

การคัดเลือก กลไกการเป็นปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้เชื้อรา
Trichoderma harzianum Rifai เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา
Screening, Antagonistic Mechanisms and Applications of
Trichoderma harzianum Rifai to Control White Root Disease of Rubber Trees

พรทิพย์ แยมสุวรรณ
Porntip Yamsuwan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือก กลไกการเป็นปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้เชื้อรา
Trichoderma harzianum Rifai เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา

ผู้เขียน นางสาวพรทิพย์ แยมสุวรรณ

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (รองศาสตราจารย์ ดร.วสันต์ เพชรรัตน์)ประธานกรรมการ (ดร.ชนินันท์ พรสุริยา)
กรรมการ (ดร.ภวิกา บุญยพิพัฒน์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร. วสันต์ เพชรรัตน์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	
..... (ดร.ปฏิมาพร ปลอดภัย)กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)
กรรมการ (ดร.ปฏิมาพร ปลอดภัย)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช
วิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอแสดงความ
ขอบคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันต์ เพชรรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวพรทิพย์ แยมสุวรรณ)

นักศึกษา

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวพรทิพย์ แยมสุวรรณ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือก กลไกการเป็นปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา
ผู้เขียน	นางสาว พรทิพย์ แยมสุวรรณ
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

การคัดเลือก และศึกษากลไกการเป็นปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรครากขาวของยางพารา โดยแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินบริเวณรากต้นยางพารา 86 ตัวอย่าง ได้เชื้อรา 356 ไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ด้วยวิธี dual culture plate พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ChM1.1 และ NL2.2 จำนวน 2 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพสูงสุด จึงจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวโมเลกุล จำแนกได้คือ เชื้อรา *T. harzianum* จากการศึกษาต่อกับกลไกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ต่อเชื้อรา *R. microporus* พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 แย่งแย่งสารอาหาร และพื้นที่ของเชื้อรา *R. microporus* เมื่อเลี้ยงร่วมกันเส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* เป็นปรสิตต่อเชื้อรา *R. microporus* เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ผลิตเอนไซม์ chitinase ทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *R. microporus* ผลิตสารอินทรีย์ระเหย และไม่ระเหยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ซึ่งเมื่อวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ระเหยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ทั้ง 2 ไอโซเลท โดย Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) พบว่า สารระเหยหลักของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 อยู่ในกลุ่มแอลกอฮอล์ ขณะที่เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 เป็นกลุ่มแอลกอฮอล์ และสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้เมื่อทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* แต่น้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ไม่สามารถยับยั้งได้จึงสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 เมื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อรา *R. microporus* เท่ากับ 500 และ 1,000 mgml⁻¹ ตามลำดับ และผลการทดสอบด้วยวิธี bioautography บนแผ่น Thin-layer chromatography

พบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา มีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.22-0.4 เมื่อวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ระเหย ของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 โดย GC-MS พบว่า เป็นสารกลุ่มแอลกอฮอล์ และสารปฏิชีวนะ

การเตรียมสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล และผงจากสปอร์ของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ทดสอบความมีชีวิตรอด และประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จทั้งสอง พบว่า ลดลงเพียงเล็กน้อย ในช่วง 6 เดือนของการเก็บรักษา และจากนั้นนำสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล 1 เปอร์เซ็นต์ มาเพิ่มปริมาณในมูลไก่ มูลวัว และปุ๋ยอินทรีย์ (ซีพี หมอดิน) ป่มเป็นเวลา 15 วัน พบว่า เมื่อนับจำนวนโคโลนีต่อกรัม ตั้งแต่เริ่มต้น ถึง 15 วัน พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 เจริญดีในปุ๋ยอินทรีย์ เมื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในสภาพเรือนกระจกผลการศึกษา พบว่า ทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม

Thesis Title Screening, Antagonistic Mechanisms and Applications of *Trichoderma harzianum* Rifai to Control White Root Disease of Rubber Trees

Author Miss Porntip Yamsuwan

Major Program Plant Pathology

Academic Year 2013

ABSTRACT

Screening, antagonistic mechanisms and applications of *Trichoderma* spp. to control white root disease of rubber trees were studied. A total of 356 *Trichoderma* spp. isolates were isolated from 86 rhizosphere soil samples of rubber trees. All isolates were screened for their ability to control *Rigidoporus microporus* in dual culture plates. Two promising isolates, ChM1.1 and NL2.2 were selected and were later identified as *T. harzianum* by morphological, physiological and molecular studies. In Vitro study on biocontrol mechanisms of *T. harzianum* ChM1.1 and NL2.2 against *R. microporus* revealed that both isolates compete for nutrients and space on dual culture plates, hypha of *T. harzianum* parasitize *R. microporus*, which was observed under scanning electron microscope (SEM), produced chitinase which can degrade the *R. microporus* cell wall, produced volatile and non-volatile organic compounds that inhibit *R. microporus* mycelial growth. Volatile organic compounds (VOCs) of each *T. harzianum* isolate was analysed by gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). The main VOCs of *T. harzianum* ChM1.1 was a compound class of alcohol, while *T. harzianum* NL2.2 was alcohol and antibiotic groups. From preliminary testing, culture filtrate of *T. harzianum* ChM1.1 inhibited *R. microporus* mycelial growth but *T. harzianum* NL2.2 did not. Hence, the crude extract of *T. harzianum* ChM1.1 was prepared and studied. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of the extract in inhibiting *R. microporus* mycelial growth were 500 and 1000 mgml⁻¹, respectively. Bioautography assay on Thin-layer

chromatography with *R. microporus* displayed high antifungal activity with R_f value of 0.22-0.44. The analysis of non-volatile organic compounds of *T. harzianum* ChM1.1 in crude by GC-MS showed that it was the compound classes of alcohol and antibiotics.

Spores of *T. harzianum* NL2.2 were prepared and formulated into granules and powder. Viability of spores and efficacy of both products slightly decreased during six months of storage. One percent of granule formulate was applied onto chicken and cow manure and organic fertilizer (CP Mordin) and incubated for 15 days. Enumerating the colony forming unit of *T. harzianum* indicated that organic fertilizer supported good growth of *T. harzianum* NL2.2. This organic fertilizer containing *T. harzianum* was applied to control white root disease of rubber trees in greenhouse conditions. The result revealed that it was effective to suppress the disease and significantly different from the control treatment.

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการตารางภาคผนวก	(12)
รายการภาพ	(15)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	19
2. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุอุปกรณ์	20
วิธีการวิจัย	23
3. ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง	37
4. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	74
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	86
ประวัติผู้เขียน	116

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตัวอย่างสูตรสำเร็จของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ที่ผลิตในเชิงการค้า	15
2 ส่วนประกอบของสูตรสำเร็จของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp.	31
3 การเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 และ NL2.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	44
4 การเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 และ NL2.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิต่าง ๆ หลังการบ่ม เป็นเวลา 2 วัน	47
5 ปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ในสูตรสำเร็จ หลังการผลิต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	62
6 ปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ในสูตรสำเร็จ หลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	64
7 เปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> ในสูตรสำเร็จของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 หลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	65
8 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> ในดินปลูก หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	69
9 ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ในการควบคุมโรครากขาวของต้นกล้ายางพาราในเรือนกระจก หลังการทดสอบ เป็นเวลา 4 เดือน	72

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1 รหัสของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ที่แยกจากตัวอย่างดิน จำนวน 86 ตัวอย่าง ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร TSM	91
2 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> โดยเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.	95
3 ประสิทธิภาพของสารระเหยของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 และ NL2.2 ต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> หลังบ่มการที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	99
4 องค์ประกอบสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1	100
5 องค์ประกอบสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2	102
6 องค์ประกอบของสารที่สกัดได้จากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1	105
7 ปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ที่เจริญในปุ๋ยชนิดต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 5, 10 และ 15 วัน	106
8 ปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ที่เจริญในปุ๋ยอินทรีย์ ซึ่งความชื้นที่แตกต่างกัน หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน	107
9 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการเจริญของ เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 ที่ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	108
10 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการเจริญของ เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ที่ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	108
11 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการเจริญของ เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ หลังการบ่ม เป็นเวลา 2 วัน	109
12 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการเจริญของ เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ หลังการบ่ม เป็นเวลา 2 วัน	109

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
13 วิเคราะห์ความแปรปรวนประสิทธิภาพของสารระเหยของ เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 ต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใย เชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	110
14 วิเคราะห์ความแปรปรวนประสิทธิภาพของสารระเหยของ เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	110
15 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ในสูตรสำเร็จหลังการผลิต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	110
16 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ในสูตรสำเร็จ หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	111
17 วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> โดย สูตรสำเร็จของ เชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 หลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน	111
18 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2. ที่เจริญในปุ๋ยชนิดต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน	112
19 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ที่เจริญในปุ๋ยอินทรีย์ ซึ่งความชื้นที่แตกต่างกัน หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน	112
20 วิเคราะห์ความแปรปรวนการเจริญของเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> ในดินปลูก หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	112
21 วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรคของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ในดินปลูก หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	113
22 วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรครากขาวของต้นกล้ายางพารา ในเรือนกระจก หลังการทดสอบ เป็นเวลา 4 เดือน	113

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
23 วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรครากขาวของต้นกล้ายางพารา ในเรือนกระจก หลังการทดสอบ เป็นเวลา 4 เดือน	113

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การวางเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพสารระเหยของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ต่อการเจริญของเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i>	28
2 ลักษณะฝาขวดตูแรนดัดแปลง โดยเจาะฝาขวดใส่จุกยางแทน เพื่อสามารถแทงเข็มฉีดของเครื่อง GC-MS	29
3 โคโลนีของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSM หลังการแยกเชื้อด้วยวิธี dilution spread plate ที่ความเข้มข้นของดิน 10^{-4} เป็นเวลา 7 วัน	37
4 โคโลนีของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. และเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture plate หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	39
5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1	41
6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2	42
7 ขนาด PCR products ของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 และ NL2.2 เมื่อเปรียบเทียบกับ Markers (100 bp ladder)	43
8 โคโลนีของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีระดับ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	45
9 โคโลนีของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีระดับ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	46
10 โคโลนีของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 2 วัน	48
11 โคโลนีของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 2 วัน	49
12 เส้นใยเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> แสดงอาการเหี่ยว เกิดรูพรุน และฉีกขาด เมื่อวางเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 และ NL2.2 หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	51

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13 ลักษณะการสร้างวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate โดยเอนไซม์ chitinase บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสม colloidal chitin 2.4 เปอร์เซ็นต์ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน	53
14 ประสิทธิภาพของสารระเหยของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1 และ NL2.2 ต่อเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	55
15 Total ion chromatogram ของสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1	56
16 Total ion chromatogram ของสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2	57
17 บริเวณยับยั้งเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> เมื่อทดสอบด้วยวิธี Thin-layer chromatography bioautography บนแผ่น TLC หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน	59
18 Total ion chromatogram ของสารที่สกัดได้จากเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> ChM1.1	60
19 ลักษณะของสูตรสำเร็จของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2	61
20 โคโลนีเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 บนอาหาร TSM หลังนำสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	62
21 จำนวนประชากรของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ในปุ๋ยชนิดต่าง ๆ ที่นิ่งและไม่นิ่งฆ่าเชื้อ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 5, 10 และ 15 วัน	66
22 ลักษณะของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ที่เจริญบนปุ๋ยอินทรีย์ นิ่งฆ่าเชื้อ	67
23 โคโลนีของเชื้อรา <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ที่เจริญในปุ๋ยอินทรีย์ และเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture plate หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	67

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
24 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> ในดินปลูก หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	70
25 ฟู่ไม้และรากของต้นกล้ายางพาราหลังทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จ <i>Trichoderma harzianum</i> NL2.2 ในปุ๋ยอินทรีย์ ต่อการยับยั้ง เชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> สาเหตุโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก หลังการทดสอบ เป็นเวลา 4 เดือน	73

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และภูมิภาคอาเซียน โดยประเทศไทยเป็นผู้นำในการผลิต และส่งออกยางธรรมชาติมากที่สุดในโลก โดยมีพื้นที่ปลูก 18.76 ล้านไร่ ซึ่งเป็นพื้นที่ปลูกทางภาคใต้มากที่สุด รองลงมาเป็นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคเหนือตามลำดับ สามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรชาวสวนยางเป็นอย่างมาก (สถาบันวิจัยยาง, 2555) แต่มีปัจจัยที่ทำให้ผลผลิตของยางพาราลดลงเป็นอย่างมาก คือ โรครากขาวซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem (Syn. *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki) ซึ่งทำความเสียหายรุนแรงให้กับยางพารา พงษ์เทพ ขจรไชยกูล (2523) ได้สำรวจโรครากขาวในสวนยางสงเคราะห์ในจังหวัดกระบี่ นราธิวาส ปัตตานี และยะลา พบว่า ต้นยางใหม่เป็นโรครากขาว 12-17 เปอร์เซ็นต์ และจากการสำรวจพื้นที่เสียหายของภาคใต้ตอนบน และตอนล่างในปี 2551-2553 พบว่าภาคใต้ตอนบนมีพื้นที่เสียหายจากโรครากขาวทั้งหมด 1,929 ไร่ จากพื้นที่สำรวจทั้งหมด 56,296 ไร่ คาดว่าทำความเสียหายเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 1,600 ล้านบาท (อารมณโรจน์สุจิตร์ และคณะ, 2553)

เชื้อรา *R. microporus* สามารถเข้าทำลายระบบรากของต้นยางพารา ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณรากเกิดความเสียหายส่งผลกระทบต่อกระบวนการดูดน้ำ อาหารของยางพารา ซึ่งเป็นปัจจัยในการสังเคราะห์แสง ทำให้ต้นยางพาราแสดงอาการใบเหลือง ร่วง และยืนต้นตาย ผิวรากมีเส้นใยสีขาวปกคลุมจับตัวกันแน่น (rhizomorph) เมื่ออายุมากขึ้นมีลักษณะกลมมน เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาล และยืนต้นตายในที่สุด เนื้อไม้ของรากที่เป็นโรคมียืดหยุ่น เยื่อ และเบา หากอยู่ในที่ชื้นแฉะจะอ่อนนิ่ม ในฤดูฝนมักพบดอกเห็ดบริเวณโคนต้นที่เป็นโรค (กรมวิชาการเกษตร, 2555) การควบคุมโรคกระทำโดยการใส่สารเคมีซึ่งเป็นวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ เนื่องจากสะดวก และให้ผลในการควบคุมเร็วกว่าวิธีการอื่น กรมวิชาการเกษตร (2555) แนะนำให้ใช้กำมะถันรองกันหลุมสำหรับยางปลูกใหม่ ในแหล่งที่มีการระบาดของโรครากขาวมาก่อนเพื่อปรับความเป็นกรดต่างของดินไม่ให้เป็นเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อสาเหตุโรครากขาว หากพบต้นที่เป็นโรคควรขุดรากเผาทำลายหรืออาจขุดล้อมบริเวณต้นที่เป็นโรคเพื่อป้องกันการระบาดไปยังต้นอื่น

ในแถวเดียวกัน สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคได้ เช่น cyproconazole, difenoconazole, fenichonil, hexaconazole, mycloboutanil, propiconazole, prochloraz และ triadimefon ซึ่งอาจใช้ได้ผลในระยะแรกที่พืชเริ่มติดเชื้อโรครากขาว แต่การใช้สารเคมีสิ้นเปลืองทุนสูง และเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ และสิ่งแวดล้อม การควบคุมโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรนำมาใช้ในการควบคุมโรค จึงได้วางแผนการทดลองโดยใช้สารชีวภัณฑ์ร่วมกับปุ๋ยคอกหรืออินทรีย์เพื่อเพิ่มจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ให้สามารถตั้งรกรากได้ในดิน เพื่อแนะนำเกษตรกรต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. โรครากขาว

โรครากขาวของยางพาราเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem [Syn : *Rigidoporus lignosus* (Klozsch) Imazeki] สามารถจัดจำแนกอนุกรมวิธาน (Kirk et al., 2008) ดังนี้

Kingdom Fungi

Phylum Basidiomycota

Class Agaricomycetes

Subclass Agaricomycetidae

Order Polyporales

Family Meripilaceae

Genus *Rigidoporus*

Species *R. microporus*

1.1 สันฐานวิทยาของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

เชื้อรา *R. microporus* จัดเป็นพวงราชั้นสูงเส้นใยมีผนังกันแบบ simple septate ไม่มี clamp connection เส้นใยสีขาวแตกแขนงจับตัวกันแน่น ขนาดกว้าง 1.5-6 ไมโครเมตร basidiospore มีสีส้มอ่อน เดี่ยว ๆ กลม ใส ผิวเรียบ ขนาด 2.5-3 ไมโครเมตร เมื่อเส้นใยแก่จะนูนสีน้ำตาลอ่อน สร้างดอกเห็ดบริเวณรากหรือตอไม้ยางพาราเป็นแผ่นครึ่งวงกลมไม่มีก้าน ขึ้นซ้อนกัน ขณะดอกเห็ดอ่อนผิวด้านบนมีสีส้มหรือส้มแดง ขอบสีขาว ผิวสัมผัสลื่น เมื่อดอกแก่จะแข็งกระด้างมีสีน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลเหลืองสลับกัน ด้านล่างมีรูขนาดเล็ก (pore) ลักษณะกลม รี หรือเหลี่ยมกลม กระจายทั่วแผ่นดอกเห็ดยกเว้นบริเวณขอบดอกเห็ด ขนาดดอกเห็ดไม่

แน่นอนขึ้นอยู่กับความชื้น อายุ และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6-7 แต่ในสภาวะที่ pH 3 และอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถเจริญหรือเจริญได้น้อยมาก (อารมณั ไรจน์สุจิตร์, 2541)

1.2 อาการของโรครากขาว

เชื้อสาเหตุโรครากขาวสามารถเข้าทำลายระบบรากของต้นยางพารา ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณรากเกิดความเสียหายส่งผลกระทบต่อกระบวนการดูดน้ำ อาหารของยางพารา ซึ่งน้ำ และธาตุอาหารเป็นปัจจัยในการสังเคราะห์แสง หากรากถูกทำลายไม่สามารถดูดน้ำ อาหารได้ขาดปัจจัยในการสังเคราะห์แสง ต้นยางพาราจะแสดงอาการใบเหลือง ร่วง และยืนต้นตาย ผิวรากมีเส้นใยสีขาวปกคลุมจับตัวกันแน่น (rhizomorph) เมื่ออายุมากขึ้นมีลักษณะกลมมนเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาลตามลำดับ เนื้อไม้ของรากที่เป็นโรคมืดครึ้ม ยุ่ย และเบา หากอยู่ในที่ชื้นแฉะจะอ่อนนิ่มจนเหลวละ ในฤดูฝนมักพบดอกเห็ดบริเวณโคนต้นที่เป็นโรค (กรมวิชาการเกษตร, 2555)

1.3 การระบาดของโรครากขาว

เชื้อราเจริญ และระบาดอย่างรวดเร็วในช่วงฤดูฝน อากาศมีความชื้นสูงสามารถแพร่กระจายได้สองทางคือ การสัมผัสกันระหว่างรากที่เป็นโรคกับรากจากต้นปกติทำให้เชื้อเจริญลุกลามไปยังต้นใกล้เคียง และโดยสปอร์ของเชื้อรารากดอกเห็ดปลิวไปตามลม ติดไปกับร่องเท้า หรือลอยไปตามน้ำ ตกบนบาดแผลของต้นยางใหม่ เมื่อมีความชื้นเพียงพอจะเจริญลุกลามไปยังระบบรากกลายเป็นแหล่งเชื้อโรคแหล่งใหม่ต่อไป ปัจจุบันพบว่าโรครากขาวสามารถแพร่ระบาดได้ทุกฤดู เนื่องจากมีแหล่งเชื้อที่อยู่ในดินจำนวนมาก และกระจายทั่วไป ดังนั้นเกษตรกรควรป้องกันมิให้เชื้อปนเปื้อนในดิน อายุยางที่พบการเกิดโรคหากปลูกครั้งแรกมักพบในยางอายุ 15 ปีขึ้นไป ในยางที่ปลูกเป็นรอบที่ 2 และไม่ได้กำจัดตอเก่า มักพบเมื่อยางอายุ 1 ถึง 5 ปีแล้วแต่การสะสมของเชื้อในดินในแปลงยางนั้น ยางรอบที่ 2 มีโอกาสเป็นโรครากขาวเร็วกว่ายางรุ่นแรก เนื่องจากช่วงรุ่นแรกที่ปลูกนั้นเมื่อมีต้นยางเป็นโรค และไม่ได้ขุดรากถอนโคน และเผาทิ้งหรือตัดต้นทิ้งแล้ว แต่ไม่ได้เผาราก และทำลายดอกเห็ด เชื้อจึงสะสมอยู่ในสวนยาง เมื่อปลูกยางใหม่ เชื้อจึงเข้าทำลายยางที่ปลูกใหม่นั้นตั้งแต่ในปีแรก (เสมอใจ ชื่นจิตต์, 2555) นอกจากนี้การทำลายยางแล้ว เชื้อยังมีพืชอาศัยได้แก่ กระทกรก กาแฟ โกโก้ ขนุน จำปาตะ ขา หัง ทูเรียน น้อยหน่า เนียงนก ไม้ พริกไทย พริกชี้หนู มะเขือเปราะ มะพร้าว มังคุด มันเทศ มันสำปะหลัง ลองกอง ส้ม สะเดาเทียม สะเดาบ้าน ฯลฯ (กรมวิชาการเกษตร, 2555)

1.4 กลไกการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครากขาว

จากการศึกษาของ Nicole และ Benhamou (1991) พบว่าต้นยางอายุน้อย ติดเชื้อได้ง่ายกว่าต้นยางอายุมาก ซึ่งกระบวนการหรือกลไกการเข้าทำลายของเชื้อรา *R. microsporus* สามารถสรุปได้ 3 ขั้นตอนคือ 1) ไรโซมอฟของเชื้อราเจริญอยู่บนผิวรากภายนอก (ectotrophic growth habit) 2) เมื่อไม่มีอาหารจากภายนอกเชื้อราจะเข้าทำลายเซลล์รากพืชโดยไรโซมอฟเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีผนังเซลล์บางขึ้นเพื่อการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช (infectious hyphae) ทางรูเปิดธรรมชาติ เช่น รอยแตกของผิวที่ลำต้น (lenticels) ทางบาดแผล หรือโดยการสร้าง เอนไซม์เพื่อย่อยเซลล์ผิวรากของพืช กระบวนการนี้เกิดขึ้นในสภาพดินขาดออกซิเจน (Nandris *et al.*, 1987) ทำให้ลักษณะโครงสร้างของพืชเปลี่ยนไป โดยปลดปล่อย extracellular enzymes เข้าย่อยสลายเนื้อไม้ 3) เส้นใยเจริญอยู่ภายในเซลล์พืชโดยการย่อยผนังเซลล์ของระบบท่อลำเลียง ท่ออาหาร และแพร่กระจายสู่เซลล์อื่นโดยการแทงผ่านทางช่องว่าง และท่อต่าง ๆ ของเซลล์ จึงสามารถพบเส้นใยเชื้อราได้ทั้งระหว่างเซลล์ และผนังเซลล์ และพบว่า การที่เชื้อราเจริญอยู่ภายในท่ออาหาร ทำให้น้ำยางตกตะกอนจับเป็นก้อนส่งผลให้ปริมาณน้ำยางในต้นยางลดลงด้วย

จากการตรวจสอบเนื้อไม้ที่เป็นโรค พบว่าโครงสร้างของเซลล์ถูกทำลาย ส่วนของ middle lamella และผนังเซลล์ถูกย่อยสลาย ทั้งนี้เกิดจากเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างของพืชได้ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย เช่น 1. glycosidases (β -glucosidase, α -galactosidase และ β -galactosidase) 2. polysaccharidases (CM-cellulase pectinase และ xylanase) และ 3. phenol oxidases (laccase และ peroxidase) เนื้อเยื่อของพืชเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *R. microsporus* นั้นพบการทำงานของเอนไซม์ laccase ในปริมาณมากเป็นเอนไซม์หลัก ในขณะที่เชื้อราทำลายเนื้อไม้ชนิดอื่น เช่น *Phellinus noxius* จะสร้างเอนไซม์ glycosidase และ polysaccharidases เป็นหลัก (Geiger *et al.*, 1986)

1.5 ความสำคัญ และความเสียหายที่เกิดจากโรครากขาว

เชื้อรา *R. microsporus* สาเหตุโรครากขาวก่อให้เกิดความเสียหายให้กับไม้ผล และไม้ยืนต้นหลายชนิด โดยเฉพาะยางพาราจัดเป็นโรคที่สำคัญพบในพื้นที่ปลูกยางทั่วโลก เช่น ไทย มาเลเซีย ศรีลังกา อินโดนีเซีย อินเดีย แอฟริกากลาง แอฟริกาตะวันตก และในบางประเทศ ทำให้เกิดความสูญเสียมากกว่าศัตรูพืชอื่น ๆ (Jayasuriya and Thennakoon, 2007) สำหรับมูลค่าความเสียหายนั้น Nandris และคณะ (1987) รายงานว่า โดยทั่วไปต้นยางมีอายุเก็บเกี่ยว 25 ปี หากเชื้อเข้าทำลายจะก่อให้เกิดความเสียหายเป็นมูลค่าหลายแสนดอลลาร์ต่อเฮกตาร์

อารมณั โรจน์สุจิตร และคณะ (2553) ได้สำรวจโรคทางรากของยางพารา พบการแพร่ระบาดของโรค และทำความเสียหายแก่พื้นที่ปลูกยางทั่วไป พบต้นยางเป็นโรคตั้งแต่ อายุ 1-2 ปีแรกหลังปลูกหรืออายุ 15-20 ปี ทำให้ต้นที่เป็นโรครยืนต้นตาย และเป็นแหล่ง แพร่กระจายเชื้อแก่ต้นยางข้างเคียง ทั้งในแถว และระหว่างแถวต่อไป ซึ่งทำให้จำนวนต้นยาง และ ผลผลิตต่อไร่ลดลง จากการสำรวจ และประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจของยางพาราสาเหตุ จากโรครากขาวในพื้นที่ปลูกยางปี 2551-2553 พบว่า พื้นที่ปลูกยางภาคใต้มีการระบาดของโรค รากขาวกระจายในทุกพื้นที่ ทำความเสียหายแก่แปลงยางที่เป็นโรคคิดเป็น 3.4-3.5 เปอร์เซ็นต์ของ พื้นที่ปลูกยาง ส่วนในภาคตะวันออก (จังหวัดจันทบุรี ตราด และระยอง) พบน้อยมาก ทำความเสียหายแก่แปลงยางที่เป็นโรค 0.05-0.8 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ปลูกยาง หากรวมมูลค่าความเสียหายโรครากขาวทั้งหมดในปี 2551-2553 คาดว่ามีความเสียหายเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 1,600 ล้านบาท และภายใน 10 ปี คาดว่าประเทศไทยจะสูญเสียรายได้จากยางพาราไม่ต่ำกว่า 50,000 ล้านบาท

1.6 การควบคุมโรครากขาว

การใช้สารเคมีในการป้องกันโรคเป็นวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ เนื่องจากสะดวก และให้ผลในการควบคุมเร็วกว่าวิธีการอื่น กรมวิชาการเกษตร (2555) แนะนำให้ใช้กำมะถันรอง ก้นหลุมสำหรับยางปลูกใหม่ในแหล่งที่มีการระบาดของโรครากขาวมาก่อน เพื่อปรับความเป็นกรด ด่างของดินไม่ให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อสาเหตุโรครากขาว หากพบต้นที่เป็นโรคควรขุดราก เมาทำลายหรืออาจขุดล้อมบริเวณต้นที่เป็นโรคเพื่อป้องกันการระบาดไปยังต้นอื่นในแถวเดียวกัน สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรค ได้แก่ cyproconazole, difenoconazole, fenichonil, hexaconazole, mycloboutanil, propiconazole, prochloraz และ triadimefon ซึ่งอาจใช้ได้ผล ในระยะแรกที่พืชเริ่มติดเชื้อโรครากขาว

สำหรับการควบคุมโดยชีววิธี โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งเป็นเชื้อรา ที่เจริญอย่างรวดเร็ว และสามารถยับยั้งเชื้อโรคพืชหลายกลุ่ม รวมทั้งเชื้อโรคที่เกิดจากเชื้อรากลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งเป็นสาเหตุในการย่อยเนื้อไม้ (Bruce and Highley, 1991) Wijesundera และ คณะ (1991) แยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินในสวนยางพาราได้จำนวน 7 ไอโซเลท นำมา ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรครากขาว พบว่า เชื้อรา *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii* 4 ไอโซเลท และ *T. viridae* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ โรครากขาวได้ โดยการสร้างสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค เช่น

glucanase, chitinase (สามารถย่อยสลายเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช) และเป็นปรสิตรกับเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค

อารมณีย์ โรจน์สุจิตร์ (2541) รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microsporus* ทั้งในจานทดลอง และในดินที่บรรจุในหลอดทดลอง แต่เมื่อทดสอบในสภาพเรือนทดลองพบว่า ไม่สามารถควบคุมโรครากขาวของกล้วยไม้ได้ ส่วนเชื้อ *Chaetomium* sp. ไม่สามารถควบคุมเชื้อโรครากขาวในทุกการทดลอง

Jayasuriya และ Thennakoon (2007) รายงานว่า เชื้อรา *T. harzianum* T310 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microsporus* ได้ดีในห้องปฏิบัติการ และเมื่อทดสอบในสภาพเรือนทดลอง โดยปลูกเชื้อรา *R. microsporus* ด้วยชิ้นส่วนของรากยางพาราที่แสดงอาการโรครากขาว 25, 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ และปลูกเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* พบว่า ในระยะแรกกล้วยไม้ที่ปลูกเชื้อด้วยชิ้นส่วนที่แสดงอาการโรค 25 เปอร์เซ็นต์ แสดงอาการเกิดโรค 23.6 เปอร์เซ็นต์แต่เมื่อตรวจผลที่ 60 วัน กลับพบว่า รากพืชมีลักษณะปกติ ไม่มีการติดเชื้อ ส่วนการปลูกเชื้อด้วยชิ้นส่วนรากที่แสดงอาการโรค 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์พบว่า เมื่อตรวจผลที่ 90 วัน พืชแสดงอาการติดเชื้อ 40 และ 44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Kaewchai และ Soyong (2010) ศึกษาเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microsporus* ด้วยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้เชื้อจำนวน 30 ไอโซเลท คือ *Acremonium fusidiodes* 2 ไอโซเลท *Aspergillus niger* 2 ไอโซเลท *Chaetomium aureum* 2 ไอโซเลท *Ch. bostrychodes* 7 ไอโซเลท *Ch. cochliodes* 1 ไอโซเลท *Ch. cupreum* 1 ไอโซเลท *Ch. fusiforme* 5 ไอโซเลท *Ch. indicum* 2 ไอโซเลท *Penicillium canescens* 1 ไอโซเลท *T. hamatum* 2 ไอโซเลท *T. harzianum* 2 ไอโซเลท *T. viride* 3 ไอโซเลท ผลการศึกษา พบว่า เชื้อ *A. niger* *Ch. bostrychodes*, *Ch. cochliodes* *Ch. cupreum*, *T. hamatum*, *T. harzianum* และ *T. viride* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microsporus* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และในจำนวนนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด รองลงมาคือ *Aspergillus* spp. และ *Chaetomium* spp. ตามลำดับ โดยเชื้อรา *T. hamatum* STN07 และ *T. viride* STN04 และ STN05 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 89.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microsporus* จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ *A. niger* SN71 และ SN72, *Ch. bostrychodes* BN08, BN11 และ BS01, *Ch. cupreum* RY202, *T. hamatum* STN07 *T. harzianum* STN01 และ STN02 และ *T. viride* STN04 มาสกัดสารสกัดหยาบ และทดสอบความสามารถในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา

R. microporus พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วย hexane จากเชื้อ *Ch. cupreum* RY202 ให้ผลดีที่สุดสามารถยับยั้งได้ 82 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นสารที่สกัดด้วย methanol จากเชื้อรา *T. hamatum* STN07 และสารที่สกัดด้วย ethyl acetate จากเชื้อ *Ch. cupreum* RY202 โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 80 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังพบว่าประสิทธิภาพของ *Ch. cupreum* RY202 รูปแบบผง และน้ำมันสามารถลดการเกิดโรครากขาวยางพาราได้ 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ปวีณา สังข์แก้ว (2556) ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* sp. โดยแยกเชื้อ *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดินสวนยางในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยได้เชื้อจำนวน 258 ไอโซเลท นำมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. S106 และ S110 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 83.57 และ 74.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อ *Streptomyces* sp. S106 และ S110 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ในดินปลูกที่บรรจุน้ำในหลอดทดลอง พบว่า เชื้อ *Streptomyces* sp. S106 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Streptomyces* sp. S110 และชุดควบคุม และเมื่อนำเชื้อ *Streptomyces* sp. S106 มาจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซีวเคมี และการเทียบเคียงโดยใช้ partial 16S rDNA sequence analysis ได้เป็นเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* จากนั้นทดสอบผลของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อการเปลี่ยนแปลงของเชื้อรา *R. microporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า เส้นใยของเชื้อราเหี่ยวยุบผิดรูปร่าง และเมื่อนำสารสกัดหยาบของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *R. microporus* โดยหาค่า MIC และ MFC พร้อมทั้งทดสอบด้วยวิธี Thin-layer chromatography bioautography พบว่า สารสกัดให้ค่า MIC และ MFC เท่ากับ 62.5 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรามีค่า R_f เท่ากับ 0.06 จากนั้นได้ผลิตสูตรสำเร็จ 4 สูตร และคัดเลือกสูตรสำเร็จชนิดแกรนูลสูตรที่ 3 และชนิดผงสูตรที่ 4 เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก ผลการทดลอง พบว่า สูตรสำเร็จทั้ง 2 ชนิดสามารถควบคุมโรครากขาวได้ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี

2. เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช เช่น เชื้อรา *T. harzianum*, *T. koningi*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii*, *T. virens* และ *T. viride* (Kuhls et al., 1999) จีระเดช แจ่มสว่าง 2546 กล่าวว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชได้ดี และกว้างขวางนั้น สาเหตุอาจมาจากมีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีการสร้างเอนไซม์มาย่อยสลายพวก polysaccharide สามารถขยายพันธุ์ได้ในแหล่งคาร์บอนหลายชนิด และเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละสายพันธุ์สามารถทนต่อสารเคมีต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoter) และสามารถฟื้นฟูสภาพดินที่เสื่อมโทรม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเจริญตั้งรกรากร่วมกับระบบรากของพืชได้ดีเป็นผลทำให้รากพืชถูกปกป้องด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. เต็มพื้นที่ผิวรากพืช (Harman, 2000; Harman, 2006) เชื้อสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถควบคุมได้ดีเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน เช่น *Fusarium oxysporum*, *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, *Pythium aphanidermatum* f.sp. *culmorum*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* (Chet and Inbar., 1994) โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถจัดจำแนกอนุกรมวิธาน (Gagera et al., 2013) ดังนี้

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Pezizomycetes

Order Hypocreales

Family Hypocreaceae

Genus *Trichoderma*

2.1 สันฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

Rifai (1969) รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. มีการสร้างเส้นใยเจริญเร็ว เริ่มแรกโคโคนีมีลักษณะผิวหน้าเรียบไม่มีสีหรือสีขาว ต่อมาจะมีลักษณะเป็นแบบปุยฝ้ายฟูอย่างหลวม ๆ หรืออยู่เป็นกระจุกหนาแน่น การสร้างสปอร์มีลักษณะที่สำคัญคือบริเวณที่เริ่มมีการสร้างสปอร์มีลักษณะเป็นวงรอบหรือเป็นวงแหวน (ring-like zone) ซึ่งเกิดจากอิทธิพลของแสง และเมื่อโคโคนีมีอายุมากขึ้นจะมีการสร้างโคนิดิโอฟอร์ขึ้นมาใหม่อีกรอบ ทำให้เห็นการเกิดรอบวงหรือ

zonation สำหรับตัวอย่างที่โคโลนี่เป็นแบบปุยฝ้าย (floccose) การสร้างรอบวงสามารถสังเกตเห็นได้ในขณะที่เชื้อยังมีอายุน้อย สีของโคโลนี่ส่วนใหญ่เกิดมาจากการสร้างสีของสปอร์ ซึ่งมีตั้งแต่โคโลนี่สีเขียวอมเหลืองจนถึงเขียวเข้ม (dark green) นอกจากสีของสปอร์ที่มีผลต่อสีของโคโลนี่แล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อสีโคโลนี่ คือปริมาณสปอร์ที่สร้างขึ้นทำให้โคโลนี่เข้มขึ้นหรืออ่อนลง การสร้างผลึกสีหรือปล่อยสีออกมาทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไปรวมทั้งชนิด และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อสีของโคโลนี่ การสร้างเส้นใยที่ยืดตัวออก และเป็นหมัน (sterile hyphal elongation) เนื่องมาจากของโคโคนิโอฟอร์ทำให้โคโลนี่มีสีเขียวหรือสีเทาเขียว (grayish-green)

2.2 การเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ต่อเชื้อโรคพืช

2.2.1 การแข่งขันในด้านพื้นที่ และสารอาหาร (competition)

เนื่องจากเชื้อราสามารถเจริญได้รวดเร็ว จึงสามารถแข่งขันในด้านการตั้งรกรากครอบครองพื้นที่ และแย่งสารอาหารจากเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยการแก่งแย่ง แข่งขัน ในการดูดซับสารอาหารพวกสารอินทรีย์ต่าง ๆ เพื่อใช้ในการเจริญ ขยายพันธุ์ (Danielson and Davey, 1973) นอกจากนั้นเชื้อรา *Trichoderma* sp. บางสายพันธุ์ยังสามารถผลิต siderophores ออกมาดูดซับแย่งธาตุเหล็ก (Chet and Inbar, 1994) ซึ่งการแข่งขันในด้านสารอาหารเป็นกลไกหลักที่ทำให้เชื้อรา *T. harzianum* มีประสิทธิภาพในการควบคุม และมีการแข่งขันได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ในดิน โดยเฉพาะเชื้อสาเหตุโรคพืช และเชื้อชนิดอื่น ๆ การแก่งแย่งสารอาหารของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในดินมากแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลต่อกิจกรรมในการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. (Bae and Knudsen, 2005) ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *T. koningii* สามารถเจริญแก่งแย่งสารอาหารส่งผลให้สามารถครอบครองพื้นที่บริเวณรากของต้นหอม และลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *S. cepivorum* สาเหตุโรคโคนเน่าได้ (Danielson and Davey, 1973)

2.2.2 การเป็นปรสิตต่อเชื้อร่าก่อโรคพืช (parasitism)

โดยจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดสามารถเจริญบนจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งได้ เจริญแทงทะลุผ่านผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืชเข้าไปดูดน้ำเลี้ยง หรือสารอาหารโดยตรงจากเชื้อสาเหตุโรค และขัดขวางการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช (hyphal interference) โดยการพันรัดเส้นใยหรือโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp. และเชื้อสาเหตุโรคพืชอื่น ๆ โดยมีผลทำให้เส้นใยเชื้อสาเหตุโรคเจริญผิดปกติ (Weindling, 1934)

เกศินี แก้วมาลา (2551) ตรวจหาเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 4 พันธุ์ ได้แก่ ชม. 60 สจ. 5 MJ9518-2 และ MJ9520-21 โดยวิธีเพาะบน

กระดาษขึ้นสามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้ 4 ไอโซเลท จากพันธุ์ ชม. 60 สจ. 5 และ MJ 9520-21 เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลือง ด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลทให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูง และเมื่อนำมาศึกษากลไกการเป็นปฏิปักษ์โดยวิธี slide dual culture พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. แสดงการเป็นปรสิตโดยการพันรัด และแทงเข้าไปภายในเส้นใยของเชื้อรา *C. truncatum* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับสารเคมี captan ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในระยะต้นอ่อนของถั่วเหลืองพันธุ์ ชม. 60 และ สจ.5 ในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลทที่ 3 และ 4 และสารเคมี captan ลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสในต้นอ่อนของถั่วเหลืองได้ โดย captan ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลทที่ 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เสมอใจ ชื่นจิตต์ และคณะ (2553) ประเมินการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora* สาเหตุโรคใบร่วงของกล้วยพารา สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้ 797 ไอโซเลท (*Chaetomium* spp. 174 ไอโซเลท *Trichoderma* spp. 168 ไอโซเลท *Streptomyces* spp. 158 ไอโซเลท และ *Bacillus* spp. 297 ไอโซเลท) เมื่อทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. T016-2 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora* ได้ 92.5 และ 92.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบในสภาพเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. T016-2 บนใบยางพารา ก่อนพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora* สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ดีที่สุด

2.2.3 การผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiosis) ชนิดที่เป็นสารระเหย และชนิดที่แพร่ในอาหาร

เชื้อรา *Trichoderma* sp. เจริญได้ดี สามารถดูดซับสารอินทรีย์มาใช้เป็นอาหารในการเจริญขยายพันธุ์ สร้าง และปลดปล่อยสารพิษ หรือสารปฏิชีวนะ ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น ส่งผลให้เชื้อสาเหตุโรคพืชถูกทำลาย ลดจำนวน และลดความสามารถในการเกิดโรค (เกษม สร้อยทอง, 2551)

Ghisalberti และ Sivasithamparam (1991) รายงานว่า การสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และสารต้านเชื้อรา ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งความ

แตกต่างของกลุ่มสารประกอบทางเคมี แบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ (1) สารประกอบชนิดที่ระเหยได้ เช่น 6-pentyl-a-pyrone (6PP) และอนุพันธ์ของ isocyanide (2) สารประกอบที่ละลายน้ำได้ เช่น heptelidic acid หรือ koningic acid และ (3) peptaibol เป็นโพลิโกเพปไทด์ของกรดอะมิโน ซึ่งเป็นโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะจากเชื้อรา *Trichoderma* sp.

Vinale และคณะ (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของสารทุติยภูมิของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T22 T39 และ A6 และ *T. atroviride* สายพันธุ์ P1 ในการควบคุมโรคและการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยพ่นสาร harzianolide และ 6PP ซึ่งสกัดได้จากเชื้อรา *T. atroviride* และ *T. harzianum* ในต้นถั่ว (*Pisum sativum*) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) และผักกาดขาว (*Brassica napus*) พบว่า สารทุติยภูมิเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค และพืชมีการสร้าง auxin ที่ส่งเสริมการเจริญ นอกจากนี้ทดสอบการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรค โดยพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Botrytis cinerea* สาเหตุโรคผลเน่าของมะเขือเทศ และเชื้อ *Leptosphaeria maculans* สาเหตุโรคเน่าของต้นกล้า oilseed rape พบว่า พืชทั้งสองชนิดแสดงอาการโรคที่เกิดจากเชื้อทั้งสองชนิดลดลง จึงสรุปว่าสารทุติยภูมิเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชและชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชได้

ชมพูนุท บุญราชแขวน (2550) ศึกษาอิทธิพลของสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 13 สายพันธุ์ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ T-50 และ PM 9 สามารถสร้างบริเวณใสหรือบริเวณยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 61.66 เปอร์เซ็นต์ และ 52.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถผลิตสารเคมีอาจเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotics) สารพิษ หรือ เอนไซม์ (extracellular enzymes) มายับยั้ง ทำลายเส้นใย หรือการออกของสปอร์เชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น สารไตรโคเดอร์มิน (trichodermin) เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม sesquiterpene (Godfredsen and Vangedal, 1965) สารอะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เป็นสารปฏิชีวนะชนิดที่ระเหยได้ (volatile antibiotic) (Dennis and Webster, 1971) นอกจากนี้ Elad และคณะ (1993) รายงานว่าตรวจพบเอนไซม์ cellulases, chitinase และ glucanase บริเวณที่เส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* เกาะติดพันรัดเส้นใยของเชื้อรา *Botrytis cinerea* สาเหตุโรค grey mold ของแตงกวา

2.2.4 ชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (induced resistance)

การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชเกิดขึ้นกับทุกพืช ซึ่งเป็นกลไกการต่อต้านการเกิดโรคพืชเอง และเกิดอย่างซับซ้อน (Harman *et al.*, 2004) การเกิดการต้านทานของพืชอาจเกิดเฉพาะแห่งหรือกระจายทั่วทั้งต้น (Pal and Gardener, 2006) เชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ โดย Harman และคณะ (2004) รายงานว่ามีการค้นพบเชื้อรา *T. harzianum* T-39 สามารถชักนำให้ผักกาดหอม พริกไทย มะเขือเทศ และยาสูบ ต้านทานต่อเชื้อรา *B. cinerea*

นอกจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีกลไกในการเป็นปฏิปักษ์ ต่อเชื้อโรคพืชแล้ว ยังสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth regulators) จีระเดช แจ่มสว่าง (2547) ศึกษาการส่งเสริมการเจริญของพืชในไม้ดอกไม้ประดับที่ปลูกในกระถาง พืชผัก กุหลาบ ไม้ผลที่เพาะด้วยเมล็ด กิ่งปักชำ และพืชหัว พบว่า สามารถเพิ่มขนาด ความสูง น้ำหนักของต้น และช่วยเร่งการสร้างดอก โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถช่วยละลายแร่ธาตุให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชจึงช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2.3 การผลิตจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปของสารชีวภัณฑ์

ในปัจจุบันมีการนำเชื้อรา *Trichoderma* sp. มาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์การค้ามากที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดอื่น ทั้งในรูปเชื้อสด เชื้อแห้ง หรือผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ อยู่ในรูปสารกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชผสมในปุ๋ยอินทรีย์หรือสารปรับสภาพดิน (Harman *et al.*, 2004; Harman, 2006 : Vinale *et al.*, 2006) ในต่างประเทศมีการนำเชื้อรา *Trichoderma* sp. มาผลิตเชิงการค้าอย่างแพร่หลาย ดังแสดงในตารางที่ 1 Ramanujam และคณะ (2010) รายงานว่า การผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เชิงการค้าในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อให้ง่าย และสะดวกในการใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (*Fusarium* sp., *Phytophthora* sp., *Sclerotium* sp. และเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดิน) อีกทั้งสามารถใช้ร่วมกับระบบการปลูกพืชแบบต่าง ๆ โดยมีการผลิตออกมาหลายรูปแบบ เช่น ผงฝุ่น (dusts) ผงเปียกน้ำ (wetable powder) น้ำมันผสมน้ำ (emulsions) และเม็ด (granules) Wijesinghe และคณะ (2010) ศึกษาการใช้สูตรสำเร็จของเชื้อรา *T. asperellum* รูปแบบน้ำมันผสมน้ำในการควบคุม เชื้อ *Thielaviopsis paradoxa* สาเหตุโรคเน่าดำของสับปะรด ผลการทดสอบ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Th. paradoxa* ได้ 92.7 เปอร์เซ็นต์ และ Batta (2007) ศึกษาการใช้สูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* รูปแบบน้ำมันผสมน้ำ โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้สูตรสำเร็จที่มีเชื้อรา *T. harzianum* และสูตรสำเร็จที่ไม่มีเชื้อรา *T. harzianum* ในส่วนผสม เพื่อควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผล แพร่ พืช สตรอ

เบอริรี และแอปเปิล ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Rhizopus stolonifer* สายพันธุ์ RS1 โดยวัดขนาดของแผล จากการศึกษพบว่า สัตว์สำเร็จที่มีเชื้อรา *T. harzianum* สามารถลดการเกิดโรคได้ 86 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Dubey และคณะ (2009) ศึกษา และพัฒนาสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อใช้ในการควบคุมโรครากเน่าแห้งของถั่วเขียว (*Vigna radiate*) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia bataticola* พบว่า สูตรสำเร็จ Pusa 5 seed (ประกอบด้วย peat powder (47.75 เปอร์เซ็นต์) Sabudana powder (*Manihot esculenta*) (47.75 เปอร์เซ็นต์) และ carboxymethyl cellulose (5 เปอร์เซ็นต์)) สามารถลดการเกิดโรค 87.2 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มการงอกของเมล็ด 43 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มความยาวของราก 37 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีอายุการเก็บรักษานาน 25 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรสำเร็จอื่น ๆ จำนวน 31 สูตร

สำหรับในประเทศไทยมีการวิจัยค้นคว้าจำนวนมากเกี่ยวกับการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืช อย่างไรก็ตามการผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. บางสายพันธุ์มีประสิทธิภาพดีในห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อทดสอบในสภาพแปลงทดลอง พบว่า มีประสิทธิภาพลดลง และแม้จะมีการผลิตเชิงการค้า แต่ก็มีข้อจำกัดในการใช้เนื่องจากความสามารถในการควบคุมโรคในแปลงยังได้ผลน้อย เมื่อเทียบกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (สายทอง แก้วฉาย, 2555) และมีปัญหาเกี่ยวกับการมีชีวิตรอดของเชื้อราปฏิปักษ์ในขณะเก็บรักษา (Kaewchai *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาการผลิตเชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อผลิตเป็นการค้า เช่น การศึกษาเพื่อผลิตเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในรูปแบบผง ใช้ควบคุมโรคราเมล็ดผักกาดของมะเขือเทศ และพัฒนาการผลิตเชื้อรา *Trichoderma* sp. รูปแบบผงในเชิงพาณิชย์ พบว่า สามารถพัฒนาได้โดยพิจารณาที่ต้นทุนการผลิต และกำไรที่ได้ซึ่งความเป็นไปได้ขึ้นอยู่กับราคาขาย ความต้องการใช้ผงเชื้อรา *Trichoderma* sp. และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเป็นต้น (สุมาลี สันติพลวุฒิ, 2536) มีการส่งเสริมให้เกษตรกรได้รู้จัก และใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ควบคุมโรคพืชโดยการผลิตเชื้อรา *Trichoderma* sp. ชนิดสด ซึ่งมีการเลี้ยงบนเมล็ดข้างฟางที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว อย่างไรก็ตามการผลิตเชื้อสดยังไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร และยังมีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ อายุการเก็บรักษาสั้น การเสื่อมหรือกลายพันธุ์ทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อด้อยลง (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2546) และการผลิตเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยนำเมล็ดข้าวหุงสุกหรือเมล็ดข้าวฟ่างต้มสุกบรรจุในถุงพลาสติกแล้วใส่เชื้อรา *Trichoderma* sp. ลงไป ปิดถุง บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7 วัน เชื้อเจริญเต็มถุงมีสีเขียวนำไปผสมรำละเอียด ปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยอินทรีย์ โรยกันหุ้มนหรือรอบโคนต้น และรดน้ำตามปกติไม่ควรใช้ร่วมกับปุ๋ยเคมี นอกจากนี้สำนักเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน

(ม.ป.ป.) ได้นำเชื้อรา *Trichoderma* sp. มาผลิตเป็นสูตรสำเร็จบรรจุในซองเพื่อแจกจ่ายแก่เกษตรกร และผู้สนใจ และให้ชื่อว่าสารเร่งซูปเปอร์พอด. 3 วิธีการใช้จะต้องผสมกับน้ำ ราดลงในกองปุ๋ยหมักหมักไว้ประมาณ 7 วันหลังจากนั้นจึงสามารถนำไปใช้ได้ สำหรับการใส่เชื้อรา *Trichoderma* sp. จีระเดช แจ่มสว่าง (2547) ได้กล่าวไว้ดังนี้ 1) คลุกเมล็ดพืชหรือส่วนขยายพันธุ์ด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ชนิดเชื้อสดที่เจริญอยู่บนเมล็ดข้าวฟ่างหรือข้าวสาลีในอัตรา 1 ช้อนโต๊ะต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม 2) ใส่เชื้อลงในดินโดยผสมเชื้อรา *Trichoderma* sp. จำละเอียด และปุ๋ยหมักอัตรา 1 : 5 : 50 และ 3) นำเชื้อสดไปผสมน้ำกรองเอาแต่น้ำไปใช้ อัตราการใช้เชื้อสด 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 100-200 ลิตร แล้วฉีดพ่น จีระเดช แจ่มสว่าง และคณะ (2543) ศึกษาและพัฒนาการผลิต และการประยุกต์ใช้สารชีวภัณฑ์จากเชื้อรา *Trichoderma* sp. CB-Pin-01 ในรูปแบบผงแห้ง (ยูนิกรีน ยูเอ็น-1) เพื่อใช้ในการควบคุม เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคโคนเน่าของถั่วฝักยาว พบว่า ต้นถั่วฝักยาวมีอัตราการรอดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *S. rolfsii* 92.5-97.8 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดปริมาณเมล็ด *Sclerotium* ได้ 60.9-73.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และได้มีการจดสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตรเกี่ยวกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. เช่น สิทธิบัตรกรรมวิธีการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma* sp. ในรูปแบบผงแห้ง โดย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (2552) เลขที่สิทธิบัตร 9913 และอนุสิทธิบัตรกรรมวิธีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* T9 โดย มหาลัยขอนแก่น (2551) เลขที่สิทธิบัตร 0803000959

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผลิตในเชิงการค้า

ชื่อการค้า	สายพันธุ์	โรคพืช/เชื้อสาเหตุโรค	รูปแบบผลิตภัณฑ์	ผู้ผลิต
Bineb T Pellet [®] ,	<i>T. harzianum</i> ATCC	fungi causing wilt,	granule,	Innovation, Sweden
Bineb T WG [®]	20476	root rot	wettable powder	
	<i>T. polysporum</i> ATCC			
	20475			
Bioderma [®]	<i>T. harzianum</i>	<i>Cercospora</i> ,	wettable powder	Biotech Internation, India
Bioderma-H [®]	<i>T. viride</i>	<i>Colletotrichum</i> ,		
		<i>Fusarium</i> ,		
		<i>Phytophthora</i> ,		
		<i>Rhizoctonia solani</i> ,		
		<i>Pythium</i> ,		
		<i>Sclerotinium</i>		
Biofunus [®]	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Fusarium</i> ,	granules,	Grondortsmettingen De
		<i>Rhizoctonia solani</i> ,	wettable powder	Cuester, Belgium
		<i>Pythium</i> ,		
		<i>Sclerotinia</i> ,		
		<i>Verticillium</i>		

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อการค้า	สายพันธุ์	โรคพืช/เชื้อสาเหตุโรค	รูปแบบผลิตภัณฑ์	ผู้ผลิต
Bioten WP [®]	<i>T. asperellum</i> strain ICC	<i>Pythium</i> ,	wettable powder	Isagro USA.
Remedier WP [®]	012, <i>T. gamsii</i> strain ICC	<i>Rhizoctonia</i> ,		
Tenet WP [®]	080	<i>Fusarium</i> ,		
		<i>Sclerotium</i>		
Bio-Trek [®] ,	<i>T. harzianum</i> (1295-22)	<i>Pythium</i> ,	wettable powder	Bioworks Inc, Geneva, USA.
Plant Shield [®] ,		<i>Rhizoctonia</i> ,		
Root Shield [®] T-22 [®]		<i>Fusarium</i> ,		
T-22HB [®]		<i>Sclerotium</i>		
Fungi-killer [®]	<i>T. harzianum</i>	<i>Fusarium oxyspora</i> ,	powder	Bangkok Organic Compost Ltd,
		<i>Phytophthora</i>		Thailand
SARDAR ECO GREEN [®]	<i>T. harzianum</i>	damping off,	wettable powder	Zhejiang NetSun Co., Ltd. India
		root and stem rots,		
		wilts blights,		
		leaf and spots,		
		downy, powdery		
		mildews, white rust, smut		

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อการค้า	สายพันธุ์	โรคพืช/เชื้อสาเหตุโรค	รูปแบบผลิตภัณฑ์	ผู้ผลิต
Trichoma [®]	<i>T. viride</i>	fungi causing wilt, root rot	powder, liquid	V. J. AGRO, Co., Ltd. India
UNIGREEN UN-1 [®]	<i>T. harzianum</i>	<i>Phytophthora palmivora</i> , <i>Phytophthora parasitica</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i>	powder	Kasetsart J.2. Office of Agricultural Research and Development, Region 6, Department of Agriculture of Thailand.

2.4 สารประกอบสำหรับเตรียมสูตรสำเร็จ

ในการเตรียมสูตรสำเร็จเพื่อควบคุมโรคพืชนั้น นอกจากจะมีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติแล้วยังประกอบด้วยสารช่วย (excipients) ซึ่งทำหน้าที่ต่างกัน ได้แก่ สารเพิ่มปริมาณ (fillers หรือ diluents) สารยึดเกาะ (binders) สารช่วยแตกกระจายตัว (disintegrants) และสารช่วยไหล (glidants) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เป็นตัวเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติสามารถมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพมากขึ้น (ทัดทรง ท้วทพิพย์, 2535; ปราโมทย์ ทพิพย์ดวงตา, 2539)

2.4.1 สารเพิ่มปริมาณ

เป็นสารที่เติมลงไปในสูตรสำเร็จ เพื่อเพิ่มขนาดหรือน้ำหนักของแกรนูล โดยสารเพิ่มปริมาณต้องมีคุณสมบัติสามารถเข้ากันได้กับตัวยา และสารประกอบอื่นในสูตรสำเร็จ ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาใด ๆ มีความคงตัว ไม่ดูดความชื้น มีการไหลที่ดี ราคาไม่สูง และทำให้แกรนูลมีความแข็งที่เหมาะสม มีการแตกตัวดี ตัวอย่างสารเพิ่มปริมาณ ได้แก่ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, calcium, CaSO_4 , cellulose, dextrose, lactose, mannitol, microcrystalline, phosphate, sorbitol, starch และ tribasic sucrose เป็นต้น (มนต์ชูลี นิติพน, 2534)

2.4.2 สารยึดเกาะ

เป็นสารที่เพิ่มแรงเกาะกันของผง ทำให้เกิดการเกาะกันเป็นแกรนูลภายใต้แรงตอกทำให้อัดกันเป็นเม็ดได้ และทำให้ได้แกรนูลสม่ำเสมอ มีความแข็งเพียงพอ และเหมาะสมในการตอก โดยคุณสมบัติของสารยึดเกาะที่ดีต้องสามารถเข้ากันได้กับสารตัวอื่นในสูตรสำเร็จ ให้แรงยึดเกาะเพียงพอในการทำให้ผงจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการต่าง ๆ ในการผลิตได้ สารยึดเกาะที่ใช้มีหลายชนิด ทั้งที่เป็นพวกน้ำตาล และสารประกอบเชิงซ้อนประเภทที่ได้จากธรรมชาติ เช่น acacia, gelatin, glucose, gum, starch, sucrose และ tragacanth และสารที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น methyl cellulose และ poly vinyl pyrolidone (PVP) เป็นต้น (มนต์ชูลี นิติพน, 2534)

2.4.3 สารช่วยแตกกระจายตัว

เป็นสารช่วยให้แกรนูลเกิดการแตกตัวหรือกระจายตัวได้ในเวลาอันสมควร เมื่อแกรนูลสัมผัสกับสารละลายหรือน้ำ การผสมสารช่วยในการแตกตัวอาจทำได้โดยผสมในขั้นตอนก่อนทำเป็นแกรนูลหรือผสมในขั้นตอนเป็นแกรนูลแล้ว หรืออาจแบ่งผสมทั้งสองขั้นตอน ตัวอย่างของสารที่ช่วยในการแตกตัว เช่น

-alginate เป็นสารช่วยในการแตกตัว อยู่ในกลุ่ม hydrophilic colloid substances มีจำหน่ายในรูปของ alginic acid หรือเกลือของ alginic acid โดยเฉพาะในรูปของ

เกลือ sodium มีคุณสมบัติในการชอบน้ำมากกว่าพวกแป้ง ปริมาณที่ใช้ในสูตรนั้นสำหรับ alginic acid ใช้ในปริมาณ 1-5 เปอร์เซ็นต์ ส่วน sodium alginate อยู่ที่ 2.5-10 เปอร์เซ็นต์

-gum เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการพองตัวในน้ำได้ รวมทั้งเป็นตัวช่วยยึดเกาะที่ดี ปริมาณที่ใช้ 1-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเม็ดยา ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ ได้แก่ agar, guar, pectin และ tragacanth เป็นต้น (จักรพันธ์ ศิริวัณณญาณลักษณ์, 2538)

-starch นิยมใช้กันมาก โดยทั่วไปถ้าหากมีปริมาณของ starch ในสูตรมาก มักทำให้มีการแตกตัวที่เร็วขึ้น แต่ปัญหาที่ตามมาคือการเกาะตัวกัน และความแข็งของแกรนูลจะลดน้อยลง

2.4.4 สารช่วยไหล

เป็นสารที่ใส่ลงไปในสูตรสำเร็จ เพื่อเพิ่มการไหลโดยการลดแรงเสียดทานระหว่างอนุภาค ทำให้แกรนูลไหลจาก hopper ลงมาสู่เบ้าได้อย่างสม่ำเสมอ ทำให้แกรนูลที่มีน้ำหนักสม่ำเสมอ สารที่ใช้ในการช่วยไหล เช่น calcium phosphate, colloidal silicon dioxide, silicate, starch และ talc (มนต์ชูลี นิตินพ, 2534) ซึ่งสารที่ช่วยในการไหลต้องไม่ทำให้ความคงตัวทั้งทางด้านกายภาพ และทางเคมีของแกรนูลเปลี่ยนแปลงไป (จักรพันธ์ ศิริวัณณญาณลักษณ์, 2538)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อให้ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *R. microporus*
2. เพื่อทราบกลไกการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา *R. microporus*
3. เพื่อผลิตสูตรสำเร็จจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. และประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์สำหรับควบคุมโรครากขาวของยางพารา

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ และอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound และ stereo binocular
2. กล้องถ่ายรูป (camera)
3. เครื่อง Gas chromatography-mass spectrometer
4. เครื่อง UV transilluminator
5. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixture)
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด (analytical balance)
7. เครื่องเทอร์มอไซเคิลเลอร์ (thermocycler หรือ PCR machine)
8. เครื่องผสมแป้ง
9. เครื่องแรงแกรนูล
10. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
11. เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)
12. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air-flow cabinet)
13. ตู้แช่ (refrigerator)
14. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
15. ไมโครเวฟ (microwave)
16. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
17. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
18. อุปกรณ์ และเครื่องมือแก้ว ได้แก่ cork borer, cover slip, glass bead, micropipette, Pasture's pipettes, Thin-layer chromatography silica gel 60 F 254 กระบอกตวง ขวดรูปกลมพู่ จานเลี้ยงเชื้อ แท่งแก้วสามเหลี่ยม ปีกเกอร์ แผ่นสไลด์ หลอดทดลอง
19. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปากคีบ และอื่น ๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. Potato dextrose broth (PDB)
3. *Trichoderma* selective medium (TSM)

วัสดุสำหรับเตรียมสูตรสำเร็จ

1. ดินพีท (peat powder)
2. แป้งมันสำปะหลัง (cassava powder)
3. แป้งสาลี (wheat powder)

วัสดุเกษตร

1. กระดาษพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว
2. ก้อนเชื้อเห็ด
3. แกลบ
4. ข้าวฟ่าง
5. ดินผสม อัตราส่วน ดิน : แกลบ 10 : 1
6. ต้นกล้ายาง พันธุ์ RRIM 600 อายุ 8 เดือน
7. ป้ายพลาสติก
8. ปุ๋ยคอก (มูลไก่, มูลวัว)
9. ปุ๋ยอินทรีย์ ซีพี หมอดิน

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมีทั่วไป

1. Agar
2. Carboxin
3. Captan
4. Chloramphenical
5. Congo red
6. Dextrose

สารเคมีทั่วไป (ต่อ)

7. Dimethyl sulfoxide
8. Ethanol
9. Ethyl acetate
10. Glucose
11. HCl
12. Hexane
13. K_2HPO_4
14. KCl
15. Lactophenol cotton blue
16. Methanol
17. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
18. NaCl
19. NH_4NO_3
20. Rose bengal

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

1. Agarose
2. Chloroform isopropyl alcohol
3. Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB buffer)
4. DI water
5. Dream Taq green PCR mastermix
6. Ethidium bromide
7. Forward primer
8. Isopropyl alcohol
9. Loading dye
10. Marker (100 bp ladder)
11. Reverse primer

วิธีการวิจัย

1. การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน และแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เก็บตัวอย่างดินระหว่างเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม พ.ศ. 2555 ในพื้นที่จังหวัดกระบี่ ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ภูเก็ต ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบโคนต้นยางพาราในแปลงปลูกที่มีการระบาดของโรครากขาว และแปลงไม่มีการระบาดของโรครากขาว เลือกเก็บดินจากผิวดินลึก 15 เซนติเมตร แปลงละ 5 จุด ๆ ละ 200 กรัม ผสมกันเป็น 1 ตัวอย่าง ทั้งหมด 86 ตัวอย่าง แล้วนำมาแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp.

แยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากตัวอย่างดิน ด้วยวิธี dilution spread plate โดยชั่งดินจำนวน 1 กรัม ใส่ในหลอดเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) เจือจางเป็นลำดับสิบ (10-fold dilution) ได้ดินแขวนลอยเจือจางที่ 10^{-3} - 10^{-5} ดูดดินแขวนลอย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร *Trichoderma* selective medium (TSM) เกลี่ยให้ทั่วหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เลือกเก็บโคโลนีเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีลักษณะเส้นใยเริ่มแรกสีขาวขนาดเล็กประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร เมื่อมีอายุมากขึ้นมีสีเขียวค่อนข้างเหลืองจนถึงเขียวเข้ม วางเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเขี่ยปลายเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง จนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วจึงเก็บเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ทดสอบต่อไป

การให้รหัสเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลท โดยอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ตัวแรก มาจาก ชื่อจังหวัดที่เก็บตัวอย่างดิน อักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ตัวที่สองมาจาก อำเภอ และตัวที่สามเป็นหมายเลขตัวอย่างดิน ตามด้วยลำดับที่ของไอโซเลท เช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp. ChM1.1 หมายถึง เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัดชุมพร อำเภอเมือง ตัวอย่างดินแหล่งที่ 1 และเป็นไอโซเลทที่ 1

1.2 การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate (Skidmore and Dickinson, 1976)

โดยเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อรา *R. microporus* เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะ บริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *R. microporus* วางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 2 เซนติเมตร ในแนวตรงข้ามกัน ส่วนกรรมวิธีชุดควบคุมวางเชื้อรา *R. microporus* อย่างเดียวห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* และ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Morton and Stroube, 1955) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

เมื่อ R_1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R_2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ

คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* จำนวน 2 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. จำแนกชนิด และศึกษาลักษณะทางสรีระของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2.1 จำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เตรียม slide culture โดยตัดชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีขนาดกว้างยาว 1x1 เซนติเมตร วางบน แผ่นสไลด์ ฆ่าเชื้อ แล้วใช้เข็มเขี่ยฆ่าเชื้อเขี่ยปลายเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงไว้ เป็นเวลา 3 วัน แต่ที่ขอบชิ้นวุ้นทั้ง 4 ด้าน แล้วปิดด้วย cover slip ฆ่าเชื้อ วางบนชิ้นอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ได้แก่ ลักษณะเส้นใย ก้านชูสปอร์ (conidiophore) และไฟอะไลด์ (phialide) โคนิเดีย (conidia) คลามายาโดสปอร์ (chlamydospore) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound ตามวิธีการของ Rifai (1969); Gams และ Bissett (1998) และ Anees และคณะ (2010)

2.2 จำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

2.2.1 การเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. และการสกัด DNA

การสกัด DNA ดัดแปลงตามวิธีการของ Gupta และคณะ (2011) โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นชูดเส้นใยใส่หลอด centrifuge บดเส้นใยให้ละเอียด เติม CTAB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบดเส้นใยให้ละเอียดอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (เขย่าทุก 10 นาที) เติม Chloroform isopropyl alcohol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร 1-2 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) ใส่หลอดใหม่ แล้วล้างตกตะกอนด้วย isopropyl alcohol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอน DNA ฝั่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำ DI ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.2 การวิเคราะห์ DNA

ตรวจสอบ DNA ที่ได้โดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยผสม DNA ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร กับ 6X loading dye ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตจุดใส่ลงในช่องเจลวางอยู่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มี TAE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที แล้วตรวจสอบ DNA ด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.2.3 การเพิ่มปริมาณส่วน internal transcribed spacers (ITS) โดยปฏิกิริยา PCR

เพิ่มปริมาณส่วน ITS ของ rRNA โดยใช้ universal fungal primer (Neuvéglise *et al.*, 1994) ได้แก่ Pn3 (forward) และ Pn16 (reverse)

2.2.4 การเตรียมส่วนผสมของ PCR (PCR mixture)

ผสมปฏิกิริยาของ PCR (ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร) ประกอบด้วย DNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร forward primer (Pn3) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร reverse primer (Pn16) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร DI water 21 ไมโครลิตร และ Dream Taq Green PCR Mastermix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

2.2.5 การทำปฏิกิริยา PCR

เมื่อผสมส่วนผสมต่าง ๆ เรียบร้อยแล้ว จากนั้นทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermocycler โดยมีปฏิกิริยาแต่ละขั้นตอนดังนี้

Hot start	95 องศาเซลเซียส	3	นาที	} 35 รอบ
Denature	95 องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Annealing	50 องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	1	นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5	นาที	

2.2.6 การตรวจ PCR product

ตรวจสอบ PCR product ที่ได้โดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยผสม PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับ 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดใส่ลงในช่องเจลที่วางอยู่ในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มี TAE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า ใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 100 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที แล้วตรวจสอบ PCR product ด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.2.7 การอ่านลำดับเบส DNA (DNA sequencing)

ส่งตัวอย่าง PCR products เพื่ออ่านลำดับเบส DNA ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2.3 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2.3.1 ทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปรับ pH 4, 5, 6, 7 และ 8 จากนั้นเทอาหารใส่จานเลี้ยงเชื้อ รอจนอาหารแข็งตัว ตัดปลายเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. อายุ 3 วัน ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลโดยการวัดขนาดของโคโลนี

2.3.2 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3 วัน แล้วใช้ cork borer ตัดปลายเส้นใย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยการวัดขนาดของโคโลนี

3. ศึกษากลไกการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา

3.1 ศึกษาลักษณะทางโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

ศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. microporus* ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Pathan และคณะ (2010) โดยตัดเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* และเชื้อรา *Trichoderma* spp. วางตรงกันข้ามบนชิ้นวุ้น PDA ขนาด 1x1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำตัวอย่างมาแช่ในสารละลาย glutaraldehyde ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.3 บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ dehydrated ด้วย graded ethanol series (50, 60, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ๆ 15 นาที จากนั้นทำตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่อง critical point drying แล้วนำตัวอย่างติดบนแท่นวางตัวอย่าง (stub) และฉาบด้วยทองคำ ด้วยเครื่อง sputter coater ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)

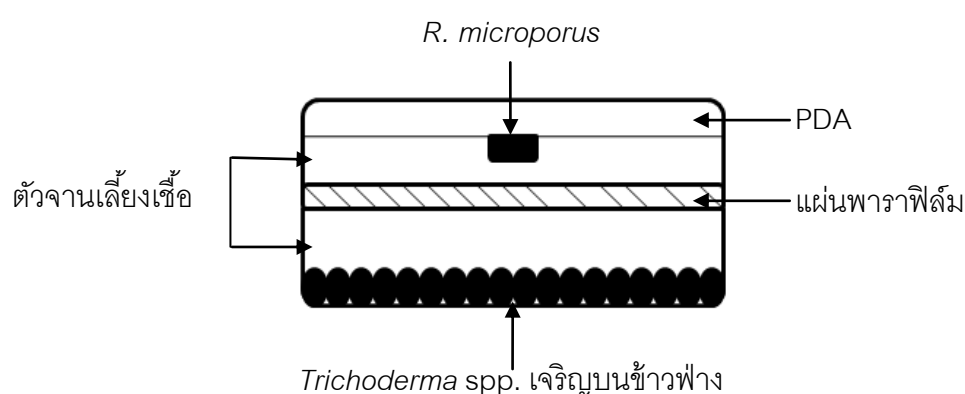
3.2 ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. อายุ 3 วัน ใช้ cork borer ตัดปลายเส้นใย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสม colloidal chitin ความเข้มข้น 2.4 เปอร์เซ็นต์ (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Roberts และ Selitrenkoff, 1985) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดย เท congo red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร เป็นเวลา 30 นาที เททิ้ง แล้ววาดด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที เททิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น สังเกตการเกิดวงใส หากมีวงใสรอบ ๆ ขอบโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ออกมาย่อย chitin ได้ อ่านผล

เป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดวงใสแสดงว่าไม่สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ออกมาย่อย chitin อ่านผลเป็นลบ

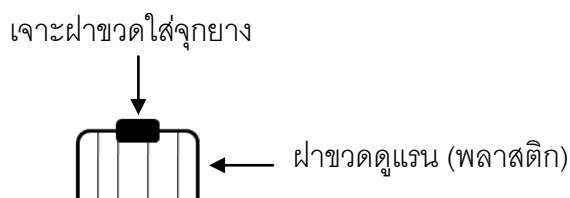
3.3 ศึกษาประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะชนิดที่ระเหยได้ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

ทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะชนิดที่ระเหยได้ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Parizi และคณะ (2012) และ Li และคณะ (2012) โดยเลี้ยงเชื้อราปฏิชีวนะ *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นที่มีปลายเส้นใย นำไปเลี้ยงในข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ (นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที) ที่บรรจุในขวดดูแรนขนาด 200 มิลลิลิตร จำนวน 4 ชิ้นต่อข้าวฟ่างน้ำหนัก 250 กรัม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน เตรียมเชื้อรา *R. microporus* อายุ 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใย วางกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ส่วนตัวจานเลี้ยงเชื้อ) แล้วนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงในข้าวฟ่าง เป็นเวลา 14 วัน ใส่ลงจานเลี้ยงเชื้อ (ส่วนตัวจานเลี้ยงเชื้อ) น้ำหนัก 25 กรัม จากนั้นนำเชื้อรา *R. microporus* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ส่วนตัวจานเลี้ยงเชื้อ) เข้าประกบกันกับตัวของจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *Trichoderma* spp. เลี้ยงในข้าวฟ่าง ปิดให้สนิทด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (ภาพที่ 1) ส่วนชุดควบคุมมีเชื้อรา *R. microporus* และข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียวบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง



ภาพที่ 1 การวางเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบประสิทธิภาพสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

จากนั้นนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่สามารถสร้างสารระเหยยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* วิเคราะห์เพื่อจำแนกกลุ่มของสารออกฤทธิ์ ด้วยเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือมหาวิทาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. อายุ 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใยเลี้ยงในข้าวฟ่างหนึ่งฆ่าเชื้อ (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที) ที่บรรจุในขวดดูแรน ขนาด 200 มิลลิลิตร จำนวน 4 ชั้นต่อข้าวฟ่าง 250 กรัม (ฝาขวดดูแรนจัดทำเป็นพิเศษ เพื่อให้สามารถแทงเข็มฉีดของเครื่อง GC-MS ดังภาพที่ 2) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน แล้วจึงนำไปวิเคราะห์



ภาพที่ 2 ลักษณะฝาขวดดูแรนดัดแปลง โดยเจาะฝาขวดใส่จุกยางแทน เพื่อสามารถแทงเข็มฉีดของเครื่อง GC-MS

3.4 ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะชนิดที่แพร่ในอาหารของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ต่อการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

3.4.1 การสกัดสารปฏิชีวนะจากเชื้อรา *Trichoderma* sp.

เนื่องจากการคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้จำนวน 2 สายพันธุ์ หนึ่งในจำนวนนั้น พบว่า ผลของน้ำเลี้ยงเชื้อมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* จึงทำการสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp. ดัดแปลงจากวิธีการของ Jang และคณะ (2009) โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใยไปเลี้ยงในอาหารเหลว Potato dextrose broth (PDB) (หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จำนวน 5 ชั้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน กรองเอาส่วนของตัวเซลล์ และสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ง นำเฉพาะส่วนน้ำเลี้ยงมาสกัดสาร โดยใช้ ethyl acetate เป็นตัว

ทำละลาย เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำส่วน ethyl acetate ทำให้แห้ง ด้วยเครื่อง rotary evaporator

3.4.2 การหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum fungicidal concentration (MFC) ด้วยวิธี broth microdilution

นำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี broth microdilution ตามวิธีของ CLSI (2008) เลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เตรียมเส้นใยแขวนลอย เท 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl บนผิวหน้าโคโลนีเชื้อรา *R. microporus* ชูดเส้นใยที่ใส่หลอดทดลองปราศจากเชื้อ ปรับความเข้มข้นให้ได้ $0.4-0.5 \times 10^4$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหาร Roswell Park Memorial Institute 1640

เตรียมสารสกัดจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. ด้วยตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) และสารกำจัดเชื้อรา carboxin ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้ในการทดสอบหาค่า MIC ทำการดูดสารสกัดที่มีความเข้มข้น 4,000, 2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.50 และ 31.25 ตามลำดับ และสารกำจัดเชื้อรา carboxin ที่มีความเข้มข้น 250, 125, 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91 และ 1.95 ตามลำดับ (เจือจางสารสกัด และสารกำจัดเชื้อราแบบลำดับสอง (serial 2 fold dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 8 ความเข้มข้น) ใส่ลงใน 96-well microtiter plates หลุมละ 50 ไมโครลิตร เติมน้ำเส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *R. microporus* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ อ่านผลเป็นค่า MIC

การทดสอบหาค่า MFC โดยดูดเชื้อราจากหลุมที่ไม่สามารถเจริญได้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด และสารเคมีที่เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ อ่านผลเป็นค่า MFC

3.4.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ด้วยวิธี Thin-layer chromatography bioautography

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *R. microporus* ด้วยสารสกัดเชื้อรา *Trichoderma* sp. บนแผ่น TLC ตามวิธีการของ Zhao และคณะ (2008) โดยหยดสารสกัดจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ละลายด้วย ethyl acetate ลงบนแผ่น TLC จากนั้นตั้งสารด้วย hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 8 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วคว่ำแผ่น TLC อบด้วยแสง UV เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นหงายแผ่น TLC ขึ้นแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลงบนแผ่น TLC บาง ๆ รอจนอาหารแห้ง แล้วจึงวางเชื้อรา *R. microporus* ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร รอบ

แผ่น TLC ส่วนชุดควบคุมวางเชื้อรา *R. microporus* ไม่หยดสารสกัดลงบนแผ่น TLC บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน สังเกตเห็นวงใส ซึ่งเป็นบริเวณที่สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ และคำนวณหาค่า rate of flow (R_f) ดังนี้ $R_f = A/B$, A=ระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น และ B = ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุด

จากนั้นนำส่วนบริเวณที่เกิดการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS เพื่อจำแนกกลุ่มของสารออกฤทธิ์

4 สูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

เตรียมสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma* sp. จำนวน 1 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สูง เจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว มาผลิตสูตรสำเร็จในรูปแบบสูตรแกรนูล และแบบผง (ดัดแปลงตามวิธีการของ Dubey และคณะ, 2009) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ส่วนประกอบ	สูตรสำเร็จ	
	สูตรแกรนูล	สูตรผง
Peat powder	40 กรัม	40 กรัม
Cassava powder	-	40 กรัม
Wheat powder	40 กรัม	
สปอร์เชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. (ความเข้มข้น 10^{10} โคลิไนต์ต่อมิลลิลิตร)	15 มิลลิลิตร	15 มิลลิลิตร

สูตรแกรนูล ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ เข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำส่วนผสมที่ได้ผ่านเครื่องแรงแกรนูลเบอร์ 8 และผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผ่านเครื่องแกรนูลเบอร์ 6 เพื่อให้ได้แกรนูลที่มีขนาดสม่ำเสมอเก็บรักษาสูตรสำเร็จที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สูตรผง ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ เข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบดให้เป็นผงละเอียด เก็บรักษาสูตรสำเร็จที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1 การประเมินผลสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

4.1.1 การทดสอบความสม่ำเสมอ และการกระจายตัวของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในสูตรสำเร็จ

สุ่มสูตรสำเร็จ จำนวน 5 จุด ๆ ละ 1 กรัม ตรวจสอบปริมาณเชื้อราด้วยวิธี dilution spread plate โดยทำการทดสอบความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในสูตรสำเร็จนั้น ๆ

4.1.2 การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เตรียมสารแขวนลอยของสูตรสำเร็จที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ วัดค่า pH ด้วย pH meter โดยวัด 5 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

4.1.3 ความสามารถในการละลายน้ำ

ชั่งสูตรสำเร็จ 1 กรัม ใส่น้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร แล้วนำมาละลายโดยใช้แท่งแม่เหล็กคน ตั้งความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งสูตรสำเร็จละลายน้ำ บันทึกระยะเวลาในการละลายน้ำแต่ละสูตรสำเร็จ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

4.1.4 ทดสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในสูตรสำเร็จ

โดยตรวจนับปริมาณเชื้อราในสูตรสำเร็จทันทีหลังผลิตได้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับทุกเดือนหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือนด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร TSM ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ยของแต่ละสูตร

4.1.5 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในสูตรสำเร็จ

โดยทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยวิธี dual culture plate หลังผลิตได้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

5 ศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* sp. สูตรสำเร็จในปุ๋ย ความชื้นต่าง ๆ และทดสอบประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เพื่อให้เชื้อรา *Trichoderma* sp. เจริญ และสามารถตั้งรกรากในดินได้ดียิ่งขึ้น จึงได้ศึกษาผสมสูตรสำเร็จกับปุ๋ยคอก (มูลไก่ และมูลวัว) และปุ๋ยอินทรีย์ ดังนี้

5.1. ทดสอบการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในปุ๋ยคอก (มูลไก่ มูลวัว) และปุ๋ยอินทรีย์

การเตรียมมูลไก่ มูลวัว และปุ๋ยอินทรีย์ โดยชั่งตัวอย่างละ 100 กรัม ปรับให้มีความชื้น 25 เปอร์เซ็นต์ แบ่งดินเป็น 2 ส่วน

ส่วนแรก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงผสมสูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma* sp. น้ำหนัก 1 กรัม

ส่วนที่สอง ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ นำผสมสูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma* sp. น้ำหนัก 1 กรัม

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน เปรียบเทียบร้อยละการเจริญ ทุก 0, 5, 10 และ 15 วัน เพื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในปุ๋ยคอก (มูลไก่ และมูลวัว) และปุ๋ยอินทรีย์ โดยวิธี dilutions spread plate บนอาหาร TSM ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

5.2 ทดสอบการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในปุ๋ยที่ปรับให้มีความชื้นต่างกัน

นำปุ๋ยที่ผ่านคัดเลือกการเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* sp. ปรับความชื้นของปุ๋ย เป็น 25, 30 และ 35 เปอร์เซ็นต์ โดยการเตรียมความชื้นจะเริ่มชั่งน้ำหนักเริ่มแรกของดินอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้ง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มแรก} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักแห้ง}} \times 100$$

จากนั้นนำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เติลงในปุ๋ย อัตราส่วน

0.1 : 50 กรัม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน เปรียบเทียบร้อยละการเจริญ ศึกษาการเพิ่มจำนวนของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในปุ๋ยด้วยวิธี dilutions spread plate บนอาหาร TSM ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

5.3 ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จในปุ๋ยต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

นำปุ๋ยที่มีเชื้อรา *Trichoderma* sp. เจริญอยู่มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

6 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากขาวในดินปลูก

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากขาวในดินปลูกโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Fox (1977)

6.1 การเตรียมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยเลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 2.5 X 15 เซนติเมตร (หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

6.2 การเตรียมดิน เป็นดินที่ใช้ในการปลูกยาง โดยบดดินให้ส่วนผสมแกลบอัตราส่วน 10 : 1 คลุกเคล้าให้เข้ากัน ปรับให้มีความชื้น 25 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมความชื้นเช่นเดียวกับข้อ 5.2 แล้วจึงแบ่งดินเป็น 2 ส่วน

6.2.1 ส่วนแรก นำไปหนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงผสมปุ๋ยอินทรีย์ที่มีสูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma* sp. เจริญอยู่ในอัตราส่วน 10 : 1 กรัม

6.2.2 ส่วนที่สอง เป็นดินที่ไม่หนึ่งฆ่าเชื้อผสมปุ๋ยอินทรีย์ที่มีสูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในอัตราส่วน 10 : 1 กรัม

6.3 การทดสอบ บรรจุดินจากข้อ 6.2.1 และ 6.2.2 ในหลอดที่เตรียมไว้ในข้อ 6.1 หลอดละ 15 กรัม ส่วนชุดควบคุม ใส่ดินผสมแกลบ และผสมกับปุ๋ยอินทรีย์ที่ไม่มีเชื้อรา

Trichoderma sp. เตรียมชุดทดสอบละ 4 ซ้ำ ป่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผล โดยวัด ความสูงของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เจริญ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คำนวณหา เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

7. ประเมินศักยภาพของรา *Trichoderma* sp. ในปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยอินทรีย์ต่อการควบคุมโรค รากขาวในเรือนกระจก

7.1 การเตรียมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เตรียมโดยเลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* ในถุงเพาะเห็ดปราศจากเชื้อที่มีส่วนผสมของ ขี้เลื่อยขี้เถ้า : รำ : น้ำตาลทราย : น้ำ อัตราส่วน 100 : 3 : 2 : 50 (โดยน้ำหนัก) ถุงละ 400 กรัม ป่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน (อารมณ วิจารณ์สุจิต, 2541)

7.2 การเตรียมดิน ใช้ดินไม่เน่าเชื้อ มาจากพื้นที่เดียวกัน ผสมดินกับแกลบ อัตราส่วน 10 : 1 ให้สม่ำเสมอกัน กระจายละ 1.5 กิโลกรัม

7.3 การปลูกเชื้อ และการปลูกต้นยาง ใช้ต้นกล้ายางพันธุ์ RRIM 600 อายุ 8 เดือน ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว กระจาย ละ 3 ต้น และปลูกเชื้อโดยฝังก้อน เชื้อลงกลางกระถาง ๆ ละ 1 ก้อน

7.4 การใส่ปุ๋ยคอกหรือปุ๋ยอินทรีย์สูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma* sp. ใส่ปุ๋ย บริเวณโคนต้นยาง กระจายละ 125 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design 6 กรรมวิธี 10 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ดิน+สูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma* sp.+ปุ๋ยอินทรีย์+ต้นกล้า ยาง+เชื้อรา *R. microporus*

กรรมวิธีที่ 2 ดิน+สูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma* sp.+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา *R. microporus*

กรรมวิธีที่ 3 ดิน+สารกำจัดเชื้อรา carboxin 2 กรัม+ต้นกล้ายาง+ เชื้อรา *R. microporus*

กรรมวิธีที่ 4 ดิน+ปุ๋ยอินทรีย์+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา *R. microporus*

กรรมวิธีที่ 5 ดิน+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา *R. microporus*

กรรมวิธีที่ 6 ดิน+ต้นกล้ายาง
ประเมินระดับความรุนแรงของโรคโดยให้ระดับความรุนแรงของโรคตาม
วิธีการที่ดัดแปลงจาก Wattanasilakorn และคณะ (2012)

ระดับ 0 ไม่แสดงอาการ

ระดับ 1 แสดงอาการเหี่ยว

ระดับ 2 แสดงอาการใบเหลือง

ระดับ 3 แสดงอาการใบร่วง

ระดับ 4 แสดงอาการต้นตาย

นำค่าจากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรคมาคำนวณเปอร์เซ็นต์
ลดการเกิดโรค และดัชนีการเกิดโรค จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค} = 100 - \left[\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ}}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right] \times 100$$

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \left[\frac{\text{ผลรวมการเกิดโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นยาง} \times \text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right] \times 100$$

วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test พร้อมทั้งทดสอบ
คุณสมบัติบางประการ เช่น Total N, Available P, Available K และ pH ของดินปลูกยางพารา
หลังสิ้นสุดการทดลอง เป็นเวลา 4 เดือน

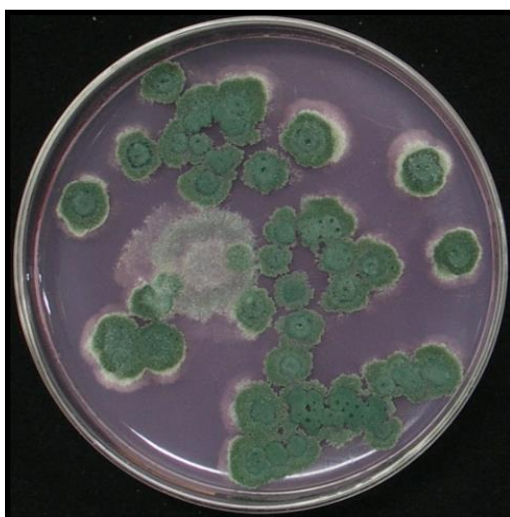
บทที่ 3

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน และแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp.

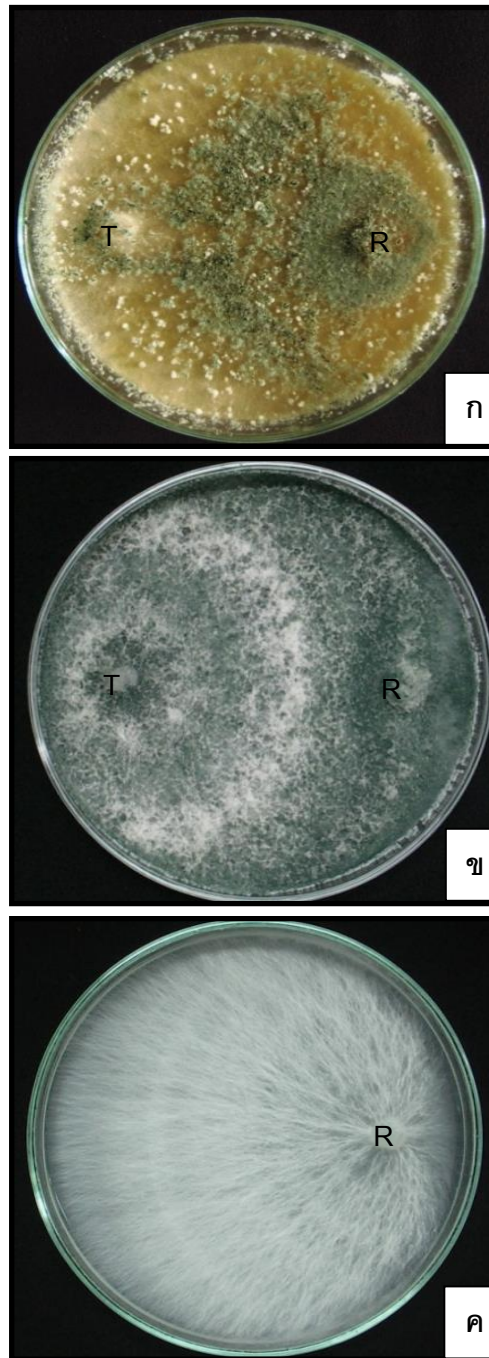
แยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากตัวอย่างดินจำนวน 86 ตัวอย่าง (ตารางภาคผนวกที่ 1) ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร TSM โดยคัดเลือกจากโคโลนีที่มีลักษณะการสร้างเส้นใยที่เจริญเร็ว ได้จำนวน 356 ไอโซเลท ในระยะแรกโคโลนีมีเส้นใยสีขาว หลังจากนั้นมีการสร้างสปอร์สีเขียว เรียงเป็นวงรอบหรือเป็นวงแหวน (ภาพที่ 3) ทั้งนี้ Rifai (1969) และ Bissett (1991) รายงานว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถใช้คัดแยกความแตกต่างในกลุ่ม Hyphomycete ออกจากเชื้อรากลุ่มอื่น แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ออกจากกันได้ใช้เป็นเพียงข้อสังเกตเบื้องต้นในการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งการเจริญรวดเร็วเป็นความโดดเด่นที่มีประโยชน์อย่างมากสำหรับการระบุ โดยทั่วไปว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ไม่เพียงพอในการจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยทั่วไปเชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างสปอร์สีเขียว แต่ในบางกรณีอาจเป็นสีขาวหรือสีเหลืองหรือสีเทา ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์



ภาพที่ 3 โคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSM หลังการแยกเชื้อด้วยวิธี dilution spread plate ที่ความเข้มข้นของดิน 10^{-4} เป็นเวลา 7 วัน

1.2 การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture plate พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 356 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้ 48.57-91.43 เปอร์เซ็นต์ (ตารางภาคผนวกที่ 2) โดยไอโซเลท NL2.2 และ ChM1.1 สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 91.43 และ 88.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4) Gaiera และคณะ (2013) รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีกลไกการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายวิธี แบ่งเป็นกลไกทางตรง และทางอ้อม กลไกทางตรง เช่น การเป็นปรสิตของเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้เส้นใยพันรัด และแทงเข้าเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคพืช ดูดกินสารอาหารภายในเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช แล้วทำให้เกิดความผิดปกติไม่สามารถเจริญตามปกติได้ และกลไกทางอ้อม เช่น การแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่ และสารอาหาร การสร้างสารปฏิชีวนะชนิดต่าง ๆ และเหนี่ยวนำกลไกให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งกลไกเหล่านี้ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีความโดดเด่นในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อใช้ควบคุมโรคพืชโดยวิธีที่นำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง สอดคล้องกับการรายงานของ Harman (2000) ที่รายงานว่าการเป็นปรสิตของเชื้อสาเหตุโรคพืช การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขันในด้านการครอบครองพื้นที่ และสารอาหาร และชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชเป็นกลไกที่สำคัญที่ทำให้เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคพืช



ภาพที่ 4 โคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อรา *Rigidoporus microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture plate หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ก. เชื้อรา *Trichoderma* sp. ChM1.1 (ซ้าย)+เชื้อรา *R. microporus* (ขวา)

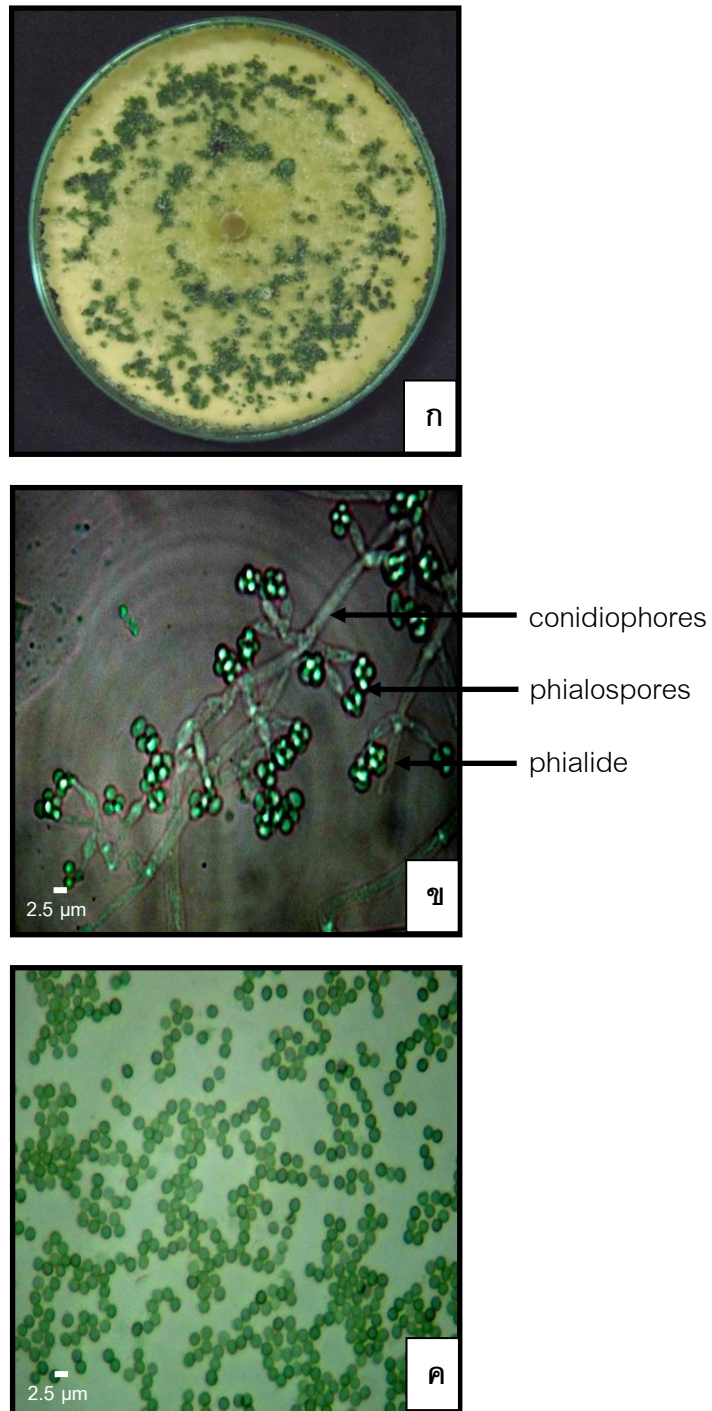
ข. เชื้อรา *Trichoderma* sp. NL2.2 (ซ้าย)+เชื้อรา *R. microporus* (ขวา)

ค. เชื้อรา *R. microporus* อย่างเดียว (ชุดควบคุม)

2. จำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2.1 จำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทางสัณฐานวิทยา

จากการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ChM1.1 และ NL2.2 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้สูงสุดมาจำแนกทางสัณฐานวิทยา พบว่า ทั้ง 2 ไอโซเลท มีลักษณะตรงกับ เชื้อรา *T. harzianum* โดยเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยในระยะแรกเส้นใยมีสีขาว และมีการเจริญอย่างรวดเร็วภายใน 2 วัน หลังจากนั้นมีการสร้างสปอร์สีเขียวจำนวนมากภายใน 7 วัน โดยกลุ่มสปอร์มีสีเขียวอ่อน ลักษณะค่อนข้างกลม ผิวเรียบ มีขนาด 2.5-2.7x2.5-2.8 ไมโครเมตร ก้านชูสปอร์จะแตกกิ่งก้านสาขาจำนวนมาก และสร้างสารบางอย่างแพร่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปรากฏเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 5) สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เช่นกัน โดยในระยะแรกเส้นใยมีสีขาวเจริญขึ้น หลังจากนั้นมีการสร้างสปอร์สีเขียวภายใน 5 วัน โดยมีกลุ่มสปอร์สีเขียวอ่อน ลักษณะค่อนข้างกลม ผิวเรียบ มีขนาด 2.5-3.5x2.1-2.8 ไมโครเมตร ก้านชูสปอร์จะแตกกิ่งก้านสาขาจำนวนมาก (ภาพที่ 6) ซึ่งจากการจัดจำแนกเชื้อรา *T. harzianum* ตรงกับที่ Bissett (1991) รายงานว่า โคลนินของเชื้อรา *T. harzianum* เจริญเร็ว ก้านชูสปอร์แตกกิ่งก้านมากมาย สปอร์ค่อนข้างกลม หรือเป็นวงรี มีขนาดเล็กกว่า 2.5-3.5x2.1-3.0 ไมโครเมตร เมื่อแก่เต็มที่จะเป็นสีเขียวอ่อน จนถึงเขียวเข้ม

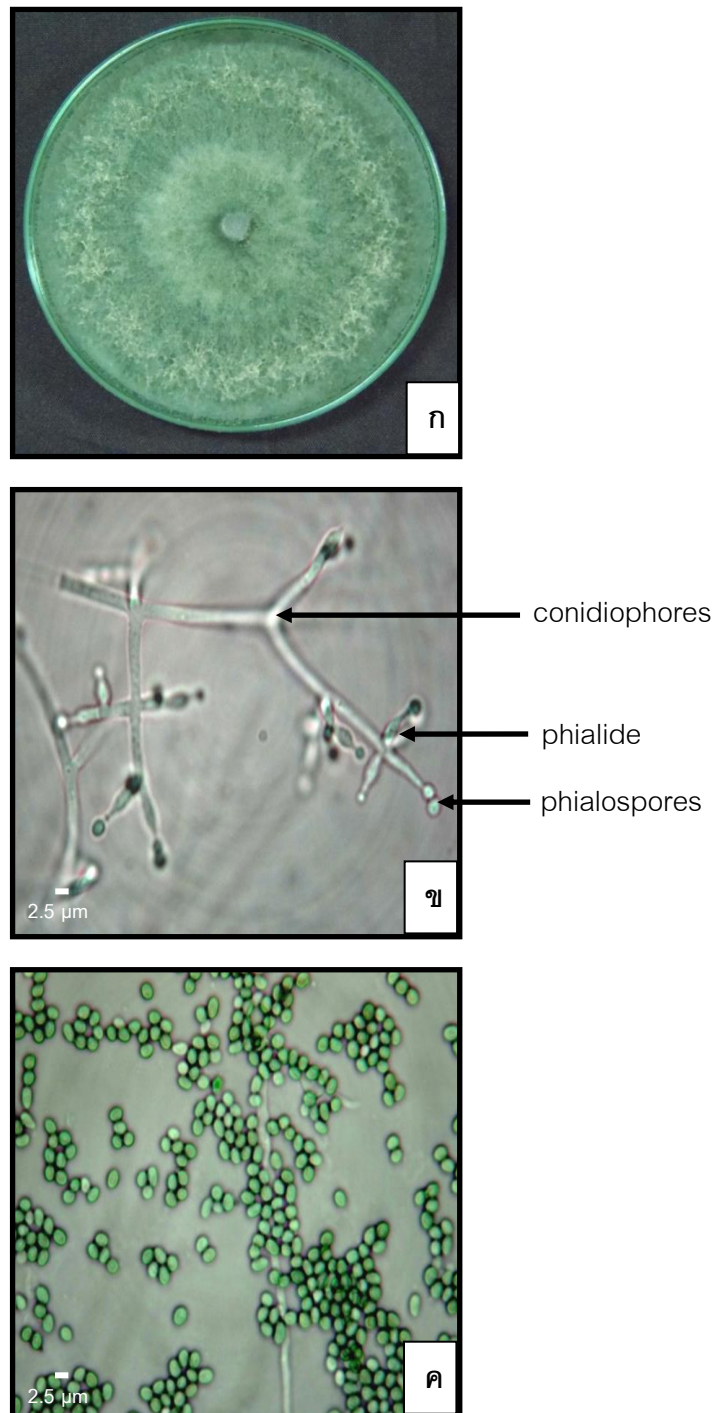


ภาพที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1

ก. โคโคโคนี้ อายุ 7 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ข. conidiophores, phialide และ phialospores

ค. phialospores



ภาพที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2

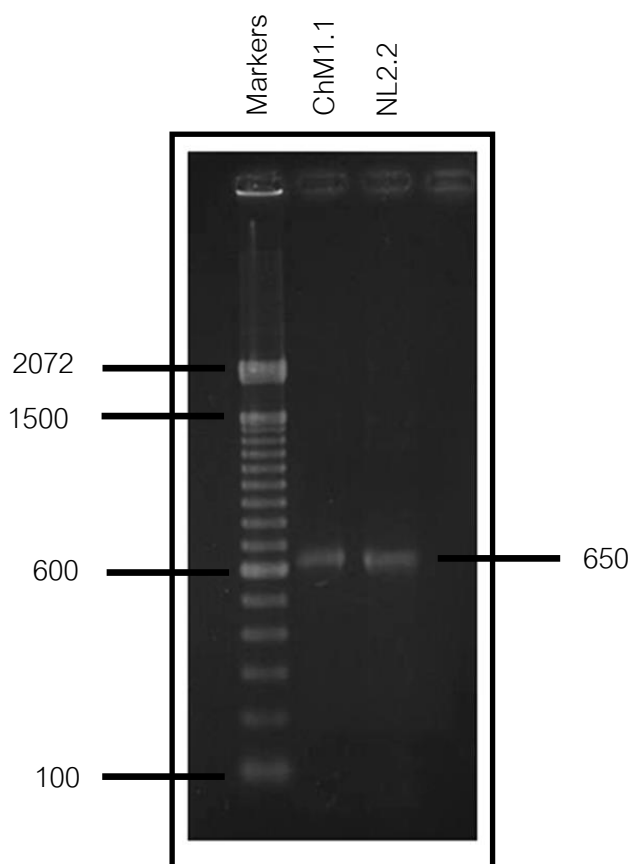
ก. โคโลนี อายุ 7 วัน

ข. conidiophores, phialide และ phialospores

ค. phialospores

2.2 จำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*. ChM1.1 และ NL2.2 ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

จากการนำเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้สูงสุดมาจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ด้วย primer Pn3 (forward) และ Pn16 (reverse) แล้วส่ง PCR products (ภาพที่ 7) เพื่ออ่านลำดับเบส DNA ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำการตรวจสอบลำดับเบสบน DNA จากนั้นนำลำดับเบส DNA ที่ได้ ตรวจสอบโดยโปรแกรม BLAST search จากฐานข้อมูลใน GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อค้นหาสายพันธุ์เชื้อราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุด พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp ทั้ง 2 ไอโซเลท มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับเชื้อรา *T. harzianum* มากถึง 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 ขนาด PCR products ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 เมื่อเปรียบเทียบกับ Markers (100 bp ladder)

2.3 ศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2

2.3.1 ทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2

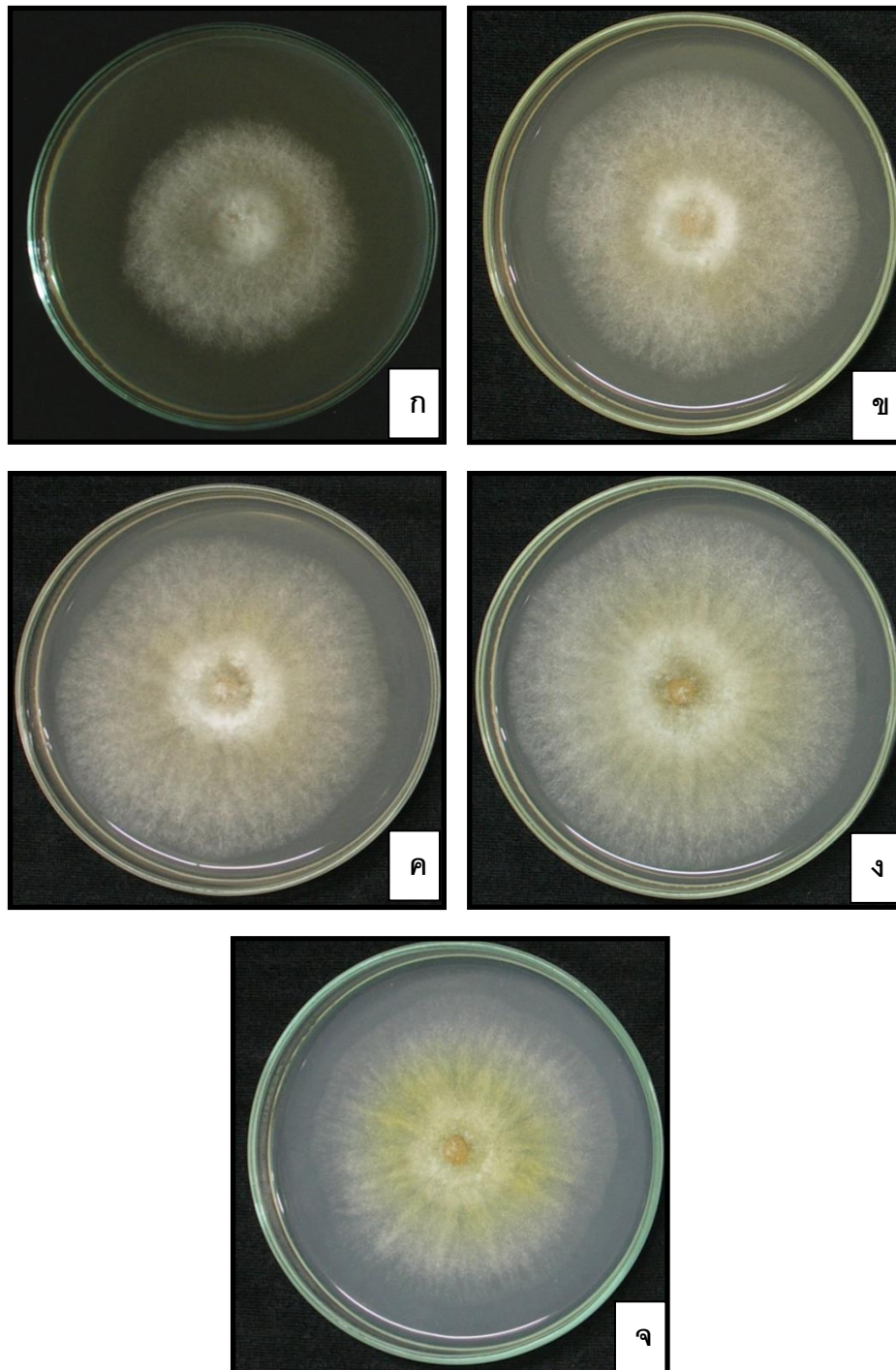
จากการศึกษา พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 สามารถเจริญได้ในทุก pH ตั้งแต่ 4-8 โดย เชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 สามารถเจริญได้ดีใน pH 6-7 รองลงมาใน pH 8, 5 และ 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 8) ส่วนเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 สามารถเจริญได้ดีใน pH 6-8 รองลงมาใน pH 5 และ pH 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 9) สอดคล้องกับรายงานของ Kollı และคณะ (2012) ที่ศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ใน pH ต่าง ๆ ได้แก่ pH 4.5 5.5 6.5 และ 7.5 จากการศึกษ พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 25 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 7.5 รองลงมาคือ pH 5.5 และ 6.5 ตามลำดับ ส่วนที่ pH 4.5 สามารถเจริญได้น้อยที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะเชื้อรา *T. harzianum* เพียงสายพันธุ์เดียว พบว่า สามารถเจริญได้ดีใน pH 7.5, 6.5, 5.5 และ 4.5

ตารางที่ 3 การเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

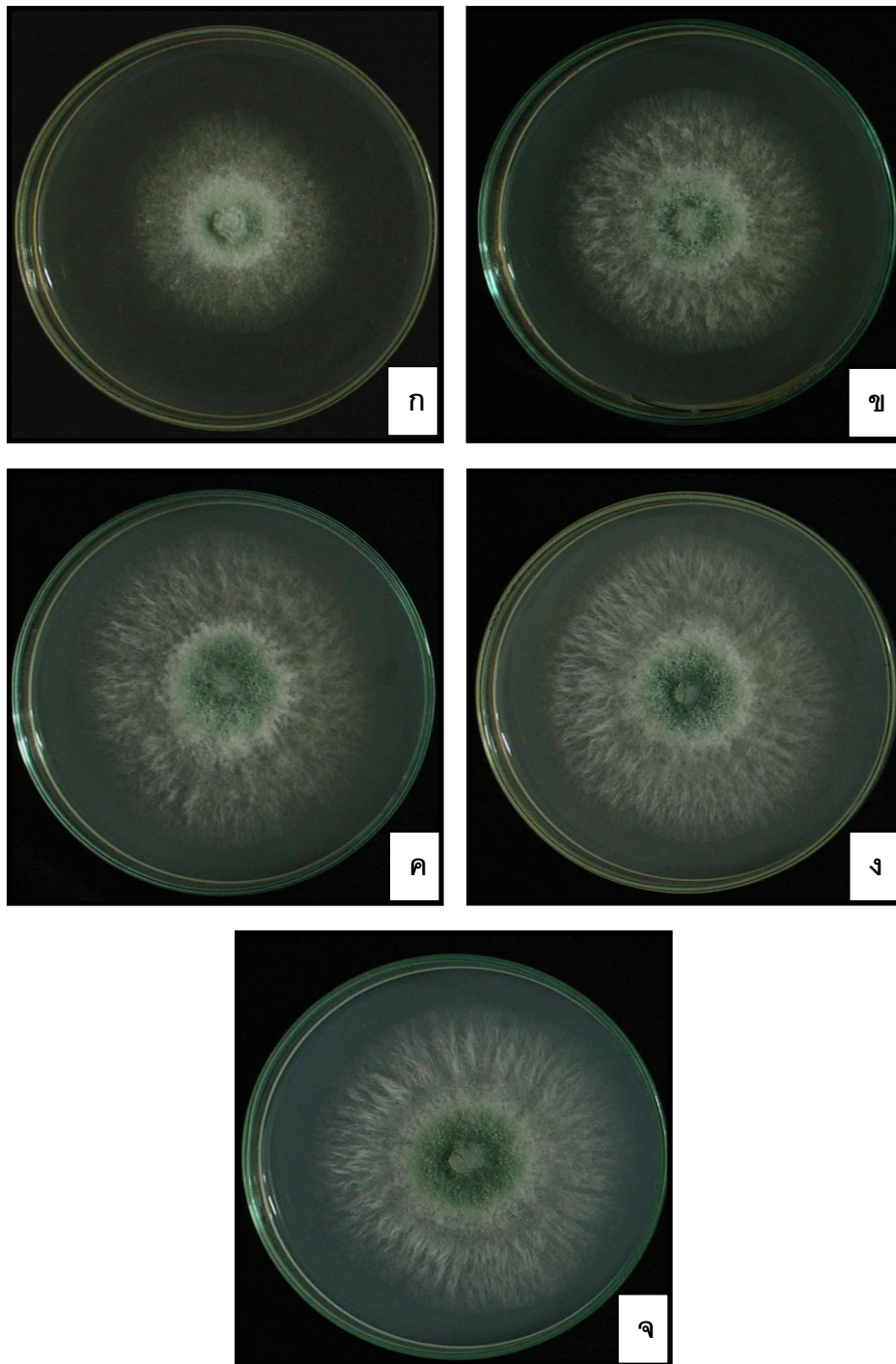
pH	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	
	ChM1.1	NL2.2
4	6.03±0.10d ^{1/}	6.25±0.35b
5	7.45±0.05c	6.30±0.35b
6	8.03±0.12ab	7.58±0.05a
7	8.35±0.09a	7.68±0.05a
8	7.93±0.22b	7.92±0.33a
F-test	**	**
C.V. (%)	3.25	1.43

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 8 โคโคโคนีของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีระดับ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน
 ก. pH 4 ข. pH 5 ค. pH 6 ง. pH 7 จ. pH 8



ภาพที่ 9 โคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีระดับ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน
 ก. pH 4 ข. pH 5 ค. pH 6 ง. pH 7 จ. pH 8

2.3.2 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 สามารถเจริญได้ดีที่สุด

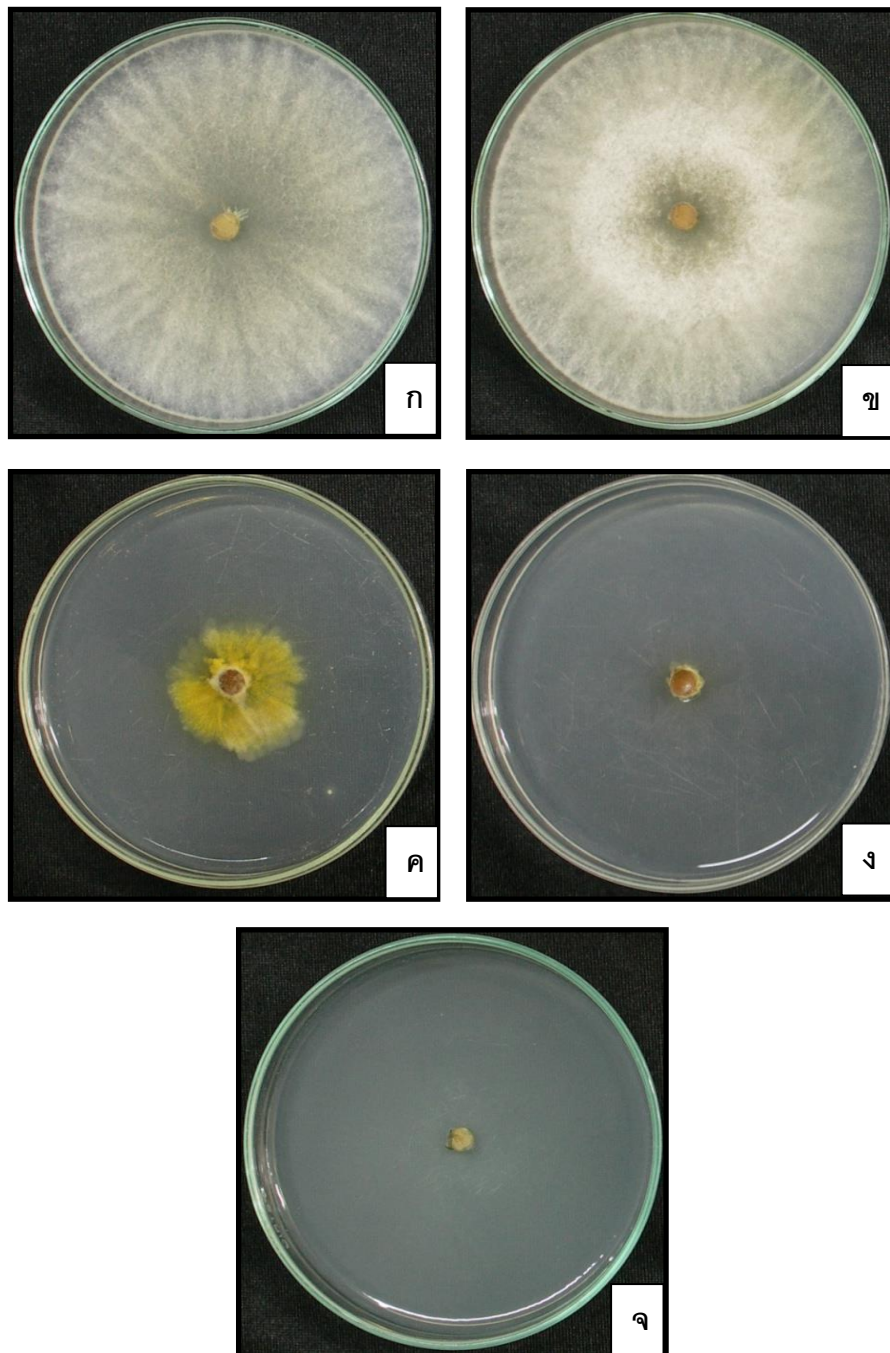
จากการทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส เจริญลดลงที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 10) และ (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 11) สอดคล้องกับการทดลองของ Yates และคณะ (2008) ที่รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถทนและเจริญได้ดีในอุณหภูมิ 15-35 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Anees และคณะ (2010) ซึ่งได้ทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในอุณหภูมิ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีการเจริญเป็นปกติที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เจริญลดลงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 การเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิต่าง ๆ หลังการบ่ม เป็นเวลา 2 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	
	ChM1.1	NL2.2
20	9.00±0.00a ^{1/}	9.00±0.00a
25	9.00±0.00a	9.00±0.00a
30	3.13±0.05b	5.20±0.00b
35	0.96±0.08c	2.28±0.08c
40	0.50±0.00d	0.50±0.00d
F-test	**	**
C.V. (%)	0.035	0.025

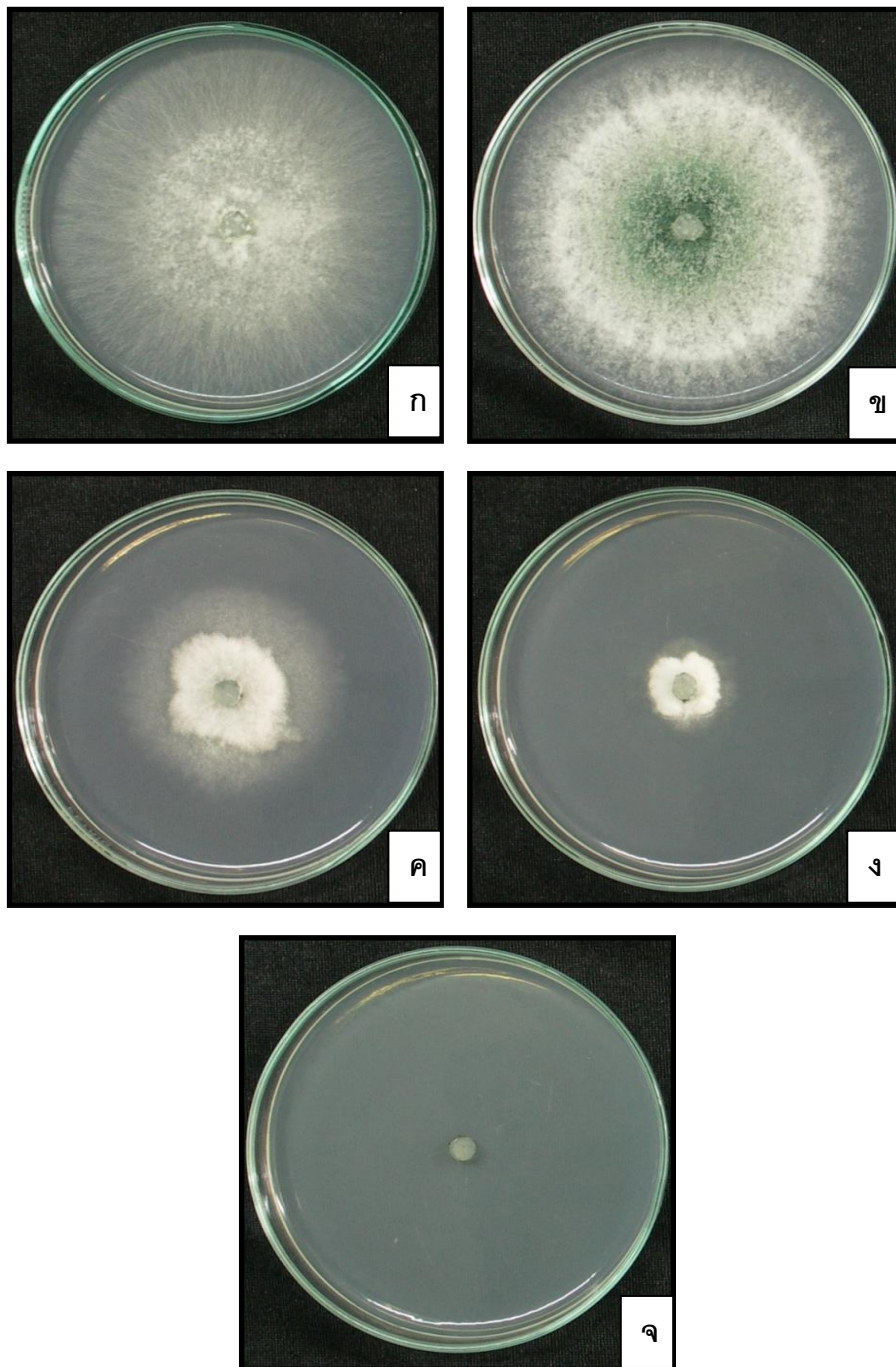
** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 10 โคโคนีของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 2 วัน

ก. 20 องศาเซลเซียส	ข. 25 องศาเซลเซียส
ค. 30 องศาเซลเซียส	ง. 35 องศาเซลเซียส
จ. 40 องศาเซลเซียส	



ภาพที่ 11 โคโคเนียของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 2 วัน

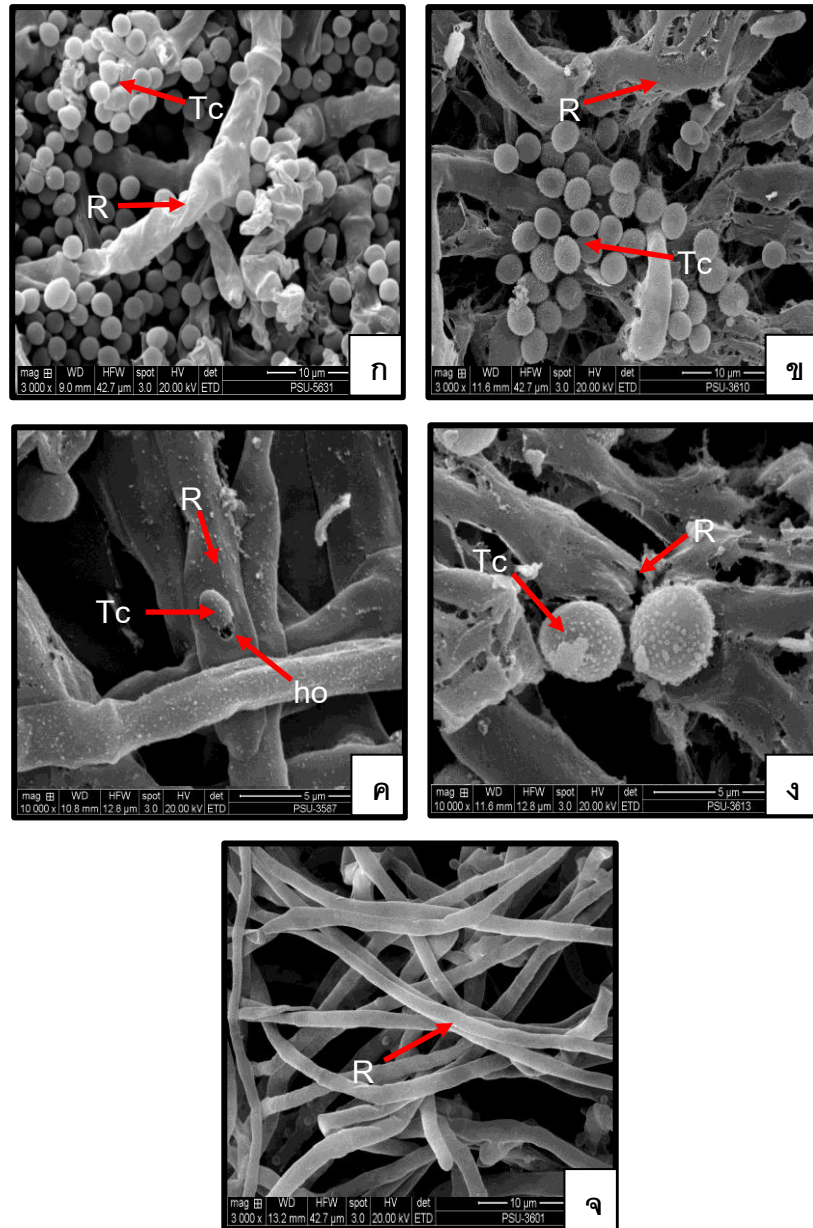
ก. 20 องศาเซลเซียส	ข. 25 องศาเซลเซียส
ค. 30 องศาเซลเซียส	ง. 35 องศาเซลเซียส
จ. 40 องศาเซลเซียส	

3. ศึกษากลไกการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*. ChM1.1 และ NL2.2 ต่อเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา

3.1 ศึกษาลักษณะทางโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงของเชื้อรา

Rigidoporus microporus

จากการศึกษาลักษณะทางโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปของเชื้อรา *R. microporus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า เส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* มีลักษณะผิดปกติ โดยเกิดเป็นรูปพวง และฉีกขาด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* อย่างเดียว (ภาพที่ 12) อาการผิดปกติของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ที่เกิดขึ้น เป็นผลมาจากเส้นใย และสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สัมผัสกับเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* แล้วผลิตสารบางอย่างออกมาทำให้ผนังเซลล์ผิดปกติ ทั้งนี้ Collmer และ Keen (1986) ได้รายงานไว้ว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยเส้นใยเข้าไปสัมผัส พันธ์ และเจาะเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคพืช ทำให้โครงสร้างเซลล์ผิดปกติไป เกษม สร้อยทอง (2551) กล่าวว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารพิษปลดปล่อยออกภายนอกเซลล์ สารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น ส่งผลให้เชื้อสาเหตุโรคพืชถูกทำลาย นอกจากนี้ Intana (2003) รายงานว่า จากการเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับเชื้อ *Pythium aphanidermatum* ด้วยวิธี dual culture เป็นเวลา 4 วัน และ 6 วัน พบว่า จากการเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 4 วัน เส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* มีการพันรัด และปล่อยสารบางอย่างออกมาทำให้เส้นใยของเชื้อ *P. aphanidermatum* ผิดปกติ ในขณะที่การเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 6 วัน พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* มีการสร้างสปอร์เพิ่มมากขึ้น และเมื่อเส้นใยของเชื้อ *P. aphanidermatum* สัมผัสกับสปอร์ของเชื้อรา *T. harzianum* จะมีลักษณะเหี่ยว และเป็นรูปพวง ส่งผลให้เส้นใยถูกทำลาย



ภาพที่ 12 เส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* แสดงอาการเหี่ยว เกิดรูพรุน และฉีกขาด เมื่อวางเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

ก. และ ค. เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ เชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1

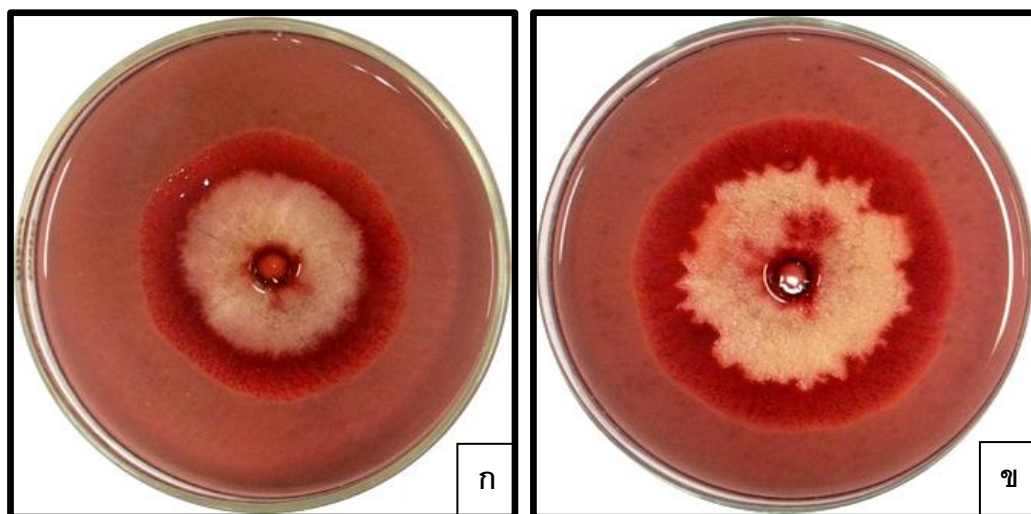
ข. และ ง. เชื้อรา *R. microporus* ร่วมกับ เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2

จ. เชื้อรา *R. microporus* (ชุดควบคุม) มีลักษณะเส้นใยปกติ

Conidia of *Trichoderma* spp. =Tc, *R. microporus*=R และ hole=ho

3.2 ศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2

จากการศึกษาการสร้าง chitinase ของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 โดยสังเกตการเกิดวงใสรอบโคโลนี พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ออกมาย่อย colloidal chitin ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จึงให้ผลเป็นบวก (ภาพที่ 13) Agrawal และ Kotasthane (2012) กล่าวว่า chitin เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์ของเชื้อรา การที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase ซึ่งสามารถย่อยสลาย chitin จึงทำให้มีคุณสมบัติในยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้ จึงจัดเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. สอดคล้องกับการทดลองของ Tokimoto (1982) Sivan และ Chet (1986) Kubicek และคณะ (2001) ที่รายงานว่าผนังเซลล์ของเชื้อรามีโครงสร้างหลักส่วนใหญ่เป็น chitin, glucan และ proteins การที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีกลไกการปรสิตต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช และผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายองค์ประกอบเหล่านี้ก็จะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพของกลไกหลักในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช Haran และคณะ (1996) และ Balasubramanian (2003) รายงานว่า เชื้อรา *T. flavofuscum*, *T. harzianum* และ *T. viride* เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีการใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมากที่สุด กลไกที่สามารถควบคุมเชื้อราโรคพืชส่วนใหญ่ คือ การผลิต antibiotics และเป็นปรสิตของพืชโดยตรง สามารถเข้าทำลายแล้วหลั่งเอนไซม์ เช่น cellulase, chitinase, β -1,3-glucanase และ proteases โดยเอนไซม์เหล่านี้ สามารถทำลายส่วนของผนังเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคพืช ซึ่งมีองค์ประกอบเป็น cellulose, chitin, glucan และ proteins (Lorito *et al.*, 1994; Carsolio *et al.*, 1999) ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชหยุดการเจริญ



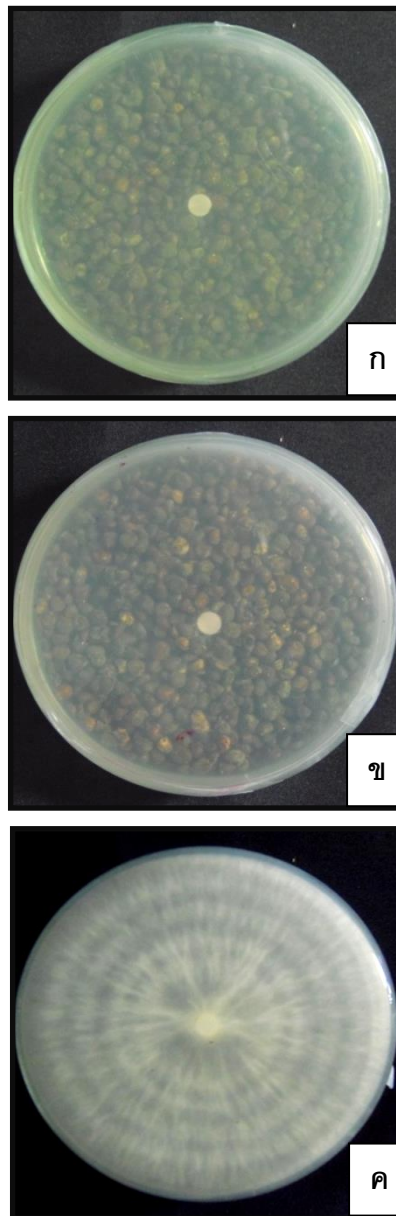
ภาพที่ 13 ลักษณะการสร้างวงใสที่เกิดจากการย่อย substrate โดยเอนไซม์ chitinase บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสม colloidal chitin 2.4 เปอร์เซ็นต์ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

- ก. วงใสที่เกิดจากการย่อย chitin โดยเอนไซม์ chitinase ของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1
- ข. วงใสที่เกิดจากการย่อย chitin โดยเอนไซม์ chitinase ของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2

3.3 ศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะชนิดที่ระเหยได้ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ต่อการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารระเหยของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้เท่ากันคือ 94.4 เปอร์เซ็นต์ (ตารางภาคผนวกที่ 3 และ ภาพที่ 14) และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 โดยใช้เครื่อง GC-MS พบว่า องค์ประกอบหลักของสารระเหยของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 ได้แก่ 3-octanone, benzeneacetaldehyde, 3-octanyl acetate, pentadecane, 4-heptanol, 4-ethyl-2,6-dimethyl-, Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl และ Hydroxymethylcyclododecane (ตารางภาคผนวกที่ 4 และ ภาพที่ 15) โดย พบว่า มีสาร 3-octanone ปริมาณมากที่สุด 29.82 เปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด โดย 3-octanone เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยมีผลไปทำลายส่วน

ของโปรตีนของเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งโปรตีนเป็นองค์ประกอบพื้นฐานในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีหน้าที่สำคัญภายในเซลล์เช่น เอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต โปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อนจะมีความสำคัญมากในกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ แต่หากโปรตีนถูกทำลายเสียสภาพ (denaturation) ทำให้ไม่สามารถทำหน้าที่นั้น ๆ ได้ โครงสร้างของโปรตีนถูกทำลายเมื่อพันธะที่ใช้ยึดโครงสร้างถูกทำลายด้วยสารกลุ่มแอลกอฮอล์ โดยสารกลุ่มแอลกอฮอล์จะไปสลายพันธะไฮโดรเจนในส่วนที่เชื่อมโองอะตอมไฮโดรเจนและออกซิเจน ซึ่งต่อกันเหมือนลูกโซ่ ทำให้โมเลกุลของโปรตีนสูญเสียรูปร่างมีผลต่อการทำงานของโปรตีน (นิรนาม, 2556) และองค์ประกอบหลักของสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ได้แก่ 1-butanol 3-methyl-, benzeneethanol, à-bergamotene, 1-methyl-4(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-methylbenzene, 6 amyl à pyrone, zingibereneá, à-bisabolene, á-sesquiphellandrene และ 2(1H)-naphthalenone4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-8a-methyl-, trans- (ตารางภาคผนวกที่ 5 และ ภาพที่ 16) โดยพบว่า มีสาร 6 amyl à pyrone และสาร benzeneethanol ปริมาณการผลิตมากที่สุด 14.72 และ 13.16 เปอร์เซ็นต์ ของสารที่วิเคราะห์ได้ทั้งหมด ตามลำดับ โดยสาร benzeneethanol จัดอยู่ในกลุ่มแอลกอฮอล์เป็นสารที่มีฤทธิ์แบบเดียวกันกับสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 ส่วนสาร 6 amyl à pyrone มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ จึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค Pezet และคณะ (1999) รายงานว่า สาร 6-pentyl-a-pyrone ที่สกัดได้จากสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Botrytis cinerea* สอดคล้องกับการศึกษาของ Claydon และคณะ (1987) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารระเหย 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one และ 6-n-pentenyl-2H-pyran-2-one ของเชื้อรา *T. harzianum* 2 สายพันธุ์ พบว่า มีคุณสมบัติในการยับยั้ง และลดอัตราการเข้าทำลายของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรค damping off ในต้นกล้าผักกาดหอม

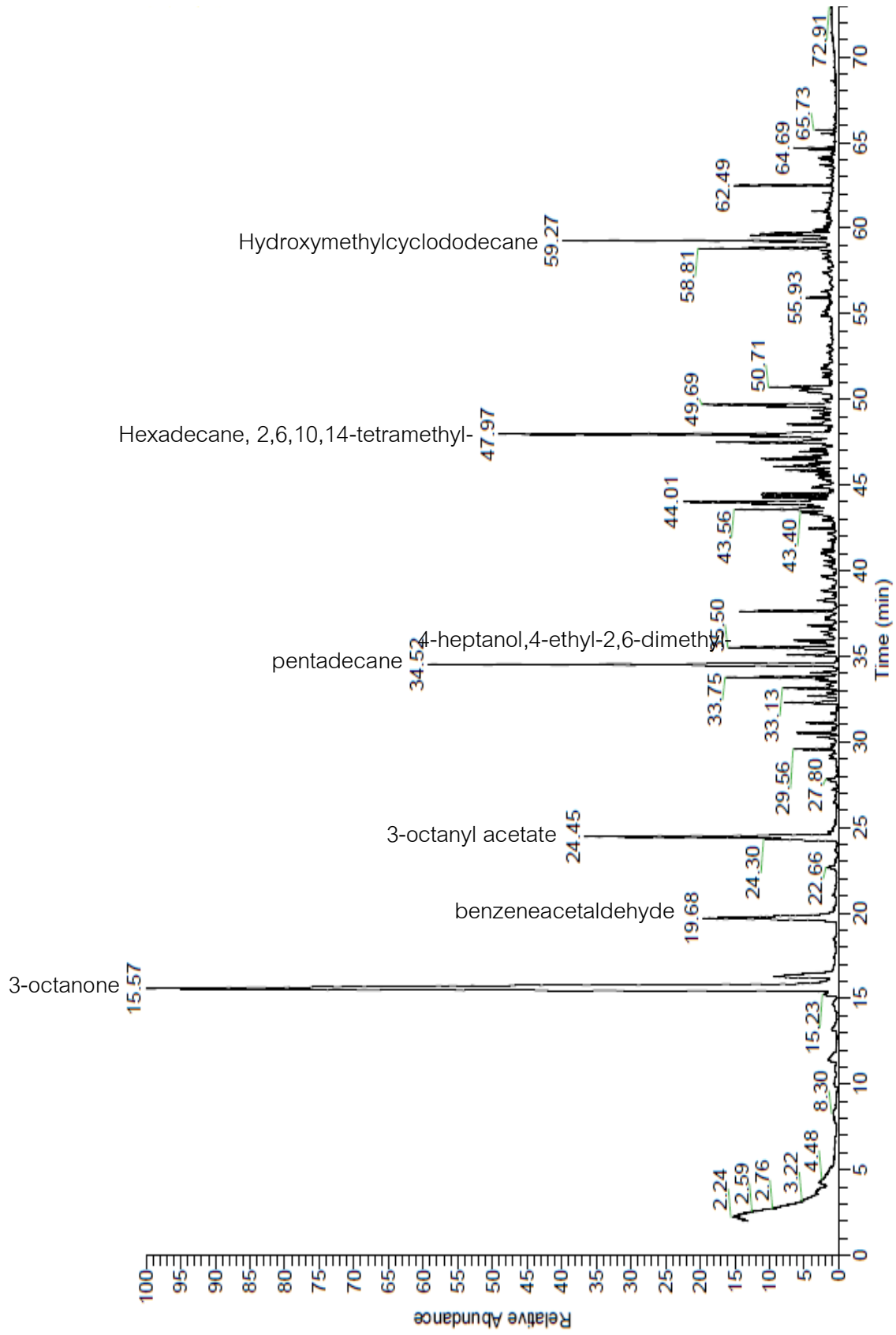


ภาพที่ 14 ประสิทธิภาพของสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ต่อเชื้อรา *Rigidoporus microporus* หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

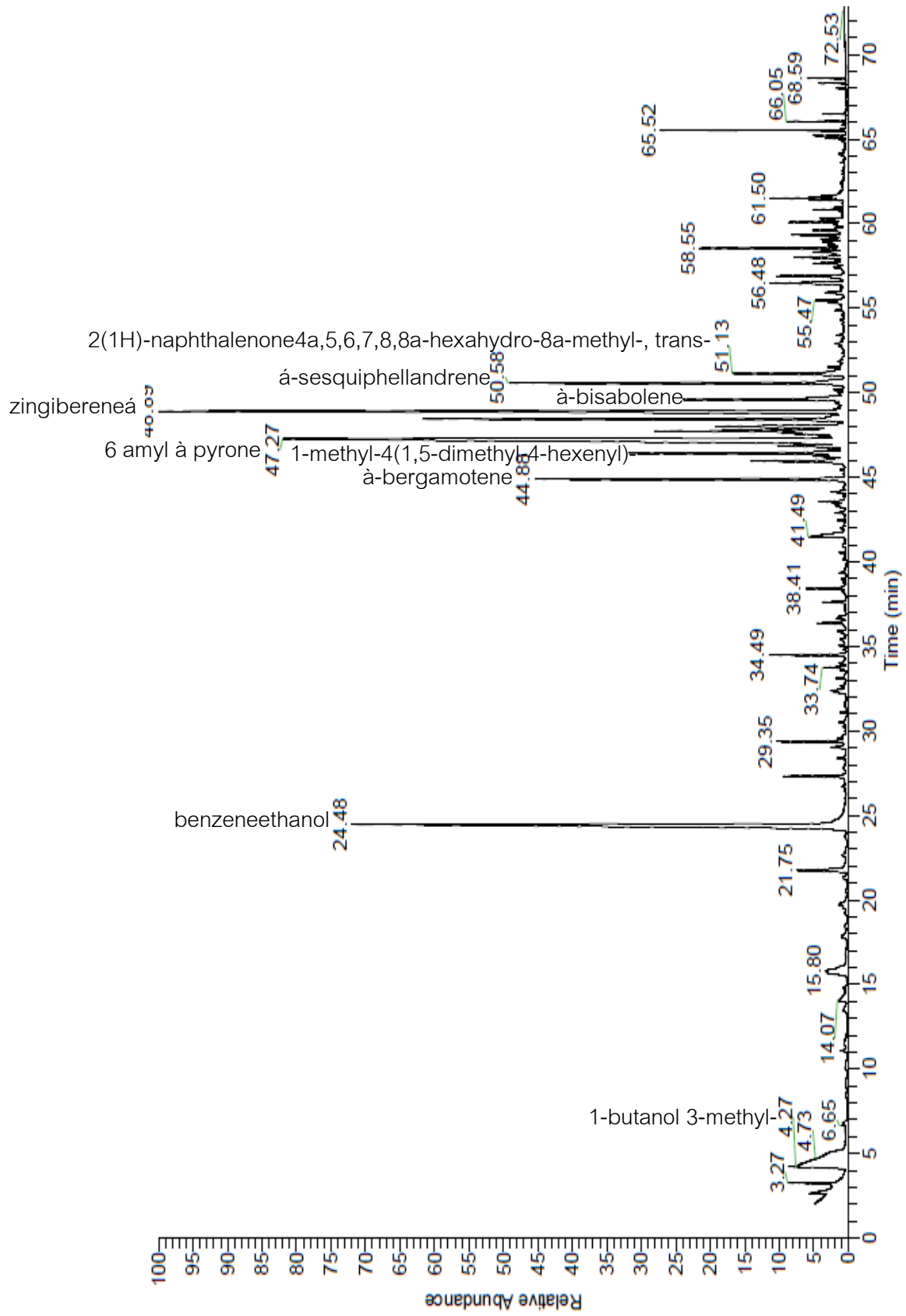
ก. เชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 ที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่าง (ด้านล่าง) ปล่อยสารระเหยมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* (ด้านบน)

ข. เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่าง (ด้านล่าง) ปล่อยสารระเหยมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* (ด้านบน)

ค. เชื้อรา *R. microporus* เจริญได้ดี เนื่องจากไม่มีสารระเหยจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. มายับยั้ง (ชุดควบคุม)



ภาพที่ 15 Total ion chromatogram ของสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1



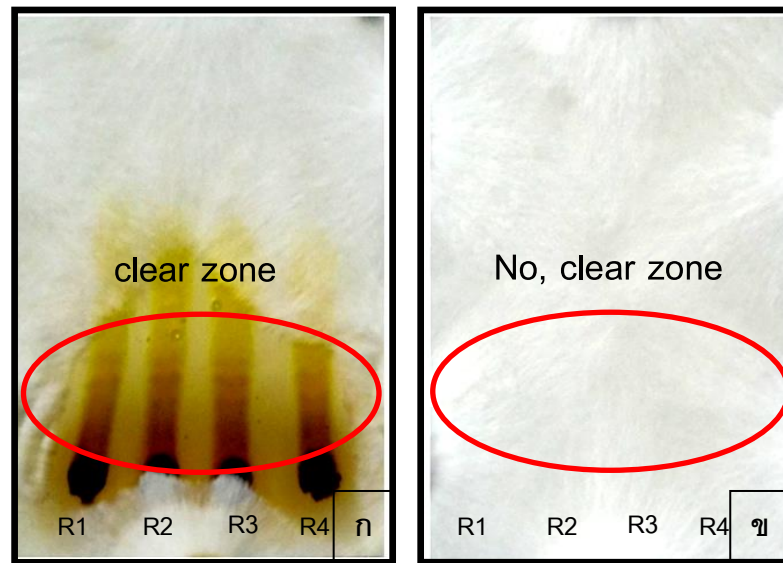
ภาพที่ 16 Total ion chromatogram ของสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2

3.4 การสร้างสารปฏิชีวนะชนิดที่แพร่ในอาหารของเชื้อรา

Trichoderma harzianum ChM1.1 ต่อการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus*

จากการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* จึงสกัดสารปฏิชีวนะจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 เพื่อหาค่า MIC และ MFC ด้วยวิธี broth microdilution พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 มีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารกำจัดเชื้อรา carboxin มีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.49 และ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *R. microporus* ของสารสกัดด้วยวิธี Thin-layer chromatography bioautography พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *R. microporus* โดยเห็นบริเวณยับยั้ง (clear zone) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเส้นใยของเชื้อรา *R. microporus* เจริญทั่วผิวน้ำอาหาร ซึ่งมีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.22-0.4 (ภาพที่ 17) และเมื่อนำสารไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า องค์ประกอบหลัก ได้แก่ acetic acid, 1,3-Diamio-2-propanol, 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one, octadecanoic acid, octadec-9-enoic acid, 9-octadecenamide และ chrysophanol ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของแอลกอฮอล์ สำหรับการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะ เช่น สาร 1-Hydroxy-3-methyl-5,10-anthraquinone (ตารางภาคผนวกที่ 6 และ ภาพที่ 18) Fuzellier และคณะ (1982) รายงานว่า สารในกลุ่ม anthraquinone (rheinemodin และ aloe-emodin) มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น เชื้อราสาเหตุโรคผิวหนัง (กลาก และเกลื้อน) ได้แก่ เชื้อ *Candida albicans*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Pityrosporum* sp. และอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อรา *T. harzianum* Th-R16 สามารถผลิตสาร 1,5-dihydroxy-3-hydroxymethyl-9,10-anthraquinones ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา และแบคทีเรีย (Ghisalberti and Sivasithamparam, 1991)

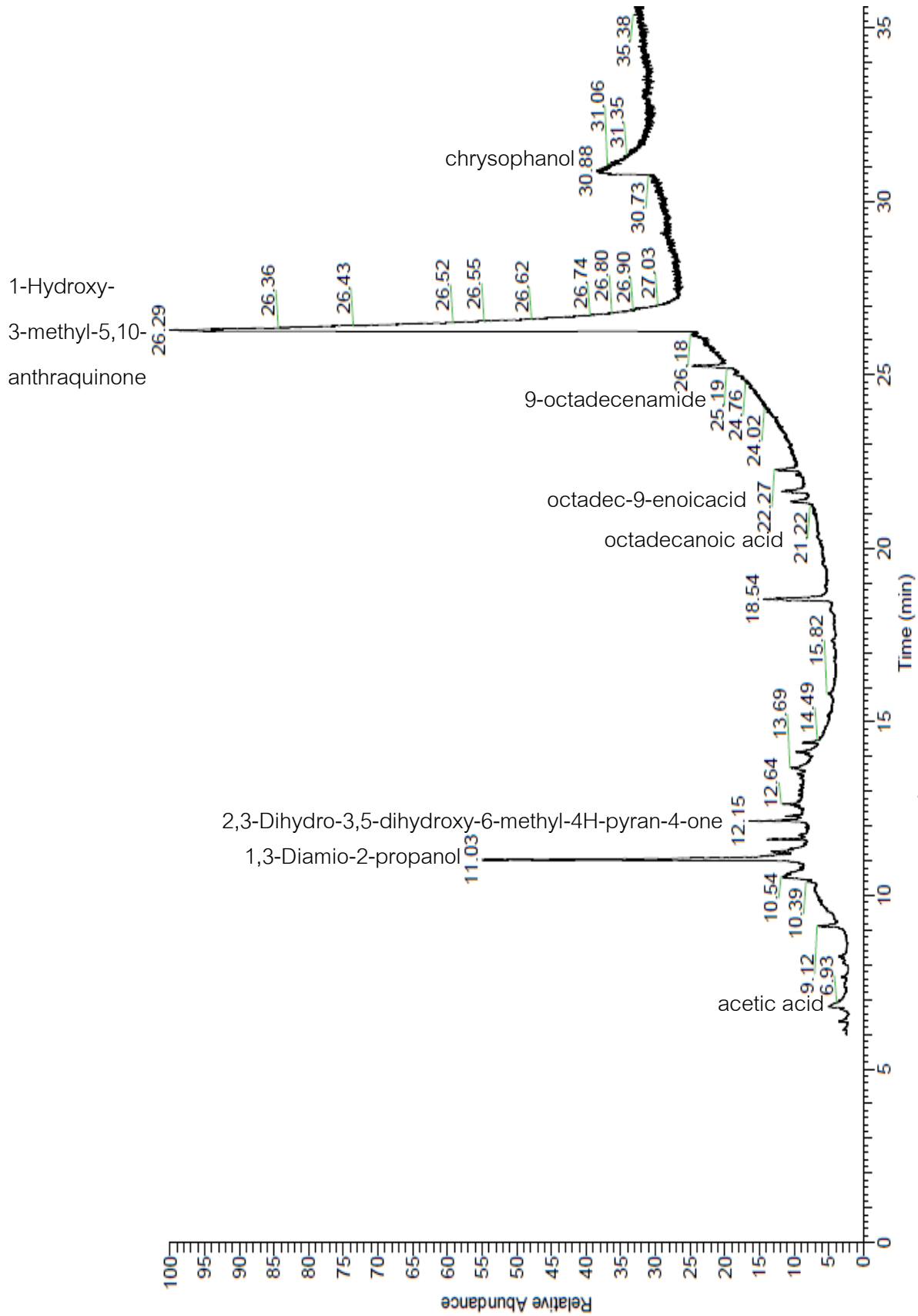


ภาพที่ 17 บริเวณยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Thin-layer chromatography bioautography บนแผ่น TLC หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

ก. ชุดทดสอบ (หยดสารสกัด)

ข. ชุดควบคุม (หยดตัวทำละลาย ethyl acetate)

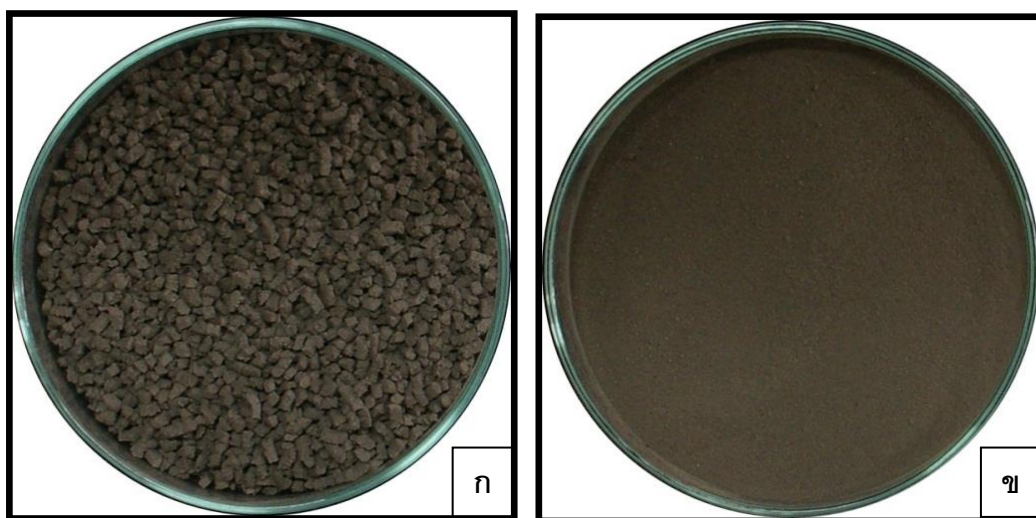
R1-4 คือ จำนวนซ้ำของการทดลอง



ภาพที่ 18 Total ion chromatogram ของสารที่สกัดได้จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1

4. สูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2

ผลิตสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล และผงจากเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 เนื่องจากเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 มีการเจริญ ขยายพันธุ์รวดเร็ว และมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สูงกว่าเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล มีสีน้ำตาลเข้ม ขนาดใกล้เคียงกัน ลักษณะอัดตัวกันแน่น และแข็ง ส่วนสูตรสำเร็จชนิดผงมีสีน้ำตาลเข้ม ละเอียด และเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ลักษณะของสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2

- ก. สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลผ่านเครื่องแรงเบอร์ 6
- ข. สูตรสำเร็จชนิดผง

4.1 การประเมินผลสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2

4.1.1 การทดสอบความสม่ำเสมอ และการกระจายตัวของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในสูตรสำเร็จ

เมื่อนำสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล และผงมาตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร TSM พบว่า สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล มีปริมาณเชื้อมากกว่าสูตรสำเร็จชนิดผง ซึ่งในแต่ละสูตรมีปริมาณเชื้อเฉลี่ย 6.13 และ 5.60 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และ ภาพที่ 20) สอดคล้องกับรายงานของอัจฉรา อุทิศวรรณกุล (2536) รายงานว่า สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลเป็นสูตรที่มีความคงตัวของเชื้อจุลินทรีย์สูง เนื่องจากมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอากาศน้อย จึงสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของสูตรสำเร็จ

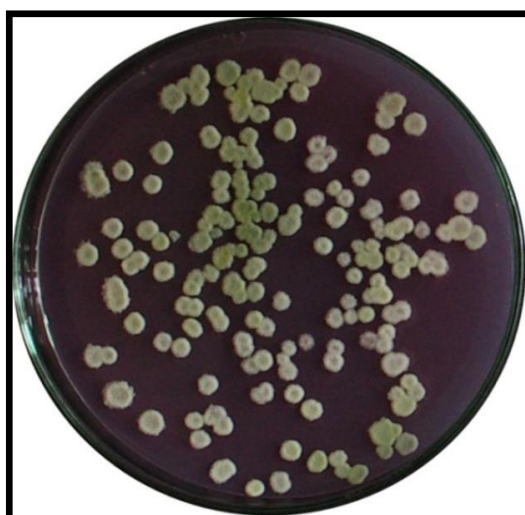
ตารางที่ 5 ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในสูตรสำเร็จหลังการผลิต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อรา <i>T. harzianum</i> NL2.2 ในสูตรสำเร็จ ($\times 10^7$ โคโลนีต่อกรัม)		
จุดที่	สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล	สูตรสำเร็จชนิดผง
1	6.60 \pm 2.04a ^{1/}	5.60 \pm 1.50
2	6.58 \pm 1.44a	5.35 \pm 0.87
3	6.38 \pm 1.75a	5.55 \pm 0.87
4	5.58 \pm 1.03b	5.75 \pm 0.65
5	5.50 \pm 0.91b	5.75 \pm 2.06
ค่าเฉลี่ย	6.13 \pm 1.26	5.60 \pm 0.62
F-test	**	ns
C.V. (%)	14.96	12.91

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

**แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 20 โคโลนีเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 บนอาหาร TSM หลังนำสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

4.1.2 การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความสามารถในการละลายน้ำของสูตรสำเร็จ

เตรียมสารแขวนลอยของสูตรสำเร็จที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้ววัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วย pH meter พบว่า สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล และผง มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.41-6.57 และ 6.06-6.29 ตามลำดับ และมีความสามารถในการละลายน้ำ อยู่ในช่วง 1.8-2.5 และ 2.53-3.50 วินาที ตามลำดับ ทั้งนี้สูตรสำเร็จทั้งสองชนิดมีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกรดอ่อน ซึ่งเป็นผลมาจากส่วนประกอบของสูตรสำเร็จที่ได้จากดินพีช โดยดินพีชที่นำมาผลิตสูตรสำเร็จมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 5.38-5.46

4.1.3 ทดสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในสูตรสำเร็จ

จากการตรวจนับปริมาณเชื้อในสูตรสำเร็จทันทีหลังผลิต 24 ชั่วโมง และตรวจนับทุกเดือนหลังจากการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร TSM พบว่า จำนวนประชากรของเชื้อที่มีชีวิตรอดในแต่ละเดือนตั้งแต่เดือนแรกจนถึงเดือนที่ 6 ลดลงเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้ในการเก็บรักษาเชื้อเป็นอุณหภูมิเหมาะสม จึงสามารถยืดระยะเวลาอายุการเก็บรักษาเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในสูตรสำเร็จนานออกไป (ตารางที่ 6) สอดคล้องกับรายงานของ ปวีณา สังข์แก้ว (2556) ได้ศึกษาโดยเก็บรักษาสูตรสำเร็จของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในอุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บรักษานานกว่าอุณหภูมิห้อง โดยมีปริมาณของเชื้อมากกว่า และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคดีกว่าเช่นกัน

ตารางที่ 6 ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในสูตรสำเร็จ หลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

ปริมาณเชื้อรา <i>T. harzianum</i> NL2.2 ในสูตรสำเร็จ ($\times 10^7$ โคโลนีต่อกรัม)		
เดือนที่	สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล	สูตรสำเร็จชนิดผง
24 ชั่วโมง หลังผลิต	6.13 \pm 1.26cd ^{1/}	5.60 \pm 0.62de
1	6.85 \pm 1.26bc	6.53 \pm 4.70bc
2	7.63 \pm 0.95a	7.18 \pm 1.18ab
3	6.08 \pm 3.20cd	5.53 \pm 3.20de
4	5.13 \pm 1.60ef	4.53 \pm 3.54f
5	4.45 \pm 2.72fg	3.75 \pm 2.66hi
6	4.58 \pm 2.66f	3.55 \pm 2.53i
F-test	**	
C.V. (%)	9.03	

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

4.1.4 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในสูตรสำเร็จ

ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยวิธี dual culture plate หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สูตรสำเร็จทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* ได้ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 หลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

เดือนที่	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i>	
	สูตรสำเร็จชนิดแกรนูล	สูตรสำเร็จชนิดผง
24 ชั่วโมง หลังผลิต	83.57±0.71a ^{1/}	82.14±1.36a
1	81.07±1.07a	81.79±2.95a
2	81.07±0.69a	80.36±1.80a
3	83.21±1.07a	82.50±2.14a
4	80.36±1.35a	81.07±2.42a
5	81.07±0.68a	81.07±2.14a
6	82.14±1.23a	82.50±2.14a
ชุดควบคุม	0.00±0.00b	0.00±0.00b
F-test	**	
C.V. (%)	3.92	

** แตกต่างทางสถิติที่ P < 0.01

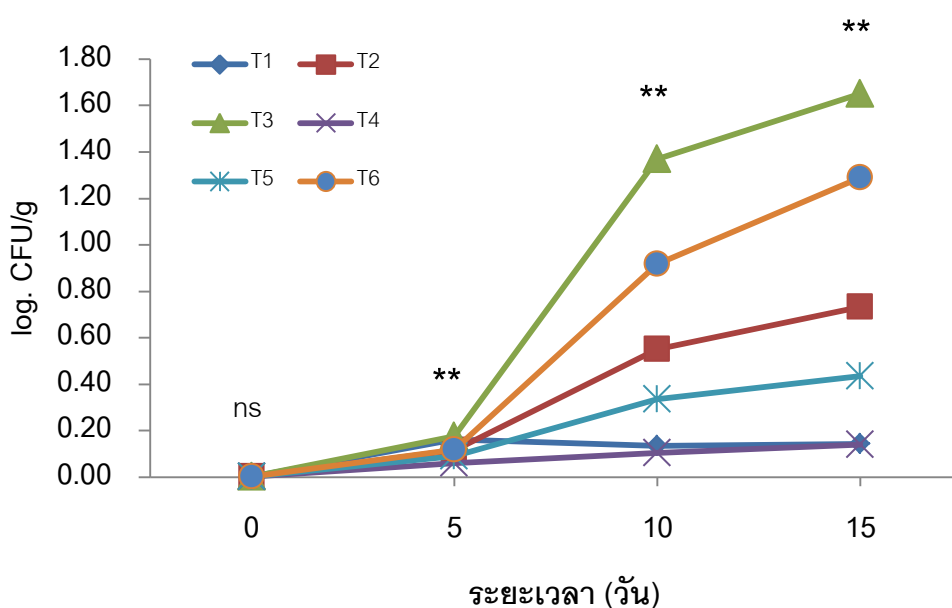
^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

5. ศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 สูตรสำเร็จในปุ๋ยคอก (มูลไก่ และมูลวัว) และปุ๋ยอินทรีย์

ตรวจนับปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ซึ่งเลี้ยงในมูลไก่ มูลวัว และปุ๋ยอินทรีย์ (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปุ๋ยนึ่งฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในปุ๋ยที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แต่หากเปรียบเทียบระหว่างชนิดปุ๋ย พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดในปุ๋ยอินทรีย์ (หมอดิน ชีพี) รองลงมาคือ มูลวัว และมูลไก่ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางภาคผนวกที่ 7 และ ภาพที่ 21 และ 22)

ศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเชื้อ โดยนำสูตรสำเร็จของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 คลุกเคล้าในปุ๋ยอินทรีย์ ปรับความชื้น 25, 30 และ 35 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่

อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ความชื้น 25 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณเชื้อ 2.82×10^8 โคโลนีต่อกรัม (ตารางภาคผนวกที่ 8) และเมื่อนำปุ๋ยอินทรีย์ที่มีสูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 เจริญอยู่มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* โดยวิธี dual culture plate พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 85.43 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 23) สอดคล้องกับการรายงานของกรมส่งเสริมการเกษตร (2556) ที่กล่าวว่า หากผสมเชื้อรา *Trichoderma* sp. ชนิดสดกับปุ๋ยอินทรีย์ (เก่าหรือหมักดีแล้ว) โดยไม่ใส่รำข้าว สามารถเก็บปุ๋ยไว้ได้ไม่เกิน 1 เดือน บรรจุกระสอบหรือกองไว้ในที่ร่ม และควรคลุมด้วยพลาสติกหรือกระสอบ เพื่อรักษาความชื้นในเนื้อปุ๋ยเอาไว้ให้อยู่ที่ประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 21 จำนวนประชากรของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในปุ๋ยชนิดต่าง ๆ ที่หนึ่ง

และไม่หนึ่งฆ่าเชื้อ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 5, 10 และ 15 วัน

ก. T1 จำนวนประชากรของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในมูลไก่ (หนึ่งฆ่าเชื้อ)

ข. T2 จำนวนประชากรของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในมูลวัว (หนึ่งฆ่าเชื้อ)

ค. T3 จำนวนประชากรของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในปุ๋ยอินทรีย์ (หนึ่งฆ่าเชื้อ)

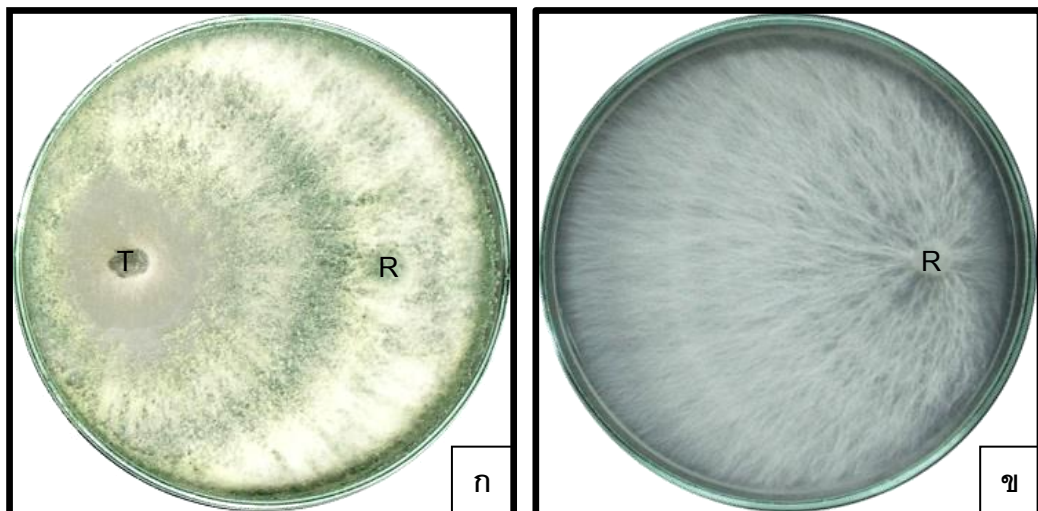
ง. T4 จำนวนประชากรของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในมูลไก่ (ไม่หนึ่งฆ่าเชื้อ)

จ. T5 จำนวนประชากรของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในมูลวัว (ไม่หนึ่งฆ่าเชื้อ)

ฉ. T6 จำนวนประชากรของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในปุ๋ยอินทรีย์ (ไม่หนึ่งฆ่าเชื้อ)



ภาพที่ 22 ลักษณะของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ที่เจริญบนปุ๋ยอินทรีย์หนึ่งฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 23 โคโคโนเนียของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ที่เจริญในปุ๋ยอินทรีย์และเชื้อรา *Rigidoporus microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture plate หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

- ก. ปุ๋ยอินทรีย์สูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 (ซ้าย)+เชื้อรา *R. microporus* (ขวา)
- ข. เชื้อรา *R. microporus* (ชุดควบคุม)

6. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรครากขาวในดินปลูก

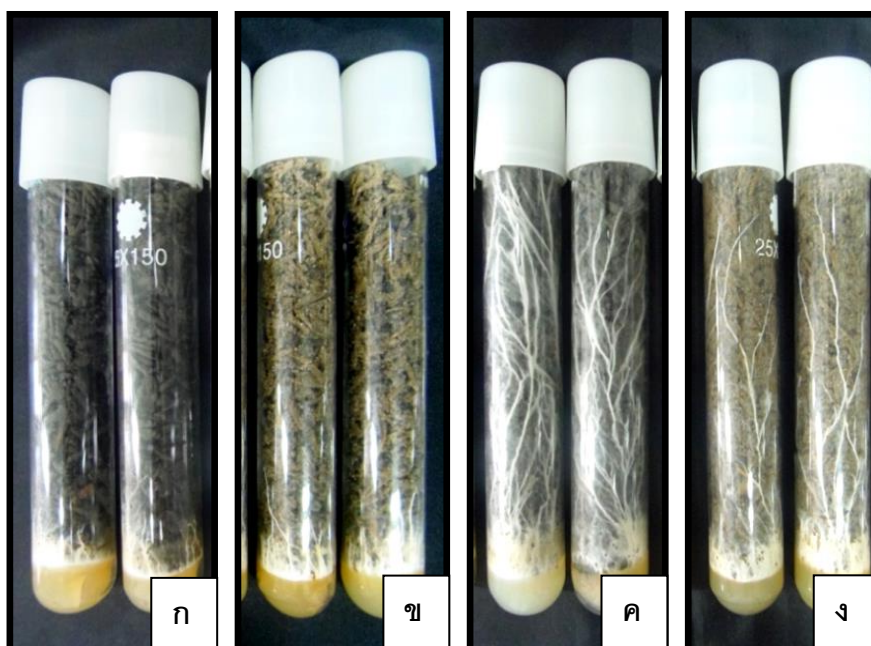
เมื่อนำเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ที่ผ่านการผลิตเป็นสูตรสำเร็จ และศึกษาการเพิ่มปริมาณ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ในดินบรรจุหลอดทดลอง (ซึ่งเป็นการจำลองสภาพแวดล้อมให้มีสภาพใกล้เคียงกับธรรมชาติ) โดยการทดลองแบ่งเป็น 2 ชุดดิน ชุดแรกเป็นชุดดินนิ่งฆ่าเชื้อ และชุดที่สองไม่นิ่งฆ่าเชื้อ พบว่า สูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในปุ๋ยอินทรีย์ ร่วมกับดินนิ่งฆ่าเชื้อ และดินไม่นิ่งฆ่าเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ 90.63 และ 89.38 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 24) ขณะที่ชุดควบคุมซึ่งเป็นชุดดินที่ไม่นิ่งฆ่าเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* เท่ากับ 26.46 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากดินในธรรมชาติมีทั้งจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และเป็นโทษรวมกันในแต่ละแหล่ง เกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกันมากมาย อานัฐ ต้นโช (2549) กล่าวว่า การทำเกษตรธรรมชาติ จะมุ่งเน้นความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยเน้นการควบคุมกันเองของจุลินทรีย์ในห่วงโซ่อาหาร ซึ่งมีผลต่อชนิด และปริมาณของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศ การที่พืช และสัตว์แสดงอาการโรคส่วนหนึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากความไม่สมดุลของความหลากหลายของจุลินทรีย์ในห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศนั้น ๆ ทำให้เกิดการระบาดของจุลินทรีย์ที่เป็นโทษในการผลิตพืช และสัตว์

ตารางที่ 8 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในดินปลูก หลังการบ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

กรรมวิธี	การเจริญของเชื้อรา <i>R. microporus</i> (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับ ยั้งเชื้อรา <i>R. microporus</i>
สูตรสำเร็จเชื้อรา <i>T. harzianum</i> NL2.2+ปุ๋ย อินทรีย์+ดินนิ่งฆ่าเชื้อ	1.13±0.08a ^{1/}	90.63±3.92a
สูตรสำเร็จเชื้อรา <i>T. harzianum</i> NL2.2+ปุ๋ย อินทรีย์+ดินไม่นิ่งฆ่าเชื้อ	1.28±0.16a	89.38±1.04a
ชุดควบคุมดินนิ่งฆ่าเชื้อ	12.00±0.00c	0.00±0.00c
ชุดควบคุมดินไม่นิ่งฆ่าเชื้อ	8.83±0.12b	26.46±0.98b
F-test	**	**
C.V. (%)	1.17	9.77

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 24 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในดินปลูก หลังการป่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

- ก. สูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2+ปุ๋ยอินทรีย์+ดินนิ่งฆ่าเชื้อ
- ข. สูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 +ปุ๋ยอินทรีย์+ดินไม่นิ่งฆ่าเชื้อ
- ค. ชุดควบคุมดินนิ่งฆ่าเชื้อ
- ง. ชุดควบคุมดินไม่นิ่งฆ่าเชื้อ

7. ประเมินศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในปุ๋ยอินทรีย์ต่อการควบคุมโรครากขาวในเรือนกระจก

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในปุ๋ยอินทรีย์ต่อการควบคุมโรครากขาวในเรือนกระจก เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ กรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ แต่ไม่ใส่สูตรสำเร็จ กรรมวิธีที่ใช้สารเคมี กรรมวิธีที่ใส่สูตรสำเร็จ และปุ๋ยอินทรีย์ และกรรมวิธีที่ปลูกต้นยางอย่างเดียว เมื่อประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรค พบว่า ทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรครากขาวได้ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค 77.60, 76.58, 79.05 และ 55.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ดัชนีการเกิดโรคมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อรา *R. microporus* เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 25) และเมื่อนำดินที่ใช้ในการทดลอง (ก่อน และหลังการทดลอง) มาทดสอบคุณสมบัติบางประการ พบว่าดินหลังการทดลองมีธาตุอาหารหลัก (ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K)) เพิ่มมากขึ้น

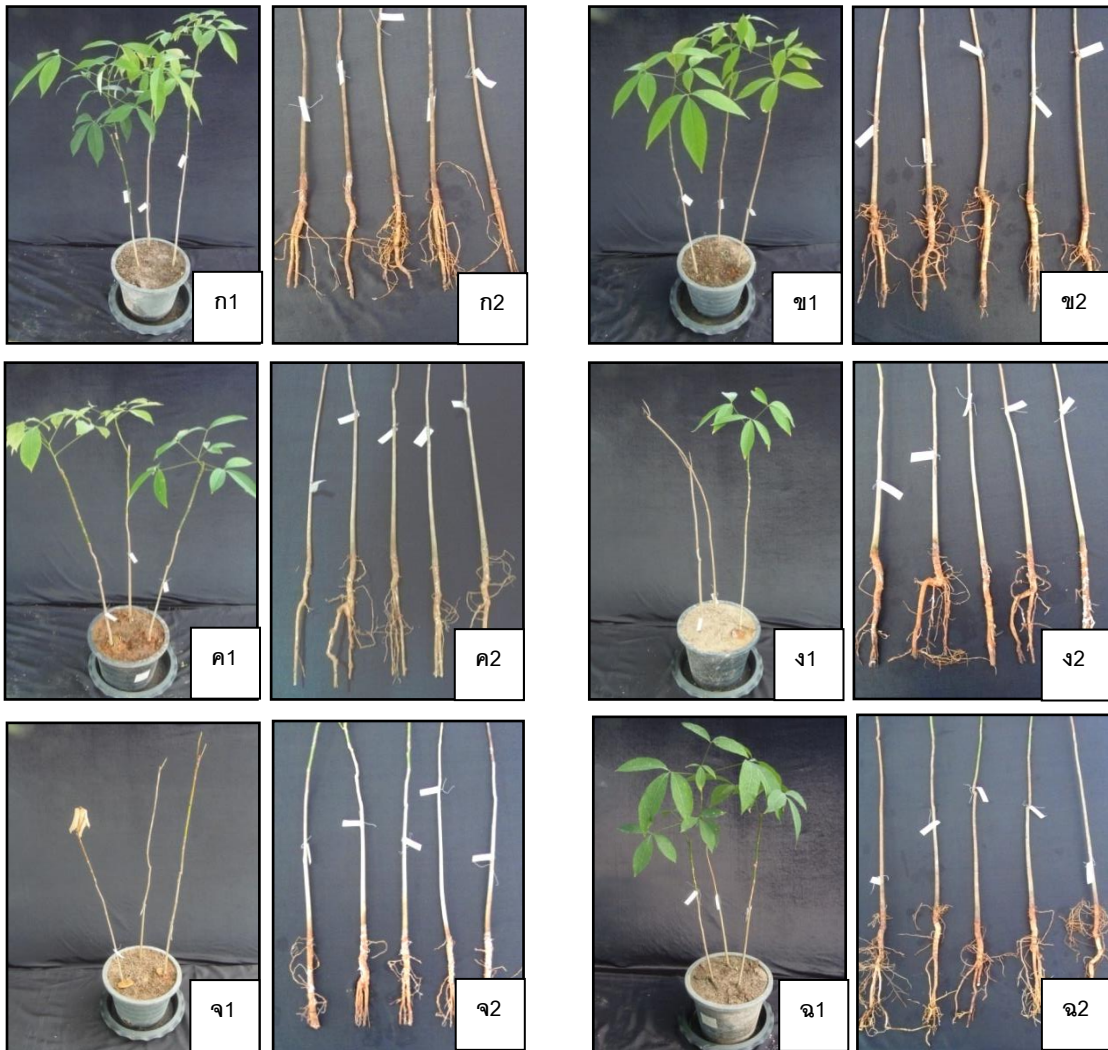
เมื่อเปรียบเทียบกับดินก่อนการทดสอบ (ตารางที่ 9) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแกลบที่ใช้เป็นส่วนผสมในการปลูกเชื้อรา *R. microporus* ถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน และปลดปล่อยธาตุอาหารออกมา (ธงชัย มาลา, 2546) ซึ่งธาตุอาหารภายในแกลบมีปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัส และมีอินทรีย์คาร์บอน ร้อยละ 0.36, 0.09, 1.08 และ 54,00, 72 9 ตามลำดับ (ปรัชญา ัญญาดี และคณะ, 2540) นอกจากนี้ Saravanakumar และคณะ (2013) ศึกษาความสามารถในการละลายฟอสเฟต ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากรากของต้นแสม และโกกวาง บริเวณป่าชายเลน พบว่า สามารถละลาย tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) ซึ่งเป็นฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ ให้อยู่ในรูปที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในการควบคุมโรครากขาวของต้นกล้ายางพาราในเรือนกระจก หลังการทดสอบเป็นเวลา 4 เดือน

กรรมวิธี	ดัชนีการเกิดโรค	เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค	คุณสมบัติของดิน			
			Total N (g/kg)	Avaliable P (mg/kg)	Avaliable K (mg/kg)	pH
ดินก่อนการทดลอง	-	-	0.04	9.51	37.72	6.39
ดิน+สูตรสำเร็จเชื้อรา <i>T. harzianum</i> NL2.2+ปุ๋ยอินทรีย์+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา <i>R. microporus</i>	25.83±12.51bc	77.60±9.51a	0.08	202.45	248.08	5.50
ดิน+สูตรสำเร็จเชื้อรา <i>T. harzianum</i> NL2.2 ต้นกล้ายาง+เชื้อรา <i>R. microporus</i>	25.00±12.23bc	76.58±10.60a	0.06	70.77	166.83	5.50
ดิน+สารกำจัดเชื้อรา carboxin 2 กรัม+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา <i>R. microporus</i>	23.33±12.47b	79.05±10.82a	0.06	63.48	140.09	5.76
ดิน+ปุ๋ยอินทรีย์+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา <i>R. microporus</i>	55.83±14.17bc	55.95±10.36a	0.06	103.28	196.21	5.09
ดิน+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา <i>R. microporus</i>	70.83±6.94a	0.00±0.00	0.05	102.19	161.63	5.61
ดิน+ต้นกล้ายาง	0.00±0.00	0.00±0.00	0.05	52.55	172.29	5.10
F-test	**	**				
C.V. (%)	57.36	44.46				

** แตกต่างทางสถิติที่ P < 0.01

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test



ภาพที่ 25 พุ่มใบและรากของต้นกล้ายางพาราหลังทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในปุ๋ยอินทรีย์ต่อการยับยั้งเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพาราในเรือนกระจก หลังการทดสอบ เป็นเวลา 4 เดือน

ก1 และ ก2 กรรมวิธีที่ 1 ดิน+สูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2+ปุ๋ยอินทรีย์+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา *R. microporus*

ข1 และ ข2 กรรมวิธีที่ 2 ดิน+สูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ต้นกล้ายาง+เชื้อรา *R. microporus*

ค1 และ ค2 กรรมวิธีที่ 3 ดิน+สารกำจัดเชื้อรา carboxin 2 กรัม+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา *R. microporus*

ง1 และ ง2 กรรมวิธีที่ 4 ดิน+ปุ๋ยอินทรีย์+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา *R. microporus*

จ1 และ จ2 กรรมวิธีที่ 5 ดิน+ต้นกล้ายาง+เชื้อรา *R. microporus*

ฉ1 และ ฉ2 กรรมวิธีที่ 6 ดิน+ต้นกล้ายาง

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

แยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากตัวอย่างดินจำนวน 86 ตัวอย่างด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร TSM ได้เชื้อรา จำนวน 356 เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microsporus* ด้วยวิธี dual culture plate พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 356 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* ได้ 48.57-91.43 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลทที่ยับยั้งสูงสุดคือ ChM1.1 และ NL2.2 จึงนำมาใช้ในการศึกษาต่อ

จำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ChM1.1 และ NL2.2 ทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีลักษณะตรงกับเชื้อรา *T. harzianum* และจำแนกทางชีวโมเลกุล พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. ChM1.1 และ NL2.2 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันกับเชื้อรา *T. harzianum* มากถึง 99 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า สามารถเจริญได้ดีใน pH 6-8 และอุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส

ศึกษาลักษณะทางโครงสร้างที่เปลี่ยนแปลงไปของเชื้อรา *R. microsporus* ซึ่งเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า เส้นใยของเชื้อรา *R. microsporus* ผิดปกติไป โดยมีลักษณะ เหี่ยว เกิดเป็นรูพรุน และฉีกขาด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงเชื้อรา *R. microsporus* เพียงอย่างเดียว และเมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ chitinase ของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 พบว่า สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ย่อย chitin ได้

เชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถผลิตสารระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *R. microsporus* เท่ากันคือ 94.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 โดยเครื่อง GC-MS พบว่า องค์ประกอบหลักของสารระเหยจากเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 เป็นสารกลุ่มแอลกอฮอล์ และองค์ประกอบหลักของสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 พบว่า อยู่ในกลุ่มแอลกอฮอล์ และสารปฏิชีวนะ จึงได้คัดเลือกเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 ศึกษาต่อเนื่องจากเมื่อทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

การเจริญของเชื้อรา *R. microporus* จึงสกัดสารปฏิชีวนะจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 โดยทดสอบหาค่า MIC และ MFC พบว่า มีค่า เท่ากับ 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบสารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซินซึ่งมีค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.49 และ 0.98 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อสกัดสารจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 มาทดสอบด้วยวิธี bioautography บนแผ่น TLC พบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราเกิดเป็นบริเวณยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* มีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.22-0.4 และเมื่อนำสารไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเครื่อง GC-MS พบว่า เป็นสารกลุ่มแอลกอฮอล์ และสารปฏิชีวนะ

เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 พบว่า มีการเจริญ ขยายพันธุ์รวดเร็ว และมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* สูงกว่าเชื้อรา *T. harzianum* ChM1.1 จึงได้คัดเลือกเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 เพื่อผลิตสูตรสำเร็จ

จากการผลิตสูตรสำเร็จชนิดแกรนูล และผงจากเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 และประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพ พบว่า สูตรสำเร็จชนิดแกรนูลเหมาะสมต่อการนำไปใช้ทดสอบการเพิ่มปริมาณในปุ๋ยคอก และปุ๋ยอินทรีย์ และการยับยั้งโรครากขาวในเรือนกระจก

ศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในปุ๋ยคอก และปุ๋ยอินทรีย์ พบว่า เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในปุ๋ยอินทรีย์ ที่มีความชื้น 25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำปุ๋ยอินทรีย์ *T. harzianum* NL2.2 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 85.43 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ที่ผ่านการทำสูตรสำเร็จ และศึกษาการเพิ่มปริมาณ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ในดินบรรจุหลอดทดลอง พบว่า ปุ๋ยอินทรีย์เชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ร่วมกับดินนิ่งฆ่าเชื้อ และดินไม่นิ่งฆ่าเชื้อสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ในปุ๋ยอินทรีย์ต่อการควบคุมโรครากขาวในเรือนกระจก เปรียบเทียบกับการใช้สูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 สารกำจัดเชื้อราคาร์บอกซิน และปุ๋ยอินทรีย์เพียงอย่างเดียว เมื่อประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรค พบว่า ทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม

ข้อเสนอแนะ

การควบคุมโรครากขาวของยางพารา ควรใช้กรรมวิธีที่มีสูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ร่วมด้วย เนื่องจากมีดัชนีการเกิดโรคต่ำ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโรคสูง โดยใช้สูตรสำเร็จเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 ก่อนปลูกยางพารา อาจเป็นการรอกันหลุมก่อนปลูกต้นกล้ายางพารา ซึ่งเชื้อรา *T. harzianum* NL2.2 สามารถเจริญตั้งรกรากในดินบริเวณรอบ ๆ รากของต้นยางพาราซึ่งจะช่วยป้องกันการเกิดโรครากขาวของต้นยางพาราได้

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2555. ข้อมูลวิชาการยางพารา. กรุงเทพฯ : กระทรวงเกษตร และสหกรณ์.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2556. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช (ออนไลน์) สืบค้นจาก <http://esc.agritech.doae.go.th/webpage/e-book/trai-cro-der-ma.pdf> [15 ธันวาคม 2556].
- เกศินี แก้วมาลา. 2551. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของถั่วเหลืองในระยะต้นอ่อน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- เกษม สร้อยทอง. 2551. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. กรุงเทพฯ : คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์. 2538. ยาเม็ด : การผลิต วิจัย และพัฒนา. เชียงใหม่ : ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. การควบคุมโรคพืช และแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. โครงการเกษตรก้าวหน้า โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพ และชีวภัณฑ์ในการจัดการศัตรูพืชเพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์. นครปฐม : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2547. การควบคุมโรคผักโดยชีววิธี. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีในการปลูกผักระบบไม่ใช้ดินและภายในโรงเรือน วันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2527 ณ อาคารเจ้าคุณทหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- จิระเดช แจ่มสว่าง วรณวิไล อินทนู และถวัลย์ คุ่มช้าง. 2543. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สูตรสำเร็จต่าง ๆ ในการควบคุมโรคโคนเน่าของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*. รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 ณ สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543 หน้า 236-242.
- ชมพูนุช บุญราชแขวน. 2550. อิทธิพลของสารทุติยภูมิจากเชื้อ *Trichoderma harzianum* ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริก. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทัตทรง ท้วทพิย์. 2535. ยาเม็ด. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พรีนติ้งเฮาส์.

- ธงชัย มาลา. 2546. ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพ : เทคนิคการผลิต และการใช้ประโยชน์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาลัยเกษตรศาสตร์.
- นิรนาม. 2556. กลไกการออกฤทธิ์ของแอลกอฮอล์ (ออนไลน์) สืบค้นจาก <http://www.wisegeeek.org/why-is-alcohol-a-good-antiseptic.htm> [26 ธันวาคม 2556].
- ปราโมทย์ ทิพย์ดวงตา. 2539. ยาเม็ด. เชียงใหม่ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ปรัชญา ัญญาดี เมธี มณีวรรณ และพิรัชมา วาสนุกุล. 2540. กลุ่มอินทรีย์วัตถุ และวัสดุเหลือใช้. กรุงเทพฯ : กองอนุรักษ์ดิน และน้ำ กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตร และสหกรณ์
- ปวีณา สังข์แก้ว. 2556. สูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* สำหรับการยับยั้งโรคราขาวของยางพารา. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พงษ์เทพ ขจรไชยกุล. 2523. โรค และศัตรูยางพาราในประเทศไทยปี 2522. ว. ยางพารา 10 : 12-19.
- มนต์ชูลี นิติน. 2534. ยาเม็ด. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. พรินติ้งเฮาส์.
- มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2551. อนุสิทธิบัตรกรรมวิธีการใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต T9 (ออนไลน์) สืบค้นจาก www.champa.kku.ac.th/sc/sarsc_51/result/..QA/./Index_4.4.2.doc [21 กุมภาพันธ์ 2556].
- สถาบันวิจัยยาง. 2555. ข้อมูลวิชาการยางพารา. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สายทอง แก้วฉาย. 2555. การใช้ไตรโคเดอรมาในการควบคุมโรคพืช. ว. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ 3 : 108-123.
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 2552. สิทธิบัตรกรรมวิธีการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอรมาในรูปผงแห้ง. (ออนไลน์) สืบค้นจาก <http://www.nstda.or.th/home> [21 กุมภาพันธ์ 2556].
- สำนักเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน. ม. ป. ป. การผลิตเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยใช้สารเร่งซูเปอร์พด. 3. กรุงเทพฯ : กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตร และสหกรณ์.
- สุมาลี สันติพลวุฒิ. 2536. การศึกษาความเป็นไปได้ในเชิงเศรษฐศาสตร์ในการใช้ผงเชื้อราไตรโคเดอรมาในการควบคุมโรคราเมล็ดผักกาดของมะเขือเทศ. ว.เกษตรศาสตร์ (สังคมศาสตร์) 14 : 61-70.

เสมอใจ ชื่นจิตต์ วสันต์ เพชรรัตน์ พรศิลป์ จันทวีเมือง และปวีณา สังข์แก้ว. 2553. การประเมินการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบร่วง *Phytophthora* ของกล้ายางพารา. รายงานการประชุมวิชาการศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ (ภาคใต้) ณ โรงแรมเมธาวลัย ชะอำรีสอร์ท เพชรบุรี. 1-3 กันยายน 2553 หน้า 46.

เสมอใจ ชื่นจิตต์. 2555. โรคพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ. สงขลา : คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อานัฐ ต้นไซ. 2549. เกษตรกรรมชาติประยุกต์ : หลักการ แนวคิด เทคนิคปฏิบัติในประเทศไทย. ปทุมธานี : สำนักพิมพ์พิมพ์ลักษณ์.

อารมณ โรจน์สุจิตร. 2541. โรครากขาว (*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki) ของยางพารา และแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อารมณ โรจน์สุจิตร อุไร จันทพรประทีน เพียว รมรินทร์สุขารมณ นริสา จันทรเรือง สโรชา กริธาพล วันเพ็ญ พฤษวิวัฒน์ สุเมธ พฤษวรณ วลัยพร ศศิประภา ปราโมทย์ คาพุท และประภา พงษ์อุธา. 2553. ประเมินความสูญเสียทางเศรษฐกิจของยางพาราสาเหตุจากโรครากขาวในพื้นที่ปลูกยางของประเทศไทย. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อัฉรา อุทิศวรรณกุล. 2536. รูปแบบเกสรตัวผู้. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Agrawal, T. and Kotasthane, A. S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in central India. Springerplus. 10 : 1-10.

Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C. and Steinberg, C. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. Fungal Biol. 114 : 691-701.

Bae, Y. S. and Knudsen, G. R. 2005. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. Biol. Control 32 : 236-242.

Balasubramanian, N. 2003. Strain Improvement of *Trichoderma* spp. by Protoplast Fusion for Enhanced Lytic Enzymes and Biocontrol Potential. Ph. D. Dissertation. University of Madras Chennai, India.

- Batta, Y. A. 2007. Control of postharvest diseases of fruit with an invert emulsion formulation of *Trichoderma harzianum* Rifai. Postharvest Biol. Technol. 43 : 143-150.
- Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*: II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69: 2357-2372.
- Bruce, A. and Highley, L. T. 1991. Control of growth of wood decay Basidiomycetes by *Trichoderma* spp. and other potentially antagonistic fungi. Forest Prod. J. 41 : 63-76.
- Carsolio, C., Benhamou, N. Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I. and Herrere, E. A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 929-935.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungal pathogens. Appl. Biochem. Biotechnol. 48 : 37-43.
- Claydon, N., Allan, M., Hanson, J. R. and Avent, A. G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 88 : 503-513.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. 2nd CLSI Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Collmer, A. and Keen, N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol. 24 : 383-409.
- Danielson, R. M. and Davey, C. B. 1973. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma* Soil Biol. Biochem. 5 : 505-515.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc. 57 : 41-48.

- Dubey, S. C., Bhavani, R. and Sigh, S. 2009. Development of Pusa 5 SD for seed dressing and Pusa biopellet 10G for soil application formulations of *Trichoderma harzianum* and their evaluation for integrated management of dry root rot of mungbean (*Vigna radiata*). Biol. Control 50 : 231-242.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaqs, Y., Zuriel, S. and Chet, I. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. Plant Pathol. 42: 324-332.
- Fox, R. A. 1977. The impact of ecological, cultural and biological factors on the strategy and costs of controlling root diseases in tropical plantation crops as exemplified by *Hevea brasiliensis*. JI. Rubb. Res. Inst. Sri Lanka. 54 : 329-362.
- Fuzellier, M. C., Mortier, F. and Lectard, P. 1982. Antifungal activity of *Cassia alata* L. Ann. Pharm. Fr. 40 : 357-363.
- Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M. and Golakiya, B. 2013. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system-a review. Cur. Res. Microbiol. Biotech.1 : 133-142.
- Gams, W. and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In : *Trichoderma and Gliocladium* Vol. I. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. (ed. Kubicek, C. P. and Harman, G.E.) Ontario : Taylor & Francis Inc.
- Geiger, J. P., Rio, B., Nicole, M. and Nandris, D. 1986. Biodegradation of *Hevea brasiliensis* wood by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. Eur. J. For. Pathol. 16 : 147-155.
- Ghisalberti, E. L. and Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil Biol. Biochem. 23 : 1011-1020.
- Godtfredsen, W. O. and Vangedal, S. 1965. Trichodermin, a new sequiterpene antibiotic. Acta. Chem. Scand. 19 : 1088-1120
- Gupta, A. K., Harish, Rai, M. K., Phulwaria, M. and Shckhawat, N. S. 2011. Isolation of genomic DNA suitable for community analysis from mature trees adapted to arid environment. Gene 487 : 156-159.

- Haran, S., Schickler, H. and Chet, I. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiol. 142 : 2321-2331.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84 : 377-393.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathol. 96 : 190-194.
- Harman, G. E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microb. 2 : 43-56.
- Intana, W. 2003. Selection and Development of *Trichoderma* spp. for High Glucanase, Antifungal Metabolite Producing and Plant Growth Promoting Isolates for Biological Control of Cucumber Damping-off Caused by *Pythium* spp. Ph. D. Dissertation. Kasetsart University Bangkok, Thailand.
- Jayasuriya, K. E. and Thennakoon, B. I. 2007. Biological control of *Rigidoporus microporus*, the cause of white root disease in rubber. Cey. J. Sci. (Bio. Sci.) 36 : 9-16.
- Jang, S. G., Jeon, K. S., Lee, E. H., Kong, W. S. and Cho, J. Y. 2009. Isolation of 1', 3'-dilinolenoyl'-2'-linoleoylglycerol with tyrosinase inhibitory activity from *Flammulina velutipes*. J. Microb. Biotech. 19 : 681-684.
- Kaewchai, S. and Soyong, K. 2010. Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. J. Agric. Technol. 6 : 349-363.
- Kaewchai, S., Soyong, K. and Hyde, K. D. 2009. Mycofungicides and fungal biofertilizers. Fungal Divers. 38 : 25-50.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. and Stalpers, J. A. 2008. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi. 10th ed. Wallingford, UK: CAB International Press.
- Kolli, S. C., Nagamani, A. and Ratnakumari, Y. R. 2012. Growth response of *Trichoderma* isolates against varying pH levels. Int. J. Environ. Biol. 4 : 180-182.

- Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K. and Lorito, M. 2001. *Trichoderma* : from genes to biocontrol. J. Plant Pathol. 83 : 11-23.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E. Borner, T. and Gueho, E. 1999. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. Med. Mycol. 37 : 25-33.
- Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G. and Hsiang, T. 2012. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. Biol. Control 61 : 113-120.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Pietro, A. D., Woo, S. L. and Harman, G. E. 1994. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathol. 84 : 398-405.
- Morton, D. J. and Stroube, W. H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon *Sclerotium rolfsii*. Phytopathol. 45 : 417-420.
- Nandris, D., Nicole, M. R. and Geiger, J. P. 1987. Root rot diseases of rubber trees. Plant Dis. 71 : 298-306.
- Neuvéglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B. and Riba, R. 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strain of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. Mycol. Res. 98 : 322-328.
- Nicole, M. R. and Benhamou, N. 1991. Cytochemical aspect of cellulose breakdown during the infection process of rubber tree roots by *Rigidoporus lignosus*. Cytol. Histol. 81 : 1412-1420.
- Pal, K. K. and Gardener, B. M. 2006. Biological control of plant pathogens. Plant Health Instruc. 10 : 1094-1117
- Parizi, T. E., Ansari, M. and Elaminejad, T. 2012. Evaluation of the potential of *Trichoderma viride* in the control of fungal pathogens of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in vitro*. Microb. Pathog. 52 : 201-205.
- Pathan, A. K., Bond, J. and Gaskin, R. E. 2010. Sample preparation for SEM of plant surfaces. Mat. Today 12 : 32-43.

- Pezet, R., Pont, V. and Tabacchi, R. 1999. Simple analysis of 6-pentyl- α -pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochem. Anal.* 10 : 285-288.
- Ramanujam, B., Prasad, R. D., Sriram, S. and Rangeswaran, R. 2010. Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management. *J. Plant Protect. Sci.* 2 : 1-8.
- Rifai, A. M. 1969. A revision of the Genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116 : 1-56.
- Roberts, A. and Selitrenkoff, N. 1985. Colloidal chitin preparations. *J. Gen. Microb.* 134 : 169-176.
- Saravanakumar, K., Arasu, V. S. and Kathiresan, K. 2013. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aqua. Bot.* 104 : 101-105.
- Sivan, A. and Chet, I. 1986. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol.* 116 : 38-47.
- Skidmore, A. M. and Dickinson, C. H. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66 : 57-64.
- Tokimoto, K. 1982. Lysis of the mycelium of *Lentinus edodes* caused by mycolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* when the two fungi were in an antagonistic state. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 23 : 13-20.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E. L., Lorito, M. and Sivasithamparam, K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters App. Microb.* 43 : 143-148.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L. and Marra, R. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72 : 80-86.

- Wattanasilakorn, S., Sdoodee, S., Nualsri, C. and Chuenchit, S. 2012. Screening of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) rootstocks for the white root disease resistance. J. Agric. Technol. 8 : 2385-2395.
- Weindling, R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathol. 24 : 1153-1179.
- Wijesinghe, C. J., Wijeratnam, R. S. W., Samarasekara, J. K. R. R. and Wijesundera, R. L. C. 2010. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an isolate of *Trichoderma asperellum*. Biol. Control 53 : 285-290.
- Wijesundera, R. L. C., Jeganathan, S. and Liyanage, N. S. 1991. Some effects of isolates of *Trichoderma* on *Rigidoporus lignosus*. Rubb. Res. Inst. Sri Lanka 2 : 42-47.
- Yates, I. E., Bush, C. L. S., Samuels, G. J. and Sparks, D. 2008. Growth rate and temperature tolerance of diverse *Trichoderma koningiopsis* isolates. American Phytopathol. 6 : 26-30.
- Zhao, J., Xu, L., Huang, Y. and Zhou, L. 2008. Detection of antimicrobial components from extracts of the endophytic fungi associated with *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* using TLC-bioautography-MTT assay. Nat. Prod. Res. Dev. 20 : 28-32.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วล้างน้ำให้สะอาด ตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ สี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก ต้มต่อไปอีก สักครู่จึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบางเอาเนื้อมันฝรั่งออกเติมน้ำตาล dextrose 20.0 กรัม ต้ม และ คนจนน้ำตาล dextrose ละลายจึงนำส่วนผสมน้ำกับมันฝรั่งละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร ผสมเข้ากัน เติมน้ำกลั่นแทนน้ำที่ขาดหายไป ใส่ขวดหรือหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

2. Potato dextrose broth (PDB)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วล้างน้ำให้สะอาด ตัดออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ สี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก ต้มต่อไปอีก สักครู่จึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบางเอาเนื้อมันฝรั่งออกเติมน้ำตาล dextrose 20.0 กรัม ต้ม และ คนจนน้ำตาล dextrose ละลาย ผสมเข้ากันในฟาสต์นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

3. *Trichoderma* Selective Medium (TSM)

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.90	กรัม
KCl	0.15	กรัม
NH ₄ NO ₃	1.00	กรัม
glucose	3.00	กรัม
chloramphenical	0.25	กรัม
tetrachlor 75 %WP	0.20	กรัม
rose bengal	0.15	กรัม
agar	20.00	กรัม
distilled water	1,000	มิลลิลิตร

*captan 20.00 ไมโครกรัม ใส่หลังนี้ฆ่าเชื้อแล้ว

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที

4. Carboxyl methyl cellulose (CMC) agar

C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	5	กรัม
KH ₂ PO ₄	1	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.001	กรัม
Carboxyl methyl cellulose	20	กรัม
Agar	16	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายวุ้นในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้ละลายละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ต้มให้ละลายผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล

1. CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PVP-4	1.0	กรัม
NaCl	8.12	กรัม
0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)	62.5	กรัม
1.0 M Tris-HCl (pH 8.0)	10.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม CTAB ปริมาตร 2 กรัม และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าสารละลายจะเจือจางจนหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเติมสาร β -mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปใช้

2. CIA (chloroform-isoamyl alcohol)

Chloroform	24	มิลลิลิตร
isoamyl alcohol	1.0	มิลลิลิตร

3. TE buffer ปริมาตร 500 ml

1.0 M Tris-HCL (pH 7.5)	500	ไมโครลิตร
0.25 M Na ₂ EDTA (pH 7.0)	200	ไมโครลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. TAE buffer เข้มข้น 50 เท่า

Tris-Base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)	50.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. TBE buffer เข้มข้น 5 เท่า

Tris-Base	216.0	กรัม
Boric Acid	110.0	กรัม
0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)	80.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง agarose 2 กรัม ใส่ใน TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยไมโครเวฟ แล้วจึงเท agarose ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ ทิ้งให้ agarose แข็งประมาณ 45 นาที

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 รหัสของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกจากตัวอย่างดินจำนวน 86 ตัวอย่าง ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร TSM

ตัวอย่างดิน	รหัสไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท	แหล่งเก็บตัวอย่าง
1	ChL1.1- ChL1.4	4	อ.หลังสวน จ.ชุมพร
2	ChL2.1- ChL2.3	3	อ.หลังสวน จ.ชุมพร
3	ChLa1.1- ChLa1.5	5	อ.ละแม จ.ชุมพร
4	ChLa2.1- ChLa2.6	6	อ.ละแม จ.ชุมพร
5	ChLa3.1- ChLa3.5	5	อ.ละแม จ.ชุมพร
6	ChM1.1- ChM1.5	5	อ.เมือง จ.ชุมพร
7	ChM2.1- ChM2.3	3	อ.เมือง จ.ชุมพร
8	ChP1.1- ChP1	4	อ.พะโต๊ะ จ.ชุมพร
9	ChP2.1- ChP2.2	2	อ.พะโต๊ะ จ.ชุมพร
10	ChP3.1- ChP3.5	5	อ.พะโต๊ะ จ.ชุมพร
11	KA1.1- KA1.7	7	อ.อำเภอลี้ จ.กระบี่
12	KA2.1- KA2.6	6	อ.อำเภอลี้ จ.กระบี่
13	KA3.1- KA3.4	4	อ.อำเภอลี้ จ.กระบี่
14	KA4.1- KA4.5	5	อ.อำเภอลี้ จ.กระบี่
15	KA5.1- KA5.4	4	อ.อำเภอลี้ จ.กระบี่
16	KK1.1- KK1.5	5	อ.คลองท่อม จ.กระบี่
17	KM1.1- KM1.3	3	อ.เมือง จ.กระบี่
18	KM2.1- KM2.3	3	อ.เมือง จ.กระบี่
19	NCh1.1- NCh1.2	2	อ.ชะอวด จ.นครศรีธรรมราช
20	NCh2.1- NCh2.2	2	อ.ชะอวด จ.นครศรีธรรมราช
21	NJ1.1- NJ1.4	4	อ.จุฬาภรณ์ จ.นครศรีธรรมราช
22	NJ2.1- NJ2.6	6	อ.จุฬาภรณ์ จ.นครศรีธรรมราช
23	NL1.1- NL1.4	4	อ.ลานสกา จ.นครศรีธรรมราช
24	NL2.1- NL2.4	4	อ.ลานสกา จ.นครศรีธรรมราช

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	รหัสไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท	แหล่งเก็บตัวอย่าง
25	NN1.1- NN1.5	5	อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช
26	NN2.1- NN2.3	3	อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช
27	NN3.1- NN3.5	5	อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช
28	NN4.1- NN4.5	5	อ.นาบอน จ.นครศรีธรรมราช
29	NP5.1- NP5.5	5	อ.พรหมคีรี จ.นครศรีธรรมราช
30	NP6.1- NP6.5	5	อ.พรหมคีรี จ.นครศรีธรรมราช
31	NT1.1- NT1.3	3	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช
32	NT2.1- NT2.5	5	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช
33	NT3.1- NT3.4	4	อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช
34	NTs1.1- NTs1.2	2	อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช
35	NTs2.1- NTs2.4	4	อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช
36	NTs3.1- NTs3.4	4	อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช
37	NTs4.1.1	1	อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช
38	PhaB1.1- PhaB1.6	6	อ.บางแก้ว จ.พังงา
39	PhaT1.1- PhaT1.6	6	อ.ทับปุด จ.พังงา
40	PhaTa1.1- PhaTa1.5	5	อ.ตะกั่วทุ่ง จ.พังงา
41	PhaTa2.1- PhaTa2.7	7	อ.ตะกั่วทุ่ง จ.พังงา
42	PhaTa3.1- PhaTa3.4	4	อ.ตะกั่วทุ่ง จ.พังงา
43	PhatB1.1	1	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
44	PhatB2.1- PhatB2.4	4	อ.บางแก้ว จ.พัทลุง
45	PhatM1.1- PhatM1.5	5	อ.เมือง จ.พัทลุง
46	PhatM2.1- PhatM2.4	4	อ.เมือง จ.พัทลุง
47	PhatM3.1- PhatM3.4	4	อ.เมือง จ.พัทลุง
48	PhatM4.1- PhatM4.4	4	อ.เมือง จ.พัทลุง
49	PhatP1.1- PhatP1.3	3	อ.ป่าบอน จ.พัทลุง
50	PhatP2.1- PhatP2.3	3	อ.ป่าบอน จ.พัทลุง
51	PhatP3.1- PhatP3.4	4	อ.ป่าบอน จ.พัทลุง

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	รหัสไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท	แหล่งเก็บตัวอย่าง
52	PhuK1.1- PhuK1.7	7	อ.กระทุ่ม จ. ภูเก็ต
53	PhuK2.1- PhuK2.5	5	อ.กระทุ่ม จ.ภูเก็ต
54	PhuM1.1- PhuM1.3	3	อ.เมือง จ.ภูเก็ต
55	PhuT1.1- PhuT1.4	4	อ.ถลาง จ.ภูเก็ต
56	PhuT2.1- PhuT2.3	3	อ.ถลาง จ.ภูเก็ต
57	RK1.1- RK1.5	5	อ.กระบุรี จ.ระนอง
58	RK2.1- RK2.3	3	อ.กระบุรี จ.ระนอง
59	RK3.1- RK3.3	3	อ.กระบุรี จ.ระนอง
60	RK4.1- RK4.5	5	อ.กระบุรี จ.ระนอง
61	RL1.1- RL1.4	4	อ.ละอุ่น จ.ระนอง
62	RL2.1- RL2.3	3	อ.ละอุ่น จ.ระนอง
63	RM1.1	1	อ.เมือง จ.ระนอง
64	RM2.1- RM2.4	4	อ.เมือง จ.ระนอง
65	RM3.1- RM3.3	3	อ.เมือง จ.ระนอง
66	SKlo.1- SKlo.15	5	อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา
67	SNa.1- SNa.7	7	อ.นาหม่อม จ. สงขลา
68	SuK1.1- SuK1.7	7	อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี
69	SuK2.1- SuK2.6	6	อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี
70	SuK3.1- SuK3.5	5	อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี
71	SuK4.1- SuK4.4	4	อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี
72	SuM1.1- SuM1.5	5	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
73	SuM2.1- SuM2.2	2	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
74	SuM3.1- SuM3.2	2	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
75	SuN1.1- SuN1.3	3	อ.นาเดิม จ.สุราษฎร์ธานี
76	SuN2.1- SuN2.5	5	อ.นาเดิม จ.สุราษฎร์ธานี
77	SuP1.1- SuP1.4	4	อ.พระแสง จ.สุราษฎร์ธานี
78	SuP2.1- SuP2.3	3	อ.พระแสง จ.สุราษฎร์ธานี

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างดิน	รหัสไอโซเลท	จำนวนไอโซเลท	แหล่งเก็บตัวอย่าง
79	SuT1.1- SuT1.4	4	อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
80	SuT2.1- SuT2.3	3	อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
81	SuT3.1- SuT3.4	4	อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
82	SuW1.1- SuW1.2	2	อ.เวียงสระ จ.สุราษฎร์ธานี
83	SuW2.1- SuW2.4	4	อ.เวียงสระ จ.สุราษฎร์ธานี
84	TM1.1- TM1.6	6	อ.เมือง จ.ตรัง
85	TN1.1- TN1.5	5	อ.นาโยง จ.ตรัง
86	TS1.1- TS1.5	5	อ.สิเกา จ.ตรัง

ตารางภาคผนวกที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	จำนวนไอโซเลท
90.00-100	NL2.2 (91.43%) รวม 1 ไอโซเลท
80.00-89.99	ChM1.1(88.57%),NL2.1(87.14%),NN4.3(87.14%),NN4.4(87.14%),NP5.2(87.14%),PhaT1.1(87.14%),PhaT1.5(87.14%),PhaTa1.1,(87.14%),PhaTa2.7(87.14%),ChL1.2(85.71%),ChM2.2(85.71%),NCh2.1(85.71%),NN4.1(85.71%),NP6.4(85.71%),NTs3.3(85.71%),PhaB1.5(85.71%),PhaTa1.4(85.71%),PhuK1.4(85.71%),PhuK1.7(85.71%),PhuK2.5(85.71%),RK3.1(85.71%),RK3.2(85.71%),RK4.4(85.71%),RM3.1(85.71%),SuN1.2(85.71%),SuN1.3(85.71%),SuT1.3(85.71%),SuT1.4(85.71%),TN1.2(85.71%),TS1.2(85.71%),KA2.3(84.29%),NL1.3(84.29%),NL1.6(84.29%),NL2.4(84.29%),NN1.1(84.29%),NT2.1(84.29%),NT3.3(84.29%),NTs1.1(84.29%),PhaTa2.4(84.29%),PhaTa3.2(84.29%),PhatB2.4(84.29%),PhatP3.3(84.29%),PhuK2.2(84.29%),PhuT2.3(84.29%),RK1.3(84.29%),RK4.5(84.29%),RM2.3(84.29%),SuK1.1(84.29%),SuK3.1(84.29%),SuM1.2(84.29%),SuP2.1(84.29%),TS1.3(84.29%),ChLa3.4(82.86%),KA2.5(82.86%),NL1.1(82.86%),NL1.4(82.86%),NT1.2(82.86%),NT1.3(82.86%),NT2.3(82.86%),NT3.2(82.86%),NT3.4(82.86%),NTs2.1(82.86%),NTs3.4(82.86%),PhaB1.1,(82.86%),PhaB1.4(82.86%),PhaTa2.3(82.86%),PhaTa3.1(82.86%),PhatM1.2(82.86%),PhuK2.1(82.86%),PhuK2.3(82.86%),PhuT1.1(82.86%),PhuT1.2(82.86%),PhuT1.3(82.86%),PhuT1.4(82.86%),PhuT2.1(82.86%),RK2.1(82.86%),RK2.2(82.86%),RK3.3(82.86%),RK4.3(82.86%),RL1.1(82.86%),RL1.4(82.86%),RM3.3(82.86%),SKlo1.1(82.86%),SKlo1.3(82.86%),SNa1.6(82.86%),SuK1.3(82.86%),SuK1.6(82.86%),SuK2.1(82.86%),SuK3.4(82.86%),SuK4.2(82.86%),SuM1.4(82.86%)

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	จำนวนไอโซเลท
80.00-89.99	SuM3.1(82.86%),SuM3.2(82.86%),SuN2.3(82.86%),SuP2.3(82.86%),SuT1.1(82.86%),SuW2.1(82.86%),SuW2.4(82.86%),TN1.3(82.86%),TS1.1(82.86%),TS1.4(82.86%),KA5.5(81.43%),KM1.3(81.43%),KM2.3(81.43%),NCh2.2(81.43%),NL1.2(81.43%),NL1.5(81.43%),NN4.2(81.43%),NN4.5(81.43%),NT1.1(81.43%),PhaTa2.2(81.43%),PhatM2.3(81.43%),PhatP2.1(81.43%),PhatP2.2(81.43%),PhuK1.5(81.43%),RK1.2(81.43%),RK1.4(81.43%),RK1.5(81.43%),RL1.2(81.43%),RL2.1(81.43%),SNa1.1(81.43%),SNa1.2(81.43%),SuK1.5(81.43%),SuK3.3(81.43%),SuK4.1(81.43%),SuK4.4(81.43%),SuP1.2(81.43%),SuW2.2(81.43%),TM1.2(81.43%),TS1.5(81.43%),ChL2.2(80.57%),KK1.4(80.57%),KA1.4(80.00%),KA2.6(80.00%),NN1.2(80.00%),NN1.3(80.00%),NN2.1(80.00%),NN2.3(80.00%),NN2.5(80.00%),NP5.1(80.00%),NP5.3(80.00%),NTs1.2(80.00%),NTs3.2(80.00%),PhaB1.6(80.00%),PhaTa1.2(80.00%),PhatM1.3(80.00%),PhatM3.2(80.00%),PhatM4.3(80.00%),PhatP1.2(80.00%),PhatP3.2(80.00%),RK2.3(80.00%),RL1.3(80.00%),RM3.2(80.00%),SNa1.7(80.00%),SuN2.4(80.00%),SuP2.2(80.00%),SuT3.2(80.00%),TM1.3(80.00%) 159 ไอโซเลท
70.00-79.99	ChLa2.2(78.57%),KK1.2(78.57%),KK1.3(78.57%),NN2.4(78.57%),PhatP3.1(78.57%),PhatP3.4(78.57%),PhuK1.1(78.57%),PhuK1.6(78.57%),PhuK2.4(78.57%),PhuM1.1(78.57%),PhuM1.3(78.57%),PhuT2.2(78.57%),RK1.1(78.57%),RK4.1(78.57%),SKlo1.5(78.57%),SuK2.3(78.57%),SuK2.4(78.57%),SuT3.3(78.57%),SuT3.4(78.57%),SuW2.3(78.57%),TM1.4(78.57%),TM1.5(78.57%),TN1.4(78.57%)

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	จำนวนไอโซเลท
70.00-79.99	,ChL1.3(77.14%),PhatM4.4(77.14%),SKlo1.4(77.14%)SNa1.3(77.14%),SuK2.2(77.14%),SuK2.6(77.14%),SuN2.5(77.14%),SuP1.4(77.14%),SuT3.1(77.14%),SuW1.1(77.14%),TM1.6(77.14%),ChLa1.4(75.71%),ChLa2.5(75.71%),KA4.3(75.71%),KA5.1(75.71%),NN1.4(75.71%),NT2.4(75.71%),PhaB1.2(75.71%),PhatP1.1(75.71%),PhuK1.2(75.71%),PhuK1.3(75.71%),SKlo1.2(75.71%),SNa1.5(75.71%),SuK1.4(75.71%),SuK1.7(75.71%),SuK3.5(75.71%),SuK4.3(75.71%),SuM1.5(75.71%),SuP1.3(75.71%),SuW1.2(75.71%),TM1.1(75.71%),TN1.1(75.71%),NT2.5(75.00%),SuM2.1(75.00%),KA2.2(74.29%),KA2.4(74.29%),KA3.2(74.29%),KK1.1(74.29%),NT3.1(74.29%),NTs2.4(74.29%),NTs3.1(74.29%),PhatB2.3(74.29%),PhatP2.3(74.29%),RM2.1(74.29%),SuM2.2(74.29%),SuN2.1(74.29%),SuT2.1(74.29%),NL2.3(72.86%),RL2.2(72.86%),RL2.3(72.86%),RM1.2(72.86%),RM2.2(72.86%),SuK2.5(72.86%),KA3.4(71.43%),KA3.6(71.43%),KA4.4(71.43%),KM2.2(71.43%),PhatM2.4(71.43%),RK4.2(71.43%),TN1.5(71.43%),ChLa2.3(70.00%),ChM1.5(70.00%),KM1.2(70.00%),PhaTa2.5(70.00%) รวม 87 ไอโซเลท
60.00-69.99	ChLa1.5(68.57%),ChLa2.1(68.57%),NJ1.1(68.57%),NJ1.2(68.57%),NJ2.3(68.57%),PhaTa1.5(68.57%),PhaTa2.1(68.57%),PhatM2.1(68.57%),ChLa2.4(67.14%),KA4.2(67.14%),NJ2.2(67.14%),NP6.5(67.14%),PhatM3.1(67.14%),PhatP1.3(67.14%),ChLa1.3(65.71%),KM1.5(65.71%),ChL1.1(64.29%),ChM2.3(64.29%),ChP1.1(64.29%),KA2.1(64.29%),KA2.7(64.29%),KA3.3(64.29%),NCh1.1(64.29%),NCh1.2(64.29%),NCh1.3(64.29%),NJ2.1(64.29%),NP6.1(64.2

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	จำนวนไอโซเลท
60.00-69.99	9%),NT2.2(64.29%),NTs2.3(64.29%),PhatM2.2(64.29%),SuK1.2(64.29%),SuK3.2(64.29%),SuM1.3(64.29%),KA1.3(62.86%)PhaT1.6(61.43%),PhaTa1.3(61.43%),PhatM4.1(61.43%),ChL2.1(61.43%),ChP2.1(61.43%),KA1.5(61.43%),ChL2.3(60.00%),ChLa3.2(60.00%),ChP1.2(60.00%),KA4.1(60.00%),NN2.2(60.00%),PhatB2.1(60.00%),PhatB2.2(60.00%),PhatM1.5(60.00%),PhatM3.3(60.00%) รวม 49 ไอโซเลท
50.99-50.99	PhaB1.3(57.14%),ChLa2.6(57.14%),ChLa3.3(57.14%),ChLa3.5(57.14%),ChP1.3(57.14%),ChP3.3(57.14%),KA3.1(57.14%),KA5.3(57.14%),PhaTa2.6(57.14%),PhaTa3.4(57.14%),PhatB1(57.14%),PhatM1.1(57.14%),PhatM3.4(57.14%),PhatM4.2(57.14%),PhuM1.2(57.14%),NJ2.4(55.17%),SuN1.1(55.17%),SuP1.1(55.17%),SuT1.2(55.17%),ChLa1.1(54.29%),ChLa1.2(54.29%),ChM1.3(54.29%),ChP3.1(54.29%),ChP1.4(52.86%),ChP3.2(52.86%),NN3.2(52.86%),NN3.3(52.86%),PhatM1.4(52.86%),NTs2.2(52.57%),NP5.4(52.57%),ChM1.2(51.43%),KA5.4(51.43%),KM1.1(51.43%),KM1.4(51.43%),PhaT1.3(50.00%),PhaT1.4(50.00%),ChL1.4(50.00%),ChP3.4(50.00%),ChP3.5(50.00%),KA1.1(50.00%),NP5.5(50.00%),NP6.3(50.00%),SNa1.4(50.00%) รวม 44 ไอโซเลท
40.00-49.99	ChLa3.1(48.57%),ChM2.1(48.57%),ChP2.2(48.57%),KA1.2(48.57%),KA3.5(48.57%),KA5.2(48.57%),KM2.1(48.57%),NN3.1(48.57%),NP6.2(48.57%),NTs3.5(48.57%),PhaT1.2(48.57%),PhaTa3.3(48.57%),RM2.4(48.57%),SuM1.1(48.57%),SuT2.3(48.57%),ChM1.4(48.57%) รวม 16 ไอโซเลท

ตารางภาคผนวกที่ 3 ประสิทธิภาพของสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 และ NL2.2 ต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* หลังบ่มการที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

กรรมวิธี	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เชื้อรา <i>R. microporus</i>
<i>T. harzianum</i> ChM1.1	0.50±00a	94.4±00a ^{1/}
<i>T. harzianum</i> NL2.2	0.50±00a	94.4±00a
ชุดควบคุม	9.00±00b	0±00b
F-test	**	**
C.V.(%)	00	00

**แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{1/} ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ตารางภาคผนวกที่ 4 องค์ประกอบสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1

Retention time (min)	% Relative peak area	Possible compounds	Formula	Molecular mass
11.40	0.48	2-Heptenal, (E)-	C ₇ H ₁₂ O	112
15.57	29.82	3-Octanone	C ₈ H ₁₆ O	128
16.28	2.08	3-Octanol	C ₈ H ₁₈ O	130
19.68	4.51	Benzeneacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	120
24.45	5.11	3-Octanyl acetate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	170
29.56	0.65	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198
30.51	0.67	Undecane, 4,6-dimethyl-	C ₁₃ H ₂₈	184
31.10	0.46	Dodecane, 4-methyl	C ₁₃ H ₂₈	184
32.28	0.82	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198
33.13	0.82	Dodecane, 4-methyl	C ₁₄ H ₃₀	198
33.76	1.62	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198
34.52	6.04	Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	212
35.07	0.75	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	C ₂₀ H ₄₂	282
35.50	2.18	4-Heptanol, 4-ethyl-2,6-dimethyl-	C ₁₁ H ₂₄ O	172
37.62	1.40	Pentadecane	C ₁₅ H ₃₂	212
43.56	1.38	Heptadecane	C ₁₇ H ₃₆	240
44.01	2.46	à-Guaiene	C ₁₅ H ₂₄	204
44.28	0.95	á-Cedrene	C ₁₅ H ₂₄	204
44.48	1.09	à-Copaene	C ₁₅ H ₂₄	204
47.50	2.20	Acoradiene	C ₁₅ H ₂₄	204
47.97	5.24	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	C ₂₀ H ₄₂	282

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

Retention time (min)	%Relative peak area	Possible compounds	Formular	Molecular mass
49.69	2.07	Spiro[5.5]undeca-1,8-diene, 1,5,5,9-tetramethyl-, (R)-	C ₁₅ H ₂₄	204
50.71	0.97	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl	C ₂₀ H ₄₂	282
55.93	0.42	Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	282
58.81	1.81	5-Isocedranol	C ₁₅ H ₂₆ O	222
59.27	3.13	Hydroxymethylcyclododecane	C ₁₃ H ₂₆ O	198
59.60	0.91	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-	C ₂₀ H ₄₂	282
59.69	0.79	1,4-Cis-1,7-Cis-acorenone	C ₁₅ H ₂₄ O	220
62.49	0.70	Cembrene	C ₂₀ H ₃₂	272

ตารางภาคผนวกที่ 5 องค์ประกอบสารระเหยที่สกัดได้จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

NL2.2

Retention time (min)	%Relative peak area	Possible compounds	Formular	Molecular mass
3.26	0.54	Acetic acid	$C_2H_4O_2$	60
4.27	4.84	1-Butanol, 3-methyl- (impure)	$C_5H_{12}O$	88
14.08	0.29	Cyclohexanone, 4-methyl-	$C_7H_{12}O$	112
15.80	0.65	3-Heptanone, 6-methyl-	$C_8H_{16}O$	128
17.85	0.20	Benzene, 1-methoxy-3- methyl-	$C_8H_{10}O$	122
19.70	0.26	Benzeneacetaldehyde	C_8H_8O	120
21.75	1.18	3-Ethylcyclopent-2-en-1- one	$C_7H_{10}O$	110
24.48	13.16	Benzeneethanol	$C_8H_{10}O$	122
27.31	0.97	Octanal, 3,7-dimethyl	$C_{10}H_{20}O$	156
29.36	1.04	2-Heptyl furan	$C_{11}H_{18}O$	166
34.49	1.07	pentadecane	$C_{15}H_{32}$	212
36.37	0.53	2-Undecanone	$C_{11}H_{22}O$	170
37.61	0.31	pentadecane	$C_{15}H_{32}$	212
38.41	0.61	2-Methoxy-4-ethyl-6- methylphenol	$C_{10}H_{14}O_2$	166
41.49	1.07	Benzene, 4-ethenyl-1,2- dimethoxy-	$C_{10}H_{10}O_2$	164
44.88	4.52	à-Bergamotene	$C_{15}H_{24}$	204
45.96	1.57	1-Methyl-4(1,5-dimethyl-4- hexenyl)-methylbenzene	$C_{15}H_{24}$	204

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Retention time (min)	%Relative peak area	Possible compounds	Formular	Molecular mass
46.42	3.28	1-Methyl-4(1,5-dimethyl-4-hexenyl)- <i>methylbenzene</i>	$C_{15}H_{24}$	204
46.86	0.90	(3S,3aS,7R)-3a,4,5,6,7a-Tetrahydro-3,6-dimethylbenzofuran-2(3H)-one	$C_{10}H_{14}O_2$	166
47.27	14.72	6 Amyl à pyrone	$C_{10}H_{14}O_2$	166
47.73	2.40	ç-curcumene	$C_{15}H_{24}$	204
48.89	10.78	Zingiberene	$C_{15}H_{24}$	204
49.59	2.88	á-Bisabolene	$C_{15}H_{24}$	204
50.58	5.39	á-Sesquiphellandrene	$C_{15}H_{24}$	204
51.13	2.13	2(1H)-Naphthalenone, 4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-8a-methyl-, trans-	$C_{11}H_{16}O$	164
56.48	1.31	á-Guaiene	$C_{15}H_{24}$	204
56.90	1.17	zingiberenol	$C_{15}H_{26}O$	222
58.55	1.81	5,6,6-Trimethyl-3,4-undecadien-2,10-dione	$C_{14}H_{22}O_2$	222
60.10	0.52	Acetic acid, 10,11-dihydroxy-3,7,11-trimethyl-dodeca-2,6-dienyl ester	$C_{17}H_{30}O_4$	298
61.50	0.95	2-Amino-6-methyl-6,7-dihydro-9H-5-oxa-9-azabenzocyclohepten-8-1	$C_{10}H_{12}N_2O_2$	192

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Retention time (min)	%Relative peak area	Possible compounds	Formular	Molecular mass
65.52	0.97	Verticelloi	$C_{20}H_{34}O$	290
66.05	0.31	Verticelloi	$C_{20}H_{34}O$	290
68.59	0.19	Cyclopenta[a,d]cycloocten-5-one, 1,2,3,3a,4,5,6,8,9,9a	$C_{20}H_{30}O$	286

ตารางภาคผนวกที่ 6 องค์ประกอบของสารที่สกัดได้จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1

Retention time (min)	%Relative peak area	Possible compounds	Formular	Molecular mass
6.93	2.25	Acetic acid (CAS)	C ₂ H ₄ O ₂	60
11.03	18.29	1,3-Diamio-2-propanol	C ₃ H ₁₀ N ₂ O	90
11.62	0.9	3-Furanol, tetrahydro-	C ₄ H ₈ O ₂	88
12.15	1.73	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	C ₆ H ₈ O ₄	144
13.68	0.62	2-Furancarboxaldehyde 5-(hydroxymethyl)-	C ₆ H ₆ O ₃	126
18.54	0.76	Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
21.22	1.26	Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284
22.27	1.54	Octadec-9-enoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282
25.19	1.93	9-Octadecenamide	C ₁₈ H ₃₅ NO	281
26.29	53.19	1-Hydroxy-3-methyl-5,10-anthraquinone	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	238
30.88	7.82	Chrysophanol	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254

ตารางภาคผนวกที่ 7 ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ที่เจริญในปุ๋ยชนิดต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 5, 10 และ 15 วัน

		จำนวนประชากร ($\times 10^8$ โคโลนีต่อกรัม)			
ชนิดปุ๋ย		ระยะเวลาบ่มเลี้ยงเชื้อ (วัน)			
		0	5	10	15
หนึ่งฆ่าเชื้อ	มูลไก่	0.003 \pm 0.000a	0.163 \pm 0.000b	0.135 \pm 0.000e	0.144 \pm 0.000e
	มูลวัว	0.003 \pm 0.000a	0.115 \pm 0.000d	0.550 \pm 0.004c	0.732 \pm 0.000c
	อินทรีย์ ซีพี	0.003 \pm 0.000a	0.175 \pm 0.000a	1.370 \pm 0.004a	1.650 \pm 0.004a
ไม่หนึ่งฆ่าเชื้อ	มูลไก่	0.003 \pm 0.000a	0.06 \pm 0.000f	0.105 \pm 0.000e	0.140 \pm 0.004e
	มูลวัว	0.003 \pm 0.000a	0.092 \pm 0.000e	0.336 \pm 0.001d	0.435 \pm 0.000d
	อินทรีย์ ซีพี	0.003 \pm 0.000a	0.118 \pm 0.000c	0.918 \pm 0.400b	1.290 \pm 0.147b
F-test		ns	**	**	**
CV. (%)		00	00	0.14	00

ns ไม่แตกต่างทางสถิติ

**แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ตารางภาคผนวกที่ 8 ปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ที่เจริญในปุ๋ยอินทรีย์ ซึ่ง
ความชื้นที่แตกต่างกัน หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน

กรรมวิธี	จำนวนโคโลนีต่อกรัม ($\times 10^3$)
ความชื้น 25	2.82 \pm 0.63a ^{1/}
ความชื้น 30	2.00 \pm 0.41b
ความชื้น 35	1.57 \pm 1.50c
F-test	**
C.V. (%)	16.18

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 9 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการเจริญของเชื้อรา
Trichoderma harzianum ChM1.1 ที่ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่
อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	4	13.667	3.342	51.019**
Error	15	0.982	0.065	
Total	19	14.349		

C.V. 1.27 %

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 10 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการเจริญของเชื้อรา
Trichoderma harzianum NL2.2 ที่ pH ต่าง ๆ หลังการบ่มที่
อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	4	10.357	2.589	9.048**
Error	15	4.292	0.286	
Total	19	14.649		

C.V.2.67 %

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 11 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่มเป็นเวลา 2 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	4	281.657	70.414	1.006E4**
Error	15	0.105	0.007	
Total	19	281.762		

C.V.0.42%

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 12 วิเคราะห์ความแปรปรวนความสามารถในการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่มเป็นเวลา 2 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	4	235.303	58.826	1.177E4**
Error	15	0.075	0.005	
Total	19	235.378		

C.V.0.35

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 13 วิเคราะห์ความแปรปรวนประสิทธิภาพของสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ChM1.1 ต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	2	190.919	95.459	1.002E5**
Error	9	0.009	0.001	
Total	11	190.927		

C.V.0.26%

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 14 วิเคราะห์ความแปรปรวนประสิทธิภาพของสารระเหยของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	4	473.500	118.375	13.226**
Error	15	134.250	8.950	
Total	19	607.750		

C.V.14.96%

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 15 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในสูตรสำเร็จหลังการผลิต เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	4	44.000	11.000	1.165 ^{ns}
Error	15	100.000	6.667	
Total	19	144.000		

C.V.12.91%

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 16 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในสูตรสำเร็จ หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	13	8329.804	640.754	25.057**
Error	42	1074.000	25.571	
Total	55	9403.804		

C.V.9.03

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 17 วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยสูตรสำเร็จของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 หลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	13	52.223	4.017	0.833 ^{ns}
Error	42	202.551	4.823	
Total	55	254.774		

C.V.3.92%

^{ns} ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 18 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2. ที่เจริญในปุ๋ยชนิดต่าง ๆ หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	2	2530.500	1265.250	337.400**
Error	9	33.750	3.750	
Total	11	2564.250		

C.V. 16.14%

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 19 วิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ที่เจริญในปุ๋ยอินทรีย์ ซึ่งความชื้นที่แตกต่างกัน หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็น เวลา 15 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	2	323.167	161.583	43.410**
Error	9	33.500	3.722	
Total	11	356.667		

C.V.16.18%

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 20 วิเคราะห์ความแปรปรวนการเจริญของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในดินปลูก หลังการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	3	359.687	119.896	3.405E3**
Error	12	0.422	0.035	
Total	15	360.109		

C.V.1.17

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 21 วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรคของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* NL2.2 ในดินปลูก หลังการบ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	3	24978.255	8326.085	3.405E3**
Error	12	29.340	2.445	
Total	15	25007.595		

C.V.9.77

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 22 วิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีการเกิดโรครากขาวของต้นกล้ายางพาราใน เรือนกระจก หลังการทดสอบ เป็นเวลา 4 เดือน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	5	32492.213	6498.443	5.486**
Error	54	63964.906	1184.535	
Total	59	96457.119		

C.V.57.36

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ตารางภาคผนวกที่ 23 วิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรครากขาวของต้นกล้า ยางพาราในเรือนกระจก หลังการทดสอบ เป็นเวลา 4 เดือน

Source	DF	SS	MS	F
Treatment	5	73280.292	14656.058	20.596**
Error	54	38425.657	711.586	
Total	59	111705.949		

C.V.44.46

** แตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.01$

ภาคผนวก ง

ลำดับเบสของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ChM1 ซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (GenBank accession number gb|KC330218.1|) ซึ่งมีความเหมือน (homology) เท่ากับร้อยละ 99 (655/664 bp)

```
ACCAATGTGAACGTTACCAAACGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGG
ACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAA
TCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCT
TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT
TTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCT
CCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGC
GCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCAACTTCTGAAATGTTGACTCGGACAGGTAGGAATACCCGC
TGAACTTAAGCATATCAATTAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGT
GAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCTAGGGCCGAGTTGTAATTTGTA
```

ลำดับเบสของเชื้อรา *Trichoderma* sp. NL2.2 ซึ่งมีความเหมือนกับลำดับเบสของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (GenBank accession number gb|KC330218.1|) ซึ่งมีความเหมือน (homology) เท่ากับร้อยละ 99 (640/648 bp)

```
GAAGTGTGAAGGTA AAAACCAATGTGAACGTTACCAA ACTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCG
GGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCC
TCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTTCGAAAATGAATCAAAA
CTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGC
ATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTGGCGTTGGGGATCGGCCCTC
CCTTAGCGGGTGGCCGTCTCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTT
GCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCAACTTCTGAAATGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATTAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGG
GATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAATCTGGCCCTA
```