การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพสำหรับควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

Selection of *Trichoderma harzianum* for Biological Products to Control Plant Pathogenic Diseases

หฤษฎ์ นิ่มรักษา[1]

บทคัดย่อ

เชื้อราปฏิปักษ์ชนิด *Trichoderma harzianum* มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บรวบรวมเชื้อรา *T. harzianum* จากพื้นที่ในเขตภาคกลางของประเทศไทยและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการและทดสอบการควบคุมโรคพืชในเรือนเพาะชำ รวมถึงการพัฒนาเชื้อราปฏิปักษ์ในรูปผลิตภัณฑ์ชีวภาพสำหรับควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากการเก็บตัวอย่างดินสามารถรวบรวมเชื้อรา *T. harzianum* ได้จำนวน 33 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช 8 ชนิด ด้วยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ พบว่ามี 2 ไอโซเลทที่แสดงผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคพืชทั้ง 8 ชนิดได้สูง คือ RU.Tr.005 และ RU.Tr.008 จึงนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพสำหรับใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากการเปรียบเทียบเชื้อราปฏิปักษ์สองสายพันธุ์ พบว่า RU.Tr.005 เป็นเชื้อราที่เจริญเติบโตได้ดี ผลิตสปอร์ได้จำนวนมากและมีอายุได้นาน 1 ปี ในชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากรำหยาบ จึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช 2 ชนิด ได้แก่ โรคเหี่ยวมะเขือเทศ ที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และโรคใบจุดคะน้า ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยทดสอบในสภาพเรือนทดลอง จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับ เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr.005) สดจากอาหารพีดีเอและข้าวสุก ให้ผลในการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวมะเขือเทศได้ดีไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้สารเคมี benomyl นอกจากนี้พบว่าทุกกลุ่มการทดลองที่พ่นเชื้อราปฏิปักษ์และพ่นสารเคมี benomyl ให้เปอร์เซ็นต์ควบคุมโรคใบจุดคะน้าได้ดี แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มที่มีการพ่นเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว

คำสำคัญ : เชื้อราปฏิปักษ์ ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ โรคพืช

[1] อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

ABSTRACT

The antagonistic fungus *Trichoderma harzianum* is an effective biocontrol agent against several fungal soil borne plant pathogens. In this research, the isolations of *T. harzianum* were collected from different agricultural fields in central part of Thailand. In addition, the isolations expressing high potential to suppress fungus pathogens were screened in laboratory and subsequently used to examine fungicide efficiency in greenhouse. The biological product of an antagonistic *T. harzianum* was also produced. Soil samples collection, an antagonistic fungus *T. harzianum* of 33 isolations were derived. Their efficiency of growth inhibition on 8 phytopathogenic fungi was investigated by dual culture method on PDA medium. It was found that 2 isolations which were RU.Tr.005 and RU.Tr.008 showed highly suppression on growth of 8 phytopathogenic fungi. Subsequently, these two isolations were developed as power of bioproduct for plant pathogenic disease control. In comparison between these two isolations, RU.Tr.005 performed higher growth and abundant spore production as well as could live up to one year in rich husk. In greenhouse experiment, subsequently, the inhibition efficiency on tomato wilt from *Fusarium oxysporum* and Chinese kale leaf spot from *Alternaria brassicicola* was evaluated. The result showed that the treatments of *T. harzianum* (RU.Tr.005) culturing on PDA medium and cooked rice revealed efficacy to control tomato wilt as high as using of benomyl. In addition, all the treatments treated with antagonistic fungus and benomyl could effectively control Chinese kale leaf spot significantly differed from the group only inoculated with *A. brassicicola*.

Keywords : Antagonistic Fungi , Biological Product , Plant Pathology

บทนำ

การทำเกษตรกรรมในปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีเพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืช เพราะเป็นวิธีที่สะดวกและเห็นผลรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อเกษตรกรทั้งทางตรงและทางอ้อม ได้แก่ ปัญหาทางเศรษฐกิจ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง โรคและแมลงศัตรูพืชต้านทานต่อสารเคมี ปัญหาสุขภาพอนามัยของเกษตรกรผู้ใช้ รวมถึงปัญหาสารพิษตกค้างที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตทางการเกษตรซึ่งจะมีผลกระทบต่อผู้บริโภค และปัญหาสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม การแก้ไขหรือลดปัญหาต่างๆ จากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชวิธีหนึ่งที่สามารถกระทำได้ คือ การควบคุมโรคพืชทางชีวภาพ (Biological Control) โดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Antagonistic Microorganisms) เช่น การใช้เชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีสบางชนิดที่ไม่เป็นอันตรายต่อพืชแต่สามารถยับยั้งการทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคได้ การใช้จุลินทรีย์ต่างๆ เหล่านี้สามารถควบคุมโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นไปอย่างต่อเนื่องในระยะยาว นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาสารพิษตกค้างที่ปนเปื้อนไปกับผลผลิตทางการเกษตรและสภาพแวดล้อมอีกด้วย

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Antagonistic Microorganisms) และเชื้อราโรคพืช (Plant Pathogen) มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ แต่ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ดังกล่าวอาจจะผันแปรไปตามแหล่งและสถานที่ซึ่งต่างกัน รวมทั้งสภาวะอากาศที่แตกต่างกันในแต่ละปี โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อโรคสามารถพบได้ในบริเวณซึ่งเคยมีโรคระบาดจากโรคพืชบางชนิดแต่ต่อมาไม่พบการระบาดของโรคนั้น หรือพบว่ามีการระบาดลดลงทั้งๆ ที่มีการปลูกพืชอาศัยที่อ่อนแอ (Susceptible Host Plants) ก็ไม่พบการเกิดโรค จากข้อสังเกตดังกล่าวนี้นับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความผันแปรของ

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อโรคในแหล่งปลูกพืชแต่ละแห่ง กระบวนการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เริ่มจากขั้นตอนการรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งที่มีโรคระบาด จากพืชที่เป็นโรคหรือจากดินที่มีคุณสมบัติดีซึ่งทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีและมีความต้านทานโรค จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อตรวจดูคุณสมบัติของการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช มีการเจริญได้ดีอย่างรวดเร็วและมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีรายงานการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้แก่ เชื้อราปฏิปักษ์ เช่น *Trichoderma* spp. *Chaetomium* spp. *Gliocladium* spp. และ *Talaromyces flavus* (teleomorph of *Penicillium* sp.) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *Bacillus* spp. *Pseudomonas* spp. และ *Streptomyces* sp. (Gnanamanickam, 2002)

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้งในห้องปฏิบัติการและเรือนเพาะชำ รวมถึงการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพเพื่อเผยแพร่สู่เกษตรกรสำหรับใช้ควบคุมโรคพืชแทนการใช้สารเคมีต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* จากดินในแปลงเกษตร

นำตัวอย่างดินที่เก็บจากแปลงเกษตรในบริเวณภาคกลาง จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี อ่างทอง และชัยนาท มาทำการแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* โดยวิธี Dilution Plate บนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) และ Martin's Medium (MA) หลังจากนั้นทำการแยกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อเก็บเชื้อราปฏิปักษ์แยกเป็นไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จำนวน 33 ไอโซเลท ใช้เป็น stock culture โดยเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 4 - 7 ^{O}C ไว้ศึกษาต่อไป

การทดลองที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum*

การทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการโดยการนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จำนวน 33 ไอโซเลท มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิด ประกอบด้วย เชื้อรา *Rhizoctonia solani* , *Sclerotium rolfsii* และ *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่า *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยว *Alternaria solani* และ *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุด *Colletotrichum capsicum* และ *C. gleosporoides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก โดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะบริเวณรอบนอกของโคโลนีของเชื้อรา จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด และชิ้นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* มาวางบนจานอาหารให้ห่างจากชิ้นของเชื้อสาเหตุที่ทดสอบประมาณ 4 เซนติเมตร ตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลาง ซึ่งเป็นวิธีที่เรียกว่า Dual Culture Technique หรือ Biculture Technique ในแต่ละกรรมวิธี (treatment) ทำ 5 ซ้ำ (replication) จากนั้นนำจานอาหารดังกล่าวไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญของเชื้อรา 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งใช้สูตรดังรายงานของ เกษม (2532)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

โดย R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อราร่วม

จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 8 ชนิดได้ดี เพื่อนำไปทำการทดสอบในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลองต่อไป

การทดลองที่ 3 การศึกษากลไกการทำลายราสาเหตุ

การศึกษากลไกการทำลายราสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM) โดยนำเส้นใยของเชื้อราที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ อายุ 3 สัปดาห์ มาตรวจดูกลไกการทำลายบนผิวใบด้วยกล้อง SEM โดยตรวจสอบการเจริญเติบโตของเส้นใย การสร้างสปอร์ และลักษณะการทำลายเส้นใยของเชื้อรา สาเหตุโรค

การทดลองที่ 4 การพัฒนาเชื้อราปฏิปักษ์ *T. Harzianum* เพื่อเป็นผงผลิตภัณฑ์ชีวภาพสำหรับควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำสารพา (carrier) 3 ชนิด ประกอบด้วย รำหยาบ มิลเลท และปลายข้าว บรรจุใส่ถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 8 x 14 นิ้ว บรรจุถุงละ 50 กรัม เติมน้ำเพื่อให้ความชื้น 60-70 เปอร์เซ็นต์ เติมคอขวดและอุดด้วยสำลี พร้อมทั้งปิดทับด้วยฟอยล์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อระยะเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนด ทิ้งให้เย็น จากนั้นใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* นำมาวางบนรำหยาบ มิลเลท และปลายข้าว ที่อยู่ภายในถุงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นเลี้ยงเชื้อรา 14 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้อง และมีแสงสว่างเพียงพอ เมื่อครบกำหนด นำเชื้อราที่เลี้ยงบนวัสดุแต่ละชนิดไปทำให้แห้งโดยการผึ่งลมเป็นระยะเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อราในวัสดุแต่ละชนิด โดยวิธีการเจือจางตัวอย่างปริมาณเชื้อรา (Serial dilution)

การทดลองที่ 5 การทดสอบประสิทธิภาพในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

เตรียมเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญสูงสุดเพื่อทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ คือ *Fusarium oxysporum* และเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดคะน้า คือ *Alternaria brassicicola* โดยมีวิธีการดังนี้

การเตรียมผลิตภัณฑ์จาก *T. harzianum* ชนิดผงผลิตภัณฑ์ชีวภาพ

การเตรียมผงผลิตภัณฑ์ชีวภาพเพื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคพืช โดยการใช้ผงผลิตภัณฑ์แห้งผสมน้ำอัตราส่วน 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร นำสารละลายเชื้อราที่ได้มาใช้ราดโคนต้นมะเขือเทศและคะน้าในกระถาง ปลูกกระถางละ 20 มิลลิลิตร

การเตรียมผลิตภัณฑ์จาก *T. harzianum* ชนิดเชื้อสดในอาหาร PDA

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ในรูปเชื้อสดในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน เชื้อราจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร เทน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใช้ loop ปลอดเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกแล้วนำ suspension ที่ได้มาปรับความเข้มข้นเป็น 10^9 สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อนำไปราดโคนต้นมะเขือเทศในกระถาง ปลูกกระถางละ 20 มิลลิลิตร

การเตรียมผลิตภัณฑ์จาก *T. harzianum* ชนิดเชื้อสดในวัสดุ

การเตรียมผลิตภัณฑ์จาก *T. harzianum* ชนิดเชื้อสดในวัสดุ 3 ชนิด ประกอบด้วย ข้าวโพดข้าวสุก และ มิลเลท โดยวิธีการนำวัสดุทั้ง 3 ชนิด ต้มด้วยหม้อไฟฟ้า เมื่อสุกรีบบรรจุลงในถุงพลาสติกขนาด 8x14 นิ้ว ปริมาณชนิดละ 200 กรัม ในขณะที่ยังร้อน เมื่อถุงข้าวเย็น ทำการขยายเชื้อรา *T. harzianum* โดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อย้ายชิ้นเชื้อราจากจานเลี้ยงเชื้อลงในถุงวัสดุทั้ง 3 ชนิด เปิดปากถุงพลาสติกและปิดอย่างรวดเร็วเพื่อทำให้มีอากาศอยู่ภายใน จากนั้นรัดด้วยยางวง ตั้งทิ้งไว้บริเวณที่มีแสงสว่าง เป็นเวลา 14 วัน เชื้อจะเจริญเต็มถุงวัสดุจนเป็นสีเขียว จากนั้นเทน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในถุงปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าให้สปอร์หลุดออก กรองเพื่อแยกส่วนของวัสดุออกทิ้ง แล้วนำ suspension ที่ได้มาใช้ราดโคนต้นมะเขือเทศในกระถาง ปลูกกระถางละ 20 มิลลิลิตร

การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน เชื้อจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร เทน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใช้ loop ปลอดเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดออก แล้วนำ suspension ที่ได้มาปรับความเข้มข้นเป็น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อนำไปราดโคนต้นมะเขือเทศในกระถางปลูก โดยมีปริมาตรกระถางละ 20 มิลลิลิตร

การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร เป็นเวลา 14 วัน เชื้อจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร เทน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานอาหารปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใช้ loop ปลอดเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดออก แล้วนำ suspension ที่ได้มาปรับความเข้มข้นเป็น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ก่อนนำไปฉีดพ่นต้นคะน้าในกระถางปลูก โดยมีปริมาตรกระถางละ 30 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีกำจัดเชื้อรา

การเตรียมสารเคมีกำจัดเชื้อรา ชื่อการค้า benomyl อัตราการใช้ 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร นำสารละลายที่ได้มาใช้ราดโคนต้นมะเขือเทศในกระถางปลูกกระถางละ 20 มิลลิลิตร

การทดลองที่ 5.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ

เตรียมวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ดิน : แกลบ : ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 5 : 1 : 1 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นบรรจุลงในกระถางที่สะอาด ย้ายต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 14 วัน ลงปลูกในกระถางที่เตรียมไว้กระถางละ 1 ต้น เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโดยราดโคนต้นมะเขือเทศด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ที่ได้เตรียมไว้แล้วในแต่ละประเภท หลังจากนั้น 1 วัน จึงทำการปลูกเชื้อราสาเหตุ *F. oxysporum* ที่ความเข้มข้นของ inoculum คือ 10^4สปอร์/มิลลิลิตร ปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเกิดโรค รักษาระดับความชื้นให้เหมาะสมโดยการพ่นฝอยน้ำเช้าเย็น แล้วทำการราดสปอร์แขวนลอยของราปฏิปักษ์ ผลิตภัณฑ์ชีวภาพและสารเคมีหลังการปลูกเชื้อทุก 5 วัน รวม 4 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 4 บล็อค บล็อคละ 5 ซ้ำต่อกรรมวิธีประกอบด้วยหน่วยทดลองดังนี้

กรรมวิธี 1. ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อรา (Control)
2. ปลูกเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว (Inoculation)
3. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ในรูปเชื้อราสดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA
4. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ในรูปเชื้อราสดที่เลี้ยงในถุงข้าวสุก
5. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ในรูปผงผลิตภัณฑ์ชีวภาพ
6. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นสารกำจัดเชื้อรา benomyl

การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น และการประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค โดยนับจำนวนต้นที่มีอาการของโรคเหี่ยว (wilt) คือ เริ่มจากส่วนล่างของต้นมะเขือเทศเหี่ยวจนกระทั่งตายไปทั้งต้น และนอกจากนี้ได้ทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าเป็นการเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* โดยเมื่อผ่าตามยาวต้นจะพบว่าบริเวณท่อน้ำท่ออาหารมีสีน้ำตาลดำ

การทดลองที่ 5.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของผักคะน้า

เตรียมวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของ ดิน : แกลบ : ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 5 : 1 : 1 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นบรรจุลงในกระถางที่สะอาด ย้ายต้นกล้าคะน้าอายุ 14 วัน ลงปลูกในกระถางที่เตรียมไว้กระถางละ 1 ต้นเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุด โดยฉีดพ่นต้นคะน้า ด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ที่

ได้เตรียมไว้แล้วในแต่ละประเภท หลังจากนั้น 1 วัน จึงทำการปลูกเชื้อราสาเหตุ *A. brassicicola* ที่ความเข้มข้นของ inoculum คือ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเกิดโรค โดยพยายามรักษาความชื้นให้พอเหมาะด้วยการพ่นฝอยน้ำเช้าเย็นและทำการพ่นสปอร์แขวนลอยของราปฏิปักษ์ผลิตภัณฑ์ชีวภาพและสารเคมีหลังการปลูกเชื้อทุก 5 วัน รวม 4 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 4 บล็อค บล็อคละ 5 ซ้ำต่อกรรมวิธีประกอบด้วยหน่วยทดลองดังนี้

กรรมวิธี 1. ชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อรา (Control)
2. ปลูกเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว (Inoculation)
3. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ในรูปเชื้อราสด ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
4. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ในรูปเชื้อราสดที่เลี้ยงในถุงข้าวสุก
5. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ในรูปผงผลิตภัณฑ์ชีวภาพ
6. ปลูกเชื้อราสาเหตุและฉีดพ่นสารกำจัดเชื้อรา benomyl

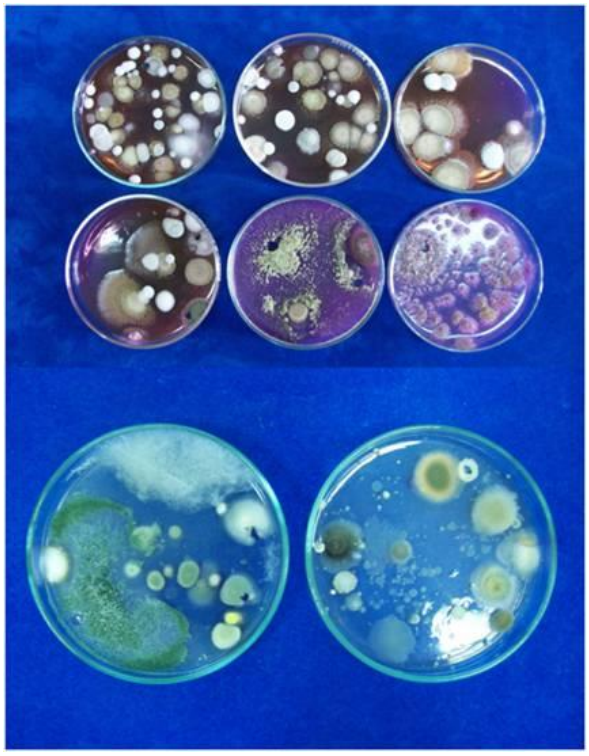
การบันทึกผลการทดลอง

บันทึกลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น และการประเมินความเสียหายที่เกิดจากโรค โดยการประเมินพื้นที่ใบที่เป็นโรคต่อต้น (โรคใบจุด) ที่เกิดขึ้นในแต่ละการทดลอง โดยแบ่งปริมาณของโรคเป็น 11 ระดับ คือ 0 - 10 โดยที่ 0 = ไม่มีอาการของโรค และ 10 = เป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์ นำค่าที่ได้จากการประมาณของโรคมาแปลงเป็นค่าความเสียหายของพืช (crop loss assessment) การประเมินความเสียหายโดยคิดเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การทำลาย

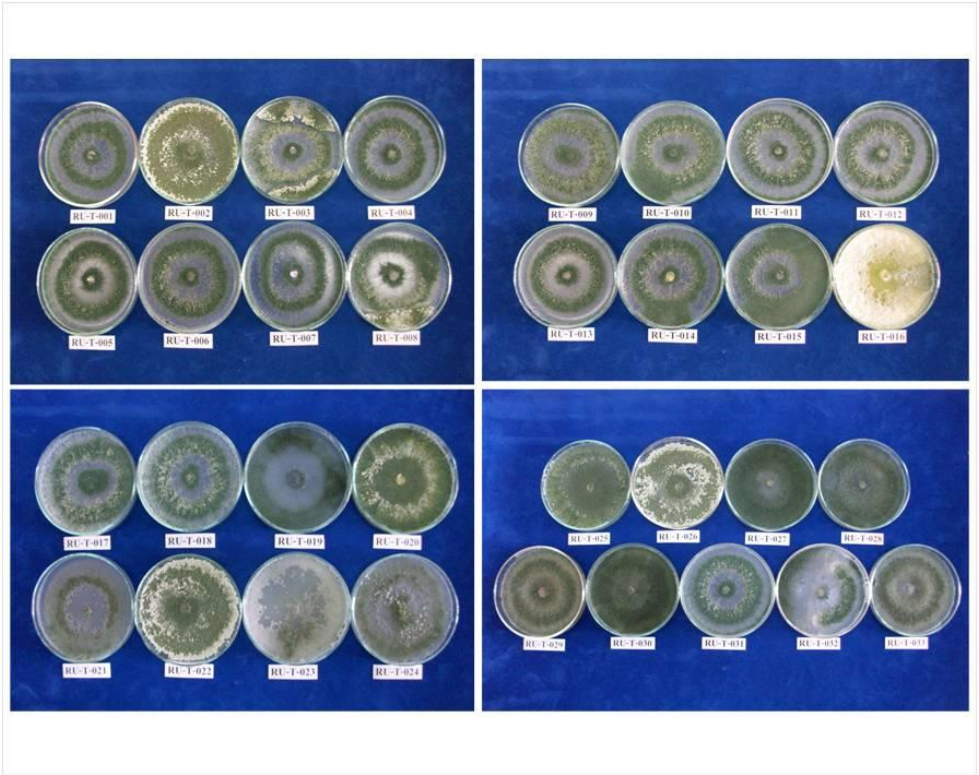
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การแยกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* จากดินและเตรียมเชื้อราบริสุทธิ์

จากการแยกเชื้อรา *T. harzianum* จากดินในแปลงเกษตรกรภาคกลางในจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี อ่างทอง และชัยนาท ทำการแยกเชื้อราจากดินโดยวิธี soil dilution plate technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MA พบเชื้อรา *T. harzianum* ที่แยกได้เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย มีลักษณะเป็นโคโลนีสีเขียว เจริญบนอาหาร MA ที่ทำการเจือจางสารละลายดินที่ระดับความเข้ม 10 - 5, 10 - 6และ 10 - 7 โดยจะปรากฏโคโลนีของเชื้อที่พอดีสำหรับนำไปใช้ได้ (ภาพที่ 1) และจากการแยกเลี้ยงเชื้อรา *T. aharzianum* เพื่อตรวจสอบรูปร่างลักษณะของเชื้อพบว่าเชื้อรามีการเจริญบนอาหาร PDA อย่างรวดเร็ว ระยะแรกบริเวณที่สร้างสปอร์มีสีเขียวปนขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวสด phialide เกิดขึ้นเป็นกลุ่มมีจำนวนถึง 5 อัน อาจเกิดเดี่ยว ๆ ตามด้านข้างของกิ่งก้านที่แตกออกมา phialide สีใส มีขนาด 5 x 3 ไมครอน รูปร่างสั้น ส่วนฐานแคบกว่าตรงกลาง ส่วนบนเรียวจนถึงคอเป็นรูปกระสวยปลายแหลม phialospore มีสีเขียวอ่อน รูปร่างกลม ขนาด 3 ไมครอนโดยเทียบกับ ลาวัลย์ และคณะ (2540) จากการตรวจสอบสามารถรวบรวมเชื้อรา *T. harzianum* ได้จำนวน 33 ไอโซเลท (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 โคโลนีของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (ศรชี้) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA และ PDA



ภาพที่ 2 โคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลทที่ RU.Tr001-RU.Tr033 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

การทดลองที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิด ในสภาพห้องปฏิบัติการ

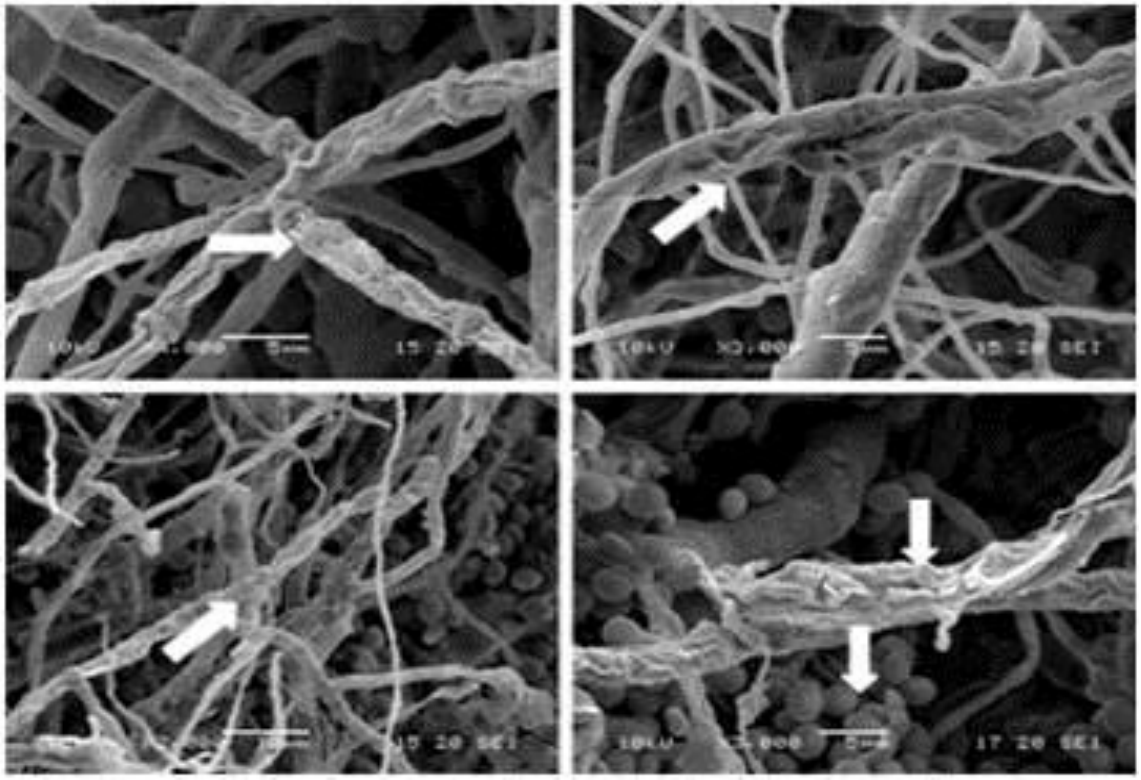
จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 33 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิดในห้องปฏิบัติการ พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 33 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีแตกต่างกัน โดยพบไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 2 ไอโซเลท โดยไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงสุดและมีการเจริญคลุมทับเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีคือ ไอโซเลทที่ RU.Tr005 และ ไอโซเลทที่ RU.Tr008 (ตารางที่ 1) ในขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งต่ำ โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงคัดเลือกไอโซเลทที่ RU.Tr005 และ RU.Tr008 เป็นตัวแทนสำหรับการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderam harzianum* ไอโซเลทที่ RU.Tr005 และ RU.Tr008 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิด

เชื้อราสาเหตุโรคพืช	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ	
	RU.Tr005	**RU.Tr008**
Rhizoctonia solani	84.53	77.25
Sclerotium rolfsii	78.24	84.51
Phytophthora palmivora	82.87	80.63
Fusarium oxysporum	88.71	84.17
Alternaria solani	81.57	76.38
Alternaria brassicicola	89.14	85.32
Colletitrichum capsicum	76.19	78/94
Colletotrichum gleosporoides	90.17	82.74

การทดลองที่ 3 การศึกษากลไกในการทำลายเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช

การศึกษากลไกในการทำลายเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T.harzianum* (RU.Tr005) มีกลไกในการพันรัดและแทงทะลุเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพื่อดูดสารภายในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเหี่ยวแฟบลงในขณะเดียวกัน เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* มีการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์เพื่อเพิ่มปริมาณบนเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (ภาพที่ 3)



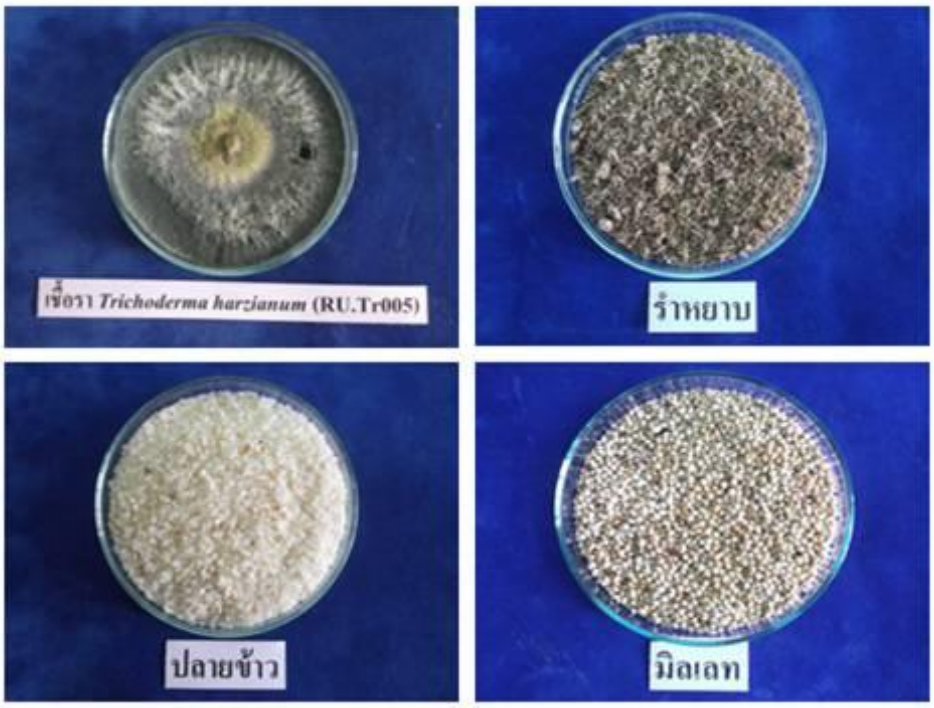
ภาพที่ 3 กลไกในการทำลายเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลท RU.Tr005 (ศรชี้) การพันรัดและแทงทะลุเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชภาพถ่ายจากกล้องอิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การทดลองที่ 4 การพัฒนาเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* เพื่อเป็นผงผลิตภัณฑ์ชีวภาพสำหรับควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช

การนำเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลทที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี จำนวน 2 ไอโซเลท คือ RU.Tr005 และ RU.Tr008 นำมาพัฒนาเป็นผงเชื้อเพื่อเป็นภัณฑ์ชีวภาพโดยการเลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดในสารพา (carrier) 3 ชนิดคือ รำหยาบ มิลเลท และปลายข้าว (ภาพที่ 4) ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อราโดยวิธีการเจือจางตัวอย่าง (Serial dilution) พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลทที่ RU.Tr005 สามารถเจริญเติบโตได้ดีและสร้างสปอร์ปริมาณมากที่สุดในรำหยาบมีปริมาณเชื้อ 3.6 x 10^{22} cfu/กรัม (ตารางที่ 2) ภายหลังจากการผึ่งให้แห้งในสภาพที่ร่มได้ผงผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ปริมาณเท่ากับ 3.6 x 10^{22} cfu/กรัม เมื่อเก็บรักษาผงชีวผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 1 ปี นำมาตรวจนับปริมาณเชื้อราพบว่ามีปริมาณเชื้อเท่ากับ 3.2 x 10^{21} cfu/กรัม (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma ahrzianum* ไอโซเลท RU.Tr005 และ RU.Tr008 cfu/กรัม และระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในสารพาแต่ละชนิด

สารพา (Carrier)	ปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* ไอโซเลท RU.Tr005 และ RU.Tr005 cfu/กรัม ในระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ชีวภาพ			
	RU.Tr005		RU.Tr008	
	0 วัน	12 เดือน	0 วัน	12 เดือน
รำหยาบ	3.6×10^{22}	3.2×10^{21}	3.4×10^{16}	2.1×10^{14}
มิลเลท	3.3×10^{20}	2.5×10^{18}	3.4×10^{19}	2.3×10^{16}
ปลายข้าว	3.1×10^{17}	3.7×10^{13}	3.1×10^{19}	2.5×10^{17}



ภาพที่ 4 ชนิดของสารพา (carrier) รำหยาบ มิลเลท และปลายข้าว ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพ

การผลิตเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (RU.Tr005) ในวัสดุเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อชนิดสดสำหรับนำไปควบคุมโรคพืช

การนำผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) เลี้ยงในวัสดุเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อชนิดสดสำหรับนำไปควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยการเลี้ยงเชื้อในวัสดุจำนวน 3 ชนิดคือ ข้าวสุก ข้าวโพด และมิลเลท ที่ผ่านการต้มให้สุก ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลท RU.Tr005 สามารถเจริญเติบโตได้ดีและสร้างสปอร์ได้ในปริมาณมากในวัสดุข้าวสุก โดยพบว่ามีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.7×10^{24} cfu/กรัม จึงทำการคัดเลือกเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในขั้นต่อไป (ตารางที่ 3, ภาพที่ 5)

ตารางที่ 3 ปริมาณเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma ahrzianum* ไอโซเลท RU.Tr005 ในวัสดุเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดสด

ชนิดของวัสดุ	ปริมาณเชื้อ (cfu/กรัม)
ข้าวสุก	5.7×10^{24}
ข้าวโพด	3.5×10^{20}
มิลเลท	2.1×10^{17}

ภาพที่ 5 เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ที่เลี้ยงเป็นเชื้อราสดในวัสดุ ข้าวสุก ข้าวโพด และมิลเลท

การทดลองที่ 5 การทดสอบประสิทธิภาพในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

การทดลองที่ 5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (RU.Tr005) ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในเรือนทดลอง โดยการราดโคนต้นด้วยเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Fusarium oxysporum* ที่ความเข้มข้นของ inoculum คือ 10^4 cfu/มิลลิลิตร และเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ในรูปแบบเชื้อราสด เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ชีวภาพและ Benlate (50%WP) หลังจากนั้นจึงย้ายกล้ามะเขือเทศอายุ 6 สัปดาห์ มาปลูกในกระถางแต่ละกรรมวิธีการทดลอง พบว่าภายหลังจากการย้ายปลูก 2 สัปดาห์ กรรมวิธีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ที่เลี้ยงเป็นเชื้อราสดในข้าวสุก กรรมวิธีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ที่เลี้ยงใน PDA และกรรมวิธีการใช้สารเคมี Benlate (50%WP) สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุดโดยมะเขือเทศไม่แสดงอาการเหี่ยว รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) โดยพืชแสดงอาการเหี่ยว 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพียงอย่างเดียว พบว่าพืชแสดงอาการเหี่ยวสูงที่สุด 94 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 6)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ต้นเหี่ยวของมะเขือเทศภายหลังจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderam harzianum* (Ru.Tr005) ร่วมกับการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคพืช ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี	ต้นเหี่ยวของมะเขือเทศ (เปอร์เซ็นต์)
Control (ไม่ปลูกเชื้อ)	0 a
Inoc. (ปลูกเชื้อ)	94 c
Inoc. +RU.Tr005 ที่เลี้ยงใน PDA	0 a
Inoc. +RU.Tr005 ที่เลี้ยงในข้าวสุก	0 a
Inoc. +RU.Tr005 (ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ)	20 b
Inoc. +Benlate (50%WP)	0 a
CV (%)	97.76

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan' s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

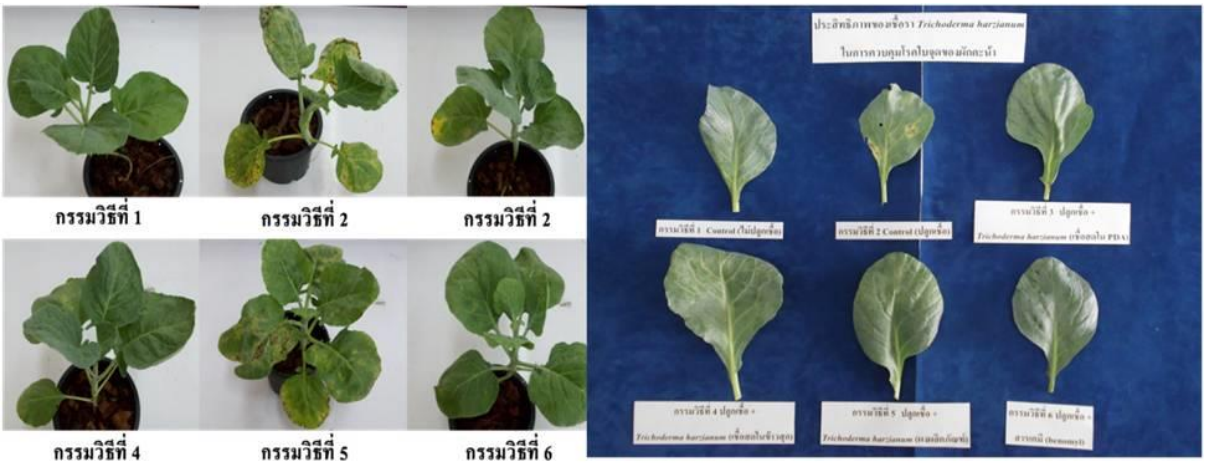
การทดลองที่ 5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (RU.Tr005) ในการควบคุมโรคใบจุดของผักคะน้าในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ในการควบคุมโรคใบจุดของผักคะน้าในเรือนทดลอง โดยทำการพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ในรูปแบบเชื้อราสด เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ชีวภาพและ Benlate (50%WP) ก่อนการปลูกราสาเหตุ 1 วัน และหลังฉีดพ่นซ้ำอีกทุก 5 วัน หลังฉีดพ่นครั้งแรก พบว่าหลังจากการฉีดพ่น 21 วัน การใช้ Benlate (50%WP) สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย 1 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ กรรมวิธีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งให้ผลในการควบคุมโรคไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ที่เลี้ยงเป็นเชื้อราสดในข้าวสุก มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย 12 และ14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและสำหรับกรรมวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย 18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลในการควบคุมโรคไม่แตกต่างจากกรรมวิธีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ที่เลี้ยงเป็นเชื้อราสดในข้าวสุก ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดเพียงอย่างเดียว มีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายสูงที่สุดถึง 30 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5, ภาพที่ 7)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลายของโรคใบจุดของผักคะน้าภายหลังจากการฉีดพ่นเชื้อราสาเหตุโรคพืชและเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (Ru.Tr005) ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของโรคใบจุดของผักคะน้า		
	7 วัน	**14 วัน**	**21 วัน**
Control (ไม่ปลูกเชื้อ)	1 a	3 a	1 a
Inoc. (ปลูกเชื้อ)	38 c	42 c	30 d
Inoc. +RU.Tr005 ที่เลี้ยงใน PDA	14 b	18 b	12 b
Inoc. +RU.Tr005 ที่เลี้ยงในข้าวสุก	12 b	16 b	14 bc
Inoc. +RU.Tr005 (ผลิตภัณฑ์ชีวภาพ)	18 b	26 b	18 c
Inoc. +Benlate (50%WP)	2 a	2 a	1 a
CV (%)	39.27	34.27	22.78

หมายเหตุ ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ในการควบคุมโรคใบจุดของผักคะน้าในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง

สรุปและวิจารณ์ผล

การแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* จากดินในแปลงเกษตรกรภาคกลาง สามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ได้จำนวน 33 ไอโซเลท โดยพบเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ปริมาณมากจากแปลงเกษตรกรที่ทำการเกษตรอินทรีย์ และพบน้อยมากในแปลงเกษตรกรที่ทำการเกษตรแบบใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ดังที่รายงานของ Harman (2000) และ Monte and Llobell (2003) ที่กล่าวว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* มีปริมาณมากในแปลงเกษตรที่มีการใส่ปุ๋ยอินทรีย์เนื่องจากอินทรียวัตถุในปุ๋ยอินทรีย์นั้นเป็นแหล่งอาหารและที่อยู่อาศัยของเชื้อราชนิดนี้

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* จำนวน 33 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิดในห้องปฏิบัติการ พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ทั้ง 33 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีแตกต่างกัน โดยพบไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญจำนวน 2 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทที่ RU.Tr005 และไอโซเลทที่ RU.Tr008 ในการทดสอบ

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 8 ชนิด พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* มีการแข่งขันและการทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยพบว่าเชื้อราปฏิปักษ์มีการเจริญเร็วกว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืช บางไอโซเลทมีการเจริญเร็วมากจนคลุมทับเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทำให้โคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคพืชยุบตัวลง ทั้งนี้อาจมีผลเนื่องมาจากเชื้อราปฏิปักษ์สร้างสารบางชนิดและปลดปล่อยออกมาทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืชและนอกจากนี้เชื้อราปฏิปักษ์อาจจะอาศัยดูดกินสารจากเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชจนทำให้เส้นใยเกิดการแฟบจนโคโลนียุบตัวลง สอดคล้องกับที่ จิระเดช (2542) กล่าวไว้ว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีกลไกในการต่อสู้กับเชื้อโรคอยู่ 3 ประการคือ การแข่งขันกับเชื้อโรค การเป็นปรสิต และการสร้างปฏิชีวนะสารเพื่อหยุดยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การนำเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลทที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีจำนวน 2 ไอโซเลท คือ RU.Tr005 และ RU.Tr008 มาพัฒนาเป็นผงเชื้อเพื่อเป็นชีวภัณฑ์สำหรับแจกให้เกษตรกรนำไปใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ไอโซเลทที่ RU.Tr005 สามารถเจริญเติบโตได้ดีและสร้างสปอร์ได้ในปริมาณมาก โดยพัฒนาเป็นผงเชื้อเพื่อเป็นชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้ เมื่อนำมาขยายในรูปเชื้อราสด สามารถเจริญเติบโตได้ดีและสร้างสปอร์ได้ในปริมาณมากในข้าวสุก สอดคล้องกับรายงานของ Cavalcante et al. (2008) ที่ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในข้าวสุกและข้าวโพด พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอุณหภูมิ 30˚C โดยใช้เวลา 7 วัน ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเลี้ยงเชื้อราเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์เนื่องจากต้องการให้ได้ปริมาณสปอร์ที่เพิ่มมากขึ้น

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในเรือนทดลองพบว่า *T. harzianum* (RU.Tr005) ที่เลี้ยงเป็นเชื้อราสดในข้าวสุก กรรมวิธีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ที่เลี้ยงใน PDA สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุดไม่แตกต่างจากกรรมวิธีการใช้สารเคมี Benlate (50%WP) โดยมะเขือเทศไม่แสดงอาการเหี่ยว รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) พืชแสดงอาการเหี่ยว 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพียงอย่างเดียวโดยไม่ได้รับเชื้อราปฏิปักษ์ พืชแสดงอาการเหี่ยวสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Elad et al. (1980) กล่าวว่า *T. harzianum* สามารถควบคุมโรคเน่าคอดิน (damping-off) ที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* และ *Rhizoctonia solani* ในถั่ว มะเขือเทศ และฝ้าย ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รายงานของ Ahmad and Baker (1987) ได้ศึกษาถึงการควบคุมโรคพืชทางชีวภาพในพืชต่างๆ ได้แก่ ถั่ว แตงกวา ข้าวโพด มะเขือเทศ และแรดิช พบว่าการใช้เชื้อราที่กลายพันธุ์ของ *T. harzianum* มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้สูงกว่า *T. harzianum* ที่เป็น wild type นอกจากนี้ยังพบว่าการกลายพันธุ์ของเชื้อรานี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ cellulase ได้มากกว่า โดยปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อราที่เป็นแซโปรไฟท์และจุลินทรีย์อื่นๆ ที่อยู่รอบๆ รากพืช นอกจากนี้ Jonglaekha and Vichittragoonthavorn (2009) ได้รายงานการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* โดยพบว่าเมื่อใช้ร่วมกับปุ๋ยหมักในการควบคุมโรคพืชทางดินสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ในการควบคุมโรคใบจุดของผักคะน้าในเรือนเพาะชำ พบว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) ทุกกรรมวิธีทั้งที่เลี้ยงเป็นเชื้อราสดในข้าวสุก กรรมวิธีการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และกรรมวิธีที่ใช้ในรูปผลิตภัณฑ์ชีวภาพ สามารถควบคุมโรคได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเข้าทำลาย 12, 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอยู่หลายปัจจัย เช่น สภาพแวดล้อมบนผิวใบพืช

อุณหภูมิในอากาศ ความชื้นในดิน (Tronsmo and Raa, 1977; Harman et al., 2004) การที่เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ไม่ได้รับเชื้อราปฏิปักษ์อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากสภาวะในการทดลองได้มีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้มีความชื้นอย่างเหมาะสมสอดคล้องกับรายงานของ Harman et al. (2004) ได้กล่าวว่าการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (T22) สามารถควบคุมโรคบนผิวใบพืชได้ดีในสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศค่อนข้างสูง และรายงานของ Tronsmo and Raa (1977) ทดสอบการควบคุมโรคเน่าแห้งของแอปเปิ้ลที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* โดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. pseudokiningii* พบว่าในสภาพโรงเรือนที่ควบคุมสภาพแวดล้อมอย่างเหมาะสมนั้นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. pseudokonigii* สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดี อย่างไรก็ตามแม้ว่าการทดลองควบคุมโรคใบจุดคะน้าในครั้งนี้จะพบว่าการใช้สารเคมี Benlate (50%WP) มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) แต่หากพิจารณาถึงต้นทุนและความปลอดภัยของเกษตรกร รวมถึงความปลอดภัยจากสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อมที่จะมีผลในระยะยาว จะพบว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (RU.Tr005) เป็นกรรมวิธีในการควบคุมโรคพืชที่เหมาะสมและควรส่งเสริมให้เกษตรกรนำไปใช้มากกว่าการใช้สารเคมี

จากผลการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชในระดับห้องปฏิบัติการและการควบคุมโรคพืชในเรือนเพาะชำแสดงให้เห็นว่า *T. harzianum* เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ RU.Tr005 สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพในรูปแบบแห้งที่สามารถเก็บไว้ได้นานโดยใช้รำหยาบเป็นสารพาและนอกจากนี้ยังผลิตในรูปแบบเชื้อราสดพร้อมใช้ที่เกษตรกรสามารถนำไปทำการผลิตใช้ได้เองได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยรามคำแหง สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับคำแนะนำ และความช่วยเหลือจากบุคคลหลายฝ่ายอาทิงานวิจัยและปฏิบัติการกลางมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ให้บริการงานกล้องจุลทรรศน์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง สาขาวิทย-บริการเฉลิมพระเกียรติจังหวัดอุทัยธานี ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ในการอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่เกษตรกรนักศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร รุ่น 15

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 326 หน้า.

จิระเดช แจ่มสว่าง และวิไลวรรณ อินทนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช ภาควิชาโรคพืชคณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 90 หน้า.

ลาวัลย์ จิระพงษ์, แสงมณี ชิงดวง, และสุอาภา ดิษฐาพร. 2540. เชื้อราไตรโคเดอร์มา. กรมส่งเสริมการเกษตรและกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 37 หน้า.

Ahmad, J.A. and Baker, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma hazianum.* Phytopathology. 77 : 182-189.

Cavalcante, R.S., Lima, H.L.S., Pinto, G.A.S. and Carlos, A.T.G. 2008. Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bram by Solid State Fermentation. Food Bioprocess Technol 1: 100-104.

Elad, Y., Chet . I. And Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum* A. biocontrol agent effective against *Sclerotium Folfsii* and *Rhizoctonia solani* Phytopathology. 70 : 119-121.

Gnanamanickam, S.S. 2002. Biological Control of Crop Diseases. Marcel Dekker, Inc. 468 p.

Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84 : 377-393.

Harman, G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts, A reviews. Nature Reviews Microbiology 2, 43-56.

Jonglaekha, N. and Vichittragoonthavorn, K. 2009. Success of using antagonistic fungi for control of plant pests in the Royal Project's area. Journal of Agricultural Technology, V.5(1): 65-73.

Monte, E. and Llobell, A. 2003. Trichoderma in Organic Agriculture. Proceeding V World Avocado Congress. 725-733

Tronsmo, A, and Raa, J.1977. Antagonistic action of *Trichoderma preudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. Phytopathologische Zeitschrift. 89 : 216-220.