รายงานเรื่องเต็มผลการทดลองสิ้นสุดปีงบประมาณ 2556

1. แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาอารักขาพืช
2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี

   กิจกรรมที่ 2 การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช
3. ชื่อการทดลอง(ภาษาไทย) การคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) Selection of Endophytic fungi to Inhibit *Sclerotium rolfsii*

4. คณะผู้ดำเนินงาน

สุทธินี ลิขิตตระกูลรุ่ง[1/] ชนินทร ดวงสอาด[2/] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[2/] พรพิมล อธิปัญญาคม[2/]

5. บทคัดย่อ

การศึกษาการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* เพื่อต้องการให้ได้เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่สามารถควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งได้ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากส่วนใบ ราก และลำต้น ของพืชสมุนไพร 3 ชนิด คือ น้ำนมราชสีห์ ขิงป่า และสาบเสือ จากพื้นที่ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ สามารถแยกได้ทั้งหมด 91 ไอโซเลท แบ่งออกเป็น 13 กลุ่ม ได้แก่ *Colletotrichum* spp., *Eupenicillium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. Mycelia sterilia 1 - 9 คัดเลือกเชื้อราที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี dual culture จากจำนวน 20 ไอโซเลท สามารถคัดเลือกได้ 5 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อราเอนโดไฟต์ Mycelia sterile 3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 68.56% รองลงมาคือ *Eupenicillium* spp. No. 01 (63.56%), *Eupenicillium* spp. No. 03 (62.14%), *Eupenicillium* spp. No. 02 (60.35%) และ *Eupenicillium* spp. No. 05 (54.99%) ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน แต่แตกต่างจากเชื้อราอีก 15 ไอโซเลท ซึ่งมีการยับยั้งอยู่ในช่วง 0 - 17.85% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% นำเชื้อราที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการมาทดสอบในสภาพโรงเรือน โดยแบ่งออกเป็นการแช่เมล็ดพริกในเชื้อราเอนโดไฟท์ก่อนทำการปลูกเชื้อสาเหตุ และการใช้เชื้อราเอนโดไฟท์ราดลงบนดินหลังการปลูกเชื้อสาเหตุ จากการทดลองพบว่าพบว่าการแช่ด้วยเชื้อรา *Eupenicillium* spp. No. 03 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 2.73 *Eupenicillium* spp. No. 05 (2.93), *Eupenicillium* spp. No. 02 (2.98), *Eupenicillium* spp. No. 01 (3.00), Mycelia sterilia 3 (3.03) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (3.03) มีความรุนแรงของโรคต่ำสุดจนถึงสูงสุดตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ส่วนการทดสอบโดยการราดดินพบว่าการราดด้วยเชื้อรา *Eupenicillium* spp. No. 05 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 2.18 *Eupenicillium* spp. No. 02 (2.20), *Eupenicillium* spp. No. 03 (2.28), *Eupenicillium* spp. No. 01 (2.35), Mycelia sterilia 3 (2.38) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (2.45) มีความรุนแรงของโรคต่ำสุดจนถึงสูงสุดตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

6. คำนำ

Sclerotium rolfsii Sacc. เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน (soilborne) เป็นสาเหตุโรคเน่าระดับดิน (damping off) ของกล้าพืช และโรครากเน่าและโคนเน่าของพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ โรคลำต้นเน่าของถั่วลิสง โคนเน่าของมะเขือเทศ โคนเน่าของพริก เน่าคอดินของฝ้าย เน่าระดับดินของถั่วฝักยาว เน่าแห้งของกล้วยไม้ รากเน่าของเยอบีร่า ลำต้นเน่าของทานตะวัน หัวและรากเน่าของหอม กระเทียม และต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์ Aycock, (1966) รายงานถึงความเสียหายของผลผลิตถั่วลิสงที่ปลูกในพื้นที่ราบทางตอนใต้ของรัฐ North Carolina ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1959 ว่ามีความเสียหาย 1-60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นมูลค่า10-20 ล้านดอลลาร์ และปัจจุบันปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfsii* ยังคงเป็นปัญหาที่รุนแรงและสำคัญในเขตภาคเหนือตอนบน สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรากันอย่างแพร่หลาย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพืช อย่างไรก็ดีการใช้สารเคมีที่ไม่จำเพาะต่อเชื้อสาเหตุ ทำให้การป้องกันหรือกำจัดไม่มีประสิทธิภาพอย่างเต็มที่ ส่งผลต่อการใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินความจำเป็น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตที่เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังทำลายสภาพแวดล้อมรวมไปถึงสุขภาพของมนุษย์และสัตว์อีกด้วย (Chutima, 2008)

เชื้อราสกุล *Sclerotium* จัดอยู่ใน Form-Class Hyphomycetes (Hyphales) Form-Order Agonomycetales (Mycelia Sterilia) Form-Family Agonomycetaceae มีหลายชนิด (species) เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของพืช เช่น *Sclerotium cepivorum S. rolfsii S. tuliparum S. delphinii* และ *S. wakkeri* เป็นต้น (Von,1981)

S. rolfsii เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน (soilborne) เป็นสาเหตุโรคเน่าระดับดิน (damping off) ของกล้าพืช และโรครากเน่าและโคนเน่าของพืช มีพืชอาศัยมากกว่า 500 ชนิด Farr *et. al*.(1989) รายงานว่ามีพืชมากกว่า 270 สกุล ในประเทศสหรัฐอเมริกาที่เป็นพืชอาศัยของ *S. rolfsii* พืชที่อ่อนแอต่อเชื้อรา *S. rolfsii* เช่น มันเทศ (Sweet potato) ฟักทอง (Pumpkin) ข้าวโพด (Corn) ข้าวฟ่าง (Wheat) ถั่วลิสง (Peanut) นาซีซัส (Narcissus) ไอริส (Iris) ลิเลี่ยม (Lilium) บานชื่น (Zinnia) และ เบญจมาศ (Chrysanthemum) เป็นต้น

ลักษณะของรา *S. rolfsii* คือ สร้างเส้นใยสีขาวหรือสีอ่อน มี clamp connection เจริญได้รวดเร็ว และสร้าง sclerotium มีลักษณะเป็นเม็ดกลม สีน้ำตาล ประกอบด้วยเส้นใยอัดตัวกันเป็นชั้นหลายชั้น และเป็นเนื้อเยื่อแบบ pseudoparenchyma ปัจจุบันพบ perfect state จัดอยู่ใน subdivision Basidiomycotina คือ รา *Athelia rolfsii* (Barnett ,1987 ; วิจัย, 2546)

สำหรับในประเทศไทยรา *S. rolfsii* เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ โรคลำต้นเน่าของถั่วลิสง โคนเน่าของมะเขือเทศ โคนเน่าของพริก เน่าคอดินของฝ้าย เน่าระดับดินของถั่วฝักยาว เน่าแห้งของกล้วยไม้ รากเน่าของเยอบีร่า ลำต้นเน่าของทานตะวัน หัวและรากเน่าของหอม กระเทียม และต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์ (สุณีรัตน์, 2551)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาอย่างมากในการนำเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ มาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งสามารถเพิ่มความแข็งแรง ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชได้ดี (Belanger,1996) Suslow (1982) รายงานว่าจุลินทรีย์ควบคุมโรคสามารถใช้แทนการใช้สารเคมีในกรณีที่ไม่สามารถใช้สารเคมีหรือมี

สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อีกทั้งจุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณและคงทนอยู่ในดินในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าสารเคมี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) ได้มีผู้ให้คำจำกัดความของคำนี้แตกต่างกัน แต่อาจสรุปโดยรวมได้ว่าหมายถึง การลดปริมาณเชื้อสาเหตุของโรคหรือลดกิจกรรมการก่อให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุของโรคหรือปรสิตที่อยู่ในระยะที่มีปฏิกิริยา โดยการใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่ามาใช้ในการควบคุม และอาจรวมถึงการใช้สารพันธุกรรม (gene หรือ gene product) จากสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ไม่รวมถึงมนุษย์ (Cook and Baker, 1983; Cook, 1985)

Chanway (1998) กล่าวถึงเชื้อราเอ็นโดไฟท์ว่า คือเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในพืช โดยไม่ทำให้พืชเกิดโรค และมีความสัมพันธ์แบบ mutualistic sysmbiosis เชื้อราเอ็นโดไฟท์บางชนิดสร้างสารประกอบบางอย่างหรือปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ระหว่างเชื้อรากับพืชอาศัย ทำให้เนื้อเยื่อพืชลดความดึงดูดต่อพวก herbivores และบางสายพันธุ์กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในทางกลับกันเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ได้รับประโยชน์จากพืชโดยอาศัยสารต่างๆจากพืช และดำรงชีวิตอยู่ภายในต้นพืช นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราเอ็นโดไฟท์ บางสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ และสามารถใช้เป็น biological control agents โดยเป็นปฏิปักษ์ต่อ microbial pathogens หรือกระตุ้นให้เกิดความต้านทางแบบ systemic ได้

Clay (1989) ได้รายงานว่า การทดลองในโรงเรือนนั้นเอนโดไฟท์ยังช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ด และความแข็งแรงของต้นกล้าด้วย

ในการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ต้องอาศัยความรู้ทางด้านชีวเคมี ทราบลักษณะและคุณสมบัติทางกายภาพของพืช ประกอบการมีเทคนิคและวิธีการสุ่มตัวอย่างที่ดี จึงจะทำการแยกได้ชนิดและจำนวนตามความต้องการ นอกจากนี้เชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่แยกได้ส่วนมากจะไม่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เพราะการจะเกิดโรคได้นั้นต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัย เชื้อสาเหตุ และสภาพแวดล้อม (Sinclair, 1991)

Umali *et al* (1999) กล่าวว่า เวลาที่ใช้ในการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการฆ่าเชื้อที่ผิวยิ่งนานจะทำให้ใบยิ่งซีดจางจนเนื้อเยื่อตายและทำให้ได้เชื้อราจำนวนน้อย

Baker and Cook (1974) ได้กล่าวไว้ว่า จุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์ต่อต้านนั้นจะมีกลไกการเข้าทำลาย 3 ขบวนการ คือ การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขันซึ่งกันและกัน และการเป็นปรสิตกับอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งในการทดลองในห้องปฏิบัติการอาจให้ผลที่แตกต่างไปจากในสภาพโรงเรือนได้

Gasoni *et al.* (1993) ศึกษาและแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ (nonpathogenic sterile fungus) จาก alfalfa และ alfalfa soil เพื่อใช้ในการควบคุมโรค damping off ของต้น flax ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบว่าสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุของโรคได้ดี เมื่อทำการปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ก่อนการปลูกเพื่อให้พืชพัฒนา defense mechanism

พิภพ และคณะ (2544) แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 13 ชนิดจากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดใกล้เคียงได้เชื้อราเอ็นโดไฟท์ จำนวน 1206 ไอโซเลท โดยแยกได้จากดีปลี 395 จักค่าง 149 มะกรูด 119 พญายอ 105 ทองพันชั่ง 88 มะแขว้งขม 82 ผักปลัง 49 ชาสตูล 45 คาวตอง 43 ลิ้นงูเห่า 41 เสลดพังพอน 27 ผักแปบ 22 ไอโซเลท พืชสมุนไพรที่มี colonization rate สูงได้แก่ ชาสตูล ผักแปบ และเสลดพังพอน และนำเชื้อรา

เอ็นโดไฟท์ ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum capcisi* สาเหตุโรคกุ้งแห้ง โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ Mycelia sterilia 9 ที่แยกได้จากมะกรูดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ 57 เปอร์เซ็นต์

จิตรา และคณะ (2550) ศึกษาและทำการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากพืชสมุนไพร 13 วงศ์ 15 ชนิด ได้จำนวน 210 ไอโซเลท ราที่พบมากที่สุดได้แก่ *Colletotrichum, Pestalotiopsis, Phyllosticta, Phoma* และ *Phomopsis* ตามลำดับ และนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่แยกได้จำนวน 7 ชนิดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 10 ชนิด พบว่า เชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์จำนวน 5 ไอโซเลท และรา *Pestalotiopsis* sp. 1ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *Alternaria alternata, Bipolaris maydis, Lasiodiplodia theobromae, Phytophthora palmivora* และ *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

Rafaeli *et al.* (2009) แยกและคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากสมุนไพร comfrey (*Symphytum officinale* L.) เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* สาเหตุโรคพืช ซึ่งนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์จำนวน 12 ไอโซเลทมาทำการทดสอบโดยวิธี dual cultute พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จำนวน 4 ไอโซเลท ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. sclerotiorum* ได้ 46.7 – 50.0 เปอร์เซ็นต์

Paul and Richard (2008) ให้ความเห็นว่า ในอนาคต การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีด้วยเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ และการใช้สารเคมีจะมีวิธีการใช้ที่ผสมผสานกัน เช่น การจำหน่ายเมล็ดพันธุ์เชิงการค้า จะมีการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ ร่วมกับการใช้สารเคมี เพื่อกระตุ้นประสิทธิภาพระหว่างสารและให้ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคแบบหลากหลาย biological agent จะกลายเป็นส่วนหนึ่งในระบบการผลิตพืช ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตพืชและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ พลั่วมือ ถุงพลาสติก มีดพร้า เสียม กรรไกรตัดแต่งกิ่ง
- วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ Haemacytometer
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บิกเกอร์ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ หลอดแก้วมีฝาเกลียว
- เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด มีด
- ผ้าขาวบาง กระดาษซับนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (อาจใช้กระดาษทิชชูหรือกระดาษกรอง)
- แผ่นพลาสติกสำหรับรองตัดส่วนต่างๆของพืช
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ sterio
- อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA), Rose Bengal Agar (RBA), Corn Meal Agar (CMA) และ Malt Extract Agar (MEA)
- สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรต์ และ เอธิลแอลกอฮอล์ 75%

- วัสดุปลูก กระถางพลาสติก ถุงเพาะกล้า
- ต้นสมุนไพรที่ปกติไม่มีอาการของโรค
- ต้นกล้าพริก

วิธีการทดลอง

1. การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช (sample selection)

เก็บตัวอย่างต้นพืชสมุนไพรได้แก่ น้ำนมราชสีห์ ขิงป่า สาบเสือ โดยเก็บต้นปกติที่ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและไม่มีอาการของโรค ในเขต อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

1.2 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวส่วนต่างๆ ของต้นสมุนไพรด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อไม่ให้เชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อที่เจริญหรือติดบริเวณผิวของส่วนต่างๆเช่น ผิวใบ ซึ่งต้องทดสอบในพืชสมุนไพรทุกชนิดที่ทำการเก็บตัวอย่าง ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืชเพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ชิ้นส่วนใบ ลำต้น และรากของต้นสมุนไพรในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆกัน มีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างต้นสมุนไพรที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาด
2. ตัดต้นสมุนไพรแต่ละส่วนที่จะทำการแยกให้ได้ความยาวประมาณ 1 ซม.
3. นำผ้าขาวบางมาห่อชิ้นส่วนของพืชที่ตัดได้ จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที
4. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมด แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 1, 3 และ 5% ในเวลานานต่างๆกันคือ 1, 3 และ 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว
5. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว
6. นำชิ้นส่วนของพืชวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ RBA (Rose Bengal Agar) โดยแต่ละจานอาหารวาง 5 ตำแหน่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง
7. ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากแต่ละชิ้นส่วนของพืช วิเคราะห์ผลของการเจริญของเชื้อราที่เวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่างๆกัน

1.3 การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ (isolation)

นำตัวอย่างพืชผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 1.2 ตามความเข้มข้นที่ผ่านการทดสอบ ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของแต่ละชิ้นพืช แยกเชื้อราที่ได้ไปทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเก็บใน PDA slant เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

1.4 การตรวจสอบและจำแนกกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ เพื่อจำแนกกลุ่มของเชื้อรา

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

2.1 การทดสอบในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรมาทดสอบประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* อย่างน้อย 20 ไอโซเลท ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture โดยเริ่มวางเชื้อเพื่อทดสอบ ณ วันที่เชื้อมีอัตราการเจริญเท่ากัน วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ 21 กรรมวิธี บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตบันทึกผลการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุด้านที่ติดกับเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ในชุดทดสอบ และวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยังยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG)

$$PIRG = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในจานชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในจานชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้ง (ประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์) ดังนี้ (เกษม, 2532)

>75%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
61 – 75 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51 – 60 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
< 50%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

2.2 การทดสอบในโรงเรือน

2.2.1 การศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการงอกของเมล็ดพริก

นำเมล็ดพริกขี้หนูที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วแช่ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์จำนวน 5 ไอโซเลท และในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นผึ่งให้แห้งในสภาพอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเพาะในกระบะเพาะเมล็ดเป็นเวลา 20 วันบันทึกผลโดยหาเปอร์เซ็นต์ความงอก วัดความยาวของต้น ราก และน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 01

กรรมวิธีที่ 2 เชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 02

กรรมวิธีที่ 3 เชื้อราเอนโดไฟท์ Mycelia sterilia 3

กรรมวิธีที่ 4 เชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 03

กรรมวิธีที่ 5 เชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 05

กรรมวิธีที่ 6 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในโรงเรือน

2.2.2.1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยการแช่เมล็ด

นำเมล็ดพริกขี้หนูที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาแช่ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ และน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปเพาะในกระบะเพาะในวัสดุปลูกที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากเพาะกล้า 20 วัน จึงทำการย้ายปลูก หลังจากย้ายปลูก 15 วัน ทำการปลูกเชื้อ *S. rolfsii* (Shokes *et al*., 1996) ใช้ถุงพลาสติกคลุม 2 วัน เพื่อรักษาความชื้น ประเมินความรุนแรงของโรคโดยให้คะแนน 5 ระดับ ทุก 3, 5, 7, 11 และ 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 01

กรรมวิธีที่ 2 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 02

กรรมวิธีที่ 3 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ Mycelia sterilia 3

กรรมวิธีที่ 4 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 03

กรรมวิธีที่ 5 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 05

กรรมวิธีที่ 6 แช่ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

2.2.2.2 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยการราดดิน

นำเมล็ดพริกขี้หนูที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วนำไปเพาะในกระบะเพาะในวัสดุปลูกที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากเพาะกล้า 20 วัน จึงทำการย้ายปลูก หลังจากย้ายปลูก 15 วัน ทำการปลูกเชื้อ *S. rolfsii* (Shokes *et al*., 1996) จากนั้น 1 วัน ทำการราดดินด้วยบริเวณโคนต้นพริกด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้ถุงพลาสติกคลุม 2 วัน เพื่อรักษาวามชื้น ประเมินความรุนแรงของโรคโดยให้คะแนน 5 ระดับ ทุก 3, 5, 7, 11 และ 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 01

กรรมวิธีที่ 2 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 02

กรรมวิธีที่ 3 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ Mycelia sterilia 3

กรรมวิธีที่ 4 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 03

กรรมวิธีที่ 5 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 05

กรรมวิธีที่ 6 ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

การประเมินความรุนแรงของโรค

ใช้เกณฑ์การประเมินของ Shokes *et al.* (1996) โดยแบ่งความรุนแรงขงโรคเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1	ต้นปกติ
ระดับ 2	เกิดแผลที่โคนต้นอย่างเดียว
ระดับ 3	แสดงอาการเหี่ยว 25%
ระดับ 4	แสดงอาการเหี่ยว 26 – 50%
ระดับ 5	แสดงอาการเหี่ยวมากกว่า 50%

นำผลการประเมินที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลาย ตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

8. ระยะเวลา

ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2556

9. สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และห้องปฏิบัติการคลินิกพืช กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

10. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างต้นพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ น้ำนมราชสีห์ ขิงป่า สาบเสือ โดยเก็บต้นปกติที่ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและไม่มีอาการของโรค ในเขต อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

1.2 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว

ได้ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับฆ่าเชื้อส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก ของพืชทั้ง 3 ชนิด คือ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1% เป็นเวลา 3 นาที ดังที่ Umali *et al* (1999) กล่าวว่า เวลาที่ใช้ในการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรต์ยิ่งนานจะทำให้ใบยิ่งซีดจางจนเนื้อเยื่อตายและทำให้ได้เชื้อราจำนวนน้อย

1.3 การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ 91 ไอโซเลท ในต้นน้ำนมราชสีห์พบมากที่สุดในส่วนลำต้น 11 ไอโซเลท ขิงป่าพบมากที่สุดในส่วนราก 17 ไอโซเลท และต้นสาบเสือพบมากที่สุดในส่วนราก 28 ไอโซเลท

1.4 การตรวจสอบและจำแนกกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่างขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกกลุ่มของเชื้อราได้ 13 กลุ่ม ได้แก่ *Colletotrichum* spp., *Eupenicillium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. Mycelia sterilia 1- 9 โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ที่พบมากที่สุดได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. รองลงมาได้แก่ *Eupenicillium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. และ Mycelia sterilia ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่แยกได้ส่วนมากจะไม่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เพราะการจะเกิดโรคได้นั้นต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัย เชื้อสาเหตุ และสภาพแวดล้อม (Sinclair, 1991)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

2.1 การทดสอบในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรมาทดสอบประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture จำนวน 20 ไอโซเลท ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราในแต่ละกลุ่ม วัดผลการเจริญของเชื้อ

รา *S. rolfsii* ที่ 1,3, 5 และ 7 วัน วัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง และนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ Mycelia sterile 3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 68.56% รองลงมาคือ *Eupenicillium* spp. No. 01(63.56%), *Eupenicillium* spp. No. 03 (62.14%), *Eupenicillium* spp. No. 02 (60.35%) และ *Eupenicillium* spp. No. 05(54.99%) ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน แต่แตกต่างจากเชื้อราอีก 15 ไอโซเลท ซึ่งมีการยับยั้งอยู่ในช่วง 0 - 17.85% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกมามีรูปแบบในการยับยั้งการเจริญ 3 รูปแบบ คือ เชื้อราเอนโดไฟท์เจริญชนกับเชื้อราสาเหตุ เชื้อราเอนโดไฟท์เจริญคลุมเชื้อสาเหตุ และการเจริญแบบต้านกันไว้ (เกิด clear zone) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Baker and Cook (1974) ได้กล่าวไว้ว่า จุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์ต่อต้านนั้นจะมีกลไกการเข้าทำลาย 3 ขบวนการ คือ การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขันซึ่งกันและกัน และการเป็นปรสิตกับอีกชนิดหนึ่ง

2.2 การทดสอบในโรงเรือน

2.2.1 การศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการงอกของเมล็ดพริก

การหาเปอร์เซ็นต์ความงอกพบว่าการแช่ด้วยเชื้อรา Mycelia sterilia 3 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสูด 83.75% แต่ไม่แตกต่างจากทรีทเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

การวัดความยาวของต้น *Eupenicillium* spp. No. 03 มีความยาวของลำต้นมากที่สุด 13.84 ซม. มีความแตกต่างกับทรีทเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

การหาน้ำหนักสด พบว่าการแช่ด้วยเชื้อรา Mycelia sterilia 3 มีน้ำหนักสดสูงสุดไม่ต่างจากการแช่ด้วย *Eupenicillium* spp. No. 03 และน้ำกลั่นนึ่ง แต่แตกต่างจาก *Eupenicillium* spp. No. 05, *Eupenicillium* spp. No. 02 และ *Eupenicillium* spp. No. 01

การหาน้ำหนักแห้งพบว่การแช่ด้วยเชื้อรา Mycelia sterilia 3 มีน้ำหนักแห้งสูงสุดไม่ต่างจากการแช่ด้วย *Eupenicillium* spp. No. 03, *Eupenicillium* spp. No. 02 และ *Eupenicillium* spp. No. 05 แต่แตกต่างจาก *Eupenicillium* spp. No. 01 และน้ำกลั่นนึ่ง ซึ่งเชื้อราเอนโดไฟท์อาจช่วยส่งเสริมให้พืชมีความงอกดีขึ้น และต้นกล้ามีความแข็งแรงมากขึ้นสอดคล้องกับ ที่ Clay (1989) ได้ศึกษาไว้

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในโรงเรือน

2.2.2.1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยการแช่เมล็ด

หลังจากที่ปลูกเชื้อรา *S. rofsii* ลงไป พบว่า 3 วัน ต้นพริกเริ่มแสดงอาการของโรค วันที่ 5 อาการของโรคเริ่มรุนแรงขึ้น และวันที่ 7 พบอาการรุนแรงสูงสุด ต้นเหี่ยวตายและอาการของโรคเริ่มคงที่ เมื่อประเมินความรุนแรงของโรคแล้ว พบว่าการแช่ด้วยเชื้อรา *Eupenicillium* spp. No. 03 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 2.73 *Eupenicillium* spp. No. 05 (2.93), *Eupenicillium* spp. No. 02 (2.98), *Eupenicillium* spp. No. 01 (3.00), Mycelia sterilia 3 (3.03) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (3.03) มีความรุนแรงของโรคต่ำสุดจนถึงสูงสุดตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อดูในภาพรวมแล้วมีการเกิดโรคในระดับ 3 (แสดงอาการเหี่ยว 25%)

2.2.2.1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยการราดดิน

หลังจากที่ปลูกเชื้อรา *S. rofsii* ลงไป พบว่า 3 วัน ต้นพริกเริ่มแสดงอาการของโรค วันที่ 5 อาการของโรคเริ่มรุนแรงขึ้น และวันที่ 7 พบอาการรุนแรงสูงสุด ต้นเหี่ยวตาย และอาการของโรคคงที่ เมื่อประเมินความรุนแรงของ

โรคแล้ว พบว่าการราดด้วยเชื้อรา *Eupenicillium* spp. No. 05 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 2.18 *Eupenicillium* spp. No. 02 (2.20), *Eupenicillium* spp. No. 03 (2.28), *Eupenicillium* spp. No. 01 (2.35), Mycelia sterilia 3 (2.38) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (2.45) มีความรุนแรงของโรคต่ำสุดจนถึงสูงสุดตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อดูในภาพรวมแล้วมีการเกิดโรคในระดับ 2 (เกิดแผลที่โคนต้นอย่างเดียว)

จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ และในโรงเรือนให้ผลที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับสภาพที่อยู่ในการทดลองที่เอื้อต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุ ตามที่ Baker and Cook (1974) ได้กล่าวไว้ว่า ซึ่งในการทดลองในห้องปฏิบัติการอาจให้ผลที่แตกต่างไปจากในสภาพโรงเรือนได้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการดำเนินงานในการการคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* นั้น จากการทดสอบในสภาพโรงเรือน สามารถคัดเลือก ได้ 5 ไอโซเลท จากที่แยกได้ทั้งหมด 91 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคให้อยู่ในระดับความรุนแรงในระดับ ที่ 2 และ 3 แต่ผลอาจจะไม่แตกต่างจากชุดควบคุมมากนักซึ่งอาจเป็นผลมาจากวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุลงบนต้นพริก และช่วงที่ทำการทดลองนั้นเป็นช่วงที่มีฝนตกชุก ความชื้นสูง ซึ่งเป็นสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค แต่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งในการศึกษาในครั้งต่อไปอาจต้องมีการปรับปรุงในเรื่องของวิธีการปลูกเชื้อให้มีความเหมาะสมมากกว่านี้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

งานทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการนำเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ มาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งเชื้อราเอนโดไฟท์สามารถเพิ่มความแข็งแรง ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชได้ดี สามารถใช้แทนการใช้สารเคมีในกรณีที่ไม่สามารถใช้สารเคมีหรือมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และจุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณและคงทนอยู่ในดินในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าสารเคมี ซึ่งถือได้ว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้จุลินทรีย์แทนการใช้สารเคมี ซึ่งทางผู้วิจัยคาดหวังไว้ว่าข้อมูลที่ได้รับจะสามารถนำไปให้เกิดประโยชน์เพื่อนำไปขยายผลเพื่อทดสอบในระดับแปลงปลูกต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ เพื่อร่วมงานกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิตที่สละเวลา และให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 326 หน้า.

จิตรา เกาะแก้ว เลขา มาโนช จีรพันธ์ วรพงษ์ นิพนธ์ วิสารทานนท์ ณรงค์ สิงห์บุระอุดม อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ และวรวรรณ ปุณณะตระกูล. 2550. ราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (1): 571-578.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. จามจุรี โปรดักส์, กรุงเทพฯ. 351 หน้า

พิภพ ลำยอง. 2544. การควบคุมโรคกุ้งแห้งของพริก (*Colletotrichum* spp.) โดยใช้ endophytic microorganism ที่แยกได้จากสมุนไพรไทย (Control of anthracnose disease of chili peper (*Colletotrichum* spp.) by endophytic microorganism isolated from Thai medicinal plants). เชียงใหม่ : ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 55 หน้า.

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ พรพิมล อธิปัญญาคม และอภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2551. สำรวจ รวบรวม จำแนก และศึกษาพืชอาศัยของรา *Sclerotium spp.*สาเหตุโรคพืช. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

Aycock, R. 1966. Stem Rot and Other Diseases Caused by *Sclerotium rolfsii*. Tech. Bul. No. 174. North Carolina Agr. Exp. Sta. 202 pp.

Baker, K.F. and Cook, R.J. 1974. Biological Control of Plant Pathologens, W.H. Freeman and Company, USA. 433 p.

Barnett, H.L. and B. B. Hunter. 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Ed., The American Phytopathological Society,.Minnesota. 218 pp.

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

Clay, L. 1989. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as Biocontrol Agents. Mycological Research 92:1-12.

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

Cook, R.J. 1985. Biological control of plant pathogens: theory of application. Phytopathology 75: 25-29.

Cook, R.J. and Baker, K.F. 1983. The Nature of Practice of Biological of Plant Pathogens. The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota. 539 p.

Chutima Kuekulvong. 2008. Antifungal activity against *Sclerotium rolfsii* by antagonistic microorganisms isolated from soil and *Dendrobium* orchid. Ph.D. Mahidol University.

Farr, D.F., G.F. Bills, G.P. Chamuris, and A.Y. Rossman. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. American Phytopathological Society., St. Paul, Minnesota.

Gasoni, L., Stegman, D.G.B. and Fortugo, C. 1993. Suppression of damping-off causedby *Rhizoctonia solani* through a nonpathogenic sterile septate fungus. Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und

Pflanzenschutz 100: 467-473.

Paul, A., Backman and Richard, A., Sikora. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control (Online). Available : URL : http://www.worldcocoafoundation.org/scientific-research/research-library/documents/Backman2008D.pdf [2009 August 26]

Rafaeli Rocha, Daniela Eleuterio da Luz, Cibele Engels, Sonia Alvim Veiga Pileggi, David de Souza Jaccoud Filho, Rodrigo Rodrigues Matiello and Marcos Pileggi. 2009. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.). Brazilian Journal of Microbiology 40: 73-78.

Shokes, F.M., Rozalski, K., Gorbet, D.W., Brenneman, T.B. and Berger, D.A. 1996. Techniques for inoculation of peanut with *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse and field. Peanut Science 23:124-128.

Sinclair, J.B. 1991. Latent infection of soybean plants and seed by fungi. Plant Disease 75: 220-224.

Suslow, T.U. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. Phytopathogenic Prokaryotes 1: 187-223.

Taylor, J.E., Hyde, K.D. and Jones, E.B.G. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei,* within and outside its natural geographic range. New Phytopathologist 142: 335-346.

Umali, T.E., Quimio, T.H. and Hyde, K.D. 1999. Endophytic fungi in leaves of Bambusa tuldoides. Fungi Science 14:11-18.

Von ARX, J.A.. 1981. The Gennera of Fungi Sporulating in Pure Culture. 3rd Revised Ed., J. cramer, Kommandit Gesellschaft, Germany. 422 pp.