รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรที่ใช้เป็นอาหารและเครื่องเทศ

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาพืชเครื่องเทศ

กิจกรรม : ระบุชื่อกิจกรรมตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การทดสอบเทคโนโลยีป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าพริกไทย โดยวิธีชีวภาพ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Testing Biological control of foot rot of black pepper

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	:	นางสาวสุนิตรา คามีศักดิ์	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
ผู้ร่วมงาน	:	นางลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
		นางสาวศรีสุดา โท้ทอง	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน
		นางสาวอนัญญา เอกพันธ์	สังกัด สถาบันวิจัยพืชสวน

5. บทคัดย่อ

การประเมินความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของ *Trichoderma* sp. ต่อการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริกไทย โดยเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพริกไทย จังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด มาแยกเชื้อ *Trichoderma* sp. ด้วยวิธี soil dilution spread plate จำนวน 10 ไอโซเลท และแยกเชื้อสาเหตุของโรค *Phytophthora* sp. จากใบ เถา และโคนต้นที่แสดงการโรค ด้วยวิธี tissue transplanting และนำมาทดสอบความสามารถของการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 11 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ทดสอบด้วยวิธี bi-culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 พบว่าเชื้อ *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยตั้งแต่ 41.22 – 83.54 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อรา *Trichoderma* sp. T-09 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ดีที่สุด 83.54 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวของรัศมีโคโลนีของเชื้อสาเหตุด้านที่เจริญไปทางกรรมวิธีทดสอบ 0.57 เซนติเมตร ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม (control) มีความยาวของรัศมีโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora* sp. เฉลี่ย 3.50 เซนติเมตร

กรมวิชาการเกษตร

จากนั้นจึงได้คัดเลือก *Trichoderma* sp. T-03 และ T-09 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุในสภาพโรงเรือนทดลอง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใช้สารเคมี และกรรมวิธีควบคุม พบว่า Trichoderma ไอโซเลท T-09 และ T-03 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า 21.75 – 25.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 5.30 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด 35.11 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ทั้ง 2 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุใกล้เคียง หรือรองลงมาจากการใช้สารเคมี เพื่อนำไปสู่การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าในพริกไทยโดยชีววิธี และชะลอการต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อราและลดการใช้สารเคมี เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าต่อไป
คำสำคัญ : โรครากเน่าโคนเน่า พริกไทย *Phytophthora* sp. *Trichoderma* sp.

Assessment of antagonistic activity of *Trichoderma* sp. against *Phytophthora* sp. causal agent of foot rot in black pepper. Ten isolates of *Trichoderma* spp. were obtained from soil sample collected from black pepper orchard at Rayong, Chantaburi and Trat province using soil dilution spread plate method. *Phytophthora* sp. was isolated from foot rot symptom on leaf and branches of black pepper using tissue transplanting method. The studies was antagonistic assessment of *Trichoderma* sp. and the experimental design was CRD consists of 11 treatments 3 replications with bi-culture method on V8 media under the laboratory condition. It were found that *Trichoderma* spp. ten isolates had effective to inhibit the growth of *Phytophthora* sp. which has a different percentage of the inhibitory from 41.22 to 83.54%. *Trichoderma* sp. T-09 showed the highest percentage of inbihition, 83.54% and diameter of radial growth of colony, 0.57 centimeter while the control had diameter of radial growth of colony, 3.50 centimeter. In greenhouse, Trichoderma sp. T-03 and T-09 were selected to test their efficacy in inhibition of foot rot of black pepper compared with chemicals and control. It were found that two isolates had effective to inhibit the foot rot nearby to use chemicals. Therefore, *Trichoderma* sp. T-09 which is isolated from Bo Rai District, Trat Province and Trichoderma sp. T-03 is isolated from Tha Mai District, Chantaburi Province. It had the most effective to inhibit the growth of *Phytophthora* sp. and used in further studies.
Keywords : foot rot, black pepper, *Phytophthora* sp., *Trichoderma* sp.

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

พริกไทย (Black pepper, Piper nigrum) เป็นพืชเครื่องเทศที่นิยมนำมาทำเป็นพริกไทยแห้งสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมยา แหล่งปลูกพริกไทยส่วนใหญ่อยู่ในจังหวัดจันทบุรี เพชรบูรณ์

พิษณุโลก และเขตภาคใต้ ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาความต้องการพริกไทยสำหรับอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น แต่ผลผลิตที่ได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด โดยพบว่า ปี 2563 มีมูลค่าการนำเข้าผลผลิตพริกไทยจำนวน 605 ล้านบาท แต่ในทางตรงกันข้าม พริกไทยมีมูลค่าการส่งออก เพียง 30.9 ล้านบาท (กรมศุลกากร, 2564) สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตไม่เพียงพอ คือ ในหลายพื้นการผลิตพริกไทยมีการระบาดของโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ซึ่งต้นพริกไทยที่ได้รับการเข้าทำลายของเชื้อ จะแสดงอาการใบเหี่ยว ร่วง ตายทั้งต้น (แสงมณี และคณะ, 2540) ในประเทศเวียดนาม มีรายงานการเข้าทำลายของโรครากเน่าโคนเน่าถึง 80 เปอร์เซ็นต์ สร้างความเสียหายของพื้นที่ปลูกประมาณ 300 เฮกตาร์ (Nguyen, 2015) สำหรับประเทศไทยวิธีการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่านั้น การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชยังคงเป็นวิธีที่ดีที่สุด (ชวเลิศ, 2537) แต่บางพื้นที่พบว่าการใช้สารเคมีไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร อาจเกิดจากเชื้อราสาเหตุมีความต้านทานต่อสารเคมี ซึ่งการใช้เชื้อรา ปฏิปักษ์ของ *Trichoderma* sp. จึงเป็นวิธีการหนึ่งเพื่อนำไปสู่การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าในพริกไทยโดยชีววิธี

เชื้อ *Trichoderma* sp. เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อราที่อยู่ในดิน เช่น *Phytophthora* spp. *Pythium* spp. *Rhizoctonia solani* *Fusarium* spp. *Sclerotium rolfsii* เป็นต้น โดยใช้กลไกการควบคุมโรคหลายกลไกที่สำคัญๆ ได้แก่ การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขัน การเป็นปรสิต และการชักนำให้เกิดความต้านทาน (สายทอง, 2555) z] ผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า มีการใช้เชื้อ *Trichoderma* sp. ในการป้องกันกำจัดโรคพืชหลายชนิด สุธามาศ และคณะ (2018) ได้ศึกษาผลของราไตรโคเดอร์มาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอ พบว่า เชื้อรา ไตรโคเดอร์มา จำนวน 2 ไอโซเลท ให้ผลในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอในห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสุภาภรณ์ และคณะ (2559) ได้ศึกษาเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคโคนเน่าแก่นตะวันที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* พบว่าเชื้อไตรโคเดอร์ทุกไอโซเลท ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าได้เป็นอย่างดี

ดังนั้น การประเมินความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของ *Trichoderma* sp. จึงเป็นวิธีการหนึ่งเพื่อนำไปสู่การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าในพริกไทยโดยชีววิธี และชะลอการต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อราและลดการใช้สารเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตู้เขี่ยเชื้อ (ยี่ห้อ GTech รุ่น GT-CL120ST)
2. กล้องจุลทรรศน์ (ยี่ห้อ Olympus รุ่น BH-2)

กรมวิชาการเกษตร

3. กระบอกตวง
4. จานเลี้ยงเชื้อและอุปกรณ์เลี้ยงเชื้อ
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ And รุ่น FX-2000i)
6. ตู้อบเครื่องแก้ว (ยี่ห้อ Contherm รุ่น 2400)
7. ตู้บ่มเชื้อ (ยี่ห้อ Memmert รุ่น INE600 2561)
8. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (ยี่ห้อ Tomy รุ่น ES-315)
9. ไมโครเวฟ (ยี่ห้อ LG รุ่น MS2120VW)
10. ไมโครปิเปต
11. แบบบันทึกข้อมูล
12. ต้นพริกไทย พันธุ์ซาลาวัค
13. กระถางพลาสติก ขนาด 12 นิ้ว
14. วัสดุทางการเกษตร ได้แก่ ดิน แกลบ ขุยมะพร้าว ปุ๋ยเคมี

วิธีการ

การสำรวจ และเก็บตัวอย่างเชื้อสาเหตุโรคพืชของพริกไทย

ทำการสำรวจเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในแหล่งปลูกพริกไทย จังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ จันทบุรี ระยอง และตราด โดยนำตัวอย่างใบ และเถาที่แสดงอาการเกิดโรคมาแยกเชื้อสาเหตุด้วยวิธี Tissue transplanting method โดยตัดชิ้นส่วนบริเวณแผลเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ฆ่าเชื้อด้วยคลอล็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ และใช้กระดาษทิชชู่ที่ฆ่าเชื้อแล้วซับให้แห้ง จากนั้นวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BNPRA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เมื่อเชื้อเจริญเติบโตจึงตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไปพิสูจน์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า โดยอาศัยหลักการพิสูจน์โรค Koch's Postulates และต้นพริกไทยต้องแสดงอาการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าเช่นเดิม จึงนำไปแยกเชื้อ และเก็บไว้เป็น stock culture

การรวบรวมตัวอย่าง และแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากแหล่งปลูกพริกไทย

สำรวจ และเก็บตัวอย่างดินจากต้นพริกไทยที่ไม่มีการเกิดโรคจากแหล่งปลูกพริกไทย จังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ จันทบุรี ระยอง และตราด ตรวจหาเชื้อ *Trichoderma* spp. ด้วยวิธี soil dilution spread plate ชั่งดินจำนวน 5 กรัม ใส่ลงในขวดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 45 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกันดีและวางทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำไปทำการเจือจางโดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ซึ่งตัวอย่างนั้นจะถูกทำให้เจือจางลงอีก 10 เท่า คือ 1:10 หรือ 10^{-1} ทำต่อไปเรื่อยๆ จนได้ความเข้มข้น 1:1,000 หรือ 10^{-3} จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างของเชื้อจากทุกความเข้มข้น จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม Rose Bengal 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Streptomycin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อราเจริญขึ้น จะมีโคโลนีเป็นเป็นวงกลม เส้นใยมีสีเหลือง หรือสีเขียว จึงแยกลงในอาหาร PDA สำหรับเก็บไว้เป็น stock culture

ระบบวิชาการเกษตร

เมื่อได้เชื้อ *Trichoderma* spp. ที่คัดเลือกรหัสเชื้อแต่ละไอโซเลทแล้ว จึงเพิ่มปริมาณเชื้อรา และเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารเอียง เพื่อใช้ในการทดสอบ ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ในห้องปฏิบัติการ

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ Trichoderma sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Phytophthora sp. ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบการสุ่มแบบสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) ประกอบด้วย 11 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 *Trichoderma* sp. T-01
กรรมวิธีที่ 2 *Trichoderma* sp. T-02
กรรมวิธีที่ 3 *Trichoderma* sp. T-03
กรรมวิธีที่ 4 *Trichoderma* sp. T-04
กรรมวิธีที่ 5 *Trichoderma* sp. T-05
กรรมวิธีที่ 6 *Trichoderma* sp. T-06
กรรมวิธีที่ 7 *Trichoderma* sp. T-07
กรรมวิธีที่ 8 *Trichoderma* sp. T-08
กรรมวิธีที่ 9 *Trichoderma* sp. T-09
กรรมวิธีที่ 10 *Trichoderma* sp. T-10
กรรมวิธีที่ 11 วิธีควบคุม (control)

ทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค ที่แยกได้ด้วยวิธี bi-culture technique บนอาหาร V8 กรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 10 plate โดยใช้เชื้อ *Trichoderma* sp. ที่มีอายุ 5 วัน และเชื้อ *Phytophthora* sp. อายุ 7 วัน โดยนำ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะและนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 ให้เชื้อทั้งสองชนิดมีระยะห่าง 6 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดความยาวของรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุด้านที่เจริญไปทางกรรมวิธีทดสอบ และความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรัศมีการเจริญของเชื้อสาเหตุ (percent inhibition rate growth หรือ PIRG) ของเชื้อราสาเหตุตามสูตร (Tronsmo, 1992)

$$PIRG = \frac{R1 - R2 \times 100}{R1}$$

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อ *Phytophthora* sp. ในชุดควบคุม
R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อ *Phytophthora* sp. ในชุดทดสอบ

การวัดค่าปฏิปักษ์ของเชื้อสามารถประเมินค่ายับยั้ง ดังนี้

>75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

กรมวิชาการเกษตร

61-75 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51-60 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
<50 เปอร์เซ็นต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ Trichoderma sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Phytophthora sp. ในสภาพโรงเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ (ซ้ำละ 5 ต้น) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 *Trichoderma* sp. T-03

กรรมวิธีที่ 2 *Trichoderma* sp. T-09

กรรมวิธีที่ 3 สารเมทาแลกซิล (metalaxyl) อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ไม่ใช้สารเคมี (control)

- เตรียมต้นพริกไทย โดยนำมาปลูกลงในกระถางขนาด 12 นิ้ว บรรจุด้วยดินที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ดูแลต้นให้มีความสมบูรณ์สำหรับการทดสอบ

- นำเชื้อ *Trichoderma* sp ที่ได้คัดเลือกว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุสูงมาก จำนวน 2 isolates คือ *Trichoderma* sp. T-03 และ T-09 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุได้ 7 วัน ทำเป็น spore suspension ที่มีปริมาณสปอร์ 10^8 ผสมลงในดินปลูกที่ปลูกต้นพริกไทย

- นำเชื้อสาเหตุโรค *Phytophthora* sp อายุ 7 วัน มาทำเป็น spore suspension และใส่ลงไปในกระถางปลูกพริกไทย

- นำต้นพริกไทยที่เตรียมไว้ มาทำให้เกิดบาดแผลด้วยวิธีการตัดราก จำนวน 4 จุด โดยใช้ใบมีด ขนาดกว้าง 2 เซนติเมตร ตัดลงดินให้มีความลึกประมาณ 2 นิ้ว และห่างจากโคนต้น 1 นิ้ว จากนั้นนำเชื้อสาเหตุที่เตรียมไว้ราดลงบริเวณโคนต้น บ่มเชื้อด้วยถุงพลาสติกมัดบริเวณด้านบนปากถุง

- เมื่อครบ 24 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 3 ให้ราดด้วยสารเมทาแลกซิล อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร จึงบ่มเชื้อ

- บันทึกข้อมูล ลักษณะการเข้าทำลายบริเวณโคนต้น และอาการบนต้น โดยประเมินความรุนแรงของโรคเป็นระดับ ดังนี้

ระดับที่ 1 = พืชไม่แสดงอาการเกิดโรค

ระดับที่ 2 = พืชแสดงอาการเกิดโรค 1-25% ของต้น

ระดับที่ 3 = พืชแสดงอาการเกิดโรค 26-50% ของต้น

ระดับที่ 4 = พืชแสดงอาการเกิดโรค 51-75% ของต้น

ระดับที่ 5 = พืชแสดงอาการเกิดโรค 76-100% ของต้น

- นำข้อมูลที่ได้จากการประเมินความรุนแรงของโรคมาคำนวณหาค่าดัชนีการเกิดโรค ตามกรรมวิธีของ Cirulii and Alexander (1966) ที่คำนวณได้จากสูตร

ดัชนีการเกิดโรค = ผลรวมของ (จำนวนต้นพืชแต่ละระดับอาการxคะแนนของระดับอาการ)

กรมวิชาการเกษตร

จำนวนต้นพืชทดสอบทั้งหมด x คะแนนสูงสุดของระดับอาการ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2563

ห้องปฏิบัติการ สถาบันวิจัยพืชสวน

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การสำรวจ และเก็บตัวอย่างเชื้อสาเหตุโรคพืชของพริกไทย

สำรวจ และเก็บตัวอย่างของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในแหล่งปลูกพริกไทย ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ จันทบุรี ระยอง และตราด ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2559 – กันยายน 2560 โดยนำตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเกิดโรค มาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue transplanting บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BNPRA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส พบเชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชจาก อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี จึงได้ทำการพิสูจน์การเกิดโรค ตรวจสอบลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และย้ายเชื้อเก็บในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture (ภาพที่ 1-2)

การรวบรวมตัวอย่าง และแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จากแหล่งปลูกพริกไทย

สำรวจ และเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบโคนต้นพริกไทยที่ไม่แสดงอาการโรค ในพื้นที่อำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ อำเภอแกลง จังหวัดระยอง อำเภอท่าใหม่ อำเภอเขาคิชฌกูฏ อำเภอเมือง อำเภอแหลมสิงห์ อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี และอำเภอบ่อไร่ อำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด ได้ตัวอย่างจำนวน 25 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี soil dilution spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติม Rose Bengal 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Streptomycin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส พบเชื้อ *Trichoderma* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) จึงแยกลงในอาหาร PDA และเก็บไว้เป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp.

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ Trichoderma sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Phytophthora sp. ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* sp. จำนวน 10 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. พบว่า เชื้อ *Trichoderma* spp. ทุกไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Phytophthora* sp. ตั้งแต่ 41.22 – 83.54 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท T-09 และ T-03 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. สูงมาก คือมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ 83.54 และ 77.85 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวของรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุด้านที่เจริญไปทางกรรมวิธีทดสอบ 0.57 และ 0.77 เซนติเมตร ตามลำดับ ไอโซเลท T-02, T-10, T-07 และ T-06 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. สูง มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้น

กรมวิชาการเกษตร

ใยเชื้อสาเหตุ 71.09 68.20 67.34 และ 61.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความยาวของรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุด้านที่เจริญไปทางกรรมวิธีทดสอบอยู่ที่ 1-1.33 เซนติเมตร ส่วนไอโซเลท T-05 และ T-08 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ปานกลาง ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค 55.66 และ 51.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความยาวของรัศมีโคโลนีเชื้อสาเหตุ 1.47-1.67 เซนติเมตร และไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ คือ T-04 และ T-01 และทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 2, ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 เชื้อ *Trichoderma* sp จำนวน 10 ไอโซเลทจากแหล่งปลูกต่างๆ

รหัส	***Trichoderma***	**แหล่งที่เก็บตัวอย่าง**
T-01	*Trichoderma* sp. isolate1	แกลง ระยอง
T-02	*Trichoderma* sp. isolate2	แกลง ระยอง
T-03	*Trichoderma* sp. isolate3	ท่าใหม่ จันทบุรี
T-04	*Trichoderma* sp. isolate4	เขาคิชฌกูฏ จันทบุรี
T-05	*Trichoderma* sp. isolate5	เขาคิชฌกูฏ จันทบุรี
T-06	*Trichoderma* sp. isolate6	เขาคิชฌกูฏ จันทบุรี
T-07	*Trichoderma* sp. isolate7	บ่อไร่ ตราด
T-08	*Trichoderma* sp. isolate8	บ่อไร่ ตราด
T-09	*Trichoderma* sp. isolate9	บ่อไร่ ตราด
T-10	*Trichoderma* sp. isolate10	เขาสมิง ตราด

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. บนอาหาร V8 หลังบ่มเชื้อ 3 วัน

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุ[1] (%)**	**ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี[1] (ซม.)**
Trichoderma sp. T-01	41.22 f	2.03 f
Trichoderma sp. T-02	71.09 c	1.00 c
Trichoderma sp. T-03	77.85 b	0.77 b
Trichoderma sp. T-04	44.28 f	1.93 f
Trichoderma sp. T-05	57.66 d	1.47 d
Trichoderma sp. T-06	61.53 d	1.33 d
Trichoderma sp. T-07	67.34 c	1.13 c
Trichoderma sp. T-08	51.82 e	1.67 e
Trichoderma sp. T-09	83.54 a	0.57 a
Trichoderma sp. T-10	68.20 c	1.10 c

กรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีควบคุม	-	3.50 g
CV (%)	5.3	7.9

[1]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ Trichoderma sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Phytophthora sp. ในสภาพโรงเรือนทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* ไอโซเลท T-09 และ T-03 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล และกรรมวิธีการไม่ใช้สารเคมี บนต้นพริกไทยในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า *Trichoderma* ไอโซเลท T-09 และ T-03 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่า 21.75 – 25.94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้สารเคมีเมทาแลกซิล ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ดีที่สุด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 5.30 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด 35.11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3, ภาพที่ 4) จากการทดลองจะเห็นได้ว่า *Trichoderma* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้แตกต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mathew et al. (2011) ได้มีการศึกษาการคัดเลือก *Trichoderma* spp. ทั้ง 3 species ในการป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าพริกไทยที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora capsici* พบว่า *Trichoderma viride* มีประสิทธิภาพลดการเกิดโรคมากที่สุด และ KUMAR et al. (2012) ยังได้ศึกษาการจัดการโรครากเน่าโคนเน่าในพริกไทยเพื่อลดการใช้สารเคมี โดยได้ศึกษาการใช้ *Trichoderma harzianum* ร่วมกับโพแทสเซียมฟอสเฟต หรือใช้ bordeaux mixture ร่วมกับ copper oxychloride หรือ *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า *Trichoderma harzianum* ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ สามารถลดการเกิดโรคของพริกไทยได้ ใกล้เคียงกับการใช้สารเคมี ดังนั้น ควรคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. จากไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ใกล้เคียงกับกรรมวิธีใช้สารเคมี เพื่อนำไปสู่การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าในพริกไทยโดยชีววิธี และชะลอการต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อราและลดการใช้สารเคมี เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าต่อไป

ตารางที่ 3 ดัชนีการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าของพริกไทยในสภาพโรงเรือนทดลอง

กรรมวิธี	ดัชนีการเกิดโรค[1] (%)
Trichoderma sp. T-03	25.94 b
Trichoderma sp. T-09	21.75 b
Metalaxyl	5.30 a
กรรมวิธีควบคุม	35.11 c
CV (%)	37.9

กรมวิชาการเกษตร

[1]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การประเมินความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ *Trichoderma* sp. ต่อการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริกไทย พบว่า *Trichoderma* sp. T-09 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากแปลงปลูกพริกไทย อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด และ *Trichoderma* sp. T-03 ไอโซเลทที่แยกได้จากแปลงปลูกพริกไทย อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุใกล้เคียง หรือรองลงมาจากการใช้สารเคมี เพื่อนำไปสู่การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าในพริกไทยโดยชีววิธี และชะลอการต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อราและลดการใช้สารเคมี เป็นแนวทางในการแก้ปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เกษตรกรผู้ผลิตพริกไทย นักวิชาการ และผู้สนใจทั่วไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์. 2537. ประสิทธิภาพของสารกำจัดราประเภทดูดซึม ในการควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่า (*Phytophthora parasitica* Dastur.) ของพริกไทย. บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: 91 หน้า.

สายทอง แก้วฉาย. 2555. การใช้ไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืช. วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์. ปีที่ 4 ฉบับที่ 3 กันยายน – ธันวาคม 2555. หน้า 108 – 123.

สุธามาศ ณ น่าน ปฏิพัทธ์ ใจปิน สนอง จรินทร และบุญปิยะธิดา คล่องแคล่ว. 2018. ผลของราไตรโคเดอร์มาในการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอ. Thai Agricultural Research Journal, 35(3), 321-324.

สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง นิรัตน์ หนูทอง และสุนัสดา โสรัตน์สะ. 2559. การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมโรคโคนเน่าแก่นตะวันที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii.* วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ (III): M09/21-28

แสงมณี ชิงดวง ประเสริฐ เคร่งเปี่ยม และสุชาติ วิจิตรานนท์. 2540. ผลของเชื้อรา *Trichoderma hazianum* ที่มีผลต่อเชื้อรา *Phytophthora parasitica* และ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าและ

กรมวิชาการเกษตร

โคนเน่าของ พริกไทยและวนิลา. *วารสารโรคพืช* 12: 13-14.

Cirulii, M. and L.J. Alexander. 1966. A comparison of pathogenic isolates of Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici and different sources of resistance in tomato. Phytopathology 56 : 1301-1304.

Kumar N.R., K.R. Kumar and K. SESHAKIRAN. 2012. Management of Phytophthora foot rot disease in black pepper. Green Farming Vol. 3 (5): 583-585.

Mathew S.K., C.F. GLEENA MARY, K.S. GOPAL and D. GIRIJA. 2011. Antagonistic activity of endophytic *Trichoderma* against Phytophthora rot of black pepper (*Piper nigrum* L.). Journal of Biological Control, 25 (1): 48–50.

Nguyen, V.L. 2015. Spread of *Phytophthora capsici* in Black Pepper (Piper nigrum) in Vietnam. Engineering, 7, 506-513

13. ภาคผนวก

ข ค

ภาพที่ 1 การสำรวจ และเก็บตัวอย่างเชื้อสาเหตุโรคพืชของพริกไทย

ก = สำรวจและเก็บตัวอย่างการเกิดโรค

ข = การแยกเชื้อสาเหตุโรค

ค = ลักษณะใบพริกไทยที่แสดงการเกิดโรค

ง = เชื้อ *Phytophthora sp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ข ค

ภาพที่ 2 การพิสูจน์การเกิดโรครากเน่าโคนเน่าของพริกไทย

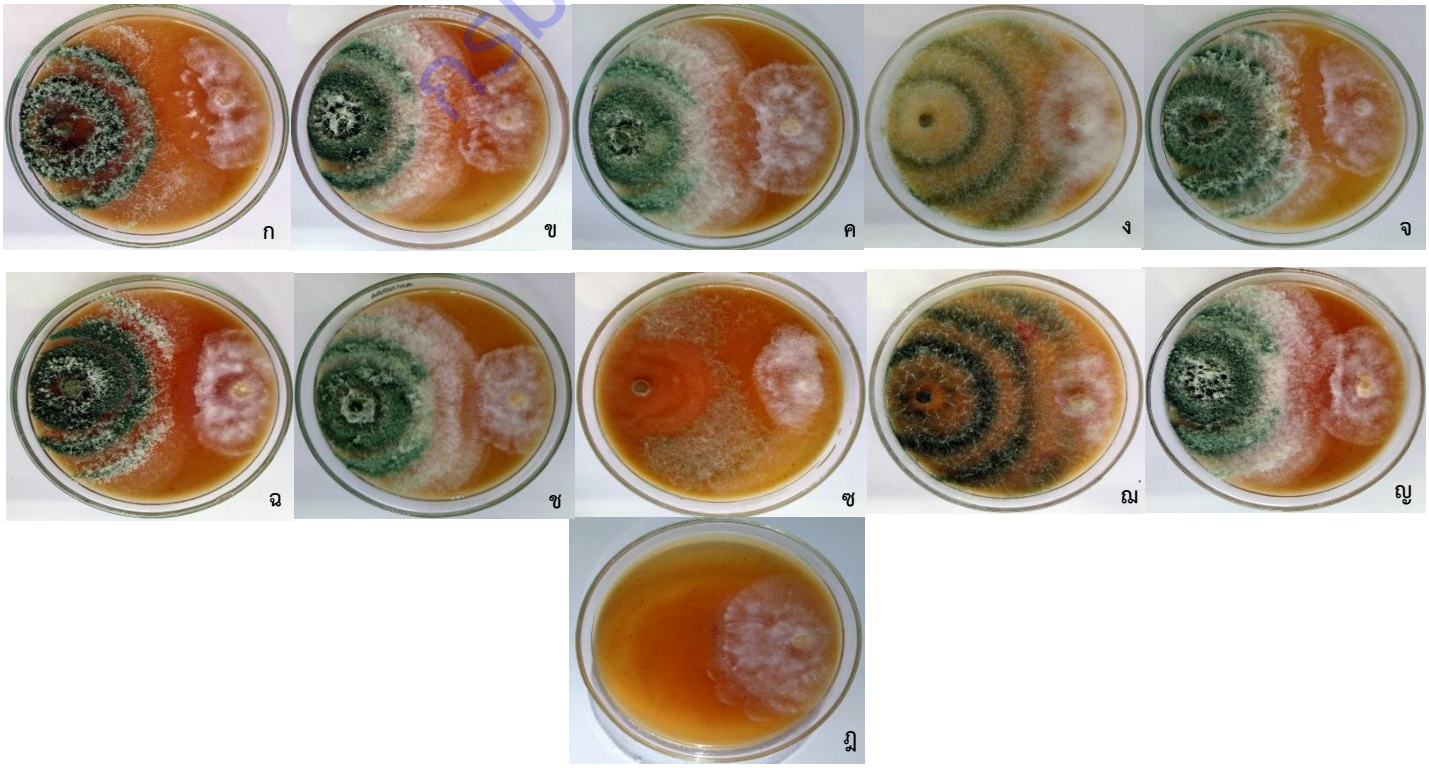
ก = เชื้อ *Phytophthora* sp. ที่อายุ 5 วัน เพื่อทำการพิสูจน์โรค

ข = การทำให้เกิดแผล และปลูกเชื้อ (inoculation)

ค = ใบพริกไทยที่แสดงการเกิดโรคหลังปลูกเชื้อ

ง = เชื้อ *Phytophthora sp.* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 หลังบ่มเชื้อ 3 วัน

ก = *Trichoderma* sp. T-01
ข = *Trichoderma* sp. T-02
ค = *Trichoderma* sp. T-03
ง = *Trichoderma* sp. T-04
จ = *Trichoderma* sp. T-05
ฉ = *Trichoderma* sp. T-06
ช = *Trichoderma* sp. T-07
ซ = *Trichoderma* sp. T-08
ฌ = *Trichoderma* sp. T-09
ญ = *Trichoderma* sp. T-10
ฎ = control

ภาพที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma* sp. ในสภาพโรงเรือนทดลอง