

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.  
เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน



กานต์ วงศาริยะ  
สุเมธ กุณฑลวรรณ  
สุวัฒน์ สัจจวรรณ

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 67305  
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

b. 11663261  
i. ....

โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์  
คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Screening of *Trichoderma* spp. for Inhibition of Aflatoxin Producing Fungi**



**A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the**

**Degree of**

**Bachelor of Science**

**Department of Applied Biology**

**Faculty of Science**

**King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang**

**Academic Year 2005**



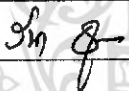
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

นักศึกษา นายกานต์ วงสาริยะ รหัสประจำตัว 45050727  
 นายสุเมธ กุณฑลวรรณ รหัสประจำตัว 45050792  
 นายสุวัฒน์ สัจจวรรณ รหัสประจำตัว 45050793

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์  
 สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม  
 อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.คุณณี ชนะบริพัฒน์  
 ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์  
 คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร.อุ๋นเรือน เพชรวัลย์	
กรรมการ รศ.ดร.คุณณี ชนะบริพัฒน์	
กรรมการ ผศ.วินา ชูโชติ	

(รศ.ดร.นवलพรรณ ฒ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน
นักศึกษา	นายกานต์ วงศาริยะ นายสุเมธ กุณฑลวรรณ นายสุวัฒน์ สังวรวรรณ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2548
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.คุณณี ชนะบริพัทธ์

#### บทคัดย่อ

จากการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. 13 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากดินธรรมชาติ และเชื้อรา *Trichoderma* sp. TISTR 3167 และ *Trichoderma viride* S84-1 มาศึกษาและคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ IMI 242684 และ *A. parasiticus* IMI 102566 โดยศึกษาการเจริญแข่งขัน การเป็นไมโคพาราสิต และการสร้างสารปฏิชีวนะ จากการทดสอบการเจริญแข่งขันระหว่าง *Trichoderma* spp. กับเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 15 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยพบว่าไอโซเลท SCP I มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้ 90.605 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท KSR มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้ 91.387 เปอร์เซ็นต์ จากการทดสอบการเป็นไมโคพาราสิต พบว่าไอโซเลทที่มีคุณสมบัติในการเป็นไมโคพาราสิต คือ CHA 4 , KSR , SCP I , SCP II และ SCP III และการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะ พบว่าไอโซเลท SRS 4 และ KMC มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* เท่ากับ 88.76 และ 87.337 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

<b>Special Project Title</b>	Screening of <i>Trichoderma</i> spp. for Inhibition of Aflatoxin Producing Fungi
<b>Name</b>	Mr. Karn Wongsariya Mr. Sumet Kuntanwan Mr. Suwat Sangvorawanna
<b>Department</b>	Applied Biology
<b>Program</b>	Industrial Microbiology
<b>Academic Year</b>	2005
<b>Special Project Advisor</b>	Assoc.Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat

#### Abstract

Thirteen isolates of *Trichoderma* spp. obtained from soils and two other isolates (*Trichoderma* sp. TISTR 3167 and *T. viride* S84-1) were determined for their abilities to control the growths of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by mechanisms of competition, mycoparasitism and antibiosis. From the competition study, it was found that all 15 isolates of *Trichoderma* could inhibit the growths of *A. flavus* and *A. parasiticus*. Isolate SCP I gave the highest inhibitory effect on *A. flavus* (90.605% of inhibition) where as isolate KSR was the most effective fungus against *A. parasiticus* (91.387 % of inhibition). In term of mycoparasitism test, it was shown that isolates CHA 4, KSR, SCP I, SCP II and SCP III were mycoparasitic to *A. flavus* and *A. parasiticus*. For antibiosis test, the results showed that isolates SRS 4 and KMC gave the highest inhibitory effect on *A. flavus* and *A. parasiticus* by 88.76% and 87.337% of inhibition, respectively.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเรื่องการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญของราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงการพิเศษ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ต้องขอขอบพระคุณ รศ.ดร.คุณณี ณะบริวัฒน์ ที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในการทำโครงการพิเศษ ผศ.สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์ ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ และต้องขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อุ้นเรือน เพชรวัลย์ ประธานกรรมการสอบโครงการพิเศษ และ ผศ.วินา ชูโชติ กรรมการสอบโครงการพิเศษ รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ จนทำให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและดำเนินงาน.....	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....	4
2.1 ประวัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน.....	4
2.2 เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน.....	4
2.3 ชนิดและคุณสมบัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน.....	6
2.4 กระบวนการสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน.....	7
2.5 อันตรายจากสารพิษอะฟลาทอกซิน.....	9
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน.....	10
2.7 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.....	11
2.8 วิธีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์.....	15
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	17
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	17
3.2 สายพันธุ์ของเชื้อรา.....	17
3.3 การแยกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. จากดินธรรมชาติ.....	17
3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ใน ระดับห้องปฏิบัติการ.....	18
3.5 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ.....	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	21
4.1 การแยกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. จากดินธรรมชาติ.....	21
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ใน ระดับห้องปฏิบัติการ.....	22
4.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ.....	32
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	43
5.1 การทดสอบการเจริญแข่งขัน.....	43
5.2 การทดสอบการเป็นไมโคพาราสิต.....	43
5.3 การทดสอบการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> .....	44
เอกสารอ้างอิง.....	45
ภาคผนวก.....	50
ภาคผนวก ก.....	51
ภาคผนวก ข.....	53
ภาคผนวก ค.....	54
ภาคผนวก ง.....	56
ภาคผนวก จ.....	57
ภาคผนวก ฉ.....	58
ภาคผนวก ช.....	61
ภาคผนวก ซ.....	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 แหล่งที่มาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ.....	21
4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> โดย เฉลี่ยที่เลี้ยงคู่กับเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ.....	23
4.3 ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อรา (ชม.) เชื้อรา <i>A. flavus</i> อายุ 10 วันในการ ทดสอบการเจริญแข่งขันกับเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ....	23
4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> โดย เฉลี่ยที่เลี้ยงพร้อมๆกับเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ.....	24
4.5 ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> อายุ 10 วันในการทดสอบการ เจริญแข่งขันกับเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ....	25
4.6 แสดงผลการเป็นไมโคพาราสิตของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ....	27
4.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> โดย เฉลี่ยที่ทำการทดสอบการสร้างปฏิชีวนะของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ....	29
4.8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา <i>A. flavus</i> อายุ 4 วันในการทดสอบการสร้าง ปฏิชีวนะของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ....	29
4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญของเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> โดยเฉลี่ยที่ทำการทดสอบการสร้างปฏิชีวนะของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.....	30
4.10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> อายุ 4 วันในการทดสอบการสร้าง สารปฏิชีวนะของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ....	31

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะ conidiophore ของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp.....	5
2.2 แสดงโครงสร้างของสารพิษอะฟลาทอกซิน B1, B2, G1 และ G2.....	7
2.3 เมแทบอลไลต์ของอะฟลาทอกซิน (วรนันท์, 2538).....	9
2.4 ลักษณะของ <i>Trichoderma</i> spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA.....	12
2.5 โครงสร้างของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp.....	12
4.1 การเจริญแข่งขันของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. กับเชื้อรา <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> .....	26
4.2 แสดงการเป็นไมโทพลาสติด ของเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ต่อเชื้อ <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> .....	28
4.3 การทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.....	32
4.4 เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท CHA 4 ที่แยกได้จากรากต้นมันสำปะหลัง (อ.บ้านบัว จ. ชลบุรี).....	35
4.5 เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท KMC ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงปลูกข้าวโพด ทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง).....	36
4.6 เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท KSR ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงปลูกสับปะรด อ. เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี ).....	37
4.7 เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SCP I ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี ).....	38
4.8 เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SCP II ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี ).....	39
4.9 เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SCP III ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี ).....	40
4.10 เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SCP IV ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ. ดอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี ).....	41
4.11 เชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลท SRS 4 ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงสับปะรด อ.เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี).....	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

ราในสกุล *Aspergillus* spp. ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ดำรงชีวิตแบบ saprophyte โดยอาศัยอยู่ในดิน และย่อยสลายอินทรีย์วัตถุเป็นอาหาร ราในสกุล *Aspergillus* spp. มีหลายชนิดที่สามารถผลิตสารพิษ mycotoxin สารพิษที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางคือ อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) (วิชัย, 2546) สารอะฟลาทอกซินที่สร้างขึ้นมีหลายชนิดได้แก่อะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, B<sub>2a</sub> และ G<sub>2a</sub> (WHO, 1979) อาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดมีการปนเปื้อนจากสารพิษเหล่านี้ ได้แก่ เมล็ดธัญพืช ข้าวสาลี ข้าวโพด ถั่วลิสง เมล็ดฝ้าย มะพร้าวตากแห้ง นม ไข่ ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ อะฟลาทอกซินมีความสำคัญทางด้านการเกษตร การแพทย์ สาธารณสุขและเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง และเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์และยังเป็นผลให้เกิดมะเร็งตับในมนุษย์อีกด้วย (Ainsworth and Austwick, 1973) ตัวอย่างโรคที่เกิดจากความเป็นพิษของสารอะฟลาทอกซิน เช่น ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแอฟริกา (Rodrick and Roberts, 1997) พบว่าอะฟลาทอกซินมีส่วนเกี่ยวข้องในการทำให้เกิดโรคมะเร็งตับ โรคตับอักเสบเฉียบพลัน Reye's syndrome โรคขาดโปรตีนในเด็กทารก (Gourama and Bullerman, 1995a ; Jelinek et al., 1989) โดยอาการที่เกิดจากสารพิษอะฟลาทอกซินมีทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับสารพิษอะฟลาทอกซินเป็นอย่างมาก ซึ่งการวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งถึงการควบคุมและกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซิน

*Trichoderma* spp. เป็นราที่พบมากในดิน (วิชัย, 2546) และยังจัดเป็นพวก mycoparasite ต่อราที่ก่อให้เกิดโรคพืชบางชนิด และมีบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารในการยับยั้งการเจริญของราชนิดอื่นได้ (Papavizas, 1985 ; Inglis and Kawchuk, 2002) ในการเป็น mycoparasitism ของ *Trichoderma* spp. จะมีการสร้างสารที่มีผลต่อการเจริญของราชนิดอื่น เช่น การสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของราชนิดอื่น ตัวอย่างเช่น เอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase, protease และ chitinase โดยทั่วไปพบว่าสาร chitin เป็นสารที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังของเชื้อรา ซึ่ง *Trichoderma* spp. สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase ที่สามารถย่อย chitin ที่ผนังเซลล์ของเชื้อราได้ เนื่องจากผลของเอนไซม์ chitinase ดังกล่าวข้างต้นถือว่าเอนไซม์ chitinase จัดเป็นสารชีวภาพที่ *Trichoderma* spp. ผลิตขึ้น (El-katatny et al., 2000 ; Gokul et al., 2000)

การทดลองนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Trichoderma* spp. ที่มีผลในการควบคุมการเจริญของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินธรรมชาติ
- 1.2.2 เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในระดับห้องปฏิบัติการ
- 1.2.3 เพื่อศึกษากลไกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ ต่อ *A. flavus* และ *A. parasiticus*

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษถึงการควบคุมเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ มาทดสอบเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อต้านเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบความสามารถในด้านการเจริญแข่งขัน การเป็นไมโคพาราสิต การย่อยสลายเซลล์ulos และ การสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* จากนั้นศึกษาลักษณะของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกได้ เพื่อจำแนกสปีชีส์

## 1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน

- 1.4.1 การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินธรรมชาติ
- 1.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่
  - 1.4.2.1 การเจริญแข่งขัน (competition)
  - 1.4.2.2 การเป็นไมโคพาราสิต (mycoparasitism)
  - 1.4.2.3 การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*
- 1.4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

## 1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 สามารถคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของ *A. flavus* และ *A. parasiticus*
- 1.5.2 ทราบกลไกของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ เพื่อใช้ในการควบคุม *A. flavus* และ *A. parasiticus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.3 ทราบแนวทางในการพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ในดินที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีในผลิตผลทางการเกษตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและหลักการ

#### 2.1 ประวัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทำให้เกิดการสะสมของไพรูเวต (pyruvate) และกรดอะมิโน (amino acid) บางชนิดโดยกระบวนการ polyketide biosynthesis pathway และสร้างอะฟลาทอกซินแทนกรดไขมัน (fatty acid) (ชนิกาน และ สมจินตนา, 2542) พบครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ.2503 เนื่องจากไก่อ้วนประมาณ 100,000 ตัว ในประเทศ อังกฤษตายโดยไม่ทราบสาเหตุ จึงได้ให้ชื่อว่าโรค “Turkey X” (Blount, 1961) ต่อมาพบว่าสาเหตุ มาจากถั่วลิสงที่ซื้อมาจากประเทศบราซิล ซึ่งพบในภายหลังว่ามีเชื้อรา *Aspergillus flavus* ขึ้นอยู่ เป็นจำนวนมากจึงได้สกัดและแยกสารพิษจากถั่วลิสงที่นำเข้าจากประเทศบราซิลให้บริสุทธิ์ (Sargeant. *et al.*, 1961a) และยังสามารถแยกเชื้อราได้หลายชนิดจากถั่วลิสงที่ซื้อมาจากประเทศยู กานดา โดยเชื้อราชนิดหนึ่งชื่อ *A. flavus* Link สามารถสร้างสารพิษได้ ซึ่งพบว่าเป็นชนิดเดียวกัน กับที่พบในส่วนสกัดของถั่วลิสงที่เป็นพิษจากประเทศบราซิล จึงเรียกสารพิษจากเชื้อราชนิดนี้ว่า “aflatoxin” (Sargeant *et al.*, 1961b) ซึ่งย่อมาจากชื่อ Genus “Aspergillus” และ fla ย่อมาจากชื่อ *flavus* (ปริศนา, 2534)

สำหรับประเทศไทยในปี พ.ศ. 2515 พบว่าเด็กที่จังหวัดอุดรธานี มีอาการตัวร้อน ปวด ท้อง ท้องเดิน อาเจียน ไม่รู้สึกตัว ชักหมดสติ ละอองเสียชีวิตภายใน 24-48 ชั่วโมง อาการของเด็ก คล้ายโรค Reye's syndrome จากการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดอยู่ใน เกณฑ์ต่ำกว่าปกติ มีระดับแอมโมเนียในเลือดสูง และตรวจพบอะฟลาทอกซินชนิด B<sub>1</sub> ในกระเพาะ อาหารลำไส้เล็ก ปัสสาวะ อุจจาระ และน้ำดีของผู้ป่วย จากการตรวจสอบเชื้อราที่เจริญบนข้าว เหนียวพบเชื้อรา 3 ชนิด ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ (กวินดา และคณะ, 2538)

#### 2.2 เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

เชื้อราที่สร้างสารพิษได้แก่ *A. flavus* Link, *A. parasiticus* Speare, *A. nomius* (Kurtzman *et al.*, 1987), *A. tamarii* (Goto *et al.*, 1997) และ *A. bombycis* (Peterson *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อรา *A. pseudotamarii* สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางพันธุกรรม รวมถึงลักษณะการสร้างสารพิษของเชื้อรา พบว่ามีความแตกต่างจากเชื้อรา *A. tamarii* จึงถือว่าเชื้อรา *A. pseudotamarii* เป็นเชื้อราชนิดใหม่ที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้

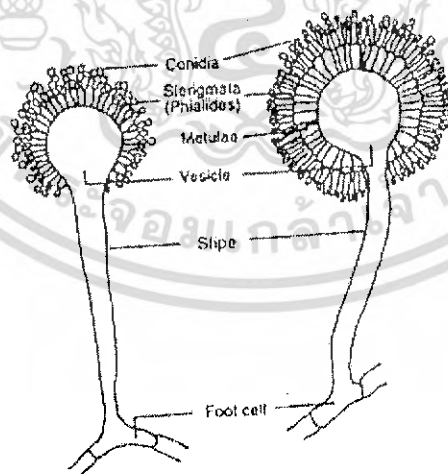
เชื้อรา *Aspergillus* sp. มี foot cell ทำให้สามารถแยกออกจากเชื้อราชนิดอื่นได้ง่าย นอกจากนี้ พบว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร Czapek's solution agar และ malt extract agar การจำแนกเชื้อรา

เอ็กสัรณเป็นเอ็กสัรณที่หลังวันเวสท์หรับการเข่งานเพื่อกำรห้กษัเอ็กสัรณน เมื่อผู้ญ่เตเห็นาเป้เซบประเอ็ช่นดานการค้

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ *Aspergillus* sp. สามารถดูได้จากลักษณะสัณฐานวิทยา โดยลักษณะที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คือ conidiophore เป็นชนิด unbranched และ non septated hypha แยกออกมาจาก vegetative mycelium ตรงปลายของ conidiophore จะขยายใหญ่ขึ้นและพองออก ซึ่งเรียกว่า vesicle ตรงบริเวณ vesicle จะมี sterigmata รูปร่างแบบ flask-shaped งอกออกมาจนเต็ม vesicle และจะมี conidia งอกออกมาที่ปลายของ sterigma แต่ละอัน โดยไม่มีการแตกแขนงดังรูปที่ 2.1 (อรวรรณ, 2531 ; Gourama and Bullerman, 1995a) เชื้อรา *Aspergillus* sp. พบทั่วไปในดินและผลผลิตทางการเกษตร บางชนิดจะสร้างอะฟลาทอกซินซึ่งเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งตับ (Gourama and Bullerman, 1995a)

เชื้อรา *A. flavus* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกับ *A. parasiticus* เป็นเชื้อราที่มีการปนเปื้อนในสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิตมากที่สุด ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *A. flavus* คือ conidiophore หนาและจุกขระ ไม่แตกแขนงบน conidiophore มี vesicle เป็นกระเปาะบวมกลมๆยึดหยุ่นได้ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-65 ไมโครเมตร รูปร่างของ vesicle จะเปลี่ยนไปตามองค์ประกอบของอาหาร บน vesicle จะมี sterigma 1 หรือ 2 อัน ซึ่งมีผนังเซลล์ 2 ชั้น ชั้นแรกเรียกว่า metulides ชั้นที่ 2 เรียกว่า phialide ส่วนปลายของ sterigma มี conidia รูปร่างกลมรี มีหน้าที่สำหรับการสืบพันธุ์ของเชื้อรา ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยจะสร้างสปอร์ (หรือ sclerotia) ที่เหลือจนถึงสีน้ำตาล ผลผลิตที่สร้างขึ้นจากสปอร์มีความสำคัญมากในการจำแนกเชื้อรา *Aspergillus* sp. แต่ละชนิด (Gourama and Bullerman, 1995a)



รูปที่ 2.1 ลักษณะ conidiophore ของเชื้อรา *Aspergillus* sp.

### 2.3 ชนิดและคุณสมบัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นสารเคมีพวกบิสฟูราโนควิมาริน (bisfuranocoumarin) ที่มีอนุพันธ์ของ coumarin ต่อกับ bifuran ring มี 17 ชนิด คือ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, GM<sub>1</sub>, GM<sub>2</sub>, M2a, GM2a, B3, P1, Q1, aflatoxicol และ dihydroaflatoxicol (Betina, 1984) ที่แยกได้ แต่เดิมมีเพียง B1, B2, G1 และ G2 (รูปที่ 2.2) สำหรับอะฟลาทอกซินชนิดอื่นๆส่วนใหญ่เป็นผลมาจากเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซิน B1 (นงนุช, 2540)

ชื่อชนิดของสารพิษอะฟลาทอกซินตั้งขึ้นตามคุณสมบัติการเรืองแสงบนแผ่นโครโมโทกราฟี ผิวนาง (Thin-layer chromatographic (TLC) plate) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365-366 นาโนเมตร โดยอะฟลาทอกซิน B1 และ B2 เรืองแสงสีน้ำเงิน (blue) และอะฟลาทอกซิน G1 และ G2 เรืองแสงสีเขียว (green) (Hartley, 1963)

โครงสร้างของอะฟลาทอกซิน B1 ประกอบด้วย bifuran, coumarin และ cyclopentanone ring การที่อะฟลาทอกซิน B1 มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 8-9 ใน bifuran ring ทำให้อะฟลาทอกซิน B1 มีความเป็นพิษมากกว่าอะฟลาทอกซินชนิดอื่นเพราะพันธะคู่นี้สามารถถูกเปลี่ยนเป็น epoxide ซึ่ง epoxide จะจับกับโมเลกุล DNA, RNA และโปรตีนได้ง่าย นอกจากนี้อะฟลาทอกซิน B1 มี cyclopentanone ring ติดกับ coumarin ring การมี cyclopentanone ring ทำให้สลายตัวช้ากว่าพวกที่มี lactone ring ซึ่งพบในอะฟลาทอกซิน G1 และ G2 ดังนั้นอะฟลาทอกซินชนิดที่เป็นพิษมากที่สุด จึงเรียงลำดับจากอะฟลาทอกซิน B1, G1, B2 และ G2 พิจารณาจากพันธะคู่และ lactone ring สารตัวใดมีพันธะคู่ก็เป็นพิษมากกว่า ดังนั้น อะฟลาทอกซิน B1 กับ G1 จึงเป็นพิษมากกว่า B2 กับ G2 ส่วน lactone ring นั้นจะถูกสลายได้ง่ายกว่า ความเป็นพิษขม่น้อยกว่า เพราะโครงสร้างถูกเปลี่ยนแปลงไปแล้ว (วรรณท์, 2538)

อะฟลาทอกซินมีคุณสมบัติที่สำคัญๆดังนี้ (สุกัญญา และคณะ, 2540)

1. การเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตขนาดคลื่น 365 นาโนเมตร จากคุณสมบัตินี้จะนำมาใช้ในการตรวจสอบหาสารพิษ โดยอะฟลาทอกซินชนิด B จะเรืองแสงสีน้ำเงิน และอะฟลาทอกซินชนิด G จะเรืองแสงสีเขียว

2. สารพิษนี้มีคุณสมบัติในการละลายได้ดีในไขมันและน้ำมัน ละลายได้บ้างในน้ำเกลือ

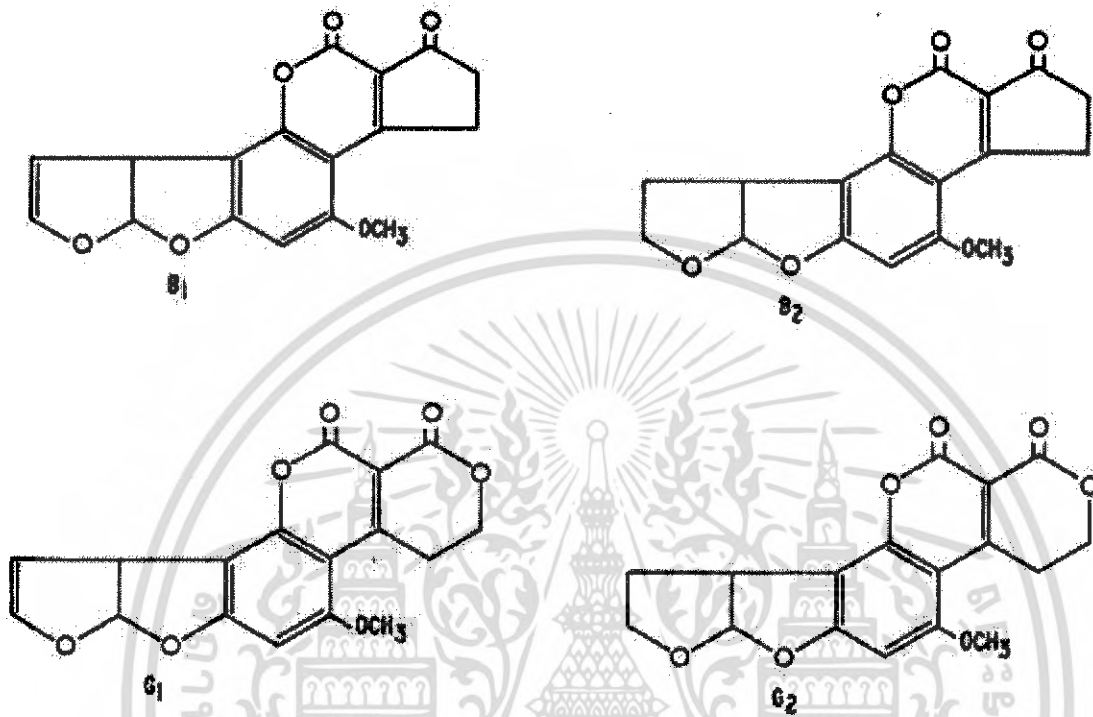
3. ละลายได้ดีในตัวทำละลายหลายชนิด เช่น เมทานอล (methanol) คลอโรฟอร์ม (chloroform) อะซีโตน (acetone) และเบนซีน (benzene)

4. ไม่ละลายในสารบางชนิด เช่น เฮกเซน (hexane) อีเทอร์ (ether) และอื่นๆ ซึ่งจากคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ในการทำให้สารพิษที่ได้บริสุทธิ์

5. สารพิษนี้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยสารละลายต่าง เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) จึงนำสารละลายนี้มาใช้ในการทำความสะอาดภาชนะเครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์สารพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. จุดหลอมตัวของอะฟลาทอกซินอยู่ที่ 250 องศาเซลเซียส ดังนั้นการใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ กั้ว หรือนึ่ง จึงไม่สามารถทำลายสารพิษนี้ได้ อย่างไรก็ตามอะฟลาทอกซินก็สามารถถูกทำลายได้บ้างด้วยแสงและความร้อนในรูปต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาและอุณหภูมิ



รูปที่ 2.2 แสดง โครงสร้างของสารพิษอะฟลาทอกซิน B1, B2, G1 และ G2

#### 2.4 กระบวนการสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินผลิตมาจาก acetate และมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นวงแหวนได้เป็น cyclicpolyketo acid โดยมีคาร์บอน 20 ตัว ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น averufin, versinocol, sterigmatocystin และ อะฟลาทอกซิน B1 ในที่สุด ไนโตรเจนและกรดอะมิโน (asparagines, aspartate, glycine และ glutamine) เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน โดยอะฟลาทอกซินจะมีการสังเคราะห์ขึ้นเมื่อเชื้อรา *A. flavus* มีการเจริญแล้ว 48 ชั่วโมง และเชื้อราจะสังเคราะห์อะฟลาทอกซินได้สูงสุด หลังจากเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือวัตถุดิบอาหารสัตว์แล้วเป็นเวลา 7 วัน (Heathcote, 1984)

อะฟลาทอกซิน B1 จะถูกให้เปลี่ยนให้เป็นสารพิษที่ดับ เมื่ออะฟลาทอกซินเคลื่อนย้ายมาสู่ตับ และอวัยวะอื่นๆ โดยจะเปลี่ยนเป็น epoxide และรวมตัวกับดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน โดยไปรวมกับ guanine residue ของดีเอ็นเอ (นางนุช, 2540) ทำให้ ดีเอ็นเอเสียหาย เอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เช่น เอนไซม์ polymerase ไม่สามารถทำงานได้ มีผลทำให้การสร้าง DNA และ RNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดลง (มาลินี, 2527) อะฟลาทอกซินจะมีผลทำให้จำนวน ribosome ลดลงและมีลักษณะผิดปกติ ไมโทคอนเดรียเสื่อมสลายทำให้การขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์สูญหายไป (ศศิธร, 2528)

การเปลี่ยนแปลงสารพิษจากเชื้อราในร่างกายแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้ (อนงค์, 2539-2543)

1. การดูดซึม (absorption) สัตว์จะได้รับสารพิษโดยซึมผ่านผิวหนัง สูดดมผ่านทางเดินหายใจ และกินโดยผ่านทางเดินอาหาร

2. การแพร่กระจาย (distribution) เมื่อสารพิษเข้าสู่ร่างกายแล้ว จะกระจายผ่านกระแสโลหิต น้ำเหลือง น้ำหล่อเลี้ยงต่างๆ ทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร รก และอวัยวะต่างๆทั่วร่างกาย

3. การสะสม (accumulation) สารพิษบางส่วนมีการสะสม หรือตกค้างที่อวัยวะสำคัญเช่น ต่อมไทรอยด์ ตับ กระจก ไชมัน เนื้อเยื่อต่างๆ

4. เมแทบอลิซึม (metabolism) สารพิษบางส่วนจะผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism pathway) ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี ทำให้สารพิษมีฤทธิ์ลดลง หรือเพิ่มฤทธิ์รุนแรงขึ้น และจับกับสารที่มีในเซลล์ ซึ่งกระบวนการเมแทบอลิซึมนี้สามารถจำแนกได้ 2 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) รีดักชัน (reduction) และไฮโดรไลซิส (hydrolysis) เนื่องจากอะฟลาทอกซิน B1 มีพิษรุนแรงกว่าอะฟลาทอกซินชนิดอื่นๆ ดังนั้นเมื่อสารพิษเข้าสู่ร่างกายจะทำให้เกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือเปลี่ยนแปลงสารพิษที่ตับ โดยในระยะที่ 1 ใช้ระบบไมโครโซมของตับเกิดปฏิกิริยาทางเคมีคือ ปฏิกิริยา hydroxylation เปลี่ยนอะฟลาทอกซิน B1 เป็น Q1 และ M1 ปฏิกิริยา O-demethylation เปลี่ยนอะฟลาทอกซิน B1 เป็น P1 ปฏิกิริยา epoxidation เปลี่ยนอะฟลาทอกซิน B1 เป็นอะฟลาทอกซิน B1-epoxide ซึ่งไม่คงตัวและสามารถเปลี่ยนต่อไปเป็นอะฟลาทอกซิน B1-dihydrodiol โดยใช้เอนไซม์ epoxide hydrase นอกจากนี้ยังใช้เอนไซม์ในระบบ cytoplasmic reduction system ของตับ เกิดปฏิกิริยารีดักชัน เปลี่ยนอะฟลาทอกซิน B1 เป็น aflatoxicol ทำให้เกิดการเมแทบอลิซึมอะฟลาทอกซิน B1 ทั้งหมดจึงมีพิษน้อยลง

ระยะที่ 2 เกิดปฏิกิริยา conjugation โดยอะฟลาทอกซิน B1 จะจับกับ glutathione โดยใช้เอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส (GSH-S-transferase) ได้อะฟลาทอกซิน B1 จับกับ glutathione ซึ่งมีพิษรุนแรงน้อยลง แต่จะเกิดมะเร็งตับได้ด้วยการจับตัวกับดีเอ็นเอหรือโปรตีนโดยพันธะโควาเลนต์

5. การกำจัด (excretion) สารพิษบางส่วนถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ อุจจาระ ลมหายใจ น้ำดี เหงื่อ น้ำนม น้ำลาย ของเสียผ่านต่อมหรืออวัยวะ รวมทั้งน้ำย่อยจากระบบทางเดินอาหาร

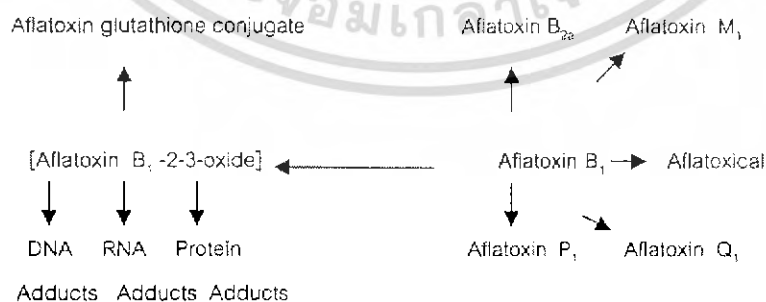
อะฟลาทอกซินที่พบในท้องตลาดพบทั้งในอาหารสำเร็จรูปของคนและสัตว์ มีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อรา ระยะเวลาของการเจริญ รวมถึงชนิดของอาหารด้วย ดังนั้นคนเฝ้าระวังเป็นเอกสารที่สวนวงไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสัตว์อาจได้รับอะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทางอาหารในปริมาณที่แตกต่างกัน แต่ถ้าได้รับเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดโรคตับแข็ง หรือมะเร็งในตับได้ ถ้าได้รับปริมาณสูงในระยะเวลาสั้นๆอาจทำให้เกิดอาการเป็นพิษอย่างเฉียบพลันขึ้นได้ อาการและลักษณะของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาทอกซิน เช่น ในไก่จะแสดงอาการ ซึม ท้องร่วง เบื่ออาหาร โลหิตจาง และตายในที่สุด ถ้าเกิดโรคแบบเฉียบพลันอาจตายได้ภายใน 1-5 วัน (กวินดา และคณะ, 2538) อะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ หยุดกระบวนการสังเคราะห์แสง และการขนถ่ายออกซิเจนของสาหร่าย *Chlorella fusca* ได้ โดยพบว่าอะฟลาทอกซินจะขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และลดองค์ประกอบของคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส ภายในเซลล์ของสาหร่าย (Sayed and Fadi-Allah, 1992 )

## 2.5 อันตรายจากสารพิษอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินจัดเป็นสาร secondary metabolite ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็ง เป็นพิษต่อตับ ทำให้เกิดตับอักเสบ ตับแข็ง เนื้องอกในตับ และมะเร็งที่ตับ มีพิษต่อคนและสัตว์โดยความเป็นพิษจะมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณของสารพิษที่ได้รับ ความถี่ของการได้รับสารพิษ เข้าสู่ร่างกาย อายุ เพศ ชนิดของพันธุ์สัตว์ รวมทั้งสภาวะการทำงานของเอนไซม์ในตับ (สุกัญญา และคณะ, 2540 )

เมื่อมีการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน เช่น อะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ถูกนำไปที่ตับที่มีเอนไซม์ต่างๆ สามารถทำปฏิกิริยากับอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ได้เป็นสารใหม่ (metabolite) ที่มีลักษณะ โครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปจากอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> เมแทบอลไลต์บางตัวอาจมีความเป็นพิษมากกว่าอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> แต่บางตัวมีความเป็นพิษน้อยกว่าได้ ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 เมแทบอลไลต์ของอะฟลาทอกซิน (วรนนท์, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซิน B1 มีความเป็นพิษน้อยกว่าอะฟลาทอกซิน B1 ยกเว้น aflatoxin B1-2-3-oxide ซึ่งเป็นสารที่ไม่คงทน สลายง่าย จึงไม่สามารถแยกเป็นสารบริสุทธิ์ออกมาได้ แต่สารตัวนี้มีความไวมาก สามารถจับกับ DNA, RNA หรือ โปรตีนได้ การเกิดปฏิกิริยาแบบนี้ทำให้ DNA polymerase และ RNA polymerase ที่เกาะอยู่กับ DNA ทำงานได้ไม่ดีเท่าที่ควร การสร้าง DNA หรือ RNA จึงลดลง เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของกลไกการถอดรหัส (gene transcription) และการแปลรหัส (translation) จะเป็นผลต่อเนื่องถึงการสร้างโปรตีนด้วย

ในกรณีที่อะฟลาทอกซิน B1 ที่บริโภคเข้าไปมีปริมาณไม่มากนัก และร่างกายมี glutathione, glucuronide และ sulfate มากพอ aflatoxin B1 -2-3-oxide จะเชื่อมกับสารดังกล่าว ทำให้โมเลกุลมีขนาดใหญ่ขึ้น และละลายน้ำได้ดีขึ้น สามารถถูกกำจัดออกจากร่างกายได้ง่าย กระบวนการนี้ถือว่าเป็นกระบวนการกำจัดสารพิษในร่างกาย (วรรณิ์, 2538 )

ในการตรวจสอบหาสารพิษอะฟลาทอกซินสามารถตรวจพบอะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตรในประเทศไทยตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่องมาตรฐานที่มีสารปนเปื้อนข้อ 4 ได้กำหนดให้มีปริมาณอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (อรุณศรี, 2542 )

## 2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน

**2.6.1 ชนิดของเชื้อรา** เชื้อราต่างชนิดกันจะมีการสร้างอะฟลาทอกซินแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณของอะฟลาทอกซิน Pitt (1989) พบว่า *A. parasiticus* จะผลิตอะฟลาทอกซิน B กับ G ส่วน *A. flavus* จะผลิตอะฟลาทอกซิน B เพียงอย่างเดียว และจากรายงานของ Criseo *et al.* (2001) ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) พบว่า *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินกับสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษจะให้แถบของ DNA ที่แตกต่างกัน

**2.6.2 แหล่งอาหาร** พบว่าในอาหารสังเคราะห์จะต้องมีปริมาณของไนโตรเจน กรดอะมิโน เช่น asparagine, aspartate, glycine, glutamine และ glutamate ปริมาณสูง และกลูโคส ในปริมาณที่เหมาะสม จึงสามารถผลิตอะฟลาทอกซินได้สูงสุด (Betina, 1984) และแร่ธาตุสำคัญที่ช่วยให้เชื้อราสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดี คือ สังกะสี ถ้าปริมาณเกลือแร่ลดลงปริมาณของอะฟลาทอกซินก็จะลดลงด้วย (สุกัญญาและคณะ, 2540)

**2.6.3 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกัน** ในอาหารทั่วไปมักมีเชื้อจุลินทรีย์หลายๆชนิดเจริญปะปนกันและเชื้อเหล่านี้มีปฏิสัมพันธ์กัน ซึ่งมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของ *A. flavus* เช่นพบว่า *Lactobacillus* sp. มีผลยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *A. flavus* subsp. *parasiticus* ในอาหารเหลว (Gourama and Bullerman, 1995b) และจากการเพาะเลี้ยง *Streptococcus lactis* ร่วมกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*A. parasiticus* ที่เจริญแล้วเป็นเวลา 3 วัน พบว่าในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงจะสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินจาก 108.33 เป็น 31.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และเมื่อเลี้ยง *S. lactis* 3 วัน ก่อนที่จะใส่สปอร์ของ *A. parasiticus* จะพบว่า *A. parasiticus* จะสามารถผลิตสารอะฟลาทอกซินเพียง 58.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จากการเปรียบเทียบความสามารถในการลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ของ *S. lactis* และ Lactic acid bacteria ในโยเกิร์ต พบว่าที่อายุการเก็บ 7 วัน *S. lactis* สามารถลดอะฟลาทอกซิน B1 จาก 50 เป็น 37.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (Thanaboripat *et al.*, 1997)

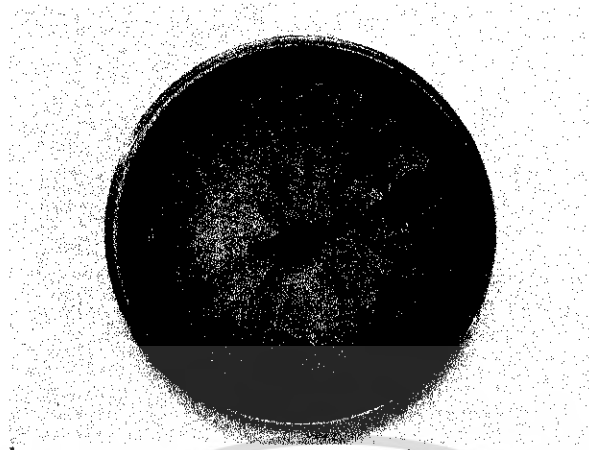
**2.6.4 สภาพแวดล้อม** ความชื้นและอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน Al-Yahya (1999) ได้ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อราระหว่างการเก็บข้าวสาลีที่ความชื้นและอุณหภูมิต่างๆ กัน พบว่าจะมีการเข้าทำลายของเชื้อราเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ 4 องศาเซลเซียส โดยมีระดับการเข้าทำลาย 30 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และปริมาณความชื้นไม่ต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Moss, 1996)

**2.6.5 ปัจจัยอื่นๆ** ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา เช่น วัสดุที่เชื้อราเจริญ การเข้าทำลายของแมลง ปริมาณวิตามินและแร่ธาตุปลีกย่อย (trace element) บางชนิด (Prado *et al.*, 1995) โดยพบว่าอะลูมิเนียม เหล็ก และสังกะสี ความเข้มข้น 40-160 กรัมต่อกรัม จะยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซิน B1 ของ *A. flavus* NRRL 6513 ในถั่วลิสงได้ และ निकเกิด 4 กรัมต่อกรัมกระตุ้นการสร้างสารพิษ แต่ที่ 1 กรัมต่อกรัม จะยับยั้งการสร้างสารพิษ จากรายงานของ Praveen และ Subramanyam (1999) พบว่าแคลเซียมความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อกรัมสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินจาก *A. parasiticus* NRRL 2999 ได้ เมล็ดพืชที่พื้นเวลาเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมจะช่วยให้เกิดการสร้างสารพิษได้มากขึ้น (กนกรัตน์, 2540) และยังพบว่าการศึกษาการสุกของพืชเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (Elangovan and Kalyanasundaram, 1999)

## 2.7 ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่พบทั่วไปในดิน และไม่พบว่ามีอาการเจริญบนพืชที่มีชีวิต จัดจำแนกอยู่ใน sub-division Deuteromycota, form-class Hyphomycetes, form-family Moniliaceae มี teleomorph (perfect stage) อยู่ใน genus *Hypocrea* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราใน Phylum Ascomycota, Order Hypocreales (Samuels, 1996) ลักษณะทาง anamorph (imperfect stage) ของเชื้อราชนิดนี้สร้าง conidiophore มีสีจาง หรือไม่มีสี แตกแขนงมาก พบ phialide เกิดเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม conidia (phialospore) เป็นแบบเซลล์เดี่ยว รูปไข่ ไม่มีสี เกิดเป็นกลุ่มเล็กๆ ที่ปลาย phialide โคลนีสามารถเจริญบนอาหารได้อย่างรวดเร็ว (รูปที่ 2.4) ลักษณะของเส้นใยที่เจริญออกมาเริ่มแรกจะมีสีขาว เมื่อเชื้อราที่มีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม เนื่องจากการสร้างสปอร์มากขึ้น ก้านสปอร์จะแตกกิ่ง (รูปที่ 2.5) ก้านเป็นข้อ สปอร์ส่วนใหญ่จะมีสีเขียวมี 1 เซลล์รูปไข่ ผิวเรียบ หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ลักษณะของ *Trichoderma* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

ขรุขระ เจริญออกมาจากส่วนปลายของเส้นใย มีขนาดเฉลี่ย  $3.2 \times 2.7$  ไมครอน สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว chamydospore จะเจริญระหว่างหรือส่วนปลายของเส้นใย มีลักษณะกลมใส เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.9 ไมครอน (Homer *et al.*, 1972) เชื้อรา *Trichoderma* ที่พบทั่วไปในดินสามารถที่จะเจริญแข่งขันกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15-21 องศาเซลเซียส และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในที่มีอุณหภูมิเป็นจัดประมาณ 10-12 องศาเซลเซียส (Johnson *et al.*, 1987)

เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีรายงานในการจัดจำแนกไว้ทั้งหมด 11 ชนิด (species) โดย Domsch และคณะ (1980) และ Rifai (1969) ได้จัดจำแนกเชื้อราสกุล *Trichoderma* spp. ออกเป็น 9 ชนิด โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี conidia และ conidiophore เชื้อรา

*Trichoderma* spp.เจริญได้ดีในดิน เศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิต รวมทั้งจุลินทรีย์และอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ เชื้อราบางสายพันธุ์สามารถเป็นปรสิต (parasite) โดยการพันรัดเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้วสร้างเอนไซม์ เช่น chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase และ cellulase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อโรค จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยเชื้อโรคพืช เป็นเหตุให้เชื้อโรคพืชสูญเสียความมีชีวิต ส่งผลให้ปริมาณของเชื้อโรคพืชลดลง ขณะที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างสาร Trichodermin ออกมาเพื่อยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคจนเกิดการย่อยสลาย (lysis) ได้

การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดินโดยชีววิธี เป็นทางเลือกใหม่นอกจากการใช้สารเคมี เพื่อลดปัญหามลพิษต่อสภาพแวดล้อม *Trichoderma* spp. หลาย species ที่แยกได้จากดินพบว่า เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราทั้งภายใต้สภาพเรือนทดลองและแปลงปลูก (Chet and Inbar, 1994) เช่น *T. viride* เป็น species ที่พบบ่อยในดิน มีการปล่อยสารที่มีความเฉพาะเจาะจงสามารถทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช Ingold and Hudson (1993) ได้ทดลองใช้ *T. viride* เพื่อควบคุมโรค Botrytis rot ขององุ่น โดยใช้ 4 ครั้งตั้งแต่เริ่มออกดอกจนถึง 3 สัปดาห์ก่อนการเก็บเกี่ยว พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสายพันธุ์ของ *T. harzianum* ที่สามารถควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด เช่น โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แดงฝ้าย และ Fusarium disease ของข้าวสาลี dry eye rot ของแอปเปิ้ล *T. harzianum* สายพันธุ์ 1295-22 เป็นสายพันธุ์ทางการค้าที่สามารถเข้าครอบครองรากได้ดี นิภาพร (2538) ได้ทดสอบการควบคุมเชื้อโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* (T20) ในสภาพแปลงปลูกทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตาย 61.1% หากใช้ร่วมกับสารเคมี mancozeb ความเข้มข้น 18,000 กรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตายถึง 88.9 %

การวิจัยเกี่ยวกับ *Trichoderma* spp. ในประเทศไทยมีมานาน โดยได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *T. harzianum* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดินที่สำคัญ คือ *S. rolfsii*, *R. solani*, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. และ *Fusarium oxysporum* ทั้งนี้มีการคำนึงถึงปัญหามลภาวะที่มีต่อสภาพแวดล้อมจากการใช้สารเคมีและปัญหาการต้านทานสารเคมีกำจัดเชื้อราของเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงมีการผลิต *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เป็นการค้าซึ่งมีชื่อว่า UNIGREEN UN-1 โดยความร่วมมือของบริษัท Uniseed (ประเทศไทย) และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (จระเข้ และวรรณวิไล, 2542) สำหรับกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีหลายวิธี เช่น การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขันในแง่ของอาหารและที่อยู่ และการเป็นปรสิตต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช เป็นต้น สำหรับความหลากหลายชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในประเทศไทยนั้น จินตนา (2543) ได้ศึกษาถึงชนิด (species) ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และ *Gliocladium* sp. ในดินทั่วไป พบว่ามี *Trichoderma* spp. จำนวน 4 ชนิด และ *Gliocladium* sp. จำนวน 1 ชนิด โดยได้ศึกษาถึงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคน้ำระดับดินของคะน้า บนอาหารเลี้ยงเชื้อเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ PDA พบว่าอัตราการเจริญและความสามารถในการเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ต่างกันเล็กน้อย เมื่อนำเมล็ดคั่วด้วยผงเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ก่อนปลูกในดิน อบอุ่นเชื้อที่มี *P. aphanidermatum* เจริญอยู่ ปรากฏว่าระดับการเกิดโรคของต้นกล้า 63242 โผล่พื้นดิน หรือโรคน่าระดับดินหลังงอกต่ำกว่าการทดลองควบคุมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

คุณสมบัติของเชื้อรา *Trichoderma* สามารถนำมาใช้ควบคุม ทำลาย หรือยับยั้งเชื้อราในดิน สาเหตุโรคพืชที่ก่อให้เกิดอาการโรครากเน่าโคนเน่ากับพืช ทั้งในพืชผัก พืชไร่ และไม้ผล เช่น เชื้อราเมล็ดผักกาด (*Sclerotium rolfsii*), เชื้อรา *Pythium* sp., เชื้อรา *Rhizoctonia* sp. เชื้อรา *Phytophthora* sp., เชื้อรา *Fusarium* sp. ในธรรมชาติจะมีเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการนำมาใช้ควบคุมโรคพืช เรียกว่า เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) โดยเชื้อนี้จะมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคได้ 4 ลักษณะ คือ

**2.7.1 การแข่งขัน (competition)** เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืช ในด้านต่างๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญ หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ พืชจะเจริญเติบโตแข็งแรง มีผลผลิตสูงขึ้น การแข่งขันที่พบมากคือ การนำเอาธาตุอาหารหรือสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้น มาใช้ประโยชน์ในการเติบโต ทำให้เชื้อโรคขาดสารอาหาร ไม่สามารถเจริญเติบโตเข้าทำลายพืช เช่น เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* จะผลิตสาร siderophore ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* สาเหตุโรค Take-all ของ ข้าว สาลี ทำให้เชื้อราไม่สามารถทำลายรากของข้าวสาลี ช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ ให้ผลผลิตดีขึ้น

**2.7.2 การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis)** เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น จะเน้นคุณสมบัติการสร้างปฏิชีวนะของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่ โดยเชื้อปฏิปักษ์นี้มีความสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) พบว่ากลไกชนิดนี้เป็นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีที่สำเร็จเป็นครั้งแรกโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Agrobacterium radiobacter* สายพันธุ์ K84 จะผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า agrocin 84 ไปยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* biotype 1 และ 2 สาเหตุโรค crown gall ของพืชได้

**2.7.3 การเป็นปรสิต (parasitism)** เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต เข้าไปเจริญอาศัย ทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบได้ไม่มากนัก การใช้ควบคุมโรคพืช ยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนปฏิกิริยาแบบการสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น *Erwinia uredinolytica* เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิมหรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม

**2.7.4 การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance)** เป็นกลไกที่น่าสนใจ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรีย โดยเฉพาะพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคแล้วสามารถจะชักนำ หรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพืชพวกแตง จะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะเจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิมได้ หรือในกรณีของเชื้อแบคทีเรีย *P. solanacearum* สายพันธุ์ไม่รุนแรงที่มีชีวิตอยู่สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณรากทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้

## 2.8 วิธีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปใช้ในการควบคุมโรคพืช นิยมนำไปใช้กับโรคพืชที่เกิดบริเวณผิวน้ำ (rhizoplane) หรือบริเวณผิวพืชที่อยู่เหนือดิน (phylloplane) ซึ่งการใช้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคจะมีกรรมวิธีการใช้แตกต่างกัน

2.8.1 บริเวณผิวน้ำ จะมีกรรมวิธีการใช้เชื้อปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคได้หลายแบบแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความสะดวกในการปฏิบัติของผู้ใช้และแต่ละวิธีอาจให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ไม่เท่ากัน ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น คุณสมบัติของพืช และลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่มีหลายรูปแบบ

2.8.1.1 การคลุกเมล็ด นิยมใช้กับพืชที่ใช้เมล็ดในการเพาะปลูก โดยเมล็ดจะต้องมีขนาดไม่ใหญ่มากนัก ช่วยให้คลุกง่ายและไม่สิ้นเปลืองผงเชื้อ มักนิยมคลุกเมล็ดก่อนปลูก

2.8.1.2 การราดดิน เป็นวิธีที่นิยมปฏิบัติกันมาก แต่จะไม่ค่อยสะดวก หากจะนำไปใช้ในสภาพไร่ของเกษตรกรที่น้ำไม่เพียงพอ และถ้าปลูกพืชเป็นปริมาณมากก็จะยังไม่สะดวกในการปฏิบัติ

2.8.1.3 การคลุกดิน เป็นวิธีการนำเอาผงเชื้อหรือสารละลายเชื้อปฏิปักษ์ ใส่ไปในดินและคลุกเคล้าผสมกันให้ทั่วก่อนปลูกพืช ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างสะดวก

2.8.1.4 การจุ่มราก เป็นวิธีที่นิยมใช้กันกับพืชที่ ต้องเพาะเมล็ดแล้วย้ายกล้าไปปลูก เช่น มะเขือเทศ พริก หรือพืชที่มีเมล็ดพันธุ์ราคาแพง โดยจะต้องทำให้ดินบริเวณรากหลุดออกให้หมดก่อนนำไปจุ่มในสารละลายเชื้อที่เข้มข้น  $10^8$  cfu/ml แล้วจึงนำไปปลูกในแปลงต่อไป วิธีนี้จะทำให้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคได้ดี เพราะรากจะสัมผัสกับเชื้อได้หมดทุกส่วน ไม่ก่อให้เกิดช่องว่างให้เชื้อโรคเข้าทำลาย

2.8.2 บริเวณผิวพืชอยู่เหนือดิน มีวิธีใช้ที่นิยม 2 วิธีคือ

2.8.2.1 การทา เป็นวิธีที่นิยมใช้กับพืชยืนต้นที่ถูกทำลาย มีผลปรากฏให้เห็นชัดเจนบนส่วนของต้นหรือกิ่ง บริเวณที่สามารถนำเอาเชื้อปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้มีความเข้มข้นและเหนียวไปทาเพื่อให้ยึดติดกับผิวพืชได้คงทน

**2.8.2.2 การพ่น** เป็นวิธีที่นิยมใช้กับพืชที่ปลูกเป็นปริมาณมาก หรือมีลำต้นสูง ซึ่งใช้หลักการปฏิบัติเช่นเดียวกับการพ่นสารเคมีกำจัดโรคพืช เชื้อปฏิปักษ์ที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบันมีทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งสายพันธุ์ที่ใช้กันและผลิตในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่

*Bacillus thuringiensis* (BT) เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก สร้างสปอร์ และผลึกโปรตีนหลายรูปแบบ ผลึกโปรตีนที่สร้างขึ้นนี้มีฤทธิ์ในการทำลายแมลงศัตรูชนิดต่าง ๆ เมื่อตัวอ่อนของแมลงกินผลึกโปรตีนนี้เข้าไป สภาพความเป็นด่างในกระเพาะอาหารส่วนกลางจะย่อยสลายผลึกโปรตีนได้ protoxin และน้ำย่อย protease จะช่วยกระตุ้นให้ protoxin เข้าทำลายเซลล์ผนังกระเพาะอาหารของแมลงให้บวมและแตกออก เพื่อ BT ในกระเพาะอาหารจะไหลเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวของแมลง มีผลกระทบต่อระบบไหลเวียนโลหิต ทำให้แมลงมีอาการโลหิตเป็นพิษ ชักกระตุก เป็นอัมพาต และตายในที่สุด ปัจจุบันเชื้อ *Bacillus* ได้เข้ามามีบทบาทในการควบคุมแมลงศัตรูสำคัญทั้งทางด้านการเกษตรและการแพทย์ เช่น การนำมาพัฒนาเป็นสารกำจัดหนอนแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจ เช่น หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย และควบคุมปริมาณของลูกน้ำยุงชนิดต่าง ๆ

*Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่เจริญได้ดีในดิน เศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิต รวมทั้งจุลินทรีย์และอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ เชื้อบางสายพันธุ์สามารถเป็นปรสิต โดยการพันรัดเส้นใยเชื้อโรคแล้วสร้างเอนไซม์ เช่น chitinase, cellulase, 3-glucanase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยเชื้อโรคพืช ทำให้เชื้อโรคพืชสูญเสียความมีชีวิต มีผลทำให้ปริมาณของเชื้อโรคพืชลดลง นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่จะเจริญโดยสร้างเส้นใยและสปอร์ได้ค่อนข้างรวดเร็ว จึงมีความสามารถสูงในการแข่งขันกับเชื้อโรคพืชด้านการใช้อาหารและแร่ธาตุต่างๆจากแหล่งอาหารในธรรมชาติ ตลอดจนการใช้สารที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยได้เป็นอย่างดีขณะที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมาเพื่อยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อโรคจนเกิดการ lysis ได้ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงได้มีการนำเชื้อรา *Trichoderma* มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Sclerotium* spp, *Pythium* spp. และ *Fusarium* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมล็ดเน่า รากเน่า โดยปัจจุบันได้มีการผลิตเชื้อ *Trichoderma harzianum* เป็นผลิตภัณฑ์ใช้อย่างแพร่หลายทั้งในพืชผัก ไม้ประดับ พืชไร่ พืชสวนต่างๆ

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1.1 จานเพาะเชื้อ ( petri dish )
- 3.1.2 เครื่องแก้วต่างๆ
- 3.1.3 เครื่องเขย่า
- 3.1.4 ตู้อบ 180 องศาเซลเซียส
- 3.1.5 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
- 3.1.6 กล้องจุลทรรศน์ ( Microscopy) รุ่น Nikon ECLIPSE 80i
- 3.1.7 ตู้เขี่ยเชื้อ ( laminar air flow )
- 3.1.8 cork borer ขนาด 8 และ 3 มิลลิเมตร

3.2 สายพันธุ์ของเชื้อรา

*Aspergillus flavus* IMI 242684 และ *Aspergillus parasiticus* IMI 102566 จาก International Mycological Institute ประเทศอังกฤษ

*Trichoderma* sp. TISTR 3167 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

*Trichoderma viride* S84-1 แยกได้จากดินปลูก เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ (รัชชชัย, 2543)

3.3 การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินธรรมชาติ

เก็บตัวอย่างดินจากดินธรรมชาติมาแยกเชื้อรา โดยดัดแปลงวิธีมาจากวิธีของ Dhingra and Sinclair (1987) โดยชั่งดินที่เก็บจากธรรมชาติ 25 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่านาน 30 นาที ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที แล้วทำการเจือจาง  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  เท่า นำสารแขวนลอยดินที่เจือจางได้จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ไปหยดลงบนอาหาร Martin's medium (peptone dextrose rose-bengal agar) (Johnson and Curl,1972) แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร หลังจากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเป็นโคโลนี คัดเลือกโคโลนีของเชื้อราที่เจริญรวดเร็ว ซึ่งมีลักษณะของโคโลนีเป็นสีขาว เขียวอมเหลืองถึงเขียวเข้ม และมีบริเวณที่สร้างสปอร์ (conidial area) เป็นวงแหวน (ring-like zone) นำมาตรวจการสร้างสปอร์ conidia หรือ phialospore บน phialide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นจึงย้ายเชื้อราที่มีลักษณะดังกล่าวลงบนอาหาร PDA ในหลอดอาหารเอียงไว้ศึกษาต่อไป

### 3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นจุลินทรีย์

#### ปฏิปักษ์ในระดับห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพของการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ต่อไป โดยมีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

##### 3.4.1 การเจริญแข่งขัน (competition)

ใช้ cork borer ขนาด 8 มิลลิเมตร ตัดชิ้นอาหารวุ้นที่มีเส้นใยบริเวณโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* อายุ 3-5 วันที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และนำไปวางบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อโดยวาง mycelial disc ของ *A. flavus* หรือ *A. parasiticus* ให้ห่างจากขอบจาน 1.5 เซนติเมตร แล้ววาง mycelial disc ขนาด 8 มิลลิเมตร ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 2-4 วัน ไว้ตรงข้ามในจานเพาะเชื้อ ให้ระยะห่างของเชื้อราทั้งสองเท่ากับ 6 เซนติเมตร บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน สังเกตการเจริญและปฏิกิริยาของเชื้อราทั้งสองชนิดเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ปล่อยให้เชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* และ *Trichoderma* spp. เจริญเพียงลำพัง

##### 3.4.2 การเป็นไมโคพาราสิต (mycoparasitism)

นำ mycelial disc ขนาด 3 มิลลิเมตร ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA วางลงบนขอบด้านใดด้านหนึ่งของแผ่นกระดาษแก้วขนาด 2 x 2 เซนติเมตร (ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที) ซึ่งปูทับอยู่บนอาหาร WA (ภาคผนวก ก.) ในจานเพาะ บ่มเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ก่อนวาง mycelial disc ขนาด 3 มิลลิเมตร ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกได้ลงบนขอบของแผ่นกระดาษแก้วด้านตรงข้าม บ่มเชื้อทั้งสองต่ออีก 2-3 วัน จากนั้นนำ mycelial disc ของเชื้อทั้งสองออก ลอกกระดาษแก้วซึ่งมีเส้นใยของเชื้อราทั้งสองชนิดนำไปทำสไลด์โดยย้อมเส้นใยด้วยสี lactophenol-acid fuchsin และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป โดยวิธีนี้ดัดแปลงเทคนิคจากกรรมวิธีของ Singh และ Faull (1988)

##### 3.4.3 การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

#### (antibiosis)

นำกระดาษแก้วที่ตัดเป็นชิ้นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นนำไปปูทับผิวหน้า PDA ในจานเพาะเชื้อ โดยดัดแปลงวิธีมาจากเทคนิคของ Simon *et al.* (1988) ก่อนวาง mycelial disc ขนาด 8 มิลลิเมตร ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่จะทดสอบลงตรงกึ่งกลางจาน บ่มเชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง จากนั้นลอกกระดาษแก้วพร้อมโคโลนีเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เจริญออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วนำ mycelial disc ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ขนาด 8 มิลลิเมตร มาวางลงบนอาหารวุ้นในตำแหน่งกึ่งกลางจานเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับที่เคยวาง mycelial disc ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. บ่มเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่อุณหภูมิห้อง 4 วัน จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ) เปรียบเทียบกับจานเพาะเชื้อควบคุม (control) ที่ใช้เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* วางบนการะคายแก้วแทนเชื้อรา *Trichoderma* spp. วัดขนาดโคโลนี *A. flavus* และ *A. parasiticus* นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยตัดแปลงจากสูตรของ Royse และ Ries (1978) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(D_1 - D_2) / D_1] \times 100$$

เมื่อ  $D_1$  = ขนาดของโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่อายุ 4 วัน ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เคยมีเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* เจริญอยู่ก่อน 36 ชั่วโมง (จานเพาะเชื้อควบคุม) ลบด้วยขนาดของ mycelial disc ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ใช้ในการทดลอง

$D_2$  = ขนาดของโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่อายุ 4 วัน ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เคยมีเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญอยู่ก่อน 36 ชั่วโมง ลบด้วยขนาดของ mycelial disc ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ใช้ในการทดลอง

### 3.5 การศึกษาลักษณะวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากดินธรรมชาติ

เตรียม mycelial disc ขนาด 8 มิลลิเมตร ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA และ 2% malt extract agar (ภาคผนวก ก.) (Rifai, 1969) บ่มเชื้อในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 2 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อเริ่มมีการสร้าง phialide และเป็นระยะที่สามารถตรวจการจัดเรียงตัวของ conidiophore และ phialide ได้ง่าย โดยตรวจสอบจากเชื้อที่เจริญบนอาหาร Malt Extract Agar ซึ่งมีการสร้าง conidiophore และ phialide และเส้นใยที่หนาแน่นกว่าบนอาหาร 2% Malt Extract Agar นำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการย้อมสี lactophenol-acid fuchsin วัดขนาดด้วย ocular micrometer และบันทึกลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัว จากนั้นบ่มเชื้อต่อในที่มืดแสงสว่างส่องถึงหรือภายใต้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์เพื่อให้เชื้อสร้าง phialospore จนเชื้ออายุ 2-4 สัปดาห์ ซึ่งเป็นระยะที่ chlamydospore และ phialospore ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีความแก่ เหมาะสมที่ใช้ศึกษาขนาดและรูปร่าง จึงนำเชื้อที่เจริญบนอาหาร 2% Malt Extract Agar ซึ่งมีการกระจายตัวของ chlamydospore และ phialospore ไม่หนาแน่นเกินไปมาตรวจลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธีการย้อมสี lactophenol-acid fuchsin และ lactophenol (Dhingra and Sinclair, 1987) วัดขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บันทึกลักษณะรูปร่าง สี และตำแหน่งบนเส้นใย ตรวจการสร้างเม็ดสีจากเชื้อที่เจริญบนอาหาร PDA จากนั้นศึกษาการเจริญบนอาหาร Malt Extract Agar ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยวัดขนาดโคโลนี หลังเลี้ยงเชื้อนาน 4 วัน นำผลที่ได้มาประกอบการพิจารณาและบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อรา *Trichoderma* spp. เปรียบเทียบกับเอกสารของ Rifai (1969) และของ Bissett (1984, 1991a, 1991b, 1991c และ 1992)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1. การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินธรรมชาติ

จากการแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินธรรมชาติ 6 แหล่งรวมจำนวน 20 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้ 13 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1) โดยเชื้อราที่แยกได้มีลักษณะการเจริญบนอาหาร Martin's medium ได้รวดเร็วกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่โคโลนีสีเขียวเข้ม บางไอโซเลท โคโลนีสีเขียวปนเหลืองและมีวงแหวนของบริเวณสร้างสปอร์มากกว่า 1 วงซ้อนๆ กัน

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่างๆที่แยกได้จากดินธรรมชาติ

ลำดับ	แยกได้จาก	แหล่งที่มา	รหัสของไอโซเลท
1.	รากต้นมันสำปะหลัง	ไร่มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ.ชลบุรี	CHA-4
2.	ดินปลูก	ไร่มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ.ชลบุรี	CHA-5
3.	รากต้นมันสำปะหลัง	ไร่มันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 90 อ.บ้านบัว จ.ชลบุรี	CHA-6
4.	ดินปลูก	แปลงปลูกข้าวโพดทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง	KMC
5.	ดินปลูก	แปลงปลูกสัปปะรด อ.เขาสก จ.สุราษฎร์ธานี	KSR
6.	ดินปลูก	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	SCP I
7.	ดินปลูก	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	SCP II
8.	ดินปลูก	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	SCP III
9.	ดินปลูก	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	SCP IV
10.	ดินปลูก	แปลงดินเกษตร สวนเงาะ อ.เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี	SRS 1
11.	ดินปลูก	แปลงดินเกษตร สวนเงาะ อ.เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี	SRS 2
12.	ดินปลูก	แปลงสัปปะรด อ.เขาสก จ. สุราษฎร์ธานี	SRS 4
13.	ดินปลูก	ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	SCP 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเป็นจุลินทรีย์ ปฏิปักษ์ในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 13 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินคือ CHA-4, CHA-6, KMC, KSR, SCP I, SCP II, SCP III, SCP IV, SRS 1, SRS 2, SRS 4, CHA-5, SCP 2 และอีก 2 ไอโซเลท คือ *Trichoderma viride* S84-1 และ *Trichoderma* sp.TISTR 3167 มาทดสอบคุณสมบัติต่างๆคือ การเจริญแข่งขัน การเป็นไมโคพาราสิต และการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomize Design , CRD) โดยในแต่ละสิ่งทดลอง (treatment) จะมีจำนวนซ้ำไม่เท่ากัน(Unequal Replication) ได้ผลการทดลองดังนี้

### 4.2.1. การเจริญแข่งขัน

จากการทดสอบการเจริญแข่งขันระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 13 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 และอีกสองไอโซเลท ( S84-1, TISTR 3167) กับเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ IMI 242684 และ *A. parasiticus* สายพันธุ์ IMI 102566 บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ (ตารางที่ 4.2) โดยไอโซเลท CHA 5, KMC, KSR, S84-1, SCP 2, SCP I, SCP IV, SRS 1, SRS 2, SRS 4 และ TISTR 3167 จะสร้างเส้นใยปกคลุมโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* (รูปที่ 4.1 ก., ข.) ในขณะที่ไอโซเลท SCP II และ SCP III จะสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* และทำให้อาหาร PDA เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (รูปที่ 4.1ค.,ง) ส่วนไอโซเลท CHA 4 และ CHA 6 จะสร้างวงใสยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* (รูปที่ 4.1 จ.,ฉ)

เชื้อรา *A. flavus* ที่มีการเพาะเลี้ยงพร้อมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในชุดทดลอง พบว่ามีการเจริญน้อยกว่าเชื้อรา *A. flavus* ในชุดควบคุม ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งแสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Anova) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P-value < 0.01) ดังตารางที่ 4.2 แสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลทมีอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) เพื่อหาคู่ที่แตกต่างกันด้วยวิธีการของ Duncan พบว่าสามารถแบ่งสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามระดับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ออกเป็น 10 กลุ่ม ดังตารางที่ 4.3 โดยไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีค่าตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SCP I มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* โดยเฉลี่ย ที่เลี้ยงพร้อมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

แหล่งของความแปรผัน	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	p-value
สายพันธุ์ของเชื้อราต่างๆ (Treatment)	15	168.597	11.240	905.524	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	69	0.856	0.012		
รวม	84	169.453			

ตารางที่ 4.3 ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) ของเชื้อรา *A. flavus* อายุ 10 วัน ในการทดสอบการเจริญแข่งขันกับเชื้อรา *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> spp.	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>A. flavus</i>	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
SCPI	7.885	2.230 <sup>a</sup>	90.605
SRS 2	7.812	2.376 <sup>b</sup>	89.147
KMC	7.750	2.496 <sup>bc</sup>	87.879
KSR	7.744	2.512 <sup>bc</sup>	87.706
SRS 1	7.545	2.620 <sup>cd</sup>	86.503
SCP II	6.650	2.682 <sup>de</sup>	85.791
S84-1	7.637	2.725 <sup>de</sup>	85.287
SCP IV	7.637	2.726 <sup>de</sup>	85.275
SCP III	7.626	2.748 <sup>de</sup>	85.014
SRS 4	7.585	2.830 <sup>e</sup>	84.022
TISTR 3167	7.419	3.162 <sup>f</sup>	79.708
CHA 4	7.325	3.350 <sup>b</sup>	77.053
CHA 6	7.104	3.792 <sup>h</sup>	70.208
CHA 5	6.635	4.610 <sup>i</sup>	55.305
SCP 2	4.700	4.700 <sup>i</sup>	53.488
งานควบคุม	0.000	6.838 <sup>j</sup>	0.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *A. parasiticus* ที่มีการเลี้ยงพร้อมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลทในชุดทดลอง มีการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* น้อยกว่าเชื้อรา *A. parasiticus* ในชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* และเมื่อนำข้อมูล มาวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P\text{-value} < 0.01$ ) ดัง ตารางที่ 4.4 แสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลทมีอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนรายคู่ เพื่อหาคู่ที่แตกต่างกัน พบว่าสามารถแบ่งสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามระดับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ออกเป็น 11 กลุ่ม ดังตารางที่ 4.5 โดยไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีค่าตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท KSR มีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดีที่สุด

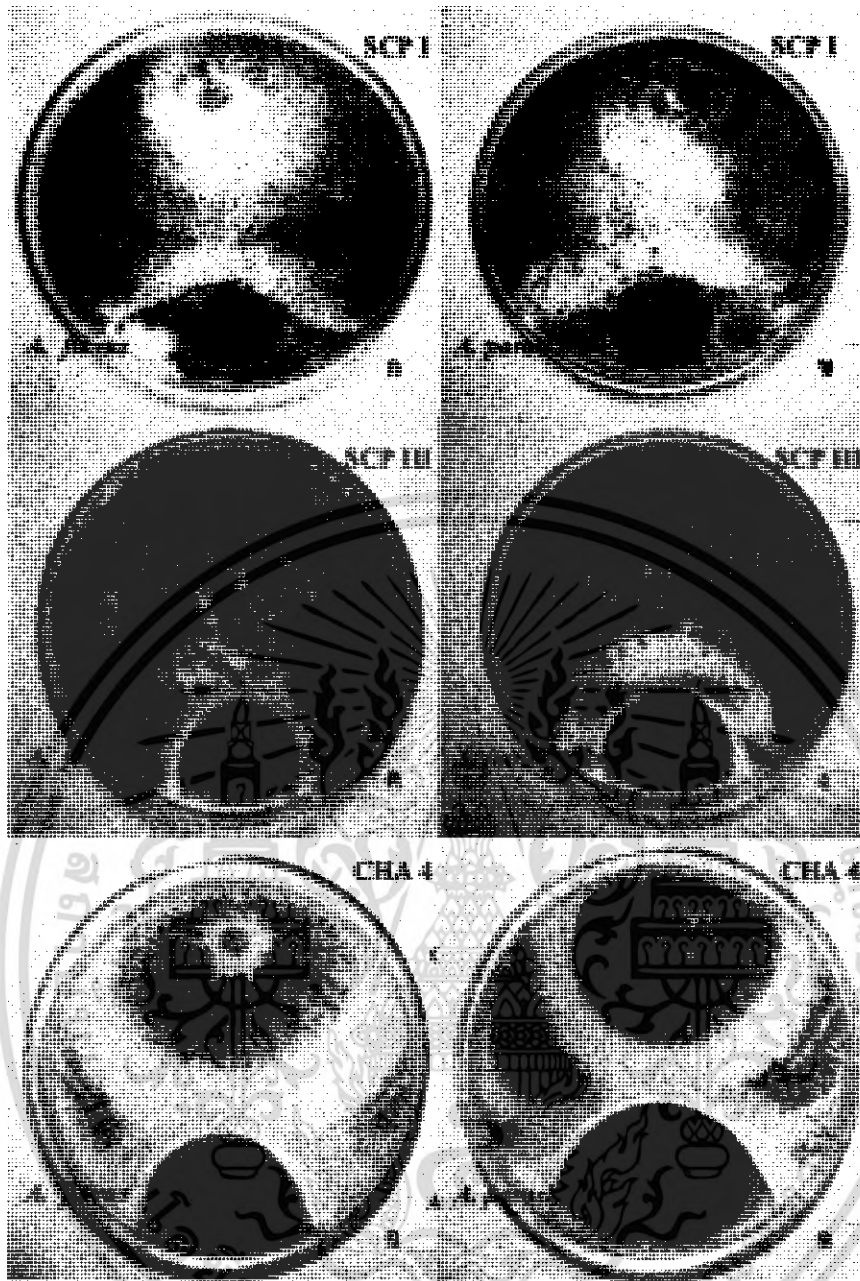
ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเฉลี่ย ที่เลี้ยงพร้อมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่างๆ

แหล่งของความแปรผัน	df	SS	MS	$F_{cal}$	p-value
สายพันธุ์ของเชื้อราต่างๆ (Treatment)	15	178.353	11.890	1285.209	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	69	0.638	0.009		
รวม	84	178.992			

ตารางที่ 4.5 ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 10 วัน ในการทดสอบการเจริญแข่งขันกับเชื้อรา *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> spp.	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>A. parasiticus</i>	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
KSR	7.870	2.266 <sup>a</sup>	91.387
SRS 2	7.762	2.556 <sup>b</sup>	88.707
SCP IV	7.600	2.800 <sup>c</sup>	86.203
TRIS 3167	7.609	2.782 <sup>c</sup>	86.395
SCP III	7.516	2.968 <sup>d</sup>	84.376
SRS 1	7.685	3.010 <sup>d</sup>	83.864
S84-1	7.491	3.018 <sup>d</sup>	83.772
KMC	7.470	3.060 <sup>de</sup>	83.283
SRS 4	7.425	3.150 <sup>ef</sup>	82.212
SCP II	7.405	3.190 <sup>f</sup>	81.726
SCPI	7.392	3.216 <sup>f</sup>	81.407
CHA 6	7.138	3.724 <sup>b</sup>	74.650
CHA 4	6.860	4.260 <sup>h</sup>	66.450
SCP 2	6.670	4.663 <sup>i</sup>	59.558
CHA 5	6.570	4.860 <sup>j</sup>	55.963
งานควบคุม	0.000	7.263 <sup>k</sup>	0.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 การเจริญแข่งขันของเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*  
 ก.,ข. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ถูกเชื้อรา *Trichoderma* spp.  
 (ไอโซเลท SCP I) เจริญปกคลุมและยับยั้งการเจริญ  
 ค.,ง. เชื้อรา *Trichoderma* spp. (ไอโซเลท SCP III) สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญ  
 ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* มีผลทำให้อาหาร PDA เกิดเป็นสีเหลือง  
 จ.,ฉ. เชื้อรา *Trichoderma* spp. (ไอโซเลท CHA 4) สร้างลักษณะที่เป็นวงใสยับยั้งการ  
 เจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.2 การเป็นไมโคพาราสิต (mycoparasitism)

จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 5 ไอโซเลทจาก 8 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ (CHA 4, KMC, KSR, SCP I, SCP II, SCP III, SCP IV, SRS 4) คือ CHA 4, KSR, SCP I, SCP II และ SCP III มีคุณสมบัติเป็นไมโคพาราสิตกับเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* อย่างเด่นชัด (ตารางที่ 4.6) โดยเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถแทงทะลุเข้าไปเจริญภายในเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* (รูปที่ 4.2) ส่วนไอโซเลทอื่นๆ ไม่พบคุณสมบัติการเป็นไมโคพาราสิต

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการเป็นไมโคพาราสิตของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

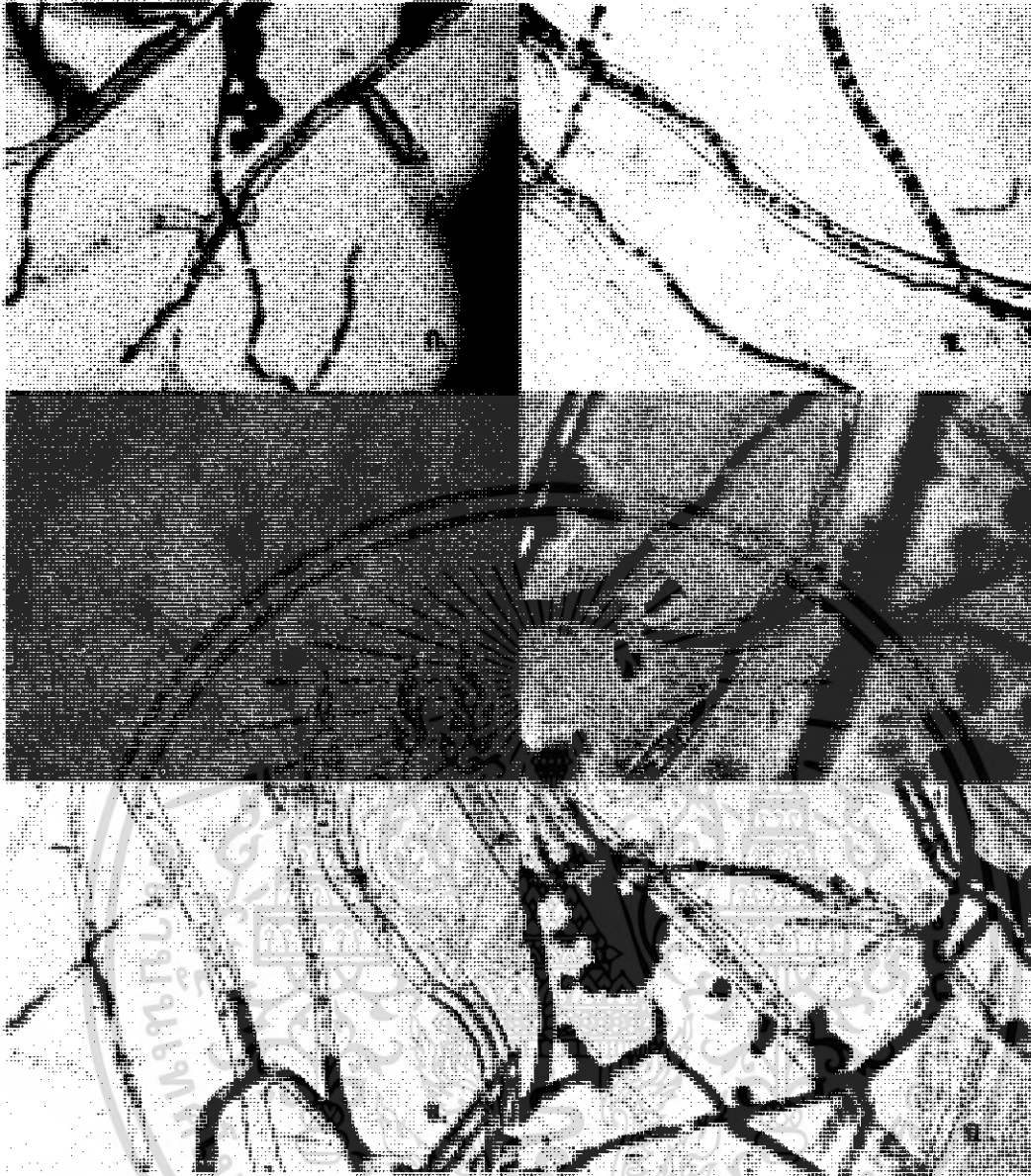
<i>Trichoderma</i> spp.	การเป็นไมโคพาราสิต
CHA 4	+
KMC	-
KSR	+
SCP I	+
SCP II	-
SCP III	+
SCP IV	-
SRS 4	-

หมายเหตุ + คือ เป็นไมโคพาราสิต, - คือ ไม่เป็นไมโคพาราสิต

#### 4.2.3. การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

ในการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยทำการทดลองในแผนการทดลองแบบ CRD แบบ Equal Replication โดยทำ treatment ละ 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SRS 4 จากจำนวน 8 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* สูงที่สุด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 88.762 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท KMC สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง 87.337 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลทอื่นๆ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ต่ำกว่า (ตารางที่ 4.8)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารPDA ที่มีสารที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลท พบว่าในชุดทดลองมีการเจริญน้อยกว่าเชื้อรา *A. flavus* ในชุดควบคุม ซึ่งแสดงว่า



รูปที่ 4.2 แสดงการเป็นไมโคพาราสิต ของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus*

รูป ก. ไมโคพาราสิตระหว่าง CHA 4 กับเชื้อ *A. flavus*

รูป ข. ไมโคพาราสิตระหว่าง KSR กับเชื้อ *A. parasiticus*

รูป ค. ไมโคพาราสิตระหว่าง SCP I กับเชื้อ *A. flavus*

รูป ง. ไมโคพาราสิตระหว่าง SCP II กับเชื้อ *A. flavus*

รูป จ.และ ฉ. ไมโคพาราสิตระหว่าง CHA-4 กับเชื้อ *A. parasiticus*  
(กำลังขยาย 1000 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Anova) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P$ -value < 0.01) ดังตารางที่ 4.7 แสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลทมี อย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) เพื่อหาคู่ที่แตกต่างกันด้วยวิธีการของ Duncan พบว่าสามารถแบ่งสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามระดับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังตารางที่ 4.8 โดยไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SRS 4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* โดยเฉลี่ย ที่ทำการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

แหล่งของความแปรผัน	df	SS	MS	F <sub>cal</sub>	p-value
สายพันธุ์ของเชื้อราต่างๆ (Treatment)	8	10.037	1.255	28.510	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	18	0.792	0.044		
รวม	26	10.829			

ตารางที่ 4.8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *A. flavus* อายุ 4 วัน ในการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	Diameter of <i>A. flavus</i> colony(cm.)	percent inhibition of <i>A. flavus</i>
SRS 4	1.323 <sup>a</sup>	88.762
KMC	1.356 <sup>a</sup>	87.833
SCP II	1.395 <sup>a</sup>	86.775
SCP III	1.841 <sup>b</sup>	73.190
SCP IV	1.878 <sup>b</sup>	70.752
CHA 4	2.247 <sup>c</sup>	55.334
KSR	2.394 <sup>c</sup>	48.471
SCP I	2.562 <sup>c</sup>	39.981
จานควบคุม <i>A. flavus</i>	3.242 <sup>d</sup>	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *A. parasiticus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลท พบว่าในชุดทดลองมีการเจริญน้อยกว่าเชื้อรา *A. parasiticus* ในชุดควบคุม (รูปที่ 4.3) ซึ่งแสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Anova) พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P\text{-value} < 0.01$ ) ดังตารางที่ 4.9 แสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลทมีอย่างน้อย 1 คู่ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนรายคู่ เพื่อหาคู่ที่แตกต่างกัน พบว่าสามารถแบ่งสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ตามระดับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ออกเป็น 5 กลุ่ม ดังตารางที่ 4.10 โดยไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีค่าตัวอักษรอยู่ในกลุ่มเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท KMC มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดีที่สุด

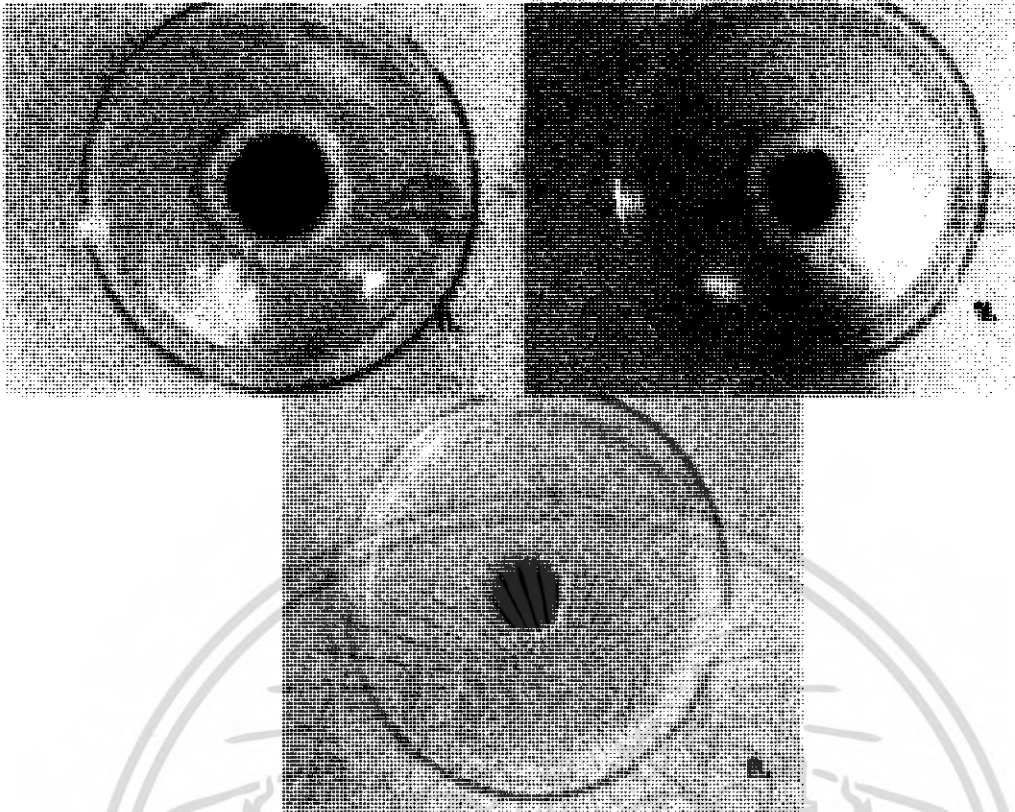
ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อทดสอบความแตกต่างของการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเฉลี่ย ที่ทำการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

แหล่งของความแปรผัน	df	SS	MS	$F_{\text{cal}}$	p-value
สายพันธุ์ของเชื้อราต่างๆ (Treatment)	8	15.020	1.877	40.864	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	18	0.827	0.046		
รวม	26	15.847			

ตารางที่ 4.10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.) เชื้อรา *A. parasiticus* อายุ 4 วันในการทดสอบการสร้างสารปฏิชีวนะของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ของ <i>A. parasiticus</i>	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง <i>A. parasiticus</i>
KMC	1.576 <sup>a</sup>	87.337
SCP III	1.741 <sup>a</sup>	83.552
SRS 4	1.875 <sup>ab</sup>	80.213
SCP II	1.931 <sup>ab</sup>	78.750
SCP I	2.165 <sup>bc</sup>	72.301
SCP IV	2.38 <sup>c</sup>	65.431
KSR	3.066 <sup>d</sup>	39.712
CHA 4	3.215 <sup>d</sup>	33.271
งานควบคุม	3.895 <sup>e</sup>	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 การทดสอบการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

รูป ก. เชื้อ *A. flavus* ที่เจริญในงานควบคุม (Control)

รูป ข. เชื้อ *A. flavus* ที่เจริญบนสารปฏิชีวนะของ CHA4

รูป ค. เชื้อ *A. flavus* ที่เจริญบนสารปฏิชีวนะของ KMC

#### 4.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ดินธรรมชาติ

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 8 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 13 ไอโซเลทที่แยกได้จากดินธรรมชาติมาศึกษาสัณฐานวิทยา โดยศึกษาจากลักษณะของ โคลโคนี, การเจริญ, conidiophores, phialides, chlamydospore และ phialospores

4.3.1 ไอโซเลท CHA-4 (รูปที่ 4.4) ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ มีการเจริญอย่างรวดเร็ว ในช่วงแรกของการเจริญเส้นใยจะมีสีขาวปกคลุมแผ่ทั่วผิวหน้าอาหาร โคลโคนีมีสีเขียวเข้ม โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรหลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน สร้าง conidia บน phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีสีเขียวเข้มลักษณะเป็นวงกลม มีขนาดประมาณ 45.85 ไมโครเมตร chlamydospore มีผนังหนาลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 77.37 ไมโครเมตร

**4.3.2 ไอโซเลท KMC (รูปที่ 4.5)** ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ มีการเจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็วโดยในการเจริญช่วงแรกเส้นใยจะมีสีขาว หลังจากนั้นจะมีการสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว เส้นใยจะแผ่ปกคลุมอย่างหนาแน่นทั่วผิวหน้าอาหาร โคโลนีมีสีเขียวเข้ม โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 9 เซนติเมตรหลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน มีการสร้าง conidia บน phialide เรียก conidia นั้นว่า phialospore phialide มีการแตกตัวเป็นซ่อ มีจำนวน 1-3 อัน แต่ phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 30.72 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 92.30 ไมโครเมตร

**4.3.3 ไอโซเลท KSR (รูปที่ 4.6)** ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ มีการเจริญและแผ่ปกคลุมของเส้นใยอย่างรวดเร็ว โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็น 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้านน้อย มีการสร้าง conidia บน phialide โดย conidia จะมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็น chlamyospore อย่างรวดเร็ว phialospore มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 27.82 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะกลมมีขนาดประมาณ 95.99 ไมโครเมตร

**4.3.4 ไอโซเลท SCP I (รูปที่ 4.7)** ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ โคโลนีมีสีขาวและเมื่อสร้าง phialospore จะมีเขียวปนขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวในที่สุด มีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีลักษณะพอมยาว มีการแตกกิ่งก้านด้านข้างเล็กน้อย มีจำนวน phialide 1-3 ซ่อ จะมี phialospore 2-3 สปอร์อยู่ที่ปลายของ phialide phialospore มีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 42.65 ไมโครเมตร chlamyospore มีขนาดใหญ่และผนังหนา ลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 137.38 ไมโครเมตร

**4.3.5 ไอโซเลท SCP II (รูปที่ 4.8)** ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ โคโลนีมีสีขาวและเมื่อสร้าง phialospore จะมีเขียวปนขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวในที่สุด มีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar พบการสร้าง เม็ดสี (สีเหลือง) บนอาหาร PDA conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน สร้าง conidia บน phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีสีเขียวเข้มลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 25.26 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 92.14 ไมโครเมตร

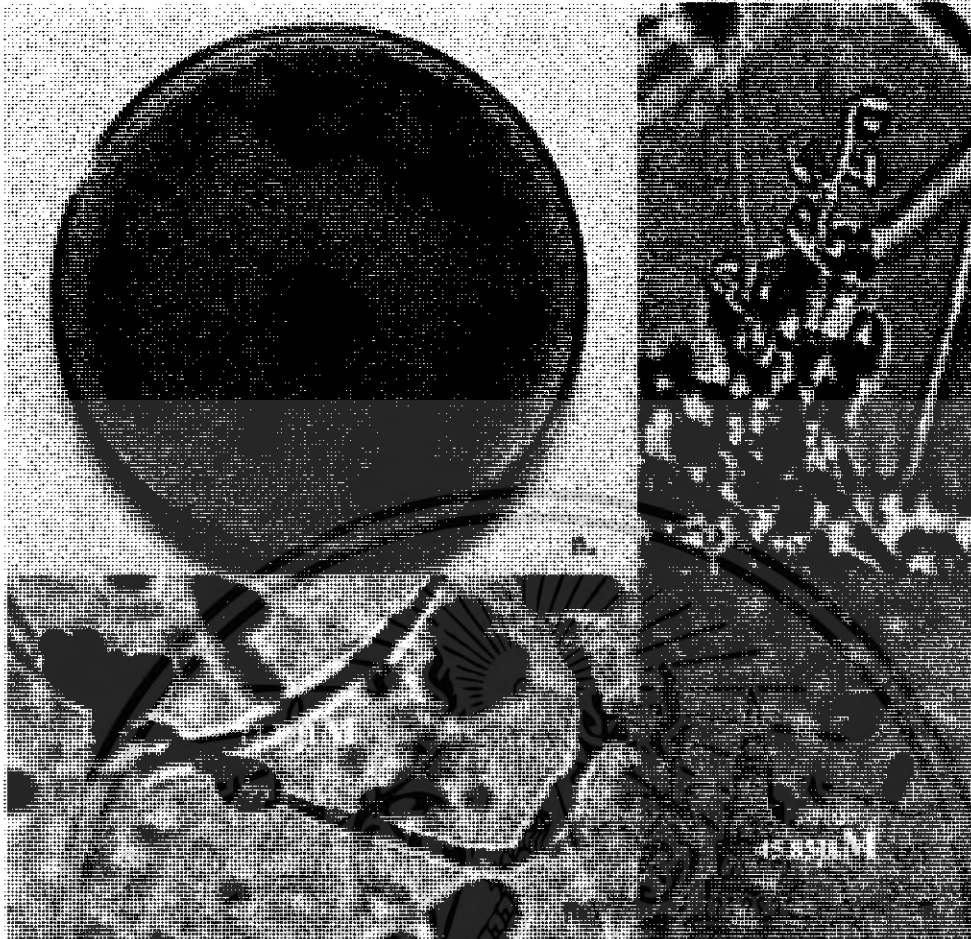
**4.3.6 ไอโซเลท SCP III (รูปที่ 4.9)** ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ โคโลนีมีสีขาวและเมื่อสร้าง phialospore จะมีสีเขียวปนขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวในที่สุด มีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar พบการสร้าง เม็ดสี (สีเหลือง) บนอาหาร PDA conidiophore มีลักษณะพอมยาวและโค้งงอ มีการแตกกิ่งก้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านข้างเล็กน้อย 1-2 กิ่ง phialospore มีสีเขียวยเข้มลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 26.43 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 91.64 ไมโครเมตร

**4.3.7 ไอโซเลท SCP IV (รูปที่ 4.10)** ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ โคลินีสมีสีขาวและเมื่อสร้าง phialospore จะมีสีเขียวยปนขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวยในที่สุด มีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้าน สร้าง conidia บน phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีสีเขียวยเข้มลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 30.41 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 86.23 ไมโครเมตร

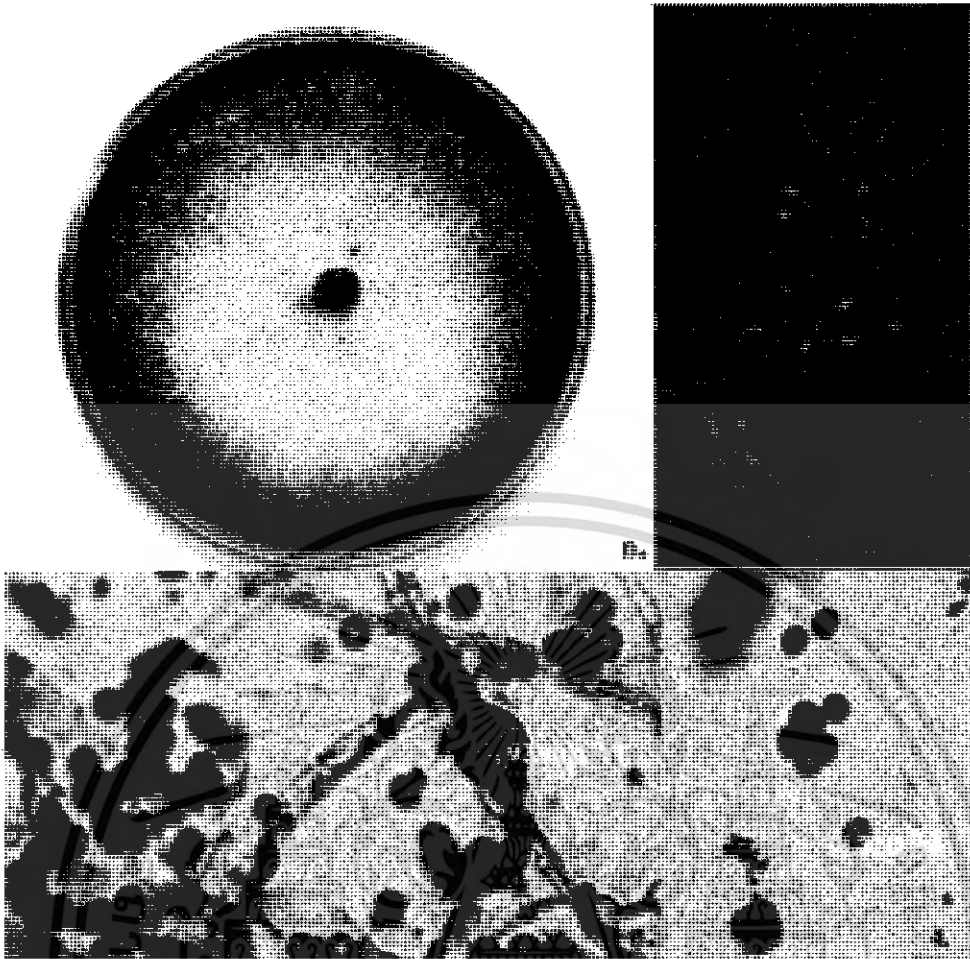
**4.3.8 ไอโซเลท SRS 4 (รูปที่ 4.11)** ลักษณะสำคัญของไอโซเลทนี้คือ มีการเจริญและสร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว โดยในการเจริญช่วงแรกเส้นใยจะมีสีขาว หลังจากนั้นจะมีการสร้างเม็ดสีอย่างรวดเร็ว เส้นใยจะแผ่ปกคลุมอย่างหนาแน่นทั่วผิวหน้าอาหาร โคลินีสมีสีเขียวยเข้ม โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 9 เซนติเมตรหลังจากบ่มเป็นเวลา 4 วันบนอาหาร malt extract agar conidiophore มีการแตกกิ่งก้านเล็กน้อย มีการแตกกิ่งก้านของ phialide 1-2 กิ่ง มีการสร้าง conidia บน phialide ที่ปลายสุดของ conidiophore มักจะมี phialide อันเดียว phialospore มีสีเขียวยเข้มลักษณะรูปไข่ มีขนาดประมาณ 33.03 ไมโครเมตร chlamyospore มีผนังหนา ลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 79.87 ไมโครเมตร



- รูปที่ 4.4 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลต CHA 4 ที่แยกได้จากรากต้นมันสำปะหลัง (อ.บ้านบัว จ. ชลบุรี)
- ก. โคลนินของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง
- ข. conidiophores และ phialides<sup>1</sup>
- ค. chlamydo-spore<sup>1</sup>
- ง. phialospores<sup>1</sup>

<sup>1</sup> กำลังขยาย 1000 เท่า

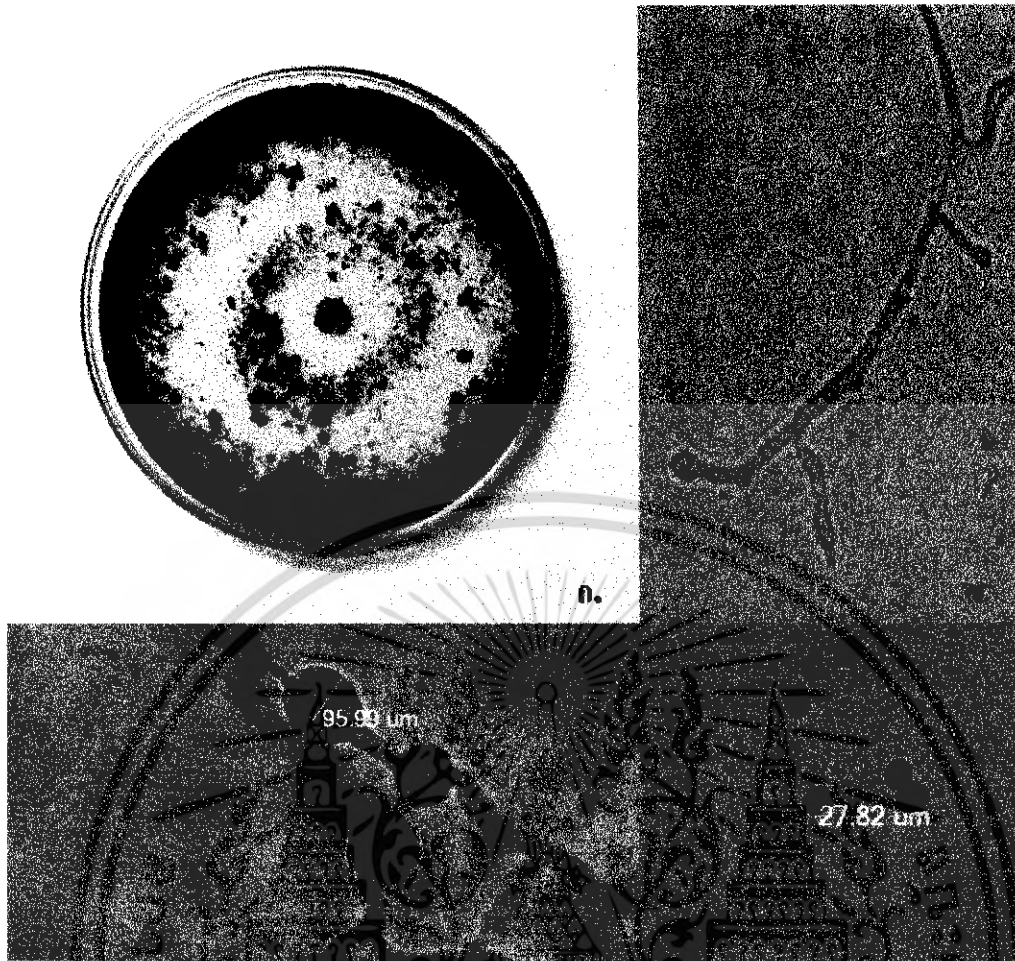
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท KMC ที่แยกได้จากคินปลูก (แปลงปลูกข้าวโพดทดลอง  
คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง)  
ก. โคลนินของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง  
ข. conidiophores และ phialides<sup>1</sup>  
ค. chlamydospore<sup>1</sup>  
ง. phialospores<sup>1</sup>

<sup>1</sup> กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท KSR ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงปลูกสับปะรด

อ. เขาตม จ.สุราษฎร์ธานี )

ก. โคลนินของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง

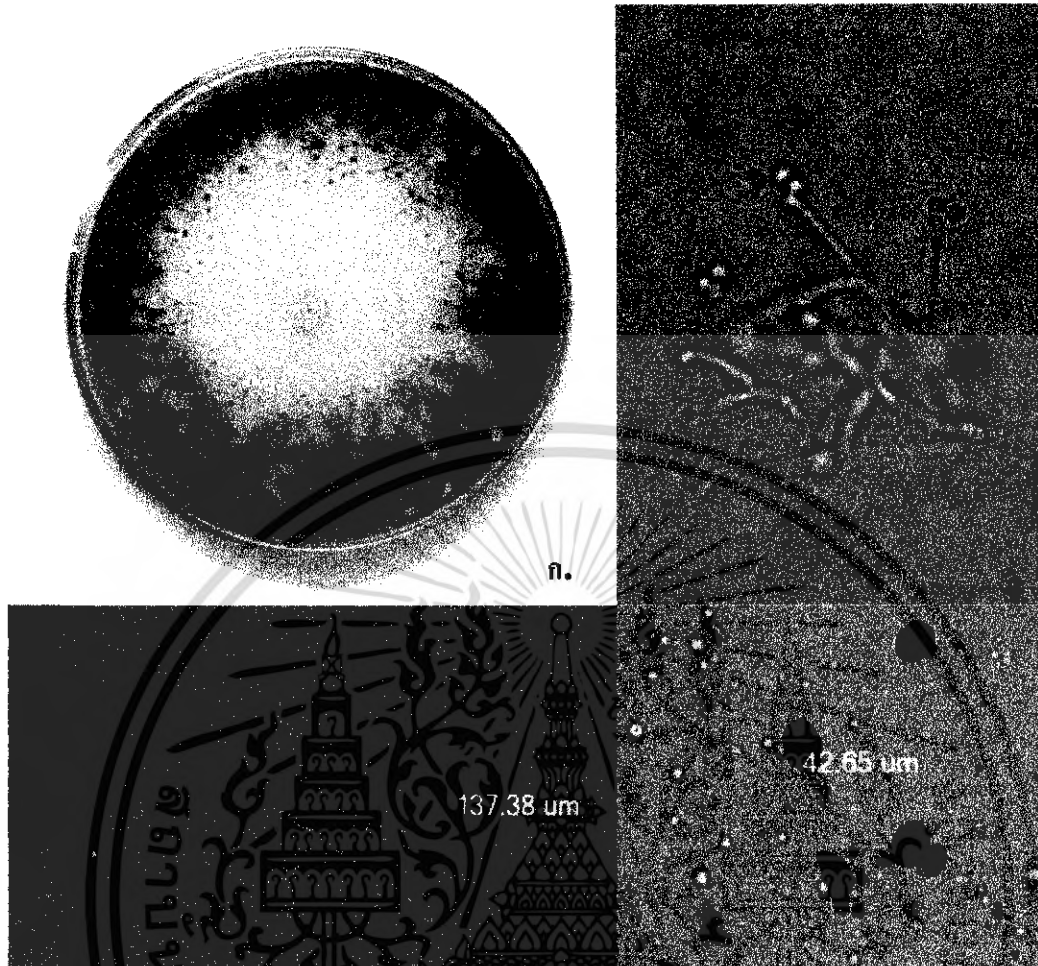
ข. conidiophores และ phialides<sup>1</sup>

ค. chlamydospore<sup>1</sup>

ง. phialospores<sup>1</sup>

<sup>1</sup> กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SCP1 ที่แยกได้จากคินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.คอนเจดีย์

จ. สุพรรณบุรี )

ก. โคลโลนีของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง

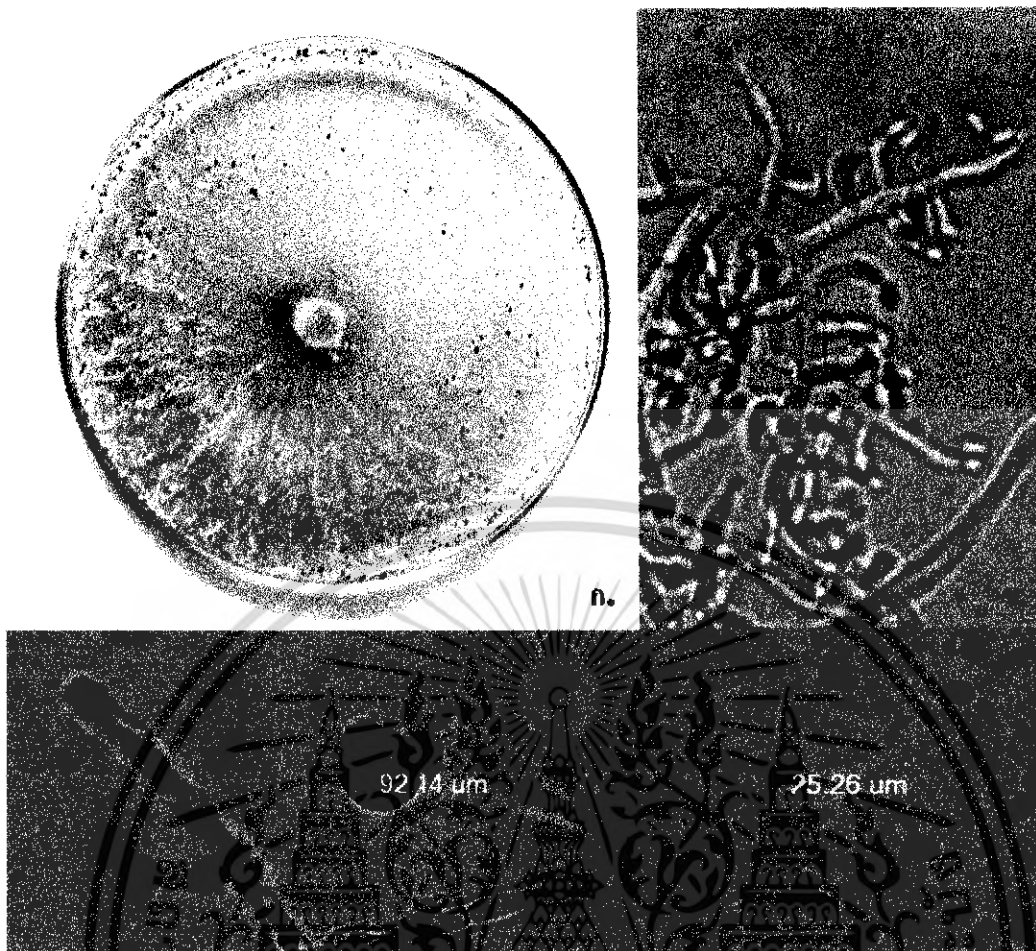
ข. conidiophores และ phialides<sup>1</sup>

ค. chlamyospore<sup>1</sup>

ง. phialospores<sup>1</sup>

<sup>1</sup> กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SCP II ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.คอนเจ็ลย์

จ. สุพรรณบุรี )

ก. โคโลนีของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง

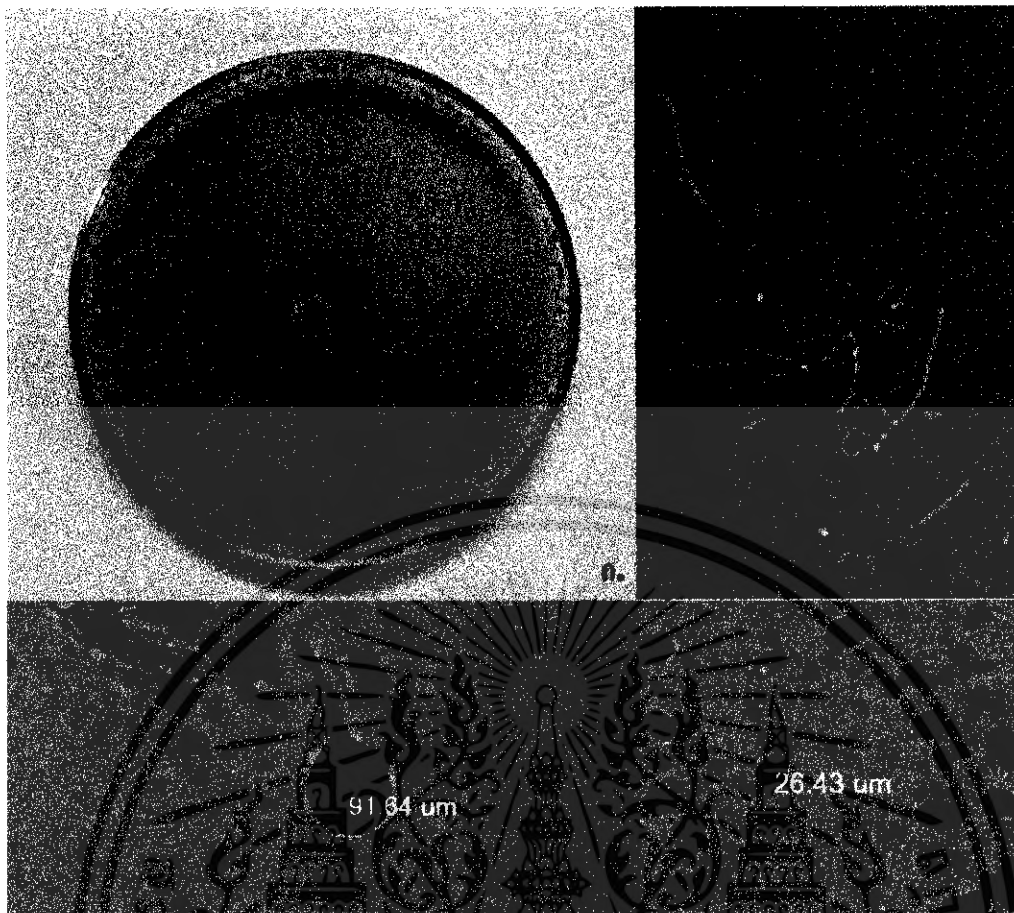
ข. conidiophores และ phialides<sup>1</sup>

ค. chlamyospore<sup>1</sup>

ง. phialospores<sup>1</sup>

<sup>1</sup> กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

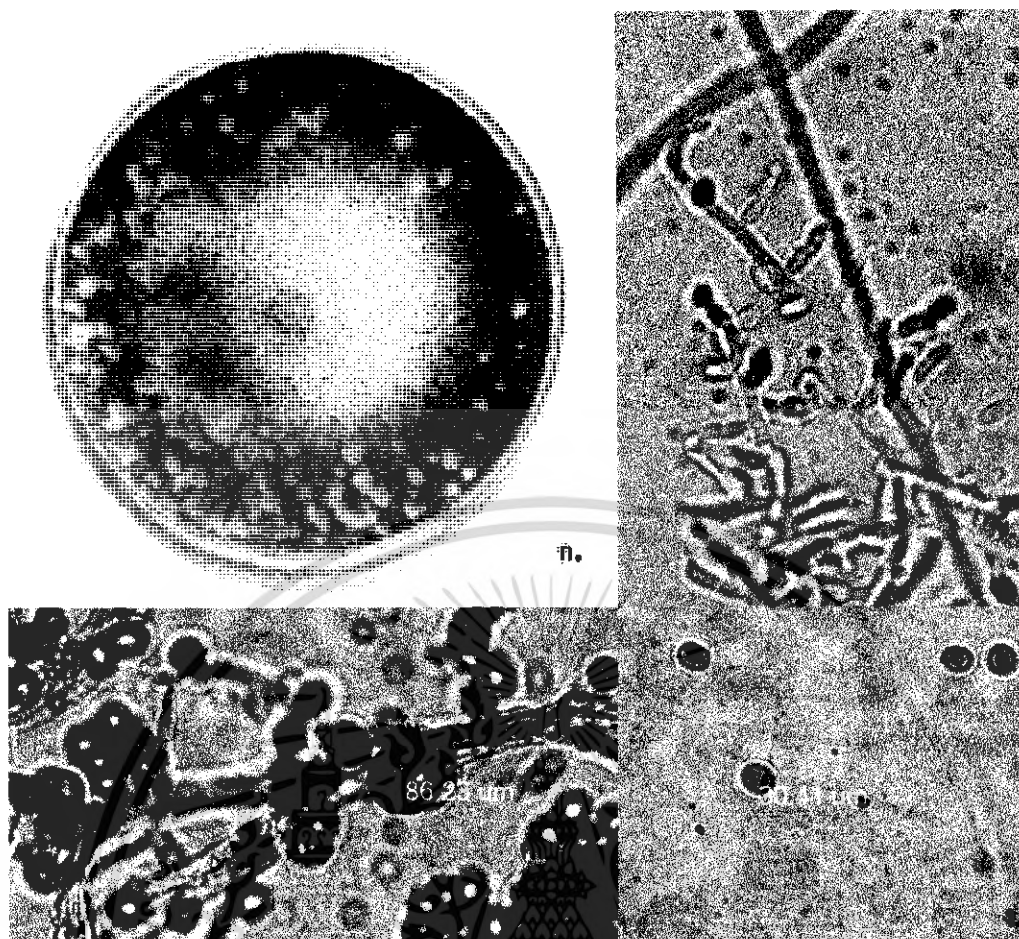


รูปที่ 4.9 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SCP III ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์ อ.คอนเจดีย์ จ. สุพรรณบุรี )

- ก. โคลินิจของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง
- ข. conidiophores และ phialides<sup>1</sup>
- ค. chlamydospore<sup>1</sup>
- ง. phialospores<sup>1</sup>

<sup>1</sup> กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SCP IV ที่แยกได้จากดินปลูก (ไร่บัวสวรรค์

อ. คอนเจตย์ จ. สุพรรณบุรี )

ก. โคลนินของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง

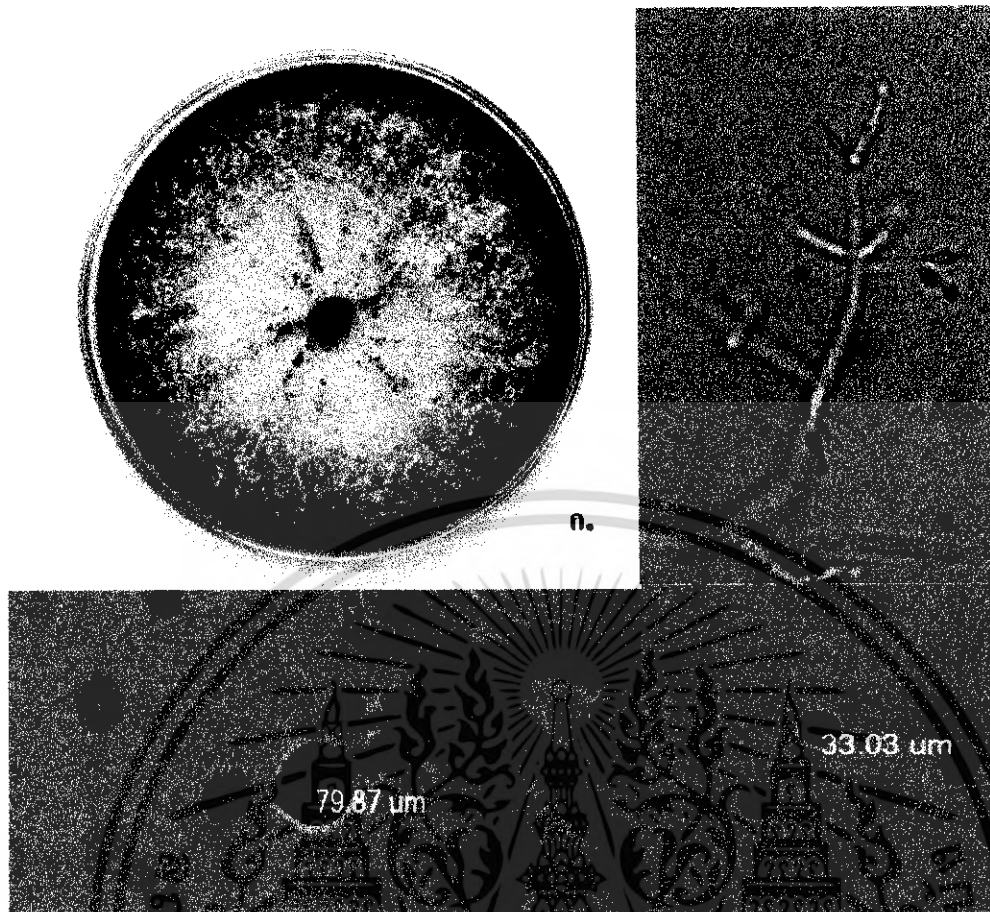
ข. conidiophores และ phialides<sup>1</sup>

ค. chlamydospore<sup>1</sup>

ง. phialospores<sup>1</sup>

<sup>1</sup> กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 เชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SRS 4 ที่แยกได้จากดินปลูก (แปลงสับปะรด อ.เขาคอก จ. สุราษฎร์ธานี)  
 ก. โคลนินของเชื้อเจริญบน malt extract agar อายุ 7 วันที่อุณหภูมิห้อง  
 ข. conidiophores และ phialides<sup>1</sup>  
 ค. chlamydo-spore<sup>1</sup>  
 ง. phialospores<sup>1</sup>

<sup>1</sup> กำลังขยาย 1000 เท่า

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. จากแหล่งดินธรรมชาติ 5 แหล่ง จำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท ได้แก่ CHA 4, CHA 5, CHA 6, KMC, KSR, SCP 2, SCP I, SCP II, SCP III, SCP IV, SRS 1, SRS 2 และ SRS 4 กับอีก 2 ไอโซเลท คือ *Trichoderma viride* S 84-1 และ *Trichoderma* sp. TISTR 3167 นำเชื้อราทั้ง 15 ไอโซเลท มาทดสอบการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์กับเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 *A. parasiticus* IMI 102566 ทั้งสามด้านดังนี้

#### 5.1 การทดสอบการเจริญแข่งขัน

พบว่าทั้ง 15 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ ซึ่ง ไอโซเลท SCP1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 90.605 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท KSR สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 91.387 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* 8 ไอโซเลท คือ CHA 4, KMC, KSR, SCP I, SCP II, SCP III, SCP IV และ SRS 4 มาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในด้านการเป็นไมโคพาราสิตและการสร้างสารปฏิชีวนะ

#### 5.2 การทดสอบการเป็นไมโคพาราสิต

เชื้อรา 8 ไอโซเลทที่ทำการคัดเลือกได้ พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติเป็นไมโคพาราสิตได้แก่ CHA 4, KSR, SCP I, SCP II และ SCP III ซึ่งลักษณะของการเป็นไมโคพาราสิตของทั้ง 5 ไอโซเลท คือจะมีการแทงเส้นใยเข้าไปในเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* เป็นผลทำให้การเจริญของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

### 5.3 การทดสอบการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

#### *A. flavus* และ *A. parasiticus*

เชื้อรา 8 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ พบว่าไอโซเลท SRS 4 สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* เป็นเปอร์เซ็นต์สูงถึง 88.762 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ไอโซเลท KMC และ SCP II ให้ผลการยับยั้งไม่แตกต่างกับไอโซเลท SRS 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าไอโซเลท KMC สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* คิดเป็นเปอร์เซ็นต์สูงถึง 87.337 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าไอโซเลท SCP II, SCP III และ SRS 4 ให้ผลการยับยั้งไม่แตกต่างกับไอโซเลท KMC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่คัดเลือกได้จากดินธรรมชาติทั้งหมด 8 ไอโซเลท พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีความสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ระบุไว้ในเอกสารการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ของ Rifai (1969) และจากการศึกษาการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ด้วยเทคนิค PCR – RFLP โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*, *HaeIII*, *SmaI* และ *BamHI* ผลที่ได้พบว่าสามารถแยกเชื้อตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อ TISTR 3176, KMC 5, SRS 1 และ SRS 4 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ CHA, CHA 6, SCP II และ SCP III กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยเชื้อ KSR, SCP I และ SCP IV และกลุ่มที่ 4 คือเชื้อ CHA 4 (ชาติกร และสังวาลย์, 2548)

ในการศึกษาทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ผลที่ได้เป็นผลที่ใช้ยืนยันได้ภายในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ควรทำการทดลองในสภาวะแวดล้อมจริงตามธรรมชาติ เพื่อให้สามารถทราบประสิทธิภาพที่แท้จริงของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญเชื้อที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

## เอกสารอ้างอิง

- กนกรัตน์ ป้องประทุม. 2540. การควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* 102566 ในเมล็ดข้าวโพดโดยสารเคมีบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร.
- กวินดา ตั้งกิจวานิชย์ม ขจรเกียรติ ศิริเชษฐ์ และวรพจน์ แก้วมะเร็ง. 2538. การตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินในกระเทียม หัวหอม และกุ้งแห้ง จากตลาดในเขตเทศบาลขอนแก่น จ.ขอนแก่น ปัญหาพิเศษปริญญาเกษตรศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- จินตนา อิงคินันท์. 2543. การจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิระเดช แจ่มสว่าง และคณะ. 2538. การคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มีประสิทธิภาพย่อยสลายเซลลูโลสและไคติน หน้า 15-37 ใน รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรม ครั้งที่ 5/2537 การผลิตและการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา สปีชี เพื่อควบคุมเชื้อราสเทอโรเทียมรอล์ฟฟิโอ. : ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช. โครงการเกษตรสู่ชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา: ตอนที่ 2 หลักการและบทบาท. วารสารเคหการเกษตร 19(10): 159-165.
- ชนิกา เอี่ยมสุภายัต และ สมจินตนา ทুমแสน. 2542. การเกิดสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงและแนวทางการแก้ไข. ข่าวสารสถาบันวิจัยพืชไร่ มกราคม-มีนาคม : 12-13
- ชาติกร บุญไกร และสังวาลย์ เสงพะฤกษ์กุล. 2548. การจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ธวัชชัย เปรมศรี. 2543. การศึกษาสาเหตุโรคโคนต้นเน่าและรากเน่าของต้นป๊ายเซียนและการควบคุมโดยชีววิธีด้านเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกจากดินปลูก. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- นงนุช วนิตย์ธนาคม. 2540. วิทยาเชื้อราการแพทย์. คณะแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- นิพนธ์ ทวีชัย.2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. สัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและกรมวิชาการเกษตร: 118-129.
- นิภาพร บุญศักดิ์ดาพร. 2538. การคัดเลือกรเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่ต้านทานต่อสารเคมีเพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* sacc. โดยวิธีประสมประสาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปริศนา สิริอาษา. 2534. อะฟลาทอกซินในข้าวโพด การสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องวิธีการตรวจสอบอะฟลาทอกซิน กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.กรุงเทพมหานคร.
- พิพัฒน์ แก้วปลั่ง. 2544. ธุรกิจพันธุ์พันธุ์ส่งออกเมล็ดพันธุ์. ข้าวสารเมล็ดพันธุ์พืช. 8 (1) : 2-3.
- มาลินี ลิ้มโสภา. 2527. พืชวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. แพรววิทยา. กรุงเทพมหานคร.
- วรรณัท สุภพิพัฒน์. 2538. อาการ โภชนาการและสารพิษ. แสงการพิมพ์. กรุงเทพมหานคร.
- วิจัย รักรักษาศาสตร์.2546. ราวิทยาเบื้องต้น.
- ศศิธร ถิ่นนคร. 2528. สารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ในเขตร้อน. รายงานเสนอในวิชาโภชนาศาสตร์สัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุกัญญา กองเงินและคณะ. 2540. อะฟลาทอกซินในถั่วลิสง.: กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพมหานคร.
- อนงค์ บินทวิหค. 2539-2543. การแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาอะฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจร.: กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์กรมปศุสัตว์. กรุงเทพมหานคร.
- อรรวรรณ นวิภาพ. 2531. เชื้อราที่ก่อโรคในสัตว์. : ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- อรุณศรี วงศ์อุไร. 2542. “อันตรายจากเชื้อราในถั่วลิสง”. ข้าวสาร โรคพืชและจุลชีววิทยา. 9(2) : 5-7.
- Ainsworth, G. C. and Austwick, 1973. P.K.C. Fungal diseases of animals, 2<sup>nd</sup> ed. Commonwealth Agricultural Bureau, : Slough. UK.
- Al-Yahya, S. 1999. “ Change of fungi infection during wheat storage at different condition.” J. Agric. Sci. 7(2) : 531-545.
- Betina, V. 1984. Mycotoxins. Product, Isolation, Separation and Purification. Elsevier Science Publishers Amsterdam. Netherlands.
- Bissett, J.1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I.Section *Longibarchiatum* sect.nov. Can. J. Bot. 62 : 924-931.
- Bissett, J.1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II.Infrageneric classification. Can. J. Bot.69 : 2357-2372.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bissett, J.1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III.Section *Pachybasium*. Can . J . Bot. 69 : 2373-2417.
- Bissett, J.1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV.Additional notes on section *Longibarchiatum*. Can . J . Bot. 69 : 2418-2420.
- Bissett, J.1992. *Trichoderma atroviride*. Can . J . Bot. 70 : 639-641.
- Blount, W.P. 1961. Turkey X disease. Turkey. 9:52.
- Chet, I. and Inbar, J. 1994. Biological control of fungus pathogens. Appl. Biochem Biotechnol. 48 (1) : 37-43.
- Criseo, G. 2001 "Differentiation of aflatoxin producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group". Lett. Appl. Microbiology. 33: 291-295
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, TH. 1980. Compendium of soil fungi. Vol.I Academic Press, London.
- Elangovan, T.V.P. and Kalyanasundaram. 1999. "Prevalence of aflatoxin B<sub>1</sub> in rice bran and some associated factor". Indian Phytopath. 52(2) : 129-133.
- El-Katatny, M.H., Gudeji, M. K. and Robra, -H. 2000. Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$  - 1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii* .Appl. Microbiol. Biotechnol. 56. 137-143.
- Gokul, B., Lee J.-H. and Song K.-B. 2000. Characterzation and application of chitinase from *Trichoderma harianum*-A Review. Bioprocess Eng. 23. 691-694.
- Goto, T. , Ito, Y. , Peterson, S.W. and Wicklow, D.T. 1997. Mycotoxin production ability of *Aspergillus tamaritii*. Mycotoxins 44 : 17-20.
- Gourama, H. and Bullerman, L. 1995a. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* : aflatoxigenic fungi of concern in food and feeds. A Review. J. Food Protect. 58(12) : 1395-1404.
- Gourama H and Bullerman L B.. 1995b. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. J. Food Protect. 58, , 249-1256.
- Hartly, R.D. 1963. Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature (London) 198 : 1056-1058.
- Heathcote, J.G. 1984. Aflatoxin and Related Toxins. Mycotoxins-Production, Isolation, Separation and Purification. Elsevier Science Publishers Netherlands .
- Homer, D.W., Bell, D.K. and C.A. Jaworki. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathol 62: 442-447.

- Inglis, G. D. and Kawchuk, L.M. 2002. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and Basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Can. J. Microbiol.* 48. 60-70.
- Ingold, C.T. and Hudson, H.J. 1993. *The Biology of Fungi*. Chapman & Hall, London.
- Jelinek, C. F., Pohland, A.E. and Wood, G.E. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an update. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* 72. 223-230.
- Johnson, L.E., Bernard, E.C. and Qian, P. 1987. Isolation of *Trichoderma* spp. at low temperature from Tennessee and Alaska soil. *Plant. Dis.* 71: 137-140.
- Johnson, L.F. and Curl, E.A. 1972. *Methods for Research on the Soil borne Plant Pathogen*. Burgess Publishing Company, Minnesota.
- Kurtzman, C.P. , Horn, B.W. and Hesseltine, C.W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii* Antonie van Leeuwenhoek. 53 : 147-158.
- Moss, M.O. 1996. Mycotoxin. *Mycological Res.* 100 : 513-523.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23, , 23-24.
- Peterson, S.W. , Ito, Y. , Horn, B.W. and Goto, T. 2001. "*Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia.* 93 : 689-703.
- Pitt, J.J. 1989. Field Studies on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in Australian groundnuts. In *Aflatoxin Contamination of Groundnuts* (D. Mc Donald and V.K. Mehan, eds). ICRISAT, Patancheru, India
- Prado, G. 1995. Influencia de metais na producao de aflatoxina B<sub>1</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 15 : 294-297
- Praveen RAO, J. and Subramanyam, C. 1999. Requirement of Ca<sup>2+</sup> for aflatoxin production : inhibitory effect of Ca<sup>2+</sup> channel blocks on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Lett. Appl. Microbiol* 28 : 85-88.
- Rodrick, J.V. and Roberts, H.R. 1997. Mycotoxin regulation in the United States. In *Mycotoxins in Human and Animal Health*. (J. V. Rodricks, C. W. Hesselstein, and M. A. Mehlman, eds). Pathotox Publishers Inc. Park Forest South , IL.
- Rifai , M.A. 1969. A Revision of the Genus *Trichoderma*. *Mycol. Paper No 116*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.

- Royse, D.J. and Ries, S.M. 1978. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*. *Phytopathol.* 68 : 603-607 .
- Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100: 923-935.
- Samuels, G.J. 2001. Workshop on the Taxonomy and Biotechnology.
- Sargeant, K., O'Kelly, J. and Carnaghan, R.B.A. 1961a. The assay of a toxic principle in certain samples of groundnut meals. *Veterinary Record.* 73 : 1219.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J. and Carnaghan, R.B.A. 1961b. Toxicity associated with certain samples of groundnut. *Nature.* 192 : 1096.
- Sayed, L.M. and Fadi-Allah, E.M. 1992. Influence of aflatoxin B<sub>1</sub> on growth photosynthetic oxygen evolution and regreening of *Chlorella fusca* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Cryptogamie-Algologie.* 13(1) : 45-48.
- Simon, A. *et al.* 1988. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil Biol. Biochem.* 20 : 263-264
- Singh, J. and Faull, J. L. 1988. "Antagonism and biological control." 167-177. In *Biocontrol of Plant Diseases*, Vol 2. (K. G. Mukerji and K. L. Garg, eds). CRC Press. Florida:
- Soytong, K. 1992. Antagonism of *Chaetomium cupreum* to *Pyricularia oryzae*. *J. Plant Protection in the Tropics.* 9:17-23.
- Thanaboripat, D. 1997. Detoxification of aflatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercial yoghurt. *Kasetsart J. (Nat.Sci.)* 31 : 117-123.
- WHO. 1979. *Environment Health Criteria II: Mycotoxins*. World Health Organization. Geneva.

# ภาคผนวก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก  
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

**MEA : Malt Extract Agar**

Malt extract ( Powdered )	20 g
Peptone, bacteriological	1 g
Glucose	20g
Agar	20g
Distilled water	1,000 ml
Final pH 5.0 -5.5	

**2 % MA : 2% Malt Extract Agar**

Oxoid malt extract	20 g
Agar	20g
Distilled water	1,000 ml

**Martin's Medium : Peptone –Dextrose –Rose Bengal agar**

Agar	15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Mg <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Peptone	5 g
Dextrose	10 g
Rose Bengal ( 1 % in alc.)	3.3 ml
Distilled water	1,000 ml
Streptomycin	1 g

หมายเหตุ : ใส่ Streptomycin หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขณะอาหารมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

**PDA : Potato Dextrose Agar**

Potato	200 g
Dextrose or Glucose	20 g
Agar	15 g
Distilled water	1,000 ml

**WA 1% : Water agar**

Agar	10 g
Distilled water	1,000 ml



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข  
การเตรียมสีย้อม

สีย้อม lactophenol (Dhingra and Sinclair, 1978)

เตรียมสีย้อม lactophenol โดยมีส่วนผสมดังนี้

Glycerine	40 กรัม
Lactic acid	20 กรัม
Phenol	20 กรัม
Distilled water	20 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้าด้วยกัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง

สีย้อม lactophenol – acid fuchsin (Dhingra and Sinclair, 1987)

เตรียมสีย้อม lactophenol – acid fuchsin โดยมีส่วนผสมดังนี้

Glycerin	40 กรัม
Lactic acid	20 กรัม
Phenol	20 กรัม
Distilled water	20 กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้าด้วยกัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเติม 1-5

มิลลิลิตรของ 1 เปอร์เซ็นต์ของ acid fuchsin ที่ละลายในน้ำ หรือจนได้สีที่เข้มตามต้องการ และตาม  
ด้วย 0-20 มิลลิลิตรของ glacial acetic acid

## ภาคผนวก ค

### Key to species aggregates of *Trichoderma* (Rifai, 1969)

A. Conidiophores long and thick, often with sterile hyphal elongation ; side branches mostly short but thick, bearing crowded , short and plump phialides ; colonies whitish-green to green, generally with compact tufts of conidiophores

B. Sterile hyphal elongation absent ; phialospores globose,  
hyaline ..... *T. piluliferum*

Bb. Sterile hyphal elongation present or modified or rarely absent ;  
phialospores not globose ; hyaline or green coloured

C. Phialospores hyaline, small.....*T. polysporum*

Cc. Phialospores green, small to large.....*T. hamatum*

Aa. Conidiophores and their side branches long and slender, without sterile hyphal elongation ;  
phialides not crowded, rather slender ; colonies yellowish, bright, dull to dark green, floccose  
or with compact conidiospore tufts

D. Phialospores smooth-walled

E. Conidiophores with complicated dendroid branching system ;  
phialides quite regularly disposed and almost *Verticillium*-like

F. Phialospores ellipsoidal or oblong, often  
appearing angular.....*T. koningii*

Ff. Phialospores obovoid, with truncate base ;  
reverse of colonies often discoloured.....*T. aureoviride*

Fff. Phialospores globose or subglobose or short  
obovoid, with length and breadth ratio of less  
than 1.25 ..... *T. harzianum*

Ee. Conidiophores with simpler branching systems ; phialides  
Irregularly disposed, often arising singly and almost  
*Cephalosporium*-like

G. Phialospores large, up to 7  $\mu$  long, mostly elliptic ellipsoidal ;  
phialides usually only slightly attenuate at the base.....*T. longibrachiatum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gg. Phialospores smaller, 2.8-4.8  $\mu$  long, mostly oblong  
 ellipsoidal ; phialides often distinctly attenuate at  
 the base ; branching system of conidiophore

more complicated.....*T. pseudokoningii*

Dd. Phialospores rough-walled..... *T. viride*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

### Key to species of *Trichoderma* section *Longibrachiatum*

(Bissett, 1984)

- 1a. Conidiophores with side branches relatively long and several times rebranched ; branches often curved or sinuous ; conidia spinulose, roughened or pitted, or if smooth walled then globose and greater than 3.5  $\mu\text{m}$  diam. .... cf. *T. viride* aggr. sensu Rifai (1969)
- 1b. Conidiophores with side branches short and rarely rebranched ; conidia smooth walled and ellipsoidal to cylindrical.....2
- 2a. Phialides arising predominately in false whorls ; intercalary phialides not produced ..... cf. *T. koningii* aggr. sensu Rifai (1969)
- 2b. Phialides frequently arising singly , particularly toward the apex of the conidiophore and its branches ; intercalary phialides produced by most strains.....3
- 3a. Conidiophore bearing side branched that are commonly rebranched once or twice ; phialides distinctly constricted at the base ; conidia mostly smaller than 4.0 x 2.5  $\mu\text{m}$ .....4
- 3b. Conidiophores very sparingly branched ; phialides nearly cylindrical and hardly or not at all constricted at the base ; conidia mostly larger than 4.0 x 2.5  $\mu\text{m}$ .....5
- 4a. Colonies with conidial areas widely effused and not forming pustules ; conidiation mostly in bluish-green shades and not darkening appreciably in age ; conidia nearly cylindrical and frequently larger than 3.5 x 2.0  $\mu\text{m}$ .....*T. citrinoviride*
- 4b. Colonies with conidial areas widely effused and not forming pustules ; conidiation mostly in bluish-green shades and not darkening appreciably in age ; conidia nearly cylindrical and frequently larger than 3.5 x 2.0  $\mu\text{m}$ .....*T. koningii*
- 5a. Conidia more or less obovoid, variable in size but usually shorter than 5.0  $\mu\text{m}$ .....*T. longibrachiatum*
- 5b. Conidia ellipsoidal, mostly longer than 5.0  $\mu\text{m}$ ..... *T. atroviride*

## ภาคผนวก จ

### Key to the section *Trichoderma* (Bissett, 1991a)

- 1a. Conidiatio effuse; conidiophores with few or no lateral branches ; phialides borne in simple terminal verticals, cylindrical to lageniform..... section *Hypocreanum*
- 1b. Conidiatio effuse or fasciculate to postulate ; conidiophores with frequent lateral branches ; phialides mostly lageniform to ampulliform.....2
- 2a. Conidiophore main axes long with short secondary branches, not extensively rebranching ; branches and phialides frequently arising singly..... section *longibrachiatum*
- 2b. Conidiophores repeatedly rebranching ; branches and phialides paired or verticillate.....3
- 3a. Phialides ampulliform to broadly lageniform, mostly in verticils of 2 or 3 ; conidia with conspicuous, sinuste, winglike or bullate ornamentation.....section *Saturnisporum*
- 3b. Phialides lageniform to subulate, or if ampulliform , then in verticils of up to 7 ; conidia smooth or verrucose.....4
- 4a. Conidiophores and branches relatively broad (main axis to 10  $\mu\text{m}$  wide ) ; phialides in verticils of 2-7, ampulliform to lageniform.....section *Pachybasium*
- 4b. Conidiophores and branches narrow and flexuous (main axis to 6  $\mu\text{m}$  wide ) ; phialides mostly in verticils of 2 or 3 , lageniform to subulate ..... section *Trichoderma*

## ภาคผนวก ก

### Dichotomous key to species in *Trichoderma* section

#### Pachybasium (Bissett, 1991b)

1. Conidiation entirely effuse, or conidiophores arranged in loosely organized flat pustules or small irregular fascicles ; conidiophores sparingly branched with principal branches most often arising singly or paired .....2
1. Conidiophores organized in compact, hemispherical to cushion-shaped pustules on MA ; conidiophores usually highly branched with branches 2-4 verticillate.....7
2. Conidiophores arranged in fascicles up to 2 mm in diameter.....3
2. Conidiophores effuse, or loosely arranged in flat pustules.....4
3. Colonies less than 4 cm in diameter after 4 days at 20 °c ; aerial hyphae more than 1.5 µm in diameter ; chlamydospores infrequent .....*Trichoderma anam. H. gelatinosa* (6)
4. Conidia subglobose to obovoid, smaller than 3.5 x 2.5 µm..... *T. hazianum* (8)
4. Conidia broad ellipsoidal, smaller than 3.5 x 2.5 µm.....5
5. Conidia pale brown..... *T. flavafuscum* (5)
5. Conidia dark green.....6
6. Conidiophores aggregated into flat pustules on MA, usually with sterile apical elongations .....*T. crassum* (1)
6. Conidiophores entirely effuse, or conidiophores lacking sterile apical elongations ..... *T. virens* (20)
7. Conidiation white to buff.....8
7. Conidiation eventually green to gray .....9
8. Conidiophore with spiral, sterile apical elongation ; conidia ellipsoidal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- .....*T. polysporum* (13)
8. Conidiophores lacking sterile apical elongation ; conidia subglobose..... *T. piluliferum* (12)
9. Conidiophores with conspicuously roughened, spiral, sterile apical elongation ; conidiation bright greenish yellow or rosy-buff..... *T. croceum*(2)
9. Conidiophores lacking sterile elongation or elongation not roughened ; conidiation in various green or gray shades..... 10
10. Conidiophores arranged in pustules up to 2 mm in diameter, glaucous to grayish ; and conidiophore main axis 4.5-7  $\mu\text{m}$  wide over the fertile part  
..... *Trichoderma anam. H. semiorbis* (15)
10. Conidiophores pustules larger, usually in definite green shades ; or conidiophore main axis not exceeding 5.5  $\mu\text{m}$  wide over the fertile part..... 11
11. Conidia consistently less than 3.5  $\mu\text{m}$  long and 2.5  $\mu\text{m}$  wide .....12
11. Conidia mostly longer and (or) wider.....14
12. Conidia subglobose to broadly obovoid..... *T. harzianum* (8)
12. Conidia ellipsoidal.....13
13. Conidiogenous area bright green to yellow-green, conidiophore main axis branched and fertile to apex..... *T. minutisporum* (10)
13. Conidiogenous area grey-green, conidiophore main axis with conspicuous spiral sterile apical elongation.....*T. tomentosum* (19)
14. Colony reverse conspicuously pigmented yellow to reddish brown shades ; conidiophores main axis very stout, 4-5.6  $\mu\text{m}$  wide at base of sterile elongation.....15
14. Colony reverse colourless to pale dull yellow ; conidiophore main axis usually 3.5-5  $\mu\text{m}$  wide at base of sterile elongation.....16
15. Conidiophore main axis relatively straight throughout, the upper part unbranched and nonfertile to near to the apex, that is terminated by a single phialide or more often by 2-3 short fertile branches.....*T. fertile* (4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. Conidiophore main axis with a spiral, sterile apical elongation , never with fertile branches near the apex.....*T. spirale* (16)
16. Conidia frequently longer than 4.5  $\mu\text{m}$ , often shorter than 3.5  $\mu\text{m}$ .....17
16. Conidia rarely longer than 4.5  $\mu\text{m}$  , often shorter than 3.5  $\mu\text{m}$  .....18
17. Conidiophore main axis with undulate to spiral sterile elongation that is highly branched and anastomosing to within 100  $\mu\text{m}$  of the acute apex.....*T. longipilis* (9)
17. Conidiophore main axis with a straight to flexuous sterile elongation that is sparingly branched with a bluntly rounded apex.....*T. oblongisporum*(11)
18. Conidiophore main axis with straight to flexuous sterile elongation.....19
18. Conidiophore main axis with undulate to coiled or circinate, sterile elongation.....20
19. Conidiogenous pustules bluish green, appearing spiny owing to presence of stiff, javelin-like sterile conidiophore apices.....*T. strigosum* (18)
19. Conidiogenous pustules bluish dull green, appearing hairy owing to presence of very long, straight or flexuous sterile conidiophore apices .....*T. strictipilis* (17)
20. Conidiogenous pustules bluish green, appearing velvety owing to presence of strongly undulate or hamate, sterile conidiphore apices.....*T. harmatum* (7)
20. Conidiogenous pustules bluish green, surface appearing downy owing to presence of branched, undulate, thin, sterile conidiophore apices.....*T. pubescens* (14)
20. Conidiogenous pustules bluish green, appearing woolly owing to presence of coarse, spiral, conidiophore apices.....*T. spirale*

## ภาคผนวก ข

ตารางแสดงข้อมูลดิบการทดสอบการสร้างสปอร์ปฏิชีวนะของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

<i>Trichoderma</i> spp.	ขนาดโคโลนีของ <i>A. flavus</i> (cm.)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
control	3.205	3.205	3.315	3.242
CHA 4	2.223	2.275	2.243	2.247
KMC	1.275	1.694	1.101	1.357
KSR	2.465	2.501	2.215	2.394
SCP I	2.512	2.617	2.557	2.562
SCP II	1.515	1.465	1.205	1.395
SCP III	1.552	1.975	1.995	1.841
SCP IV	1.465	2.255	1.915	1.878
SRS 4	1.165	1.475	1.329	1.323

<i>Trichoderma</i> spp.	ขนาดโคโลนีของ <i>A. parasiticus</i> (cm.)			ค่าเฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
control	3.689	4.315	3.682	3.895
CHA 4	3.080	3.215	3.352	3.215
KMC	1.372	1.667	1.688	1.576
KSR	3.110	3.065	3.025	3.066
SCP I	2.000	2.465	2.015	2.160
SCP II	1.845	1.750	2.198	1.931
SCP III	1.515	1.934	1.775	1.741
SCP IV	2.400	2.590	2.150	2.380
SRS 4	1.772	1.981	1.872	1.875

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ตารางแสดงข้อมูลคิบบการทดสอบการเจริญแข่งขัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด โคโคโคนี	ขนาดโคโคโคนี <i>A. flavus</i> ที่เลี้ยงพร้อมกับการเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. บนอาหาร PDA														
	CHA 4	CHA 5	CHA 6	KMC	KSR	S84-1	SCP 2	SCP 1	SCP II	SCP III	SCP IV	SRS 1	SRS 2	SRS 4	TRIS
คววม	3.350	4.750	3.860	2.450	2.500	2.750	4.720	2.250	2.650	2.740	2.740	2.820	2.360	2.670	3.200
6.820	3.450	4.700	3.740	2.620	2.520	2.725	4.680	2.230	2.680	2.820	2.680	2.540	2.540	3.150	3.160
6.840	3.270	4.730	3.910	2.550	2.570	2.860	4.720	2.230	2.700	2.690	2.700	2.600	2.300	2.940	3.080
6.790	3.350	4.130	3.700	2.430	2.460	2.700	4.760	2.310	2.570	2.700	2.710	2.540	2.420	2.740	3.140
6.800	3.330	4.740	3.750	2.430	2.510	2.590	4.620	2.130	2.810	2.790	2.800	2.600	2.260	2.650	3.230
6.720															
6.860															
6.740															
6.910															
6.900															
7.020															
n = 10	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$
6.838	3.350	4.610	3.792	2.496	2.512	2.725	4.700	2.230	2.682	2.748	2.726	2.620	2.376	2.830	3.162

หมายเหตุ n คือ จำนวนที่ของการทดลอง,  $\mu$  คือ ค่าเฉลี่ยของขนาดโคโคโคนี *A. flavus*

ขนาดโคโคโคนี	ขนาดโคโคโคนี <i>A. parasiticus</i> ที่เลี้ยงพร้อมกันเชื้อ <i>Trichoderma</i> spp. บนอาหาร PDA														
	CHA 4	CHA 5	CHA 6	KMC	KSR	S84-1	SCP 2	SCP 1	SCP II	SCP III	SCP	SRS 1	SRS 2	SRS 4	TRIS
<i>A. parasiticus</i> ควบคุม											IV				3167
7.240	4.250	4.840	3.670	2.940	2.270	2.950	4.665	3.250	3.250	2.940	2.740	2.950	2.500	2.940	2.800
7.260	4.130	4.820	3.740	3.150	2.410	3.000	4.670	3.170	3.030	2.960	2.800	3.150	2.550	3.050	2.810
7.230	4.250	4.800	3.760	3.240	2.240	3.040	4.630	3.170	3.240	2.960	2.840	3.050	2.570	3.470	2.760
7.300	4.140	4.760	3.760	3.060	2.210	3.000	4.700	3.290	3.330	2.920	2.800	2.850	2.620	3.030	2.780
7.280	4.530	5.080	3.690	2.910	2.200	3.100	4.650	3.200	3.100	3.060	2.820	3.050	2.540	3.260	2.760
7.290															
7.260															
7.240															
7.330															
7.250															
n = 10	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5
$\mu = 7.268$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$	$\mu =$
4.260	4.860	3.724	3.060	2.266	3.018	4.663	3.216	3.190	2.968	2.800	3.010	2.556	3.150	2.782	

หมายเหตุ n คือ จำนวนซ้ำของการทดลอง,  $\mu$  คือ ค่าเฉลี่ยของขนาดโคโคโคนี *A. parasiticus*