



การคัดกรองและเตรียมสูตรสำเร็จของรา *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรค
ใบจุด *Curvularia* ของกล้าปาล์มน้ำมัน
Screening and Formulation of *Trichoderma* spp. for Controlling *Curvularia*
Leaf Spot of Oil Palm Seedlings

อรณิชา ตันติพลานนท์
Onnicha Tantipalanon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การคัดกรองและเตรียมสูตรสำเร็จของรา *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรค
ใบจุด *Curvularia* ของกล้าปาล์มน้ำมัน

Screening and Formulation of *Trichoderma* spp. for Controlling *Curvularia*
Leaf Spot of Oil Palm Seedlings

อรณิชา ตันติพลานนท์
Onnicha Tantipalanon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดกรองและเตรียมสูตรสำเร็จของรา *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรคใบจุด *Curvularia* ของกล้าปาล์มน้ำมัน

ผู้เขียน นางสาวอรุณิชา ตันติพลานนท์

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**คณะกรรมการสอบ**

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วสันต์ เพชรรัตน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา)

.....กรรมการ
(ดร. ธัญชนก ไชยรินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟ้ารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคล
ที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(นางสาว อรณิชา ตันติพลานนท์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาว อรณิชา ตันติพลานนท์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองและเตรียมสูตรสำเร็จของรา <i>Trichoderma</i> spp. เพื่อควบคุมโรคใบจุด <i>Curvularia</i> ของกล้าปาล์มน้ำมัน
ผู้เขียน	นางสาวอรุณิชา ตันติพลานนท์
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

โรคใบจุดที่เกิดจากรา *Curvularia oryzae* เป็นโรคที่ระบาดรุนแรงในแปลงเพาะปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมัน การควบคุมโดยใช้สารเคมีเป็นเวลานานไม่เพียงแต่ทำให้เชื้อโรคเกิดความต้านทาน แต่ยังเป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม การใช้ราปฏิปักษ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง แต่การนำราปฏิปักษ์ไปใช้ขาดความระมัดระวังในการศึกษาครั้งนี้จึงคัดกรองราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อรา *C. oryzae* และพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบอิมัลชัน โดยเก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันที่สมบูรณ์ ปลอดโรค จากพื้นที่อำเภอคลองหอยโข่ง และบริเวณภายในแปลงเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา มาแยกราเอนโดไฟท์และอิพิไฟท์ ได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลท (*Trichoderma harzianum* TM2/1 และ *Streptomyces hygroscopicus* NR 8-2) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Culture Collection of Pest Management เมื่อนำมาคัดเลือกร่วมวิธี dual culture พบว่ามี 6 ไอโซเลท (V76-12, T76-1, V76-14, T76-14, T76-12/2 และ *T. harzianum* TM2/1) ให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเส้นใยรา *C. oryzae* ได้มากกว่า 80% เมื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยาาร่วมกัน สามารถจัดจำแนกรากปฏิปักษ์ได้เป็น 2 ชนิด คือ *T. asperellum* ไอโซเลท T76-14 กับ V76-14 และ *T. spirale* ไอโซเลท V76-12, T76-1 และ T76-12/2 ความสัมพันธ์ระหว่างรากปฏิปักษ์กับรา *C. oryzae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าราทั้ง 6 ไอโซเลทเจริญคลุมทับและพันรัดเส้นใยรา *C. oryzae* และ *S. hygroscopicus* NR8-2 สามารถทำให้ปลายเส้นใย *C. oryzae* เกิดความผิดปกติ รา *T. spirale* T76-1 และ *T. harzianum* TM2/1 ผลิตเอนไซม์ไคติเนสและ เบตา-1,3-กลูคาเนส เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์รา *C. oryzae* รวมถึงยังสามารถสร้างสารระเหยในกลุ่มแอลกอฮอล์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ได้และพบว่ารากปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิด (*T. harzianum* TM2/1, *T. spirale* T76-1 และ *S. hygroscopicus* NR8-2) สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตนเองของพืช ได้แก่ polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) และ phenylalanine ammonia lyase (PAL) จึงเลือกจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท ไปผลิตเป็นสูตรสำเร็จ

(6)

ชนิดอิมัลชัน การทดสอบประสิทธิภาพในการเก็บรักษา พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สามารถยืดอายุการเก็บรักษา และเมื่อทดสอบสูตรสำเร็จลงบนต้นกล้าปาล์มน้ำ พบว่าอิมัลชันทั้ง 4 สูตร สามารถควบคุมโรคใบจุดได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับการใช้สารเคมีโพรคลอราซ

Thesis Title	Screening and Formulation of Antagonistic Microorganisms for Controlling Leaf Spot Disease of Oil Palm Seedlings
Author	Miss Onnicha Tantipalanon
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	2017

Abstract

Leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* is a severe outbreak on oil palm seedlings in nurseries. Long-time usage of chemical fungicide not only causes pathogen resistance but also harmful for human health and environment. The use of antagonistic microorganism is an alternative strategy but it is inconvenient to use. In this study, fungi were screened for antagonistic activity against *C. oryzae* and developed to emulsifying biopesticide. Twenty-six isolates of fungi were isolated from the tissue and leaf surface of oil palm leaves collected from Khlong Hoi Khong District and the agricultural field of Faculty of Natural Resources, Hat Yai District, Songkhla, and 2 isolates (*Trichoderma harzianum* TM2 / 1 and *Streptomyces hygroscopicus* NR 8-2) were obtained from the Culture Collection of Pest Management Department. Six isolates (V76-12, T76-1, V76-14, T76-14, T76-12/2 and *T. harzianum* TM2/1) showed antagonistic activity against the mycelial growth of *C. oryzae* with inhibition rate more than 80% on dual culture plate assay. The antagonists were identified into 2 species as follows: *T. asperellum* (T76-12 and V76-12) and *T. spirale* (V76-12, T76-1 and T76-12/2) by morphology characteristics and molecular techniques. Electron microscope observation showed that mode of action of the six isolates were covered and coiled around *C. oryzae*, while *S. hygroscopicus* NR 8-2 caused abnormal shaped of *C. oryzae* hyphal tip. *T. spirals* T76-1 and *T. harzianum* TM2 / 1 produced chitinase and beta-1,3-glucanase enzymes to degrade fungal cell wall and produced volatile (alcohol group) to inhibit mycelial growth of *C. oryzae*. Three isolates (*T. harzianum* TM2 / 1, *T. spirals* T76-1 and *S. hygroscopicus* NR 8-2) induced the activities of the plant defense enzymes including polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) and phenylalanine ammonia lyase (PAL). Therefore, these isolates were selected to develop

to emulsion formulation. In efficiency test showed that all formulations, storage at 10° C increased the shelf-life in comparison with room temperature. In nursery experiments, the 4 formulations showed effective in reducing disease incidence which did not significantly differ from chemical fungicide (prochloraz).

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิมันท์ พรสุริยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง และการแก้ไขจุดบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. วสันต์ เพชรรัตน์ และ ดร. ธัญชนก ไชยรินทร์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาชี้แนะแนวทาง ให้คำปรึกษา อันเป็นประโยชน์ต่อการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ และบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นริศ ท้าวจันทร์ ให้คำปรึกษาแนวทางอันเกิดประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณบุคลากรภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่าน ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทั้งด้านวัสดุ อุปกรณ์ ในการทำวิทยานิพนธ์ และความช่วยเหลือทางด้านงานธุรการ

ขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ และทุกคนในครอบครัวต้นติพลานนท์ ผู้เป็นแรงผลักดัน และเป็นกำลังใจในการจัดทำวิทยานิพนธ์ รวมถึง พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

อรณิชา ต้นติพลานนท์

(10)

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(12)
รายการตารางภาคผนวก	(14)
รายการภาพภาคผนวก	(15)
บทที่ 1	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	13
บทที่ 2	14
วัตถุประสงค์อุปกรณ์และวิธีการ	14
บทที่ 3	27
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
บทที่ 4	52
สรุปผลการทดลอง	52
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	62
ภาคผนวก ก	63
ภาคผนวก ข	65
ภาคผนวก ค	74
ประวัติผู้เขียน	79

รายการตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เชิงการค้าที่ได้จากรา <i>Trichoderma</i> spp.	10
ตารางที่ 2 สารประกอบของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน	24
ตารางที่ 3 ราปฏิบั้กษที่แยกได้จากใบปาล์มน้ำมัน	27
ตารางที่ 4 การระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาและหมายเลขของรา <i>Trichoderma</i> ที่เก็บในฐานข้อมูล GenBank	30
ตารางที่ 5 การยับยั้งเส้นใยรา <i>Curvularia oryzae</i> ด้วยสารระเหยจากราปฏิบั้กษ	37
ตารางที่ 6 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งรา <i>Curvularia oryzae</i> ด้วยน้ำเลี้ยงราปฏิบั้กษโดยวิธี poison food technique	40
ตารางที่ 7 ระดับความรุนแรงการเกิดโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันจากการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิบั้กษ	41
ตารางที่ 8 การคัดเลือกราปฏิบั้กษจากการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ	45
ตารางที่ 9 ระดับและดัชนีการเกิดโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน หลังทดสอบด้วยสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน	51

รายการภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	โรคใบจุดบนใบต้นกล้าปาล์มน้ำมัน	4
ภาพที่ 2	วงจรการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากรา <i>Curvularia oryzae</i> ในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน	6
ภาพที่ 3	การทดสอบ dual culture เพื่อควบคุมเชื้อ <i>Curvularia oryzae</i>	16
ภาพที่ 4	เกณฑ์ระดับการประเมินการเกิดโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน 6 ระดับ	21
ภาพที่ 5	การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จด้วยวิธี agar diffusion method	25
ภาพที่ 6	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยรา <i>Curvularia oryzae</i> ด้วยวิธีการ dual culture	28
ภาพที่ 7	ลักษณะโคโคนิเดียรา <i>Trichoderma</i> spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	31
ภาพที่ 8	การจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	33
ภาพที่ 9	เส้นใยรา <i>Curvularia oryzae</i> เลี้ยงร่วมกับราปฏิปักษ์สองภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	34
ภาพที่ 10	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และเบตา-1,3-กลูคาเนส	36
ภาพที่ 11	ผลของสารระเหยที่ผลิตโดยราปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	37
ภาพที่ 12	GC-MS chromatography ของสารระเหยจากรา <i>Trichoderma spirale</i> T76-1	39
ภาพที่ 13	การยับยั้งรา <i>Curvularia oryzae</i> ด้วยน้ำเลี้ยงราปฏิปักษ์ทดสอบโดยวิธี poison food technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน	40
ภาพที่ 14	ประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการยับยั้งโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน	42
ภาพที่ 15	กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่วัดจากใบปาล์มน้ำมันในระยะเวลา 6 วัน	44
ภาพที่ 16	สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน	46
ภาพที่ 17	อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 เดือน	48

รายการภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 18 ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันในการยับยั้งการเจริญของรา <i>C. oryzae</i> เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 เดือน	50
ภาพที่ 19 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จในการควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากรา <i>C. oryzae</i> บนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน	51

รายการตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางภาคผนวกที่ 1 ประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ที่แยกจากใบปาล์มน้ำมันในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา <i>Curvularia oryzae</i>	65
ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ราปฏิปักษ์ผลิต	67
ตารางภาคผนวกที่ 3 ปริมาณเอนไซม์ไคติเนสที่ราปฏิปักษ์ผลิต	67
ตารางภาคผนวกที่ 4 องค์ประกอบสารระเหยที่ปลดปล่อยจากรา <i>Trichoderma spirale</i> T76-1	68
ตารางภาคผนวกที่ 5 ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 6 เดือน	71
ตารางภาคผนวกที่ 6 ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน	72
ตารางภาคผนวกที่ 7 อัตราการรอดชีวิตของราปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส	72
ตารางภาคผนวกที่ 8 อัตราการรอดชีวิตของราปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง	73

(15)

รายการภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานกลูโคส และ N-Acetyl-D-glucosamine

หน้า

66

บทที่ 1

บทนำ

บทนำตั้งเรื่อง

จากแผนยุทธศาสตร์อุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันปี 2547 – 2572 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร มีการส่งเสริมให้ประเทศไทยเพิ่มผลผลิตน้ำมันปาล์มดิบให้เพียงพอต่ออุตสาหกรรมแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่า โดยเฉพาะการนำน้ำมันปาล์มผลิตเป็นไบโอดีเซลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันดีเซล และเพิ่มความสามารถในการแข่งขันส่งออกปาล์มน้ำมันในตลาดโลก ซึ่งในปัจจุบันอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทย การเพิ่มมูลค่าน้ำมันปาล์มให้สูงขึ้นยังไม่สามารถดำเนินการได้เนื่องจากผลผลิตปาล์มสดและน้ำมันปาล์มดิบยังไม่เพียงพอต่อการเกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่อง สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรจึงส่งเสริมให้เพิ่มพื้นที่การปลูกปาล์มน้ำมันในประเทศเพิ่มมากขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่ออุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันที่จะเกิดขึ้นต่อไป (ศิริวรรณ ประเสริฐฐานนท์ และสุดาร์ตน์ เตชะศรีประเสริฐ, 2547) ซึ่งพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของไทยส่วนใหญ่อยู่ในภาคใต้ เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่ต้องอาศัยสภาพอากาศร้อนชื้นในการเจริญเติบโต

จากการส่งเสริมของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรส่งผลให้มีความต้องการต้นกล้าปาล์มน้ำมันในตลาดเพิ่มมากขึ้น ทำให้ต้องเพาะกล้าปาล์มน้ำมันในปริมาณมากต่อรอบการปลูก เกษตรกรผู้จำหน่ายต้นกล้าปาล์มน้ำมันในภาคใต้จึงประสบปัญหาการเกิดโรคระบาดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ได้แก่ โรคใบจุด โรคใบไหม้ โรคใบเน่า และโรครากเน่า (Pornsuriya *et al.*, 2013) โดยโรคที่มีการแพร่ระบาดรุนแรงที่สุดคือโรคใบจุด ซึ่งส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของต้นกล้า และหากเกิดอาการรุนแรงอาจส่งผลให้ต้นกล้าตายได้ การเกิดโรคส่วนหนึ่งมาจากกระบวนการดูแลระยะห่างของการวางถุงต้นกล้าที่ชิดเกินไป ส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคได้รวดเร็วและรุนแรง และรวมถึงวัชพืชบริเวณแปลงปลูกซึ่งเป็นที่อาศัยของราก่อโรค โรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันเกิดจากรา *Curvularia oryzae* ทำให้ปาล์มน้ำมันในระยะกล้ามีอาการใบจุดรุนแรง โดยลักษณะอาการในระยะแรกคือ เป็นจุดสีเหลืองขนาดเล็ก แผลขอบนูน รูปร่างกลมรี จากนั้นมีการขยายใหญ่ขึ้นเห็นเป็นวงแหวนสีน้ำตาลและแผลสามารถเชื่อมต่อกันจนมีขนาดใหญ่ หากเกิดรุนแรงอาจเหมือนอาการโรคใบไหม้ (Sunpapao *et al.*, 2014) การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคใบจุดใน

ปัจจุบันทำให้ต้นทุนในการเพาะปลูกสูงขึ้น เนื่องจากต้องฉีดพ่นทุกสัปดาห์ เพื่อควบคุมโรคไม่ให้มีการแพร่ระบาดของรุนแรงมากขึ้น (พิพัฒน์ เชียงหลิว และเกริกชัย ธนรักษ์, 2554) ส่งผลให้รา *C. oryzae* เกิดการต้านทานเนื่องจากต้องพัฒนาตัวเองให้ทนต่อสารกำจัดรา เกษตรกรจึงต้องหาสารกำจัดราชนิดใหม่ 2-3 ชนิดมาผสมกันเพื่อให้รา *C. oryzae* เกิดการต้านทานช้าลง ต้นทุนในการผลิตจึงสูงขึ้น รวมถึงการตกค้างของสารเคมีซึ่งส่งผลต่อเกษตรกรผู้ใช้สารเคมีและผู้บริโภค

ในปัจจุบันมีการใช้การควบคุมโดยชีววิธีเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไม่ส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ไม่ส่งผลกระทบต่อมนุษย์และยังไม่เกิดการตกค้างในระบบนิเวศ ในการศึกษาของสุภาภรณ์ พิทักษ์กิจ (2556) ได้ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากต้นปาล์มน้ำมัน ในจังหวัดต่าง ๆ ทางภาคใต้ (กระบี่ นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ตรัง ภูเก็ต ระนอง ชุมพร และสตูล) จำนวน 66 ตัวอย่าง นำมาแยกแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes ได้จำนวน 156 ไอโซเลท และทำการคัดเลือกราปฏิปักษ์ พบว่า *S. hygroscopicus* NR8-2 สามารถยับยั้งรา *C. eragostidis* ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 79.45 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น จิตรา กิตติโมรากุล (2557) ได้นำแบคทีเรีย *S. hygroscopicus* NR8-2 และรา *Trichoderma* spp. จำนวน 20 ไอโซเลททำการทดลองควบคุมรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมันเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีกำจัดรา พบว่า รา *T. harzianum* TM 2/1 และแบคทีเรีย *S. hygroscopicus* NR8-2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. oryzae* ได้ดีรองจากการใช้สารกำจัดราแมนโคเซบและโพรคลอราซ จึงแนะนำให้เกษตรกรใช้ราปฏิปักษ์ในการป้องกันการเข้าทำลายของ *C. oryzae* สลับกับการใช้สารกำจัดราเพื่อลดค่าใช้จ่ายและการต้านทานต่อสารกำจัดราของเชื้อสาเหตุโรค แต่ยังไม่มีการพัฒนาจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ให้อยู่ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ทางการค้า เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้งาน ยืดอายุการเก็บรักษา และลดกระบวนการในการเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ *S. hygroscopicus* NR8-2 และ *T. harzianum* TM 2/1 เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินบริเวณรากปาล์มน้ำมันจึงอาจยังไม่ใช่เชื้อที่ดีที่สุดสำหรับการควบคุมโรคใบจุดของกล้าปาล์มน้ำมัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากใบของปาล์มน้ำมันที่ไม่เป็นโรคมาศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *C. oryzae* เปรียบเทียบกับเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 และ *T. harzianum* TM 2/1 และคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *C. oryzae* มาเตรียมให้อยู่ในรูปสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันใช้ฉีดพ่นเพื่อยับยั้งโรคใบจุดของกล้าปาล์มน้ำมันต่อไป

ตรวจเอกสาร

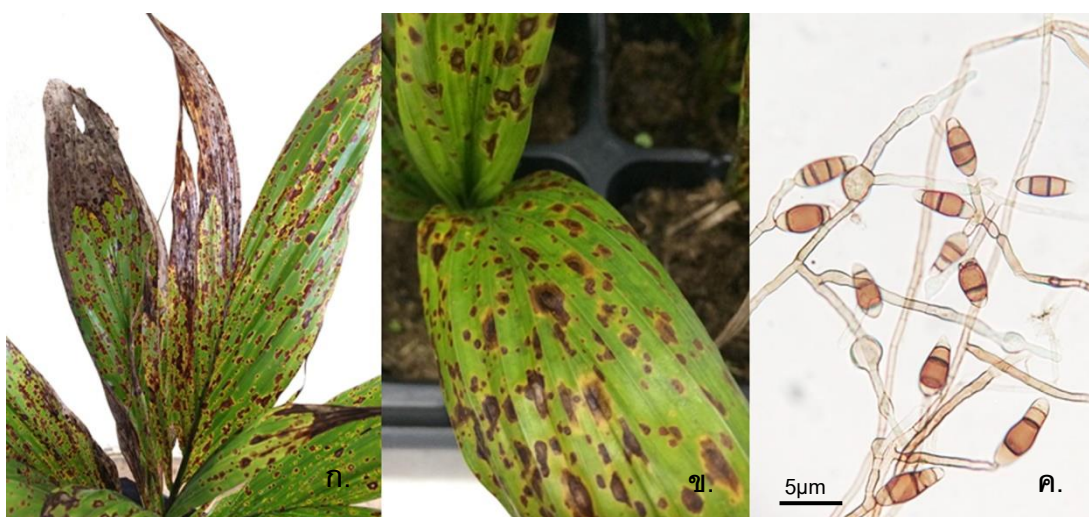
ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ชนิดยืนต้น มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา อยู่ในสกุล *Elaeis* ซึ่งสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจคือ *Elaeis guineensis* Jacq. (Hartley, 1998) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้น การเจริญเติบโตของปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้าต้องการน้ำ สารอาหาร ในปริมาณมาก เพื่อการเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ เนื่องด้วยต้องอาศัยอยู่ในสภาพอากาศร้อนชื้น จึงเหมาะแก่การเข้าทำลายของราสาเหตุโรคในปาล์มน้ำมัน โดยเฉพาะในปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้า ส่งผลให้มีการเข้าทำลายของโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) เกิดจากราหลายชนิด เช่น *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia* sp., *Glomerella* sp. และ *Melanconium* sp. (Aderungboye, 1977) โรคใบไหม้ (blight) เกิดจากรา *Pestalotiopsis* sp. (Pornsuriya et al., 2013) โรคใบจุด (leaf spot) เกิดจากรา *C. oryzae* ซึ่งเป็นโรคที่พบได้ในแปลงปลูกที่ขาดการจัดการดูแล เช่น การให้น้ำมากเกินไป (Sunpapao et al., 2014)

โรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

ต้นกล้าปาล์มน้ำมันต้องการน้ำในปริมาณมากกว่า 6.5 มิลลิเมตรต่อวัน เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาระบบราก และการละลายธาตุอาหารในดินเพื่อการเจริญเติบโต (Mutert et al., 1999) ซึ่งภาคใต้ของประเทศไทยมีปริมาณน้ำฝนมากกว่า 200 มิลลิเมตรต่อเดือน (สถานีอุตุนิยมวิทยาสงขลา, 2559) ทำให้ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูง ซึ่งเป็นสภาวะอากาศที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของต้นปาล์มน้ำมัน รวมถึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อราก่อโรคในต้นกล้าปาล์มน้ำมันเช่นกัน ปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้าจึงเสี่ยงกับโรคหลายชนิด (Kittimorakul et al., 2014) จากทั่วโลกพบว่าในต้นปาล์มน้ำมันมีโรคระบาดมากถึง 60 โรค โดยโรคส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อราส่งผลทำให้ต้นปาล์มน้ำมันชะงักการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตลดน้อยลง (Turner, 1981) ในระยะต้นกล้าพบโรคที่สำคัญคือ โรคใบจุด และใบไหม้ โดยมีการรายงานไว้ว่าในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบโรคใบจุดที่เกิดจากรา *C. eragrostidis* และโรคใบไหม้เกิดจากรา *Pestalotiopsis* spp. (Aderungboye, 1977) ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยพบโรคใบจุดในปาล์มน้ำมันระยะกล้าที่เกิดจากรา ได้แก่ รา *Pestalotiopsis palmarum* สาเหตุโรคใบจุดในระยะแรกพบมีลักษณะเป็นจุดแผลสีน้ำตาลต่อมาเมื่อเนื้อเยื่อยุบตัว บริเวณกลางแผลมีสีขาว น้ำตาลอ่อน และมีจุดสปอร์สีน้ำตาล (Labarca et al., 2006) รา *Cercospora elaeidis* สาเหตุโรคใบจุด *cercospora* พบอาการของโรคบนใบแสดงจุดสีเหลือง ขนาดเล็ก มีสีน้ำตาลตรงกลางและสีม่วง

บริเวณขอบแผลในระยะเริ่มต้น ในระยะต่อมาเกิดการผสานกันระหว่างแผลทำให้แผลมีสีเทา น้ำตาล ขนาดใหญ่และเปราะขาด และ รา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุด ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญที่สุดในปาล์มน้ำมันระยะกล้า (Sunpapao *et al.*, 2014) ในระยะแรกอาการเกิดกับใบอ่อน จุดที่ราเจริญมีสีเหลืองล้อมรอบ ในช่วงที่อากาศชื้น แผลจะขยายอย่างรวดเร็วผสานกันทำให้แผลมีสีน้ำตาลเข้มหรือดำขนาดใหญ่ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ พิพัฒน์ เขียงหลิว และเกริกชัย ธนรักษ์ (2554) รายงานว่าในพื้นที่จังหวัดกระบี่และสุราษฎร์ธานี ซึ่งเป็นแหล่งผลิตกล้าปาล์มน้ำมันที่สำคัญของประเทศไทย พบมีการระบาดของรา *C. oryzae* และ *C. eragrostidis* การระบาดของโรคใบจุดในระยะต้นกล้าปาล์มน้ำมันส่งผลให้ต้นกล้า เจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ ไม่แข็งแรง ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาเมื่อลงปลูกในแปลงและส่งผลในระยะยาวจนถึงช่วงให้ผลผลิต การดูแลจัดการในช่วงระยะต้นกล้าจึงมีความสำคัญต่อเกษตรกรผู้จำหน่ายต้นกล้าปาล์มน้ำมัน (ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช, 2548)



ภาพที่ 1 โรคใบจุดบนใบต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ก. ลักษณะอาการโรคใบจุด ข. ลักษณะแผล ค. รา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในปาล์มน้ำมัน

รา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุด

ลักษณะทั่วไปของราในสกุล *Curvularia* spp. เส้นใยมีสีน้ำตาล มีผนังกัน (septate hypha) สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spore) เรียกว่า โคนิเดียม (conidium) ภายในโคนิเดียมมีการสร้างผนังกันแบ่งเป็น 3 – 5 เซลล์ โดยเซลล์กลางมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ข้างเคียง (Sivanesan, 1987) ส่วนรา *C. oryzae* มีลักษณะแตกต่างจาก *Curvularia* ชนิดอื่น ๆ คือมีสปอร์เพียง 1 สปอร์บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) ไม่เป็นกลุ่มหรือเป็นช่อ สปอร์มีขนาด

ใหญ่ ภายในโคนิเดียมมีการสร้างผนังกันแบ่งเป็น 4 เซลล์ บริเวณเซลล์กลางของสปอร์ มีขนาด $24-40 \times 12-22 \mu\text{m}$ สีน้ำตาลเข้มหรือสีน้ำตาลมากกว่าเซลล์ข้างเคียง (Sunpapao et al., 2014) การจัดลำดับอนุกรมวิธานของเชื้อ *Curvularia oryzae* (Webster and Weber, 2007)

อาณาจักร (Kingdom): Fungi

ไฟลัม (Phylum): Ascomycota

ชั้น (Class): Dothideomycetes

อันดับ (Order): Pleosporales

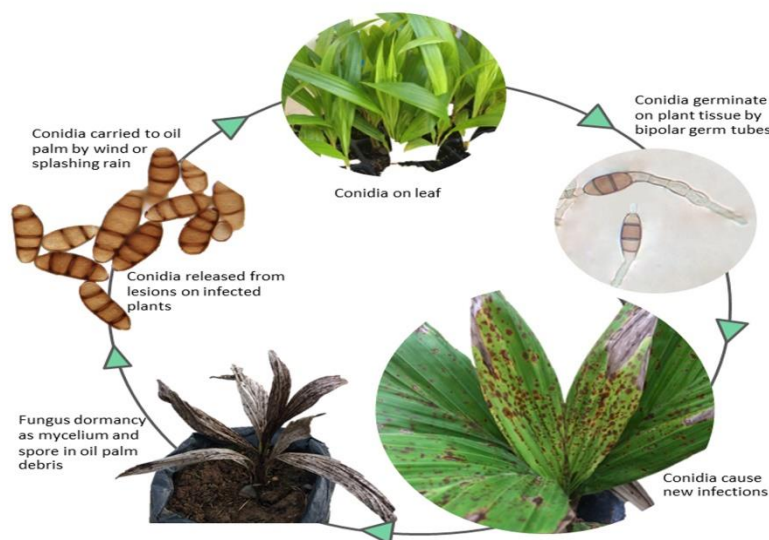
วงศ์ (Family): Pleosporaceae

สกุล (Genus): *Curvularia*

ชนิด (Species): *Curvularia oryzae* Bugnic.

การแพร่กระจายของรา *C. oryzae* สามารถแพร่กระจายได้โดยอาศัยลมและน้ำฝน เมื่อสปอร์สัมผัสกับผิวพืชจะงอกเส้นใย (germ tube) ออกมาทั้งสองด้าน (bipolar germination) สร้าง appressoria บนผิวพืชและเจริญเส้นใยเจาะเข้าสู่เซลล์พืช โดยเส้นใยเจริญอยู่ระหว่างเซลล์พืช ส่งผลให้เกิดอาการใบจุดมีรอยแผลเนื้อเยื่อตายเป็นจุด ๆ (ภาพที่ 2) ซึ่งรา *C. oryzae* มีการระบาดได้ดีในสภาพอากาศร้อนและมีฝนตก ส่งผลให้เกิดการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้รา *C. oryzae* ยังมีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายอินทรีย์สาร (saprophyte) ทำให้มีชีวิตรอดได้ในซากพืชและภายในดิน และมีวัชพืชเป็นพืชอาศัยได้ (จิตรา กิตติโมรากุล, 2557) โรคใบจุดจึงสามารถระบาดได้ตลอดหากขาดการจัดการที่ดีจากเกษตรกร

นอกจากนี้รา *Curvularia* spp. ยังมีพืชอาศัยอื่น ๆ มีรายงานว่ารา *C. oryzae* ก่อให้เกิดโรคเมล็ดต่างในข้าวบางสายพันธุ์ (Siddhardha et al., 2009) โดยเชื้อเข้าทำลายใน ระยะที่เมล็ดข้าวเริ่มเป็นน้ำนมช่วงที่ดอกข้าวเผล่จากกาบหุ้มรวง พบอาการเมล็ดต่างได้ชัดเจนในระยะใกล้เก็บเกี่ยว (นิรนาม, 2559) และพบว่ารา *C. oryzae* ก่อให้เกิดโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์ม น้ำมันซึ่งพบการระบาดรุนแรงในภาคใต้ของประเทศไทย (Pornsuriya et al., 2013)



ภาพที่ 2 วงจรการเกิดโรคใบจุดที่เกิดจากรา *Curvularia oryzae* ในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

การควบคุมรา *Curvularia* spp. ด้วยชีววิธี

จากปัญหาการแพร่ระบาดของโรคใบจุดในปาล์มน้ำมัน ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรให้มีค่าใช้จ่ายในการดูแลปาล์มน้ำมันมากขึ้น รวมถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการใช้สารกำจัดราในการควบคุมการแพร่ระบาด ทำให้เชื้อสาเหตุโรคใบจุด *C. oryzae* และราสาเหตุโรคอื่น ๆ เกิดการต้านทานต่อสารเคมีมากขึ้น ปัจจุบันจึงมีการศึกษาการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากไม่มีผลกระทบต่อเกษตรกรและสภาพแวดล้อม ไม่มีการตกค้างของสารพิษ และราสาเหตุโรคไม่เกิดการต้านทานต่อราปฏิปักษ์ ตัวอย่างการศึกษานำจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมรา *Curvularia* spp. ดังนี้

Ningthoujam และคณะ (2009) ได้นำเชื้อ *Streptomyces vinaceusdrappus* ไอโซเลท LSCH-10C, NRP1-14, NRP1-18 และ NRP1-26 ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับรา *C. oryzae* MTCC 2605 สาเหตุโรคข้าวในประเทศอินเดียด้วยวิธี dual culture พบว่าแบคทีเรีย *S. vinaceusdrappus* LSCH-10C สามารถควบคุมรา *C. oryzae* NRP 1-26 โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุด 60.00 เปอร์เซ็นต์

Prajapati และคณะ (2012) ได้ทำการทดลองควบคุมรา *C. eragrostidis* เชื้อสาเหตุโรคปลายใบไหม้ของต้นพลับพลึงด้วยรา *T. viride*, *T. longibrachyatum* และ *T. harzianum* พบว่า รา *T. viride* สามารถควบคุมรา *C. eragrostidis* ได้ดีที่สุดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 73.39 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *T. longibrachyatum* และ *T. harzianum* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 71.76 และ 67.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ราปฏิปักษ์

ราปฏิปักษ์เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกับพืชบางชนิดมีประโยชน์ส่งผลดีให้กับพืช แต่ต้องไม่ก่อให้เกิดโรคหรืออาการผิดปกติใด ๆ โดยมักอาศัยอยู่ในบริเวณผิวพืช (phylloplane) เนื้อเยื่อพืช (endophyte) รากพืช (mycorrhiza) บริเวณดินรอบรากพืช (rhizosphere) และ ซากพืชที่ย่อยสลายแล้ว (saprophyte) โดยมีการศึกษาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์เบื้องต้น เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคพืชได้

Bae และคณะ (2011) แยกเชื้อราจากต้นพืชในเขตร้อน ได้แก่ พืช *Banisteriopsis caapi*, *Theobroma cacao*, *Theobroma gileri* และ *Cola praecuta* ซึ่งราที่แยกได้เป็นราเอนโดไฟท์ เมื่อจัดจำแนกได้เป็นรา *T. ovalisporum*, *T. theobromicola*, *T. hamatum*, *T. stilbohypoxylis* และ *T. caribbaeum* var. *aequatoriale* จากนั้นนำไปทดสอบการเป็นราปฏิปักษ์พบว่าสามารถควบคุมรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคเน่าของพริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Rocha และคณะ (2011) คัดแยกราเอนโดไฟท์จากใบยางพาราในกลุ่มประเทศลาตินอเมริกาโดยพบว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้เป็นรา *Microsphaeropsis* sp., *Pestalotiopsis* sp. และ *Myrothecium* sp. เมื่อทดสอบการเป็นปฏิปักษ์พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Microcyclus ulei* สาเหตุโรคใบไหม้ของยางพารา

Shikha และ Harsh (2014) คัดแยกจุลินทรีย์จากบริเวณผิวพืชของต้น Akarkara (*Spilanthes oleracea*) แล้วนำจุลินทรีย์ที่ได้ทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Alternaria alternata* สาเหตุโรคใบจุด เบื้องต้นด้วยวิธี dual culture พบว่าราที่ให้ค่ายับยั้งสูงสุดคือ รา *T. harzianum* ISO-1, *T.harzianum* ISO-2 and *T. piluliferum* ตามลำดับ

กลไกการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อก่อโรคพืช

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีในปัจจุบันเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับ สามารถช่วยลดผลกระทบจากการใช้สารเคมี จึงสามารถพบการควบคุมโดยชีววิธีในการจัดการโรคพืชแบบผสมผสาน (Kumar et al., 2008) ในธรรมชาติจุลินทรีย์มีกลไกในการดำรงชีวิตหลากหลายรูปแบบ ซึ่งบางรูปแบบสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้ จึงเรียกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีกลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรคและสามารถควบคุมโรคพืชได้ว่า “จุลินทรีย์ปฏิปักษ์” โดยมีกลไกการควบคุมหรือยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชใน 4 ลักษณะดังนี้

การแข่งขัน (competition)

ราปฏิปักษ์สามารถเจริญได้รวดเร็วแข่งขันกับเชื้อก่อโรคพืช ทำให้เชื้อก่อโรคพืชไม่สามารถเจริญจนก่อให้เกิดโรคกับพืชได้ เช่น การหาอาหารได้ดีกว่าเชื้อก่อโรค เจริญครอบครองพื้นที่บนผิวพืชได้เร็ว ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ ส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้ตามปกติ ดังที่ Nemes และคณะ (1996) ทำการทดลองโดยเติมราปฏิปักษ์ลงในวัสดุที่ใช้ปลูก สัมมะเชื้อเทศ คีนไฉ่ พริก และฝรั่ง พบว่ารา *T. harzianum* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถเข้าครอบครองรากพืชได้รวดเร็วกว่าเชื้อสาเหตุโรค โดยมีการครอบครองพื้นที่ของราปฏิปักษ์ที่สุดคือ 76 – 100 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงรายงานของ Viterbo และคณะ (2007) ที่พบว่ารา *T. harzianum* T-35 สามารถยับยั้งรา *Fusarium* sp. ได้โดยการเจริญแข่งขันแย่งพื้นที่ผิวหน้าอาหารและพื้นที่บริเวณรอบราก (rhizosphere)

การทำลายชีวิตหรือการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis)

ราปฏิปักษ์สามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) สารปฏิชีวนะ (antibiotic) และสารปฏิชีวนะชนิดที่ระเหยได้ (volatile antibiotic) (Dennis and Webster, 1971) ทำให้โรคพืชลดลง Lorito และคณะ (1993) รายงานว่ารา *T. harzianum* ไอโซเลท P1 สามารถสร้าง chitinolytic enzymes ที่ยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญของ germ tube ของราที่มีไคติน (chitin) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ โดยการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจะแปรผันตรงกับไคตินที่ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ รา *Trichoderma* spp. สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ (active compound) เพื่อใช้เป็นกลไกในการเป็นปฏิปักษ์ เช่น gliotoxin, harzianic acid, trichoviridin, viridin, viridiol และ alamethicins ซึ่งเป็นสารที่ทำงานร่วมกับเอนไซม์ต่าง ๆ ในการย่อยผนังเซลล์เป็นผลทำให้สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคพืชได้หลายชนิด (Benitez *et al.*, 2004; Woo and Lorito, 2007; Vinale *et al.*, 2008)

การเป็นปรสิต (parasitism)

ราปฏิปักษ์มีคุณสมบัติเป็นปรสิต สามารถเข้าไปเจริญภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่น เกาะดูดกินอาหาร และปล่อยเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (Chet *et al.*, 1990; Viterbo *et al.*, 2007) เช่น ไคติเนส โปรติเอส และ เบตา-1, 3 กลูคาเนส โดยเอนไซม์ดังกล่าวส่งผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อสาเหตุโรค เอนไซม์ไคตินเนสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของโครงสร้างผนังเซลล์เชื้อรา (Whipps, 2001) และเอนไซม์เบตา-1, 3 กลูคาเนสยังสามารถทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อราเกิดการเสื่อมสภาพส่งผลให้การ

เจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์หยุดชะงัก (Benítez *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2007) โดยกลไกดังกล่าวช่วยลดการเกิดโรคให้กับพืชและยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้อีกด้วย สอดคล้องกับการรายงานดังต่อไปนี้

Elad และคณะ (1980) รายงานว่ารา *T. harzianum* เป็นปรสิตกับรา *Rhizoctonia solani* โดยการสร้างเส้นใยเข้าไปใกล้เส้นใยรา *R. solani* แล้วพันรัด และเจริญแทงเข้าสู่ภายใน ส่งผลให้เส้นใยรา *R. solani* หยุดชะงักการเจริญ

Sun และคณะ (2006) รายงานว่า เอนไซม์เบตา-1, 3 กลูคาเนส ที่ได้จากรา *Chaetomium* sp. สามารถทำลายผนังเซลล์ของรา *Rhizoctonia solani*, *Gibberella zeae*, *Fusarium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Phoma* sp. ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในพืช

การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรค (induced host resistance)

ราปฏิปักษ์สามารถชักนำ หรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้โดยการสร้างเอนไซม์ที่มีผลต่อการการออกซิไดซ์ ผลิตและส่งสัญญาณให้พืชผลิตกรดซาลิไซลิกเพิ่มขึ้นเพื่อครอบคลุมในบริเวณที่ติดเชื้อให้ระงับการแพร่ของเชื้อก่อโรคทำให้พืชเกิดความต้านทาน (Li and Steffens, 2002)

นลินา เหมสนิท และสุดฤดี ประเทืองวงศ์ (2552) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)) *Pseudomonas fluorescens* SP007s ที่ได้แยกจากบริเวณรอบรากต้นกะหล่ำดอก สามารถชักนำต้นคะน้าให้เกิดความต้านทานต่อโรคขอบใบทองที่เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Howell (2003) กล่าวว่ารา *T. harzianum* T-203 ที่แยกได้จากต้นกล้าแตงกวาในระบบไฮโดรพอนิกส์มีผลทำให้ต้นกล้ามีการตอบสนองต่อการป้องกันโรคพืชที่เกิดขึ้นในรากและใบ เมื่อตรวจสอบพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และโคติเนสเพิ่มขึ้นอย่างมาก

Christopher และคณะ (2010) พบว่ารา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นให้ต้นมะเขือเทศสร้างเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase; PPO) เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase; POD) และเอนไซม์ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine ammonia-lyase; PAL) ต่อการตอบสนองด้านต้านทานต่อรา *Fusarium oxysporum* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่า

สูตรสำเร็จของราปฏิปักษ์

ปัจจุบันราปฏิปักษ์ มีการพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบสารชีวภัณฑ์หลายรูปแบบ เช่น แบบแกรนูล แบบเม็ด แบบผง และแบบน้ำ เพื่อให้สะดวกในการนำไปใช้ ซึ่งสามารถเลือกซื้อได้ในท้องตลาดทั่วไป เช่น เชื้อ *S. griseoviridis* ชื่อการค้าคือ Mycrotop[®] เชื้อ *B. subtilis* มีชื่อการค้า ลาร์มินา[®] และเชื้อ *T. harzianum* ชื่อการค้าคือ F-stop[®] เป็นต้น การผลิตสูตรสำเร็จในปัจจุบันมีการผลิตในรูปแบบชนิดผงเพื่อนำไปเป็นหัวเชื้อในการเพิ่มปริมาณเชื้อปฏิปักษ์ และนำไปผสมน้ำเพื่อใช้ฉีดพ่นต่อไป รวมถึงรูปแบบชนิดน้ำที่สามารถผสมน้ำแล้วฉีดพ่นได้ทันที ทำให้การนำราปฏิปักษ์ไปใช้ในปัจจุบันมีความสะดวกมากขึ้น ประมาณ 90% ของสูตรสำเร็จราปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชใช้สายพันธุ์ *Trichoderma* sp. เช่น *T. harzianum*, *T. virens* และ *T. viride* (Kaewchai *et al.*, 2009) โดยส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบ แกรนูลและผง (Fravel, 2005; Jin and Custis, 2011) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เชิงการค้าที่ได้จากรา *Trichoderma* spp.

ชื่อการค้า	สายพันธุ์	โรคพืช/เชื้อสาเหตุโรค	รูปแบบผลิตภัณฑ์	ผู้ผลิต
Binab T WG	<i>T. harzianum</i>	Fungi causing wilt, root rot	Wetable powder	Bio-
Bineb T Pellet	<i>T. polysporum</i>	wood decay	Granules pellets	Innovation, Sweden
Bineb T Vector				www.algonet.se/~binab/index2.html
Bineb TF WP				
Bioderma	<i>T. viride</i>	<i>Sclerotinia</i> , <i>Rhizoctonia</i>	Wetable powder	Biotech International Ltd., India www.biotech-int.com
Bioderma-H	<i>T. harzianum</i>	<i>Phytophthora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Cercospora</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Ascochyta</i> , <i>Macrophomina</i> , <i>Myrothecium</i> , <i>Ralstonia</i>	Wetable powder	Biotech International Ltd., India www.biotech-int.com
Biofungus	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> spp., <i>Fusarium</i>	Verticillium Granule Wetable powder	Grondortsmettinge n deCuester n. v., Belgium
Fungi-Killer	<i>T. harzianum</i>	<i>Phytophthora</i> , <i>Fusarium</i>	Powder	Bangkok Organic Compost Ltd. Thailand

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อการค้า	สายพันธุ์	โรคพืช/เชื้อสาเหตุโรค	รูปแบบผลิตภัณฑ์	ผู้ผลิต
Promote	<i>T. harzianum</i> <i>T. viride</i>	<i>Pythium</i> <i>Rhizoctonia</i> <i>Fusarium</i>	Wetable powder	JH Biotech Inc., Ventura, CA, USA www.jhbiotech.com
RootShield PlantShield	<i>T. harzianum</i> Strain T-22	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Sclerotinia</i>	Granules and Wetable powder	Bioworks, Inc. NY. USA www.bioworksbioc ontrol.com
Sentinel®	<i>Trichoderma</i> spp. Strain LC52	<i>Botrytis cinerea</i>	Wetable powder	Agrimms Technologies Ltd, www.vinevax.com
Trichoma®	<i>T. viride</i>	fungi causing wilt, root rot	powder, liquid	V. J. AGRO, Co., Ltd. India
Trichodex Fungal	<i>T. harzianum</i> T-39	diseases e.g. <i>Botrytis cinerea</i> <i>Colletotrichum</i> , <i>Monilinia</i> <i>laxa</i> , <i>Plasmopara viticola</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	Wetable powder	Makhteshim-Agan, DeCeuster, Belgium
Vinevax™	<i>Trichoderma</i> spp.	Wood-infecting fungal pathogens of vineyard, orchard, ornamental trees, and vines	Wetable powder	Agrimms Technologies Ltd, www.vinevax.com

การผลิตสูตรสำเร็จรูปแบบอิมัลชัน

อิมัลชัน (emulsion) คือผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย ของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ไม่สามารถละลายเข้ากันได้ ซึ่งสามารถนำมารวมกันได้โดยมีตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) เป็นตัวผสมของเหลวทั้งสองให้สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกันได้ หากนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีลักษณะเป็นหยดขนาดเล็กแบ่งเป็น 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคภายใน (internal or dispersed phase) กระจายตัวแทรกอยู่ใน ของเหลวอีกชนิดหนึ่ง เรียก วัฏภาคภายนอก (external or continuous phase) โดยขนาดของวัฏภาคนั้นให้สีและความขุ่นผลิตภัณฑ์แตกต่างกัน ลักษณะอิมัลชัน มี 4 ลักษณะดังนี้คือ

วิภาคขนาดเล็กกว่า 0.05 ไมครอน มีลักษณะโปร่งใส (transparent)

วิภาคขนาด 0.05 - 0.10 ไมครอน มีลักษณะขุ่นหรือโปร่งแสง (translucent)

วิภาคขนาด 0.10 - 1.00 ไมครอน มีลักษณะสีขาวอมฟ้า

วิภาคขนาดใหญ่กว่า 1.00 ไมครอน มีลักษณะขุ่นขาวทึบ

โดยส่วนใหญ่ที่พบในปัจจุบันผลิตภัณฑ์อิมัลชัน มักมีลักษณะขุ่นคล้ายน้ำมัน ซึ่งมีทั้งรูปแบบชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O) และ น้ำมันในน้ำ (O/W) อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) มีวิภาคภายในเป็นน้ำ วิภาคภายนอกเป็นน้ำมันพบอิมัลชันชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากอิมัลชันชนิดนี้ค่อนข้างเหนียวและล้างน้ำออกยาก ส่วนอิมัลชันชนิด น้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) มีวิภาคภายในเป็นน้ำมัน วิภาคภายนอกเป็นน้ำ จึงมีความเหนียวน้อยกว่า มีการกระจายตัวดี โดยมีการนำสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันมาปรับใช้กับการเกษตรโดยนำจุลินทรีย์มาพัฒนาให้อยู่ในรูปอิมัลชันเพื่อรักษาการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ดังกล่าวงานวิจัยดังต่อไปนี้

Batta (1999; 2004) ผลิตสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันของรา *Trichoderma* sp. ด้วยน้ำมันคาโนล่า (rape-seed, canola, *Brassica napus*) เพื่อใช้ในการควบคุมรา *Botrytis cinerea* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าในแอปเปิ้ล และได้พัฒนาสูตรอิมัลชันโดยปรับใช้น้ำมันมะพร้าวร่วมกับน้ำมันถั่วเหลืองทำให้มีความเหนียวและความคงตัวที่ 93%

Mbarga และคณะ (2014) ผลิตสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันของรา *T. asperellum* โดยใช้น้ำมันถั่วเหลือง น้ำตาลกลูโคสร่วมกับสาร emulsifier เพื่อใช้ควบคุมโรคผลดำในโกโก้ ที่เกิดจากรา *Phytophthora megakarya* โดยรา *T. asperellum* อิมัลชันสามารถควบคุมโรคผลดำในโกโก้ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี และเมื่อตรวจสอบพบว่ารา *T. asperellum* สามารถคงตัวอยู่ได้ในต้นโกโก้

Pornsuriya และ Sunpapao (2014) ผลิตสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันของเชื้อ *Streptomyces philanthi* RL-1-178 โดยผสมน้ำมันมะพร้าวเข้ากับน้ำมันถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการควบคุมโรครากและต้นเน่าที่เกิดจากรา *Sclerotium rolfsii* ของต้นพริก ซึ่งสามารถควบคุมโรคได้ดี แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม

Ahamedemujtaba และ Kulkarni (2017) ได้ผลิตสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน เพื่อควบคุมโรคใบจุดและราสนิมในต้นถั่วลิสง พบว่าสูตรที่ผลิตด้วยน้ำมันคาโนล่าผสมกลีเซอรอล สามารถยืดอายุของสปอร์รา *Trichoderma harzianum* ได้นานขึ้น 12 เดือน และสามารถควบคุมโรคได้ดีอย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ได้รา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของกล้าปาล์มน้ำมัน
2. เพื่อทราบชนิดของรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากรา *C. oryzae*
3. เพื่อให้ได้สูตรสำเร็จของรา *Trichoderma* spp. ใช้ในการควบคุมโรคใบจุดของกล้าปาล์มน้ำมัน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและแยกราบปฏิบัติ

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันทางใบที่ 17 ช่วงใบเพสลาด เลือกเก็บใบที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่แสดงอาการของโรคใด ๆ จากอำเภอ คลองหอยโข่ง และภายในแปลงเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา นำมาแยกราจากเนื้อเยื่อใบ (endophyte)

1.1 การแยกราจากเนื้อเยื่อใบ

ทำการแยกราด้วยวิธี tissue transplanting (ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang *et al.*, 2014) นำตัวอย่างมาล้างทำความสะอาด โดยสุ่มตัดชิ้นส่วนใบปาล์มน้ำมัน ขนาด 1x1 เซนติเมตร ส่วนเส้นกลางใบตัดเป็นชิ้นยาว 1 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วย 70%เอทานอล เป็นเวลา 2 นาที แล้วแช่ใน 5% คลอโรกซ์ เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ซับให้แห้ง ด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อ นำไปวางในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA, Himedia) เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตรวจสอบเชื้อที่ติดอยู่บริเวณผิวพืช (หากมีเชื้อที่เจริญเหมือนกับในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังกล่าวจะไม่เก็บเชื้อนั้น) จากนั้นย้ายไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จานใหม่บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 – 30 °C) สังเกตเชื้อที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อ ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน แยกให้ได้ เชื้อบริสุทธิ์ ตัดส่วนปลายเส้นใยย้ายลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแก้วที่ อุณหภูมิ 10 °C เพื่อนำเชื้อที่ได้ไปศึกษาต่อไป

1.2 การแยกราจากผิวใบ

นำตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันมาแยกราด้วยวิธี dilution pour plate โดยสุ่มตัด ชิ้นส่วนใบปาล์มน้ำมัน 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/ นาที นาน 30 นาที ทำการเจือจางเป็นลำดับ ๆ ละ 10 เท่า (ten fold serial dilution) ดูดสารแขวนลอยที่ 10^{-6} และ 10^{-7} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทำการ pour plate ด้วยอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 – 72 ชั่วโมง แยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว ย้ายลงในหลอดอาหารเลี้ยง PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 °C

2. การคัดกรองราปฏิบัติเบื้องต้น

2.1 การเตรียมเชื้อ

นำราก่อโรค *C. oryzae* เชื้อที่แยกได้จากข้อ 1 และราปฏิบัติ *T. harzianum* TM.2/1 และแบคทีเรีย *S. hygroscopicus* NR8-2 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Culture

Collection of Pest Management Department คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ก่อนการนำไปทดลอง

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Curvularia oryzae*

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ด้วยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นส่วนของเชื้อทดสอบ ใช้เข็มเย็บลงไฟ ย้ายชิ้นส่วนของบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร และใช้ cork borer ขนาดเดียวกันตัดชิ้นส่วนของ *C. oryzae* ใช้เข็มเย็บลงไฟ ย้ายชิ้นส่วนของบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในทิศตรงข้ามกับเชื้อทดสอบ และห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 3 ข)

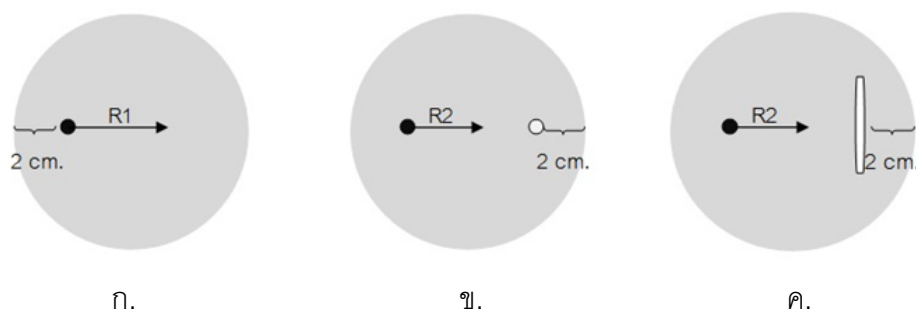
การทดสอบ *S. hygroscopicus* NR8-2 นำเชื้อมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นส่วนของ *C. oryzae* ใช้เข็มเย็บลงไฟ ย้ายชิ้นส่วนของบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยให้อยู่ในทิศตรงข้ามกับเชื้อทดสอบ ซึ่งห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร (ภาพที่ 3 ค) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบและเชื้อสาเหตุโรค โดยทำการวัดขนาดรัศมีของเชื้อสาเหตุโรค นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสมการ (Rahman *et.al.*,2009)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

R_1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R_2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's Multiple Comparison test ที่ $P \leq 0.05$ คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 3 การทดสอบ dual culture เพื่อควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* ก. ชุดควบคุม
 ข. ชุดทดสอบกลุ่มธัญพืช และ ค. ชุดทดสอบกลุ่มแอคติโนมัยซีท

3. การจำแนกชนิดของราปฏิบัติ

3.1 การจำแนกชนิดราปฏิบัติด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* มาจำแนกชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับลักษณะที่สังเกตได้จากหนังสือ Illustrated genera of imperfect fungi (Barnett and Hunter, 1990) และหนังสือ Compendium of soil fungi (Domsch and Gams, 1993)

3.2 การจำแนกชนิดราปฏิบัติด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

3.2.1 การสกัด DNA ของราปฏิบัติ

ทำการเพาะเลี้ยงราปฏิบัติที่ได้จากการคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการขูดเส้นใยราใส่ลงหลอดไมโครทิวป์ 1.5 มิลลิลิตร บดละเอียดให้แขวนลอยใน CTAB buffer บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 30 นาที และเติม chloroform isoamyl alcohol (24:1) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่ในหลอดไมโครทิวป์ 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เท isopropanol ออก ตกให้แห้ง 1 คืน เติมน้ำ deionized water 20 ไมโครลิตร (ดัดแปลงจากวิธีการของ Manamgoda *et al.*, 2012)

3.2.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อราที่บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS1-ยีน 5.8s-ITS2) ด้วยคู่ไพรเมอร์ PN3 forward 5'CGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC 3' กับ PN16 reverse 5' TCCCTTTCAACAATTCACG 3' (Neuveglise *et al.*, 1994) โดยการ

ผสมส่วนต่าง ๆ ได้แก่ forward primer 1 ไมโครลิตร, reverse primer 1 ไมโครลิตร, DNA template 2 ไมโครลิตร, Dream Taq Mastermix (Thermo Scientific™) 25 ไมโครลิตร, Rnase - free water 21 ไมโครลิตร รวม 50 ไมโครลิตร ในหลอด PCR tube จากนั้นนำเข้าเครื่อง BIO-RAD T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ตั้งเวลาและอุณหภูมิดังนี้ Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ Extension ขั้นสุดท้าย ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้เครื่อง UV transilluminator (GenedireX, Taiwan)

3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์จากเทคนิค PCR ที่ได้ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MACROGEN ประเทศเกาหลีใต้ นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) และทำการยืนยันชนิดของราปฏิบัติกับผลที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4. การคัดกรองราปฏิบัติจากคุณสมบัติต่าง ๆ

4.1 ปฏิสัมพันธ์ของราปฏิบัติและเชื้อสาเหตุโรคมายไตกล้ามเนื้อจลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เลี้ยงรา *C. oryzae* ร่วมกับราปฏิบัติที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 2.2 ตามภาพที่ 3 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะรูบนบริเวณที่เส้นใยราเจริญมาซ้อนทับกัน หรือบริเวณเส้นใยรา *C. oryzae* หากราปฏิบัติไม่เจริญ หรืออาจสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้ง นำชิ้นรูนที่เจาะได้แช่ลงใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer นาน 4 ชั่วโมง ล้างด้วย 1 M phosphate buffer 4 ครั้ง แล้วจึงนำไปดึงน้ำออก (dehydrate) ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้น 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยแช่ที่ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที จากนั้นนำชิ้นรูนไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง critical point drier เมื่อได้ชิ้นรูนตัวอย่างที่แห้งแล้ว จึงนำไปติดบน stub ทำการเคลือบตัวอย่างด้วยอนุภาคทองคำ แล้วจึงนำไปศึกษาการเป็นปฏิบัติภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รุ่น Quanta 400, FEI, Czech Republic)

4.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ เบตา- 1,3 - กลูคาเนส

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์โดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นดูดน้ำเลี้ยงเชื้อกรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ (millipore filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Minisart, Sartorius stedim biotech) เพื่อให้ได้น้ำเลี้ยงราปฏิบัติ (culture filtrate) ใช้ในการวัดกิจกรรม

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วย 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959) ใช้ 2% colloidal chitin ใน phosphate buffers pH 7 เป็น substrate solution สำหรับวัดเอนไซม์ไคติเนส และ ใช้ 0.5% laminarin ใน sodium acetate buffer pH 5.0 เป็น substrate solution สำหรับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส โดยใช้น้ำเลี้ยงราปฏิบัติ 125 ไมโครลิตร ผสมด้วย substrate solution 125 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที จากนั้นเติม DNS 250 ไมโครลิตร หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือด 15 นาที แล้วจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ultraviolet-visible spectrophotometer (รุ่น UV 5300, metash, China) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร สำหรับเอนไซม์เบตา-1,3 กลูคาเนส และที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร สำหรับเอนไซม์ไคติเนส นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส และ N-Acetyl-D-glucosamine (ภาพภาคผนวกที่ 1)

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบตา-1,3 - กลูคาเนส 1 ยูนิต (unit, U) เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย laminarin เป็นกลูโคสได้ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ส่วนค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส 1 ยูนิต เป็นปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินได้เป็น N-Acetyl-D-glucosamine 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = (A)(1000) \times \frac{1}{(B)(C)(D)(E)} \times \text{dilution factor}$$

A = ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้และคำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน ของ N-acetylglucosamine หรือ กลูโคส (μg)

B = ปริมาณของสารละลายทั้งหมดที่ทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

C = มวลโมเลกุลของ N-acetyl d-glucosamine หรือ กลูโคส

D = เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (30 นาที)

E = ปริมาตรสารละลายในหลอดคววต (มิลลิลิตร)

Dilution factor = ความเข้มข้นของน้ำที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจวัด

4.3 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างสารระเหย

การคัดเลือกราปฏิบักษ์ที่สร้างสารระเหยยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ด้วยวิธี volatile extracellular metabolite test ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Dennis and Webster (1971) โดยเลี้ยงราปฏิบักษ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 ทั้ง 6 ไอโซเลท และรา *C. oryzae* บนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเปิดฝาและนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อปฏิบักษ์แต่ละไอโซเลท ประกบกับรา *C. oryzae* พันด้วย parafilm ในชุดควบคุมใช้จานอาหาร PDA ที่ไม่ได้เลี้ยงราปฏิบักษ์ใด ๆ ประกบแทน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีรา *C. oryzae* ในชุดทดสอบเมื่อรา *C. oryzae* ในชุดควบคุมเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำผลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's Multiple Comparison test ที่ $P \leq 0.05$ นำจุลินทรีย์ที่มีค่าการควบคุมได้สูงที่สุด ตรวจสอบการสร้างสารระเหยด้วยเครื่อง Gas chromatography mass spectrometer (GC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

4.4 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Curvularia oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงราปฏิบักษ์

ทำการทดสอบด้วยวิธี poison food technique (ดัดแปลงวิธีการจาก Schmitz, 1930) โดยเลี้ยงราปฏิบักษ์ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำอาหารเหลว PDB ที่มีการเจริญของจุลินทรีย์มากรองผ่านกระดาษกรองมิลลิพอร์ ขนาด 0.45 ไมครอน ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร แล้วทำการ pour plate ด้วยอาหาร PDA ลงไปในจานเลี้ยงเชื้อในปริมาณ 9 มิลลิลิตร เมื่ออาหารแข็งตัวใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา *C. oryzae* วางลงบนกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้อาหาร PDA ที่ไม่ได้ผสมน้ำเลี้ยงจุลินทรีย์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำไอโซเลทละ 4 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีรา *C. oryzae* ในชุดทดสอบและชุดควบคุม คำนวณการเจริญโดยใช้สมการเดียวกับข้อ 2.2 และวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's Multiple Comparison Test ที่ $P \leq 0.05$

4.5. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

นำต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 4 เดือน พันธุ์ ทรัพย์ มอ. 1 (สายพันธุ์อ่อนแอ) มาทำการพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของรา *C. oryzae* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อต้น ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสปอร์หรือเซลล์แขวนลอยของราปฏิปักษ์ ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อต้น พ่นลงข้างบนกล้าปาล์มน้ำมัน (จิตรา กิตติโมรากุล, 2557) สังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะการแสดงอาการใบจุด เปรียบเทียบผลกับเชื้อ *T. harzianum* TM2/1 และ *S. hygroscopicus* NR8-2 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) จำนวน 6 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 2 ต้น ตามกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธี 1 : ชุดควบคุม ฉีดพ่นน้ำกลั่นหนึ่งชาม้าเชื้อไม่มีการพ่นเชื้อ *C. oryzae*

กรรมวิธี 2 : ชุดควบคุม ฉีดพ่นเชื้อ *C. oryzae* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธี 3 : ฉีดพ่นเชื้อ *C. oryzae* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง และฉีดพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้

กรรมวิธี 4 : ฉีดพ่นเชื้อ *C. oryzae* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง และฉีดพ่นรา *T. harzianum* TM.2/1

กรรมวิธี 5 : ฉีดพ่นเชื้อ *C. oryzae* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง และฉีดพ่น *Streptomyces* sp. NR 8-2

กรรมวิธี 6 : ฉีดพ่นเชื้อ *C. oryzae* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง และฉีดพ่นด้วยสารเคมีโพคคอลลราสที่ความเข้มข้น 40 ppm

ประเมินระดับความรุนแรงของโรคด้วยเกณฑ์การประเมินการเกิดโรคใบจุดบนใบปาล์มน้ำมัน (ดัดแปลงจากวิธีการของ จิตรา กิตติโมรากุลและคณะ, 2557)

ระดับการประเมินการเกิดโรคใบจุดบนใบปาล์มน้ำมัน (ภาพที่ 4)

ระดับ 0 ไม่มีอาการใบจุดเลย

ระดับ 1 พบจุดขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร

ระดับ 2 มีจุดสีเหลืองเข้มอมส้ม ขนาด 1 – 2 มิลลิเมตร มีอาการ 1 – 2 % ของพื้นที่ใบ

ระดับ 3 มีจุดเนื้อเยื่อตาย ขนาด 5 มิลลิเมตรขอบแผลสีน้ำตาล มีอาการ 25 – 50 % ของพื้นที่ใบ

ระดับ 4 จุดเนื้อเยื่อตายเชื่อมต่อกันขนาดใหญ่ 1 – 2 เซนติเมตร มีอาการ 51 – 75 % ของพื้นที่ใบ

ระดับ 5 พื้นที่ใบมากกว่า 75% เป็นโรคในระยะสุดท้าย ใบบางส่วนตาย
คำนวณดัชนีการเกิดโรค (Cirulii and Alexander, 1966) ด้วยสมการดังนี้

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค (DSI)} = \frac{\Sigma d}{d \text{ max} \times n} \times 100$$

Σd = ผลรวมของระดับการเกิดโรคทั้งหมด

$d \text{ max}$ = ระดับการเกิดโรคที่รุนแรงที่สุด

n = จำนวนต้นกล้าปาล์มน้ำมันทั้งหมดที่ทดลอง

จากนั้นนำผลประเมินที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย

Tukey's Multiple Comparison test ที่ $P \leq 0.05$



ภาพที่ 4 เกณฑ์ระดับการประเมินการเกิดโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน 6 ระดับ

4.6. ประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ต่อการกระตุ้นการตอบสนองของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของราปฏิปักษ์ที่ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Sharma *et al.*, 2012) ลงบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ทั้ง 4 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุมฉีดพ่นน้ำกลั่น กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอย *S. hygroscopicus* NR8-2 กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยรา *T. spirale* T76-1 และกรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยรา *T. harzianum* TM 2/1 กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เก็บใบปาล์มน้ำมันทุกวันเป็นเวลา 6 วัน เพื่อนำไปใช้ในการวัดกิจกรรมของ

เอนไซม์ peroxidase(POD), polyphenol oxidase(PPO), และ phenylalanine ammonia lyase (PAL)

การเตรียมตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) สำหรับการวัดกิจกรรมเอนไซม์ สุ่มเก็บใบปาล์มน้ำมันที่มีการฉีดพ่นตามกรรมวิธีต่าง ๆ ทุกวัน เป็นเวลา 6 วัน นำมาแช่ทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งน้ำหนัก 1 กรัม บดในโกร่งโดยเติม 0.1 M phosphate buffer 3 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด จากนั้นดูดส่วนน้ำสีเขียวใส่ใน micro centrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/วินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงใส่ในหลอด micro centrifuge หลอดใหม่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.6.1. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Polyphenol oxidase (PPO)

นำเอนไซม์สกัดหยาบมาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PPO โดยปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลาย 0.03 M catechol (substrate) 0.1 มิลลิลิตร 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) น้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร และ เอนไซม์สกัดหยาบ 0.2 มิลลิลิตร ลงในควอร์ตคิวเวท (quartz cuvette) ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงจากนาที่ที่ 0 - 3 บันทึกผลที่ได้นำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ PPO วิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's Multiple Comparison Test ที่ $P \leq 0.05$

4.6.2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase (POD)

กิจกรรมของเอนไซม์ POD วัดโดยปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 1% O-Phenylenediamine (OPDA) ใน 70 % เอทานอล (substrate) 0.1 มิลลิลิตร 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) 2.0 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตร และ เอนไซม์สกัดหยาบ 0.2 มิลลิลิตร และ 0.3% H_2O_2 0.1 มิลลิลิตร ในควอร์ตคิวเวท นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงจากนาที่ที่ 0 - 3 บันทึกผลที่ได้นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's Multiple Comparison Test ที่ $P \leq 0.05$

4.5.3. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

กิจกรรมของเอนไซม์ PAL โดยปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 3 mM L- Phenylalanine (ใน 150 mM Tris HCL Buffer pH 8.5 ที่ 30 องศาเซลเซียส) น้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วจึงเติมเอนไซม์สกัดหยาบ 0.1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงจากนาที่ที่ 0 - 10 ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น

270 นาโนเมตร บันทึกผลที่ได้นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's Multiple Comparison Test ที่ $P \leq 0.05$

$$\text{เอนไซม์แอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{\Delta A}{d \times \epsilon \times b \times t}$$

ΔA = ค่าดูดกลืนแสง นาที่ที่ 3 ลบกับค่าดูดกลืนแสงนาที่เริ่มต้น (นาที่ที่ 0)

d = ปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้ต่อปริมาตรรวมทั้งหมด

ϵ = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (extinction coefficient)

b = ค่าความกว้างของคิวเวตที่ใช้ (เซนติเมตร)

t = เวลาที่ทำปฏิกิริยา (นาที่)

5. การผลิตสูตรสำเร็จของเชื้อราปฏิภักษ์ชนิดอิมัลชัน

การเตรียมสปอร์จุลินทรีย์

นำราปฏิภักษ์เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 วัน จากนั้นทำการชูดสปอร์บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแผ่นสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสปอร์ผสมด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และกรองผ่านผ้าขาวบางที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ได้สปอร์แขวนลอยในน้ำเพื่อนำไปใช้ในการผลิตสูตรสำเร็จ เชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 เลี้ยงในอาหารเหลว glucose yeast malt extract broth (GYMB) เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที่ นาน 10 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปใช้

สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Batta 2004) ประกอบด้วยส่วนผสมแบ่งเป็น 2 ส่วนได้แก่ วัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Homogenizer (รุ่น D-160, DLAB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 นาที ซึ่งส่วนที่เป็นน้ำประกอบด้วย น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่มีสปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดเลือกที่ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หรือน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 ผสมกับ spen 60 และกลีเซอริน ส่วนน้ำมันประกอบด้วยน้ำมันดอกคาโนล่าและทวิน 60 (อิมัลซิไฟเออร์) (ตารางที่ 2) ผสมเป็นเนื้อเดียว เก็บรักษาในขวดพลาสติกสีขาวขุ่นมีฝาปิด ทำการเปรียบเทียบอัตราการงอกของสปอร์ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28 – 30) และ 10 องศาเซลเซียส (ตู้เย็น)

ตารางที่ 2 สารประกอบของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน

สารประกอบ	สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน
วัฏภาคน้ำ ประกอบด้วย น้ำสปอร์จุลินทรีย์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^9 สปอร์ ต่อมิลลิลิตร หรือ น้ำเลี้ยงเชื้อ <i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i> NR 8-2 Spen 60 กลีเซอริน	40-45 % โดยปริมาตร 1-2 % โดยปริมาตร 3-5 % โดยปริมาตร
วัฏภาคน้ำมัน ประกอบด้วย น้ำมันดอกคาโนล่า สารอิมัลซิไฟเออร์ (ทวิน 20)	32-35 % โดยปริมาตร 15-18 % โดยปริมาตร

ที่มา: ดัดแปลงจาก Y. A. Batta (2004)

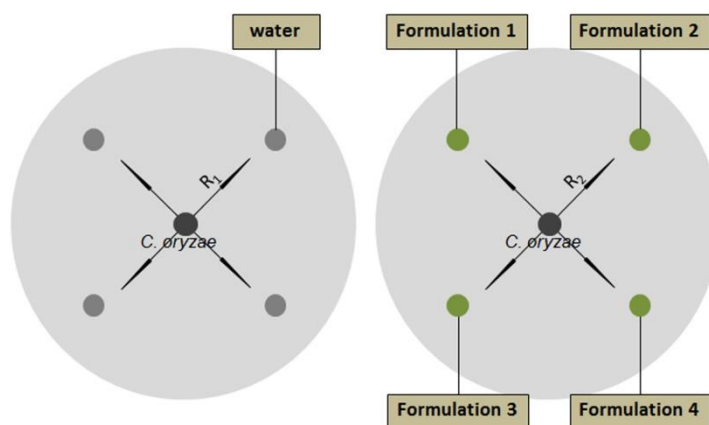
6. การทดสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อราปฏิบัตินในสูตรสำเร็จ ในสภาพอุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 10°C

ตรวจนับปริมาณสปอร์ราหลังการทำสูตรสำเร็จทันที โดยวิธี dilution pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นับการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หลังผ่านไป 36 ชั่วโมง ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ จากนั้นนำค่าเฉลี่ยการงอกของสปอร์ที่ได้วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติด้วย Tukey's Multiple Comparison Test ทดสอบทุก ๆ เดือน นาน 6 เดือน

7. การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จ หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 6 เดือน

ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จในการควบคุมรา *C. oryzae* หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 10°C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ด้วยวิธี agar well method โดยการละลายสูตรสำเร็จด้วยน้ำกลั่นหนึ่งชามื้อตามอัตราส่วน คือ 2 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1 ลิตร (Navaneetha *et al.*, 2015) เาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จำนวน 4 หลุม แล้วจึงนำสูตรสำเร็จที่เตรียมไว้ใส่ลงหลุม 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำขึ้นวุ้นที่มีรา *C. oryzae* วางลงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในชุดควบคุม ใส่ น้ำกลั่นหนึ่งชามื้อเชื้อแทนสูตรสำเร็จ สังเกตการเจริญของรา *C. oryzae* ในชุดควบคุมเจริญเต็มผิวหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของรา *C. oryzae* เชื้อสาเหตุโรคในชุดทดสอบ (ภาพที่ 5) นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เช่นเดียวกับข้อ 2 ทำการทดลอง

จำนวน 4 ซ้ำ และนำค่าเฉลี่ยที่ได้วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติด้วย Tukey's Multiple Comparison test



ภาพที่ 5 การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จด้วยวิธี agar diffusion method

R1 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R2 คือ รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

8. การประเมินประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของเชื้อราปฏิบัติการควบคุมโรคใบจุดของกล้าปาล์มน้ำมัน

ประเมินประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของเชื้อราปฏิบัติการควบคุมโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยใช้กล้าปาล์มน้ำมันพันธุ์ทรัพย์มอ. 1 อายุ 4 เดือน มาใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จ ทุกกรรมวิธีจะทำการฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยรา *C. oryzae* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ในการทดลองใช้สูตรสำเร็จ จำนวน 4 กรรมวิธีเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยรา *C. oryzae* ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. NR 8-2

กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสปอร์แขวนลอยรา *T. harzianum* TM.2/1

กรรมวิธีที่ 5 ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสปอร์แขวนลอยรา *T. spirale* T76-1

กรรมวิธีที่ 6 ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสปอร์แขวนลอยรา *T. harzianum* TM.2/1

+ *T. spirale* T76-1

กรรมวิธีที่ 7 ฉีดพ่นสารเคมีไพโรคลอราส

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ต้น ทำการฉีดพ่นสูตรสำเร็จและประเมินผลการเกิดโรคใบจุดโดยใช้ระดับการประเมินเช่นเดียวกับข้อ 7 ทุก ๆ 7 วัน นาน 1 เดือน จากนั้นนำผลประเมินเฉลี่ยที่ได้วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย Tukey's Multiple Comparison Test รวมถึงสุ่มเก็บใบปาล์มน้ำมันที่ผ่านการทดสอบสูตรสำเร็จมา ตรวจสอบการคงอยู่ของราปฏิปักษ์

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและแยกราปฏิปักษ์

จากการนำตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันที่เก็บมาจากอำเภอคลองหอยโข่งและภายในแปลงเกษตรคณะทรัพยากรธรรมชาติ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา จำนวน 25 ตัวอย่าง ผ่านการแยกทั้ง 2 วิธี สามารถแยกได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็น ราเอนโดไฟท์ 21 ไอโซเลท และราอีพิไฟท์ 5 ไอโซเลท (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากใบปาล์มน้ำมัน

Microorganisms	Isolates of Number ^{1/}
Endophyte	T76-1, T76-1/1, T76-1/2, T76-6, T76-12/1, T76-12/2, T76-12/3, T76-14, T76-15/1, T76-18/1, T76-18/2, V76-1, V76-6, V76-9, V76-12, V76-14, V76-15/1, V76-15/2, V76-18, V76-18/1, V76-23
Epiphyte	E875-9, E876-14, E976-4, E976-6, E976-23

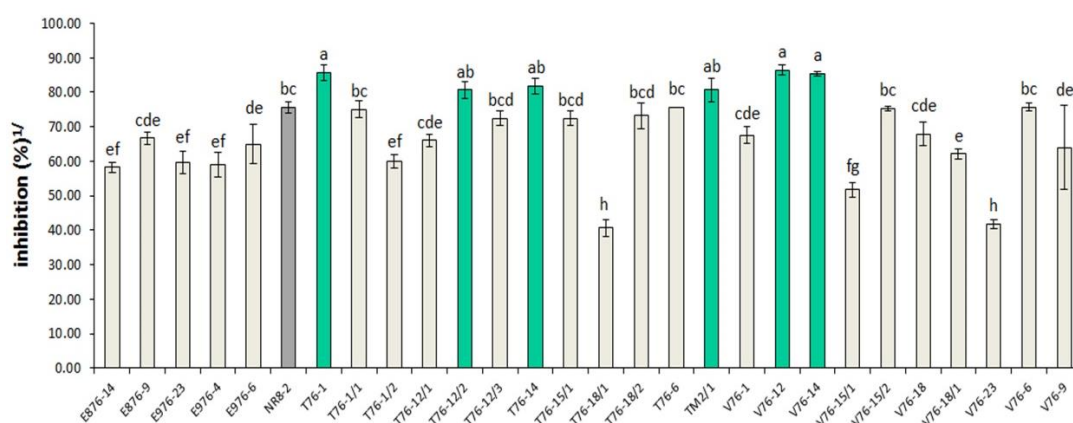
^{1/}T = ไอโซเลทที่แยกได้จากเนื้อเยื่อใบ, V = ไอโซเลทที่แยกจากเส้นกลางใบ, E = ไอโซเลทที่แยกจากบริเวณผิวใบ

การแยกจากใบปาล์มน้ำมัน สามารถแยกได้น้อยไอโซเลทเนื่องจากระหว่างการแยกได้ทำการคัดเลือกด้วยวิธี dual culture พบว่าราที่แยกได้สามารถยับยั้งรา *C. oryzae* ได้ดีหลายไอโซเลท ซึ่งเพียงพอต่อการนำมาคัดเลือกใช้เป็นราปฏิปักษ์ ราส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็นราเอนโดไฟท์ โดยราที่แยกได้มีโคโคโคนีเป็นสีเขียว เจริญได้รวดเร็วซึ่งเมื่อสังเกตลักษณะก้านชูสปอร์และ สปอร์คล้ายกับรา *Trichoderma* spp. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kubicek และคณะ (2011) ที่พบว่ารา *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตอยู่ในดินต่อมาในช่วงระยะหลังพบว่ามีการปรับตัวเป็นเอนโดไฟท์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นผลดีในการนำไปใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดบริเวณใบพืชหรือบริเวณเนื้อเยื่ออื่น ๆ เนื่องจากรา *Trichoderma* spp. สามารถปรับตัวเป็นเอนโดไฟท์คงอยู่ในเนื้อเยื่อพืชเพื่อควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราได้ดังรายงานของ Hanada และคณะ (2010) ทำการแยกเอนโดไฟท์จากเนื้อไม้ของต้นโกโก้สามารถแยกได้รา *T. martii* ซึ่งพบว่าเป็นสายพันธุ์ใหม่และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรคฝักเน่าดำของโกโก้ และ

สายทอง แก้วฉาย (2557) ที่รายงานไว้ว่า สามารถแยกราเอนโดไฟท์จากใบข้าวหอมกระดังงาได้มากถึง 93 ไอโซเลท แต่พบว่ามีเพียงรา *Trichoderma* sp. 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ของข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. การคัดกรองราปฏิปักษ์เบื้องต้น

จากการทดสอบความสามารถของราในการยับยั้งการเจริญของ *C. oryzae* โดยวิธี dual culture พบว่ามีราปฏิปักษ์จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ V76-12, T76-1, V76-14, T76-14, T76-12/2 และ TM2/1 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงกว่า 80 % โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 86.43, 85.71, 85.36, 81.79, 80.71 และ 80.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยรา *Curvularia oryzae* ด้วยวิธีการ dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ย ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test

จากการทดลองพบว่าราที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมันได้สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เป็นราที่แยกได้จากเนื้อเยื่อใบซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดถึง 86.43 % สามารถสร้างเส้นใยเจริญปกคลุมทับเส้นใยรา *C. oryzae* แข่งขันครอบคลุมพื้นที่อาหาร ได้อย่างรวดเร็ว สอดคล้องกับการทดลองของ จิตรา กิตติโมรากุล และคณะ (2557) ที่รายงานไว้ว่า *T. harzianum* TM.2/1 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมันได้ดีที่ 90.22% *Trichoderma* spp. เป็นเชื้อที่เจริญได้รวดเร็วสามารถเจริญปกคลุม และสร้างเส้นใยพักรัดเส้นใยของราสาเหตุโรคได้ (dos Reis Almeida *et al.*, 2007) และ Mishra (2010) ได้ทำการทดสอบการยับยั้งรา *Pythium*

aphanidermatum ด้วยรา *Trichoderma* spp. โดยใช้วิธี dual culture พบว่ารา *Trichoderma* spp. สามารถควบคุมการเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งของรา ทั้ง 6 ไอโซเลทไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.01$) จึงนำราปฏิบัติการทั้ง 6 ไอโซเลท และ เชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 ไปทดสอบประสิทธิภาพและกลไกในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย รา *C. oryzae* ต่อไป

3. การจำแนกชนิดของเชื้อราปฏิบัติการ

3.1 จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของราที่ได้จากการคัดเลือก (V76-12, T76-1, V76-14, T76-14 และ T76-12/2) ระบุได้เป็นราสกุล *Trichoderma* ทั้ง 5 ไอโซเลท เนื่องจากมีโคโลนีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม เจริญขยายโคโลนีอย่างรวดเร็ว เส้นใยมีผนังกัน มีสีใสหรือ สีเขียวอ่อนผนังเรียบ โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) มีการแตกกิ่งออกจากกิ่งหลักทั้งแบบเดี่ยว และแบบกลุ่มซึ่งมีความยาวแตกต่างกัน บริเวณปลายโคนิดิโอฟอร์มีการสร้างไฟอะไลด์ (phialide) โคนิเดียมีลักษณะเป็นเชลล์เดี่ยว มีสีเขียวทั้งผิวเรียบและขรุขระอยู่เป็นกลุ่มบริเวณ ไฟอะไลด์ ซึ่งสอดคล้องกับ Domsch และคณะ (1980) ได้จัดจำแนกเชื้อราสกุล *Trichoderma* spp. โดยอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โคลนี โคนิดิโอฟอร์ และ โคนิเดีย ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ ที่แยกมาจากดิน ซากพืช และวัตถุทางธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นรา *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์สามารถดำรงชีวิตโดยเป็นปรสิตในการพ่นรดเชื้อราก่อโรคพืชอื่น ๆ รา *Trichoderma* spp. จึงเหมาะสมแก่การนำไปศึกษาเป็นราปฏิบัติการ

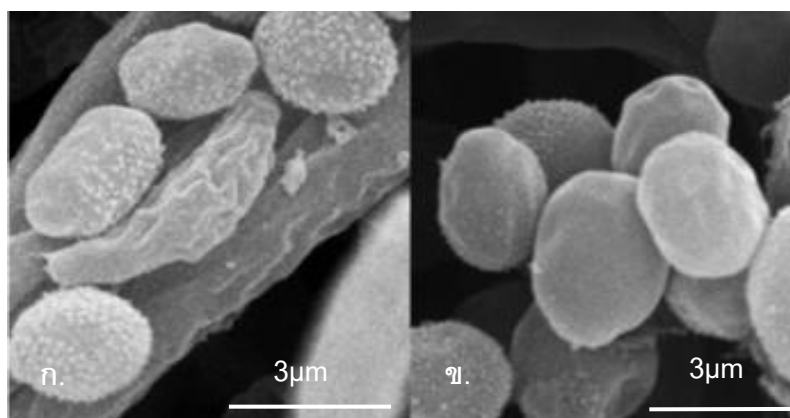
3.2 จำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

จากการนำเส้นใยราทั้ง 5 ไอโซเลททำการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS1 ยีน 5.8s และ ITS2 ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า ราปฏิบัติการไอโซเลท T76-14 และ V76-14 มีความใกล้เคียงกับรา *T. asperellum* และรา *T. viride* ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ ราปฏิบัติการ ไอโซเลท T76-1 และ V76-12 ใกล้เคียงกับรา *T. spirale* ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ และราปฏิบัติการไอโซเลท T76-12/2 มีความใกล้เคียงกับรา *Trichoderma* spp. ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่สามารถระบุชนิดได้ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาและหมายเลขของรา *Trichoderma* ที่เก็บในฐานข้อมูล GenBank

Isolate	morphology	Nucleotide BLAST	% identity	Nucleotide blast + morphology	Accession no.
T76-1	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Trichoderma spirale</i>	99%	<i>Trichoderma spirale</i>	LC158829
T76-12/2	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Trichoderma</i> sp.	99%	<i>Trichoderma spirale</i>	LC158830
T76-14	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Trichoderma asperellum</i>	99%	<i>Trichoderma asperellum</i>	LC158827
		<i>Trichoderma viride</i>			
V76-12	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Trichoderma spirale</i>	99%	<i>Trichoderma spirale</i>	LC158826
V76-14	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Trichoderma asperellum</i>	99%	<i>Trichoderma asperellum</i>	LC158828
		<i>Trichoderma viride</i>			

จากการจัดจำแนกด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาหรือเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพียงวิธีใดวิธีหนึ่งไม่สามารถระบุถึงระดับสปีชีส์ได้อย่างชัดเจนจึงนำทั้งสองวิธีมาใช้ร่วมกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของรา *T. asperellum* กับ *T. viride* มีความคล้ายคลึงกันทำให้การจำแนกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาไม่สามารถระบุได้ แต่ลักษณะของสปอร์มีความแตกต่างกันโดยลักษณะสปอร์ของรา *T. viride* มีตุ่มคล้ายหนามสามารถมองเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound แต่ในทางตรงกันข้ามรา *Trichoderma* ไอโซเลท T76-14 และ V76-14 มีสปอร์ที่เห็นตุ่มคล้ายหนามบริเวณผิวไม่ชัดเจน โดยเห็นผิวโคนิเดียขรุขระ (ภาพที่ 7) ตรงกับการรายงานของ Samuels *et al.* (1999) ที่รายงานไว้ว่า *T. asperellum* เป็นราที่มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วภูมิภาคเอเชีย และมีความคล้ายคลึงกับรา *T. viride* แตกต่างกันที่ผิวของโคนิเดียซึ่ง *T. viride* มีตุ่มคล้ายหนามมองเห็นได้ชัดเจน รวมถึงมีความใกล้เคียงกันในลักษณะทางพันธุกรรม มีเพียงบางตำแหน่งบนบริเวณ ITS1 - ITS2 ที่แตกต่างกันจึงจำเป็นต้องใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบด้วยในการจัดจำแนกที่ถูกต้อง รวมถึงมีการรายงานว่าราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อต้นโกโก้ในอินโดนีเซียกว่า 90 เปอร์เซ็นต์เป็นรา *T. asperellum* และอีก 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นรา *T. viride* (Rosmana *et al.*, 2015)



ภาพที่ 6 ลักษณะโคนิเดียรา *Trichoderma* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
 ก. โคนิเดียรา *Trichoderma asperellum* T76-14 และ ข. โคนิเดียรา *Trichoderma spirale* T76-1

จากการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคทางอณูชีววิทยาสรุปได้ผลดังนี้

รา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T76-14 และ V76-14

โคโลนีมีสีเขียว โคนิดิโอฟอร์และเส้นใยมีผนังกัน เจริญยาว ไพอะลาไคมีรูปร่างแบบ flask-shaped เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม 2 – 4 อัน โคนิเดียมีผิวขรุขระ รูปร่างกลมรี สีเขียวเข้ม โคนิเดียมีขนาด $3.0 - 4.0 \times 4.0 - 5.0 \mu\text{m}$ (ภาพที่ 8)

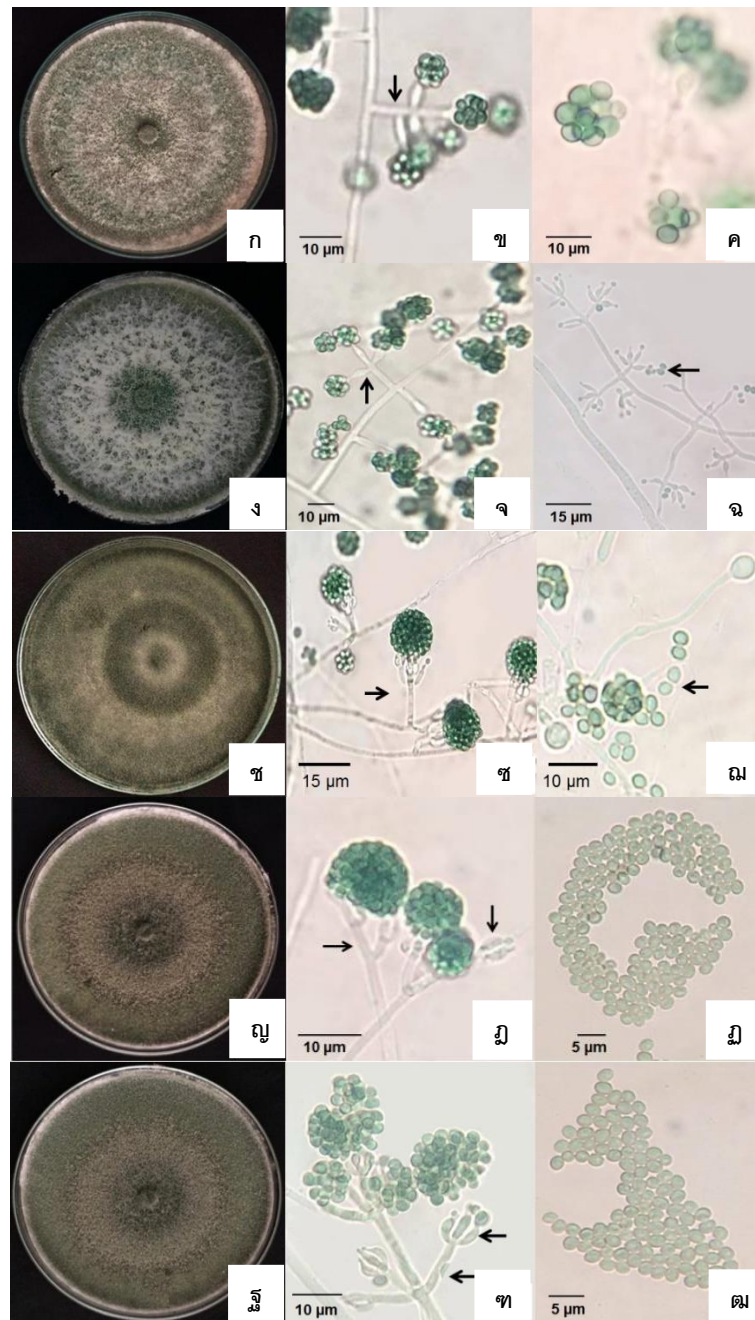
รา *Trichoderma spirale* ไอโซเลท V76-12, T76-1 และ T76-12/2

โคโลนีมีสีเขียวเข้ม โคนิดิโอฟอร์ และเส้นใยมีผนังกัน ไพอะลาไคมีรูปร่างแบบ flask-shaped เป็นกลุ่ม 2 – 4 อัน มีการสร้างคลาไมโดสปอร์ โคนิเดียมีผิวเรียบ ค่อนข้างกลมมีรอยนูนตรงกลาง สีเขียวเข้ม โคนิเดียมีขนาด $2.5 - 5.0 \times 3.0 - 5.0 \mu\text{m}$ (ภาพที่ 8)

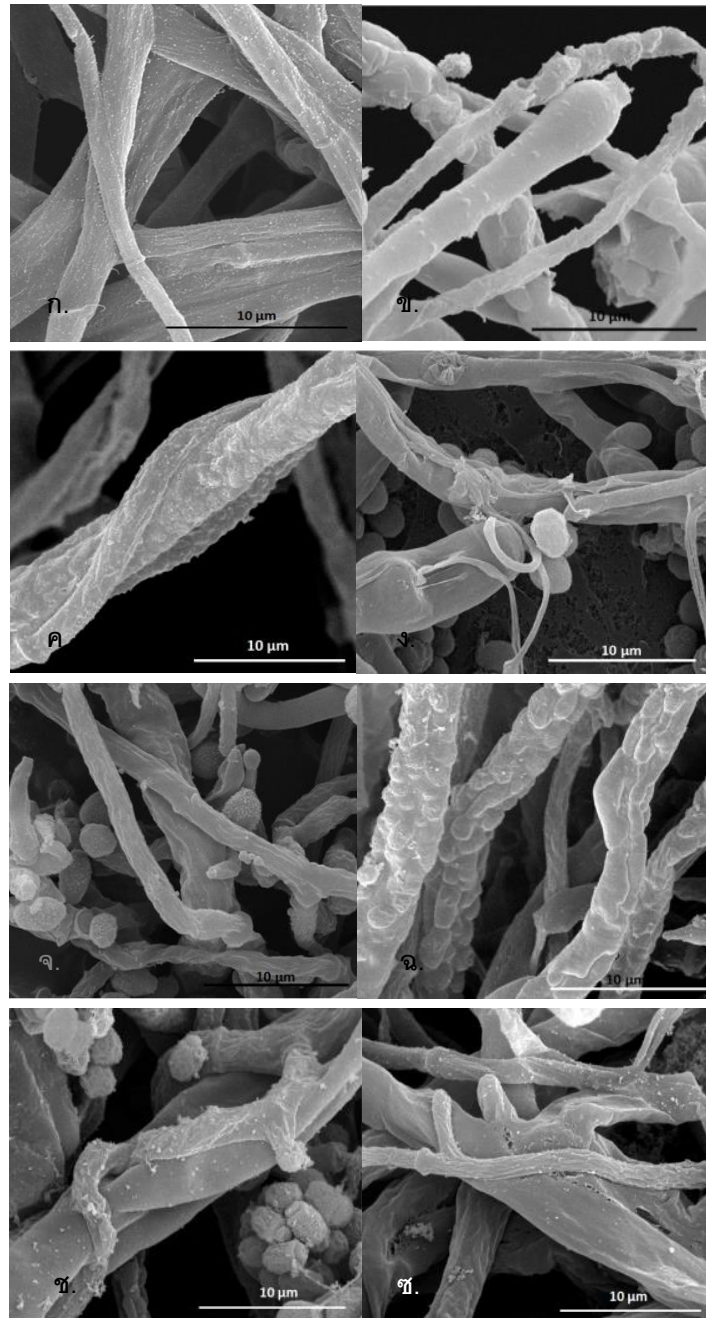
4. การคัดกรองราปฏิปักษ์จากคุณสมบัติต่าง ๆ

4.1 ปฏิสัมพันธ์ของราปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 ทำให้ผนังเซลล์รา *C. oryzae* มีลักษณะขรุขระผิดปกติ บวม พอง บิดเบี้ยว ซึ่งอาจเกิดจากการสร้างเอนไซม์หรือสร้างปฏิชีวนะบางชนิดที่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อผนังเซลล์ (ภาพที่ 9ข.) และราปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลท รวมทั้ง *T. harzianum* TM2/1 มีการเจริญคลุมทับและพันรัดเส้นใยรา *C. oryzae* ส่งผลให้การเจริญของรา *C. oryzae* มีลักษณะผิดปกติ คือ ผนังของเส้นใยเหี่ยว การพันรัดทำให้เส้นใยรา *C. oryzae* มีการเจริญผิดปกติ รูปร่าง พบการสร้างสปอร์น้อยและเจริญช้าเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยรา *C. oryzae* ในชุดควบคุม การเจริญอย่างรวดเร็วของราทั้ง 6 ไอโซเลทเป็นการแก่งแย่งพื้นที่ผิวหน้าอาหาร ซึ่งเป็นกลไกแบบแข่งขัน (competition) การสร้างเส้นใยพันรัดทางทะเลเส้นใยรา *C. oryzae* เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้การยับยั้งการเจริญของรา *C. oryzae* เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพซึ่งเป็นกลไกการเป็นปรสิต (parasitism) (ภาพที่ 9 ค – ข) สอดคล้องกับการศึกษาของ Philip *et al.* (2000) พบว่ารา *T. harzianum* -1, *T. harzianum* -2 และ *T. viride* -2 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งมีกลไกในการยับยั้งแบบ hyperparasitism และ antibiosis การศึกษาของ Darshna *et al.* (2017) ที่รายงานไว้ว่ารา *T. virens* NBAII Tvs12 สามารถเจริญและทำให้เส้นใยรา *Sclerotium rolfsii* เสื่อมสภาพโดยการสร้างเส้นใยพันรอบ สร้าง appressorium และ hook-like เพื่อใช้ในการยึดเกาะจากนั้นเจริญแทงทะลุเส้นใยเข้าไปภายในเส้นใยรา *S. rolfsii*



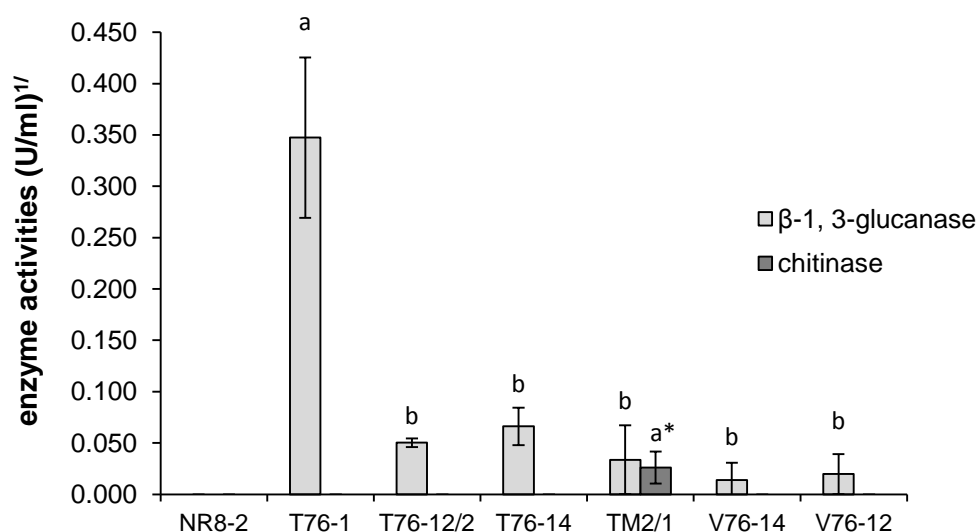
ภาพที่ 7 การจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ก. - ค. ลักษณะรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท T76-14 ง. - จ. ลักษณะรา *Trichoderma asperellum* ไอโซเลท V76 - 14 ช. - ฉ. ลักษณะรา *Trichoderma spirale* ไอโซเลท V76-12 ญ. - ฎ. ลักษณะรา *Trichoderma spirale* ไอโซเลท T76 - 1 ส. - ฉ. ลักษณะรา *Trichoderma spirale* ไอโซเลท T76-12/2 ก., ง., ช., ญ., ส. ลักษณะของโคโลนีและสีของรา ข., จ., ช., ฎ., ฉ. ลักษณะของก้านชูสปอร์ และ ค., ฉ., ฉ., ฎ., ฉ. ลักษณะของสปอร์



ภาพที่ 9 เส้นใยรา *Curvularia oryzae* เลี้ยงร่วมกับราปฏิปักษ์สองภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ก. เส้นใยรา *C. oryzae* ชุดควบคุม ข. เส้นใยรา *C. oryzae* เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *S. hygrosopicus* NR8-2 เส้นใยมีลักษณะ บวม พอง บิดเบี้ยว ค. รา *T. spirale* T76-1 เจริญพันธุ์ ทำให้เส้นใยรา *C. oryzae* มีผิวที่ผิดปกติ ง. รา *T. spirale* T76-12/2 เจริญบนละพันรัดไปกับเส้นใยรา *C. oryzae* จ. รา *T. asperellum* T76-14 เจริญคลุมทับ พันรัดทำให้เส้นใยรา *C. oryzae* เหี่ยว ข. รา *T. harzianum* TM2/1 มีการสร้างสารบางชนิดทำให้เส้นใยรา *C. oryzae* มีผิวขรุขระ ปูด พอง ช. รา *T. spirale* V76-12 เจริญพันธุ์ คลุมทับ ทำให้เส้นใยรา *C. oryzae* เหี่ยวผิดปกติ ซ. รา *T. asperellum* V76-14 เจริญพันธุ์ คลุมทับทำให้ เส้นใยรา *C. oryzae* แห้ง เหี่ยว

4.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสและ เบตา-1,3-กลูคาเนส

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสและเบตา-1,3-กลูคาเนส จากรายงานปฏิบัติพบว่ารา *T. harzianum* TM2-1 เพียงไอโซเลทเดียวมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส ที่ปริมาณ 0.026 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยไคตินเนสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของเชื้อรา จัดว่าเป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งในการเป็นปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืช (Agrawal and Kotasthane, 2012) สอดคล้องกับการทดลองของ Ashwin และ Anita (2012) ที่รายงานว่า *T. harzianum* สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสเพื่อใช้ในการย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อราก่อโรคพืชได้ นอกจากนี้รายปฏิบัติทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ T76-1, T76-14, T76-12/2, V76-12 และ V76-14 สามารถผลิตเอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนส โดยไอโซเลท T76-1 ผลิตเอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนส ได้สูงที่สุดถึง 0.347 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 10) Balasubramanian และคณะ (2003) รายงานว่ารา *T. harzianum* และ *Trichoderma* sp. สามารถหลั่งเอนไซม์ เช่น เซลลูเลส ไคตินเนส เบตา-1, 3-กลูคาเนส และ โปรติเอส เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ที่ประกอบด้วย เซลลูโลส ไคติน กลูแคน และโปรตีน ของราสาเหตุโรคพืชทำให้รา *Trichoderma* sp. สามารถแทงเข้าสู่ภายในเส้นใยรา ทำให้ผนังเซลล์ราสาเหตุโรคพืชเกิดความผิดปกติ และส่งผลต่อการเจริญของราสาเหตุโรคพืช (Carsolio et al., 1999) สอดคล้องกับรายงานของ Mallikharjuna และคณะ (2016) พบว่ารา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท ThJt1 และ TvHt2 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นยาสูบ สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสและ เบตา-1,3-กลูคาเนส ปริมาณสูงและสามารถย่อยสลายเส้นใยของเชื้อ *S. rolfsii* และ *Pythium aphanidermatum* ที่ก่อโรคในต้นยาสูบ ซึ่งกลไกของราที่เป็นปรสิตรจะเจริญแนบพันรัดกับเส้นใยเชื้อก่อโรค จากนั้นปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายส่วนประกอบของผนังเซลล์ และเจาะเข้าสู่เส้นใย ดังนั้นรา *Trichoderma* sp. จึงเป็นรายปฏิบัติที่มีกลไกหลายด้านในการนำไปใช้ควบคุมโรคพืชแบบชีววิธี



ภาพที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส และเบตา-1,3-กลูคาเนส

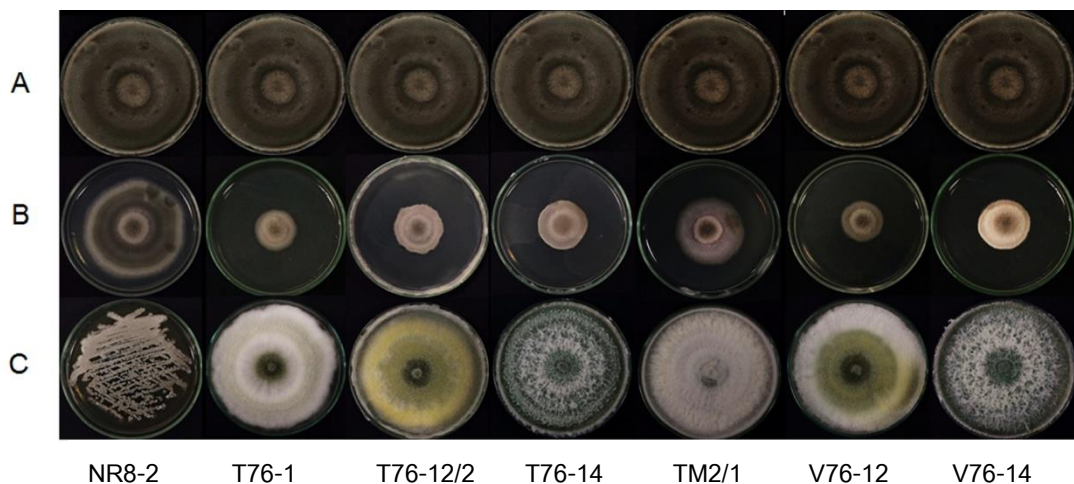
^{1/2}ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test

*ค่าความแตกต่างทางสถิติของเอนไซม์ไคตินเนส

4.3 การคัดเลือกราปฏิปักษ์จากคุณสมบัติการสร้างสารระเหย

คัดเลือกราปฏิปักษ์ที่มีการสร้างสารระเหยเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ด้วยวิธี volatile antifungal bioassay พบว่าราปฏิปักษ์ทั้ง 6 ไอโซเลท มีการสร้างสารระเหยทุกไอโซเลท ซึ่งมีผลทำให้การเจริญของรา *C. oryzae* เจริญได้ช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายในระยะเวลา 7 วัน โดยรา *T. spirale* T76-1 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดคือ 73.06 % (ภาพที่ 11 และตารางที่ 5) เมื่อทำการวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของสารระเหยจากรา *T. spirale* T76-1 ที่เลี้ยงร่วมกับรา *C. oryzae* ด้วยเครื่อง GC-MS พบสาร ได้แก่ Naphthalene,1,2,3,4,4A,5,6,8a - octahydro - 7- Methyl-4-Methylene - 1 - (1 - Methylene)-(1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.) และ 2,4-diisopropenyl-1-methyl-1-vinylcyclohexane ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 20.01% (นาที่ที่ 23.4620) และ 11.01% (นาที่ที่ 21.1600) ตามลำดับ รวมถึงพบสาร 3 - Octanone ที่ปริมาณ 0.15%



ภาพที่ 9 ผลของสารระเหยที่ผลิตโดยราปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน A. รา *Curvularia oryzae* ชุดควบคุม B. รา *C. oryzae* ชุดทดสอบสารระเหย C. ราปฏิปักษ์

ตารางที่ 5 การยับยั้งเส้นใยรา *Curvularia oryzae* ด้วยสารระเหยจากราปฏิปักษ์

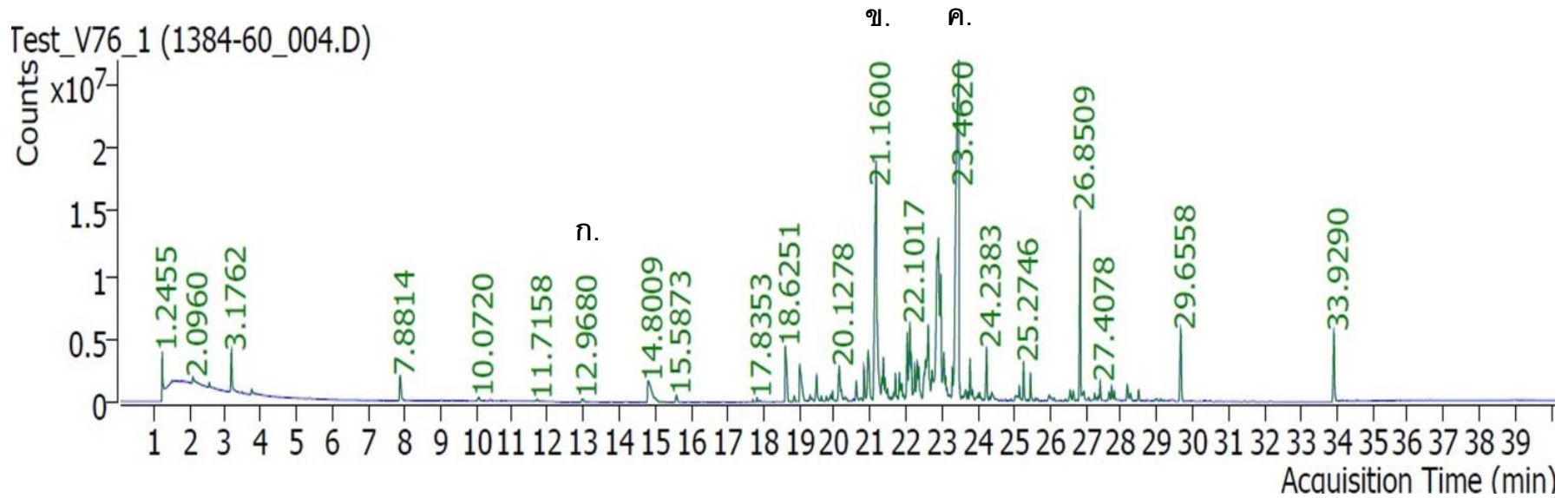
isolate	Inhibition growth (%) ^{1/}
<i>S. hygroscopicus</i> NR8-2	10.28±0.24f
<i>T. spirale</i> T76-1	73.06±0.08a
<i>T. spirale</i> T76-12/2	59.44±0.08d
<i>T. asperellum</i> T76-14	58.89±0.07d
<i>T. harzianum</i> TM2/1	44.72±0.04e
<i>T. spirale</i> V76-12	67.50±0.04b
<i>T. asperellum</i> V76-14	62.50±0.01c

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ย ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test

(ภาพที่ 12) สารที่พบจัดอยู่ในกลุ่มแอลกอฮอล์ ซึ่งมีผลทำให้ผนังเซลล์เกิดความผิดปกติ โดยเข้าทำลายโปรตีนภายในเซลล์ให้เสียสภาพ ซึ่งโปรตีนเป็นโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์เชื้อสาเหตุโรค โปรตีนมีหน้าที่สำคัญต่อระบบต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Caldwell, 2017) สอดคล้องกับรายงานของ Pezet และคณะ (1999) รายงานว่า ได้สกัดสาร 6-pentyl-a-pyrone ซึ่งอยู่ในกลุ่มแอลกอฮอล์ จากรา *Trichoderma* spp. มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์รา *Botrytis cinerea* ได้ และในการทดลองครั้งนี้สารที่พบมากคือสารระเหยแนฟทาไลน์ ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของระบบหายใจของสิ่งมีชีวิตรวมถึงเชื้อรา ส่งผลให้ชะงักการเจริญ และมีฤทธิ์ทำลายโปรตีนได้ ซึ่งในการทดลองพบว่ารา *C. oryzae* เจริญได้ช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งอาจเกิดจากรา *T. spirale* T76-1 สร้างสารระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งราสาเหตุโรคพืช สอดคล้องกับรายงานของ Newell และ คณะ (1987) พบว่าสารระเหยแนฟทาไลน์ ส่งผลให้รัศมีของโคโลนีของรากกลุ่ม basidiomycetes ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถลดกิจกรรมการหายใจของราและแบคทีเรีย ส่งผลให้ปริมาณไนโตรเจนในดินลดน้อยลง (Blair et al., 1989)

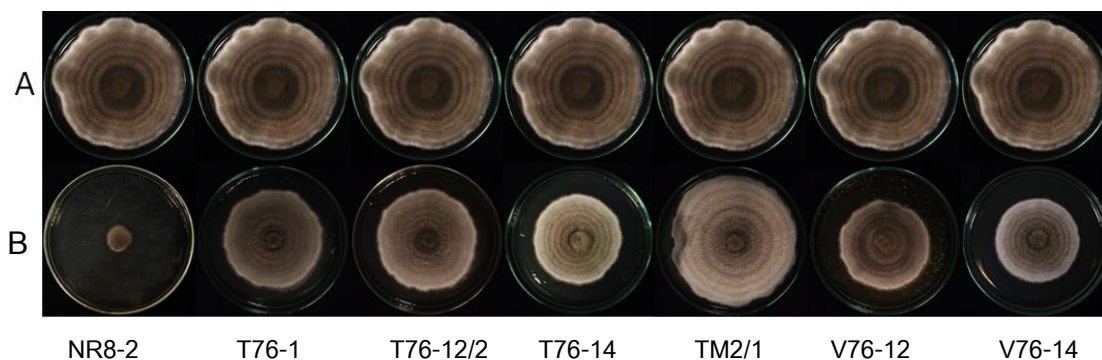
4.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงราปฏิบัฏซ์โดยวิธี poison food technique

จากการทดลองควบคุมการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อพบว่าทุกไอโซเลท ทำให้รา *C. oryzae* เจริญได้ช้าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เส้นใยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใน 7 วัน โดยมีเพียงเชื้อ *S. hygrosopicus* NR8-2 ที่ให้ค่าการยับยั้งสูงถึง 79.72% (ภาพที่ 13 และตารางที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับ Pithakkit และคณะ (2015) ที่พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. hygrosopicus* NR8-2 สามารถยับยั้งการเจริญและทำให้เส้นใยรา *C. oryzae* เกิดการบวมตัวผิดปกติ เนื่องจากเชื้อ *S. hygrosopicus* NR8-2 มีการสร้างสารปฏิชีวนะบางชนิดที่สามารถส่งผลต่อความผิดปกติต่อเส้นใยราและรายงานของ Tadijan และคณะ (2016) ที่พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. hygrosopicus* ผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากกว่าหนึ่งชนิด ได้แก่ *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium avenaceum* และ *Alternaria* spp.



ภาพที่ 10 GC-MS chromatography ของสารระเหยจากรา *Trichoderma spirale* T76-1 ที่เลี้ยงร่วมกับรา *Curvularia oryzae* ก. 3 – Octanone
 ข. Naphthalene,1,2,3,4,4A,5,6,8a - octahydro -7- Methyl-4-Methylene - 1 - (1 - Methylene)-(1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.)
 ค. 2,4- diisopropenyl-1-methyl-1-vinylcyclohexane

พรนภา โทตรี (2554) รายงานว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอสโคติโนมายซีท ไอโซเลท OMA60-1 ที่แยกได้จากดินบนดอยสุเทพ-ปุย มีประสิทธิภาพสูงสุดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยราที่ 64.40 และ 56.39 % ตามลำดับ



ภาพที่ 11 การยับยั้งรา *Curvularia oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงราปฏิบัตินทดสอบโดยวิธี poison food technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน
A. รา *Curvularia oryzae* ชุดควบคุมและ B. ชุดทดสอบ

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งรา *Curvularia oryzae* ด้วยน้ำเลี้ยงราปฏิบัตินโดยวิธี poison food technique

Isolate	Inhibition growth (%) ^{1/}
<i>S. hygroscopicus</i> NR8-2	79.72±0.13a
<i>T. spirale</i> T76-1	23.89±0.17c
<i>T. spirale</i> T76-12/2	23.33±0.12c
<i>T. asperellum</i> T76-14	32.50±0.15bc
<i>T. harzianum</i> TM2/1	6.11±0.42d
<i>T. spirale</i> V76-12	30.83±0.21c
<i>T. asperellum</i> V76-14	36.94±0.05bc

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ย ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test

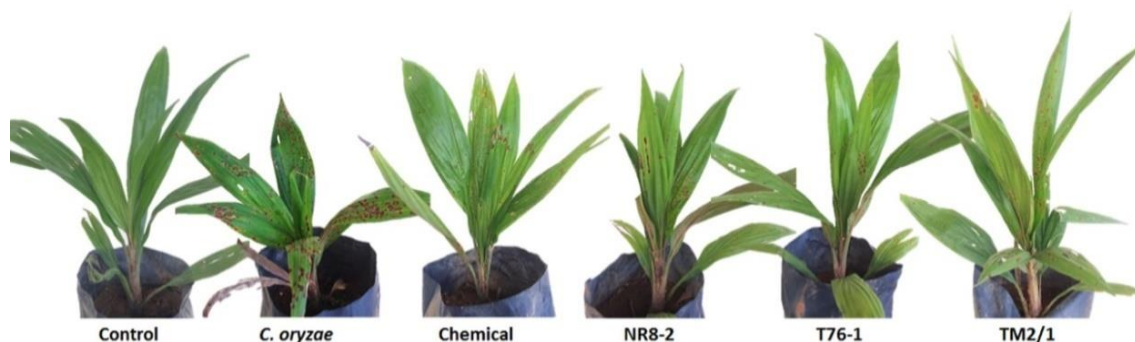
4.5 ประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Curvularia oryzae* บนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ *T. spirale* T76-1 เปรียบเทียบกับ *T. harzianum* TM2/1, *S. hygroscopicus* NR8-2 และการใช้สารเคมี ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* บนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน พบว่ากรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย *T. spirale* T76-1 กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย *T. harzianum* TM2/1 และกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย *S. hygroscopicus* NR8-2 สามารถควบคุมโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีโพรคลอราซ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 14) กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย *T. spirale* T76-1 สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ดีเนื่องจากเป็นราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อใบปาล์มน้ำมัน ซึ่งสามารถเจริญอยู่ได้ภายในเนื้อเยื่อและมีคุณสมบัติการเป็นปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคพืช รวมถึงกรรมวิธีฉีดพ่นด้วย *T. harzianum* TM2/1 ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นปาล์มน้ำมันแต่สามารถควบคุมโรคที่เกิดบริเวณใบได้ ซึ่งมีรายงานว่ารา *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์สามารถปรับตัวเป็นราเอนโดไฟท์ได้ โดยอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชทั่วลำต้นได้ (Mukherjee *et al.*, 2012) ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้ดีไม่แตกต่างจากเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 ที่แยกได้จากดินรอบรากปาล์มน้ำมันเช่นเดียวกัน

ตารางที่ 7 ระดับความรุนแรงการเกิดโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันจากการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์

กรรมวิธี	ระดับการเกิดโรค	ดัชนีการเกิดโรค(DSI) ^{1/}
Distilled water	0.4	8.00±0.52a
<i>C. oryzae</i>	4.1	82.00±0.57c
<i>C. oryzae</i> + Chemical (prochoraz)	1.9	34.00±0.74b
<i>C. oryzae</i> + <i>S. hygroscopicus</i> NR8-2	2.1	42.00±0.53b
<i>C. oryzae</i> + <i>T. spirale</i> T76-1	1.5	30.00±0.70b
<i>C. oryzae</i> + <i>T. harzianum</i> TM2/1	1.7	34.00±0.48b

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ย ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test



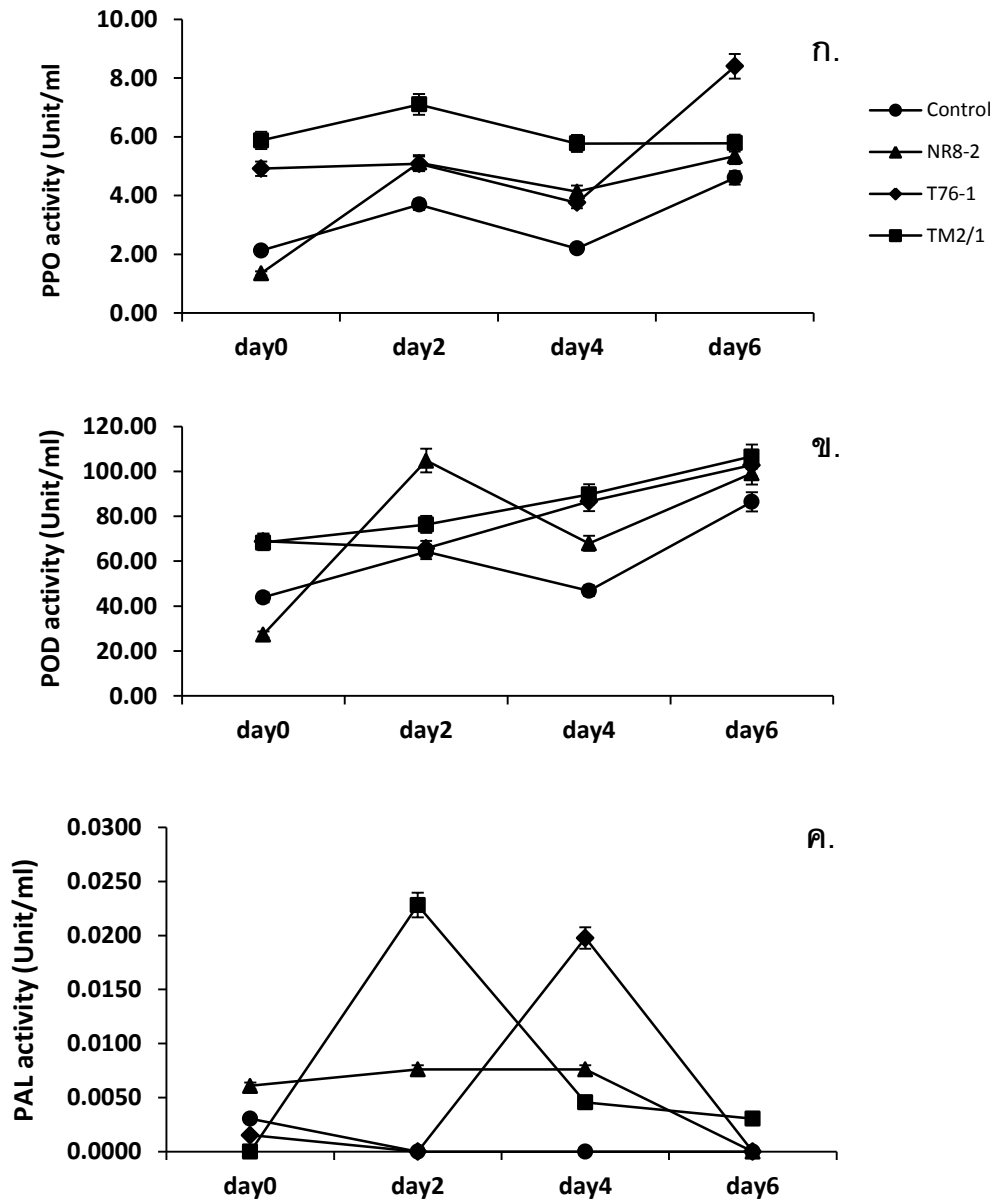
ภาพที่ 12 ประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการยับยั้งโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

4.6. ประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ต่อการกระตุ้นการตอบสนองของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

จากการวัดกิจกรรมเอนไซม์ PPO, POD และ PAL หลังจากทำการพ่นราปฏิปักษ์ลงบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน นาน 6 วัน พบว่าเอนไซม์ polyphenol oxidase ในใบปาล์ม น้ำมันถูกกระตุ้นให้ผลิตทันทีหลังฉีดพ่น *T. spirale* T76-1 และลดลงแล้วเพิ่มมากขึ้นอีกครั้งในวันที่ 6 ซึ่งปริมาณที่วัดได้ 8.04 U/ml (ภาพที่ 15 ก) เอนไซม์ POD ถูกกระตุ้นหลังพ่นด้วยเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 นาน 2 วัน ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์ POD สูงถึง 104.84 U/ml จากนั้นลดลงและเพิ่มขึ้นไม่คงที่ แตกต่างกับกรรมวิธีที่ถูกกระตุ้นด้วยรา *T. spirale* T76-1 และ *T. harzianum* TM2/1 ที่มีแนวโน้มการผลิตเอนไซม์ POD เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในวันที่ 6 สามารถวัดเอนไซม์ที่ผลิตได้สูงถึง 102.81 และ 106.68 U/ml ตามลำดับ (ภาพที่ 15 ข) ส่วนเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) พบว่าในกรรมวิธีที่พ่นด้วย รา *T. spirale* T76-1 มีการกระตุ้นให้ต้นปาล์มน้ำมันผลิตเอนไซม์ PAL หลังฉีดนาน 2 วัน และมีแนวโน้มลดลงหลังจากวันที่ 4 เช่นเดียวกับ กรรมวิธีที่พ่นด้วย *T. harzianum* TM2/1 มีการกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์ PAL ทันทีหลังพ่นถึงวันที่ 2 และมีแนวโน้มลดลงหลังจากวันที่ 2 (ภาพที่ 15 ค) จากการทดลองพบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด สามารถกระตุ้นให้ต้นปาล์มน้ำมันตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งเมื่อต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้รับการพ่นจุลินทรีย์ลงบนต้นแล้วจุลินทรีย์จะส่งผลให้ต้นกล้าปาล์ม น้ำมันมีการกระตุ้นเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด เพื่อป้องกันหรือเฝ้าระวังการแพร่กระจายเชื้อก่อโรคภายในเซลล์ โดยเอนไซม์ PPO มีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อก่อโรค เอนไซม์ PAL ส่งสัญญาณให้เพิ่มระดับของโมเลกุลกรดซาลิไซลิกในบริเวณที่มีการติดเชื้อ เพื่อให้

พืชเกิดความต้านทานต่อโรคและระบบการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคได้ (Li and Steffens, 2002) จากการศึกษา Christopher และคณะ (2010) พบว่ารา *Trichoderma* spp. สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ POD, PPO และ PAL ส่งผลให้ต้นมะเขือเทศต้านทานต่อโรคเน่าที่เกิดจากการเข้าทำลายโดยรา *Fusarium oxysporum* เช่นเดียวกับ Singh และคณะ (2014) ที่รายงานว่ ต้นทานตะวันสามารถต้านทานต่อรา *R. solani* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าได้โดยการถูกกระตุ้นให้เกิดความต้านทานด้วยรา *T. harzianum* NBRI-1055 ซึ่งส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์ POD, PPO และ PAL สูงขึ้นเมื่อเริ่มมีการระบาด

จากผลการคัดเลือกราปฏิปักษ์ด้วยคุณสมบัติต่าง ๆ ตามข้างต้น สามารถคัดเลือกราปฏิปักษ์นำไปพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จเพื่อควบคุมรา *C. oryzae* ได้จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ NR8-2, TM2/1 และ T76-1 (ตารางที่ 8) เนื่องจากเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 มีคุณสมบัติสร้างสารปฏิชีวนะบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* จากการทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงราปฏิปักษ์โดยวิธี poison food technique รวมถึงจากการทดลองของจิตรา กิตติโมรากุล (2557) ที่พบว่าเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 สามารถยับยั้งรา *C. oryzae* ได้ดี *T. harzianum* TM2/1 มีคุณสมบัติการเป็นปรสิตสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ย่อยสลายผนังเซลล์ของเส้นใยรา *C. oryzae* และ *T. spirale* T76-1 มีคุณสมบัติการแก่งแย่งแข่งขัน เจริญบนผิวหน้าอาหารได้รวดเร็ว ส่งผลให้แหล่งอาหารของรา *C. oryzae* ไม่เพียงพอหรือไม่เหมาะสมในการเจริญ รวมถึงรา *T. spirale* T76-1 ยังมีคุณสมบัติการเป็นปรสิตสามารถผลิตเอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนส ได้สูงที่สุด จากการคัดเลือกพบว่าราปฏิปักษ์ที่แยกจากไบปาล์มน้ำมันทั้ง 5 ไอโซเลทมีคุณสมบัติใกล้เคียงกันถึง 3 คุณสมบัติ ได้แก่ การผลิตเอนไซม์กลูคาเนส การสร้างสารระเหย และการยับยั้งด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ แต่ด้วยไอโซเลท T76-1 มีความแตกต่างคือมีกลไกในการกระตุ้นให้กล้าปาล์มน้ำมันผลิตเอนไซม์ที่ต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค (PAL, POD, PPO) จึงได้ทำการเลือกนำไปผลิตเป็นสูตรสำเร็จ



ภาพที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ที่วัดจากใบปาล์มน้ำมันในระยะเวลา 6 วัน ก.กิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase(PPO) ข. กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase(POD) และ ค. กิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

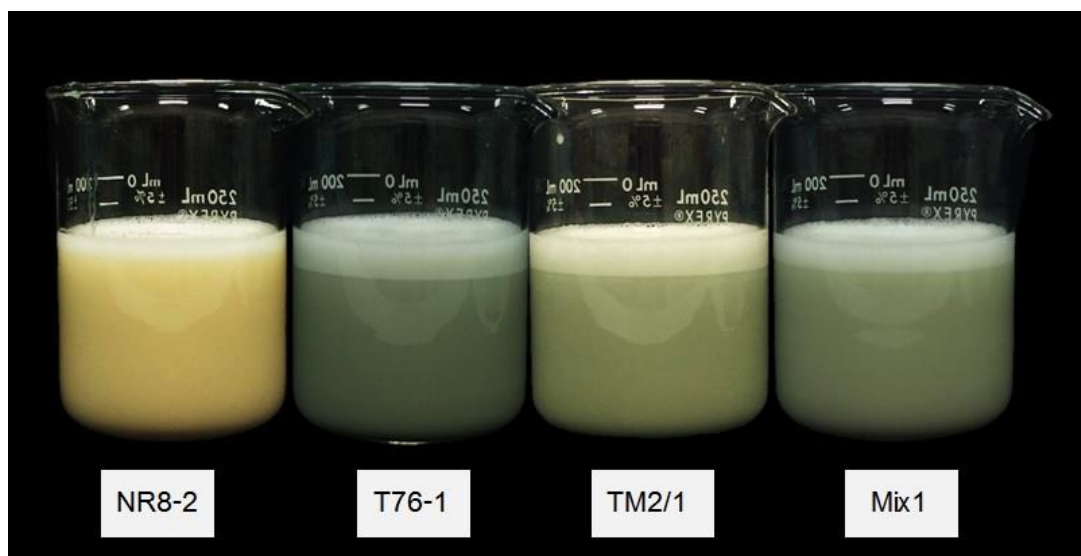
ตารางที่ 8 การคัดเลือกราปฏิบัติภัยจากการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ

isolate	chitinase	glucanase	VOCs	growth inhibition	PAL	POD	PPO	selected
<i>T. asperellum</i> T76-14	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>T. asperellum</i> V76-14	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>T. harzianum</i> TM2-1	+	+	+	+	+	+	+	✓
<i>T. spirale</i> T76-1	-	+	+	+	+	+	+	✓
<i>T. spirale</i> T76-12/2	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>T. spirale</i> V76-12	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. hygroscopicus</i> NR8-2	-	-	+	+	+	+	+	✓

+ มีคุณสมบัติ - ไม่มีคุณสมบัติ ✓ คัดเลือกผลิตสูตรสำเร็จ VOCs: volatile organic compounds
 PAL: phenylalanine ammonia-lyase POD: peroxidase PPO: polyphenol oxidase

5. การผลิตสูตรสำเร็จของราปฏิบักษ์ชนิดอิมัลชัน

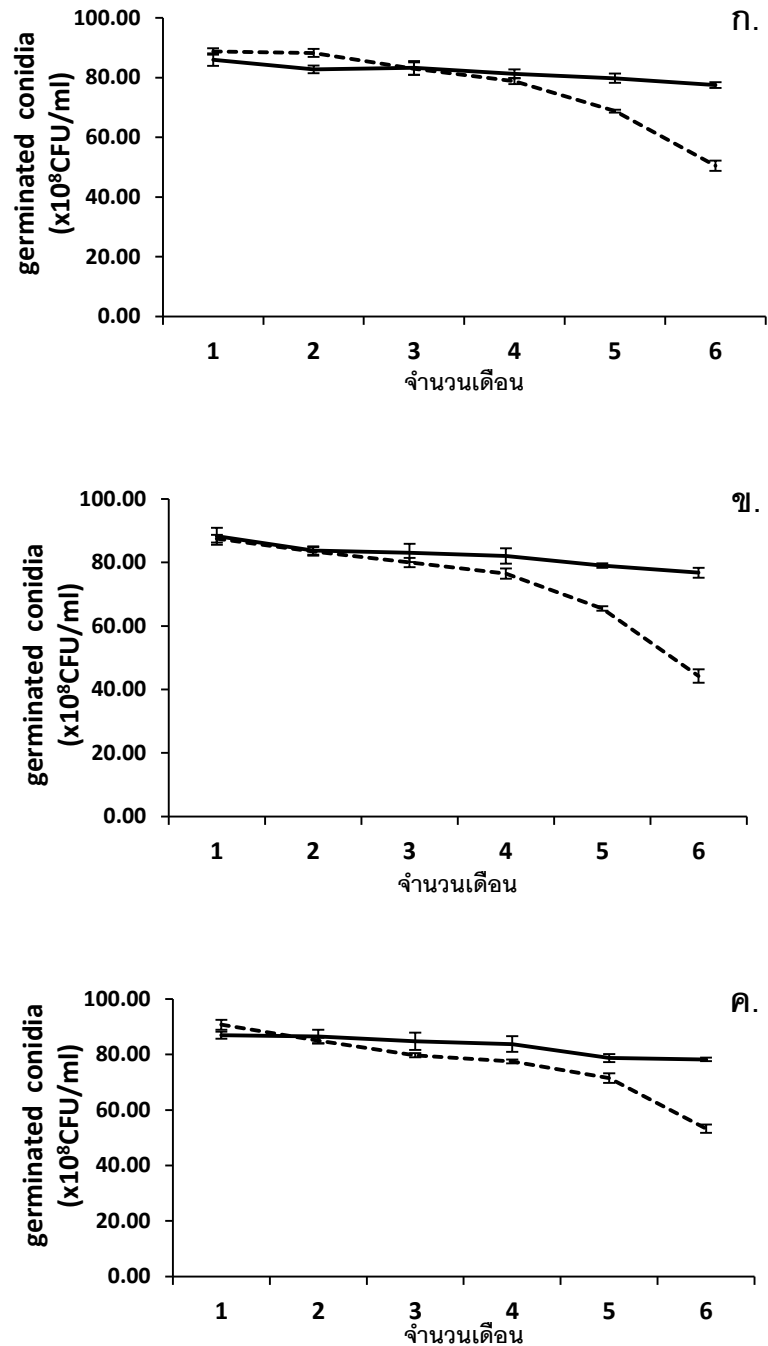
อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ สูตรที่ 1 เป็นน้ำมันมีสีเหลืองอ่อนขึ้นเนื่องจากการผสมของน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 สูตรที่ 2 เป็นน้ำมันสีเขียวเข้มขึ้น คล้ายสีโคนิเดียรา *T. spirale* T76-1 สูตรที่ 3 เป็นน้ำมันสีเขียวอ่อนขึ้น คล้ายสีโคนิเดียรา *T. harzianum* TM2/1 และสูตรที่ 4 เป็นน้ำมันสีเขียวเข้มขึ้น เนื่องจากการผสมของโคนิเดียรา *T. spirale* T76-1 กับ *T. harzianum* TM2/1 (ภาพที่ 16) สอดคล้องกับ การศึกษาของ Batta (1999; 2004) ได้ทดลองผลิตสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันของรา *Trichoderma* sp. เพื่อใช้ในการควบคุมรา *Botrytis cinerea* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าในแอปเปิ้ล ด้วยน้ำมันคาโนลา (rape-seed, canola, *Brassica napus*) เมื่อผลิตได้เป็นอิมัลชันสีขุ่น มีการแยกชั้นหลังจากทิ้งไว้นาน 7 วัน ซึ่งต่อมาได้พัฒนาสูตรอิมัลชันโดยใช้น้ำมันมะพร้าวผสมกับน้ำมันถั่วเหลืองซึ่งพบว่ามีควมคงตัวที่ 93% และมีความหนืดต่ำ สามารถนำไปใช้ควบคุมโรคเน่าในแอปเปิ้ลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Mberga และคณะ (2014) ได้ผลิตสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันของรา *T. asperellum* เพื่อใช้ควบคุมโรคผลดำในโกโก้ ที่เกิดจากรา *Phytophthora megakarya* โดยใช้น้ำมันถั่วเหลือง 74%, Tensiofix NTM (emulsifying) 15% Tensiofix 869 5% และกลูโคส 4% เมื่อผลิตเป็นอิมัลชันมีสีขุ่นและแยกชั้น เมื่อทดสอบพบว่าสามารถควบคุมโรคผลดำในโกโก้ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี และรา *T. asperellum* สามารถคงตัวอยู่ได้ในต้นโกโก้



ภาพที่ 13 สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน

6. การทดสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อราปฏิปักษ์ในสูตรสำเร็จ ในสภาพอุณหภูมิห้อง และ อุณหภูมิ 10° C นาน 6 เดือน

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดเลือกผลิตเป็นสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเก็บไว้ในขวดพลาสติก สีขาวขุ่นมีฝาปิด และวางเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 10 องศาเซลเซียส จากนั้นทดสอบการรอดชีวิตด้วยวิธี dilution pour plate ทุก ๆ เดือน เป็นเวลา 6 เดือน จากการทดสอบพบว่าหลังเก็บรักษา 1 เดือน ลักษณะของสูตรสำเร็จที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28 – 30 และ 10 องศาเซลเซียสยังไม่มี การเปลี่ยนแปลงสี แต่มีการแยกชั้นระหว่างน้ำกับน้ำมัน เมื่อเขย่าสามารถผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน สูตรสำเร็จที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เดือนที่ 1 – 6 จำนวนโคนินเดียที่สามารถงอกได้หลังทำการ pour plate บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ของทุกสูตรมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจเป็นผลจากสภาพอากาศไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต ส่งผลให้มีจำนวนโคนินเดียที่สามารถงอกได้หลังจากเก็บรักษาไว้ 6 เดือน เหลือเพียง 50×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 17) ส่วนการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ในช่วงเดือนที่ 1 – 6 พบว่าสปอร์ที่งอกได้มีค่าคงที่เฉลี่ยอยู่ในช่วง $76 - 90 \times 10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 17) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสปอร์แขวนลอยของรา *T. spirale* T76-1 และ *T. harzianum* TM2/1 พบว่าน้ำสปอร์แขวนลอยของราที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ 10 องศาเซลเซียส มีจำนวนสปอร์งอกลดลงอย่างต่อเนื่อง การเก็บรักษาสปอร์ราปฏิปักษ์ให้อยู่ในรูปสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันจึงสามารถยืดอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ราได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับการทดลองของ Ahamedemujtaba และ Kulkarni (2017) ที่พบว่าอัตราการรอดชีวิตของรา *T. harzianum* ในน้ำมันดอกคาโนล่ากับกลีเซอรอล มีสูงถึง 3.0×10^4 cfu/ml. จากความเข้มข้นเริ่มที่ 4.3×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12 เดือน และสามารถงอกได้เมื่ออยู่ในน้ำมันดอกคาโนล่ากับกลีเซอรอล และสามารถยืดอายุของสปอร์ได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์ราที่อยู่ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ รวมถึงสอดคล้องกันรายงานของ Pornsuriya และ Sunpapao (2014) ที่ผลิตสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าการรอดชีวิตของเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีมากกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเป็นผลจากกระบวนการเมตาโบลิซึม ของเชื้อลดลงเมื่อสภาพแวดล้อมมีความชื้นและอุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้มีการใช้ออกซิเจน อาหาร ลดลงทำให้เชื้อสามารถรอดชีวิตในสูตรสำเร็จได้นานเพิ่มขึ้น



————— อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส - - - - - อุณหภูมิห้อง

ภาพที่ 14 อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 เดือน ก. สูตรที่ 2 ผสมสปอร์รา *T. spirale* T76-1 ข. สูตรที่ 3 ผสมสปอร์รา *T. harzianum* TM2/1 และ ค. สูตรที่ 4 ผสมของสปอร์รา *T. spirale* T76-1 กับ *T. harzianum* TM2/1

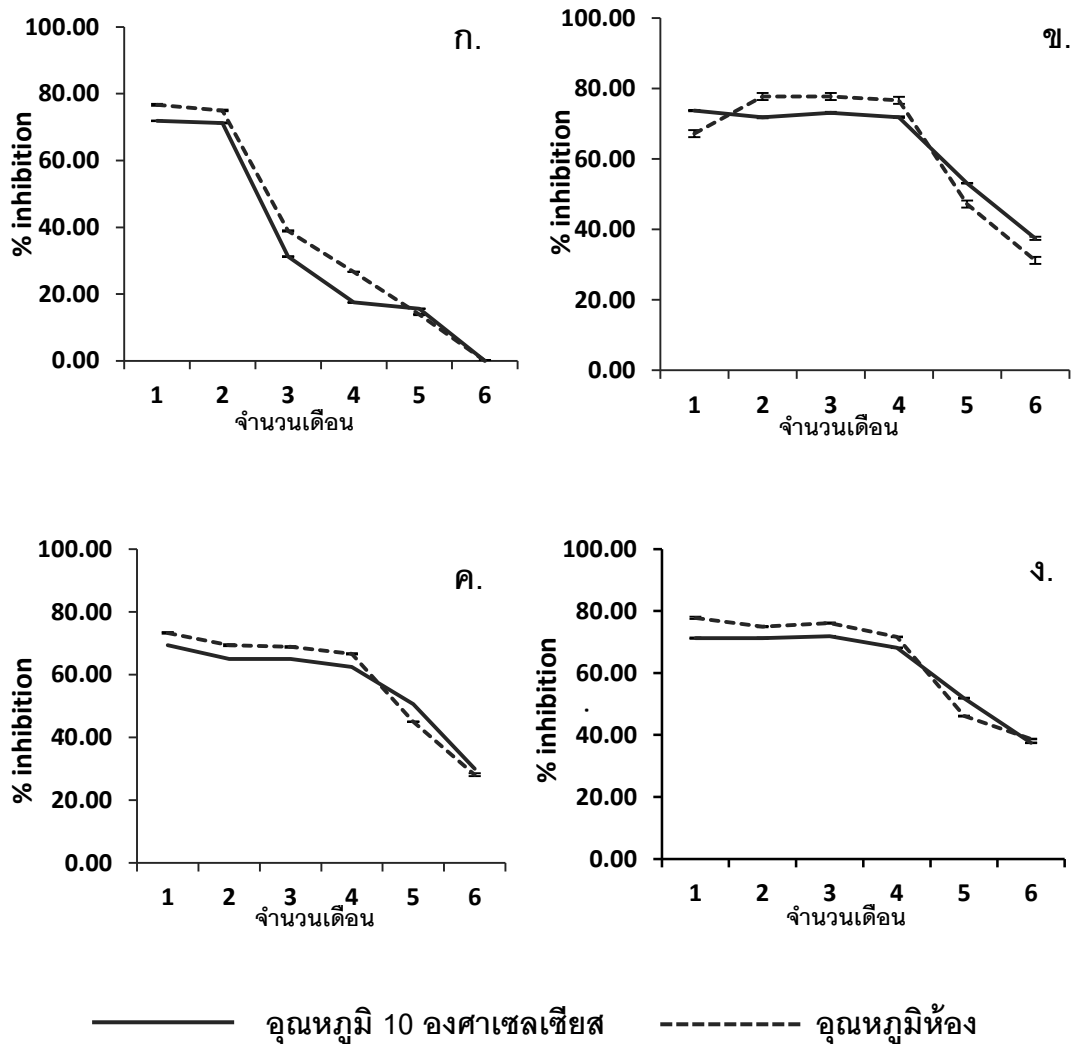
7. ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จ หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 10° C เป็นเวลา 6 เดือน

การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จหลังเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง นาน 6 เดือน พบว่า สูตรสำเร็จทั้ง 4 สูตร สามารถยับยั้งเส้นใยรา *C. oryzae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ในช่วง 1 – 4 เดือนแรก สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ได้ดีซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 62.22 – 79.44% ต่อมาในช่วงเดือนที่ 5 และ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งมีแนวโน้มลดลง ยกเว้นเพียงแต่สูตรที่ 1 ซึ่งเป็นสูตรที่มีการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 มีประสิทธิภาพลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ในเดือนที่ 2 ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *C. oryzae* ในช่วงเดือนที่ 2 – 4 มีค่าคงที่ในช่วง 62.22 – 77.78% ต่อมาในเดือนที่ 5 และ 6 การยับยั้งเส้นใยรา *C. oryzae* ประสิทธิภาพมีแนวโน้มลดลง ยกเว้น สูตรที่ 1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยรา *C. oryzae* ลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ช่วงเดือนที่ 2 เช่นเดียวกันกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 18 ก) ซึ่งเป็นผลจากที่น้ำเลี้ยงเชื้อเสื่อมสภาพส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลงอย่างรวดเร็ว จากการทดลองพบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีผลดีทำให้ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จคงที่ได้ในระยะเวลาที่นานขึ้น เนื่องจากสปอร์ราสามารถอยู่รอดได้เนื่องจากมีสภาวะเหมาะสมแก่การพักตัว ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งราสาเหตุโรคสามารถยับยั้งได้อย่างรวดเร็ว

8. การประเมินประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคใบจุดของกล้าปาล์มน้ำมัน

ผลการประเมินประสิทธิภาพสูตรสำเร็จของเชื้อราปฏิปักษ์ 4 สูตร เปรียบเทียบกับสารเคมีไพโรคลอราส ชุดควบคุม (น้ำกลั่น) และชุดควบคุมโรคใบจุด (*C. oryzae*) พบว่ากรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรอิมัลชันสูตรที่ 4 มีระดับดัชนีการเกิดโรคที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (น้ำกลั่น) รวมถึงกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรอิมัลชันอื่น ๆ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีไพโรคลอราส โดยมีระดับการเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 1 – 2 (ตารางที่ 9 และภาพที่ 19) อย่างไรก็ตามสูตรที่เหมาะสมในการนำไปใช้ควบคุมโรคใบจุดเป็นสูตรที่มีการผสมสปอร์รา *T. spirale* T76-1 และ *T. harzianum* TM2/1 เนื่องจากราปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดมีกลไกในการยับยั้งหลายรูปแบบ และสามารถยับยั้งรา *C. oryzae* ได้ดี ส่งผลให้ควบคุมโรคใบจุดที่เกิดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อสุ่มเก็บใบปาล์มน้ำมันที่ผ่านการทดสอบตรวจสอบ

การคงอยู่ของราปฏิปักษ์ พบว่ามีการเจริญของรา *Trichoderma* spp. การใช้สูตรสำเร็จควบคุมโรคใบจุดให้เกิดประสิทธิภาพจำเป็นต้องอาศัยความสม่ำเสมอในการฉีดพ่นเพื่อให้ได้ผลอย่างชัดเจน และควรงดการใช้สารเคมีในการแปลงปลูกเพื่อให้ราปฏิปักษ์สามารถคงตัวอยู่ได้ภายในเนื้อเยื่อพืชหรือบริเวณรอบ ๆ ราก ซึ่งจะส่งผลดีต่อสมดุลของระบบนิเวศภายในแปลงปลูก



ภาพที่ 18 ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันในการยับยั้งการเจริญของรา *C. oryzae* เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 6 เดือน ก. สูตรที่ 1 ผสมของน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 ข. สูตรที่ 2 ผสมสปอร์รา *T. spirale* T76-1 ค. สูตรที่ 3 ผสมสปอร์รา *T. harzianum* TM2/1 และ ง. สูตรที่ 4 ผสมของสปอร์รา *T. spirale* T76-1 กับ *T. harzianum* TM2/1

ตารางที่ 9 ระดับและดัชนีการเกิดโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน หลังทดสอบด้วยสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชัน

กรรมวิธี	ระดับการเกิดโรค	ดัชนีการเกิดโรค(%DSI) ^{1/}
ชุดควบคุม(น้ำกลั่น)	0.59	11.88±3.31a
ชุดควบคุมโรคใบจุด (<i>C. oryzae</i>)	3.38	67.50±8.72c
สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสูตร 1	1.44	28.44±4.72b
สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสูตร 2	1.38	27.19±7.80b
สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสูตร 3	1.30	25.94±2.77b
สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันสูตร 4	1.08	21.56±2.77ab
สารเคมีกำจัดเชื้อรา ไพโรคลอราส	1.19	25.63±4.39b

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ต้น ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ย ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test



ภาพที่ 19 การทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จในการควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากรา *C. oryzae* บนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากรายปฏิบัติการ 26 ไอโซเลทที่แยกได้จากใบปาล์มน้ำมันสามารถนำมาคัดเลือกการเป็นปฏิปักษ์เบื้องต้นได้จำนวน 5 ไอโซเลท และทำการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคทางอนุชีววิทยาได้เป็นรา *Trichoderma* spp. 2 สปีชีส์ คือ รา *T. asperellum* ได้แก่ ไอโซเลท T76-14 และ V76-14 รา *T. spirale* ได้แก่ ไอโซเลท V76-12, T76-1 และ T76-12/2 จากนั้นนำไปคัดเลือกการเป็นปฏิปักษ์ด้วยคุณสมบัติต่าง ๆ ซึ่งสามารถคัดเลือกได้รา *T. spirale* T76-1 รวมทั้ง *T. harzianum* TM2-1 และ *S. hygroscopicus* NR8-2 ที่มีคุณสมบัติการเป็นปรสิตต่อเชื้อก่อโรค สร้างสารปฏิชีวนะบางชนิด สร้างเอนไซม์เบตา 1,3-กลูคาเนส โคติเนส สร้างสารระเหย ยับยั้งการก่อโรคด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ และรวมถึงสามารถกระตุ้นให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดได้ นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ไปผลิตเป็นสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันซึ่งประกอบด้วยน้ำแขวนลอยสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดเลือกที่ความเข้มข้น 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หรือน้ำเลี้ยงเชื้อ *S. hygroscopicus* NR8-2 ผสมกับ spen 60 กลีเซอริน น้ำมันดอกคาโนล่าและทวิน 60 โดยควรเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสซึ่งสามารถยืดอายุการรอดชีวิตและคงประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคใบจุด เมื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคใบจุดของกล้าปาล์มน้ำมันในแปลงทดลองพบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันทุกสูตรไม่มีความแตกต่างกับการใช้สารเคมีโพรคลอราซ แต่เพื่อให้การยับยั้งมีประสิทธิภาพที่ดีควรใช้อิมัลชันสูตรที่ 4 เนื่องจากเป็นสูตรที่มีการผสมสปอร์ราทั้งสองชนิดซึ่งช่วยส่งเสริมการควบคุมโรคใบจุดที่เกิดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้สามารถผลิตสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันไว้ใช้พ่นควบคุมโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยแนะนำให้ผู้นำไปใช้ฉีดได้ทั้งป้องกันและควบคุมโรคใบจุดในอัตราส่วนสูตรสำเร็จ 2 มิลลิลิตร : น้ำ 1 ลิตร ฉีดพ่นลงบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันอย่างน้อย 1 ครั้งต่อเดือน และเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถคงตัวได้ในต้นพืชควรงดใช้สารเคมีเนื่องจากสารเคมีสามารถทำลายราปฏิปักษ์และความสมดุลในธรรมชาติ ทำให้การใช้สูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันไม่ประสบผลสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

- จิตรา กิตติโมรากุล วสันต์ เพชรรัตน์ และ เสมอใจ ชื่นจิตต์. 2557. การควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในปาล์มน้ำมัน โดยการใช้สารเคมีและชีววิธี. วารสารพืชศาสตร์ สงขลานครินทร์ 1: 39-47.
- จิตรา กิตติโมรากุล. 2557. การควบคุมเชื้อ *Curvularia* sp. สาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมันโดย สารเคมีและชีววิธี. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- นลินา เหมสนิท และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2552. *Pseudomonas fluorescens* SP007s กระตุ้น ให้คะแนสร้าง salicylic acid เพื่อต้านทานการเกิดโรคขอบใบทอง. ใน รายงานการประชุม ทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 วันที่ 17-20 มีนาคม 2552. กรุงเทพฯ. 611-620.
- นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ. ในสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดย พระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. กรุงเทพฯ. 35: 128-159.
- นิรนาม. 2559. โรคข้าวที่สำคัญในประเทศไทยและการป้องกันกำจัด. สำนักวิจัย และพัฒนาข้าว กรมการข้าว. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://phon.khonkaen.doae.go.th/data/rice.pdf>. (25 กุมภาพันธ์ 2559).
- นิรนาม. 2559. สารเพิ่มปริมาณยา. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. [ออนไลน์] เข้าถึงได้ จาก <https://www.mtec.or.th/academic-services/mtec-knowledge/422>. (10 มีนาคม 2559).
- ปวีณา สังข์แก้ว. 2556. สูตรสำเร็จของราปฏิปักษ์ *Streptomyces griseus* subsp. *Fomicus* สำหรับการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- พรนภา ไทตรี . 2554. ผลของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสต่อเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต (วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว) สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่
- พิพัฒน์ เชียงหลิว และเกริกชัย ธนรักษ์. 2554. การปลูกปาล์มน้ำมันตามหลักการปฏิบัติทาง เกษตรที่ดี. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขต 7 กรมวิชาการเกษตร สุราษฎร์ธานี.

- วานิด รอดเนียม. 2552. การคัดเลือกและการพัฒนาสูตรสำเร็จเชื้อ แบคทีเรียปฏิบั๊กซ์ *Bacillus* spp. เพื่อควบคุมโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Alternaria* spp. ในผักสลัด (*Lactuca sativa* L.) ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิคส์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2548. โรคปาล์มน้ำมัน. ใน เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน . กรุงเทพฯ. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, หน้า 74-86.
- ศิริวรรณ ประเศษฐานนท์ และสุดาร์ตน์ เตชะศรีประเสริฐ. 2547. ยุทธศาสตร์อุตสาหกรรมปาล์ม น้ำมัน ปี 2547-2572. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- สกุลรัตน์ แสนปทุวงค์. 2553. การขยายพันธุ์ปาล์มน้ำมันลูกผสมทนหนาวจากการเพาะเลี้ยง คัพภะอ่อนและการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2560. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- สุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2551. กระบวนการเฉพาะและสูตรจุลินทรีย์เพื่อสุขภาพพืช. ใน นิทรรศการ "นวัตกรรมงานวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2551". 30 เมษายน - 4 พฤษภาคม 2551, ณ อาคารจักรพันธ์เพ็ญศิริ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://www.ku.ac.th/e-magazine/jan52/agri/agri2.htm>
- สุภาภรณ์ พิทักษ์กิจ. 2556. เชื้อ *Streptomyces* spp. ที่แยกจากดินใต้ต้นปาล์มน้ำมัน และผลการยับยั้งเชื้อราก่อโรคปาล์มน้ำมันในห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- อัจฉรา อูทิศวรรณกุล. 2536. รูปแบบเกสรภัณฑ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- Aderungboye, F.O. 1977. Disease of the oil palm. Tropical Pest Management 23: 05-326.
- Ahamedemujtaba, V. and Shripad, K. 2017. Shelf Life of *Trichoderma harzianum* an antagonist in different oil based formulations. IRA-International Journal of Applied Sciences 6: 34-40.
- Ashwin, G.L. and Anita, S.P. 2012. Characterization of efficient chitinolytic enzyme production *Trichoderma* species: a tool for better antagonistic approach. International Journal of Science, Environment and Technology 1: 377-385.

- Bae, H., Roberts, D.P., Lim, H.S., Strem, M.D., Park, S.C., Ryu, C.M., Melnick, R.L. and Bailey, B.A. 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 336-351.
- Balasubramaniana, N., Priyab, V.T., Gomathinayagama, S. and Lalithakumaria, D. 2012. Fusant *Trichoderma* HF9 with Enhanced Extracellular Chitinase and Protein Content. *Applied Biochemistry and Microbiology* 48: 409-415.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1909. Illustrated genera of imperfect fungi. Minneapolis : Burgess Publishing.
- Batta, Y.A. 1999. Biological effect of two strains of microorganisms antagonistic to *Botrytis cinerea* causal organism of gray mold on strawberry. *An-Najah University Journal for Research Natural Sciences* 13: 67-83.
- Batta, Y.A. 2004. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection* 23: 19-26.
- Benítez, T., Rincón, M.A., Limón, M.C. and Codón, C.A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology* 7: 249-260.
- Bugnicourt, F. 1950. *Revue Générale de Botanique* 57: 69. [online] available from : <http://www.nzor.org.nz/names/95289ca6-21da-4450-b531-d28338d337d7> (accessed on February 25, 2016).
- Carsolio, C., Benhamou, N. Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I. and Herrere, E. A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology* 65 : 929-935.
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R. and Oppenheim, A. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by *Rhizobacteria*. *Plant and Soil* 129: 85-92.
- Christopher, D.J., Suthin-Raj, T., Usha-Rani, S. and Udhayakumar, R. 2010. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Journal of Biopesticides* 3: 158–162.

- Cirulii, M., and Alexander, L.J. 1966. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* and different sources of resistance in tomato. *Phytopathology* 56: 1301-1304.
- Connick, W.J., Boyette, C.D. and McAlpine, J.R. 1991. Formulation of mycoherbicides using a Pasta like process. *Biological Control* 1: 281-87.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 41-48.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H. 1993. *Compendium of Soil Fungi*. 1th Edition. IHW-Verlag, Eching.
- Elad, Y., Chet, I. and Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum* a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 70: 119 - 121.
- Hanada, R.E., Pomella, A.W.V., Costa, H.S., Bezerra, J.L., Loguercio, L.L. and Pereira, J.O. 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology* 114 : 901-910.
- Hartley, C.W.S. 1988. *The oil palm*, 2nd edn. Longman, London. [online] available from :[https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The%20oil%20palm&author=CW S.%20Hartley&publication_year=1988](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=The%20oil%20palm&author=CW%20S.%20Hartley&publication_year=1988). (accessed on December 25, 2016).
- Hirpara, D.G., Gajera, H.P., Hirapara, J.G. and Golakiya, B.A. 2017. Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant *Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Infection, Genetics and Evolution* 55: 75-92.
- Howell, R.C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.
- Jin, X. and Custis, D. 2011. Microencapsulating aerial conidia of *Trichoderma harzianum* through spray drying at elevated temperatures. *Biological Control* 56: 202-206.
- Kaewchai, S., Soyong, K., and Hyde, K.D. 2009. Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Diversity* 38: 25-50.

- Kittimorakul, J., Pornsuriya, C., Sunpapao, A. and Petcharat, V. 2014. Survey and incidence of leaf blight and leaf spot diseases of oil palm seedlings in southern Thailand. *Plant Pathology Journal* 12: 149-153.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L.D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M.G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Coulpier, F., Deshpande, N., von Dohren, H., Ebbolle, D.J., Esquivel-Naranjo, E.U., Fekete, E., Flippin, M., Glaser, F., Gomez-Rodríguez, E.Y., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernandez-Oñate, M., Karaffa, L., Kostic, I., Le Crom, S., Lindquist, E., Lucas, S., Lubeck, M., Lubeck, P.S., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti-Rivera, E.E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, B., Shapiro, H., Sukno, S., Tamayo-Ramos, J.A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H.H., Zhang, M., Coutinho, P.M., Kenerley, C.M., Monte, E., Baker, S.E., Grigoriev, I.V. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology* 12: R40.
- Kumar, S., Kaushik, N., Edrada-Ebel, R., Ebel, R., and Proksch, P. 2008. Endophytic fungi for pest and disease management. In Ciancio A. and Mukerji K.G. (Eds.). *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria*. Springer, Berlin. 365-387.
- Labarca, M., Sanabria, N. and Arcia, A. 2006. *Pestalotiopsis palmarum* Cooke. pathogenicity on nursery-oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plants. *Journal of University of Zulia (Venezuela)* 23: 414-421.
- Li, L. and Steffens, J.C. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215: 239-247.

- Lin, C., Yang J., Sun H., Huang X., Wang R. and Zhang, K.Q. 2007. Purification and characterization of a β -1, 3-glucanase from the novel mycoparasite *Periconia byssoides*. *Biotechnology Letter* 29: 617-622.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L. and Di Pietro, A. 1993. Chitinolytic enzyme produced by *Trichoderma harzianum* antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Mallikharjuna, R.K.L.N., Rajub, S.K. and Ravisankar, H. 2016. Cultural conditions on the production of extracellular enzymes by *Trichoderma* isolates from tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology* 47: 25-32.
- Manamgoda, D.S., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R.G. and Tan, Y.P. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56: 131-144.
- Mbarga, J.B., Ten Hoopen, G.M., Begoude, A.D., Tondje, P.R., Kuate, J., Ambang, Z., Amougou, A. and Schiffers, B. 2014. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control. *Biological Control* 77: 15-22.
- Mishra, V.K. 2010. In vitro Antagonism of *Trichoderma* Species against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Phytology* 2: 28-35.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Zachow C., Berg, G. and Zeilinger, S. 2012. *Trichoderma*-plant-pathogen interaction: Advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology* 52: 522-529.
- Mutert, E., Esquivéz, A.S., de los Santos, A.O. and Cervantes, E.O. 1999. The Oil Palm Nursery: Foundation for High Production. *Better Crops International* 13: 39-44.
- Nemes, S., Datnoff, L.E. and Strandberg, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixed to colonize plant root and control root disease of vegetables and citrus. *Crop Protection* 15: 735-742.
- Neueglise, C.Y., Brygoo, Y. and Riba, G. 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycological Research* 98: 322-328.

- 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.
- Numberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198: 249-266.
- Pithakkit, S., Petcharat, V., Chuenchit, S., Pornsuriya, C. and Sunpapao, A. 2015. Isolation of antagonistic actinomycetes species from rhizosphere as effective biocontrol against oil palm fungal diseases. *Walailak Journal of Science and Technology* 12: 481-490.
- Pornsuriya, C. and Sunpapao, A. 2014. Formulation of *Streptomyces philanthi* RL-1-178 biocontrol agent against *Sclerotium* root and stem rot of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *The Philippine Agricultural Scientist* 97: 273-279.
- Pornsuriya, C., Sunpapao, A., Srihanant, N., Worapattamasri, K., Kittimorakul, J., Phithakkit S., and Petcharat, V. 2013. A Survey of Diseases and Disorders in Oil Palms 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.-an incitant of spider lily leaf tip blight. *The Bioscan* 7: 701-703.
- Prasad, R.D. and Rangeshwaran, R. 1998. A modified liquid medium for mass production of *Trichoderma* by fermentation process. *In Abstracts of National symposium on Eco-friendly approaches in the management of plant diseases* December 22-24, 1998, Shimoga, Karnataka, India.
- Rahman, M.A., Begum, M.F. and 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
- Rocha, A.C.S., Garcia, D., Uetanabaro, A. P.T., Carneiro, R. T. O., Araujo, I. S., Mattos, C. R. R. and Goes-Neto, A. 2011. Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity* 47: 75-80.

- Rosmana, A., Samuels, G.J., Ismaiel, A., Ibrahim, E. S., Chaverri, P., Herawati, Y. and Asman, A. 2015. *Trichoderma asperellum*: A Dominant Endophyte Species in Cacao Grown in Sulawesi with Potential for Controlling Vascular Streak Dieback Disease. *Tropical Plant Pathology* 40: 19-25.
- Samuels, G.J., Lieckfeldt, E. and Nirenberg, H.I. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51: 71-88.
- Schmitz, H. 1930. Food poisoned technique. *Industrial Engineering Chemical Analyst Education*, p. 361-363.
- Sharma, P., Patel, A.N., Saini, M.K. and Deep, S. 2012. Field demonstration of *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter in wheat (*Triticum aestivum* L). *Journal of Agricultural Science* 4: 65-73
- Shikha, T. and Harsh, N.S.K. 2014. Phylloplane fungi as biocontrol agent against *Alternaria* leaf spot disease of (Akarkara) *Spilanthes oleracea*. *Bioscience Discovery* 5: 139-144.
- Siddhardha, B., Prabhakar, P., Suryanarayana, Murty, U.S.N. and Venkateswarlu, Y. 2009. Secondary metabolites of *Curvularia oryzae* MTCC 2605. *Records of Natural Products* 3: 204-208.
- Singh, B.N., Singh, A., Singh, B.R. and Singh, H.B. 2014. *Trichoderma harzianum* elicits induced resistance in sunflower challenged by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology* 116: 654-666.
- Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and Their Teleomorphs. *Mycological Papers*. United Kingdom, 1-261.
- Sunpapao, A., Kittimorakul, J. and Pornsuriya, C. 2014. Identification of *Curvularia oryzae* as cause of leaf spot disease on oil palm seedlings in nurseries of Thailand. *Phytoparasitica* 42: 529-533.
- Tadijan, I., Grahovac, J., Dodic, J., Grahovac, M. and Dodic, S. 2016. Effect of Cultivation Time on Production of Antifungal Metabolite(s) by *Streptomyces hygrosopicus* in Laboratory-Scale Bioreactor. *Journal of Phytopathology* 164: 310-317.

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L. and Lorito, M. 2008. Trichoderma plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1-10.
- Viterbo, A., Inbar, J., Hadar, Y. and Chet, I. 2007. Plant disease biocontrol and induced resistance via fungal mycoparasites. In: *Environmental and Microbial Relationships*, 2nd edn. *The Mycota IV*. (eds. C.P. Kubicek and I.S. Druzhinina). Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 127-146.
- Webster, J. and Weber, R.W.S. 2007. Introduction to Fungi. Cambridge: Cambridge University Press.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- Wijesinghe, C.J., Wijeratnum, R.S.W., Samarasekara, J.K.R.R. and Wijesundera, R.L.C. 2011. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). *Crop Protection* 30: 300-306.
- Wijesinghe, C.J., WilsonWijeratnam, R.S., Samarasekara, J.K.R.R. and Wijesundera, R.L.C. 2010. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an isolate of *Trichoderma asperellum*. *Biological Control* 53: 285-290.
- Woo, L.S. and Lorito, M. 2007. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, (eds. M. Vurro and J. Gressel) Springer: 107-130.
- Zhang, Q., Zhang, J., Yang, L., Zhang, L., Jiang, D., Chen, W. and Li, G. 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control* 72: 98-108.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. Glucose Yeast Malt extract Agar (GYMA)

Glucose	4 กรัม
Yeast	4 กรัม
Malt extract	10 กรัม
Agar	17 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่นรวมทั้งหมดทั้งหมดที่ผสมละลายเข้ากันนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 – 20 นาที

2. Glucose Yeast Malt broth (GYMB)

Glucose	4 กรัม
Yeast	4 กรัม
Malt extract	10 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่นรวมทั้งหมดทั้งหมดที่ผสมละลายเข้ากันนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 – 20 นาที

3. Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200 กรัม
Dextrose	20.0 กรัม
Agar	15.0 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วล้างน้ำให้สะอาด ตัดออกเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก แล้วจึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกเนื้อมันฝรั่งออกจากจากน้ำ จากนั้นเติมน้ำตาล dextrose 20.0 กรัม ลงในน้ำมันฝรั่งต้มและคนจนน้ำตาล dextrose ละลาย แล้วจึงเติมน้ำที่ละลายวุ้น 500

มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วเทใส่ภาชนะที่มีฝาปิด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

4. Potato dextrose broth (PDB)

Potato	200 กรัม
Dextrose	20.0 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

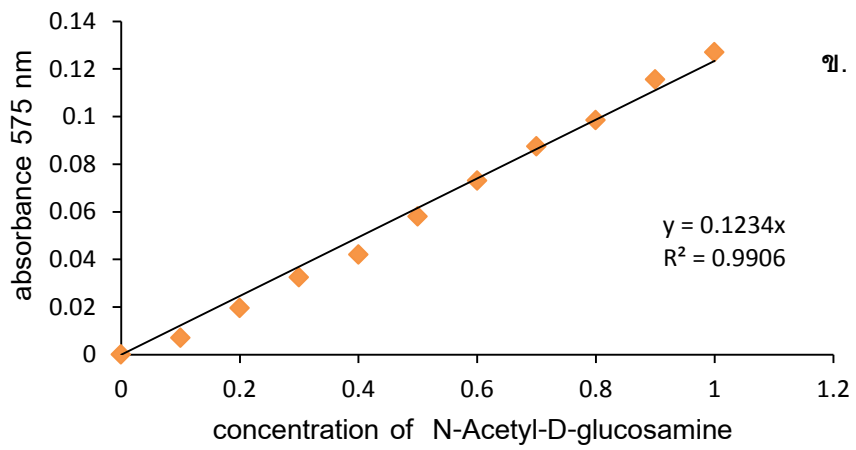
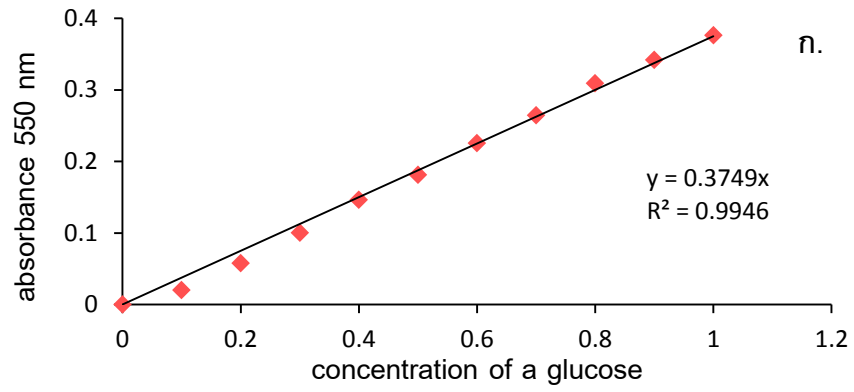
นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วล้างน้ำให้สะอาด ตัดออกเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก แล้วจึงนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกเนื้อมันฝรั่งออกจากน้ำ จากนั้นเติมน้ำตาล dextrose 20.0 กรัม และคนจนน้ำตาล dextrose ละลาย จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 ประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ที่แยกจากใบปาล์มน้ำมันในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *Curvularia oryzae* โดยวิธีการ dual culture plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ไอโซเลข	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ^{1/}	ไอโซเลข	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ^{1/}
T76-18/1	40.71±0.17	V76-9	63.93±0.85
T76-1/1	75.00±0.17	V76-18	67.86±0.23
T76-15/1	72.50±0.15	V76-12	86.43±0.10
T76-6	75.71±0.00	V76-1	67.50±0.17
T76-1	85.71±0.16	V76-14	85.36±0.05
T76-18/2	73.21±0.26	V76-18/1	62.14±0.10
T76-12/2	80.71±0.17	V76-15/1	51.79±0.15
T76-12/3	72.50±0.15	E976-6	65.00±0.40
T76-12/1	66.07±0.12	E876-9	66.79±0.12
T76-14	81.79±0.15	E976-4	58.93±0.25
T76-1/2	60.00±0.14	E876-14	58.21±0.09
V76-6	75.71±0.08	E976-23	59.64±0.22
V76-23	41.79±0.09	TM2/1	80.71±0.23
V76-15/2	75.36±0.05	NR8-2	75.71±0.11

^{1/}ค่าเฉลี่ย (4 ซ้ำ) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานกลูโคส (ก.) และ N-Acetyl-D-glucosamine (ข.)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ราปฏิบัติผลิต

ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส (U/ml) ^{1/}
NR8-2	0.000±0.00
T76-1	0.347±0.08
T76-12/2	0.050±0.00
T76-14	0.066±0.02
TM2/1	0.034±0.03
V76-12	0.020±0.02
V76-14	0.014±0.02

^{1/}ค่าเฉลี่ย (4 ซ้ำ) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 3 ปริมาณเอนไซม์ไคติเนสที่ราปฏิบัติผลิต

ไอโซเลท	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส (U/ml) ^{1/}
NR8-2	0.000±0.00
T76-1	0.000±0.00
T76-12/2	0.000±0.00
T76-14	0.000±0.00
TM2/1	0.026±0.02
V76-12	0.000±0.00
V76-14	0.000±0.00

^{1/}ค่าเฉลี่ย (4 ซ้ำ) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 4 องค์ประกอบสารระเหยที่ปลดปล่อยจากรา *Trichoderma spirale* T76-1

Component Retention time (min)	%Relative peak area	Compound Name	Formula
2.5563	0.08	Ethyl Acetate	C ₄ H ₈ O ₂
3.1760	1.00	Ethanol	C ₂ H ₆ O
10.0725	0.13	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (R)-	C ₁₀ H ₁₆
12.9693	0.15	3-Octanone	C ₈ H ₁₆ O
15.5871	0.21	2-Pentenoic acid, 4,4-dimethyl-, methyl ester	C ₈ H ₁₄ O ₂
18.6260	1.89	Ethyl-3-ethoxy-3-hydroxy-2-(2-hydroxybenzoyl)acrylate	C ₁₄ H ₁₆ O ₆
18.8757	0.13	.alpha.-Cubebene	C ₁₅ H ₂₄
19.0257	1.64	Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂
19.3154	0.14	(1S,2E,6E,10R)-3,7,11,11-Tetramethylbicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene	C ₁₅ H ₂₄
19.4998	0.74	3-Isopropyl-6,8a-dimethyl-1,2,4,5,8,8ahexahydroazulene	C ₁₅ H ₂₄
19.8900	0.18	3-Acetyl-4-ethenylphenyl acetate	C ₁₂ H ₁₂ O ₃
19.9427	0.19	(S*,S*)-2-Hydroxy(4-methoxy-2-trimethylsilylphenyl)methyl-1-cycloheptanone	C ₁₈ H ₂₈ O ₃
20.1324	1.13	.alpha.-Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄
20.2912	0.12	1H-cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene,3a,3b,4,5,6,7-hexahydro-3,7-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, [3aS-(3a.alpha.,3b.beta.,4.beta.,7.alpha.,7aS*)]-	C ₁₅ H ₂₄
20.6034	0.53	1,4-cyclohexadiene, 6-isopropenyl-1,2,3,4-tetramethyl-	C ₁₃ H ₂₀
20.9293	2.06	(-)-Tricyclo[6.2.1.0(4,11)]undec-5-ene, 1,5,9,9-tetramethyl- (isocaryophyllene-11)	C ₁₅ H ₂₄
21.1593	11.01	2,4-Diisopropenyl-1-methyl-1-vinylcyclohexane	C ₁₅ H ₂₄
21.3618	0.88	Aromandendrene	C ₁₅ H ₂₄

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

Component Retention time (min)	%Relative peak area	Compound Name	Formula
21.4251	0.63	Spiro[5.5]undec-2-ene, 3,7,7-trimethyl-11-methylene	C ₁₅ H ₂₄
21.6994	0.61	(1S,4S,4aS)-1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,4,4a,5-hexahydronaphthalene	C ₁₅ H ₂₄
21.8081	1.22	5-Azulenemethanol, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-.alpha.,.alpha.,3,8-tetramethyl-, acetate, [3S-(3.alpha.,5.alpha.,8.alpha.)]-	C ₁₇ H ₂₈ O ₂
22.0279	1.55	Azulene, 1,2,3,3a,4,5,6,7-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,3a.beta.,4.alpha.,7.beta.)]-	C ₁₅ H ₂₄
22.1011	2.09	.delta.-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄
22.1385	0.97	1-ISOPROPYL-4,7-DIMETHYL-1,2,4A,5,8,8AHEXAHYDRONAPHTHALENE	C ₁₅ H ₂₄
22.3050	2.08	4a-Methyl-1-methylene-7-(1-methylethylidene)-decahydronaphthalene	C ₁₅ H ₂₄
22.6092	3.17	(+)-LEDEN	C ₁₅ H ₂₄
22.7191	1.25	(+)-epi-Bicyclosesquiphellandrene	C ₁₅ H ₂₄
22.8940	4.88	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.)-	C ₁₅ H ₂₄
22.9664	3.61	.alpha.-Selinene	C ₁₅ H ₂₄
23.0442	1.61	(1S,2E,6E,10R)-3,7,11,11-Tetramethylbicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene	C ₁₅ H ₂₄
23.2850	0.63	Oxime-, methoxy-phenyl-	C ₈ H ₉ NO
23.7243	0.13	cis-(-)-2,4a,5,6,9a-Hexahydro-3,5,5,9-tetramethyl(1H)benzocycloheptene	C ₁₅ H ₂₄

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

Component Retention time (min)	%Relative peak area	Compound Name	Formula
23.7804	0.77	(3S,3aR,3bR,4S,7R,7aR)-4-Isopropyl-3,7-dimethyloctahydro-1Hcyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzen-3-ol	C ₁₅ H ₂₆ O
23.8477	0.22	Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethylidene)-, (1S-cis)-	C ₁₅ H ₂₄
24.0519	0.12	Benzene, 1,5-dichloro-2-methoxy-3-methyl-	C ₈ H ₈ Cl ₂ O
24.2377	1.15	(1S-cis)-1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-naphthalene	C ₁₅ H ₂₂
25.1530	0.35	CALACORENE	C ₁₃ H ₁₆
25.2734	0.74	4aH-Cycloprop[e]azulen-4a-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	C ₁₅ H ₂₆ O
25.4655	0.51	2-Pentenoic acid, 2,3-dimethyl-	C ₇ H ₁₂ O ₂
26.5718	0.34	1,5,5,9-TETRAMETHYLSPIRO[5.5]UNDECA-1,8-DIENE	C ₁₅ H ₂₄
26.6419	0.27	Di-epi-1,10-cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O
26.8516	3.99	1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	C ₁₅ H ₂₆ O
27.4087	0.34	(-)-Spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O
27.6553	0.22	.tau.-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O
27.7284	0.29	1,3-Dioxolan-2-one, 5-methyl-4-(4,4-dimethyl-2,3-dimethylenecyclohexyl)	C ₁₄ H ₂₀ O ₃
27.8037	0.20	.tau.-Muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O

ตารางภาคผนวกที่ 4 (ต่อ)

Component Retention time (min)	%Relative peak area	Compound Name	Formula
28.2594	0.20	Selin-6-en-4.alpha.-ol	C ₁₅ H ₂₆ O
28.4835	0.24	Neointermedeol	C ₁₅ H ₂₆ O
29.6564	1.98	2,4a,5,8a-Tetramethyl-1,2,3,4,4a,7,8,8a octahydronaphthalen-1-ol	C ₁₄ H ₂₄ O
33.9291	1.82	Tricyclo[4.4.0.0(2,7)]dec-3-ene-3-methanol, 1-methyl-8-(1-methylethyl)-	C ₁₅ H ₂₄ O

ตารางภาคผนวกที่ 5 ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง นาน 6 เดือน

month	Growth inhibition (%) ^{1/}					
	control T76-1	control TM2/1	NR8-2	T76-1	TM2/1	T76-1+TM2/1
1	74.38±0.05	71.88±0.15	71.88±0.10	73.75±0.17	69.38±0.15	71.25±0.17
2	70.63±0.15	68.75±0.30	71.25±0.15	71.88±0.27	65.00±0.19	71.25±0.17
3	63.75±0.06	60.63±0.19	31.25±0.10	73.13±0.24	65.00±0.17	71.88±0.13
4	60.63±0.22	57.50±0.14	17.50±0.13	71.88±0.24	62.50±0.08	68.13±0.13
5	48.13±0.10	43.13±0.10	15.63±0.10	53.13±0.10	50.63±0.17	51.88±0.15
6	30.00±0.05	22.50±0.24	0.00±0.29	37.50±0.46	30.00±0.00	37.50±0.10

^{1/}ค่าเฉลี่ย (4 ซ้ำ) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 6 ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน

month	Growth inhibition (%) ^{1/}					
	control T76-1	control TM2/1	NR8-2	T76-1	TM2/1	T76-1+TM2/1
1	79.44±0.15	76.67±0.26	76.67±0.26	67.22±0.24	73.33±0.22	77.78±0.36
2	73.89±0.33	72.78±0.33	75.00±0.22	77.78±0.29	69.44±0.32	75.00±0.21
3	67.78±0.06	65.00±0.19	38.89±0.17	77.78±0.22	68.89±0.24	76.11±0.21
4	65.00±0.22	62.22±0.14	26.67±0.08	76.67±0.25	66.67±0.24	71.67±0.13
5	42.78±0.10	38.33±0.10	13.89±0.17	47.22±0.10	45.00±0.10	46.11±0.15
6	30.63±0.10	23.13±0.10	0.00±0.00	31.25±0.29	28.13±0.46	38.75±0.10

^{1/}ค่าเฉลี่ย (4 ซ้ำ) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางภาคผนวกที่ 7 อัตราการรอดชีวิตของราปฏิบักษ์ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

month	Growth inhibition (10 ⁸ cfu/ml) ^{1/}					
	Control T76-1	Control TM2/1	NR8-2	T76-1	TM2/1	T76-1+TM2/1
1	87.25±2.04	86.00±2.68	-	86.00±1.25	88.25±2.25	87.00±1.96
2	81.00±1.25	82.75±1.34	-	82.75±2.42	83.75±3.14	86.50±2.50
3	69.75±2.28	66.00±2.85	-	83.25±3.12	83.00±1.89	84.75±2.65
4	58.25±1.43	52.25±2.41	-	81.25±2.84	82.00±1.38	83.75±1.49
5	50.00±1.55	49.50±0.70	-	79.75±1.44	79.00±2.94	78.75±2.02
6	40.00±0.94	39.50±1.58	-	77.50±0.65	76.75±0.82	78.25±1.04

^{1/}ค่าเฉลี่ย (4 ซ้ำ) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่ตรวจสอบการมีชีวิตรอดเนื่องจากใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ

ตารางภาคผนวกที่ 8 อัตราการรอดชีวิตของราปฏิบักษ์ในสูตรสำเร็จชนิดอิมัลชันเมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิห้อง

month	Growth inhibition (10^8 cfu/ml) ^{1/}					
	Control T76-1	Control TM2/1	NR8-2	T76-1	TM2/1	T76-1+TM2/1
1	85.25±1.03	83.00±0.58	-	88.75±1.03	87.50±1.19	90.75±1.80
2	79.25±0.75	79.50±2.18	-	88.25±1.31	83.50±1.32	85.00±1.08
3	71.25±2.02	64.75±1.75	-	83.00±2.12	80.00±1.47	79.75±0.75
4	50.75±0.85	47.75±0.85	-	78.75±0.95	76.50±1.58	77.50±0.65
5	44.00±0.58	41.75±1.65	-	68.75±0.48	65.50±0.71	71.50±1.70
6	37.75±0.48	34.00±0.91	-	50.50±1.71	44.25±2.08	53.25±1.50

^{1/}ค่าเฉลี่ย (4 ซ้ำ) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

- ไม่ตรวจสอบการมีชีวิตรอดเนื่องจากใช้น้ำเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ค

การจัดเรียงลำดับเบส DNA ส่วน ITS ของราที่ได้จากการคัดเลือก เปรียบเทียบกับลำดับเบส DNA จาก GenBank ของ National center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov)

ลำดับเบสของรา *Trichoderma* T76-1 มีความคล้ายกับลำดับเบสของรา *Trichoderma spirale* (KM011996 1095 bp) ที่ 99 เปอร์เซ็นต์

AAGACAGTGATGCACTCCAACCCAATGTGAACGTTACCAAAGTGTGCCTCGGCGGG
 ATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGGAGGACCAA
 CCAAAGTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGC
 CCCTCGTGGGCGTTTTGAAAATGAATCAAAGCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTG
 GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
 ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTC
 CGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCC
 TTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCA
 GTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCCA
 AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC
 AATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCG
 GCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCCTCGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGA
 TGCTTTTGGTGAGGTGCCGCCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAG
 AGCCCCGTCTGGCTGGCCACCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGT
 TTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGA
 GACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTGAAAAGAGGGT
 TAATATACTGAGTGTTTGGGAGAGAGGAGAAGGAAAACCCAAGGGATTTCAAAGTG
 AATAAAAT

ลำดับเบสของรา *Trichoderma* T76-12/2 มีความคล้ายกับลำดับเบสของรา *Trichoderma spirale* (KM011996 1095 bp) ที่ 99 เปอร์เซ็นต์

AAGCAGTTATTATACTCCCAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCCGGCGG
GATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCCGCCGGTAGGACC
AACCAAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGC
GCCCCTCGTGGGCGTTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCT
GTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGG
CCCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGC
GCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACC
CCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCAT
ATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAA
GCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCTCGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGA
GGATGCTTTTTGGTGAGGTGCCGCCCGAGTTCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGT
GAGAGCCCCGTCTGGCTGGCCACCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAG
TAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATATTGCC
AGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTGAAAAGAG
GGTAAATATAGTGAGTTTTTTTTTGGAGAGAGAAGAAAAAAGAAGGGTTTTTTAAATG
GT

ลำดับเบสของรา *Trichoderma* T76-14 มีความคล้ายกับลำดับเบสของรา *Trichoderma asperellum* (KF723005 1690 bp) ที่ 99 เปอร์เซ็นต์

AAATCGGGACTCACTCCAAACCAATGTGACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGT
CACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGAGGAACCAAC
CAAACCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCA
AAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA
GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCC
TCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCG
GCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAA
CTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAACACCCAACCTTTCTGAAATGT
TGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
AAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA
TTTGAAATCTGGCCCTCCGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAG
GTGCCGCCCGAGTTCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGG
CTGGCCACCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTG
CTCAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATATTGGGCCAGAGACCGATAGCG
CACAAGTAGAGTGGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTTGAAAAGAGGGGTAAACAGT
ACGTGAAATGTGTTGAAAGGGGAAAAGGGATTGCGTGTTTTTTTTGGGTTGGG

ลำดับเบสของรา *Trichoderma* V76-12 มีความคล้ายกับลำดับเบสของรา *Trichoderma spirale* (KM011996 1095 bp) ที่ 99 เปอร์เซ็นต์

TTGGATGATATAGTCCAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATC
TCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCA
AAACTCTTATTGTATACCCCCTCGCGGGTTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCC
TCGTGGGCGTTTTGAAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGA
GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTT
ACGGGGCCCGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGT
AGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCCAAA
CTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCCCTCGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATG
CTTTTGGTGAGGTGCCGCCCGAGTTCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAG
CCCCGTCTGGCTGGCCACCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTT
GGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGA
CCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTGAAAAGAGGGTAA
ATATACTGAGTTTTGTTGGGGAAGGAAGAAAAAAAAGCCAATTCTTTTGT

ลำดับเบสของรา *Trichoderma* V76-14 มีความคล้ายกับลำดับเบสของรา *Trichoderma asperellum* (KF723005 1690 bp) ที่ 99 เปอร์เซ็นต์

TGAGGGGGTACAGTCCCAACCCAATGTGAACGTTTACCAAACCTGTTGCCTCCGGCGG
 GGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCCGGTAGGAAC
 CAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAA
 TTCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC
 GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
 ACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
 CCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTG
 CCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGC
 ACAACTCGCACCCGGGAGCGCGGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACTTTCTGA
 AATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
 AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCT
 CAAATTTGAAATCTGGCCCCTCCGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGT
 GAGGTGCCGCCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCCGTC
 TGGCTGGCCACCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATG
 CTGCTCAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAG
 CGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACCTTGAAAAGAGGGTTAAACAGTA
 CGTGAATGTTTTAAAGGGGAAAAAGGATCTGTATTT

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวอรุณิชา ตันติพลานนท์	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5810620043	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2558

ทุนการศึกษา

สถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สถานวิจัย ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์และเผยแพร่ผลงาน

อรุณิชา ตันติพลานนท์ และ ชนินันท์ พรสุริยา. 2559. การคัดเลือกราปฏิปักษ์ที่แยกจากใบปาล์ม
น้ำมันเพื่อควบคุมรา *Curvularia oryzae* Bugnic. สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์ม
น้ำมัน. วารสารแก่นเกษตร 44 ฉบับพิเศษ 1: 2559

อรุณิชา ตันติพลานนท์ เอกพันธ์ หมะหมีน ปัทมาศ อารีเอื้อ กัลยา เหม่มล่า และ ชนินันท์
พรสุริยา. 2559. การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์เพื่อยับยั้งการเจริญของรา
Curvularia oryzae สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. วารสารพืชศาสตร์สงขลา
นครินทร์ 3 ฉบับพิเศษ 1: 2559