบนพืชหลายชนิด เช่น อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และ พืชตระกูลถั่ว เป็นต้น (Domsch *et al.* , 1993) พบเป็นสาเหตุ โรคใบจุดของข้าวโพด (นิยม, 2542) ในประเทศไทย พบว่าเป็นสาเหตุของ โรคดอกสนิมหรือจุดสนิมของกล้วยไม้ (นิยมรัฐ, 2543)

การแพร่ระบาด โรคจุดสนิมนี้ พบมากบนดอกกล้วยไม้ที่ถูกผสมสกลห่วย เกิดโรคได้ตลอด ทั้งปี แต่แพร่ระบาดได้ดีในช่วงฤดูฝน โดยเฉพาะถ้ามีฝนตกติดต่อกันเป็นเวลานานๆ หรือช่วงฤดู หนาวที่มีน้ำค้างลงจัด เพราะสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้ ออกในสภาพอากาศที่มีความชื้นสูง (นิยมรัฐ, 2543) สามารถระบาดติดต่อกันอย่างรวดเร็วทั่วทั้งรังกล้วยไม้และบริเวณใกล้เคียง ในเครื่องปลูกที่มี ลักษณะขังน้ำ เช่น กาบมะพร้าวที่วางแบบเรือใบ มีส่วนทำให้โรคสามารถเกิดได้ง่ายและรุนแรงมาก ขึ้น

การป้องกันกำจัดโรค

1. หมั่นตรวจดูแล้งกล้วยไม้ให้สะอาดอยู่เสมอ อย่าปล่อยให้ดอกกล้วยไม้บาน และ ไรศาคาตัน
2. กำจัดเศษซากกล้วยไม้ที่ไม่ต้องการและที่เป็น โรคออกจากแปลง เพราะจะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรค
3. พยายามเก็บดอกที่เป็น โรคให้หมด แล้วนำไปเผาทำลาย เพื่อไม่ให้เป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรค
4. พ่นด้วยสารเคมีในกลุ่ม mancozeb เช่น ไโดเทนเอ็ม 45, ไโดเทนแอลเอฟ, มาเน็กซ์ ในรูปสารละลายเข้มข้น (soluble concentrates) เพื่อป้องกันการเกิดคราบของสารเคมีบน กลีบดอก หรือพ่นด้วยโพพินาบ, แคปแทน หรือฟอสเฟต
5. ในช่วงฤดูฝนควรมีการพ่นสารเคมีให้ถี่ขึ้นกว่าปกติ และเพื่อเป็นการลดคราบสารเคมีที่จะเกิดขึ้นบนกลีบดอก ควรผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพ (adjuvant) ที่มีคุณสมบัติเป็น สารช่วยการกระจายตัว (spreader) ช่วยจับใบ (sticker) ช่วยให้น้ำเปียกน้ำ (wetting action) ช่วยการฟุ้งกระจาย (dispersing) และเป็นหยดน้ำ (droplets) สม่ำเสมอ สามารถลดแรงตึงผิว (surfactant) ช่วยให้สารเคมีเกาะติดหรือซึมเข้าสู่เซลล์ผิวพืชได้ดี มีจำหน่ายในท้องตลาดมีหลายชื่อการค้า ทั้งคุณภาพต่ำและสูง เกษตรกรรู้จัก adjuvant ในชื่อของ “สารจับใบ”
6. จากการที่เชื้อราสาเหตุ โรคนี้ มีชีวิตอยู่ในน้ำที่ขังไว้เพื่อใช้รดกล้วยไม้ได้ จึงควรนำเชื้อเป็นครั้งคราว ด้วยการใส่คลอรีนผงในอัตรา 5 กรัม ต่อน้ำ 20 ปีบ (400 ลิตร) โดยการกวนน้ำและคลอรีนผงให้ทั่วกันแล้วปล่อยให้ค้างคืนจนหมดกลิ่นคลอรีน จึงนำน้ำไปใช้ควรระวังการใช้สารเสริมประสิทธิภาพในอัตราที่เข้มข้นเกินไป เพราะในช่วงฤดูฝนจะทำให้กลีบของดอกกล้วยไม้ น้ำเน่าผิปกติไป (เมื่อส่องดูด้วยแสงแดดหรือแสงไฟ กลีบดอกปกติที่บดแสง แต่ดอกที่น้ำเน่าผิปกติจะโปร่งแสง) ดอกไม่มีคุณภาพ ส่วนในฤดูร้อนมักจะทำให้กลีบดอกกล้วยไม้เป็นสีซีดขาว ดอกได้รับความเสียหายเช่นเดียวกัน

7. ใช้ปุ๋ยให้ถูกสัดส่วน ด้วยการลดการใช้ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนสูง ในฤดูฝน ซึ่งเป็นช่วงการระบาดของโรคนี้นี้เนื่องจากสภาพแวดล้อม น้ำฝนช่วยเพิ่มไนโตรเจนให้สูงขึ้นตามธรรมชาติ จึงทำให้เกิดโรคนี้นี้มากยิ่งขึ้น การเพิ่มปุ๋ยโพแทสเซียมให้สูงขึ้น ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคหรือลดความรุนแรงของโรคนี้นี้ได้

2. เชื้อรา *Trichoderma harzianum*

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราชั้นสูงที่จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน (Papavizas, 1985) สามารถมีชีวิตรอดในสภาพธรรมชาติได้ดี โดยอาศัยอาหารจากอินทรีย์วัตถุ เศษซากพืชและเชื้อโรค เชื้อรา *Trichoderma* มีการเจริญสร้างเส้นใยสีขาวได้อย่างรวดเร็ว มีผนังกันเซลล์ (septate hyphae) ผนังเส้นใยเรียบมีการแตกกิ่งก้านมากมาย (Rifai, 1969) และสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่าสปอร์ ซึ่งเกิดจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ สร้างสปอร์สีเขียวได้เป็นจำนวนมาก *Trichoderma* บางชนิดทำให้สีของอาหารเปลี่ยนแปลงไปหรือมีการสร้างกลิ่น เช่น กลิ่นมะพร้าว (ลาวัลย์ และคณะ, 2540)

ปัจจุบันเชื้อรา *T. harzianum* เป็นจุลินทรีย์ประยุกต์ที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมและป้องกันเชื้อราสาเหตุโรคพืช (biocontrol agent) เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้หลายชนิด (Harman, 2000) เชื้อรา *T. harzianum* สามารถพบได้ทั่วไปในดินและระบบรากพืช สามารถแยกเชื้อนี้ได้จากดิน เศษซากพืชทั้งไม้เนื้ออ่อนและเนื้อแข็ง รวมทั้งส่วนต่างๆ ของพืชได้ง่าย (Chaverri *et al.*, 2003; Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004) สามารถจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของเชื้อรา *T. harzianum* ได้ดังนี้

การจำแนกอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* แบบไม่อาศัยเพศ (Papavizas, 1985)

Kingdom Fungi

Division Eumycota

Subdivision Deuteromycotina

Class Hyphomycetes

Order Moniliales, Hyphales

Family Moniliaceae

Genus *Trichoderma*

Species *harzianum*

เชื้อรา *T. harzianum* มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphs) โดยการสร้างสปอร์ปริมาณมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี มีตั้งแต่ไม่มีสี, สีเหลืองอ่อน, สีเหลือง (yellow), สีน้ำตาลเหลือง (amber), สีเหลืองอมเขียว (yellow-green) และเขียว (green) บางสายพันธุ์ผลิต chlamyospore ระหว่างเส้นใยหรือปลายเส้นใย และเป็น โครงสร้างที่ช่วยให้เชื้อสามารถอยู่ในดินได้นาน

ส่วนระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) ของเชื้อรา *T. harzianum* Rifai จัดอยู่ใน Order Hypocreales Family Hypocreaceae Genus *Hypocrea* ซึ่งเชื้อรา *T. harzianum* สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Hypocrea lixii* ที่มีการสร้าง ascospore (Papavizas, 1985; Chaverri *et al.*, 2003; Howell, 2003; Harman *et al.*, 2004) เชื้อรา *Trichoderma* spp. หลายสายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์ที่เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ส่วนมากไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยในธรรมชาติ จำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น มาจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004)

กลไกที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. รวมถึงการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชนั้น ได้แก่ การเป็นปรสิตภายในของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasitism), การแข่งขันการใช้อาหารและการครอบครองพื้นที่กับเชื้อโรคพืช (competition and rhizosphere competence), การสร้างปฏิชีวนสารยับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช (antibiosis), การส่งเสริมให้พืชทนต่อสภาพเครียด (tolerance to biotic and abiotic stresses through enhanced root development), การช่วยละลายธาตุอาหารให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ประโยชน์ได้ (solubilization and sequestration of inorganic plant nutrients), และการชักนำความต้านทานในพืช (induced resistance) รวมทั้งการส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืช (plant growth promoting) (Harman, 2000) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) การเป็นปรสิต เป็นกลไกในการควบคุมโรคพืชโดยที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญไปพันรัดเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคแล้วย่อยสลายผนังเซลล์ เพื่อเจริญเข้าไปใช้อาหารภายใน โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น เชื้อรา *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Pythium*, *Phytophthora* และ *Colletotrichum* เป็นต้น (จิระเดช และ วรณวิไล, 2546) จากนั้นส่วนขยายพันธุ์สามารถเจริญออกมาจากเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ จนเป็นเหตุให้เส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคพืชแตกสลายหรือเหี่ยวแห้ง (lysis) และตายในที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ผลิตขึ้นมา เพื่อช่วยในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรค เช่น

chitinase หรือ chitinolytic enzyme, β -1,3-glucanase, β -1,6-glucanase, peptidase antibiotics (Harman, 2000; Howell, 2003)

Elad *et al.* (1983) รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีคุณสมบัติในการเป็นปรสิตของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อสร้างเอนไซม์ β -1, 3-glucanase และ chitinase ซึ่งสามารถย่อยผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราโรคพืชได้ แล้วเจริญเข้าไปภายในเส้นใยโดยตรง

รายงานของ Weindling (1932) ได้แสดงให้เห็นถึงการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* เข้าไปใกล้เส้นใยของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* แล้วเจริญพันรัดเส้นใย สัมผัสแบบชิดและเจริญเข้าสู่ภายในเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* ทำให้เส้นใยสูญเสียความมีชีวิต บางครั้งพบว่า เส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* ไม่ได้สัมผัสกับเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคพืช แต่สามารถทำให้โปรโตพลาสซึมสูญเสียคุณสมบัติได้ แสดงให้เห็นถึงลักษณะอื่นนอกเหนือจากการเป็นปรสิตโดยไม่ต้องมีการสัมผัสของเส้นใย สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางส่วนที่พบว่าถูกเชื้อรา *Trichoderma* เข้าทำลายโดยวิธีการเป็นปรสิตประกอบด้วย *Rhizoctonia Sclerotium Helminthosporium Fusarium Verticillium Pythium Phytophthora Colletotrichum Rhizopus Endothia Venturia Diaporthe* และ *Fusicladium*

แสงมณี และคณะ (2540) ได้รายงานว่เชื้อรา *T. harzianum* สามารถสร้างเส้นใยพันรัดรอบเส้นของเชื้อรา *Phytophthora* spp. และเจริญแทงเข้าสู่ภายในเส้นใย ทำให้เกิดลักษณะว่างเปล่าภายในเส้นใย ผนังเส้นใยมักถูกย่อยสลาย ส่งผลกระทบต่อการสร้าง sporangium และ chlamydospore ด้วย

2) การแข่งขันการใช้อาหารและการครอบครองพื้นที่ เป็นลักษณะการแข่งขันการใช้อาหารและการครอบครองพื้นที่ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างเส้นใยได้รวดเร็ว และสามารถสร้างสปอร์ได้ในปริมาณสูงมาก โดยอาศัยอาหารจากเศษวัสดุต่าง ๆ จึงช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชหรือจุลินทรีย์ที่อยู่ในบริเวณเดียวกันได้ เช่น ในกรณีที่เชื้อรา *T. koningii* สามารถเจริญครอบครองรากหอม และทำลายเชื้อสาเหตุโรค คือ เชื้อรา *Sclerotium cepivorum* ได้ (Danielson and Davey, 1973; Howell, 2003) และในกรณีของ Hubbard *et al.* (1983) ที่พบว่าในดินมีธาตุเหล็กต่ำ อันเป็นผลมาจากการที่เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มเรืองแสง คือ fluorescent pseudomonads ได้จับยึดแร่เหล็กที่เป็นประโยชน์ด้วยสารซิเดอโรฟออร์ (siderophores) ส่งผลให้ความสามารถของเชื้อรา

Trichoderma ในการควบคุมโรคพืชลดลงด้วย ความชื้นของดินก็มีบทบาทต่อการเจริญและการแข่งขันของเชื้อรา *Trichoderma* มาก ในบางกรณีพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ไม่อาจสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ทั่ว ๆ ไปในดิน (soil microflora) ได้ จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้มากพอที่จะไปทำหน้าที่ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช แต่เมื่อใดก็ตามที่จุลินทรีย์ในดิน หรือเชื้อโรคที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพมากถูกรบกวนหรือถูกรบกวนด้วยปัจจัยบางประการจนเกิดความอ่อนแอหรือมีปริมาณลดลงเชื้อรา *Trichoderma* จะสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตัวอย่างเช่น การใช้คาร์บอนไดออกไซด์ และเมทิลโบรไมด์ ซึ่งเป็นสารกำจัดสิ่งมีชีวิตในดิน ส่งผลให้เชื้อรา *Armillaria mellea* อ่อนแอลง ระยะเวลาจึงเป็นช่วงที่เหมาะสมแก่ เชื้อรา *T. viride* ซึ่งมีความทนทานต่อสารเคมีดังกล่าว ในการเข้าแก่งแย่งอาหารและทำลายเชื้อรา *A. mellea* ช่วยให้โรครากเน่าลดลง

3) การสร้างปฏิชีวนสาร เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารเคมี ซึ่งอาจเป็นปฏิชีวนสาร (antibiotics) สารพิษ หรือเอนไซม์ (extracellular enzymes) เพื่อมายับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยหรือยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* บางชนิด หรือบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารประกอบที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วย เชื้อรา *Trichoderma* สามารถผลิตสารดังกล่าวได้หลายชนิด อาทิเช่น

สารไตรโคเดอร์มิน (Trichodermin) เป็นปฏิชีวนสารในกลุ่ม sesquiterpene ที่ผลิตโดยเชื้อรา *Trichoderma* (Godtfredsen and Vangedal, 1965)

สารเดอร์มาดีน (dermadine) เป็นสารพวก unsaturated monobasic acid ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยขัดขวางการทำงานของระบบเอนไซม์ (Pyke and Dietz, 1966)

สารซูกากาซิลลิน (Suzukacillin[®]) และอลาเมทิซิน (Alamethicine[®]) เป็นสารในกลุ่ม peptides ที่สร้างโดยเชื้อรา *Trichoderma* ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย (Meyer and Reusser, 1967; Ooka *et al.*, 1996; Reusser, 1967) โดยไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์จุลินทรีย์แตกสลาย (lysis)

ในปี 1971 Dennis and Webster ได้รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* สามารถผลิตสารอะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ซึ่งเป็นปฏิชีวนสารที่ระเหยได้ (Volatile antibiotic)

ในระยะต่อมามีการศึกษาปฏิชีวนสารที่เชื้อรา *Trichoderma* สร้างขึ้นอีกมากมาย ตัวอย่างเช่น สารไตรโคลิน (Tricholin) ที่ผลิตโดยเชื้อรา *T. viride* มีผลยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (Lin *et al.*, 1994)

สารไตรโคซิเนียนีนส์ (Trichozinianines) ที่ผลิตโดยเชื้อรา *T. harzianum* มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Sclerotium rolfii* (Correa, 1995)

นอกจากนี้ Intana *et al.* (2003) ยังพบว่า *T. harzianum* สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) สามารถสร้าง pentyl pyrone และ oxazole ได้

4) การยับยั้งเชื้อโรคพืชด้วยเอนไซม์ เป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่จะช่วยให้เชื้อรา *Trichoderma* สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่น ๆ รวมทั้งเชื้อโรคพืชในการใช้อาหาร ตลอดจนช่วยในการเข้าทำลายเชื้อโรคพืชด้วยเอนไซม์ไลติก (lytic enzymes) เอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) ที่มีบทบาทในการทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อรา *S. rolfii* ที่ระดับ pH เป็นกลาง (Rodriguez-Kabana, 1969; Rodriguez-Kabana *et al.*, 1968, 1978) เอนไซม์ไฮโดรไลติก (hydorlytic extracellular enzymes) สามารถช่วยให้เกิดการย่อยผนังเส้นใยของเชื้อโรคจนเป็นช่อง ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* เจริญเข้าไปได้ (Geremia *et al.*, 1991) เอนไซม์เปคโตไลติก (pectolytic enzyme) ยับยั้งการเจริญของเชื้อราไฟทอปธอรา (Anju, 1994) ไคตินเนส (chitinase) กลูคาเนส (glucanase) และเซลลูเลส (cellulases) เป็นเอนไซม์ที่ถูกผลิตขึ้นมาตรงบริเวณที่เชื้อรา *T. harzianum* เกาะติดหรือพันรัดอยู่บนเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfii* *Pythium aphanidermatum* และ *R. solani* (Elad *et al.*, 1983; Intana *et al.*, 2003) ดังนั้นการเติมไคติน (chitin) ให้กับเชื้อรา *T. harzianum* จึงพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Pythium* spp. และ *R. solani* ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลผลิตมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อรา *Trichoderma* ที่เพิ่มขึ้น (Harman *et al.*, 1981) อย่างไรก็ตามมีรายงานที่บ่งชี้ว่า *Trichoderma* สายพันธุ์ที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคพืชกลับไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ก็ได้ ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคของเชื้อรา *Trichoderma* ขึ้นอยู่กับการร่วมกันของกิจกรรมการสร้างปฏิชีวนสารและเอนไซม์ (จิระเดช, 2549)

5) การช่วยให้พืชมีความทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ช่วยให้พืชมีความทนต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมทั้งทาง biotic และ abiotic stresses เช่น ช่วยให้พืชทนแล้ง ทนต่อแมลงและโรค โดยส่งเสริมการพัฒนาระบบราก เช่น การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ fusant T-22 ซึ่งสามารถเจริญครอบครองรากพืชได้ ทำให้พืชที่ทดสอบในสภาพแห้งแล้ง (drought stress) มีความยาวของรากเพิ่มขึ้นและยับยั้งอาการม้วนงอของใบได้ (Harman, 2000)

6) การช่วยละลายแร่ธาตุในดิน เชื้อรา *T. harzianum* สามารถช่วยละลายแร่ธาตุในดินที่อยู่ในรูปที่พืชไม่สามารถดูดซึมได้ ให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถดูดซึมแล้วนำไปใช้ได้ โดยเฉพาะธาตุแมงกานีสที่มีบทบาทต่อการเจริญของพืชและกระบวนการต้านทานต่อโรคในพืช ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่พืชใช้ได้คือ Mn^{2+} และส่งเสริมการใช้แร่ธาตุในพืชชนิดอื่นๆ ได้ เช่น ฟอสฟอรัส

7) การชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน เป็นกลไกชักนำความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งมีการศึกษาการชักนำความต้านทานเป็นครั้งแรกและให้ผลอย่างชัดเจนในปี ค.ศ. 1997 โดย Bigirimana *et al.* ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-39 ใส่งดินสามารถชักนำความต้านทานต่อโรคบนใบของถั่วที่เกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* และเชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* ได้เพราะตรวจพบเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-39 เฉพาะบริเวณรากไม่พบในส่วนของใบ โดยเชื้อรา *T. harzianum* สามารถชักนำความต้านทานในพืชได้ทั้งพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Harman *et al.*, 2004)

Kloepper *et al.* (1992) ให้คำจำกัดความของ induced resistance ไว้ว่า เป็นการที่สิ่งมีชีวิตหรือไม่มีชีวิต สามารถชักนำให้พืชเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางด้าน phenotype เช่น การใส่งเชื้อจุลินทรีย์หรือการฉีดสารเคมีแล้วทำให้เกิดความเสียหายเฉพาะจุด (local damage) แก่พืช แล้วส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและกลไกต่าง ๆ (biochemical and mechanistic changes) ขึ้น จึงเรียกรูปการชักนำที่เกิดขึ้นในลักษณะนี้ว่า induced systemic resistance (ISR)

เชื้อรา *T. harzianum* เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ในการป้องกันและควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช อีกทั้งยังมีคุณสมบัติในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคได้ด้วยการสร้าง PR-protein (pathogenesis related protein) (Harman *et al.*, 2004) เช่น เชื้อรา *T. harzianum* สามารถผลิตเอนไซม์ β -1,3-glucanase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ glucanohydrolase ที่จัดเป็น PR-protein ดังนั้นการชักนำการสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase โดยเชื้อรา *T. harzianum* จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจและมีความปลอดภัยกับต้นพืช เนื่องจากเอนไซม์ β -1,3-glucanase มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะ β -1,3-glucan ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของ

โครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด หากใช้เชื้อรา *T. harzianum* แล้วจะสามารถชักนำให้พืชสร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase ได้ในปริมาณที่เพียงพอต่อการป้องกันการบุกรุกเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งจะช่วยลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้ และทำให้ผลผลิตไม่เสียหายมากนัก (Benhamou, 1992)

พบว่าในปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านทำการศึกษาวิจัยถึงความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* หรือผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *Trichoderma* ในการชักนำให้พืชต้านทานโรค และในปี 2003 Intana ได้รายงานถึงผลิตภัณฑ์ (culture filtrate) ของเชื้อรา *Trichoderma* ที่สามารถกระตุ้นให้ต้นแตงกวาด้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช (*Pythium irregulare*) อย่างไรก็ดีตามแนวทางดังกล่าวนี้ยังเป็นแนวทางที่ใหม่ และต้องมีการศึกษาอีกมากเพื่อความสมบูรณ์ของงานวิจัยและข้อมูลมากยิ่งขึ้น

8) การส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืช การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืชได้ มีผู้รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารไปกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโตมากกว่าปกติ หรือเกิดจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถไปทำลายเชื้อโรคบริเวณรอบ ๆ ราก แล้วทำให้ระบบรากพืชแข็งแรง ไม่มีการรบกวนจากเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช จึงทำให้พืชเจริญเติบโตดีกว่าต้นที่มีการรบกวนจากเชื้อสาเหตุโรค ดังเช่น ในรายงานของ Harman (2000) ที่พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-22 สามารถเจริญครอบครองราก และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวโพดหวาน และเพิ่มผลผลิตของพริกหวานได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

Intana (2003) รายงานไว้ว่า พบสาร pentyl pyrone และ hexazone ที่ผลิตจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-50 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและสามารถเพิ่มผลผลิตของแตงกวาได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

3. การใช้เชื้อราปฏิชีวนะในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค

การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี (biocontrol) หมายถึง การลดปริมาณประชากรของเชื้อโรคพืชหรือลดกิจกรรมของเชื้อโรค ส่งผลให้การเกิดโรคอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืชนั้น ๆ โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ (organism) ซึ่งรวมทั้งพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์

ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganisms) แต่ยกเว้นผลจากการกระทำต่อเชื้อโรคโดยตรงจากมนุษย์ (จิระเดช และ วรณวิไล, 2546)

การที่เชื้อรา *Trichoderma harzianum* เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงและกว้างนั้น (Harman, 2000) สาเหตุเนื่องมาจากเชื้อรา *T. harzianum* มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว มีการสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายสารพวก polysaccharide สามารถขยายพันธุ์ได้ในแหล่งคาร์บอนหลายชนิด และ *Trichoderma* ในแต่ละสายพันธุ์ มีความสามารถในการทนต่อสารเคมีและสภาพแวดล้อมได้แตกต่างกัน (Tronsmo and Hjeljord, 1998)

จิระเดช และ วรณวิไล (2542) ได้รายงานไว้ว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์สูง โดยมีกลไกในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายอย่าง เช่น การแข่งขันด้านปัจจัยในการดำรงชีวิตกับเชื้อสาเหตุโรคพืช (competition) เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญได้อย่างรวดเร็ว การเป็นปรสิต (parasitism) และการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) กลไกในการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. คือการสร้างเส้นใยเข้าพันรัด เชื้อราสาเหตุโรคแล้วผลิตเอนไซม์ออกมาหลายชนิด เช่น chitinase cellulase glucanase และ สารปฏิชีวนะต่าง ๆ มาย่อยสลายหรือทำลายผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ยังสามารถใช้เส้นใยแทงผ่านเข้าสู่เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค ใช้ส่วนของเหลวในเส้นใยเชื้อโรคเป็นอาหาร ทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อโรคเกิดการฉีกขาด ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของของเหลวภายในเส้นใย เกิดการตกตะกอนของ organelles และ cytoplasm ทำให้กิจกรรมการเจริญของเชื้อโรคลดลง ส่งผลต่อการขยายพันธุ์และทำให้ตายในที่สุด

จากการทดลองของ Michhereff ในปี 1995 พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* สายพันธุ์ TN 1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* สาเหตุของโรคใบจุด (leaf spot) ของต้นมันแกว (Yam) ในสภาพโรงเรือนได้ โดยสามารถทำให้อาการของโรคลดลงได้ถึง 89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

Nampoothiri (2004) รายงานไว้ว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (TUBF 781) ที่เลี้ยงบนรำข้าวสาลี (solid-state) ที่เติม yeast extract (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) และ colloidal chitin (1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พร้อมกับการใช้สปอร์แขวนลอยของ *T. harzianum* (TUBF 781) ที่ความเข้มข้น 4×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าทำให้อัตราการเจริญของเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 3.18 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อนำสารสกัด

หยาบ (crude extract) มาทดสอบพบว่าสามารถควบคุมเชื้อรา *Aspergillus Rhizopus* และ *Mucor* sp. ได้ โดยที่สามารถควบคุมเชื้อรา *Aspergillus niger* (NCIM 563) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. การศึกษาวิจัยที่ใช้จุลินทรีย์ประยุกต์เพื่อควบคุมโรคของกล้วยไม้ในประเทศไทย

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในกล้วยไม้ แม้จะพิจารณาแล้วเห็นว่าอาจไม่ใช่วิธีที่จะประสบความสำเร็จได้เทียบเท่าสารเคมีในทุกกรณีก็ตาม แต่เชื่อได้ว่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะผลตอบแทนที่ดีได้ในอนาคต การศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางการใช้จุลินทรีย์ประยุกต์ควบคุมโรคของกล้วยไม้เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2545 และมีผลการวิจัยที่ดำเนินการแล้วดังนี้

ทัศนพร (2545) รายงานการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลมอศคาร่า สาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl.) ด้วยการใส่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans* ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้ (epiphytic microorganisms) ในระดับห้องทดลองและแปลงทดลอง ผลปรากฏว่าได้ผลดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี fosetyl-A1 โดยสามารถลดขนาดของแผลได้ 56.52 - 81.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

กรพินธุ์ และคณะ (2548) รายงานการใส่สารกรอง (culture filtrate) ซึ่งเตรียมจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวสุก ผสมน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วกรองเอาสปอร์ออก สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* สาเหตุโรคใบปื้นเหลือง (Yellow leaf spot หรือ *Pseudocercospora* leaf spot) ในกล้วยไม้สกุลหวาย ได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีความยาวของเส้นใยลดลง 20.72 - 56.76 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

ชุติมา (2548) รายงานการควบคุมโรคเน่าแห้งของกล้วยไม้ สาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. ด้วยการใส่จุลินทรีย์ประยุกต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ สำหรับการยับยั้งการเจริญของเส้นใยในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ C5 และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ NRT-1 สามารถยับยั้งได้ดี 80.95 ± 2.38 และ 96.43 ± 5.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 (ชนิดสด) สามารถยับยั้งเส้นใยได้ดีถึง 97.22 ± 4.81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดสอบในสภาพโรงเรือน พบว่าสารเคมี vitavax ให้ผลการยับยั้ง

โรคได้ดีที่สุดคือ 78.13 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ NRT-1 และ CB-Pin-01 เท่ากับ 73.96 และ 71.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการควบคุมโรคได้ดีเช่นเดียวกับการใช้สารเคมี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบเชื้อราสาเหตุโรคดอกจูดสนิม

ได้รับความอนุเคราะห์ เชื้อรา *Curvularia eragrostidis* (Henn.) J.A. Meyer จากคุณธิดา เดชสวบ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร บางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำมาเลี้ยงขยายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปใช้เตรียมสปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับพ่นลงบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย (ที่ดอกบานทั้งช่อ) กลุ่มช่อด้วยถุงพลาสติก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเปิดถุงออกแล้วสังเกตอาการ

2. เชื้อราปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบ

คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. 14 สายพันธุ์ โดย 13 สายพันธุ์เป็นเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ วารุณี (2546) รายงานไว้ว่า สามารถสร้างเอนไซม์ไฮโดรไลซิซชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น chitinase cellulase glucanase เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ส่วนต่างๆ ของเชื้อราสาเหตุโรค ได้แก่ เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ M 4, M 23, 84-42, 71-42, BK-04, CB-Pin-01, SM-3-2, T2R2-33, TH-01, TO.01 และ Cit17 เชื้อรา *T. pseudokoningii* สายพันธุ์ DU-07 และเชื้อรา *T. longibrachiatum* สายพันธุ์ TL-01 ส่วนเชื้อรา *T. harzianum* อีกสายพันธุ์หนึ่งที่น่ามาทดสอบ คือ T-50 ที่ได้จากการทดลองของ ดร.วาริน อินทนา (Intana *et al.*, 2003) ที่รายงานไว้ว่าเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการครอบครองรากพืช (root colonization) ได้ดี เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 14 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) จนเกิดการสร้างสปอร์ ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 วิธี Dual culture test

ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 14 สายพันธุ์ ต่อเชื้อรา *C. eragrostidis* ด้วยวิธี Dual culture test บนอาหาร PDA โดยนำชิ้นวุ้น PDA ที่มีเส้นใยของเชื้อรา

C. eragrostidis เจริญอยู่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร วางชิดขอบด้านหนึ่งของจานอาหาร PDA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำชิ้นวุ้น PDA ที่มีเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 14 สายพันธุ์ ขนาดเท่ากัน มาวางตรงข้ามกันในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของจาน โดยให้ชิ้นวุ้นทั้งสองห่างกัน 6 เซนติเมตร ตรวจสอบลักษณะและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อเส้นใยของเชื้อราทั้งสองเจริญเข้าหากัน วัดความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อทั้งสอง เพื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อโรคและอัตราการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คลุมทับเส้นใยของเชื้อรา

C. eragrostidis

3.2 วิธี slide culture ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. eragrostidis* ด้วยเชื้อรา *T. harzianum* โดยวิธี slide culture ด้วยการตัดชิ้นวุ้นของอาหาร PDA เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด ประมาณ 1 x1 เซนติเมตร หลังจากนั้นเจี่ยเส้นใยของเชื้อรา *C. eragrostidis* ไปวางไว้บนชิ้นอาหาร PDA ซึ่งวางอยู่บนสไลด์ บ่มไว้ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำนิ่งฆ่าเชื้อเพื่อให้ความชื้นเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเจี่ยเชื้อรา *T. harzianum* ไปวางไว้ด้านตรงข้ามของชิ้นวุ้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ เลี้ยงต่อไปอีก 3-4 วัน พร้อมทั้งสังเกตการเจริญมาพบกันของเส้นใย จากนั้นจึงนำไปตรวจจุลกลไกการเป็นปฏิปักษ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) และบันทึกภาพ

3.3 เทคนิค Dialysis membrane

การทดสอบด้วย Dialysis membrane technique นี้เป็นการศึกษาตามวิธีการของ Gibb (1967); Whipps (1987), Simon *et al.* (1988) โดยการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยที่กำลังเจริญ มาวางบนแผ่นเซลโลเฟน(นิ่งฆ่าเชื้อ) เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่วางทับอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตรงกลางจาน 1 ชิ้นต่อจาน บ่มไว้ภายใต้แสงจากหลอดฟลูออโรเรสเซนส์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อจากนั้น จึงนำแผ่นเซลโลเฟนพร้อมทั้งชิ้นวุ้นเชื้อรา *Trichoderma* spp. ออกก่อนวาง เส้นใยของเชื้อรา *C. eragrostidis* ลงไปตรงกลางจาน แล้วบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้แสงตลอดเวลา ตรวจสอบผลโดยการวัดขนาดของโคโลนีเชื้อรา *C. eragrostidis* ที่ 3 และ 6 วันหลังจากวางเชื้อบนอาหาร โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมและกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี mancozeb(80 % WP) ผสมในอาหาร PDA ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm

4. การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ในการควบคุมโรคดอกจุดสนิมในสภาพโรงเรือน

4.1 การทดลองที่ 1: ทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

4.1.1 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ด้วยการกวาดสปอร์ของเชื้อราลงน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer แล้วปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยให้ได้ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย haemocytometer

4.1.2 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราทดสอบ

โดยเลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (เลี้ยงขยายบนอาหาร PDA จนครบ 7 วัน) แล้วกวาดสปอร์ของเชื้อราลงน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้สปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4.1.3 การเตรียมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

เตรียมสาร mancozeb (80 % WP) ด้วยอัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ตามคำแนะนำ

4.1.4 การเตรียมช่อดอก

ห่อช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่ปลูกในกระถาง ด้วยถุงพลาสติกใส ขนาด 11 x 15 นิ้ว ตัดปลายถุงไว้สำหรับการพ่นเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อโรค

4.1.5 การปฏิบัติ

พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) โดยใช้สปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนช่อดอกในช่วงเย็น ปิดช่องเปิดปลายถุงโดยใช้เชือกมัด แล้วบ่มไว้ 24 ชั่วโมง ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ(ควบคุม) พ่นเชื้อรา *C. eragrostidis* โดยใช้สปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1, 2, 3, 4 หรือ 5 วัน หลังจากพ่นเชื้อรา *T. harzianum* หรือสารเคมี mancozeb ไปแล้ว โดยกำหนดกรรมวิธีไว้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* หลังจากพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ไปแล้ว 1 วัน

กรรมวิธีที่ 2 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* หลังจากพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ไปแล้ว 2 วัน

กรรมวิธีที่ 3 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* หลังจากพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ไปแล้ว 3 วัน

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* หลังจากพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ไปแล้ว 4 วัน

กรรมวิธีที่ 5 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* หลังจากพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ไปแล้ว 5 วัน

กรรมวิธีที่ 6 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* หลังจากพ่นสารเคมี mancozeb ไปแล้ว 1 วัน

กรรมวิธีที่ 7 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* หลังจากพ่นสารเคมี mancozeb ไปแล้ว 2 วัน

กรรมวิธีที่ 8 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* หลังจากพ่นสารเคมี mancozeb ไปแล้ว 3 วัน

กรรมวิธีที่ 9 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* หลังจากพ่นสารเคมี mancozeb ไปแล้ว 4 วัน

กรรมวิธีที่ 10 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* อย่างเดียว (control +)

กรรมวิธีที่ 11 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 12 พ่นน้ำเปล่า (control -)

เมื่อพ่นเชื้อรา *C. eragrostidis* ไปแล้ว ปิดปากถุงพลาสติก เพื่อเพิ่มสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในถุง บ่มไว้ 1 คืน ก่อนนำถุงออก การทดสอบบนช่อกกล้วยไม้ประกอบด้วย 12 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ช่่า ช่่าละ 3 ดอก ตรวจสอบการทดลองเมื่อครบ 10 วัน หลังการปลูกเชื้อโรค โดยนับจำนวนจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม วิเคราะห์ผลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (P=0.05)

4.2. การทดลองที่ 2: ทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เติมสารเพิ่มประสิทธิภาพ (colloidal chitin 5%)

4.2.1 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค เช่นเดียวกับข้อ 4.1.1

4.2.2 การเลี้ยงเชื้อราทดสอบ

เลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 บนข้าวสุกนึ่งฆ่าเชื้อ ที่เติมสารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ (colloidal chitin 5%) โดยชั่งปลายข้าวสาร 100 กรัม และน้ำ 50 มิลลิลิตร ตวงใส่ถุงร้อนขนาด 8 x 12 นิ้ว แล้วเติมสารที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ (colloidal chitin 5%) ลงในถุงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ความเข้มข้น 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อถุง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (4 วัน) คัดแปลงตามวิธีการของ Nampoothiri(2004)

4.2.3 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราทดสอบ

โดยเลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 บนปลายข้าวที่ผ่านการนึ่งมาเชื้อ (ตามวิธี 5.1) ใส่สปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อกรรมวิธีต่อถุง บ่มไว้ได้แสงให้ครบ 5-7 วัน ที่อุณหภูมิปกติเมื่อเชื้อรา *T. harzianum* สร้างสปอร์สีเขียวเต็มถุง (เชื้อสด) จึงเก็บเข้าห้องเย็นและนำไปใช้ในขั้นต่อไป

4.2.4 การเตรียมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่นเดียวกับข้อ 4.1.3

4.2.5 การเตรียมช่อดอก เช่นเดียวกับข้อ 4.1.4

4.2.6 การปฏิบัติ

ห่อช่อดอกกล้วยไม้ด้วยถุงพลาสติกใส ที่ตัดปลายถุงไว้สำหรับการพ่นเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อทดสอบ พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (spore suspension) ที่เลี้ยงในข้าวสุก ซึ่งเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพหรือไม่เติม (ผลจากการทดลองที่ 5) พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb ในบางกรรมวิธีด้วยอัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นที่ช่อดอกที่หุ้มพลาสติกตัดปลายไว้แล้ว ในเวลาเย็น บ่มไว้ 24 ชั่วโมง แล้วเปิดปากถุงออก พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อโรค *Curvularia eragrostidis* ที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3, 4 หรือ 5 วัน หลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือสารเคมี mancozeb ไปแล้ว โดยกำหนดเป็นกรรมวิธีไว้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ก่อน 3 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 2 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ก่อน 4 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 3 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่ผสม colloidal chitin ก่อน 3 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 5 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่ผสม colloidal chitin ก่อน 4 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 6 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่ผสม colloidal chitin ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 7 พ่นสารเคมี mancozeb ก่อน 3 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 8 พ่นสารเคมี mancozeb ก่อน 4 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 9 พ่นสารเคมี mancozeb ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 10 พ่นเชื้อรา *C. eragrostidis* อย่างเดียว (control +)

กรรมวิธีที่ 11 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 12 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่ผสม colloidal chitin

กรรมวิธีที่ 13 พ่นน้ำเปล่า (control -)

การทดสอบบนช่อกกล้วยไม่มีทั้งหมด 13 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ดอก เมื่อพ่นเชื้อรา *C. eragrostidis* ไปแล้ว จะปิดปากถุง เพื่อให้เกิดสภาพชื้นในถุง บ่มไว้ 1 คืน แล้วจึงนำถุงออก ตรวจสอบการทดลองเมื่อครบ 7 และ 14 วัน หลังการปลูกเชื้อโรคด้วยการประเมินการเกิดโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมและวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5. การทดสอบประสิทธิภาพสารบางชนิดที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรคดอกจูดสนิมในกล้วยไม้

5.1 การเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* บนข้าวสุกนึ่งฆ่าเชื้อ ที่เติมสารบางชนิดที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ

ชั่งปลายข้าวสาร 100 กรัม และน้ำ 50 มิลลิลิตร ตวงใส่ถุงร้อนขนาด 8 x 12 นิ้ว แล้วเติมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase ชนิดต่าง ๆ คือ yeast extract (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก), colloidal chitin (1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง), chitin flake (5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) เพียงชนิดเดียว หรือ 2 ชนิด ร่วมกัน กรรมวิธีไม่เติมสารใด ๆ ถือเป็นกรรมวิธีควบคุม เติม stock salt solution ที่เตรียมโดยการผสม NH_4NO_3 0.5 เปอร์เซ็นต์, KH_2PO_4 0.2 เปอร์เซ็นต์, NaCl 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร ในทุก ๆ ถุง ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อถุง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ความเข้มข้น 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อถุง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (4 วัน) ดัดแปลง ตามวิธีการของ Nampoothiri (2004)

5.2 การทดสอบความสามารถของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ที่เลี้ยงบนข้าวสุกและเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Curvularia eragrostidis*

เนื่องจากเชื้อรา *T. harzianum* เป็นเชื้อราที่เจริญได้ค่อนข้างเร็ว จึงคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โดยพิจารณาจากความสามารถในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. eragrostidis* แล้วจึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้ดีเพื่อนำไปทดสอบต่อไป

เตรียมสปอร์แขวนลอยของ *C. eragrostidis* ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ด้วยการกวาดสปอร์ของเชื้อราลงน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer แล้วปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยให้ได้ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย haemocytometer

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราทดสอบ โดยเลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 บนปลายข้าวที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (ตามวิธี 5.1) ใส่สปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อกรรมวิธีต่อถุง บ่มไว้ได้แสงให้ครบ 5-7 วัน ที่อุณหภูมิปกติ เมื่อเชื้อรา *T. harzianum* สร้างสปอร์สีเขียวเต็มถุง (เชื้อสด) จึงเก็บเข้าห้องเย็นและนำไปใช้ในขั้นต่อไป

เตรียมสารกรอง (culture filtrate) ด้วยการชั่งเชื้อสดในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ลิตร(เชื้อสด 1 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร) แช่ไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมงก่อนนำของเหลวที่ได้ไปกรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาดช่อง 0.2 ไมโครเมตร เก็บสารกรองไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบในขั้นต่อไป โดยมีกรรมวิธีต่างๆ ที่ใช้เลี้ยงเชื้อสดก่อนเตรียมเป็นสารกรอง ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ yeast extract (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (T50)

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ yeast extract (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) และ colloidal chitin (1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (T50)

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ yeast extract (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) และ chitin (5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (T50)

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ chitin (5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (T50)

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ colloidal chitin (1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (T50)

กรรมวิธีที่ 6 เติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (T50) อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 7 ใส่ yeast extract (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01)

กรรมวิธีที่ 8 ใส่ yeast extract (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) และ colloidal chitin (1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01)

กรรมวิธีที่ 9 ใส่ yeast extract (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) และ chitin (5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01)

กรรมวิธีที่ 10 ใส่ chitin (5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01)

กรรมวิธีที่ 11 ใส่ colloidal chitin (1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) ลงในข้าว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อน แล้วเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01)

กรรมวิธีที่ 12 เติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (T50) อย่างเดียว

หยดสปอร์แขวนลอยของ *C. eragrostidis* ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ลงในสไลด์หลุม (depression slide) หลังจากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ หรือสารกรองปริมาตร เท่ากันลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในกล่องพลาสติกขึ้น ทำกรรมวิธีละ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ย้อมสไลด์ด้วยสี acid fushin ก่อนตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการงอกของสปอร์ และวัดความยาวของ germ tube โดยนับ 10 สปอร์ต่อสไลด์ในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนเชื้อราทดสอบและสารกรอง

ตรวจผลและวิเคราะห์ผลทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (P=0.05)

5.3 ความสามารถของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ที่เลี้ยงบนข้าวสุกและเติมสารเพิ่มประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis*

หยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* ลงบนสไลด์หลุม บ่มเชื้อในสภาพเดียวกันกับการทดสอบความสามารถของสารกรองจากเชื้อราปฏิชีวนะ ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. eragrostidis* (ตามข้อ 5.2) หลังจากนั้น 18 ชั่วโมง นำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการงอกเป็น germ tube แล้วจึงหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิชีวนะทดสอบลงไป บ่มเชื้อต่ออีก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาย้อมด้วยสี acid fushin ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตการเจริญของเส้นใย โดยนับ 10 สปอร์ต่อสไลด์ ในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อแทนเชื้อราปฏิชีวนะ

ตรวจผลและวิเคราะห์ผลทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (P=0.05)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เลี้ยงบนอาหารที่ผสมสารเพิ่มประสิทธิภาพ ในการควบคุมโรคดอกจุกสนิมในสภาพโรงเรือน

6.1 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค เช่นเดียวกับข้อ 4.1.1

6.2 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราทดสอบ เช่นเดียวกับข้อ 5.1 และ 5.2

6.3 การเตรียมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่นเดียวกับข้อ 4.1.3

6.4 การเตรียมช่อดอก เช่นเดียวกับข้อ 4.1.4

6.5 การปฏิบัติ ห่อช่อดอกกล้วยไม้ด้วยถุงพลาสติกใส ที่ตัดปลายถุงไว้สำหรับการพันเชื้อปฏิชีวนะและเชื้อทดสอบ พันสารกรองหรือสปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 และ CB-Pin-01 ชนิดสด ที่เลี้ยงในข้าวสุกนิ่งมาเชื้อที่เดิม และไม่สารเพิ่มประสิทธิภาพ ในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อ 100 ลิตร หรือสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

mancozeb ในบางกรรมวิธีด้วยอัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร บริเวณช่อดอก ที่หุ้มพลาสติกตัดปลายไว้แล้วให้ห่มช่อดอกในเวลาเย็น มัดถุงให้ความชื้น บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ก่อนพ่นสปอร์แขวนลอย ที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของเชื้อรา *C. eragrostidis* ในวันที่ 5 หลังจากพ่นสารกรองหรือสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือสารเคมี mancozeb ไปแล้ว โดยกำหนดเป็นกรรมวิธีไว้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นสารกรองจากน้ำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (T50) ที่ได้จากการเลี้ยงไว้ในข้าว ที่ผสม chitin (5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารกรองจากน้ำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่เลี้ยงไว้ในข้าว ที่ผสม colloidal chitin (1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง) ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 3 พ่นสารกรองของน้ำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่เลี้ยงไว้ในข้าว ที่ผสม yeast extract (2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* (T50) ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 5 พ่นสารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 6 พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* (T50) ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 7 พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 8 พ่นสารเคมี mancozeb ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค

กรรมวิธีที่ 9 พ่นเชื้อรา *C. eragrostidis* อย่างเดียว (control +)

กรรมวิธีที่ 10 ฟ่นน้ำเปล่า (control -)

การทดสอบบนช่อกกล้วยไม้ทั้งหมด 10 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ช้ำ ช้ำละ 4 ดอก เมื่อฟ่นเชื้อโรคไปแล้ว ปิดปากถุง เพื่อให้เกิดความชื้นสัมพัทธ์ในถุง บ่มไว้ 1 คืนแล้วจึงนำถุงออกตรวจผลการทดลองเมื่อครบ 10 วันหลังการปลูกเชื้อโรคโดยประเมินการเกิดโรคเป็นเปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบ กับกรรมวิธีควบคุมและวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (P=0.05)

7. ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

เตรียมสปอร์แขวนลอยของ *C. eragrostidis* ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วันด้วยการกวาดสปอร์ของเชื้อราลงน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer แล้วปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยให้ได้ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วย haemocytometer

เตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในรูปเชื้อสด ตามวิธีการของ จิระเดช และ วรณวิไล (2545) โดยนำปลายข้าวหอมมะลิผสมกับน้ำในอัตราข้าว 3 ส่วน น้ำ 2 ส่วนโดยปริมาตร หุงสุกโดยใช้หม้อหุงข้าวไฟฟ้าอัตโนมัติ เมื่อข้าวสุกแล้ว ใช้ทัพพีชวยข้าวในหม้อให้ทั่ว ตักข้าวใส่ถุงพลาสติกขนาด 8 x 12 นิ้ว ปริมาณ 250 กรัมต่อถุง หรือประมาณ 2 ทัพพีพูนใน 1 ถุง ขณะข้าวยังร้อน พับปากถุง ใช้นิ้วเกลี่ยข้าวให้แบนเพื่อรีดอากาศออกจากถุง ให้ถุงพลาสติกแนบกับข้าว รองข้าวอุ่นจนเกือบเย็น แล้วใส่ชิ้นวุ้นของเชื้อรา *Trichoderma* ที่เลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3-4 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะเชื้อจากจานเลี้ยงเชื้อ นำชิ้นวุ้นมาใส่ในถุงข้าว จำนวน 3-4 ชิ้นต่อ 1 ถุง คลุกเคล้าให้เชื้อกระจายอย่างทั่วถึง รัดปากถุงด้วยยางวง หรือใช้ลวดเย็บกระดาษ แล้วใช้เข็มที่สะอาดแทงบริเวณด้านบนรอบ ๆ ปากถุง ประมาณ 15-20 รู เพื่อให้มีอากาศเข้าไปภายในถุงเพื่อช่วยในการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* แผ่ข้าวสุกในถุงให้แบนราบ แล้วดึงบริเวณกลางถุงให้พองขึ้น เพื่อให้มีอากาศถ่ายเทภายในถุงได้ วางในที่ที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก และมีแสงสว่างเพียงพอ อาจวางภายใต้แสงจากหลอดนีออนก็ได้ โดยการวางถุงต้องไม่วางซ้อนทับกัน เมื่อบ่มถุงข้าวครบ 2 วัน เขย่าข้าวในถุงเบา ๆ ให้เส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* กระจายทั่วทั้งถุง แล้วบ่มเชื้อต่อไปอีก 5 วัน เมื่อครบ 7 วัน ก็จะได้เชื้อสด ที่เจริญปกคลุมเมล็ดข้าวสุกจนเห็นเป็นสปอร์สีเขียวเจริญอยู่เต็มถุงพร้อมนำไปใช้ หรือนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หากยังไม่นำไปใช้

การปฏิบัติ ห่อช่อดอกกล้วยไม้ด้วยถุงพลาสติกใส ที่ตัดปลายถุงไว้สำหรับการพ่นเชื้อ ปฏิบัติและเชื้อทดสอบ พ่นสปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ชนิดสด ที่เลี้ยงในข้าวสุก ในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อ 100 ลิตร บริเวณช่อดอก ที่หุ้มพลาสติกตัดปลายไว้แล้ว พ่นให้ชุ่มช่อดอก มัดถุงให้ความชื้น โดยกำหนดเป็นกรรมวิธีไว้ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นน้ำเปล่า (control-)

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) อย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อรา *C. eragrostidis* อย่างเดียว (control+)

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) พร้อมกับ พ่นเชื้อรา

C. eragrostidis

กรรมวิธีที่ 5 พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ก่อน 3 วัน แล้วพ่นเชื้อรา

C. eragrostidis

การทดสอบบนช่อดอกกล้วยไม้ทั้งหมด 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ช่้า ช่้าละ 3 ดอก เมื่อพ่นเชื้อโรคลงไปแล้ว ปิดปากถุง เพื่อให้เกิดความชื้นสัมพัทธ์ในถุง บ่มไว้ 1 คืนแล้วจึงนำถุงออก ทำการตัดดอกกล้วยไม้ เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ chitinase และเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในดอกกล้วยไม้ทุกวัน โดยเริ่มวัดการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 12 ตรวจนับปริมาณการเกิดโรคโดยนับจำนวนจุดต่อดอก เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมและวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test ($P=0.05$)

เตรียมตัวอย่างดอกกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากปลูกเชื้อ เก็บตัวอย่างมาตัดดอกเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปบดในโกร่งที่แช่เย็น โดยใช้ตัวอย่างดอก 0.5 กรัมต่อสารละลาย acetate buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดจนละเอียด คูดตัวอย่างที่บดแล้วไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ β -1,3-glucanase หรือเก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวัดกิจกรรมต่อไป

7.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase

เตรียม colloidal chitin เพื่อใช้เป็น substrate ด้วยการผสมน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออัตรา 0.25 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร ใส่วัสดุของตัวอย่างกล้วยไม้ที่ต้องการวิเคราะห์มา 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร ในหลอด microtube นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำละลาย colloidal chitin ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เปิดฝา microtube ก่อนนำไปต้มบน hot plate อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างที่ได้ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้ว (อัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร) แล้วเติม copper acetate ($C_4H_6CuO_4$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว นำไปปั่นด้วย vortex ก่อนต้มบน hot plate ในขณะที่น้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงโดยแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส แล้วเติมน้ำละลาย Nelson's reagent 1 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐานโดย NAG เป็นสารมาตรฐานในการคำนวณกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 3) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Nelson, 1944)

1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิด N-acetylglucosamine 1 ไมโครกรัม ใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

7.2 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase

เตรียม laminarin เพื่อใช้เป็น substrate ด้วยการผสมน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออัตรา 0.075 กรัม ต่อ น้ำ 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ก่อน ใส่วัสดุของตัวอย่างกล้วยไม้ที่ต้องการวิเคราะห์มา 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำ 0.4 มิลลิลิตรในหลอด microtube นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำละลาย laminarin ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เสร็จแล้วเปิดฝา microtube นำไปต้มบน hot plate เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดแก้ว (อัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร) แล้วเติม copper

acetate ($C_4H_6CuO_4$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้ว นำไปปั่นด้วย vortex แล้วต้มบน hot plate ในขณะที่น้ำเดือด เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิลงโดยแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลาย Nelson's reagent 1 มิลลิลิตรลงไปผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อนำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase ในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานในการคำนวณกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 2) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Nelson, 1944)

1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครกรัม ใน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry *et al.*, 1957)

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำนิ่งมาเชื้อที่ความเข้มข้น 1: 5 ใช้ pipette ดูดมาใส่ในหลอดแก้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย alkaline copper 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วเติมสารละลาย Folin-ciocalteu phenol reagent โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ วัดการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าที่ได้เพื่อหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน (ภาพผนวกที่ 1) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพและเรือนกล้วยไม้ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน ธันวาคม 2547 - กุมภาพันธ์ 2550

ผลและวิจารณ์

1. การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Dual culture

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 14 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* บนอาหาร PDA ปรากฏว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา อยู่ที่ระหว่าง 52.67 - 60 % สายพันธุ์ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงสุด 3 สายพันธุ์แรก คือ M23, 84-42 และ CB-Pin-01 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 60, 59 และ 57.67 % ตามลำดับ ส่วนอัตราการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา อยู่ที่ระหว่าง 0 - 1.88 เซนติเมตรต่อวัน โดยมี 2 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้คือ สายพันธุ์ DU-07 และ TL-01 โดยสายพันธุ์ TL-01 พบบริเวณใส (clear zone) ระหว่างบริเวณที่เส้นใยของทั้งสองเชื้อราเจอมาพบกัน (ตารางที่ 1)

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้และมีอัตราการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้ค่อนข้างสูง เพราะเชื้อรา *T. harzianum* เป็นเชื้อราชั้นสูงที่มีการเจริญโดยสร้างเส้นใยและสปอร์ได้อย่างรวดเร็ว และมีจำนวนมาก ดังรายงานของจิระเดช และ วรณวิไล (2542) ที่รายงานไว้ว่าเชื้อรา *Trichoderma* มีคุณสมบัติและศักยภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชใน 3 ลักษณะ คือ การแข่งขันด้านปัจจัยในการดำรงชีวิตกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช (competition) ซึ่งจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดที่มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วจะได้เปรียบในเรื่องของการแข่งขันด้านการใช้ปัจจัยในการเจริญกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ดี การเป็นปรสิต(parasite) และการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) เป็นต้น

ตารางที่ 1 เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งและอัตราการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยวิธี Dual culture technique

สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ^{1/}	อัตราการเจริญคลุมทับ ^{2/}	รูปแบบการเจริญคลุมทับ ^{3/}
<i>T. harzianum</i>			
M4	53.33 e ^{4/}	1.25 d ^{5/}	A2
84-42	59.00 ab	1.25 d	A2
71-42	53.33 e	0.94 f	A2
BK-04	56.00 cd	1.25 d	A2
CB-Pin-01	57.67 a-c	1.25 d	A2
SM-3-2	56.67 bc	1.50 b	A2
T2R2-31	57.67 a-c	1.50 b	A2
M23	60.00 a	1.88 a	A2
TH-01	57.34 bc	1.07 e	A2
T50	54.00 de	1.25 d	A2
T0.01	56.67 bc	1.25 d	A1
CIT 17	52.67 e	1.07 e	A2
<i>T. longibrachiatum</i>			
TL-01	56.67 bc	0.00	B1
<i>T. pseudokoningii</i>			
DU-07	53.33 e	0.00	B2

หมายเหตุ ^{1/} เปรอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* คำนวณจากระยะการเจริญ (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในงานเลี้ยงเชื้อทดสอบเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับระยะการเจริญของเชื้อในงานควบคุม ตามสูตร $\frac{C - T}{C} \times 100$

C = ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชในงานควบคุม
 T = ระยะการเจริญของเส้นใย (รัศมีโคโลนี) ของเชื้อโรคพืชที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อปฏิปักษ์หลังหยุดการเจริญ

^{2/} ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำของอัตราการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละสายพันธุ์เจริญคลุมทับเส้นใย เชื้อโรคจนเต็มหรือสุดขอบจานเลี้ยงเชื้อโดยใช้ สูตร $\frac{D \times 1}{T}$
(เซนติเมตรต่อวัน)

D = ระยะทางที่เชื้อปฏิปักษ์เจริญคลุมทับเชื้อโรค เริ่มต้นจากจุดที่เส้นใยเชื้อทั้งสองพบกัน (เซนติเมตร)

T = ระยะเวลาที่เชื้อปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์ใช้ในการเจริญคลุมทับเชื้อโรคจนสุดขอบจานเลี้ยงเชื้อ (วัน)

^{3/} รูปแบบการเจริญคลุมทับ

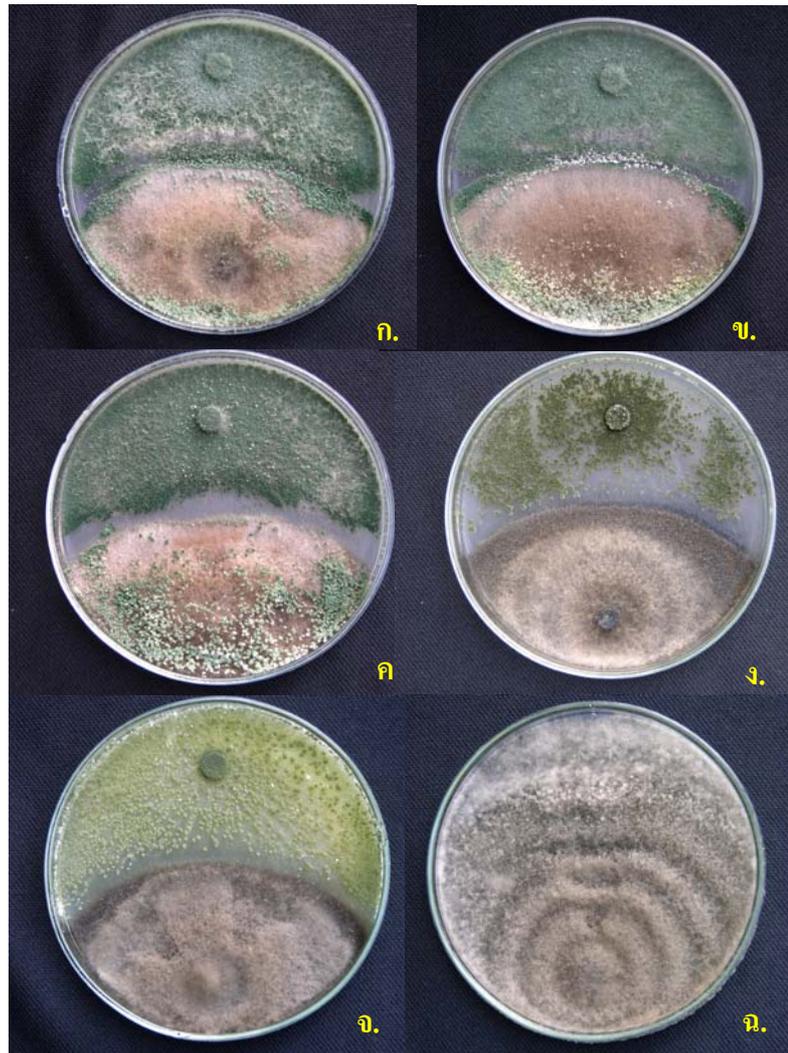
A = เส้นใยของ *C. eragrostidis* เจริญมาสัมผัสกับโคโลนีของเชื้อทดสอบแล้วหยุดการเจริญ ต่อมาส่วนของเชื้อทดสอบเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้หมด หรือทำให้เส้นใยของ *C. eragrostidis* เกิด lysis ได้หมด

A1 = เกิด clear zone A2 = ไม่เกิด clear zone

B = เส้นใยของ *C. eragrostidis* เจริญมาสัมผัสกับโคโลนีของเชื้อทดสอบแล้วหยุดการเจริญทั้งสองฝ่าย มีการสร้าง clear zone ขึ้น

B1 = เกิด clear zone B2 = ไม่เกิด clear zone

^{4/ และ 5/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปรียบเทียบทางสถิติ โดย Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05)

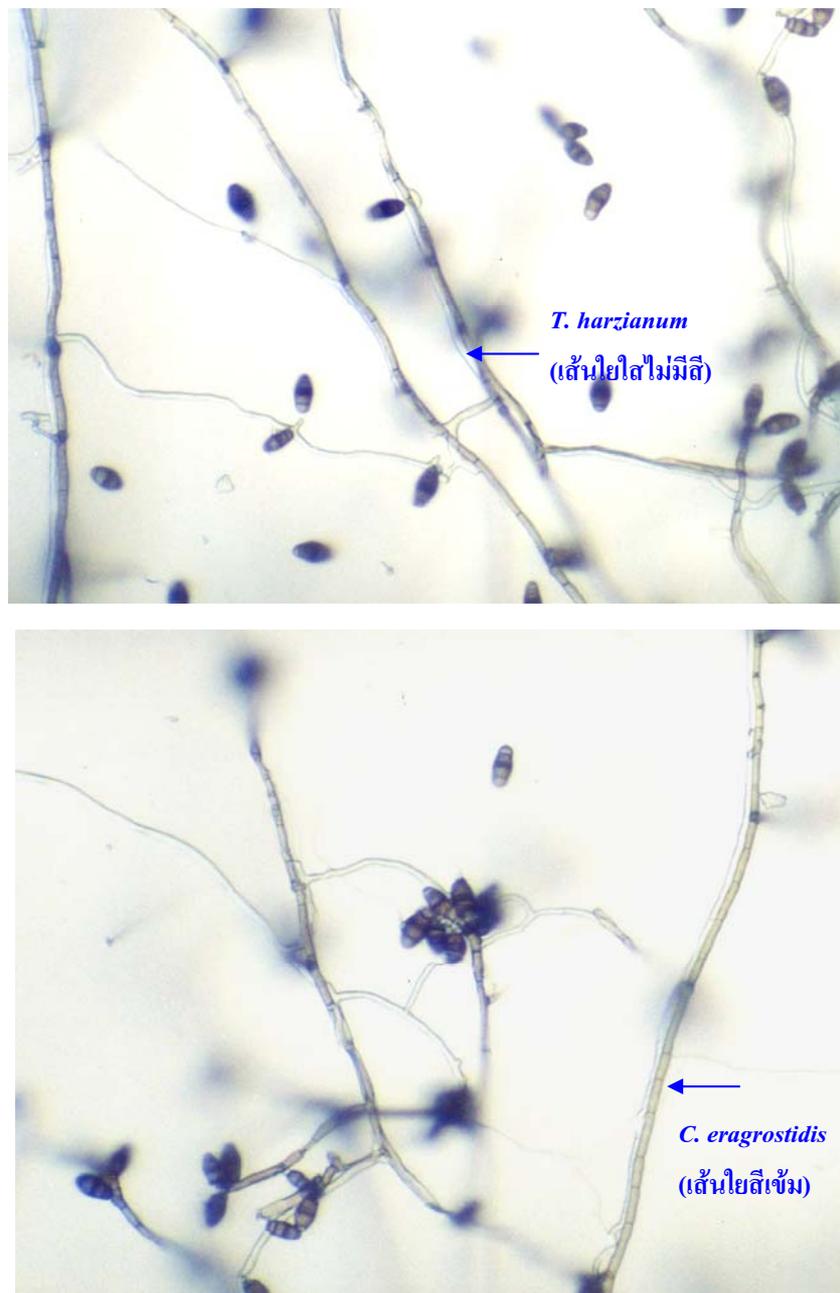


ภาพที่ 1 รูปแบบการเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* แบบต่าง ๆ ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

- ก. *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 รูปแบบการเจริญคลุมทับแบบ A2
- ข. *T. harzianum* สายพันธุ์ T50 รูปแบบการเจริญคลุมทับแบบ A2
- ค. *T. harzianum* สายพันธุ์ T0.01 รูปแบบการเจริญคลุมทับแบบ A1
- ง. *T. longibrachiatum* สายพันธุ์ TL-01 รูปแบบการเจริญคลุมทับแบบ B2
- จ. *T. pseudokoningii* สายพันธุ์ DU-07 รูปแบบการเจริญคลุมทับแบบ B1
- ฉ. *C. eragrostidis* (control)

2. การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ด้วยวิธี Slide culture

จากการศึกษากลไกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *T. harzianum* ด้วยวิธี Slide culture พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถเจริญพันธุ์และแนบชิดไปกับเส้นใยของเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้ (ดังภาพที่ 2) ซึ่งในการศึกษากลไกการเป็นปฏิปักษ์นี้ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของขวัญเนตร (2549) ที่อธิบายถึงการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ที่สามารถพันธุ์และแนบชิดไปกับเส้นใย และสามารถย่อยสลายองค์ประกอบภายในเส้นใยของเชื้อรา *Pseudocercospora fuligina* ได้ และในการศึกษาของ Elad *et al.* (1983) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน มีคุณสมบัติในการเป็น parasite กับเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช เช่น เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. โดยการเข้าทำลายเส้นใยด้วยการพันรัดรอบเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* Sacc. ย่อยสลายผนังเซลล์ และเจริญเข้าไปข้างในเส้นใยโดยตรง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อรา *T. harzianum* มีกลไกในการเป็นปรสิต สามารถเจริญพันธุ์เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ และมีการสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา เช่น chitinase cellulase และ β -1,3-glucanase เป็นต้น ทำให้เกิดการสลายตัวของผนังเส้นใยเป็นอาหาร ทำให้เกิดการฉีกขาด และสลายในส่วน of ผนังเซลล์ ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของของเหลวภายในเซลล์ ตลอดจนเกิดการตกตะกอนของ organelles และ cytoplasm ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชตายในที่สุด (Lorito *et al.*, 1994)



ภาพที่ 2 การพันรัดและแนบชิดเส้นใยเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ของ
เส้นใยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01)

3. การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย Dialysis membrane technique

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. eragrostidis* ด้วย Dialysis membrane technique พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 14 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้ทั้งหมด สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีคือ T2R2-33, DU-07, BK-04 และ CB-Pin-01 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อโรคได้ 1.50, 1.51, 1.55 และ 1.59 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อครบ 3 วัน หลังจากวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. eragrostidis* การใช้สารเคมี mancozeb พบว่ายับยั้งเชื้อโรคได้อย่างสมบูรณ์ (ไม่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคเกิดขึ้น) ขณะที่กรรมวิธีควบคุม (control+) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อโรคได้ 5.06 เซนติเมตร ซึ่งมีความสูงกว่าทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.05$)

จากการปล่อยให้เชื้อรา *C. eragrostidis* เจริญต่อจนครบ 6 วัน พบว่าสารทุติยภูมิที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ผลิตขึ้นมานั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *C. eragrostidis* ให้เจริญช้าลงได้ทั้งหมด สารเคมี mancozeb มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุด คือไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อโรค ขณะที่สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ คือ BK-04, DU-07, CB-Pin-01, T2R2-33 และ TL-01 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อโรคได้ 2.53, 2.56, 2.90, 2.91 และ 3.24 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control) ที่วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อโรคได้ 8.9 เซนติเมตร (เชื้อโรคเจริญเต็มจาน) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.05$) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 3)

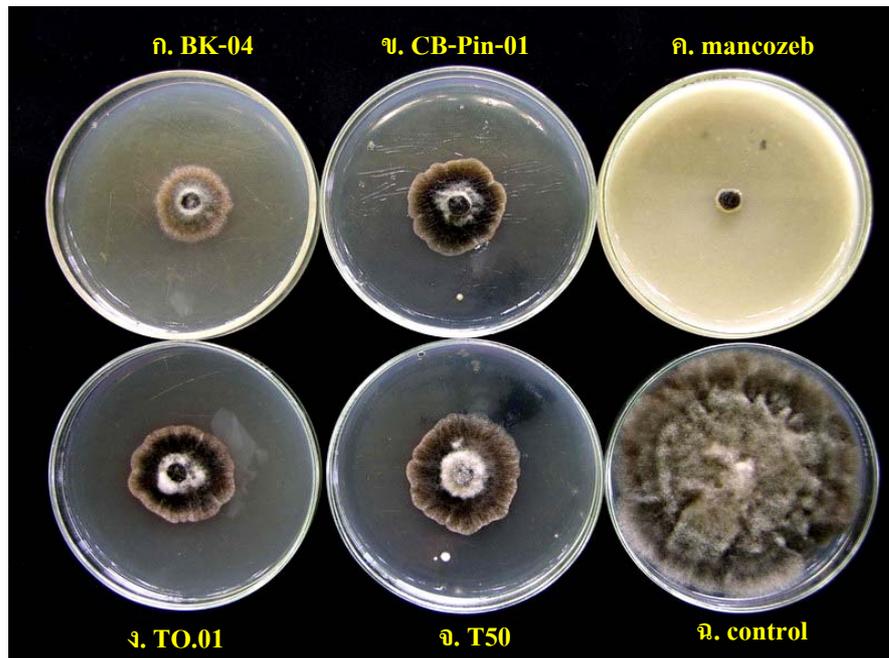
จากผลการทดสอบด้วย Dialysis membrane technique แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารทุติยภูมิซึมผ่านแผ่นเซลโลเฟนลงไปสะสมอยู่ในอาหาร PDA ได้ ช่วยให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* ซึ่งได้ผลในทำนองเดียวกันกับการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ด้วยเชื้อรา *T. harzianum* โดย Intana (2003) ซึ่งในกระบวนการผลิตสารจากเมทาบอลิซึมของเชื้อรา *Trichoderma* spp. นี้มีผลในการยับยั้งหรือต่อต้านต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหรือจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น trichodermin trichozinianines pentyl pyrone และ oxazole เป็นต้น (Intana, 2003)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ซึมผ่านแผ่นเซลโลเฟน ด้วย Dialysis membrane technique ภายหลังการบ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ที่ 3 วัน และ 6 วัน หลังจากการปลูกเชื้อ

สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (cm) ^{1/}		การยับยั้งเส้นใยเชื้อโรค (%) ^{1/}	
	3 วัน	6 วัน	3 วัน	6 วัน
<i>T. harzianum</i>				
M4	2.29 cd ^{2/}	4.13 de ^{2/}	54.74	53.30
84-42	1.85 d-f	3.88 d-f	63.44	56.40
71-42	3.00 b	5.59 b	40.71	37.19
BK-04	1.55 f	2.53 i	69.37	71.57
CB-Pin-01	1.59 f	2.90 hi	68.58	67.42
SM-3-2	1.74 ef	3.65 e-h	65.61	58.99
T2R2-33	1.50 f	2.91 g-i	70.36	67.30
M23	2.55 c	4.99 bc	49.60	43.93
TH-01	1.73 ef	3.64 e-h	65.81	59.10
T50	1.70 ef	3.75 e-g	66.40	57.87
TO.01	1.71 ef	3.46 e-h	66.21	61.12
CIT 17	2.08 de	4.63 cd	58.89	47.98
<i>T. longibrachiatum</i>				
TL-01	1.93 d-f	3.24 f-i	61.86	63.60
<i>T. pseudokoningii</i>				
Du-07	1.51 f	2.56 i	70.16	71.24
control	5.06 a	8.90 a	-	-
mancozeb	0.10 g	0.10 j	98.02	98.88

หมายเหตุ ^{1/} วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร) ของโคโลนีเชื้อรา *C. eragrostidis* ที่ 3 และ 6 วัน หลังจากการปลูกชิ้นวุ้นเชื้อโรคบนอาหาร PDA ที่นำชิ้นวุ้น *Trichoderma* spp. และแผ่นเซลโลเฟน ณ ตำแหน่งเดียวกันออกไป คัดเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเส้นใยเชื้อโรคเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบทางสถิติ โดย Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05)



ภาพที่ 3 โคลนินของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* บนอาหาร PDA เมื่อครบ 6 วัน
 หลังจากนำแผ่นเซลโลเฟนที่มีเชื้อรา *Trichoderma* spp. ออก

ก. *T. harzianum* สายพันธุ์ BK-04
 ข. *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01
 ค. อาหาร PDA ผสมสารเคมี mancozeb
 ง. *T. harzianum* สายพันธุ์ TO.01
 จ. *T. harzianum* สายพันธุ์ T50
 ฉ. *C. eragrostidis* (control)

4. การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01) ในการควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย ในสภาพโรงเรือน

4.1 การใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ชนิดสด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ชนิดสด ซึ่งเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้วเตรียมในรูปสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* บนดอกกล้วยไม้ เมื่อพ่นสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของเชื้อโรครักษาความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ไปแล้ว เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน เปรียบเทียบกับการพ่นสารเคมี mancozeb แทนเชื้อรา *T. harzianum* ปรากฏว่าจำนวนจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการพ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) มีจำนวนลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control+) โดยพบจำนวนจุดระหว่าง 11.22 - 74.44 จุดต่อดอก ขณะที่กรรมวิธีที่พ่นแต่เชื้อโรครอย่างเดียว (กรรมวิธีควบคุม) มีจำนวนจุดสนิม 220.11 จุดต่อดอก คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของโรคเท่ากับ 66.18- 94.90 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ส่วนกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดจุดสนิม คือ กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ลงบนดอกกล้วยไม้ก่อนพ่นเชื้อโรครเป็นเวลา 3 หรือ 5 วัน ซึ่งให้ผลดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี mancozeb ที่ 1,200 ppm (ตารางที่ 3)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ชนิดสดในรูปของสปอร์แขวนลอย สามารถใช้พ่นเพื่อป้องกันโรคจุดสนิมของดอกกล้วยไม้ได้ โดยมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้สารเคมี mancozeb ดังนั้นการพ่นเชื้อรา *T. harzianum* อย่างต่อเนื่องก่อนที่เชื้อโรครจะเข้าทำลายอาจจะช่วยป้องกันการเกิดโรคจุดสนิมได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น การพบจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ในกรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ได้ปลูกเชื้อรา *C. eragrostidis* จำนวนเล็กน้อย อาจเกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อโรครมาบนดอกก่อนที่จะนำมาใช้ทดสอบหรือเชื้อที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ

ตารางที่ 3 การลดการเกิดโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย หลังจากพ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01) ชนิดสด ภายใต้อุณหภูมิโรงเรือน

กรรมวิธี	จำนวนจุดต่อดอก ^{1/}	ลดการเกิดโรค (%)
พ่นสปอร์แขวนลอยของ CB-Pin-01		
ก่อนพ่นเชื้อโรค 1 วัน	74.44 b ^{3/}	66.18 ^{2/}
ก่อนพ่นเชื้อโรค 2 วัน	62.56 b	71.58
ก่อนพ่นเชื้อโรค 3 วัน	44.44 bc	79.81
ก่อนพ่นเชื้อโรค 4 วัน	62.66 b	71.53
ก่อนพ่นเชื้อโรค 5 วัน	49.22 bc	77.64
พ่น mancozeb ก่อน		
พ่นเชื้อโรค 1 วัน	13.11 c	94.04
พ่นเชื้อโรค 2 วัน	20.56 c	90.66
พ่นเชื้อโรค 3 วัน	11.22 c	94.90
พ่นเชื้อโรค 4 วัน	23.45 c	89.35
พ่นเชื้อโรคอย่างเดียว (control+)	220.11 a	0.00
พ่นสปอร์แขวนลอยของ CB-Pin-01 (control)	11.56 c	94.75
พ่นน้ำเปล่า (control-)	13.00 c ^{4/}	94.10

หมายเหตุ ^{1/} ตรวจนับจำนวนจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ เมื่อครบ 10 วัน หลังปลูกเชื้อรา

C. eragrostidis ใช้แวนขยายช่วยในการนับจำนวนจุด โดยนับทั้งหน้าและหลังดอก รวมกันต่อ 1 ดอก ในการทดลองแบ่งการทดลองเป็น 10 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ดอก

^{2/} เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค คัดจากจำนวนจุดสนิมที่ลดลงจากกรรมวิธีควบคุม

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบทางสถิติ โดย Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05)

^{4/} จำนวนจุดสนิมที่เกิดจากเชื้อโรคซึ่งมีอยู่ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

จากการทดสอบเรื่องการลดการเกิดโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวายในสภาพโรงเรือนนั้น พบว่าการปลูกเชื้อโรค *C. eragrostidis* ในรูปสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (กรรมวิธีควบคุม) ที่พ่นเชื้อโรคอย่างเดียว มีการเกิดโรคที่

รุนแรงมาก ประกอบกับในช่วงเวลาของการทดลอง สภาพแวดล้อมมีความเหมาะสมต่อการเกิดโรคมาก คือมีฝนตกชุก อากาศร้อนชื้น โรงเรือนมีความชื้นสูง จึงทำให้อาการของโรคดอกจูดสนิมมีความรุนแรงมากกว่าปกติ ในการทดลองครั้งต่อไป ควรลดปริมาณของเชื้อโรคให้น้อยลง เช่น อาจลดเป็นความเข้มข้นที่ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หรือเลือกทำการทดลองในช่วงที่ฝนทิ้งช่วง พยายามอย่าให้โรงเรือนมีความชื้นสูงมาก ๆ จะทำให้การเกิดโรคไม่รุนแรงมากเกินไป เพราะสภาพแวดล้อมก็เป็นส่วนที่สำคัญของการแสดงอาการของโรคนั้น ๆ จึงทำให้สามารถตรวจผลได้ไม่คลาดเคลื่อนมากนัก

4.2 การใช้สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ชนิดสด ร่วมกับสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (colloidal chitin 5 %)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ชนิดสด (ข้าวสุก) และ *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่เลี้ยงในอาหาร (ข้าวสุก) ที่ผสมด้วย colloidal chitin (c-chitin) 5 % ในอัตรา 5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (W/V) ซึ่งเตรียมในรูปสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ที่ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eragrostidis* บนดอกกล้วยไม้ เมื่อพ่นเชื้อโรคที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากฉีดพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) และ เชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่ผสมด้วย colloidal chitin 5 % ไปแล้ว เป็นเวลา 3, 4 และ 5 วัน เปรียบเทียบกับสารเคมี mancozeb แทนเชื้อรา *T. harzianum* ปรากฏว่าจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการพ่นด้วยเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) มีจำนวนลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (control+) โดยพบว่ามีจำนวนจุดบนดอกกล้วยไม้ระหว่าง 7.56 – 25.78 จุดต่อดอก ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นแต่เชื้อโรคอย่างเดียว (กรรมวิธีควบคุม) มีจำนวนจุดสนิม 46.33 จุดต่อดอก กรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเกิดจุดสนิม คือ กรรมวิธีที่ใช้ *T. harzianum* ที่เลี้ยงบนอาหาร (ข้าวสุก) ที่ผสมด้วย colloidal chitin (c-chitin) 5% ที่ 5 วันและกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีที่ 5 และ 3 วัน โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนจุด เท่ากับ 7.56 , 10.56 และ 10.89 จุด/ดอก ตามลำดับ การใช้ *T. harzianum* (CB-Pin-01) พ่นก่อน 5 วัน กับการใช้สารเคมีที่ 3 และ 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.05$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การลดการเกิดโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย หลังจากพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01) ที่เลี้ยงบนข้าวสุก และ *T. harzianum* (CB-Pin-01) ที่เลี้ยงบนข้าวสุกที่ผสมด้วย colloidal chitin 5% (c-chitin) พ่นลงบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ภายใต้สภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	จำนวนจุด / 1 ดอก ^{1/}	การลดลงของ โรค (%)
พ่น CB-Pin-01 ก่อน 3 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค	21.78 bc ^{2/}	52.99
พ่น CB-Pin-01 ก่อน 4 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค	17.00 cd	63.31
พ่น CB-Pin-01 ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค	14.33 c-e	69.07
พ่น CB-Pin-01 + (c-chitin) ก่อน 3 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค	25.78 b	44.36
พ่น CB-Pin-01 + (c-chitin) ก่อน 4 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค	19.67 bc	57.54
พ่น CB-Pin-01 + (c-chitin) ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค	7.56 e	83.68
พ่น mancozeb ก่อน 3 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค	10.89 de	76.49
พ่น mancozeb ก่อน 4 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค	16.89 cd	63.54
พ่น mancozeb ก่อน 5 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค	10.56 de	77.21
พ่นเชื้อโรค (control +)	46.33 a	0.00
พ่น <i>T. harzianum</i> (CB-Pin-01)	10.67 de	76.97
พ่น <i>T. harzianum</i> CB-Pin-01 + (c-chitin)	8.22 e	82.26
พ่นน้ำเปล่า (control -)	7.44 e	-

หมายเหตุ^{1/} ตรวจสอบจำนวนจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ เมื่อครบ 10 วัน หลังปลูกเชื้อรา

C. eragrostidis ใช้แว่นขยายในการนับจำนวนจุดโดยนับทั้งหน้าและหลังดอกรวมกัน
ต่อ 1 ดอก ในการทดลองแบ่งการทดลองเป็น 12 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ดอก

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์ โดย Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในข้าวสุกต่อการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis*

5.1 ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ที่เลี้ยงบนข้าวสุกซึ่งเติมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 0.2 %) ในการยับยั้งการงอกของสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. eragrostidis* โดยหยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* และสารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* 0.02 มิลลิลิตร ลงในสไลด์หลุมพร้อมกัน หลังจาก 24 ชั่วโมง พบว่าการใช้สารกรองในทุกกรรมวิธีให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ใกล้เคียงกันเกือบทุกกรรมวิธี โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เท่ากับ 81.88 - 91.88 % คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของการงอกของสปอร์กับ 8.12- 21.25 % เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 5)

สารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ที่ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อราที่เจริญอยู่บนข้าวสุก ผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase ในกรรมวิธีต่าง ๆ ในอัตราเชื้อสด 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ลิตร แล้วกรองผ่านแผ่น membrane filter ขนาดช่อง 0.2 ไมครอน (μm) ทุกกรรมวิธีทั้งที่เติม 0.2 % yeast extract, 1 % colloidal chitin, chitin ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือร่วมกันและไม่เติมสารใด ๆ เลย สามารถยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของสปอร์เชื้อรา *C. eragrostidis* ได้ โดยมีค่าความยาวของเส้นใยมีค่าเท่ากับ 200.05 – 620.00 ไมครอน (μm) ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีความยาวเท่ากับ 880.23 ไมครอน (μm) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกรณีสายพันธุ์ T50 ที่เติม chitin ลงในอาหาร พบว่าให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยดีที่สุดโดยมีความยาวของเส้นใยเพียง 200.05 ไมครอน (μm) หรือความยาวลดลง 77.27 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ส่วนกรณีที่เติม yeast extract กลับพบว่าประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเส้นใยลดลง ส่วนการเติม chitin ร่วมกับ yeast extract หรือ yeast extract และ colloidal chitin ลงไปนั้นพบว่าให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยต่ำกว่าการเติม chitin เพียงอย่างเดียว สำหรับสายพันธุ์ CB-Pin-01 ทุกกรรมวิธีทั้งที่เติม 0.2 % yeast , chitin หรือ colloidal chitin อย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกัน หรือการไม่เติมสารใด ๆ เลย ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 และ T50) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนข้าวสุกผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 0.2 %) ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Curvularia eragrostidis* บนสไลด์หลุมที่ 24 ชั่วโมง หลังการทดสอบ

กรรมวิธี	การงอกของสปอร์ (%)	การลดลงของการงอกสปอร์ (%)
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01)		
+ 0.2 % yeast extract	87.50 b-d ^{uv}	12.50
+ 0.2% yeast extract + 1% colloidal-chitin	82.50 ef	17.50
+ 0.2% yeast extract + 5% chitin	81.88 ef	18.12
+ 5% chitin	90.00 bc	10.00
+ 1% colloidal chitin	81.88 ef	18.12
ไม่เติมสารใด ๆ (CB-Pin-01 อย่างเดียว)	90.63 bc	9.37
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (T50)		
+ 0.2 % yeast extract	88.13 b-d ^{uv}	11.87
+ 0.2% yeast extract + 1% colloidal-chitin	91.88 b	8.12
+ 0.2% yeast extract + 5% chitin	89.38 b-d	10.62
+ 5% chitin	78.75 f	21.25
+ 1% colloidal chitin	84.38 de	15.62
ไม่เติมสารใด ๆ (T50 อย่างเดียว)	86.25 c-e	13.75
Control (กรรมวิธีควบคุม)	100.00 a	-

หมายเหตุ ^{uv} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดย Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05)

กรณีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 2 สายพันธุ์ จะเห็นได้ว่าการเติม 0.2% yeast extract ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ T50 ไม่ได้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อโรคมามากนัก ขณะที่การเติม 0.2% yeast extract ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ CB-Pin-01 กลับให้ผลการยับยั้งที่ดีกว่า ในทางตรงกันข้ามเมื่อเปรียบเทียบการใช้ chitin ร่วมกับเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าการใช้ร่วมกับสายพันธุ์ T50 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคดีกว่า เมื่อใช้ร่วมกับสายพันธุ์ CB-Pin-01 อย่างไรก็ตามการใช้ colloidal chitin ร่วมกับเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในกรณีที่ไม่ใช้สารอะไรร่วมกับเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และในกรรมวิธีที่เติมทั้ง 0.2 % yeast extract และ colloidal chitin นั้น พบว่าการใช้ร่วมกับเชื้อราสายพันธุ์ T50 ให้ผลดี้อยกว่าการใช้ร่วมกับเชื้อสายพันธุ์ CB-Pin-01 ขณะที่การเติม 0.2 % yeast extract และ chitin ลงในอาหารที่เลี้ยงเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นให้ผลการยับยั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 และ 6 แสดงให้เห็นว่าการเติมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของสารกรองในการยับยั้งการงอกของสปอร์ แต่ในกรณีของการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ประสิทธิภาพของสารกรองขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่จะมีการตอบสนองต่อสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase แตกต่างกัน

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 และ T50) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนข้าวสุกผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 0.2 %) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* บนสไลด์หลุม

กรรมวิธี	ความยาวเส้นใย (μm) ^{1/}	การลดลงของความยาว เส้นใยเทียบกับ control (%)
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01)		
+ 0.2% yeast extract	280.70 d-f ^{2/}	68.11
+ 0.2% yeast extract + 1% colloidal chitin	240.35 ef	72.69
+ 0.2% yeast extract + 5% chitin	410.36 cd	53.38
+ 5% chitin	400.05 cd	54.55
+ 1% colloidal chitin	220.38 ef	74.96
ไม่เติมสารใด ๆ (CB-Pin-01 อย่างเดียว)	310.10 d-f	64.77
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (T50)		
+ 0.2% yeast extract	620.00 b ^{2/}	29.54
+ 0.2% yeast extract + 1% colloidal chitin	500.00 bc	43.20
+ 0.2% yeast extract + 5% chitin	350.18 c-e	60.22
+ 5% chitin	200.05 f	77.27
+ 1% colloidal chitin	360.60 c-e	59.03
ไม่เติมสารใด ๆ (T50 อย่างเดียว)	360.93 c-e	59.00
Control (กรรมวิธีควบคุม)	880.23 a	-

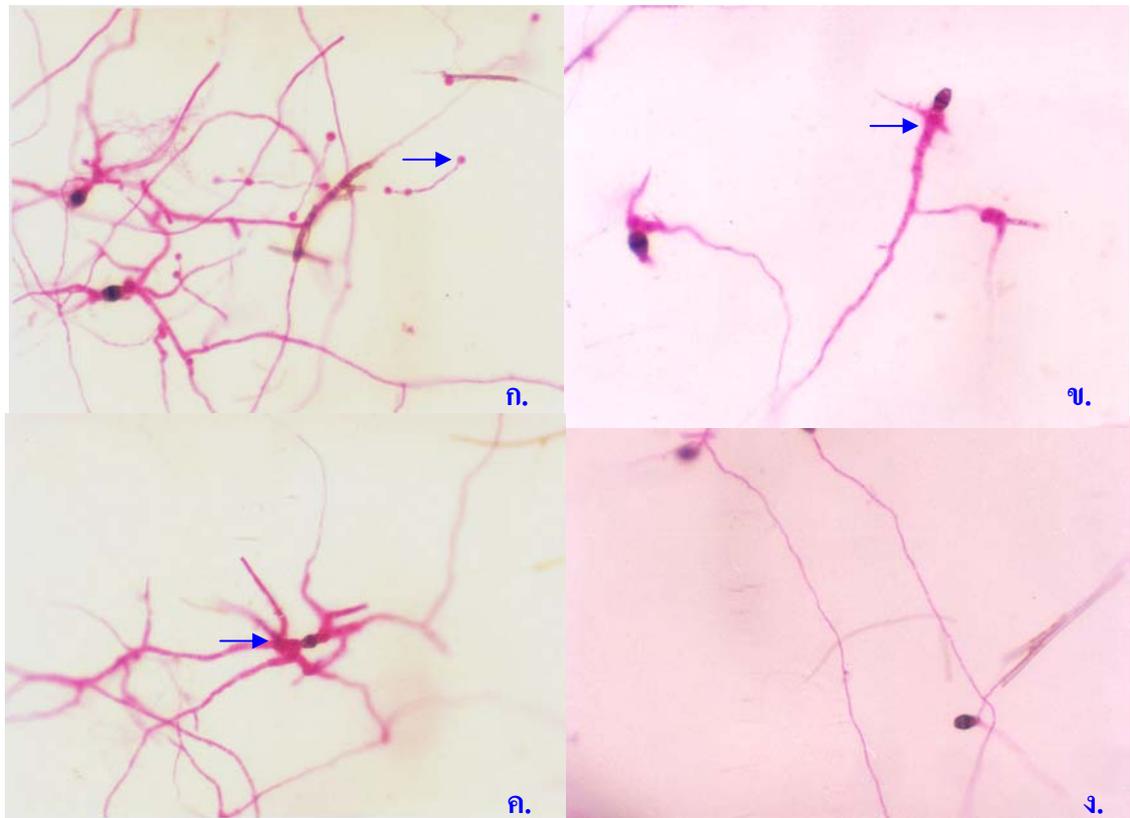
หมายเหตุ ^{1/} ความยาวของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* ที่มีการพัฒนาจากสปอร์เป็นเส้นใย

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบทางสถิติ โดย Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05)

สารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* ในอัตราเชื้อสด 1 กิโลกรัมต่อ 100 ลิตร ทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของสปอร์เชื้อรา *C. eragrostidis* ได้ บางกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของ *C. eragrostidis* ได้ โดยทำให้เชื้อรามี้อัตรการงอกของสปอร์ การเจริญของเส้นใยลดลง และมีสภาพผิดปกติไป (เส้นใยโป่งพอง) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยเฉพาะกรรมวิธีที่เติม colloidal chitin และ chitin ลงในอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* จะทำให้เห็นสภาพผิดปกติของเส้นใยอย่างชัดเจน (ตารางที่ 7 และภาพที่ 4)

ตารางที่ 7 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* บนสไลด์หลุม เมื่อได้รับอิทธิพลของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 และ T50)

กรรมวิธี	ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา <i>C. eragrostidis</i>
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01)	
+ 0.2% yeast extract	เส้นใยเจริญช้าลง
+ 0.2% yeast extract + 1% colloidal chitin	เส้นใยหนาผิดปกติ – โป่งพอง
+ 0.2% yeast extract + 5% chitin	เส้นใยหนาผิดปกติ – โป่งพอง
+ 5% chitin	เส้นใยหนาผิดปกติ – โป่งพอง
+ 1% colloidal chitin	เส้นใยหนาผิดปกติ – โป่งพอง
ไม่เติมสารใด ๆ (ใส่ CB-Pin-01 อย่างเดียว)	เส้นใยเจริญช้าลง
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (T50)	
+ 0.2% yeast extract	เส้นใยเจริญช้าลง
+ 0.2% yeast extract+ 1% colloidal chitin	เส้นใยหนาผิดปกติ – โป่งพอง
+ 0.2% yeast extract + 5% chitin	เส้นใยเจริญช้าลง
+ 5% chitin	เส้นใยหนาผิดปกติ – โป่งพอง
+ 1% colloidal chitin	เส้นใยหนาผิดปกติ – โป่งพอง
ไม่เติมสารใด ๆ (ใส่ T50 อย่างเดียว)	เส้นใยเจริญช้าลง
Control (กรรมวิธีควบคุม)	เส้นใยเจริญปกติ



ภาพที่ 4 ลักษณะผิดปกติของสปอร์เชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ที่ได้รับอิทธิพลจากสารกรองของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เลี้ยงบนข้าวสุกผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase

ก.- ข. เส้นใย *C. eragrostidis* บวม โป่งพอง หลังการหยุดสารกรองจาก *T. harzianum* (T50)

ค. เส้นใย *C. eragrostidis* บวม โป่งพอง และมีการแตกแขนงมากกว่าปกติ

ง. เส้นใย *C. eragrostidis* เจริญปกติ (control)

5.2 ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ที่เลี้ยงบนข้าวสุกและเติมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 2 %) ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis*

การทดสอบในหัวข้อนี้ได้เพิ่มความเข้มข้นของสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase คือ yeast extract ให้มากขึ้นจากเดิม (ข้อ 4.1) จาก 0.2 % เป็น 2 % ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. eragrostidis* โดยหยดเซลล์แขวนลอยของเชื้อรา *C. eragrostidis* และสารกรองจากเชื้อรา *T. harzianum* 0.02 มิลลิลิตร ลงในสไลด์หลุมพร้อมกัน หลังจาก 24 ชั่วโมง พบว่า การใช้สารกรองในทุกกรรมวิธีให้ผลการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ใกล้เคียงกันเกือบทุกกรรมวิธีและแตกต่างกับกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 8)

สารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 และ T50 ที่ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อราที่เจริญอยู่บนข้าวสุก ผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase ในกรรมวิธีต่าง ๆ ในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ลิตร แล้วกรองผ่านแผ่น membrane filter ขนาดช่อง 0.2 ไมครอน (μm) ทุกกรรมวิธีทั้งที่เติม 2% yeast extract, colloidal chitin, chitin ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือร่วมกัน และไม่เติมสารใด ๆ เลย สามารถยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยของสปอร์เชื้อรา *C. eragrostidis* ได้ โดยมีค่าความยาวของเส้นใยเท่ากับ 95.00 - 293.00 ไมครอน (μm) ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมที่มีความยาวเท่ากับ 716.25 μm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกรณีสายพันธุ์ T50 ที่เติม 2 % yeast extract และ colloidal chitin ลงในอาหาร พบว่าให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยดีที่สุดโดยมีความยาวของเส้นใยเพียง 95.00 μm หรือความยาวลดลง 86.74 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และในทุกกรรมวิธีทั้งที่เติม yeast extract, chitin หรือ colloidal chitin อย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกัน พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกรรมวิธีไม่เติมสารใด ๆ เลยให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 และ T50) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนข้าวสุกผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 2%) ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ในสไลด์หลุมที่ 24 ชั่วโมง หลังการทดสอบ

กรรมวิธี	การงอกของสปอร์ (%)	การลดลงของความยาวเส้นใยเทียบกับcontrol(%)
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01)		
+ 2% yeast extract	82.50 bc ^{1/}	17.5
+ 2% yeast extract + 1% colloidal chitin	77.50 c	22.5
+ 2% yeast extract + 5% chitin	80.00 c	20.0
+ 5% chitin	77.50 c	22.5
+ 1% colloidal chitin	80.00 bc	20.0
ไม่เติมสารใด ๆ (ใส่ CB-Pin-01 อย่างเดียว)	80.00 bc	20.0
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (T50)		
+ 2% yeast extract	75.00 c ^{1/}	25.0
+ 2% yeast extract + 1% colloidal chitin	80.00 bc	20.0
+ 2% yeast extract + 5% chitin	80.00 bc	20.0
+ 5% chitin	80.00 bc	20.0
+ 1% colloidal chitin	80.00 bc	20.0
ไม่เติมสารใด ๆ (ใส่ T50 อย่างเดียว)	87.50 b	12.5
Control (กรรมวิธีควบคุม)	100.00 a	-

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เปรียบเทียบทางสถิติ โดย Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05)

สำหรับสายพันธุ์ CB-Pin-01 ทุกกรรมวิธีที่เติม yeast extract, chitin หรือ colloidal chitin อย่างใดอย่างหนึ่งหรือร่วมกัน หรือการไม่เติมสารใด ๆ เลย ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ในกรรมวิธีที่เติม chitin ลงไปในอาหาร จะให้ผลการยับยั้งเส้นใยเชื้อโรคค่อนข้างดีกว่าในกรรมวิธีอื่น ๆ (ตารางที่ 9)

กรณีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 2 สายพันธุ์ จะเห็นได้ว่าการเติม 2 % yeast extract ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ T50 สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อโรค ได้ดีกว่าใช้กับสายพันธุ์ CB-Pin-01 ในทางตรงกันข้ามเมื่อเปรียบเทียบการใช้ chitin ร่วมกับเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าการใช้ chitin ร่วมกับสายพันธุ์ T50 และ CB-Pin-01 นั้น ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคดีเท่าเทียมกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามการใช้ colloidal chitin ร่วมกับเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์พบว่าการใช้ร่วมกับสายพันธุ์ T50 ให้ผลดีกว่าการใช้ร่วมกับสายพันธุ์ CB-Pin-01 ในกรณีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* เพียงอย่างเดียว พบว่าสายพันธุ์ CB-Pin-01 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อโรคดีกว่าสายพันธุ์ T50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกรรมวิธีที่เติมทั้ง yeast extract และ colloidal chitin นั้นพบว่าการใช้ร่วมกับเชื้อราสายพันธุ์ T50 ให้ผลดีกว่าการใช้ร่วมกับเชื้อสายพันธุ์ CB-Pin-01 อย่างเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่การเติม yeast extract และ chitin ลงในอาหารที่เลี้ยงเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นให้ผลการยับยั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าสายพันธุ์ T50 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเส้นใยเชื้อโรคดีกว่า (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01 และ T50) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนข้าวสุกผสมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase (yeast extract 2%) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ในสไลด์หลุม

กรรมวิธี	ความยาวเส้นใย (μm) ^{1/}	การลดลงของความยาว เส้นใยเทียบกับ control (%)
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (CB-Pin-01)		
+2% yeast extract	221.50 bc ^{2/}	69.08
+2% yeast extract + 1% colloidal chitin	219.00 bc	69.42
+2% yeast extract + 5% chitin	236.00 bc	67.05
+5% chitin	174.13 cd	75.69
+1% colloidal chitin	251.50 bc	64.89
ไม่เติมสารใด ๆ (CB-Pin-01 อย่างเดียว)	208.75 bc	70.86
เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> (T50)		
+2% yeast extract	107.50 d ^{2/}	84.99
+2% yeast extract + 1% colloidal chitin	95.00 d	86.74
+2% yeast extract +5% chitin	116.50 d	83.73
+5% chitin	170.25 cd	76.23
+1% colloidal chitin	161.25 cd	77.49
ไม่เติมสารใด ๆ (T50 อย่างเดียว)	293.00 b	59.09
Control (กรรมวิธีควบคุม)	716.25 a	-

หมายเหตุ ^{1/} ความยาวของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* ที่มีการพัฒนาจากสปอร์เป็นเส้นใย

^{2/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบทางสถิติ โดย Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05)

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (T50 และ CB-Pin-01) ที่ได้จากการเลี้ยงในข้าวสุกซึ่งเติมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase ในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ด้วยวิธีพ่นบนดอกกล้วยไม้ ในสภาพโรงเรือน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองเชื้อรา *T. harzianum* (T50 และ CB-Pin-01) เปรียบเทียบกับสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. eragrostidis* บนดอกกล้วยไม้ เมื่อพ่นเชื้อโรคที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากพ่นสารกรองและสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* ไปแล้ว 3 วัน เปรียบเทียบกับการพ่นสารเคมี mancozeb แทนเชื้อรา *T. harzianum* ผลปรากฏว่าจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการพ่นด้วยสารกรองและสปอร์เชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) มีจำนวนลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม โดยพบจำนวนจุดระหว่าง 44.33 - 80.67 จุดต่อดอก ขณะที่กรรมวิธีที่พ่นแต่เชื้อโรคอย่างเดียว (กรรมวิธีควบคุมที่ใส่เชื้อโรค) มีจำนวนจุดสนิม 192.00 จุดต่อดอก คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของโรคเท่ากับ 57.98-76.91 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเกิดจุดสนิม คือ กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี mancozeb โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนจุด เท่ากับ 26.50 จุดต่อดอก ส่วนการใช้สารกรองและสปอร์ของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) พ่น ก่อนพ่นเชื้อโรค 3 วันให้ผลไม่ต่างกับการใช้สารเคมี ยกเว้นสารกรองของ CB-Pin-01 ที่ใช้ร่วมกับ chitin ที่ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 5)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการใส่สารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ต่างสายพันธุ์กันก็ให้ผลการควบคุมโรคที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *T. harzianum* และในการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* จะให้ผลดีกว่าการใช้สารกรอง เพราะสปอร์แขวนลอยที่เรานำไปใช้พ่นนั้นมีประสิทธิภาพดีกว่าและมีกลไกในการควบคุมโรคอยู่หลายชนิด เช่น ในเรื่องของการแก่งแย่งแข่งขันการใช้อาหาร พื้นที่ (competition) กับเชื้อโรค ความเป็นปรสิต (parasite) ความสามารถในการสร้างปฏิชีวนสาร (antibiotic) และยังสามารถชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน(induced resistance) ได้อีกด้วย ส่วนการใช้สารกรองพ่นนั้นอาจมีผลจากการเสียดสีไปของสาร เมื่อนำไปใช้ได้ ในสภาพธรรมชาติ จึงควรมีการประยุกต์นำมาใช้ร่วมกัน จึงจะเกิดประโยชน์สูงสุด

ตารางที่ 10 การลดการเกิดโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย หลังจากพ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ชนิดสด สารกรองและสารกรองที่เติมสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase เปรียบเทียบกับสารเคมี ในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	จำนวนจุดสนิม ^{1/} (จุด)/ดอก	% การลดการ เกิดโรค ^{2/}
พ่นสารกรอง yeast + T50 ก่อน 3 วัน พ่นเชื้อโรค	58.50 bc ^{3/}	69.53
พ่นสารกรอง chitin + T50 ก่อน 3 วัน พ่นเชื้อโรค	52.83 bc	72.48
พ่นสารกรอง chitin + CB-Pin-01 ก่อน 3 วัน พ่นเชื้อโรค	80.67 b	57.98
พ่นสารกรอง T50 ก่อน 3 วัน พ่นเชื้อโรค	61.17 bc	68.14
พ่นสารกรอง CB-Pin-01 ก่อน 3 วัน พ่นเชื้อโรค	49.83 c-e	74.05
พ่นสปอร์แขวนลอย T50 ก่อน 3 วัน พ่นเชื้อโรค	52.97 b-d	72.41
พ่นสปอร์แขวนลอย CB-Pin-01 ก่อน 3 วัน พ่นเชื้อโรค	44.33 c-e	76.91
พ่น mancozeb ก่อน 3 วัน พ่นเชื้อโรค	26.50 de	86.20
พ่นเชื้อโรค (control +)	192.00 a	-
พ่นน้ำเปล่า (control -)	20.83 e ^{4/}	89.15

หมายเหตุ^{1/} ตรวจสอบจำนวนจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ เมื่อครบ 10 วันหลังปลูกเชื้อรา

C. eragrostidis ใช้แวนขยายช่วยในการนับจำนวนจุด โดยนับทั้งหน้าและหลังดอก
รวมกันต่อ 1 ดอก ในการทดลอง แบ่งการทดลองเป็น 10 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ดอก

^{2/} เปอร์เซ็นต์การลดการเกิดโรค คัดจากจำนวนจุดสนิมที่ลดลงจากกรรมวิธีควบคุม

^{3/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทาง
สถิติเปรียบเทียบทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (P = 0.05)

^{4/} จำนวนจุดสนิมที่เกิดจากเชื้อโรคซึ่งมีอยู่ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ

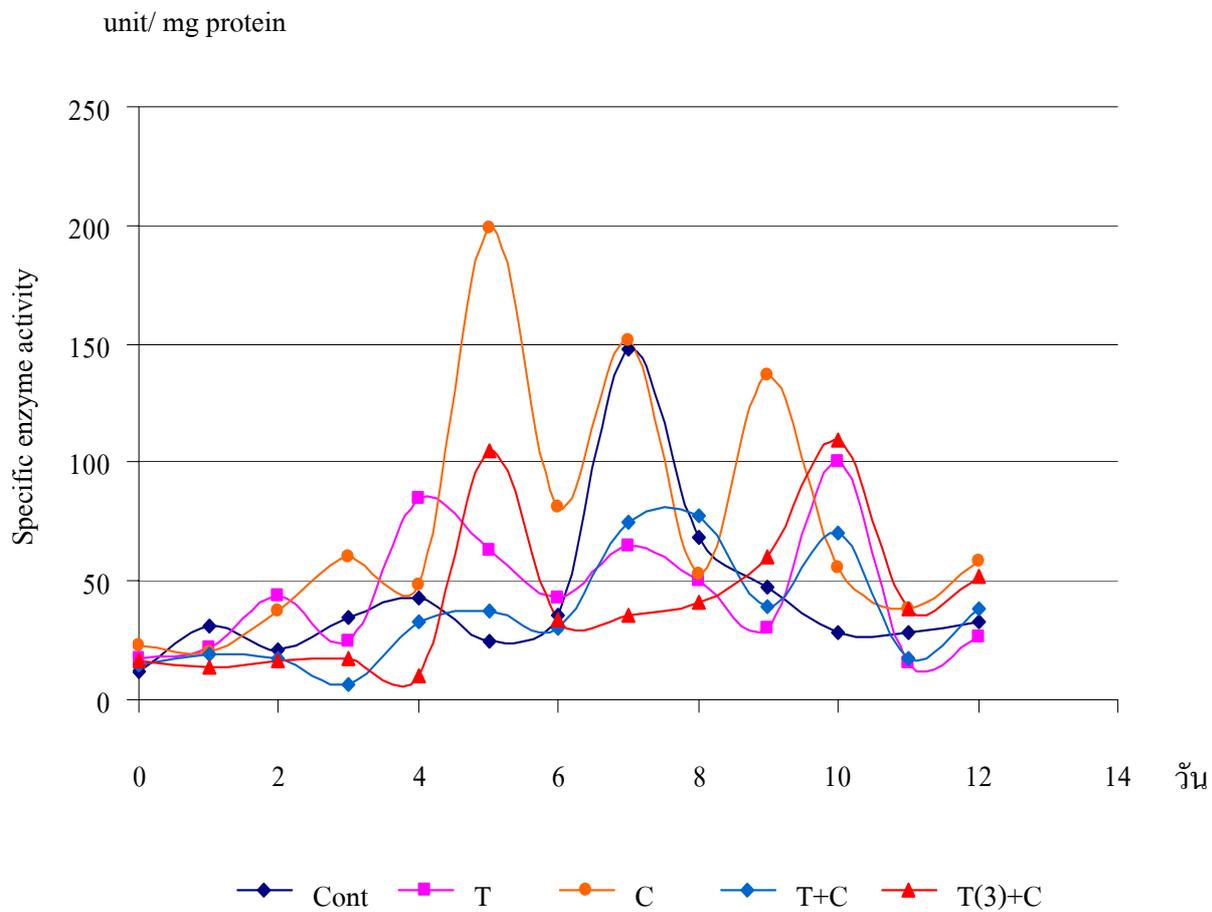


ภาพที่ 5 การเกิดจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้ หลังการปลูกเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* 10 วัน

5.4 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase บนดอกกล้วยไม้

เก็บตัวอย่างดอกกล้วยไม้ที่ได้รับการพ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ระหว่างวันที่ 0-12 หลังจากการปลูกเชื้อมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β -1,3 glucanase ผลปรากฏว่า ในกรรมวิธีที่พ่นเชื้อโรคอย่างเดียว (control+) ในวันที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 199.25 unit/mg protein และสูงขึ้นอีกครั้งในวันที่ 7 มีค่าเท่ากับ 151.65 unit/mg protein จากนั้นการสร้างเอนไซม์ก็ลดลง (ภาพที่ 6) กรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01) อย่างเดียว พบว่ามีการชักนำให้พืชสร้างเอนไซม์ β -1,3 glucanase เพิ่มขึ้นในวันที่ 4 และ 10 ได้ โดยมีค่าเท่ากับ 85.10 และ 100.10 unit/mg protein ตามลำดับ การใช้เชื้อรา *T. harzianum* กระตุ้นให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นกลไกหนึ่งในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคจุดสนิมได้ ในกรรมวิธีนี้พบว่าค่ากิจกรรมที่เกิดขึ้นมีค่าไม่คงที่ มีการเพิ่มและลดลงในแต่ละวัน สาเหตุที่เกิดผลเช่นนี้อาจมาจากกลไกการรักษาสสมดุลเพื่อให้มีการดำรงชีวิตอยู่รอด เพราะในสภาพปกตินั้น มิได้มีการรุกรานจากเชื้อโรคหรือการถูกกระตุ้นด้วยจุลินทรีย์บางชนิด พืชก็จะสร้างกลไกในการป้องกันตนเองขึ้นมา พืชจะสร้างเอนไซม์ β -1,3 glucanase มาเพื่อต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค หรือสารบางอย่างนั้นได้ (Mauch *et al.*, 1988)

จากการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase บนดอกกล้วยไม้พบว่าในกรรมวิธีที่พ่นเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (CB-Pin-01) อย่างเดียว มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในวันที่ 4 เท่ากับ 105.95 unit/mg protein ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดและลดลงเรื่อย ๆ ในขณะที่กรรมวิธีที่พ่นเชื้อโรค อย่างเดียว มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในวันที่ 5, 7 และ 10 มีค่าเท่ากับ 81.24 , 97.06 และ 79.06 unit/mg protein ตามลำดับ จากกราฟแสดงให้เห็นว่า การพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) นั้นมีผลในการชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ chitinase ขึ้นมาเพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อโรคขึ้นบนดอกของกล้วยไม้ ดังจะเห็นได้จากการพ่นเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ไปก่อน 3 วัน แล้วพ่นเชื้อโรค พบว่าเอนไซม์ chitinase เริ่มสูงขึ้นเมื่อวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 แล้วค่อย ๆ ลดลง จนวันที่ 10 เอนไซม์ chitinase จึงสูงขึ้นอีก เท่ากับ 109.46 unit/mg protein (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ β -1,3 glucanase หลังจากพ่นบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ระหว่างวันที่ 0-12

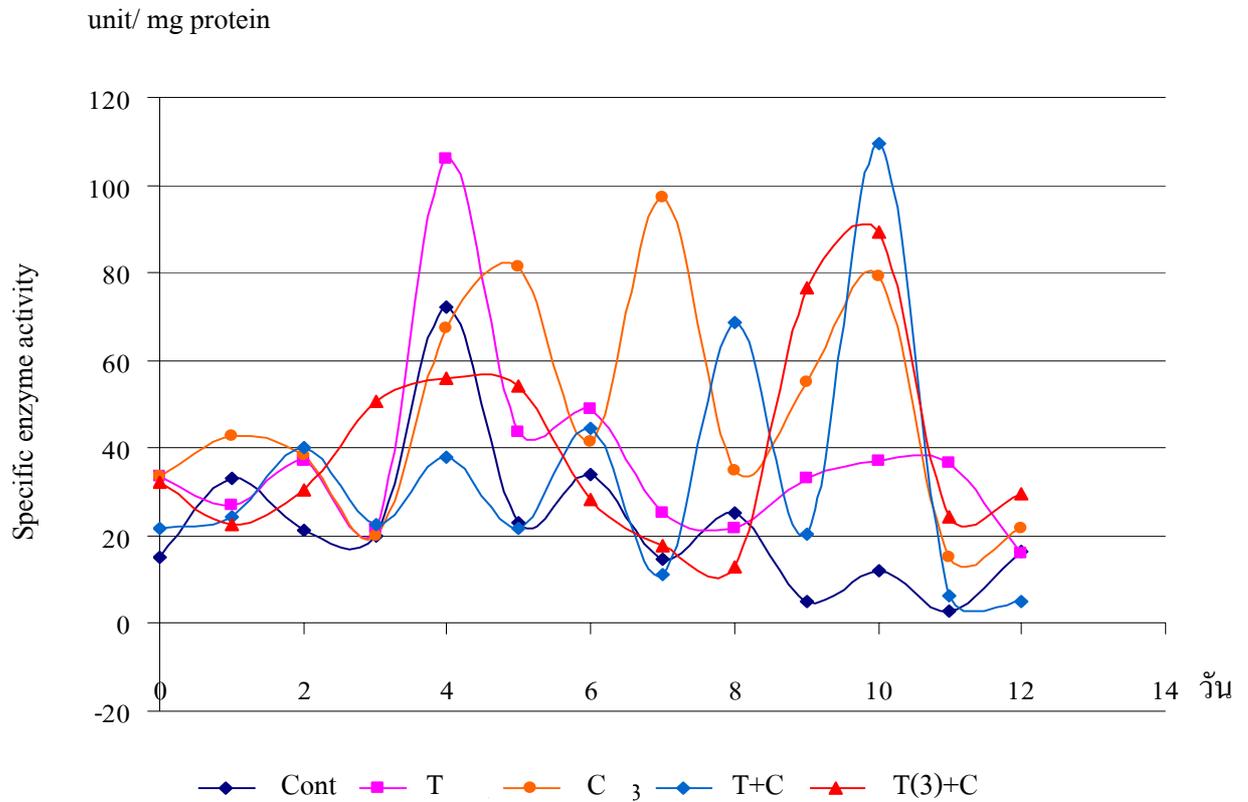
ชุดข้อมูล 1 control ไม่มีฉีดพ่นใด ๆ (Cont)

ชุดข้อมูล 2 control พ่นเชื้อรา *Trichoderma* (T)

ชุดข้อมูล 3 control พ่นเชื้อรา *Curvularia* (C)

ชุดข้อมูล 4 พ่นเชื้อรา *Trichoderma* และ *Curvularia* พร้อมกัน (T+C)

ชุดข้อมูล 5 พ่นเชื้อรา *Trichoderma* ก่อนพ่น *Curvularia* 3 วัน (T (3) +C)



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ chitinase หลังจากพ่นบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ระหว่างวันที่ 0-12

ชุดข้อมูล 1 control ไม่มีฉีดพ่นใด ๆ (Cont)

ชุดข้อมูล 2 control พ่นเชื้อรา *Trichoderma*(T)

ชุดข้อมูล 3 control พ่นเชื้อรา *Curvularia* (C)

ชุดข้อมูล 4 พ่นเชื้อรา *Trichoderma* และ *Curvularia* พร้อมกัน (T+C)

ชุดข้อมูล 5 พ่นเชื้อรา *Trichoderma* ก่อนพ่น *Curvularia* 3 วัน (T (3) +C)

จากการทดลองนี้ อาจถือได้ว่าเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น คือทำการทดลองเพื่อดูแนวโน้มกิจกรรมของเอนไซม์บนดอกกล้วยไม้ หลังการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) และเชื้อโรครูปสปอร์แขวนลอย กรณีพ่นแบบเดี่ยว พ่นพร้อมกัน หรือพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนดอกกล้วยไม้ก่อนพ่นเชื้อโรครเป็นเวลา 3 วัน เพียงแค่ 12 วัน (ตั้งแต่วันที่ 0-12)

นอกจากยังพบว่าเอนไซม์บนดอกกล้วยไม้สามารถผันแปรไปได้ตลอดเวลาด้วยปัจจัยหลายประการ เช่น สภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในโรงเรือน การให้น้ำ ให้อุณหภูมิ หรือแม้แต่การตัดดอกหรือการหลุดร่วงของใบ การทำให้พืชเกิดบาดแผล ซึ่งอาจเกิดจากแมลงมากัดกินหรือคู่น้ำเลี้ยงที่บริเวณดอกและก้านช่อดอกก็สามารถทำให้เอนไซม์ที่เรานำไปวัดเปลี่ยนแปลงไปได้ ก็อาจเป็นไปได้ว่าผู้ทำการทดลองทดสอบบนกล้วยไม้ช่อเดียวกันและตัดดอกกล้วยไม้ออกไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทุกวันจนจบการทดลอง จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่พบว่าเอนไซม์บนดอกกล้วยไม้ มีความผันแปร ขึ้น ๆ ลง ๆ ไม่เป็นไปตามทฤษฎี การทดลองนี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น หากมีการศึกษาค้นคว้าในด้านการชักนำให้พืชต้านทานโรคนี้อาจจะทำการทดลองให้มากขึ้นกว่านี้หาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่พืชสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด แล้วจึงนำข้อมูลที่ได้มาใช้ประกอบกับการทดลองและนำมาค้นคว้าวิจัยในขั้นต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* 12 สายพันธุ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. eragrostidis* และเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อโรคด้วยอัตราการเจริญค่อนข้างเร็ว โดยสายพันธุ์ที่มีอัตราการยับยั้งที่ดี คือ CB-Pin-01, 84-42 และ M23 ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ คือ *T. pseudokonigii* (DU-07) และ *T. longibrachiatum* (TL-01) ไม่เจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อโรคแต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้

การใช้ Dialysis membrane technique พิสูจน์ว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 14 สายพันธุ์สามารถสร้างสารมายับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อโรคได้ทั้งหมด โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารเคมี mancozeb (80 WP) ที่ 1,200 ppm

เมื่อใช้สปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ชนิดสด ไปพ่นลงบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่ปลูกอยู่ในโรงเรือน 1 - 5 วัน ก่อนทำการปลูกเชื้อโรคที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถลดอาการจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายได้ระหว่าง 66.18 - 79.81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลดีใกล้เคียงการใช้สารเคมี mancozeb (80 WP) ที่ 1,200 ppm

การทดสอบความสามารถของสารกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ chitinase ที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01 และ T50) โดยใช้อัตราเชื้อสด 1 กรัม ผสมน้ำ 100 มิลลิลิตร พบว่าสารกรองที่ได้จากทุกกรรมวิธีที่เติม yeast extract 0.2 %, colloidal chitin 1 % และ chitin 5 % เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกัน และไม่เติมสารใด ๆ ให้ผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 78.75 - 91.88 % และสามารถยับยั้งการเจริญเป็นเส้นใยได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การลดลงของความยาวของเส้นใยเชื้อโรค 29.54 - 77.27 %

การทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01 และ T50) ในสภาพโรงเรือน พบว่าการพ่นสารกรอง และสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) ก่อนพ่นเชื้อโรคเป็นเวลา 3 วัน สามารถลดอาการจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวายได้ คิดเป็น

57.98 - 76.91 % เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งให้ผลดีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี mancozeb (80 % WP) ที่ 1,200 ppm

การนำดอกกล้วยไม้ไปวิเคราะห์เอนไซม์ β -1,3 glucanase และ chitinase ภายหลังจากฟ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* (CB-Pin-01) และเชื้อโรคในรูปสปอร์แขวนลอย กรณีแบบเดี่ยว พร้อมกันหรือฟ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนดอกกล้วยไม้ก่อนฟ่นเชื้อโรคเป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3 glucanase และ chitinase ทุกวันตลอดการทดลอง 12 วัน แสดงให้เห็นว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือเชื้อโรคสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคบนดอกกล้วยไม้ได้

เชื้อรา *Trichoderma harzianum* เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวาย โดยอาศัยกลไกการเป็น mycoparasite การผลิตสารทุติยภูมิหรือสารปฏิชีวนะมายับยั้งการเจริญของเชื้อโรค สามารถชักนำให้พืชผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นความต้านต่อการเกิดโรคได้ เช่น β -1,3 glucanase และ chitinase

ข้อเสนอแนะ

จากประสบการณ์ของสมาชิกชมรมผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้จังหวัดราชบุรีบางท่าน เกี่ยวกับการใช้เชื้อรา *Trichoderma* ชนิดสด ที่เลี้ยงเชื้อบนเมล็ดข้าวสุก แล้วนำมาล้างสปอร์ออกจากเมล็ดข้าวด้วยน้ำสะอาด นำไปพ่นกล้วยไม้หลายชนิดอยู่เป็นประจำ 1-2 ครั้งต่อเดือน พบว่าช่วยลดการเกิดโรคเน่าแห้งที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* (คุณกิตติ เพื่อนบัวผัน) ลดโรคเน่าเข้าไส้ของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* และลดโรคใบปื้นเหลืองที่เกิดบนใบกล้วยไม้สาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* (คุณสุวิทย์ แสงเทียน) นอกจากนี้ผู้ใช้เชื้อรา *Trichoderma* อย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน สามารถยืนยันได้ว่าการใช้เชื้อรา *Trichoderma* ไม่ทำให้ก้ามมะพร้าวและเครื่องปลูกอื่นๆ ผุพังเร็วกว่าปกติ (ผศ.ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง - ติดต่อส่วนตัว)

ในการพ่นเชื้อรา *Trichoderma* ชนิดสด ลงบนคอกกล้วยไม้ เพื่อใช้ในการควบคุมโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวายนั้น ควรเน้นการพ่นเชื้อรา *T. harzianum* ในรูปแบบของการป้องกัน ก่อนที่โรคจะเข้าทำลาย ควรมีการพ่น *T. harzianum* ทุก ๆ 7 วัน อย่างต่อเนื่องกัน เพื่อให้ *Trichoderma* ไปครอบครองพื้นที่ก่อนที่เชื้อโรคจะสามารถเข้าทำลายได้ จะเป็นการดีเหมือนเป็นการสร้างภูมิคุ้มกันให้กับพืชก่อน(จิระเดช, 2549) และในการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ควรพ่นอย่างต่อเนื่อง และเป็นประจำตามอัตราแนะนำ ควรพ่นบริเวณดอก ใบ ลำต้น ให้ทั่วถึงทั้งต้นรวมไปถึงวัสดุปลูกด้วย เพื่อป้องกันเชื้อราสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นได้ด้วย เช่น โรคเน่าดำของกล้วยไม้ (*Phytophthora palmivora*), โรคราเมล็ดผักกาด (*Sclerotium rolfsii*), โรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum gloeosporioides*), โรคใบปื้นเหลือง (*Pseudocercospora dendrobii*), โรคเน่าแห้ง (*Fusarium oxysporum*), เป็นต้น

ในการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายเราต้องทราบวิธีการปลูกเลี้ยง การจัดการที่ดี และแนวทางการป้องกันในการเกิดโรคที่ดีด้วย ควรมีการปรับสภาพโรงเรือน หรือเครื่องปลูกให้ไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรค ควรมีการจัดการที่ดีตั้งแต่เริ่มปลูก เช่น การแช่ต้นกล้วยไม้ที่เพิ่งออกมาจากขวด tissue ก่อนนำไปหนิบน้ำ(ไม้น้ำ) ด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ควรแช่วัสดุปลูกในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* ก่อนปลูก และควรพ่นเชื้อรา *Trichoderma* เมื่อปลูกไปแล้วเป็นประจำอย่างต่อเนื่อง โดยให้ไปกับระบบน้ำ หรือพ่นพร้อมกับปุ๋ย หรือสารเคมีต่าง ๆ ยกเว้นการใช้ร่วมกับสารเคมีกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เบโนมิล หรือโพพพิโคนาโซล และเมื่อมีโรคเกิดโรคเกิดขึ้นแล้ว ควรเก็บส่วนที่เป็นโรคไปเผาทิ้งนอกแปลงอย่าปล่อยให้มีการสะสมโรคอยู่ในแปลง

เพราะจะเป็นแหล่งระบาดของโรค ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ การพ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma* ให้ทั่วทั้งต้น สามารถทดแทนการใช้สารเคมีได้ ปกป้องภัยต่อผู้ปลูกเลี้ยง ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม รวมทั้งสามารถลดต้นทุนการผลิตได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2548. โรคไม้ดอก. กลุ่มวิจัยโรคพืช, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 103 น.
- กรพินธุ์ ทนกล้า, จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล อินทนู. 2548. ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเซลล์แขวนลอยหรือสารกรองของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการงอกและการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Pseudocercospora dendrobii* สาเหตุโรคใบปื้นเหลืองของกล้วยไม้สกุลหวาย, ใน วิทยาสารกำแพงแสน ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ ธันวาคม การประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 2, 7-9 ธันวาคม 2548. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.
- ขวัญเนตร หินอ่อน. 2549. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* 3 สายพันธุ์และสารกรองต่อการงอกและการเจริญของเชื้อรา *Pseudocercospora fuligina* (Rolden) Deighton สาเหตุโรคราดำของใบมะเขือเทศ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จิตราพรรณ พิสิถ. 2536. การผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก, น.16-32. ใน คู่มือการผลิตกล้วยไม้เพื่อการส่งออก. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืชโครงการเกษตรกู่ชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 90 น.
- _____. 2545. การผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดด้วยเทคนิคอย่างง่าย เพื่อใช้ควบคุมโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*. ใน รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 40th มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 4-7 กุมภาพันธ์ 2545. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- _____. 2546. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา, น. 12-53. ใน จิระเดช แจ่มสว่าง, บรรณาธิการ. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- _____. 2549. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 323 น.
- ชุตินา วิฑูรจิตต์. 2548. **สัณฐานวิทยา ความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และการควบคุม *Sclerotium rolfsi*. Sacc. สาเหตุโรคเน่าแห้งของกล้วยไม้โดยการใส่เชื้อราปฏิปักษ์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นิยม สุดเพราะ. 2542. ความหลากหลายของราดินและราโรคพืชในดินปลูกพืชไร่ จ. สกลนคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นิยมรัฐ ไตรศรี. 2543. โรคของกล้วยไม้และการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 61 น.
- ทัศนาวร ทศกร. 2545. การควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้โดยชีววิธีด้วยการใช้จุลินทรีย์จากผิวพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ลาวัลย์ วีระพงษ์ แสงมณี ชิงดวง และ สุอาภา ดิสถาพร. 2540. เอกสารวิชาการเชื้อราไตรโคเดอร์มา. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 37 น.
- วารุณี มณีนาค. 2546. การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคตินเอสได้สูง และการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ. 2540. ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้จากประสบการณ์, สมาคมพฤกษชาติแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ. 414 น.

แสงมณี ชิงดวง ประเสริฐ เครื่องเปี่ยม และ สุชาติ วิจิตรานนท์. 2540. ผลของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่มีผลต่อเชื้อรา *Phytophthora parasitica* และ *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริกไทย และโรคเน่าดำของวานิลลา. **วารสารโรคพืช** 12: 13-24.

Anju, P. 1994. Antagonism of *Trichoderma* against fungal pathogen and their enzyme production. **Advance in Plant Sciences** 7(1): 147-153.

Benhamou, N. 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. **Phytopathology** 82: 1185-1193.

Bigirimana, J., G. De Meyer, J. Poppe, Y. Elad and M. Hofte, 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. **Med. Fac. Landbouww.** 62: 1001-1007.

Chaverri, P., L. A. Castlebury., J. S. Gary and M. G. David. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum* / *Hypocrea lixii* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution.** 27: 302-313.

Correa, A. 1995. *In vitro* inhibitory activity of trichozinianines on *Sclerotium rolfii* Sacc. **Cryptogamine Mycologia** 16(3):185-190.

Danielson, R. M. and C. B. Davey. 1973. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* sp. **Soil Biol. Biochem.** 5: 505-515.

Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 157: 41.

Domsch, K. H., W. Gams and T. H. Anderson. 1993. **Compendium of Soil Fungi.** Vol.2 2nd ed. Academic Press, London. 405 p.

- Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Hennis. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. **Phytopathology** 73: 85-88.
- Geremia, R. A., Goldman, G.H., Jacobs, D., van Montagn, M., and Herrera-Estrella, A. Hydrolytic extracellular enzymes of *Trichoderma*: specific induction of a basic proteinase, pp. 193-195. *In New approaches in biological control of soil-borne diseases*, Copenhagen, Denmark.
- Gibb J. N. 1967. A study of the epiphytic growth habit of *Fomes annosus*. **Annals of Botany** 31: 755-773.
- Godtfredsen, W. O. and Vangedal, S. 1965. Trichodermin a new sesquiterpene antibiotic. **Acta. Chem. Scand.** 19: 1088.
- Harman, G. E., Chet, I., and Baker, R. 1981. Factors affecting *Trichoderma harzianum* applied to seeds as a biocontrol agent. **Phytopathology** 71: 569-572.
- _____. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Dis.** 84: 377-393.
- _____, C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews / Microbiology** 2: 43-55.
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases : The history and evolution of current concepts. **Plant Dis.** 87: 4-10.
- Hubbard, J. P., Harman, G.E., and Hadar, Y. 1983. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biocontrol agent, *Trichoderma hamatum* on pea seeds. **Phytopathology** 73: 655.

- Intana, W. 2003. **Selection and Development of *Trichoderma* spp. for High Glucanase, Antifungal Metabolite Producing and Plant growth Promoting Isolates for Biological Control of Cucumber Damping-off Caused by *Pythium* spp.**. Ph.D. thesis, Kasetsart University. Bangkok.
- _____, C. Chamswarnng, W. Intanoo, K. Sivasithamparam and C. Hongprayoon. 2003. Potential of *Trichoderma harzianum* isolates for growth promotion and biocontrol of damping-off of cucumber. **Thai J. Agric. Sci.** 36: 305-318.
- _____, C. Chamswarnng, W. Intanoo, C. Hongprayoon. and K. Sivasithamparam. 2003. Use of mutant strains for improved efficacy of *Trichoderma harzianum* for controlling cucumber damping – off. **Thai J. Agric. Sci.** 36: 429-439.
- Johnson, L. F. and E. A. Curl. 1972. **Methods for Research on the Ecology of Soil-borne Plant Pathogens.** Burgess Publishing Company, Minnesona. 247 p.
- Kloepper J., S. Tuzan and J. Kuc. 1992. Proposed definitions related to induce disease resistanc. **Biocon. Sci. Techno.** 2: 347-349.
- Lin, A. 1994. Trichodermin a new antifungal agent from *Trichoderma viride* and its action in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Jour. of Antibiotic** 47: 799-805.
- Lorito, M., C.K. Hayes., C. Peterbaver. And G.E. Harman. 1994. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. **Microbiol.** 140 : 623-629.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

- Mauch, F. 1989. Antifungal hydrolases in pea tissue : I Purification and characterization of two chitinase and two 1,3-beta-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. **Plant Physiol.** 87: 325 – 333.
- Meyer, C. E. and Reusser, F. 1967. A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*. **Experientia** 23: 85.
- Michereff, S. J. , N. S. S. Da Silveira, A. Reis and R. De L. R. Mariano. 1995. Greenhouse screening of *Trichoderma* isolates for control of *Curvularia* leaf spot of yam. **Mycophothologia** 130: 103-108.
- Nampoothiri, K. M., T. V. Baiju, C. Sandhya , A. Sabu , G. Szakacs and A. Pandey. 2004. Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. **Process Biochemistry** 39: 1583-1590.
- Nelson, N. 1944. A Photometrigue adaptation of the Somogi Method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** 153: 375-380.
- Ooka, T., Shimojima, Y., Akimoto, T., Senoh, S., and Abe., J. 1966. A new antibacterial peptide “Suzukacillin”. **Agric. Biol. Chem.** 30: 700.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. **Ann. Rev. Phytopathol.** 23: 23-54.
- Pyke, T. R. and Dietz, A. 1966. U-21, 963, a new antibiotic I. Discovery and biological activity. **App. Microbiol.** 14: 506.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the gene *Trichoderma* . **Mycol. Papers. C. M. I.** 116: 1-56.
- Riker, A. J. and R. S. Riker. 1936. **Introduction to Research on Plant Disease.** John S. Swift Co., St. Louis. Mo. 117 p.

- Reusser, F. 1967. Biosynthesis of antibiotic U-22, 324, a cyclic polypeptide. **J. Biol. Chem.** 242: 243.
- Rodriguez-Kabana, R. 1969. Enzymatic interactions of *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma viride* in mixed soil culture. **Phytopathology** 59: 910.
- _____, R. and Curl, E. A. 1968. Saccharase activity of *Sclerotium rolfsii* in soil and the mechanism of antagonistic action by *Trichoderma viride*. **Phytopathology** 58: 985.
- _____, R., Kelley, W. D. and Curl, E. A. 1978. Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed culture with *Sclerotium rolfsii* in soil. **Can J. Microbiol.** 24: 487.
- Simon, A., R. W. Dunlop, E. L. Ghisalberti, and K. Sivasithamparam. 1988. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. **Soil Biol. Biochem.** 20: 263-264.
- Tronsmo, A. and L.G. Hjeljord. 1998. Biological Control with *Trichoderma* Species. **Plant-Microbe Interactions and Biological Control.** Marcel Dekker, Inc.
- Whipps, J. M. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soilborne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. **New Phytologist** 107: 127-142.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology** 22: 837-845.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิต่ำ

1. potato dextrose agar (PDA) (Riker and Riker, 1936)

น้ำสะอาด	1000	มิลลิลิตร
มันฝรั่ง	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
วุ้นผง	12	กรัม

วิธีปฏิบัติ หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำสะอาด 1 ลิตร ให้เดือดและมันฝรั่งนุ่ม กรองเอาเฉพาะส่วนน้ำไปใช้ ละลาย dextrose และวุ้นผงในน้ำมันฝรั่งต้ม ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 -20 นาที เทอาหารที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วและมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียสลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเย็นแล้ว ประมาณ 15-20 มิลลิลิตรต่อจาน

2. peptone dextrose rose-bengal agar (Martin's medium) (Johnson and Curl, 1972)

น้ำสะอาด	1000	มิลลิลิตร
KH ₂ PO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Rose bengal (1%)	3	มิลลิลิตร
วุ้นผง	12	กรัม
*Streptomycin	0.1	กรัม

วิธีปฏิบัติ ละลายสารต่างๆ ในน้ำสะอาด 1 ลิตร (ยกเว้น Rose bengal และ Streptomycin) นำไปต้มให้เดือด แล้วจึงเติม Rose bengal บรรจุลงใน flask ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

* เติมลงในอาหารที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วและมีอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส แล้วเทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแห้งในตู้อบความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และจานอาหารเย็นแล้วทันที เพื่อไม่ให้อาหารแข็ง ประมาณ 15-20 มิลลิลิตรต่อจาน หากเติมในอาหารที่ร้อนมาก (เกิน 45 องศาเซลเซียส) สารปฏิชีวนะจะเสื่อมคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ง่าย

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การเตรียม 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5

เตรียมโดยผสมสาร A จำนวน 14.8 มิลลิลิตร กับสาร B จำนวน 35.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเช็ ให้ได้ 200 มิลลิลิตร และปรับค่า pH ด้วย 6 N HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 5.5

สาร A

0.2 M glacial acetic acid	11.55	กรัม
distilled water	1	ลิตร

สาร B

0.2 M sodium acetate	27.2	กรัม
distilled water	1	ลิตร

การเตรียม 0.05M sodium acetate buffer pH 5.5 โดยทำการเจือจาง 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5 ในน้ำกลั่นหนึ่งมาเช็ในอัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร และปรับค่า pH ด้วย 6 N HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 5.5

2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Lowry *et al.* (1957)

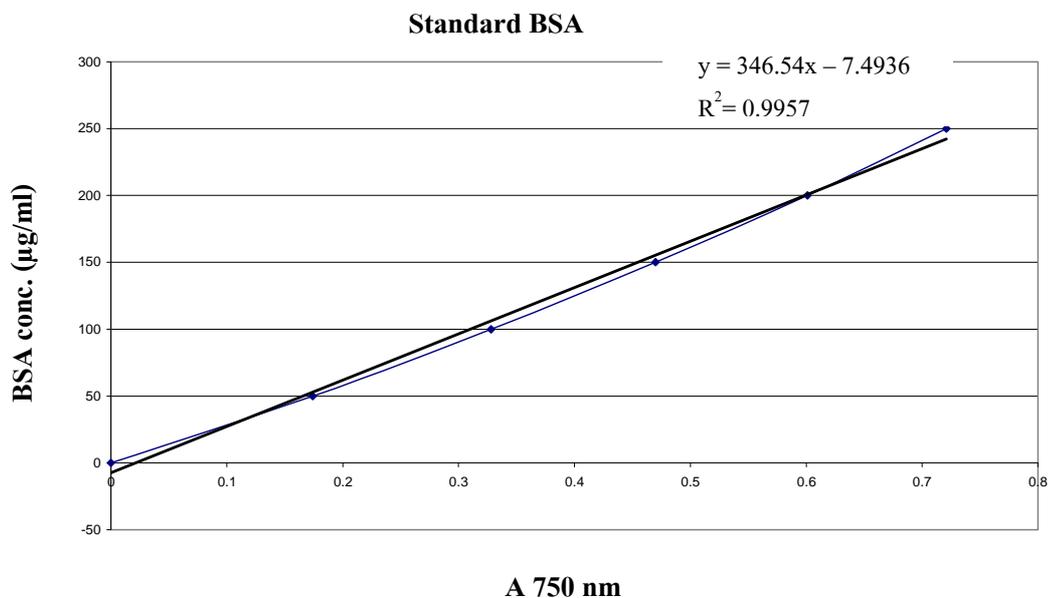
2.1 สารเคมีที่ใช้

สารละลาย alkaline copper

เตรียมโดยผสม 4 % (W/V) Na_2CO_3 , 0.2 M NaOH, 1 % (W/V) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ 2% (W/V) sodium potassium tartrate ในอัตราส่วน 49: 49: 1: 1 โดยเตรียมก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

2.2 การเตรียม standard curve ของ Bovine Serum Albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้น 15, 30, 45, 60, 75, และ 90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นบรรจุหลอดทดสอบหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติมสารละลาย alkaline copper จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol reagent เตรียมโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตร จำนวน 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์ วัดการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสง (A)



ภาพผนวกที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (A 750 nm)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส) โดยดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Nelson (1994)

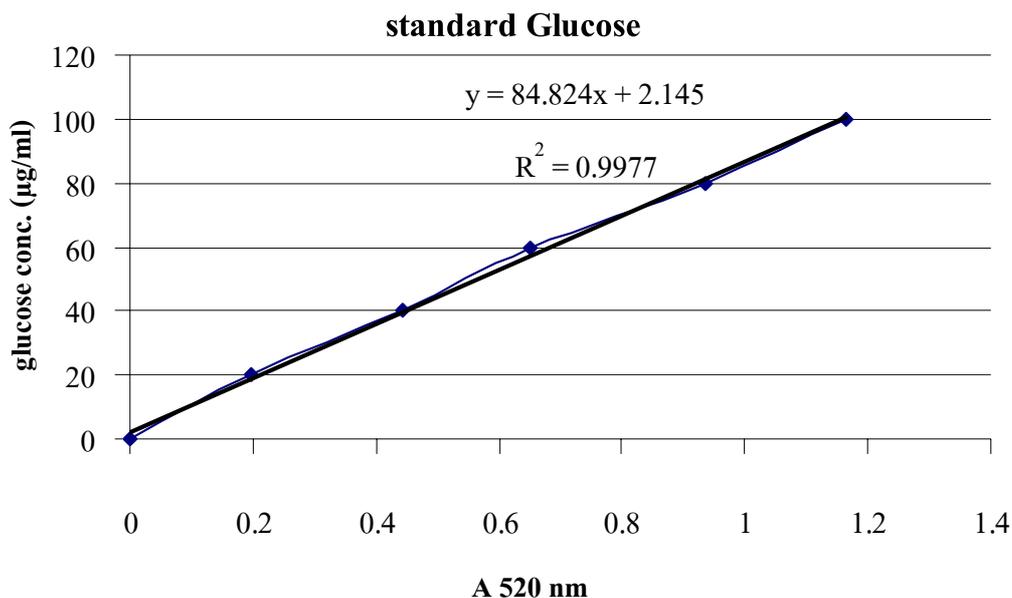
3.1 สารเคมีที่ใช้

3.1.1 copper reagent เตรียมสารละลาย Cu reagent (alkaline copper solution) โดยละลาย Na_2CO_3 24 กรัมในน้ำ 250 มิลลิลิตร ให้เป็นสารละลายแล้วเติม potassium sodium tartrate 12 กรัม คนให้ละลายจึงเติมสารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 10% ลงไป 40 มิลลิลิตร (เวลาเติมค่อย ๆ เติมลงไปช้า ๆ และคนไปด้วย) จากนั้นจึงเติม NaHCO_3 16 กรัม คนให้ละลาย เติมสารละลาย Na_2SO_4 (Na_2SO_4 180 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ในที่มืด 1 สัปดาห์ กรองเอาตะกอนออก

3.1.2 Nelson reagent เตรียมสารละลาย Nelson reagent โดยละลาย ammonium molybdate 50 กรัมในน้ำ 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 42 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย sodium arsenate (sodium arsenate 6 กรัมในน้ำ 50 มิลลิลิตร) แล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 1 ลิตร เก็บในที่มืด 1 สัปดาห์ กรองเอาตะกอนออก

3.2 การเตรียม standard curve ของน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นบรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นโดยทันที โดยแช่น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลและค่าการดูดกลืนแสง(A)



ภาพผนวกที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (A 520 nm)

4. การวิเคราะห์ปริมาณ N- acetylglucosamine

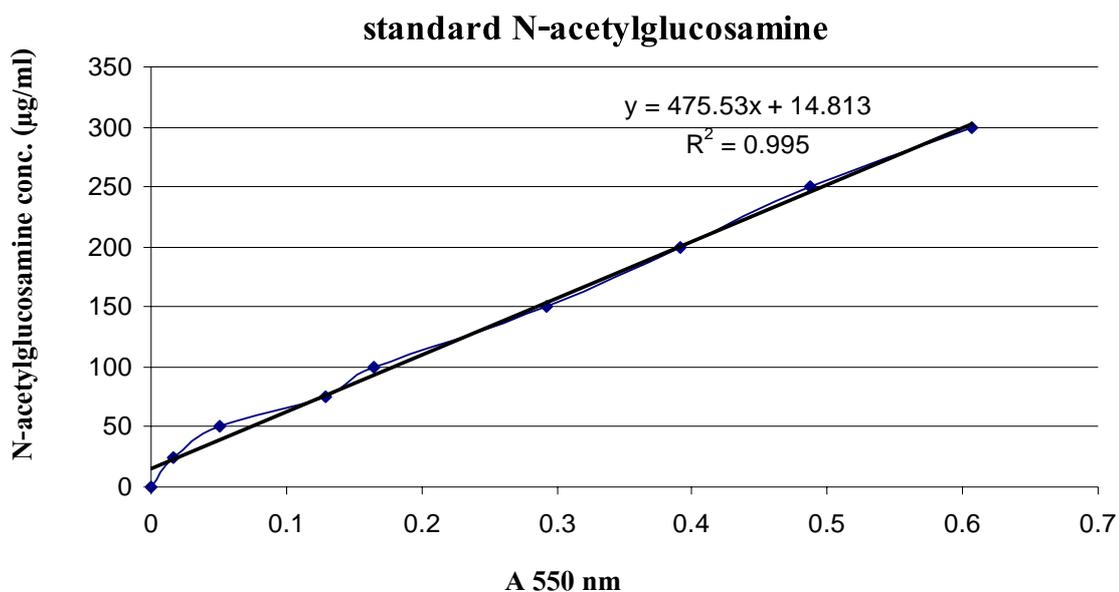
4.1 สารเคมีที่ใช้เหมือนกับสารเคมีที่ใช้หาปริมาณน้ำตาล glucose (ข้อ 3.1.1 และ 3.1.2)

4.2 การวิเคราะห์

4.1.1 การเตรียม standard curve ของ N-acetylglucosamine เตรียมสาร

ละลาย N-acetylglucosamine เข้มข้น 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 และ 300 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่น บรรจุในหลอดทดสอบหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่น้ำเย็นจัด เติม Nelson reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำ 9.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เขียนกราฟระหว่างปริมาณน้ำตาลและค่าการดูดกลืนแสง (A) แสดงในภาพผนวกที่ 3

4.1.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลอย่างเหมาะสมจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ แล้วนำไปวิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาล N-acetylglucosamine ข้างต้น คำนวณปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานนั้น



ภาพผนวกที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวอารีรัตน์ เทียนขาว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 31 กรกฎาคม 2523
สถานที่เกิด	อ. บางระจัน จ. สิงห์บุรี
ประวัติการศึกษา	ปี 2546 ระดับปริญญาตรี วท.บ.(เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	เจ้าหน้าที่ประจำคลินิกสุขภาพพืช
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คลินิกสุขภาพพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม