รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาปาล์มน้ำมัน

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปาล์มน้ำมัน

กิจกรรมที่ 2 : วิจัยด้านอารักขาปาล์มน้ำมัน

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 : การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Biological Control of Basal Stem Rot of Oil Palm

ชื่อการทดลองย่อย 2.1.1 : การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้รา endophyte และรา *Trichoderma* spp. (หัวหน้าการทดลอง นางสาวชนินทร ดวงสอาด)

: Biological Control of Basal Stem Rot of Oil Palm by Endophytic Fungi and *Trichoderma* spp.

ชื่อการทดลอง 2.1.2 : การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้รา วี-เอ ไมคอร์ไรซา (หัวหน้าการทดลองนางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม)

: Biological Control of Basal Stem Rot of Oil Palm by VA-mycorrhizal fungi

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นางสาวชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	: นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางยิ่งนิยม ริยาพันธุ์	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
	นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายอภิรัชต์ สมฤทธิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายพิพัฒน์ เซี่ยงหลิว	สำนักวิจัยพัฒนาเกษตรเขตที่ 8

5. บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากปาล์มน้ำมัน รางจืด กระถินเทพา ย่านาง และไผ่ หลังผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที และการแยกเชื้อรา *Trichoderma* จากดินบริเวณรอบรากของพืช 50 ชนิด พบว่า เชื้อราเอ็นโดไฟท์ ไอโซเลท KtB-4 ที่แยกได้จากกิ่งของกระถินเทพา มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* ในห้องปฏิบัติการสูงสุด และ *Trichoderma* St-Te-5 1 *Trichoderma* St-Pr-1 *Trichoderma* St-Ct-2 *Trichoderma* St-Ta-3 และ

Trichoderma St-Srb-3 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบ สัก ยางพารา ขี้เหล็ก มะขาม และข่อย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรองลงมาตามลำดับ และเชื้อราปฏิปักษ์ข้างต้นมีศักยภาพในการควบคุมการเกิดโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า โดยพบการแสดงอาการของโรคในระดับที่ต่ำและรุนแรงน้อยกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการใช้เชื้อราปฏิปักษ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ endophyte KtB-4 และ *Trichoderma* St-Te-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ และควบคุมการเกิดโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันที่เกิดจากเชื้อเห็ด *G. boninense* สูงสุด

จากการรวบรวมและจำแนกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบลำต้นปาล์มน้ำมันและรากของต้นพืช จำนวน 22 ตัวอย่าง จากจังหวัดกระบี่ ชลบุรี ชุมพร และสุราษฎร์ธานี และทำการศึกษาแยกราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดินที่เก็บมาทั้งหมด 22 ตัวอย่าง พบราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดินจำนวน 11 ตัวอย่าง แยกราวี-เอไมคอร์ไรซาได้ทั้งหมด 56 ไอโซเลท การจำแนกชนิดราวี-เอไมคอร์ไรซา โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน ตรวจสอบลักษณะสปอร์ราวี-เอไมคอร์ไรซา ภายใต้กล้อง เช่น สีของสปอร์ ผนังของสปอร์ และวัดขนาดของสปอร์ เป็นต้น จำแนกราวี-เอไมคอร์ไรซาได้ 4 สกุล ได้แก่ *Acaulospora* จำนวน 11 ไอโซเลท *Gigaspora* จำนวน 2 ไอโซเลท *Glomus* จำนวน 32 ไอโซเลท และ *Scutellospora* จำนวน 11 ไอโซเลท จากการทดสอบประสิทธิภาพของ ราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า หลังจากปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* และราวี-เอไมคอร์ไรซา ทำการบันทึกความสูงและบันทึกจำนวนการแตกใบยอดต้นกล้าปาล์มน้ำมันทุกเดือน จากการผลการบันทึกความสูงและจำนวนการแตกใบยอดต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ในแต่ละกรรมวิธี ยังเห็นผลไม่ชัดเจน ตลอดจนการเกิดโรคของปาล์มน้ำมันยังแสดงอาการไม่ชัดเจน เนื่องจากสภาพอากาศร้อนแห้งจัด ทำให้การเกิดโรคช้า สังเกตอาการของโรคจากภายนอกได้ไม่ชัดเจน **จึงขอต่อระยะเวลาในการบันทึกผลจนถึงเดือนพฤษภาคม** เพื่อให้ผลการทดลองสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

Endophytic fungi from *Elaeis guineensis*, *Thunbergia laurifolia*, *Acacia mangium*, *Tiliacora triandra* and *Bambusa* sp. were isolated after triple surface sterilization. *Trichoderma* spp. were also isolated from soil surrounding root system of 50 host plants. It was found that endophytic fungi isolate KtB-4 from *A. mangium* and *Trichoderma* St-Te-5 1, *Trichoderma* St-Pr-1, *Trichoderma* St-Ct-2, *Trichoderma* St-Ta-3, *Trichoderma* St-Srb-3 from soil collected from root system of *Tectona grandis*, *Hevea brasiliensis*, *Senna siamea*, *Tamarindus indica* and *Streblus asper*, respectively showed high efficacy of being antagonists to *G. boninense* in laboratory. These antagonist fungi obviously presented the highly significant of efficacy to control basal stem rot disease. As the results, endophytic fungi isolate KtB-4 and *Trichoderma* St-Te-5 were proved to be the effective antagonistic fungi to *G. boninense*, the causal agent of basal stem rot of oil palm.

56 isolates of VA-mycorrhizal fungi were isolated from 22 samples of roots and soil, collected from oil palm plantations in Krabi, Chon Buri, Chumphon and Surat Thani. VA-mycorrhizal fungi were isolated from 11 soil samples. VA-mycorrhizal fungi were observed under light microscope using characters of spore colors, spore walls and sizes of spores and 56 isolates of VA-mycorrhizal fungi were identified and classified into four genera namely, *Acaulospora* (11 isolates), *Gigaspora* (2 isolates), *Glomus* (32 isolates) and *Scutellospora* (11 isolate). The efficacy of being antagonists of VA-mycorrhizal fungi to control *G. boninense* was determined in seedling stage of oil palm. The preliminary results after treated *G. boninense* for four months showed that the differentiation among treatments could not be determined as the height and number of new shoots of oil palm seedlings were not highly significant of differences. The disease symptom of basal stem rot was only at the first stage. The extension of timeframe until May 2016 to monitor the disease occurrence is required in order to improve the results of this experiment.

6. คำนำ

ปาล์มน้ำมัน *(Elaeis guineensis* jacq.) เป็นพืชน้ำมัน ที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงกว่าพืชน้ำมันชนิดอื่น ทั้งด้านการผลิตและการตลาด ส่วนแบ่งการผลิตน้ำมันปาล์มต่อน้ำมันพืชของโลก มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และรวดเร็ว จากร้อยละ 11.7 ในช่วงปี 2519-2543 เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 27.5 ในช่วงปี 2544-2548 และคาดว่าจะเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 31.2 ในช่วงปี 2549-2563 โดยมีประเทศผู้ผลิตสำคัญ คือ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย สำหรับประเทศไทย อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มของไทย มีอัตราการขยายตัวค่อนข้างสูงเช่นกัน โดยมีพื้นที่เพาะปลูกเพิ่มขึ้นจาก 69,625 ไร่ ในปี 2520 เป็น 2.04 ล้านไร่ ในปี 2546 และน้ำมันปาล์มเป็นน้ำมันพืชที่มีส่วนแบ่งการผลิตสูงสุดของ อุตสาหกรรมน้ำมันพืชของไทย คือ มีส่วนแบ่งการผลิตถึงร้อยละ 73 และมีส่วนแบ่งการบริโภคน้ำมันพืชร้อยละ 62 ของน้ำมันพืชทุกชนิด และมีมูลค่าของอุตสาหกรรมสูงถึง 45,000 ล้านบาท ในปี 2546 ในปี 2547 นี้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้จัดทำยุทธศาสตร์อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมัน โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำมันปาล์มให้เพียงพอ จะก่อให้เกิดอุตสาหกรรมแปรรูป ที่สร้างมูลค่าเพิ่ม ทั้งในส่วนของการนำมายบริโภค และนำมาทำเป็นพลังงาน ทั้งนี้ มีเป้าหมายขยายพื้นที่ปลูกปาล์ม ให้ได้ 10 ล้านไร่ ภายในปี 2572 เพื่อให้ได้ผลปาล์ม 25 ล้านต้น เพื่อให้ได้น้ำมันปาล์มดิบ 4.50 ล้านตัน (องค์การตลาดเพื่อการเกษตร, 2552) จึงเป็นแรงจูงใจให้เกษตรกรขยายพื้นที่ปลูก ประกอบกับมีโครงการเปลี่ยนพื้นที่ปลูกปาล์มทั่วประเทศ ซึ่งในการนี้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้มีแผนกำหนดพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน (Zoning) ใหม่ในประเทศขึ้น โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาความเป็นไปได้ของการปลูกปาล์มน้ำมัน เช่นในพื้นที่ตัวอย่างภาคเหนือ และตะวันออกเฉียงเหนือแล้ว (กรมวิชาการเกษตร, 2548)

ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการปลูกปาล์มน้ำมันคือศัตรูพืช โดยเฉพาะโรคพืช ได้แก่โรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน มีสาเหตุจากเชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. ซึ่งเป็นเห็ดในตระกูลเดียวกับเห็ดหลินจือ มีรายงานพบโรคนี้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2458 และอีก 20 ปีต่อมาจึงพบว่าเชื้อเห็ดทำความเสียหายในหลายประเทศที่ปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศมาเลเซีย และอินโดนีเซีย (Ariffin *et al*., 1995) นอกจากนี้มีรายงานพบโรคในประเทศแซร์ โรดีเซียเหนือ คาเมรูน เซนต์เทมส์ พริ้นซิปเป้ แองโกล่า กานา ไนจีเรีย แทนซาเนีย ปาปัวนิวกินี อินเดีย และประเทศไทย (ศรีสุรางค์, 2536; Turner, 1981; Kochu and Kalidas, 2004) โดยทั่วไปเชื้อเห็ดจะเข้าทำลายต้นปาล์มน้ำมันที่มีอายุ 25-30 ปี ในปี พ.ศ. 2534 Singh ได้รายงานถึงความเสียหายของโรคนี้ว่า ทำให้ต้นปาล์มน้ำมันแถบชายฝั่งทะเลของมาเลเซียที่มีอายุ 25 ปี เป็นโรคลำต้นเน่าตายถึง 85% และเมื่อทำการปลูกแทนในที่เดิมก็ทำให้ปาล์มน้ำมันที่ปลูกแทนนั้นเป็นโรค โดยแสดงอาการของโรคได้ตั้งแต่อายุ 4-5 ปี และความรุนแรงของโรคจะเพิ่มขึ้นถึง 40-50% เมื่อปาล์มน้ำมันอายุ 15 ปี (Singh,1991) ซึ่งปัญหาดังกล่าวนี้นับว่าเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่งในการปลูกทดแทนของปาล์มน้ำมันในประเทศมาเลเซีย ซึ่งจะต้องมีการปลูกแทนในปี พ.ศ. 2540-2543 ปีละ 82,000 เฮกตาร์ (Mohamad *et al*., 1985) โรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันมีความสำคัญเพิ่มขึ้นในพื้นที่ที่มีการปลูกทดแทนในพื้นที่เดิมของปาปัว นิวกินี และหมู่เกาะโซโลมอน (Flood and Hasan, 2004)

ในพื้นที่ป่าธรรมชาติจะพบโรคที่เกิดจากเชื้อ *Ganoderma* spp. ในปริมาณน้อย ทั้งๆ ที่มีเชื้อสาเหตุอยู่ในพื้นที่ เนื่องจากพื้นที่ป่าธรรมชาติมีความสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในสภาพ แวดล้อมกล่าวคือ เชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. ถูกควบคุมโดยเชื้อจุลินทรีย์อื่น จากการ ศึกษาถึงเชื้อจุลินทรีย์ในดินโดยเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus* spp. พบว่าเชื้อราจะอาศัยอยู่ที่ระดับผิวดิน ในพื้นที่ป่าเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีอยู่ปริมาณมากและสามารถควบคุมเชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. ได้ แต่ในแปลงปลูกปาล์มน้ำมันพื้นผิวดินถูกรบกวนโดยการเตรียมพื้นที่ปลูก เชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลายทำให้มีปริมาณลดลง เป็นโอกาสของเชื้อสาเหตุเจริญเติบโตเข้าทำลายพืชได้

เทคนิคการปลูกแทนมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน มีรายงานการทดลองเปรียบเทียบการปลูกแทนด้วยวิธีการต่างๆต่อการเกิดโรค การปลูกแทนโดยการปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมันใต้ต้นเดิมจะเกิดโรคในปริมาณสูง พบว่าหากแปลงเก่าพบโรค 27.3 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มเป็น 33 เปอร์เซ็นต์หลังจากปลูกแทนแล้ว 15 ปี และการปลูกแทนโดยการกำจัดต่อเก่า พบเป็นโรคลดลงจาก 27.3 เปอร์เซ็นต์ เป็น 14 เปอร์เซ็นต์ และการปลูกแทนในแปลงที่นำต้นปาล์มโค่นมาวางเรียงกันระหว่างแถวปาล์มน้ำมันที่ปลูกแทนโดยไม่มีการกำจัดทิ้งการเกิดโรคลดลงจาก 27.3 เป็น 17.6 เปอร์เซ็นต์ แต่การทดลองปลูกแทนในระหว่างแถวของต้นปาล์มน้ำมันที่เป็นโรค จะเกิดโรคเพิ่มขึ้น 27.3 เป็น 93 เปอร์เซ็นต์ (ศรีสุรางค์, 2545)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาอย่างมากในการนำเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์และราไมคอร์ไรซา มาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งสามารถเพิ่มความแข็งแรง ความทนทานต่อโรคและแมลงได้ดีและทนทานต่อความแห้งแล้ง ความเค็ม และอุณหภูมิ ได้ดี (Belanger,1996; Phosr *et al*., 2010) Suslow (1982) รายงานว่าจุลินทรีย์ควบคุมโรคสามารถใช้แทนการใช้สารเคมีในกรณีที่ไม่สามารถใช้สารเคมีหรือมี

สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อีกทั้งจุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณและคงทนอยู่ในดินในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าสารเคมี

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

จากอดีตถึงปัจจุบันได้มีการพัฒนาเกี่ยวกับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โดยชักนำให้เชื้อโรคอ่อนแอลงเรื่อยๆ การพัฒนาเพื่อป้องกันพืชโดยวิธีสร้างภูมิคุ้มกันโรคด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ และเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอหรือไม่รุนแรงใส่ลงในพืช การคลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา เพื่อควบคุมโรคและเพิ่มผลผลิตของพืช นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเป็นศัตรูต่อเชื้อโรค การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในระดับโมเลกุลด้วยวิธีทางพันธุกรรม (genetic engineering) ตลอดจนการขยายกระบวนการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม นับเป็นเรื่องที่กำลังอยู่ในความสนใจของนักวิชาการทั่วโลก (จิระเดช, 2549)

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

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

การจัดการโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยวิธีการเขตกรรมและการใช้สารเคมี ไม่สามารถยับยั้งหรือควบคุมการเกิดโรคได้โดยให้ผลไม่คงที่ ซึ่งอาจเนื่องมากจากเชื้อเห็ด *Ganoderma* มีระยะพักตัวหลายระยะและสามารถแพร่กระจายได้หลายทางเช่น แพร่สามารถกระจายทางลมโดย basidiospores เชื้อสามารถแพร่กระจายเข้าทางรากในดินที่มีเชื้อเห็ดอยู่หรือเมื่อรากถูกตัดโดยอุปกรณ์ที่มีเชื้อเห็ดปนเปื้อนอยู่ เชื้อเห็ดสามารถกระจายตัวในดินโดยในแนวดิ่งสามารถกระจายลงลึกได้ถึง 2 เมตร จากรากที่เป็นโรคไปยังรากที่ปกติ เมื่อพิจารณาอย่างละเอียดพบว่า ในพื้นที่ที่แสดงอาการลำต้นเน่าน้อยหรือต่ำนั้น ขึ้นอยู่กับระยะหรือความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อเห็ด *Ganoderma* ซึ่งเชื้อเห็ดอาจถูกยับยั้งหรือถูกควบคุมโดยระบบ

ทางชีววิทยา ดังนั้น การแก้ไขควบคุมเชื้อเห็ด *Ganoderma* จะมุ่งเน้นการควบคุมโรคโดยชีววิธี และมีหลายการทดลองที่ศึกษาพบว่า *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งและควบคุมการเจริญของเชื้อเห็ดได้ดี (Sariah *et al*., 2000 และAnonymous, 2009)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีไม่ใช่เรื่องง่าย โดยเฉพาะในการจัดการควบคุมโรคที่เข้าทำลายในระบบหรือลำต้นของพืช (Ploetz, 2007) เชื้อราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. ในธรรมชาติมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น *Trichoderma* spp., *Actinomycetes* sp. และ *Bacillus* spp. ในประเทศอินโดนีเซียมีรายงานการศึกษาชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แสดงปฏิกิริยาปฏิปักษ์ต่อเชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. พบว่า *T. koningii* isolate Marihat (MR14) ให้ผลดีที่สุด และมีการผลิตเป็น biofungicides เพื่อควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. ได้ (Soepena and Purba, 1998) เชื้อรา *Trichoderma* ชนิดอื่น เช่น *T. viride*, *T. harzianum* และ *Gliocladium virens* จะมีปฏิกิริยาเป็นเชื้อราที่ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุมากกว่า ดังนั้นการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ร่วมกับเชื้อราที่ช่วยในการย่อยสลายอินทรียวัตถุ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดเชื้อเห็ด *Ganodermas* spp. ให้ได้ผลดียิ่งขึ้น เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. สามารถอยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ในรูปของ chlamydospore ซึ่งมีความต้านทานต่อ pesticides และสารกำจัดวัชพืชชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตามเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อราที่ต้องการน้ำในการงอกและเจริญเติบโต ดังนั้นการใช้เชื้อรา *Trichoderma* ควรใช้ในช่วงฤดูฝน ในแปลงที่มีการปลูกแทนเมื่อขุดต้นที่เป็นโรคออกแล้วควรใส่เชื้อรา *Trichoderma* ลงในหลุมเพื่อป้องกันโรคที่จะเกิดกับต้นปลูกใหม่ สำหรับต้นแม่พันธุ์หรือต้นที่ให้ผลผลิตสูงที่เป็นโรคควรใช้ biofungicide ฉีดอัดลงในดิน ต้นละ 3 จุด เพื่อควบคุมโรคเพื่อให้ได้ผลเต็มที่ (Soepena *et al*., 2000)

ในปี ค.ศ. 2005 Susanto และคณะ แนะนำแนวทางป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน 2 ทาง คือ หาพันธุ์ต้านทานโรค และการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จากนั้นได้คัดเลือกและทดสอบเชื้อรา *T. harzianum* และ *Gliocladium vriide* ในแปลงปลูกพบว่าสามารถลดการเกิดโรคในแปลงปลูกได้ และให้คำแนะนำว่าควรขุดหลุมรอบต้นปาล์มและใส่ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมันลงไปในหลุมเพื่อเป็นการกระตุ้น และเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อราปฏิปักษ์ในดิน

Srinivasulu *et al.* (2004) ศึกษาพบว่าเชื้อรา *T. viride* มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. applanatum* และ *G. lucidum* ได้ดี แนะนำให้ใช้ *T. viride* 5 กรัมต่อปุ๋ยอินทรีย์ 500 กรัมต่อต้น ให้ผลดีในการควบคุมโรคลำต้นเน่า

Abdullah และ Ilias (2004) ได้ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน โดยทำการทดสอบในระยะกล้าปาล์มอายุ 6 เดือน พบว่าการผสมเชื้อรา *T. harzianum* ในปุ๋ยอินทรีย์รองก้นหลุมก่อนปลูก และราดสารละลาย *T. harzianum* ระหว่างปลูกทุกสองสัปดาห์ ให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดีที่สุด โดยพบการเกิดโรคเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Nur และ Abdullah (2008)

Shamala *et al.* (2008) ศึกษาการใช้ *T. harzianum* ในการยับยั้งโรคลำต้นเน่าปาล์มที่มีสาเหตุจากเชื้อเห็ด *G. boninense* พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง แต่เมื่อผสมเชื้อ *Trichoderma* 2 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบการยับยั้งพบว่าความสามารถในการควบคุมโรคลดลง

Sujinda *et al.* (2009) นำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากกะพ้อ (palm: *Licuala spinosa*) จาก อำเภอกันตรัง จังหวัดตรัง มาทำการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อเห็ด *G. boninense* โดยวิธี dual culture จำนวน 300 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 86 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 17 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* สูงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

ราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (arbuscular mycorrhizal fungi; AMF) หรือราวี-เอ ไมคอร์ไรซาเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับพืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) กับพืช โดยเส้นใยราที่อยู่ภายนอกรากจะทำหน้าที่ในการดูดซับธาตุอาหารจากดิน และแลกเปลี่ยนธาตุอาหารของราที่อยู่ในเซลล์ในชั้นคอร์เท็กของพืชเพื่อส่งให้กับพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟอสฟอรัส ซึ่งราสามารถเปลี่ยนฟอสฟอรัสให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ ในขณะเดียวกันราจะได้รับสารประกอบคาร์บอนจำพวกน้ำตาลจากพืชผ่านทางโครงสร้างแลกเปลี่ยนนี้เช่นเดียวกัน (Smith and Read, 1997) ดังนั้นราสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และพบว่าพืชชั้นสูงจำนวน 80 เปอร์เซ็นต์ มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันกับราไมคอร์ไรซา (Harley and Smith 1983; Smith and Read 1997; Phosri *et al*., 2010) ในต่างประเทศได้มีการผลิตราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในเชิงพาณิชย์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) หรือปุ๋ยชีวภาพ(biofertilizers/microbial fertilizers) ให้กับพืชทั้งพืชไร่ พืชสวน และพืชป่าไม้มากมายหลายชนิด (Miyasaka et al. 2003) **พรพิมล (2531) ศึกษาการแพร่กระจายของราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาในดินปลูกส้มในประเทศไทย พบว่าราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาชนิดที่พบแพร่กระจายมากที่สุดคือ ราในสกุล *Glomus* sp. และ *Acaulospora* sp.** Sharma (2010) ศึกษาใช้ราวี-เอ ไมคอร์ไรซา *Glomus intraradices* ในต้นกล้าปาล์มน้ำมันเปรียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ใส่ราวี-เอ ไมคอร์ไรซา พบว่าความสูงของต้นกล้าปาล์มน้ำมันสูงกว่า 21 เปอร์เซ็นต์ เส้นรอบวงเพิ่มขึ้น 36 เปอร์เซ็นต์ จำนวนพื้นที่ใบมากกว่า 11 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดผลหลังปลูกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา 12 เดือน

การแก้ปัญหาโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันนั้นเป็นปัญหาที่ยากจะแก้ไขได้โดยสมบูรณ์ มีคำแนะนำทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ในการชะลอการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุบนตอของต้นปาล์มน้ำมันที่ทิ้งไว้ในแปลงปลูกเพื่อเป็นการลดการเกิดโรคในการปลูกแทน ในระยะสั้นการป้องกันมุ่งที่การใช้สารเคมี ส่วนในระยะยาวเพื่อให้การป้องกันกำจัดได้ผลอย่างสมบูรณ์จะเน้นการกำจัดเศษซากตอปาล์มในแปลงเพื่อลดจำนวน inoculum ของเชื้อ ในขณะเดียวกันควรมีการศึกษาคัดหาพันธุ์ต้านทานโรค วิธีการตรวจโรคตั้งแต่ในระยะแรกของการเข้าทำลาย การป้องกันกำจัดโรคควรจะทำทั้งต้นที่แสดงอาการของโรค และต้นที่ไม่แสดงอาการในบริเวณใกล้เคียงกัน เทคนิคการป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันมีหลายวิธี ได้แก่ การเขตกรรม การตัดเอาส่วนที่เป็นโรคออก การใช้สารเคมี พันธุ์ต้านทาน และการใช้ชีววิธีโดยใช้จุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุของโรค

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน โดยมีเป้าหมายให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพและศักยภาพในการควบคุมเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันอย่างน้อย 1 สายพันธุ์ ซึ่งจะสามารถใช้เป็นวิธีในการแก้ปัญหาโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยวิธีการทางชีววิธี และ ได้ราวี-เอ ไมคอร์ไรซา เพื่อทำให้พืชแข็งแรงและสามารถทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุของโรค

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ พลั่วมือ ถุงพลาสติก มีดพร้า เสียม กรรไกรตัดแต่งกิ่ง
- วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ Camera Lucida
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บิกเกอร์ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ หลอดแก้วมีฝาเกลียว
- เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด มีด
- ผ้าขาวบาง กระดาษซับนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (อาจใช้กระดาษทิชชูหรือกระดาษกรอง)
- แผ่นพลาสติกสำหรับรองตัดส่วนต่างๆของพืช
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo
- ตะแกรงร่อนดินขนาด 250 149 74 และ 44 ไมครอน
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 1,750 รอบ/นาที
- อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA), Rose Bengal Agar (RBA), Garnoderma Selective Medium (GSM) ,Corn Meal Agar (CMA) และ Malt Extract Agar (MEA)
- สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และ เอธิลแอลกอฮอล์ 75%
- สารเคมีย้อมราก ได้แก่ trypan blue
- สารเคมีสำหรับย้อมสปอร์ ได้แก่ polyvinyl alcohol lacto glycerol (PVLG) และ Melzer's Reagent
- วัสดุปลูก กระถางพลาสติก ถุงเพาะกล้า
- ต้นกล้าปาล์มน้ำมันปกติที่ไม่มีโรคและแมลงเข้าทำลาย

- วิธีการ

การทดลองย่อยที่ 1 การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้ Endophyte และ เชื้อรา *Trichoderms* spp.

1. การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

1.1 สืบค้นเอกสารและเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

1.2 การรวบรวมและจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์

1.2.1 การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.2.1.1 การเก็บตัวอย่าง (sample selection)

เก็บตัวอย่างรากปาล์มปกติและ เนื้อเยื่อบริเวณลำต้น ที่ไม่มีอาการของโรคจากจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมัน ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

1.2.1.2 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นพืชส่วนต่างๆ ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่จะเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ชิ้นพืชในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆกัน มีขั้นตอนดังนี้

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้น และ รากของต้นปาล์มน้ำมันที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาด

1. ใช้กรรไกรตัดส่วนเนื้อเยื่อลำต้นและราก ให้ได้ความยาวประมาณ 1 ซม.

2. นำผ้าขาวบางมาห่อชิ้นส่วนของพืชที่ตัดได้ จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที

3. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมด แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 1, 3 และ 5% ในเวลานานต่างๆกันคือ 1, 3 และ 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว

4. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว

5. นำชิ้นส่วนของพืชวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ RBA (Rose Bengal Agar) โดยแต่ละจานอาหารวาง 5 ตำแหน่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. ตรวจดูเชื้อที่เจริญออกมาจากแต่ละชิ้นส่วนของพืช วิเคราะห์ผลของการเจริญของเชื้อราที่เวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่างๆกัน

1.2.1.3 การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

นำตัวอย่างพืชผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 1.1.2 ตามความเข้มข้นที่ผ่านการทดสอบ ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของแต่ละชิ้นพืช แยกเชื้อราที่ได้ไปทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเก็บใน PDA slant เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

1.2.1.4 การตรวจสอบและจำแนกกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆของ

เชื้อราเอ็นโดไฟท์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา และจำแนกลำดับสปีชี่ของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

1.2.1.5 บันทึกผล

บันทึกจำนวนและกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.2.2 การแยกและจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp.

1.2.2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างรากปาล์มปกติ และดินบริเวณรอบรากจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมัน ห่อรากด้วยกระดาษ เก็บตัวอย่างดินใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

1.2.2.2 การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินและราก

แยกเชื้อจากดินโดยวิธี soil dilution plate ในอาหาร Rose Bengal แยกเชื้อจากรากโดยวิธี tissue transplanting บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 3-5 วัน แยกเชื้อที่เจริญบนอาหาร เพื่อจำแนกชนิดและทำการทดสอบประสิทธิภาพ

1.2.2.3 การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

1.2.2.4 บันทึกผล

บันทึกจำนวนและชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

1.3 การเก็บตัวอย่างเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

เก็บตัวอย่างดอกเห็ดของ *G. boninense* และรากของต้นปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคลำต้นเน่าจากแปลงปลูก แยกเชื้อโดยใช้อาหารพิเศษ Ganoderma Selective Media, GSM แยกเชื้อที่ได้เลี้ยงบนอาหาร PDA

1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ทั้งหมดทุกไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture โดยเริ่มวางเชื้อเพื่อทดสอบ ณ วันที่เชื้อมีอัตราการเจริญเท่ากัน วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ กรรมวิธีคือ เชื้อราเอ็นโดไฟท์ เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ และกรรมวิธีควบคุม บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตบันทึกผลการเจริญของเชื้อเห็ด โดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อเห็ดด้านที่ติดกับเชื้อราปฏิปักษ์ในชุดทดสอบ และวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อเห็ดจากชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG)

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

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อเห็ด *G. boninense* ในจานชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อเห็ด *G. boninense* ในจานชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

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

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติและบันทึกผล

2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

2.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธีโดยนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงจากขั้นตอนที่ 1 มาทำการทดสอบ จำนวน 6 กรรมวิธี โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบ 2 กรรมวิธี คือ ไม่ให้เชื้อราปฏิปักษ์-ไม่ปลูกเชื้อเห็ด และ ไม่ให้เชื้อราปฏิปักษ์-ปลูกเชื้อเห็ด

2.2 การเตรียมเชื้อราปฏิปักษ์

เตรียมขยายเพิ่มปริมาณเชื้อราเอ็นโดไฟท์ และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่จะทำการทดสอบบนอาหาร PDA เมื่อนำมาละลายน้ำทำเป็น suspension สารละลายของเชื้อทดสอบต้องมีความเข้มข้นมากกว่า 10^6 spore/มิลลิลิตร

2.3 การเตรียม inoculums ของเชื้อเห็ด *G. boninense*

เตรียม inoculum ของเชื้อเห็ด *G. boninense* โดยเลี้ยงเชื้อเห็ด สาเหตุของโรคลำต้นเน่าบนชิ้นไม้ยางพาราที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเคลือบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDA (Potato Dextrose Agar) และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6-8 สัปดาห์

2.4 ทำการทดสอบเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อเห็ด *G. boninense*

ปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* กับต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุอย่าง 3-5 เดือน โดยใส่วัสดุปลูกลงในกระถาง 1ใน 3 ของภาชนะ วางชิ้นไม้ยางพาราที่มีเชื้อเห็ดเจริญอยู่จากนั้น ย้ายต้นกล้าปาล์มน้ำมันลงปลูกในภาชนะที่มีเชื้อเห็ด

ให้รากของต้นกล้าปาล์มสัมผัสกับชิ้นไม้ยางพารา จากนั้นเติมวัสดุปลูกให้เต็มถุง ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 เดือน และทดสอบการเป็นปฏิปักษ์โดย ทุกกรรมวิธียกเว้นกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ให้เชื้อราปฏิปักษ์ ราดด้วยสารละลายของเชื้อราปฏิปักษ์ปริมาณ 1 ลิตรต่อต้น ทุก 2 สัปดาห์ จำนวน 4 ครั้ง

2.5 การดูแลและบันทึกผล

บันทึกลักษณะอาการ เกิดตามระดับความรุนแรงของโรค คำนวณตามสูตรคือ

สูตรคำนวณดัชนีการเกิดโรค (Disease Severity Index: DSI) (Abdullah *et al.,* 2003)

$$\text{Disease severity index (\%)} = \frac{\sum (A \times B) \times 100}{\sum B \times 4}$$

A คือ ระดับการเกิดโรค ระดับ 1 2 3 และ 4

B คือ จำนวนพืชที่แสดงอาการ

โดยระดับการเกิดโรค (Disease Class) มีดังนี้

ระดับ 0	พืชปกติ ไม่พบการแสดงอาการหรือเส้นใยของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช
ระดับ 1	พบเส้นใยสีขาวของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลืองเล็กน้อย
ระดับ 2	พบเส้นใยสีขาวหรือ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลือง 1-3 ใบ
ระดับ 3	พบเส้นใยสีขาวหรือ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลืองมากกว่า 3 ใบ
ระดับ 4	พบเส้นใยสีขาวหรือ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และต้นปาล์มแห้ง

บันทึกลักษณะอาการของต้นกล้าปาล์มน้ำมันของทุกกรรมวิธี เมื่อต้นเปรียบเทียบที่ปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* อย่างเดียวแสดงอาการออกมาและพบการแสดงอาการของโรคมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ถอนต้นกล้าปาล์มน้ำมันจากทุกกรรมวิธี เพื่อบันทึกลักษณะของรากในแต่ละกรรมวิธี และนำรากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการทุกกรรมวิธีมาแยกเชื้อ

การทดลองย่อยที่ 2 การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้ วี-เอ ไมคอร์ไรซา

1. รวบรวม จำแนกและคัดเลือกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน

1.1 เก็บตัวอย่างราวี-เอไมคอร์ไรซา

เก็บตัวอย่างดินและรากของต้นพืชบริเวณรอบลำต้นปาล์มน้ำมัน บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และข้อมูลภูมิศาสตร์ นำตัวอย่างมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

1.2 การแยกราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดิน

นำตัวอย่างดินที่เก็บมาร่อนแยกสปอร์ โดยวิธีการร่อนดินแบบเปียก (wet seiving and decanting) ของ Gerdemann และ Nicolson (1963) ร่วมกับวิธี sucrose centrifugation ของ Daniels และ Skipper

(1982) โดยนำตัวอย่างดิน 200-300 กรัม ใส่ลงในน้ำ 1 ลิตร ทำเม็ดดินให้แตกกระจายและกวนไปมาประมาณ 1 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้เศษดินตกตะกอน เทลงบนตะแกรงขนาดต่างๆ เก็บตะกอนที่อยู่บนชั้นตะแกรงแต่ละขนาดใส่ลงในหลอด centrifuge ทำให้เป็น suspension แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบ horizontal rotor ที่มีความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวที่อยู่ส่วนบนทิ้ง แล้วเติมสารละลายซูโครส ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เป็น suspension แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนที่มีสปอร์อยู่ลงบนตะแกรงขนาด 45 ไมครอน ล้างสารละลายน้ำตาลออกด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อหลาย ๆ ครั้ง รินลงบนแผ่นกระจก เพื่อตรวจหา chlamydospore, azygospore และ sporocarp

การย้อมสีรากด้วยสี trypan blue โดยวิธีของ Phillips and Hayman (1970)

1.3 การจำแนกราวี-เอไมคอร์ไรซา

การจำแนกชนิดราวี-เอไมคอร์ไรซา โดยแยกสปอร์ที่มีลักษณะหมือนกันไว้ด้วยกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope แล้วใช้ Pasteur pipette ดูดสปอร์จากน้ำวางบนสไลด์ หยดด้วย polyvinyl alcohol lacto glycerol (PVLG) และ Melzer's reagent ปิดทับด้วย cover slip แล้วนำตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope เพื่อศึกษารูปร่างลักษณะสปอร์ **การจัดจำแนกชนิด**ราวี-เอไมคอร์ไรซา **โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน ตรวจสอบลักษณะสปอร์**ราวี-เอไมคอร์ไรซา **ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 20x 40x และ 100x สังเกตลักษณะของสปอร์ เช่น สีของสปอร์ ผนังของสปอร์ และวัดขนาดของสปอร์ เป็นต้น จัดกลุ่มหรือจำแนกชนิดเบื้องต้นตามลักษณะของสปอร์ โดยเทียบกับฐานข้อมูลของ International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM)**

1.4 เก็บรักษาสายพันธุ์ราวี-เอไมคอร์ไรซา

เก็บดินและรากพืชที่มีราวี-เอไมคอร์ไรซา โดยนำดินรากมาทำให้แห้ง และเก็บไว้ในถุงพลาสติค ปิดผนึกให้สนิทและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

เก็บสปอร์ไว้ในพืช (ข้าวโพด และพืชวงศ์หญ้า เป็นต้น) ที่ปลูกไว้ในเรือนทดลอง

2. การทดสอบประสิทธิภาพราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา พร้อมกับปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* ในดินปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา ในดินปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* ในดินปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซาในดินปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมัน 1 เดือน แล้วจึงปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense*

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยไม่ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา และไม่ปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense*

การเตรียมราวี-เอ ไมคอร์ไรซา

การเพิ่มปริมาณราวี-เอไมคอร์ไรซา โดยทำการปลูกพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวโพด พืชวงศ์หญ้าชนิดต่าง ๆ ที่มีระบบรากฝอย และนำสปอร์ของราที่แยกได้มาปลูกเชื้อลงไปในดิน ประมาณ 3-6 เดือน เพื่อขยายปริมาณของราไว้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

การเตรียม inoculums ของรา *G. boninense*

เลี้ยงรา *G. boninense* บนอาหาร PDA นาน 5-7 วัน เตรียม inoculum ของรา *G. boninense* โดยนำรา *G. boninense* บนอาหาร PDA มาวางบนชิ้นไม้ยางพาราที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเคลือบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDA (Potato Dextrose Agar) เป็นเวลา 8-10 สัปดาห์ เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 5-6 เดือน โดยใส่วัสดุปลูกลงในกระถาง 1ใน 3 ของภาชนะ นำดินและรากที่มีราวี-เอไมคอร์ไรซามาวางบริเวณรอบต้นกล้าปาล์มน้ำมันทิ้งไว้ประมาณ 2 เดือน แล้ววางชิ้นไม้ยางพาราที่มีรา *G. boninense* เจริญอยู่บนไม้ โดยให้รากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันสัมผัสกับชิ้นไม้ยางพารา จากนั้นเติมวัสดุปลูกให้เต็ม

การบันทึกผลการทดลอง

การย้อมสีรากด้วยสี trypan blue โดยวิธีของ Phillips and Hayman (1970) ตรวจดูการเจริญของเส้นใยเข้าไปในรากปาล์มน้ำมัน

วัดความสูงของต้นกล้าปาล์มน้ำมันทุกเดือนหลังทำการปลูกเชื้อ และบันทึกผลการเกิดโรคทุกโดยคำนวณตามสูตร ดังนี้

สูตรคำนวณดัชนีการเกิดโรค (Disease Severity Index: DSI) (Abdullah *et al.,* 2003)

$$\text{Disease severity index (DSI)} = \frac{\sum (A \times B) \times 100}{\sum B \times 4}$$

A คือ ระดับการเกิดโรค ระดับ 1 2 3 และ 4

B คือ จำนวนพืชที่แสดงอาการ

โดยระดับการเกิดโรค (Disease Class) มีดังนี้

ระดับ 0 พืชปกติ ไม่พบการแสดงอาการหรือเส้นใยของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช

ระดับ 1 พบเส้นใยสีขาวของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลืองเล็กน้อย

ระดับ 2 พบ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลือง 1-3 ใบ

ระดับ 3 พบ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลืองมากกว่า 3 ใบ

ระดับ 4 พบ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และต้นปาล์มแห้ง

บันทึกลักษณะอาการของต้นกล้าปาล์มน้ำมันของทุกกรรมวิธี เมื่อครบระยะเวลาการทดลอง นำรากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการทุกกรรมวิธีมาแยกเชื้อ

- เวลาและสถานที่

เวลา ระยะเวลาเริ่มต้น ปีงบประมาณ 2553 และสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558 รวม 5 ปี

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองย่อยที่ 1 การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้ Endophyte และ เชื้อรา *Trichoderms* sp.

1. การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

1.1 การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.1.1 การเก็บตัวอย่าง (Sample selection)

เก็บตัวอย่างพืช ได้แก่ ปาล์มน้ำมัน จากจังหวัดชุมพร และระยอง รางจืดจาก อ.สวี จังหวัดชุมพร กระถินเทพา ย่านาง และไผ่จาก อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี จากนั้นนำมาทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.1.2 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (Surface sterilization)

หลังจากทดสอบหาความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์และเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อที่ผิวในแต่ละส่วนของพืชที่ทำการเก็บตัวอย่าง พบว่า เมื่อใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 1 % เป็นเวลา 1 นาที จะให้ผลดีที่สุดสำหรับการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 0 % ที่เวลา 1, 3 และ 5 นาที พบว่า มีเชื้อราเจริญขึ้นมาก แต่ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราปนเปื้อนทั่วไปที่พบในห้องปฏิบัติการ หรือเป็นเชื้อราที่พบตามผิวใบหรือผิวส่วนอื่นๆของพืช ซึ่งเจริญเร็วและคลุมทับเชื้อราชนิดอื่นๆ ทำให้ยากต่อการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเชื้อราที่แยกได้มีการปนเปื้อนอยู่ด้วยโดยเฉพาะพวกแบคทีเรีย และการใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้น 1 % เป็นเวลานาน 3 และ 5 นาที และที่ความเข้มข้น 3 และ 5 % พบมีเชื้อราเจริญขึ้นน้อย ซึ่งที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น ชิ้นพืชจะเกิดลักษณะช้ำ บางส่วนของเนื้อเยื่อไหม้ กลายเป็นสีน้ำตาล แม้ไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่ก็ไม่มีเชื้อราเอ็นโดไฟท์เจริญขึ้น ดังนั้นในการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์สำหรับการทดลองครั้งนี้ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เหมาะสมคือ 1 % โดยระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่เหมาะสมคือ 1 นาที

1.1.3 การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ (Isolation of endophytic fungi)

แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากส่วนต่างๆ ของพืชบนอาหาร RBA (Rose Bengal Agar) ปาล์มน้ำมัน แยกจากส่วนของใบ ก้านใบ ก้านและ ราก รางจืด แยกจากส่วนของใบ ก้านและ ลำต้น กระถินเทพา แยกจากส่วนของใบ ก้านและ กิ่ง ย่านาง แยกจากส่วนของใบ ก้านและ ลำต้น ไผ่แยกจากส่วนของใบ กาบและ ลำต้น

เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 85 ไอโซเลท โดยปาล์มน้ำมันจากชุมพรและ ระยอง แยกได้จำนวน 30 ไอโซเลท รางจืดจากชุมพร แยกได้จำนวน 26 ไอโซเลท กระถินเทพาจากจันทบุรี แยกได้จำนวน 14 ไอโซเลท ย่านางจากจันทบุรี แยกได้จำนวน 10 ไอโซเลท และไผ่จากจันทบุรี แยกได้จำนวน 5 ไอโซเลท

1.1.4 การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ โดยสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ในเบื้องต้น เป็นเชื้อรา *Fusarium Colletotrichum Nigrospora Aspergillus Acremonium Xylalia* และ เชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ (mycelia sterilia)

1.2 การแยกและจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp.

1.2.1 การเก็บตัวอย่าง (Sample selection)

เก็บตัวอย่าง รากและดินของพืช 50 ชนิด คือ ปาล์มน้ำมัน ดินจากข้าวโพด สับปะรด โหระพา ว่านหางจระเข้ มันสำปะหลัง ข้าว ถั่วฝักยาว ตะไคร้ กล้วย ดินป่า สัก กะหล่ำดอก พริก อ้อย น้อยหน่า มะขามเทศ ปอเทือง จามจุรี พิกุล มะเดื่อ มะม่วง ยางพารา มะขาม ขนุน ส้มโอ มะนาว มะขาม พุทรา ลิ้นจี่ ตะขบ ยูคาลิปตัส มะเม่า กะบก กะถินเทพา ข่อย แค องุ่น เงาะ พริกไทย มะไฟ มังคุด ทุเรียน ปีบ ขนุน ลองกอง ขี้เหล็ก กฤษณา สายหยุด และลำไย จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร กระบี่ ตรัง พัทลุง นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี อุบลราชธานี ขอนแก่น ชัยภูมิ เพชรบูรณ์ ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ ชัยนาท อุทัยธานี เชียงใหม่ กรุงเทพฯ จันทบุรี และเชียงราย บันทึกรายละเอียด แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และผู้เก็บ

1.2.2 การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินและราก

จากการแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินด้วยวิธี soil dilution plate (ภาพที่ 1) และแยก *Trichoderma* spp. จากรากพืชด้วยวิธี tissue transplanting

1.2.3 การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ชนิดของเชื้อราไตรโคเดอร์ม่าที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในการทดลองนี้ เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. viride* โดยการจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* สามารถทำได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Rifai, 1969; Bissett, 1984; Bissett, 1991a-c; Bissett, 1992) เช่น รูปร่างลักษณะและขนาดของ conidia สี ลักษณะผิว conidia (ornamentation) ลักษณะการแตกกิ่งก้าน การฟอร์มเส้นใยแบบ sterile หรือ fertile ความยาวที่ยื่นออกมาจากก้านชูสปอร์ แต่ทั้งนี้ ลักษณะความแตกต่างที่มีการรายงานหรือบันทึกไว้ดังกล่าวสามารถใช้แยกความแตกต่างของได้อย่างชัดเจนสำหรับบางสปีชีส์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน หรือมีความคลุมเครือระหว่าง strain ของบางสปีชีส์ (Singh et al., 2014) เช่น ในเชื้อรา *T.*

harzianum ซึ่งมีหลายการศึกษาพบว่า เชื้อราที่ถูกจัดจำแนกว่าเป็น *T. harzianum* มีมากกว่า 1 ชนิด ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงลักษณะของ cultures นั้นมีความแตกต่าง แต่เป็นความแตกต่างที่คลุมเครือและไม่เพียงพอหรือสามารถจัดจำแนกในระดับสปีชีย์ (Muthumeenakshi et al, 1994; Fujimori and Okuda, 1994; Zimand et al., 1994) เช่น ลักษณะของ conidia ของ เชื้อรา *T. harzianum* มีความใกล้เคียงกับ conidia ของ เชื้อรา *T. viride* โดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของลักษณะและความหนาแน่นของ conidia และ ความแตกต่างของเฉดสี โดยราทั้งสองสปีชีส์ถูกนำมาใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ อีกทั้งพบว่า เชื้อรา *T. harzianum* มีหลายสายพันธุ์ (strain) และมีการใช้ในเชิงการค้า เช่น *T. harzianum* strains PlantshieldTM, T8, T22, T95 และอื่นๆ

ภาพที่ 1 การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินด้วยวิธี soil dilution plate

ในปัจจุบันการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ของเชื้อรา ในชนิดที่มีความคล้ายคลึงกัน หรืออาจประกอบไปด้วยมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ จึงมีการนำลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) มาร่วมวิเคราะห์ เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและการจัดจำแนกที่ถูกต้องในระดับสปีชีส์ เช่น มี

รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma* ที่พบในประเทศอินเดียจำนวนหลายไอโซเลทที่จัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าเป็น *T. viride* แต่เมื่อใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอจากตำแหน่ง ITS และ elongation factor พบว่าเชื้อราเหล่านี้คือเชื้อรา *T. asperellum* หรือ *T. asperelloides* (Siram et al., 2013) และเชื้อรา *T. viride* พบว่าเป็น complex species ที่อาจมีมากกว่า 1 สปีชีส์ภายใต้ชื่อ *T. viride* เนื่องจาก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *T. viride* ไม่สามารถใช้อ้างอิง หรือเปรียบเทียบเพื่อจำแนกชนิดได้ อีกทั้งยังมีความใกล้เคียงกับ *T. asperellum* (Singh et al., 2014)

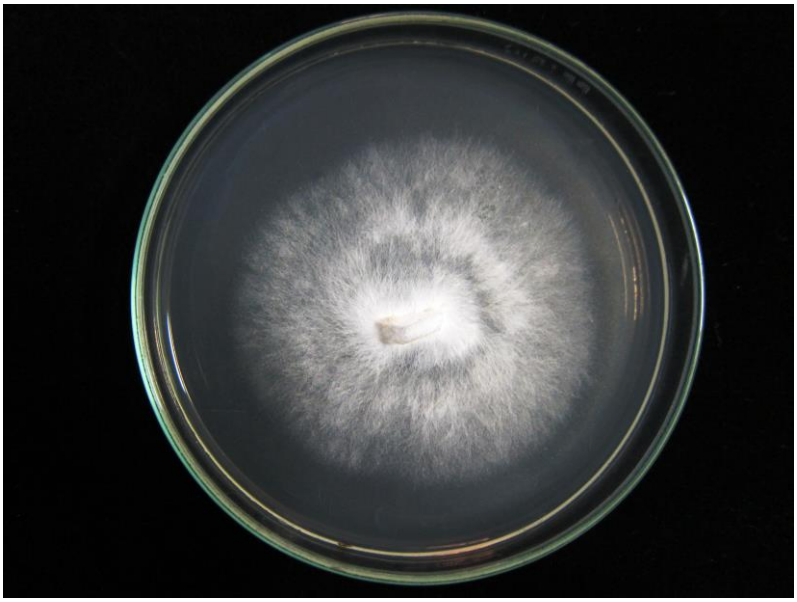
ดังนั้น การยืนยันชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ ต้องทำโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันการจัดจำแนก โดยจะจำแนกไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบว่ามีประสิทธิภาพเท่านั้น

1.2.4 บันทึกผล

ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวนทั้งสิ้น 158 ไอโซเลท โดยแยกจากรากพืชด้วยวิธี tissue transplanting ได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 41 ไอโซเลท โดยแยกได้จากพืช 2 ชนิดคือ ปาล์มน้ำมันและเงาะ แยกได้จากดินบริเวณรอบราก จำนวน 117 ไอโซเลท จากพืช 26 ชนิด คือ ปาล์มน้ำมัน ว่านหางจระเข้ มะขามเทศ มะขาม สัก มะม่วง น้อยหน่า มะเดื่อ ยางพารา จามจุรี ส้มโอ ตะขบ ไผ่ ยูคาลิปตัส มะเม่า กระบก มะไฟ มังคุด เงาะ ลองกอง ลำไย ขี้เหล็ก ปีบ ข่อย และดินป่า

1.3 การเก็บตัวอย่างเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

แยกเชื้อเห็ด *G. boninense* จากดอกเห็ดของ *G. boninense* และรากของต้นปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคลำต้นเน่า โดยใช้อาหารพิเศษ Ganoderma Selective Media (GSM) เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เชื้อรา *G. boninense* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

1.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* ในห้องปฏิบัติการ

1.4.1 ปฏิกิริยาของเชื้อราเอ็นโดไฟท์กับเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

ทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ 85 ไอโซเลท กับเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยวิธี dual culture พบว่า เชื้อราเอ็นโดไฟท์ ไอโซเลท KtB-4 (ภาพที่ 3) ซึ่งแยกได้จากก้านกระถินเทพา จากอำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* (ตารางที่ 1) และเชื้อราเอ็นโดไฟท์ชนิดนี้ไม่สร้างสปอร์ จึงไม่สามารถจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้

1.4.2 ปฏิกิริยาของเชื้อรา *Trichoderma* spp. กับเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

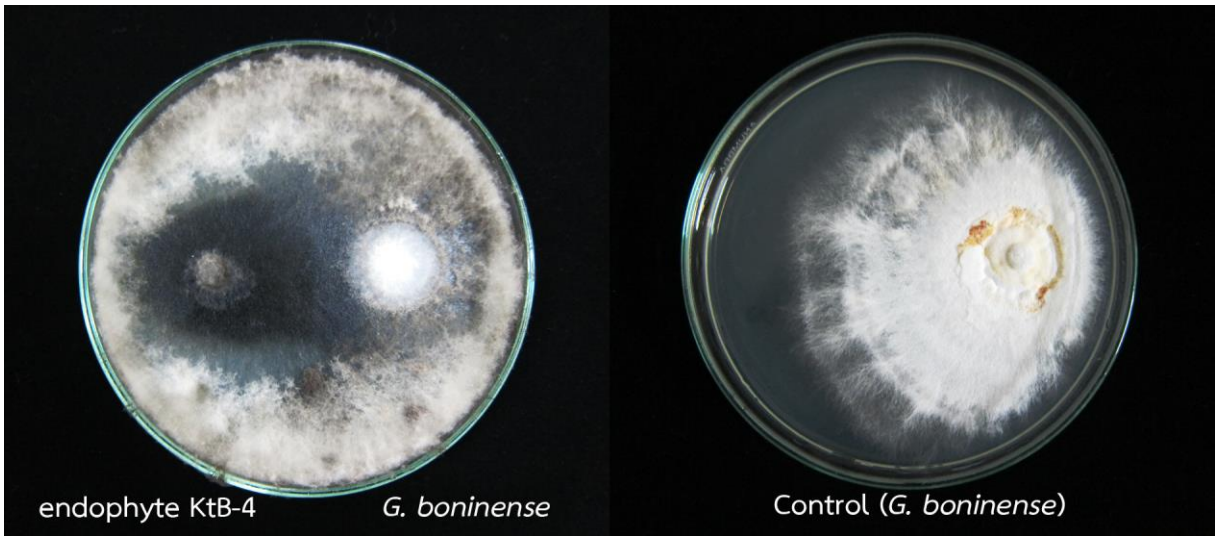
ทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ 158 ไอโซเลท กับเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยวิธี dual culture พบ 5 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากพืช 5 ชนิดแสดงปฏิกิริยาปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพต่อเชื้อเห็ด *Ganoderma* (ตารางที่ 1) คือ ไอโซเลท St-Pr-1 แยกได้จากดินปลูกยางพารา (ภาพที่ 4) ไอโซเลท St-Ta-3 จากดินปลูกมะขาม (ภาพที่ 5) ไอโซเลท St-Ct-2 จากดินปลูกขี้เหล็ก (ภาพที่ 6) ไอโซเลท St-Te-5 จากดินปลูกสัก (ภาพที่ 7) และ St-Srb-3 จากดินปลูกต้นข่อย (ภาพที่ 8) โดยพบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท endophyte KtB-4 ที่แยกได้จากรากกระถินเทพา และ *Trichoderma* St-Te-5 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากสัก มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* สูงสุดคือ 68.10 และ 60.46 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยังยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* เชื้อราสาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน หลังจากวางเชื้อ 3 5 7 9 และ 12 วัน

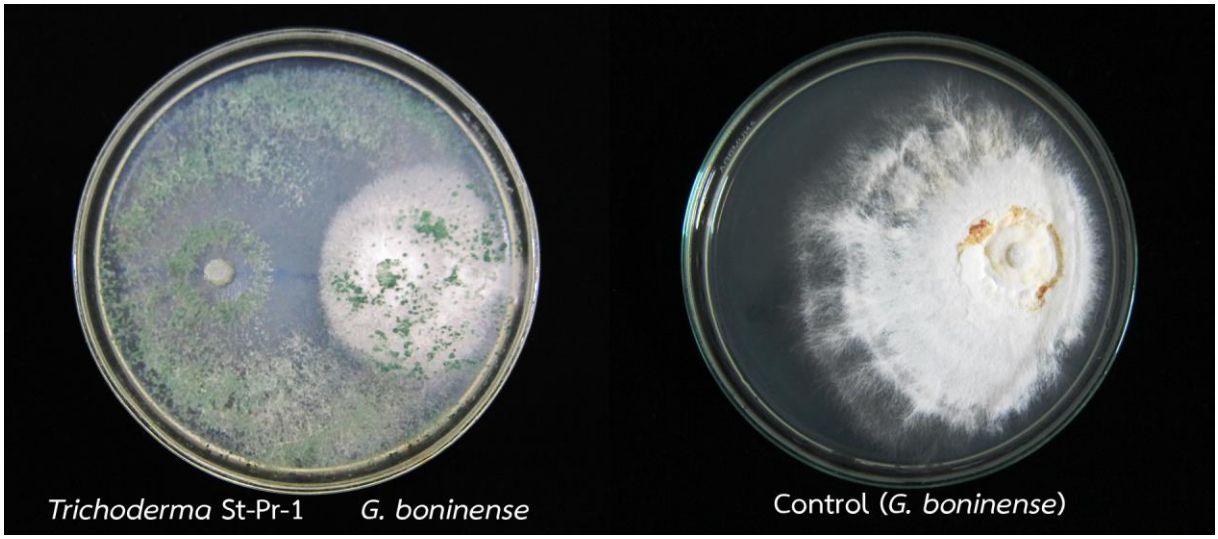
ไอโซเลท	แหล่ง	ประสิทธิภาพในการยับยั้ง (%)*				
		3 วัน	5 วัน	7 วัน	9 วัน	12 วัน
endophyte KtB-4	กระถินเทพา	32.10**	45.70	53.35	60.82	68.10
Trichoderma St-Pr-1	ยางพารา	13.20	30.78	40.46	49.97	59.31
Trichoderma St-Ta-3	มะขาม	12.29	29.91	39.87	49.46	58.86
Trichoderma St-Ct-2	ขี้เหล็ก	12.93	30.16	40.03	49.62	59.00
Trichoderma St-Te-5	สัก	12.29	32.71	42.10	51.42	60.46
Trichoderma St-Srb-3	ข่อย	11.93	29.76	39.56	49.27	58.73

* ประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532); >75% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก, 61 – 75 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง, 51 – 60 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง, < 50% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

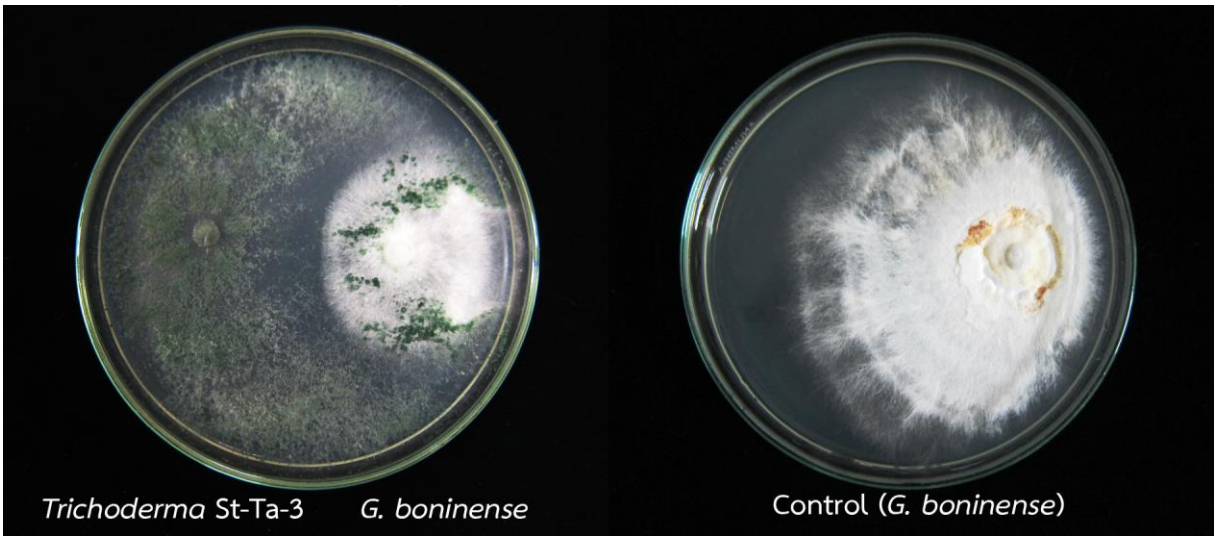
** ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ



ภาพที่ 3 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *G. boninense* โดยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ไอโซเลท KtB-4 ที่แยกได้จากกระถินเทพา

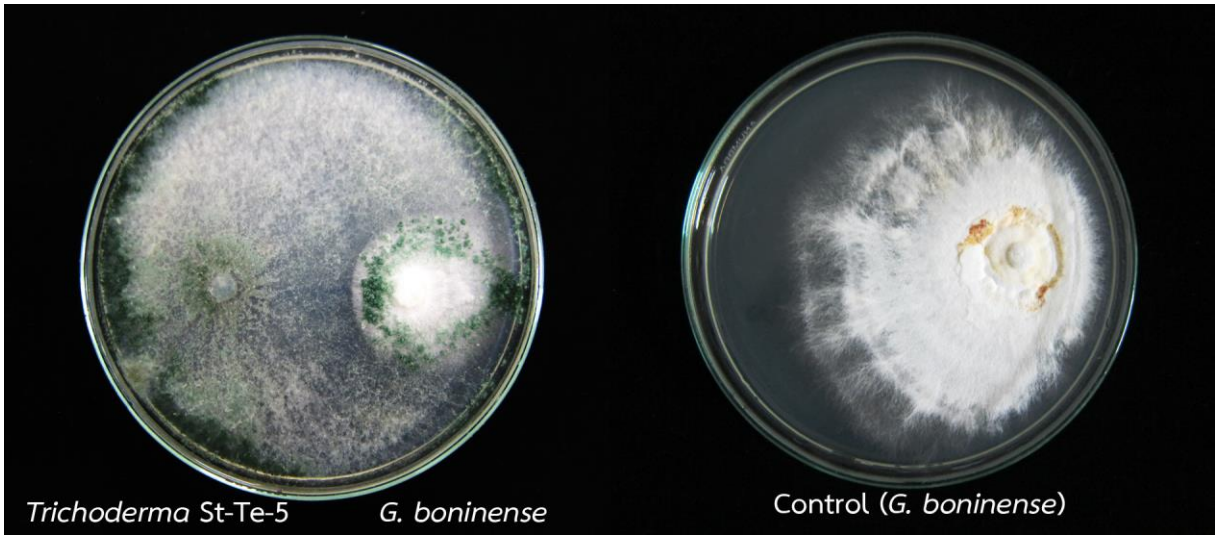


ภาพที่ 4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *G. boninense* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท St-Pr-1ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากยางพารา



ภาพที่ 5 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *G. boninense* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท St-Ta-3 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากมะขาม

ภาพที่ 6 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *G. boninense* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท St-Ct-2 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากขี้เหล็ก



ภาพที่ 7 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *G. boninense* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท St-Te-5 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากสัก

ภาพที่ 8 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *G. boninense* โดยเชื้อรา *Trichoderma* ไอโซเลท St-Srb-3 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากข่อย

เลี้ยงและเก็บรักษาเชื้อราเอ็นโดไฟท์และ เชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 5 ไอโซเลท บนอาหาร PDA เพื่อใช้เตรียมเป็น inoculum กับต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปลูกเชื้อ *Ganoderma* เป็นการทดสอบปฏิกิริยาของเชื้อปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้กับเชื้อเห็ด *Ganoderma* ในเรือนทดลอง

2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

2.1 เตรียมเชื้อเห็ด *G. boninense* และต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อใช้ในการปลูกเชื้อในเรือนทดลอง

เตรียมท่อนไม้ยางพาราที่มีเชื้อ *Ganoderma* เพื่อใช้เป็น innoculum ในการปลูกเชื้อ จำนวน 250 ชิ้น ตามวิธีดำเนินการ เก็บท่อนไม้ที่มีเชื้อเห็ดไว้ในที่มืดเป็นเวลา 45 วันจนเชื้อ *Ganoderma* เจริญคลุมท่อนไม้ยางพารา ตรวจการปนเปื้อนทุกอาทิตย์เพื่อแยกถุงที่มีการปนเปื้อนออก จนกระทั่งเชื้อเห็ดบนท่อนไม้มีอายุ ๒ เดือน

เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 อายุ 4 เดือน จำนวน 250 ต้น ดูแลให้น้ำและปุ๋ยตามปกติ (ภาพที่ 9)

2.2 การปลูกเชื้อ *G. boninense*

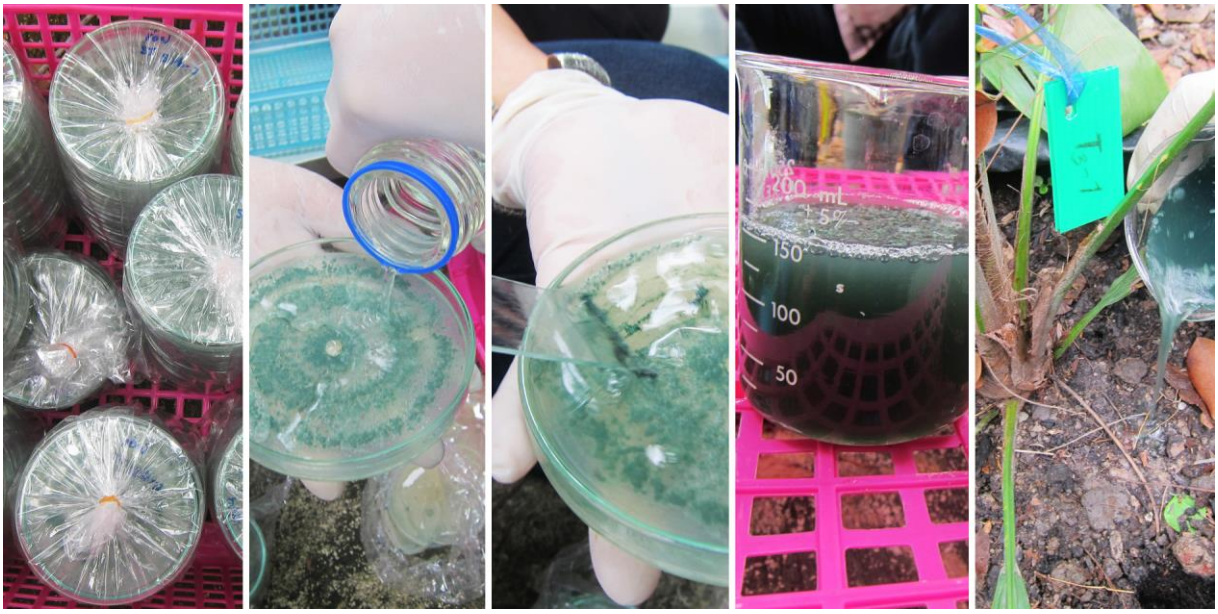
ในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อ *G. boninense* วางท่อนไม้ยางพาราที่มีเชื้อเห็ดลง (ภาพที่ 10) ที่ก้นถุงปลูกสีดำ นำต้นกล้าปาล์มน้ำมันพร้อมดินปลูกวางลงบนท่อนไม้ยางพารากลบดินให้ทั่ว ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบไม่มีการปลูกเชื้อ ดำเนินการโดยย้ายต้นกล้าลงถุงปลูกสีดำ

2.3 การเตรียมเชื้อราปฏิปักษ์

เลี้ยงเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 1 ไอโซเลท และเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 5 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 5 วัน ทำส่วนผสมของน้ำกับเชื้อราแต่ละชนิดโดยขูดเชื้อบนอาหารลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดย suspension สารละลายของเชื้อทดสอบมีความเข้มข้นมากกว่า 10^6 spore/มิลลิลิตร นำส่วนผสมที่ได้ (ปริมาตร 1 ลิตร) ไปราดบนผิวดินรอบๆ ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปลูกเชื้อเห็ด *Ganoderma* จำนวน 4 ครั้ง ห่างกัน 15 วัน หรือทุก 2 สัปดาห์ (ภาพที่ 11)

ภาพที่ 9 กล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 อายุ 4 เดือน ที่ใช้ในการทดลอง

ภาพที่ 10 ท่อนไม้ยางพาราที่มีเชื้อ *G. boninense*



ภาพที่ 11 การเตรียมสารสะลายและราดเชื้อราปฏิปักษ์

2.4 การบันทึกข้อมูล

จากการบันทึกลักษณะอาการของต้นกล้าปาล์มน้ำมันของทุกกรรมวิธี การเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมัน เช่น ความสูง จำนวนทางใบ มีความใกล้เคียงกันในทุกกรรมวิธี สำหรับการเกิดโรค พบว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันเริ่มแสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อเห็ด *G. boninense* หลังจากการปลูกเชื้อประมาณ 6 เดือน โดยเริ่มแสดงอาการใบเหลือง ใบล่าง จะแสดงอาการใบแห้ง และหากอาการเริ่มรุนแรง ต้นกล้าปาล์มน้ำมันจะแห้งตาย (ภาพที่ 12) และเมื่อนำรากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่แห้งตายมาทำการแยกเชื้อ พบการเชื้อเห็ด *G. boninense* เจริญออกมาจากราก (ภาพที่ 13) ทั้งนี้สามารถยืนยันการเกิดโรคได้ว่า ลักษณะอาการของโรคที่แสดงออกเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *G. boninense*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า โดยบันทึกผลจากระดับการเกิดโรคตามสูตรการคำนวณดัชนีการเกิดโรคของ Abdullah *et al.*, 2003 พบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท endophyte KtB-4 ที่แยกได้จากรากกระถินเทพา, *Trichoderma* St-Te-5 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากสัก, *Trichoderma* St-Ta-3 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากมะขาม และ *Trichoderma* St-Pr-1 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากยางพารา สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ดี โดยพบการเกิดโรคที่ 2.08, 3.13, 4.17 และ 5.21 % ตามลำดับ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* แต่ไม่ปลูกเชื้อราปฏิปักษ์ โดยพบการเกิดโรคถึง 14.58 % และไม่พบการเกิดโรคในกรรมวิธีที่ไม่มีการปลูกเชื้อใดๆ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อเห็ด *G. boninense* เชื้อราสาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

ไอโซเลท	แหล่ง	การเกิดโรค (%)*
endophyte KtB-4	กระถินเทพา	2.08 a**
Trichoderma St-Pr-1	ยางพารา	5.21 ab
Trichoderma St-Ta-3	มะขาม	4.17 ab
Trichoderma St-Ct-2	ขี้เหล็ก	11.46 bc
Trichoderma St-Te-5	สัก	3.13 ab
Trichoderma St-Srb-3	ข่อย	8.33 abc
G. boninense	-	14.58 d
ไม่ปลูกเชื้อใดๆ	-	0.00 a
C.V.		1.09

* การเกิดโรคคำนวณ (% Disease Severity; DS) ตามสูตรของ Abdullah *et al*., 2003 โดยคิดค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 6 ต้น

** ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan Multiple Range Test ที่ความเชื่อมั่น 95%

ภาพที่ 12 การแสดงอาการของโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อเห็ด *G. boninense* บนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน; a. พืชปกติ, b-c. แสดงอาการใบเหลือง, d-e. แสดงอาการใบเหลืองและใบแห้ง, f. ต้นกล้าปาล์มแห้ง

ภาพที่ 13 แสดงเส้นใยของเชื้อเห็ด *G. boninense* บนรากของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

ภาพที่ 13 แสดงเส้นใยของเชื้อเห็ด *G. boninense* บนรากของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

การทดลองย่อยที่ 2 การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้ วี-เอ ไมคอร์ไรซา

1. รวบรวม จำแนกและคัดเลือกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน

1.1 เก็บตัวอย่างราวี-เอไมคอร์ไรซา

เก็บตัวอย่างดินและรากของต้นพืชบริเวณรอบลำต้นปาล์มน้ำมัน จำนวน 22 ตัวอย่าง ได้แก่ อำเภอท่าชนะ (4 ตัวอย่าง) อำเภอเมือง (5 ตัวอย่าง) อำเภอท่าฉาง (1 ตัวอย่าง) อำเภอไชยา (1 ตัวอย่าง) จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอคลองท่อม (3 ตัวอย่าง) อำเภออ่าวลึก (3 ตัวอย่าง) จังหวัดกระบี่ และอำเภอปะทิว (3 ตัวอย่าง) อำเภอท่าแซะ (1 ตัวอย่าง) จังหวัดชุมพร และ อำเภอหนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี (1 ตัวอย่าง) (ตารางที่ 3)

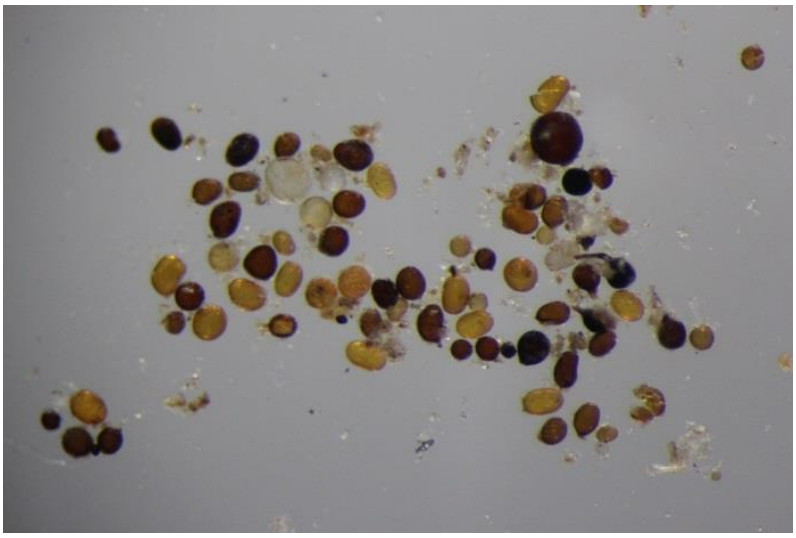
1.2 การแยกราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดิน

จากการศึกษาแยกราวี-เอไมคอร์ไรซา จากดินปาล์มน้ำมัน จำนวน 22 ตัวอย่าง จากจังหวัดกระบี่ ชลบุรี ชุมพร และ สุราษฎร์ธานี แยกได้ราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดิน 11 ตัวอย่าง นอกนั้นไม่พบราวี-เอไมคอร์ไรซา (ตารางที่ 2) แยกลักษณะราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscopeและ compound microscope ได้ราวี-เอไมคอร์ไรซาทั้งหมด 56 ไอโซเลท (ตารางที่ 3; ภาพที่ 14)

ตารางที่ 3: ราวี-เอไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากดินจากจังหวัดต่างๆ

ลำดับ	**สถานที่เก็บตัวอย่าง**	**ราวี-เอไมคอร์ไรซา (ไอโซเลท)**
1	อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี	VAM 01, VAM 02, VAM 03, VAM 04 (4 ไอโซเลท)
2	อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี	ไม่พบสปอร์
3	อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี	ไม่พบสปอร์
4	ต.ประสงค์ อ. ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี	VAM 46, VAM 47, VAM 48, VAM 49 (4 ไอโซเลท)
5	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	VAM 08 (1 ไอโซเลท)
6	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	VAM 12, VAM 13 (2 ไอโซเลท)
7	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ไม่พบสปอร์
8	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ไม่พบสปอร์
9	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ไม่พบสปอร์
10	บ้านท่าหัก ต. ป่าเว อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	VAM 54, VAM 55, VAM 56, VAM 57, VAM 58, VAM 59, VAM 60, VAM 61 (8 ไอโซเลท)
11	ต. เสวียด อ.ท่าฉาง จ.สุราษฎร์ธานี	VAM 26, VAM 27, VAM 28, VAM 29, VAM 30, VAM 31, VAM 32, VAM 33, VAM 34, VAM 35, VAM 36, VAM 37, VAM 38, VAM 39, VAM 40, VAM 41, VAM 42, VAM 43, VAM 44, VAM 45 (20 ไอโซเลท)

12	อ.คลองท่อม จ.กระบี่	VAM 05, VAM 06, VAM 07 (3 ไอโซเลท)
13	อ.คลองท่อม จ.กระบี่	ไม่พบสปอร์
14	อ.คลองท่อม จ.กระบี่	ไม่พบสปอร์
15	อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	VAM 09, VAM 10, VAM 11 (3 ไอโซเลท)
16	อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	ไม่พบสปอร์
17	อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	ไม่พบสปอร์
18	อ.ปะทิว จ.ชุมพร	VAM 14, VAM 15 (2 ไอโซเลท)
19	อ.ปะทิว จ.ชุมพร	ไม่พบสปอร์
20	อ.ปะทิว จ.ชุมพร	ไม่พบสปอร์
21	ต. ท่าแซะ อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	VAM 50, VAM 51, VAM 52, VAM 53 (4 ไอโซเลท)
22	ต. เขาชก อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี	VAM 62, VAM 63, VAM 64, VAM 65, VAM 66 (5 ไอโซเลท)



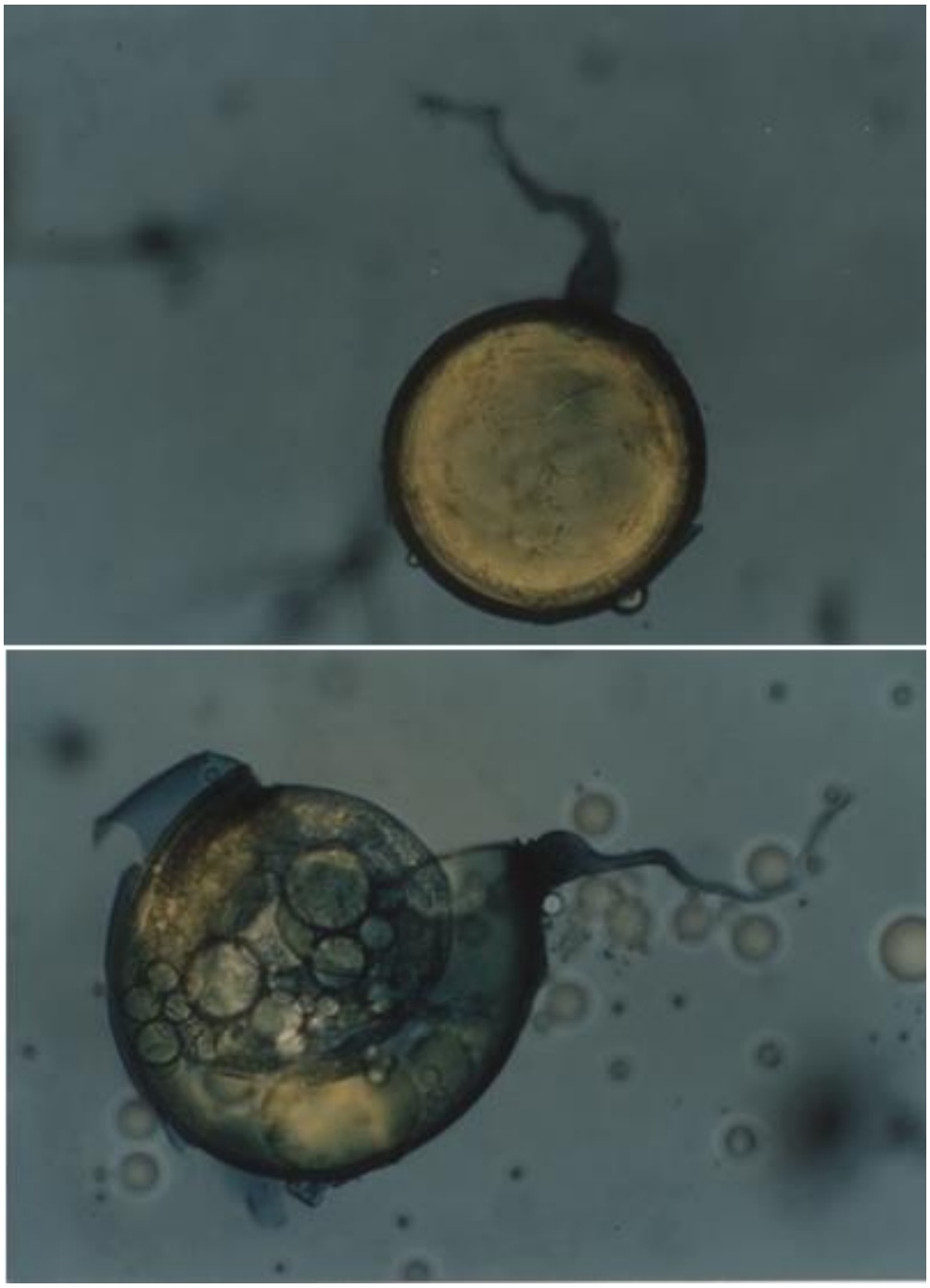
ภาพที่ 14 ราวี-เอไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากดินปาล์มน้ำมัน

1.3 การจำแนกราวี-เอไมคอร์ไรซา

การจำแนกชนิดราวี-เอไมคอร์ไรซา โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐาน ตรวจสอบลักษณะสปอร์ราวี-เอไมคอร์ไรซาภายใต้กล้อง เช่น สีของสปอร์ ผนังของสปอร์ และวัดขนาดของสปอร์ เป็นต้น จัดกลุ่มหรือจำแนกชนิดเบื้องต้นตามลักษณะของสปอร์ โดยเทียบกับฐานข้อมูลของ International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) แยกราวี-เอไมคอร์ไรซาทั้งหมด 56 ไอโซเลท จำแนกได้ราวี-เอไมคอร์ไรซา 4 สกุล ได้แก่ *Acaulospora* จำนวน 11 ไอโซเลท พบที่จังหวัดกระบี่ ชลบุรี และสุราษฎร์ธานี

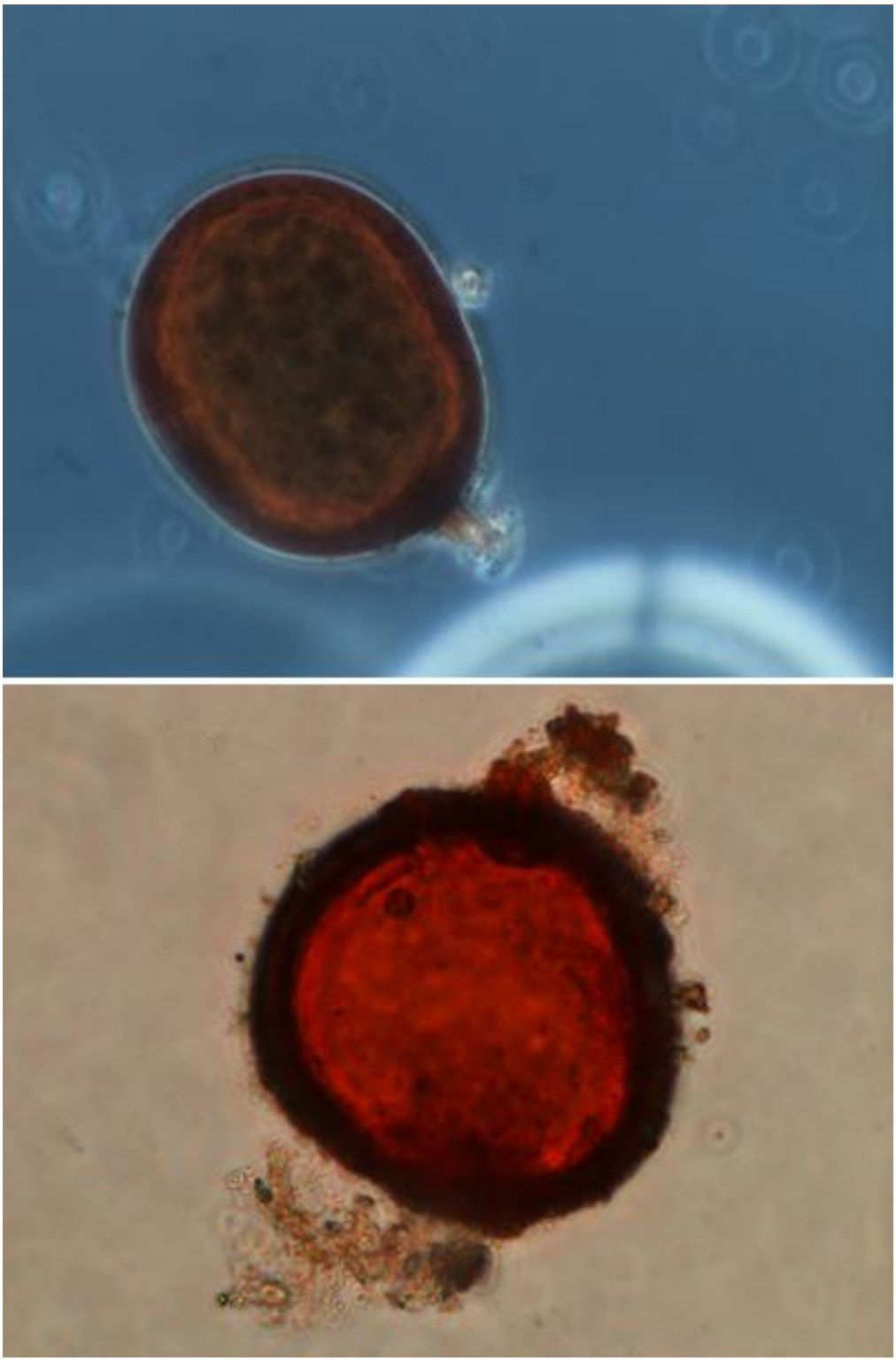
(ภาพที่ 15; ตารางที่ 4) *Gigaspora* จำนวน 2 ไอโซเลท พบที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี (ภาพที่ 16; ตารางที่ 4), *Glomus* จำนวน 32 ไอโซเลท พบที่จังหวัดกระบี่ ชลบุรี ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (ภาพที่ 18; ตารางที่ 4) และ *Scutellospora* จำนวน 11 ไอโซเลท พบที่จังหวัดกระบี่ ชลบุรี ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (ภาพที่ 17; ตารางที่ 4)

ภาพที่ 15 ราวี-เอไมคอร์ไรซา สกุล *Acaulospora* แยกได้จากดินปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 16 ราวี-เอไมคอร์ไรซา สกุล *Gigaspora* แยกได้จากดินปาล์มน้ำมัน

ภาพที่ 17 ราวี-เอไมคอร์ไรซา สกุล *Glomus* แยกได้จากดินปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 18 ราวี-เอไมคอร์ไรซา สกุล *Scutellospora* แยกได้จากดินปาล์มน้ำมัน

จากการจำแนกชนิดราวี-เอ ไมคอร์ไรซา ของดินปาล์มน้ำมันครั้งนี้ยังไม่สามารถจำแนกถึงระดับสปิชีส์ได้ เนื่องจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาไม่เพียงพอและสภาพสปอร์ที่คัดแยกมีสภาพไม่สมบูรณ์

ตารางที่ 4: ราวี-เอไมคอร์ไรซาชนิดต่าง ๆที่แยกได้จากดินจากจังหวัดต่างๆ

ราวี-เอไมคอร์ไรซา	**ราวี-เอไมคอร์ไรซา (ไอโซเลท)**	**สถานที่เก็บตัวอย่าง**
Acaulospora	VAM 03	อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 46	ต.ประสงค์ อ. ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 12, VAM 13	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 27, VAM 42, VAM 43, VAM 44	ต. เสวียด อ.ท่าฉาง จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 10, VAM 11	อ.อ่าวลึก จ.กระบี่
	VAM 66	ต. เขาซก อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี
Gigaspora	VAM 08	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 48	ต.ประสงค์ อ. ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
Glomus	VAM 01, VAM 02, VAM 04	อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 47, VAM 49	ต.ประสงค์ อ. ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 54, VAM 55, VAM 58, VAM 59, VAM 61	บ้านท่าหัก ต.ป่าเว อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 26, VAM 28, VAM 29, VAM 31, VAM 32, VAM 33, VAM 34, VAM 37, VAM 38, VAM 39, VAM 40, VAM 41	ต. เสวียด อ.ท่าฉาง จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 05, VAM 06, VAM 07	อ.คลองท่อม จ.กระบี่
	VAM 14, VAM 15	อ.ปะทิว จ.ชุมพร
	VAM 50, VAM 51, VAM 52	ต. ท่าแซะ อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร
	VAM 64, VAM 65	ต. เขาซก อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี
Scutellospora	VAM 56, VAM 57, VAM 60	บ้านท่าหัก ต.ป่าเว อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 30, VAM 35, VAM 36, VAM 45	ต. เสวียด อ.ท่าฉาง จ.สุราษฎร์ธานี
	VAM 09	อ.อ่าวลึก จ.กระบี่

	VAM 53	ต. ท่าแซะ อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร
	VAM 62, VAM 63	ต. เขาซก อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี

1.4 เก็บรักษาสายพันธุ์ราวี-เอไมคอร์ไรซา

เก็บรักษาราวี-เอไมคอร์ไรซาไว้ในดินทรายที่อบฆ่าเชื้อแล้วเก็บรักษาราวี-เอไมคอร์ไรซาไว้ในดินทรายที่อบฆ่าเชื้อแล้ว และเพิ่มปริมาณราวี-เอไมคอร์ไรซา ไว้ในดินปลูกข้าวโพด นาน 3 เดือน (ภาพที่ 19)

ภาพที่ 19 แสดงภาพการเพิ่มปริมาณราวี-เอไมคอร์ไรซา ไว้ในดินปลูกข้าวโพด

2. การทดสอบประสิทธิภาพราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

การเตรียมราวี-เอ ไมคอร์ไรซา

การเพิ่มปริมาณราวี-เอไมคอร์ไรซา ในดินปลูกข้าวโพด (ภาพที่ 19) นาน 3 เดือน เพื่อขยายปริมาณของราไว้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

การเตรียม inoculums ของรา *G. boninense*

เก็บตัวอย่างดอกเห็ดของ *G. boninense* และรากของต้นปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคลำต้นเน่าจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานี และกระบี่ มาแยกเชื้อโดยใช้อาหาร Ganoderma Selective Media แยกเชื้อบริสุทธิ์และนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 20)

ภาพที่ 20 *Ganoderma boninense* นาน PDA นาน 30 วัน

ดอกเห็ด (basidiocarp) มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ รูปร่างไม่แน่นอน ดอกมีลักษณะครึ่งวงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร หนา 50 มิลลิเมตร ผิวหน้าเรียบเป็นมัน ดูรื่น สีน้ำตาลไหม้ โดยมีขอบดอกริมในสีส้ม และขอบดอกริมนอกสีขาว ด้านใต้ดอกเป็นรูพรุน มีสีขาวและริมขอบด้านล่างเป็นสีส้ม เมื่อผ่าดอกเห็ดตามยาวจะเห็นเป็นชั้น โดยชั้นบนหนา 0.07 มิลลิเมตร ชั้นใต้ลงมามีเส้นบางๆสีส้มหรือสีเหลือง และชั้นกลางมีสีเหลืองอ่อน มีความหนา 1-10 มิลลิเมตร ก้านหนา 40 มิลลิเมตร มีสีน้ำตาลอมแดง basidiospore ขนาด 8.5 - 13.5 x 4.5 - 7.0 ไมครอน ขนาดเฉลี่ย 10.9 x 5.9 ไมครอน สปอร์รูปรีตรงกลางกว้าง สปอร์มีหนามสั้นๆ (echinulate) มีสีเหลืองทองกึ่งเหลืองอมน้ำตาล ส่วนสปอร์ไม่มีหนาม (nonechinulate) บางครั้งอาจจะพบสปอร์สีเหลือง ผนังไม่มีหนามปะปนอยู่ด้วย

เตรียมเชื้อเห็ด *G. boninense* และต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อใช้ในการปลูกเชื้อในเรือนทดลอง

เตรียมท่อนไม้ยางพาราที่มีเชื้อเห็ด *G. boninense* เพื่อใช้เป็น innoculum ในการปลูกเชื้อ จำนวน 250 ชิ้น ตามวิธีดำเนินการ เก็บท่อนไม้ที่มีเชื้อเห็ดไว้ในที่มืดเป็นเวลา 45 วันจนเชื้อ *Ganoderma* เจริญคลุมท่อนไม้ยางพารา ตรวจการปนเปื้อนทุกอาทิตย์เพื่อแยกถุงที่มีการปนเปื้อนออก จนกระทั่งเชื้อเห็ดบนท่อนไม้มีอายุ 3 เดือน (ภาพที่ 21)

ภาพที่ 21 ท่อนไม้ยางพาราที่มีเชื้อเห็ด *G. boninense*

เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 อายุ 4 เดือน จำนวน 250 ต้น ดูแลให้น้ำและปุ๋ยตามปกติ (ภาพที่ 22)

ภาพที่ 22 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์สุราษฎร์ธานี

การปลูกเชื้อ *G. boninense*

ในกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อ *G. boninense* วางท่อนไม้ยางพาราที่มีเชื้อเห็ดลง (ภาพที่ 23) ที่ก้นถุงปลูกสีดำ นำต้นกล้าปาล์มน้ำมันพร้อมดินปลูกวางลงบนท่อนไม้ยางพารากลบดินให้ทั่ว ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบไม่มีการปลูกเชื้อ ดำเนินการโดยย้ายต้นกล้าลงถุงปลูกสีดำ

ภาพที่ 23 การปลูกเชื้อ *G. boninense* บนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

การบันทึกข้อมูล

ทำการบันทึกลักษณะอาการของต้นกล้าปาล์มน้ำมันของทุกกรรมวิธี การเจริญเติบโตของกล้าปาล์มน้ำมัน เช่น ความสูง จำนวนทางใบ มีความใกล้เคียงกันในทุกกรรมวิธี สำหรับการเกิดโรค พบว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันเริ่มแสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อเห็ด *G. boninense* หลังจากการปลูกเชื้อประมาณ 6 เดือน โดยเริ่มแสดงอาการใบเหลือง ใบล่าง จะแสดงอาการใบแห้ง และหากอาการเริ่มรุนแรง ต้นกล้าปาล์มน้ำมันจะแห้งตาย

จากการทดสอบประสิทธิภาพของราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า หลังจากปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* ไปแล้ว 4 เดือน ทำการวัดความสูงทุกเดือน จากการวัดความสูงจำนวน 4 ครั้ง (ตารางที่ 5) จากผลการลองพบว่า กรรมวิธีที่ 1 ที่ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา พร้อมกับปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* ในดินปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมัน นาน 4 เดือน พบว่าความสูงของต้นกล้าปาล์มน้ำมันสูงที่สุดมีความสูงเท่ากับ 89.50 เซนติเมตร สำหรับกรรมวิธีที่ 2 ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา เพียงอย่างเดียว ในดินปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมัน มีความสูงรองลงมาเท่ากับ 86.52 เซนติเมตร และกรรมวิธีที่ 5 เป็นกรรมวิธีควบคุมโดยปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยไม่ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา และไม่ปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* มีความสูงเป็นอันดับที่ 3 เท่ากับ 85.88 เซนติเมตร ซึ่งทั้ง 3 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* ในดินปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมัน นั้นมีความสูงเท่ากับ 80 เซนติเมตร สำหรับกรรมวิธีที่ 4 ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา ในดินปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมัน 1 เดือน แล้วจึงปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* มีความสูงเท่ากับ 73.58 เซนติเมตร แต่ผลวัดความสูงของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในทุกกรรรมวิธีนั้นยังมีความแตกต่างไม่ชัดเจน ซึ่งจะต้องใช้เวลาในการบันทึกผลการทดลองนานกว่านี้

จากการผลการบันทึกจำนวนการแตกใบยอดต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ทำการใส่ราวี-เอ ไมคอร์ไรซา และ

เชื้อเห็ด *G. boninense* ตามกรรมวิธีการทดลอง ก็เช่นเดียวกัน ยังเห็นผลไม่ชัดเจน แต่ก็ยังพบว่ากรรมวิธีที่ปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* ทีจำนวนการแตกใบน้อยกว่า (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลองครั้งนี้โดยการประเมินการเกิดโรคของต้นกล้าปาล์มน้ำมันทางสายตาก็พบว่ากรรมวิธีที่ปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* นั้น ต้นกล้าปาล์มน้ำมันเริ่มแสดงอาการใบเหลืองแต่ยังเห็นผลไม่ชัดเจนเนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างในการทำให้เกิดโรค โดยเฉพาะการปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* ในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน จะต้องใช้เวลา กว่าที่โรคจะแสดงอาการเห็นผลชัดเจน และการทดลองได้ดำเนินการทดลองที่กรุงเทพฯ ซึ่งสภาพอากาศอาจไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อเห็ด แต่อย่างไรก็ตามอาการเริ่มแสดงออกบ้างแล้ว **จึงขอต่อระยะเวลาในการบันทึกผลจนถึงเดือนพฤษภาคม** เพื่อให้ผลการทดลองสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ตารางที่ 5 การเจริญของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ทำการปลูกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา และเชื้อเห็ด *G. boninense* ตามกรรมวิธีการทดลอง

Treatment	การวัดความสูงของต้นปาล์ม* (เซ็นติเมตร)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
T1 Mycorrhiza + *G. boninense*	69.86 a**	72.33 a	72.39 a	89.51 a
T2 Mycorrhiza	64.68 a	65.06 a	67.85 a	86.52 a
T3 *G. boninense*	65.20 a	66.03 a	69.47 a	80.01 b
T4 Mycorrhiza + *G. boninense****	67.26 a	67.80 a	69.49 a	73.59 c
T5 control	68.13 a	68.67 a	71.69 a	85.89 a
C.V.	0.07	0.08	0.06	0.08

* ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 14 ต้น

** ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan Multiple Range Test ที่ความเชื่อมั่น 95%

*** ทำการปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* หลังจากปลูกปลูกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา 1 เดือน

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนการแตกใบยอดต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ทำการปลูกเชื้อรา mycorrhiza และเชื้อเห็ด *G. boninense* ตามกรรมวิธีการทดลอง

Treatment	นับจำนวนใบ*		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
T1 Mycorrhiza + *G. boninense*	1.82 b**	3.31 b	4.31 c
T2 Mycorrhiza	1.97 a	3.77 a	4.77 ab
T3 *G. boninense*	2.00 a	3.17 b	4.18 c
T4 Mycorrhiza + *G. boninense****	2.00 a	3.71 a	4.90 a
T5 control	1.93 a	3.66 a	4.64 b
C.V.	0.04	0.09	0.07

* ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 14 ต้น

** ตัวอักษรเหมือนกันใน column เดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan Multiple Range Test ที่ความเชื่อมั่น 95%

*** ทำการปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* หลังจากปลูกปลูกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา 1 เดือน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่เหมาะสม คือ 1 % และใช้เวลาในการฆ่าเชื้อนาน 1 นาที เหมาะกับการฆ่าเชื้อที่ผิวเพื่อแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ทั้งนี้ถ้าใช้ความเข้มข้นที่มากหรือเวลาที่นานกว่านี้จะทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย แต่ถ้าไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวเลยหรือใช้ความเข้มข้นและเวลาที่น้อยกว่านี้ เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้มักจะเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือเชื้อราปนเปื้อนในกลุ่มอื่นๆ ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการทดลอง หรืออาจยากต่อการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

เมื่อนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์และเชื้อรา *Trichoderma* ที่ผ่านการคัดเลือกเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ดในห้องปฏิบัติการ พบว่า เชื้อรา endophyte KtB-4 ที่แยกได้จากรากของกระถินเทพา และ เชื้อรา *Trichoderma* St-Te-5 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากของต้นสัก มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราเอ็นโดไฟท์หรือ เชื้อรา *Trichoderma* ชนิดอื่นๆ ซึ่งปฏิกิริยาที่มีต่อเชื้อเห็ดนอกจากจะยับยั้งการเจริญเชื้อเชื้อเห็ดแล้ว ยังเจริญทับเชื้อเห็ด *G. boninense* อีกด้วย โดยประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ดพี่พบในห้องปฏิบัติการ มีความสอดคล้องกับผลในการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า ซึ่งพบว่าต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ได้รับการปลูกเชื้อทั้งสองชนิดมีอัตราการเกิดโรคโดยเฉลี่ยต่ำสุด

ทั้งนี้ระยะเวลาในการแสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อเห็ดค่อนข้างใช้ระยะเวลานาน ประกอบกับกรอบระยะเวลาในการทดลองในการทดลองครั้งนี้สิ้นสุดลง จึงสามารถเก็บข้อมูลเมื่อพืชแสดงอาการของโรคในระยะเริ่มแรกเท่านั้น อย่างก็ตาม ผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา endophyte KtB-4 และเชื้อรา *Trichoderma* St-Te-5 รวมไปถึงเชื้อรา *Trichoderma* St-Ta-3 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากมะขามและ *Trichoderma* St-Pr-1 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากยางพารา มีประสิทธิภาพและศักยภาพในการชะลอหรือยังยั้งการแสดงอาการของโรค หรือการเข้าทำลายของเชื้อเห็ด *G. boninense*

ในการทดลองครั้งนี้จะสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น หากทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันเพิ่มเติม เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของ เชื้อราเอ็นโดไฟท์ และเชื้อรา *Trichoderma* ในการควบคุมการเกิดโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน อีกทั้งสารเคมีที่แนะนำให้มีการใช้ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อเห็ด *G. boninense* เป็นสารเคมีที่มีการแนะนำมานาน ไม่เป็นปัจจุบัน รวมไปถึงการจัดการโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันไม่สามารถยับยั้งหรือให้ผลควบคุมการเกิดโรคที่คงที่ หากมีการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดโรคลำต้นเน่า จะสามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและกำจัดโรค อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นวิธีการผสมผสานกับการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ ในการป้องกันและกำจัดโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันอีกทางหนึ่งด้วย

จากการรวบรวมและจำแนกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน โดยเก็บตัวอย่างดินและรากของต้นพืชบริเวณรอบลำต้นปาล์มน้ำมัน จำนวน 22 ตัวอย่าง จากจังหวัดกระบี่ ชลบุรี ชุมพร และสุราษฎร์ธานี และทำการศึกษาแยกราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดินที่เก็บมาทั้งหมดจำนวน 22 ตัวอย่าง พบราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดิน

จำนวน 11 ตัวอย่าง จำแนกได้ราวี-เอไมคอร์ไรซา 4 สกุล ได้แก่ *Acaulospora* จำนวน 11 ไอโซเลท *Gigaspora* จำนวน 2 ไอโซเลท *Glomus* จำนวน 32 ไอโซเลท และ *Scutellospora* จำนวน 11 ไอโซเลท จากการทดสอบประสิทธิภาพของ ราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า หลังจากปลูกเชื้อเห็ด *G. boninense* ไปแล้ว 4 เดือน ทำการบันทึกความสูงและบันทึกจำนวนการแตกใบยอดต้นกล้าปาล์มน้ำมันทุกเดือน จากการผลการบันทึกความสูงและจำนวนการแตกใบยอดต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ในแต่ละกรรมวิธี ยังเห็นผลไม่ชัดเจน ตลอดจนการเกิดโรคของปาล์มน้ำมันยังแสดงอาการไม่ชัดเจน **จึงขอต่อระยะเวลาในการบันทึกผลจนถึงเดือนพฤษภาคม** เพื่อให้ผลการทดลองสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 เป็นข้อมูลทางเลือกที่นักวิชาการและเกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมัน ในการป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อเห็ดสกุล *Ganoderma* ตลอดจนเป็นการลดการใช้สารเคมีการป้องกันกำจัดโรค

10.2 ผลจากการทดลองสามารถขยายการทดลองสู่ระดับแปลงปลูก หรือทำการทดลองซ้ำในระยะกล้าเพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพและศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์

10.3 เชื้อราปฏิปักษ์ที่ได้จากการทดลอง มีแนวโน้มสามารถพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ เพื่อใช้ในการจัดการโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

10.4 สามารถเผยแพร่งานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์ต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

12. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. โครงการเปลี่ยนพื้นที่ปลูกปาล์มทั่วประเทศ. แหล่งที่มา:

http://www.doa.go.th/pl_data/ PALM/1STAT/st01. html 2005 ,16 ธันวาคม 2558.

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

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2549. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

พรพิมล อธิปัญญาคม. 2531. ชนิดและการเพิ่มปริมาณเชื้อราเวสสิคูลา อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซาและผลของเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของส้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 166 หน้า.

ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2536. โรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในประเทศไทย. หน้า 205-209. ใน : การอบรมสัมมนาเชิงปฏิบัติการการพัฒนาเพื่อเพิ่มเทคโนโลยีการวิจัยและการผลิตมะพร้าว โกโก้ ปาล์มน้ำมัน ประจำปี 2536. ณ โรงแรมแมนฮัตตันพาเลซ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา.

ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2545. โรคของปาล์มน้ำมัน. เอกสารวิชาการ กลุ่มงานวิจัยโรคไม้ผลพืชสวนอุตสาหกรรมและสมุนไพร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 88 หน้า.

องค์การตลาดเพื่อการเกษตร. 2552. แหล่งที่มา: http://www.mof.or.th/web/agriculture.php?id=46&cat=24, 29 ธันวาคม 2558.

Abdullah, F. nd G.N.M. Ilias. 2004. Application of *Trichoderma harzianum* in the control of basal stem rot of oil palm. Journal of Zhejiang University 30(4): 391 (Online). Available: URL: http://wanfangdata.com.cn/qikan/periodical.articles/zjdxxb-nyysm/zjdx2004/0404. aspx [2009 August 27]

Abdullah, M.T., Ali, N.Y. and Suleman, P. 2008. Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection, 27, 1354-1359.

Abdullah, F., Ilias, G.N.M., Nelson, M., Nur Ain Izzati, M.Z., Umi Kalsom Y. 2003. Disease assessment and the efficacy of *Trichoderma* as a biocontrol agent of basal stem rot of oil palms. Research Bulletin Science Putra 11: 31-33.

Anonymous. 2009. Technical Dicussion # 7 Basal Stem Rot (BSR) in Palm (Online). Available: URL: http://www.holdingtanktreatments.com/technical/Ganoderma-palm.html [2009 August 28].

Ariffin, D., Idris, A. Seman and M. Azabari. 1995. Development of Technique to Screen Oil Palm Seedlings for resistance to *Ganoderma*. Pages 1-20. In: 1995 PORIM National Oil Pakm Conference-Technologies in Plantation "The Way Forward", Kuala Lumpure.

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

Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany* 62, 924-931.

Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69, 2357-2372.

Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69, 2373-2417.

Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany* 69, 2418-2420.

Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany* 70, 639-641.

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

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

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

Daniels, B. A. and H. D. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Ed. N. C. Schenck.The American Phytopathological Society. pp. 29-36.

Flood, J. and Y. Hasan. 2004. Basal Stem Rot – Taxonomy, Biology, Epidemiology, Economic Status and Control in South East Asia and Pacific Islands. Pages 117-133. In: Proceedings of the International conference on Pests and Diseases of Importance to the Oil Palm Industry. Mohd Basri Wahid *et al*. Eds. Kuala Lumpur, Malaysia.

Fujiimori, F., and Okuda, T. 1994. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. I. Fungi. *Journal of antibiotics* 47, 173-182.

Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transaction of British Mycological Society 46: 235-244.

Harley JL and S.E Smith. 1983. Mycorrhizal symbiosis. London, Academic Press. 483 p.

Kochu B., M., and P. Kalidas. 2004. Key Pests and Diseases of Oil Palm in India – Their Biology, Epidimiology and Method of Control. Pages 184-208. In: Proceedings of the International conference on Pests and Diseases of Importance to the Oil Palm Industry, 2004. Mohd Basri Wahid *et al*. eds. Kuala Lumpur, Malaysia.

Miyasaka SC, Habte M, Friday JB, Johnson EV. 2003. Manual on arbuscular mycorrhizal fungus production and inoculation techniques. University of Hawaii at Manoa.

Mohamad, H., Z.Z. Zin and A.H. Halim. 1985. Potentials of oil palm by-products as raw materials for agro-based industries. Pages 7-15. In: Proceedings of the National Symposium on Oil Palm By-Products for Agro-Based Industries. Palm Oil Research Institule of Malaysia, Kuala Lumpur.

Muthumeenakshi, S., Mills, P. R., Brownd, A. E., and Seaby, D. A. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology* 140, 769-777.

Nur Ain Izzati, M.Z. and Abdullah, F. 2008. Disease suppression in *Ganoderma*-infected oil palm seedlings treated with *Trichoderma harzianum.* Plant Protect. Sci., 44: 101-107.

Phosri C, Rodriguez A, Sanders IR, Jeffries P. 2010. The role of mycorrhizas in more sustainable oil palm cultivation. Agriculture, Ecosystems & Environment 135: 187-193.

Ploetz, R.C. 2007. Disease of Tropical Perennial Crops: Challenging Problems in Disease Environments. Plant Disease 91(6): 644-663.

Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116, 1-116.

Sariah, M. and Zakaria, H. 2000. The Use of Soil Amendments for the Control of Basal Stem Rot of Oil-palm Seedling. Pages 89-99. In: *Ganoderma* Diseases of Perennial Crops. CABI Publishing.

Schenck NC, Perez N. 1987. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

Shamala, S. 2010. Growth effects by arbuscular mycorrhiza fungi on oil palm seedlings (*Elaeis guineensis* Jacq.) J. Oil Plam Research. V.22: 796-802.

Shamala S., F. Abdullah, Z. Abidin, M. Ahmad, U. K. Yusuf. 2008. Efficacy of singal and mixed treatments of *Trichoderma harzianum* as biocontrol agents of *Ganoderma* basal stem

rot in oil palm. Journal of Oil Palm Research (Online). Available: URL: http://d.wanfangdata.com.cn/NSTLQK_NSTL_QK17631711.aspx [2009 August 28]

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

Singh, G. 1991. *Ganoderma* - The Scourge of Oil Palms in the Coastal Areas. *The Planter* 67: 421-444.

Singh, A., Shahid, M., and Srivastava, M. 2014. Phylogenetic relationship of *Trichoderma asperellum Tasp*/8940 using Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. *International Journal of Advanced Research* 2, 979-986.

Smith SE, Read DJ. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London.

Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Amsterdam; Boston: Academic Press

Soepena, H., R.Y. Purba and S. Pawirosukarto. 2000. A Control Strategy for Basal Stem Rot on Oil Palm. Pages 83-88. In: *Ganoderma* Diseases of Perennial Crops. CABI Publishing.

Srinivasulu B., Aruna K., Vijay K., Krishna Kuma, Sabitha Doraiswamy and Rao D.V.R. 2004. Biocontrol potentiality of *Trichoderma viride* against basal stem rot disease of coconut. Journal of Plantation Crops 32(1).

Sriram, S., Savitha, M. J., Rohini, H. S., and Jalali, S. K. 2013. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oligonucleotide barcode and morphological characters. *Current Science* 104, 1332-1340.

Sujinda Sommai, Rattaket Choeyklin, Umpava Pinruan and E. B. GarethJones. 2009. Inhibition of the oil palm pathogen, *Ganoderma boninense* by endophytic fungi from the palm *Licula spinosa.* Page 86. In: International Conference on Fungal Evolution and Charles Darwin: From Morphology to Molecules. 9-11 July 2009, Sirindhorn Science Home, Thailand Science Park, Thailand.

Susanto, A., P.S. Sudharto and R.Y. Purba. 2005. Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantation. *Mycopathologia* 159(1):153-157.

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

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

Turner, P.D. 1981. Oil Palm Diseases and Disorders.Oxford University Press. 280 pp.

Zimand, G., Valinsky, L., Elad, Y., Chet, I., and Manulis, S. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research* 98, 531-534.