

ผลของราไตรโคเดอร์มาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอ
Efficacy of *Trichoderma harzianum* on Inhibition of the Causal Agent
of Pummelo Tan Spot Disease (*Phyllosticta citriasiana*)

สุธามาศ ณ น่าน^{1/} ปฏิพัทธ์ ใจปิ่น^{1/} สนอง จรินทร์^{1/} บุญปิยธิดา คล่องแคล่ว^{1/}
Suthamas Na Nan^{1/} Patipat Jaipin^{1/} Sanong Jarintorn^{1/} Boonpiyathida Klongkaew^{2/}

ABSTRACT

The efficacy of *Trichoderma harzianum* for inhibition of *Phyllosticta citriasiana*, a causal agent of pummelo tan spot disease, was examined under laboratory condition at Chiangrai Horticulture research center during 2014-2015. Forty four isolates of *T. harzianum* were obtained from soil samples collected from pummelo orchards at Wiangkaen district, Chiangrai province and Chiangdao district, Chiangmai province using soil dilution spread plate method. Three pure culture of *P. citriasiana*; CR-L01, CR-F09, and CM-F05 were isolated from tan spot symptom on leaf and fruit of pomelo using tissue transplanting method. The mycelia growth of *P. citriasiana* isolate CR-F09 was cultured on eight types of agar media based on CRD criterion with five replications for each treatment. OMA, PoDA, and PSA were effective media to cultivate *P. citriasiana* as they provided the highly percentage of mycelium growth with 98.2, 96.4 and 88.9%, respectively after 14-day of incubation. The inhibition efficacy of 17 isolates of *T. harzianum* on *P. citriasiana* was determined by dual culture method *in vitro*. After 3-day incubation, *T. harzianum* isolates T4, T9, T10, T14, T21, T29, and T35 presented the mycelium growth inhibition at 43.3, 50.0, 50.0, 46.7, 43.3, 43.3, and 50.0 %, respectively. Strain of T35 and T10 showed highly percentage mycelium growth inhibition after 5-day of incubation with 52.1 and 51.0 %. The efficacy of *T. harzianum* isolates T35, commercial product of *Trichoderma* and azoxystrobin 25% W/V SC to control pummelo tan spot disease were also determined under field condition based on RCBD criterion with four replications for each treatment. The results showed that application of azoxystrobin at 10 ml/20 L of water was the most effective method to control pummelo tan spot disease compared to *T. harzianum* isolates T35 and commercial product of *Trichoderma*.

Key words: *Trichoderma*, tan spot disease, pummelo

1 ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

บทคัดย่อ

การทดสอบประสิทธิภาพของรา *Trichoderma harzianum* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phyllosticta citriasiana* สาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอ ในห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ระหว่างปี พ.ศ.2557-2558 ใช้วิธี soil dilution spread plate แยกรา *Trichoderma* จากดินในสวนส้มโอ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย และ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ สามารถแยกได้รา *Trichoderma* บริสุทธิ์จำนวน 44 ไอโซเลตสำหรับเชื้อรา *P. citriasiana* แยกด้วยวิธี tissue transplanting จากใบและผลส้มโอที่เป็นโรคจุดสีน้ำตาล ได้เชื้อบริสุทธิ์ 3 ไอโซเลตคือ CR-L01 CR-F 09 และ CM-F05 ศึกษาการเจริญและลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้บนอาหาร PDA พบว่า ไอโซเลต CR-F 09 มีลักษณะตรงกับเชื้อสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลเป็นรา *P. citriasiana* จึงเลือกไอโซเลต CR-F 09 ทดสอบในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อราก่อนข้างช้า จึงทดสอบชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อดังกล่าว วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อรา 8 ชนิด เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยบนอาหารหลังจากบ่มเชื้อ 14 วัน พบว่าเส้นใยของรา *P. citriasiana* เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA เท่ากับ 98.2% รองลงมาคือ อาหาร PoDA และ PSA เท่ากับ 96.4 และ 88.9% แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการเจริญ ของรา *P. citriasiana* บนอาหารทั้ง 3 ชนิด เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของรา *T. harzianum* ต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยของรา *P. citriasiana* โดยวิธี Dual culture test ได้คัดเลือกรา *T.harzianum* 17 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา หลังจากบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ปรากฏว่ารา 7 ไอโซเลต

ได้แก่ T4 T9 T10 T1 T21 T29 และ T35 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 43.3 50.0 50.0 46.7 43.3 43.3 และ 50.0 % ตามลำดับ และหลังจากบ่มเชื้อครบ 5 วัน พบว่ารา *T. harzianum* ไอโซเลต T35 และ T10 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยราสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลได้มากกว่าไอโซเลตอื่น คือ 52.1 และ 51.0% สำหรับการทดสอบผลของรา *T. harzianum* เพื่อควบคุมโรคจุดสีน้ำตาลในสวนส้มโอ วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี พบว่า การใช้สาร azoxystrobin 25% WV/SC มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคจุดสีน้ำตาลในสวนส้มโอได้ดีที่สุด พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และจำนวนผลบนผลส้มโอน้อยกว่าการใช้รา *T. harzianum* ไอโซเลต T35 TKU และชีวภัณฑ์การค้า No.1

คำสำคัญ : ไตรโคเดอร์มา ส้มโอ โรคใบจุดสีน้ำตาล

บทนำ

โรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอ (Tan spot) มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous & Gruyter, sp. nov. ลักษณะอาการของโรคพบทั้งบนใบ และผลส้มโอ แต่มักพบอาการรุนแรงมากเมื่อผลส้มโอเจริญเติบโตเต็มที่หรือใกล้เก็บเกี่ยวผล อาการเริ่มแรกมีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ สีน้ำตาล ขอบแผลมีสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม แผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-10 มม. ต่อมาแผลจะขยายขนาดใหญ่ขึ้น เป็นแผลแห้งสีเทาหรือน้ำตาล ตรงกลางแผลพบพิกินเดี่ยวมจุดสีดำขนาดเล็ก มีเนื้อเยื่อสีเขียวล้อมรอบแผล ลักษณะอาการโรคจุดสีน้ำตาลบนผลส้มโอนั้นมีลักษณะคล้ายคลึงกับอาการของโรคจุดดำ (Black spot) ที่เกิดจากเชื้อรา *P. citricarpa* (McAlpine) Vander Aa ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มของเอเชีย แอฟริกา อเมริกาใต้

ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ แต่ยังไม่มียางานพบในสหภาพยุโรป (European Union, 2000) จึงจัดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา (Kotze, 1981)

ในประเทศไทยมีรายงานว่าเชื้อรา *Phyllosticta* sp. เป็นสาเหตุโรคในพืชหลายชนิดรวมทั้งส้มโอ (พัฒนา, 2542) ปี พ.ศ. 2549 พบโรคจุดน้ำตาลระบาดในแหล่งปลูกส้มโอ อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย ตลาดไม่ยอมรับผลส้มโอที่มีตำหนิจากโรค ทำให้ผลผลิตส้มโอและปริมาณการส่งออกลดลง พรพิมลและคณะ (2550) ศึกษาสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย จำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของโคโลนีบนอาหารชนิดต่าง ๆ และลักษณะของพิกนินเดียม โคนิเดียม ไมโครโคนิเดียมและสเปอมาเทีย จำแนกสาเหตุเป็น *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) และมีลักษณะใกล้เคียงกับรายงานของ Kiely (1949); Sutton and Waterston (1966); Punithalingam and Holliday (1975) และ Baayen *et al.* (2002) พรพิมลและคณะ (2558) จำแนกชนิดของราสกุล *Phyllosticta* ที่แยกจากส้มโอซึ่งแสดงอาการโรคจุดสีน้ำตาล รวมทั้งราที่ได้จากการศึกษาในปี 2550 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางชีวโมเลกุลสามารถจำแนกชนิดเป็นรา *Phyllosticta citriasiana* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wulandari *et al.*, (2009) รายงานว่าพบรา *P. citriasiana* เป็นสาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ และเป็นรายงานการพบครั้งแรกในประเทศไทย ในปี 2552 ดังนั้น จากการศึกษาสาเหตุของโรคส้มโออาการผลจุดในประเทศไทย พบว่าเป็นโรคจุดสีน้ำตาล (Tan spot disease) สาเหตุเกิดจาก *P. citriasiana*

นอกจากการศึกษานิตเชื้อสาเหตุโรคแล้วยังมีการจัดการป้องกันกำจัดโรค โดยศรีสุรางค์และคณะ (2552) ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคจุดดำในแปลงปลูกส้มโอของเกษตรกร อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย พบว่าสาร azoxystrobin สามารถควบคุมโรคจุดดำได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ carbendazim และ copper oxychloride ปัจจุบันเกษตรกร อ. เวียงแก่น นิยมใช้สารเคมีประเภทดูดซึมเพื่อป้องกันกำจัดโรคจุดสีน้ำตาลในสวนส้มโออย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจเกิดการต้านทานสารเคมีของเชื้อ และมีสารตกค้างในผลผลิต การป้องกันกำจัดโรคให้ได้ผลดีควรใช้วิธีหลายวิธีผสมผสานกัน การใช้ *Trichoderma* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีคุณสมบัติและศักยภาพสูงในการใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช เพราะเป็นราที่อยู่ในดินอาศัยเศษซากพืชซากสัตว์และอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร มีคุณสมบัติเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิดโดยใช้วิธีการเบียดเบียน แข่งขันหรือแย่งใช้อาหารที่เชื้อโรคต้องการ นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะและน้ำย่อยจำพวกเอนไซม์ช่วยละลายผนังเส้นใยของเชื้อโรคพืช และชักนำให้ต้นพืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรคพืช (จิระเดช, 2538) ดังนั้นการใช้รา *Trichoderma* จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยให้เกษตรกรลดการใช้สารเคมี การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของรา *T. harzianum* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. citriasiana* สาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอในห้องปฏิบัติการ ให้ได้รา *T. harzianum* ที่มีประสิทธิภาพดี และนำไปทดสอบควบคุมโรคจุดสีน้ำตาลในแหล่งปลูกส้มโอ อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย ให้ผลผลิตที่มีปริมาณและคุณภาพดีตรงตามความต้องการของตลาดและผู้บริโภค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคจุดน้ำตาลของส้มโอและเชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum*

1.1 เก็บตัวอย่างส้มโอที่แสดงอาการโรคจุดสีน้ำตาลและตัวอย่างดินรอบทรงพุ่มส้มโอต้นที่สมบูรณ์จากสวนส้มโอของเกษตรกร อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง และ อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่ จำนวน 5 ตัวอย่าง นำไปแยกหาเชื้อราสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาล และรา *T. harzianum* ในห้องปฏิบัติการ

1.2 แยกเชื้อราสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลใช้วิธี tissue transplanting โดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณรอยแผลต่อกับเนื้อเยื่อปกติของพืชเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มม.แช่ในสารละลายคลอโรกซ์ 10% 3 นาที ซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง วางบนอาหาร PDA ให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

1.3 แยกเชื้อรา *T. harzianum* จากตัวอย่างดินโดยใช้วิธี Soil Plate Dilution บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ Martin's medium และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA (hypha tip isolation) แล้วเพิ่มปริมาณเชื้อรา *T. harzianum* ที่คัดเลือกได้ ให้รหัสเชื้อแต่ละไอโซเลต และเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารเอียง (PDA slant) สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. citriasiana*

2 ทดสอบการเจริญของเชื้อรา *P. citriasiana* บนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบ 8 ชนิด ได้แก่ PDA PSA PoDA CA MEA OMA V-8 และ WA

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา 8 ชนิด เทในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 ซม. จานละ 10 มล. รอให้ผิวอาหารแข็งตัวก่อนใช้เลี้ยงเชื้อรา จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะขึ้นอาหารวันบริเวณปลายเส้นใยเชื้อรา *P. citriasiana* ที่เตรียมไว้ วางตรงกลางจานอาหารทดสอบทั้ง 8 ชนิด ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 ซม. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญของเส้นใยราทุกวัน เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด เพื่อคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมใช้ทดสอบขั้นตอนต่อไป โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเส้นใยรา} = (100 \times a)/9$$

a = ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยราที่เจริญบนอาหารทดสอบ

3. การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. citriasiana* ด้วย *T. harzianum* โดยวิธี Dual Culture Test

เปรียบเทียบประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *P. citriasiana* โดย *T. harzianum* ซึ่งแยกได้จากดินสวนส้มโอในสภาพธรรมชาติ กับสารชีวภัณฑ์ *Trichoderma* การค้า No.1 และ ชีวภัณฑ์ *Trichoderma* การค้า No.2 โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะขึ้นวันที่มีเส้นใยเชื้อรา *P. citriasiana* จากโคโลนีอายุ 7 วัน วางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากขอบจาน 2.0 ซม. และวางขึ้นวันที่มีเส้นใยรา *T. harzianum* ด้านตรงข้ามในแนวเส้นผ่าศูนย์กลางเดียวกัน บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน วัดรัศมีของโคโลนีเชื้อรา *P. citriasiana* ในจานทดสอบและจานควบคุม

ซึ่งไม่มีเชื้อรา *T. harzianum* นำค่าที่ได้คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. citriasiana* จากสูตรดังนี้ (วาสนาและคณะ, 2548)

Percent inhibition of radial growth (PIRG) = $(RC - RT) \times 100 / RC$

RC = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *P. citriasiana* ในจานควบคุม

RT = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *P. citriasiana* ในจานทดสอบ

4. ทดสอบประสิทธิภาพของ *T. harzianum* ในการควบคุมโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอในแปลงเกษตรกร

วางแผนการทดลอง แบบ RCBD มี 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ไอโซเลตของ *T. harzianum* ที่คัดเลือกมาจากข้อ 3

กรรมวิธีที่ 2 *T. harzianum* TKU (ชีวภัณฑ์งานวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

กรรมวิธีที่ 3 ชีวภัณฑ์ *Trichoderma* การค้า # 1

กรรมวิธีที่ 4 สารป้องกันกำจัดโรคพืชอะซ็อกซีสโตรบิน 25% WW/SC

กรรมวิธีที่ 5 พ่นน้ำสะอาด (control)

4.1 เตรียมต้นส้มโอที่สวนของเกษตรกร ต.ม่วงยาย อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย พื้นที่ปลูก 19 ไร่ เป็นส้มโอพันธุ์ทองดีอายุ 18 ปี ซึ่งมีประวัติการระบาดของโรคจุดสีน้ำตาลติดต่อกันหลายปี เตรียมต้นส้มโอที่คัดเลือกไว้จำนวน 20 ต้น ทำการตัดแต่งกิ่งและทำความสะอาดสวนเก็บเศษซากใบกิ่ง ผลส้มโอเป็นโรคออกจากสวน เพื่อลดแหล่งระบาดของโรคภายในสวน ปฏิบัติการดูแลตามคำแนะนำ GAP ของกรมวิชาการเกษตร ประเมินผลการเกิดโรคจุดสีน้ำตาลในเดือนพฤศจิกายน พบว่าการเกิดโรคค่อนข้างต่ำ ค่าเฉลี่ยของโรคอยู่ระหว่าง 11.2-13.7%

4.2 ทดสอบการใช้รา *T. harzianum* เพื่อควบคุมการเกิดโรคจุดสีน้ำตาลในสวนส้มโอ โดยผลิตเชื้อ กรรมวิธีที่ 1 และ 2 ในรูปของเชื้อสดเลี้ยงขยายเชื้อบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราอายุได้ 3 วัน จึงตัดส่วนปลายโคโลนีไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารข้าวหุงสุกนาน 7-10 วัน ให้ราสร้างสปอร์สีเขียว นำไปผสมกับปุ๋ยหมักที่อัตรา 1:1 โดยน้ำหนัก หวานใต้ทรงพุ่มของต้นส้มโอตามกรรมวิธี ใช้อัตรา การหว่าน 2 กก./ต้น จำนวน 6 ครั้ง ตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์-พฤษภาคม จากนั้นใช้สปอร์แขวนลอยของ *T. harzianum* ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml พ่นอัตรา 10 ล./ต้น ตั้งแต่เดือน มิถุนายน-สิงหาคม จำนวน 6 ครั้ง ห่างกัน 15 วัน/ครั้ง (Figure 1) การใช้ชีวภัณฑ์การค้า No.1 อัตราการใช้ตามฉลากแนะนำคือ ผสมกับปุ๋ยหมักอัตรา 100 กก.:1กก. การใช้สารอะซ็อกซีสโตรบิน พ่นอัตรา 10 มล./น้ำ 20 ล. พ่นห่างกัน 15 วัน/ครั้ง ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์-กรกฎาคม รวม 10 ครั้ง สำหรับการพ่นน้ำเปล่าจะพ่นน้ำให้ทั่วทรงพุ่มต้นส้มโอ อัตรา 10 ล./ต้น ห่างกัน 15 วัน/ครั้ง

4.3 วิธีการเขตกรรมที่ใช้ร่วมกัน ได้แก่ จัดการสุขอนามัยในสวน ตัดแต่งส่วนที่เป็นโรคเก็บเศษซากพืชได้ทรงพุ่มออกทำลายนอกแปลง เพื่อลดปริมาณเชื้อโรคจุดสีน้ำตาลในสวนส้มโอ ใส่ปุ๋ยหมักหลังตัดแต่งกิ่งจำนวน 50 กก./ต้น ก่อนการใส่เชื้อ *Trichoderma* กรรมวิธีต่าง ๆ

4.4 ประเมินโรคจุดสีน้ำตาลที่ปรากฏในสวนส้มโอในแต่ละกรรมวิธี ทุก 60 วัน และบนผลส้มโอระยะที่สุกแก่ ทำการเก็บเกี่ยวออกจากต้น นำออกมาตรวจนับการเกิดโรคในห้องปฏิบัติการ โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และระดับความรุนแรงของโรคบนใบ และผลส้มโอ ซึ่งตัดแปลงจากวิธีการของ ศรีสุรางค์และคณะ (2552) โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคเป็น 6 ระดับ คือ

- ระดับ 0 = ไม่พบแผลโรคจุดสีน้ำตาล
 ระดับ 1 = พบแผลโรคจุดสีน้ำตาล
 1-5 แผลต่อใบ/ผล
 ระดับ 2 = พบแผลโรคจุดสีน้ำตาล
 6-10 แผลต่อใบ/ผล
 ระดับ 3 = พบแผลโรคจุดสีน้ำตาล
 11-25 แผลต่อใบ/ผล
 ระดับ 4 = พบแผลโรคจุดสีน้ำตาล
 26-50 แผลต่อใบ/ผล
 ระดับ 5 = พบแผลโรคจุดสีน้ำตาล
 มากกว่า 50 แผลต่อใบ/ผล

4.5 นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ซึ่งได้จากสูตร (จำนวนใบ/ผลที่เกิดโรค x 100)/จำนวนใบ/ผลทั้งหมดที่ประเมิน (20 ใบ/ผลต่อต้น) และนำระดับความรุนแรงของโรค ในแต่ละกรรมวิธีไปหาค่าเฉลี่ยเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. จำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอและเชื้อรา *T. harzianum*

ผลการเก็บตัวอย่างดินใต้ทรงพุ่มต้นส้มโอจากแหล่งปลูก สามารถแยกเชื้อรา *Trichoderma* บริสุทธิ์จากตัวอย่างดินได้จำนวน 44 ไอโซเลต สำหรับเชื้อสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอสามารถแยกเชื้อรา *Phyllosticta* sp. บริสุทธิ์ได้ 3 ไอโซเลต คือ CR-L 01 จากใบส้มโอ จ. เชียงราย CR-F 09 แยกจากผลส้มโอ จ. เชียงราย (Figure 2) และ CM-F 05 จากผลส้มโอ จ. เชียงใหม่ เมื่อศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA และลักษณะของโคโลนี พบว่า ไอโซเลต CR-F 09 มีลักษณะตรงกับการศึกษาของ พรพิมลและคณะ (2558) ที่จำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลเป็นรา *P. citriasiana* จึงเลือกเชื้อราไอโซเลต

CR-F 09 สำหรับการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. ทดสอบการเจริญของเชื้อรา *P. citriasiana* บนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ผลทดสอบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. citriasiana* ไอโซเลต CR-F 09 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิด คือ PDA PSA PoDA CA MEA OMA V-8 และ WA ผลการทดลองในช่วง 2-10 วันหลังการบ่มเชื้อพบว่าเส้นใยของเชื้อรา *P. citriasiana* เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร PoDA รองลงมาได้แก่อาหาร OMA PSA และ PDA ตามลำดับ แต่เมื่อระยะเวลาการบ่มเชื้อนาน 14 วัน พบว่าเส้นใยของรา *P. citriasiana* เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA มีอัตราการเจริญของเส้นใยเท่ากับ 98.2% รองลงมาคือ อาหาร PoDA และ PSA ซึ่งอัตราการเจริญเท่ากับ 96.4 และ 88.9% (Figure 3) แต่อัตราการเจริญของเส้นใยเชื้อบนอาหารทั้ง 3 สูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 1) ในขณะที่อาหาร PDA ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราทั่วไป เชื้อรา มีอัตราการเจริญ 82.2% ดังนั้นจึงใช้อาหารสูตร OMA PoDA หรือ PSA ในการทดสอบต่อไป

3. การยับยั้งการเจริญของของเส้นใยรา *P. citriasiana* ด้วย *T. harzianum* โดยวิธี Dual Culture Test

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA หลังจากบ่มเชื้อไว้ 1 วัน พบว่า รา *T. harzianum* จำนวน 44 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. citriasiana* ได้มากกว่า 20.0% ในขณะที่ชีวภัณฑ์ *Trichoderma* การค้า No.1 และชีวภัณฑ์ *Trichoderma* การค้า No.2 สามารถยับยั้งได้ 10.5 และ 15.8 % เมื่อบ่มเชื้อนาน 3 วัน พบว่า รา *T. harzianum* จำนวน 5 ไอโซเลต คือ T2 T5 T7 T12 และ T30

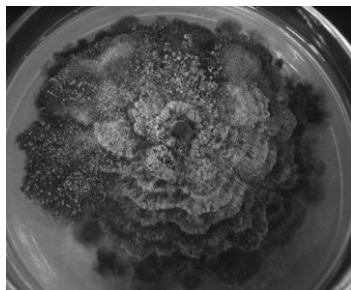


(a)

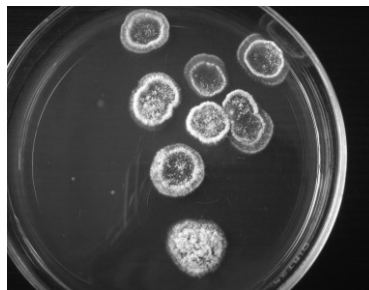


(b)

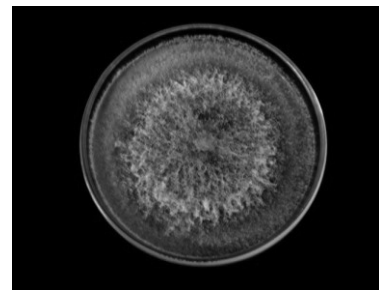
Figure 1 The mixture of *T. harzianum* and compost direct applied to the soil around the canopy (a) Spraying of spore suspension of *T. harzianum* on pummelo canopy (b)



(a)



(b)



(c)

Figure 2 Colony of *P. citriasiana* growth on PDA medium (a) *Trichoderma* spp. isolated from soil of pummelo orchard on Martin's medium (b) and colony of *T. harzianum* on PDA medium (c)

สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. citriasiana* เพิ่มขึ้นเป็น 40.0% นอกจากนั้นยัง พบว่า รา *T. harzianum* อีก 7 ไอโซเลต ได้แก่ T4 T9 T10 T14 T21 T29 และ T35 สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. citriasiana* สาเหตุโรคจุดน้ำตาลได้ 43.3-50.0% และเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน พบว่า T35 ยังคงมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้สูงสุด 52.1% รองลงมาได้แก่ T10

และ T9 ยับยั้งได้ 51.0 และ 50.0% แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างกันกับชีวภัณฑ์ *Trichoderma* การค้า No.2 (Table2) จากผลการทดลองนี้จึงนำรา *T. harzianum* ไอโซเลต T35 ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. citriasiana* ไปทดสอบการควบคุมโรคจุดสีน้ำตาลในแหล่งปลูกส้มโอ อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย

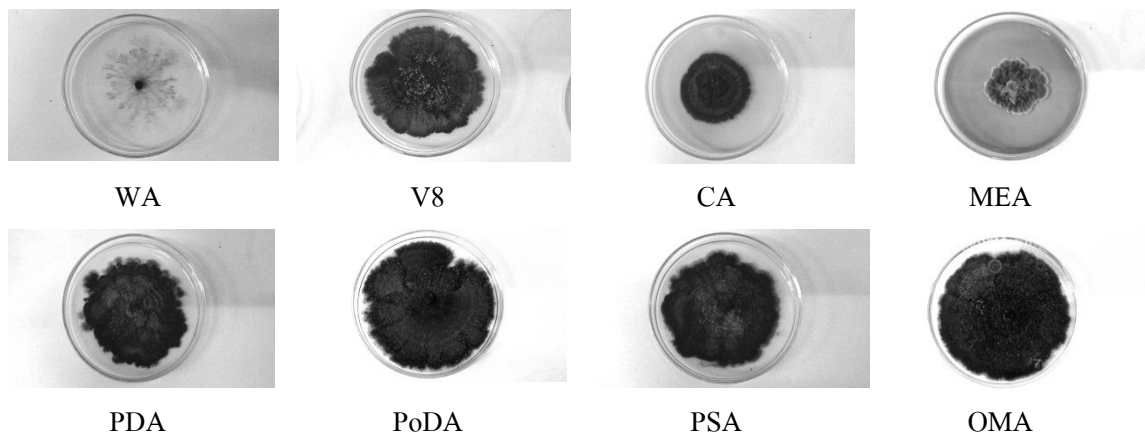


Figure 3 Mycelium growth of *P. citriasiana* on 8 different types of agar media after 14-days of incubation

Table 1 Mycelium growth rate of *P. citriasiana* on 8 types of media after incubated 2-14 days at room temperature

Media	Growth rate of mycelium (%)				
	2-day	4-day	6-day	10-day	14-day
WA	11.6	26.0	34.9	50.0	57.8 c ¹
V 8	9.8	13.1	16.4	27.8	49.6 c
CA	14.4	24.8	38.1	65.6	85.5 b
PDA	15.1	26.4	40.0	69.4	82.2 b
PSA	16.9	28.9	40.7	68.2	88.9 ab
PoDA	20.0	40.0	57.4	91.4	96.4 a
OMA	18.7	36.4	54.4	82.2	98.2 a
MEA	15.5	22.6	27.8	37.2	58.7 c
CV (%)	-	-	-	-	9.5

¹ Mean in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% Level by DMRT

Table 2 Efficacy of *T. harzianum* for inhibition of mycelial growth of *P. citriasiana* on PSA medium after 1, 3 and 5 days of incubation

Isolates of <i>T. harzianum</i>	Mycelial growth inhibition (%) ^{1/}		
	1 day	3days	5 days
T1	21.0	36.7	37.5 a ^{2/}
T2	36.8	40.0	43.8 a
T4	26.3	43.3	46.9 a
T5	21.0	40.0	43.8 a
T7	21.0	40.0	42.7 a
T9	31.6	50.0	50.0 a
T10	42.1	50.0	51.0 a
T12	21.0	40.0	41.7 a
T14	26.3	46.7	49.0 a
T15	21.0	36.7	39.6 a
T17	21.0	33.3	36.5ab
T21	26.3	43.3	41.7 a
T24	21.0	36.7	38.6 a
T29	26.3	43.3	45.8 a
T30	26.3	40.0	44.8 a
T35	31.6	50.0	52.1 a
T40	21.0	36.7	41.6 a
Commercial product No.1	10.5	26.7	31.3ab
Commercial product No.2	15.8	26.7	17.7 b
CV (%)	-	-	26.4

^{1/} Percentage of inhibition of mycelial growth followed as

(RC- RT) × 100 / RC

RC = the radius of colony of *P. citriasiana* in petri-dish without *T. harzianum*

RT = the radius of colony of *P. citriasiana* in petri-dish with *T. harzianum*

^{2/} Mean in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% Level by DMRT

4. ทดสอบประสิทธิภาพของรา *T. harzianum* ในการควบคุมโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอในแปลงเกษตรกร

ผลการประเมินการเกิดโรคของส้มโอตามกรรมวิธี พบว่า ในเดือนมกราคม วิธีที่ใช้ TKU ผลส้มโอเกิดโรคเพียง 6.2% ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ รองลงไปได้แก่ T35 และสารอะซ็อกซีสโตรบิน เป็นโรคเท่ากัน คือ 7.5% สำหรับเดือนมีนาคมการใช้ TKU และสารอะซ็อกซีสโตรบิน พบว่าส้มโอเกิดโรคต่ำสุด 6.2% เท่ากัน ในเดือนพฤษภาคมพบว่าสารอะซ็อกซีสโตรบิน T35 และ TKU เกิดโรค 10.0 11.2 และ 13.7% ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติในขณะที่กรรมวิธีควบคุม พบส้มโอเป็นโรคสูงสุด 20% (Table 3) เมื่อพิจารณา

ระหว่างพฤศจิกายน 2557-พฤษภาคม 2558 จะเห็นว่า การเกิดโรคจุดสีน้ำตาลภายในสวนทดลองค่อนข้างต่ำ ซึ่งตรงกับลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุของโรคบนพืช เชื้อราจะมีระยะฟักตัว (latent period) เป็นเวลาประมาณ 4-5 เดือน (ศรีสุรางค์และคณะ, 2552) ก่อนที่จะแสดงอาการของโรคบนผลส้มโอ ซึ่งเป็นระยะผลสุกแก่ใกล้เก็บเกี่ยว ดังนั้นจึงตรวจสอบโรคที่เกิดบนผลส้มโอหลังเก็บเกี่ยวจากต้น โดยการตรวจนับจำนวนผลที่เกิดโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และจำนวนจุดแผลของโรคจุดสีน้ำตาลบนผลส้มโอแล้วให้คะแนนความรุนแรงของโรค

Table 3 Effect of *T. harzianum* , bio-control agent and fungicide to control tan spot disease in pummelo orchard before harvesting

Treatment	Disease incident (%) ¹			
	Nov 2014	Jan 2015	March 2015	May 2015
1 T-35	12.5	7.5	7.5	11.2 a ²
2 T-KU	13.7	6.2	6.2	13.7 ab
3 commercial product No.1	13.7	8.7	10.0	16.2 bc
4 azoxystrobin 25%WV/SC	12.5	7.5	6.2	10.0 a
5 control	11.2	8.7	10.0	20.0 c
CV (%)	21.8	48.9	38.9	21.5

¹ Percent of disease incident averaged from 4 replications

² Mean in the same column followed by a common letter are not significantly different at the 5% Level by DMRT

การประเมินผลการเกิดโรคจุดสีน้ำตาลบนผลส้มโอที่เก็บเกี่ยวปลายเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558 พบว่า สารอะซ็อกซีโตรบิน ให้ผลควบคุมโรคบนผลส้มโอได้ดีที่สุด มีผลส้มโอปกติที่ปราศจากอาการแผลจากโรคจุดสีน้ำตาล 22.5% รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่ใช้ TKU ได้ผลผลิตปกติคุณภาพดี ไม่มีอาการแผลจากโรคจุดสีน้ำตาลเท่ากับ 7.5% ในขณะที่ T35 และชีวภัณฑ์การค้า No.1 ไม่สามารถควบคุมโรคจุดสีน้ำตาลในระยะผลส้มโอใกล้สุกแก่ได้ทัน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจำนวน

จุดแผลเฉลี่ยบนผลส้มโอ พบว่า การพ่นสารอะซ็อกซีโตรบิน สามารถป้องกันโรคบนผลส้มโอได้ดี เกิดจุดแผลเฉลี่ยต่ำสุด 6.95 แผล ความรุนแรงของโรคระดับ 2.0 รองลงไปได้แก่ TKU เกิด 9.47 แผล ความรุนแรงโรค 2.0 ขณะที่ T35 และชีวภัณฑ์การค้า No 1 เกิดจุดแผล 12.60 และ 13.35 แผล ส่วนกรรมวิธีควบคุมเกิดแผล 15.72 แผล ความรุนแรงของโรคระดับ 3.0 เท่ากัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 4)

Table 4 Effect of *T. harzianum*, bio-control agent and fungicide for control tan spot disease on pummelo fruit after harvesting

Treatment	Normal fruit (%)	Dis. Fruit ¹ (%)	No. of tan spot lesion on fruit	Dis. Severity ²
1 T35	0.0	100.0	12.60	3.0
2 TKU	7.5	92.5	9.47	2.0
3 commercial product #1	2.5	97.5	13.35	3.0
4 azoxystrobin	22.5	77.5	6.95	2.0
5 control	7.5	92.5	15.72	3.0
CV (%)	-	-	55.3	

¹ Disease incident of pomelo fruit averaged from 4 replications

² Disease severities evaluated from the number of lesions on fruit divided by 6 levels

0 = no symptom

1 = 1-5 lesions/fruit

2 = 6-10 lesions/fruit

3 = 11-25 lesions/fruit

4 = 26-50 lesions/fruit

5 = more than 50 lesions/fruit

จากผลการทดลองนี้ พบการเกิดโรคบนผลส้มโอค่อนข้างสูงมาก เพราะเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคตรวจนับจากจำนวนผลที่เกิดโรคส้มเก็บจากต้นทดลอง แม้ว่าการเกิดโรคของผลจะเกิดจำนวนผลเพียง 1-2 ผล ก็นับว่าเป็นโรค ซึ่งส้มโอที่มีอาการจุดแผลดังกล่าว ไม่เป็นที่ต้องการของตลาดเพื่อการส่งออก ปัจจัยประการหนึ่งอาจเนื่องมาจากต้นส้มโอมีอายุมากถึง 18 ปี ทรงพุ่มแน่นทึบ ความชื้นภายในสวนสูงและมีประวัติโรคจุดสีน้ำตาลระบาดในสวนติดต่อกัน 3-4 ปี ทำให้การควบคุมโรคมีประสิทธิภาพต่ำ นอกจากนั้นช่วงผลส้มโอกำลังเจริญเต็มที่ใกล้สุกแก่ มีสภาพอากาศที่ค่อนข้างร้อน อุณหภูมิประมาณ 30-40 °ซ และมีฝนตกติดต่อกันหลายวันในฤดูฝน เป็นสภาพที่เหมาะสมของเชื้อสาเหตุโรคที่จะสร้างสปอร์จำนวนมาก ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการแพร่ระบาดของโรคภายในสวน และถ้าเกิดมีฝนตกติดต่อกันนาน 1-2 วัน ก็ควรพ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชทันทีหลังฝนตกแล้วภายใน 3-5 วัน เพราะหลังจากฝนหยุดตกจะเป็นระยะที่มีความชื้นเหมาะสมของเชื้อราสาเหตุโรคในการสร้างสปอร์จำนวนมาก (ศรีสุรางค์และคณะ, 2552) ผลการทดสอบนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นสำหรับการใช้รา *T. harzianum* เพื่อควบคุมโรคจุดสีน้ำตาลในสวนส้มโอ ซึ่งมีความเป็นไปได้หากนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการเกษตรกรรมให้เหมาะสมเพื่อลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช แต่จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับอัตราการใช้ระยะเวลาการใช้ที่เหมาะสม จำนวนครั้ง หรือความถี่ของการใช้เพื่อให้เหมาะสมกับช่วงระยะ

เวลาการแพร่ระบาดของโรคจุดสีน้ำตาล และควรพัฒนารูปแบบของเชื้อรา *T. harzianum* ที่จะนำไปใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลอง

รา *T. harzianum* ไอโซเลต T35 ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. citriasiana* สาเหตุโรคจุดน้ำตาลของส้มโอในห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา *P. citriasiana* สูง 52.1% ผลการทดสอบควบคุมโรคจุดน้ำตาลในสวนส้มโอของเกษตรกร พบว่า การใช้รา *T. harzianum* (T35) มีประสิทธิภาพควบคุมการเกิดโรคจุดน้ำตาลในแปลงก่อนการเก็บเกี่ยวได้ดี ไม่แตกต่างจากการใช้สารอะซ็อกซิสโตรบิน และ TKU แต่หลังเก็บเกี่ยวพบว่าการใช้ T35 ผลส้มแสดงอาการของโรค 100 % และมีความรุนแรงของโรคอยู่ที่ระดับ 3 ขณะที่การใช้สารอะซ็อกซิสโตรบิน พบการเกิดโรค 77.5 % และมีความรุนแรงอยู่ที่ระดับ 2

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสุพิน โนระ เกษตรกร ต. ม่วงยาย อ. เวียงแก่น จ. เชียงราย เอื้อเพื่อให้ใช้สวนส้มโอในการทดลอง ขอขอบคุณ นางสาวทิพวรรณ ปัญญาสิทธิ์ นักวิชาการเกษตร นายดาวรุ่ง สุริยนต์ นางอุรา เนตรสุวรรณ และนายไพโรจน์ พรหมวงศ์ พนักงานราชการ ศูนย์วิจัยพืชสวน เชียงราย ที่ช่วยปฏิบัติงาน และเก็บบันทึกข้อมูลในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา : ตอนที่ 2 หลักการและบทบาท. *วารสารเคหการเกษตร*; ปีที่ 19(10); 159-165.
- พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช สุธามาต ณ น่าน บุรณี พัวงษ์แพทย์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และไมตรี พรหมมินทร์. 2550. โรคจุดดำของส้มโอสาเหตุเกิดจากรา *Guignardia citricarpa*. หน้า 1-12. ใน *การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 “อารักขาพืชไทยได้ร่วมพระบารมี”* ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก. 20-22 พฤศจิกายน 2550.
- พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเตือ และชนินทร ดวงสะอาด. 2558. การจำแนกชนิดของราสกุล *Phyllosticta* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ปี 2558. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร.
- พัฒนา สนธิรัตน์. 2542. *ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุล ชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จัดพิมพ์โดย กรมส่งเสริมการเกษตร. 284 หน้า.
- วาสนา ฤทธิไธสง วรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และชวลิต ฮงประยูร. 2548. การควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศสาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ด้วยการใช้ราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ร่วมกับธาตุแคลเซียมและซิลิกอน. *วิทยาสารกำแพงแสน* 3 (1):8-17.
- ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช พรพิมล อธิปัญญาคม มนตรี ทศานนท์ สุธามาต ณ น่าน บุรณี พัวงษ์แพทย์ นภสร ปุญญพิทักษ์ รัตตาสุทธยาคม และไมตรี พรหมมินทร์. 2552. *การจัดการโรคจุดดำของส้มโอพันธุ์ทองดีเพื่อการส่งออก*. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม. กองทุนสนับสนุนงานวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 42 หน้า.
- Baayen, R.P., P.J.M. Bonants, G. Verkley, G.C. Carroll, H.A. van dew Aa, M. de Weerd, I.R. van Brouwershaven, G.C. Schutte, W. Maccheroni Jr., C. Glienke de Blanco and J.L. Azevedo. 2002. Nonpathogenic isolates of the Citrus Black Fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*).
- European Union. 2000. Special requirement of import plants, plant products and other object originating in third countries. *OJEC*. 169:44-45.
- Kiely, T.B. 1949. Black spot of citrus in New South Wales coastal orchards. *Agric. Gaz. of N.S.W.* 60: 17-20.

- Kotze, J.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Dis.* 65: 945-950.
- Punithalingam, E. and P. Holliday. 1975. *Guignardia musae*. No. 467 In: *CMI Descriptions of Pathogenic fungi and bacteria*. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.
- Sutton, B.C. and J.M. Waterston. 1996. *Guignardia citricarpa*. No. 85 In: *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.
- Wulandari, N.F., To-anun, C., Hyde, K.D., Duong, L.M., de Gruyter, J., Meffert, J.P., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of Citrus maxima in Asia. *Fungal Divers.* 34: 23-39.