



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดกรองปัจจัยการผลิตอินทรีย์-ชีวภาพเพื่อผลิตชาคุณภาพสูง
Screening of Bio-organic Inputs for High Quality Tea Production

หัวหน้าโครงการ : ดร. อรพรรณ จัตรสีรุ่ง
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



รายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดกรองปัจจัยการผลิตอินทรีย์-ชีวภาพเพื่อผลิตชาคุณภาพสูง Screening of Bio-organic Inputs for High Quality Tea Production

หัวหน้าโครงการ : ดร. อรพรรณ นัตรสีรุ่ง
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะผู้วิจัย

1. ดร. อรพรรณ นัตรสีรุ่ง
2. ดร. ชูชาติ สันทรทรัพย์
3. ผศ.ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล

สังกัด

สาขาวิชาปฐพีศาสตร์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานวิจัยของโครงการนี้ จะไม่สามารถสำเร็จลงได้หากไม่ได้รับการสนับสนุนด้านทุนวิจัยและด้านการดำเนินงานจากคณะบุคคลหลายภาคส่วน ดังนั้นผู้วิจัยจึงขอแสดงความขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) (Thailand Research Fund) ฝ่ายเกษตร (2) ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณตลอดระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณจักริน วังวิวัฒน์ กรรมการผู้จัดการ บริษัท ชาระมิงค์ จำกัด ที่ได้อนุญาตและให้ความร่วมมือกับคณะผู้วิจัยได้ดำเนินงานทดลองภาคสนามในไร่นาของบริษัท และขอขอบคุณ คุณกำธร เจ้าหน้าที่ภาคสนามของบริษัท ที่ได้อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานภาคสนาม รวมทั้งเกษตรกรทุกท่านที่ได้อำนวยความสะดวกในการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และเก็บตัวอย่างใบชา

และขอขอบคุณ ผู้ช่วยนักวิจัยห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ สาขาวิชาปฐพีศาสตร์ฯ เจ้าหน้าที่สังกัดหน่วยวิจัย คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รวมถึงผู้เกี่ยวข้องอื่นๆอีกหลายท่านที่ไม่อาจเอ่ยนามได้ครบ ที่ได้ช่วยเหลือให้การดำเนินงานวิจัยเป็นไปอย่างราบรื่นและสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลงานวิจัยนี้ผู้ประกอบการและเกษตรกรสามารถนำไปปฏิบัติต่อเนื่องในภาคสนามเพื่อให้เกิดผลดีต่อคุณภาพและผลผลิตของชาในระยะยาว นอกจากนี้ผลการวิจัยสามารถเป็นพื้นฐานอย่างดีให้การวิจัยต่อยอดด้านการผลิตชาอินทรีย์ในอนาคต เพื่อจะก่อให้เกิดคุณค่าแก่การนำไปประยุกต์ใช้และขยายผลในพื้นที่ปลูกชาอื่นๆได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้กลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ที่เป็นผลลัพธ์จากโครงการนี้ยังสามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เพื่อใช้ในระบบเกษตรยั่งยืนและระบบเกษตรอินทรีย์ในระบบการผลิตชาได้ และรายงานการวิจัยฉบับนี้คงมีคุณค่าในด้านแนวทางการพัฒนาด้านอื่นทางการเกษตร อุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้อมที่จะมีในโอกาสต่อไปด้วย

ดร. อรรธรณ ชัตรสีรุ่ง

หัวหน้าโครงการวิจัย

พฤษภาคม 2553

Executive Summary

Tea is an economic crop of highland areas of northern Thailand with high input of agrochemical for its production. Consecutive years of agrochemicals use have resulted in soil fertility degradation and chemicals residues contamination in the environment especially water resources. The major areas for assam Tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) production is located in highland areas of Mae Tang District, Chiang Mai Province covering around 3,000 Rai of Tea plantation areas of Raming Tea company and farmers' Tea extension areas. Soil degradation due to high agrochemicals input resulted in decreasing of Tea yield. For this reason the company and farmers would like to increase tea yield while they also could improve soil properties and conserve the environment. In addition the yield obtained would be of interest for consumer's demands of safe and health products. The use of organic and beneficial microorganisms is an appropriate way to reduce the use of agrochemicals and conserve the environment. This study was aimed to screen and test microorganisms which are able to increase the availability of plant nutrients for tea by direct application as biofertilizer or mixed with organic fertilizer. Screening of bio-organic inputs was done to clarify their effect on tea yield and quality. Study of microorganisms that show antagonistic activity to root rot diseased was also included.

Three groups of microorganisms; nitrogen (N) fixing (*Azospirillum*, *Azotobacter* and *Beijerinckia*), phosphorus (P) solubilizing (*Penicillium* and actinomycetes isolate LGLA-01-012) and potassium (K) solubilizing microorganisms (*Bacillus*) were selected to use as biofertilizer and mixed with organic fertilizers to apply in the field experiment. Before these fertilizers application, the soil pH was 4.76. The soil pH was raised to 5.4 by organic fertilizer application however bio-fertilizer application showed little increase in soil pH. Although the soil properties of treatments with 4 consecutive times of organic and bio- fertilizers application during 14 months did not significantly differ from those of the control but the results showed a positive trend of better soil quality. Soil organic matter content was increased from 3.45 to 5.11 – 5.39%. Besides raising soil pH and organic matter, organic and bio- fertilizers could increased the quantity of many plant nutrients (P,

K, Ca, Mg, S and Zn) in the soils. However some nutrients such as B showed only little increase. Several nutrients; Fe, Mn and Cu were decreased with organic and bio- fertilizer application.

However the quantity of P availability and exchangeable K was higher than the optimum value while the quantity of Ca and Mg were lower than the optimum value of general plant production. This might due to a long and high input of N,P and K fertilizer in Raming Tea plantation before transition to organic system. This practice resulted in increment of soil acidity and accumulation of P and K in the soils. In addition Ca and Mg were removed through erosion in this slope plantation. For this reason even after this experiment, this area should be continuously applied with organic fertilizer blended with dolomite. After a certain time, the soil pH would be increase and stable.

Tea leaves analysis showed that major nutrients (N, P and K) especially N were increased by these fertilizers application. The N content in tea leaves both of shaded (2.93 - 3.23%) and un-shaded (2.71 – 2.82%) plantation areas was higher that of the control (2.68%). These results clearly showed that tea performed better nutrient uptake.

Measurement of antioxidant catechin in green leaves showed that the highest catechins in shaded and unshaded area was found as EGCG (17.24 – 77.75 mg/g) followed by EGC (5.80 – 55.67 mg/g), EC (4.39 – 60.83%) and C (0.15-4.67 mg/g). It was interesting to note that catechin antioxidant in young green leaves of un-shaded plots were higher than that of shaded areas. In contrast caffeine in young green leaves of shaded plots was higher than that of unshaded areas. It was also interesting to note that antioxidant catechin was lowest in winter, gradually increased in summer and showed highest quantity in rainy season.

Four consecutive times application of organic and bio- fertilizers tended to enhance tea yield. The average year-round yield in 2008 was 617.5 to 711.3 kg/ha, and in 2009 the yield was increased to 1,165 to 1,271.9 kg/ha. The highest yield was obtained with organic fertilizer treatment. However the yield of the control plots was also tended to increased. This might due to higher nutrients obtained from gradually natural decomposition of fallen tea leaves and pruning tea leaves under the tea plants.

Continuous application of organic fertilizer in the long run would result in more obvious yield increment.

Plant diseases survey in this experiment showed that no obvious spread of plant disease in shaded plots on high slope areas. The un-shaded plots in lower slope areas showed higher disease spread than that of the shaded areas. In general no obvious effect of organic and bio-fertilizers application on the spread of plant disease was found. However it could be concluded that no serious plant disease in the areas of fertilizers experiment. Soil fertility and environment might affect tea growth and also plant disease tolerant of tea plant. Therefore continuous improvement of soil fertility by organic fertilizer would result in more obvious results of both yield and plant disease tolerant.

In another tea plantation areas without fertilizer experiment, the two most important tea diseases were recorded; anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. and brown root rot caused by *Phellinus noxius*. From the isolation and screening of antagonistic endophytic actinomycetes; isolates COF2 and COF1 showed highest activity to suppress *Colletotrichum* sp. growth with the percentage of suppressing of 72.19 and 70.20, respectively. The highest activity (69.37%) in suppressing *P. noxius* was obtained with isolate GAR2.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ชาเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในพื้นที่สูงของภาคเหนือและมีการใช้สารเคมีเกษตรในอัตราสูงอย่างต่อเนื่องทำให้ดินเสื่อมความอุดมสมบูรณ์และมีสารปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมสูง โดยเฉพาะแหล่งต้นน้ำบนที่สูง แหล่งปลูกชาอัสสัม(*Camellia sinensis* var. *assamica*) ที่สำคัญแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่อยู่บนพื้นที่สูงใน อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่ ซึ่งเป็นแหล่งต้นน้ำแม่ปิงโดยมีพื้นที่ปลูกชากว่า 3,000 ไร่ ซึ่งเป็นพื้นที่สัมปทานของบริษัทชาระมิงค์ จำกัด และพื้นที่ส่งเสริมการปลูกชาอัสสัมของเกษตรกร เมื่อปัจจัยทางดินเสื่อมถอยลงจากการใช้สารเคมีเกษตรดังกล่าวทำให้ผลผลิตของชาอัสสัมลดลง ดังนั้นผู้ประกอบการรวมทั้งเกษตรกรมีความประสงค์จะเพิ่มปริมาณผลผลิตในขณะเดียวกันก็สามารถฟื้นฟูดินและอนุรักษ์สิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้ก็จะได้ผลผลิตที่สอดคล้องกับความต้องการของตลาดผู้บริโภคที่ห่วงใยต่อสุขภาพซึ่งก็มีแนวโน้มของตลาดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การใช้ปุ๋ยอินทรีย์และจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์น่าจะเป็นทางเลือกที่เหมาะสมเพื่อลดการใช้สารเคมีเกษตรและอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม การศึกษาทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อคัดเลือกและทดลองใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเพิ่มประโยชน์ของธาตุอาหารให้แก่ชาโดยใช้โดยตรงเป็นปุ๋ยชีวภาพหรือผสมกับปุ๋ยอินทรีย์ คัดกรองปัจจัยการผลิตอินทรีย์ชีวภาพที่มีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของชาในภาคเหนือ พร้อมทั้งศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์เชื้อราเห็ดสาเหตุของโรคโคนเน่าของชา

ผลการคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่มเพิ่มธาตุอาหารพืชเพื่อใช้ผสมในปุ๋ยอินทรีย์สำหรับใช้ทดลองในภาคสนามได้เลือกมา 3 กลุ่มคือ กลุ่มตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Azospirillum*, *Azotobacter* และ *Beijerinckia* กลุ่มละลายฟอสฟอรัส ได้แก่ *Penicillium* และ แอคติโนมัยซิส isolate, LGLA-01-012 อีกกลุ่มหนึ่งคือกลุ่มละลายโพแทสเซียม ได้แก่ *Bacillus* จุลินทรีย์กลุ่มที่คัดเลือกนี้ได้นำมาผลิตเป็นส่วนผสมของปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพสำหรับการทดลองภาคสนามครั้งนี้ จากการศึกษาวิจัยการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพในพื้นที่ไร่ชาของบริษัทชาระมิงค์ จำกัด พบว่าก่อนใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพดินเป็นกรดสูงมีค่า pH อยู่ประมาณ 4.76 หลังมีการใส่ปุ๋ยอินทรีย์แล้วค่า pH ของดินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (ความเป็นกรดลดลง) โดยมีค่าอยู่ที่ 5.4 ส่วนการใส่ปุ๋ยชีวภาพในการวิจัยครั้งนี้ส่งผลให้ค่า pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้น ถึงแม้ว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ จำนวน 4 ครั้ง ในระยะเวลา 14 เดือน จะไม่ทำให้คุณสมบัติของดินโดยส่วนใหญ่แตกต่างจากการไม่ใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม แต่การใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ มีแนวโน้มที่ทำให้ดินมีคุณภาพที่ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับดินปลูกชาก่อนการทดลอง ปริมาณอินทรีย์วัตถุเพิ่มขึ้นจาก 3.45 เป็น 5.11 – 5.39 % การใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพนอกจากจะส่งผลให้ค่า pH และอินทรีย์วัตถุปรับ

สูงขึ้นแล้วปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ P, K, Ca, Mg, S และ Zn มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นชัดเจน ส่วนปริมาณธาตุอาหารอื่น ได้แก่ B มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังการใส่ปุ๋ยอินทรีย์เพียงเล็กน้อย ส่วนปริมาณธาตุบางธาตุมีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจน ได้แก่ Fe, Mn และ Cu

อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองครั้งนี้พบว่า ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์และปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้อยู่ในระดับสูงเกินค่าที่เหมาะสม แต่มีแคลเซียมแมกนีเซียมในระดับต่ำกว่าค่าที่เหมาะสม เมื่อเทียบกับดินที่เหมาะสมในการผลิตพืชโดยทั่วไป ทั้งนี้เป็นผลสืบเนื่องมาจากการใช้ปุ๋ยเคมีที่ให้ธาตุอาหารหลัก (NPK) อย่างต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลายาวนาน ในไร่ปลูกชาของ บริษัท ชาระมิงค์ จำกัด ก่อนที่จะปรับเปลี่ยนมาผลิตในระบบอินทรีย์ ทำให้มีการสะสมฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมในดินในปริมาณสูงมากเป็นทุนเดิม และสะสมความเป็นกรดในดินเพิ่มขึ้น ประกอบกับการเป็นพื้นที่ลาดชัน มีการสูญเสีย แคลเซียมและแมกนีเซียมไปกับชะล้างได้ง่าย ดินจึงมีแคลเซียมและแมกนีเซียมต่ำ ดังนั้นในระยะหลังจากนี้ควรมีการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการใช้ปูนโดโลไมท์ (Dolomite- $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) โดยผสมในปุ๋ยอินทรีย์ก่อนการใส่ลงดินโดยปฏิบัติอย่างต่อเนื่องในระยะยาวคาดว่าจะทำให้ค่า pH มีความเหมาะสมและคงที่มากขึ้น

จากผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบชา พบว่าถึงแม้ความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบชาทั้งที่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพจะไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม ทั้งแปลงที่ปลูกชาภายใต้ร่มเงา และแปลงกลางแจ้ง แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพมีแนวโน้มทำให้ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก โดยเฉพาะไนโตรเจนในใบชาสูงกว่าในกรรมวิธีที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ทั้งแปลงที่ปลูกในร่มและกลางแจ้ง โดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพทำให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนสูงขึ้นถึง 2.93 - 3.23% และ 2.71 - 2.82% ตามลำดับ ขณะที่ไม่ใส่ปุ๋ยมีไนโตรเจนเพียง 2.68% แสดงให้เห็นว่าชามีการดูดใช้ธาตุอาหารดีขึ้น

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในกลุ่มคาเทชิน (Catechin) ซึ่งได้แก่ Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin 3-gallate (EGCG) Epicatechin gallate ECG และ คาเฟอีน (Caffeien) ตลอดระยะเวลาการศึกษา พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจพบ มีปริมาณสาร EGCG สูงสุดในทุกฤดูทั้งแปลงที่ปลูกชาในร่มและแปลงปลูกชากลางแจ้ง ที่ประมาณ 17.24 - 77.75 mg/g รองลงมาคือสาร EGC มีประมาณ 5.80 - 55.67 mg/g รองลงมาคือสารมีประมาณ EC 4.39 - 60.83% และมีปริมาณสาร C น้อยที่สุด 0.15-4.67 mg/g และเมื่อพิจารณาถึงความแตกต่างของสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มคาเทชินและคาเฟอีนในยอดชาอ่อนจากแปลงที่ปลูกในร่มและแปลงที่ปลูกกลางแจ้ง พบข้อสังเกตที่น่าสนใจว่ามีแนวโน้มว่าสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มคาเทชินในยอดชาอ่อนจากแปลงกลางแจ้งจะมีปริมาณที่สูงกว่าแปลงชาที่ปลูกในร่ม แต่ในทางตรงกันข้ามมีแนวโน้มว่าสารคาเฟอีนในยอดชาอ่อนของแปลงในร่มมี

ปริมาณที่ สูงกว่าแปลงกลางแจ้ง และข้อสังเกตอีกประการก็คือ โดยส่วนใหญ่แล้วปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มคาเทชินจะมีปริมาณต่ำที่สุดในช่วงฤดูหนาว และค่อยเพิ่มสูงขึ้นในช่วงฤดูร้อน และจะมีปริมาณสูงสุดในฤดูฝน

การใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพต่อเนื่องกัน 4 ครั้ง มีแนวโน้มว่าช่วยส่งเสริมให้ผลผลิตของชาดีขึ้น ซึ่งจะเห็นว่าในฤดูการผลิตปี 2551 ผลผลิตของชา เฉลี่ยอยู่ในช่วง 617.5 ถึง 711.3 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ (kg/ha) และในฤดูการผลิตปี 2552 ผลผลิตของชาเพิ่มขึ้นเป็น 1,165 ถึง 1,271.9 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ โดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ให้ผลผลิตสูงสุด สำหรับแปลงที่ไม่ใส่ปุ๋ยนั้นมีแนวโน้มของการเพิ่มผลผลิตเช่นกันซึ่งคาดว่าเกิดจากการย่อยสลายของใบชาธรรมชาติที่ได้จากการตัดแต่งกิ่งชาในทุกฤดูแล้งของแต่ละปี หากมีการใส่ปุ๋ยอินทรีย์อย่างต่อเนื่องคาดว่าจะเห็นผลในทางบวกต่อผลผลิตที่ส่งผลให้เพิ่มขึ้นอยู่ในระดับสูงได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

จากการสำรวจการระบาดของโรคในแปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพนั้น แปลงที่ปลูกในบริเวณไหล่เขาที่สูงชันและมีร่มไม้ไม่ค่อยพบอาการของโรค เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงที่ปลูกในบริเวณที่ต่ำกว่าและมีร่มไม้่น้อยซึ่งพบว่ามีโรคเกิดโรคมามากกว่า โดยภาพรวมแล้วการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพในการทดลองนี้ยังไม่ส่งผลชัดเจนว่าทำให้ความรุนแรงของโรคต่างจากแปลงที่ไม่ใส่ปุ๋ย อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่ได้สามารถสรุปว่า แปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์ไม่มีการระบาดของโรคที่รุนแรง ความอุดมสมบูรณ์ของดินและสภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่นั้นอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการทนทานต่อโรคของต้นชา ดังนั้นการฟื้นฟูความอุดมสมบูรณ์ของดินอย่างต่อเนื่องในระยะยาวน่าจะเห็นผลทางบวกด้านนี้ได้ชัดเจนขึ้น

ในส่วนของแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงซึ่งห่างจากแปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์ได้มีการสำรวจโรคสำคัญของชา พบโรคสำคัญ 2 ชนิด คือ โรคแอนแทรคโนส ที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum* sp. โรครากร่อนโคนเน่าสีน้ำตาล เกิดจากเชื้อรา *Phellinus noxius* การทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีตเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. พบว่า ไอโซเลท COF2 และ COF1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด เท่ากับ 72.19 และ 70.20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีตเอนโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. noxius* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าสีน้ำตาลของชา พบว่า เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคมามากที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในระดับสูง (69.37%) คือ GAR2

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
Executive Summary	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	จ
สารบัญเรื่อง	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
Abstract	1
บทคัดย่อ	2
บทที่ 1 บทนำ (Introduction)	3
1.1 ความเป็นมาของโครงการ	3
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง (Materials and Methods)	8
2.1 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสเพื่อใช้ในการย่อยสลายใบชาและการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและฮอร์โมนพืช IAA	8
2.1.1 การแยกแอคติโนมัยซีส (Actinomycetes) จากใบลำไย	8
2.1.2 การแยกแอคติโนมัยซีสจากดินบริเวณโคนต้นลำไย	8
2.1.3 การแยกแอคติโนมัยซีสจากผิวใบลำไยและผิวใบชา	9
2.1.4 การประเมินศักยภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ของเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกได้	9
2.1.5 การประเมินศักยภาพในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA (Indole Acetic Acid)	10
2.1.6 การประเมินประสิทธิภาพในการละลายฟอสฟอรัสของเชื้อแอคติโนมัยซีส	10
รายงานฉบับสมบูรณ์ “โครงการคัดกรองปัจจัยการผลิตอินทรีย์-ชีวภาพเพื่อผลิตชาคุณภาพสูง	๗

2.1.7 การแยกและขยายเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากและ ดินบริเวณรากต้นชา	11
2.1.8 การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในการย่อยสลาย ใบชาในเรือนทดลอง	13
2.2 การทดสอบผลของปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพและปุ๋ยชีวภาพต่อการเปลี่ยนแปลง สมบัติของดิน ผลผลิต และคุณภาพผลผลิตของชา ในภาคสนาม	14
2.2.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำไปใช้ในการทดลองภาคสนาม	14
2.2.2 แผนการทดลองการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพในแปลงปลูกชา	14
2.2.3 การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล	19
2.3 การสำรวจโรคในแปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ	20
2.4 การแยกเชื้อและการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคชาในแปลง	21
2.4.1 การสำรวจและการแยกเชื้อสาเหตุโรค	21
2.4.2 กลุ่มเชื้อรา	21
2.4.3 กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย	21
2.4.4 กลุ่มไส้เดือนฝอย	23
2.5 การแยกและการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิส และเชื้อแอคติโนมัยซิส เอนโดไฟท์	23
2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซิส	24
บทที่ 3 ผลการทดลอง (Results)	25
3.1 ผลการแยกแอคติโนมัยซิส และการประเมินการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	25
3.2 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการละลายฟอสฟอรัส ของเชื้อแอคติโนมัยซิส	29
3.3 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการละลายฟอสฟอรัส ของเชื้อแอคติโนมัยซิส	30
3.4 การคัดแยกและขยายเชื้อไมคอร์ไรซา	34
3.4.1 ผลคัดแยกสปอร์จากดินบริเวณรากชา	34
3.4.2 การขยายปริมาณสปอร์ของเชื้อราอาบัสคูลารีไมคอร์ไรซา ชนิด <i>Glomus</i> sp.	34

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
3.4.3 การขยายปริมาณสปอร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในงานทดลองภาคสนาม	35
3.4.4 การขยายปริมาณสปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา ชนิด <i>Glomus</i> sp.	34
3.5 ผลการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ทดสอบในภาคสนาม	35
3.6 ผลการทดสอบการย่อยสลายของใบชา	36
3.7 ผลของปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพต่อคุณภาพและผลผลิตของชาในภาคสนาม	39
3.7.1 ผลการตรวจสอบสมบัติของดินก่อนการทดลอง	39
3.7.2 ผลของปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน	40
3.8 ผลการสำรวจการระบาดของโรคในแปลงผลิตชาระบบอินทรีย์	55
3.8.1 การสำรวจการแยกเชื้อ และการพิสูจน์สาเหตุโรค	55
3.8.2 การแยกและการเลี้ยงเชื้อ แอคติโนมัยซีสและแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์	71
3.8.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ สาเหตุโรคของชา	76
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย (Summary)	84
4.1 แปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ	84
4.2 แปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรง	85
เอกสารอ้างอิง	86
ภาคผนวก	90

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 แผนการใส่ปุ๋ยในแปลงทดลอง	16
ตารางที่ 3.1 เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากใบลำไยและศักยภาพในการผลิต เอนไซม์เซลลูเลส (clear zone ratio)	27
ตารางที่ 3.2 ศักยภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (clear zone ratio) ของเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกได้จากดิน	28
ตารางที่ 3.3 เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากผิวใบลำไย และผิวใบชา	28
ตารางที่ 3.4 ปริมาณการผลิต IAA ของเชื้อที่แยกได้จากผิวใบลำไย และใบชา	29
ตารางที่ 3.5 ประสิทธิภาพเทียบจาก clear zone ratio ของเชื้อ Actinomycetes จากใบลำไย ที่ฝังในการละลายฟอสเฟต	31
ตารางที่ 3.6 ประสิทธิภาพเทียบจาก clear zone ratio ของเชื้อแอคติโนมัยซีส จากดินบริเวณ โคนต้นลำไยในการละลายฟอสเฟต	32
ตารางที่ 3.7 ประสิทธิภาพเทียบจาก clear zone ration ของเชื้อ Actinomycetes ที่แยกจากผิวใบ ลำไยและผิวใบชาในการละลายฟอสเฟต	33
ตารางที่ 3.8 ประสิทธิภาพเทียบจาก clear zone ration ของเชื้อ Actinomycetes เชื้อแบคทีเรียที่ แยกมาจากดินบริเวณรากชาในการละลายฟอสเฟต	33
ตารางที่ 3.9 จุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกกว่ามีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป	36
ตารางที่ 3.10 คุณสมบัติของดินในบริเวณแปลงปลูกชา ของบริษัทชาระมิงค์	39
ตารางที่ 3.11 คุณสมบัติของดินในแปลงที่ปลูกชาภายใต้ร่มเงาต้นไม้หลังการใส่ปุ๋ยครั้งที่ 1 (กันยายน 2551)	42
ตารางที่ 3.12 คุณสมบัติของดินในแปลงที่ปลูกชาที่อยู่กลางแจ้ง หลังการใส่ปุ๋ยครั้งที่ 1 (กันยายน 2551)	42
ตารางที่ 3.13 คุณสมบัติของดินในแปลงที่ปลูกชาภายใต้ร่มเงาต้นไม้หลังการใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 (เมษายน 2552)	43

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 3.14 คุณสมบัติของดินในแปลงที่ปลูกชาที่อยู่กลางแจ้ง หลังการใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 (เมษายน 2552)	43
ตารางที่ 3.15 คุณสมบัติของดินในแปลงที่ปลูกชาภายใต้ร่มเงาต้นไม้หลังการใส่ปุ๋ยครั้งที่ 4 (เดือนตุลาคม 2552)	44
ตารางที่ 3.16 คุณสมบัติของดินในแปลงที่ปลูกชาที่อยู่กลางแจ้ง หลังการใส่ปุ๋ยครั้งที่ 4 (เดือนตุลาคม 2552)	44
ตารางที่ 3.17 ระดับปริมาณธาตุอาหารต่างๆที่เหมาะสมในใบชาและความเข้มข้นของ ธาตุอาหารในใบชาที่เก็บจากแปลงชาของบริษัทชาระมิงค์	45
ตารางที่ 3.18 ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆในใบชาที่ปลูกในแปลงในร่ม (เก็บตัวอย่างเดือน กันยายน 2551)	46
ตารางที่ 3.19 ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆในใบชาที่ปลูกในแปลงกลางแจ้ง (เก็บตัวอย่าง เดือน กันยายน 2551)	46
ตารางที่ 3.20 ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆในใบชาที่ปลูกในแปลงในร่ม (เก็บตัวอย่างเดือน เมษายน 2551)	47
ตารางที่ 3.21 ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆในใบชาที่ปลูกในแปลงกลางแจ้ง (เก็บตัวอย่างเดือน เมษายน 2551)	47
ตารางที่ 3.22 ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆในใบชาที่ปลูกในแปลงในร่ม (เก็บตัวอย่างเดือนตุลาคม 2552)	49
ตารางที่ 3.23 ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆในใบชาที่ปลูกในแปลงกลางแจ้ง (เก็บตัวอย่างเดือนตุลาคม 2552)	49
ตารางที่ 3.24 ปริมาณของสารกลุ่มคาเทชินและคาเฟอีนในยอดชาที่ปลูกภายใต้ร่มเงา (ธ.ค.51)	50
ตารางที่ 3.25 ปริมาณของสารคาเทชินและคาเฟอีนในยอดชาที่ปลูกกลางแจ้ง (ธ.ค. 2551)	51
ตารางที่ 3.26 ปริมาณของสารกลุ่มคาเทชินและคาเฟอีนในยอดชาที่ปลูกภายใต้ร่มเงา (เม.ย.52)	51

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 3.27	ปริมาณของสารกลุ่มคาเทชินและคาเฟอีนในยอดชาที่ปลูกกลางแจ้ง (เม.ย.52)	51
ตารางที่ 3.28	ปริมาณของสารกลุ่มคาเทชินและคาเฟอีนในยอดชาที่ปลูกภายใต้ร่มเงา (ก.ค.52)	52
ตารางที่ 3.29	ปริมาณของสารคาเทชินและคาเฟอีนในยอดชาที่ปลูกกลางแจ้ง (ก.ค.52)	52
ตารางที่ 3.30	ปริมาณของสารคาเทชินและคาเฟอีนในยอดชาที่ปลูกภายใต้ร่มเงา (ต.ค.52)	53
ตารางที่ 3.31	ปริมาณของสารกลุ่มคาเทชินและคาเฟอีนในยอดชาที่ปลูกกลางแจ้ง (ต.ค.52)	53
ตารางที่ 3.32	ผลผลิตยอดอ่อนใบชา	54
ตารางที่ 3.33	ผลการสำรวจโรคในแปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์	55
ตารางที่ 3.34	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (Unknown) ที่แยกได้จากชาที่แสดง อาการต้นไหม้โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลตต่างๆทดสอบโดยวิธี dual culture นาน 3 วัน	75
ตารางที่ 3.35	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโคนี (%PIRG) ของเชื้อ <i>Colletotrichum</i> sp. ไอโซเลต 1 ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ 36 ไอโซเลต	77
ตารางที่ 3.36	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโคนี (%PIRG) ของเชื้อ <i>Colletotrichum</i> sp. ไอโซเลต 2 ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ 36 ไอโซเลต	79
ตารางที่ 3.37	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโคนี (%PIRG) เชื้อรา <i>Phellinus noxius</i> ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ 35 ไอโซเลต	82
ตารางที่ 4.1	เปรียบเทียบคุณสมบัติดินแปลงปลูกชาก่อนและหลังการทดลอง	85
ตารางที่ 4.2	ระดับปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมในใบชา (<i>Camellia sinensis</i>) และความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบชาที่เก็บจากแปลงชา ของบริษัทชาระมิงค์	87
ตารางที่ 4.5	ผลผลิตยอดอ่อนใบชาเปรียบเทียบในรอบการผลิตปี 2551 และ 2552	90
ตารางที่ 4.6	จำนวนและความรุนแรงของโรคที่พบบนใบชา ในแปลงผลิตชาในระบบอินทรีย์	91

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1.	ผังแปลงทดลอง ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีการทดลองประกอบไปด้วยต้นชาประมาณ 70-80 ต้น (รายละเอียดของ Treatment 1, 2 และ 3 ดังแสดงในตารางที่ 2.1)	17
ภาพที่ 2.2	ตัวอย่างพื้นที่แปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ; พื้นที่ที่ต้นชาอยู่ภายใต้ร่มเงา (บน) และ พื้นที่ที่ต้นชาอยู่กลางแจ้ง (ล่าง)	18
ภาพที่ 2.3	ต้นชาที่แสดงอาการของโรคแห้งตายที่รุนแรง พื้นที่ที่ต้นชาบริเวณรอบยังดีอยู่ (บน) และ บริเวณที่ต้นชาโดยรอบเริ่มมีอาการโรคประปราย (ล่าง)	22
ภาพที่ 2.4	การวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม (R_1) และชุดทดสอบ (R_2) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ	24
ภาพที่ 3.1	ตัวอย่าง isolates ของเชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้ ก) LGLA-03-026, ข) LSA-007, ค) LSA-014, และ ง) TSA-006	26
ภาพที่ 3.2	ตัวอย่างการย่อยละลายฟอสเฟตของเชื้อแอคติโนมัยซิสสังเคราะห์จากวงใส (clear zone) รอบโคโลนี (ลูกศรชี้) ก) มีการย่อยละลายเล็กน้อย ข) มีการย่อยละลายปานกลาง	30
ภาพที่ 3.3	ลักษณะของสปอร์ออบัสคิวลาร์ไมคอร์ไรซาเชื้อราสกุล <i>Glomus</i> sp. ที่พบบริเวณรากชา	34
ภาพที่ 3.4	การขยายปริมาณสปอร์ของเชื้อราออบัสคิวลาร์ไมคอร์ไรซาในต้นข้าวโพด ก) การเพาะเมล็ดข้าวโพด ข) ย้ายปลูกต้นกล้าข้าวโพดลงในกระถาง ค) ข้าวโพดอายุประมาณ 1 เดือน	34
ภาพที่ 3.5	ลักษณะการเข้ารากของเส้นใยสปอร์ไมคอร์ไรซา (ลูกศรชี้) ในรากข้าวโพด	35
ภาพที่ 3.6	ลักษณะการย่อยสลายของใบชาหลังผ่านการหมักประมาณ 1 เดือน: แถวบน กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่เชื้อ และ กรรมวิธีที่ 6 ใส่ชุปเปอร์ฟูด. 1; แถวกกลาง กรรมวิธีที่ 2 ใส่เชื้อ LGLA 02-021 และ กรรมวิธีที่ 3 ใส่เชื้อ LGLA 01-015; แถวล่างกรรมวิธีที่ 5 ใส่เชื้อผสม LGLA 02-021 +LGLA 01-015+ LGLA 03-026	37
ภาพที่ 3.7	ลักษณะการย่อยสลายของใบชาหลังผ่านการหมักประมาณ 1 เดือน: แถวบน กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่เชื้อ และ กรรมวิธีที่ 6 ใส่ชุปเปอร์ฟูด. 1; แถวกกลาง กรรมวิธีที่ 2 ใส่เชื้อ LGLA 02-021 และ กรรมวิธีที่ 3 ใส่เชื้อ LGLA 01-015; แถวล่าง กรรมวิธีที่ 4 ใส่เชื้อ LGLA 03-026 และ กรรมวิธีที่ 5 ใส่เชื้อผสม LGLA 02-021 +LGLA 01-015+ LGLA 03-026	38

- ภาพที่ 3.8 ลักษณะแผลโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) บนใบชา มีลักษณะกลม สีน้ำตาลเป็นวงซ้อนกัน พบจุดสีดำเล็กๆ กระจายบนแผล ก แบบที่ 1 แผลเป็นจุดขนาดเล็กมีสีม่วงปนน้ำตาล ขอบแผลนูนขึ้นเล็กน้อยมีสีม่วงปนน้ำตาล ข แบบที่ 2 แผลมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม เป็นวงสีดำซ้อนกันเป็นชั้นๆ ขอบแผลมีสีเหลือง 62
- ภาพที่ 3.9 ลักษณะของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ที่พบบนอาการโรค แบบที่ 1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า ก: setae ข: acervulus (conidia ภายใน fruiting body) 62
- ภาพที่ 3.10 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท 1 (ก) และ ไอโซเลท 2 (ข) บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน 63
- ภาพที่ 3.11 อาการใบจุดของใบชาหลังการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท 1 (ก) และ ไอโซเลท 2 (ข) โดยวิธี Detach leave นาน 7 วันโดย 64
- ภาพที่ 3.12 ลักษณะอาการโรคใบพุ่มของบริเวณหน้าใบเป็นตุ่มพองสีเหลืองปนน้ำตาล แผลยุบตัวลงเล็กน้อย และพบกลุ่มเชื้อราสีขาวพูนด้านหลังใบ (ก) เมื่อตรวจสอบลักษณะเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข) พบ Basidium ที่มี Sterigmata (ข) ชู Basidiospores ซึ่งมีลักษณะยาวรี (ค) (ของเชื้อจำนวนมากเจริญบนเนื้อเยื่อแผลโรค 65
- ภาพที่ 3.13 ลักษณะต้นชาที่แสดงอาการต้นไหม้ใบสดทั้งทรงพุ่ม (ก) และต่อมาประมาณ 1-3 เดือนจึงยืนต้นแห้งตาย (ข) 65
- ภาพที่ 3.14 ลักษณะของต้นชาที่มีอาการต้นไหม้ อาการเริ่มแรกของทรงพุ่มและลำต้น (ก, ข) เมื่อนำ รากฝอย (ค) และลำต้นติดกับผิวดิน (ง) มาตรวจดูลักษณะเนื้อเยื่อ ไม่พบแผลหรือร่องรอยของการทำลายจากเชื้อรา 66
- ภาพที่ 3.15 ลักษณะโคโลนี (ก) เส้นใย (ข) และสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium* sp. (ค,ง) ที่แยกได้จากรากฝอย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์บนอาหาร PDA นาน 12 วัน 66

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

- ภาพที่ 3.16 ลักษณะ โคนต้น (ก) และราก (ข) ของต้นชาที่เป็นโรคต้นโทรม
เปลือกมีลักษณะเปื่อยยุ่ย (ค) และและเนื้อไม้มีแผลสีดำ (ง) 67
- ภาพที่ 3.17 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา (unknown) บนอาหาร PDA อายุ 1 สัปดาห์ หลังแยกจาก
เนื้อไม้ของชาที่ แสดง อาการต้นโทรม (ก) และลักษณะของเชื้อภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า (ข) 68
- ภาพที่ 3.18 ลักษณะ Dendritic Hypha ของเชื้อ *Phellinus noxius* (ก และ ข) ภาพภายใต้
กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ของเชื้ออายุ 7 สัปดาห์ ที่แยกได้จากแผลโรค
บริเวณเนื้อไม้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เปรียบเทียบกับ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอน (ค) จากงานทดลองของ Nicole et al. ในปี 1995 68
- ภาพที่ 3.19 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Phellinus noxius* (ศรีษี) ที่เจริญเข้าทำลาย
เซลภายในเนื้อเยื่อของรากชา 69
- ภาพที่ 3.20 ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Phellinus noxius* อายุ 5 สัปดาห์ ในอาหาร IMA-2 (ก) มี
ลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว บาง เรียบติดอาหาร กลางโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน
ในอาหาร PDA (ข) เส้นใยบาง เรียบติดไปกับอาหารและไม่มีการอัดตัวกันของเส้นใย
ในอาหาร MEA (ค) เส้นใยละเอียด เรียบติดกับอาหารเริ่มมีความเหนียวและเปลี่ยนสี
เป็นสีขาวขุ่น-สีครีมเส้นใยอัดตัวกันจนซ้อนทับกัน 69
- ภาพที่ 3.21 ลักษณะโรคราดำที่เจริญปกคลุมผิวใบชา พบกลุ่มผงสีดำเป็นแผ่นขึ้นปกคลุม
ผิวใบจำนวนมาก 70
- ภาพที่ 3.22 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (unknown) ที่แยกได้จากชาที่แสดงอาการ
ต้นโทรมอายุ 3 วัน เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อ แอคติโนมัยซีไอโซเลทต่างๆ บนอาหาร
IMA-2 เปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราในชุดควบคุม (control) 74
- ภาพที่ 3.23 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท 1 ของเชื้อ
แอคติโนมัยซีเอนโดไฟท์ 36 ไอโซเลท หลังการทดสอบ โดยวิธีการ โดยวิธี
Dual culture 78

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 3.24	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> sp. ไอโซเลท 2 ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ 36 ไอโซเลท หลังการทดสอบ โดยวิธีการ โดยวิธี Dual culture	80
ภาพที่ 3.25	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Phellinus noxius</i> ของเชื้อแอคติโนมัยซีสเอนโดไฟท์ 35 ไอโซเลทหลังการทดสอบ โดยวิธีการ Paper disk method	83
ภาพที่ 4.1	ผลของการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และอินทรีย์ชีวภาพต่อสารปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์กลุ่มคาเทชิน (catechin) และคาเฟอีน (caffeine) ในยอดชา (a) แปลงชาในร่ม (b) แปลงชากลางแจ้ง	89

Abstract

Application of bio- and organic fertilizers together with 3 groups of microorganisms: nitrogen fixing, P and K solubilizing microorganisms in Tea plantation area of Raming Tea company tended to result in better soil properties. The soil pH and soil organic matter were increased from 4.76 to 5.4, and from 3.45 to 5.11-5.39%, respectively. Besides raising soil pH and organic matter, organic and bio- fertilizers increase the quantity of many plant nutrients (P, K, Ca, Mg, S and Zn) in the soils. Tea leaf analysis showed that major nutrients (N, P and K) especially N were increased by these fertilizers application. The N content in tea leaves both of shaded (2.93 - 3.23%) and un-shaded (2.71 – 2.82%) plantation areas was higher than that of the control (2.68%). These results clearly showed that tea performed better nutrient uptake. Measurement of antioxidant catechin in green leaves showed that the highest catechins in shaded and un-shaded area were found as EGCG (17.24 – 77.75 mg/g) followed by EGC (5.80 – 55.67 mg/g), EC (4.39 – 60.83%) and C (0.15-4.67 mg/g). Four consecutive times application of organic and bio- fertilizers tended to enhance tea yield. The average year-round yield in 2008 was 617.5 to 711.3 kg/ha, and in 2009 the yield was increased to 1,165 to 1,271.9 kg/ha. The highest yield was obtained with organic fertilizer treatment. Plant disease survey in this experiment showed that no obvious spread of plant disease. In another tea plantation areas without fertilizer experiment, the two most important tea diseases were recorded; anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. and brown root rot caused by *Phellinus noxius*. From the isolation and screening of antagonistic endophytic actinomycetes; isolates COF2 and COF1 showed highest activity to suppress *Colletotrichum* sp. growth with the percentage of suppressing of 72.19 and 70.20, respectively. The highest activity (69.37%) in suppressing *P. noxius* was obtained with isolate GAR2.

Keywords: Tea, organic fertilizer, bio-fertilizer, antioxidant, catechin

บทคัดย่อ

การใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพซึ่งมีส่วนผสมของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มตรึงไนโตรเจน กลุ่มละลายฟอสฟอรัส และกลุ่มละลายโพแทสเซียม ในพื้นที่ไร่ชาของบริษัทชาะมิงค์ จำกัด พบว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ มีแนวโน้มที่ทำให้ดินมีคุณภาพที่ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับดินปลูกชาก่อนการทดลองโดยที่ค่า pH สูงขึ้นจาก 4.76 เป็น 5.4 ปริมาณอินทรีย์วัตถุเพิ่มขึ้นจาก 3.45 เป็น 5.11 – 5.39 % การใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพนอกจากจะส่งผลให้ค่า pH และอินทรีย์วัตถุปรับสูงขึ้นแล้วปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ P, K, Ca, Mg, S และ Zn มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นชัดเจน จากผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบชา พบว่าการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพมีแนวโน้มทำให้ความเข้มข้นของธาตุอาหารหลัก โดยเฉพาะไนโตรเจนในใบชาสูงกว่าในกรรมวิธีที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย ทั้งแปลงที่ปลูกในร่มและกลางแจ้ง โดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์หรือปุ๋ยชีวภาพทำให้ความเข้มข้นของไนโตรเจนในใบสูงขึ้นถึง 2.93 - 3.23% และ 2.71 – 2.82% ตามลำดับ ขณะที่ไม่ใส่ปุ๋ยมีไนโตรเจนเพียง 2.68% แสดงให้เห็นว่าชามีการดูดใช้ธาตุอาหารดีขึ้น จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในกลุ่มคาเทชิน (Catechin) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจพบ มีปริมาณสาร EGCG สูงสุดในทุกฤดูทั้งแปลงที่ปลูกในร่มและแปลงปลูกกลางแจ้ง ที่ประมาณ 17.24 – 77.75 mg/g รองลงมาคือสาร EGC มีประมาณ 5.80 – 55.67 mg/g รองลงมาคือสารมีประมาณ EC 4.39 – 60.83% และมีปริมาณสาร C น้อยที่สุด 0.15-4.67 mg/g การใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพต่อเนื่องกัน 4 ครั้ง มีแนวโน้มว่าช่วยส่งเสริมให้ผลผลิตของชาดีขึ้น ซึ่งจะเห็นว่าในฤดูการผลิตปี 2551 ผลผลิตของชา เฉลี่ยอยู่ในช่วง 617.5 ถึง 711.3 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ (kg/ha) และในฤดูการผลิตปี 2552 ผลผลิตของชาเพิ่มขึ้นเป็น 1,165 ถึง 1,271.9 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ โดยการใส่ปุ๋ยอินทรีย์ให้ผลผลิตสูงสุด จากการสำรวจการระบาดของโรคในแปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพนั้น สามารถสรุปว่า แปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์ไม่มีการระบาดของโรคที่รุนแรง ในส่วนของแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงซึ่งห่างจากแปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์ พบโรคชาสำคัญ 2 ชนิด คือ โรคแอนแทรคโนส ที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum* sp. โรคราคน้ำตาเกิดจากเชื้อรา *Phellinus noxius* จากการแยกเชื้อปฏิบัติกับเชื้อสาเหตุพบว่าไอโซเลท COF2 และ COF1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ *Colletotrichum* sp. ดีที่สุด โดย โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด เท่ากับ 72.19 และ 70.20 เปอร์เซ็นต์ และ เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. noxius* มากที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในระดับสูง (69.37%) คือ GAR2

คำหลัก : ชา, ปุ๋ยอินทรีย์, ปุ๋ยชีวภาพ, สารต้านอนุมูลอิสระ, คาเทชิน

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการ

ชาหรือมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า คาเมลเลีย ไชนนซิส (*Camellia sinensis*) ปลูกได้ในพื้นที่อากาศเย็นที่มีความสูงกว่าระดับน้ำทะเล 1,000 – 2,000 เมตร ดังนั้นชาจึงเป็นพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของเขตพื้นที่สูงของภาคเหนือ ปลูกมากในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และน่าน เพราะเป็นแหล่งที่มีศักยภาพเหมาะสมในการปลูกชาคุณภาพทั้งชาอัสสัมและชาจีน(กรมส่งเสริมการเกษตร, 2551) แหล่งปลูกชาอัสสัม(*Camellia sinensis* var. *assamica*) ที่สำคัญแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่คือ บริเวณ ต.อินทขิล อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่เป็นแหล่งต้นน้ำแม่ปิง โดยมีพื้นที่ปลูกชากว่า 3,000 ไร่ โดยเป็นพื้นที่สัมปทานของบริษัทชาอะมิงค์ จำกัด และพื้นที่ส่งเสริมการปลูกชาอัสสัมของเกษตรกร พื้นที่ดังกล่าวเป็นสวนชาเก่าที่มีอายุประมาณกว่า 30 ปีและได้ผ่านการใช้สารเคมีเกษตรปริมาณสูงในช่วงที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบัน ส่งผลให้คุณภาพของดินเสื่อมลง กล่าวคือ มีการลดลงของปริมาณอินทรีย์วัตถุ ความสามารถของดินในการดูดซับธาตุอาหาร การอุ้มน้ำ และปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เป็นต้น ปัจจัยทางดินที่เสื่อมถอยดังกล่าวทำให้ผลผลิตของชาอัสสัมลดลง (personal contact, คุณจักริน วงวิวัฒน์) โรคสำคัญของชาส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อสาเหตุในกลุ่มเชื้อรา รองลงมาได้แก่เชื้อสาเหตุในกลุ่มแบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย สาหร่าย และไวรัส (Baby and Muraleedharan, 2005) สำหรับการศึกษาโรคของชาในประเทศไทย พบว่ามีรายงานเผยแพร่ค่อนข้างน้อย ศูนย์ปฏิบัติการจังหวัดเชียงรายได้รายงานข้อมูลการป้องกันกำจัดโรคและศัตรูของชาไว้ว่า ในประเทศไทยยังไม่มีศัตรูชาที่ระบาดทำความเสียหายรุนแรงเพราะพื้นที่ปลูกชาอยู่กระจัดกระจาย อย่างไรก็ตาม จากการสำรวจพบว่า ต้นชาของสวนบางแห่งของสวนไร่ชาอะมิงค์แสดงอาการเหี่ยวเฉาและแห้ง ยืนต้นตาย และมีลักษณะการลุกลามจากต้นที่แสดงอาการไปยังต้นปกติ ซึ่งคาดว่าเกิดจากเชื้อสาเหตุของโรคโคนเน่ากลุ่มเชื้อเห็ดรา ซึ่งเข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดิน เช่น ลำต้นที่ติดกับผิวดินและบริเวณราก ดังนั้น การฟื้นฟูคุณภาพดินและการปรับปรุงสวนชาเก่า รวมทั้งแก้ไขสาเหตุของการเกิดโรคโคนเน่าใช้ปัจจัยการผลิตที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งจำเป็นทั้งนี้เพื่อเป็นการอนุรักษ์ต้นน้ำแม่ปิง และให้การเก็บเกี่ยวผลผลิตชาสามารถเก็บได้ดีและยาวนานมากขึ้นจนอายุต้นชาเข้าปีที่ 40 หรือบางทีอาจถึง 60 ปีเลยทีเดียว หากมีการจัดการที่ดีและเหมาะสมเนื่องจากต้นชาเป็นไม้ยืนต้น

ในปัจจุบันชาจากประเทศไทยเป็นที่นิยมของตลาดต่างประเทศมากขึ้น มีผู้นิยมบริโภคชาจากประเทศไทยมากกว่าชาจากประเทศจีนโดยเฉพาะชาวกาหลี่ แต่เนื่องจากตลาดต่างประเทศไม่ว่าจีน ไต้หวัน ฮองกง สิงคโปร์ สหรัฐอเมริกา ต่างมีความต้องการนำเข้าเฉพาะชาอินทรีย์เท่านั้น ทำให้ผู้ผลิตชาต้องเร่งปรับตัวเข้าสู่ระบบเกษตรอินทรีย์ สถานการณ์ตลาดสินค้าเกษตรอินทรีย์ทั่วโลกมีอัตราขยายตัวเพิ่มขึ้น 10-20% ต่อปี (หนังสือพิมพ์ประชาชาติธุรกิจ, 2550) ดังนั้นการศึกษาวิจัยและคัดกรองปัจจัยการผลิตอินทรีย์-ชีวภาพ เช่น ปุ๋ยอินทรีย์ (ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยพืชสด ฯลฯ) ปุ๋ยชีวภาพ (เชื้อจุลินทรีย์ไมคอร์ไรซา อีโอสไปริลลัม ฯลฯ) และผลิตภัณฑ์อื่นๆ รวมทั้งศึกษาปริมาณธาตุอาหารที่ต้นชาต้องการ ปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์ในใบชา เพื่อให้การใช้ปัจจัยการผลิตอินทรีย์-ชีวภาพมีความถูกต้องและเหมาะสม จึงเป็นพื้นฐานสำคัญในอันที่จะเป็นแรงสนับสนุนให้มีการผลิตและส่งออกชาอินทรีย์เพิ่มขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกและทดลองใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการช่วยย่อยสลายใบชา เชื้อจุลินทรีย์ที่ช่วยขยายระบบราก และเพิ่มประโยชน์ของธาตุอาหารให้แก่ชา และเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์เชื้อราเห็ดสาเหตุของโรคโคนเน่าของชา
2. เพื่อศึกษาปัจจัยการผลิตและรูปแบบการจัดการผลิตชาภายใต้ระบบการผลิตแบบอินทรีย์ที่มีผลต่อผลผลิตและคุณภาพของชาในภาคเหนือ

1.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลผลิตของชาที่ปลูกในแถบอินเดียนั้นได้ไม่เพิ่มขึ้นถึงแม้ว่าจะมีการเพิ่มปริมาณปุ๋ยเคมีและสารกำจัดศัตรูพืชก็ตาม เนื่องจากคุณภาพของดินเสื่อมถอยมาก หลังจากปลูกแบบเกษตรแผนใหม่มานาน การฟื้นฟูความอุดมสมบูรณ์ของดินในแถบนี้โดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ สามารถเพิ่มผลผลิตได้มากถึง 75 – 282% เมื่อเทียบกับวิธีการของเกษตรแผนใหม่ (Conventional techniques) และทำให้กิจกรรมและประชากรของจุลินทรีย์ดินเพิ่มขึ้นด้วย (Senapati *et al.* 1994) การปรับเปลี่ยนการผลิตเป็นแบบอินทรีย์ในไร่ชาจึงต้องคำนึงถึงแหล่งของธาตุอาหารที่ได้จากปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยอินทรีย์ที่มีคุณภาพ การปลูกชาบนที่สูงส่วนใหญ่บนพื้นที่สูงไม่มีการเก็บยอดชาช่วง พฤศจิกายน-กุมภาพันธ์ หรือหากมีก็ปริมาณค่อนข้างน้อย เพราะชาไม่แตกยอด เนื่องจากอากาศเย็นจัด ดังนั้นจึงมีการตัดแต่งใบ (pruning) ในช่วงนี้และทำให้มีใบชาที่ปริมาณมากบริเวณใต้ต้นชา การรวบรวมนำใบชาออกมาทำเป็นปุ๋ยหมักจะใช้แรงงานค่อนข้างสูง มากกว่าการปล่อยให้ย่อยสลายใต้ต้นชาเลย อย่างไรก็ตามการย่อยสลายของใบชาดังกล่าวจะช้ามากเนื่องจากใบมีลักษณะผิวมัน (waxy leaf surface) ดังนั้นการแยกและคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีต (actinomycetes) ซึ่งมีบทบาทสูงในการย่อยสลายวัสดุที่ย่อยสลายยากแล้วนำมาเพิ่มปริมาณใส่ให้กับใบชาพร้อมกับปุ๋ยหมักที่มีเชื้อแบคทีเรียและราที่ช่วยย่อยสลายเศษพืชอยู่แล้วก็น่าจะเป็นทางเลือกที่ทำให้ประหยัดเวลาและแรงงานได้เป็นอย่างดี

ในธรรมชาติที่สมดุลพืชส่วนใหญ่รวมทั้งไม้ยืนต้นมีความสัมพันธ์ที่หลากหลายร่วมกับจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในดิน เช่น รา (fungi) แบคทีเรีย (bacteria) และไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) จุลินทรีย์ดังกล่าวมีประโยชน์ต่อพืชหลายประการ เช่น เพิ่มความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหาร ขยายระบบรากฝอย ควบคุมเชื้อสาเหตุของโรค และทำให้พืชทนต่อความแห้งแล้ง เป็นต้น การใช้เชื้อไมคอร์ไรซาประเภท AMF (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) สายพันธุ์ *Glomus versiforme* ทำให้กล้าชามีปริมาณฟอสฟอรัส (P) ในใบเพิ่มขึ้นถึง 59% ในดินที่ไม่ใส่ P เปรียบเทียบกับควบคุม (control) (Kahneh *et al.* 2006) นอกจากฟอสฟอรัสแล้ว ไมคอร์ไรซายังทำให้ปริมาณธาตุโพแทสเซียม (K) , เหล็ก (Fe) และสังกะสี (Zn) ของใบชาเพิ่มขึ้นด้วย จากการทดลองของ Lui *et al.* (2006) พบว่าการใช้ AMF 5 สายพันธุ์ ใส่ให้แก่ต้นชาทำให้อัตราการเพิ่มราก ความสูง การแตกใบ และน้ำหนักต้นและราก ของต้นชาสูงกว่าแปลงที่ไม่มีการใส่เชื้อ AMF โดยที่สายพันธุ์ *Glomus fasciculatum* และ *Gigaspora margarita* ให้น้ำหนักรากและอัตราการผลิตใบสูง นอกจากนี้เขายังพบว่าปริมาณกรดอะมิโน GABA (gamma-amino butyric acid) ในแปลงที่มีการใส่ *Glomus*

fasciculatum สูงกว่าแปลงที่ไม่ใส่ AMF การใช้ AMF ร่วมกับแบคทีเรียทำให้อัตราการเข้ารากต้นกล้าสักของ AMF เพิ่มขึ้น (Swaminathan and Srinivasan, 2006) การใส่เชื้อสองชนิดคือ AMF และ แบคทีเรีย *Azospirillum* ทำให้ต้นกล้ามีน้ำหนัก ความยาวรากฝอย น้ำหนักต้น และ พื้นที่ใบมากกว่าต้นที่ไม่ได้ใส่ (Garcia-Gómez *et al.* 2002)

ปัจจัยด้านธาตุอาหารในดินก็มีผลต่อคุณภาพของใบชา จากการศึกษาของปิยวรรณ (2549) พบว่า ปริมาณ เชน ปริมาณ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โพแทสเซียม มีความสัมพันธ์ในทางบวกกับ ปริมาณสารแอนด็อกซิแดนท์กลุ่ม EGCG (Epigallocatechin 3-gallate) ในใบชา ดังนั้นจึงคาดว่า ปัจจัยการผลิตอินทรีย์-ชีวภาพ น่าจะส่งผลต่อปริมาณสารแอนด็อกซิแดนท์ในใบชาพันธุ์อัสสัม เช่นกัน

ชาเป็นพืชที่นิยมเพาะปลูกเป็นบริเวณกว้างทั่วโลกโดยเฉพาะประเทศที่ตั้งอยู่บริเวณระหว่าง ละติจูด 43 องศาเหนือ และ 42 องศาใต้ ที่ระดับความสูงประมาณ 2300 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล และเป็นพืชที่ชอบสภาพภูมิอากาศแบบอบอุ่น ความชื้นสูง มีการกระจายตัวของฝนดี และมีแสงแดด เพียงพอ ซึ่งสภาพอากาศดังกล่าวเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชด้วยเช่นกัน ประกอบกับการทำไร่ชาเป็นการเพาะปลูกแบบพืชเดี่ยว ทำให้ง่ายต่อการแพร่ระบาดของโรคได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นจึงพบการระบาดของโรคชามากกว่า 400 โรค โรคสำคัญของชาส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อสาเหตุในกลุ่มของเชื้อรา รองลงมาได้แก่เชื้อสาเหตุในกลุ่มแบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย สาหร่าย และ ไวรัส ซึ่งเชื้อเหล่านี้อาจเข้าทำลายส่วนทั้งส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน เช่น ใบ กิ่ง ก้าน ลำต้น และ เชื้อสาเหตุที่เข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดิน เช่น ลำต้นที่ติดกับผิวดิน หรือบริเวณราก และสมคม โรคพืชประเทศสหรัฐอเมริกา (The American Phytopathological Society) โดย Chandra, 1996 ได้รวบรวมชื่อสามัญของเชื้อสาเหตุโรคของชาที่สำคัญไว้มากมาย

แอคติโนมัยซีสเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์เซลล์เดียว มีขนาดประมาณ 0.5-1.0 ไมโครเมตร จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะเป็นเส้นสายคล้ายเส้นใยเชื้อรา มีการสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ primary (substrate) mycelium หรือเส้นใยใต้ผิวดิน และ secondary (aerial) mycelium หรือ เส้นใยเหนือผิวดิน เกิดขึ้นภายหลังและยื่นไปในอากาศ เพื่อทำหน้าที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแบ่งเซลล์ (fusion) (Kalakoutsii and Agre, 1976) แอคติโนมัยซีสเป็นเชื้อที่มีประโยชน์ทางการแพทย์และเภสัชกรรม เนื่องจากสามารถผลิตสารเมตาบอไลต์หลายชนิด เช่น ยาปฏิชีวนะที่มีความสำคัญทางการแพทย์และอุตสาหกรรม อีกทั้งยังมีความสำคัญทางนิเวศวิทยาอีกด้วย (Caruso *et al.*, 2002) ปัจจุบันมีนักวิจัยศึกษาและแยกเชื้อกลุ่มนี้จากส่วนต่างๆ ของพืชปกติ พบเชื้อหลาย

สกุล ที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สาเหตุโรคได้และมีกลไกบางอย่างที่ไปกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน เป็นผลทำให้พืชต้านทานต่อโรคได้ (Chris, 2002) เช่นในงานของ Shimizu *et al.* (2000) ทดลองแยกเชื้อแอคติโนมัยซีส เอนโดไฟท์ จาก *Rhododendron* เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* และ *Pestalotiopsis* สาเหตุโรครากเน่าและโรคใบไหม้สีเทาของ *Rhododendron* ตามลำดับ และพบว่าสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรสดังกล่าวได้

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสเพื่อใช้ในการย่อยสลายใบชาและการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและฮอร์โมนพืช IAA

เนื่องจากใบชามีลักษณะผิวใบเป็นผิวมัน (waxy leaves) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันกับผิวของใบลำไยซึ่งเป็นใบพืชที่มีการย่อยสลายยาก จึงได้ทำการแยกจุลินทรีย์จากหลายแหล่งเพื่อให้มีโอกาสเพิ่มขึ้นที่จะได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพ ได้ทำการแยกทั้งจากใบลำไย ใบชา และจากดิน เพื่อหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายใบม้นดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพ เพื่อนำไปผสมกับปุ๋ยอินทรีย์และ/หรือปุ๋ยชีวภาพในการทดลองในภาคสนามต่อไป

2.1.1 การแยกแอคติโนมัยซิส (Actinomycetes) จากใบลำไย

เลือกใบลำไยที่อยู่บริเวณใต้ต้นลำไยและมีลักษณะผุพังจากการย่อยสลายจากจุลินทรีย์ นำใบลำไยดังกล่าวมาชั่งประมาณ 2 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 95 มล. แล้วนำไปเขย่า 20 นาที ดูด suspension 1 มิลลิลิตร (mL) ทำให้สารละลายผสมที่ดูดมาทำการเจือจางลง (dilution) ตั้งแต่ว่า 10^{-1} ถึง 10^{-5} ดูดแต่ละ dilution มา 100 ไมโครลิตร (μL) มาทำ spread plate บนอาหาร IMA (Inhibitory Mold Agar) (ภาคผนวก) ซึ่งมีส่วนผสมของสารกลุ่ม antibiotics ที่ยับยั้งแบคทีเรีย (bacteria) และเชื้อรา (fungi) ทำการเพาะอาหาร (incubate) ที่ 25°C ประมาณ 7 วัน ถ้ามีเชื้อจะพบ colony ที่มีลักษณะคล้ายผงแป้ง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) แตะ colony แล้วนำมาเขี่ย (streak) บนอาหาร IMA จานใหม่เพื่อแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว (single colony) ทำการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหาร Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก)

2.1.2 การแยกแอคติโนมัยซิสจากดินบริเวณโคนต้นลำไย

สุ่มเก็บดินบริเวณโคนต้นลำไย (เลือกที่มีใบลำไยผุพังอยู่ด้วย) นำดินมาชั่ง 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 95 mL นำไปเขย่า 20 นาที จากนั้นดูดมา 1 mL ทำเป็น dilution 10^{-1} และเจือจางต่อไปจนถึง 10^{-5} ดูดแต่ละ dilution มา 100 μL มาทำ spread plate บนอาหาร IMA ที่ผสมที่ยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา ทำการเพาะอาหาร ที่ 25°C ประมาณ 7 วัน ถ้ามีเชื้อจะพบ colony ที่มีลักษณะคล้ายผงแป้ง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ แตะ colony แล้วนำมาเขี่ย บนอาหาร IMA จานใหม่เพื่อแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว ทำการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหาร NA

2.1.3 การแยกแอกติโนมัยซิสจากผิวใบลำไยและผิวใบชา

เลือกใบลำไยและใบชาที่แห้งและร่วงหล่นอยู่ใต้ต้นโดยเลือกใบที่มีจุดการเข้าย่อยของจุลินทรีย์ ใช้ loop สะกิดจุดที่มีจุลินทรีย์ย่อยใบ มา streak บนอาหาร IMA ซึ่งมีส่วนผสมของสารกลุ่ม antibiotic ที่ยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา ทำการเพาะอาหาร ทิ้งไว้ประมาณ 7 วัน ถ้ามีเชื้อจะพบ colony ที่มีลักษณะคล้ายผงแป้ง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ แต่ละ colony แล้วนำมาเขี่ย บนอาหาร IMA จานใหม่เพื่อแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์เดี่ยว ทำการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหาร NA

2.1.4 การประเมินศักยภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ของเชื้อแอกติโนมัยซิส ที่แยกได้

นำเอาเชื้อแอกติโนมัยซิสบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.3 มาทำการประเมินศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) โดยใช้อาหาร CMC (carboxy methyl cellulose) (ภาคผนวก) โดยเริ่มจากการนำเชื้อแต่ละ isolate ที่เก็บไว้นามาเลี้ยงบนอาหาร IMA จานโตเต็มที่แล้วจึงใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร ตัดเชื้อบริสุทธิ์แอกติโนมัยซิส (Actinomycetes) จากฐานอาหารของเชื้อแต่ละชนิด แล้วนำไปวางบนอาหาร CMC ทำการบ่มเพาะไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25-30 °c เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบการย่อย cellulose ที่มีในอาหารโดยการย้อมสี หลังการย้อมสีจะมองเห็นการสร้าง clear zone ของเชื้อ Actinomycetes ซึ่งเป็นดัชนีบ่งบอกถึงศักยภาพในการผลิต cellulase การย้อมสีทำโดยเทสารละลาย 0.1 % Congo red จันท่วมเชื้อที่อยู่ในจานอาหาร ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเทสารละลายทิ้งจากนั้นล้างด้วย NaCl 1M จำนวน 3 ครั้ง ทำการหาค่า clear zone ratio โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ค่า clear zone ratio} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของ colony เชื้อ}}$$

2.1.5 การประเมินศักยภาพในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA (Indole Acetic Acid)

เชื้อแอคติโนมัยซีส์ที่แยกได้จาก ข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.3 ได้นำมาทำการประเมินศักยภาพในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA (Indole-3-acetic-Acid) ของเชื้อแอคติโนมัยซีส์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) ซึ่งมีการเติม tryptophan 1 กรัม/อาหารเหลว 1 ลิตร (ภาคผนวก) ใส่อาหาร NB ลงในขวดชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 50 mL ในปริมาณ 25 mL จากนั้นตัดเชื้อที่ขึ้นในอาหารโดยใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร 1 cork ใส่ลงในอาหารที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นทำการห่อ flask ด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum Foil) ทำการเขย่าขวดเลี้ยงเชื้อโดยใช้เครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลาประมาณ 7 วัน หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หา IAA ในขวดอาหารโดยทำการกรองแยกเชื้อที่ขึ้นใน Erlenmeyer flask ออกจากสารละลายโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 5 ดูดสารละลายใส่ที่กรองได้ของแต่ละตัวอย่าง มา 1 mL ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม salkovskii reagent (ภาคผนวก) 2 mL เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (nm) โดยใช้ spectrophotometer โดยทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน (Standard Solution) (ภาคผนวก) สารเคมีที่ใช้เป็น Standard คือ Indole-3-acetic acid (MW = 175.19) โดยการเตรียม IAA ให้มีความเข้มข้น 10 mM โดยสารละลายนี้จะใช้เป็น stock solution (ละลาย IAA ใน 50% Methanol) แล้วจึงเจือจาง สารละลาย IAA 10 mM ให้เป็น 1 mM ด้วย 50% Methanol ใช้สารละลาย IAA ที่มีความเข้มข้น 1 mM นี้ในการเตรียมชุดสารละลายมาตรฐาน (standard series) ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100 และ 150 μ M โดยเตรียมแต่ละความเข้มข้นจำนวน 1 mL ปรับปริมาตรด้วย 50% Methanol โดยทำการดูดสารละลาย (pipette) standard แต่ละความเข้มข้น 1 mL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วเติม salkovskii reagent 2 mL เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืดเช่นเดียวกับตัวอย่าง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm โดยใช้ spectrophotometer

2.1.6 การประเมินประสิทธิภาพในการละลายฟอสฟอรัสของเชื้อแอคติโนมัยซีส์

2.1.6.1 ประเมินประสิทธิภาพในการละลายฟอสฟอรัสโดยใช้อาหาร Czapek's agar ที่มีส่วนผสมของ Aluminum phosphate (ภาคผนวก) โดยเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อแต่ละ isolates ในอาหาร IMA จนโตเต็มที่แล้วจึงใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร ตัดเชื้อบริสุทธิ์ Actinomycetes ของเชื้อแต่ละชนิดจากวุ้นอาหาร แล้วนำไปวางบนอาหาร

Czapek's agar (ภาคผนวก) ทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เพื่อการสร้าง clear zone ของเชื้อ Actinomycetes ทำการหาค่า clear zone ratio โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ค่า clear zone ratio} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของ colony เชื้อ}}$$

2.1.7 การแยกและขยายเชื้อราไมคอร์ไรซาจากรากและดินบริเวณรากต้นชา

วิธีการคัดแยกสปอร์อาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา

(1) ตรวจสอบลักษณะเชื้อราไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) ในธรรมชาติ

เก็บดินจากบริเวณรอบรากต้นชา (Rhizosphere) มาคัดแยกชนิดของสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา (Arbuscular Mycorrhiza) โดยวิธี wet-sieving และ 50% sucrose gradient centrifugation จากนั้นคัดแยกชนิดของสปอร์เชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาออกตามลักษณะ

สัณฐานวิทยา โดยตรวจสอบจากลักษณะต่างๆ คือ รูปร่างสปอร์ สีและขนาดของสปอร์

วิธีการคัดแยกและการนับสปอร์ ทำโดยการนำดินประมาณ 100 กรัม แช่น้ำ 400 มล. ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นคนด้วยแท่งแก้ว 10 นาที ปล่อยให้ตกตะกอน 1 นาที แล้วเทผ่านตะแกรงขนาด 2.0 มิลลิเมตร (mm), 850, 500, 250, 125 และ 45 ไมโครเมตร (μm) ล้างดินส่วนที่ค้างในตะแกรงขนาด 45 และ 125 μm . ไปปั่นเหวี่ยงกับน้ำสะอาด ที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำใสและตะกอนที่ลอยอยู่ด้านบนทิ้ง และเหลือตะกอนดินอยู่ก้นหลอด จากนั้นเติมสารละลาย 50% sucrose แล้วเขย่าเพื่อให้ตะกอนก้นหลอดกระจายตัวอยู่ในสารละลาย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที สปอร์ของเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซา จะลอยอยู่ในสารละลาย sucrose จากนั้นเทสารละลาย sucrose ลงในภาชนะรองที่มีขนาด 20 μm . แล้วล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นล้างสปอร์ที่ติดบนตะแกรงลงบนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 ทำการเก็บสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope ที่กำลังขยาย 40 เท่า หรือเก็บสปอร์ไว้ใน Ringer solution ซึ่งเป็นสารละลายที่ช่วยรักษาการรอดชีวิตของสปอร์ จากนั้นนำสปอร์ใส่ใน Ringer solution โดยวัดปริมาตร 25 mL คนให้สปอร์กระจายตัวในสารละลาย แล้วใช้กระบอกตวงมา 1 mL ใส่ในกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 ทำการนับสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ

stereo ที่กำลังขยาย 4 เท่า โดยทำการนับ 5 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย นำมาเปรียบเทียบกับปริมาตร 25 มล. นำมาคำนวณเป็นจำนวนสปอร์/มิลลิลิตร

(2) การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการทดลอง

เนื่องจากสปอร์ที่เก็บในแปลงชามีปริมาณน้อยมาก จึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณสปอร์ โดยการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซากับข้าวโพด โดยปลูกข้าวโพดในทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการคัดแยกสปอร์ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น การเพาะกล้าข้าวโพดและการปลูกเชื้อราอาร์บัสคูลาร์ไมคอร์ไรซามีวิธีการดังนี้

ก่อนทำการเพาะเมล็ดข้าวโพด ได้ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดก่อน โดยเทเมล็ดที่จะเพาะทั้งหมดใส่ใน สารละลาย 95% ethanol ทำการแช่ 3 นาที แล้วจึงเทสารละลายออก ล้างเมล็ดด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง เทเมล็ดลงในสารละลาย 3% H_2O_2 แช่อีก 1 นาที แล้วเทสารละลายออก หลังจากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 4-5 ครั้ง จนแน่ใจว่าไม่มีสารละลาย 3% H_2O_2 ตกค้างที่ผิวเมล็ด เพราะถ้ามีตกค้างอาจมีผลเสียต่อความงอกของเมล็ดได้ เมื่อทำการฆ่าเชื้อผิวเมล็ดข้าวโพดแล้ว จึงทำการเพาะเมล็ดข้าวโพด ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษรองด้านในซึ่งได้นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเช่นกัน หลังจากเมล็ดงอกและได้ต้นกล้าที่มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร หลังจากนั้นจึงปลูกต้นกล้าลงในทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้แล้วจำนวน 1 ต้นต่อหลุม ในระหว่างการปลูกทำการปลูกเชื้อ (inoculate) สปอร์ของเชื้อราไมคอร์ไรซาลงไปบริเวณรากโดยให้สปอร์สัมผัสรากข้าวโพดด้วย หลังจากนั้นนำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 25 °C ภายใต้แสงที่มีความเข้ม 75,000 ลักซ์ เป็นเวลา 12 ชม./วัน รดด้วยสารละลาย ¼ Hoagland (ภาคผนวก) จนครบ 1 เดือน หลังจากนั้น ทำการเก็บจำนวนสปอร์ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น

2.1.8 การทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในการย่อยสลายใบชา ในเรือนทดลอง

วิธีการทดสอบการย่อยสลายของใบชา

ทำการทดลองหมักใบชาที่ได้จากการตัดแต่งกิ่งใบชาจากสวนของบริษัทชาระมิงค์ จำกัด นำมาหมักกับมูลวัว โดยใช้สัดส่วนของใบชาต่อมูลวัวโดยปริมาตร 10 ส่วนต่อ มูลวัว 4 ส่วน และเพิ่มเติมเชื้อจุลินทรีย์ Actinomycetes ที่คัดกรองจากข้อ 3.1.4 แล้วว่ามีศักยภาพสูงในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส มา 3 isolates (LGLA 02-021, LGLA 01-015, LGLA 03-026) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการย่อยใบชาของแต่ละเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสมโดยมีดำรับที่ไม่ใส่เชื้อ และ ใส่หัวเชื้อ ปุ๋ยหมักซูปเปอร์พด. 1 เปรียบเทียบด้วย โดยมีกรรมวิธีการทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 (Tr. 1) ไม่ใส่เชื้อ

กรรมวิธีที่ 2 (Tr. 2) ใส่เชื้อ LGLA 02-021

กรรมวิธีที่ 3 (Tr. 3) ใส่เชื้อ LGLA 01-015

กรรมวิธีที่ 4 (Tr. 4) ใส่เชื้อ LGLA 03-026

กรรมวิธีที่ 5 (Tr. 5) ใส่เชื้อผสม LGLA 02-021 +LGLA 01-015+ LGLA 03-026

กรรมวิธีที่ 6 (Tr. 6) ใส่ซูปเปอร์พด. 1

ทำการหมักส่วนผสมตามกรรมวิธีต่างๆในตะกร้าขนาด 35 * 45 เซนติเมตร ในเรือนทดลอง ให้แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ ตามผังการทดลองข้างล่าง ทำการรดน้ำให้มีความชื้นพอเหมาะและทำการกลับส่วนผสมตามระยะเวลา เช่นเดียวกับการผลิตปุ๋ยหมักกองใหญ่ โดยใช้ระยะเวลาหมักประมาณ 3 เดือน ในระหว่างการหมักทำการตรวจสอบลักษณะการย่อยสลายของใบชา ที่ระยะเวลา 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน

ผังการทดลอง

Block 1	Tr.1	Tr.5	Tr.6	Tr.2	Tr.3	Tr.4
Block 2	Tr.2	Tr.6	Tr.4	Tr.5	Tr.1	Tr.3
Block 3	Tr.6	Tr.2	Tr.1	Tr.4	Tr.3	Tr.5

2.2 การทดสอบผลของปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพและปุ๋ยชีวภาพต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของดิน ผลผลิต และคุณภาพผลผลิตของชา ในภาคสนาม

2.2.1 การคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพเพื่อนำไปใช้ในการทดลองภาคสนาม

ได้ทำการคัดเลือกเชื้อที่แยกได้และได้ประเมินศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้คัดเลือกเชื้อ LGLA03-021 ซึ่งมี clear zone ratio สูงสุดคือ 7.65 แต่การขยายเชื้อให้มีปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ในภาคสนามมีปัญหาเนื่องจากเชื้อมีการเพิ่มปริมาณเชื้อช้ามาก จึงต้องเลือกเชื้อที่มี clear zone ratio สูงรองลงมา (6.25) คือเชื้อ LGLA02-021 ซึ่งเมื่อทำการขยายเชื้อแล้วจึงนำไปผสมกับปุ๋ยหมักเพื่อใช้ทดสอบในแปลงทดลอง โดยเมื่อเชื้อนี้เมื่อมีการขยายตัวในแปลงทดลอง ในระยะสั้นและระยะยาวสามารถมีบทบาทในการย่อยสลายใบชาที่ร่วงหล่นและที่ได้จากการตัดแต่งกิ่ง

นอกจากเชื้อในกลุ่มที่ได้คัดกรองจากโครงการก่อนหน้าของคณะผู้วิจัยแล้วคือ จุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจนได้แก่ *Azospirillum*, *Azotobacter* และ *Beijerinckia* จุลินทรีย์กลุ่มละลายฟอสฟอรัสคือ *Penicillium* และ จุลินทรีย์กลุ่มละลายโพแทสเซียมคือ *Bacillus*

กรรมวิธีที่ได้กำหนดไว้ก่อนการทดลอง มี 3 กรรมวิธี (Treatment) คือ

- 1) การจัดการแบบที่เกษตรกรนิยมปฏิบัติในบริเวณพื้นที่ส่งเสริมของไร่ชารมิงค์ เป็นแปลงควบคุม
- 2) ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ผสมร่วมกับ จุลินทรีย์แอคติโนมัยซีต (actinomycetes), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* และ *Penicillium*
- 3) *ใช้จุลินทรีย์ไมคอร์ไรซา (Mycorrhiza) ร่วมกับ อโซสไพริลลัม (*Azospirillum*)

รวมหน่วยการทดลองเท่ากับ $3 \times 3 = 9$ หน่วยการทดลอง แต่ละหน่วยพื้นที่ประมาณ 1 งาน แผนผังการทดลองดังแสดงในแผนภาพ หน้า 17

*สำหรับกรรมวิธีที่ 3 นั้น ไม่มีการใส่จุลินทรีย์ไมคอร์ไรซา เนื่องจากปริมาณไมคอร์ไรซาที่แยกได้ครั้งแรกมีน้อยมาก และหลังจากทำการขยายปริมาณสปอร์โดยใช้ข้าวโพดแล้วก็ยังมีปริมาณไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงได้ปรับกรรมวิธีที่ 3 โดยไม่มีการใช้ไมคอร์ไรซา

2.2.2 แผนการทดลองการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพในแปลงปลูกชา

การแก้ไขปัญหาความอุดมสมบูรณ์ดินในพื้นที่ปลูกชาที่ปรับเปลี่ยนมาสู่การผลิตในระบบอินทรีย์นั้น การใช้ปุ๋ยอินทรีย์และการใช้ปุ๋ยชีวภาพก็เป็นอีกแนวทางหนึ่ง ที่จะช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ดิน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้ปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ และปุ๋ยชีวภาพ ในการเพิ่ม

ความอุดมสมบูรณ์ดินในการผลิตชาอินทรีย์บนพื้นที่สูง ในแปลงชาพันธุ์อัสสัม ของไร่ชาละมังค์ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design : RCBD ใน 2 พื้นที่ที่มีลักษณะการได้รับแสงแดดที่แตกต่างกัน คือ 1. พื้นที่ที่ต้นชาอยู่ภายใต้ร่มเงา และ 2. พื้นที่ที่ต้นชาอยู่กลางแจ้ง พื้นที่ละจำนวน 3 Blocks และ 3 กรรมวิธี (Treatment) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1. (Tr.1) เป็นกรรมวิธีควบคุม (Control) ไม่มีการใช้ปุ๋ย สำหรับการจัดการแปลงปลูกจะเป็นแบบที่เกษตรกรนิยมปฏิบัติในบริเวณพื้นที่ส่งเสริมของไร่ชาละมังค์

กรรมวิธีที่ 2. (Tr.2) เป็นกรรมวิธีที่ใช้จุลินทรีย์แอคติโนมัยซีท (Actinomycetes) ร่วมกับปุ๋ยหมัก เรียกว่า ปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ ซึ่งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพใส่ในรอบการเก็บผลผลิตช่วงที่สอง ซึ่งได้เพิ่มเติมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ผสมในปุ๋ยอินทรีย์ด้วย (ดังรายละเอียดในตารางที่ 2.1)

(จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์: การใส่ปุ๋ยรอบการเก็บผลผลิตครั้งที่ 1 ผสม Actinomycetes, ช่วยย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ เนื่องจากมีใบชาที่ร่วงหล่นและจากการตัดแต่งกิ่งบางส่วนที่อยู่บริเวณใต้ต้นชาจึงคาดว่าจะการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มนี้ในดินจะได้ผลดีในแง่การเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ช่วยย่อยสลายในดินระดับหนึ่ง; การใส่ปุ๋ยอินทรีย์รอบการเก็บผลผลิตครั้งที่ 2 ได้มีการเพิ่มเติมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์โดยผสมในปุ๋ยอินทรีย์และทำการหมักต่ออีกประมาณ 1 เดือน จึงนำไปใส่ในแปลงทดลองคือ จุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจน *Azospirillum*, *Azotobacter* และ *Beijerinckia* จุลินทรีย์กลุ่มละลายฟอสฟอรัส *Penicillium* จุลินทรีย์กลุ่มละลายโพแทสเซียม *Bacillus*

กรรมวิธีที่ 3. (Tr.3) ปุ๋ยชีวภาพ โดยใช้จุลินทรีย์ อโซสไปริลลัม (*Azospirillum*) ในช่วงแรก และเพิ่มเติมปุ๋ยชีวภาพคือ จุลินทรีย์กลุ่มตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Azotobacter* และ *Beijerinckia* จุลินทรีย์กลุ่มละลายฟอสฟอรัสคือ *Penicillium* และจุลินทรีย์กลุ่มละลายโพแทสเซียม *Bacillus* (ตารางที่ 2.1)

รวมหน่วยการทดลองเท่ากับ $3 \times 3 = 9$ หน่วยการทดลอง แต่ละหน่วยพื้นที่ประมาณ 1 งาน แผนผังการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แผนการใส่ปุ๋ยในแปลงทดลอง

กรรมวิธี การทดลอง	รอบการเก็บผลผลิตครั้งที่ 1 ¹ ปี พ.ศ. 2551		ช่วงที่ช้าไม่ให้ผลผลิต และช่วงตัดแต่งกิ่งชา ²	รอบการเก็บผลผลิตครั้งที่ 2 ³ ปี พ.ศ. 2552	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
กรรมวิธีที่ 1 (Tr. 1)	กลางเดือนสิงหาคม 2551	กลางเดือนกันยายน 2551	เดือนธันวาคม ถึง มีนาคม	11 กุมภาพันธ์ 2552	24 มิถุนายน 2552
กรรมวิธีที่ 2 (Tr. 2)	-	-	ชามีการแตกยอดน้อย หรือไม่มีเลยเพราะเป็น ช่วงฤดูหนาว และเป็น ช่วงหน้าแล้งไม่มีน้ำฝน	-	-
	ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับจุลินทรีย์ Actinomycetes ในอัตรา 1.9 กิโลกรัม/ตัน	ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับจุลินทรีย์ Actinomycetes ในอัตรา 1.9 กิโลกรัม/ตัน		ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับจุลินทรีย์ Actinomycetes ในอัตรา 1.9 กิโลกรัม/ตัน	ใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับจุลินทรีย์ Actinomycetes Azospirillum, Beijerinckia, Azotobacter, Penicillium และ Bacillus ในอัตรา 1.9 กิโลกรัม/ตัน
กรรมวิธีที่ 3 (Tr. 3)	ใช้จุลินทรีย์ Azospirillum (100 กรัม/ตัน)	-		ใช้จุลินทรีย์ Azospirillum (100 กรัม/ตัน)	ใช้จุลินทรีย์ Azospirillum เพิ่มเติมจุลินทรีย์ Beijerinckia, Azotobacter, Penicillium และ Bacillus (100 กรัม/ตัน)

¹ เริ่มการทดลองในแปลงครั้งแรกโดยใช้จุลินทรีย์ที่ได้คัดกรองจากผลการวิจัยก่อนหน้าและในครั้งนี้องค์คณะผู้วิจัย;

² ช่วงเข้าสู่ฤดูหนาวซึ่งชาให้ผลผลิตน้อย และมีการตัดแต่งกิ่งชา และไม่ให้น้ำเนื่องจากไร่ชากระมังค่อนข้างเค็มเฉพาะน้ำฝนในการผลิตชา จึงไม่มีกิจกรรมการวิจัยในแปลงทดลอง มีเฉพาะในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองเท่านั้น

³ เป็นช่วงที่ช้าเริ่มแตกใบใหม่เนื่องจากเริ่มมีฝนตกบ้างประมาณต้นเมษายน และสามารถดำเนินงานในแปลงทดลองต่อไปได้

แปลงในร่มเงา

Block 1			Block 2			Block 3		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tr2	Tr3	Tr1	Tr3	Tr2	Tr1	Tr2	Tr1	Tr3

แปลงกลางแจ้ง

Block 1			Block 2			Block 3		
10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tr3	Tr2	Tr1	Tr3	Tr1	Tr2	Tr3	Tr2	Tr1

ภาพที่ 2.1 ผังแปลงทดลอง ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีการทดลองประกอบไปด้วยต้นชาประมาณ 70-80 ต้น (รายละเอียดของ Treatment 1, 2 และ 3 ดังแสดงในตารางที่ 2.1)

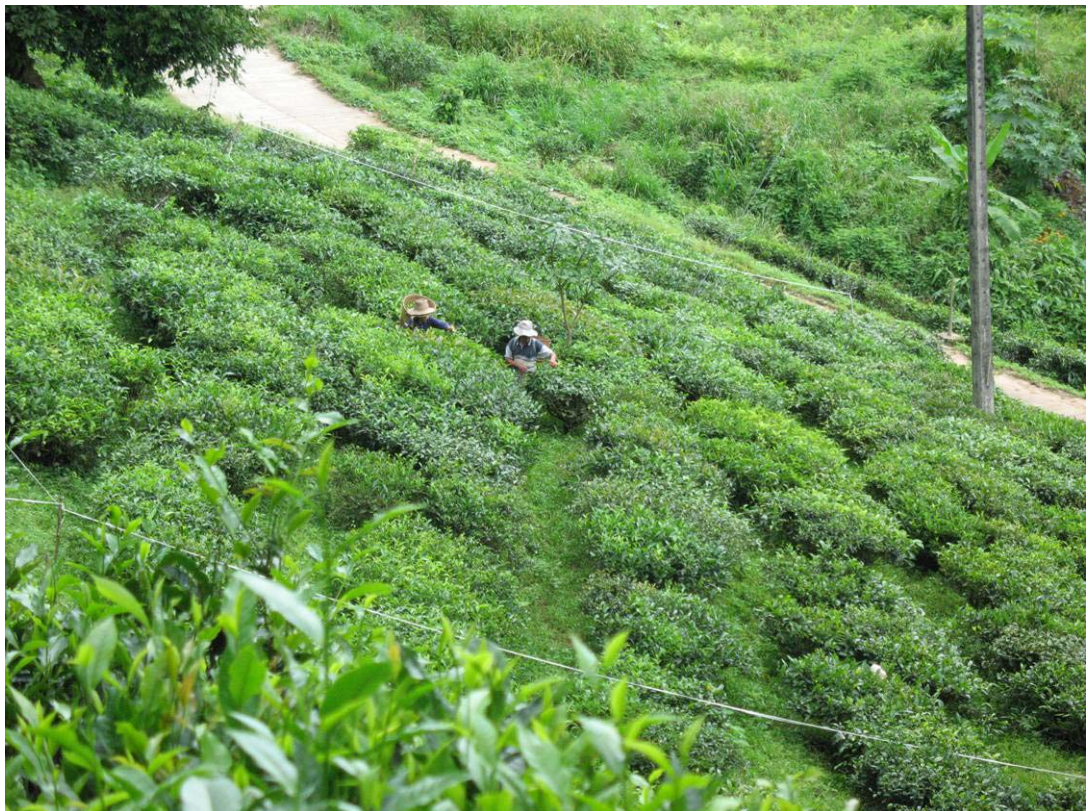
ปุ๋ยหมักที่ใช้ในกรรมวิธีที่ 2 เป็นปุ๋ยหมักจากฟางข้าว และ ปุ๋ยหมักจากเปลือกกาแฟที่ย่อยสลายสมบูรณ์แล้ว ซึ่งได้นำมาผสมกันในอัตรา 1:1 โดยปริมาตร และนำปุ๋ยหมักผสมมาใช้เป็นปัจจัยการผลิตในไร่ชาะมิงค์ หลังจากทำการผสมแล้ว นำเชื้อจุลินทรีย์แอสโคติโนมายีสต์ตัวที่ได้คัดเลือกคือ LGLA02-021 มาผสมกับปุ๋ยหมักผสม ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5 เซลล์/ กรัม ปุ๋ยหมัก

อัตราการใส่ปุ๋ยหมักผสมใส่ในอัตรา 3 ต้นต่อไร่ โดยคิดเฉลี่ยว่ามีต้นชาประมาณ 800 ต้นต่อไร่ ดังนั้น ปุ๋ยหมักผสมที่ใส่ต่อต้นเป็น ประมาณ 3.75 กิโลกรัม/ต้น โดยที่จะแบ่งใส่เป็น 2 ครั้งคือ

ครั้งที่ 1 ประมาณกลาง สิงหาคม 2551

ครั้งที่ 2 ประมาณกลางเดือน กันยายน 2551

ปุ๋ยชีวภาพที่ใช้ในกรรมวิธีที่ 3 เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ปุ๋ยหมักร่อนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุรองรับ มีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นประมาณ 10^9 เซลล์/ กรัม โดยอัตราที่ใช้คือ 100 กรัม/ต้น



ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างพื้นที่แปลงทดลองปลูกอินทรีและปุยขาวภาพ; พื้นที่ที่ต้นชาอยู่ภายใต้ร่มเงา (บน) และ พื้นที่ที่ต้นชาอยู่กลางแจ้ง (ล่าง)

2.2.3 การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล

(1) เก็บตัวอย่างดิน : เก็บตัวอย่างดินแบบ composite sampling ของดินที่ปลูกชาในแต่ละกรรมวิธี นำไปผึ่งให้แห้งในร่ม ก่อนนำไปบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 2 มม. แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาสมบัติต่างๆของดิน ได้แก่ค่า ความเป็นกรดต่างของดิน (pH), ค่าการนำไฟฟ้า (Electrical Conductivity-EC), อินทรีย์วัตถุ (Organic Matter-OM), ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P), โพแทสเซียม แคลเซียม และ แมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (Exchangeable K, Ca, Mg), ซัลเฟอร์ และ โบรอน ที่สกัดได้ (Extractable S, B) และ เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และ สังกะสี ที่สกัดโดย DTPA (DTPA-Fe, DTPA-Mn DTPA-Cu และ DTPA-Zn)

(2) เก็บตัวอย่างใบชา: การเก็บตัวอย่างใบชา จะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เก็บใบชาเพื่อนำมาหาความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบชา โดยเก็บใบชาตำแหน่งที่ 3 (young mature leaves) ของแต่ละกรรมวิธีการทดลอง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปบดให้ละเอียดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 มม. ก่อนนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของธาตุอาหารในใบชา ได้แก่ ไนโตรเจน (Nitrogen-N), ฟอสฟอรัส (Phosphorus-P), โพแทสเซียม (Potassium-K), แคลเซียม (Calcium-Ca), แมกนีเซียม (Magnesium-Mg), เหล็ก (Iron-Fe), แมงกานีส (Manganese-Mn), ทองแดง (Copper-Cu), สังกะสี (Zinc-Zn) และ โบรอน (Boron-B)

สำหรับส่วนที่ 2 เป็นการเก็บตัวอย่างยอดชาอ่อน (ในระยะที่นำไปผลิตชาเขียว) ของแต่ละกรรมวิธีการทดลอง แล้วนำไปหาสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในกลุ่มคาเทชิน (Catechin) ซึ่งได้แก่ Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin 3-gallate (EGCG) Epicatechin gallate ECG และ คาเฟอีน (Caffeine) ตามกรรมวิธีของ Saito *et. al.*, (2007)

(3) เก็บบันทึกข้อมูลผลผลิตยอดชาในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

2.3 การสำรวจโรคในแปลงทดลองปุ๋ยอินทรีย์-ชีวภาพ

นอกจากงานทดสอบปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพในแปลงชาแล้ว ได้ทำการสำรวจและประเมินโรคที่เกิดขึ้นกับต้นชาในแต่ละแปลงทดลอง โดยสุ่มต้นชามาทั้งหมดแปลงละ 8 ต้น นับจำนวนใบชาที่แสดงอาการของโรค และประเมินความรุนแรงของโรค โดยคิดเป็น เปอร์เซ็นต์พื้นที่ที่ถูกทำลายต่อใบชาที่แสดงอาการของโรค พบว่า จากการสำรวจต้นชาทั้งหมด 144 ต้น ตามแผนภาพข้างล่าง

แปลงในร่มเงา				
Plot No.	Block I	Block II	Block III	จำนวนต้นชาที่ สำรวจโรค
1	Tr. 2			8
2	Tr. 3			8
3	Tr. 1			8
4		Tr. 3		8
5		Tr. 2		8
6		Tr. 1		8
7			Tr. 2	8
8			Tr. 1	8
9			Tr. 3	8
แปลงกลางแจ้ง				
Plot No.	Block I	Block II	Block III	จำนวนต้นชาที่ สำรวจโรค
10	Tr. 3			8
11	Tr. 2			8
12	Tr. 1			8
13		Tr. 3		8
14		Tr. 1		8
15		Tr. 2		8
16			Tr. 3	8
17			Tr. 2	8
18			Tr. 1	8

2.4 การแยกเชื้อและการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคชาในแปลง

นอกจากการสำรวจโรคในแปลงทดลองปุยอินทรีย์และปุยชีวภาพแล้ว ทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการสำรวจและแยกเชื้อสาเหตุของโรคชา ในอีกบริเวณหนึ่งซึ่งห่างจากพื้นที่ทดลองปุยอินทรีย์และปุยชีวภาพประมาณ 3 กิโลเมตร แต่เป็นพื้นที่ในบริเวณของ บริษัทไร่ธาระมิงค์เช่นกัน ซึ่งพื้นที่นี้เป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสูง และมีอัตราการตายของชาสูง (ภาพที่ 2.3) ทั้งนี้เพื่อเป็นการวินิจฉัยสาเหตุเบื้องต้น และหาแนวทางแก้ไขเบื้องต้นให้ผู้ประกอบการและเกษตรกรที่ประสบปัญหาด้านดังกล่าว

2.4.1 การสำรวจและการแยกเชื้อสาเหตุโรค

แบ่งกลุ่มพื้นที่ในการสำรวจโรคของชาในแปลงปลูกของบริษัทธาระมิงค์ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ โดยเน้นในพื้นที่ ที่มีปัญหาพืชยืนต้นตาย และมีลักษณะการลุกลามจากต้นที่แสดงอาการไปยังต้นปกติ เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค ทั้งในส่วนของ ใบอ่อน ใบแก่ กิ่งก้าน ลำต้น ราก รวมถึงดินบริเวณรากพืชที่แสดงอาการ นำมาศึกษา แยกเชื้อสาเหตุ และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค จากนั้นนำตัวอย่างที่ต้องมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการตามวิธีที่เหมาะสมตามชนิดของเชื้อ เช่น ดังนี้

2.4.2 กลุ่มเชื้อรา

นำชิ้นส่วนของพืชที่แสดงอาการ มาฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อเชื้อเจริญ แยกเชื้อจากชิ้นส่วนของพืชมาเลี้ยงบนอาหาร PDA และแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยวิธี hyphal tip isolation โดยใช้ capillary ตัดปลายเส้นใยนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อบน PDA เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ส่วนการแยกเชื้อจากดินรอบ ๆ รากพืชที่แสดงอาการของโรคนำมาแยกเชื้อโดยใช้วิธี soil dilution และเลี้ยงเชื้อโดยวิธี spread plate บนอาหาร PDA เมื่อตรวจพบการเจริญของเชื้อ นำมาตรวจสอบและแยกเชื้อบริสุทธิ์

2.4.3 กลุ่มเชื้อแบคทีเรีย

แยกเชื้อแบคทีเรียจากชิ้นส่วนของพืชที่แสดงอาการนำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหาร NA โดยการ streak plate เมื่อพบโคโลนีเดี่ยว เจริญบนผิวหน้าอาหาร ใช้ loop ย้ายโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารใหม่โดยการวิธี streak plate อีกครั้ง และเมื่อได้โคโลนีเดี่ยวเช่นเดียวกับครั้งแรก จึงนำเชื้อที่ได้ไปเก็บไว้ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ในหลอดทดลอง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 2.3 ต้นชาที่แสดงอาการของโรคแห้งตายที่รุนแรง พื้นที่ที่ต้นชาบริเวณรอบยังดีอยู่ (บน) และ บริเวณที่ต้นชาโดยรอบเริ่มมีอาการโรคประปราย (ล่าง)

2.4.4 กลุ่มไส้เดือนฝอย

การแยกจากชิ้นพืช เก็บตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยโดยการนำชิ้นส่วนของพืช และดินบริเวณรากพืชที่แสดงอาการผิดปกติมาตรวจหาไส้เดือนฝอย โดยใช้วิธีการพ่นหมอก (mist extraction) และวิธีใช้กรวยกรอง (bermann funnel) ตามลำดับ ทั้งนี้ได้รับการอนุเคราะห์ในการตรวจสอบโดยภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.5 การแยกและการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิส และเชื้อแอคติโนมัยซิส เอนโดไฟท์

แยกเชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟท์ จากใบและรากชา โดยการนำใบชาประมาณคู่ที่ 2-3 นับจากยอดที่มีลักษณะสมบูรณ์ไม่มีโรค มาล้างน้ำไหลเป็นเวลา 30 นาที – 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาผึ่งลมให้หมาด เลือกตัดแผ่นใบให้มีขนาด 1x1 เซนติเมตร โดยเลือกสุ่มตัดจากหลายบริเวณ นำชิ้นพืชที่เลือกได้ไปฆ่าเชื้อที่ผิวใบ โดยแช่ใน NaOCl 1% เป็นเวลา 2 นาที แล้ต่อใน EtOH 70% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแล้ว แช่ใน Heritage ต่ออีก 1 นาที ก่อนนำไปวางบนกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ผึ่งลมให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อ 24-48 ชั่วโมง เมื่อชิ้นพืชแห้ง จึงนำไปวางบนอาหารสูตร IMA2 ประมาณ 15 ชิ้น ต่อหนึ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1-2 เดือน เมื่อพบการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซิส จึงทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเชื้อไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป

สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซิส และแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟท์ ที่ใช้ในการทดลองควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคชา แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

ก. เชื้อแอคติโนมัยซิส ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อรวรรณ ฉัตรสีรุ่ง ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำมาเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร IMA2 จำนวน 16 ไอโซเลท (CSAL 01-016)

ข. เชื้อแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟท์ ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ปิยะธิดา, 2549) นำมาเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร IMA2 จำนวน 5 ไอโซเลท (KAE1, KMI1, FIT1, GAR1 และ TIN1)

ค. เชื้อแอคติโนมัยซิสโดไฟท์ 36 ไอโซเลท ที่แยกจากลำต้นและใบของพืชสมุนไพรร 6 ชนิด ใช้เฉพาะการทดสอบควบคุมเชื้อ *Colletotrichum* sp.

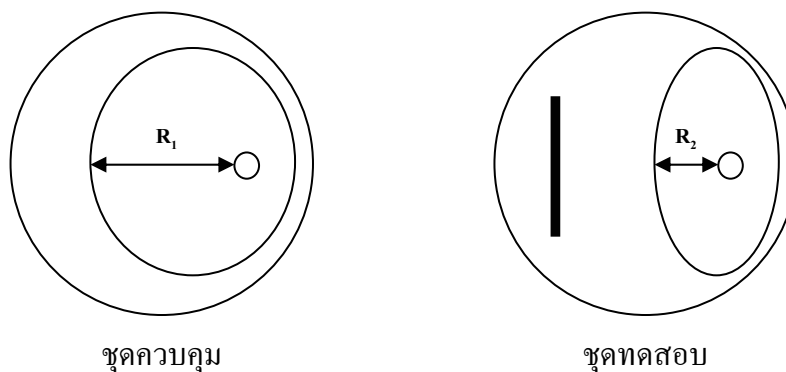
ง. เชื้อแอคติโนมัยซิสโดไฟท์ 35 ไอโซเลท ที่แยกจากลำต้นและใบของพืชสมุนไพรร 12 ชนิด ใช้เฉพาะการทดสอบควบคุมเชื้อ *Phellinus noxius*

2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซิส

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซิส และแอคติโนมัยซิสเอนโดไฟท์ ในการควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญ ได้แก่ โรคใบจุดแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และโรคต้นโทรม หรือ โรครากเน่าโคนเน่าสีน้ำตาลของชา ที่เกิดจากเชื้อรา *P. noxius* ด้วยวิธี Dual culture โดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิสบนอาหาร IMA-2 บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำชิ้นเชื้อ (culture disc) ขนาด 0.5 เซนติเมตร ของเชื้อสาเหตุโรคแต่ละชนิดวางตรงข้ามห่างจากเชื้อแอคติโนมัยซิส 4 เซนติเมตร (ภาพที่ 2.4)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 4 ซ้ำ ต่อเชื้อแอคติโนมัยซิสแต่ละไอโซเลท เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว เมื่อเชื้อสาเหตุเจริญเกือบเต็มจานอาหาร จึงวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบ (ภาพที่ 2.4) แล้วนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ (Percent Inhibition of Radial Growth; %PIRG)

$$\%PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$



ภาพที่ 2.4 การวัดขนาดรัศมีของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม (R_1) และชุดทดสอบ (R_2) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ

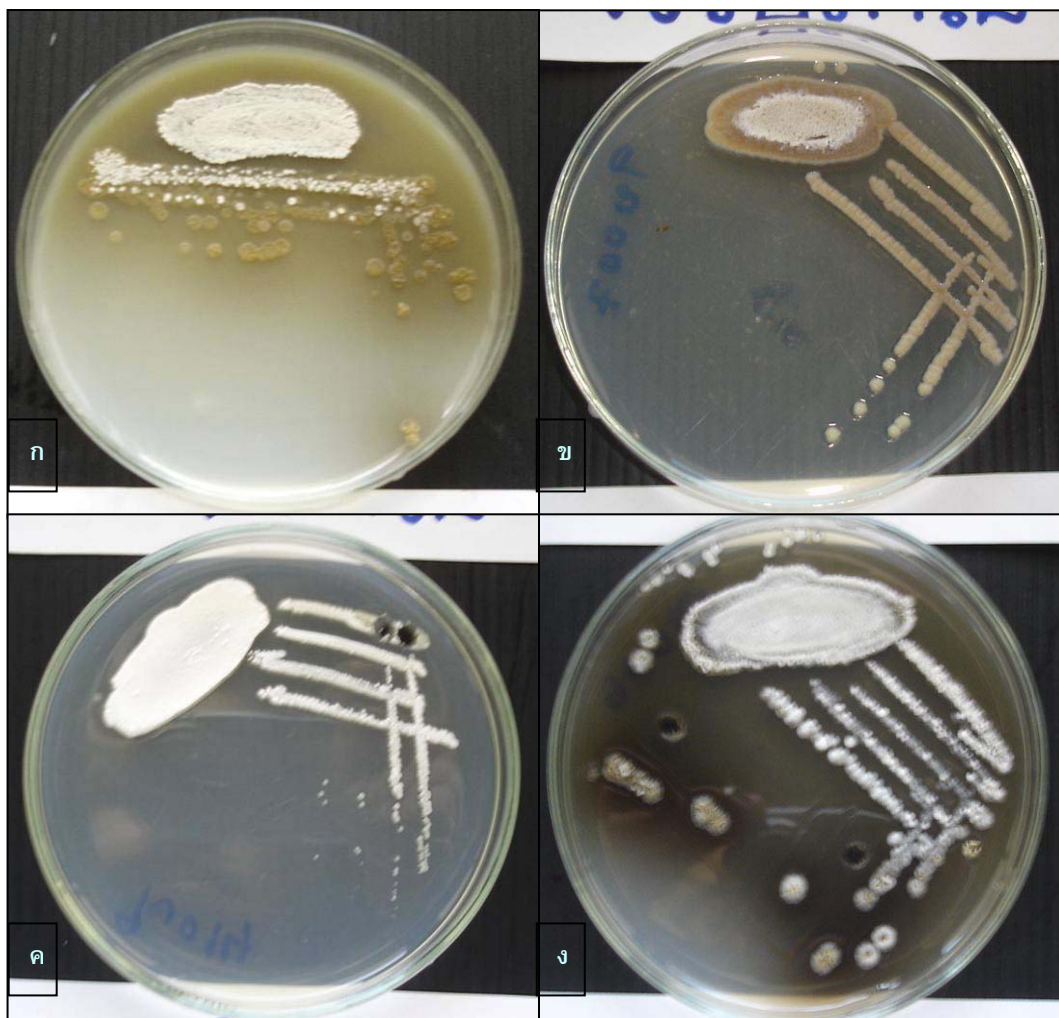
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการแยกแอสคิตินัมยีส และ การประเมินการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ผลการแยกเชื้อแอสคิตินัมยีสจากใบลำไยที่ผู้พังย่อยสลายตามธรรมชาติ ได้เชื้อแอสคิตินัมยีสทั้งหมดจำนวน 84 isolates อย่างไรก็ตามในจำนวนนี้มีเชื้อที่ไม่สามารถขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อีก (เชื้อตาย) จำนวน 1 isolate คงเหลือเชื้อจำนวน 83 isolates (ตารางที่ 3.1) ส่วนการแยกเชื้อจากดินบริเวณโคนต้นลำไยได้เชื้อทั้งหมดจำนวน 36 isolates อย่างไรก็ตามในจำนวนนี้มีเชื้อที่ไม่สามารถขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อีก (เชื้อตาย) จำนวน 9 isolates เหลือเชื้อจำนวน 27 isolates (ตารางที่ 3.2) ส่วนการแยกเชื้อจากผิวใบชา และ ใบลำไยอีกจำนวนหนึ่งซึ่งพบว่า มีการเข้าย่อยใบพืชโดยมีลักษณะเป็นจุดที่มีการเริ่มการเข้าย่อยใบพืช ผลการแยกเชื้อจากผิวใบได้เชื้อทั้งหมดจำนวน 20 isolates แบ่งเป็นเชื้อจากผิวใบลำไยจำนวน 10 isolates และ จากผิวใบชาอีก 10 isolates (ตารางที่ 3.3) ตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์บางตัวที่แยกได้ดังแสดงใน ภาพที่ 3.1

จากการประเมินศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) โดยดูจากการหาค่า clear zone ratio ที่คำนวณได้จากวงใสหรือ clear zone ที่เชื้อแต่ละ isolate สร้างขึ้นในอาหาร พบว่า **ในกลุ่มของเชื้อแอสคิตินัมยีสที่แยกได้จากใบลำไยที่ผู้พัง** มีเชื้อจำนวน 67 isolates ที่สร้างเอนไซม์ cellulase และมีจำนวน 16 isolates ที่ไม่สร้าง cellulase คิดเป็น 80.7% และ 19.3% ตามลำดับ ในกลุ่มที่สร้างเอนไซม์ cellulase มีค่า clear zone ratio ตั้งแต่ 1.63 ถึง 7.65 และเชื้อที่มีค่า clear zone ratio สูงมากมีจำนวน 2 isolates คือ LGLA02-021 และ LGLA03-021 โดยมีค่า clear zone ratio เป็น 6.26 และ 7.65 ตามลำดับ **ในกลุ่มของเชื้อแอสคิตินัมยีสที่แยกได้จากดินบริเวณโคนต้นลำไย** มีเชื้อจำนวน 14 isolates ที่สร้างเอนไซม์ cellulase และมีจำนวน 13 isolates ที่ไม่สร้าง cellulase คิดเป็น 51.9% และ 48.1% ตามลำดับ ในกลุ่มที่สร้างเอนไซม์ cellulase มีค่า clear zone ratio ตั้งแต่ 2.11 ถึง 4.58 และเชื้อที่มีค่า clear zone ratio อยู่ในระดับปานกลางแต่สูงกว่า isolates อื่นๆในกลุ่มนี้มีจำนวน 3 isolates คือ LGSA01-003, LGSA01-016 และ LGSA01-002 โดยมีค่า clear zone ratio เป็น 4.58, 4.26 และ 4.25 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2 และ 3.3)



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่าง isolates ของเชื้อ Actinomycetes ที่แยกได้ ก) LGLA-03-026, ข) LSA-007, ค) LSA-014, และ ง) TSA-006

ตารางที่ 3.1 เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากใบลำไยและศักยภาพในการผลิต

เอนไซม์เซลลูเลส (clear zone ratio)

Isolates no.	Clear zone ratio	Isolates no.	Clear zone ratio	Isolates no.	Clear zone ratio
LGLA01-001	4.48	LGLA02-001	4.34	LGLA03-001	2.07
LGLA01-002	2.26	LGLA02-002	2.81	LGLA03-002	0
LGLA01-003	3.77	LGLA02-003	4.05	LGLA03-003	2.10
LGLA01-004	2.94	LGLA02-004	4.69	LGLA03-004	3.74
LGLA01-005	3.57	LGLA02-005	4.00	LGLA03-005	4.32
LGLA01-006	3.07	LGLA02-006	2.76	LGLA03-006	4.56
LGLA01-007	3.14	LGLA02-007	2.58	LGLA03-007	3.83
LGLA01-008	1.63	LGLA02-008	4.22	LGLA03-008	4.21
LGLA01-009	2.99	LGLA02-009	0	LGLA03-009	2.86
LGLA01-010	3.21	LGLA02-010	5.00	LGLA03-010	0
LGLA01-011	4.06	LGLA02-011	3.24	LGLA03-011	1.83
LGLA01-012	3.66	LGLA02-012	2.13	LGLA03-012	4.34
LGLA01-013	0	LGLA02-013	1.76	LGLA03-013	2.04
LGLA01-014	0	LGLA02-014	0	LGLA03-014	2.48
LGLA01-015	0	LGLA02-015	3.12	LGLA03-015	0
LGLA01-016	3.18	LGLA02-016	2.32	LGLA03-016	2.55
LGLA01-017	0	LGLA02-017	2.35	LGLA03-017	3.80
LGLA01-018	3.22	LGLA02-018	4.09	LGLA03-018	5.23
LGLA01-019	0	LGLA02-019	4.74	LGLA03-019	0
LGLA01-020	0	LGLA02-020	4.87	LGLA03-020	2.38
LGLA01-021	0	<u>LGLA02-021</u>	<u>6.26</u>	<u>LGLA03-021</u>	<u>7.65</u>
LGLA01-022	2.24	LGLA02-022	3.42	LGLA03-022	2.84
LGLA01-023	3.76	LGLA02-023	2.92	LGLA03-023	3.46
LGLA01-024	0	LGLA02-024	5.52	LGLA03-024	2.47
LGLA01-025	0	LGLA02-025	3.83	LGLA03-025	2.33
LGLA01-026	2.13			LGLA03-026	3.79
LGLA01-027	3.11			LGLA03-027	ตาย
LGLA01-028	5.00				
LGLA01-029	0				
LGLA01-030	2.43				
LGLA01-031	2.80				
LGLA01-032	2.57				

LGLA = Longan Leaf Actinomycetes

ตารางที่ 3.2 ศักยภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (clear zone ratio) ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดิน

Isolates no.	Clear zone ratio	Isolates no.	Clear zone ratio	Isolates no.	Clear zone ratio
¹ LGSA01-001	ตาย	LGSA02-001	3.55	LGSA03-001	4.04
LGSA01-002	4.25	LGSA02-002	0	LGSA03-002	0
LGSA01-003	4.58	LGSA02-003	0	LGSA03-003	0
LGSA01-004	ตาย	LGSA02-004	0	LGSA03-004	3.80
LGSA01-005	3.05	LGSA02-005	0	LGSA03-005	3.68
LGSA01-006	3.91	LGSA02-006	0	LGSA03-006	0
LGSA01-007	2.11	LGSA02-007	2.60		
LGSA01-008	ตาย	LGSA02-008	ตาย		
LGSA01-009	ตาย	LGSA02-009	0		
LGSA01-010	0	LGSA02-010	0		
LGSA01-011	ตาย	LGSA02-011	2.87		
LGSA01-012	ตาย	LGSA02-012	0		
LGSA01-013	0				
LGSA01-014	ตาย				
LGSA01-015	ตาย				
LGSA01-016	4.26				
LGSA01-017	2.60				
LGSA01-018	3.08				

LGSA = Longan Soil Actinomycetes

ตารางที่ 3.3 เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากผิวใบลำไย และผิวใบชา

ผิวใบลำไย	ผิวใบชา
LSA-001	TSA-001
LSA-003	TSA-002
LSA-004	TSA-003
LSA-005	TSA-004
LSA-006	TSA-005
LSA-007	TSA-006
LSA-008	TSA-007
LSA-012	TSA-008
LSA-013	TSA-009
LSA-014	TSA-010

LSA = Longan-leaf Surface Actinomycetes; TSA = Tea-leaf Surface Actinomycetes

3.2 ผลการประเมินความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA

ได้ทำการประเมินความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช IAA (Indole-3-acetic acid) ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบลำไยและผิวใบชา โดยวิธีของ Gordon *et al.* (1951) เพื่อให้ได้ผลสำหรับการคัดเลือกเชื้อไปทดลองในสนามได้ในช่วงแรก ผลการวิเคราะห์ปริมาณ IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า เชื้อทุกตัวที่แยกได้จากผิวใบลำไยและผิวใบชาสามารถสร้าง IAA ได้ โดยมีปริมาณการผลิตตั้งแต่ปานกลาง (> 3 ถึง ~ 5 $\mu\text{mole/g dry cell}$); ปานกลางค่อนข้างสูง (> 5 ถึง ~ 10 $\mu\text{mole/g dry cell}$); สูง (> 10 ถึง ~ 15 $\mu\text{mole/g dry cell}$) และสูงมาก (> 20 ถึง $\sim >30$ $\mu\text{mole/g dry cell}$) เชื้อแอคติโนมัยซีส์ที่มีความสามารถในการผลิต IAA ในปริมาณที่สูงมากมี 6 isolates คือ TSA-009, LGL-03-026, LSA-005, LSA-001, TSA-010 และ TSA-007 โดยมีปริมาณการผลิต IAA เป็น 21.7; 22.0; 23.1; 26.1; 30.3; และ 35.8 $\mu\text{mole/g dry cell}$ (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ปริมาณการผลิต IAA ของเชื้อที่แยกได้จากผิวใบลำไย และใบชา

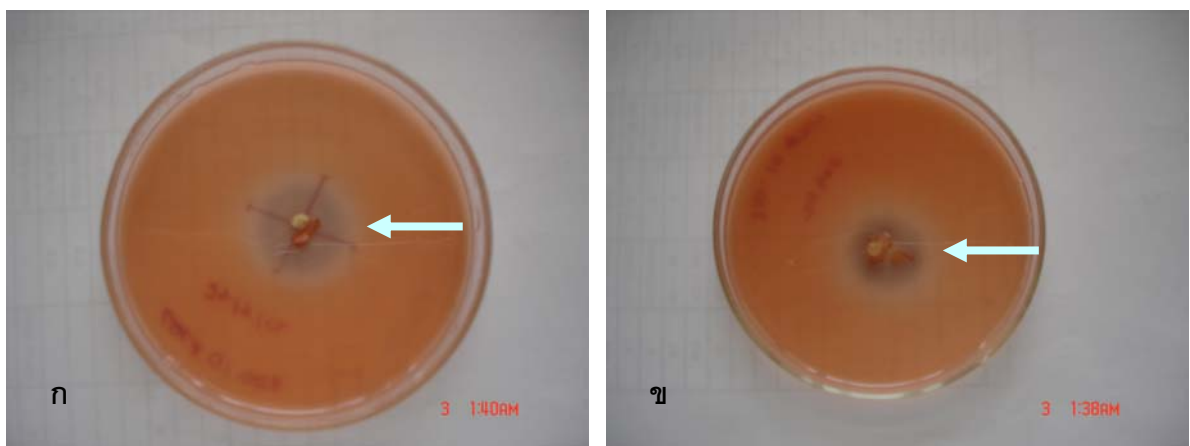
ผิวใบลำไย	IAA ($\mu\text{mole/g dry cell}$)	ผิวใบชา	IAA ($\mu\text{mole/g dry cell}$)
LSA-001	26.13	TSA-001	3.59
LSA-004	8.52	TSA-002	9.17
LSA-005	23.08	TSA-003	3.37
LSA-006	5.94	TSA-004	6.72
LSA-007	7.42	TSA-005	2.89
LSA-008	7.41	TSA-006	<u>12.51</u>
LSA-012	4.51	TSA-007	35.77
LSA-013	5.06	TSA-008	<u>16.40</u>
LSA-014	6.07	TSA-009	21.66
LGL-03-021	9.39	TSA-010	30.30
LGL-03-026	21.99		
LGL-02-002	3.84		

LSA = Longan-leaf Surface Actinomycetes; LGL = Longan Leaf;

TSA = Tea-leaf Surface Actinomycetes

3.3 การประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นในการละลายฟอสฟอรัสของเชื้อแอคติโนมัยซีส

การประเมินประสิทธิภาพการละลายฟอสเฟตโดยดูจากการเกิด clear zone ที่เชื้อแอคติโนมัยซีส แต่ละ isolate สร้างขึ้น ซึ่งตัวอย่างของ clear zone ดังภาพที่ 3.2 จากผลการทดลองพบว่าในกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกได้จากใบลำไยที่สุก มีเชื้อจำนวน 56 isolates ที่มีความสามารถในการย่อยละลายฟอสเฟต และมีจำนวน 26 isolates ที่ไม่พบการละลายของฟอสเฟต ในกลุ่มที่ละลายฟอสเฟตมีขนาด clear zone ratio ตั้งแต่ 0.55-2.85 และเชื้อที่มีศักยภาพในการย่อยละลายฟอสเฟตสูงสุดคือ LGLA 01-012 โดยมีค่าเป็น 2.85 (ตารางที่ 3.5) ในส่วนของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินบริเวณโคนต้นลำไยพบว่ามี 14 isolates ที่มีศักยภาพในการละลายฟอสเฟต ซึ่งขนาดของ clear zone ratio อยู่ในช่วง 1.20-3.00 และมี 13 isolates ที่ไม่พบการละลายฟอสเฟต (ตารางที่ 3.6) ในกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกได้จากผิวใบลำไยและผิวใบชาพบการละลายฟอสเฟตอยู่ 18 isolates มี clear zone ratio อยู่ในช่วง 0.65-2.10 ซึ่งตัวที่มีสูงสุดคือ เชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกจากผิวใบชา isolate no. 002 (ตารางที่ 3.7) สำหรับในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่แยกมาจากดินบริเวณรากชา พบว่ามีการละลายฟอสเฟตอยู่เพียง 3 isolates คือ TR-02 TR-08 และ TR-13 ซึ่งมีค่า clear zone ratio เท่ากับ 3.75 3.20 และ 3.58 ตามลำดับ ส่วนอีก 6 isolates ไม่พบการละลายฟอสเฟต (ตารางที่ 3.8)



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างการย่อยละลายฟอสเฟตของเชื้อแอคติโนมัยซีสสังเกตุจากรวงใส (clear zone) รอบโคโลนี (ลูกศรชี้) ก) มีการย่อยละลายเล็กน้อย ข) มีการย่อยละลายปานกลาง

ตารางที่ 3.5 ประสิทธิภาพเทียบจาก clear zone ratio ของเชื้อ Actinomycetes จากใบลำไยที่
 ผุพังในการละลายฟอสเฟต

รหัส	Clear zone ratio	รหัส	Clear zone ratio	รหัส	Clear zone ratio
¹ LGLA01-001	2.15	LGLA02-001	2.20	LGLA03-001	1.70
LGLA01-002	1.70	LGLA02-002	0	LGLA03-002	0.90
LGLA01-003	2.10	LGLA02-003	0	LGLA03-003	0.55
LGLA01-004	1.50	LGLA02-004	2.40	LGLA03-004	0.65
LGLA01-005	0.60	LGLA02-005	0	LGLA03-005	1.60
LGLA01-006	2.05	LGLA02-006	1.05	LGLA03-006	1.35
LGLA01-007	2.90	LGLA02-007	1.05	LGLA03-007	0.90
LGLA01-008	1.10	LGLA02-008	1.60	LGLA03-008	1.25
LGLA01-009	0	LGLA02-009	1.50	LGLA03-009	0.90
LGLA01-010	1.65	LGLA02-010	1.15	LGLA03-010	0.80
LGLA01-011	0.70	LGLA02-011	0	LGLA03-011	1.35
LGLA01-012	2.85	LGLA02-012	0.95	LGLA03-012	1.05
LGLA01-013	1.45	LGLA02-013	1.85	LGLA03-013	1.85
LGLA01-014	0.85	LGLA02-014	0	LGLA03-014	0.85
LGLA01-015	0.95	LGLA02-015	2.30	LGLA03-015	1.15
LGLA01-016	0	LGLA02-016	0	LGLA03-016	0
LGLA01-017	0	LGLA02-017	0	LGLA03-017	ตาย
LGLA01-018	0	LGLA02-018	0	LGLA03-018	0.95
LGLA01-019	0.80	LGLA02-019	1.35	LGLA03-019	1.50
LGLA01-020	0	LGLA02-020	0	LGLA03-020	0
LGLA01-021	0	LGLA02-021	0	LGLA03-021	0
LGLA01-022	1.40	LGLA02-022	0	LGLA03-022	1.50
LGLA01-023	1.05	LGLA02-023	0	LGLA03-023	0
LGLA01-024	2.10	LGLA02-024	1.00	LGLA03-024	1.00
LGLA01-025	0	LGLA02-025	1.10	LGLA03-025	1.25
LGLA01-026	0			LGLA03-026	1.35
LGLA01-027	0			LGLA03-027	ตาย
				LGLA01-028	0
				LGLA01-029	1
				LGLA01-030	1.90
				LGLA01-031	1.50
				LGLA01-032	1.30

¹LGLA = Longan Leaf Actinomycetes

ตารางที่ 3.6 ประสิทธิภาพเทียบจาก clear zone ratio ของเชื้อแอคติโนมัยซีส จากดินบริเวณ
โคนต้นลำไยในการละลายฟอสเฟต

รหัส	Clear zone ratio	รหัส	Clear zone ratio	รหัส	Clear zone ratio
LGSA01-001	ตาย	LGSA02-001	0	LGSA03-001	2.05
LGSA01-002	2.20	LGSA02-002	0	LGSA03-002	0
LGSA01-003	1.80	LGSA02-003	1.20	LGSA03-003	0
LGSA01-004	ตาย	LGSA02-004	1.15	LGSA03-004	0
LGSA01-005	0	LGSA02-005	0	LGSA03-005	0
LGSA01-006	1.20	LGSA02-006	2.25	LGSA03-006	3.00
LGSA01-007	0	LGSA02-007	0		
LGSA01-008	ตาย	LGSA02-008	ตาย		
LGSA01-009	ตาย	LGSA02-009	0		
LGSA01-010	0	LGSA02-010	0		
LGSA01-011	ตาย	LGSA02-011	2.20		
LGSA01-012	ตาย	LGSA02-012	1.15		
LGSA01-013	2.75				
LGSA01-014	ตาย				
LGSA01-015	ตาย				
LGSA01-016	2.10				
LGSA01-017	1.65				
LGSA01-018	1.45				

LGSA = Longan Soil Actinomycetes

ตารางที่ 3.7 ประสิทธิภาพเทียบจาก clear zone ration ของเชื้อ Actinomycetes ที่แยกจากผิวใบลำไยและผิวใบชาในการละลายฟอสเฟต

ผิวใบลำไย รหัส	Clear zone ratio	ผิวใบชา รหัส	Clear zone ratio
LSA-001	0	TSA-001	1.35
LSA-003	1.15	TSA-002	2.10
LSA-004	1.15	TSA-003	1.25
LSA-005	0.65	TSA-004	1.55
LSA-006	1.20	TSA-005	1.45
LSA-007	1.00	TSA-006	1.65
LSA-008	0.65	TSA-007	1.35
LSA-012	1.55	TSA-008	2.00
LSA-013	1.25	TSA-009	0
LSA-014	1.20	TSA-010	1.05

LSA = Longan-leaf Surface Actinomycetes;

TSA = Tea-leaf Surface Actinomycetes

ตารางที่ 3.8 ประสิทธิภาพเทียบจาก clear zone ration ของเชื้อ Actinomycetes เชื้อแบคทีเรียที่แยกมาจากดินบริเวณรากชาในการละลายฟอสเฟต

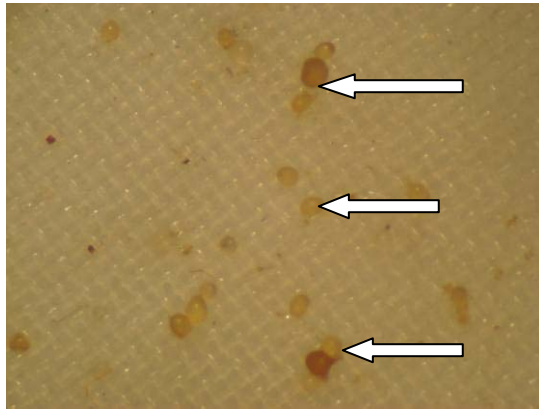
รหัส	Clear zone ratio	รหัส	Clear zone ratio
TR 01	0	TR 08	3.20
TR 02	3.71	TR 09	ตาย
TR 03	0	TR 10	ตาย
TR 04	ตาย	TR 11	0
TR 05	ตาย	TR 12	ตาย
TR 06	0	TR 13	3.58
TR 07	0	TR 14	0

TR = Tea Root

3.4 การคัดแยกและขยายเชื้อไมคอร์ไรซา

3.4.1 ผลคัดแยกสปอร์จากดินบริเวณรากชา

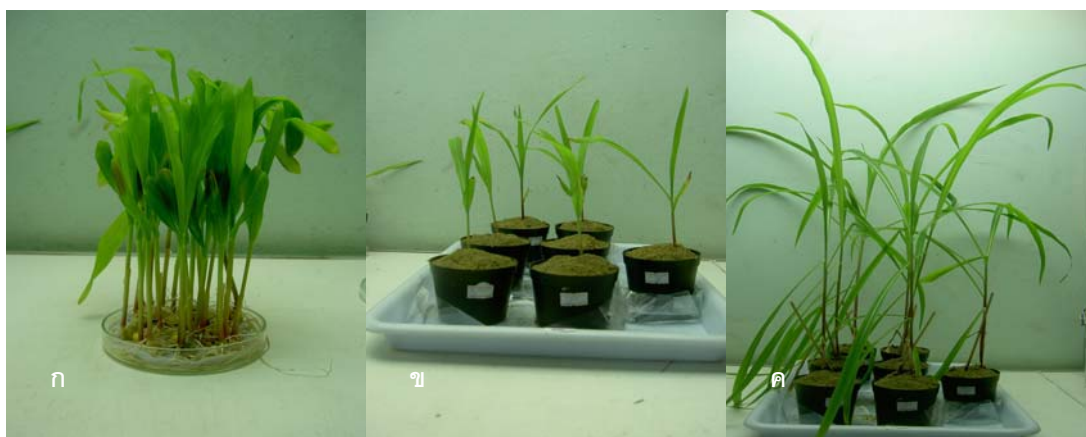
เมื่อเก็บดินจากบริเวณรอบรากต้นชา มาร่อนสปอร์พบสปอร์เชื้อราอับัสคูลารีไมคอร์ไรซา เพียง 1 isolate เท่านั้น โดยสปอร์มีขนาด 45-125 μm . รูปร่างกลม มีสีน้ำตาล (ภาพที่ 3.3)



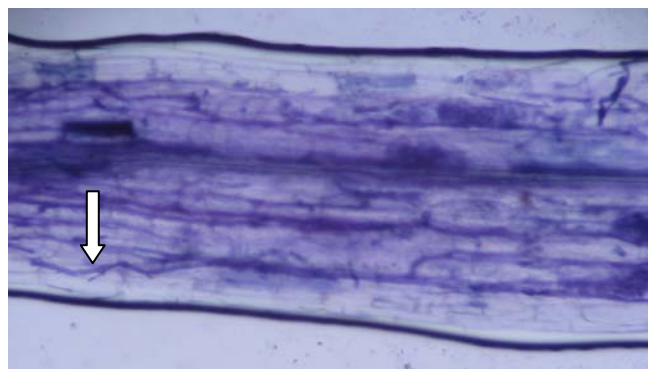
ภาพที่ 3.3 ลักษณะของสปอร์อับัสคูลารีไมคอร์ไรซาเชื้อราสกุล *Glomus* sp. ที่พบบริเวณรากชา

3.4.2 การขยายปริมาณสปอร์ของเชื้อราอับัสคูลารีไมคอร์ไรซาชนิด *Glomus* sp.

ได้ทดลองขยายปริมาณสปอร์ของเชื้อราอับัสคูลารีไมคอร์ไรซาเชื้อราสกุล *Glomus* sp. โดยใช้ต้นข้าวโพดที่ปลูกในทรายที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 3.4) เป็นเวลา 1 เดือน พบว่า เชื้อราไมคอร์ไรซาเข้ารากได้ดี (ภาพที่ 3.5) และมีจำนวนสปอร์เฉลี่ย 28 สปอร์/มิลลิลิตร และทำการเก็บสปอร์ที่ขยายปริมาณได้ไว้ในสารละลาย Ringer solution เพื่อรอทำการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.4 การขยายปริมาณสปอร์ของเชื้อราอับัสคูลารีไมคอร์ไรซาในต้นข้าวโพด ก) การเพาะเมล็ดข้าวโพด ข) ย้ายปลูกต้นกล้าข้าวโพดลงในกระถาง ค) ข้าวโพดอายุประมาณ 1 เดือน



ภาพที่ 3.5 ลักษณะการเข้ารากของเส้นใยสปอร์ไมคอร์ไรซา (ลูกครี) ในรากข้าวโพด

3.4.3 การขยายปริมาณสปอร์ไมคอร์ไรซาเพื่อใช้ในการทดลองภาคสนาม

การขยายปริมาณสปอร์ไมคอร์ไรซาโดยใช้ต้นข้าวโพดประสบปัญหา กล่าวคือปริมาณสปอร์มีน้อย และมีขนาดเล็ก จึงไม่สามารถผลิตเพื่อใช้ในการภาคสนามได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ตัดกรรมวิธีที่มีการใช้ไมคอร์ไรซาออก

3.5 ผลการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ทดสอบในภาคสนาม

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ได้ดำเนินงานในภาคสนามตั้งแต่เริ่มโครงการ โดยมีกรรมวิธีที่ต้องผสมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในปุ๋ยอินทรีย์และใช้ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพ ดังนั้นกลุ่มจุลินทรีย์จึงมีสองชุดคือ ชุดแรกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากโครงการอื่นๆของคณะผู้วิจัยนี้และชุดที่สองเป็นจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโครงการวิจัยนี้โดยชุดที่สองนี้เลือกเฉพาะกลุ่มที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสเท่านั้น (จากผลการทดลองข้อ 3.1) ส่วนกลุ่มอื่นๆไม่สามารถเลือกนำไปใช้ทันในภาคสนามได้ (เชื้อจากผลการทดลองข้อ 3.2 ถึง 3.3) เนื่องจากส่วนใหญ่เป็นกลุ่มเชื้อแอคติโนมัยซิสซึ่งหลายตัวที่มีศักยภาพสูงในแต่ละด้านยังไม่สามารถขยายเชื้อในปริมาณมากได้ ประกอบกับระยะเวลาการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพต้องดำเนินการตามระยะเวลา การคัดเลือกเชื้อเพื่อทดสอบการย่อยสลายใบชาเบื้องต้นในโรงเรือนได้เชื้อ 3 isolates โดยเลือกเชื้อที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ สูง กลาง และต่ำ คือ LGLA-02-021, LGLA-03-026 และ LGLA-01-015 โดยมีค่า clear zone ratio อยู่ที 6.26, 3.79 และ 0 ตามลำดับ ส่วนเชื้อกลุ่มนี้ที่เลือกนำไปขยายและผสมกับปุ๋ยอินทรีย์เพื่อทดลองภาคสนามคือ LGLA-02-021 (ตารางที่ 3.9)

จุลินทรีย์กลุ่มเพิ่มธาตุอาหารพืชที่ได้คัดเลือกผสมในปุ๋ยอินทรีย์เพื่อทดลองในภาคสนามนั้น บาง isolate ได้จากงานวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้วิจัย และบาง isolate ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ โดยได้เลือกจาก 3 กลุ่มคือ กลุ่มตรึงไนโตรเจน ได้แก่ *Azospirillum*, *Azotobacter* และ *Beijerinckia*

กลุ่มละลายฟอสฟอรัส ได้แก่ *Penicillium* และ แอคติโนมัยซีส isolate, LGLA-01-012 อีกกลุ่มหนึ่งคือกลุ่มละลายโพแทสเซียม ได้แก่ *Bacillus* (ตารางที่ 3.9)

ตารางที่ 3.9 จุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกกว่ามีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การทดลอง	กลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้				
	ตรึงไนโตรเจน	ละลายฟอสฟอรัส	ละลายโพแทสเซียม	สร้างฮอริโมนพืช	สร้างเอนไซม์เซลลูเลส
1.ทดสอบการย่อยสลายใบชา	-	-	-	-	LGLA-02-021 ² LGLA-01-015 ² LGLA-03-026 ²
2.การทดลองภาคสนาม	<i>Azospirillum</i> ¹ <i>Azotobacter</i> ¹ <i>Beijerinckia</i> ¹	<i>Penicillium</i> ¹	<i>Bacillus</i> ¹	<i>Azospirillum</i> ¹	*LGLA02-021 ²
	ใช้ในกรรมวิธีที่ผสมกับปุ๋ยอินทรีย์ (Tr.2) และ ใช้ผลิตเป็นปุ๋ยชีวภาพเพื่อใช้ใน Tr.3 (ดังรายละเอียดในบทที่ 3)				*ใช้ผสมเฉพาะในกรรมวิธีที่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์

¹กลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากงานวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้วิจัย

²กลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกจากงานวิจัยครั้งนี้

3.6 ผลการทดสอบการย่อยสลายของใบชา

จากการตรวจสอบลักษณะการย่อยใบชาของตำรับต่างๆพบว่าหลังผ่านการหมักได้ประมาณ 1 เดือน ลักษณะของใบชาในกรรมวิธีที่ 1 และ 6 มีการย่อยสลายที่ไม่ต่างกันและน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับที่ 3, 4 และ 5 ซึ่ง ใส่เชื้อแอคติโนมัยซีส มีการย่อยสลายที่ชัดเจนมากกว่า (ภาพที่ 3.6) อย่างไรก็ตามในเดือนที่ 2 ดูเหมือนว่ามีอัตราการย่อยสลายน้อยลงทุกตำรับ กล่าวคือไม่แตกต่างกันนักจากเดือนที่ 1 อาจเนื่องมาจากเป็นช่วงที่มีฝนตก และ อุณหภูมิต่ำกว่าช่วงเดือนที่ 1 หลังจากผ่านการหมักประมาณ 3 เดือน ลักษณะการย่อยของใบชามีความแตกต่างกันระหว่างตำรับการทดลองและมีแนวโน้มเช่นเดียวกับช่วงเดือนที่ 1 และ 2 กล่าวคือ กรรมวิธีที่ 1 และ 6 ไม่แตกต่างกันมากนักและมีการย่อยสลายที่น้อยกว่า กรรมวิธีที่ 3, 4 และ 5 (ภาพที่ 3.7)



ภาพที่ 3.6 ลักษณะการย่อยสลายของใบชาหลังผ่านการหมักประมาณ 1 เดือน:

แถวบน กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่เชื้อ และ กรรมวิธีที่ 6 ใส่ซูเปอร์ฟัด. 1;

แถวกลาง กรรมวิธีที่ 2 ใส่เชื้อ LGLA 02-021 และ กรรมวิธีที่ 3 ใส่เชื้อ LGLA 01-015;

แถวล่าง กรรมวิธีที่ 5 ใส่เชื้อผสม LGLA 02-021 + LGLA 01-015+ LGLA 03-026



ภาพที่ 3.7 ลักษณะการย่อยสลายของใบชาหลังผ่านการหมักประมาณ 1 เดือน:

แถวบน กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่เชื้อ และ กรรมวิธีที่ 6 ใส่ชูปเปอร์พด. 1; **แถวกกลาง** กรรมวิธีที่ 2 ใส่เชื้อ LGLA 02-021 และ กรรมวิธีที่ 3 ใส่เชื้อ LGLA 01-015; **แถวล่าง** กรรมวิธีที่ 4 ใส่เชื้อ LGLA 03-026 และ กรรมวิธีที่ 5 ใส่เชื้อผสม LGLA 02-021 + LGLA 01-015+ LGLA 03-026

3.7 ผลของปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพต่อคุณภาพและผลผลิตของชาในภาคสนาม

3.7.1 ผลการตรวจสอบสมบัติของดินก่อนการทดลอง

การศึกษาผลของการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพต่อคุณภาพและผลผลิตของชา ได้ดำเนินการศึกษาในระหว่าง เดือน กรกฎาคม 2551- ตุลาคม 2552 โดยใช้พื้นที่แปลงปลูกชาของบริษัทชาระมิงค์ ซึ่งทางบริษัทฯ ได้เริ่มบุกเบิก ทำไร่ชา และผลิตใบชาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510 บนพื้นที่ภูเขาสูง แหล่งต้นน้ำ อ. แม่แตง จ.เชียงใหม่ กว่า 3,000 ไร่ โดยมีการใช้ปัจจัยการผลิตตามวิธีการผลิตชาโดยทั่วไป ภายหลังประมาณปี 2548 ได้ปรับเปลี่ยนแนวทาง มาทำการผลิตชาในระบบอินทรีย์ ต่อมาในต้นปี 2551 ทางคณะผู้วิจัยได้เข้าไปสำรวจเพื่อศึกษาความอุดมสมบูรณ์ดินในบริเวณดังกล่าวพบว่า ดินในแปลงปลูกชาของบริษัทนั้น สภาพดินโดยทั่วไปเป็นดินกรดจัด (pH 4.76) มีอินทรีย์วัตถุในระดับสูง (3.45%) มีระดับปริมาณธาตุอาหารหลักในระดับสูง – สูงมาก เช่น ปริมาณฟอสฟอรัสอยู่ในระดับสูง(102.37 mg/kg) และ โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้สูงมาก (> 300 mg/kg) มีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมต่ำมาก เมื่อเปรียบเทียบกับดินป่าธรรมชาติที่อยู่รอบ ๆ จะเห็นว่าความอุดมสมบูรณ์ของดินที่ผ่านการทำการเกษตรมาเป็นระยะเวลายาวนาน มีการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างต่อเนื่อง นั้นจะมีความอุดมสมบูรณ์ที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับดินในป่าธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเป็นกรด-ด่างของดินและระดับอินทรีย์วัตถุ ดังแสดงในตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.10 คุณสมบัติของดินในบริเวณแปลงปลูกชาของบริษัทชาระมิงค์

ตัวอย่างดิน	pH	EC μS /cm	OM %	N %	P mg/kg	K mg/kg	Ca mg/kg
ดินในแปลงปลูกชา	4.76	11.00	3.45	0.18	102.37	336.40	333.48
ดินป่าธรรมชาติ	5.82	15.30	5.52	0.28	7.14	376.43	1549.51

ตัวอย่างดิน	Mg mg/kg	Fe mg/kg	Mn mg/kg	Cu mg/kg	Zn mg/kg	S mg/kg	B mg/kg
ดินในแปลงปลูกชา	55.43	142.83	24.75	1.85	1.04	15.72	0.18
ดินป่าธรรมชาติ	220.14	87.98	37.16	0.49	0.82	1.24	0.16

3.7.2 ผลของปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน

3.7.2.1 ปริมาณธาตุอาหารในดิน

ในการศึกษาการเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ดินของแปลงปลูกชาที่ทำการผลิตในระบบอินทรีย์ โดยใช้ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ คณะผู้วิจัยได้ทดลองใส่ปุ๋ยครั้งแรกในช่วงกลางเดือนสิงหาคม 2551 ภายหลังการใส่ปุ๋ยประมาณ 1 เดือน ได้เก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์หาปริมาณธาตุอาหารในดิน (ผลการวิเคราะห์ดินแสดงในตารางที่ 3.11 และ 3.12) และในช่วงกลางเดือนกันยายนได้ใส่ปุ๋ยให้กับแปลงชาในครั้งที่ 2 ในต้นช่วงฤดูหนาวปลายปี 2551 ไม่มีฝนตกบนพื้นที่ปลูกชา ผลผลิตชามีปริมาณน้อยมาก เจ้าของสวนชาได้ทำการตัดแต่งต้นชา (ตัดแต่งใบออกหมดเหลือแต่กิ่งก้านเท่านั้น) จึงทำให้ไม่มีผลผลิตชาในช่วงฤดูหนาว ภายหลังการตัดแต่งกิ่ง/ต้น จึงมีการใส่ปุ๋ยให้กับต้นชาในครั้งที่ 3 (ช่วงต้นเดือนกุมภาพันธ์ 2552) หลังจากต้นชาได้แตกยอดใหม่ (ประมาณต้นเดือนเมษายน 2552) จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในดิน (ผลการวิเคราะห์ดินแสดงในตารางที่ 3.13 และ 3.14) หลังจากนั้นก็ใส่ปุ๋ยให้กับชาครั้งสุดท้ายในช่วงฤดูฝน (มิถุนายน 2552) และหลังจากใส่ปุ๋ยครั้งสุดท้ายได้ 6 เดือน (ตุลาคม 2552) จึงทำการเก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของธาตุอาหารในดินอีกครั้ง (ผลการวิเคราะห์ในดินแสดงในตารางที่ 3.15 และ 3.16 2.8)

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติของดินเบื้องต้นของแปลงปลูกชา บริษัทชาระมิงค์ ในช่วงเดือนเมษายน 2551 พบว่าโดยทั่วไปดินมีสภาพเป็นดินกรดจัด (pH 4.76) มีอินทรีย์วัตถุในระดับสูง (3.45%) มีระดับปริมาณธาตุอาหารหลักในระดับสูง - สูงมาก เช่น ปริมาณฟอสฟอรัสอยู่ในระดับสูง (102.37 mg/kg) และ โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้สูงมาก (> 300 mg/kg) มีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียมต่ำมาก ภายหลังการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ 1 เดือน (ใส่ปุ๋ยครั้งแรกในช่วงเดือนสิงหาคม 2551) เมื่อเก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์พบว่าคุณสมบัติของดินโดยทั่วไปไม่แตกต่างจากดินที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งดินในแปลงปลูกชาที่อยู่ในร่มและกลางแจ้ง (ตารางที่ 3.11 และ 3.12) โดยมี pH อยู่ในช่วง 4.7 – 5.1 ปริมาณอินทรีย์วัตถุผิวดินแปรอยู่ในช่วง 3.3 – 6.2% ธาตุอาหารหลักไนโตรเจน ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ อยู่ในช่วง 0.2 – 0.3%, 63-198 mg/kg และ 241 - 451 mg/kg ตามลำดับ

หลังการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพครั้งที่ 2 ได้ 8 เดือน (การเก็บตัวอย่างดินครั้งที่ 2 ช่วงเดือนเมษายน 2552) คุณสมบัติของดินโดยทั่วไปก็ยังไม่แตกต่างจากดินที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งดินในแปลงปลูกชาที่อยู่ใต้ร่มไม้และกลางแจ้ง (ตารางที่ 3.13 และ 3.14) โดย

ดินแปลงปลูกชาที่อยู่ภายใต้ร่มไม้ มี pH อยู่ในช่วง 4.6 – 4.9 ปริมาณอินทรีย์วัตถุอยู่ในช่วง 7.0 – 7.7% ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ อยู่ในช่วง 201-300 mg/kg และ 318 - 358 mg/kg ตามลำดับ ในขณะที่ดินแปลงปลูกชากลางแจ้ง มี pH อยู่ในช่วง 5.3 – 5.5 ปริมาณอินทรีย์อยู่ในช่วง 3.7 – 5.6% ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ อยู่ในช่วง 110-190 mg/kg และ 291 - 346 mg/kg ตามลำดับ และเป็นที่น่าสนใจว่าปริมาณทองแดงในดินแปลงปลูกชาที่อยู่ในร่มไม้ ที่ใส่ปุ๋ยชีวภาพจะมีปริมาณธาตุทองแดงต่ำกว่าดินที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยและใส่ปุ๋ยอินทรีย์เล็กน้อย และดินที่ปลูกชากลางแจ้งการใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพทำให้ปริมาณโบรอนสูงกว่าดินที่ไม่ใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภายหลังจากใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพครั้งสุดท้ายในช่วงเดือนมิถุนายน 2552 ได้ 6 เดือน เมื่อเก็บตัวอย่างดินมาวิเคราะห์ พบว่าคุณสมบัติของดินที่ใช้ปลูกชาภายใต้ร่มเงาส่วนใหญ่ไม่แตกต่างจากดินที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3.15) โดยดินแปลงปลูกชาที่อยู่ภายใต้ร่มไม้ มี pH อยู่ในช่วง 4.85– 5.36 ปริมาณอินทรีย์อยู่ในช่วง 5.53-6.20% ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ อยู่ในช่วง 63.17-212.50 mg/kg และ 297.20 – 357.10 mg/kg ตามลำดับ ยกเว้นปริมาณของฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ แคลเซียมและแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในดินที่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยชีวภาพที่สูงกว่าดินที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยดินที่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ มีฟอสฟอรัสที่แลกเปลี่ยนได้ 212.5 และ 144.3 mg/kg มีแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 607.7 และ 601.6 mg/kg และแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 160.49 และ 105.6 mg/kg ตามลำดับ ในขณะที่ดินที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย มีฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 63.2 mg/kg มีแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 288.6 mg/kg และแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 43.5 mg/kg ตามลำดับ สำหรับดินที่ปลูกชากลางแจ้งนั้น มีเพียงปริมาณของแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้เท่านั้นที่ การใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพที่ทำให้ปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้สูงกว่าดินที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3.16) โดยดินที่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์และปุ๋ยชีวภาพ มีแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 389.5 และ 296.6 mg/kg ตามลำดับ ในขณะที่ดินที่ไม่ได้ใส่ปุ๋ย มีแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 264.3 mg/kg ตามลำดับ ส่วนคุณสมบัติอื่น ๆ ของดินนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกกรรมวิธีการทดลอง (ไม่ใส่ปุ๋ย ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ และใส่ปุ๋ยชีวภาพ) โดยมี pH ของดินอยู่ในช่วง 4.95 – 5.41 ปริมาณอินทรีย์อยู่ในช่วง 4.58 – 5.09% ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ และโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ อยู่ในช่วง 193.50-229.50 mg/kg และ 227.09 - 318.98 mg/kg ตามลำดับ