ความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราสกุล *Trichoderma* จากบริเวณรากของพริกและสารชีวภัณฑ์

Genetic Variations Among Isolates of *Trichoderma* from Rhizosphere of Chilli and Biofungicide

นฤมล แววคล้ายหงษ์[1/] และ ชวนพิศ บุญชิตสิริกุล[1/]

Narumon Weakhawhong[1/] and Chuanpit Boonchitsirikul[1/]

Abstract: Ninety-four isolates of *Trichoderma* spp. were randomly collected from the rhizosphere of chilli found in five different geographic regions. These isolates were isolated from the soil by using the dilution plate method. The other six isolates of *Trichoderma* spp. used in this study were from biofungicides. The results of their morphological studies indicated that 100 isolates of *Trichoderma* spp. could be grouped into seven species. The polymorphism of the internal transcribed spacer (ITS) regions was also used to characterize isolated *Trichoderma* spp. in this study. The ITS regions of 100 isolates of *Trichoderma* spp. were amplified by using a polymerase chain reaction (PCR) with universal primers ITS1 and ITS4. The amplified products (600 bp) were then digested with *Bam*HI, *Sma*I and *Eco*RI. The *Bam*HI digestion profiles could classify the 100 isolates of *Trichoderma* spp. into three groups. These results resembled the results of the cluster analysis of PCR-RFLP data which clearly partitioned the 100 studied isolates into three groups (at 78 percent similarity). Group A was comprised of *T. harzianum* 34 isolates, *T. hamatum* 23 isolates, *T. aureoviride* 14 isolates and *T. viride* 1 isolate, group B was comprised of *T. koningii* 4 isolates and group C was comprised of *T. longibrachiatum* 19 isolates and *T. pseudokoningii* 5 isolates.

Keywords: *Trichoderma*, PCR-RFLP, morphology

[1/]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1/]Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

บทคัดย่อ: จากการสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณ rhizosphere ของพริกใน 5 พื้นที่ เพื่อแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. รวมทั้งจากสารชีวภัณฑ์ โดยวิธี dilution plate สามารถแยกเชื้อได้ 94 ไอโซเลท จากบริเวณรากพืช และ 6 ไอโซเลท จากสารชีวภัณฑ์ ในการจัดจำแนกเชื้อรา โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดจำแนกเชื้อราทั้ง 100 ไอโซเลท ออกเป็น 7 กลุ่ม species เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ร่วมกับ universal primer ITS1 และ ITS4 พบว่า ผลผลิตของ PCR มีขนาด 600 คู่เบส และเมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Sma*I, *Bam*HI และ *Eco*RI พบว่าเอนไซม์ *Bam*HI สามารถย่อยผลผลิตของ PCR ได้ทั้งหมดซึ่งแบ่งเชื้อราทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 แถบ ดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 600 คู่เบสได้แก่ เชื้อรา *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. aureoviride* และ *T. viride* กลุ่มที่ 2 แถบดีเอ็นเอมีขนาด 480 และ 220 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. koningii* กลุ่มที่ 3 แถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาด 560 และ 140 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. pseudokoningii* โดยมีค่า similarity เท่ากับ 78% ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยอาศัยทางสัณฐานวิทยา

คำสำคัญ: *Trichoderma,* PCR-RFLP, สัณฐานวิทยา

คำนำ

เชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราจำพวก saprophyte ที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากดินธรรมชาติ เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้มีการนำเชื้อรา *Trichoderma* มาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากเชื้อสาเหตุในดิน เช่น การนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาควบคุมโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมในมะเขือเทศ (Larkin and Fravel, 1998) เนื่องจาก เชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไปในดินและบริเวณรากพืช ดังนั้นในการสำรวจและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินเกษตรกรรม และจากสารชีวภัณฑ์ อาจทำให้พบเชื้อรา *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ใหม่ ที่มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค และไม่ส่งผลกระทบต่อเชื้อที่มีประโยชน์ในดิน

ปัจจุบันเทคนิคทางอณูวิทยาได้มีการนำเอามาใช้อย่างกว้างขวางในการจัดจำแนก และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งทำให้สามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ดียิ่งขึ้น สำหรับในประเทศไทย เชื้อรา *Trichoderma* ได้มีการจัดจำแนกโดยนำเอาเทคนิคทางอณูวิทยาต่าง ๆ มาใช้ เช่น เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) เทคนิค random amplified polymorphism DNA (RAPD) และ sequence analysis เนื่องจากเป็นเชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราที่จัดจำแนก species ได้ยาก การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจทำให้การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ผิดพลาดได้ เพราะ เชื้อรา *Trichoderma* มีลักษณะที่คาบเกี่ยวระหว่าง species ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน (Stasz *et al*., 1989)

เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* นิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรคเพิ่มมากขึ้นในประเทศไทย แต่การศึกษาเชื้อรา *Trichoderma* จะมุ่งเน้นการศึกษาทางด้านการควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคเป็นหลักมีส่วนน้อยที่ศึกษาถึงความหลากหลายของเชื้อรา *Trichoderma* ทางด้านเทคนิคทางชีวภาพ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Trichoderma* เปรียบเทียบเชื้อราที่ได้จากบริเวณ rhizosphere ของพริกกับสารชีวภัณฑ์ โดยเทคนิค PCR-RFLP แล้วทำการจัดกลุ่มของ เชื้อราสกุล *Trichoderma*

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อรา *Trichoderma* จากบริเวณ rhizosphere ของต้นพริก และ จากสารชีวภัณฑ์

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณรอบ ๆ รากพริกจากแปลงเกษตรกร 5 พื้นที่ คือ บ้านแม่โจ้ อ.สันทราย อ.สันป่าตอง อ. ดอยสะเก็ด อ. สันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ และ จังหวัดลำพูน ที่ความลึกจากผิวหน้าดิน 15-50 เซนติเมตร และจากสารชีวภัณฑ์ 6 ชนิด นำดินและสารชีวภัณฑ์มาแยกเชื้อราปฏิปักษ์ โดยชั่งดินและสารชีวภัณฑ์ อย่างละ 1 กรัม นำดินมาละลายในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความเข้มข้น 10^{-3} ไมโครลิตร แล้วจึงหยดสารละลายดังกล่าว 100 ไมโครลิตรลงบนอาหารส่วนสารชีวภัณฑ์นำมาเกลี่ยให้ทั่วอาหาร PDA-Rose Bengal ที่เตรียมไว้ จากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน แล้วนำไป แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการ hyphal tip isolation (นุชนารถ, 2540) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

การจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาและจัดจำแนกสันฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้มาจากสารชีวภัณฑ์และจากในดิน โดยใช้เทคนิค slide culture โดยบ่มทิ้งไว้ 3 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยอาศัยหลักการของ Rifai (1969)

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP

นำเส้นใยเชื้อรา 0.1-0.3 กรัม ย้ายลงหลอด microfuge แล้วเติม 0.2 กรัม ของ glass bead vortex บ่มนาน 5 นาที จากนั้นสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามวิธีดัดแปลงจากวิธีของ White *et al.* (1990) แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ITS 1 - ITS 4 นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ *Eco*RI, *Bam*HI และ *Sma*I ปริมาณของสารที่ใช้ คือ ผลผลิตของ PCR 10 ไมโครลิตร buffer 2 ไมโครลิตร 10x BSA 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ไมโครลิตร และ น้ำ 5 ไมโครลิตร นำมาบ่มในแต่ละช่วงอุณหภูมิตามชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วจึงนำไปวิเคราะห์แบบแผนลายพิมพ์ ดีเอ็นเอบน agarose gel

การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏบน RFLP gel บนตาราง matrix โดยแต่ละแถบ ดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบ ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่มีแถบ ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ๆ นั้น จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy System (NTSYS version 2.0) (Rohlf, 2000) โดยเปลี่ยนเป็น similarity matrix ด้วยโปรแกรม SIMQUAL (similarity for qualitative data) โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี unweighted pair group by arithmetic mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม SAHN (sequential, agglomerative, hierachical and nested clustering method) และวิเคราะห์ bootstrap (1,000 ซ้ำ) ด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากบริเวณ rhizosphere ของต้นพริก และ จากสารชีวภัณฑ์

จากการแยกเชื้อรา ในบริเวณ rhizosphere ของต้นพริกจากแปลงเกษตรกร 5 พื้นที่ ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 94 ไอโซเลท และ จากการแยกเชื้อราจากสารชีวภัณฑ์ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 6 ไอโซเลท

การจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 100 ไอโซเลท มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้เป็น 7 กลุ่ม species ดังนี้ คือ 1) กลุ่มเชื้อรา *T. harzianum* 34 ไอโซเลท มีลักษณะ

โคโลนีเจริญรวดเร็ว บริเวณที่สร้างสปอร์มีสีเขียวปนขาว สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง เส้นใยแตกแขนงมีผนังกั้น ไม่มีสี พบ chlamydospore มีรูปร่างกลม ผิวเรียบ เกิดระหว่างและปลายเส้นใย phailide มีรูปร่าง skittle-shaped เกิดเป็นกลุ่ม 2) กลุ่มเชื้อรา *T. hamatum* 23 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีเจริญค่อนข้างช้า สีใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง เส้นใยมี septate ส่วน conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน เป็นกระจุก ทำให้มองเห็นโคโลนีเป็นวงแหวนต่อเนื่องกันเป็นชั้น ๆ 3) กลุ่มเชื้อรา *T. aureoviride* 14 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีเจริญเติบโตช้า โคโลนีมีสีเขียวหม่น เมื่ออายุมากขึ้นสีของอาหารใต้โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองน้ำตาล พบ chlamydospore มีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม ผิวเรียบ มีสีเขียวปนเหลือง 4) กลุ่มเชื้อรา *T. pseudokoningii* 5 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีเจริญเร็ว มีสีเขียวปนขาวจนถึงสีเขียวสด อาหารใต้โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง พบ chlamydospore รูปร่างค่อนข้างกลมเกิดระหว่างเส้นใย phialide มีรูปร่าง pin-shaped 5) กลุ่มเชื้อรา *T. viride* 1 ไอโซเลท โคโลนีเจริญเติบโตเร็ว โคโลนีมีลักษณะฟูสีขาว เมื่ออายุมากขึ้นมีการสร้างสปอร์จำนวนมากทำให้โคโลนีมีสีเขียวดำเข้ม ใต้โคโลนีสีไม่เปลี่ยนแปลง มีลักษณะเฉพาะคือ เมื่ออายุมากขึ้นจะสร้างกลิ่นเป็นกลิ่นมะพร้าว เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านมาก มีผนังกั้น phialide เกิดเดี่ยว ๆ ทำมุมเป็นมุมกว้างกับฐาน ลักษณะแบบลูกพินโบว์ลิ่ง ส่วน phialospore รูปร่างกลม 6) กลุ่มเชื้อรา *T. longibrachiatum* 19 ไอโซเลท โคโลนีเจริญอย่างรวดเร็ว โคโลนีมีลักษณะปุยแบบปุยฝ้าย และสร้างสปอร์สีเขียวมะกอกอ่อน ๆ ใต้โคโลนีสีไม่เปลี่ยน phialide จะมีรูปร่างแบบขวด ฐานแคบลงและส่วนปลายสั้น ส่วน phialospore มีรูปร่างแบบรูปไข่หัวกลับเหมือนกระสวย และมีฐานตัดตรงชัดเจน และ 7) กลุ่มเชื้อรา *T. koningii* 4 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีเจริญเร็ว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม สีของอาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยน เส้นใยแตกกิ่งก้านมาก มีผนังกั้น พบ chlamydospore รูปร่างกลม-รูปถังเบียร์ เกิดที่ปลายเส้นใย phialide มีรูปร่าง pin-shaped เกิดเป็นกลุ่มคล้ายกับเชื้อรา *T. harzianum* แต่การแตกกิ่งก้านจะทำมุมกว้างมากกับฐาน phialophore มีรูปร่างแบบกระสวยเหลี่ยม มีสีเขียวอ่อน-เขียว (ภาพที่ 1)

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP

จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามวิธีดัดแปลงจากวิธีของ White *et al.* (1990) เมื่อนำมาตรวจปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าให้ปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 25-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

เมื่อนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ universal primer ITS1 และ ITS4 พบว่าขนาดของดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส จากนั้นนำเอาผลผลิต PCR มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Eco*RI, *Bam*HI และ *Sma*I สามารถย่อยได้อย่างสมบูรณ์ โดยการตรวจสอบบน agarose gel electrophoresis โดยเอนไซม์ *Eco*RI ย่อยได้แถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาด 600 คู่เบส เอนไซม์ *Sma*I สามารถย่อยดีเอ็นเอได้แถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาด 550 และ 125 คู่เบส และเอนไซม์ *Bam*HI สามารถย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ดีเอ็นเอไม่ถูกย่อย ได้แก่ เชื้อรา *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. aureoviride* และ *T. viride* กลุ่มที่ 2 ได้แถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาด 480 และ 220 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. koningii* กลุ่มที่ 3 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 560 และ 140 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. pseudokoningii* (Castle *et al*., 1998) (ภาพที่ 2) เมื่อนำดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดพบว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *Eco*RI และ *Sma*I เมื่อนำมาย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 100 ไอโซเลท พบว่าแถบ ดีเอ็นเอที่ได้จะเหมือนกัน คือ 600 และ ขนาด 550 และ 125 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถบ่งบอกได้ว่า เชื้อราทั้งหมดเป็นเชื้อรา *Trichoderma* sp. ส่วนเอนไซม์ *BamH*I สามารถจัดกลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมดได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Castle *et al*.(1998) ที่ใช้เทคนิค RFLP ในการจัดจำแนก *Trichoderma* spp. ทั้ง 160 ไอโซเลท โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 7 ชนิด คือ *Hin*dIII, *Kpn*I, *Bgl*II, *Xba*I, *Bam*HI, *Sma*I และ *Eco*RI ผลการทดลองที่ได้ พบว่าเอนไซม์ที่สามารถจำแนกเชื้อรา

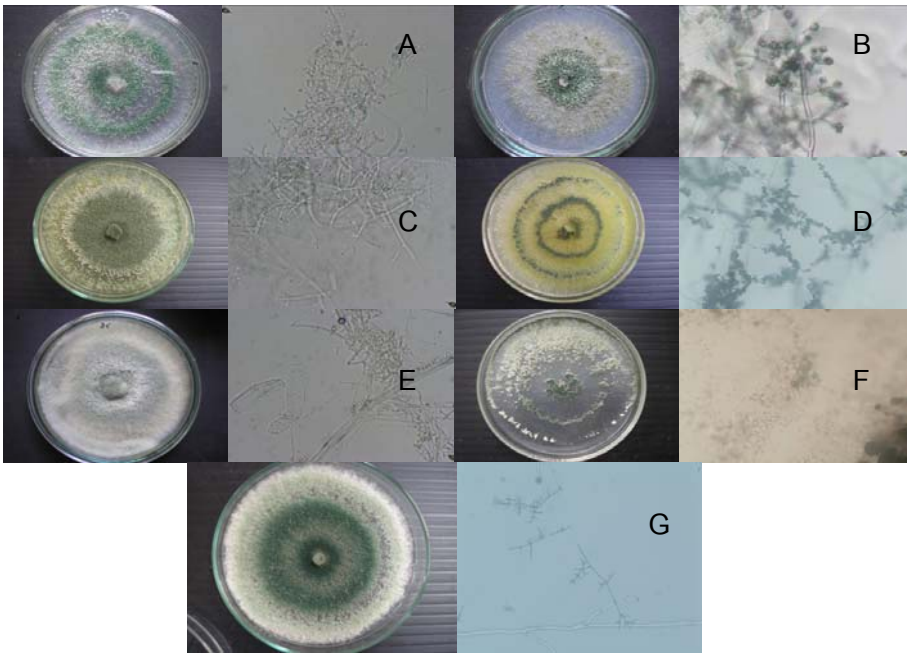

Figure 1 Colony and morphological characteristics of *Trichoderma* spp. isolates on potato dextrose agar were observed under compound microscope (400x). A: *T. harzianum*, B: *T. hamatum*, C: *T. aureoviride*, D: *T. pseudokonigii*, E: *T.viride*, F: *T. longibrachiatum* and G: *T. koningii*

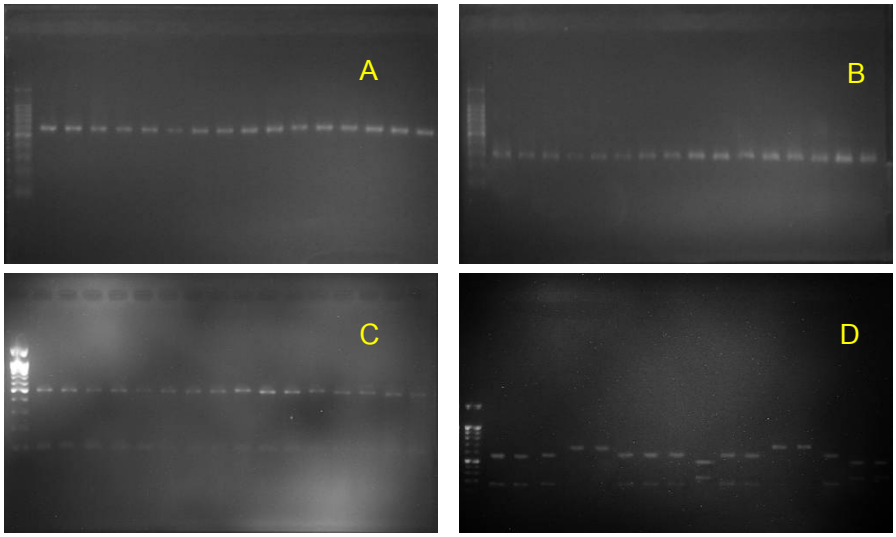

Figure 2 DNA fingerprint of *Trichoderma* spp. 100 isolates.
A: Polymerase chain reaction(PCR) technique by using universal primers ITS1 and ITS4.
B: PCR-RFLP technique by using restriction enzyme *Eco*RI.
C: PCR-RFLP technique by using restriction enzyme *Sma*I.
D: PCR-RFLP technique by using restriction enzyme *Bam*HI.

ได้มีอยู่ 3 ชนิด คือ *Bam*HI, *Sma*I และ *Eco*RI ซึ่งสามารถจำแนกเชื้อราได้ 3 กลุ่ม เช่นเดียวกันกับผลการทดลองที่ได้ แต่เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ สามารถจัดกลุ่มได้แบบคร่าว ๆ เท่านั้น ไม่เฉพาะเจาะจงลงไปในระดับ species เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้ทำการหาลำดับเบสของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

การวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-PC เพื่อจัดกลุ่มเชื้อราทั้ง 100 ไอโซเลท ซึ่งสามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ที่ค่า similarity 0.78 โดยกลุ่ม A ประกอบด้วยเชื้อรา *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. aureoviride* และ *T. viride* 71 ไอโซเลท กลุ่ม B ประกอบด้วยเชื้อรา *T. koningii* 4 ไอโซเลท และกลุ่ม C ประกอบด้วยเชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. pseudokoningii* 25 ไอโซเลท (ภาพที่ 3) ซึ่งจากการแบ่งกลุ่มโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวใช้ดีเอ็นเอต้นแบบในปริมาณน้อย เพราะดีเอ็นเอต้นแบบถูกนำมาเพิ่มปริมาณในขั้นตอนของการทำ PCR ซึ่งไปเพิ่มปริมาณยีน *Trichoderma* ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) 1 ยีน 5.8S และ ITS 2 ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับ universal primer ITS1 และ ITS4 ซึ่งลำดับเบสในส่วน ITS นี้มีความผันแปรมากในเชื้อราแต่ละ species ในการจัดจำแนก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน เพียงอย่างเดียวยังมีข้อจำกัด เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่จัดจำแนก species หรือสายพันธุ์ได้ยาก เชื้อราที่อยู่ใน species เดียวกันจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นถ้าใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจจะตัดสินใจได้ยากว่าเป็น species ใด (Stasz *et al*., 1989) นอกจากนี้การจำแนกชนิดโดยอาศัยการสืบพันธุ์แบบใช้เพศยังมีความสับสน คือ แต่ละ species ของ teleomorph อาจมี anamorph เป็น *Trichoderma* spp. มากกว่า 1 species ได้ (Samuels *et al*., 1994) นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นผลให้การจำแนก species หรือสายพันธุ์ยุ่งยากมากขึ้น ดังนั้นวิธีทางอณูวิทยาจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยในการจัดจำแนกเชื้อ ซึ่งผลที่ได้จะแน่นอนและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

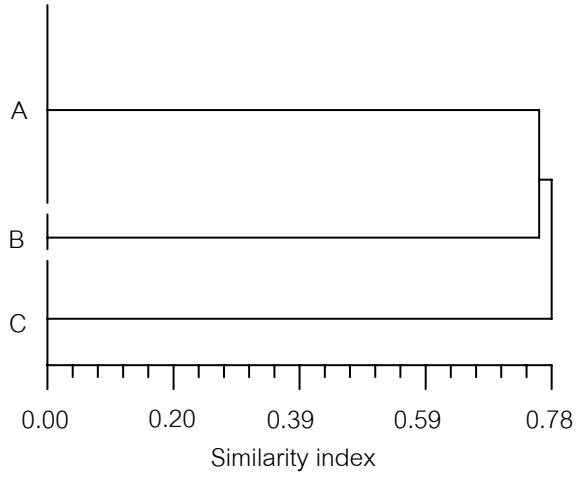

Figure 3 UPGMA dendrogram based on the DICE similarity index (SD) illustrating the genetic relationships among 100 *Trichoderma* isolates.
Group A: Isolates 1-44, 97, 96, 46, 50, 53, 58, 59, 61, 62, 47, 48, 49, 55, 64, 71, 74, 83, 84, 85, 89, 94, 72, 73, 79, 80, 81, 93, 52
Group B: Isolates 90, 100, 95, 99
Group C: Isolates 45, 51, 98, 54, 92, 88, 86, 87, 82, 91, 78, 76, 75, 77, 70, 67, 65, 63, 68, 66, 57, 56, 69 60

สรุปผลการทดลอง

แยกเชื้อราที่บริเวณ rhizosphere ของพริกใน 5 พื้นที่ ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 94 ไอโซเลท และ จากสารชีวภัณฑ์ ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 6 ไอโซเลท จากการจัดจำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม species

เมื่อทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการจัดจำแนกและการจัดกลุ่ม พบว่า เอนไซม์ *Eco*RI และ *Sma*I ไม่สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่นำมาศึกษาได้ แต่สำหรับเอนไซม์ *Bam*HI สามารถแบ่งเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 แถบ ดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 600 คู่เบสได้แก่ เชื้อรา *T. harzianum*, *T. hamatum, T. aureoviride* และ *T. viride* กลุ่มที่ 2 แถบ ดีเอ็นเอมีขนาด 480 และ 220 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. koningii* กลุ่มที่ 3 แถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาด 560 และ 140 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. pseudokoningii*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้เงินสนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ จงเลขา. 2540. เทคนิคขั้นพื้นฐานทางโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 119 หน้า.

Castle, A.J., D. Speranzini, N. Rghei, G. Alm, D. Rinker and J. Bissett. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. Applied and Environmental Microbiology 64: 133-137.

Larkin, R.P. and D.R. Fravel. 1998. Efficacy of various fungal and bacteria biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. Plant Disease 82: 1022-1028.

Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers No.116, Commonwealth Mycological Institute, Kew. 56 pp.

Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exeter Software, Setauket, New York. 206 pp.

Samuels, G.J., O. Petrini and S. Manguin. 1994. Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. Mycologia 86: 421-435.

Stasz, T.E., K. Nixon, G.E. Harman, N.F. Weeden and G.A. Kuter. 1989. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozyme polymorphism. Mycologia 81: 391-403.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics., pp. 315-322. *In*: M.A. Innis , D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.

Yap, I.V. and R.J. Nelson. 1996. Winboot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-based Dendograms. IRRI Discussion Paper Series No.14. International Rice Research Institute, Manila.