การคัดเลือกและทดสอบเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล

Screening and Efficacy Testing of Antagonist Fungal for Controlling Gummy Stem Blight Disease caused by *Didymella bryoniae*

ทัศนาพร ทัศคร วัชรี วิทยวรรณกุล บังอร นวลศรี

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Screening and Efficacy testing of antagonistic fungi activity against *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. causal agent of Gummy Stem Blight (GSB) disease were performed. Thirty one isolates of *Trichoderma* spp. were shown as highly effective antagonistic characteristic exhibiting mycelia growth inhibition on PDA agar. Spraying and Soil surface with spore suspension method were used to select ten *Trichoderma* spp. (TC59-04, TC59-05, TC59-06, TC59-07, TC59-08, TC59-10, TC59-16, TC59-19, TC59-26 and TC59-30) under greenhouse condition by seven days intervals period repeated four times were performed. The results indicated that five isolates of *Trichoderma* spp. such as TC59-05, TC59-07, TC59-26, TC59-16 and TC59-19 exhibited disease inhibition in leaf and stem lesion. As a result, This study can be used for further study in application of biocontrol agents control Gummy Stem Blight disease under field condition in the further.

Keywords : Gummy Stem Blight, *Didymella bryoniae*, Biological Control, Melon

รหัสการทดลอง 01-22-59-01-02-00-01-59

บทคัดย่อ

ทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. จากปี 2558 - 2559 จำนวน 31 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท TC59-01 – TC59-031 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 31 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพที่ดีมากในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค และมีกลไกในการควบคุมไม่ให้เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคมีการเจริญได้ภายใน 3 วัน จากนั้นได้คัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท TC59-04, TC59-05, TC59-06, TC59-07, TC59-08, TC59-10, TC59-16, TC59-19, TC59-26 และ TC59-30 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดแผลบนต้นและใบพืชใน สภาพโรงเรือนทดลอง โดยวิธีการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และวิธีราดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทลงในดิน จำนวน 4 ครั้ง ทุก 7 วัน และทำการประเมินการเกิดโรคและการวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นทุกครั้งก่อนการการพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ เปรียบเทียบกับวิธีการพ่นน้ำเปล่า ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการเกิดแผลได้ดีทั้งในใบและลำต้น มีอย่างน้อย 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท TC59-05, TC59-07, TC59-26, TC59-16 และ TC59-19 ซึ่งในการศึกษาครั้งต่อไป สามารถนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพไปพัฒนารูปแบบการนำไปใช้ในสภาพแปลงทดลองต่อไป

คำหลัก : โรคยางไหล *Didymella bryoniae* การป้องกันกำจัดโรคโดยชีววิธี แตงเมล่อน

คำนำ

พืชตระกูลแตง (cucurbitaceae) เป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมปลูกกันมากในทุกประเทศ ซึ่งมีหลายชนิดได้แก่ แตงกวา แตงร้าน ฟัก แฟง ฟักทอง มะระ บวบ แตงโม แตงเทศ (แคนตาลูป) และแตงเมล่อน เป็นต้น พืชตระกูลแตงที่นิยมปลูกในประเทศไทย มีทั้งเพื่อรับประทานผลสดและเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งต่างประเทศ ในการผลิตเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงเพื่อการส่งออกนั้นเกษตรกรจะปลูกพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่จากเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ จึงอาจส่งผลให้เกิดปัญหาโรคของพืชตระกูลแตงเพิ่มมากขึ้น อาจเนื่องมาจากเมล็ดพันธุ์ไม่สะอาด มีการปนเปื้อนของเชื้อสาเหตุของโรคมากับเมล็ดพันธุ์ เมื่อนำเมล็ดที่มีเชื้อสาเหตุโรคมาปลูกจะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคในแปลงปลูกด้วย (จุมพล และอรพรรณ, 2532) ซึ่งโรคที่สำคัญและทำความเสียหายให้กับพืชตระกูลแตงคือ โรคราแป้ง โรคราน้ำค้าง โรคแอนแทรคโนส โรคต้นแตกยางไหล และโรคเหี่ยวเหลืองของแตงเทศ

โรคยางไหล (Gummy Stem Blight) เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. เป็นโรคสำคัญที่พบมีการระบาดและเข้าทำลายในพืชตระกูลแตง ประเทศไทยพบมีการระบาดในพืช

ตระกูลแตง ในพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ลักษณะอาการของโรคเริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง ลักษณะสำคัญของโรคคือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ซึ่งด้วยลักษณะอาการของโรคเช่นนี้ จึงได้มีการตั้งชื่อโรคตามอาการโรคที่พบ คือ โรคยางไหล ถ้าโรคมีการระบาดในระยะที่ติดผล จะทำให้ต้นแตงมีการเจริญเติบโตช้า ผลโตไม่เต็มที่ และในต้นที่อาการรุนแรงมาก ต้นจะเหี่ยวแห้งและยืนต้นตาย ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง บางครั้งเกษตรกรจึงรีบเก็บผลผลิตก่อน ทั้งที่แตงยังสุกไม่เต็มที่ทำให้ผลผลิตของแตงไม่ได้คุณภาพ (ทัศนาพร และพีระวรรณ, 2552)

ลักษณะอาการของโรคยางไหล เริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง หลังจากนั้นส่วนทีเป็นแผลจะบุ๋มลึก และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง ลักษณะสำคัญของโรคคือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ส่วนอาการที่ใบก็จะพบใบเป็นแผลฉ่ำน้ำก่อน จากนั้นแผลที่ใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลุกลามไปตามเส้นกลางใบทำให้ใบไหม้ วงจรการเกิดโรคของเชื้อรา *D. bryoniae* สามารถอาศัยและติดไปได้ทั้งในเมล็ดพันธุ์และดิน (seed borne, soil borne) และอยู่ข้ามฤดูได้เป็นเวลานานในเศษซากพืชที่เป็นโรค โดยอาศัยอยู่ใน perithecium เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมคือ มีความชื้นสูง perithecium ที่อยู่บนเศษซากพืชก็จะเจริญแล้วสร้าง และปล่อย conidia ออกมา และ conidia นี้สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำฝน หรือระบบการให้น้ำ การป้องกันกำจัดโรคมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การเขตกรรมโดยการไถตากดินเพื่อฆ่าเชื้อโรคในดิน การปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชอาศัยเพื่อตัดวงจรของเชื้อราสาเหตุโรคพืช การใช้พันธุ์ต้านทาน และการใช้สารเคมี สำหรับการใช้พันธุ์ต้านทานนั้นมีค่าใช้จ่ายสูงอีกทั้งการใช้สารเคมีทำให้ต้นทุนการผลิตสูง และเกิดการตกค้างของสารเคมีในพืช สภาพแวดล้อม รวมไปถึงเกษตรกรเอง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ปัจจุบันได้มีการศึกษาการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอย่างกว้างขวาง Sudisha และคณะ (2005) ได้ทดสอบผลของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ชนิด คือ เชื้อรา *T. hazianum* และ*Pseudomonas fluorescens* ในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้และเพิ่มผลผลิตของแคนตาลูปด้วย และ Abd-El-Moity และคณะ (2009) ได้รายงานว่าการใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* , *Bacillus subtilis* ผสมร่วมกับเชื้อรา *T. hazianum* ในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อราในพืชตระกูลแตงได้ดีเช่นเดียวกัน การเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมีได้ ดังนั้นเพื่อให้การป้องกันกำจัดโรคยางไหลมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปสู่การจัดการโรคแบบผสมผสานได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาและทดสอบเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดโรคยางไหลของพืชตระกูลแตง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก กล่องเก็บความเย็น ปากกา กรรไกร ฯลฯ
3. อุปกรณ์เครื่องมือ และเครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ
4. กล้องถ่ายภาพ
5. เมล็ดพันธุ์แตงเมล่อน พันธุ์ มรกต
6. กระถาง
7. ดิน
8. กระบอกฉีดแบบอัดแรงดัน
9. ปุ๋ยสูตร 15-15-15, 21-21-21
10. ไม้ไผ่รวก

วิธีการ

1. การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *D. bryoniae* ในห้องปฏิบัติการ

1. การแยกเชื้อราปฏิปักษ์

เก็บตัวอย่างต้นพืชตระกูลแตง ที่แสดงอาการเป็นโรค และต้นที่ปกติ จากแหล่งปลูกที่สำคัญ เพื่อนำมาแยกหาเชื้อราปฏิปักษ์โดยวิธี leaf washing technique และเก็บตัวอย่างดินมาแยกหาเชื้อราปฏิปักษ์โดยวิธี Soil dilution plate โดยชั่งดิน จำนวน 10 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 นาที จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ไปทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution โดยใช้ความเข้มข้นที่ 10^{-5} - 10^{-6} เท่าและใช้ micropipette ดูดสารละลายในแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหาร Martin's Medium, NGA และ PDA จำนวน 4 ซ้ำต่อตัวอย่าง ใช้แท่งแก้วงอกระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อ 24 ชั่วโมง เมื่อมีราเจริญบนอาหาร ทำการบันทึกลักษณะของเชื้อ และแยกเชื้อเก็บไว้ให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *D. bryoniae* ในห้องปฏิบัติการต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อรา *D. bryoniae* ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual Culture technique โดย เลี้ยงเชื้อรา *D. bryoniae* บนอาหาร PDA อายุ 5 วัน ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซ.ม เจาะเส้นใย รา. *D. bryoniae* ย้ายไปวางห่างจากขอบจาน 1 ซ.ม. จากนั้นนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากข้อที่1 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซ.ม เจาะเส้นใย และย้ายไปวางห่างจากขอบจาน 1 ซ.ม. เช่นเดียวกัน โดยให้เชื้อราทั้งสองอยู่ตรงข้ามกัน ทำการบันทึกผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา *D. bryoniae* และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราปฏิปักษ์ คัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยไว้ เพื่อการทดสอบขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในสภาพโรงเรือนทดลอง

เลี้ยงขยายเชื้อราปฏิปักษ์ จำนวน 10 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการทดลองวางแผนการทดลอง CRD จำนวน 4 ซ้ำ มี 11 กรรมวิธีๆ คือ เชื้อราปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ 10 ไอโซเลท

กรรมวิธีที่ 1 แช่เมล็ดแตงและพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-04

กรรมวิธีที่ 2 แช่เมล็ดแตงและพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-05

กรรมวิธีที่ 3 แช่เมล็ดแตงและพ่นชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-06

กรรมวิธีที่ 4 แช่เมล็ดแตงและพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-07

กรรมวิธีที่ 5 แช่เมล็ดแตงและพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-08

กรรมวิธีที่ 6 แช่เมล็ดแตงและพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-10

กรรมวิธีที่ 7 แช่เมล็ดแตงและพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-16

กรรมวิธีที่ 8 แช่เมล็ดแตงและพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-19

กรรมวิธีที่ 9 แช่เมล็ดแตงและพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-26

กรรมวิธีที่ 10 แช่เมล็ดแตงและพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลท TC59-30

กรรมวิธีที่ 11 แช่เมล็ดแตงและพ่นน้ำเปล่า (กรรมวิธีควบคุม)

2.1 ทำการแช่เมล็ดแตงเมล่อนจำนวน 100 เมล็ด ลงในสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราปฏิปักษ์ในแต่ละกรรมวิธี นาน 30 นาทีแล้วผึ่งเมล็ดให้แห้ง จากนั้นนำเมล็ดไปปลูกลงในดินที่ปลอดเชื้อสาเหตุโรคและดินที่มีเชื้อสาเหตุโรค จำนวน 10 เมล็ดต่อซ้ำ ทั้งหมด 4 ซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกและการเกิดโรคในระยะกล้า

2.2 ทำการย้ายกล้าแตงเมล่อนลงในดินที่ปลอดเชื้อสาเหตุโรค เมื่อต้นแตงมีอายุประมาณ 30 วัน ให้ทำการปลูกเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลด้วยวิธี toothpick's technique ที่บริเวณลำต้นและใบ นำกระถางที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคแล้วใส่ลงในถุงพลาสติกใสเพื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้ว ทำการเปิดถุง ตรวจเช็คการเกิดโรคที่บริเวณลำต้นพืชและใบพืช และทำการวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้น ก่อนการพ่น spore suspension เชื้อราปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 สปอร์/ม.ล. ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ให้ทั่วต้นพืชทดสอบ ทุก 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง

2.3 ในการทดลองที่ปลูกแตงเมล่อนในดินที่มีเชื้อสาเหตุโรค ได้ทำการย้ายกล้าแตงเทศอายุ 10 วัน ลงในถุงดำขนาด 6x12นิ้ว ลงในดินที่มีเชื้อสาเหตุโรค จำนวน 10 ต้นต่อซ้ำ ทั้งหมด 4 ซ้ำ และทำการใส่ spore suspension เชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลท ลงในดิน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทุก 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง ลงในดินที่ปลูกพืชทดสอบไว้ และทำการเช็คการเกิดโรคทุกครั้งก่อนการใส่เชื้อ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผล เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และประเมินความรุนแรงโรคและวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้นบนต้นแตงก่อนพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ทุกครั้ง โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุเพียงอย่างเดียว และนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลการทดลอง

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2558 - กันยายน 2560

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงปลูกแตงเมล่อนของเกษตรกร จ.สุพรรณบุรี, พะเยา และ สระแก้ว

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อ *D. bryoniae* ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การแยกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นแตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่ปกติ 10 ตัวอย่าง และต้นที่แสดงอาการโรคยางไหล 10 ตัวอย่าง และสุ่มเก็บตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง ที่ จ.สุพรรณบุรี สระแก้ว และพะเยา ในปี 2558-2559 เพื่อแยกหาเชื้อราปฏิปักษ์จากต้นพืชและดิน พบว่า สามารถแยกได้เชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดิน จำนวน 31 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท TC59-01 – TC59-031 (ตารางที่ 1) ส่วนการแยกจากส่วนของพืชพบว่า สามารถแยกได้เป็นเชื้อราสาเหตุโรค *D. bryoniae* และเชื้อราอื่น ๆ ที่ไม่พบมีการสร้างสปอร์ จึงไม่ได้คัดเลือกมาใช้ในการทดสอบครั้งนี้

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อรา *D. bryoniae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ จำนวน 31 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* ในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual Culture technique ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลท มีประสิทธิภาพดีมาก สามารถควบคุมและยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* ได้อย่างรวดเร็ว และสามารถเจริญคลุมทับเส้นใยได้ภายใน 3 วัน ซึ่งมีผลทำให้เส้นใยชื้อราสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญต่อไปได้ กลไกที่สำคัญในการยับยั้งเป็นแบบการแข่งขัน (ภาพที่1) (ตารางที่ 1)

2. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในสภาพโรงเรือนทดลอง

2.1 ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคที่ติดมากับเมล็ดแตง โดยนำเมล็ดแตงเมล่อน จำนวน 100 เมล็ด แช่ลงใน spore suspension เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกได้ จำนวน 10 ไอโซเลท ปริมาตร 100 ม.ล. นาน 30 นาที ผึ่งเมล็ดให้แห้ง และนำเมล็ดไป

เพาะกล้าลงในกระบะเพาะตามกรรมวิธีที่วางไว้ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการแช่ในน้ำเปล่า ผลการตรวจนับการงอกของเมล็ดหลังการเพาะกล้าที่อายุ 7 วัน พบว่า การแช่เมล็ดแตงใน spore suspension ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TC59-04, TC59-06, TC59-16 และ TC59-19 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในไอโซเลทอื่นๆ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดอยู่ที่ 90 - 97.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีแช่ในน้ำเปล่า พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด 80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sudisha และคณะ (2005) ที่ทดสอบผลของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ชนิด คือ เชื้อรา *T. hazianum* และเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* ในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเกิดโรคที่ติดมากับเมล็ดได้ดี

2.2 ในการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในสภาพโรงเรือน โดยปลูกแตงเมล่อนลงในดินที่ปลอดเชื้อสาเหตุโรค เมื่อพืชอายุประมาณ 30 วัน จึงทำการปลูกเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลด้วยวิธี toothpick's technique ที่บริเวณลำต้นพืช จากนั้นนำกระถางพืชที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคแล้ว ใส่ลงในถุงพลาสติกใสเพื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้ว ทำการเปิดถุง และตรวจเช็คการเกิดโรคที่บริเวณลำต้นพืช ทำการวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้น ก่อนการพ่น spore suspension เชื้อราปฏิปักษ์ ผลการทดลองพบว่า เชื้อสาเหตุโรคที่ทำการปลูกเชื้อลงบนต้นพืชทดสอบ สามารถทำให้เกิดโรค และแสดงอาการของโรคยางไหลได้ภายใน 24 ชั่วโมง ทำการพ่นเชื้อรา *Trichoderma* spp. และวัดขนาดของแผลก่อนการพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ทุกครั้ง จำนวน 2 ครั้ง ผลการทดลอง พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TC59-26 มีประสิทธิภาพดีที่สุด สามารถยับยั้งการเกิดแผลได้ดี มีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลที่ต้นพืชเท่ากับ 0.5 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท TC59-16 และ TC59-19 ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดแผลที่ต้นพืชได้ดีเช่นกัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 1.0 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่พ่นเชื้อราปฏิปักษ์ พบว่า มีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 6.13 เซนติเมตร (ภาพที่ 2) (ตารางที่ 3) ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคมีความรุนแรงมาก ทำให้ต้นพืชทดสอบในกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ไม่ได้มีการพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ ตายหลังการพ่นการทดลองครั้งที่ 2 จึงไม่สามารถทำการทดลองพ่นสารจนครบ 4 ครั้งได้ แต่จากการพ่นเชื้อราปฏิปักษ์เพียง 2 ครั้ง ก็เห็นผลการทดลองชัดเจนในไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่พบว่าต้นพืชทดสอบยังสามารถเจริญเติบโตได้ และแผลที่เกิดไม่มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นอีก ซึ่งจะได้ทำการทดลองเพิ่มเติมในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเกิดแผลบนใบพืชต่อไป

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเกิดแผลที่ใบพืชทดสอบ โดยทำการปลูกเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลด้วยวิธี mycerial disc method จากนั้นนำกระถางพืชที่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคแล้ว ใส่ลงในถุงพลาสติกใสเพื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้ว ทำการเปิดถุง และตรวจเช็คการเกิดโรคที่บริเวณใบพืช ทำการวัดขนาดของแผลที่เกิดขึ้น ก่อนการพ่น spore suspension เชื้อราปฏิปักษ์ครั้งแรก ผลการทดลองพบว่า เชื้อสาเหตุโรค

ที่ทำการปลูกเชื้อลงบนใบพืชทดสอบ สามารถทำให้เกิดโรค และแสดงอาการของโรคยางไหลได้ภายใน 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับที่ปลูกเชื้อสาเหตุลงบนต้นพืช จากนั้นได้ทำการพ่นเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 4 ครั้ง ทุก 7 วัน และวัดขนาดของแผลก่อนการพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ทุกครั้ง ผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TC59-16 มีประสิทธิภาพดีที่สุด สามารถยับยั้งการเกิดแผลบนใบได้ดี มีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 1.35 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท TC59-05 และ TC59-19 ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดแผลได้ดีเช่นกัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 2.50 และ 2.48เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่พ่นเชื้อราปฏิปักษ์ พบว่า มีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 5.76 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

2.3 ในการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในสภาพโรงเรือน โดยปลูกแตงเมล่อนในดินที่มีเชื้อสาเหตุโรค และราดดินด้วย spore suspension เชื้อราปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท ปริมาตร 50 ม.ล. หลังการย้ายกล้า 10 วัน จำนวน 4 ครั้ง ทำการตรวจเช็คการเกิดโรคทุกครั้งก่อนการใส่เชื้อ หลังการทดลองใส่เชื้อรา *Trichoderma* spp. ลงดิน ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายต้นพืช และพืชแสดงอาการของโรคเมื่อพืชอายุ 30 วันหลังจากการย้ายกล้า ในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลทลงในดิน ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท TC59-05 สามารถยับยั้งการเกิดโรคยางไหลได้ดีที่สุด มีสามารถยับยั้งโรคได้ดี 100 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบพืชมีอาการของโรค รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท TC59-07 และ TC59-26 สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อ พบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกได้จากปี 2558 - 2559 จำนวน 31 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท TC59-01 – TC59-031 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่า เชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. ทั้ง 31 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพที่ดีมากในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค และสามารถเจริญคลุมทับเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ภายใน 3 วัน

จากนั้นได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท TC59-04, TC59-05, TC59-06, TC59-07, TC59-08, TC59-10, TC59-16, TC59-19, TC59-26 และ TC59-30 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดแผลบนต้นและใบพืชในสภาพโรงเรือนทดลอง ซึ่งผลการทดลองพบว่า

จากการแช่เมล็ดแตงใน spore suspension ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TC59-04, TC59-06, TC59-16 และ TC59-19 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน

ในไอโซเลทอื่นๆ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดอยู่ที่ 90 - 97.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีแช่ในน้ำเปล่า พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด 80 เปอร์เซ็นต์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเกิดแผลที่ใบพืชทดสอบ โดยทำการปลูกเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลด้วยวิธี mycerial disc method ผลการทดลอง พบว่า เชื้อสาเหตุโรคที่ทำการปลูกเชื้อลงบนใบพืชทดสอบ สามารถทำให้เกิดโรค และแสดงอาการของโรคยางไหลได้ภายใน 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับที่ปลูกเชื้อสาเหตุลงบนต้นพืช เมื่อทำการพ่นเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 4 ครั้ง ทุก 7 วัน และวัดขนาดของแผลก่อนการพ่นเชื้อราปฏิปักษ์ทุกครั้ง ผลการทดลอง พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TC59-16 มีประสิทธิภาพดีที่สุด สามารถยับยั้งการเกิดแผลบนใบได้ดี มีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 1.35 เซนติเมตร รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท TC59-05 และ TC59-19 ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดแผลได้ดีเช่นกัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 2.50 และ 2.48เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่พ่นเชื้อราปฏิปักษ์ พบว่า มีค่าเฉลี่ยขนาดของแผลเท่ากับ 5.76 เซนติเมตร

จากการทดลองในครั้งนี้ สามารถคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคยางไหลในแตงเมล่อนได้ดีในการทดลองแต่ละกรรมวิธีในการนำไปใช้ อย่างน้อย 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท TC59-05, TC59-07, TC59-26, TC59-16 และ TC59-19 ซึ่งในการศึกษาต่อไปสามารถนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ไปพัฒนาการนำไปใช้เป็นชีวภัณฑ์ในสภาพแปลงทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ทัศนาพร ทัศคร และ พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2552. โรคยางไหลในแคนตาลูป. จดหมายข่าวผลิใบ ปีที่ 12 ฉบับที่ 3 ประจำเดือน เมษายน 2552. หน้า 2 - 3.

Abd-El-Moity, T.H, M.L Abed –El- Moneim, M.M.M. Tia, A.Z. Aly, M.R.A. Tohomy. 2009. Biological Control of some cucumber diseases under organic agriculture. แหล่งข้อมูล : http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=608_28 (1 ก.ย. 2559)

Sudisha, J., S. R. Niranjana, S. Umesha, H. S. Prakash and H. Shekar Shetty. 2005. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and effect of seed treatment on disease incidence and fruit yield. Biological Control, Vol.37 Issue 2, May. P 196-205.

Table 1 Efficacy of antagonistic fungal for controlling mycerial growth of *D. bryoniae*

Isolate	Source of Isolation	Ø colony of fungi [1/]		Mode of action
		Ø colony of *D. bryoniae* (cm.)	Ø colony of *Trichoderma* sp. (cm.)	
TC59-01	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-02	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-03	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-04	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-05	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-06	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-07	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-08	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-09	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-10	Soil/Corn	-	9.0	Competition
TC59-11	Soil/Melon	-	9.0	Competition
TC59-12	Soil/Melon	-	9.0	Competition
TC59-13	Soil/Melon	-	9.0	Competition
TC59-14	Soil/Melon	-	9.0	Competition
TC59-15	Soil/Melon	-	9.0	Competition
TC59-16	Soil/Melon	-	9.0	Competition
TC59-17	Soil/Melon	-	9.0	Competition
TC59-18	Soil/Melon	-	9.0	Competition
TC59-19	Soil/Melon	-	9.0	Competition
TC59-20	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-21	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-22	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-23	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-24	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-25	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-26	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC5927	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-28	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-29	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-30	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
TC59-31	Soil/Cantalope	-	9.0	Competition
Control	-	9.0	9.0	-

Table 2 Percentage of Melon seeds germination after inoculation with spore suspension of 10 *Trichoderma* spp. Isolates in laboratory

Isolates	% seed germination 7 day after inoculation
TC59-04	100
TC59-05	95
TC59-06	100
TC59-07	92.5
TC59-08	90
TC59-10	90
TC59-16	100
TC59-19	100
TC59-26	97.5
TC59-30	92.5
Control	80

Table 3 Efficacy of 10 *Trichoderma* spp. isolates have inhibiting the lesion on stem of melon in greenhouse

Isolates	Average of lesion on stem of melon before spraying (cm.)	
	1ST	2nd
TC59-04	1.40	3.50
TC59-05	0.40	2.88
TC59-06	1.40	4.75
TC59-07	1.30	5.38
TC59-08	1.50	5.38
TC59-10	2.50	5.50
TC59-16	0.00	1.00
TC59-19	0.50	1.00
TC59-26	0.00	0.50
TC59-30	0.40	1.13
Control	2.10	6.13

Table 4 Efficacy of 10 *Trichoderma* spp. isolates have inhibiting the lesion on leaf of melon in greenhouse.

Isolates	Average of lesion on leaf of melon before spraying (cm.)			
	1ST	2nd	3th	4th
TC59-04	0.95ab1/	2.10b	2.73bc	3.83c
TC59-05	0.98ab	2.10b	3.50cd	2.50b
TC59-06	0.95ab	3.25cd	4.38d	4.90de
TC59-07	1.25bc	2.03b	2.20b	3.15bc
TC59-08	0.95ab	4.10d	4.10cd	4.28d
TC59-10	1.23bc	2.13b	4.13cd	4.78de
TC59-16	0.98ab	0.75a	1.28ab	1.35a
TC59-19	0.75a	0.53a	0.63a	2.48b
TC59-26	0.73a	3.5cd	3.93cd	4.95de
TC59-30	0.65a	2.90bc	3.00c	4.88de
Control	1.53c	5.00e	5.38e	5.76e
CV (%)	26.91	22.16	28.22	16.48

1/ Means of disease incidence with 4 replications. Numbers in a column followed by the same letter are not significantly different by DMRT (Duncan's Multiple Range Test). $P \leq 0.05$

Table 5 Efficacy of 10 *Trichoderma* spp. isolates for controlling Gummy stem blight of melon in greenhouse.

Isolates	Healthy Plant[1/]	Gummy stem blight Disease	Disease incidence (%)
TC59-04	32	8	20
TC59-05	40	0	0
TC59-06	28	12	30
TC59-07	36	4	10
TC59-08	32	8	20
TC59-10	24	16	40
TC59-16	28	12	30
TC59-19	32	8	20
TC59-26	36	4	10
TC59-30	32	8	20
Control	10	30	75

[1/] Total plants are 40 plants

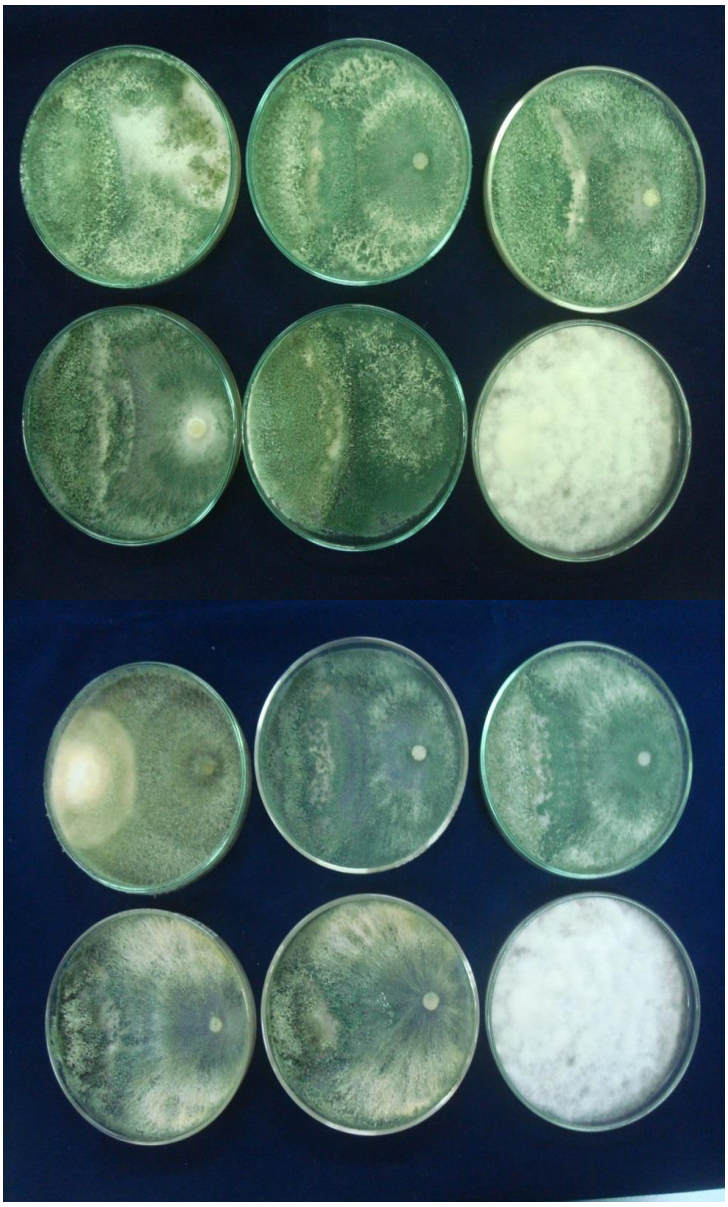

Figure 1 Efficacy of *Trichoderma* spp. isolates inhibition mycerial growth of *D. bryoniae* on PDA agar in laboratory

Figure 2 Efficacy of *Trichoderma* spp. isolates have inhibiting the lesion on stem of melon in greenhouse