



การคัดแยกและประเมินศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. จากดินสวนทุเรียนในการควบคุมเชื้อรา
Phytophthora sp. สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน

Isolation and Evaluation of *Trichoderma* sp. from Durian Orchard Soil for the Control of
Phytophthora sp., the Causal Agent of Root and Collar Rot in Durian

โสภณา วงศ์ทอง^{1,2} สุมาลี เลี่ยมทอง^{1,2*} ประวิทย์ เนื่องมัจฉา^{1,2} อานันท์นิตย์ คุ้ยยกสุย^{1,2} และ ปิยวรรณ เนื่องมัจฉา^{1,2}

Sopana Wongthong^{1,2} Sumalee Liamthong^{1,2*} Prawit Nuengmatcha^{1,2}

Arnannit Kuyyogsuy^{1,2} and Piyawan Nuengmatcha^{1,2}

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช

²ศูนย์ความเป็นเลิศเฉพาะทางด้านวัสดุนาโนเคมี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช

¹Faculty of Science and Technology, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Nakhon Si Thammarat Province

²Center of Excellence in Nanomaterials Chemistry, Nakhon Si Thammarat Rajabhat University,
Nakhon Si Thammarat Province

*Corresponding Author: sumalee_lia@nstru.ac.th

Received: February 10, 2025

Revised: April 10, 2025

Accepted: April 12, 2025

บทคัดย่อ

โรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของทุเรียน การใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์ทางชีวภาพ เป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* sp. โดยคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินในสวนทุเรียนที่ไม่พบการระบาดของโรคในอำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช ได้ตัวแทนสำหรับการทดสอบจำนวน 50 ไอโซเลต และคัดแยกเชื้อรา *Phytophthora* sp. จากต้นทุเรียนที่แสดงอาการของโรคได้ 7 ไอโซเลต (P01–P07) ผลการทดสอบด้วยวิธี dual culture assay พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 46 ไอโซเลต (92%) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora* spp. ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ Dunnett's test เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Trichoderma* สายพันธุ์ทางการค้า เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต NSTRU-T93 แสดงประสิทธิภาพสูงสุด โดยสามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* sp. ไอโซเลต P01 และ P03 ได้ในระดับ 66.41% และ 80.53% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากสายพันธุ์ทางการค้า ($p < 0.05$) การจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับชีวโมเลกุลระบุว่าเป็นเชื้อรา *Trichoderma reesei* ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *T. reesei* ที่แยกได้จากดินในสวนทุเรียนมีศักยภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่า และสามารถพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อการเกษตรอย่างยั่งยืนในอนาคต

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี เชื้อราปฏิปักษ์ การจำแนกสายพันธุ์ โรคของทุเรียนจากเชื้อรา



Abstract

Root and collar rot in durian caused by the fungus *Phytophthora* sp. is a major problem affecting durian yield. The use of *Trichoderma* sp., a biological antagonistic fungus, is an effective alternative for controlling pathogenic fungi. This study aimed to select highly effective *Trichoderma* sp. isolates for inhibiting *Phytophthora* sp. A total of 50 *Trichoderma* spp. isolates were obtained from soil samples collected in disease-free durian in Nopphitam District, Nakhon Si Thammarat Province. In addition, seven *Phytophthora* sp. isolates (P01-P07) were isolated from symptomatic durian trees. The dual culture assay revealed that 46 isolates (92%) of *Trichoderma* spp. significantly inhibited the mycelial growth of *Phytophthora* spp. ($p < 0.05$), based on Dunnett's test when compared with a commercial *Trichoderma* strain. The *Trichoderma* sp. isolate NSTRU-T93 exhibited the highest inhibitory activity, suppressing the growth of *Phytophthora* sp. isolates P01 and P03 by 66.41% and 80.53%, respectively - both statistically superior to the commercial strain ($p < 0.05$). Morphological and molecular identification confirmed NSTRU-T93 as *Trichoderma reesei*. These findings indicate that the fungal isolate *T. reesei* obtained from durian orchard soil has strong potential for inhibiting *Phytophthora* sp., the causal agent of root and collar rot, and can be further developed into a sustainable biocontrol agent for agricultural applications.

Keywords: Biocontrol, Antagonistic, Fungi species identification, Fungal diseases of durian

1. บทนำ

โรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน (*Phytophthora* root rot and collar rot) ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora* spp. เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของทุเรียนในหลายประเทศ โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นที่มีความชื้นในดินสูง เชื้อรา *Phytophthora* สามารถเข้าทำลายระบบราก ลำต้น และใบของพืช ส่งผลให้ต้นทุเรียนแสดงอาการเหี่ยว ใบเหลือง และในกรณีรุนแรงอาจทำให้ต้นตาย (Phonkerd et al., 2023) การควบคุมโรคดังกล่าวสามารถดำเนินการได้หลายวิธี โดยวิธีการเกษตรกรรม เช่น การปรับปรุงพื้นที่ปลูกให้ระบายน้ำดี การใช้ต้นกล้าปลอดโรค และการรักษาความสะอาดบริเวณโคนต้น สามารถช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคได้ (Pegg et al., 2021) ขณะที่การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช เช่น ฟอสฟอรัสแอซิด (Phosphorous acid) และเมทาแลกซิล (Metalaxyl) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในระยะสั้น แต่การใช้ในระยะยาวอาจก่อให้เกิดการดื้อยาของเชื้อรา รวมถึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้บริโภค (Wang et al., 2024) ด้วยเหตุนี้ แนวทางควบคุมแบบชีวภาพ (biological control) จึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น โดยมีการใช้ชีวภัณฑ์หลากหลายชนิด เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งมีคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้งเชื้อรา กระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืช และสามารถปรับตัวได้ดีในดิน (Kavitha et al., 2021; Raza et al., 2023) อย่างไรก็ตาม เชื้อราเหล่านี้มักมีอายุการใช้งานสั้นในสภาพแวดล้อมจริง และอาจถูกจำกัดด้วยความสามารถในการแข่งขันกับจุลินทรีย์ท้องถิ่น ในทางตรงกันข้ามเชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้รับการศึกษาและใช้ประโยชน์มายาวนานในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด *Trichoderma* สามารถควบคุมเชื้อราได้ผ่านกลไกหลายแบบ เช่น การแข่งขันแย่งชิงพื้นที่และ



สารอาหาร (competition) การทำลายเชื้อราโดยตรง (mycoparasitism) การผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiosis) รวมถึงการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช (induced systemic resistance, ISR) (Sharma et al., 2023) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการควบคุม *Phytophthora* spp. ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริก และกล้วย (Fang et al., 2021) อย่างไรก็ตาม การศึกษาประสิทธิภาพของ *Trichoderma* ในทุเรียนยังมีข้อมูลค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ที่แยกจากแหล่งปลูกทุเรียนจริง ซึ่งมีปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมเฉพาะตัวที่อาจมีผลต่อความสามารถของเชื้อรา ทั้งในด้านการเจริญเติบโต การผลิตเอนไซม์ และศักยภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (Mendoza et al., 2022)

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก *Trichoderma* spp. จากดินในสวนทุเรียนในพื้นที่อำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช ซึ่งเป็นแหล่งปลูกทุเรียนสำคัญของภาคใต้ และประเมินศักยภาพของเชื้อราในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากต้นทุเรียนที่แสดงอาการโรครากเน่าและโคนเน่า และจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งนี้เพื่อนำไปสู่การพัฒนาชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคในระบบการผลิตทุเรียนอย่างยั่งยืนในอนาคต

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การแยกเชื้อ *Trichoderma* sp. จากดินสวนทุเรียนในอำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช

เก็บตัวอย่างดินในสวนทุเรียนในพื้นที่ อำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช ที่ไม่พบการระบาดของโรครากเน่าและโคนเน่าทุเรียน โดยเก็บดินที่ระดับความลึก 5-10 เซนติเมตร จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยวิธี dilution plate method บนอาหาร glucose ammonium nitrate agar (GAN) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน คัดแยกโคโลนีของเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีที่เจริญอย่างรวดเร็ว และสร้างโคนินเดีย (conidia) สีเขียวบนผิวหน้าอาหาร เก็บเชื้อบริสุทธิ์แต่ละตัวอย่างบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนี และรูปร่างลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจำแนกชนิดและนำไปทดสอบการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน

2.2 การแยกเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน และการทดสอบการเกิดโรคของไอโซเลท *Phytophthora* sp.

เก็บตัวอย่างบริเวณเปลือกลำต้นทุเรียนที่แสดงอาการของโรครากเน่าโคนเน่า จำนวน 10 ตัวอย่าง จากสวนทุเรียนที่มีการระบาดของโรครากเน่าโคนเน่า ในพื้นที่อำเภอนบพิตำ จังหวัดนครศรีธรรมราช นำมาแยกเชื้อรา *Phytophthora* sp. โดยวิธี tissue transplanting โดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่แสดงอาการของโรคขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร นำไปแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้นร้อยละ 1 นาน 3 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่ปราศจากเชื้อ นำไปวางบนอาหารจำเพาะ BNPR (corn meal agar ที่ผสม ampicillin 10 มิลลิกรัม, nystatin 1,000 ไมโครลิตร, rifampicin 10 มิลลิกรัม และ benlate 100 มิลลิกรัม) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยการตัดขอบโคโลนีของเส้นใยเชื้อที่เจริญออกมาจากตัวอย่าง นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-5 วัน เพื่อนำไปจำแนกชนิดและทดสอบการเกิดโรคบนใบทุเรียนโดยวิธีการปลูกเชื้อด้วยวิธี detached leaf (Vawdrey et al., 2005) โดยนำชิ้นวุ้น PDA ที่มีเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* sp. ที่แยกได้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่อยู่ในระยะเพสลาด ที่มีการทำแผลก่อนปลูกเชื้อ บ่มใบทุเรียนที่ปลูกเชื้อในกล่อง



พลาสติกที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน และทำการบันทึกภาพ นำเชื้อที่ผ่านการพิสูจน์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเกิดโรคบนใบทุเรียนจะถูกนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* sp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* sp. ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดิน ในสวนทุเรียน และเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ทางการค้า ดำเนินการโดยใช้วิธีการเพาะร่วม (dual culture test) บนอาหาร PDA ในแต่ละจานเพาะเชื้อ นำชิ้นวุ้น PDA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ซึ่งมีเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* sp. วางห่างจากขอบจานด้านหนึ่ง 2 เซนติเมตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวางชิ้นวุ้น PDA ที่มีเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ขนาดเดียวกัน บริเวณด้านตรงข้าม โดยให้ห่างกัน 6 เซนติเมตร ตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของจาน และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน หลังการบ่ม วัดรัศมีของเชื้อรา *Phytophthora* sp. แล้วคำนวณร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเส้นใย (percent inhibition of radial growth: PIRG)

$$\text{โดยใช้สูตร: PIRG (\%)} = ((R1 - R2) / R1) \times 100 \quad \dots\dots\dots(\text{สมการที่ 1})$$

โดย $R1$ = รัศมีของเชื้อรา *Phytophthora* sp. ในจานควบคุม (ไม่มี *Trichoderma* sp.)

$R2$ = รัศมีของเชื้อรา *Phytophthora* sp. ด้านที่เจริญไปทาง *Trichoderma* sp.

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* sp. ดำเนินการภายใต้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) โดยมีปัจจัยหลักคือไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 50 ไอโซเลท (รวมถึงสายพันธุ์ทางการค้า) และทดสอบกับเชื้อรา *Phytophthora* จำนวน 7 ไอโซเลท โดยทำซ้ำ 3 ครั้งต่อชุดการทดลอง ข้อมูล PIRG ที่ได้จากการทดลอง นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของประสิทธิภาพในการยับยั้งระหว่างไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* sp. หากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเพิ่มเติมด้วย Dunnett's Multiple Comparison Test โดยใช้สายพันธุ์ทางการค้าเป็นกลุ่มควบคุม เพื่อประเมินว่าแต่ละไอโซเลทมีประสิทธิภาพสูงกว่า เท่าเทียม หรือด้อยกว่าสายพันธุ์ทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดดำเนินการด้วยโปรแกรม Minitab version 17

นำค่าร้อยละการยับยั้งที่ได้จากการทดลอง นำมาประเมินระดับประสิทธิภาพของแต่ละไอโซเลท โดยใช้เกณฑ์ของเกษม สร้อยทอง (Soithong, 1989) ดังนี้

PIRG > ร้อยละ 75 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก (4 คะแนน)

PIRG ร้อยละ 61-75 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง (3 คะแนน)

PIRG ร้อยละ 51-60 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง (2 คะแนน)

PIRG < ร้อยละ 50 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ (1 คะแนน)

ไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีคะแนนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* sp. สูงที่สุด จะถูกนำไปจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ต่อไป



2.4 การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* sp. ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีชีวโมเลกุล

จำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีคะแนนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* sp. สูงที่สุดในระดับสปีชีส์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีชีวโมเลกุล ดังนี้

2.4.1 การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี เส้นใย การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ และดูลักษณะโครงสร้างของเชื้อรารายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการทำให้ slide culture นำลักษณะที่ได้เปรียบเทียบกับรายงานของ Kubicek (1998) และ Samuels et al. (2015)

2.4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ด้วยวิธีชีวโมเลกุล

เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในอาหารเหลว PDB เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 5 วัน กรองเส้นใย ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 นำมาสกัด DNA โดยประยุกต์จากวิธีการของ Doyle & Doyle (1987) ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer เพิ่มปริมาณลำดับเบสในบริเวณ ITS rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') และ ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990) ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X buffer, 2.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTPs, 0.2 ไมโครโมลาร์ (ITS5 และ ITS4) และ 1 ยูนิต Taq DNA polymerase โดยจำนวนรอบในการทำ PCR คือ 35 รอบ ใช้เวลาและอุณหภูมิในการสังเคราะห์สาย DNA ดังนี้ initial denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตร-โฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้ Nucleotide BLAST ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อยืนยันเชื้อในระดับสปีชีส์

3. ผลการวิจัย

3.1 ผลการคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. จากดินในสวนทุเรียน

จากการแยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. จากดินในสวนทุเรียนสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะของเชื้อรา *Trichoderma* sp. คือมีลักษณะโคโลนีที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และสร้างโคนิเดียสีขาว บนผิวหน้าอาหาร ได้ทั้งหมด 66 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกได้มาจัดกลุ่มตามลักษณะโคโลนีและลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อเป็นตัวแทนในการทดสอบการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* sp. ได้เชื้อราเป็นตัวแทนในการทดสอบจำนวน 50 ไอโซเลท ดังแสดงใน Figure 1. และ Figure 2.

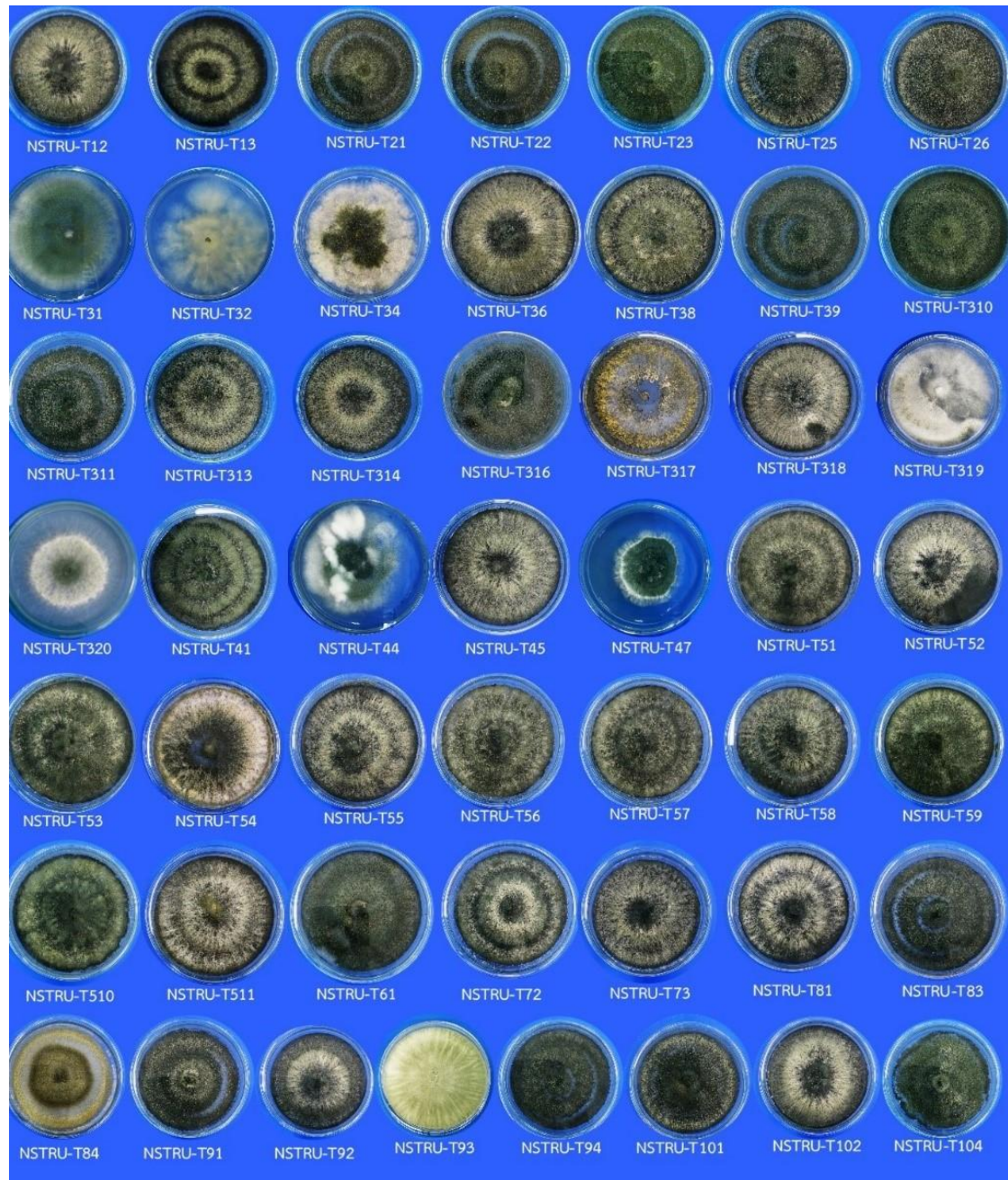


Figure 1. Colony morphology of *Trichoderma* spp. on PDA medium after 7 days of incubation

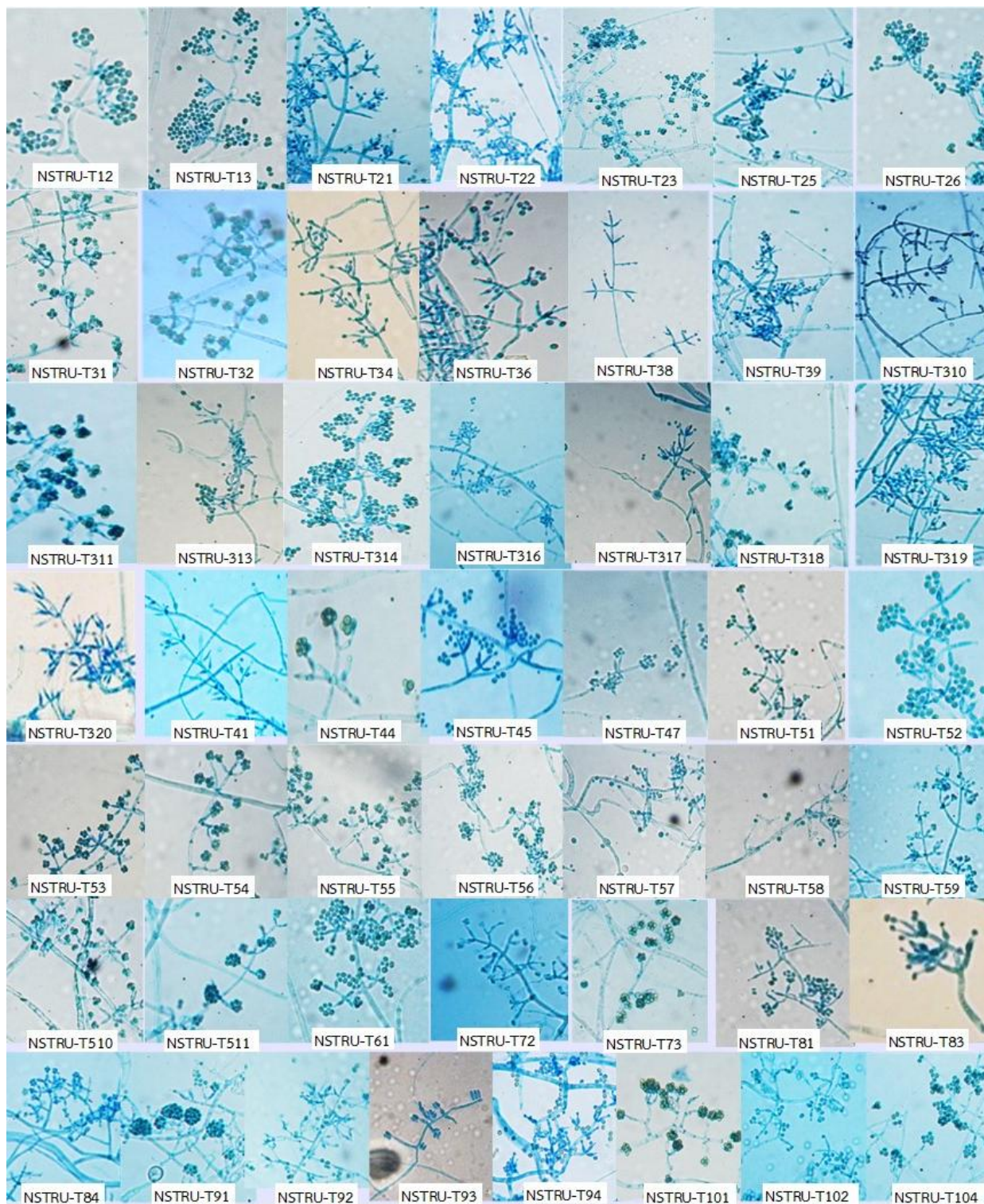


Figure 2. Microscopic morphology of *Trichoderma* spp. at 400x magnification

3.2 ผลการแยกเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าโคนของทุเรียน

จากการแยกเชื้อราจากเปลือกลำต้นทุเรียนที่เป็นโรค สามารถแยกเชื้อรา *Phytophthora* spp. ได้จำนวน 7 ไอโซเลท (P01-P07) เชื้อราที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง โดยเชื้อรา *Phytophthora* spp. ไอโซเลท P01 และ P07 มีโคโลนีแบบ stellate pattern และในไอโซเลท P02, P03, P04 และ P06 มีลักษณะโคโลนีแบบ radiate และไอโซเลท P05 มีโคโลนีแบบ slightly stellate pattern โดยเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท เมื่อนำมาตรวจสอบเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีลักษณะไม่มีผนังกันระหว่างเซลล์ มี sporangium แบบ ovoid และมีการสร้าง chlamydospore สีน้ำตาล ผนังหนา เป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Suksiri et al. (2018) ที่รายงานว่าลักษณะพื้นฐานดังกล่าวเป็นลักษณะของเชื้อ *Phytophthora* spp. และเมื่อนำเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 7 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนใบทุเรียนโดยวิธี detached leaf พบว่าทุก ไอโซเลทมีความสามารถในการก่อโรคบนใบพืชทดสอบได้ โดยใบทุเรียนเริ่มแสดงอาการติดเชื้อ 2 วันหลังจากปลูกเชื้อบนใบ ทุเรียน รอบแผลมีรอยช้ำน้ำ และขยายลามเป็นวงสีน้ำตาลขนาดใหญ่ แผลจะลุกลามไปตามเส้นใบ ดังแสดงใน Figure 3.

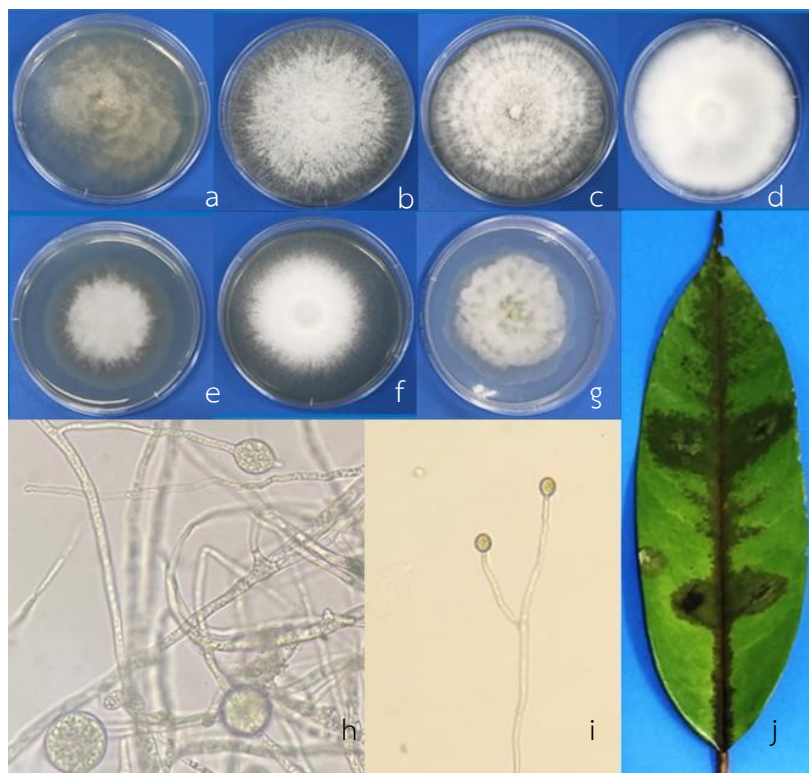


Figure 3. Morphology and pathogenicity test of *Phytophthora* spp. (a-g) Colony morphology of *Phytophthora* spp. (P01- P07) on PDA medium after 7 days of incubation. (h, i) Sporangia and chlamydospores of the representative *Phytophthora* sp. isolate, P01. (j) Symptoms on a durian leaf inoculated with mycelial plugs of the representative *Phytophthora* sp. isolate, P01.

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าโคนของทุเรียน

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 50 ไอโซเลตในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลต สามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. แตกต่างกัน แสดงตัวอย่างดัง Figure 4. โดยมีค่าร้อยละในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* spp. แสดงใน Table 1. ซึ่งพบว่ามีเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 46 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 92 ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora* spp. ได้ และมีเพียง 4 ไอโซเลต ได้แก่ NSTRU-T319, NSTRU-T44 , NSTRU-T47 และ NSTRU-T92 ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora* spp. ทั้ง 7 ไอโซเลตได้

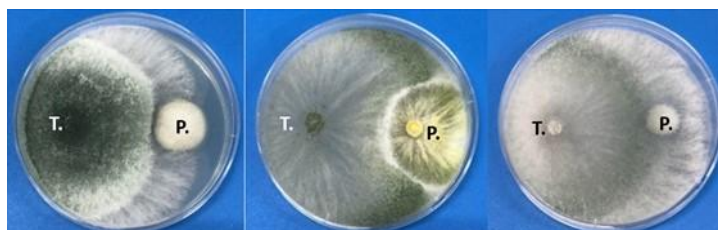


Figure 4. Example of antagonistic activity of *Trichoderma* spp. (T.) against *Phytophthora* spp. (P.) using the dual culture test on PDA medium (3 days at room temperature).

Table 1. Percentage of Inhibition of Radial Growth (PIRG) of *Phytophthora* spp. Isolates P01-P07

<i>Trichoderma</i> spp.	Percentage of Inhibition of Radial Growth (PIRG) of <i>Phytophthora</i> spp.						
	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07
NSTRU-T12	50.33±1.41 ^b	50.73±1.16 ^a	63.92±0.82 ^a	26.15±1.84 ^b	48.17±1.19 ^a	31.07±1.21 ^c	46.81±1.02 ^b
NSTRU-T13	51.11±1.63 ^b	35.99±0.07 ^b	62.40±0.79 ^a	30.95±2.11 ^a	54.88±1.09 ^a	22.31±2.68 ^c	46.04±1.28 ^b
NSTRU-T21	54.42±1.91 ^b	33.31±1.42 ^b	56.46±1.02 ^b	28.69±1.61 ^a	56.38±4.37 ^a	33.79±0.63 ^b	46.04±1.48 ^b
NSTRU-T22	59.44±1.46 ^a	41.04±0.86 ^a	59.87±0.78 ^b	41.09±0.68 ^a	43.48±1.42 ^a	36.91±0.78 ^b	50.88±1.72 ^a
NSTRU-T23	53.03±2.74 ^b	36.24±0.54 ^b	63.78±0.81 ^a	18.19±1.63 ^b	37.14±1.08 ^a	39.52±2.23 ^b	50.44±2.05 ^a
NSTRU-T25	54.69±2.22 ^b	25.24±0.94 ^c	58.71±1.12 ^b	36.38±0.65 ^a	35.65±2.83 ^a	28.57±1.74 ^c	52.59±2.40 ^a
NSTRU-T26	61.57±0.73 ^a	41.29±0.28 ^a	58.93±2.52 ^b	29.14±1.98 ^a	51.60±0.17 ^a	22.21±1.37 ^c	51.38±0.39 ^a
NSTRU-T31	60.70±2.64 ^a	33.79±1.03 ^b	54.10±1.62 ^b	33.39±1.37 ^a	42.36±1.02 ^a	44.21±1.15 ^a	45.10±0.89 ^b
NSTRU-T32	63.22±3.54 ^a	41.61±1.11 ^a	62.40±1.88 ^a	16.56±2.80 ^b	37.21±1.27 ^a	27.74±2.31 ^c	49.83±0.71 ^a
NSTRU-T34	-	-	66.53±0.86 ^a	-	18.94±1.32 ^b	2.82±2.56 ^c	15.58±1.89 ^c
NSTRU-T36	61.66±1.94 ^a	44.54±0.78 ^a	67.55±0.99 ^a	37.65±2.98 ^a	45.19±1.94 ^a	42.23±4.50 ^a	56.61±1.16 ^a
NSTRU-T38	55.65±3.05 ^a	20.28±0.92 ^c	61.84±1.02 ^a	29.05±1.33 ^a	33.86±1.20 ^a	34.10±0.83 ^b	38.05±0.68 ^c



Table 1. Percentage of Inhibition of Radial Growth (PIRG) of *Phytophthora* spp. Isolates P01-P07 (Cont.)

<i>Trichoderma</i> spp.	Percentage of Inhibition of Radial Growth (PIRG) of <i>Phytophthora</i> spp.						
	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07
NSTRU-T39	44.32±2.55 ^b	46.82±1.16 ^a	62.23±0.39 ^a	30.86±1.08 ^a	41.83±0.10 ^a	49.32±1.46 ^a	44.44±2.40 ^b
NSTRU-T310	62.83±3.23 ^a	30.94±0.58 ^b	64.53±3.11 ^a	22.08±1.67 ^b	47.35±1.60 ^a	32.95±2.02 ^c	57.16±0.10 ^a
NSTRU-T311	49.88±0.00 ^b	26.47±2.60 ^c	56.10±3.08 ^b	16.11±1.84 ^b	35.50±2.42 ^a	27.11±1.85 ^c	36.84±0.70 ^c
NSTRU-T313	53.46±1.70 ^b	34.28±1.02 ^b	68.66±0.94 ^a	31.13±0.67 ^a	55.48±2.04 ^a	30.34±0.53 ^c	53.80±0.30 ^a
NSTRU-T314	37.86±1.67 ^c	41.12±2.15 ^a	66.72±1.12 ^a	22.08±0.60 ^b	33.33±0.67 ^a	27.32±1.85 ^c	45.65±1.20 ^b
NSTRU-T316	45.49±0.56 ^b	24.19±1.22 ^c	61.59±0.88 ^a	18.64±1.11 ^b	21.03±1.50 ^a	25.55±0.53 ^c	43.72±1.90 ^b
NSTRU-T317	60.22±0.10 ^a	41.29±2.54 ^a	60.59±1.42 ^a	31.95±2.20 ^a	22.37±2.31 ^b	19.19±1.30 ^c	42.90±1.05 ^b
NSTRU-T318	51.08±3.68 ^b	35.50±1.03 ^b	63.28±2.44 ^a	25.43±1.74 ^b	50.48±4.12 ^a	38.37±0.50 ^b	43.83±0.10 ^b
NSTRU-T319	-	-	-	-	-	-	-
NSTRU-T320	49.43±0.94 ^b	28.83±0.25 ^b	65.14±0.51 ^a	25.97±0.06 ^b	32.14±2.77 ^a	24.82±1.76 ^c	43.61±0.72 ^b
NSTRU-T41	43.30±3.16 ^c	33.47±2.10 ^b	45.15±0.58 ^c	27.69±1.97 ^a	35.27±1.29 ^a	34.20±0.19 ^b	26.10±2.42 ^c
NSTRU-T44	-	-	-	-	-	-	-
NSTRU-T45	50.09±3.39 ^b	21.42±2.02 ^c	63.67±0.06 ^a	35.02±1.23 ^a	42.95±1.71 ^a	37.02±0.19 ^b	77.75±0.28 ^a
NSTRU-T47	-	-	-	-	-	-	-
NSTRU-T51	41.68±1.77 ^c	28.58±1.30 ^b	59.07±0.04 ^b	32.22±1.94 ^a	40.27±1.49 ^a	30.45±1.39 ^c	40.25±0.93 ^c
NSTRU-T52	52.16±2.57 ^b	41.61±0.25 ^a	63.01±1.73 ^a	28.05±1.34 ^a	30.05±1.22 ^a	34.93±1.22 ^b	48.18±0.83 ^a
NSTRU-T53	39.30±5.14 ^c	54.72±2.60 ^a	62.01±0.06 ^a	26.70±1.59 ^a	40.57±0.85 ^a	25.96±0.89 ^c	40.53±0.51 ^c
NSTRU-T54	55.35±2.50 ^a	45.68±1.30 ^a	68.66±2.02 ^a	40.72±1.95 ^a	47.35±2.21 ^a	40.67±0.71 ^b	54.63±1.03 ^a
NSTRU-T55	42.10±2.67 ^c	38.11±1.41 ^a	67.03±1.91 ^a	33.39±3.65 ^a	35.50±1.06 ^a	22.94±2.01 ^c	43.28±0.21 ^b
NSTRU-T56	41.47±0.14 ^c	26.71±1.85 ^b	65.97±0.65 ^a	15.75±1.83 ^b	32.89±0.86 ^a	31.39±1.17 ^c	44.49±1.30 ^b
NSTRU-T57	38.01±2.60 ^c	30.29±1.32 ^b	56.46±3.21 ^b	20.63±0.72 ^b	35.42±0.58 ^a	29.51±1.36 ^c	48.79±0.93 ^a
NSTRU-T58	42.46±1.84 ^c	47.80±3.20 ^a	63.98±3.11 ^a	37.29±0.15 ^a	41.76±1.12 ^a	39.31±1.57 ^b	49.72±0.74 ^a
NSTRU-T59	53.70±1.35 ^b	45.60±1.65 ^a	65.34±1.31 ^a	39.91±0.10 ^a	36.24±0.73 ^a	41.29±0.99 ^a	48.68±0.99 ^a
NSTRU-T510	37.68±1.94 ^c	40.15±2.92 ^a	60.43±1.65 ^a	20.18±2.36 ^b	44.44±0.94 ^a	36.70±1.24 ^b	49.56±1.68 ^a
NSTRU-T511	55.95±0.28 ^a	30.21±0.31 ^b	65.97±1.42 ^a	36.65±2.33 ^a	30.57±0.64 ^a	38.79±0.07 ^b	46.97±1.29 ^b
NSTRU-T61	48.17±0.03 ^b	38.19±1.12 ^a	62.84±0.30 ^a	30.68±0.85 ^a	23.04±0.72 ^a	27.53±0.77 ^c	51.38±0.91 ^a
NSTRU-T72	58.86±1.08 ^a	25.41±2.67 ^c	62.12±1.25 ^a	30.68±6.52 ^a	27.22±1.03 ^b	31.60±1.14 ^c	45.54±0.06 ^b
NSTRU-T73	56.94±0.38 ^a	30.78±3.33 ^b	62.95±2.52 ^a	30.95±1.98 ^a	15.73±2.42 ^b	30.24±2.09 ^c	49.34±0.78 ^a
NSTRU-T81	48.62±4.02 ^b	37.13±1.32 ^a	60.87±0.71 ^a	25.70±0.62 ^b	32.89±0.28 ^a	23.98±1.03 ^c	48.79±1.13 ^a



Table 1. Percentage of Inhibition of Radial Growth (PIRG) of *Phytophthora* spp. Isolates P01-P07 (Cont.)

<i>Trichoderma</i>	Percentage of Inhibition of Radial Growth (PIRG) of <i>Phytophthora</i> spp.						
spp.	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07
NSTRU-T83	49.61±1.01 ^b	36.32±2.35 ^b	64.36±0.82 ^a	26.15±3.31 ^b	36.76±1.13 ^a	41.40±0.73 ^a	44.55±0.28 ^b
NSTRU-T84	56.04±0.03 ^a	43.65±4.41 ^a	59.21±0.25 ^b	30.68±2.20 ^a	27.67±0.72 ^b	31.39±1.17 ^c	48.29±0.79 ^a
NSTRU-T91	57.54±0.94 ^a	47.80±1.42 ^a	59.18±2.66 ^b	46.88±1.02 ^a	45.04±1.16 ^a	45.57±0.68 ^a	43.01±0.92 ^b
NSTRU-T92	-	-	-	-	-	-	-
NSTRU-T93	66.41±0.07 ^a	20.93±1.25 ^c	80.53±0.38 ^a	34.66±3.00 ^a	50.26±0.58 ^a	37.23±0.23 ^b	57.87±0.81 ^a
NSTRU-T94	47.39±0.59 ^b	38.68±3.11 ^a	61.54±1.29 ^a	22.62±4.20 ^b	40.57±0.60 ^a	44.00±0.75 ^a	44.66±0.24 ^b
NSTRU-T101	00.00±0.00 ^c	33.39±3.25 ^b	60.73±1.42 ^a	27.69±3.51 ^a	38.33±0.38 ^a	37.23±0.95 ^b	40.69±1.06 ^c
NSTRU-T102	51.95±3.02 ^b	30.37±0.32 ^b	61.59±0.77 ^a	23.53±2.81 ^b	36.09±0.52 ^a	25.03±0.84 ^c	39.59±0.73 ^c
NSTRU-T104	53.22±3.30 ^b	34.85±1.25 ^b	61.76±0.99 ^a	29.41±0.65 ^a	38.85±0.24 ^a	-	35.35±0.39 ^c
Commercial strain	49.57±0.05	31.68±4.61	55.99±0.53	20.72±0.67	25.88±0.97	37.33±0.61	45.15±0.82

Note: Superscript letters a, b, and c following the mean values and standard deviations within each column indicate groupings based on Dunnett's test ($p < 0.05$). Comparisons were made within the same column only.

A = significantly higher than the commercial strain;

B = not significantly different from the commercial strain;

C = significantly lower than the commercial strain.

- = No inhibition

เมื่อพิจารณาผลการยับยั้งของแต่ละไอโซเลท พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท NSTRU-T93 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora* sp. ไอโซเลท P01 และ P03 โดยให้ค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 66.41 และ 80.53 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท NSTRU-T53 ยับยั้งเชื้อ P02 ได้สูงสุดที่ร้อยละ 54.72, NSTRU-T91 ยับยั้ง P04 ได้สูงสุดที่ร้อยละ 46.88, NSTRU-T21 ยับยั้ง P05 ได้สูงสุดที่ร้อยละ 56.38, NSTRU-T39 ยับยั้ง P06 ได้สูงสุดที่ร้อยละ 49.32 และ NSTRU-T45 ยับยั้ง P07 ได้สูงสุดถึงร้อยละ 77.75

ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Dunnett's test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 โดยใช้สายพันธุ์ทางการค้าเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท ที่นำมาทดสอบ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีเชื้อรา *Trichoderma* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* sp. ไอโซเลท P01 ถึง P07 ได้สูงกว่าสายพันธุ์ทางการค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวน 15, 20, 35, 29, 39, 7 และ 20 ไอโซเลท ตามลำดับ

จากการจัดลำดับคะแนนประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* spp. ตามเกณฑ์ของ Soithong (1989) พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท NSTRU-T93 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* sp. ไอโซเลท P01 และ P03 สูงสุดนั้น ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* sp. ไอโซเลท P03 และ P07



ได้ในระดับที่สูงมาก ส่วน *Phytophthora* sp. ไอโซเลท P01 ถูกยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ในระดับสูง และ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท P02 และ P05 ถูกยับยั้งการเจริญของเส้นใยในระดับปานกลาง มีเฉพาะ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท P04 และ P06 ถูกยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ในระดับต่ำ โดยเชื้อ *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* spp. ได้แตกต่างกัน จึงได้นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย มาให้ระดับคะแนนประสิทธิภาพการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora* spp. ภายหลังการจัดเรียงค่าคะแนนประสิทธิภาพการยับยั้ง ได้เชื้อ *Trichoderma* spp. ที่มีคะแนนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* spp. สูงสุด 5 อันดับแรกดังแสดงใน Table 2.

Table 2. Top five *Trichoderma* spp. isolates with the highest inhibition efficiency scores against the mycelial growth of *Phytophthora* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	Inhibition efficiency scores against <i>Phytophthora</i> spp. mycelial growth							
	P01	P02	P03	P04	P05	P06	P07	Total
NSTRU-T93	3	1	4	1	2	1	2	14
NSTRU-T45	2	1	3	1	1	1	4	13
NSTRU-T26	3	1	2	1	2	1	2	12
NSTRU-T36	3	1	3	1	1	1	2	12
NSTRU-T310	3	1	3	1	1	1	2	12
Commercial strain	1	1	2	1	1	1	1	8

จาก Table 2. เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีคะแนนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* spp. สูงสุด 5 อันดับแรก ได้แก่ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท NSTRU-T93 มีคะแนนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* spp. 14 คะแนน, *Trichoderma* sp. ไอโซเลท NSTRU-T45 มีคะแนนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* spp. 13 คะแนน และ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท NSTRU-T26, NSTRU-T36 และ NSTRU-T310 มีคะแนนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* spp. 12 คะแนน ซึ่งทั้ง 5 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ เส้นใย *Phytophthora* spp. ได้ดีกว่า *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ทางการค้า จึงคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท NSTRU-T93 ที่มีคะแนนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงสุด ไปจัดจำแนกชนิดต่อไป

3.4 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. NSTRU-T93 ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุล

เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท NSTRU-T93 เส้นใยเจริญได้ดีบนอาหาร PDA โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 90 มิลลิเมตร เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 4 วัน เส้นใยสีขาวฟู ระยะแรกพบการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อน และสร้างรงควัตถุสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะของโคนิเดียมีสีเขียว รูปร่าง ellipsoidal มีโคนิดิโอฟอร์แตกแขนงแบบ longibrachiatum-type สร้างไฟอะโลด์ รูปร่างแบบ cylindrical ดัง Figure 5. จัดจำแนกเป็นเชื้อราในสกุล *Trichoderma* sp.

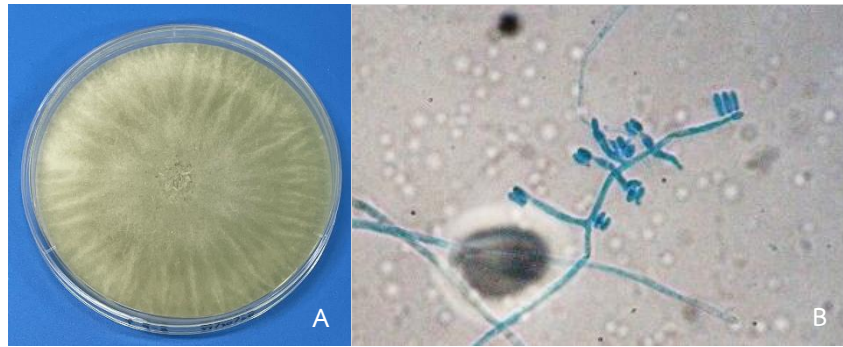


Figure 5. *Trichoderma* sp. isolate NSTRU-T93

(A) Colony morphology on PDA medium after 4 days of incubation at room temperature.

(B) Conidiophore, phialides, and conidia under a microscope at 400x magnification

การจำแนกชนิดของเชื้อราไอโซเลท NSTRU-T93 ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS บางส่วนไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ฐานข้อมูลสากล GenBank ซึ่งพบว่าเชื้อราไอโซเลท NSTRU-T93 มีความใกล้เคียงกับรา *Trichoderma reesei* (GenBank accession number LC535971.1) มากที่สุด (เทียบกับ Type strain = 100%)

4. อภิปรายผลการวิจัย

การคัดแยกและประเมินศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. จากดินสวนทุเรียน ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนในครั้งนี้ ได้ทำการคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* จากดินในสวนทุเรียนที่ไม่มีการระบาดของโรครากเน่าและโคนเน่า ซึ่งเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการป้องกันโรคตามธรรมชาติ เนื่องจากดินที่ปลอดโรคมักมีจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งหรือแข่งขันกับเชื้อก่อโรคได้ดี การคัดเลือกเชื้อจากดินเหล่านี้จึงเพิ่มโอกาสในการค้นพบสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูง นอกจากนี้เชื้อจากดินปลอดโรคยังมีแนวโน้มที่จะเจริญเติบโตและตั้งตัวในสภาพแวดล้อมของสวนทุเรียนได้ดี ทำให้มีมีประสิทธิภาพสูงเมื่อนำไปใช้เป็นชีวภัณฑ์ป้องกันโรค การคัดแยกเชื้อราจากดินที่ปลอดโรคจึงเป็นแนวทางที่ช่วยให้ได้เชื้อที่มีศักยภาพสูงสุดสำหรับการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ทางการเกษตรในระยะยาว

จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถแยกเชื้อราจากดินในสวนทุเรียนได้ 66 ไอโซเลท และได้ทำการคัดเลือกเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และลักษณะสัณฐานของสปอร์และเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่แตกต่างกันจำนวน 50 ไอโซเลท ซึ่งความหลากหลายของเชื้อรา *Trichoderma* ที่คัดแยกได้จากดินในสวนทุเรียนอาจเกิดจากปัจจัยหลายประการ เช่น สภาพแวดล้อมของดิน ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในดิน และแหล่งที่มาของการคัดแยก ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Thomchanreed et al. (2021) ได้คัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* จากดินปลูกทุเรียนในจังหวัดจันทบุรีและชุมพร พบว่าเชื้อราเหล่านี้มีความแตกต่างในลักษณะโคโลนีและประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน นอกจากนี้ การศึกษาของ Rattanalernussorn (2009) พบว่าเชื้อรา *T. viride* ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มีความหลากหลายในด้านสัณฐานวิทยาและการใช้ประโยชน์ ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างในสภาพแวดล้อมของดินและปัจจัยอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา



จากผลการทดลองพบว่า *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่ที่แยกจากดินสวนทุเรียนสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Phytophthora* spp. ได้ในระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่า *Trichoderma* มีศักยภาพสูงในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด อันเป็นผลมาจากกลไกการปฏิสัมพันธ์ที่หลากหลาย แม้ในงานวิจัยนี้จะได้ศึกษาจากกลไกโดยตรง แต่ผลที่ได้สะท้อนให้เห็นถึงความสามารถเชิงปฏิบัติของเชื้อในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทุเรียน โดยเฉพาะ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาต่อเนื่องเพื่อพัฒนาไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรค และศึกษาปัจจัยที่อาจมีผลต่อความสามารถในการปฏิสัมพันธ์ของเชื้อ เช่น การปรับตัวของ *Trichoderma* ต่อสภาพแวดล้อมของสวนทุเรียนและการทำงานร่วมกับจุลินทรีย์อื่น ๆ ในดิน การใช้ *Trichoderma* spp. เป็นแนวทางที่มีศักยภาพในการควบคุม *Phytophthora* sp. เนื่องจากสามารถควบคุมเชื้อก่อโรคผ่านกลไกต่าง ๆ เช่น การแข่งขันแย่งชิงสารอาหาร การหลั่งเอนไซม์ที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา และการผลิตสารปฏิชีวนะ

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าไอโซเลท NSTRU-T93 มีศักยภาพสูงสุด ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* sp. ทั้งไอโซเลท P01 และ P03 ขณะที่บางไอโซเลท เช่น NSTRU-T319, NSTRU-T44, NSTRU-T47 และ NSTRU-T92 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อก่อโรคได้เลย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากข้อจำกัดด้านกลไกการปฏิสัมพันธ์ เช่น ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไฮโดรไลติก เช่น ไคตินเนส (chitinase) และกลูคาเนส (glucanase) หรือการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมเชื้อก่อโรค ความแตกต่างของ *Trichoderma* แต่ละไอโซเลทอาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางพันธุกรรม ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อราและเอนไซม์ที่ใช้ทำลายโครงสร้างของ *Phytophthora* spp. นอกจากนี้ ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ค่า pH ของดินที่อยู่ในช่วง 5.5–6.5 ปริมาณสารอินทรีย์ และความหนาแน่นของจุลินทรีย์อื่น ๆ ก็อาจมีผลต่อศักยภาพของ *Trichoderma* ในการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคและความสามารถในการตั้งตัวในดิน (Tian et al., 2024; Wang et al., 2022) การศึกษานี้ยังพบว่า ประสิทธิภาพของ *Trichoderma* แต่ละไอโซเลทขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *Phytophthora* spp. ที่ใช้ทดสอบ โดยพบว่าไอโซเลท P03 และ P07 ถูกยับยั้งได้สูงกว่าร้อยละ 80 ขณะที่ P04 และ P06 ถูกยับยั้งในระดับต่ำกว่า 50% ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบผนังเซลล์ของ *Phytophthora* แต่ละสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อเอนไซม์จาก *Trichoderma* ไม่เท่ากัน

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Dunnett's test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ยืนยันว่าเชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกจากดินสวนทุเรียนมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ทางการค้า โดยในไอโซเลทของ *Phytophthora* แต่ละชนิด พบว่า *Trichoderma* จากแหล่งท้องถิ่นหลายไอโซเลท สามารถแสดงศักยภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าอย่างชัดเจน ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงคุณค่าของการใช้จุลินทรีย์จากแหล่งปลูกเฉพาะถิ่นในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การประเมินระดับคะแนนประสิทธิภาพของแต่ละไอโซเลทโดยอิงตามค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย ยังช่วยให้สามารถคัดเลือกไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงสุดได้อย่างชัดเจน โดยพบว่าไอโซเลท NSTRU-T93 เป็นไอโซเลทที่มีคะแนนรวมสูงสุดและมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ในระดับสูงสม่ำเสมอ จึงได้รับการคัดเลือกให้นำไปจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์

ผลการจำแนกสายพันธุ์ของ NSTRU-T93 พบว่ามีลักษณะของโคนินิโอฟอร์ที่แตกแขนงแบบ longibrachiatum-type และไฟอะไลด์รูปร่าง cylindrical ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของ *Trichoderma reesei* (Kubicek et al., 2011) การใช้เทคนิคชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer) และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ยืนยันว่าไอโซเลทนี้มีความใกล้เคียงกับ *T. reesei* 100% อย่างไรก็ตามแม้ว่าผลการจำแนกสายพันธุ์จะมีความแม่นยำสูงจากการใช้ลำดับ ITS แต่ควรมีการตรวจสอบเพิ่มเติมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอื่น ๆ เช่น TEF1- α



(Translation Elongation Factor 1-alpha) หรือ RPB2 (RNA Polymerase II subunit 2) ซึ่งสามารถเพิ่มความแม่นยำในการจำแนกชนิดของ *Trichoderma* spp. ได้ดียิ่งขึ้น (Dou et al., 2020)

แม้ว่า *T. reesei* จะเป็นที่รู้จักในฐานะเชื้อราที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์เซลลูโลสในอุตสาหกรรมชีวภาพ (Druzhinina et al., 2006) แต่การศึกษาหลายฉบับระบุว่า *T. reesei* ยังมีศักยภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ทางชีวภาพ สามารถควบคุมเชื้อก่อโรคพืชได้หลายชนิดผ่านกลไกการแข่งขันแย่งชิงสารอาหาร การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรค และการสร้างสารต้านจุลชีพ (Steindorff et al., 2014) นอกจากนี้คุณสมบัติของ *T. reesei* ที่สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วในอาหาร PDA โดยสามารถขยายโคโลนีได้เต็มจานภายใน 4 วัน ถือเป็นข้อได้เปรียบในแง่ของการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ทางการเกษตร เนื่องจากเชื้อที่เติบโตเร็วสามารถตั้งตัวและควบคุมเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Harman & Uphoff, 2021)

แม้ว่าผลการศึกษายืนยันว่า NSTRU-T93 มีศักยภาพสูงในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. แต่การนำไปใช้ในระบบการปลูกทุเรียนยังคงต้องมีการศึกษาต่อเนื่อง โดยเฉพาะการทดสอบในสภาพแวดล้อมจริงเพื่อให้มั่นใจว่าเชื้อสามารถตั้งตัวและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในดินที่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นร่วมอยู่ด้วย นอกจากนี้ควรมีการศึกษาระดับโมเลกุลเพิ่มเติมเพื่อวิเคราะห์ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมโรค เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ปฏิปักษ์ และสารควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค

การศึกษาต่อไปควรให้ความสำคัญกับการทดลองภาคสนามในระบบการปลูกทุเรียนจริง เพื่อให้มั่นใจว่าเชื้อสามารถแสดงประสิทธิภาพในสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ และไม่ถูกยับยั้งจากปัจจัยแวดล้อมของดิน นอกจากนี้ควรศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเสริมสร้างประสิทธิภาพของเชื้อ เช่น การใช้ร่วมกับปุ๋ยชีวภาพ การปรับค่า pH ของดิน หรือการใช้เชื้อร่วมกับจุลินทรีย์อื่นที่เป็นประโยชน์ต่อระบบนิเวศของดิน ทั้งนี้ควรพัฒนาเทคนิคการขยายเชื้อและเทคโนโลยีการนำไปใช้ในภาคสนามเพื่อให้สามารถนำไปใช้ได้ในระดับเชิงพาณิชย์

5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า *T. reesei* ไอโซเลท NSTRU-T93 ที่แยกได้จากดินในสวนทุเรียนที่ไม่เป็นโรค จากอำเภอโนนพิทา จังหวัดนครศรีธรรมราช เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการควบคุม *Phytophthora* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าและโคนเน่าในทุเรียน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาย่อยดัดเกี่ยวกับกลไกการควบคุมเชื้อก่อโรค การนำไปใช้ในภาคสนาม และการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในภาคเกษตรกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืนในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (อว.) ความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้วิจัย มหาวิทยาลัยไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

7. เอกสารอ้างอิง

Dou, K., Lu, D., Zhang, Z., Druzhinina, IS., & Shen, Y. (2020). MIST: A multilocus identification system for *Trichoderma*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(20), e01366-20.



- Doyle, JJ., & Doyle, JL. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11–15.
- Druzhinina, IS., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, BA., Kenerley, CM., Monte, E., & Kubicek, CP. (2006). *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 427–437.
- Fang, W., Guo, Y., Zhang, X., Zhao, Y., Zhang, Y., & Li, Y. (2021). Evaluation of *Trichoderma* spp. for controlling *Phytophthora capsici* and promoting growth in chili pepper. *Biological Control*, 160, 104689.
- Harman, GE., & Uphoff, N. (2021). *Trichoderma* and the future of agriculture. *Plant Disease*, 105(2), 176–191.
- Kavitha, R., Umesha, S., & Srinivas, C. (2021). Biocontrol mechanisms of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* against plant diseases. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104702.
- Kubicek, CP., & Harman, GE. (1998). *Trichoderma and Gliocladium: Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis.
- Kubicek, CP., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, DA., Druzhinina, IS., Thon, M., & Mukherjee, PK. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral lifestyle of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(4), R40.
- Mendoza, L., Sikora, RA., & Kiewnick, S. (2022). Diversity and biocontrol potential of *Trichoderma* spp. from different agroecosystems in Colombia. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 1206–1219.
- Pegg, KG., Coates, LM., O'Dwyer, C., & Wylie, SJ. (2021). Integrated management of *Phytophthora* diseases of tropical tree crops. *Plant Pathology*, 70(3), 423–437.
- Phonkerd, N., Kongkaew, S., & Intana, W. (2023). First report of *Phytophthora vexans* causing root rot in durian (*Durio zibethinus*) in Thailand. *Plant Disease*, 107(2), 589.
- Rattanalertnussorn, S. (2009). Diversity and application of *Trichoderma viride* in plant disease control. *Journal of Mycology*, 15(2), 145–158.
- Raza, W., Ling, N., Zhang, R., & Shen, Q. (2023). Microbial antagonists: Promising tools for controlling soil-borne plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1190761.
- Samuels, GJ., & Hebbar, KP. (2015). *Trichoderma* identification and agricultural applications. Minnesota: The American Phytopathological Society Press.
- Sharma, R., Singh, P., Meena, KK., & Singh, AK. (2023). *Trichoderma*: An ecofriendly plant growth regulator and biocontrol agent. *Journal of Environmental Biology*, 44(1), 43–56.
- Soithong, K. (1989). Biological control of plant pathogens. Bangkok: Department of Agricultural Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. (in Thai)
- Steindorff, AS., Silva, JA., Coelho, AS., & Ulhoa, CJ. (2014). *Trichoderma reesei* as a biocontrol agent: Mechanisms and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 117(6), 1407–1424.
- Suksiri, S., Laipas, P., Soyong, K., & Poeaim, S. (2018). Isolation and identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from durian orchard in Chumphon Province, Thailand. *International Journal of Agricultural Technology*, 14(3), 389–402. (in Thai)
- Thomchanreed, K., Chantarasiri, K., & Supaphon, P. (2021). Isolation and identification of *Trichoderma* spp. from durian orchards in Chanthaburi and Chumphon provinces, Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*, 54(3), 221–234. (in Thai)
- Tian, S., Wang, Y., & Huang, M. (2024). Environmental factors shaping microbial biocontrol efficacy in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 184, 109124.



- Vawdrey, LL., Martin, TM., & Defaveri, J. (2005). A detached leaf bioassay to screen durian cultivars for susceptibility to *Phytophthora palmivora*. *Australasian Plant Pathology*, 34, 251–253.
- Wang, L., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Wang, J., & Hou, D. (2022). Differences in microbial diversity and environmental factors in ploughing-treated tobacco soil. *Frontiers in Microbiology*, 13, 977880.
- Wang, Y., Zhang, H., & Li, J. (2024). Health risks of pesticide residues in food and the environment: A review of recent findings. *Food and Chemical Toxicology*, 180, 113758.
- White, TJ., Bruns, T., Lee, SJWT., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.