บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจและรวบรวมเชื้อรา *Trichoderma* จากตัวอย่างวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ด และตัวอย่างดินในแปลงเกษตรกร พื้นที่จำนวน 24 อำเภอ จังหวัดเชียงใหม่ สามารถรวบรวมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้ทั้งหมด 155 ไอโซเลท และแยกได้จากสารชีวภัณฑ์อีกจำนวน 1 ไอโซเลท

การศึกษาการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 156 ไอโซเลท บนอาหาร PDA โดยวัดการเจริญที่ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน สามารถแบ่งอัตราการเจริญออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1. เจริญเร็ว จำนวน 71 ไอโซเลท 2. เจริญปานกลาง จำนวน 78 ไอโซเลท 3. เจริญช้า จำนวน 7 ไอโซเลท และพบว่าทั้ง 3 กลุ่มมีอัตราการเจริญเฉลี่ย ± SD เท่ากับ 32.30 ± 1.62, 27.17± 2.32 และ 19.48 ± 0.56 มิลลิเมตรต่อวันตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกได้จากวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ด จำนวน 35 ไอโซเลท มีลักษณะการเจริญเร็ว จำนวน 18 ไอโซเลท ลักษณะการเจริญปานกลาง จำนวน 16 ไอโซเลท และลักษณะการเจริญช้า จำนวน 1 ไอโซเลท โดยมีอัตราการเจริญเฉลี่ย ± SD เท่ากับ 32.87 ± 1.50, 27.52 ± 1.46 และ 18.40 ± 0 มิลลิเมตรต่อวัน สำหรับเชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกจากตัวอย่างดินแปลงเกษตรกรแต่ละอำเภอ จ.เชียงใหม่ จำนวน 120 ไอโซเลท มีลักษณะการเจริญเร็ว จำนวน 52 ไอโซเลท ลักษณะการเจริญปานกลาง จำนวน 62 ไอโซเลท และลักษณะการเจริญช้า จำนวน 6 ไอโซเลท โดยมีอัตราการเจริญเฉลี่ย ± SD เท่ากับ 32.13 ± 1.63, 27.08 ± 2.50 และ 19.67 ± 0.32 มิลลิเมตรต่อวันตามลำดับ และเชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกจากสารชีวภัณฑ์ จำนวน 1 ไอโซเลท มีลักษณะการเจริญอยู่ในกลุ่มที่เจริญเร็วโดยเจริญได้ มากกว่า30 มิลลิเมตรต่อวัน

การศึกษาปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 156 ไอโซเลท โดยเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 วันแล้วนับปริมาณการสร้างสปอร์ด้วย Haemacytometer สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1. สร้างสปอร์มากกว่า 10×10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 35 ไอโซเลท 2. สร้างสปอร์อยู่ระหว่าง 5-10 $\times 10^{10}$ สปอร์ /มิลลิลิตร จำนวน 81 ไอโซเลท 3. สร้างสปอร์น้อยกว่า 5×10^{10} สปอร์ /มิลลิลิตร จำนวน 40 ไอโซเลท และพบว่าทั้ง 3 กลุ่มมีปริมาณการสร้างสปอร์เฉลี่ย ± SD เท่ากับ $13.04 \pm 2.52 \times 10^{10}$, $7.37 \pm 1.28 \times 10^{10}$ และ $3.22 \pm 1.22 \times 10^{10}$ สปอร์ /มิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบเชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกได้จากวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ดแต่ละฟาร์ม มีการสร้างสปอร์มากกว่า 10×10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 5 ไอโซเลท มีการสร้างสปอร์อยู่ระหว่าง 5-10 $\times 10^{10}$ สปอร์ /มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวน 27 ไอโซเลท และสร้างสปอร์น้อยกว่า 5×10^{10} สปอร์ /มิลลิลิตร จำนวน 3 ไอโซเลท โดยมีปริมาณการสร้างสปอร์เฉลี่ย ± SD เท่ากับ $11.03 \pm 0.46 \times 10^{10}$, $7.58 \pm 1.26 \times 10^{10}$ และ $3.24 \pm 1.49 \times 10^{10}$ สปอร์ /มิลลิลิตรตามลำดับ สำหรับเชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกจากตัวอย่างดินแปลงเกษตรกรแต่ละอำเภอ จ.เชียงใหม่ มีการสร้างสปอร์มากกว่า 10×10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 29 ไอโซเลท มีการสร้างสปอร์อยู่ระหว่าง 5-10 $\times 10^{10}$ สปอร์ /มิลลิลิตร จำนวน 54 ไอโซเลท และสร้างสปอร์น้อยกว่า 5×10^{10} สปอร์ /มิลลิลิตร จำนวน 37 ไอโซเลท โดยมีปริมาณการสร้างสปอร์เฉลี่ย ± SD เท่ากับ $13.44 \pm 2.59 \times 10^{10}$, $7.27 \pm 1.29 \times 10^{10}$ และ $3.22 \pm 1.22 \times 10^{10}$ สปอร์ /มิลลิลิตรตามลำดับ และเชื้อรา *Trichoderma* ที่แยกจากสารชีวภัณฑ์ มีการสร้างสปอร์มากกว่า 10×10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร

การตรวจหา double-stranded RNA (dsRNA) จากเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 156 ไอโซเลท โดยวิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Jordan and Dodds (1985) และ Valverde *et al*. (1990) สามารถตรวจพบ dsRNA จากเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ TM10 พบแถบของ dsRNA ขนาดประมาณ 1000 bp และ TM20 พบแถบของ dsRNA ขนาดแตกต่างกัน 2 แถบมีขนาดประมาณ 700 bp และ 1100 bp ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท TM10 แยกได้จากวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ด ต.แม่แฝกใหม่ อ.สันทราย และ TM20 แยกได้จากวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ด ต.ป่าไผ่, ฟาร์ม 1 อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ซึ่งงานทดลองครั้งนี้ได้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาของ Antal และคณะในปี 2005 โดยได้นำเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลทที่แยกได้จากวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ดในประเทศฮังการีมาตรวจหา sdRNA ปรากฏว่าพบ dsRNA จากเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 12 ไอโซเลท และแถบของ dsRNA มีขนาด 2.4-10 kbp และมีลักษณะของแถบที่ปรากฏแตกต่างกันถึง 5 รูปแบบ

เมื่อตรวจสอบดูลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท TM10 และ TM20 พบว่ามีการเจริญผิดปกติโดยลักษณะขอบโคโลนีเจริญเป็นหยักๆ มีอัตราการเจริญอยู่ในกลุ่มที่เจริญช้าถึงปานกลางเห็นได้ชัดเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งแตกต่างจากเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลทอื่นๆ ที่ไม่พบ dsRNA โดยทั่วไปแล้วเชื้อรา *Trichoderma* จะมีลักษณะการเจริญที่รวดเร็วเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อได้ภายใน 2 – 3 วัน ตรงกับการรายงานของ จิระเดช (2544) และ นุชนารถ (2535) ที่กล่าวว่าเชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราที่มีการแข่งขันที่ดีในด้าน ที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร มีความสามารถในการเข้าครอบครองพื้นที่อาศัยได้รวดเร็วกว่า เชื้อราสาเหตุโรคพืช สำหรับการสร้างสปอร์เชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท TM10 และ TM20 มีปริมาณการสร้างสปอร์อยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณสปอร์น้อยกว่า 5×10^{10} สปอร์ /มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กับงานวิจัยของ Chu และคณะในปี 2002 ได้ศึกษาลักษณะของ dsRNA จากเชื้อรา *Fusarium graminearum* พบว่า dsRNA มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *F. graminearum* โดยมีอัตราการเจริญของเส้นใยลดลง และจากการศึกษาของ Diepeningen *et al.* (2006) พบว่า dsRNA มีผลทำให้การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus* ลดลงด้วยเช่นกัน

การศึกษาความเสถียร และขจัด dsRNA โดยเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลทที่พบ dsRNA ได้แก่ TM10 และ TM20 ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง สลับกับวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว sub culture เป็นจำนวน 10 รุ่น พบว่าทั้งสองไอโซเลท มีอัตราการเจริญและการสร้างสปอร์เพิ่มขึ้น แต่ก็ยังสามารถตรวจพบแถบของ dsRNA อยู่จากเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* ซึ่งการทดลองในลักษณะเช่นนี้ได้เคยมีการศึกษาโดย Kim *et al.* (1996) โดยทำการทดสอบเลี้ยงเชื้อรา *Rhizoctonai solani* PT3-1 และ US-9 ที่ตรวจพบ dsRNA บนอาหาร PDA ที่มีส่วนผสมของ cycloheximide และ emetine เข้มข้น 10 ppm แล้ว subculture เป็นจำนวน 10 ครั้ง และตรวจหา dsRNA ปรากฏว่ายังสามารถพบ dsRNA จากเส้นใยของเชื้อรา *R. solani* AG4 ได้โดยไม่เปลี่ยนแปลงไป และ Fekete *et al.* (1995) ได้ทำการ subculture เชื้อรา *Fusarium pore* ที่ตรวจพบ dsRNA เป็นจำนวนหลายครั้งก็ยังสามารถตรวจพบ dsRNA อยู่ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีการศึกษาที่จะขจัด dsRNA ออกไปโดยใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นดังรายงานของ Ann and Lee (2000) ที่เลี้ยงเชื้อรา *Nectria radicicola* บนอาหาร PDA ที่เติม cycloheximide เข้มข้น 10 ppm และ emetine เข้มข้น 20 ppm เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายลงเลี้ยงบนอาหาร PDA จานใหม่ เมื่อนำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหาร Czapek dox broth มาสกัด dsRNA ปรากฏว่าไม่สามารถตรวจพบ dsRNA ในเชื้อรา *Nectria radicicola*

เมื่อศึกษากิจกรรมการสร้างเอนไซม์ พบว่าจากเชื้อรา *Trichodema* ไอโซเลทที่ไม่พบ dsRNA คือ T15, T42 และ T75 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ exo-chitinase ได้ 59.3×10^{-3}, 54.5×10^{-3} และ 60.0×10^{-3} หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนไอโซเลทที่พบ dsRNA คือ TM10, TM10h, TM20 และ TM20h มีปริมาณเอนไซม์ exo-chitinase เท่ากับ 53.0×10^{-3}, 54.5×10^{-3}, 50.5×10^{-3} และ 56.8×10^{-3} หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และพบว่าเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มทั้งพบและไม่พบ dsRNA ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ซึ่งก็ตรงกับการรายงานของ Zaldivar *et al.* (2001) ที่ศึกษาการสร้างเอนไซม์ exo-chitinase ในเชื้อรา *T. aureoviride* witd type และ *T. aureoviride* mutant 7-121 เปรียบเทียบกันพบว่าทั้ง 2 ชนิดมีการผลิตเอนไซม์ exo-chitinase ได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน และก็ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ chitinase ในเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Trichoderma โดย Marco และคณะในปี 2002 ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ chitinase, N-acetylglucosaminidase และ β-1,3-glucanase ในเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 3 ไอโซเลท คือ 1051, TVC และ 39.1 พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท มีปริมาณการสร้างเอนไซม์ chitinase ได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T15, T42 และ T75 กับกลุ่มที่พบ dsRNA ได้แก่ TM10 และ TM20 และไอโซเลทที่ศึกษาความเสถียรและขจัด dsRNA ได้แก่ TM10h และ TM20h ในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท TM10, TM20 TM10h และ TM20h มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *S. rolfsii* เท่ากับ 25.42, 24.62, 28.52 และ 26.74 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าเชื้อรา *S. rolfsii* เจริญเข้าปกคลุมบริเวณโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* กลุ่มที่พบ dsRNA จนกระทั้งเกือบเต็มจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท T15 ซึ่งแยกได้จากสาร ชีวภัณฑ์ (*T. harzianum*) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ดีที่สุดถึง 71.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือไอโซเลท T75 และ T42 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 60.79 และ 54.93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ มาลัยพร (2546) ที่รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ โดยเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะเจริญปกคลุมเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* จนไม่สามารถเจริญต่อไปได้

เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 7 ไอโซเลท มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ในสภาพเรือนทดลอง พบว่าเชื้อราไอโซเลทที่ไม่พบ dsRNA ได้แก่ T15 และ T75 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดีที่สุด และพบว่าไอโซเลทที่พบ dsRNA ได้แก่ TM10, TM20, TM10h และ TM20h ไม่สามารถควบคุมโรครากและโคนเน่าของถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ โดยถั่วเหลืองจะแสดงอาการเมล็ดเน่าก่อนงอก และเมื่ออายุ 7-14 วัน ต้นกล้าจะเริ่มแสดงอาการเน่าบริเวณโคนลำต้น ทำให้ต้นกล้าถั่วเหลืองเหี่ยวและลำต้นหักล้มตายในที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Chu *et al.* (2002) และ Diepeninigen *et al.* (2006) ที่พบว่า dsRNA จะมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด hypovirulence ในเชื้อราที่ทำการศึกษาคือ *Fusarium* และ *Aspergillus* ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะของ dsRNA ในเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวนทั้งหมด 156 ไอโซเลท สามารถตรวจพบ dsRNA จำนวน 2 ไอโซเลท จากเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TM10 และ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท TM20 ซึ่งแยกได้จากวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ด แถบของ dsRNA ที่ปรากฏมีขนาดประมาณ 700 bp, 1000 bp และ 1100 bp จากการทดลองพบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อรา *Trichoderma* ที่พบ dsRNA มีความสามารถในการเข้าครอบครองพื้นที่และแย่งอาหารกับเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ไม่ดีเท่ากับเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลทอื่นๆ ที่ไม่พบ dsRNA ทั้งภายในสภาพห้องปฏิบัติการ และในเรือนทดลอง ซึ่งจากการทดลองนอกจากจะทราบถึงผลกระทบของ dsRNA แล้วยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* ที่จะนำมาใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งปัจจุบันเกษตรกรได้นำเชื้อรา *Trichoderma* มาใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งในรูปแบบหัวเชื้อสดและรูปแบบของชีวภัณฑ์ที่มีออกมาจำหน่ายทั่วไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved