การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี
Biological Control of Basal Stem Rot of Oil Palm

พรพิมล อธิปัญญาคม ชนินทร ดวงสอาด สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากส่วนต่างๆ ของพืช 5 ชนิด คือ ปาล์มน้ำมัน รางจือ กระถินเทพา รางจืด และไผ่ ในระหว่าง ตุลาคม 2554-กันยายน 2556 ได้ เชื้อราเอ็นโดไฟท์ 85 ไอโซเลท โดยแยกได้จากปาล์มน้ำมัน 30 ไอโซเลท รางจืด 26 ไอโซเลท กระถินเทพา 14 ไอโซเลท ย่านาง 10 ไอโซเลท และไผ่ 5 ไอโซเลท จากการจำแนกชนิดของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ในเบื้องต้นเป็นเชื้อรา *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Xylalia* และเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ เมื่อทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อเห็ด *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 1 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* คือไอโซเลท KtB-4 ซึ่งแยกได้จากก้านกระถินเทพาจากอำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี

จากการรวบรวมและจำแนกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน โดยเก็บตัวอย่างดินและรากของต้นพืชบริเวณรอบลำต้นปาล์มน้ำมัน จำนวน 22 ตัวอย่าง จากอำเภอท่าชนะ อำเภอเมือง อำเภอท่าฉาง อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอคลองท่อม อำเภออ่าวลึก) จังหวัดกระบี่ อำเภอปะทิว อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร และ อำเภอหนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี ทำการศึกษาแยกราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดินที่เก็บมทั้งหมดจำนวน 22 ตัวอย่าง พบราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดินจำนวน 11 ตัวอย่าง นอกนั้นไม่พบราวี-เอไมคอร์ไรซาและศึกษาจากดิน 22 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะราวี-เอไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope และ compound microscope แยกได้ราวี-เอไมคอร์ไรซา ทั้งหมด 56 ไอโซเลท เก็บรักษาราวี-เอไมคอร์ไรซาไว้ในดินทรายที่อบฆ่าเชื้อแล้ว และเพิ่มปริมาณราวี-เอไมคอร์ไรซา ไว้ในดินปลูกข้าวโพดแยกราสาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันจากต้นปาล์มที่เป็นโรคจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีและกระบี่ แยกเชื้อโดยใช้อาหาร Ganoderma Selective Media จำแนกชนิดราสาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันเป็นรา *G. boninense* เก็บเชื้อไว้บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

รหัสการทดลอง 01-09-54-02-02-00-01-54

คำนำ

โรครากเน่าของพืชยืนต้นมีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ส่วนใหญ่พืชที่เป็นโรคจะแสดงอาการในช่วงพืชอายุมากกว่า 10 ปีขึ้นไป ทำให้ผลผลิตของพืชลดลงหรือไม่ให้ผลผลิต และยืนต้นตายในที่สุด เชื้อสาเหตุเข้าทำลายระบบรากของพืชทำให้ระบบการขนส่งน้ำและอาหารภายในลำต้นเสียหายหรือหยุดชะงักลง ส่งผลให้การเจริญเติบโตของพืชลดลงในระยะแรก ถ้าหากอาการรุนแรงทำให้พืชยืนต้นตาย ส่วนใหญ่การะบาดของโรครากเน่านี้แพร่กระจายไปได้โดยการสัมผัสกันของรากที่เป็นโรคกับรากปกติที่อยู่ใกล้เคียงกัน เมื่อมีการปลูกแทนต้นเดิม เชื้อสาเหตุอาศัยอยู่บนเศษซากพืชในดินจะเข้าทำลายต้นที่ปลูกทดแทนทำความเสียหายต้นปลูกทดแทนตั้งแต่พืชอายุน้อยและต้นปาล์มตายในที่สุด

ปาล์มน้ำมันที่ปลูกตามหลังมะพร้าวและปาล์มน้ำมันด้วยกันเองจะมีโอกาสเป็นโรคลำต้นเน่าสูง ปาล์มน้ำมันที่ปลูกตามหลังยางพาราหรือปลูกในพื้นที่ใหม่พบว่าการเป็นโรคลำต้นเน่าในปริมาณที่ต่ำกว่า การทิ้งตอมะพร้าวหรือตอปาล์มน้ำมันไว้ในแปลงจะเป็นการสร้างแหล่งสะสมเชื้อสาเหตุไว้ในแปลง บางแปลงที่มีการปลูกมะพร้าวมาก่อนจะฝังตอมะพร้าวในดิน เพื่อหลีกเลี่ยงการเข้าทำลายของด้วงแรดที่ชอบวางไข่บนเศษซากพืชที่ทิ้งไว้ในแปลง การทำเช่นนี้เป็นการลดการสะสมเชื้อเห็ด *Ganoderma boninense* สาเหตุของลำต้นเน่าที่ขึ้นบนซากพืชได้

ในประเทศไทยมีรายงานถึงการพบและการศึกษาโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในปี พ.ศ. 2536 (ศรีสุรางค์ และคณะ, 2536) ที่แปลงปาล์มน้ำมันของเอกชน อำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ ในต้นปาล์มน้ำมันอายุ 21-22 ปี แต่ยังไม่พบการระบาดของโรค อาจเป็นเพราะสาเหตุเนื่องจากปาล์มน้ำมันในประเทศไทยที่มีอายุมากที่สุดถึง 20-25 ปี ซึ่งเป็นระยะที่ปาล์มน้ำมันที่มีเชื้อเข้าทำลายจะเริ่มแสดงอาการของโรค แปลงปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นพื้นที่เปิดใหม่ไม่เคยมีการปลูกพืชมาก่อน ดังนั้นจึงค่อนข้างจะปลอดจากเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่า แต่ในปัจจุบันปาล์มน้ำมันในประเทศไทยเริ่มมีการปลูกแทนในบางพื้นที่ เนื่องจากต้นปาล์มน้ำมันที่มีอายุ 20 ปีขึ้นไปไม่สะดวกต่อการเก็บเกี่ยว (Likhitekaraj and Tummakate, 2000) เนื่องจากราสาเหตุโรคเข้าทำลายระบบรากเจริญเข้าสู่ลำต้น ในด้านการป้องกันกำจัดโรคจึงเป็นสิ่งที่ยากมาก การใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืชอย่างเดียวมักไม่ได้ผล จึงมีการศึกษาถึงการป้องกันหลายวิธีผสมผสานกัน เช่น การเขตกรรม ร่วมกับชีววิธี ตลอดจนการศึกษาถึงการเพิ่มความแข็งแรงให้ต้นพืชโดยเฉพาะส่วนของรากปาล์มน้ำมัน

ในพื้นที่ป่าธรรมชาติจะพบโรคที่เกิดจากเชื้อ Ganoderma spp. ในปริมาณน้อย ทั้งๆ ที่มีเชื้อสาเหตุอยู่ในพื้นที่ เนื่องจากพื้นที่ป่าธรรมชาติมีความสมดุลย์ของจุลินทรีย์กล่าวคือ เชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. ถูกควบคุมโดยเชื้อจุลินทรีย์อื่น จากการศึกษาถึงเชื้อจุลินทรีย์ในดินโดยเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus* spp. พบว่าเชื้อราจะอาศัยอยู่ที่ระดับผิวดิน ในพื้นที่ป่าเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีอยู่ปริมาณมากและสามารถควบคุมเชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. ได้ แต่ในแปลงปลูกปาล์มน้ำมันพื้นผิวดินถูกรบกวนโดยการเตรียมพื้นที่ปลูก เชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลายทำให้มีปริมาณลดลง เป็นโอกาสของเชื้อสาเหตุเจริญเติบโตเข้าทำลายพืชได้ ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาต่อยอดในการนำเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์มาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งนอกจากเพิ่มความแข็งแรง ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชได้ดี (Belanger,1996) Suslow (1982) รายงานว่าจุลินทรีย์ควบคุมโรคเหล่านี้สามารถใช้แทนสารเคมีในกรณีที่ไม่สามารถใช้สารเคมีหรือมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อีกทั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณและคงทนอยู่ในดินในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าสารเคมี

ในปัจจุบันการจัดการโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยวิธีการเขตกรรมและการใช้สารเคมี ไม่สามารถยับยั้งหรือควบคุมการเกิดโรคได้โดยให้ผลไม่คงที่ ซึ่งอาจเนื่องมากจากเชื้อเห็ด *Ganoderma* มีระยะพักตัวหลายระยะและสามารถแพร่กระจายได้หลายทางเช่น แพร่สามารถกระจายทางลมโดย basidiospores เชื้อสามารถแพร่กระจายเข้าทางรากในดินที่มีเชื้อเห็ดอยู่หรือเมื่อรากถูกตัดโดยอุปกรณ์ที่มีเชื้อเห็ดปนเปื้อนอยู่ เชื้อเห็ดสามารถกระจายตัวในดินโดยในแนวดิ่งสามารถกระจายลงลึกได้ถึง 2 เมตร จากรากที่เป็นโรคไปยังรากที่ปกติ เมื่อพิจารณาอย่างละเอียดพบว่า ในพื้นที่ที่แสดงอาการลำต้นเน่าน้อยหรือต่ำนั้น ขึ้นอยู่กับระยะหรือความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อเห็ด *Ganoderma* ซึ่งเชื้อเห็ดอาจถูกยับยั้งหรือถูกควบคุมโดยระบบทางชีววิทยา ดังนั้น การแก้ไขควบคุมเชื้อเห็ด *Ganoderma* จะมุ่งเน้นการควบคุมโรคโดยชีววิธี

ผลการทดลองจำนวนไม่น้อยที่ศึกษาพบว่า *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งและควบคุมการเจริญของเชื้อเห็ดได้ดี (Sariah *et al*., 2000 และAnonymous, 2009) ในปี ค.ศ. 2005 Susanto *et al*. แนะนำแนวทางป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน 2 ทางคือ หาพันธุ์ต้านทานโรคและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จากนั้นได้คัดเลือกและทดสอบเชื้อรา *T. harzianum* และ *Gliocladium vriide* ในแปลงปลูกพบว่าสามารถลดการเกิดโรคในแปลงปลูกได้ และให้คำแนะนำว่าควรขุดหลุมรอบต้นปาล์มและใส่ทะลายเปล่าปาล์มน้ำมันลงไปในหลุมเพื่อเป็นการกระตุ้นและเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อราปฏิปักษ์ในดิน 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 นอกจากเชื้อราเอ็นโดไฟท์แล้วยังมีราวี-เอ ไมคอร์ไรซา ซึ่งเป็นราที่เจริญเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ของรากพืชชั้นคอร์เท็กซ์ ซึ่งเป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยหรือเอื้ออำนวยประโยชน์ซึ่งกันและกัน ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกและทดสอบเชื้อราเอ็นโดไฟท์ และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุม เชื้อรา *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน และรวบรวมและจำแนกชนิดของรา วี-เอ ไมคอร์ไรซา ในดินบริเวณรากปาล์ม เพื่อประโยชน์ในการนำไปคัดเลือกชนิดที่สามารถอยู่ร่วมกับรากพืชและยังประโยชน์สูงสุดให้รากปาล์มน้ำมันให้ความแข็งแรงและทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าได้แก่เชื้อ *Ganoderma* spp. ได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ ถุงพลาสติก กรรไกร กรรไกรตัดแต่งกิ่ง กระดาษฟาง ไม้อัดทับตัวอย่าง
2. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้วและอุปกรณ์แยกเชื้อ ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บิกเกอร์ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด มีด ไมโครไปเปต
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ sterio

6. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA) Potato Dextrose Agar (PDA) peptone-dextrose-rose bengal agar Malt Extract Agar Corn Meal Agar (CMA) และ Ganoderma Selective Media (GSM)

7. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และเอธิลแอลกอฮอล์ 75%

8. ตะแกรงขนาด 44, 74, 149 และ 250 ไมครอน

9. เครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 1,750 รอบ/นาที

วิธีการ

การทดลองย่อยที่ 1 การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้ Endophyte และเชื้อรา *Trichoderms* sp.

การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1. การเก็บตัวอย่าง (sample selection)

เก็บตัวอย่างรากปาล์มปกติ และ เนื้อเยื่อบริเวณลำต้น ที่ไม่มีอาการของโรคจากจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันห่อด้วยกระดาษใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

2. การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นพืชส่วนต่างๆ ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่จะเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ชิ้นพืชในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆกัน มีขั้นตอนดังนี้

2.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อลำต้น และ รากของต้นปาล์มน้ำมันที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาด

2.2 ใช้กรรไกรตัดส่วนเนื้อเยื่อลำต้นและราก ให้ได้ความยาวประมาณ 1 ซม.

2.3 นำผ้าขาวบางมาห่อชิ้นส่วนของพืชที่ตัดได้ จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที

2.4 นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมด แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 1, 3 และ 5% ในเวลานานต่างๆกันคือ 1, 3 และ 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว

2.5 นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว

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

2.7 ตรวจดูเชื้อที่เจริญออกมาจากแต่ละชิ้นส่วนของพืช วิเคราะห์ผลของการเจริญของเชื้อราที่เวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่างๆกัน

3. การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ (isolation)

นำตัวอย่างพืชผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 2 ตามความเข้มข้นที่ผ่านการทดสอบตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของแต่ละชิ้นพืช แยกเชื้อราที่ได้ไปทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเก็บใน PDA slant เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

4. การตรวจสอบและจำแนกกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา บันทึกจำนวนและกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

การเก็บตัวอย่างเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

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

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อราเอ็นโดไฟท์อย่างน้อย ที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* อย่างน้อย 10 ไอโซเลท ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture โดยเริ่มวางเชื้อเพื่อทดสอบ ณ วันที่เชื้อมีอัตราการเจริญเท่ากัน วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ 11 กรรมวิธี หรือแปรผันตามจำนวนไอโซเลทของเชื้อราปฏิปักษ์ที่นำมาทดสอบ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตบันทึกผลการเจริญของเชื้อเห็ด โดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อเห็ดด้านที่ติดกับเชื้อราปฏิปักษ์ในชุดทดสอบ และวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อเห็ดจากชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยังยั้งการเจริญเติบโต (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

การทดลองย่อยที่ 2 การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้ วี-เอ ไมคอร์ไรซา

ขั้นตอนที่ 1 รวบรวม จำแนกและคัดเลือกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน ที่มีศักยภาพในการยับยั้งรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

การสำรวจและเก็บตัวอย่างราวี-เอไมคอร์ไรซา

เก็บตัวอย่างดินและรากของต้นพืชบริเวณรอบลำต้นปาล์มน้ำมัน บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และข้อมูลภูมิศาสตร์ นำตัวอย่างมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

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)

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 โดยวิธีจำแนกราวี-เอไมคอร์ไรซาของ Schenck and Perez (1988)

เก็บรักษาสายพันธุ์ราวี-เอไมคอร์ไรซา

เก็บดินและรากพืชที่มีราวี-เอไมคอร์ไรซา โดยนำดินรากมาทำให้แห้ง และเก็บไว้ในถุงพลาสติค ปิดผนึกให้สนิทและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

เก็บสปอร์ไว้ในพืช (ข้าวโพด และพืชวงศ์หญ้า เป็นต้น) ที่ปลูกไว้ในเรือนทดลอง

เก็บสปอร์และ sporocarp ของราไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 7 กรรมวิธี 5 ซ้ำ โดยนำราวี-เอ ไมคอร์ไรซาจากขั้นตอนที่ 1 จำนวน 3 isolates โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา isolates 001 ก่อนที่จะ inoculate รา *G. boninense*

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา isolates 002 ก่อนที่จะ inoculate รา *G. boninense*

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา isolates 003.. ก่อนที่จะ inoculate รา *G. boninense*
กรรมวิธีที่ 4 ใส่ราวี-เอไมคอร์ไรซา isolates 001 พร้อมกับ inoculate รา *G. boninense*
กรรมวิธีที่ 5 ใส่ราวี-เอ ไมคอร์ไรซา isolates 002 พร้อมกับ inoculate รา *G. boninense*
กรรมวิธีที่ 6 ใส่ราวี-เอ ไมคอร์ไรซา isolates 003.พร้อมกับ inoculate รา *G. boninense*
กรรมวิธีที่ 7 ไม่ใส่วี-เอ ไมคอร์ไรซา

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*

เตรียมรา *G. boninense* โดยเลี้ยงรา *G. boninense* บนอาหาร PDA นาน 5-7 วัน เตรียม inoculum ของรา *G. boninense* โดยนำรา *G. boninense* บนอาหาร PDA มาวางบนชิ้นไม้ยางพาราที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเคลือบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEA (Malt Extract Agar) เป็นเวลา 8-10 สัปดาห์ เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 5-6 เดือน โดยใส่วัสดุปลูกลงในกระถาง 1ใน 3 ของภาชนะ นำดินและรากที่มีราวี-เอไมคอร์ไรซามาวางบริเวณรอบต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 เดือน แล้ววางชิ้นไม้ยางพาราที่มีรา *G. boninense* เจริญอยู่บนไม้ โดยให้รากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันสัมผัสกับชิ้นไม้ยางพารา จากนั้นเติมวัสดุปลูกให้เต็ม
ปลูกในภาชนะที่มีเชื้อเห็ด ให้รากของต้นกล้าปาล์มสัมผัสกับชิ้นไม้ยางพารา จากนั้นเติมวัสดุปลูกให้เต็ม

การบันทึกผลการทดลอง

การย้อมสีรากด้วยสี trypan blue โดยวิธีของ Phillips and Hayman (1970) ตรวจดูการเจริญของเส้นใยเข้าไปในรากปาล์มน้ำมัน

วัดความสูงของต้นกล้าปาล์มน้ำมันทุกเดือนหลังทำการปลูกเชื้อ และบันทึกผลการเกิดโรคทุกโดยคำนวณตามสูตร ดังนี้
สูตรคำนวณดัชนีการเกิดโรค (Disease Severity Index:DSI)Z (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 0พืชปกติ ไม่พบการแสดงอาการหรือเส้นใยของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช
ระดับ 1พบเส้นใยสีขาวของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลืองเล็กน้อย
ระดับ 2 พบ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลือง 1-3 ใบ
ระดับ 3พบ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลืองมากกว่า 3 ใบ
ระดับ 4 พบ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และต้นปาล์มแห้ง

บันทึกลักษณะอาการของต้นกล้าปาล์มน้ำมันของทุกกรรมวิธี เมื่อครบระยะเวลาการทดลอง นำรากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการทุกกรรมวิธีมาแยกเชื้อ

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มต้น – สิ้นสุด

เดือนตุลาคม 2553 - เดือนกันยายน 2558

สถานที่- ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช

- โรงเรือนทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
- แปลงปาล์มน้ำมันของเกษตรกรในแหล่งปลูกภาคใต้

ผลและวิจารณ์การทดลอง

การทดลองย่อยที่ 1 การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้ Endophyte และเชื้อรา *Trichoderms* sp.

การแยกเชื้อรา เอ็นโดไฟท์จากส่วนต่างๆ ของพืช

เก็บตัวอย่างพืช ได้แก่ ปาล์มน้ำมันจากจังหวัดชุมพร และระยอง รางจืดจาก อ.สวี จังหวัดชุมพร กระถินเทพา ย่านาง และไผ่จาก อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี

แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากส่วนต่างๆ ของพืชบนอาหาร RBA (Rose Bengal Agar) ปาล์มน้ำมัน แยกจากส่วนของใบ ก้านใบ ก้าน และราก รางจืดแยกจากส่วนของใบ ก้าน และลำต้น กระถินเทพาแยกจากส่วนของใบ ก้าน และกิ่ง ย่างนางแยกจากส่วนของใบ ก้านและลำต้น ไผ่แยกจากส่วนของใบ กาบและลำต้น

เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 85 ไอโซเลท จากปาล์มน้ำมัน 30 ไอโซเลท รางจืด 26 ไอโซเลท กระถินเทพา 14 ไอโซเลท ย่างนาง 10 ไอโซเลท และไผ่ 5 ไอโซเลท (ตารางที่ 1)

จำแนกชนิดของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มองเห็นด้วยตาเปล่าและลักษณะของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ในเบื้องต้นเป็นเชื้อรา *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Xylalia* และเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์

ปฏิกิริยาของเชื้อราเอ็นโดไฟท์กับเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

ทำการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ 85 ไอโซเลท กับเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 1 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* คือไอโซเลท KtB-4 ซึ่งแยกได้จากก้านกระถินเทพาจากอำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรีซึ่งเป็นเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์

ตารางที่ 1 เชื้อรา Endophyte ที่แยกได้จาก ปาล์มน้ำมัน รางจืด กระถินเทพา ย่านาง และไผ่

	ไอโซเลท	ส่วนของพืช	สถานที่เก็บ
ปาล์มน้ำมัน : *Elaeis guineensis* Jacq.			
1	OpL-1	ใบ	จ.ชุมพร
2	OpL-2	ใบ	จ.ชุมพร
3	OpL -3	ใบ	จ.ชุมพร
4	OpL -4	ใบ	จ.ชุมพร
5	OpL -5	ใบ	จ.ชุมพร
6	OpL -6	ใบ	จ.ชุมพร
7	OpL -7	ใบ	จ.ระยอง
8	OpLs -1	ก้านใบ	จ.ชุมพร
9	OpLs -2	ก้านใบ	จ.ชุมพร
10	OpLs -3	ก้านใบ	จ.ชุมพร
11	OpLs -4	ก้านใบ	จ.ชุมพร
12	OpLs -5	ก้านใบ	จ.ชุมพร
13	OpLs -6	ก้านใบ	จ.ชุมพร
14	OpLs -7	ก้านใบ	จ.ชุมพร
15	OpLs -8	ก้านใบ	จ.ชุมพร
16	OpLs -9	ก้านใบ	จ.ชุมพร
17	OpLs -10	ก้านใบ	จ.ชุมพร
18	OpLs -11	ก้านใบ	จ.ระยอง
29	OpLs -12	ก้านใบ	จ.ระยอง
20	OpLs -13	ก้านใบ	จ.ระยอง
21	OpLs -14	ก้านใบ	จ.ระยอง
22	OpLs -15	ก้านใบ	จ.ระยอง
23	OpLs -16	ก้านใบ	จ.ระยอง
24	OpB-1	ก้าน	จ.ชุมพร
25	OpB -2	ก้าน	จ.ชุมพร
26	OpR-1	ราก	จ.ชุมพร
27	OpR -2	ราก	จ.ชุมพร
28	OpR -3	ราก	จ.ชุมพร

ตารางที่ 1 (ต่อ)

	ไอโซเลท	ส่วนของพืช	สถานที่เก็บ
29	OpR -4	ราก	จ.ชุมพร
30	OpR -5	ราก	จ.ชุมพร
รางจืด : *Thumbergia laurifolia* Linn.			
31	BbL-1	ใบ	อ.สวี จ.ชุมพร
32	BbL-2	ใบ	อ.สวี จ.ชุมพร
33	BbL-3	ใบ	อ.สวี จ.ชุมพร
34	BbL-4	ใบ	อ.สวี จ.ชุมพร
35	BbL-5	ใบ	อ.สวี จ.ชุมพร
36	BbL-6	ใบ	อ.สวี จ.ชุมพร
37	BbL-7	ใบ	อ.สวี จ.ชุมพร
38	BbL-8	ใบ	อ.สวี จ.ชุมพร
39	BbB-1	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
40	BbB-2	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
41	BbB-3	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
42	BbB-4	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
43	BbB-5	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
44	BbB-6	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
45	BbB-7	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
46	BbS-1	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
47	BbS-2	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
48	BbS-3	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
49	BbS-4	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
50	BbS-5	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
51	BbS-6	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
52	BbS-7	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
53	BbS-8	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
54	BbS-9	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
55	BbS10	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
56	BbS-11	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร

ตารางที่ 1 (ต่อ)

	ไอโซเลท	ส่วนของพืช	สถานที่เก็บ
กระถินเทพา : *Acacia mangium* Wild.			
57	Ktl-1	ใบ	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
58	Ktl-2	ใบ	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
59	Ktl-3	ใบ	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
60	Ktl-4	ใบ	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
61	KtB-1	ก้าน	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
62	KtB-2	ก้าน	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
63	KtB-3	ก้าน	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
64	KtB-4	ก้าน	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
65	KtBr-1	กิ่ง	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
66	KtBr-2	กิ่ง	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
67	KtBr-3	กิ่ง	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
68	KtBr-4	กิ่ง	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
69	KtBr-5	กิ่ง	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
70	KtBr-6	กิ่ง	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
ย่านาง : *Tiliacora triandra* (Colebr) Diels.			
71	BgL-1	ใบ	อ.สวี จ.ชุมพร
72	BgB-1	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
73	BgB-2	ก้าน	อ.สวี จ.ชุมพร
74	BgS-1	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
75	BgS-2	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
76	BgS-3	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
77	BgS-4	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
78	BgS-5	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
79	BgS-6	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร
80	BgS-7	ลำต้น	อ.สวี จ.ชุมพร

ตารางที่ 1 (ต่อ)

	ไอโซเลท	ส่วนของพืช	สถานที่เก็บ
ไผ่ : *Bambusa* sp.			
81	BaL-1	ใบ	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
82	BaL-2	ใบ	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
83	BaL-3	ใบ	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
84	BaSh-1	กาบใบ	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
85	BaS-1	Je9ho	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี

การทดลองย่อยที่ 2 การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้ วี-เอ ไมคอร์ไรซา

1. รวบรวม จำแนกและคัดเลือกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน ที่มีศักยภาพในการยับยั้งรา *Ganoderma boninense* ได้สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

การสำรวจและเก็บตัวอย่างราวี-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 2)

การแยกและจำแนกราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดิน

จากการศึกษาแยกราวี-เอไมคอร์ไรซา (ภาพที่ 1) 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 1) เก็บรักษาราวี-เอไมคอร์ไรซาไว้ในดินทรายที่อบฆ่าเชื้อแล้วเก็บรักษาราวี-เอไมคอร์ไรซาไว้ในดินทรายที่อบฆ่าเชื้อแล้วและเพิ่มปริมาณราวี-เอไมคอร์ไรซา ไว้ในดินปลูกข้าวโพด

ตารางที่ 2: 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. เขาสก อ.หนองใหญ่ จ.ชลบุรี	VAM 62, VAM 63, VAM 64, VAM 65, VAM 66 (5 ไอโซเลท)

2. การศึกษารา *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

เก็บตัวอย่างดอกเห็ดของ *G. boninense* และรากของต้นปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคลำต้นเน่าจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันจังหวัดสุราษฎร์ธานี และกระบี่ มาแยกเชื้อโดยใช้อาหาร Ganoderma Selective Media แยกเชื้อบริสุทธิ์และนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดอกเห็ด (basidiocarp) มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ รูปร่างไม่แน่นอน ดอกมีลักษณะครึ่งวงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร หนา 50 มิลลิเมตร ผิวหน้าเรียบเป็นมัน ดูรื่น สีน้ำตาลไหม้ โดยมีขอบดอกริมในสีส้ม และขอบดอกริมนอกสีขาว ด้านใต้ดอกเป็นรูพรุน มีสีขาวและริมขอบด้านล่างเป็นสีส้ม เมื่อผ่าดอกเห็ดตามยาว จะเห็นเป็นชั้น 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

3. เก็บรักษาสายพันธุ์ราวี-เอไมคอร์ไรซา

เก็บดินและรากพืชที่มีราวี-เอไมคอร์ไรซา โดยนำดินรากมาทำให้แห้ง และเก็บไว้ในถุงพลาสติค ปิดผนึกให้สนิทและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

เก็บสปอร์ของราไมคอร์ไรซาและเพิ่มปริมาณราในดินปลูกข้าวโพด

4. เพิ่มปริมาณไมคอร์ไรซา

เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจำนวน 40 กระถาง เมื่อเมล็ดข้าวโพดงอก 7 วัน ปลูกราไมคอร์ไรซาลงไปในดินปลูกข้าวโพด โดยนำไมคอร์ไรซารวมทุกไอโซเลทที่แยกได้จากดินแต่ละชนิดมาปลูกเชื้อลงไปในดินปลูกข้าวโพด ในกครั้งนี้ ปลูกราไมคอร์ไรซาทั้งหมด 4 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1, 2, 3 และ 4 ชุดละ 10 กระถาง

รูปที่ 1 :ราวี-เอไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากดินปาล์มน้ำมัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 85 ไอโซเลท จากปาล์มน้ำมัน 30 ไอโซเลท รางจืด 26 ไอโซเลท กระถินเทพา 14 ไอโซเลท ย่างนาง 10 ไอโซเลท และไผ่ 5 ไอโซเลท จากการจำแนกชนิดของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ในเบื้องต้นเป็นเชื้อรา *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Xylalia* และเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ การศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้ทั้งหมดกับเชื้อเห็ด G. *boninense* พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 1 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* คือไอโซเลท KtB-4 ซึ่งแยกได้จากก้านกระถินเทพาจากอำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรีซึ่งเป็นเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์

จากการรวบรวมและจำแนกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน โดยเก็บตัวอย่างดินและรากของต้นพืชบริเวณรอบลำต้นปาล์มน้ำมัน จำนวน 22 ตัวอย่าง จาก 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) ทำการศึกษาแยกราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดินที่เก็บมทั้งหมดจำนวน 22 ตัวอย่าง พบราวี-เอไมคอร์ไรซาจากดินจำนวน 11 ตัวอย่าง นอกนั้นไม่พบราวี-เอไมคอร์ไรซาและศึกษาจากดิน 22 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะราวี-เอไมคอร์ไรซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope และ compound microscope แยกได้ราวี-เอไมคอร์ไรซา ทั้งหมด 56 ไอโซเลท เก็บรักษาราวี-เอไมคอร์ไรซาไว้ในดินทรายที่อบฆ่าเชื้อแล้ว และเพิ่มปริมาณราวี-เอไมคอร์ไรซา ไว้ในดินปลูกข้าวโพด แยกราสาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันจากต้นปาล์มที่เป็นโรคจากจังหวัดสุราษฎร์ธานีและกระบี่ แยกเชื้อโดยใช้อาหาร Ganoderma Selective Media จำแนกชนิดราสาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันเป็นรา *G. boninense* เก็บเชื้อไว้บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

เอกสารอ้างอิง

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

ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2536. โรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในประเทศไทย หน้า 205-209 *ใน* : การอบรมสัมมนาเชิงปฏิบัติการการพัฒนาเพื่อเพิ่มเทคโนโลยีการวิจัยและการผลิตมะพร้าวโกโก้ ปาล์น้ำมัน ประจำปี 2536. ณ โรงแรมแมนฮัตตันพาเลซ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

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., A.S. Idris and G. Singh. 2000. Status of *Ganoderma* Oil Palm. Pages 49-70.*In* : *Ganoderma* Diseases of Perennial Crops. CABI Publishing.

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

Caron, M., J.A Fortin and C. Richard. 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* on tomatoes. Plant Soil. 87: 233-239.

Davis, R.M. and J.A. Menge. 1981. *Phytophthora parasitica* inoculation and intensity of vesicular-arbuscular mycorrhizae in citrus. New Phytopol. 87: 705-715.

Habte,M., Y.C. Zhang and D.P. Schmitt. 1999. Effectiveness of Glomus species in protecting white clover against nematode damage. Can. J. Bot. 7 : 135-139.

Harley JL & Smith SE. 1983. Mycorrhizal symbiosis. London, Academic Press. 483 p.

Kobayashi, N. 1992. Suppression of soil-borne disease by VA mycorrhizal fungi. Agriculture and Horticulture 10:69-71

Jalaluddin, M., M. Hamid and S,E Muhammad. 2008. Selection and Application of a VAM-Fungus for promoting growth and resistance to charcoal rot disease of sunflower var. Helico-250. Pak. J. Bot., 40(3): 1313-1318, 2008.

Likhitekaraj, S. and A. Tummakate. 2000. Basal Stem Rot of Oil Palm in Thailand Caused by *Ganoderma*. Pages 69-70 *In* : *Ganoderma* Diseases of Perennial Crops. CABI Publishing.

Mohamad, H., Zin, Z.Z and Halim, A.H. 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.

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.

Schonbeck, F. and H.W. Dehne. 1977. Damage to mycorrhizal and nonmycorrizal cotton seedlings by *Thielaviopsis basicola.* Plant Dis. Reptre. 61: 266-267.

Sikora, R.A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystemes for the control of plant parasitric nematodes. Annual Review of Phytopathology 12 : 245-270.

Sikora, R.A. and F. Schonbeck. 1995. Effect of vesicular-mycorrhizae, *Endogone mosseae* on the population dynamics of the root-knot nematodes*Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla,* pp. 158-166. *In* proceedings VIII International Congress Plant Protection, Moscow.

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.

Sundarababu, R. and C. Sankaranarayanan. 1995. Effect of nursery treated VAM on the nematode interaction in tomato. International Journal of Tropical Plant Diseases 13 (1): 107-111.

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.

Zambolium, L. and N.C. Schenck. 1983. Reduction of the effects of pathogenic, root-infecting fungi on soybesn by mycoorhizsl fungus: *Glomus mosseae.* Phytopathol. 73: 1402-1405