โครงการ “การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันและชะลอการเกิดโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน”

Utilization of Antagonistic Microorganisms in Protecting and Delaying Leaf Spot Diseases of Oil Palm in Nurseries Stage

โดย อนุรักษ์ สันป่าเป้า

กุมภาพันธ์ 2561

สัญญาเลขที่ RDG5920051

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันและชะลอการเกิดโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

Utilization of Antagonistic Microorganisms in Protecting and Delaying Leaf Spot Diseases of Oil Palm in Nurseries Stage

ผู้วิจัย
ผศ.ดร.อนุรักษ์ สันป่าเป้า

สังกัด
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Executive Summary

Leaf spot of oil palm seedling occurred and distributed in private oil palm nurseries throughout southern Thailand. The disease caused by *Curvularia oryzae* infected severely during seedling stage. The typical symptom was small dark brown spot and the lesion increased in size and coalesced for the severe case, resulting the seedling dead. Control of leaf spot of oil palm seedlings is costly and difficulty due to the environment in southern favorable for pathogen infection. Most farmers use chemical in controlling the leaf spot disease. However, the extensive use of chemical possessed human health risk and pathogen became resistance. The use of antagonistic microorganisms is an alternative way which environmental friendly and reduce chemical usage. The aim of this study is to evaluate the effect of selected microorganisms *Streptomyces* and *Trichoderma* in protecting and delaying leaf spot of oil palm seedlings *in vitro*, *in vivo* (greenhouse) and in field condition.

Antagonistic microorganisms including *Streptomyces* NR8-2, *Trichoderma* TM2/1 and V76-12 were selected to test against *C. oryzae in vitro* by dual culture assay. Selected microorganisms (NR8-2, TM2/1 and V76-12) were cultured with *C. oryzae* on PDA, *C. oryzae* cultured alone on PDA was served as control. The culture plates were incubated with ambient temperature till the growth of *C. oryzae* covered all PDA on control plates. The colony diameter of each treatment were measured and percent inhibition of mycelial growth were calculated. The dual culture test showed 85.71% inhibition of mycelial growth of *C. oryzae* by V76-12, followed by TM2/1 and NR8-2 with 75.71 and 72.50% respective inhibitions. The results indicate that *Trichoderma* TM2/1 and V76-12 compete for nutrient and space with fungal pathogen *C. oryzae* on PDA, whereas *Streptomyces* NR8-2 secreted some antifungal metabolite to inhibit *C. oryzae* on PDA.

In order to evaluate effect of antagonistic microorganism *in vivo*, spore suspensions of *C. oryzae*, NR8-2, TM2/1 and V76-12 were prepared with distilled water and 0.5% tween 20. There were 6 treatments comprised of, distilled water, spore suspension of *C. oryzae*, NR8-2, TM2/1, V76-12 and chemical (Prochloraz). Spore suspension of NR8-2, TM2/1 and V76-12 was applied onto oil palm seedling leaves prior to inoculate with spore suspension of *C. oryzae*. Disease score and disease severity index (DSI) was evaluated after 6 month incubation at greenhouse condition. In pot experiments, the V76-12 gave disease severity index (DSI) about 20% of that with a reference chemical (Prochloraz), whereas TM2/1 and NR8-2 gave 66% and 75%.

To evaluate effect antagonistic microorganism on field condition, oil palm seedlings were placed at 3 study sites including 1) Department of Pest Management field, Faculty of natural Resources, Prince of Songkla University, 2) Klong Hoi Kong research station, Songkhla and 3) Tached research station, Phatthalung. There were 5 treatment composed of distilled water, spore suspension of NR8-2, TM2/1, V76-12 and chemical (Prochloraz). Disease score and DSI were measured and calculated every month for 12 months. The results showed application with V76-12 had the lowest disease score and % DSI compared with NR8-2, TM2/1 and chemical at study site 1 and 2 ($p < 0.05$ by Duncan's multiple range test). On the other hand, no different among antagonistic test on oil palm seedlings at study 3.

Survival of antagonistic microorganisms was conducted from treated oil palm seedlings leaves at 10, 20 and 30 days by tissue transplanting method. The result demonstrated that *Trichoderma* V76-12 could isolate on oil palm seedlings leaves after 30 day application. This result suggested that *Trichoderma* V76-12 could be

colonized and survived on oil palm leave due to their capacity of endophyte. Therefore, based on this study *Trichoderma* V76-12 was an effective microorganism in inhibiting fungal pathogen and reduced leaf spot on oil palm seedling leaves. *Trichoderma* V76-12 might be a good candidate microorganism to develop formulation for commercial in near future.

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RDG5920051
ชื่อโครงการ: การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในการป้องกันและชะลอการเกิดโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน
ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ผศ.ดร.อนุรักษ์ สันป่าเป้า มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อีเมลล์: anurag.su@psu.ac.th
ระยะเวลาในโครงการ: 1 กันยายน พ.ศ.2559 - 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2561

โรคใบจุดส่งผลกระทบอย่างรุนแรงต่อปาล์มน้ำมันซึ่งลดทั้งคุณภาพและผลผลิตต้นกล้า งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* NR8-2, *Trichoderma harzianum* TM2/1, และราเอนโดไฟต์ *Trichoderma* V76-12 เพื่อควบคุมโรคใบจุดที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Curvularia oryzae* ในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ในใบปาล์มน้ำมัน (*in vivo*) และในสภาพแปลง (field condition) จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการด้วยกรรมวิธี dual culture พบว่าเชื้อ V76-12 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* เท่ากับ 85.71% ส่วนเชื้อ TM2/1 และ NR8-2 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 75.71 และ 72.50% ตามลำดับ ผลการทดลองบนใบปาล์มน้ำมันในสภาพโรงเรือน (greenhouse condition) พบว่าเชื้อ V76-12 มีดัชนีความรุนแรงของโรค (disease severity index, DSI) 20% เทียบเท่ากับการใช้สารเคมีโพลคอราซ ขณะที่การใช้เชื้อ TM2/1 และ NR8-2 มีดัชนีความรุนแรงของโรค 66 และ 75% ตามลำดับ ผลการทดลองในสภาพแปลงพบว่าการพ่นด้วย V76-12 มีระดับการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคต่ำกว่าเชื้อ TM2/1, NR8-2 และสารเคมี ขณะที่ชุดควบคุมที่พ่นด้วยน้ำกลั่นมีระดับการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคสูงสุด จากพื้นที่ศึกษาที่ 1 (แปลงภาควิชาการจัดการศัตรูพืช) การพ่น V76-12 มีระดับการเกิดโรค 1.16±0.69 และดัชนีความรุนแรงของโรค 20.50±10.20% น้อยกว่าการการพ่นด้วยเชื้อ NR8-2, TM2/1 และสารเคมี ที่มีระดับการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1.49±0.98 (27.00±17.36% DSI), 1.48±0.80 (26.83±13.63% DSI) และ 1.42±0.92 (23.33±16.78% DSI) ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีระดับการเกิดโรคเท่ากับ 2.10±1.40 และดัชนีความรุนแรงของโรคสูงสุด เท่ากับ 37.67±25.41% DSI. ในพื้นที่ศึกษาที่ 2 (สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง) พบว่าการพ่นด้วยเชื้อ V76-12 มีระดับการเกิดโรค 2.16±0.62 และดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 46.00±7.34% น้อยกว่าการพ่นด้วย NR8-2, TM2/1 และสารเคมี ที่มีระดับการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 2.78±0.76 (61.33±7.92% DSI), 2.60±0.78 (57.83±12.13% DSI) และ 2.54±0.77 (53.00±8.68% DSI) ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมที่ไม่ได้พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีระดับการเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงสูงที่สุด เท่ากับ 3.51±0.91 และ 78.67±7.69% DSI ส่วนในการทดลองพื้นที่ศึกษาที่ 3 (สถานีวิจัยท่าเชียด) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และชุดทดลอง นอกจากนี้เชื้อ V76-12 สามารถถูกแยกออกมาจากใบของปาล์มน้ำมันหลังจากพ่น 30 วัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Trichoderma* V76-12 สามารถคงอยู่บนใบปาล์มน้ำมันได้นานกว่าเชื้อ *Trichoderma* TM2/1 และเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* NR8-2 เพราะคุณสมบัติการเป็นเชื้อราเอนโดไฟต์ จากผลการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของเชื้อ V76-12 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุด ลดการเกิดโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลง

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี, โรคใบจุด, ปาล์มน้ำมัน, *Streptomyces*, *Trichoderma*

Abstract

Project Code: RDG5920051

Project Title: Utilization of Antagonistic Microorganisms in Protecting and Delaying Leaf Spot Diseases of Oil Palm in Nurseries Stage

Investigator and Institute: Asst.Prof.Dr.Anurag Sunpapao Prince of Songkla University

Email Address: anurag.su@psu.ac.th

Project Period: September 1, 2016 - February 28, 2018

Leaf spot disease causes devastating damage to oil palm seedlings and reduces both quality and quantity of the produced seedlings. This study aimed to apply the selected microorganisms *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* NR8-2, *Trichoderma harzianum* TM2/1, and endophytic *Trichoderma* sp. V76-12, to the control of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* on oil palm leaves, *in vitro*, *in vivo* and in field conditions. The dual culture test showed 85.71% inhibition of mycelial growth of *C. oryzae* by V76-12, followed by TM2/1 and NR8-2 with 75.71 and 72.50% respective inhibitions. In pot experiments, the V76-12 gave disease severity index (DSI) about 20% of that with a reference chemical (Prochloraz), whereas TM2/1 and NR8-2 gave 66% and 75%. In naturally infested cases, oil palm seedlings treated with V76-12 showed disease score and diseases severity index (%) lower than those of NR8-2, TM2/1 and chemical, whereas the control treatment without antagonistic microorganisms gave the most severe %DSI. At study site 1 (Department of Pest Management field) application of V76-12 showed disease score 1.16±0.69 and 20.50±10.20% DSI, lower than those of NR8-2, TM2/1 and chemical which showed disease scores 1.49±0.98 (27.00±17.36% DSI), 1.48±0.80 (26.83±13.63% DSI) and 1.42±0.92 (23.33±16.78% DSI), respectively. Control without application of antagonistic microorganisms showed the most severe case with disease score 2.10±1.40 and 37.67±25.41% DSI. At study site 2 (Klong Hoi Kong research station), application of V76-12 also presented disease score 2.16±0.62, 46.00±7.34% DSI lower than those of NR8-2, TM2/1 and chemical which showed disease score with 2.78±0.76 (61.33±7.92% DSI), 2.60±0.78 (57.83±12.13% DSI) and 2.54±0.77 (53.00±8.68% DSI), respectively. Control without application of antagonistic microorganisms showed the most severe case showed disease score 3.51±0.91 and 78.67±7.69% DSI. In contrast, at study site 3 (Tached research station), there were no different among antagonistic test and control. Furthermore, V76-12 was re-isolated from treated oil palm leaves after 30 days post application, therefore, *Trichoderma* V76-12 could survive on oil palm leaves due to endophyte characteristic. All these results indicated that the *Trichoderma* V76-12 isolate was the most effective in reducing leaf spot disease of oil palm seedlings, due to its capacity to inhibit mycelial growth *in vitro*, to reduce disease symptoms *in vivo* and in natural fields.

Keywords: Biological control, leaf spot, oil palm, *Streptomyces*, *Trichoderma*

สารบัญ

	หน้า
แบบสรุปโครงการวิจัย	i
บทคัดย่อ	iii
สารบัญ	v
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์	8
เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก	17

บทที่ 1

บทนำ

ปาล์มน้ำมันเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะในเขตภาคใต้ ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันโดยประมาณ 3.93 ล้านไร่ ให้ผลผลิตแล้ว 3.2 ล้านไร่ ให้ผลผลิตทลายสด 8.6 ล้านตัน และผลิตเป็นน้ำมันปาล์มดิบ 1.46 ล้านตัน ปัญหาที่สำคัญในการผลิตปาล์มน้ำมันของเกษตรกรไทยคือการได้รับพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ไม่ดีไปปลูก การขาดความรู้ในการดูแลรักษาและการจัดการที่ดีของเกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมัน อีกทั้งการเข้าทำลายของโรคต่าง ๆ ในทุกระยะของการเติบโตของปาล์มน้ำมัน เริ่มจากโรคเมล็ดเน่า (brown germ) ในระยะเมล็ด โรคใบจุด (leaf spot) ซึ่งพบระบาดรุนแรงในปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้า พบระบาดมากในช่วงฤดูฝน ทำให้ต้นกล้าชะงักการเจริญเติบโต และในต้นที่รุนแรงมากอาจทำให้ต้นกล้าตายได้ และโรคลำต้นเน่า (basal stem rot) ที่พบในระยะให้ผลผลิต พบส่วนของดอกเห็ด (fruiting body) งอกออกมาจากโคนต้น หลังจากนั้นต้นปาล์มจะยืนต้นตาย ในบรรดาโรคที่พบทั้งหมดของปาล์มน้ำมัน พบว่าโรคใบจุดในระยะต้นกล้า ก่อให้เกิดปัญหาที่สำคัญสำหรับเกษตรกรผู้ค้ากล้าปาล์มน้ำมัน เนื่องจากถ้าโรคเข้าทำลายในระยะต้นอ่อน ต้นกล้าที่มีอาการรุนแรงไม่สามารถฟื้นตัวได้และจะตาย โรคใบจุดมีสาเหตุมาจากเชื้อราหลายชนิด ในประเทศไทยพบเชื้อ *Curvularia oryzae* เป็นสาเหตุเหตุหลักของโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน การควบคุมโรคนี้เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีฉีดพ่น อาทิ ไทแรม แคปแทน และแมนโคเซบ แต่เกษตรกรก็ยังประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคใบจุดตลอดทั้งปี จากปัญหาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่องทำให้เชื้อสาเหตุโรคใบจุดเกิดต้านทานต่อสารเคมี การควบคุมโดยชีววิธีเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมแพร่หลาย เนื่องจากปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม ไม่เกิดสารตกค้าง ไม่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยง จึงถือเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีความสนใจประเมินการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิด *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* NR8-2, *Trichoderma harzianum* TM2/1 และเอนโดไฟท์ *Trichoderma* sp. V76-12 ที่เคยได้ทดสอบไว้ในห้องปฏิบัติการแล้ว เพื่อใช้ควบคุมโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ในโรงเรือนอนุบาลต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ก่อนที่จะถ่ายทอดไปยังเกษตรกรผู้ค้าและปลูกปาล์มน้ำมันต่อไป ซึ่งข้อมูลและหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ด้านการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ใช้เป็นข้อมูลเพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรได้ปาล์มน้ำมันพันธุ์ดี ปราศจากโรคไปปลูก อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นให้เกษตรกรหรือผู้ที่เกี่ยวข้องเล็งเห็นถึงการทำเกษตรแบบยั่งยืน ลดการใช้สารเคมี

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

โรคของปาล์มน้ำมัน

โรคในระยะเมล็ด

มีเชื้อสาเหตุหลายชนิดด้วยกัน ทำความเสียหายให้กับเมล็ดโดยตรง มีผลกระทบต่อการงอกและการเตรียมแปลงเพาะกล้า หากเกิดความเสียหายรุนแรงในระยะเพาะเมล็ด จะส่งผลกระทบต่อแผนการเพาะต้นกล้าไปจนถึงในระยะแปลงปลูก เนื่องจากต้นกล้าไม่เพียงพอ โรคที่สำคัญที่พบในระยะเมล็ดที่พบในประเทศไทยที่สำคัญคือโรคเมล็ดเน่า เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp., *Mucorales* spp., *Fusarium* spp. และ *Schizophyllum commune* (ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช และพิพัฒน์ เชี่ยงหลิว, 2541) โดยมีลักษณะอาการจุดแผลสีน้ำตาลที่ปลายรากอ่อนและยอดอ่อน ต่อมาแผลขยายตัวทำลายเนื้อเยื่อรากและยอดอ่อน แผลขยายตัวลุกลามเข้าสู่คัพภะทำให้ส่วนของคัพภะและเนื้อเยื่อในเมล็ดถูกทำลาย การป้องกันกำจัดโดยการตากหรืออบเมล็ดให้แห้ง ให้มีความชื้นต่ำกว่า 19% ทำความสะอาดเมล็ดโดยเอาเส้นใยออกให้หมด แยกเมล็ดแตกออก หลีกเลี่ยงการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราและแมลงบางชนิดเนื่องจากมีส่วนประกอบของทองแดง และปรอท เพราะจะทำให้เกิดอันตรายกับส่วนอ่อนที่เริ่มงอก (ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช และพิพัฒน์ เชี่ยงหลิว, 2541)

โรคในระยะต้นกล้า

โรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันนับเป็นปัญหาสำคัญสำหรับเกษตรผู้ค้ากล้าปล้าปาล์มน้ำมัน (ภาพที่ 1) พบในระยะเริ่มปลูก 1 เดือน – 2 ปี การระบาดของโรคพบมากในฤดูฝน โรคในกล้าปาล์มน้ำมันที่พบมีอยู่หลายโรคได้แก่ โรคใบจุด (leaf spot) เกิดจากเชื้อราหลายชนิด เช่น โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Pestalotiopsis palmarum* อาการในระยะแรกเป็นจุดสีดำ บริเวณที่เกิดแผลทำให้ใบยุบตัวลง รอยแผลเก่าเนื้อเยื่อเป็นสีขาวครีม ขอบแผลสีดำ และมีจุดสปอร์สีน้ำตาลบริเวณกลางแผล (Labarca et al., 2006) โรคใบจุดเกิดจากเชื้อรา *Cercospora elaeidis* อาการในระยะแรกเป็นจุดสีน้ำตาล ขนาดเล็ก ระยะต่อมาเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดใหญ่ขึ้นและมีวงสีเหลืองล้อมรอบ (yellow halo) เมื่อมีการติดเชื้ออย่างรุนแรง จุดสีน้ำตาลจะกระจายอยู่ทั่วทั้งใบ (Kovachich, 1954) โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราได้หลายชนิดเช่น *Colletotrichum gloeosporiodes, Botryodiplodia palmarum, Melanconium sp.* และ *Glomerella cingulata* (Aderungboye, 1977) โรคใบจุดเกิดจากเชื้อรา *Drechslera halodes* และ *Helminthosporium* sp. อาการของโรคในระยะแรกทำให้ใบอ่อนของต้นปาล์มน้ำมันที่ยังไม่คลี่เกิดแผลเป็นจุดกลมสีเหลืองเล็ก ๆ เท่าหัวเข็มหมุด ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีดำ หากระบาดมากใบจะเหลืองทั้งใบ และทำให้ต้นกล้าแห้งตายได้ (Jegathambigai et al., 2008) โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* spp. โดยระยะแรกเป็นจุดสีเหลืองขนาดเล็กเป็นแผลขอบนูน รูปร่างกลมรี ต่อมาแผลขยายเป็นสีน้ำตาลขนาด 7–8 มิลลิเมตร และเมื่อแผลขยายใหญ่ขึ้นเห็นเป็นวงแหวนสีน้ำตาลซ้อนกันเป็นชั้น ๆ อยู่ด้านใน แผลเชื่อมซ้อนกันเป็นแผลขนาดใหญ่ได้ ใบแห้งกรอบเป็นสีน้ำตาล (พิพัฒน์ เชี่ยงหลิวและเกริกชัย ธนรักษ์ 2554)

ภาพที่ 1 โรคในระยะต้นกล้าของปาล์มน้ำมัน a) anthracnose, b) ใบจุด *Cercospora*, c) ใบจุด *Curvularia*, d) ใบจุด *Pestalotiopsis*, f) ไหม้จากการใช้ปุ๋ย, g) ใบลีบเล็ก, h) โรคจากพันธุกรรม
(ที่มา: Pornsuriya et al., 2013)

โรคของลำต้น

ส่วนใหญ่พบในช่วงอายุมากกว่า 10 ปีขึ้นไป ปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคให้ผลผลิตลดลง หรือไม่ให้ผลผลิต หรือยืนต้นตายในที่สุด โรคของลำต้นที่สำคัญ ได้แก่ โรคลำต้นเน่า มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Garnoderma boninense* มีรายงานพบระบาดทำความเสียหายอย่างรุนแรงในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศมาเลเซีย ไทย และอินโดนิเซีย ในต้นปาล์มน้ำมันที่อายุยังน้อยอาการที่ปรากฏที่ด้านหนึ่งของลำต้น ใบล่างมีสีเหลือง หรือด่างซีด ต่อมาเนื้อเยื่อใบแห้งตาย (necrosis) ทางใบใหม่ไม่คลี่ มีขนาดสั้นกว่าปกติ มีสีเหลืองซีด (chlorosis) และอาจพบว่าเนื้อเยื่อปลายใบแห้งตาย การเจริญช้ากว่าต้นปกติ เมื่อพืชแสดงอาการใบซีดแสดงว่าอย่างน้อยครึ่งหนึ่งของเนื้อเยื่อโคนต้นถูกเชื้อเข้าทำลายแล้ว และมักตายภายใน 6–24 วัน ส่วนอาการในต้นที่โตเต็มที่แล้วมีอาการคล้าย ๆ กันคือ ใบมีสีซีดหม่น ไม่เป็นมันและใบแห้งตายเริ่มจากใบที่แก่สุด ใบที่แห้งตายหักพับน้อมลงสู่โคนต้น ไม่หลุดร่วงจากลำต้นจึงปรากฏเป็นเสมือนกระโปรง ลักษณะที่เด่นอีกอย่างหนึ่งคือ พบทางใบไม่คลี่ 3–5 ทางใบ พืชมักตายหลังจากแสดงอาการไปแล้วภายใน 2–3 ปี ในต้นปาล์มน้ำมันที่อายุมาก 15–20 ปี จะพบอาการ ลำต้นเน่า โดยในระยะแรกทรงพุ่มบางลง สังเกตได้จากมีใบยอดที่ไม่คลี่จำนวนมาก คล้ายกับอาการขาดน้ำ ทรงพุ่มโปร่งขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากรากและเนื้อเยื่อโคนต้นถูกทำลายโดยเชื้อ ต่อมาปรากฏดอกเห็ดมีสีออกขาว ต้นล้ม ในการปลูกปาล์มน้ำมันแทนในชั่วที่ 2 จะพบโรคลำต้นเน่านี้มากและเร็วขึ้น เนื้อเยื่อของลำต้น ทำให้โคนต้นเน่า และพบดอกเห็ด สีน้ำตาลแข็ง ขอบสีเหลืองสด (เสมอใจ ชื่นจิตต์ และวสันณ์ เพชรรัตน์, 2553) การป้องกันกำจัด ควรใช้วิธีล้มต้นแล้วสับเป็นชิ้นบาง ๆ ทั้งต้น เพื่อลดตอที่เหลืออยู่ในดินที่เป็นแหล่งอาศัยแพร่ของเชื้อเห็ด แทนวิธีเดิมที่ใช้ทำลายต้นด้วยสารกำจัดวัชพืชและปล่อยให้ผุอยู่ในแปลง และขุดดินรอบ ๆ บริเวณต้นปาล์มน้ำมันที่เป็นโรค เพื่อป้องกันไม่ให้จำนวนของเส้นใยเชื้อกระจายไปสู่ต้นอื่น ๆ (พิพัฒน์ เชี่ยงหลิว และเกริกชัย ธนรักษ์, 2554)

จากรายงานการสำรวจโรคของปาล์มน้ำมันนะระยะต่าง ๆ ในเขต 11 จังหวัดภาคใต้ ระหว่างปี 2555–2556 พบโรคในระยะเมล็ดคือ โรค brown germ 13.12%, โรคเมล็ดเน่า 4.20% โรคในระยะต้นกล้า (nurseries stage) โรคใบจุด 11.26% โรคผิดปกติทางพันธุกรรม 6.85% และโรคในระยะต้นโต โรคที่เกิดจากสาหร่าย 24.92% โรคต้นเน่า (basal stem rot) 1.53% (Pornsuriya et al., 2013) Kittimorakul และคณะ 2013 ได้สำรวจและจัดจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยพบโรคใบจุดจากเชื้อ *Curvularia* 61.01% และโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum* 22.38% (Kittimorakul et al., 2013) จากการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่าเป็นเชื้อ *Curvularia oryzae* (Sunpapao et al., 2014) จะเห็นได้ว่าโรคใบจุดของต้นกล้า

ปาล์มน้ำมันนั้นเป็นปัญหาที่สำคัญในการปลูกและค้าต้นกล้าปาล์มน้ำมัน เนื่องจากการวางต้นกล้าที่ชิดติดกันส่งผลให้เมื่อมีการระบาดโรคใบจุดจึงมีการระบาดได้อย่างรวดเร็ว เกษตรกรนิยมฉีดพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา (fungicide) เนื่องจากสะดวกและให้ผลที่รวดเร็ว ชัดเจน แต่ก็ยังประสบปัญหากับโรคใบจุดทุกปี

การควบคุมโดยชีววิธี

จากปัญหาการระบาดของโรคใบจุดของปาล์มน้ำมัน การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี (biological control) ได้มีการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถแก้ปัญหาการต้านทานยาของเชื้อสาเหตุโรคชนิดต่าง ๆ ปลอดภัยต่อเกษตรผู้ปลูก ตัวอย่างงานวิจัยที่นำเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia* ดังนี้ Michereff และคณะ (1994) ทดสอบการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ของ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา *C. eragrostidis* สาเหตุโรคใบจุดในมันเทศ พบว่าสามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคได้ถึง 99.20% และจากการทดสอบการควบคุมโรคใบจุดในเรือนกระจก พบว่าสามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุดที่ 96.30% อารีรัตน์ เทียนขาวและคณะ (2548) ทดลองใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ควบคุมเชื้อ *C. eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมในกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคได้ถึง 60% Ningthoujam และคณะ (2009) ทดสอบการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ของ *Streptomyces vinaceusdrappus* เพื่อควบคุมเชื้อรา *C. oryzae* สาเหตุโรคข้าวในประเทศอินเดีย โดยยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุดที่ 65 เปอร์เซ็นต์ Prajapati และ Joshi (2012) ศึกษาการควบคุมเชื้อรา *C. eragrostidis* สาเหตุโรคปลายใบไหม้ของต้นพลับพลึง โดยใช้เชื้อรา *T. viride*, *T. longibrachyatum* และ *T. harzianum* ด้วยวิธี Dual-culture พบว่า *T. viride* สามารถควบคุมเชื้อ *C. eragrostidis* ได้ดีที่สุดที่ 73.39% รองลงมาคือเชื้อ *T. longibrachyatum* และ *T. harzianum* ซึ่งสามารถควบคุมเชื้อ *C. eragrostidis* ได้ 71.76% และ 67.75% ตามลำดับ จากรายงานล่าสุด สุภาภรณ์และคณะ (Pithakkit et al., 2014) ได้ทดสอบเชื้อปฏิปักษ์ *S. abiokensis* (ChM3-1), *S. hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* (NR8-2) และ *Kitasatospora nipponensis* (KM6-4) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในห้องปฏิบัติการและในสภาพเรือนทดลอง นอกจากนั้น จิตรา กิตติโมรากุล (2557) ได้ทดสอบ *T. harzianum* TM2/1 ในการยับยั้งเชื้อ *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าพบว่า เชื้อ *T. harzianum* TM2/1 มีประสิทธิภาพดี ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคใบจุดทั้งในห้องปฏิบัติการและในโรงเรือนอนุบาลกล้าปาล์มน้ำมัน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพเรือนทดลองและในสภาพแปลงเพาะกล้าปาล์มน้ำมัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma harzianum* (TM2/1) และ *Trichoderma* sp. (V76-12) เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร potato dextrose agar (PDA) ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม *S. hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* (NR8-2) เพาะเลี้ยงในอาหาร glucose yeast malt extract agar (GYMA)

2. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เบื้องต้นด้วยกรรมวิธี dual culture assay

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* NR8-2 บนอาหาร PDA โดยขีด (streak) เป็นแนวยาวห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อสาเหตุโรค *C. oryzae* วางลงอีกด้านให้ห่างจากขอจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 เซนติเมตร ในชุดควบคุมทำการวางชิ้นวุ้นบนจานอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 เซนติเมตรอย่างเดียว บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นจนเชื้อในชุดควบคุมเต็มจาน ทำการวัดรัศมีของเชื้อ *C. oryzae* ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

ตัดชิ้นวุ้นที่เลี้ยงเชื้อ *Trichoderma* วางบนอาหาร PDA ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 เซนติเมตร และตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *C. oryzae* วางในทิศตรงข้ามให้ห่างจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1 เซนติเมตร ชุดควบคุมตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *C. oryzae* วางบนอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบประมาณ 1 เซนติเมตรเพียงอย่างเดียว บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อในชุดควบคุมเจริญเต็มจาน วัดรัศมีของเชื้อ *C. oryzae* ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตร

Percent inhibition of radial growth (PIRG) = [(R1–R2)/R1) × 100]

โดยที่ R1 คือรัศมีของเชื้อ *C. oryzae* ในชุดทดลอง และ R2 คือรัศมีของเชื้อ *C. oryzae* ในชุดควบคุม (Rahman et al., 2009).

3. ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดในสภาพโรงเรือนทดลอง

3.1 การเตรียมเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma*

ย้ายเชื้อรา TM2/1 และ V76-12 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน เทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อบนโคโคนีในจานเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใช้แผ่นสไลด์ขูดผิวหน้าโคโลนีเบา ๆ เทสปอร์แขวนลอยลงในบีกเกอร์อบฆ่าเชื้อ นับปริมาณสปอร์ด้วย heamacytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^{8} สปอร์/มิลลิลิตร โดยในการทดลองนี้ต้องเตรียมสปอร์แขวนลอยที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม *Streptomyces*

ย้ายเชื้อแบคทีเรีย NR8-2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYMA เป็นเวลา 14 วัน เทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อบนโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลตร ใช้แผ่นสไลด์ขูดผิวหน้าโคโลนีเบา ๆ เทสปอร์แขวนลอยลงในบีกเกอร์อบฆ่าเชื้อ นับปริมาณสปอร์ด้วย haemycetometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^{8} สปอร์/มิลลิลิตร โดยในการทดลองนี้ต้องเตรียมสปอร์แขวนลอยที่ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

3.3 การทดสอบประสิทิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดในสภาพโรงเรือนทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการควบคุมโรคใบจุดภายในห้องปฏิบัติการที่ดีเปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดเชื้อราที่ให้ผลการควบคุมได้ดีภายในห้องปฏิบัติการ (จิตรา กิตติโมรากุล 2557) มา

ทดสอบภายในโรงเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 6 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น ในแต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1: ชุดควบคุม ไม่มีการพ่นเชื้อรา *Curvularia oryzae*

กรรมวิธีที่ 2: ชุดควบคุม พ่นเชื้อรา *Curvularia oryzae* เพียงอย่างเดียว

กรรมวิธีที่ 3: พ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ทิ้งไว้ 24 ชม. และพ่นเชื้อรา *C. oryzae*

กรรมวิธีที่ 4: พ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* TM2/1 ทิ้งไว้ 24 ชม. และพ่นเชื้อรา *C. oryzae*

กรรมวิธีที่ 5: พ่นเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces hygroscopicus* NR8-2 ทิ้งไว้ 24 ชม. และพ่นเชื้อรา *C. oryzae*

กรรมวิธีที่ 6: พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราโพรคลอราชที่ความเข้มข้น 40 ppm ทิ้งไว้ 24 ชม. (จิตรา กิตติโมรากุล 2557) และพ่นเชื้อรา *C. oryzae*

ดำเนินการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดเชื้อราทุกเดือน ๆ ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 เดือน ประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อเดือนที่ 6 ของการทดสอบ ประเมินระดับการเกิดโรคจากเกณฑ์การให้คะแนนในดัชนีความรุนแรงตามข้อแบ่งระดับการเกิดโรคเป็น 6 ระดับ โดยดัดแปลงวิธีประเมินการเกิดโรคของ ปริศนา วงศ์ล้อม (2548)

ระดับ 0 ไม่มีอาการใบจุด

ระดับ 1 พบจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กเท่าปลายเข็มหมุด ไม่พบจุดเนื้อเยื่อตาย

ระดับ 2 จุดเนื้อเยื่อตายค่อนข้างกลมขนาด 1 - 2 มม. ขอบแผลสีน้ำตาลมีอาการ 1 - 25% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 3 จุดเนื้อเยื่อตายขนาด 5 มม. มีอาการ 26 - 50% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 4 จุดเนื้อเยื่อตายเชื่อมต่อกันขนาดใหญ่ 1 - 2 ซม. มีอาการ 51 - 75% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 5 พื้นที่ใบมากกว่า 75% เป็นโรคในระยะสุดท้าย ทำให้ใบบางส่วนตาย

จากนั้นนำคะแนนความรุนแรงของโรคมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS) เวอร์ชั่น 16 และนำมาคำนวณหา เปอร์เซ็นต์ disease severity index (DSI) โดยใช้สูตร

$$\text{DSI } (\%) = \frac{\Sigma(\text{Scale} \times \text{Amount of plants})}{\text{Maximum level} \times \text{Total number of plants}} \times 100$$

4. การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกัน ควบคุมโรคใบจุดในสภาพแปลง

เตรียมเชื้อราปฏิปักษ์ และแบคทีเรียปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีที่แสดงในข้อ 3.1 และ 3.2

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพแปลง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 5 กรรมวิธี ๆ ละ 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น ในแต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1: ชุดควบคุม ไม่มีการพ่นเชื้อปฏิปักษ์

กรรมวิธีที่ 2: พ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp.

กรรมวิธีที่ 3: พ่นเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* TM2-1

กรรมวิธีที่ 4: พ่นเชื้อแบคทีเรีย *S. hygroscopicus* NR8-2

กรรมวิธีที่ 5: พ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราโพรคลอราชที่ความเข้มข้น 40 ppm

ดำเนินการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดเชื้อราทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 1 ปี โดยวางต้นกล้าปาล์มน้ำมันให้ใกล้เคียงสภาพจริงที่สุด โดยวางไว้ 3 พื้นที่คือ 1) โรงเรือนอนุบาลกล้าปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติ 2) สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง อ.คลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา 3) สถานีวิจัยท่าเชียด อ.แม่ขรี จ.พัทลุง ประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อปฏิปักษ์ ไปแล้วทุก ๆ เดือน ของการทดสอบ ประเมินการ

เกิดโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันด้วยวิธี descriptive area (ปริศนา วงศ์ล้อม, 2548) โดยแบ่งระดับการเกิดโรคเป็น 6 ระดับ

ระดับ 0 ไม่เกิดโรค

ระดับ 1 เกิดโรค 0 - 20% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 2 เกิดโรค 20 - 40% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 3 เกิดโรค 40 - 60 % ของพื้นที่ใบ

ระดับ 4 เกิดโรค 60 - 80% ของพื้นที่ใบ ใบล่างบางส่วนมีรอยแผลขยายติดกันประมาณ 50% ของพื้นที่ใบ

ระดับ 5 เกิดโรค 80 - 100% ของพื้นที่ใบ ใบล่างบางส่วนมีรอยแผลขยายติดกันประมาณ 75% ของพื้นที่ใบ

จากนั้นนำคะแนนความรุนแรงของโรคมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS) เวอร์ชั่น 16 และนำมาคำนวณหา DSI โดยสูตรข้างต้น

5. การทดสอบการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบปาล์มน้ำมัน

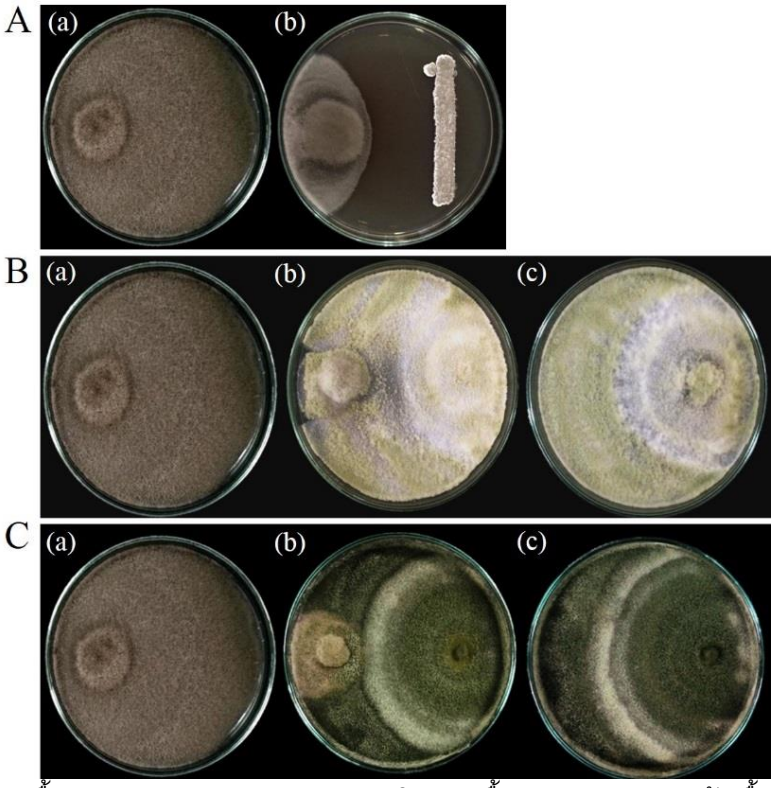
ทำการเก็บใบปาล์มน้ำมันหลังจากพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน หลังจากนั้นทำการแยกเชื้อโดยกรรมวิธี tissue transplanting โดยตัดใบปาล์มขนาด 3×3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% แอลกอฮอล์และ 10% sodium hypochloride หลังจากนั้นล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และผึ่งให้แห่งบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางชิ้นส่วนของใบปาล์มลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องและสังเกตการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อใยปาล์มน้ำมัน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ในห้องปฏิบัติการเบื้องต้นด้วยกรรมวิธี Dual culture test

จากการทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อรา *T. harzianum* (TM 2/1) และ *Trichoderma* sp. (V76-12) และเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* (NR8-2) โดยวิธีเลี้ยงร่วมบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ โดยเชื้อ V76-12 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* ได้ดีที่สุดที่ 85.71% รองลงมาคือเชื้อ TM 2/1 สามารถยับยั้งได้ 75.71% และเชื้อ NR8-2 ยับยั้งได้ 72.50% (ภาพที่ 2 และตารางที่ 1)



ภาพที่ 2 การเจริญของเชื้อรา *Curvularia oryzae* และการเจริญของเชื้อรา *C. oryzae* ร่วมกับเชื้อ *S. hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* NR8-2 (A), *Trichoderma harzianum* TM2/1 (B) และ *Trichoderma* sp. V76-12 (C) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังการปลูกเชื้อที่อายุ 10 วัน, Aa, Ba, Ca: ชุดควบคุม *C. oryzae*, Ab: *C. oryzae* และ NR8-2, Bb: *C. oryzae* และ V76-12, Bc: *C. oryzae*, Cb: *C. oryzae* และ TM2/1 และ Cc: *C. oryzae*.

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยวิธี dual culture test ที่อายุ 10 วัน

เชื้อปฏิปักษ์	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซม.)		% ยับยั้ง
	Control	Dual culture test	
NR8-2	7.0±00	1.92±0.09	72.50±0.09b
TM2/1	7.0±00	1.70±0.14	75.71±0.14b
V76-12	7.0±00	1.00±0.21	85.71±0.21a

ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถว ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P < 0.05 ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), % coefficient of variation (CV) = 10.26%

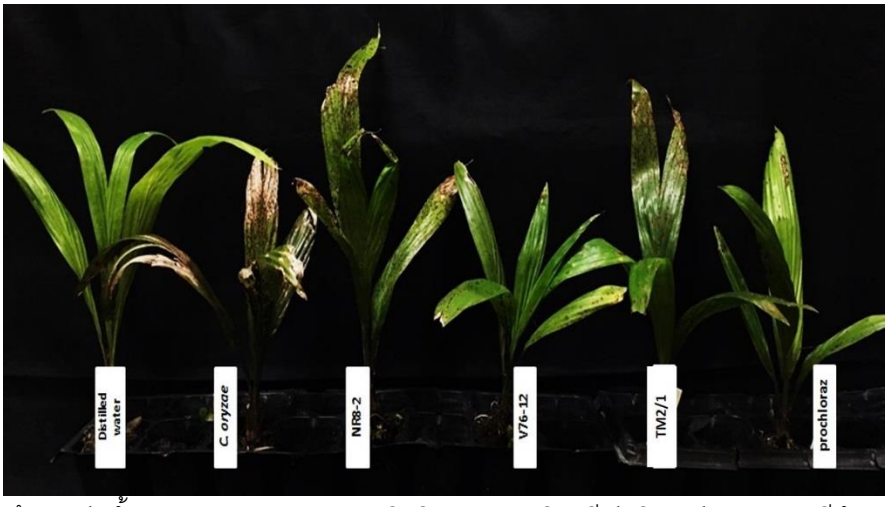
การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดในสภาพโรงเรือนทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Trichoderma* TM 2/1 และ V76-12 และเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* NR8-2 เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราโพลคอลราชต่อการยับยั้งการเกิดโรคใบจุดในปาล์มน้ำมัน พบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยสารเคมีโพรคลอราช 40 ppm และสปอร์แขวนลอยของเชื้อ V76-12 มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุดต่ำสุดคือระดับ 2 มีเปอร์เซ็นต์ DSI เท่ากับ 20 และ 21% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ รองลงมาคือกรรมวิธีที่พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของ TM 2/1 มีระดับความรุนแรงของโรคที่ระดับ 3 มีเปอร์เซ็นต์ DSI เท่ากับ 66% และกรรมวิธีที่พ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของ NR8-2 ที่ระดับความรุนแรง 4 มีเปอร์เซ็นต์ DSI เท่ากับ 75% ส่วนกรรมวิธีที่พ่นโดยสปอร์แขวนลอยของเชื้อสาเหตุโรค *C. oryzae* มีระดับความรุนแรงของโรครุนแรงที่สุดที่ระดับ 5 มีเปอร์เซ็นต์ DSI เท่ากับ 78% (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 3) จากผลการทดลองใน 6 เดือนได้ข้อมูลประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถลดความรุนแรงของโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยพบว่าการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อ TM 2/1 และ V76-12 และเชื้อแบคทีเรีย NR8-2 สามารถลดระดับความรุนแรงของโรคได้ในโรงเรือนทดลอง โดยเฉพาะสปอร์แขวนลอยของเชื้อ V76-12 สามารถลดระดับความรุนแรงของโรคได้เทียบเท่ากับสารเคมีโพลคลอราช

ตารางที่ 2 ระดับความรุนแรงของโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละกรรมวิธีการทดลองภายในเรือนทดลองหลังจากปลูกเชื้อ *C. oryzae* เป็นเวลา 6 เดือน

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรง	DSI (%)
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0.20±0.22	6.00±0.42a
C. oryzae	4.80±0.58	78.00±0.42d
สารเคมีโพลคอลราช	1.60±1.22	20.00±0.52b
NR8-2	4.40±1.15	75.00±0.84d
TM2/1	3.40±1.08	66.00±0.83c
V76-12	2.10±0.85	21.00±0.74b

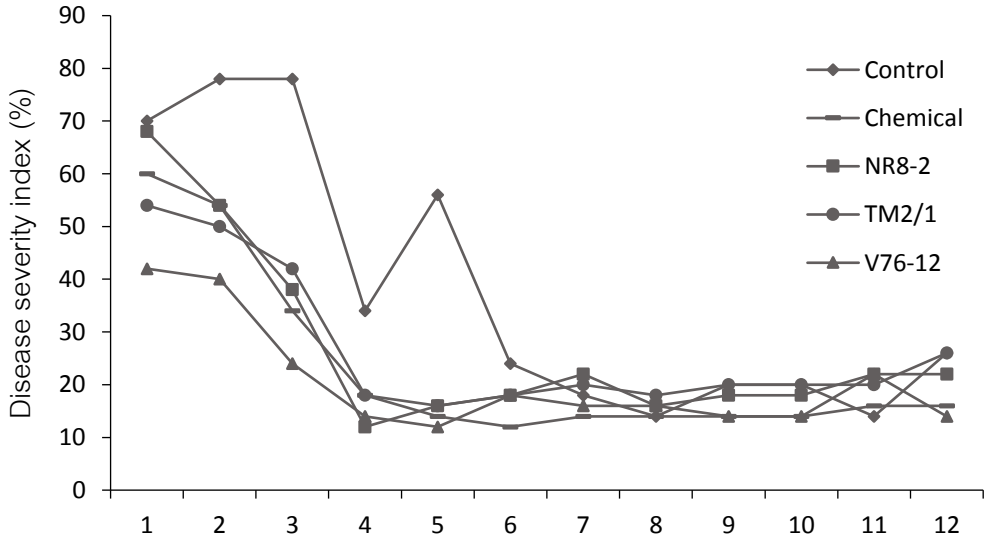
ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P < 0.05 ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT), % coefficient of variation (CV) = 24.72%



ภาพที่ 3 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันหลังการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารเคมีกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคใบจุดในเรือนทดลองเป็นเวลา 6 เดือน

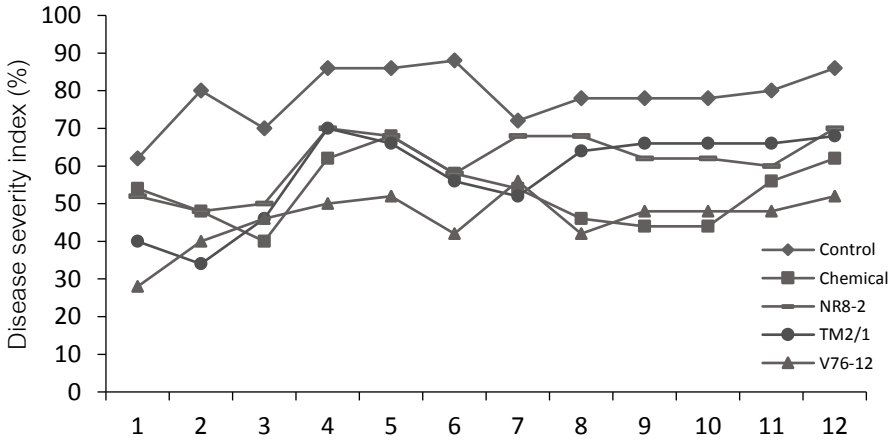
การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดในสภาพแปลง

จากผลการทดลองการประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 12 เดือน ที่พื้นที่แปลงภาควิชาการจัดการศัตรูพืชพบว่าแต่ละกรรมวิธีมีความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน โดยกรรมวิธีที่มีความรุนแรงของโรคสูงที่สุดคือกรรมวิธีควบคุม (ตารางภาคผนวกที่ 1) ไม่ได้ฉีดพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีค่าเฉลี่ยของการเกิดโรคเท่ากับ 2.10±1.40 และมีเปอร์เซ็นต์ DSI เท่ากับ 37.67±25.41% ส่วนกรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีค่าเฉลี่ยการเกิดโรคเท่ากับ 1.49±0.92 (27.00% DSI), 1.48±0.80 (26.83±13.63 %DSI) และ 1.16±0.69 (20.50±10.20 %DSI) สำหรับ NR8-2, TM2/1 และV76-12 ตามลำดับ ส่วนสารเคมีมีระดับความรุนแรงของโรคตั้งแต่ 1.42±0.92 (23.33±16.78% DSI) ภาพที่ 4 แสดงดัชนีความรุนแรงของโรคทุกเดือนเป็นระยะเวลา 12 เดือน การพ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีค่าดัชนีความรุนแรงของโรคต่ำกว่าชุดควบคุม



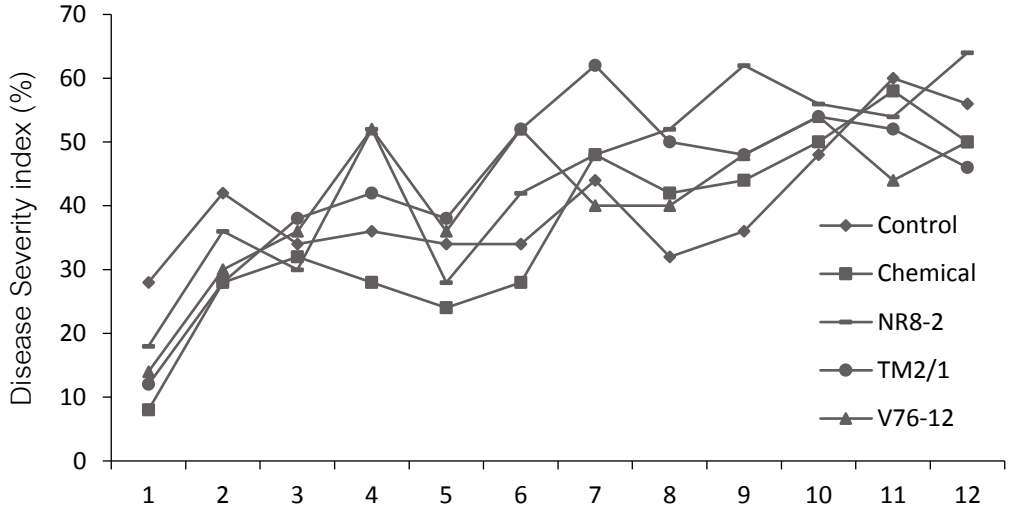
ภาพที่ 4 ดัชนีความรุนแรงของโรคใบจุดในปาล์มน้ำมันประเมินจากใบปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 12 เดือน ณ แปลงภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จากผลการทดลองการประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 12 เดือน ที่พื้นที่สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา พบว่าแต่ละกรรมวิธีมีความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน โดยกรรมวิธีที่มีความรุนแรงของโรคสูงที่สุดคือกรรมวิธีควบคุม (ตารางภาคผนวกที่ 2) ไม่ได้ฉีดพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีค่าเฉลี่ยของการเกิดโรคเท่ากับ 3.51±0.91 และมีเปอร์เซ็นต์ DSI เท่ากับ 78.67±7.69% ส่วนกรรมวิธีที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีค่าเฉลี่ยการเกิดโรคเท่ากับ 2.78±0.76 (61.33% DSI), 2.60±0.78 (57.83±12.13% DSI) และ 2.19±0.62 (46.00±7.34% DSI) สำหรับ NR8-2, TM2/1 และ V76-12 ตามลำดับ ส่วนสารเคมีมีระดับความรุนแรงของโรคตั้งแต่ 2.54±0.77 (53.00±8.68% DSI) ภาพที่ 5 แสดงดัชนีความรุนแรงของโรคทุกเดือนเป็นระยะเวลา 12 เดือน การพ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีค่าดัชนีความรุนแรงของโรคต่ำกว่าชุดควบคุมในทุก ๆ เดือนที่ทดสอบ



ภาพที่ 5 ดัชนีความรุนแรงของโรคใบจุดในปาล์มน้ำมันประเมินจากใบปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 12 เดือน ณ แปลงทดลองสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา

จากผลการทดลองการประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันเป็นระยะเวลา 12 เดือน ที่พื้นที่สถานีวิจัยท่าเชียด อ.แม่ขรี จ.พัทลุง พบว่าแต่ละกรรมวิธีมีความรุนแรงของโรคที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ 3 และ ภาพที่ 6) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (DMRT) โดยมีค่าระดับความรุนแรงของโรคอยู่ที่ 1.86–2.45 และมีเปอร์เซ็นต์ DSI เท่ากับ 36.67–45.17% แสดงให้เห็นว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในบริเวณสถานีวิจัยท่าเชียดไม่ประสบผลสำเร็จ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะสภาพภูมิอากาศที่ต่างจากจังหวัดสงขลาในแง่ของ ปัจจัยทางกายภาพ เช่นความชื้นสัมพัทธ์และปริมาณน้ำฝน (โดยเฉพาะในฤดูฝน) ประกอบกับการระบาดของโรคและแมลง (pest intensity) ที่สถานีวิจัยท่าเชียดมีมากกว่าแปลงภาควิชาการจัดการจัดการศัตรูพืช และสถานีวิจัยคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา



ภาพที่ 6 ดัชนีความรุนแรงของโรคใบจุดในปาล์มน้ำมันประเมินจากใบปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 12 เดือน ณ แปลงทดลอง สถานีวิจัยท่าเชียด จ.พัทลุง

การอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบปาล์มน้ำมัน

หลังจากพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดลงบนใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน และนำมาแยกเชื้อด้วยกรรมวิธี tissue transplanting เพื่อศึกษาการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน พบเชื้อ V76-12 ทุกระยะเวลา เชื้อ TM2/1 พบที่ 10 วัน ส่วนเชื้อ NR8-2 ไม่พบอยู่บนใบของปาล์มน้ำมันทุกระยะเวลาที่ทดสอบ แต่พบการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นที่ 30 วัน (ตารางที่ 3) ส่วนในชุดควบคุมที่พ่นสารเคมีและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อพบการเจริญของเชื้ออื่น ที่ไม่ใช่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ 30 วัน (รูปที่ 7)

ตารางที่ 3 การอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	ระยะเวลาการพ่น (วัน)		
	10	20	30
Control	–[1,2]	–	c[3]
Chemical	–	–	c
NR8-2	–	–	–
TM2/1	+	–	–
V76-12	+	+	+

[1] – ไม่พบเชื้อ, + พบเชื้อ

[2] การเจริญของโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหาร PDA

[3] ปนเปื้อนเชื้อ endophyte/pathogen

ภาพที่ 7 โคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้ออื่น ๆ บนอาหาร PDA หลังจากแยกจากใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่ระยะเวลา 30 วัน ด้วยกรรมวิธี tissue transplanting

จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิด *Streptomyces* NR8-2, *Trichoderma* TM2/1 และ V76-12 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน *C. oryzae* บนอาหาร PDA โดยมีกลไกแก่งแย่งอาหารและพื้นที่สำหรับการเจริญ (Benítez et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Trichoderma* TM2/1 และ V76-12 สร้างสารระเหยต้านเชื้อราสาเหตุโรคได้โดยกรรมวิธี volatile antifungal assay (ภาพผนวกที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dennis and Webster (1971) ซึ่งเชื้อ *Streptomyces* NR8-2 ขาดกลไกชนิดนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดสร้างเอนไซม์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคใบจุดได้ (ภาพผนวกที่ 2) นอกจากกลไกการแก่งแย่งแข่งขัน สร้างสารระเหยต้านเชื้อรา และสร้างเอนไซม์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ การพ่นเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดพบว่ากระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ PAL, POD และ PPO (ภาพผนวกที่ 3) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองของพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค โดยพบว่าเชื้อจุลินทรย์ปฏิปักษ์กระตุ้นการสร้างเอนไซม์เหล่านั้นมากกว่าชุดควบคุม จากกลไกเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดมีศักยภาพในการที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการลดการเกิดโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้

ผลการทดลองในสภาพโรงเรือนพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ลดการเกิดโรคใบจุดได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่พ่นเชื้อสาเหตุโรค *C. oryzae* ที่ระยะเวลา 6 เดือนหลังพ่น โดยเฉพาะเชื้อ *Trichoderma* V76-12 มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารเคมีโพลคอลราช และเมื่อวิเคราะห์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคใบจุดในสภาพแปลงเป็นระยะเวลา 12 เดือนพบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์และการใช้สารเคมีโพลคอลราชไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถทดแทนการใช้สารเคมีโพลคอลราชได้ หรือเป็นอีกทางเลือกของเกษตรกรในการใช้กรรมวิธีแบบผสมผสาน (integrated pest management, IPM) แต่เมื่อเปรียบกับสภาพพื้นที่พบว่าการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในพื้นที่สถานีวิจัยท่าเชียด อ.แม่ขรี จ.พัทลุงให้ผลไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้สภาพแวดล้อม และปัจจัยทางกายภาพ และการระบาดของโรคและแมลง อาจจะแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ส่งผลให้การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในพื้นที่สถานีวิจัยท่าเชียดให้ผลที่แปรปรวนตามที่แสดงในภาพที่ 6

เมื่อทดสอบการอยู่รอดของเชื้อจุลิทรีย์ปฏิปักษ์บนใบปาล์มน้ำมันด้วยกรรมวิธี tissue transplanting พบว่าเชื้อ *Trichoderma* V76-12 สามารถอยู่รอดได้ถึง 30 วัน ทั้งนี้แหล่งที่มาของเชื้อ V76-12 นั้นแยกได้มาจากใบพืชและมีคุณสมบัติเป็นเอนโดไฟต์ (endophyte) ทำให้เชื้อ V76-12 สามารถอยู่รอดและปรับตัวอยู่ในใบปาล์มน้ำมันได้ดีกว่าเชื้อ

ปฏิปักษ์อื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง แสดงให้เห็นจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิด *Trichoderma* V76-12 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทดลองนี้ ทั้งในห้องปฏิบัติการ ในสภาพโรงเรือนและในสภาพแปลงทดลอง เชื้อ *Trichoderma* V76-12 มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำไปพัฒนาสูตรสำเร็จเพื่อการค้าในอนาคตได้

เอกสารอ้างอิง

จิตรา กิตติโมรากุล. 2557. การควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมันโดยสารเคมีและชีววิธี. วิทยานิพน์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชาย โพธิวิส และสุรกิจ ศรีสกุล. 2548. ประวัติความเป็นมาของปาล์มน้ำมัน. *ใน* เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน. กรุงเทพฯ. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, หน้า 1-14.

ธีระ เอกสมทราเมษฐ์, ชัยรัตน์ นิลนนท์, ธีระพงศ์ จันทรนิยม, ประกิจ ทองคำ, นิทัศน์ สองศรี และยงยุทธ เชื้อมงคล. 2545. การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตของปาล์มน้ำมัน. สงขลา. คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปริศนา วงศ์ล้อม. 2548. การใช้พืชสมุนไพร และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BO12-022 ควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma harzianum* Rifai.) ในเห็ดหูหนู และผลของการพลู (*Eugenia aromatic* ktze.) ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.). วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตร์มหาบัรฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

พิพัฒน์ เชี่ยงหลิว และเกริกชัย ธนรักษ์. 2554. การปลูกปาล์มน้ำมันตามหลักการปฏิบัติทางเกษตรที่ดี. สุราษฎร์ธานี. สำนักวิจัยละพัฒนาการเกษตร เขต 7 กรมวิชาการเกษตรสุราษฎ์ธานี, 77 หน้า

ศรีสุรางค์ ลิขตเอกราช และพิพัฒน์ เชี่ยงหลิว. 2541. โรคปาล์มน้ำมัน. เอกสารการสัมมนาวิชาการปาล์มน้ำมันแห่งชาติ ครั้งที่ 1 22 - 24 มิถุนายน 2541. กรมวิชาการเกษตรร่วมกับสมาคมปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์มแห่งประเทศไทย. หน้า 71 - 86.

เสมอใจ ชื่นจิตต์ และวสันณ์ เพชรรัตน์. 2553. โรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน. ใน โครงการชุดความรู้ ม.อ. เล่มที่ 2/2553. ปาล์มน้ำมัน: การปรับปรุงขยายพันธุ์ การปลูกและการจัดการสวน. สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน คณะทรัพยากรธรรมชาติและสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 54-58.

อารีรัตน์ เทียนขาว, วรรณวิไล อินทนู, จิระเดช แจ่มสว่าง และกนกวรรณ รมยานนท์. 2548. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และการลดการเกิดโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย. *ใน*: รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 7 วันที่ 2-4 พฤศจิกายน 2548 โรงแรมโลตัสกาดสวนแก้ว, หน้า 34.

Aderungboye, F.O. 1977. Disease of the oil palm. Tropic Pest Management 23: 305-326.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Inter. J. Microbiol. 7, 249–260.

Dennis, C., Webbster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Trans. Br. Mycol. Soc. 57, 41–48.

Jegathambigai, V., Karunaratne, M.D., Svining, A. and Mikunthan, G. 2008. Potential of *Trichoderma* species on *Helminthosporium* leaf spot on cane palm, *Chrysalidocarpu slutescens*. Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences 73: 147-152.

Kittimorakul, J., Pornsuriya, C., Sunpapao, A. and Petcharat V. 2013. Survey and incidence of leaf blight and leaf spot diseases of oil palm seedlings in southern Thailand. Plant Pathology Journal 12(3): 149-153.

Kovachich, W.G. 1954. *Cercospora elaeidis* leaf spot of the oil palm. Transactions of the British Mycological Society 37: 209-212.

Labarca, M., Sanabria, N. and Arcia, A. 2006. *Pestalotiopsis palmarum* Cooke pathogenicity on nursery-oil palm (*Elaesis guineensis* Jacq.) plants. Journal of University of Zulia (Venezuela) 23: 414-421.

Michereff, S.J., Silverira, N.S.S., Reis, A. and Mariano, R.L.R. 1994. Epiphytic bacteria antagonistic to *Curvularia* leaf spot of yam. Microbial Ecology 28: 101-110.

Ningthoujam, S.D., Sanasam, S., Tamreihao, K. and Nimaichand, S. 2009. Antagonistic activities of local actinomycetes isolates against rice fungal pathogens. African Journal of Microbiology Research 11: 737-742.

Pithakkit, S., Petcharat, V., Chuenchit, S., Pornsuriya, C. and Sunpapao, A. 2014. Isolation of antagonistic actinomycetes species from rhizosphere as effective biocontrol against oil palm fungal diseases. Walailak Journal of Science and Technology 12(5): 481-490.

Pornsuriya, C., Sunpapao, A., Srihanant, N., Worapattamasri, K., Kittimorakul, J., Phitakkit, S. and Petcharat, V. 2013. A survey of diseases and disorders in oil aplm of southern Thailand. Plant Pathology Journal 12: 169-175.

Prajapati, V.P., Joshi, D.M., Gajre, N.K. and Kansara, S.S. 2012. Antagonism of some well-known bioagents against *Curvularia eragrostidis* (HENN.) J.A.MEY.-anincitant of spider lily leaf top blight. The Bioscan 7: 701-703.

Rahman, M.A., Begum, M.F., Alam, M.F., 2009. Screening of *Trichoderma* isolates as a biological control agent against *Ceratocystis paradoxa* causing pineapple disease of sugarcane. Microbiology 37, 277–285.

Sunpapao, A., Kittimorakul, J. and Pornsuriya, C. 2014. Disease Note: Identification of *Curvularia oryzae* as cause of leaf spot disease on oil palm seedlings in nurseries of Thailand. Phytoparasitica 42: 529-533.

ภาคผนวก 1

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าเฉลี่ยของการเกิดโรคและ disease severity index (%) ประเมินจากใบจุดของปาล์มน้ำมันที่ระยะเวลา 12 เดือน ณ แปลงภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Treatment	Average of disease score	%DSI
Control	2.10±1.40*	37.67±25.41b
Chemical	1.42±0.92	23.33±16.78ab
NR8-2	1.49±0.98	27.00±17.36ab
TM2/1	1.48±0.80	26.83±13.63ab
V76-12	1.16±0.69	20.50±10.20a

*ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถว ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P < 0.05 ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), % coefficient of variation (CV) = 5.33%

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าเฉลี่ยของการเกิดโรคและ disease severity index (%) ประเมินจากใบจุดของปาล์มน้ำมันที่ระยะเวลา 12 เดือน ณ สถานีวิจัยคลองหอยโข่ง อ.คลองหอยโข่ง จ.สงขลา

Treatment	Average of disease score	%DSI
Control	3.51±0.91*	78.67±7.69d
Chemical	2.54±0.77	53.00±8.68ab
NR8-2	2.78±0.76	61.33±7.92c
TM2/1	2.60±0.78	57.83±12.13bc
V76-12	2.19±0.62	46.00±7.34a

*ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถว ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P < 0.05 ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), **% coefficient of variation (CV) = 1.68%**

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าเฉลี่ยของการเกิดโรคและ disease severity index (%) ประเมินจากใบจุดของปาล์มน้ำมันที่ระยะเวลา 12 เดือน ณ สถานีวิจัยท่าเชียด จ.พัทลุง

Treatment	Average of disease score	%DSI
Control	2.02±0.53a	40.33±9.94a*
Chemical	1.86±0.74a	36.67±14.30a
NR8-2	2.45±0.70a	45.17±14.43a
TM2/1	2.03±0.61a	43.50±13.35a
V76-12	2.13±0.59a	41.33±11.48a

*ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถว ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น P < 0.05 ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT), % coefficient of variation (CV) = 3.15%

ภาคผนวก 2

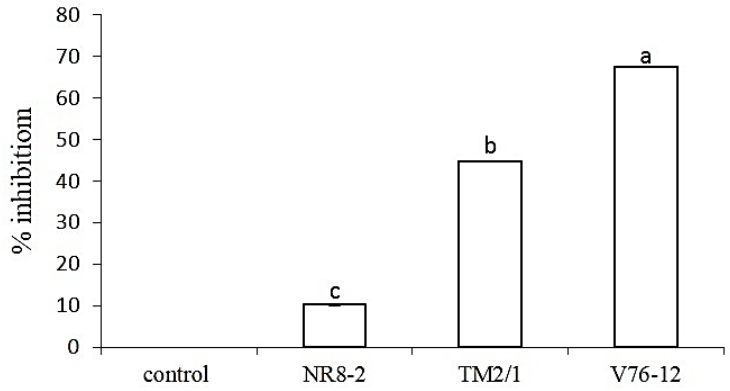
การทดสอบการสร้างสารระเหยต่อต้านเชื้อราของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ทดสอบการสร้างสารระเหยต่อต้านเชื้อรา (volatile antifungal bioassay) โดยกรรมวิธีของ Dennis และ Webster (1971) ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ NR8-2, TM2/1, V76-12 และเชื้อราสาเหตุโรค *C. oryzae* บนอาหาร PDA ประมาณ 5 วันและตัดชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางตรงกลางอาหาร PDA หลังจากนั้นเอาฝาจานเลี้ยงเชื้อออกประกบกับจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นวุ้นของเชื้อ *C. oryzae* พันด้วย parafilm ส่วนในชุดควบคุมประกบจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นวุ้นของเชื้อ *C. royzae* กับจานที่มีแค่อาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อ *C. oryzae* ในชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ *C. oryzae* ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตร

Percent inhibition of fungal diameter (%) = [(Dc–Dt)/Dc × 100]

โดยที่ Dc คือเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ *C. oryzae* ในชุดทดลองและ Dt คือเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ *C. oryzae* ในชุดทดสอบ (Prapagdee et al., 2008)

จากการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรค *C. oryzae* ร่วมกับเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดโดยกรรมวิธี volatile antifungal bioassay เพื่อทดสอบการสร้างสารระเหยต้านเชื้อราของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองพบว่าเชื้อ V76-12 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* ได้ถึง 68 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ TM2/1 และ NR8-2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* ได้ 45 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพผนวกที่ 1) แสดงว่าเชื้อ *Trichoderma* ทั้ง 2 ชนิดสามารถสร้างสารระเหยต่อต้านเชื้อราออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ได้ ส่วนเชื้อ *Streptomyces* ไม่สามารถสร้างสารระเหยต่อต้านเชื้อรา ทำให้เป็นเซ็นต์การยับยั้งมีค่าต่ำกว่าเชื้อ *Trichoderma* อย่างมีนัยสำคัญ



ภาพผนวกที่ 1 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อ *Curvularia oryzae* โดยสารระเหยต้านเชื้อราที่เชื้อแต่ละชนิดผลิต

เอกสารอ้างอิง

Dennis, C., Webbster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Trans. Br. Mycol. Soc. 57, 41–48.

Prapagdee, B., Akrapikulchart, U., Mongkolsuk, S., 2008. Potential of a soil-borne *Streptomyces hygroscopicus* for biocontrol of Anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in orchard. J. Biol. Sci. 8(7), 1187–1192

ภาคผนวก 3

การสร้างเอนไซม์ยับยั้งเชื้อ *C. oryzae* ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* NR8-2 ในอาหารเหลว GYMB ผสม 1% colloidal chitin ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ส่วนเชื้อ *Trichoderma* TM2/1 และ V76-12 เลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid state) ผสม 1% colloidal chitin ตามกรรมวิธีของ Thongkeawyuan และ Chairin (2016) ผสม potassium phosphate buffer (KPB) pH 7.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารแต่ละชนิดที่เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เขย่าและปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตรให้ปลอดเชื้อ ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่สกัดได้ด้วยกรรมวิธี agar diffusion ตามกรรมวิธีของ Chairin และ Petcharat (2017) ทำการเทอาหาร PDA และเจาะชิ้นวุ้นให้เป็นช่องขนาด 5 มิลลิเมตร 3 ช่องต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ ช่องที่ 1 หยอดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ช่องที่ 2 หยอด KPB และช่องที่ 3 หยอดเอนไซม์สกัดหยาบ และวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ *C. oryzae* ตรงกลางระหว่างช่องทั้ง 3 ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน วัดรัศมีของเชื้อ *C. oryzae* และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตร

Percent inhibition = [(C–T)/C × 100]

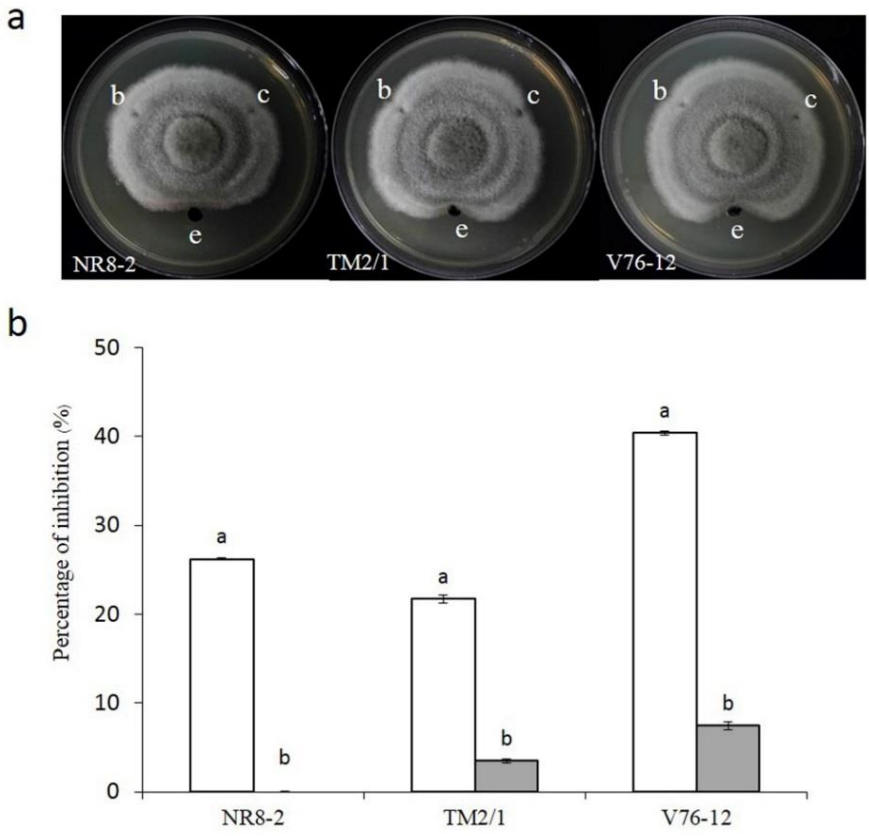
โดยที่ C คือรัศมีของเชื้อ *C. oryzae* จากศูนย์กลางถึงช่องชุดควบคุม (KPB) และ T รัศมีของเชื้อ *C. oryzae* จากศูนย์กลางถึงช่องสารสกัดหยาบเอนไซม์ (Chairin and Petcharat, 2017)

จากการทดสอบสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากเชื้อทั้ง 3 ชนิดด้วยกรรมวิธี agar diffusion พบว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* ได้ (ภาพผนวกที่ 2a) โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* คือ 40.57, 26.10 และ 21.67 เปอร์เซ็นต์สำหรับเชื้อ V76-12, NR8-2 และ TM2/1 ตามลำดับ (ภาพผนวกที่ 2b) แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดสร้างเอนไซม์ยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมันได้

เอกสารอ้างอิง

Chairin, T., Petcharat, V. 2017. Induction of defense responses in longkong fruit (*Aglaia dookkoo* Griff.) against fruit rot fungi by *Metarhizium guizhouense*. Boil. Control 111, 40–44.

Thongkeawyuan, A., Chairin, T., 2016. Selection of carbon and nitrogen sources for protease production by *Metarhizium anisopliae* PSUM02 under solid state cultivation. Khon Kaen Agri. J. 44(Suppl. 1), 924–929.



ภาพผนวกที่ 2 ผลของสารสกัดหยาบเอนไซม์ต่อการเจริญของเส้นใยสาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน *C. oryzae* (a) โดยที่ช่อง b หยอดบัฟเฟอร์ c หยอดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและ e หยอดสารสกัดหยาบเอนไซม์และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* (b)

ภาคผนวก 4

การกระตุ้นเอนไซม์ในพืชปาล์มน้ำมันโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

ทำการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงบนใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมันและเก็บใบปาล์มน้ำมันมาสกัดเอนไซม์โดยบดตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันน้ำหนัก 10 กรัมกับ extraction buffer (Tris-HCl) pH 8.5 สำหรับสกัดเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ส่วนบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์ peroxidase คือ potassium phosphate buffer (KPB) pH 6.0 และ pH 7.5 สำหรับสกัดเอนไซม์ polyphenyl oxidase (PPO) หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C 50 นาที เลือกส่วนใสมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ PAL โดยปรับจากกรรมวิธีของ Hodgins (1971) และกรรมวิธีของ Havir และ Hanson (1970) โดยบ่ม 2.0 มิลลิลิตร L-phenylalanine สำหรับสารตั้งต้น 0.9 มิลลิลิตร น้ำกลั่น วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 270 นาโนเมตรหลังจากผสม0.1 มิลลิลิตรเอนไซม์สกัดหยาบลงไป 5 นาที และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ΔA 270 U mL^{-1}

กิจกรรมของเอนไซม์วัดโดยกรรมวิธีของ Vetter และคณะ (1958) โดยผสม 2 มิลลิลิตร 0.1 โมลาร์ KPB pH 6.0 กับ 0.1 O-phenylenediamine (OPDA), 0.2 มิลลิลิตร เอนไซม์สกัดหยาบ และ 0.1 มิลลิลิตรน้ำกลั่น วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร หลังจากเติม 0.1 มิลลิลตร 0.3% H_2O_2 และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ΔA 430 U mL^{-1}

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ตามกรรมวิธีของ Luh และ Phithakpol (1972) โดยบ่ม 2.0 มิลลิลตร 0.1 KPB, 0.1 มิลลิลิตร 0.3 โมลาร์ Catechol, 0.2 มิลลิลตร เอนไซม์สกัดหยาบ และ 0.2 มิลลิลตร น้ำกลั่น วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ΔA 420 U mL^{-1}

เพื่อทดสอบการกระตุ้นระบบป้องกันตัวเองของพืช (defense response) โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทำการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดลงบนใบปาล์มน้ำมันและเก็บตัวอย่างใบมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ PAL,PPO และ POD 0, 2, 4 และ 6 วัน ผลการทดลองพบว่าการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดสูงกว่าชุดควบคุมที่พ่นแค่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว (ภาพผนวกที่ 3) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ PAL นั้นต่ำกว่าเอนไซม์ PPO และ POD กิจกรรมของเอนไซม์ POD นั้นสูงกว่าเอนไซม์อีก 2 ชนิด ระดับของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสามชนิดนั้นต่างกันในแต่ละวันของการเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในตัวอย่างที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้นก็ยังสูงกว่าตัวอย่างที่พ่นด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว

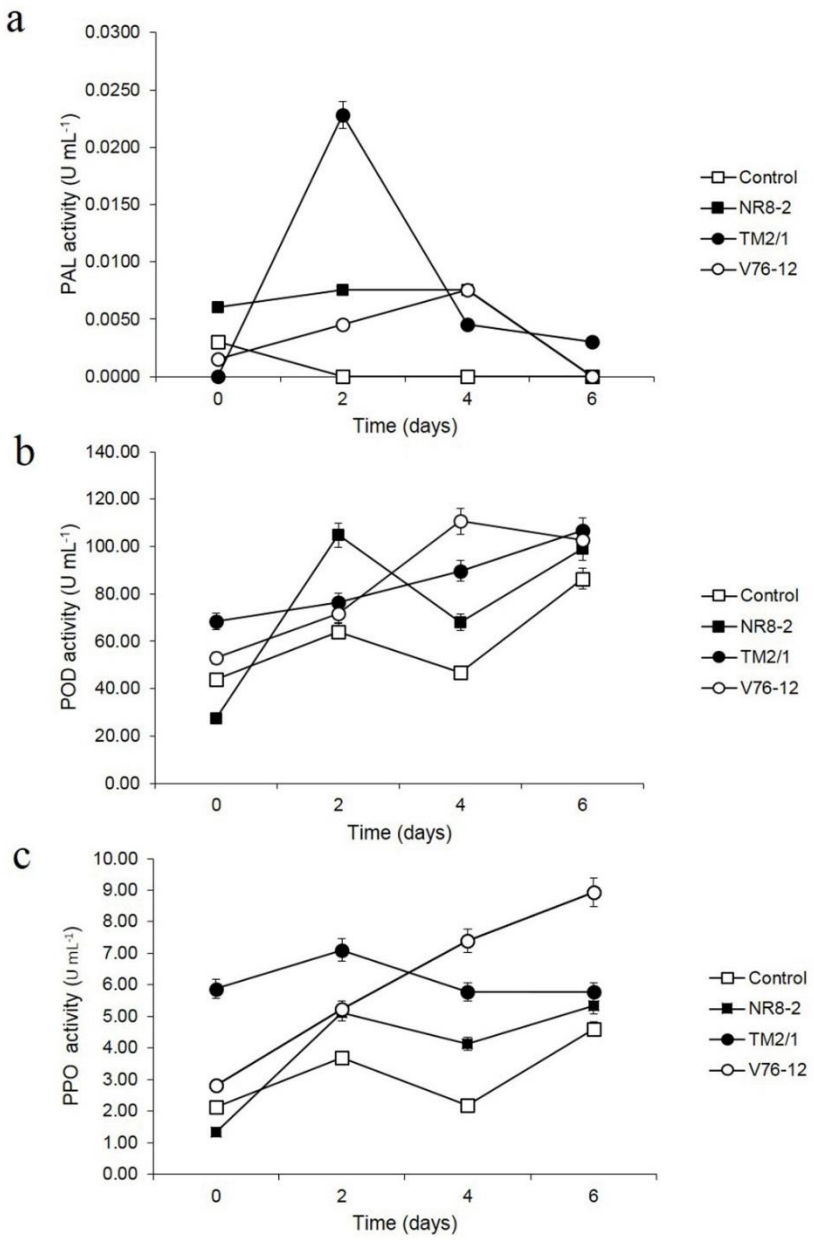
เอกสารอ้างอิง

Havir, E.A., Hanson, K.R., 1970. L-phenylalanine ammonia lyase (potato tubers), in: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology, Vol. VXIIA. Academic Press, New York, pp. 575–581.

Hodgins, D.S., 1971. Yeast phenylalanine ammonia-lyase purification, properties, and the identification of catalytically essential dehydroalanine. J. Biol. Chem. 246, 2977–2985.

Luh, B.S., Phithakpol, B., 1972. Characteristics of polyphenol-oxidase related to browning in cling peaches. J. Food Sci. 37, 264–268.

Vetter, J.L., Steinberg, M.P., Nelson, A.I., 1958. Quantitative determination of peroxidase in sweet corn. J. Agr. Food Chem. 6, 39–41.



ภาพผนวกที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์ PAL (a), POD (b) และ PPO (c) บนใบปาล์มน้ำมันที่พ่นด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิด NR8-2, TM2/1 และ V76-12 ที่ระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วันหลังพ่น

ตารางแผนงาน (Grantt chart)

วัตถุประสงค์	แผนกิจกรรม	แผนกิจกรรมรอง	ช่วงระยะดำเนินการ	กิจกรรมที่ทำจริง
1. เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	1.1 เพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุโรคและเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์	1.1.1 ทดสอบยืนยันการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ 1.1.2. ทดสอบยืนยันการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์โรงเรือนทดลอง	กันยายน 2559 - ตุลาคม 2559	เป็นไปตามแผน เป็นไปตามแผน
2. เพื่อทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพโรงเรือน	2.1 กำหนดขอบเขตพื้นที่ทดสอบวางต้นกล้าปาล์มน้ำมัน 3 พื้นที่คือ โรงเรือนอนุบาลต้นกล้าปาล์มน้ำมันในภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โรงเรือนอนุบาลต้นกล้าปาล์มน้ำมัน สถานีวิจัยคลองหอยโข่งและโรงเรือนอนุบาลต้นกล้าปาล์มน้ำมันสถานีวิจัยท่าเชียด	2.1.1 ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดเชื้อรา ทุก ๆ เดือน (1 ปี 12 ครั้ง) 2.1.2 วิเคราะห์ดัชนีการเกิดโรค	กันยายน 2559 - กุมภาพันธ์ 2560	เป็นไปตามแผน พบการเข้าทำลายของแมลงกัดกินใบ แก้ไขโดยใช้กับดักแมลง
3. เพื่อทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อจุลินทรีย์ต่อโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแปลงเพาะต้นกล้า	3.1 ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดเชื้อรา ทุก ๆ เดือน (ต่อ)	3.1.1 วิเคราะห์ดัชนีการเกิดโรค 3.1.2 วิคราะห์ดัชนีความรุนแรงของโรค (disease severity index)	มีนาคม 2560 - สิงหาคม2560	เป็นไปตามแผน เป็นไปตามแผน
4. เพื่อวิเคราะห์ความสามารถของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการเกิดโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน	4.1 ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เปรียบเทียบกับสารเคมีกำจัดเชื้อรา ทุก ๆ เดือน (ต่อ)	4.1.1 วิเคราะห์ดัชนีการเกิดโรค 4.1.2 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	กันยายน 2560 - กุมภาพันธ์ 2561	เป็นไปตามแผน เป็นไปตามแผน

ตาราง out put

Outputs		สาเหตุ
กิจกรรมในข้อสเนอโครงการ/ผลสำเร็จ (100%)		
1. ได้ข้อมูลประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมการเกิดโรคใบจุดต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพโรงเรือน	100%	
2. ได้ข้อมูลประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมการเกิดโรคใบจุดต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพแปลง	100%	
3. ร่างรายงานฉบับสมบูรณ์	100%	
4. รายงานฉบับสมบูรณ์	-	ร่างรายงานฉบับสมบูรณ์
5. เขียนงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์	100%	