การยับยั้งเชื้อรา Phytophthora parasitica ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดินในเขตพื้นที่ ตำบลกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

Inhibition of Phytophthora parasitica by Antagonistic Molds from Soil's Kuiburi Subdistrict, Prachuap Khiri Khan Province

วนิดา ชื่นชัน* สุกันยา รักษาสระน้อย สมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์ และ วรรณกร กิจจะ
Wanida Chuenchan Sukanya Raksasanoy Somsak Yooboriboon and Wannakorn Kitja
สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
วันที่ส่ง : 23 มกราคม 2562 วันที่แก้ไข : 7 พฤษภาคม 2562 วันที่ตอบรับ : 14 พฤษภาคม 2562

บทคัดย่อ

การยับยั้งเชื้อรา Phytophthora parasitica ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดิน ในเขตพื้นที่ ตำบลกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง จำนวน 5 จุด ของพื้นที่ปลูกสับปะรด และนำมาคัดแยกด้วยวิธี Serial dilution spread plate สามารถคัดแยกเชื้อราปฏิปักษ์ได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท จัดจำแนกเชื้อราโดยอาศัยสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิค Slide culture ได้ 11 ชนิด ใน 5 สกุล คือ Acremonium sp., Aspergillus spp., Penicillium spp., Trichoderma sp., และ Syncephalastrum sp. เมื่อนำเชื้อราทั้งหมดที่คัดแยกได้ มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา P. parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด ด้วยวิธี Dual technique พบว่า Trichoderma harzianum MKB 11 (86.28%) และ MKB 01 (81.51%) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา P. parasitica ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ Aspergillus niger MKB 12 (59.30%) และ Aspergillus oryzae MKB 06 (55.81%) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อรา Trichoderma harzianum MKB 01 และ MKB 11 มีศักยภาพที่ดีที่สุดในการนำมาควบคุมเชื้อรา P. parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด

คำสำคัญ : สับปะรด เชื้อราปฏิปักษ์ โรครากเน่า

---

*ที่อยู่ที่ติดต่อ. E-mail address: Wanida.ch@bsru.ac.th

Abstract

The research, Inhibition of Phytophthora parasitica by Antagonistic Molds from Soil's Kuiburi Subdistrict, Prachuap Khiri Khan Province was conducted with random sampling in 5 points of the pineapple planting area by using a method of serial dilution spread plate. The antagonistic molds could be sorted out in 13 isolates and could be identified by morphology characteristic with slide culture technique. They were identified into 5 genera and 11 species including: Acremonium sp., Aspergillus spp., Penicillium spp., Trichoderma sp., and Syncephalastrum sp. While all the fungi were sorted to test the effectiveness in inhibiting P. parasitica, the cause of root rot in pineapple with dual technique, it could be found that Trichoderma harzianum MKB 11 (86.28%) and MKB 01 (81.51%) were the most effective in inhibiting the growth of P. parasitica, followed by Aspergillus niger MKB 12 (59.30%) and Aspergillus oryzae MKB 06 (55.81%). The result showed that Trichoderma harzianum MKB 11 and MKB 01 had the best potential for controlling P. parasitica, the cause of root rot in pineapple.

Keywords : Pineapple, Antagonistic fungi, Root rot

1.บทนำ

สับปะรด (Ananas comosus) เป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย สามารถปลูกได้ทุกแห่งโดยเฉพาะพื้นที่ใกล้ทะเล เช่น เพชรบุรี ระยอง ชลบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา และประจวบคีรีขันธ์ ในเขตพื้นที่ตำบลกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มีสภาพดินเป็นลักษณะดินปนทราย และดินเหนียวบางแห่ง ทำให้สภาพดินเหมาะสำหรับการปลูกสับปะรด เกษตรกรในพื้นที่จึงนิยมปลูกเป็นจำนวนมากและปลูกสม่ำเสมอตลอดปี มีโรงงานแปรรูปสับปะรดกระป๋องอยู่ในเขตเทศบาล ถึง 2 แห่ง ได้แก่ บริษัทกุยบุรีผลไม้กระป๋อง จำกัด และบริษัทผลไม้กระป๋องประจวบ จำกัด ในปัจจุบันเกษตรกรนิยมปลูกกันมากยิ่งขึ้น เนื่องจากราคาสับปะรดอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างสูง การส่งออกสับปะรดกระป๋อง ขยายตัวเพิ่มขึ้น โรงงานจึงแบ่งปันราคารับซื้อวัตถุดิบเพื่อให้เพียงพอแก่กำลังผลิตที่มีอยู่ แหล่งเพาะปลูกที่สำคัญและมีการปลูกมากที่สุด อยู่ในหมู่ที่ 3 และหมู่ที่ 4 ตำบลกุยบุรี โดยปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ปลูกทั้งขายส่งโรงงานแปรรูปและขายผลสด [1]

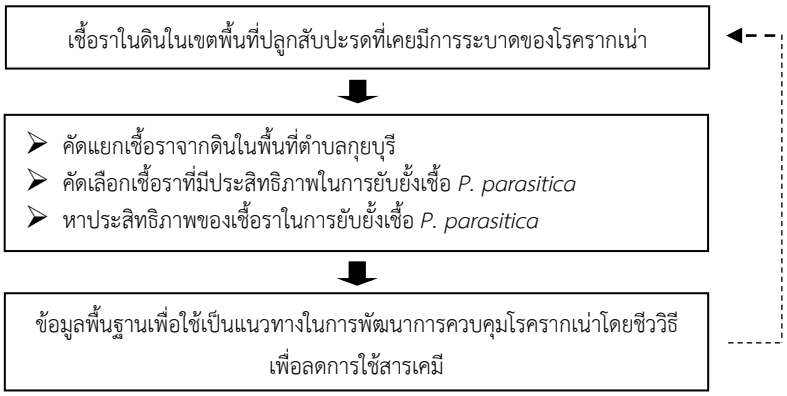
ปัญหาที่สำคัญที่สุดของเกษตรกรที่ปลูกสับปะรดในเขตพื้นที่ตำบลกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ คือ โรครากเน่าหรือยอดเน่า ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา Phytophthora parasitica หรือ Phytophthora nicotianae var. parasitica ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมากในพื้นที่เขตร้อน ในช่วงฤดูฝนมีความชื้นสูงทำให้มีการแพร่ระบาดของเชื้อโรครุนแรง เชื้อจะแพร่กระจายโดยอาศัยลม และความชื้นไปตกตามยอดใบ และส่วนต่าง ๆ ของสับปะรด เกิดการรุกรามของโรคทำให้สับปะรดแสดงอาการต้นโทรม อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค ยอดไหม้ มีอาการลำต้นหรือรากเน่า [2] ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมี

Metalaxyl ในการควบคุม Phytophthora spp. ซึ่งเป็นเพียงการแก้ปัญหาในระยะสั้นเท่านั้น อีกทั้งสารเคมีราคาค่อนข้างสูง บางครั้งก็ไม่สามารถควบคุม หรือกำจัดโรครากเน่าในพื้นที่ปลูกได้ และยังก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้ใช้ รวมทั้งเกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันมีการศึกษาหาวิธีการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี เชื้อราบางชนิดสามารถสร้างสารต่าง ๆ เช่น ยาปฏิชีวนะ กรด เอนไซม์ และสารทุติยภูมิอื่น ๆ หลากหลายชนิด เชื้อราบางชนิดสามารถนำมาใช้ควบคุมโรคพืชได้ [3] เช่น Trichoderma harzianum, T. viride, และ T. virens ซึ่งเป็นราที่แข่งขันกับราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้ดี ไม่ว่าจะเป็นเรื่องอาหาร ที่อยู่ หรือสารที่ใช้ในการเจริญเติบโต สามารถทำลายราสาเหตุโรคพืชได้ โดยเฉพาะราในดิน เช่น Pythium sp., Sclerotium rolfsii, Fusarium sp. และ Phytophthora sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืช [4] ดังนั้นการควบคุมโรคพืชด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี งานวิจัยของ Nyoman et al. [5] ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อ Phytophthora cinnamomi ด้วยจุลินทรีย์ที่คัดแยกจากปุ๋ยหมัก พบว่า Trichoderma sp., Gliocladium penicillioides, Fusarium sp. Streptomyces sp., Pseudomonas sp., และ Bacillus sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ P. cinnamomi ได้

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการคัดเลือกเชื้อราจากดินในเขตพื้นที่ตำบลกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา P. parasitica ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรครากเน่าหรือยอดเน่าของสับปะรด เพื่อให้ได้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งเชื้อราโรครากเน่าของสับปะรดได้ และสามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ในอนาคต เพื่อเกษตรกรจะได้นำไปใช้เพื่อลดการใช้สารเคมีต่อไป

2. วิธีการทดลอง

2.1 กรอบแนวคิดของการวิจัย



2.2 เตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อรา Phytophthora parasitica ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2.2.1 เลี้ยงเชื้อบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเอียง (PDA slant) เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2.2 ศึกษารูปร่างลักษณะโคโลนี อัตราการเจริญ และรูปร่างสัณฐานของเชื้อรา Phytophthora parasitica โดยการทำ Slide culture เชื้อรา และย้อมด้วยสี Lactophenol cotton blue [6] และนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโครงสร้างที่ใช้สืบพันธุ์ภายใต้กล้องสเตอริโอ (Olympus model GZ 3060) และกล้องจุลทรรศน์ (Olympus model CX – 40, BX 50) ที่กำลังขยาย 40 เท่า

2.3 เก็บตัวอย่างดินและคัดแยกเชื้อราปฏิปักษ์

2.3.1 สุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกสับปะรด หมู่ 6 ตำบลกุยบุรี อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 5 จุด โดยเลือกแปลงปลูกที่เคยมีการระบาดของโรครากเน่า แต่ยังสามารถปลูกสับปะรดได้

2.3.2 แยกเชื้อราในดินด้วยวิธีปลอดเชื้อ โดยชั่งดิน 1 กรัม ทำ Serial dilution spread plate จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหาร Rose bengal agar base เพื่อแยกเชื้อราออกจากดิน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน [7]

2.3.3 แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ ทำการจำแนกเชื้อรา และบันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์

2.4 ทดสอบเชื้อราในดินที่มีประสิทธิภาพในการยังยั้งเชื้อ Phytophthora parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด ด้วยวิธี Dual technique [8]

2.4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อรา P. parasitica และเชื้อราที่คัดแยกได้จากข้อ 2.3 ในอาหาร Potato dextrose ager (PDA) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา P. parasitica วางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวางห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร และด้านตรงข้ามในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางนั้นวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราที่จะทดสอบประสิทธิภาพ (รูปที่ 1 ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และบ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 °C) เป็นเวลา 7 วัน

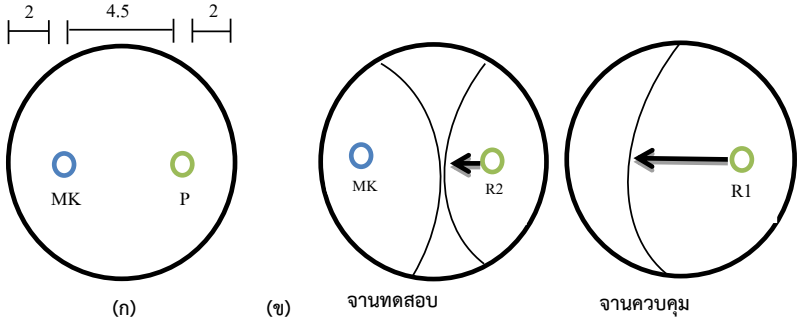
2.4.2 วัดรัศมีของเชื้อรา P. parasitica ในจานทดสอบและจานควบคุม ซึ่งไม่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (รูปที่ 1 ข)

2.4.3 นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อรา P. parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด (Percent inhibition of radial growth = PIRG) โดยมีสูตร คำนวณดังนี้ [9]

PIRG = [(R1 - R2)/R1 x 100]

R1 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *P. parasitica* ในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *P. parasitica* ในจานทดสอบ



รูปที่ 1. การวางตำแหน่งการวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา P. parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรดและตำแหน่งของเชื้อราปฏิปักษ์ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญบนอาหาร PDA (ก) และการวัดขนาดรัศมีโคโลนีของเชื้อรา P. parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด ในจานทดสอบและจานควบคุมซึ่งนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใย (ข)

2.5 จัดจำแนกชนิดของเชื้อรา

ศึกษาลักษณะรูปร่างสัณฐานวิทยาโดยการใช้เทคนิค Slide culture

2.5.1 เตรียมสไลด์ กระจกปิดสไลด์ วางบนแท่งแก้วงอ ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.5.2 ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นอาหาร PDA และนำมาวางบนสไลด์ ในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อรา มาแตะส่วนหนาทั้ง 4 ด้านของชิ้นวุ้น นำกระจกปิดสไลด์ ปิดบนแผ่นวุ้นที่ปลูกเชื้อแล้ว

2.5.3 วางสำลีชุบน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในจานเพาะเชื้อ เพื่อให้ความชื้นแก่เชื้อรา บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

2.5.4 ใช้ปากคีบจับแผ่นสไลด์ขึ้นมา หงายด้านที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ หยดเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด ลงตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ที่ ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที เพื่อให้เอทานอลแพร่กระจายเข้าสู่เส้นใยเชื้อรา นำไปวางลงบนแผ่นสไลด์ที่หยด Lactophenol cotton blue

2.5.5 ศึกษารูปร่างสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องสเตอริโอ แล้วทำการจัดจำแนกตาม Atlas of Clinical Fungi [10] และ Introductory Mycology [11]

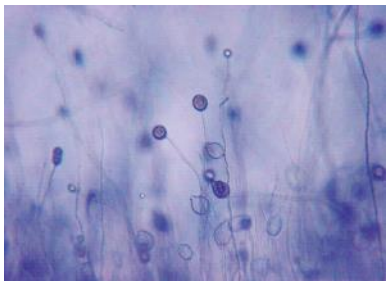
2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ CRD (Completely random design) ทำการทดลอง ซ้ำ 3 ครั้ง วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One – way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan’s multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลการศึกษาเชื้อราที่ใช้ทดสอบ

เชื้อรา Phytophthora parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด เจริญเติบโตค่อนข้างช้าเมื่อเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) สามารถเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงหลังบ่มที่อุณหภูมิห้อง 14 วัน โคโลนีมีสีขาว เส้นใยฟู สัณฐานวิทยาของเชื้อรา P. parasitica มีเส้นใยกว้าง 9 ไมโครเมตร sporangiophore เรียงยาว เส้นใยแตกกิ่งก้านแบบ sympodial sporangium รูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ ขนาดเฉลี่ย 38 x 30 ไมโครเมตร oospore ขนาดเล็กและมีผนังหนา อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ คือ 10 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิสูงสุด คือ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 2)



รูปที่ 2. เชื้อรา Phytophthora parasitica

3.2 ผลการเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกเชื้อราในดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกสับปะรด หมู่ 6 ตำบลกุยบุรี อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 5 จุด เพื่อนำมาแยกเชื้อราปฏิปักษ์โดยวิธี Serial dilution spread plate โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร Rose bengal agar base ผลการทดลองพบว่า สามารถแยกเชื้อราในดินได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา P. parasitica

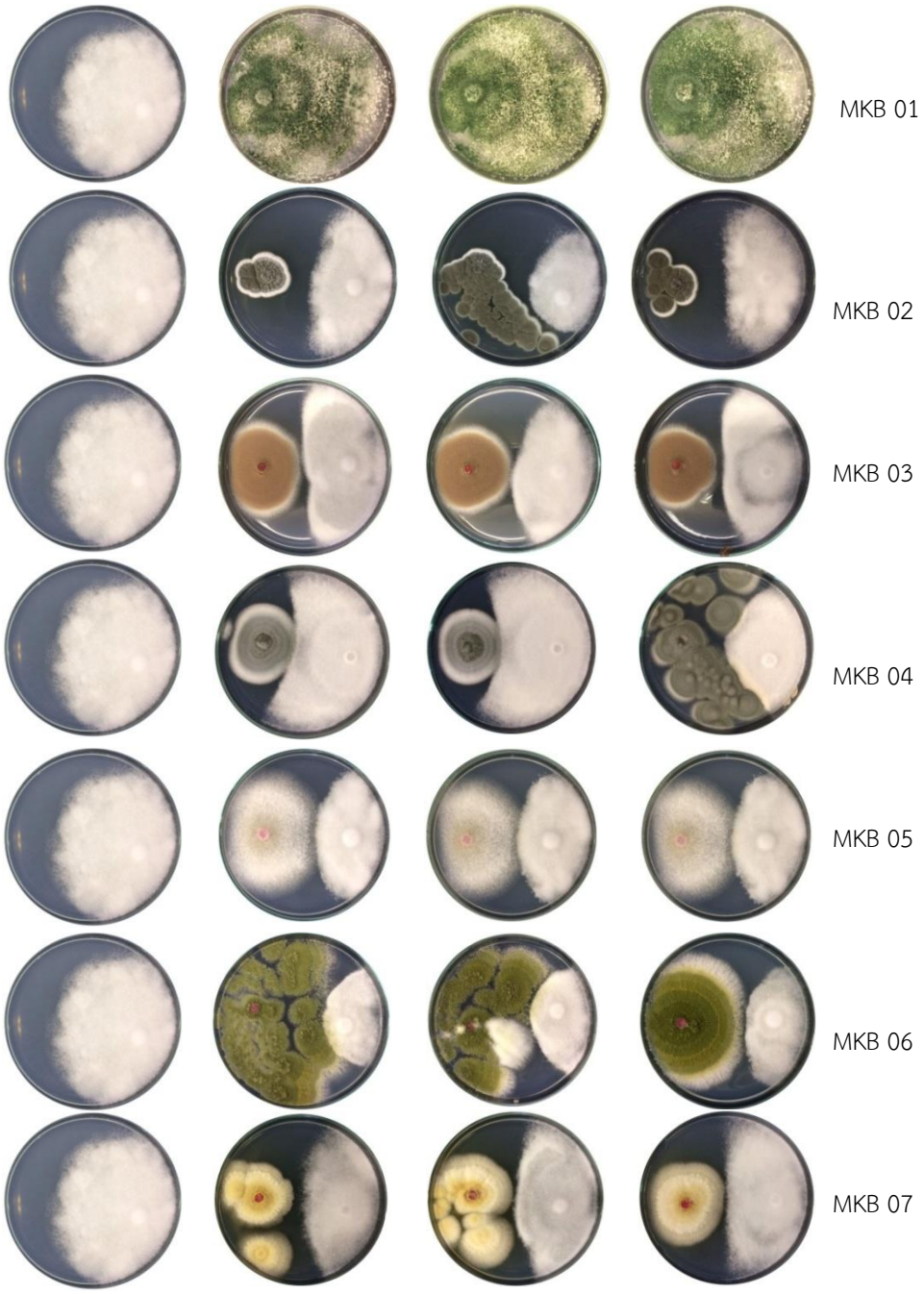
3.3 ผลการทดสอบเชื้อราในดิน ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ Phytophthora parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด ด้วยวิธี Dual technique

ประสิทธิภาพของเชื้อราในดินที่แยกได้ทั้ง 13 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา P. parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ด้วยวิธี Dual technique ซึ่งได้คัดเลือกเชื้อราในดินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค โดยการวัดขนาดความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา P. parasitica และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา P. parasitica ได้จากสูตร ดังนี้ (ตารางที่ 1 และ รูปที่ 3)

ตารางที่ 1. ผลการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา Phytophthora parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด

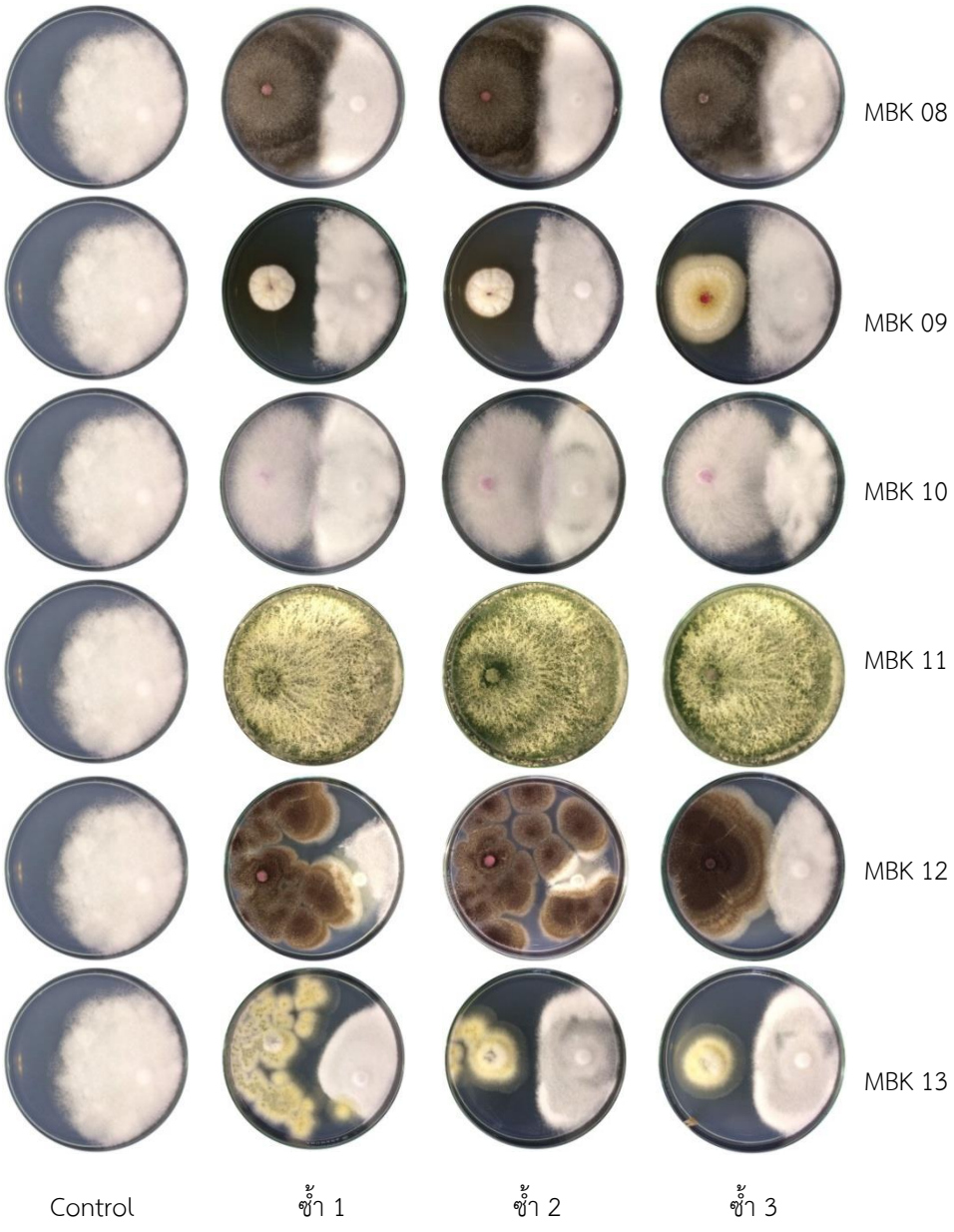
ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *Phytophthora parasitica* ในจานควบคุม	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ *Phytophthora parasitica* ในจานทดสอบ	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora parasitica*
MKB 01	4.3	0.80 ± 0.20	81.39%
MKB 02	4.3	2.71 ± 0.10	36.81%
MKB 03	4.3	2.90 ± 0.30	32.55%
MKB 04	4.3	3.41 ± 0.38	20.54%
MKB 05	4.3	2.31 ± 0.10	46.11%
MKB 06	4.3	1.90 ± 0.26	55.81%
MKB 07	4.3	3.28 ± 0.15	23.63%
MKB 08	4.3	2.66 ± 0.14	37.98%
MKB 09	4.3	3.08 ± 0.31	29.06%
MKB 10	4.3	2.73 ± 0.20	36.43%
MKB 11	4.3	0.60 ± 0.38	86.28%
MKB 12	4.3	1.66 ± 0.80	59.29%
MKB 13	4.3	2.96 ± 0.19	31.00%

จากตารางที่ 1 พบว่ามีเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา P. parasitica ได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลท คือ MKB 01, MKB 06, MKB 11 และ MKB 12 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเฉลี่ยที่ 81.39% 55.81% 86.28% และ 59.29% ตามลำดับ



รูปที่ 3. การทดสอบความสามารถของเชื้อ MKB 01, 02, 03, 04, 05, และ 07 ต่อการยับยั้งเชื้อรา Phytophthora parasitica เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

รูปที่ 3. (ต่อ) การทดสอบความสามารถของเชื้อ MKB 01, 02, 03, 04, 05, และ 07 ต่อการยับยั้งเชื้อรา Phytophthora parasitica เมื่อเทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ 3. (ต่อ) การทดสอบความสามารถของเชื้อ MKB 08, 09, 10, 11, 12 และ 13 ต่อการยับยั้งเชื้อรา Phytophthora parasitica เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 2. ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา Phytophthora parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด

เชื้อราปฏิปักษ์	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora parasitica*
MKB 01	81.51 ± 4.83[a]
MKB 06	55.81 ± 6.16[b]
MKB 11	86.28 ± 4.24[a]
MKB 12	59.30 ± 20.96[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยตามอักษรภาษาอังกฤษต่างกันแสดงผลค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

จากตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของการยับยั้งเชื้อรา P. parasitica สาเหตุโรครากเน่า ของสับปะรด พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ MKB 01 ไม่แตกต่างจาก MKB 11 แต่ MKB 01 และ MKB 11 แตกต่างจาก MKB 06 และ MKB 12 ซึ่งไม่แตกต่างกัน

3.4 ผลของการจัดจำแนกชนิดเชื้อราในดิน

จากผลการคัดแยกเชื้อราในดินที่แยกได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท นำมาจัดจำแนกชนิด โดยการทำ Slide culture เพื่อตรวจดูรูปร่างสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจัดจำแนกตาม Atlas of Clinical Fungi และ Introductory Mycology พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 11 ชนิด 5 สกุล คือ Acremonium sp., Aspergillus spp., Penicillium spp., Trichoderma sp. และ Syncephalastrum sp. ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. ผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราในดินที่คัดแยกได้ ในเขตพื้นที่ปลูกสับปะรด หมู่ 6 ตำบลกุยบุรี อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 13 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ผลการจัดจำแนก
MKB 01	*Trichoderma harzianum*
MKB 02	*Penicillium citrinum*
MKB 03	*Aspergillus flavipes*
MKB 04	*Penicillium griseofulvum*
MKB 05	*Acremonium* sp.
MKB 06	*Aspergillus oryzae*
MKB 07	*Aspergillus sclerotorum*
MKB 08	*Syncephalastrum racemosum*
MKB 09	*Aspergillus candidus*
MKB 10	*Acremonium* sp.
MKB 11	*Trichoderma harzianum*
MKB 12	*Aspergillus niger*
MKB 13	*Penicillium chrysogenum*

3.5 อภิปรายผล

จากการศึกษาผลของการคัดแยกเชื้อราจากดินในเขตพื้นที่ปลูกสับปะรด หมู่ที่ 6 ตำบลกุยบุรี อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ที่คัดแยกได้จำนวน 13 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา Phytophthora parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรดในครั้งนี้ พบว่ามีเชื้อรา 4 ไอโซเลท ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา P. parasitica ได้แก่ Trichoderma harzianum (MKB 11) ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา P. parasitica ได้ 86.28% รองลงมาคือ Trichoderma harzianum (MKB 01), Aspergillus niger (MKB 12) และ Aspergillus oryzae (MKB 06) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา P. parasitica ได้ 81.51%, 59.30%, 55.81% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว [12] และ กนกนาฎ เรืองวิเศษ [13] ซึ่งพบว่าเชื้อรา T. harzianum สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา P. parasitica และ Phytophthora palmivora ได้ สาเหตุที่เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อรา P. parasitica ได้ อาจเนื่องจาก เชื้อรามีลักษณะโคโลนีที่มีการสร้างเส้นใยเจริญเติบโตเร็ว ซึ่งอาจส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ จากการศึกษาของ อนันต์ วงเจริญ [14] ซึ่งพบว่าเชื้อรา T. harzianum มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอ็นไซม์ย่อยสลายเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้แก่ Chitinase, Proteinase และ Cellulase รวมถึงผลิตสารที่ส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ IAA และความสามารถละลายฟอสเฟต นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่า T. harzianum สามารถยับยั้งเชื้อรา Phytophthora infestans [15] จากรายงานของ สุดารัตน์ ดีช่วย [16] พบว่า Trichoderma sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา P. palmivora ได้ ซึ่งการยับยั้งจะเป็นไปในลักษณะของการเจริญครอบคลุมและครอบครองพื้นที่ ทำให้เชื้อสาเหตุโรคหยุดการเจริญเติบโต และ Adebola et al. [17] รายงานว่า เชื้อรา Aspergillus spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา P. palmivora ได้ นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่าใน Dual technique ของเชื้อรา Trichoderma sp. และ Aspergillus spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีของเชื้อราในฝั่งที่ไม่เผชิญหน้ากับเชื้อราปฏิปักษ์ ทั้ง 4 ไอโซเลท หยุดการเจริญเติบโตเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งน่าจะได้รับอิทธิพลมาจากสารระเหย (Volatile metabolite) ที่ถูกสร้างขึ้นจากเชื้อราปฏิปักษ์

4. สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อราในดิน ในเขตพื้นที่ปลูกสับปะรด หมู่ที่ 6 ตำบลกุยบุรี อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ด้วยวิธี Serial dilution spread plate สามารถคัดแยกราได้ 13 ไอโซเลท และเมื่อนำมาจัดจำแนกพบว่าเป็น 11 ชนิดใน 5 สกุล ได้แก่ Acremonium sp., Aspergillus spp., Penicillium spp., Trichoderma sp. และ Syncephalastrum sp. เมื่อนำเชื้อราทั้ง 13 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา Phytophthora parasitica สาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด พบว่าเชื้อราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา P. parasitica มีจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ Trichoderma harzianum ไอโซเลท MKB 11 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา P. parasitica ได้ 86.28% รองลงมาคือ Trichoderma harzianum ไอโซเลท MKB 01, Aspergillus niger ไอโซเลท MKB 12 และ Aspergillus oryzae ไอโซเลท MKB 06 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา P. parasitica ได้ 81.51%, 59.30%, 55.81% ตามลำดับ และเมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ MKB 01 และ MKB 11 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างจาก MKB 06 และ MKB 12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ใช้วิธีศึกษาสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกชนิดเชื้อราปฏิปักษ์ จึงควรใช้วิธีการตรวจสอบในระดับโมเลกุลเพื่อเป็นการยืนยันผลการศึกษา และควรมีการศึกษาเชิงลึกถึงกลไกของ Trichoderma harzianum (MKB 11) Aspergillus niger (MKB 12) และ Aspergillus oyzae (MKB 06) ในการยับยั้งเชื้อรา Phytophthora parasitica ควบคู่กับการใช้สารเคมีที่เกษตรกรใช้ในการควบคุมโรครากเน่าในสับปะรดเป็นชุดควบคุมเชิงบวกเพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบในการหาแนวทางการพัฒนาสู่การประยุกต์ใช้งานในจริงสภาพธรรมชาติ นอกจากนี้การศึกษานี้เลือกศึกษาเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าสับปะรด (P. parasitica) เพียง 1 ชนิด ซึ่งเป็นโรคและพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จึงควรมีนำเชื้อที่แยกได้จากพื้นที่ปลูกสับปะรด หมู่ที่ 6 ตำบลกุยบุรี อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ไปศึกษาความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคชนิดอื่น อย่างไรก็ดีการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบในห้องปฏิบัติการ จึงควรมีการทดสอบในระดับเรือนทดลอง และสภาพไร่ต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถใช้เชื้อราปฏิปักษ์มาเป็นต้นแบบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ผงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เพื่อลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของสับปะรด และมีส่วนช่วยส่งเสริมในการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ให้แก่พื้นที่ที่ทำการเพาะปลูกสับปะรดของเกษตรกรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

[1] แผนพัฒนาจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (พ.ศ. 2561-2564). สำนักงานจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กลุ่มงานยุทธศาสตร์และข้อมูลเพื่อการพัฒนาจังหวัด. แหล่งข้อมูล : http://www.prachuapkhirikhan.go.th/_2018/files/com_news_project/2018-02_a5bca28084116b9.pdf ค้นเมื่อวันที่ 8 มีนาคม 2561.

[2] สำนักงานสถิติ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. 2559. โรคที่สำคัญของสับปะรด. แหล่งข้อมูล : http://pchkkhan.nso.go.th/index.php?option=com ค้นเมื่อวันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2560.

[3] สายทอง แก้วฉาย. 2555. การใช้ไตรโครเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์, 4, 108-123.

[4] จิระเดช แจ่มสว่าง. 2547. การควบคุมโรคผักโดยชีววิธี. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีในการปลูกผักระบบไม่ใช้ดินและภายในโรงเรือน. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

[5] Aryantha, N.P. and Guest, D.I. 2006. Mycoparasitic and antagonistic inhibition on Phytophthora cinnamomi rands by microbial agents isolated from manure composts. Plant Pathology Journal, 5(3), 291-298.

[6] Wijedasa, M.H. and Liyanapathirana, L.V.C. 2012. Evaluation of an alternative slide culture technique for the morphological identification of fungal species. Sri Lanka Journal of Infectious Diseases. 2(2), 47-52.

[7] Jayaram, M. and Nagao, H. 2018. Potato dextrose agar with rose-Bengal and chloramphenicol: A new culture medium to isolate pathogenic Exophiala dermatitidis from the environment. Klimik Dergisi, 31(1), 11-15.

[8] Nawrot-Chorabik, K. 2013. The use of interactions in dual cultures in vitro to evaluate the pathogenicity of fungi and susceptibility of host plant genotypes. Environmental Biotechnology – New Approaches and Prospective Applications. http://dx.doi.org/10.50772/

[9] Gamaliel, A., Katan, J. and Conen, E. 1989. Toxicity of chloronitrobenzenes to Fusarium oxysporum and Rhizoctonia solani as related to their structure. Phytoparasitica, 17, 101-106.

[10] Hoog, G.S. de, Guarro, J., Gene, J., and Figueras, M., 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed, Centraalbureau voor Schimmelcultures/Reus. Universitat Rovira i Virgili, Utrecht, The Netherland.

[11] Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology, 4th ed, John Wiley & Sons, Inc., New York.

[12] อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว. 2541.ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันโรครากเน่าของส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อรา Phytophthora parasitica (Dastur.). บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[13] กนกนาฏ เรืองวิเศษ. 2540. การใช้เชื้อรา Trichoderma harzianum เพื่อควบคุมโรครากเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา Phytophthora palmivora (Butl.) Butl. ในสภาพสวนของเกษตรกร. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[14] อนันต์ วงเจริญ. 2557. การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าว (Oryza sativa L.) ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งราสาเหตุโรค. ข้าวแก่นเกษตร, 42, 385-396.

[15] สุดารัตน์ ดีช่วย. 2556. เชื้อราดินและเศษซากพืชในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชเขื่อนรัชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี และการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคยางพารา. สาขาวิชาโรคพืชวิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

[16] Fatima, K., Noureddine, K., Henni, J.E. and Mabrouk, K. 2015. Antagonistic effect of Trichoderma harzianum against Phytophthora infectans in the North-west of Algeria. International Journal of Agronomy and Agricultural Research. 6(4), 44-53.

[17] Adebola, M.O. and Amadi, J.E 2010. Screening three Aspergillus species of antagonistic activities against the cocoa black pod organism (Phytophthora palmivora). Agriculture and Biology Journal of North America, 1, 362-365.