

การคัดเลือกเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วเหลืองเพื่อควบคุม
โรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง

**Selection of Fungi Associated with Soybean Seed
for Controlling of Soybean Anthracnose**

สิทธิศักดิ์ แสนไพศาล^{1/} และ สมบัติ ศรีชูวงศ์^{1/}

Sitthisak Saepaisal^{1/} and Sombat Srechuwong^{1/}

Abstract : Detection of seedborne fungi in 6 cultivars of soybean seed samples was conducted by using Blotter Method. Twenty fungal isolates were found and identified to be in 12 genera. *Cladosporium* sp., *Cercospora* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Macrophomina phaseolina*. *Cladosporium* sp. were found at the highest percentage in cultivars CM 1, CM 2, CM 60, SJ 4, SJ 5 and Doi Kham respectively. Sixteen isolates of all which grew well were tested *in vitro* on efficacy of being antagonist, to inhibit growth of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose disease of soybean, using Dual Culture Technique. It was found that the isolate of *Trichoderma* sp. gave higher percentage of growth inhibition (80.05%). This fungus showed its capability of parasite by penetrating its mycelium into the pathogen's mycelium, grew inside and then made the mycelium collapsed. Comparison on effectiveness of *Trichoderma* sp. and the thiram fungicide in controlling *C. truncatum* on soybean seed, cultivar CM 2, by seed dressing. It was found that both *Trichoderma* and thiram reduced incidence of diseases and enhanced increasing the percentage of seed germination but thiram showed higher effectiveness, significant difference than *Trichoderma*.

^{1/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

บทคัดย่อ: ตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วเหลือง 6 พันธุ์ ด้วยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น พบเชื้อรา 20 ไอโซเลท จำแนกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่ เชื้อรา *Cladosporium* sp., *Cercospora* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Macrophomina phaseolina* และ *Cladosporium* sp. เป็นเปอร์เซ็นต์สูงสุดในพันธุ์ ชม.1, ชม.2, ชม.60, สจ.4, สจ.5 และพันธุ์ คอยคำตามลำดับ เลือกเชื้อราที่เจริญดี 16 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองโดยวิธี Dual Culture พบว่าไอโซเลทที่เป็นเชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* sp.) มีการยับยั้งสูงถึง 80.05 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรานี้แสดงการเป็นปรสิตโดยเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุด้วยการแทงทะลุเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยทำให้เชื้อราสาเหตุเหี่ยวลงในเวลาต่อมา ผลการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาและสารกำจัดเชื้อราไซแรม ในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรค แอนแทรคโนส *C. Truncatum* บนเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.2 โดยการคลุกเมล็ด พบว่าทั้งไตรโคเดอร์มาและไซแรมสามารถลดการเกิดโรคและช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอก แต่ไซแรมให้ประสิทธิภาพสูงกว่าไตรโคเดอร์มาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Index words: ถั่วเหลือง โรคแอนแทรคโนส

Colletotrichum truncatum, *Trichoderma* sp., soybean, seedborne, disease

คำนำ

โรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* พบในเขตอบอุ่นขึ้น ในเขตนาว เขตอบอุ่นและเขตร้อน โดยทำให้ผลผลิตถั่วเหลืองลดลง 10 – 26 เปอร์เซ็นต์ ในประเทศไทย 30 – 35 เปอร์เซ็นต์ และในประเทศบราซิล และอินเดีย เสียหายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Sinclair, 1989) ถ้าเชื้อทำลายบริเวณลำต้นจะทำให้ผลผลิตลดลงเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าเข้าทำลายบริเวณฝัก ผลผลิตจะลดลงมากและการระบาดเป็นไปอย่างรวดเร็ว (Sinclair, 1982) และโรคแอนแทรคโนสอาจจะมีผลต่อเมล็ดโดยตรงทำให้คุณภาพและผลผลิตลดลงซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่เกิดขึ้นกับถั่วเหลืองที่ปลูกในเขตร้อนและเขตร้อนชื้น ซึ่งรวมทั้งในประเทศไทยด้วย (Neergaard *et al.*, 1999)

การป้องกันและกำจัดโดยทั่วไปนิยมใช้สารคลุกเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูกเพื่อให้ปลอดภัยจากการเข้าทำลายของเชื้อ ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

(ชาตรี, 2539) แต่ต้องประสบปัญหาเกี่ยวกับการใช้สารกำจัดศัตรูพืชที่เกินความจำเป็นและไม่ถูกวิธี ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาก็คือศัตรูพืชมีความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและการใช้สารเหล่านี้อย่างไม่ถูกต้องยังอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวและการพัฒนาสายพันธุ์ต้านทานต่อสาร แนวทางการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นมาตรการหนึ่งที่สามารถลดหรือทดแทนการใช้สารกำจัดศัตรูพืชและเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด

ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาแนวทางในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองโดยชีววิธี เนื่องจากบนเมล็ดถั่วเหลืองมีรายงานการตรวจพบจุลินทรีย์หลายชนิดที่เจริญอยู่ร่วมกันทั้งที่เป็นเชื้อสาเหตุและไม่ได้เป็นเชื้อสาเหตุโรค (Sinclair, 1982; Anwar *et al.*, 1995; สมบัติ, 2544) ซึ่งอาจจะมีการยับยั้งกันเองเกิดขึ้นตามธรรมชาติบนเมล็ด ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาความน่าจะเป็นไปได้ที่จะใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการ

ยับยั้งดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ โดยมุ่งเน้นที่จะนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนเมล็ดถั่วเหลือง และคาดหวังว่าจะสามารถนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพนี้ไปเผยแพร่ให้เกษตรกรเพื่อใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองโดยชีววิธีและสามารถลดการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในการป้องกันกำจัดโรคของถั่วเหลืองได้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

สุ่มตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลือง 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ ชม.1, ชม.2, ชม.60, สจ.4, สจ.5, และพันธุ์คอย คำมาตรฐานหาเชื้อราบนเมล็ดด้วยวิธี Blotter method (การเพาะบนกระดาษชื้น) ทำการทดลองถั่วเหลือง แต่ละพันธุ์ 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด และทำการแยกเชื้อราแต่ละชนิดเก็บเป็น Stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส

2.1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. truncatum*

นำเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองมาทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. truncatum* โดยวิธี Dual culture บนอาหาร PDA ทำการทดลอง 5 ซ้ำ บ่มเชื้อ

ไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกต บันทึกผล และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราแต่ละชนิดต่อเชื้อรา *C. truncatum* จากสูตร $(R_1 - R_2 / R_1) \times 100$ โดยที่ R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *C. truncatum* ในจานชุดควบคุม และ R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *C. truncatum* ในจานชุดทดสอบ R_1

2.2 ศึกษาปฏิกริยาของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *C. truncatum*

ในการศึกษาใช้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *C. truncatum* ซึ่งได้จากการทดลองที่ 2.1 มาทำ Slide culture โดยวิธี Dual slide culture บนอาหาร PDA และเมื่อเชื้อราปฏิปักษ์เจริญคลุม เชื้อรา *C. truncatum* นำมาศึกษาคูปฏิกริยาการยับยั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.2 ในระยะต้นกล้าในโรงเรือนเปรียบเทียบกับสารฆ่าเชื้อราคลุกเมล็ด

นำเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.2 ที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นชุดควบคุมไม่ปลูกเชื้อ ส่วนที่ 2 เป็นชุดปลูกเชื้อโดยการนำเมล็ดมาแช่ลงใน suspension ของเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* นาน 30 นาที แล้วนำมาผึ่งนาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแบ่งเมล็ดดังกล่าวออกเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกนำไปแช่ใน suspension ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ส่วนที่สองนำไปปลูกกับสารฆ่าเชื้อรา thiram อัตรา 3 กรัม/เมล็ด 1 กิโลกรัม และส่วนสุดท้ายเป็นชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 หูดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)
 กรรมวิธีที่ 2 หูดควบคุมปลูกเชื้อราสาเหตุ
C. truncatum อย่างเดียว
 กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อรา *C. truncatum* +
Trichoderma sp.
 กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อรา *C. truncatum* +
 สารฆ่าเชื้อราคลุกเมล็ด
 thiram
 กรรมวิธีที่ 5 หูดควบคุมเมล็ดคลุกสารฆ่าเชื้อ
 รา thiram อย่างเดียว

นำเมล็ดทั้งหมดที่เตรียมไว้มาปลูกในดิน
 ฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งบรรจุในตะกร้าขนาด 35x45x12 หลัง
 จากนั้น 14 วัน จึงทำการประเมินผลถึงประสิทธิภาพ
 ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อการควบคุม
 โรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง โดยตรวจจาก
 เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดถั่วเหลืองและนำข้อ
 มูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลอง

1. การตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมา กับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

จากการตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อ
 ราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ทั้ง 6 พันธุ์ ด้วยวิธี
 Blotter method พบว่ามีเชื้อราติดมากับเมล็ดทั้งหมด
 12 genus 20 species ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A.*
niger, *Cladosporium* sp., *Colletotrichum truncatum*,
Curvularia sp., *Fusarium* sp., *Fusarium* spp. (5
 Isolate), *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium*
 sp., *Phomopsis* sp., *Chaetomium* sp., *Cercospora*
 sp., *Myrothecium* sp. และ *Trichoderma* sp. โดยใน
 ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์พบทั้งชนิดและปริมาณของเชื้อ
 ราที่แตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อเปรียบ

เทียบเชื้อรา *C. truncatum* ในถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์
 พบว่ามีปริมาณ 0-2.00 เปอร์เซ็นต์ โดยในพันธุ์
 ชม.2 มีปริมาณเชื้อรา *C. truncatum* มากที่สุด คือ
 2.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากถั่วเหลืองอีก 5 พันธุ์
 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความงอกของเมล็ด
 ถั่วเหลือง พบว่าพันธุ์ ชม.2 และ สจ.5 มีความงอกสูง
 ที่สุด (97 เปอร์เซ็นต์) และพันธุ์ ชม.1 มีความงอก
 ต่ำสุด (68 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 1)

2. การคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลือง ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. truncatum* สาเหตุ โรคแอนแทรคโนส

2.1 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ
 เชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองในการยับยั้งการ
 เจริญของเชื้อรา *C. truncatum*

นำเชื้อรา 16 Isolate ที่แยกได้จากเมล็ด
 ถั่วเหลืองมาใช้ในการทดสอบ โดยบันทึกผลและ
 เปรียบเทียบผลการทดลองที่ 7, 9 และ 12 วัน แล้วนำ
 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ดังตารางที่ 2 ผลการทดสอบที่
 เวลา 7, 9 และ 12 วัน พบว่าเชื้อราที่มีประสิทธิภาพใน
 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. truncatum* ได้ดีที่สุด
 คือ เชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยที่ 7 และ 9 วัน มี
 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 62.14 เปอร์เซ็นต์ และ
 72.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ 12 วัน มี
 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุดโดยสามารถยับยั้งได้
 80.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัย
 สำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบ
 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 7 และ 9 วัน และเมื่อเปรียบเทียบ
 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับเชื้อราแต่ละชนิดที่นำ
 มาทดสอบที่ 7 และ 9 วัน พบว่ามีความแตกต่างกัน
 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดย
 เชื้อรา *Trichoderma* sp. จะเจริญคลุมทับเชื้อรา
 สาเหตุ *C. truncatum* (ภาพที่ 1) และเมื่อประมาณ

ค่าการยับยั้งเชื้อราพบว่าที่เวลา 7 และ 9 วัน เชื้อรา *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงและ
ที่เวลา 12 วัน พบว่าเชื้อราดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

Table 1 Percentage of fungi associated with the seeds of different soybean cultivars.

Fungi	Soybean cultivars (%)						LSD (p=0.05)
	CM 1	CM 2	CM 60	SJ 4	SJ 5	Doi Kham	
<i>Aspergillus flavus</i>	16.25 a ¹ (B) ¹	2.25 c (BCD)	3.00 bc (BC)	2.25 c (BC)	5.25 b (B)	4.50 bc (BC)	2.71
<i>Aspergillus niger</i>	1.50 bc (D)	3.50 ab (BC)	1.25 bc (C)	4.50 a (A)	3.50 ab (BCD)	1.00 c (DE)	2.49
<i>Cladosporium</i> sp.	38.25 a (A)	1.25 b (BCD)	1.00 b (C)	3.50 b (AB)	1.50 b (CDE)	10.50 b (A)	11.58
<i>Colletotrichum truncatum</i>	0 c (D)	2.00 a (BCD)	0.50 bc (C)	0.25 bc (CD)	0 c (E)	1.00 b (DE)	0.97
<i>Curvularia</i> sp.	12.00 a (BC)	4.00 b (B)	0.50 b (C)	2.75 b (AB)	4.00 b (BC)	2.00 b (CDE)	7.96
<i>Fusarium</i> sp.	4.75 ab (CD)	2.00 bc (BCD)	3.25 ab (BC)	0 c (D)	2.25 bc (BCDE)	6.00 a (B)	3.21
<i>Fusarium</i> spp. (5 Isolate)	6.00 c (CD)	0.50 b (CD)	1.00 b (C)	0.25 b (CD)	2.00 b (BCDE)	2.50 b (CDE)	2.94
<i>Macrophomina phaseolina</i>	0 c (D)	3.75 bc (BC)	6.00 ab (BC)	0 c (D)	9.00 a (A)	3.50 bc (BCD)	4.8
<i>Penicillium</i> sp.	2.25 b (D)	1.00 b (BCD)	40.00 a (A)	3.25 b (AB)	1.75 b (CDE)	0.50 b (E)	9.34
<i>Phomopsis</i> sp.	0.75 ab (D)	2.75 a (BCD)	3.25 a (BC)	0 c (D)	2.25 ab (BCDE)	1.75 ab (DE)	2.71
<i>Chaetomium</i> sp.	0 c (D)	4.00 ab (B)	4.50 a (BC)	0.50 c (CD)	1.00 c (CDE)	1.25 bc (DE)	2.77
<i>Cercospora</i> sp.	11.25 a (BC)	8.75 ab (A)	7.75 ab (B)	0 c (D)	1.25 c (CDE)	4.50 bc (BC)	5.88
<i>Myrothecium</i> sp.	0.25 a (D)	1.00 a (BCD)	0.50 a (C)	0 a (D)	0.50 a (DE)	0 a (E)	1.25
<i>Trichoderma</i> sp.	0 a (D)	1.00 a (D)	0.25 a (C)	0 a (D)	0.25 a (DE)	0 a (E)	0.43
LSD (p=0.05)	8.2	3.42	6.18	2	3.36	2.71	
germination (%)	68	97	94	95	97	92	

¹ Mean in column / row followed by are not significantly different at p = 0.05 according to common letter LSD

(Letter out parenthesis comparison row, in parenthesis comparison column)

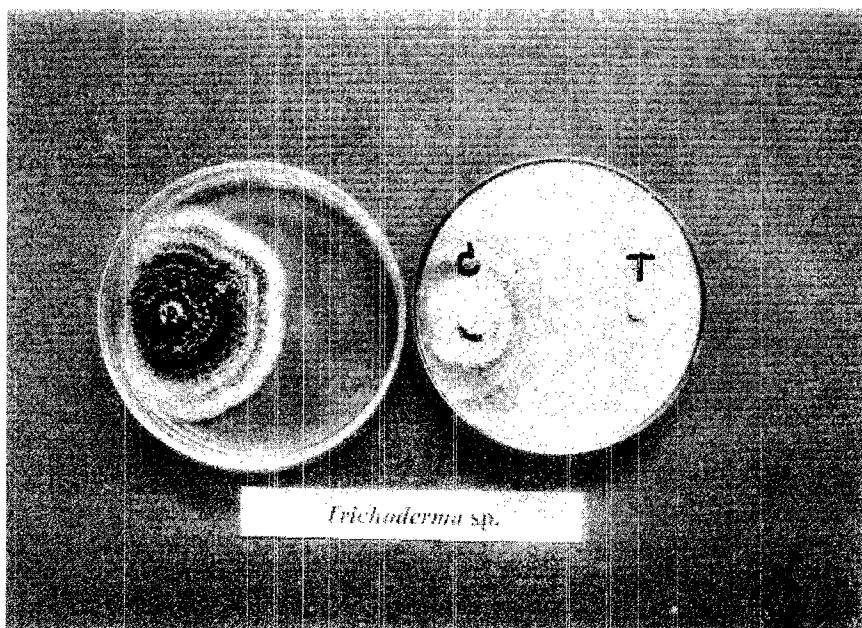


Figure 1 Control and Dual culture of *Trichoderma* sp. against *Colletotrichum truncatum* at 12th day.

Left = Radial growth of *C. truncatum* (Control)

Right = Dual culture of *Trichoderma* sp. (T) against *C. truncatum* (C)

2.2 ผลการศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *C. truncatum*

จากการศึกษาที่ 2.1 เชื้อรา *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. truncatum* จึงได้นำเชื้อรา *Trichoderma* sp. มาศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งต่อเชื้อรา *C. truncatum* พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็นปรสิตรต่อเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* โดยการสร้างเส้นใยแทงเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* เหี่ยวแฟบลง (ภาพที่ 2)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองพันธุ์ชม.2 ในระยะต้นกล้าในโรงเรือนเปรียบเทียบกับสารฆ่าเชื้อราคลุกเมล็ด

จากการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองที่ปลูกด้วยเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* เปรียบเทียบกับสารฆ่าเชื้อราคลุกเมล็ด thiram หลังจาก 14 วันวิเคราะห์ผล โดยตรวจนับจากเปอร์เซ็นต์ความงอกต้นกล้าปกติ ต้นกล้าไม่ปกติ และต้นกล้าที่ตายก่อนงอก และหลังงอก พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดถั่วเหลือง ที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อราสาเหตุ

Table 2 Comparison on effectiveness 16 isolate of fungi to inhibit growth of *Colletotrichum truncatum* in Dual culture at 7, 9 and 12 day after incubation.

Fungi	growth inhibition (%) ^{1/}		
	7 days	9 days	12 days
<i>Trichoderma</i> sp.	62.14	72.24	80.05
<i>Macrophomina phaseolina</i>	50.92	63.50	73.78
<i>Myrothecium</i> sp.	-1.53	23.40	44.59
<i>Curvularia</i> sp.	28.58	46.54	61.59
<i>Aspergillus flavus</i>	32.04	49.69	63.46
<i>Aspergillus niger</i>	51.60	64.53	74.15
<i>Chaetomium cupreum</i>	12.39	34.74	53.10
<i>Chaetomium globosum</i>	3.31	21.93	37.61
<i>Chaetomium tortile</i>	-11.42	17.73	39.43
<i>Fusarium</i> sp. I1 ^{2/} (<i>F. moniliforme</i>)	30.65	49.16	63.46
<i>Fusarium</i> sp. I 2 (<i>F. equiseti</i>)	26.35	43.97	59.74
<i>Fusarium</i> sp. I 3 (<i>F. oxysporum</i>)	25.05	45.05	60.14
<i>Fusarium</i> sp. I 4 (<i>F. solani</i>)	38.40	53.34	66.45
<i>Fusarium</i> sp. I 5 (<i>F. semitectum</i>)	39.07	54.32	67.13
<i>Fusarium</i> sp. I 6	41.86	57.36	69.35
<i>Phomopsis</i> sp.	47.43	60.93	71.92

^{1/} comparison of mean conducted split plot

LSD_(0.01) = 9.33

LSD_(0.05) = 6.64

CV_A (%) = 22.73

CV_B (%) = 6.02

^{2/} I1 = Isolate 1

I2 = Isolate 2

I3 = Isolate 3

I4 = Isolate 4

I5 = Isolate 5

I6 = Isolate 6

C. truncatum ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าในเมล็ดที่ผ่านการปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ร่วมกับคลุกสารฆ่าเชื้อรา thiram และในชุดที่คลุกสารฆ่าเชื้อรา thiram อย่างเดียวคือ 95 เปอร์เซ็นต์ และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ผ่านการปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* อย่างเดียวซึ่งมีค่าเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเมล็ดที่ปลูกเชื้อ *C. truncatum* ร่วมกับเชื้อรา

Trichoderma sp. ตายหลังออก 3.25 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าเมล็ดที่ปลูกเชื้อ *C. truncatum* อย่างเดียว (7.25 เปอร์เซ็นต์) แต่มากกว่าเมล็ดที่ปลูกเชื้อ *C. truncatum* ร่วมกับสารเคมี thiram (1.75 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยชุดควบคุม(0 เปอร์เซ็นต์) เมล็ดปลูกเชื้อ *C. truncatum* ร่วมกับสารเคมี thiram (1.75 เปอร์เซ็นต์) และ เมล็ดที่คลุกสารเคมี thiram อย่างเดียว(0 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 3

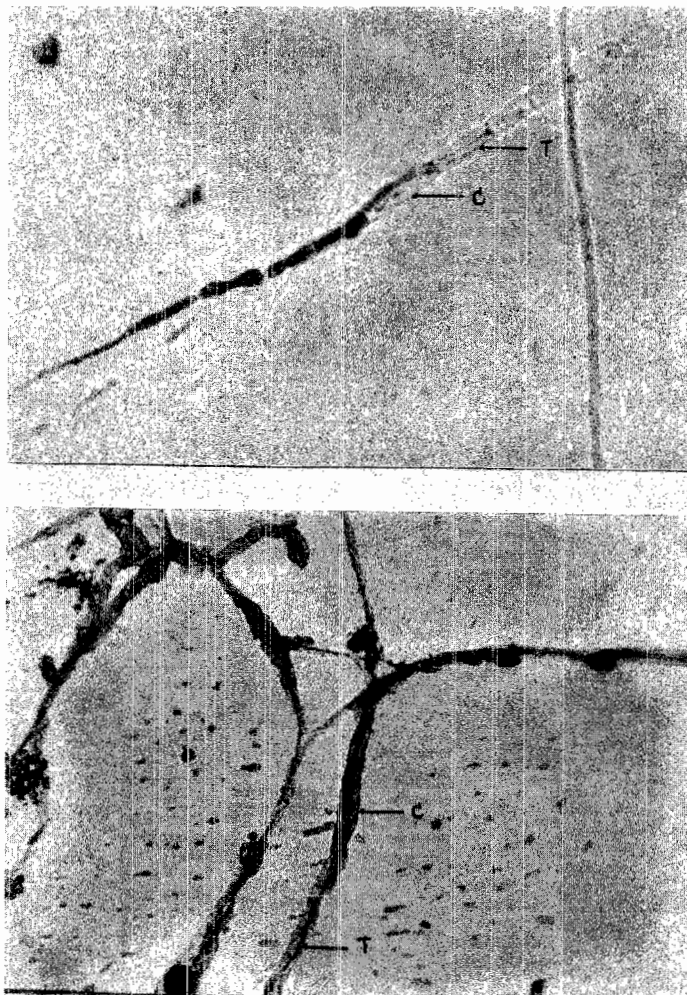


Figure 2 Parasitism of *Trichoderma* sp. on hypha of *Colletotrichum truncatum*, hypha of *Trichoderma* sp. (T) penetrated into *C. truncatum* (C) hypha (above) and than made the hyphae collapsed.

สำหรับอาการผิดปกติของต้นกล้าถั่วเหลือง พบว่าเมล็ดที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ใบเลี้ยงของต้นกล้าที่ออกยากเมื่อเปรียบเทียบกับ ชุดควบคุมและต้นกล้าที่งอกจะตายหลังงอก โดย เกิดแผลสีน้ำตาลบริเวณยอดและใบเลี้ยง ส่วนต้นที่ รอดพบแผลสีน้ำตาลที่ใบเลี้ยง และโคนต้น ส่วนเมล็ด ที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ร่วมกับเชื้อรา ปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. พบว่าต้นกล้าที่ใบเลี้ยง

ออกได้ดีกว่าเมล็ดที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* อย่างเดียว แต่ให้ผลไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ร่วมกับสารฆ่าเชื้อ รากลูกเมล็ด thiram ซึ่งมีแผลบริเวณใบเลี้ยงแต่พบ น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* อย่างเดียว และก็ยังพบต้นกล้าตายหลัง งอกแต่ในปริมาณที่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* อย่างเดียว (ภาพที่ 3)

Table 3 Efficacy of seed treatment with *Trichoderma* sp. on seed germination, mortality and seedling of soybean cultivar CM 2 under glasshouse condition.

Method	Seed germination (%)	Pre- emergence damping off (%)	Post- emergence damping off (%)	Normal seedling (%)	Abnormal seedling (%)
Control	98 a	1.50 c	0 c	98.00 a	1.50 c
<i>C. truncatum</i>	87 b	12.50 a	7.25 a	0 d	80.25 a
<i>C. truncatum</i> + <i>Trichoderma</i> sp.	90 b	8.50 bc	3.25 b	34.50 c	58.00 b
<i>C. truncatum</i> +thiram	95 a	5.00 ab	1.75 c	90.50 b	4.50 c
thiram	98 a	1.75 c	0 c	96.75 a	1.75 c
CV %	2.84	54.76	30.43	4.04	12.98

Mean in column followed by common letter are not significantly different at p=0.05 according to LSD



Figure 3 Comparison of using *Trichoderma* sp. and seed dressing with thiram for control of *Colletotrichum truncatum* under glasshouse condition.

A = control and treated with *Colletotrichum truncatum*

B = control and treated with *Colletotrichum truncatum* + *Trichoderma* sp.

C = control and treated with *Colletotrichum truncatum* + thiram

D = control and treated with thiram

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 6 พันธุ์ คือ พันธุ์ชม.1, ชม.2, ชม.60, สจ.4, สจ.5 และ พันธุ์ค้อยคำ พบเชื้อราชนิดต่าง ๆ ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ในปริมาณที่แตกต่างกันของแต่ละพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sinclair (1982); Anwar *et al.* (1995); สมบัติ (2544) การตรวจพบเชื้อราทั้งชนิดและปริมาณจะแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพันธุ์พืช การจัดการพืช แหล่งปลูกและฤดูปลูก เชื้อราที่พบติดมากับเมล็ดนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เชื้อราที่ติดมาจากในไร่ (field fungi) โดยเชื้อรานี้เข้าทำลายพืชตั้งแต่เมล็ดมีการพัฒนาจนกระทั่งใกล้เก็บเกี่ยว ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราสาเหตุโรค เช่น *Colletotrichum truncatum*, *Fusarium moniliforme*, *F. semitectum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* และ *Phomopsis* sp. เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองเป็นเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยว (storage fungi) ส่วนใหญ่ไม่เป็นสาเหตุโรคแต่ทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. niger* และ *Penicillium* sp. ซึ่งในแง่ของเมล็ดพันธุ์แล้วเชื้อราที่ติดมาจากในไร่จะมีความสำคัญกว่าเชื้อราในโรงเก็บ (Neergaard, 1979)

สำหรับการคัดเลือกเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *C. truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลือง จำนวน 16 Isolate นำมาทำการทดสอบด้วยวิธี Dual culture พบว่าที่เวลา 12 วัน ของการทดสอบเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. truncatum* สูงถึง 80.05 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราแต่

ละชนิดที่นำมาทดสอบที่ 7 และ 9 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% และได้้นำเชื้อราดังกล่าวมาศึกษาปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *C. truncatum* โดยวิธี Dual slide culture พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. เป็นปรสิตรต่อเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* โดยพบเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สร้างเส้นใยแทงทะลุเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยของเชื้อรา *C. truncatum* ทำให้เส้นใยของราสาเหตุแฟบลงในเวลาต่อมา ซึ่งคล้ายกับรายงานของ Bruckner and Przybylski (1984) และ Ridout *et al.* (1988) ที่กล่าวว่า เชื้อรา *T. hamatum*, *T. viride* เป็นปรสิตรต่อเชื้อราสาเหตุโรค โดยแทงเข้าไปทำให้เส้นใยเหี่ยวและแฟบลง และเชื้อราปฏิปักษ์เหล่านี้มีการผลิตเอนไซม์ B-1, 3-glucanase, chitinase, cellulase และ protease สลายผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราสาเหตุ

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองพันธุ์ชม. 2 ในระยะต้นกล้า โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองที่ปลูกด้วยเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* พบว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* เพียงอย่างเดียวมีความงอก 87 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ซึ่งมีความงอก 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% โดยหาคะควบคุม เมล็ดที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ร่วมกับสารฆ่าเชื้อรา thiram และเมล็ดที่คลุกสารฆ่าเชื้อรา thiram อย่างเดียว มีความงอกเท่ากับ 98, 95 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับต้นกล้าที่ได้จาก

การปลูกเชื้อรา *C. truncatum* พบว่าใบเลี้ยงคลีออกยากและ ต้นกล้าที่งอกจะตายหลังงอก โดยเกิดแผลสีน้ำตาลบริเวณยอดและใบเลี้ยง ต้นกล้าเน่าระดับดินนั้น ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของ Neergaard *et al.* (1999) ที่กล่าวว่าตำแหน่งการเข้าทำลายของเชื้อจะพบบนเปลือกเมล็ดถึง 89.1 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้าทั้งหมดจะแสดงอาการจุดแผลบนใบเลี้ยงและต้นกล้าแห้งตายหรือเน่าระดับดิน (seedling blight / damping-off) ส่วนเมล็ดที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. เมล็ดจะสามารถคลีใบเลี้ยงออกได้ดีกว่า เนื่องจากเมล็ดที่ผ่านการแช่กับเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. นั้นพบว่าเชื้อราปฏิปักษ์จะไปเกาะอยู่กับเมล็ดส่วนเปลือกส่งผลต่อเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* ที่อยู่บริเวณเปลือกเมล็ดทำให้ช่วยลดการเกิดโรคลงได้

ผลจากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองสูงในสภาพห้องทดลอง ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. truncatum* ได้โดยเป็นปรสิตรกับเชื้อราสาเหตุรวมทั้งมีการเจริญที่เร็วทำให้แย่งพื้นที่อาศัยของเชื้อราสาเหตุโรค ส่งผลให้เชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* หยุดชะงักการเจริญเติบโตได้ และเมื่อนำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองในระยะต้นกล้าพบว่า ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมี thiram และทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงในช่วงแรก แต่เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในภาพรวมแล้วทำให้ต้นกล้าถั่วเหลืองมีอัตราการเจริญดีกว่าในชุดที่ไม่ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. และเปอร์เซ็นต์ความงอกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ปลูกเชื้อราสาเหตุ *C. truncatum* อย่างเดียว

ดังนั้นในงานวิจัยนี้สามารถนำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเหลืองมาใช้ร่วมกับวิธีอื่น ๆ ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมและเพื่อลดการใช้สารเคมี และเพื่อเป็นแนวทางในการทดสอบควบคุมหรือเป็นข้อมูลที่จะอาจเป็นประโยชน์ในการศึกษาครั้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ชาติรี สิริทกุล. 2539. โรคของพืชไร่. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 248 หน้า.
- สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2544. ระบาดวิทยาและการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคถั่วเหลืองที่แพร่โดยทางเมล็ดพันธุ์. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 42 หน้า.
- Anwar, S.A., S.F. Abbas, M.M. Gill, C.A. Rauf, S. Mahmood, and A.R. Bhutta. 1995. Seed-borne fungi of soybean and their effect on seed germination. *Phytopathology* 7(20): 184-190.
- Bruchner, H. and M. Przybylski. 1984. Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by HPLC with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 296: 263-275.
- Neergaard, E.D., C. Tome and A.M. Norskov. 1999. *Colletotrichum truncatum* in soybean : studies of seed infection. *Seed Sciences and Technology* 27: 911- 921.
- Neergaard, P. 1979. Seed Pathology. Volume 1. The Macmillan Press, Ltd. London. 896 p.

- Ridout, C.J., J.R. Coley-Smith and J.M. Lynch. 1988. Fractionation of extracellular enzymes from a Mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. Enzyme and Microbial Technology 10: 180-187.
- Sinclair, J.B. 1982. Compendium of Soybean Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 104 pp.
- Sinclair, J.B. and P.A. Backman. 1989. Compendium of Soybean Diseases. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 106 p.
-