การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของวานิลา (*Vanilla pilifera* Holttum) โดยใช้เชื้อรา *Emericella nidulans*

Controlling Anthracnose of *Vanilla pilifera* Holttum using *Emericella nidulans*

จุฬาลักษณ์ ตลับนาค และ เกษม สร้อยทอง
Chulalak Talubnak and Kasem Soytong
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

การทดสอบศักยภาพในการต่อต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum gloeosporioides*) ของ *Vanilla pilifera* Holttum ด้วยเชื้อรา *Emericella nidulans* โดยการแยกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคจากใบวานิลาด้วยวิธี tissue transplanting technique ได้จำนวน 6 ไอโซเลท (ไอโซเลท VI1-VI6) และเมื่อนำไปทดสอบการเกิดโรคด้วยวิธี detached leaves พบว่า ไอโซเลท VI1 ทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุด ในการทดสอบศักยภาพของการต่อต้านเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท VI1 ด้วยเชื้อรา *E. nidulans* ที่แยกได้จากเศษซากใบของวานิลา ด้วยวิธีการทดสอบเลี้ยงเชื้อร่วมในอาหาร (Bi-culture) พบว่าเชื้อรา *E. nidulans* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุได้ 46.11% และ 89.45% ตามลำดับ และวิธีการทดสอบสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *E. nidulans* ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ hexane, ethyl acetate และ methanol พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จาก hexane ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลท VI1 ได้ โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 5,523 µg/ml และ 0.016 µg/ml ตามลำดับ

คำสำคัญ : *Vanilla pilifera*, anthracnose, *Emericella nidulans*, *Colletotrichum gloeosporioides*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The effect of *Emericella nidulans* against anthracnose disease of *Vanilla pilifera* Holttum caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) was investigated. Six isolates of *C. gloeosporioides* (VI1 - VI6) were obtained by tissue transplanting technique and all of them were proved for their pathogenicity. The results showed that the isolate VI1 gave the highest virulence for disease incidence. *Emericella nidulans* was isolated from fallen leaves of *V. pilifera* and tested against mycelial growth and spore production of *C. gloeosporioides* VI1 by bi-culture and bioactivity assay tests. Bi-culture test showed that *E. nidulans* could inhibit mycelial growth and spore production by 46.11% and 89.45%, respectively. Crude extracts were extracted from *E. nidulans* with hexane, ethyl acetate and methanol. Crude extract which was extracted by hexane gave the best mycelial growth inhibition and spore production at the concentration of 1,000 µg/ml and the effective doses (ED_{50}) were 5,523 µg/ml and 0.016 µg/ml, respectively.

Keywords : *Vanilla pilifera*, anthracnose, *Emericella nidulans*, *Colletotrichum gloeosporioides*

1. บทนำ

วานิลา (*Vanilla pilifera* Holttum) หรือ งด หรือ สามร้อยต่อใหญ่ [1] เป็นกล้วยไม้ป่าที่พบในแถบภาคใต้ของประเทศไทย ประเทศมาเลเซีย จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae ลำต้นเป็นเถาเลื้อย เป็นกล้วยไม้ชนิดเดียวที่สามารถนำฝักมาใช้ประโยชน์ได้ โดยนำมาหมักและบ่มให้เกิดกลิ่นหอมและรสชาติ แล้วนำฝักไปสกัดสาร ที่เรียกว่า วานิลิน (Vanillin: 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde) ใช้สำหรับปรุงแต่งกลิ่นและรสอาหาร เช่น ไอศกรีม ช็อคโกแลต เครื่องดื่ม ขนม นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมยา น้ำหอม และ เครื่องสำอางได้อีกด้วย ปัจจุบันประเทศไทยยังมีการนำเข้าผลิตภัณฑ์วานิลาและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการปลูกภายในประเทศมีปริมาณน้อย และยังไม่แพร่หลายเหมือนพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น จึงควรส่งเสริมการปลูกวานิลาให้มากขึ้น [2-4]

การปลูกวานิลามักจะพบปัญหาจากการเข้าทำลายของโรค โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) [5-6] มีรายงานว่าโรคนี้ทำความเสียหายรุนแรงในแปลงปลูกวานิลา โดยเข้าทำลายลำต้น ใบ ฝัก และ ราก บริเวณโคนต้น ทำให้ต้นเหี่ยว โรคนี้จะระบาดในช่วงฤดูฝน โดยเฉพาะในแปลงปลูกที่มีการระบายน้ำไม่ดี มีสภาพร่มเงามากเกินไป [7] ในการป้องกันกำจัดโรคโดยทั่วไปนิยมใช้สารเคมีกำจัด เช่น Benomyl [8] ซึ่งการใช้สารเคมี ในปริมาณมากมักก่อให้เกิดการสะสมสารพิษในสิ่งแวดล้อม จนอาจจะเป็นอันตรายต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งมีชีวิต [9] ดังนั้น ในการป้องกันกำจัดโรคพืชและหาวิธีการใช้สารเคมีให้น้อยที่สุด พบว่าในปัจจุบันมีนักวิจัยได้ศึกษา ทดลองนำเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซิส (actinomycetes) มาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชต่างๆ เช่น การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ควบคุมโรคแอนแทรคโนส และ โรคลำต้นเน่า (stem-end rot) ในมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *Botryosphaeria* spp. [10] การใช้แอคติโนมัยซิสต่อต้านเชื้อรา *Phytophthora fragariae* var. *rubi* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าของต้นราสเบอรี่ (raspberry root rot) [11] และการใช้เชื้อราในการควบคุมโรคพืช เช่น ใช้เชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *C. globosum* ต่อต้านเชื้อรา *Thielaviopsis paradoxa* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคตาเน่า (bud rot) ของปาล์มแชมเปญ (*Hyophorbe lagenicaulis* (L.H. Bailey) H.E. Moore) [12] โรครากเน่าโคนเน่าของส้มโชกุน [13] และมีรายงานว่าเชื้อรา *Chaetomium* spp. สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในพืชหลายชนิด เช่น ส้มเขียวหวาน ปาล์ม มะม่วง และ องุ่น [14-17] นอกจากนี้เคยมีผู้ใช้เชื้อรา *Emericella nidulans* strain EN ควบคุมโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* [18] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *E. nidulans* ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของวานิลาในห้องปฏิบัติการ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อสาเหตุโรค

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบวานิลา (*Vanilla pilifera* Holttum) ที่เป็นโรคแอนแทรคโนสจากพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี มาทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรค (*Colletotrichum gloeosporioides*) โดยวิธี tissue transplanting technique [6] ที่ห้องปฏิบัติการตึกเห็ดราวิทยา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2.2 ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

นำเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ทุกไอโซเลทที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีแล้วย้ายชิ้นวุ้นที่มีเชื้อสาเหตุโรควางบนใบวานิลาที่ทำแผลด้วยปลายเข็มหมุดลนไฟฆ่าเชื้อ จำนวน 4 ใบต่อไอโซเลท ใช้อาหาร PDA อย่างเดียวเป็นตัวควบคุม (control) เพื่อใช้เปรียบเทียบการทดลอง หลังจากนั้นนำใบวานิลาที่ปลูกเชื้อแล้ว (Inoculated leaves) บ่มในตู้ที่ควบคุมความชื้น (Moist chamber) วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ตรวจผลการทดลองหลังจากการปลูกเชื้อ โดยสังเกตการเกิดโรคบนแผล วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลที่ทำการปลูกเชื้อ เปรียบเทียบกับ control วิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ DMRT จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่ทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุดนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 ทดสอบด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบคือ เชื้อรา *Emericella nidulans* ที่แยกได้จากเศษซากใบวานิลา นำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* ไอโซเลทที่รุนแรงที่สุด โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนี ทั้งนี้ปฏิบัติเช่นเดียวกันกับจุลินทรีย์ต่อต้าน แล้วย้ายชิ้นวุ้นของจุลินทรีย์ต่อต้านและชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรควางบนอาหาร PDA ในลักษณะตรงกันข้ามให้มีระยะห่างพอประมาณ และทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อราสาเหตุโรคบน PDA คนละจานทดลอง เพื่อเป็นตัวควบคุม (control) สำหรับใช้เปรียบเทียบ และนำจานทดลองทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิห้อง (27-32 องศาเซลเซียส) วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคที่อายุ 10, 20 และ 30 วัน และนับจำนวนสปอร์ที่อายุ 30 วัน และคำนวณหาเปอร์เซนต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth inhibition, GI) โดยใช้สูตร GI=(R1-R2)/R1 x 100 เมื่อ R1 = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคของ control R2 = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคของจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

2.3.2 ทดสอบโดยใช้สารสกัดจากจุลินทรีย์ต่อต้าน

เลี้ยงจุลินทรีย์ต่อต้าน *E. nidulans* ในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (27-32 องศาเซลเซียส) และกรองเก็บเฉพาะเส้นใยเชื้อรา ทำให้แห้งและนำไปแช่ในตัวทำละลาย Hexane เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดกรองแยกกากออก นำกากที่แยกได้แช่ใน Ethyl acetate และ Methanol ตามลำดับ ส่วนของสารละลายที่ได้นำไประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) แล้วนำสารที่ได้ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรค *C. gloeosporioides*

การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบ โดยทำการทดลองแบบ complete randomized design (CRD) กำหนดจำนวน 6 สิ่งทดลอง 4 ซ้ำ ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ ดังนี้ 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml ละลายด้วย 2% Dimethylsulfoxide (DMSO) ผสมในอาหาร PDA ตามลำดับ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นนำ cork borer เจาะขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน และนำไปวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมกับสารสกัดหยาบในแต่ละความเข้มข้นที่เตรียมไว้ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (27-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค แล้วนำมาคำนวณหาค่า Effective Dose (ED_{50}) เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุ วิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ DMRT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อสาเหตุโรค

จากการเก็บตัวอย่างใบวานิลาที่เป็นโรคแอนแทรคโนส และนำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรค ได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท คือ VI1, VI2, VI3, VI4, VI5 และ VI6 ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ลักษณะของโคโลนีเป็นเส้นใยหยาบปานกลางจนถึงละเอียดคล้ายกำมะหยี่ บางไอโซเลทฟู สีขาวจนถึงสีเทา การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ค่อนข้างเร็ว บางไอโซเลทมีการสร้าง setae และ sclerotia บางไอโซเลทสร้าง setae หรือ sclerotia อย่างใดอย่างหนึ่งบางไอโซเลทมีการสร้าง spore mass สีส้ม ดำ conidia มีรูปร่างคล้ายแคปซูล หัวท้ายมน (cylindrical) ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ขนาดประมาณ 3.4-4.6 x 9.8-15.1 ไมโครเมตร (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 อาการของโรคและลักษณะของเชื้อสาเหตุ
a) แสดงใบวานิลาที่เป็นโรคแอนแทรกโนส
b) ลักษณะโคโลนี *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร PDA อายุ 10 วัน
c) ลักษณะ conidia *Colletotrichum gloeosporioides* ที่กำลังขยาย 40x

3.2 ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

จากการทดสอบการเกิดโรคของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่า ไอโซเลท VI1 มีความสามารถทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุด ทำให้แผลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 13 มิลลิเมตร และแผลมีขนาดใหญ่ที่สุด (ตารางที่ 1 รูปที่ 2)

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในห้องปฏิบัติการ

3.3.1 ทดสอบด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสโดยใช้ *E. nidulans* พบว่า เชื้อนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* VI1 ได้ 46.11% และ 89.45% ตามลำดับ (รูปที่ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 ทดสอบโดยใช้สารสกัดหยาบจากจุลินทรีย์ต่อต้าน

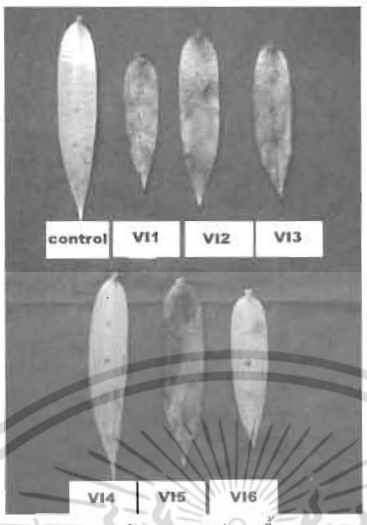
จากการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบ *E. nidulans* ที่สกัดด้วย hexane, methanol และ ethyl acetate สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml เท่ากับ 97.32, 94.13 และ 70% ตามลำดับ โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.016, 0.06 และ 101.75 µg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารที่สกัดด้วย methanol ระดับความเข้มข้น 100 และ 500 µg/ml ให้ผลยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ดีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ระดับความเข้มข้น 1,000 µg/ml (ตารางที่ 2) ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย methanol, ethyl acetate และ hexane สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml ซึ่งเท่ากับ 43, 34.5 และ 22.5% ตามลำดับ และมีค่า ED_{50} คือ 3280, 1855 และ 5523 µg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ รูปที่ 4) แม้จะพบว่าสารสกัดหยาบด้วย hexane ในระดับความเข้มข้น 500 µg/ml ให้ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ดีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับที่ระดับความเข้มข้น 1,000 µg/ml (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* ทั้ง 6 ไอโซเลท

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางแผล (มม.)
VI1	13.00a[1]
VI2	8.75b
VI3	9.75b
VI4	5.25c
VI5	9.25b
VI6	5.25c
Control	5.00c
CV. (%)	10.77

[1]ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P \leq 0.01$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 การเกิดโรคบนใบ *Vanilla pilifera* หลังจากการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นเวลา 15 วัน

รูปที่ 3 การเจริญเติบโตของ *Emericella nidulans* ร่วมกับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ไอโซเลท VI1 ที่อายุ 30 วัน

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก *Emericella nidulans* ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ไอโซเลท VI1

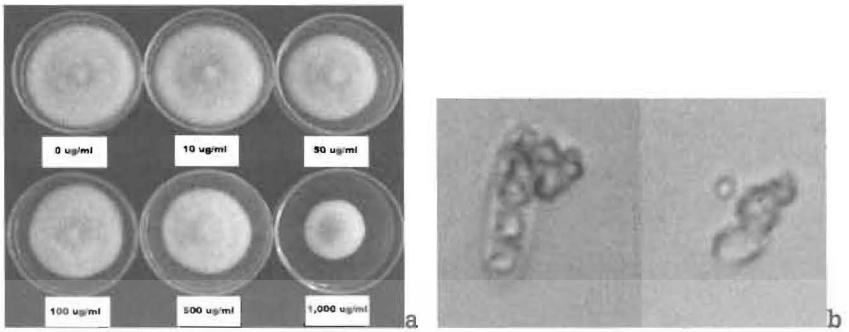
Concentration	Hexane		Ethyl acetate		Methanol	
(µg/ml)	% MGI[1/]	% SP[2/]	% MGI	% SP	% MGI	% SP
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
10	3.50d[3/]	87.19c	5.50d	26.28c	1.50d	85.42b
50	9.00c	92.89b	7.50cd	35.37bc	16.00c	85.07b
100	15.50b	96.01ab	13.00c	41.59bc	18.50c	90.72a
500	20.00a	96.14ab	28.00b	51.99ab	23.50b	92.23a
1,000	22.50a	97.32a	34.50a	70.00a	43.00a	94.13a
CV. (%)	11.13	1.85	15.22	24.28	7.66	2.63

[1/] MGI = mycelial growth inhibition

[2/] SP = spore production

[3/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P \leq 0.01$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ไอโซเลท VI1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Emericella nidulans* ที่สกัดด้วย methanol (a) และลักษณะของ conidia ที่ผิดปกติ ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml (b)

จากการเก็บตัวอย่างใบวานิลา (*Vanilla pilifera*) ที่เป็นโรคแอนแทรคโนสและนำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Divakaran และคณะ [5] และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้าน โดยการทดสอบด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม พบว่าเชื้อรา *Emericella nidulans* มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* VI1 และการทดสอบโดยใช้สารสกัดหยาบจากเชื้อรา *E. nidulans* พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sibounnavong และคณะ [18] ที่ใช้ bioactive compound จากเชื้อรา *E. nidulans* strain EN ยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ได้ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml และมีค่า ED_{50} เท่ากับ 211 µg/ml

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของ *Vanilla pilifera* ด้วยเชื้อรา *E. nidulans* โดยวิธีเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม และ วิธีใช้สารสกัดหยาบ แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดหยาบจากเชื้อรา *E. nidulans* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* VI1 ได้ดีกว่าวิธีการเลี้ยงเชื้อบนอาหารร่วม ดังนั้นควรมีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการนำสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสามารถป้องกันกำจัดโรคพืช ต่อไปและพัฒนา เพื่อจะได้นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณทัศนารถ กระจ่างวุฒิ และเจ้าหน้าที่ประจำพระตำหนักสวนปทุม จังหวัดปทุมธานี ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] เต็ม สมิตินันทน์. "ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย". พิมพ์ครั้งที่ 2, ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ, 2544.

[2] ธารทิพย์ เพชระบูรณิน. "ผลของอาหารเพาะเลี้ยงต่อการพัฒนาตาข้างของวานิลลา (*Vanilla planifolia* Andr.)." วารสารวิชาการเกษตร, 2549, 24(1), 97-105.

[3] Podstolski, A., Frenkel, H.D., Malinowski, J., Blount, J.W. Kourteva, G. and Dixon, R.A. "Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*." Phytochemistry, 2002, 61, 611-620.

[4] Seidenfaden, G. and Smitinand, T. "The orchids of Thailand a preliminary list." The Siam Society, Bangkok, 1958, 870.

[5] Divakaran, M., Pillai, G.S., Babu, K.N. and Peter, K.V. "Isolation and fusion of protoplasts in *Vanilla* species." Current Science, 2008, 94(1), 115-120.

[6] Ratanacherdchai, K. and Soytong, K. "A study of vanilla diseases in Thailand." Proc. of the 1st KMITL International Conference on Intergration of Science & Technology for sustainable development, Bangkok, Thailand. 25-26 August 2004, 232-235.

[7] วราวุธ ชูธรรมธัช. "วนิลา-Vanilla." เอกสารวิชาการ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, 2536, 27 หน้า.

[8] Peres, N.A.R., Souza, N.L., Peever, T.L. and Timmer, L.W. "Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus." Plant Disease, 2004, 88(2), 125-130.

[9] แสงมณี ชิงดวง. "การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยใช้พืชสมุนไพร." ข่าวสารกองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2539, 16(2), 32-34.

[10] Korsten, L. and Govender, V. "Evaluation of different formulations of *Bacillus licheniformis* in mango pack house trials." Biological Control, 2006, 37, 237-242.

[11] Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., Déry, C., Brzezinski, R. and Beaulieu, C. "Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot." Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(5), 1630-1635.

[12] Soytong, K., Pongnak, W. and Kasiolam, H. "Biological control of *Thielaviopsis* bud rot of *Hyophorbe lagenicaulis* in the field." Journal of Agricultural Technology, 2005, 1(2), 235-245.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[13] วิเชียร ดีทอง เกษม สร้อยทอง และ สมเดช กนกเมธากุล. "การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของส้มโชกุน (*Citrus reticulate* Blanco cv. Shogun) โดยชีววิธีแบบผสมผสาน." วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร, 2543, 17(2), 31-42.

[14] ถิรัตน์ สมารักษ์ และเกษม สร้อยทอง. "การใช้จุลินทรีย์คีโตเมี่ยมควบคุมโรคแอนแทรคโนสของปาล์มโดยชีววิธี." การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาของประเทศไทย ครั้งที่ 3 18-19 กรกฎาคม 2545. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, จังหวัดนครราชสีมา. 2545, 19-20.

[15] วิไลรัตน์ ศรีนนท์ และเกษม สร้อยทอง. "การใช้เชื้อราต่อต้านในการควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสขององุ่น." การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาของประเทศไทย ครั้งที่ 3 18-19 กรกฎาคม 2545. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, จังหวัดนครราชสีมา, 2545, 21-22.

[16] สุมิตรา น้อยเอี่ยม. "การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์โดยชีววิธีแบบผสมผสาน." วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ, 2540.

[17] Usuwan, P., Soytong, K., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Kukongviriyapan, V. and Isobe, M. "Integrated biological control of *Phytophthora* root rot sweet orange using mycofungicide." Thailand 5th International Conference on Plant Protection in the Tropics 15-18 March 1999. Kuala Lumpur, Malaysia. 1999, 329-331.

[18] Sibounnavong, P., Cynthia, C.D., Kanokmedhakul, S. and Soytong, K. "The new antagonistic fungus, *Emericella nidulans* strain EN against Fusarium Wilt of Tomato." Journal of Agricultural Technology, 2008, 4(1), 89-99.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้