การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากเนื้อไม้ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) สำหรับควบคุมเชื้อ *Phytophthora palmivora* (Butler) และ*P. botryosa* (Chee) โดยชีววิธี

Screening of Endophytic *Trichoderma* spp. from Sapwood of Rubber Trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) for Biological Control of *Phytophthora palmivora* (Butler) and *P. botryosa* (Chee)

กาญจนา มณีศรี

Kanchana Maneesri

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University
2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากเนื้อไม้ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) สำหรับควบคุมเชื้อ *Phytophthora palmivora* (Butler) และ*P. botryosa* (Chee) โดยชีววิธี

ผู้เขียน นางสาวกาญจนา มณีศรี

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ
(ดร.ชนินันท์ พรสุริยา)

……..กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

……..กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์)

……..กรรมการ
(ดร.สายทอง แก้วฉาย)

……..กรรมการ
(ดร.ธนัญชนก ไชยรินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

……
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอแสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....
(นางสาวกาญจนา มณีศรี)
นักศึกษา

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นางสาวกาญจนา มณีศรี)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากเนื้อไม้ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) สำหรับควบคุมเชื้อ *Phytophthora palmivora* (Butler) และ *P. botryosa* (Chee) โดยชีววิธี

ผู้เขียน นางสาวกาญจนา มณีศรี

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

แยกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากเนื้อไม้ยางพาราด้วยวิธี tissue transplanting ได้จำนวน93 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Phytophthora palmivora* (Butler) และ *P. botryosa* (Chee) สาเหตุโรคใบร่วงและเส้นดำของยางพารา ด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* ได้ตั้งแต่ 70.36 ถึง 90.71 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้ง *P. botryosa* ได้ตั้งแต่ 72.14 ถึง 85.71 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากเนื้อไม้ยางพันธุ์ปลูกดั้งเดิมและพันธุ์ RRIM 600 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 93 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร carboxyl methyl cellulose (CMC) agar ได้ จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.ได้ 7 ชนิด ได้แก่ *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei* และ *T. viride* นำเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 2 ไอโซเลท จำแนกสายพันธุ์ทางชีวโมเลกุล พบว่า ไอโซเลท SUL 1501-30 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *T. asperellum* และ ไอโซเลท SUR 1305-14 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *T. harzianum* นำเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 2 สายพันธุ์มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* บนใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 เปรียบเทียบกับสารเคมี metalaxyl พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* และ*T. harzianum* สามารถลดอาการโรคบนใบยางได้ แต่ต่ำกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมี metalaxyl จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *Phytophthora* spp.โดยนำเชื้อทั้ง 2 สกุลมาเลี้ยงด้วยวิธี slide culture เป็น

เวลา 4 วัน นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด(SEM) พบว่าเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ทำลายผนังเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. ได้

Thesis Title	Screening of Endophytic *Trichoderma* spp. from Sapwood of Rubber Trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) for Biological Control of *Phytophthora palmivora* (Butler) and *P. botryosa* (Chee)
Author	Miss Kanchana Maneesri
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	2013

ABSTRACT

A total number of 93 isolates of endophytic *Trichoderma*spp. were isolated from the sapwood of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by tissue transplanting method and were assessed for their ability to control *Phytophthora palmivora* (Butler) and *P. botryosa* (Chee) on dual culture plates**.** The results showed that *Trichoderma* spp. inhibited *P. palmivora* mycelial growth at the rate of 70.36 to 90.71 % and inhibited *P. botryosa* at the rate of 72.14 to 85.71 %. The efficacy of endophytic *Trichoderma* spp. isolated from the sapwood of early introduced clones and clone RRIM 600 of rubber trees were the same. All 93 *Trichoderma* spp. isolates produced cellulase on carboxyl methyl cellulose agar plates. Based on morphological characteristics 7 species were identified as follows : *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei* and *T. viride*. Two promising isolates of *Trichoderma* spp., *T. asperellum* isolate SUL 1501-30 and *T. harzianum* isolate SUR 1305-14, were selected and the identification of both isolates were confirmed by molecular analysis. Efficacies of both isolates were tested on detached leaves of rubber clone RRIM 600 to control *P. palmivora* and *P. botryosa* diseases. The results revealed that both *Trichoderma* spp. isolates decreased disease symptoms on rubber leaves, but their efficacy were less than metalaxyl treatment. The interaction between *Trichoderma* spp. and *Phytophthora* spp. mycelia was determined under scanning electron microscope (SEM) after they were cultured on slide cultures for 4 days. It indicated that the *Trichoderma* spp. mycelia attached, coiled *Phytophthora* spp. hyphae and degraded the *Phytophthora* spp. cell wall.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วสันณ์ เพชรรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ชื่นจิตต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษา ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.ชนินันท์ พรสุริยา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.สายทอง แก้วฉาย และ ดร.ธนัญชนก ไชยรินทร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย คณะทรัพยากรธรรมชาติ และสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณจำลอง ชูกำเนิด คุณสุภาพ จันทรัตน์ คุณปัทมาพร อินสุวรรโณ และบุคลากรภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเอื้ออำนวยความสะดวก ทั้งด้านวัสดุ อุปกรณ์ในการทำวิทยานิพนธ์และความช่วยเหลือทางด้านงานธุรการ

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณป้าสำหรับความห่วงใยและเป็นกำลังใจที่สำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้กันตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

กาญจนา มณีศรี

สารบัญ

สารบัญ	**หน้า**
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(8)
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(10)
รายการตารางภาคผนวก	(11)
รายการภาพ	(12)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	22
2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	
วัสดุและอุปกรณ์	23
วิธีการดำเนินการวิจัย	26
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	35
4 สรุปผลการทดลอง	57
เอกสารอ้างอิง	60
ภาคผนวก	68
ประวัติผู้เขียน	88

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (PCR master mix from Merck) 30
2 สถานที่เก็บตัวอย่างเนื้อไม้ยางพาราและจำนวนเชื้อรา เอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ 36
3 ชนิดและจำนวนไอโซเลทเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากเนื้อไม้ยางพารา 42
4 พื้นที่แผลบนใบยางพันธุ์ RRIM 600 หลังจากปลูกเชื้อราปฏิปักษ์เอนโดไฟท์ *Trichoderma asperellum* หรือ *T. harzianum* และเชื้อ *Phytophthora palmivora* เป็นเวลา 6 วัน 52
5 พื้นที่แผลบนใบยางพันธุ์ RRIM 600 หลังจากปลูกเชื้อราปฏิปักษ์เอนโดไฟท์ *Trichoderma asperellum* หรือ *T. harzianum* และเชื้อ *Phytophthora botryosa* เป็นเวลา 6 วัน 53

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ **หน้า**

1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกจากเนื้อไม้ยาง 74

พันธุ์ปลูกดั้งเดิม และพันธุ์ RRIM 600 ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อ *Phytophthora palmivora* โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA

2 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกจากเนื้อไม้ยาง พันธุ์ปลูกดั้งเดิม และพันธุ์ RRIM 600 ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อ *Phytophthora bothyosa* โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA 78

3 ค่าเฉลี่ยขนาดวงใสของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC agar 82

รายการภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* 27

2 เส้นใยเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากเนื้อไม้ยางพารา หลังจากนำชิ้นเนื้อไม้ยางพาราเพาะเส้นใยบนจานอาหารวุ้น PDA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ (neomycin 100 mg/L, penicillin 50 mg/L และ streptomycin 50 mg/L) เป็นเวลา 4 วัน 35

3 โคโลนีเชื้อ *Phytophthora palmivora* และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่างๆ เมื่อเลี้ยงใน dual culture plate บนอาหารวุ้น PDA หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน 37

4 โคโลนีเชื้อ *Phytophthora botryosa* และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่างๆเมื่อเลี้ยงใน dual culture plate บนอาหารวุ้น PDA หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน 38

5 ลักษณะวงใสที่เกิดจากการย่อยเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.ไอโซเลท SUL 503-51 บนอาหาร CMC agar หลังจากหยดน้ำเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง 39

6 โคโลนีของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ที่เจริญคลุม paper disc ที่หยดน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA หลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 40

7 โคโลนีของเชื้อ *Phytophthora botryosa* ที่เจริญคลุม paper disc ที่หยดน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่างๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA หลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน 41

8 เชื้อรา *Trichoderma asperellum* 43

9 เชื้อรา *Trichoderma atroviride* 44

10 เชื้อรา *Trichoderma harzianum* 45

11 เชื้อรา *Trichoderma koningii* 46

12 เชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* 47

13 เชื้อรา *Trichoderma reesei* 48

14 เชื้อรา *Trichoderm aviride* 49

15 ขนาด PCR products ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.ไอโซเลท SUL 1501-30 หรือ SUR 1305-14 เปรียบเทียบกับ Markers (100 bp ladder) 50

16 อาการของโรคบนใบยางพาราพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* SUL 1501-30 หรือ *T. harzianum* SUR 1305-14 และปลูกเชื้อ 52

Phytophthora palmivora ร่วมกัน เป็นเวลา 6 วัน
17 อาการของโรคบนใบยางพาราพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* SUL 1501-30 หรือ *T. harzianum* SUR 1305-14 และปลูกเชื้อ *Phytophthora botryosa* ร่วมกันเป็นเวลา 6 วัน 53
18 เส้นใยเชื้อ *Phytophthora palmivora* (*P. pal*) แสดงอาการเหี่ยว ผนังเส้นใยถูกทำลาย เมื่อวางเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma asperellum* (*Ta*) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM Quanta 400, FEI ที่ 10 kV) 55
19 เส้นใยเชื้อ *Phytophthora botryosa* (*P. bo*) แสดงอาการเหี่ยว ผนังเส้ยใยถูกทำลาย เมื่อวางเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma harzianum* (*Th*) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM Quanta 400, FEI ที่ 10 kV) 56

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญยิ่งของประเทศไทยและภูมิภาคอาเซียน ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกอันดับหนึ่งของโลก โดยมีพื้นที่ปลูกยาง 18.76 ล้านไร่ ก่อให้เกิดกิจกรรมต่อเนื่องทั้งภาคการผลิตภาคอุตสาหกรรม และภาคการตลาด เกี่ยวข้องกับทุกภาคส่วนทั้งเกษตรกร ผู้ประกอบการ และภาครัฐ กระจายอยู่ทั่วประเทศ ในปี 2554 มูลค่าการส่งออกยางดิบ ผลิตภัณฑ์ยาง รวมทั้งอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ไม้ ทำให้ยางพารามีรายได้ให้ประเทศถึง 678,942 ล้านบาท (สถาบันวิจัยยาง, 2555)

ในการปลูกยางพารามักมีปัญหาโรคเข้าทำลายได้ตั้งแต่เริ่มปลูกจนกระทั่งถึงโค่น ทำให้ต้นยางชะงักการเจริญ ผลผลิตลดลงและอาจรุนแรงจนถึงต้นยางยืนต้นตาย โรคยางพาราที่ระบาดส่วนใหญ่มีสาเหตุจากเชื้อรา ซึ่งโรคที่สำคัญของยางพาราได้แก่ โรคราแป้ง (powdery mildew) โรคใบจุดก้างปลา (Corynespora leaf disease) โรคใบจุดตานก (bird's eye spot) โรคใบร่วง (leaf fall) โรคเส้นดำ (black stripe) โรคเปลือกเน่า (mouldy rot) โรคราสีชมพู (pink disease) โรครากขาว (white root disease) โรครากน้ำตาล (brown root disease) โรครากแดง (red root disease) โรคลำต้นเน่าของต้นยางชำถุง (twig rot of polybag rubber) เป็นต้น ในอดีตยางพาราพันธุ์ปลูกดั้งเดิมที่ปลูกมีความแข็งแรงตามธรรมชาติ ทำให้ต้นยางสามารถต้านทานต่อการเกิดโรค แต่เมื่อมีการนำยางพันธุ์ดีมาปลูกทดแทนทำให้ประสบปัญหาโรคยางพาราเพิ่มขึ้น และจากการที่ภาคใต้มีฝนตกตลอดทั้งปี ทำให้การระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. เป็นไปอย่างกว้างขวางและรุนแรงมากขึ้น ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคกับยางพาราในประเทศไทย ได้แก่ *P. palmivora* (Butler), *P. botryosa* (Chee) และ *P. nicotinae* var. *parasitica* (Dastur) (สถาบันวิจัยยาง, 2555) เชื้อสามารถเข้าทำลายยางพาราได้ทุกส่วน มีลักษณะอาการที่แตกต่างกันไปตามแต่ละส่วนของพืช ทำให้ผลผลิตลดลง สำหรับการป้องกันกำจัด โดยทั่วไปเกษตรกรมักใช้สารเคมีซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว และสามารถลดการระบาดของโรคที่เกิดขึ้นอย่างได้ผล แต่การใช้สารเคมีอย่างขาดความระมัดระวัง นอกจากเป็นอันตรายต่อผู้ใช้โดยตรงแล้ว ยังก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นปัญหาของสังคมส่วนรวมอย่างชัดเจน ปัจจุบันจึงมีผู้สนใจศึกษาการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) เพื่อแก้ไขและลดการใช้สารเคมี

การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี เป็นการควบคุมโรคโดยใช้จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นช่วยลดจำนวนประชากรของเชื้อโรค ลดการเกิดโรคหรือลดความเสียหายของพืชที่เกิดจากเชื้อโรค (สืบศักดิ์ สนธิรัตน์, 2540) ดังนั้นการค้นหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้สำหรับควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี เอนโดไฟท์เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในพืช ในภาวะพึ่งพาอาศัยโดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัย (Rocha *et al*., 2011) ปัจจุบันมีการศึกษาการนำเชื้อราเอนโดไฟท์มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชกันอย่างแพร่หลาย (Gazis and Chaverri, 2010) เนื่องจากราเอนโดไฟท์มีบทบาทในการป้องกันพืชอาศัยปกป้องพืชจากเชื้อราก่อโรคอื่นๆ โดยทำการยับยั้ง หรือทำลายเชื้อราก่อโรค ดังนั้นการนำราเอนโดไฟท์จากต้นยางพาราที่ไม่แสดงอาการโรคมาใช้ในการควบคุมโรคยางพารา จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการควบคุมโรคของยางพารา

ตรวจเอกสาร

1. โรคยางพาราที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp.

โรคของยางพาราที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. เป็นโรคที่สำคัญของประเทศไทย ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตยางพารา จึงมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ สามารถเข้าทำลายต้นยางได้ทุกระยะการเจริญ ตั้งแต่ยางเล็กจนถึงยางใหญ่ และเกือบทุกส่วนของลำต้น ก่อให้เกิดโรคใบร่วง (leaf fall) ฝักเน่า (pod rot) และโรคเส้นดำ (black stripe) ซึ่งปัจจุบันกำลังเป็นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรชาวสวนยางพาราเป็นอย่างมาก ส่งผลให้ผลผลิตลดลงและมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมยางพาราในประเทศ

โรคใบร่วงและเส้นดำที่เกิดจากเชื้อ Phytophthora (Phytophthora leaf fall and black stripe)

เชื้อสาเหตุ

โรคใบร่วงและเส้นดำของยางพาราเกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. มีอยู่หลายชนิด ได้แก่ *P. palmivora, P. botryosa, P. heveae, P. meadii, P. nicotianae* และ *P. parasitica* (Erwin and Ribeiro, 1996) ในประเทศไทยพบที่ทำให้เกิดโรคในยางพารามี 3 ชนิด คือเชื้อ *P. palmivora, P. botryosa* และ *P. nicotianae* var. *parasitica* (สถาบันวิจัยยาง, 2555) ในปัจจุบันเชื้อ *Phytophthora* spp. มีการแพร่กระจายทั่วโลก ทำลายผลผลิตทางการเกษตร และระบบนิเวศ มีพืช

อาศัยที่เชื้อสามารถเข้าทำลายได้มากกว่า 100 ชนิด และมีสายพันธุ์เกิดขึ้นมากกว่า 138 ชนิด (Kroon *et al.*, 2012)

Phytophthora spp. พบทั้งที่อาศัยอยู่ในน้ำและในดิน เส้นใยไม่มีผนังกั้น ผนังเซลล์ประกอบด้วย cellulose และ β -1,3 glucan เป็นพวกที่มีลักษณะรูปร่างและการเจริญคล้ายรา อยู่ในกลุ่ม Oomycetes โดยเส้นใยเดี่ยวๆ (hypha) แตกกิ่งก้านเป็นกลุ่มเส้นใย (mycelium) สีขาวมีการสร้างสปอร์แรงเจียม (sporangium) บนสปอร์แรงจิโอฟอร์ (sporangiophore) หลังจากเจริญเป็นสปอร์แรงเจียมแล้วสปอร์แรงจิโอฟอร์จะเจริญให้สปอร์แรงเจียมใหม่จากปลายเดิม แล้วดันสปอร์แรงเจียมไปด้านข้างของสปอร์ของแรงจิโอฟอร์ โดยส่วนที่เป็นสปอร์แรงจิโอฟอร์นั้นมีลักษณะพองกว่าเส้นใยปกติ สปอร์แรงเจียมมีรูปร่างคล้ายไข่ ตรงบริเวณฐานมีความกว้างกว่าส่วนบน ตรงปลายมีปุ่ม (papilla) ซึ่งเป็นส่วนที่ปล่อยให้ซูโอสปอร์ออกสู่ภายนอกทางด้านที่มีลักษณะเป็นปุ่ม สามารถให้เกิดกำเนิดซูโอสปอร์ที่อุณหภูมิระหว่าง 12-15 องศาเซลเซียสและงอกเส้นใยลักษณะเป็นท่อ (germ tube) เข้าทำลายพืชโดยตรงที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียสสำหรับโครงสร้างของซูโอสปอร์เกิดจากการแบ่งตัวของโปรโตพลาสซึม ภายในสปอร์แรงเจียม เมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสม ซูโอสปอร์ที่มี 2 หาง เป็นลักษณะ tinsel มีขนอ่อนจำนวนมาก ทำหน้าที่โบกให้เคลื่อนที่ไปข้างหน้า ส่วนอีกเส้นหนึ่งเป็นแส้หรือ whiplash ทำหน้าที่โบกถอยหลัง (Desjardin *et al.*, 1969) เมื่อซูโอสปอร์ถูกปล่อยออกจากสปอร์แรงเจียมและว่ายน้ำได้ระยะหนึ่งจะหยุดเคลื่อนไหว ปลดหาง แล้วเข้าเกาะพืชอาศัย (Erwin and Ribeiro, 1996)

ลักษณะอาการของโรคใบร่วง

ใบยางร่วงทั้งที่มีสีเขียวสดหรือสีเหลือง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ โดยมีลักษณะเด่นที่สามารถสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน คือ มีรอยช้ำสีดำตรงบริเวณก้านใบ และที่จุดกึ่งกลางของรอยช้ำมีหยดน้ำยางสีขาวเกาะติดอยู่ เมื่อนำใบยางที่ร่วงขึ้นมาสลัดเบาๆ ใบย่อยจะหลุดทันที ซึ่งต่างกับใบยางที่ร่วงหล่นตามธรรมชาติ ต้นยางที่เกิดโรคใบร่วงนี้แล้ว มักไม่ผลิใบยางออกมาใหม่ในปีนั้น ๆ และผลิใบใหม่ตามปกติเมื่อถึงฤดูผลิใบของปีถัดไป ยกเว้นต้นยางที่เป็นโรคใบร่วงจนหมดต้น ซึ่งจะผลิใบใหม่ขึ้นมาทดแทนเพียงเล็กน้อย ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของพุ่มใบปกติเท่านั้น (สถาบันวิจัยยาง, 2555)

ลักษณะอาการของโรคเส้นดำ

โรคเส้นดำเกิดจากการที่น้ำฝนชะล้างเชื้อสาเหตุจากฝัก ใบ ยอด และกิ่งก้าน ลงมายังหน้ากรีด เชื้อเข้าทำลายได้เฉพาะบริเวณเปลือกยางที่มีบาดแผลเท่านั้น โดยส่วนใหญ่เข้าทำลายทางรอยกรีดใหม่ที่กรีดไปแล้วไม่เกิน 24 ชั่วโมง ส่วนบนผิวเปลือกยางที่ไม่มีบาดแผลใด ๆ เชื้อสาเหตุของโรคนี้ไม่สามารถเข้าทำลายต้นยางได้ ในระยะแรกหลังจากที่เชื้อเข้าทำลายแล้ว บริเวณที่

เป็นโรคเป็นรอยช้ำ มีสีผิดปกติ ส่วนมากมักเกิดขึ้นเหนือรอยกรีด หากอาการรุนแรงมากขึ้นบริเวณที่เป็นรอยช้ำจะเปลี่ยนเป็นรอยบุ๋มสีดำหรือน้ำตาลดำ เป็นเส้นขยายลงตามแนวขนานกับลำต้น เยื่อเจริญส่วนนั้นตายหมด เมื่อเฉือนเปลือกออกดูพบรอยบุ๋มสีดำ และมีลายเส้นสีดำบนเนื้อไม้บริเวณแผล เป็นรอยยาวตามแนวยืนของลำต้น อาการระยะรุนแรงทำให้เปลือกของหน้ายางบริเวณที่เป็นโรคปริ มีน้ำยางไหลออกมาตลอดเวลา เปลือกเน่าและหลุดออกมาในที่สุด ทำให้หน้ากรีดเสียหาย เปลือกที่งอกใหม่กรีดซ้ำไม่ได้ ยางพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้ได้แก่ RRIM 600 (สถาบันวิจัยยาง, 2555)

การเข้าทำลาย

เชื้อ *Phytophthora* spp. สามารถอยู่ข้ามฤดูในรูปของโอโอสปอร์ และอยู่ในรูปของเส้นใยในพืชที่เป็นโรค เช่น ฝัก ยอด และเปลือกบนต้นยาง หรือเศษพืชอาศัยที่อยู่บนดิน เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเกิดการแพร่กระจายจากแผลที่ใบหรือกิ่งก้านบนต้น โดยสปอร์แรงเจียมที่อยู่ในละอองน้ำที่เกิดจากฝน ตกลงบนส่วนของพืช ทำให้เกิดแผ่นน้ำบนแผล สปอร์แรงเจียมจะพัฒนาโครงสร้างเกิดซูโอสปอร์มีขนาดเล็กถูกปลดปล่อยออกจากสปอร์แรงเจียมและสามารถเข้าทำลายส่วนต่าง ๆ ของยางโดยตรงหรืองอกเป็นเส้นใยที่สามารถเข้าทำลายยางได้ (พิพัฒน์ เชี่ยงหลิว , 2540) เชื้อ *Phytophthora* spp. สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด เช่น ไม้ดอก ไม้ประดับ พืชล้มลุกต่าง ๆ รวมทั้งไม้ยืนต้น ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าที่ผล ราก ลำต้น และหัว (Erwin and Ribeiro, 1996)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

การระบาดของเชื้อ *Phytophthora* spp. เกิดขึ้นเมื่อสภาพภูมิอากาศชื้นเป็นระยะเวลานาน และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ของเชื้อ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนและจำนวนวันฝนตก โรคเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางและรุนแรง ในระยะที่ฝนตกติดต่อกันหลายวัน โดยปกติพบระบาดระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน (กรมส่งเสริมการเกษตร, มปป.)

การป้องกันกำจัด

การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่ได้ผลดีที่สุดในปัจจุบัน แต่มีข้อจำกัดคือต้องใช้ระยะเวลานานในการปรับปรุงพันธุ์ยาง ให้มีลักษณะเป็นพันธุ์ยางที่ดี ให้ผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรค ต้องใช้ระยะเวลาในการทดสอบนาน ไม่น้อยกว่า 20 ปี เพื่อให้ได้ผลที่แน่นอนเชื่อถือได้

การใช้สารเคมีในการป้องกันโรคเป็นวิธีที่นิยม เนื่องจากสะดวกและให้ผลในการควบคุมเร็วกว่าวิธีการอื่น ในยางเล็กที่มีอายุไม่เกินสองปี ใช้สารเคมี เมทาแลกซิล (metalaxyl) ฟอสเอทธิล อลูมินั่ม (fosetyl-Al) ฉีดพ่นพุ่มใบทุกสัปดาห์เพื่อป้องกันโรคในช่วงที่มีโรคนี้ระบาด ในยาง

ใหญ่การป้องกันรักษาไม่คุ้มกับค่าใช้จ่ายที่เสียไป ประกอบกับยางใหญ่ถึงแม้จะเป็นโรคใบร่วง ต้นยางก็ไม่ตาย เพียงแต่ปริมาณน้ำยางลดลงเท่านั้น วิธีแก้ไขในยางใหญ่ที่เป็นโรคคือ ใส่ปุ๋ยบำรุงดินให้มีความอุดมสมบูรณ์เพิ่มขึ้น เพื่อเร่งการเจริญของต้นยาง หากยางเปิดกรีดแล้วจำเป็นต้องใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ทาบริเวณรอยกรีดอย่างสม่ำเสมอ เพื่อป้องกันการเกิดโรคหน้ากรีด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเส้นดำ

การควบคุมโดยชีววิธีมีการทดลองการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. และพบจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ได้หลายชนิดดังรายงานต่อไปนี้

นริสา จันทร์เรือง (2543) แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินในสวนยาง นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. botryosa* ด้วยวิธี dual culture พบเชื้อแบคทีเรีย 13 สายพันธุ์สามารถยับยั้งได้ โดย 5 สายพันธุ์ สามารถเจริญเร็วทำให้เส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญได้ และเมื่อทดสอบการควบคุมการเกิดโรคบนก้านยาง พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 7 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของซูโอสปอร์ได้ดี

เสมอใจ ชื่นจิตต์ และคณะ (2553) ประเมินการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบร่วง *Phytophthora* spp. ของกล้ายางพารา สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้ 797 ไอโซเลท (*Chaetomium* spp. 174 ไอโซเลท, *Trichoderma* spp. 168 ไอโซเลท, *Streptomyces* spp. 158 ไอโซเลท และ*Bacillius* spp. 297 ไอโซเลท) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร PDA พบว่า *Chaetomium* sp. C007-9, *Trichoderma* sp. T016-2, *Streptomyces* sp. SC03-15 และ *Bacillius* sp. B068-2 สามารยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora* ได้ จากการประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเข้าทำลายโดยซูโอสปอร์ของเชื้อทั้ง 2 บนใบและก้านยางพารา พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillius* sp. B068-2 ยับยั้งการเข้าทำลายของ *P. botryosa* ได้สูงสุด และเชื้อ *Streptomyces* sp. SC03-15 ยับยั้งเชื้อ *P. palmivora*ได้สูงสุด และเมื่อทดสอบในสภาพเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีพ่นสปอร์แขวนลอยของ *Trichoderma* sp. T016-2 ก่อนพ่นซูโอสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *P. botryosa* และ *P. palmivora* สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ดีที่สุด

2. เอนโดไฟท์ (Endophytes)

เอนโดไฟท์ คือ สิ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์ที่ในช่วงหนึ่งหรือตลอดวงจรชีวิตสามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชได้ (Azevedo *et al*., 2000) โดยไม่ทำให้พืชเกิดอาการผิดปกติและมี

ความสัมพันธ์กันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualistic symbiosis) อาจเป็นกลุ่มของแบคทีเรีย แอคทิโนมัยซิส เชื้อรา และปรสิตของพืช ซึ่งสิ่งมีชีวิตดังกล่าวจะพบอยู่ในเนื้อเยื่อที่มีชีวิตของพืช มีจำนวนมากที่เจริญอยู่ในท่อลำเลียงของพืช โดยสามารถตรวจพบได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ฆ่าเชื้อที่ผิวแล้ว (Chanway, 1998) เอนโดไฟท์สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนภายในเนื้อเยื่อโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อพืชอาศัย ช่วยให้เนื้อเยื่อของพืชลดความดึงดูดต่อศัตรูพืช บางสายพันธุ์กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน ส่งเสริมการเจริญของพืช และสามารถใช้ในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช (biological control agent) โดยเอนโดไฟท์สร้างสารประกอบเคมี หรือเอนไซม์จากส่วนประกอบของเซลล์พืช หรือเป็นแหล่งของสารพิษที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อสัตว์และศัตรูพืชหรือเชื้อโรคได้ (Carroll, 1988) นอกจากนี้ยังเพิ่มความแข็งแรงให้กับต้นพืช และสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลงศัตรูได้เป็นอย่างดี (Belanger, 1996)

2.1 เชื้อราเอนโดไฟท์

เชื้อราเอนโดไฟท์เป็นกลุ่มของเชื้อราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช สามารถพบได้ทุกแหล่งอาศัย ตั้งแต่ป่าชายเลนตามแนวชายฝั่ง จนถึงเขตอบอุ่นและเขตหนาว (Gazis and Chaverri, 2010) เป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเซลล์ของพืชที่ยังมีชีวิตอยู่ ลำต้น ก้านใบ ราก และใบของพืชที่มีความสมบูรณ์ โดยไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคใดๆ กับพืชอาศัย (Rocha *et al*., 2011; Unterseher *et al*., 2013) ไม่พบในส่วนของตา (bud) แต่พบเมื่อเจริญเป็นใบ (Elamo *et al*., 1999) เนื้อเยื่อของพืชที่มีราเอนโดไฟท์ ยังสามารถทำงานได้อย่างปกติ โดยราเอนโดไฟท์อาจมีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยซึ่งอยู่ในภาวะเกื้อกูล (mutuality) หรืออิงอาศัย (symbiosis) (Redlin and Carris, 1985) หรือเป็นเชื้อก่อโรค (Pertrini, 1991) เชื้อราเอนโดไฟท์บางชนิดเป็น latent pathogen ในพืชอาศัย Smith และคณะ (1996) รายงานว่าพบราเอนโดไฟท์ *Botryosphaeria dothidea* ในใบของยูคาลิปตัสที่ปกติในแอฟริกาใต้ ซึ่งโดยปกติเชื้อ *B. dothidea* เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญในต้นไม้เนื้อแข็งรวมถึงยูคาลิปตัสด้วย เชื้อราเอนโดไฟท์ส่วนใหญ่อยู่ใน Class Ascomycetes และ Deuteromycetes พบเล็กน้อยใน Basidiomycetes และพบจำนวนน้อยมากใน Oomycetes (Isaac, 1992)

2.2 บทบาททางชีวภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีต่อพืชอาศัย

ราเอนโดไฟท์มีผลต่อกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ตามธรรมชาติ เช่น ราเอนโดไฟท์กลุ่ม Xylariaceae ที่อาศัยอยู่ในพืช อาจมีบทบาทเพื่อรอที่จะย่อยสลายเซลลูโลสและลิกนินในซากพืชหลังจากที่พืชตาย (Pertrini *et al*., 1995) ซึ่งราเอนโดไฟท์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อของพืชสามารถเข้ายึดครอง และเริ่มกระบวนการย่อยสลายได้ก่อนเชื้อกลุ่มแซปโปรไฟท์ (saprophyte) ที่มาจาก

สิ่งแวดล้อมภายนอก และเมื่อราเอนโดไฟท์เริ่มกระบวนการย่อยสลายในพืชที่ตายแล้วจะทำให้เกิดการหมุนเวียนของวัฏจักรแร่ธาตุและสารอาหาร

มีการศึกษาบทบาทของราเอนโดไฟท์ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญของพืช เช่น เชื้อราเอนโดไฟท์ *Piriformospora indica* ซึ่งอาศัยอยู่ในรากของพืช มีผลในการเพิ่มน้ำหนักของรากและยอดของพืชหลายชนิด (Varma *et al*., 1999; Waller *et al*., 2005) Clay (1987) ศึกษาผลของเอนโดไฟท์ต่อ *Lolium perenne* และ *Festuca arundinacea* ในโรงเรือน พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สามารถช่วยส่งเสริมอัตราการงอกของเมล็ดและส่งเสริมความแข็งแรงในต้นกล้า Muller (2003) ทดลองปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Epichloe typhina* ในหญ้า *L. perenne* พบว่า ทำให้พืชมีน้ำหนักน้อยลง แต่เมื่อปลูกเชื้อราเอนโดไฟท์ชนิด *Neotyphodium lolii* มีผลทำให้พืชมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น

ราเอนโดไฟท์เป็นแหล่งของเอนไซม์ สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น สามารถผลิตเอนไซม์ phytase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Sopalun, 2004) ราเอนโดไฟท์ *Piriformospora indica* นอกจากสามารถเพิ่มอัตราการเจริญของพืชแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ nitrate reductase และ glucan-water dikinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายแป้ง (Sherameti *et al*., 2005) และราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* spp. สามารถหลั่งเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ amylase, cellulase, lipase, pectinase และ protease ในสภาวะ pH ที่แตกต่างกัน (Maccheroni *et al.,* 2004)

ราเอนโดไฟท์ทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์คุ้มครองพืช เป็นผลมาจากสารพิษจำพวก alkaloids ที่เชื้อราสร้างขึ้น ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ 1) ergot alkaloids 2) indolediterpenes 3) pyrrolopyrazine และ 4) saturated aminopyrrolizidines หรือ lolines โดยสาร alkaloids ทั้ง 4 กลุ่ม มีความเป็นพิษต่อแมลงและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หญ้าที่มีราเอนโดไฟท์ จะมีสารกลุ่ม alkaloid อยู่ จึงทำให้แมลงที่กินใบและสัตว์เคี้ยวเอื้องบางชนิดไม่ชอบ (Schardl and Phillips, 1997)

ราเอนโดไฟท์มีบทบาทในการป้องกันพืชอาศัย ปกป้องพืชจากเชื้อราก่อโรคอื่น ๆ โดยทำการยับยั้ง หรือทำลายเชื้อราก่อโรค เช่น ราเอนโดไฟท์ *Gliocladium catenulatum* สามารถยับยั้งเชื้อรา *Crinipellis perniciosa* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค witches broom ที่ก่อความเสียหายอย่างมากต่อการปลูกต้นโกโก้ (Rubini *et al*., 2005)

ราเอนโดไฟท์สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งสารส่วนใหญ่จากราเอนโดไฟท์มีผลยับยั้งเชื้อราโรคพืช แบคทีเรีย ปรสิต แต่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ เช่น ราเอนโดไฟท์ *Gliocladium* sp. จากต้น *Eucryphia cordifolia* สามารถผลิตสารจำพวกสารระเหยอินทรีย์ (volatile organic compounds, VOCs) ซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช ได้แก่ *Pythium ultimum* และ *Verticillium dahliae* (Stinson *et al*., 2003)

2.3 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์

การเก็บตัวอย่างพืชเพื่อนำมาแยกเอนโดไฟท์ ควรเลือกเก็บจากต้นที่มีลักษณะการเจริญปกติสมบูรณ์ ไม่มีอาการของโรค และควรทำการแยกเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง หลักการที่สำคัญคือ การทำให้ผิวของพืชที่นำมาใช้แยกนั้นปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อ ซึ่งมักแตกต่างกัน (สายสมร ลำยอง และคณะ, 2541) โดยปรับปรุงเปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมกับสภาพของเนื้อเยื่อพืชตัวอย่าง วิธีการทำให้ปราศจากเชื้อที่ผิว ทำได้โดยเลือกชิ้นส่วนของพืชจากต้นที่สมบูรณ์ นำมาล้างผ่านน้ำไหล แล้วนำชิ้นพืชมาจุ่มในเอทธานอล (ethanol) และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) เจือจาง ตามด้วย ethanol อีกครั้ง ซึ่ง Spurr และ Welty (1975) พบว่า การเพิ่มแอลกอฮอล์ในขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ sodium hypochlorite และช่วยให้ชิ้นพืชเปียกอย่างทั่วถึง หลังจากฆ่าเชื้อแล้ว วางชิ้นพืชในจานอาหารแข็งที่เติมสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังรายงานวิจัยต่อไปนี้

เลขา มาโนช และคณะ (2544) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบกล้วยไม้ป่า 3 ชนิด โดยนำใบพืชปกติมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 3 x 3 ตารางเซนติเมตร แช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 10 นาที และแช่ใน 10 เปอร์เซ็นต์ clorox เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างพืชวางบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยเลี้ยงในอาหาร PDA

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย (2549) แยกเชื้อราเอนไฟท์จากพืชสกุล *Garcinia* โดยเก็บตัวอย่างใบพืช และกิ่งที่มีความสมบูรณ์ สีเขียวเข้ม ไม่มีอาการของโรค เก็บตัวอย่างต้นละ 5 ใบ และ 5 กิ่ง โดยพืช 1 ชนิด เก็บตัวอย่าง ชนิดละ 1-3 ต้น นำตัวอย่างพืชมาแยกราเอนโดไฟท์ทันที โดยนำตัวอย่างพืชมาล้างด้วย detergent และน้ำประปา ผึ่งให้แห้งภายใต้ laminar flow เมื่อตัวอย่างพืชแห้งใช้มีดผ่าตัดจุ่ม 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol นำไปผ่านไฟ แล้วตัดส่วนของ เส้นใบ เส้นกลางใบ เนื้อใบ ก้านใบ และกิ่ง เป็นชิ้นขนาด 1 x 1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2, 3, 3, 4 และ 10 ชิ้น ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้นๆ มากำจัดเชื้อบริเวณผิว โดยแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 30 วินาที แช่ใน 5 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 30 วินาที นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 3-5 วินาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร corn meal agar (CMA) ที่เติมสารปฏิชีวนะ tetracycline และ ampicillin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญรอบ ๆ ตัดปลายเส้นใยเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ แยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

ยุพาภรณ์ เดชโสภา (2554) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากส่วนของใบ กิ่ง และรากพริก ล้างให้สะอาดโดยการล้างผ่านน้ำและผึ่งในที่ร่มให้แห้ง นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 1 นาที 0.44 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที และล้างในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำตัวอย่างมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 3 x 3 ตารางมิลลิเมตร ซับชิ้นตัวอย่างให้แห้งด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นตัวอย่างวางบนอาหาร malt extract agar ที่ผสมสารปฏิชีวนะ chloramphenicol ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อไว้ 3 สัปดาห์ แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยว หรือเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA

Bayman และคณะ (1997) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากส่วนรากและใบของพืชในสกุล *Lepanthes* นำใบและรากมาล้างผ่านน้ำ ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน 75 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 1 นาที แช่ใน 65 เปอร์เซ็นต์ Clorox เป็นเวลา 10 นาที และแช่ใน 75 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำฆ่าเชื้อแล้ว นำตัวอย่างรากมาตัดตัวอย่างละ 6 ชิ้น ขนาด 2-5 มิลลิเมตร และตัวอย่างใบนำมาตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร บริเวณปลายใบ กลางใบ และโคนใบ และตัดแบ่งครึ่งอีกครั้ง นำชิ้นส่วนจากรากตัวอย่างละ 3 ชิ้น และตัวอย่างจากใบที่ตัดแบ่งเป็นครึ่งวงกลม วางบนอาหาร half-strength malt extract agar ที่ผสม rose bengal ความเข้มข้น 35 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสโคโลนีของเชื้อราที่ได้ให้ย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร MEA หรือ V8 juice agar

Liu และคณะ (2001) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อเยื่อลำต้นของ *Artemisia annua* โดยนำส่วนของลำต้น *A. annua* มาล้างผ่านน้ำ และฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ 75 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 1 นาที และแช่ใน 5 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และนำชิ้นตัวอย่างพืชมาตัดเป็นแท่งขนาด 1 เซนติเมตร จาก 1 แท่งให้ตัดแบ่งเป็น 2 แท่งตามแนวตั้งตรง นำชิ้นตัวอย่างวางบนอาหาร PDA ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 150 มิลลิกรัมต่อลิตร และ streptomycin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญจากชิ้นส่วนของตัวอย่าง คัดเลือกเชื้อราให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ใน PDA

Evans และคณะ (2003) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์ และ mycoparasites จากไม้ป่าในประเทศเอกวาดอร์ เลือกต้นไม้ขนาดใหญ่ สูง 15-20 เมตร ตัดเปลือกไม้ที่ความสูงระดับไหล่ (1.5 เมตร) ขนาดประมาณ 8 x 6 ตารางเซนติเมตร จากนั้นใช้มีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อ ตัดเนื้อไม้ขนาด 0.8 x 0.5 ตารางเซนติเมตร ใช้ปากคีบคีบเนื้อไม้ใส่จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร) ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะ streptomycin 10 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ

MEA เติมสารปฏิชีวนะ chloramphenicol 0.05 กรัมต่อลิตร ปิดด้วยเทปกาวทันที เก็บใส่กล่องพลาสติก

Kim และคณะ (2007) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบ ลำต้น และรากของพืชผัก 5 ชนิด คือ พริก แตงกวา มะเขือเทศ ฟักทอง และผักกาดขาวจีน เก็บตัวอย่างพืชปกติ 3-5 ต้นต่อพื้นที่แบบสุ่ม นำตัวอย่างพืชมาทำความสะอาดโดยล้างผ่านน้ำและผึ่งให้แห้ง ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ตัวอย่างพืชใน 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 1 นาที และแช่ใน 5 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และวางเลี้ยงบนอาหาร MEA ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะ chloramphenicol ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยวางชิ้นตัวอย่าง 4 ชิ้นต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อราเจริญทำการถ่ายเชื้อโดยใช้อาหาร PDA บ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส

Chaverri และคณะ (2011) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบและเนื้อไม้ยางพาราในลุ่มน้ำอเมซอนประเทศบราซิล ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ *T. amazonicum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ โดยนำตัวอย่างจากใบ มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite และ 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ วางบนอาหาร corn meal-dextrose agar (CMD) ที่เติมสารปฏิชีวนะเพื่อกำจัดแบคทีเรียเอนโดไฟท์ ส่วนการแยกเอนโดไฟท์จากเนื้อไม้ยางพารา ได้ตัดเปลือกไม้ยางพาราขนาด 10 x 10 ตาราเซนติเมตร และส่วนเปลือกออก ใช้มีดตัดส่วนที่เป็นเนื้อไม้ขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ย้ายเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMD ที่ผสมสารปฏิชีวนะในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตรทันที โดยวางจานละ 1 ชิ้น ปิดขอบจานด้วยเทปพลาสติกบ่มเลี้ยงไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

Rocha และคณะ (2011) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบยางพารา ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 1 นาที 3 เปอร์เซ็นต์ calcium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 1 นาที 3 ครั้ง วางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-15 วัน เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญรอบๆ ชิ้นส่วนของตัวอย่าง แยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

Li และคณะ (2012) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Arabis hirsute*, *Acacia decurrens*, *Symplocos paniculata*, *Rabbosia eriocalyx*, *Arenaria serpyllifolia* และ *Rosa longicuspis* จากส่วนของใบและก้านที่ปกติ ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite เป็นเวลา 2 นาที และ 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 2 นาที วางบนอาหาร PDA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ streptomycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญ

ทุกวันจนถึง 30 วัน เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อ ตัดปลายเส้นใยเลี้ยงบนอาหาร PDA แยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์

Gazis และคณะ (2012) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบและลำต้นของยางพารา โดยนำส่วนใบมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite และแช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ วางบนอาหาร CMD ที่มีสารปฏิชีวนะ ส่วนการแยกเอนโดไฟท์จากเนื้อไม้ยางพารา ใช้มีดฆ่าเชื้อ ตัดส่วนเปลือกของลำต้นขนาด 3 x 6 เซนติเมตร ที่ความสูงระดับบ่า และส่วนเปลือกออก นำมีดที่ฆ่าเชื้อตัดส่วนที่เป็นเนื้อไม้ด้านในยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร วางบนอาหาร CMD ที่มีสารปฏิชีวนะ (1 เปอร์เซ็นต์ solution of Neomycin–Penicillin–Streptomycin) เพื่อกำจัดแบคทีเรียเอนโดไฟท์ บ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญรอบ ๆ ชิ้นส่วนของตัวอย่าง แยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

Ming และคณะ (2012) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากรากของพืช *Salvia miltiorrhiza* นำรากมาล้างน้ำ แล้วฆ่าเชื้อโดยใช้ 75 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 30 วินาที 1.3 M sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที และ 75 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ วางบนอาหาร PDA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ penicillin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่ 26 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญรอบๆ ชิ้นส่วนของตัวอย่าง ตัดปลายเส้นใยเลี้ยงบนอาหาร PDA แยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์

Silva และคณะ (2012) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จาก ใบ กิ่ง และราก กาแฟ ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 1-2 นาที 2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียสสังเกตการเจริญ เมื่อเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อ ตัดปลายเส้นใยเลี้ยงบนอาหาร PDA แยกให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์

2.4 การใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ในการควบคุมโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี คือ วิธีการใดก็ตามที่ควบคุมโรคพืชหรือลดปริมาณหรือผลของเชื้อสาเหตุ โดยอาศัยกลไกทางชีววิทยาหรือสิ่งที่มีชีวิตอื่น ๆ โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคพืช และพืชอาศัย เพื่อลดปริมาณของเชื้อสาเหตุของโรคพืชลง (วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, 2544) ซึ่งการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น เป็นการควบคุมที่ไม่เพียงแต่เป็นการลดความหนาแน่นของเชื้อที่ก่อโรคเท่านั้น แต่ยังเป็นการป้องกันบนผิวหน้าของพืชและในพืชอาศัยด้วย บทบาทการสร้างความต้านทาน (resistance) หรือเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตที่ต่อต้านเชื้อโรคภายหลังการติดเชื้อ หรือการชักนำให้เกิดความต้านทานของพืชอาศัย (host plant resistance) ต่อเชื้อโรค จุลินทรีย์ต่อต้านจัดเป็นตัวควบคุมโดยชีววิธีที่มีศักยภาพต่อการขัดขวางกระบวนการต่าง ๆ

ของเชื้อโรคพืชที่มีชีวิต (เกษม สร้อยทอง, 2551) เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) จะประสบความสำเร็จในการควบคุมเชื้อสาเหตุได้นั้นต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุ การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตขึ้นมาโดยตรงหรือส่งเสริมให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ปรากฏอยู่ตามธรรมชาติทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช การปรับปรุงหรือพัฒนาวิธีเขตกรรมที่เหมาะสม เพื่อปรับสภาพแวดล้อมให้เอื้ออำนวยหรือส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือศัตรูของเชื้อโรคพืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติ จะช่วยลดปริมาณเชื้อโรคพืชหรือระดับของการเกิดโรคลงได้ (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2546)

กลไกลในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (เกษม สร้อยทอง, 2551)

1. การแย่งอาหารกัน (competition) หมายถึง การที่เชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรคพืชและจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืชจะแข่งขันกันในการเจริญและขยายพันธุ์ จากการแย่งกันดูดซับอาหารพวกสารอินทรีย์ต่าง ๆ และเจริญเข้าครอบครองในบริเวณนั้น

2. การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) และการสลายตัวของเชื้อโรค (lysis) คือ จุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรคพืช (antagonistic microorganism หรือ microbial antagonists) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีโดยการดูดซับสารละลายอินทรีย์เป็นอาหารในการเจริญแพร่ขยายพันธุ์และปลดปล่อยสารพิษ หรือสารปฏิชีวนะ ออกมาภายนอก และสารดังกล่าวมีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคที่อยู่ในบริเวณนั้นได้ มีผลให้เซลล์เชื้อสาเหตุโรคตาย ลดปริมาณลง อ่อนแอลง ความสามารถในการทำให้เกิดโรคลดลง การสลายตัว หมายถึงการสลายตัวของเซลล์เชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค เนื่องจากไม่สามารถรวมเข้ากันได้ของสารแปลกปลอมที่ซึมผ่านเข้าผนังเซลล์ หรือเนื่องจากเกิดสภาวะความเครียด (stress condition) เช่น ความแห้งแล้ง น้ำท่วมขัง เป็นต้น ซึ่งสารประกอบหรือส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ของเชื้อโรคจะเกิดการเน่าสลายและตายในที่สุด

3. การเป็นปรสิตของเชื้อก่อโรคพืช (parasitism) หรือการขัดขวางการเจริญของเชื้อโรคพืช (hyphal interference) คือ การที่จุลินทรีย์หนึ่งหรือหลายชนิดสามารถเจริญบนจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่เป็นเชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรค โดยดูดน้ำเลี้ยงหรือได้รับอาหารโดยตรงจากเชื้อสาเหตุโรค การขัดขวางการเจริญของเชื้อโรค คือ กลไกลอย่างหนึ่งของจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อโรค ซึ่งสามารถพันรัดเส้นใยหรือโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อสาเหตุโรคพืช มีผลต่อการรบกวนหรือขัดขวางการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค ทำให้เชื้อสาเหตุโรคเจริญผิดปกติ เสียรูปทรง ความสามารถในการซึมผ่านของของเหลวสู่เซลล์สูญเสียไป บางชนิดสามารถเจริญแทงทะลุผ่านผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรคพืช

4. การสร้างภูมิคุ้มกันโรค (plant immunity) คือ การชักนำให้พืชป้องกันตนเองโดยการปลูกเชื้อหรือการใช้สารเคมีบางชนิดสามารถทำให้พืชเกิดความต้านทานโรคเฉพาะแห่งและกระจายทั่วต้น (local and systemic acquired resistance) โดยพืชสามารถพัฒนาความต้านทานหลังจากการติดเชื้อหรือได้รับสารเคมีสังเคราะห์ (synthetic chemical compounds) หรือสารธรรมชาติ (natural compounds) บางชนิด

ฤทัยรัตน์ คำแสน (2551) ศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชเศรษฐกิจ 3 ชนิด คือ มะเขือเทศ ส้ม และยางพารา สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ทั้งหมด 298 ไอโซเลท จำแนกได้เป็น 9 จีนัส คือ *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Papularia* spp., *Curvularia* spp., *Colletotrichum* spp., *Idriella* spp., *Nodulosporium* spp. และ *Geotrichum* spp. เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora infestans* พบว่า *Fusarium* sp. RR251 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. infestans* ได้สูงสุด (62.22 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา คือ *Penicillium* sp. RL3036 (56.67 เปอร์เซ็นต์) และ *Aspergillus* sp. OS3029 (55.56 เปอร์เซ็นต์) ผลการทดสอบประสิทธิภาพน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อราเอนโดไฟท์ทั้ง 3 ชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. infestans* ที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดสอบพบว่าทุกความเข้มข้นให้ผลการยับยั้งต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Fusarium* sp. RR251 ที่เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพการยับยั้งดีที่สุด (45.93 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ *Aspergillus* sp. OS3029 (38.89 เปอร์เซ็นต์) และ *Penicillium* sp. RL3036 ให้ผลการยับยั้งต่ำสุด (10 เปอร์เซ็นต์) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการงอก และความผิดปกติของเมล็ดมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* cv. TVF) พบว่า ในชุดควบคุมเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ TVF มีอัตราการงอก 36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่แช่ด้วย *P. infestans* มีอัตราการงอกเพียง 11.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเมล็ดที่แช่ด้วยเอนโดไฟท์เพียงอย่างเดียวมีผลอัตราการงอกไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ยกเว้นเมล็ดที่แช่ด้วย *Fusarium* sp. RR251 ที่มีผลอัตราการงอก 19 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเมล็ดมาแช่ด้วย *P. infestans* เป็นเวลา 1 ชม. แล้วจึงแช่เชื้อราเอนโดไฟท์ พบว่ามีผลให้อัตราการงอกของเมล็ดเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่แช่ใน *P. infestans* เพียงอย่างเดียว เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในต้นมะเขือเทศ พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วย *Aspergillus* sp. OS3029 ช่วยลดระดับความรุนแรงของโรคในมะเขือเทศได้

ยุพาภรณ์ เดชโสภา (2554) แยกเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ จากเนื้อเยื่อปกติของใบ ก้านใบ กิ่ง และรากของพริกรวมทั้งผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส ด้วยวิธี tissue transplanting และ dilution spread plate ตามลำดับ เพื่อนำมาใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของพริก ซึ่งได้แก่โรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่า ได้เชื้อราเอน

โดไฟท์ทั้งหมด 146 ไอโซเลทและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 205 ไอโซเลท เลือกราเอนโดไฟท์ *Colletotrichum* spp. มาทดสอบการก่อโรคหรือไม่ก่อโรคบนผลพริก ผลการศึกษาพบว่ามีทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค จากนั้นนำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นเอนโดไฟท์แยกได้จากเนื้อเยื่อพริกปกติ (isolates End1-6) มาทดสอบความรุนแรงของเชื้อ เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อเป็นโรค (isolates Path1-6) บนผลพริก เมล็ดพริกและต้นกล้าพริก พบว่าเชื้อ *Colletotrichum* End1-6 และ *Colletotrichum* Path1-6 สามารถทำให้เกิดโรคบนพืชทดสอบ ซึ่งเชื้อ *Colletotrichum* End1-6 ทำให้เกิดโรคได้รุนแรงน้อยกว่า *Colletotrichum* Path1-6 ยกเว้นการทดสอบบนเมล็ดพริกชี้ฟ้าที่เชื้อ *Colletotrichum* End1-6 ทำให้เกิดโรคได้รุนแรงกว่า *Colletotrichum* Path1-6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราและแบคทีเรียเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Coll. capsici* C1, *Coll. gloeosporioides* C5, *Cercospora capsici* Ce7 และ *Sclerotium rolfsii* S5 โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* S5 ได้โดยการแย่งพื้นที่ ส่วนเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคของพริกทั้ง 4 ชนิดได้ ผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* BPNab1.1, *B. subtilis* BKSol1.3 และ *B. subtilis* BMSul1.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุด เมื่อนำมาทดสอบความเข้ากันได้ของเชื้อ พบว่าเชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 และ *B. subtilis* BMSul1.5 สามารถเจริญร่วมกันได้ และมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคของเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้า การทดลองในสภาพแปลงทดลอง พบว่าเชื้อ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสมกับ *B. subtilis* BMSul1.5 มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคใบจุดเซอร์คอสปอรา 74.48 เปอร์เซ็นต์ และ 28.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ *B. subtilis* BKSol1.3 ผสมกับ *B. subtilis* BMSul1.5 มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรครากและโคนเน่าของต้นพริกชี้ฟ้าโดยมีต้นพริกชี้ฟ้าที่อยู่รอด 85.00 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นเอนโดไฟท์ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรคเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกจากเนื้อเยื่อพริกที่เป็นโรค พบว่าเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่เป็นเอนโดไฟท์ทำให้เกิดโรคได้น้อยกว่าเชื้อที่แยกจากเนื้อเยื่อพริกที่เป็นโรค

Li และคณะ (2001) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากต้นไม้ในพื้นที่เขตร้อนชื้น ประเทศเยอรมัน สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย ปาปัวนิวกินี และเนปาล เลือกราเอนโดฟท์ 2 ชนิด นำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Pestalotiopsis* spp. และ *Monochaetia* sp. ยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้แก่ *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Diplodia natelensis*, *Fusarium cubense*, *Helminthosporium sativum*, *Cephalosporium*

gramineum และ *Pythium ultinum* ได้ โดยเชื้อราทั้งสองสามารถสร้างสาร ambuic acid ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรค

Strobel และคณะ (2001) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Muscodor albus* จาก *Cinnamomum zeylanicum* พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารจำพวกสารระเหยอินทรีย์ VOCs ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางเคมีแล้วพบว่ามีสารอินทรีย์หลายชนิดผสมกันอยู่ โดยพบว่าสาร VOCs จากเชื้อรา *M. albus* มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น *Py. ultimum*, *P. cinnamomi*, *Aspergillus fumigatus*, *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, *Stachybotrys chartarum* ต้านเชื้อยีสต์ *Candida albicans* และยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *B. subtilis* ได้ และเมื่อนำ *M. albus* ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับพืช พบว่าสามารถลดการเกิดโรคจากเชื้อรา *R. solani* และ *P. capsici* สาเหตุของโรคเน่าคอดิน (damping-off) และรากเน่า (root rot) ได้

Stinson และคณะ (2003) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Gliocladium* sp. จากต้น *Eucryphia cordifolia* พบว่าเชื้อนี้สามารถผลิตสารจำพวก VOCs ซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช ได้แก่ *Py. ultimum* และ *V. dahlia*

Schwarz และคณะ (2004) แยกสาร 3 - hydroxypropionic acid, propionic acid, D-lactic acid และ L-lactic acid จากเชื้อราเอนโดไฟท์ *Phomopsis phaseoli* ซึ่งแยกได้จากใบของพืชในป่าดิบชื้น และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Melanconium betulinum* 4 สายพันธุ์ จากกิ่งของ *Betula pendula* และ *B. pubescens* เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งไส้เดือนฝอยศัตรูพืช *Meloidogyne incognita* พบว่าสาร 3 - hydroxypropionic acid มีประสิทธิภาพยับยั้งไส้เดือนฝอยได้ดีที่สุดโดยให้ค่า LD_{50} ระหว่าง 12.5-15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังมีผลในการยับยั้งเชื้อ *Caenorhabditis elegans* แต่ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์อื่นๆ และไม่ทำให้พืชเกิดอาการเป็นพิษ (cytotoxic หรือ phytotoxic) กับพืช

Manoch และคณะ (2009) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชป่า 37 ชนิด ที่เก็บรวบรวมจาก เขตอนุรักษ์สัตว์ป่าภูหลวง จ.เลย เกาะแสมสาร จ.ชลบุรี และหมู่เกาะอ่างทอง จ.สุราษฎร์ธานี แยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ 286 ไอโซเลท ได้แก่ *Chaetomiun globosum*, *Eupenicillium* sp., *Gelasinospora* sp. *Glomerella cingulata*, *Hamigera avellanea*, *Talaromyces* spp., *Chaetomella raphigera*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. dermatum, Cryptosporiopsis* sp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp. และ *Phyllosticta* spp., *Arthrinium phaeospermum*, *Curvularia pallescens*, *Fusarium semitectum*, *Nigrospora oryzae*, *Periconia* sp. และ *Pteroconium pterospermum* นำเชื้อราเอนโดไฟท์กลุ่ม Ascomycetes 5 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช พบว่าเชื้อรา

เอนโดไฟท์สามารถยับยั้งเจริญของเส้นใยเชื้อ *Bipolaris maydis*, *R. solani*, *Py. aphanidermatum* และ *P. palmivora* ได้

Rocha และคณะ (2011) แยกเชื้อราเอนไฟท์จากใบยางพารา พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Microsphaeropsis* sp. *Pestalotiopsis* sp. และ *Myrothecium* sp. สามารถยับยั้งเชื้อ *Microcyclus ulei* สาเหตุโรคใบไหม้ลาตินอเมริกันในยางพาราได้

2.5 เชื้อรา *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. เป็นราจัดจำแนกอนุกรมวิธานตาม (Gajera *et al*., 2013) ดังนี้

Kingdom : Fungi

Phylum : Ascomycota

Class : Pezizomycetes

Order : Hypocreales

Family : Hypocreaceae

Genus : *Trichoderma*

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

เชื้อรา *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่มีการดำรงชีวิตแบบ saprophyte และเป็น mycoparasite โดยมีคุณสมบัติและศักยภาพเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช คือ แข่งขันด้านปัจจัยในการดำรงชีวิต(competition) การเป็นปรสิต(parasitism) การสร้างเอนไซม์ (cellulase, chitinase, β-1,3 glucanase) และการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) กลไกในการเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรคพืชของเชื้อรา *Trichoderma* spp. โดยการเจริญสร้างเส้นใยเข้าพันรัดรอบเส้นใย แล้วผลิตเอนไซม์ เช่น ไคติเนส เซลลูเลส กลูคาเนส และสารปฏิชีวนะต่าง ๆ แล้วย่อยผนังเซลล์หรือทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู, 2542) เชื้อรา *Trichoderma* spp. ดำรงชีวิตอยู่ในดินโดยทั่วไป อาศัยซากพืชและสัตว์เป็นแหล่งอาหาร เจริญได้ดีในดินที่มีความชื้นแต่ไม่แฉะ สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากดินธรรมชาติได้ง่าย เจริญได้รวดเร็วบนอาหารหลายชนิด สร้างก้านชูสปอร์ ที่แตกกิ่งก้านสาขาโดยที่ปลายก้านชูสปอร์ มีโครงสร้างกำเนิดโคนิเดีย หรือ สปอร์ เรียกว่า phialide รูปร่างคล้ายลูกพินโบว์ลิ่ง โคนิเดียซึ่งเกิดจากปลาย phialide จะรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (slime head) เห็นเป็นสีเขียวหรือใส (hyaline) ส่วนระยะสมบูรณ์เพศหรือ teleomorph ของเชื้อรา *Trichoderma* คือ เชื้อราในสกุล Hypocrea หรือสกุลอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกัน (Bissett, 1984) เชื้อรา *Trichoderma* จัดเป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากมีการเจริญและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว จึงสามารถแข่งขัน

และเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ อย่างรวดเร็วเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด โดยวิธีเป็นปรสิต (mycoparasite) สร้างสารพิษ (toxin) และน้ำย่อยจำพวกเอนไซม์ได้ด้วย (Cook and Baker, 1983) การเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* สามารถถูกกระตุ้นให้เจริญได้โดยใช้สารไธแรม แต่จะถูกยับยั้งโดยสารเบโนมิล เชื้อราชนิดนี้มีความทนทานต่อสารเมตาแลกซิลและแอมโมเนีย (Lorito *et al*., 1993)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

1. โคโลนี

เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีการสร้างเส้นใยเจริญเร็ว เริ่มแรกโคโลนีมีผิวหน้าเรียบไม่มีสีต่อมาโคโลนีมีลักษณะเป็นแบบปุยฝ้ายฟูอย่างหลวม ๆ (loosely floccose) หรือเป็นกระจุกหนาแน่น (compactly tuft) หรือมีลักษณะทั้งสองแบบในโคโลนีเดียวกัน หรือมีลักษณะอยู่ระหว่างทั้งสองแบบ การเกาะกันเป็นกระจุกของโคโลนีมีส่วนเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของก้านชูสปอร์ ตัวอย่างเช่นเชื้อรา *T. hamatum* มีโคโลนีเป็นกระจุกหนาแน่น สังเกตพบว่าระบบการแตกกิ่งก้านของก้านชูสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้มีความซับซ้อนมาก สีของโคโลนีส่วนใหญ่เกิดมาจากการสร้างสีของสปอร์ (phialospore) โดยปกติเชื้อรา *T. viride* มีโคโลนีสีเขียวเข้ม แต่บางครั้งอาจแสดงสีที่แตกต่างออกไปอย่างชัดเจน ตั้งแต่สีเหลืองไปจนถึงสีเขียวอ่อน ส่วนโคโลนีของเชื้อรา *T. polysporum* มีสีขาวเนื่องจาก phialospore ไม่มีสี นอกจากนี้สีของสปอร์ที่มีผลต่อสีของโคโลนีแล้วยังมีปัจจัยอื่นอีก คือ

1. ปริมาณสปอร์ที่สร้างขึ้น ทำให้สีของโคโลนีเข้มขึ้นหรืออ่อนลง
2. สร้างผลึกสี หรือปล่อยสีออกมา ทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไป
3. ชนิดและความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อสีของโคโลนี
4. การสร้างเส้นใยที่ยืดตัวออกและเป็นหมัน (sterile hyphal elongation) เหนือกระจุกของก้านชูสปอร์ของเชื้อรา *T. hamatum* ทำให้โคโลนีมีสีเขียวหรือสีเทาเขียว (grayish green)

2. โคนิเดีย หรือ สปอร์

เกิดเดี่ยว ๆ และเกาะกันเป็นกลุ่มก้อนกลม หรือค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 15 ไมครอน อยู่บนปลาย phialide ซึ่งการเกิดสปอร์ต่อกันเป็นแถวพบน้อยมากและเป็นแถวสั้น ๆ บางครั้งกลุ่มสปอร์ที่เกิดบน phialide ข้างเคียง อาจรวมกันเป็นก้อน (conidial head) ที่ใหญ่ขึ้น ผนังของสปอร์เรียบ หรือบางครั้งพบขรุขระเล็กน้อย ไม่มีสี (hyaline) หรือมีสีเขียวปนเหลือง (yellowish green) จนถึงสีเขียวเข้ม (dark green) รูปร่างค่อนข้างกลม บริเวณที่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นวงรอบ หรือเป็นวงแหวน ซึ่งเกิดจากอิทธิพลของแสงและเมื่อโคโลนีมีอายุมากขึ้นจะมีการสร้างก้านชูสปอร์ ขึ้นมาใหม่อีกบริเวณรอบนอกที่สร้างสปอร์ ทำให้เห็นการเกิด

วงรอบ (zonation) ไม่ชัดเจน บางไอโซเลท มีลักษณะเป็นแบบปุยฝ้าย (floccose) การสร้าง zonation สามารถสังเกตได้ในขณะที่เชื้อยังมีอายุน้อยเท่านั้น

3. ก้านชูสปอร์

ก้านชูสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีการแตกกิ่งก้านหลายแบบและการสร้างสลับซับซ้อนกันมาก มองดูโครงสร้างรอบนอกเป็นแบบรูปกรวย หรือแบบปิรามิด เช่น เชื้อรา *T. hamatum* และ *T. polysporum* มีก้านชูสปอร์ยาว แตกกิ่งก้านด้านข้างสั้นและหนา มีลักษณะเฉพาะ คือ สร้างเส้นใยที่ยืดตัวออกและเป็นหมัน เป็นเส้นยาวคล้ายแส้ เป็นส่วนที่ไม่สร้างสปอร์อยู่ปลายก้านของก้านชูสปอร์ส่วนเชื้อรา *T. longibrachiatum* มีเส้นแกนกลางของก้านชูสปอร์ค่อนข้างยาวและแตกกิ่งก้านสั้นเช่นกัน แต่ไม่เหมือน *T. hamatum* และ *T. polysporum* เป็นต้น ที่สร้างก้านชูสปอร์มีการแตกกิ่งก้านน้อยและสลับกันไป สำหรับเชื้อรา *T. viride* และ *T. koningii* สร้างก้านชูสปอร์ที่มีการแตกกิ่งก้านด้านข้างออกมาจากจุดเดียวกันเหมือนกับพวกเชื้อรา *Verticillium*

4. ไฟอะไลด์

เป็นก้านสปอร์ที่อยู่ปลายสุด ให้กำเนิดสปอร์ ส่วนใหญ่มีรูปร่างคล้ายขวดชมพู่หรือลูกพินโบว์ลิ่งที่ฐานแคบกว่าตรงกลางเล็กน้อยและค่อย ๆ เรียวไปยังส่วนปลาย ซึ่งตรงปลายจะเป็นรูปกรวยแคบ ๆ หรือใกล้จะเป็นทรงกระบอก โดยทั่วไป phialide แตกออกมาจากจุดกำเนิดเป็นวงกว้างและปลายงอโค้ง ทำให้มองด้านข้างเหมือนเขาสัตว์ (horn-shaped) และอาจเกิดขึ้นบนกิ่งก้านของก้านชูสปอร์ที่แตกด้านข้าง ลักษณะเรียงกันของ phialide เป็นวงรอบไม่สม่ำเสมอ เกิดที่ปลายก้านของก้านชูสปอร์ซึ่งเกิดจากเซลล์ที่ให้กำเนิด หรือเกิดตลอดกิ่งก้านแบบเดี่ยว ๆ และค่อนข้างยาวกว่าอันที่อยู่ข้างล่าง

กลไกการควบคุมโรคโดยชีววิธีของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

1. การแข่งขันในการแย่งพื้นที่และอาหาร หมายถึง การที่สิ่งมีชีวิตสองชนิดหรือมากกว่าเจริญอยู่ด้วยกัน มีความต้องการอาหารและที่อยู่อาศัย เมื่ออาหารที่มีอยู่ไม่เพียงพอจึงทำให้เกิดการแข่งขันกันโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ธาตุอาหารและปัจจัยอื่น ๆ สำหรับการเจริญ เชื้อรา *Trichoderma* มีความสามารถในการเข้าครอบครองรากพืชได้รวดเร็วกว่าเชื้อสาเหตุโรคพืช หากในดินที่ใช้ในการเกษตรมีปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* สูงย่อมพิสูจน์ได้ว่าเชื้อรา *Trichoderma* สามารถที่จะเป็นผู้แข่งขันที่ดีในด้านการแย่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอาหาร นอกจากนั้นยังสามารถเพิ่มโอกาสในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคได้มากขึ้นด้วย (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2544)

2. การสร้างสารปฏิชีวนะ หมายถึง การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นจากสารที่สร้างขึ้นโดยสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง สารดังกล่าวนี้จะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญ

หรืออาจทำให้ตายได้ สารเคมีดังกล่าวอาจเป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotics) และสารจำพวกเอนไซม์ (extracelluar enzymes) (Bilai, 1963) การผลิตเอนไซม์ที่ย่อยเชื้อสาเหตุโรคพืชได้โดยตรงเป็นปัจจัยร่วมอย่างหนึ่งของการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ กลไกการออกฤทธิ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีผลต่อเชื้อราก่อโรคพืช เช่น *R. solani*, *Sclerotium* sp. และ *Phytophthora* sp. โดยพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. จะสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น ไคติเนส และ เซลลูเลส (จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู, 2542)

3. การเป็นปรสิตต่อเชื้อราก่อโรคพืช การที่เชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างเส้นใยแทงทะลุเข้าไปในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเหี่ยวแฟบหรือเชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างเส้นใยพันรัดเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช Inbar และคณะ (1996) ได้ศึกษาโครงสร้างของเชื้อราก่อโรค *S. sclerotiorum* หลังจากที่นำมาเลี้ยงร่วมกับ เชื้อรา *T. harzianum* และตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่าเส้นใยของเชื้อรา *T. harzianum* พันรัดเส้นใยของเชื้อรา *S. sclerotiorum* ทำให้ผนังเซลล์บางส่วนของเม็ด sclerotium แตกออก

บทบาทของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ที่มีต่อพืช

มีการศึกษาบทบาทของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ที่มีต่อพืช ได้หลายชนิดดังรายงานต่อไปนี้

Hanada และคณะ (2008) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อไม้ของต้นโกโก้ในประเทศบราซิล ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ *T. martial* สายพันธุ์ใหม่ และพบว่า *T. martial* สามารถเจริญได้รวดเร็ว บนอาหาร CMD และ synthetic low nutrient agar (SNA) เป็นเอนโดไฟท์สายพันธุ์ใหม่ในเขตร้อนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อ *P. palmivora* สาเหตุโรคฝักเน่าดำของโกโก้

Hanada และคณะ (2010) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จาก ลำต้นและกิ่งของต้นโกโก้ (*Theobroma cacao* และ *The. Grandiflorum*) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Curvularia* spp., *Tolypocladium* spp. และ *Fusarium* spp. มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าดำของโกโก้

Bae และคณะ (2011) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากพืชเขตร้อน ได้แก่พืช *Banisteriopsis caapi, Theobroma cacao, Theobroma gileri* และ *Cola praecuta* ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จำแนกได้เป็น *T. ovalisporum T. theobromicola T. hamatum T. stilbohypoxyli* และ *T. caribbaeum* var. *aequatoriale* ซึ่งสามารถควบคุมโรคราก่อโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. capsici* ได้

Shukla และคณะ (2012) ศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. harzianum* ต่อการตอบสนองของข้าว (*Oryza sativa* L.) ในสภาวะแห้งแล้ง พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. harzianum* ส่งผลให้ข้าวตอบสนองต่อภัยแล้งได้ช้าลง และสามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ด และการเจริญของรากข้าวในสภาวะแห้งแล้งได้

เอนไซม์จากเชื้อราและการนำไปใช้ประโยชน์

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเศษซากพืชให้เป็นปุ๋ยที่มีแหล่งสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช และสามารถนำไปใช้ได้โดยใช้เวลาในการหมักที่ไม่นานจนเกินไป จำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยสลายซากพืช ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีเซลลูโลส (cellulose) เป็นส่วนประกอบหลัก โดยเซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงทุกชนิด สาหร่าย และเชื้อราบางชนิด เป็นโพลิเมอร์ที่มีน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic bond) มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสาย เป็นเส้นใยโครงสร้างซับซ้อน ยากต่อการทำลาย การสลายพันธะภายในโมเลกุลเซลลูโลสให้สมบูรณ์ ซึ่งจะได้น้ำตาลกลูโคส อาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulolytic enzyme) ประกอบด้วย เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) และเบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) โดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส จะเข้าทำลายพันธะเบต้า 1,4 กลูโคซิเดส (β-1,4-glucosidase) ด้านปลายของโมเลกุลได้มากขึ้น ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลเซลโลไบโอส ซึ่งน้ำตาลเซลโลไบโอสจะถูก β-glucosidase เข้าทำลายพันธะภายในโมเลกุลได้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยเซลลูโลส โดยจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาอย่างมาก ได้แก่ เชื้อรา เช่น *Aspergillus niger* และ *Trichoderma* sp. ที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ในปริมาณสูง (Dashtban *et al*., 2009)

จาตุรงศ์ จงจีน และ สุพรรนี อะโอกิ (2550) ศึกษาเชื้อราทนร้อนจากดิน ในป่าชุมชนเขื่อน สิรินธร อำเภอสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี จำแนกได้ 9 ชนิด ได้แก่ *Arthroderma* sp. isolate1, *Arthroderma* sp. isolate2, *A. fumigatus*, *A. fumigatus* var. *ellipticus*, *A. niger*, *A. thomii*, *Bispora* sp., *Penicilium* sp. และ *Trichothecium roseum* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้สับสเตรทต่างกัน 2 ชนิด คือ carboxyl methyl cellulose (CMC) agar และ Av substrate plate พบว่าเมื่อใช้ CMC เป็นสับสเตรท พบว่า *A. niger* เกิดวงใสวัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้ 10.0, 10.5 และ 7.5 มิลลิเมตร ที่ pH 3.0, 7.0 และ 10.0 ตามลำดับ ส่วน *Arthroderma* sp. isolate 2 เกิดวงใสวัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้ 9.0, 6.0 และ 7.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ *Arthroderma* sp. isolate 1 เกิดวงใสวัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้ 6.0, 9.0 และ 5.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อใช้ Av เป็นสับสเตรท พบว่า *Penicillium* sp. เกิดวงใสวัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้ 8.0, 11.0 และ 6.0 มิลลิเมตร ส่วน

A. niger เกิดวงใสวัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้ 6.0, 10.0 มิลลิเมตร ที่ pH 3.0, 7.0 ส่วน pH 10.0 ไม่เกิดวงใส และ *A. fumigates* เกิดวงใสวัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้ และ 5.0 มิลลิเมตร. ที่ pH 3.0 7.0 และ pH 10.0 ตามลำดับ

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และคณะ (2553) ศึกษาศักยภาพของการผลิตเอนไซม์กลูโคสอะไมเลสและเซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อแบบผสมของ *A. niger* TIST 3254 และ *T. reesei* TISTR 3081 โดยเลี้ยงในอาหารประยุกต์สูตร Mandel ที่ใช้กากมันสำปะหลังแห้งร้อยละ 1-3 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน CMC ร่วมกับการใช้แหล่งไนโตรเจนเดี่ยวร้อยละ 1 (แอมโมเนียม ซัลเฟต ยูเรียหรือแป้งถั่วเหลือง) บ่มเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน พบว่า การเจริญของเชื้อผสม *A. niger* TISTR 3254 และ *T. reesei* TISTR 3081 ที่เลี้ยงด้วยกากมันสำปะหลังร้อยละ 2 ร่วมกับแอมโนเนียมซัลเฟตร้อยละ 1 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสอะไมเลส เท่ากับ 7,734 ± 0.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสเท่ากับ 5.76 ±0.09 (FPase) และ 27.96 ± 0.44 (CMCase) ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำาดับ

เสาวภา สุราวุธ และคณะ (2554) คัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากดินในพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี จำนวน 74 ตัวอย่าง ได้เชื้อราจำนวน 298 ไอโซเลท และนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเบื้องต้นบนอาหารแข็ง คือ CMC ตรวจผลโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิด จากการศึกษาพบว่าจากเชื้อรา 298 ไอโซเลท สามารถแยกเชื้อรา ในจำนวนนี้มี 144 ไอโซเลทที่ให้ผลการเกิดบริเวณใส (48.32เปอร์เซ็นต์) โดยไอไซเลทที่เกิดบริเวณใสกว้าง คือ RB85-1 (7 ± 0.1 เซนติเมตร), RB94-2 (6.5 ± 0 เซนติเมตร), RB135-2 (6.5 ± 0.1 เซนติเมตร), RB64-1 (6.0 ± 0.1 เซนติเมตร), RB89-4 (6.0 ± 0.1 เซนติเมตร) และ RB145-8 (6.0 ± 0.1 เซนติเมตร) ตามลำดับ

Bailey และคณะ (2006) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *T. ovalisporum* DIS 70a, *T. hamatum* DIS 219b, *T. harzianum* DIS 219f, และ *Trichoderma* sp. DIS 172ai. ในการยับยั้งการเจริญของ *Moniliophthora roreri* พบว่าสายพันธุ์ DIS 70a DIS 219b และ DIS 219f เป็นปรสิตต่อเชื้อ *Mo. roreri* ได้ และศึกษาการสร้างเอนไซม์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. ovalisporum*-DIS 70a โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม glycerol, CMC, cellulose, powdered lyophilized cacao seedling และ V8 broth พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ β - glucanase, cellulose, polygalacturonase และ protease ได้

Ahamed และ Vermette (2008) ศึกษาวิธีการเพิ่มปริมาณเซลลูเลส จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* RUT-C30 โดยเลี้ยงในอาหารที่ส่งเสริมการสร้างเซลลูเลส 4 ชนิดได้แก่ Cellulose–yeast extract, Corn steep–glucose, Cellulose–yeast extract–peptone และ Cellulose–yeast nitrogen base–CMC จากการศึกษาพบว่าเชื้อรา *T. reesei* RUT-C30 เจริญได้ดีและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด ในอาหาร Cellulose–yeast extract

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อให้ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกจากเนื้อไม้ยางพารา ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* สาเหตุโรคใบร่วงและเส้นดำของยางพารา
2. เพื่อทราบกลไกลการยับยั้งของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa*

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. กรวยแยก (separatory funnel)
2. กระดาษกรอง เบอร์ 1
3. กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound และ stereo binocular
4. กล้องถ่ายรูป (camera)
5. เครื่อง UV transilluminator
6. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixture)
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด (analytical balance)
8. เครื่องเทอร์มอไซเคลอร์ (thermocycler หรือ PCR machine)
9. เครื่องสกัดสาร (rotary evaporator)
10. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
11. เครื่องอิเลคโตรโฟรีซิส *(*electrophoresis)
12. ตัวอย่างเนื้อไม้ยางพารา
13. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air-flow cabinet)
14. ตู้แช่ (refrigerator)
15. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
16. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air-flow cabinet)
17. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
18. แผ่นสไลด์ haemacytometer และ cover slip
19. แผ่น paper disc
20. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
21. ไมโครเวฟ (microwave)
22. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
23. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
24. อุปกรณ์การเกษตร ได้แก่ สิ่ว ค้อน ตลับเมตร

25. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ ขวดรูปชมพู่ หลอดทดลอง บีกเกอร์ กระบอกตวง micro tubes Pasture's pipettes แผ่นสไลด์ และ cover slip
26. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูป มีดผ่าตัด แท่งแก้วสามเหลี่ยม ปากคีบ cork borer ตะเกียงแอลกอฮอล์ และอื่นๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. carboxyl methyl cellulose (CMC)
2. potato dextrose agar (PDA)
3. potato dextrose broth (PDB)
4. V8 juice agar (V8A)

สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการทดลอง

1. agar
2. aqueous MeOH
3. dextrose
4. dimethyl sulfoxide
5. ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์
6. ethyl acetate
7. glucose
8. lactophenol cotton blue
9. methanol
10. sodium carboxy methylcellulose
11. sodium hypoclorite (Clorox)
12. sodium sulphate anhydrous

ยาต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial agents)

1. metalaxyl
2. neomycin
3. penicillin V
4. streptomycin

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

1. 10 mM dNTPs mix
2. 10X PCR buffer
3. 50 mM $MgCl_2$
4. 6X Loading dye
5. absolute ethanol
6. Agarose minigel 1 เปอร์เซ็นต์
7. ammonium acetate
8. chloroform
9. CTAB buffer
10. ethidium bromide
11. ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
12. isoamyl alcohol
13. isopropanol
14. liquid nitrogen
15. mercaptoethanol
16. NaCl
17. phenol
18. PVP-40
19. TAE buffer (Tris Acetate EDTA buffer,pH 8)
20. taq DNA polymeras
21. tris-EDTA (TE) buffer (pH 8)
22. tris-hydrochloric acid (pH 8)

ไพรเมอร์ (primer)

1. ITS 4
2. ITS 5

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อไม้ยางพารา

เก็บตัวอย่างเนื้อไม้ยางพาราพันธุ์ปลูกดั้งเดิมและพันธุ์ RRIM 600 จากสวนยางที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี และสงขลา จังหวัดละ 2 สวน สวนละ 20 ต้น รวมจำนวน 80 ต้น แต่ละต้นเก็บ 2 จุดตรงข้ามกัน ที่ความสูงจากโคนต้น 120 เซนติเมตร พ่น70 เปอร์เซ็นต์ ethanol บริเวณที่จะทำการเจาะ ใช้สิ่วฆ่าเชื้อโดยการจุ่ม 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol ลนไฟฆ่าเชื้อ เจาะบริเวณลำต้นยางพารา ขนาดประมาณ 3 x 3 ตารางเซนติเมตร แคะส่วนที่เป็นเนื้อไม้ติดกับเปลือกไม้ใส่ถุงพลาสติกนำมายังห้องปฏิบัติการ นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตัดส่วนที่เป็นเนื้อไม้ยางพาราขนาด 5 x 5 ตารางมิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 1 นาที แช่ใน 10 เปอร์เซ็นต์ sodium hypocholorite (NaOCl) เป็นเวลา 5 นาที แช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ซับชิ้นตัวอย่างให้แห้ง นำมาวางบนอาหาร PDA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ (neomycin 100 มิลลิกรัมต่อลิตร, penicillin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ streptomycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-10 วัน สังเกตการเจริญทุกวัน เมื่อพบว่ามีการเจริญของเชื้อราเอนโดไฟท์ออกมาจากชิ้นตัวอย่างให้ตัดปลายเส้นใยของเชื้อรา นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ไม่เติมสารปฏิชีวนะ แยกเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวหรือเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA เก็บไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป (ดัดแปลงจาก Gazis และ Chaverri, 2010)

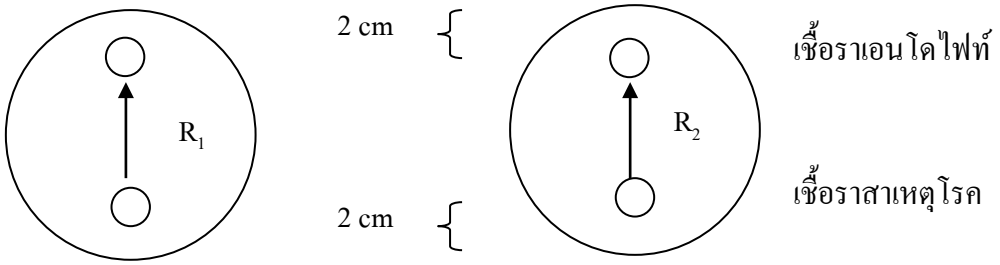
การให้รหัสเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลท โดยอักษรตัวแรก SU ย่อมาจากชื่อจังหวัดสุราษฎร์ธานี และ SK ย่อมาจากชื่อจังหวัดสงขลา อักษรตัวที่สอง L ย่อมาจากการเก็บตัวอย่างเนื้อไม้ยางพาราพันธุ์ปลูกดั้งเดิม และอักษรตัว R ย่อมาจากการเก็บตัวอย่างเนื้อไม้ยางพาราพันธุ์ RRIM 600

2. คัดเลือกและเปรียบเทียบเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากยางพันธุ์ปลูกดั้งเดิมและพันธุ์ RRIM 600 ที่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa*

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากโครงการ ประเมินการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบร่วง *Phytophthora* spp. ของกล้ายางพารา บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* บนอาหาร PDA เป็นเวลา

5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อนำไปวางบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และด้านตรงข้ามนำเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. อายุ 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อ นำไปวางห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) โดยในแต่ละไอโซเลท ทดสอบ 4 ซ้ำ ส่วนชุดควบคุมวางเชื้อ *Phytophthora* spp. อย่างเดียว ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth ; PIRG) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (PIRG)} = \frac{(R_1 - R_2) \times 100}{R_1}$$



R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดทดสอบ

ภาพที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa*

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อเชื้อราสาเหตุโรค ประเมินความสามารถในการยับยั้ง (เกษม สร้อยทอง, 2532) ได้ดังนี้

> 75เปอร์เซ็นต์ = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

61-75 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

51-60 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

< 50 = มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ที่ดีที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

3.1 การเตรียมเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.

นำเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. วางเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อรา นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ carboxy methyl cellulose (CMC) broth ในขวดรูปชมพู่ โดยใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ชิ้นต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมากรองเอาเส้นใยออกครั้งที่ 1 ด้วยกระดาษกรองปราศจากเชื้อ Whatman No.1 และกรองครั้งที่ 2 ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3.2 ทดสอบการสร้างเซลลูเลสด้วยอาหาร carboxy methyl cellulose (CMC) agar

เตรียมอาหาร carboxy methyl cellulose (CMC) agar เทในจานเลี้ยงเชื้อ เจาะวุ้นให้เป็นหลุมด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จำนวน 2 หลุมต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการทดสอบไอโซเลทละ 2 ซ้ำ นำน้ำเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.1 หยดลงในหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจการย่อยสลายเซลลูโลส โดยเทสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ congo red ให้ท่วมอาหาร ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเทสารละลาย congo red ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเทสารละลาย NaCl 1M ให้ท่วมอาหาร ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ถ้ามีวงใส (clear zone) รอบ ๆ หลุมที่หยดน้ำเลี้ยงเชื้อแสดงว่าสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส ออกมาย่อยเซลลูโลสได้ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณ clear zone ที่เกิดขึ้น

4. ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. เลี้ยงบน PDA เป็นเวลา 3-4 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีจำนวน 5 ชิ้น แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นจึงกรองแยกเส้นใยเชื้อราผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อราแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราเบื้องต้น โดยหยดน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ลงบนกระดาษ paper disc ที่อยู่บนอาหาร PDA ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อแผ่น วางบนอาหาร PDA 4 จุด ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขอบโคโลนีของเชื้อ *P. palmivora* หรือ *P. botryosa* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ไป

วางที่จุดกึ่งกลางของอาหาร PDA ทำซ้ำ 4 plate สำหรับชุดควบใช้ อาหาร PDB แทนน้ำเลี้ยงเชื้อรา เอนโดไฟท์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วันหรือจนชุดควบคุมเจริญเต็มจาน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา 2 ค่าที่ตั้งฉากกันและหาค่าเฉลี่ย

5. จำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-7 วัน ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ได้แก่ ลักษณะรูปร่างโคโลนี ลักษณะผิวและสีของสปอร์ ขนาดเส้นใย ไฟอะไลด์ และลักษณะโครงสร้างที่เชื้อราสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope และ compound microscope เปรียบเทียบกับหนังสือ Keys ได้แก่ Gams และ Bissett (1998)

6. จำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

คัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* จำแนกทางชีวโมเลกุล

6.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. เพื่อสกัด DNA

เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่สามารถยับยั้ง *P. palmivora* และ *P. botryosa* ได้สูงสุด 2 ไอโซเลท ในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อราที่ได้ กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ล้างเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (อุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส) อย่างน้อย 2 ครั้ง หรือจนกว่าเส้นใยจะสะอาด ซับน้ำออกจากเส้นใยให้มากที่สุดด้วยกระดาษซับที่ปราศจากเชื้อ ถ่ายเส้นใยเชื้อราลงในโกร่งบดยาที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นบดเส้นใยให้ละเอียดโดยใช้ lysis buffer ในโกร่งแช่เย็น เพื่อนำไปสกัด DNA ต่อไป

6.2. การสกัด DNA ด้วย lysis buffer (Gupta และคณะ 2011)

บดเส้นใยให้ละเอียดในโกร่งแช่เย็นน้ำหนักประมาณ 400 มิลลิกรัม ใช้ lysis buffer (400 mM Tris-HCl [pH 8.0], 60 mM EDTA [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2 เปอร์เซ็นต์ sodium dodecyl sulfate) 500 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของเชื้อราและบัฟเฟอร์ที่บดเรียบร้อยแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม potassium acetate 150 ไมโครลิตร (pH 4.8; 5M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, น้ำกลั่น) นำหลอดตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยง ที่

ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดเฉพาะส่วนใส (supernatant) ที่อยู่ชั้นบนออก แล้วนำไปใส่ในหลอด microtube ใหม่ นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติม isopropyl alcohol อัตราส่วนที่เท่ากัน กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน นำหลอดตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนที่เป็นสารละลายชั้นบนสุดในหลอดทิ้ง ถ้าสามารถสกัด DNA ได้จะพบ DNA pellet สีขาวติดอยู่ก้นหลอด ล้างตะกอน DNA ที่ติดอยู่ก้นหลอด 2 ครั้งด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนของ ethanol ทิ้ง เปิดฝาหลอดตัวอย่างแล้วตากตะกอน DNAให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยคว่ำหลอดเพื่อป้องกันการปนเปื้อน เป็นเวลา 1 คืน ละลายตะกอน DNA ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 ไมโครลิตร เก็บ DNA ที่สกัดได้ ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

6.3 การตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้

ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer ถ้าตรวจสอบแล้วมี band DNA เกิดขึ้น เจือจาง DNA ด้วย Deicnized water (DI) ในอัตรส่วน 1:10 หรือ 1:100 ก่อนทำ PCR กรณีไม่พบ band DNA ให้นำตัวอย่าง DNA ไปใช้ทำ PCR ได้โดยไม่ต้องเจือจาง

6.4 การเพิ่มปริมาณส่วน ITS โดยปฏิกิริยา PCR

เพิ่มปริมาณส่วน ITS (White *et al*., 1990) ได้แก่ ITS4R (5’ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3’) และ ITS5F (5’ GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG 3’)

6.4.1 การเตรียมส่วนผสมของ PCR (PCR mixture)

ส่วนผสมปฏิกิริยาของ PCR (ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (PCR master mix from Merck)

ส่วนผสม	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Genomic DNA	5
DEPC water	5.5
Forward primer	1
Reverse primer	1
Master mix (2X) from Merck	12.5
รวม	25

6.4.2 การทำปฏิกิริยา PCR

ผสมส่วนผสมต่าง ๆ ดังตารางที่ 1 เรียบร้อยแล้ว นำไปทำปฏิกิริยาภายในเครื่อง PCR ใช้ PCR profile ดังนี้

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส	3 นาที
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 3	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที
ขั้นที่ 4	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
ขั้นที่ 5	ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 ทั้งหมด 35 รอบ	
ขั้นที่ 6	72 องศาเซลเซียส	10 นาที

6.4.3 การตรวจสอบปริมาณ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis นำ PCR product ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 3 ไมโครลิตร load ลงใน 2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ที่แช่อยู่ใน TAE buffer กระแสไฟฟ้า 100 volts นาน 30-60 นาที ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรวจสอบ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transiluminator บันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation

6.4.4 การอ่านลำดับเบส DNA (DNA sequencing)

ส่ง PCR products อ่านลำดับเบส DNA ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

6.4.5 การจัดเรียงลำดับเบส DNA (multiple sequence alignment)

ตรวจสอบลำดับเบส DNA เชื้อรา โดยนำลำดับเบส DNA ที่ได้ ใส่โปรแกรม BLAST search จากฐานข้อมูลใน GenBank ของ National Center for Biotechology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อหาเชื้อราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุด

7. ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* บนใบยางพารา

เลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จำนวน 2 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ในห้องปฏิบัติการสูงที่สุด มาทดสอบการยับยั้งการเข้าทำลายใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อ *Phytophthora* spp.

7.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* บนใบยางพารา

7.1.1 การเตรียมใบยาง

เก็บใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ในระยะเพสลาด อายุประมาณ 2 สัปดาห์ จำนวน 32 ใบ ทำความสะอาดใบยางด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง พันโคนใบด้วยสำลีชุบน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปวางบนตะแกรงที่หล่อด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในกล่องพลาสติก (นริสา จันทร์เรือง, 2543)

7.1.2 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.

เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทใส่จานเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วฆ่าเชื้อขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ ดูดสปอร์แขวนลอยเชื้อราใส่ในบีกเกอร์ ปรับสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ด้วย haemacytometer

7.1.3 การเตรียมเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa*

เลี้ยงเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อเพื่อนำไปวางบนใบยาง

7.1.4 การเตรียมสารเคมีกำจัดเชื้อรา metalaxyl

เตรียมสารเคมีกำจัดเชื้อรา metalaxyl (ชื่อการค้า ซิลเซ ที 25) ความเข้มข้น 500 ppm

7.1.5 การทดสอบ

พ่นใบยางด้วยสปอร์แขวนลอย หรือสารเคมีกำจัดเชื้อรา metalaxyl ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตามกรรมวิธีต่าง ๆ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) 4 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ใบ มีกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นใบยางด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลทที่ 1 ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. palmivora* วางบนใบยาง

กรรมวิธีที่ 2 พ่นใบยางด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลทที่ 2 ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. palmivora* วางบนใบยาง

กรรมวิธีที่ 3 พ่นใบยางด้วยสารเคมี metalaxyl ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. palmivora* วางบนใบยาง

กรรมวิธีที่ 4 นำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. palmivora* วางบนใบยาง

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน นำใบยางที่บ่มมาประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยวัดพื้นที่แผลที่แสดงอาการเกิดอาการ necrosis ด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบ คำนวณพื้นที่เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งนำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. palmivora* วางบนใบยางพาราเพียงอย่างเดียว (นริสา จันทร์เรือง, 2543)

7.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. botryosa* บนใบยางพารา

7.2.1 การเตรียมใบยาง

เก็บใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ในระยะเพสลาด อายุประมาณ 2 สัปดาห์ จำนวน 32 ใบ ทำความสะอาดใบยางด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง พันโคนใบด้วยสำลีชุบน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปวางบนตะแกรงที่หล่อด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในกล่องพลาสติก (นริสา จันทร์เรือง, 2543)

7.2.2 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.

เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง นำน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทใส่จานเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วฆ่าเชื้อขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ ดูดสปอร์แขวนลอยเชื้อราใส่ในบีกเกอร์ นับจำนวนสปอร์ให้มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร

7.2.3 การเตรียมเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa*

เลี้ยงเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อเพื่อนำไปวางบนใบยาง

7.1.4 การเตรียมสารเคมีกำจัดเชื้อรา metalaxyl

เตรียมสารเคมีกำจัดเชื้อรา metalaxyl (ชื่อการค้า ซิลเซ ที 25) ความเข้มข้น 500 ppm

7.2.5 การทดสอบ

พ่นใบยางด้วยสปอร์แขวนลอย หรือสารเคมีกำจัดเชื้อรา metalaxyl ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตามกรรมวิธีต่าง ๆ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) 4 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ใบ มีกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นใบยางด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลทที่ 1 ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. botryosa* วางบนใบยาง

กรรมวิธีที่ 2 พ่นใบยางด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลทที่ 2 ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. botryosa* วางบนใบยาง

กรรมวิธีที่ 3 พ่นใบยางด้วยสารเคมี metalaxyl ปล่อยให้แห้ง จากนั้นนำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. botryosa* บนใบยาง

กรรมวิธีที่ 4 นำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. botryosa* วางบนใบยาง

บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน นำใบยางที่บ่มมาประเมินประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยวัดพื้นที่แผลที่เกิดอาการ necrosis ด้วยเครื่องวัดพื้นที่ใบ แล้วคำนวณพื้นที่เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งนำชิ้นวุ้นของเชื้อ *P. botryosa* วางบนใบยางพาราเพียงอย่างเดียว (นริสา จันทร์เรือง, 2543)

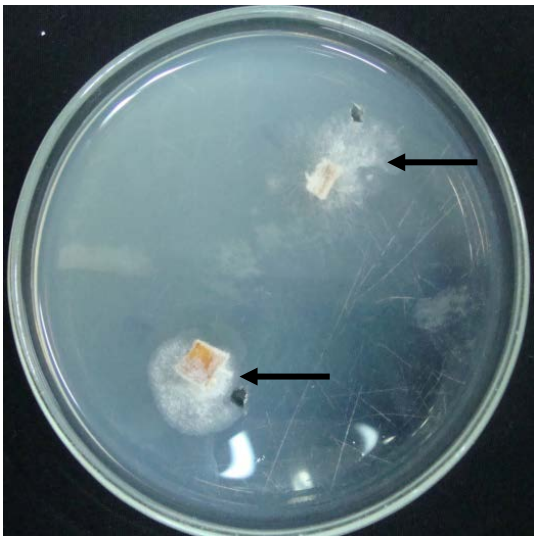
8. ศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อสาเหตุโรค *P. palmivora* และ *P. botryosa* ภายใต้กล้องจุลทรรศ์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *Phytophthora* spp. บนชิ้นวุ้น PDA ขนาด 1 x 1 ตารางเซนติเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อทั้งสองวางบน slide ด้านตรงกันข้าม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน นำชิ้นวุ้นแช่ลงในขวด vial ที่มี 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 เป็นเวลา 1 คืน กำจัดน้ำออกจากตัวอย่างและทำให้แห้ง ด้วยวิธี graded ethanol series ที่ความเข้มข้น 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที เก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำตัวอย่างให้แห้งด้วยวิธี critical point drying นำตัวอย่างมาวางบนแท่นวางตัวอย่าง แล้วเคลือบผิวตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (metal coating) โดยใช้ทองคำแท้ระเหิดให้เป็นละอองตกเคลือบลงบนตัวอย่าง ด้วยเครื่อง sputter coater จากนั้นนำมาตรวจดูภายใต้ scanning electron microscope Quanta 400, FEI ที่ 10 kV.

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อไม้ยางพารา

เก็บตัวอย่างเนื้อไม้ยางพารา เพื่อนำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ โดยเก็บตัวอย่างเนื้อไม้ยางพาราพันธุ์ปลูกดั้งเดิมและพันธุ์ RRIM 600 จากสวนยางที่ จ.สุราษฎร์ธานี และ จ.สงขลา สวนละ 20 ต้น รวมจำนวน 80 ต้น นำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อไม้ยางพาราด้วยวิธี tissue transplanting (ภาพที่ 2) ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จำนวน 93 ไอโซเลท โดยแยกได้จากพันธุ์ปลูกดั้งเดิมจำนวน 47 ไอโซเลท และจากพันธุ์ RRIM600 จำนวน 46 ไอโซเลท (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 2 เส้นใยเชื้อราเอนโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากเนื้อไม้ยางพารา หลังจากนำชิ้นเนื้อไม้ยางพาราเพาะเส้นใยบนจานอาหารวุ้น PDA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ (neomycin 100 mg/L, penicillin 50 mg/L และ streptomycin 50 mg/L) เป็นเวลา 4 วัน

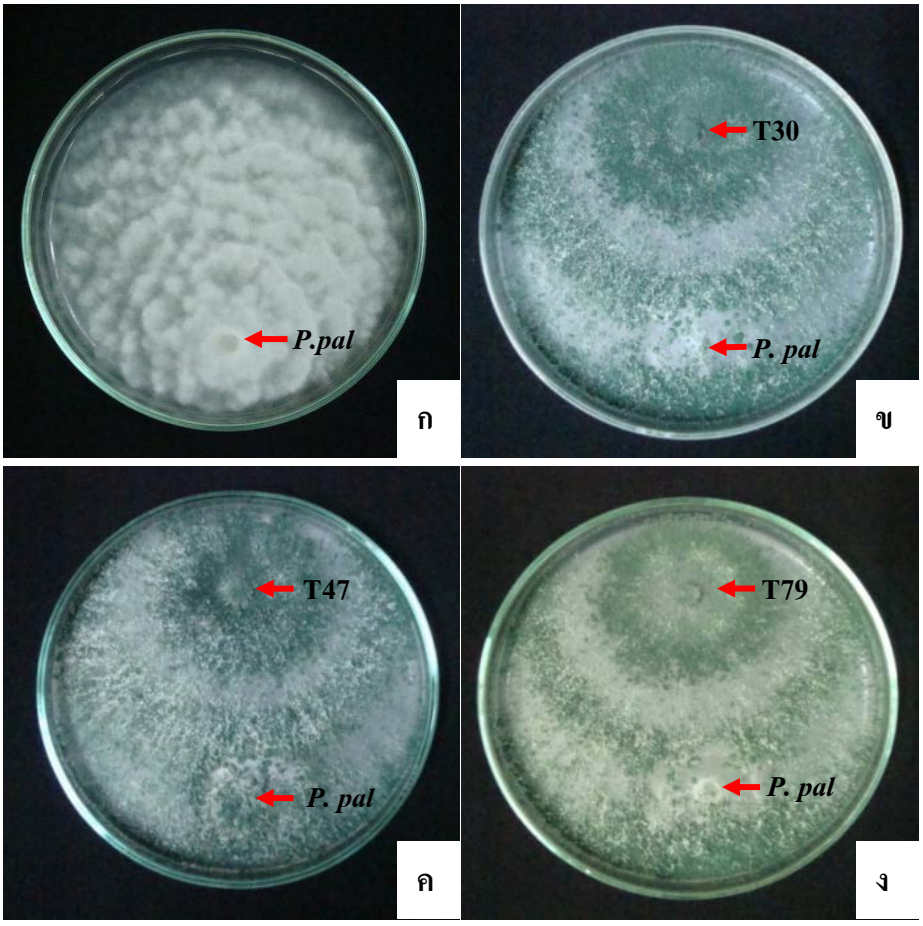
ตารางที่ 2 สถานที่เก็บตัวอย่างเนื้อไม้ยางพาราและจำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง (ต้น)	จำนวนเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ (ไอโซเลท)
จังหวัดสุราษฎร์ธานี		
พันธุ์ปลูกดั้งเดิม	20	19
พันธุ์ RRIM 600	20	23
จังหวัดสงขลา		
พันธุ์ปลูกดั้งเดิม	20	28
พันธุ์ RRIM 600	20	23
รวม	80	93

2. คัดเลือกและเปรียบเทียบเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากยางพันธุ์ปลูกดั้งเดิมและพันธุ์ RRIM 600 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa*

เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยวิธี dual culture plate โดยตรวจผลในวันที่ 7 พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อ *P. palmivora* (ภาพที่ 3) ได้ตั้งแต่ 70.36 ถึง 90.71 % โดยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่ยับยั้งได้ 90 % ขึ้นไปมี 1 ไอโซเลท ยับยั้งการเจริญได้ 80.00-89.99% มี 42 ไอโซเลท โดย 3 อันดับแรกที่ยับยั้งได้สูงสุด คือ ไอโซเลท SUL 1501-30 (90.71%), SKL 301-47 (85.36%) และ SKR 601-79 (85.36%) (ภาคผนวก ง และตารางภาคผนวกที่ 2) และสามารถยับยั้งการเจริญโดยการเจริญคลุมทับเชื้อ *P. botryosa* (ภาพที่ 4) ได้ตั้งแต่ 72.14 ถึง 85.71% โดยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่ยับยั้งได้ 80.00-89.99% มี 51 ไอโซเลท และ70.00-79.99% มี 42 ไอโซเลท โดยให้ผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. botryosa* สูงที่สุด 3 อันดับคือไอโซเลท SUR 1305-14 (85.71%), SUR 1101-13(85.00%) และ SUR 1404-16(84.64%) (ภาคผนวก ง และตารางภาคผนวกที่ 3) สอดคล้องกับการศึกษาของ Bae และคณะ (2011) ซึ่งแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากพืชเขตร้อน เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อราพบว่าสามารถควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. capsici* ได้ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Hanada และคณะ (2010) ซึ่งแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.

จากเนื้อไม้ของต้นโกโก้ พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* สาเหตุโรคฝักเน่าดำของโกโก้ได้



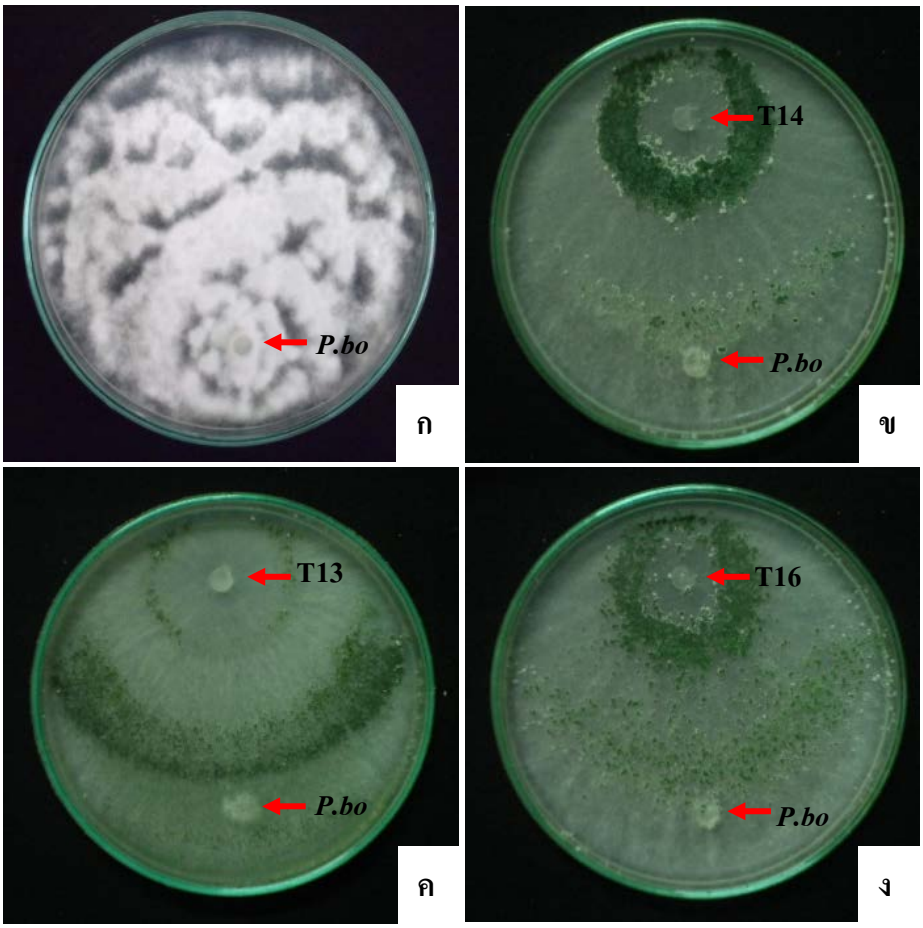
ภาพที่ 3 โคโลนีเชื้อ *Phytophthora palmivora* และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่างๆ เมื่อเลี้ยงใน dual culture plate บนอาหารวุ้น PDA หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

(ก) เชื้อ *Phytophthora palmivora* (*P. pal,* ชุดควบคุม)

(ข) เชื้อ *Phytophthora palmivora* (*P. pal*) และ เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUL 1501-30 (T30)

(ค) เชื้อ *Phytophthora palmivora* (*P. pal*) และ เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SKL 301-47 (T47)

(ง) เชื้อ *Phytophthora palmivora* (*P. pal*) และ เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SKR 601-79 (T79)



ภาพที่ 4 โคโลนีเชื้อ *Phytophthora botryosa* และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่างๆเมื่อเลี้ยงใน dual culture plate บนอาหารวุ้น PDA หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

(ก) เชื้อ *Phytophthora botryosa* (*P. bo*, ชุดควบคุม)

(ข) เชื้อ *Phytophthora botryosa* (*P. bo*) และ เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUR 1305-14 (T14)

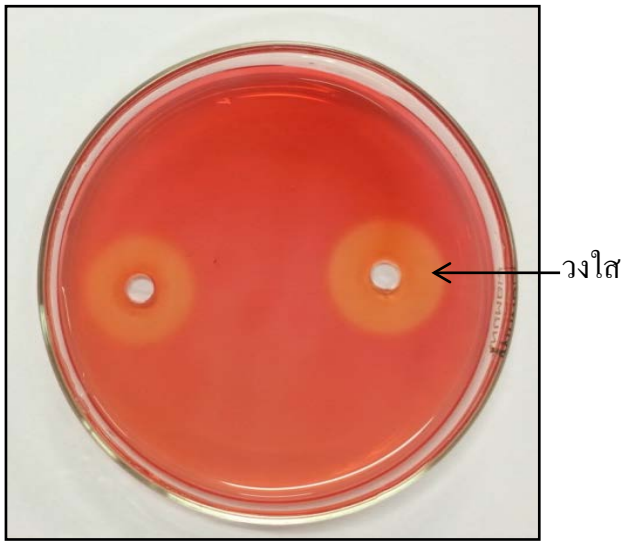
(ค) เชื้อ *Phytophthora botryosa* (*P. bo*) และ เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUR 1101-13 (T13)

(ง) เชื้อ *Phytophthora botryosa* (*P. bo*) และ เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUR 1404-16 (T16)

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกจากเนื้อไม้ยางพันธุ์ปลูกดั้งเดิม และพันธุ์ RRIM 600 ในการควบคุม *P. palmivora* และ *P. botryosa* พบว่าใกล้เคียงกัน (ภาคผนวก ง และตารางภาคผนวกที่ 2, 3)

3. ศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

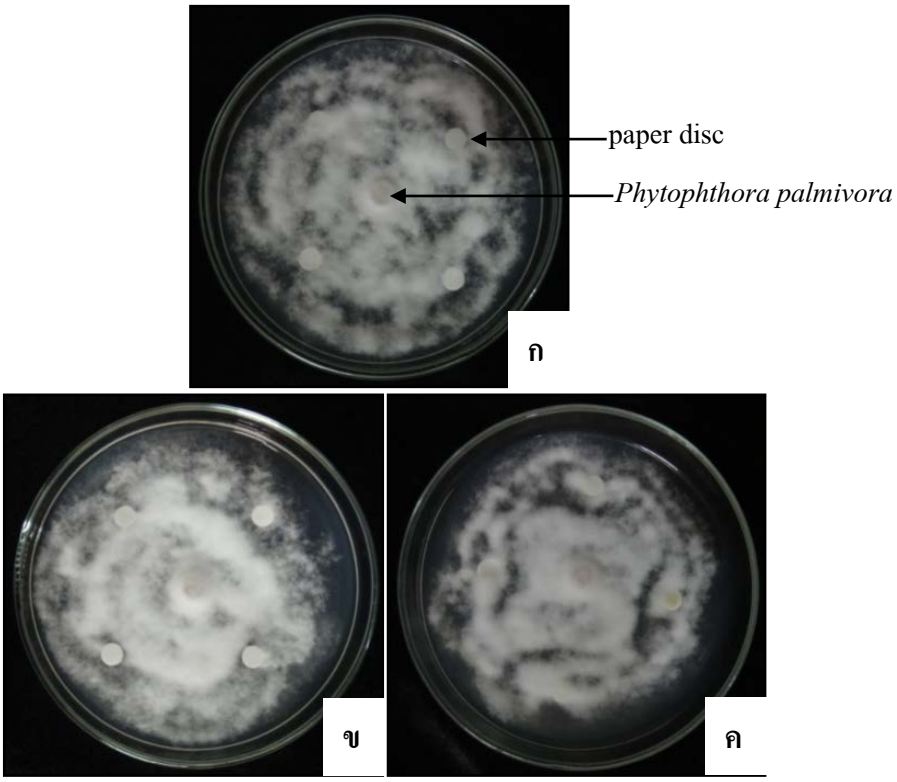
จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 93 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยสังเกตจากการเกิดวงใสรอบๆ หลุมที่หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นพบว่า มีขนาดของวงใสอยู่ในช่วง 21.00-24.25 มิลลิเมตร (ภาพที่ 5 ภาคผนวก จ ตาราง ภาคผนวกที่ 4) จากรายงานวิจัยพบว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. หลายชนิดมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เช่น *T. atroviride* (Kovacs *et al*., 2008) *T. koningii* (Wang *et al*., 2012) *T. harzianum* (Delabona *et al*., 2012) *T. reesei* (Li *et al*., 2010) และ *T. viride* (Lan *et al*., 2013) ดังนั้นเชื้อ *Trichoderma* spp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. ดังรายงานของ Desjardin และคณะ (1969) ที่ระบุว่าผนังเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. มีส่วนประกอบของเซลลูโลส สอดคล้องกับการทดลองธวัชชัย เปรมศรี และคณะ (2543) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกจากรากของต้นโป๊ยเซียนสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยเซลลูโลสของเชื้อ *P. nicotianae* var. *parasitica* ได้ และสอดคล้องกับรายงานของ Picard และคณะ (2000) พบว่าเชื้อ *T. viride* ส่วนใหญ่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยสลายเซลลูโลสบนผนังเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. และ *Py. oligandrum* ได้



ภาพที่ 5 ลักษณะวงใสที่เกิดจากการย่อยเซลลูโลสโดยเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลท SUL 503-51 บนอาหาร CMC agar หลังจากหยดน้ำเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4. ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUL 1501-30 และ SUR 1305-14 ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* เจริญคลุม paper disc (ภาพที่ 6,7 ตามลำดับ) สรุปได้ว่าน้ำเลี้ยงเชื้อไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ได้

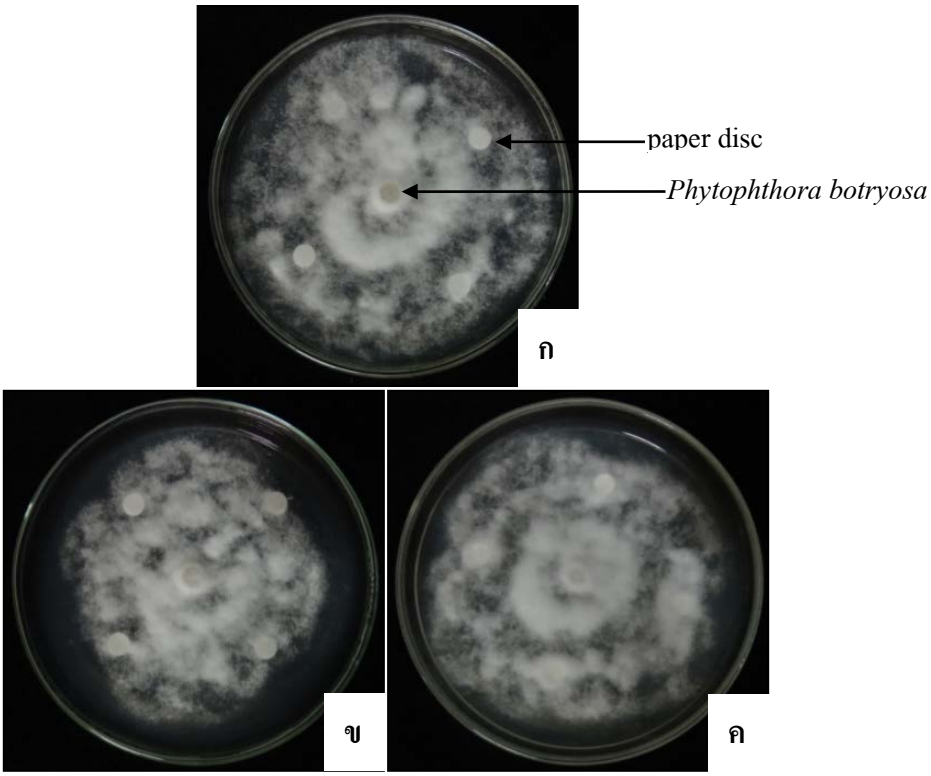


ภาพที่ 6 โคโลนีของเชื้อ *Phytophthora palmivora* ที่เจริญคลุม paper disc ที่หยดน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA หลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

(ก) เชื้อ *P. palmivora* และ paper disc หยดน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

(ข) เชื้อ *P. palmivora* และ paper disc หยดน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUL 1501-30

(ค) เชื้อ *P. palmivora* และ paper disc หยดน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUR 1305-14



ภาพที่ 7 โคโลนีของเชื้อ *Phytophthora botryosa* ที่เจริญคลุม paper disc ที่หยดน้ำเลี้ยงเชื้อเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ไอโซเลทต่างๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA หลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

(ก) เชื้อ *P. botryosa* และ paper disc หยดน้ำกลั่น (ชุดควบคุม)

(ข) เชื้อ *P. botryosa* และ paper disc หยดน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUL 1501-30

(ค) เชื้อ *P. botryosa* และ paper disc หยดน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUR 1305-14

5. จำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ด้วยลักษณะสัณฐาน

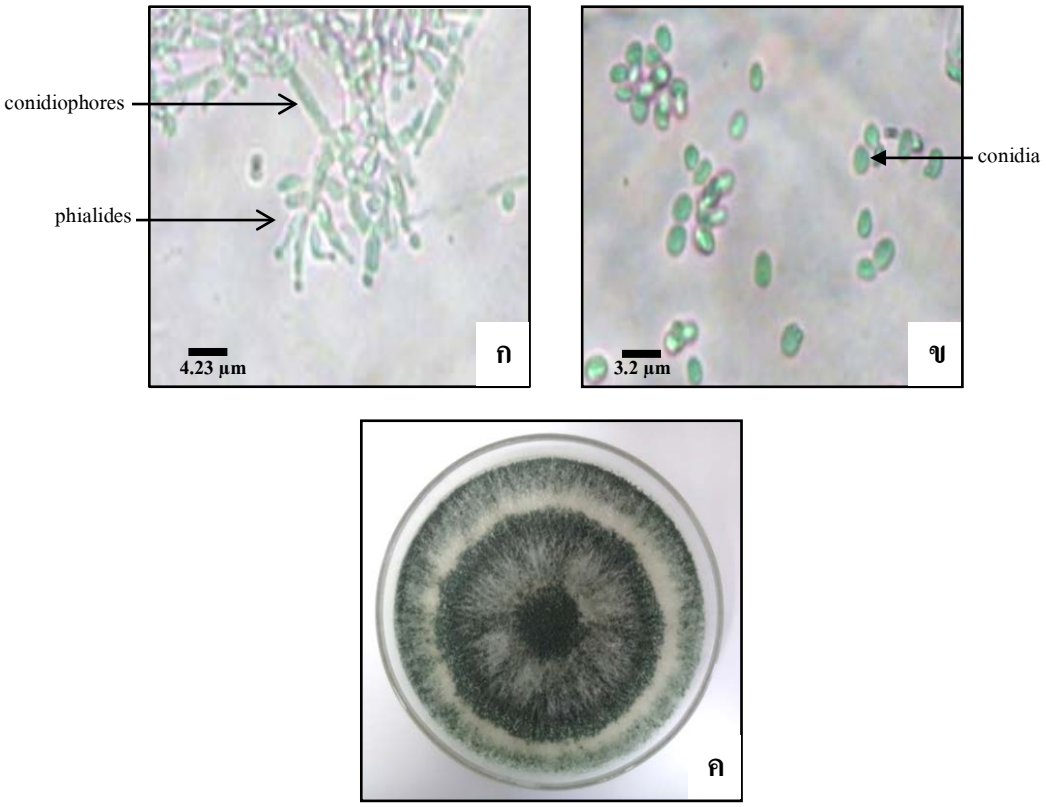
เลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. บนอาหาร PDA อายุ 5-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) ศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษารูปร่าง ขนาด สี ของสปอร์ ไฟอะไลด์ และลักษณะโครงสร้างที่เชื้อราสร้าง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound จำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบกับคู่มือหนังสือ keys ของ Gams และ Bissett (1998) และ Samuels และคณะ (2010) จำแนกได้เป็น *T. asperellum* จำนวน 5 ไอโซเลท *T. atroviride* จำนวน 3 ไอโซเลท *T. harzianum* จำนวน 52 ไอโซเลท *T. koningii* จำนวน 3 ไอโซเลท *T. longibrachiatum* จำนวน 1 ไอโซเลท *T. reesei* จำนวน 1 ไอโซเลท และ *T. viride* จำนวน 28 ไอโซเลท (ตารางที่ 3) *Trichoderma* spp. ที่พบมากคือ *T. harzianum* โดยพบ 52 ไอโซเลท (55.91 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chaverri และ Gazis (2011) ซึ่งศึกษาเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากเนื้อไม้ยางพารา พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่พบมากคือ *T. harzianum* โดยพบ 19 ไอโซเลท (73.08 เปอร์เซ็นต์)

ตารางที่ 3 ชนิดและจำนวนไอโซเลทเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากเนื้อไม้ยางพารา

เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.	จำนวนไอโซเลท
Trichoderma asperellum	5
Trichoderma atroviride	3
Trichoderma harzianum	52
Trichoderma koningii	3
Trichoderma longibrachiatum	1
Trichoderma reesei	1
Trichoderma viride	28
รวม	93

5.1. เชื้อรา *Trichoderma asperellum* Samuels (ภาพที่ 8)

โคโลนีเจริญเร็ว เต็มจานเลี้ยงเชื้อภายใน 4 วัน โคโลนีมีสีเขียว โคนิดิโอฟอร์เรียวยาว มีผนังกั้น ไฟอะไลด์มีรูปร่างแบบ flask-shaped เกิดเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 2-4 อัน มีขนาด 5.3-11.6 × 2.0-3.5 ไมโครเมตร โคนิเดีย รูปร่างรี ผนังเรียบ สีเขียวเข้ม ขนาด 2.6-3.8 × 2.2-3.4 ไมโครเมตร (Samuels *et al*., 2010)



ภาพที่ 8 เชื้อรา *Trichoderma asperellum*

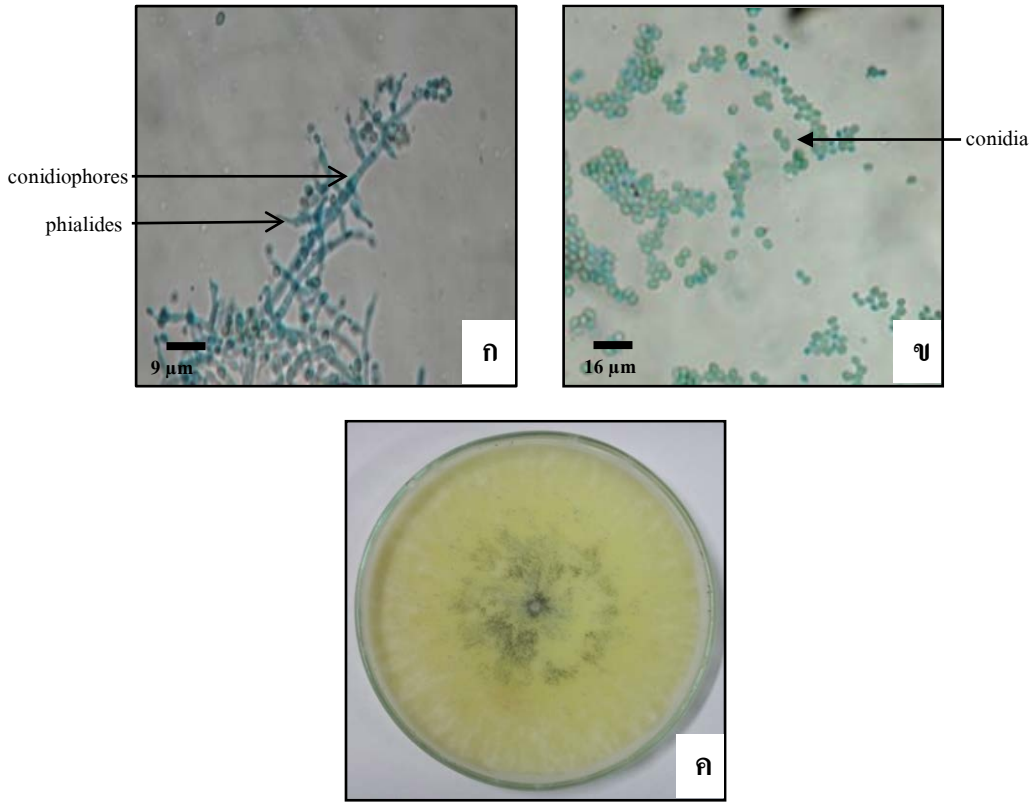
(ก) conidiophores และ phialides (400X)

(ข) conidia (400X)

(ค) โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

5.2. เชื้อรา *Trichoderma atroviride* Karsten (ภาพที่ 9)

โคโลนีเจริญเร็ว เต็มจานเลี้ยงเชื้อภายใน 4 วัน ระแยกโคโลนีมีสีเหลืองและที่ผิวหน้าของโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อเชื้อเริ่มสร้างสปอร์ โคนิดิโอฟอร์เรียวยาว มีผนังกั้น ไฟอะไลด์มีรูปร่างแบบ lageniform เกิดเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 2-4 อัน มีขนาด 6-12 × 2.4-3.0 ไมโครเมตร โคนิเดีย รูปร่างค่อนข้างกลม ผนังเรียบ สีเขียวเข้ม ขนาด 2.6-3.8 × 2.2-3.4 ไมโครเมตร (Gams and Bissett, 1998)



ภาพที่ 9 เชื้อรา *Trichoderma atroviride*

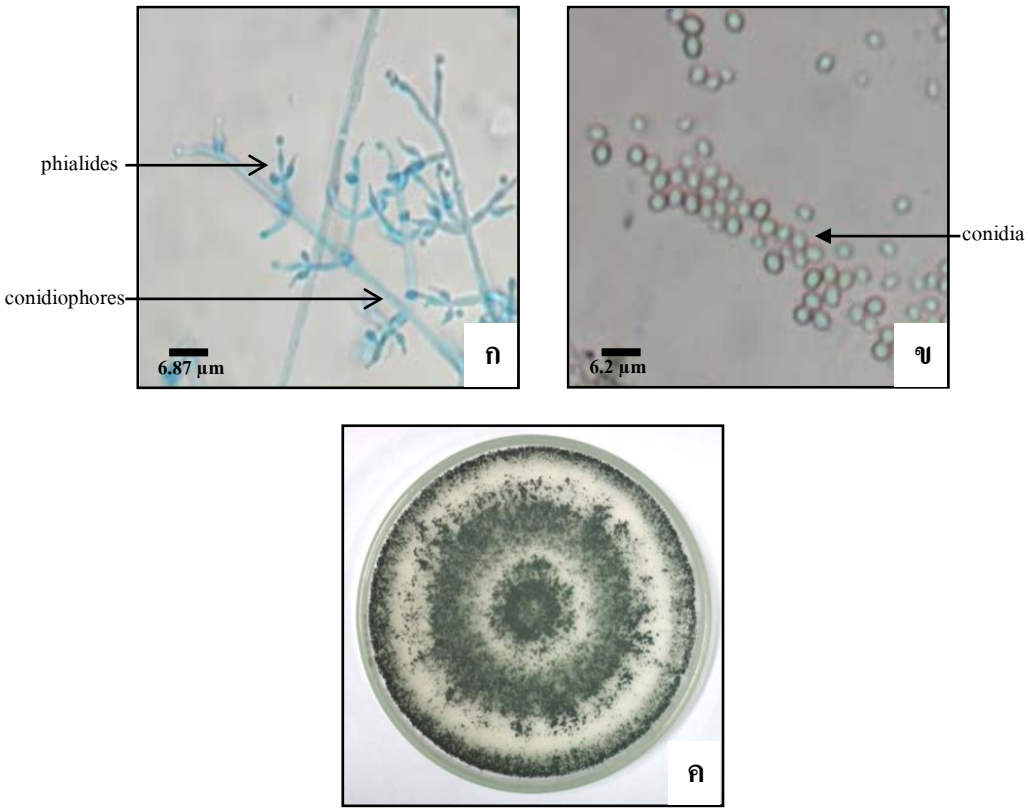
(ก) conidiophores และ phialides (400X)

(ข) conidia (400X)

(ค) โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

5.3. เชื้อรา *Trichoderma harzianum* Rifai (ภาพที่ 10)

โคโลนีเจริญเร็ว เต็มจานเลี้ยงเชื้อภายใน 4 วัน โคโลนีมีสีเขียว โคนิดิโอฟอร์เรียวยาว มีผนังกั้น ไฟอะไลด์มีรูปร่างแบบ ampulliform และ lageniform เกิดเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 3-4 อัน มีขนาด 3.5-7.5 × 2.5-3.8 ไมโครเมตร โคนิเดีย รูปร่างค่อนข้างกลม ผนังเรียบ สีเขียวอ่อน ขนาด 2.7-3.5 × 2.1-2.6 ไมโครเมตร (Gams and Bissett, 1998)



ภาพที่ 10 เชื้อรา *Trichoderma harzianum*

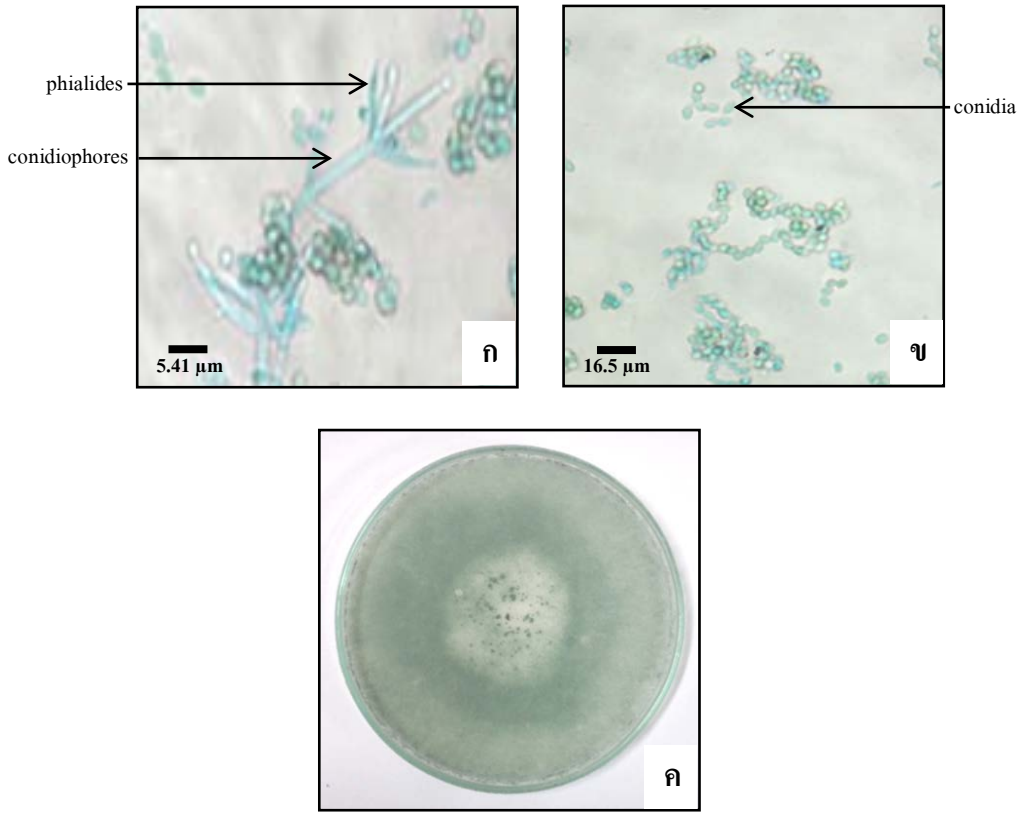
(ก) conidiophores และ phialides (400X)

(ข) conidia (400X)

(ค) โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

5.4. เชื้อรา *Trichoderma koningii* Oud. (ภาพที่ 11)

โคโลนีเจริญเร็ว เต็มจานเลี้ยงเชื้อภายใน 4 วัน โคโลนีมีสีเขียว โคนิดิโอฟอร์เรียวยาว มีผนังกั้น ไฟอะไลด์มีรูปร่างแบบ ampulliform และ lageniform เกิดเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 3-5 อัน มีขนาด 7.5-12 × 2.5-3.5 ไมโครเมตร โคนิเดีย รูปร่างรี ผนังเรียบ สีเขียว ขนาด 3.0-5.5 × 1.9-3.2 ไมโครเมตร (Gams and Bissett, 1998)



ภาพที่ 11 เชื้อรา *Trichoderma koningii*

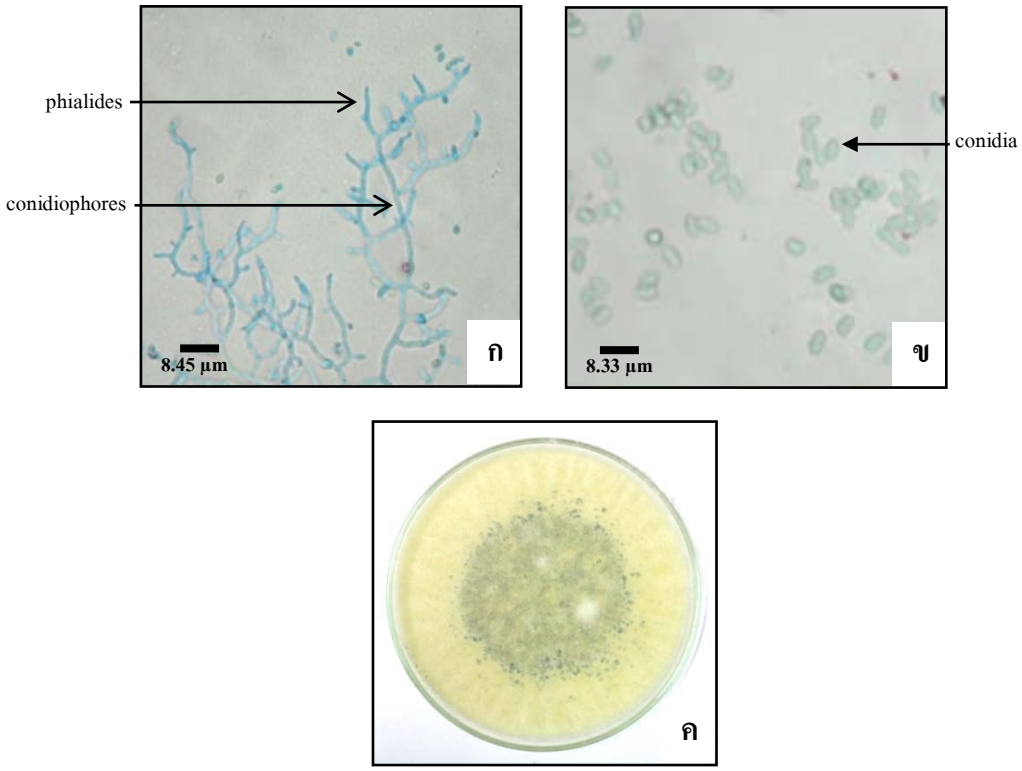
(ก) conidiophores และ phialides (400X)

(ข) conidia (400X)

(ค) โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

5.5. เชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* Rifai (ภาพที่ 12)

โคโลนีเจริญเร็ว เต็มจานเลี้ยงเชื้อภายใน 4 วัน โคโลนีมีสีเขียว โคนิดิโอฟอร์เรียวยาว มีผนังกั้น ไฟอะไลด์มีรูปร่างแบบ lageniform เกิดเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 3 อัน มีขนาด 5.3-11.6 × 2.0-3.2 ไมโครเมตร โคนิเดีย รูปร่างรี ผนังเรียบ สีเขียว ขนาด 3.4–6.6 × 2.3–3. ไมโครเมตร (Gams and Bissett, 1998)



ภาพที่ 12 เชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum*

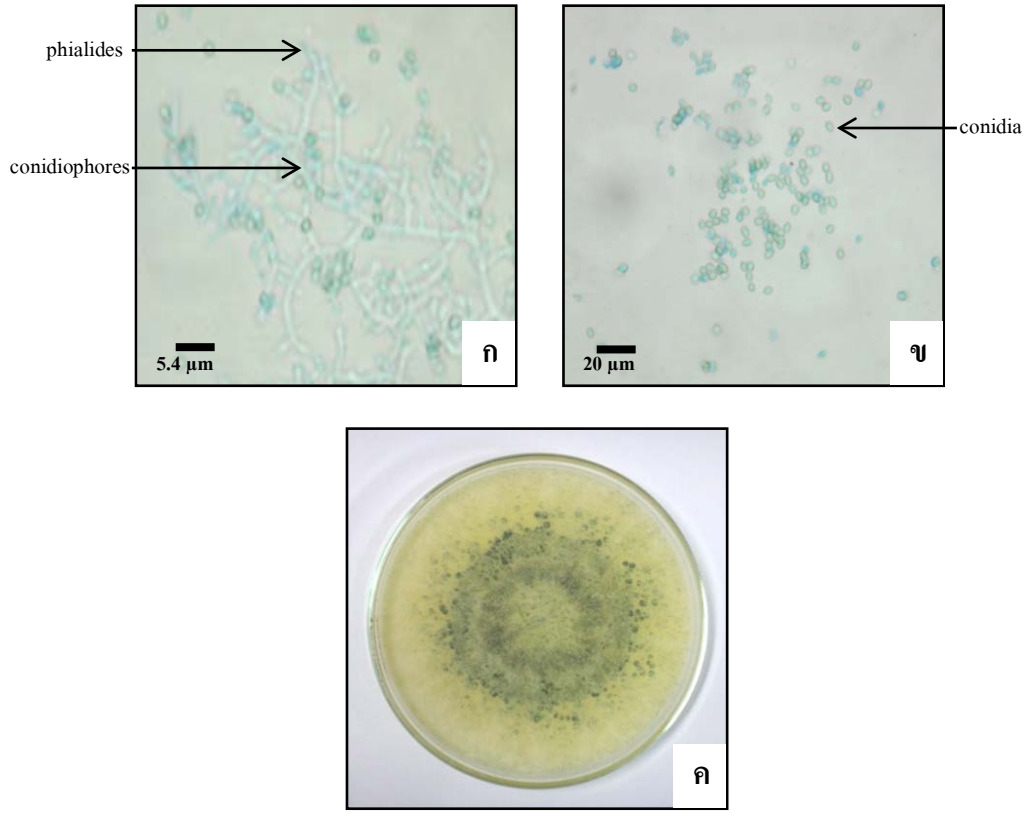
(ก) conidiophores และ phialides (400X)

(ข) conidia (400X)

(ค) โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

5.6. เชื้อรา *Trichoderma reesei* Simmons (ภาพที่ 13)

โคโลนีเจริญเร็ว เต็มจานเลี้ยงเชื้อภายใน 4 วัน ระแยกโคโลนีมีสีเหลืองและที่ผิวหน้าของโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อเชื้อเริ่มสร้างสปอร์ โคนิดิโอฟอร์เรียวยาว มีผนังกั้น ไฟอะไลด์มีรูปร่างแบบ cylindrical เกิดเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 3-4 อัน มีขนาด 5.5–8 × 2.0–3.7 ไมโครเมตร โคนิเดีย รูปร่างรี ผนังเรียบ สีเขียวอ่อน ขนาด 3.5-4.5 × 2.3-3.0 ไมโครเมตร (Gams and Bissett, 1998)



ภาพที่ 13 เชื้อรา *Trichoderma reesei*

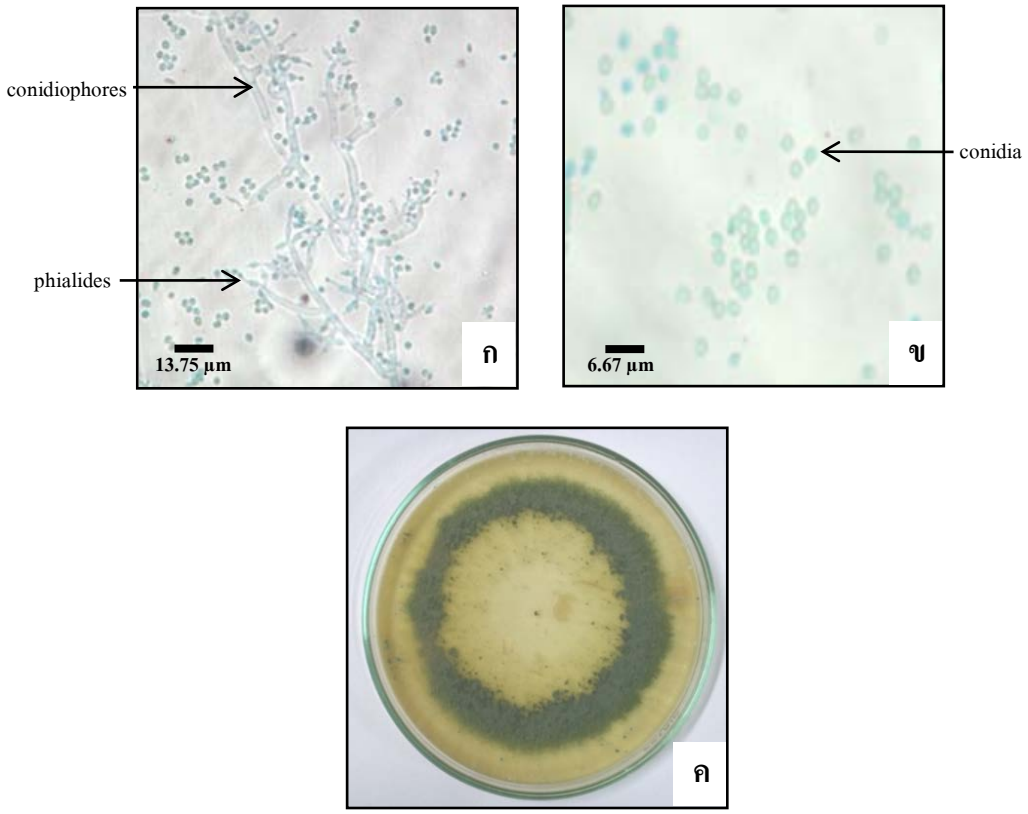
(ก) conidiophores และ phialides (400X)

(ข) conidia (400X)

(ค) โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

5.7. เชื้อรา *Trichoderma viride* Pers. (ภาพที่ 14)

โคโลนีเจริญเร็ว เต็มจานเลี้ยงเชื้อภายใน 4 วัน ระแยกโคโลนีมีสีเหลืองและที่ผิวหน้าของโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อเชื้อเริ่มสร้างสปอร์ โคนิดิโอฟอร์เรียวยาว มีผนังกั้น ไฟอะไลด์มีรูปร่างแบบ lageniform เกิดเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 3-4 อัน มีขนาด 8-14 ×2.4-3.0 ไมโครเมตร โคนิเดีย รูปร่างกลมรี ผนังเรียบ สีเขียวเข้ม ขนาด 3.5-4.5 × 2.3-3.0 ไมโครเมตร (Gams and Bissett, 1998)



ภาพที่ 14 เชื้อรา *Trichoderma viride*

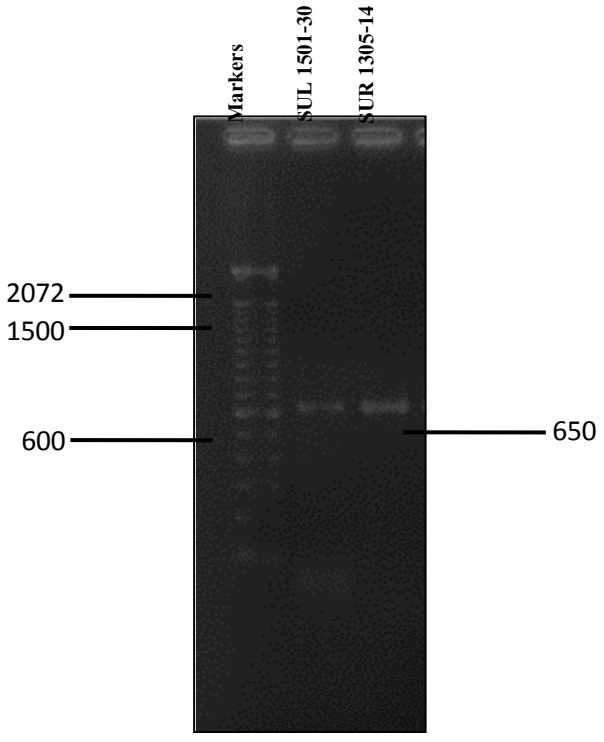
(ก) conidiophores และ phialides (400X)

(ข) conidia (400X)

(ค) โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

6. จำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

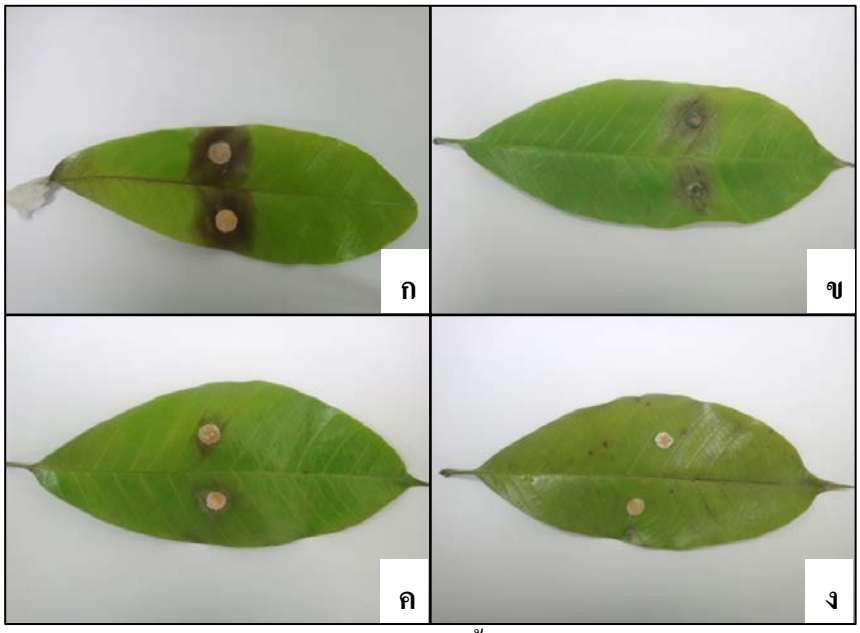
จำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ทางชีวโมเลกุล โดยสกัด DNA (Deoxyribonucleic acid) เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และส่ง PCR product (ภาพที่ 15) เพื่ออ่านลำดับเบส พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUL 1501-30 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Trichoderma asperellum* มากที่สุด 97 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUR 1305-14 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *Trichoderma harzianum* 100 เปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp.ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* ได้ดีที่สุดคือ *T. asperellum* และยับยั้งเชื้อ *P. botryosa* ได้ดีที่สุดคือ *T. harzianum*



ภาพที่ 15 ขนาด PCR products ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.ไอโซเลท SUL 1501-30 และ SUR 1305-14 เปรียบเทียบกับ Markers (100 bp ladder)

7. ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* บนใบยางพารา

จากการนำเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* ที่ยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* ได้ดีที่สุด และเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. harzianum* ที่ยับยั้งเชื้อ *P. botryosa* ได้ดีที่สุด มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* บนใบยางพาราด้วยวิธี detached leaf โดยใช้ใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา metalaxyl ประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* SUL 1501-30 และ *T. harzianum* SUR 1305-14 โดยการวัดพื้นที่แผลที่ถูกทำลายโดยเครื่อง leaf area meter ci-202 เปรียบเทียบกับพื้นที่แผลของชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อ *P. palmivora* อย่างเดียว ผลการทดสอบพบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อราปฏิปักษ์เอนโดไฟท์ *T. asperellum* และ *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* ได้ (ภาพที่ 16) โดยมีพื้นที่แผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม มีค่าเฉลี่ยพื้นที่แผล 4.96 และ 4.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ(ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่แผลของชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อ *P. botryosa* อย่างเดียว พบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อราปฏิปักษ์เอนโดไฟท์ *T. asperellum* และ *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. botryosa* ได้ (ภาพที่ 17) มีพื้นที่แผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม มีค่าเฉลี่ยพื้นที่แผล 1.78 และ 2.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) แต่ต่ำกว่ากรรมวิธีที่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl แตกต่างทางสถิติจากชุดควบคุม สอดคล้องกับรายงานของ เสมอใจ ชื่นจิตต์ และคณะ 2553 ซึ่งทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* บนใบยางพาราด้วยวิธี detached leaf พบว่า เชื้อ *Bacillus* sp. B068-2, *Streptomyces* sp. SC03-15 และ *Trichoderma* sp. T016-2 สามารถยับยั้งการเข้าทำลายเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ได้แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา matalaxyl



ภาพที่ 16 อาการของโรคบนใบยางพาราพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* SUL 1501-30 หรือ *T. harzianum* SUR 1305-14 และปลูกเชื้อ *Phytophthora palmivora* ร่วมกัน เป็นเวลา 6 วัน

(ก) ใบยางพาราปลูกเชื้อ *P. palmivora* (ชุดควบคุม)

(ข) ใบยางพาราพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* SUL 1501-30 และปลูกเชื้อ *P. palmivora*

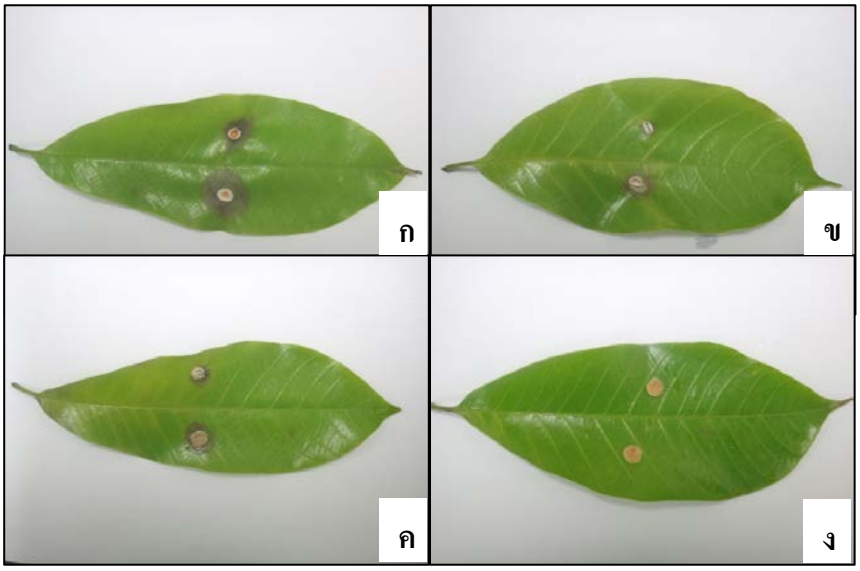
(ค) ใบยางพาราพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. harzianum* SUR 1305-14 และปลูกเชื้อ *P. palmivora*

(ง) ใบยางพาราพ่นด้วยสารเคมี metalaxyl และปลูกเชื้อ *P. palmivora*

ตารางที่ 4 พื้นที่แผลบนใบยางพันธุ์ RRIM 600 หลังจากปลูกเชื้อราปฏิปักษ์เอนโดไฟท์ *Trichoderma asperellum* หรือ *T. harzianum* และเชื้อ *Phytophthora palmivora* เป็นเวลา 6 วัน

เชื้อ	ค่าเฉลี่ยพื้นที่แผล(%) ± SD
P. palmivora (Control)	19.77 ± 0.23c
T. asperellum + *P. palmivora*	4.96 ± 0.34b
T. harzianum + *P. palmivora*	4.42 ± 0.12b
metalaxyl + *P. palmivora*	0.00 ± 0.00a
C.V. (%)	5.84

* ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test



ภาพที่ 17 อาการของโรคบนใบยางพาราพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* SUL 1501-30 หรือ *T. harzianum* SUR 1305-14 และปลูกเชื้อ *Phytophthora botryosa* ร่วมกัน เป็นเวลา 6 วัน

(ก) ใบยางพาราปลูกเชื้อ *P. botryosa* (ชุดควบคุม)

(ข) ใบยางพาราพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* SUL 1501-30 และปลูกเชื้อ *P. botryosa*

(ค) ใบยางพาราพ่นด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. harzianum* SUR 1305-14 และปลูกเชื้อ *P. botryosa*

(ง) ใบยางพาราพ่นด้วย สารเคมี metalaxyl และปลูกเชื้อ *P. botryosa*

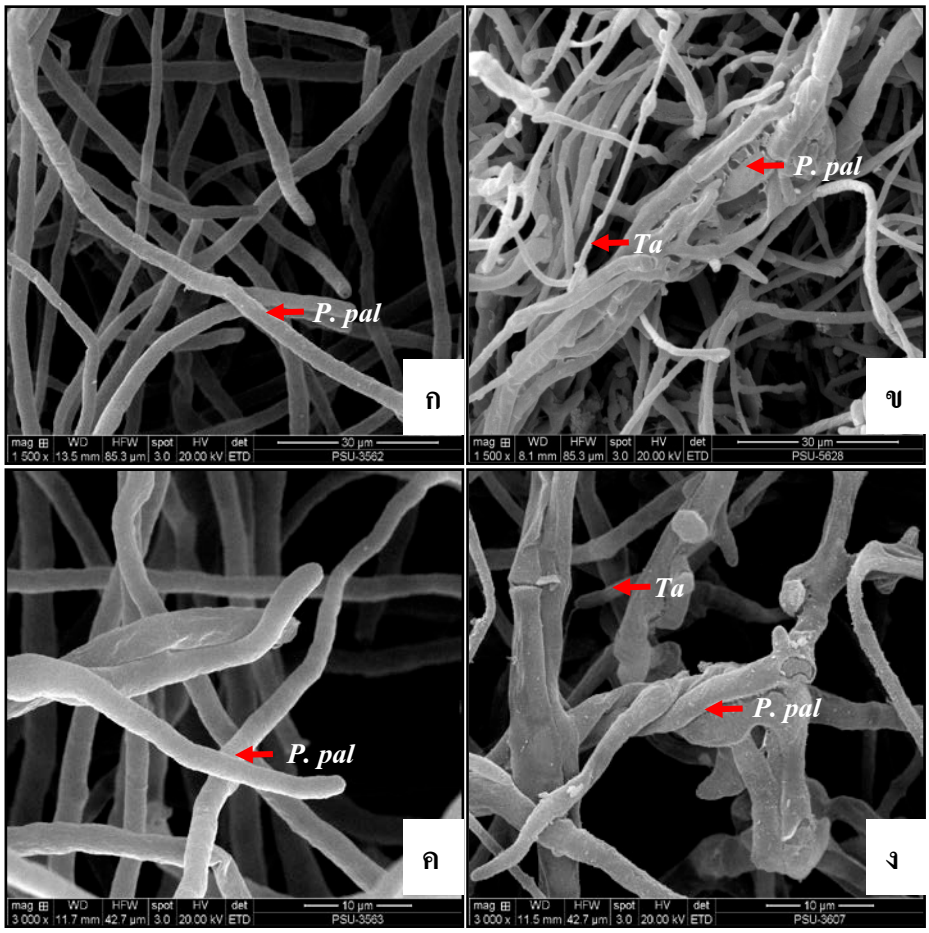
ตารางที่ 5 พื้นที่แผลบนใบยางพันธุ์ RRIM 600 หลังจากปลูกเชื้อราปฏิปักษ์เอนโดไฟท์ *Trichoderma asperellum* หรือ *T. harzianum* และเชื้อ *Phytophthora botryosa* เป็นเวลา 6 วัน

เชื้อ	ค่าเฉลี่ยพื้นที่แผล(%)± SD
P. botryosa (Control)	8.48 ± 0.06 c
T. asperellum + *P. botryosa*	1.78 ± 0.21 b
T. harzianum+ *P. botryosa*	2.49 ± 0.51 b
metalaxyl + *P. botryosa*	0.00 ± 0.00 a
C.V. (%)	17.56

* ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Duncan's Mutiple Range Test

8. ศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อสาเหตุโรค *P. palmivora* และ *P. botryosa* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

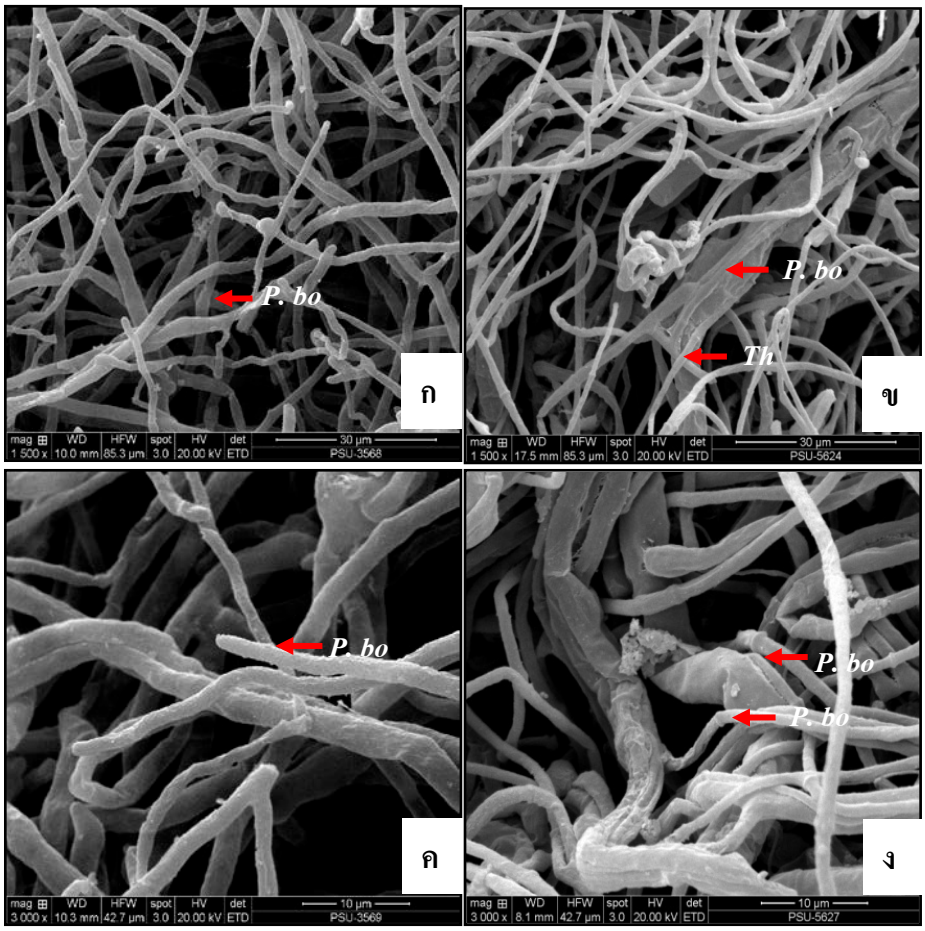
จากการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* และ *T. harzianum* ยับยั้งเชื้อทั้ง 2 ได้สูงสุดตามลำดับ จึงได้นำเชื้อแต่ละคู่มาศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *Phytophthora* spp. โดยนำเชื้อในแต่ละคู่ มาเลี้ยงด้วยวิธี slide culture เป็นเวลา 4 วัน นำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเส้นใยของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. สัมผัส พันรัดล้อมรอบเส้นใยเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ได้ ทำให้เส้นใยของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* แสดงอาการเหี่ยว (ภาพที่ 18 และ 19) สอดคล้องกับการศึกษาของ Intana (2003) ซึ่งเลี้ยงเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อ *Py. aphanidermatum* ด้วยวิธี dual culture นำมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าเส้นใยของเชื้อ *T. harzianum* สามารถทำลายเส้นใย เชื้อ *Py. aphanidermatum* ได้ และยังพบว่าสปอร์ของเชื้อ *T. harzianum* ทำให้เส้นใยของเชื้อ *Py. aphanidermatum* เป็นหลุมได้



ภาพที่ 18 เส้นใยเชื้อ *Phytophthora palmivora* (*P. pal*) แสดงอาการเหี่ยว ผนังเส้นใยถูกทำลาย เมื่อวางเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma asperellum* (*Ta*)บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM Quanta 400, FEI ที่ 10 kV)

(ก), (ค) เส้นใยเชื้อ *P. palmivora* (ชุดควบคุม) มีลักษณะเส้นใยปกติ

(ข), (ง) เส้นใยเชื้อ *P. palmivora* แสดงอาการเหี่ยว เมื่อวางเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum*



ภาพที่ 19 เส้นใยเชื้อ *Phytophthora botryosa* (*P. bo*) แสดงอาการเหี่ยว ผนังเส้นใยถูกทำลาย เมื่อวางเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma harzianum* (*Th*) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลา 4 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM Quanta 400, FEI ที่ 10 kV)

(ก), (ค) เส้นใยเชื้อ *P. botryosa* (ชุดควบคุม) มีลักษณะเส้นใยปกติ

(ข), (ง) เส้นใยเชื้อ *P. botryosa* แสดงอาการเหี่ยว เมื่อวางเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. harzianum*

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากเนื้อไม้ยางพารา

เก็บตัวอย่างเนื้อไม้ยางพารา โดยเก็บตัวอย่างเนื้อไม้ยางพาราพันธุ์ปลูกดั้งเดิมและพันธุ์ RRIM 600 จากสวนยางที่ จ.สุราษฎร์ธานี และสงขลา สวนละ 20 ต้น รวมจำนวน 80 ต้น นำมาแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ด้วยวิธี tissue transplanting ได้เชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จำนวน 93 ไอโซเลท

2. คัดเลือกและเปรียบเทียบเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. จากยางพันธุ์ปลูกดั้งเดิมและพันธุ์ RRIM 600 ที่ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยวิธี dual culture plate พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* ได้ตั้งแต่ 70.36 ถึง 90.71 % และ *P. botryosa* ได้ตั้งแต่ 72.14 ถึง 85.71% ไอโซเลทที่ยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* ได้สูงสุดคือ SUL 1501-30 และไอโซเลทที่ยับยั้งเชื้อ *P. botryosa* ได้สูงสุดคือ SUR 1305-14 และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกจากเนื้อไม้ยางพันธุ์ปลูกดั้งเดิมและพันธุ์ RRIM 600 พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกจากเนื้อไม้ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. palmivora* และ*P. botryosa* ไม่แตกต่างกัน

3. ศึกษาความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 93 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ โดยวัดขนาดวงใสได้ 21.00-24.25 มิลลิเมตร

4. ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp.

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUL 1501-30 และ SUR 1305-14 โดยวิธี paper disc diffusion พบว่าเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* เจริญคลุม paper disc

5. จำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ด้วยลักษณะสัณฐาน

ศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษา ผิว รูปร่าง ขนาด สีของสปอร์ไฟอะไลด์ และลักษณะโครงสร้างที่เชื้อราสร้าง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound จำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบกับคู่มือหนังสือ keys จำแนกได้เป็น *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei* และ *T. viride*

6. จำแนกชนิดของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *Phytophthora palmivora* และ *P. botryosa* ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

จากการเพิ่มปริมาณ DNA พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUL 1501-30 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *T. asperellum* มากที่สุด 97 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUR 1305-14 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *T. harzianum* 100 เปอร์เซ็นต์

7. ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* บนใบยางพารา

จากการนำเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* และ *T. harzianum* มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *P. palmivora* และ *P. botryosa* ผลการศึกษาพบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยเชื้อราปฏิปักษ์เอนโดไฟท์ *T. asperellum* และ *T. harzianum* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม แต่ต่ำกว่ากรรมวิธีใช้สารเคมี metalaxyl

8. ศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ต่อเชื้อสาเหตุโรค *P. palmivora* และ *P. botryosa* ภายใต้กล้องจุลทรรศ์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. และเชื้อ *Phytophthora* spp. พบว่า เส้นใยเชื้อ *P. palmivora* แสดงอาการเหี่ยว ผนังเส้นใยถูกทำลาย เมื่อวางเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. asperellum* และเส้นใยเชื้อ *P. botryosa* แสดงอาการเหี่ยว ผนังเส้นใยถูกทำลาย เมื่อวางเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อราเอนโดไฟท์ *T. harzianum*

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. ม.ป.ป. โรคใบร่วงและผลเน่าที่เกิดจากเชื้อไฟท้อปโทร่า (Phytophthora Leaf Fall). คลินิคพืช. กลุ่มงานสัตว์ศัตรูพืช กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร. จาก http://forecast.doae.go.th/web/rubber/229-diseases-of-rubber/1077-phytophthora-leaf-fall.html (19 ธันวาคม 2554)

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ ขวัญใจ แก้วจันทร์ และสมจิตต์ ปาละกาศ. 2553. ศักยภาพในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสจากเชื้อผสม *Aspergillus niger* TISTR 3254 และ *Trichoderma reesei* TISTR 3081. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น 15 : 833-842.

เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เกษม สร้อยทอง. 2551. เทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทนู. 2542. การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช. โครงการเกษตรกู้ชาติ มหาวิทาลัยเกษตรศาสตร์. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2544. คุณสมบัติและบทบาทของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. โครงการเกษตรกู้ชาติ โครงการการถ่ายทอดการใช้เทคโนโลยีชีวภาพและชีวภัณฑ์ในการจัดการศัตรูพืชเพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

จาตุรงค์ จงจีน และสุพรรณี อะโอกิ. 2550. การคัดแยกและจำแนกเชื้อราทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดิน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 38 : 291-294.

ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย. 2549. ราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากพืชสกุล *Garcinia*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธวัชชัย เปรมศรี นิพนธ์ วิสารทานนท์ และ ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2543 การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมเชื้อรา *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* เชื้อราสาเหตุโรคโคนต้นเน่าและรากเน่าของโป๊ยเซียน (*Euphorbia milii*). *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 468-480.

นริสา จันทร์เรือง. 2543. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora botryosa* ของยางพาราโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พิพัฒน์ เซี่ยงหลิว. 2540. ข้อสังเกตโรคใบร่วงของยางพาราในภาคใต้. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 7 : 10-13.

ยุพาภรณ์ เดชโสภา. 2554. ประเมินการใช้แบคทีเรียและราเอนโดไฟท์สำหรับควบคุมโรคเชื้อราบางชนิดของพริกโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ฤทัยรัตน์ คำแสน 2551. ความสามารถของเชื้อราเอนโดไฟท์จากมะเขือเทศ ส้มและยางพารา ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เลขา มาโนช กัญญา เจริญไทย คนึงนิจ บุศราคำ พรพิมล อธิปัญญาคม อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และอรอุมา เจียมจิตต์. 2544. เชื้อราโรคพืช รา endophyte และราดินในประเทศไทย. *ใน* การประชุมวิชาการครั้งที่ 39 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 502-510.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2544. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. โรคพืช มข. ปริทรรศน์. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สถาบันวิจัยยาง. 2555. ข้อมูลวิชาการยางพารา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สายสมร ลำยอง พิภพ ลำยอง นิตยา บุญทิม และ Hyde, K.D. 2541. การสำรวจการกระจายของราที่เจริญในต้นพืชป่าบริเวณดอยสุเทพ-ปุย : รายงานการวิจัย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2540. การจัดการโรคพืช. กรุงเทพฯ : วี.บี. บุ๊คเซ็นเตอร์.

เสมอใจ ชื่นจิตต์ วสันณ์ เพชรรัตน์ พรศิลป์ จันทวีเมือง และปวีณา สังข์แก้ว. 2553. การประเมินการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบร่วง *Phytophthora* ของกล้ายางพารา.*ใน* รายงานการประชุมวิชาการ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ (ภาคใต้). โรงแรมเมธาวลัย ชะอำ รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี. หน้า 46.

เสาวภา สุราวุธ ประสาน แสงไพบูลย์ วิญญู ภักดี เดือนเต็ม ทองเผือก กาญจนา ราชสุวรรณ และวิระ ศรีมาลา. 2554. การคัดแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี.*ใน*. การประชุมวิชาการ.ทรัพยากรไทย ก้าวสู่โลก

กว้างอย่างมั่นใจ.ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จังหวัดนครราชสีมา. หน้า 48-58.

Ahamed, A. and Vermette, P. 2008. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. Biochemical Engineering Journal 40 : 399–407.

Azevedo, J.L., Maccheroni Jr.W., Pereira, J.O. and Araujo, W.L. 2000. Endophytic microorganism : a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electric Journal of Biotechnology 3 : 40-65.

Bae, H., Roberts, D.P., Lim, H.S., Strem, M.D., Park, S.C., Ryu, C.M., Melnick, R.L. and Bailey, B.A. 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici*. Molecular Plant-Microbe Interactions 24 : 336-351.

Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Roberts, D.P., Thomas, S.E., Crozier, J., Samuels, G.J., Choi, I.Y. and Holmes, K.A. 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. Planta 224 : 1449-1464.

Bayman, P., Lebron, L.L., Tremblay, R.L. and Lodge, D.J. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). New Phytopathologist 135 : 143-149.

Belanger, F.C. 1996. A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. Crop Sciences 36 : 460-462.

Bilai, V.I. 1963. Antibiotic Producing Microscropic Fungi. Amsterdam : Elsevier.

Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma* I: Section Longibrachiatum Sect. Nov. Canadian Journal of Botany 62: 922-931.

Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves : from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 69 : 2-9.

Chanway, C.P. 1998. Bacterial endophytes : ecology and practical implication. Sydowia 50 : 149-170.

Chaverri, P., Gazis, R.O. and Samuels, G.J. 2011. *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. Mycologia 103: 139-151.

Clay, K. 1987. Effect of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. Oecologia 73 : 358-362.

Cook, R.J. and Baker, K.F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Pathology. Minnesota : APS Press.

Dashtban, M., Schraft, H. and Qin, W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & per-spectives. International Journal of Biological Sciences 5 : 578-595.

Delabona, P.D.S., Farinas, C.S., Silva, M.R.D., Azzoni, S.F. and Pradella, J.G.D.C. 2012. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. Bioresource Technology 170 : 517-521.

Desjardin, P.R., Zentmyer, G.A. and Reynolds, D.A. 1969. Electron microscope observations of the flagellar hairs of *Phytophthora palmivora* zoospores. Canadian Journal of Botany 47 : 1077-1079.

Elamo, P., Helander, M.L., Soloniemi, I. and Neuvonen, S. 1999. Birch family and environmental conditions affect endophytic fungi in leaves. Oecologia 118 : 151-156.

Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. New York : APS Press.

Evans, H.C., Holmes, K.A. and Thomas, S.E. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri,* in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. Mycological Progress 2 : 149–160.

Gajera, H., Domadiya, R., Patel, S., Kapopara, M. and Golakiya, B. 2013. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system - a review. Current Research in Microbiology and Biotechnology 1: 133-142.

Gams, W. and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. *In* : *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. I. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. (ed. Kubicek, C. P. and Harman, G.E.) pp. 3-34.

Gazis, R. and Chaverri, P. 2010. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. Fungal Ecology 3 : 240-254.

Gazis, R., Miadlikowska, J., Lutzoni, F., Arnold, A.E. and Chaverri, P. 2012. Culture-based study of endophytes associated with rubber trees in Peru reveals a new class of Pezizomycotina: Xylonomycetes. Molecular Phylogenetics and Evolution 65 : 294–304.

Gupta, A. K., Harish, R. M. K., Phulwaria, M. and Shekhawat, N. S. 2011. Isolation of genomic DNA suitable for community analysis from mature trees adapted to arid environment. Gene 487 : 156-159.

Hanada, R.E., Souza, T.J., Pomella, A.W.V., Hebbar, K.P., Pereira, J.O., Ismaiel, A. and Samuels, G.J. 2008. *Trichoderma martial* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. Mycological Research 112 : 1335-1343.

Hanada, R.E., Pomella, A.W.V., Costa, H.S., Bezerra, J.L., Loguercio, L.L. and Pereira, J.O. 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. Fungal Biology 114 : 901-910.

Inbar, J., Menendaz, A. and Chet, I. 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotium rolfsii* and its role in biological control. Soil Biology and Biochemistry 28 : 757-763.

Intana, W. 2003. Selection and Development of *Trichoderma* app. for High Glucanase, Antifungal Metabolite Producing and Plant Growth Promoting Isolates for Biological Control of Cucumber Damping-off Caused by *Pythium* spp. Graduate School. Kasetsart University.

Isaac, S. 1992. Fungal-Plant Interaction. London : Chapman & Hall.

Kim, H.Y., Choi, G.J., Lee, H.B., Lee, S.W., Lim, H.K., Jang, K.S., Son, S.W., Lee, S.O., Cho, K.Y., Sung, N.D. and Kim, J.C. 2007. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycetes activities against tomato late blight. Letters in Applied Microbiology 44 : 332-337.

Kovacs, K., Megyeri, L., Szakacs.G.,Kubicek, C., Galb, M. and Zacchi, G. 2008. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β-glucosidase on pretreated willow. Enzyme and Microbial Technology 43 : 48–55.

Kroon, L.P.N.M., Brouwer, H., Cock, A.W.A.M. and Gover, F. 2012. The genus *Phytophthora* Anno 2012. Phytopathology 102 : 348-364.

Lan, T.Q., Wei, D., Yang, S.T. and Liu, X. 2013. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. Bioresource Technology 133 : 175-182.

Li, J.Y., Harper, J.K., Grant, D.M., Tombe, B.O., Bashyal, B., Hess, W.M. and Strobel, G.A. 2001. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp.. Phytochemistry 56 : 463-468.

Li, H.Y., Li, D.W., He, C.M., Zhou, Z.P., Mei, T. and Xu, H.M. 2012. Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. Fungal Ecology 5 : 309-315.

Li, X.H., Yang, H.j., Roy, B., Park, E.Y., Jiang, L.J., Wang, D. and Miao, Y.G. 2010. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. Microbiological Research 165 : 190-198

Liu, C.H., Zou, W.X., Lu, H. and Tan, R.X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology 88 : 277-282.

Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L. and Pietro, A.D. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Journal of Phytopathology 83: 302-307.

Maccheroni Jr., W., Araujo, W.L. and Azevedo, J.L. 2004. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. Scientia Agricola 61 : 298-302.

Manoch, L., Kokaew, J., Visarathanonth, N. and Singburaudom, N. 2009. Diversity of endophytic fungi from wild plants and *in vitro* antagonistic test against plant pathogenic fungi. Asian Mycologyical Congress 2009 & 11th International Marine and Freshwater Mycology Symposium, National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan. (Abstr.).

Ming, Q., Han, T., Li, W., Zhang, Q., Zhang, H., Zhang, C., Huang, F., Rahman, K. and Qin, L. 2012. Tanshinone IIA and tanshinone I production by *Trichoderma atroviride* D16, an endophytic fungus in *Salvia miltiorrhiza*. Phytomedicine 19 : 330-333.

Muller, J. 2003. Artificial infection by endophytes affects growth and mycorrhizal colonization of *Lolium perenne*. Functional Plant Biology 30 : 419-424.

Pertrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. *In* : Microbial Ecology of Leaves (ed. Andrew, J.H. and Hirano, S.S.). pp. 179-197. New York : Springer-Verleg.

Pertrini, O., Pertrini, L.E. and Rodrigues, K. 1995. Xylariaceous endophytes : an exercise in biodiversity. Fitopatologia Brasileira 20 : 531-539.

Picard, K., Tirilly, Y. and Benhamou, N. 2000. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. Applied and Environmental Microbiology 66 : 4305-4314.

Redlin, R.C. and Carris, L.M. 1985. Endophytic Fungi of Grasses and Wood Plants. New York : APS Press.

Rifai, A.M. 1969. A Revision of the Genus *Trichoderma*. Mycological paper 116 : 1- 56.

Rocha, A.C.S., Garcia, D., Uetanabaro, A. P.T., Carneiro, R. T. O., Araujo, I. S., Mattos, C. R. R. and Goes-Neto, A. 2011. Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. Fungal Diversity 47 : 75-80.

Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W.V., Maki, C.S., Araujo, W.L., dos Santos, D.R. and Azededo, J.L. 2005. Diverisity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches's broom disease. International Journal of Biological Sciences 1 : 24-33.

Schardl, C.L. and Phillips, T.D. 1997. Protective grass endophytes : Where are they from and where are they going? Plant Disease 81 : 430-438.

Schwarz, M., Kopcke, B., Weber, R.W.S., Sterner, O. and Anke, H. 2004. 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. Phytochemistry 65 : 2239-2245.

Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A. and Oelmuller, R. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. The Journal of Biological Chemistry 280 : 26241-26247.

Shukla, N., Awasthi, R.P., Rawat, L. and Kumar, J. 2012. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) as influenced. Plant Physiology and Biochemistry 54 : 78-88.

Silva, H.S.A., Tozzi, J.P.L., Terrasan, C.R.F. and Bettiol, W. 2012. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. Biological Control 63 : 62–67.

Smith, H., Wingfield, M.J. and Pertrini, O. 1996. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalytus nitens* in south Africa. Forest Ecology and Management 89 : 189-195.

Sopalun, K. 2004. Production and Characterization of Phytase from an Endophyte Fungus MEC1. M.Sc. Thesis, Mahidol University, Thailand. 116 pp.

Stinson, M., Ezra, D., Hess, W.M., Sears, J. and Strobel, G. 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. Plant Science 165 : 913-922.

Strobel, G.A, Dirkse, E., Sears, J. and Markworth, C. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. Microbiology 147 : 2943-2950.

Spurr Jr., H. W. and Welty, G.W. 1975. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotina* spp. Phytopathology 65 : 417-422.

Unterseher, M., Persoh, D. and Schnittler, M. 2013. Leaf-inhabiting endophytic fungi of European beech (*Fagus sylvatica* L.) co-occur in leaf litter but are rare on decaying wood of the same host. Fungal Diversity DOI 10.

Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Butehorn, B. and Franken, P. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. Applied and Environmental Microbiology 65 : 2741-2744.

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D.V., Franken, P. and Kogel, K.H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 31 May, 2005, pp.13386-13391.

Wang, Z., Ong, H.X. and Geng, A. 2012. Cellulase production and oil palm empty fruit bunch saccharification by a new isolate of *Trichoderma koningii* D-64. Process Biochemistry 47 : 1564-1571.

White, T.M., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. *In* PCR protocols (eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J.) : a guide to methods and applications. San Diego : Academic Press 315–322.

William, E.F. 1982. Principles of Plant Disease Management. New York : Academic Press.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วล้างน้ำให้สะอาด ตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ สี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก ต้มต่อไปอีกสักครู่ จึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบางเอาเนื้อมันฝรั่งออกเติมน้ำตาล dextrose 20.0 กรัม ต้มและคนจนน้ำตาล dextrose ละลายจึงนำส่วนผสมน้ำกับวุ้นละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันเติมน้ำกลั่นแทนน้ำที่ขาดหายไป ใส่ขวดหรือหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

2. V8 Juice Agar (VA)

V8 Juice	200	มิลลิลิตร
$CaCO_3$	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

3. Potato dextrose broth (PDB)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วล้างน้ำให้สะอาด ตัดออกเป็นชิ้นเล็กๆ สี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก ต้มต่อไปอีกสักครู่จึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบางเอาเนื้อมันฝรั่งออกเติมน้ำตาล dextrose 20.0 กรัม ต้มและคนจน

น้ำตาล dextrose ละลาย ผสมเข้ากันใส่ฟาสด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

4. Carboxyl methyl cellulose (CMC) broth

$(NH_4)_2SO_4$	0.5	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$CaCl_2$	0.1	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Carboxyl methyl cellulose	10.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันใส่ฟาสด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

5. Carboxyl methyl cellulose (CMC) agar

Carboxyl methyl cellulose	1.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล

1. CTAB buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PVP-40	1.0	กรัม
NaCl	8.12	กรัม
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	62.5	กรัม
1.0 M Tris-HCl (pH 8.0)	10.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเติม CTAB ปริมาตร 2 กรัม และบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C จนกว่าสารละลายจนหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเติมสาร β- mercaptoethanol เข้มข้น 2% ก่อนนำไปใช้

2. TE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.0 M Tris-HCL (pH 7.5)	500	µl
0.25 M Na_2EDTA (pH 7.0)	200	µl

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. TAE buffer เข้มข้น 50 เท่า

Tris-Base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	50.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. TBE buffer เข้มข้น 5 เท่า

Tris-Base	216.0	กรัม
Boric Acid	110.0	กรัม
0.5 M Na_2EDTA (pH 8.0)	80.0	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. 1% Agarose gel

ชั่ง agarose 2 g ใส่ใน TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปละลายด้วยไมโครเวฟ แล้วเท agarose ลงในถาดที่เตรียมไว้ ทิ้งให้ agarose แข็งประมาณ 45 นาที

6. การตรวจสอบด้วย agarose gel

ผสม DNA ปริมาตร 2.5 µl กับ 6X loading dye ปริมาตร 1 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วหยดลงในแต่ละหลุมของ agarose gel ที่วางอยู่ใน gel tank ที่เติม TAE buffer จนท่วมแผ่น agarose gel เปิดกระแสไฟฟ้า 100 volts นานเป็นเวลา 60-90 นาที

7. การตรวจหาชิ้นส่วน DNA

ย้อม agarose gel ในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10-15 นาที ตรวจหาชิ้นส่วน DNA ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator, Gel Documentation ถ่ายภาพแถบที่เกิดขึ้น

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกจากเนื้อไม้ยาง พันธุ์ปลูกดั้งเดิม และพันธุ์ RRIM 600 ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อ *Phytophthora palmivora* โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA

ไอโซเลท	% การยับยั้ง
SUL 1501-30	90.71
SKR 301-47	85.36
SKL 601-79	85.36
SUL 402-22	84.65
SUL 1802-6	84.64
SKL 1601-66	84.29
SKL 503-51	83.57
SKL 502-50	83.57
SUL 1301-28	83.57
SUR 1404-16	83.22
SUR 1101-13	83.22
SUL 1204-3	83.22
SKL 401-48	83.22
SKL 1501-65	83.22
SUL 601-25	83.22
SUR 201-31	82.86
SKL 505-68	82.86
SKL 504-67	82.86
SUL 201-31	82.86
SKL 501-49	82.860
SUR 1305-14	82.86
SKL 201-45	82.50
SKL 802-55	82.15

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	% การยับยั้ง
SKL 601-52	82.15
SUL 702-27	82.15
SKL 1402-64	82.15
SUL 1302-29	82.15
SUL 701-26	81.79
SKL 104-44	81.43
SUL 401-21	81.43
SKR 302-71	81.07
SUR 1601-17	81.07
SKL 702-56	81.07
SUL 403-23	81.07
SKL 103-43	81.07
SUR 1501-19	80.72
SKL 1301-62	80.72
SKL 1202-60	80.72
SUL 1603-4	80.72
SKR 403-75	80.36
SUR 1302-93	80.36
SUR 1502-20	80.36
SKL 202-46	80.36
SKR 309-70	80.36
SKR 201-73	79.64
SKR 701-80	79.64
SUL 1801-5	79.64
SUL 601-24	79.29
SKR 303-72	79.29
SUR 603-12	79.29

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	% การยับยั้ง
SUL 1902-8	79.29
SKL 1101-59	78.93
SUR 1602-18	78.57
SKL 801-54	78.57
SUL 1901-7	78.57
SKR 101-69	78.21
SUR 304-34	78.21
SUL 101-1	78.21
SKL 1302-63	77.86
SKR 1701-91	77.86
SKL 1203-61	77.86
SUR 801-38	77.50
SKL 101-41	77.50
SKR 801-81	77.50
SUR 1702-40	77.50
SUR 602-11	77.50
SKL 901-57	77.50
SUL 1205-92	77.50
SKR 1601-90	77.14
SUR 301-10	77.14
SKL 701-53	77.14
SKL 102-42	77.14
SKL 102-42	77.14
SKR 901-82	76.79
SKR 502-78	76.78
SUR 307-37	76.43
SKL 1004-58	76.43

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	% การยับยั้ง
SKR 1301-86	76.43
SUR 306-36	76.07
SUR 305-35	76.07
SKR 404-76	75.72
SKR 501-77	75.71
SUR 303-33	75.36
SUR 103-9	75.36
SKR 1001-83	75.36
SUR 302-32	75.00
SUR 1401-15	74.65
SKR 402-74	74.29
SKR 1501-89	73.57
SUR 1701-39	71.79
SUL 103-2	71.79
SKR 1402-88	70.36

ตารางภาคผนวกที่ 3 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ที่แยกจากเนื้อไม้ยางพันธุ์ปลูกดั้งเดิม และพันธุ์ RRIM 600 ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อ *Phytophthora bothyosa* โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA

ไอโซเลท	% การยับยั้ง
SUR 1305-14	85.71
SUR 1101-13	85.00
SUR 1404-16	84.64
SKL 503-51	84.64
SUR 303-33	84.28
SUL 1603-4	83.57
SUL 1205-92	83.23
SKL 1004-58	83.21
SKL 504-67	82.56
SKL 1601-66	82.56
SKL 802-55	82.86
SUR 1602-18	82.50
SUL 1501-30	82.50
SKR 303-72	82.50
SKL 1101-59	82.50
SKL 505-68	82.50
SUR 603-12	82.14
SUL 1204-3	82.14
SKR 404-76	82.14
SUR 301-10	82.10
SKL 401-48	81.78
SKL 502-50	81.78
SUL 403-23	81.78
SUL 1802-6	81.78

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลท	% การยับยั้ง
SUR 602-11	81.78
SKL 101-41	81.78
SKR 701-80	81.43
SKR 1001-83	81.43
SKR 302-71	81.43
SKL 901-57	81.43
SUL 401-21	81.43
SUL 103-2	81.43
SUL 101-1	81.43
SUR 1302-93	81.42
SKL 1302-63	81.07
SKR 502-78	81.07
SKR 201-73	80.71
SKR 501-77	80.71
SUR 801-38	80.71
SUR 1601-17	80.71
SUL 201-31	80.71
SUR 1701-39	80.71
SKL 102-42	80.35
SKL 1301-62	80.35
SKL 102-42	80.35
SUL 601-25	80.35
SUL 1902-8	80.35
SUL 1801-5	80.35
SKR 1501-89	80.00
SUR 201-31	80.00

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลท	% การยับยั้ง
SKL 702-56	80.00
SKL 301-47	80.00
SUL 1301-28	80.00
SUL 402-22	80.00
SUR 304-34	79.64
SKL 701-53	79.64
SKL 601-52	79.64
SKL 501-49	79.64
SKR 601-79	79.28
SUR 1501-19	79.28
SUL 1302-29	79.28
SUL 1901-7	79.28
SKR 502-78	78.92
SUR 302-32	78.92
SUR 103-9	78.92
SKR 901-82	78.92
SUR 1702-40	78.92
SKL 801-54	78.92
SUL 701-26	78.57
SKR 1701-91	78.57
SKR 309-70	78.570
SUR 306-36	78.57
SUR 307-37	78.57
SKL 1203-61	78.57
SKL 1202-60	78.57
SKL 201-45	78.57

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

ไอโซเลท	% การยับยั้ง
SKR 801-81	78.21
SKR 101-69	78.21
SUR 1502-20	78.21
SKL 103-43	78.21
SKL 1402-64	78.21
SKL 202-46	77.14
SKR 1301-86	77.14
SKL 1501-65	77.14
SUL 702-27	77.14
SUR 1401-15	76.42
SKR 403-75	76.07
SKR 403-75	76.07
SUL 601-24	76.07
SUR 305-35	75.35
SKR 402-74	74.64
SKR 1601-90	74.28
SKR 1402-88	72.14
SKL 104-44	72.14

ภาคผนวก ง

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าเฉลี่ยขนาดวงใสของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC agar

ไอโซเลท *Trichoderma* spp.	ขนาดวงใส (มม.)
SKL 503-51	24.25
SUL 702-27	24
SUL 1302-29	24
SKL 401-48	24
SKL 505-68	24
SUR 1101-13	23.25
SUL 1902-8	23
SUR 103-9	23
SUL 1301-28	23
SUL 1501-30	23
SUR 201-31	23
SKL 601-52	23
SKL 802-55	23
SKL 702-56	23
SKL 1004-58	23
SKR 309-70	23
SKR 201-73	23
SKR 1401-87	23
SKR 1402-88	23
SUL 1205-92	23
SUL 101-1	22.75
SUR 1305-14	22.75
SUR 303-33	22.5

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลท *Trichoderma* spp.	ขนาดวงใส (มม.)
SUR 305-35	22.25
SUL 103-2	22
SUL 1204-3	22
SUL 1603-4	22
SUL 1802-6	22
SUL 1901-7	22
SUR 301-10	22
SUR 602-11	22
SUR 603-12	22
SUR 1401-15	22
SUR 1404-16	22
SUR 1601-17	22
SUR 1602-18	22
SUR 1501-19	22
SUR 1502-20	22
SUL 401-21	22
SUL 4O2-22	22
SUL 403-23	22
SUL 601-24	22
SUL 601-25	22
SUL 702-26	22
SUR 302-32	22
SUR 304-34	22
SUR 306-36	22
SUR 306-36	22

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลท *Trichoderma* spp.	ขนาดวงใส (มม.)
SUR 307-37	22
SUR 801-38	22
SUR 1701-39	22
SKL 101-41	22
SKL 102-42	22
SKL 103-43	22
SKL 104-44	22
SKL 201-45	22
SKL 202-46	22
SKL 301-47	22
SKL 501-49	22
SKL 502-50	22
SKL 701-53	22
SKL 801-54	22
SKL 901-57	22
SKL 1101-59	22
SKL 1202-60	22
SKL 1203-61	22
SKL 1301-62	22
SKL 1302-63	22
SKL 1402-64	22
SKL 1501-65	22
SKL 1601-66	22
SKL 504-67	22
SKR 101-69	22

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

ไอโซเลท *Trichoderma* spp.	ขนาดวงใส (มม.)
SKR 302-71	22
SKR 303-72	22
SKR 402-74	22
SKR 403-75	22
SKR 404-76	22
SKR 501-77	22
SKR 601-79	22
SKR 701-80	22
SKR 801-81	22
SKR 901-82	22
SKR 1001-83	22
SKR 1101-84	22
SKR 1201-85	22
SKR 1301-86	22
SKR 1501-89	22
SKR 1601-90	22
SKR 1701-91	22
SUR 1302-93	22
SUL 1801-5	21.5
SUR 1702-40	21
SKR 502-78	21

ภาคผนวก จ

การจัดเรียงลำดับเบส DNA ของส่วน ITS ของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* spp. เปรียบเทียบกับลำดับเบส DNA จาก GenBank ของ National Center for Biotechology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

ลำดับเบสของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SUL 1501-30 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *T. asperellum* (KF804097 639 bp) ซึ่งมีความเหมือน 97 เปอร์เซ็นต์

CTGTTACCGACGGAGGAATATCANTGAGCGGAGGAAAACCNGACCCTTGTGAACGTT
ACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCACCCCAGAACCAGG
CGCCCGCCGGAGGAACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCACCTCGCGGAAGTATTTCTT
TACAGCTCTGAGAAAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGAGAGAA
TGCCTGTCCAAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGAGGATCGGCGTTAGGG
ATCCGGAACCCTCACCACCGGTGCCAGCCCCTTAATACATGGGGGGGGTGCCTGAGC
CTCTCCTGCGAAGGAATTGGGCAACTACCCCCCGGAGCCAGGAGCTTTGGTAATCCT
TAAAATAACCTTGGTTCTTGAAAAACTGGGCCTAGATCCGTCGGATTTCCCGCCTAAA
GTTAAGTTTTTAAAAAATTTGAGGTAAAAA

ลำดับเบสของเชื้อราเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. ไอโซเลท ไอโซเลท SUR 1305-14 ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อ *T. harzianum* (HF 569183 681 bp.) ซึ่งมีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์

CCTTTTATCAGAGAAAAAGGACATTACCGAGTTTCAACTCCCAAACCCAATGTGAAC
ATACCAAACTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCCAAGTGCTTCGCAGCCCCGGAACC
AGGCACCCGCCGGATGGACCTACCAAACTCTTTCTGTAGTCACCTCGCGGACATTATT
TCTTACAACTCTGAGCAAAAATTCAAAATGTATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTT
GGTTATGACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATACAATAAATAATGCGAATTACTGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGTACGCACATTGCTCCCGCCAGTATTCTGGCGGGC
ATGCCTGTCCGAACGTCTTTTCTACCCTCGAACCCTCCGGAGAGTCGGCGTTGATGGA
TCGCCGAACCCCTAATACGGAACCCGGTGCCTAAATACATTGGCGGGCTCCCGCATC
CTCTCCTGCGAAGTAGTTTGGCAAGTCCCCCCGAAGCACGGGGGCTGCCACGTCCCA
AAATAAACCTAGTTCTGAAAAATTGGCTCTGATCCCGGCCGGAGTACCCCCTGGAAC
TTTAACTTTTTAATAATTTGAGGTAA