

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

1. รวบรวมเชื้อรา *Trichoderma* จากสารชีวภัณฑ์ และ แยกเชื้อรา *Trichoderma* จากดินในบริเวณ rhizosphere ของต้นพริก ในแปลงเกษตรกร รวมทั้งเชื้อราอื่นๆ ที่ไม่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุของโรค

#### 1.1 การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อราชนิดอื่นจากบริเวณ rhizosphere

ทำการแยกเชื้อราจากบริเวณ rhizosphere ของต้นพริกที่สมบูรณ์ แข็งแรงและไม่เป็นโรคจากแปลงเกษตรกร 5 พื้นที่ ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 94 ไอโซเลต และเชื้อราที่ไม่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุโรคได้ 2 ไอโซเลต คือ เชื้อรา *Aspergillus flavus* และเชื้อรา *Penicillium* sp. (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาและปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากพื้นที่ต่างๆ รวมถึงเชื้อราชนิดอื่นที่ไม่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุโรค

สถานที่	ปริมาณเชื้อรา (ไอโซเลต)
1. แปลงเกษตรกร บ้านแม่ใจ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่	20
2. แปลงเกษตรกร อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่	12
3. แปลงเกษตรกร อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่	22
4. แปลงเกษตรกร อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่	21
5. แปลงเกษตรกร จังหวัดลำพูน	19
6. เชื้อราชนิดอื่นที่ไม่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุโรค	2

1.2 การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากสารชีวภัณฑ์ที่ได้จากแหล่งการค้า

ทำการแยกเชื้อราจากสารชีวภัณฑ์ 6 แหล่ง ได้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ทั้งหมด 6 ไอโซเลต ได้แก่ สารชีวภัณฑ์ 1 สารชีวภัณฑ์ 2 สารชีวภัณฑ์ 3 สารชีวภัณฑ์ 4 สารชีวภัณฑ์ 5 และ สารชีวภัณฑ์ 6

### 1.3 การจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การแยกเชื้อราจากบริเวณ rhizosphere และจากสารชีวภัณฑ์แล้วนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้ดังนี้ (ตารางที่ 2)

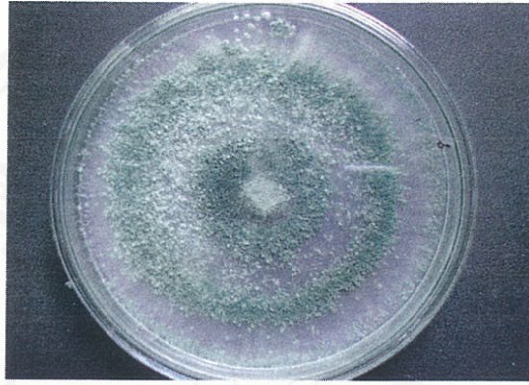
**ตารางที่ 2** การจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามลักษณะสัณฐานวิทยา ที่ได้จากบริเวณ rhizosphere 94 ไอโซเลต และจากสารชีวภัณฑ์ 6 ไอโซเลต

รหัส	species	รหัส	species
T-1	<i>T. hamatum</i>	T-26	<i>T. harzianum</i>
T-2	<i>T. harzianum</i>	T-27	<i>T. hamatum</i>
T-3	<i>T. hamatum</i>	T-28	<i>T. hamatum</i>
T-4	<i>T. hamatum</i>	T-29	<i>T. hamatum</i>
T-5	<i>T. hamatum</i>	T-30	<i>T. hamatum</i>
T-6	<i>T. harzianum</i>	T-31	<i>T. hamatum</i>
T-7	<i>T. hamatum</i>	T-32	<i>T. harzianum</i>
T-8	<i>T. harzianum</i>	T-33	<i>T. hamatum</i>
T-9	<i>T. hamatum</i>	T-34	<i>T. hamatum</i>
T-10	<i>T. harzianum</i>	T-35	<i>T. harzianum</i>
T-11	<i>T. harzianum</i>	T-36	<i>T. aureoviride</i>
T-12	<i>T. hamatum</i>	T-37	<i>T. aureoviride</i>
T-13	<i>T. hamatum</i>	T-38	<i>T. harzianum</i>
T-14	<i>T. hamatum</i>	T-39	<i>T. harzianum</i>
T-15	<i>T. aureoviride</i>	T-40	<i>T. aureoviride</i>
T-16	<i>T. harzianum</i>	T-41	<i>T. harzianum</i>
T-17	<i>T. hamatum</i>	T-42	<i>T. hamatum</i>
T-18	<i>T. hamatum</i>	T-43	<i>T. harzianum</i>
T-19	<i>T. harzianum</i>	T-44	<i>T. harzianum</i>
T-20	<i>T. hamatum</i>	T-45	<i>T. longibrachiatum</i>
T-21	<i>T. hamatum</i>	T-46	<i>T. harzianum</i>
T-22	<i>T. harzianum</i>	T-47	<i>T. hamatum</i>
T-23	<i>T. harzianum</i>	T-48	<i>T. harzianum</i>
T-24	<i>T. aureoviride</i>	T-49	<i>T. aureoviride</i>
T-25	<i>T. viride</i>	T-50	<i>T. harzianum</i>

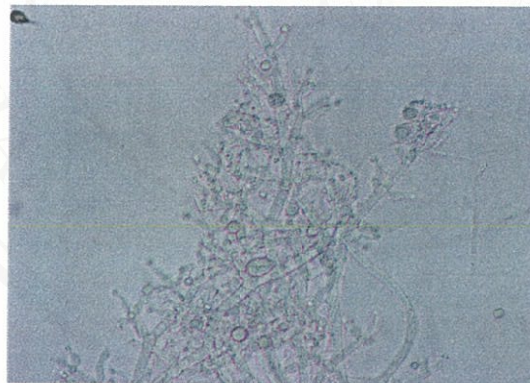
## ตารางที่ 2(ต่อ)

รหัส	species	รหัส	species
T-51	<i>T. longibrachiatum</i>	T-76	<i>T. longibrachiatum</i>
T-52	<i>T. harzianum</i>	T-77	<i>T. pseudokonigii</i>
T-53	<i>T. harzianum</i>	T-78	<i>T. longibrachiatum</i>
T-54	<i>T. longibrachiatum</i>	T-79	<i>T. aureoviride</i>
T-55	<i>T. harzianum</i>	T-80	<i>T. aureoviride</i>
T-56	<i>T. pseudokonigii</i>	T-81	<i>T. harzianum</i>
T-57	<i>T. longibrachiatum</i>	T-82	<i>T. longibrachiatum</i>
T-58	<i>T. harzianum</i>	T-83	<i>T. aureoviride</i>
T-59	<i>T. aureoviride</i>	T-84	<i>T. hamatum</i>
T-60	<i>T. longibrachiatum</i>	T-85	<i>T. harzianum</i>
T-61	<i>T. harzianum</i>	T-86	<i>T. longibrachiatum</i>
T-62	<i>T. harzianum</i>	T-87	<i>T. longibrachiatum</i>
T-63	<i>T. longibrachiatum</i>	T-88	<i>T. longibrachiatum</i>
T-64	<i>T. aureoviride</i>	T-89	<i>T. aureoviride</i>
T-65	<i>T. longibrachiatum</i>	T-90	<i>T. koningii</i>
T-66	<i>T. longibrachiatum</i>	T-91	<i>T. longibrachiatum</i>
T-67	<i>T. longibrachiatum</i>	T-92	<i>T. pseudokonigii</i>
T-68	<i>T. longibrachiatum</i>	T-93	<i>T. harzianum</i>
T-69	<i>T. longibrachiatum</i>	T-94	<i>T. harzianum</i>
T-70	<i>T. pseudokonigii</i>	T-95	<i>T. koningii</i>
T-71	<i>T. harzianum</i>	T-96	<i>T. harzianum</i>
T-72	<i>T. aureoviride</i>	T-97	<i>T. harzianum</i>
T-73	<i>T. aureoviride</i>	T-98	<i>T. longibrachiatum</i>
T-74	<i>T. harzianum</i>	T-99	<i>T. koningii</i>
T-75	<i>T. pseudokonigii</i>	T-100	<i>T. koningii</i>

ซึ่งประกอบด้วยเชื้อกลุ่มต่างๆ คือ 1) กลุ่มเชื้อรา *T. harzianum* 34 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีเจริญรวดเร็ว บริเวณที่สร้างสปอร์มีสีเขียวปนขาว แล้วเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้น สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง เส้นใยแตกแขนงมีผนังกัน ไม่มีสี พบ chlamydospore มีรูปร่างกลม ผิวเรียบ เกิดระหว่างและปลายเส้นใย phialide มีรูปร่าง skittle-shaped เกิดเป็นกลุ่ม phialospore มีรูปร่างกลม และค่อนข้างกลม ผิวเรียบ มีสีเขียวอ่อนเมื่อรวมกันจะมีสีเขียวเข้มขึ้น (ภาพที่ 2 ก และ ข)



ก



ข

ภาพที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* บนอาหาร PDA

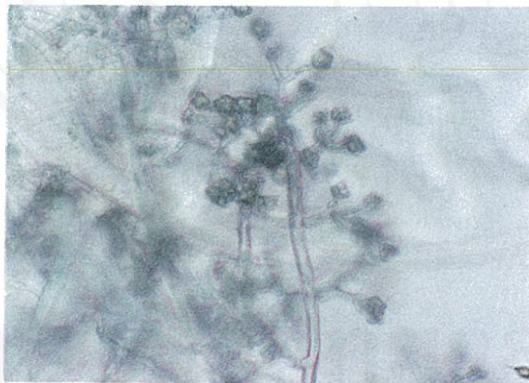
ลักษณะโคโลนี (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ conidiophore, phialide และ phialospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า(ข)



2) กลุ่มเชื้อรา *T. hamatum* 23 ไอโซเลต ลักษณะโคโลนีเจริญค่อนข้างช้า เริ่มแรกผิวหน้าเรียบแผ่แบนราบบนอาหาร ส่วนใหญ่ไม่มีสี โดยมีเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหารน้อย มีลักษณะเป็นกำมะหยี่ สีได้โคโลนีไม่มีการเปลี่ยนแปลง เส้นใยไม่มีสี ผ่องเรียบ แตกกิ่งก้าน เส้นใยมี septate ส่วน chlamydospore เกิดขึ้นระหว่างเส้นใย รูปร่างกลมเป็นส่วนใหญ่ ส่วน conidiophore มีการแตกกิ่งก้านมากมาย เป็นกระจุกหนาแน่นมากบ้างครั้งเกิดติดต่อกัน ทำให้มองเห็นบริเวณที่สร้างโคโลนีเป็นวงแหวนต่อเนื่องกันเป็นชั้นๆ (ภาพที่ 3 ก และ ข)



ก



ข

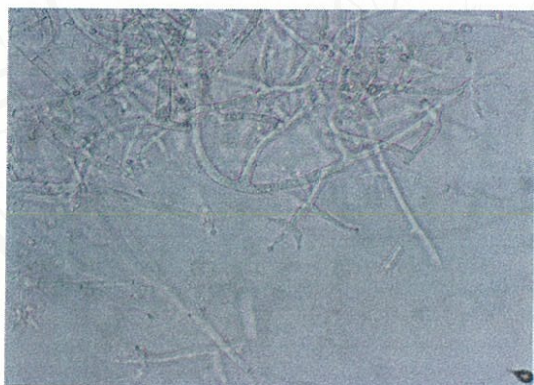
ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Trichoderma hamatum* บนอาหาร PDA

ลักษณะโคโลนี (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ conidiophore, phialide และ phialospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า(ข)

3) กลุ่มเชื้อรา *T. aureoviride* 14 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีเจริญเติบโตช้า ผิวหน้าเรียบ โคโลนีมีสีเขียวปนขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวหม่นเมื่ออายุมากขึ้นสีของอาหารใต้โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเขียว-เหลืองน้ำตาล พบ chlamydospore มีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม ผิวเรียบ มีสีเขียวปนเหลือง (ภาพที่ 4 ก และ ข)



ก

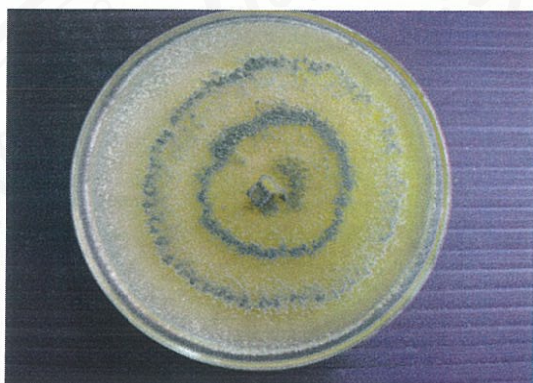


ข

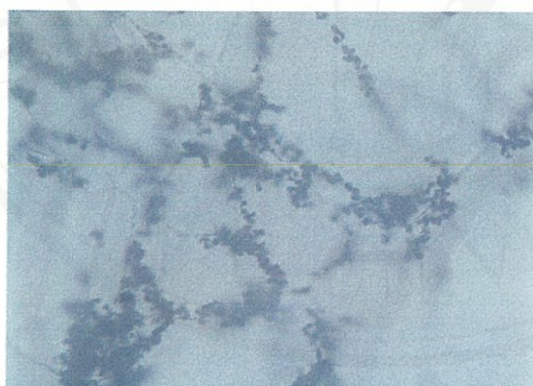
ภาพที่ 4 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Trichoderma aureoviride* บนอาหาร PDA

ลักษณะโคโลนี (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ conidiophore, phialide และ phialospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า(ข)

4) กลุ่มเชื้อรา *T. pseudokoningii* 5 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีเจริญเร็ว มีสีเขียวปนขาวจนถึงสีเขียวสด และมีการสร้างเม็ดสีไปลอยไปในอาหารทำให้สีของอาหารใต้โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง พบ chlamydospore รูปร่างค่อนข้างกลมเกิดระหว่างเส้นใย ไม่มีสี phialide เกิดเป็นคู่ ไม่เกิดเป็นวง โดยรอบ มีรูปร่าง pin-shaped phialospore มีรูปร่างทรงกระบอก ขนาดสั้น ผิวเรียบ มีสีเขียวอ่อน เมื่อรวมกันเป็นกลุ่มจะมีสีเขียว (ภาพที่ 5 ก และ ข)



ก



ข

**ภาพที่ 5 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Trichoderma pseudokoningii* บนอาหาร PDA**

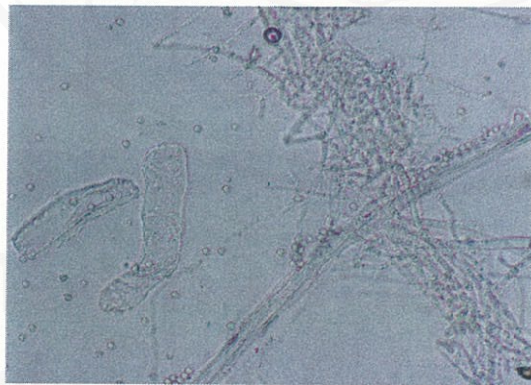
ลักษณะโคโลนี (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ conidiophore, phialide และ phialospore ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ 400 เท่า(ข)



5) กลุ่มเชื้อรา *T. viride* 1 ไอโซเลต โคลนิจერიญเติบโตเร็ว เริ่มแรกผิวหน้าเรียบ สีขาวใส แผ่นบนราบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมาสร้างเส้นใยอยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้โคลนนี้มีลักษณะฟูสีขาว เมื่ออายุมากขึ้นมีการสร้างสปอร์จำนวนมากทำให้โคลนนี้มีสีเขียวดำเข้มหรือเขียวปนน้ำเงินเข้ม และได้โคลนีสีไม่เปลี่ยนแปลง มีลักษณะเฉพาะคือ เมื่ออายุมากขึ้นจะสร้างกลิ่นคล้ายกลิ่นมะพร้าว เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านมาก ไม่มีสี ผนังเรียบ มีผนังกัน conidiophore เป็นปุยแบบหลวมๆ จนถึงหนาแน่น และกระจายกระจายทั่วไป เป็นวงรอบหรือวงบางส่วน phialide เกิดเดี่ยวๆ ขนาดไม่แน่นอน ทำมุมเป็นมุมกว้างกับฐานเช่นเดียวกับการแตกกิ่งก้านของ conidiophore ลักษณะตรงหรือโค้งงอบ้างเล็กน้อยปลายฐานแคบและส่วนคอยาว ลักษณะแบบลูกพินโบว์ลิ่ง ส่วน phialospore รูปร่างกลม หรือรูปไข่หัวกลับและสั้น หรือกระสวยป่องตรงกลาง แต่พบน้อย บางครั้งที่ฐานสปอร์มีลักษณะคล้าย apicule ไม่ชัดเจน ผนังมีลักษณะขรุขระเล็กน้อย ทำให้มองสปอร์เป็นรูปเหลี่ยม (ภาพที่ 6 ก และ ข)



ก



ข

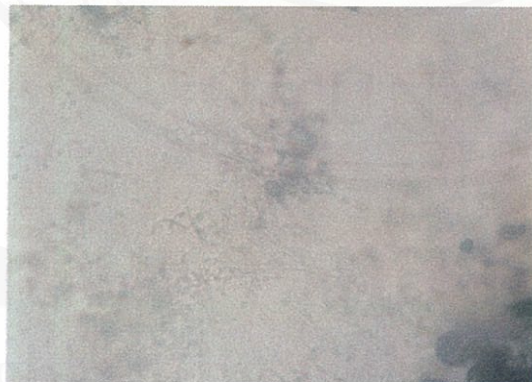
**ภาพที่ 6 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Trichoderma viride* บนอาหาร PDA**

ลักษณะ โคลนิจ (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ conidiophore, phialide และ phialospore ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า(ข)

6) กลุ่มเชื้อรา *T. longibrachiatum* 19 ไอโซเลต โคโลนีเจริญอย่างรวดเร็ว เริ่มแรกผิวหน้าเรียบไม่มีสี ต่อมาสร้าง conidiophore ทำให้โคโลนีมีลักษณะฟูแบบฟูฝ้าย และสร้างสปอร์สีเขียวปนขาว จนถึงเขียวมะกอกอ่อนๆ ได้โคโลนีสีไม่เปลี่ยน phialide มักสร้างเดี่ยวๆ และเกิดรอบๆ เป็นระยะตลอดทางยาวของก้าน conidiophore แต่ไม่เป็นระเบียบ แต่ละอันแยกจากกัน บางครั้งเกิดเป็นคู่ตรงข้าม จะมีรูปร่างแบบขวด ฐานแคบลงและส่วนปลายสั้น หรือบางอันงอเล็กน้อยเข้าหาปลายยอดหรือหันไปทิศทางอื่น ส่วน phialospore มีรูปร่างแบบรูปไข่หัวกลับเหมือนกระสวย หรือรูปกระสวยป่องตรงกลาง แต่ส่วนใหญ่รูปร่างค่อนข้างเป็นทรงกระบอก และมีฐานตัดตรงชัดเจน ผนังเรียบ สีเขียวอ่อนร่วนกันเป็นกลุ่มก้อน มีสีเขียว ซึ่ง phialospore ที่ยังอ่อนมักจะพบหยดมีน้ำมัน เมื่อแกะมองไม่เห็น (ภาพที่ 7 ก และ ข)



ก



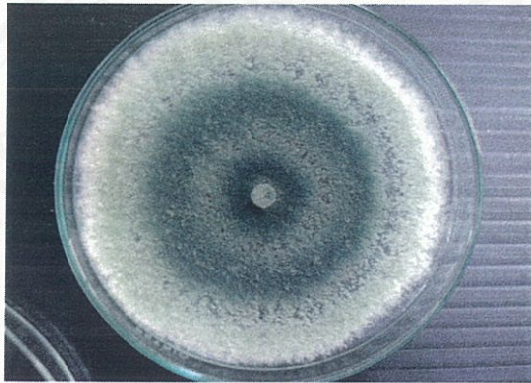
ข

**ภาพที่ 7 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* บนอาหาร PDA**

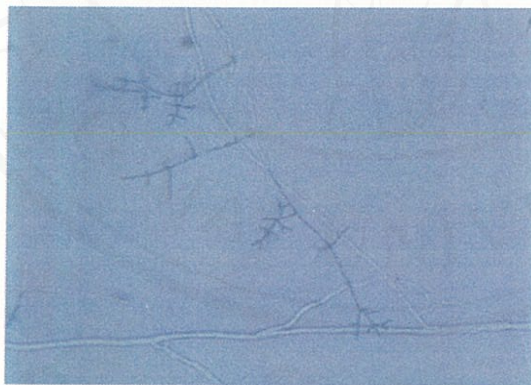
ลักษณะโคโลนี (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ conidiophore, phialide และ phialospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า(ข)



7) กลุ่มเชื้อรา *T. koningii* 4 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีเจริญเร็ว เส้นใยฟูเหนียวอาหาร มีสีเขียวปนขาวเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง เส้นใยแตกกิ่งก้านมาก มีผนังกัน พบ chlamydospore รูปร่างกลมแบบรูปดั่งเบียร์ เกิดที่ปลายเส้นใย phialides มีรูปร่าง pin-shaped เกิดเป็นกลุ่มคล้ายกับเชื้อรา *T. harzianum* แต่การแตกกิ่งก้านจะมามุมกว้างมากกับฐาน phialophore มีรูปร่างแบบกระสวยเหลี่ยม มีสีเขียวอ่อน-เขียว (ภาพที่ 8 ก และ ข)



ก

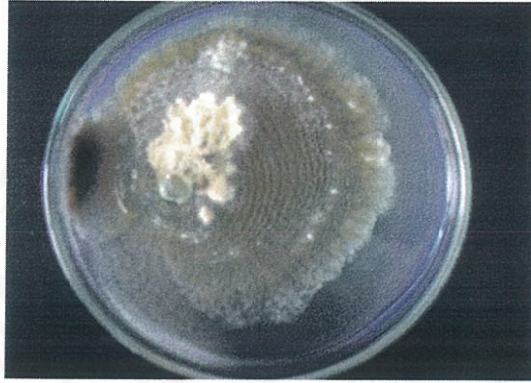


ข

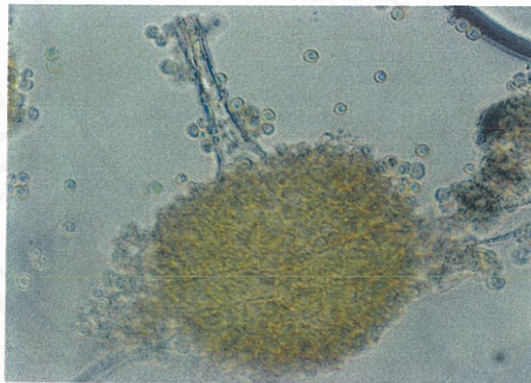
**ภาพที่ 8 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Trichoderma koningii* บนอาหาร PDA**

ลักษณะโคโลนี (ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ conidiophore, phialide และ phialospore ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ 400 เท่า(ข)

เชื้อราอื่นๆที่ไม่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคได้ 2 ชนิด คือ เชื้อรา *Aspergillus flavus* (ภาพที่ 9ก และ ข) และเชื้อรา *Penicillium* sp. (ภาพที่ 10 ก และ ข)



ก



ข

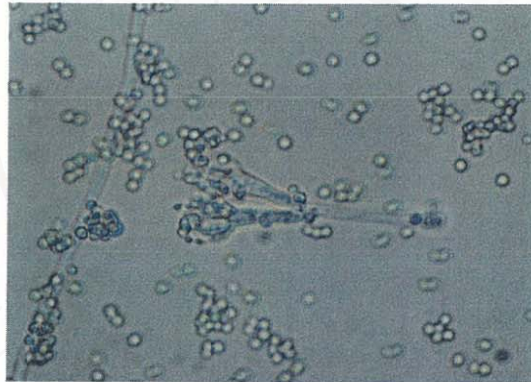
**ภาพที่ 9 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Aspergillus flavus* บนอาหาร PDA**

ลักษณะโคโลนี (ก) ลักษณะสปอร์และก้านชูสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 400

เท่า(ข)



ก



ข

ภาพที่ 10 ลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา *Penicillium* sp. บนอาหาร PDA

ลักษณะโคโคนี (ก) ลักษณะสปอร์และเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 400 เท่า(ข)

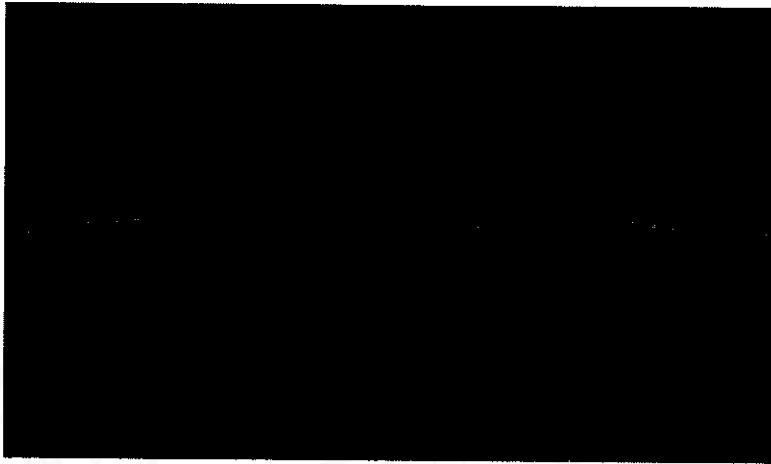
## 2. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP

เมื่อสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามวิธีดัดแปลงจากวิธีของ White *et al.*(1996) นำมาตรวจปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ให้ปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 25-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

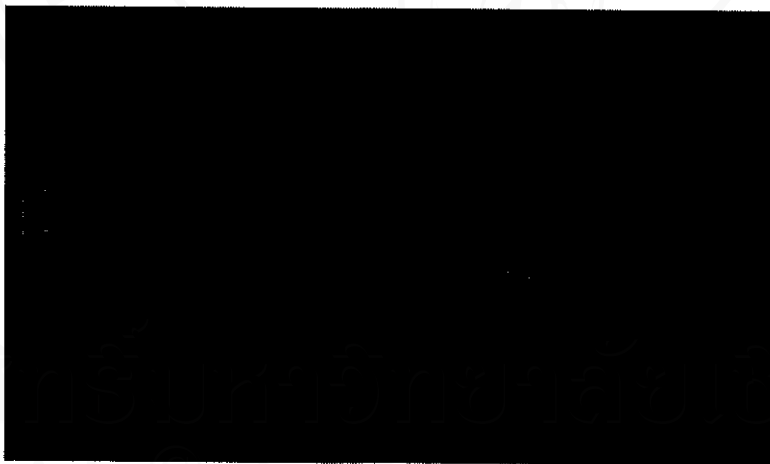
เมื่อนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ universal primer ITS1 และ ITS4 พบว่าขนาดของดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (ภาพที่ 11) จากนั้นนำเอาผลผลิตของ PCR มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *EcoRI*, *BamHI* และ *SmaI* สามารถย่อยได้อย่างสมบูรณ์ โดยการตรวจสอบบน agarose gel electrophoresis หลังจากการย่อย พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ *EcoRI* ย่อยได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 600 คู่เบส (ภาพที่ 12), เอนไซม์ *SmaI* สามารถย่อยดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 550 และ 125 คู่เบส (ภาพที่ 13) และเอนไซม์ *BamHI* สามารถย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ดีเอ็นเอไม่ถูกย่อย ได้แก่ เชื้อรา *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. aureoviride* และ *T. viride* กลุ่มที่ 2 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 480 และ 220 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. koningii* กลุ่มที่ 3 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 560 และ 140 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. pseudokoningii* (ภาพที่ 14) (Alan *et al.*, 1997)

เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc เพื่อจัดกลุ่มเชื้อราทั้ง 100 ไอโซเลต ซึ่งสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ที่ค่า similarity 0.78 โดยกลุ่ม A ประกอบด้วยเชื้อรา *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. aureoviride* และ *T. viride* 71 ไอโซเลต กลุ่ม B ประกอบด้วย เชื้อรา *T. koningii* 4 ไอโซเลต และกลุ่ม C ประกอบด้วยเชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. pseudokoningii* 25 ไอโซเลต (ภาพที่ 15)



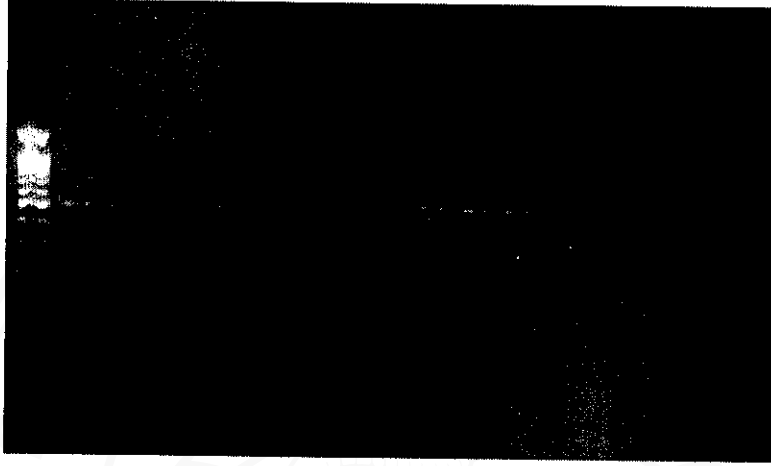


**ภาพที่ 11** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 100 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction โดยใช้ universal primer ITS1 และ ITS4



**ภาพที่ 12** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 100 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

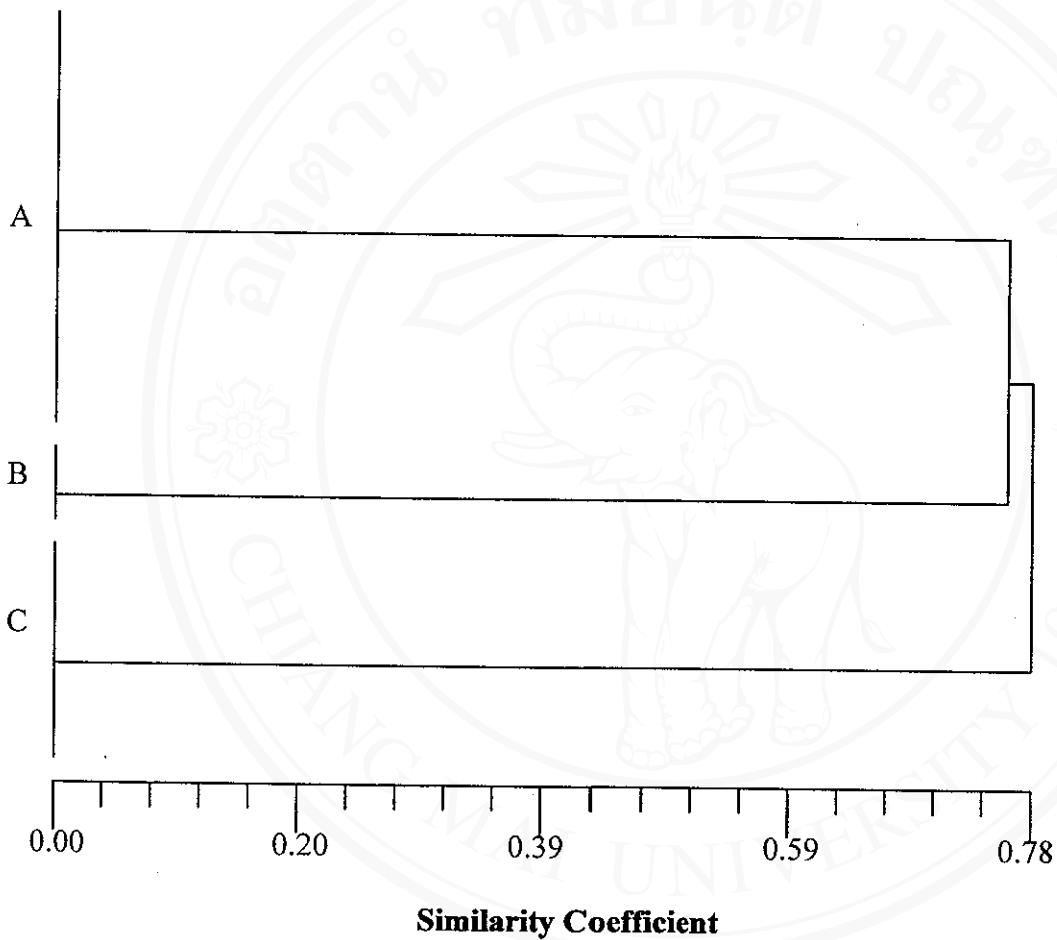




**ภาพที่ 13** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 100 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SmaI*



**ภาพที่ 14** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 100 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI*



**ภาพที่ 15** Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 5 polymorphic band ทั้ง 100 ไอโซเลต โดยวิธี UPGMA ด้วยค่า Dice's similarity coefficient แบ่งได้ 3 กลุ่ม ที่ค่า similarity เท่ากับ 0.78

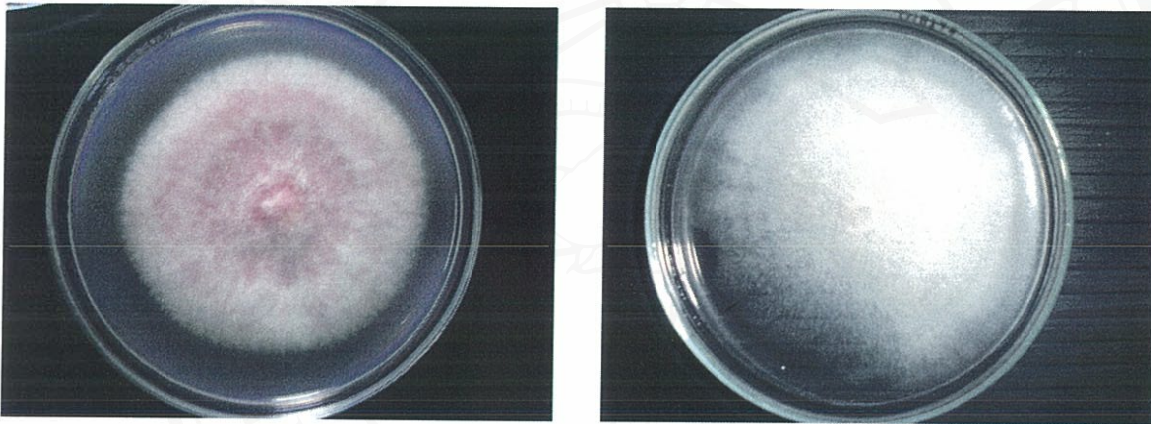
A คือ ไอโซเลตที่ 1-44, 97, 96, 46, 50, 53, 58, 59, 61, 62, 47, 48, 49, 55, 64, 71, 74, 83, 84, 85, 89, 94, 72, 73, 79, 80, 81, 93, 52

B คือ ไอโซเลตที่ 90, 100, 95, 99

C คือ ไอโซเลตที่ 45, 51, 98, 54, 92, 88, 86, 87, 82, 91, 78, 76, 75, 77, 70, 67, 65, 63, 68, 66, 57, 56, 69 60

### 3. แยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชจากต้นพริก

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชจากต้นพริกได้เชื้อรา *F. oxysporum* 2 ไอโซเลต ซึ่งเชื้อรา *F. oxysporium* ไอโซเลตที่ 1 มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวอมชมพู ส่วนเชื้อรา *F. oxysporium* ไอโซเลตที่ 2 มีเส้นใยสีขาวอมเหลืองเมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีสีเหลืองเข้ม (ภาพที่16) จะสร้าง asexual spore 3 แบบ คือ microconidium เป็น conidium ที่มีรูปร่างคล้ายรูปไข่ มี 0-1 septum ไม่มีสี, macroconidium เป็น conidium ที่มีรูปร่างแบบ foot-shaped ส่วน basal cell จะสร้างบน sporodochia มี 2-4 septum ไม่มีสีและ chlamydospore จะมี 1-2 เซลล์



ก

ข

**ภาพที่ 16** ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 10 วันของเชื้อรา *F. oxysporum* 2 ไอโซเลต  
ภาพ ก แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporium* ไอโซเลตที่ 1  
ภาพ ข แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporium* ไอโซเลตที่ 2

#### 4. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* 2 ไอโซเลต

เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 100 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* 2 ไอโซเลต บนอาหาร PDA พบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีอยู่ 3 แบบ (ตารางที่ 3) คือ 1. เชื้อราปฏิปักษ์เจริญปกคลุมเชื้อรา *F. oxysporum* (ภาพที่ 17) 2. เชื้อราปฏิปักษ์เกิด clear zone (ภาพที่ 18) 3. เชื้อราปฏิปักษ์สร้างสาร secondary metabolite production (ภาพที่ 19) เมื่อรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพิ่มขึ้น รัศมีโคโลนีของเชื้อรา *F. oxysporum* ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเฉพาะเชื้อรา *F. oxysporum* ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในแต่ละ species มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่แตกต่างกันออกไป

**ตารางที่ 3** จำนวนปฏิกิริยาระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อรา *F. oxysporum* 2 ไอโซเลตบนอาหาร PDA

ปฏิกิริยา	เชื้อรา <i>F. oxysporum</i>
1. เจริญปกคลุม (hypha mycoparasite)	37
2. clear zone	31
3. สร้าง secondary metabolite production	32



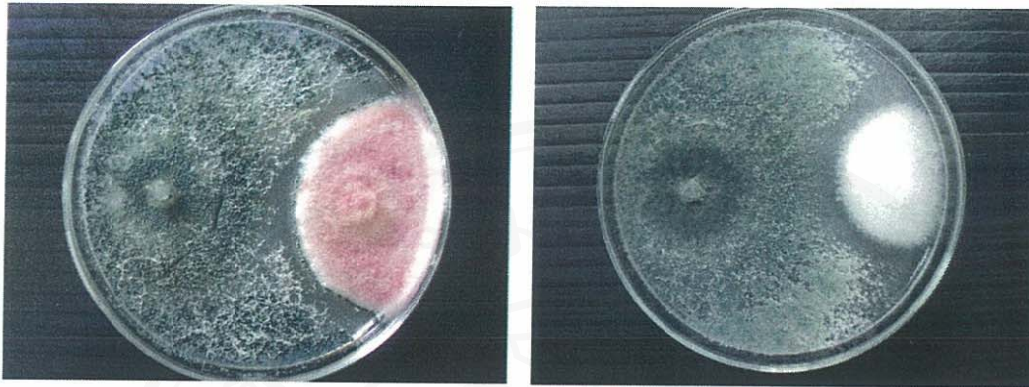
ก



ข

**ภาพที่ 17** ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลตที่ 10 ที่เจริญปกคลุมเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 1 (ก) และ เชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 2 (ข) ข่ายมือ คือ เชื้อรา *Trichoderma* sp. และขวามือ คือ เชื้อรา *F. oxysporum*

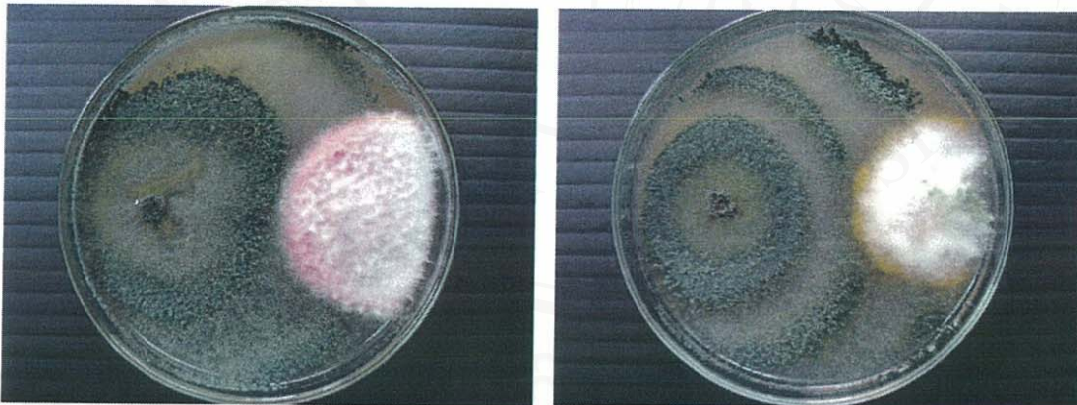




ก

ข

**ภาพที่ 18** ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลตที่ 6 ที่เกิด clear zone กับเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 1 (ก) และ เชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 2 (ข) ซ้ายมือ คือ เชื้อรา *Trichoderma* sp. และขวามือ คือ เชื้อรา *F. oxysporum*



ก

ข

**ภาพที่ 19** ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma aureoviride* ไอโซเลตที่ 37 สร้างสาร secondary metabolite production ออกมาขัดขวางการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 1 (ก) และ เชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 2 (ข) ซ้ายมือ คือ เชื้อรา *Trichoderma* sp. และขวามือ คือ เชื้อรา *F. oxysporum*



เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. เบื้องต้นที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 2 ไอโซเลต ได้คัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดีที่สุด จำนวน 10 ไอโซเลต คือเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต 10 เชื้อรา *T. hamatum* ไอโซเลต 3 เชื้อรา *T. longibrachiatum* ไอโซเลต 67 เชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลต 37 และสารชีวภัณฑ์ 6 ไอโซเลต ดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** เชื้อรา *Trichoderma* spp. 10 ไอโซเลต ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 2 ไอโซเลต

เชื้อรา <i>Trichoderma</i>	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	
	<i>F. oxysporum</i> ไอโซเลตที่ 1	<i>F. oxysporum</i> ไอโซเลตที่ 2
<i>T. harzianum</i> ไอโซเลต 10	66.67	72.22
<i>T. hamatum</i> ไอโซเลต 3	64.44	68.89
<i>T. longibrachiatum</i> ไอโซเลต 67	66.67	70.00
<i>T. aureoviride</i> ไอโซเลต 37	65.56	76.67
สารชีวภัณฑ์ 1	55.00	62.50
สารชีวภัณฑ์ 2	64.44	75.56
สารชีวภัณฑ์ 3	65.56	66.67
สารชีวภัณฑ์ 4	48.15	81.11
สารชีวภัณฑ์ 5	67.78	70.00
สารชีวภัณฑ์ 6	66.67	64.44

### 5. ทดสอบประสิทธิภาพฆ่าของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

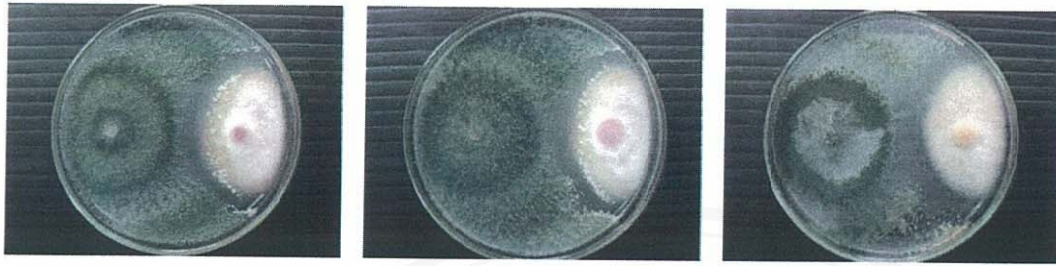
นำเอาเชื้อรา *Trichoderma* spp. 10 ไอโซเลตที่ได้คัดเลือกจากการทดลองที่ 4 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพฆ่ากับเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 2 ไอโซเลต โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ พบว่า สารชีวภัณฑ์ 2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 1 ได้ดีที่สุดใน 61.39 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 20) และสารชีวภัณฑ์ 4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 2 ได้ดีที่สุดใน 72.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 21)

**ตารางที่ 5** ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากบริเวณ rhizosphere และสารชีวภัณฑ์ 6 ชนิดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 2 ไอโซเลต

ไอโซเลตเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <sup>1/</sup>	
	ไอโซเลตที่ 1	ไอโซเลตที่ 2
<i>T. harzianum</i> ไอโซเลต 10	56.67 <sup>bc</sup>	66.39 <sup>c*</sup>
<i>T. hamatum</i> ไอโซเลต 3	57.78 <sup>bcd</sup>	63.61 <sup>bc</sup>
<i>T. longibrachiatum</i> ไอโซเลต 67	60.83 <sup>de</sup>	66.11 <sup>c</sup>
<i>T. aureoviride</i> ไอโซเลต 37	55.83 <sup>b</sup>	63.61 <sup>bc</sup>
สารชีวภัณฑ์ 1	57.22 <sup>bcd</sup>	59.72 <sup>b</sup>
สารชีวภัณฑ์ 2	61.39 <sup>c</sup>	71.39 <sup>d</sup>
สารชีวภัณฑ์ 3	60.28 <sup>cde</sup>	66.39 <sup>c</sup>
สารชีวภัณฑ์ 4	58.61 <sup>bcd</sup>	72.50 <sup>d</sup>
สารชีวภัณฑ์ 5	60.00 <sup>cde</sup>	66.94 <sup>c</sup>
สารชีวภัณฑ์ 6	57.78 <sup>bcd</sup>	65.56 <sup>c</sup>
ชุดควบคุม ( <i>Fusarium</i> spp.)	90.00 <sup>a</sup>	90.00 <sup>a</sup>

หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

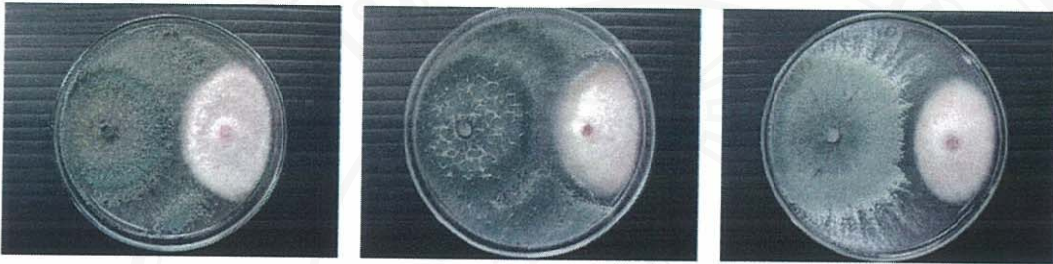
\*ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (P=0.05)



ก

ข

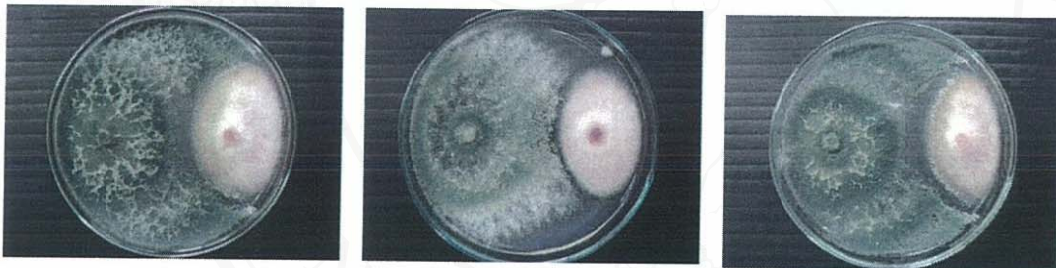
ค



ง

จ

ฉ



ช

ช

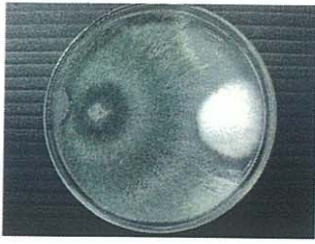
ฉ



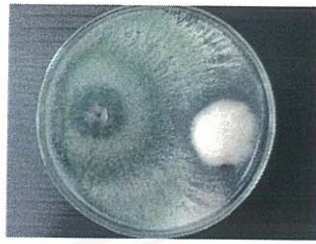
ช

**ภาพที่ 20** การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 1 ต่อเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลตที่ 10 (ก), เชื้อรา *T. hamatum* ไอโซเลตที่ 3 (ข), เชื้อรา *T. longibrachiatum* ไอโซเลตที่ 67 (ค), เชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลต ที่ 37 (ง), สารชีวภัณฑ์ 1 (จ), สารชีวภัณฑ์ 2 (ฉ), สารชีวภัณฑ์ 3 (ช), สารชีวภัณฑ์ 4 (ช), สารชีวภัณฑ์ 5 (ฉ) และสารชีวภัณฑ์ 6 (ช) ในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน ซ้ายมือ คือ เชื้อรา *Trichoderma* sp. และขวามือ คือ เชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลต 1





ก



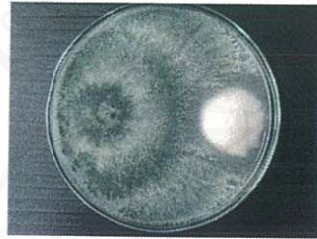
ข



ค



ง



จ



ฉ



ช



ซ



ฌ



ญ

**ภาพที่ 21** การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 2 ต่อเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลตที่ 10 (ก), เชื้อรา *T. hamatum* ไอโซเลตที่ 3 (ข), เชื้อรา *T. longibrachiatum* ไอโซเลตที่ 67 (ค), เชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลตที่ 37 (ง), สารชีวภัณฑ์ 1 (จ), สารชีวภัณฑ์ 2 (ฉ), สารชีวภัณฑ์ 3 (ช), สารชีวภัณฑ์ 4 (ซ), สารชีวภัณฑ์ 5 (ฌ) และสารชีวภัณฑ์ 6 (ญ) ในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน ซ้ายมือ คือ เชื้อรา *Trichoderma* sp. และขวามือ คือ เชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลต 2

## 6. ทดสอบประสิทธิภาพฆ่าของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราอื่นๆ ที่ไม่ได้เป็นสาเหตุของโรค

นำเอาเชื้อรา *Trichoderma* spp. 10 ไอโซเลตที่ได้คัดเลือกจากการทดลองที่ 4 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพฆ่ากับเชื้อรา *Aspergillus flavus* และเชื้อรา *Penicillium* sp. โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ พบว่าสารชีวภัณฑ์ 6 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้ดีที่สุดใน 66.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 22) และสารชีวภัณฑ์ 1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้ดีที่สุดใน 51.94 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 23)

**ตารางที่ 6** ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราอื่นๆ ที่ไม่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุของโรค

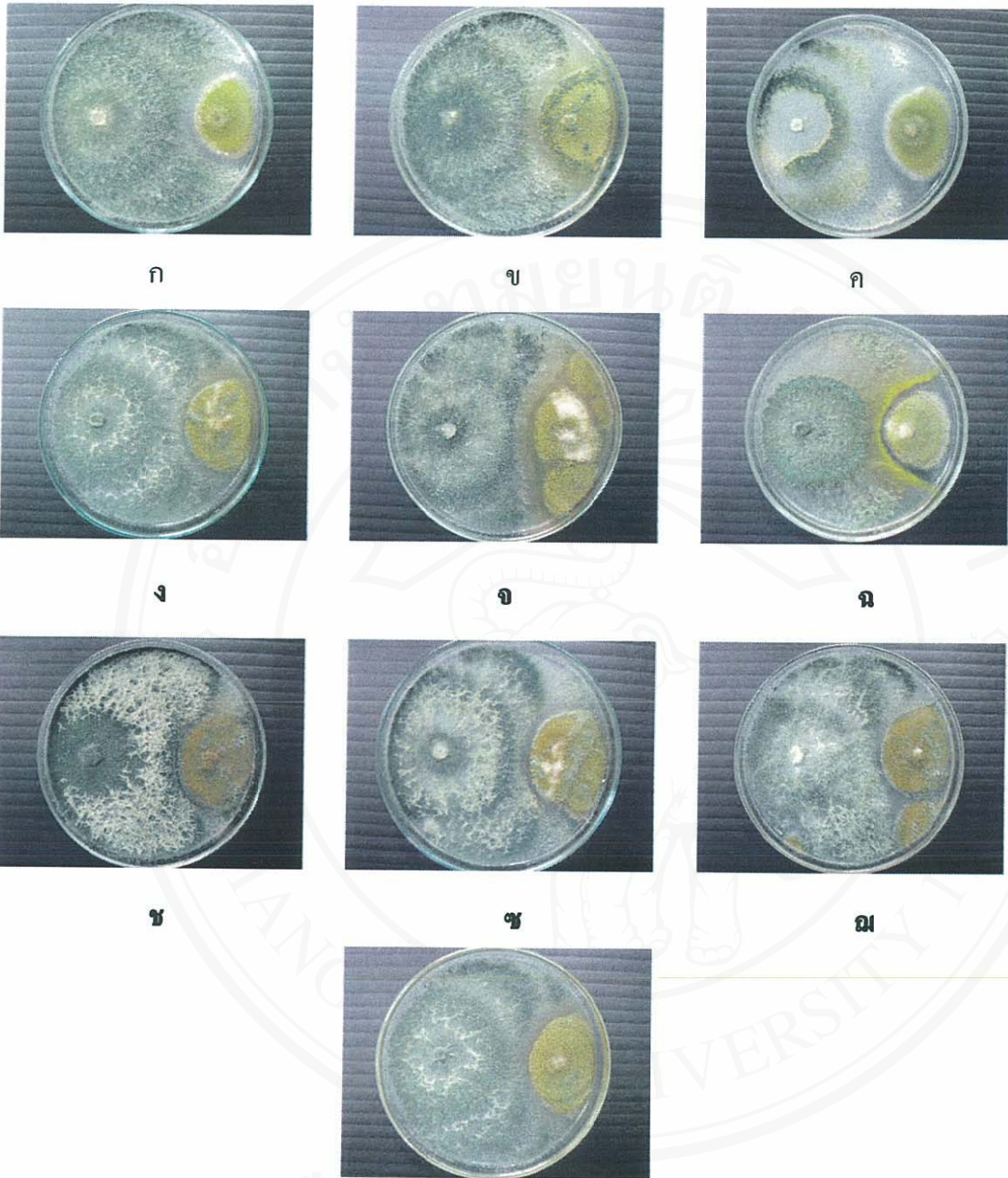
ไอโซเลตเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <sup>1/</sup>	
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<i>T. harzianum</i> ไอโซเลต 10	64.17 <sup>bc</sup>	48.06 <sup>def*</sup>
<i>T. hamatum</i> ไอโซเลต 3	61.94 <sup>b</sup>	43.33 <sup>bc</sup>
<i>T. longibrachiatum</i> ไอโซเลต 67	65.56 <sup>c</sup>	45.83 <sup>cde</sup>
<i>T. aureoviride</i> ไอโซเลต 37	66.11 <sup>c</sup>	51.67 <sup>g</sup>
สารชีวภัณฑ์ 1	65.83 <sup>c</sup>	51.94 <sup>g</sup>
สารชีวภัณฑ์ 2	65.00 <sup>bc</sup>	40.83 <sup>b</sup>
สารชีวภัณฑ์ 3	64.44 <sup>bc</sup>	50.00 <sup>fg</sup>
สารชีวภัณฑ์ 4	66.39 <sup>c</sup>	42.50 <sup>bc</sup>
สารชีวภัณฑ์ 5	63.89 <sup>bc</sup>	45.28 <sup>cd</sup>
สารชีวภัณฑ์ 6	66.67 <sup>c</sup>	48.89 <sup>efg</sup>
ชุดควบคุม ( <i>Fusarium</i> spp.)	90.00 <sup>a</sup>	90.00 <sup>a</sup>

หมายเหตุ 1/ ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

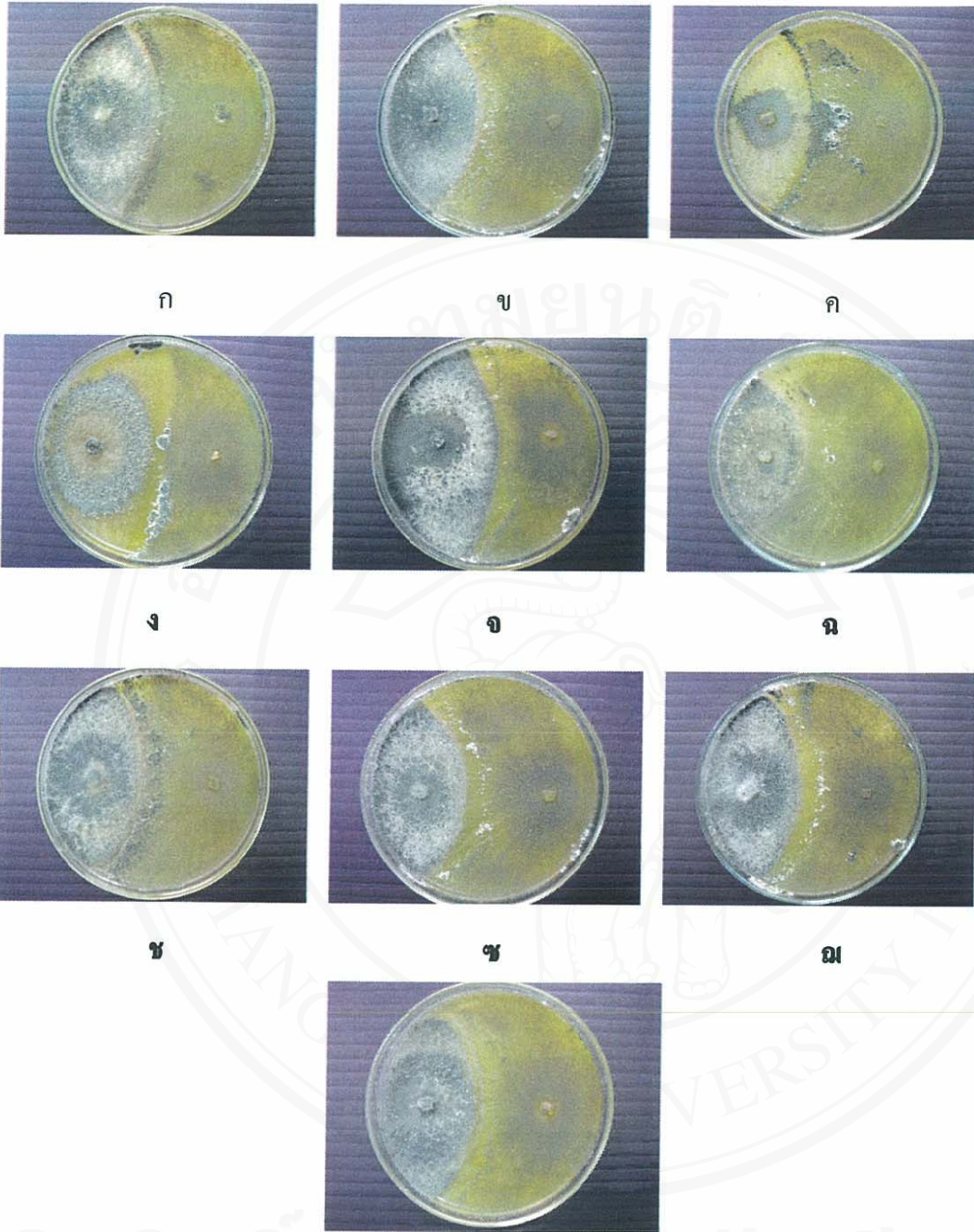
\*ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติจากการวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (P=0.05)





**ภาพที่ 22** การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ต่อเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลตที่ 10 (ก), เชื้อรา *T. hamatum* ไอโซเลตที่ 3 (ข), เชื้อรา *T. longibrachiatum* ไอโซเลตที่ 67 (ค), เชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลตที่ 37 (ง), สารชีวภัณฑ์ 1 (จ), สารชีวภัณฑ์ 2 (ฉ), สารชีวภัณฑ์ 3 (ช), สารชีวภัณฑ์ 4 (ซ), สารชีวภัณฑ์ 5 (ญ) และสารชีวภัณฑ์ 6 (ฎ) ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus*. บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน ซ้ายมือ คือ เชื้อรา *Trichoderma* sp. และขวามือ คือ เชื้อรา *Aspergillus flavus*



**ภาพที่ 23** การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp. ต่อเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลตที่ 10 (ก), เชื้อรา *T. hamatum* ไอโซเลตที่ 3 (ข), เชื้อรา *T. longibrachiatum* ไอโซเลตที่ 67 (ค), เชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลตที่ 37 (ง), สารชีวภัณฑ์ 1 (จ), สารชีวภัณฑ์ 2 (ฉ), สารชีวภัณฑ์ 3 (ช), สารชีวภัณฑ์ 4 (ฅ), สารชีวภัณฑ์ 5 (ฉ) และสารชีวภัณฑ์ 6 (ญ) ในการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* sp. บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน ซ้ายมือ คือ เชื้อรา *Trichoderma* sp. และขวามือ คือ เชื้อรา *Penicillium* sp.