

การแยกและคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มา สปีชีส์ จากดินสำหรับยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora colocasiae*
Isolation and Screening *Trichoderma* species. from Soil
for Inhibition of *Phytophthora colocasiae*

เพชรพิกุล ขำอ่อน¹ และ กมลวรรณ สนใจยิ่ง²
Khumon, P.¹ and Sonjaiying, K.²

Abstract

Trichoderma species were isolated from 45 soil samples in Banmo district, Saraburi and 5 soil samples in Lat Lum Kaew district, Pathumthani by soil dilution plate method using Rose Bengal Agar medium. *Trichoderma* sp. were isolates from Saraburi 20 isolates and Pathimtani 1 isolate. Antagonistic activity assay of all isolates were carried out by using dual culture plate technique against *Phytophthora colocasiae*, a causative agent of taro leaf blight disease. BM6 BM1 and BM7 isolates were able to inhibit the mycelium growth of *P. colocasiae* with the percentage of 56.25 55.80 and 54.59 respectively. The antifungal activity of *Trichoderma asperellum* (commercial strain). compare with *Trichoderma* sp. the inhibition of fungal mycelia did not significantly different ($P < 0.05$).

Keywords: *Trichoderma* species, Inhibition, *Phytophthora colocasiae*

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มา สปีชีส์ (*Trichoderma* species) จากดินอำเภอบ้านหมอ จังหวัดสระบุรี จำนวน 45 ตัวอย่าง และดินในอำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยวิธี soil dilution plate บนอาหาร Rose Bengal Agar สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. จากดินในจังหวัดสระบุรี ได้ 20 ไอโซเลท และ จากจังหวัดปทุมธานี ได้ 1 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora colocasiae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบจุดตาเสือของเผือกในโดยวิธี dual culture พบว่า ไอโซเลท BM6 BM1 และ BM7 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. colocasiae* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.25 55.80 และ 54.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Trichoderma asperellum* (สายพันธุ์การค้า) กับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่แยกได้พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

คำสำคัญ: ไตรโคเดอร์มา สปีชีส์ การยับยั้ง เชื้อรา *Phytophthora colocasiae*

คำนำ

เผือกเป็นพืชเศรษฐกิจระดับท้องถิ่นที่สำคัญชนิดหนึ่ง ประเทศไทยมีการปลูกเผือกอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศส่วนจังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ นครสวรรค์ พิษณุโลก นครราชสีมา สุรินทร์ สระบุรี อุตรดิตถ์ ในช่วงฤดูฝนและอากาศมีความชื้นสูงบางพื้นที่มีการระบายน้ำไม่ดีทำให้มีการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคใบจุดตาเสือ โรคดังกล่าวเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora colocasiae* Rac. โดยทำความเสียหายให้กับเผือกตั้งแต่ระยะเริ่มปลูกจนถึงระยะหลังการเก็บเกี่ยว (Misra et al., 2008) ลักษณะอาการของต้นเผือกที่เกิดโรคใบจุดตาเสือคือ บนใบเกิดจุดสีน้ำตาล เห็นได้ชัดบนผิวใบขนาดใหญ่ขึ้นเป็นวงๆ บริเวณขอบแผลมีหยดสีเหลืองขึ้น ซึ่งตอนแห้งเป็นเม็ดๆ เกาะอยู่เป็นวงๆ เมื่อใบเผือกถูกทำลายการสังเคราะห์ด้วยแสงจะลดลงส่งผลให้หัวเผือกมีขนาดเล็กและผลผลิตลดลง รวมทั้งหัวเผือกเกิดอาการเน่าเสียหาย เผือกที่เป็นโรคนี้อาศัยไม่เริ่มลงหัวหรือลงหัวไม่โตนักจะเสียหายหมด หัวที่ลงจะไม่ขยายเพิ่มขนาดสามารถทำให้ผลผลิตลดลง 50 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (อมรรัตน์, 2552; กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2555) การป้องกันกำจัดโรคใบจุดตาเสือในเผือกสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การเกษตรกรรม การป้องกันโดยชีววิธี การใช้พันธุ์เผือกที่ต้านทานต่อโรคใบจุดตาเสือเช่น พันธุ์ พจ.06 และการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ในปัจจุบันพบว่ามีการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ประโยชน์มาใช้ทั้งควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญของพืช โดยพบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มาเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มี

¹ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา เลขที่ 96 ถ. ปรีดีพนมยงค์ ต. ประตูลี อ. พระนครศรีอยุธยา จ. พระนครศรีอยุธยา 13000

Phranakhon si Ayutthaya Rajabhat University 96, Pridi Banomyong Rd., Pratu Chai Si Ayutthaya, Phranakhon Sri Ayutthaya 13000, Thailand

² มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา เลขที่ 96 ถ. ปรีดีพนมยงค์ ต. ประตูลี อ. พระนครศรีอยุธยา จ. พระนครศรีอยุธยา 13000

Phranakhon si Ayutthaya Rajabhat University 96, Pridi Banomyong Rd., Pratu Chai Si Ayutthaya, Phranakhon Sri Ayutthaya 13000, Thailand

ประสิทธิภาพควบคุมเชื้อราโรคพืชหลายชนิด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อราไตรโคเดอร์มา สปีชีส์ (*Trichoderma* species) จากดินบริเวณขุยไม้หรือดินใต้โคนไม้ ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆ ทั้งเชื้อราแบคทีเรียและยีสต์ ในพื้นที่อำเภอบ้านหมอ จังหวัดสระบุรีและดินจากอำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี เพื่อหาเชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่ดำรงชีวิตประจำถิ่นจากแหล่งธรรมชาติ มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อรา *P. colocasiae* ในระดับห้องปฏิบัติการ เป็นการจัดการเชื้อสาเหตุโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกรในการลดการใช้สารเคมีต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างดินขุยไม้

เก็บตัวอย่างดินขุยไม้จากบริเวณ อ. บ้านหมอ จ. สระบุรี และ อ. ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ที่ระดับความลึก 10 เซนติเมตร จากผิวดิน นำตัวอย่างดินที่เก็บมาผึ่งเพื่อลดความชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ทดลองต่อไป

การแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มา

ชั่งตัวอย่างดินน้ำหนัก 1 กรัม ต่อน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่า 20 –30 นาที วางทิ้งไว้ 10 นาที แยกเชื้อจากสารแขวนลอยดินเจือจาง (soil dilution plating) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ศึกษารละลายดินในแต่ละความเจือจาง เลี้ยงบนอาหาร Rose Bengal (Mohammad และ Hamisu, 2019) บ่มที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน สังเกตและคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว ที่มีสีขาว ขาวอมเหลือง เทา ทั้งที่ขอบเรียบและขอบหยักไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) เมื่อสร้างสปอร์เต็มที่แล้วจึงนำไปศึกษาต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora colocasiae* ในบนอาหารเลี้ยงเชื้อเลี้ยงเชื้อรา *P. colocasiae* และ เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่คัดแยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cock borer เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อราทั้งสองย้ายชิ้นส่วนของเชื้อราทั้งสองวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยใช้เทคนิค dual culture จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน คำนวณประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma* sp. (%) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. colocasiae* (percent inhibition of radial growth – PIRG) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$PIRG = [(Rc - Rt) / Rc] \times 100$$

Rc = ค่าเฉลี่ยของรัศมีเชื้อรา *P. colocasiae* ในกรรมวิธีควบคุม

Rt = ค่าเฉลี่ยของรัศมีเชื้อรา *P. colocasiae* ในกรรมวิธีทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Teste (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างดินเชื้อรา *Trichoderma* sp. จากดินขุยไม้

การเก็บตัวอย่างดินใน อ. บ้านหมอ จ. สระบุรี จำนวน 45 ตัวอย่าง และใน อ. ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี จำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อไตรโคเดอร์มาจากดินใน อ. บ้านหมอ จ. สระบุรีได้จำนวน 20 ไอโซเลตคือ BM1, BM2, BM3, BM4, BM5, BM6, BM7, BM8, BM9, PB1, PB2, PB3, PB4, PB5, PB6, PB7, PB8, PB9, PB10 และPB11 ในขณะที่ อ. หลุมแก้ว จ. ปทุมธานีได้ 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต KB1

การแยกเชื้อรา *Trichoderma* sp. จากดินขุยไม้

สามารถแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มาโดยวิธี soil dilution plate บนอาหาร Rose Bengal Agar จาก อ. บ้านหมอ จ. สระบุรี ได้ 20 ไอโซเลต และจาก อ. ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ได้ 1 ไอโซเลต ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราไตรโคเดอร์มาออกได้เป็น 4 กลุ่ม สอดคล้องกับในรายงานของ Bin Liu และคณะ (2020) ซึ่งทำการแยกเชื้อราไตรโคเดอร์มาจากดิน โดยศึกษาลักษณะของการเจริญของเส้นใย การสร้างโคนเดี่ยวและการเปลี่ยนสีของอาหาร PDA โดยสามารถจัดกลุ่มที่มีเส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวมีการเจริญเติบโตของเส้นใยที่รวดเร็วจำนวน 7 ไอโซเลต คือ BM1 BM2 BM6 BM8 BM9 PB5 และ PB10 (Figure 1) กลุ่มที่สร้างเส้นใยสีขาว มีการสร้างสปอร์สีเขียวจำนวน

6 ไอโซเลท คือ BM7 PB1 PB2 PB6 PB11 และ KB1 กลุ่มที่สร้างเส้นใยช้า มีการสร้างสปอร์สีเขียวจำนวน 2 ไอโซเลท คือ BM4 และ BM5 และกลุ่มที่สร้างเส้นใยขอบหยักจำนวน 5 ไอโซเลท คือ PB3 PB4 PB7 PB8 และ PB9 ส่วนเชื้อรา *Trichoderma asperellum* (สายพันธุ์การค้า) ที่นำมาใช้เป็นเชื้ออ้างอิงพบว่ามีสปอร์สีเขียว เส้นใยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. colocasiae*

จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่แยกได้กับเชื้อ *P. colocasiae* โดยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท BM6 BM1 และ BM7 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. colocasiae* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.25 55.80 และ 54.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคระหว่างเชื้อรา *T.a asperellum* (สายพันธุ์การค้า) กับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่แยกได้พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Figure 2)

สรุปผล

เชื้อรา *Trichoderma* sp. จากดินขุยไผ่ อ. บ้านหมอ จ. สระบุรี สามารถแยกได้จำนวน 20 ไอโซเลท และ อ. ลาดหลุมแก้ว จ. ปทุมธานี ได้จำนวน 1 ไอโซเลท และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. colocasiae* พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท BM6 BM1 และ BM7 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. colocasiae* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.25 55.80 และ 54.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อรา *Trichoderma asperellum* (สายพันธุ์การค้า)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์ส่งเสริมศึกษา (STEM Education) มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- อมรรัตน์ ภูโพบูลย์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และพีระวรรณ พัฒนาการ, 2552, การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici*. ใน : ผลงานวิจัย ประจำปี 2555. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร: 2281-2292.
- Bin, L., Shida, J., Huifang, Z., Yucheng, W., Zhihua, L., 2020, Isolation of *Trichoderma* in the Rhizosphere soil of *Syringa oblata* from Harbin and Their Biocontrol and Growth Promotion Function, Microbiological Research, 235: 1-10.
- Misra, A.K., Sharma, K., Misra, R.S., 2008, Effect of Benzyl Amino Purine on the Pathogen Growth and Disease Development of Taro Leaf Blight Caused by *Phytophthora colocasiae*, Plant Pathology, 90(2): 191-196.
- Mohammad, M. S. and Hamisu, A., 2019, Introductory Chapter: Identification and Isolation of *Trichoderma* spp., Agriculture Industrial and Environmental Application, 1-13.

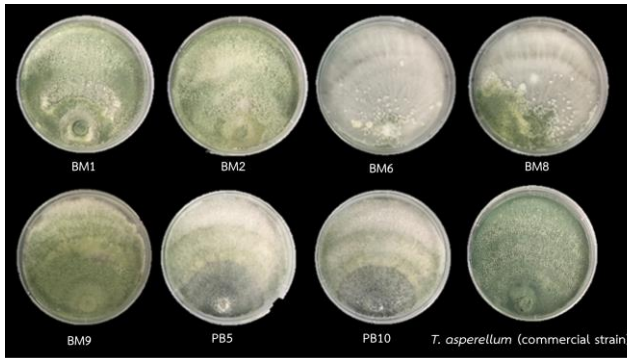


Figure 1 The variation of colours and morphology of the fungal colonies of *Trichoderma* sp. shown on Potato Dextrose Agar (PDA) compare with *T. asperellum* (commercial strain)

Table 1 Antagonistic activity of *Trichoderma* sp. against *P. colocasiae* on Potato Dextrose Agar (PDA) compared with *T. asperellum* (commercial strain)

Isolate	Percentage Inhibition
BM1	55.80 ± 0.08 ^{ab}
BM6	56.52 ± 0.23 ^a
BM7	54.59 ± 0.10 ^{abc}
<i>Trichoderma asperellum</i> (commercial strain)	53.14 ± 0.30 ^{bcd}

Note Different alphabets in the column represents significant difference at P< 0.05 employing DMRT

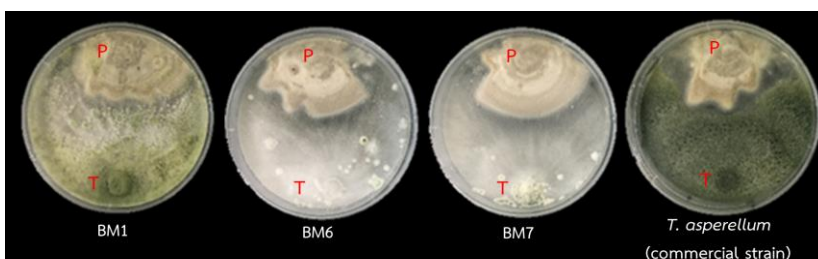


Figure2. Antagonistic effect of *Trichoderma* sp. 3 isolate compare with *T. asperellum* (commercial strain) against *P. colocasiae* on Potato Dextrose Agar (PDA) after 5 days

The antifungal activity of those three isolates was not significantly different from (P < 0.05) from *Trichoderma asperellum* (commercial strain).