โรครากขาว [*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.] ของยางพารา และแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี

White Root Disease [*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.] of the Rubber Tree and a Biological Control Approach

อารมณ์ โรจน์สุจิตร

Arom Rodesuchit

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2541

เลขหมู่ SB608.H5 O64 2541 ฉ.2

Bib Key 1416919

ชื่อวิทยานิพนธ์	โรครากขาว [*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.] ของยางพาราและแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี
ผู้เขียน	นางอารมณ์ โรจน์สุจิตร
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร)

.....กรรมการ
(นางประภา พัฒนกุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	โรครากขาว [*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.] ของยางพาราและแนวทางการควบคุมโดยชีววิธี
ผู้เขียน	นางอารมณ์ โรจน์สุจิตร
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2541

บทคัดย่อ

ได้ทำการเก็บตัวอย่างโรครากขาวของยางพาราซึ่งเกิดจากเชื้อ *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz. จากสวนยางพารา 4 แห่ง นำมาแยกเลี้ยงเชื้อ พิสูจน์เชื้อ และพิสูจน์โรคพบว่าเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ทำให้ต้นกล้ายางแสดงอาการของโรคคือ ใบเหลืองและตายภายใน 60 วันหลังปลูกเชื้อ ลักษณะของเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีขาวค่อนข้างหยาบและเมื่ออายุมากขึ้นเปลี่ยนเป็นสีส้ม เชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถสร้างดอกเห็ดหลังจากการทำให้สร้างดอกโดยวิธีการต่าง ๆจากการเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของ ขี้เลื่อยยางพารา รำข้าว น้ำตาลทราย และน้ำอัตรา 100:3:2:50 โดยน้ำหนัก โดยเห็ดจะออกดอกหลังจากถูกกระตุ้นให้ออกดอกประมาณ 45-60 วัน

จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อ *R. lignosus* พบว่าเชื้อ *R. lignosus* เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth ผสมน้ำสกัดฟางข้าว แหล่งคาร์บอนที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ดี คือ ฟรุคโตส มอลโตส กลูโคส เซลลูโลส และแป้ง ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย พบว่าเชื้อราสามารถใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุดรองลงมา คือ แอสปาราจีน เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญคือที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และระดับ pH 6-7 ส่วนแสงในสภาพห้องปฏิบัติการไม่มีผลต่อการเจริญของเส้นใย

การศึกษาอิทธิพลของปุ๋ยไนโตรเจน 4 ชนิดคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และ ยูเรีย ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และอัตรา 0.1, 0.2, 0.4 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ในดิน พบว่าเชื้อราสามารถใช้ปุ๋ยเหล่านี้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญได้ แต่อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่พบว่า ความเข้มข้นของปุ๋ยที่สูงขึ้นทำให้เส้นใยเจริญลดลง

ส่วนการศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารและในดินที่มีส่วนผสมของกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับการทดสอบปุ๋ยไนโตรเจน พบว่ากำมะถันที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและในดิน ตามลำดับ สามารถยับยั้งการ

เจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus*

การเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งโรครากขาว 21 แห่ง และนำมาแยกเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* spp.และ *Chaetomium* spp. เพื่อทำการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธานและทดสอบการเป็นเชื้อราต่อต้านต่อเชื้อ *R. lignosus* ปรากฏว่าสามารถแยกเชื้อ *Trichoderma* spp. ได้ 79 สายพันธุ์ จำแนกเป็น *T. aureoviride, T. harzianum, T. koningii, T. longibrachiatum, T. piluliferum, T. polysporum, T. pseudokoningii, T. viride, Trichoderma* sp.9 และ *Trichoderma* sp.10 จำนวน 1, 47, 1, 4, 4, 5, 1, 8, 6 และ 2 สายพันธุ์ตามลำดับ ส่วน *Chaetomium* spp. สามารถแยกได้ 63 สายพันธุ์ จำแนกเป็น *C. aureum, C. cupreum, C. fusiforme, C. gracile, Chaetomium* sp.5, *Chaetomium* sp.6, *Chaetomium* sp.7, *Chaetomium* sp.8, *Chaetomium* sp.9 และ *Chaetomium* sp.10 จำนวน 13, 11, 24, 6, 4, 1, 1, 1, 1 และ 1 สายพันธุ์ตามลำดับ

ผลการทดสอบการเป็นเชื้อราต่อต้านของเชื้อ *Trichoderma* spp. กับเชื้อ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar และในดินที่บรรจุในหลอดทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่สามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ได้ และได้นำเชื้อ *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ได้ดี 4 สายพันธุ์ไปทดสอบเบื้องต้นกับต้นกล้ายางในสภาพเรือนทดลอง โดยการจุ่มรากต้นกล้ายางในน้ำแขวนลอยสปอร์ของ *Trichoderma* spp. ผลปรากฏว่าเชื้อ *Trichoderma* ทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่สามารถป้องกันการเกิดโรครากของต้นกล้ายางได้ ส่วนการทดสอบการเป็นเชื้อราต่อต้านของ *Chaetomium* spp. ในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดที่เป็นเชื้อราต่อต้านเชื้อ *R. lignosus* ได้ดี

Thesis Title	White Root Disease [*Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.] of the Rubber Tree and a Biological Control Approach
Author	Mrs. Arom Rodesuchit
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	1998

Abstract

Rigidoporus lignosus (Klotzsch) Imaz. is a causal agent of white root rot of rubber trees in Thailand. Four isolates of fungus were isolated and tested on rubber seedlings. The symptoms of disease could be observed within 60 days following inoculation, through yellowish leaves and mortality. Mycelia of this fungus on agar plates were white and turned yellowish orange with age. Basidiocarps could be induced, under laboratory condition, using pararubber sawdust, rice bran, sugar and water (100:3:2:50 by weight) as the substrate. Fructification began 45-60 days after inducement.

Some physiological aspects of *R. lignosus* were investigated. It produced the maximum mycelial growth on potato dextrose straw extract broth. In terms of carbon and nitrogen sources, the maximum mycelial growth was obtained in culture containing fructose, maltose, glucose, cellulose or soluble starch as the carbon source. *R. lignosus* utilized ammonium chloride better than other nitrogen sources. L-asparagine, peptone or ammonium sulfate were also good. The optimum growth occured at a temperature of 30°C and pH between 6 and 7. Light had no effect on mycelial growth.

Mycelial growth of *R. lignosus* was further tested on medium broth and soil containing fertilizers such as ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium sulfate and urea at different concentrations (0-0.2% in media, 0-1.0% in soil). The results showed that the fungus was able to use these fertilizers as a nitrogen source for mycelial growth. However mycelial growth was reduced or showed some toxicity to *R. lignosus* at higher concentrations.

Soil amended with sulphur is widely used to control white root disease. In this study, *R. lignosus* was grown in culture broth and soil containing sulphur at different concentrations. The results showed that sulphur higher than 0.05 % in culture broth

and 0.1 % in soil inhibited *R. lignosus* growth.

Twenty-one soil samples from root rhizospheres were taken from different rubber plantations and isolated for the antagonistic fungi. 79 isolates of *Trichoderma* and 63 of *Chaetomium* were studied and identified. *Trichoderma* species were *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii*, *T. viride*, *Trichoderma* sp.9 and *Trichoderma* sp.10 (1, 47, 1, 4, 4, 5, 1, 8, 6 and 2 isolates, respectively). *Chaetomium* were identified as *C. aureum*, *C. cupreum*, *C. fusiforme*, *C. gracile*, *Chaetomium* sp.5, *Chaetomium* sp.6, *Chaetomium* sp.7, *Chaetomium* sp.8, *Chaetomium* sp.9 and *Chaetomium* sp.10 (13, 11, 24, 6, 4, 1, 1, 1, 1 and 1 isolates, respectively).

The interaction of *Trichoderma* and *Chaetomium* against *R. lignosus* were investigated on dual cultures both on PDA plates and in soil in test tubes. Antagonistic activity of *Chaetomium* on PDA was detected in some isolates but no *Chaetomium* isolates were good antagonists in soil. Four isolates of *Trichoderma* which were found to be better antagonists to *R. lignosus* than others *in vitro* were selected and further tested in a green house to control white root disease. The preliminary results showed that coating rubber seedling roots with a spore suspension of *Trichoderma* failed to protect *R. lignosus* infection.

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งต่อรองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำทุกขั้นตอนในการศึกษา การเรียบเรียงและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ คุณประภา พัฒนกุล นักวิชาการเกษตร 7 ศูนย์วิจัยยางสงขลา และรองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร กรรมการสอบที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ซึ่งให้ความช่วยเหลือและความสะดวกต่างๆ ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้องทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ขอขอบคุณ คุณขจิต ลาพินี ที่ให้ที่อยู่และความช่วยเหลือในระหว่างการศึกษา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยและมูลนิธิมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ในการสนับสนุนเงินทุนการทำงานวิจัยและเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานี และสถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ที่ให้โอกาสในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ Mr. David Patterson ที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไขบทคัดย่อภาษาอังกฤษให้ถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอบคุณ คุณรังสี โรจน์สุจิตร ลูกเกด ลูกแก้ว และน้องกริ่ม ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจด้วยดีตลอด

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณ พี่ชาย พี่สาว น้องชาย และน้องสาว และขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ศูนย์วิจัยยางสุราษฎร์ธานีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ผู้เขียนใคร่ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

อารมณ์ โรจน์สุจิตร

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อ.....(3)
Abstract.....(5)
กิตติกรรมประกาศ.....(7)
สารบาญ.....(8)
รายการตาราง.....(9)
รายการภาพ.....(10)
รายการตารางภาคผนวก.....(12)
บทที่
1. บทนำ.....1
บทนำต้นเรื่อง.....1
การตรวจเอกสาร.....4
วัตถุประสงค์.....11
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ
วัสดุ.....12
อุปกรณ์.....12
วิธีการ.....14
3. ผลและวิจารณ์.....26
4. บทสรุป.....110
เอกสารอ้างอิง.....113
ภาคผนวก.....120
ประวัติผู้เขียน.....137

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ หลังปลูกเชื้อ 12 วัน....37

2 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอน 9 ชนิด หลังปลูกเชื้อ 12 วัน....39

3 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในแหล่งไนโตรเจน 9 ชนิด หลังปลูกเชื้อ 12 วัน....40

4 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในสภาพแสงปกติและมืดตลอดหลังปลูกเชื้อ 12 วัน....41

5 การเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในดินนึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และกำมะถันในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ....49

6 การเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในดินที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรตและกำมะถันในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ....51

7 ระดับ pH ของดินที่เปลี่ยนแปลงหลังการผสมยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ....55

8 การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* และเชื้อ *Trichoderma* spp. ในดินที่ใส่เชื้อ *Trichoderma* spp. ในหลอดทดลอง....102

9 การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* (R)ในดินที่ผสมเชื้อ *Chaetomium* spp. (C) ในหลอดทดลอง....105

10 จำนวนต้นกล้ายางที่ตายหลังการปลูกเชื้อ *R. lignosus* (R)และ *Trichoderma* spp. (T) 4 สายพันธุ์ในเรือนทดลอง....109

รายการภาพ

ภาพที่ หน้า

1 สภาพสวนยางพาราอายุประมาณ 8 ปีที่เป็นโรครากขาว ต้นที่เป็นโรค แสดงอาการพุ่มใบเหลือง และร่วง....27
2 ลักษณะของรากยางที่เป็นโรครากขาว....28
3 ลักษณะของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* สายพันธุ์ต่าง ๆบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA (บน) และ PDA (ล่าง) หลังปลูกเชื้อ 5 วัน....30
4 การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* สายพันธุ์ต่าง ๆบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA(ซ้าย) และ MA(ขวา)....31
5 ลักษณะเส้นใยของเชื้อ *R. lignosus* มีลักษณะใส แตกสาขามาก มีผนังกั้น และไม่มี clamp connection....32
6 ลักษณะ basidiospore ของเชื้อ *R. lignosus* มีลักษณะกลม ใส และผิวเรียบ....33
7 ลักษณะของต้นกล้ายางพาราที่เป็นโรครากขาวเปรียบเทียบกับต้นปกติ....35
8 ลักษณะของดอกเห็ดของเชื้อ *R. lignosus* บนต้นกล้ายางพาราอายุ 1 ปี....36
9 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในอาหาร GPB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ระดับ pH ต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 9 วัน....42
10 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 10 วัน....42
11 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และยูเรีย ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 10 วัน....44
12 ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และยูเรีย ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus*....45
13 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 10 วัน....47
14 ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* 47
15 การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในดินนึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมยูเรีย(A) แอมโมเนียมไนเตรต(B) และกำมะถัน(C)ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ....50

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

16 การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในดินที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมยูเรีย(A) แอมโมเนียมไนเตรต(B) และกำมะถัน(C)ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....52

17 การเจริญของเชื้อ R. lignosus ในดินที่ผสมแอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย และกำมะถันที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์หลังบรรจุดินในหลอดทดลอง 10 วัน.....56

18 แสดงวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์ *Trichoderma* spp. บนอาหาร TSM(A) และ *Chaetomium* spp. โดยใช้กระดาษกรองเป็นเหยื่อล่อ(B)จากตัวอย่างดิน.....58

19 *Trichoderma aureoviride* (056.11).....60

20 *Trichoderma harzianum* (057.13).....62

21 *Trichoderma koningii* (061.12).....64

22 *Trichoderma longibrachiatum* (042.21).....66

23 *Trichoderma piluliferum* (036.12).....68

24 *Trichoderma polysporum* (048.11).....70

25 *Trichoderma pseudokoningii* (047.13).....72

26 *Trichoderma viride* (035.14).....74

27 *Trichoderma* sp.10 (040.11).....77

28 *Chaetomium aureum* (047.12).....80

29 *Chaetomium cupreum* (019.41).....82

30 *Chaetomium fusiforme* (018.11).....84

31 *Chaetomium gracile* (002.11).....86

32 *Chaetomium* sp.6 (047.13).....89

33 *Chaetomium* sp.8 (054.13).....92

34 *Chaetomium* sp.10 (046.11).....95

35 ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ *Trichoderma* spp. กับ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. 5 วัน.....97

36 ลักษณะการเกิดสีไต้โคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อ *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์เจริญครอบคลุมเชื้อ *R. lignosus*.....98

37 ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ *Chaetomium* spp. กับ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA.....100

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

38 ลักษณะการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ต่าง ๆ ต่อเชื้อ *R. lignosus* ในดินหลังจากปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. 10 วัน.....103

39 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. lignosus* ของเชื้อ *Trichoderma* spp.และเชื้อ *Chaetomium* spp. หลังบรรจุดินผสมเชื้อ *Trichoderma* spp.หรือ *Chaetomium* spp. 5 วัน.....106

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

1 รายละเอียดของสวนยางที่เป็นโรครากขาวและการเก็บตัวอย่างโรค.....124

2 การเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* แต่ละสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MA.....124

3 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในอาหาร GPB ปริมาตร 10 มิลลิตรที่ระดับ pH ต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 9 วัน.....125

4 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB ปริมาตร 10 มิลลิตรที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 10 วัน.....125

5 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมปุ๋ย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และยูเรีย ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หลังปลูกเชื้อ 10 วัน.....126

6 ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมปุ๋ย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และยูเรีย ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* 126

7 น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกำมะถัน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 12 วัน.....127

8 ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกำมะถัน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* 127

9 น้ำหนักแห้งของเชื้อ *T. harzianum* (Indonesia)เมื่อเลี้ยงในอาหาร GPB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ระดับ pH ต่าง ๆ หลังปลูกเชื้อ 6 วัน.....128

10 ปริมาณธาตุอาหารของดินที่ใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการและในเรือนทดลอง.....128

11 สถานที่ รายละเอียดและรหัสของดินที่เก็บตัวอย่างจากสวนยางพาราที่เป็นโรครากขาวเพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. สำหรับการศึกษาคุณสมบัติการเป็นเชื้อราต่อต้าน.....129

12 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังการปลูกเชื้อ *R. lignosus* 7 วัน.....131

13 ปฏิกิริยาการเป็นเชื้อราต่อต้านของ *Chaetomium* spp. ต่อเชื้อ *R. lignosus* และการเจริญของ *Chaetomium* spp. หลังปลูกเชื้อ 10 วัน.....134

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell-Arg.) เป็นพืชยืนต้นจัดอยู่ในวงศ์ (family) Euphorbiaceae มีถิ่นกำเนิดในแถบลุ่มน้ำอะเมซอน ประเทศบราซิล พืชสกุล (genus) *Hevea* มีหลายชนิด (species) เช่น *H. benthamiana* Muell-Arg., *H. camargoana* Pires, *H. camporum* Ducke, *H. guianensis* Aubl., *H. microphylla* Ule, *H. nitida* Mart. ex Muell-Arg., *H. pauciflora* Muell-Arg., *H. rigidifolia* Muell-Arg. และ *H. spruceana* Muell-Arg. เป็นต้น (Wycherley, 1992) *H. brasiliensis* นับว่าสำคัญที่สุด (สมพงศ์ สุขมาก, 2536) เพราะให้ผลผลิตน้ำยางสูง ยางมีคุณสมบัติดี และสามารถปรับตัวเองเข้ากับสภาพแวดล้อมทางทวีปเอเชีย และอาฟริกาได้ได้เป็นอย่างดี นำมาปลูกในเอเชียครั้งแรกที่ประเทศศรีลังกาในปี ค.ศ. 1876 และประเทศอื่น ๆ ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศมาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และ ไทย ปลูกเพื่อการค้าในระดับอุตสาหกรรมครั้งแรกที่เกาะสุมาตรา ประเทศมาเลเซีย (ปัจจุบันเป็นของประเทศอินโดนีเซีย) ในปี ค.ศ. 1902 (Nandris *et al.*, 1987) และได้เพิ่มขึ้นในประเทศใกล้เคียง ภายใน 16 ปีประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้สามารถผลิตยางสู่ตลาดโลกได้ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ของยางทั้งหมด ประเทศที่เป็นผู้ผลิตยางธรรมชาติรายใหญ่ของโลกคือ ประเทศไทย มาเลเซีย และ อินโดนีเซีย ซึ่งในปี ค.ศ. 1982 สามารถผลิตได้ถึง 92 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ประเทศในทวีปอาฟริกาผลิตได้เพียง 7 เปอร์เซ็นต์ และประเทศในละตินอเมริกาผลิตได้เพียง 0.7 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Nandris *et al.*, 1987)

ยางพาราเป็นแหล่งยางธรรมชาติที่สำคัญที่สุด นำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาห-กรรมการผลิตผลิตภัณฑ์ยาง (วราภรณ์ ขจรไชยกูล, 2536) และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยมาช้านาน นำเข้ามาปลูกครั้งแรกที่ จังหวัดตรัง ในปี พ.ศ. 2443 จากนั้นได้ขยายไปปลูกทั่วภาคใต้และภาคตะวันออก ต่อมาได้ขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้นในจังหวัดภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือบางจังหวัด ซึ่งในปี พ.ศ. 2532 ประเทศไทยสามารถผลิตยางได้เป็นอันดับสามของโลก ทำรายได้ให้ประเทศสูงถึง 25,287 ล้านบาท และสามารถเป็นผู้ผลิตยางได้เป็นอันดับหนึ่งของโลกเป็นปีแรกในปี พ.ศ. 2534 ทำรายได้สูงถึง 26,000 ล้านบาท (ฉกรรจ์ แสงรักษาวงศ์, 2536) จากพื้นที่ปลูกยางทั้งหมดประมาณ 10.7 ล้านไร่ (สมพงศ์ สุขมาก, 2536) ปัจจุบันประเทศไทยยังคงเป็นประเทศที่ผลิตยางธรรมชาติเป็นอันดับ 1 ของ

โลกเป็นปริมาณถึง 2.077 ล้านตัน (ฉกรรจ์ แสงรักษาวงศ์, 2541) ทำรายได้จากการส่งออกถึง 55,492 ล้านบาท (จันทวรรณ คงเจริญ, 2541)

ปัญหาและอุปสรรคของการปลูกยางพาราส่วนใหญ่เกิดจากโรค ซึ่งเกิดขึ้นได้ทุกส่วนของต้นยางตั้งแต่ระยะต้นกล้า จนถึงต้นโตเก็บเกี่ยวผลผลิตโดยเกิดทั้ง บนดอก ผล ใบ ลำต้น และราก จากรายงานพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์มากกว่า 40 ชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับยาง แต่เชื้อที่มีผลต่อระดับเศรษฐกิจและผลผลิตของยางที่สำคัญมีประมาณ 14 ชนิด (Chee, 1990) เช่น เชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับใบ เช่น *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Oidium heveae* Steinm., *Microcyclus ulei* (P. Henn.) V. Arx., *Phytophthora* spp. (*P. palmivora* (Butl.) Butl., *P. botryosa* Chee และ *P. meadii* Mc Rae), *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei., *Drechslera heveae* (Petch) M.B. Ellis. และ *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk เชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับลำต้น เช่น *Corticium salmonicolor* Berk. & Br., *Ceratocystis fimbriata* Ell. & Halst., *Phytophthora palmivora* , *P. meadii* และ *P. botryosa* และเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับระบบราก เช่น *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz., *Ganoderma philippii* (Bres. & P. Henn.) Bres. [หรือ *G. pseudoferreum* (Wakef.) Overh. & Steinm.], *Phellinus noxius* (Corner) G.H. Cunn., *Helicobasidium compactum* (Boedijin) Boedijin และ *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.) Kummer เป็นต้น เชื้อราโรครากทั้ง 3 ชนิดแรก มีความสำคัญทำให้เกิดความเสียหายแก่สวนยางที่ปลูกแทนที่ป่าถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *R. lignosus* สาเหตุโรครากขาว (white root disease) ของยางพาราเป็นเชื้อโรคที่สำคัญที่สุด แพร่ระบาดในพื้นที่ปลูกยางทั่วโลก โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกยางในทวีปเอเชียและอาฟริกาตะวันตก (Chee, 1990)

สำหรับประเทศไทยโรครากขาวของยางพาราแพร่กระจายอยู่ในสวนยางทั่วไป เช่นในจังหวัดระนอง พังงา สุราษฎร์ธานี ชุมพร นครศรีธรรมราช สงขลา และ นราธิวาส (อุไร จันทรประทิน, 2534) โดยทำความเสียหายให้กับต้นยางปลูกใหม่และต้นยางใหญ่ ทำให้จำนวนต้นยางลดลง ถึงแม้จะไม่มีการศึกษาและสำรวจถึงความสูญเสียทางเศรษฐกิจ แต่การแพร่กระจายทั่วไปของโรครากขาว ทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เพิ่มมากขึ้นทุก ๆปี เนื่องจากต้นยางที่เป็นโรคจะเป็นแหล่งเชื้อแพร่กระจายสู่ต้นยางข้างเคียงโดยการสัมผัสทางรากต่อไปเรื่อย ๆ Nandris และคณะ (1987) รายงานว่าเส้นใยหรือไรโซมอฟ(rhizomorph) ของเชื้อราสามารถเจริญได้ไกลถึง 2.5 เมตรต่อปี โดยปกติการปลูกยางพารามักนิยมปลูกระยะระหว่างต้น 2.5 เมตร ระยะระหว่างแถว 8 เมตร หรือระยะระหว่างต้น 3 เมตร ระยะระหว่างแถว 7 เมตร ดังนั้นจากต้นยางที่เป็นโรคจึงลุกลามติดต่อกันอย่างรวดเร็วทำให้ต้นยางเสียหาย และจำนวนต้นลดลงโดยเฉพาะในสวนยางที่เกิดโรคหลายจุด ถ้าไม่มีการควบคุมและป้องกันรักษา โรคจะลุกลามทำความเสียหายแก่สวนยางเป็นอันมาก เนื่องจากยางพาราเป็นพืชยืนต้นสามารถให้ผลผลิตได้นานถึง 25 ปี ดังนั้นทุก ๆต้นของยางพาราจึงมีความสำคัญ และประกอบกับข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ

ราโรครากขาวของยางพาราในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อย จึงสมควรศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเชื้อราและการป้องกันกำจัดเพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาและประยุกต์ใช้ในการป้องกันรักษาโรครากขาวของยางพาราต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. เชื้อสาเหตุ

โรครากขาวของยางพารา เกิดจากเชื้อ *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz. เป็นเชื้อราจำพวกเห็ด (Basidiomycetes) *R. lignosus* มีชื่อพ้องหลายชื่อได้แก่ *Polyporus lignosus* Klotzsch , *Fomes auberianus* (Mont.) Murr. (Holliday, 1980), *Fomes lignosus* Berk [Ridley (1904) อ้างโดย Fox (1977)], *F. lignosus* Klotzsch [Lloyd (1912) อ้างโดย Fox (1977)] และ *Leptoporus lignosus* (Nandris *et al.*, 1987) การจัดอันดับหมวดหมู่ของเชื้อ *R. lignosus* มีดังนี้คือ (Hawksworth *et al.* 1995)

Phylum Basidiomycota

Class Basidiomycetes

Order Poriales

Family Coriolaceae

Genus Rigidoporus

Species lignosus

ลักษณะของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nandris และคณะ (1987) รายงานว่าเชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวค่อนข้างหยาบบนอาหาร MEA (malt extract agar) และบางส่วนเจริญลงไปในอาหาร เจริญได้เล็กน้อยที่ระดับ pH 4.0 และเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 7.0 (Hashim and Azaldin, 1985) ส่วน Holliday (1980) รายงานว่าเส้นใยบนอาหาร MEA มีสีขาว จับตัวกันเป็นเส้นนูน และเปลี่ยนเป็นเส้นสายไรโซมอฟสีน้ำตาลอ่อน ภายใน 5 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเชื้อเจริญวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีได้ 5-5.5 เซนติเมตร ระบบเส้นใยของดอกเห็ด (hyphal system) เป็นแบบ monomitic ไม่เกาะกัน (non-agglutinated) ส่วนเส้นใยเจริญ (generative hyphae) มีขนาด 2-7 µm ใส หรือสีน้ำตาลอ่อน ผนังบางถึงค่อนข้างหนา แตกสาขามาก มีผนังกั้น (simple septate)

ลักษณะของดอกเห็ด ออกจากตอไม้หรือราก เป็นแผ่นครึ่งวงกลมไม่มีก้าน มักขึ้นซ้อนกัน ดอกอ่อนลื่นเหมือนหนัง ดอกแก่แข็งกระด้าง สีของดอกด้านบนขณะยังอ่อนสีส้มแดง เมื่อแก่สีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลเหลือง เป็นสีแก่อ่อนสลับกันเป็นวง ขอบดอกขาว ไม่เป็นขน ดอกเห็ดมีขนาด 4-22x3-9x0.3-1.5 เซนติเมตร ขอบดอกสีขาวกว้าง 4 มิลลิเมตร ส่วน context สีครีม หรือสีขาว หรือสีเหลืองอ่อน หนา 1 เซนติเมตร ลักษณะเป็นเส้นอัดกันแน่น คล้ายจุกคอร์ก รู(pore) รูปร่างไม่แน่นอน มีลักษณะกลม รี หรือเป็นเหลี่ยม มีจำนวน 5-9 รูต่อความยาว 1 มิลลิเมตร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50-140 µm เป็นหลอดยาว 6 มิลลิเมตร (Bakshi, 1971 และ Holliday, 1980) สปอร์(basidiospore) รูปร่างค่อนข้างกลมมีขนาด 3.5-4.5x3.5

-4(4.2x3.7)µm เบสิเดียม (basidium) รูปร่างเป็นกระบองสั้น มี 4 สปอร์ (Holliday, 1980)

2. ลักษณะอาการของโรค

ในสภาพธรรมชาติเชื้อราโรครากขาวเจริญได้รวดเร็วกว่าเชื้อราสาเหตุโรครากชนิดอื่น จึงมักพบโรครากขาวในสวนยางเป็นอันดับแรก ภายหลังการปลูกยางแล้วประมาณ 1 ปี และพบจำนวนต้นที่เป็นโรคสูงสุดในปีที่ 4-5 (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2533) รากที่เป็นโรคจะปรากฏสายไรโซมอฟแตกสาขาเป็นร่างแหจับติดแน่นและแผ่คลุมทั่วผิวราก มีสีขาวและปลายเส้นใยมีลักษณะแบน เมื่อสายไรโซมอฟมีอายุมากขึ้น มีลักษณะนูนกลมสีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลแดงชัด เนื้อไม้ของรากที่เป็นโรคในระยะลุกลามมีสีขาวหรือครีมและแข็ง ส่วนต้นที่เป็นโรคตายใหม่ ๆ เนื้อไม้มีสีน้ำตาลและแข็งบางครั้งมีสีเทาแต้ม ต่อมาจะยุ่ยและเบา ถ้าอยู่ในที่ชื้นแฉะจะเหลวเละ ในฤดูฝนมักปรากฏดอกเห็ดตรงบริเวณโคนต้นของต้นที่เป็นโรคหรือตรงส่วนรากที่โผล่พ้นผิวดิน ลักษณะของดอกเห็ดมักขึ้นซ้อนกันหลายชั้น ไม่มีก้าน แข็ง ผิวของดอกสีเหลืองส้มเป็นวง ๆ ขอบขาว ผิวล่างสีส้มแดงหรือน้ำตาล เมื่อตัดดอกเห็ดตามขวางจะเห็นชั้นบนเป็นสีขาวและชั้นล่างเป็นสีน้ำตาลแดงชัดเจน ขนาดของดอกขึ้นกับสภาพแวดล้อมและความชื้น ทรงพุ่มของต้นยางที่เป็นโรคมีสีเหลือง ในระยะที่เชื้อราเข้าทำลายระบบรากค่อนข้างรุนแรงแล้ว จะทำให้ใบร่วง และยืนต้นตายในที่สุด

จากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ Nandris และคณะ (1987) โดยการปลูกเชื้อกับต้นกล้ายางในเรือนกระจก และควบคุมสภาพของดินให้เป็นสภาพขาดออกซิเจนทั้งในดินทรายและดินเหนียว พบว่ารากยางติดเชื้อหลังจากปลูกเชื้อ 2 เดือน และต้นที่เป็นโรคตายภายใน 5 เดือน ทั้งนี้การตายขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย

3. นิเวศวิทยาและระบาดวิทยา

โรครากของพืชพบแพร่กระจายอยู่ทั่วโลกในป่าเขตฝนตกชุก(rain-forest zone) ที่มีปริมาณน้ำฝนสูงถึง 1,300 มิลลิเมตรต่อปี ในป่าแถบเส้นศูนย์สูตร (equatorial forest) มักพบชนิดของพืชที่เป็นโรครากมากกว่าพืชในแถบอบอุ่น (temperate-zone forest) จากการสำรวจชนิดของพืชอาศัยพบว่าโดยเฉลี่ยในพื้นที่ 1 เฮกตาร์พบพืชที่เป็นโรครากมากกว่า 200 ชนิด แต่อย่างไรก็ตามชนิดของพืชที่อ่อนแอต่อโรคมีค่อนข้างน้อย การพัฒนาและการลุกลามจึงเกิดเฉพาะจุดเล็ก ๆและค่อนข้างช้า จึงพบต้นไม้ในป่าเป็นโรคเพียง 2-7 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น โรครากพบระบาดมากในป่าที่อยู่ในแนวเส้นศูนย์สูตรซึ่งมีลักษณะสภาพทางภูมิศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน การบุกรุกทำลายป่าเพื่อการเกษตรเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมการแพร่ระบาดของโรคนี้ เช่น การทำลายป่าเพื่อปลูกยางพาราซึ่งเป็นพืชอาศัยชนิดหนึ่งของเชื้อราโรครากเชื้อราที่ยังมีชีวิตอยู่ตรงส่วนรากและบริเวณโคนต้นของไม้ป่าที่ถูกตัดโค่นเดิมระบาดไปยังต้นยางที่ปลูกใหม่ โดยรากของ

ต้นยางที่ปลูกใหม่เจริญไปสัมผัสกับแหล่งเชื้อเหล่านั้น (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2533, Nandris *et al.*, 1987) หรือสัมผัสกับไรโซมอฟของเชื้อราที่เจริญอิสระอยู่ในดิน เชื้อราที่เข้าทำลายรากยางจะเจริญจากจุดสัมผัสไปตามรากจนถึงโคนต้น ทำให้ต้นยางที่ปลูกใหม่ตายและกลายเป็นแหล่งเชื้อแห่งใหม่ต่อไป ปริมาณของแหล่งเชื้อจากต้นไม้ป่าเดิมจะมีผลต่อการเกิดโรค และปริมาณโรคของพืชใหม่ด้วย

4. กระบวนการการเข้าทำลาย

เชื้อ *R. lignosus* ทำลายหรือย่อยสลายลิกนินในผนังเซลล์ (Nandris *et al.*, 1987) สามารถผลิต lytic enzymes ในการย่อยสลายพวกสารประกอบคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์ของไม้เนื้อแข็งได้เช่นเดียวกับเชื้อราทำลายเนื้อไม้อื่น ๆ เช่น เอนไซม์ cellulolytic เป็นเอนไซม์หลักที่ผลิตขึ้นในช่วงการเข้าทำลายของเชื้อเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสที่อยู่ในท่อน้ำ(xylem) ท่ออาหาร (phloem) และ เฟลเลม(phellem) เพื่อให้ง่ายต่อการแทงผ่านของเส้นใยเชื้อ การเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชของเชื้อราเกิดขึ้นได้เฉพาะเมื่อการเจริญอย่างรวดเร็วของไรโซมอฟไม่สามารถหาอาหารจากภายนอกได้ (Nicole and Benhamou, 1991) จึงปล่อยเอนไซม์เซลลูเลส(cellulase) ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อต้องการอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนก่อนจะเข้าไปย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลสเพื่อเจริญอยู่ภายในเซลล์พืช นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์แลคเคส(laccases) ซึ่งเชื้อราปลดปล่อยออกมาในช่วงการแทงผ่านเข้าไปในรากของต้นยาง เอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทในการควบคุมเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อย่อยสลายลิกนินและทำให้มีการสะสมของฟีนอล ซึ่งมีผลในการต่อต้านการสร้างลิกนินของพืชด้วย จากการศึกษาของ Nicole และ Benhamou (1991) พบว่าต้นยางอายุน้อยสามารถชักนำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่ายกว่าต้นยางอายุมาก ซึ่งกระบวนการหรือกลไกการเข้าทำลายของเชื้อ *R. lignosus* สามารถสรุปได้ 3 ขั้นตอนคือ

1) ไรโซมอฟของเชื้อราเจริญอยู่บนผิวรากภายนอก(ectotrophic growth habit)

2) เมื่อไม่มีอาหารจากภายนอก เชื้อราจะเข้าทำลายเซลล์รากพืชโดยไรโซมอฟเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีผนังเซลล์บางขึ้นเพื่อการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช(infectious hyphae) และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม(morphogenetic) เพื่อปลดปล่อย extracellular enzymes เข้าย่อยสลายเนื้อไม้ (Nandris *et al.*, 1987) เส้นใยของเชื้อเข้าสู่รากทางรูเปิดธรรมชาติ เช่น เลนติเซล (lenticels) ทางบาดแผล หรือโดยการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยเซลล์ผิวรากของพืช ซึ่ง Nandris และคณะ (1987) รายงานว่ากระบวนการนี้เกิดขึ้นในสภาพดินขาดออกซิเจน

3) เส้นใยเจริญอยู่ภายในเซลล์พืชโดยการย่อยผนังเซลล์ของระบบท่อน้ำ ท่ออาหาร และ แพร่กระจายสู่เซลล์อื่นโดยการแทงผ่านทางช่องว่างและท่อต่าง ๆของเซลล์ จึงสามารถพบเส้นใยเชื้อราได้ทั้งระหว่างเซลล์ ในเซลล์ และในผนังเซลล์ และพบว่าการที่เชื้อเจริญอยู่ภายในท่ออาหารทำให้น้ำยางตกตะกอนจับเป็นก้อนส่งผลให้ปริมาณน้ำยางในต้นยางลดลงด้วย

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) เนื้อเยื่อของพืชเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *R. lignosus* นั้นพบการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในปริมาณมากเป็นเอนไซม์หลัก ในขณะที่เชื้อราทำลายเนื้อไม้อื่นเช่น *P. noxius* จะสร้าง glycosidase และ polysaccharidases เป็นหลัก

5. ความสำคัญและการสูญเสีย

ในประเทศมาเลเซียโรครากขาวมีความสำคัญกว่าโรคยางชนิดอื่น จากการศึกษาผลกระทบของโรครากต่อจำนวนต้นที่เหลือและผลผลิตรวมของยางต่อเฮกตาร์ของ Fox (1977) โดยการสำรวจเพื่อการคาดเดาระยะการให้ผลผลิต (life yield) ของยาง โดยแสดงการคำนวณปริมาณผลผลิตของต้นยางแต่ละต้นในต้นยางที่เปิดกรีด 8 หน้ากรีด เป็นเวลา 38 ปี ในสวนยางที่ไม่เป็นโรค เป็นโรคระดับความรุนแรงน้อย รุนแรงปานกลาง และรุนแรงมาก พบว่าจำนวนต้นที่เหลือและผลผลิตรวมต่อเฮกตาร์เท่ากับ 90, 66, 53, และ 35 เปอร์เซ็นต์ และ 100, 81, 71, และ 56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการศึกษาผลผลิตเฉลี่ยเป็นเวลา 4 ปี ในแปลงที่เป็นโรครากขาวและโรครากแดงที่ไม่มีการควบคุมและจัดการโรคเลยพบว่าผลผลิตจะลดลงทุกปี คือในปีที่ 1, 2, 3, และ 4 จะให้ผลผลิตเท่ากับ 953, 897, 861, 659 และ 1155, 985, 939 และ 885 ปอนด์ต่อเฮกตาร์ ตามลำดับ

ตัวอย่างผลกระทบของโรครากจากเชื้อสาเหตุ 4 ชนิด คือ *R. lignosus, G. philippii, P. noxius* และ *A. mellea* จากพื้นที่ปลูกยางในประเทศอาฟริกาตะวันตก (Fox, 1977) ในสวนยางที่ปลูกจากต้นกล้าในปี ค.ศ. 1957 และ ปลูกจากต้นตอตาในปี ค.ศ. 1957, 1958, 1959, 1960 และ 1961 โดยเปรียบเทียบการสำรวจในปี ค.ศ.1963 ซึ่งเป็นช่วงที่ยังไม่มีมาตรการในการควบคุมโรค กับปี ค.ศ.1970 ซึ่งเป็นปีที่สำรวจหลังจากได้ดำเนินการการควบคุมโรคแล้ว หลังปี ค.ศ. 1963 พบว่ามีต้นยางที่ตายจากโรครากดังกล่าวในปี ค.ศ. 1963 ถึง 32, 26, 36, 40, 28 และ 31 เปอร์เซ็นต์ และในปี ค.ศ.1970 มีต้นยางตายถึง 49, 46, 45, 42, 26 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อสำรวจจำนวนต้นยางที่เหลืออยู่ในปี ค.ศ.1970 โดยรวมต้นยางที่เป็นโรคแล้วหายจากการได้รับการรักษา พบว่าต้นยางที่ปลูกในปีต่าง ๆนั้นเหลืออยู่เพียง 41, 36, 45, 47, 54 และ 57 เปอร์เซ็นต์ จึงเห็นได้ว่าหากไม่มีการป้องกันในระยะแรกแล้วต้นยางมีโอกาสถูกทำลายโดยโรครากมากขึ้น ซึ่งมีผลกระทบต่อผลผลิตและรายได้ของเกษตรกรและรายได้ของประเทศเป็นอันมาก

6. การควบคุมโรครากขาวของยางพารา

ตั้งแต่มีการปลูกยางเพื่อการค้าสำหรับอุตสาหกรรมเป็นต้นมา เชื้อราโรครากนับเป็นปัญหาและอุปสรรคมาแต่ต้น ทำให้จำนวนต้นยางลดลง บางครั้งเกิดความเสียหายถึงระดับที่รุนแรง สถาบันวิจัยยางของหลายประเทศในทวีปเอเชียและอาฟริกาใต้ได้มีการศึกษาและปรับปรุงวิธีการควบคุมตลอดช่วง 70 กว่าปีที่ผ่านมา แต่ยังไม่มีวิธีการที่ได้ผลเท่าที่ควร (Nandris *et al.*, 1987) พงษ์เทพ ขจรไชยกูล (2533) รายงานว่าการควบคุมโรครากยางจำเป็นต้องปฏิบัติตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมปลูก จนถึงระยะที่ให้ผลผลิตตลอดช่วงอายุของยาง

การป้องกันและควบคุมโรคในช่วงเตรียมแปลง และในช่วงปลูก ทำได้โดยการทำความสะอาดแปลง และปลูกพืชที่ไม่เป็นพืชอาศัยก่อนปลูกยาง เช่น ข้าว (Nandris *et al.*, 1987) การปลูกพืชคลุมดินหรือพืชแซมในระหว่างแถวยางสามารถลดและป้องกันการเกิดโรคได้ในระดับหนึ่ง เนื่องจากเป็นการสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของต้นยาง และทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์เจริญได้ดี ช่วยในการย่อยสลายและทำลายแหล่งเชื้อที่เป็นสาเหตุโรครากได้ (Fox, 1965 อ้างโดย Liyanage, 1992) พงษ์เทพ ขจรไชยกูล (2533) รายงานว่าพืชคลุมสกุลถั่วที่เหมาะสม คือ *Paspalum conjugatum* Berg., *Calopogonium mucunoides Desv.*, *Centrosema pubescenes* Benth.และ *Pueraria phaseoloides Benth.* พืชตระกูลถั่วบางชนิดที่เป็นไม้พุ่ม มันสำปะหลัง และ สีเสียด ไม่เหมาะที่จะปลูกเป็นพืชแซมยาง เนื่องจากมีรากขนาดใหญ่และเป็นพืชอาศัยของเชื้อราโรครากมีการแนะนำให้ขุดคูรอบลำต้นที่เป็นโรคเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของรากสู่ต้นข้างเคียง (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2533 และ Nandris *et al.*, 1987) แต่วิธีการนี้ค่อนข้างยุ่งยากต้องใช้แรงงานมาก ไม่เหมาะกับพื้นที่ขนาดใหญ่ที่เกิดโรคกระจายหลายจุด

สำหรับการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคปัจจุบันถือว่าเป็นวิธีที่สะดวกง่ายกว่าวิธีการอื่น จากการทดสอบของ Hoong และคณะ (1991) ได้ทำการทดสอบสารเคมีชนิดดูดซึม 3 ชนิด ในแปลงยางเป็นโรคในประเทศมาเลเซีย คือ Bayleton (triadimefon), Bayfidan (triadimenol) และ Tilt (propiconazole) อัตรา 10 กรัม, 10 มิลลิลิตร และ 7.5 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตรต่อต้นตามลำดับ โดยราดรอบโคนต้นสามารถรักษาต้นยางที่เป็นโรคในระดับเล็กน้อยถึงปานกลางได้ และ อัตรา 15-20 กรัม, 20 มิลลิลิตร และ 7.5 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตรต่อต้นตามลำดับสามารถรักษาต้นยางที่เป็นโรคในระดับค่อนข้างรุนแรงให้หายได้ ส่วนสารเคมีชนิดอื่น เช่น คาลิกซิน (tridemorph) และ pentachloronitrobenzene (PCNB) มีประสิทธิภาพในการควบคุมและรักษาโรคได้เช่นกัน (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2533, Liyanage *et al.*, 1984)

การจัดการดินเป็นมาตรการหนึ่งที่ใช้ในการป้องกันโรครากขาว ซึ่งในดินมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อจุลินทรีย์ดิน เชื้อสาเหตุของโรคและการเกิดโรคของพืช เช่น แร่ธาตุ ระดับ pH และความชื้นเป็นต้น (Gladstone and Moorman, 1989, Meyer and Shew, 1991, Singh, 1991 และ Ownley *et al.*, 1992) ปริมาณของแร่ธาตุบางชนิดที่ให้ในรูปของปุ๋ย(form) มาก

หรือน้อยเกินไปมีผลต่อการเกิดโรคพืชเช่น เช่น โรค take-all ของข้าวสาลี พบว่า เมื่อเพิ่มไนโตรเจนในรูปของปุ๋ยแอมโมเนียม สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ ทั้งนี้เนื่องจากมีผลทำให้ pH ของดินลดลงไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อสาเหตุ แต่ถ้าเพิ่มไนโตรเจนในรูปของปุ๋ยไนเตรตทำให้ pH ของดินเพิ่มขึ้นทำให้ระดับความเป็นโรครุนแรงมากขึ้น (Smiley and Cook, 1973) แต่โดยทั่วไปพืชที่ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนมากเกินไป มักอ่อนแอต่อเชื้อโรคที่เป็นปรสิตถาวร (obligate parasite) มากขึ้น ตัวอย่างเช่น โรคราสนิม โรคราแป้ง โรคราน้ำค้าง โรครากปม เป็นต้น แต่จะเพิ่มความต้านทานโรคพืชที่เกิดจากเชื้อที่เป็นปรสิตชั่วคราว(facultative parasite) ในต้นพืชระยะต้นกล้า หรือระยะกำลังเจริญเติบโต (Fageria *et al.*, 1991) นอกจากนี้แร่ธาตุอื่น ๆ เช่น เหล็ก มังกานีส ฟอสฟอรัส และสังกะสี สามารถลดความรุนแรงของโรค take-all ได้เช่นกัน (Reis *et al.*, 1983) Fageria และคณะ (1991) รายงานว่าฟอสฟอรัสมีประโยชน์ในการเสริมสร้างความแข็งแรง และการพัฒนาการของรากของต้นพืช ซึ่งสามารถลดการเกิดโรครากได้ เช่น สามารถลดการเกิดโรครากเน่าจากเชื้อ *Pythium* sp. ลดการระบาดของโรคราดำ (boil smut)ของข้าวโพด และสามารถลดโรคขอบใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของข้าวได้ เป็นต้น ในการศึกษาการควบคุมโรครากขาวของยางพาราโดยการใส่กำมะถันอัตรา 250 กรัมต่อหลุมปลูกลงในหลุมก่อนปลูกยางในพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของโรค พบว่าสามารถลดและป้องกันการเกิดโรคได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Azaldin, 1985) ทั้งนี้เนื่องจากการใส่กำมะถันลงไปในดินมีผลทำให้ระดับ pH ของดินลดลงทำให้เกิดสภาพไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อโรค และเป็นการส่งเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านเจริญเพิ่มขึ้น (Peries and Liyanage, 1983) สำหรับ pH ที่ลดลงของดินไม่มีผลต่อการเจริญของต้นยาง เนื่องจากยางพาราสามารถเจริญได้ดีในช่วง pH 4.5 - 5.0 และสามารถเจริญได้ในดินที่มีระดับ pH กว้างคือ 3.5-7.5 (อรุณ ทรงมณี, 2525) การใช้กำมะถันควบคุมโรครากยางสอดคล้องกับการควบคุมโรคโคนเน่า(basal stem rot) โดยชีววิธีของปาล์มน้ำมันสาเหตุจากเชื้อ *Ganoderma boninense* ซึ่งเป็นเชื้อราจำพวกเห็ดเช่นเดียวกับ เชื้อ *R. lignosus* โดยจากการรายงานของ Singh (1991) พบว่า *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ และการใส่กำมะถันลงไปในดินรอบต้นปาล์มน้ำมันทำให้เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านเจริญได้ดีขึ้นและลดการเกิดโรคโคนเน่าของปาล์มน้ำมันได้ นอกจากนี้ pH ของดิน แร่ธาตุ ปุ๋ย หรือชนิดของดินก็มีผลต่อการเกิดโรคของปาล์มน้ำมันได้ด้วยเช่นกัน เช่น ในดินเหนียวที่มี pH ค่อนไปทางด่าง และมีคลอไรด์สูง ปุ๋ยโพแตสเซียมคลอไรด์(muriate of potash : KCl) ลดการเกิดโรคได้ ในขณะที่ปุ๋ยยูเรีย และปุ๋ยฟอสเฟต (rock phosphate) ส่งเสริมการเกิดโรค

Sudirman และคณะ (1992) ได้ทำการทดลองใช้เชื้อราจำพวกเห็ด 3 ชนิด ได้แก่ *Lentinus squarrosulus* Mont., *Cerena meyenii* (Kl.) Hans. และ *Gloeophyllum striatum* (Fr.) Murr. เพื่อควบคุมเชื้อ *R. lignosus* ในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อ *L. squarrosulus* เป็นเชื้อราต่อต้านเชื้อ *R. lignosus* ได้ดีที่สุดและพบว่าสารสกัดจากน้ำกรองเชื้อ *L. squarrosulus*

ที่ระดับ pH 5 มีประสิทธิภาพในการใช้ต่อต้าน *R. lignosus* ได้ดีที่สุด และยังมีประสิทธิภาพได้ถึงระดับ pH 10 นอกจากนี้สารปฏิชีวนะ(antibiotic compound) ของเชื้อราชนิดนี้มีความทนร้อนสูง พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที สารปฏิชีวนะยังคงมีประสิทธิภาพในการต่อต้านได้ดี Jollands (1983) อ้างโดย Liyanage (1992) ได้ทำการศึกษาการเป็นเชื้อต่อต้านของเชื้อราที่แยกได้จากดินในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อ *T. viride* Pers. ex S. F. Gray, *T. harzianum* Rifai และ *Gliocladium roseum* (Link) Bainier มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราต่อต้านเชื้อ *R. lignosus* นอกจากนี้ได้มีการทดลองควบคุมโรครากขาวโดยการใช้สารเคมี คือ triadimefon และ tridemorph ร่วมกับเชื้อ *Trichoderma* sp. โดยการใส่เชื้อราหลังจากใช้สารเคมีแล้ว 2 เดือนพบว่าเชื้อ *Trichoderma* sp. สามารถเพิ่มปริมาณอยู่ในดินเป็นปริมาณมาก (Hashim, 1990 อ้างโดย Liyanage, 1992) ซึ่งการทดลองนี้อาจเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้ควบคุมโรครากขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะอาการของโรครากขาวของยางพาราและพิสูจน์เชื้อตามหลักของ Koch
2. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อ *R. lignosus* ในห้องปฏิบัติการ
3. ศึกษาแนวทางในการควบคุมและป้องกันการเกิดโรครากขาวของยางพาราสาเหตุจากเชื้อ *R. lignosus* โดยชีววิธี

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์จากประเทศอินโดนีเซีย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อราและอาหารที่เป็นส่วนประกอบได้แก่ potato dextrose agar, malt extract agar, V-8 , sucrose, peptone, dextrose, glucose, yeast extract, corn meal และ วุ้น ผง เป็นต้น
3. สารเคมีต่าง ๆ ได้แก่

   $CaCO_3$, $FeSO_4.7H_2O$, KCl, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, $NaNO_3$, NH_4NO_3, Thiamine-HCl, urea

   chloramphenicol

   p-dimethylaminobenzenediazo sodium sulfonate (Dexon 60 w.p.)

   pentachloronitrobenzene (Terraclor 75 w.p.)

   rose-bengal (tetrachlorotetradiofluorescein)
4. สีย้อมเชื้อรา เช่น lactophenol cotton blue
5. เอทธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์
6. คลอรอกซ์ (clorox) และสารเคมีอื่น ๆที่จำเป็น

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่

   จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

   ฟลาสก์ ขนาด 125, 250, 500 และ1,000 มิลลิลิตร

   บีกเกอร์ขนาด 50, 100, 200, 500,และ 1,000 มิลลิลิตร

   กระบอกตวง และเครื่องแก้วอื่น ๆ
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. เครื่องวัด pH
4. เครื่องเขย่าหลอด (vortex mixer)
5. ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)
6. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)

6. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
7. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
8. ตู้ปรับอุณหภูมิ (incubator)
9. เครื่องกรองอย่างละเอียด (millipore membrane filter)
10. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
11. กล้องจุลทรรศน์ และอุปกรณ์ประกอบ เช่น เลนส์วัดขนาดเซลล์ เครื่องนับเซลล์ (hemacytometer)

วิธีการ

1. ลักษณะอาการของโรค การเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อสาเหตุ

ศึกษาลักษณะอาการของต้นยางที่เป็นโรครากขาวในแหล่งระบาด คือในสวนยาง อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร, อำเภอกระบุรี จังหวัดระนอง, อำเภอท้ายเหมือง จังหวัดพังงา และอำเภอสุไหงปาดี จังหวัดนราธิวาส โดยสังเกตจากลักษณะทรงพุ่ม ต้นยางที่ตาย ลักษณะของรากที่เป็นโรค และดอกเห็ดที่โคนต้นยางที่เป็นโรคและตาย

ทำการเก็บตัวอย่างดอกเห็ดและรากยางที่เป็นโรคในระยะลุกลามซึ่งเนื้อไม้มีลักษณะเป็นสีขาวครีมและแข็ง เพื่อนำมาแยกเชื้อราสาเหตุให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากราก โดยทำความสะอาดผิวรากเป็นโรคด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์แล้วใช้มีดผ่าตัดลนไฟฆ่าเชื้อแซะเนื้อเยื่อข้างในเป็นชิ้นเล็ก ๆเพาะเลี้ยงบน PDA หรือโดยการตัดเนื้อไม้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และทำความสะอาดผิวภายนอกด้วยคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ประมาณ 2-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง และนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อบน PDA บ่มเลี้ยงในสภาพห้องปฏิบัติการ 3-5 วัน แล้วแยกเชื้อราบริสุทธิ์โดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเส้นใยที่บริเวณขอบโคโลนี (hyphal tip isolation technique) ของเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยค่อนข้างหยาบ สีขาวลงเลี้ยงบนอาหาร PDA slant ในหลอดทดลอง บ่มเลี้ยงประมาณ 5 วัน แล้วแยกเลี้ยงเชื้อบน PDA ในจานทดลองเพื่อขยายเชื้อสำหรับการศึกษาต่อไป

สำหรับการแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากดอกเห็ดโดยใช้ดอกเห็ดสดที่ไม่เปียกน้ำ ทำความสะอาดผิวภายนอกดอกเห็ดโดยเช็ดด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ฉีกหรือผ่าดอกเห็ดด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วและใช้เข็มเขี่ยเชื้อหรือปลายมีดที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดเนื้อเยื่อดอกภายในมาเพาะเลี้ยงบน PDA หรือทำความสะอาดดอกโดยล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วตัดดอกด้วยมีดฆ่าเชื้อเป็นชิ้นเล็ก ๆ ล้างด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อบน PDA บ่มเลี้ยงในสภาพห้องปฏิบัติการ 3-5 วัน จากนั้นแยกและเลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากราก

2. การพิสูจน์เชื้อและการพิสูจน์โรค

2.1 การพิสูจน์เชื้อ

2.1.1 ศึกษาลักษณะของเส้นใยและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MA

<u>วิธีการ</u> เพาะเลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยใช้ก้อนเชื้อราที่เจาะด้วย cork borrer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรบริเวณ

ขอบโคโลนี ของเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน วางลงบนจุดกึ่งกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อในจานทดลองปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการทดลองสายพันธุ์ละ 4 ซ้ำ จากนั้นบ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทำ slide culture โดยการตัดอาหารวุ้น PDA บริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่แยกบริสุทธิ์ได้เป็นสี่เหลี่ยมจตุรัสขนาด 5x5 มิลลิเมตร วางบนสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้วและปิดทับด้วย cover slip วาง slide culture ในจานอาหารที่ให้ความชื้นโดยใช้สำลีชุบน้ำกลั่นบ่มเลี้ยงไว้ประมาณ 3 วัน จากนั้นเอาชิ้นวุ้นออกและย้อมเส้นใยด้วย lactophenol cotton blue และนำไปศึกษาลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การบันทึกผล -วัดขนาดการเจริญของเส้นใยโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อในแนวตั้งฉากกันทั้ง 2 แนวทุกวันจนเชื้อเจริญเต็มจานทดลอง

-บันทึกลักษณะของเส้นใย

2.1.2 ทำให้เชื้อราสร้างดอกเห็ด ศึกษาลักษณะดอก ลักษณะสปอร์ และอื่น ๆ

วิธีการ ทำให้เชื้อราทุกสายพันธุ์ที่แยกบริสุทธิ์ได้สร้างดอกเห็ด โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราทุกสายพันธุ์ในก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเห็ดในถุงพลาสติก สูตรอาหารที่ใช้คือ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา รำ น้ำตาลทราย และน้ำ อัตราส่วน 100:3:2:50 โดยน้ำหนัก ผสมให้เข้ากันบรรจุในถุงพลาสติกทนร้อน ถุงละ 600 กรัม (ดัดแปลงจากการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือ โดย ศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์ และคณะ, 2531) นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็น ใส่เชื้อที่เลี้ยงบน PDA หรือในเมล็ดข้าวฟ่างบ่มไว้ในสภาพเรือนเพาะเห็ด อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้ออกดอกดังนี้คือ 1)เมื่อก้อนเชื้ออายุ 1 เดือนครึ่ง เปิดถุงพลาสติกออกแล้วนำไปฝังในดินซึ่งบรรจุในถุงเพาะชำสีดำขนาดใหญ่และรดน้ำให้ความชื้นทุกวัน และ 2)เมื่อก้อนเชื้ออายุ 3 เดือน เปิดถุงพลาสติกออกและรดน้ำให้ความชื้นทุกวัน

การบันทึกผล -บันทึกระยะเวลาที่เชื้อราเริ่มสร้างดอก

-ศึกษาลักษณะของดอกเห็ด และ ลักษณะของสปอร์ของเชื้อรา โดยดักจับสปอร์จากดอกเห็ดด้วยการวางแผ่นสไลด์ไว้ใต้ดอกเห็ดในช่วงเวลา 7.00-9.00 นาฬิกา ประมาณ 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

2.2 การพิสูจน์โรค

วิธีการ ทำให้ต้นกล้ายางแสดงอาการของโรคและนำรากที่เป็นโรคมาแยกเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกบริสุทธิ์ได้ทุกสายพันธุ์จากวิธีการที่ 1 ในก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเห็ดในถุงพลาสติกเช่นเดียวกับวิธีการที่ 2.1.2 แล้วนำก้อนเชื้ออายุ 1 เดือนครึ่งไปฝังในดินซึ่งบรรจุในถุงเพาะชำสีดำขนาดใหญ่ตรงกลางและปลูกต้นกล้ายางอายุ 1 ปี ห่างจากก้อนเชื้อ 2

นิ้ว ถุงละ 3 ต้น สายพันธุ์ละ 5 ถุง รดน้ำให้ความชื้นทุกวัน เมื่อพบต้นกล้ายางแสดงอาการของโรคให้นำรากยางของต้นกล้าที่เป็นโรคไปแยกเชื้อบริสุทธิ์ตามวิธีการที่ 1

การบันทึกผล -บันทึกการแสดงอาการเป็นโรคของต้นกล้ายาง
-บันทึกลักษณะของเชื้อราที่แยกบริสุทธิ์ได้
-บันทึกลักษณะอื่นๆ เช่น การสร้างดอกเห็ดที่โคนต้นกล้ายางที่ตายเนื่องจากโรค

3. ลักษณะทางสรีรวิทยา

การศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อ *R. lignosus* ใช้เชื้อราสายพันธุ์จาก อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพรเพียง 1 สายพันธุ์

วิธีการ

การเตรียมเชื้อเพาะ (inoculum) โดยเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานทดลอง เมื่อจะทำการทดลองจึงย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใหม่จนมีอายุครบ 5 วัน จึงใช้ cork borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรตัดบริเวณขอบโคโลนีสำหรับเป็นเชื้อเพาะเพื่อใช้เลี้ยงในอาหารที่ทดสอบ การทดสอบการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเหลวทุกการทดลองทำในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยบรรจุอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ยกเว้นการทดสอบ pH ทำในหลอดทดลองขนาด 25x150 มม. และบรรจุอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การวัดการเจริญของเชื้อรา ใช้วิธีชั่งหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย โดยนำเส้นใยออกจากอาหารที่ทดสอบและล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่แห้งซึ่งชั่งน้ำหนักแล้ว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่งอีกครั้ง แล้วหาผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งจะได้ผลลัพธ์เป็นน้ำหนักแห้งของเส้นใย

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ CRD 9 กรรมวิธีๆละ 4 ซ้ำ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว 9 ชนิดคือ Czapek's solution, glucose peptone broth (GPB), potato dextrose broth (PDB), potato dextrose peptone yeast extract broth (PDPYEB), potato dextrose root rubber extract broth (PDRREB), potato dextrose straw extract broth (PDSEB), potato dextrose yeast extract broth (PDYEB), malt extract broth (MEB) และ V-8 ทำการทดลองชนิดละ 4 ซ้ำ จากนั้นบ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

บันทึกผล -วัดการเจริญของเชื้อราเมื่ออายุ 12 วัน

-วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญในอาหารแต่ละชนิด

3.2 แหล่งคาร์บอน

วิธีการ การศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อรา ใช้อาหารพื้นฐาน(basal medium) ซึ่งดัดแปลงจาก Raper และ Miles (1958) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม(C-control) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 9 กรรมวิธี ๆละ 4 ซ้ำ

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ศึกษามี 9 ชนิด คือ เซลลูโลส(cellulose) เดกแตรน (dextran) ฟรุคโตส(fructose) กลูโคส(glucose) แลคโตส(lactose) มอลโตส(maltose) แป้ง (soluble starch) แป้งข้าวเหนียว(sticky rice flour) ซูโครส(sucrose) โดยใช้ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ผสมในอาหารพื้นฐาน ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวแหล่งคาร์บอนต่าง ๆทั้ง 9 ชนิดและในอาหารควบคุม โดยทำการทดลองชนิดละ 4 ซ้ำ แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

บันทึกผล -วัดการเจริญของเชื้อราเมื่ออายุ 12 วัน

-วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญในอาหารแต่ละชนิด

3.3 แหล่งไนโตรเจน

วิธีการ การศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อรา ใช้อาหารพื้นฐานซึ่งดัดแปลงจาก Raper และ Miles (1958) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (N-control) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 9 กรรมวิธี ๆละ 4 ซ้ำ

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ศึกษามี 8 ชนิดคือ แคลเซียมไนเตรต[$Ca(NO_3)_2$], กลูตาเมต(glutamic acid, sodium salt), แอมโมเนียมคลอไรด์(NH_4Cl), แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3), แอมโมเนียมซัลเฟต[$(NH_4)_2SO_4$], เปปโตน(peptone), แอสปาราจีน (L-asparagine) และ ยูเรีย(urea) โดยใช้ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ผสมในอาหารพื้นฐาน ทำการทดลองและบันทึกผลเช่นเดียวกับการศึกษาแหล่งคาร์บอนในวิธีการที่ 3.2

3.4 ระดับ pH ต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ CRD 8 กรรมวิธี ๆละ 5 ซ้ำ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่ระดับ pH ต่าง ๆ 8 ระดับ คือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GPB ที่ปรับระดับ pH ด้วย 0.1 N HCl หรือ 0.1 N NaOH และทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วยอุปกรณ์กรองเชื้อ (millipore membrane filter) บรรจุลงในหลอดทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 25x150 มิลลิเมตรจำนวน 10 มิลลิลิตร ทำการทดลองระดับ pH ละ 5 ซ้ำ และบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในสภาพห้องปฏิบัติการอุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส

การบันทึกผล -วัดการเจริญของเชื้อราเมื่ออายุครบ 9 วัน

-วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญ

3.5 ระดับอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ CRD 7 กรรมวิธี ๆละ 5 ซ้ำ

ศึกษาระดับอุณหภูมิ 7 ระดับคือ 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และบ่มเลี้ยงเชื้อที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ ระดับอุณหภูมิละ 5 ซ้ำในตู้ปรับอุณหภูมิ

การบันทึกผล -วัดการเจริญของเชื้อราเมื่ออายุ 10 วัน

-วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญ

3.6 สภาพแสงต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ CRD 2 กรรมวิธี ๆละ 5 ซ้ำ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ในฟลาสก์ และแบ่งฟลาสก์เป็น 2 ชุด ๆละ 5 ฟลาสก์ โดยชุดแรกหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม ส่วนอีกชุดไม่หุ้ม นำฟลาสก์ที่เลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชุดวางไว้ริมหน้าต่างให้ได้รับแสงสว่างตามปกติ ฟลาสก์ชุดที่หุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมจะไม่ได้รับแสงตลอดการทดลอง ส่วนฟลาสก์ชุดที่ไม่หุ้มจะได้รับแสงประมาณวันละ 12 ชั่วโมง

การบันทึกผล -วัดการเจริญของเชื้อราเมื่ออายุ 12 วัน

-วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญ

3.7 อิทธิพลของปุ๋ยไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเหลว

วิธีการ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ N-control ที่ผสมสารประกอบไนโตรเจน 4 ชนิด คือ ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ โดยใช้สารเคมีบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0(ควบคุม), 0.01, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ และบ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผล -บันทึกระดับ pH ก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อของอาหารในแต่ละความเข้มข้น

-วัดการเจริญของเชื้อราเมื่ออายุ 10 วัน วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญ

3.8 อิทธิพลของกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเหลว

วิธีการ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ N-control ที่ผสมกลูโคส 20.0 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร และผสมกำมะถันที่ระดับความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 0 (ควบคุม), 0.01, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ และบ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผล -บันทึกระดับ pH ก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อของอาหารในแต่ละความเข้มข้น

-วัดการเจริญของเชื้อราเมื่ออายุ 10 วัน วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญ

3.9 อิทธิพลของปุ๋ยแอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย และ กำมะถันในดินต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

วิธีการ ทำการศึกษาอิทธิพลของแอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย และกำมะถันในดินที่นึ่งฆ่าเชื้อและดินที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 5 ระดับคือ 0(ควบคุม), 0.1, 0.2, 0.4 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (ต่อน้ำหนักดินแห้ง)

การเตรียมเชื้อรา เพาะเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* ในหลอดทดลองขนาด 25x150 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุอาหาร PDA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน จำนวน 130 หลอด

การเตรียมดิน นำดินมาผึ่งให้แห้งผสมด้วยแกลบอัตรา 9:1 โดยน้ำหนัก แล้วแบ่งออกเป็น 26 ชุด ๆละ 250 กรัม นำดินผสมจำนวน 13 ชุดนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที ได้ดินที่นึ่งฆ่าเชื้อและไม่นึ่งฆ่าเชื้อชนิดละ 13 ชุด จากนั้นนำดินแต่ละชุดผสมปุ๋ยไนโตรเจนและกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นตามวิธีการทดลองแล้วผสมน้ำกลั่นไร้เชื้อประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ความชื้น สำหรับชุดควบคุมผสมน้ำกลั่นไร้เชื้อประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

แล้วนำดินที่เตรียมไว้บรรจุในหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อไว้ให้สูง 10 เซนติเมตร (ดัดแปลงตามการทดลองของ Hashim, 1985) ปิดปากหลอดด้วยจุกสำลีและกระดาษอลูมิเนียม แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการ ทำการทดลอง 4 ซ้ำ เก็บดินผสมส่วนที่เหลือเพื่อวัดระดับ pH ในวันทดลองและหลังวันทดลอง 1, 3, 5, 7 และ 10 วัน โดยใช้ ดิน:น้ำ เท่ากับ 1:1 (Meyer and Shew, 1991) วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารของดินที่นำมาใช้ศึกษาคือ ปริมาณอินทรียสาร(organic matter) ปริมาณไนโตรเจน(total N) ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์(available P) โพแทสเซียม(K) และ กำมะถัน(S)

การบันทึกผล -วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยวัดความยาวของเส้นใยที่เจริญขึ้นในดินที่บรรจุในหลอดทดลองทุกวันเป็นเวลา 10 วัน วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญ

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

4. การศึกษาและคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

4.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการจำแนกชนิดของเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp.

4.1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากยางที่โคนต้น จากสวนยางที่เป็นโรคโดยเก็บดิน 2 ระดับคือดินบนและดินล่างที่ระดับความลึก 4 นิ้ว (ดัดแปลงจาก Onsando and Waudo, 1994 และ Askew and Laing, 1994) เก็บตัวอย่างสถานที่ละ 6 จุด โดยแยกเก็บบริเวณรากที่เป็นโรค 3 จุด และบริเวณรากที่ไม่เป็นโรค 3 จุด จากสวนยางในภาคใต้ตอนบนคือ จังหวัดชุมพร (3 สถานที่) สุราษฎร์ธานี (2 สถานที่) พังงา (5 สถานที่) ระนอง (2 สถานที่) ภูเก็ต (1 สถานที่) และ จังหวัดนครศรีธรรมราช (1 สถานที่) และจากสวนยางในภาคใต้ตอนล่าง คือใน จังหวัดสงขลา (1 สถานที่) ยะลา (2 สถานที่) และ จังหวัดนราธิวาส (4 สถานที่) รวมทั้งหมด 21 สถานที่ (ตารางภาคผนวกที่ 11)

4.1.2 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์

แยกเชื้อ *Trichoderma* spp. จากดินให้บริสุทธ์ ด้วยวิธี soil plate method บนอาหาร Trichoderma selective agar medium (TSM) (Elad *et al.*, 1981) โดยนำดินบนและล่างแต่ละจุดผสมกันโดยแยกเป็น 2 ชุดคือ ชุดที่เก็บจากบริเวณที่เป็นโรคและชุดที่เก็บจากบริเวณที่ไม่เป็นโรคจากนั้นนำดิน 25 กรัมใส่ในกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 นาที ทำให้เจือจางถึงระดับ 10^{-4} เท่า แล้วนำสารละลายดินที่เจือจางระดับ 10^{-4} เท่า จำนวน 0.1 มิลลิลิตรหยดลงในอาหาร TSM 15 มิลลิลิตรโดยวิธี pour plate ทำ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 3-7 วัน ทำการย้ายเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ลงบน PDA slant โดยวิธี hyphal tip isolation เพื่อจำแนกชนิด และใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ต่อไป

แยกเชื้อ *Chaetomium spp.* จากดินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี baiting technique โดยใช้กระดาษกรองตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 0.5x2.0 เซนติเมตรเป็นเหยื่อล่อ นำดินชุดเดียวกับที่ใช้แยกเชื้อ *Trichoderma* spp. ใส่ในจานทดลองที่ฆ่าเชื้อแล้วประมาณครึ่งจาน ใส่น้ำกลั่นลงในดินให้ทั่วพอหมาดและเรียงกระดาษกรองบนผิวดิน จานทดลองละ 15 ชิ้น ปิดฝา ทำ 3 ซ้ำ และบ่มไว้ในสภาพห้องปฏิบัติการ ประมาณ 15-25 วัน ทำการย้ายเชื้อรา *Chaetomium* spp.โดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ย ascomata ล้างในคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์นาน 2-5 นาที และล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง บ่มเลี้ยงบน PDA slant เพื่อจำแนกชนิด และใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ต่อไป

4.1.3 การจำแนกชนิดของเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีเชื้อ เช่น สี การเกิดวง(zonation) และการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อ *Trichoderma* spp. โดยใช้หนังสืออ้างอิงของ Rifai (1969) และชนิดของเชื้อ *Chaetomium* spp.โดยใช้หนังสืออ้างอิงของ Seth (1970) และ von Arx และคณะ (1986)

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.1 การทดสอบเชื้อ *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากวิธีการที่ 4.1.2 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยใช้เชื้อ *T. harzianum* ที่ใช้ในการควบคุมโรครากขาวของโกโก้ซึ่งเกิดจากเชื้อ *R. lignosus* จากประเทศอินโดนีเซียเป็นตัวเปรียบเทียบ

วิธีการ ปลูกเชื้อ *R. lignosus* ที่เจาะด้วย cork borrer บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตรในจานทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรห่างจากขอบจานทดลอง 1.5 เซนติเมตร หลังจากนั้น 2 วันจึงทำการปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. โดยใช้ปลายเข็มเขี่ยแตะเชื้อที่เลี้ยงไว้บน PDA 5 วันและปลูกเชื้อโดยการแตะบนอาหารเพียงจุดเดียวในด้านตรงข้ามห่างกัน 6 เซนติเมตร ทำการทดลองคู่ละ 3 ซ้ำ

ปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ชนิดเดียวบนจุดกึ่งกลางของอาหาร และปลูกเชื้อ *R. lignosus* ให้เชื้อราห่างจากขอบจานทดลอง 1.5 เซนติเมตรด้านใดด้านหนึ่งเพียงจุดเดียวเพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อรา ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดละ 3 ซ้ำ

การบันทึกผล

-บันทึกผลการยับยั้งเชื้อ *R. lignosus* เมื่อปลูกเชื้อ *R. lignosus* แล้ว 7 วัน โดยวัดระยะของเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่เจริญครอบคลุมโคโลนีของเชื้อ *R. lignosus* จากจุดสัมผัส

-วัดระยะของเชื้อ *R. lignosus* ที่เจริญครอบคลุมโคโลนี *Trichoderma* spp.

-วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทั้งสองแนวที่ตั้งฉากกันของ *Trichoderma* spp.

-วัดรัศมีของโคโลนีเชื้อ *R. lignosus* ที่เจริญเข้าสู่จุดกึ่งกลางอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปลูกเชื้อ *R. lignosus* เพียงชนิดเดียวเมื่ออายุ 3 และ 7 วันตามลำดับ

4.2.2 การทดสอบเชื้อ *Chaetomium* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อ *Chaetomium* spp. ที่แยกได้จากวิธีการที่ 4.1.3 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในจานทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

วิธีการ ปลูกเชื้อ *R. lignosus* และ *Chaetomium* spp. ที่เจาะด้วย cork borrer บริเวณขอบโคโลนีขนาด 0.5 เซนติเมตรบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่จุดตรงข้ามกันระยะห่าง 6 เซนติเมตร ทำการทดลองคู่ละ 3 ซ้ำ บ่มเลี้ยงในสภาพห้องปฏิบัติการ

ปลูกเชื้อ *Chaetomium* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ชนิดเดียวบนจุดกลางของอาหาร สายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ

การบันทึกผล

-บันทึกผลของเชื้อ *Chaetomium* spp. ในการยับยั้งเชื้อ *R. lignosus* ตามลักษณะปฏิกิริยาที่เกิดหลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน คือ

A หมายถึง *R. lignosus* เจริญครอบคลุม *Chaetomium* spp.

B หมายถึง *R. lignosus* และ *Chaetomium* spp.เจริญพบกันแล้วหยุดเจริญ

C หมายถึง *Chaetomium* spp.เจริญครอบคลุม *R. lignosus*

D หมายถึง เกิดบริเวณใส (clear zone) ระหว่างโคโลนีของ *R. lignosus* และ *Chaetomium* spp.

-วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทั้งสองแนวที่ตั้งฉากกันของ *Chaetomium* spp. แต่ละสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในดิน

คัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการเจริญครอบคลุมโคโลนีของเชื้อ *R. lignosus* มากกว่าหรือเท่ากับประสิทธิภาพในการเจริญครอบคลุมของเชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์จากประเทศอินโดนีเซีย และคัดเลือกเชื้อ *Chaetomium* spp. ที่มีปฏิกิริยาการยับยั้งแบบ B หรือ D

การเตรียมเชื้อ *R. lignosus* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองเช่นเดียวกับวิธีการที่ 3.9

การเตรียมดินนึ่งฆ่าเชื้อ เตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมดินในการทดสอบแอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย และกำมะถันตามวิธีการที่ 3.9

การเตรียมดินผสมเชื้อที่ทดสอบ โดยนำดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมกับเชื้อ *Trichoderma* spp. หรือ *Chaetomium* spp. ที่เลี้ยงไว้ในข้าวฟ่าง 15 วัน และน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว อัตรา 100:1:20 (กรัม:กรัม:มิลลิลิตร)

4.3.1 การทดสอบเชื้อ *Trichoderma* spp. ในดิน

วิธีการ บรรจุดินที่ไม่ผสมเชื้อลงในหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* สูง 10 เซนติเมตร จากนั้นบรรจุดินที่ผสมเชื้อทดสอบที่คัดเลือกทับอีก 2 เซนติเมตร ปิดปากหลอดด้วยจุกสำลีและกระดาษอลูมิเนียม ใช้ดินนึ่งไม่ผสมเชื้อเป็นการเปรียบเทียบ (control) ทำการทดลอง 6 ซ้ำ บ่มเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผล

- วัดความยาวของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ที่เจริญในหลอดทดลองทุกวันจนเชื้อในหลอดทดลองเปรียบเทียบเจริญคลุมดิน
- วัดความลึกของดินที่สามารถมองเห็นการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp.
- วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* และ *Trichoderma* spp.

4.3.2 การทดสอบเชื้อ *Chaetomium* spp. ในดิน

วิธีการ บรรจุดินผสมเชื้อทดสอบลงในหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* ให้สูง10 เซนติเมตร ปิดปากหลอดด้วยจุกสำลีและกระดาษอลูมิเนียม ใช้ดินนึ่งไม่ผสมเชื้อเป็นการเปรียบเทียบ (control) ทำการทดลอง 6 ซ้ำ บ่มเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผล

-วัดความยาวของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ที่เจริญในหลอดทดลองทุกวันจนเชื้อในหลอดทดลองเปรียบเทียบเจริญคลุมดิน

-วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

4.4 การทดสอบความเป็นเชื้อราต่อต้านของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในสภาพเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 6 กรรมวิธีๆละ 5 ซ้ำโดยใช้เชื้อ *R. lignosus* (R) ที่แยกบริสุทธิ์ได้จากรากของต้นยางที่เป็นโรครากขาว อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร และคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. (T) จากวิธีการที่ 4.3.1 ที่มีประสิทธิภาพในการเจริญครอบคลุมโคโลนีของเชื้อ *R. lignosus* ได้ดีที่สุด 4 สายพันธุ์มาทำการทดสอบดังนี้คือ

กรรมวิธีที่ 1 ดิน + ต้นกล้ายาง
2 ดิน + ต้นกล้ายาง + R
3 ดิน + ต้นกล้ายาง + R + T1
4 ดิน + ต้นกล้ายาง + R + T2

5 ดิน + ต้นกล้ายาง + R + T3

6 ดิน + ต้นกล้ายาง + R + T4

วิธีการ

1) การเตรียมเชื้อ *R. lignosus* เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ(inoculum source) โดยเลี้ยงในถุงเพาะแบบเห็ดที่มีส่วนผสมของ ขี้เลื่อยยางพารา : รำ : น้ำตาลทราย : น้ำ อัตรา 100 : 3 : 2 : 50 (โดยน้ำหนัก) ถุงละ 400 กรัม บ่มเลี้ยงในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือนครึ่งถึง 2 เดือน

2) การเตรียมเชื้อ *Trichoderma* spp. โดยเลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* spp. ในข้าวฟ่างต้มที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 กรัมซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร สายพันธุ์ละ 6 ฟลาสก์ เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นทำสารแขวนลอยเชื้อ(suspension) โดยใช้เชื้อ 5 ฟลาสก์ ละลายด้วยด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ 1 ลิตร จากนั้นเก็บเฉพาะน้ำที่แขวนลอยสปอร์ผสมกันนำไปนับจำนวนสปอร์ โดยการนับกับกล้องจุลทรรศน์ด้วย hemacytometer และปรับสารแขวนลอยให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์ประมาณ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสม Tween 80 ประมาณ 2-3 หยดต่อลิตร

3) การปลูกเชื้อและการปลูกต้นกล้ายางโดยใช้ต้นกล้ายางอายุ 5-6 เดือน ปลูกในถุงเพาะชำดำขนาดใหญ่ ถุงละ 5 ต้น กรรมวิธีละ 5 ถุง ดังนี้คือ

- ฝังก้อนเชื้อ *R. lignosus* ลงในดินกลางถุง ๆละ 1 ก้อนเชื้อในกรรมวิธีที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 วิธีการละ 5 ถุง
- จุ่มรากต้นกล้ายางที่จะปลูกในกรรมวิธีที่ 3, 4, 5 และ 6 ลงในสารแขวนลอยของเชื้อตามการทดลองเป็นเวลา 5 นาทีก่อนปลูก
- ปลูกต้นกล้ายางที่ไม่จุ่มเชื้อในการทดลองที่ 1 และ 2 เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

4) รดน้ำวันละครั้ง

การบันทึกผล บันทึกจำนวนต้นที่แสดงอาการใบเหลือง และจำนวนต้นที่ตายหลังปลูกเชื้อ 45, 60, 75 และ 90 วัน

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยาภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. สวนยางที่เก็บตัวอย่างดิน จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ระนอง พังงา สงขลา และ จังหวัดนราธิวาส

3. เรือนเพาะชำภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

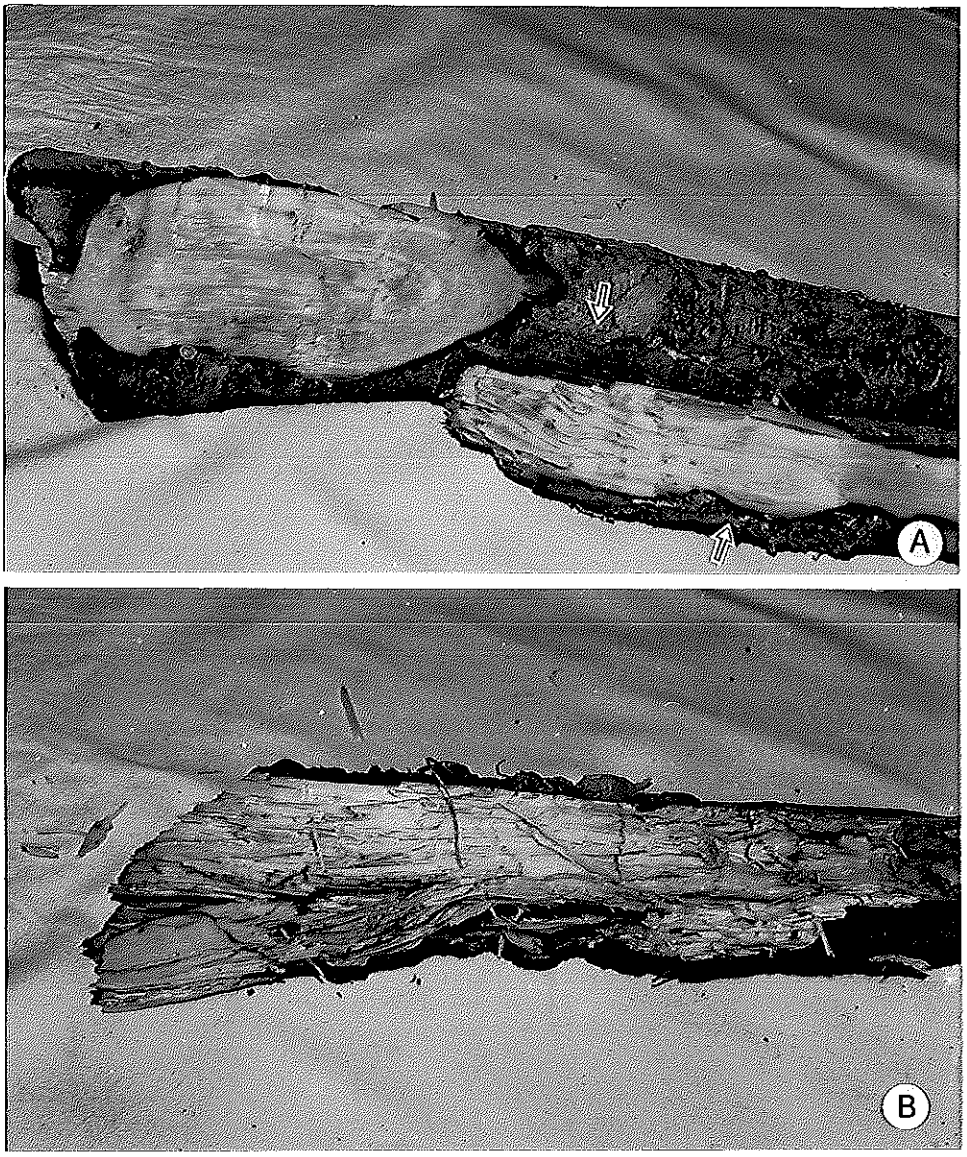
บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการของโรค การเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อสาเหตุ

ได้ทำการศึกษาอาการของโรคในสวนยางที่เป็นโรครา 4 แห่งที่จังหวัดนราธิวาส ระนอง ชุมพร และพังงา ดังรายละเอียดในตารางภาคผนวกที่ 1 ในระหว่างเดือนกรกฎาคม-พฤศจิกายน2537 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝน สามารถสังเกตลักษณะอาการโรคและลักษณะของเชื้อได้ง่ายเนื่องจากเชื้อราจะสร้างดอกเห็ดในช่วงฤดูฝน ลักษณะของโรครากที่สังเกตได้ชัดเจน คือต้นยางที่เป็นโรค พุ่มใบจะเหลือง อาจเหลืองเป็นบางส่วน เหลืองทั้งต้น หรือใบร่วงทั้งต้น ขึ้นกับความรุนแรงของโรค (ภาพที่ 1) ในแต่ละจุดที่พบโรคจะพบหลุมต้นยางเก่าที่ว่างหรือพบต้นยางตายที่จุดกลางและบริเวณรอบนอก หรือบริเวณใกล้เคียงมักพบต้นยางแสดงอาการพุ่มใบเหลือง เมื่อตรวจสอบลักษณะรากของต้นที่แสดงอาการโรค พบว่ารากยางที่เป็นโรคปกคลุมด้วยสายไรโซมอฟของเชื้อรา มีลักษณะนูนกลมสีขาวหรือสีเหลืองส้มหรือสีน้ำตาลแดง ซึ่งแตกสาขาเป็นร่างแหจับติดแน่นและปกคลุมทั่วผิวราก ส่วนลักษณะของเนื้อไม้ที่เป็นโรคพบลักษณะที่แตกต่างกันตามระยะความรุนแรงคือในระยะแรกหรือระยะลุกลามเนื้อไม้จะแข็ง สีขาวหรือสีครีม ต่อมาเนื้อไม้จะฟ่าม เบา และเปื่อยยุ่ย (ภาพที่ 2) ซึ่งลักษณะอาการหลังมักพบในต้นยางที่เริ่มตายใหม่ๆ บริเวณโคนต้นหรือรากของต้นที่ตายเนื่องจากโรคมักจะพบดอกเห็ด สีส้มแก่ อ่อนสลับกันเป็นวง ขอบดอกขาว ลักษณะดอก แข็ง ค่อนข้างหนา ไม่มีก้านชูดอก ขึ้นซ้อนกันมากบ้างน้อยบ้าง จากการสังเกตพบว่าขนาดของดอก และการขึ้นซ้อนกันของดอกมักเกี่ยวข้องกับความชื้นโดยพบว่าดอกเห็ดที่ขึ้นบนโคนต้นยางที่ปกคลุมด้วยวัชพืชซึ่งมีความชื้นสูงลักษณะของดอกจะใหญ่มาก และดอกจะขึ้นซ้อนกันหลายชั้น ซึ่งแตกต่างกับดอกเห็ดที่เกิดบนโคนต้นยางที่โล่งเตียนจะพบดอกเห็ดขนาดเล็ก การซ้อนกันของดอกน้อย ส่วนลักษณะอื่นๆ เช่น ดอกเห็ดขนาดใหญ่และอายุมากจะมีความหนาของดอกน้อยกว่า สีของดอกจะเข้มกว่า และขอบดอกมีขอบขาวแคบกว่าดอกเห็ดที่เพิ่งเริ่มออกหรือที่อายุน้อยกว่า

ภาพที่ 1. สภาพสวนยางพาราอายุประมาณ 8 ปีที่เป็นโรครากขาว ต้นที่เป็นโรคแสดงอาการพุ่มใบเหลือง และร่วง



ภาพที่ 2. ลักษณะของรากยางที่เป็นโรครากขาว

A) ผิวรากปรากฏสายไรโซมอฟที่เปลือกไม้ภายนอก (ลูกศรชี้) และลักษณะเนื้อไม้ในระยะลุกลาม

B) ลักษณะเนื้อไม้ที่เป็นโรคในระยะสุดท้ายมีน้ำหนักเบาและเปื่อยยุ่ย

จากการเก็บตัวอย่างรากที่เป็นโรคและดอกเห็ดจากสวนยาง อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร และจากแปลงผลิตกิ่งตาพันธุ์ BPM 24 สถานีทดลองยางวังทัง อำเภอตะกั่วทุ่ง จังหวัดพังงา และเก็บตัวอย่างได้เฉพาะรากที่เป็นโรคจากสวนยางพันธุ์ RRIM 600 อายุ 4 ปี อำเภอกระบุรี จังหวัดระนอง และแปลงผลิตกิ่งตาพันธุ์ RRIM 600 สถานีทดลองยางนราธิวาส อำเภอสุไหงปาดี จังหวัดนราธิวาส และนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์พบว่าเชื้อราเจริญออกจากเนื้อไม้ และดอกเห็ดหลังจากบ่มเชื้อประมาณ 3-5 วัน เชื้อที่ได้มีลักษณะเส้นใยสีขาวค่อนข้างหยาบซึ่งเชื้อที่แยกได้จากดอกเห็ดและราก และในแต่ละสถานที่มีลักษณะเหมือนกัน ดังนั้นจึงได้ใช้เชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากรากเป็นตัวแทนของเชื้อจากแต่ละสถานที่สำหรับการศึกษาต่อไป โดยกำหนดให้เชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากรากจาก จังหวัดระนอง นราธิวาส ชุมพร และ พังงา เป็นสายพันธุ์ I, II, III และ IV ตามลำดับ

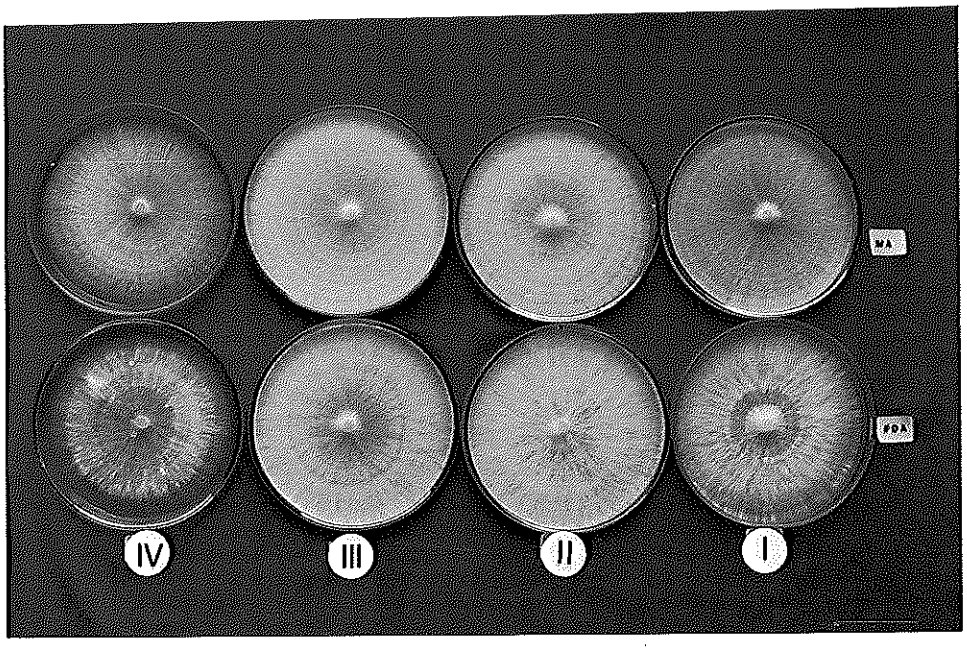
ลักษณะตัวอย่างโรคที่เก็บมาแยกเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เนื่องจากการแยกเชื้อในการทดลองนี้พบว่าการแยกเชื้อจากรากยางที่เป็นโรคมักจะมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียน้อยกว่าที่แยกจากดอกเห็ดทั้งนี้เป็นเพราะดอกเห็ดที่เก็บจากธรรมชาติส่วนใหญ่มักเปียกชื้นด้วยน้ำฝนซึ่งซึมเข้าไปในเนื้อดอก และปนเปื้อนพวกแมลงหรือสัตว์ตัวเล็ก ๆที่กินสปอร์หรือดอกเห็ด ซึ่งสามารถแก้ปัญหาการแยกเชื้อจากดอกเห็ดได้โดยการเก็บดอกเห็ดหรือตุ่มดอกเห็ดที่ออกใหม่ ที่ยังไม่ถูกน้ำฝน การแยกเชื้อจากเห็ดดอกเล็ก ๆแยกง่ายกว่าเห็ดดอกใหญ่เนื่องจากเห็ดดอกเล็ก ดอกจะหนาและไม่เหนียว การเขี่ยเอาเนื้อเยื่อภายในดอกมาเลี้ยงจึงทำได้สะดวกกว่าเห็ดดอกที่มีอายุมากกว่า ส่วนการแยกเชื้อจากเนื้อไม้ต้องเลือกเฉพาะรากที่เป็นโรคขณะที่เนื้อไม้ยังแข็ง เพราะการแยกเชื้อจากเนื้อไม้ที่ฟ่ามแล้วส่วนใหญ่จะไม่ได้ผลเนื่องจากการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ดังนั้นควรเก็บตัวอย่างรากที่เป็นโรคในระยะที่เนื้อไม้ยังแข็ง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ว่ามีเชื้อราเจริญอยู่ในเนื้อไม้หรือไม่ โดยตัดเนื้อไม้เป็นท่อนสั้น ๆ หรือตัดเนื้อไม้ให้เป็นชิ้นพอประมาณ ทำความสะอาดผิวด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 หรือ 75 เปอร์เซ็นต์และนำไปบ่มให้ความชื้น 1-2 คืน จะเห็นเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีขาวเจริญปกคลุมบนผิวไม้ ซึ่งสามารถแยกเชื้อราโดยการเขี่ยเอาเส้นใยด้วยวิธี hyphal tip isolation มาเลี้ยงให้บริสุทธิ์บน PDA ได้อีกวิธีหนึ่ง

2. การพิสูจน์เชื้อ และการพิสูจน์โรค

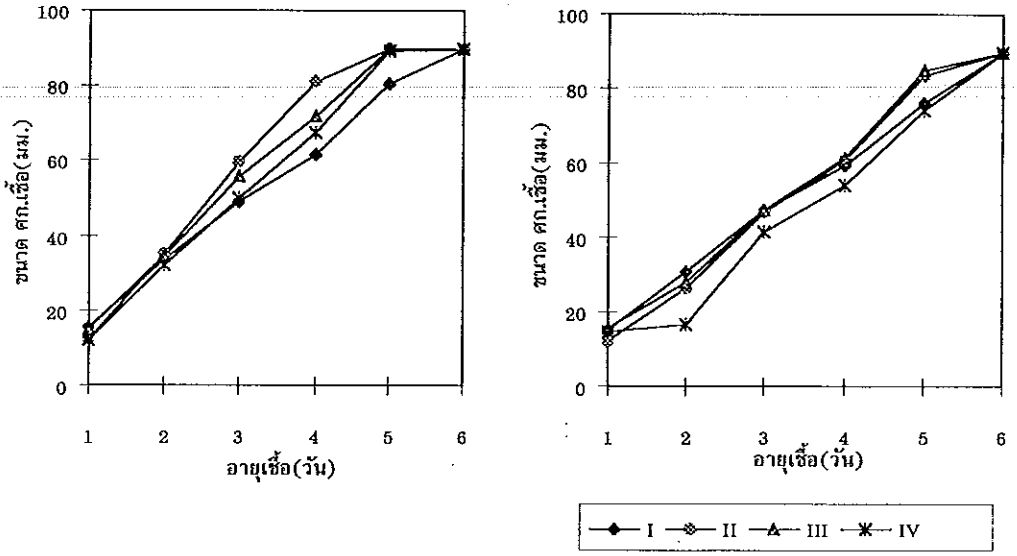
2.1 การพิสูจน์เชื้อ

2.1.1 ลักษณะของเส้นใยและการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MA

จากการเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MA พบว่าลักษณะเส้นใยของเชื้อรา ค่อนข้างหยาบ มีสีขาว ไม่ฟู มีลักษณะเช่นเดียวกับรายงานของ Nandris และคณะ (1987) เมื่อเส้นใยอายุมากขึ้น เส้นใยจับตัวกันเป็นเส้นนูนกลม สีค่อนข้างเหลืองส้ม ปลายเส้นใยค่อนข้างแบนแผ่ออก ลักษณะเส้นใยบน PDA และ MA แตกต่างกันเล็กน้อยคือ บน PDA ลักษณะเส้นใยค่อนข้างละเอียดกว่าบน MA ซึ่งหยาบและปรากฏเป็นเส้นสายชัดเจนกว่า (ภาพที่ 3) จากการเปรียบเทียบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MA ของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อราเจริญไม่แตกต่างกันมากนักคือ เมื่ออายุ 5 วันวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีได้ 8.1-9.0 เซนติเมตร และ 7.5-8.7 เซนติเมตร บนอาหาร PDA และ MA ตามลำดับ (ภาพที่ 4) เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วเชื้อราทุกสายพันธุ์จะเจริญบนอาหาร PDA ได้ดีกว่า MA ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* ที่นิยมใช้กันทั่วไป (Nandris *et al.*, 1987)



ภาพที่ 3. ลักษณะของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* สายพันธุ์ต่าง ๆบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA (บน) และ PDA (ล่าง) หลังปลูกเชื้อ 5 วัน



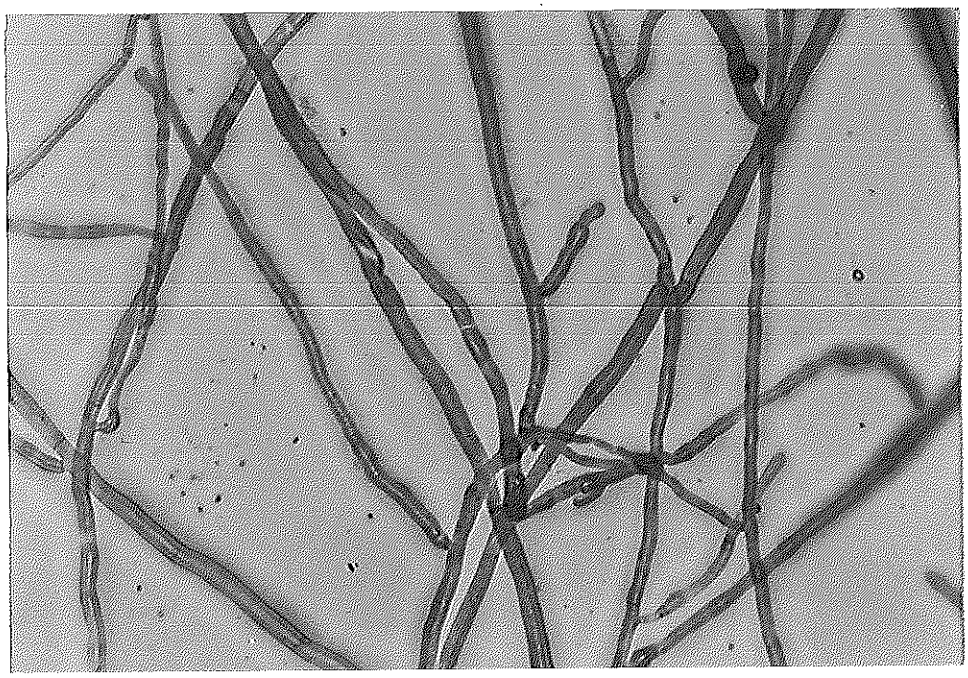
ภาพที่ 4. การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* สายพันธุ์ต่าง ๆบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA(ซ้าย) และ MA(ขวา)

ส่วนลักษณะทางจุลสันฐานของเส้นใยพบว่าเส้นใยใส แตกสาขา มีผนังกั้น (septate) ไม่มี clamp connection กว้าง 1.5-6 μm (ภาพที่ 5) เชื้อราทุกสายพันธุ์มีลักษณะเส้นใยไม่แตกต่างกัน ซึ่งลักษณะของเส้นใยที่ตรวจสอบมีลักษณะเช่นเดียวกับการบรรยายของ Bakshi (1971) แต่มีขนาดของเส้นใยกว้าง 3.4-4.6 μm

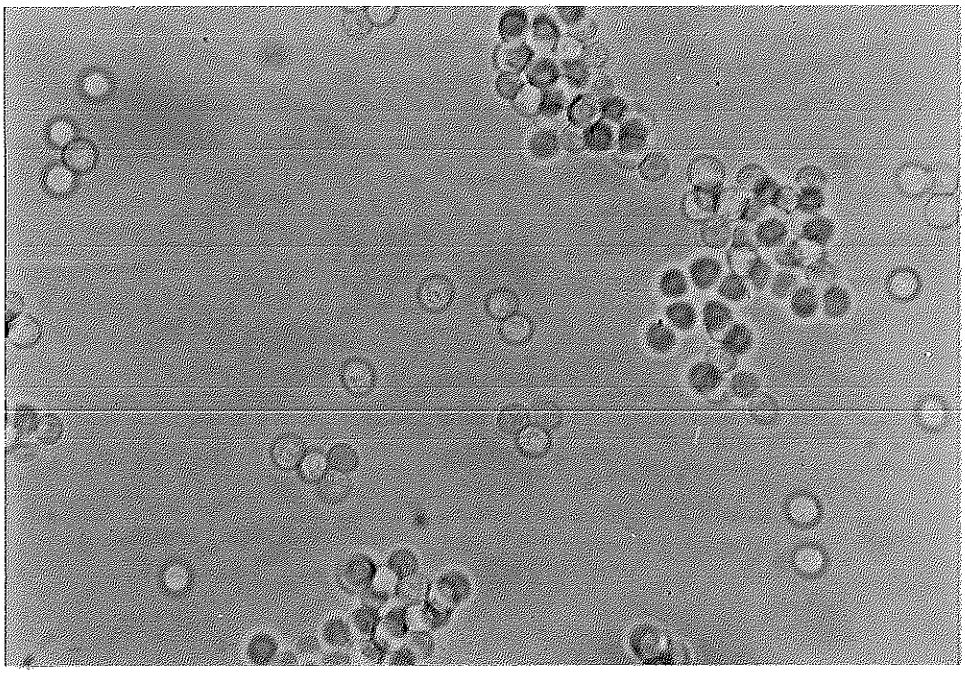
2.1.2 การสร้างดอกเห็ด ลักษณะดอก ลักษณะสปอร์ และอื่น ๆ

การทำให้เชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์สร้างดอกเห็ด โดยเอาถุงพลาสติกออกจากก้อนเชื้อและรดน้ำ ให้ความชื้นทุกวัน พบว่าเชื้อราสร้างดอกเห็ดหลังจากเปิดปากถุงแล้ว 1 เดือนครึ่ง-2 เดือน และ จากการทำให้สร้างดอกเห็ดโดยการนำก้อนเชื้อไปฝังดินในถุงเพาะชำขนาดใหญ่ พบว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์สร้างดอกเห็ดหลังจากฝังดินแล้วประมาณ 2 เดือนที่บริเวณรูระบายน้ำและเหนือดินปากถุง ลักษณะของดอกเห็ดที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกันและเหมือนกับดอกเห็ดในธรรมชาติ คือมีลักษณะแข็ง ไม่มีก้าน ผิวด้านบนสีส้มหรือส้มแดง สีเข้มและอ่อนสลับกันลักษณะเป็นวง ๆ ขอบดอกเห็ดขาว ผิวดอกเห็ดด้านล่างสีส้มจางกว่าผิวบนและปรากฏลักษณะเป็นรูเล็ก ๆ(pore) ทั่วทั้งแผ่นดอกยกเว้นบริเวณขอบ ขนาดของดอกเห็ดจะไม่แน่นอนขึ้นกับความชื้นและอายุ จากการทดลองพบว่าดอกเห็ดที่ได้จากวิธีฝังก้อนเชื้อในดินในถุงเพาะชำดำของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์เมื่ออายุ 2 เดือน มีขนาดเท่ากับ 4.5-5.5 x7.8-8.5 เซนติเมตร Bakshi (1971) รายงานว่าดอกเห็ดมีขนาด 3-9x4-22 เซนติเมตร และหนา 0.3-1.5 เซนติเมตร

ลักษณะของ basidiospore บนกระดาษขาวจะออกสีส้มอ่อน สปอร์เดี่ยว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะ กลม ใส ผิวเรียบ ขนาด 2.5-3 μm ส่วน pore มีลักษณะกลม หรือรี หรือเป็นเหลี่ยมกลม



ภาพที่ 5. ลักษณะเส้นใยของเชื้อ *R. lignosus* มีลักษณะใส แตกสาขามาก มีผนังกั้น และไม่มี clamp connection (400x)



ภาพที่ 6. ลักษณะ basidiospore ของเชื้อ *R. lignosus* มีลักษณะกลม ใส และผิวเรียบ (1,000x)

2.2 การพิสูจน์โรค

เมื่อตรวจสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อ *R. lignosus* ทั้ง 4 สายพันธุ์กับต้นกล้ายางอายุ 1 ปี พบว่าเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ทำให้ต้นกล้ายางเป็นโรคโดยแสดงอาการใบเหลืองและตายหลังปลูกเชื้อภายใน 2 เดือน รากและโคนต้นที่เป็นโรคมีเส้นใยสีขาวปกคลุม เนื้อไม้ของรากสีค่อนข้างคล้ำกว่าต้นปกติ (ภาพที่ 7) ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของเซลล์ส่วนของ middle lamella และ ผนังเซลล์ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยสลายโครงสร้างของพืช (Nandris *et al.*, 1987) Nicole และ Benhamou (1991) รายงานว่าเอนไซม์ที่มีบทบาทมากต่อการทำลายเนื้อไม้ในต้นยางอายุน้อย คือ เอนไซม์แลคเคสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เชื้อราปลดปล่อยออกมาในช่วงการแทงผ่านเข้าไปในราก มีบทบาทในการควบคุมเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายลิกนิน ทำให้มีการสะสมของฟีนอลในเซลล์ จากการทดลองได้ปล่อยต้นกล้ายางที่ตายไว้ต่อไปโดยมีการรดน้ำให้ความชื้นทุกวันปรากฏว่าเกิดดอกเห็ดขึ้นที่โคนต้นกล้ายางที่เป็นโรคหลังจากนั้นภายใน 2 เดือน ลักษณะดอกเห็ดเหมือนกับดอกเห็ดที่ได้ในวิธีการที่ 2.1.2 และเหมือนกับดอกเห็ดที่ขึ้นในธรรมชาติ (ภาพที่8)

เมื่อนำรากที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ไปแยกเชื้อบริสุทธิ์สามารถแยกได้เชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีขาว ค่อนข้างหยาบ เช่นเดียวกับเชื้อที่ได้จากการแยกเชื้อในการทดลองที่ 1

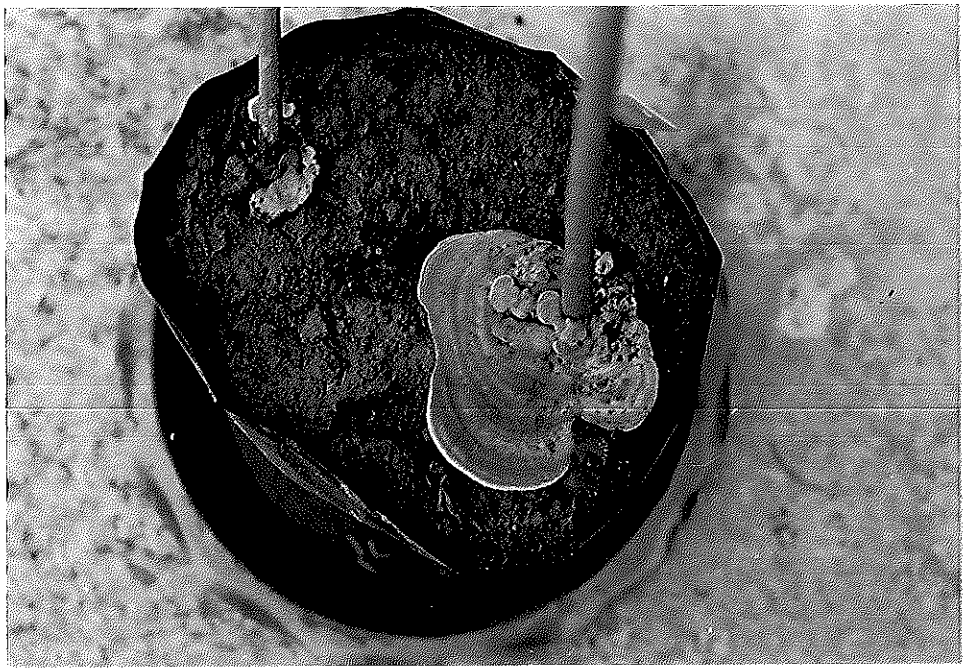
จากการศึกษาข้างต้นนั้นเชื้อราที่แยกบริสุทธิ์ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีลักษณะเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกัน ลักษณะทางจุลสันฐานของเส้นใย และสปอร์เหมือนกัน สามารถทำให้สร้างดอกเห็ดได้ทั้ง 3 วิธีและดอกเห็ดของเชื้อรา ทั้ง 4 สายพันธุ์จากการทำให้สร้างดอกทุกวิธีการมีลักษณะเหมือนกันและเหมือนกับดอกเห็ดในธรรมชาติ เชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถทำให้ต้นยางแสดงอาการของโรคและแยกได้เชื้อราบริสุทธิ์ลักษณะเช่นเดิม จึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อราที่แยกบริสุทธิ์ได้เป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรครากขาวของยางพารา

ภาพที่ 7. ลักษณะของต้นกล้ายางพาราที่เป็นโรครากขาวเปรียบเทียบกับต้นปกติ

A) ลักษณะพุ่มใบ ; (1a) ต้นป็นโรคและ (2a) ต้นปกติ

B) ลักษณะรากภายนอก ; (1b) ต้นเป็นโรคและ (2b) ต้นปกติ

C) ลักษณะเนื้อไม้ของราก ; (1c) ต้นเป็นโรคและ (2c) ต้นปกติ



ภาพที่ 8. ลักษณะของดอกเห็ดของเชื้อ *R. lignosus* บนต้นกล้ายางพาราอายุ 1 ปี

3. ลักษณะทางสรีรวิทยา

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

การศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร potato dextrose straw extract broth โดยวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใยหลังจากปลูกเชื้อได้ 513 มิลลิกรัม ซึ่งแตกต่างจากการเจริญในอาหารเหลวชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือ potato dextrose root rubber extract broth, potato dextrose yeast extract broth และ potato dextrose, potato dextrose peptone yeast extract broth, V-8, glucose peptone broth และ malt extract broth ตามลำดับ ส่วน Czapek's solution นั้นเชื้อราเจริญได้น้อยมาก (ตารางที่ 1) ส่วนระดับ pH ของอาหารทุกชนิดอยู่ในช่วง 5.2-7.3 ซึ่ง pH ในระดับนี้ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเส้นใยดังผลการศึกษาระดับ pH ต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในวิธีการที่ 3.4

ตารางที่ 1. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 12 วัน

ชนิดอาหาร	น้ำหนักแห้ง(มิลลิกรัม)	ระดับ pH
Czapek's solution	2.0f	7.26
Glucose peptone broth	169.5d	5.60
Malt extract broth	106.0e	5.27
Potato dextrose broth	387.5c	5.83
Potato dextrose peptone yeast extract brot	367.0c	5.94
Potato dextrose root rubber extract broth	435.5b	5.61
Potato dextrose straw extract broth	513.0a	5.55
Potato dextrose yeast extract broth	430.0b	5.78
V-8	183.0d	6.94

C.V. = 6.68 %

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.2 แหล่งคาร์บอนต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

การศึกษาความต้องการอาหารจากแหล่งคาร์บอน 9 ชนิดของเชื้อ *R. lignosus* พบว่า เชื้อราสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี ฟรุคโตส มอลโตส กลูโคส เซลลูโลส และแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอน โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือ แป้งข้าวเหนียว ส่วนแลคโตส ซูโครส และเดกแตรน เชื้อราเจริญได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อราสูตรพื้นฐานเล็กน้อย ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) แสดงว่าเชื้อ *R. lignosus* สามารถใช้สารประกอบคาร์บอนที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก(monosaccharide) คือ กลูโคสและฟรุคโตส และสารประกอบคาร์บอนโมเลกุลขนาดใหญ่(disaccharide) คือ มอลโตส หรือสารคาร์โบไฮเตรดเชิงซ้อน(polysaccharide) คือ เซลลูโลส และ แป้งได้ โดยเฉพาะเซลลูโลส เชื้อราที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชและเป็นพวกย่อยสลายพืช(saprophyte) ส่วนใหญ่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์เซลลูเลส ส่วนแป้งเชื้อราส่วนใหญ่สามารถใช้ประโยชน์ในการเจริญได้โดยเอนไซม์อะไมเลส (amylase) (Garraway and Evans, 1984) ส่วนแลคโตส ซูโครส และ เดกแตรนนั้น เชื้อ *R. lignosus* สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้เล็กน้อยหรือไม่ได้เลยเช่นเดียวกับเชื้อราบางชนิด เช่น *Rhizopus nigricans*, *Blakeslea trispora*, *Sordaria fimicola* (Garraway and Evans, 1984) และ เห็ดหูกวาง [*Lentinus strigosus* (Shcwein.) Fr.] (วสันณ์ เพชรรัตน์, 2538b) ซึ่งเจริญได้ดีบนอาหารที่มีกลูโคส หรือ ฟรุคโตส แต่เจริญได้น้อยมากในอาหารที่มีซูโครส

ตารางที่ 2. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในแหล่งคาร์บอน 9 ชนิดหลังปลูกเชื้อ 12 วัน

แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักแห้ง(มิลลิกรัม)
C-control	8.8c
Cellulose	335.0a
Dextran	10.5c
Fructose	351.5a
Glucose	336.0a
Lactose	87.0c
Maltose	344.0a
Soluble starch	289.0a
Sticky rice flour	138.8b
Sucrose	25.0c

C.V. = 28.45 %

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.3 แหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

การศึกษาความต้องการอาหารจากแหล่งไนโตรเจน 9 ชนิด พบว่าเชื้อ *R. lignosus* สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมคลอไรด์ ซึ่งแตกต่างกับการเจริญในแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือ แอสปาราจีน เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และ ยูเรีย ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนจาก กลูตาเมต แคลเซียมไนเตรต และโปแตสเซียมไนเตรต พบว่าเชื้อราเจริญได้ไม่แตกต่างทางสถิติกับอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (ตารางที่ 3) แสดงว่าเชื้อราสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียม ยูเรีย เปปโตน และกรดอะมิโนชนิดแอสปาราจีนได้ และไม่สามารถใช้หรือใช้ไนโตรเจนในรูปของไนเตรตและกรดอะมิโนชนิดกลูตาเมตได้เล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Garraway และ Evans (1984) ที่ว่าเชื้อราส่วนใหญ่สามารถใช้ไนเตรตได้แต่มีเชื้อราบางกลุ่มที่ไม่สามารถใช้ไนเตรตได้คือราจำพวกเห็ดชั้นสูง(higher Basidiomycetes), Saprolegniaceae และ Blastocladiales ซึ่งเข้าใจว่าไม่สามารถผลิตเอนไซม์ nitrate reductase ได้ แสดงว่าเชื้อ *R. lignosus* ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ จึงไม่สามารถใช้ไนเตรตได้ สำหรับกรดอะมิโน เชื้อราส่วนใหญ่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้แต่ไม่ทุกชนิด และบางชนิดใช้ได้ดีสำหรับการเจริญด้านเส้นใย แต่ไม่มีผลต่อการสร้าง

ส่วนขยายพันธุ์อื่นๆ ในทางกลับกันบางชนิดไม่มีผลต่อการเจริญด้านเส้นใยแต่มีผลต่อการสร้างส่วนขยายพันธุ์ และบางชนิดสามารถใช้ได้ในทุกระยะการเจริญของเชื้อ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเชื้อ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนด้วย เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นตัวส่งเสริมการเจริญและบางส่วนมีอิทธิพลต่อการย่อยสลายแหล่งไนโตรเจนสำหรับการนำไปใช้ (Garraway and Evans,1984) ซึ่งจากการทดลองนี้เชื้อ *R. lignosus* สามารถใช้กรดอะมิโนชนิดแอสปาราจีนสำหรับการเจริญด้านเส้นใยได้ แต่ไม่สามารถใช้กรดอะมิโนชนิดกลูตาเมตได้

ตารางที่ 3. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในแหล่งไนโตรเจน 9 ชนิด หลังปลูกเชื้อ 12 วัน

แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
N-control	24.0d
Glutamic acid	74.3d
KNO_3	10.0d
L-asparagine	471.0b
$Ca(NO_3)_2$	47.0d
NH_4Cl	594.5a
NH_4NO_3	300.0c
$(NH_4)_2SO_4$	364.5bc
Peptone	440.5b
Urea	282.5c

C.V. = 32.07 %

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.4 ระดับ pH ต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

การศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหาร GPB ที่ปรับระดับ pH ตั้งแต่ 3-10 พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ที่ระดับ pH 4-10 แต่สามารถเจริญได้ดีที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับระดับ pH อื่นคือที่ระดับ pH 6-7 รองลงมาคือ ระดับ pH 5, 8, 9, 10 และ 4 ตามลำดับ ส่วนระดับ pH 3 เชื้อราเจริญได้น้อยมาก (ภาพที่ 9) สอดคล้องกับการทดลองของ Liyanage และคณะ (1977) ซึ่งได้ทำการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA พบ

ว่าเชื้อราไม่สามารถเจริญได้ที่ระดับ pH 3 และ สามารถเจริญได้ดีถึงระดับ pH 11 แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ระดับ pH 9

3.5 ระดับอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

การศึกษาระดับอุณหภูมิ 6 ระดับต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในอาหาร PDB พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ที่ระดับอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่สุดตามลำดับที่อุณหภูมิ 30, 25 และ 20 องศาเซลเซียส เจริญได้น้อยมากที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 และ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 10) สอดคล้องกับการทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MA ของ Liyanage และคณะ (1977)

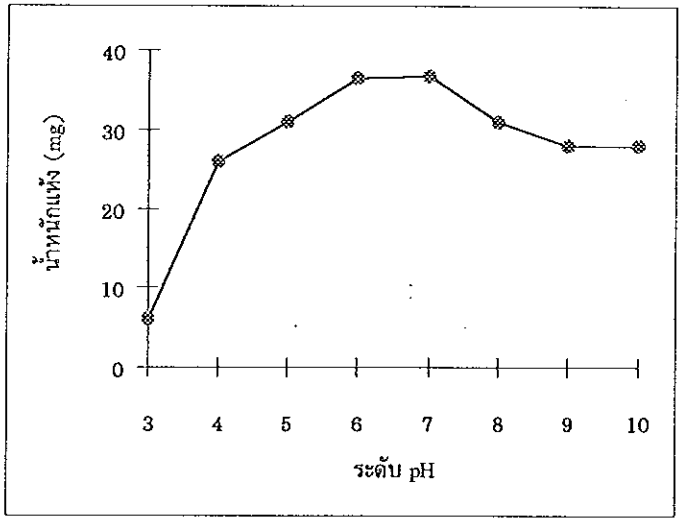
3.6 สภาพแสงต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

การศึกษาสภาพแสงต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในสภาพที่ได้รับแสงสว่างตามปกติประมาณวันละ 12 ชั่วโมง และในสภาพมืดตลอดในห้องปฏิบัติการ พบว่าเส้นใยเจริญได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยหลังจากปลูกเชื้อ 12 วันเท่ากับ 427.7 และ 433.3 มิลลิกรัมตามลำดับ(ตารางที่ 4) แสดงว่าแสงไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เช่นเดียวกับในเห็ดกระด้าง (*Lentinus polycrous* Lev.) ที่แสงสว่างไม่มีอิทธิพลต่อการเจริญในแนวระดับของเส้นใย (วสันณ์ เพชรรัตน์, 2538a) อย่างไรก็ตามชนิดของแสงอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ดังการทดลองของ Liyanage และคณะ (1977) ซึ่งพบว่าเชื้อที่ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์เจริญน้อยกว่าเชื้อที่เลี้ยงไว้ในที่มืด

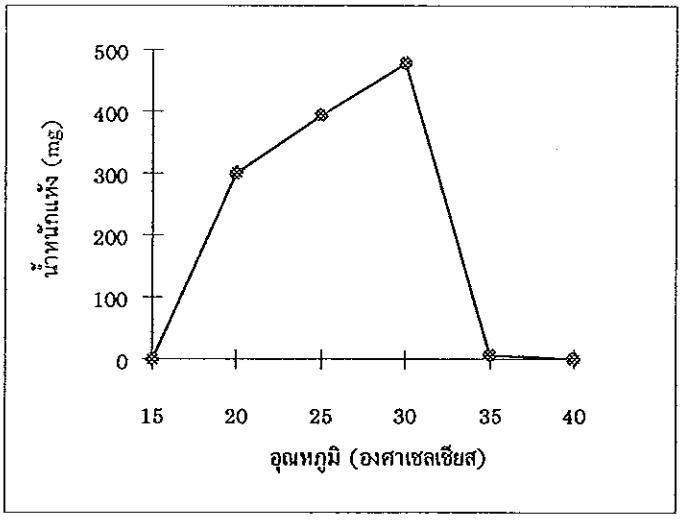
ตารางที่ 4. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในสภาพแสงปกติและสภาพมืดตลอดหลังปลูกเชื้อ 12 วัน

สภาพแสง	น้ำหนักแห้ง(มิลลิกรัม)
ปกติ(แสง 12 ชม.-มืด 12 ชม.)	427.7^{NS}
มืดตลอด	433.3

C.V. = 8.36 %



ภาพที่ 9. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในอาหาร GPB ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่ระดับ pH ต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 9 วัน



ภาพที่ 10. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในอาหาร PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 10 วัน

3.7 อิทธิพลของปุ๋ยไนโตรเจนบางชนิดต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเหลว

การศึกษาผลของยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0(ควบคุม), 0.01, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราสามารถเจริญในอาหารที่ผสมสารทุกชนิดทุกความเข้มข้นได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากเชื้อราสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของแอม-โมเนียมได้ซึ่งสอดคล้องกับผลของวิธีการที่ 3.3 แต่การเจริญของเชื้อยังขึ้นกับระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ด้วยดังนี้คือ (ภาพที่ 12)

แอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10 และ 0.15 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของเส้นใยเชื้อราไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่ระดับความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์พบว่าการเจริญของเส้นใยลดลง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับพวกแรก

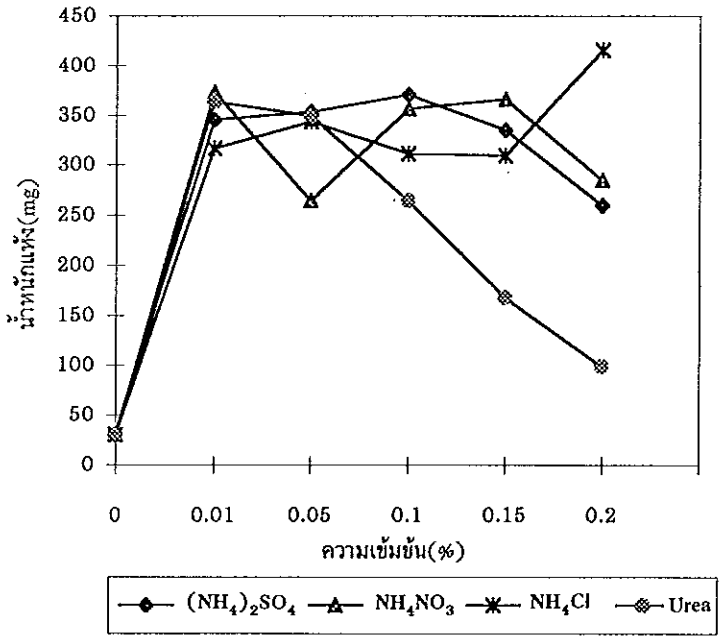
แอมโมเนียมไนเตรต การเจริญของเส้นใยเชื้อราทุกระดับความเข้มข้นไม่แตกต่างกันในทางสถิติ แต่มีแนวโน้มเจริญลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น

แอมโมเนียมคลอไรด์ การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ระดับความเข้มข้น 0.01-0.15 ไม่แตกต่างกันในทางสถิติแต่มีแนวโน้มเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 0.20 เปอร์เซ็นต์

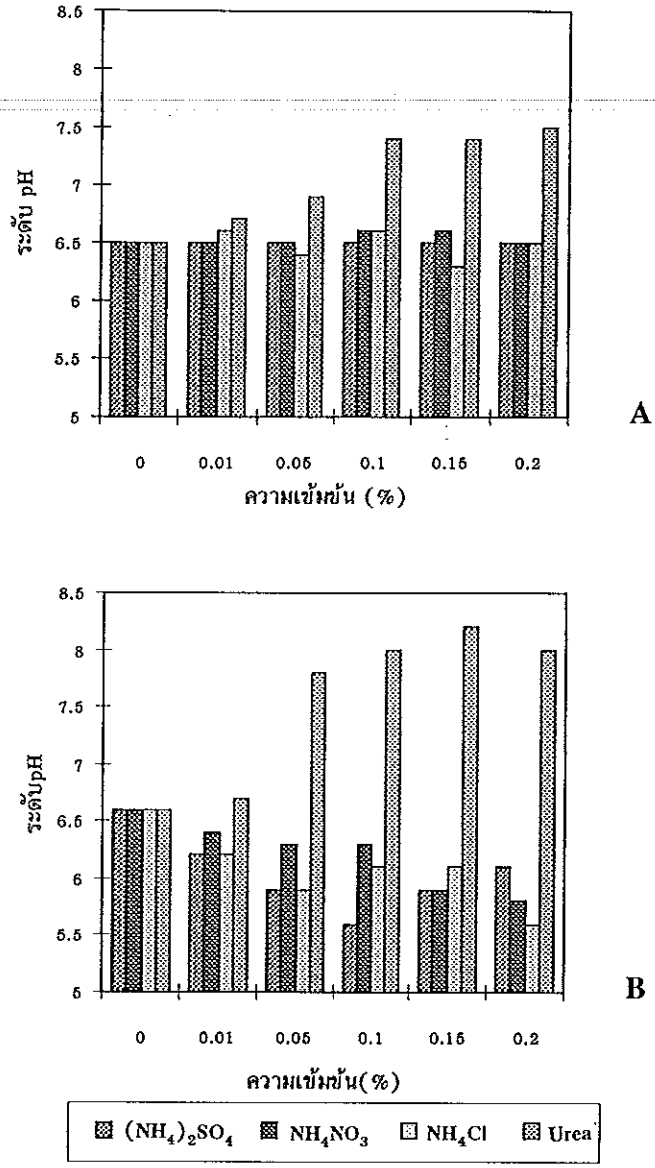
ยูเรีย การเจริญของเส้นใยเชื้อรามีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้นซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการวัดระดับ pH ของอาหารผสมสารทุกชนิดและทุกระดับความเข้มข้น(ภาพที่ 12) ทั้งก่อนและหลังเลี้ยงเชื้อ พบว่าระดับ pH ก่อนเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 6-7.5 เป็นกลางค่อนไปทางกรดเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับความเป็นจริงที่การใช้แอมโมเนียมของเชื้อราส่วนใหญ่จะทำให้ระดับ pH ของอาหารลดลง (Garraway and Evans ,1984) ผลของระดับ pH ที่ต่ำลงทำให้การนำไปใช้ และ การรับไนโตรเจนของเชื้อเข้าสู่เซลล์ได้น้อย ทำให้การเจริญน้อยลง จากการทดลองพบว่าระดับ pH ในอาหารมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากจึงไม่มีผลต่อการเจริญที่เด่นชัด ส่วนในอาหารผสมยูเรีย พบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ระดับ pH เพิ่มขึ้นและจะเพิ่มมากขึ้นค่อนไปทางด่างหลังจากเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การเจริญของเส้นใยลดลงสอดคล้องกับการศึกษาระดับ pH ที่มีต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. lignosus* ซึ่งเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 6-7 และจะลดลงเมื่อระดับ pH เพิ่มขึ้น และในการทดลองได้ใช้วิธีฆ่าเชื้อโดยการนึ่งด้วยความร้อนซึ่งจะทำให้ยูเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกตัวเป็นแอมโมเนีย (Cochrane, 1985) และอาจรวมตัวกับน้ำทำให้เกิดแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ จึงเห็นได้ว่าในการทดลองเมื่อระดับความเข้มข้นของยูเรียเพิ่มขึ้นระดับ pH จะเพิ่มขึ้น

ด้วย ดังนั้นการเกิดกาซแอมโมเนีย และ pH ที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นพิษต่อการเจริญของเชื้อ จึงพบว่าในอาหารที่ผสมยูเรียในระดับความเข้มข้นมากขึ้นการเจริญของเชื้อก็ยิ่งลดลง



ภาพที่ 11. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และ ยูเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 10 วัน



ภาพที่ 12. ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และ ยูเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus*

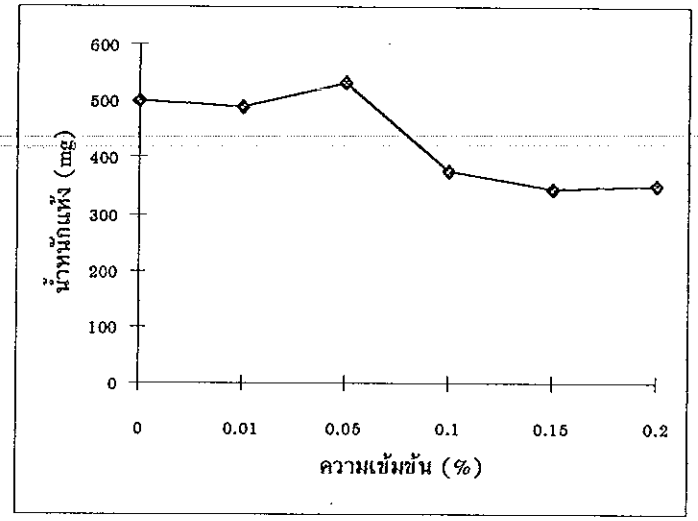
A) ก่อนการเลี้ยงเชื้อ

B) หลังการเลี้ยงเชื้อ

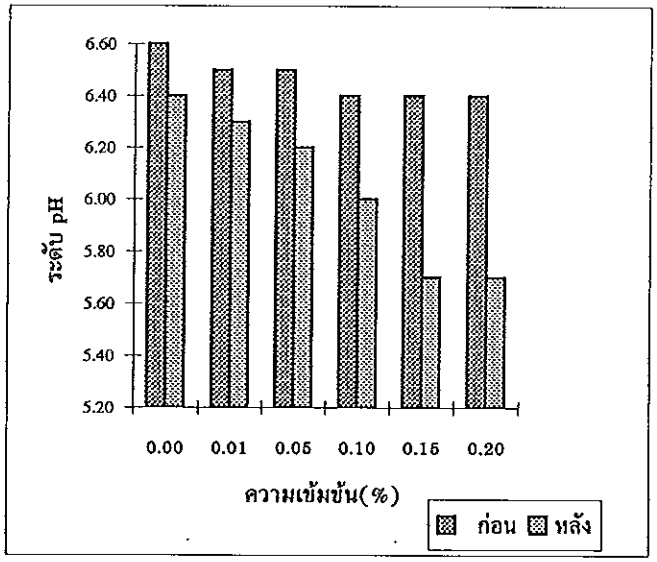
3.8 อิทธิพลของกำมะถันต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเหลว

การศึกษาอิทธิพลของกำมะถันต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเส้นใยเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับในอาหารควบคุม (0 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์แต่เจริญได้ไม่แตกต่างทางสถิติกับการควบคุม ส่วนที่ระดับ 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์นั้นพบว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อราเจริญน้อยกว่าในอาหารควบคุม และลดลงตามลำดับ (ภาพที่ 13) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองนี้แสดงว่าเส้นใยของเชื้อราสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของกำมะถัน 0.05 เปอร์เซ็นต์ และจะเจริญลดลงเมื่อมีส่วนผสมของผงกำมะถันมากกว่า 0.05 เปอร์เซ็นต์ กำมะถันมีบทบาทในการสร้างโปรตีน เป็นส่วนประกอบของโปรตีนและวิตะมินต่างๆ เช่น ซีสทีอิน(cystein) และ เมไทโอนีน (methionine) โดยทั่วไปเชื้อราสามารถออกซิไดซ์กำมะถันให้เป็นซัลเฟตอิออน(SO_4^{2-}) ที่บริเวณภายนอกเซลล์และจะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดย ซีสทีอิน และ เมไทโอนีน ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการกระตุ้นโดยเป็นทั้งสารตั้งต้น(precursors) และ เป็นผลผลิตสุดท้าย(endproducts) ของกระบวนการสร้างโปรตีน ดังนั้นระดับที่มีอยู่ของกำมะถันจึงมีผลต่อการสร้างโปรตีน ดังตัวอย่างใน *Neurospora crassa* (Garraway and Evans, 1984) พบว่าการมีระดับของซัลเฟตอิออน และ เมไทโอนีนชนิดใดชนิดหนึ่งมากเกินไปที่ภายนอกเซลล์ ทำให้กระบวนการนำเข้าซัลเฟตอิออนถูกยับยั้ง และถ้าในเซลล์มีกำมะถันมาก ทำให้กิจกรรมการหายใจในระดับเซลล์ลดลง ซึ่งจะไปยับยั้งการงอกและการเจริญของเส้นใย ทำให้เกิดการพักตัว เช่นในสปอร์ คลาไมโดสปอร์ และ สเคลอโรเทียของเชื้อราบางชนิด ในการทดลองนี้จึงพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกำมะถันมากขึ้นการเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ลดลง

เมื่อพิจารณาผลของการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ก่อนเลี้ยงเชื้อ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในอาหารผสมกำมะถันแล้วพบว่าระดับ pH จะลดลงเล็กน้อยตามระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 14) ซึ่งระดับ pH 5.7-6.4 ไม่มีผลต่อการเจริญของเส้นใย ดังที่แสดงไว้ในผลของวิธีการที่ 3.4 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นของกำมะถันมากขึ้น เชื้อ *R. lignosus* เจริญลดลง



ภาพที่ 13. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 10 วัน



ภาพที่ 14. ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus*

3.9 อิทธิพลของปุ๋ยแอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย และกำมะถันต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในดิน

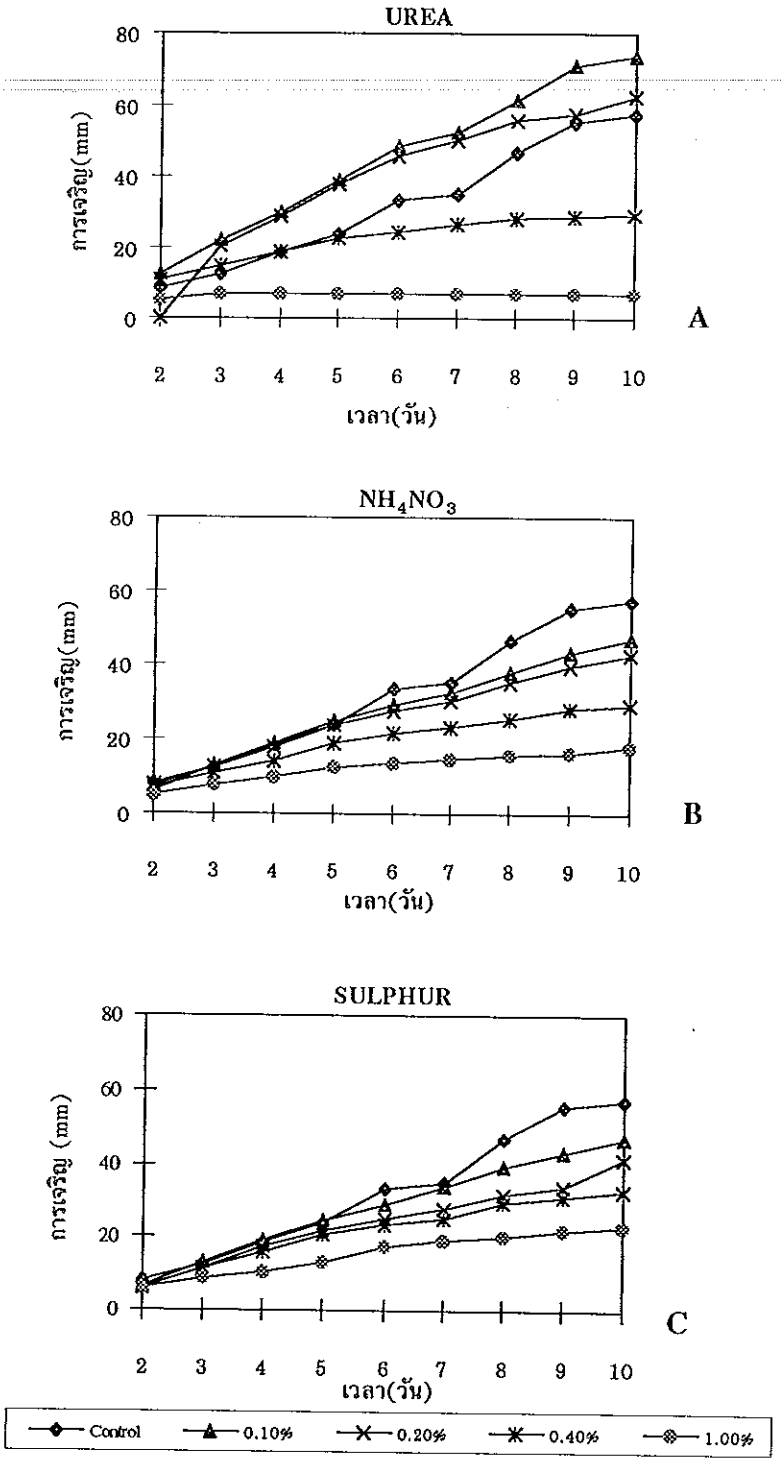
การเจริญของเส้นใยของเชื้อ *R. lignosus* ในดินนึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมแอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย และ กำมะถันผงที่ระดับความเข้มข้น 0(ควบคุม), 0.1, 0.2, 0.4 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์นั้น (ตารางที่ 5) พบว่าเชื้อราในดินที่ผสมแอมโมเนียมไนเตรต และ กำมะถันทุกความเข้มข้น เจริญได้น้อยกว่าในดินชุดควบคุม และเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้นการเจริญของเชื้อลดลงซึ่งเห็นได้ชัดขึ้นเมื่อระยะเวลามากขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์นั้น การเจริญในช่วง 5 วันแรกไม่แตกต่างกันทางสถิติกับดินชุดควบคุม แต่หลังจากนั้นเชื้อราเจริญลดลงอย่างเด่นชัดซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับดินชุดควบคุม ส่วนในดินผสมยูเรียพบว่าที่ระดับ 0.10 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราเจริญได้ดีกว่าในดินชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเจริญลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามลำดับ (ภาพที่ 15) สอดคล้องกับการทดลองในอาหารเหลวที่เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้นการเจริญของเชื้อรามีแนวโน้มลดลง แต่ต่างกันที่ในอาหารเหลวผสมยูเรียนั้นเชื้อราเจริญลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นมากกว่า 0.05 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ในดินเชื้อราเจริญลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของยูเรียมากกว่า 0.20 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ส่วนประกอบและปฏิกิริยาของดินอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา และในอาหารเหลวเชื้อราสัมผัสกับสารโดยตรงจึงอาจจะมีผลต่อเชื้อมากกว่าแม้ว่าความเข้มข้นจะน้อยกว่าก็ตาม

การเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในดินผสมที่ไม่ได้นึ่งฆ่าเชื้อ พบว่าในช่วง 2 วันแรก เชื้อราในทุกวิธีการสามารถเจริญได้ไม่แตกต่างกันมาก(ตารางที่ 6, ภาพที่ 16) แต่หลังจากนั้นไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ส่วนที่เจริญออกในช่วงแรกเส้นใยจะกลายเป็นสีน้ำตาลอ่อน ขาดเป็นท่อน ๆ และไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ซึ่งแตกต่างกับในดินนึ่งฆ่าเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงวันที่ 5 จะพบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญขึ้นในดินบริเวณที่เชื้อรา *R. lignosus* เจริญอยู่ และทำให้เส้นใยของเชื้อราซึ่งปกติสีขาวถูกทำลายกลายเป็นสีน้ำตาลอ่อน และขาดเป็นท่อน ๆ ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ซึ่งเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์ในดินเหล่านี้จะเป็นตัวยับยั้งและทำลายเส้นใยของเชื้อ *R. lignosus*

ตารางที่ 5. การเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในดินนึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และกำมะถันในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร		การเจริญของเชื้อ (มิลลิเมตร) หลังปลูกเชื้อ			
		2 วัน	5 วัน	8 วัน	10 วัน
Control		8.2c	23.8bc	46.6c	57.4b
Urea	0.1%	12.4a	39.0a	61.6a	73.6a
	0.2%	12.8a	37.8a	55.6b	62.6b
	0.4%	10.6b	22.6bc	28.0h	29.2d
	1.0%	4.8d	7.0e	7.0i	7.0f
NH_4NO_3	0.1%	6.0c	24.6bc	37.8d	46.8c
	0.2%	7.4c	23.6bc	35.2de	42.8c
	0.4%	7.2cd	19.0c	25.2g	29.0d
	1.0%	5.0e	12.4d	15.6h	17.6e
Sulphur	0.1%	6.8cd	24.4b	39.2d	46.6c
	0.2%	6.2d	21.6cb	31.8ef	41.2c
	0.4%	6.0d	20.6b	29.4fg	32.8d
	1.0%	5.8de	13.0d	20.2h	22.6e
C.V. (%)		16.51	12.54	10.10	11.58

ค่าเฉลี่ยของการเจริญของเชื้อที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

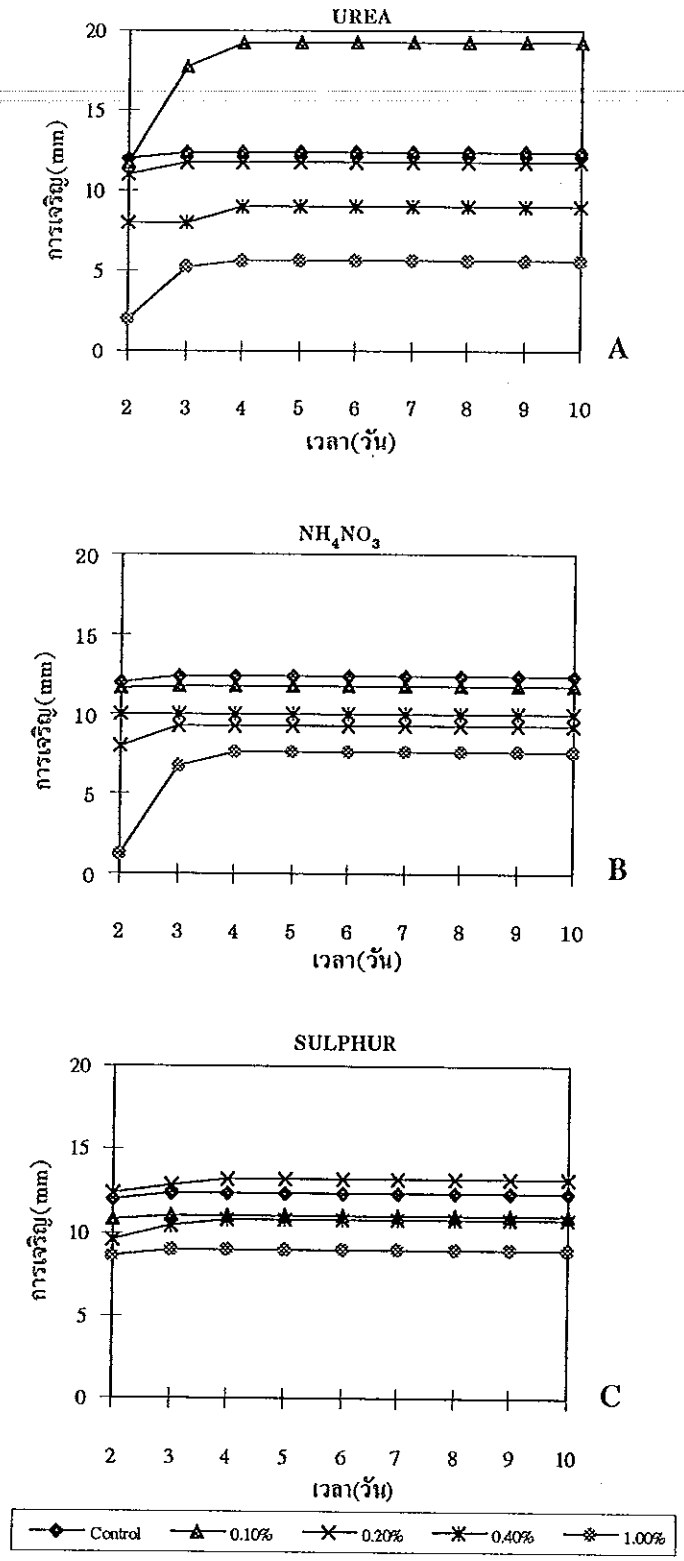


ภาพที่ 15. การเจริญของเชื้อ *R lignosus* ในดินนึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมยูเรีย(A) แอมโมเนียมไนเตรต(B) และกำมะถัน(C)ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 6. การเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในดินที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และกำมะถันในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร		การเจริญของเชื้อ (มิลลิเมตร) หลังปลูกเชื้อ			
		2 วัน	5 วัน	8 วัน	10 วัน
Control		12.0a	12.4b	12.4b	12.4b
Urea	0.1%	11.8a	19.2a	19.2a	19.2a
	0.2%	11.0a	11.8bc	11.8bc	11.8bc
	0.4%	8.0ab	9.2bcd	9.2bcd	9.2bc
	1.0%	2.0c	5.6d	5.6d	5.6d
NH_4NO_3	0.1%	11.6a	11.8bc	11.8bc	11.8bc
	0.2%	8.0ab	9.2bcd	9.2bcd	9.2bc
	0.4%	5.4bc	6.2d	6.2d	6.2d
	1.0%	1.2c	7.6cd	7.6cd	7.6cd
Sulphur	0.1%	10.8a	11.0bc	11.0bc	11.0bc
	0.2%	12.4a	13.2b	13.2b	13.2b
	0.4%	9.6ab	10.8bc	10.8bc	10.8bc
	1.0%	8.6ab	9.0bcd	9.0bcd	9.0bc
C.V. (%)		37.47	32.36	32.36	32.36

ค่าเฉลี่ยของการเจริญของเชื้อที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 16. การเจริญของเชื้อรา *R lignosus* ในดินที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อที่ผสมยูเรีย(A) แอมโมเนียมไนเตรต(B) และกำมะถัน(C) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ของดินที่ผสมสารที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อในระหว่างการทดลอง (ตารางที่ 7) พบว่าในดินนึ่งชุดควบคุมมีระดับ pH ค่อนไปทางกรดประมาณ pH 4 ส่วนในดินไม่นึ่งชุดควบคุมมีระดับ pH สูงกว่าในดินนึ่งเล็กน้อย และระดับ pH ของดินทั้ง 2 สภาพในระยะ 10 วันมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยคืออยู่ในช่วง 4.2-4.1 และ 4.5-4.3 ในดินที่นึ่งฆ่าเชื้อและในดินที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อตามลำดับ

ในดินผสมยูเรียที่ไม่เลี้ยงเชื้อพบว่าได้กลิ่นกาซแอมโมเนียมากขึ้นตามความเข้มข้นของยูเรียที่ผสม ซึ่งแอมโมเนียที่ระดับความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อเชื้อ (Cochrane, 1958) สอดคล้องกับผลการทดลองที่เชื้อ *R. lignosus* เจริญลดลงเมื่อความเข้มข้นของยูเรียผสมในดินมากขึ้น และพบว่าระดับ pH จะเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 5 วันแรก และจะลดลงทั้งในดินนึ่งและไม่นึ่งฆ่าเชื้อ โดยจะเห็นว่าในวันที่ 5 ในดินนึ่งที่ผสมยูเรียที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ นั้น ระดับ pH ของดินผสมทุกระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นไปทางด่างในระดับ 6.8, 6.9, 7.5 และ 8 ในขณะที่ในดินไม่นึ่ง ระดับ pH เพิ่มมากกว่าคืออยู่ในระดับ 6.8, 8.7, 8.9 และ 9.3 ตามลำดับ ทั้งนี้เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของเชื้อในดินที่ทำให้เกิดกาซแอมโมเนียซึ่งทำให้ระดับ pH ของดินเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปเชื้อในดินจะผลิตเอนไซม์ urease ซึ่งสามารถแปรสภาพยูเรียให้เป็นแอมโมเนียมคาร์บอเนตและสลายตัวได้กาซแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ ดังปฏิกิริยา (Bremner, 1982)

$$CO(NH_2)_2 + 2H_2O \longrightarrow (NH_4)_2CO_3$$

$$(NH_4)_2CO_3 \longrightarrow 2NH_3 + CO_2 + H_2O$$

ส่วนของก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้นจะละลายกับน้ำในดินได้แอมโนเนียมไฮดรอกไซด์ และทำให้ระดับ pH ของดินเพิ่มขึ้นทำให้ดินเป็นด่าง ดังปฏิกิริยา

$$\underset{\text{เมื่อดินเป็นกรด}}{NH_4^+ + OH^-} \rightleftharpoons NH_4OH \rightleftharpoons \underset{\text{เมื่อดินเป็นด่าง}}{NH_3 + H_2O}$$

ปรากฏการณ์เหล่านี้จะเกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาหนึ่ง แล้วระดับ pH ของดินจะค่อย ๆ ลดลงเป็นปกติซึ่งสอดคล้องกับการทดลองพบว่าหลังจากการทดลอง 10 วัน ระดับ pH ของดินมีแนวโน้มลดลง

ในดินผสมแอมโมเนียมไนเตรตที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อ พบว่าระดับ pH ของดินลดลงเล็กน้อย เมื่อส่วนผสมของแอมโมเนียมไนเตรตเพิ่มขึ้นทั้งในดินนึ่งและไม่นึ่ง และในดินนึ่งระดับ pH ต่ำกว่าในดินไม่นึ่งเล็กน้อย และการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ในทุกระดับเพิ่มขึ้นเล็กน้อย การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* เจริญได้น้อยกว่าดินชุดควบคุมและลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น(ภาพที่ 17A) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของแอมโมเนียมไนเตรตและระดับ pH ที่เป็นกรดซึ่งเชื้อราไม่สามารถนำไนโตรเจนไปใช้ได้ จะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 0.4 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ระดับ pH เริ่มต้นต่ำมากถึง 3.6-3.7 ซึ่งระดับ pH ขนาดนี้มีผล

ต่อการเจริญของเชื้อ ส่วนในดินไม่นึ่ง ระดับ pH มากกว่า 4 ซึ่งไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อมากนัก แต่เชื้อ *R. lignosus* ไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ในดินชนิดอื่นที่เจริญขึ้นมาแข่งขัน ต่อต้าน และทำลายเชื้อ *R. lignosus* มากกว่า

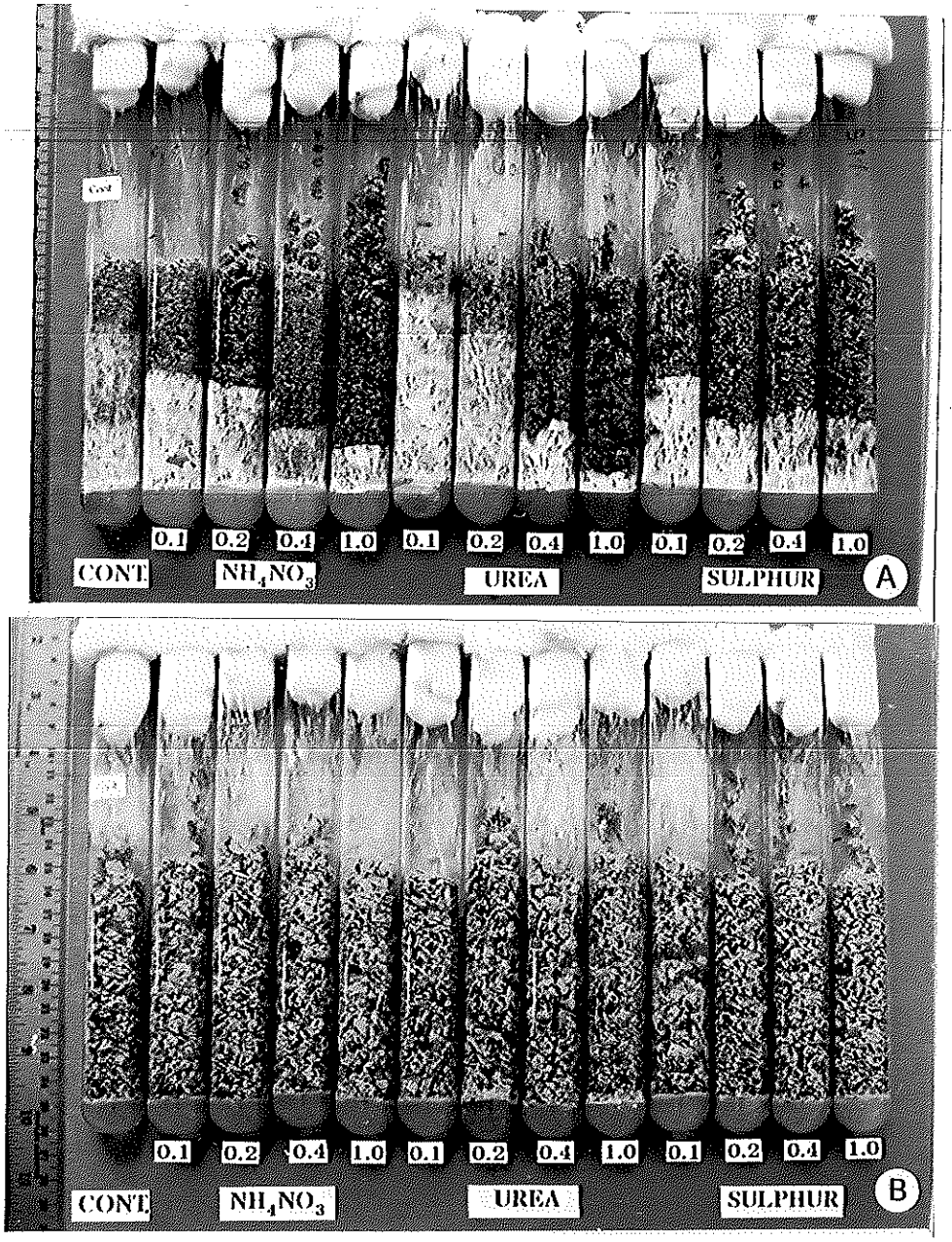
ในดินผสมผงกำมะถันที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อทุกความเข้มข้นทั้งในดินนึ่งและไม่นึ่งฆ่าเชื้อ พบว่าระดับ pH เริ่มต้นไม่แตกต่างกันมากนักคืออยู่ในช่วง 4.0-4.3 แต่หลังจากผสมสารแล้วภายใน 10 วัน ในดินนึ่งที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าระดับ pH ลดลงเป็น 3.1, 3.3 และ 3.3 ตามลำดับ ซึ่งระดับ pH ที่ต่ำกว่า 4 และปริมาณกำมะถันผงที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา สอดคล้องกับผลของการทดสอบในอาหารเหลว ส่วนในดินที่ไม่นึ่ง ระดับ pH ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนักโดยจะเห็นว่าลดลงเล็กน้อย แต่เชื้อรายังเจริญได้น้อยกว่าในดินนึ่งทั้งนี้อาจมาจากสาเหตุเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นในดินที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา ในสภาพแปลงปลูกพืชโดยทั่วไปการเพิ่มกำมะถันลงในดินจะทำให้ระดับ pH ของดินลดลง ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ในดินเช่น *Thiobacillus thiooxidans* จะออกซิไดส์กำมะถันผงทำให้ได้กรดกำมะถันเพิ่มขึ้น (ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2529) ดังสมการ

$$2S + 3O_2 + 2H_2O \longrightarrow 2H_2SO_4$$

ดังนั้น การเติมกำมะถันผงลงไปในดิน จึงเสมือนเติมกรดลงไป ซึ่งหากใส่มากจะทำให้ดินมีสภาพเป็นกรดจัด จึงมีผลต่อการเจริญของเชื้อราบางชนิดที่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่เป็นกรด จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการใช้ควบคุมโรครากขาวของยาง Azaldin (1985) ได้ทดลองใส่กำมะถันผงลงในหลุมปลูกยางในพื้นที่ที่เคยเป็นแหล่งโรคระบาด พบว่าสามารถลดและป้องกันการเกิดโรคได้ นอกจากนี้กรดกำมะถันที่เกิดจากการออกซิไดซ์กำมะถันผงจะช่วยทำให้ธาตุในดินหลายชนิดซึ่งรวมถึงธาตุอาหารของพืชด้วยละลายได้มากขึ้น ได้แก่ P, K, Ca, Mn, Al และ Mg ซึ่งพืชสามารถดูดไปใช้ประโยชน์และส่งเสริมให้เกิดความแข็งแรงและทนทานต่อโรคพืชมากขึ้น (ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, 2529)

ตารางที่ 7. ระดับ pH ของดินไม่เลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงหลังการผสมยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต และกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ชนิดของสาร		ระดับ pH					
		ดินนึ่งฆ่าเชื้อ			ดินไม่นึ่งฆ่าเชื้อ		
		เริ่มต้น	5 วัน	10 วัน	เริ่มต้น	5 วัน	10 วัน
Control		4.2	3.9	4.1	4.5	4.4	4.3
Urea	0.1%	5.5	6.8	6.4	5.3	6.8	6.4
	0.2%	6.4	6.9	7.1	6.0	8.7	7.6
	0.4%	7.0	7.5	7.4	6.4	8.9	7.6
	1.0%	7.6	8.0	7.4	6.8	9.3	7.6
NH_4NO_3	0.1%	4.1	3.9	4.0	4.8	6.1	6.3
	0.2%	4.0	3.8	4.2	4.2	4.6	4.7
	0.4%	3.6	4.0	4.0	3.9	4.1	4.6
	1.0%	3.7	3.5	4.0	3.9	4.0	4.3
Sulphur	0.1%	4.2	4.0	4.0	4.2	4.7	5.1
	0.2%	4.0	3.6	3.1	4.2	3.9	4.0
	0.4%	4.0	3.8	3.3	4.0	3.7	4.0
	1.0%	4.3	3.7	3.3	4.1	3.5	3.8



ภาพที่ 17. การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในดินผสมแอมโมเนียมไนเตรต ยูเรีย และกำมะถันที่ระดับความเข้มข้น 0.1 , 0.2, 0.4 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์หลังบรรจุดินในหลอดทดลอง 10 วัน

A)ในดินที่นึ่งฆ่าเชื้อ

B)ในดินที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ

4. การศึกษาและคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

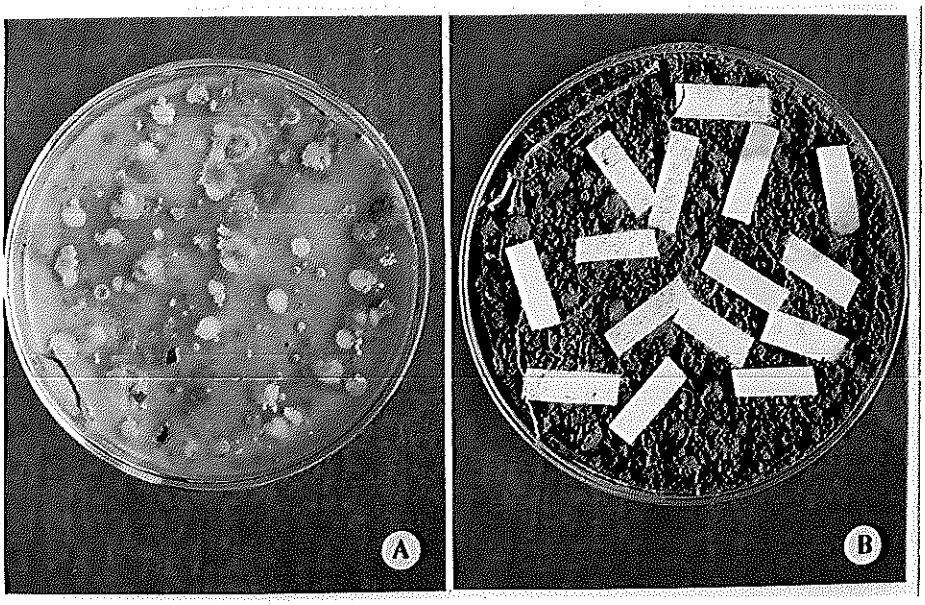
4.1 การเก็บตัวอย่างดิน การแยกเชื้อบริสุทธิ์ และการจำแนกชนิดของเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp.

จากการเก็บตัวอย่างดินจากสวนยางที่ตรวจพบโรครากขาว 21 แห่ง โดยเก็บจากสวนยางในจังหวัดภาคใต้ตอนบน 14 แห่ง คือจาก จังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง พังงา และ ภูเก็ต จำนวน 1, 2, 3, 2, 5 และ 1 แห่ง ตามลำดับ เก็บจากสวนยางในจังหวัดภาคใต้ตอนล่าง 7 แห่ง คือ จังหวัดสงขลา ยะลา และ จังหวัดนราธิวาส จำนวน 1, 2 และ 4 แห่ง ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 11) และเมื่อนำดินบนและล่างผสมกันของทุกจุดในแต่ละแห่งโดยแยกดินที่เก็บบริเวณรากที่เป็นโรคกับที่ไม่เป็นโรค ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 61 ตัวอย่าง

ผลการแยกเชื้อ *Trichoderma* spp.บนอาหาร TSM และ *Chaetomium* spp. โดยการใช้กระดาษกรองเป็นเหยื่อล่อ(ภาพที่ 18) แล้วเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สามารถแยกเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. ที่บริสุทธิ์ได้ 79 และ 63 สายพันธุ์ ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบและจำแนกเชื้อทางอนุกรมวิธานแล้วสามารถจำแนกชนิด (species) ได้ดังนี้ คือ

4.1.1 เชื้อ *Trichoderma* spp. มี 10 ชนิด คือ

T. aureoviride Rifai	1	สายพันธุ์
T. harzianum Rifai	47	สายพันธุ์
T. koningii Oud.	1	สายพันธุ์
T. longibrachiatum Rifai	4	สายพันธุ์
T. piluliferum Webster & Rifai	4	สายพันธุ์
T. polysporum (Link ex Pers.) Rifai	5	สายพันธุ์
T. pseudokoningii Rifai	1	สายพันธุ์.
T. viride Pers. ex S. F. Gray	8	สายพันธุ์
Trichoderma sp.9	6	สายพันธุ์
Trichoderma sp.10	2	สายพันธุ์



ภาพที่ 18. แสดงวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์ *Trichoderma* spp. บนอาหาร TSM (A) และ *Chaetomium* spp. (B) โดยใช้กระดาษกรองเป็นเหยื่อล่อจากตัวอย่างดิน

ลักษณะของ *Trichoderma* แต่ละชนิดมีดังนี้คือ

1. *T. aureoviride* (ภาพที่ 19) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 1 สายพันธุ์ คือ 056.11

ลักษณะโคโลนี เจริญค่อนข้างเร็ว เส้นใยฟูเล็กน้อย ระยะแรกมีสีขาว ต่อมาบริเวณกลางโคโลนีจะเป็นบริเวณของสปอร์มีสีเขียวเข้ม ขอบหนาสีขาว และเมื่ออายุมากขึ้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มเป็นวง (ring zone) หลังโคโลนีปรากฏรอยใสแยกออกเป็นแฉกจากจุดกลางของโคโลนี แต่ลักษณะนี้บางครั้งไม่ปรากฏ

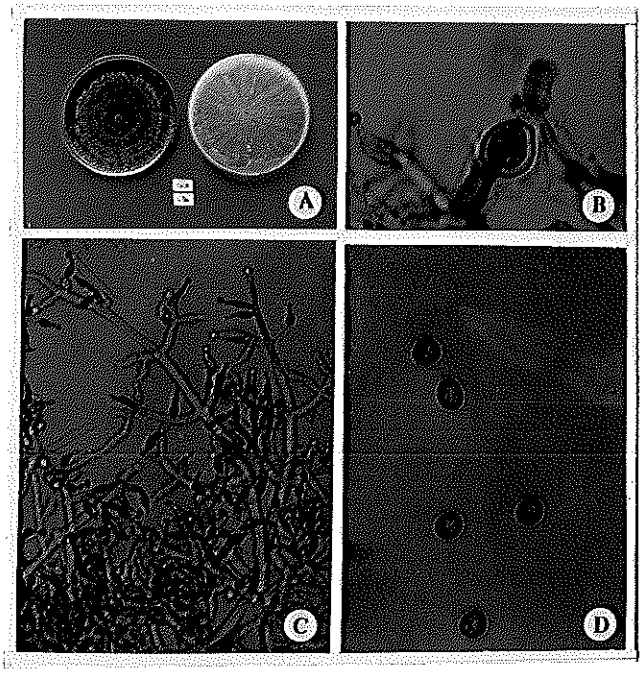
เส้นใย ใส แตกสาขามาก มีผนังกั้น ขนาด 2.8 µm

คลาไมโดสปอร์(chlamydospore) เกิดบนเส้นใย(intercalary) รูปร่างค่อนข้างกลม ผิวเรียบ และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 5-10 µm

ก้านชูสปอร์(conidiophore) บนอาหารเลี้ยงเชื้อจะเห็นก้านชูสปอร์เป็นกลุ่มสีเขียวปรากฏบริเวณเป็นวงสลับกับวงใส แคบ ๆ ก้านชูสปอร์หลักค่อนข้างผอมและยาว ขนาดกว้าง 3-4 µm ก้านชูสปอร์สาขาแตกออกเป็นกลุ่มประมาณ 2-3 ก้าน และจะแตกก้านชูสาขาย่อยได้อีกเป็นก้านชูสั้น ๆ ออกบริเวณจุดละ 2-3 ก้านเช่นเดียวกัน แต่ละช่อของก้านชูสปอร์ประกอบด้วย phialide จำนวน 2-3 อัน หรืออาจพบมากกว่า ขนาดความยาวของก้านชูสาขาขึ้นกับตำแหน่งที่แยกออกกับระยะห่างจากส่วนปลายของก้านชูหลัก

Phialide ค่อนข้างยาว ขนาด 7-15x2-3 µm รูปร่างเหมือนขวดยาว ส่วนฐานแคบกว่าส่วนกลางเล็กน้อยและค่อย ๆเรียวเป็นคอขวด ค่อนข้างยาว มักเจอ phialide รูปร่างโค้งงอบ้างที่บริเวณส่วนยอดของก้านชู

Phialospore ลักษณะรูปไข่ ผิวเรียบ สีเขียวออกน้ำตาล มีรอยตัดที่ปลายข้างหนึ่ง ขนาด 3-4x2-3 µm



ภาพที่ 19. *Trichoderma aureoviride* (056.11)

A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 10 วัน

B) chlamydospore (1,000x)

C) conidiophore และ phialide (400x)

D) phialospore (1,000x)

2. *T. harzianum* (ภาพที่ 20) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 47 สายพันธุ์ คือ 006.21, 007.11, 007.31, 010.21, 012.21, 016.11, 020.11, 020.12, 024.11, 024.12, 024.13, 031.11, 034.11, 034.12, 034.14, 034.32, 035.11, 035.12, 036.21, 037.11, 037.13, 037.21, 038.11, 038.12, 039.11, 039.21, 040.12, 041.13, 043.11, 043.12, 043.13, 043.14, 045.11, 045.12, 045.13, 047.11, 047.12, 049.11, 050.11, 051.11, 051.13, 053.12, 053.14, 055.11, 057.13, 059.13 และ 061.11

ลักษณะโคโลนี เจริญเร็ว เส้นใยเจริญไปตามผิวของอาหาร และค่อนข้างฟู ภายใน 3 วัน ปรากฏบริเวณของก้านชูสปอร์หรือสปอร์มีสีเขียวอ่อนขาวและเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม เป็นวงฟูไม่แน่น

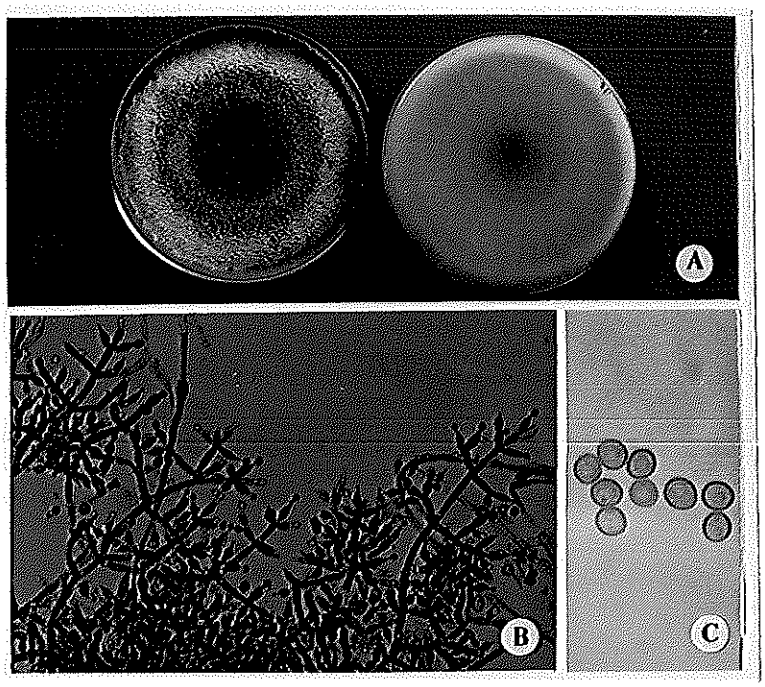
เส้นใย ใส มีผนังกั้น ผิวเรียบ ขนาดกว้าง 1.5-12 μm

คลาไมโดสปอร์ เกิดบนเส้นใยหรือบางครั้งพบบนปลายเส้นใย(terminal) รูปร่างกลม ผิวเรียบ ไม่มีสี ขนาดไม่แน่นอนตั้งแต่ 6-12 μm

ก้านชูสปอร์ ก้านชูสปอร์หลัก มีขนาดกว้าง 4-5 μm มีก้านชูสาขา ซึ่งสามารถแยกสาขาเป็นก้านชูย่อยได้อีก ก้านชูสาขาหรือก้านชูย่อยจะแยกออกเป็นเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 2-3 ก้านต่อจุด ความยาวของก้านชูสาขาขึ้นกับระยะระหว่างจุดที่แตกสาขากับส่วนปลายยอดของก้านชูสปอร์หลัก ก้านชูสปอร์ย่อยแต่ละช่อจะประกอบด้วย phialide 2-5 อัน

Phialide ค่อนข้างสั้น รูปร่าง skittle ที่ฐานจะแคบกว่าบริเวณตรงกลาง ซึ่งป่องกว่า และค่อย ๆเรียวแคบเป็นคอขวด ขนาดของ phialide เท่ากับ 5-7x3-3.5 μm phialide บริเวณส่วนยอดอาจจะยาวกว่า และอาจจะมีขนาดถึง 18x2.5 μm

Phialospore รูปร่างค่อนข้างกลม มีรอยตัดข้างหนึ่ง ผิวเรียบ สีเขียวอ่อน และเมื่อปรากฏเป็นกลุ่มจะมีสีเขียวเข้ม ขนาด 2.5-3 μm



ภาพที่ 20. *Trichoderma harzianum* (057.13)

A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 5 วัน

B) conidiophore และ phialide (400x)

C) phialospore(1,400x)

3. *T. koningii* (ภาพที่ 21) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 1 สายพันธุ์ คือ 061.12

ลักษณะโคโลนี บน PDA ที่อุณหภูมิห้องเจริญค่อนข้างเร็วภายใน 3 วันเจริญได้เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร โคโลนีและเส้นใยสีขาว กลุ่มของสปอร์ที่อายุมากสีเขียวเข้มและมักปรากฏตรงบริเวณจุดกึ่งกลางของโคโลนี ส่วนอาหารหลังโคโลนีมีสีปกติ

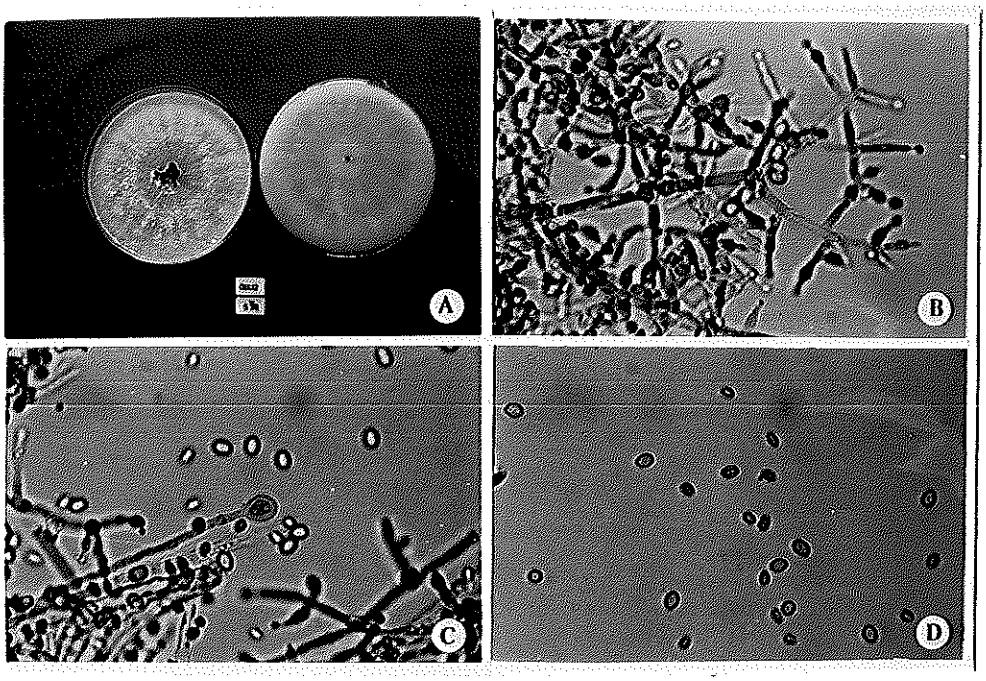
เส้นใย มีผนังกั้น ใส ขนาด 2-10 μm

คลาไมโดสปอร์ เกิดบนเส้นใย รูปร่างกลมหรือรี หรือรูปกลมป่องแต่ปลายรีแหลม (barrel shape) ผิวเรียบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่แน่นอน บางสปอร์ขนาดใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 12 μm

ก้านชูสปอร์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อจะเห็นบริเวณของก้านชูสปอร์เป็นวงๆ ก้านชูสปอร์หลักจะแตกสาขาเป็นก้านชูสปอร์ย่อยอีกมาก ขนาดของก้านชูหลัก 4 μm ก้านชูสาขาแตกแขนงออกเป็นกลุ่มบริเวณเดียวกัน 2-3 ก้าน ความยาวของก้านชูสาขาลดลงเมื่อเข้าใกล้บริเวณปลายยอดของก้านชูหลัก ก้านชูสาขาจะแตกสาขาเป็นก้านชูสปอร์ย่อยออกไปได้อีก แต่ละช่อของก้านชูสปอร์ประกอบด้วย phialide จำนวน 2-5 อัน หรืออาจพบออกมาเดี่ยวๆ จากก้านชูสปอร์

Phialide รูปร่างคล้ายขวดคอยาว หรือแบบ nine-pin ที่ฐาน phialide แคบกว่าตรงกลางซึ่งป่องกว่าเล็กน้อยและค่อย ๆแคบเป็นคอขวด ขนาด 5.5-10x2.5-3.5 μm แต่อาจพบ phialide ที่บริเวณปลายของก้านชู ซึ่งยาวถึง 30 μm

Phialospore รูปร่างเป็นท่อน ผิวเรียบ สีเขียว มีรอยตัดที่ปลายข้างหนึ่ง และอีกข้างหนึ่งโค้งป้าน ขนาด 3-5x2-3 μm



ภาพที่ 21. *Trichoderma koningii* (061.12)

A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 5 วัน

B) conidiophore และ phialide (700x)

C) chlamydospore (700x)

D) phialospore (700x)

4. ***T. longibrachiatum*** (ภาพที่ 22) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 4 สายพันธุ์ คือ 042.21, 052.21, 054.11 และ 054.12

ลักษณะโคโลนี เชื้อราเจริญได้เร็ว ภายใน 3 วันสามารถเจริญได้เต็มผิวหน้าอาหารในจานทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร ช่วงแรกลักษณะโคโลนีมีสีขาว เส้นใยละเอียดค่อนข้างฟู ภายใน 3 วันจะปรากฏบริเวณของสปอร์เป็นวงกลม สีเขียวอ่อนและเขียวเข้มเหลือบเหลือง และเปลี่ยนเป็นสีเขียวฟ้าค่อนข้างฟูทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อมีอายุ 4 วัน

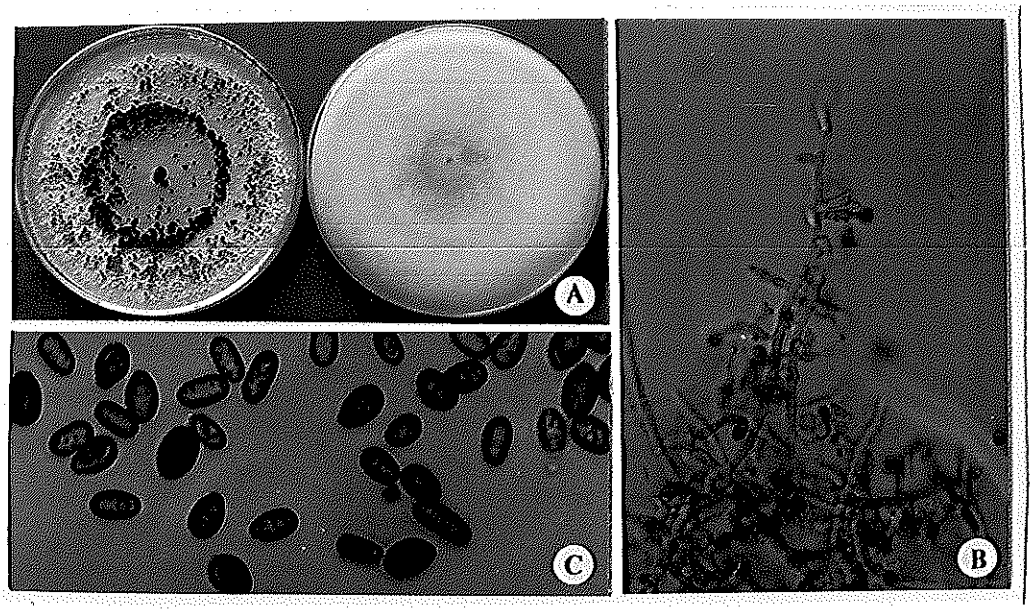
เส้นใย ใส มีผนังกั้น แตกสาขามาก ผนังเรียบ ขนาด 2-10 µm

คลาไมโดสปอร์ มักปรากฏบนปลายเส้นใยหรือระหว่างเส้นใย รูปร่างค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ ผนังเรียบ ใส ขนาดใหญ่ถึง 10 µm

ก้านชูสปอร์ กลุ่มก้านชูสปอร์ของเชื้อที่เลี้ยงบน PDA มักเป็นกระจุกหรือเป็นกลุ่มๆ และปรากฏบริเวณสปอร์ชัดเจน ก้านชูสปอร์สายหลักมีขนาด 4-5 µm ค่อนข้างยาวและมีก้านชูสาขาเพียง 2-3 สาขาเท่านั้น ซึ่งแตกแขนงออกจากก้านชูสปอร์หลักเป็นมุมฉาก ส่วนใหญ่ phialide มักออกมาเดี่ยวๆ จากก้านชูหลัก

Phialide ส่วนใหญ่มักอยู่เดี่ยวๆ และออกมาจากก้านชูสปอร์สายหลักโดยตรง โดยออกมาเป็นคู่ๆ ตรงข้ามกัน และมี phialide ที่ออกมาจากก้านชูที่แยกจากเส้นหลักอีก อาจออกมาเพียง 1 หรือ 2 phialide เช่นเดียวกับที่ออกจากก้านชูสายหลัก ลักษณะของ phialide ค่อนข้างยาว รูปขวด ขนาด 13-14x2.5-3 µm ซึ่ง phialide บริเวณต้นๆ ของก้านชูมีขนาดสั้นกว่าบริเวณปลาย มีขนาดประมาณ 6x3 µm ที่ฐาน phialide ค่อนข้างแคบกว่าตรงกลางเล็กน้อยและสั้น และมักพบลักษณะของ phialide ที่บิดงอตรงบริเวณส่วนคอขวด

Phialospore รูปร่างเป็นท่อนค่อนข้างยาว ที่ปลายข้างหนึ่งจะเห็นเป็นรอยตัด ผนังเรียบสีเข้มออกเขียว ขนาด 6-7x3-4 µm ซึ่งโตกว่าขนาดสปอร์ที่บรรยายโดย Rifai (1969) ที่มีขนาดสปอร์ 3.6-6.5x2.2-3 µm



ภาพที่ 22. *Trichoderma longibrachiatum* (042.21)

A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 5 วัน

B) conidiophore และ phialide (400x)

C) phialospore (1,000x)

5. *T. piluliferum* (ภาพที่ 23) สามารถแยกบริสุทธิ์ได้ 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 036.11, 036.12, 039.32 และ 044.11

ลักษณะโคโลนี เชื้อเจริญค่อนข้างช้า พบว่าที่อายุ 3 วันเชื้อราเจริญโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 5.8 เซนติเมตร โคโลนีระยะแรกขาว เส้นใยเจริญติดแน่นกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่ฟู ค่อนข้างละเอียด เมื่ออายุมากขึ้นจะปรากฏบริเวณสปอร์แน่นเป็นวงๆ สีขาว และออกเขียวอ่อน และต่อมาเป็นสีเขียวเข้ม หรือเขียวเทา ขอบโคโลนีสีขาว

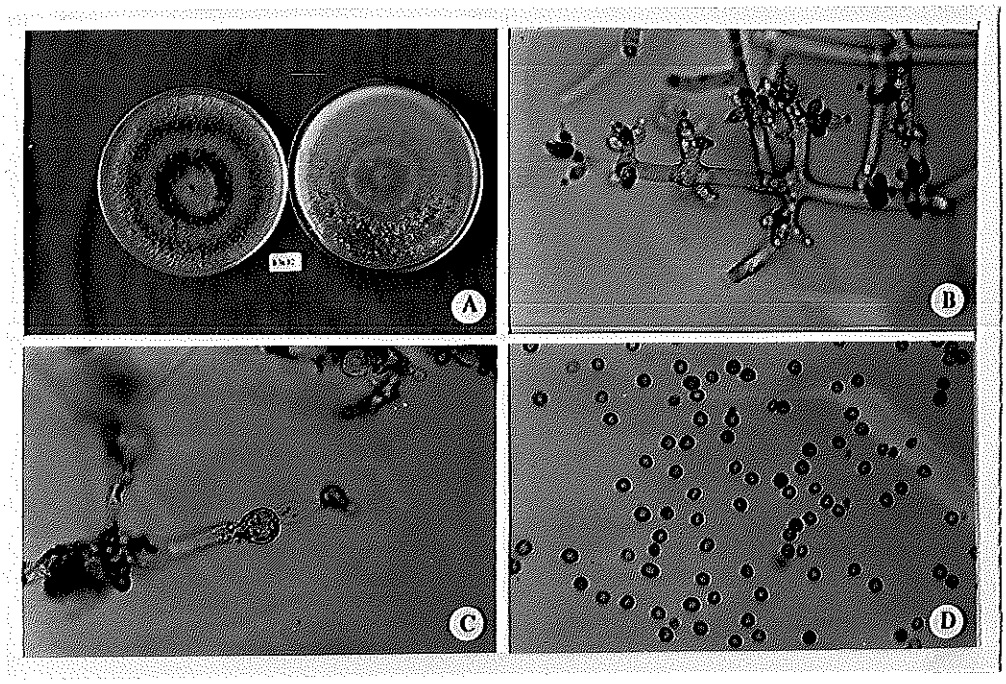
เส้นใย ใส มีผนังกั้น ขนาดกว้าง 9-10 μm

คลาไมโดสปอร์ รูปร่างค่อนข้างกลมหรือรี ผิวเรียบ ใส เกิดบนเส้นใย หรือบนปลายเส้นใย ขนาดไม่แน่นอน บางสปอร์มีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 12 μm

ก้านชูสปอร์ ก้านชูสปอร์หลักมีขนาด 5-7 μm ก้านชูสปอร์สาขาแตกออกค่อนข้างแน่น หนาและสั้น ก้านชูสปอร์สาขามักออกตำแหน่งละ 2-3 ก้าน บางครั้งจะเห็นก้านชูเดี่ยวๆ ก้านชูสาขาสามารถแตกก้านชูออกได้อีกซึ่งค่อนข้างสั้น และมีขนาดใหญ่ และปรากฏกลุ่มของ phialide บริเวณปลายก้านชู ช่อละ 2-5 phialide

Phialide รูปร่างแบบขวดชมพู่สั้น ๆ ขนาด 5-7x3-4 μm ฐานแคบ ตรงกลางป่องและค่อยๆ เรียวสู่ปลายเป็นรูปคอขวด

Phialospore รูปร่างค่อนข้างกลม ใส ผิวเรียบ มีรอยตัดที่ปลายข้างหนึ่ง ขนาด 2.5-3.5μm



ภาพที่ 23. *Trichoderma piluliferum* (036.12)

A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 5 วัน

B) conidiophore และ phialide (500x)

C) chlamydospore (500x)

D) phialospore (600x)

6. *T. polysporum* (ภาพที่ 24) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 5 สายพันธุ์ คือ 034.21, 037.12, 041.12, 048.11 และ 048.12

ลักษณะโคโลนี เชื้อเจริญค่อนข้างเร็วเมื่ออายุ 3 วันเชื้อราเจริญโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 8.7 เซนติเมตร ระยะแรกลักษณะเส้นใยขาว ไม่ฟู เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยค่อนข้างฟู และเกิดบริเวณของสปอร์สีขาวเป็นวงขอบหยักเล็กน้อย เมื่อดูโคโลนีภายใต้กล้องกำลังขยายต่ำจะเห็นเส้นใยยาวโค้งชูเหนือช่อ phialide (sterile hyphae) เมื่อเชื้ออายุมากขึ้นในวันที่ 4 หรือ 5 ปรากฏบริเวณของก้านชูสปอร์หรือของสปอร์แน่นสีเขียวโศก รอบบริเวณก้านชูสปอร์จะเป็นบริเวณเส้นใยและก้านชูสปอร์ สีขาว ค่อนข้างฟูไม่แน่น

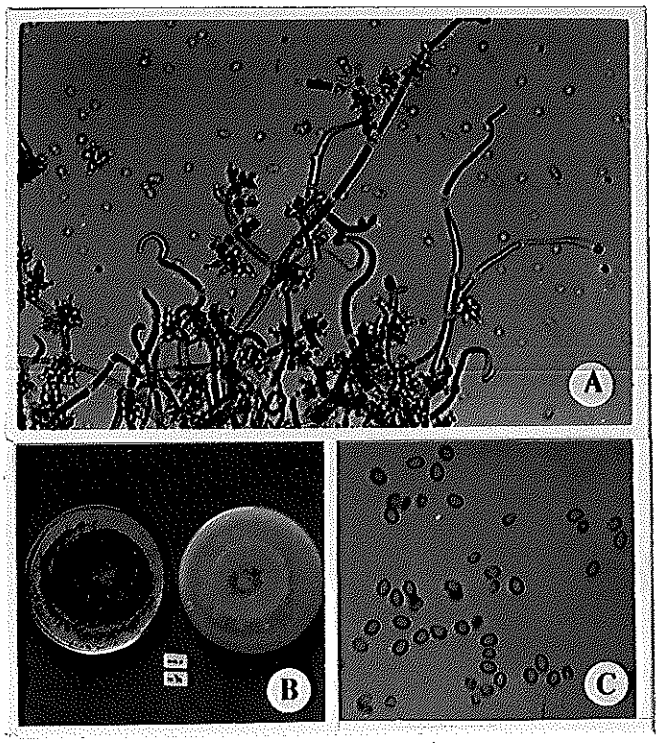
เส้นใย ใส แตกสาขา มีผนังกั้น ผิวเรียบ ขนาด 2-10 μm

คลาไมโดสปอร์ รูปร่างค่อนข้างกลม ใส ผิวเรียบ ขนาด 8.5 μm มักพบบนเส้นใยและบางครั้งอาจพบที่ปลายได้เช่นกัน

ก้านชูสปอร์ ก้านชูสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อปรากฏเป็นบริเวณลักษณะเป็นวง ๆ แน่นค่อนข้างแข็ง ก้านชูสปอร์หลักมีขนาด 4-6.5 μm บริเวณส่วนล่างของก้านชูหลัก จะแตกสาขาออกเป็นก้านชูที่มี phialide (fertile branch) โดยแยกออกเป็นคู่ ๆ ตรงข้ามกัน แต่อาจพบแตกสาขาออกเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 3 ก้านบ้าง ก้านชูสาขายังแตกสาขาออกเป็นก้านชูย่อยสั้น ๆได้อีก ก้านชูที่อยู่เหนือขึ้นไปบนก้านชูหลักค่อย ๆ สั้นลงตามระยะห่างจากจุดที่แตกออกกับส่วนปลาย ปลายของก้านชูหลักมีลักษณะเป็นเส้นใยยาวไม่มี phialide มีผนังกั้น โค้งหรือปลายม้วน ใส ผนังเรียบ ขนาด 1.5 μm

Phialide รูปร่างคล้ายผลลูกแพร์ ค่อนข้างสั้น ขนาด 4-6.5x3-3.5 μm ส่วนกลางของ phialide กว้างกว่าฐานเล็กน้อย ส่วนที่เป็นคอแคบและสั้น แต่ละช่อของก้านชูย่อยประกอบด้วย phialide มากถึง 5 phialide

Phialospore รูปร่างเป็นท่อนสั้น ใส ผิวเรียบ ขนาด 2.5-3x1.5-2 μm



ภาพที่ 24. *Trichoderma polysporum* (048.11)

A) conidiophore , phialide และ sterile hyphae (300x)

B) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 10 วัน

C) phialospore (800x)

7. *T. pseudokoningii* (ภาพที่ 25) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 1 สายพันธุ์ คือ 047.13

ลักษณะโคโลนี เชื้อเจริญเร็วสามารถเจริญได้เต็มจานทดลองภายใน 3 วัน ระยะแรกลักษณะเส้นใยสีขาวเจริญไปตามผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างบาง เส้นใยค่อนข้างละเอียด และปรากฏบริเวณของสปอร์เป็นวงๆ สีขาวเมื่ออายุมากขึ้นในวันที่ 3 หรือ 4 เปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนและสีเขียวออกเหลือง อาหารใต้โคโลนีเป็นสีเหลือง

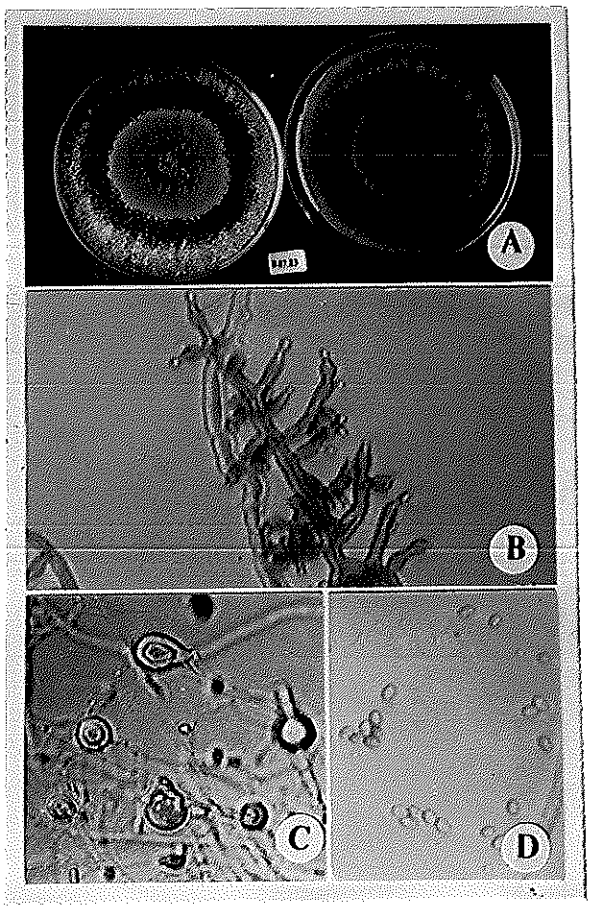
เส้นใย ใส แตกสาขา มีผนังกั้น ผิวเรียบ ขนาด 1-10 µm

คลาไมโดสปอร์ ค่อนข้างกลม ผิวเรียบ ใส ขนาด 6-10 µm

ก้านชูสปอร์ ก้านชูสปอร์หลักค่อนข้างยาว ขนาดกว้าง 4-5 µm ก้านชูสปอร์สาขาแตกออกเป็นคู่ ๆ ตรงข้ามกัน แต่อาจพบเป็นกลุ่ม 3-4 ก้านบ้าง

Phialide รูป skittle หรือ nine-pin ฐานกับตรงกลางของ phialide มีขนาดใกล้เคียงกันโดยที่ฐานจะแคบกว่าเล็กน้อย มีขนาด 5-7x2.5-3 µm phialide ที่ปลายก้านชูอาจยาวถึง 3 µm phialide อาจขึ้นบนก้านชูสปอร์โดยตรง ซึ่งมักพบบนก้านชูสปอร์หลัก บางครั้งพบ phialide ออกจาก phialide เอง

Phialospore รูปร่างค่อนข้างกลม รี ผิวเรียบ ขนาด 2 µm แตกต่างจาก Rifai (1969) รายงานว่ามีขนาด 3.5-4.6x2-2.5 µm



ภาพที่ 25. *Trichoderma pseudokoningii* (047.13)

A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 5 วัน

B) phialide (700x)

C) chlamydospore (700x)

D) phialospore (700x)

8. *T. viride* (ภาพที่ 26) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 8 สายพันธุ์ คือ 012.11, 019.11, 020.11, 021.12, 027.11, 035.14, 052.12 และ 052.32

ลักษณะโคโลนี เชื้อราเจริญได้เร็วสามารถเจริญได้เต็มจานทดลองภายใน 3 วัน เส้นใยค่อนข้างละเอียด และบาง สีขาว ก้านชูสปอร์หรือสปอร์เป็นบริเวณสีเขียวแน่นเฉพาะจุดกลางโคโลนี ส่วนบริเวณรอบ ๆมีสีขาวเหมือนเดิมแม้อายุมากถึง 10 วัน

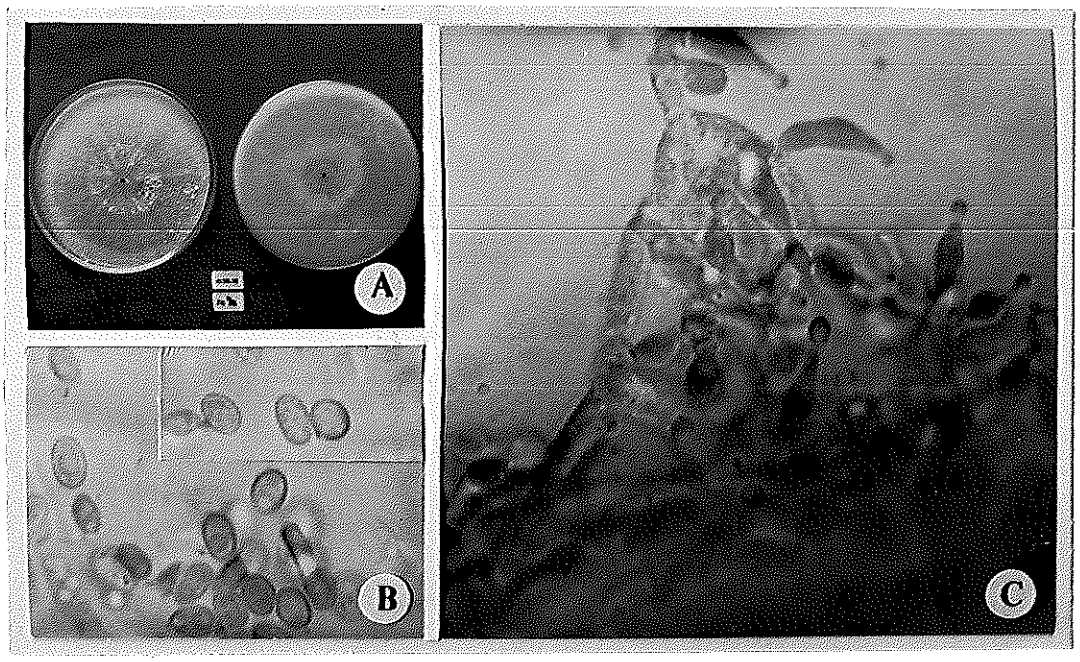
เส้นใย ใส ผิวเรียบ มีผนังกั้น ขนาด 1.5-10 μm

คลาไมโดสปอร์ ส่วนใหญ่เกิดบนเส้นใยและพบบ้างที่ปลายเส้นใยที่เป็นกิ่งสาขาสั้น ๆ รูปร่างค่อนข้างกลม ใส ผิวเรียบ อาจมีขนาดใหญ่ถึง 14 μm

ก้านชูสปอร์ ก้านชูสปอร์หลัก ขนาด 4.5 μm แตกสาขาเป็นก้านชูสาขาประมาณ 5-7 ก้าน ซึ่งอาจแตกออกเดี่ยว ๆ หรือแตกออกเป็นกลุ่ม ๆละ 2-3 ก้าน และมี phialide ออกจากก้านชูเองโดยตรงด้วย ความยาวของก้านชูสปอร์สาขาขึ้นกับระยะห่างจากปลายก้านชูหลัก นั่นคือถ้าห่างมากความยาวของก้านชูสปอร์จะยาวกว่าที่แตกบริเวณใกล้ส่วนปลาย แต่ละก้านของก้านชูสาขาค่อนข้างห่าง และ phialide ที่ออกจากก้านชูก็ห่างด้วยเช่นกัน ก้านชูสาขายังแตกสาขาออกเป็นก้านชูย่อยได้อีกและแต่ละช่อของก้านชูย่อยประกอบด้วย phialide ไม่เกิน 3 phialide

Phialide รูปร่างคล้ายขวดคอยาว บริเวณคอค่อนข้างบิดงอ ฐานแคบกว่าตรงกลางเล็กน้อย และค่อย ๆ เรียวแคบ เป็นคอยาว มีขนาด 2-3 x 12 μm และพบ phialide ที่ออกมาจากก้านชูสปอร์เดี่ยว ๆ และมักออกมาที่จุดตรงข้ามกับก้านชูที่แยกออก

Phialospore รูปร่างค่อนข้างกลม ลักษณะเป็นท่อนสั้น ๆ สีออกเขียว ขนาด 3x3.5-4 μm ผิวขรุขระไม่เรียบ



ภาพที่ 26. *Trichoderma viride* (035.14)

A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 10 วัน

B) phialospore (1,200x)

C) phialide และ conidiophore (1,200x)

9. ***Trichoderma* sp.9** สามารถแยกได้ 5 สายพันธุ์ คือ 012.31, 024.12, 038.21, 052.31 034.31 และ 038.21

ลักษณะโคโลนี เชื้อราเจริญได้เร็ว สามารถเจริญเต็มจานทดลองภายใน 3 วัน เส้นใยมีลักษณะละเอียดฟู สีขาว ปรากฏบริเวณก้านชูสปอร์หรือสปอร์สีเขียวอ่อนออกขาวค่อนข้างฟูไม่แน่น และเปลี่ยนเป็นสีเขียวออกเหลืองเมื่อมีอายุ 4 วัน อาหารใต้โคโลนีไม่เปลี่ยนสี

เส้นใย ใส มีผนังกั้น ผิวเรียบ

ก้านชูสปอร์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างฟู เป็นวงบริเวณกว้าง ขนาดของก้านชูหลักเท่ากับ 3 µm แตกสาขาออกลักษณะคล้าย *T. harzianum*

Phialide รูปร่างค่อนข้างสั้นเกือบกลมฐานแคบกว่าตรงกลางเล็กน้อยส่วนปลายค่อยๆ แคบลงไม่มีคอเหมือน phialide ของสกุลอื่น ยกเว้น phialide ที่ส่วนปลายก้านชูค่อนข้างยาวกว่า ขนาดโดยทั่วไปเท่ากับ 3x3.5 µm ส่วน phialide ที่ปลายยอดมีขนาด 6-7x2 µm ก้านชูย่อย 1 ช่อประกอบด้วย phialide 2-4 phialide

Phialospore รูปร่างค่อนข้างกลม ใส ผิวเรียบ ขนาด 2x2-2.5 µm

10. ***Trichoderma.*** **sp.10** (ภาพที่ 27) แยกได้ 2 สายพันธุ์ คือ 040.11 และ 042.11

ลักษณะโคโลนี เชื้อราเจริญได้เร็วสามารถเจริญเต็มจานทดลองภายใน 3 วัน ลักษณะเส้นใยสีขาวฟู ปรากฏบริเวณก้านชูสปอร์ค่อนข้างฟู เป็นวงๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียวออกเหลืองแต่จางกว่า *Trichoderma* sp.9 เมื่ออายุ 4 วัน รอบๆบริเวณก้านชูเป็นบริเวณเส้นใยค่อนข้างฟู

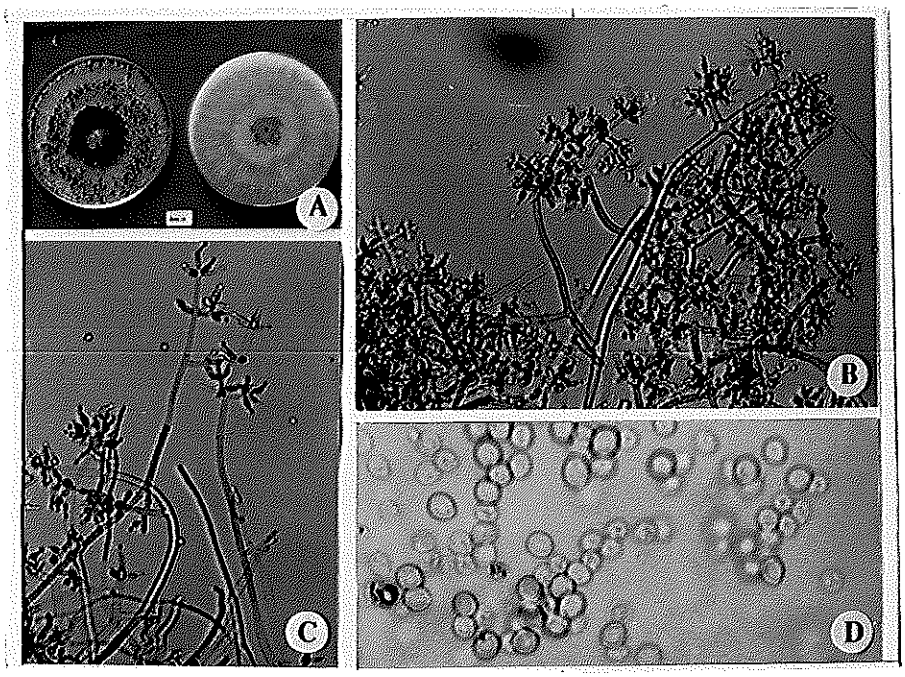
เส้นใย ใส มีผนังกั้น ผิวเรียบ

ก้านชูสปอร์ ลักษณะก้านชูสปอร์คล้ายกับ *T. hamatum* ที่มี reduced หรือ modified sterile hyphal ค่อนข้างยาว ก้านชูสปอร์หลักมีขนาดกว้างประมาณ 4-6 µm ส่วนปลายจะเป็นเส้นยาวมีก้านชูสปอร์ 1 หรือ 2 ก้านชู หรืออาจมี phialide 1 หรือ 2 phialide ก้านชูสปอร์สาขาส่วนใหญ่ปรากฏอยู่ส่วนล่างของก้านชูหลักและแตกสาขาเป็นก้านชูย่อยๆที่มีลักษณะค่อนข้างสั้นและใหญ่ แตกออกจุดละ 1-3 ก้าน ซึ่งแยกออกเป็นมุมฉากเช่นเดียวกับ *T. hamatum* ก้าน ชูสปอร์ย่อยแต่ละช่อประกอบด้วย phialide 2-5 phialide

Phialide รูปลูกแพร์ หรือรูปไข่ค่อนข้างรี ที่ฐานแคบกว่าส่วนกลาง คอสั้น ขนาด 4-5.5x3-4 µm

Phialospore รูปร่างค่อนข้างกลม ผิวเรียบ ใส ขนาด 2x2-2.5 µm

ราชนิดนี้มีลักษณะ โคโลนี เส้นใย ก้านชูสปอร์ และ phialide คล้ายกับ *T. hamatum* มาก (Rifai, 1969) แต่ต่างกันที่ phialospore ของราชนิดนี้ค่อนข้างกลมและมีขนาดเล็ก ในขณะที่ phialospore ของ hamatum เป็นท่อนหรือรีป้าน ที่ปลายอีกด้านเป็นรอยตัด สีออกเขียว ขนาด 3.8-6x2.2-2.8 µm



ภาพที่ 27. *Trichoderma* sp.10 (040.11)

A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 10 วัน

B) phialide และ conidiophore (200x)

C) conidiophore with modified steriled hyphal elonggation (200x)

D) phialospore (1,000x)

4.1.2 เชื้อ *Chaetomium* spp. มี 10 ชนิด คือ

C. aureum Chivers	จำนวน	13	สายพันธุ์
C. cupreum Ames	จำนวน	11	สายพันธุ์
C. fusiforme Chivers	จำนวน	24	สายพันธุ์
C. gracile Udagawa	จำนวน	6	สายพันธุ์
Chaetomium sp.5	จำนวน	4	สายพันธุ์
Chaetomium sp.6	จำนวน	1	สายพันธุ์
Chaetomium sp.7	จำนวน	1	สายพันธุ์
Chaetomium sp.8	จำนวน	1	สายพันธุ์
Chaetomium sp.9	จำนวน	1	สายพันธุ์
Chaetomium sp.10	จำนวน	1	สายพันธุ์

ลักษณะเด่นของ *Chaetomium* แต่ละชนิดมีดังนี้คือ

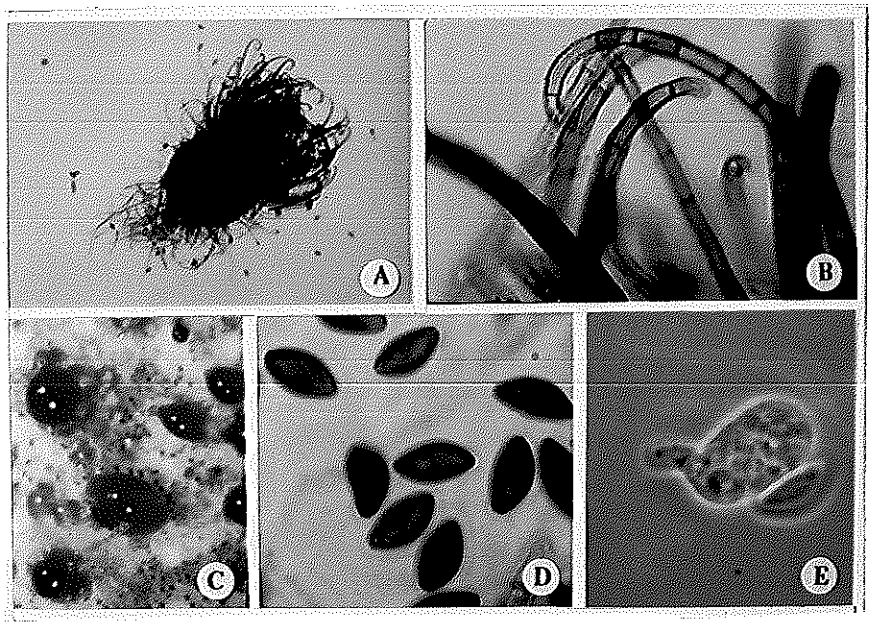
1. ***C. aureum*** (ภาพที่ 28) สามารถแยกเชื้อบริสุทธุ์ได้ 13 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 001.11, 001.12, 001.42, 001.43, 002.12, 004.11, 005.11, 012.42, 012.43, 045.11, 045.31, 047.11 และ 047.12

เชื้อราบน PDA มี ascomata สีเขียวมะกอก หรือเขียวอ่อน หรือสีเทา สร้าง exudate สีแดง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง

Ascomata รูปร่างกลม หรือรี มีปากเปิด ขนาด 80-160 µm ascomatal hair ปลายโค้งหรือปลายม้วน 2-3 รอบ มีผนังกั้น และผิวมีหนาม

Ascus รูปร่างคล้ายกระบอง มี stalk ค่อนข้างสั้น ประกอบด้วย ascospore 8 spore มีขนาด 30-40x10-14 µm

Ascospore รูปรี มีลักษณะแบน 1 ข้าง ที่ส่วนปลายมีรู 2 รู



ภาพที่ 28. *Chaetomium aureum* (047.12)

A) ascomata (200x)

B) ascomatal hair (1,000x)

C) red exudate

D) ascospore (1,000x)

E) ascus (400x)

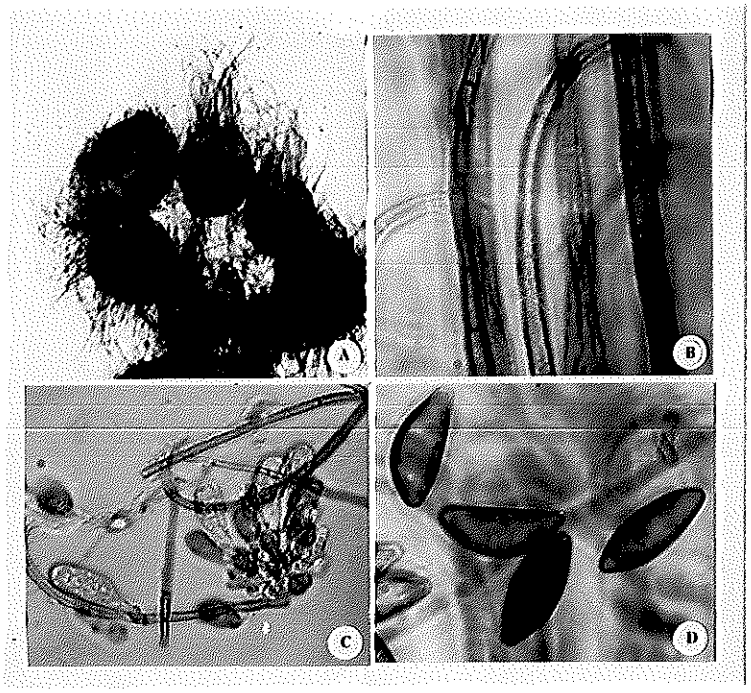
2. *C. cupreum* (ภาพที่ 29) สามารถแยกเชื้อบริสุทธุ์ได้ 11 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 011.41, 015.41, 018.41, 018.33, 019.41, 032.21, 046.31, 047.33, 054.11, 047.33 และ 054.12

เชื้อราบน PDA มี ascomata, exudate และ ascomatal hair สีแดง

Ascomata รูปร่างค่อนข้างกลม หรือรี มีปากเปิด ขนาด 70-130 µm ascomatal hair ส่วนใหญ่อยู่บริเวณรอบปากเปิด ปลายโค้งหรือม้วน 1-3 รอบ มีผนังกั้น และผิวมีหนาม

Ascus รูปร่างคล้ายกระบอง มี stalk แต่ละ ascus มี ascospore 8 spore มีขนาด 25-35x10-13 µm

Ascospore รูปร่างคล้ายไต หรือคล้ายพระจันทร์ครึ่งซีกค่อนข้างรี มีขนาด 7-10x 4.5-6 µm มีรูที่ปลาย 1 รู



ภาพที่ 29. *Chaetomium cupreum* (019.41)

A) ascomata (150x)

B) ascomatal hair (400x)

C) ascus (400x)

D) ascospore (1,000x)

3. *C. fusiforme* (ภาพที่ 30) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 23 สายพันธุ์ คือ 1) สายพันธุ์ที่มี ascomata สีแดง คือ 001.23, 012.41, 014.31, 016.31, 018.11, 023.31, 028.31, 030.31 และ 056.11 และ 2) สายพันธุ์ที่มี ascomata สีเทา คือ 015.33, 017.11, 017.12, 017.41, 029.11, 030.32, 030.33, 032.22, 032.23 และ 033.31

เชื้อราบน PDA มีลักษณะภายนอก 2 แบบ คือ

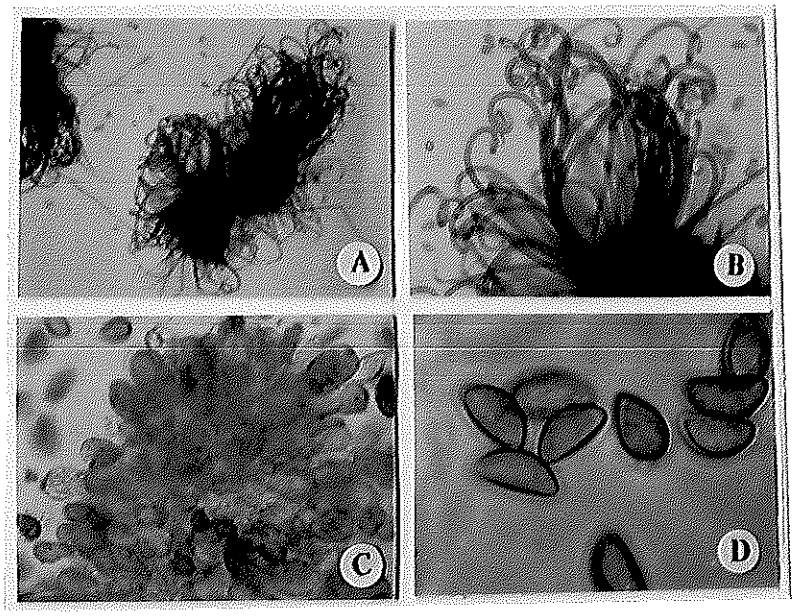
1) เชื้อรามี ascomata และ ascomatal hair สีแดงชมพู และมี exudate สีแดง

2) เชื้อรามีเส้นใยฟูสีขาวออกเหลือง มี ascomata และ ascomatal hair สีเทา exudate สีเหลือง และสีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

Ascomata รูปร่างค่อนข้างกลม หรือรี มีปากเปิด ขนาด 70-180 µm ascomatal hair ค่อนข้างตรงและยาว ส่วนปลายโค้งเล็กน้อย มีผนังกั้น ผิวมีหนาม และที่โคนของ hair กว้าง 2-3 µm

Ascus รูปร่างคล้ายกระบอง มี stalk แต่ละ ascus มี ascospore จำนวน 8 spore ขนาด 40-60x14-19 µm

Ascospore รูปร่างค่อนข้างเรียว ยาว (fusiform) มีรูที่ปลาย 2 รูซึ่งเห็นได้ชัด มีขนาด 4-7.5x12-18 µm เมื่อแก่สีน้ำตาลอ่อน



ภาพที่ 30. *Chaetomium fusiforme* (018.11)

A) ascomata (100x)

B) ascomatal hair (1,000x)

C) ascus (400x)

D) ascospore (1,000x)

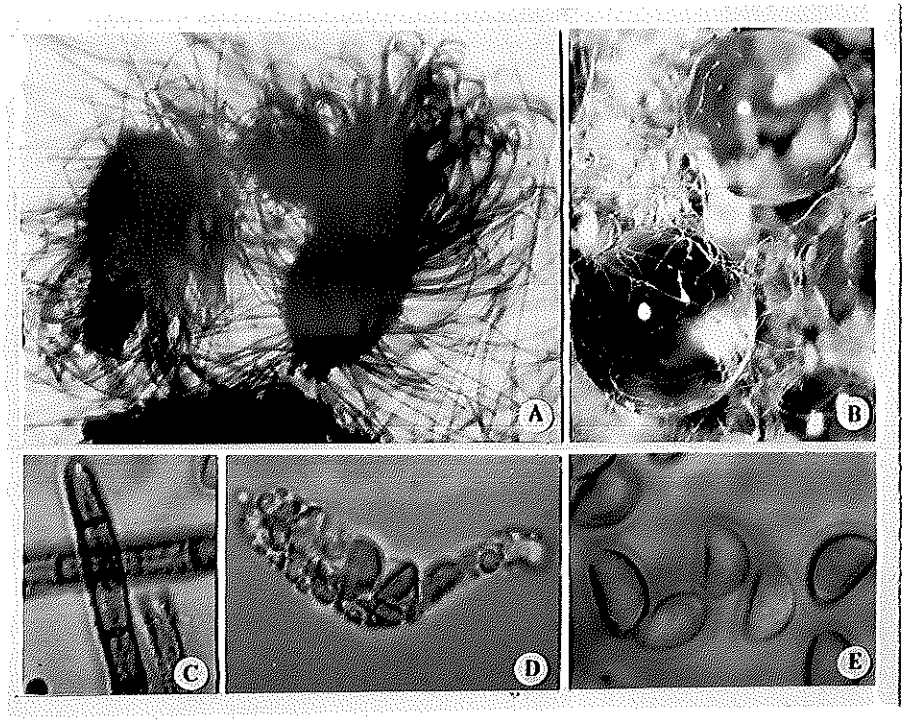
4. *C. gracile* (ภาพที่ 31) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 6 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 002.11, 010.41, 1, 016.41, 028.32, 040.20 และ 045.13

เชื้อราบน PDA มี ascomata สีเทา หรือสีเขียวขี้ม้า สร้าง exudate สีเหลืองออกเขียว อาหารใต้โคโลนีสีดำ หรือสีเหลือง หรือสีไม่เปลี่ยนแปลง

Ascomata รูปร่างค่อนข้างกลม หรือรี มีปากเปิด ขนาด 110-180 µm ส่วน ascomatal hair ขึ้นที่บริเวณรอบๆ ปากเปิด มีลักษณะส่วนปลายโค้ง โคนบวมเล็กน้อย มีผนังกั้น ผิวมีหนาม

Ascus รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) มี stalk ประกอบด้วย ascospore จำนวน 8 spore มีขนาด 36-50x10-14 µm

Ascospore รูปร่างรี มีรูตรงส่วนปลายสปอร์ 1 หรือ 2 รู เมื่อแก่เป็นสีน้ำตาล มีขนาดเท่ากับ 11-15x6-8.5 µm



ภาพที่ 31. *Chaetomium gracile* (002.11)

A) ascomata (100x)

B) yellow exudate

C) ascomatal hair (1,000x)

D) ascus (1,000x)

E) ascospore (1,000x)

5. ***Chaetomium*** **sp.5** สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 3 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ 011.11, 045.22 และ 047.22

เชื้อราบน PDA มีเส้นใยฟู สีขาว ascomata สีเทาดำ และมี exudate สีแดง

Ascomata รูปร่างกลม หรือรี มีขนาด 75-100 µm ascomatal hairs ค่อนข้างสั้น ปลายโค้งหรือม้วน 1-2 รอบ มี septate และผิวมีหนาม

Ascus รูปร่างคล้ายกระบอง มี stalk ascus แต่ละอันมี ascospore จำนวน 8 spore ขนาด 35-45x12-17 µm

Ascospore รูปร่างรียาว มีขนาด 11-14x7-9 µm มีรูที่ปลายทั้ง 2 ข้างจำนวน 2 รู และเมื่อแก่มีสีน้ำตาล

ลักษณะโดยทั่วไปคล้าย *C. flavigenum* (von Arx *et al*, 1986) แต่ต่างกันที่สีของ exudate และขนาด ascomata ซึ่ง *C. flavigenum* มี exudate สีส้มและมีขนาด ascomata เล็กกว่าคือเท่ากับ 75-100 µm หรือคล้ายกับ *C. aureum* ที่มี exudate ascomata และ ascus คล้ายกัน แต่มีขนาดของสปอร์ และรูปร่างซึ่งมีขนาดเล็กกว่าคือ 8-12 x4-7 µm

6. *Chaetomium* sp.6 (ภาพที่ 32)สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 1 สายพันธุ์คือสายพันธุ์ 047.13

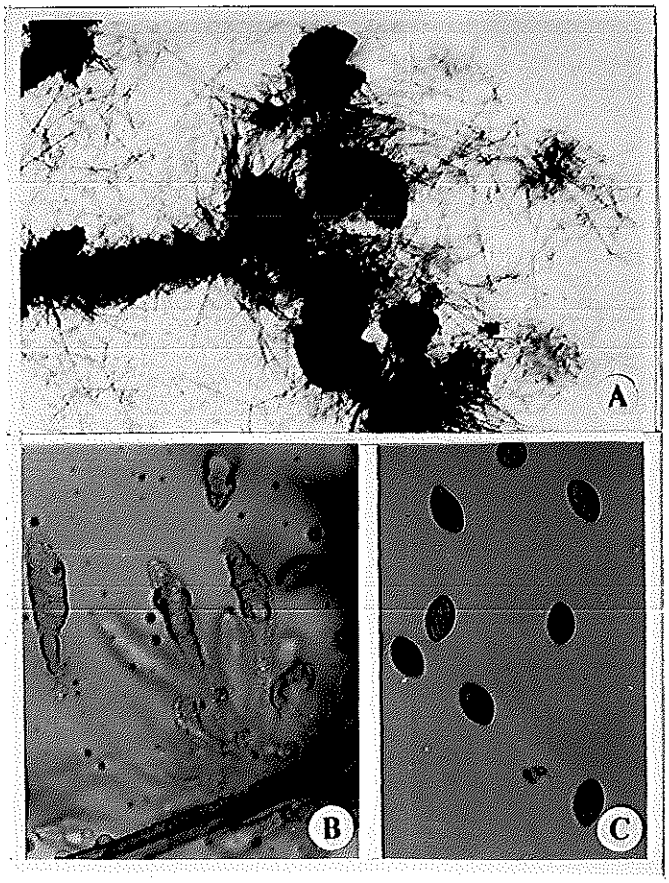
เชื้อราบน PDA มี ascomata สีเทา exudate สีเหลืองทอง ascomatal hair มีสีเทาค่อนข้างยาว

Ascomata รูปร่างกลม หรือรี มีขนาด 130-180 µm ascomatal hair มีลักษณะตรงปลายโค้งเล็กน้อย มี septate และ ผิวมีหนาม

Ascus รูปร่างค่อนข้างเรียว มี stalk สั้น ascus แต่ละอันมี ascospore จำนวน 8 spore มีขนาด 23-25x6.5-8 µm

Ascospore รูปร่างสปอร์รี มีรู 2 รู ที่ปลายทั้งสองข้างชัดเจน ขนาด 4.5-5x7.5-8 µm

เชื้อ *Chaetomium* ชนิดนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับ *C. veriostiolatum* ของ von Arx และคณะ (1986) คือ มี exudate สีเหลือง ascomata สีเทาเหมือนกัน แต่ขนาดของ ascospore ของ *Chaetomium* ชนิดนี้โตกว่าคือป่องตรงกลางมากกว่า และ ascus ค่อนข้างเรียวกว่าและ hair มี septate ชัดเจน



ภาพที่ 32 *Chaetomium* sp.6 (047.13)

A) ascomata (100x)

B) ascus (800x)

C) ascospore (800x)

7. *Chaetomium* sp.7 สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 035.41

เชื้อราบน PDA มี ascomata และ ascomatal hair สีเขียวสด สร้าง exudate สีเหลืองออกเขียว และ อาหารใต้โคโลนีเชื้อเปลี่ยนเป็นสีดำ

Ascomata รูปร่างค่อนข้างกลม หรือรี ขนาด 94-100x105-120 µm ส่วน ascomatal hair ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่รอบปากเปิด มีลักษณะค่อนข้างตรงและยาว ปลายโค้งเล็กน้อย มี septate และผิวเป็นหนาม

Ascus รูปร่างคล้ายกระบอง มี stalk ค่อนข้างสั้น ascus แต่ละอันมี ascospore จำนวน 8 spore มีขนาด 25-30x10-12 µm

Ascospore รูปร่างรีตรงกลางสปอร์ป่องมาก (ellipsoidal) ที่ปลาย spore มีรู 2 รู ซึ่งเห็นได้ชัด มีขนาด 5-8x7-9.5 µm

เชื้อ *Chaetomium* ชนิดนี้มีลักษณะส่วนใหญ่คล้ายกับ *C. gracile* แต่แตกต่างกันที่มีขนาดของสปอร์ป้อมกว่าเกือบกลมและมีรูที่ปลาย 2 รูซึ่งเห็นได้ชัด ในขณะที่สปอร์ของ *C. gracile* มีรูปร่างรีและยาวกว่า มีรู 1 หรือ 2 รู

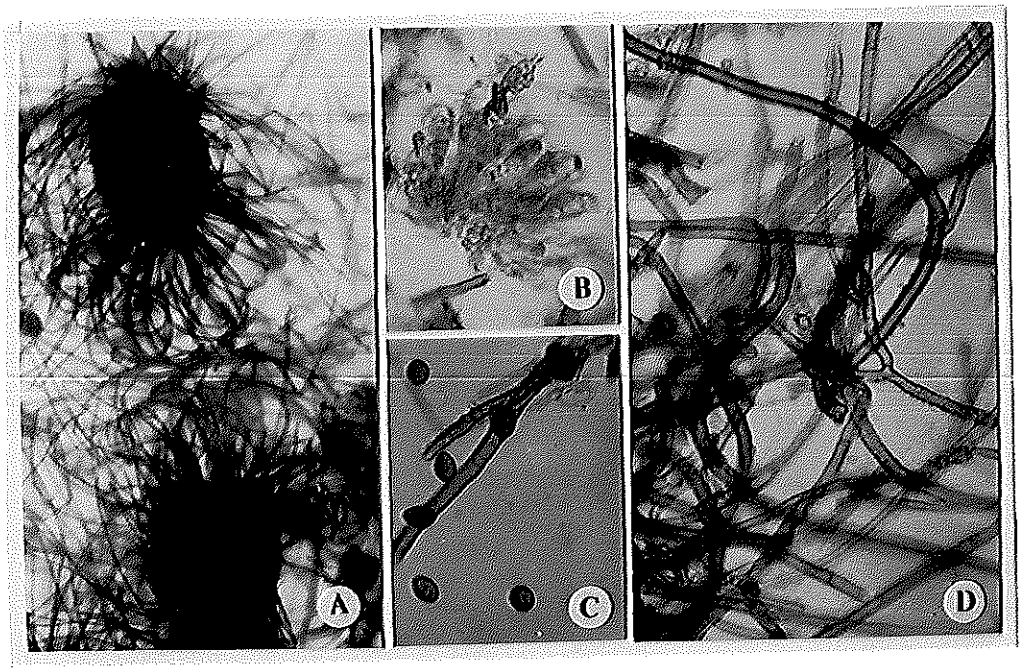
8. *Chaetomium* sp.8 (ภาพที่ 33) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 1 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 054.13

เชื้อราบน PDA มีเส้นใยขาวฟูปกคลุม ascomata ซึ่งมีสีเทาดำ อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือสีดำ สร้าง exudate สีเหลือง

Ascomata รูปร่างค่อนข้างกลม หรือค่อนข้างรี มีขนาด 90-160 µm ส่วนปลายของ ascomatal hair โค้งเล็กน้อย และบางเส้นอาจม้วนขดหลวมๆ ประมาณ 1-3 ขด มี septate ผิวเป็นหนาม สีน้ำตาล

Ascus รูปร่างคล้ายกระบอง มี stalk ascus แต่ละอันมี ascospore จำนวน 8 spore มีขนาด 8x29 µm

Ascospore รูปร่างรีค่อนข้างกลม มีรู 1 รูที่ปลาย มีขนาด 4-6x6-8 µm



ภาพที่ 33. *Chaetomium* sp.8 (054.13)

A) ascomata (200x)

B) ascus (400x)

C) ascospore (400x)

D) hyphae (400x)

9. *Chaetomium* sp.9 สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 1 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 045.21

เชื้อราบน PDA มี ascomata และ ascomatal hairs สีเทาดำ มี exudate สีเหลือง

Ascomata รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาด 120-200 µm มี ascomatal hair เฉพาะที่รอบๆ ปากเปิด มีลักษณะคล้ายเส้นขน (setea like) คือที่โคนกว้างและค่อยๆเรียวสู่ปลายซึ่งแหลม มี septate แต่ไม่ชัด ผิวเป็นหนาม และสีน้ำตาล

ascus รูปร่างคล้ายกระบอง มี stalk ascus แต่ละอันมี ascospore จำนวน 8 spore มีขนาด 20-30x7-12 µm

Ascospore รูปร่างเกือบกลม ขนาด 4.5-5x4.5-5.5 µm ที่ปลายสปอร์มีรู 1 รู ส่วนปลายตรงข้าม ambonate

เชื้อ *Chaetomium* ชนิดนี้มีลักษณะทั่วไปคล้ายกับ *Chaetomium* sp.8 มาก แต่ต่างกันที่ *Chaetomium* sp.9 มีขนาดสปอร์เล็กกว่า และมี ascomatal hair ตรงคล้ายเส้นขนปลายแหลมในขณะที่ ascomatal hair ของ *Chaetomium* sp.8 ปลายไม่แหลม

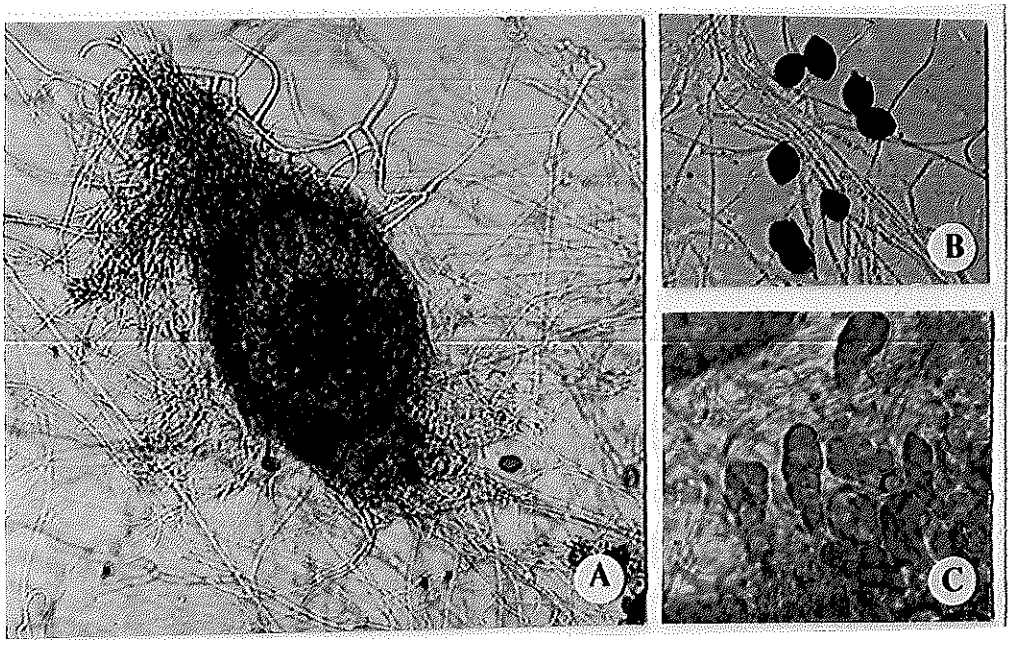
10. *Chaetomium* sp.10 (ภาพที่ 34) สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 1 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 046.11

เชื้อราบน PDA มี ascomata และ ascomatal hair สีขาว ascomota แก่หลังจากปลูกเชื้อภายใน 14วัน สร้าง exudate สีชมพูอมส้ม อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีม่วงอ่อน

Ascomata รูปร่างค่อนข้างกลม ไม่มีปากเปิด มีขนาด 55x70 µm มีผนังใสมองเห็น ascus และ ascospore ที่อยู่ภายในได้ ส่วน ascomatal hair ขึ้นอยู่รอบ ascomata มีลักษณะยาวเหมือนเส้นใย ใส ผิวเรียบ มี septate แต่ไม่เด่นชัด

Ascus รูปร่างคล้ายกระบอง มี stalk ascus แต่ละอันมี ascospore จำนวน 8 spore มีขนาด 9-10x20 µm

Ascospore รูปร่างรี มีขนาด 5-6x8-10 µm มีรูที่หัวท้าย 2 รู เมื่อแก่มีสีน้ำตาลเข้ม



ภาพที่ 34. *Chaetomium* sp.10 (046.11)

A) ascomata (200x)

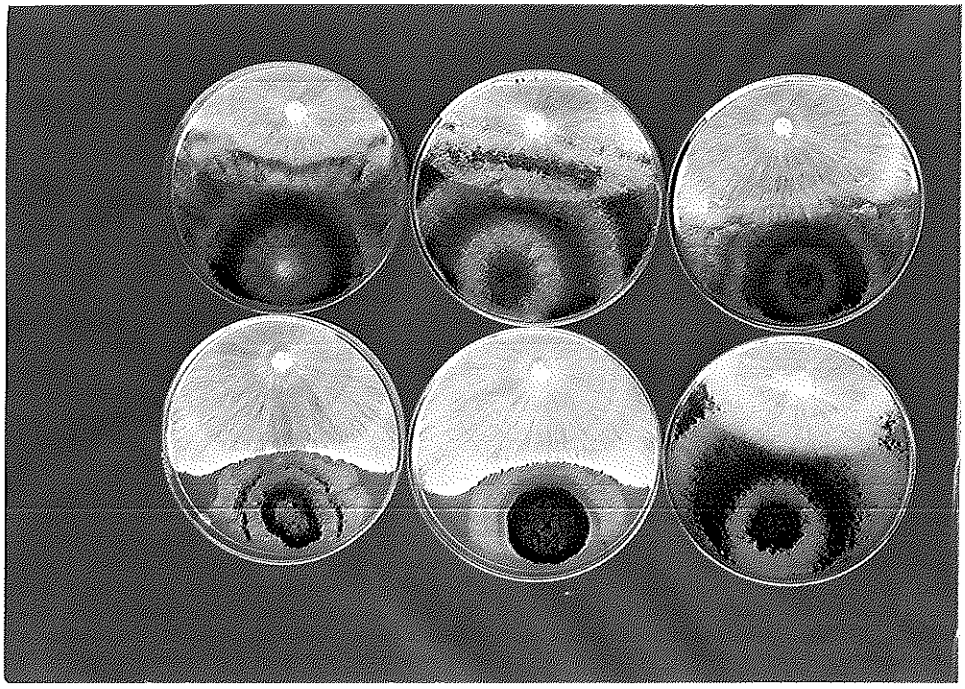
B) ascomata and ascomatal hair (400x)

C) ascus (400x)

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2.1 การทดสอบเชื้อ *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 78 สายพันธุ์ ต่อเชื้อ *R. lignosus* เบื้องต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. 10 วันปรากฏว่าเกิดปฏิกิริยา 2 แบบคือ 1)เชื้อ *Trichoderma* spp. เจริญคลุมทับเชื้อรา *R. lignosus* และ 2)เชื้อราทั้ง 2 ชนิดเจริญพบกันแล้วหยุดการเจริญ (ภาพที่ 35) ลักษณะของปฏิกิริยาในบางสายพันธุ์ของ *Trichoderma* จะพบว่าอาหารใต้บริเวณที่เชื้อเจริญคลุมเชื้อ *R. lignosus* มีลักษณะเป็นสีเหลืองส้ม(ภาพที่ 36) ทั้งนี้อาจจะเป็นเอนไมซ์ของเชื้อ *Trichoderma* ที่สร้างขึ้นเพื่อย่อยสลายเชื้อ *R. lignosus* เนื่องจากเชื้อ *Trichoderma* spp. สามารถสร้างและปล่อยเอนไซม์กลูแคเนส(ß-(1,3)-glucanase) และไคติเนส(chitinase) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และพบว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่สามารถเจริญคลุมโคโลนี ของเชื้อ *R. lignosus* ได้มากกว่า หรือเท่ากับความสามารถของเชื้อ *T. harzianum* จากประเทศอินโดนีเซีย มีทั้งหมด 9 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่รหัสเลขที่ 006.21, 007.11, 027.11, 035.11, 042.11, 043.11, 043.14, 045.11 และ 057.13 (ตารางภาคผนวกที่ 12)



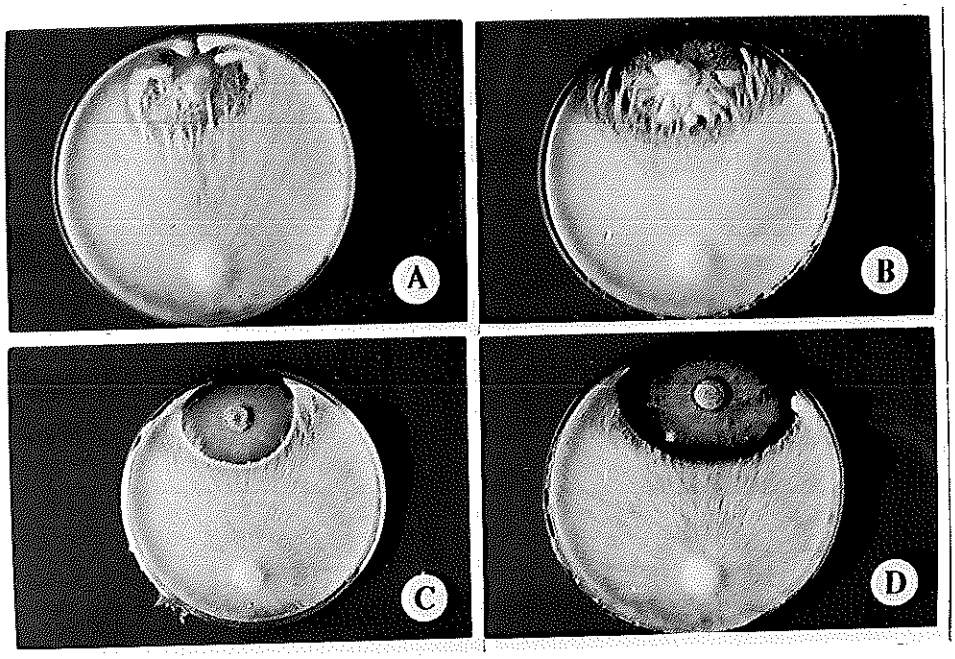
ภาพที่ 35. ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ *Trichoderma* spp.กับ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. 5 วัน

ภาพที่ 36. ลักษณะการเกิดสีใต้โคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อ *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์เจริญครอบคลุมเชื้อ *R. lignosus*

4.2.2 การทดสอบเชื้อ *Chaetomium* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Chaetomium* spp. ต่อเชื้อ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบลักษณะของปฏิกิริยา 2 ลักษณะ (ภาพที่ 37) คือ 1) เจริญพบกันแล้วหยุดมีบริเวณใส(clear zone) แคบ ๆ ส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อ *C. cupreum* และ *C. fusiforme* ที่เป็นโคโลนีสีแดง และ 2) เชื้อ *R. lignosus* เจริญคลุมบนโคโลนีเชื้อ *Chaetomium* spp. และ เมื่อเวลานานขึ้นประมาณ 15 วัน เส้นใยของเชื้อ *R. lignosus* เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและปรากฏกลุ่ม ascomata เจริญบนเชื้อ*R. lignosus*จากผลการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ (ตารางภาคผนวกที่ 13) พบว่าเชื้อ *Chaetomium* spp. บางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* (ปฏิกิริยาที่ 1) คือสายพันธุ์ 001.23, 014.31, 016.31, 018.11, 019.41, 023.31, 028.31, 028.32, 032.21, 034.31, 040.1, 046.11, 046.12, 046.31, 047.33, 054.11, 054.12 และสายพันธุ์ 056.11 Di Pietro และคณะ(1992) รายงานว่า *Chaetomium* มีคุณสมบัติต่อการเป็นเชื้อราต่อต้าน คือเป็น mycoparasitism โดยการใช้เส้นใยรัดพันเส้นใยราชนิดอื่น เช่น *Pythium* spp. , *Rhizoctonia* spp. และมีคุณสมบัติในการเป็น antibiosis โดยสร้างสารปฏิชีวนะ ดังนั้นการที่เส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและการเกิดบริเวณใสเล็กน้อยในบางสายพันธุ์ซึ่งไม่ค่อยเด่นชัดนักจึงอาจเป็นไปได้ที่เชื้อ *Chaetomium* ชนิดนั้นเป็นทั้ง mycoparasitism และสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งเป็นพิษต่อเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* Boudreau และ Andrews (1987) กล่าวว่าการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะของ *Chaetomium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อมักขึ้นกับ ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ และสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

ในการทดลองครั้งนี้ได้คัดเลือกเชื้อราเฉพาะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* (ปฏิกิริยาที่ 1) จากกลุ่มดังกล่าวจำนวน 10 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 028.31, 034.31, 019.41, 032.21, 023.31, 018.11, 028.32, 016.31, 014.31 และ 047.33 เพื่อใช้ทดสอบในดินที่บรรจุในหลอดทดลองต่อไป



ภาพที่ 37. ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของเชื้อ *Chaetomium* spp. กับ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังปลูกเชื้อ 7 วัน

A) *R. lignosus* เจริญคลุมทับ *Chaetomium* spp. (017.41)

B) *R. lignosus* เจริญคลุมทับ *Chaetomium* spp. (005.11) และเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

C) *R. lignosus* และ *Chaetomium* spp. (001.43) เจริญพบกันและหยุดการเจริญ

D) *R. lignosus* และ *Chaetomium* spp. (001.12) เจริญพบกัน และปรากฏบริเวณใสเล็กน้อย

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ในดิน

4.3.1 การทดสอบเชื้อ *Trichoderma* spp. ในดิน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* spp.ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นั้น ได้นำเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการเจริญครอบคลุมโคโลนีของเชื้อ *R. lignosus* ได้มากกว่าหรือเท่ากับความสามารถของเชื้อ *T. harzianum* จากประเทศอินโดนีเซียทั้ง 9 สายพันธุ์ และ *T. harzianum* จากประเทศอินโดนีเซียมาศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *R. lignosus* ในดิน เพื่อให้สภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับธรรมชาติโดยการทำให้เชื้อเจริญเข้าหากันในดินที่ทดสอบ พบว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *R. lignosus* ได้ดีและเจริญได้เร็วกว่าเชื้อ *Trichoderma* สายพันธุ์อื่นๆ คือ เชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์จากอินโดนีเซีย และสายพันธุ์ 042.11 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ได้ดีแตกต่างจากเชื้อ *Trichoderma* สายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อ *Trichoderma* สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* รองลงมา คือสายพันธุ์ 057.13, 045.11, 043.11, 007.11, 006.21, 035.11, 043.14 และสายพันธุ์ 027.11 ตามลำดับ แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนในดินที่ไม่มีเชื้อ *Trichoderma* spp. นั้นพบว่าเชื้อ *R. lignosus* สามารถเจริญได้ดีที่สุดและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(ตารางที่ 8, ภาพที่ 38) การที่เชื้อ *Trichoderma* บางสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญโดยการเจริญขึ้นคลุมเชื้อ *R. lignosus* บน PDA ได้แสดงว่าเชื้อ *Trichoderma* สายพันธุ์นั้นสามารถเจริญแข่งขัน(competition) ในการใช้อาหารวุ้นกับเชื้อ *R. lignosus* ได้ และจากการทดลองพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเส้นใยของเชื้อ *R. lignosus* เปลี่ยนเป็นสีเหลืองน้ำตาล และขาดเป็นท่อนๆ ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนจากการทดสอบในดินแสดงว่าเกิดการย่อยสลายของเส้นใย Hadar และคณะ (1979) รายงานว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. สามารถสร้างเส้นใยพันรัดเส้นใยของเชื้อราบางชนิด และปล่อยเอนไซม์ไคติเนส และ กลูแคเนส เพื่อย่อยสลายเส้นใยของเชื้อราเหล่านี้สำหรับใช้เป็นอาหารแหล่งคาร์บอนในการเจริญ

จากการตรวจสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. แต่ละสายพันธุ์ในหลอดทดลองเดียวกัน โดยการวัดระยะที่เจริญลงในดิน พบว่า *Trichoderma* spp. ที่เจริญได้เร็วและแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ สายพันธุ์จากประเทศอิน-โดนีเซีย และ สายพันธุ์ 042.11 รองลงมาตามลำดับคือสายพันธุ์ 043.11, 057.13, 045.11, 006.21, 007.11, 043.14, 027.11 และสายพันธุ์ 035.11 (ตารางที่ 8) โดยที่เชื้อ *Trichoderma* spp. สายพันธุ์ 006.21 และ สายพันธุ์ 042.11 เป็นเชื้อราที่แยกบริสุทธิ์ได้จากดินบริเวณโคนต้นยางที่ไม่เป็นโรคจาก ตำบลพะตง อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา และ ตำบลทุ่งตะโก อำเภอทุ่งตะโก จังหวัดชุมพร ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Trichoderma*

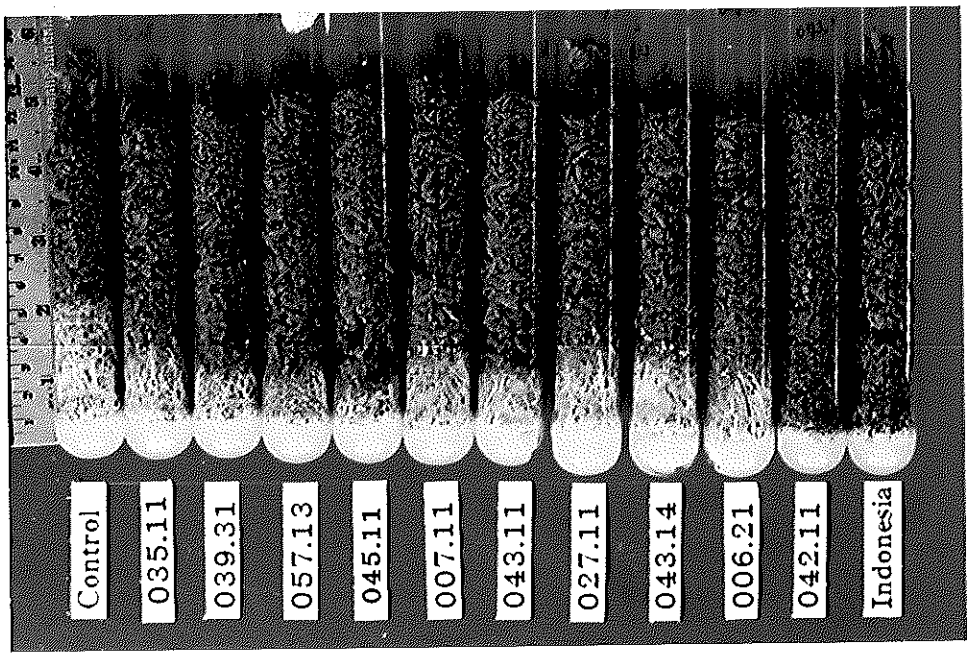
spp. สายพันธุ์ 007.11, 027.11, 035.11, 043.11 และ 043.14, 045.11 และสายพันธุ์ 057.13 เป็นเชื้อราที่แยกบริสุทธิ์ได้จากดินบริเวณโคนต้นยางที่เป็นโรคจาก สถานีทดลองยางนราธิวาส, ตำบลศรีสาคร อำเภอศรีสาคร จังหวัดนราธิวาส, ตำบลปากจั่น อำเภอกระบุรี, สถานีทดลองยางระนอง จังหวัดระนอง, ตำบลแม่นางขาว อำเภอคุระบุรี จังหวัดพังงา และ ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช ตามลำดับ

จากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *R. lignosus* และความสามารถในการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. จึงได้คัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. สายพันธุ์จากประเทศอินโดนีเซีย, 042.11, 057.13 และสายพันธุ์ 045.11 นำไปทดสอบในสภาพเรือนทดลองต่อไป ซึ่งจากการจำแนกชนิดปรากฏว่าเชื้อราสายพันธุ์เหล่านี้จัดเป็น *T. harzianum 3* สายพันธุ์ และไม่ทราบชนิด 1 สายพันธุ์ (042.11)

ตารางที่ 8. การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* และเชื้อ *Trichoderma* spp. ในดินที่ใส่เชื้อ *Trichoderma* spp. ในหลอดทดลอง

สายพันธุ์เชื้อ *Trichoderma* spp.	การเจริญของเชื้อ(มิลลิเมตร) หลังจากปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp.			
	5 วัน		10 วัน	
	R. lignosus	*Trichoderma* spp	*R. lignosus*	*Trichoderma* spp
ควบคุม	19.7b	0.0g	71.8a	0.0g
006.21	18.3b	67.0c	23.7b	92.8cd
007.11	17.7b	51.8de	23.7b	91.5cd
027.11	27.2a	45.7e	26.2b	91.0cd
035.11	19.3a	41.3f	25.7b	82.8d
042.11	15.3b	102.3b	7.2c	108.7ab
043.11	17.5b	59.3cd	20.2b	97.0bc
043.14	19.2b	51.17def	25.8b	91.5cd
045.11	17.8b	55.0cde	19.3b	93.7cd
057.13	18.3b	54.8cde	18.5b	94.8cd
อินโดนีเซีย	8.0c	116.7a	3.3c	120.0a
C.V. (%)	34.19	34.19	26.84	12.55

ค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 38. ลักษณะการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp สายพันธุ์ต่าง ๆต่อเชื้อ *R. lignosus* ในดินหลังจากปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. 10 วัน

4.3.2 การทดสอบเชื้อ *Chaetomium* spp. ในดิน

การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Chaetomium* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* จำนวน 10 สายพันธุ์ในหลอดทดลองโดยให้เชื้อ *R. lignosus* เจริญเข้าสู่ดินที่มีเชื้อ *Chaetomium* spp. ผสมอยู่ (ตารางที่ 9,ภาพที่ 39) พบว่าในช่วงระยะ 5 วันแรกของการทดลองเชื้อ *R. lignosus* สามารถเจริญได้ไม่แตกต่างกับดินควบคุมที่ไม่ผสมเชื้อ *Chaetomium* spp. ยกเว้นในดินที่ผสม *Chaetomium* spp. สายพันธุ์ 047.33 แต่หลังจากนั้นเชื้อ *R. lignosus* มีการเจริญที่แตกต่างกันค่อนข้างชัดเจนขึ้น ในวันที่ 10 พบว่าเชื้อ *Chaetomium spp.* ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. lignosus* ได้ และมีความแตกต่างกับการเจริญในดินควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามลำดับ คือเชื้อ *Chaetomium* spp. สายพันธุ์ 028.31, 034.31, 019.41, 032.21, 023.31, 018.11, 028.32, 016.31, 014.31, และสายพันธุ์ 047.33 ซึ่งเชื้อ *R. lignosus* สามารถเจริญได้ 52.0, 54.2, 57.4, 58.4, 58.6, 64.2, 64.4, 70.4, 76.6 และ 88.2 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านของเชื้อ *Chaetomium* spp. ที่สามารถทำให้เชื้อ *R. lignosus* เจริญได้น้อยกว่าการเจริญในดินควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินั้น จะเห็นว่าทุกสายพันธุ์สามารถต่อต้านเชื้อ *R. lignosus* ได้น้อยกว่า 45 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลานานถึง 20 วัน เชื้อ *R. lignosus* ยังเจริญได้ดีไม่ปรากฏการถูกทำลายที่เด่นชัด ดังนั้นจึงไม่พิจารณา *Chaetomium* spp. มาทดสอบในขั้นเรือนทดลอง Brewer และ Taylor (1978) อ้างโดย Bodreau และคณะ(1987) กล่าวว่าการเจริญและการสร้างสารปฏิชีวนะมักเกี่ยวข้องกับชนิดและสภาพของอาหารขณะนั้น เช่นในอาหารที่ไม่สมบูรณ์สปอร์จะไม่งอก นอกจากนี้ในสภาพธรรมชาติ สารปฏิชีวนะมักไม่คงทน(unstable)

ตารางที่ 9. การเจริญของเชื้อ *R. lignosus* (R)ในดินที่ผสมเชื้อ *Chaetomium* spp. (C) ในหลอดทดลอง

สายพันธุ์เชื้อ	การเจริญ (มิลลิเมตร)ของเชื้อ R หลังจากปลูกเชื้อ C		
Chaetomium spp.	5 วัน	8 วัน	10 วัน
ควบคุม	33.4b	64.4ab	88.2a
014.31	35.4b	59.4ab	70.4bc
016.31	35.8b	56.2bc	64.4cd
018.11	35.8b	51.8cd	58.6de
019.41	33.8b	50.8cd	57.4de
023.31	33.8b	45.8d	58.4de
028.31	33.0b	45.4d	52.0e
028.32	34.6b	57.4ab	64.2cd
032.21	32.8b	53.0cd	57.4de
034.31	33.8b	48.0cd	54.2e
047.33	42.4a	66.4a	76.6b
C.V. (%)	13.95	12.79	10.25

ค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 39. เปรียบเทียบความเจริญในการยับยั้งเชื้อ *R. lignosus* ของเชื้อ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *Chaetomium* spp. หลังบรรจุดินผสมเชื้อ *Trichoderma* spp. หรือ *Chaetomium* spp. 5 วัน

4.4 ความสามารถในการเป็นเชื้อราต่อต้านของเชื้อ *Trichoderma* spp. ในสภาพเรือนทดลอง

การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อราต่อต้านของ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *R. lignosus* ในสภาพห้องปฏิบัติการ สามารถคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จากประเทศอินโดนีเซีย (*T. harzianum*), 042.11 (*Trichoderma* sp.10), 057.13 (*T. harzianum*) และสายพันธุ์ 045.11 (*T. harzianum*) มาทดสอบในสภาพเรือนทดลองโดยวิธีการจุ่มรากในสารแขวนลอยสปอร์เชื้อ *Trichoderma* ก่อนปลูกปรากฏว่า (ตารางที่ 10) กรรมวิธีที่จุ่มรากยางด้วย *Trichoderma* spp. ทำให้ต้นยางแสดงอาการเป็นโรคใบเหลืองและตายมากกว่ากรรมวิธีที่ปลูกด้วยเชื้อราโรครากขาวเพียงชนิดเดียว โดยจะเห็นว่ากรรมวิธีที่ปลูกเชื้อ *R. lignosus* เพียงอย่างเดียวเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อ *R. lignosus* และที่จุ่มรากด้วย *Trichoderma* สายพันธุ์จากประเทศอินโดนีเซีย, 045.11, 057.13 และสายพันธุ์ 042.11 ทำให้ต้นกล้ายางแสดงอาการของโรคและตายเพิ่มขึ้นตามเวลาหลังปลูกเชื้อ พบว่าในช่วงระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ 90 วันมีต้นกล้ายางที่เป็นโรคและตาย 32, 84, 68, 60 และ 48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับในกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ *R. lignosus* และ *Trichoderma* spp. ปรากฏว่ามีต้นกล้ายางตาย 1, 3, 4 และ 4 ต้น หรือ 4, 12 , 16 และ 16 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปลูก 45, 60, 75 และ 90 วัน ตามลำดับ ทั้งนี้อาจตายเนื่องจากบางต้นระบบรากอาจได้รับการกระทบกระเทือนในช่วงระยะปลูกเช่น รากหักพับ ทำให้เน่าไม่สามารถเจริญและงอกรากใหม่ได้ หรือยอดอาจจะเหี่ยวแล้วทำให้เกิดอาการตายแห้งลามสู่ลำต้นทำให้ต้นตายได้เช่นเดียวกัน สำหรับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อ *R. lignosus* และจุ่มรากด้วยเชื้อ *Trichoderma* นั้นต้นกล้ายางตายเนื่องจากสาเหตุของเชื้อโรครากแล้ว อาจจะมีจำนวนต้นตายโดยสาเหตุเหล่านี้ก่อนด้วยเช่นกัน แต่จำนวนที่ตายโดยสาเหตุนี้ไม่ควรจะแตกต่างกับจำนวนต้นกล้ายางที่ตายในกรรมวิธีควบคุม เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อด้วย *R. lignosus* เพียงชนิดเดียวพบว่ามีจำนวนต้นที่ตายมากกว่าโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์จากประเทศอินโดนีเซียร่วมด้วยมีต้นยางตายถึง 84 เปอร์เซ็นต์

Fanta และคณะ (1992) รายงานว่าเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *T. harzianum* สามารถย่อยสลายเนื้อไม้พืชได้ โดยย่อยสลายเฉพาะเนื้อเยื่อพืชที่เป็นบาดแผลมาก่อนแล้วเท่านั้น นั่นคือถ้าพืชเกิดบาดแผลโดยการกระทำของแมลง หรือโดยวิธีกลต่าง ๆ(mechanical forces) เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สามารถเข้าย่อยสลายผนังเซลล์พืชซึ่งปกติไม่สามารถย่อยสลายได้มาใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญ เช่นเดียวกับการรายงานของ Goodman (1986) กล่าวว่าในสภาพธรรมชาติเชื้อ *T. viride* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในดินที่ไม่ได้เป็นเชื้อสาเหตุของโรคแต่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสได้มาก สามารถย่อยเซลลูโลสของพืชที่เป็นโรคได้สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ ที่รากยางพารามีบาด

แผลจากการถอนย้ายและตัดแต่งก่อนจุ่มรากลงในสารแขวนลอยของเชื้อ *Trichoderma* spp. จึงเป็นไปได้ที่เชื้อ *Trichoderma* spp. ซึ่งปกคลุมรากของต้นกล้ามีส่วนในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเข้าย่อยสลายเซลลูโลสของรากยางจึงส่งเสริมให้ต้นกล้ายางที่ปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. ร่วมด้วยตายมากกว่าต้นกล้ายางที่ปลูกเชื้อ *R. lignosus* เพียงชนิดเดียว

นอกจากนี้วิธีการใช้ *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมเชื้อโรครากในการทดลองนี้อาจไม่เหมาะสม จากการทดลองของ Hadar และคณะ (1979) รายงานว่าประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชของ *T. harzianum* ขึ้นกับปริมาณเชื้อ ชนิดของวัสดุเพาะเลี้ยงเชื้อ(food base) และช่วงเวลาของการใส่เชื้อลงในดินปลูก โดยพบว่าการใช้รำข้าวสาลีเป็นวัสดุเพาะเลี้ยงเชื้อและใส่ลงในดินเพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia rolfsii* สามารถลดการเป็นโรคของต้นถั่วได้มากกว่าใช้น้ำแขวนลอยสปอร์ และการใส่เชื้อในดินก่อนปลูกพืชจะให้ผลในการควบคุมได้ดีกว่าใส่เชื้อและปลูกพืชในเวลาที่ใกล้เคียงหรือในเวลาเดียวกัน นอกจากนี้ Liu และ Baker (1980) รายงานว่าลักษณะของดินที่มีความร่วนซุยสามารถทำให้เชื้อ *Trichoderma* สามารถดำรงชีพและเพิ่มปริมาณได้มากจึงสามารถควบคุมโรคได้ดีกว่า ในการทดลองนี้ดินที่ใช้ทดสอบเป็นดินเหนียวร่วนปนทรายละเอียดและมีส่วนประกอบของอินทรียวัตถุต่ำ (ตารางภาคผนวกที่ 10) ประกอบกับใช้วิธีการปลูกเชื้อโดยจุ่มรากต้นกล้าในน้ำแขวนลอยสปอร์ก่อนปลูก จึงอาจทำให้การควบคุมโรคไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการศึกษาวิธีการปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่เหมาะสม และควรศึกษาผลกระทบของเชื้อ *Trichoderma* ต่อการเกิดโรครากขาวของยางพาราด้วย

ได้มีการนำเชื้อรา *Trichoderma* มาควบคุมโรครากในพืชหลายชนิดซึ่งให้ผลในการควบคุมเป็นที่น่าพอใจในระดับหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ คือ เจริญและขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว ทนทานต่อสภาวะแวดล้อม เช่น สามารถทนทานต่อสภาวะความแห้งแล้ง และอุณหภูมิสูงได้ดี ทนต่อระดับ pH ของดินได้ดี ดังผลการทดลองตารางภาคผนวกที่ 9 พบว่าที่ระดับความเป็นกรดจัดคือ pH 3 และด่างจัดคือ pH 10 เชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์จากประเทศอินโดนีเซียสามารถเจริญได้ดีไม่แตกต่างกับระดับ pH อื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถแปรรูปโดยผลิตเป็นรูปเม็ดตามขบวนการของเภสัชกรรมได้ ซึ่งพบว่าสามารถเจริญได้ดีแม้ว่าจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปกติในภาชนะนานถึง 6 เดือนก็ตาม (Kanjanamaneesathian *et al.*, 1995) ดังนั้นการนำมาใช้ควบคุมโรครากพืช และการใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆเพื่อให้เกิดผลในการควบคุมสูงสุดควรจะมีการศึกษาและพัฒนา โดยเฉพาะในการควบคุมโรกรากขาวของยางพาราต่อไป

ตารางที่ 10. จำนวนต้นกล้ายางที่ตายหลังการปลูกเชื้อ *R. lignosus* (R) และ *Trichoderma* spp. (T) 4 สายพันธุ์ในเรือนทดลอง

กรรมวิธี	จำนวนต้นตายหลังจากปลูกเชื้อ			
	45 วัน	60 วัน	75 วัน	90 วัน
1. ไม่ปลูกเชื้อ	1(4)	3(12)	4(16)	4(16)
2. ปลูกเชื้อ *R. lignosus*(R)	1(4)	3(12)	8(32)	8(32)
3. ปลูกเชื้อ R+T(Indonesia)	5(20)	13(52)	16(64)	21(84)
4. ปลูกเชื้อ R+T(057.13)	3(12)	9(36)	13(36)	15(60)
5. ปลูกเชื้อ R+T(045.11)	5(20)	13(36)	16(64)	17(68)
6. ปลูกเชื้อ R+T(042.11)	2(8)	6(24)	8(32)	12(48)

( ) = เปอร์เซ็นต์ต้นตาย

บทที่ 4

บทสรุป

1. ลักษณะอาการของโรค การเก็บตัวอย่าง และ การแยกเชื้อสาเหตุ

โรครากขาวของยางพาราเกิดจากเชื้อ *Rigidoporus lignosus* โดยเชื้อราเข้าทำลายต้นยางได้ทุกระยะ ทำให้เกิดอาการใบเหลืองและร่วง เซลล์เนื้อไม้ของรากยางถูกทำลายทำให้ต้นยางตาย เมื่อทำการแยกเชื้อราสาเหตุจากตัวอย่างดอกเห็ดและรากที่เป็นโรคจากสวนยางพารา 4 แห่ง พบว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์มีลักษณะไม่แตกต่างกัน คือเส้นใยมีลักษณะค่อนข้างหยาบสีขาว ไม่ฟูเจริญเร็ว เมื่ออายุมากขึ้นเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีส้มเหลือง จับตัวกันเป็นเส้นนูนกลมทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MA

2. การพิสูจน์เชื้อ และการพิสูจน์โรค

เชื้อ *R. lignosus* สามารถทำให้สร้างดอกเห็ดได้โดยเลี้ยงเชื้อในก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเห็ดในถุงพลาสติก และทำให้สร้างดอกโดยเปิดถุงพลาสติกออกเมื่อก้อนเชื้ออายุ 1 เดือนครึ่งแล้วฝังดินรดน้ำให้ความชื้น และเปิดถุงพลาสติกออกเมื่อก้อนเชื้ออายุ 3 เดือนรดน้ำให้ความชื้น พบว่าเชื้อราออกดอกเห็ดหลังจากเปิดถุงหรือฝังดินแล้ว 1 เดือนครึ่งถึง 2 เดือน และจากการทดลองโดยการปลูกเชื้อ *R. lignosus* กับต้นกล้ายางพารา พบว่าต้นกล้าเกิดอาการของโรคภายใน 2 เดือน และหลังจากนั้นอีกประมาณ 2 เดือน เชื้อราสร้างดอกเห็ดที่โคนของต้นกล้าที่ตาย

3. ลักษณะทางสรีรวิทยา

การทดสอบการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆพบว่าเชื้อ *R. lignosus* สามารถ

3.1 เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose straw extract broth, potato dextrose root rubber extract broth, potato dextrose yeast extract broth, potato dextrose broth, potato dextrose peptone yeast extract broth, V-8, glucose peptone broth และ malt extract broth ตามลำดับ และเจริญได้น้อยมากใน Czapek's solution

3.2 ใช้ฟรุคโตส มอลโตส กลูโคส เซลลูโลส และแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญได้ แต่ไม่สามารถใช้ แลคโตส ซูโครส และเดกแตรนได้

3.3 ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แอสปาราจีน เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญได้ดี ส่วนในอาหารที่มีกลูตาเมต แคลเซียมไนเตรต และโพแทสเซียมไนเตรต เชื้อราเจริญได้น้อยมากไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

3.4 เจริญได้ที่ระหว่าง pH 4-10 โดยเจริญได้ดีที่ระดับ pH 6-7

3.5 เจริญได้ดีที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ระดับอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า และที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า

3.6 เจริญในสภาพแสง 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมงไม่แตกต่างกับในสภาพมืดตลอด

3.7 เจริญในอาหารเหลวที่ผสมปุ๋ยโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 0-0.2 เปอร์เซ็นต์ต่างกันคือ

การเจริญด้านเส้นใยของเชื้อ *R. lignosus* มีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียมากขึ้น แต่มีแนวโน้มเจริญมากขึ้นในแอมโมเนียมคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีผลต่อการเจริญในแอมโมเนียมไนเตรตที่ระดับความเข้มข้น 0-0.2 เปอร์เซ็นต์

3.8 เจริญได้ดีขึ้น และลดลงในอาหารเหลวที่ผสมกำมะถันที่ระดับความเข้มข้น 0.05 และมากกว่า 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.9 เจริญลดลงในดินที่ผสมปุ๋ยแอมโมเนียมไนเตรต และ กำมะถันทุกระดับความเข้มข้น และ เจริญได้ดีขึ้นในดินที่ผสมยูเรียน้อยกว่า หรือเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเจริญลดลงในดินที่ผสมยูเรียมากกว่า 0.2 เปอร์เซ็นต์

4. การศึกษาและคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus*

4.1 สามารถจำแนกและแยกเชื้อ *Trichoderma* spp. ให้บริสุทธิ์ได้ 10 ชนิด 79 สายพันธุ์ คือ *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. piluliferum*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii*, *T. viride*, *Trichoderma* sp.9 และ *Trichoderma* sp.10 จำนวน 1, 47, 1, 4, 4, 5, 1, 8, 6 และ 2 สายพันธุ์ ตามลำดับ

เชื้อ *Trichoderma* spp ที่สามารถเจริญแข่งขันและครอบคลุมเชื้อ *R. lignosus* บนอาหาร PDA ได้ดีกว่าหรือเท่ากับความสามารถของเชื้อ *T. harzianum* จากประเทศอินโดนีเซียมี 9 สายพันธุ์ ส่วนการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในดินในหลอดทดลองจาก 9 สายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *T. harzianum* จากประเทศอินโดนีเซีย พบว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีตามลำดับคือ *T. harzianum* จากประเทศอินโดนีเซีย, *Trichoderma* sp.10 (สายพันธุ์ 042.11), *T. harzianum* สายพันธุ์ 057.13, 045.11, 043.11, 006.21, 007.11, 035.11, 027.11 และ 043.14 ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่แยกบริสุทธิ์ได้จากดินที่บริเวณโคนต้นยางที่เป็นโรค

ส่วนการทดสอบในสภาพเรือนทดลองซึ่งใช้เชื้อ *Trichoderma* spp. 4 อันดับแรกที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *R. lignosus* จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยวิธีการจุ่มรากต้นกล้ายางอายุ 1 ปีในสารแขวนลอยสปอร์ *Trichoderma* spp. ความเข้มข้น 10^8 สปอร์

ต่อมิลลิลิตร ปลูกต้นกล้าพร้อมกับการปลูกเชื้อ *R. lignosus* ปรากฏว่าไม่มีเชื้อ *Trichoderma* สายพันธุ์ใดป้องกันการเกิดโรคแต่กลับทำให้ต้นกล้ายางแสดงอาการของโรคมากขึ้น ซึ่งควรต้องมีการศึกษาหาสาเหตุและปรับปรุงวิธีการในการนำไปใช้ต่อไป

4.2 สามารถจำแนกและแยกเชื้อ *Chaetomium* spp. ให้บริสุทธิ์ได้ 10 ชนิด 63 สายพันธุ์ 10 ชนิดคือ *C. aureum*, *C. cupreum*, *C. fusiforme*, *C. gracile*, *Chaetomium* sp.5, *Chaetomium* sp.6, *Chaetomium* sp.7, *Chaetomium* sp.8, *Chaetomium* sp.9 และ *Chaetomium* sp.10 จำนวน 13, 11, 24, 6, 4, 1, 1, 1, 1 และ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ

การทดสอบความสามารถในการเจริญแข่งขันและยับยั้งเชื้อ *R. lignosus* บนอาหาร PDA ของเชื้อ *Chaetomium* spp.พบว่าเชื้อ *Chaetomium* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* ได้ 18 สายพันธุ์ ซึ่งเมื่อนำเชื้อ 10 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในดินซึ่งบรรจุในหลอดทดลองปรากฏว่าระยะแรกเชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อ *R. lignosus* ได้ไม่ถึง 45 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเชื้อ *R. lignosus* ก็ยังสามารถเจริญได้เป็นปกติ จึงไม่นำมาใช้ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

เอกสารอ้างอิง

จันทวรรณ คงเจริญ. 2541. "การสำรวจโรงงานแปรรูปยาง" เอกสารประกอบการประชุมวิชาการยางพาราประจำปี 2541 ครั้งที่2. วันที่ 1 กรกฎาคม 2541 ณ โรงแรมมารวยการ์เด้น กรุงเทพฯ. 12 หน้า.

ฉกรรจ์ แสงรักษาวงศ์. 2536. "ตลาดกลางยางพารา" เอกสารวิชาการเรื่องยาง. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 15-16.

ฉกรรจ์ แสงรักษาวงศ์. 2541. "บทบาทของสถาบันวิจัยยาง : การปรับตัวตามสถานการณ์ยาง" เอกสารประกอบการประชุมวิชาการยางพาราประจำปี 2541 ครั้งที่2. วันที่ 1 กรกฎาคม 2541 ณ โรงแรมมารวยการ์เด้น กรุงเทพฯ. 9 หน้า.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2533. โรคและศัตรูยางพารา. ศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. 49 หน้า.

วราภรณ์ ขจรไชยกูล. 2536. "อุตสาหกรรมการผลิตยาง" เอกสารวิชาการเรื่องยาง. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 83-109.

วสันณ์ เพชรรัตน์. 2538a. การเพาะเห็ดป่า : II เห็ดหูกวาง [*Lentinus strigosus* (schwein) Fr.]. วารสารสงขลานครินทร์ 17(1) : 57-68.

วสันณ์ เพชรรัตน์. 2538b. การเพาะเห็ดป่า : V เห็ดกระด้าง (*Lentinus polychrous* Lev.). วารสารสงขลานครินทร์ 17(3) : 271-280.

ศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์ สัญชัย ตันตยาภรณ์ พรรณี บุตรธนู และ สมพงษ์ อังโขรัมย์. 2531. หลินจือ เห็ดมีสรรพคุณทางยา. กสิกร 61(5). หน้า 427-433.

ศุภมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา. 2529. จุลชีววิทยาของอินทรีย์สาร. จุลชีววิทยาของดินเพื่อผลิตผลทางการเกษตร. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 335 หน้า.

สมพงศ์ สุขมาก. 2536. "การปรับปรุงพันธุ์ยางพารา" เอกสารวิชาการเรื่องยาง. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 15-16.

อรุณ ทรงมณี. 2525. การใช้ปุ๋ยเคมีอย่างมีประสิทธิภาพ ภาค 2:การใช้ปุ๋ยกับพืชต่าง ๆ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ จัดแปลและจัดพิมพ์. พิมพ์ครั้งที่ 4. 264 หน้า. แปลจาก Vladimir Egnatieff and Harold J. Page. 1958. Efficient Use of Fertilizers. F.A.O.

อุไร จันทรประทิน. 2534. "โรคและศัตรูยางพารา" เอกสารประกอบการบรรยายในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการทางวิชาการ เรื่อง การป้องกันและกำจัดโรคยางพารา. ระหว่างวันที่ 30 กันยายน-2 ตุลาคม 2534 จันทบุรี. 7 หน้า.

Askew, D. S., and M. D. Laing. 1994. The in vitro screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggressive strains. Plant and soils 159 : 277-281.

Azaldin, M. Y. 1985. Control of root disease of *Hevea* using sulphur. Planters' Bulletin 182 : 9-10.

Bakshi, B. K. 1971. Indian Polyporaceae (On Tree and Timber). 1st Printed April : 246 pages.

Bell, D. K., H. D. Wells, and C.R. Markham. 1982. In vitro antagonism of Trichoderma species against six fungi plant pathogen. Phytopathology 72 : 379-382.

Benhamou, N., and I. Chet. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology 83 : 1062-1071.

Boudreau, M. A., and J. H. Andrtews. 1987. Factors influencing antagonism of *Chaetomiun globosum* to *Venturia inaequalis*: A case study in failed biocontrol. Phytopathology 77 : 1470-1475.

Bremner, J. M. 1982. Nitrogen-Urea. *In* Methods of Soils Analysis, Chemical and Microbiological Properties. 2nd Edition (*edited* by A. L. Page, A. L. Miller, and D. R. Keeney). Number 9 (Part 2). Madison, Wisconsin USA. 699-708.

Chee, K. H. 1990. Present status of rubber diseases and their control. Review of Plant Pathology 69(7) : 423-430.

Chet, I., and R. Baker. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 71 : 286-290.

Cochrane, V. W. 1985. Physiology of Fungi. New York: Wiley.

Cook, R. J., and K. F. Baker. 1983. Approaches to biological control. *In* The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.

Di Pietro, A., M. Gut-Rella, J. P. Pachlatko, and F. J. Schwinn. 1992. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pytium ultimum*, a causal agent of damping-off. Phytopathology 82 : 131-135.

Elad, Y., I. Chet, and Y. Henis. 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Phytoparasitica 9(1) : 59-67.

Fageria, N. K., V. C. Baligar, and C. A. Jones. 1991. Essential nutrients and plant diseases. *In* Growth and Mineral Nutrition of Field Crops. Marcel Dekker, Inc. New York.

Fanta, N., A. Quaas, P. Zulueta, and L. M. Perez. 1992. Release of reducing sugars from *Citrus* seedlings, leaves and fruits. Effect of treatment with pectinase and cellulase from *Alternaria* and *Trichoderma*. Phytochemistry 3(10) : 3359-3364.

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*. Journal Rubber Research Institute of Sri lanka 54 : 329-362.

Garraway, M. O., and R. C. Evans. 1984. Fungal Nutrition and Physiology. New York : Wiley.

Gladstone, L. A., and G. W. Moorman. 1989. Pythium root rot of seedling geranim associated with various concentrations of nitrogen, phosphorus, and sodium chloride. Plant Disease 73 : 733-736.

Goodman, R. N. 1986. Cell wall composition and metabolism. *In* Biochemistry and Physiology of Plant Disease. University of Missouri Press : 105-149.

Hadar, Y., I. Chet and Y. Henis. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69 : 64-68.

Hashim, I., and M. Y. Azaldin. 1985. Interaction of sulphur with soil pH and root disease of hevea rubber. Journal of Rubber Research Institute of Malaysia 35 (2) : 59-69.

Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton, and D. N. Pegler. 1995. Dictionary of the Fungi. 8th ed. The UK at the University Press, Cambridge. 616 pp.

Holliday, P. 1980. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge, Cambridge University Press. 607pp.

Hoong, C. W., W. C. Pheng, and W. C. Chuan. 1991. Control of white root disease in immature rubber with three systemic fungicides. Planter 67(783) : 251-265.

Kanjanamaneesathian, M., T. Srichana, and A. Rhodesujit. 1995. Pellets of *Trichoderma harzianum*. Songklanakarin Journal of Science and Techology 17(30) : 317-326.

Liu, S., and R. Baker. 1980. Mechanism of biological control in soil suppressive to Rhizoctonia solani. Phytopathology 70 : 404-412.

Liyanage, G. W., A. de S. Liyanage, O. S. Peries and L. Halangoda. 1977. Studies on the variability and pathogenecity of *Rigidoporus lignosus*. Journal Rubber Research Institute of Sri Lanka 54 : 363-372.

Liyanage, A. de S., O. S. Peries, S. S. Warnapura, E.A.T. Senadura, and W. Amaratunga. 1984. An Integrated approach to control of white root disease in Sri Lanka. Journal Rubber Research Institute of Sri Lanka 1 : 499-520.

Liyanage, A. de S. 1992. Disease of Economic importance in Rubber. *In* Natural Rubber: Biology, Cultivation and Technology. (*edited* by M.R. Sethuraj and N.M. Mathew). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands. 324-359.

Lorito, M., G. E. Harman, C. K. Hayes, R. M. Broadway, A. Tronsmo, S. L. Woo, and A. Di Pietro. 1993. Chitinolytic enzymes produces by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase. Phytopathology 83 : 302-307.

Meyer, J. R., and H. D. Shew. 1991. Soils suppressive to black root rot of burley tobacco, caused by *Thielaviopsis basicola*. Phytopathology 81 : 946-954.

Michael, O. G., and Robert C. E. 1984. Fungal Nutrition and Physiology. New York: Wiley.

Nandris, D., M. Nicole, and J. P. Geiger. 1987. Root rot diseases of rubber trees. Plant Disease 71(4) : 298-306.

Nicole, M. R., and N. Benhamou. 1991. Cytochemical aspects of cellulose breakdown during the infection process of rubber tree roots by *Rigidoporus lignosus*. Phytopathology 81 : 1412-1420.

Onsando, J. M. and S. W. Waudo. 1994. Interaction between *Trichoderma* species and *Armillaria* root rot fungus of tea in Kenya. International Journal of Pest Management 40(1) : 69-74.

Ownley, B. H., D. M. Weller, and L. S. Thomashow. 1992. Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Phytopathology 82 : 178-184.

Peries, O. S., and N. I. S. Liyanage. 1983. The use of sulphur for the control of white root disease caused by *Rigidoporus lignosus*. Journal Rubber Research Institute of Sri Lanka 61 : 35-40.

Raper, J. R., and P. G. Miles. 1958. The genetics of *Schizophyllum commune*. Genetic 43 : 530-546.

Reis, E. M., R. . Cook, and B. L. McNeal. 1983. Elevated pH and associated reduced trace-nutrient availability as factors contributing to take-all of wheat upon soil liming. Phytopathology 73 : 411-413.

Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma**. Commonwealth Mycology Institute. 56 pages.

Seth, H. K. 1970. A monograph of the genus *Chaetomium*. Nova Hedwigia 37 : 1-133.

Singh, G. 1991. *Ganoderma* - the scourge of oil palms in the coastal areas. The Planter 67(786) : 421-444.

Smiley, R. W., and R. J. Cook. 1973. Relationship between take-all of wheat and rhizophere pH in soils fertilized with ammonium vs. nitrate-nitrogen. Phytopathology 63 : 882-890.

Sudirman, L. I., A. I. I. Housseini, G. le. Febure, E. Kiffer, and B. Botton. 1992. Screening of some basidiomycetes for biocontrol of *Rigidoporus lignosus*, a parasite of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. Mycological Research 96(8) : 621-625.

von Arx, J. A., J. Guarro, and M. J. Figueras. 1986. The Ascomycete Genus *Chaetomium*. Berlin Stuttgart. 162 pages.

Wycherley, P. R. 1992. The genus *Hevea* - botanical aspects. *In* Natural Rubber: Biology, Cultivation and Technology. (*edited* by M.R. Sethuraj and N.M. mathew). Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, The Netherlands. 50-66.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารพื้นฐาน (C-control)

$MgSO_4.7H_2O$	0.5	g
$KH_2 PO_4$	0.46	g
K_2HPO_4	1.0	g
Peptone	2.0	g
Agar	12.0	g
Thiamine-HCl	0.5	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

สูตรอาหารพื้นฐาน (N-control)

$MgSO_4.7H_2O$	0.5	g
KH_2PO_4	0.46	g
K_2HPO_4	1.0	g
Glucose	20.0	g
Agar	12.0	g
Thiamine-HCl	0.5	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	g
Dextrose	20	g
Agar	17.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Malt extract agar (MEA)

Malt extract	3.0	g
Yeast extract	2.0	g
KH_2PO_4	0.5	g
$MgSO_4$	0.5	g
Agar	17.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Glucose peptone broth (GPB)

Glucose	10	g
Peptone	2.0	g
KH_2PO_4	0.5	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Corn meal broth (CMB)

Corn meal	20	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Czapek's solution broth (CZB)

$NaNO_3$	3.0	g
K_2HPO_4	1.0	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	g
KCl	0.5	g
Sucrose	30	g
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Potato dextrose peptone yeast extract broth (PDPYEB)

Potato	200	g
Dextrose	20	g
Peptone	2.0	g
Yeast extract	0.5	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Potato dextrose yeast extract broth (PDYEB)

Potato	200	g
Dextrose	20	g
Yeast extract	0.5	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Potato dextrose straw extract broth (PDSEB)

ฟางข้าวสับ	150	g
Potato	200	g
Dextrose	20	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

(ฟางข้าวต้ม เอาเฉพาะน้ำ)

V-8

V-8 juice	150	ml
$CaCO_3$	0.3	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

Potato dextrose root rubber extract broth (PDRREB)

รากยางพาราหั่นชิ้นเล็ก	200	g
Potato	200	g
Dextrose	20	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

(รากยางต้ม เอาเฉพาะน้ำ)

***Trichoderma* selective medium (TSM)**

$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g
K_2HPO_4	0.9	g
NH_4NO_3	1.0	g
Glucose	3.0	g
Chloramphenicol	0.25	g
p-dimethylaminobenzenediazo sodium sulfonate(Dexon 60 w.p.)	0.3	g
Pentachloronitrobenzene(Terraclor 75 w.p.)	0.2	g
Rose-bengal(tetrachlorotetradiofluorescein)	0.15	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ภาคผนวก ข.

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 1. รายละเอียดของสวนยางที่เป็นโรครากขาวและการเก็บตัวอย่าง

สถานที่	พันธุ์ยาง อายุ	ส่วนที่เก็บตัวอย่าง	วัน เดือน ปี ที่เก็บ
1. อ.กระบุรี จ. ระนอง	RRIM 600,4 ปี	ราก	10 ก.ค. 2537
2. สถานีทดลองยางนราธิวาส ต.โคกปริเม็ง อ.สุไหงปาดี	แปลงกิ่งตา, RRIM 600,ไม่ทราบอายุ	ราก	19 ก.ค.2537
3. ม.7 ต.วังตะกอ อ.หลังสวน จ.ชุมพร	RRIM 600 8-9 ปี	ดอกเห็ด และ ราก	19 ส.ค. 2537
4. สถานีทดลองยางวังทัง อ.ตะกั่วทุ่ง จ.พังงา	แปลงกิ่งตา,BPM 24, ไม่ทราบอายุ	ดอกเห็ด และ ราก	20 ก.ย.2537

ตารางภาคผนวกที่ 2. การเจริญของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* แต่ละสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ MA (ประกอบภาพที่ 4)

ชนิดอาหาร	สายพันธุ์เชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)					
		1	2	3	4	5	6
PDA	I	1.57	3.39	4.96	6.19	8.12	9.0
	II	1.20	3.48	5.99	8.13	9.0	-
	III	1.48	3.43	5.58	7.19	9.0	-
	IV	1.24	3.23	5.0	6.63	8.96	9.0
MA	I	1.55	3.15	4.83	6.03	7.68	9.0
	II	1.19	2.59	4.60	6.06	8.31	9.0
	III	1.57	2.83	4.83	6.26	8.56	9.0
	IV	1.44	2.73	4.23	5.49	7.53	9.0

ตารางภาคผนวกที่ 3. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* เมื่อเลี้ยงในอาหาร GPB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ระดับ pH ต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 9 วัน (ประกอบภาพที่ 10)

ระดับ pH	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
3	6.0d
4	26.0c
5	31.0b
6	36.5a
7	36.7a
8	31.0b
9	28.0b
10	28.0b

C.V. = 0.10 %

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 4. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในอาหาร PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ระดับอุณหภูมิต่างกันหลังปลูกเชื้อ 10 วัน (ประกอบภาพที่ 11)

ระดับอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
15	0.0
20	300.0c
25	392.6b
30	479.0a
35	6.6d
40	0.0

C.V. = 16.10 %

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 5. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และ ยูเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 10 วัน (ประกอบภาพที่ 12)

ชนิดปุ๋ยไนโตรเจน	น้ำหนักแห้ง(มิลลิกรัม)ของเส้นใยที่ระดับความเข้มข้น						C.V.(%)
	0%	0.01%	0.05%	0.10%	0.15%	0.20%	
$(NH_4)_2SO_4$	30.0d	345.0ab	353.0ab	370.0a	335.0b	260.0bc	21.65
NH_4NO_3	30.0c	373.0a	264.0b	356.0a	366.0a	385.0a	25.50
NH_4Cl	30.0c	316.0b	343.0b	311.0b	309.0b	415.0a	53.98
Urea	30.0e	363.0a	349.0a	264.0b	168.0c	99.0d	36.53

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวนอนไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 6. ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และยูเรียที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆก่อน และหลังการเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* (ประกอบภาพที่ 13)

	ชนิดปุ๋ยไนโตรเจน	ระดับ pH ที่ระดับความเข้มข้น					
		0%	0.01%	0.05%	0.1%	0.15%	0.2%
ก่อนเลี้ยงเชื้อ	$(NH_4)_2SO_4$	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
	NH_4NO_3	6.5	6.5	6.5	6.6	6.6	6.5
	NH_4Cl	6.5	6.6	6.4	6.6	6.3	6.5
	Urea	6.5	6.7	6.9	7.4	7.4	7.5
หลังเลี้ยงเชื้อ	$(NH_4)_2SO_4$	6.6	6.2	5.9	5.6	5.9	6.1
	NH_4NO_3	6.6	6.4	6.3	6.3	5.9	5.8
	NH_4Cl	6.6	6.2	5.9	6.1	6.1	5.6
	Urea	6.6	6.7	7.8	8.0	8.2	8.0

ตารางภาคผนวกที่ 7. น้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อ *R. lignosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 12 วัน (ประกอบภาพที่ 14)

ความเข้มข้นกำมะถัน(%)	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
0	502.0b
0.01	490.0b
0.05	532.0a
0.10	375.0c
0.15	344.0d
0.20	352.0e

C.V. = 21.09%

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 8. ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. lignosus* ที่ผสมกำมะถันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ (ประกอบภาพที่ 15)

ความเข้มข้นของกำมะถัน(%)	ก่อนการเลี้ยงเชื้อ	หลังการเลี้ยงเชื้อ
0	6.6	6.4
0.01	6.5	6.3
0.05	6.5	6.2
0.10	6.4	6.0
0.15	6.4	5.7
0.20	6.4	5.7

ตารางภาคผนวกที่ 9. น้ำหนักแห้งของเชื้อ *T. harzianum* (Indonesia) เมื่อเลี้ยงในอาหาร GPB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ระดับ pH ต่าง ๆหลังปลูกเชื้อ 6 วัน

ระดับ pH	น้ำหนักแห้ง (มิลลิกรัม)
3	29.0a
4	26.0ab
5	25.6ab
6	26.8a
7	29.2a
8	24.8ab
9	22.8b
10	20.0c

C.V. = 12.9 %

ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติโดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางภาคผนวกที่ 10. ปริมาณธาตุอาหารของดินที่ใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการและในเรือนทดลอง

ชนิดของธาตุอาหาร	ปริมาณ (มิลลิกรัม/ดิน 1 กิโลกรัม)
K	12.95
avaiable P	1.75
S	5.17
total N	0.03
% O.M.	0.19
pH(1:5)	4.39

ตารางภาคผนวกที่ 11. สถานที่ รายละเอียดและรหัสของดินที่เก็บตัวอย่างจากสวนยางพาราที่เป็นโรครากขาวเพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ *Trichoderma* spp. และ *Chaetomium* spp. สำหรับการศึกษาคุณสมบัติการเป็นเชื้อราต่อต้าน

สถานที่ตั้งสวน	พันธุ์ยางและอายุ	จุดที่เก็บ	รหัส*
1.ต.พะตง อ.สะเดา จ.สงขลา	RRIM 600, 8 ปี	เป็นโรค	001,002,003
		ไม่เป็นโรค	004,005,006
2.สถานีทดลองยางนราธิวาส	แปลงกิ่งตา	เป็นโรค	007,008,009
		ไม่เป็นโรค	010,011,012
3.บ้านศาลามาก อ.โคกโพธิ์ จ.ยะลา	อายุประมาณ 10 ปี	เป็นโรค	013,014,015
		ไม่เป็นโรค	016,017,018
4.ม.4 ต.เชิงคีรี อ.ศรีสาคร จ.นราธิวาส	RRIM 600,6 ปี	เป็นโรค	019,020,021
		ไม่เป็นโรค	022,023,024
5.ม.1 ต.ศรีสาคร อ.ศรีสาคร จ.นราธิวาส	RRIM 600,6 ปี	เป็นโรค	025,026,027
		ไม่เป็นโรค	028
6.ม.5 ต.ศรีสาคร อ.ศรีสาคร จ.นราธิวาส	RRIM 600,6 ปี	เป็นโรค	029,030,031
		ไม่เป็นโรค	032
7.อ.รามัน จ.ยะลา	RRIM 600,8 ปี	เป็นโรค	034
8.ต.ปากจั่น อ.กระบุรี จ.ระนอง	RRIM 600,14 ปี	เป็นโรค	035
		ไม่เป็นโรค	036
9.ต.วังไผ่ อ.เมือง จ.ชุมพร	PR 255,RRIM 600	เป็นโรค	037
		ไม่เป็นโรค	038
10.ต.ทุ่งคาวัด อ.ละแม จ. ชุมพร	PR 255,13½ ปี	เป็นโรค	039
		ไม่เป็นโรค	040
11.ต.ทุ่งตะโก อ.ทุ่งตะโก จ.ชุมพร	RRIM 600,30 ปี	เป็นโรค	041
		ไม่เป็นโรค	042
12.สถานีทดลองยางระนอง จ.ระนอง	PR 107,17 ปี	เป็นโรค	043
		ไม่เป็นโรค	044
13.ต.แม่นางขาว อ.คุระบุรี จ.พังงา	GT 21,21 ปี	เป็นโรค	045
		ไม่เป็นโรค	046
14.ต.บางม่วง อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา	BPM 24,6 ปี	เป็นโรค	047
		ไม่เป็นโรค	048

สถานที่ตั้งสวน	พันธุ์ยางและอายุ	จุดที่เก็บ	รหัส*
15.สลย.วังทัง อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	แปลงกิ่งตา	เป็นโรค	049
		ไม่เป็นโรค	050
16.ต.ไม้ขาว อ.ถลาง จ.ภูเก็ต	GT 1,21 ปี	เป็นโรค	051
		ไม่เป็นโรค	052
17.บ้านนาอยู่ อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา	GT 1,21 ปี	เป็นโรค	053
		ไม่เป็นโรค	054
18.ต.บ้านกลาง ต.อ่าวลึก จ.พังงา	RRIM 600,10ปี	เป็นโรค	055
		ไม่เป็นโรค	056
19.ต.ถ้ำใหญ่ อ.ทุ่งสง จ.นครศรีฯ	PB 5/51	เป็นโรค	057
		ไม่เป็นโรค	058
20.ศวย.สุราษฎร์ธานี อ.ท่าชนะ	อายุ 15 ปี	เป็นโรค	059
		ไม่เป็นโรค	060
21.ต.ปากหมาก อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	RRIM 600	เป็นโรค	061

หมายเหตุ *แสดงรหัสของเชื้อราที่แยกบริสุทธิ์ได้ เช่น เชื้อ *Chaetomium* หรือ *Trichodermar* สายพันธุ์ 018.11 หมายถึงเชื้อราที่แยกได้จาก สวนยางบริเวณที่ไม่เป็นโรค บ้านศาลามาก จ.ยะลา บนอาหารที่แยกเชื้อบริสุทธิ์จานทดลองที่1 โคโลนีที่ 1 (จุดทศนิยม ตำแหน่งที่1 = จานทดลองที่, ตำแหน่งที่2 = โคโลนีที่ของเชื้อที่คัดเลือกและแยกบริสุทธิ์)

ตารางภาคผนวกที่ 12. ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญของเชื้อ *R. lignosus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังการปลูกเชื้อ *R. lignosus* 7 วัน*

สายพันธุ์เชื้อ *Trichoderma* spp.(T)	ระยะทางที่เชื้อ T เจริญข้ามจุดสัมผัส(ซม.)	การเจริญของเชื้อ T (ซม.)**
T. harzianum (Indonesia)	2.77	5.47
006.21	2.77	4.90
007.11	3.40	5.87
010.21	2.17	5.13
011.11	1.73	5.07
011.12	2.23	6.73
012.11	1.8	4.37
012.21	1.33	5.23
012.31	2.03	6.90
016.11	1.43	5.50
019.11	2.07	5.83
020.11	1.97	7.17
024.11	2.47	5.70
024.12	2.13	5.90
024.13	2.33	5.53
027.11	2.97	5.13
031.11	1.70	5.03
034.11	2.10	6.13
034.12	2.57	5.53
034.13	2.43	5.80
034.14	2.17	5.80
034.31	1.57	6.17
035.11	3.33	5.80
035.12	1.20	5.60
035.13	2.27	4.83

สายพันธุ์เชื้อ *Trichoderma* spp.(T)	ระยะทางที่เชื้อ T เจริญข้ามจุดสัมผัส(ซม.)	การเจริญของเชื้อ T (ซม.)**
035.14	0.17	5.40
036.11	1.93	5.35
036.13	0.27	3.50
036.21	1.50	4.47
037.11	1.50	6.87
037.12	1.87	5.35
037.21	1.73	5.73
038.11	1.27	5.73
038.12	1.37	6.40
039.21	1.77	4.77
039.31	3.13	4.67
039.32	1.40	3.93
040.11	1.33	6.93
040.12	1.80	5.87
041.13	2.03	5.63
042.11	2.77	5.23
042.21	1.70	6.27
043.11	3.33	6.17
043.12	1.87	7.27
043.13	2.30	6.37
043.14	2.80	7.73
044.11	0.57	1.23
045.11	3.83	5.93
045.13	2.73	5.40
047.11	1.50	6.0
047.12	1.73	5.60
047.13	1.83	4.87
048.11	0.0	5.0
048.12	0.63	5.60

สายพันธุ์เชื้อ *Trichoderma* spp.(T)	ระยะทางที่เชื้อ T เจริญข้ามจุดสัมผัส(ซม.)	การเจริญของเชื้อ T (ซม.)**
049.11	1.53	6.73
050.11	1.0	4.10
051.11	1.77	7.30
051.13	2.07	6.47
052.11	2.67	5.90
052.12	1.87	6.17
052.21	0.90	8.0
052.31	1.17	6.57
053.12	1.90	6.07
053.14	1.47	7.03
054.11	0.13	7.23
054.12	0.50	7.23
055.11	1.80	7.63
056.11	2.0	5.27
057.12	1.90	4.63
057.13	2.97	6.43
059.13	2.73	5.87
061.11	2.53	5.76
061.12	0.0	4.9

* = ทำการทดลองโดยปลูกเชื้อ *R. lignosus* บน PDA ก่อน 2 วัน แล้วปลูกเชื้อ *Trichoderma* spp.

** = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *Trichoderma* spp.อายุ 3 วันที่ปลูกเลี้ยงบน PDA เพียงชนิดเดียว

ตารางภาคผนวกที่ 13. ปฏิกิริยาการเป็นเชื้อราต่อต้านของ *Chaetomium* spp.ต่อเชื้อ *R. lignosus* และ การเจริญของเชื้อ *Chaetomium* spp. หลังปลูกเชื้อ 10 วัน

กำหนดให้ A หมายถึง เชื้อ *R. lignosus* เจริญคลุม *Chaetomium* spp.

B หมายถึง เชื้อ *R. lignosus* เจริญพบเชื้อ *Chaetomium* spp. แล้วหยุดเจริญ

สายพันธุ์เชื้อ *Chaetomium* spp.	ลักษณะการเกิดปฏิกิริยา	การเจริญของ *Chaetomium* spp.(ซม.)
001.11	A	6.40
001.12	A	5.20
001.23	B	5.45
001.42	A	5.37
001.43	A	5.47
002.11	B	5.47
002.12	A	5.07
004.11	A	5.80
005.11	A	4.50
006.41	A	4.83
010.41	A	5.00
011.11	A	5.40
011.41	A	6.20
012.42	A	5.20
012.43	A	4.10
014.31*	B	5.60
015.33	A	5.20
015.41	B	6.30
016.31*	B	5.83
017.11	A	4.83
017.12	A	6.40
017.41	A	6.80

สายพันธุ์เชื้อ *Chaetomium* spp.	ลักษณะการเกิดปฏิกิริยา	การเจริญของ *Chaetomium* spp.(ซม.)
018.11*	B	4.93
019.41*	B	4.10
021.41	B	5.60
023.31*	B	5.60
028.31*	B	5.80
028.32*	B	4.87
029.11	A	6.10
030.31	B	5.17
030.32	A	5.13
032.21*	B	5.10
032.22	A	5.80
032.23	A	5.00
033.31	A	7.00
034.31*	B	6.90
035.41	A	7.00
040.1	B	5.27
040.2	A	6.20
042.1	A	5.63
045.11	A	4.70
045.13	A	4.27
045.21	A	4.70
045.22	A	5.40
045.31	A	6.70
046.11	B	4.90
46.12	B	6.10
046.31	B	7.00
047.11	A	5.40

สายพันธุ์เชื้อ *Chaetomium* spp.	ลักษณะการเกิดปฏิกิริยา	การเจริญของ *Chaetomium* spp.(ซม.)
047.12	A	5.30
047.13	A	5.60
047.22	A	5.30
047.33*	B	8.60
054.11	B	7.23
054.12	B	4.83
056.11	B	6.27
056.12	A	7.13

* หมายถึง *Chaetomium* spp. สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาความสามารถในการเป็นเชื้อรา ต่อต้านในดิน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางอารมณ์ โรจน์สุจิตร

วัน เดือน ปีเกิด 25 กุมภาพันธ์ 2508

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2531