บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อราที่บริเวณ rhizosphere ของพริกใน 5 พื้นที่ คือ แปลงเกษตรกร บ้านแม่โจ้ อำเภอสันทราย อำเภอสันป่าตอง อำเภอดอยสะเก็ด อำเภอสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำพูน สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 94 ไอโซเลต และเชื้อราที่ไม่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุโรคได้ 2 ชนิด คือ เชื้อรา *Aspergillus flavus* และเชื้อรา *Penicillium* sp. สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากสารชีวภัณฑ์ ได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลต จากการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น colony conidiophore phialide phialospore และ chlamydospore สามารถจัดจำแนกเชื้อราทั้ง 100 ไอโซเลต ได้เป็น 7 species คือ *T. harzianum* 34 ไอโซเลต *T. hamatum* 23 ไอโซเลต *T. longibrachiatum* 19 ไอโซเลต *T. aureoviride* 14 ไอโซเลต *T. pseudokoningii* 5 ไอโซเลต *T. viride* 1 ไอโซเลต และ *T. koningii* 4 ไอโซเลต

เมื่อทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการจัดจำแนกและการจัดกลุ่มโดยการนำเอาสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 100 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอต้นแบบมาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Sma*I, *Bam*HI และ *Eco*RI พบว่าเอนไซม์ *Eco*RI สามารถย่อยผลผลิตของ PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส เอนไซม์ *Sma*I สามารถย่อยผลผลิตของ PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 550 และ 125 คู่เบส ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่นำมาศึกษาได้ แต่สำหรับเอนไซม์ *Bam*HI สามารถย่อยผลผลิต PCR ได้ทั้งหมดสามารถแบ่งเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 แถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 600 คู่เบสได้แก่ เชื้อรา *T. harzianum, T. hamatum, T. aureoviride* และ *T. viride* กลุ่มที่ 2 แถบดีเอ็นเอมีขนาด 480 และ 220 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. koningii* กลุ่มที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 560 และ 140 คู่เบส ได้แก่ เชื้อรา *T. longibrachiatum* และ *T. pseudokoningii* เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc เพื่อจัดกลุ่มเชื้อราทั้งหมด สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ที่ค่า similarity 0.78 โดยกลุ่ม A ประกอบด้วยเชื้อรา *T. harzianum, T. hamatum, T. aureoviride* และ *T. viride* 71 ไอโซเลต กลุ่ม B ประกอบด้วยเชื้อรา *T. koningii* 4 ไอโซเลต และกลุ่ม C ประกอบด้วยเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

T. longibrachiatum และเชื้อรา *T. pseudokoningii* 25 ไอโซเลต ผลจากการแบ่งกลุ่มโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเนื่องจากเทคนิคดังกล่าวใช้ดีเอ็นเอต้นแบบในปริมาณน้อย เพราะดีเอ็นเอต้นแบบถูกนำมาเพิ่มปริมาณในขั้นตอนของการทำ PCR ซึ่งไปเพิ่มปริมาณยีน *Trichoderma* ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) 1 ยีน 5.8S และ ITS 2 ด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับ universal primer ITS1 และ ITS4 ซึ่งลำดับเบสในส่วน ITS นี้มีความผันแปรมากในเชื้อราแต่ละ species เมื่อนำดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดพบว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *Eco*RI และ *Sma*I เมื่อนำมาย่อยดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 100 ไอโซเลต พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้จะเหมือนกัน คือ 600 และ ขนาด 550 และ 125 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถบ่งบอกได้ว่า เชื้อราทั้งหมดเป็นเชื้อรา *Trichoderma* sp. ส่วนเอนไซม์ *BamH*I สามารถจัดกลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมดได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Alan *et al.*(1997) ที่ใช้เทคนิค RFLP ในการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 160 ไอโซเลต โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 7 ชนิด คือ *Hin*dIII, *Kpn*I, *Bgl*II, *Xba*I, *Bam*HI, *Sma*I และ *Eco*RI ผลการทดลองที่ได้ พบว่าเอนไซม์ที่สามารถจำแนกเชื้อราได้มีอยู่ 3 ชนิด คือ *Bam*HI, *Sma*I และ *Eco*RI ซึ่งสามารถจำแนกเชื้อราได้ 3 กลุ่ม เช่นเดียวกันกับผลการทดลองที่ได้ แต่เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ สามารถจัดกลุ่มได้แบบคร่าวๆ เท่านั้น ไม่เฉพาะเจาะจงลงไปในระดับ species เนื่องจากการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้ทำการหาลำดับเบสของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

การจัดจำแนก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน เพียงอย่างเดียวยังมีข้อจำกัด เนื่องจาก *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่จัดจำแนก species หรือสายพันธุ์ได้ยาก เชื้อราที่อยู่ใน species เดียวกันจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นถ้าใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจจะตัดสินใจได้ยากว่าเป็น species ใด (Stasz, 1989) นอกจากนี้การจำแนกชนิดโดยอาศัยการสืบพันธุ์แบบใช้เพศยังมีความสับสน คือ แต่ละ species ของ teleomorph อาจมี anamorph เป็นเชื้อรา *Trichoderma* spp. มากกว่า 1 species ได้ (Samuels, 1994) นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นผลให้การจำแนก species หรือสายพันธุ์ยุ่งยากมากขึ้น ดังนั้นวิธีทางอณูวิทยาจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยในการจัดจำแนกเชื้อ ซึ่งผลที่ได้จะแน่นอนและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 100 ไอโซเลต มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* 2 ไอโซเลต ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพริก โดยวิธีการ dual culture technique พบว่ามีปฏิกิริยาที่แตกต่างกันอยู่ 3 รูปแบบ คือ 1. เชื้อราปฏิปักษ์เจริญปกคลุมเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้งหมด 37 ไอโซเลต 2. เกิด clear zone 31 ไอโซเลต 3. เชื้อราปฏิปักษ์สร้าง secondary metabolite production 32 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bilai (1963) ที่พบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อรา *Trichoderma* มีลักษณะการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ 3 แบบ คือ 1. การเป็นปรสิต (parasitism) 2. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) และ 3. การแข่งขัน (competition)

จากการศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรค พบว่า เชื้อราใน species เดียวกัน มีปฏิกิริยาการยับยั้งที่แตกต่างกัน เช่น เชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต ที่ 10 มี ปฏิกิริยาในการยับยั้งเป็นแบบ เจริญปกคลุม ส่วนเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต ที่ 6 มีปฏิกิริยาในการยับยั้งเป็นแบบ clear zone จึงได้คัดเลือกเชื้อราในแต่ละกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 2 ไอโซเลตที่ดีที่สุด ผลจากการคัดเลือกได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. จากบริเวณ rhizosphere ทั้งหมด 4 ไอโซเลต คือ เชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลต 10 เชื้อรา *T. hamatum* ไอโซเลต 3 เชื้อรา *T. longibrachiatum* ไอโซเลต 67 เชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลต 37 และ 6 ไอโซเลต จากสารชีวภัณฑ์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ในการยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* 2 ไอโซเลต พบว่า สารชีวภัณฑ์ 2 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 1 ได้ดีที่สุดถึง 61.39% รองลงมาคือ *T. longibrachiatum* ไอโซเลต 67 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 60.83% และสารชีวภัณฑ์ 4 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 2 ได้ดีที่สุด ถึง 72.50% รองลงมาคือ สารชีวภัณฑ์ 2 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 71.39 % ซึ่งแตกต่างจากเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลตอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05) จะเห็นได้ว่าเชื้อรา *Trichoderma* สามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลตที่ 2 ได้ดีกว่าไอโซเลตที่ 1 เนื่องจาก ไอโซเลตที่ 2 เส้นใยมีอัตราการเจริญช้ากว่าไอโซเลตที่ 1 และพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุดคือ เชื้อที่ได้มาจากสารชีวภัณฑ์ เนื่องจากได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดแล้ว

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* และเชื้อรา *Penicillium* sp. พบว่า สารชีวภัณฑ์ 6 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้ดีที่สุดถึง 66.67% รองลงมาคือ สารชีวภัณฑ์ 4, เชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลต 37, สารชีวภัณฑ์ 1 และเชื้อรา *T. longibrachiatum* ไอโซเลต 67 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* 66.39 %, 66.11%, 65.83% และ 65.56% ตามลำดับซึ่งแตกต่างจากเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลตอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05) และพบว่าสารชีวภัณฑ์ 1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp.ได้ดีที่สุด ถึง 51.94% รองลงมาคือเชื้อรา *T. aureoviride* ไอโซเลต 37 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium sp.* 51.67% ซึ่งแตกต่างจากเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลตอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05) จะเห็นได้ว่า เชื้อรา *Trichoderma* ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus* ได้เพียงบางส่วนเท่านั้น ซึ่งต่างจากเชื้อรา *Penicillium* ซึ่งไม่ถูกยับยั้ง เนื่องจากเชื้อรา *Penicillium* ปล่อยสาร penicillin ออกมาเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา *Trichoderma*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อรา *Trichoderma* sp. เป็นเชื้อราที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว และสามารถเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรคได้หลายชนิด เช่น โรค brown patch ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โรค dollar spot ที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium homoeocarpa* และ โรค Pythium root rot ที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium graminicola* และได้มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการควบคุมโรค เช่น การใช้เชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ 1295-22 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้า ที่สามารถเข้าครอบครองรากพืชได้ดีมาควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชดังกล่าว Lo *et al.* (1996) และการนำเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ CB-Pin-01 ที่มีชื่อทางการค้าว่า UNIGREEN UN-1® *harzianum* มาควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน คือ เชื้อรา *S. rolfsii, R. solani, Pythium spp., Phytophthora spp.* และ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (จิระเดช และวรรณวิไล, 2542) จากการทดสอบกับเชื้อราที่ไม่ได้เป็นสาเหตุของโรคพริก คือ เชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* สามารถเข้าไปยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* ได้เพียงบางส่วน สำหรับเชื้อรา *Penicillium* พบว่า เชื้อรา *Penicillium* สามารถเจริญต่อไปได้ เนื่องจากเชื้อรา *Penicillium* สร้างสาร penicillin ขึ้นมาเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา *Trichoderma* ซึ่ง penicillin เป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้กันมากที่สุดมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดยจะเปลี่ยนแปลงและขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ทำลายพวก peptidoglycan ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญและทำให้ผนังเซลล์แข็งแรง (สุรเกียรติ,2544) ดังนั้นในการใช้ สารชีวภัณฑ์ต้องคำนึงถึงปริมาณที่ใช้ เนื่องจาก หากใช้ในปริมาณที่มากแล้วอาจส่งผลกระทบต่อเชื้อราที่เป็นประโยชน์อื่นๆ ที่อยู่ในดิน เช่น เชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ช่วยย่อยละลายหินฟอสเฟตให้เป็นประโยชน์แก่พืชได้ ในการที่จะทำให้หินฟอสเฟตละลายดี จะต้องทำให้เกิดสภาพกรด ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะเป็นตัวทำให้เกิดกรดออกมาละลายฟอสฟอรัสได้ (ออมทรัพย์, 2541) นอกจากนี้จุลินทรีย์เหล่านี้สร้างน้ำย่อยพวก protease เพื่อเปลี่ยนโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน น้ำตาล ribose และ deoxyribose ซึ่งสารดังกล่าวนี้ส่วนหนึ่งจะเป็นอาหารของจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ และอีกส่วนหนึ่งจะแปรสภาพต่อไปเป็นอนินทรียไนโตรเจน ซึ่งเป็นรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ได้แก่ แอมโมเนียม และไนเตรท และคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ นอกจากนี้สารประกอบอะมิโนจะสามารถรวมตัวกับสารควิโนน กลายเป็นสารประกอบฮิวมัส ซึ่งเป็นอินทรียสารที่เป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ดิน และมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมเสถียรภาพของโครงสร้างดินและเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน จุลินทรีย์บางชนิดในสกุล *Bacillus* และ *Aspergillus* สร้างกรดอินทรีย์พวกไนตริกและกำมะถัน ละลายฟอสฟอรัสออกมาให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้ (ศุภมาศ, 2539)

ในการนำเอาเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากสารชีวภัณฑ์มาทดสอบด้วยเพื่อที่จะศึกษาดูว่าสารชีวภัณฑ์ที่เกษตรกรใช้กันอยู่ทั่วไปนี้มีผลในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคได้ดีหรือไม่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ได้มาจากดินของพืชนั้นๆ และศึกษาว่าสารชีวภัณฑ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่นำมาใช้อยู่ทั่วไปนี้มีผลอย่างไรต่อระบบนิเวศน์ของเชื้อราชนิดอื่นที่ไม่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุของโรค ในอนาคตสามารถใช้แนวทางดังกล่าวนี้ให้เป็นประโยชน์ในการควบคุมโรค โดยลดปริมาณการใช้สารเคมี ช่วยแก้ไขปัญหาสารเคมีตกค้างในผลผลิต ช่วยรักษาระบบนิเวศน์ภายในดินให้มีความสมดุลโดยใช้สารชีวภัณฑ์ในปริมาณที่เหมาะสม และอาจนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาปรับปรุงเพื่อให้ได้สายพันทางการค้าที่สามารถควบคุมโรคได้ดีเพิ่มมากขึ้น

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Trichoderma* spp. นอกจากจะใช้ประโยชน์ในการศึกษาหาความหลากหลาย และการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแล้ว ยังสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อราได้โดยการสังเคราะห์ DNA probe หรือ primer ซึ่งมีดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) มาจากแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งในอนาคตสามารถนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์สำหรับการหาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่จำเพาะต่อ species ที่ยากต่อการจัดจำแนกชนิดในกลุ่มของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved