

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc.

เชื้อรา *S. rolfsii* จัดอยู่ใน Sub-division Deuteromycotina Class Agonomycetes เชื้อราชนิดนี้ไม่สร้าง spore แต่สร้างเม็ด sclerotium ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยที่ประสานกันแน่นจนเปลี่ยนเป็น pseudoparenchymatous tissue มีสัณฐาน perfect stage อยู่ใน Sub-division Basidiomycotina genus *Athelia rolfsii* (West, 1961; Wilson, 1961) เชื้อ *S. rolfsii* สามารถทำลายพืชได้อย่างกว้างขวาง Cooper (1961) รายงานว่า เชื้อ *S. rolfsii* เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น และเป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิดทั้งที่เป็นพืชผัก พืชไร่ ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผล นอกจากนี้ยังสามารถเข้าทำลายได้ทั้งเมล็ดพืชและต้นกล้า เจริญเติบโตได้ดีในเศษซากพืชที่ทับถมกัน ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่มีศักยภาพสูงในการเข้าทำลายต้นกล้า (Garren, 1964)

เชื้อ *S. rolfsii* เมื่อเข้าทำลายต้นกล้า จะทำให้แสดงอาการไหม้ (seedling blight) และตายอย่างรวดเร็ว เช่น โรคกล้าไหม้ของข้าวบาร์เลย์ ที่ช่อดอกแฉกเชื้อมากในช่วง 20 วันหลังปลูก และต้นทานตะวันโตมากเมื่อมีอายุ 90 วันขึ้นไป ดังนั้นจึงพบโรคนี้ระบาดมากในระยะกล้าและระยะแตกกอ (จิระเดช, 2534) ส่วนระยะอื่นๆ เช่น ระยะติดผลในมะเขือเทศ พริก มะเขือยาว แตงเทศ และแตงโม เชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาวเจริญคลุมบริเวณรอบโคนต้นและรากที่ใกล้ระดับดิน ต่อมาจะสร้างเม็ดสเคลอโรเทียมลักษณะกลมสีขาว แล้วเปลี่ยนเป็นเม็ดสีน้ำตาลในเวลาต่อมา (Jenkins and Averre, 1986) ส่วนบริเวณเชื้อทำลายจะเกิดแผลที่เนื้อเยื่อหุ้มท่อน้ำตาล ได้รายงานว่ เนื่องจากเชื้อ *S. rolfsii* สร้างกรด oxalic และเอนไซม์ polygalacturonase ที่ทำลายเนื้อเยื่ออย่างรวดเร็ว ต้นพืชจึงแสดงอาการเหี่ยวและเหี่ยวตายในเวลาต่อมา (Bateman and Beer, 1965) ส่วน Beckman และ Finch (1980) พบว่า พืชอาศัยของวัชพืชรูปลิ้นหอยเชอรี่ เชื้อ *S. rolfsii* สามารถทำให้ต้น *Chenopodium quinoa*

เป็นโรคเมล็ดเน่า (seed rot) และโคนเน่า (damping-off) ได้ในสภาพห้องปฏิบัติการ Higgins (1927) รายงานว่า เชื้อ *S. rolfsii* เข้าทำลายพริก ทำให้ผลผลิตลดลง 75% และยังพบว่าหลังจากปลูกเชื้อราชนิดนี้ในแปลงที่ปลูกมันเทศประมาณ 2 สัปดาห์ เชื้อราสามารถแพร่กระจายทั่วแปลงและทำความเสียหายกับพืชได้ นอกจากนี้เชื้อราชนิดนี้ยังเป็นปัจจัยหนึ่งในการกำหนดความสามารถในการสร้างเส้นใยและเม็ด sclerotium ของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ คือ 8 ถึง 40°C ในประเทศไทย จิระเดช และคณะ (2535) พบว่า เชื้อ *S. rolfsii* ทำให้เกิดโรคพืชได้หลายชนิด เช่น ถั่วลิสง มะเขือเทศ พริก และข้าวบาร์เลย์ โดยทำให้ผลผลิตข้าวบาร์เลย์ลดลงประมาณ 5-50%

2. ความสามารถของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคพืช

เชื้อ *Trichoderma* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นปรสิต และสามารถควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดินหลายชนิด เช่น เชื้อ *S. rolfsii*, *Ceratobasidium cornigerum*, *Phytophthora parasitica* f.sp. *nicotina*, *P. cactorum*, *Pythium aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *Rhizoctonia solani* และ เชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (Bell et al., 1982; Sivan et al., 1987; Smith et al., 1990; Roiger and Jeffers, 1991) เชื้อ *Trichoderma* spp. เจริญเติบโตแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 15-21°C และมีชีวิตรอดในสภาพที่มีอุณหภูมิที่เย็นจัดประมาณ 10-12°C (Johnson et al., 1987; Eastburn and Butler, 1991) นอกจากนี้ยังเจริญได้ในที่อุณหภูมิสูง จากการศึกษาในประเทศไทย Kanitta และคณะ (1991) พบว่า เชื้อ *Trichoderma* และ *Gliocladium* ควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจาก เชื้อ *S. rolfsii* ในสภาพไร่ได้ 13.2-95.9%

3. การสร้างสารปฏิชีวนะและ extracellular enzyme ของเชื้อ *Trichoderma* spp.

เชื้อ *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่สร้างสารปฏิชีวนะ ซึ่งมีผลต่อการเป็นปรสิตต่อเส้นใย และสร้างเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ Dennis และ Webster (1971) พบว่า เชื้อรา *Fomes annosus* ที่มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* Schlecht. สร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ชนิดเดียวกับกับที่เชื้อ *Trichoderma* spp. สร้างขึ้น คือ สาร trichodermin นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สร้างสาร harzianopyridone ซึ่งจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด และมีศักยภาพในการนำไปผลิตในเชิงการค้า (Rodgers, 1989) และยังมีรายงานว่าเชื้อ *T. harzianum* สร้างเอนไซม์ β -1,3-glucanase, protease, N-acetyl- β -D-glucosaminidases, chitinase, 1,4- β -chitobiosidases และ endochitinases ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อย่างกว้างขวาง เช่น *Botrytis cinerea*, *F. solani*, *Ustilago avenae* เป็นต้น (Elad et al., 1982; Harman et al., 1993; Lorito et al., 1993) Hadar และคณะ (1979) พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* สามารถผลิตเอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase ออกมาย่อยสลายทั้งเส้นใยเมื่อสัมผัสกับเส้นใยของเชื้อ *R. solani* เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม laminarin และ chitin เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ นอกจากนี้เชื้อ *T. harzianum* ยังสามารถใช้ทั้งเส้นใยของเชื้อ *S. rolfsii* เป็นแหล่งของคาร์บอน (carbon source) ได้ด้วย (Elad et al., 1982)

4. รูปแบบและการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่นำมาใช้ประโยชน์

การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรคพืช จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเชื้อในวัสดุต่างๆที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้ดี จากรายงานของ Sivan และคณะ (1984) พบว่า หากผสม peat และรำข้าวสาลี (pea : wheat

bran) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และรักษาระดับ pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 25°ซ
เชื้อจะมีชีวิตรอดได้นาน 1 ปี นอกจากนี้ Knudsen และ Bin (1990) พบว่า การใช้รา
ข้าวสาลี 2 กรัม ใส่ในเส้นใยที่ผสม alginate (hyphae alginate mixture) จะ
ช่วยส่งเสริมให้เชื้อรา *T. harzianum* มีการเจริญเติบโตของเส้นใย และมีความหนาแน่น
มาก

มีการพยายามพัฒนารูปแบบการผลิตเชื้อ *Trichoderma* spp. ให้อยู่ในรูปแบบผง
เชื้อแห้งซึ่งนำไปใช้ได้สะดวก มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาและขนส่ง จีระเดช และ
คณะ (2535) พบว่า การใช้ผงโคอะคอมไมท์ (diatomite) เป็นสารพาหหรือสารไม่
ออกฤทธิ์ที่ดีในการเจือจางปริมาณเชื้อราของการผลิตผงเชื้อ ส่วนการเตรียมหัวเชื้อมี
วิธีการ 2 ขั้นตอน ประกอบด้วย การหมักอาหารแข็งโดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma*
spp. บนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเชื้อราเจริญจนคลุม
เมล็ดข้าวฟ่างทั่วถึงแล้ว (7-10 วัน) จึงเก็บเชื้อราไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำไปใช้เตรียม
ผงเชื้อต่อไป ซึ่งวิธีนี้ วีระศักดิ์ และ ระวีวรรณ (2528) ได้ใช้ควบคุมโรคโคนเน่าของผัก
และถั่วลิสงได้ดี ส่วนอีกวิธีการหนึ่งคือ การหมักอาหารเหลวด้วยการเลี้ยงเชื้อราในส่วน
ผสมของกากน้ำตาล(molass) ยีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัม ผสมน้ำ 1 ลิตร
และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที ผ่านอากาศที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหาร
ผสมตลอดเวลา เมื่อครบกำหนด 10-14 วัน จึงกรองเอาเฉพาะสปอร์และเส้นใยของเชื้อ
ราซึ่งเรียกว่า มวลชีวภาพ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นสำหรับใช้เตรียมผงเชื้อต่อไป

ขั้นตอนต่อไปคือ ผลิตผงเชื้อ โดยนำมวลชีวภาพของเชื้อที่ได้จากการผลิตทั้งสองวิธีการ
มาคั่วให้ละเอียด แล้วผสมคลุกเคล้ากับผงโคอะคอมไมท์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 240 μm
ในอัตราส่วนของมวลชีวภาพจากการหมักในอาหารแข็งและอาหารเหลวต่อผงโคอะคอมไมท์
คือ 1:1 และ 1:9 ตามลำดับ นำส่วนผสมที่ได้ไปแผ่ให้เป็นแผ่นบางๆ ตั้งให้แห้งในตู้อบ
ก่อนนำไปบดให้เป็นผงละเอียด แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 35 เมช (500 μm) บรรจุผง
เชื้อที่ร่อนได้ในถุงพลาสติกเก็บไว้ในตู้เย็น หรือนำไปใช้ได้เลย ในต่างประเทศมีรายงาน
ว่า Alginate pellets ที่มีปริมาณเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium*
spp. ผสมข้าวสาลี ใช้ควบคุมเชื้อรา *R. solani* โดยลดอัตราการออกรูโรคของเชื้อได้ถึง
34-78% (Lewis and Papavizas, 1985; Lewis and Papavizas, 1987)

5. การป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเกษตรกรรม การกำจัดวัชพืช การปลูกพืชหมุนเวียน การใช้พันธุ์ต้านทาน การใช้สารเคมี และการใช้ชีววิธี ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

5.1 การปลูกพืชหมุนเวียน Cooper ในปี 1956 อ้างตาม Garren (1961) รายงานว่า เชื้อ *S. rolfsii* จะทำลายถั่วลิสงโดยเฉลี่ยประมาณ 9% เมื่อมีการปลูกพืชหมุนเวียนกับถั่วเหลือง เชื้อทำลายถั่วลิสง 5% และในปีต่อมาเมื่อปลูกถั่วลิสงสลับกับข้าวโพด เชื้อทำลายถั่วลิสงได้ 3% ส่วนในปีที่ 3 ปลูกข้าวสาลีและถั่วลิสงเชื้อ *S. rolfsii* จะทำลายถั่วลิสงได้เพียง 2% เท่านั้น

5.2 การใช้พลังงานความร้อนจากดวงอาทิตย์ เป็นการนำทรัพยากรที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เป็นประโยชน์ Mihail และ Alcorn (1984) พบว่า การใช้ความร้อนจากดวงอาทิตย์อบดินสามารถควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ที่ระดับดินลึก 15 เซนติเมตรในฤดูร้อน แต่ในฤดูฝนจะควบคุมเชื้อได้เพียงระดับหน้าผิวดินที่ 1 เซนติเมตรเท่านั้น

5.3 การใช้สารเคมี Abeygunawardena และ Wood (1957) รายงานว่า สารเคมี chlorobromopropen หรือ chloropicrin อบดิน สามารถทำลายเมล็ดสเคลอโรเตียมได้ และในปี (1961) Harrison พบว่า สารเคมี pentachloronitrobenzene (PCNB) ผสมกับขี้เถ้าประมาณ 400 ปอนด์ต่อเอเคอร์ ควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* ได้เช่นกัน

5.4 การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นวิธีควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบต่อผู้ใช้และสภาพแวดล้อม เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี Wells และคณะ (1972) พบว่า การใช้เชื้อรา *T. harzianum* ช่วยลดการเข้าทำลายของเชื้อ *S. rolfsii* ในมะเขือเทศและถั่วลิสงในสภาพไร่ได้ นอกจากนี้ Elad และคณะ

(1980) รายงานว่า เชื้อ *T. harzianum* สามารถควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfii* ในถั่ว(bean) พืช หรือมะเขือเทศในสภาพไร้ออกซิเจนได้ PCNB ที่เข้มข้นสูง ระดับ pH สูง และอุณหภูมิต่ำ เป็นต้น

สำหรับในประเทศไทย จิระเดช (2534) รายงานว่า เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ 1 ทำให้ดินมะเขือเทศลดตายได้ 17-42% เมื่อเปรียบเทียบกับไม่ใส่เชื้อ นอกจากนี้ วีระศักดิ์ และ ระวีวรรณ (2528) ได้พบว่า การใช้เชื้อ *T. harzianum* เพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของผักและถั่วลิสงได้ผลในระดับที่น่าพอใจ และมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ควบคุมสาเหตุโรคพืชอื่นที่เข้าทำลายระบบรากพืชได้

5.5 การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ร่วมกับการใช้สารเคมี การควบคุมโรคพืชจะได้ผลดีเมื่อใช้หลายวิธีร่วมกัน การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ร่วมกับสารเคมี ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่ควบคุมโรคพืชได้ Peoples และคณะ (1976) พบว่า การใช้ดินร่วนปนทราย (sandy loam) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผสมด้วยสารเคมีที่ป้องกันกำจัดวัชพืช EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) ในอัตรา 2.5 และ 40 $\mu\text{g}/\text{ดิน}$ 1 กรัม ตรวจสอบการเจริญของเชื้อ *S. rolfii* และ *T. viride* พบว่า เชื้อ *S. rolfii* สามารถเจริญได้น้อยกว่า *T. viride* และจะถูกยับยั้งด้วยสารเคมี EPTC ที่อัตรา 40 $\mu\text{g}/\text{ดิน}$ 1 กรัม Abd-Ei Moity และคณะ (1982) พบว่า เชื้อ *T. harzianum* isolate T (ipro 25 M) เมื่อใช้ร่วมกับสารเคมี iprodione ในอัตราส่วน *Trichoderma* ต่อ iprodione 240:3 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ สามารถควบคุมโรค white rot ของต้นถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *S. cepivorum* โดยมีต้นกล้าที่ถูกเชื้อเข้าทำลายเพียง 6% เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าที่ใช้สารเคมี iprodione เพียงอย่างเดียว ต้นกล้าถูกทำลายถึง 51%

เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ (strain) WT-6 ที่ได้รับการชักนำด้วยแสง UV (uv-induce biotype) สามารถหนทางต่อสารเคมีเบนไมล์ที่ระคายความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 100-500 มก./มล. และยับยั้งโรคโคนเน่าของถั่ว(peas) ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Pythium ultimum* ตลอดจนโรคโคนเน่าของผักกาดหัวที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *R. solani* และโรค white rot ของถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *S. cepivorum* ได้

(Papavizas, 1981; Papavizas et al., 1982) และในเมื่อมา Papavizas และ Lewis (1983) รายงานว่า *T. viride* สายพันธุ์ T-1 สามารถยับยั้งและทนทานต่อสารเคมี benomyl, thiabendazole และ thiophanatemethyl ที่มีความเข้มข้นถึง 100 $\mu\text{g a.i./ml}$ และเจริญเติบโตได้ในอาหารสังเคราะห์ที่มี pH 3.5-4.5 ซึ่ง *T. viride* strain T-1 ยังช่วยยับยั้งโรคโคนเน่าของถั่วลิสงที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Pythium ultimum* ได้เช่นกัน การควบคุมเชื้อ *S. rolfsii* โดยวิธีผสมผสานระหว่างการใช้สารเคมีร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคทั้งในระยะต้นและระยะยาวอย่างต่อเนื่อง นับเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าให้ความสนใจเป็นอย่างมากในการควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง

1.1 แหล่งที่มาของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ใช้ทดลองทั้งหมด 27 ไอโซเลต ดังนี้

1.1.1 *Trichoderma* spp. (ไอโซเลต T1 และ T2) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศศ.ดร.จิระเดช แซ่ม่วง่าง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1.2 *Trichoderma* spp. (ไอโซเลต T3 ถึง T24 เรียงตามลำดับ) แยกได้จากดินในแปลงของหมวดพืชผัก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.1.3 *T. harzianum* (ไอโซเลต T25), *T. hamatum* (ไอโซเลต T26) และ *T. koningii* (ไอโซเลต T27) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Institute of plant disease and plant protection, University of Hanover ประเทศเยอรมัน

1.2 แหล่งที่มาของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

เชื้อรา *S. rolfsii* ที่ใช้ศึกษา แยกได้จากมะเขือเทศที่เป็นโรคโคนเน่า โดยความอนุเคราะห์ของภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.3 การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. (ไอโซเลต T3 ถึง T24)

แยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินในแปลงทดลองของหมวดพืชผัก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยลุ่มเก็บตัวอย่างดินมาฝังไว้ในที่ร่มแห้ง

แล้วบดคั้นให้ละเอียด ตักคั้นที่บดแล้วด้วยเข็มเย็บเย็บปริมาณ 0.05 มิลลิกรัม ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Martin's medium (ภาคหนวก) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ท่วมคั้น แล้วเขย่าให้ดินกระจายคลุกเคล้าในอาหารให้ทั่วถึง นำไปหมัก (incubate) ไว้ที่อุณหภูมิ 28°C ประมาณ 2-3 วัน แยกเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่บริสุทธิ์ โดยเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 27 วิธีการ (treatment) ซึ่งหมายถึงไอโซเลตของเชื้อ ทั้ง 22 ไอโซเลตละ 4 ซ้ำ (replication)

เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 27 ไอโซเลต และเชื้อรา *S. rolfsii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ประมาณ 3 วัน ย้ายเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *S. rolfsii* ที่เจริญแล้ว โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะวงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยของเชื้อราทั้งสองเจริญอยู่ แล้ววางชิ้นส่วนของเชื้อ *Trichoderma* spp. ให้ชิดขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และวางชิ้นส่วนของเชื้อ *S. rolfsii* ไว้ในทิศทางตรงข้ามชิดขอบจานอาหารภายในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ทำทุกไอโซเลตของเชื้อ *Trichoderma* spp.

วัดการเจริญเติบโตของเชื้อทุก 24 ชั่วโมง โดยวัดระยะทางการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *S. rolfsii* จนกระทั่งเชื้อทั้งสองเจริญชนกัน บันทึกความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* โดยดูจากระยะทางของเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่เจริญได้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน และลักษณะการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อ *S. rolfsii*

1.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเลอโรเทียจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

เลือกไฮโซเลตของเชื้อ *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไฮโซเลต คือ T1, T2, T6, T9, T12, T14, T16, T18, T19, T20, T21 และ T24, *T. harzianum* (T25), *T. hamatum* (T26) และ *T. koningii* (T27) มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อสเลอโรเทียของเชื้อ *S. rolfsii*

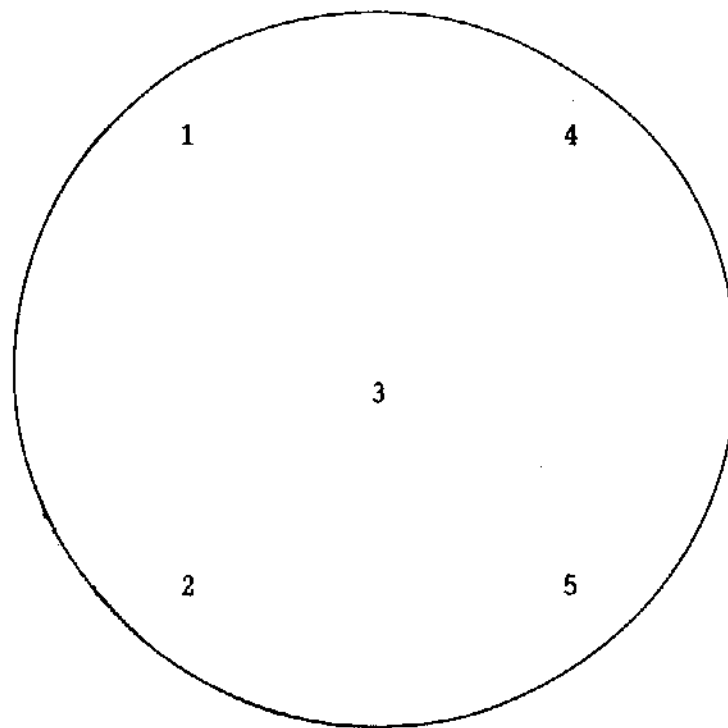
โดยเลี้ยงเชื้อรา *S. rolfsii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 28°C ประมาณ 7 วัน จนสร้างเชื้อสเลอโรเทียจากเนื้อเยื่อเชื้อสเลอโรเทียวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไฮโซเลต เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28°C โดยวาง 5 ตำแหน่ง (ภาพที่ 1) ทำสองจานอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็น 10 ซ้ำ

นำจานอาหารที่มีเชื้อทั้งสองไปหมักที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3 วัน แล้วบันทึกผลการทดลอง โดยสุ่มลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยจากเชื้อสเลอโรเทีย

1.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในสภาพเรือนทดลอง

1.6.1 การเตรียมหัวเชื้อข้าวฟ่างเพื่อเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Sclerotium rolfsii*

แช่เมล็ดข้าวฟ่างในน้ำ 1 คืน แล้วนำข้าวฟ่างไปนึ่งให้เมล็ดข้าวฟ่างสุกพอดี จากนั้นบรรจุลงในถุงพลาสติกที่ทนร้อนประมาณ 500 กรัม ใช้คอตวศรตีปากถุงปิดด้วยจุกลาลี แล้วนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเมล็ดข้าวฟ่างเย็นแล้วจึงบรรจุเชื้อ *Trichoderma* spp. 15 ไฮโซเลต ตามข้อ 1.5 โดยใช้ cork borer เจาะขึ้นรู้น แล้วบรรจุเชื้อโดยใช้ขึ้นรู้น 5 ขึ้นต่อข้าวฟ่าง 1 ถุง ลงในถุงหัวเชื้อข้าวฟ่างเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ หมักไว้ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ สำหรับหัวเชื้อ *S. rolfsii* นั้นบรรจุ



ภาพที่ 1 ตำแหน่งการวางเบ็ดสเซลล์ไรเค็มในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ
Trichoderma spp. ไฮโซเลตต่างๆเจริญอยู่

เชื้อ *S. rolfsii* ลงในเมล็ดข้าวฟ่าง และบ่มเชื้อในสภาพเช่นเดียวกันกับเชื้อ *Trichoderma* spp. (วีระศักดิ์ และ ระวีวรรณ, 2528)

1.6.2 การเตรียมต้นกล้ามะเชื้อเห็ด และการปลูกเชื้อ (inoculation)

เพาะเมล็ดมะเชื้อเห็ดลงในกระบะเพาะ เมล็ดจะงอกเป็นต้นกล้า อายุประมาณ 25-30 วัน นำขากกล้ามะเชื้อเห็ดลงในแก้วพลาสติกที่บรรจุดิน 350 มิลลิลิตร 1 ต้นต่อแก้ว ประมาณ 7 วัน เมล็ดมะเชื้อเห็ดตั้งตัวได้ปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. 15 ไอโซเลต ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.5 ไอโซเลตละ 10 ต้น โดยใช้หัวเชื้อ 5% โดยปริมาตร โรยรอบโคนต้น หลังจากนั้นอีก 7 วันจึงปลูกเชื้อ *S. rolfsii* ตามลงไป โดยใช้หัวเชื้อ 5% โดยปริมาตร ประมาณ 7 วันหลังจากปลูกเชื้อ *S. rolfsii* ตรวจสอบ ต้นมะเชื้อเห็ดที่รอดตาย และคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. 5 ไอโซเลตที่มี ประสิทธิภาพดี เพื่อศึกษาการหมานสารเคมีควบคุมเชื้อราต่อไป

2. การตรวจสอบกิจกรรมของ extracellular enzymes ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2.1 การเตรียม substrate เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

2.1.1 Substrate เพื่อตรวจสอบเอนไซม์เซลลูเลส เตรียม buffer substrate โดยใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) ความเข้มข้น 0.2 M และการดอะซิติก (acetic acid) เข้มข้น 0.2 M นำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน 7:3 ตามลำดับ ให้ได้ pH 5.0 จากนั้นเติม Na carboxymethyl cellulose 4% ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปหนึ่งหลอดก่อนที่จะใช้ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

สำหรับอาหารเหลว Czapek Dox broth มีส่วนผสมในอัตราส่วน ดังนี้ NaNO_3 3.0 กรัม K_2HPO_4 1.0 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัม KCl 0.5

กรัม $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 กรัม sucrose 30.0 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
ผสมสารเคมีที่เตรียมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2.1.2 Substrate เพื่อตรวจสอบเอ็นไซม์โปรทีเอสโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar (MEA) มีส่วนผสมในอัตราส่วนดังนี้ คือ Malt extract 25 กรัม วันผง 20 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อน เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเจลาตินให้ได้ความเข้มข้นของเจลาตินในอาหาร MEA 1%

2.1.3 Substrate เพื่อตรวจสอบเอ็นไซม์ไลเปส ประกอบด้วย 1% glycerol tributyrat (v/v), 1% NaCl (w/v), 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ และวันผง 2% โดยให้วันละลายก่อนแล้วใส่สารละลายทั้งหมดตามลงไป จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer ให้ละลายเข้ากันได้ดี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้พออุ่นแล้วเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.4 Substrate เพื่อตรวจสอบเอ็นไซม์แอลฟาอะมายเลส โดยใช้ Malt extract agar เช่นเดียวกับ 2.1.2 เพียงแต่ใช้ soluble starch 0.2% แทนเจลาติน

2.2 การเตรียม crude enzyme เพื่อตรวจสอบเอ็นไซม์เซลล์เลส

เลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไบโอสเลต (จากข้อ 1.5) ในอาหารเหลว Czapek Dox broth บรรจุใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร โดยบรรจุอาหารเหลวขวดละ 30 มิลลิลิตร ปิดเชื้อ *Trichoderma* spp. โดยใช้ก้านวัน 5 ชิ้นต่อขวด แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญเติบโตหนาแน่น รองเอาเส้นใยออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จะได้ culture filtrate ซึ่งนำไปหมัก

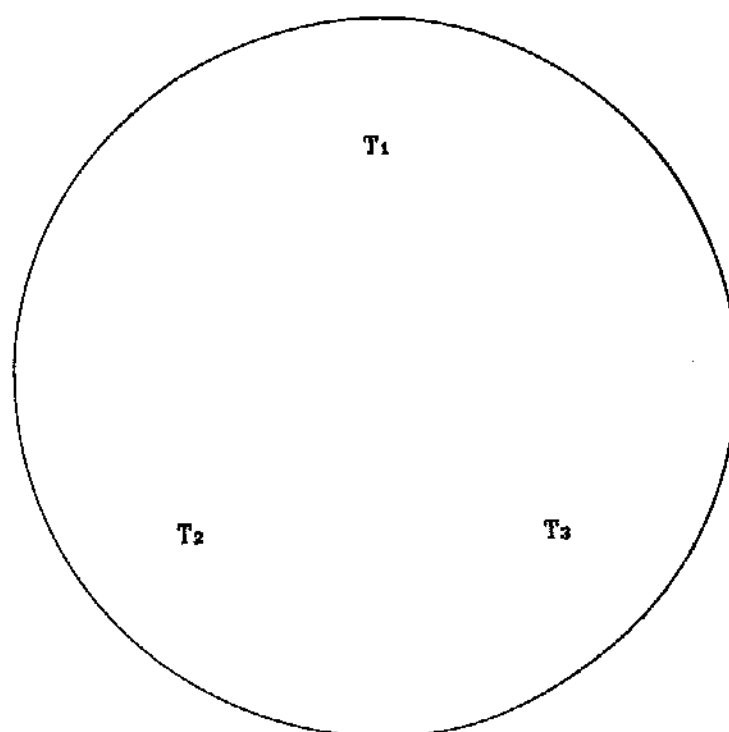
เหวี่ยง(centrifuge)ด้วยความเร็ว 5,000 rpm ที่ 5°ซ เวลา 20 นาที แล้วใช้ปิเปตคูลเอสารละลาย (supernatant) ที่เป็น crude enzyme ใส่ในขวดขนาด 20 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -20°ซ เมื่อต้องการนำ culture filtrate ที่เตรียมไว้ไปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิ 5°ซ แล้วนำเอา 0.5 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองที่มี substrate อยู่ 5 มิลลิลิตร ซึ่งจะलयอยู่บนผิวของ Na carboxymethyl cellulose ซึ่งมีสีขาวทึบ ทำไฮโดรไลซิส 3 ชั่วโมง นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการทดลอง โดยวัดความสูงของบริเวณที่ substrate ถูกย่อยเป็นมิลลิเมตรของแต่ละไฮโดรไลซิสของเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่มี cellulolytic activity (Kreisel and Schauer, 1987)

2.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

ย้ายเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เตรียมไว้ด้วย cork borer มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ซึ่งมี gelatine ผสมอยู่ 1% w/v โดยนำเชื้อมาวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ตำแหน่ง (ภาพที่ 2) ในหนึ่งจานอาหารปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. 3 ไฮโดรไลซิส ทำ 4 ชั่วโมง เชื้อที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเหสารละลายที่ลุ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งไว้ประมาณ 3 นาที บริเวณรอบ colony ของเชื้อ *Trichoderma* spp. ซึ่งจะไม่ใส (clear zone) ในขณะที่ยังมีสีขาวทึบ อันเนื่องมาจากโปรตีนตกตะกอนและไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ protease

2.4 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

เตรียม substrate ตามข้อ 2.1.3 แล้วย้ายเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่เตรียมไว้ใน substrate โดยมีตำแหน่งการวางขึ้นไว้เช่นเดียวกับข้อ 2.3 ทำ 4 ชั่วโมง เชื้อที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 7 วัน วัด clear zone ที่เกิดขึ้นรอบๆ colony ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสของเชื้อรา *Trichoderma* spp.



ภาพที่ 2 ตำแหน่งการปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างจากบนเจลลาติน 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar และ lipase substrate ในการตรวจสอบ proteolytic และ lipolytic activity ตามลำดับ (T1, T2, T3 = เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ)

2.5 การทดสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์แอลฟาอะมายเลส

โดยนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เตรียมไว้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ซึ่งผสม soluble starch ในปริมาตร 0.2% ตำแหน่งการวางชิ้นหัวเห็ดขึ้นเคียวกับภาพที่ 2 หน้า 4 ข้ามน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบละลายไอโอดีน (Lugol's iodine) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นให้ท่วม ทั้งไว้สักครู่ แล้ววัด clear zone รอบ colony ของเชื้อ *Trichoderma* spp. ซึ่งเป็นบริเวณที่แป้งถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์แอลฟาอะมายเลส

3. ผลของสารเคมีควบคุมเชื้อราบางชนิดต่อเชื้อ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีควบคุมเชื้อราต่อเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *S. rolfsii* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

3.1.1 การเตรียมไอโซเลตของเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่ใช้ทดสอบ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลต ตามข้อ 1.6 ได้คัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T2, T20, T24, *T. harzianum* (T25), *T. hamatum* (T26) และ *T. koningii* (T27) รวม 6 ไอโซเลต และเชื้อ *S. rolfsii* และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ประมาณ 3 วันเชื้อจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมทั้งจะนำไปทดสอบ

3.1.2 การเตรียมสารเคมีความเข้มข้น

สารเคมีที่ใช้ทดสอบมี 5 ชนิด ดังนี้

ชื่อสามัญ	ชื่อการค้า	ชื่อเคมี
Pentachloronitrobenzene	Terrachlor	---> Pentachloronitrobenzene
Mancozeb	Dithane M45	---> Manganese ethylene bisdithiocarbamate
Prochloraz	Octave	---> N-propyl-N-(2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl)-imidazole-1-carboxamide
Carbendazim	Derosal	---> 2-(methoxy carbonylaminobenzimidazole
Copper oxychloride	Vitigran Blue	---> Copper oxychloride

เตรียมสารเคมีแต่ละชนิดความเข้มข้นเป็น $\mu\text{g/ml}$ ของตัวทำ
ออกฤทธิ์ (active ingredient, a.i.) เตรียมสารละลายของสารเคมีแต่ละ 5 ระดับ
ความเข้มข้น $\mu\text{g/ml}$ ดังนี้คือ

ชนิดของสารเคมี	ระดับความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)				
PCNB	7,200	720*	72	7.20	0.720
Mancozeb	18,000	1,800*	180	18.00	1.800
Prochloraz	3,750	375*	37.5	3.75	0.375
Carbendazim	3,750	375*	37.5	3.75	0.375
Copper oxychloride	10,800	1,080*	108	10.80	1.080

* ความเข้มข้นที่ผู้ผลิตแนะนำ

3.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ที่ประกอบด้วย 7 การทดลองละ 4 ซ้ำ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยให้ความเข้มข้นของสารเคมีตามที่ต้องการข้างต้นทั้ง 5 สารเคมี ละ 5 ความเข้มข้น และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยไม่มีสารเคมีเพื่อใช้เป็นวิธีเปรียบเทียบ

ย้ายเชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 6 ไอโซเลต และ *S. rolfii* ที่เตรียมไว้โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะในอาหารที่มีเส้นใยของราแล้ววางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารควบคุมเชื้อรา เชื้อเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28°C วัดการเจริญเติบโตของเชื้อทุกวันหลังจากปลูกเชื้อ โดยวัดความหนาแน่นผ่าศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อสองแนวตั้งฉากกัน จนกว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *S. rolfii* ในวิธีการเปรียบเทียบจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 การคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* sp. และสารเคมีที่เหมาะสม เพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศในสภาพเรือนกระจก

3.2.1 การเตรียมพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์สีดา

เพาะเมล็ดมะเขือเทศในกระบะเพาะ เมื่อต้นกล้ามีอายุประมาณ 25-30 วัน ย้ายลงในแก้วพลาสติกขนาด 350 มิลลิตร ประมาณ 7 วัน ต้นมะเขือเทศจะตั้งตัวได้

3.2.2 การเตรียม inoculum เชื้อ *Trichoderma* spp.

นำเชื้อ *Trichoderma* spp. (ไอโซเลต T20, T25 และ T27) มาเลี้ยงในซีลีเนียมซัลเฟต 5% โดยน้ำหนัก ส่วนหัวเชื้อ *S. rolfii* เตรียมเช่นเดียวกันกับข้อ 1.6.1

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ทดลอง

สารเคมีที่ใช้ทั้งหมด 4 ชนิด และใช้ความเข้มข้นดังนี้

ชื่อสามัญ	ชื่อการค้า	ตัวยาลอกฤทธิ์	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Bacillus subtilis</i>	ชัยทูลา	<i>B. subtilis</i>	20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
<i>Bacillus subtilis</i>	BS	<i>B. subtilis</i>	20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
Pentachloronitrobenzene	Terrachlor	Pentachloronitrobenzene	7,200 $\mu\text{g/ml}$
Mancozeb	Dithane M45	Manganese ethylene bisdithiocarbamate	18,000 $\mu\text{g/ml}$

3.2.4 การปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp.

นำหัวเชื้อ *Trichoderma* spp. โรยรอบโคนต้นมะเขือเทศที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.1 จำนวน 5% โดยปริมาตร (17.5 มิลลิลิตร) หลังจากนั้นประมาณ 7 วัน ปลูกเชื้อ *S. rolfsii* ตามลงไปอีก 5% โดยปริมาตร และรดสารเคมีทั้ง 4 ชนิดละหนึ่งความเข้มข้นตามลงไปอีกแต่ละ 5% โดยปริมาตร ทำ 14 treatment 10 ข้าง (ต้น) โดยมีต้นมะเขือเทศที่ไม่ใช้เชื้อ *Trichoderma* กับสารละลายเคมี แต่ปลูกเชื้อ *S. rolfsii* อย่างเดียว และต้นมะเขือเทศซึ่งไม่ปลูกเชื้อใดและไม่ใช้สารเคมีเป็นวิธีการเปรียบเทียบ (check) จากนั้นประมาณ 7 วันตรวจนับต้นที่เป็นโรคโคนเน่า แล้วคัดเลือก *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่เหมาะสมเพื่อทดสอบในสภาพเรือนทดลองและแปลงปลูกต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในวัสดุค้ำจุน

เลือกเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20), *T. harzianum* (T25) และ *T. koningii* (T27) จากการทดสอบความทนทานต่อสารเคมีควบคุมเชื้อรา มาศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อในวัสดุค้ำจุน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 18 วิธีการ 3 ข้าง

4.1 วิธีศุน้ที่นำมาเพิ่มปริมาณเชื้อ *Trichoderma* spp.

เตรียมวัสดุที่จะใช้เพิ่มปริมาณเชื้อ *Trichoderma* spp. ได้แก่ ขี้ไก่ ข้าวโพดคั่ว ข้าวฟ่าง ขี้เลื่อย ทรายหึ่งสีอิฐ ทรายหึ่งสีอิฐที่คัดเป็นชั้นเล็ก ๆ และกากวัสดุเหลือหึ่งจากการสกัดน้ำผลไม้ (สับปรดและส้ม) ผสมกับรำละเอียด 5% ปั่นให้วัสดุหึ่งมีความชื้นพอเหมาะไม่เปียกและ นำวัสดุที่เตรียมบรรจุลงในขวดขนาด 350 มิลลิลิตร บรรจุวัสดุ 200 มิลลิลิตรต่อขวด ลุกด้วยจุลสารี แล้วนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง น้ายเชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลต โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะขึ้นวันแล้ววางลงบนผิววัสดุต่าง ๆ ที่เตรียมไว้จำนวน 4 ชิ้นต่อขวด บ่มเชื้อไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง แล้ววัดการเจริญของเชื้อทุกวัน โดยวัดในแนวคึ่ง 4 ด้าน แล้วหาค่าเฉลี่ยการเจริญ

4.2 การตรวจนับปริมาณเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่เจริญในวัสดุต่าง ๆ

คัดวัสดุที่มีเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่เจริญในวัสดุต่าง ๆ กันทั้ง 3 ขี้ไก่ รวมกัน 5 กรัม มาบดด้วยโกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้ว นำวัสดุที่บดแล้วนี้จำนวนหนึ่งกรัมาใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เจือจางสารแขวนลอย (suspension) เชื้อ *Trichoderma* spp. ให้ได้ 3 ระดับ คือ 10, 100 และ 1,000 เท่า จากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อในแต่ละระดับปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ไป spread plate บนอาหาร selective medium (ภาคผนวก) โดยดัดแปลงสูตรอาหารของ Elad และ Chet (1983) หน้า 3 ขี้ไก่ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28°C เวลา 3 วัน ตรวจนับจำนวน colony แล้วคำนวณปริมาณเชื้อเป็น colony forming unit/กรัม (cfu/gm) คัดเลือกวัสดุที่เชื้อ *Trichoderma* spp. เจริญเติบโตได้ดีที่สุดเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

5. การใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. (T20) ร่วมกับสารเคมี mancozeb เพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลองและในสภาพแปลงปลูก

5.1 การทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

เตรียมวัสดุเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) โดยใช้เชื้อผสมว่าข้าวตามข้อ 4.1 สืบทับเชื้อ *S. rolfsii* เตรียมจากการใช้ข้าวฟ่างห่าหัวเชื้อตามข้อ 1.6.1

5.1.1 เตรียมต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สุริยาโดยเพาะในกระบะเพาะ เมื่อกล้าอายุประมาณ 25-30 วัน ย้ายลงในกระถางทดลอง ขนาดที่บรรจุดินได้ 1,000 มิลลิเมตรโดยปริมาตร ปลูกกระถางละ 1 ต้น

5.1.2 เตรียมสารเคมี mancozeb ในน้ำเข้มข้น 18,000 $\mu\text{g/ml}$

5.1.3 ปลูกเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) โดยใช้หัวเชื้อที่เลี้ยงในเชื้อผสมว่าข้าวปริมาณ 50 กรัมต่อต้น โดยโรยรอบๆโคนต้นมะเขือเทศที่ปลูกไว้ในกระถางขนาด 1,000 มิลลิเมตร หลังจากนั้นอีก 7 วันจึงปลูกเชื้อ *S. rolfsii* โดยโรยด้วยเชื้อปริมาณ 50 กรัมต่อต้น และราดสารเคมี mancozeb ต้นละ 50 มิลลิเมตรตามลงใบ ห่า 5 วิธีการฯ ละ 20 ต้น หลังจากนั้น 7 วันจึงตรวจนับต้นที่เป็นโรคในทุกวิธีการนำค่าการเป็นโรคไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

5.2 การทดลองในสภาพแปลงปลูก

ใช้แปลงทดลองจำนวน 4 แปลง ขนาดความกว้าง 1 เมตร ยาว 4 เมตร วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) มี 4 วิธีการ
ดังนี้คือ



- 744
58
4621
D.A
- วิธีการที่ 1 ไม่ปลูกเชื้อทั้ง 2 ชนิด
วิธีการที่ 2 ปลูกเชื้อ *S. rolfsii* (กรรมวิธีการเปรียบเทียบ)
วิธีการที่ 3 ปลูกเชื้อ *S. rolfsii* และ *Trichoderma* sp. (T20)
วิธีการที่ 4 ปลูกเชื้อ *S. rolfsii* และ *Trichoderma* sp. (T20)
ร่วมกับการใช้สารเคมี mancozeb ความเข้มข้น 1,800
μg/ml

เตรียมแปลงปลูกโดยการพรวนดินและอบดินด้วยเมทิลโบรไมด์เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเตรียมหลุมปลูกจำนวน 9 หลุมต่อวิธีการในแต่ละซ้ำ แล้วใส่แอมโมเนีย 10 G หลุมละ 5 กรัม และปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 หลุมละประมาณ 10 กรัมรองกันหลุม ย้ายกล้ามะเขือเทศที่มีอายุประมาณ 25-30 วัน แล้วรดน้ำตามทันที ประมาณ 7 วันมะเขือเทศจะตั้งตัวได้

ปลูกเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) และ *S. rolfsii* โดยใช้ inoculum เช่นเดียวกับข้อ 5.1 โดยโรยเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) รอบโคนต้นมะเขือเทศต้นละ 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นอีกประมาณ 7 วันจึงปลูกเชื้อ *S. rolfsii* พร้อมกับราดสารเคมี mancozeb รอบโคนต้นอย่างละ 50 มิลลิลิตรต่อต้น ตรวจนับต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคโคนเน่า หลังจากใช้สารเคมี 7 วัน นำค่าการเป็นโรคไปวิเคราะห์ทางสถิติ

6. การตรวจสอบการสร้าง secondary metabolic product ของเชื้อ *Trichoderma* spp.

เลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T20, T24 และ *T. koningii* (T27) ในอาหาร PDB ที่บรรจุใน Elenmayer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ขวดละ 50 มิลลิลิตร โดยใช้ cork borer เจาะขึ้นรู้นิ่มมีเชื้อ *Trichoderma* เจริญอยู่ 5 ชิ้นต่อขวด เป็น inoculum แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 30 วัน

สกัดสาร secondary metabolic product ของเชื้อ *Trichoderma* spp. โดยดัดแปลงวิธีการของ Dennis และ Webster (1971) นำเชื้อที่เตรียมไว้ และอาหารเหลวที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จะได้ culture filtrate ซึ่งนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15°ซ เวลา 20 นาที แล้วรินเอาเฉพาะ supernatant ทั้งส่วนที่ตกตะกอนไป น้ำคลอโรฟอร์มใส่ลงใน supernatant อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทั้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง สารละลายจะแยกออกเป็น 2 ส่วน ใช้ Pasture pipett ดูดเอาส่วนของคลอโรฟอร์มซึ่งอยู่ด้านล่าง แล้วนำไปทำให้ระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยใช้ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50°ซ จนกว่าคลอโรฟอร์มจะระเหยออกจนหมด แล้วใส่คลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายสาร secondary metabolic product ที่ติดอยู่ในขวด แล้วเก็บไว้ในขวดขนาด 20 มิลลิลิตร นำสาร secondary metabolic product ซึ่งละลายในคลอโรฟอร์มจำนวน 60 μ l มาจุดบนแผ่น (thin layer chromatography, (TLC, silica gel, Merk) นำแผ่น TLC ไปใส่ไว้ในโหลแก้วที่บรรจุด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม/อะซีโตนอัตราส่วน 95:5 โดยปริมาตร เวลาประมาณ 1 ชม. นำแผ่น TLC ออกทิ้งลมไว้ให้แห้ง นำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 365 nm ด้วยสารละลายเงินไนเตรทที่เข้มข้น 1 มิลลิลิตร ในอะซีโตน 20 มิลลิลิตร (Stahl, 1969) จากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 120°ซ ประมาณ 1 ชม. ตรวจสอบผลการสร้าง secondary metabolic product เปรียบกับกรรมวิธีการเปรียบเทียบ

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง

1.1 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *S. rolfsii* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 27 ไอโซเลต และเชื้อ *S. rolfsii* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เดียวกันในทิศทางตรงกันข้ามพบว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3) และมีลักษณะการยับยั้ง 3 แบบ ดังนี้คือ

1.1.1 เชื้อทั้ง 2 ชนิด เจริญขึ้นกัน แล้วชกการเจริญทั้งสองฝ่าย (ภาพที่ 4ก)

1.1.2 เชื้อเจริญขึ้นกัน โดยเชื้อ *Trichoderma* spp. เจริญข้าม colony ของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ (ภาพที่ 4ข)

1.1.3 เชื้อเจริญขึ้นกัน แล้วเชื้อ *S. rolfsii* ชกการเจริญระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นก็เจริญข้าม colony ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. (ภาพที่ 4ค)

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T14, T6, T16, T24, T19, T1 และ T18 เจริญข้าม colony ของเชื้อ *S. rolfsii* ได้เร็วกว่า ไอโซเลตอื่นตามลำดับ และจากผลการทดสอบได้คัดเลือกตัวแทนลักษณะการยับยั้งทั้ง 3 แบบ ได้แก่ เชื้อ *Trichoderma harzianum* (T25), *T. hamatum* (T26) แสดงการยับยั้งแบบที่ 1.1.1 *T. koningii* (T27) แสดงการยับยั้งแบบที่ 1.1.2 และ *Trichoderma* spp. (ไอโซเลต T2, T9 และ T12) แสดงการยับยั้งแบบ 1.1.3 ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับ การทดลองของ จุฬารัตน์ (2531) ซึ่งพบว่า เชื้อ *Trichoderma* sp. (Tsp-15) สามารถเจริญข้ามแนวสัมผัสยับยั้งการ

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเคียวกัน หลังจากปลูกเชื้อ 3 วัน

ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มม.) ^{1/}		ลักษณะการ ยับยั้ง ^{2/}
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Sclerotium rolfsii</i>	
T1	50.25	21.00	1
T2	44.00	26.00	3
T3	47.75	22.50	3
T4	47.75	24.25	3
T5	45.25	27.50	3
T6	51.75	20.50	1
T7	47.00	23.00	2
T8	44.50	27.50	2
T9	45.50	27.25	3
T10	45.25	26.50	1
T11	45.00	25.50	3
T12	48.75	22.25	3
T13	45.50	25.50	3
T14	53.00	19.50	1
T15	46.00	24.50	2
T16	51.75	21.25	1
T17	49.75	23.00	3
T18	50.00	21.50	1
T19	51.00	21.25	2
T20	47.00	24.00	1

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน หลังจากปลูกเชื้อ 3 วัน (ต่อ)

ไฮโซเลข	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มม.) ^{1/}		ลักษณะการยับยั้ง ^{2/}
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Sclerotium rolfsii</i>	
T21	46.75	26.00	1
T22	44.75	26.75	3
T23	48.50	23.50	3
T24	51.50	20.75	3
T25	39.50	31.00	1
T26	39.75	31.75	1
T27	45.00	26.00	2

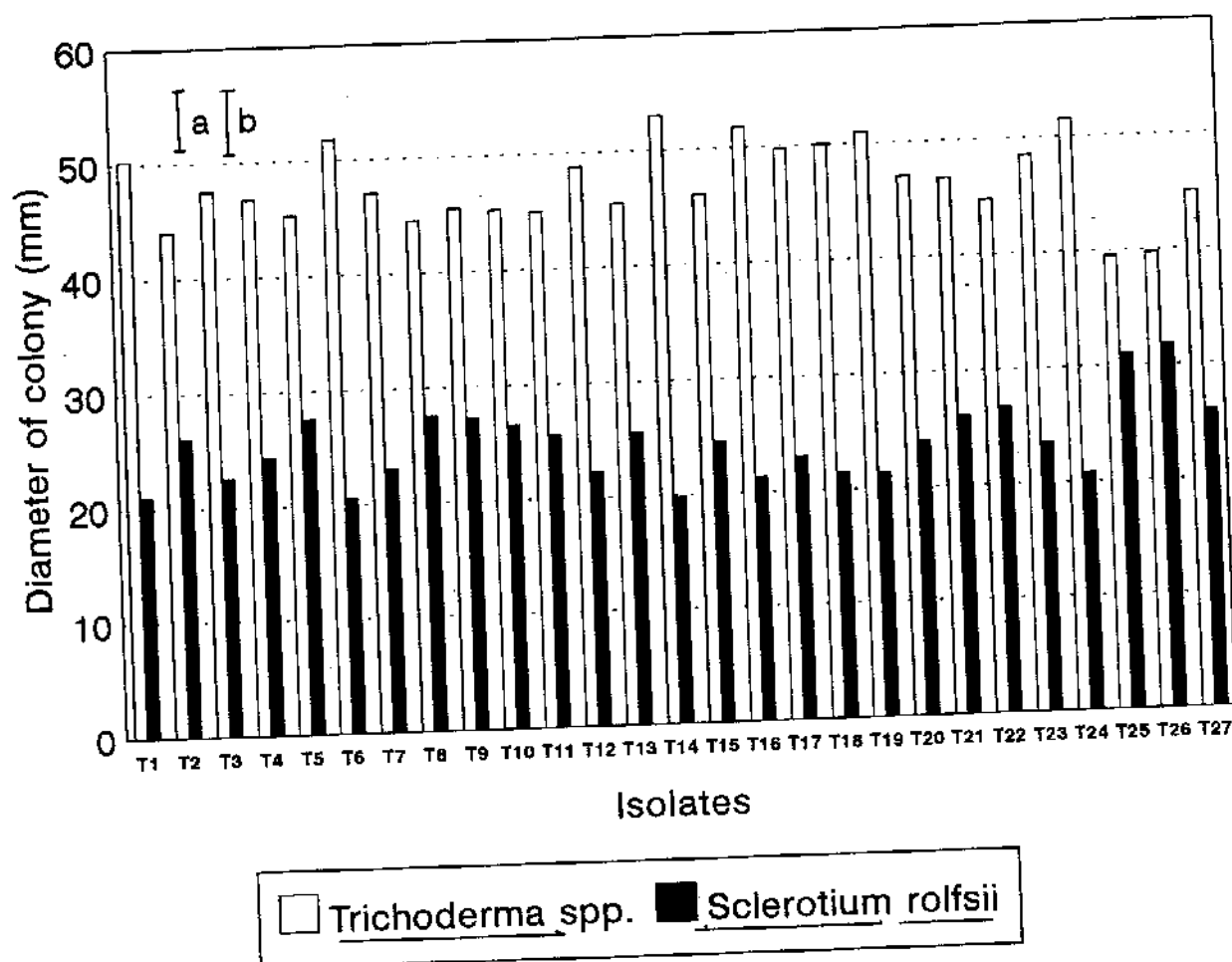
1/ ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

LSD _{0.05}	5.34	5.80
CV (%)	8.07	16.90

2/ ลักษณะการยับยั้ง 1 = เชื้อทั้ง 2 ชนิดเจริญชนกันแล้วซึ่งกการเจริญทั้งสอง

2 = เชื้อ *Trichoderma* spp. เจริญข้ามโคโลนีเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

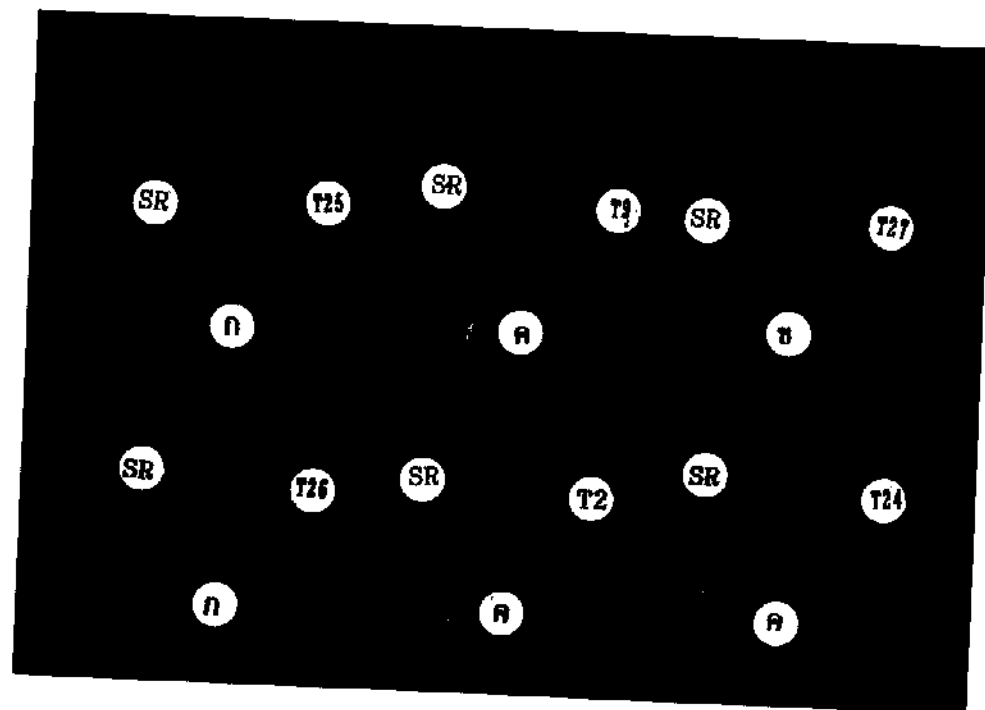
3 = เชื้อ *Sclerotium rolfsii* เจริญข้ามโคโลนีเชื้อ *Trichoderma* spp.



ภาพที่ 3 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ และ *Sclerotium rolfsii* เมื่อเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เดียวกัน

a = $LSD_{0.05}$ (*Trichoderma* spp.)

b = $LSD_{0.05}$ (*Sclerotium rolfsii*)



ภาพที่ 4 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

n = เชื้อทั้ง 2 ชนิด เจริญชนกันแล้วจึงทำการเจริญทั้งสอง

บ = เชื้อ *Trichoderma* sp. เจริญข้ามโคโลนีเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

ค = เชื้อ *Sclerotium rolfsii* เจริญข้ามเชื้อ *Trichoderma* sp.

(SR = *Sclerotium rolfsii*, T25 = *Trichoderma harzianum*,

T2, T9 = *Trichoderma* spp., T27 = *Trichoderma koningii*)

เจริญเติบโตของเชื้อ *Fusarium* spp. ได้ดีที่สุด เชื้อเจริญได้อย่างรวดเร็วและขึ้นคลุมเชื้อสาเหตุของโรคได้ทั่วทั้งโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ส่วนเชื้อ *T. harzianum* (Tha-14) มีประสิทธิภาพรองลงมา ส่วนเชื้อ *T. viride* (Tvi-3) แย้งเชื้อ *F. moniliforme* และเชื้อ *F. oxysporum* ได้ดี ในการทดสอบครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาถึงรายละเอียดของปฏิกิริยาความสัมพันธ์ของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *S. rolfsii* แต่ก็มีรายงานของ Elad และคณะ (1983) ซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเส้นใยของเชื้อ *T. harzianum* และ *T. hamatum* ต่อ *S. rolfsii* และ *R. solani* พบว่าเชื้อ *T. hamatum* สัมผัสกับเชื้อสาเหตุโดยใช้เส้นใยครอบ(coil) และเกี่ยวพัน(hooks) หรือสร้าง appressorium แล้วสร้างเส้นใยเจริญทะลุผ่านเข้าไปในเส้นใยเชื้อสาเหตุได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *T. harzianum* สร้างเอนไซม์ β - (1,3) glucanase และ chitinase เพื่อย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อสาเหตุด้วย

ในการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *S. rolfsii* ในสภาพห้องปฏิบัติการครั้งนี้ ได้คัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. 15 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต T1, T2, T6, T9, T12, T14, T16, T18, T19, T20, T21 และ T24, *T. harzianum* (T25), *T. hamatum* (T26) และ *T. koningii* (T27) เพื่อศึกษาต่อไป

1.2 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญจากเมล็ดสเคลอโรเต็มจากเชื้อ *S. rolfsii*

เมื่อนำเมล็ดสเคลอโรเต็มวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลต ซึ่งคัดเลือกจากข้อ 1 มาศึกษา พบว่าในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ *T. koningii* (T27) เจริญอยู่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ดีที่สุด โดยเชื้อ *T. koningii* เจริญคลุมเมล็ดสเคลอโรเต็มได้ ส่วนเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตอื่นไม่สามารถเจริญคลุมเมล็ดสเคลอโรเต็ม ได้ทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* จากเมล็ด
สเคลอโรเตียมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ *Trichoderma* spp. เจริญอยู่

<i>Trichoderma</i> ไอโซเลต	การเจริญของเมล็ด <i>sclerotium</i> ^{1/}
T1	++
T2	+
T6	+
T9	+
T12	+
T14	+
T16	+
T18	+
T19	+
T20	+
T21	+
T24	+
T25	+
T26	+
T27	-

^{1/} ค่าความถี่จาก 10 ซ้ำ

- = เชื้อ *Sclerotium rolfsii* ไม่เจริญเติบโต

+ = เชื้อ *Sclerotium rolfsii* เจริญเติบโต แต่เชื้อ *Trichoderma* spp. เจริญ
ไม่คลุมเมล็ดสเคลอโรเตียม

++ = เชื้อ *Sclerotium rolfsii* ไม่เจริญเติบโต แต่เชื้อ *Trichoderma* spp.
เจริญคลุมเมล็ดสเคลอโรเตียม

ประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในการทดสอบครึ่งไม้นางไอโซเลต ที่ยับยั้งการเจริญของเมล็ดสเคลอโรเต็มได้คือ บางไอโซเลตไม่สามารถยับยั้งได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในไอโซเลตที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้คือนั้น เนื่องจากกิจกรรมของ extracellular enzyme และสาร metabolite ที่มีมากกว่าในไอโซเลตอื่นๆ และมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Henis และ Papavizas (1983) ซึ่งพบว่า การใช้สารแขวนลอยของเชื้อ *T. harzianum* (WT-6) เติบโตอาหารเลี้ยงเชื้อ Water agar ในจานอาหารที่มีเมล็ด sclerotium 10 เม็ด/จาน (WA 2% agar, 10 sclerotia/plate) เติบโตไว้ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อ *T. harzianum* (WT-6) สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดสเคลอโรเต็มได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ทั้งในสภาพของเส้นใยและเมล็ดสเคลอโรเต็ม

1.3 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *S. rolfsii* ในสภาพเรือนทดลอง

ผลจากการทดลองปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลต และเชื้อ *S. rolfsii* โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมจากข้าวฟ่างเลี้ยงเชื้อราทั้งสอง เมื่อเชื้อเจริญแล้วนำหัวเชื้อ *Trichoderma* spp. โรยรอบๆโคนต้นมะเขือเทศที่ปลูกในแก้วพลาสติกขนาด 5% โดยปริมาตร หลังจากนั้นอีก 7 วัน ปลูกเชื้อ *S. rolfsii* ตามลงไปอีก 5% โดยปริมาตร เมื่อตรวจนับต้นมะเขือเทศที่รอดตาย พบว่ามีต้นมะเขือเทศรอดตายเมื่อปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) และ *T. koningii* (T27) มีจำนวนต้นที่รอดตายมากที่สุด (ตารางที่ 3 และภาพที่ 5 และ 6) ซึ่งการทดลองครั้งนี้คล้ายกับการทดลองของหลายคน เช่น Chang และคณะ (1986) พบว่า การนำ conidia ของเชื้อ *T. hamatum* (T-203) ใส่ลงไปในดินร่วนปนทรายที่ปลูกมะเขือเทศพริก และแดงกว่า ทำให้พืชทดลองมีน้ำหนักแห้ง (dry weights) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อ *T. hamatum* สามารถใช้เพื่อป้องกันโรคโคนเน่าและคาน้ำของถั่วลิสง

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ *Trichoderma* spp.
15 ไอโซเลต และเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

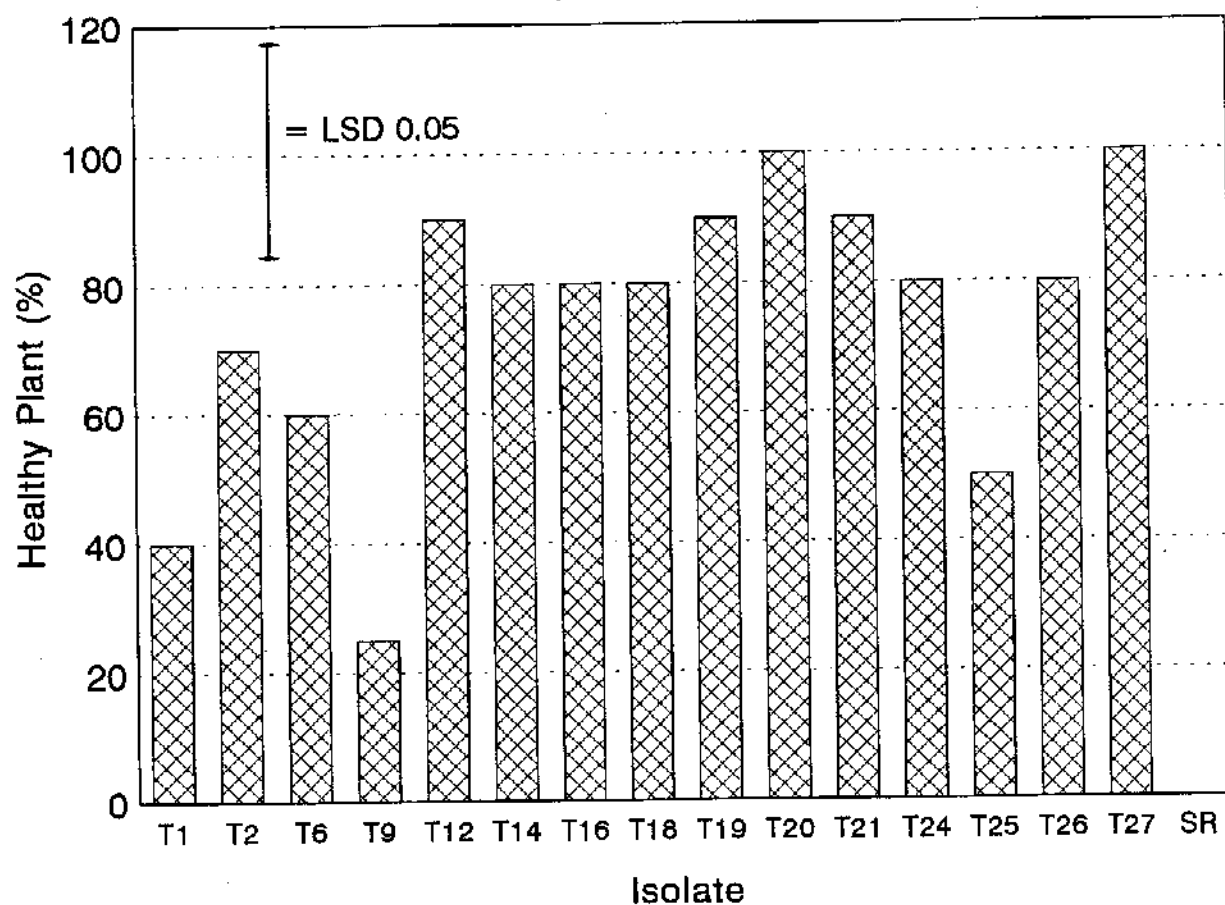
<i>Trichoderma</i> spp. (ไอโซเลต)	ความเสียหาย (%) ^{1/}
T1	40 de
T2	70 abcd
T6	60 bcde
T9	25 ef
T12	90 ab
T14	80 abc
T16	80 abc
T18	80 abc
T19	90 ab
T20	100 a
T21	90 ab
T24	80 abc
T25	50 cde
T26	80 abc
T27	100 a
control (<i>S. rolfsii</i>)	0 g

^{1/} คำนวณจากการปลูกเชื้อในมะเขือเทศ 10 ต้น

ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ Duncan's multiple range test (P=0.05)

ภาพที่ 5 เปรียบเทียบคัมมะเชื้อเห็ดที่ไม่เป็นโรค (ซ้าย) และเป็นโรค (ขวา) หลังจาก
ปลูกเชื้อ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต T20 และ *Sclerotium rolfsii*



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบความเสียหายของพืชหลังจากปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ และ *Sclerotium rolfsii*

และโรคพืชที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* spp. หรือ *R. solani* ได้ ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้สารเคมี การคลุกเมล็ดพืชด้วย *T. hamatum* พบว่าเชื้อเพิ่มปริมาณในดินได้ และช่วยลดปริมาณของโรคได้ (Harman et al., 1980) สำหรับ Simon (1989) รายงานว่า เชื้อ *T. koningii* (IMI308475) สามารถลดการเกิดโรค Take-all ของต้นข้าวสาลีที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Gaeumannomyces graminis* ได้เช่นกัน จะเห็นได้ว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. แต่ละชนิดมีความสามารถในการเข้าทำลายเชื้อโรคพืชแตกต่างกัน

2. กิจกรรมของ extracellular enzyme ของเชื้อ *Trichoderma* spp.

2.1 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

เชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อ *T. koningii* (T27) มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด เมื่อเทียบกับ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตอื่นๆ (ตารางที่ 4) ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า เชื้อไอโซเลตต่างก็มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ต่างกัน ซึ่งคล้ายกับที่ Ahmad และ Baker (1987) รายงานว่า ได้เลี้ยงเชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์ T-95 และ T12B ในอาหารเหลว Czapek Dox ที่มี cellobiose, carboxymethyl cellulose หรือ cotton linters ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์ T-95 และ T-12B สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ทั่วไป

2.2 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส

เชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลต มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อ *Trichoderma* sp. (T12)

สร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับไฮโซเลตอื่นๆ (ตารางที่ 4) เอนไซม์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อ *Fusarium oxysporum* ซึ่งผนังเส้นใยจะประกอบด้วย glycoprotein เป็นส่วนใหญ่ แต่ในการย่อยสลายผนังเส้นใยของ *S. rolfii* และ *Rhizoctonia solani* นั้น เอนไซม์ β -1,3-glucanase และ chitinase จะมีบทบาทมากกว่า (Sivan and Chet, 1989)

2.3 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

เชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไฮโซเลต มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4) จากการศึกษาของ Elad และคณะ (1982) พบว่า การตรวจสอบเอนไซม์โปรตีเอสและไลเปสของเชื้อ *Trichoderma* spp. จะพบว่าสร้างเอนไซม์เมื่อเส้นใยของเชื้อเข้าสัมผัสแล้วแทงผ่านเข้าไปในเส้นใยของเชื้อ *S. rolfii* และยังมีรายงานว่าเชื้อ *T. viride* สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสใน solid media ได้ (Hankin and Anagnostakis, 1975)

2.4 การตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะมายเลส

เชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไฮโซเลต ไม่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะมายเลส (ตารางที่ 4) แต่ Hankin และ Anagnostakis (1975) พบว่า เมื่อผสมสารละลายแป้ง 0.2% ใน Difco Nutrient Agar pH 6.0 แล้วเลี้ยงเชื้อ *T. viride* ไว้เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นหัดด้วยสารละลายไอโอดีนให้ทั่วโคโลนีของเชื้อทดสอบ จะเกิด clear zone รอบๆโคโลนีของเชื้อ แสดงว่าเชื้อ *T. viride* มี amylolytic activity ซึ่งในการศึกษครั้งนี้อาจเป็นไปได้ที่เชื้อ *Trichoderma* spp. ที่นำมาทดสอบมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะมายเลส แต่ไม่สามารถตรวจสอบในเชิงคุณภาพได้

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ เซลลูเลส โปรตีเอส ลิเปส และแอลฟาอะมาเลส

<i>Trichoderma</i> spp. (ไอโซเลต)	กิจกรรมของเอนไซม์ (มม.)			
	cellulase	protease	lipase	amylase
T1	4.34	35.50	14.25	0
T2	4.67	36.00	15.50	0
T6	5.00	33.25	14.00	0
T9	4.33	37.37	15.75	0
T12	5.67	39.87	15.00	0
T14	5.00	36.75	15.25	0
T16	4.67	38.25	14.25	0
T18	3.67	38.50	14.75	0
T19	4.67	38.37	15.00	0
T20	4.33	36.87	14.50	0
T21	4.67	33.75	14.50	0
T24	4.00	37.50	14.75	0
T25	6.00	38.25	14.25	0
T26	5.33	39.00	16.75	0
T27	6.33	36.25	14.75	0
LSD 0.05	1.02	2.76	NS	
CV (%)	12.69	5.23	5.88	
NS = non significant				

3. ผลของสารเคมีความเข้มข้นต่ำบางชนิดต่อเชื้อ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

3.1 ประสิทธิภาพของสารเคมีความเข้มข้นต่ำต่อเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Sclerotium rolfsii* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบสารเคมีต่อเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Sclerotium rolfsii* พบว่า สารเคมีที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. rolfsii* ได้ดีที่สุดคือ mancozeb และ PCNB ที่ระดับความเข้มข้น 18,000 $\mu\text{g/ml}$ และ 7,200 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งเชื้อ *S. rolfsii* ไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารเคมีที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวได้ สำหรับเชื้อ *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลต T2, T20, T24, T25, T26 และ T27 นั้น สามารถเจริญเติบโตในสารเคมี mancozeb ที่ระดับความเข้มข้น 18,000 $\mu\text{g/ml}$ ได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมี PCNB ที่ระดับความเข้มข้น 7,200 $\mu\text{g/ml}$ (ตารางที่ 5, ภาพที่ 7, 8, 9, 10 และ 11 ตามลำดับ) ส่วนสารเคมี prochloraz และ carbendazim นั้นจะยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลตที่ระดับความเข้มข้น 375 $\mu\text{g/ml}$ ขึ้นไป แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของ *S. rolfsii* สารเคมี copper oxychloride ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* และ *Trichoderma* spp. ได้ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับวิธีการเปรียบเทียบ (ตารางที่ 5)

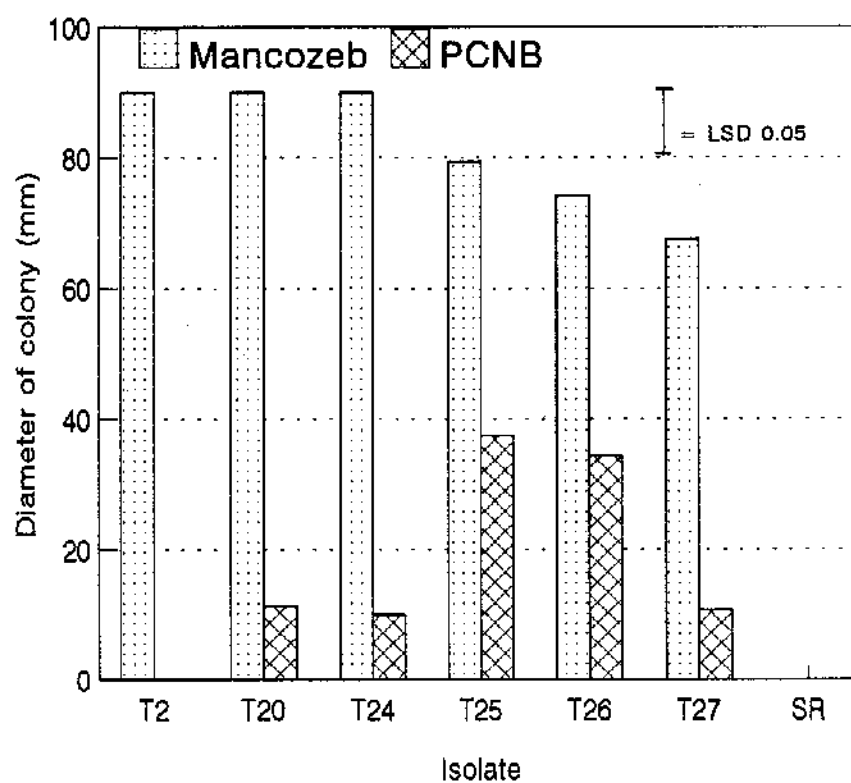
สารเคมีที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. rolfsii* แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. (ไอโซเลต T2, T20, T24, T25 และ T26) พบว่า *T. harzianum* (T25) และ *T. hamatum* (T26) เท่านั้นที่ยังสามารถเจริญได้ในอาหาร PDA ที่มี PCNB ผสมอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 7,200 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้ว เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T2, T20 และ T24 สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารเคมี mancozeb ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 18,000 $\mu\text{g/ml}$ สมควรที่จะนำมาพิจารณาใช้ร่วมกับสารเคมี mancozeb ส่วน *T. harzianum* (T25) และ *T. hamatum* (T26) นั้นควรจะใช้ร่วมกับสารเคมี PCNB ที่ระดับความเข้มข้น 7,200

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ย colony ของเชื้อ *Trichoderma* spp. (ไลโซเลท T2, T20 และ T24), *Trichoderma harzianum* (T25), *Trichoderma hamatum* (T26), *Trichoderma koningii* (T27) และ *Sclerotium rolfsii* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งผสมสารเคมีในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เมื่ออายุได้ 3 วันหลังปลูกเชื้อ

ความเข้มข้น ของสารเคมี ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าเฉลี่ย colony ของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. และ <i>S. rolfsii</i> จาก 4 ซ้ำ (mm.)						
	T2	T20	T24	T25	T26	T27	<i>S. rolfsii</i>
PCNB							
7,200	0.00	11.25	10.00	37.37	34.25	10.63	0.00
720	10.25	13.25	12.00	62.25	53.50	13.63	11.25
72	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	67.75	85.88
7.20	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	89.13
0.75	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
Mancozeb							
18,000	90.00	90.00	90.00	79.38	74.13	67.50	0.00
1,800	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	40.50
180	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	78.50
18	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	88.63
1.80	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
Prochloraz							
3,750	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	36.25
375	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.25	76.88
37.50	11.75	10.00	15.00	20.88	19.50	57.13	90.00
3.75	25.13	33.38	29.38	27.25	42.13	66.13	90.00
0.37	40.75	53.25	45.25	42.25	57.13	90.00	90.00

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ย colony ของเชื้อ *Trichoderma* spp. (ไลโซเลท T2, T20 และ T24), *Trichoderma harzianum* (T25), *Trichoderma hamatum* (T26), *Trichoderma koningii* (T27) และ *Sclerotium rolfsii* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งผสมสารเคมีในความเข้มข้นต่างๆกัน เมื่ออายุได้ 3 วันหลังปลูกเชื้อ (ต่อ)

ความเข้มข้น ของสารเคมี ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าเฉลี่ย colony ของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. และ <i>S. rolfsii</i> จาก 4 ซ้ำ (mm.)						
	T2	T20	T24	T25	T26	T27	<i>S. rolfsii</i>
Carbendazim							
3,750	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	81.63
375	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	86.00
37.50	24.88	31.00	27.00	21.38	24.25	33.38	86.25
3.75	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	88.50
0.37	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
Copper Oxychloride							
10,800	90.00	90.00	90.00	90.00	79.38	63.00	90.00
1,080	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	82.00	90.00
108	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
10.80	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
1.08	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
Control	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
LSD _{0.05}	4.94	2.00	2.36	3.35	10.42	2.92	2.67
CV (%)	5.88	2.30	2.77	3.91	12.15	3.21	2.57



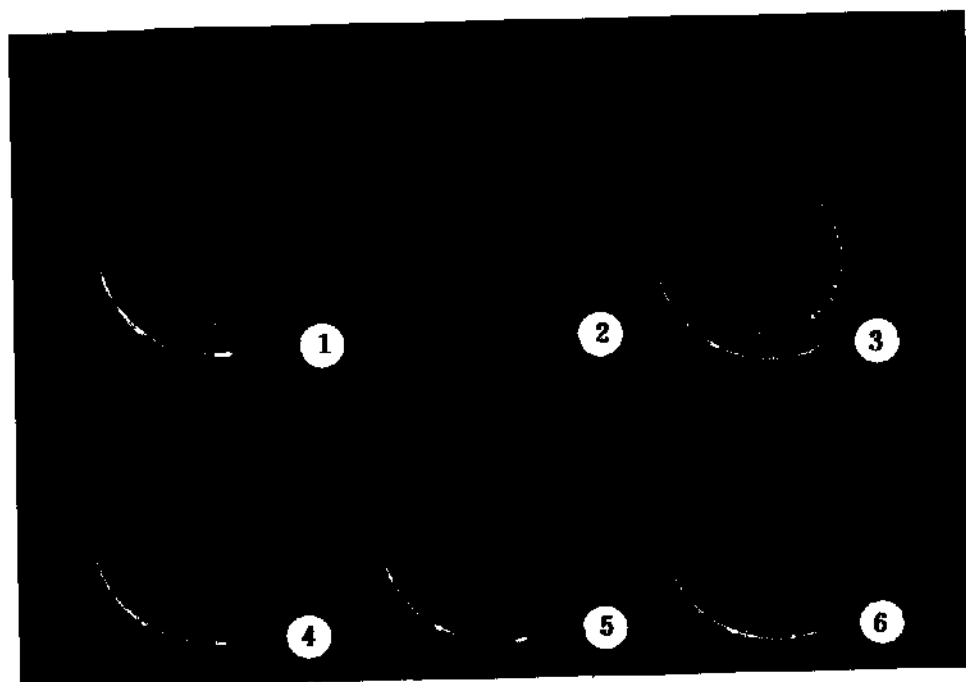
ภาพที่ 7 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีอายุ 3 วัน ของเชื้อ *Trichoderma* spp.

(ไลโซเลต T2, T20 และ T24) *Trichoderma harzianum* (T25)

Trichoderma hamatum (T26) *Trichoderma koningii* (T27) และ

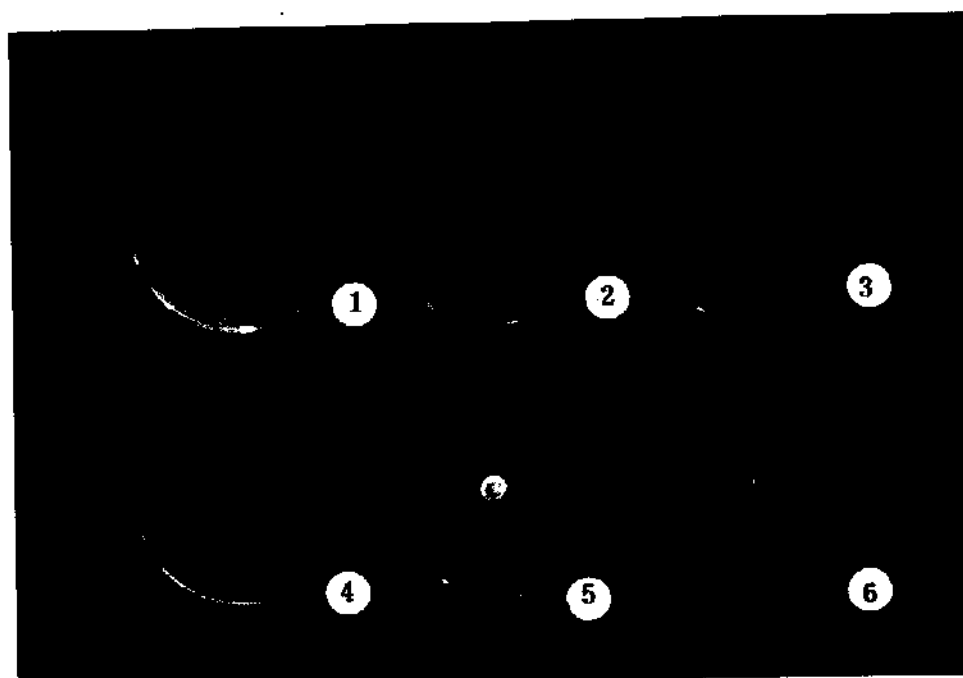
Sclerotium rolfsii (SR) ในอาหาร PDA ที่มี mancozeb เข้มข้น

18,000 $\mu\text{g/ml}$ และ PCNB เข้มข้น 7,200 $\mu\text{g/ml}$



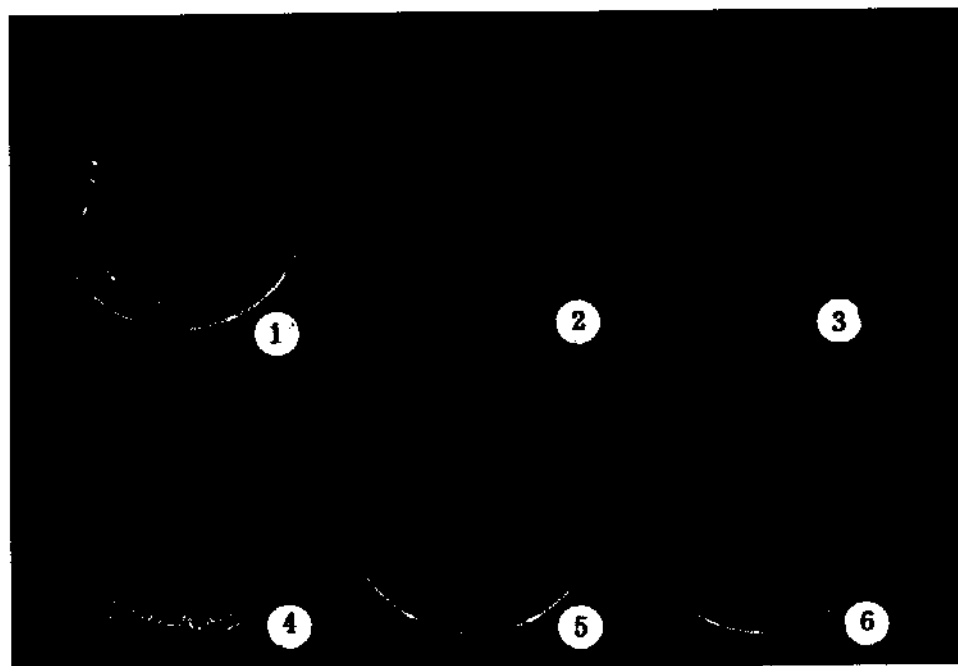
ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) อายุ 3 วัน ในอาหาร PDA ที่มี PCNB ที่ความเข้มข้นต่างกัน

1. control treatment (PCNB 0 $\mu\text{g/ml}$)
2. PCNB 0.72 $\mu\text{g/ml}$
3. PCNB 7.20 $\mu\text{g/ml}$
4. PCNB 72 $\mu\text{g/ml}$
5. PCNB 720 $\mu\text{g/ml}$
6. PCNB 7,200 $\mu\text{g/ml}$



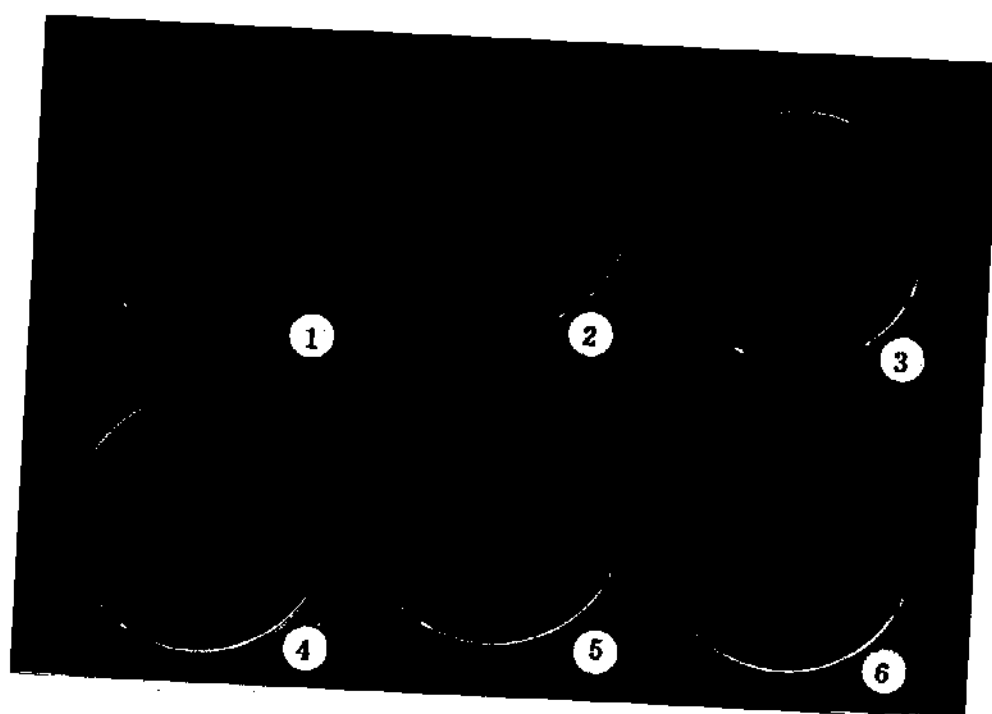
ภาพที่ 9 การเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* อายุ 3 วัน ในอาหาร PDA ที่มี PCNB เข้มข้นต่างกัน

1. control treatment (PCNB 0 $\mu\text{g/ml}$)
2. PCNB 0.72 $\mu\text{g/ml}$
3. PCNB 7.20 $\mu\text{g/ml}$
4. PCNB 72 $\mu\text{g/ml}$
5. PCNB 720 $\mu\text{g/ml}$
6. PCNB 7,200 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 10 การเจริญของเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) อายุ 3 วัน ในอาหาร PDA ที่มี mancozeb ความเข้มข้นต่างกัน

1. control treatment (Mancozeb 0 $\mu\text{g/ml}$)
2. Mancozeb 1.80 $\mu\text{g/ml}$
3. Mancozeb 18 $\mu\text{g/ml}$
4. Mancozeb 180 $\mu\text{g/ml}$
5. Mancozeb 1,800 $\mu\text{g/ml}$
6. Mancozeb 18,000 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 11 การเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ในอาหาร PDA ที่มี mancozeb ความเข้มข้นต่าง ๆ

1. control treatment (Mancozeb 0 $\mu\text{g/ml}$)
2. Mancozeb 1.80 $\mu\text{g/ml}$
3. Mancozeb 18 $\mu\text{g/ml}$
4. Mancozeb 180 $\mu\text{g/ml}$
5. Mancozeb 1,800 $\mu\text{g/ml}$
6. Mancozeb 18,000 $\mu\text{g/ml}$

$\mu\text{g/ml}$ ได้ สำหรับ *T. koningii* (T27) นั้น มีแนวโน้มที่จะใช้ร่วมกับสารเคมี mancozeb (18,000 $\mu\text{g/ml}$) ได้มากกว่า PCNB (7,200 $\mu\text{g/ml}$) เพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfii* ทั้งในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Harrison (1961) พบว่า เมื่อผสมสารเคมี PCNB กับยิปซัมประมาณ 400 ปอนด์ต่อเอเคอร์ ความคุมเชื้อ *S. rolfii* ได้ และเมื่อใช้สารเคมี EPTC อัตรา 40 $\mu\text{g/คน}$ 1 g จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. rolfii* ได้ (Peeples et al., 1976) สำหรับ Abd-Ei Moity (1982) รายงานว่า เมื่อใช้ *T. harzianum* ร่วมกับสารเคมี iprodione อัตรา 240:3 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. cepivorum* ได้

3.2 การคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. และสารเคมีที่เหมาะสมเพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศในสภาพเรือนทดลอง

เชื้อ *Trichoderma* spp. 6 ไอโซเลต ซึ่งได้ทดสอบกับสารเคมีควบคุมเชื้อราในสภาพห้องปฏิบัติการ ตามผลการทดลองข้อ 3.1 ได้คัดเลือก 3 ไอโซเลต คือ T20, T25 และ T27 ซึ่งใช้ร่วมกับสารเคมี *Bacillus subtilis* (ขัณฑิลา^๕) และ BS^๕) PCNB และ mancozeb พบว่าต้นมะเขือเทศรอดตายจากการเข้าทำลายของเชื้อ *S. rolfii* โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) เชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) สามารถใช้ร่วมกับสารเคมี mancozeb, PCNB และ *Bacillus subtilis* ที่ระดับความเข้มข้น 18,000 $\mu\text{g/ml}$ และ 7,200 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โดยมีต้นมะเขือเทศรอดตาย 80, 60 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน *T. harzianum* (T25) ใช้ร่วมกับสารเคมีทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นเช่นเดียวกับ ไอโซเลต T20 โดยมีต้นมะเขือเทศรอดตาย 50, 30 และ 30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับ *T. koningii* (T27) ใช้ร่วมกับสารเคมี mancozeb และขัณฑิลา^๕ ได้ดีที่สุด โดยมีต้นมะเขือเทศรอดตาย 70 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. สามารถนำมาใช้ร่วมกับสารเคมีควบคุมโรคพืชได้ โดยเฉพาะกับ mancozeb ซึ่งมีงานทดลองที่สนับสนุน เช่น การศึกษาของ

ตารางที่ 6 เปรูเซ็นต์คัมมะเชื้อเห็ดที่รลดตายจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* เมื่อใช้สารเคมีร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20), *Trichoderma harzianum* (T25) และ *Trichoderma koningii* (T27)

Treatment	เปรูเซ็นต์คัมมะเชื้อเห็ดที่รลดตาย		
	T20	T25	T27
ขี้ปูลำ	50 cde	30 e	60 bcd
BS	40 de	20 ef	30 e
PCNB	60 bcd	30 e	30 e
Mancozeb	80 ab	50 cde	70 bc
<i>S. rolfsii</i>	0 f	0 f	0 f
Check ^{1/}	100 a	100 a	100 a

LSD_{0.05} = 26.77

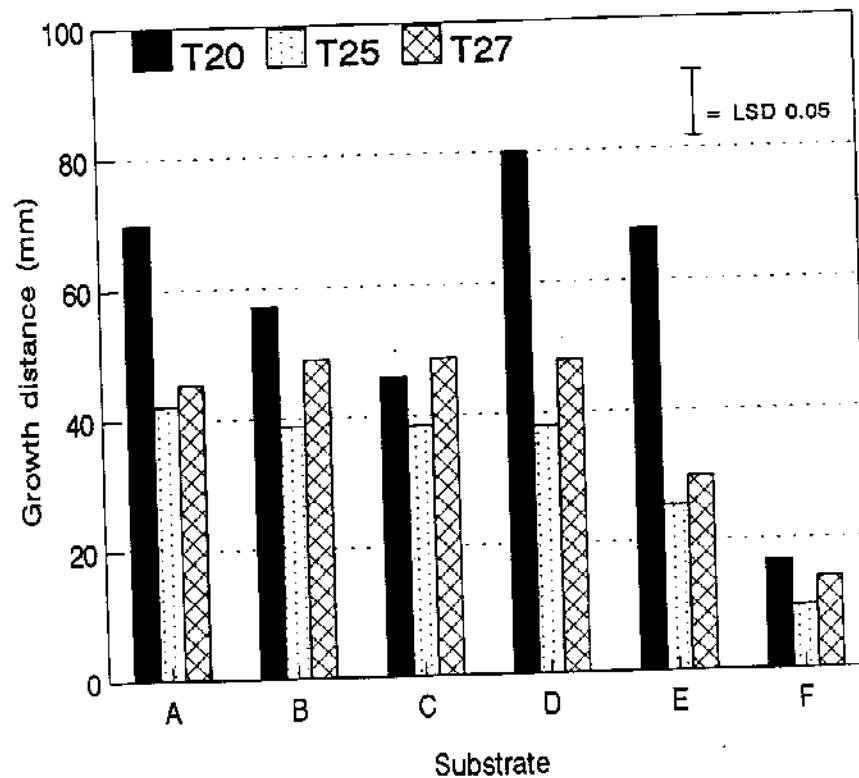
CV (%) = 27.00%

^{1/} ไม่ปลูกเชื้อ *Sclerotium rolfsii*

Elad และคณะ (1980) พบว่า การใช้พลังงานความร้อนจากแสงอาทิตย์หรือสารเคมี methyl bromide ร่วมกับเชื้อ *T. harzianum* จะมีอิทธิพลและผลในการควบคุมเชื้อ *S. rolfii* และยังพบว่าการใช้เชื้อ *T. harzianum* ร่วมกับพลังงานความร้อนจากแสงอาทิตย์ มีศักยภาพในการลดปริมาณเชื้อ *R. solani* ทั้งในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารเคมี Vapam ร่วมกับ methyl bromide หรือพลังงานความร้อน จะลดปริมาณเชื้อ *S. rolfii* ได้ 76-100% แต่เมื่อใช้เชื้อ *T. harzianum* ร่วมกับพลังงานความร้อน จะควบคุมโรคโคนเน่าของถั่วที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *S. rolfii* ภายในสภาพเรือนทดลองได้ 90-100%

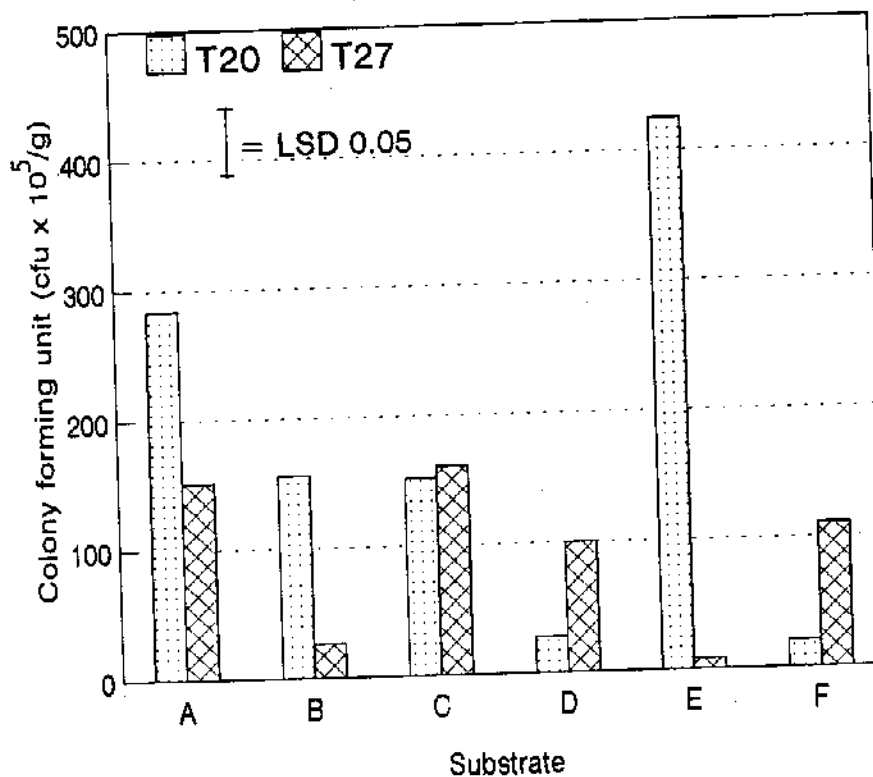
4. การเพิ่มปริมาณของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในวัสดุต่างๆ

จากการนำเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20), *T. harzianum* (T25) และ *T. koningii* (T27) มาเพิ่มปริมาณในวัสดุต่างๆ ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษลังลูกฟูก ขี้เลื่อย ข้าวฟ่าง ชั่งข้าวโพด และวัสดุเหลือทิ้งจากการสกัดน้ำมัน (สับปะรดและส้ม) ที่ผสมรำละเอียด 5% โดยปริมาตร และมีความชื้นพอเหมาะ บรรจุลงในขวดแบบปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำเข้าเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหาค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโตในวัสดุของเชื้อ และตรวจนับจำนวนโคโลนีในอาหาร selective medium พบว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลต เจริญเติบโตในวัสดุได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในวัสดุข้าวฟ่างและหนังสือพิมพ์ โดยมีค่าเฉลี่ยระยะทางการเจริญเติบโตจากผิววัสดุจนถึงกันชน 80 และ 69.8 มิลลิเมตรตามลำดับ *T. harzianum* (T25) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในกระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษลังลูกฟูก ขี้เลื่อย และข้าวฟ่าง โดยมีค่าเฉลี่ยการเจริญเป็น 42.1, 38.7, 38.4 และ 37.9 มิลลิเมตรตามลำดับ สำหรับ *T. koningii* (T27) เจริญเติบโตได้ดีที่สุดในกระดาษลังลูกฟูก ขี้เลื่อย ข้าวฟ่าง และหนังสือพิมพ์ โดยมีค่าเฉลี่ยการเจริญเป็น 48.7, 48 และ 45 ตามลำดับ (ภาพที่ 12) สำหรับการตรวจนับจำนวน colony forming unit (cfu)/g ในอาหาร selective medium พบว่าเชื้อ *T. harzianum* (T25) ไม่สามารถตรวจนับจำนวน colony ได้ในทุกวัสดุ



ภาพที่ 12 ระยะทางการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20), *Trichoderma harzianum* (T25) และ *Trichoderma koningii* (T27) ในวัสดุต่างๆ (A = กระดาษหนังสือพิมพ์, B = กระดาษลังลูกฟูก, C = ชี้อเลื่อย, D = ขี้วัวแห้ง, E = ขี้วัวไคบด และ F = วัสดุเหลือทิ้งจากการสกัด น้ำสับปะรดและส้ม ทุกวัสดุผสมรำข้าว 5% โดยปริมาตร)

ส่วนเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) และ *T. koningii* (T27) จำนวน cfu/g ที่ตรวจนับในวัสดุต่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) มีจำนวน cfu/g ในวัสดุขี้ขำวโคมกสูงสุดเฉลี่ย 424.71×10^5 cfu/g เมื่อเปรียบเทียบกับ *T. koningii* (T27) มีจำนวน cfu/g ในวัสดุขี้เลื่อยและหนังสือพิมพ์ 161×10^5 และ 151×10^5 cfu/g ตามลำดับ จะเห็นว่าเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) มีจำนวน cfu/g ในวัสดุต่างมากกว่า *T. koningii* (T27) และ *T. harzianum* (T25) ตามลำดับ (ภาพที่ 13) แต่ปริมาณ cfu/g ที่มากไม่ได้หมายถึงว่าเชื้อจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ดี ต้องมีการศึกษาต่อไปว่ามวลชีวภาพให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด สำหรับ Sivan และคณะ (1984) รายงานว่า การให้มวลชีวภาพ *T. harzianum* ในรูป bran peat ลดการเกิดโรคโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ได้ถึง 85% Lewis และ Papavizas (1985) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium virens* ในรูปของข้าวสาลีและ alginate pellets ได้ และยังมีรายงานว่า การเตรียม inoculum ของเชื้อ *T. harzianum* จากข้าวสาลีลดโรคของถั่ว(bean)ที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfisii* และ *R. solani* ได้เช่นกัน (Elad et al., 1980) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า การใช้ผงเชื้อที่ผสมสารพาโคอะคอมโมท์คลุกเมล็ดข้าวบาร์เลย์ สามารถควบคุมโรคกล้าไหม้สเคลอโรเทียมได้ โดยมีจำนวนต้นรอดตายสูงกว่า control 60% (จิระเดช และ วรณวิไล, 2534) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เชื้อ *Trichoderma* spp. ป้องกันกำจัดโรคโคนเน่าของต้นทุเรียน โดยใช้เชื้อ *Trichoderma* spp. 1 กิโลกรัม : รำ 20 กิโลกรัม : บัวคอก 25 กิโลกรัม (กะแสด 49 (นามแดง), 2537) ซึ่งวัสดุที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นวัสดุที่หาง่ายในท้องถิ่น และสะดวกในการเตรียมเพื่อเพิ่มมวลชีวภาพของเชื้อแอนทาโกนิสต์ได้ดี



ภาพที่ 13 จำนวน colony forming unit (cfu)/g ของเชื้อ *Trichoderma* sp.

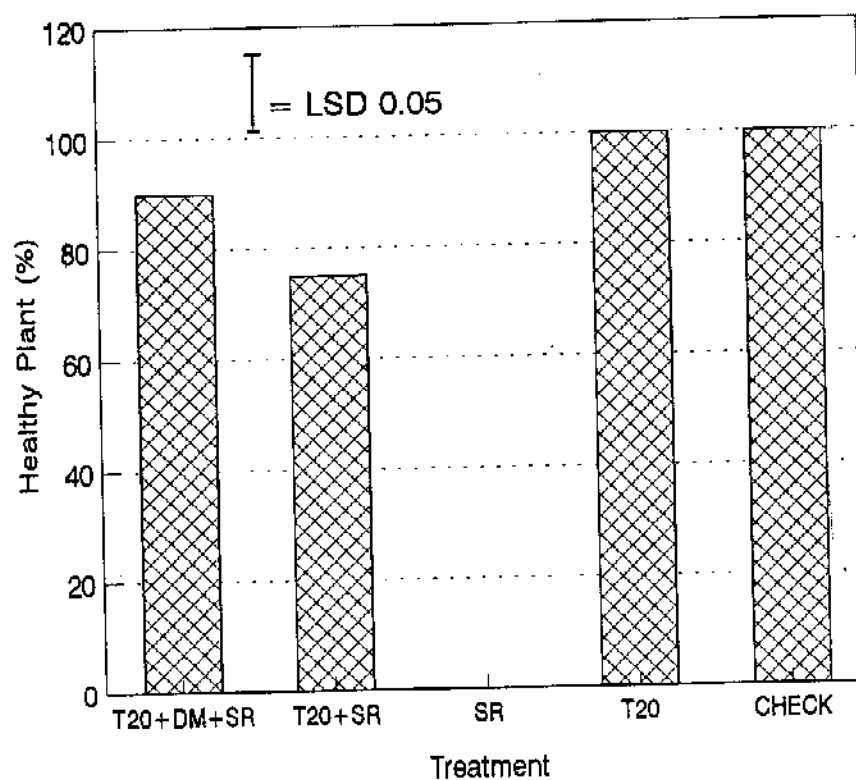
(T20) และ *Trichoderma koningii* (T27) ในวัสดุต่างกัน (A = กระดาษหนังสือพิมพ์, B = กระดาษลังสุญญากาศ, C = ขี้เลื่อย, D = ขี้วัวแห้ง, E = ขี้ขี้วัวโคมค และ F = วัสดุเหลือทิ้งจากการสกัดน้ำสับปะรดและส้มทุกวัสดุผสมรำข้าว 5% โดยปริมาตร)

5. การใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. (T20) ร่วมกับสารเคมี mancozeb ควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในสภาพเรือนทดลองและในสภาพแปลงปลูก

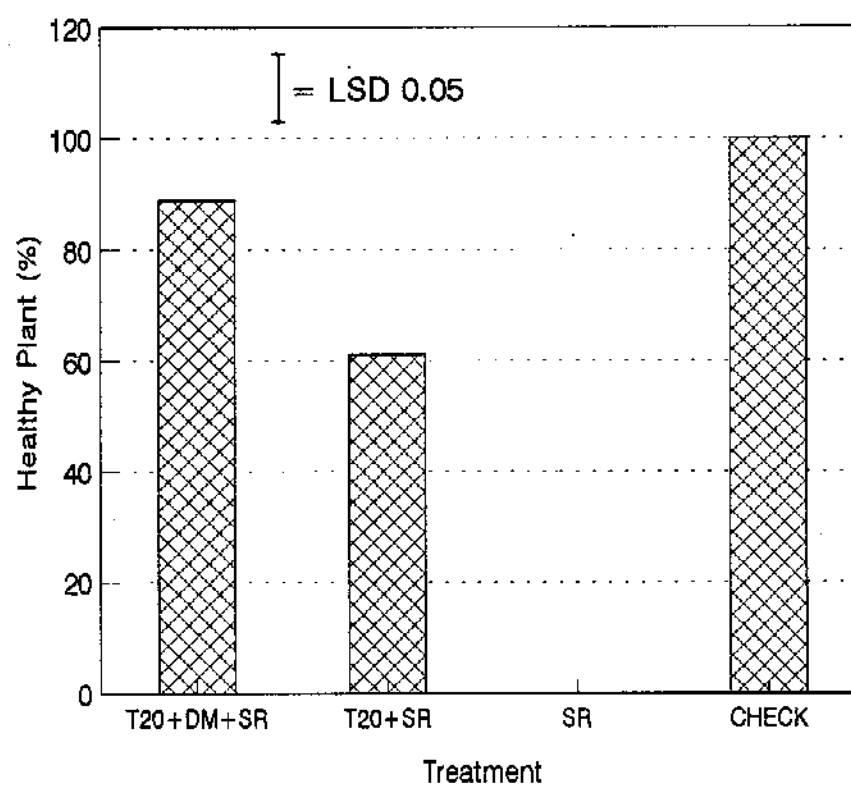
จากผลการทดลองใช้เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T20, T25 และ T27 ร่วมกับสารเคมี ได้เลือกเอาเชื้อไอโซเลต T20 และสารเคมี mancozeb มาทดสอบในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ ให้มะเขือเทศพันธุ์สีดาตราเครื่องบิน ผลการทดลองพบว่า การใช้สารเคมี mancozeb ร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) ทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตายมากที่สุด คือ 90% เมื่อเทียบกับกรรมวิธีตรวจสอบ (SR) ซึ่งต้นมะเขือเทศเป็นโรคทั้งหมด ในขณะที่การใช้ *Trichoderma* sp. (T20) อย่างเดียวในสภาพที่มีเชื้อ *S. rolfsii* ทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตาย 75% (ภาพที่ 14)

สำหรับในแปลงปลูก พบว่าการใช้สารเคมี mancozeb ร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) ทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตายแตกต่างกับวิธีการอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีต้นมะเขือเทศที่รอดตาย 88.9% เมื่อเทียบกับแปลงกรรมวิธีทดสอบ (SR) ซึ่งไม่มีต้นมะเขือเทศรอดตายเลย (0%) (ภาพที่ 15)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) ซึ่งแยกได้จากดินหมักพืชผัก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งสามารถนำมาประสมประสานร่วมกับการใช้สารเคมี mancozeb ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hadar และคณะ (1979) ซึ่งใช้ *T. harzianum* ร่วมกับสารเคมี pentachloronitrobenzene (PCNB) ลดโรครากเน่าของมะเขือยาวที่เกิดจากเชื้อ *R. solani* ได้ 40% นอกจากนั้น Elad และคณะ (1993) ยังพบว่า การใช้สารเคมี dicarboximide ร่วมกับ *T. harzianum* สามารถควบคุมโรค grey mold ของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea* ได้ถึง 96% ในสภาพห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ควรมีการทดลองเพิ่มเติมทั้งในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ต่อไป เพราะในสภาพดังกล่าวอาจมีแอนทาโกนิสต์ชนิดอื่นาร่วมอยู่ด้วย อันจะมีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20)



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์ต้นมะเขือเทศที่รอดตายจากโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* (SR) เมื่อใช้สารเคมี mancozeb (DM) ร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) ในสภาพเรือนทดลอง



ภาพที่ 15 เปรูเซ็นต์ต้นมะเขือเทศที่รอดตายจากโรคโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* (SR) เมื่อใช้สารเคมี mancozeb (DM) ร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) ในสภาพแปลงปลูก

6. การตรวจสอบการสร้าง secondary metabolic product ของเชื้อ *Trichoderma* spp.

เชื้อ *Trichoderma* spp. 3 ไอโซเลต คือ T20, T24 และ *Trichoderma koningii* (T27) สร้างสาร secondary metabolite ซึ่งเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 365 nm ทั้งหมด 5 จุด ซึ่งมีค่า Rate of flow (Rf) แตกต่างกัน (ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 16) และหลังจากฉีกแผ่น TLC plate ด้วยสารละลายเงินไนเตรทแล้วจะพบจุดทั้งหมด 8 จุด โดยมีค่า Rf ที่แตกต่างกัน จุด A จะเห็นชัดเจนมากที่สุด โดยเฉพาะใน ไอโซเลต T24 และ T27 จุด B และ C จะพบเฉพาะในไอโซเลต T27 ดังแสดงใน (ตารางที่ 8 และภาพที่ 16) การทดสอบสาร secondary metabolite ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีสารชนิดที่เชื้อ *Trichoderma* spp. ผลิตได้แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นสารพิษต่อเชื้อ *S. rolfsii* ได้ การศึกษานี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ยังไม่สามารถบอกได้ว่าจุดใดมีความเป็นพิษต่อ *S. rolfsii* จึงควรมีการศึกษาถึงความเป็นพิษของสาร secondary metabolite นี้ต่อเชื้อ *S. rolfsii* เพื่อผลในการค้นหาสารพิษที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากเน่า ซึ่งสารพิษของ *Trichoderma* spp. นี้มีรายงานหลายชนิดด้วยกัน เช่น Trichodermin, Viridin และ harzianopyridone เป็นต้น (Dennis and Webster, 1971; Rodgers, 1989)

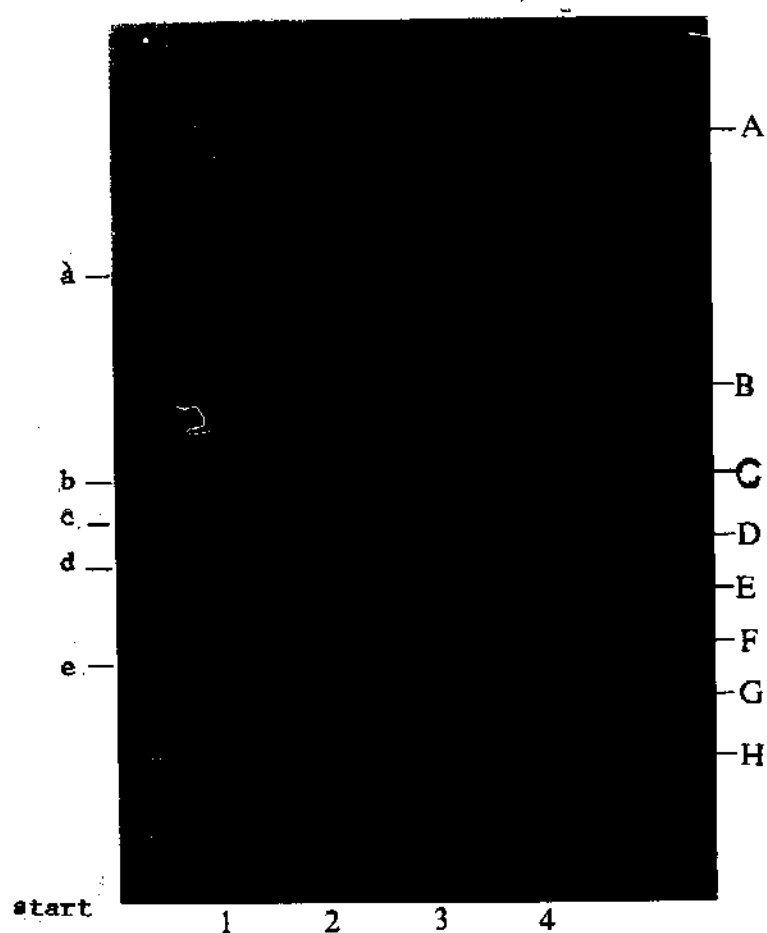
การใช้สารพิษจากเชื้อแอนตาโกนิสต์ต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโดยตรงนั้น จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากเน่าได้เร็วกว่าการใช้ตัวเชื้อแอนตาโกนิสต์โดยตรง ทั้งนี้จะต้องมีการศึกษาถึงวิธีการสกัดสารพิษนั้นให้ได้เป็นปริมาณมาก ความเป็นพิษของสารต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่า อัตราและวิธีการใช้ที่เหมาะสมต่อไป

ตารางที่ 7 ค่า Rate of flow (Rf) ของสาร secondary metabolic product
จากเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20), T24 และ *Trichoderma*
koningii (T27) เรืองแสงที่ความยาวคลื่น 365 nm

จุด	ค่า Rf		
	T20	T24	T27
a	0.69	0.69	0
b	0	0	0.46
c	0.42	0	0.42
d	0.39	0.39	0.39
e	0	0.27	0

ตารางที่ 8 ค่า Rate of flow (Rf) ของสาร secondary metabolic product จากเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20), T24 และ *Trichoderma koningii* (T27) ตรวจสอบด้วย Thin layer chromatography (Silica Gel) โดยใช้ chloroform : acetone 95:5 (v/v) เป็น solvent และฉีดด้วยสารละลายเงินในเทรท

จุด	ค่า Rf		
	T20	T24	T27
A	0.87	0.87	0.87
B	0	0	0.58
C	0	0	0.47
D	0.39	0.39	0.39
E	0.33	0.33	0.33
F	0	0.27	0
G	0.22	0.22	0.22
H	0	0.17	0.17



ภาพที่ 16 สาร secondary metabolic product ของ *Trichoderma* sp. (T20, เลขที่ 2) T24 (เลขที่ 3) และ *Trichoderma koningii* (T27 เลขที่ 4) และกรรมวิธีการตรวจสอบ (check เลขที่ 1) บนแผ่น Thin layer chromatography (Silica gel) หัวเข็มเล็ก เป็นจุดที่เรืองแสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 nm หัวเข็มใหญ่ เป็นจุดที่พัฒนามาจากการฉีกแผ่นด้วย สารละลายเงินไนเตรท

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ผลจากการศึกษาค้นพบว่า เชื้อ *Trichoderma* spp. หลายไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ในสภาพห้องปฏิบัติการ จากจำนวนทั้งหมด 27 ไอโซเลตที่นำมาศึกษา ได้คัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพค่อนข้างดีมา 15 ไอโซเลต เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. rolfsii* จากเมล็ดสเคลอโรเตียม ซึ่งพบว่าเชื้อ *T. koningii* (T27) ยับยั้งการเจริญของเมล็ดสเคลอโรเตียมได้ดีที่สุด

ในการตรวจสอบกิจกรรมของ extracellular enzyme ของเชื้อ *Trichoderma* spp. จำนวน 15 ไอโซเลตที่คัดเลือกมา พบว่าเชื้อทั้ง 15 ไอโซเลต มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและโปรตีเอสแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อ *T. koningii* (T27) มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุด และเชื้อ *Trichoderma* sp. (T12) มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสได้สูง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสนั้น ทุกไอโซเลตไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ และไม่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase

ประสิทธิภาพเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *S. rolfsii* ในสภาพเรือนทดลองนั้น พบว่าคั้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20) และ *T. koningii* (T27) ทำให้มะเขือเทศรอดตายมากที่สุด

ในการทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีที่ควบคุมเชื้อราต่อเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *S. rolfsii* พบว่าสารเคมี mancozeb ที่ระดับความเข้มข้น 18,000 $\mu\text{g/ml}$ สามารถนำมาใช้ร่วมกับ *Trichoderma* spp. (ไอโซเลต T2, T20 และ T24) ส่วนเชื้อ *T. harzianum* (T25) และ *T. hamatum* (T26) ควรจะใช้ร่วมกับ PCNB ที่ความเข้มข้น 7,200 $\mu\text{g/ml}$

การศึกษาเพื่อผลิตมวลชีวภาพของเชื้อ *Trichoderma* sp. (T20), *T. harzianum* (T25) และ *T. koningii* (T27) ในวัสดุต่างๆ ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษลังถูกฟูก ขี้เลื่อย ขี้วัวฟาง ช้างข้าวโพด และวัสดุเหลือทิ้งจากการสกัดน้ำผลไม้ ล้างประคและส้ม พบว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลตมีการเจริญในวัสดุต่างๆ

ได้แตกต่างกัน ชื่อ *Trichoderma* sp. (T20) จะเจริญได้ดีในกระดาษหนังสือพิมพ์และข้าวฟ่าง แต่การตรวจนับจำนวนโคโลนีโดยใช้อาหาร selective medium จะมีปริมาณ colony forming unit/g มากที่สุดในซึ่งข้าวโพด ชื่อ *T. harzianum* (T25) เจริญได้ดีในกระดาษหนังสือพิมพ์และกระดาษลังลูกหูก แต่ไม่สามารถตรวจนับจำนวน cfu/g ได้ ส่วนชื่อ *T. koningii* (T27) เจริญได้ดีในกระดาษลังลูกหูกและข้าวฟ่าง และตรวจนับจำนวน cfu/g ได้มากที่สุดในกระดาษหนังสือพิมพ์ ผลจากการทดลองนี้ได้คัดเลือกชื่อ *Trichoderma* sp. (T20) และวัสดุที่เลี้ยง เพราะเตรียมได้ง่ายและสะดวกในการใช้มากกว่า เพื่อใช้ศึกษาในการควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศร่วมกับสารเคมีต่อไป

การทดสอบใช้สารเคมีร่วมกับชื่อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T20 เพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ ทั้งในสภาพเรือนทดลองและแปลงปลูก พบว่าชื่อ *Trichoderma* sp. (T20) ร่วมกับสารเคมี mancozeb ความเข้มข้น 18,000 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตายในสภาพเรือนทดลองและแปลงปลูกได้ 90 และ 88.9% ตามลำดับ

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ชื่อ *Trichoderma* sp. (T20) ประสมประสานกับการใช้สารเคมี mancozeb ให้ผลการควบคุมได้ผลดีเมื่อเปรียบเทียบกับแปลงที่ไม่มีการใช้หรือใช้แต่ชื่อ *Trichoderma* sp. (T20) เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้เมื่อศึกษาถึงการผลิตสาร secondary metabolite ของชื่อ *Trichoderma* sp. (T20, T24) และ *T. koningii* (T27) ด้วยการ ใช้ Thin layer chromatography ได้พบสาร secondary metabolite ที่ตรวจสอบได้ด้วยสารละลายเงินไนเตรท 8 จุด โดยมีค่า Rf แตกต่างกัน แต่การศึกษาค้างนี้ไม่ได้ทดสอบถึงความเป็นพิษของสารเหล่านั้นต่อชื่อ *S. rolfsii*

ชื่อ *Trichoderma* sp. (T20) ร่วมกับสารเคมีควบคุมเชื้อรา mancozeb สามารถควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากชื่อ *S. rolfsii* ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง ความมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำชื่อ *Trichoderma* sp. (T20) ไปควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อสาเหตุชนิดอื่นแบบวิธีที่การประสมประสาน และมีความมีการศึกษาถึงความเป็นพิษต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชของสาร secondary metabolite

product ของเชื้อ *Trichoderma* spp. การสกัด และผลิตให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปใช้ควบคุมโรคพืชและพัฒนาารูปแบบที่เหมาะสมให้สะดวกในการใช้เป็นสารชีวภาพที่ใช้ควบคุมโรคพืชได้ต่อไป