

การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์
Trichoderma spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา
สาเหตุโรคพืชที่สำคัญ

Screening and Identification of Antagonistic Fungi *Trichoderma* spp. for
Inhibition of Important Plant Pathogens

มานะ กาญจนมณีเสถียร¹

อนงค์ หนูด้วง²

สากุล สุวลักษณ์³

Mana Kanjanamaneesathian¹

Anong Nooduang²

Sakol Suwaluk³

ABSTRACT

Antagonistic fungi *Trichoderma* spp. were isolated from forest and cultivated soils in the southern region of Thailand. One hundred eighty-three isolates of *Trichoderma* spp. and *Trichoderma*-like fungi were obtained from the soil plate technique. All isolates were tested in vitro for inhibition of mycelial growth of *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Cultivated soils were a better source of potential antagonistic fungi *Trichoderma* spp. than forest soils because they harbored isolates of *Trichoderma* spp. which were aggressive against three species of plant pathogens. Four isolates of *Trichoderma* spp. and two isolates of *Gliocladium* spp. had a potential as selected biological control agents. These potential

¹ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

¹ Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla 90110.

² ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ (ภาคใต้) คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

² National Biological Control Research Center, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla 90110.

³ หน่วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110.

³ Electron Microscope Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla 90110.

fungal antagonists were identified using Scanning Electron Microscope (SEM) as *Trichoderma harzianum* (isolate no. 0123), *Trichoderma viride* (isolates no. 0140), and *Gliocladium virens* (isolates no. 0104 and 0138) were an unidentified species (isolate no. 0015 and no. 0173).

Key words : biological control, *Trichoderma* spp.

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากดินป่าและดินเกษตรกรรมในภาคใต้ของประเทศไทย ได้จำนวน 183 สายพันธุ์ และทำการคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ทุกสายพันธุ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในภาคใต้ 3 ชนิด คือ เชื้อรา *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพโดยเทคนิค dual culture ในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในดินเกษตรกรรมพบจำนวนสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีกว่าในดินป่าและพบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. 4 สายพันธุ์และเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีลักษณะคล้าย *Trichoderma* spp. คือเชื้อราปฏิปักษ์ *Gliocladium* spp. 2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิด จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของโครงสร้างสปอร์ของเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 6 ชนิด โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) สามารถจำแนกและบอกชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ได้ 4 สายพันธุ์ *Trichoderma harzianum* (สายพันธุ์ 0123) *Trichoderma viride* (สายพันธุ์ 0140) และ *Gliocladium virens* (สายพันธุ์ 0104 และ 0138)

คำหลัก : การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.

คำนำ

ปัจจุบันในประเทศไทยและประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกกำลังประสบปัญหาเกี่ยวกับมลภาวะ ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เกินความจำเป็นและไม่ถูกวิธี ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาคือ ศัตรูพืชมีความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช การที่ศัตรูพืชต้านทานต่อสารเคมีจัดเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่ง มีรายงานว่าปัจจุบันมีแมลง ไร และเชื้อรา มากกว่า 400 ชนิด พัฒนาสายพันธุ์ที่ให้ต้านทานสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช (กองกัญและสัตววิทยา, 2537) นอกจากนั้นการใช้สารเคมีอย่างไม่ถูกต้อง ยังอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ มีผู้เสียชีวิตเนื่องจากพิษของสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชประมาณปีละ 40 คน และอีก 5,000 คน ต้องเข้า โรงพยาบาลเพื่อรับการรักษา (กองกัญและสัตววิทยา, 2537) จากเหตุผล ดังกล่าว ทำให้มีความตื่นตัวในหลาย ๆ ประเทศ รวมทั้งประเทศไทยในการนำเอา จุลินทรีย์มาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อแก้ไขปัญหามลภาวะและการพัฒนา สายพันธุ์ต้านทานต่อสารเคมี แนวทางการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นมาตรการหนึ่งที่สามารถลดหรือ

ทดแทนการใช้สารเคมีซึ่งอาจจะก่อให้เกิดปัญหา ดังกล่าวได้

การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณเชื้อราก่อโรค (inoculum) และการลดการพัฒนามากการเกิดโรคโดยใช้สิ่งมีชีวิต ชนิดหนึ่งหรือมากกว่าเป็นตัวควบคุม หรือใช้สารที่สกัดจากสิ่งมีชีวิตมาควบคุมเชื้อโรคพืช ในปัจจุบัน การควบคุมโดยชีววิธีได้รับความสนใจ เป็นอย่างมากจากนักโรคพืชและนักวิจัยทั่วไป (Cook and Baker, 1983)

เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ประโยชน์มีหลาย ชนิด เช่น *Chaetomium* sp. (เกษม, 2533) และ *Trichoderma* spp. (จิระเดช และคณะ, 2535) ซึ่งการศึกษาพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคพืชหลาย ชนิดได้ดี เช่น สามารถใช้ควบคุมโรครากเน่าใน ส้มเขียวหวาน ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica*, (Erwin et al., 1983) โรคที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของถั่วเขียว (Hader et al., 1979; Elad et al., 1980; Liu and Baker, 1980) และโรคที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ในข้าวบาร์เลย์ (Cook and Baker, 1983) สำหรับเชื้อรา *Trichoderma* spp. นั้นมีรายงานว่าหลายชนิดสามารถตรวจพบได้จากดินเกษตรกรรมทั่วไป (จิระเดช และคณะ, 2535) อย่างไรก็ตามยังมีเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. อีกหลายชนิดจากแหล่งที่สภาพแวดล้อมไม่ถูกรบกวนจากการทำเกษตรกรรม เช่น สภาพดินในป่าไม้ธรรมชาติ (Bull et al., 1992) ดังนั้นการ

สำรวจและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินป่าและดินเกษตรกรรมในเขตภาคใต้ของประเทศอาจจะตรวจพบเชื้อ *Trichoderma* spp. ชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่ ๆ ซึ่งอาจจะมีศักยภาพในการควบคุมและป้องกันโรคพืชที่สำคัญ ๆ ได้หลายชนิด และสามารถนำเชื้อชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่ ๆ ดังกล่าวไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ควบคุมและป้องกันโรคพืชได้ในอนาคต

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและรวบรวมเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากดินเกษตรกรรมและดินป่าจาก 14 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อเปรียบเทียบแหล่งของดินที่น่าจะมีศักยภาพในการเป็นแหล่งของเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดนี้และคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ 3 ชนิด รวมทั้งจำแนกเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เก็บตัวอย่างดินและการแยกเชื้อราปฏิปักษ์

เก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 6 นิ้วจากผิวดิน จาก 14 จังหวัดในภาคใต้ จังหวัดละ 4 แห่ง โดยเป็นตัวอย่างดินป่า 2

แห้ง และดินเกษตรกรรม (ดินจากสวนผลไม้) 2 แห่ง แต่ละตัวอย่างมีน้ำหนัก 500 กรัม (เก็บจากใต้ทรงพุ่มพืช 5 จุด ๆ ละ 100 กรัม) นำตัวอย่างดินดังกล่าวมายังห้องปฏิบัติการแล้วแบ่งดินจำนวน 100 กรัม นำไปวิเคราะห์หาปริมาณอินทรีย์วัตถุและความชื้นในดิน ดินส่วนที่เหลือนำมาทำการแยกเชื้อราปฏิปักษ์โดยชั่งดินตัวอย่างละ 0.004 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ (จำนวน 5 จานเลี้ยงเชื้อต่อดิน 1 ตัวอย่าง) หลังจากนั้นจึงเทอาหาร *Trichoderma* Selective Medium (TSM) (Elad and Chet, 1983) ที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้วลงในจานเลี้ยงเชื้อและทำการเขย่า เพื่อให้ดินกระจายทั่วอาหาร ป่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25° ซ. เป็นเวลานาน 7 วัน เมื่อเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. หรือเชื้อราที่มีลักษณะคล้ายเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญบนอาหาร จึงทำการย้ายเส้นใยของเชื้อราดังกล่าวลงเลี้ยงในหลอดทดสอบที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้นำไปใช้ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช และศึกษาการจัดจำแนกชนิดตามการจำแนกโดย Rifai (1969)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด คือ เชื้อรา *Phytophthora palmivora*,

Rhizoctonia solani และ *Sclerotium rolfsii* โดยเทคนิค dual culture บนอาหาร PDA โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ในแต่ละ isolate ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. 1 ชนิด ทำการป่มจานเลี้ยงเชื้อในตู้ป่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงทำการวัดผลการทดลอง โดยใช้มาตรฐานของ Bell *et al.* (1982) โดยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่มีระดับความรุนแรงที่ระดับ 1 คือ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่สามารถเจริญคลุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ทดสอบร่วมและผิวหน้าอาหารที่ใช้ทดสอบทั้งหมด ระดับความรุนแรงที่ระดับ 2 คือ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่สามารถเจริญคลุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ทดสอบร่วม และผิวอาหารที่ใช้ทดสอบอย่างน้อย 2 ใน 3 ของผิวอาหาร ระดับความรุนแรงที่ระดับ 3 คือ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. และเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ทดสอบร่วมต่างเจริญคลุมผิวหน้าอาหารที่ใช้ทดสอบ 50% ระดับความรุนแรงที่ระดับ 4 คือเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ทดสอบร่วมเจริญคลุมผิวหน้าอาหารที่ใช้ทดสอบ 2 ใน 3 และสามารถต่อต้านการเจริญคลุมทับโดยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ได้ และระดับความรุนแรงที่ระดับ 5 คือเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ทดสอบเจริญคลุมผิวหน้าอาหารทั้งหมด

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้การวิเคราะห์แบบ nonparametric statistic test โดยทำการวิเคราะห์ข้อมูลค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรง (จาก 1-5) จากการทดสอบระหว่างเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด โดยวิธี Mann-Whitney U-test (Kranzler and Moursund, 1995)

4. การจำแนกชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

คัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. เฉพาะที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* เพื่อนำมาทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานและรูปร่างของสปอร์เพื่อจำแนกชนิดเชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าว ณ หน่วยปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเชื้อราปฏิปักษ์เพื่อศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดดังนี้คือ นำชิ้นหุ้มที่มีเชื้อราปฏิปักษ์เจริญขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ใส่ในน้ำยา 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 นาน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง ล้างตัวอย่างใน phosphate buffer 3 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที จึงนำตัวอย่างใส่ในน้ำยา 1% osmium tetroxide นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ล้างตัวอย่างด้วย

น้ำกลั่น 2 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างมาทำให้ปราศจากน้ำ โดยใช้ Ethanol 50, 70, 80 และ 90% อย่างละ 2 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที และใน 100% Ethanol 2 ครั้ง นานครั้งละ 30 นาที จึงนำตัวอย่างมาทำให้แห้งโดยวิธี critical point drying ใน CO₂ เหลว โดยใช้เครื่อง samdri-790 จากนั้นจึงติดตัวอย่างบนแท่งทองเหลือง (stub) ด้วยเทปสชนหน้าและใช้ silver paint ป้ายรอบตัวอย่างอีกครั้งหนึ่ง ฉาบตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (Au) นาน 4 นาทีในเครื่อง ion sputter-JFC 1100 นำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แรงดันกระแสไฟฟ้า 10KV (JEOL 35-CF Scanning electron microscopy)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราปฏิปักษ์

Trichoderma spp.

จากการแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากดินป่าและดินเกษตรกรรมที่เก็บจาก 14 จังหวัดภาคใต้ของประเทศไทยจำนวน 56 ตัวอย่าง โดยวิธี soil plate method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* Selective Medium สามารถแยกได้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จำนวน 183 สายพันธุ์ จากดินป่าและดินเกษตรกรรมจำนวน 27 ตัวอย่างจาก 11 จังหวัด (Table

1) พบว่ามีจำนวนเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินเกษตรกรรม 9 จังหวัด เป็นจำนวน 107 สายพันธุ์ คิดเป็นจำนวน 58.47% ของสายพันธุ์ทั้งหมดและที่แยกได้จากดินป่า 10 จังหวัด เป็นจำนวน 76 สายพันธุ์คิดเป็นจำนวน 41.53% ของสายพันธุ์ทั้งหมด โดยจังหวัดที่สามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ได้มาก 3 อันดับแรก คือ จังหวัดตรัง กระบี่ และภูเก็ต ตามลำดับ แต่ไม่พบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากทั้งดินป่าและดินเกษตรกรรม จากตัวอย่างดินที่เก็บจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ยะลา และสตูล

ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าดินเกษตรกรรมน่าจะเป็นแหล่งที่อาจตรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ได้ดีกว่าดินป่า การตรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในดินเกษตรกรรมมากกว่าในดินป่าธรรมชาติดังกล่าวข้างต้นนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากลักษณะของดินเกษตรกรรมมีความเหมาะสมต่อการเจริญและการแพร่กระจายของเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดนี้มากกว่าดินป่า เพราะดินเกษตรกรรมได้รับผลจากกิจกรรมทางการเกษตร เช่น การปลูกพืช การใส่ปุ๋ย และการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชอย่างต่อเนื่อง กิจกรรมทางการเกษตรเหล่านี้ อาจเป็นปัจจัยคัดเลือกให้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. เจริญเติบโตเพิ่มจำนวนและดำรงชีพในสภาพดินดังกล่าวได้ เช่น มีรายงานว่าสามารถตรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จำนวนมากในดินภายหลัง

จากการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราในดินปลูกถั่วลิสง (Baired et al., 1991)

2. การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด

การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิด คือ เชื้อรา *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. หลายสายพันธุ์จากดินป่าและดินเกษตรกรรมที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 3 ชนิด (Table 2) โดยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ทุกสายพันธุ์ (คิดเป็น 100%) จากแหล่งดินป่าและดินเกษตรกรรมมีระดับความรุนแรงในระดับ 1 และ 2 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* สำหรับในกรณีของการทดสอบกับเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* พบว่าจำนวนของเชื้อราปฏิปักษ์จากดินเกษตรกรรมที่มีระดับความรุนแรงในระดับ 1 และ 2 ตามมาตรฐานของ Bell et al. (1982) มีจำนวน 99 (คิดเป็น 92.52%) และ 56 (คิดเป็น 52.34%) สายพันธุ์ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ nonparametric พบว่าสายพันธุ์ของ

เชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดินเกษตรกรรมระดับความรุนแรงในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชมากกว่าสายพันธุ์ของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดินป่า (Table 3) การที่ตรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่รุนแรงในดินเกษตรกรรม มากกว่าในดินป่า อาจเนื่องมาจากกระบวนการคัดเลือกทางธรรมชาติ (natural selection) ที่เกิดขึ้นระหว่างเชื้อราสาเหตุโรคพืชและเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในสภาพดินเกษตรกรรม โดยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสามารถต่อสู้แข่งขันในการดำรงชีพในสภาพแวดล้อมเดียวกันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช แล้วนำมาซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่สามารถปรับตัวได้ดีในสภาพดินเกษตรกรรมทำให้เชื้อราปฏิปักษ์มีโอกาสอยู่รอดเพิ่มจำนวนและดำรงชีพอยู่ได้ ข้อมูลในลักษณะเช่นนี้น่าจะเป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยในอนาคต เช่น ใช้เป็นแนวทางในการหาแหล่งของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่มีศักยภาพดีจากแหล่งที่มีกระบวนการคัดเลือกทางธรรมชาติ เช่น ในสภาพแปลงปลูกพืชที่มีการปลูกพืชเดี่ยวอย่างต่อเนื่องหรือในสภาพโรงเรือนที่มีการปลูกพืชตลอดปี (Askew and Laing, 1994) เพื่อใช้สายพันธุ์ดังกล่าวในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

3. การจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

จากการทดสอบโดยเทคนิค dual culture พบว่ามีเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จำนวน 6 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 3 ชนิด คือสายพันธุ์หมายเลข 0015, 0104, 0123, 0138, 0140 และ 0173 และสายพันธุ์เหล่านี้จะมีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าวได้ 4 ชนิด คือ เชื้อราปฏิปักษ์หมายเลข 0123 คือ เชื้อ *Trichoderma harzianum* เชื้อราปฏิปักษ์ หมายเลข 0140 คือ เชื้อ *Trichoderma viride* เชื้อราปฏิปักษ์ หมายเลข 0104 และ 0138 คือ เชื้อ *Gliocladium virens* (Figure 1) และเชื้อราปฏิปักษ์ หมายเลข 0015 และ 0173 คือเชื้อ *Unidentified Trichoderma* spp.

การจำแนกชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 6 สายพันธุ์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้น นับเป็นวิธีการที่ดีวิธีการหนึ่ง เนื่องจากเครื่องมือชนิดนี้สามารถใช้ตรวจสอบลักษณะผิวภายนอกของสปอร์ของเชื้อราปฏิปักษ์ได้ และช่วยให้การจำแนก

มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น อย่างไรก็ตามเทคนิคชีวโมเลกุล เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR) และ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Zimand *et al.*, 1994) อาจจะถูกนำมาใช้ประกอบกับกล้อง SEM เพื่อช่วยให้การจัดจำแนกมีความถูกต้องมากขึ้นและเทคนิคดังกล่าวอาจนำมาใช้ในการศึกษาทางนิเวศวิทยาของเชื้อราปฏิปักษ์ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการที่จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อวางแผนและแนวทางการใช้มาตรการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในอนาคตให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และขณะนี้ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติ (ภาคใต้) กำลังดำเนินการศึกษาการใช้เทคนิค

RAPD ในการจำแนกชนิดเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.

คำขอบคุณ

ผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติ (ภาคใต้) ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนการวิจัยสำหรับการวิจัยในปีงบประมาณประจำปี 2539 รวมทั้งให้การสนับสนุนอุปกรณ์การวิจัย และห้องปฏิบัติการทางโรคพืชวิทยาสำหรับดำเนินการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กองกัญและสัตววิทยา. 2537. ปัญหาการใช้น้ำสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพิ่มขึ้น. *กสิกรรม*. 67(6): 522-524.

เกษม สร้อยทอง. 2533. ประสิทธิภาพของรา *Chaetomium cochliodes* และ *Chaetomium curicolum* ในการป้องกันโรคไหม้ของข้าว (Rice Blast) ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Pyricularia oryzae*. *แก่นเกษตร*. 18(2): 89-96.

จิระเดช แจ่มสว่าง จินตนา ชนะ วรณวิไล เกษนรา เฉลิมลาภ ช่วยประสิทธิ์ สุพรรณี ชีววิทย์กุล ธีรยุทธ ตูจินดา ศรีปราชญ์ ชโนศวรรยวงกุล วุฒิชัย

ญาณอรธ กัทลีวัลย์ สุขช่วย และ สมนึก กายาผาด. 2535. การควบคุมโรคต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์โดยวิธีคลุกเมล็ดด้วยผงมวลชีวภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ข้าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและปลูกพืชทดลอง. 6(2): 3-8.

Askew, D.J. and M.D. Laing. 1994. The *in vitro* screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and an evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggre-

- ssive strains. *Plant and Soil* 159:277-281..
- Baird, R.E.; T.B. Brenneman; D.K. Bell; and A.P. Murphy. 1991. The effects of the fungicide propiconazole (Tile) on the groundnut shell mycobiota. *Mycological Research* 95(5): 571-576.
- Bell, D.K.; H.D. Wells and C.R. Markham. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Bull, A.T.; M. Goodfellow and J.H. Slater. 1992. Biodiversity as a source of innovation of biotechnology. *Annual Review of Microbiology* 46: 219-252.
- Cook, R.J. and K.F. Baker. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The Amer. Phytopathol. Soc., St. Paul. Minnesota. 539 pp.
- Elad, Y. and I. Chet. 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica* 11: 55-58.
- Elad, Y.; I. Chet and J. Katan. 1980. *Trichoderma harzianum* a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119-121.
- Erwin, D.C.; S. Bartricki-Garcia and P.H. Tsao. 1983. *Phytophthora* : Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. Amer. Phytopathol. Soc., St Paul, Minnesota. 392 pp.
- Hader, Y.; I. Chet and Y. Henis. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 69: 64-68.
- Kranzler, G. and J. Moursund. 1995. Statistics for the Terrified. Prentice Hall. New Jersey. 164 pp.
- Liu, S. and R. Baker. 1980. Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani* *Phytopathology* 70: 404-412.
- Rifai, M.A. 1969. A Revision of the Genus *Trichoderma*. Mycological Papers, No. 116. 56 pp.
- Zimand, G.; L. Valinsky; Y. Elad; I. Chet and S. Manulis. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research* 98(5): 531-534.

Table 1 Number of antagonistic fungi *Trichoderma* spp. isolated from soils in 11 provinces in the southern part of Thailand.

Collection sites	Number of isolates		Total
	Cultivated soil	Forest soil	
Amphoe Muang, Chumphon	-	3	3
Amphoe Muang, Krabi	-	25	25
Amphoe Cha-uat, Nakhon Si Thammarat	-	2	2
Amphoe Ron Phibun, Nakhon Si Thammarat	14	-	14
Amphoe Thung Song, Nakhon Si Thammarat	12	2	14
Amphoe Bacho, Narathiwat	6	6	12
Amphoe Jak-I-long, Narathiwat	3	-	3
Amphoe Sungai Padi, Narathiwat	-	7	7
Amphoe Khok Pho, Pattani	4	8	12
Amphoe Yarang, Pattani	7	-	7
Amphoe Kong Ra, Pattalung	5	-	5
Amphoe Muang, Phattalung	4	-	4
Amphoe Thai-Muang, Pangnga	-	7	7
Amphoe Muang, Phuket	18	6	24
Amphoe Kra Buri, Ranong	-	2	2
Amphoe La-un, Ranong	4	-	4
Amphoe Hat Yai, Songkhla	2	-	2
Amphoe Rattaphum, Songkhla	3	1	4
Amphoe Yan Ta Khao, Trang	4	-	4
Amphoe Kantang, Trang	-	2	2
Amphoe Muang, Trang	21	5	26
Total	107	76	183

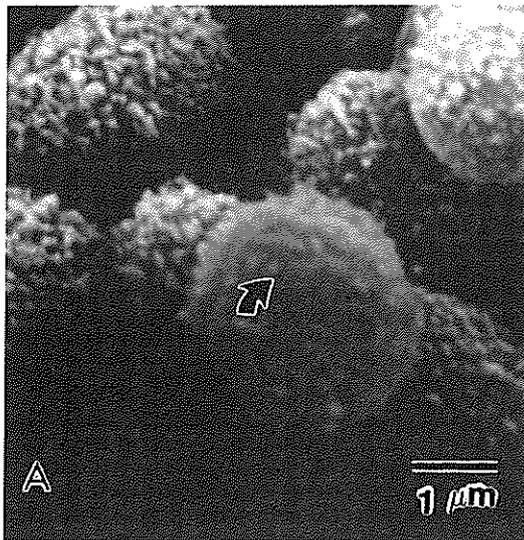
Table 2 Number of antagonistic fungi *Trichoderma* spp. isolates which possessed antagonistic activity in class 1 and 2 in inhibiting mycelial growth of plant pathogens (Bell *et al.*, 1982)

Plant pathogens	Number of <i>Trichoderma</i> spp. isolates which belonged to class 1 and 2 antagonistic activity	
	Forest soil	Cultivated soil
<i>Phytophthora palmivora</i>	76(100%)	107(100%)
<i>Rhizoctonia solani</i>	50(65.79%)	99(92.52%)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	17(22.37%)	56(52.34%)

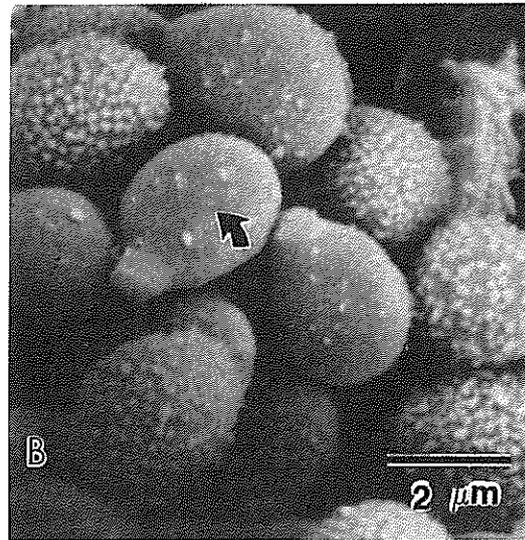
Table 3 Antagonism comparisons of the different sources of *Trichoderma* spp. against Plant pathogens

Source	Average score against plant pathogens ¹		
	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Cultivated soil	1.0 a	1.2 a	2.5 a
Forest soil	1.0 a	2.2 b	3.4 b

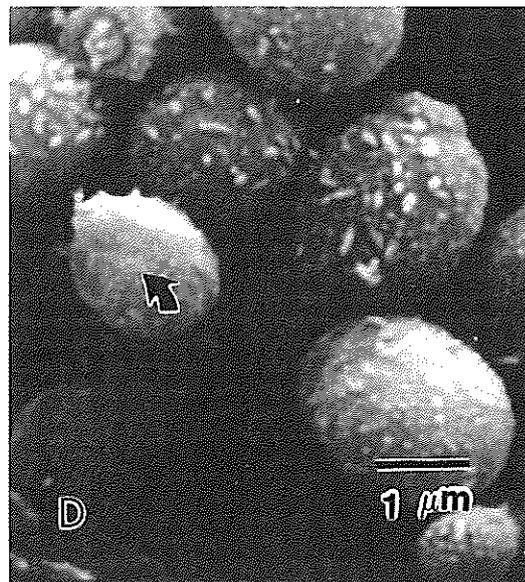
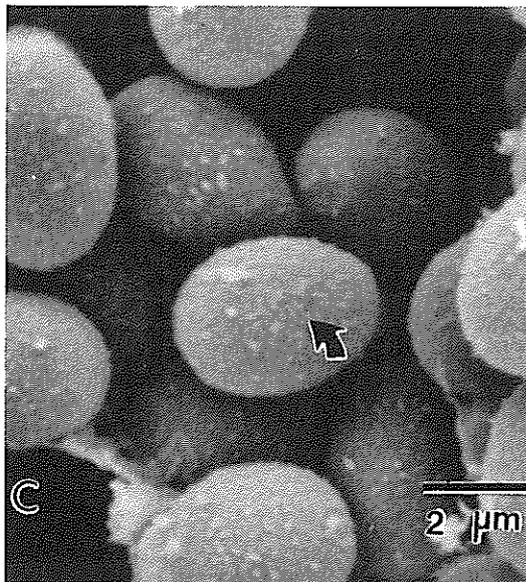
¹ In column, averages not followed by the same letter are significantly different using Mann-Whitney U-test.



a. *Trichoderma harzianum*,



b. *Trichoderma viride*,



c. and d. *Gliocladium virens*

Figure 1. Conidia surface (arrow) of potential fungal antagonists.