การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี

Biological Control of Basal Stem Rot of Oil Palm

ชนินทร ดวงสอาด พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากต้นปาล์มน้ำมันที่ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง จากพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันจังหวัด กระบี่ สุราษฎร์ธานี และชุมพร โดยนำส่วนของใบ ก้านใบ และรากมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization รวมถึงดินบริเวณรอบราก ได้เชื้อราจำนวน 650 ไอโซเลท และสามารถจัดกลุ่มเบื้องต้นได้อย่างน้อย 7 taxa คือ *Alternaria* spp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* spp., *Neosartorya* spp., *Xylaria* spp., *Trichoderma* spp. และ Mycelia Sterilia ทำการวัดอัตราการเจริญของเชื้อราเอ็นโดไฟท์และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ และเก็บรักษาเชื้อราดังกล่าว และได้ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของต้นปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคลำต้นเน่า โดยแยกเชื้อรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน และเก็บรักษาเพื่อทำการทดสอบและคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไป

แยกราสาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี จำนวน 7 ตัวอย่าง และจำแนกชนิดได้รา *Ganoderma boninense* จำนวน 5 isolates จากจังหวัดกระบี่ แต่ไม่สามารถแยกเชื้อสาเหตุเก็บเชื้อที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

รหัสการทดลอง 01-09-54-02-02-00-01-54

คำนำ

ในพื้นที่ป่าธรรมชาติจะพบโรคที่เกิดจากเชื้อ *Ganoderma* spp. ในปริมาณน้อย ทั้งๆ ที่มีเชื้อสาเหตุอยู่ในพื้นที่ เนื่องจากพื้นที่ป่าธรรมชาติมีความสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในสภาพ แวดล้อมกล่าวคือ เชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. ถูกควบคุมโดยเชื้อจุลินทรีย์อื่น จากการศึกษาถึงเชื้อจุลินทรีย์ในดิน โดยเฉพาะเชื้อรา *Aspergillus* spp. พบว่าเชื้อราจะอาศัยอยู่ที่ระดับผิวดิน ในพื้นที่ป่าเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีอยู่ปริมาณมากและสามารถควบคุมเชื้อเห็ด *Ganoderma* spp. ได้ แต่ในแปลงปลูกปาล์มน้ำมันพื้นผิวดินถูกรบกวนโดยการเตรียมพื้นที่ปลูก เชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลายทำให้มีปริมาณลดลง เป็นโอกาสของเชื้อสาเหตุเจริญเติบโตเข้าทำลายพืชได้ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาอย่างมากในการนำเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ มาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งสามารถเพิ่มความแข็งแรง ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชได้ดี (Belanger,1996) Suslow (1982) รายงานว่าจุลินทรีย์ควบคุมโรคสามารถใช้แทนการใช้สารเคมีในกรณีที่ไม่สามารถใช้สารเคมีหรือมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อีกทั้งจุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณและคงทนอยู่ในดินในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าสารเคมี การจัดการโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยวิธีการเขตกรรมและการใช้สารเคมี ไม่สามารถยับยั้งหรือควบคุมการเกิดโรคได้โดยให้ผลไม่คงที่ ซึ่งอาจเนื่องมากจากเชื้อเห็ด *Ganoderma* มีระยะพักตัวหลายระยะและสามารถแพร่กระจายได้หลายทางเช่น แพร่สามารถกระจายทางลมโดย basidiospores เชื้อสามารถแพร่กระจายเข้าทางรากในดินที่มีเชื้อเห็ดอยู่หรือเมื่อรากถูกตัดโดยอุปกรณ์ที่มีเชื้อเห็ดปนเปื้อนอยู่ เชื้อเห็ดสามารถกระจายตัวในดินโดยในแนวดิ่งสามารถกระจายลงลึกได้ถึง 2 เมตร จากรากที่เป็นโรคไปยังรากที่ปกติ เมื่อพิจารณาอย่างละเอียดพบว่า ในพื้นที่ที่แสดงอาการลำต้นเน่าน้อยหรือต่ำนั้น ขึ้นอยู่กับระยะหรือความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อเห็ด *Ganoderma* ซึ่งเชื้อเห็ดอาจถูกยับยั้งหรือถูกควบคุมโดยระบบทางชีววิทยา ดังนั้น การแก้ไขควบคุมเชื้อเห็ด *Ganoderma* จะมุ่งเน้นการควบคุมโรคโดยชีววิธี และมีหลายการทดลองที่ศึกษาพบว่า *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 มี

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 17 ไอโซเลท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ด *G. boninense* สูงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากเชื้อราเอ็นโดไฟท์แล้วยังมีราวี-เอ ไมคอร์ไรซาซึ่งเป็นราที่เจริญเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ของรากพืชชั้นคอร์เท็กซ์ ซึ่งเป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยหรือเอื้ออำนวยประโยชน์ซึ่งกันและกัน

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกและทดสอบเชื้อราเอ็นโดไฟท์ และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุม เชื้อรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน และรวบรวมและจำแนกชนิดของรา วี-เอ ไมคอร์ไรซา ในดินบริเวณรากปาล์มเพื่อประโยชน์ในการนำไปคัดเลือกชนิดที่สามารถอยู่ร่วมกับรากพืชและยังประโยชน์สูงสุดให้รากปาล์มน้ำมันให้ความแข็งแรงและทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าได้แก่เชื้อ *Ganoderma* spp. ได้

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ ถุงพลาสติก กรรไกร กรรไกรตัดแต่งกิ่ง กระดาษฟาง ไม้อัดทับตัวอย่าง
2. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บิกเกอร์ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด มีด
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ sterio
6. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ water agar (WA) potato dextrose agar (PDA) Malt Extract Agar, Corn Meal Agar (CMA)
7. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และ เอธิลแอลกอฮอล์ 75%

วิธีการ

1. **การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อเห็ด *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน**

1.1 สืบค้นเอกสารและเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

1.2 การรวบรวมและจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์

1.2.1 การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.2.1.1 การเก็บตัวอย่าง (sample selection)

เก็บตัวอย่างใบ ก้านใบ และรากปาล์ม ที่ไม่มีอาการของโรคจากจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมัน และดินบริเวณรอบราก ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียดแหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

1.2.1.2 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นพืชส่วนต่างๆ ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่จะเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ชิ้นพืชในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆกัน มีขั้นตอนดังนี้

นำตัวอย่างใบ ก้านใบ และรากของต้นปาล์มน้ำมันที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาด

1. ใช้กรรไกรตัดส่วนเนื้อเยื่อลำต้นและราก ให้ได้ความยาวประมาณ 1 ซม.
2. นำผ้าขาวบางมาห่อชิ้นส่วนของพืชที่ตัดได้ จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที
3. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมด แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆคือ 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 (isolation)

นำตัวอย่างพืชผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 1.2.1.2 ตามความเข้มข้นที่ผ่านการทดสอบ ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของแต่ละชิ้นพืช แยกเชื้อราที่ได้ไปทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเก็บใน PDA slant เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป นับจำนวนชิ้นตัวอย่างที่มีเชื้อราเจริญออกมาเพื่อคำนวณหาค่า isolate prevalence หรือ colonization rate (Taylor *et al.*) ดังสูตร

$$\text{Colonization rate} = \frac{\text{Total number of samples yielding} \geq 1 \text{ isolate}}{\text{Total number of samples in that trial}} \times 100$$

1.2.1.4 การตรวจสอบและจำแนกกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา บันทึกจำนวนและกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.2.2 การแยกและจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* spp.

1.2.2.1 การเก็บตัวอย่าง (sample selection)

เก็บตัวอย่างรากปาล์มปกติ และดินบริเวณรอบรากจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมัน ห่อรากด้วยกระดาษ เก็บตัวอย่างดินใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

1.2.2.2 การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินและราก

แยกเชื้อโดยวิธี soil dilution plate ในอาหาร Rose Bengal บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 3-5 วัน แยกเชื้อที่เจริญบนอาหาร เพื่อจำแนกชนิดและทำการทดสอบประสิทธิภาพ

1.2.2.3 การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อรา *Trichoderma* spp. บันทึกจำนวนและชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

2. การเก็บตัวอย่างเชื้อเห็ด *G. boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

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

3. สรุปผลการทดลอง

รวบรวมข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยใช้ วี-เอ ไมคอร์ไรซา

1 รวบรวม จำแนกและคัดเลือกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากแหล่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน ที่มีศักยภาพในการยับยั้งรา *Ganoderma* 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-เอไม คอร์ไรซา โดยนำดินรากมาทำให้แห้ง และเก็บไว้ในถุงพลาสติค ปิดผนึกให้สนิทและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

เก็บสปอร์ไว้ในพืช (ข้าวโพด และพืชวงศ์หญ้า เป็นต้น) ที่ปลูกไว้ในเรือนทดลอง

เก็บสปอร์และ sporocarp ของราไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทดสอบประสิทธิภาพราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

การเตรียมราวี-เอ ไมคอร์ไรซา

การเพิ่มปริมาณราวี-เอไมคอร์ไรซา โดยทำการปลูกพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวโพด พืชวงศ์หญ้าชนิด

ต่าง ๆ ที่มีระบบรากฝอย และนำสปอร์ของราที่แยกจากข้อ 13.1.4 มาปลูกเชื้อลงไปในดิน ประมาณ 3-6 เดือน เพื่อขยายปริมาณของราไว้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

การเตรียม inoculums ของรา *Ganoderma*

เตรียมรา *Ganoderma* โดยเลี้ยงรา *Ganoderma* บนอาหาร PDA นาน 5-7 วัน เตรียม inoculum ของรา *Ganoderma* โดยนำรา *Ganoderma* บนอาหาร PDA มาวางบนชิ้นไม้ยางพาราที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเคลือบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MEA (Malt Extract Agar) เป็นเวลา 8-10 สัปดาห์

การทดสอบราวี-เอ ไมคอร์ไรซาในการควบคุมรา *Ganoderma* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในระยะกล้า

เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 5-6 เดือน โดยใส่วัสดุปลูกลงในกระถาง 1ใน 3 ของภาชนะ นำดินและรากที่มีราวี-เอไมคอร์ไรซามาวางบริเวณรอบต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 เดือน แล้ววางชิ้นไม้ยางพาราที่มีรา *Ganoderma* เจริญอยู่บนไม้ โดยให้รากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันสัมผัสกับชิ้นไม้ยางพารา จากนั้นเติมวัสดุปลูกให้เต็ม

เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 5-6 เดือน โดยใส่วัสดุปลูกลงในกระถาง 1ใน 3 ของภาชนะ นำดินและรากที่มีราวี-เอไมคอร์ไรซามาวางบริเวณรอบต้นกล้าปาล์มน้ำมัน และปลูกเชื้อรา *Ganoderma* กับต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยใส่วัสดุปลูกลงในกระถาง 1ใน 3 ของภาชนะ วางชิ้นไม้ยางพาราที่มีเชื้อเห็ดเจริญอยู่จากนั้น ย้ายต้นกล้าปาล์มน้ำมันลงปลูกในภาชนะที่มีเชื้อเห็ด ให้รากของต้นกล้าปาล์มสัมผัสกับชิ้นไม้ยางพารา จากนั้นเติมวัสดุปลูกให้เต็ม

เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 5-6 เดือน โดยใส่วัสดุปลูกลงในกระถาง 1ใน 3 ของภาชนะ ย้ายต้นกล้าปาล์มน้ำมันลงปลูกในภาชนะ

การดูแลและบันทึกผล

การย้อมสีรากด้วยสี trypan blue โดยวิธีของ Phillips and Hayman (1970) ตรวจดูการเจริญของเส้น
ใยเข้าไปในรากปาล์มน้ำมัน

แยกราวี-เอ ไมคอร์ไรซา จากดินปลูกปาล์มน้ำมันทุกกรรมวิธี

บันทึกผลการเกิดโรคทุก 2 สัปดาห์ ประมาณ 20 สัปดาห์และคำนวณตามสูตร 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 0 พืชปกติ ไม่พบการแสดงอาการหรือเส้นใยของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช

ระดับ 1 พบเส้นใยสีขาวของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลืองเล็กน้อย

ระดับ 2 พบ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และใบเหลือง 1-3 ใบ

ระดับ 3 พบ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืชและใบเหลืองมากกว่า3 ใบ

ระดับ 4 พบ basidioma ของเชื้อเห็ดบนส่วนใดๆของพืช และต้นปาล์มแห้ง

บันทึกลักษณะอาการของต้นกล้าปาล์มน้ำมันของทุกกรรมวิธี เมื่อครบระยะเวลาการทดลอง นำรากของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการทุกกรรมวิธีมาแยกเชื้อ

ดำเนินการทดลอง 2 ฤดู

บันทึกข้อมูลสภาพอากาศและสภาพแวดล้อมระหว่างดำเนินการทดลอง

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มต้น – สิ้นสุด

เดือนตุลาคม 2553 - เดือนกันยายน 2558

สถานที่ - ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช

- โรงเรือนทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี
- แปลงปาล์มน้ำมันของเกษตรกรในแหล่งปลูกภาคใต้

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากต้นปาล์มน้ำมันที่ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง จากพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันจังหวัด กระบี่ สุราษฎร์ธานี และชุมพร โดยนำส่วนของใบ ก้านใบ และรากมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization รวมถึงดินบริเวณรอบราก ได้เชื้อราจำนวน 650 ไอโซเลท และสามารถจัดกลุ่มเบื้องต้นได้อย่างน้อย 7 taxa คือ *Alternaria* spp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* spp., *Neosartorya* spp., *Xylaria* spp., *Trichoderma* spp. และ Mycelia Sterilia โดยยังมีเชื้อราเอ็นโดไฟท์บางส่วนที่ยังอยู่ในระหว่างการจัดและจำแนกกลุ่มและได้ทำการวัดอัตราการเจริญของเชื้อราเอ็นโดไฟท์และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ และเก็บรักษาเชื้อราดังกล่าว และได้ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของต้นปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคลำต้นเน่า โดยแยกเชื้อรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน และเก็บรักษาเพื่อทำการทดสอบและคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ในขั้นตอนต่อไป

แยกราสาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี จำนวน 7 ตัวอย่าง และจำแนกชนิดได้รา *Ganoderma boninense* จำนวน 5 isolates พบว่า รา G. *boninense* ที่แยกจากโรคลำต้นเน่าจังหวัดสุราษฎร์ธานี ไม่สามารถนำมาแยกเชื้อสาเหตุได้เนื่องจากดอกเห็ดที่เจริญบนลำต้นนั้นมีอายุมากแล้ว เมื่อทำการแยกเชื้อสาเหตุทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียและราชนิดอื่น แต่รา *G. boninense* ที่จังหวัดกระบี่นั้นยังมีอายุอ่อน แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากต้นปาล์มน้ำมันที่ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง จากพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันจังหวัด กระบี่ สุราษฎร์ธานี และชุมพร ได้เชื้อราเอ็นโดไฟท์จำนวน 650 ไอโซเลท และสามารถจัดกลุ่มเบื้องต้นได้อย่างน้อย 7 taxa คือ *Alternaria* spp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* spp., *Neosartorya* spp., *Xylaria* spp., *Trichoderma* spp. และ Mycelia Sterilia โดยยังมีเชื้อราเอ็นโดไฟท์บางส่วนที่ยังอยู่ในระหว่างการจัดและจำแนกกลุ่มและได้ทำการวัดอัตราการเจริญของเชื้อราเอ็นโดไฟท์และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้ และเก็บรักษาเชื้อราดังกล่าว และได้ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของต้นปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคลำต้นเน่า โดยแยกเชื้อรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน และเก็บรักษาเพื่อทำการทดสอบและคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ในขั้นตอนต่อไป โดยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่จะนำมาทดสอบควนมีคุณสมบัติเช่น มีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็ว หรือสามารถสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งอาจมีฤทธิ์ในการระงับหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้

แยกราสาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน จังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี จำนวน 7 ตัวอย่าง และจำแนกชนิดได้รา *G. boninense* จำนวน 5 isolates แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เพื่อนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ เชื้อรา *Trichoderma* spp. และ วี-เอ ไมคอร์ไรซา ที่แยกได้ มาทำการทดสอบและคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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].

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

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.

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.