

รายงานสมบูรณ์

การผลิตเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อใช้เป็นสารชีวอินทรีย์สำหรับเกษตรอินทรีย์

Production of *Trichoderma* spp. as Biopesticide for Organic Agriculture

โดย

ดร. เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง	หัวหน้าโครงการ
ดร.แสงชัย เอกประทุมชัย	ผู้ร่วมโครงการ
ผศ.ดร.กนกวรรณ พุ่มพุดรา	ผู้ร่วมโครงการ
นายไวยุจน์ เดชมหิตกุล	ผู้ร่วมโครงการ
ดร.อนวัช สุวรรณกุล	ผู้ร่วมโครงการ
ผศ.ดร.อนันต์ ทองทา	ผู้ร่วมโครงการ

รายงานนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

ปีงบประมาณ 2553

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการคัดแยกเชื้อราที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชและ คัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการยับยั้งสูง โดยการทดสอบประสิทธิภาพ และได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* เพื่อใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ ที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อโรคพืช จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จาก ลำไย และลิ้นจี่ ในจังหวัด เชียงใหม่ และลำพูน สามารถแยก เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืช ได้ 6 สายพันธุ์ และ 65 ไอโซเลท และ เชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราโรคพืช *Trichoderma* ได้ 102 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อ *Trichoderma* มาทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้ง เชื้อราก่อโรค 4 สายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Pestalotiopsis* spp., *Alternaria* spp., *Phomopsis* spp., *Colletotrichum* spp. โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันบนอาหาร PDA และ คัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่ สามารถเจริญครอบคลุมพื้นที่บนจานอาหารได้มากกว่า 2/3 ขึ้นไป (สามารถคัดเลือกได้ 7, 4, 5 และ 7 ไอโซเลท ตามลำดับ) เมื่อนำไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาทดสอบ ประสิทธิภาพบนผลลำไย โดยวิธีการปลูกเชื้อร่วมกัน 5 แบบ ได้แก่ ปลูกเชื้อราโรคพืชอย่างเดียว ปลูก เชื้อราปรปักษ์อย่างเดียว ปลูกเชื้อราโรคพืชก่อนปลูกเชื้อราปรปักษ์ 3 วัน ปลูกเชื้อราปรปักษ์ก่อนปลูก เชื้อราโรคพืช 3 วัน ปลูกเชื้อราโรคพืชพร้อมเชื้อราปรปักษ์ ผลการทดลองจะแตกต่างกันไปในแต่ละ เชื้อ พบว่า กรณี *Pestalotiopsis* spp. ปลูกเชื้อราปรปักษ์ก่อนปลูกเชื้อราโรคพืช มีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็น โรคต่ำกว่ากรรมวิธีทดสอบอื่นๆ กรณี *Alternaria* spp. และ *Phomopsis* spp. การปลูกเชื้อราโรคพืช ก่อนปลูกเชื้อราปรปักษ์ มีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรคต่ำกว่ากรรมวิธีทดสอบอื่นๆ เป็นส่วนใหญ่ ส่วน กรณี *Colletotrichum* spp. ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละวิธี กล่าวคือทุกไอโซเลทไม่มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งเชื้อนี้บนผลลำไย จากการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma hazianum* บนอาหารแข็ง โดยใช้ข้าวสุก สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ช่วงความชื้น 20 -40 % พบว่า เชื้อรามีแนวโน้มเจริญได้ดีเมื่อความชื้น สูงขึ้น โดยจะเจริญได้ดีที่สุดเมื่อใช้ ปลายข้าวหอมมะลิที่อัตราส่วน ข้าว:น้ำ เท่ากับ 3:1 ได้ความ เข้มข้นของ *Trichoderma haziznum* ที่ 10^9 CFU/g

คำสำคัญ *Trichoderma* spp., การหมักบนอาหารแข็ง

Abstract

This study is focus on isolation, efficiency screening and culture of *Trichoderma* as a biopesticide for pathogenic fungi on fruits. Several isolated of *Trichoderma* spp. are studied on their efficiency as bio-control agents for pathogenic fungi of Longan. Six species of pathogenic fungi (65 isolated) and of *Trichoderma* spp. (102 isolated) were isolated from Lychee and Longan trees. The efficiency of *Trichoderma* isolated for controlling 4 species of pathogenic fungi (*Pestalotiopsis* spp. *Alternaria* spp. *Phomopsis* spp. *Colletotrichum* spp) were tested by Dual culture method on PDA agar. *Trichoderma* Isolated that can outgrow more than 2/3 of the plate area were selected to be inoculated with pathogenic fungi on the surface of Longan. The treatment methods were : inoculate only *Trichoderma*, inoculate only pathogenic fungi , inoculate *Trichoderma* 3 days earlier, inoculate pathogenic fungi 3 days earlier and Inoculate both at the same time. The best inhibitions were varied in each case: for *Pestalotiopsis* spp., inoculate *Trichoderma* 3 days earlier is the best, for. *Alternaria* spp.and *Phomopsis* spp., inoculate pathogenic fungi 3 days earlier is the best, for *Colletotrichum* spp., no significant results between treatments. *Trichoderma hazianum* was cultured by solidstate fermentation at 37 c for 9 days. Three species of steamed rice at the moisture content between 20-40 % were studied. The result showed that *Trichoderma* had tendency to grow better at higher moisture content. Using Saohi rice and Hommali rice at the proportion of rice:water of 3:1 were most suitable to get the final concentration of 10^9 CFU/g.

Keywords :*Trichoderma* spp., Solid state fermentation

สารบัญ

บทคัดย่อ	2
บทที่ 1 บทนำ	7
บทที่ 2 ทฤษฎีและวารสารปริทัศน์	9
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง	13
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	25
ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	
ข การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา <i>Trichoderma hazianum</i>	
ค ลักษณะของถังหมักเชื้อขนาด 200 ลิตร	

รายการตาราง

ตารางที่ 1	14
ตารางที่ 2	15
ตารางที่ 3	18
ตารางที่ 4	18
ตารางที่ 5	19
ตารางที่ 6	20

รายการรูปประกอบ

รูปที่ 1	20
รูปที่ 2	21
รูปที่ 3	22
รูปที่ 4	22

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันเกษตรกรได้มีการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชเป็นจำนวนมาก ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์การเกษตรซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาสุขภาพต่อผู้บริโภค ปัญหาด้านมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม และปัญหาด้านการส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรซึ่งได้รับการกีดกันจากประเทศผู้นำเข้าโดยการออกข้อบังคับให้ปริมาณสารเคมีต่างๆที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์ในปริมาณที่ยอมรับได้ต่ำมากหรือไม่มีเลย เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวหลายหน่วยงานของรัฐได้มีการเสนอวิธีการแก้ปัญหาเพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช โดยการใช้สารชีวอินทรีย์ (Biocontrol) ในการกำจัดศัตรูพืช ซึ่งได้รับการตอบสนองเป็นอย่างดีในการผลิตพืชผักอินทรีย์ นอกจากนี้ สารชีวอินทรีย์ที่นิยมใช้ในปัจจุบันนั้น ส่วนใหญ่เป็นสารสกัดจากพืชซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของแมลงศัตรูพืช และจุลินทรีย์เช่น NPV และ *Trichoderma* spp. ซึ่งเป็นศัตรูตามธรรมชาติ มีความจำเพาะเจาะจงต่อศัตรูพืช และได้รับการยอมรับว่า มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

Trichoderma spp. เป็นเชื้อราที่มีประโยชน์ซึ่งสามารถขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ พบได้โดยทั่วไปในดินที่มีความสมบูรณ์และมีสารอินทรีย์เป็นส่วนประกอบสูง *Trichoderma* spp. สามารถนำมาใช้ในการควบคุม ทำลาย และยับยั้งการเจริญของเชื้อราในดินซึ่งเป็นสาเหตุทางโรคพืชที่ก่อให้เกิดโรครากเน่า โคนเน่าในพืช ทั้งในพืชผัก พืชไร่ รวมทั้งไม้ผล เช่น เชื้อราเมล็ดผักกาด (*Sclerotium rolfii*) ราพิเทียม (*Pythium* spp.) ราไรซอกโทเนีย (*Rhizoctonia* spp.) ราฟัยทอปโทรา (*Phytophthora* spp.) และราฟูซาเรียม (*Fusarium* spp.) เชื้อราเหล่านี้เมื่อเข้าทำลายระบบรากพืชจะทำให้พืชแสดงอาการรากเน่าและโคนเน่า ในพืชที่แสดงอาการรุนแรงจะเหี่ยวแห้งตายในที่สุด ดังนั้นจึงได้รับการส่งเสริมจากหน่วยราชการต่างๆ ให้เกษตรกรมาใช้ประโยชน์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มา ในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืช เพื่อลดสารพิษตกค้างในพืชและสภาพแวดล้อม

นอกจากการใช้เป็นสารชีวอินทรีย์ในพืชแล้ว *Trichoderma* spp. ยังมีประโยชน์อีกมากมายจากการศึกษาพบว่า *Trichoderma* spp. มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ cellulase ได้สูง ซึ่งสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารทั้งคนและสัตว์ และอุตสาหกรรมสิ่งทอ นอกจากนี้ *Trichoderma* spp. ยังสามารถนำมาใช้ในการส่งเสริมการเจริญของพืช (growth promotion) เนื่องจาก *Trichoderma* spp. ช่วยส่งเสริมให้ระบบรากของพืชมีความแข็งแรง และทำให้รากเจริญได้ลึกมากขึ้น ทำให้พืชสามารถเจริญได้ดีและมีความต้องการน้ำที่ลดลง และให้ผลผลิตสูงขึ้น

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและกระบวนการผลิตเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในระดับห้องปฏิบัติการและการขยายขนาดเพื่อสามารถผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรมได้

1.2 วิธีดำเนินการวิจัย

1. ทดสอบหาสายพันธุ์
2. ทดลองหาสภาวะการผลิตในสภาวะที่เป็นอาหารแข็ง (Solid state fermentation)
3. ขยายขนาดการผลิต

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. สามารถพัฒนากระบวนการผลิตเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพและสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเกษตรอินทรีย์ และถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตสู่ผู้ประกอบการ
2. ลดการนำเข้าสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดโรคพืช
3. ส่งเสริมการทำเกษตรอินทรีย์ให้แพร่หลายภายในประเทศ

1.4 แผนการดำเนินการ

ระยะเวลา(เดือน)	งานวิจัย
1-6	คัดเลือกสายพันธุ์ ไตรโคเดอร์มา ที่สามารถกำจัดเชื้อราโรคเน่าในพืชได้ดี
7-10	ทดลองผลิตเชื้อราไตรโคเดอร์มา สายพันธุ์ที่ กำจัดเชื้อราโรคเน่าในพืชได้ดี ในระดับ ห้องปฏิบัติการและขยายขนาด
11-12	สรุปและเขียนรายงาน

บทที่ 2

ทฤษฎีและวาทสารปริทัศน์

Trichoderma spp. เป็นราชั้นสูงที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืช ซากสัตว์และอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร เจริญได้รวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อราหลายชนิด สร้างเส้นใยสีขาวและผลิตส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า “โคนิเดีย” หรือ “สปอร์” จำนวนมากรวมเป็นกลุ่มหนาแน่นจนเห็นเป็นสีเขียว เชื้อราไตรโคเดอร์มาเป็นศัตรู (ปฏิปักษ์) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดโดยวิธีการเบียดเบียน หรือเป็นปรสิต และแข่งขันหรือแย่งใช้อาหารที่เชื้อโรคต้องการ นอกจากนี้เชื้อราไตรโคเดอร์มายังสามารถผลิตปฏิชีวนสาร และสารพิษ ตลอดจนน้ำย่อยหรือเอนไซม์สำหรับช่วยละลายผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช คุณสมบัติพิเศษของเชื้อราไตรโคเดอร์มาคือ สามารถช่วยละลายแร่ธาตุให้อยู่ในรูปแบบที่เป็นประโยชน์ต่อพืช จึงช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและชักนำให้ต้นพืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรค เชื้อราไตรโคเดอร์มาบางสายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคของพืชเศรษฐกิจต่างๆทั้งพืชไร่ ไม้ผล พืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิดได้ในสภาพแปลงเกษตรกร ทั้งโรคที่เกิดบนส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดิน เช่น โรคเมล็ดเน่า โรคเน่าระดับดิน (โรคลำไย) รากเน่า หัวหรือแง่งเน่า และโคนเน่า เป็นต้น โรคที่เกิดบนส่วนของพืชที่อยู่เหนือดินไม่ว่าจะเป็นส่วนของ กิ่ง ผล ใบ หรือดอก เช่น โรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง โรคแคงเกอร์ของมะนาว โรคราดำของมะเขือเทศ โรคใบปื้นเหลืองและโรคดอกสนิมของกล้วยไม้ โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงและพริกทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต นอกจากนี้ยังสามารถใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรครากเน่าของพืชผักสลัดและผักกินใบต่างๆที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหาร (ระบบไฮโดรโปนิคส์) และจากผลการวิจัยล่าสุดพบว่าการแช่เมล็ดข้าวเปลือกก่อนใช้หว่านลงในนาข้าว ช่วยลดการเกิดโรคเมล็ดด่าง เมล็ดลีบ ของข้าวที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราหลายชนิด ตลอดจนช่วยเพิ่มผลผลิตและน้ำหนักเมล็ด และเพิ่มผลผลิตต่อไร่ได้ด้วยโดยมีกลไกในการต่อสู้กับเชื้อสาเหตุโรคพืชอยู่ 4 ประการ คือ

1. การแข่งขันกับเชื้อโรคพืช เนื่องจาก *Trichoderma* spp. เป็นราที่เจริญเร็วและสร้างสปอร์ในปริมาณที่สูงทำให้สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชหรือจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณเดียวกัน
2. การเป็นปรสิตต่อเชื้อโรคพืช พบว่า *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วสามารถพ่นรด แล้วแทงส่วนของเส้นใยของราสาเหตุโรคพืช ทำให้เส้นใยของราโรคพืชนั้นตาย
3. การสร้างสารยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคพืช *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์ สามารถสร้างปฏิชีวนสาร สารพิษ และเอนไซม์ เพื่อหยุดยั้งหรือทำลายเส้นใยของราสาเหตุโรคพืชได้
4. การชักนำให้พืชมีความต้านทาน *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์สามารถชักนำให้พืชสร้างกระบวนการผลิตสารประเภทเอนไซม์หรือโปรตีน ซึ่งมีส่วนช่วยให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อโรคได้

การผลิตรา *Trichoderma* spp.

การผลิตราเพื่อขยายและเพิ่มปริมาณโดยกระบวนการหมักบนอาหารแข็ง (solid state fermentation) โดยใช้อาหารที่เป็นของแข็ง เช่น เมล็ดพืช เมล็ดธัญพืช ตลอดจนวัสดุอินทรีย์ต่างๆ ทั้งประเภทที่ยังเป็นเมล็ดอยู่ หรือที่บดเป็นผงละเอียดแล้ว ทำในถุงพลาสติกซึ่งใช้แรงงานและพื้นที่มาก การผลิตในถังหมักจะเป็นการนำเทคโนโลยีการหมักเข้ามาปรับใช้ซึ่งจะช่วยลดแรงงานและพื้นที่ใช้สอยลง อีกทั้งยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนได้ดีด้วย

เชื้อสดหรือมวลชีวภาพของเชื้อที่ได้จากกระบวนการผลิตสามารถนำไปใช้ได้ทันที แต่หากต้องการเก็บรักษาเชื้อไว้เป็นเวลานาน ต้องนำเชื้อสดที่ได้มาผลิตให้อยู่ในรูปสำเร็จชนิดต่างๆ โดยนำเชื้อสดผสมสารพา เช่น ผงโคอะคอมไมท์ ซีโอไลท์ฯ แล้วทำให้เชื้ออยู่ในสภาพที่แห้ง สปอร์ของเชื้อหยุดการเจริญ และเข้าสู่ระยะพักตัว

บทที่ 3

การทดลอง

1. การสำรวจและแยกเชื้อสาเหตุโรคพืชของลำไยและลิ้นจี่

ทำการสำรวจเชื้อสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวของลำไยและลิ้นจี่ ในเขตจังหวัดเชียงใหม่

บริเวณ อำเภอ สันทราย แม่ริม สะเมิง หางดง ไชยปราการ สารภี จอมทอง สันกำแพง สันป่าตอง และดอยสะเก็ด ในเขตจังหวัด ลำพูน บริเวณ อำเภอ บ้านโฮ่ง และบ้านทา ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2544 ถึง พฤษภาคม 2545 โดยนำตัวอย่างผลที่เป็นโรคมายกเชื้อด้วย Tissue transplanting method ทดสอบความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity test) และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ใน PDA slant agar

2. การสำรวจและแยกเชื้อจุลินทรีย์ปรักษ์จากแหล่งปลูกลำไยและลิ้นจี่

แยกเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดจากตัวอย่างใบ ผล และช่อดอก ของลำไยและลิ้นจี่ จากตัวอย่างในพื้นที่ ที่ทำการสำรวจ แหล่งละ 5 จุด โดยวิธี dilution plate (Xu and Gross, 1983) จากสารแขวนลอยของผิวชิ้นส่วนตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA., TSM. และ King's medium B นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ถึง 3 วัน เมื่อตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนอาหาร ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงนำมาตรวจสอบและจำแนกชนิด

สำหรับตัวอย่างดิน เก็บจากบริเวณที่ลึกจากผิวหน้าดิน 15 ถึง 50 เซนติเมตร จุดละประมาณ 200 กรัม แหล่งละ 5 จุด มาทำการแยกเชื้อโดยวิธี dilution plate ที่ความเข้มข้น 10^{-4} และ 10^{-5} บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA., TSM. และ King's medium B นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ถึง 3 วัน เมื่อตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนอาหารทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงนำมาตรวจสอบและจำแนกชนิด

3. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปรักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคหลังเก็บเกี่ยวของลำไยและลิ้นจี่

3.1 การประเมินในห้องปฏิบัติการ คัดเลือกจุลินทรีย์ปรักษ์ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคสำหรับเชื้อราใช้วิธี dual culture test บนอาหาร P.D.A. จำนวน 5 ซ้ำ ต่อเชื้อรา 1 ไอโซเลท บันทึกผลการทดลองแบบ CRD และในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย ใช้วิธี Dual culture test แบบปลูกเชื้อเป็นจุดสี่ด้าน (spot inoculation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA., TSM. และ King's medium B จำนวน 3 ซ้ำต่อเชื้อแบคทีเรีย 1 ไอโซเลท วัดพื้นที่ที่แสดงการยับยั้ง (inhibition zone) (เซนติเมตร)

3.2 การประเมินในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง นำผลลำไยและลิ้นจี่ที่ไม่เป็นโรคมารับการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยการแช่ในคลอโรกซ์ 10% นาน 20 นาที ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยรังสียูวีนาน 30 นาที จากนั้นทำการปลูกเชื้อราโรคพืชซึ่งเตรียมจากสารแขวนลอยของสปอร์ (spore suspension) ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมล. เพื่อทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ปรักษ์ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบในห้องปฏิบัติการแล้ว (เตรียมจากสารแขวนลอยของเซลล์ ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml กรณีเป็นเชื้อแบคทีเรีย และ 10^8 สปอร์ต่อมล. สำหรับเชื้อรา) จากนั้นทำการทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปรักษ์แต่ละไอโซเลท ตามกรรมวิธีดังต่อไปนี้

1. ปลูกเชื้อราโรคพืชอย่างเดียว
2. ปลูกเชื้อราปรักษ์อย่างเดียว
3. ปลูกเชื้อราโรคพืชก่อน 3 วัน แล้วจึงปลูกเชื้อราปรักษ์ตาม
4. ปลูกเชื้อราปรักษ์ก่อน 3 วัน แล้วจึงปลูกเชื้อราโรคพืชตาม
5. ปลูกเชื้อราโรคพืชพร้อมเชื้อราปรักษ์
6. พ่นน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำๆละ 10 ผล สังเกตลักษณะอาการของโรค และทำการนับผลที่เป็นโรค แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบเชื้อโรคพืช

4. การขยายขนาดการผลิตในถุงพลาสติกและถังหมัก

ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อราในถุงพลาสติกโดยนำข้าวที่หุงแล้วตักใส่ถุงทิ้งให้เย็นแล้วใส่หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส 3 วันทำการกลับพลิกถุงเพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตได้เต็มถุงในเวลา 9 วัน สำหรับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักนั้นจะให้ความร้อนข้าวกับน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมทิ้งไว้ให้เย็นจึงใส่หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ถังหมักจะหมუნข้าวตลอดเวลา

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและแยกเชื้อสาเหตุโรคพืชของลำไยและลิ้นจี่

จากการสำรวจในช่วงเดือน กรกฎาคม 2544 ถึง พฤษภาคม 2545 ตรวจพบเชื้อราโรคพืชที่ทำความเสียหายให้กับผลผลิตลำไยจำนวน 40 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp., *Alternaria* spp. และ *Phomopsis* spp. จำนวน 22, 10, 5 และ 3 ไอโซเลทตามลำดับ และเชื้อราโรคพืชที่ทำความเสียหายให้กับผลผลิตลิ้นจี่จำนวน 25 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp. และ *Aspergillus niger* จำนวน 10, 6, 6 และ 3 ไอโซเลทตามลำดับ

2. การสำรวจและแยกเชื้อจุลินทรีย์ปรปักษ์จากแหล่งปลูกลำไยและลิ้นจี่

จากการสำรวจและแยกเชื้อจุลินทรีย์ปรปักษ์จากแหล่งปลูกลำไยและลิ้นจี่ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน ช่วงเดือน กรกฎาคม 2544 ถึง พฤษภาคม 2545 พบเชื้อจุลินทรีย์ปรปักษ์ทั้งหมดจำนวน 102 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินสวนลำไยจำนวน 30 ไอโซเลท และจากส่วนเหนือดินของต้นลำไยจำนวน 27 ไอโซเลท และพบเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินสวนลิ้นจี่จำนวน 21 ไอโซเลท และจากส่วนเหนือดินของต้นลิ้นจี่จำนวน 24 ไอโซเลท (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงผลการสำรวจและแยกเชื้อจุลินทรีย์ปรปักษ์จากแหล่งปลูกลำไยและลิ้นจี่ในจ. เชียงใหม่และลำพูน

แหล่งปลูกลำไย และลิ้นจี่	จำนวนจุลินทรีย์ปรปักษ์ (ไอโซเลท)			
	แยกจากดิน		แยกจากส่วนเหนือดิน	
	ลำไย	ลิ้นจี่	ลำไย	ลิ้นจี่
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp
จังหวัดเชียงใหม่				
อำเภอสันทราย	8	6	6	7
อำเภอแมริม	2	3	2	2
อำเภอสะเมิง	3	1	1	2
อำเภอหางดง	6	2	3	3
อำเภอจอมทอง	3	2	0	0
อำเภอสันกำแพง	2	4	2	2
อำเภอดอยสะเก็ด	1	2	1	2
อำเภอสันป่าตอง	0	0	3	0
อำเภอไชยปราการ	0	1	0	4
รวม	25	21	18	22
จังหวัดลำพูน				
อำเภอบ้านโฮ่ง	3	0	4	1
อำเภอบ้านทา	2	0	5	1
รวม	5	0	9	2
รวมทั้งหมด	30	21	27	24

3. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปรปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของลำไยและลิ้นจี่

3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปรปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่ 29-61 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp., *Alternaria* spp., *Phomopsis* spp. และเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยวิธี dual culture test บนอาหาร PDA. อายุ 7 วัน แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชในระดับที่ไม่เกิน 2 พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่

34,39,42,43,47,48 และ 49 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ได้ดี ไอโซเลทที่ 29,30,31 และ 32 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* spp. ได้ดีมาก ไอโซเลทที่ 30,31,32,42 และ 43 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* spp. และไอโซเลทที่ 29,30,31,37,42,48 และ 49 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ดี ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยระดับการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่ 29 ถึง 61 ^{1/}

เชื้อโรคพืช	ระดับการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช			
	ไอโซเลท	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Phomopsis</i> spp.
T29	2	1	2	1
T30	2	1	1.8	1
T31	2	1	1.8	1
T32	2	1	1.8	1.6
T33	1.8	2	2.4	2
T34	1.6	2	2.4	1.8
T35	2	1.8	2	1.4
T36	2	2	3	1.8
T37	2	2	3	1.4
T38	1.8	2	3	2
T39	1.6	2	3	2
T40	2	2	3	2
T41	2	2	2.8	2
T42	1.4	2	2	1.2
T43	1	1.6	2	1.4
T44	1.6	1.4	2.8	1.6
T45	1.6	1.2	2.4	1.4
T46	1.6	1.2	2.4	1.4
T47	1.4	1.8	2.6	1.6
T48	1.2	1.4	2	1.4
T49	1.4	1.2	3	1.4
T50	3	3	3	2.6

เชื้อโรคพืช	ระดับการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช			
	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Colletotrichum</i> spp.
T51	2.6	2.8	3	2.8
T52	2.4	3	3	3
T53	2.4	2.6	3	2.8
T54	3	2.8	3	2.6
T55	3	3	3	2.6
T56	2.4	2.8	2.8	3
T57	3	2.6	3	3
T58	2.4	3	3	2.6
T59	2.4	2.8	3	2.6
T60	3	2.8	3	2.6
T61	3	2.8	3	2.6

- หมายเหตุ ตารางนี้ไม่มีการวิเคราะห์ทางสถิติโดยคัดเลือกระดับการยับยั้งการเจริญไม่เกิน 2
 - หมายเหตุ ระดับการควบคุม (Bell *et al.*, 1982)
 - ระดับ 1 *Trichoderma* spp. เจริญคลุมเชื้อราโรคพืชและเจริญคลุมผิวหน้าอาหารทั้งหมด
 - ระดับ 2 *Trichoderma* spp. เจริญคลุมเชื้อราโรคพืช 2/3 ของผิวหน้าอาหาร
 - ระดับ 3 *Trichoderma* spp. และเชื้อโรคต่างเจริญ ½ ของผิวหน้าอาหารและทั้งสองไม่ปรากฏอำนาจเหนือเหนือกัน
 - ระดับ 4 เชื้อโรคพืชเจริญคลุม *Trichoderma* spp. 2/3 ของผิวหน้าอาหาร และปรากฏการบุกรุกต่อต้านโดย *Trichoderma* spp.
 - ระดับ 5 เชื้อโรคพืชเจริญคลุม *Trichoderma* spp. และเจริญคลุมผิวอาหารทั้งหมด
- ถ้า < 2 ประสิทธิภาพดี
- ถ้า > 3 มีคุณสมบัติการเป็นปรปักษ์ไม่ดี

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปรักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โรคพืชบนผลลำไย

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่ 34,39,42,43,47,48 และ 49 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. บนผลลำไยแล้ววิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ พบว่าไอโซเลทที่ 42 ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. ในทุกกรรมวิธีทดสอบ (ปลูกเชื้อราโรคพืชก่อนเชื้อราปรักษ์ 3 วัน, ปลูกเชื้อราปรักษ์ก่อนเชื้อราโรคพืช 3 วัน และปลูกเชื้อราโรคพืชพร้อมเชื้อราปรักษ์) โดยมีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรค ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการปลูกเชื้อราโรคพืชอย่างเดียว และส่วนใหญ่กรรมวิธีทดสอบที่ปลูกเชื้อราปรักษ์ก่อนปลูกเชื้อราโรคพืช มีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรคต่ำกว่ากรรมวิธีทดสอบอื่นๆ อย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ ในไอโซเลทที่ 47 และ 48 และการปลูกเชื้อราปรักษ์ก่อนปลูกเชื้อราโรคพืช มีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรคไม่แตกต่างกันกับการปลูกเชื้อราโรคพืชก่อนปลูกเชื้อราปรักษ์ในไอโซเลทที่ 34 และ 49 (ตารางที่ 3)

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่ 29, 30, 31 และ 32 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* spp. บนผลลำไย แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่า กรรมวิธีทดสอบที่ทำการปลูกเชื้อราโรคพืชก่อนปลูกเชื้อราปรักษ์ มีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรคต่ำกว่ากรรมวิธีทดสอบอื่นๆ อย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลทที่ 30 ซึ่งการปลูกเชื้อราปรักษ์ก่อนปลูกเชื้อราโรคพืชมีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรคไม่แตกต่างกันกับการปลูกเชื้อราโรคพืชพร้อมเชื้อราปรักษ์ (ตารางที่ 4)

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่ 30, 31, 32, 42 และ 43 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* spp. บนผลลำไย แล้วนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่าไอโซเลทที่ 32 และ 42 ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* spp. บนผลลำไยในทุกกรรมวิธีทดสอบ โดยมีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการปลูกเชื้อราโรคพืชอย่างเดียว และส่วนใหญ่กรรมวิธีทดสอบที่ปลูกเชื้อราปรักษ์ก่อนปลูกเชื้อราโรคพืชมีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรคต่ำกว่ากรรมวิธีทดสอบอื่นๆ อย่างมีความแตกต่างกันทางสถิติ เช่นในไอโซเลทที่ 30,31,42 และ 43 (ตารางที่ 5)

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่ 29, 30, 31, 37, 42, 48 และ 49 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนผลลำไย แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่า ทุกไอโซเลทไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนผลลำไย โดยทุกกรรมวิธีทดสอบมีเปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติกับวิธีการปลูกเชื้อราโรคพืชอย่างเดียว (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* spp. บนผลลำไย

วิธีการทดลอง	เปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรค						
	T34	T39	T42	T43	T47	T48	T49
ปลูกเชื้อราโรคพืชอย่างเดียว	96.66 d	86.66 e	93.33 b	90.00 c	96.66 d	93.33 e	96.66 d
ปลูกเชื้อราปรักษ์อย่างเดียว	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
ปลูกเชื้อราโรคพืชก่อนปลูกเชื้อราปรักษ์ 3 วัน	40.00 b	70.00 b	86.66 b	86.66 c	86.66 c	56.66 c	56.66 b
ปลูกเชื้อราปรักษ์ก่อนปลูกเชื้อราโรคพืช 3 วัน	43.33 b	56.66 b	80.00 b	76.66 b	80.00 b	43.33 b	46.66 b
ปลูกเชื้อราโรคพืชพร้อมเชื้อราปรักษ์	53.33 c	60.00 b	90.00 b	73.33 b	86.66 c	70.00 d	76.66 c
พ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

หมายเหตุ เปรียบเทียบโดยใช้วิธี Duncan's multiple range Test ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria* spp. บนผลลำไย

วิธีการทดลอง	เปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรค			
	T29	T30	T31	T32
ปลูกเชื้อราโรคพืชอย่างเดียว	83.33 d	80.00 e	86.66 e	86.66 e
ปลูกเชื้อราปรักษ์อย่างเดียว	0 a	0 a	0 a	0 a
ปลูกเชื้อราโรคพืชก่อนปลูกเชื้อราปรักษ์ 3 วัน	76.66 ed	80.00 c	70.00 d	66.66 d
ปลูกเชื้อราปรักษ์ก่อนปลูกเชื้อราโรคพืช 3 วัน	76.66 ed	60.00 b	36.66 c	36.66 c
ปลูกเชื้อราโรคพืชพร้อมเชื้อราปรักษ์	60.00 b	53.33 b	20.00 b	20.00 b
พ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0 a	0 a	0 a	0 a

หมายเหตุ เปรียบเทียบโดยใช้วิธี Duncan's multiple range Test ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* spp. บนผลลำไย

วิธีการทดลอง	เปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรค				
	T30	T31	T32	T42	T43
ปลูกเชื้อราโรคพืชอย่าง เดียว	93.33 e	83.33 d	80.00 b	90.00 d	83.33 d
ปลูกเชื้อราปรักษ์อย่าง เดียว	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
ปลูกเชื้อราโรคพืชก่อน ปลูกเชื้อราปรักษ์ 3 วัน	70.00 d	73.33 c	7.66 b	83.33 cd	76.66 cd
ปลูกเชื้อราปรักษ์ก่อน ปลูกเชื้อราโรคพืช 3 วัน	40.00 b	33.33 b	66.66 b	76.66 bc	53.33 b
ปลูกเชื้อราโรคพืชพร้อม เชื้อราปรักษ์	56.66 c	40.00 b	70.00 b	73.33 b	73.33 c
พ่นน้ำกลั่นนึ่งมาเชื้อ	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

หมายเหตุ เปรียบเทียบโดยใช้วิธี Duncan's multiple range Test ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

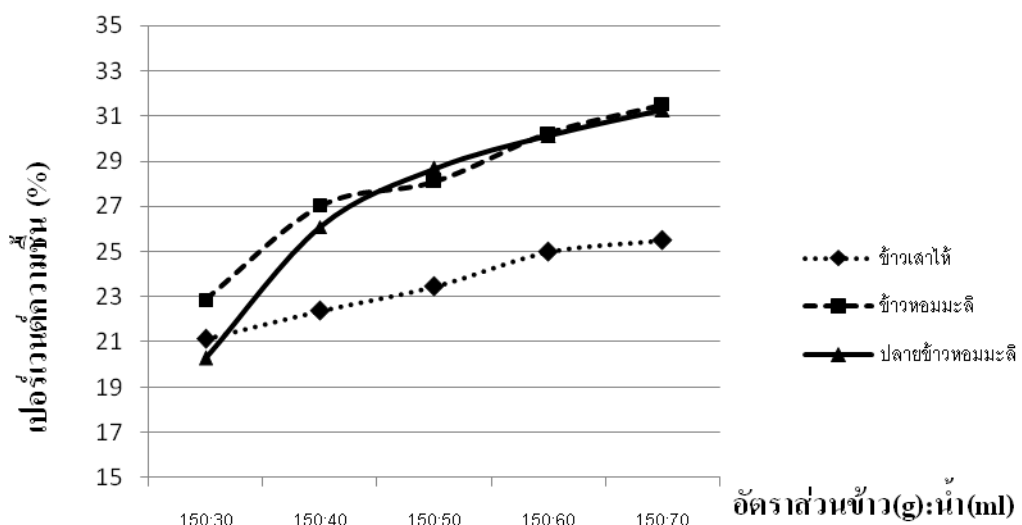
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนผลลำไย

วิธีการทดลอง	เปอร์เซ็นต์ผลที่เป็นโรค						
	T29	T30	T31	T37	T42	T48	T49
ปลูกเชื้อราโรคพืชอย่างเดียว	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
ปลูกเชื้อราปรักย์อย่างเดียว	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
ปลูกเชื้อราโรคพืชก่อนปลูก เชื้อราปรักย์ 3 วัน	96.66 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b	100 b
ปลูกเชื้อราปรักย์ก่อนปลูก เชื้อราโรคพืช 3 วัน	100 b	100 b	100 b	100 b	93.33 b	100 b	100 b
ปลูกเชื้อราโรคพืชพร้อมเชื้อรา ปรักย์	100 b	100 b	100 b	96.66 b	100 b	100 b	100 b
พ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

หมายเหตุ เปรียบเทียบ โดยใช้วิธี Duncan's multiple range Test ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับ $P < 0.05$

ความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นกับการเจริญเติบโต

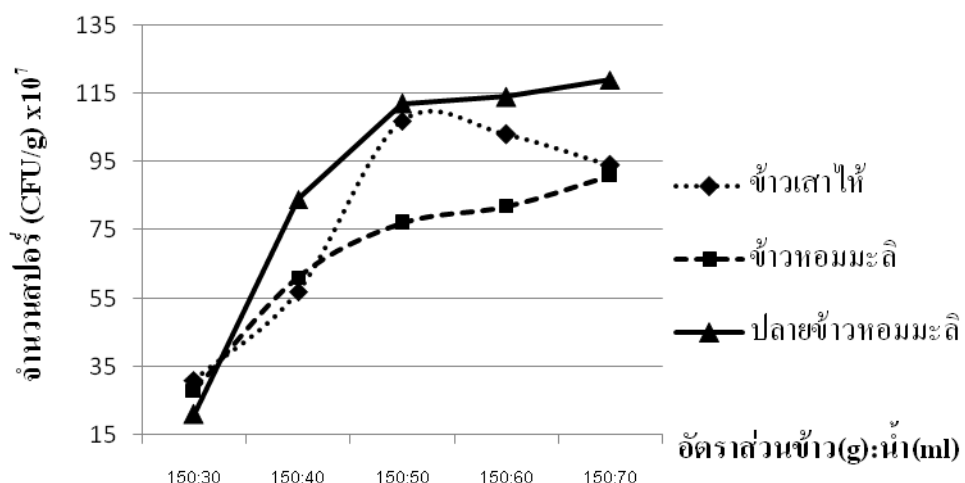
ความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นกับอัตราส่วนข้าว : น้ำที่ 150:30 150:40 150:50 150:60 150:70 ของ ข้าวเสาไห้ ข้าวหอมมะลิ และปลายข้าวหอมมะลินิตินต่าง ๆ ที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยมีความชื้นของข้าวหลังนึ่งฆ่าเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 กราฟแสดงค่าความชื้นของข้าวเสาไห้ ข้าวหอมมะลิ และปลายข้าวหอมมะลิ ที่อัตราส่วนข้าว : น้ำต่างๆ หลังนึ่งฆ่าเชื้อ

จากรูปที่ 1 จะเห็นได้ว่า ข้าวที่ผสมกับน้ำในแต่ละอัตราส่วนก่อนนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที นั้นข้าวหอมมะลิจะมีความชื้นสูงที่สุด รองมาคือปลายข้าวหอมมะลิ และข้าวเสาไห้ ตามลำดับ ซึ่งข้าวหอมมะลิมีความชื้นสูงสุดเท่ากับ 31.52% ที่อัตราส่วนข้าว 150(g): น้ำ 70(ml) ปลายข้าวหอมมะลิมีความชื้นสูงสุดเท่ากับ 31.24% ที่อัตราส่วนข้าว 150(g): น้ำ 70(ml) และ ข้าวเสาไห้มีความชื้นสูงสุดเท่ากับ 25.51% ที่อัตราส่วนข้าว 150(g): น้ำ 70(ml)

เมื่อนำเชื้อรามาปลูกลงบนข้าวเสาไห้ ข้าวหอมมะลิ และปลายข้าวหอมมะลิ ที่นึ่งฆ่าเชื้อ อัตราส่วนข้าว : น้ำที่ 150:30 150:40 150:50 150:60 150:70 ตามลำดับนำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 9 วัน นำมาวัดจำนวนสปอร์ของเชื้อราและแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 กราฟแสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่เจริญบนข้าวชนิดต่างๆ ในวันที่ 9

จากรูปที่ 2 จำนวนสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่บ่มมาแล้วเป็นเวลา 9 วัน บนข้าวเสาไห้ ข้าวหอมมะลิหัก และปลายข้าวหอมมะลิ ที่อัตราส่วนข้าว : น้ำ ต่างๆ พบว่า ในปลายข้าวหอมมะลิมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ ซึ่งปลายข้าวหอมมะลิมีจำนวนสปอร์สูงสุดเท่ากับ 1.19×10^9 CFU/g ที่อัตราส่วนข้าว 150(g):น้ำ 70(ml) ข้าวเสาไห้มีจำนวนสปอร์สูงสุดเท่ากับ 1.07×10^9 CFU/g ที่อัตราส่วนข้าว 150(g):น้ำ 50 (ml) และข้าวหอมมะลิหักมีจำนวนสปอร์สูงสุดเท่ากับ 9.1×10^8 CFU/g ที่อัตราส่วนข้าว 150(g):น้ำ 70(ml)

จากผลการทดลอง พบว่าความชื้นที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีเป็นความชื้นที่ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์

การขยายขนาดการผลิตเชื้อในถุงพลาสติก

ใช้ไตรโคเดอร์มาที่เลี้ยงในอาหารแข็งในจานเลี้ยงเชื้อเป็นหัวเชื้อเพื่อผลิตในถุงโดยนำเชื้อจากจานเลี้ยงเชื้อมาเจียลงในข้าวสุกที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ใส่ในถุงพลาสติก(เป็นถุงที่ใช้เพาะเห็ด) ถุงละประมาณ ครึ่งกก. ใส่หัวเชื้อประมาณ 1 จานต่อข้าว 1 ถุงแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 9 วัน โดยในวันที่ 3 ต้องคลุกถุงเพื่อให้เส้นใยเจริญเติบโตในทุกด้านของถุงจากนั้นตั้งไว้ในที่ที่มีแสงเชือกก็จะเจริญเติบโตจนเต็มเมล็ดข้าว ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่3 เชื้อที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วพร้อมนำไปใช้เป็นสารชีวอินทรีย์กำจัดแมลง

การขยายขนาดการผลิตในถังหมุนขนาด 200 ลิตร

ถังหมักอาหารแข็งจะเป็นรูปทรงกระบอก สามารถให้ความร้อนในการนึ่งฆ่าเชื้อได้ถึงจะหมุนอย่างช้าๆตลอดเวลาซึ่งจะทำการคลุกเคล้าอาหารและเชื้อที่อยู่ภายในได้อย่างดี นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยระบายความร้อนที่เกิดขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต ลักษณะของถังหมักจะเป็นดังรูปที่4



รูปที่4 รูปถังหมักอาหารแข็งแบบหมุนขนาด 200 ลิตร

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงในถังหมักอาหารแบบแข็ง(Solid state fermentation) ที่เป็นถังหมุน 200 ลิตรพบว่าเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้เนื่องจากเส้นใยหักขาดขณะที่ถังหมุนกวนตลอดเวลาและจากการศึกษาพบว่าเชื้อราชนิดนี้ต้องการแสงในขณะที่สร้างสปอร์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงไม่สามารถขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเชื้อราไตรโคเดอร์มาในถังหมุนขนาด 200 ลิตรได้ เพราะนอกจากการหักและขาดของเส้นใยแล้วถึงที่ใช้ในการหมักนี้ไม่มีแสงผ่านเข้าไปได้ทำให้เชื้อไม่เจริญเติบโตและสร้างสปอร์

ถังหมุนลักษณะนี้จึงไม่เหมาะในการใช้เลี้ยงเชื้อราไตรโคเดอร์มา

10. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วิธีดำเนินการวิจัย	สถานที่ทำการทดลอง
คัดเลือกสายพันธุ์ <i>Trichoderma</i> spp. ที่สามารถทำลายเชื้อราก่อโรคกับพืช	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของ <i>Trichoderma</i> spp. บนอาหารแข็งในระดับห้องปฏิบัติการ	ห้องปฏิบัติการ การหมัก สถาบันพัฒนาและฝึกอบรม โรงงานต้นแบบ
ขยายขนาดการผลิตลงถังหมักแบบหมุนขนาด 200 ลิตร	โรงงานต้นแบบการหมัก สรบ. มจธ.

11. ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ให้ระบุขั้นตอนอย่างละเอียด)

กิจกรรม	เดือนที่ 1-3	เดือนที่ 4-6	เดือนที่ 7-9	เดือนที่ 10-12
1. คัดเลือกสายพันธุ์ <i>Trichoderma</i> spp. ที่ทำลายราก่อโรคพืชที่ดี				
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง <i>Trichoderma</i> spp. ระดับห้องปฏิบัติการ				
3. ศึกษาเพื่อขยายขนาดการผลิต <i>Trichoderma</i> spp. ระดับโรงงานต้นแบบถังหมัก200ลิตร				

12. เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล อินทนู. 2544. การผลิตและวิธีใช้ไตรโคเดอร์มาชนิดสดควบคุมโรคพืช. หจก.เอ พลัส ทรี มีเดีย. 32 หน้า

จริยา วิสิทธิ์พานิช. 2543. โรคและแมลงศัตรูลำไย. หจก. ชนบรรณการพิมพ์, เชียงใหม่. 106 หน้า.

दनัย บุญยเกียรติ. 2545. โรคหลังเก็บเกี่ยวของพืชสวน. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 156 หน้า.

Andrew, J.H. 1992. Biological control of phyllosphere. Annual Review Phytopathology. 30 p 603-635.

Bell, D.K., H.D. Wells and C.R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species Against six fungal plant pathogen. Phytopathology v 3 379-382.

Blakeman, J.P. and N.J. Fokkema. 1982. Potential for biological control of plant disease on Phytoplane. Annual Review Phytopathology 20 p 167-192.

Snowdon, A.L. 1990. A color of postharvest disease and disorder of fruits and vegetables, Volume 1 General introduction and fruits. CRC Press Raton, Florida. P. 126-127

Van Driesche, R.G. and T.S. Bellows, Jr. 1996. Biological control. New York. P. 90-101.

Wolfgang, L., B., Berker, M. Hahn and K. Mendgan. 1997. Control of postharvest pathogen And colonization of the apple surface by antagonistic microorganism in the field. Biological Control of postharvest 87 p 1103-1109

Xu, G.W. and Gross. 1983. Selection of fluorescent pseudomonas antagonist to *Erwinia* Carotovora and suppressive of seed piece decay. Phytopathology 76 p. 414-422.

ภาคผนวก

ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

1. Potato 200 กรัม
2. Dextrose 20 กรัม
3. Agar 15 กรัม
4. น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

อาหาร MEA (Malt Extract Agar)

1. Glucose 20 กรัม
2. Peptone 1 กรัม
3. Malt Extract 40 กรัม
4. Agar 15 กรัม
5. น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

อาหาร SDB (Sabouraud Dextrose Agar)

1. Special peptone 10 กรัม
2. Dextrose 20 กรัม
3. Agar 15 กรัม
4. น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

การหาความชื้น (Moisture Content)

อุปกรณ์

1. Moisture can
2. Incubator 105 ± 3 °C
3. Desicator

วิธีทำ

1. อบถั่วที่ 105 ± 3 °C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง
2. นำถั่วไปเข้า Desicator ทันที ประมาณ 15-30 นาที
3. ชั่งน้ำหนักถั่ว (W_1)
4. ชั่งตัวอย่างลงในถั่ว 3 g (W_2)
5. เขย่าให้ตัวอย่างกระจายทั่วถั่ว
6. นำไปอบที่ 105 ± 3 °C ประมาณ 3 ชั่วโมง
7. นำออกจากตู้อบและนำเข้า Desicator 10-30 นาที

8. ชั่งน้ำหนักถ้วย (W_3)

9. นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

$$\%DM = \frac{W_3 - W_2}{W_2 - W_1} \times 100$$

$$\%Total\ Moisture = 100\% - \%DM$$

ข. การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma hazianum*

นำข้าวจากถุงที่มีเชื้อโตแล้วสังเกตจากสปอร์สีเขียว ประมาณ 9 วัน มา 1 กรัม ทำ dilution กับ สารละลาย Tween 80* ที่เตรียมไว้ 9 ml จากนั้นนำไปเขย่าผสมกันจนสังเกตเห็นว่าสปอร์สีเขียวหลุดออกจากข้าวจนหมด และทำการดูดตัวอย่างมา 0.01 ml หยดลงบน Haemocytometer ตรงบริเวณตัว H ต้องกล้องจุลทรรศน์เพื่อนับสปอร์ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตรข้างล่าง

จำนวนเซลล์ที่นับได้ =

หมายเหตุ : การเตรียมสารละลาย Tween 80

เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml ใส่ Duran แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที จากนั้นดูด Tween 80 มา 0.5 ml ผสมให้เข้ากับน้ำกลั่นที่เตรียมไว้โดยนำไปอุ่นที่ Water bath

ค. ลักษณะถังหมักอาหารแข็งขนาด 200 ลิตร

ถังหมักมีลักษณะเป็นทรงกระบอกตั้งภาพ ตรงกลางมีแกนขับเคลื่อนได้ด้วยมอเตอร์ ถังหมักสามารถ หมุนช้าๆ ได้ตลอดเวลาทำให้อาหารข้างในคลุกเคล้ากันได้ดีและมีอุณหภูมิสม่ำเสมอ มีระบบควบคุม ที่เชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ทำให้สามารถควบคุมพารามิเตอร์บางตัวได้ สำหรับหมักอาหารชนิดแข็ง เช่น ถั่วเหลือง รำ ข้าวหรือเมล็ดพืชต่างๆ ได้ดี โดยในขั้นตอนแรกต้องทำการฆ่าเชื้ออาหารด้วยไอน้ำ ที่ทิ้งไว้ให้เย็นจึงใส่หัวเชื้อ

