# บทที่ 4

# วิจารณ์

แยกเชื้อ *Trichoderma* ได้จำนวน 145 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *T. harzianum* จำนวน 82 ไอโซเลท *T. virens* จำนวน 21 ไอโซเลท *T. virens* – like จำนวน 14 ไอโซเลท *T. atroviride* จำนวน 21 ไอโซเลท และ *T. aureoviride* จำนวน 7 ไอโซเลท จะเห็นได้ว่าเชื้อราเขียวที่ทำความเสียหายส่วนใหญ่เป็น *T. harzianum* มากที่สุด ซึ่งมีรายงานพบว่า *T. harzianum* เป็นเชื้อราสายพันธุ์รุนแรงและมีหลาย biotype ทำความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตเห็ดทั่วโลก (Chen *et al.*, 1999a.) *Trichoderma* สายพันธุ์อื่น ๆ ที่ทำความเสียหายต่อเห็ดที่ได้รับรายงาน แต่ไม่พบในงานวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ *T. harmatum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* และ *T. longibrachiatum* (ศักรินทร์ บวรดิเรกลาภ, 2539) ระยะการเกิดโรคส่วนมากจะเกิดในช่วงหลังจากเห็ดออกดอกรุ่นที่ 1 เนื่องจากราเขียวเป็นราที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว สร้างสปอร์ได้มาก การระบาดจึงเกิดขึ้นอย่างรุนแรงและต่อเนื่อง ทำให้เส้นใยเห็ดได้รับความเสียหาย กลไกการเข้าทำลายของเชื้อ *Trichoderma* ต่อเส้นใยเห็ด มีหลายวิธี เช่น เชื้อราเขียวจะมีความสามารถในการแก่งแย่งแข่งขันพื้นที่และอาหาร การเป็นปรสิตกับเส้นใยเห็ดโดยการพันรัดและแทงเส้นใยเข้าไปเจริญในเส้นใยเห็ด และสร้างสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ต่าง ๆ เพื่อใช้ในการย่อยสลายผนังของเส้นใยเห็ด ทำให้เห็ดไม่สามารถสร้างดอกได้ จากการทดลองครั้งนี้พบว่าเชื้อ *T. harzianum* มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อปลูกเชื้อพร้อมกันกับเส้นใยเห็ด เชื้อ *T. harzianum* จะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายในเวลา 40 ชั่วโมง สามารถเจริญเข้าครอบครองเส้นใยเห็ดทำให้เส้นใยเห็ดไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่การปลูกเชื้อเห็ดอย่างเดียวที่อายุ 40 ชั่วโมง เส้นใยเห็ดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 3.0 เซนติเมตร

การสุ่มเชื้อ *Trichoderma* จำนวน 23 ไอโซเลท ซึ่ง 22 ไอโซเลท เป็นตัวแทนเชื้อราที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ ทั่วประเทศ อีก 1 ไอโซเลท เป็น *T. harzianum* ซึ่งผลิตออกจำหน่ายเพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา แยกเชื้อที่สุ่มมานี้ประกอบด้วย 5 กลุ่ม คือ *T. harzianum* จำนวน 10 ไอโซเลท *T. virens* 3 ไอโซเลท *T. virens*-like 4 ไอโซเลท *T. atroviride* 4 ไอโซเลท และ *T. aureoviride* 2 ไอโซเลท พบว่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในแต่ละชนิด เช่น *T. harzianum* ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอต่างกันถึง 6 แบบ เป็นที่น่าสังเกตว่า *T. harzianum* จากบริษัทโซตัส ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้เพื่อการควบคุมโรคพืชจะให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอแตกต่างไปจาก

ไอโซเลท อื่น ๆ เป็นการยืนยันได้ว่า *T. harzianum* ที่ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงต่อเห็ดกับที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชเป็นเชื้อคนละสายพันธุ์กัน แม้จะพบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ แต่ลักษณะรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของ *T. harzianum* จะคล้ายคลึงกัน ทั้งนี้เพราะมีความแตกต่างในระดับยีนหรือโครโมโซมที่ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยสายตาหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชจากบริษัทโซตัส เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อร่วมกับเส้นใยเห็ด พบว่าเชื้อ *T. harzianum* ไม่ทำอันตรายต่อเส้นใยเห็ด แต่อัตราการเจริญที่รวดเร็วกว่า ทำให้เชื้อ *T. harzianum* สามารถเจริญเข้าครอบครองพื้นที่และแก่งแย่งอาหารจากเส้นใยเห็ดได้ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Ospina-Giraldo และคณะ (1999) ที่ศึกษา *Trichoderma* ซึ่งทำให้เกิดโรครุนแรงกับเห็ดกระดุม โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล พบว่า *T. harzianum* มี 4 biotype คือ Th1, Th2, Th3 และ Th4 โดยพบว่า biotype Th2 และ Th4 เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรครุนแรง ส่วน biotype Th1 และ Th3 ไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเห็ดมากนัก สำหรับการศึกษาถึง biotype ของ *T. harzianum* น่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติม นอกจากนี้แล้ว จากที่มีผู้ศึกษามาก่อนว่า *T. harzianum* สามารถแบ่งได้เป็น 4 biotype เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์คนละชนิดกันกับการทดลองของ Ospina-Giraldo *et al.*, (1999) จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้ เพื่อยืนยันผลที่ชัดเจน อาจต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยการใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้ เทคนิค RAPD เป็นอีกเทคนิคที่รวดเร็วในการแยกความแตกต่างของเชื้อรากลุ่ม *Trichoderma* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากช่วยในการจำแนกสายพันธุ์หรือจัดหมวดหมู่แล้ว ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการแยกเชื้อสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงต่อเห็ดออกจากกลุ่มที่สามารถควบคุมโรคพืช ซึ่งทำให้การควบคุมเชื้อโรคมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

การแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ สามารถแยกได้จากทุกแหล่ง Boer และ Diderichsen (1991) รายงานว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์มักพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย หรือทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อคน สัตว์ หรือพืช อีกทั้งยังผลิตสารปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้หลายชนิด (Mckeen *et al.*, 1986) ในการแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อาศัยร่วมกับถุงเห็ดเป็นโรค และจากแหล่งอื่น ๆ ที่ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรค สามารถใส่สปอร์เชื้อ *Trichoderma* ลงไปผสมกับน้ำละลายก่อนจะนำไป pour plate จะสามารถแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ออกจากพวกที่ไม่เป็นปฏิปักษ์ได้ทันที เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก ใช้ระยะเวลา 2 วัน ก็สามารถคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ และแบคทีเรียที่ได้จะมีประสิทธิภาพสูง โดยเลือกเก็บเฉพาะโคโลนีแบคทีเรีย ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราไม่ให้สามารถเจริญเข้ามาใกล้บริเวณที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ ซึ่งจะปรากฏลักษณะวงใสเกิดขึ้น วงใสที่มีขนาดใหญ่ย่อมแสดงว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทนั้นมีประสิทธิภาพสูงในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งเบื้องต้นสามารถเก็บแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้จำนวน 174 ไอโซเลท ซึ่งได้จากถุงเป็นโรคมากที่สุด อาจเป็นไปได้ว่า

แบคทีเรียปฏิปักษ์บางชนิดสามารถย่อยสลายเส้นใยเชื้อ *Trichoderma* spp. และใช้เป็นอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเอง จึงทำให้จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในถุงเห็ดที่เป็นโรคมีจำนวนมากกว่าแหล่งอื่น ๆ

การทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเส้นใยเห็ด พบว่ามีเพียง 12 ไอโซเลทเท่านั้นที่ทำให้เส้นใยเห็ดไม่สามารถเจริญเข้าใกล้แบคทีเรียที่ขีดไว้ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *Trichoderma* เส้นใยเห็ดได้ด้วย แบคทีเรียส่วนที่เหลือพบว่าสามารถส่งเสริมให้เส้นใยเห็ดเจริญได้ดีขึ้น และเมื่อคัดเลือกต่อไปพบว่า ที่มีประสิทธิภาพสูง มีเพียงจำนวน 28 ไอโซเลท สามารถกระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอกในจานอาหาร PDA ในระยะเวลา 25 วัน น่าจะเป็นเพราะว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์นอกจากผลิตสารปฏิชีวนะได้แล้ว ยังผลิตสารอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในด้านส่งเสริมให้เส้นใยเห็ดเจริญได้ดีและสามารถสร้างตุ่มดอกได้ในสภาวะที่มีอาหารเหมาะสม จากการศึกษาเบื้องต้นของ Stanek (1974a.) พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกันกับเห็ดกระดุมมีประโยชน์ในด้านการปรับความเหมาะสมของธาตุอาหารในวัสดุเพาะ ทำให้เส้นใยเห็ดมีความสมบูรณ์ นอกจากนี้ Stanek (1974b.) ยังรายงานว่าแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับเส้นใยเห็ดเป็นแบคทีเรียพวกที่ทนร้อน (thermotolerant) สามารถผลิตสารพวกเซลลูโลส เช่น โพลีแซคคาไรด์ และ วิตามินบางชนิด ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทอื่น ๆ ที่ไม่ทำให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอกอาจเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์เหล่านั้นอาจจะสร้างผลิตสารที่มีประโยชน์ได้แต่สร้างในปริมาณน้อย จึงไม่สามารถที่กระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอกได้ จากการทดลองของ Eger (1963) อ้างโดย Hume และ Hayes (1974) ในเห็ดกระดุม พบว่า แบคทีเรีย *P. putida* และ *Pseudomonas* Group IV สามารถกระตุ้นให้เห็ดกระดุมสร้างตุ่มดอก นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Bacillus* และ *P. fluorescenses* อีกด้วย (Stanek, 1974b; Hume and Hayes, 1974; Singh and Singh, 2001)

การทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่กระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอก และยับยั้งเชื้อ *Trichoderma* พบว่า แบคทีเรียทั้ง 28 ไอโซเลท ที่สามารถกระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอก เมื่อนำไปทดสอบว่าแบคทีเรียดังกล่าวจะสามารถควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ได้หรือไม่ ก็พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 22 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *T. harzianum* ได้ อาจเกิดจากประสิทธิภาพของตัวเชื้อแบคทีเรียเอง กล่าวคือ แบคทีเรียเมื่อเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลานานหรือการย้ายเชื้อเพื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ประสิทธิภาพหรือความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์เปลี่ยนแปลงหรือลดลงไปได้ จึงทำให้แบคทีเรียอีก 6 ไอโซเลท ไม่มีความสามารถในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ได้อีกต่อไป

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 22 สายพันธุ์ ที่สามารถกระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอก และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *T. harzianum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ขั้นตอนต่อไป คือ การนำไปทดสอบความสามารถในการกระตุ้นให้เห็ดสร้างดอกในโรงเรือนเห็ด พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลท ทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้น (1.1-34.3 เปอร์เซ็นต์) การที่แบคทีเรียทั้งหมดไม่สามารถทำให้ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้นทุกไอโซเลท อาจเป็นไปได้ว่า การผลิตสารที่มีประโยชน์เพื่อกระตุ้นให้เห็ดสร้างดอกมากขึ้นและให้น้ำหนักเห็ดเพิ่มขึ้นนั้น เกิดได้ดีในสภาพที่แบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีธาตุอาหารสมบูรณ์มากกว่าอยู่ในวัสดุเพาะเห็ด ดังนั้นการจะใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจในสภาพธรรมชาติ จึงควรศึกษาถึงการผลิตสูตรตำรับซึ่งมีแหล่งพลังงานที่เหมาะสมเป็นส่วนประกอบเพื่อให้แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี และสามารถควบคุมการเกิดโรคได้เช่นเดียวกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ และเมื่อพัฒนาสูตรตำรับที่มีประสิทธิภาพแล้ว การนำไปใช้ควบคุมโรคราเขียวในเห็ดโดยเกษตรกรจะมีแนวโน้มประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้น

หลังจากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ให้ผลผลิตเห็ดสูง จำนวน 6 ไอโซเลท และเมื่อจำแนกชนิดพบว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. จากการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (Katz and Kemain, 1977) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Boer and Diderichsen, 1991) เช่น *Bacillus brevis* สามารถผลิตสาร Gramicidin S (Ovchinnkov and Lvanov, 1982) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของคอนิเดีย (Edwards and Seddon 1992 อ้างโดย นริสา จันทร์เรือง, 2543) *B. subtilis* ผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น inturin จะออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราและยีสต์ (Sandrin *et al.*, 1990) surfactin เป็นสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Cooper *et al.*, 1981)

การทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 6 ไอโซเลท ต่อการควบคุมโรคราเขียว *Trichoderma* ในโรงเรือน ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ทำให้ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้นสูงสุด ได้แก่ แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B012-021, B012-022, B012-034, B012-054, B004-013 และ B006-017 โดยปลูกเชื้อร่วมกับ *T. harzianum* เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อราในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ของ *Bacillus* สายพันธุ์ B012-022 และ B006-017 มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคได้ดีที่สุด ให้ผลผลิตเห็ดสูงสุด และทำให้ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดรุ่นที่ 1 เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Curto และ Favelli (1974) พบว่าการฉีดพ่นน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงบนดินที่ปิดผิวหน้า (casing) แปลงเพาะเห็ดกระดุม ทำให้ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้น 37 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดจะเร็วขึ้น การที่ฉีดพ่นน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวให้ผล

ผลิตน้อยกว่าการฉีดพ่นด้วยเชื้อ *Trichoderma* เพียงอย่างเดียว เนื่องจากมีการระบาดของเชื้อ *Trichoderma* จากถุงใกล้เคียง ทำให้เกิดโรคถึง 33.3 เปอร์เซ็นต์

ถุงเห็ดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อ *T. harzianum* เพียงอย่างเดียว จะแสดงอาการเกิดโรคเร็วและรวดเร็วกว่าการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมด้วย ระยะเวลาในการแสดงอาการของโรคประมาณ 30 วัน หลังจากนั้นเมื่อตรวจสอบอาการของโรคอีกครั้ง ในวันที่ 50 ของการทดสอบโรค พบว่าอาการของโรคจะไม่ปรากฏชัดเจน โดยสังเกตเห็ดเส้นใยเห็ดนางฟ้าเกิดอาการเน่ามีสีน้ำตาลอ่อน จะไม่ปรากฏสปอร์สีเขียวของเชื้อ *Trichoderma* ได้ชัดเจนเหมือนระยะแรกของการเกิดโรค และถุงเห็ดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะยังคงให้ดอกเห็ดอยู่ แต่ให้ในปริมาณที่น้อยลง อาจจะเป็นเพราะว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทำการฉีดพ่นบนก้อนเชื้อเห็ดก่อนที่จะฉีดพ่นด้วยเชื้อ *T. harzianum* จะเข้าทำลาย แบคทีเรียปฏิปักษ์มีการเจริญและเข้าครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่าเชื้อ *Trichoderma* เพื่อหาอาหาร และสามารถอยู่รอดได้ เมื่อมีเชื้อ *Trichodema* เข้าไปภายหลัง เชื้อ *Trichoderma* จึงไม่สามารถเข้ายึดอำนาจหรือแก่งแย่งพื้นที่ครอบครองจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ ส่งผลให้เชื้อ *Trichoderma* ไม่สามารถเจริญได้ และไม่แสดงอาการเกิดโรคในที่สุด

ดังนั้นการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B012-022 และ B006-017 ฉีดพ่นก่อนการเกิดโรคน่าจะมีผลในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *T. harzianum* ในเห็ดได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ทำให้ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดเร็วขึ้น

การศึกษาปริมาณเชื้อแบคทีเรียบนดอกเห็ดและโคนเห็ด พบว่าถุงเห็ดที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงไป มีจำนวนปริมาณแบคทีเรียมากกว่าถุงเห็ดที่ไม่ได้ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ สำหรับงานทดลองนี้เป็นงานทดลองเบื้องต้น ยังไม่ศึกษาถึงความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ในห้องปฏิบัติการต่อไป