บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

พริก (chilli) จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae จัดอยู่ในสกุลเดียวกับมะเขือต่างๆ และมะเขือเทศ โดยมีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Capsicum annuum* พืชในตระกูลนี้มีอยู่ด้วยกันประมาณ 90 สกุล หรือ 2,000 ชนิด โดยทั่วไปเป็นได้ทั้งพืชล้มลุก ไม้พุ่ม และไม้ยืนต้นขนาดเล็ก พริกขึ้นกระจายอยู่ทั่วไปของโลก ส่วนใหญ่เจริญอยู่ในเขตร้อน ลักษณะของต้นพริก คือ มีลักษณะลำต้นตั้งตรง สูงประมาณ 1 ฟุต กิ่งเจริญจากลำต้นเพียง 1 กิ่งแล้วแตกเป็น 2 กิ่งและเพิ่มเป็น 4 เป็น 8 ไปเรื่อยๆ ใบพริกเป็นแบบใบเดี่ยว ใบแบนเรียบ มีขนบ้างเล็กน้อย ใบมีรูปร่างตั้งแต่รูปไข่ ไปจนกระทั่งเรียวยาว ขนาดใบมีต่างๆ กัน ส่วนรากหากินได้ลึก ตรงบริเวณรอบๆต้นพบว่ามีรากฝอยสานกันอยู่อย่างหนาแน่นมาก สำหรับดอกโดยปกติมักพบว่าเกิดดอกเดี่ยวที่ข้อตรงมุมที่เกิดใบหรือกิ่ง ผลพริกจัดเป็นประเภท berry ที่มีลักษณะเป็นกระเปาะ มีฐานสั้นและหนา ส่วนเมล็ดจะเกาะรวมกันอยู่ที่รก พริกเป็นพืชที่มีอายุอยู่ได้หลายฤดู พริกมีถิ่นกำเนิด อยู่ในอเมริกาเขตร้อน และ หมู่เกาะอินเดียตะวันตก พริกที่พบมากในประเทศไทย ได้แก่ พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู และ พริกขี้หนูสวน ซึ่งแต่ละชนิดก็แบ่งย่อยเป็นหลายพันธุ์ พื้นที่ปลูกที่สำคัญ จังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ ขอนแก่น เลย กาฬสินธุ์ นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ เชียงใหม่ ลพบุรี พระนครศรีอยุธยา กาญจนบุรี นครปฐม สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และ ตราด พริกเป็นพืชที่มีการปลูกโดยทั่วไปในทุกภูมิภาค ของประเทศไทย ในระหว่างปี 2531-2539 มีพื้นที่ปลูกเฉลี่ย 382,245 ไร่ ผลผลิตรวมเฉลี่ยระหว่างปี เท่ากับ 418,895 ตัน โดยมีผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่เท่ากับ 1,128 กิโลกรัม ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้ในการบริโภคในครัวเรือนและเพื่อการอุตสาหกรรม พบว่ามีการส่งออกเพียงเล็กน้อยประมาณ 10,000 ตัน/ปี คิดเป็นมูลค่าประมาณ 100 ล้านบาท ที่นิยมปลูกในประเทศไทย จากการสำรวจพบว่ามีอยู่ 2-3 กลุ่มที่สำคัญที่สุดได้แก่ *Capsicum annuum* (ทศพร, 2531)

การปลูกพริกในปัจจุบันมีปัญหาที่สำคัญและมีผลกระทบต่อผลผลิต คือ โรคและแมลง สำหรับโรคที่พบมากในพริก นอกจาก โรคใบจุด ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ยังมีอีกโรคที่สำคัญ คือ โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราฟิวซาเรียม (อนงค์, 2544)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

***Fusarium oxysporum* เชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของพริก**

โรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากเชื้อราฟิวซาเรียม ได้มีผู้รายงานการพบครั้งแรกในรัฐนิวเม็กซิโก ประเทศสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1960 หลังจากนั้นก็มีรายงานการระบาดและความเสียหายจากโรคนี้เกือบทุกแห่งที่มีการปลูกพริก เป็นโรคที่พบประปรายในแปลงปลูกพริกทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งแปลงที่ปลูกพริกซ้ำที่เดิม หรือปลูกพริกที่อ่อนแอต่อโรคต่อเนื่องกันหลายรุ่น เป็นโรคที่ระบาดรุนแรงในภูมิอากาศอบอุ่นและในสภาพดินทรายของเขตร้อน (Agrios, 1988)

สำหรับอาการเริ่มแรกของโรคเหี่ยวจะปรากฏ vein clearing ที่บริเวณด้านนอกของใบอ่อนเพียงเล็กน้อย ต่อมาเมื่อใบแก่จะแสดงอาการ epinasty ที่บริเวณใบซึ่งเกิดจากการเหี่ยวของ petiole พืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลายในระยะต้นกล้ามักเกิดอาการเหี่ยว แคระแกร็น และใบล่างเหลือง บางครั้งมีการสร้างรากมากไปยังลำต้นและใบเหี่ยว ใบร่วงเกิด necrosis ที่ขอบใบและตายในที่สุด ในกรณีที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่อาการที่เกิดขึ้นมักพบบริเวณด้านข้างของลำต้นและลุกลามขึ้นไปด้านบนจนกระทั่งใบและลำต้นตายในที่สุด ถ้าเข้าทำลายที่ผลจะทำให้เกิดจุดดำขึ้น เกิดอาการเน่าและผลร่วงในที่สุด ในกรณีที่เชื้อเข้าทำลายบริเวณราก จะทำให้พืชมีอาการแคระแกรนเมื่อทำการผ่าดูด้านข้างของต้นพืชที่เป็นโรคพบว่าบริเวณโคนต้นปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลที่ท่อลำเลียง อาการดังกล่าวจะแพร่กระจายขึ้นไปด้านบนของต้นพืช ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค ในบางครั้งต้นพืชอาจถูกทำลายก่อนที่จะถึงฤดูการเก็บเกี่ยว แต่โดยทั่วไปแล้วการเข้าทำลายที่รุนแรงจะไม่เกิดขึ้นหากอุณหภูมิของดินและสภาพอากาศค่อนข้างสูงในระหว่างฤดูกาลเพาะปลูก (Agrios, 1997)

ความสำคัญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

เชื้อราสกุล *Fusarium* เป็นราจัดอยู่ใน

Kingdom Mycetae

Division Eumycota

Sub-Division Deuteromycotina

Class Hyphomycetes

Order Hyphales (Moniliales)

Family Dematiaceae

Genus Fusarium

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Fusarium* (Agrios, 1997)

วงจรชีวิตของเชื้อรา *F. oxysporum* เชื้ออยู่ข้ามฤดูในดินในรูปของเส้นใยและสปอร์ชนิดต่างๆ แต่ส่วนมากเป็น chlamydospore เชื้อแพร่กระจายไปกับลม น้ำ ติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตร พืชและดิน ปลูกพืช เชื้อมีชีวิตอยู่ในดินได้นาน (สถิตย์, 2532) การเข้าทำลายเกิดขึ้นเมื่อพืชเจริญเติบโตในดินที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ conidium จะสร้าง germ tube และเส้นใยจะงอกแทง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผ่านปลายรากโดยตรงหรือผ่านทางบาดแผล เส้นใยเจริญผ่าน cortex ของรากไปยังช่องว่างระหว่างเซลล์ และเมื่อเจริญมาถึงท่อลำเลียงก็แผ่ขยายไปถึงลำต้น ยอดของต้นพืชในขณะที่อยู่ในท่อลำเลียง เส้นใยมีการแตกแขนงและสร้าง microconidium ซึ่งถูกปลดปล่อยและแพร่กระจายไปตามระบบท่อลำเลียงของพืช เส้นใยแทงผ่านไปยังเซลล์ที่อยู่ติดกันและผลิต microconidium ต่อไป (นุชนารถ, 2524) ในระยะหลังการเพาะปลูก เชื้อราจะมีชีวิตอยู่รอดโดยอาศัยอยู่ในดิน ฝัก เมล็ด และเศษซากพืชในรูปของ conidium หรือเส้นใย จะเริ่มวงจรชีวิตอีกครั้งเมื่อมีการปลูกพืชในฤดูต่อไป สำหรับการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ ในบางครั้งอาจมีเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดคือมีการเข้าทำลายร่วมกันระหว่างเชื้อชนิดอื่น ซึ่งมีบทบาทในการจำกัดผลผลิตของพืช (Lucas *et al.*, 1995) เชื้อรา *F. oxysporum* เจริญได้ดีภายในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 27-32 องศาเซลเซียสและอัตราการเจริญเติบโตลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชเมื่อมีอุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิของดินมีความสำคัญมากกว่าความชื้นของดิน (สถิตย์, 2532)

ลักษณะของบริเวณรากพืช (rhizosphere) (Curl and Truelove, 1985)

rhizosphere เป็นเขตที่มองเห็นได้ไม่ชัดเจน ซึ่งจะอยู่บริเวณรากพืชที่มีระยะห่างอย่างน้อย 1 หรือ 2 มิลลิเมตร จากผิวรากของพืชซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่รากพืชจะสร้างสารขับจากรากที่มีลักษณะเป็นสารคัดเลือก (selective) สารเหล่านี้มีอิทธิพลต่อจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน สำหรับเซลล์รากพืชที่ตายแล้ว จะมีการสร้างสารคัดเลือกในปริมาณที่น้อยกว่าในเซลล์ของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ ดังนั้น บริเวณ rhizosphere จึงเป็นบริเวณที่มีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดอาศัยอยู่ และเป็นแหล่งอาหารของเชื้อ (Lynch, 1990)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อสารขับจากรากพืช (สมศักดิ์, 2528) มีดังต่อไปนี้คือ

1. ปัจจัยทางพืช เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ คือ สภาพของรากพืชที่มีบาดแผล เกิดเนื่องมาจากการเจริญของราก เช่น การแตกแขนงของรากพืช อายุพืช การเจริญเติบโตของพืช สายพันธุ์พืช และความสมบูรณ์ของพืช

2. สภาพแวดล้อมที่สำคัญต่อการขับสารจากราก คือ สภาพความชื้นของดิน เช่น ถ้าดินแห้งมากจะทำให้ปากใบปิด การเคลื่อนที่ของอาหารมาสู่รากจะมีปริมาณที่น้อยลง ซึ่งจะทำให้สารที่ขับจากรากมีปริมาณลดลง เป็นต้น

3. การฉีดพ่นสารเคมีทางใบพืช เช่น การใช้สาร จำพวก potassium chloride, urea และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid ฉีดพ่นทางใบพืช จะทำให้ไปมีผลต่อปริมาณและชนิดของสารขับจากราก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. ปัจจัยทางชีวภาพ จุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรากพืช จะมีบทบาทที่สำคัญต่อการเจริญของพืชหรือ ทำให้พืชอ่อนแอในกรณีของเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งจะมีผลต่อการขับสารเคมีออกจากรากพืชสู่บริเวณ rhizosphere เชื้อราจะถูกกระตุ้นโดยสารขับจากราก ชนิดของสารขับจากรากยังขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์ที่ต้านทานโรค

การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธี (เกษม, 2532)

วิธีการควบคุมโรคโดยการนำเอาสิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นมาใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยวิธีการลดปริมาณเชื้อ (inoculum) หรือลดกิจกรรมการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคพืชหรือปรสิตที่อยู่ในระยะเจริญเติบโตหรือระยะพักตัวโดยการใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่ามาช่วยในการป้องกันกำจัด ร่วมกับการจัดการสิ่งแวดล้อม พืชอาศัยและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านโรค ซึ่งได้มีการศึกษาทั้งในและต่างประเทศมาแล้วหลายสิบปี โดยเริ่มมีการศึกษากันตั้งแต่ปี 1964 แต่ยังไม่ค่อยแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับ ปัจจุบันการควบคุมโดยชีววิธีเริ่มเป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปใช้ป้องกันกำจัดโรค เนื่องจากมีการนำไปใช้ได้ผลดีจนถึงขั้นทำเป็นการค้า ดังนั้นจึงมีผู้หันมาสนใจในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีกันมากขึ้น โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาใช้ในการควบคุมโรคพืช เช่น การนำเชื้อรา *T. lignorum* มาควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เกิดโรคในถั่ว (Aziz *et al.*, 1997) เชื้อรา *T. viride* เป็น species ที่พบมากในดิน มีการปล่อยสารที่มีความเฉพาะเจาะจงสามารถทำลายเส้นใยของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Ingold and Hudson, 1993) Windels and Lindow (1991) ได้ทดลองใช้เชื้อรา *T. viride* เพื่อควบคุมโรค Botrytis rot ขององุ่นโดยใช้ 4 ครั้งตั้งแต่เริ่มออกดอกจนกระทั่ง 3 สัปดาห์ก่อนเก็บเกี่ยว พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ นอกจากนี้มีการค้นพบสายพันธุ์ของเชื้อรา *T. harzianum* ที่สามารถควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด เช่น โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ แตง ฝ้าย และโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราฟิวซาเรียม ของข้าวสาลี (Campbell, 1989)

ลักษณะของเชื้อรา *Trichoderma* spp. (Troutman and Matejka, 1978)

เชื้อรา *Trichoderma* spp. จัดเป็น soil saprophyte และเป็น mycoparasite โดยใช้เส้นใยขดเป็นวงรอบๆ เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคพืช จากนั้นเข้าไปเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้โดยการย่อยผนังเซลล์ แล้วใช้อาหารจากเชื้อราโรคพืช เจริญได้ดีในดินที่มีความชื้นแต่ไม่แฉะ มีชีวิตยืนยาวได้ในสภาพดินที่มีความชื้นสูง พบว่าในดินที่ปราศจากแหล่งอาหาร เชื้อราชนิดนี้สามารถอยู่รอดได้นานกว่า 130 วัน การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma* สามารถถูกกระตุ้นให้เจริญเติบโตได้โดยใช้สารไธแรม (thiram) แต่จะถูกยับยั้งโดยสารเบโนมิล (benomyl) เชื้อราชนิดนี้มีความทนทานต่อสารเมตาแลกซิล (metalaxyl) และแอมโมเนีย เชื้อรา *Trichoderma* จัดเป็นเชื้อ

ราที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อราโรคพืช เนื่องจากมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว จึงสามารถแข่งขันและเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืชกับเชื้อราชนิดอื่นได้อย่างรวดเร็ว

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* (Beagle-Ristaino and Papavizas,1985)

เชื้อราสกุล *Trichoderma* เป็นราจัดอยู่ใน

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Euascomycetes

Order Hypocreales

Family Hypocreaceae

Genus Trichoderma

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma*

ลักษณะของเชื้อราในจีนัส *Trichoderma* เป็นเชื้อราที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว สร้าง conidiophore ที่แตกกิ่งก้านสาขา อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน โดยที่ปลาย conidiophore มีโครงสร้างที่ให้กำเนิด conidium หรือ spore เรียกว่า phialide รูปร่างคล้ายลูกโบว์ลิ่ง conidium ซึ่งเกิดจากปลาย phialide จะรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (slime head) เห็นเป็นสีเขียวหรือใส (hyaline) ส่วนระยะสมบูรณ์เพศ หรือ teleomorph ของเชื้อรา *Trichoderma* คือเชื้อราในจีนัส Hypocrea หรือจีนัสอื่นๆที่ใกล้เคียงกัน

colony เชื้อรา *Trichoderma* มีการสร้างเส้นใยเจริญเติบโตเร็ว เริ่มแรกโคโลนีมีผิวหน้าเรียบ ไม่มีสี ต่อมาโคโลนีมีลักษณะเป็นแบบฝ้ายฟูอย่างหลวมๆ (loosely floccose) หรือเป็นกระจุกหนาแน่น (compactly tuft) หรือมีลักษณะทั้งสองแบบในโคโลนีเดียวกัน หรือมีลักษณะอยู่ระหว่างทั้งสองแบบ การเกาะกันเป็นกระจุกของโคโลนีมีส่วนเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของก้านชูสปอร์ ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *T. hamatum* มีโคโลนีเป็นกระจุกหนาแน่น สังเกตพบว่าระบบการแตกกิ่งก้านของก้านชูสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้มีความซับซ้อนมาก (complicate) (นุชนารถ, 2535)

การสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* ที่สำคัญ คือ บริเวณที่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นวงรอบ หรือเป็นวงแหวน ซึ่งเกิดจากอิทธิพลของแสง และเมื่อโคโลนีมีอายุมากขึ้นจะมีการสร้าง conidiophore ขึ้นมาใหม่อีกบริเวณรอบนอกที่สร้างสปอร์ ทำให้เห็นการเกิดวงรอบ (zonation) ไม่ชัดเจน บางไอโซเลต มีลักษณะเป็นแบบปุยฝ้าย (floccose) การสร้าง zonation สามารถสังเกตได้ในขณะที่เชื้อยังมีอายุน้อยเท่านั้น (นุชนารถ, 2535)

สีของโคโลนีส่วนใหญ่เกิดมาจากการสร้างสีของสปอร์ (phialospore) โดยปกติเชื้อรา *T. viride* มีโคโลนีสีเขียวเข้ม แต่บางครั้งอาจจะแสดงสีที่แตกต่างออกไปอย่างชัดเจน ตั้งแต่สี

เหลืองไปจนถึงสีเขียวอ่อน ส่วนโคโลนีของเชื้อรา *T. polysporum* มีสีขาวเนื่องจาก phialospore ไม่มีสี นอกจากนี้สีของสปอร์ที่มีผลต่อสีของโคโลนีแล้วยังมีปัจจัยอื่นอีก คือ

1. ปริมาณสปอร์ที่สร้างขึ้น ทำให้สีของโคโลนีเข้มขึ้นหรืออ่อนลง
2. สร้างผลึกสี หรือปล่อยสีออกมา ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไป
3. ชนิดและ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อสีของโคโลนี
4. การสร้างเส้นใยที่ยืดตัวออกและเป็นหมัน (sterile hyphal elongation) เหนือกระจุกของ conidiophore ของเชื้อรา *T. hamatum* ทำให้โคโลนีมีสีเขียวหรือสีเทาเขียว (grayish-green)

conidiophore ก้านชูสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* มีการแตกกิ่งก้านหลายแบบ และการสร้างสลับซับซ้อนกันมาก มองดูโครงสร้างรอบนอกเป็นแบบรูปกรวย (conidia) หรือแบบปิรามิด (pyramid) ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *T. hamatum* และ *T. polysporum* มีก้าน conidiophore ยาว แตกกิ่งก้านด้านข้างสั้นและหนา มีลักษณะเฉพาะ คือ สร้างเส้นใยที่ยืดตัวออกและเป็นหมัน เป็นเส้นยาวคล้ายแส้ เป็นส่วนที่ไม่สร้างสปอร์อยู่ปลายก้านของ conidiophore ส่วนเชื้อรา *T. longibrachiatum* มีเส้นแกนกลางของก้าน conidiophore ค่อนข้างยาว และแตกกิ่งก้านสั้นเช่นกัน แต่ไม่เหมือน เช่น เชื้อรา *T. hamatum* และ *T. polysporum* ที่สร้าง conidiophore มีการแตกกิ่งก้านน้อยและสลับกันไป ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ง่ายมาก สำหรับเชื้อรา *T. viride* และ *T. koningii* สร้าง conidiophore ที่มีการแตกกิ่งก้านด้านข้างออกมาจากจุดเดียวกันเหมือนกับพวกเชื้อรา *Verticillium* (นุชนารถ, 2535)

phialide เป็นก้านสปอร์ที่อยู่ปลายสุด ให้กำเนิดสปอร์ ส่วนใหญ่มีรูปร่างคล้ายขวดชมพู่ (flask) หรือลูกพินโบว์ลิ่งที่ฐานจะแคบกว่าตรงกลางเล็กน้อย และค่อยๆเรียวไปยังส่วนปลาย ซึ่งตรงปลายจะเป็นรูปกรวยแคบๆ หรือใกล้จะเป็นทรงกระบอก โดยทั่วไป phialide จะแตกออกมาจากจุดกำเนิดเป็นวงกว้างและปลายงอโค้ง ทำให้มองด้านข้างเหมือนเขาสัตว์ (horn-shaped) และอาจเกิดขึ้นบนกิ่งก้านของ conidiophore ที่แตกด้านข้าง ลักษณะเรียงกันของ phialide เป็นวงรอบไม่สม่ำเสมอ มีจำนวนถึง 5 อัน เกิดที่ปลายก้านของ conidiophore ซึ่งเกิดจากเซลล์ที่ให้กำเนิด หรือเกิดตลอดกิ่งก้านแบบเดี่ยวๆ และสลับกันไป หรือเกิดตรงข้ามเป็นคู่ๆ แต่ส่วนใหญ่อันที่อยู่ปลายสุดมักเกิดเดี่ยวๆ และค่อนข้างยาวกว่าอันที่อยู่ข้างล่าง (นุชนารถ, 2535)

การเปรียบเทียบการแตกกิ่งก้านของ conidiophore และตำแหน่งของ phialide

การแตกกิ่งก้านของ conidiophore มีความสัมพันธ์เป็นอย่างดีกับการจัดเรียงของ phialide ที่มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อรา *Verticillium* เช่น เชื้อรา *T. koningii* และ species อื่นที่เป็นพวกเดียวกันจะเห็นความแตกต่างได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการจัดเรียงของ phialide

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะทั่วไปของ phialide ในแต่ละ species โดย Beagle-Ristaino and Papavizas (1985) บันทึกไว้ดังนี้

เชื้อรา *T. koningii* มี phialide มีลักษณะกลมและสั้น การจัดเรียงของ phialide แตกออกจากจุดเดียวกันแบบ verticillate แต่เป็นมุมกว้างกว่าเชื้อรา *Verticillium* แต่ไม่สม่ำเสมอและเป็นมาตรฐานอย่างเชื้อรา *Verticillium* เพราะไม่ได้เกิดที่ระดับเดียวกัน ซึ่งเป็นลักษณะที่ใช้แยกเชื้อรา *Trichoderma*

เชื้อรา *T. viride* ส่วนใหญ่แสดงการเรียงตัวของ phialide และมีลักษณะที่แตกต่างไปจากกลุ่มอื่นโดยการแตกกิ่งก้านของ conidiophore เป็นแบบง่ายๆไม่ยุ่งยาก และมีความเป็นระเบียบน้อย ไม่อยู่เป็นกลุ่มหนาแน่นอย่างเชื้อรา *T. koningii* และ species อื่นๆ จึงมีลักษณะที่ต่างไปจากเชื้อรา *Verticillium* มากขึ้น

เชื้อรา *T. longibrachiatum* มีการแตกกิ่งก้านของ conidiophore แบบเรียบง่าย มี phialide เกิดขึ้นโดยตรงและเกิดขึ้นเดี่ยวๆ บนก้านของ conidiophore ซึ่งโดยทั่วไปแต่ละอันห่างกัน และระยะไม่สม่ำเสมอ บางครั้งรวมกันเป็นกลุ่มเล็กๆ

เชื้อรา *T. hamatum* และ *T. polysporum* ทั้ง 2 species การเรียงตัวของ phialide มีลักษณะเฉพาะคือ เกิดการรวมกลุ่มกันเป็นก้อน (aggregate) เนื่องจาก conidiophore เป็นแบบกระจุกหนาแน่น ลักษณะ phialide อ้วนและสั้น และรูปร่างเป็นแบบผลสาลี่ (pear-shaped) จนถึงรูปไข่ (ovoid) แต่ส่วนใหญ่เป็นรูปไข่ เรียงตัวกันอย่างใกล้ชิดและหนาแน่นบนกิ่งก้านที่แตกแขนง (side branch) ออกไปซึ่งมีขนาดสั้นและหนา

เชื้อรา *T. piluliferum* มีลักษณะการเรียงตัวของ phialide ซึ่งอาจจะแยกเป็นอีกแบบหนึ่ง เนื่องจากมีการแตกกิ่งก้านของ conidiophore เป็นแบบ koningii-type แต่การเรียงตัวของ phialide เป็นแบบ hamatum-type

เมื่อเชื้อรา *Trichoderma* มีอายุมากขึ้น จะทำให้แยกลักษณะความแตกต่างของ phialide และ conidiophore ได้ยาก เนื่องจากในระยะที่เจริญเติบโตเต็มที่เส้นใยยุบตัวลง แต่สามารถแยกลักษณะของเชื้อรา *Gliocladium* และ เชื้อรา *Verticillium* ได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากทั้งสองชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา *Trichoderma* และเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพของ phialide ไปมีลักษณะและทำหน้าที่คล้าย phialospore ซึ่งมีลักษณะสีดำและมีผนังหนาเพิ่มขึ้น ซึ่งพบเสมอๆ ในเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* ที่มีอายุมาก โดยเฉพาะเชื้อรา *T. hamatum*

phialospore เกิดเดี่ยวๆ และเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนกลม หรือค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 15 ไมครอน อยู่บนปลาย phialide ซึ่งการเกิดสปอร์ต่อกันเป็นแถวพบน้อยมาก และเป็นแถวสั้นๆ บางครั้งกลุ่มสปอร์ที่เกิดบน phialide ข้างเคียงอาจรวมกันเป็นก้อน (conidial head) ที่ใหญ่ขึ้น ผนังของสปอร์เรียบ หรือบางครั้งพบขรุขระเล็กน้อย ไม่มีสี (hyaline) หรือสีเขียวปนเหลือง (yellowish green) จนถึงสีเขียวดำเข้ม (dark green) รูปร่างค่อนข้างกลม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(subglobose) รูปไข่หัวกลับและสั้น (short obovoid) หรือรูปไข่หัวกลับ (obovoid), รูปกระสวย (ellipsoid) หรือรูปทรงกระบอกเรียวแบบกระสวย (elliptic-cylindrical) จนถึงส่วนใหญ่เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า (oblong) บางครั้งที่ปลายฐานมีลักษณะเป็นมุมเหลี่ยม (angular) ปลายฐานตัดตรง (truncate base) ชัดเจน ในขณะที่สปอร์ยังอ่อนอยู่พบหยดน้ำมันภายในแล้วหายไปเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ (Beagle-Ristaino and Papavizas, 1985)

ความแตกต่างของ phailospore ของเชื้อรา *Trichoderma* แต่ละชนิด

เชื้อรา *T. viride* – รูปร่างค่อนข้างกลม (subglobose) แต่บางไอโซเลต เป็นรูปไข่หัวกลับ (obovoid) หรือรูปกระสวย (ellipsoid) และมีผนังขรุขระ (rough wall) ซึ่งใช้ในการแยกความแตกต่างจากชนิดอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน

เชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. hamatum* – มีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ส่วนใหญ่ความยาวมากกว่า 4 ไมครอน จนถึง 9 ไมครอน

เชื้อรา *T. harzianum* – ส่วนใหญ่รูปร่างค่อนข้างกลม (subglobose) และผนังเรียบมีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.7 ไมครอน

เชื้อรา *T. polysporum* – มีขนาดเล็กเช่นเดียวกัน รูปร่างเป็นสี่เหลี่ยม (oblong) หรือสี่เหลี่ยมรูปกระสวย (oblong-ellipsoid) เนื่องจากความยาวของ phialospore ที่มีขนาดถึง 4 ไมครอน พบน้อยมาก

chlamydospore เป็นสปอร์ที่มีผนังหนา สร้างขึ้นเพื่อความอยู่รอด ส่วนใหญ่สร้างระหว่างเส้นใย ไม่ค่อยพบที่สร้างที่ปลายเส้นใย รูปร่างกลม (globose) เป็นส่วนใหญ่ ส่วนรูปกระสวย (ellipsoid) พบน้อยมาก ความแตกต่างของ chlamydospore ในเชื้อราแต่ละชนิดอยู่ที่ความถี่ของการสร้างขนาด และตำแหน่งที่เกิด (สร้างในเส้นใยที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสร้างได้ทั้งเส้นใยที่อยู่ในอาหารและเส้นใยที่อยู่เหนืออาหารในอากาศ)

ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อรา *Trichoderma* (Cook and Baker, 1983)

เชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราจำพวก saprophyte ที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน อาศัยเศษซากพืชและสัตว์เป็นแหล่งอาหาร เป็นเชื้อราที่พบได้โดยทั่วไปในดินทุกหนทุกแห่ง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย เจริญได้รวดเร็วบนอาหารหลายชนิด สร้างเส้นใยสีขาวและ conidia หรือสปอร์มากมาย รวมเป็นกลุ่มเห็นเป็นสีเขียว บางชนิดอาจเป็นสีขาวหรือสีเหลือง เชื้อรา *Trichoderma* เป็นปฏิปักษ์หรือศัตรูต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยวิธีเป็นปรสิต (mycoparasite) และแข่งขันการใช้อาหารกับเชื้อโรค (competition) นอกจากนี้ ยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) สารพิษ (toxin) และน้ำย่อยจำพวกเอนไซม์ (enzyme) ได้ด้วย เชื้อรา *Trichoderma* บางชนิดเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำลายเชื้อราโรคพืชหรือการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* (Bilai, 1963)

เชื้อรา *Trichoderma* มีลักษณะการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ 3 แบบ คือ

1. การเป็นปรสิต (parasitism)
2. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotics)
3. การแข่งขัน (competition)

1. การเป็นปรสิต (parasitism) หมายถึง การที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญอยู่ใกล้หรือ อยู่บนส่วนของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพื่อใช้สารอาหารต่างๆ ของเชื้อสาเหตุโรคพืช จากการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างเชื้อรา *T. harzianum* และ sclerotia ของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคพืชในดิน โดยใช้กล้อง scanning electron microscope (SEM) พบว่า เส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* เจริญบนผิวของ sclerotia เป็นจำนวนมากและสร้างกลุ่มของเส้นใยแตกแขนงอย่างหนาแน่น เมื่อตรวจสอบภาพตัดขวางของ sclerotia โดยใช้กล้อง light microscopy พบเส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* มากมายบนผิวของ sclerotia และเจริญแทงเข้าสู่ชั้น rind ของ sclerotia (Benhamou and Chet, 1996) เช่นเดียวกับ ปฏิกิริยาระหว่างเชื้อรา *T. harzianum* (BAFC. Cult No. 72) และเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Sclerotinia sclerotiorum* ที่เลี้ยงร่วมกันบนอาหาร (dual culture) และในดินที่อบฆ่าเชื้อ ซึ่งเมื่อตรวจสอบโดยใช้กล้อง light microscope และกล้อง SEM พบว่า บนอาหารที่เลี้ยงร่วมกันนั้นเส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* เจริญไปสู่เส้นใยของเชื้อรา *S. sclerotiorum* และพันรัดล้อมรอบเส้นใย ทำให้ผนังเซลล์บางส่วนของ sclerotia แตกออก ส่วนในดินที่อบฆ่าเชื้อ พบว่า conidium ของเชื้อรา *T. harzianum* งอกเส้นใยแขนงสั้น และสร้างส่วนคล้าย appressorium ซึ่งใช้ยึดและแทงผนังเซลล์ของเชื้อรา *S. sclerotiorum* (Inbar *et al.*, 1996)

2. การสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อโรค (antibiotics) สารปฏิชีวนะเป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเชื้อรา *Trichoderma* spp. เมื่อปล่อยออกมาแล้วมีผลยับยั้ง หรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ เช่น เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ P1 สร้าง chitinolytic enzymes สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ และการเจริญของ germ tube สำหรับเชื้อราที่มี chitin เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ พบว่าระดับการยับยั้งจะสัมพันธ์กับระดับของ chitin ในผนังเซลล์ของเชื้อราเป้าหมาย (Lorito *et al.*, 1993) ในการประเมินความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Cylindocladium floridanum* ของเชื้อรา *T. harzianum, T. viride, T. koningii, T. virens, T. polysporum* และ *T. hamatum* พบว่าสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจะผลิตสาร 6-*n*-pentyl-2H-pyran-2-one ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการสร้าง microsclerotia ของเชื้อรา *C. floridanum* (Dumas *et al.*, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การแข่งขัน (competition) หมายถึง การแข่งขันระหว่างเชื้อสาเหตุโรคพืชกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการครอบครองราก แหล่งอาหารเพื่อการเจริญ และการดำรงชีพ เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีความสามารถเข้าครอบครองรากได้เร็วกว่าเชื้อสาเหตุโรคพืช เมื่อเติมจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไปในวัสดุปลูกที่ใช้เพาะปลูกมะเขือเทศ ส้ม พริก คื่นไฉ่ และฝรั่ง พบว่ามีการเข้าครอบครองรากของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 76-100 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เจริญเข้าครอบครองได้ดีที่สุด (Nemes *et al.*, 1996)

บทบาทของเชื้อรา *Trichoderma* ต่อการควบคุมโรคพืช

การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดินโดยชีววิธี เป็นทางเลือกใหม่ นอกจากการควบคุมโดยชีววิธีไม่เป็นอันตรายต่อสภาพแวดล้อมแล้ว พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. หลาย species ที่แยกได้จากดิน เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ทั้งภายใต้สภาพเรือนทดลองและแปลงปลูก (Inbar *et al.*, 1994) เช่นเชื้อรา *T. viride* เป็น species ที่พบมากในดิน มีการปล่อยสารที่มีความเฉพาะเจาะจงสามารถทำลายเส้นใยของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Ingold and Hudson, 1993) Lo *et al.* (1996) ทดลองใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ 1295-22 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้า สามารถเข้าครอบครองรากได้ดีและควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น brown patch (*Rhizoctonia solani*), dollar spot (*Sclerotium homoeocarpa*) และ Pythium root rot (*Pythium graminicola*)

นอกจากใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชแล้ว มีการทดลองใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ควบคุมไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช Thienhirun (1997) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 6 species คือ เชื้อรา *T. piluliferum, T. harzianum, T. hamatum, T. longibrachiatum, T. aureoviride* และ *T. koningii* ในการควบคุมโรค root knot พบว่าเชื้อรา *T. piluliferum* และ *T. harzianum* ให้น้ำหนักสดของยอดสูงสุด และน้ำหนักสดของรากต่ำสุด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 species นี้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค root knot การนำเชื้อรา *T. piluliferum* และ *T. harzianum* ไปใช้ร่วมกับเชื้อปฏิปักษ์อื่น เช่น การควบคุมโรครากปมของผักกาดหอมในสภาพเรือนทดลองนั้นสามารถใช้เชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* เพื่อช่วยลดการเกิดโรครากปมได้ดียิ่งขึ้น (ทรงศักดิ์, 2540)

Gesnara (1994) ศึกษาการควบคุมโรคของมะเขือเทศ และข้าวบาร์เล่ย์ ที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfsii* โดยการคลุกเมล็ดข้าวบาร์เล่ย์ ด้วยผงเชื้อรา *T. harzianum* ในอัตรา 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พบว่าให้ประสิทธิภาพในการป้องกันต้นกล้าจากเชื้อรา *S. rolfsii* ได้มากกว่าการคลุกในอัตรา 0.5 และ 0.1เปอร์เซ็นต์ สำหรับการควบคุมโรค stem rot ของมะเขือเทศโดยการใช้ในรูป alginate pellets ที่ประกอบด้วยเชื้อรา *T. harzianum* 0.1 หรือ 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สามารถควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ เช่นเดียวกับการใช้ผงเชื้อรา *T. harzianum* และคาร์บอกซิน นอกจากนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยังศึกษาการพัฒนาประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* โดยการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตร้าไวโอเล็ต พบว่าสายพันธุ์กลาย M23 และ M4 สามารถเจริญบนอาหาร PDA ที่เติมสาร benomyl และสามารถลดการเจริญของเส้นใย และการสร้าง sclerotia ของเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหาร PDA สายพันธุ์กลายสามารถลดการเกิดโรค stem rot ของมะเขือเทศ และโรค seedling blight ของข้าวบาร์เล่ย์ได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม

นอกจากนี้เชื้อรา *T. harzianum* สามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่า (แสงมณี, 2538) ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* ส่วนใหญ่จะใช้ในการควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคในดิน แต่จากการศึกษาของ พรอุษา(2548) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่เก็บได้จากผิวใบที่ไม่เป็นโรคของสตรอเบอรี่สามารถควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis obscurans* ของสตรอเบอรี่

การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในประเทศไทยมีมานานกว่าสิบปี โดยได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดินที่สำคัญ คือเชื้อรา *S. rolfsii, R. solani, Pythium* sp., *Phytophthora* spp. และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* รวมทั้งการคำนึงถึงปัญหามลภาวะที่มีต่อสภาพแวดล้อมจากการใช้สารเคมีในการเกษตร และปัญหาการต้านทานสารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicide resistance) ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช จึงมีการผลิตเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 เป็นการค้าชื่อว่า UNIGREEN UN-1® โดยความร่วมมือของบริษัท Uniseeds Co. Ltd. (ประเทศไทย) และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Chamswarng and Tanangsanakul, 1996) โดยชีวภัณฑ์ดังกล่าวได้ผ่านการรับรองคุณภาพจากกรมวิชาการเกษตร นับเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืชชนิดแรกของประเทศไทยที่ได้ผ่านขั้นตอนการขึ้นทะเบียนตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 (จิระเดช และวรรณวิไล, 2542)

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อที่สามารถทำลายเชื้อชนิดอื่นได้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และสามารถเข้าทำลายเชื้อราชนิดอื่นได้หลายชนิด บางชนิดเข้าทำลายเชื้อราที่เป็นประโยชน์ เช่น การระบาดของเชื้อราเขียว *T. harzianum* ในฟาร์มเห็ดกระดุมในแถบอเมริกาเหนือ ยุโรป และออสเตรเลีย ทำให้ผลผลิตลดลง (Seaby, 1996) ดังนั้นการใช้เชื้อรา ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคพืชในดินซึ่งเป็นที่นิยมในปัจจุบัน ถ้าใช้อย่างไม่ระมัดระวังอาจเกิดผลกระทบขึ้นในอนาคตได้เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* สามารถเจริญได้ดีและเจริญได้เร็ว นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* พบได้ในดินทั่วไป รวมทั้งบนผิวใบ และยังมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง แต่ยังไม่ได้มีการจำแนกถึงความแตกต่างของเชื้อ การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาจำแนกและจัดกลุ่มของเชื้อ และดูความสัมพันธ์ของเชื้อในแต่ละตัวซึ่งจะทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในการควบคุมโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยใช้ลักษณะทางอณูวิทยา

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่จัดจำแนก species หรือสายพันธุ์ได้ยาก เนื่องจากเชื้อราที่อยู่ใน species เดียวกันจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นถ้าใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจจะตัดสินใจได้ยากว่าเป็น species ใด (Stasz, 1989) นอกจากนี้การจำแนกชนิดโดยอาศัยการสืบพันธุ์แบบใช้เพศยังมีความสับสน คือ แต่ละ species ของ teleomorph อาจมี anamorph (imperfect state) เป็นเชื้อรา *Trichoderma* spp. มากกว่า 1 species ได้ เช่นเชื้อรา *Hypocrea* sp. อาจมี anamorph เป็นเชื้อรา *T. longibrachiatum, T. reesei* หรือ *T. pseudokoningii* (Samuels, 1994) นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นผลให้การจำแนก species หรือสายพันธุ์ยุ่งยากมากขึ้น ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางอณูวิทยาร่วมกับการเปรียบเทียบกายวิภาค สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุศาสตร์ และความสัมพันธ์ระหว่าง species ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) สามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของสารพันธุกรรม ที่สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลาน ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ ในชื่อที่รู้จักกันว่า "ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ" (DNA fingerprint) DNA fingerprint เป็นเทคนิคที่ใช้กันมากในงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนก (identification) และอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ พันธุศาสตร์ประชากร (population genetics) ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์ (breeding) และระบาดวิทยา (epidemiology) ของพืชและเชื้อรา (Weising *et al.*, 1995)

เทคนิค polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR - RFLP) (พิสสวรรณ, 2540)

polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นการจำลองกระบวนการลอกแบบของดีเอ็นเอ (replication) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์มาไว้ในหลอดทดลอง ทำให้ได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณมากภายในเวลาอันรวดเร็ว

restriction fragment length polymorphism (RFLP) คือ ความแตกต่างหรือความหลากหลายของดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่แยกได้จากแบคทีเรีย และจะตัดดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่งตัดจำเพาะ เรียกว่า ตำแหน่งจดจำ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิด ประกอบด้วย 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้น ถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอ ที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ แล้วตรวจสอบด้วย probe ที่สามารถ hybridize ได้กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เป้าหมายถ้าดีเอ็นเอ มาจากแหล่งที่ต่างกันหรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งแล้ว เมื่อนำมาตัดด้วนเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ที่ต่างกันเรียกว่า polymorphism (จินตนา, 2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทบาททางเทคนิค PCR-RFLP

RFLP เป็นวิธีการที่มีประโยชน์ในการศึกษาทางด้าน phylogenetic ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เทคนิค PCR-RFLP ในปัจจุบันเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันมากในการศึกษาเกี่ยวกับการวิวัฒนาการ (phylogeny) อนุกรมวิธาน (taxonomy) และหาความแตกต่างของเชื้อรา 2 species (หรือมากกว่า) ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างจากกันได้ชัดเจนโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและค่าใช้จ่ายน้อย (Takamatsu, 1998 อ้างโดย จินตนา, 2543)

Whitehead *et al.* (1992) ศึกษาเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* ที่แยกได้จากประเทศอังกฤษและอเมริกา นำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชต่างๆ (series of host differentials) พบว่าใน race 1, 2, 5 และ 6 สามารถทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยได้ ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง races โดยนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค RFLP และ vegetative compatibility grouping สรุปได้ว่าทั้งเทคนิค RFLP และ vegetative compatibility grouping นั้นสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างของทั้ง 4 races ออกจากกันได้ และยังสามารถจัดจำแนกความแตกต่างภายใน race ได้เช่นกัน คือใน race 2 ประกอบไปด้วย 2 กลุ่มที่แยกออกจากกัน เรียกว่า 2A และ 2B

Kiss (1997) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา Ampelomyces ซึ่งเป็น hyperparasite ของราแป้ง ซึ่งมีประโยชน์ในด้านการควบคุมราแป้งโดยชีววิธี Kiss ได้ศึกษาเชื้อรา Ampelomyces 46 ไอโซเลต ด้วยการใช้เทคนิค RFLP วิเคราะห์ตรงตำแหน่ง ITS โดยสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง ITS โดยใช้เทคนิค PCR และนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 20 ชนิด พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราเป็น 7 กลุ่ม ดังนั้นการตรวจสอบหาความแตกต่างด้านพันธุกรรมจะช่วยในการจัดจำแนกเชื้อราไอโซเลต ต่างๆ เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้าน biocontrol ต่อไป

Bowen *et al.* (1996) ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *T. harzianum* ที่เป็นทั้งเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืช ซึ่งใช้เทคนิค RFLP สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อราทั้ง 2 ลักษณะนี้ได้ โดย probe จะไปจับกับสายดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชในตำแหน่ง hybridizing band ที่ 1.1 kb ทำการทดลองอยู่ 12 ไอโซเลต พบว่ามี 3 ไอโซเลต ที่เป็นเชื้อราก่อให้เกิดโรค ดังนั้นในการจัดจำแนก เชื้อรา *Trichoderma* ที่ได้มาจากพื้นที่ต่างกัน สามารถนำเอาเทคนิคทาง PCR-RFLP มาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อได้

เชื้อรา *Trichoderma* ปกติเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน เป็นเชื้อราที่มีการศึกษามากทางด้านการควบคุมโรคพืชแบบชีววิธี เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* เป็นทั้งเชื้อปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุของโรคในเห็ด กลไกในการติดเชื้อในเห็ดยังไม่ชัดเจน ดังนั้น ในการศึกษาลักษณะของเชื้อรา *Trichoderma* ในเห็ด ทำได้โดยการวัดอัตราการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิต่างกัน กลิ่นของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหาร ศึกษารูปร่างของสปอร์ และระยะเวลาในการสร้างสปอร์บนอาหาร ซึ่งวิธีเหล่านี้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ได้เฉพาะลักษณะภายนอกเท่านั้น ดังนั้น หลายปีต่อมา จึงมีการศึกษาทางด้าน taxonomy เพิ่มมากขึ้นโดยการนำเอาเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ เพื่อจำแนกความแตกต่างภายในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *Trichoderma* ที่พบหลายไอโซเลต ในแต่ละพื้นที่ เช่น การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค RFLP และ ใช้เทคนิค RAPD เป็นต้น (Seaby, 1987)

Seaby (1987) และ Doyle *et al.* (1991) พบเชื้อรา *Trichoderma* spp. หลาย species บนกองวัสดุเพาะเห็ด (mushroom compost) เช่นเชื้อรา *T. viride, T. pseudokoningii, T. hamatum, T. longibrachiatum* และ *T. harzianum* โดยส่วนใหญ่พบเชื้อรา *T. harzianum* มากที่สุด จำแนกเชื้อรา *T. harzianum* ที่พบในกองวัสดุเพาะเห็ดเป็น 4 biotype (Th1, Th2, Th3 และ Th4) โดยอาศัยความแตกต่างในอัตราการเจริญ ระยะเวลาและรูปแบบของการสร้างสปอร์มาเป็นหลักในการจัดกลุ่ม Muthumeenakshi *et al.* (1994) ใช้เทคนิค RFLP, เทคนิค RAPD และ ลำดับเบสบริเวณ ITS-1 จำแนกเชื้อรา *T. harzianum* 81 สายพันธุ์ จากกองวัสดุเพาะเห็ดออกเป็น 3 กลุ่ม เช่นกัน โดยพบว่าไม่มีความผันแปร (variation) ภายในกลุ่มเมื่อวิเคราะห์ด้วย rDNA แต่พบ polymorphism เล็กน้อยภายในกลุ่ม เมื่อวิเคราะห์ด้วย mtDNA จากการทดลองครั้งนี้ คณะที่ทำการวิจัยได้คัดเลือกเชื้อ 30 สายพันธุ์ เพื่อมาศึกษาด้วยเทคนิค RAPD และผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกับ ผลของการใช้เทคนิค RFLP นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS-1 ของเชื้อ 18 สายพันธุ์ สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มเช่นเดียวกัน โดยไม่มีความผันแปรของลำดับเบสภายในกลุ่ม 2 และ 3 แต่พบว่ามีความผันแปรในวงจำกัด (limited sequence variation) ภายในกลุ่ม 1 จากการศึกษาพบว่า เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ที่รุนแรงจะพบเฉพาะกลุ่มที่ 2 เท่านั้น ต่อมาในปี 1996 Muthumeenakshi ได้ศึกษาเชื้อรา *T. harzianum* เพิ่มขึ้นเป็น 95 สายพันธุ์ โดย 81 สายพันธุ์ มาจากอุตสาหกรรมเห็ดในสหราชอาณาจักร และ 14 สายพันธุ์ มาจากอเมริกาเหนือ นำมาประเมินหาความผันแปรทางพันธุกรรมภายใน species จากการศึกษาด้วยเทคนิค RFLP (rDNA) โดยใช้เอนไซม์ *Eco*RI, *Sac*I และ *Cla*I สามารถแบ่งเชื้อรา *T. harzianum* ทั้ง 95 สายพันธุ์ออกเป็น 4 กลุ่มที่ต่างกัน โดยกลุ่มที่ 1 และ 3 ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่มาจากทั้งสหราชอาณาจักร และอเมริกาเหนือ ขณะที่กลุ่มที่ 2 และ 4 จะประกอบด้วยสายพันธุ์เฉพาะที่มาจากสหราชอาณาจักร และอเมริกาเหนือตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved