บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) (เกษม, 2532)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณเชื้อก่อโรค หรือการลดกิจกรรมการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรคพืช หรือปรสิตที่อยู่ในระยะเจริญเติบโตหรือระยะพักตัวโดยการใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่ามาช่วยในการป้องกันกำจัด ร่วมกับการจัดการสิ่งแวดล้อม พืชอาศัย และการใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค และอาจรวมถึงการใช้สารพันธุกรรม (gene หรือ gene product) จากสิ่งมีชีวิตนั้นด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่ใช้นี้ไม่รวมถึงมนุษย์ (Cook and Baker, 1983; Cook, 1985) ปัจจุบันการควบคุมโดยชีววิธีเริ่มเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปใช้ป้องกันกำจัดโรค เนื่องจากมีการนำไปใช้ได้ผลดี เป็นทางเลือกใหม่นอกจากการใช้สารเคมี เพื่อลดปัญหามลพิษต่อสภาพแวดล้อม จนมีการนำมาผลิตเป็นการค้า ดังนั้นจึงมีผู้หันมาสนใจในการควบคุมโรคพืชโดย ชีววิธีกันมากขึ้น โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์มาใช้ในการควบคุมโรคพืช เช่น การนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. หลาย species ที่แยกได้จากดินซึ่งเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ทั้งภายใต้สภาพเรือนทดลองปลูกและแปลงปลูก (Chet and Inbar, 1994) Aziz *et al.* (1997) นำเชื้อรา *T. lignorum* มาควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เกิดโรคในถั่ว

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* (Raifai, 1969)

เชื้อรา *Trichoderma* จัดอยู่ใน

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Euascomycetes

Order Hypocreales

Family Hypocreaceae

Genus *Trichoderma*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma*

เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma*) เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ จัดเป็น soil saprophyte และเป็น mycoparasite โดยใช้เส้นใยขดเป็นวงรอบๆ เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากนั้นเข้าไปเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้โดยการย่อยผนังเซลล์ แล้วใช้อาหารจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช เชื้อราไตรโคเดอร์มาเจริญได้ดีในดินที่มีความชื้นแต่ไม่แฉะ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย ขยายพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ นำมาเพาะเลี้ยงจะเห็นเส้นใยและสปอร์สีเขียว อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน Bassett (1984) ได้อธิบายลักษณะของเชื้อราชนิดนี้ไว้ว่า เป็นเชื้อราที่เจริญรวดเร็วบนอาหารหลายชนิด สร้าง conidiophore ที่แตกกิ่งก้านสาขา โดยที่ปลาย conidiophore มีโครงสร้างกำเนิด conidium หรือ spore เรียกว่า phialide รูปร่างคล้ายลูกโบว์ลิ่ง conidium ซึ่งเกิดจากปลาย phialide จะรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (slime head) เห็นเป็นสีเขียวหรือใส (hyaline) ส่วนระยะสมบูรณ์เพศ หรือ teleomoph ของเชื้อรา *Trichoderma* คือเชื้อราในจีนัส Hypocrea หรือจีนัสอื่นๆ ที่ใกล้เคียงกัน สามารถพบได้ทั่วไปในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีอินทรีย์วัตถุอาศัยเศษซากพืชและสัตว์เป็นแหล่งอาหาร (กณิษฐา , 2548) พบว่าในดินที่ปราศจากแหล่งอาหาร เชื้อราชนิดนี้สามารถอยู่รอดได้นานกว่า 130 วัน เชื้อรา *Trichoderma* จัดเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช เนื่องจากมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในที่มีอุณหภูมิเย็นจัดประมาณ 10-12 องศาเซลเซียส (Johnson *et al*., 1987) ราสกุลนี้มีรายงานการจัดจำแนกไว้หลายชนิด (Bilai, 1963) โดย Rifai (1969) ได้จัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ออกเป็น 9 ชนิด *T. piluliferum, T. polysporum, T. aureoviride, T. hamatum, T. koningii, T. harzianum, T. longibrachiatum, T. pseudokoningii* และ *T. viride*

Colony เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีการสร้างเส้นใยเจริญเติบโตเร็ว เริ่มแรกโคโลนีมีผิวหน้าเรียบ ไม่มีสี (translucent) หรือสีขาว (watery white) ต่อมาโคโลนีมีลักษณะเป็นแบบปุยฝ้ายฟูอย่างหลวม ๆ (loosely floccose) หรือเป็นกระจุกหนาแน่น (compactly tuft) หรือมีลักษณะทั้งสองแบบในโคโลนีเดียวกัน หรือมีลักษณะอยู่ระหว่างทั้ง 2 แบบ การเกาะกันเป็นกระจุกของโคโลนีมีส่วนเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของก้านชูสปอร์ (conidiophore) (นุชนารถ, 2535)

การสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่สำคัญคือบริเวณที่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นวงรอบหรือเป็นวงแหวน (ring-like zone) ซึ่งเกิดจากอิทธิพลของแสง Gutter (1957) อ้างโดยลาวัลย์และคณะ (2540) และเมื่อโคโลนีมีอายุมากขึ้นจะมีการสร้าง conidiophore ขึ้นมาใหม่อีกบริเวณรอบนอกที่สร้างสปอร์ทำให้เห็นการเกิดวงรอบ หรือ zonation ไม่ชัดเจนสำหรับใน isolate ที่โคโลนีเป็นแบบปุยฝ้าย (floccose) การสร้าง zonation สามารถสังเกตได้ในขณะที่เชื้อยังมีอายุ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้อยเท่านั้น สีของโคโลนีส่วนใหญ่เกิดมาจากการสร้างสีของสปอร์ (phialospore) โดยปกติ *T. viride* มีโคโลนีสีเขียวเข้ม (dark green) แต่บางครั้งเมื่อมีหลายๆ ชนิด (species) ขึ้นอยู่ร่วมกัน อาจจะแสดงสีที่แตกต่างออกไปอย่างชัดเจน ตั้งแต่สีเหลืองไปจนถึงสีเขียวอ่อน และ *T. polysporum* โคโลนีมีสีขาวเนื่องจาก phialospore ไม่มีสี นอกจากสีของสปอร์ที่มีผลต่อสีของโคโลนีแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นอีกคือ

1. ปริมาณสปอร์ที่สร้างขึ้น ทำให้โคโลนีเข้มขึ้นหรืออ่อนลง
2. สร้างผลึกสี หรือปล่อยสีออกมา ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไป
3. ชนิดและ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อสีของโคโลนี
4. การสร้างเส้นใยที่ยืดตัวออกและเป็นหมัน (sterile hyphal elongation) เหนือกระจุกของ conidiophore ของ *T. hamatum* ทำให้โคโลนีมีสีขาวหรือสีเทาเขียว (greyish-green)

Mycelium ไม่มีสี มีผนังกั้นระหว่างเซลล์ มีการแตกกิ่งก้านมากมาย ผนังเส้นใยเรียบ (Rifai,1969)

Chlamydospore เป็นสปอร์ที่มีผนังหนา สร้างขึ้นเพื่อความอยู่รอด ส่วนใหญ่จะสร้างระหว่างเส้นใย ไม่ค่อยพบที่สร้างปลายเส้นใย รูปร่างกลม (globose) เป็นส่วนใหญ่ ส่วนรูปกระสวย (ellipsoid) ไม่มีสี และผนังเรียบพบน้อยมาก (Rifai,1969)

Conidiophore ก้านชูสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* มีการแตกกิ่งก้านหลายแบบและการสร้างสลับซับซ้อนกันมาก มองดูโครงสร้างรอบนอกเป็นรูปกรวย (conical) หรือแบบปิรามิด (pyramid) ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *T. hamatum* และ *T. polysporum* มีก้าน conidiophore ยาว แตกกิ่งก้านด้านข้างสั้นและหนา มีลักษณะเฉพาะคือ สร้างเส้นใยที่ยืดตัวออกเป็นหมัน เป็นเส้นยาวคล้ายแส้ เป็นส่วนที่ไม่สร้างสปอร์อยู่ปลายก้านของ conidiophore ส่วนเชื้อรา *T. longibrachiatum* มีเส้นแกนกลางของก้าน conidiophore ค่อนข้างยาว และแตกกิ่งก้านสั้น ส่วนเชื้อรา *T. hamatum* และ *T. polysporum* ที่สร้าง conidiophore มีการแตกกิ่งก้านน้อยและสลับกันไป สำหรับเชื้อรา *T. viride* และ *T. koningii* สร้าง conidiophore ที่มีการแตกกิ่งก้านด้านข้างออกมาจากจุดเดียวกัน เหมือนกับพวกเชื้อรา *Verticillium* (นุชนารถ, 2535)

Phialide เป็นก้านสปอร์ที่อยู่ปลายสุด ให้กำเนิดสปอร์ส่วนมากจะมีรูปร่างคล้ายขวดรูปชมพู่ (flask) หรือลูกพินโบว์ลิ่งที่ฐานจะแคบกว่าตรงกลางเล็กน้อย และค่อยๆ เรียวไปยังส่วนปลาย ซึ่งตรงปลายจะเป็นรูปกรวยแคบๆ (conical neck) หรือใกล้จะเป็นทรงกระบอก (subcylindrical terminal phialide) โดยทั่วไป phialide จะแตกออกมาจากจุดกำเนิดเป็นมุมกว้างและปลายโค้งงอ ทำให้มองด้านข้างเหมือนเขาสัตว์ (horn-shape) และอาจเกิดขึ้นบนกิ่งก้านของ conidiophore ที่แตกด้านข้าง ลักษณะเรียงกันของ phialide เป็นวงรอบไม่สม่ำเสมอ มีจำนวนถึง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5 อัน เกิดที่ปลายก้านของ conidiophore ซึ่งเกิดจากเซลล์ที่ให้กำเนิด หรือเกิดตลอดกิ่งก้านแบบเดี่ยวๆ และสลับกันไป หรือเกิดตรงข้ามเป็นคู่ๆ แต่ส่วนใหญ่อันที่อยู่ปลายสุดมักเกิดเดี่ยวๆ และค่อนข้างยาวกว่าอันที่อยู่ข้างล่าง (นุชนารถ, 2535)

Phialospore เกิดเดี่ยวๆ และเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนกลม (globose) หรือค่อนข้างกลม (subglobose) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 15 μ อยู่บนปลาย phialide ข้างเคียงอาจรวมกันเป็นก้อน (conidial head) ที่ใหญ่ขึ้น ผนังของสปอร์เรียบ หรือบางครั้งพบขรุขระเล็กน้อย ไม่มีสี (hyaline) หรือสีเหลือง (yellowish-green) จนถึงสีเขียวดำเข้ม (dark green) รูปร่างค้อนข้างกลม (subglobose) รูปไข่หัวกลับและสั้น (short obovoid) หรือรูปไข่หัวกลับ (obovoid), รูปกระสวย (ellipsoid) หรือรูปทรงกระบอกเรียวแบบกระสวย (elliptic-cylindrical) จนถึงส่วนใหญ่เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า (oblong) บางครั้งที่ปลายฐานสปอร์มีลักษณะเป็นมุมเหลี่ยม (angular) ปลายฐานตัดตรง (truncate base) ชัดเจน ในขณะที่สปอร์ที่ยังอ่อนอยู่พบหยดน้ำมันภายในแล้วหายไปเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่

กลไกการควบคุมโรคโดยชีววิธีหรือการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma*

กลไกในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั่วๆไป มี 3 ประการคือ

1. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic)
2. การแข่งขันซึ่งกันและกัน (competition)
3. การเป็นปรสิตของเชื้อราปฏิปักษ์ (parasitism)

1. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) หมายถึง การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นจากสารที่สร้างขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารดังกล่าวนี้จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต หรืออาจทำให้ตายได้ สารเคมีดังกล่าวอาจเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotic) และสารจำพวกเอนไซม์ (extracellular enzymes) ซึ่งมีผลในการยับยั้งและทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* บางชนิดหรือบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารประกอบที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ด้วย เช่นสาร Trichoderma เป็นสารปฏิชีวนะในกลุ่ม sequisterpene ที่ผลิตโดยเชื้อรา *Trichoderma* (Bilai, 1963) ต่อมามีการศึกษาสารปฏิชีวนะที่เชื้อรา *Trichoderma* สร้างขึ้นมาอีกมากมายเช่น Tricholin ที่ผลิตโดยเชื้อรา *T. viridae* มีผลยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และสาร Trichoziniznines ที่ผลิตโดยเชื้อรา *T. harzianum* มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเส้นใยของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* (Elad *et al*., 1980) และ Dumas *et al*. (1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ประเมินความสามารถของเชื้อรา *T. harzianum, T. viride, T. Koningii, T. polysporum, T. virens* และ *T. hamatum* ในการยับยั้งเชื้อรา *Cylindocladium floridanum* พบว่าสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจะผลิตสาร 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการสร้าง microsclerotia ของเชื้อรา *C. floridanum* ได้

2. การแข่งขันซึ่งกันและกัน (competition) การที่สิ่งมีชีวิตสองชนิดหรือมากกว่าเจริญอยู่ด้วยกัน และมีความต้องการอาหารและที่อยู่อาศัยซึ่งสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดต้องการ และเมื่ออาหารที่มีอยู่ไม่เพียงพอจึงทำให้เกิดการแข่งขันกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ธาตุอาหาร และปัจจัยอื่นๆ สำหรับการเจริญเติบโต เชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราที่มีการแข่งขันที่ดีในด้านที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร มีความสามารถในการเข้าครอบครองรากพืชได้รวดเร็วกว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืช ถ้าในดินที่ใช้ในการเกษตรพบว่ามีปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* สูงย่อมพิสูจน์ได้ว่าเชื้อรา *Trichoderma* สามารถที่จะเป็นผู้แข่งขันที่ดีในด้านการแย่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร นอกจากนั้นยังสามารถเพิ่มโอกาสในการแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคได้มากขึ้นด้วย (จิระเดช, 2544)

3. การเป็นปรสิตของเชื้อราปฏิปักษ์ (parasitism) การที่เชื้อราปฏิปักษ์สร้างเส้นใยแทงทะลุเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ แล้วดูดของเหลวจากราทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเหี่ยวแฟบลง หรือการที่เชื้อราปฏิปักษ์สร้างเส้นใยพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุก่อนการเข้าทำลายเส้นใย เชื้อรา *Trichoderma* เป็นปรสิตของเชื้อราต่างๆ ในกลุ่มเชื้อราชั้นต่ำพวก Phycomycetes และกลุ่ม ราชั้นสูงพวก fungi Imperfect (Deuteromycetes) และพวก Ascomycetes และ Basidiomycetes ในบางกรณีพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* เป็นศัตรูสำคัญของการเพาะเห็ด จากการศึกษาของ (Elad *et al*., 1980) พบเชื้อรา *T. harzianum* เป็นปรสิตกับเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยการสร้างเส้นใยเจริญเข้ามาใกล้เส้นใยของเชื้อรา *R. solani* แล้วจึงพันรัดและเจริญเข้าไปในเส้นใย *R. solani* ส่วนเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harmatum* เป็นปรสิตกับเชื้อรา *Pytium* sp., *Rhizoctonia* sp. และ *Sclerotium* sp. โดยการสร้างเอนไซม์ β- 1, 3- glucanase และ cellulose ทำลายเส้นใยเชื้อราดังกล่าวให้เหี่ยวและแฟบลง (Briickner และ Przybylski, 1984) เยาวพา (2549) รายงานว่า กลไกการออกฤทธิ์ของเชื้อรา *Trichoderma* ที่มีผลต่อเชื้อราก่อโรค เช่น *R. solani, S.rolfsii* และ *Phytophthora* sp. โดยพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* จะสร้าง enzyme บางชนิด เช่น Chitinase , ß-1,3-glucanase และ Cellulase เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของราก่อโรค แล้วเข้าไปเจริญสร้างเส้นใยภายในเส้นใยของเชื้อราก่อโรค และ Inbar *et al*. (1996) ได้ทำการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อรา *Sclerotium sclerotiorum* โดยเลี้ยงเชื้อราทั้งสองร่วมกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บนอาหาร(dual culture) ซึ่งเมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้อง light microscope และกล้อง SEM พบว่า เส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* พันรัดและรอบเส้นใยของเชื้อรา *S. sclerotiorum* ทำให้ผนังเซลล์บางส่วนของเม็ด sclerotia แตกออก

สมคิด (2546) กล่าวว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาบางสายพันธุ์สามารถเป็นปรสิต (parasite) โดยการพันรัดเส้นใยเชื้อโรคแล้วสร้างเอนไซม์ เช่นไคตินเนส (chitinase) เบต้า-1,3 กลูคาเนส (ß-1,3-glucanase) และเซลลูเลส (cellulose) ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช เป็นเหตุให้เชื้อโรคพืชสูญเสียความมีชีวิต ยังผลให้ปริมาณของเชื้อโรคพืชลดลง นอกจากนี้เชื้อราไตรโคเดอร์มาส่วนใหญ่เจริญสร้างเส้นใยและสปอร์ได้ค่อนข้างรวดเร็ว จึงมีความสามารถในการแข่งขัน (competition) กับเชื้อโรคพืชด้านการใช้อาหารและแร่ธาตุต่างๆ จากแหล่งอาหารในธรรมชาติ ตลอดจนการใช้สารที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยได้เป็นอย่างดีขณะที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ออกมาเพื่อยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค

การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา ในการควบคุมโรค

การวิจัยเกี่ยวกับเชื้อราไตรโคเดอร์มา ในประเทศไทยมีมานานกว่าสิบปีโดยได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินที่เป็นเชื้อราชั้นสูงและชั้นต่ำ ได้แก่

1. เชื้อรา *Pythium* spp. สาเหตุโรคกล้าเน่าหรือโรคโคนเน่าคอดิน
2. เชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากและโคนเน่า
3. เชื้อรา *Rhizoctonia* spp. สาเหตุโรครากและลำต้นเน่า
4. เชื้อรา *Sclerotium* spp. สาเหตุโรครากและลำต้นเน่า
5. เชื้อรา *Fusarium* spp. สาเหตุโรคเหี่ยว

แสงมณี และคณะ (2540) ได้ศึกษาผลของเชื้อรา *T. harzianum* ต่อการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora parasitica* และ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริกไทย และโรคเน่าดำของวนิลา พบว่าการทดลองในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เชื้อรา *T. harzianum* สามารถเจริญปกคลุมเชื้อรา *Phytophthora* และเจาะเข้าไปแย่งอาหารที่อยู่ภายใน ทำให้เกิดช่องวางภายในเส้นใยที่ถูกทำลาย และผนังเส้นใยถูกย่อยสลาย เป็นผลให้เส้นใยเชื้อรา *Phytophthora* ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มณฑา และคณะ (2541) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมโรคโคนเน่าของถั่วเหลืองฝักสดพันธ์ TVB 7 ผลการทดลองปรากฏว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถลดความเสียหายของโรคโคนเน่าของถั่วเหลืองฝักสดได้ โดยทำให้จำนวนต้นเป็นโรคหลังปลูก 30 วันลดลงได้มากที่สุดถึงร้อยละ 62 และทำให้ความสูงตลอดจนน้ำหนักฝักสดของถั่วเหลืองฝักสดเพิ่มขึ้นด้วย

มาลัยพร และคณะ (2546) ได้ศึกษาถึงความหลากหลายชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค Fusarium wilt ของมะเขือเทศและพืชตระกูลแตง โดยนำเชื้อรา ที่แยกได้จากดินจำนวน 186 ไอโซเลท มาทดสอบศักยภาพของเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และพืชตระกูลแตงในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อราจำนวน 20 ไอโซเลทเป็นเชื้อรา *Trichoderma* spp. ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ของเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงเทศ และ *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวาได้ โดยเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะเจริญปกคลุมเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวจนไม่สามารถเจริญต่อไปได้อีก ภายในระยะเวลา 7 วันหลังจากการปลูกเชื้อ

วาสนา และคณะ (2548) ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ T-50 และ CB-Pin-01 และ *T. virenns* สายพันธุ์ Tv-16 ในรูปแบบสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ร่วมกับการใช้แคลเซียมคลอไรด์ 10 กรัม/ลิตร และซิลิกอนอัตรา 1 กรัม/วัสดุปลูก(พืช) 1 กก. รดวัสดุปลูก ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศพันธุ์คิงคอง-2 ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง พบว่าหลังจากย้ายปลูกพืช 14 วัน ทุกกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum, T. virens* หรือสารเคมีเมทาแลกซิล ช่วยให้มีต้นรอดตายสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมที่ปลูกเชื้อรา *P. aphanidermatum* เมื่อใช้ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ และซิลิกอนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 2 สายพันธ์ในรูปสปอร์แขวนลอยความเข็มข้น 10^8 สปอร์ต่อ มล. รดดินอัตรา 5 มล./กระถาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว) และการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. virens* ความเข็มข้น 10^8 สปอร์ต่อ มล. แช่เมล็ดมะเขือเทศเป็นเวลา 30 นาที ก่อนปลูกร่วมกับการใช้แคลเซียมคลอไรด์รดวัสดุปลูก ช่วยให้มีต้นมะเขือเทศรอดตาย 100 % ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม และสูงกว่าการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Ram *et al.* (2000) ได้ใช้เชื้อราปฏิปักษ์ ได้แก่ *T. harzianum, T. aureoviridae, T. viridae , T. virens และ G. virens* ในการยับยั้งการเกิดโรค ginger rhizome rot ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium myriotylum* ได้อย่างดี อีกทั้งยังสามารถช่วยทำให้มีปริมาณของผลผลิตเพิ่มมากขึ้น

Sharon *et al*. (2001) ได้นำเชื้อรา *T. harzianum* มาควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne javanica* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรครากปมในมะเขือเทศ โดยทำการทดสอบภายในโรงเรือน พบว่าการปลูกมะเขือเทศในดินที่ผสมเชื้อรา *Trichoderma* สามารถทำให้จำนวนปมของรากมะเขือเทศลดลง และทำให้น้ำหนักสดของผลเพิ่มมากขึ้น

Widyastuti *et al*. (2003) ได้ศึกษาการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* โรครากและโคนเน่าของต้นกล้าสน ในพื้นที่เขตร้อนโดยชีววิธี โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 3 ไอโซเลทคือ *T. koningii, T. reesei* และ *T. harzianum* ในการทดสอบด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ทุก ไอโซเลทสามารถเข้าทำลายเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* โดยเฉพาะ *T. reesei* และ *T. harzianum* สามารถเข้าพันรัดรอบเส้นใยของเชื้อรา *S. rolfsii* และพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากัน เมื่อทดสอบ *T. reesei* และ *T. harzianum* ในสภาพโรงเรือนพบว่าการใส่เชื้อรา *Trichoderma* ก่อนและพร้อม *S. rolfsii* สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้ และพบว่าการใส่ เชื้อรา *Trichoderma* ก่อน *S. rolfsii* เป็นเวลา 4 วัน สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด

Freeman *et al.* (2004) ศึกษาการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอรี่ในสภาพโรงเรือน โดยเลือกเชื้อรา *Trichoderma* sp. 3 ไอโซเลท คือ T-39, T-161 และ T-166 ในการใช้ จะใช้ในช่วงเวลาและอัตราที่แตกต่างกัน มาทำการควบคุโรคแอนแทรคโนสที่เกิดกับสตรอเบอรี่ พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดอาการของโรคแอนแทรคโนสได้และให้ผลเหมือนกับสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา fenhexamine

Zaldivar, *et al*. (2001) ได้ศึกษากิจกรรมการสร้างเอนไซม์ exochitinase ของเชื้อรา *Trichoderma aureoviride* 7-121 ที่เกิดการกลายพันธุ์เปรียบเทียบกับ wide type โดยเลี้ยงเชื้อรา *T. aureoviride* ในอาหารเหลวที่ผสม chitin เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ p-nitrophenyl-N-acetyl – glucosaminide เป็น substrate แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร พบว่าเชื้อรา *T. aureoviride* ที่เกิดการกลายพันธุ์และ wide type มีการสร้างเอนไซม์ exochitinase ได้ในปริมาณที่น้อยมากที่ระยะเวลา 12 วัน และพบว่าที่ระยะเวลา 25 วัน มีปริมาณการสร้างเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเท่ากับ 1.2 และ 2.3 U/ml ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษา double-stranded RNA (dsRNA)

Double-straded RNA (dsRNA) สามารถพบได้ในเชื้อราทั่วๆ ไปรวมถึงเชื้อราสาเหตุโรค แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจนนัก ดังนั้นจึงได้มีการศึกษา dsRNA จากเชื้อรากันอย่างแพร่หลาย Ahn and Lee (2000) ได้ศึกษาเชื้อรา *Nectria radicicola* สาเหตุของโรครากเน่าของโสม โดยเมื่อนำเชื้อรา *N. radicicola* จำนวนทั้งหมด 81 strain มาตรวจหา dsRNA ปรากฏว่าพบแถบของ dsRNA จำนวน 24 strain มีขนาดแตกต่างกัน 4 ขนาดคือ 6.0, 5.0, 2.5 และ 1.5 kbp และเมื่อนำเชื้อรา *N. radicicola* ที่พบ dsRNA ขนาดที่แตกต่างกันมาทดสอบคุณสมบัติอื่นๆต่อ ปรากฏว่า dsRNA ขนาด 6.0 kbp มีความเกี่ยวข้องกับ ระดับความรุนแรงในการเกิดโรค ปริมาณการสร้างสปอร์ กิจกรรมของเอนไซม์ และการสร้างสารเม็ดสี (pigment) ของเชื้อรา

ในเชื้อรา *Trichoderma* ก็ได้มีการศึกษา dsRNA เช่นกันโดย Antal และคณะในปี 2005 โดยได้แยกเชื้อรา *Trichoderma* จากวัสดุในการเพาะเห็ด (*Agaricus bisporus* และ *Pleurotus ostreatus*) ในฟาร์มเพาะเห็ดจำนวน 3 ฟาร์มในประเทศฮังการี พบ dsRNA ในเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 12 ไอโซเลท และมีลักษณะของ dsRNA แตกต่างกันถึง 5 รูปแบบ และรูปแบบของ dsRNA ที่พบมีขนาดตั้งแต่ 2.4 kbp -10 kbp ในแต่ละไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* พบแถบของ dsRNA มีขนาดแตกต่างกัน 2-4 ขนาด และพบว่า dsRNA ที่พบมีผลกระทบต่อความรุนแรงในการเข้าทำลายของเชื้อรา *Trichoderma* ในแต่ละไอโซเลท และเชื้อรา *Trichoderma* ที่พบ dsRNA ปรากฏว่าเป็น *T. aggressivum* f. sp. *aggressivum* จำนวน 3 ไอโซเลท *T. aggressivum* f. sp. *europaeum* จำนวน 2 ไอโซเลท *T. aggressivum* จำนวน 4 ไอโซเลท *T. harzianum* จำนวน 4 ไอโซเลท และ *Trichoderma* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท

จากการรายงานของ Nuss and Koltin (1990) กล่าวว่า double-stranded RNA (dsRNA) เป็นไวรัสที่พบในเชื้อรา (mycovirus) ซึ่งพบได้ในเชื้อราทุกชั้น และไวรัสที่พบในเชื้อรานี้สามารถแบ่งได้เป็น 4 แฟมิลี่ได้แก่ *Hypoviridae, Totiviridae, Chrysoviridae* และ *Partitiviridae* นอกจากนี้ Mertens *et al*. (2005) อ้างโดย Osaki *et al.* (2006) ยังสามารถตรวจพบ mycovirus จีนัสใหม่ในแฟมิลี่ *Reoviridae* จากเชื้อราโรคพืชที่มีลักษณะของการเกิด hypovirulence

จากการศึกษาของ Azevedo *et al*. (2000) พบแถบของ dsRNA ในเชื้อรา *Paecilomyces fumosoroseus* จำนวน 3 ไอโซเลท จากเชื้อรา *P. fumosoroseus* ทั้งหมด 12 ไอโซเลท และได้ทำการตรวจสอบ dsRNA โดยการย่อยด้วยเอ็นไซม์ RNase และ DNase จากนั้นได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อรา *P. fumosoroseus* ระหว่างไอโซเลทที่พบและไม่พบ dsRNA ต่อแมลงหวี่ขาว พบว่า dsRNA ไม่มีผลกระทบต่อความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อรา *P. fumosoroseus* ให้ลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Fekete *et al*. (1995) ได้ศึกษาเชื้อรา *Fusarium poae* ในจำนวน 55 strain เมื่อนำมาตรวจหา dsRNA พบ dsRNA ในเชื้อรา *F. poae* จำนวน 25 strain นอกจากนั้นแล้ว dsRNA ที่พบยังมีรูปแบบที่แตกต่างกันในแต่ละ strain และยังพบว่าจำนวนและขนาดมีความคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อทำการ subculture หลาย ๆ ครั้ง นอกจากนี้การศึกษาของ Jian และคณะในปี 1998 ที่พบ dsRNA มีขนาด 6.4 kbp ที่สกัดได้จากเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* และเมื่อศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคกับพืช พบว่าในเชื้อราสายพันธุ์ที่มี dsRNA จะมีผลทำให้ความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อรา *R. solani* เพิ่มขึ้น

Grogan *et al.*(2003) ศึกษาความสัมพันธ์ของ dsRNA กับการเกิดโรค mushroom virus X (MVX)ในเห็ด *Agaricus bisporus* พบว่า dsRNA มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค MVX โดยแยก dsRNA จากส่วน fruit bodies ของเห็ด ที่แสดงอาการของโรค MVX ซึ่ง dsRNA มีผลทำให้การเก็บเกี่ยวผลผลิตเกิดความล่าช้าออกไป สีของดอกเกิดเป็นสีน้ำตาล ทำให้ผลผลิตเกิดความเสียหายทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ และ dsRNA ที่พบมีขนาด 640 bp และ 20.2 kbp

การศึกษาเชื้อรา *Rhizoctonai solani* AG4 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศเกาหลี โดยทำการสกัดหา dsRNA จาก mycelial mats พบ dsRNA จำนวน 55 ไอโซเลท จากเชื้อรา *R. solani* AG4 จำนวน 81 ไอโซเลท (ประมาณ 56%) ขนาดของ dsRNA มีความแตกต่างกันถึง 9 ขนาด เมื่อทดสอบโดยการ subculture จำนวน 10 ครั้ง พบว่า dsRNA ยังคงอยู่ในเส้นใยได้ไม่เปลี่ยนแปลง และเมื่อย้ายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสม cycloheximide และ emetine ก็ยังพบ dsRNA ในเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* AG4 และพบว่า dsRNA ไม่มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคของ *R. solani* AG4 (Kim *et al*., 1996)

Chu *et al*. (2002) ศึกษา dsRNA ของเชื้อรา *Fusarium graminearum* พบ dsRNA ขนาด 7.5 kbp ในจำนวนทั้งหมด 13 strain จากเชื้อรา *F. graminearum* ทั้งหมด 286 strain ซึ่งแยกได้จากข้าวโพดที่ปลูกในประเทศเกาหลี และจากการศึกษาเชื้อรา *F. graminearum* strain DK21 ซึ่งพบ dsRNA ปรากฏว่า dsRNA มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือการเจริญของเส้นใยมีอัตราการเจริญลดลง การเกิดสีเพิ่มมากขึ้น เมื่อนำไปทดสอบการเกิดโรคกับข้าวสาลี พบว่ามีความรุนแรงในการเกิดโรคลดลง รวมไปถึงมีผลทำให้กระบวนการผลิตของ trichothecene mycotoxins ลดลงด้วย และพบว่า dsRNA สามารถแพร่กระจายไปยัง strain อื่นๆได้โดยการเกิด hyphal fusion

การศึกษาไวรัสที่พบในเชื้อราที่มีลักษณะสารพันธุกรรมแบบ dsRNA ในประชากรของเชื้อราดำ *Aspergillus* จากการศึกษาในตัวอย่างของเชื้อรา *Aspergillus* ทั้งหมด 668 ตัวอย่าง ซึ่งแยกได้จากสถานที่ต่างๆ ทั่วโลกพบว่าถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ fragment ที่แตกต่างกันตั้งแต่ 0.8-4.4 kbp ในจำนวน 1 สายพันธุ์ที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย เมื่อนำมาทดสอบเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่พบเชื้อไวรัส ในสภาวะต่างๆ กันพบว่าเชื้อไวรัสมีผลทำให้การเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อราลดลง รวมไปถึงความสามารถในการแข่งขันลดลงด้วย จากการศึกษาของ Diepeningen *et al.* (2006) ซึ่งก็ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับ Li และคณะในปี 2003 ที่ได้ศึกษาถึงการเกิด hypovirulence ใน เชื้อรา *Sclerotium sclerotiorum* ไอโซเลท S10 ที่แยกได้จากดอกทานตะวันในประเทศแคนนาดา พบว่าลักษณะของโคโลนีของ S10 มีการเจริญการแตกกิ่งของเส้นใยที่ผิดปกติบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA การผลิตเม็ด sclerotium ลดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลดการสะสมของกรด oxalic ในอาหารเหลว PDB และเมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนใบของต้น canola (*Brassica napus*) พบว่าความสามารถในการเกิดโรคลดลง และมีความแตกต่างจาก *S. sclerotiorum* ไอโซเลท wtS10 ซึ่งมีความรุนแรงในการเกิดโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved