



การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อการควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma* spp.) ของเห็ด

Screening of Antagonistic Bacteria Against the Mushroom

Green Mold Disease (*Trichoderma* spp.)

พรศิลป์ มณีฉาย

Pornsil Maneechai

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2546

เลขหมู่. QK 617	๗45	2546
Bib Key	๒๖๖๕๓๘	
	๑6 ก.ค. 2546	

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อการควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma* spp.)
ของเห็ด
ผู้เขียน นางสาวพรศิลป์ มณีฉาย
สาขาวิชา โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา 2546

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อจำแนกชนิดเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่เข้าทำลายก้อนเชื้อเห็ด และคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคราเขียวที่เกิดจากเชื้อ *Trichoderma* sp.

ทำการแยกเชื้อราเขียว (*Trichoderma* spp.) จากก้อนเชื้อเห็ด จำนวน 145 ไอโซเลท จากลักษณะสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกเชื้อราเขียวได้ 5 ชนิด คือ *T. harzianum* (82 ไอโซเลท) *T. virens* (21 ไอโซเลท) *T. virens* - like (14 ไอโซเลท) *T. atroviride* (21 ไอโซเลท) และ *T. aureoviride* (7 ไอโซเลท) ทำการคัดเลือกราเขียวจำนวน 23 ไอโซเลท มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ด้วยไพรเมอร์ 7 ชนิด อาศัยความแตกต่างของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD จากการทดลองครั้งนี้สามารถแยกกลุ่มเชื้อราเขียวในแต่ละกลุ่มได้ดังนี้ *T. harzianum* 10 ไอโซเลท สามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม ในขณะที่ *T. virens*, *T. virens* - like, *T. atroviride* และ *T. aureoviride* จำแนกได้เป็น 2, 3, 3 และ 2 กลุ่ม ซึ่งจำแนกจาก 3, 4, 4 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ

ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปฏิชีวนะกับเชื้อ *Trichoderma* sp. จากก้อนเชื้อเห็ด และดอกเห็ด จำนวน 174 ไอโซเลท นำเชื้อไปศึกษาปฏิกริยาสัมพันธ์กับเส้นใยเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus pleumonarius*) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียปฏิชีวนะ 28 ไอโซเลท มีความสามารถในการกระตุ้นให้เส้นใยเห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอกได้ ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิชีวนะนี้จำนวน 22 ไอโซเลท ไปทดสอบในโรงเรือนเห็ด โดยการทำน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะของแต่ละไอโซเลท ฉีดพ่นบริเวณปากถุงเห็ดนางฟ้า พบว่า 15 ไอโซเลท ทำให้ระยะเวลาของการออกดอกของเห็ดเร็วขึ้น และทำให้ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้น 1.1-34.3 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเก็บเกี่ยว 30 วัน

นำแบคทีเรียปฏิชีวนะ จำนวน 6 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดี ในการยับยั้งเชื้อ *T. harzianum* ส่งเสริมให้เห็ดสร้างดอกมาก และเพิ่มผลผลิตสูงในเห็ดนางฟ้า ไปใช้ในการควบคุมโรคราเขียวในโรงเรือน โดยทำการฉีดพ่นน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะของแต่ละไอโซเลท ลงบนเส้นใยเห็ดบริเวณปากถุงเห็ดนางฟ้าหลังจากเปิดปากถุง หลังจากนั้น 2 วัน ฉีดพ่นน้ำละลายสปอร์ของเชื้อ *T. harzianum* ลง

บนเส้นใยเห็ด เพื่อให้เห็ดเกิดโรค ตรวจนับการเกิดโรคของถุงเห็ดในเวลา 30 วันหลังการปลูกเชื้อ และเก็บผลผลิตเห็ดในช่วงเวลา 60 วัน ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียปฏิบักระสายพันธุ์ B012-022 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคราเขียว คือ ทำให้ถุงเห็ดเกิดโรคเพียง 6.7 เปอร์เซ็นต์ การฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิบักระสายพันธุ์ B012-022 ทำให้ผลผลิตเห็ดสูงขึ้น โดยได้รับผลผลิตเฉลี่ย 300.0 กรัม/ถุง เมื่อเพาะด้วยขี้เลื่อย ผสมรำละเอียด 5 เปอร์เซ็นต์และปูนขาว 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 900 กรัม ในช่วงเก็บเกี่ยว 60 วัน ซึ่งสูงกว่าถุงเห็ดเป็นโรคที่ไม่ฉีดพ่นแบคทีเรีย 71.1 เปอร์เซ็นต์ จากการจำแนกแบคทีเรียปฏิบักระทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่าเป็น *Bacillus* sp. ทั้ง 6 ไอโซเลท

เพื่อให้ทราบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนดอกเห็ดที่ได้จากถุงเพาะที่มีการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิบักระว่าแตกต่างจากถุงเพาะที่ไม่มีการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิบักระหรือไม่ ทำการนับปริมาณแบคทีเรียบริเวณโคนและขอบหมวกดอกเห็ด โดยวิธีการเตรียมน้ำละลายเชื้อแล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA เพื่อตรวจนับโคโลนี พบว่าจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ขอบหมวกเห็ด และโคนเห็ดที่เก็บจากก้อนเชื้อที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิบักระมีจำนวนมากกว่าถุงเห็ดที่ไม่ได้ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิบักระ

Thesis Title Screening of Antagonistic Bacteria Against the Mushroom
Green Mold Disease (*Trichoderma* spp.)
Author Miss Pornsil Maneechai
Major Program Plant Pathology
Academic Year 2003

Abstract

The objective of this study was to identify *Trichoderma* species infected on mushroom cultivating bags and screening of antagonistic bacteria for their properties in controlling the *Trichoderma* green mold disease.

One hundred and forty-five isolates of green mold (*Trichoderma* spp.) were isolated from mushroom cultivation bags and identified. Based on morphological characteristics, the following 5 species were identified *T. harzianum* (82 isolates), *T. virens* (21 isolates), *T. virens* - like (14 isolates), *T. atroviride* (21 isolates) and *T. aureoviride* (7 isolates). Twenty three isolates were randomly chosen for RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) analysis by seven primers. From RAPD banding patterns obtained, different patterns in each species were observed. Based on those DNA pattern ten isolates of *T. harzianum* could be separated into 6 groups, while *T. virens*, *T. virens* - like, *T. atroviride* and *T. aureoviride* could be distinguished into 2, 3, 3 and 2 groups, from 3, 4, 4 and 2 isolates respectively.

A total of 174 strains of bacteria antagonistic against the green mold, isolated from cultivating bags and fruiting bodies of the mushroom, were screened for effects on mushroom mycelia and ability to control the green mold disease. Twenty-eight of them promoted the primordia formation of the *Pleurotus pleumonarius* mycelia on agar plates. Twenty-two isolates were selected and further tested in mushroom house. Cell suspension of each isolate was prepared and sprayed onto the spawn surface of *P. pleumonarius*. Fifteen isolates of them shortened the times required from watering to flushing and increased the yield of the basidiocarps by 1.1-34.3% over 30 days.

Six isolates of bacteria which showed an inhibitory effect against *T. harzianum*, enhanced primordia formation and increased yield of *P. pleumonarius* were selected and used for control testing in a cultivation house. The suspension of each isolate was sprayed onto the spawn surface immediately after exposure to the air in the mushroom house, followed by spore suspension of *T. harzianum* two days later. The number of infected bags was counted at 30 days after inoculation and the cumulative yield was compared after 60 days. The results showed that bacteria isolate B012-022 was highly effective in suppressing the green mold disease. Only 6.7% of the cultivating bags were found to be infected by *Trichoderma* when bacteria isolate B012-022 was applied. Cumulative yield obtained from 900 g of sawdust + 5% rice bran + 1% Ca(OH)_2 was 300.0 g/bag after 60 days, 71.1% higher than the bags infected by the green mold and without bacterial spraying. Identification of the six bacterial isolates showed all to be *Bacillus* spp.

In order to determine the amount of bacteria on the fruiting bodies of mushrooms obtained from the bacterial-sprayed bags, pieces of the basidiocarp of *P. pleumonarius* were collected from the stalks and cap margins for preparing the suspensions. Colony counts were made on NA agar plates. It was found that the amount of bacteria associated on both sites of the basidiocarps from the bacterial-sprayed bags was higher than those obtained from the bags without bacterial spraying.