ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง ประสิทธิภาพของรา Hyphomycetes ที่แยกจากดินและกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* ในแปลงปลูกพริก เพื่อควบคุมโรครากปม

Efficiency of Hyphomycetes Isolated from Soil and *Meloidogyne* Egg Masses in Chilli Plantation for Controlling Root Knot Disease

นามผู้วิจัย นางสาวธิดา แสงสว่าง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ศาสตราจารย์เลขา มาโนช, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์จิระเดช แจ่มสว่าง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรอุมา เพียซ้าย, วท.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(อาจารย์อนงค์นุช สาสนรักกิจ, วท.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของรา Hyphomycetes ที่แยกจากดินและกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* ในแปลงปลูกพริก เพื่อควบคุมโรครากปม

Efficiency of Hyphomycetes Isolated from Soil and *Meloidogyne* Egg Masses in Chilli Plantation for Controlling Root Knot Disease

โดย

นางสาวธิดา แสงสว่าง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธิดา แสงสว่าง 2557: ประสิทธิภาพของรา Hyphomycetes ที่แยกจากดินและกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* ในแปลงปลูกพริก เพื่อควบคุมโรครากปม ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์เลขา มาโนช, Ph.D. 74 หน้า

เก็บตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่าง และรากพริก 5 ตัวอย่าง บริเวณแปลงพริกที่มีการระบาดของโรครากปม สาเหตุจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* รวม 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี แยกราโดยวิธี dilution plate, soil plate และแยกจากรากพริกบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของสปอร์และก้านชูสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบรา Hyphomycetes จำนวน 42 สายพันธุ์ (isolates) จำแนกได้ 5 สกุล (genera) ได้แก่ *Penicillium* spp. (38 เปอร์เซ็นต์), *Paecilomyces* spp. (29 เปอร์เซ็นต์), *Aspergillus* spp. (21 เปอร์เซ็นต์), *Fusarium* spp. (7 เปอร์เซ็นต์) และ *Trichoderma* spp. (5 เปอร์เซ็นต์) นำราที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม พบว่า *Paecilomyces lilacinus* (KB8) เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด โดยลดอัตราการฟักไข่ลง 69 เปอร์เซ็นต์ จึงนำมาทดสอบเพาะเลี้ยงรา *P. lilacinus* (KB8) ในเมล็ดพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง ข้าวกล้อง และ ข้าวโพด ทั้งหมดจำนวน 5 ซ้ำ พบว่า รา *P. lilacinus* (KB8) เจริญได้ดีและสร้างสปอร์ได้ปริมาณมากในข้าวฟ่างและข้าวโพด ได้ทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* (KB8) เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมพริก *M. incognita* ในสภาพโรงเรือน โดยย้ายต้นกล้าพริกที่เป็นโรครากปมปลูกลงในกระถางดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว ที่บรรจุด้วยดินร่วนปนทรายละเอียด (50:50 โดยปริมาตร) ใส่รา *P. lilacinus* (KB8) ที่เลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่าง ด้วยอัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พบว่า วิธีที่ใส่รา *P. lilacinus* (KB8) จำนวน 2, 3 และ 4 ครั้ง มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* ทำให้ลดการเกิดปมบนระบบรากได้ 50-75 เปอร์เซ็นต์ และมีดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก 2.50, 2.64 และ 2.87 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธีควบคุมที่ไม่ใส่รา *P. lilacinus* (KB8) จากผลการทดลองพบว่าการใช้รา *P. lilacinus* (KB8) ในอัตราที่สูงขึ้นมีผลทำให้ประชากรไส้เดือนฝอยในดินลดลง เนื่องจากราเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยทำให้ไม่สามารถฟักเป็นตัวอ่อนเข้าทำลายรากพืชได้

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tida Sangsawang 2014: Efficiency of Hyphomycetes Isolated from Soil and *Meloidogyne* Egg Masses in Chilli Plantation for Controlling Root Knot Disease. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Professor Leka Manoch, Ph.D. 74 pages.

Fifteen soil samples and five root knot samples were collected from chilli plantations infested with root-knot nematode *(Meloidogyne incognita*) in Kanchanaburi, Nakhon Pathom and Suphan Buri provinces. Fungi were isolated from soil samples by the dilution plate and soil plate methods and from chilli roots by placing egg masses on different agar media. Morphological characteristics of the fungi including the conidia and conidiophores were examined under a light microscope. Forty-two Hyphomycetes fungi comprising five genera were found including *Penicillium* spp. (38%), *Paecilomyces* spp. (29%)*, Aspergillus* spp. (21%), *Fusarium* spp. (7%) and *Trichoderma* spp. (5%). *In vitro* pathogenicity tests on *M. incognita* eggs were conducted using one isolate from each of the five fungal genera. The results revealed that *Paecilomyces lilacinus* (KB8) reduced the egg hatching rate 69%. *P. lilacinus* (KB8) was cultivated on five different kinds of cereal and grain including maize, sorghum, Thai jasmine rice, brown rice and soybean through solid state fermentation. The sorghum and maize were the best substrates for maximum spore production. *P. lilacinus* (KB8) was tested for the efficiency to control the root-knot nematode, *M. incognita* on chilli plants in pots under planting house conditions. In pot experiments, 20 g of fungal colonized sorghum seeds were applied into 6-inch-diameter pot contained with 50:50 parts per volume of loamy soil and sand. The results showed that the treatment with 2, 3, 4 applications of *P. lilacinus* (KB8) effectively reduced galls on root systems by 50-70% with root gall index values of 2.50, 2.64 and 2.87 respectively. Higher rates of *P. lilacinus* (KB8) application reduced the root-knot nematode population in soil by infecting the nematode eggs and inhibiting egg hatching.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.เลขา มาโนช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร.นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ผู้เชี่ยวชาญด้านจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร รองศาสตราจารย์ ดร.จิระเดช แจ่มสว่าง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอุมา เพียซ้าย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การวางแผนและค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เยาวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์ ประธานการสอบ และ ดร.พรพิพล อธิปัญญาคม ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสมาชิก ห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย กลุ่มงานไส้เดือนฝอย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน

ขอขอบคุณสมาชิก ห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี พ.ศ. 2553 ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใด เนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา-มารดา ญาติพี่น้อง และครูอาจารย์ ที่ได้ให้ความรู้ อบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ธิดา แสงสว่าง

กรกฎาคม 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	18
อุปกรณ์	18
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	60
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	61
ภาคผนวก	69
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	74

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รูปแบบโครงสร้างของราปฏิปักษ์ที่เข้าทำลายไส้เดือนฝอยศัตรูพืช	13
2	การวางแผนการทดลองใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปมพริกในสภาพโรงเรือน	30
3	รา Hyphomycetes ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากในแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปม จำนวน 20 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี โดยใช้วิธีการแยกและอาหารเลี้ยงราชนิดต่างๆ	35
4	การจำแนกสกุลราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากในแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมในจังหวัดต่างๆ	40
5	ผลคำนวณเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์รา *Paecilomyces lilacinus* ที่เพาะเลี้ยงใน 1 กรัมของเมล็ดพืชชนิดต่างๆ อายุ 7 วัน	54
6	ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากเมื่อมีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปมพริกในสภาพโรงเรือน	58

ตารางผนวกที่

1	ข้อมูลการทดลองรา *Paecilomyces* spp. ต่อการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม	71
2	ข้อมูลการทดลองรา *Fusarium* spp. ต่อการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม	71
3	ข้อมูลการทดลองรา *Penicillium* spp.ต่อการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม	72
4	ข้อมูลการทดลองรา *Paecilomyces* spp. ต่อการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม	72
5	ข้อมูลการทดลองของชุดควบคุม (control) ศักยภาพของราในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม	73
6	ผลคำนวณเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์รา *Paecilomyces lilacinus* (KB8) ที่เพาะเลี้ยงใน 1 กรัมของเมล็ดพืชชนิดต่างๆ อายุ 7 วัน	73

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โรครากปมของพริกที่เกิดจาก *Meloidogyne incognita* ที่ระบาดในแหล่งปลูก	5
2	วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp.	6
3	ภาพถ่ายจาก Scanning electron microscope (SEM) แสดงลักษณะการเข้าทำลายของรา *Paecilomyces lilacinus* ในไส้เดือนฝอยรากปม	9
4	*Paecilomyces lilacinus* เจริญบนกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*	11
5	รา *Arthrobotrys dactyloides* สร้าง ring traps มารัดรอบลำตัวของไส้เดือนฝอย	12
6	ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. จากรากพริก	23
7	ลักษณะทั่วไปของรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp.	24
8	รูปแบบรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne*) ที่แตกต่างกันในแต่ละ species	25
9	Haemacytometer ที่ใช้ในการนับสปอร์รา A. และ Counting chamber ชนิดช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง B.	28
10	การทดสอบการเข้าทำลายของราต่อไข่ไส้เดือนฝอยรากปมในถาดหลุมชนิด Tissue culture plate แบบ 24-well	28
11	การเตรียมต้นกล้าพริกเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Paecilomyces lilacinus* ในการกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมพริกในสภาพโรงเรือน	31
12	ดัชนีการเกิดปมของโรครากปมในพริก	32
13	ราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากพืชโดยใช้วิธีการและอาหารเลี้ยงราที่ต่างกัน	37
14	เปอร์เซ็นต์ราสกุลต่างๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากในแปลงปลูกพริกที่เป็นโรคไส้เดือยฝอยรากปมในของจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี จำนวน 20 ตัวอย่าง	41
15	ลักษณะกลุ่มไข่และราบนกลุ่มไข่ของรากที่เป็นปุ่มปมในพริกสาเหตุจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp.	42

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	รา *Aspergillus* sp. Micheli (1729) (NP2) แยกได้จากดินในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด	43
17	รา *Fusarium* sp. Link (1809) (SB5) แยกได้จากดินในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด	44
18	รา *Paecilomyces* sp. Bainier (1907) (KB7) แยกได้จากดินในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด	45
19	รา *Penicillium* sp. Link (1809) (KB4) แยกได้จากดินและรากในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด	46
20	รา *Trichoderma* sp. (NP8) แยกได้จากดินในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด	47
21	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมของราทั้ง 5 สกุล จำนวน 42 สายพันธุ์	48
22	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนไข่ที่ไม่ถูกทำลาย จำนวนไข่ที่ถูกทำลาย จำนวนฟักตัวของตัวอ่อนระยะที่สอง (J2) และจำนวน J2 ที่ตายของไส้เดือนฝอยรากปม จากทดสอบการเข้าทำลายของราทั้ง 5 ชนิดต่อไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม	50
23	รา *Paecilomyces lilacinus* สายพันธุ์ KB8	51
24	รา *Paecilomyces lilacinus* (KB8) ที่เพาะเลี้ยงบนเมล็ดพืชชนิดต่างๆ อายุ 3 วัน A. ข้าวหอมมะลิ, B. ข้าวฟ่าง, C. ถั่วเหลือง, D. ข้าวกล้อง และ E. ข้าวโพด	53
25	รา *Paecilomyces lilacinus* (KB8) ที่เพาะเลี้ยงบนเมล็ดพืชชนิดต่างๆ อายุ 7 วัน A. ข้าวหอมมะลิ, B. ข้าวฟ่าง, C. ถั่วเหลือง, D. ข้าวกล้อง และ E. ข้าวโพด	53
26	ต้นพริกที่เป็นโรครากปมอายุ 60 วัน ที่มีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ใส่ก้นหลุมและโรยรอบโคนต้นระยะห่าง 15 วัน	56
27	ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากของต้นพริกเมื่อมีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมโรครากปมที่อายุ 90 วัน	57

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$CaCl_2$	=	calcium chloride
$CuSO_4$	=	copper sulphate
DP	=	Soil dilution plate method
DMRT	=	Duncant's multiple range tests
EtOH	=	ethanol
g	=	gram
GAN	=	Gauchnaur's glucose Ammonium Nitrate agar
h	=	hour
IPP	=	Isolation form plant parts
l	=	liter
M	=	molar
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μm	=	micrometer
mg	=	milligram
$MgCl_2$	=	magnesium chloride
NaCl	=	sodium chloride
½ PDA	=	Half strength potato dextrose agar
PDA	=	Potato dextrose agar
SP	=	Soil plate method
WA	=	Water agar

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพของรา Hyphomycetes ที่แยกจากดินและกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* ในแปลงปลูกพริก เพื่อควบคุมโรครากปม

Efficiency of Hyphomycetes Isolated from Soil and *Meloidogyne* Egg Masses in Chilli Plantation for Controlling Root Knot Disease

คำนำ

ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. เป็นสาเหตุของโรครากปมที่พบทำความเสียหายในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกพริกเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีผลทำให้ผลผลิตเสียหายคิดเป็นมูลค่า 50-80 ล้านบาทในปี 2551 (นุชนารถ และ สรศักดิ์, 2551) โดยความรุนแรงของโรครากปมมีผลทำให้ต้นพืชเกิดอาการเหี่ยวเฉา แคระแกร็น และผลผลิตลดลง ความเสียหายนี้เป็นผลมาจากระบบรากถูกทำลายอย่างรุนแรงเกิดเป็นปุ่มปม ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำและแร่ธาตุอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆได้ อย่างไรก็ตาม วิธีการควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปมในแปลงปลูกยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควรซึ่งเป็นผลมาจากการจัดการโรคของเกษตรกรที่ยังมีปัญหาและอุปสรรคหลายประการได้แก่ สารเคมีป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยไม่มีจำหน่ายในประเทศไทยและการป้องกันกำจัดหรือลดประชากรไส้เดือนฝอยในแปลงปลูก จะต้องมีการจัดการก่อนการปลูกพืช เช่น การใช้ต้นกล้าพริกที่ปลอดไส้เดือนฝอย ดินเพาะปลูกต้องไม่มีการแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยในพื้นที่ ดังนั้น ความพยายามควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยไม่ให้แพร่ระบาดอย่างรุนแรงจึงต้องหาแนวทางป้องกันกำจัดอื่นๆ มาผสมผสานร่วมกัน เช่น การปลูกพืชสลับหมุนเวียน การใช้ต้นกล้าพริกที่ปราศจากการปนเปื้อนของไส้เดือนฝอยรากปม นอกจากนั้น การนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยในดินเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความสนใจอย่างมาก โดยเฉพาะในต่างประเทศได้มีการพัฒนาจนเป็นชีวภัณฑ์การค้า (bio-agent) อย่างต่อเนื่อง เช่น การผลิตชีวภัณฑ์ชื่อ Nemastin® บริษัทผู้ผลิตได้ใช้เทคโนโลยีในการรวมราที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยซึ่งเป็นราในกลุ่ม Hyphomycetes จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Arthrobotrys conoides*, *A. oligospora*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. fumosoroseus* และ *Verticillium chalmydosporium* มาผลิตเป็นสารในรูปผงละลายน้ำ (Krishi-Mitra™, 2005) นำไปใช้ในการควบคุม ไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปม *Meloidogyne* spp. ในพืชผักและไม้ดอกไม้ประดับ สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาและใช้ราปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยไม่มากนัก เช่น รายงานการใช้รา *P. lilacinus* ในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* ในแง่งขิง (มนตรี, 2538) การใช้ *P. lilacinus* ควบคุมโรครากปมใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผักกาดหอมช่วยลดการเกิดปมที่ระบบรากได้ (สุภกิจ, 2532) และการใช้ *P. lilacinus* ที่เพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งที่อัตรา 10 กรัมต่อต้น ลดการเกิดปมที่รากพริกได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (นุชนารถ และธารทิพย, 2552) ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาและคัดเลือกราที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรครากปม เพื่อนำมาวิจัยและพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์ทางการเกษตรในรูปของสารชีวภัณฑ์ที่ใช้ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธีที่ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม ตลอดจนเพิ่มทางเลือกให้กับเกษตรกรในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเก็บรวบรวม และจำแนกชนิดราในกลุ่ม Hyphomycetes จากแหล่งที่มีการระบาดของโรครากปม

2. เพื่อคัดเลือกราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมในระดับห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณราปฏิปักษ์ที่เลี้ยงได้ง่ายและใช้ผลิตชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดี

4. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในรูปแบบที่ใช้งานง่าย ในการกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมในพริกสภาพโรงเรือนทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. โรครากปมพริก

โรครากปมพริกพบระบาดอย่างรุนแรงในพื้นที่ปลูกเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สาเหตุเกิดจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica* (ภาพที่ 1A) โดยตัวอ่อนระยะที่ 2 หรือระยะเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย (ภาพที่ 1B) ที่แพร่กระจายอยู่ในดินปลูกพริกเจาะไชเข้าสู่รากพริกบริเวณปลายรากแล้วเคลื่อนที่ต่อไปยังท่อน้ำท่ออาหารของพืชและหยุดนิ่ง จากนั้นเริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงของพืช และมีการเจริญเติบโตด้วยวิธีการลอกคราบจากตัวอ่อนระยะที่ 2 เป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 และระยะที่ 4 ตามลำดับจากนั้นพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัย (adult) มีทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 2) โดยพบว่าพริกเป็นพืชอาหารที่ดีไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายรากพริก จึงมีอัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นเพศเมียสูงกว่าเพศผู้ในสัดส่วน 4 : 1 ของจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลาย เพศเมียสามารถสร้างไข่ที่มีลักษณะเป็นกลุ่ม (egg mass) ได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์กับเพศผู้ ซึ่ง 1 กลุ่มไข่ ประกอบด้วยไข่จำนวน 400-500 ฟอง หลังจากนั้นไข่พัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 และลอกคราบภายในไข่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยระยะนี้จะออกจากไข่ลงสู่ดินและเข้าทำลายรากพืชต่อเนื่อง โดยมีวงจรชีวิตจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ถึงตัวอ่อนระยะที่ 2 อีกรุ่น ใช้เวลาเพียง 3-4 สัปดาห์เท่านั้น ดังนั้น การที่เชื้อสาเหตุแพร่พันธุ์ได้ง่ายและเพิ่มประชากรเชื้อในปริมาณมาก ความเสียหายของโรครากปมจึงมีความรุนแรงเพียงมีไส้เดือนฝอยเข้าสู่รากพริกในระยะกล้าเพียงตัวเดียว ภายในเวลาเพียง 20 วัน จะเพิ่มจำนวนประชากร 400-500 ตัว เข้าทำลายระบบรากและขยายพันธุ์ต่อเนื่องทันที เมื่อต้นพริกอายุ 3 เดือน ไส้เดือนฝอยจะมีวงจรชีวิตรวม 3 ชั่วอายุ (generation) เกิดความเสียหาย ต่อพืชและสูญเสียผลผลิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (นุชนารถ, 2550)

ลักษณะอาการของโรครากปม เมื่อถอนต้นพริกจะพบระบบรากเป็นปุ่มปมสาเหตุเกิดจากไส้เดือนฝอยดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชบริเวณท่อน้ำ-ท่ออาหารมีผลทำให้เซลล์ของพืชบริเวณ ที่ถูกทำลายแบ่งตัวผิดปกติ เกิดเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (giant cell) ไปปิดกั้นทางเดินน้ำและแร่ธาตุอาหารจากรากไปเลี้ยงลำต้นส่วนเหนือดิน ทำให้พริกแสดงอาการเหี่ยวเฉา ต้นแคระแกร็นและทรุดโทรมหรือแห้งตายในที่สุด

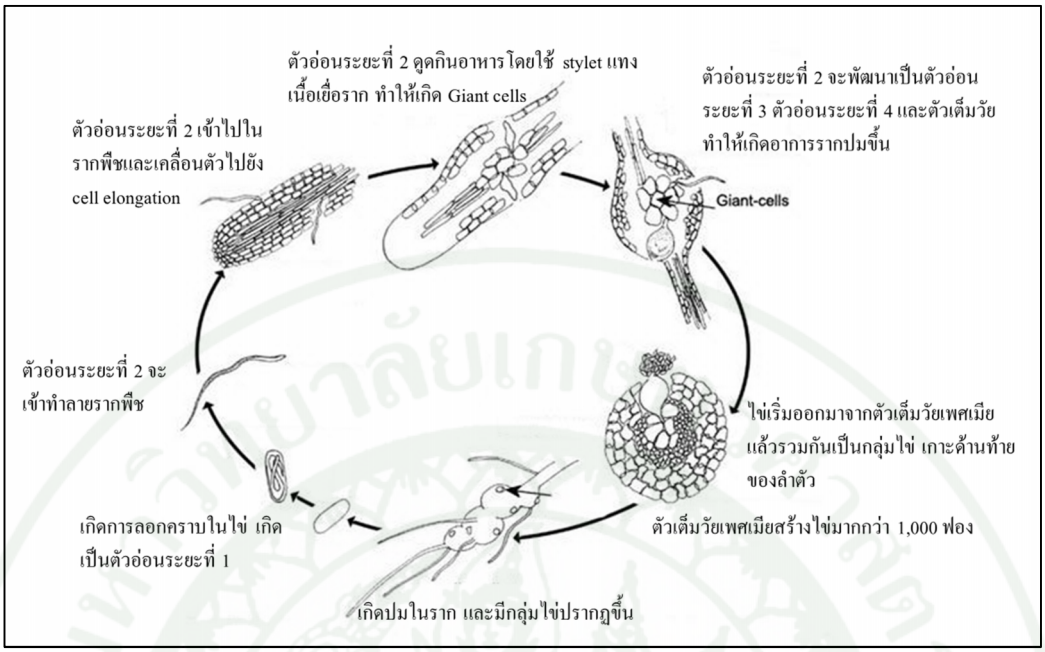
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 1 โรครากปมของพริกที่เกิดจาก *Meloidogyne incognita* ที่ระบาดในแหล่งปลูก

A. ลักษณะอาการปุ่มปมที่เกิดบนระบบรากของต้นพริก

B. ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp.

ที่มา: Nathaniel and George (2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การป้องกันกำจัดโรครากปมในพริก

การแพร่ระบาด ไส้เดือนฝอยสามารถแพร่ระบาดได้ดีในเนื้อดินชนิดร่วนปนทราย โดยไปกับระบบการให้น้ำหรือไหลไปกับน้ำฝนรวมทั้งติดไปกับดินเพาะกล้าพริกและติดไปกับเครื่องมือเกษตรต่างๆ เช่น ล้อรถไถ รองเท้าของเกษตรกร และเครื่องมือเกษตรอื่นๆ

กรมวิชาการเกษตร ได้ให้คำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรครากปมในพริกให้กับเกษตรกรในพื้นที่การระบาดของโรครากปมดังนี้ (นุชนารถ, 2550)

2.1 การจัดการดินที่ใช้เพาะกล้าพริก

ก่อนการเพาะปลูกต้องใช้ดินเพาะกล้าหรือต้นกล้าพริกจากแหล่งที่ไม่มีการระบาดของไส้เดือนฝอย นอกจากนี้การทำความสะอาดดินแปลงเพาะกล้าด้วยความร้อนไม่ต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส เพื่อฆ่าตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยหรือกลุ่มไข่ สามารถปฏิบัติได้โดยวิธีการเผาดินด้วยแกลบหรือการนำดินมานึ่งฆ่าเชื้อในถัง น้ำมันขนาด 200 ลิตร (ใส่น้ำที่ก้นถังปริมาตร 1 ใน 8 ของถัง) เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือการพลิกดินตากแดดจำนวน 4-5 ครั้ง

2.2 การเตรียมแปลงก่อนปลูกพืช

ทำการเลือกพื้นที่ปลูกพริกที่ไม่มีการระบาดของโรครากปม หรือในพื้นที่ที่มีการระบาดน้อย ก่อนปลูกควรพลิกดินตากแดดในฤดูร้อนเพื่อกำจัดตัวอ่อนและกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยที่หลงเหลือและเก็บเศษซากพืชโดยเฉพาะรากไปเผาทำลายนอกแปลงปลูก ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรครากปมรุนแรง สิ่งที่ต้องปฏิบัติก่อนปลูกพริกคือการลดจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยในดินลงให้มากที่สุด วิธีที่ดีคือการปลูกปอเทืองถึงระยะออกดอกและทำการไถกลบ ซึ่งปอเทืองจะช่วยลดจำนวนไส้เดือนฝอยในดินและเป็นปุ๋ยพืชสดบำรุงดินอีกด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 ข้อควรระวังเพื่อให้การควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพ

ควรปลูกพืชที่ไม่ใช่พืชอาหารของไส้เดือนฝอยหมุนเวียนสลับกับพริก 1-2 ฤดูปลูก เพื่อลดประชากรของเชื้อในดินและตัดวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย พืชที่สามารถนำมาปลูกสลับได้แก่ ปอเทืองและดาวเรือง อีกทั้งการใช้กล้าพริกที่สะอาดปราศจากปมที่ระบบราก เมื่อพบระบบรากของต้นพริกในแปลงปลูกมีปุ่มปม ให้ถอนและเผาทิ้งนอกแปลง นอกจากนี้ควรระมัดระวังการแพร่ระบาดจากแปลงหนึ่งสู่แปลงอื่นๆ โดยไส้เดือนฝอยสามารถติดไปกับดินหรือไหลไปกับระบบการให้น้ำหรือไปกับน้ำฝนได้

3. ราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปม

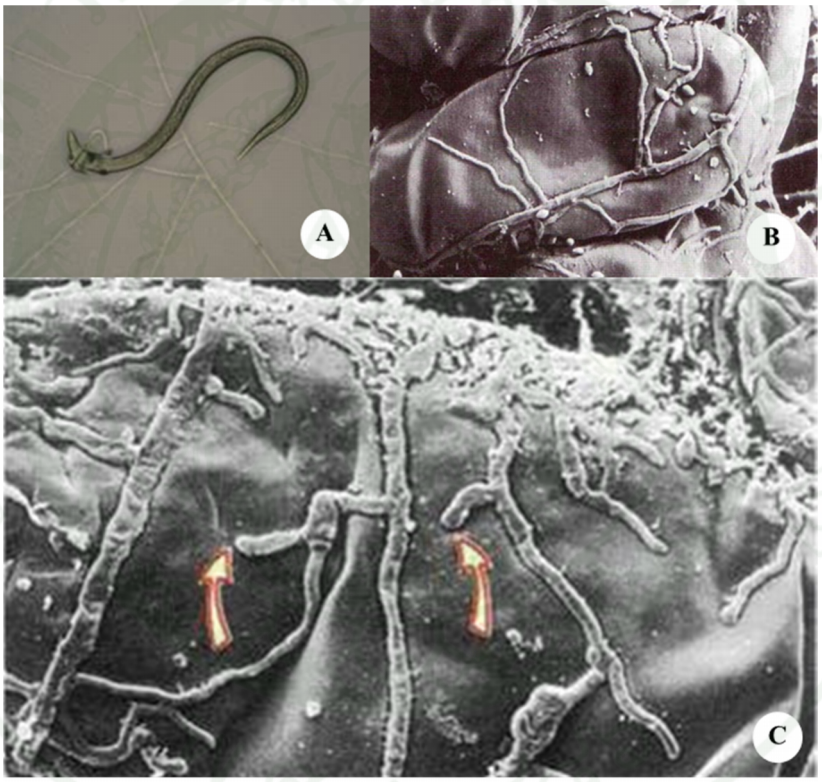
การศึกษาการใช้จุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีมากกว่า 500 เรื่อง (Kerry, 1987) ซึ่งแบ่งออกเป็นเรื่องของ trapping fungi 57%, endoparasitic fungi 19%, bacteria 5%, protozoa 3%, rickettsia 2 %, tardigrade <1%, virus <1%, nematode 7%, mite 2%, collemmbola 1%, enchytrid < 1%, turbellarian < 1% และ insect < 1% ซึ่งเห็นได้ว่า รามีการศึกษากันมากที่สุดรวม 76 เปอร์เซ็นต์ และราที่มีการศึกษามากที่สุดได้แก่ รา *Paecilomyces lilacinus, P. nostocoides* และ *Acremonium* spp. เป็นต้น โดย Jatala (1985, 1986) เป็นบุคคลแรกที่พบว่ารา *P. lilacinus* (Thom) Samson สามารถใช้ป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าสปอร์ของราชนิดนี้สามารถเกาะติดกับผนัง cuticle ของไส้เดือนฝอยรากปมได้เป็นอย่างดี สามารถเจริญงอกเส้นใยแทงผ่านผนังลำตัวของไส้เดือยฝอยรากปมเข้าทำลายได้ อีกทั้งสามารถงอกเส้นใยเข้าไปยังภายในลำตัวของไส้เดือนฝอยรากปมได้โดยผ่านทางช่องเปิดต่างๆ (body openings) เช่น anus และ vulva ดังนั้น ราชนิดนี้จึงสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งการเจริญบนไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมและไส้เดือนฝอยระยะที่เคลื่อนไหวด้วย (ภาพที่ 3) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชอื่นๆ หลายชนิดรวมทั้งไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่สามารถสร้างผนังหนาหุ้มไข่ (cyst) ได้

Dunn (1983) สามารถแยกได้รา *P. nostocoides* จาก cyst ของไส้เดือนฝอย *Heteroderazeae* แต่เนื่องจากมีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานและโครงสร้างใกล้เคียงกับรา *P. lilacinus* มากซึ่งผู้วิจัยพิจารณาเห็นว่าเป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์มาจากรา *P. lilacinus*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

David and Zorilla (1983) ทดลองใช้รา *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมจำนวนประชากรของ *Meloidogyne incognita* ในการปลูกกระเจี๊ยบเขียว พบว่าสามารถลดจำนวนประชากรของ *M. incognita* ได้ 66.50 - 77.30 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแปลงที่ไม่ได้ใช้รา *P. lilacinus*

David and Kaplan (1990) จากการทดลองพบว่า *P. lilacinus* สามารถเข้าทำลายไข่และตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้หลายสกุลได้แก่ *Pratylenchus* sp., *Rotylenchulus reniformis* และ *Tylenchulussemi penitrans* มีผลทำให้ความสูงน้ำหนักต้นรากและผลผลิตพืชเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 3 ภาพถ่ายจาก Scanning electron microscope (SEM) แสดงลักษณะการเข้าทำลายของรา *Paecilomyces lilacinus* ในไส้เดือนฝอยรากปม

A. ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมที่ถูกรา รา *P. lilacinus* เข้าทำลาย

B. รา *P. lilacinus* สร้างเส้นใยบนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

C. ลักษณะของเส้นใยรา *P. lilacinus* ที่เจริญแทงเข้าไปในไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

ที่มา: Kerry (1987)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hafeez *et al*. (2000) ได้ทดลองใช้รา *Paecilomyces lilacinus* ร่วมกับรา *Trichoderma harzianum* ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นราปฏิปักษ์ พบว่าการใช้ราทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถชะลอการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ได้ และยังพบว่าการใช้รา *P. lilacinus* ร่วมกับรา *T. harzianum* พร้อมด้วยอินทรียวัตถุทำให้พืชมีความแข็งแรงขึ้นในขณะเดียวกันก็ลดอัตราการเกิดปมที่ระบบรากได้อีกด้วย

Santiago *et al*. (2006) ได้ทำการแยกรา *P. lilacinus* และนำมาทดสอบเพื่อหาสายพันธุ์ราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. paranaensis* ในต้นมะเขือเทศพบว่าในทุกกรรมวิธีที่ใส่รา *P. lilacinus* มีผลทำให้จำนวนประชากรไส้เดือนฝอยมีปริมาณลดลงและรา *P. lilacinus* นี้สามารถดำรงชีพอยู่รอดในดินได้

Kiewnick และ Sikora (2006) ทดสอบรา *P. lilacinus* strain 251 พบว่าสายพันธุ์นี้มีศักยภาพในการควบคุม *M. incognita* ในมะเขือเทศ จากการทดลองพบว่า *P. lilacinus* strain 251 สามารถลดอัตราการเกิดปมได้ 66 เปอร์เซ็นต์ ลดจำนวนไข่ 74 เปอร์เซ็นต์ และลดจำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยในรากมะเขือเทศได้ 71 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับไม่ใช้รา *P. lilacinus* และยังพบว่า ศักยภาพของการควบคุม มีความสัมพันธ์กับปริมาณและจำนวนครั้งของการใช้ *P. lilacinus* อีกด้วย

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า *P. lilacinus* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้ เข้าทำลายไส้เดือนฝอยแตกต่างกัน บางสายพันธุ์ไม่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้ (Dunn *et al.,* 1982) ส่วนการใช้ราชนิดนี้ในสภาพไร่นั้นบางครั้งก็ไม่ควบคุมไส้เดือนฝอยได้ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณราอยู่เป็นจำนวนมาก (Hewett *et al.*, 1988) จึงเห็นได้ชัดว่าจำเป็นจะต้องมีการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับรา รวมทั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างรากับไส้เดือนฝอยอีกมาก การอยู่รอดของราอาจอยู่ในรูปของการใช้อินทรียวัตถุที่มีอยู่ในดินหรือในรูปของการเป็นพาราสิตกับไส้เดือนฝอย ปริมาณและคุณภาพของอินทรียวัตถุที่มีอยู่ในดิน การแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นๆ สิ่งเหล่านี้อาจมีอิทธิพลต่อการเป็นพาราสิตต่อไส้เดือนฝอย (Stering, 1991)

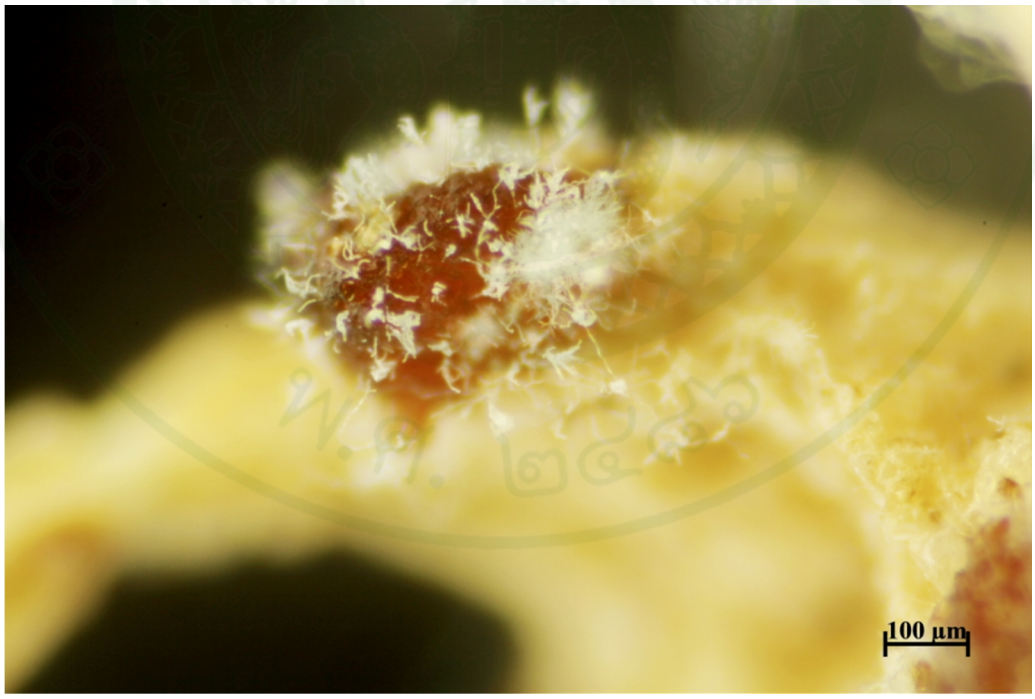
ในปัจจุบันมีการศึกษาราที่แยกได้จากดินหลายชนิดมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยได้แก่ รา *P. lilacinus* ซึ่งเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย *M. incognita* และ *M. hapla* ในรากมะเขือเทศและยังเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศอีกด้วย (Kiewnick and Sikora, 2004) (ภาพที่ 4) ราในสกุล *Arthrobotrys dactyloides* และ *A. brochopaga* สร้าง ring traps มารัดรอบๆ ลำตัวของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไส้เดือนฝอย (ภาพที่ 5) ส่วน *Arthrobotrys oligospora* จะสร้างตาข่ายเหนียว (sticky nets) ในรา *Dactylaria haptotyla* และ *Nematoctonus* spp. สามารถสร้าง sticky knobs ส่วนรา *Drechmeria coniospora* และ *Hirsutella rhossiliensis* สามารถสร้างสปอร์เหนียว ซึ่งราแต่ละชนิดสามารถสร้างกับดักและสร้างเส้นใยเข้าไปเจริญในตัวไส้เดือนฝอยและไส้เดือนฝอยจะตายในที่สุด

Kiewnick (2014) ทดสอบการใช้ *Paecilomyces lilacinus* strain 251 ในรูปของผลิตภัณฑ์ทางการค้า BioAct WG เพื่อควบคุม *Meloidogyne enterolobii* พบว่าสามารถควบคุมโรครากปมในมะเขือเทศได้ทั้งแปลงทดสอบและพื้นที่ที่มีการระบาดของโรครากปม ทำให้ประชากรของไส้เดือนฝอยลดลงและสามารถเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศให้มากขึ้นกว่าเดิมด้วย

Zhou *et al.* (2014) ได้แยกรา endophytes จากต้นฝ้าย ได้แก่ *P. lilacinus* และ *Chaetomium globosum* และนำราทั้ง 2 ชนิดมาทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) พบว่า ราทั้ง 2 ชนิดสามารถลดจำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยรากปมในดินได้ นอกจากนี้ยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืชด้วย



ภาพที่ 4 *Paecilomyces lilacinus* เจริญบนกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 5 รา *Arthrobotrys dactyloides* สร้าง ring traps มารัดรอบลำตัวของไส้เดือนฝอย

ที่มา: Kiewnick and Sikora (2004)

Sun *et al.* (2006) ได้รายงานการสำรวจรวบรวมเชื้อ *P. lilacinus, Fusarium* spp, *Pochonia chlamydosporium, Penicillium* sp., *Metarhizium* sp. และ actinomycetes ที่แยกได้จากไข่และตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. ว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่และตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยในดินได้

Birgit *et al.* (2006) กล่าวถึงราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยว่าเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถฆ่าและย่อยสลายไส้เดือนฝอยโดยการใช้โครงสร้างพิเศษที่เกิดจากเส้นใย เรียกว่า ห่วง (trap) หรือสปอร์เพื่อจับไส้เดือนฝอยที่มีรูปร่างคล้ายเส้นด้ายหรือใช้ปลายของเส้นใยบุกรุกไข่และ cyst ไส้เดือนฝอยก่อนที่จะเข้าทำลายผนังเซลล์และย่อยสลายตัวไส้เดือนฝอยรายละเอียดรูปแบบโครงสร้างของราที่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยแสดงในตารางที่ 1 โดยราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอย สามารถพบได้ทั่วไปโดยเฉพาะในดินที่มีอินทรียวัตถุสูง วิธีการแยกราอย่างง่ายทำโดยใช้เทคนิค soil sprinkling เริ่มจากการนำดิน 1 กรัม มาโรยบนบนอาหาร water agar จากนั้นใช้สารแขวนลอยไส้เดือนฝอยเป็นเหยื่อล่อ ซึ่งโดยมากในเขตอุณหภูมิอบอุ่นจะพบราสกุล *Arthrobotrys oligospora* มากที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 รูปแบบโครงสร้างของราปฏิปักษ์ที่เข้าทำลายไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

Infection structure	Species	Taxonomic classification
Adhesive nets	*Arthrobotrys oligospora*	Hyphomycetes
	A. conoides	
	A. musiformis	
	A. superba	
	Duddingtonia flagrans	
Adhesive branches	*Monacrosporium gephyropagum*	Hyphomycetes
Adhesive knobs	*M. ellipsosporum*	Hyphomycetes
	M. haptotylum	
Constricting rings	*A. dactyloides*	Hyphomycetes
	A. brochopaga	
Adhesive knobs and adhesive spores	*Nematoctonus concurrens*	Basidiomycetes
Adhesive spores	*N. leiosporus*	Basidiomycetes
	Drechmeria coniospora	Hyphomycetes
	Hirsutella rhossoliensis	
Ingested spores	*Harposporium anguillulae*	Hyphomycetes
Zoospores	*Catenaria anguillulae*	Chytridiomycetes
	Haptoglossa dickii	Oomycetes
Adhesive hyphae	*Stylopage hadra*	Zygomycetes
	Cystopage cladospora	
Toxic droplets	*Pleurotus ostreatus*	Basidiomycetes
Appressoria	*Pochonia chlamydosporia*	Hyphomycetes

ที่มา: Birgit *et al.* (2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รา *Arthrobotrys oligospora*, *Pochonia chlamydosporia* และราปฏิปักษ์ชนิดอื่น สามารถเจริญอยู่บริเวณรากของพืชได้ (Bordallo *et al.,* 2002; Birgit *et al.,* 2006) ทั้งภายในและภายนอกราก ด้วยการใช้ appressoria แทงผ่านผนังเซลล์สู่ epidermis และ cortex cells แต่ไม่เข้าไปในส่วนของ vascular tissues ในขณะเดียวกันพืชทำการสร้างโครงสร้างบางอย่างออกมา เช่น papillae, lignitubers และโครงสร้างอื่นที่มาจากผนังเซลล์ เพื่อป้องกันตัวเองจากการบุกรุก แต่โครงสร้างดังกล่าวไม่สามารถป้องกันการเจริญของราบริเวณรากได้ ราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยจึงอยู่ในสภาพเป็น endophytic fungi

ลักษณะโดยทั่วไปของรา *Arthrobotrys* spp. โคโลนีมีลักษณะแผ่ขยายออกไปบนอาหารเส้นใยบาง และมีสีใสหรือสีเทาจนถึงสีชมพู conidiophore ตั้งตรงใส มีผนังกั้น และมีลักษณะแบบ simple หรือแตกกิ่งก้าน (blanched) ปลายของ conidiophore พบกลุ่มของ conidia ที่มีสองเซลล์ในบางชนิดมีหนึ่งเซลล์ หรือหลายเซลล์ conidia ใส บนกิ่งก้าน conidiophore ที่มีลักษณะคล้ายซี่ฟัน (denticle) บ่อยครั้ง พบว่า conidial head เกิดขึ้นระหว่างเซลล์ (intercalary) โดย conidiophore ที่สร้างขึ้นมาใหม่ ในราบางชนิดสร้างกับดักในการจับไส้เดือนฝอยแบบตาข่ายเหนียว (adhesive network) เช่น *A. oligospora*, *A. conoides*, *A. musiformis*, *A. arthrobotryoides*, *A. entomophaga*, *A. robusta* (Janson and Nordbring Hertz, 1980) ราที่สร้างกับดักแบบ adhesive knob เช่น *A. haptolyla*, *A. dasgupture* (Boag *et al.,* 1988) ราที่มีโครงสร้างกับดักแบบ constricting ring เช่น *A. dactyloides* (Balan and Gerber, 1972) หรือแบบ adhesive branched ได้แก่ *A. perpasta*

นอกจากนั้นยังมีราไมคอร์ไรซา ได้แก่ เวสิคูลาร์ อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา (วี-เอไมคอร์ไรซา) ซึ่งเป็นราที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืช โดยมีความสัมพันธ์แบบอำนวยประโยชน์ซึ่งกันและกัน สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่พืช โดยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและลดการใช้ปุ๋ย ช่วยเพิ่มปริมาณการดูดธาตุฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และจุลธาตุอาหารให้มากขึ้น (Jackson *et al*., 2002; Nikitas *et al*., 2002; Bagyaraj, 1992) และยังช่วยให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในดินที่มีฟอสฟอรัสน้อย (มลชัย, 2541) เชื้อรา วี-เอไมคอร์ไรซา สามารถลดปริมาณความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังมีรายงานการลดความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยกับผักชนิดอื่นๆ ด้วย (Sikora and Schonbeck, 1995; Sikora, 1992)

Thomas *et al.* (1989) ทดลองใช้ราไมคอร์ไรซา 6 ชนิด ควบคุม *Meloidogyne incognita* ในการปลูกต้นกระวาน ปรากฏว่าราไมคอร์ไรซา *Gigaspora margarita* และ *Glomas faciculatum* สามารถลดจำนวนประชากรของ *M. incognita* ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ราที่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยศัตรูพืช สามารถจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานและโครงสร้างพิเศษสำหรับดักจับไส้เดือนฝอยได้ 3 กลุ่ม (Waller and Faedo, 1996) โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มของ Endoparasitic (endozoic) fungi เป็นราที่เข้าทำลายไส้เดือนฝอยโดยการสร้างสปอร์เหนียว (sticky spore) ซึ่งจะงอก และแทงผ่านเข้าไป หรือเกาะติดกับผิวด้านนอกของไส้เดือนฝอย ในกลุ่มที่สอง Egg–parasite fungi เป็นราที่มีความสามารถในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย โดย เฉพาะไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematodes) และ cyst nematode เช่น รา *Paecilomyces lilacinus* และ *Acremonium strictum* และกลุ่มที่สามคือ Predacious fungi เป็นราที่สร้างโครงสร้างพิเศษบนเส้นใยในการดักจับไส้เดือนฝอยได้แก่ โครงสร้างปมเหนียว (adhesive knob) ตาข่ายเหนียว (adhesive network) และแบบห่วงรัด (constricting ring) ตัวอย่างราที่สำคัญ ได้แก่ *Trichothecium* sp., *Dactylaria* spp., *Stylopage* sp. และ *Arthrobotrys* spp. (Webster, 1980)

ปัจจุบันมีการศึกษาเรื่องการใช้ราในการควบคุมโรคไส้เดือนฝอยรากปมและโรคพืชชนิดอื่นในรูปแบบของ biocontrol agent มากกว่าการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งการผลิตราเพื่อควบคุมโรคพืชมีการผลิต 2 รูปแบบ ได้แก่ 1) dried cell โดยวิธีการ lypophylization หรือ azetone dehydration ซึ่งเป็นวิธีการที่คงสภาพของเอ็นไซม์ไว้ได้หลายชนิดเช่น esterase, amidase และ oxidoreductase 2) การผลิต spore โดยการใช้ Tween-80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ล้างที่บริเวณผิวหน้าของโคโลนีราในจานเพาะเชื้อแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Demain and Solamon, 1986)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาราที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยในประเทศไทย

จากการสืบค้นข้อมูลจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทยมีรายงานผลงานวิจัย โดยสืบศักดิ์ (2533) รายงานว่ามีรามากกว่า 400 ชนิด ใน 15 สกุล ที่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้

ศรศิลป์ (2536) ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับราที่สามารถใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยได้มีจำนวน 33 สกุล ด้วยกัน ในจำนวนนี้มีราสกุล *Paecilomyces* รวมอยู่ด้วย

อนุชา (2537) ได้เก็บสำรวจและรวบรวมรา *Paecilomyces* จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรครากปมจากทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งพบว่า ราสายพันธุ์ต่างๆ สามารถเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ 66.6 -100 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าราดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ได้

มนตรี (2538) ได้ศึกษาการใช้ราร่วมกับแง่งขิงที่มีไส้เดือนฝอยรากปม โดยใช้รารองก้นหลุมก่อนปลูกแง่งขิงที่มีไส้เดือนฝอยรากปม สามารถลดปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมลงและให้ผลผลิตใกล้เคียงกับวิธีการใช้สารเคมี oxamyl จุ่มขิงก่อนปลูก

คมกฤช (2539) ได้ทำการทดสอบการใช้สปอร์ของรา *Paecilomyces* ควบคุมโรครากปม พบว่า สารแขวนลอยสปอร์ของราใช้สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีกว่าการใช้เส้นใยของรา โดยสามารถควบคุมโรครากปมได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ความเข้มข้นของสปอร์มากกว่าหรือเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

อมรศรี (2548) สามารถใช้สารสกัดหยาบที่สกัดได้จากเห็ด *Pleurotus ostreatus* ในการควบคุมตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม และได้ทดสอบการนำหัวเชื้อเห็ดเพื่อควบคุมโรครากปมในสภาพโรงเรือน พบว่า สามารถลดจำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยรากปมในดินได้ ลดอัตราการเกิดปมที่ระบบรากของพืช และสามารถลดจำนวนกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมด้วย

ธารทิพย และ นุชนารถ (2550) ทำการแยกราจากดินบริเวณที่มีการระบาดของโรครากปม พบรา 7 สกุลได้แก่ *Aspergillus flavas*, *A niger, Rhisopus* sp., *Fusarium* sp,. *Trichoderma* sp., *Penicillum* sp. และ *P. lilacinus* นำรา *P. lilacinus* มาทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไส้เดือนฝอยรากปมในอัตราเส้นใยที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่าง 5 และ 10 กรัมต่อต้น พบว่าเกิดปม15.20 และ 10.20 ปมต่อต้น ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ control ซึ่งไม่ใส่ *P. lilacinus* มีจำนวนปม 27.40 ปมต่อต้น หรือมีจำนวนปมสูงกว่า 12.20 และ 17.20 ปมต่อต้น ในอัตราการใช้ 5 และ 10 กรัม ตามลำดับ

นุชนารถ และ ธารทิพย (2552) ทดสอบใช้ราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* สาเหตุของโรครากปม โดยทำการทดสอบวิธีการใช้ราปฏิปักษ์ในสภาพแปลงปลูกพริกของเกษตรกรในพื้นที่ จ. กาญจนบุรี ในสภาพต้นกล้าพริกอายุ 30 วัน ที่มีไส้เดือนฝอย *M. incognita* เข้าทำลาย โดยนำราปฏิปักษ์ที่เพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างอัตรา 500 กรัมต่อพื้นที่แปลงทดลอง ขนาด 1x5 เมตร รองก้นหลุมก่อนปลูกกล้าพริกและโรยรอบโคนต้น มีจำนวนครั้งของการใช้ราปฏิปักษ์โดยวิธีใส่ 1, 2 และ 4 ครั้ง เปรียบเทียบกับไม่ใส่ราปฏิปักษ์ (control) เมื่อวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากพริกที่อายุเก็บเกี่ยวหรือ 3 เดือน ผลการทดสอบพบว่า การใช้ราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* ที่ 2 และ 4 ครั้ง มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* สามารถลดการเกิดปมได้ 50-75 % ของระบบราก หรือมีดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก 2.85 และ 2.54 ตามลำดับ ในขณะที่การใส่ 1 ครั้งและไม่ใส่ราปฏิปักษ์มีดัชนีการเกิดปมที่รากพริกเท่ากับ 3.54 และ 4.90

Ruanpanun *et al.* (2010) ได้ทำการแยกราและ Actionmyces จากดินที่มีการระบาดของโรครากปมในเขตภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทยจำนวน 23 ตัวอย่าง แยกได้ 67 สายพันธุ์ เป็นรา *Penicillium* spp. 37.3 เปอร์เซ็นต์, *Fusarium* spp. 32.8 เปอร์เซ็นต์ และ Actionmyces 83 สายพันธุ์ โดย 97.6 เปอร์เซ็นต์ ของ Actionmyces เป็น *Streptomyces* จากการนำราในกลุ่ม Actionmyces ที่แยกได้มาทดสอบการเข้าทำลายไข่และตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย *M. incognita* ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่ามี Actionmyces 7 สายพันธุ์ และรา 10 สายพันธุ์ ที่สามารถลดอัตราการฝักไข่และหยุดการเคลื่อนที่ของ *M. incognita* ได้ และยังพบว่ารา Actionmyces ที่แยกได้บางสายพันธุ์สามารถผลิตฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย

ในด้านการแยกและเพาะเลี้ยงรา *Paecilomyces* ได้มีการศึกษาการแยกราจากดินที่นิยมใช้คือวิธี dilution plate (เลขา และคณะ, 2542) สำหรับการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณรามีการใช้วัสดุหลายชนิดโดยมากจะใช้เมล็ดพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวบาเลย์ ข้าวโพด ข้าวเจ้า และข้าวฟ่าง ในประเทศไทยโดยสุภกิจ (2532) และ ศรศิลป์ (2536) ใช้เมล็ดข้าวฟ่างเป็นวัสดุในการเพิ่มปริมาณราและได้ผลดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างและการแยกราจากดินและรากพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลาย ได้แก่ ถุงซิปล๊อค ปากกาเขียนพลาสติก กรรไกร พลั่วมือและสมุดบันทึกรายละเอียดหลอดทดลอง ขวดแก้ว ช้อนตักสาร จานเลี้ยงเชื้อ เครื่องชั่งสาร เครื่องเขย่าหลอดทดลอง ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ยเชื้อ ไมโครปิเปต สำลี ตะแกรงสำหรับวางหลอดทดลอง และอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. อุปกรณ์ในการจำแนกชนิดและการเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของรา ได้แก่ เข็มเขี่ยเชื้อ ปากคีบ จานเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ช้อนตักสาร บีกเกอร์ เครื่องชั่งสาร ตู้อบลมร้อน หม้อนึ่งความดันไอ ตะเกียงแอลกอฮอล์ เอทธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 65, 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ แผ่นสไลด์และกระจกปิดแผ่นสไลด์ น้ำกลั่น ดินสอ น้ำยาทาเล็บ กระดาษทิชชู แท่งแก้วสามเหลี่ยม อาหารเลี้ยงเชื้อ กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope

3. อุปกรณ์ในการทดสอบศักยภาพของราในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม ในห้อง ปฏิบัติการ ได้แก่ ตะแกรงหยาบขนาด 20 และตะแกรงละเอียดขนาด 500 mesh Erlenmeyer flask ชนิดมีฝาปิดขนาด 250 มิลิลิตร แผ่นแก้วสไลด์นับจำนวนไส้เดือนฝอย (slide count) แผ่นพลาสติกใสขนาด 5×7 เซนติเมตร เข็มฉีดยา กลีเซอรีน น้ำเกลือ (0.9 %) เครื่องเขย่าหลอดทดลอง สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (0.525% NaOCl) Haemacytometer 24-well tissue culture plate กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกำลังขยายสูง

4. อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงขยายราปฏิปักษ์ในเมล็ดพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ ลังถึง ผ้าขาวบาง เตาแก๊ส Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร จุกสำลี เมล็ดพืชชนิดต่างๆได้แก่ ข้าวฟ่าง ข้าวหอมมะลิ ข้าวกล้อง ถั่วเหลืองและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

5. อุปกรณ์ในการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ ในการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมในสภาพโรงเรือน ได้แก่ เมล็ดพริกพันธุ์หัวเรือ กระดาษทิชชู จานเลี้ยงเชื้อ ป้ายติดรายละเอียด ถาดเพาะกล้าขนาด 104 หลุม กระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว พีท-มอส ดินร่วน ดินร่วนปนทราย (ดินสีดา 50: ดินทราย 50) กรงกันแมลงขนาด 95×140×95 เซนติเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเก็บรวบรวมราในกลุ่ม Hyphomycetes จากแหล่งที่มีการระบาดของโรครากปมพริก

1.1 การเก็บตัวอย่างดินและรากพืช

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณแปลงพริกที่มีการระบาดของโรครากปมโดยใช้พลั่วมือขุดดินในระดับความลึกประมาณ 10-15 เซนติเมตร ตักดินน้ำหนักประมาณ 300 กรัม ใส่ถุงซิปล๊อค ปิดปากถุง ส่วนตัวอย่างรากพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลาย มีลักษณะอาการรากเป็นปุ่มปม ทำการเก็บรากพืชใส่ถุงซิปล๊อค ปิดปากถุง บันทึกข้อมูลแหล่งที่เก็บดิน ได้แก่ วันที่ และสถานที่เก็บตัวอย่าง

1.2 การแยกราจากดินและรากพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลาย

1.2.1 การแยกราจากดิน

ก) Soil dilution plate method (เลขา และคณะ 2543; Barron, 1978) ชั่งดินน้ำหนัก 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร ให้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-1} เขย่าให้เข้ากัน ใช้ปิเปตดูดสารละลายดินปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^{-2} ปฏิบัติเป็นลำดับ ได้ความเข้มข้นของสารละลายเจือจางตามลำดับเท่ากับ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายของความเข้มข้น 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 1 มิลลิลิตร ทำ 5 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ 1) อาหาร Gochenaur's glucose ammonium agar (GAN) ที่มีส่วนผสมของ Rose Bengal และ Streptomycin 2) อาหาร Half strength potato dextrose agar (½PDA) และ 3) อาหาร Water agar (WA) ลงบนสารละลายดินและหมุนจานเลี้ยงเชื้อเบาๆ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3-5 วัน หรือนานกว่านั้น เมื่อราเจริญบนอาหาร ใช้เข็มเขี่ยย้ายโคโลนีของราที่เจริญในจานเลี้ยงเชื้อทุกโคโลนีมาเลี้ยงบนอาหาร slant PDA เพื่อเก็บเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure culture) สำหรับใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกชนิดต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข) Soil plate method (เลขา และคณะ 2543; Warcup, 1950) ใช้ช้อนตักดินแบบ microspatula ตักดินประมาณ 0.005-0.015 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร แล้วเททับเบาๆด้วยอาหารวุ้น 3 ชนิด ได้แก่ อาหาร GAN ที่มีส่วนผสมของ Rose Bengal และ Streptomycin อาหาร ½PDA และอาหาร WA หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเบาๆ ให้เม็ดดินกระจายทั่ว จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ในที่มืด ตรวจสอบการเจริญของราทุกๆวัน เมื่อพบการเจริญของเส้นใยรา ทำการแยกราให้บริสุทธิ์โดยใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อ ตัดปลายเส้นใยราย้ายลงบน slant PDA สำหรับใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกชนิดต่อไป

1.2.2 การแยกราจากกลุ่มไข่ในรากพืชที่แสดงอาการโรครากปม

นำต้นพืชที่แสดงอาการรากปมขึ้นมาเขย่าเบาๆ เพื่อให้ดินส่วนใหญ่หลุดออกไปเหลือเพียงดินบริเวณที่ติดแนบกับผิวราก แล้วใช้กรรไกรตัดที่โคนต้นพืช นำรากมาล้างผ่านน้ำไหลเป็นเวลา 10-20 นาที ใช้กรรไกรสะอาดตัดรากพืชยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำรากที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ (sodium hypochlorite, NaOCl) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ซับน้ำด้วยกระดาษทิชชูที่อบฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นรากวางบนอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ อาหาร GAN, ½PDA และ WA ที่ใส่ Streptomycin ความเข้มข้น 0.01% ในอัตราส่วน 1:10 (สารละลาย Streptomycin: อาหารเลี้ยงเชื้อ) ที่เติมลงในอาหารหลอมที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ชิ้นต่อจาน สำหรับรากที่วางบน GAN นั้นต้องเก็บในที่มืดเป็นเวลา 3-5วัน เนื่องจาก Rose Bengal เป็นพิษกับราในที่มีแสง จากนั้นเก็บราที่เจริญไว้บน slant PDA เพื่อนำมาจำแนกชนิดต่อไป

2. การจำแนกชนิดและการเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของรา

2.1 การจำแนกชนิด (เลขา และคณะ, 2543)

2.1.1 ศึกษาอัตราการเจริญของราบนอาหาร PDA เมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 7-14 วัน บันทึกสีของโคโลนีด้านบน และด้านล่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) และ fruiting body แบบต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.2 ศึกษารูปร่างลักษณะและการสร้างสปอร์ของราที่เจริญบนอาหาร PDAในจานเลี้ยงเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound เพื่อตรวจดูลักษณะเส้นใย fruiting body รูปร่างลักษณะและการเกิดสปอร์

2.1.3 ศึกษาลักษณะของเส้นใย สปอร์ fruiting body และลักษณะโครงสร้างอื่นๆ ของราใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound โดยใช้เข็มเขี่ยเส้นใยและสปอร์ นำมาวางบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำกลั่น ปิดทับด้วย cover slip แล้วนำไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการบันทึกผล รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราแต่ละชนิด และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2 การเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของรา

2.2.1 เก็บรักษาราลงบนหลอดทดสอบที่มีอาหาร PDA (slant PDA) (Smith and Onion, 1994) เลี้ยงราที่แยกบน slant PDA และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจสอบความมีชีวิตของราทุกๆ 1 เดือน โดยการเขี่ยเส้นใยลงไปเลี้ยงในอาหาร PDA จนอาหารเดิมที่เลี้ยงแห้ง จึงทำการย้ายไปบน slant PDA หลอดใหม่

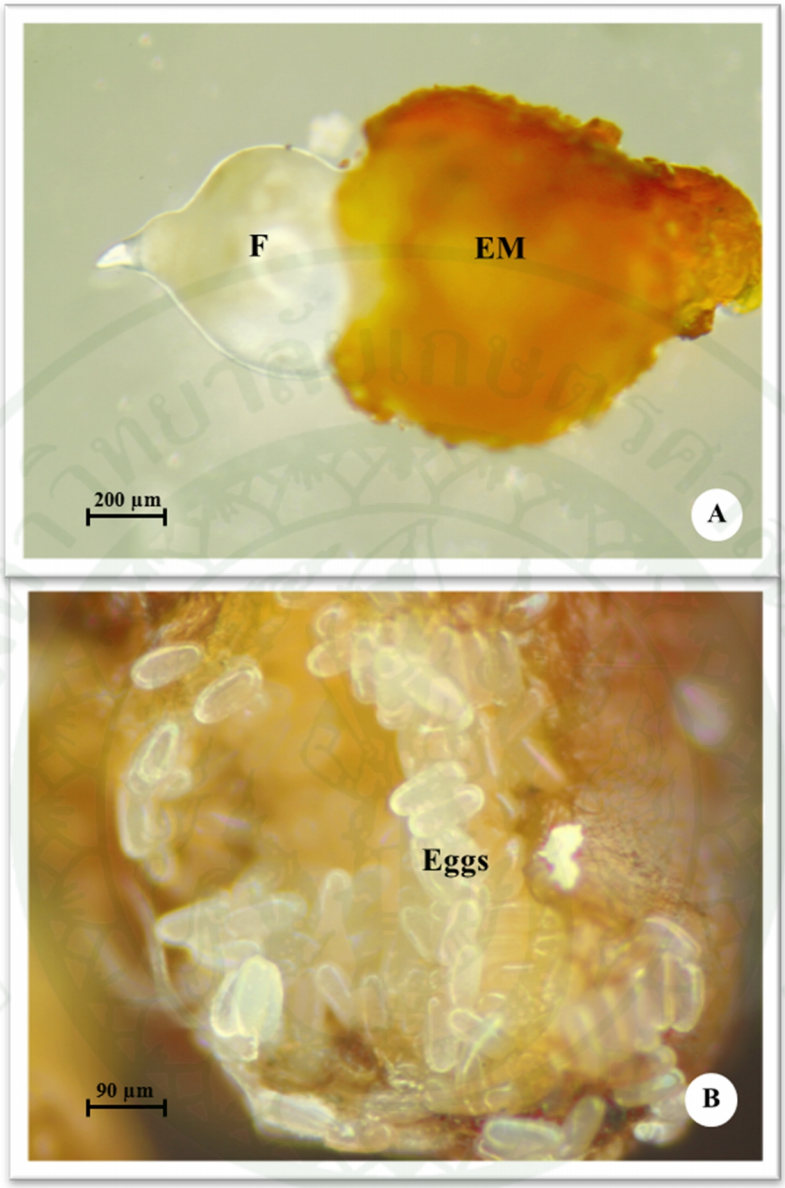
2.2.2 เก็บรักษาราในดินอบฆ่าเชื้อ (Smith and Onions, 1994) เลี้ยงราบริสุทธิ์ ใน slant PDA เมื่อรามีอายุได้ 7 วัน ใช้ micropipette ดูดน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมลงใน slant PDA ใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อขูดที่ผิวหน้า PDA เบาๆ เพื่อให้สปอร์ของราหลุดออกมาหลังจากนั้นทำการเขย่าเพื่อให้สปอร์กระจายตัว ใช้ micropipette ดูด spore suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวด vial ขนาดเล็ก ซึ่งบรรจุดิน ปริมาตร 1 ใน 2 ของขวด ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที โดยทำการนึ่งฆ่าเชื้อดิน 3 ครั้ง เมื่อใส่ spore suspension แล้วปิดฝาขวด แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการตรวจสอบความมีชีวิตของราที่เวลา 6 เดือน และ 12 เดือน โดยการนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกการเจริญเติบโตของราบนอาหาร PDA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การทดสอบประสิทธิภาพของราในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมในระดับห้องปฏิบัติการ

3.1 การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ของ *Meloidogyne incognita* โดยนำรากพริกที่แสดงอาการรากปมมาล้างผ่าน น้ำไหลเพื่อให้ดินที่ติดมากับรากหลุดออกให้หมด นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope เลือกกลุ่มไข่สีน้ำตาลแดงที่อยู่เดี่ยวๆ บริเวณตอนปลายของรากพริก ใช้ปลายเข็มหรือปากคีบแยกตัวเต็มวัยเพศเมียและกลุ่มไข่ออกจากราก (ภาพที่ 6A) นำกลุ่มไข่แต่ละกลุ่มไปแช่ในน้ำกลั่น (ภาพที่ 6B) นำตัวเต็มวัยเพศเมียแช่ในน้ำเกลือ (0.9%) เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวของไส้เดือนฝอยแตก กำหนดรหัสให้กลุ่มไข่และตัวเต็มวัยเพศเมียตรงกัน ทำการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย (species) ด้วยการตัดดูริ้วรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ของไส้เดือนฝอยรากปม (ภาพที่ 7) โดยทำการหยดกลีเซอรีนลงบนแผ่นพลาสติกใส นำตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยที่แยกไว้ วางลงบนหยดกลีเซอรีน ใช้ปลายเข็มตัดส่วนหัวของไส้เดือนฝอยให้ขาดออก บีบเอาของเหลวที่อยู่ภายในลำตัวออกให้หมดโดยใช้ไม้ไผ่เหลาปลายให้แหลมกดลงเบาๆ หลังจากนั้นใช้ปลายเข็มตัดตรงริ้วรอยย่นส่วนก้นของไส้เดือนฝอยให้เป็นแผ่นสี่เหลี่ยมแล้วใช้ปลายไม้ไผ่ปัดเบาๆ เพื่อลอกเอาเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการออก ให้เหลือเพียงผนังลำตัวด้านนอกที่มองเห็นริ้วรอยย่นที่อยู่บริเวณก้น ย้ายรอยย่นส่วนก้นที่ตัดได้ลงบนสไลด์แก้วแผ่นใหม่แล้วหยดกลีเซอรีน กดให้จมแล้วปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ (cover slip) นำไปตรวจดูลักษณะของริ้วรอยย่นส่วนก้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope เปรียบเทียบลักษณะรูปแบบ perineal pattern ของ *M. incognita* ของ Eisenback (1985) (ภาพที่ 8) จากนั้นกลุ่มไข่ที่อยู่ในน้ำกลั่นและกลุ่มไข่ที่แยกได้จากตัวเต็มวัยเพศเมียที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็น perineal pattern ของ *M. incognita* นำกลุ่มไข่ดังกล่าวไปใส่ในกล้าพริกอายุ 30-40 วัน 1 ต้นต่อ 1 กลุ่มไข่ ปลูกพริกในดินร่วนปนทราย ดูแลให้เจริญเติบโตจนมีอายุประมาณ 40-50 วัน ได้ประชากรของไส้เดือนฝอยที่เป็น *M. incognita* บริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

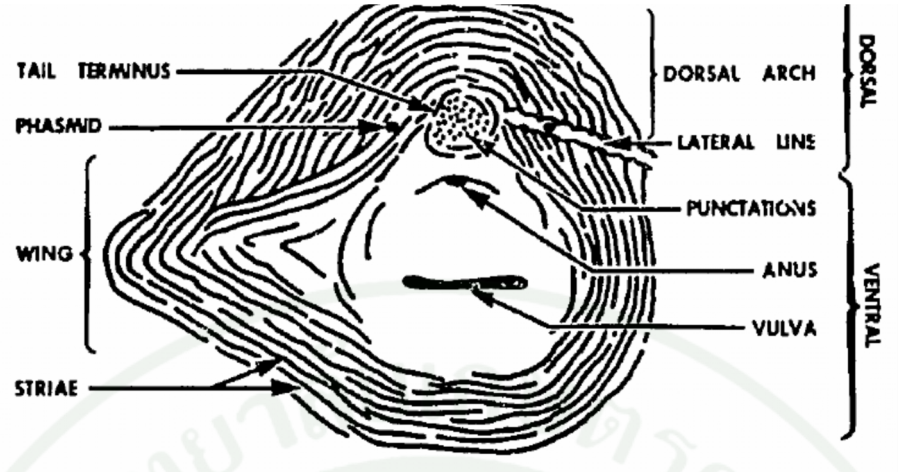


ภาพที่ 6 ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. จากรากพริก

A. ตัวเต็มวัยเพศเมีย (F) และกลุ่มไข่ (EM = egg mass)

B. ลักษณะไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

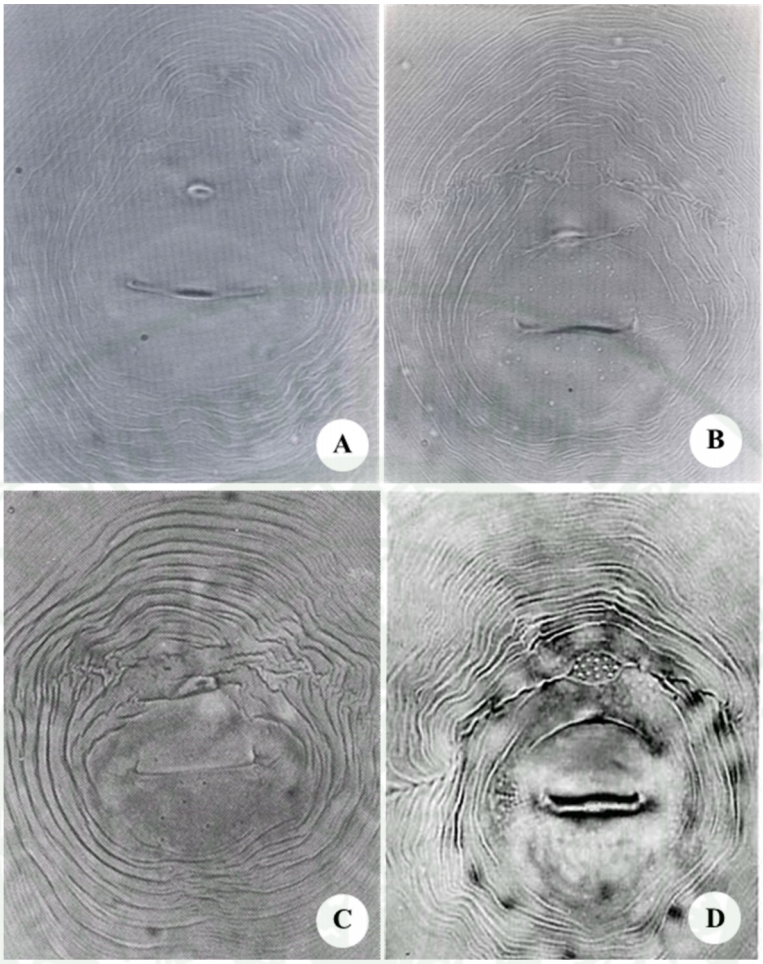
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 ลักษณะทั่วไปของรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp.

ที่มา: Eienback (1985)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 รูปแบบรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne*) ที่แตกต่างกันในแต่ละ species

A. *M. incognita* รอยย่นส่วนก้นมี dorsal arch สูง striae เป็นเส้นเรียบหรือเป็นคลื่น lateral line ไม่เด่นชัด

B. *M. javanica* มี dorsal arch กลมหรือกลมรี lateral line ชัดเจน

C. *M. arenaria* มี dorsal arch กลม เส้น striae ใน arch ลาดบริเวณ lateral line และม้วนตัวเล็กน้อยทำให้เกิดโหนกขึ้นทั้งสองข้าง

D. *M. hapla* รอยย่นส่วนก้นคล้ายรูปหกเหลี่ยมหรือรูปไข่ dorsal arch กลม lateral line ไม่ชัด อาจพบรอยเส้น striae บนและล่างมาพบกันบริเวณ lateral line เกิดเป็นเหมือนปีกทั้งสองข้างของ striae และบริเวณที่เคยเป็นปลายหางสังเกตเห็นรอยปรุหรือจุด

ที่มา: Eienback (1985)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การเพิ่มปริมาณของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* นำต้นกล้าพริกพันธุ์หัวเรือปลูกลงดินร่วนปนทรายในวงบ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร จำนวน 5-6 ต้นต่อวงบ่อ ย่อยรากพริกที่ได้จาก ข้อ 3.1 ใส่ลงใกล้ๆ กับรากพริกทุกต้น ดูแลรดน้ำและใส่ปุ๋ยอย่างสม่ำเสมอจนพริกมีอายุครบ 60 วัน ได้กลุ่มไข่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในงานทดลอง

3.3 การเตรียมไข่ของไส้เดือนฝอย *M. incognita* นำรากพริกจาก ข้อ 3.2 มาล้างผ่านน้ำไหลเอาเศษดินออก นำรากที่สะอาดแล้วใส่ลงใน Erlenmeyer flask พลาสติกชนิดมีฝาปิด ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม 0.525% sodium hypochlorite (NaOCl) พอท่วมราก แล้วเขย่าต่อเนื่องด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำตะแกรงขนาด 20 mesh วางซ้อนลงบนตะแกรงขนาด 500 mesh เทน้ำใน Erlenmeyer flask ที่ผ่านการเขย่าจนครบเวลาแล้ว ลงบนตะแกรงเพื่อกรองเอารากและเศษผงขนาดใหญ่ทิ้ง ปล่อยน้ำไหลเบาๆ ผ่านตะแกรงที่อยู่ชั้นบนแล้วยกออก จะเหลือไข่ของไส้เดือนฝอยและน้ำในตะแกรงขนาด 500 mesh ล้างผ่านน้ำไหลจนสะอาด เทใส่ บีกเกอร์ และเติมน้ำให้มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร เพื่อนำไปนับจำนวน

3.4 การนับจำนวนไข่ของไส้เดือนฝอย *M. incognita* กวนน้ำในบีกเกอร์เพื่อให้ไข่กระจายตัวสม่ำเสมอด้วยแท่งแก้ว ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายของไข่ 1 มิลลิลิตร หยดลงในสไลด์นับไส้เดือนฝอยซึ่งมีความจุเท่ากับ 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (compound microscope) โดยเลือกนับเฉพาะไข่ที่มีความสมบูรณ์ ซึ่งสังเกตได้จากไข่นั้นต้องไม่เป็นสีดำทึบทั้งฟอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่ต่อ 1 มิลลิลิตร นำค่าเฉลี่ย คูณปริมาตรน้ำเริ่มต้น (500 มิลลิลิตร) จะได้เป็นจำนวนไข่ทั้งหมดที่แยกได้ นำจำนวนไข่ทั้งหมดที่แยกได้หารจำนวนไข่ที่ต้องการเพาะเชื้อต่อต้นต่อมิลลิลิตร ตั้งตกตะกอนหรือเติมปริมาตรน้ำให้ เท่ากับที่คำนวณได้

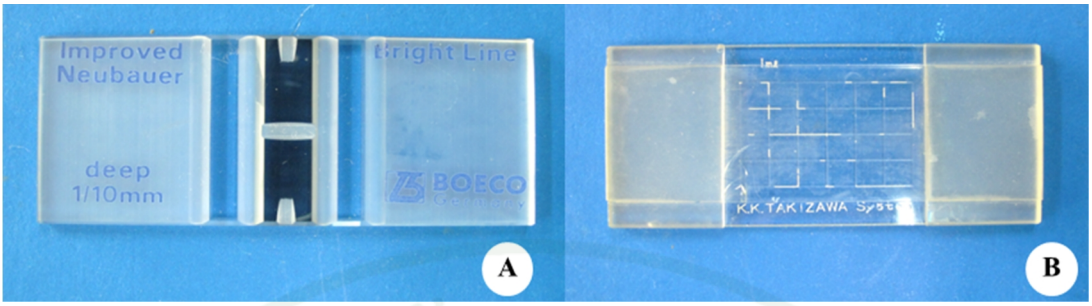
3.5 การเตรียมสปอร์ของรา (spore suspension) ปฏิบัติภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เตรียมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 25 มิลลิลิตร อุดด้วยจุกสำลีจำนวน 5-6 หลอดต่อตัวอย่าง ที่ต้องการนับ เตรียม 0.05% Tween 80 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองพลาสติกชนิดมีฝาปิดขนาด 45 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอดต่อตัวอย่างที่ต้องการนับ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำราสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนครบอายุประมาณ 7-10 วัน ใช้ cork borer เจาะบริเวณปลายของโคโลนีนำไปใส่ลงหลอด 0.05% Tween 80 ที่เตรียมไว้แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vertex mixer) ใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไมโครปิเปตดูด spore suspension ออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดน้ำกลั่นที่เตรียมไว้เขย่าให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^{-1} ใช้ไมโครปิเปตดูด spore suspension ที่ความเข้มข้น 10^{-1} ออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดน้ำกลั่นหลอดที่สองเขย่าให้เข้ากันได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^{-2} ทำแบบนี้จนได้ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^{-5}-10^{-6} หรือจนกว่าความหนาแน่นของสปอร์เจือจางจนสามารถนับได้ นำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศนแบบ compound โดยใช้สไลด์ที่มีช่องแบ่งเพื่อกำหนดปริมาตรของตัวอย่าง (Haemacytometer) (ภาพที่ 9) จากปริมาตรดังกล่าวสามารถคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตร โดยลักษณะของเครื่องมือชนิดนี้เป็นสไลด์ที่มีช่องแบ่งไว้แน่นอน และมีขอบสูงจากบริเวณขีด เมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ขอบนี้จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ ทำให้เกิดระยะห่างระหว่างกระจกและสไลด์ในบริเวณที่มีขีดคิดเป็นความลึก 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร ขีดแบ่งที่กำหนดไว้ประกอบด้วย ช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง (ภาพที่ 9) แต่ละช่องมีขนาด 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร ในแต่ละช่องใหญ่นี้มีขีดแบ่งออกเป็นช่องเล็ก 16 ช่อง แต่ละช่องเล็กมีเนื้อที่ 0.05×0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องเล็กจะมีปริมาตร 0.00025 (0.05×0.05×0.1) ลูกบาศก์มิลลิเมตร เมื่อทราบความจุที่แน่นอน จึงนำไปคำนวณหาปริมาณของสปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.6 หยด spore suspension ของราแต่ละสายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 10^{5} สปอร์ต่อมิลลิลิตร และไข่ไส้เดือนฝอยความเข้มข้น 300 ฟองต่อ 50 ไมโครลิตร ลงในถาดหลุมชนิด Tissue culture plate แบบ 24-well (ภาพที่ 4) หลังจากนั้นตรวจการเข้าทำลายของราในแต่ละสายพันธุ์ ทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการนับจำนวนไข่ที่ถูกทำลาย นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบทางสถิติแล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การถูกทำลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 Haemacytometer ที่ใช้ในการนับสปอร์รา A. และ counting chamber ชนิดช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่อง B.

ภาพที่ 10 การทดสอบการเข้าทำลายของราต่อไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ในถาดหลุมชนิด Tissue culture plate แบบ 24-well

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การจำแนกชนิด (species) ของราปฏิปักษ์ที่เข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

นำราที่มีความสามารถในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมที่ดีที่สุด มาจำแนกชนิด (species) ด้วยการศึกษาลักษณะของเส้นใย สปอร์ fruiting body และลักษณะโครงสร้างอื่นๆ ของรา ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound โดยใช้เข็มเขี่ยเส้นใยและสปอร์ นำมาวางบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำกลั่น ปิดทับด้วย cover slide แล้วนำไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการบันทึกผล รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราแต่ละชนิด และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. การเพาะเลี้ยงขยายปริมาณราปฏิปักษ์ในเมล็ดพืชและเมล็ดพืชชนิดต่างๆ

5.1 การเตรียมราปฏิปักษ์ ทำการเลี้ยงราสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

5.2 การเตรียมเมล็ดพืช นำเมล็ดพืช ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวกล้อง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ถั่วเหลืองซีกและข้าวฟ่าง แช่น้ำทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดอ่อนตัว นึ่งสุกได้ง่ายไม่แข็งกระด้าง ใช้มือซาวเมล็ดพืชขึ้นพักไว้ให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นนำไปใส่ในลังถึงที่มีผ้าขาวบางรองอยู่ ปิดฝาลังถึงเปิดไฟปานกลาง นึ่งจนเมล็ดเกือบสุก สังเกตโดยนำเมล็ดมาบีบดู ถ้าข้างในมีจุดสีขาวขุ่นเหมือนเมล็ดสาคูเพียงเล็กน้อยแสดงว่าใช้ได้ ข้อควรระวังคือ ไม่นึ่งจนสุกเกินไปจะทำให้เมล็ดติดกันเป็นแผ่นเมื่อนำไปเข้าหม้อนึ่งความดัน พักไว้จนเมล็ดเย็น ตักเมล็ดพืชชนิดต่างๆ ปริมาณ 100 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร อุดจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษและรัดด้วยยางรัด และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาพักไว้ให้เย็นและทำการเขย่าขวดเบาๆให้เมล็ดพืชกระจายตัวออกจากกัน

5.3 การย้ายราปฏิปักษ์ลงบนเมล็ดพืช ปฏิบัติภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยใช้ cork borer ลนไฟฆ่าเชื้อเจาะอาหารวุ้นตรงบริเวณขอบของโคโลนีของราปฏิปักษ์ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ภายในบรรจุเมล็ดพืชชนิดต่างๆ จากข้อ 3.2 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนราปฏิปักษ์เจริญคลุมเมล็ดพืช เป็นเวลา 7 วัน

5.4 การตรวจนับสปอร์ โดยเจือจางสปอร์ของราปฏิปักษ์ที่เลี้ยงได้จากเมล็ดพืชต่างๆด้วยวิธี ten fold serial dilution เตรียมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 25มิลลิลิตร อุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เตรียม 0.05% Tween 80 ใส่ใน 5-7 หลอดต่อตัวอย่าง ใช้ช้อนตักสารตักเมล็ดพืชที่มีราปฏิปักษ์เจริญอยู่ออกจาก Erlenmeyer flask น้ำหนัก 1 กรัมใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vertex mixer) ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^{-1} ใช้ไมโครปิเปตดูด spore suspension ที่ความเข้มข้น 10^{-1} ออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดน้ำกลั่นหลอดที่สองเขย่าให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^{-2} ทำแบบนี้จนได้ความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^{-5} และ 10^{-6} หรือจนกว่าความหนาแน่นของสปอร์จะเจือจางจนสามารถนับได้ นำไปตรวจนับโดยใช้ Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

5. การทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมพริกในสภาพโรงเรือน

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ (ตารางที่ 2)

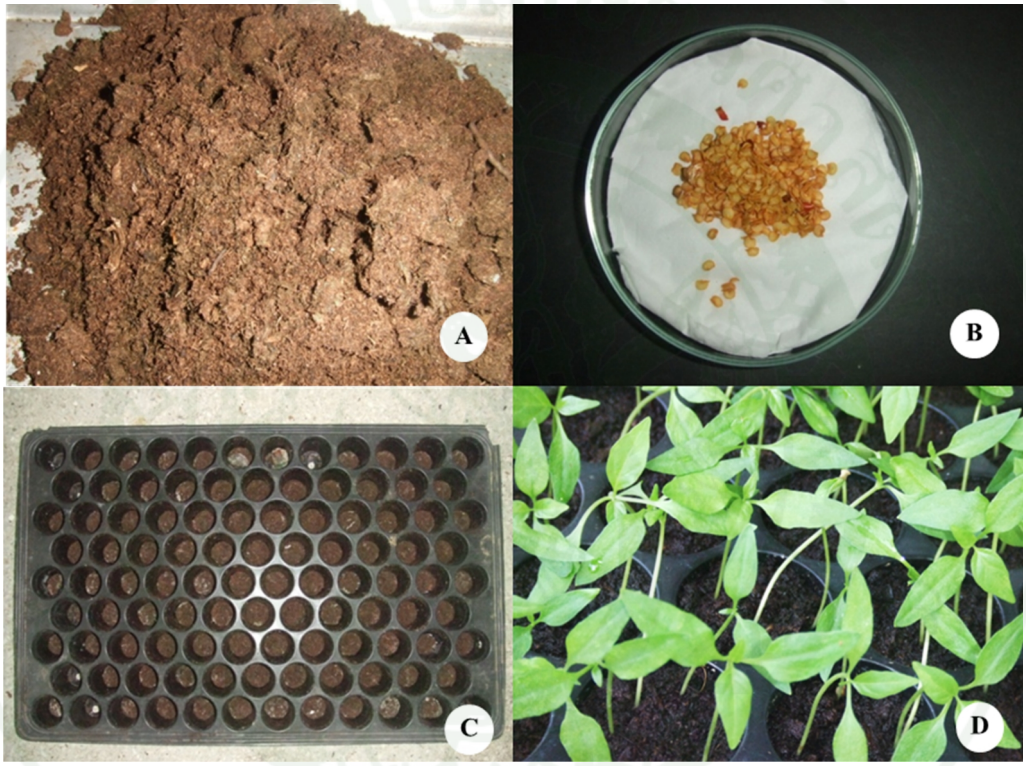
5.1 การเพาะเมล็ดพันธุ์พริก รองก้นจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ด้วยกระดาษทิชชู แช่เมล็ดพริกพันธุ์หัวเรือด้วยน้ำอุ่น 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที นำเมล็ดที่ผ่านการแช่น้ำอุ่นแล้ววางลงในจานเพาะเชื้อปิดทับด้วยกระดาษทิชชู 1 ชั้น ฉีดน้ำกลั่นลงบนกระดาษทิชชูให้เปียกพอประมาณ ปิดฝาจานเพาะเชื้อนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเมล็ดมีรากงอกยาวประมาณ 0.2-0.5 เซนติเมตร เพื่อย้ายปลูกในถาดหลุมเพาะกล้า

ตารางที่ 2 การวางแผนการทดลองใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปมพริกในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	รายละเอียด
1	ใส่ *P. lilacinus* อัตรา 20 กรัมต่อกระถางพร้อมปลูก
2	ใส่ *P. lilacinus* อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 1 ครั้ง
3	ใส่ *P. lilacinus* อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 2 ครั้ง
4	ใส่ *P. lilacinus* อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 3 ครั้ง
5	ไม่ใส่ *P. lilacinus* และใส่ไส้เดือนฝอย (inoculated control)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 การเพาะกล้าพริก ตัดกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-2.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 11) วางรองก้นถาดหลุมเพาะกล้า โดยวางหลุมละ 2 แผ่น เพื่อกันดินไหลออกเวลารดน้ำ ใส่พีทมอสลงไปในหลุมเกือบเต็ม เลือกเมล็ดที่งอกรากยาวเท่าๆ กันจาก ข้อ 5.1 วาง 1 เมล็ดต่อหลุม โรยพีทมอสทับให้เต็ม รดน้ำ นำไปวางไว้ในกรงกันแมลง ดูแล รดน้ำ ใส่ปุ๋ย พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงตามปกติ จนกล้าพริกมีอายุครบ 20 วัน จึงนำไปปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยรากปมต่อไป



ภาพที่ 11 การเตรียมต้นกล้าพริกเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของรา *Paecilomyces lilacinus* ในการกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมพริกในสภาพโรงเรือน

A. พีทมอส

B. เมล็ดพริกผ่านการแช่น้ำอุ่นแล้ววางในจานเพาะเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร

C. ถาดหลุมเพาะกล้า 104 หลุม

D. ต้นกล้าพริกอายุ 14 วัน

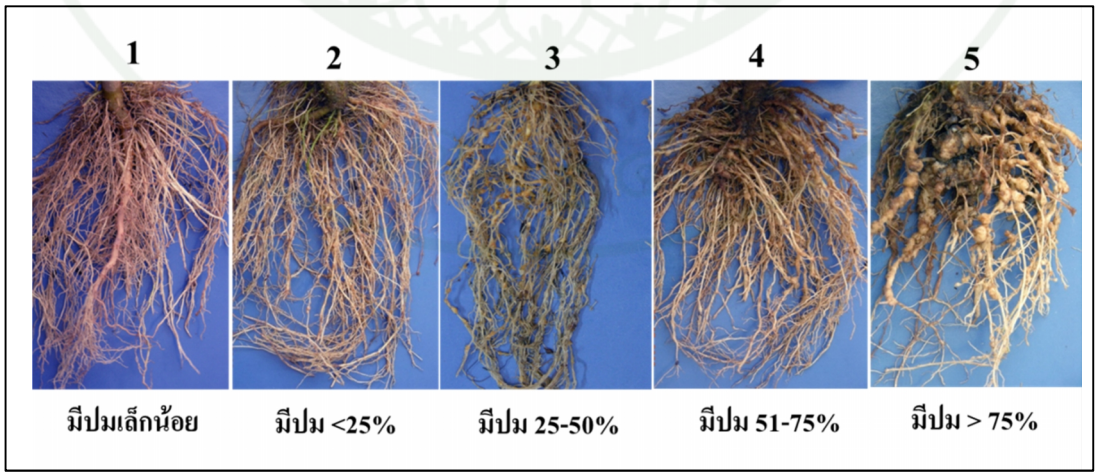
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.3 การปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยในต้นกล้าพริก (inoculation) รดน้ำกล้าพริกให้ดินเปียกพอประมาณ เตรียมไข่ไส้เดือนฝอยในน้ำกลั่นความเข้มข้น 500 ฟองต่อมิลลิลิตร คนให้ไข่กระจายตัวสม่ำเสมอด้วยแท่งแก้ว ใช้ไมโครปิเปตดูดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงบริเวณโคนต้นกล้า โดยปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีไข่จำนวน 500 ฟองต่อต้น หลังจากทำการปลูกเชื้อแล้วงดรดน้ำ 1 วัน เพื่อให้ไข่ของไส้เดือนฝอยอยู่ใกล้บริเวณราก จากนั้นรดน้ำตามปกติ ดูแลต้นกล้าต่อไปจนมีอายุครบ 30 วัน

5.4 การเตรียมดินปลูก เตรียมดินร่วนและทรายละเอียดในอัตราส่วน 50:50 ผสมให้เข้ากัน แล้วตักดินที่ผสมจนเข้ากันดีแล้วน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ใส่กระถางดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว เตรียมดินปลูกทั้งหมดจำนวน 25 กระถาง

5.5 การปลูกกล้าพริกอายุ 30 วัน คัดเลือกต้นพริกที่มีขนาดเท่าๆ กันจากข้อ 5.3 จำนวน 25 ต้น ย้ายพริกลงปลูกและใส่ราปฏิปักษ์ตามกรรมวิธีกำหนด โดยใส่แต่ละครั้งห่างกัน 15 วัน นำต้นพริกไปไว้ในกรงกันแมลง ดูแลรดน้ำใส่ปุ๋ยตามปกติ จนพริกมีอายุครบ 90 วัน

5.6 การวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก เมื่อพริกมีอายุครบ 90 วัน ทำการถอนรากและนำมาล้างผ่านน้ำไหลเพื่อให้เศษดินและทรายที่ติดมาออกให้หมด วัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากตามวิธีของ นุชนารถและ วราภรณ์ (2550) ดัดแปลงตามวิธีของ Hussey and Jansaen (2002) แบ่งเป็น 5 ระดับดังนี้ 0 =ไม่มีปม; 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย; 2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%; 3 =เกิดปม 25-50%; 4 = เกิดปม 50-75%; และ 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ดัชนีการเกิดปมของโรครากปมในพริก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.7 ตรวจสอบราปฏิปักษ์ในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* นำรากพริกที่ผ่านการวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากเรียบร้อยแล้วมาสุ่มเลือกกลุ่มไข่ โดยใช้ปากคีบ (forcep) คีบกลุ่มไข่ออกจากราก 5–10 กลุ่มต่อต้น ทำการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) โดยนำกลุ่มไข่ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำไปใส่ในหลอดทดลองแล้วเติม 0.525% NaOCl เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้กลุ่มไข่กระจายตัวออกจากกัน เทผ่านตะแกรงขนาด 500 mesh ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เทไข่ที่อยู่เหนือตะแกรงใส่ลงในบีกเกอร์ ตั้งตกตะกอนดูดน้ำด้านบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนของไข่ เติม 0.1% Streptomycin sulfate เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง เจือจางปริมาณไข่โดยวิธี dilution plate method นำ suspension ของไข่ spread ลงบนอาหาร WA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตดูการเจริญของราทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบว่ามีเส้นใยของราเจริญออกมาจากฟองไข่ ใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อตัดปลายเส้นใยของรา (hyphal tips) ดังกล่าวมาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA ศึกษาลักษณะของโคโลนี เส้นใย และสปอร์เพื่อจำแนกชนิดราต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. เก็บรวบรวมราในกลุ่ม Hyphomycetes จากแหล่งที่มีการระบาดของโรครากปม

จากการเก็บตัวอย่างดินและรากในแหล่งปลูกพริก สามารถแยกราในกลุ่ม Hyphomycetes จากดินและรากในแหล่งปลูกพริกจำนวน 42 สายพันธุ์ โดยจังหวัดกาญจนบุรี แยกได้ราจากตัวอย่างดินจำนวน 7 สายพันธุ์ กำหนดรหัส เป็น KB1 - KB7 โดยวิธี Soil dilution plate (DP) และ Soil plate (SP) บนอาหาร Gauchnaur's glucose Ammonium Nitrate Agar (GAN) และ Half potato dextrose agar ½ (PDA) และแยกได้จากชิ้นราก จำนวน 1 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Isolation from plant parts (IPP) บนอาหาร Water agar (WA) กำหนดรหัสเป็น KB8 สำหรับในตัวอย่างดินและรากที่เก็บจากแหล่งปลูกพริกจังหวัดนครปฐม สามารถแยกราจากตัวอย่างดินในกลุ่ม Hyphomycetes จำนวน 12 สายพันธุ์ ด้วยวิธี DP และ SP บนอาหาร GAN และ ½ PDA กำหนดรหัสเป็น NP1 - NP12 และแยกได้จากรากด้วยวิธี IPP บนอาหาร WA กำหนดรหัสเป็น NP13

จากการแยกราในกลุ่ม Hyphomycetes ของตัวอย่างดินและรากที่สุ่มเก็บจากพื้นที่การระบาดของโรครากปมในเขตจังหวัดสุพรรณบุรี สามารถแยกได้จากดินรวม 21 สายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่แยกได้จากดินด้วยวิธี DP และ SP บนอาหาร GAN และ ½ PDA กำหนดรหัสเป็น SB1- SB4 และ SB6-SB21 และสามารถแยกราจากตัวอย่างรากโดยใช้วิธี IPP บนอาหาร WA ได้จำนวน 1 สายพันธุ์ กำหนดรหัสเป็น SB5 (ตารางที่ 3 และภาพที่ 13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 รา Hyphomycetes ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากในแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปม จำนวน 20 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี โดยใช้วิธีการแยกและอาหารเลี้ยงราชนิดต่างๆ

แหล่งปลูกพริก	ตัวอย่าง	วิธีการ[1/]	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ[2/]	รหัส
กาญจนบุรี	ดิน	DP	GAN	KB1
	ดิน	DP	GAN	KB2
	ดิน	DP	GAN	KB3
	ดิน	DP	½ PDA	KB4
	ดิน	SP	GAN	KB5
	ดิน	DP	½ PDA	KB6
	ดิน	DP	GAN	KB7
	ราก	IPP	WA	KB8
นครปฐม	ดิน	DP	GAN	NP1
	ดิน	SP	GAN	NP2
	ดิน	SP	GAN	NP3
	ดิน	DP	GAN	NP4
	ดิน	DP	½ PDA	NP5
	ดิน	DP	GAN	NP6
	ดิน	DP	GAN	NP7
	ดิน	DP	½ PDA	NP8
	ดิน	DP	½ PDA	NP9
	ดิน	DP	GAN	NP10
	ดิน	DP	½ PDA	NP11
	ดิน	DP	GAN	NP12
	ราก	IPP	WA	NP13

[1/] DP = Soil dilution plate method; SP = Soil plate method; IPP = Isolation form plant parts

[2/] GAN = Gauchnaur's glucose Ammonium Nitrate Agar; ½ PDA = Half potato dextrose agar; WA = Water agar

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

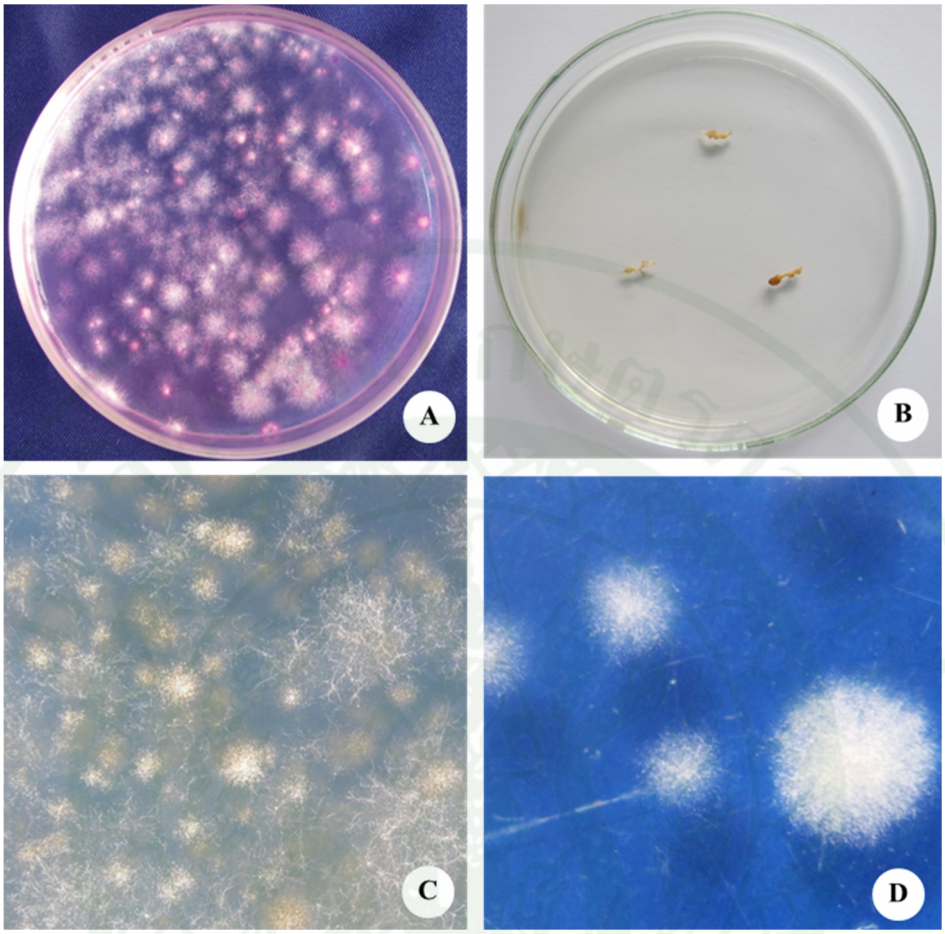
ตารางที่ 3 (ต่อ)

แหล่งปลูกพริก	ตัวอย่าง	วิธีการ[1/]	ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ[2/]	รหัส
สุพรรณบุรี	ดิน	DP	GAN	SB1
	ดิน	DP	GAN	SB2
	ดิน	DP	GAN	SB3
	ดิน	SP	½ PDA	SB4
	ราก	IPP	WA	SB5
	ดิน	DP	GAN	SB6
	ดิน	SP	GAN	SB7
	ดิน	DP	½ PDA	SB8
	ดิน	DP	GAN	SB9
	ดิน	DP	GAN	SB10
	ดิน	DP	GAN	SB11
	ดิน	DP	GAN	SB12
	ดิน	DP	GAN	SB13
	ดิน	SP	½ PDA	SB14
	ดิน	DP	GAN	SB15
	ดิน	DP	GAN	SB16
	ดิน	SP	GAN	SB17
	ดิน	DP	½ PDA	SB18
	ดิน	DP	GAN	SB19
	ดิน	SP	GAN	SB20
	ดิน	SP	GAN	SB21

[1/] DP = Soil dilution plate method; SP = Soil plate method; IPP = Isolation form plant parts

[2/] GAN = Gauchnaur's glucose Ammonium Nitrate Agar; ½ PDA = Half potato dextrose agar; WA = Water agar

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 ราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากพืชโดยใช้วิธีการและอาหารเลี้ยงราที่ต่างกัน

A. แยกจากดินโดยใช้วิธี soil plate method บนอาหาร GAN

B. แยกจากราจากชิ้นราก โดยวางบนอาหาร WA

C. แยกจากดินโดยใช้วิธี soil plate method บนอาหาร ½ PDA

D. แยกจากดินโดยใช้วิธี soil dilution plate method บนอาหาร PDA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การจำแนกชนิดและการเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของรา

2.1 การจำแนกราในระดับสกุล

ผลการศึกษา สามารถจำแนกราได้ 42 สายพันธุ์ จำแนกในระดับสกุล (genus) ได้ 5 สกุลได้แก่ *Aspergillus* spp. (9 สายพันธุ์), *Fusarium* spp. (3 สายพันธุ์), *Paecilomyces* spp. (12 สายพันธุ์), *Penicillium* spp. (16 สายพันธุ์) และ *Trichoderma* spp. (2 สายพันธุ์) จากตัวอย่างดินและรากที่มีการระบาดของโรครากปม จำนวน 20 ตัวอย่าง จากตัวอย่างดินและรากที่สุ่มเก็บ 20 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่แยกได้จากตัวอย่างดินมีจำนวน 39 สายพันธุ์ โดยพบจากตัวอย่างดินจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี จำนวน 7, 13 และ 20 สายพันธุ์ ตามลำดับ และพบจากตัวอย่างรากพริกพื้นที่ละ 1 สายพันธุ์ รวม 3 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4)

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การพบและแยกได้ในแต่ละสกุลของรา (ภาพที่ 14) พบรา *Penicillium* spp. มากที่สุด เท่ากับ 38.10 เปอร์เซ็นต์ โดยพบในตัวอย่างดินของทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง และแยกได้ทั้งวิธี DP และ SP บนอาหาร GAN และ ½ PDA รองลงมาคือ *Paecilomyces* spp. พบ 28.57 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่แยกได้ พบในทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างเช่นกัน โดยแยกได้จากตัวอย่างดินด้วยวิธี DP บนอาหาร GAN และ ½ PDA และแยกได้จากชิ้นรากที่มีอาการรากปมจากแปลงปลูกพริกในจังหวัดกาญจนบุรี และนครปฐม โดยวิธี IPP บนอาหาร WA โดยสามารถตรวจพบเส้นใยของรา *Paecilomyces* spp. เจริญอยู่รอบกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย แสดงให้เห็นว่าราสกุลดังกล่าวเป็นปฏิปักษ์กับไข่ไส้เดือนฝอย (ภาพที่ 15) เช่นเดียวกับรายงานของ Jatala *et al.* (1979) สามารถแยกรา *Paecilomyces* spp. จากหัวมันฝรั่งที่เป็นโรครากปม โดยพบราเข้าทำลายกลุ่มไข่

รา *Aspergillus* spp. สามารถแยกได้จากตัวอย่างดินในทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่างพบ 21.43 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่แยกได้ แยกโดยวิธี DP และ SP บนอาหาร GAN และ ½ PDA รา *Trichoderma* spp. และ *Fusarium* spp. แยกได้จากแปลงพริก คิดเป็น 7, 14 และ 4.76 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่แยกได้ ตามลำดับ โดยรา *Trichoderma* spp. แยกได้จากดินปลูกพริกในจังหวัดนครปฐม ด้วยวิธี DP บนอาหาร ½ PDA ส่วนรา *Fusarium* spp. แยกได้จากตัวอย่างดินด้วยวิธี DP และ SP บนอาหาร GAN และแยกได้จากรากด้วยวิธี IPP บนอาหาร WA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

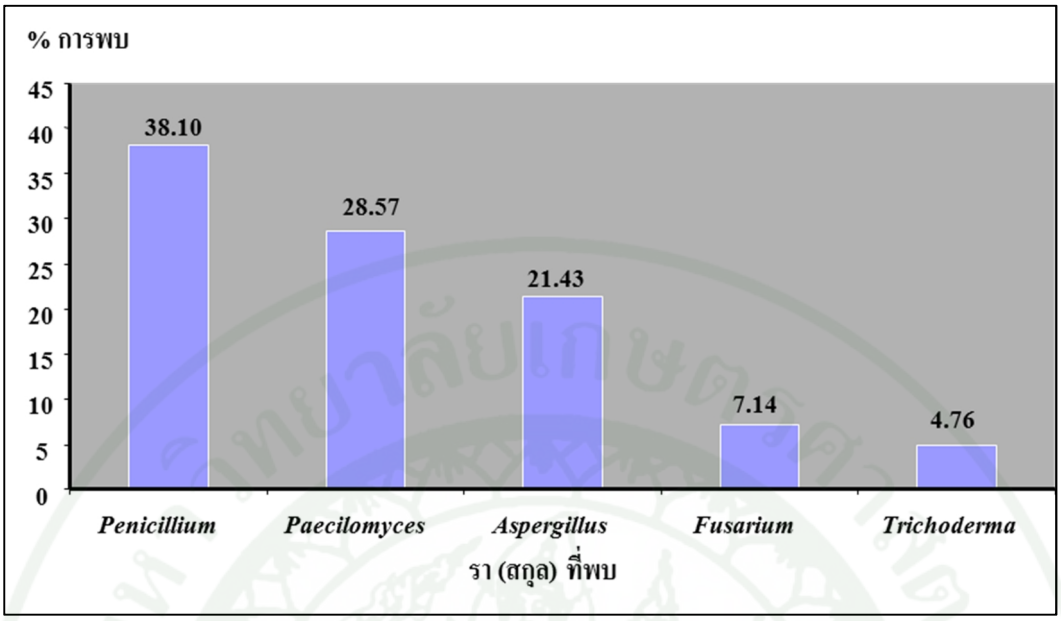
จากการทดลองสามารถแยกรากลุ่ม Hyphomycetes ได้จำนวน 42 สายพันธุ์ ซึ่งแยกราได้จากทุกวิธีการ ในวิธีการแยกราโดยวิธี dilution plate ร่วมกับการคัดเลือกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงราสูตรอาหาร GAN สามารถแยกรากลุ่ม Hyphomycetes จากดินได้ดีกว่าวิธีอื่นๆ จากวิธีนี้ พบรา *Penicillium* spp. มากที่สุด รองลงมาคือ *Paecilomyces* spp. และ *Fusarium* spp. ส่วนวิธีการ IPP บนอาหาร WA สามารถตรวจพบเส้นใยของรา *Paecilomyces* spp. เจริญอยู่รอบกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยได้อย่างชัดเจน ในวิธีการ DP บนอาหารสูตร ½ PDA พบรา *Aspergillus* spp. และ *Trichoderma* spp. ซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างดินในทุกพื้นที่ที่เก็บรวบรวม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 การจำแนกสกุลราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากในแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมในจังหวัดต่างๆ

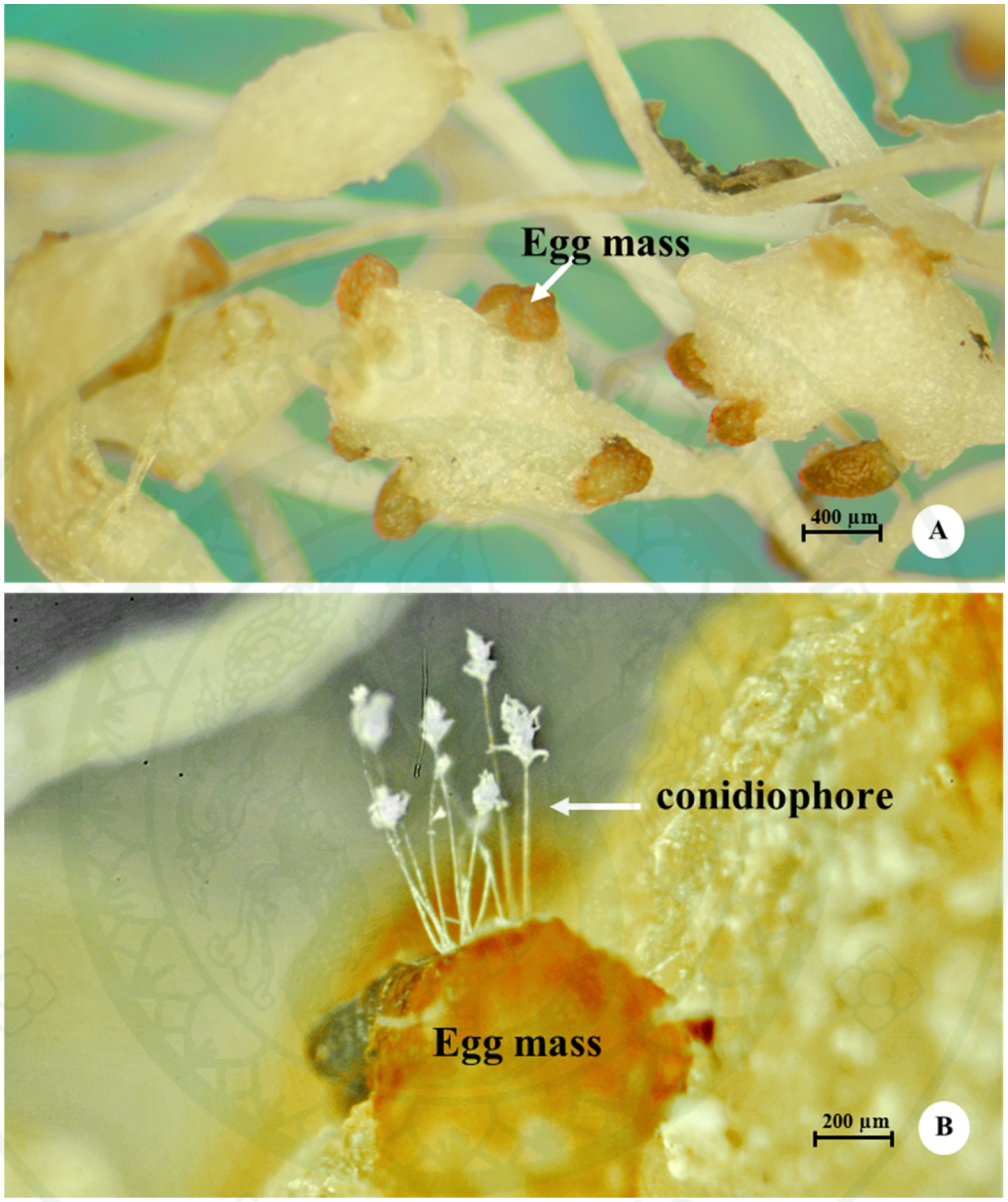
จังหวัด	รา (สกุล)	ตัวอย่าง	รหัส
กาญจนบุรี	*Aspergillus* spp.	ดิน	KB1, KB2, KB3
	Penicillium spp.	ดิน	KB4, KB5, KB6
	Paecilomyces sp.	ดิน	KB7
	Paecilomyces sp.	ราก	KB8
นครปฐม	*Aspergillus* spp.	ดิน	NP1, NP2
	Penicillium spp.	ดิน	NP3, NP4, NP5, NP6, NP7
	Trichoderma spp.	ดิน	NP8, NP9
	Paecilomyces spp.	ดิน	NP10, NP11, NP12
	Paecilomyces sp.	ราก	NP13
สุพรรณบุรี	*Aspergillus* spp.	ดิน	SB1, SB2, SB3, SB4
	Fusarium sp.	ราก	SB5
	Fusarium spp.	ดิน	SB6, SB7
	Paecilomyces spp.	ดิน	SB8, SB9, SB10, SB11, SB12, SB13
	Penicillium spp.	ดิน	SB14, SB15, SB16, SB17, SB18, SB19, SB20, SB21

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์ราสกุลต่างๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากในแปลงปลูกพริกที่เป็นโรคไส้เดือนฝอยรากปม ในจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี รวม 20 ตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 ลักษณะกลุ่มไข่และราบนกลุ่มไข่ของรากที่เป็นปุ่มปมในพริก สาเหตุจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp.

A. รากปมพริกที่มีกลุ่มไข่ (egg mass) ของไส้เดือนฝอยรากปม

B. รา *Paecilomyces* sp. เข้าทำลายและเจริญเติบโตบนกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

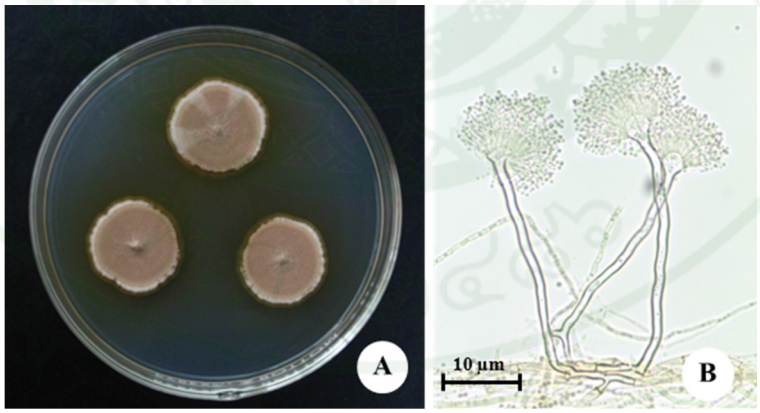
3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากพริก

3.1 รา *Aspergillus* spp. Micheli (1729)

แยกรา *Aspergillus* spp. ได้จากแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมทั้งสามจังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี 3 สายพันธุ์ คือ รหัส KB1, KB2 และ KB3 จังหวัดนครปฐม 2 สายพันธุ์ คือ NP1 และ NP2 และจังหวัดสุพรรณบุรี 4 สายพันธุ์ คือ SB1, SB2, SB3 และ SB4

รา *Aspergillus* sp. (NP2) ขนาดของโคโลนีบนอาหาร PDA วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 2.7 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โคโลนีมีสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 16A) ลักษณะของ conidiophore ตั้งตรง ไม่มีการแตกแขนง ส่วนปลายโป่งออกเรียกว่า vesicle ส่วน conidial head เป็นแบบ round ลักษณะ phialides เป็นแบบ uniseriate ลักษณะ conidia ใส รูปร่างกลมรี มีเซลล์เดียว (ภาพที่ 16B)

Ruanpanun *et al.* (2010) พบว่ามีรา *Aspergillus* สามารถลดอัตราการฟักไข่และหยุดการเคลื่อนที่ของ *M. incognita* ได้ ด้วยการผลิตสาร Indole acetic acid (IAA) ซึ่งเป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยรากปม



ภาพที่ 16 รา *Aspergillus* sp. Micheli (1729) (NP2) แยกได้จากดินในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด
A. โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส
B. รูปร่างลักษณะ conidiophores, phialides และ conidia

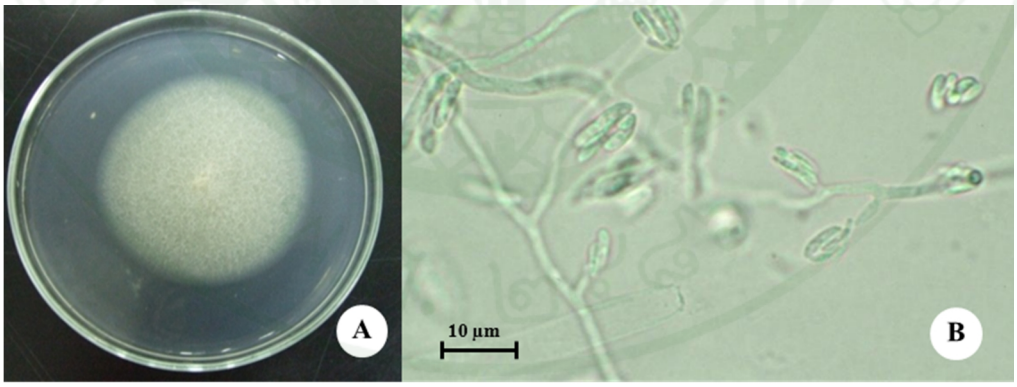
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 รา *Fusarium* spp. Link (1809)

แยกรา *Fusarium* spp. ได้จากดินในแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมในจังหวัดสุพรรณบุรี ได้จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ รหัส SB6 และ SB7 และจากตัวอย่างรากพริกแยกได้จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ SB5

รา *Fusarium* sp. (SB5) โคโลนีบนอาหาร PDA มีสีขาวเส้นใยฟู วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 6.0 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 17A) สร้าง macroconidia ใสไม่มีสี มีลักษณะโค้งเป็นเสี้ยวพระจันทร์ มีผนังกั้นตามขวาง (septum) เมื่อสังเกตทางด้านข้าง ภายใน conidia แบ่งเป็นหลายเซลล์มีผนังกั้นตามขวาง macroconidia เกิดรวมกันเป็นกลุ่ม (fale head) บนก้านของ conidiophore พบการสร้าง microconidia และ macroconidia รูปร่างรีใส มี 0-1 เซลล์ (ภาพที่ 17B)

รา *Fusarium* spp. เป็นราที่พบกระจายอยู่ทั่วไปในดินและบนพืชที่มีชีวิตหรือตายแล้ว มีทั้งชนิดที่เป็นสาเหตุโรคพืชและสัตว์ ส่วนใหญ่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวในพืช และมีบางชนิดที่มีรายงานว่ามีศักยภาพในการนำมาใช้ควบคุมไข่และตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) (Sun *et al.*, 2006)



ภาพที่ 17 รา *Fusarium* sp. Link (1809) (SB5) แยกได้จากดินในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด

A. โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส

B. รูปร่างลักษณะของ conidiophores และ macroconidia

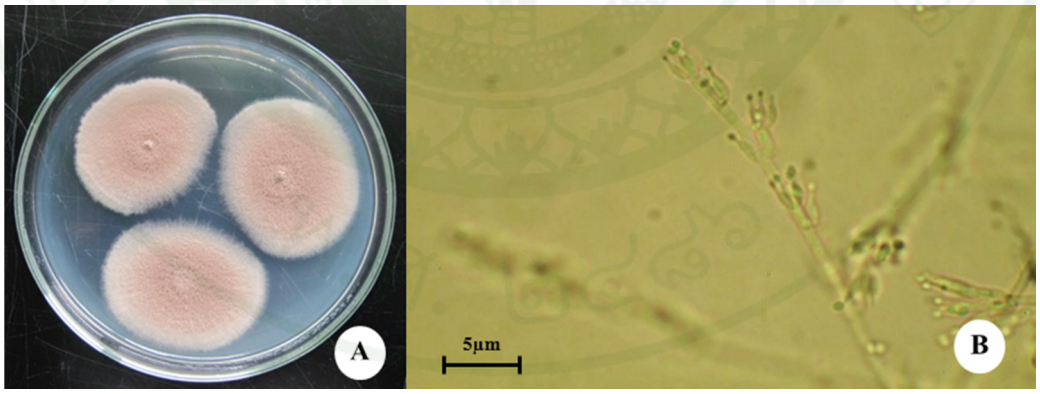
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 รา *Paecilomyces* spp. Bainier (1907)

แยก *Paecilomyces* spp.ได้จากแปลกปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี 2 สายพันธุ์ คือ รหัส KB7 และ KB8 นครปฐม 4 สายพันธุ์ คือ NP10, NP11, NP12 และ NP13 และสุพรรณบุรี 6 สายพันธุ์ คือ รหัส SB8, SB9, SB10, SB11, SB12 และ SB13

รา *Paecilomyces* sp. Bainier (KB8) โคโลนีบนอาหาร PDA เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 3.5 เซนติเมตร สีม่วงอ่อนอมชมพู ผิวหน้าโคโลนีละเอียดคล้ายผงแป้ง (ภาพที่ 18A) ลักษณะของก้านชูสปอร์คล้ายรา *Penicillium* แต่สร้าง phialide ที่ปลาย ลักษณะเรียวยาวเป็นที่เกิดของสปอร์ เรียกว่า conidia สปอร์รูปร่างรีหัวท้ายแหลม (ellipsoid) เซลล์เดียวใส ไม่มีสีมี ขนาด 2.5-3×2-2.5 ไมครอน (ภาพที่ 18B)

รา *P. lilacinus* (Thom) Samson สามารถใช้ป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าสปอร์ของราชนิดนี้สามารถเกาะติดกับผนัง cuticle ของไส้เดือนฝอยรากปมได้เป็นอย่างดี สามารถเจริญงอกเส้นใยแทงผ่านผนังลำตัวของไส้เดือยฝอยรากปมเข้าทำลายได้ (Jatala, 1985)



ภาพที่ 18 รา *Paecilomyces* sp. Bainier (1907) (KB8) แยกได้จากดินและรากในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด

A. โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส

B. รูปร่างลักษณะ conidiophores, phialides และ conidia

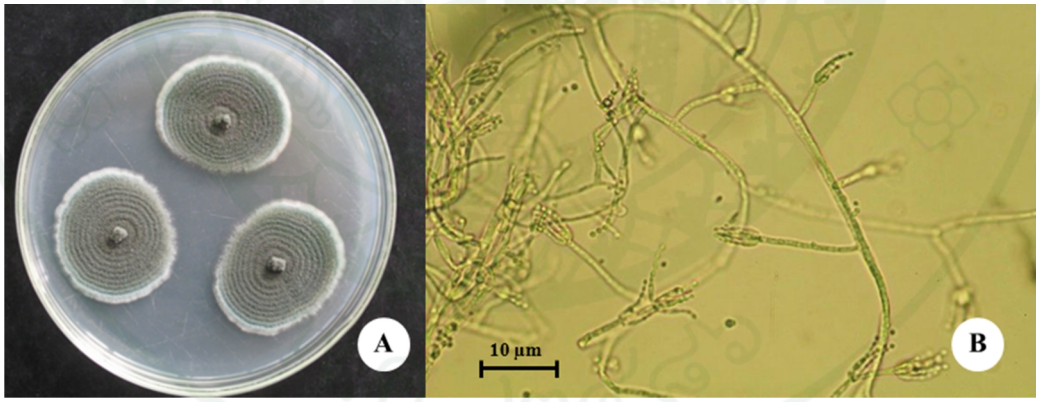
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4 รา *Penicillium* spp. Link (1809)

แยกรา *Penicillum* spp. ได้จากแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมทั้งสามจังหวัดได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี 3 สายพันธุ์คือ รหัส KB4, KB5, และ KB6 จังหวัดนครปฐม 5 สายพันธุ์ คือ รหัส NP3, NP4, NP5, NP6, และ NP7 และจังหวัดสุพรรณบุรี 8 สายพันธุ์คือ รหัส SB14, SB15, SB16, SB17, SB18, SB19, SB20 และ SB21

รา *Penicillium* sp. (KB4) โคโลนีบนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 4.5 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ลักษณะผิวหน้าโคโลนีละเอียดสีเขียวเข้ม ไม่พองฟู (ภาพที่ 19A) conidiophore แตกแขนงจากเส้นใย ลักษณะตั้งตรง ค่อนข้างสั้น (ภาพที่ 19B)

Gotlieb *et al.* (2003) พบว่ามีรา *Penicillium* sp. สามารถลดอัตราการเกิดปมของโรครากปมในพืชตระกูลแตงได้ โดยใช้ dry mycelium ที่ความเข้มข้น 0.25% (w/w) ผสมกับดินร่วนปนทราย ก่อนปลูก



ภาพที่ 19 รา *Penicillium* sp. Link (1809) (KB4) แยกได้จากดินในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด

A. โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส

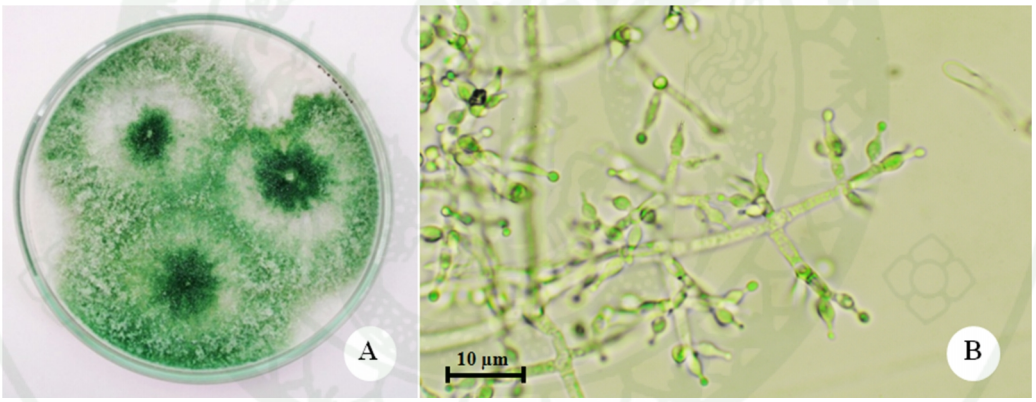
B. รูปร่างลักษณะ conidiophores, phialides และ conidia

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5 รา *Trichoderma* spp. Persoon (1801)

แยกรา *Trichoderma* spp. ได้จากแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมในพื้นที่จังหวัดนครปฐม 2 สายพันธุ์ ได้แก่ รหัส NP8 และ NP9

รา *Trichoderma* sp. (NP8) โคโลนีบนอาหาร PDA เจริญอย่างรวดเร็ว อายุ 3 วัน เส้นใยเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 9.0 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ผิวหน้าโคโลนีฟูเล็กน้อยมีสีเขียวอ่อนและเมื่ออายุมากขึ้น สีของโคโลนีจะเข้มขึ้นจนกลายเป็นสีเขียวแก่ (ภาพที่ 20A) เส้นใยผนังเรียบ สปอร์มีสีเขียวและเกิดเป็นกลุ่ม conidiophore แตกกิ่งก้านเป็นจำนวนมาก มี phialides เกิดที่ปลายขนาด 2.5-3.5 × 4.0-5.5 ไมครอน เป็นที่เกิดของ conidia รูปร่างกลม หรือค่อนข้างกลม สีเขียวอ่อน ปลายด้านหนึ่งตัด ขนาด 2.0-3.6 × 3.5-6.0 ไมครอน (ภาพที่ 20B)

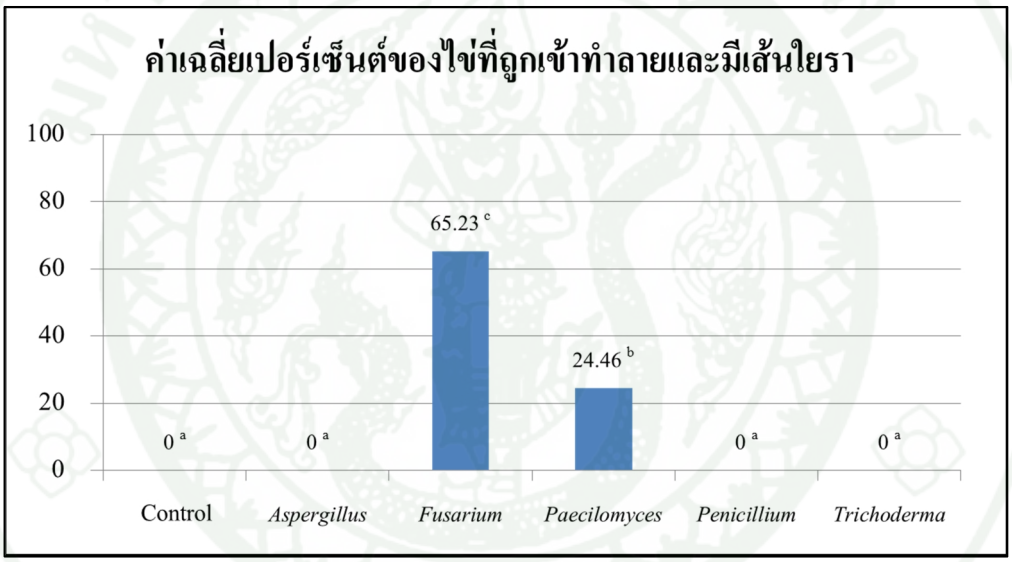


ภาพที่ 20 รา *Trichoderma* sp. (NP8) แยกได้จากดินในแปลงปลูกพริกที่มีโรครากปมระบาด
A. โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส
B. รูปร่างลักษณะของ conidiophores, phialides และ conidia

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การทดสอบศักยภาพของราในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปมของราทั้ง 5 สกุล และทำการเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น ทำการทดสอบ 4 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำของการทดลองใช้ไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 300±20 ฟอง ผลการทดลองพบว่า มีรา 2 สกุลที่สามารถเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมและมีเส้นใยราได้ คือ รา *Paecilomyces* sp. (KB8) และ *Fusarium* sp. (SB5) โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเท่ากับ 65.23 และ 23.46 ตามลำดับ (ภาพที่ 21 และ 22) ส่วนราอีก 3 สกุลคือ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., และ *Trichoderma* spp. ไม่สามารถเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยได้ (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมของราทั้ง 5 สกุล จำนวน 42 สายพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนไข่ไม่ถูกทำลายทั้งหมด พบว่า การทดสอบกับรา *Paecilomyces* spp. มีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 2.68 (ภาพที่ 22) ส่วนผลการทดสอบด้วย *Fusarium* spp. พบว่า มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนไข่ไม่ถูกทำลายทั้งหมดมีค่าน้อยเป็นลำดับรองจาก *Paecilomyces* spp. โดยมีค่าเท่ากับ 20.33 และส่วนของผลการทดสอบด้วย *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. และ *Trichoderma* spp. พบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนไข่ที่ไม่ถูกทำลายของราทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 48.38, 55.76 และ 55.89 ตามลำดับ และมีค่าเทียบเท่ากับการทดลองชุดควบคุม ซึ่งเท่ากับ 52.38 (ภาพที่ 22)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

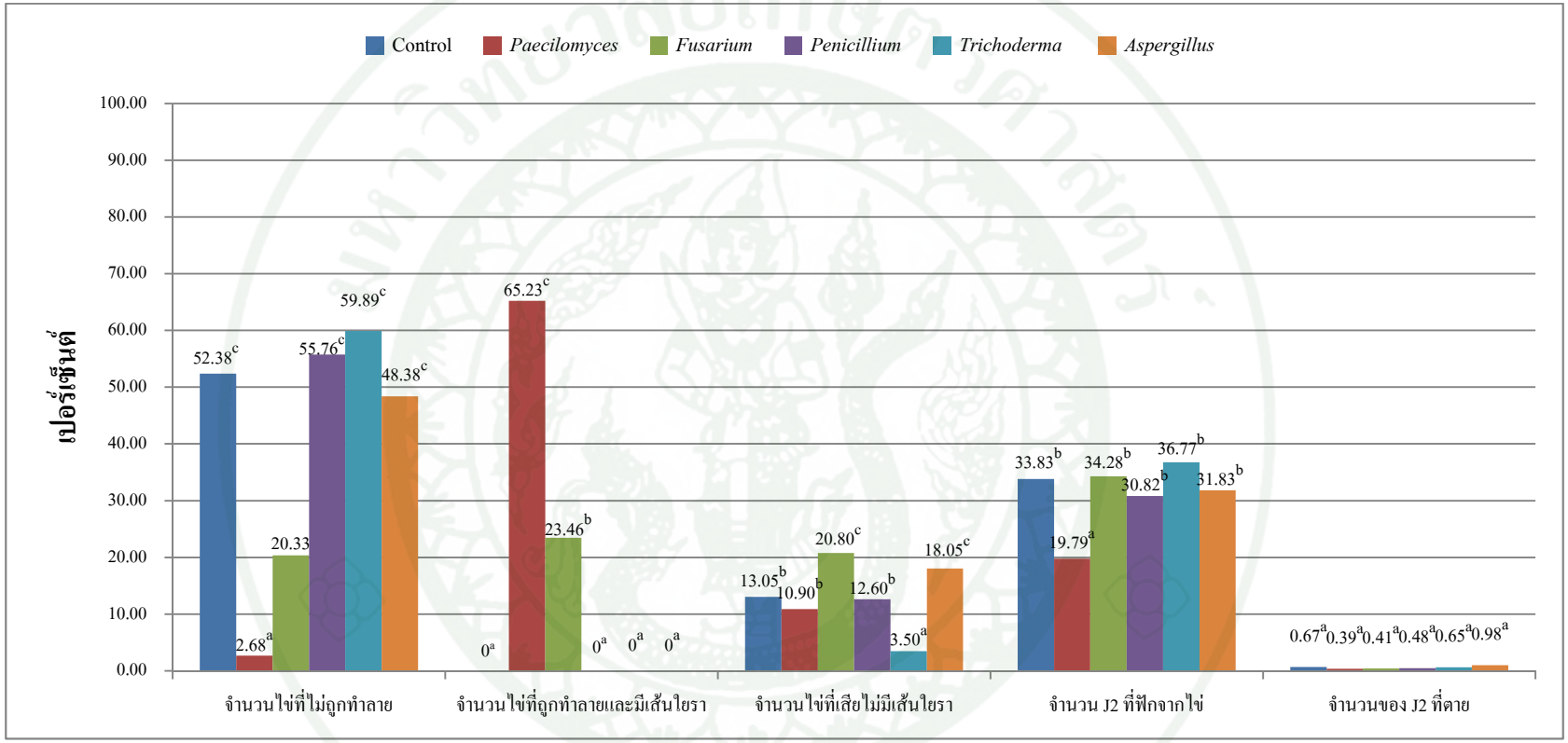
จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนไข่เสียที่ไม่มีเส้นใยราพบว่า การทดสอบรา *Fusarium* spp. มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 20.80 และลำดับรองคือ *Aspergillus* spp. มีค่าเท่ากับ 18.05 ส่วน รา *Trichoderma* spp. โดยให้ค่าที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 3.50 การทดลองของรา *Paecilomyces* spp. และ *Fusarium* spp. ให้ค่าเท่ากับ 10.90 และ 12.60 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 13.50

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม (J2) ที่ฟักออกจากไข่ทั้งหมด พบว่า การทดสอบกับ *Paecilomyces* spp. มีค่าที่น้อยที่สุดเท่ากับ 19.79 โดยการทดสอบรา *Penicilium* spp. *Fusarium* spp. *Trichoderma* spp. และ *Aspergillus* spp. มีค่าเท่ากับ 34.28, 30.82, 36.77 และ 31.83 ตามลำดับ โดยให้ค่าที่ใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างทางสถิติซึ่งรวมไปถึงชุดการทดลองควบคุมที่มีค่าเท่ากับ 33.83 (ภาพที่ 22) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนของ J2 ที่ตายทั้งหมด พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในชุดของการทดลองนี้ทั้งหมด โดยให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนของ J2 ที่มีค่าน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมด (ภาพที่ 22)

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของราในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม พบว่า รา *Paecilomyces lilacinus* สามารถเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยได้มากที่สุด ซึ่งทำให้จำนวนไข่ปกติที่ใช้ในการทดสอบของไส้เดือนฝอยลดลง และไส้เดือนฝอยรากปมไม่สามารถฟักออกจากไข่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับ การรายงานของ Yang and Zhang (2014) ที่พบว่าราสกุล *Paecilomyces* sp. เป็นราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปมโดยการเจริญบนไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมในสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น (tropical) และสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตจากไข่ของไส้เดือนฝอยได้อย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้ลดจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในดินที่มีการแพร่ระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

รา *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. เป็นราที่สร้างสารพิษในการยับยั้งการฟักตัวของไส้เดือนฝอยรากปม แต่ต้องการสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Collange *et al.*, 2011) ส่วน *Trichoderma* spp.สามารถเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยได้โดยตรงและเป็นพิษต่อตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม และมีความจำเพาะเจาะจงต่อ species ของไส้เดือนฝอยรากปม โดยมีการรายงานของ Shahebani and Hadavi (2008) พบว่า *Trichoderma harzianum* สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne javanica* ที่ระบาดในมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

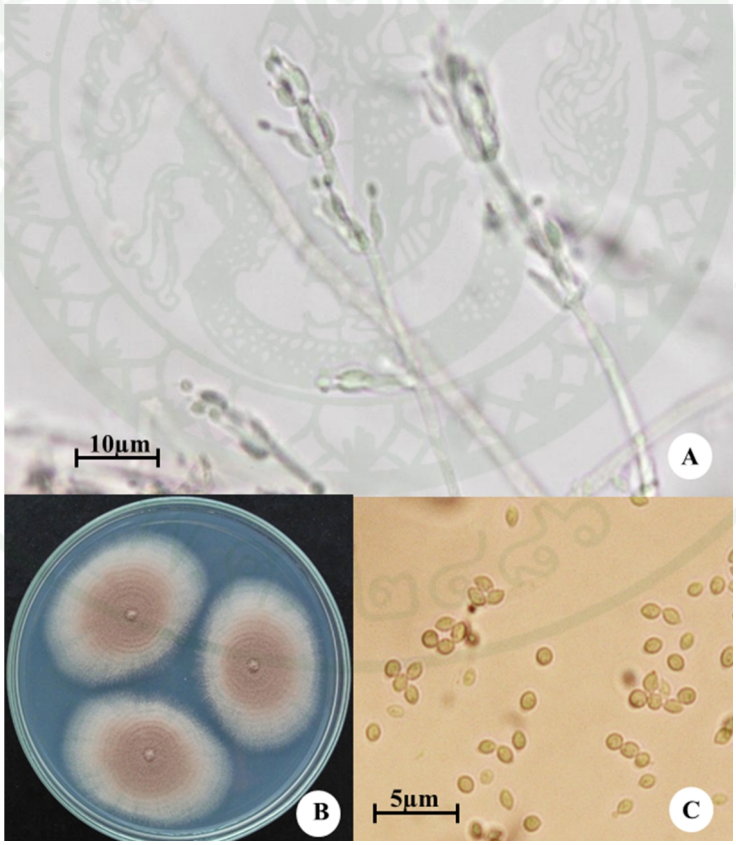


ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์จำนวนไข่ที่ไม่ถูกทำลาย จำนวนไข่ที่ถูกทำลาย จำนวนฟักตัวของตัวอ่อนระยะที่สอง (J2) และจำนวน J2 ที่ตายของไส้เดือนฝอยรากปม จากทดสอบการเข้าทำลายของราทั้ง 5 ชนิดต่อไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การจำแนกชนิด (species) ของราปฏิปักษ์ที่เข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

จากผลการทดลอง การทดสอบศักยภาพของราในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า *Paecilomyces* spp. ที่แยกได้จากรากปม สายพันธุ์ KB8 มีความสามารถในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสกุลราอื่นๆ ในสายพันธุ์ต่างๆ และจากผลการจำแนกชนิด (species) พบว่า เป็นรา *Paecilomyces lilacinus* โดยมีลักษณะของสีโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน มีสีม่วงอ่อนอมชมพู วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 3.4-3.6 เซนติเมตร ผิวหน้าโคโลนีละเอียดคล้ายผงแป้ง เมื่อทำการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลักษณะของก้านชูสปอร์ (conidiophores) แตกกิ่งก้านคล้ายรา *Penicillium* ซึ่งสามารถแตกกิ่งก้านได้หลายชั้น และมีลักษณะสมมาตรกัน ลักษณะ conidia รีถึง fusiform ผนังเรียบ ถึงขรุขระ หัวท้ายแหลม ลักษณะของสปอร์ใสไม่มีสี ขนาดประมาณ 2.5-3×2-2.5 ไมครอน ไม่พบการสร้าง chlamydospores (Domsch *et al.,* 1983) (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 รา *Paecilomyces lilacinus* สายพันธุ์ KB8; A. รูปร่างลักษณะ conidiophores, phialides และ conidia; B. โคโลนีบนอาหาร PDA เมื่ออายุ 7 วัน และ C. ลักษณะของ conidia

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การเพาะเลี้ยงขยายปริมาณราปฏิปักษ์ในเมล็ดพืชชนิดต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยงรา *Paecilomyces lilacinus* ในเมล็ดพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง ข้างกล้อง และข้าวโพด ทั้งหมดจำนวน 5 ซ้ำ พบว่า รา *P. lilacinus* สามารถที่จะเจริญได้ดีและผลิตสปอร์ได้ปริมาณมากในข้าวฟ่างและข้าวโพด เมื่อทำการสังเกตด้วยตาเปล่า เมื่อรามีอายุครบ 3 วัน พบว่า เส้นใยราเริ่มเจริญปกคลุมเมล็ดพืช โดยเฉพาะราที่เพาะเลี้ยงในข้าวฟ่างและข้าวโพด ส่วนในข้าวหอมมะลิ ข้าวกล้อง และถั่วเหลืองมีเส้นใยของราเจริญอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ภาพที่ 24) และทำการสังเกตอีกครั้งเมื่อรามีอายุครบ 7 วัน พบว่า ข้าวฟ่างและข้าวโพดมีเส้นใยของราเจริญปกคลุมทั่วทั้งหมด (ภาพที่ 25)

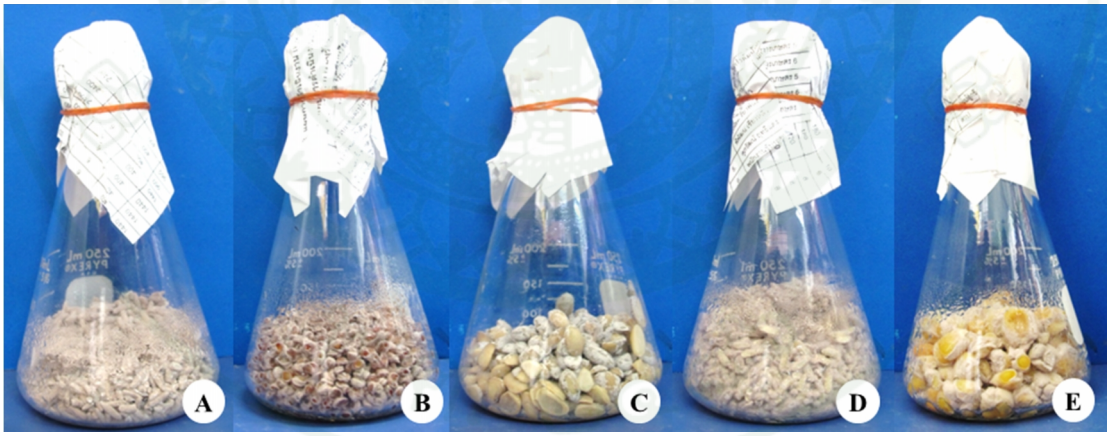
เมื่อทำการนับจำนวนสปอร์ของรา พบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ที่เลี้ยงในข้างฟ่าง มีค่าเท่ากับ 1.89×10^{11} CFU/g และในข้าวโพดเท่ากับ 1.87×10^{11} CFU/g ส่วนในข้าวหอมมะลิ ข้าวกล้อง และถั่วเหลือง มีค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ราเท่ากับ 1.6×10^{11}, 1.634×10^{11} และ 1.24×10^{11} CFU/g ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของราในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม คัดเลือกรา *P. lilacinus* มาเพาะเลี้ยงในเมล็ดพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง ข้าวกล้อง และ ข้าวโพด พบว่า รา *P. lilacinus* สามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ปริมาณมากในข้าวฟ่างและข้าวโพด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chioza and Ohga (2013) ที่พบว่า เส้นใยของรา *P. hepialid* สามารถเจริญได้ดีในข้าวฟ่าง ข้าวโพด และข้าวสาลี และเจริญเติบโตที่ดีที่สุดที่ pH ระหว่าง 6-9

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองพบว่ารา *P. lilacinus* ที่เพาะเลี้ยงบนข้าวฟ่างและข้าวโพดเป็นระยะเวลา 7 วัน ราสร้างสปอร์เฉลี่ยได้เท่ากับ 1.89×10^{11} และ 1.87×10^{11} CFU/g ตามลำดับ ซึ่งมากกว่า ผลการศึกษาของ Mishra and Khan (2014) ที่เพาะเลี้ยง รา *P. lilacinus* บนข้าวฟ่างและข้าวโพดที่ระยะเวลา 12 วัน โดยมีการสร้างสปอร์เฉลี่ยเท่ากับ 6.32×10^{7} และ 8.96×10^{5} CFU/g ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 24 รา *Paecilomyces lilacinus* (KB8) ที่เพาะเลี้ยงบนเมล็ดพืชชนิดต่างๆ อายุ 3 วัน
A. ข้าวหอมมะลิ, B. ข้าวฟ่าง, C. ถั่วเหลือง, D. ข้าวกล้อง และ E. ข้าวโพด



ภาพที่ 25 รา *Paecilomyces lilacinus* (KB8) ที่เพาะเลี้ยงบนเมล็ดพืชชนิดต่างๆ อายุ 7 วัน
A. ข้าวหอมมะลิ, B. ข้าวฟ่าง, C. ถั่วเหลือง, D. ข้าวกล้อง และ E. ข้าวโพด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ผลคำนวณเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์รา *Paecilomyces lilacinus* ที่เพาะเลี้ยงใน 1 กรัมของเมล็ดพืชชนิดต่างๆ อายุ 7 วัน

เมล็ดพืช	ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ ($\times 10^{11}$)
ข้าวหอมมะลิ	1.60 b[1/]
ข้าวฟ่าง	1.89 a
ถั่วเหลือง	1.24 c
ข้าวกล้อง	1.63 b
ข้าวโพด	1.87 a
CV (%)	4.15

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณโดยการใช้วิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การทดสอบประสิทธิภาพราปฏิปักษ์ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมพริกในสภาพโรงเรือน

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมพริก *Meloidogyne incognita* ในสภาพโรงเรือน โดยทำการย้ายปลูกต้นกล้าพริกที่เป็นโรครากปม ลงดินปลูกที่ผสมดินร่วนและทรายละเอียดในอัตราส่วน 50:50 ในกระถางดินเผา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว (ภาพที่ 26) โดยนำ *P. lilacinus* ที่เพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างเป็นเวลา 7 วัน อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง รองก้นหลุมพร้อมกับย้ายปลูกกล้าพริกและโรยรอบโคนต้น มีจำนวนการใช้รา *P. lilacinus* โดยวิธีใส่ 1, 2, 3 และ 4 ครั้ง เปรียบเทียบกับไม่ใส่รา *P. lilacinus* (control) ตามแบบแผนการทดลองทั้ง 5 กรรมวิธี แล้วทำการวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก

ผลการทดลองพบว่า การใช้รา *P. lilacinus* ใส่ในดินจำนวน 2, 3 และ 4 ครั้ง มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* ได้ดี ทำให้ลดการเกิดปมได้ 50-75 % ของระบบราก (ภาพที่ 27) หรือมีดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก 2.50, 2.64 และ 2.87 ตามลำดับ (2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%) ในขณะที่การใส่รา *P. lilacinus* 1 ครั้ง และไม่ใส่รา *P. lilacinus* (control) มีดัชนีการเกิดปมที่รากพริกเท่ากับ 3.78 และ 4.89 (3 = เกิดปม 25-50 %; 4 = เกิดปม 50-75%) ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลองพบว่าการใช้รา *P. lilacinus* 2 ครั้ง (พร้อมปลูกและหลังปลูก 15 วัน) มีผลทำให้ลดประชากรไส้เดือนฝอยในดินลง เนื่องจากราเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยทำให้ไข่ถูกทำลายไม่สามารถฟักเป็นตัวอ่อนเข้าทำลายรากพืชต่อเนื่องได้ ดังนั้น การใส่รา *P. lilacinus* ลงในวัสดุปลูก 2 ครั้งจึงเพียงพอต่อการควบคุมโรครากปมในพริกได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 26 ต้นพริกที่เป็นโรครากปมอายุ 60 วัน ที่มีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ใส่ก้นหลุมและโรยรอบโคนต้นระยะห่าง 15 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 27 ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากของต้นพริกเมื่อมีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมโรครากปมที่อายุ 90 วัน

A. ไม่ใส่ราปฏิปักษ์และไม่ใส่ไส้เดือนฝอย (control)

B. ใส่ราปฏิปักษ์อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 1 ครั้ง

C. ใส่ราปฏิปักษ์อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก

D. ไม่ใส่ราปฏิปักษ์และใส่ไส้เดือนฝอย (inoculated control)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากเมื่อมีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปมพริกในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	รายละเอียด	ดัชนีการเกิดปมที่ราก[1/]
1	ใส่ *P. lilacinus* อัตรา 20 กรัมต่อกระถางพร้อมปลูก	3.78 b[2/]
2	ใส่ *P. lilacinus* อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 1 ครั้ง	2.50 c
3	ใส่ *P. lilacinus* อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 2 ครั้ง	2.64 c
4	ใส่ *P. lilacinus* อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 3 ครั้ง	2.87 c
5	ไม่ใส่ *P. lilacinus* และใส่ไส้เดือนฝอย (inoculated control)	4.89 a
	CV. (%)	6.24

[1/]0 = ไม่มีปม; 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย; 2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%; 3 = เกิดปม 25-50%; 4 = เกิดปม 50-75%; และ 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณโดยการใช้วิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมพริกในสภาพโรงเรือน พบว่า กรรมวิธีการใช้รา *Paecilomyces lilacinus* เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างที่อัตรา 20 กรัม/กระถาง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 1 ครั้งสามารถลดการเกิดปมได้ 50-75 % ของระบบราก เมื่อเปรียบเทียบกับ กรรมวิธีควบคุม (control) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ นุชนารถ และธารทิพย (2552) พบว่า รา *P. lilacinus* ที่เจริญบนข้าวฟ่าง สามารถใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่อัตรา 10 และ 50 กรัม/ต้น โดยระบบรากพริกที่อายุเก็บเกี่ยว มีดัชนีการเกิดปมที่รากระดับ 2.6 (3 = เกิดปมน้อยกว่า 25 - 50%) และ 2.2 (2 = เกิดปม 25%) เมื่อมีการใส่ที่อัตรา 10 และ 50 กรัม/ต้น ตามลำดับ สามารถลดการเกิดปมได้ในช่วงระหว่าง 50- 75% ของระบบราก เมื่อเปรียบเทียบกับพริกที่ปลูกในดินที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมแต่ไม่มีการใส่ราปฏิปักษ์หรือศัตรูธรรมชาติ (inoculated control) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลองในสภาพโรงเรือน สามารถนำราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ไปปรับใช้ในการควบคุมโรครากปมในสภาพแปลงพริกที่มีการระบาดของโรครากปมต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

แยกรา Hyphomycetes จำนวน 42 สายพันธุ์ จากดินและรากพริกที่มีการระบาดของโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* ใน 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี จำแนกราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบรา 5 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp. และ *Trichoderma* spp. และพบว่ารา *Paecilomyces* spp. และ *Fusarium* spp. เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ โดยที่รา *Paecilomyces lilacinus* สายพันธุ์ KB8 เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด ได้นำรา *Paecilomyces lilacinus* สายพันธุ์ KB8 มาเพาะเลี้ยงบนเมล็ดพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง ข้าวกล้อง และ ข้าวโพด พบว่า รา *P. lilacinus* สายพันธุ์ KB8 สามารถที่เจริญได้ดีและสร้างสปอร์ได้เป็นจำนวนมากในข้าวฟ่าง

การทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมพริก *M. incognita* ในสภาพโรงเรือน โดยการใส่รา *P. lilacinus* ที่เพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่าง ในอัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พบว่า กรรมวิธีที่ใส่รา *P. lilacinus* จำนวน 2, 3 และ 4 ครั้ง มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* ได้ดีที่สุด ทำให้ลดการเกิดปมได้ 50-75 % ของระบบราก เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่รา *P. lilacinus*

จากผลการศึกษาสามารถนำรา *P. lilacinus* (KB8) ไปปรับใช้ในสภาพแปลงที่มีการระบาดของโรครากปม เพื่อลดประชากรของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*)ในดิน นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาต่อยอดการใช้ประโยชน์จากรา *P. lilacinus* ในการผลิตเป็นราปฏิปักษ์ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในแปลงปลูกพืชของเกษตรกรได้จริง อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ชนิดอื่นๆ เพิ่มเติมด้วย เพื่อเป็นการเพิ่มทางเลือกของการใช้ราปฏิปักษ์ที่เป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ทางเกษตรให้มากขึ้นต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คมกฤช เพียงภูเขียว. 2539. **ประสิทธิภาพของการผสมสายพันธุ์เชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ต่อการทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธารทิพย ภาสบุตร และ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2550. เทคนิคการขยายปริมาณเชื้อราในเมล็ดพืช, น. 581-590. *ใน* **รายงานผลงานวิจัยบทคัดย่อ/รายงานความก้าวหน้า ปี 2550**. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2550. **การควบคุมโรครากปมในพริก.** กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

_____ และ ธารทิพย ภาสบุตร. 2552. การทดสอบเทคโนโลยีการใช้ชีวินทรีย์ในการควบคุมโรครากปมในแปลงสาธิต, น. 822-830. *ใน* **รายงานผลงานวิจัย บทคัดย่อ/รายงานความก้าวหน้า ปี 2550.** สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

_____ และ สรศักดิ์ มณีขาว. 2551. การทดสอบวิธีป้องกันกำจัดโรครากปมพริกในสภาพโรงเรือน. **วารสารอารักขาพืช** 2(1-2): 1-8.

เลขา มาโนช, จินตนา ชะนะ และ วิรัช ชูบำรุง. 2542. สายพันธุ์เชื้อราที่มีความสำคัญในประเทศไทย, น. 125-132. *ใน* **การประชุม ทางวิชาการครั้งที่ 37 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, _____, สายัณห์ สมฤทธิ์ผล และ สุจิตรา โกศล. 2540. ราเมือก รา Hyphomycetes และรามูลสัตว์จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง, น. 444-452. *ใน* **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, _____ และ พรพิมล อธิปัญญาคม. 2543. สายพันธุ์เชื้อราในป่าชนิดต่างๆ ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง, น. 436-444. *ใน* **การประชุมวิชาการของ ครั้งที่ 38 สาขาพืช.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____, อรอุมา เพียซ้าย, ธิดา เดชฮวบ, จิตรา เกาะแก้ว, อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ และ เสียงแจ๋ว พิริยพฤนต์. 2552. การควบคุมรา *Rhizoctonia* สาเหตุโรคข้าว ข้าวโพด และทุเรียน โดยใช้รา ดินและราเอนโดไฟท์, น. 542-547. *ใน* **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาพืช.** กรุงเทพฯ.

มนตรี เอี่ยมวิมังสา. 2538. **ผลของสารเคมีและเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในแง่งพันธุ์ขิง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มลชัย กิตติศักดิ์. 2541. **ผลของเชื้อราเวสิคูลาร์ อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ต่อการเจริญของปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* var. *altissima*) และการเข้าทำลายปอแก้วของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.

ศรศิลป์ บุญบันดาล. 2536. **การแพร่กระจายและการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดในพื้นที่สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภกิจ สุขใจมิตร. 2532. **อิทธิพลของ antagonist plants และเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2533. หลักการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยชีววิธี. **วารสารโรคพืช** 10(3-4): 45-47.

อนุชา ธีรวุฒิธร. 2537. **ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ต่างสายพันธุ์ในการทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรศรี ขุนอินทร์. 2548. **อิทธิพลของเห็ดบางชนิดที่มีผลต่อไส้เดือนฝอยรากปม, *Meloidogyne incognita*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Bagyaraj, D.J. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhiza, Application in Agriculture. **Methods Microbiology** 24: 360-373.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Balan, J. and N. Gerber. 1972. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactyloides*. **Nematology** 18: 163-173.

Barron, G.L. 1978. Nematophagous fungi: Endoparasites of *Rhabditis terricola*. **Microbial Ecology** 4: 157–163.

Birgit, N.H., J. Hans-Bo¨rje and A. Tunlid. 2006. **Nematophagous Fungi: Encyclopedia of Life Sciences.** Available Source: http:// www.els.net, January 24, 2007.

Boag, B., D.J.F. Brown and P.B. Topham. 1988. Vertical and horizontal distribution of virus vector nematodes and implications for sampling procedures. **Nematologica** 33: 83-96.

Bordallo, J.J., L.V. Lopez-Llorca, H-B. Jansson, J. Salinas, L. Persmark, L. Asensio. 2002. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist** 154(2): 491–499.

Chioza, A. and S. Ohga. 2013. Mycelial Growth of *Paecilomyces hepiali* in Various Agar Media and Yield of Fruit Bodies in Rice Based Media. **Advances in Microbiology** 3: 529-536.

Collange, B., M. Navarrete, G. Peyre, T. Mateille and M. Tchamitchian. 2011. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: the challenge of an agronomic system analysis. **Crop Protection** 30(10): 1251-1262.

David E.W. and D.T. Kaplan. 1990. Antagonists of Plant-parasitic Nematodes in Florida Citrus. **Journal of Nematology** 22: 567-573.

David, R.G. and R.A. Zorilla. 1983. Evolution of a fungus, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson for the biological control of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* Woll. as compared with some nematicides. **The Philippines Agriculturist** 66: 397-404.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1993. **Compendium of Soil Fungi**. Vol. 1, 2nd ed. Academic Press, London.

Demain, A.L. and N.A. Solomon. 1986. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington: American Society of Microbiology.

Dunn, M. T. 1983. *Paecilomyces nostocoides,* a new hypomycetes isolated from cysts of *Heterodera zeae.* **Mycologia** 75: 179-182.

_____, R.M. Sayre, A. Carell and W.P. Wergin. 1982. Colonization of Nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. **Scanning Electron Microscopy** 3: 1351-1357.

Eisenback, J.D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), pp. 95-112. *In* J.N. Sasser and C.C. Carter., eds. **An advanced treatise on *Meloidogyne* Vol I: Biology and control**. North Carolina State University, USA.

Gotlieb, D., Y. Oka, B. Ben-Daniel and Y. Cohen. 2003. Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* protects cucumber and tomato plants against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Phytoparasitica** 31: 217-225.

Hafeez, U.K., A. Riaz, A. Waqar, S.M. Khan and S. Akhtar. 2000. Evaluation of chemical vs biological control treatments against root-knot nematode (*M. incognita*) on tomato. **Pakistan Journal Phytopathol** 12(2): 118-120.

Hewett, T.E., D.W. Dickson, D.J. Mitchell and M.E. Kannwischer-Mitchell. 1988. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* on tobacco. **Journal of Nematology** 20: 578-584.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hussey, R.S. and G.J.W. Janssen. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species, pp. 43–70. *In* J.L. Starr, R. Cook, and J. Bridge., eds. **Plant Resistance to Parasitic Nematodes**. Wallingford, UK.

Jackson, L.E., D. Miller and S.E. Smith. 2002. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of wild and cultivated lettuce in response to nitrogen and phosphorus. **Scientia Horticulturae** 94: 205-218.

Janson, H.B. and B.N. Hertz. 1980. Interactions between nematophagous fungi and plant-parasitic nematodes: attraction, induction of trap formation and capture. **Nematologia** 26: 383-389.

Jatala, P. 1985. Biological control of nematode, pp. 303-308. *In* J.N. Sasser and C.C. Carter., eds. *In* **An Advanced Treatise on Meloidogyne Volume II: Biology and Control.** North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina.

_____. 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology** 24 : 453-489.

_____, R. Kaltenbach, M. Bocangel. 1979. Biological control of *Meloidogyne incognita* acrita and *Globodera pallida* on potatoes. **Journal of Nematology** 11: 296-303.

Kerry, B.R. 1987. Biological Control. pp. 233-263. *In* R.H. Brown and B.R. Kerry., eds. **Principle and Practice of Nematode Control in Crop.** Academic Press, Sydney.

Kiewnick, S. 2014. Efficacy of BioACT WG by (*Paecilomyces lilacinus* strain 251) to control root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in high value crops, pp. 66-67. *In* **Processing of the 6th International Congress of Nematology**. 4-9 May 2014, Cape Town, South Africa.

Kiewnick, S. and R.A. Sikora. 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incongnita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Biological Control** 38: 179-187.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Krishi-Mitra™. 2005. **Kumar Krishimitra Bioproducts (I) Pvt Ltd.** Available Source: http:// www.krishimitra.net/nemastin.htm, November 24, 2012.

Mishra, P.K. and F.N. Khan. 2014. Biomass Production of *Paecilomyces Vairoti*. **Indian Journal of Applied Research** 4(4): 497-499.

Nathaniel A.M. and S.A. George. 2003**. DISEASE: Root-knot nematode.** Available Source: https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/RootknotNematode.aspx, June 13, 2014.

Nikitas, K., B. Fotios and S. Nikolaos. 2002. Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. **Scientia Horticulturae** 94: 145-156.

Pau, C.G., C.T.S. Leong, S.K. Wong, L. Eng, M. Jiwan, F.R. Kundat, Z.F.B.A. Aziz, O.H. Ahmed and N.M. Majid. 2012. Isolation of indigenous strains of *Paecilomyces lilacinus* with antagonistic activity against *Meloidogyne incognita*. **International Journal of Agriculture and Biology** 14: 197–203.

Ruanpanun, P., H. Laatsch, N. Tangchitsomkid, K.D. Hyde and S. Lumyong. 2010. Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 27(6): 1373-1380.

Sahebani, N. and N. Hadavi. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry** 40(8): 2016-2020.

Santiago, D.C., M. Homechin, J.F.V. Silva, E.R. Ribeiro, B.C. Gomes and E.P.H. Santoro. 2006. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensisem* tomateiro. **Ciência Rural** 36: 1055-1064.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sikora, R.A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the control of plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology** 12: 245-270.

Sikora, R.A. and F. Schonbeck. 1995. Effect of vesicular-mycorrhizae, *Endogone mosseae* on the population dynamics of the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla,* pp. 158-166. *In* **Proceedings VIII International Congress Plant Protection**, Moscow.

Smith, O. and A.H.S. Onions. 1994. **Preservation and Maintaince of Living Fungi**. CAB International, UK.

Sterring, G.R. 1991. **Biological Control of Plant Parasitic Nematode: Progress, Problem and Prospect.** CAB International, UK.

Sun, M.H., L. Gao, Y.X. Shi, B.J. Li and X.Z. Liu. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and female in China and their biocontrol potential. **Journal of Invertebrate Pathology** 93: 22–28.

Thomas, G.V., P. Sundararaju, S.S. Ali and S.K. Ghai. 1989. Individual and interactive effects of VA mycorrhizal fungi and root knot nematodes, *Meloidogyne incognita* on cardamom. **Tropical Agriculture** 66: 21-24.

Waller, P.J. and M. Faedo. 1996. The prospects for biological control Free-living stage of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology** 26: 915-925.

Warcup, J.H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. **Nature** 166: 117-118.

_____ and K.F. Baker. 1963. Occurrence of dormant ascospore in soil. **Nature** 197: 1317-1318.

Webster, J. 1980. **Introduction to Fungi 2 nd.** Cambridge University press, Cambridge, London.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yang J. and K. Zhang. 2014. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Nematophagous Fungi. **Fungal Diversity Research Series** 23: 231-262.

Zhou, W., J. Starr and G. Sword. 2014. The effects of endophytic *Paecilomyces lilacinus* and *Chaetomium globosum* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and cotton aphid *Aphis gossypii*, pp. 68-69. *In* **Processing of the 6th International Congress of Nematology**. 4-9 May 2014, Cape Town, South Africa.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูตรอาหารในการทดลอง

1. Potato Dextrose Ager (PDA)

potato	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
agar	15	กรัม
distilled water	1	ลิตร

2. ½ Potato Dextrose Ager (PDA)

potato	100	กรัม
dextrose	10	กรัม
agar	15	กรัม
distilled water	1	ลิตร

3. Water Agar (WA)

difco bacto agar	15	กรัม
water	1	ลิตร

4. Gauchnaur's glucose Ammonium Nitrate Agar (GAN)

NH_4NO_3	1	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
rose bengal	0.03	กรัม
yeast extract	1	กรัม
glucose	5	กรัม
agar1	5	กรัม
streptomycin solution	4	มิลลิลิตร* (0.3 มก. / 100 มล.)
Water	1	ลิตร

*เติมหลังจาก autoclave อาหารแล้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูลการทดลองรา *Paecilomyces* spp. ต่อการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

Paecilomyces spp.	จำนวนซ้ำของการทดสอบ				ผลรวม	ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4		
จำนวน J2 ที่ฟักจากไข่ (ตัว)	70.00	63.00	60.00	58.00	251.00	62.75
จำนวนของ J2 ตาย (ตัว)	0.00	2.00	1.00	2.00	5.00	1.25
จำนวนไข่ไม่ถูกราเข้าทำลาย (ฟอง)	8.00	6.00	12.00	8.00	34.00	8.50
จำนวนไข่เสีย (ฟอง)	33.00	12.00	22.00	86.00	153.00	38.25
จำนวนไข่ที่ราเข้าทำลาย (ฟอง)	207.00	232.00	210.00	176.00	825.00	206.25
ผลรวม	318.00	315.00	305.00	330.00	1268.00	317.00
เปอร์เซ็นต์ของไข่ที่ถูกราเข้าทำลาย	65.09	73.65	68.85	53.33	260.93	65.23

หมายเหตุ: J2 = ระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม (Second stage juvenile)

ตารางผนวกที่ 2 ข้อมูลการทดลองรา *Fusarium* spp. ต่อการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

Fusarium spp.	จำนวนซ้ำของการทดสอบ				ผลรวม	ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4		
จำนวน J2 ที่ฟักจากไข่ (ตัว)	104.00	88.00	126.00	103.00	421.00	105.25
จำนวนของ J2 ตาย (ตัว)	3.00	0.00	0.00	2.00	5.00	1.25
จำนวนไข่ไม่ถูกราเข้าทำลาย (ฟอง)	18.00	58.00	33.00	67.00	176.00	44.00
จำนวนไข่เสีย (ฟอง)	135.00	89.00	60.00	54.00	338.00	84.50
จำนวนไข่ที่ถูกราเข้าทำลาย (ฟอง)	63.00	62.00	93.00	70.00	288.00	72.00
ผลรวม	323.00	297.00	312.00	296.00	1228.00	307.00
เปอร์เซ็นต์ของไข่ที่ถูกราเข้าทำลาย	19.50	20.88	29.81	23.65	93.84	23.46

หมายเหตุ: J2 = ระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม (Second stage juvenile)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 ข้อมูลการทดลองรา *Penicillium* spp.ต่อการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

Penicillium spp.	จำนวนซ้ำของการทดสอบ				ผลรวม	ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4		
จำนวน J2 ที่ฟักจากไข่ (ตัว)	82.0	103.0	110.0	93.0	388.0	97.00
จำนวนของ J2 ตาย (ตัว)	1.0	3.0	1.0	1.0	6.0	1.50
จำนวนไข่ไม่ถูกราเข้าทำลาย (ฟอง)	183.0	163.0	169.0	187.0	702.0	175.50
จำนวนไข่เสีย (ฟอง)	43.0	54.0	37.0	29.0	163.0	40.75
จำนวนไข่ที่ถูกราเข้าทำลาย(ฟอง)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
ผลรวม	309.0	323.0	317.0	310.0	1259.0	314.75
เปอร์เซ็นต์ของไข่ที่ถูกราเข้าทำลาย	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00

หมายเหตุ: J2 = ระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม (Second stage juvenile)

ตารางผนวกที่ 4 ข้อมูลการทดลองรา *Trichoderma* spp. ต่อการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

Trichoderma spp.	จำนวนซ้ำของการทดสอบ				ผลรวม	ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4		
จำนวน J2 ที่ฟักจากไข่ (ตัว)	58.0	82.0	107.0	95.0	342.0	85.50
จำนวนของ J2 ตาย (ตัว)	2.0	1.0	2.0	1.0	6.0	1.50
จำนวนไข่ที่ไม่ถูกราเข้าทำลาย (ฟอง)	178.0	164.0	117.0	98.0	557.0	139.25
จำนวนไข่เสีย (ฟอง)	72.0	63.0	84.0	95.0	314.0	78.50
จำนวนไข่ที่ถูกราเข้าทำลาย (ฟอง)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
ผลรวม	310.0	310.0	310.0	289.0	1219.0	304.75
เปอร์เซ็นต์ของไข่ที่ถูกราเข้าทำลาย	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ: J2 = ระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม (Second stage juvenile)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 5 ข้อมูลการทดลองของชุดควบคุม (control) ประสิทธิภาพของราในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

น้ำกลั่น (Control)	จำนวนซ้ำของการทดสอบ				ผลรวม	ค่าเฉลี่ย
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4		
จำนวน J2 ที่ฟักจากไข่ (ตัว)	109.0	79.0	109.0	108.0	405.00	101.25
จำนวนของ J2 ตาย (ตัว)	2.0	1.0	3.0	2.0	8.00	2.00
จำนวนไข่ไม่ถูกราเข้าทำลาย (ฟอง)	163.0	138.0	158.0	168.0	627.00	156.75
จำนวนไข่เสีย (ฟอง)	38.0	62.0	26.0	31.0	157.00	39.25
จำนวนไข่ที่ถูกราเข้าทำลาย (ฟอง)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
ผลรวม	312.0	280.0	296.0	309.0	1197.00	299.25
เปอร์เซ็นต์ของไข่ที่ถูกราเข้าทำลาย	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00

หมายเหตุ: J2 = ระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม (Second stage juvenile)

ตารางผนวกที่ 6 ผลคำนวณเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์รา *Paecilomyces lilacinus* (KB8) ที่เพาะเลี้ยงใน 1 กรัมของเมล็ดพืชชนิดต่างๆ อายุ 7 วัน

เมล็ดพืช	จำนวนสปอร์ (x 10^{11})						
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4	ซ้ำ 5	รวม	ค่าเฉลี่ย
ข้าวหอมมะลิ	1.512	1.623	1.489	1.666	1.710	8.000	1.60 b
ข้าวฟ่าง	1.890	1.874	1.914	1.898	1.902	9.478	1.89 a
ถั่วเหลือง	1.198	1.240	1.254	1.228	1.278	6.198	1.24 c
ข้าวกล้อง	1.499	1.778	1.559	1.658	1.674	8.168	1.63 b
ข้าวโพด	1.865	1.830	1.890	1.921	1.844	9.350	1.87 a
CV (%) 4.15							

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวธิดา แสงสว่าง
เกิดวันที่	30 กรกฎาคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม พ.ศ. 2549
ประวัติการทำงาน	ลูกจ้างชั่วคราว กลุ่มงานไส้เดือนฝอย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร พ.ศ. 2549-2557
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้	197 หมู่ 3 ตำบลทุ่งคอก อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี 72190
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี พ.ศ. 2553 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์