การควบคุมโรคเน่าดำในกล้วยไม้ ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* (Butl.) โดยใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* (Speg.)

Control of Black Rot Disease of Orchids Caused by *Phytophthora palmivora* (Butl.) Using Bioactive Compound from Luminescent Mushroom, *Neonothopanus nambi* (Speg.)

สุรีย์พร บัวอาจ บุษราคัม อุดมศักดิ์ ไตรเดช ข่ายทอง รุ่งนภา คงสุวรรณ์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Black rot disease of orchids by *Phytophthora palmivora* (Butl.) is serious disease of various genera. This research aims to investigate the efficiency of the bioactive compound, aurisin A derived from luminescent mushroom (Sirin Ratsamee mushroom), *Neonothopanus nambi* for control black rot disease. The study was conducted during October, 2015 – September, 2017 in laboratory and green – house of Plant Pathology research group, Plant Protection research and Development office. The hyphal colony inhibition of bioactive compounds against *P. palmivora* was tested on PDA. The result revealed that bioactive compounds, aurisin A suspension and concentration of culture filtrate of all concentrations suppressed clearly against colony of *P. palmivora* and non significantly different with fungicide. The control treatment (no fungicide or bioactive compounds) exhibited the colony diameters of *P. palmivora* on 3, 5 and 7 days with 4.15, 7.3 and 9.0 cm., respectively. Similary, result on sporangium inhibition by bioactive compounds showed that the aurisin A at 100 and 500 mg/l and 75% and 100% culture filtrates inhibited sporangial formation. The lesion of black rot of a Vandaceous orchid inhibition was also experimented using detached leaf technique. The result indicated that the 100% culture filtrate of *N. nambi* gave the best result in lesion suppression (0.23 cm) with non significance ($P<0.01$) to fungicide application (0.01 cm), but significant difference to control treatment (2.45 cm).

รหัสการทดลอง 03-05-59-01-02-00-02-59

The application of bioactive compounds were also carried out in green - house. The lesion size was significantly different to the control treatment. Result showed that the application by spraying of aurisin a every 3 days on orchids inhibited the disease better than spraying every 5 days.

Keywords : orchids, luminescent mushroom, black rot disease

บทคัดย่อ

โรคเน่าดำ ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl.) เป็นโรคที่มีความสำคัญทำความเสียหายให้กับกล้วยไม้หลายสกุล การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสงสิรินรัศมี *Neonothopanus nambi* ในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้ ซึ่งดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 ณ ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดสอบกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการทดสอบสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. palmivora* บนอาหาร PDA พบว่า สารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงทั้งในรูปแบบของสารสกัด (aurisin A) และน้ำคั้นจากเชื้อเห็ด (culture filtrate) ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ได้ดี ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเชื้อรา ที่ 3, 5 และ 7 วัน เส้นใยแผ่และเจริญ 4.15, 7.3 และ 9.0 เซนติเมตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดสอบการยับยั้งการสร้าง sporangium ของเชื้อรา *P. palmivora* พบว่า ทุกความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง สามารถยับยั้งการสร้าง sporangium และเส้นใยได้ดี โดยเฉพาะสาร aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 500 mg/l และ culture filtrate ที่ระดับความเข้มข้น 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการยับยั้งการเกิดแผลบนใบกล้วยไม้สกุลแวนดา ด้วยวิธี detached leaf technique หลังการปลูกเชื้อ ที่ 3 วัน พบว่า culture filtrate ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีสุด (0.23 เซนติเมตร) โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$) กับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี (0.01 เซนติเมตร) แต่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีเปรียบเทียบ (2.45 เซนติเมตร) และผลการทดสอบรูปแบบการใช้สารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในสภาพโรงเรือน พบว่าขนาดแผลที่เกิดขึ้นในแต่ละกรรมวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกรรมวิธีเปรียบเทียบ และผลการทดสอบระยะการพ่นสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในสภาพโรงเรือน พบว่าระยะเวลาพ่นสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง ทุก 3 วัน ให้ผลดีกว่าการพ่นสารทุก 5 วัน

คำหลัก : กล้วยไม้ เห็ดเรืองแสง โรคเน่าดำ

คำนำ

กล้วยไม้ (orchid) จัดเป็นไม้ดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะนอกจากจำหน่ายภายในประเทศแล้ว ยังมีการส่งออกต่างประเทศเป็นจำนวนมาก พันธุ์กล้วยไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกมีหลายสกุล เช่น กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย, ม็อคคารา, ออนซิเดียม, คัทลียา, แอสโคเซนดา, อะแรนดา และแวนดา (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544) ปัจจุบันการปลูกกล้วยไม้มักประสบปัญหาด้านโรคพืชและแมลง ซึ่งทำให้ผลผลิตของกล้วยไม้ลดลง และไม่ได้มาตรฐาน (กรมวิชาการเกษตร, 2547) ปัญหาด้านโรคที่สำคัญของกล้วยไม้ คือ โรคเน่าดำ หรือโรคยอดเน่า หรือโรคเน่าเข้าไส้ (black rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl.) (Uchida, 1994) ซึ่งทำความเสียหายให้กับกล้วยไม้ได้หลายสกุล เช่น แวนดา, ที เอ็ม เอ, แวนดารอทไชเดียนา, อะแรนคริสติน, แคทลียา, มอคคารา และกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย เป็นต้น พบได้กับทุกส่วนของกล้วยไม้ตั้งแต่ ราก ใบ ยอด และดอก อาการที่พบ คือ จะเกิดจุดกลมฉ่ำน้ำสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลตาลเข้ม จากนั้นแผลจะลุกลามขยายทำให้ใบเน่า ถ้าอาการรุนแรงจะเข้าทำลายส่วนยอด และลำต้นทำให้เกิดอาการยอดเน่าดำ (นิยมรัฐ, 2544)

การป้องกันกำจัดโรคเน่าดำของกล้วยไม้โดยทั่วไปนั้นมักจะใช้สารเคมี เช่น fosetyl-Al และ metalaxyl ซึ่งเมื่อมีการใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานมีผลทำให้เชื้อสาเหตุโรคเกิดการดื้อต่อสารเคมี และก่อให้เกิดสารพิษตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และทำลายสภาพแวดล้อม ดังนั้นการนำวิธีการอื่นที่ปลอดภัยมาใช้ จึงเป็นแนวทางที่ควรให้ความสำคัญ ในต่างประเทศ Boehlendorf และคณะ (2004) รายงานว่าสาร aurisin A ที่แยกได้จากเห็ดในสกุล *Panus* sp. มีฤทธิ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Pythium ultimum*, *Venturia inaequalis*, *Plasmopara viticola*, *Puccinia graminis* และ *Phytopthora infestans* ในประเทศไทย สุรีย์พร (2550) พบสาร Aurisin A ซึ่งสกัดจากเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* โดยพบสาร aurisin A ที่มีผลออกฤทธิ์ต่อเชื้อราชั้นต่ำสาเหตุโรคพืชในสกุล *Pythium* และ *Phytopthora* และมีผลต่อการตายของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืช ดังนั้นการศึกษานี้จึงสนใจที่จะนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง *N. nambi* มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้ ซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อนเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้กับเกษตรกร และหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อไป อันจะเป็นแนวทางในการอนุรักษ์สภาพแวดล้อม และเพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากเห็ดเรืองแสงในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* (Speg.) R.H. Petersen & Krisai ไอโซเลต PW2
2. เชื้อรา *Phytophthora palmivora* จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections
3. กล้วยไม้สกุลแวนดา

4. สารเคมี metalaxyl 25% WP เป็นสารเปรียบเทียบ
5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ เช่น เอทิลอะซีเตต (ethyl acetate, EtOAc)
6. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ กล่องชื้น หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ และเครื่อง rotary evaporator ฯลฯ
7. โรงเรือนปลูกกล้วยไม้

วิธีการ

การทดลองที่ 1 ทดสอบสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ในสภาพห้องปฏิบัติการ (ปีงบประมาณ 2559)

1.1 แหล่งที่มาของเชื้อ เชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ไอโซเลท PW2 แยกได้จากเห็ดเรืองแสงที่พบในเขตโคกภูตากา อำเภอเวียงเก่า จังหวัดขอนแก่น โดยเลี้ยงเชื้อเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) จากนั้นเก็บรักษาเชื้อเห็ดที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

เชื้อรา *P. palmivora* จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections กลุ่มงานวิทยา ไมโคกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแยกเชื้อจากแปลงกล้วยไม้ของเกษตรกร

1.2 เตรียมสาร aurisin จากเชื้อเห็ดเรืองแสง โดยเลี้ยงเชื้อเห็ดเรืองแสงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว malt extract broth (MEB) เป็นเวลา 30 วัน กรองเส้นใยและเก็บเส้นใยที่ได้นำไปอบที่ตู้อบ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยแห้งแล้วนำมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น จากนั้นสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยเอทิลอะซีเตต (EtOAc) จำนวน 3 ครั้ง เก็บสารละลายที่ได้มากรองและระเหยตัวทำละลายออกภายใต้ความดัน ด้วยเครื่อง rotary evaporator นำสารสกัดหยาบ crude EtOAc ไปแยกสกัดด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยการใช้ซิลิกาเจล เป็นตัวดูดซับและใช้ EtOAc:hexane เป็นตัวชะ เก็บสารที่ถูกชะออกมาพร้อมกับตัวชะเป็น fraction เพิ่มความแรงของขั้วของตัวชะให้มากขึ้นจนถึง 100% EtOAc จึงหยุด นำแต่ละ fraction มาตรวจสอบด้วย thin layer chromatography (TLC) เพื่อทำการรวม fraction ที่เหมือนกันไว้ด้วยกัน จากนั้นนำ faction ที่มีจุดบน TLC ไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีและการตกผลึกจนได้สาร aurisin A ที่สกัดได้ในรูปผงสีเหลืองอ่อน จากนั้นเตรียมสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 และ 500 mg/l โดยใช้ Dimethylsulfoxid (DMSO) เป็นตัวละลายร่วมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อใช้เป็นสารทดสอบต่อไป

1.3 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยบนอาหาร PDA วางแผนการทดลอง Completely randomized designs (CRD) ประกอบด้วย 10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l + เชื้อรา *P. palmivora*
กรรมวิธีที่ 2 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 50 mg/l + เชื้อรา *P. palmivora*
กรรมวิธีที่ 3 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l + เชื้อรา *P. palmivora*
กรรมวิธีที่ 4 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/l + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 5 culture filtrate ความเข้มข้น 35% + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 6 culture filtrate ความเข้มข้น 50% + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 7 culture filtrate ความเข้มข้น 75% + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 8 culture filtrate ความเข้มข้น 100% + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 9 สารเคมี metalaxyl 25% WP + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 10 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ + เชื้อรา *P. palmivora* . (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

วิธีปฏิบัติการทดลอง นำสารสกัด aurisin A และ culture filtrate จากเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ที่เตรียมไว้ ผสมกับอาหาร PDA ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา *P. palmivora* อายุ 7 วัน โดยใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะวุ้นตรงปลายเส้นใยของเชื้อเห็ดเรืองแสง จำนวน 1 ชิ้น วางกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

การบันทึกข้อมูล วัดการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) โดยเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นใยเชื้อราทุก 3, 5 และ 7 วัน เปรียบเทียบกับการเจริญที่มีเชื้อรา *P. palmivora* เพียงอย่างเดียว

1.4 ทดสอบการยับยั้งการสร้าง sporangium วางแผนการทดลอง CRD ประกอบด้วย 10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l

กรรมวิธีที่ 2 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 50 mg/l

กรรมวิธีที่ 3 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/l

กรรมวิธีที่ 5 culture filtrate ความเข้มข้น 35%

กรรมวิธีที่ 6 culture filtrate ความเข้มข้น 50%

กรรมวิธีที่ 7 culture filtrate ความเข้มข้น 75%

กรรมวิธีที่ 8 culture filtrate ความเข้มข้น 100%

กรรมวิธีที่ 9 สารเคมี metalaxyl 25% WP

กรรมวิธีที่ 10 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

วิธีปฏิบัติการทดลอง เลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ cork borer เบอร์ 3 เจาะวุ้นตรงปลายเส้นใยของเชื้อรา *P. palmivora* จำนวน 1 ชิ้น วางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เตรียมสาร aurisin A และ culture filtrate ตามกรรมวิธีที่วางไว้ โดยดูดสารออกฤทธิ์ จำนวน 10 มล.ต่อจานอาหารเลี้ยง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และตั้งทิ้งไว้ในที่มีแสง

การบันทึกข้อมูล หลังการทดสอบตรวจดูลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อราและการสร้าง sporangium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 24, 48 และ 72 ชม. โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ทดสอบ

1.5 ทดสอบการยับยั้งการเกิดแผลบนใบกล้วยไม้ ทดสอบด้วยวิธี detached leaf technique บนใบของกล้วยไม้ โดยวางแผนการทดลอง CRD ประกอบด้วย 10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 2 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 50 mg/l + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 3 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 4 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/l + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 5 culture filtrate ความเข้มข้น 35% + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 6 culture filtrate ความเข้มข้น 50% + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 7 culture filtrate ความเข้มข้น 75% + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 8 culture filtrate ความเข้มข้น 100% + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 9 สารเคมี metalaxyl 25% WP + เชื้อรา *P. palmivora*

กรรมวิธีที่ 10 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ + เชื้อรา *P. palmivora* (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

กรรมวิธีที่ 11 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมใบกล้วยไม้สกุลแวนดา โดยตัดใบกล้วยไม้ใต้น้ำ และฆ่าเชื้อที่ผิวใบด้วย 70%EtOH พ่น culture filtrate และสาร aurisin A ที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างๆ ลงบนใบกล้วยไม้ จากนั้นใช้เข็มทำแผลบนใบของกล้วย นำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา *P. palmivora* วางลงบนแผล บ่มเชื้อในกล่องชื้น 24 ชม. จึงนำชิ้นวุ้นออก

การบันทึกข้อมูล วัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้น (เซนติเมตร) ที่ 3, 5 และ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูล นำค่าผลการเกิดแผลบนใบกล้วยไม้ ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน (ปีงบประมาณ 2560)

2.1 ทดสอบรูปแบบการใช้สารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้ โดยคัดเลือกกรรมวิธีที่ดีที่สุดมาทดสอบต่อในโรงเรือนกล้วยไม้ โดยวางแผนการทดลอง Randomized Complete Block Design (RCB) ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำๆ ละ 10 ต้น

กรรมวิธีที่ 1 พ่น culture filtrate ความเข้มข้น 50%

กรรมวิธีที่ 2 พ่น culture filtrate ความเข้มข้น 75%

กรรมวิธีที่ 3 พ่น culture filtrate ความเข้มข้น 100%

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/l

กรรมวิธีที่ 5 พ่นสารเคมี metalaxyl 25% WP

กรรมวิธีที่ 6 control + (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ + ใส่เชื้อ *P. palmivora*)

กรรมวิธีที่ 7 control – (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ + ไม่ใส่เชื้อ *P. palmivora*)

วิธีปฏิบัติการทดลอง หยด tween 80 จำนวน 1-2 หยด ผสมกับสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ฉีดพ่นให้ทั่วบริเวณใบและยอดกล้วยไม้สกุลแวนดาด้วยเครื่องพ่นมือ ทิ้งไว้ให้แห้ง จึงทำการปลูกเชื้อรา *P. palmivora* ด้วยวิธี tooth's method ที่ใบของกล้วยไม้ จำนวน 10 ใบ/ต้น

การบันทึกข้อมูล check การเกิดโรค โดยวัดขนาดของแผลบนใบกล้วยไม้สกุลแวนดา เมื่อ 3, 5 และ 7 วัน หลังปลูกเชื้อ (เซนติเมตร)

การวิเคราะห์ข้อมูล นำค่าวัดขนาดของแผลบนใบกล้วยไม้ ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT

2.2 ทดสอบระยะการพ่นสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง นำผลการทดสอบรูปแบบการใช้สารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงที่มีประสิทธิภาพดี อย่างน้อย 2 ระดับความเข้มข้น โดยวางแผนการทดสอบ RCB ประกอบด้วย 9 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 10 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 culture filtrate ความเข้มข้น 75% พ่นทุก 3 วัน

กรรมวิธีที่ 2 culture filtrate ความเข้มข้น 100% พ่นทุก 3 วัน

กรรมวิธีที่ 3 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 mg/l พ่นทุก 3 วัน

กรรมวิธีที่ 4 control + (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ + ใส่เชื้อ *P. palmivora*) พ่นทุก 3 วัน

กรรมวิธีที่ 5 culture filtrate ความเข้มข้น 75% พ่นทุก 5 วัน

กรรมวิธีที่ 6 culture filtrate ความเข้มข้น 100% พ่นทุก 5 วัน

กรรมวิธีที่ 7 สารสกัด aurisin A ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 mg/l พ่นทุก 5 วัน

กรรมวิธีที่ 8 control + (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ + ใส่เชื้อ *P. palmivora*) พ่นทุก 5 วัน

กรรมวิธีที่ 9 control – (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ + ไม่ใส่เชื้อ *P. palmivora*)

วิธีปฏิบัติการทดลอง เตรียมต้นกล้วยไม้สกุลแวนดา หยด tween 80 จำนวน 1-2 หยด ผสมกับสารสกัดจากเห็ดเรืองแสง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ฉีดพ่นสารครั้งแรกให้ทั่วบริเวณใบและยอดกล้วยไม้สกุลแวนดาด้วยเครื่องพ่นมือก่อนทำการปลูกเชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง จึงทำการปลูกเชื้อรา *P. palmivora* ด้วยวิธี tooth's method โดยใช้เข็มทำแผลบนใบของกล้วย แล้วนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา *P. palmivora* วางลงบนแผล นำต้นกล้วยไม้บ่มในถุงชื้นที่โรงเรือนกล้วยไม้ เป็นเวลา 48 ชม. จึงเอาชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *P. palmivora* ออกจากผิวใบ สังเกตแผลที่เกิดขึ้นบนใบ

การบันทึกข้อมูล ก่อนพ่นสารทุกครั้ง check การเกิดโรค โดยวัดขนาดของแผลบนใบกล้วยไม้ (ซม.)

การวิเคราะห์ข้อมูล นำค่าวัดขนาดของแผลบนใบกล้วยไม้ ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี DMRT

เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลอง ระหว่างเดือนตุลาคม 2558 ถึง กันยายน 2560 ณ ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ทดสอบสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ในสภาพห้องปฏิบัติการ (ปีงบประมาณ 2559)

1.1 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยบนอาหาร PDA พบว่าสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงทั้งในรูปแบบของสาร aurisin A และ secondary metabolite ในรูป culture filtrate ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ได้ดี คือ เส้นใยของเชื้อรา *P. palmivora* ไม่สามารถแผ่ขยายเส้นใยและเจริญเติบโต ซึ่งไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อพบเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเชื้อราที่ 3, 5 และ 7 วัน เส้นใยแผ่และเจริญ 4.15, 7.3 และ 9.0 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 1 และ Fig. 1)

1.2 ทดสอบการยับยั้งการสร้าง sporangium พบว่าสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงทั้งในรูปสาร aurisin A และ culture filtrate ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการสร้าง sporangium และการเจริญของเส้นใยได้ดี โดยเฉพาะสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 500 mg/l และ culture filtrate ที่ระดับความเข้มข้น 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เส้นใยมีการเจริญผิดปกติ เส้นใยหงิกงอ และไม่สามารถแตกกิ่งก้าน รวมทั้งไม่สร้าง sporangium ซึ่งพบการสร้าง sporangium และเส้นใยเฉพาะบริเวณภายในวุ้น เนื่องจากชิ้นวุ้นไม่ได้สัมผัสกับสารออกฤทธิ์ของเห็ดเรืองแสง หรือสัมผัสเพียงเล็กน้อยเนื่องจากสาร aurisin A และ culture filtrate ที่ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรเพียง 10 มล.ต่อจานอาหารเลี้ยง ซึ่งไม่ท่วมชิ้นวุ้นเพียงปริ่มๆ ดังนั้นเส้นใยจึงอัดกันแน่นและสร้าง sporangium เฉพาะในชิ้นวุ้นเท่านั้น (Table 2 และ Fig. 2)

1.3 ทดสอบการยับยั้งการเกิดแผลบนใบกล้วยไม้ ส่วนผลทดสอบการยับยั้งการเกิดแผลบนใบกล้วยไม้สกุลแวนดา ด้วยวิธี detached leaf technique ที่ 3 วัน หลังการปลูกเชื้อ พบว่า culture filtrate ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีสุด โดยมีขนาดของแผลที่เกิดขึ้นบนใบกล้วยไม้ เพียง 0.23 เซนติเมตร ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี ที่มีขนาดของแผล 0.01 เซนติเมตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่มีเพียงเชื้อรา *P. palmivora* โดยพบขนาดแผล 2.45 เซนติเมตร (Table 3 และ Fig. 3)

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน (ปีงบประมาณ 2560)

2.1 ทดสอบรูปแบบการใช้สารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้ นำกรรมวิธีที่ดีที่สุดทดสอบต่อในสภาพโรงเรือน พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *P. palmivora* ได้ดี รองมาจากกรรมวิธีการใช้สารเคมี metalaxyl 25% WP ซึ่งหลังปลูกเชื้อที่ 3 วัน พบขนาดแผลเพียง 0.27 ซม. รองลงมาเป็นกรรมวิธีพ่น culture filtrate ที่ความเข้มข้น 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (ขนาดแผล 0.68 และ 0.58 ซม. ตามลำดับ) ส่วนสาร

aurisin A ที่ 500 mg/l พบขนาดแผล 1.17 ซม. ซึ่งแต่ละกรรมวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยพบแผลขนาด 2.06 ซม. (Table 4 และ Fig. 4)

2.2 ทดสอบระยะการพ่นสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง จากการนำสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงที่มีประสิทธิภาพดี อย่างน้อย 2 ระดับความเข้มข้น และได้เพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด aurisin A ที่ระดับ 1,000 mg/l เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* พบว่าระยะเวลาในการพ่นสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงทุก 3 วัน มีผลในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* ได้ดีกว่า การพ่นสารออกฤทธิ์ทุก 5 วัน เพราะเมื่อเชื้อเข้าสู่พืชแล้วยากที่จะป้องกันการระบาดของโรคได้ ยิ่งในการทดสอบมีการปลูกเชื้อด้วยวิธี tooth's method เชื้อยิ่งทำลายพืชได้อย่างรวดเร็ว และหลังการปลูกเชื้อมีฝนตกติดต่อกันหลายวันส่งผลให้การเกิดแผลบนในกล้วยไม้อย่างรวดเร็ว (Table 5 และ Fig. 5)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการทดสอบสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. palmivora* ในสภาพห้องปฏิบัติการ ได้ผลดีทั้งในรูปแบบของสาร aurisin A และ secondary metabolite ในรูป culture filtrate เห็นได้จากเชื้อราหยุดการเจริญเติบโตไม่สามารถสร้างเส้นใยและ sporangium โดยเฉพาะสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 500 mg/l และ culture filtrate ที่ระดับความเข้มข้น 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนำไปทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงในการควบคุมโรคเน่าดำของกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *P. palmivora* ได้ดี รองมาจากกรรมวิธีการใช้สารเคมี metalaxyl 25% WP ส่วนระยะเวลาในการพ่นสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง พบว่าระยะการพ่นสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงทุก 3 วัน มีผลในการยับยั้งเชื้อรา *P. palmivora* ได้ดีที่สุดไม่ช้าเกินไปหลังจากที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. palmivora* การทดสอบนี้เป็นการปลูกเชื้อด้วยวิธี tooth's method โดยใช้เข็มจิ้มใบพืชให้เกิดแผล จำนวน 5 แผลต่อเข็ม เพื่อเปิดแผลให้เชื้อเข้าสู่พืชได้โดยตรง หลังใส่เชื้อนำต้นกล้วยไม้บ่มในถุงชื้นเป็นเวลา 48 ชม. จึงเอาชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *P. palmivora* ออกจากผิวใบ สังเกตได้ว่าเชื้อเริ่มเข้าทำลายตั้งแต่ที่ 24 ชม. เนื่องจากสภาพแวดล้อมเหมาะแก่การเกิดโรคเป็นอย่างมาก เพราะเป็นช่วงฤดูฝน อาการร้อนและมีความชื้นสูง สังเกตจากขนาดแผลขยายเร็ว แต่ถ้าในสภาพแปลงปลูกโรคเกิดเองโดยธรรมชาติไม่มีการปลูกเชื้อหรือทำแผล อาการและขนาดแผลจะไม่รุนแรงและระบาดอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการใช้สารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงพ่นก่อนและหลังเกิดโรคทุก 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง ก็สามารถควบคุมโรคเน่าดำในกล้วยไม้ได้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. *เอกสารวิชาการกล้วยไม้.* กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 152 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. *ทะเบียนเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออกปี 2544.* กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ, กรมส่งเสริมการเกษตร, กรมส่งเสริมการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 655 หน้า.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. *คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด.* กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 90 หน้า.

สุรีย์พร บัวอาจ. 2550. *ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนไรโบโซมอลดีเอ็นเอของเห็ดเรืองแสง และผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดต่อไส้เดือนฝอยรากปม (Meloidogyne incognita Chitwood)* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 126 หน้า.

Boehlendorf, B., S. Neff., T.C. Schuez., L.P. Molleyres, T. Winkler, M. Dobler, and Y. Huang. 2004. *Isolation and characterization of compounds obtained from a fungal microorganism and preparation of some derivatives thereof.* Brit. UK Patent Application.

Uchida, J. Y. 1994. *Diseases of Orchids in Hawaii.* Plant Disease. 78: 220-224.

Table 1 The hyphal colony inhibition of bioactive compounds against *Phytopthora palmivora* was tested on PDA

Treatment	Inhibition zone (cm)[1/]		
	3 days	5 days	7 days
1. aurisin A at 10 mg/l + *P. palmivora*	0	0	0
2. aurisin A at 50 mg/l + *P. palmivora*	0	0	0
3. aurisin A at 100 mg/l + *P. palmivora*	0	0	0
4. aurisin A at 500 mg/l + *P. palmivora*	0	0	0
5. culture filtrate at 35% + *P. palmivora*	0	0	0
6. culture filtrate at 50% + *P. palmivora*	0	0	0
7. culture filtrate at 75% + *P. palmivora*	0	0	0
8. culture filtrate at 100% + *P. palmivora*	0	0	0
9. Chemical (metalaxyl 25% WP)+ *P. palmivora*	0	0	0
10. control (only *P. palmivora*)	4.15	7.3	9.0

[1/] Inhibition zone (cm): Measure the width clear zone

Table 2 The result on sporangium inhibition by bioactive compounds

Treatment	24 hr		48 hr		72 hr	
	Number of sporangia	Length of hyphae (mm)[1/]	Number of sporangia	Length of hyphae (mm)[1/]	Number of sporangia	Length of hyphae (mm)[1/]
1. aurisin A at 10 mg/l + *P. palmivora*	0	0	0	0	0	0
2. aurisin A at 50 mg/l + *P. palmivora*	0	0	0	0	0	0
3. aurisin A at 100 mg/l + *P. palmivora*	0	0	0	0	0	0
4. Aurisin A at 500 mg/l + *P. palmivora*	0	0	0	0	0	0
5. culture filtrate at 35% + *P. palmivora*	0	0	0	0	0	0
6. culture filtrate at 50% + *P. palmivora*	0	0	0	0	0	0
7. culture filtrate at 75% + *P. palmivora*	0	0	0	0	0	0
8. culture filtrate at 100% + *P. palmivora*	0	0	0	0	0	0
9. Chemical (metalaxyl 25% WP) + *P. palmivora*	0	0	0	0	0	0
10. control (Distilled water + *P. palmivora*)	>100	>1mm	>100	>1mm	>100	>1mm

[1/] Sporangium inhibition: Measurement of the length of fungal hyphae (mm): objective 10X 100 scale X 10 micron = 1,000 micron or 1mm

Table 3 The lesion of black rot of a Vandaceous orchid after inoculation with *Phytophthora palmivora* in laboratory using detached leaf technique at 3 days

Treatment	Lesion size (cm) 1/
1. aurisin A at 10 mg/l	2.16 e
2. aurisin A at 50 mg/l	2.31 e
3. aurisin A at 100 mg/l	1.82 d
4. aurisin A at 500 mg/l	1.62 d
5. culture filtrate at 35%	1.24 c
6. culture filtrate at 50%	1.23 c
7. culture filtrate at 75%	0.49 b
8. culture filtrate at 100%	0.23 ab
9. Chemical (metalaxyl 25% WP)	0.01 a
10. Distilled water + *Phytophthora palmivora*	2.45 e
11. untreated	0.00 a
F-test	**
C.V.(%)	29.20

Means followed by the same letter are not significant different (P>0.01, DMRT)

Table 4 The application of bioactive compounds against *Phytopthora palmivora* in green – house using tooth's method at 3 days

Treatment	Lesion size (cm) 1/
1. culture filtrate at 50%	1.11 d
2. culture filtrate at 75%	0.68 c
3. culture filtrate at 100%	0.58 c
4. aurisin A at 500 mg/l	1.17 d
5. metalaxyl 25% WP	0.27 b
6. control + (Distilled water + *P. palmivora*)	2.06 e
7. control - (Distilled water)	0.00 a
F-test	**
C.V.(%)	9.15

Means followed by the same letter are not significant different (P>0.01, DMRT)

Table 5 The application by spraying of bioactive compounds every 3 and 5 days on orchids against *Phytophthora palmivora* by tooth's method

Treatment	Lesion size (cm)[1/]		
	Before 1^{st} spraying	Before 2^{nd} spraying	Before 3^{rd} spraying
1. culture filtrate at 75% spraying every 3 days	1.37 b	2.98 b	6.15 bc
2. culture filtrate at 100% spraying every 3 days	1.47 b	3.11 b	5.48 bc
3. aurisin A at 1,000 mg/l spraying every 3 days	1.48 b	2.61 b	5.01 b
4. control + (Distilled water + *P. palmivora*) spraying every 3 days	1.57 b	2.93 b	5.56 bc
5. culture filtrate at 75% spraying every 5 days	2.47 d	6.10 d	8.48 d
6. culture filtrate at 100% spraying every 5 days	2.06 c	4.99 c	6.98 cd
7. aurisin A at 1,000 mg/l spraying every 5 days	2.40 d	5.75 d	8.05 d
8. control + (Distilled water + *P. palmivora*) spraying every 5 days	2.52 d	6.36 d	8.29 d
9. control - (Distilled water)	0.00 a	0.00 a	0.00 a
F-test	**	**	**
C.V.(%)	6.92	9.75	14.42

Means followed by the same letter are not significant different (P>0.01, DMRT)

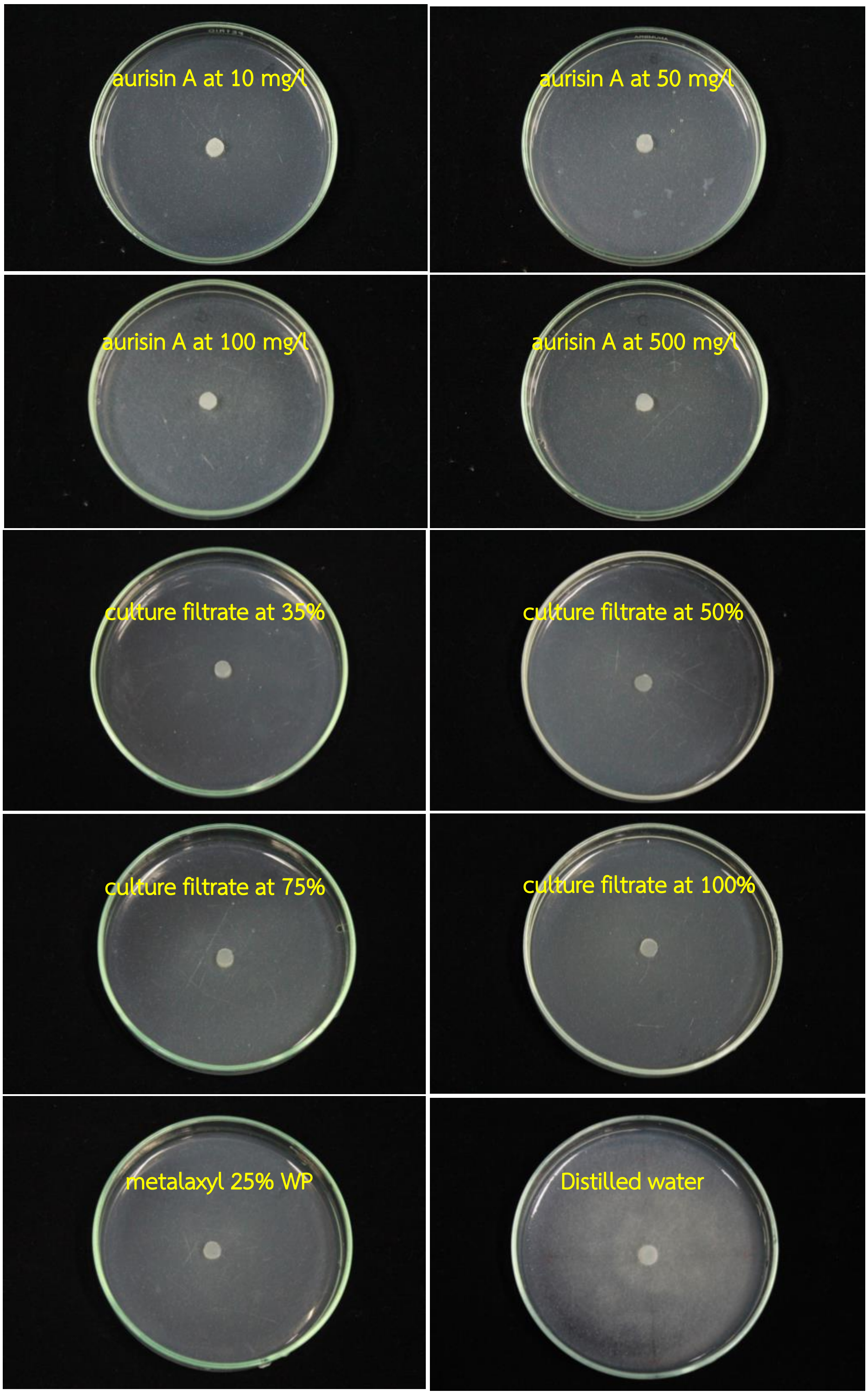


Figure 1 Effect of bioactive compound from *Neonothopanus nambi* to against hyphal growth of *Phytophthora palmivora* on PDA at 7 days

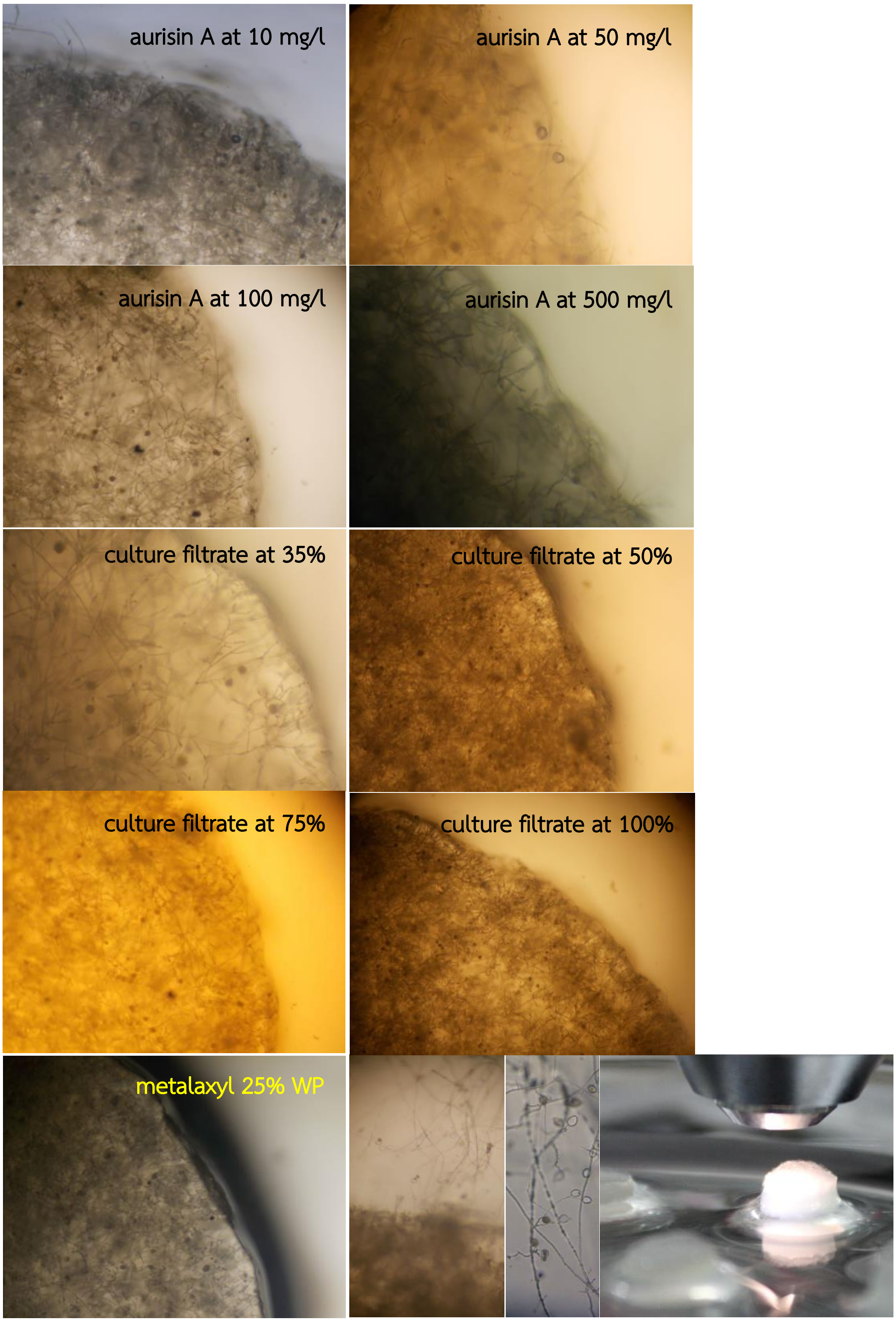
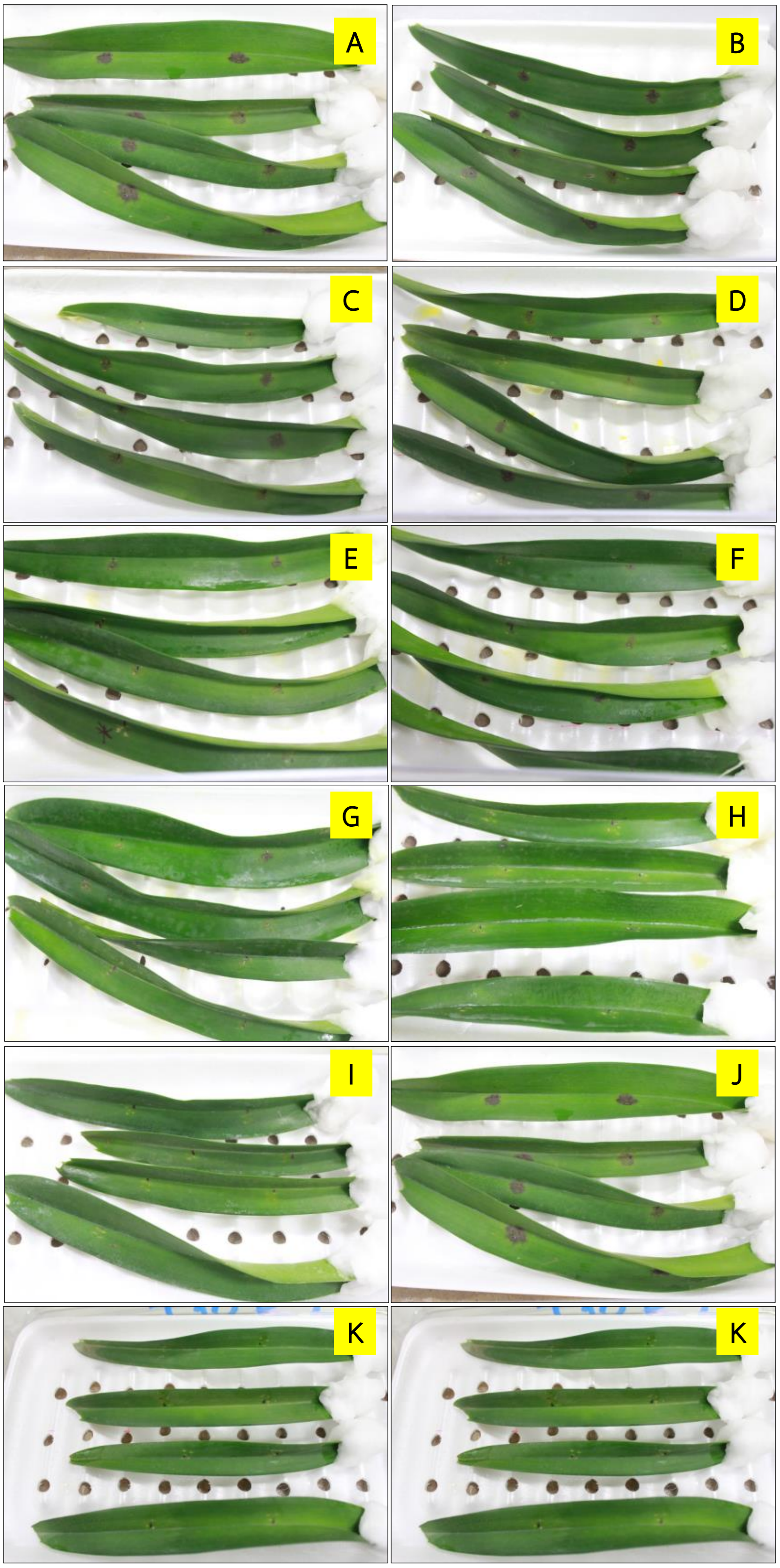


Figure 2 Effect of bioactive compound from *Neonothopanus nambi* to against sporangium production of *Phytophthora palmivora* at 72 hr



A: aurisin A at 10 mg/l

B: aurisin A at 50 mg/l

C: aurisin A at 100 mg/l

D: aurisin A at 500 mg/l

E: culture filtrate at 35%

F: culture filtrate at 50%

G: culture filtrate at 75%

H: culture filtrate at 100%

I: metalaxyl 25% WP

J: Distilled water + *P. palmivora*

Figure 3 Symptom of lesion length on orchids after inoculation with *Phytophthora palmivora* in laboratory using detached leaf technique at 3 days

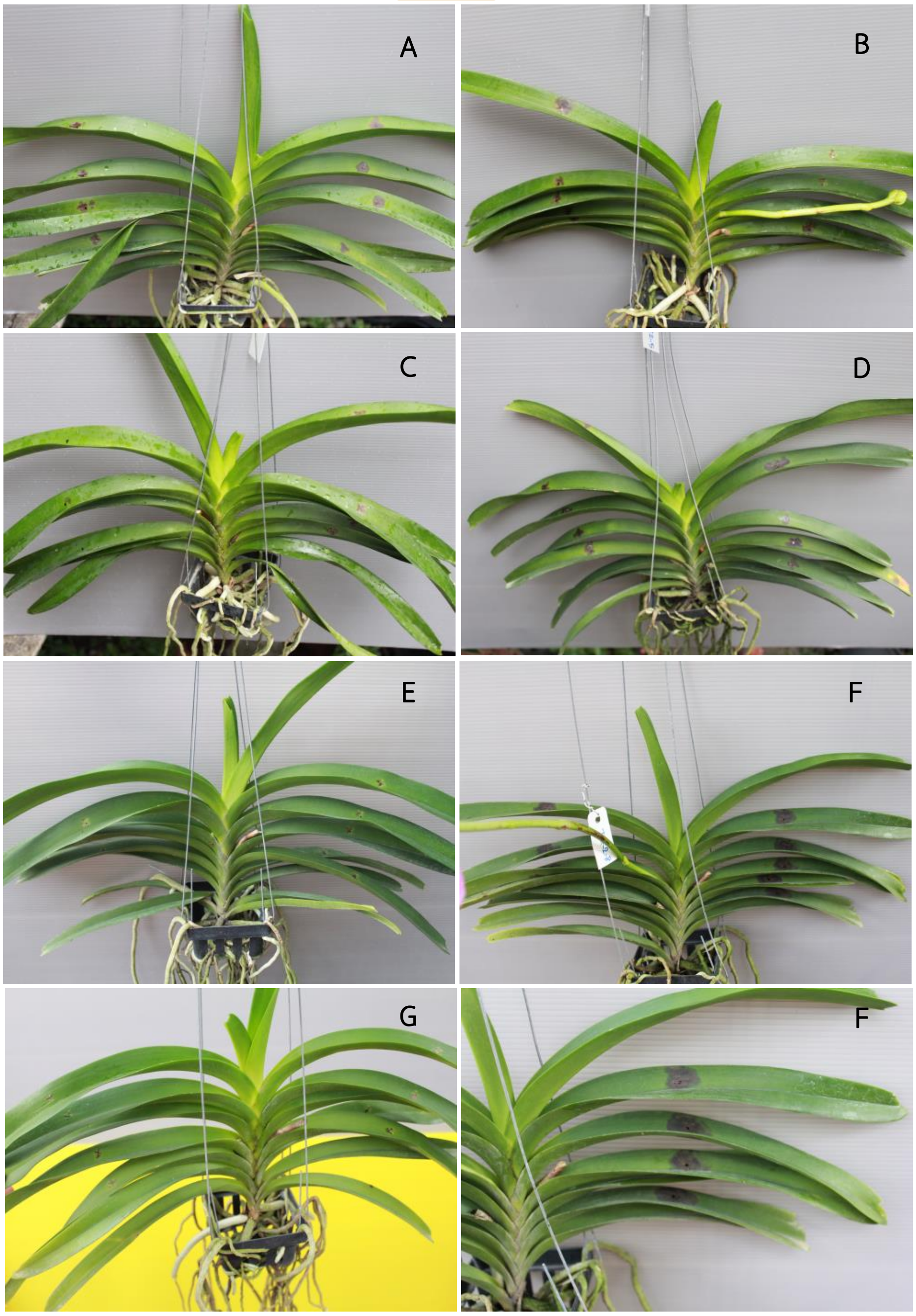


Figure 4 The application of bioactive compounds against *Phytopthora palmivora* in green – house using tooth's method at 3 days

A : culture filtrate at 50%

B : culture filtrate at 75%

C : culture filtrate at 100%

D : aurisin A at 500 mg/l

E : chemical (metalaxyl 25% WP)

F : control + (Distilled water + *P. palmivora*)

G : control – (Distilled water)

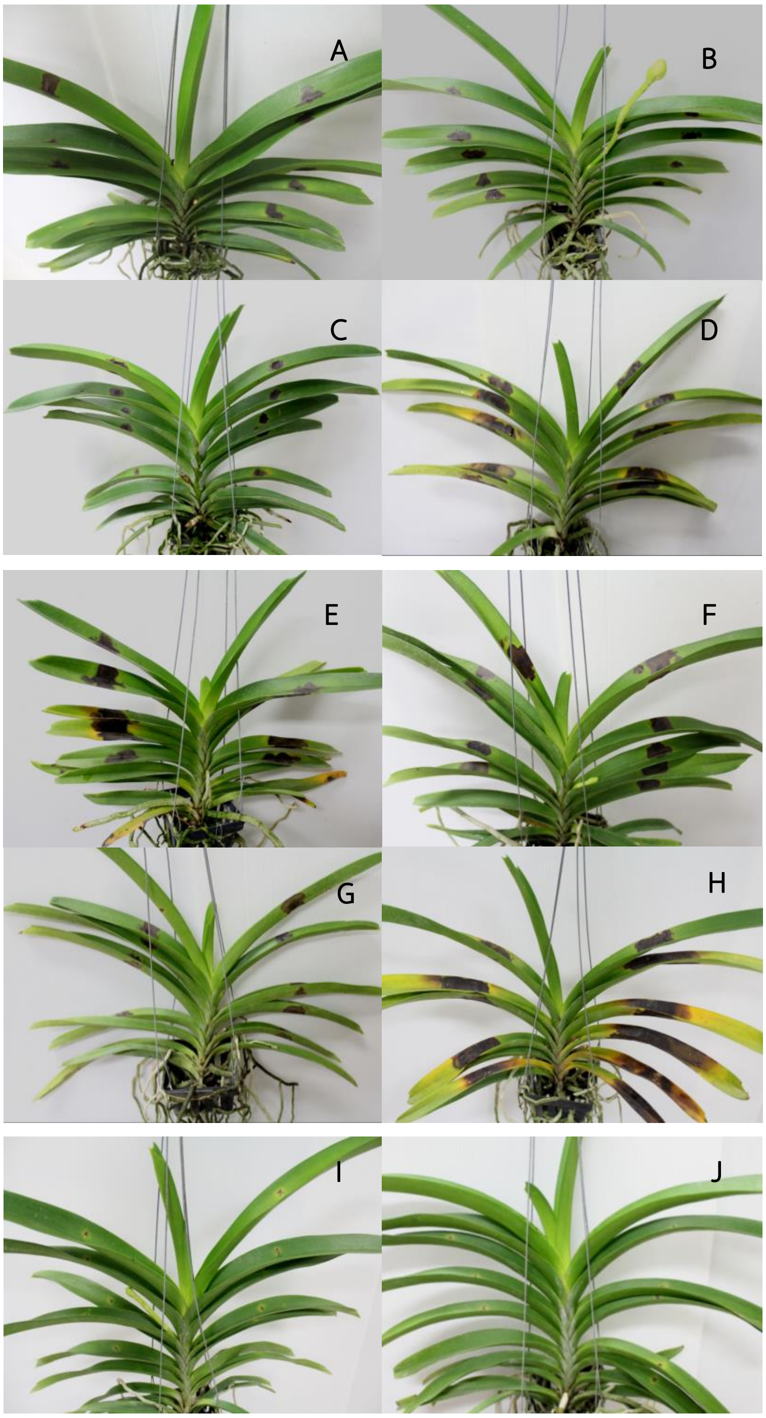


Figure 5 The application by spraying of bioactive compounds a every 3 and 5 days on orchids against *Phytophthora palmivora* by tooth's method

A : culture filtrate at 75% spraying every 3 days

B : culture filtrate at 100% spraying every 3 days

C : aurisin A at 1,000 mg/l spraying every 3 days

D : control + (Distilled water + *P. palmivora*) spraying every 3 days

E : culture filtrate at 75% spraying every 5 days

F : culture filtrate at 100% spraying every 5 days

G : aurisin A at 1,000 mg/l spraying every 5 days

H : control + (Distilled water + *P. palmivora*) spraying every 5 days

I,J : control – (Distilled water)