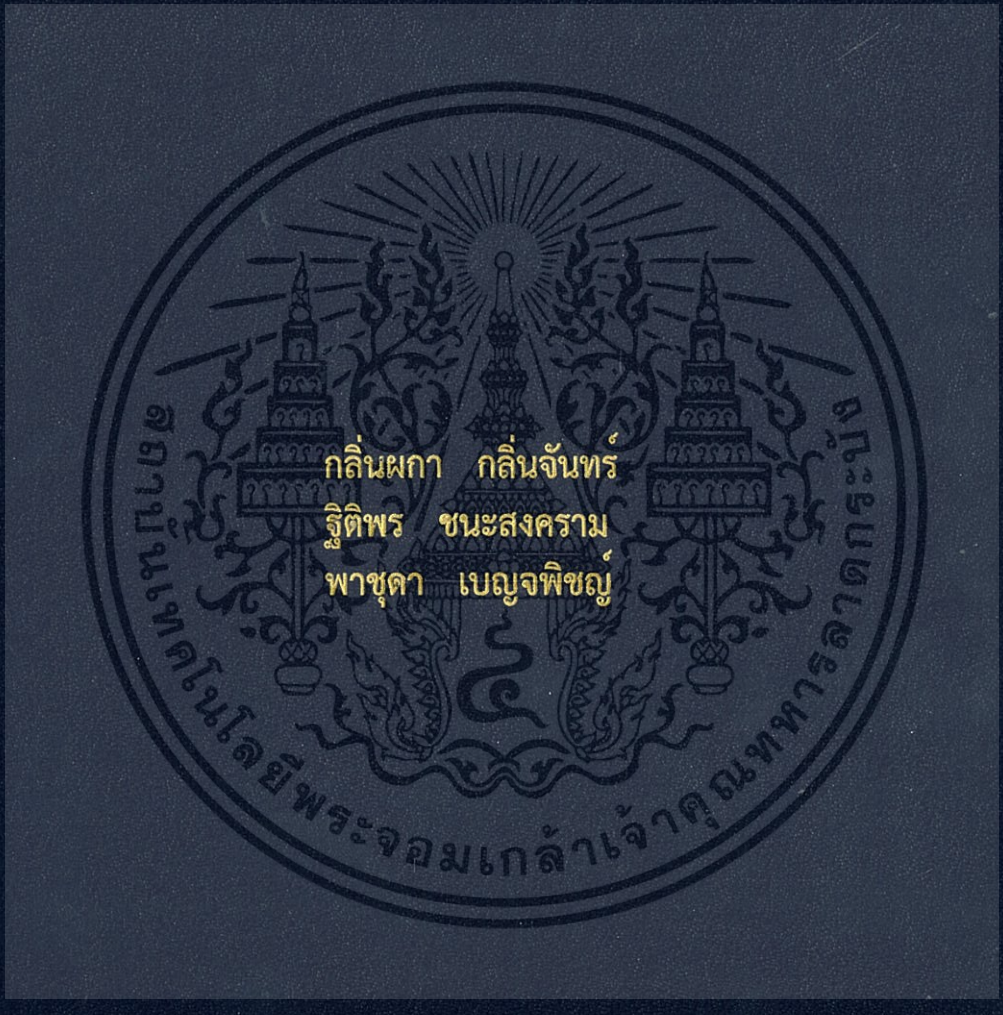
การควบคุมทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี

MICROBIAL ENDOPHYTES FROM LADY'S SLIPPER ORCHIDS AND THEIR BIOLOGICAL CONTROL



กลิ่นผกา กลิ่นจันทร์

ฐิติพร ชนะสงคราม

พาชุดา เบญจพิชญ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

การควบคุมทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี

MICROBIAL ENDOPHYTES FROM LADY'S SLIPPER ORCHIDS AND THEIR BIOLOGICAL CONTROL

กลิ่นผกา กลิ่นจันทร์
ฐิติพร ชนะสงคราม
พาชุดา เบญจพิชญ์

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MICROBIAL ENDOPHYTES FROM LADY'S SLIPPER ORCHIDS AND THEIR BIOLOGICAL CONTROL

GLINPAGA GLINJUN
TITIPORN CHANASONGKRAM
PACHUDA BENCHAPICH

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การควบคุมทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี Microbial Endophytes from Lady's Slipper Orchids and their Biological control
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกลิ่นผกา กลิ่นจันทร์ รหัส 55051233 นางสาวฐิติพร ชนะสงคราม รหัส 55051267 นางสาวพาชุดา เบญจพิชญ์ รหัส 55051348
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ	
ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การควบคุมทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี

ชื่อนักศึกษา นางสาวกลิ่นผกา กลิ่นจันทร์ รหัส 55051233
นางสาวฐิติพร ชนะสงคราม รหัส 55051267
นางสาวพาชุดา เบญจพิชญ์ รหัส 55051348

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี (สายพันธุ์เหลืองปราจีนและเหลืองกระบี่) พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 123 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้รองเท้านารี ซึ่งทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี dual culture พบว่าสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งในระดับปานกลาง-สูง ได้จำนวน 23 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 4 ไอโซเลต และเชื้อราเอนโดไฟต์ 19 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 23 ไอโซเลต มาตรวจสอบแบบ in vivo test บนใบกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ E1, C2, C9, C40 และ C60 จากการศึกษาพบว่าไอโซเลต E1 สามารถระบุและจัดจำแนกได้เป็น เชื้อราสกุล *Curvularia* sp. ซึ่งไอโซเลต C2, C9, C40 และ C60 ยังไม่สามารถระบุและจัดจำแนกได้

คำสำคัญ : กล้วยไม้รองเท้านารี การควบคุมทางชีวภาพ จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ แบคทีเรียเอนโดไฟต์ ราเอนโดไฟต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Microbial Endophytes from Lady's Slipper Orchids and their Biological control
Students	Miss Glinpaga Glinjun Student ID 55051233
	Miss Titiporn Chanasongkram Student ID 55051267
	Miss Pachuda Benchapich Student ID 55051348
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Dr. Nattawut Rungjindamai

Abstract

Study on the biological control of Microbial Endophytes from Lady's Slipper Orchids (*Paphiopedilum concolor*, *Paphiopedilum exul*). was conducted. 123 Microbial Endophytes were isolated. Antagonistic activity of endophytes were studied by dual culture method to inhibit growth of *Pestalotiopsis* sp., causal agents of leaf spot disease of Lady's Slipper Orchids. Bacterial and fungal endophytes 23 isolates (4 isolates, 19 isolates , respectively.) showed high inhibition of mycelial growth of *Pestalotiopsis* sp. In vivo test on leaf of Lady's Slipper Orchids showed that isolate E1, C2, C9, C40 and C60 showed the ability to inhibit mycelial growth of *Pestalotiopsis* sp.. This study found that endophytic fungi isolate E1 was identify as *Curvularia* sp. and isolate C2, C9, C40 and C60 could not be unidentified.

Keywords : bacteria endophytic, biological control, fungal endophytic, Lady's Slipper Orchids, microbial endophytes

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเรื่องการควบคุมทางชีวภาพของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารีจะสำเร็จมิได้หากขาดความอนุเคราะห์จากหลายๆ ฝ่าย

ขอขอบพระคุณ ดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษา อบรมให้ทำงานอย่างมีระเบียบแบบแผน พร้อมทั้งให้ความช่วยเหลือและตรวจทานโครงงานพิเศษนี้ ตลอดจนชี้แนะแนวทางในการทำโครงงานพิเศษ จนโครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.อรอุมา รุ่งน้อย อาจารย์ประจำคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ต้นกล้วยไม้รองเท้านารี มาใช้ในโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ คุณสมาน คิดประเสริฐ เจ้าของสวนกล้วยไม้สมานออร์คิดส์ จังหวัดราชบุรี ที่กรุณาให้ความรู้เกี่ยวกับกล้วยไม้รองเท้านารี และให้ความอนุเคราะห์ต้นกล้วยไม้รองเท้านารี มาใช้ในโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอาคารจุฬาภรณ์ 1 ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำการปฏิบัติงาน

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ สำหรับความห่วงใยและเป็นกำลังใจที่สำคัญในการทำโครงงานพิเศษนี้ ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้กันตลอดระยะเวลาในการทำโครงงานพิเศษ ส่งผลให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

กลิ่นผกา กลิ่นจันทร์
ฐิติพร ชนะสงคราม
พาชุดา เบญจพิชญ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญรูป ..... ช

คำย่อ ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 กล้วยไม้รองเท้านารี 3

2.2 เชื้อก่อโรค (Pathogens) 10

2.3 จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (Endophytes) 11

2.4 การควบคุมทางชีวภาพในพืช 11

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 14

3.1 พืชที่ใช้ในการทดสอบ 14

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 14

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 16

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 20

4.1 คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ และกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 20

4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยใช้วิธี in vitro test 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค
โดยใช้วิธี in vivo test 25
4.4 การจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 28
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 32
5.1 สรุปผลการวิจัย 32
5.2 ข้อเสนอแนะ 32
เอกสารอ้างอิง 34
ภาคผนวก 37
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 38
ภาคผนวก ข ตารางผลการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค
โดยใช้วิธี in vitro test 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนใบ และรากของต้นกล้วยไม้รองเท้านารี 20
4.2 แสดงราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (In vitro test) 22
4.3 แสดงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (In vitro test) 24
4.4 แสดงผลการทดสอบแบบ in vivo ในใบกล้วยไม้รองเท้านารี 25
ข.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (In vitro test) 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 รองเท้านารีเหลืองกระบี่ 5

2.2 รองเท้านารีคางกบ 6

2.3 รองเท้านารีฝาหอย 6

2.4 รองเท้านารีเหลืองตรัง 7

2.5 รองเท้านารีเหลืองปราจีน 8

4.1 ลักษณะเส้นใยของเชื้อก่อโรคซึ่งคล้ายคลึงกับ *Pestalotiopsis* sp. ที่เจริญบนอาหาร PDA (A), ลักษณะ appendage และ septum ของสปอร์เมื่อส่องกล้องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (B) (C) 21

4.2 แสดงราเอนโดไฟต์ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (A) โดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบ dual culture บนอาหาร PDA ซึ่งภาพนี้บันทึกหลังจากลงเชื้อผ่านไปแล้ว 7 วัน 23

4.3 แสดงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (B) โดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบ dual culture บนอาหาร PDA ซึ่งภาพนี้บันทึกหลังจากลงเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. ผ่านไปแล้ว 7 วัน 24

4.4 แสดงราเอนโดไฟต์ E1 (C), C9 (D) และ C2 (E) ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. โดยการทดสอบแบบ in vivo บนกล้วยไม้รองเท้านารีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ 1 น้ำกลั่น (A) และชุดควบคุมที่ 2 เชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. (B) ซึ่งภาพนี้บันทึกหลังจากลงเชื้อบนใบกล้วยไม้รองเท้านารีผ่านไปแล้ว 7 วัน 27

4.5 แสดงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ C60 (C) และ C40 (D) ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. โดยการทดสอบแบบ in vivo บนกล้วยไม้รองเท้านารีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ 1 น้ำกลั่น (A) และชุดควบคุมที่ 2 เชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. (B) ซึ่งภาพนี้บันทึกหลังจากลงเชื้อบนใบกล้วยไม้รองเท้านารี ผ่านไปแล้ว 7 วัน 28

4.6 แสดงลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์บนอาหาร PDA และเส้นใยของราเอนโดไฟต์ 29

4.7 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์บนอาหาร NA และเส้นใยของราเอนโดไฟต์ 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ

กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ Orchidaceae วงศ์ย่อย Cypripedioideae โดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Paphiopedilum* กล้วยไม้สกุลนี้เป็นที่รู้จักกันมานาน โดยเฉพาะมีลักษณะเด่นทั้งทางดอกและทางใบ คือมีกลีบปาก (lip) เป็นกระเป๋าคล้ายรองเท้าผู้หญิงของชาวดัตช์สมัยก่อน ซึ่งสวยงามแปลกตา สีสีนสดใส ดอกบานนานหลายวันเป็นอาทิตย์หรืออาจมากกว่านั้น ใบมีลายคล้ายหินอ่อนหรือไม่มีลาย กล้วยไม้รองเท้านารีเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส จัดเป็นกล้วยไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินโดนิเซีย ไทย ฟิลิปปินส์ ภาคตะวันออกเฉียงใต้ของจีน และหมู่เกาะโซโลมอน ในเขตหนาวมีบ้างประปราย (เศรษฐมันตร์, 2551) ในปัจจุบันกล้วยไม้กลายเป็นดอกไม้เศรษฐกิจที่สำคัญ และได้รับความนิยมในการปลูกเลี้ยงเนื่องจากประเทศไทยมีลักษณะภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ทั้งยังมีลักษณะดอกที่สวยงาม รูปร่างแปลกแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ บางสายพันธุ์มีกลิ่นหอม ซึ่งการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการค้าสามารถขายได้ราคากว่าดอกไม้ชนิดอื่นๆ จึงทำให้ดอกกล้วยไม้ชนิดนี้ได้รับความนิยมกว่าดอกไม้ชนิดอื่นๆ และมีการคัดเลือกพันธุ์ การพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ เพื่อใช้สำหรับปลูกเลี้ยงกันอย่างกว้างขวาง (ไชยา, 2534)

เชื้อก่อโรค (pathogens) ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้มีด้วยกันหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นโรค ที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส ตัวอย่างโรค ได้แก่ โรคเน่าเละหรือเน่าดำ (Soft Rot) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas gladioli* โรคเน่าแห้ง เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โรคเน่าดำ ยอดเน่า หรือเน่าเข้าไส้ เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (เศรษฐมันตร์, 2551) ซึ่งการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ อาจมีปัญหาเรื่องโรค ทำให้กล้วยไม้ไม่เจริญเติบโตตามที่ต้องการ อาจไม่ออกดอกหรือตายได้

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ ประกอบด้วยจุลินทรีย์ทั้งหมดที่สามารถเจริญได้ในเนื้อเยื่อพืชซึ่งไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชเจ้าบ้าน ราเอนโดไฟต์อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualists) หรือทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (saprobes) (Bayman *et al.*, 1997) และเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Schulz et al., 2002; Mousa and Raizada, 2013) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรคพืช ช่วยลดการเกิดโรค หรือความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุชนิดต่างๆ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย รา และไส้เดือนฝอย เป็นต้นทั้งยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งยังสามารถอาศัยอยู่ในพืชได้เป็นเวลานาน (อนันต์, 2557)

เนื่องจากกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่เพาะเลี้ยงยาก เป็นไม้ประดับที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจระดับประเทศ งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะช่วยป้องกันและยับยั้งโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เกิดในกล้วยไม้ชนิดนี้ โดยทำการศึกษาความสามารถในการควบคุมทางชีวภาพของราเอนโดไฟต์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายและส่งผลกระทบต่อการปลูกเลี้ยงเพื่อการค้า การควบคุมทางชีวภาพนั้นก็เป็นวิธีที่นำมาใช้ป้องกันกำจัดโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดการใช้สารเคมี เป็นกรรมวิธีที่ปลอดภัย และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการจัดการโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่นอกจากจะทำให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ทดแทนการใช้สารเคมีแล้ว ยังทำให้ผลผลิตมีคุณภาพและปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์จากกล้วยไม้รองเท้านารี

2) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรคที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี

3) เพื่อศึกษาการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในกล้วยไม้รองเท้านารี

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีจากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และจากสวนกล้วยไม้ จังหวัดราชบุรี ทำการแยกเชื้อเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ โดยนำรากและใบมาฆ่าเชื้อด้วยวิธี surface sterilization จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 ชนิด คือ PDA และ NA เพื่อแยกเชื้อรา และแบคทีเรีย ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง และทำการแยกเชื้อก่อโรค โดยการนำใบ และรากที่มีลักษณะเป็นโรคมาเขี่ยเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นนำเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรคที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี โดยใช้วิธี dual culture คือการเลี้ยงเชื้อร่วมกันบนอาหาร PDA เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อก่อโรค แล้วทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์การต้านการเจริญของเชื้อก่อโรค

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากกล้วยไม้รองเท้านารี

2) สามารถระบุและจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคในกล้วยไม้รองเท้านารี

3) สามารถระบุและจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เกิดในกล้วยไม้รองเท้านารี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีดอกและสีสันลวดลายที่สวยงามทำให้เป็นที่นิยมไปทั่วโลก นอกจากนี้ยังมีบทบาทเกี่ยวข้องกับชีวิตความเป็นอยู่ของมนุษย์ กล้วยไม้มีความสำคัญเริ่มต้นจากการใช้เป็นยาของบางชนชาติ จนพัฒนาไปสู่การค้าดอกไม้ระดับโลก มีการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เป็นธุรกิจในหลายพื้นที่ เช่น ยุโรป อเมริกา เอเชีย ออสเตรเลีย เป็นต้น (กาญจนา, 2555) จนไปถึงการผลิตเป็นอุตสาหกรรมที่มีการซื้อขายไปทั่วโลก ซึ่งกล้วยไม้ยังเป็นที่นิยมนำมาเป็นไม้กระถางเพื่อใช้ประดับตกแต่งสวนหรือภายในอาคารบ้านเรือน ได้แก่ สกุลฟาแลนนอปซิส สกุลแคทลียา และสกุลหวาย นอกจากนี้ยังมีกล้วยไม้อีกสกุลหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นไม้กระถางได้คือสกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) สำหรับประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนพบกล้วยไม้รองเท้านารีพื้นเมืองเพียงสกุลเดียวคือ *Paphiopedilum* (อุไร, 2550) และในปัจจุบันการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นที่นิยมกันอย่างมาก โดยเฉพาะพันธุ์พื้นเมืองของไทยได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งประเทศไทยเป็นแหล่งส่งออกกล้วยไม้ต่างๆ โดยกล้วยไม้รองเท้านารีก็เป็นแหล่งสำคัญแห่งหนึ่งของโลกเช่นกัน (เศรษฐมันตร์, 2551) และในปัจจุบันกล้วยไม้รองเท้านารีมีสถานภาพทางกฎหมายในประเทศไทยเป็นพืชป่าอนุรักษ์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ ตามอนุสัญญาไซเตส (CITES) (สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช, 2551)

2.1 กล้วยไม้รองเท้านารี

กล้วยไม้รองเท้านารี ภาษาอังกฤษเรียกว่า Lady's Slipper หรือ Venus's Slipper หรือ Slipper Orchid มีชื่อไทยอื่นๆ ว่า รองเท้านาง และรองเท้าแตะนารี (กาญจนา, 2555) เป็นกล้วยไม้ชนิดหนึ่งที่อยู่ในวงศ์ Orchidaceae วงศ์ย่อย Cypripedioideae โดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Paphiopedilum* กล้วยไม้สกุลนี้เป็นที่รู้จักกันมานาน โดยเฉพาะมีลักษณะเด่นทั้งทางดอกและทางใบ คือมีกลีบปาก (lip) เป็นกระเป๋าคล้ายรองเท้าผู้หญิงของชาวดัตช์สมัยก่อน ซึ่งสวยงามแปลกตา สีสันสดใส ดอกบานนานหลายวันเป็นอาทิตย์หรืออาจมากกว่านั้น ใบมีลายคล้ายหินอ่อนหรือไม่มีลาย กล้วยไม้รองเท้านารีเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 24-28 องศาเซลเซียส จัดเป็นกล้วยไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินโดนิเซีย ไทย ฟิลิปปินส์ ภาคตะวันออกเฉียงใต้ของจีน และหมู่เกาะโซโลมอน ในเขตหนาวมีบ้างประปราย (เศรษฐมันตร์, 2551)

2.1.1 ถิ่นกำเนิด

กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* จัดเป็นพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน โดยเฉพาะแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินเดีย บังคลาเทศ พม่า อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไทย ประเทศในอินโดจีน และทางตะวันตกเฉียงใต้ของจีน ในประเทศไทยพบกล้วยไม้รองเท้านารีพื้นเมืองสกุล *Paphiopedilum* เพียงสกุลเดียวมีทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีคางกบคอแดง รองเท้านารีม่วงสงขลาหรือรองเท้านารีคางกบภาคใต้ รองเท้านารีฝาหอย รองเท้านารีคางกบหรือรองเท้านารีไทยแลนด์ รองเท้านารีดอตตุง รองเท้านารีเหลืองปราจีนหรือรองเท้านารีเหลืองกาญจน์หรือรองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกระบี่ รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีเหลืองตรังหรือรองเท้านารีเหลืองพังงา ฯลฯ (กาญจนา, 2555) พบกล้วยไม้รองเท้านารีขึ้นอยู่ในป่าทั่วๆ ไป บางชนิดเกาะอาศัยอยู่ตามต้นไม้ แต่ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นพวกที่ขึ้นอยู่ตามพื้นดิน หรือซอกหินที่มีอินทรียวัตถุทับถม เจริญงอกงามในที่โปร่ง ไม่รกทึบ แสงแดดส่องถึง (สุทัศน์, 2554)

2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ประเภทแตกกอเช่นเดียวกับกล้วยไม้สกุลหวายสกุลแคทลียา และสกุลซิมบิเดียม ต้นที่แท้จริงเรียกว่า เหง้า กอหนึ่งจะประกอบด้วยต้นย่อยหลายต้น รากออกเป็นกระจุกที่โคนต้น มีลักษณะอวบอ้วน และมักจะทอดไปทางด้านราบมากกว่าหยั่งลึกลงไปในวัสดุ หน่อใหม่จะแตกจากตาที่โคนต้นเก่า มีลำต้นสั้นมาก แต่ไม่มีลำลูกกล้วย ใบมีขนาดรูปร่างต่างกันไป บางชนิด มีใบยาวตั้งชูขึ้น ใบทอดขนานกับพื้น มีทั้งใบมีลายและใบไม่มีลายแต่เป็นสีเดียวเรียบๆ ออกดอกที่ปลายยอดมีทั้งชนิดออกดอกเป็นดอกเดี่ยวและดอกเป็นช่อ กลีบดอกชั้นนอกกลีบบนมีขนาดใหญ่ดูสะดุดตา ส่วนกลีบชั้นนอกคู่ล่างจะเชื่อมติดกันและมีขนาดเล็กลงจนส่วนปากบังมิดหรือเกือบมิด กลีบคู่ในซึ่งมีลักษณะเหมือนกันกางออกไปทั้ง 2 ข้างซ้ายขาวของดอก ส่วนกลีบในกลีบที่ 3 จะเปลี่ยนเป็นกระเปาะคล้ายรูปรองเท้า กระเปาะนี้มีหน้าที่รับน้ำฝนและความชื้น เพื่อชะล้างเกสรตัวผู้ไปติดกับแผ่นเกสรตัวเมีย กล้วยไม้สกุลนี้จะมีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน และโดยธรรมชาติของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีทุกชนิดเมื่อออกดอกแล้วก็จะตายไป แต่ก่อนตายจะแตกหน่อทดแทนด้วย ซึ่งหน่อนี้จะเจริญงอกงามเป็นต้นใหม่ต่อไป (สุทัศน์, 2554) และเนื่องจากรองเท้านารีมีรูปทรงที่เป็นเอกลักษณ์ของตัวเอง แต่ละชนิดก็มีลักษณะที่โดดเด่นแตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 รองเท้านารีเหลืองกระบี่

รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul* (Ridl.) Rolfe) ถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์ เป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่พบในประเทศไทย พบขึ้นตามหินปูนบริเวณหมู่เกาะฝั่งทะเลอันดามัน ตามเกาะที่มีลักษณะเป็นหน้าผาสูงชัน และพบได้ตามภูเขาที่อยู่ติดชายฝั่งทะเลในจังหวัดตรัง กระบี่ พังงา และสตูล ซึ่งรองเท้านารีเหลืองกระบี่จะอยู่ในบริเวณที่ได้รับแสงค่อนข้างมาก บางครั้งพบขึ้นอยู่บนหินกลางแจ้ง รองเท้านารีเหลืองกระบี่เป็นไม้พุ่มกว้างประมาณ 30-40 เซนติเมตร ใบกว้าง 2.5-3 เซนติเมตร ยาว 10-20 เซนติเมตร ใบสีเขียวเป็นมัน แตกหน่อง่าย ดอกมีลักษณะเป็นดอกเดี่ยวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางดอกประมาณ 6-7 เซนติเมตร ก้านดอกยาวประมาณ 12-15 เซนติเมตร กลีบบนมีพื้นริมกลีบสีขาว โคนกลีบมีสีเขียวปนเหลือง และมีจุดประขนาดใหญ่สีม่วงปนน้ำตาล กลีบในแคบสีเหลืองเป็นมัน ริมกลีบเป็นคลื่นงุ้มมาด้านหน้า มีเส้นสีน้ำตาลกลางกลีบ กระเป๋าสีเหลืองอมเขียวเป็นมันเงา ออกดอกในช่วงเดือนเมษายน-มิถุนายน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

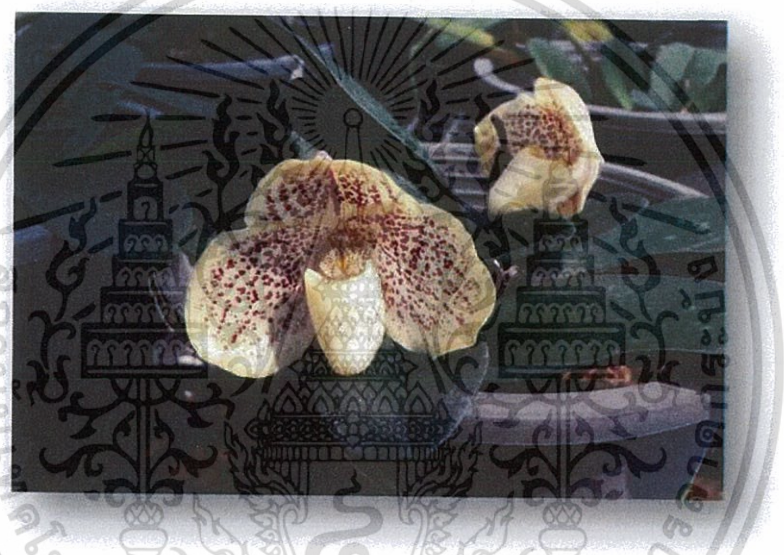
รูปที่ 2.2 รองเท้านารีคางกบ

รองเท้านารีคางกบ (*Paphiopedilum callosum* (Rchb.f.) Stein) เป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่พบในประเทศไทย แหล่งกำเนิดอยู่ในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 500-700 เมตร ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย เป็นรองเท้านารีในประเภทในลาย ปลายใบเรียวแหลม ดอกมีไฝ (Warts) เป็นจุดสีดำ ลักษณะเป็นตุ่มนูนเล็กน้อย มีขนที่จุดประปรายตามผิวของกลีบชั้นในทั้งคู่ กลีบดอกชั้นนอกกลีบบนตั้งและกว้างเล็กน้อย ริมกลีบมีสีขาวอมชมพูโคนกลีบมีสีเขียวจางอ่อน บริเวณกลีบมีเส้นสีม่วงคล้ำบนพื้นสีเขียว ขาว อมชมพู กลีบดอกในทั้งคู่แคบและเฉียงลงด้านล่างเล็กน้อย ก้านดอกยาว 15-20 เซนติเมตร ก้านดอกแข็ง ให้ดอกเดี่ยว ออกดอกประมาณเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม

รูปที่ 2.3 รองเท้านารีฝาหอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รองเท้านารีฝาหอย (*Paphiopedilum bellatulum* (Rchb.f.) Stein) เป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่พบในประเทศไทย แหล่งกำเนิดอยู่บนภูเขาหินในจังหวัดทางภาคเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย ในบริเวณซึ่งมีความสูงจากระดับน้ำทะเลไม่ต่ำกว่า 100-500 เมตร ต้นมีลักษณะเป็นพุ่ม ต้นกว้างประมาณ 20-25 เซนติเมตร สูงประมาณ 10 เซนติเมตร ใบมีขนาด 2.5-7 เซนติเมตร ใบด้านบนเป็นลายสีเขียวสลับเขียวอ่อน ใต้ท้องใบมีจุดสีม่วงเข้มกระจายหนาแน่นทั้งแผ่นใบ จะออกดอกเดี่ยว ค่อนข้างกลมกว้างประมาณ 3.5-7 เซนติเมตร กลีบบนและกลีบในสีขาวเป็นมัน ค่อนข้างหนา กลีบดอกมีจุดสีม่วงหรือสีน้ำตาลขนาดใหญ่กระจายทั่วกลีบ ก้านช่อดอกอ่อนและสั้น ขนาดประมาณ 3-5 เซนติเมตร มีกลีบดอกหนามาก ปลายกลีบมน แผ่นกลีบมีขนปกคลุม รูปลักษณะกลม มีจุดสีม่วงน้ำตาล คล้ำจุดค่อนข้างใหญ่ทั้งกลีบ ออกดอกในช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม



รูปที่ 2.4 รองเท้านารีเหลืองตรัง

รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paphiopedilum godefroyae* (godefroy) Pfitzer) เป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่พบในประเทศไทย พบขึ้นตามผาหินปูนทั่วไปในจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย และบริเวณหมู่เกาะฝั่งทะเลอันดามันตามเกาะที่มีลักษณะเป็นหน้าผาสูง มีลักษณะเด่นคือ ใบลายท้องใบสีม่วง และปลายมนคล้ายรูป ลักษณะของก้านดอกจะมีสีม่วงมีขน ดอกโตสีครีมเหลือง กลีบนอกบนมีรูปกลม ปลายยอดแหลมเล็กน้อย กลีบในสองข้างกลมรี ปลายกลีบเว้า กลีบดอกมีจุดประลายสีน้ำตาลจางบริเวณโคนกลีบแล้วค่อยจางออกตอนปลาย ปากกระเปาะสีขาวไม่มีลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.5 รองเท้านารีเหลืองปราจีน

รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer) เป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่พบในประเทศไทย มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบอำเภออรัญประเทศ จังหวัดปราจีนบุรี พบขึ้นตามผาหินปูนทั่วทุกภาค ยกเว้นภาคใต้ รองเท้านารีชนิดนี้เป็นกล้วยไม้ระบบรากกึ่งอากาศที่อาศัยตามพื้นราบที่มีเศษอินทรียวัตถุลักษณะเด่นของกล้วยไม้พันธุ์นี้คือ มีใบลาย ท้องใบสีม่วง ขนาด 2.5-10 เซนติเมตร ปลายใบมน ลักษณะก้านดอกจะยาวมีขนปกคลุม อาจมี 2-3 ดอกบนก้านเดียวกัน กลีบดอกด้านบนผายออกคล้ายพัด ปลายมนสูง กลีบในกางพอประมาณ เมื่อดอกบานจะงุ้มมาข้างหน้าคล้ายดอกบานไม่เต็มที่ พื้นดอกสีเหลืองอ่อน มีจุดละเอียดสีน้ำตาลแดงเล็กๆ ประปรายทั่วทั้งกลีบปลายกลีบมน แผ่นกลีบมีขนปกคลุม กระเปาะสีเดียวกับกลีบดอก ปลายกระเปาะเรียวแหลมและงอน ปลายเส้าเกสรเป็นแผ่นใหญ่ ออกดอกตลอดปี (สุทัศน์, 2554)

2.1.3 ประโยชน์ของการปลูกกล้วยไม้รองเท้านารี

ประโยชน์จากกล้วยไม้รองเท้านารีที่ส่งผลต่อมนุษย์นั้นก็คือหลักการเดียวกับที่มนุษย์ได้รับสิ่งอื่นๆ จากธรรมชาติเช่นกัน ดังนี้ สามารถใช้ในการประดับอาคารสถานที่ เนื่องจากกล้วยไม้รองเท้านารีมีลักษณะที่สวนงามทั้งต้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประดับอาคารสถานที่ ประดับตามโต๊ะอาหาร โต๊ะรับแขก ห้องน้ำ เป็นต้นเพื่อให้เกิดความสวยงาม เป็นของขวัญทำให้ผู้ที่ได้รับรู้สึกสดชื่น มีความสุขที่ได้รับ และเนื่องจากต้นและดอกมีขนาดกะทัดรัด มีสีสันที่สวยงาม จึงเหมาะแก่การนำมาจัดเป็นกระเช้าของขวัญที่ระลึก เป็นประโยชน์ในการศึกษาหาความรู้ ทำให้ผู้ที่สนใจศึกษาได้รู้จักความหลากหลายของกล้วยไม้ชนิดนี้ รวมทั้งโครงสร้างส่วนต่างๆ ลักษณะที่อยู่อาศัย และประวัติความเป็นมาต่างๆ ของกล้วยไม้รองเท้านารีมากยิ่งขึ้น เป็นบ่อเกิดของความรัก ความรับผิดชอบ และการมีจิตใจอ่อนโยนเนื่องจากการที่เราจะกระทำสิ่งใดนั้นต้องมีใจรักในสิ่งที่จะทำก่อน และต้องดูแล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอาใจใส่ ต้องมีความรับผิดชอบ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เองจะส่งผลดีต่อจิตใจ ต่อความคิดของคนนั้นๆ ให้รู้จักผู้อื่น มีความรับผิดชอบต่อหน้าที่ที่ทำ และมีจิตใจอ่อนโยนต่อผู้อื่นมากขึ้น ทำให้สังคมมีความสุข และยังเป็นการอนุรักษ์ธรรมชาติ ช่วยขยายพันธุ์ให้กล้วยไม้รองเท้านารีมีจำนวนมากขึ้น (แต่ต้องไม่ใช่การนำต้นพันธุ์จากธรรมชาติมาปลูก) (เศรษฐมันตร์, 2551)

2.1.4 ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

เนื่องจากกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่มีการพัฒนาของกลีบปากได้อย่างอัศจรรย์ที่สุด และด้วยสีสันที่หลากหลายและความแปลกตาของดอก ทำให้กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นที่นิยมของวงการกล้วยไม้ทั้งในประเทศและต่างประเทศ อีกทั้งเป็นพืชที่มีราคาค่อนข้างสูงจึงมีการลักลอบนำออกมาจากป่า เพื่อจำหน่ายบ้าง เลี้ยงเองที่บ้านบ้าง จนปัจจุบันกล้วยไม้รองเท้านารีจัดเป็นพืชอนุรักษ์ คือเป็นพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ ตามอนุสัญญาไซเตส (CITES) (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) คือ อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศภาคีสมาชิกที่ร่วมลงนาม โดยกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นพืชที่อยู่ในบัญชีที่ 1 ซึ่งหมายถึง ชนิดพันธุ์ที่ถูกคุกคาม และอยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์ ห้ามทำการค้าโดยเด็ดขาด เว้นแต่การศึกษาวิจัยและสามารถทำการค้าได้จากการขยายพันธุ์เทียมเท่านั้น (นพรัตน์, 2554)

2.1.5 การอนุรักษ์กล้วยไม้รองเท้านารี

การอนุรักษ์ หมายถึง “การเก็บรักษาไว้ให้คงเดิม และใช้ได้นานๆ” ใกล้เคียงกับคำนิยามของสหประชาชาติ คือ การไม่ทำลายพืชพันธุ์แท้ต่างๆ รวมทั้งความหลากหลายของลักษณะประจำพันธุ์ให้สูญหายไป ซึ่งการกระทำบางอย่างของมนุษย์อาจเป็นการทำลายธรรมชาติโดยมิได้คาดคิด เช่น การปรับปรุงพันธุ์พืช และเลือกลักษณะที่ดีตามต้องการนั้น อาจทำให้ลักษณะที่ดีบางอย่างของพืชชนิดนั้นสูญหาย และด้วยการที่คนไทยได้รู้จักคุ้นเคยกับกล้วยไม้มากขึ้น จนในปัจจุบันมีการปลูกเลี้ยงเป็นไม้ประดับในบ้านกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งกล้วยไม้ที่ปลูกเลี้ยงกัน ส่วนหนึ่งได้จากพ่อค้าที่ลักลอบนำพืชป่าหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นกล้วยไม้ป่า เฟิร์นป่า หรือท่อนไม้ที่มีพืชป่าเกาะอาศัยอยู่มาจำหน่ายตามตลาดต้นไม้กันมากมาย โดยมีชาวบ้านในท้องถิ่นนั้นเป็นผู้ขุด ดึง แซะ พืชป่าต่างๆ และโคนต้นไม้ใหญ่ที่มีพืชเหล่านั้นอาศัยอยู่ในธรรมชาติ เพื่อมาสนองความต้องการของผู้คนที่ห่างไกลธรรมชาติอันสวยงามเหล่านั้น และไม่ว่าผู้ซื้อสามารถปลูกไม้ป่าเหล่านั้นจนเจริญเติบโตได้ดีเพียงใดก็ตาม ก็คงไม่มีผู้ใดคาดคิดว่าการกระทำเช่นนั้นเป็นการอนุรักษ์พันธุ์ไม้ที่ถูกต้อง หลายประเทศรวมถึงประเทศไทยจึงได้เล็งเห็นปัญหาการสูญพันธุ์ของพืชป่านี้ จึงร่วมมือกันคุ้มครองเพื่ออนุรักษ์พืชป่าและสัตว์ป่าขึ้น ในปี พ.ศ. 2516 ต่อมาในปี พ.ศ. 2518 จึงได้มีอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งพืชและสัตว์ป่าที่กำลังสูญพันธุ์ หรือเรียกย่อๆ ว่า “อนุสัญญาไซเตส” (CITES = Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีบทบัญญัติว่าประเทศสมาชิกต้องมีกฎหมายข้อบังคับในการคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่า และพืชป่าด้วย ซึ่งเมื่อวันที่ 21 ประเทศไทยได้เข้าร่วมเป็นสมาชิกด้วย จนปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิกถึง 122 ประเทศ สำหรับประเทศไทยนั้น การดำเนินการเพื่ออนุรักษ์กล้วยไม้ป่าได้มีมาก่อนอนุสัญญาไซเตสมานานแล้ว โดยพระราชบัญญัติป่าไม้ พ.ศ. 2484 ได้กำหนดให้กล้วยไม้ป่าเป็นของหวงห้าม การเก็บกล้วยไม้ป่าต้องได้รับอนุญาตจากจังหวัดหรือกรมป่าไม้เท่านั้น ทั้งนี้เพื่อให้มีการควบคุมวิธีการเก็บหากล้วยไม้ไม่ให้เป็นอันตรายต่อการดำรงชนิดพันธุ์ อันจะช่วยป้องกันการสูญพันธุ์ของกล้วยไม้จากการเก็บหา เช่น กรณีกล้วยไม้รองเท้านารีจะเก็บได้เฉพาะกอที่มีต้นซึ่งออกดอกแล้ว 2 ยอดโดยต้องเก็บ 2 กอ เว้น 1 กอ เพื่อให้กอที่เหลืออยู่กระจายพันธุ์ได้ (อุไร, 2550)

2.2 เชื้อก่อโรค (Pathogens)

โรคพืชที่เข้าทำลายกล้วยไม้มีหลายชนิดและมีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าศัตรูพืชชนิดอื่นๆ เช่น โรคแอนแทรคโนส โรคใบปื้นเหลือง โรคใบจุด โรคเน่า เป็นต้น ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่สำคัญ (ศรีสุดา, 2554) โดยเชื้อก่อโรค (pathogens) ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้มีด้วยกันหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส ตัวอย่างโรค ได้แก่ โรคเน่าเละหรือเน่าดำ (Roft Rot) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas gladioli* มักเกิดในเรือนกล้วยไม้ที่มีความชื้นสูง อาการเริ่มจากจุดช้ำน้ำบนใบหรือหน่ออ่อน ใบเหมือนโดนน้ำร้อนลวก เมื่อลองจับดูเนื้อจะเละติดมือมีกลิ่นเหม็น สามารถลุกลามได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะหน้าฝนซึ่งมีสภาพอากาศร้อนและมีความชื้นสูง โรคเน่าแห้งเกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* มักเกิดกับกล้วยไม้ในเขตอากาศร้อนชื้น อาการเกิดจากเชื้อราเข้าสู่ท่อลำเลียงไปทำลายรากและโคนต้น ลามขึ้นมาด้านบน บริเวณที่เกิดจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและกลายเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเนื้อเยื่อจะแห้งและยุ่ยจนเหี่ยวตายในที่สุด มักระบาดในฤดูฝน ซึ่งเชื้อราตัวนี้จะสร้างสปอร์สืบพันธุ์ที่เป็นเม็ดสีน้ำตาลกลมๆ เกาะอยู่ตามโคนต้น มักมีการดื้อยา โรคเน่าดำ ยอดเน่าหรือเน่าเข้าไส้ เกิดจากเชื้อราชื่อ *Phytophthora palmivara* สามารถสังเกตอาการได้จากการเน่าที่ปลายยอดหรือส่วนต่างๆ ซึ่งจะมีสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ จะทำความเสียหายให้กับท่อลำเลียงน้ำ (เศรษฐมันตร์, 2551) และโรคใบจุด หรือโรคใบขี้กลาก เกิดจากเชื้อรา *Guignardia Pestalotiopsis* (พรพิมล และคณะ, 2556) และ *Phyllostictina pyriformis* ซึ่งลักษณะอาการของโรคนี้ในระยะแรกมีแผลเป็นจุดหรือแต้มสีเหลือง หลังจากนั้นจึงเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำในเวลาต่อมา ในกล้วยไม้สกุลหวายมีลักษณะอาการของโรคในระยะแรกคล้ายกับโรคใบปื้นเหลือง แต่รอยแผลกลมสีเหลืองมีขนาดเล็กกว่า ต่อมาเปลี่ยนเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มหรือดำ ขอบแผลมีสีน้ำตาลอ่อนแผลค่อนข้างกลม เกิดได้ทั้งด้านบนใบและหลังใบ จึงเรียกโรคนี้ในกล้วยไม้สกุลหวายว่า “โรคใบจุด” แต่อาการของโรคนี้ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าจะแตกต่างจากกล้วยไม้สกุลหวาย คือแผลมีลักษณะยาวรี ซึ่งบริเวณตรงกลางแผลสีดำจะมีการสร้างสปอร์ขึ้นมาเป็นตุ่มนูนสีน้ำตาลดำ และเมื่อใช้มือลูบที่แผลจะรู้สึกสากมือ ดังนั้นจึงเรียกโรคนี้ว่า “โรคขี้กลาก” โรคนี้เกิดขึ้นได้ตลอดปี (ศรีสุดา, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (Endophytes)

จุลินทรีย์เอนโดไฟต์ ประกอบด้วยจุลินทรีย์ทั้งหมดที่สามารถเจริญได้ในเนื้อเยื่อพืชซึ่งไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชเจ้าบ้าน ราเอนโดไฟต์อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualists) หรือทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (saprobes) (Bayman *et al.*, 1997) และเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (Schulz et al., 2002; Mousa and Raizada, 2013) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรคพืช ช่วยลดการเกิดโรค หรือความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุชนิดต่างๆ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย รา และไส้เดือนฝอย เป็นต้นทั้งยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช อีกทั้งยังสามารถอาศัยอยู่ในพืชได้เป็นเวลานาน (อนันต์, 2557) นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์เอนโดไฟต์กับเชื้อก่อโรคมีความสัมพันธ์กัน (Sajeewa, 2011) ยกตัวอย่างเช่น *Pestalotiopsis microspora* ที่พบว่าเป็นได้ทั้งจุลินทรีย์เอนโดไฟต์และเชื้อก่อโรค และปัจจัยทางสรีระวิทยาหรือปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมก็สามารถเป็นตัวกระตุ้นทำให้เชื้อราตัวนี้กลายเป็นเชื้อก่อโรคได้ (Lee *et al.*, 1995)

2.4 การควบคุมทางชีวภาพในพืช

การควบคุมทางชีวภาพในพืช หมายถึง การใช้สิ่งมีชีวิตพวกจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมายับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคจนไม่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืช เชื้อจุลินทรีย์พวกนี้เรียกว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ส่วนใหญ่ ได้แก่ เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย (นิพนธ์, 2553) หรือวิธีการใดก็ตามที่ควบคุมโรคพืชหรือลดปริมาณหรือผลของเชื้อสาเหตุ โดยอาศัยกลไกทางชีววิทยาหรือสิ่งที่มีชีวิตอื่นๆ โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคพืชและพืชอาศัย เพื่อลดปริมาณของเชื้อสาเหตุของโรคพืชลง (วีระศักดิ์, 2544)

สิ่งมีชีวิตปฏิปักษ์ที่นำมาใช้ควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. เชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย เป็นเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีประสิทธิภาพในด้านการควบคุมโรคได้ดี ปัจจุบันมีการผลิตใช้หรือจำหน่ายมากที่สุด เชื้อราที่นิยมนำมาใช้คือ *Trichoderma harzianum* ส่วนเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas fluorescens*

2. เชื้อไวรัสและไส้เดือนฝอย เป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้ได้ดีกับการกำจัดแมลงศัตรูพืชมากกว่าเชื้อโรคพืช โดยเชื้อไวรัส หรือไส้เดือนฝอยจะทำลายหนอนหรือตัวอ่อนของแมลงศัตรูพืช ในทางโรคพืชมีการใช้เชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงสร้างภูมิคุ้มกันให้แก่พืชหลายชนิดเพื่อป้องกันโรคไวรัสต่างๆ เช่น เชื้อไวรัสคิวคัมเบอร์โมเสก (Cucumber mosaic virus) ที่ทำให้เกิดโรคใบด่างของแตงกวา เชื้อไวรัสปาปายาริงสปอต (Papaya ringspot virus) ที่ทำให้เกิดโรคจุดวงแหวนของมะละกอ

3. พืช มีการนำพืชหลายชนิดมาใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยปลูกเพื่อขับไล่หรือทำลายศัตรูพืชทั้งโรคและแมลง เช่น การปลูกต้นดาวเรืองเพื่อใช้ขับไล่ไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดรากปมของพืชผัก การปลูกต้นหอมเพื่อขับไล่เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียโรคพืชที่อยู่ในดิน ปัจจุบันได้มีการทดลองนำพืชหลายชนิดมาใช้กับเชื้อโรคพืชมากขึ้น โดยเฉพาะพืชในวงศ์กะหล่ำ (นิพนธ์, 2553)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.1 ความสำคัญของราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมทางชีวภาพ

การควบคุมทางชีวภาพในพืชนั้น เป็นการควบคุมที่ไม่เพียงแต่เป็นการลดความหนาแน่นของเชื้อที่ก่อโรคเท่านั้น แต่ยังเป็นการป้องกันบนผิวหน้าของพืชและในพืชอาศัยด้วย บทบาทการสร้างความต้านทาน (resistance) หรือเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตที่ต่อต้านเชื้อโรคภายหลังการติดเชื้อ หรือการชักนำ ให้เกิดความต้านทานของพืชอาศัย (host plant resistance) ต่อเชื้อโรค จุลินทรีย์ต่อต้านจัดเป็นตัวควบคุมโดยชีววิธีที่มีศักยภาพต่อการขัดขวางกระบวนการต่างๆ ของเชื้อโรคพืชที่มีชีวิต (เกษม, 2551) เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) จะประสบความสำเร็จในการควบคุมเชื้อสาเหตุได้นั้นต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตขึ้นมาโดยตรงหรือส่งเสริมให้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ปรากฏอยู่ตามธรรมชาติทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช การปรับปรุงหรือพัฒนาวิธีเขตกรรมที่เหมาะสม เพื่อปรับสภาพแวดล้อมให้เอื้ออำนวยหรือส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือศัตรูของเชื้อโรคพืชที่มีอยู่ตามธรรมชาติ จะช่วยลดปริมาณเชื้อโรคพืชหรือระดับของการเกิดโรคลงได้ (จิระเดช, 2546)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อภาพร โพธิยอด และเกวลิน คุณาศักดากุล (2557) ได้ทำการวินิจฉัยโรครากเน่าของสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ 329 จากตัวอย่างต้นที่เป็นโรค พบว่า สามารถคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งในระดับสูงมากได้ จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ DUC2, CINv1, FRA19, CINc1 และ POL2 เมื่อนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 ไอโซเลต มาทำการปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลตลงบนต้นสตรอว์เบอร์รี เพื่อทดสอบการชักนำให้เกิดความต้านทานโรครากเน่าในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าต้นสตรอว์เบอร์รีที่ได้รับการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ แต่ละไอโซเลตสามารถต้านทานต่อการเกิดโรครากเน่าได้ โดยเชื้อไอโซเลตที่ CINv1 และ FRA19 สามารถชักนำความต้านทานต่อการเกิดโรคได้ดีที่สุด ซึ่งแสดงว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์คัดเลือกได้ทั้ง 5 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโดยสามารถเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์ 329 และชักนำให้เกิดความต้านทานการเกิดโรครากเน่าได้

ประพันธ์ โอสถาพันธ (2551) ได้ทำการศึกษาการแยกและการจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญของกล้วยไม้เอื้องแซะหอม พบว่า สามารถแยกตัวอย่างของเชื้อราได้ทั้งหมดจำนวน 42 ไอโซเลต ซึ่งเชื้อราที่สามารถจำแนกได้มากที่สุด คือ *Pestalotiopsis* sp. จำนวน 25 ไอโซเลต รองลงมาได้แก่ เชื้อรา *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Exserohilum* sp., *Curvularia* sp. และเชื้อรา *Nigrospora* sp. ซึ่งแยกได้จำนวน 5 4 4 2 1 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ

สมศิริ แสงโชติ และคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาผลอ่อนและผลแก่ของเงาะที่เก็บจากแหล่งปลูกต่างๆ ในภาคตะวันออกและภาคใต้โดยพบการเข้าทำลายของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในระดับต่างๆ กัน ซึ่งพบว่าผลอ่อนของเงาะในภาคตะวันออกพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. อยู่ที่ผลมากที่สุด และ แต่ในผลแก่ที่เก็บไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. มากที่สุด และ *Greeneria* sp. รองลงมา ยกเว้นผลเงาะจาก จ.ปราจีนบุรี ซึ่งมีปริมาณของเชื้อรา *Greeneria* sp. สูงกว่า *Pestalotiopsis* sp. ส่วนผลอ่อนของเงาะจากภาคใต้ พบเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. และ *Greeneria* sp. ในระดับที่ใกล้เคียงกันแต่ผลแก่ที่เก็บรักษาไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบเชื้อ *Greeneria* sp. มากที่สุด และ *Gliocephalotrichum bulbilium* ในระดับรองลงมา

พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ (2556) ได้ทำการศึกษาการจัดการโรคมะเม่า ซึ่งพบโรคมะเม่าทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ โรคใบจุด สาเหตุเกิดจาก *Guignardia* และโรคใบจุด สาเหตุเกิดจาก *Pestalotiopsis* ใบจุดสาหร่าย สาเหตุเกิดจาก *Cephaleuros virescens* ราดำบนใบสาเหตุเกิดจาก *Scorias cylindrica* และ อาการเปลือกแตกยางไหล สาเหตุเกิดจากรา *Lasiodiplodia pseudotheobromae* โรครากเน่าโคนเน่า แยกและจำแนกได้รา 2 ชนิด ได้แก่ *Fusarium decemcellulare* และ *Phellinus noxius* และทำการทดสอบการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าพบว่ารา *P. noxius* ทำให้ต้นมะเม่าแสดงอาการใบเหี่ยวเหลือง หลังจากปลูกเชื้อภายใน 75 วัน และต้นตายหลังจากนั้น 15 วัน และเมื่อแยกเชื้อกลับ นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร สามารถตรวจพบราชนิดเดิม สำหรับรา *F. decemcellulare* ไม่ทำให้ต้นมะเม่าเกิดโรค

จักรพงศ์ จันทวงศ์ และคณะ (2553) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ความชื้นดินในป่าเต็งรังบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2551 ถึงเดือนสิงหาคม 2552 พบว่าในฤดูฝนและฤดูร้อนมีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งต่างกับฤดูหนาวที่มีค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์ความชื้นดินต่ำ ส่งผลถึงความหลากหลายของราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ดินว่านจูงนางโดยในฤดูฝนมีความหลากหลายของราสูงกว่าในฤดูหนาวและฤดูร้อนนอกจากนี้ปัจจัยด้านอายุของรากยังมีผลต่อความหลากหลายของราเช่นกัน อย่างไรก็ตามพบว่า ราสกุล *Trichoderma* และ *Fusarium* พบได้ในทุกฤดูกาล จึงคาดว่าราทั้งสองสกุลนี้สามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทางกายภาพได้

Li *et al.* (2001) ได้ทำการแยกราเอนโดไฟต์จากต้นไม้ในพื้นที่ เขตร้อนชื้น ประเทศเยอรมัน สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย ปาปัวนิวกีนี และเนปาล เลือกราเอนโดไฟต์ 2 ชนิด นำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช พบว่าราเอนโดไฟต์ *Pestalotiopsis* spp. และ *Monochaetia* sp. ยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้แก่ *Pyricularia oryzae, Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Diplodia natelensis, Fusarium cubense, Helminthosporium sativum, Cephalosporium gramineum* และ *Pythium ultinum* ได้โดยเชื้อราทั้งสองสามารถสร้างสาร ambuic acid ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อราก่อโรค

Lee *et al* (1995) กล่าวว่า *Pestalotiopsis microspora* เป็นได้ทั้งจุลินทรีย์เอนโดไฟต์และเชื้อก่อโรค ซึ่งงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อตัวนี้สามารถอาศัยอยู่ในเปลือกชั้นในของต้นไม้ได้โดยไม่ก่อให้เกิดโรค แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยทางสรีระวิทยาหรือปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมก็สามารถเป็นตัวกระตุ้นทำให้เชื้อราตัวนี้กลายเป็นเชื้อก่อโรคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ใบและรากของต้นกล้วยไม้รองเท้านารี (Lady's slipper orchids) สายพันธุ์เหลืองกระบี่ และเหลืองปราจีน

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 อุปกรณ์

- กล้วยไม้รองเท้านารี
- กล่องพลาสติก
- บีกเกอร์ 250 ml.
- บีกเกอร์ 500 ml.
- กระบอกตวง
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- มีดผ่าตัดสแตนเลส
- ปากคีบ (Forcep)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (Aseptic Techniques)
- ปิเปต
- ที่กรองชา
- เข็มเย็บผ้า
- ทิชชู่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- ช้อนตักสาร
- Autopipette
- ทิป (tips)
- หลอดทดลอง
- Loop & needle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 เครื่องมือ

- ตู้บ่ม
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- เครื่องฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave)
- กล้องจุลทรรศน์
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow clean bench)
- ตู้แช่เย็นควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับเก็บ stock เชื้อ
- เครื่องเขย่า (Shaker)
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Potato Dextrose Agar (PDA)
- Potato Dextrose Broth (PDB)
- Nutrient Agar (NA)
- Nutrient Broth (NB)

3.2.4 สารเคมี

- เอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์
- โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium Hypochlorite) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์
- กลีเซอรอล (Glycerol) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์
- แลคโตฟีนอล คอตตอนบลู (Lactophenol Cotton Blue)
- สีคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet)
- สารละลายไอโอดีน (Iodine solution)
- สีซาฟรานิน (Safranin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 เก็บตัวอย่างและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ และกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างต้นกล้วยไม้รองเท้านารีที่มีความสมบูรณ์ จากแปลงเพาะปลูกกล้วยไม้ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และแปลงเพาะปลูกกล้วยไม้ จังหวัดราชบุรี โดยเก็บชิ้นส่วนใบและ ราก ของกล้วยไม้รองเท้านารีสายพันธุ์เหลืองกระบี่ และสายพันธุ์เหลืองปราจีน นำใบและรากมาล้างด้วยน้ำสะอาดตัดใบและรากให้ได้ขนาด 1×1 เซนติเมตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวใบและรากด้วยวิธี surface sterilization โดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที ต่อด้วยแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที และแช่ในเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที สุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง

3.3.1.2 วิธีการแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้รองเท้านารี

นำใบและรากที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธี surface sterilization นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งปลอดเชื้อ จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อผสมลงไป และดูดสารละลายตัวอย่างที่บดได้ใส่หลอดทดลองนำมาทำการเจือจาง โดยใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทำการเจือจางถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-4} จากนั้นนำสารละลายทุกระดับความเจือจาง (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4}) มา spread plate ลงบนผิวหน้าอาหาร NA ที่เติม nystatin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน นำน้ำสุดท้ายที่ใช้ล้างใบและราก มา 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร NA แล้วทำการ spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมในการยืนยันว่ามีเฉพาะแบคทีเรียเอนโดไฟต์เท่านั้นที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งผลที่ได้จะต้องไม่พบการเจริญของเชื้อ

เมื่อครบกำหนดทำการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย จากนั้น streak ลงบนอาหาร NA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อเก็บเป็น stock โดยถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเอียง NA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็น และถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว NB นำไปเขย่านาน 6-12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายสารละลายเชื้อแบคทีเรียออกมาปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendorf แล้วเติมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.1.3 วิธีการแยกราเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้รองเท้านารี

นำใบและรากมาล้างด้วยน้ำเปล่า จากนั้นตัดใบให้ได้ขนาด 1×1 เซนติเมตร และรากตัดให้ได้ขนาด 1 เซนติเมตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี surface sterilization จากนั้นนำมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม streptomycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลา 14 วัน นำน้ำสุดท้ายที่ใช้ล้างใบและราก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร PDA ที่เติม streptomycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมในการยืนยันว่ามีเฉพาะราเอนโดไฟต์เท่านั้นที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งผลที่ได้จะต้องไม่พบการเจริญของเชื้อ

เมื่อครบกำหนดคัดเลือกเส้นใยราที่เจริญออกมาจากใบ และรากที่วางบนอาหาร จากนั้นตัดบริเวณปลายเส้นใยรา ที่ต้องการออกมาวางบนอาหาร PDA จานเพาะเชื้อใหม่เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อเก็บเป็น stock โดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราลงในหลอดอาหารเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน จากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็น และนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราถ่ายลงในหลอด eppendorf ที่มีสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.1.4 วิธีการแยกเชื้อราก่อโรคจากกล้วยไม้รองเท้านารี

งานวิจัยนี้ใช้กล้วยไม้รองเท้านารี สายพันธุ์เหลืองปราจีนที่ก่อโรค ใบจุดบนใบพืช นำใบที่เกิดโรคมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะเส้นใยของเชื้อก่อโรค ใช้เข็มเขี่ยเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน คัดเลือกเส้นใยของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดบนใบพืช จากนั้น ตัดชิ้นส่วนเส้นใยราเป้าหมายวางบนอาหาร PDA เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นทำการทดสอบยืนยันว่าราที่แยกได้นั้นก่อโรคใบจุดบนใบพืชจริง โดยใช้การพิสูจน์โรคตามหลักเกณฑ์ของ Koch (Koch's Postulation) โดยการนำใบพืชกล้วยไม้ที่สมบรูณ์มาทำให้เกิดแผลบนใบ จากนั้นเขี่ยเส้นใยราก่อโรคที่แยกได้วางลงบนใบที่เป็นแผล นำน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วเทลงบนทิชชู่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้พอชุ่ม นำใบที่เป็นแผลวางลงบนทิชชู่เปียก บ่มในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อเก็บเป็น stock โดยตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราลงในหลอดอาหารเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วันจากนั้นนำไปแช่ในตู้เย็น และนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราถ่ายลงในหลอด eppendorf ที่มีสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.1.5 การส่องดูลักษณะของเชื้อราโดยใช้เทคนิค Slide culture

นำกระดาษทิชชู่วางไว้ในจานเพาะเชื้อ นำแท่งแก้วงอรูปตัว V วางลงแล้วนำสไลด์ และกระจกปิดสไลด์ที่สะอาดวางบนแท่งแก้วงอรูปตัว V แล้วนำไปอบเพื่อฆ่าเชื้อหรือทำให้ปราศจากเชื้อ ในส่วนของเทอาหาร PDA เทให้หนากว่าปกติ แล้วตัดวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณด้านละ 1 เซนติเมตร หลายๆ ชิ้น จากนั้นนำวุ้นที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส วางลงบนสไลด์เขี่ยเส้นใยเชื้อราที่ต้องการตรวจมาวางลงบนแผ่นวุ้นทั้งสี่ด้าน แล้วตามด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อปิดบนชิ้นวุ้น เทน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงบริเวณกระดาษทิชชู่ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อพอประมาณ เพื่อให้เกิดความชื้น บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนดหยดแลตโตฟีนอล คอตตอนบลู 1 หยด ที่ปลายด้านหนึ่งของสไลด์สะอาด นำกระจกปิดสไลด์ที่ปิดบนวุ้นแตะบนแลตโตฟีนอล คอตตอนบลู ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 In vitro test

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยใช้เทคนิค dual culture

3.3.2.1 แบคทีเรียเอนโดไฟต์

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากส่วน ใบ และ ราก ของกล้วยไม้รองเท้านารี ขีดลงบนอาหาร NA (Nutrient Agar) โดยขีดห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราก่อโรคที่แยกได้ มาวางบริเวณฝั่งตรงข้ามกับเชื้อแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 7 วัน

3.3.2.2 ราเอนโดไฟต์

ตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วน ใบ และ ราก ของกล้วยไม้รองเท้านารี นำชิ้นวุ้นที่ตัดมาวางให้ห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร จากนั้นตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราก่อโรคที่แยกได้ มาวางบริเวณฝั่งตรงข้ามกับราเอนโดไฟต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 7 วัน และส่วนของชุดควบคุมให้ตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราก่อโรคที่แยกได้ มาวางให้ห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 7 วัน ตรวจสอบผลการทดลองโดยวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อราก่อโรคในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth : PIRG) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(R1-R2)}{R1} \times 100$$

R1 =ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม

R2 =ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดทดสอบ

นำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้มาประเมิน ประสิทธิภาพการยับยั้ง ดังนี้

ระดับสูง = เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 41-50 เปอร์เซ็นต์

ระดับปานกลาง = เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 31-40 เปอร์เซ็นต์

ระดับต่ำ = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์

3.3.3 In vivo test

3.3.3.1 แบคทีเรียเอนโดไฟต์

เขี่ยแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค ลงในอาหารเหลว NB เขย่าเชื้อเป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง นำใบกล้วยไม้รองเท้านารีที่สภาพสมบูรณ์มาทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผล หยดสารละลายแบคทีเรียเอนโดไฟต์ลงบนแผลปริมาตร 5-10 ไมโครลิตร ระยะเวลา 30 นาที จากนั้นเขี่ยเส้นใยราก่อโรคทับลงไปที่บริเวณเดียวกัน วางใบบนทิชชู่เปียก บ่มในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน

3.3.3.2 ราเอนโดไฟต์

นำใบกล้วยไม้รองเท้านารีที่สภาพสมบูรณ์มาทำให้เกิดแผล เขี่ยเส้นใยราเอนโดไฟต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคลงบนแผล วางไว้นาน 30 นาที จากนั้นเขี่ยเส้นใยราก่อโรคทับลงไปที่บริเวณเดียวกัน วางใบบนทิชชู่เปียก บ่มในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน ในส่วนของชุดควบคุมที่ 1 ให้นำใบกล้วยไม้รองเท้านารีที่สภาพสมบรูณ์มาทำให้เกิดแผล จากนั้นหยดน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงบนแผล เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมที่ 1 วางใบบนทิชชู่เปียก บ่มในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน และชุดควบคุมที่ 2 ให้นำใบกล้วยไม้รองเท้านารีที่สภาพสมบรูณ์มาทำให้เกิดแผล จากนั้นเขี่ยเส้นใยราก่อโรคลงบนแผล เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมที่ 2 วางใบบนทิชชู่เปียก บ่มในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 14 วัน

3.3.4 การระบุเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

3.3.4.1 แบคทีเรียเอนโดไฟต์

ระบุเชื้อโดยวิธี Macroscopic observation ซึ่งดูขนาด รูปร่าง สี ลักษณะผิวหน้าโคโลนี และวิธี Microscopic observation โดยการส่องดูลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้เทคนิคการย้อมแกรม ดังนี้ ทำการ smear เชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาด และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน หยดสีคริสตัลไวโอเลตให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที และเทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งไม่มี สีม่วงละลายออกมา แต่อย่าเกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที ซับด้วยกระดาษ จากนั้นย้อมทับด้วยสีซาฟรานินให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ และซับด้วยกระดาษ วางทิ้งให้แห้ง ทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

3.3.4.2 ราเอนโดไฟต์

ระบุเชื้อโดยวิธี Macroscopic observation ซึ่งดูขนาด รูปร่าง สี ลักษณะเส้นใย และวิธี Microscopic observation โดยการส่องดูลักษณะทางสัณฐาณวิทยาของราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งใช้เทคนิค Slide culture เพื่อส่องดูลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ และกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

ผลการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์จากส่วนใบและรากของต้นกล้วยไม้รองเท้านารี สายพันธุ์เหลืองกระบี่ และสายพันธุ์เหลืองปราจีน สามารถแยกแบคทีเรียเอนโดไฟต์ได้จำนวน 54 ไอโซเลต โดยแยกได้จากใบจำนวน 20 ไอโซเลต แยกได้จากรากจำนวน 34 ไอโซเลต และแยกราเอนโดไฟต์ได้จำนวน 69 ไอโซเลต โดยแยกได้จากใบจำนวน 47 ไอโซเลต และแยกได้จากรากจำนวน 22 ไอโซเลต ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้จากส่วนใบและรากของต้นกล้วยไม้รองเท้านารีมีทั้งหมด 123 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1)

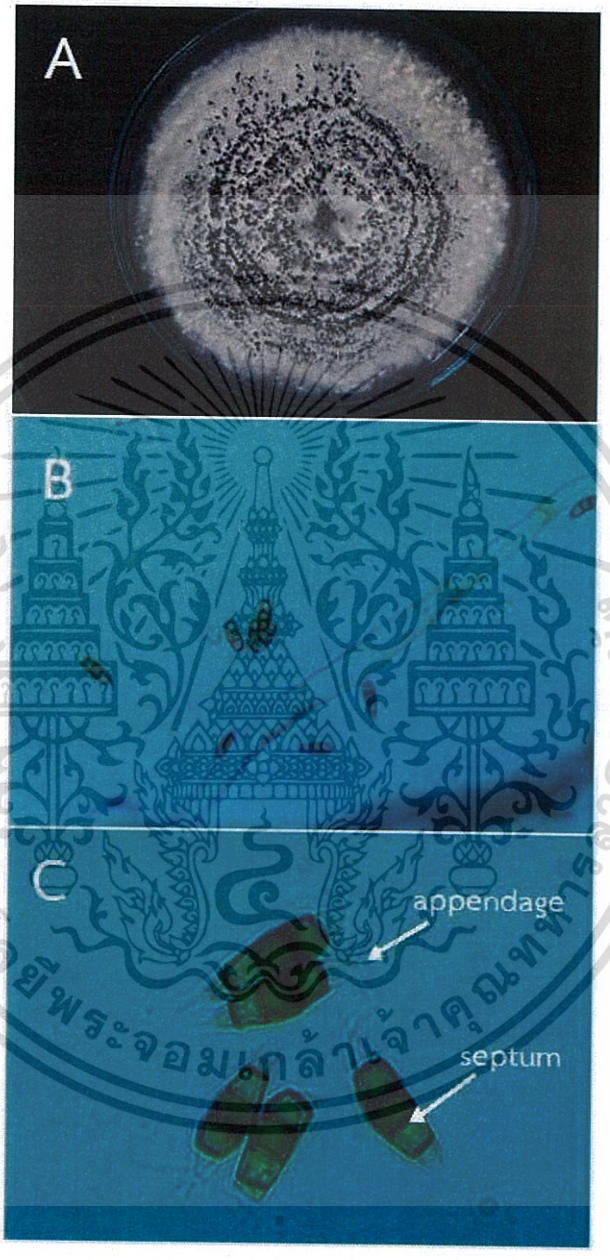
ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่แยกได้จากส่วนใบ และรากของต้นกล้วยไม้รองเท้านารี

ครั้งที่เก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	สายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี	จำนวนตัวอย่าง		จำนวนจุลิทรีย์เอนโดไฟต์ (ไอโซเลต)			
					แบคทีเรีย		รา	
			ใบ	ราก	ใบ	ราก	ใบ	ราก
1	11 ธันวาคม 2558	เหลืองกระบี่	5	4	3	6	8	4
2	19 มกราคม 2559	เหลืองกระบี่	5	3	5	8	14	9
3	11 มีนาคม 2559	เหลืองปราจีน	6	7	12	20	3	12
4	16 มีนาคม 2559	เหลืองปราจีน	6	6	-	-	13	6
		รวม			20	34	38	31
					54		69	

ผลการแยกเชื้อก่อโรคจากใบของต้นกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน สามารถแยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคที่ใบของต้นกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน พบว่าโคโลนีบนอาหาร PDA เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว ฟูคล้ายสำลี และกลุ่มของสปอร์มีลักษณะเป็นหยดของเหลวสีดำกระจายอยู่บนโคโลนี เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสปอร์มีลักษณะรูปร่างตรงเรียวยาวคล้ายกระสวย มี 4 septum แบ่งเป็น 5 เซลล์ มีสีเข้ม ยกเว้นหัวท้ายมีสีใส และปลายเซลล์มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

apical appendage ยาว ไม่มีสี 2-3 เส้น มีลักษณะคล้ายคลึงกับสกุล *Pestalotiopsis* ซึ่งสอดคล้องกับ พรพิมล และคณะ (2553) ที่พบว่า *Pestalotiopsis* sp. เป็นสาเหตุของโรคใบจุด และโรคพืชหลายชนิด (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ลักษณะเส้นใยของเชื้อก่อโรคซึ่งคล้ายคลึงกับ *Pestalotiopsis* sp. ที่เจริญบนอาหาร PDA (A), ลักษณะ appendage และ septum ของสปอร์เมื่อส่องกล้องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (B) (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยใช้วิธี in vitro test

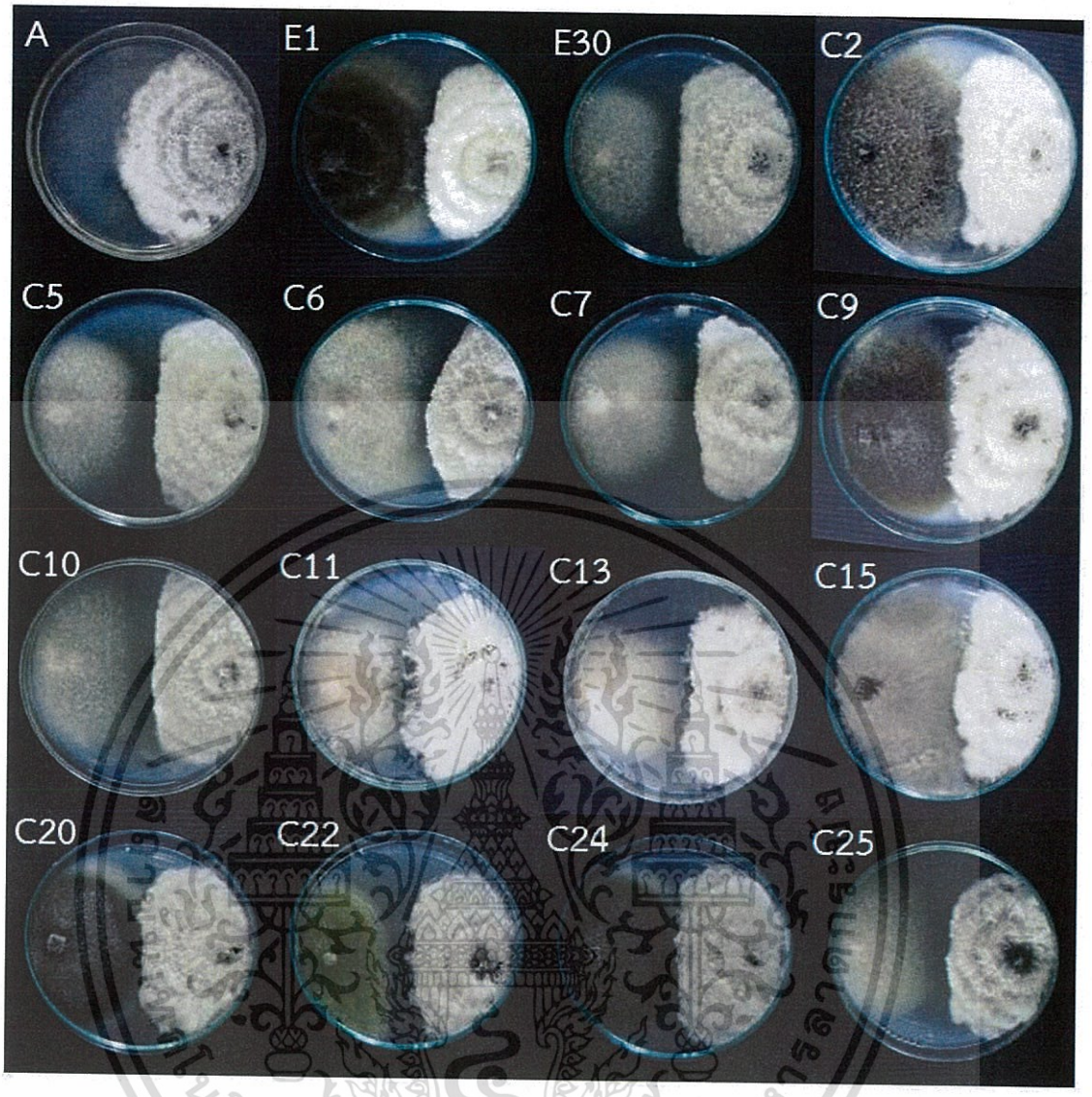
4.2.1 เชื้อราเอนโดไฟต์

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเชื้อราที่แยกได้ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบเชื้อราที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมด 15 ไอโซเลต ได้แก่ E1, E30, C2, C5, C6, C7, C9, C10, C11, C13, C15, C20, C22, C24 และ C25 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ถึงร้อยละ 38.8235, 31.1828, 31.1828, 38.7097, 41.9355, 41.9355, 34.4086, 39.7849, 36.5591, 35.4839, 36.5591, 31.1828, 37.6344, 33.3333 และ 35.4839 (ตารางที่ 4.2) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 แสดงราเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (In vitro test)

รหัสรา เอนโดไฟต์	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อก่อโรค (ซ.ม.)	เปอร์เซ็นการยับยั้งการเจริญเติบโต (PIRG)
E1	2.6	38.8235
E30	3.2	31.1828
C2	3.2	31.1828
C5	2.85	38.7097
C6	2.7	41.9355
C7	2.7	41.9355
C9	3.05	34.4086
C10	2.8	39.7849
C11	2.95	36.5591
C13	3	35.4839
C15	2.95	36.5591
C20	3.2	31.1828
C22	2.9	37.6344
C24	3.1	33.3333
C25	3	35.4839

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงราเอนโดไฟต์ที่ยับยังเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (A) โดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบ dual culture บนอาหาร PDA ซึ่งภาพนี้บันทึกหลังจากลงเชื้อผ่านไปแล้ว 7 วัน

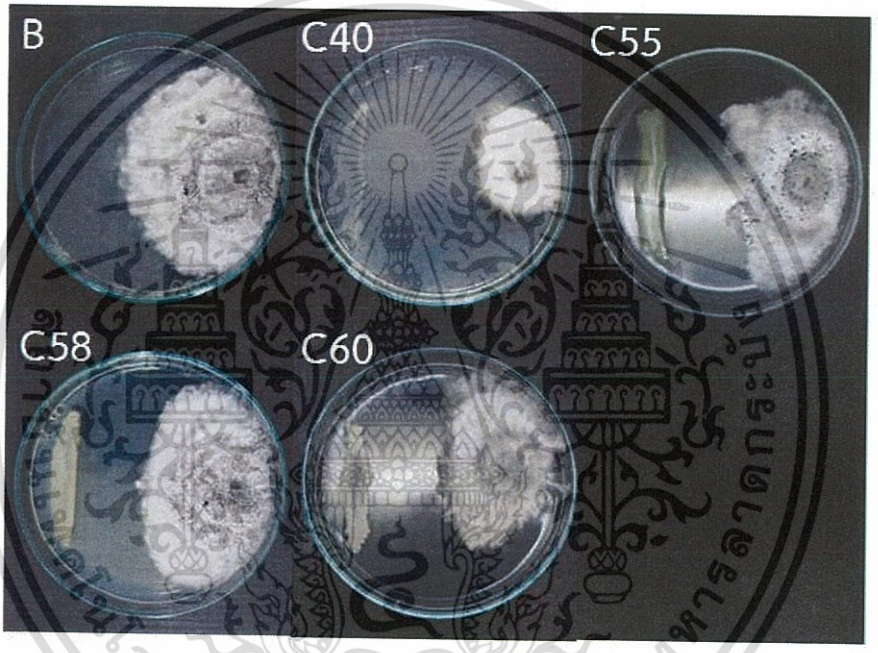
4.2.2 เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่แยก 54 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1) พบเชื้อแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ C40, C55, C58 และ C60 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ถึงร้อยละ 61.7977, 57.3034, 32.5843 และ 59.5506 (ตารางที่ 4.3) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (In vitro test)

รหัสแบคทีเรียเอนโดไฟต์	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อก่อโรค (ซ.ม.)	เปอร์เซ็นการยับยั้งการเจริญเติบโต (PIRG)
C40	1.7	61.7977
C55	1.9	57.3034
C58	3	32.5843
C60	1.8	59.5506



รูปที่ 4.3 แสดงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ยับยังเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (B) โดยใช้วิธีการเลี้ยงแบบ dual culture บนอาหาร PDA ซึ่งภาพนี้บันทึกหลังจากลงเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. ผ่านไปแล้ว 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยใช้วิธี in vivo test

ผลการทดสอบแบบ in vivo test บนใบกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคโดยมีเชื้อราเอนโดไฟต์ จำนวน 3 ไอโซเลต จาก 15 ไอโซเลต ได้แก่ E1, C2 และ C9 และเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ จำนวน 2 ไอโซเลต จาก 4 ไอโซเลต ได้แก่ C40 และ C60 (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.4) (รูปที่ 4.5)

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการทดสอบแบบ in vivo ในใบกล้วยไม้รองเท้านารี

Treatment	ฤทธิ์การยับยั้งของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (+, -)
control 1	-
control 2	+
E1	-
E30	+
C2	-
C5	+
C6	+
C7	+
C9	-
C10	+
C11	+
C13	+
C15	+
C20	+
C22	+

หมายเหตุ : + เชื้อเอนโดไฟต์ที่ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค

- เชื้อเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค

control 1 คือ น้ำกลั่น

control 2 คือ เชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงผลการทดสอบแบบ in vivo ในใบกล้วยไม้รองเท้านารี

Treatment	ฤทธิ์การยับยั้งของจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ (+, -)
control 1	-
control 2	+
C24	+
C25	+
C40	-
C55	+
C58	+
C60	-

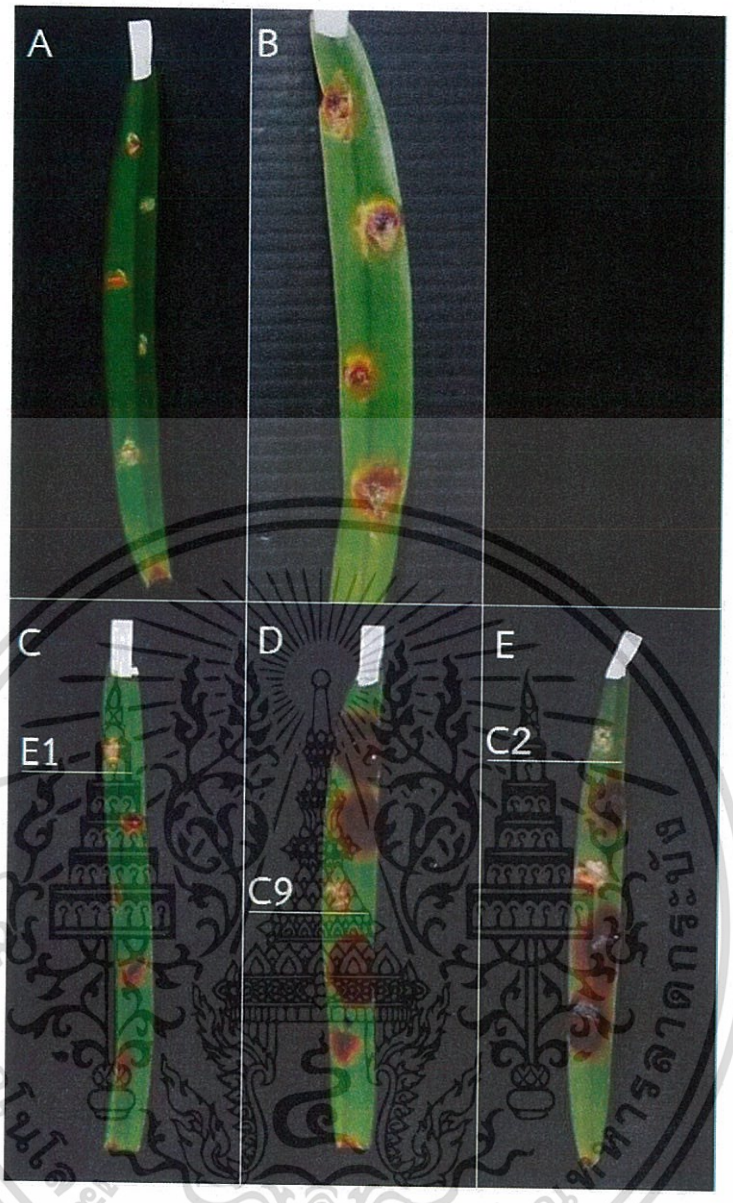
หมายเหตุ : + เชื้อเอนโดไฟต์ที่ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค

- เชื้อเอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค

control 1 คือ น้ำกลั่น

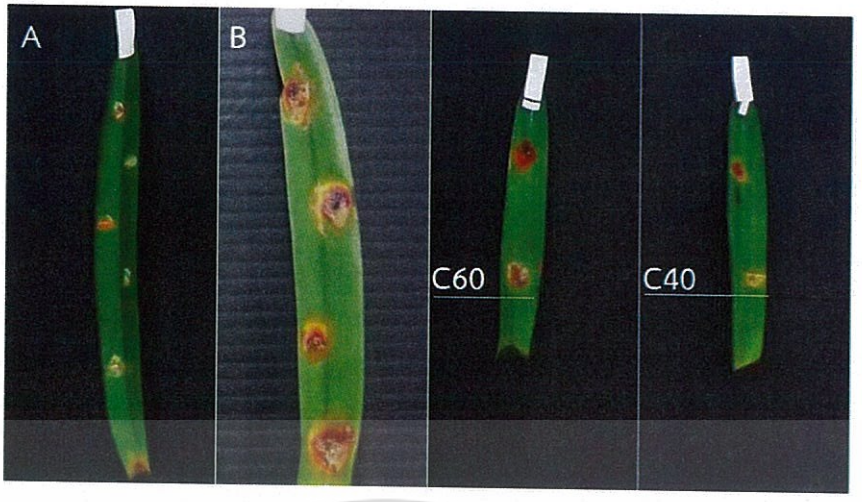
control 2 คือ เชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงราเอนโดไฟต์ E1 (C), C9 (D) และ C2 (E) ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. โดยการทดสอบแบบ in vivo บนกล้วยไม้รองเท้านารีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ 1 น้ำกลั่น (A) และชุดควบคุมที่ 2 เชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. (B) ซึ่งภาพนี้บันทึกหลังจากลงเชื้อบนใบกล้วยไม้รองเท้านารี ผ่านไปแล้ว 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



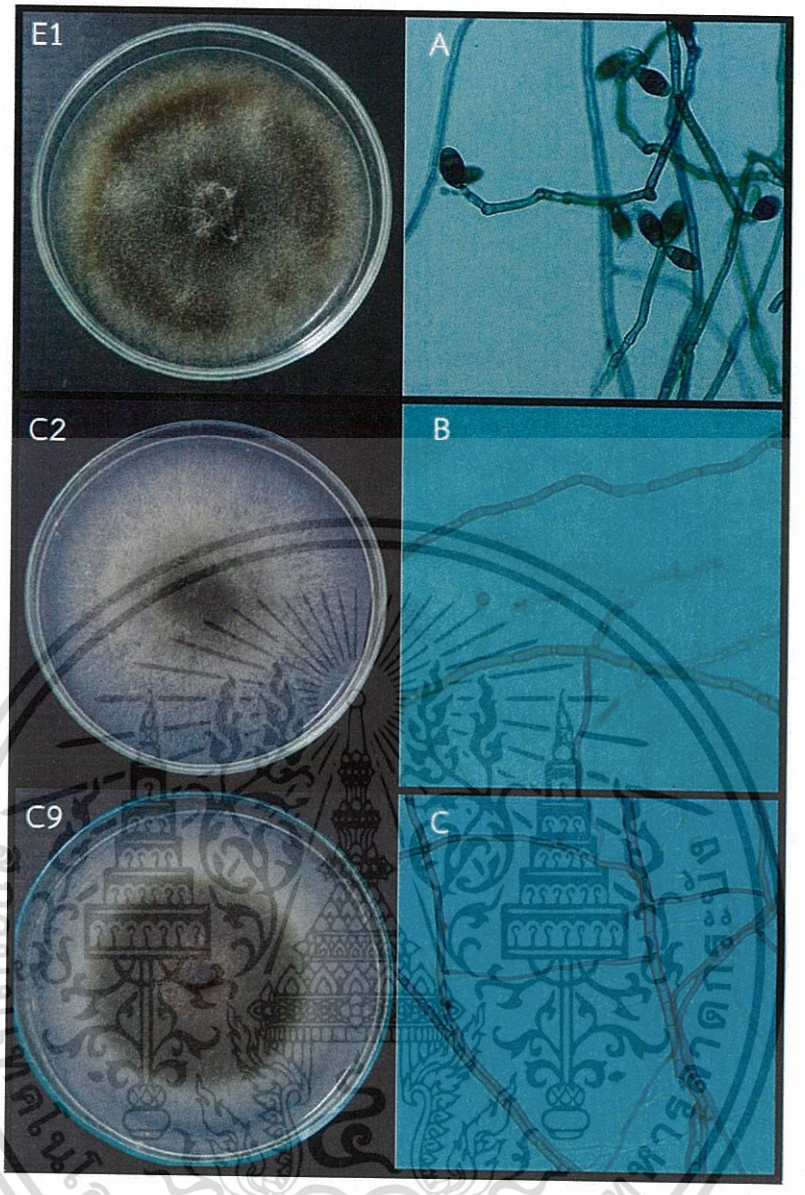
รูปที่ 4.5 แสดงแบคทีเรียเอนโดไฟต์ C60 (C) และ C40 (D) ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. โดยการทดสอบแบบ in vivo บนกล้วยไม้รองเท้านารีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ 1 น้ำกลั่น (A) และชุดควบคุมที่ 2 เชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. (B) ซึ่งภาพนี้บันทึกหลังจากลงเชื้อบนใบกล้วยไม้รองเท้านารี ผ่านไปแล้ว 7 วัน

จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการทดสอบแบบ in vivo นั้นมีประสิทธิภาพมากกว่าการทดสอบแบบ in vitro ทั้งนี้น่าจะเนื่องมาจากวิธีการแบบ in vivo สามารถแสดงถึงประสิทธิภาพในการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ E1, C2, C9, C40 และ C60 ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ส่งผลต่อการเกิดโรคในพืชได้จริง

4.4 การจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

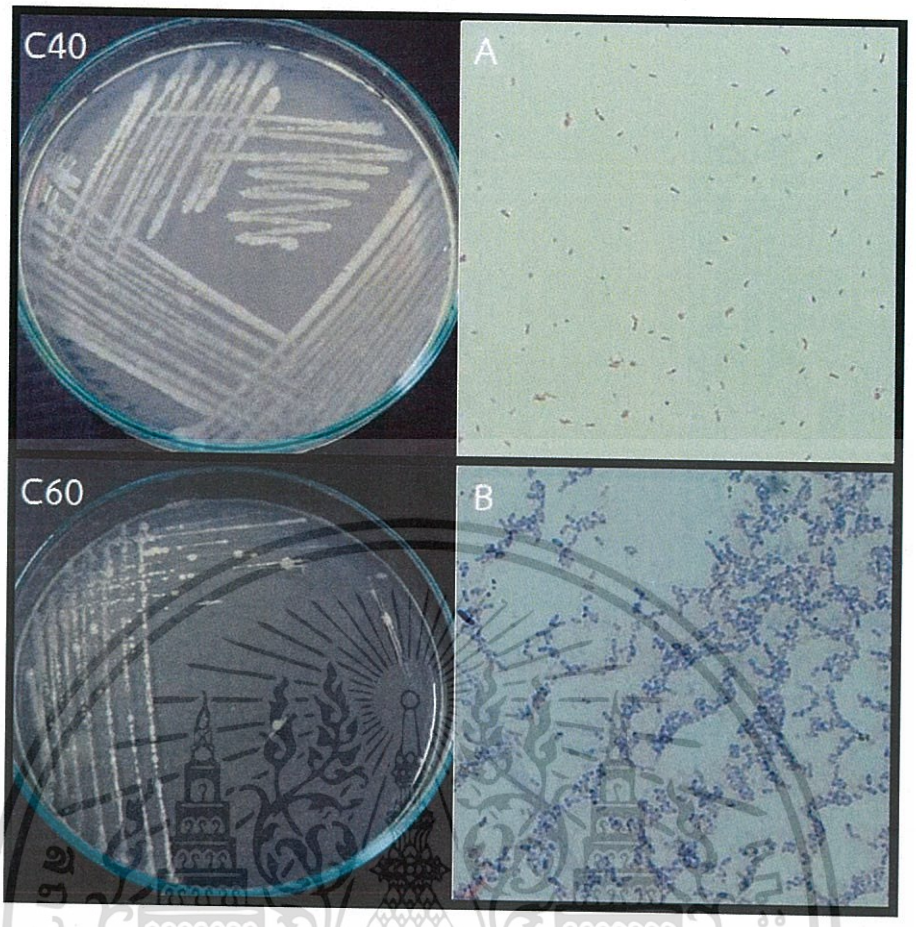
จากการทดสอบแบบ in vivo test บนใบกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่ามีเชื้อราเอนโดไฟต์ 3 ไอโซเลต เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 2 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งสามารถบอกลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะโคโลนีของราเอนโดไฟต์บนอาหาร PDA อายุ 14 วัน (ซ้าย) และเส้นใยของราเอนโดไฟต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียเอนโดไฟต์บนอาหาร NA อายุ 7 วัน (ซ้าย) และลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า (ขวา)

4.4.1 กลุ่มที่สามารถจัดจำแนกได้

ไอโซเลต E1 ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA ฟูและมีสีเขียวเข้ม เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่าพบก้านชูสปอร์เป็นแบบเดี่ยวและแบบกิ่ง มีทั้งลักษณะตรงและโค้งงอ รูปร่างสปอร์มีลักษณะโค้งเป็นวงรีคล้ายรูปไข่ มี 3 septum เซลล์ตรงกลางสีเข้ม มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์หัวและท้าย เซลล์ส่วนหัวและท้ายมีสีอ่อนกว่า (A) มีลักษณะคล้ายคลึงกับสกุล *Curvularia* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิจัย (2551) ได้กล่าวว่า เชื้อราสกุล *Curvularia* จะสร้าง conidium ที่มี 3-5 เซลล์ รูปร่างโค้ง เซลตรงกลางมีสีเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย เกิดบนก้าน conidiophore สีเข้มไม่แตกกิ่งก้าน แต่อาจมีการ proliferation ออกทางด้านข้างใกล้ส่วนปลาย ทำให้สร้างสปอร์เพิ่มขึ้นได้อีก และก้าน conidiophore มีลักษณะเป็นข้อหัก (geniculate) และงานวิจัยของ วิภาวรรณ และคณะ (2558) สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากกล้วยไม้ป่าได้ทั้งหมด 51 ไอโซเลต โดยพบ *Curvularia* sp. จำนวน 5 ไอโซเลต เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ชุติมา และคณะ (2557) สามารถแยกราเอนโดไฟต์จากกิ่งและใบโสนบริเวณอำเภอต่างๆ ของจังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบราเอนโดไฟต์จำนวน 143 สายพันธุ์ จัดจำแนกชนิดราได้ 7 สกุล 5 ชนิด ดังนี้ *Chaetomium globosum,*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Curvularia lunata, Curvularia spp., *Nigrosporium sphaerica, Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp., *Talaromyces trachyspermus, Zygosporium masonii* และ unidentified spp.

4.4.2 กลุ่มที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้

ไอโซเลต C2 ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA มีสีขาวไม่หนาแน่น เมื่อแก่สีของเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่าพบ เส้นใยมีลักษณะโค้งงอ มีผนังกั้น ไม่สร้างสปอร์ (B)

ไอโซเลต C9 ลักษณะเส้นใยบนอาหาร PDA มีสีขาวและหนาแน่น เมื่อแก่สีของเส้นใยเปลี่ยนเป็นสีเขียวมะกอก ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่าพบเส้นใยเป็นก้านเดี่ยวและแตกกิ่ง มีลักษณะตรง มีผนังกั้น ไม่สร้างสปอร์ (C)

ไอโซเลต C40 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA มีสีขาวขุ่น รูปร่างไม่แน่นอน นูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร ผิวหน้าไม่มันวาว ขอบไม่เรียบ เมื่อย้อมแกรมและส่องเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าตัวเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงและสั้น และติดสีแดง ซึ่งแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (A)

ไอโซเลต C60 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA มีสีขาวขุ่น รูปร่างกลม แห้งขรุขระเป็นแผ่น เมื่อย้อมแกรมและส่องเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าตัวเซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงและสั้น และติดสีม่วง ซึ่งแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์จากกล้วยไม้รองเท้านารีสายพันธุ์เหลืองปราจีนและเหลืองกระบี่ สามารถคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 123 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์แต่ละไอโซเลตที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. โดยวิธี dual culture พบว่าสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีประสิทธิการยับยั้งในระดับปานกลาง-สูงได้จำนวน 23 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ 4 ไอโซเลต และราเอนโดไฟต์ 19 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 23 ไอโซเลต มาตรวจสอบแบบ in vivo test บนใบกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. จำนวน 5 ไอโซเลต โดยมีแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ C40 และ C60 และ ราเอนโดไฟต์จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ E1, C2 และ C9 โดย ไอโซเลต E1 มีความคล้ายคลึงกับ เชื้อราสกุล *Curvularia* sp.

ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ทั้ง 5 ไอโซเลตนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Pestalotiopsis* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ในใบของกล้วยไม้รองเท้านารี

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ในการคัดแยกจุลินทรีย์เอนโดไฟต์จากต้นกล้วยไม้รองเท้านารีจะต้องใช้ต้นกล้วยไม้ที่มีความสมบูรณ์และไม่แสดงอาการเป็นโรค

2) เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ให้มีความหลากหลายควรเก็บตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีจากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

3) จากการศึกษานี้ในจำแนกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์ที่ผ่านการคัดเลือก มีทั้งกลุ่มที่สามารถจัดจำแนกได้ และกลุ่มที่ไม่สามารจัดจำแนกได้ ซึ่งแนวทางการระบุและจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์เอนโดไฟต์กลุ่มที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ มีวิธีการระบุและจัดจำแนกดังนี้

การระบุชนิดของราเอนโดไฟต์ที่ผ่านการคัดเลือกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบตาม Barnett and Hunter (1972) และการตรวจลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ rDNA ส่วน ITS1 และ ITS2 โดยเทคนิค PCR ด้วย primer ITS1 และ ITS2 (อนันต์, 2557)

การระบุชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ผ่านการคัดเลือก โดยการทดสอบการติดสีแกรมและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบคุณสมบัติในการย่อยแป้ง (starch hydrolysis test), การทดสอบแคตาเลส (catalase test), การทดสอบการย่อยเคซีน (casein test), การทดสอบการย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจลาติน (gelatin liquefaction test), การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation test), การทดสอบการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และการทดสอบความสามารถในการทนเกลือ ความร้อน และความเป็นกรด-ด่าง นอกจากนี้ยังสามารถระบุชนิดของเชื้อ โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) นิยมใช้ลำเบสของ 16S rDNA ซึ่งสะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง (พรพรรณ, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. 2555. **กล้วยไม้ : เทคโนโลยีและการประยุกต์ใช้งาน**. อุบลราชธานี : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

เกษม สร้อยทอง. 2551. **เทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี**. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จักรพงศ์ จันทวงศ์ และคณะ. 2553. "ผลของฤดูกาลต่อความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ในรากกล้วยไม้สกุลว่านจูงนาง". **วารสารเกษตร** 26(1) : 35-42.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. **การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี**. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ชุติมา แก้วกระจาย ธิดา เดชฮวบ และเลิศชาย สถิตย์พนาวงศ์ (2557) ประสิทธิภาพของราเอนโดไฟท์จากโสน (Sesbania javanica) ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช. **แก่นเกษตร**. 42(3) : 271-282.

ไชยา ลาวัลย์. 2534. **กล้วยไม้รองเท้านารี**. ม.ป.ท.

นพรัตน์ ถวิลเวทิน. 2554. "กล้วยไม้รองเท้านารีภาคใต้". **เกษตรก้าวหน้า**. 24(1) : 30.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. "โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ". หน้า 129-159. ใน **สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว**. กรุงเทพฯ : โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว.

ประพันธ์ โอสถาพันธ. 2551. "การผลิตกล้วยไม้เอื้องแซะหอมโดยวิธีการจัดการศัตรูพืชเชิงพาณิชย์ : การประเมินความเสียหายเนื่องจากโรคของกล้วยไม้เอื้องแซะหอม". ใน **โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ การผลิตเอื้องแซะหอมเชิงพาณิชย์เพื่ออุตสาหกรรมเครื่องหอม**. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

พรพรรณ อู่สุวรรณ. 2550. **การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น**. นครราชสีมา : สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ. 2553. "การศึกษาชนิดของโรคพุทราเพื่อการนำเข้า". หน้า 473-483. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ. 2556. "วิจัยและพัฒนาการจัดการโรคมะเม่า". หน้า 491-501. ใน **รายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๕๖ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. **ราวิทยาเบื้องต้น ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน**. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

วิภาวรรณ มะลิวัลย์ จุรีรัตน์ เจริญรอย และวรพล สุรพัฒน์. 2558. "ฤทธิ์ของสารยับยั้งแบคทีเรีย Staphylococcus aureus จากเชื้อราเอนโดไฟต์ในกล้วยไม้ป่าในจังหวัดอุบลราชธานี". **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2558**. อุบลราชธานี : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2544. "การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี". หน้า 41-63. ใน **โรคพืช มข. ปริทรรศน์ ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศรีสุดา โท้ทอง. 2554. "ศัตรูกล้วยไม้". **เกษตรก้าวหน้า**. 24(1) : 51-53.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล. 2551. **ร้อยพรรณพฤกษา รองเท้านารี**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์

สมศิริ แสงโชติ และคณะ. 2546. "การเข้าทำลายผลเงาะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคผลเน่าและการควบคุมโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยว". หน้า 129-159. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 สาขาพืช ส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร อุตสาหกรรมเกษตร**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช. 2551. **คู่มือศึกษากล้วยไม้ป่า**. เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

สุทัศน์ ลิมปิยประพันธ์. 2554. **กล้วยไม้**. กรุงเทพฯ : ซีเอ็ดยูเคชั่น.

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2557. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับอาหาร สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อนันต์ วงเจริญ. 2557. "การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์จากข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งราสาเหตุโรคข้าว". **แก่นเกษตร**. 42(3) : 385-396.

อนันต์ วงเจริญ. 2557. "บทบาทของเชื้อราเอนโดไฟต์ต่อการควบคุมโรคพืช". **แก่นเกษตร**. 42(4) : 623-634.

อภาพร โพธิยอด และเกวลิน คุณาศักดากุล. 2557. "การชักนำให้เกิดความต้านทานโรครากเน่าไฟทอปธอราในสตรอว์เบอร์รีที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเชื้อแอกติ โนไมซีสต์เอนโดไฟต์". **วารสารเกษตร** 30(3) : 213-222.

อุไร จิรมงคลการ. 2550. **กล้วยไม้รองเท้านารี (ฉบับปรับปรุงข้อมูลใหม่)**. กรุงเทพฯ : อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิสชิ่ง จำกัด.

อุไร จิรมงคลการ. 2550. **กล้วยไม้รองเท้านารี**. กรุงเทพฯ : อมรินทร์พรินติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bayman P., Ligia L. Lebro, Raymond L. Tremblay and D. Jean Lodge. 1997. "variation in endophytic fungi from roots and leaves of lepanthes (orchidaceae)". **New Phytologist**. 135 : 143-149

Barnett,H.L. and Hunter, B.B. 1972. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3rd ed. Minneapolis : Burgess.

Lee JC, Yang X, Schwartz M, Strobel G and Clardy J. 1995. "The relationship between an endangered North American tree and an endophytic fungus". **Chem Biol**. 2 : 721-727

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.

Mousa, W. K., and M. N. Raizada. 2013."c: an interdisciplinary perspective". **Frontiers in Microbiology**. 4 : 1-18

Sajeewa S. N. Maharachchikumbura, Liang-Dong Guo, Ekachai Chukeatirote, Ali H. Bahkali and Kevin D. Hyde. 2011. "Pestalotiopsis-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity". **Fungal Diversity**. 2011(50) : 167-187.

Schulz, B., C. Boyle, S. Draeger, A.-K. Römmert, and K. Krohn. 2002. "Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites". **Mycological Research**. 106 : 996-1004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nitrient Agar/Broth

ส่วนประกอบ

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
วุ้น (ไม่เติมวุ้นกรณีที่เตรียม Nitrient Broth)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Nitrient Agar/Broth

ผสมส่วนผสมทุกชนิดในน้ำกลั่น ให้ความร้อนจนวุ้นละลาย แบ่งใส่ในขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 6.8±0.2

Potato Dextrose Agar/Broth

ส่วนประกอบ

Potato infusion	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
วุ้น (ไม่เติมวุ้นกรณีที่เตรียม Potato Dextrose Broth)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม Potato Dextrose Agar/Broth

เตรียม Potato infusion โดยหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆ ไม่ต้องปอกเปลือก ชั่งน้ำหนักมันฝรั่ง 200 กรัมใส่ในภาชนะ เติมน้ำกลั่น 1 ลิตรนำไปต้ม 30 นาที กรองผ้าขาวบาง น้ำมันฝรั่งที่กรองได้คือ Potato infusion เติมวุ้นและ Dextrose ลงไป ต้มจนวุ้นละลาย บรรจุขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พีเอชสุดท้าย 5.6±0.2 (สุรีย์, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางผลการทดสอบความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค โดยใช้วิธี in vitro test

ตารางที่ ข.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (In vitro test)

ชุดการทดลอง	เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	รหัสเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อก่อโรค (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (PIRG)
1	Pathogens1		4.3	0
	2EEXLB001	E36	3	30.23255814
	2EEXLB002	E37	3.51	18.37209302
	2EEXLB003	E38	3.75	12.79069767
	2EEXRB004	E39	3.42	20.46511628
	2EEXRB005	E40	3.65	15.11627907
	2EEXRB006	E41	3	30.23255814
	2EEXRB007	E42	3.21	25.34883721
	2EEXRB008	E43	3.6	16.27906977
	2EEXRB009	E44	3.1	27.90697674
	3EEXLB001	E45	3.4	20.93023256
	3EEXLB002	E46	4	6.976744186
	3EEXLB003	E47	3.8	11.62790698
	3EEXLB004	E48	3.35	22.09302326
	3EEXLB005	E49	3.9	9.302325581
	3EEXRB006	E50	3.95	8.139534884
	3EEXRB007	E51	3.6	16.27906977
	3EEXRB008	E52	3.75	12.79069767
	3EEXRB009	E53	3.35	22.09302326
	3EEXRB010	E54	3.2	25.58139535

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (In vitro test)

ชุดการทดลอง	เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	รหัสเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อก่อโรค (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (PIRG)
	3EEXRB011	E55	3.75	12.79069767
	3EEXRB012	E56	3.3	23.25581395
	3EEXRB013	E57	3.21	25.34883721
	4ECCLB001	C35	3.15	26.74418605
	4ECCLB002	C36	3.2	25.58139535
2	Pathogens2		4.45	0
	4ECCLB003	C37	3.55	20.2247191
	4ECCLB004	C38	3.4	23.59550562
	4ECCLB005	C39	3.6	19.1011236
	4ECCLB006	C40	1.7	61.79775281
	4ECCLB007	C41	3.65	17.97752809
	4ECCLB008	C42	3.2	28.08988764
	4ECCLB009	C43	3.33	25.16853933
	4ECCLB010	C44	3.1	30.33707865
	4ECCLB011	C45	3.7	16.85393258
	4ECCLB012	C46	3.65	17.97752809
	4ECCRB013	C47	3.95	11.23595506
	4ECCRB014	C48	3.2	28.08988764
	4ECCRB015	C49	3.2	28.08988764
	4ECCRB016	C50	3.2	28.08988764
	4ECCRB017	C51	3.8	14.60674157
	4ECCRB018	C52	3.1	30.33707865
	4ECCRB019	C53	3.6	19.1011236
	4ECCRB020	C54	3.15	29.21348315
	4ECCRB021	C55	1.9	57.30337079
	4ECCRB022	C56	3.5	21.34831461

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (In vitro test)

ชุดการทดลอง	เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	รหัสเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อก่อโรค (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (PIRG)
	4ECCRB023	C57	3.95	11.23595506
	4ECCRB024	C58	3	32.58426966
	4ECCRB025	C59	3.1	30.33707865
	4ECCRB026	C60	1.8	59.5505618
	4ECCRB027	C61	3.6	19.1011236
	4ECCRB028	C62	3.9	12.35955056
	4ECCRB029	C63	3.15	29.21348315
	4ECCRB030	C64	3.7	16.85393258
	4ECCRB031	C65	3.65	17.97752809
	4ECCRB032	C66	3.25	26.96629213
3	Pathogens3		4.25	0
	2EEXLF001	E1	2.6	38.82352941
	2EEXLF002	E2	3	29.41176471
	2EEXLF003	E3	3.15	25.88235294
	2EEXLF004	E4	3.35	21.17647059
	2EEXLF005	E5	3.65	14.11764706
	2EEXLF006	E6	3.1	27.05882353
	2EEXLF007	E7	3.8	10.58823529
	2EEXLF008	E8	3	29.41176471
	2EEXRF009	E9	3.75	11.76470588
	2EEXRF010	E10	3.2	24.70588235
	2EEXRF011	E11	3.33	21.64705882
	2EEXRF012	E12	3.9	8.235294118
	3EEXLF001	E13	3.1	27.05882353
	3EEXLF002	E14	3.4	20
	3EEXLF003	E15	3.45	18.82352941

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (In vitro test)

ชุดการทดลอง	เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	รหัสเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อก่อโรค (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (PIRG)
	3EEXLF004	E16	3.85	9.411764706
	3EEXLF005	E17	3.6	15.29411765
	3EEXLF006	E18	4	5.882352941
	3EEXLF007	E19	3.05	28.23529412
	3EEXLF008	E20	3.33	21.64705882
	3EEXLF009	E21	3.15	25.88235294
	3EEXLF010	E22	3.4	20
4	Pathogens4		4.65	0
	3EEXLF011	E23	3.65	21.50537634
	3EEXLF012	E24	3.7	20.43010753
	3EEXLF013	E25	3.33	28.38709677
	3EEXLF014	E26	3.45	25.80645161
	3EEXRF015	E27	3.8	18.27956989
	3EEXRF016	E28	3.65	21.50537634
	3EEXRF017	E29	3.95	15.05376344
	3EEXRF018	E30	3.2	31.1827957
	3EEXRF019	E31	3.4	26.88172043
	3EEXRF020	E32	3.5	24.7311828
	3EEXRF021	E33	3.25	30.10752688
	3EEXRF022	E34	3.5	24.7311828
	3EEXRF023	E35	3.6	22.58064516
	4ECCLF001	C1	3.33	28.38709677
	4ECCLF002	C2	3.2	31.1827957
	4ECCLF003	C3	3.75	19.35483871
	4ECCRF004	C4	3.9	16.12903226
	4ECCRF005	C5	2.85	38.70967742

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (In vitro test)

ชุดการทดลอง	เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	รหัสเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อก่อโรค (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (PIRG)
	4ECCRF006	C6	2.7	41.93548387
	4ECCRF007	C7	2.7	41.93548387
	4ECCRF008	C8	4	13.97849462
	4ECCRF009	C9	3.05	34.40860215
	4ECCRF010	C10	2.8	39.78494624
	4ECCRF011	C11	2.95	36.55913978
	4ECCRF012	C12	4.3	7.52688172
	4ECCRF013	C13	3	35.48387097
	4ECCRF014	C14	3.5	24.7311828
	4ECCRF015	C15	2.95	36.55913978
	5ECCLF001	C16	3.4	26.88172043
	5ECCLF002	C17	4.1	11.82795699
	5ECCLF003	C18	3.65	21.50537634
	5ECCLF004	C19	3.5	24.7311828
	5ECCLF005	C20	3.2	31.1827957
	5ECCLF006	C21	3.8	18.27956989
	5ECCLF007	C22	2.9	37.6344086
	5ECCLF008	C23	3.7	20.43010753
	5ECCLF009	C24	3.1	33.33333333
	5ECCLF010	C25	3	35.48387097
	5ECCLF011	C26	3.75	19.35483871
	5ECCLF012	C27	3.6	22.58064516
	5ECCLF013	C28	4.1	11.82795699
	5ECCRF014	C29	3.25	30.10752688
	5ECCRF015	C30	3.33	28.38709677
	5ECCRF016	C31	3.65	21.50537634

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 (ต่อ) แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค (In vitro test)

ชุดการทดลอง	เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	รหัสเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์	ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อก่อโรค (ซม.)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (PIRG)
	5ECCRF017	C32	3.8	18.27956989
	5ECCRF018	C33	3.25	30.10752688
	5ECCRF019	C34	3.45	25.80645161

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้