แบบรายงานการวิจัยการพัฒนาการวิจัยการเกษตร ฉบับสมบูรณ์

รหัสโครงการ PRP5905020220

การใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. และ salicylic acid เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองในระบบเกษตรอินทรีย์เพื่อการส่งออก

Use of *Trichoderma* sp. and salicylic acid for improving the efficiency of controlling leaf spot disease of Hom Thong banana under organic agriculture for export

วีระณีย์ ทองศรี หัวหน้าโครงการวิจัย

สมศิริ แสงโชติ ผู้ร่วมวิจัย

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตบางเขน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สวก.) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยในโครงการ “การใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. และ salicylic acid เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองในระบบเกษตรอินทรีย์เพื่อการส่งออก” ประจำปีงบประมาณ 2559 และขอขอบคุณสวนกล้วยหอมทองปุณธนาลัย อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่ในการทำวิจัยตลอดโครงการ

วีระณีย์ ทองศรี
สมศิริ แสงโชติ

พฤษภาคม 2560

บทคัดย่อ

โรคใบจุดเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการผลิตกล้วยหอมทองในประเทศไทย โดยทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาผลของกรดซาลิไซลิกและเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ และการควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลองและในสภาพไร่ที่อำภอหนองแค จังหวัดสระบุรี โดยทำการแยกเชื้อราจากใบที่เป็นโรค และจำแนกโดยวิธีสัณฐานวิทยา พบเชื้อรา 6 ไอโซเลทที่ก่อให้เกิดโรค แบ่งเป็นสกุล *Alternaria* spp. 3 ไอโซเลท (HY022, HR023-1 และ HR01) สกุล *Curvularia* spp. 2 ไอโซเลท (HC011 และ HC022) และสกุล *Nigrospora* sp. 1 ไอโซเลท (HB023) โดยเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 เป็นไอโซเลทที่ก่อโรครุนแรงที่สุด และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* sp. และกรดซาลิไซลิกต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ พบว่า *Trichoderma* sp. สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ตั้งแต่ 50-100% ส่วนกรดซาลิไซลิก (1.5 mM) สามารถควบคุมได้ 12-71% และยังช่วยลดความหนาแน่นของเส้นใยบนแผลได้มากกว่า 30% นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีความทนต่อกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้นดังกล่าวในระดับสูง โดยสามารถมีชีวิตรอดได้มากกว่า 90% และจากการทดสอบศักยภาพของสิ่งควบคุมทั้งสองชนิดในการควบคุมโรคใบจุดที่ได้จากการปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 ในสภาพแปลงทดลอง ซึ่งทำการฉีดพ่นทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ในฤดูแล้งเชื้อรา *Trichoderma* sp. และกรดซาลิไซลิกสามารถลดความรุนแรงของโรคได้มากกว่า 40% ส่วนในฤดูฝน *Trichoderma* sp. ลดความรุนแรงของโรคได้มากกว่า 60% แต่กรดซาลิไซลิกลดความรุนแรงของโรคได้เท่าเดิม และเมื่อทำการทดลองในสภาพไร่ในช่วงฤดูฝน พบว่า การใช้กรดซาลิไซลิกเพียงอย่างเดียว และการใช้สลับกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถลดการเกิดจำนวนจุดแผลได้มากกว่า 40% ในขณะที่การใช้กรดซาลิไซลิกเพียงอย่างเดียวสามารถลดความรุนแรงของโรคได้มากที่สุดถึง 50% ซึ่งตรงกันข้ามกับการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. ที่ไม่สามารถลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคในสภาพธรรมชาติได้ อย่างไรก็ตาม ทั้งเชื้อรา *Trichoderma* sp. และกรดซาลิไซลิกยังสามารถช่วยชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดกลไกในการป้องกันตนเองขึ้น โดยพบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase, β-1,3-glucanase และ chitinase ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสิ่งควบคุมทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม จึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำสิ่งควบคุมนี้โดยเฉพาะกรดซาลิไซลิกมาใช้ในการจัดการโรคพืชของไม้ผลชนิดอื่นๆ ต่อไป

Abstract

Leaf spot is an important disease of banana cv. Hom Thong production in Thailand. It causes the reduction of banana yields both in terms of quantity and quality. This research aims to investigate the effects of fungal antagonist, *Trichoderma* sp. and salicylic acid on inhibiting the *in vitro* growth of the fungal causal agents, and on controlling leaf spot disease in the experimental field as well as in natural banana fields at Nong Khae district, Saraburi province. Pathogens were isolated from diseased leaves and identified by morphological features. The results showed that 6 isolates in 3 genera of fungi were pathogenic to banana including 3 isolates of *Alternaria* spp. (HY022, HR023-1 and HR01), 2 isolates of *Curvularia* spp. (HC011 and HC022), and the isolate of *Nigrospora* sp. (HB023). The most virulence pathogen was *Alternaria* sp. HR023-1 isolate. Additionally, the efficiency of *Trichoderma* sp. and salicylic acid on *in vitro* growth of the pathogens was evaluated. The results revealed that the antagonistic fungus and 1.5 mM salicylic acid showed inhibitory effects on the pathogens ranging from 50-100 and 12-17%, respectively. Moreover, the latter reduced mycelial density on the lesions by more than 30%. Interestingly, *Trichoderma* sp. was tolerant to 1.5 mM salicylic acid by more than 90%. In the experimental field, disease severity of banana inoculated with *Alternaria* sp. HR023-1 and treated weekly with the control agents were recorded for 4 weeks. In dry season, *Trichoderma* sp. and salicylic acid decreased disease severity by more than 40%. In rainy season, the former showed higher reduction on disease severity by more than 60%, while the latter exhibited the same level of disease reduction as in dry season. Additionally, in banana plantation areas, salicylic acid alone or alternated with *Trichoderma* sp. could reduce numbers of spot on the leaves by more than 40% in rainy season. Salicylic acid alone also suppressed disease severity up to 50%, while *Trichoderma* sp. alone had no effect on decreasing disease development in the natural fields. Both control agents had the potential to elevate defensive enzymes against pathogens, including phenylalanine ammonia-lyase, ß-1,3-glucanase and chitinase in plant tissues. This indicated that *Trichoderma* sp. and salicylic acid gave the direct and indirect inhibition of leaf spot disease on banana. However, salicylic acid should be further evaluated before applying to plant diseases of other fruit crops.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญตาราง	ii
สารบัญภาพ	iii
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	3
ผลการวิจัย	7
วิจารณ์ผลการวิจัย	37
สรุปผลการวิจัย	40
ข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	41

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนใบกล้วยหอมทองหลังจากปลูกเชื้อโดยวิธี detached leaf บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) ความชื้นสัมพัทธ์ 85% เป็นเวลา 6 วัน	10
2	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคไอโซเลทต่างๆ ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 2 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน	13
3	เปอร์เซ็นต์การเกิดพิษและขนาดแผลบนเนื้อเยื่อใบกล้วยหอมทองอ่อนที่อายุ 3 วันหลังใบคลี่ที่ผ่านการหยดด้วยสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	14
4	ผลของสารหมักสมุนไพรต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 และการเจริญของ germ tube บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	24

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Alternaria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 7 วัน	8
2	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Curvularia* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 7 วัน	9
3	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Nigrospora* sp. ไอโซเลท HB023 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 7 วัน	9
4	ลักษณะแผลจากการปลูกเชื้อราโดยวิธี detached leaf บนใบกล้วยหอมทองแบบไม่ทำแผล ที่อายุ 6 วันหลังจากปลูกเชื้อ	11
5	ลักษณะอาการแผลบนใบกล้วยหอมทองหลังจากปลูกเชื้อในแปลงทดลองโดยวิธีทำแผลเป็น เวลา 7 วัน	12
6	เชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 เจริญร่วมกับเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 (A), *Curvularia* sp. HC022 (B) และ *Nigrospora* sp. HB023 (C) บนอาหาร PDA บ่มที่ อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 5 วัน	13
7	เชื้อรา *Trichoderma* sp. V014 เจริญร่วมกับเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 (A), *Curvularia* sp. HC022 (B) และ *Nigrospora* sp. HB023 (C) บนอาหาร PDA บ่มที่ อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 5 วัน	13
8	ความเป็นพิษบนใบอ่อนของกล้วยหอมทองที่อายุ 3 วันหลังใบคลี่หลังจากหยดด้วยสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	15
9	ลักษณะความเป็นพิษของสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 2 mM (วงกลม) หลังจาก ฉีดพ่นลงบนใบอ่อนของกล้วยหอมทองที่อายุ 3 วันหลังใบคลี่ในแปลงทดลอง และสังเกตอาการ ที่อายุ 7 วันหลังใบคลี่	15
10	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* spp. ไอโซเลท HR023-1, HY022 และ HR01 บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน	17
11	การเจริญของเชื้อรา *Alternaria* spp. ไอโซเลท HR023-1 (A), HY022 (B) และ HR01 (C) บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 mM บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน	18

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 และ *Nigrospora* sp. HB023 บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน	19
13	การเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 (A) และ *Nigrospora* sp. HB023 (B) บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน	20
14	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1, *Alternaria* sp. HY022, *Alternaria* sp. HR01, *Curvularia* sp. HC022 และ *Nigrospora* sp. HB023 บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน	21
15	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 และ V014 บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน	22
16	การเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 (A) และ *Trichoderma* sp. V014 (B) บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน	23
17	ความเป็นพิษของสารหมักสมุนไพรบนเนื้อเยื่อใบกล้วยหอมทองที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 4 วัน หลังจากหยดสาร	24
18	ผลของเชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 ต่อความรุนแรงของโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง หลังจากปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 และ *Curvularia* sp. HC022 โดยวิธี detached leaf เป็นเวลา 6 วัน	26
19	ผลของสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM ต่อความรุนแรงของโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง หลังจากปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 และ *Curvularia* sp. HC022 โดยวิธี detached leaf เป็นเวลา 6 วัน	27
20	ผลของสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM ต่อความหนาแน่นของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 บนแผลจุดของใบกล้วยหอมทองหลังจากปลูกเชื้อที่ 4 และ 6 วัน โดยวิธี detached leaf	28

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	การประเมินคะแนนความหนาแน่นของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* HR023-1 บนใบกล้วยหอมทองที่ 6 วันหลังจากปลูกเชื้อ หลังจากพ่นสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นจำนวน 3 ครั้งห่างกันทุก 2 วัน	29
22	ผลของสารหมักสมุนไพรที่ความเข้มข้น 2.5 ml/L ต่อความรุนแรงของโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง หลังจากปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 และ *Curvularia* sp. HC022 โดยวิธี detached leaf เป็นเวลา 6 วัน	30
23	ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ต่อการลดความรุนแรงของโรคใบจุดของกล้วยหอมทองในแปลงทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ (ครั้งที่1: ฤดูแล้ง) และมิถุนายน (ครั้งที่ 2: ฤดูฝน) 2559	31
24	ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต่อการเกิดจำนวนจุดแผลเฉลี่ยในแปลงกล้วยหอมทอง อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559	32
25	ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ต่อพื้นที่ใบที่เป็นโรคเฉลี่ยในแปลงกล้วยหอมทอง อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559	33
26	ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ต่อพื้นที่ใบที่เป็นโรคเฉลี่ยในแปลงกล้วยหอมทอง อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559	34
27	ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต่อพื้นที่ใบที่เป็นโรคในแต่ละสัปดาห์ในแปลงกล้วยหอมทอง อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559	35
28	ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง ในแปลงทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
29	ระดับอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยในช่วงเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ 2559 จากกรมอุตุนิยมวิทยา สถานีดอนเมือง กรุงเทพฯ	39
30	ระดับอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยในช่วงเดือนมิถุนายนและกรกฎาคม 2559 จากกรมอุตุนิยมวิทยา สถานีบัวชุม จังหวัดลพบุรี	39

บทนำ

กล้วยหอมทอง (*Musa acuminata*, AAA Group) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยที่มีแนวโน้มถึงความต้องการของตลาดในต่างประเทศมากขึ้นทุกๆ ปี ประเทศไทยสามารถผลิตกล้วยหอมได้ตลอดทั้งปี โดยในปี 2558 มีผลผลิตออกมากที่สุดอยู่ในช่วงเดือนเมษายน และธันวาคม ซึ่งสามารถให้ผลผลิตประมาณ 113,926 ตัน แต่สามารถส่งออกเพียง 3,297 ตัน คิดเป็นมูลค่า 99.17 ล้านบาท โดยมูลค่าส่งออกไปตลาดญี่ปุ่นคิดเป็นร้อยละ 50 (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2558) การผลิตกล้วยหอมทองเพื่อการส่งออกของประเทศไทยผลผลิตทั้งหมดจะต้องเป็นผลผลิตอินทรีย์ โดยเกษตรกรจะต้องมีการปฏิบัติในการจัดการแหล่งปลูก คือ ต้องไม่ฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยเด็ดขาด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสารพิษในผลิตผลเมื่อส่งถึงมือผู้บริโภค (สำนักงานสหกรณ์จังหวัดเพชรบุรี, 2557) ด้วยเหตุนี้ การปลูกกล้วยหอมทองในระบบเกษตรอินทรีย์ จึงมักประสบปัญหาจากการเข้าทำลายของศัตรูพืช โดยเฉพาะโรคพืชอย่างต่อเนื่อง ดังเช่นสวนกล้วยหอมทองปุณธนาลัย ซึ่งตั้งอยู่ที่อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ปลูกกล้วยหอมทองอินทรีย์แบบยกร่อง และมักประสบปัญหาเรื่องโรคใบจุดมาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนจะพบการระบาดของโรครุนแรงที่สุด สำหรับวิธีการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของกล้วยหอมทองในสวนนี้ เกษตรกรได้ใช้หลายวิธีร่วมกันในการจัดการโรค เช่น วิธีเขตกรรม คือ ตัดแต่งใบที่เป็นโรคออกไปเผาทำลายเพื่อลดจำนวนประชากรของเชื้อราสาเหตุโรคในแปลง ร่วมกับการฉีดพ่นสารหมักสมุนไพร (มีส่วนผสมของกระเทียมปน เหล้าขาว ว่านน้ำ ผงมังคุดแห้ง และน้ำ) โดยฉีดพ่นเฉพาะในช่วงที่มีการระบาดของโรค แต่ถึงแม้จะมีรายงานสนับสนุนว่าสารหมักสมุนไพรที่มีส่วนผสมดังกล่าวสามารถควบคุมโรคพืชได้ (ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง, 2557a; ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง, 2557b) แต่ถ้าหากเข้าสู่ฤดูฝน ในสวนนี้ก็ยังพบการระบาดของโรคใบจุดเรื่อยมา ซึ่งผลกระทบเนื่องจากอาการใบจุดนี้ ถึงแม้จะยังไม่มีรายงานความเสียหายต่อผลผลิตของกล้วยหอมทองในประเทศไทย แต่มีรายงานเนื่องจากโรคใบจุดซิกาโตก้าสีเหลืองของกล้วยไข่ ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora musae* ซึ่งพบว่าในแปลงที่เป็นโรครุนแรง จะทำให้น้ำหนักเฉลี่ยต่อเครือลดลงมากกว่า 5 กิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงที่ไม่เป็นโรค (จริยา, 2553) ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยหอมทองในสวนปุณธนาลัย ยังไม่มีรายงานยืนยันว่าเป็นเชื้อชนิดใด ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นศึกษาถึงเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา และการควบคุมโรคโดยใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ซึ่งเคยถูกนำมาใช้ในสวนแห่งนี้อย่างเนืองๆ โดยเชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าวได้มีรายงานสนับสนุนความสำเร็จในการควบคุมโรคพืชมาแล้วอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ (จิระเดช, 2546; สุมิสา และวีระศักดิ์, 2556; Martinez-Medina *et al.,* 2011; Alves de Aguiar *et al.,* 2014; Chamswarng *et al.,* 2014) ซึ่งเชื้อราชนิดนี้นอกจากจะมีกลไกในการแข่งขันสูง และสามารถสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อก่อโรคแล้ว (จิระเดช, 2546) ยังมีคุณสมบัติชักนำความต้านทานโรคให้แก่พืชอีกด้วย ดังเช่น จากรายงานของสุวิตา และคณะ (2554) รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถชักนำให้ต้นมะเขือเทศต้านทานต่อโรคใบจุดกระสุน ที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* โดยพบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase, β-1,3-glucanase และ protease ในขณะที่ สุมิสา และวีระศักดิ์ (2556) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถชักนำให้แตงเทศมีความต้านทานต่อโรคต้นแตกยางไหล ที่เกิดจากเชื้อรา *Didymella brioniae* ได้ รวมทั้ง Chowdappa *et al.*

(2013) รายงานว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum* OTPB3 สามารถชักนำให้มะเขือเทศสร้างเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืชขึ้น ได้แก่เอนไซม์ peroxidase, polyphenol oxidase และ superoxide dismutase เพื่อต้านทานต่อโรคใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternarai solani* และ *Phytophthora infestans* นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมีแนวคิดในการนำสารละลาย salicylic acid ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในพืชมากระตุ้นความต้านทานต่อโรค ดังจากรายงานของ Tongsri (2010) ที่ใช้สารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 0.5 mM กระตุ้นความต้านทานบนผลกล้วยหอมทองและช่วยลดความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสได้มากกว่า 60% ในขณะที่ Zhou *et al.* (2014) ได้ใช้สารละลาย salicylic acid เข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเกิดโรคผลเน่าในส้มได้ในระดับหนึ่ง โดยชักนำให้เนื้อเยื่อพืชสร้างเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองของพืชขึ้นมา ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำทั้งเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* และ salicylic acid มาใช้สลับกับสารหมักสมุนไพรซึ่งมีการใช้เป็นประจำอยู่แล้วในสภาพแปลง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคให้ดียิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยหอมทองและทดสอบการก่อโรค

เลือกพื้นที่ปลูกกล้วยหอมทองแบบยกร่องที่มีการจัดการแปลงในระบบเกษตรอินทรีย์ ในเขตอำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง โดยเก็บ 3 ร่องๆ ละ 5 จุด แต่ละจุดห่างกัน 100 เมตร และนำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting technique บนจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 25ºC ภายใต้แสงสว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน ตัดส่วนรอบนอกโคโลนีของเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืชมาเก็บในหลอดอาหารเอียง (slant agar) เพื่อศึกษาในการก่อโรค โดยนำไอโซเลทของเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้มาทดสอบการก่อโรคบนใบกล้วยหอมทอง โดยวิธี detached leaf ซึ่งตัดใบกล้วยออกจากก้านใบให้มีขนาด 20x30 เซนติเมตร ล้างใบกล้วยให้สะอาด และผึ่งให้แห้ง วางใบกล้วยในกล่องพลาสติกชั้น และปลูกเชื้อราที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลท โดยวางชิ้นส่วนวุ้นที่มีเชื้อรา (agar plug) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงไป 12 จุด (ให้ด้านที่มีเชื้อราสัมผัสกับผิวใบ) วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ บ่มกล่องชื้นไว้ที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะของแผล และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผล จากนั้นแยกเชื้อกลับ (re-isolation) เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อราสาเหตุโรคที่แท้จริง

2. การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. และสารละลาย salicylic acid ในสภาพห้องปฏิบัติการ

2.1 ควบคุมด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp.

นำเชื้อรา *Trichoderma* sp. มาควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง โดยวิธี dual culture technique บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25ºC ภายใต้แสงสว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 จาน บันทึกรัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคบนจานอาหารเลี้ยงเชื่อร่วม (dual culture plates) เปรียบเทียบกับจานอาหารเดี่ยวที่มีเฉพาะเชื้อราสาเหตุโรค (ชุดควบคุม) คำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้จากสูตร ดังนี้

$$GI\ (\%) = \left[\frac{R1 - R2}{R1} \right] \times 100$$

GI = การยับยั้งการเจริญเติบโต

R1 = รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R2 = รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเจริญร่วมกับ *Trichoderma*

2.2 ควบคุมด้วยสารละลาย salicylic acid

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ให้ได้ความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 2.0 2.5 และ 3 mM โดยวิธี poisoned food technique ย้ายเชื้อราสาเหตุโรคมาเลี้ยงบนจานอาหารดังกล่าว วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ บันทึกเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา และคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค ตามสูตรข้างต้น

2.3 ควบคุมด้วยสารหมักสมุนไพร

เนื่องจากเกษตรกรมีการฉีดพ่นสารหมักสมุนไพรในแปลงกล้วยหอมทองในช่วงที่มีการระบาดของโรคเป็นประจำอยู่แล้ว โดยจะทำการฉีดพ่นทุกสัปดาห์ หรือทุกสองสัปดาห์ต่อครั้งในช่วงฤดูฝน ซึ่งสารหมักสมุนไพร มีองค์ประกอบ คือ กระเทียมปน เหล้าขาว ว่านน้ำ และผงมังคุดแห้ง ในอัตราส่วน 1:2:2:1 โดยก่อนใช้เกษตรกรจะนำมาหมักกับน้ำสะอาดปริมาตร 20 ลิตร เป็นเวลา 1 คืน และฉีดพ่นในอัตราแนะนำ คือ 2.5 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งอัตราแนะนำดังกล่าวนี้ยังไม่มีการพิสูจน์ว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้หรือไม่ ดังนั้นจึงได้นำสารหมักสมุนไพรมาทำการทดลองดังกล่าว

เตรียมสารหมักสมุนไพรให้ได้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 2.5, 5.0 และ 10.0 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ใช้ pipette ดูดความเข้มข้นละ 500 ไมโครลิตร มาหยดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ได้หยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ก่อนแล้ว เกลี่ยส่วนผสมให้กระจายทั่วจาน บ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยสุ่มนับจาก 400 สปอร์ต่อซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์ และความยาวของ germ tube ตามสูตรข้างต้น

3. การควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. และสารละลาย salicylic acid ในสภาพแปลงทดลอง

<u>ทดสอบประสิทธิภาพของสิ่งควบคุมในห้องปฏิบัติการ</u>

ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธีวางชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงบนใบกล้วยขนาด 20x30 เซนติเมตรที่ผ่านการทำแผล โดยวิธี detached leaf จำนวน 12 จุดต่อ 1 ใบ หยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. (เข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) หรือหยดสารละลาย salicylic acid (ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษกับเนื้อเยื่อพืช) จำนวน 1 หยด โดยแยกจากกัน บ่มใบกล้วยในกล่องพลาสติกชื้นที่อุณหภูมิ 25°C ภายใต้แสงสว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 12 จุด บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (หยดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) และประเมินความหนาแน่นของเส้นใยบนแผล คำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดโรค โดยใช้สูตร ดังนี้

$$DI\ (\%) = \left[\frac{L1 - L2}{L1}\right] \times 100$$

DI = การยับยั้งการเกิดโรค

L1 = เส้นผ่าศูนย์กลางแผลในชุดควบคุม

L2 = เส้นผ่าศูนย์กลางแผลที่หยดเชื้อรา *Trichoderma* หรือสารละลาย salicylic acid

สำหรับการให้คะแนนความหนาแน่นของเส้นใยบนแผล ให้คะแนนดังนี้

คะแนน 0 = ไม่มีการเจริญของเส้นใย

คะแนน 1 = มีการเจริญของเส้นใย ≤ 25%

คะแนน 2 = มีการเจริญของเส้นใย 26-50%

คะแนน 3 = มีการเจริญของเส้นใย 51-75%

คะแนน 4 = มีการเจริญของเส้นใย 76-100%

รวมทั้งทดสอบการควบคุมโรคด้วยสารหมักสมุนไพรที่ความเข้มข้น 0, 2.5, 5.0 และ 10.0 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคกับการใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. และสารละลาย salicylic acid โดยดำเนินการทดลองและบันทึกผลเช่นเดียวกับข้างต้น

ควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลอง

นำเชื้อราไอโซเลทที่ก่อโรครุนแรงที่สุดมาปลูกเชื้อลงบนใบกล้วยที่ตำแหน่งใบที่ 3 จากใบล่างของต้นกล้วยพันธุ์หอมทองที่มีอายุ 6 เดือน โดยวางชิ้นวุ้นของเชื้อราลงบนใบกล้วย ที่ผ่านการทำแผลจำนวน 1 แผล (ใช้เทปแปะให้ชิ้นวุ้นอยู่บนแผล) วางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ใบ ใบละ 12 จุด และพ่นสิ่งควบคุม ตามกรรมวิธี ดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นสารละลาย salicylic acid (ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษกับเนื้อเยื่อพืช)

กรรมวิธีที่ 2 พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. (เข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)

กรรมวิธีที่ 3 พ่นสารละลาย salicylic acid สลับกับสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp.

กรรมวิธีที่ 4 ชุดควบคุม (พ่นด้วยน้ำ)

จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกชั้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปิดถุงออก และทำการพ่นสิ่งควบคุมห่างกันทุกสัปดาห์ บันทึกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลทุกสัปดาห์ คำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งความรุนแรงของโรคโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่พ่นด้วยน้ำ

4. การควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. และสารละลาย salicylic acid ในสภาพแปลงเกษตรกร

วางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ใบ ฉีดพ่นสิ่งควบคุมตามกรรมวิธีที่ใช้ในแปลงทดลองทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำเครื่องหมายที่บริเวณกึ่งกลางของใบให้มีความยาว 2 ฟุตเพื่อกำหนดพื้นที่ในการศึกษา โดยสุ่มเลือกให้มีจำนวนจุดแผลต่อพื้นที่ที่ใช้ในการประเมิน ไม่เกินค่าคะแนนระดับ 2 ตามวิธีการของ Chuang and Jeger (1984) ทำการนับจำนวนจุดแผล (disease incidence) และประเมินความรุนแรงของโรค (disease severity) ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ คำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดจุดแผลและความรุนแรงของโรคโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่พ่นด้วยน้ำ

5. การชักนำความต้านทานต่อโรคใบจุดของกล้วยหอมทองโดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. และ salicylic acid

เก็บตัวอย่างใบกล้วยที่ผ่านการฉีดพ่นสิ่งควบคุมทั้ง 4 กรรมวิธีในแปลงทดลองทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำใบกล้วยมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคของพืช ได้แก่ phenylalanine ammonia-lyase (PAL), β-1,3-glucanase และ chitinase วางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ใบ

5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

สกัดใบกล้วยตามวิธีการของ Ramamoorthy *et al.* (2002) และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยใช้ L-phenylalanine เป็น substrate ตามวิธีการของ Silva *et al.* (2004) ตรวจวัดปฏิกิริยาที่เปลี่ยนจาก L-phenylalanine เป็น cinnamic acid ที่การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectophotometer (Shimadzu, UV-160A) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ cinnamic acid

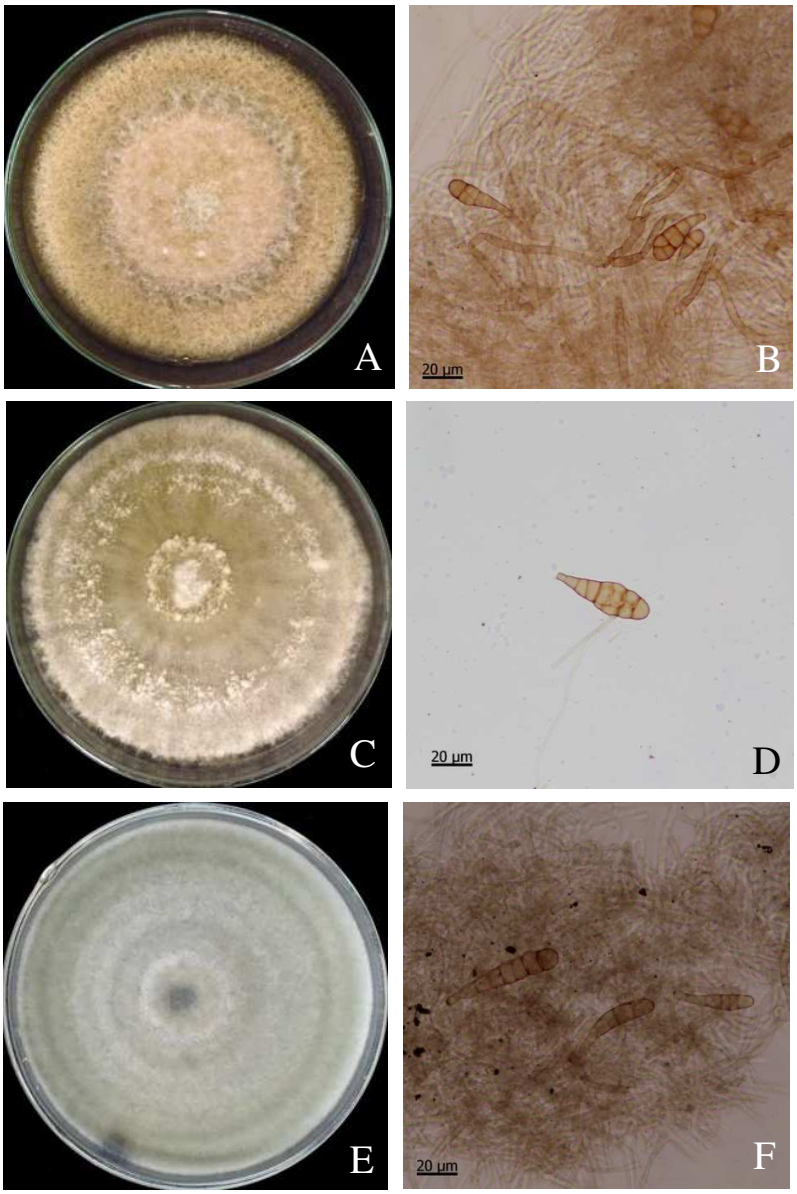
5.2 การตรวจวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase และ chitinase

สกัดใบกล้วยตามวิธีการของ Velasquez and Hammerschmidt (2004) จากนั้นนำ crude enzyme มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase โดยใช้ larminarin เป็น substrate ตามวิธีการของ Burner (1964) วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของ reducing sugar ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ glucose ส่วนการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ chitinase ใช้ 1% swollen chitin เป็น substrate ตามวิธีการของ Reissig *et al.* (1955) และตรวจวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 585 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ N-acetylglucosamine

ผลการวิจัย

1. แยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยหอมทองและทดสอบการก่อโรค

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยหอมทองโดยวิธี tissue transplanting technique พบว่าสามารถแยกได้เชื้อรา จำนวน 13 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อราทุกไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนใบกล้วยหอมทองโดยวิธีทำแผลในห้องปฏิบัติการ ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) ความชื้นสัมพัทธ์ 85% เป็นเวลา 5 วัน พบว่า มีเชื้อรา 6 ไอโซเลทเท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรค โดยแบ่งเป็นสกุล *Alternaria* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ HY022, HR023-1 และ HR01 สกุล *Curvularia* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ HC011 และ HC022 และสกุล *Nigrospora* จำนวน 1 ไอโซเลท คือ HB023 ซึ่งเชื้อราในสกุลเดียวกันแต่ต่างไอโซเลทมีลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA แตกต่างกัน โดยเชื้อรา *Alternaria* sp. HY022 มีลักษณะเส้นใยฟูสีขาว เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหม่น และมีการสร้าง pigment สีเหลืองบนอาหาร ส่วนไอโซเลท HR023-1 มีลักษณะเส้นใยฟูเล็กน้อย สีขาวหม่น เส้นใยบางส่วนจะจับกันเป็นก้อน และมีการสร้าง pigment สีแดงบนอาหาร ในขณะที่ไอโซเลท HR01 มีลักษณะเส้นใยฟูละเอียด สีเทาอ่อน เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเทาเข้ม และสร้าง pigment สีแดงบนอาหาร เชื้อรา *Alternaria* ทั้งสามไอโซเลทมีการผลิตสปอร์เป็นจำนวนน้อยมาก โดยไอโซเลท HR023-1 มีการผลิตสปอร์น้อยที่สุดหรือไม่ผลิตเลย ซึ่งสปอร์มีรูปร่างคล้ายกระบอง สีเข้ม มีผนังกั้นทั้งตามยาวและตามขวาง (longitudinal and transverse septa) (ภาพที่ 1) ส่วนเชื้อราในสกุล *Curvularia* ไอโซเลท HC011 มีลักษณะเส้นใยฟูสีเขียวมะกอก เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวมะกอกเข้มเกือบดำ และไอโซเลท HC022 เส้นใยมีลักษณะหยาบฟู สีเทาอ่อน เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเทาเข้ม รูปร่างของสปอร์มีลักษณะโค้งงอสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม มี 4 เซลล์ เซลล์ตรงกลางมีสีเข้มและขนาดใหญ่กว่าหัวและท้าย (ภาพที่ 2) ในส่วนของเชื้อรา *Nigrospora* ไอโซเลท HB023 เส้นใยมีลักษณะหยาบ ฟูเล็กน้อย มีสีเทาอ่อนแซมดำ รูปร่างของสปอร์มีลักษณะกลมค่อนข้างแบน มีสีดำ (ภาพที่ 3)

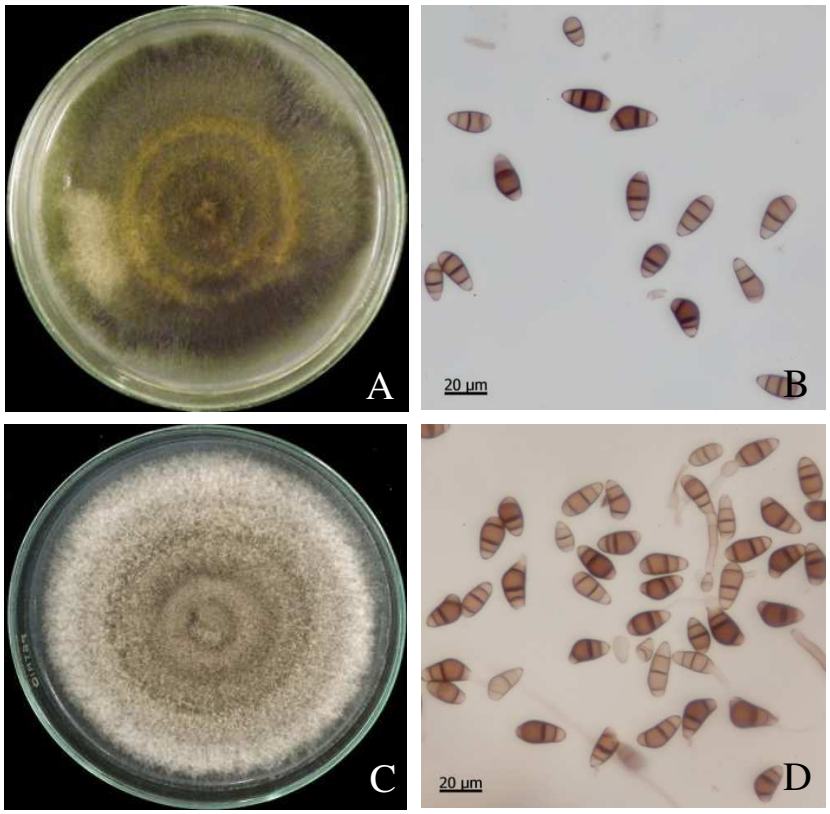


ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Alternaria* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 7 วัน

(A,B) โคโลนีและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลท HY022

(C,D) โคโลนีและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลท HR023-1

(E,F) โคโลนีและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลท HR01



ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Curvularia* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 7 วัน

(A,B) โคโลนีและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลท HC011

(C,D) โคโลนีและสปอร์ของเชื้อราไอโซเลท HC022

ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Nigrospora* sp. ไอโซเลท HB023 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 7 วัน

(A) โคโลนีของเชื้อรา *Nigrospora* sp. ไอโซเลท HB023

(B) สปอร์ของเชื้อรา *Nigrospora* sp. ไอโซเลท HB023

จากเชื้อราทั้ง 6 ไอโซเลทที่ก่อให้เกิดอาการใบจุดบนกล้วยหอมทองข้างต้น พบว่า เชื้อราสกุล *Alternaria* sp. HR023-1 ก่อให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุด โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผล 2.4 เซนติเมตร รองลงมาคือสกุล *Curvularia* sp. HC022 และ HC011 มีเส้นผ่าศูนย์กลางแผล 1.5 และ 1.3 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลทที่ก่อโรคได้น้อยที่สุด คือ *Alternaria* sp. HR01 และ HY022 โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลเพียง 0.5 และ 0.2 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

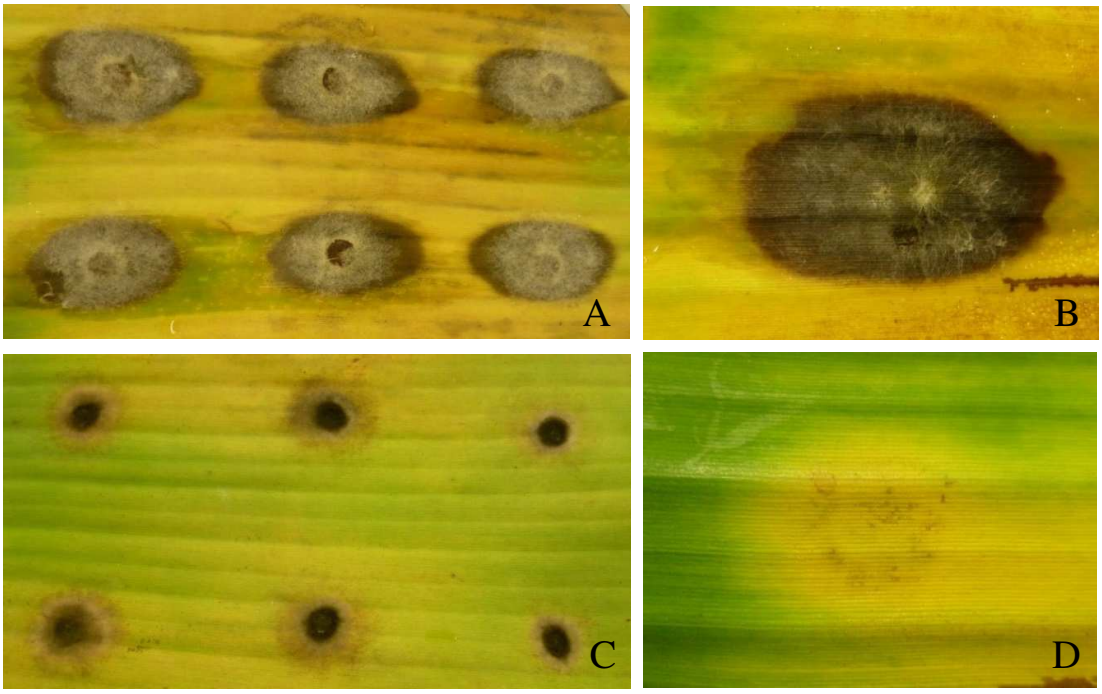
ตารางที่ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนใบกล้วยหอมทองหลังจากปลูกเชื้อโดยวิธี detached leaf บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) ความชื้นสัมพัทธ์ 85% เป็นเวลา 6 วัน

ไอโซเลทของเชื้อราที่ก่อโรค	เส้นผ่าศูนย์กลางแผล (เซนติเมตร)
Alternaria sp. HY022	0.2 d
Alternaria sp. HR023-1	2.4 a
Alternaria sp. HR01	0.5 cd
Curvularia sp. HC011	1.3 b
Curvularia sp. HC022	1.5 b
Nigrospora sp. HB023	0.9 c

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

สำหรับลักษณะแผลบนใบกล้วยหอมทองหลังจากปลูกเชื้อโดยวิธี detached leaf แบบไม่ทำแผล โดยเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 ที่ทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุดนั้น ทำให้เกิดแผลมีลักษณะจุดตายสีน้ำตาลเข้ม และเมื่อแผลอายุมากขึ้นจะปรากฏวงแหวน (halo) สีเหลืองล้อมรอบ รวมทั้งมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราซึ่งมีลักษณะสีเทาอมน้ำตาลปกคลุมอยู่บนแผล และพบว่าเชื้อราสร้างสปอร์ได้น้อยมากถึงไม่สร้างเลย (ภาพที่ 4A) ซึ่งอาการจุดตายสีเข้มนี้จะปรากฏชัดมากที่บริเวณหลังใบ (ภาพที่ 4B) ในขณะที่ลักษณะแผลที่ผ่านการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 ทำให้เกิดแผลมีลักษณะจุดประสีน้ำตาลเข้มและมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ พบมีการสร้างสปอร์เป็นจำนวนมากอยู่บนแผล (ภาพที่ 4C และ 4D)

นอกจากนี้ ได้ทำการปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 และ *Curvularia* sp. HC022 โดยวิธีทำแผลบนใบกล้วยหอมทองในแปลงทดลอง พบว่า เชื้อราทั้งสองสกุลก่อให้เกิดแผลมีลักษณะรูปร่างคล้ายรูปตาสีน้ำตาลเข้ม และเริ่มปรากฏวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบแผล ที่อายุ 5 วันหลังจากปลูกเชื้อ (ภาพที่ 5)



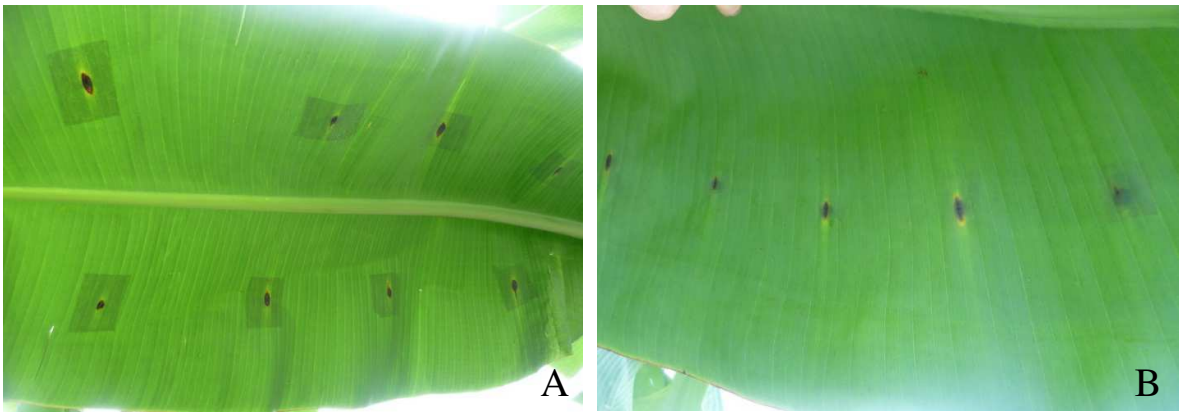
ภาพที่ 4 ลักษณะแผลจากการปลูกเชื้อราโดยวิธี detached leaf บนใบกล้วยหอมทองแบบไม่ทำแผล ที่อายุ 6 วันหลังจากปลูกเชื้อ

(A) ลักษณะแผลจากการปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 บนท้องใบ

(B) ลักษณะแผลจากการปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 บนหลังใบ

(C) ลักษณะแผลจากการปลูกเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 บนท้องใบ

(D) ลักษณะแผลจากการปลูกเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 บนหลังใบ



ภาพที่ 5 ลักษณะอาการแผลบนใบกล้วยหอมทองหลังจากปลูกเชื้อในแปลงทดลองโดยวิธีทำแผลเป็นเวลา 7 วัน

(A) ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1

(B) ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022

2. การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. และสารละลาย salicylic acid ในสภาพห้องปฏิบัติการ

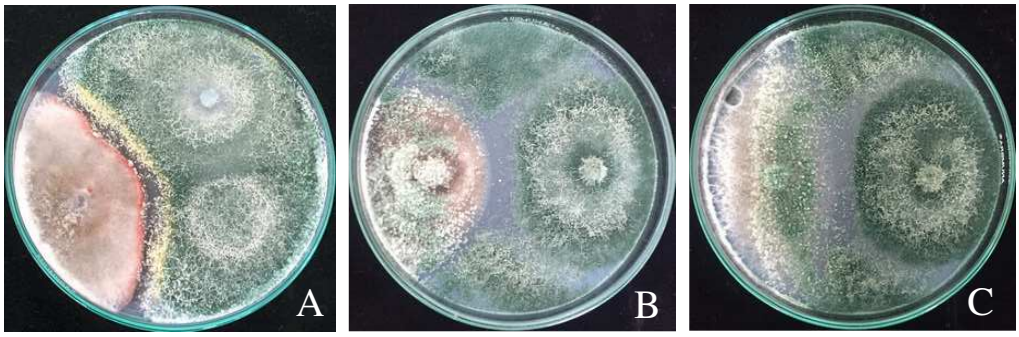
2.1 ควบคุมด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp.

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ V014 (แยกได้จากแปลงกล้วยหอมทอง) และ KS016 (จากภาควิชาโรคพืช กำแพงแสน) ต่อการควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลท คือ *Alternaria* sp. HR01, *Curvularia* sp. HC022 และ *Nigrospora* sp. HB023 โดยยับยั้งได้ถึง 100% รองลงมาคือยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 ได้ 66.6% ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติจากการยับยั้งของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. V014 ต่อการเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 และ *Nigrospora* sp. HB023 โดยสามารถยับยั้งได้ 64.5 และ 70.8% ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในไอโซเลทเดียวกัน พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสูงกว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. V014 (ตารางที่ 2) โดยไอโซเลท KS016 มีการเจริญของเส้นใยครอบคลุมโคโลนีของเชื้อราก่อโรค (ภาพที่ 6) ในขณะที่ไอโซเลท V014 ไม่สามารถเจริญครอบคลุมโคโลนีของเชื้อราก่อโรค (ภาพที่ 7)

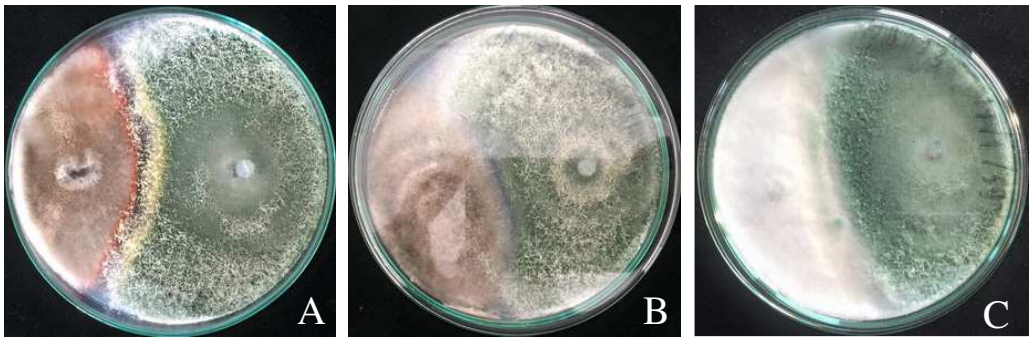
ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคไอโซเลทต่างๆ ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 2 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน

ไอโซเลทของเชื้อราสาเหตุโรค	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรค	
	Trichoderma sp. V014	*Trichoderma* sp. KS016
Alternaria sp. HR023-1	28.5 d	66.6 b
Alternaria sp. HY022	36.3 cd	49.7 c
Alternaria sp. HR01	48 c	100 a
Curvularia sp. HC022	64.5 b	100 a
Nigrospora sp. HB023	70.8 b	100 a

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 6 เชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 เจริญร่วมกับเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 (A), *Curvularia* sp. HC022 (B) และ *Nigrospora* sp. HB023 (C) บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 5 วัน



ภาพที่ 7 เชื้อรา *Trichoderma* sp. V014 เจริญร่วมกับเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 (A), *Curvularia* sp. HC022 (B) และ *Nigrospora* sp. HB023 (C) บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 5 วัน

2.2 ควบคุมด้วยสารละลาย salicylic acid

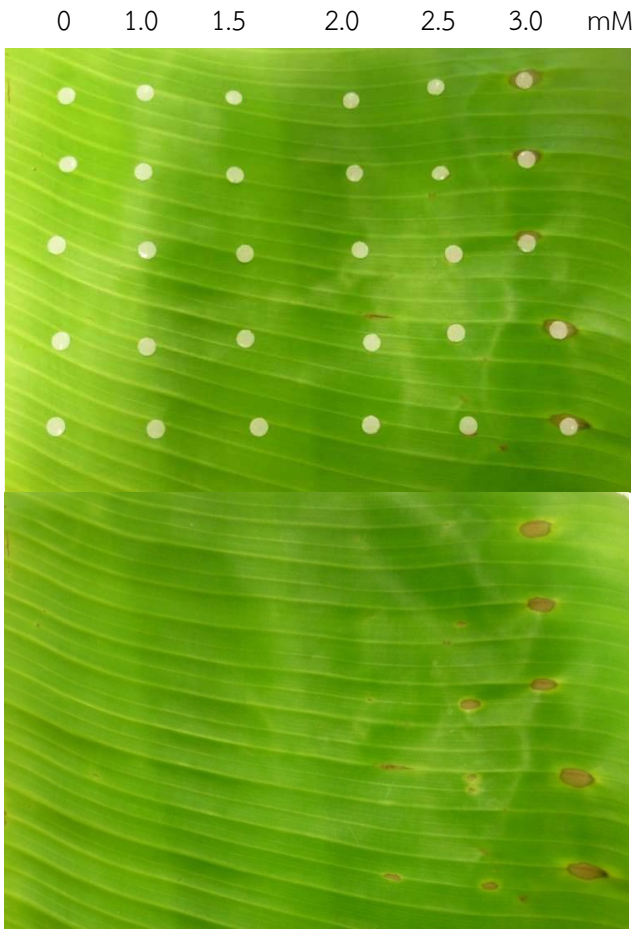
1) ทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย salicylic acid บนเนื้อเยื่อพืช

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย salicylic acid บนเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยหอมทอง (อายุ 3 วันหลังใบคลี่) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 mM โดยวิธีหยดสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนผิวใบ พบการเกิดพิษบนเนื้อเยื่อพืช ซึ่งแสดงอาการเนื้อเยื่อตายเป็นสีน้ำตาลตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 2 mM ขึ้นไป โดยพบการเกิดพิษตั้งแต่ 23.3-50.0% และมีขนาดแผลตั้งแต่ 2.46 – 9.07 มิลลิเมตร (ตารางที่ 3 และภาพที่ 8) รวมทั้งจากการทดสอบความเป็นพิษในสภาพแปลงทดลองโดยวิธีฉีดพ่นสารละลาย salicylic acid ที่เข้มข้น 2 mM ลงบนใบอ่อน (อายุ 3 วันหลังใบคลี่) บนต้นกล้วยหอมทอง และสังเกตลักษณะอาการที่อายุ 7 วันหลังใบคลี่ พบว่า ปรากฏจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลเข้มถึงดำกระจัดกระจายทั่วทั้งใบ ซึ่งต่อมาจะพัฒนาเป็นจุดตายแต่ไม่ขยายขนาด (ภาพที่ 9) ดังนั้นสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษกับเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยหอมทอง คือ 1.5 mM จึงถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองตลอดโครงการวิจัยนี้

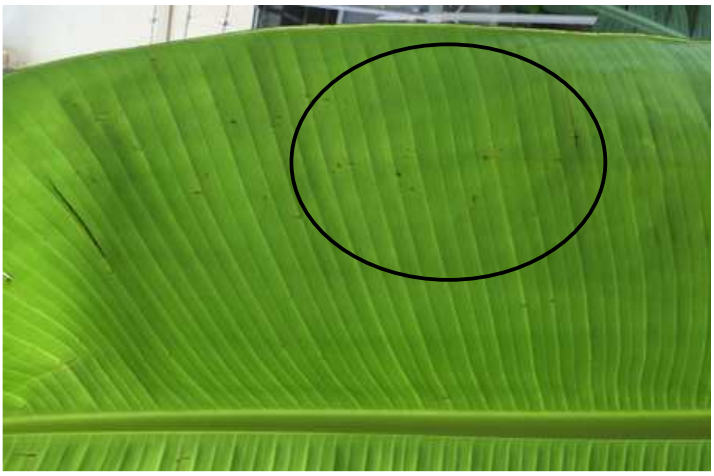
ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเกิดพิษและขนาดแผลบนเนื้อเยื่อใบกล้วยหอมทองอ่อนที่อายุ 3 วันหลังใบคลี่ที่ผ่านการหยดด้วยสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ SA (mM)	การเกิดพิษ (%)	เส้นผ่าศูนย์กลางแผล (มม.)
0	0 d	0 d
0.5	0 d	0 d
1.0	0 d	0 d
1.5	0 d	0 d
2.0	23.3 c	2.46 c
2.5	26.7 b	5.21 b
3.0	50.0 a	9.07 a

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



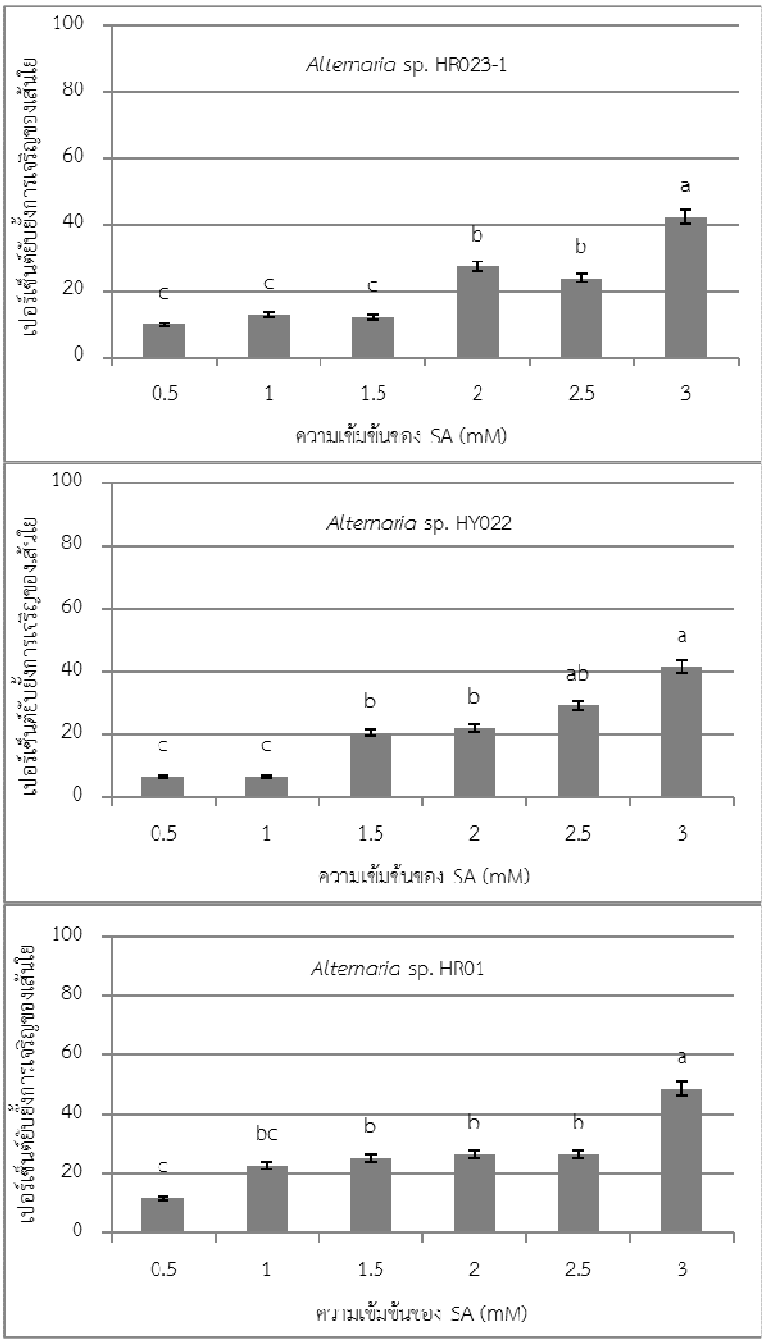
ภาพที่ 8 ความเป็นพิษบนใบอ่อนของกล้วยหอมทองที่อายุ 3 วันหลังใบคลี่หลังจากหยดด้วยสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 ลักษณะความเป็นพิษของสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 2 mM (วงกลม) หลังจากฉีดพ่นลงบนใบอ่อนของกล้วยหอมทองที่อายุ 3 วันหลังใบคลี่ในแปลงทดลอง และสังเกตอาการที่อายุ 7 วันหลังใบคลี่

2) ควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยสารละลาย salicylic acid

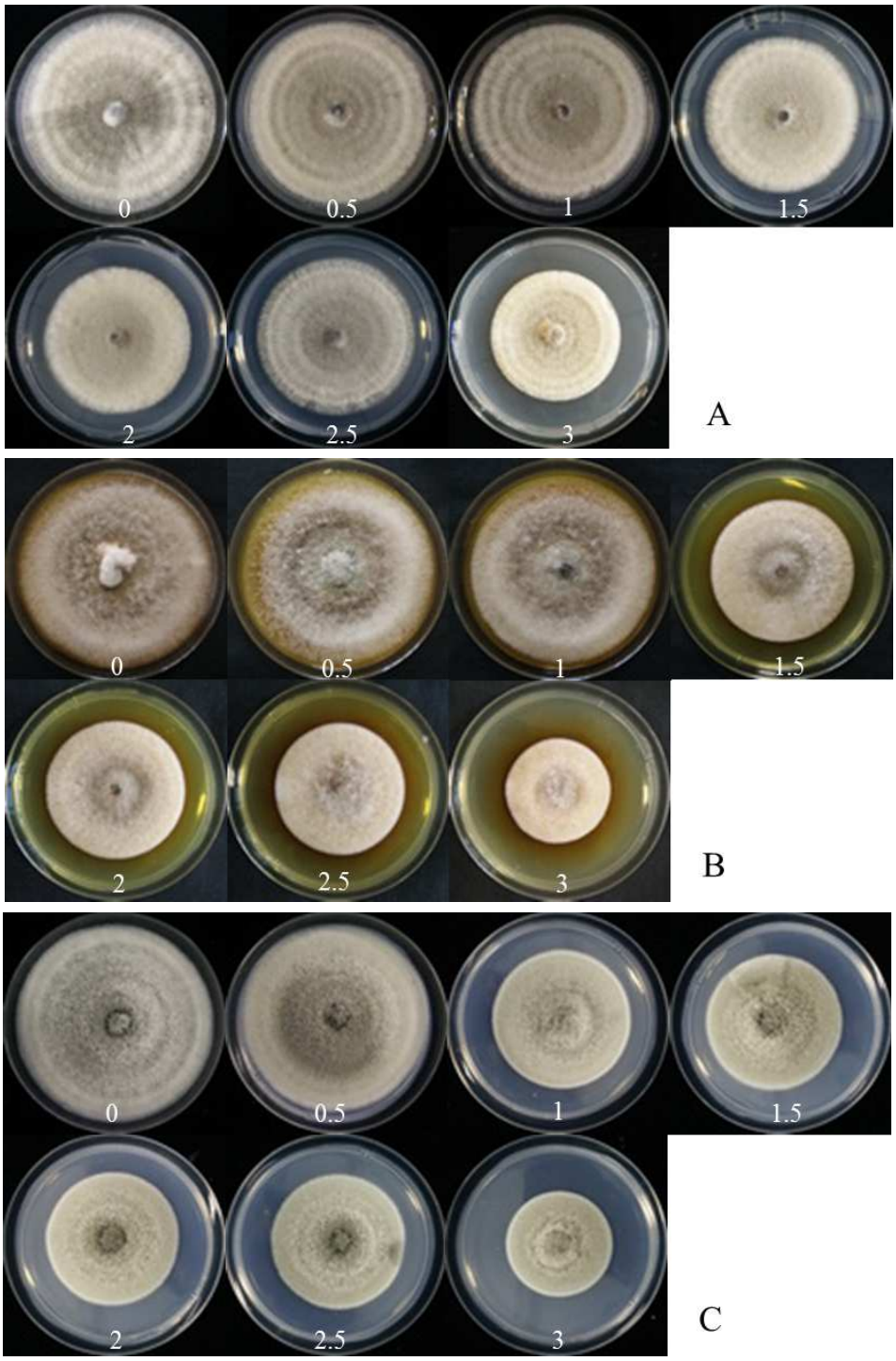
จากการศึกษาอิทธิพลของสารละลาย salicylic acid ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี poisoned food technique บนอาหาร PDA พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย salicylic acid ให้สูงขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทุกไอโซเลทได้มากขึ้น แต่เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ก่อให้เกิดพิษกับเนื้อเยื่อพืช คือ 1.5 mM ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่จะนำไปใช้ในแปลงปลูก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* ทั้ง 3 ไอโซเลทได้ในระดับหนึ่ง โดยยับยั้งไอโซเลท HY022 (20.6%) และ HR01 (25.3%) ได้ไม่แตกต่างทางสถิติกับระดับความเข้มข้น 2.5 mM (29.3 และ 26.5% ตามลำดับ) แต่ยับยั้งไอโซเลท HR023-1 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ก่อโรครุนแรงที่สุดได้น้อยกว่า คือยับยั้งได้เพียง 12.2% และไม่แตกต่างจากการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 mM ซึ่งยับยั้งได้เพียง 10 และ 12.9% ตามลำดับ (ภาพที่ 10 และ 11)



ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* spp. ไอโซเลท HR023-1, HY022 และ HR01 บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน

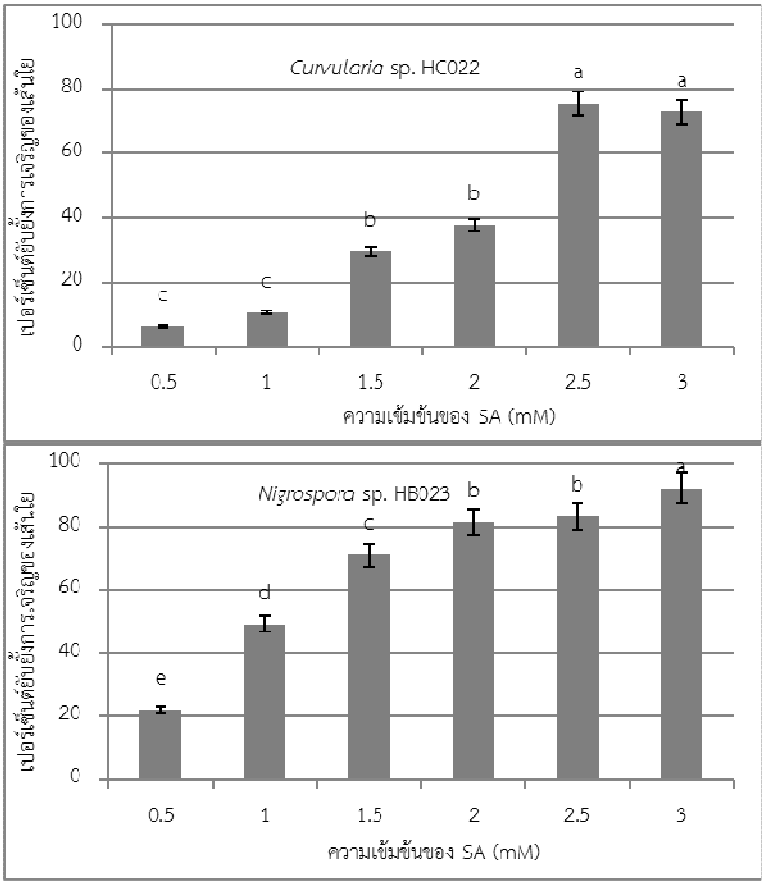
เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 11 การเจริญของเชื้อรา *Alternaria* spp. ไอโซเลท HR023-1 (A), HY022 (B) และ HR01 (C) บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 mM บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน

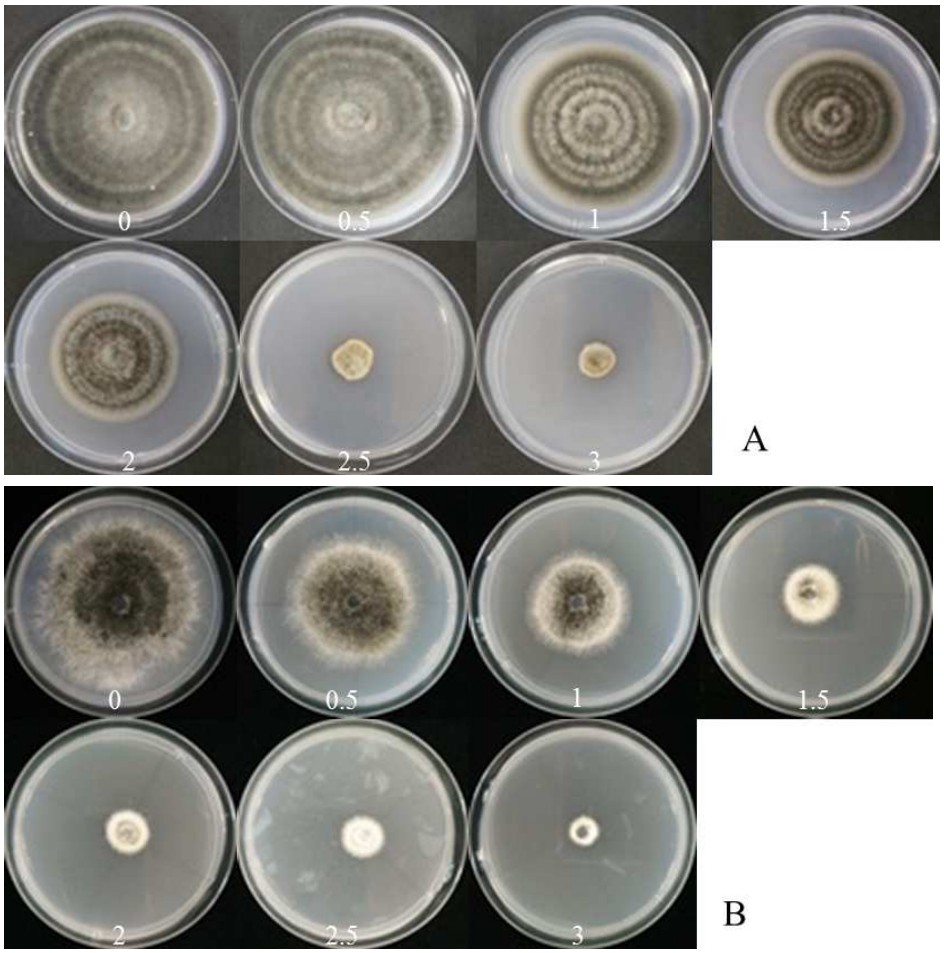
ส่วนประสิทธิภาพของสารละลาย salicylic acid ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 และ *Nigrospora* sp. HB023 พบว่าเกือบทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองไอโซเลทได้สูงกว่าเชื้อรา *Alternaria* ทั้ง 3 ไอโซเลทข้างต้น ซึ่งยิ่งเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายให้สูงขึ้นจะยิ่งเพิ่มเปอร์เซ็นต์ยับยั้งให้สูงขึ้นตามไปด้วย โดยพบเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Nigrospora* sp. HB023 สูงสุดได้มากกว่า 90% ในขณะที่ความเข้มข้น 1.5 mM ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองไอโซเลทได้สูงกว่าเชื้อรา *Alternaria* spp. ในทุกไอโซเลทได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 12 และ 13) และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ยับยั้งของสารละลาย salicylic acid ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 mM ต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อรา *Nigrospora* sp. HB023 มากที่สุดถึง 71.1% รองลงมาคือยับยั้งเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 ได้ 29.4% แต่ยับยั้งเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 น้อยที่สุดเพียง 12.2% (ภาพที่ 14)



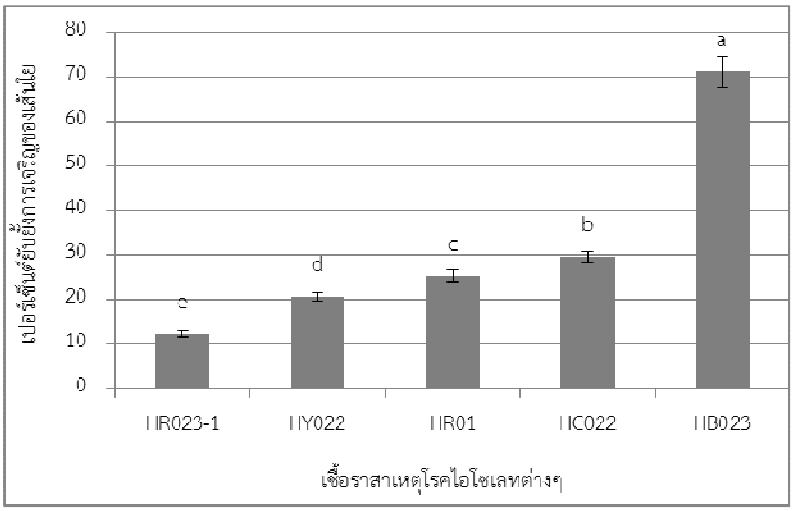
ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 และ *Nigrospora* sp. HB023 บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน

เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

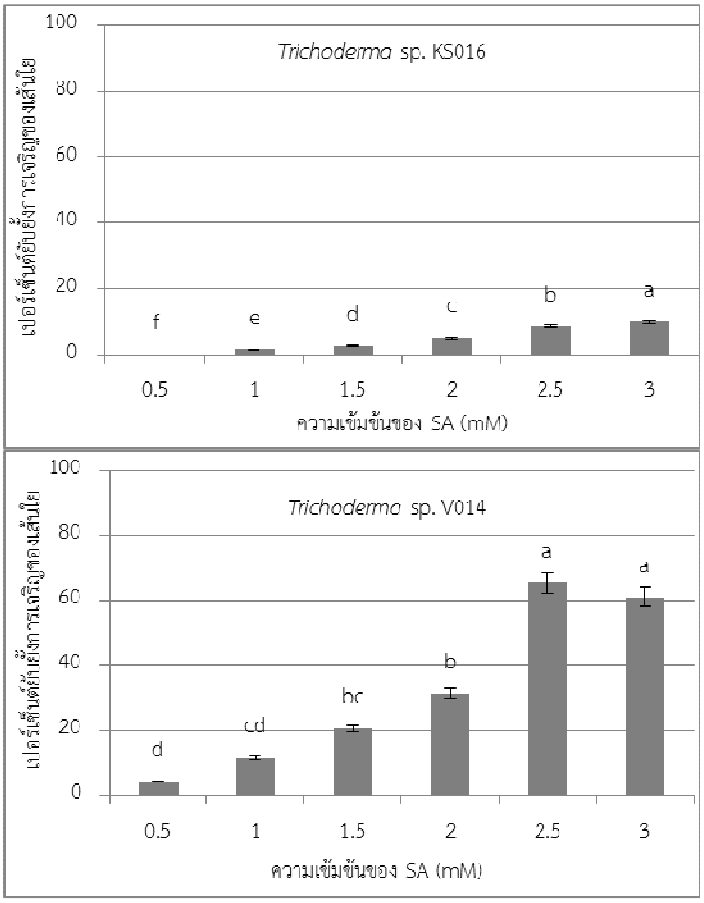


ภาพที่ 13 การเจริญของเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 (A) และ *Nigrospora* sp. HB023 (B) บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1, *Alternaria* sp. HY022, *Alternaria* sp. HR01, *Curvularia* sp. HC022 และ *Nigrospora* sp. HB023 บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน
เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

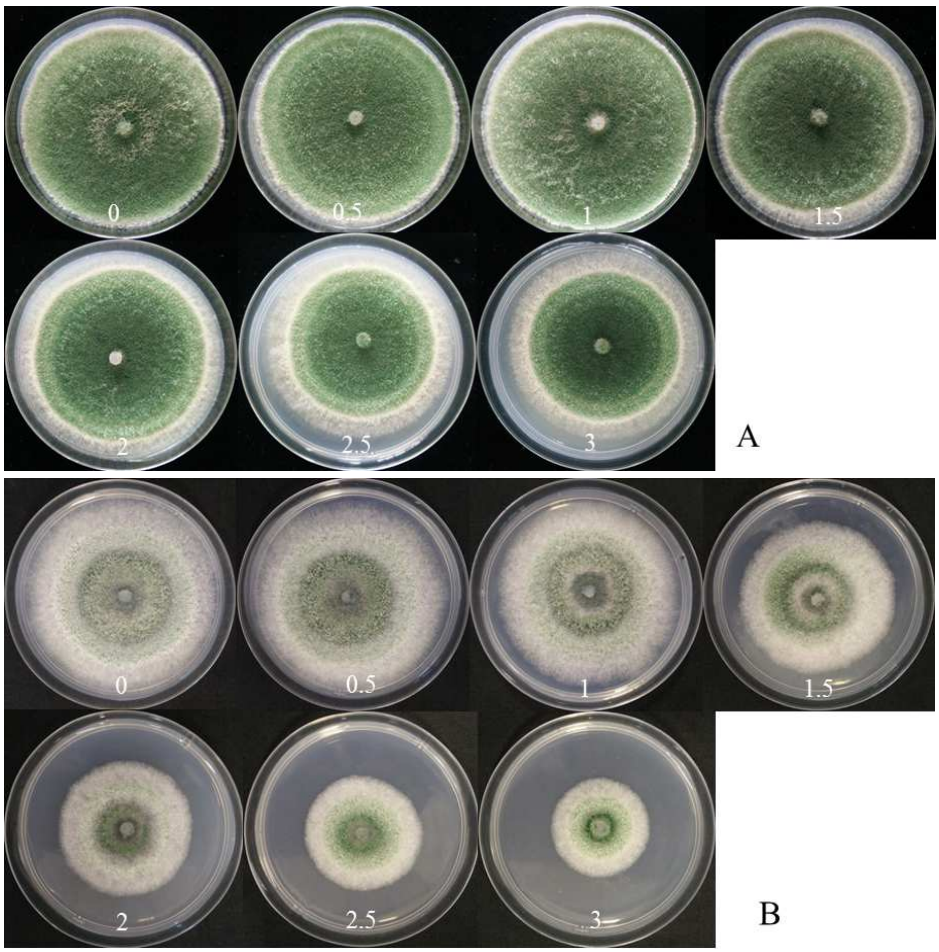
นอกจากนี้ ได้ทดสอบผลของสารละลาย salicylic acid ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma* ทั้ง 2 ไอโซเลทที่ความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับข้างต้น พบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้มากขึ้นเช่นเดียวกัน แต่เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้น 1.5 mM พบว่า สารละลาย salicylic acid สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. KSP016 และ V014 ได้ 2.5 และ 20.6% ตามลำดับ (ภาพที่ 15 และ 16) นั่นหมายถึงเชื้อรา *Trichoderma* สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ 97.5 และ 79.4% ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าเชื้อราปฏิปักษ์ดังกล่าวมีความทนทานต่อสารละลาย salicylic acid ได้ในระดับที่น่าพอใจ อันจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการนำเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไปใช้ร่วมหรือสลับกับสารละลาย salicylic acid ในสภาพแปลงทดลองและสภาพไร่ต่อไป



ภาพที่ 15 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 และ V014 บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน

เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 16 การเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 (A) และ *Trichoderma* sp. V014 (B) บนอาหาร PDA ผสมสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 6 วัน

2.3 ควบคุมด้วยสารหมักสมุนไพร

การทดลองนี้ได้ใช้เชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 เป็นตัวแทนในการศึกษา เนื่องจากมีการสร้างสปอร์ค่อนข้างมาก โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารหมักสมุนไพรที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 2.5, 5.0 และ 10.0 ml/L ต่อการงอกของสปอร์ของเชื้อราที่เวลา 6 ชั่วโมงบนอาหาร PDA พบว่า ที่ความเข้มข้นสูงสุด (10 ml/L) สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และความยาวของ germ tube ได้เพียงเล็กน้อย โดยยับยั้งได้ 3.2 และ 1.9% ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นในอัตราแนะนำ (2.5 ml/L) ที่เกษตรกรนำมาฉีดพ่นในแปลงนั้น ไม่มีศักยภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์และความยาวของ germ tube แต่อย่างใด ในทางตรงกันข้ามกลับกระตุ้นให้สปอร์งอกและมีการเจริญของ germ tube ให้ยืดยาวมากกว่าปกติ (ตารางที่ 4)

นอกจากนี้ ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารหมักสมุนไพรต่อเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยหอมทองที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ (250 และ 500 ml/L) พบว่า สารหมักสมุนไพรทำให้เกิดความเป็นพิษกับเนื้อเยื่อพืชได้ โดยทำให้เนื้อเยื่อใบพืชปรากฏเป็นจุดสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 17)

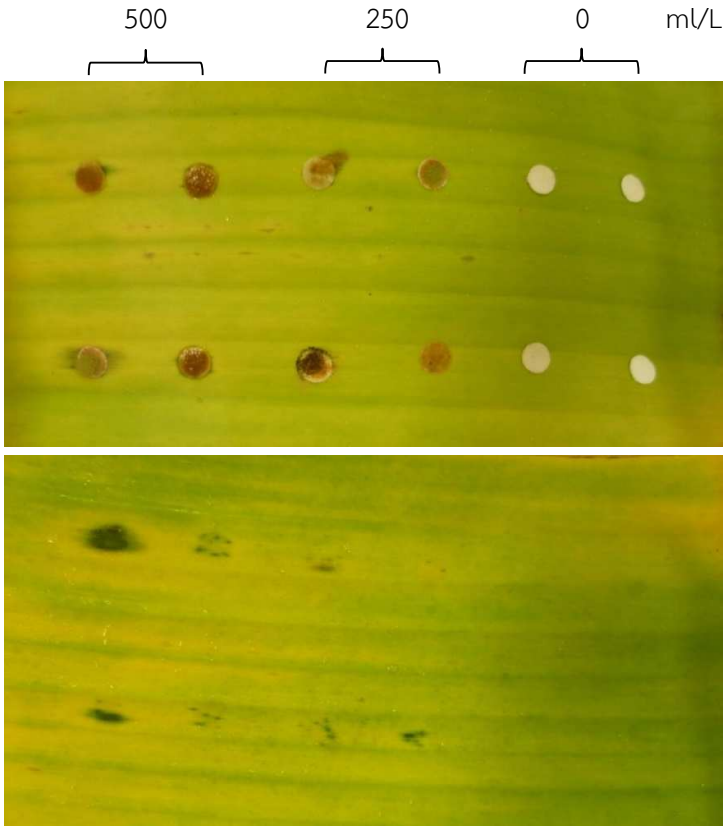
ตารางที่ 4 ผลของสารหมักสมุนไพรต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 และการเจริญของ germ tube บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32°C) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารหมักสมุนไพร (ml/L)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งความยาวของ germ tube
0.0	-	-
2.5*	-9.3 c**	-13.1 c**
5.0	1.7 b	0.7 b
10.0	3.2 a	1.9 a

* อัตราที่เกษตรกรใช้ฉีดพ่นในแปลงปลูก

** สารหมักสมุนไพรกระตุ้นการเจริญของเชื้อราให้มากกว่าปกติ

ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพที่ 17 ความเป็นพิษของสารหมักสมุนไพรบนเนื้อเยื่อใบกล้วยหอมทองที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 4 วันหลังจากหยดสาร

(A) หยดสารที่ท้องใบ (40 ไมโครลิตร) โดยใช้กระดาษกรองเพื่อช่วยให้สารหมักสมุนไพรยึดเกาะบนผิวพืช

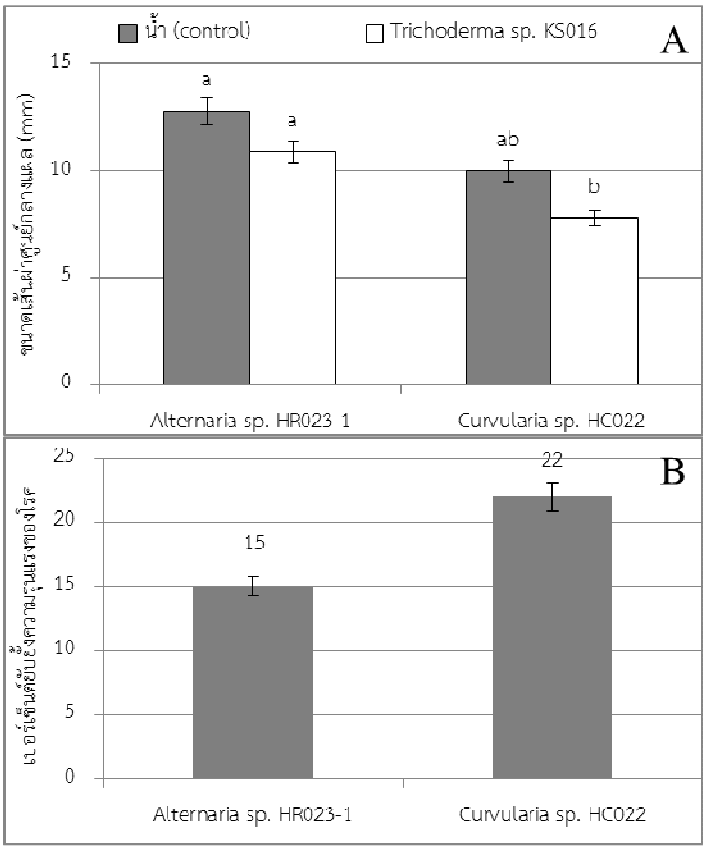
(B) ลักษณะอาการจุดสีเขียวเข้มที่ปรากฏบนหลังใบ

3. การควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. และสารละลาย salicylic acid ในสภาพแปลงทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพของสิ่งควบคุมในห้องปฏิบัติการ

ก่อนจะนำสิ่งควบคุมไปควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลอง ได้ทำการศึกษาการควบคุมโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยได้ใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 เป็นตัวแทนในการศึกษา เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีกว่าไอโซเลท V014 และจากการปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 และ *Curvularia* sp. HC022 บนชิ้นส่วนของใบกล้วยหอมทองโดยวิธี detached leaf และหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 ที่ความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ห่างกันทุก 2 วัน จำนวน 3 ครั้ง บ่มในกล่องชื้น และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลที่ 6 วันหลังจากปลูกเชื้อ พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 ได้ดีกว่าเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผล 7.8 และ 10.9 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 18A) ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 22 และ 15% ตามลำดับ (ภาพที่ 18B)

ส่วนการควบคุมโรคใบจุดด้วยสารละลาย salicylic acid โดยทำการฉีดพ่นสารละลายที่ความเข้มข้น 1.5 mM ห่างกันทุก 2 วัน เป็นจำนวน 3 ครั้ง บ่มในกล่องชื้น และวัดขนาดแผลที่ 6 วันหลังจากปลูกเชื้อ พบว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลของเชื้อราทั้งสองไอโซเลทไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ฉีดพ่นด้วยน้ำ) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งความรุนแรงของโรคได้เพียง 12.4% (*Alternaria* sp. HR023-1) และ 8.3% (*Curvularia* sp. HC022) (ภาพที่ 19) แต่เมื่อพิจารณาถึงความหนาแน่นของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* HB023-1 (ไอโซเลทที่ก่อโรครุนแรงที่สุด) บนแผลที่อายุ 4 และ 6 วันหลังจากปลูกเชื้อ พบว่า สารละลาย salicylic acid สามารถลดความหนาแน่นของเส้นใยได้ตั้งแต่วันที่ 4 (ฉีดพ่นสารละลาย salicylic acid เป็นครั้งที่สอง) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งความหนาแน่นของเส้นใย 21.4% แต่ไม่แตกต่างจากวันที่ 6 (ฉีดพ่นสารละลาย salicylic acid เป็นครั้งที่สาม) ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งความหนาแน่นของเส้นใย 35.5% (ภาพที่ 20 และ 21) จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ถึงแม้สารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM จะไม่สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคในสภาพ detached leaf ได้ แต่สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อราให้น้อยลงได้

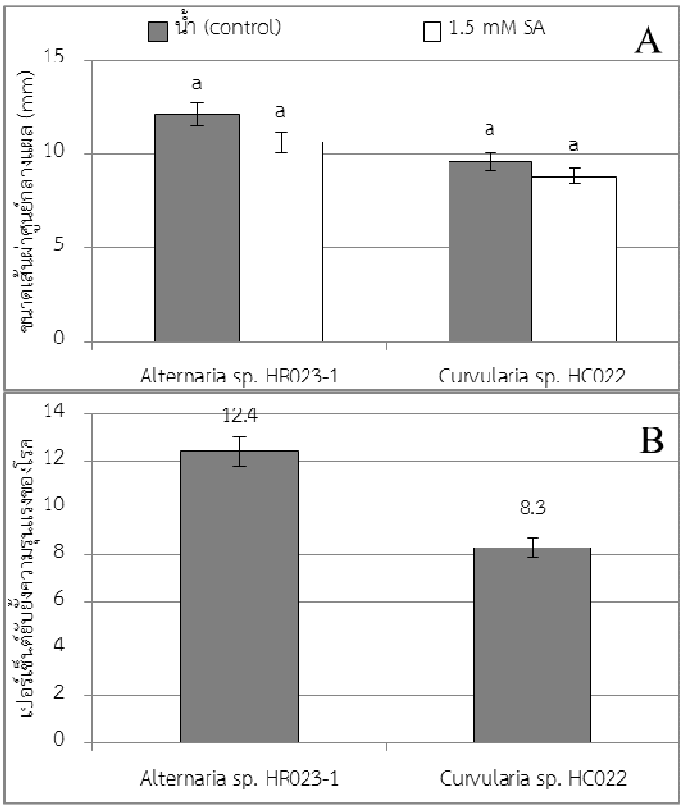


ภาพที่ 18 ผลของเชื้อรา *Trichoderma* sp. KS016 ต่อความรุนแรงของโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง หลังจากปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 และ *Curvularia* sp. HC022 โดยวิธี detached leaf เป็นเวลา 6 วัน

(A) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผล

(B) เปอร์เซ็นต์ยับยั้งความรุนแรงของโรค

เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

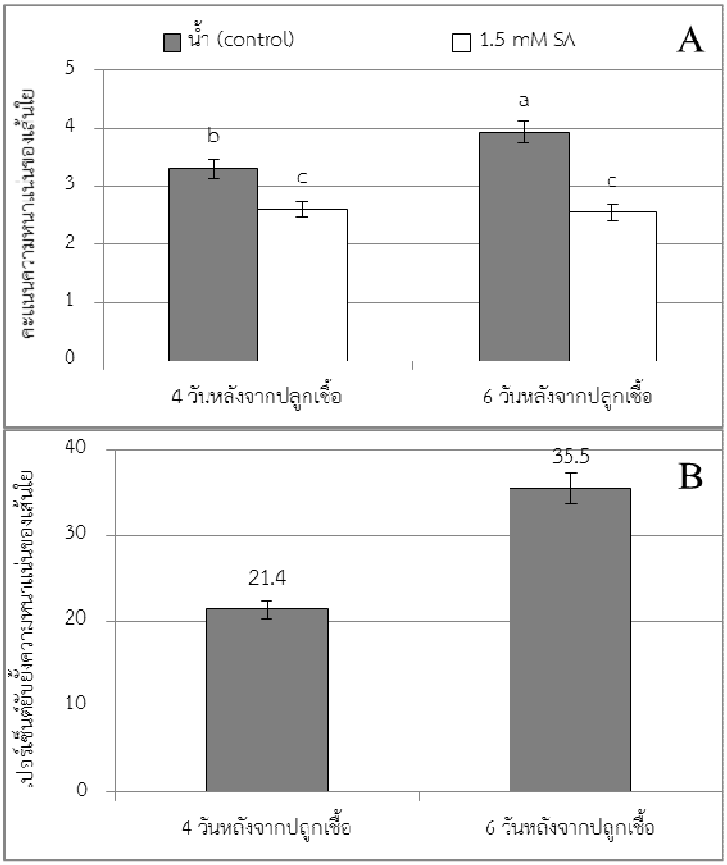


ภาพที่ 19 ผลของสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM ต่อความรุนแรงของโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง หลังจากปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 และ *Curvularia* sp. HC022 โดยวิธี detached leaf เป็นเวลา 6 วัน

(A) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผล

(B) เปอร์เซ็นต์ยับยั้งความรุนแรงของโรค

เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 20 ผลของสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM ต่อความหนาแน่นของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 บนแผลจุดของใบกล้วยหอมทองหลังจากปลูกเชื้อที่ 4 และ 6 วัน โดยวิธี detached leaf

(A) คะแนนความหนาแน่นของเส้นใยบนแผล โดยที่ 0 = ไม่มีการเจริญของเส้นใย, 1 = มีการเจริญของเส้นใย ≤ 25%, 2 = มีการเจริญของเส้นใย 26-50%, 3 = มีการเจริญของเส้นใย 51-75%, 4 = มีการเจริญของเส้นใย 76-100%

(B) เปอร์เซ็นต์ยับยั้งความหนาแน่นของเส้นใย

เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

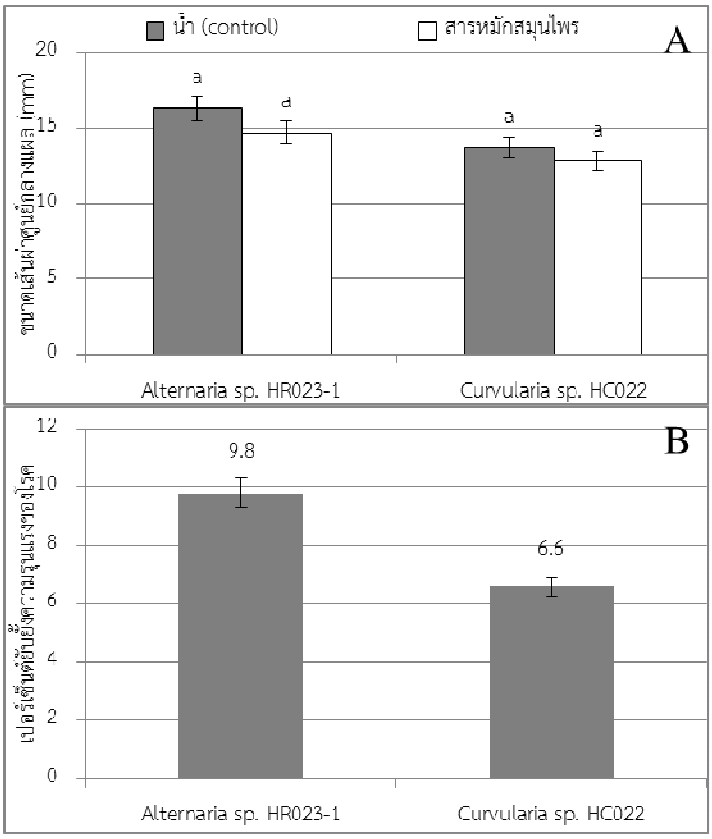
ภาพที่ 21 การประเมินคะแนนความหนาแน่นของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria* HR023-1 บนใบกล้วยหอมทองที่ 6 วันหลังจากปลูกเชื้อ หลังจากพ่นสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 1.5 mM เป็นจำนวน 3 ครั้งห่างกันทุก 2 วัน

(A) ระดับคะแนน 4 = มีการเจริญของเส้นใย 76-100%

(B) ระดับคะแนน 3 = มีการเจริญของเส้นใย 51-75%

(C) ระดับคะแนน 0 = ไม่มีการเจริญของเส้นใย

ส่วนการควบคุมด้วยสารหมักสมุนไพร ซึ่งทำการฉีดพ่นสารหมักสมุนไพร ที่ความเข้มข้น 2.5 ml/L (อัตราที่เกษตรกรใช้ในแปลง) ห่างกันทุก 2 วัน จำนวน 3 ครั้ง บ่มในกล่องชื้น และวัดขนาดแผลที่ 6 วัน พบว่า สารหมักสมุนไพรไม่สามารถยับยั้งความรุนแรงของโรคจากเชื้อราทั้งสองสกุลได้ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลไม่แตกต่างจากการพ่นด้วยน้ำ (ชุดควบคุม) (ภาพที่ 22A) และมีศักยภาพในการลดความรุนแรงของโรคได้สูงสุดเพียง 9.8% (ภาพที่ 22B)



ภาพที่ 22 ผลของสารหมักสมุนไพรที่ความเข้มข้น 2.5 ml/L ต่อความรุนแรงของโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง หลังจากปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 และ *Curvularia* sp. HC022 โดยวิธี detached leaf เป็นเวลา 6 วัน

(A) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผล

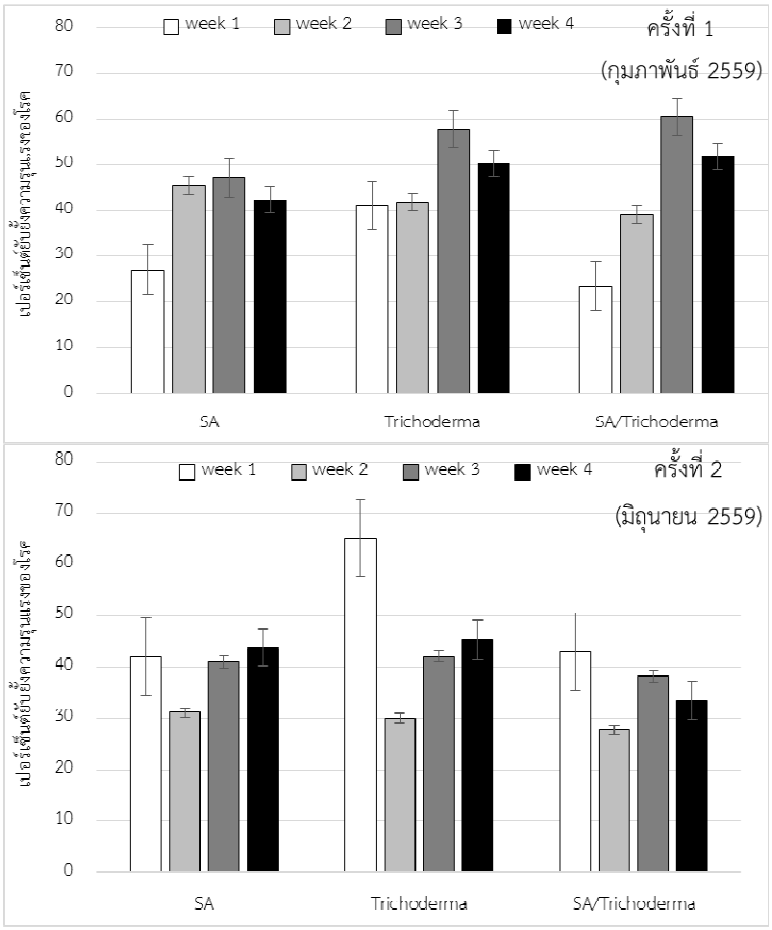
(B) เปอร์เซ็นต์ยับยั้งความรุนแรงของโรค

เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

<u>ควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลอง</u>

จากการฉีดพ่นสิ่งควบคุมทั้ง 4 กรรมวิธีในแปลงทดลองกล้วยหอมทองที่อายุ 6 เดือน ได้แก่ 1) ฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. 2) ฉีดพ่นด้วยสารละลาย salicylic acid เข้มข้น 1.5 mM 3) ฉีดพ่นด้วยสารละลาย salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* sp. และ 4) ฉีดพ่นด้วยน้ำ (ชุดควบคุม) ที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 โดยวิธีทำแผล ทำการฉีดพ่นห่างกันทุก 7 วันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทำการทดลอง 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ทำการทดลองเดือนกุมภาพันธ์ 2559 (ฤดูแล้ง) และครั้งที่ 2 ทำการทดลองเดือนมิถุนายน 2559 (ฤดูฝน) พบว่า ในเดือนกุมภาพันธ์ซึ่งเป็นช่วงที่มีอากาศค่อนข้างเย็น มีอุณหภูมิเฉลี่ย 27.7ºC ปริมาณน้ำฝน 0 mm (http://www.tmd.go.th/climate/climate.php?FileID=4) ทั้ง 3 กรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคในแต่ละสัปดาห์ได้สูงขึ้นเป็นลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นสัปดาห์สุดท้าย โดยเฉพาะเชื้อรา *Trichoderma* สามารถลดความรุนแรงของโรคได้มากกว่า 40% ตั้งแต่สัปดาห์แรกที่ฉีดพ่น ส่วนสารละลาย salicylic acid

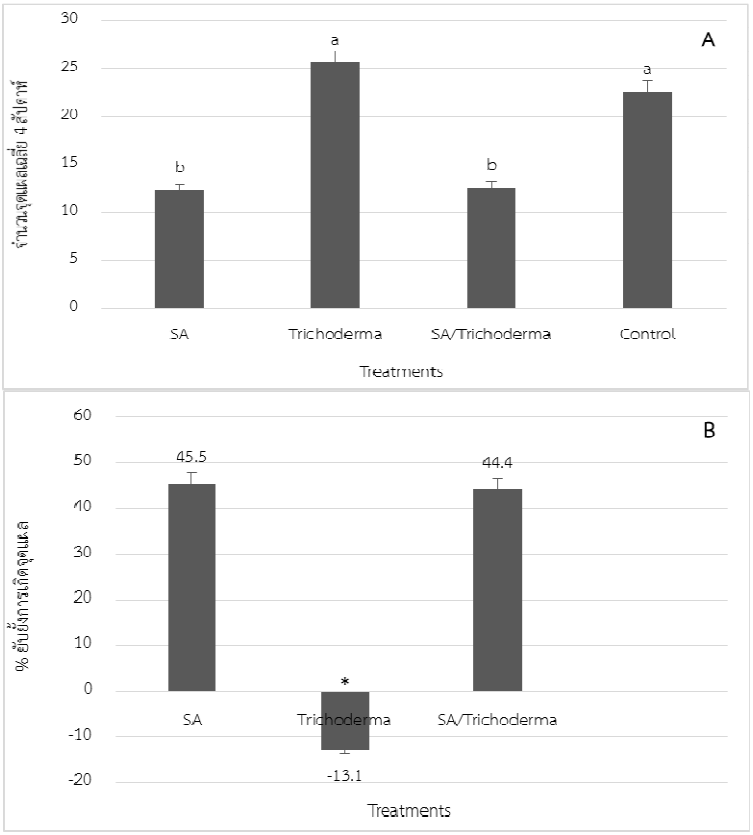
สามารถลดความรุนแรงของโรคได้มากกว่า 40% หลังจากฉีดพ่นแล้ว 2 สัปดาห์ ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูฝน มีอุณหภูมิเฉลี่ย 29.4ºC และปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 284.6 mm (http://www.tmd.go.th/climate/climate.php?FileID=4) พบว่า ทั้งเชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สามารถลดความรุนแรงของโรคได้มากกว่า 60 และ 40% ตามลำดับ ตั้งแต่สัปดาห์แรกของการฉีดพ่น ส่วนกรรมวิธีที่ใช้ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ในระดับหนึ่งในช่วงฤดูแล้ง (ภาพที่ 23) โดยสรุปแล้ว สิ่งควบคุมทั้ง 2 ชนิด คือ salicylic acid และ *Trichoderma* มีแนวโน้มในการควบคุมโรคในช่วงฤดูแล้งได้ดีกว่าในช่วงฤดูฝน



ภาพที่ 23 ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ต่อการลดความรุนแรงของโรคใบจุดของกล้วยหอมทองในแปลงทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ (ครั้งที่1: ฤดูแล้ง) และมิถุนายน (ครั้งที่ 2: ฤดูฝน) 2559

4. การควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. และสารละลาย salicylic acid ในสภาพแปลงเกษตรกร

จากการฉีดพ่นสิ่งควบคุมทั้ง 4 กรรมวิธีในแปลงของเกษตรกร ที่อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี โดยทำการฉีดพ่นทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559 ซึ่งได้ศึกษาอิทธิพลของสิ่งควบคุมต่อการเกิดจำนวนจุดแผล (disease incidence) และพื้นที่ใบที่เป็นโรค (disease severity) พบว่ากรรมวิธีที่ใช้ salicylic acid อย่างเดียว และกรรมวิธีที่ใช้ salicylic acid สลับกับเชื้อรา *Trichoderma* มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดจำนวนจุดแผลเฉลี่ยในช่วง 4 สัปดาห์มากที่สุด (ภาพที่ 24A) โดยสามารถยับยั้งการเกิดจุดแผลได้มากกว่า 40% ทั้ง 2 กรรมวิธี (ภาพที่ 24B) ซึ่งสอดคล้องกับภาพที่ 25 ที่แสดงถึงความมีศักยภาพของ salicylic acid ที่สามารถลดการเพิ่มขึ้นและลดการขยายขนาดของจุดแผลตลอดช่วง 4 สัปดาห์ที่ทำการฉีดพ่น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control)



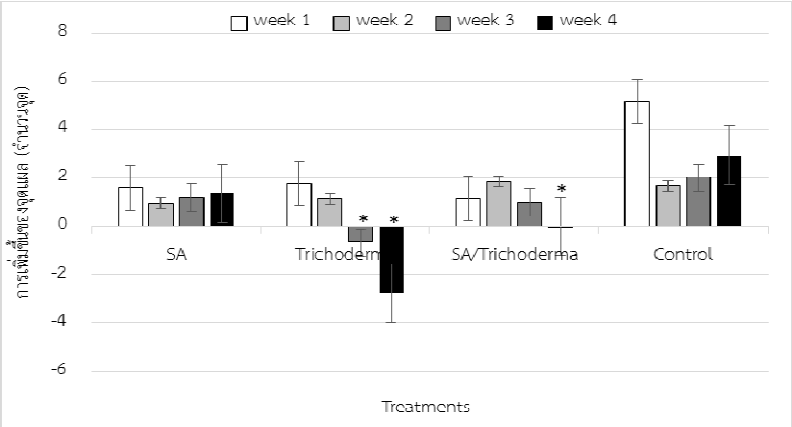
ภาพที่ 24 ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต่อการเกิดจำนวนจุดแผลเฉลี่ยในแปลงกล้วยหอมทอง อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559

(A) จำนวนจุดแผลเฉลี่ยในช่วง 4 สัปดาห์ที่ทำการฉีดพ่น

(B) เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดจุดแผล

* แสดงถึง จุดแผลมีจำนวนเพิ่มขึ้น และมีการขยายขนาดเชื่อมต่อกัน

เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

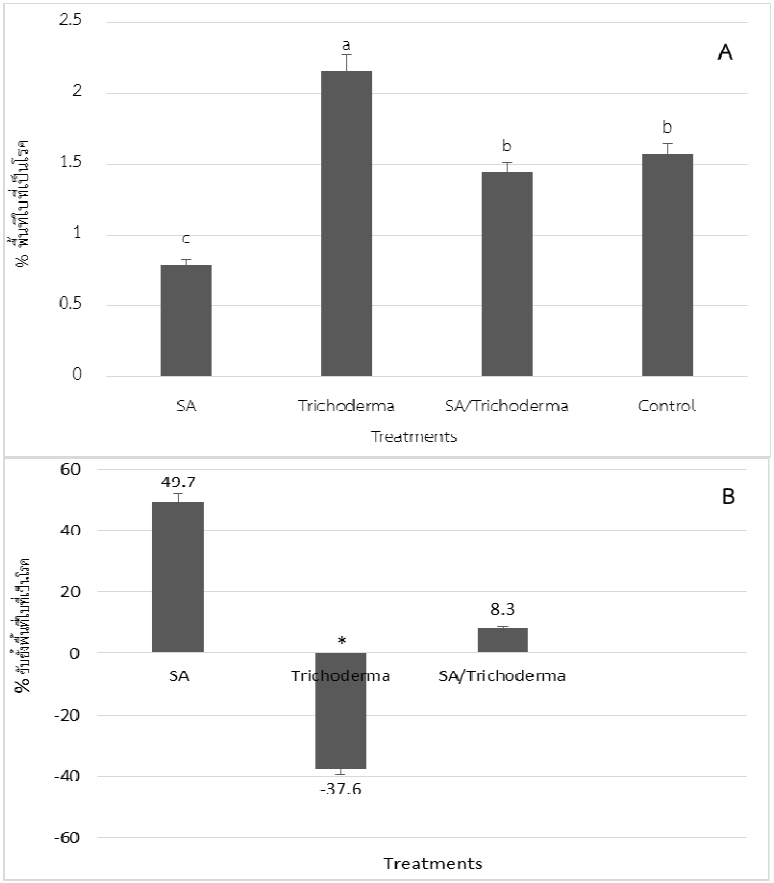


ภาพที่ 25 ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต่อการลดการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุดแผลในแต่ละสัปดาห์ ในแปลงกล้วยหอมทอง อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559

* แสดงถึง จุดแผลมีจำนวนเพิ่มขึ้น และมีการขยายขนาดเชื่อมต่อกัน

เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ในส่วนของการศึกษาอิทธิพลของสิ่งควบคุมทั้ง 4 กรรมวิธีต่อพื้นที่ใบที่เป็นโรคในช่วงระยะเวลาเดียวกัน พบว่า salicylic acid สามารถลดพื้นที่ของใบที่เป็นโรคได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นและชุดควบคุม (Control) (ภาพที่ 26A) โดยสามารถยับยั้งพื้นที่ใบที่เป็นโรคได้ 49.7% ส่วนการใช้เชื้อรา *Trichoderma* พบว่าไม่สามารถยับยั้งการขยายลามของพื้นที่ที่เป็นโรคได้ (ภาพที่ 26B) ซึ่งสอดคล้องกับภาพที่ 27 ที่แสดงถึงความมีศักยภาพของ salicylic acid ที่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ที่เป็นโรคตลอดช่วง 4 สัปดาห์ที่ทำการฉีดพ่น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control)



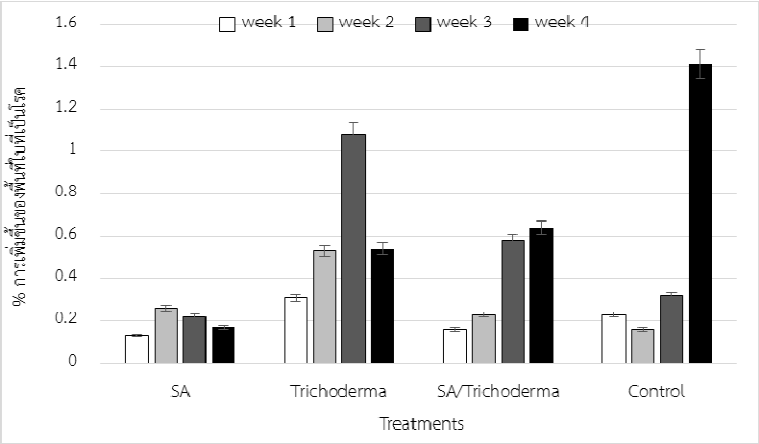
ภาพที่ 26 ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ต่อพื้นที่ใบที่เป็นโรคเฉลี่ยในแปลงกล้วยหอมทอง อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559

(A) เปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่เป็นโรคเฉลี่ยในช่วง 4 สัปดาห์ที่ทำการฉีดพ่น

(B) เปอร์เซ็นต์ยับยั้งพื้นที่ใบที่เป็นโรค

* แสดงถึง มีพื้นที่ใบที่เป็นโรคมากกว่าชุดควบคุม (Control)

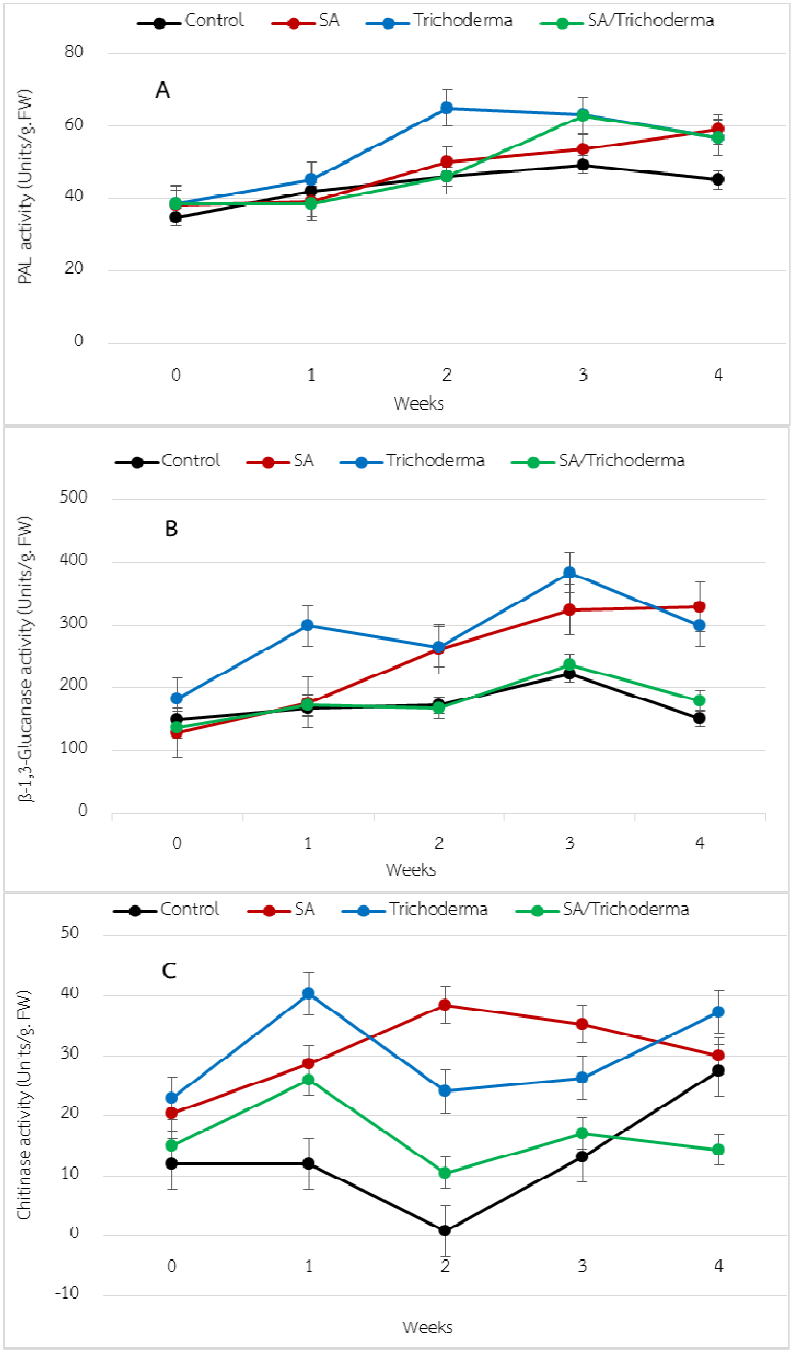
เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 27 ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต่อพื้นที่ใบที่เป็นโรคในแต่ละสัปดาห์ ในแปลงกล้วยหอมทอง อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2559
เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

5. การชักนำความต้านทานต่อโรคใบจุดของกล้วยหอมทองโดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. และ salicylic acid

จากการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคของพืช ได้แก่ phenylalanine ammonia-lyase (PAL), β-1,3-glucanase และ chitinase หลังจากผ่านการฉีดพ่นด้วยสิ่งควบคุมต่างๆ ได้แก่ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. สารละลาย salicylic acid และเชื้อรา *Trichoderma* สลับกับ salicylic acid ในแปลงทดลองทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 หลังการฉีดพ่น ส่วนสารละลาย salicylic acid กระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ PAL และ β-1,3-glucanase ได้ในสัปดาห์ที่ 2 หลังการฉีดพ่น แต่กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ chitinase ได้ตั้งแต่สัปดาห์แรกเช่นเดียวกับ *Trichoderma* ในส่วนของการใช้ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* นั้น พบการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดน้อยกว่าการใช้ salicylic acid หรือ *Trichoderma* อย่างเดียวในทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ผลของการฉีดพ่น salicylic acid เชื้อรา *Trichoderma* และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง ในแปลงทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

(A) กิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL)

(B) กิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase

(C) กิจกรรมเอนไซม์ chitinase

เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการวิจัยพบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดของกล้วยหอมทอง จำนวน 3 สกุล คือ *Alternaria* spp. *Curvularia* spp. และ *Nigrospora* sp. ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Parkunan *et al.* ในปี 2013 ที่พบว่าเชื้อรา *Alternaria alternata* สามารถก่อให้เกิดโรคใบจุดของกล้วยเป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคแตกต่างกันในกล้วยแต่ละพันธุ์ ซึ่งพบความรุนแรงของโรคตั้งแต่ 10-63% และเชื้อรา *A. alternata* ยังสามารถเข้าทำลายผลกล้วยและก่อให้เกิดอาการผลเน่าได้เช่นเดียวกัน (Barakat, 2014) นอกจากนี้ เชื้อราในสกุล *Alternaria* ยังสามารถก่อให้เกิดโรคกับไม้ผลอื่นๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ ทำให้เกิดโรคใบไหม้และผลจุดของแอปเปิล ผลเน่าในสตรอเบอร์รี่ และเชอรี่ (Harteveld *et al.,* 2014) เป็นต้น ในส่วนของเชื้อราสกุล *Curvularia* มีรายว่าเชื้อราสกุลดังกล่าวเป็นสาเหตุของโรคใบจุดของกล้วยในประเทศจาไมก้า (Meredith, 1963) และ เชื้อรา *Curvularia fallax* เป็นสาเหตุใหม่ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดของกล้วยในประเทศจีน (Xikui and Zhijun, 1991) ซึ่งเชื้อราเหล่านี้เมื่อเข้าทำลายพืชมักมีการสร้างสารพิษร่วมด้วยเสมอ ดังจากการรายงานของ Ostry (2008) ที่พบว่าเชื้อรา *A. alternata* ได้เข้าทำลายผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวหลายชนิด และมีการสร้างสารพิษหลายชนิดออกมาปนเปื้อนผลิตผล เช่น alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene, altertoxins และ tenuazonic acid เป็นต้น ซึ่งสารพิษบางชนิดมีผลกระทบต่อผู้บริโภคและสัตว์เลี้ยงโดยตรง ในส่วนของเชื้อรา *Curvularia* spp. บางรายงานพบว่าเชื้อรา *Curvularia* บางชนิดมีการสร้างสารพิษ คือ 1-O-β-D (14-hydroxy-4,12-eicosadienoyl)-glucoside ซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืช (Alam *et al.,* 1997) สำหรับเชื้อรา *Nigrospora* มีรายงานการพบว่าก่อให้เกิดโรคในบลูเบอร์รี่ โดยทำให้เกิดอาการใบจุด กิ่งและยอดไหม้ (Wright *et al.,* 2008) ซึ่ง Meredith (1962) รายงานว่าเชื้อรา *Nigrospora* sp. สามารถเจริญอยู่ในเศษซากของใบกล้วยที่เน่าทับถมกันอยู่ในแปลง โดยเชื้อราดังกล่าวมักพบว่ามีการแพร่กระจายในพื้นที่ที่มีสภาพอากาศค่อนข้างอบอุ่น (Levetin, 2015)

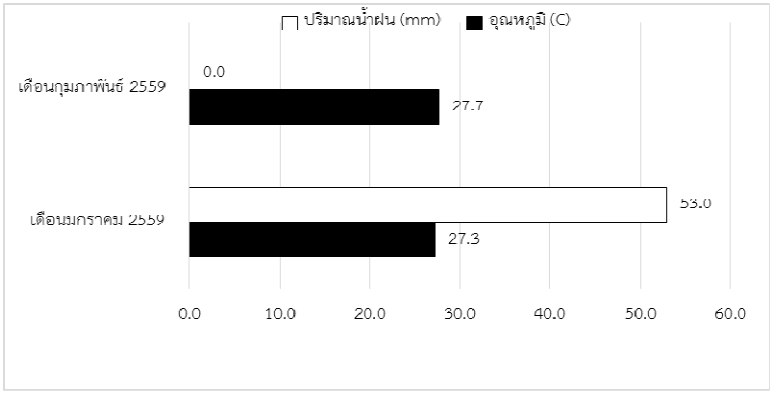
การควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยหอมทองด้วยเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. พบว่า *Trichoderma* sp. KS016 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในทุกไอโซเลทได้ดีกว่า *Trichoderma* sp. V014 เนื่องจากไอโซเลท KS016 มีอัตราเจริญเติบโตเร็วกว่า จึงสามารถแข่งขันเพื่อครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า (Widden and Hsu, 1987; Naar and Kecskés, 1998) รวมทั้งเชื้อรา *Trichoderma* สามารถปลดปล่อยเอนไซม์ เช่น chitinase และ β-1,3-glucanase เพื่อย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค จึงทำให้เชื้อราสาเหตุโรคมีความสามารถในการก่อโรคลดลง (Noronha and Ulhoa, 2000; Limón *et al.,* 2001) นอกจากนี้เชื้อรา *Trichoderma* ยังมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Harman *et al.,* 2004) ในส่วนของการควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองโดยวิธี detached leaf ด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. (เข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อ มล.) และสารละลาย salicylic acid (เข้มข้น 1.5 mM) พบว่าให้ผลการควบคุมโรคได้เพียงเล็กน้อย เนื่องจากเนื้อเยื่อใบพืชที่ถูกตัดออกมาจากต้นมีความเสื่อม (senescence) อย่างรวดเร็วจึงส่งผลให้เกิดความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อราก่อโรคได้มากขึ้น แต่เมื่อนำสิ่งควบคุมทั้ง 2 ชนิดมาควบคุมโรคใบจุดในสภาพแปลงทดลอง ซึ่งผ่านการปลูกเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 พบว่าสิ่งควบคุมทั้ง 2 ชนิดสามารถลด

ความรุนแรงของโรคได้มากกว่า 40% ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-2 ของการฉีดพ่นในทั้งสองฤดู (ฤดูแล้ง: มกราคม-กุมภาพันธ์ 2559, ฤดูฝน: มิถุนายน 2559) ซึ่งต่างจากการควบคุมโรคในสภาพไร่ โดยพบว่ากรรมวิธีที่ใช้ salicylic acid อย่างเดียวหรือสลับกับเชื้อรา *Trichoderma* เท่านั้นที่สามารถควบคุมการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุดแผล และพื้นที่ใบที่เป็นโรคได้ ส่วนเชื้อรา *Trichoderma* อย่างเดียวไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคได้ อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากตลอดช่วงของการใช้ในสภาพไร่เป็นช่วงที่มีฝนตกชุก สปอร์ของเชื้อราที่ถูกฉีดพ่นทางใบ จะถูกชะล้างออกทุกครั้ง ซึ่งตรงกันข้ามกับในแปลงทดลองที่มีการคลุมถุงรักษาความชื้นตลอดช่วงของการฉีดพ่น จึงสามารถรักษาปริมาณของเชื้อรา *Trichoderma* ให้คงอยู่บนใบและช่วยยับยั้งการเกิดโรคได้ ประกอบกับในช่วงฤดูดังกล่าวมีสภาพอากาศเฉลี่ยค่อนข้างเย็น จึงเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* (ภาพที่ 29) ในขณะที่สภาพอากาศในสภาพไร่ ถึงแม้จะมีอุณหภูมิไม่แตกต่างจากในสภาพแปลงมากนัก แต่มีปริมาณน้ำฝนค่อนข้างสูง (ฝนตกทุกวันในช่วงที่มีการฉีดพ่น) (ภาพที่ 30) จึงทำให้ประชากรของ *Trichoderma* ไม่สามารถคงอยู่ในระดับที่จะควบคุมโรคได้

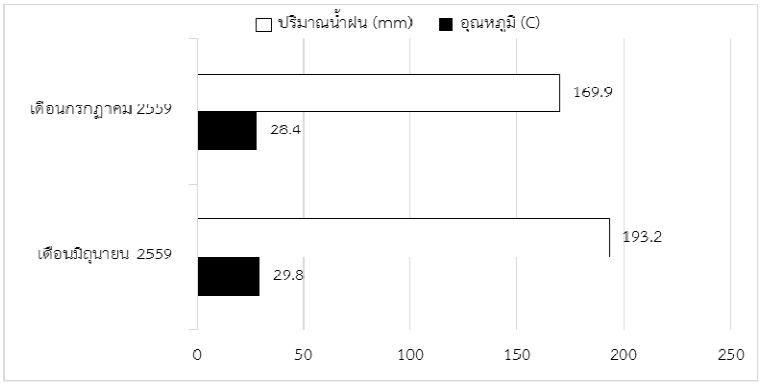
อย่างไรก็ตาม สาเหตุที่สารละลาย salicylic acid มีศักยภาพในการควบคุมโรคได้นั้น เนื่องจากโมเลกุลของสารสามารถชักนำให้พืชเกิดกลไกในการป้องกันตนเองขึ้น ดังจากการรายงานของ Gao and Zhang (2013) ที่ใช้สารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 0.2 mM กระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคของพืชเพิ่มมากขึ้น เช่น phenylalanine ammonia-lyase และ polyphenol oxidase ตลอดจนกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ pathogenesis-related proteins (PR-protein) เช่น chitinase และ peroxidase ให้มากขึ้นเพื่อต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Physalospora piricola* สาเหตุโรคใบจุดของท้อได้ ในขณะที่สารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 0.5 mM สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสของกล้วยหอมทองได้มากกว่า 60% โดยชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase และ β-1,3-glucanase และการแสดงออกของ RNA ของยีนทั้งคู่ให้สูงขึ้น (Tongsri, 2010) รวมทั้งสารละลาย salicylic acid ที่ความเข้มข้น 2 mM สามารถลดการเกิดโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวของส้มได้มากกว่า 60% โดยพบการสะสมของสารในกลุ่ม phenolics ได้มากขึ้นกว่าเนื้อเยื่อพืชปกติ (Zhu *et al.,* 2016) ยิ่งไปกว่านั้น ในการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าสารละลาย salicylic acid ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้โดยตรง โดยที่ความเข้มข้น 1.5 mM สามารถลดการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ก่อโรครุนแรงที่สุดได้ 12.2% และสามารถลดความหนาแน่นของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญอยู่บนแผลโดยวิธี detached leaf ได้มากกว่า 30% ซึ่งจะเป็นการช่วยลดชิ้นส่วนก่อโรค (inoculum) ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้อีกทางหนึ่ง ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่กลไกต่างๆ เหล่านี้จะช่วยลดความรุนแรงของโรคใบจุดของกล้วยหอมทองให้น้อยลงได้ รวมทั้งสารละลาย salicylic acid ยังมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นเดียวกัน ซึ่งจะส่งผลให้พืชมีความแข็งแรงและต้านทานต่อโรคได้ (ชานนทร์, 2557)

ในส่วนของการใช้สารหมักสมุนไพรเพื่อควบคุมโรคใบจุดนั้น ที่อัตราแนะนำ (2.5 ml/L) ไม่สามารถควบคุมโรคได้ แต่กลับกระตุ้นให้มีการงอกของสปอร์ของเชื้อราก่อโรค และทำให้ germ tube ของสปอร์ของเชื้อรางอกได้ยาวมากขึ้น อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากสารหมักสมุนไพรมีความเข้มข้นต่ำเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสุภัทรา และคณะ (มปป.) ที่พบว่าสารสกัดขิงและกระชายที่ความเข้มข้นต่ำๆ คือ 100 และ 500

ppm สามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ให้มากขึ้นกว่าปกติ โดยจากการวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งถ้าหากจะเพิ่มความเข้มข้นของสารหมักสมุนไพรให้สูงขึ้นจนถึงระดับที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Curvularia* sp. HC022 ได้นั้น อาจจะต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงมาก ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาในการบันทึกผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากเศษชิ้นส่วนพืชปริมาณมากที่อยู่ในสารหมักซึ่งมีสีเข้มจะไปบดบังสปอร์ที่กำลังงอก germ tube ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นใยขนาดเล็ก และใสไม่มีสี จึงอาจทำให้ข้อมูลคลาดเคลื่อนได้ รวมทั้งสารหมักสมุนไพรที่ความเข้มข้นสูงๆ นี้ ถ้าหากมีการนำมาฉีดพ่นในสภาพแปลง เศษของชิ้นส่วนพืชจะไปอุดตันหัวฉีดของเครื่องมือซึ่งจะทำให้เครื่องมือได้รับความเสียหายได้ ยิ่งไปกว่านั้น สารหมักสมุนไพรที่ความเข้มข้นสูงๆ จะก่อให้เกิดพิษบนเนื้อเยื่อใบกล้วยหอมทอง



ภาพที่ 29 ระดับอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยในช่วงเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์ 2559 จากกรมอุตุนิยมวิทยา สถานีดอนเมือง กรุงเทพฯ



ภาพที่ 30 ระดับอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยในช่วงเดือนมิถุนายนและกรกฎาคม 2559 จากกรมอุตุนิยมวิทยา สถานีบัวชุม จังหวัดลพบุรี

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยพบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดในกล้วยหอมทองจำนวน 6 ไอโซเลท ซึ่งจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาอยู่ในสกุล *Alternaria* spp. 3 ไอโซเลท (HR023-1, HY022 และ HR01), *Curvularia* spp. 2 ไอโซเลท (HC011 และ HC022) และ *Nigrospora* sp. 1 ไอโซเลท (HB023) โดยเชื้อรา *Alternaria* sp. HR023-1 ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด และเมื่อทดสอบศักยภาพของสิ่งควบคุม 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. และ salicylic acid ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคในห้องปฏิบัติการ พบว่า *Trichoderma* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้สูงสุดถึง 100% ในขณะที่ salicylic acid (เข้มข้น 1.5 mM) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 71.1% โดยสิ่งควบคุมทั้งสองชนิดมีศักยภาพในการควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลองทั้งในฤดูแล้งและฤดูฝนได้มากกว่า 40% ตั้งแต่ฉีดพ่น 1-2 สัปดาห์แรก ส่วนการควบคุมโรคในสภาพไร่ (ฤดูฝน) พบว่า ทั้งกรรมวิธีที่ใช้ salicylic acid อย่างเดียว และ salicylic acid สลับกับ *Trichoderma* sp. สามารถยับยั้งการเกิดจุดแผล (disease incidence) ได้มากกว่า 40% ตลอดช่วง 4 สัปดาห์ที่มีการฉีดพ่น รวมทั้งการใช้ salicylic acid อย่างเดียว ยังสามารถยับยั้งความรุนแรงของโรค (disease sevrity) ได้เกือบ 50% ตลอดช่วงที่มีการฉีดพ่น ซึ่งสามารถสรุปได้ว่า salicylic acid มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยสามารถควบคุมโรคได้ดีทั้งในสภาพแปลงทดลองและสภาพไร่ เนื่องจาก salicylic acid มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้โดยตรงเหมือนกับสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา และกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานโรคได้ในขณะเดียวกัน ในขณะที่เชื้อรา *Trichoderma* สามารถควบคุมโรคได้เฉพาะในสภาพแปลงทดลอง แต่ไม่สามารถควบคุมโรคในสภาพไร่

ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยที่พบว่าสารละลาย salicylic acid มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดของกล้วยหอมทองในสภาพไร่ จึงควรจะทำการศึกษาอีกครั้งในปีถัดไป เพื่อยืนยันผลในประสิทธิภาพของสารดังกล่าว รวมทั้งน่าจะศึกษาผลของสารละลายต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตกล้วยหอมทอง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชชนิดอื่นๆ โดยใช้ salicylic acid ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ชานนทร์ แสงจันทร์. 2557. การควบคุมโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ในผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

จริยา วิสิทธิ์พานิช. 2553. รายงานวิจัยโครงการการพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตกล้วยไข่คุณภาพเพื่อการส่งออก. http://elibrary.trf.or.th/project_content.asp?PJID=RDG5020048

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. โครงการเกษตรกู้ชาติโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพ และชีวภัณฑ์ในการจัดการศัตรูพืช เพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ ภาควิชาโรคพืชคณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 194 น.

สุภัทรา จามกระโทก ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล ชลิดา เล็กสมบูรณ์ นวลวรรณ ฟ้ารุ่งสาง กวิศร์ วานิชกุล และอุดม ฟ้ารุ่งสาง. มปป. ผลของสารสกัดจาก กระชาย ขมิ้นและขิงต่อราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว[ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/KC4201065.pdf, 7 สิงหาคม 2559.

สุมิสา อรุณโน และวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2556. การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการกระตุ้นความต้านทานโรคต้นแตกยางไหลในแตงเทศ. แก่นเกษตร 41 (2): 135-142.

สุวิตา แสไพศาล วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และพัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์. 2554. การชักนำให้มะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคใบจุดเป้ากระสุน โดยเชื้อ *Trichoderma* spp. และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย. วารสารวิจัย มข 16 (3): 261-270.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2558. สารสนเทศเศรษฐกิจรายสินค้า ปี 2558. สำนักเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง. 2557a. ผลิตพืชอินทรีย์/สมุนไพรกำจัดโรคและแมลง [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: http://www.oknation.net, 1 กรกฎาคม 2559.

ไม่ปรากฏชื่อผู้แต่ง. 2557b. สมุนไพรป้องกันโรคแมลงศัตรูพืช สูตร พด.7 [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: http://www.chainat.go.th,1 กรกฎาคม 2559.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2557. สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้า ปี 2557. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 122 หน้า.

Alam, M., A. Sattar, PK. Chaudhuri, K.K. Janardhanan and A. Husain. 1997. Isolation, purification and characterization of a phytotoxin produced by *Curvularia andropogonis.* Plant Science 123: 47-55.

Alves de Aguiar, R., M.G. da Cunha and M. Lobo Junior. 2014. Management of white mold in processing tomatoes by *Trichoderma* spp. and chemical fungicides applied by drip irrigation. Biol. Control 74: 1–5.

Barakat, H. 2014. Bio-Control of *Alternaria alternata* during banana storage by purified AFP using isoelectric focusing Technique**.** Food Nutr. Sci. 5(15): 1482-1495.

Burner, R.L. 1964. Determination of reducing sugar value 3,5 dinitrosalicylic acid method. Met. Carbohydr. Chem. 4: 67-71.

Chamswarng, C., W. Intanoo, A. Kaensarn and W. Chewapanich. 2014. Effects of sowing and planting biosubstrates supplemented with *Trichoderma harzianum* on growth and the control of lettuce root rot caused by *Pythium aphanidermatum.* Book of abstracts, The 5th Asian Conferrence on Plant Pathology, November 3-6, 2014, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Chowdappa, P., S.P. Mohan Kumar, M. Jyothi Lakshmi and K.K. Upreti. 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. Biol. Control 65: 109–117.

Chuang, T. Y., and Jeger, M. J. 1987. Relationship between incidence and severity of banana leaf spot in Taiwan. Phytopathology 77:1537-1541.

Gao, L. and Y. Zhang. 2013. Effect of salicylic acid on pear leaf induced resistance to pear ring rot. World Appl. Sci. J. 22(11): 1534-1539.

Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet and M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2: 43-56.

Harteveld, D.O.C., O.A. Akinsanmi, S. Dullahide and A. Drenth. 2014. Sources and seasonal dynamics of Alternaria inoculum associated with leaf blotch and fruit spot of apples. Crop Prot. 59: 35-42.

Levetin, E. 2015. Basic Aeroallergen Course Fungal Spore Morphology [Online]. Source: file:///C:/Users/Administrator.T2BFAGRDEZRMRO1/Downloads/Spore%20Morphology%20Handout.pdf, 6 June 2016.

Limón, M.C., E. Margolles-Clark, T. Benítez and M. Penttilä. 2001. Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol. Lett. 198: 57-63.

Martinez-Medina, A., A. Roldan and J.A. Pascual. 2011. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: Growth response and Fusarium wilt biocontrol. Appl. Soil Ecol. 47: 98–105.

Meredith, D.S. 1962. Some fungi on decaying banana leaves in Jamaica. Trans. Brit. mycol. Soc. 45(3): 335-347.

Meredith, D.S. 1963. Some graminicolous fungi associated with spotting of banana leaves in Jamaica. Ann. Appl. Biol. 51: 371-378.

Naar, Z. and M. Kecskés. 1998. Factors influencing the competitive saprophytic ability of Trichoderma species. Microbiol. Res. 153(2): 119-129.

Noronha, E.F. and C.J. Ulhoa. 2000. Characterization of a 29-kDa β-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol. Lett. 183: 119-123.

Ostry, V. 2008. Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. World Mycotoxin J. 1(2): 175-188.

Parkunan, V., S. Li, E.G. Fonsah and P. Ji**.** 2013. First Report of Alternaria leaf spot of banana caused by *Alternaria alternata* in the United States. Plant Dis. 97(8): 1116.

Ramamoorthy, V., T. Raguchander and R. Samiyappan. 2002. Induction of defense related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici.* Plant Soil 239: 55-68.

Reissig, J.L., J.L. Strominger and L.F. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylglucosamine. J. Biol. Chem. 217: 959-966.

Silva, H.S.A., R. da Silva Romeiro, D. Macagnan, B. de Almeida Halfeld-Vieira, M.C. Baracat Pereira and A. Mounteer. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. Biol. Control 29: 288-295.

Tongsri, V. 2010. Effects of secondary metabolites of some yeasts on *Colletotrichum musae* and anthracnose disease of banana cv. Hom Thong. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.

Velasques, L. and R. Hammerschmidt. 2004. Development of a method for the detection and quantification of total chitinase activity by digital analysis. Journal of Microbiological Methods 59: 7-14.

Widden, P. and D. Hsu. 1987. Competition between *Trichoderma* species: Effects of temperature and litter type. Soil Biol. Biochem. 19(1): 89-93.

Wright, E.R., M. Folgado, M. Rivera and E. Lopez. 2008. *Nigrospora sphaerica* causing leaf spot and twig and shoot blight on blueberry: A new host of the pathogen. Plant Dis. 92(1): 171-171.

Zhou, Y., J. Ming, L. Deng and K. Zeng. 2014. Effect of *Pichia membranaefaciens* in combination with salicylic acid on postharvest blue and green mold decay in citrus fruits. Biol. Control 74: 21–29.

Zhu, F., J. Chen, X. Xiao, M. Zhang, Z. Yun, Y. Zeng, J. Xu, Y. Cheng and X. Deng. 2016. Salicylic acid treatment reduces the rot of postharvest citrus fruit by inducing the accumulation of H_2O_2, primary metabolites and lipophilic polymethoxylated flavones. Food Chem. 207: 68-74.