

การควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus*

ในถั่วลิสงโดยชีววิธีด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

BIOLOGICAL CONTROL OF
ASPERGILLUS FLAVUS AND *ASPERGILLUS PARASITICUS*
BY *TRICHODERMA* SPP. IN GROUNDNUT (*ARACHIS HYPOGAEA* LINN.)

ดวงกมล เพชรทิพย์

DUANGKAMON PETTIP

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2553

KMITL-2010-SC-M-020-025

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus*
ในถั่วลิสงโดยชีววิธีด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

BIOLOGICAL CONTROL OF
ASPERGILLUS FLAVUS AND *ASPERGILLUS PARASITICUS*
BY *TRICHODERMA* SPP. IN GROUNDNUT (*ARACHIS HYPOGAEA* LINN.)



ดวงกมล เพชรทิพย์

DUANGKAMON PETTIP

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....110375
วัน,เดือน,ปี.....- 1 ๗๕, 2553

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2553

KMITL-2010-SC-M-020-025

BIOLOGICAL CONTROL OF
ASPERGILLUS FLAVUS* AND *ASPERGILLUS PARASITICUS
BY *TRICHODERMA* SPP. IN GROUNDNUT (*ARACHIS HYPOGAEA* LINN.)

DUANGKAMON PETTIP

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2010
KMITL-2010-SC-M-020-025

COPYRIGHT 2010

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ใน
 ถั่วลิสงโดยชีววิธีด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

Biological control of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by
Trichoderma spp. in Groundnut (*Arachis hypogea* Linn.)

นักศึกษา นางสาวดวงกมล เพชรทิพย์

รหัสประจำตัว 48068308

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.คุณณี ฐานะบริพัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.นิพนธ์ วิสารทานนท์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อุ๋นเรือน	เพชรวัลย์	
รศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	
ดร.ปราโมทย์	ศิริโรจน์	
รศ.นิพนธ์	วิสารทานนท์	
รศ.ดร.คุณณี	ฐานะบริพัฒน์	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2553 เวลา 14.30 น.

KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารภรณ์ 1 คณะวิทยาศาสตร์ ห้อง 424



(รองศาสตราจารย์ ดร.คุณณี ฐานะบริพัฒน์)
 คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 16 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 53

สำนักทะเบียนและประมวลผล สจล.
 วันที่ส่งเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์
 วันที่ 17 เดือน มิ.ย พ.ศ. 53
 ลงชื่อ

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การควบคุมเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> และ <i>Aspergillus parasiticus</i> ในถั่วลิสงโดยชีววิธีด้วยเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.
นักศึกษา	นางสาวดวงกมล เพชรทิพย์
รหัสประจำตัว	48068308
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2553
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. คุษณี ธนะบริพัฒน์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ. นิพนธ์ วิสารทานนท์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 5 ไอโซเลต ได้แก่ TISTR 3167, SRS 4, KMC 5, SCP III และ SCP II ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ในดินที่บ่มเชื้อเป็นเวลา 28 วัน เมื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อรา พบว่าไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 2.49×10^8 , 2.29×10^8 และ 1.43×10^8 CFU ต่อกรัมของดิน ตามลำดับ และมีปริมาณมากกว่าไอโซเลต SCP III และ SCP II (4.05×10^7 และ 4.12×10^7 CFU ต่อกรัมของดิน)อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อผสมไอโซเลตต่างๆกับเชื้อรา *A. flavus* หรือ *A. parasiticus* พบว่าไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 สามารถลดปริมาณของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในดินได้ และเมื่อทั้ง 3 ไอโซเลตมาทดสอบในกระถางโดยผสมในดินปลูกต้นถั่วลิสงร่วมกับ *A. flavus* หรือ *A. parasiticus* และเปรียบเทียบระหว่างการใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ระยะเวลาบ่ม 7 วัน พบว่าในดินฆ่าเชื้อ ไอโซเลต TISTR 3167 และ KMC 5 ลดปริมาณของ *A. flavus* ได้เท่ากับ 1.68×10^7 และ 9.99×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน ตามลำดับ สำหรับในดินที่ไม่ฆ่าเชื้อ พบว่าไอโซเลต KMC 5 และ SRS 4 ลดปริมาณของ *A. flavus* ได้เท่ากับ 3.42×10^6 และ 3.51×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการผสมไอโซเลต TISTR 3167 กับ *A. flavus* และ TISTR 3167 กับ *A. parasiticus* ในดินฆ่าเชื้อ มีผลต่อความยาวยอดต้นถั่วสูงสุด เท่ากับ 63.07 และ 68.03 มิลลิเมตร ตามลำดับ และการผสมไอโซเลต SRS 4 กับ *A. flavus* และ SRS 4 กับ *A. parasiticus* มีผลต่อความยาวรากต้นถั่วสูงสุด เท่ากับ 79.86 และ 72.84 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนในดินที่ไม่ฆ่าเชื้อ กลับพบว่าการผสมไอโซเลต SRS 4 กับ *A. flavus* และ SRS 4 กับ *A. parasiticus* มีผลต่อความยาวยอดต้นถั่วสูงสุด เท่ากับ 77.09 และ 68.48 มิลลิเมตร และการผสมไอโซเลต TISTR 3167 กับ *A. flavus* และ KMC 5 กับ *A. parasiticus* มีผลต่อความยาวรากต้นถั่วสูงสุด เท่ากับ 112.78 และ 73.27 มิลลิเมตรตามลำดับ และไอโซเลต SRS 4 มีผลต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสงสูงสุดทั้งในดินฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อ นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆที่ผสมกับ *A. flavus* หรือ *A. parasiticus* พบว่าในดินฆ่าเชื้อ ไอโซเลต

SRS 4 มีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากสูงสุดเท่ากับ 60% และในดินไม่ฆ่าเชื้อ ไอโซเลต TISTR 3167 มีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากสูงสุดเท่ากับ 40% และจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าไอโซเลต SRS 4 คล้ายคลึงกับ *Trichoderma viride* และไอโซเลต SRS 4 คล้ายคลึงกับ *Trichoderma atroviride*

Thesis Title	Biological control of <i>Aspergillus flavus</i> and <i>Aspergillus parasiticus</i> by <i>Trichoderma</i> spp. in groundnut (<i>Arachis hypogea</i> Linn.)
Student	Miss Duangkamon Pettip
Student ID	48068308
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2010
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat
Thesis Coadvisor	Assoc. Prof. Niphon Visarathanonth

ABSTRACT

Five isolates of *Trichoderma* spp., i.e., TISTR 3167, SRS 4, KMC 5, SCP III and SCP II, were investigated for the ability to control *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in soil. When *Trichoderma* spp. were incubated in soil for 28 days, it was found that the colony counts of isolates TISTR 3167, KMC 5 and SRS 4 (2.49×10^8 , 2.29×10^8 and 1.43×10^8 CFU/g soil) were significantly different from the colony counts of isolates SCP III and SCP II (4.05×10^7 and 4.12×10^7 CFU/g soil). When these isolates were mixed with either *A. flavus* or *A. parasiticus*, it was found that isolates TISTR 3167, KMC 5 and SRS 4 could reduce the numbers of *A. flavus* and *A. parasiticus* in soil. These 3 isolates were further investigated in pot trial by mixing with either *A. flavus* or *A. parasiticus* in soil and used for growing peanut seedlings for 7 days. Sterile and non-sterile soil conditions were compared. The results show that isolates TISTR 3167 and KMC 5 could reduce the amount of *A. flavus* to 1.68×10^7 and 9.99×10^6 CFU/g soil in sterile soil whereas isolates KMC 5 and SRS 4 reduce the amount of *A. flavus* to 3.42×10^6 and 3.51×10^6 CFU/g soil in non-sterile soil. Furthermore, the mixing of TISTR 3167 and *A. flavus*, TISTR 3167 and *A. parasiticus* in sterile soil stimulated the highest shoot growth of peanut seedlings (63.07 and 68.03 mm) while the mixing of SRS 4 and *A. flavus*, SRS 4 and *A. parasiticus* stimulated the highest root growth (79.86 and 72.84 mm). For non-sterile soil, it was found that the mixing of SRS 4 and *A. flavus*, SRS 4 and *A. parasiticus* induced the shoot growth *A. parasiticus* with the lengths of 77.09 and 68.48 mm, respectively whereas the mixing of TISTR 3167 and *A. flavus*, KMC 5 and *A. parasiticus* induced the root growth (112.78 and 73.27 mm). Isolate SRS 4 also gave the highest fresh weight and dry weight of peanut seedlings in both sterile and non-sterile soil. When percent of root possession was examined, the result indicates that among all isolates of *Trichoderma* spp. mixing *A. flavus*

or *A. parasiticus*, isolate SRS 4 showed the highest possession of 60% in sterile soil whereas isolate TISTR 3167 gave the highest root possession of 40% in non sterile soil. From the morphology studies, isolate SRS 4 was similar to *Trichoderma viride* and isolate SRS 4 was similar to *Trichoderma atroviride*.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษา รวมทั้งคำสอนจากท่าน รศ.ดร. คุณณี ฐนะบริพัฒน์ และ รศ. นิพนธ์ วิจารณ์ วิทยานิพนธ์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่าน และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. อุ๋นเรื่อน เพชรวัลย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และดร. ปราโมทย์ สิริโรจน์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาใช้เวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ชี้แนวทาง รวมทั้งให้ข้อคิดเห็น และ ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการทำและการเขียนวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชา เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งร่างกาย แรงใจตลอดการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อสมนึก และ คุณแม่อมรรณ เพชรทิพย์ ที่คอยสนับสนุนทั้งกำลังใจและทุนทรัพย์ พร้อมทั้งเข้าใจและห่วงใยข้าพเจ้าตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขออุทิศให้แต่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ดวงกมล เพชรทิพย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญรูป.....	XI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ.....	3
2.2 ลักษณะของเชื้อราในกลุ่ม <i>Aspergillus</i> sp. และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ.....	3
2.3 สาเหตุของการปนเปื้อนของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. ในพืชต่าง ๆ.....	5
2.4 การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อรา <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร โดยการควบคุมทางชีวภาพ.....	6
2.4.1 สายพันธุ์ของเชื้อรา <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน.....	6
2.4.2 แบคทีเรีย.....	7
2.4.3 เชื้อรา.....	7
2.5 การจำแนกเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	7
2.6 กลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp.	8
2.6.1 การเป็นปรสิตและการสร้างเอนไซม์บางชนิด.....	9
2.6.2 การสร้างสารปฏิชีวนะและสารทุติยภูมิ	10
2.6.3 การเจริญแบบแข่งขัน	10

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7 การควบคุมทางชีวภาพของเชื้อราก่อโรคโดย <i>Trichoderma</i> sp.	11
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	12
3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	12
3.1.1 เชื้อรา	12
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	12
3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	13
3.2 วิธีการวิจัย.....	15
3.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp.....	15
3.2.1.1 การเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อการทดสอบ.....	15
3.2.1.2 การแยกสปอร์เดี่ยว.....	15
3.2.1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	15
3.2.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในดิน โดย <i>Trichoderma</i> spp.	16
3.2.3 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ที่มีผลยับยั้งเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 และ <i>A. parasiticus</i> IMI 102566	17
3.2.3.1 การเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. บนเมล็ดข้าวฟ่าง.....	17
3.2.3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 และ <i>A. parasiticus</i> IMI 102566 ในดินและบริเวณ รากของถั่วลิสง.....	17
3.2.3.3 การตรวจนับจำนวนเชื้อราในดินและต้นถั่วลิสง	18
3.2.3.4 การหาความยาวยอดและราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของ ต้นถั่วลิสง	19
3.2.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ	19
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	21
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp.	21

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยกล้องจุลทรรศน์ (Light Microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)	22
4.1.2 ผลการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่าง ๆ บนอาหาร PDA	28
4.1.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ SNA	29
4.2 ผลการควบคุมเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 และ <i>A. parasiticus</i> IMI 102566 ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ.....	31
4.3 ผลการควบคุมเชื้อรา <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> โดยเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 บริเวณรากต้นถั่วลิสง	33
4.3.1 ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp., <i>A. parasiticus</i> และ <i>A. flavus</i> ในดินฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อ	33
4.3.2 ผลของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp., <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> ต่อการเจริญของต้นถั่วลิสง	38
4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	45
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	47
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก ก	54
ภาคผนวก ข	56
ภาคผนวก ค	61
ภาคผนวก ง	63
ประวัติผู้เขียน	75

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 เชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. สายพันธุ์ต่าง ๆ	10
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ.....	29
4.2 ผลการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลตต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยใช้จานเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร.....	30
4.3 ผลของอุณหภูมิและชนิดของอาหารต่อการเจริญของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียสหลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน	32
4.4 ผลการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในดินของ <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ, <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i>	33
4.5 ผลของปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4, <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> ในดินรอบรากจากต้นถั่วลิสงที่อายุ 7 วัน	38
4.6 ผลของความยาวของยอดและรากต้นถั่วลิสงที่อายุ 7 วัน ในดินผสมเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลต ต่าง ๆ, <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i>	42
4.7 ผลของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสงที่อายุ 7 วัน ในดินผสมเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซ เลตต่างๆ, <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i>	44
4.8 เปอร์เซ็นต์การครอบครองรากถั่วลิสงของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลตต่างๆ เปรียบเทียบกับเชื้อรา <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i>	45
ค 1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญในดินตามเอกสารการรับรองของกรมวิชาการเกษตร.....	61
ค 2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญในดิน.....	62
ง 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ, <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> เมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ.....	63
ง 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวยอดต้นถั่วลิสงที่มีผลมาจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซ เลตต่างๆ และ <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> โดยเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ ผ่านการฆ่าเชื้อ.....	65
ง 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวรากต้นถั่วลิสงที่มีผลมาจากเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซ เลตต่างๆ และ <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> โดยเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ ผ่านการฆ่าเชื้อ.....	67

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่

หน้า

ง 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักสดของต้นถั่วลิสงที่มีผลมาจากผสมเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ และ <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> โดยเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ.....	69
ง 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสงที่มีผลมาจากผสมเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ และ <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> โดยเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ.....	71
ง 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของต้นถั่วลิสงที่มีผลมาจากผสมเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ และ <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> โดยเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ.....	73

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะโคโลนีและโคเนียมของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp.	5
4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต TISTR 3167	23
4.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต KMC 5	24
4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต SRS 4	26
4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต SCP III	27
4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต SCP II	28
4.6 กราฟเปรียบเทียบปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ เปรียบเทียบกับ <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> ในดินที่ระยะเวลาบ่มเชื้อต่างกัน.....	34
4.7 กราฟเปรียบเทียบปริมาณเชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i>	36
4.8 กราฟเปรียบเทียบปริมาณเชื้อรา <i>A. flavus</i> และ <i>A. parasiticus</i> ที่เลี้ยงร่วมกับ เชื้อรา <i>Trichoderma</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ	36
4.9 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของต้นถั่วลิสงที่ระยะเวลา 7 วัน ในกระถางปลูก.....	40
4.10 แสดงลักษณะของยอดและรากต้นถั่วลิสงที่ระยะเวลา 7 วัน	41
4.11 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>Trichoderma</i> sp. ไอโซเลต TISTR 3167 ซึ่งมีการเจริญที่บริเวณผิวของราก ถั่วลิสง.....	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

การควบคุมเชื้อราที่ก่อโรค หรือ เชื้อราที่มีการปนเปื้อนและส่งผลเสียต่อผลผลิตทางการเกษตรนั้นมีหลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี ยากำจัดเชื้อราในดิน หรือ การจัดการในระหว่างการเพาะปลูก ก่อน และ หลังการเก็บเกี่ยว รวมทั้งกระบวนการในระหว่างการเก็บรักษา เพื่อลดความเสียหายที่เกิดกับผลผลิต โดยส่วนใหญ่แล้วเกษตรกรจะนิยมใช้สารเคมี เพื่อควบคุมหรือกำจัดเชื้อราที่มีการปนเปื้อนในดิน ก่อนการเพาะปลูกแต่สารเคมีเหล่านั้น เมื่อมีการใช้ในพื้นที่เดิมเป็นเวลานานจะมีการสะสม และอาจส่งผลต่อคุณภาพของดิน และส่งผลต่อผลผลิตทางการเกษตรในพื้นที่นั้น ในปัจจุบันการใช้วิธีการทางชีวภาพมีบทบาทสำคัญ เนื่องจากมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม หรือ พื้นที่การเกษตรน้อย เชื้อราที่มีคุณสมบัติเป็นสารควบคุมทางชีวภาพ (biological control agents : BCAs) มีหลายชนิดซึ่งสามารถที่จะคัดแยกได้จากดินธรรมชาติแหล่งต่างๆ หรือ สามารถคัดแยกได้จากพื้นที่ปลูกพืชชนิดต่างๆ ได้ โดย เชื้อราที่คัดแยกได้นั้นจะมีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) กับเชื้อราที่ก่อโรคพืช หรือ เชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในพื้นที่ปลูกพืช

สารควบคุมทางชีวภาพ นิยมนำมาใช้ควบคุมเชื้อก่อโรคพืช เพราะไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในสภาพแวดล้อม ซึ่งมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่แยกได้จากดิน เชื้อราสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการป้องกันและควบคุมเชื้อก่อโรคพืชได้ ถึงแม้เชื้อราสายพันธุ์นี้จะอยู่ในดินที่มีสภาพแตกต่างกันก็ตาม (Griffin, 1994) เชื้อรา *Trichoderma* sp. ถูกนำมาศึกษากันอย่างแพร่หลายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางการค้า เช่น ใช้ควบคุมศัตรูพืช เป็นปุ๋ยชีวภาพ ช่วยปรับปรุงดิน และใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ Benitez et al. 2004 รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. มีกลไกในการควบคุมเชื้อราที่ก่อโรคพืชหลายประเภท เช่น การเป็นไมโคปรสิต (mycoparasitism), การเจริญแบบแข่งขัน (competition for nutrient) การสร้างสารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ (antibiotic and cell wall degrading enzyme) รวมทั้งถึงกลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในพืช (plant defense mechanism) นอกจากนี้มีการศึกษาถึงการนำเชื้อรา *Trichoderma* sp. ซึ่งแยกได้จากดินและแปลงทดลองที่มีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน เช่น *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* โดยเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) จะก่อให้เกิดปัญหาต่อพืชผลทางการค้า เช่น ถั่วลิสง ฝ้าย ข้าวฟ่างและ

ข้าวโพด สาเหตุของการปนเปื้อนเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซินนี้เกิดขึ้นในระหว่างการปลูก ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา และการขนส่ง (Abbas, 2005)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ที่ปนเปื้อนในดิน รวมทั้งศึกษาผลของเชื้อราเหล่านี้ต่อการเจริญของต้นถั่วลิสง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus*

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่สามารถลดปริมาณของ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ในดิน

1.2.3 เพื่อศึกษาถึงผลของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ ต่อการเพาะปลูกต้นถั่วลิสงในกระถาง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

การทดลองนี้เป็นการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่คัดเลือกได้ ศึกษาความสามารถของเชื้อ *Trichoderma* spp. ต่อการเจริญแบบแข่งขันและการยับยั้งเชื้อ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ในดิน ศึกษาความสามารถของเชื้อ *Trichoderma* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ ต่อการส่งเสริมการเจริญต้นถั่วลิสง รวมทั้งศึกษาความสามารถของเชื้อ *Trichoderma* sp. ต่อการควบคุมปริมาณของเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในสภาพการทดลองในกระถาง และศึกษาความสามารถในการครอบครองรากของเชื้อ *Trichoderma* spp. เปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* บนอาหาร PDA

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

1.4.2 สามารถนำเชื้อรา *Trichoderma* sp. มาใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในแปลงเพาะปลูก หรือในผลิตผลทางการเกษตร

บทที่ 2

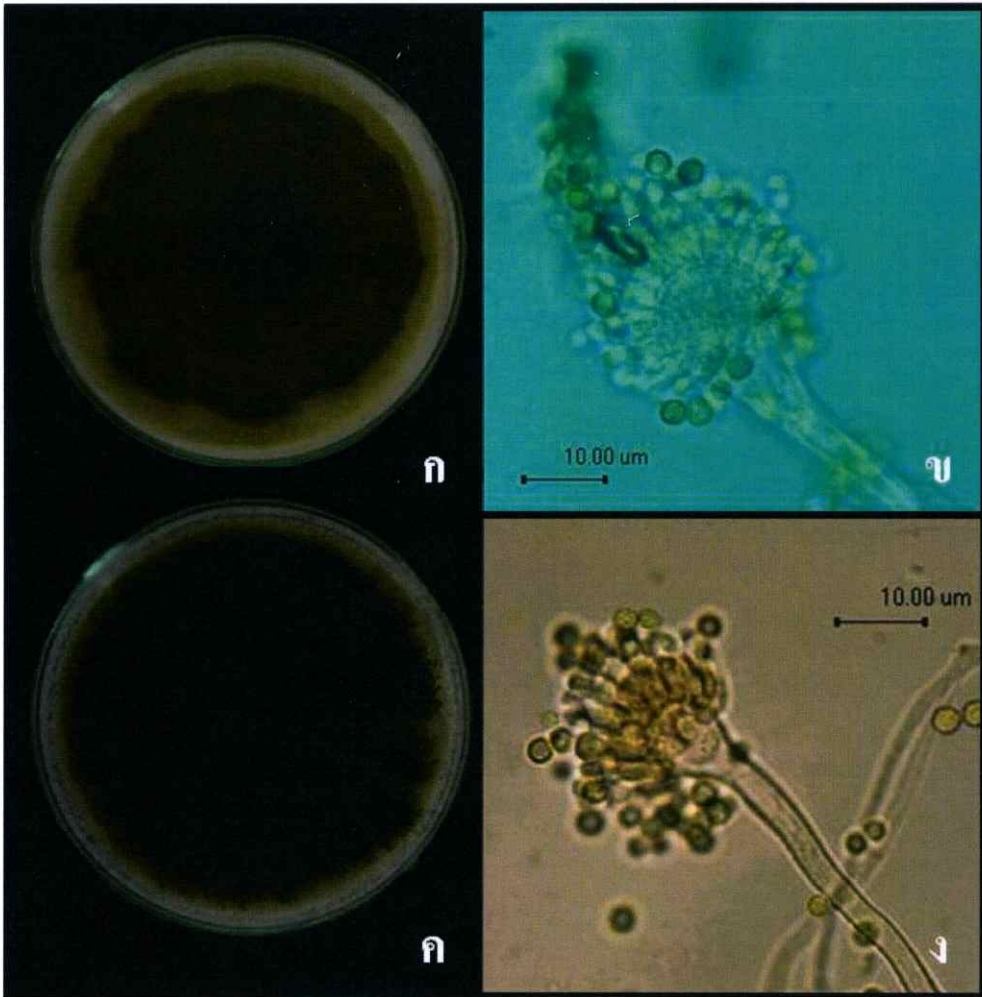
หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ

เชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ *Aspergillus flavus* Link และ *A. parasiticus* Speare นอกจากนี้ยังมีเชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์อื่น ๆ ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ Ehrlich et al. (2007) ได้รายงานเกี่ยวกับเชื้อราที่มีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินที่พบในประเทศไทยจากภูมิภาคต่าง ๆ นอกเหนือจาก *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยพบว่า *A. nomius* และ *A. pseudotamarii* เป็นเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินและปนเปื้อนในพืชผลเกษตร ได้แก่ ข้าวโพด ฝ้าย และ ถั่วลิสง โดยส่วนใหญ่พบในพื้นที่เขตร้อนชื้น ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus* sp. เป็นเชื้อราที่กระจายตัวอยู่ในดิน ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนในพืช และ มีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินสะสมอยู่ในพืชนั้นๆ และเชื้อรา *A. flavus* เป็นเชื้อราที่มีผลรุนแรงต่อเมื่อปนเปื้อนในพืช เนื่องจากมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด บี 1 และ บี 2 ส่วนเชื้อรา *A. parasiticus* มีความรุนแรงต่อพืชน้อยกว่า แต่มักพบการปนเปื้อนในเมล็ดถั่วลิสงมากกว่า และมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด บี 1 บี 2 จี 1 และ จี 2 เมื่อมีการปนเปื้อนของเชื้อราในกลุ่มนี้ทั้งในผลผลิตทางการเกษตรที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารของคนและสัตว์จะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่าง ๆ ในคน เช่น มะเร็งตับ เป็นต้น หากมีการปนเปื้อนในอาหารสัตว์ก็จะส่งผลให้การเจริญเติบโตของสัตว์นั้น ๆ มีความผิดปกติ (Abbas, 2005)

2.2 ลักษณะของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* sp. และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ

เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* เป็นเชื้อราใน Class deuteromycetes (form-class deuteromycetes) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage) ลักษณะความแตกต่างของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* sp. แยกออกจากกันค่อนข้างยาก แต่สามารถใช้วิธีการทางอณูชีวโมเลกุลเพื่อการจำแนกได้ หรือสังเกตสีของโคนิเดีย และผนังของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คือ *A. flavus* มีโคโลนีสีเหลือง เมื่ออายุมากขึ้นมีเขียวอ่อน โคนิเดียมีผิวเรียบ ขณะที่ *A. parasiticus* โคนิเดียเป็นสีเขียวขี้ม้า และโคนิเดียมีผิวขรุขระ (Griffin, 1994) ดังแสดงในรูปที่



รูปที่ 2.1 ลักษณะโคโลนีและโคนีเดียของเชื้อรา *Aspergillus* sp.

(ก) *A. flavus* IMI 242684

(ข) โครงสร้างของ *A. flavus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

(ค) *A. parasiticus* IMI 102566

(ง) โครงสร้างของ *A. parasiticus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

การปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ในถั่วลิสงมักมีความรุนแรงในช่วงหน้าแล้งหรือช่วงที่มีอุณหภูมิในดินสูง ทำให้เกิดความเสียหายกับฝักถั่ว และมีผลต่อปริมาณผลิตผลในพื้นที่ปลูก รวมทั้งมีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดหลังการเก็บเกี่ยว Abbas (2005) ได้รายงานเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซิน อยู่ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ค่า a_w (water availability) เท่ากับ 0.99 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ที่ค่า a_w เท่ากับ 0.95 นอกจากนี้ในผลิตผลทางการเกษตรต่างกัน สามารถคัดแยกเชื้อราใน *Aspergillus* sp. ได้ต่างกัน โดยใน

ข้าวโพด พบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ร้อยละ 10 เมื่อเปรียบเทียบกับ *A. parasiticus* ในถั่วลิสง ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญอยู่รอดในดินได้ โดยอยู่ในลักษณะของโคนีเดีย (conidia) สเคลอโรเทีย (sclerotia) หรือ เส้นใย (hypha) โดยศึกษาปริมาณของเส้นใยและโคนีเดียที่อยู่ในดินทั้งโดยตรงและโดยอ้อมจากวิธีการ dilution plating แต่เนื่องจากสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus* sp. สามารถแพร่กระจายไปได้ในบริเวณกว้าง ดังนั้นการศึกษา ปริมาณของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ในดินด้วยวิธี dilution plating สามารถรายงาน โอกาสของการปนเปื้อนในดิน และการใช้สารอาหารที่อยู่ในดินนั้นของเชื้อราดังกล่าว โคนีเดียและสเคลอโรเทียของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* สามารถเจริญอยู่ในดินได้แตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อราทั้ง *A. flavus* และ *A. parasiticus* สามารถสร้างสเคลอโรเทียได้ และยังเป็นโครงสร้างของเชื้อราที่สามารถต้านทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญได้ดี

2.3 สาเหตุของการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ในพืชต่าง ๆ

เชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* เป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างสเคลอโรเทียที่ทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมและสามารถเจริญในดินได้ ดังนั้น ปริมาณของเชื้อรานี้ในดินจะเป็นสาเหตุหลักในการปนเปื้อนหรือการเข้าทำลายพืชบางชนิดที่ไม่สามารถต้านทานเชื้อรานี้ รวมทั้งมีการสะสมของสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งลักษณะของพืชที่มีฝักอยู่ในดิน ได้แก่ ถั่วลิสง พบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ง่าย ส่วนพืชที่มีฝัก หรือ ผล อยู่เหนือดินนั้น พบว่า มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้โดยการพัดพาของลม หรือ มีแมลงเป็นพาหะ ได้แก่ ข้าวโพด ฝ้าย หรือ ถั่วชนิดต่าง ๆ เป็นต้น และเมื่อเกิดการปนเปื้อนของพืชที่มีผลหรือฝักอยู่เหนือดินก็เป็นการยากที่จะวิเคราะห์หรือหาสาเหตุของการปนเปื้อนว่า เกิดจากปริมาณเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่อยู่ในดิน หรือ เกิดจากการแพร่กระจายของสปอร์ในพืชที่เกิดการปนเปื้อนแล้ว แต่สำหรับพื้นที่เพาะปลูกที่มีการปนเปื้อนจากซากพืชที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* นั้น จะเป็นการสะสมและเพิ่มปริมาณของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในดิน หากไม่มีวิธีการจัดการพื้นที่ปลูกที่เหมาะสม เช่น การใช้ยาฆ่าเชื้อราหรือการใช้สารควบคุมทางชีวภาพ สำหรับการเกิดสปอร์ หรือ การเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในพื้นที่ปลูกนั้น เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดปัญหาการสะสมหรือการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินอย่างต่อเนื่อง แต่การจัดการโดยใช้สารเคมีทำให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้างสะสมในดินส่งผลต่อปริมาณผลผลิตในพื้นที่นั้นได้

นอกจากนี้ซากพืชที่มีการปนเปื้อนของ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ที่อยู่ในบริเวณหน้าดิน เมื่อมีการแพร่กระจายโดยลมก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่ง นอกจากนี้แมลงที่อยู่ในดินก็

เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายและเกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ต่อฝักของพืชที่แมลงมากัดกิน (Abbas, 2005) ดังนั้นการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ในผลผลิตทางการเกษตร และมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ เป็นปัญหาที่ต้องหาวิธีการในการควบคุม มีหลายงานวิจัยที่สนใจศึกษาวิธีการทางชีวภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่อยู่ในดิน โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีกลไกในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

2.4 การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในผลิตผลทางการเกษตรโดยการควบคุมทางชีวภาพ

เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อราสายพันธุ์ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน และ เชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็นจุลินทรีย์ที่นักวิจัยสนใจนำมาศึกษา เพื่อการควบคุมปริมาณ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ด้วยวิธีการทางชีวภาพ

2.4.1 สายพันธุ์ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

Domer *et al.* (2003) ได้ศึกษาการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยสายพันธุ์ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (non-aflatoxigenic strain) โดยการพัฒนาวิธีการทางชีวภาพ ได้แก่ วิธีที่ 1 : การเพิ่มปริมาณสปอร์โดยใช้ข้าว (solid-state fermentation) วิธีที่ 2 : การเคลือบสปอร์ของเชื้อราด้วย Pesta[®] และ วิธีที่ 3 : การเคลือบสปอร์ของเชื้อราในเม็ดแป้งที่ผ่านการ pregelatinized พบว่า ลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยลดลงได้ถึงร้อยละ 92 และยังคงปริมาณของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ที่ปนเปื้อนในดิน

Abbas *et al.* (2006) รายงานว่า *Aspergillus flavus* Link CT3 และ K49 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินสามารถลดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวโพด ตั้งแต่ปี 2001 ถึง 2004 โดยสูตรที่ใช้ในการควบคุมในดิน คือ สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน F3W4 ผสมในดินร่วมกับ *Aspergillus flavus* Link CT3 และ K49 หรือ ไอโซเลต CT3 หรือ K49 กับ F3W4 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่า ไอโซเลต K49 สามารถควบคุมการปนเปื้อนของ *Aspergillus* sp. ที่ปนเปื้อนในข้าวโพดได้

Domer และ Horn (2007) ได้ศึกษาผลของการใช้สายพันธุ์ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน เพื่อควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* พบว่าสามารถลดปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในดินได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งลดลงถึงร้อยละ

91.6 ซึ่งเชื้อรา *A. flavus* ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมีประสิทธิภาพมากกว่า เชื้อรา *A. parasiticus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

2.4.2 แบคทีเรีย

Lillehoj *et al.* (1967) ศึกษาความสามารถในการกำจัดสารอะฟลาทอกซิน B1 จากอาหารเหลวโดยเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณแบคทีเรีย เท่ากับ 1.0×10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และใส่อะฟลาทอกซิน บี17.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า สามารถกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์

Nesci *et al.* (2005) ได้คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ จากดินในแปลงปลูกข้าวโพด เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง เชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* RCB 55, *Amphibacillus xylanus* RCB 27, *B. subtilis* RCB 90 และ *Sporolactobacillus inulinus* RCB 196, *B. subtilis* สายพันธุ์ RCB 6, RCB 55 และ RCB 90 รวมทั้ง *Pseudomonas solanacearum* RCB 110 สามารถยับยั้งการสะสมของสารอะฟลาทอกซินได้

Thanaboripat *et al.* (1997) ศึกษาถึงการใส่แบคทีเรีย *Streptococcus lactis* ในการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* ในอาหารเหลว Lablemco tryptone broth (LTB) พบว่าสามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินได้ และเมื่อเพาะเลี้ยง *S. lactis* เป็นเวลา 3 วันก่อนการใส่เชื้อรา *A. parasiticus* พบว่า เชื้อราผลิตอะฟลาทอกซินได้น้อยลง

2.4.3 เชื้อรา

Calistru *et al.* (1997) ได้ศึกษาสารสกัดจากน้ำหมักของเชื้อรา *Trichoderma viride* และ *Trichoderma harzianum* เพื่อยับยั้ง *Fusarium moniliforme* และ *Aspergillus flavus* พบว่าระดับของการยับยั้งขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเหลว ซึ่งการยับยั้งเกิดจากการหลั่งสารทุติยภูมิ หรือ เอนไซม์ หรือ สารปฏิชีวนะบางชนิด โดย *T. viride* มีการสร้างสารประเภท amylolytic, pectinolytic, proteolytic และ cellulolytic activity ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราชนิดอื่นได้

Thanaboripat *et al.* (2003) ศึกษาถึงการใส่เห็ดหลินจือ *Ganoderma lucidum* ในรูปเส้นใยในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดบนเมล็ดข้าวฟ่างเป็นเวลา 3 วันขึ้นไป ก่อนใส่เชื้อรา *A. parasiticus* พบว่าเชื้อราไม่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้

2.5 การจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Trichoderma sp. เป็นเชื้อราที่พบทั่วไปในดิน และไม่พบว่ามีกรเจริญบนพืชที่มีชีวิต จัดจำแนกอยู่ใน sub-division Deuteromycotina, form-class Hyphomycetes, form-family

Moniliaceae มี teleomorph ระยะสมบูรณ์ (perfect stage) อยู่ใน genus *Hypocrea* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราใน class Ascomycetes, order Hypocreales (Samuels, 1996) ลักษณะของ conidiophore มีสีจางหรือไม่มีสี แตกแขนงมากแต่ไม่เป็นแบบ verticillate พบ phialide เกิดเดี่ยวๆ เป็นกลุ่ม รูปร่างโคนเดี่ยว (phialospore) เป็นแบบเซลล์เดี่ยวรูปไข่ ไม่มีสีเกิดเป็นกลุ่มเล็ก ๆ ที่ปลาย phialide โคลนีเจริญรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป และมีสีเขียวของกลุ่ม conidium (Barnett และ Hunter, 1972)

เชื้อราที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้งทางสัณฐานวิทยา และความเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ คือ เชื้อราในจีนัส *Gliocladium* sp. โคลนีเจริญรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อและได้โคลนีไม่มีการเปลี่ยนสีอาหาร สร้างสปอร์สีเขียวเป็นวงซ้อนกัน phialide เกิดที่ปลายของ conidiophore คล้ายเชื้อรา *Trichoderma* sp. แต่มีการจัดเรียงตัวคล้ายเชื้อรา *Penicillium* sp. phialospore มีผนังเรียบ สีเขียว เกิดรวมกันเป็นกลุ่มคล้ายลูกบอลบน phialide (Barnett และ Hunter, 1972)

ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *T. harzianum* Rifai โคลนีเจริญเร็ว เส้นใยมีผนังกัน มีสีจางหรือไม่มีสี ผนังเรียบ แตกแขนง มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ 1.5-12 ไมโครเมตร สร้าง clamydospore ระหว่างเส้นใยมีลักษณะกลม ผนังเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 -12 ไมโครเมตร ลักษณะ conidiophore ตรง แตกแขนงมาก รวมกันเป็นกลุ่มหลวม ๆ phialide เกิดที่ปลายแขนงของ conidiophore มีลักษณะเรียวยาว มีขนาด 8 x 2.5 ไมโครเมตร phialospore มีลักษณะค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ บริเวณฐานกว้าง ผนังเรียบ มีสีเขียวซีด มีขนาด (2.8-3.2) x (2.5-2.8) ไมโครเมตร (Rifai, 1969) จากตารางที่ 2.1 แสดงให้เห็นถึงตัวอย่างของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่แบ่งออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ตามลักษณะการเรียงตัวของ conidiophore ซึ่งทำให้ง่ายต่อการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp.

2.6 กลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

กลไกในการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ได้แก่ การเป็นปรสิตและการสร้างเอนไซม์บางชนิด การสร้างสารปฏิชีวนะและสารทุติยภูมิ และความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ในแหล่งที่อยู่เดียวกัน (Vinale et al., 2008a)

ตารางที่ 2.1 เชื้อรา *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ต่าง ๆ

section	section	section	section
<i>Trichoderma</i>	<i>Pachybasium</i>	<i>Longibrachiatum</i>	<i>Hypocreanum</i>
<i>T. viride</i>	<i>T. crassum</i>	<i>T. citrinoviride</i>	<i>T. lacteum</i>
<i>T. atroviride</i>	<i>T. croceum</i>	<i>T. longibrachiatum</i>	
<i>T. aureoviride</i>	<i>T. fasciculatum</i>	<i>T. parceramosum</i>	
<i>T. harzianum</i>	<i>T. fertile</i>	<i>T. pseudokoningii</i>	
<i>T. koningii</i>	<i>T. flavofuscum</i>	<i>T. reesii</i>	
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>T. ghanense</i>	
anamorph	anamorph	<i>T. satunisporum</i>	
of <i>Hypocrea vinosa</i>	of <i>Hypocrea gelatinosa</i>		
	<i>T. hamatum</i>		
	<i>T. inhamatum</i>		
	<i>T. longipile</i>		
	<i>T. minutisporum</i>		
	<i>T. oblongisporum</i>		

ที่มา : Griffin, 1994.

2.6.1 การเป็นปรสิตและการสร้างเอนไซม์บางชนิด (Mycoparasitism and lytic enzyme)

เชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยส่วนใหญ่พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นปรสิตกับเชื้อราชนิดอื่น แต่การศึกษาการเป็นปรสิตต่อเส้นใยราอื่น ๆ หรือเซลล์พืชทำได้ยากต้องอาศัยการย้อมเซลล์แบบ fluorescence imaging และ differential staining เพื่อศึกษา หรือสังเกตความสัมพันธ์เส้นใยราและผิวราก (Verma *et al.*, 2007a) ในกระบวนการเป็นปรสิตของเชื้อรานี้ประกอบด้วยหลายกลไก ได้แก่ การจดจำชนิดของรากพืช หรือ เส้นใยเชื้อราอื่น ๆ การเข้าทำลาย การแทงของเส้นใย รวมทั้งทำให้เซลล์ของเหยื่อตาย ซึ่งในกระบวนการนี้ เชื้อรา *Trichoderma* sp. มีการหลั่งเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์ (เช่น cellulase , chitinase , glucanase และอื่น ๆ) เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราชนิดอื่นที่เป็นเชื้อราก่อโรค ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* sp. จะสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเส้นใยของเชื้อราที่ก่อโรค โดยมีกลไกในการจดจำโมเลกุลของสารที่ถูกย่อย หลังจากการสลายด้วยเอนไซม์ (Verma *et al.*, 2007a)

El-katany *et al.* (2001) รายงานว่า *Trichoderma* sp. Rifai (T24) สามารถควบคุมเชื้อราที่ก่อโรค *Sclerotium rolfii* โดยการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* sp. Rifai (T24) ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ จากนั้นใช้สารสกัดจากน้ำหมักเชื้อราในเพื่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfii* ซึ่งจากการตรวจสอบน้ำหมักพบกิจกรรมของเอนไซม์ extracellular chitinase และ β -1,3-glucanase

Inglis และ Kawchuk (2002) ศึกษาเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ (cell wall degrading enzyme) จากเชื้อรา 14 ชนิด ได้แก่ *Chaetomium globosum*, *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium roseum*, *Myrothecium verrucaria*, *Talaromyces flavus* และ *Trichoderma viride* ซึ่งมีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา oomycete (*Pythium ultimum*), ascomycete (*Fusarium equisetii*) และ basidiomycete (*Rhizoctonia solani*) โดยเป็นเอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้ คือ carboxymethyl cellulase, β -glucanase และ cellulase

Okemoto *et al.* (2002) ได้จำแนกและคัดแยกเอนไซม์ endo- β -(1-6)-galactanase จาก *Trichoderma viride* และศึกษาความสามารถในการย่อยสลายผนังเซลล์ของรากพืชที่มีสารประกอบประเภท arabinogalactan protein รวมทั้งมีการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา ปฏิสัมพันธ์กับรากพืช เอนไซม์ที่พบ ได้แก่ β -glucanase, carboxymethyl cellulase และ chitinase ซึ่งการศึกษานี้พบเอนไซม์และกระบวนการย่อยผนังเซลล์ที่มีความซับซ้อนของเอนไซม์ดังกล่าว

2.6.2 การสร้างสารปฏิชีวนะและสารทุติยภูมิ (Antibiotic and secondary metabolite)

การสร้างสารปฏิชีวนะเป็นกลไกหนึ่งของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่สร้างในระหว่างการเจริญ โดยเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดอื่นที่เจริญอยู่บริเวณรอบๆ โคลนินของเชื้อรา *Trichoderma* sp. สารที่สร้าง ได้แก่ สารระเหย (volatile) เอนไซม์บางชนิด (extracellular enzyme) และสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) โดยสารปฏิชีวนะที่สร้างจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. นั้นมีการศึกษาถึง ประสิทธิภาพต่อเชื้อก่อโรคหลายชนิดด้วยกัน (Verma *et al.*, 2007b) การสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีหลายประเภท ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่มีสมบัติการระเหย (volatile antibiotic) เช่น 6-pentyl- α -pyrone (6PP) และสารอนุพันธ์ของ isocyanide นอกจากนี้ยังมีสารประกอบที่ละลายน้ำได้ (water-soluble compound) เช่น heptalidic acid, koninjac acid หรือ peptaibols (Vinale *et al.*, 2008a)

2.6.3 การเจริญแบบแข่งขัน (Competition with pathogen and soil microbial community)

Trichoderma sp. เป็นเชื้อราที่สามารถเจริญแข่งขันในการใช้แหล่งอาหารที่มีความหลากหลาย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารอาหารชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยการเจริญ รวมทั้งมีความสามารถในการเข้าครอบครองรากได้เร็วกว่าเชื้อสาเหตุโรคพืชในบริเวณแหล่งที่อยู่เดียวกัน และนิยมใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ เพื่อควบคุมเชื้อราก่อโรคพืช

Benitez *et al.* (2004) รายงานว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถควบคุมเชื้อราที่ก่อโรคนองุ่น โดยการครอบครองเนื้อเยื่อส่วนที่เจริญเป็นดอก ได้ดีกว่าเชื้อราที่ก่อโรค (*Botrytis cinerea*) รวมทั้งสามารถกำจัดเชื้อก่อโรคนองุ่นในส่วนที่เกิดการติดเชื้อได้ นอกจากนี้ยังพบว่า มีการใช้ประโยชน์จากกลไกในการเจริญแข่งขันของเชื้อรา *T. harzianum* เพื่อควบคุม *Fusarium oxysporum* และเชื้อรา *Trichoderma* sp. ยังสามารถใช้สารอาหารจากดิน และสามารถเจริญแบบแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นในดินได้อีกด้วย ดังนั้น จึงเป็นเหตุผลที่นิยมนำ เชื้อรานี้มาใช้เป็นตัวควบคุมเชื้อราที่ก่อโรคนองุ่นหลายชนิด

2.7 การควบคุมทางชีวภาพของเชื้อราที่ก่อโรคโดย *Trichoderma* sp.

Lewis และ Lumsden (2001) รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma hamatum* (TRI-4) และ *T. virens* (GI-3) ลดปริมาณของเชื้อราที่ก่อโรค damping-off ของพืชชนิดต่างๆ เช่นมะเขือแตงกวา และกะหล่ำปลี ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* (R-23) จากการทดลองพบว่า สายพันธุ์ *T. virens* (GI-3) มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อรา *R. solani* ได้มากกว่า *T. hamatum* (TRI-4) โดยเชื้อราทั้งสองชนิดนี้ยังลดปริมาณเชื้อรา *R. solani* สายพันธุ์อื่น (195, NG-2, DPR-1) ได้อีกด้วย

Tsahouridou และ Thanassouloupoulos (2002) ศึกษา *Trichoderma koningii* เพื่อควบคุมและยับยั้ง *Sclerotium rolfsii* Sacc. ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคนองุ่น damping-off ในมะเขือเทศ ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ และสามารถแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และเมื่อทดสอบในดินพืชมีการเจริญ โดยการใส่เมล็ดพืชที่มีการเคลือบเชื้อรา *Trichoderma* เมื่อตรวจสอบการงอกของเมล็ด ความสูงของต้น น้ำหนักสด พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบเชื้อรา *Trichoderma* sp. ($P \leq 0.05$)

Thangavelu *et al.* (2003) ได้คัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากบริเวณรากของกล้วย (*Musa* sp.) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ซึ่งก่อให้เกิดโรคนองุ่น wilt ในกล้วย พบว่า *T. harzianum* ไอโซเลต Th-10 เป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย และเมื่อใส่ใบกล้วยแห้งเป็นซับสเตรดเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ของไอโซเลต Th-10 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อราเท่ากับ 4.6×10^{32} CFU ต่อกรัมของใบกล้วย

Batta (2003) ได้ศึกษาการใช้ปริมาณของโคโคนีเดียที่เหมาะสมของ *T. harzianum* เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Botrytis cinerea* ที่ก่อโรค apple gray mold พบว่า สามารถลดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลที่เกิดจากเชื้อรา *B. cinerea* ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อหลังจากฉีดพ่นด้วยสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *T. Harzianum* เป็นเวลา 5 วัน และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. cinerea* ได้อย่างมีประสิทธิภาพหลังจากฉีดพ่นเป็นเวลา 10 วัน

Perello *et al.* (2003) รายงานผลของการใช้ *Trichoderma harzianum* (จำนวน 9 ไอโซเลต) *T. aureoviride* (จำนวน 2 ไอโซเลต) และ *T. koningii* (จำนวน 2 ไอโซเลต) เพื่อเป็นสารควบคุมทางชีวภาพของเชื้อรา *Drechslera tritici-repentis* ทั้งในห้องทดลองและเรือนกระจก พบว่า *Trichoderma* sp. สามารถลดการเจริญของเส้นใยของ *D. tritici-repentis* ได้อย่างมีนัยสำคัญ และผลการทดลองในเรือนกระจกพบว่า *Trichoderma* spp. ไอโซเลต Th5, Th11, Th 13, Tk 6, Tk 1, Th 2 และ Th 81 สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Roberts *et al.* (2005) ศึกษาการใช้ *Trichoderma virens* ไอโซเลต GI-3 และ GI-21 เพื่อยับยั้งการก่อโรคของเชื้อรา *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* และ *Meloidogyne incognita* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจของแตงกวา โดย *T. virens* ไอโซเลต GI-3 และ GI-21 สามารถยับยั้งการเกิดโรค damping-off โดย *R. solani* เมื่อทดสอบในเรือนกระจก

Brewer และ Larkin (2005) เปรียบเทียบ *Trichoderma* spp. ที่คัดแยกจากแหล่งต่าง ๆ กับ *Trichoderma virens* (SoilGard[®]) และ *T. harzianum* (RootShield[®]) โดยศึกษาการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในมันฝรั่ง รวมทั้งศึกษาร่วมกับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Bacillus subtilis* และ *T. virens* จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิดร่วมกัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคได้

Rojo *et al.* (2007) คัดเลือก *T. harzianum* ITEM 3636 และ *T. longibrachiatum* ITEM 3635 เพื่อควบคุม *Fusarium solani*, ซึ่งทำให้เกิดโรค brown root rot ในถั่วลิสง โดยพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* มีประสิทธิภาพมากกว่า *T. longibrachiatum* เมื่อพิจารณาจากค่า mean disease severity index (MSI)

Singh *et al.* (2007) ศึกษาถึงการผลิต *Trichoderma harzianum* เพื่อใช้ควบคุมทางชีวภาพของโรค chickpea wilt รวมทั้งโรค collar rot ในถั่วลิสง พบว่าเมื่อใช้ใบชาเป็นซับสเตรด สามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เท่ากับ 8×10^8 CFU ต่อกรัม แต่หลังเก็บรักษา 210 วัน พบว่าปริมาณลดเหลือ 6.1×10^4 CFU ต่อกรัม และเมื่อใช้รำข้าวเป็นซับสเตรด พบว่าสามารถเพิ่ม *Trichoderma* sp. ได้เพียง 2.3×10^7 CFU ต่อกรัม แต่หลังเก็บรักษาไว้ 210 วัน มีปริมาณ *Trichoderma* sp. เท่ากับ 2.9×10^5 CFU ต่อกรัม เมื่อนำไปทดสอบในการควบคุมโรคพืชดังกล่าวสามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ

Verma *et al.* (2007b) ศึกษาการใช้น้ำเสียเพื่อเป็นซับสเตรดในการสร้างโคโคนีเดียของ *Trichoderma viride* และ การสร้างเอนไซม์เพื่อใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ โดยทดสอบกับเชื้อรา *Fusarium* sp. พบว่ามีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ได้โคโคนีเดียเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และเมื่อทดสอบในแมลง พบว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีค่าสูงสุดประมาณ 17290 ยูนิตต่อไมโครลิตร ($\text{SBU } \mu\text{L}^{-1}$) และยับยั้งการเจริญของเซลล์แมลงได้

Elad (2000) ศึกษา *Trichoderma harzianum* T39 เพื่อยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea*, *Pseudomonas cubensis*, *Sclerotinia sclerotiorum* และ *Sphaerotheca fusca* (syn. *S. fuliginea*) ในแตงกวา โดยใช้สารละลายสปอร์ควบคุมทั้งในรากและใบเพื่อควบคุมโรคราแป้ง (powdery mildew)

Kucuk และ Kivanc (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Trichoderma harzianum* และเชื้อราที่ก่อโรคในดิน ได้แก่ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium culmorum* และ *F. moniliforme* โดยการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า *T. harzianum* ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรครากกล้วย และเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มี laminarin หรือ chitin เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *T. harzianum* มีการสร้างเอนไซม์ 1,3, β -glucanase และ chitinase โดยพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในเชื้อรา *T. harzianum* T15 มากที่สุด

Miranda et al. (2005) ได้ศึกษาเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต C4, C13, C17, C30 และ C44 ในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Sclerotium cepivorum* โดยเพาะเลี้ยงในบริเวณที่มีการเพาะปลูกกระเทียม (*Allium sativum* L.) และศึกษาการเจริญภายในเนื้อเยื่อราก (endorhiza) ส่วนบริเวณรอบราก (rhizosphere) และการเจริญในดิน (soil colonization) ของเชื้อรา *T. harzianum* พบว่า สายพันธุ์ C4 เป็นเชื้อราที่มีคุณสมบัติเป็น endorhiza และ rhizosphere colonization และสายพันธุ์ C44 มีการครอบครองบริเวณรอบรากของพืชได้ดีและสามารถเจริญได้มากในดิน

Dubey et al. (2007) ได้คัดแยกเชื้อรา *Trichoderma viride*, *T. harzianum* และ *T. virens* จากพื้นที่บริเวณต่าง ๆ ในอินเดีย และทดลองประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรค เช่น โรค *Fusarium wilt* ใน chickpea (*Cicer arietinum* L.) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ดังกล่าวสามารถลดปริมาณเชื้อราที่ก่อโรคและอาการของโรค รวมทั้งส่งเสริมการงอกของเมล็ด เพิ่มความยาวของยอดและรากเมื่อทดลองในเรือนกระจก

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ทดสอบมีทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่

- *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (รหัสย่อที่ใช้ในผลการทดลอง คือ TISTR 3167)
- *Trichoderma* sp. ไอโซเลต KMC 5 แยกได้จาก แปลงปลูกข้าวโพดทดลอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (รหัสย่อที่ใช้ในผลการทดลอง คือ KMC 5)
- *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SRS 4 แยกได้จากดินปลูก แปลงปลูกสับปะรด อ.เขาสก จ.สุราษฎร์ธานี (รหัสย่อที่ใช้ในผลการทดลอง คือ SRS 4)
- *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP II แยกได้จากดินปลูก ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี (รหัสย่อที่ใช้ในผลการทดลอง คือ SCP II)
- *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP III แยกได้จากดินปลูก ไร่บัวสวรรค์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี (รหัสย่อที่ใช้ในผลการทดลอง คือ SCP III)
- *Aspergillus flavus* IMI 242684 (รหัสย่อที่ใช้ในผลการทดลอง คือ AF) และ *A. parasiticus* IMI 102566 (รหัสย่อที่ใช้ในผลการทดลอง คือ AP) จาก International Mycological Institute ประเทศอังกฤษ

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง (ภาคผนวก ก)

Water Agar (WA)

Potato Dextrose Agar (PDA)

Synthetic nutrient agar (SNA : Nirenberg, 1976)

Peptone Dextrose Rose Bengal Agar (Martin's Medium : John และ Curl, 1972)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

จานเพาะเชื้อ

พลาสติกรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง

ตู้เย็นเชื้อ (ยี่ห้อ ISSCO : Model HS 123 ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง (PG 5002; Mettler-Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (ยี่ห้อ Boeco ประเทศเยอรมัน)

เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (ยี่ห้อ KEIBA รุ่น 111-251 ประเทศญี่ปุ่น)

กล้องสเตอริโอ (บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น)

กล้องจุลทรรศน์ (CH 300 บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5600 LV ประเทศญี่ปุ่น)

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

3.2.1.1 การเตรียมสารละลายสปอร์เพื่อการทดสอบ

ทำการเชื้อเชื้อราแต่ละไอโซเลตลงในอาหาร PDA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป และนำแท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อชุดเบาๆ ที่ผิวหน้าอาหาร นำสารละลายกรองผ่านผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ชั้น จากนั้นทำให้เป็นสารละลายสปอร์โดยเติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ผสมให้เข้ากันและปรับสารละลายสปอร์แต่ละไอโซเลตให้เท่ากับ 1×10^6 สปอร์ ต่อมิลลิลิตร

3.2.1.2 การแยกสปอร์เดี่ยว

ทำการเจือจางสารละลายสปอร์ของแต่ละไอโซเลต จากข้อ 3.2.1.1 ให้เป็น 10 เท่า และนำมาเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารแข็ง Water agar (WA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสปอร์เดี่ยวของแต่ละไอโซเลตที่ได้มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

3.2.1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. แต่ละไอโซเลตตามวิธีในข้อ 3.2.1.1 จากนั้นนำมาทำให้เป็นสปอร์เดี่ยวตามวิธีในข้อ 3.2.1.2 และนำโคโลนีที่เพาะเลี้ยงได้มาศึกษาขนาดและสีของโคโลนี โคนิไดโอสปอร์ โคนิไดโอฟอร์ และเส้นใย โดยใช้

กลี้องจุลทรรศน์ และกลี้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. รวมทั้งศึกษาการสร้างสปอร์ของเชื้อราดังกล่าว บนอาหาร 2 ชนิด คือ PDA และ SNA ที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบการสร้างสปอร์และสีของโคนี้เดี่ยวจากนั้นนำข้อมูลของเชื้อรา *Trichoderma* sp. มาจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามลักษณะของ branching type ตามวิธีการของ Rifai ปี 1969 (จินตนา, 2543)

3.2.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในดินโดย

Trichoderma spp.

การทดสอบผลของการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus flavus* ในดิน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 18 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1) ไม้ใส่เชื้อ (ชุดควบคุม)

ชุดที่ 2) *Trichoderma* sp. TISTR 3167 (TISTR 3167)

ชุดที่ 3) *Trichoderma* sp. KMC5 (KMC 5)

ชุดที่ 4) *Trichoderma* sp. SRS 4 (SRS 4)

ชุดที่ 5) *Trichoderma* sp. SCP II (SCP II)

ชุดที่ 6) *Trichoderma* sp. SCP III (SCP III)

ชุดที่ 7) *A. flavus* IMI 242684 (AF)

ชุดที่ 8) *A. parasiticus* IMI 102566 (AP)

ชุดที่ 9) *Trichoderma* sp. TISTR 3167 และเชื้อ *A. flavus* IMI 242684 ในอัตราส่วน 1:1 (AF+TISTR 3167)

ชุดที่ 10) *Trichoderma* sp. KMC5 และเชื้อ *A. flavus* IMI 242684 ในอัตราส่วน 1:1(AF+KMC 5)

ชุดที่ 11) *Trichoderma* sp. SRS 4 และเชื้อ *A. flavus* IMI 242684 ในอัตราส่วน 1:1 (AF+SRS 4)

ชุดที่ 12) *Trichoderma* sp. SCP II และเชื้อ *A. flavus* IMI 242684 ในอัตราส่วน 1:1(AF+SCP II)

ชุดที่ 13) *Trichoderma* sp. SCP III และเชื้อ *A. flavus* IMI 242684 ในอัตราส่วน 1:1(AF+SCP III)

ชุดที่ 14) *Trichoderma* sp. TISTR 3167 และเชื้อ *A. parasiticus* IMI 102566 ในอัตราส่วน 1:1 (AP+TISTR 3167)

ชุดที่ 15) *Trichoderma* sp. KMC5 และเชื้อ *A. parasiticus* IMI 102566 ในอัตราส่วน 1:1 (AP+KMC 5)

ชุดที่ 16) *Trichoderma* sp. SRS 4 และเชื้อ *A. parasiticus* IMI 102566 ในอัตราส่วน 1:1 (AP+SRS 4)

ชุดที่ 17) *Trichoderma* sp. SCP II และเชื้อ *A. parasiticus* IMI 102566 ในอัตราส่วน 1:1 (AP+SCP II)

ชุดที่ 18) *Trichoderma* sp. SCP III และเชื้อ *A. parasiticus* IMI 102566 ในอัตราส่วน 1:1 (AP+SCP III)

จากนั้นทำการเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อราในแต่ละไอโซเลตตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 และนำสารละลายสปอร์ที่ได้มาปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในดินยี่ห้อดินละไว้ (ตารางที่ ค1) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปริมาณ 100 กรัม และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน จากนั้นนำมาศึกษาปริมาณของเชื้อรา โดยชั่งตัวอย่างดินตัวอย่างละ 10 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นใส่ในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ และเติมน้ำกลั่น (ผสม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายน้ำกลั่นฆ่าเชื้อผสม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จนถึงระดับความเจือจาง $1:10^6$ จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^4 ถึง 10^6 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็ง Peptone Dextrose Rose Bengal Agar เกลี่ยตัวอย่างด้วยแท่งแก้วปราศจากเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ตรวจนับจำนวนเชื้อราบนจานเพาะเชื้อ และคำนวณหาจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (Intana, 2003)

3.2.3 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่มีผลยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* IMI 102566 และ *A. flavus* IMI 242684

3.2.3.1 การเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. บนเมล็ดข้าวฟ่าง

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 100 กรัม และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำสปอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง (จิระเดช และวรรณวิไล, 2534) มาปรับให้มีความเข้มข้นของสปอร์สุดท้ายเท่ากับ 1×10^8 สปอร์ต่อกรัมเมล็ดข้าวฟ่าง และนำมาผสมกับดินเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ต่อการยับยั้ง

A. parasiticus IMI 102566 และ *A. flavus* IMI 242684 ในดินและบริเวณรากของถั่วลิสง

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* IMI 102566 และ *A. flavus* IMI 242684 ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและบริเวณรากของถั่วลิสง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 12 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดที่ 1) ไม่ใส่เชื้อ (ชุดควบคุม)

ชุดที่ 2) *Trichoderma* sp. TISTR 3167 (TISTR 3167)

ชุดที่ 3) *Trichoderma* sp. KMC5 (KMC 5)

ชุดที่ 4) *Trichoderma* sp. SRS 4 (SRS 4)

ชุดที่ 5) *A. flavus* IMI 242684 (AF)

ชุดที่ 6) *A. parasiticus* IMI 102566 (AP)

ชุดที่ 7) *Trichoderma* sp. TISTR 3167 และเชื้อ *A. flavus* IMI 242684 ในอัตราส่วน 1:1 (AF+TISTR 3167)

ชุดที่ 8) *Trichoderma* sp. KMC5 และเชื้อ *A. flavus* IMI 242684 ในอัตราส่วน 1:1 (AF+KMC 5)

ชุดที่ 9) *Trichoderma* sp. SRS 4 และเชื้อ *A. flavus* IMI 242684 ในอัตราส่วน 1:1 (AF+SRS 4)

ชุดที่ 10) *Trichoderma* sp. TISTR 3167 และเชื้อ *A. parasiticus* IMI 102566 ในอัตราส่วน 1:1 (AP+TISTR 3167)

ชุดที่ 11) *Trichoderma* sp. KMC5 และเชื้อ *A. parasiticus* IMI 102566 ในอัตราส่วน 1:1 (AP+KMC 5)

ชุดที่ 12) *Trichoderma* sp. SRS 4 และเชื้อ *A. parasiticus* IMI 102566 ในอัตราส่วน 1:1 (AP+SRS 4)

จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ที่ต้องการทดสอบในแต่ละชุดการทดลองลงในกระถางที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นิ้ว ที่มีดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการฆ่าเชื้อติดต่อกันเป็นเวลา 2 วัน) ปริมาณ 250 กรัม ผสมให้เข้ากัน และนำเมล็ดถั่วลิสงมาปลูกลงในกระถางโดยใช้เมล็ดถั่วลิสง 5 เมล็ดต่อกระถาง รดน้ำทุกวันปลูกจนครบ 7 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างดินในแต่ละชุดการทดลองมาตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* sp., *A. flavus* IMI 242684 และ *A. parasiticus* IMI 102566 บนอาหาร Peptone Dextrose Rose Bengal Agar ด้วยเทคนิค spread plate (ศุภสิทธิ์, 2543)

การตรวจนับจำนวนการเจริญของเชื้อราที่บริเวณรากของต้นถั่วลิสงทำได้โดย นำรากของต้นถั่วลิสงในแต่ละชุดการทดลองมาตัดให้มีความยาว 1 เซนติเมตร ปริมาณ 30 ชิ้น ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย Clorox (ความเข้มข้นร้อยละ 10) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นย้ายรากของต้นถั่วลิสงมาวางบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 5 นาที และนำรากของต้นถั่วลิสงที่ได้มาวางบนอาหารแข็ง PDA โดยใช้รากถั่วลิสง 5 รากต่อจานเพาะเชื้อ บ่มเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการตรวจหาร้อยละของการเจริญโดยเปรียบเทียบกันระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อ *A. flavus* IMI 242684 และ *A. parasiticus* IMI 102566 (Intana, 2003)

3.2.3.3 การตรวจนับจำนวนเชื้อราในดินและต้นถั่วลิสง

การตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma* sp., *A. flavus* IMI 242684 และ *A. parasiticus* IMI 102566 ในดินและต้นถั่วลิสงที่ผ่านการปลูกเป็นเวลา 7 วัน ทำได้โดยวิธี

การเก็บตัวอย่างในดินทำโดยการสุ่มตัวอย่างดิน 5 จุด โดยเก็บที่ความลึก 5 เซนติเมตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิดโดยวิธีเดียวกับข้อ 3.2.2 และคำนวณค่าเป็น CFU ต่อกรัมของดิน (สุกสิทธิ์, 2543) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณเชื้อในดิน} = \frac{A \times B \times C}{D \times E}$$

- กำหนดให้
- A คือ จำนวนโคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ
 - B คือ ปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้เจือจางตัวอย่างดิน (มิลลิลิตร)
 - C คือ ดินที่ผ่านการเจือจาง
 - D คือ น้ำหนักของดิน (กรัม)
 - E คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่นำมา spread pate (มิลลิลิตร)

3.2.3.4 การหาความยาวยอดและราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสง

เมื่อต้นถั่วลิสงเจริญจนครบ 7 วัน นำมาวัดความยาวยอดและราก ชุคทดลองละ 3 ซ้ำ โดยแยกลำต้นเหนือดินและราก จากนั้นใช้เวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (ยี่ห้อ KEIBA รุ่น 111-251 ประเทศญี่ปุ่น) วัดจากโคนต้นจนถึงปลายยอดที่ยาวสุด บันทึกผลเป็นมิลลิเมตร ชั่งน้ำหนักสดของต้นถั่วลิสงทั้งต้น ชุคทดลองละ 3 ซ้ำ ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง PG 5002; Mettler-Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา) บันทึกผลเป็นกรัม จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักคงที่บันทึกผลเป็นกรัม (AOSA, 1981)

3.2.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ได้แก่ ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อราในดินเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ *A. flavus* และ *A. parasiticus* จากการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design : CRD) และผลการตรวจนับปริมาณเชื้อราในดินเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ทดสอบกับต้นถั่วลิสง รวมทั้งความสูงของต้นถั่วลิสง น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และ ปริมาณการครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็นร้อยละ เปรียบเทียบระหว่างดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และ ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (Randomized Complete Block Design

: RCBD) มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test ด้วยโปรแกรม SPSS
Version 15

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

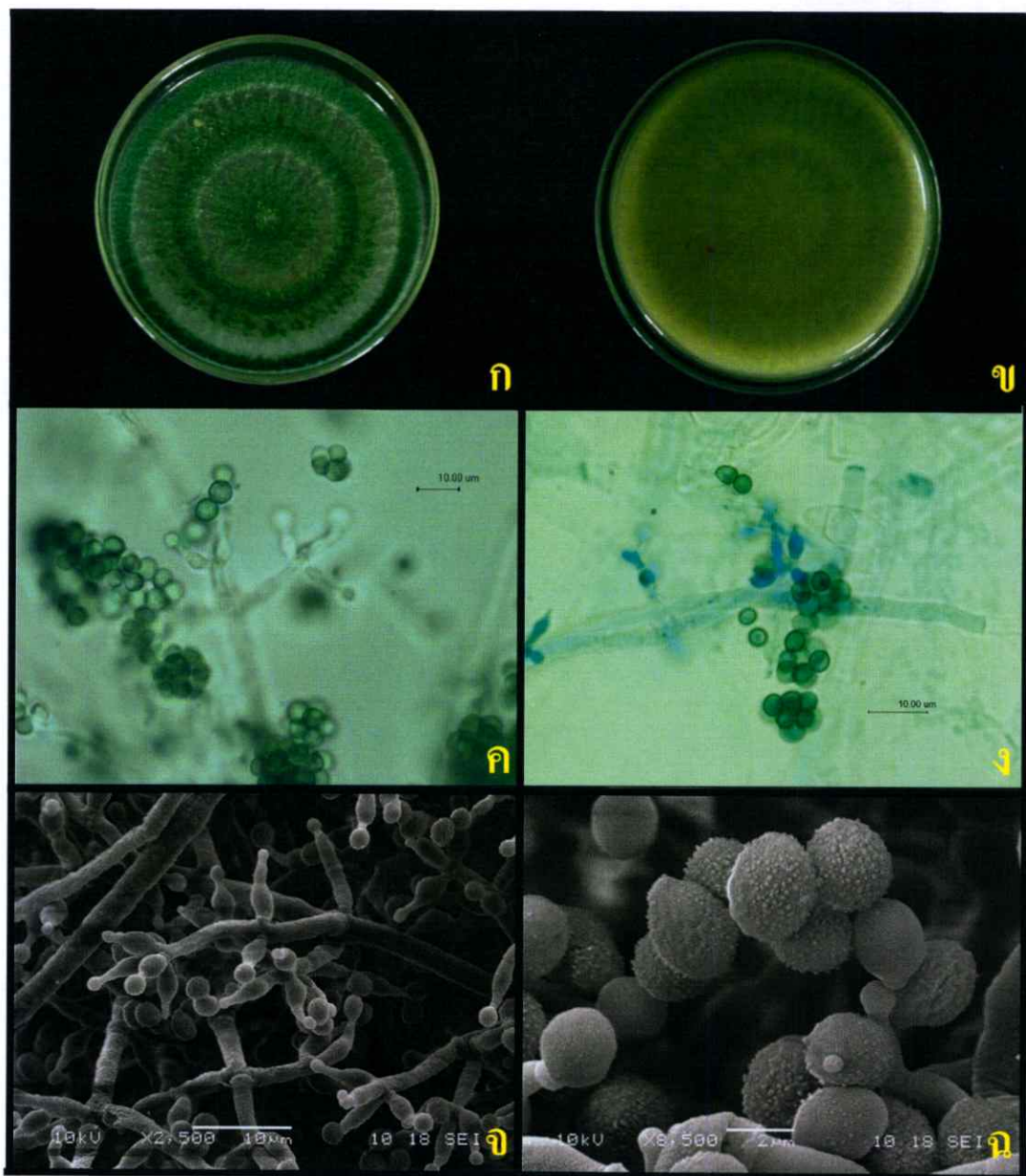
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยกล้องจุลทรรศน์ (Light Microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. 5 ไอโซเลต บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะการเรียงตัว และขนาดของ conidiophore ขนาด สี และลักษณะของ conidiospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รวมทั้งทำการจัดจำแนกโดยวิธีการของ Rifai (1969) (ภาคผนวก ข) ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

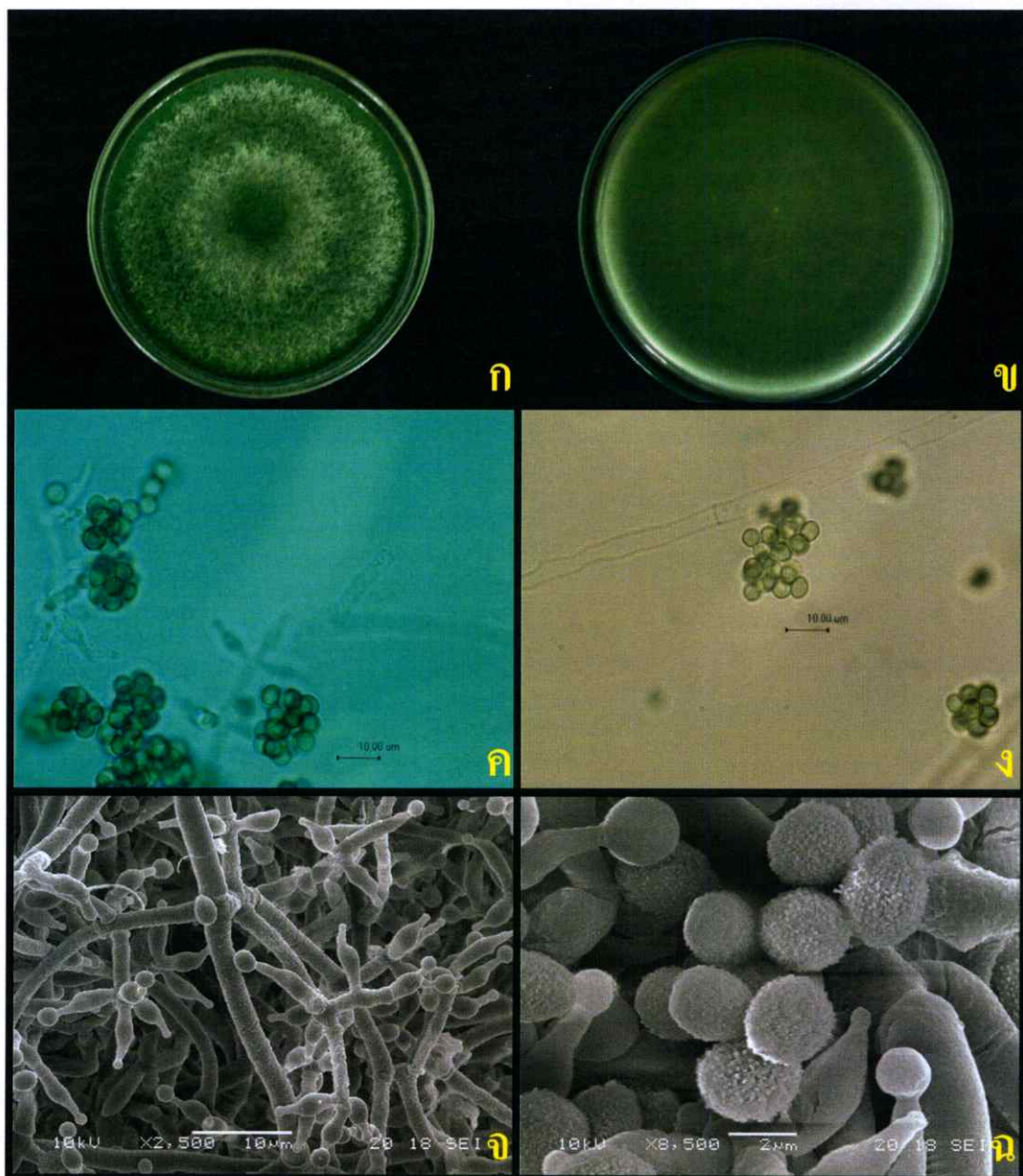
ไอโซเลต TISTR 3167 จากการเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่าโคโลนีเจริญได้อย่างรวดเร็ว (6-9 เซนติเมตร) เส้นใยมีสีขาว และเริ่มมีการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อนที่เวลา 3 วัน และเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มที่เวลา 7 วัน โคโลนีมีการเจริญในรูปแบบที่เป็นวงแหวน (ring-like form) และด้านหลังของโคโลนีไม่มีการเปลี่ยนสี การเรียงตัวของ conidiophore เป็นแบบ *Trichoderma*-like ขนาดของ phialide เมื่อวัดขนาดด้วยกล้องจุลทรรศน์มีขนาด ($4.95-7.31 \mu\text{m}$) x ($1.44-3.40 \mu\text{m}$) และ L/W ratio เท่ากับ 1.77- 4.35 ลักษณะรูปร่างของ conidiospore นั้นรูปร่างกลม (globose) และค่อนข้างกลม (subglobose) เส้นผ่านศูนย์กลางของ conidiospore ประมาณ $2.55 - 4.11 \mu\text{m}$ และเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า การเรียงตัวของ conidiophore และ ลักษณะผนังของ conidiospore มีลักษณะขรุขระ(รูปที่ 4.1) ซึ่งจากการจัดจำแนกพบว่า มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Trichoderma viride*

ไอโซเลต KMC 5 จากการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 7 พบว่า เส้นใยมีสีขาว และฟู มีการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อนที่เวลา 3 วัน และเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนถึงสีเทาเขียวที่เวลา 7 วัน และด้านหลังของโคโลนีไม่มีการเปลี่ยนสี ลักษณะการเรียงตัวของ conidiophore เป็นแบบ *Trichoderma* -like ส่วนขนาดของ phialide ประมาณ ($5.45-11.86 \mu\text{m}$) x ($1.02-3.23 \mu\text{m}$) และอัตราส่วนระหว่างความกว้างและความยาวของ phialide (L/W ratio) ประมาณ 1.79-3.67 เมื่อวัดขนาดของ conidiospore โดยกล้องจุลทรรศน์ ประมาณ $2.18 - 4.10 \mu\text{m}$ และจากการศึกษารูปร่างลักษณะของ conidiophore โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า มีลักษณะการเรียงตัวแบบปิรามิด (pyramidal form) และ ลักษณะผิวของ conidiospore เป็นผิวหน้าเรียบ จนถึงขรุขระ(รูปที่ 4.2) ซึ่งจากการจัดจำแนกมีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Trichoderma atroviride*



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะ โคลนินของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167

- (ก) ลักษณะ โคลนินบนอาหาร PDA ที่ระยะเวลาบ่มเชื้อ 7 วัน เจริญแบบวงแหวน
- (ข) ด้านหลังโคลนินที่ระยะเวลา 7 วัน ซึ่งไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- (ค) การเรียงตัวของ conidiophore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า แสดงลักษณะการแตกแขนงในแบบ *Trichoderma*-like
- (ง) conidia ที่มีสีเขียวเข้มและผิวเรียบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- (จ) ลักษณะการเรียงตัวที่ส่วนปลายของ conidiophore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยายภาพ 2,500 เท่า จากภาพมีการแตกแขนง ตั้งแต่ 3-5 phialide ที่ส่วนปลาย
- (ฉ) ลักษณะของ conidia ที่มีผิวขรุขระภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยายภาพ 8,500 เท่า



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะ โคลนินของ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต KMC 5

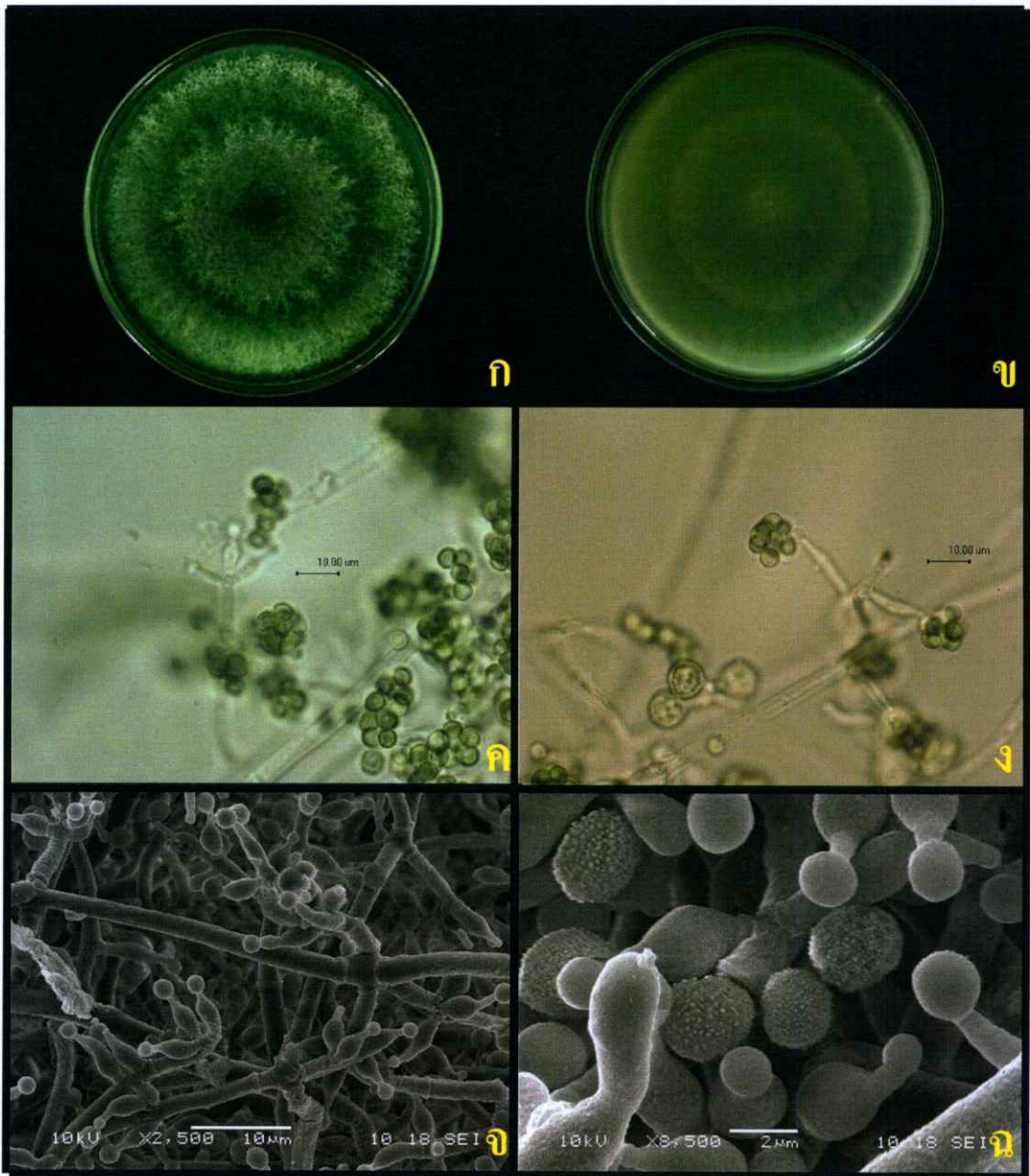
- (ก) ลักษณะ โคลนินบนอาหาร PDA ที่ระยะเวลาบ่มเชื้อ 7 วัน
- (ข) ด้านหลังโคลนินที่ระยะเวลา 7 วัน ไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- (ค) การเรียงตัวของ conidiophore แสดงลักษณะการแตกแขนงในแบบ *Trichoderma*-like ภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- (ง) แสดงลักษณะ conidia ที่มีสีเขียวเข้มและผิวเรียบภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- (จ) และ (ฉ) การเรียงตัวที่ส่วนปลายของ conidiophore จากภาพมีการแตกแขนง แบบปิรามิด ภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยายภาพ 2,500 เท่า และ conidia ที่มีผิวเรียบและขรุขระภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยายภาพ 8,500 เท่า

ไอโซเลต SRS 4 จากการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 7 พบว่า เส้นใยมีสีขาว และฟู มีการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อนที่เวลา 3 วัน และเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนถึงสีเทาเขียวที่เวลา 7 วัน และด้านหลังของโคโลนีไม่มีการเปลี่ยนสี ลักษณะการเรียงตัวของ conidiophore เป็นแบบ trichoderma-like ส่วนขนาดของ phialide ประมาณ (5.63-11.31 μm) x (1.02-2.93 μm) และ L/W ratio ประมาณ 2.31-3.86 และเส้นผ่านศูนย์กลางของ conidiospore ประมาณ 2.38 -3.74 μm และจากการศึกษารูปร่างลักษณะของ conidiophore โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า มีลักษณะการเรียงตัวแบบปิรามิด (pyramidal form) และ ลักษณะผิวของ conidiospore เป็นผิวหนังแบบเรียบ จนถึงขรุขระ (รูปที่ 4.3) ซึ่งจากการจัดจำแนกลักษณะคล้ายคลึงกับ *Trichoderma atroviride*

ไอโซเลต SCP III จากการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่า เส้นใยมีสีขาว และฟู มีการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อนที่เวลา 3 วัน และเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนถึงสีเทาเขียวที่เวลา 7 วัน และด้านหลังโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ลักษณะการเรียงตัวของ conidiophore เป็นแบบ longibrachiatum-like ลักษณะของ conidiospore มีรูปร่างเป็นกลมรี (ellipsoidal) และมีสีเขียวอ่อน เมื่อสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์ ขนาดของ phialide ประมาณ (8.27-14.38 μm) x (2.85-4.47 μm) L/W ratio ประมาณ 2.07-3.46 และขนาดของ conidiospore ประมาณ (3.07-4.42 μm) x (1.40-2.18 μm) และจากการศึกษารูปร่างลักษณะของ conidiophore โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า ลักษณะของ conidiophore มีการเรียงตัวแบบ longibrachiatum-like ลักษณะของ conidiospore เป็นรูปร่างกลมรี และ ผ้นเรียบ (รูปที่ 4.4) ซึ่งจากการจัดจำแนกมีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Trichoderma longibrachiatum*

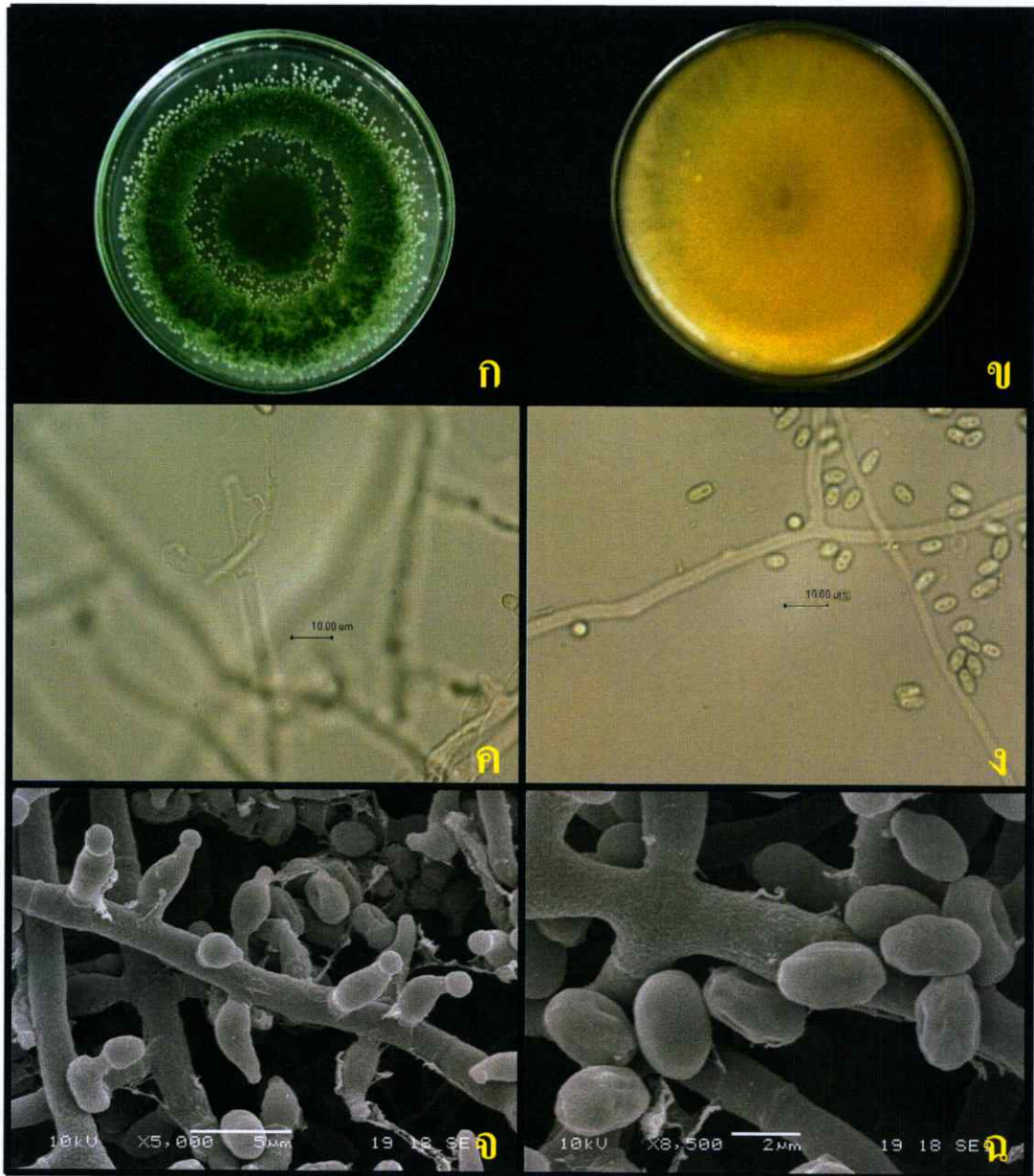
ไอโซเลต SCP II จากการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 และ 7 วัน พบว่า เส้นใยมีสีขาว และฟู มีการสร้างสปอร์สีขาวที่เวลา 3 วัน และ 7 วัน และด้านหลังโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม และ ลักษณะการเรียงตัวของ conidiophore เป็นแบบ longibrachiatum-like ลักษณะของ conidiospore มีรูปร่างเป็นกลมรี (ellipsoidal) ขนาดของ phialide ประมาณ (6.49-19.20 μm) x (2.85-4.47 μm) และ L/W ratio ประมาณ 2.49-7.36 และขนาดของ conidiospore ประมาณ (3.43-4.66 μm) x (1.94-2.86 μm) และจากการศึกษารูปร่างลักษณะของ conidiophore โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าลักษณะของ conidiophore มีการเรียงตัวแบบ longibrachiatum-like ลักษณะของ conidiospore เป็นรูปร่างกลมรี และ ผ้นเรียบ (รูปที่ 4.5) ซึ่งจากการจัดจำแนกลักษณะคล้ายคลึงกับ *Trichoderma citrinoviride*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่ได้ทดสอบนั้น สรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1



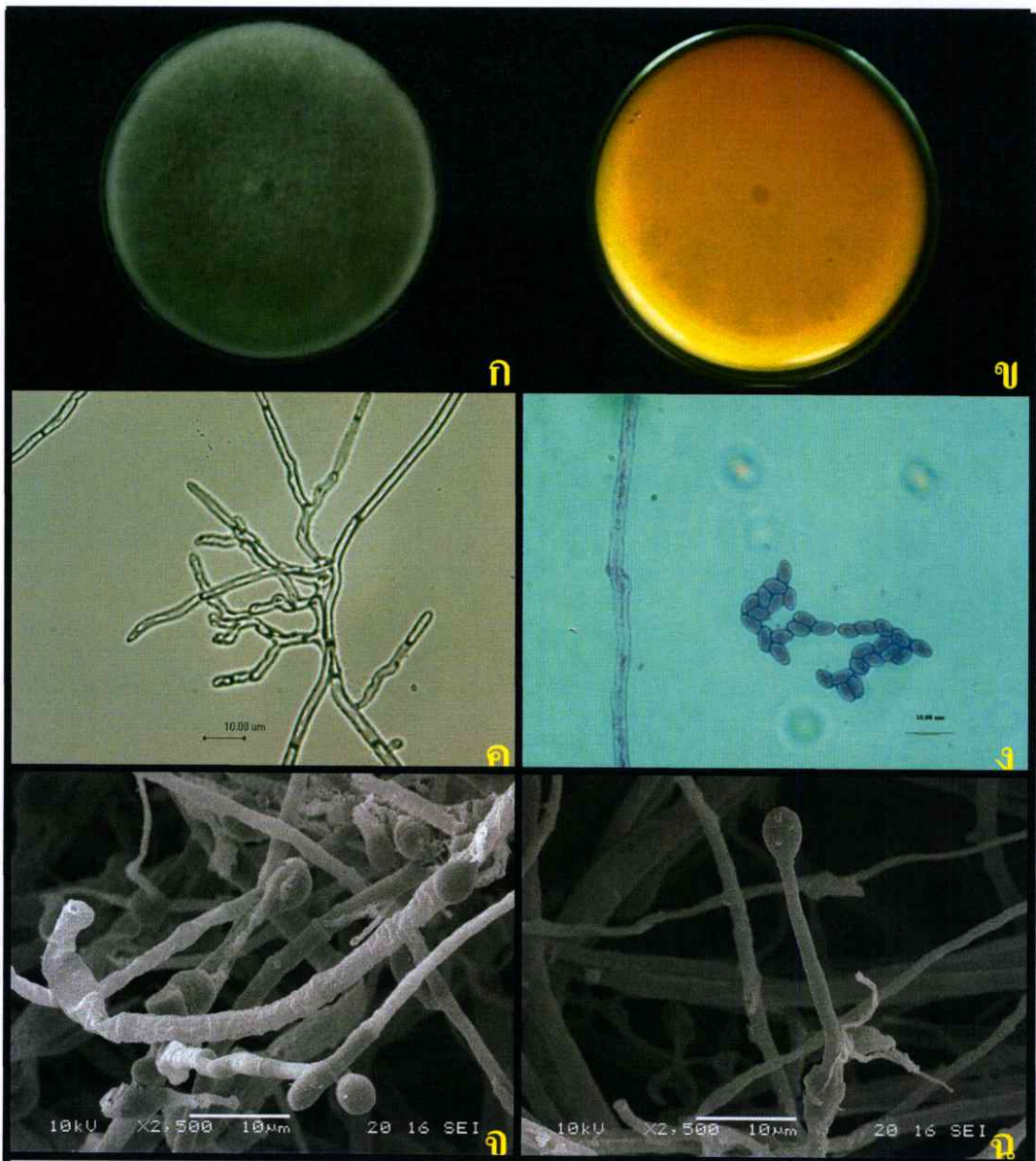
รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SRS 4

- (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่ระยะเวลาบ่มเชื้อ 7 วัน
- (ข) ลักษณะด้านหลังโคโลนีที่ระยะเวลา 7 วัน ไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- (ค) ลักษณะการเรียงตัวของ conidiophore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า มีการแตกแขนงในแบบ *Trichoderma*-like
- (ง) ลักษณะ conidia ที่มีสี่เหลี่ยมและผิวเรียบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า
- (จ) และ (ฉ) ลักษณะการเรียงตัวที่ส่วนปลายของ conidiophore จากภาพมีการแตกแขนง แบบปิรามิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยายภาพ 2,500 เท่า และ ลักษณะ conidia ที่มีผิวเรียบและขรุขระภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยายภาพ 8,500 เท่า



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP III

- (ก) ลักษณะโคโลนีนบนอาหาร PDA ที่ระยะเวลาบ่มเชื้อ 7 วัน
- (ข) ลักษณะด้านหลังโคโลนีที่ระยะเวลา 7 วัน เปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง
- (ค) การเรียงตัวของ conidiophore แตกแขนงในแบบ *Longbrachiatum*-like ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- (ง) ลักษณะ conidia ที่รูปร่างค่อนข้างรีและผิวเรียบ สีอ่อนภายใต้อกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- (จ) และ (ฉ) ลักษณะการเรียงตัวที่ส่วนปลายของ conidiophore เรียงตัวตามก้านของ conidiophore และลักษณะของ conidia รูปร่างกลมรี ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยายภาพ 5,000 เท่า และ 8,500 เท่า



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP II

- (ก) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่ระยะเวลาบ่มเชื้อ 7 วัน โคโลนีสีขาว
- (ข) ลักษณะด้านหลังโคโลนีที่ระยะเวลา 7 วัน เปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองเข้ม
- (ค) การเรียงตัวของ conidiophore แดกแขนงในแบบ *Longbrachiatum*-like ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- (ง) ลักษณะ conidia ที่รูปร่างค่อนข้างรีและผิวเรียบ สีส่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
- (จ) และ (ฉ) ลักษณะ conidiophore ซึ่งสร้าง conidia ที่ส่วนปลายและสร้าง chlamydospore ที่ภายในเส้นใย ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยายภาพ 2,500 เท่า

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ

ลักษณะ	<i>Trichoderma</i> spp.				
	TISTR 3167	KMC 5	SRS 4	SCP III	SCP II
การเจริญ	เจริญอย่างรวดเร็ว	เจริญอย่างรวดเร็ว	เจริญอย่างรวดเร็ว	เจริญอย่างรวดเร็ว	เจริญอย่างรวดเร็ว
สีโคโลนี	เขียวเข้ม	เขียวอ่อน-เทา เขียว	เขียวอ่อน-เทา เขียว	เขียวอ่อน-เทา เขียว	ขาว
การสร้างสี ในอาหารแข็ง	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	ไม่เปลี่ยน	สีเหลือง	สีเหลืองเข้ม
ลักษณะการเรียง ตัวของ conidiophore	Section <i>Trichoderma</i>	Section <i>Trichoderma</i>	Section <i>Trichoderma</i>	Section <i>Longibrachiatum</i>	Section <i>Longibrachiatum</i>
ขนาดของ phialide	(4.95-7.31 μm) x(1.44-3.40 μm)	(5.45-11.86 μm) x (1.02-3.23 μm)	(5.63-11.31 μm) x(1.02-2.93 μm)	(8.27-14.38 μm) x (2.85-4.47 μm)	(6.49-19.20 μm) x (2.85-4.47 μm)
L/W ratio ของ phialide	1.77- 4.35	1.79-3.67	2.31-3.86	2.07-3.46	2.48-7.35
ขนาดของconidia	(3.28-4.03 μm) x(2.55 - 4.11 μm)	(3.05-4.03 μm) x(2.18 - 4.10 μm)	(3.12-4.01 μm) x(2.38 -3.74 μm)	(3.07-4.42 μm) x (1.40-2.18 μm)	(3.43-4.66 μm) x (1.94-2.86 μm)

4.1.2 ผลการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ บนอาหาร PDA

จากการเลี้ยงเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่ช่วงเวลาต่าง ๆ กัน คือ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ที่ 24 ชั่วโมงพบว่า เชื้อราไอโซเลต SCP III และ SCP II มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 1.79 และ 2.77 เซนติเมตร ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 เท่ากับ 1.19, 1.12 และ 1.22 เซนติเมตร ที่ 48 ชั่วโมง เชื้อราไอโซเลต SCP III และ SCP II มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 7.50 และ 8.08 เซนติเมตร ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 เท่ากับ 4.70, 4.80 และ 4.95 เซนติเมตร ที่ 72 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลต SCP III และ SCP II มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 13.85 และ 12.98 เซนติเมตร

ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 8.86 , 8.91 และ 9.27 เซนติเมตร ที่ 96 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลต SCP III และ SCP II มีขนาดของโคโลนีเจริญเต็มงานเพาะเชื้อ หรือ มากกว่า 15 เซนติเมตร ส่วนไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเท่ากับ 13.22 , 13.39 และ 13.55 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลตต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยใช้จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร

<i>Trichoderma</i> sp.	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร) ¹			
	ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (ชั่วโมง)			
	24	48	72	96
TISTR 3167	1.19 ± 0.20a	4.70 ± 0.21a	8.86 ± 0.24a	13.22 ± 0.33a
KMC5	1.12 ± 0.13a	4.80 ± 0.14a	8.91 ± 0.17a	13.39 ± 0.15a
SRS4	1.22 ± 0.08a	4.95 ± 0.32a	9.27 ± 0.43a	13.55 ± 0.17a
SCP III	1.79 ± 0.23b	7.50 ± 0.15b	13.85 ± 0.23b	>15.00
SCP II	2.77 ± 0.28c	8.08 ± 0.41c	12.98 ± 0.38c	>15.00

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

4.1.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ SNA

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ อุณหภูมิ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (ตารางที่ 4.3) ที่ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ที่เลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 2.87, 2.79 และ 2.80 เซนติเมตร ตามลำดับ และเชื้อราไอโซเลต SCP III และ SCP II มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 2.94 และ 3.06 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับการเลี้ยงบนอาหาร SNA พบว่า ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ 1.84, 2.07 และ 2.14 เซนติเมตร และ ไอโซเลต SCP III และ SCP II มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 1.92 และ

ตารางที่ 4.3 ผลของอุณหภูมิและชนิดของอาหารต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 35 องศาเซลเซียส หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

<i>Trichoderma</i> sp.	ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) ¹					
	ชนิดของอาหาร					
	PDA			SNA		
	15 °ซ	25 °ซ	35 °ซ	15 °ซ	25 °ซ	35 °ซ
TISTR 3167	2.87±0.07ab	8.96±0.04a	1.28±0.02 b	1.84±0.13 a	8.18±0.06 a	0.30±0.15 b
KMC 5	2.79±0.19a	8.97±0.04a	0.94±0.14 a	2.07±0.11 b	8.94±0.04 a	0.00±0.00 a
SRS 4	2.80±0.14a	9.00±0.00b	1.04±0.10 c	2.14±0.10 b	8.96±0.03 b	0.00±0.00 a
SCP III	2.94±0.19b	9.00±0.00b	9.00±0.00 d	1.92±0.13 a	8.95±0.03 b	8.56±0.06 d
SCP II	3.06±0.15c	9.00±0.00b	9.00±0.00 d	2.45±0.19 c	8.95±0.05 b	6.27±0.5 c

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

2.45 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 15 °ซ เชื้อราโดยส่วนใหญ่มีการเจริญได้น้อย และไม่มีการสร้างสปอร์ ยกเว้น ไอโซเลต SCP II สังเกตพบการสร้างสปอร์สีเขียวเล็กน้อย

ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 8.96, 8.97 และ 9.00 เซนติเมตร ตามลำดับ มีการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อน ส่วนไอโซเลต SCP III และ SCP II เท่ากับ 9.00 และ 9.00 เซนติเมตร โดยไอโซเลต SCP III สร้างสปอร์สีเขียว และมีการสร้างสารสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนไอโซเลต SCP II มีการสร้างสปอร์สีขาวและมีการสร้างสารสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร SNA ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ, 8.94 และ 8.96 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต SCP III และ SCP II เท่ากับ 8.95 และ 8.95 เซนติเมตร โดยไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อน ส่วนไอโซเลต SCP III มีการสร้างสปอร์แต่ไม่มีการสร้างสารสีเหลือง ส่วน ไอโซเลต SCP II พบว่ามีการสร้างสปอร์สีขาวแต่ไม่มีการสร้างสารสีเหลือง

ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่า ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 1.28, 0.94 และ 1.04 เซนติเมตร ตามลำดับ

ส่วนไอโซเลต SCP III และ SCP II เท่ากับ 9.00 เซนติเมตร ส่วนที่เลี้ยงบนอาหาร SNA พบว่า ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 0.30, 0.00 และ 0.00 เซนติเมตร ส่วนไอโซเลต SCP III และ SCP II เท่ากับ 8.56 และ 6.27 เซนติเมตร โดยเชื้อรา ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีการเจริญได้น้อยที่สุด ส่วนไอโซเลต SCP III เจริญได้ดี และมีการสร้างสปอร์สีเขียวและสารสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนไอโซเลต SCP II มีการสร้างเส้นใยสีขาว สปอร์สีขาวและสารสีเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อไอโซเลตต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ SNA ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่า เชื้อราที่มีการเจริญแตกต่างกัน และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ (Rifai, 1969 ; Samuels และ Chaverri, 2003)

4.2 ผลการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 และ *A. parasiticus* IMI 102566 ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ

เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 , SRS 4 , SCP II และ SCP III มาทดสอบการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 100 กรัมได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 4.4

เมื่อพิจารณาปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* จะสามารถเลือกกลุ่มของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ในดินได้เป็น 2 กลุ่ม ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 จะควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้มากกว่าเชื้อราไอโซเลต SCP III และ SCP II เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเชื้อราที่ 28 วัน พบว่า ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 แบบเชื้อเดี่ยวมีปริมาณเชื้อในวันที่ 28 เท่ากับ 24.98×10^7 , 22.90×10^7 และ 14.25×10^7 CFU ต่อกรัมของดินตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ผลการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในดินของ *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ, *A. flavus* และ *A. parasiticus*

เชื้อรา		ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ (x 10 ⁷ CFU ต่อกรัมของดิน) ¹			
		ระยะเวลาบ่มเชื้อในดิน (วัน)			
		7	14	21	28
ชุดควบคุม		0.00 l	0.00 d	0.00 f	0.00 g
<i>Trichoderma</i> sp. TISTR 3167		16.04 jk	16.68 bc	22.70 e	24.98 e
<i>Trichoderma</i> sp. KMC 5		18.40 k	10.64 bc	15.42 e	22.90 e
<i>Trichoderma</i> sp. SRS 4		9.63 g-k	12.36 bc	20.16 e	14.25 e
<i>Trichoderma</i> sp. SCP II		9.73 f-j	6.57 bc	4.14 a-d	4.05 b-d
<i>Trichoderma</i> sp. SCP III		6.38 c-h	3.69 bc	3.85 a-d	1.29 b-d
<i>Aspergillus flavus</i> (AF)		8.91 f-j	9.09 bc	6.84 d	4.00 b-d
<i>Aspergillus parasiticus</i> (AP)		6.66 e-h	2.51 bc	6.57 d	4.39 cd
<i>Trichoderma</i> sp. ²	AF + TISTR 3167	13.80 i-k	14.40 bc	19.50 e	19.30 e
	AF + KMC 5	17.70 k	23.70 c	24.50 e	19.90 e
	AF + SRS 4	19.10 k	17.40 bc	23.60 e	51.50 f
	AF + SCP II	7.20 f-i	9.92 bc	6.30 d	1.22 a
	AF + SCP III	1.92 b	3.06 bc	2.50 bc	2.26 b
	AP + TISTR 3167	15.20 jk	11.40 bc	29.70 e	16.50 e
	AP + KMC 5	11.30 h-k	14.40 bc	19.50 e	21.90 e
	AP + SRS 4	12.60 h-k	12.00 bc	23.50 e	19.40 e
	AP + SCP II	4.68 c-f	7.75 bc	8.29 d	2.30 bc
	AP + SCP III	2.25 b	2.60 bc	3.77 a-d	3.05 bc
<i>Aspergillus</i> sp. ³	AF + TISTR 3167	7.11 d-h	5.85 bc	5.85 cd	2.96 bc
	AF + KMC 5	3.87 b-d	9.19 bc	5.04 b-d	4.21 b-d
	AF + SRS 4	9.81 g-k	3.60 bc	2.88 bc	2.79 d
	AF + SCP II	9.64 g-k	6.04 a	3.96 a-d	3.04 bc
	AF + SCP III	6.75 c-h	7.75 bc	5.22 cd	4.41 cd
	AP + TISTR 3167	3.51 bc	1.26 ab	9.00 d	3.03 bc
	AP + KMC 5	1.71 a	1.44 bc	2.07 a	1.48 bc
	AP + SRS 4	2.34 b	1.80 bc	1.89 a	1.05 a
	AP + SCP II	4.41 b-e	5.22 bc	5.22 b-d	2.96 bc
	AP + SCP III	6.22 c-g	3.42 bc	2.25 a-c	2.46 bc

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ในแนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

² ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ *Trichoderma* spp. เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus* sp.

³ ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ *Aspergillus* sp. เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ส่วนไอโซเลต SCP II และ SCP III มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 4.05×10^7 และ 1.29×10^7 CFU ต่อกรัมของดิน เมื่อพิจารณาความสามารถในการอยู่รอดในดินที่ 28 วัน เปรียบเทียบระหว่างเชื้อราไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 กับเชื้อราไอโซเลต SCP II และ SCP III พบว่าเชื้อราในกลุ่มหลังมีแนวโน้มลดลง (รูปที่ 4.6) จึงไม่เหมาะสำหรับการทดลองต่อไป

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบเชื้อผสม คือ เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ร่วมกับเชื้อรา *A.flavus* และ *A.parasiticus* ไอโซเลต SRS 4 สามารถลดปริมาณของ *A. parasiticus* ในดินแตกต่างกับไอโซเลตอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเลี้ยงเชื้อรา ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ร่วมกับเชื้อรา *A. flavus* พบว่า ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีปริมาณเท่ากับ 19.30×10^7 , 19.90×10^7 และ 51.5×10^7 CFU ต่อกรัมของดิน (รูปที่ 4.7) โดยไอโซเลต SRS 4 มีปริมาณแตกต่างจากไอโซเลตอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* เท่ากับ 2.96×10^7 , 4.21×10^7 และ 2.79×10^7 CFU ต่อกรัมของดิน เชื้อรา ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* พบว่า ปริมาณเชื้อในวันที่ 28 ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 เท่ากับ 16.50×10^7 , 21.90×10^7 และ 19.40×10^7 CFU ต่อกรัมของดิน ตามลำดับ และปริมาณของเชื้อรา *A. parasiticus* เท่ากับ 3.03×10^7 , 1.48×10^7 และ 1.05×10^7 CFU ต่อกรัมของดินตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

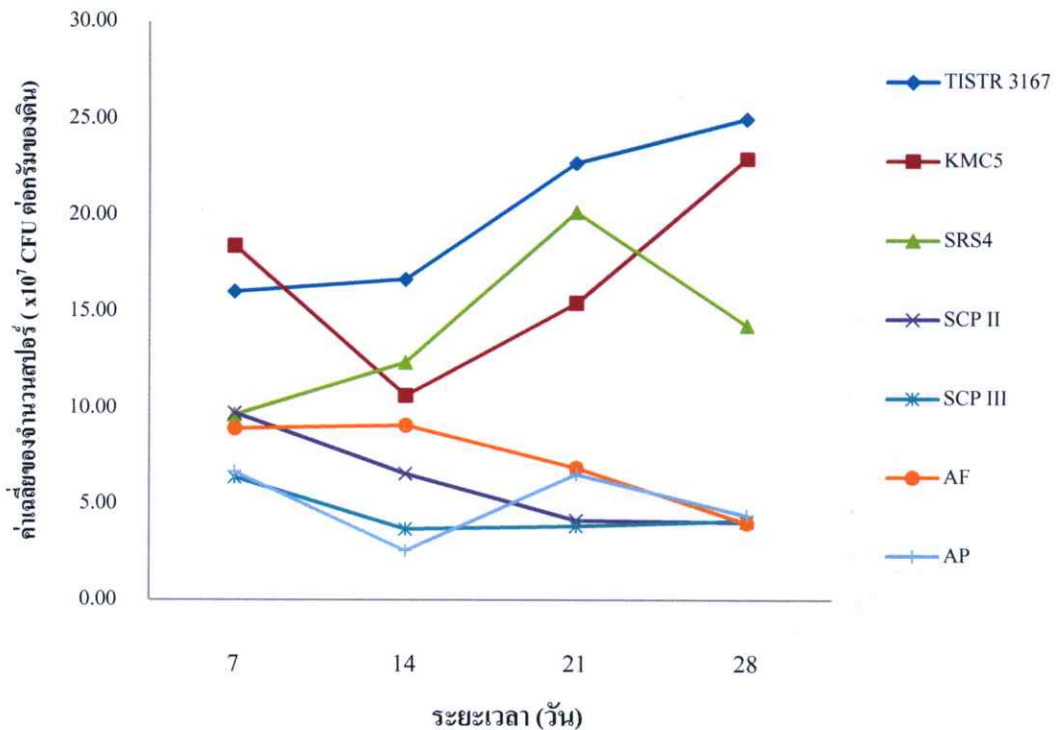
ดังนั้นในขั้นตอนนี้ต่อไป เพื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *A.parasiticus* และ *A. flavus* ในดินบริเวณรอบรากของถั่วลิสง โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต ต่าง ๆ นั้น จึงคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 เพื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *A.parasiticus* และ *A. flavus* รวมทั้งผลกระทบต่อต้นถั่วลิสง

4.3 ผลการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ไอโซเลต TISTR 3167 , KMC 5 และ SRS 4 บริเวณรากต้นถั่วลิสง

4.3.1 ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* sp., *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในดินฆ่าเชื้อ และไม่ฆ่าเชื้อ

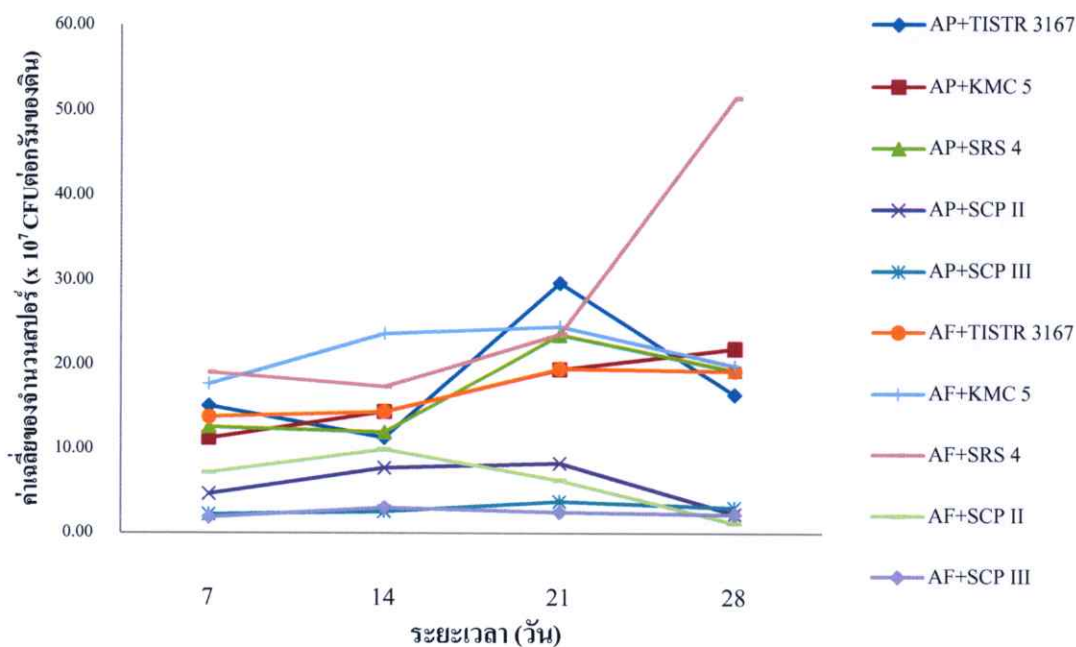
จากผลการตรวจนับปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 รวมทั้งเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* จากดินในกระถาง (ทั้งหมด 5 ซ้ำ) เปรียบเทียบดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และ ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า ปริมาณเชื้อราแตกต่างกันประมาณ 10 เท่า



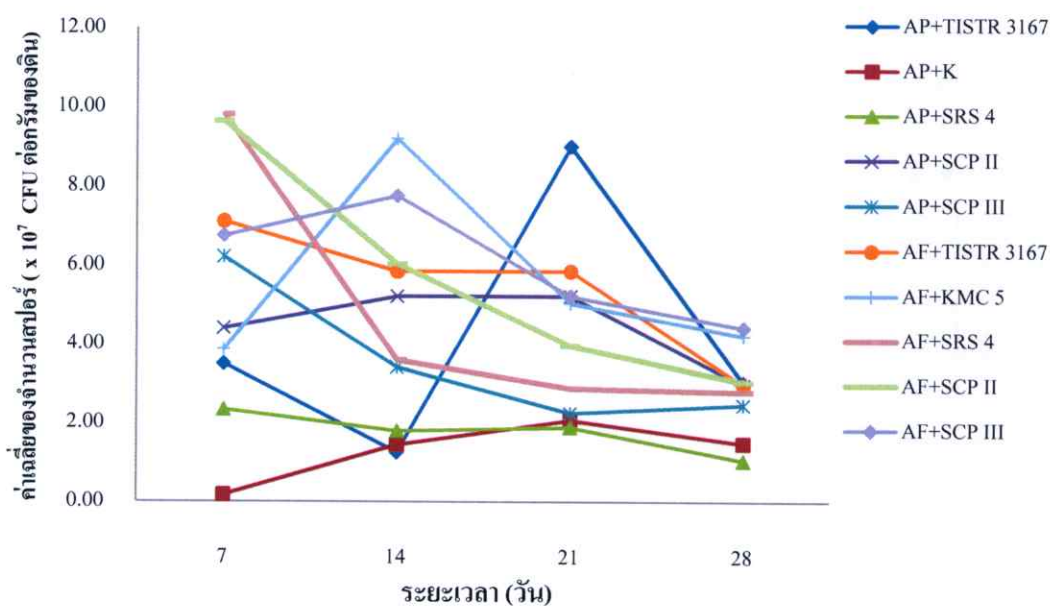
รูปที่ 4.6 กราฟเปรียบเทียบปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ เปรียบเทียบกับ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในดินที่ระยะเวลาบ่มเชื้อต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบจากการทดลอง และพบปริมาณของเชื้อราชนิดอื่น ๆ ในดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งจากการตรวจสอบลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสี และย้อมแกรม พบว่ามี *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., แบคทีเรีย และ ยีสต์ ซึ่งอาจจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตลดลง

ในการทดลองดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณของเชื้อราไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 พบว่า ในชุดทดลองที่ใส่เชื้อเดี่ยว เชื้อรา ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 28.30×10^6 , 23.90×10^6 และ 29.30×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน และ เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. flavus* มีปริมาณเท่ากับ 20.0×10^6 , 16.30×10^6 และ 18.70×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน ส่วนเชื้อรา *A. parasiticus* เท่ากับ 17.60×10^6 , 15.60×10^6 และ 19.40×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)



รูปที่ 4.7 กราฟเปรียบเทียบปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*



รูปที่ 4.8 กราฟเปรียบเทียบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ

โดยเชื้อราไอโซเลต TISTR 3167 สามารถลดปริมาณเชื้อรา *A. flavus* ได้มากที่สุดเท่ากับ 16.80×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน ไอโซเลต KMC 5 สามารถลดปริมาณเชื้อรา *A. parasiticus* ได้มากที่สุด เท่ากับ 9.99×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน แต่ปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนการทดลองใช้ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณของเชื้อราที่ตรวจนับได้ (CFU ต่อกรัมของดิน) พบว่า ไอโซเลต TISTR 3167 , KMC 5 และ SRS 4 เท่ากับ 14.2×10^6 , 2.97×10^6 และ 7.74×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน เปรียบเทียบกับไอโซเลต TISTR 3167 , KMC 5 และ SRS 4 กับเชื้อรา *A. flavus* มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 7.29×10^6 , 6.03×10^6 และ 10.30×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน ไอโซเลต TISTR 3167, KMC 5 และ SRS 4 ที่เลี้ยงร่วมกับร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 15.30×10^6 , 11.22×10^6 และ 5.22×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน ตามลำดับ และ โดยไอโซเลต KMC 5 สามารถลดปริมาณเชื้อรา *A. flavus* เหลือน้อยที่สุด เท่ากับ 3.42×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน ส่วนไอโซเลต SRS 4 สามารถลดปริมาณเชื้อรา *A. parasiticus* เหลือน้อยที่สุดเท่ากับ 3.51×10^6 CFU ต่อกรัมของดิน

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ลักษณะของดินมีผลต่อปริมาณของเชื้อราในดิน ทั้งกรณีของเชื้อรา *Trichoderma* sp. , *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าปริมาณของเชื้อราลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ รวมทั้งเป็นปัจจัยที่มีต่อการลดปริมาณ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในดิน แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้มีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* sp. ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ดังนั้น เชื้อราที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมเชื้อราก่อโรคพืช หรือ เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในดิน จะต้องมีความสามารถในการเจริญแบบแข่งขันกับเชื้อราตัวอื่นที่อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน หรือ แผลงที่อยู่เดียวกัน จากรายงานของ Bae และ Knudsen (2005) ได้ศึกษาปริมาณของชีวมวลในดินที่มีและปริมาณของจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน ผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรคของ *T. harzianum* ThzIDI-M3 พบว่าปริมาณชีวมวล 328 หรือ 517 ไมโครกรัมต่อกรัมของดิน มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยไอโซเลต ThzIDI-M3 และนำไปควบคุมเชื้อ *Sclerotinia sclerotiorum* ในดินที่มีปริมาณชีวมวลมากพบว่า สเคลอโรเทียมของ *Sclerotinia sclerotiorum* ที่ตรวจสอบการครอบครองของไอโซเลต ThzIDI-M3 มีจำนวนลดลง

ตารางที่ 4.5 ผลของปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 , KMC 5 และ SRS 4, *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในดินรอบรากถั่วลิสงที่อายุ 7 วัน

เชื้อรา		ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ ($\times 10^6$ CFU ต่อกรัมของดิน) ¹	
		ดินฆ่าเชื้อ	ดินไม่ฆ่าเชื้อ
ชุดควบคุม		1.53 e	8.73 e
<i>Trichoderma</i> sp. TISTR 3167		28.30 a	14.2 a
<i>Trichoderma</i> sp. KMC 5		23.90 cde	2.97 cde
<i>Trichoderma</i> sp. SRS 4		29.30 abc	7.74 abc
<i>Aspergillus flavus</i> (AF)		16.70 abcd	4.14 abcd
<i>Aspergillus parasiticus</i> (AP)		24.00 bcd	4.77 bcd
<i>Trichoderma</i> sp. ²	AF+ TISTR 3167	20.00 abcd	7.29 abcd
	AF+ KMC 5	16.30 bcd	6.03 bcd
	AF+ SRS 4	18.70 abc	10.30 abc
	AP+ TISTR 3167	17.60 ab	15.30 ab
	AP+ KMC 5	15.60 bcd	11.22 bcd
	AP+ SRS 4	19.40 abc	5.22 abc
<i>Aspergillus</i> sp. ³	AF+ TISTR 3167	16.80 bcd	5.85 bcd
	AF+ KMC 5	27.30 bcd	3.42 bcd
	AF+ SRS 4	33.20 abc	6.21 abc
	AP+ TISTR 3167	14.20 cde	3.69 cde
	AP+ KMC 5	9.99 bcd	4.23 bcd
	AP+ SRS 4	17.90 de	3.51 de

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

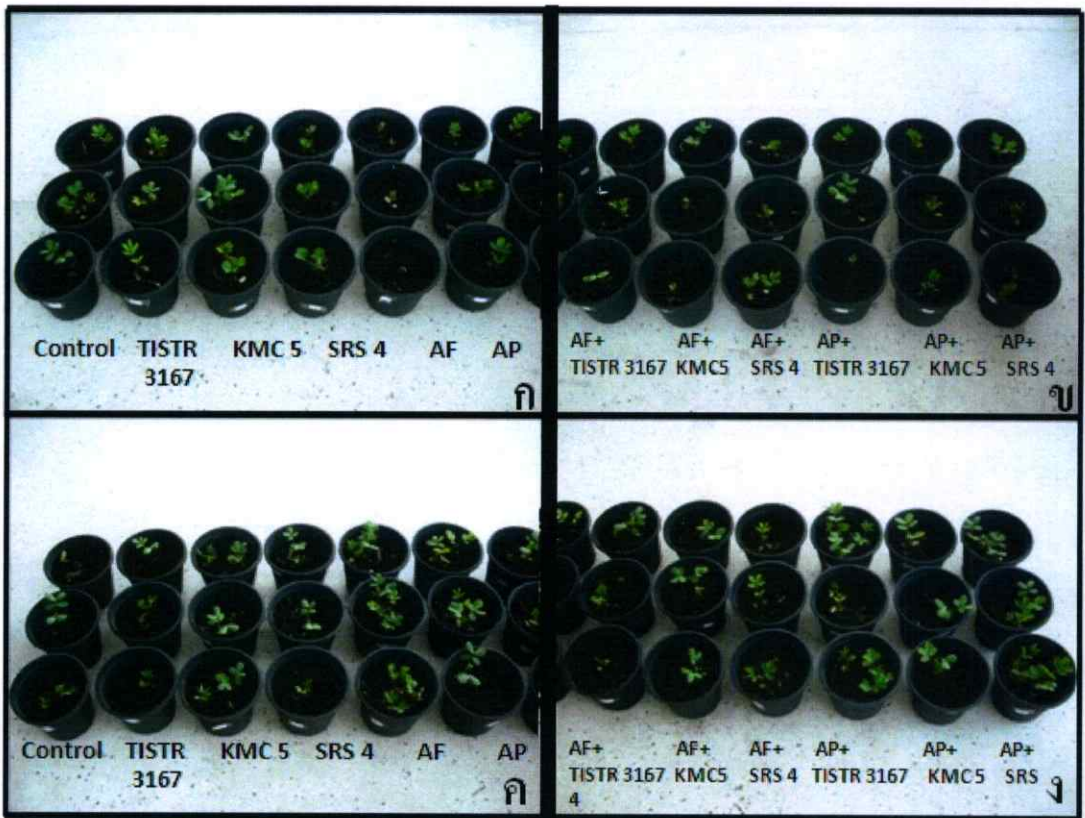
² ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ *Trichoderma* spp. เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus* sp.

³ ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ *Aspergillus* sp. เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* spp.

4.3.2 ผลของเชื้อรา *Trichoderma* sp., *A. flavus* และ *A. parasiticus* ต่อการเจริญของต้นถั่วลิสง

เมื่อเปรียบเทียบผลของเชื้อราต่อการเจริญของต้นถั่วลิสงในชุดทดลองต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างดินฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อ (รูปที่ 4.9 และ 4.10) พบว่า ต้นถั่วลิสงในดินฆ่าเชื้อที่มีเชื้อราไอโซเลต TISTR 3167 มีความยาวยอดสูงสุดเท่ากับ 91.02 มิลลิเมตร ส่วนความยาวรากกลับพบว่าในดินฆ่าเชื้อที่มี *A. parasiticus* มีผลทำให้ความยาวรากสูงสุดเท่ากับ 84.92 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่มีการผสม *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ รวมกับเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* พบว่า ไอโซเลต TISTR 3167 ที่ที่เลี้ยงร่วมกับ *A. flavus* ส่งผลให้ต้นถั่วลิสงมีความยาวยอดสูงสุดเท่ากับ 73.76 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต SRS 4 ผสมรวมกับ *A. flavus* มีความยาวรากสูงสุดเท่ากับ 79.86 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.6) ส่วนไอโซเลต TISTR 3167 ที่ผสมรวมกับ *A. parasiticus* มีความยาวรากเท่ากับ 68.03 มิลลิเมตร และ ไอโซเลต SRS 4 ที่ผสมรวมกับ *A. parasiticus* มีความยาวรากสูงสุดเท่ากับ 72.84 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.6)

ในดินไม่ฆ่าเชื้อ ไอโซเลต TISTR 3167 มีความยาวยอดสูงสุดเท่ากับ 87.54 มิลลิเมตร และ ไอโซเลต TISTR 3167 มีความยาวรากสูงสุดเท่ากับ 86.35 มิลลิเมตร และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่เลี้ยงเชื้อราพร้อมระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ กับ *A. flavus* และ *A. parasiticus* พบว่า ไอโซเลต SRS 4 ที่ผสมกับ *A. flavus* มีความยาวยอดสูงสุดเท่ากับ 77.09 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต TISTR 3167 ที่ผสมกับ *A. flavus* มีความยาวรากเท่ากับ 112.78 มิลลิเมตร และไอโซเลต SRS 4 ที่ผสมกับ *A. parasiticus* มีความยาวยอดเท่ากับ 68.48 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต KMC 5 ที่ผสมกับ *A. parasiticus* มีความยาวรากเท่ากับ 73.27 มิลลิเมตร เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยเปรียบเทียบระหว่างดินฆ่าเชื้อและดินไม่ฆ่าเชื้อ พบว่า ดินมีผลต่อการเจริญของต้นถั่วลิสงที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างทรีทเมนต์ของชุดทดลองกลับไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



รูปที่ 4.9 เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของต้นถั่วลิสงที่ระยะเวลา 7 วัน ในกระถางปลูก

(ก) และ (ข) คือ ถั่วลิสง

(ค) และ (ง) คือ ถั่วเขียว

โดยที่ Control คือ ชุดควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ) ; TISTR 3167 คือ ใส่เชื้อ

Trichoderma sp. ไอโซเลต TISTR 3167 ; KMC 5 คือ ไอโซเลต KMC 5 ; SRS

4 คือ ไอโซเลต SRS 4 ; AF คือ *A. flavus* ; AP คือ *A. parasiticus* ; AF + TISTR

3167 คือ ใส่เชื้อ *A. flavus* และ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 ; AF +

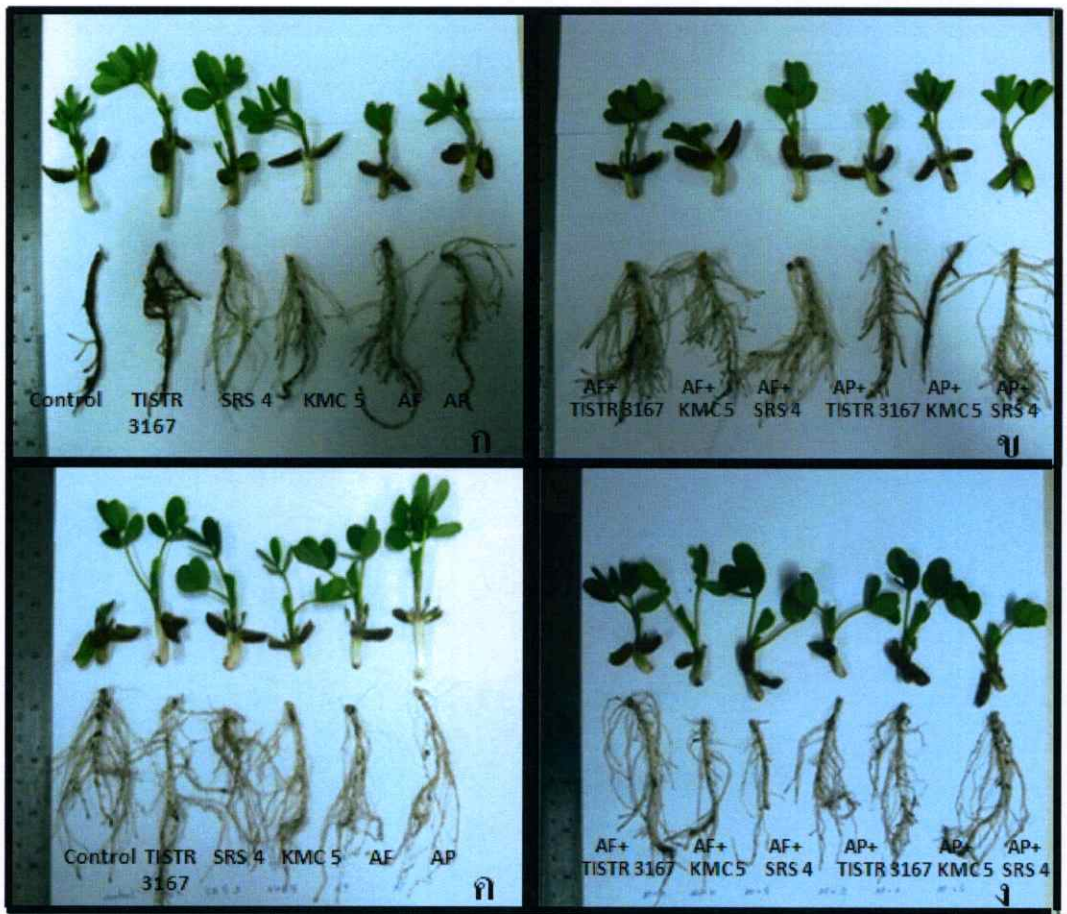
KMC 5 คือ ใส่เชื้อ *A. flavus* และ ไอโซเลต KMC 5 ; AF + SRS 4 คือ ใส่เชื้อ

A. flavus และ ไอโซเลต KMC 5 ; AP + TISTR 3167 คือ ใส่เชื้อ *A. parasiticus*

และ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 ; AP + K คือ ใส่เชื้อ

A. parasiticus และ ไอโซเลต KMC 5 ; AP + SRS 4 คือ ใส่เชื้อ *A. parasiticus*

ร่วมกับ ไอโซเลต SRS 4



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของยอดและรากต้นถั่วลิสงที่ระยะเวลา 7 วัน

(ก) และ (ข) ในดินฆ่าเชื้อ

(ค) และ (ง) ดินไม่ฆ่าเชื้อ

โดยที่ Control คือ ชุดควบคุม (ไม่ใส่เชื้อ) ; TISTR 3167 คือ ใส่เชื้อ

Trichoderma sp. ไอโซเลต TISTR 3167 ; KMC 5 คือ ไอโซเลต KMC 5 ;

SRS 4 คือ ไอโซเลต SRS 4 ; AF คือ *A. flavus* ; AP คือ *A. parasiticus* ; AF +

TISTR 3167 คือ ใส่เชื้อ *A. flavus* และ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR

3167 ; AF + KMC 5 คือ ใส่เชื้อ *A. flavus* และไอโซเลต KMC 5 ; AF + SRS 4

คือ ใส่เชื้อ *A. flavus* และ ไอโซเลต KMC 5 ; AP + TISTR 3167 คือ ใส่เชื้อ *A.*

parasiticus และ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 ; AP + KMC 5 คือ

ใส่เชื้อ *A. parasiticus* และ ไอโซเลต KMC 5 ; AP + SRS 4 คือ ใส่เชื้อ *A.*

parasiticus และ ไอโซเลต SRS 4

ตารางที่ 4.6 ผลของความยาวยอดและราก จากต้นถั่วลิสงที่อายุ 7 วัน ในดินผสมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ , *A. flavus* และ *A. parasiticus*

เชื้อรา	ค่าเฉลี่ยของความยาว (มิลลิเมตร) ¹			
	ดินฆ่าเชื้อ		ดินไม่ฆ่าเชื้อ	
	ยอด	ราก	ยอด	ราก
ชุดควบคุม	70.54±1.63bc	64.65±0.38cde	62.88±0.09bc	81.48±0.43cde
<i>Trichoderma</i> sp. TISTR 3167	91.02±0.98a	70.36±0.34bcd	87.54±0.51a	86.35±0.37bcd
<i>Trichoderma</i> sp. KMC 5	58.37±0.90bc	70.20±0.21cde	65.22±0.11bc	78.40±0.37cde
<i>Trichoderma</i> sp. SRS 4	73.09±0.75b	64.94±0.17e	74.30±0.58b	64.22±0.47e
<i>A. flavus</i> (AF)	32.13±1.23c	78.38±0.55cde	78.66±0.25c	65.99±0.11cde
<i>A. parasiticus</i> (AP)	48.48±0.70bc	84.92±0.26bc	82.89±0.10bc	78.81±0.21bc
<i>A. flavus</i> + TISTR3167	63.76±0.31bc	61.68±0.69a	64.09±0.85bc	112.78±0.09a
<i>A. flavus</i> + KMC5	52.73±0.26bc	57.39±0.56e	70.63±0.55bc	69.80±0.16e
<i>A. flavus</i> + SRS 4	50.15±0.39bc	79.86±0.34b	77.09±0.46b	70.45±0.06b
<i>A. parasiticus</i> + TISTR 3167	68.03±0.09b	66.32±0.27de	68.00±0.10bc	69.66±0.39de
<i>A. parasiticus</i> + KMC5	61.12±0.53bc	56.64±0.18e	68.37±0.59bc	73.27±0.14e
<i>A. parasiticus</i> + SRS 4	66.65±0.82b	72.84±0.24cde	68.48±0.43b	69.81±0.21cde

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

เมื่อพิจารณาน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสงที่อายุ 7 วัน พบว่า ในดินฆ่าเชื้อ ไอโซเลต SRS 4 มีผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสงมากที่สุดเท่ากับ 3.334 กรัม และ 0.389 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ผสมระหว่าง *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ กับ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ลงในดินสำหรับปลูกถั่วลิสง พบว่า ไอโซเลต KMC 5 ที่ผสมกับ *A. flavus* มีผลให้น้ำหนักสดของต้นถั่วลิสงมากที่สุดเท่ากับ 2.431 กรัม ส่วนไอโซเลต SRS 4 ที่ผสมกับ *A. parasiticus* มีผลต่อน้ำหนักสดเท่ากับ 2.608 กรัม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักแห้งกลับให้ผลที่แตกต่างกัน คือ ไอโซเลต TISTR 3167 ที่ผสมกับ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ส่งผลให้น้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสงมากที่สุดเท่ากับ 0.535 และ 0.423 กรัม ส่วนในดินไม่ฆ่าเชื้อ พบว่า ไอโซเลต SRS 4 มีผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของ

ต้นถั่วลิสงมากที่สุดเท่ากับ 3.308 กรัม และ 0.611 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ผสม *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ รวมกับ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ลงในดินสำหรับปลูกถั่วลิสง พบว่า ไอโซเลต SRS 4 ที่ผสมรวมกับ *A. flavus* และ *A. parasiticus* มีผลให้ต้นถั่วลิสงมีน้ำหนักสดมากที่สุดเท่ากับ 3.082 และ 2.717 กรัม ส่วน ไอโซเลต TISTR 3167 ที่ผสมรวมกับ *A. flavus* มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.460 กรัม และ ไอโซเลต SRS 4 ที่ผสมรวมกับ *A. parasiticus* มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.464 กรัม

จากผลของน้ำหนักของต้นถั่วลิสง ทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ (ตารางที่ 4.7) พบว่า ลักษณะของดินทั้งสองรูปแบบ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ พบว่า โดยเฉลี่ยแล้ว น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสง ที่ปลูกในดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่ามากกว่าปลูกในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบ องค์ประกอบทางเคมีในดินฆ่าเชื้อและดินไม่ฆ่าเชื้อ ดังนั้นปริมาณแร่ธาตุในดินอาจจะสูญเสียไปเนื่องจากการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในดิน(ตารางที่ ค 2) และมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วลิสง ดังนั้น การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อการควบคุมทางชีวภาพ หรือ เป็นสารที่ควบคุมทางชีวภาพนั้นต้องอาศัยปัจจัยหลายส่วนเป็นองค์ประกอบ

และนอกจากนี้ ต้องมีการพิจารณาความสามารถในการครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* พบว่า ในการใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 มีเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากมากกว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลตอื่น ๆ เท่ากับ 50 % เมื่อเปรียบเทียบกับ *A. parasiticus* และ เท่ากับ 53.33 % เมื่อเปรียบเทียบกับ *A. flavus* (ตารางที่ 4.8) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า เปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 มีจำนวนลดลง และเมื่อตรวจสอบการลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 ด้วย SEM พบว่า เส้นใยของเชื้อรานี้สามารถที่จะแทรกเข้าไปที่ผนังของรากของต้นถั่วลิสง ดังรูปที่ 4.11

ตารางที่ 4.7 ผลของน้ำหนักรีดและน้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสงที่อายุ 7 วัน ผสมเชื้อรา

Trichoderma spp. ไอโซเลตต่าง ๆ, *A. flavus* และ *A. parasiticus*

เชื้อรา	ค่าเฉลี่ยของน้ำหนัก (กรัม) ¹			
	ดินฆ่าเชื้อ		ดินไม่ฆ่าเชื้อ	
	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง	น้ำหนักสด	น้ำหนักแห้ง
ชุดควบคุม	2.863±0.005c	0.476±0.005bc	1.955±0.009c	0.360±0.002bc
<i>Trichoderma</i> sp. TISTR 3167	3.118±0.002bc	0.364±0.011bc	2.237±0.007bc	0.349±0.002bc
<i>Trichoderma</i> sp. KMC 5	2.412±0.004c	0.381±0.005c	2.319±0.006c	0.273±0.004c
<i>Trichoderma</i> sp. SRS 4	3.334±0.003a	0.389±0.002ab	3.308±0.004a	0.611±0.002ab
<i>A. flavus</i>	2.019±0.002c	0.324±0.003c	2.808±0.002c	0.349±0.002c
<i>A. parasiticus</i>	2.224±0.002ab	0.266±0.006a	3.681±0.002ab	0.874±0.004a
<i>A. flavus</i> + TISTR3167	1.943±0.019bc	0.535±0.003ab	3.036±0.002bc	0.460±0.004ab
<i>A. flavus</i> + KMC5	2.431±0.031c	0.371±0.003bc	1.895±0.004c	0.400±0.004bc
<i>A. flavus</i> +SRS 4	2.230±0.001bc	0.474±0.003abc	3.082±0.004bc	0.416±0.002abc
<i>A. parasiticus</i> + TISTR3167	2.471±0.006c	0.423±0.012c	2.158±0.004c	0.246±0.002c
<i>A. parasiticus</i> + KMC5	2.294±0.003c	0.226±0.005c	2.326±0.005c	0.380±0.002c
<i>A. parasiticus</i> +SRS 4	2.608±0.003bc	0.307±0.002c	2.717±0.001c	0.464±0.002c

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์แนวตั้งที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ตารางที่ 4.8 เปรอร์เซ็นต์การครอบครองรากของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

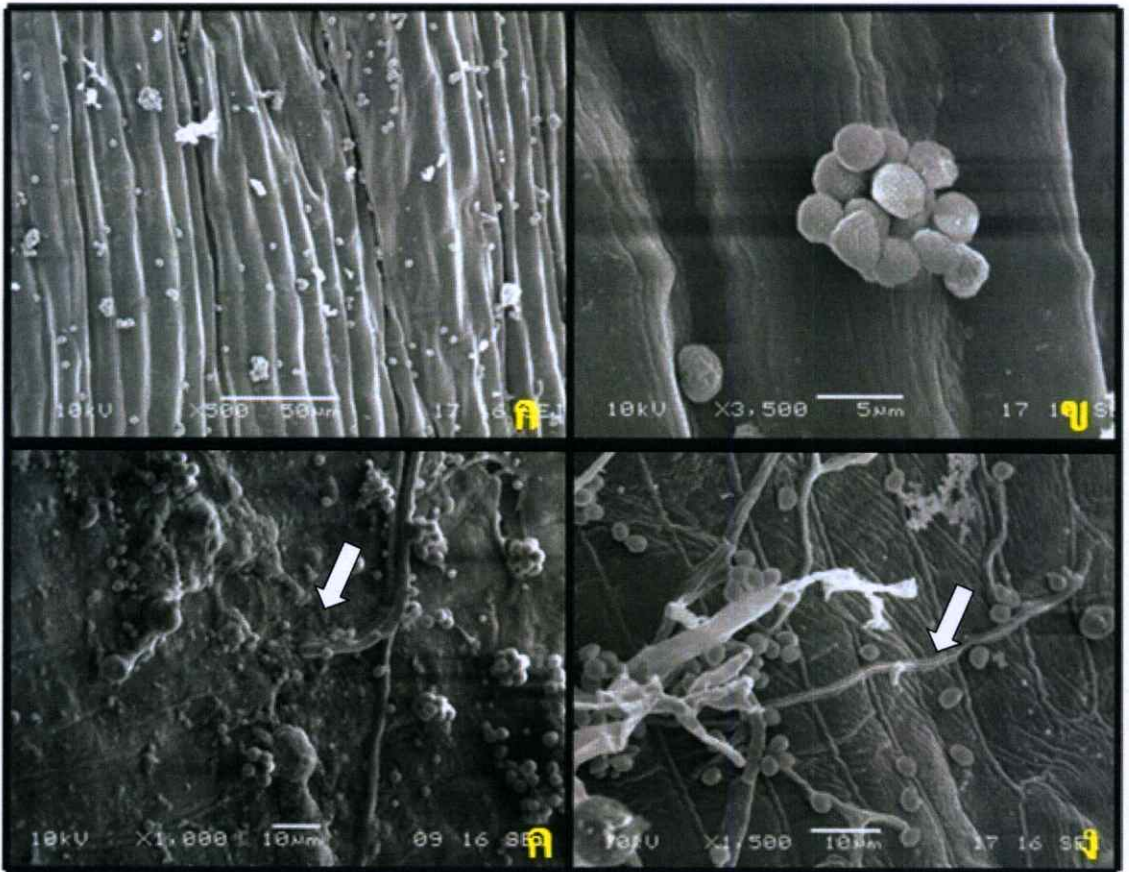
ไอโซเลตต่างๆ เปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

เชื้อรา		เปอร์เซ็นต์การครอบครองรากถั่วลิสง (%) ¹	
		ดินฆ่าเชื้อ	ดินไม่ฆ่าเชื้อ
ชุดควบคุม		20.00g	16.67g
<i>Trichoderma</i> sp. TISTR 3167		56.67a	46.67a
<i>Trichoderma</i> sp. KMC 5		50.00cd	40.00cd
<i>Trichoderma</i> sp. SRS 4		60.00ab	40.00ab
<i>Aspergillus flavus</i> (AF)		40.00de	36.67de
<i>Aspergillus parasiticus</i> (AP)		26.67f	30.00f
<i>Trichoderma</i> sp. ²	AF+ TISTR 3167	53.33abc	40.00abc
	AF+ KMC 5	40.00f	33.33f
	AF+ SRS 4	46.67cd	40.00cd
	AP+ TISTR3167	50.00cd	40.00cd
	AP+ KMC 5	46.67e	26.67e
	AP+ SRS 4	40.00e	33.33e
<i>Aspergillus</i> sp. ³	AF+ TISTR 3167	3.33h	3.37h
	AF+ KMC 5	3.33h	10.00h
	AF+ SRS 4	3.33h	6.67h
	AP+ 3167	3.33h	3.33h
	AP+ KMC 5	6.67h	10.00h
	AP+ SRS 4	6.67h	6.67h

¹ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

² เปรอร์เซ็นต์การครอบครองรากของดินถั่วลิสง ที่เกิดจากเชื้อรา *Trichoderma* spp.

³ เปรอร์เซ็นต์การครอบครองรากของดินถั่วลิสง ที่เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus* sp.



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 ซึ่งมีการเจริญที่บริเวณผิวของรากถั่วลิสง

(ก) และ (ข) ลักษณะของ conidia ที่ผิวของรากต้นถั่วลิสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยายภาพ 500 เท่า และ 3,500 เท่า

(ค) และ (ง) ลักษณะของเส้นใยของไอโซเลต TISTR 3167 ที่เจริญสัมผัสอยู่ที่ผิวของรากถั่ว และแทงเข้าไปในเนื้อเยื่อของรากภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า และ 3,500 เท่า

4.4 วิจัยรณผลการทดลอง

Vinale *et al.* (2008b) ได้ศึกษาผลของสารทุติยภูมิที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma* สายพันธุ์ที่ขยับยั้งเชื้อก่อโรค ได้แก่ *T. harzianum* T22, T39 และ A6 และ *T. atroviride* สายพันธุ์ P1 พบว่านอกจากจะสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคในดินแล้ว ยังมีการสร้างสารบางชนิดที่ส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ สาร harzianolide และ 6-n-pentyl-6H-pyran-2-ono (6PP) มีผลต่อการงอกของเมล็ดมะเขือเทศ และพืชน้ำมันบางชนิด เช่น canola นอกจากนี้ยังพบว่า โมเลกุลของ

สารนี้มีส่วนชักนำให้เกิดความต้านทานในพืช ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่พบว่า *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TISTR 3167 ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *T. viride* ที่ผสมในดินปลูกต้นถั่วลิสง มีผลให้ต้นถั่วลิสงมีความยาวยอด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสงทิวา (2540) รายงานว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* สามารถเข้าทำลายเมล็ดถั่วลิสงได้ โดยเส้นใยจะมีการแทรกผ่านชั้น outer epidermis ของเมล็ดถั่วลิสง ดังนั้นหากใช้เชื้อราปฏิปักษ์สามารถเจริญแบบแข่งขันในดินรวมทั้งมีคุณสมบัติเป็น mycorrhiza หรือ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* sp. ได้ รวมทั้งมีสารที่กระตุ้นการเจริญของพืชได้ สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติทั้งควบคุม เชื้อก่อโรคพืช กระตุ้นระบบต้านทานในพืช และ ส่งเสริมการเจริญของพืช Gravel *et al.* (2007) รายงานว่า *Trichoderma atroviride* สามารถสร้าง Indole Acetic Acid (IAA) ซึ่งสารที่กระตุ้นการเจริญของพืช โดยทดสอบผลต่อการเจริญของมะเขือเทศในเรือนทดลอง รวมทั้งปริมาณของเชื้อราในดิน และบริเวณรอบรากพืช

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการเจริญแบบแข่งขัน จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้งหมด 5 ไอโซเลต คือ *Trichoderma* sp. TISTR 3167, SRS 4, KMC 5, SCP III และ SCP II พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Trichoderma viride* จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 คล้ายคลึงกับ *Trichoderma atroviride* จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต KMC 5 และ SRS 4 คล้ายคลึงกับ *Trichoderma longibrachiatum* จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP III และคล้ายคลึงกับ *Trichoderma citrinoviride* จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SCP II

เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลตดังกล่าวมาศึกษากลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในดิน โดยเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 และ *Aspergillus parasiticus* IMI 102566 ในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่าที่ 28 วัน *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167, SRS 4 และ KMC 5 มีผลทำให้ปริมาณของเชื้อรา *A. parasiticus* เหลืออยู่ในดินเท่ากับ 1.90×10^7 , 1.03×10^7 และ 1.48×10^7 CFU ต่อกรัมของดิน และปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* เหลืออยู่ในดินเท่ากับ 2.96×10^7 , 2.79×10^7 และ 4.21×10^7 CFU ต่อกรัมของดิน พบว่า *Trichoderma* sp. ไอโซเลต SRS 4 สามารถลดปริมาณของเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้มากที่สุด แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167, SRS 4 และ KMC 5 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง จึงเลือกทั้ง 3 ไอโซเลตมาทำการทดลองผสมลงในดินปลูกกับต้นถั่วลิสงต่อไป โดยทำการเปรียบเทียบทั้งในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า ดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลตมีผลทำให้ต้นถั่วลิสงมีความสูงมากกว่าในดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปริมาณเชื้อที่ตรวจนับได้จากดินปลูก พบว่า ปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ ในแต่ละชุดทดลองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่ตรวจนับได้จากดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ยกเว้น เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167

จากการทดลองสรุปได้ว่า *Trichoderma* sp. ไอโซเลต TISTR 3167 (ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Trichoderma viride*) มีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อราอื่นๆ ในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในดิน

ข้อเสนอแนะ

1. ปรับปรุงวิธีทดสอบในแปลงทดลอง โดยศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นในดินธรรมชาติ และเพิ่มปริมาณหัวเชื้อของ *Trichoderma* sp. และทดสอบปริมาณความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมเชื้อก่อโรคในดิน
2. ทดสอบปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่าง เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมในแปลงทดลองได้
3. ปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อรา *Trichoderma* sp. เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารทุติยภูมิ หรือ เอนไซม์ เพื่อควบคุมเชื้อราก่อโรค รวมทั้งศึกษาสารทุติยภูมิที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับฮอว์โมนพืช เพื่อประโยชน์ทั้งในเรื่องการควบคุมเชื้อราที่ก่อโรคในดินและการส่งเสริมการเจริญของต้นพืช
4. ศึกษากลไกการตอบสนองของพืชที่มีต่อสารทุติยภูมิจากเชื้อรา *Trichoderma* sp. เช่น การจดจำสารทุติยภูมิ หรือ เอนไซม์ของเชื้อรา ที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิดรวมทั้งการส่งเสริมการเจริญ หรือ การกระตุ้นความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืช
5. เพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรม เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเช่น เอนไซม์ หรือ สารที่กระตุ้นการเจริญของพืช เพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม
6. วิเคราะห์ปริมาณการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

บรรณานุกรม

- จินตนา อิงคนันท์ . 2543 การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* sp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอและทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* . ปรินญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต. (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรณวิไล เกษนรา. 2534. การผลิตและการทดสอบคุณภาพของผงเชื้อรา *Trichoderma harzianum* . วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทยาศาสตร์) 25(2): 169 – 176.
- แสงทิวา สุริยงค์. 2540. ความแตกต่างของโครงสร้างเมล็ดที่มีผลต่อความเสื่อมของพันธุกรรม ความต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสง. ปรินญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต. เกษตรศาสตร์(พืชไร่).มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.เชียงใหม่.
- ศุภสิทธิ์ สิทธาพานิช. 2543. อิทธิพลของฤดูปลูกและอายุการเก็บเกี่ยวต่อการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง 3 พันธุ์ . วิทยานิพนธ์ปรินญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- Abbas, H.K. 2005. **Aflatoxin and Food Safety**. Taylor and Francis group. New York. USA.
- Abbas, H. K., Zablotowicz, R.M., Bruns, H. A. and Abel, C. A. 2006. “Biocontrol of Aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates”, **Biocontrol Science and Technology**. 16 (5) : 437-449.
- Association of Official Seed Analysis. 1981. Rules for testing seeds. **Journal of Seed Technology**. 6(2) : 1-126.
- Bae, Y.S. and Knudsen, G.R. 2005. “Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*”. **Biological Control**. 32 :236-242.
- Batta, Y. A. 2003. “Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion”, **Crop Protection**. 23:19-26.
- Barnett, H.L. and Hunter., B. B. 1972. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. Burgess Publishing Company, Minnesota, USA.
- Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C. and Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains”, **International Microbiology**. 7 : 249-260.
- Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma* II intragenic classification. **Canadian Journal of Botany**. 69 : 2357-2372.

- Brewer, M. T. and Larkin, R.P. 2005. "Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato". **Crop Protection**. 24 : 939-950.
- Calistru, C., McLean, M. and Berjak, P. 1997. "In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliform* by *Trichoderma* species". A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. **Mycopathologia**. 137 : 115-124.
- Dorner, J.W., Cole, R.J., Connick, W. J., Daigle, D. J., Mcguire, M. R. and Shasha, B. S. 2003. "Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts", **Biological Control**. 26 : 318-324.
- Dorner, J.W. and Horn, B. W. 2007. "Separate and combined applications of nontoxigenic *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* for biocontrol of aflatoxin in peanuts", **Mycopathologia**. 163 : 215-223.
- Dubey, S.C., Suresh, M. and Singh, B. 2007. "Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt". **Biological Control**. 40 : 118-127.
- Ehrlich, K. C., Kobbeman, K., Montabano, B.G. and Cotty, P.J. 2007. "Aflatoxin-producing *Aspergillus* sp. in Thailand" **International Journal of Food Microbiology**. 114 : 153-159.
- Elad, Y. 2000. "Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action". **Crop Protection**. 19 : 709-714.
- El-Katany, M.H., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M. A. and Gubitz, G. M. 2001. "Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*". **Applied Microbiological Biotechnology**. 56 :137-143.
- Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell, R.J. 2007. "Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride* : Possible role of Indole acetic acid (IAA) . 39:1968-1977.
- Griffin, D.H., 1994. **Fungal Physiology** : 2nd edition, John Wiley and Sons, Inc. New York , USA.
- Inglis, G. D. and Kawchuk, L. M. 2002. "Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi", **Canada Journal of Microbiology**. 48 :60-70.

- Intana, W. 2003. Selection and development of *Trichoderma* spp. for high glucanase , antifungal metabolite producing and plant growth promoting isolates for biological control of cucumber damping-off caused by *Pythium* spp. **Dissertation in Degree of Philosophy (Plant Pathology)**. Kasetsart University. Bangkok.
- Johnson, L. F. and Curl, E.A. 1972. **Method for Research on the Ecology of Soil Borne Pathogens**. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA.
- Kucuk, C. and Kivanc, M. 2004. "In vitro antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*". **Turkey Journal of Biology**. 28 : 111-115.
- Lewis, J. A. and Lumsden, R. D. 2001. "Biocontrol of damping-off of greenhouse –grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp." **Crop Protection**. 20 : 49-56.
- Lillehoj, E. B., Ciegler, A. and Hall, H. H. 1967. "Aflatoxin B1 uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects", **Journal of Bacteriology**. 93(1) : 464-471.
- Miranda, M., Herrera, A., Estrella, J. J. and Cabriales. P. 2005. "Colonization of rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under fields conditions". **Soil Biology and Biochemistry**. 38 : 1823-1830.
- Nesci, A.V., Bluma, R.V. and Etcheverry, M.G. 2005. "In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production". **European Journal of Plant Pathology**. 113 : 159-171.
- Nirenberg, H.I. 1976. Untersuchungen uber die morphologische und biologische Differenzierung in der **Fusariundecktion** *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fu r Land- und Forstwirrschaft. Berlin-Dahlem*. 169: 1-1 17.
- Okemoto, K., Uekita, T., Tsumaraya, Y., Hashimoto, Y. and Kasama, T. 2002. "Purification and characterization of an endo-B-(1->6)-galactanase from *Trichoderma viride*". **Carbohydrate Research**. 338 : 219-230.
- Perello, A., Monaco, C., Simon, M. R., Sisterna, M. and Bello, G. D. 2003. "Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina" **Crop Protection**. 22 : 1099-1106.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycology Papers**. 116 : 1-56.

- Roberts, D.P., Lohrke, S. M., Meyer, S.L.F., Buyer, J.S., Bowers, J.H., Baker, C. J., Wei li, de Souza, J.T., Lewis, J.A. and Chung, S. 2005. "Bicontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne disease of cucumber". **Crop Protection**. 24 : 141-155.
- Rojo, F.G., Reynoso, M.M., Ferez, M., Chulez, S. M. and Torres, A. M. 2007. "Biological control of *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions". **Crop Protection** 26 : 549-555.
- Samuels, G. J. 1996. "*Trichoderma* : a review of biology and systemic of the genus". **Mycology Research**. 86 : 421-435.
- Samuels, G.J. and Chaverri, P. 2003. "Hypocrea / *Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreacea) : species with green ascospores". **Mycology Research**. 48: 1-116.
- Singh, A., Srivastava, S. and Singh, H.B.. 2007. "Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of disease". **Bioresource Technology**. 98 : 470-473.
- Thanaboripat, D., Im-erb, A. and Rungrattanametee, V. 2003. "Effect of Ling Zhi mushroom on aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. In **Biological Control and Biotechnology**. Yang Qian (ed.). Heilongjiang Science and Technology Press, Harbin. pp. 22-30.
- Thanaboripat, D., Kraipechapun, K., Pattanapongsak, C., Srisanan, S. and Nanasombat, S. 1997. "Detoxification of aflatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercial yoghurt". **Kasetsart Journal (Nat.Sci.)** 31: 117-123.
- Thangavelu, R., Palaniswami, A. and Velazhanan, R. 2003. "Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana". **Agriculture, Ecosystems and Environment**. 103 : 259-263.
- Tsahouridou, P. C. and Thanassouloupoulos, C. C. 2002. "Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping –off by *Sclerotium rolfsii*". **Soil Biology and Biochemistry**. 34 : 767-776.
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. and Valero, J.R. 2007a. "Review : Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp. : Panoply of biological control". **Biochemical Engineering Journal**. 37 : 1-20.

- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R.D., Sahai, V., Prevost, D., Valero, J.R. and Surampalli. R.Y. 2007b. "Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge : Rheology , lytic enzymes and biocontrol activity". **Enzyme and Microbiology Technology** . 41 : 764-771.
- Vinale, F., Sivasithamparam. K, Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. and Lorito, M. 2008a. "Trichoderma –plant-pathogen interactions". **Soil Biology and Biochemistry**. 40 : 1-10.
- Vinale, F., Sivasithamparam. K, Ghisalberti, E. L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S. L. and Lorito, M. 2008b. "A novel role for Trichoderma secondary metabolites in the interactions with plants". **Physiological and Plant Pathology**. 72: 80-86.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
ผงวุ้น	12	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2. Peptone Dextrose Rose-bengal Agar (Martin's medium) Johnson and Curl.1972

ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Rose bengal (1%)	3.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
Streptomycin*	1	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

3. Water Agar

ประกอบด้วย

ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

4. Synthetic Nutrient Agar (Nirenberg , 1976)

ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
KNO_3	1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
กลูโคส	0.2	กรัม

ซูโครส	0.2	กรัม
NaOH	0.6	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

* เติมน้ำในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

The Dichotomous Key of the Genus of *Trichoderma* (Rifai, 1969)

Key to the sections of *Trichoderma*

- 1(a) Conidiation effuse, conidia not green ; conidiophores with few or no lateral branches ;
 phialides borne in simple terminal verticils, cylindrical to lageniform, “*Cephalosporium*”-
 like.....section *Hypocreanum*
- 1(b) Conidiation effuse or fasciculate to postulate, conidia often green ; conidiophores with
 frequent lateral branches ; phialides mostly lageniform to ampulliform.....2
- 2(a) Conidiophore main axes long with short secondary branches, not extensively rebranching ;
 branches and phialides frequently arising singly, particularly the terminal ones; conidia
 smooth but sometimes with conspicuous , sinuate, wing-like or bullate ornamentation
section *Longibrachiatum*
- 2(b) Conidiophores repeatedly rebranching ; branches and phialides paired or verticillate, also
 those in terminal position ; conidia smooth-walled or verrucose3
- 3(a) Conidiophores and branches relatively broad (main axis to 10 μm wide) ; phialides in
 verticils of 2-7, ampulliform to lageniform ; conidia green, brownish or hyaline
section *Pachybasium*
- 3(b) Conidiophores and branches narrow and flexous (main axis to 6 μm wide) ; phialides mostly
 in verticils of 2 or 3(-5) , lageniform to subulate ; conidia always green
section *Trichoderma*

Key to species in *Trichoderma* section *Trichoderma*

- 1(a) Colonies slow-growing, reaching less than 6 cm diam. in 7 days at 20°C2
- 1(b) Colonies faster growing3
- 2(a) Colonies yellow-green, floccose; phialides slender, almost *Verticillium*-like but curved ;
 conidia obovoid with truncate base, 3.0-5.0 x 2.0-3.2 μm 2. *Trichoderma*
aureoviride anam. of *Hypocrea aureoviridis*
- 2(b) Colonies green, granular, tardily sporulating ; phialides flask-shaped ; conidia ellipsoid,
 3.5-5.0 x 2.0-2.6 μm [*Trichoderma* anam. of *Podostroma alutaceum*].3

- 3(a) Conidia cylindrical, 3.0-4.8 x 1.9-2.8 μm 4. *T. koningii* aggregate
- 3(b) Conidia subglobose to short-ellipsoidal or ovate.....4
- 4(a) Conidia ovate with truncate base , 3.5-5.0 x 2.5-3.2 μm 5. *Hypocrea vinosa*
- 4(b) Conidia subglobose to short-ellipsoidal5
- 5(a) Fully mature conidia pale green, 2.5-3.5 x 2.1-3.0 μm 3. *T. harzianum* aggregate
- 5(b) Fully mature conidia becoming dark green6
- 6(a) Fully mature conidia more or less roughened, 3.6-4.5 μm diam. or 4.0-4.8 x 3.5-4.0 μm
.....6. *T. viride* aggregate
- 6(b) Fully mature conidia smooth-walled, usually 2.6-3.8 x 2.2-3.4 μm 1. *T. atroviride*

Key to species in *Trichoderma* section *Pachybasium*

(modified from Bissett, 1991)

- 1(a) 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 [if conidia are hyaline see 9(b)]......2
- 1(b) Conidiophore organized in compact, hemispherical to cushion-shaped pustules ; conidiophores usually highly branched with branches 2-4 verticillate.....8
- 2(a) Conidiophores arranged in fascicles up to 2 mm. diam.3
- 2(b) Conidiophores effuse, or loosely arranged in flat pustules4
- 3(a) Colonies less than 4 cm. diam. after 4 days at 20°C ; aerial hyphae more than 1.5 μm wide ; phialides convergent ; chlamydospores infrequent ; conidia 2.5-4.5 x 2.0-3.1 μm
.....12. *Trichoderma* anam. of *Hypocrea gelatinosa*
- 3(b) Colonies more than 4 cm. diam. after 4 days at 20°C ; aerial hyphae less than 1.5 μm wide ; phialides divergent ; chlamydospores abundant in older mycelium ; conidia 2.9-4.0 x 2.0-2.9 μm 9. *T. fasciculatum*
- 4(a) Conidia subglobose to obovoid , smaller than 3.5 x 2.5 μm , rather pale green5
- 4(b) Conidia broadly ellipsoidal, larger than 3.5 x 2.5 μm , of other colour6
- 5(a) Conidiation usually diffuse ; phialides flask-shaped, 5.5-7.5 (in terminal position -10) x 2.5-3.2 μm , in divergent clusters of 3-5, conidia subglobose to short-obovoid, 2.5-3.5 x 2.1-3.0 μmsee 3. *T. harzianum* aggregate

- 5(b) Conidiation more or less pustular but lacking sterile appendage ; phialides broadly flask-shaped, 4-5(-7) x 2.3-3.0 μm ; conidia subglobose , 2.3-3.0 x 2.0-2.6 μm
14. *T. inhamatum*
- 6(a) Conidia pale brown, 3.0-5.3 x 2.4-4.3 μm 11. *T. flavofuscum*
- 6(b) Conidia dark green7
- 7(a) Conidiophores aggregated into flat pustules on MA, usually with sterile apical elongations; phialides divergent; conidia 3.7-5.3 x 2.6-3.7 μm 7. *T. crassum*
- 7(b) Conidiation entirely effuse, or conidiophores lacking sterile apical elongations ; phialides convergent in penicillate manner ; conidia 3.5-6.0 x 2.8-4.1 μm 26. *T. virens*
- 8(a) (1) Conidiation white to buff9
- 8(b) Conidiation eventually green to grey10
- 9(a) Conidiophores with spiral, sterile apical elongations ; phialides divergent ; conidia ellipsoidal, 2.3-3.6 x 1.4-2.2 μm 19. *T. polysporum*
- 9(b) Conidiophores lacking sterile elongations ; phialides more or less convergent ; conidia subglobose, 2.5-3.5 μm diam.18. *T. piluliferum*
- 10(a) Conidiophores with conspicuously roughened, spiral, sterile apical elongations ; conidiation bright greenish-yellow or rosy-buff ; conidia 2.8-4.0 x 1.8-2.5 μm 8. *T. croceum*
- 10(b) Conidiophores lacking sterile elongations or elongations not roughened ; conidiation in various green or grey shades11
- 11(a) Conidiophores arrange in pustules up to 2 mm diam., glaucous to grayish ; and conidiophores main axis 4.5-7 μm wide over the fertile part ; conidia 3.0-4.6 x 1.8-2.7 μm 21. *Trichoderma* anam. of *Hypocrea semiorbis*
- 11(b) Conidiophores pustules larger , usually in definite green shades ; or conidiophores main axis not exceeding 5.5 μm wide over the fertile part12
- 12(a) Conidia consistently less than 3.5 μm long and 2.5 μm wide13
- 12(b) Conidia mostly longer and/or wider15
- 13(a) Conidia subglobose to broadly obovoidsee 5
- 13(b) Conidia ellipsoidal, 2.5-3.4 x 1.8-2.3 μm 14
- 14(a) Conidiogenous areas bright green to yellow-green, conidiophores main axis branched and fertile to ap.16. *T. minutisporum*

- 14(b) Conidiogenous areas grey-green, conidiophore main axis with conspicuous spiral sterile apical elongations25. *T. tomentosum*
- 15(a) Colony reverse conspicuously in pigmented yellow to reddish-brown shades ;
conidiophore main axis very stout, 4-6.5 μm wide at base of strile elongation.....16
- 15(b) Colony reverse colorless to pale dull yellowish ; conidiophore main axis usually 3.5-5 μm wide at base of strile elongation.....17
- 16(a) Conidiophore main axis relatively straight throughout, the upper part unbranched and nonfertile to near the apex, which is terminated by a single phialide or more often by 2-3 short fertile branches ; conidia 3.0-4.5 x 1.9-2.5 μm 10. *T. fertile*
- 16(b) Conidiophore main axis with a spiral, sterile apical elongation, never with fertile branches near the apex ; conidia 3.0-4.4 x 1.8-2.7 μm 22. *T. spirale*
- 17(a) Conidia strictly cylindrical, frequently longer than 4.5 μm , never shorter than 3.5 μm 18
- 17(b) Conidia cylindrical to ellipsoid, rarely longer than 4.5 μm , often shorter than 3.5 μm 19
- 18(a) Conidiophore main axis with undulate to spiral sterile elongation which is highly branched and anastomosing to within 100 μm of the acute apex ; conidia 3.9-5.7 x 2.0-3.0 μm 15. *T. longipile*
- 18(b) Conidiophore main axis with a straight to flexuous sterile elongation which is sparingly branched with a bluntly rounded apex ; conidia 3.5-5.0 x 1.7-2.8 μm 17. *T. oblongisporum*
[if conidia broadly ellipsoidal, 3.7-5.3 x 2.6-3.7 μm , see also 7(a)]
- 19(a) Conidiophore main axis with straight to flexuous sterile longation.....20
- 19(b) Conidiophore main axis with undulate to coiled or circinate, sterile elongation.....21
- 20(a) Conidiogenous pustules bluish green, appearing spiny due to the presence of stiff, javelin-like sterile conidiophore apices; conidia 3.0-4.8 x 1.8-2.5 μm 24. *T. strigosum*
- 20(b) Conidiogenous pustules dull-green, appearing hairy due to presence of very long, straight or flexuous sterile conidiophore apices; conidia 2.8-4.0 x 2.2-3.0 μm 23. *T. strictipile*
- 21(a) Conidiogenous pustules bluish-green22
- 21(b) Conidiogenous pustules bright-green, surface appearing downy due to the presence of branched, undulate, thin, sterile conidiophore apices; conidia 3.1-4.7 x 2.0-2.9 μm 20. *T. pubescens*

- 22(a) Conidiogenous pustules appearing velvety due to presence of strongly undulate or hamate, sterile conidiophore apices; conidia 3.0-4.5 x 2.1-2.8 μm13. *T. hamatum*
- 22(b) Conidiogenous pustules appearing woolly due to presence of coarse, spiral conidiophore apices; conidia 3.0-4.4 x 1.8-2.7 μm 22. *T. spirale*

Key to species in *Trichoderma* section *Longibrachiatum*

- 1(a) Conidia ellipsoid, ornamented with conspicuous wing- and wart-like ornamentation, 3.6-5.8 x 2.8-3.4 μm , dark green33. *T. saturnisporum*
- 1(b) Conidia generally smooth-walled or some conidia with postulate extensions of the outer layer of the wall2
- 2(a) Conidiophores bearing side branches that are commonly rebranched once or twice ; phialides distinctly constricted at the base; conidia mostly smaller than 4.0 x 2.5 μm3
- 2(b) 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 μm 4
- 3(a) Colonies with conidial areas typically forming large compact pustules ; conidiation in yellow-green shades or dark olive oil in older cultures; conidia ellipsoidal and mostly smaller than 3.5 x 2.0 μm27. *T. citrinoviride*
- 3(b) Colonies with conidial areas widely effused and not forming pustules ; conidiation mostly in bluish-green shades and not darkening appreciably in age ; conidia ellipsoid to nearly cylindrical and mostly 4.0-5.0(-6.0) x 2.5-3.0 μm 30. *T. pseudokoningii*
- 4(a) Conidia mostly longer than 5.0 μm , usually measuring 6.0-7.5 x 3.0-3.7 μm , ellipsoidal , dark green , often mixed with narrower , paler , cylindrical conidia , 5.0-6.0 x 2.0-2.5 μm 5
- 4(b) Conidia usually shorter than 5.0 μm 6
- 5(a) Conidia consistently smooth-walled29. *T. parceramosum*
- 5(b) Conidia narrow oval to subcylindrical , 5.6-8.2 x 2.9-3.8 μm , most smooth-walled , but some with pustulate extensions of the outer layer of the conidial wall32. *T. ghanense*
- 6(a) Conidia short-cylindrical to obovoid, with a conically tapering base , 4.0-5.5 x 2.0-2.5 μm ; reverse uncoloured28. *T. longibrachiatum*
- 6(b) Conidia obovoid to ellipsoid , 3.5-4.5 x 2.3 -3.0 μm ; colony exuding yellow pigment into the agar30. *T. reesei*

ภาคผนวก ก

ผลการวิเคราะห์ดินที่ใช้ในการทดลอง

1. เอกสารรับรองการวิเคราะห์ดินยี่ห้อละโว้ โดยกลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพดิน และน้ำ กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
ชื่อยี่ห้อ : ดินละโว้

บริษัทที่ผลิต : บริษัท เพชรรมณีการเกษตร แขวงคลองสิบสอง เขตหนองจอก กรุงเทพฯ

ตารางที่ ก 1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญในดินตามเอกสารการรับรองของ กรมวิชาการเกษตร

รายการที่วิเคราะห์	หน่วย	ผลการวิเคราะห์
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	-	6.0
ค่าการนำไฟฟ้า (EC)	dS/m (เดซิซีเมนต่อเมตร)	0.720
อินทรีย์วัตถุ	%	18.13
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (P)	ppm	200
โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ (K)	ppm	1,210
แคลเซียม (Ca)	ppm	1,661
แมกนีเซียม (Mg)	ppm	586
เหล็ก (Fe)	ppm	123.66
แมงกานีส (Mn)	ppm	44.46
สังกะสี (Zn)	ppm	16.50
ทองแดง (Cu)	ppm	3.16

คำแนะนำ : ความเป็นกรดเป็นด่างของดินไม่มีความจำเป็นต้องปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่าง ในดิน ดินผสมมีปริมาณฟอสฟอรัสและปริมาณโพแทสเซียมพอเพียงอยู่แล้ว ดังนั้น การดูแลรักษาให้สังเกตการเจริญเติบโตและสีเขียวของต้นไม้ ถ้ามีอาการขาดธาตุอาหารก็ให้ใส่ปุ๋ยเคมีเพิ่มเติมเล็กน้อย และใส่ปุ๋ยในช่วงบำรุงดอก เพื่อให้ดินคงความอุดมสมบูรณ์อย่างยั่งยืนในการปลูกไม้กระถางต่อไป

2. ผลการวิเคราะห์ดินยี่ห้อละโว้ โดยเปรียบเทียบระหว่างดินฆ่าเชื้อกับดินไม่ฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบสำคัญในดิน

รายการที่วิเคราะห์		หน่วย	ผลการวิเคราะห์	
			ดินฆ่าเชื้อ	ดินไม่ฆ่าเชื้อ
ความเป็นกรด-ด่าง (pH, 1:5)		-	5.28	5.35
ค่าการนำไฟฟ้า (EC, 1:5)		μS/cm	1733	1652
อินทรีย์วัตถุ (Walkley & Black)		%	19.1	21.7
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (Brayll)		ppm	442	555
สกัดด้วย 1 N NH ₄ OAc pH 7.0	โพแทสเซียม(K)	ppm	1940	1630
	แคลเซียม (Ca)	ppm	991	1005
	แมกนีเซียม (Mg)	ppm	773	731
สกัดด้วย DTPA	เหล็ก (Fe)	ppm	27.5	4.75
	สังกะสี (Zn)	ppm	95.9	13.5
	ทองแดง (Cu)	ppm	3.83	1.45

คำแนะนำ : ดินเป็นกรดเล็กน้อย ดินมีการสะสมของเกลือ ให้ระมัดระวังเรื่องการใส่ปุ๋ย
อินทรีย์วัตถุสูงมาก ฟอสฟอรัสสูงมาก โพแทสเซียมสูงมาก แคลเซียมสูง
แมกนีเซียมสูงมาก เหล็กปานกลาง - สูงมาก แมกนีเซียปานกลาง – สูงมาก
สังกะสีปานกลาง – สูงมาก

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ, *A. flavus* และ *A. parasiticus*, ความสูงของต้นถั่วลิสง รวมทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เปรียบเทียบระหว่างดินฆ่าเชื้อและดินไม่ฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต ต่างๆ *A. flavus* และ *A. parasiticus* และ เมื่อเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และ ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

		Type III				
		Sum of		Mean		
Source		Squares	df	Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	8662.385	1	8662.385	858.166	.022
	Error	10.094	1.000	10.094(a)		
Treat	Hypothesis	4.319	17	.254	2.920	.000
	Error	13.834	159	.087(b)		
Block	Hypothesis	10.071	1	10.071	115.749	.000
	Error	13.834	159	.087(b)		

a 1.002 MS(BLOCK) - .002 MS(Error)

b MS(Error)

Treat คือ ชุดทดลองทั้งหมด

Block คือ ลักษณะของดิน ทั้ง 2 รูปแบบ ได้แก่ ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Duncan^{a,b}

Treat	N		Subset			
	1	2	3	4	5	1
1	9	6.5761				
18	10	6.7417	6.7417			
16	10	6.8122	6.8122	6.8122		
3	10	6.8470	6.8470	6.8470		
17	10		6.9140	6.9140	6.9140	
14	10		6.9335	6.9335	6.9335	
8	10		6.9463	6.9463	6.9463	
13	10		6.9470	6.9470	6.9470	
11	10		6.9606	6.9606	6.9606	
6	9		6.9681	6.9681	6.9681	
5	10		6.9872	6.9872	6.9872	6.9872
7	10		7.0484	7.0484	7.0484	7.0484
12	10			7.0974	7.0974	7.0974
15	10			7.1098	7.1098	7.1098
4	10			7.1129	7.1129	7.1129
9	10			7.1131	7.1131	7.1131
10	10				7.1947	7.1947
2	10					7.2875
Sig.		.063	.055	.065	.084	.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .087.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.878.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = .05.

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวยอดของต้นถั่วลิสงที่มีผลมาจาก เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ และ *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยเปรียบเทียบ การทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Source		Type III				Sig.
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	
Intercept	Hypothesis	321696.910	1	321696.910	147.591	.052
	Error	2179.650	1	2179.650(a)		
Treat	Hypothesis	4561.027	11	414.639	5.208	.000
	Error	4697.054	59	79.611(b)		
Block	Hypothesis	2179.650	1	2179.650	27.379	.000
	Error	4697.054	59	79.611(b)		

Treat คือ ชุดทดลองทั้งหมด

Block คือ ลักษณะของดิน ทั้ง 2 รูปแบบ ได้แก่ ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Duncan^{a,b}

micro	N		Subset	
	1	2	3	1
AF	6	55.39667		
AFK	6	61.68000	61.68000	
KMC5	6	61.79333	61.79333	
AFS	6	63.62333	63.62333	
AF3	6	63.92667	63.92667	
APK	6	64.74500	64.74500	
AP	6	65.68667	65.68667	
control	6	66.71333	66.71333	
APS	6		67.56333	
AP3	6		68.01000	
SRS4	6		73.69833	
TISTR	6			89.28167
Sig.		.064	.052	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 79.611.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวรากของต้นถั่วลิสง ที่มีผลมาจาก เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ , *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยเปรียบเทียบ การทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และ ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Source		Type III				Sig.
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	
Intercept	Hypothesis	391274.798	1	391274.798	245.938	.041
	Error	1590.950	1	1590.950(a)		
Treat	Hypothesis	4233.078	11	384.825	5.193	.000
	Error	4372.493	59	74.110(b)		
Block	Hypothesis	1590.950	1	1590.950	21.467	.000
	Error	4372.493	59	74.110(b)		

Treat คือ ชุดทดลองทั้งหมด

Block คือ ลักษณะของดิน ทั้ง 2 รูปแบบ ได้แก่ ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อและดินที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Duncan^{a,b}

micro	N		Subset		
	1	2	3	4	1
8	6	63.60167			
4	6	64.58167			
11	6	64.95333			
10	6	67.99000	67.99000		
12	6	71.32167	71.32167	71.32167	
5	6	72.18833	72.18833	72.18833	
1	6	73.06500	73.06500	73.06500	
3	6	74.31500	74.31500	74.31500	
2	6		78.35167	78.35167	78.35167
6	6			81.86667	81.86667
9	6				85.15500
7	6				87.22833
Sig.		.069	.071	.066	.108

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 74.110.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ๔ การวิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักสดของต้นถั่วลิสง ที่มีผลมาจาก เชื้อรา

Trichoderma spp. ไอโซเลตต่างๆ *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และ ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

		Type III				
		Sum of		Mean		
Source		Squares	df	Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	472.341	1	472.341	1523.940	.016
	Error	.310	1	.310(a)		
Treat	Hypothesis	6.808	11	.619	3.763	.000
	Error	9.704	59	.164(b)		
Block	Hypothesis	.310	1	.310	1.885	.175
	Error	9.704	59	.164(b)		

a MS(BLOCK)

b MS(Error)

Duncan

micro	N		Subset	
	1	2	3	1
8	6	2.16283		
11	6	2.31033		
10	6	2.31433		
3	6	2.36583		
1	6	2.40900		
5	6	2.41350		
7	6	2.48917	2.48917	
9	6	2.65650	2.65650	
12	6	2.66250	2.66250	
2	6	2.67783	2.67783	
6	6		2.95267	2.95267
4	6			3.32117
Sig.		.068	.082	.121

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .164.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ๖5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักแห้งของต้นถั่วลิสง ที่มีผลมาจาก เชื้อรา

Trichoderma spp. ไอโซเลตต่างๆ *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และ ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Source		Type III			F	Sig.
		Sum of Squares	df	Mean Square		
Intercept	Hypothesis	11.813	1	11.813	225.526	.042
	Error	.052	1	.052(a)		
Treat	Hypothesis	.454	11	.041	3.253	.002
	Error	.749	59	.013(b)		
Block	Hypothesis	.052	1	.052	4.129	.047
	Error	.749	59	.013(b)		

a MS(BLOCK)

b MS(Error)

Duncan^{a,b}

micro	Subset			
	N	1	2	3
11	6	.30333		
3	6	.32700		
10	6	.33483		
5	6	.33683		
2	6	.35650	.35650	
12	6	.38567	.38567	
8	6	.38567	.38567	
1	6	.41800	.41800	
9	6	.44533	.44533	.44533
7	6		.49767	.49767
4	6		.50000	.50000
6	6			.56983
Sig.		.068	.059	.085

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = .013.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b Alpha = .05.

ตารางที่ ๖ การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การครอบครองรากของต้นถั่วลิสง ที่มีผลมาจาก เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลตต่างๆ *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยเปรียบเทียบการทดลองที่ใช้ดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และ ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

		Type III				
		Sum of		Mean		
Source		Squares	df	Square	F	Sig.
Intercept	Hypothesis	87373.938	1	87373.938	112.522	.060
	Error	776.503	1	776.503(a)		
Treat	Hypothesis	34303.649	17	2017.862	114.098	.000
	Error	1573.990	89	17.685(b)		
Block	Hypothesis	776.503	1	776.503	43.907	.000
	Error	1573.990	89	17.685(b)		

a MS(BLOCK)

b MS(Error)

Duncan

RTREAT	N	Subset												
		1	2	3	4	5	6	7	8	1				
16	6	3.3300												
13	6	3.3500												
15	6	5.0000												
14	6	6.6650												
18	6	6.6700												
17	6	8.3350												
1	6		18.3350											
6	6			28.3233										
8	6				36.8317									
12	6				36.8317									
11	6				36.8367									
5	6				39.1683	39.1683								
9	6					43.3350	43.3350							
3	6						45.1667	45.1667						
10	6						45.5000	45.5000						
7	6						46.7967	46.7967	46.7967					
4	6							49.8333	49.8333					
2	6									51.6700				
Sig.		.073	1.000	1.000	.388	.090	.199	.082	.060					

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 17.685.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b Alpha = .05.

ประวัติผู้เขียน

นางสาวดวงกมล เพชรทิพย์ เกิดเมื่อวันที่ 14 มีนาคม 2524 ที่จังหวัดชุมพร สำเร็จ
การศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปีการศึกษา 2546