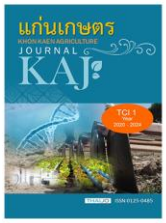
วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



รา *Arthrobotrys oliogospora* BCC 3847 และ *A. javanica* BCC 7879 ชีวภัณฑ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในพริก

Arthrobotrys oliogospora BCC 3847 and *A. javanica* BCC 7879 for management of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in chili pepper

เกวรินทร์ กล่ำเชาว์[1], รัศมี หวะสุวรรณ[1], เชษฐ์ธิดา ศรีสุขสาม[1], ลูกหว้า ชาวไร่นาค[2], นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด[2] และอลงกรณ์ อำนวยกาญจนสิน[1]*

Kewarin Klamchao[1], Rudsamee Wasuwan[1], Chettida Srisuksam[1], Lukwa Chaorainak[2], Nuchanart Tangjitsomkid[2]and Alongkorn Amnuaykanjanasin[1]*

[1] *ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถ. พหลโยธิน คลองหลวง ปทุมธานี 12120*

[1] *National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, 113 Thailand Science Park, Phahonyothin Rd., Khlong Luang, Pathum Thani 12120*

[2] *สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, 50 ถ.พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900*

[2] *Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture 50 Phahonyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900*

บทคัดย่อ: ไส้เดือนฝอยรากปมจัดเป็นศัตรูสำคัญของการปลูกพืชเศรษฐกิจหลายชนิดรวมถึงพริกและก่อความเสียหายรุนแรงต่อผลผลิตที่ผ่านมาการจัดการอาศัยการปลูกปอเทืองหรือพืชหมุนเวียนอื่น ๆ เพื่อลดการแพร่ระบาด แนวทางการควบคุมแบบชีววิธีด้วยจุลินทรีย์เป็นอีกแนวทางหนึ่งของการจัดการศัตรูพืชเพื่อรองรับตลาดเกษตรอินทรีย์และเกษตรปลอดภัยที่จะมีสัดส่วนมากขึ้นในอนาคต งานวิจัยนี้จึงทดสอบการใช้ราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยแบบจำเพาะสองสายพันธุ์ คือ ราอาร์โทโบทริส *Arthrobotrys oligospora* BCC 3847 และ *A. javanica* BCC 7879 จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเชิงประกอบและแบบอิเลคตรอนส่องกราด ราอาร์โทโบทริสทั้งสองสายพันธุ์สร้างโครงสร้างหลากหลายชนิดเพื่อดักจับไส้เดือนฝอยรากปม ได้แก่ ร่างแหกับดัก (adhesive net) ตุ่มกาวเหนียว (adhesive knob) วงแหวนดักจับ (constricting ring) และห่วงดักจับ (adhesive loop) ซึ่งประกอบด้วยวงซ้อนสลับกัน 3-4 ชั้นในรูปแบบของเงื่อนปม โครงสร้างดักจับของ *A. oligospora* และ *A. javanica* ก่อให้เกิดการตายของไส้เดือนฝอยรากปมที่ 34 และ 17% ที่ 7 วันหลังการถ่ายเชื้อ เมื่อตรวจสอบความมีชีวิตรอดของเส้นใยในดิน พบรา *A. oligospora* และ *A. javanica* ที่ 1,395 และ 92.5 CFU/g ตามลำดับ ภายใน 15-30 วันหลังถ่ายเชื้อลงดิน ผลทดสอบในโรงเรือนบ่งชี้ว่า การใส่ราอาร์โทโบทริสทั้งสองสายพันธุ์ก่อนปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย 15 วัน สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรครากปมได้ 63-66% เทียบกับชุดควบคุม การใช้ราอาร์โทโบทริสโดยเฉพาะ *A. oligospora* BCC 3847 สามารถใช้เพื่อเป็นมาตรการป้องกันและลดการเกิดรากปมในพริกได้

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี; ชีวภัณฑ์;, ราอาร์โทรโบทรีส; ราปฏิปักษ์; ไส้เดือนฝอยรากปม

ABSTRACT: Root-knot Nematodes (RKN) is a damaging pest in several crops, including chili pepper, and leads to a severe loss of crop products. Past managements include crop rotation to a different crop such as sunn hemp to limit the spread of RKNs. Biological control using microorganisms is an alternative to control the pest in the field, consequently promoting existing and future markets of organic products. This study focused on two nematophagous fungi feeding specifically on nematodes, *Arthobotrys oligospora* BCC 3847 and *A. javanica* BCC 7879. Scanning electron and compound microscopy showed that both fungi formed various trapping structures, including adhesive

* Corresponding author: alongkorn@biotec.or.th

Received: date; March 31, 2021 Accepted: date; July 12, 2021 Published: date; October 5, 2021

net, adhesive knob, constricting ring and adhesive loop. The latter structure is particularly unique for *A. oligospora* BCC 3847, and has 3-4 hyphal rings arranged in a knot type. *Arthobotrys oligospora* and *A. javanica* having these trapping structures caused 34 and 17% mortality of RKNs after 7 days post-inoculation (dpi), respectively. Similar structures were also found in *in vitro* soil experiment. Viability test indicated that *A. oligospora* and *A. javanica* were found in the soil at 1,395 and 92.5 CFU/g during 15-30 dpi. Greenhouse trials demonstrated that inoculation of the two *Arthobotrys* isolates in the soil 15 days before RKN inoculation decreased the number of root galls by 63-66%, compared with a RKN-infested treatment. Utilization of *A. oligospora* BCC 3847 can be a preventive protocol for reducing the occurrence of root galls in chili pepper.

Keywords: biological control; *Arthrobotrys*, Nematophagous fungi; root-knot nematode; *Meloidogyne incognita*

บทนำ

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. เป็นศัตรูพืชซึ่งก่อให้เกิดโรครากปมในพืชหลายชนิด (Kerry, 2000) โดยส่วนใหญ่ไส้เดือนฝอยจะอาศัยและแพร่กระจายตัวอยู่ในดิน สามารถทำความเสียหายให้กับพืชได้ตั้งแต่ระยะกล้า ตัวอ่อนที่เป็นระยะปรสิตจะเข้าทำลายและฝังตัวอาศัยอยู่ในราก ทำให้บริเวณส่วนของรากนั้นเกิดการพอง บวมโต และเกิดเป็นปุ่มปม มีผลทำให้พืชเจริญเติบโตช้าหรือชะงักการเจริญเติบโต ในพืชที่มีความอ่อนแอต่อโรค จะทำให้พืชเกิดอาการของโรคได้ง่าย พืชจะให้ผลผลิตต่ำ ถ้าพืชมีอาการของโรครุนแรงจะทำให้ต้นตายได้ (Agrios, 1997) พบได้ทั้งในเขตอบอุ่น เขตร้อน และการเพาะปลูกในเรือนกระจก ทำความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจของประเทศไทยและต่างประเทศ ทั้งนี้มีชนิดของพืชที่ไส้เดือนฝอยสามารถเข้าทำลายได้มากกว่า 2,000 ชนิด (Sasser, 1980)

การจัดการไส้เดือนฝอยรากปมอาจทำโดยการใช้สารเคมี เช่น abamectin (ไตรเดช และคณะ, 2554) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความต้านทานต่อสารเคมีเหล่านี้ของไส้เดือนฝอยรากปม (Nansen, 1993) การจัดการโดยปลูกพืชอื่นสลับเช่น ปอเทือง เพื่อจำกัดการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยรากปม (ไตรเดช ขายทอง และมนตรี เอี่ยมวิมังสา 2554)

การใช้จุลินทรีย์ป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยการใช้จุลินทรีย์เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตรได้อย่างมาก ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ติดมาหรือตกค้างอยู่ในพืชผลทางการเกษตร มีผลต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของผู้ใช้และผู้บริโภค (Nordmeyer, 1992) ราจัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยชีววิธี เนื่องจากเป็นศัตรูธรรมชาติของไส้เดือนฝอย ที่เรียกว่า ราปฏิปักษ์ ซึ่งมีหลากหลายสายพันธุ์ที่เข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้ตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อนระยะที่ 2 หรือระยะเข้าทำลาย (juveniles) ตัวอ่อนที่มีการลอกคราบเป็นระยะต่าง ๆ (vermiform juvenile) ตัวเต็มวัย และตัวเมียที่ฝังตัวอยู่ในราก (feeding sedentary females) โดยจะเจาะเข้าไปภายในตัวและค่อย ๆ ย่อยอวัยวะภายในของไส้เดือนฝอย (Jansson and Lopez-Llorca, 2001) สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะการเข้าทำลายไส้เดือนฝอย ได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ๆ คือ กลุ่มที่สร้างกับดักไส้เดือนฝอย กลุ่มที่เป็นปรสิตภายในของไส้เดือนฝอยที่ตัวเต็มวัยไม่ได้อยู่นิ่งกับที่ และกลุ่มที่เป็นปรสิตของไข่และตัวเต็มวัยที่มีรูปร่างเป็นถุง (Nordbring-Hertz et al., 2006) มีรายงานการพบราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys javanica*, *Arthrobotrys conoides*, *Dactylaria brochopaga* และ *Verticillium chlamydosporium* จะเห็นว่ามีเชื้อที่ก่อโรคในแมลงบางสายพันธุ์สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปมได้เช่นเดียวกัน ในกลุ่มราปฏิปักษ์เหล่านี้ ราที่โดดเด่นและได้ถูกใช้เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ได้แก่ รา *Paecilomyces* (Kiewnick and Sikora, 2003) และเห็ดเรืองแสงสิรินรัศมี *Neonothopanus nambi* (สุรีย์พร และคณะ, 2557)

อย่างไรก็ตาม ราที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อไส้เดือนฝอยรากปมนั้น ได้แก่ กลุ่มของสายพันธุ์รา *Pochonia*, *Verticillium* และ *Arthobotrys* ซึ่งจะเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียวไม่เข้าทำลายสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดยจะเรียกรากลุ่มนี้โดยเฉพาะว่า nematophagous fungi (Su et al., 2017) มีรายงานวิจัยส่วนหนึ่งที่ศึกษา nematophagus fungi ในประเทศไทย การคัดเลือกและการผลิตเชื้อราปฏิปักษ์ในสกุล *Arthrobotrys* เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในผักกาดหอมห่อ พบว่า รา *A. oligospora* ไอโซเลท Dong oli และรา *A. conoides* ไอโซเลท Dong con โดยการผสมดินรองก้นหลุม สามารถลดการเกิดปมและลดจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ แต่ประสิทธิภาพยังต่ำกว่าคาร์โบฟูราน (สุมาลี, 2550) รา *Pochonia chlamydosporia* var. catenulate

สามารถควบคุมการเกิดปมในรากมะเขือเทศในกระถางระดับโรงเรือนได้ที่ 6% ในขณะที่ชุดควบคุมไม่ใช้เชื้อราเกิดรากปมที่ 24% (มยุรฉัตร, 2554) นอกจากนี้พบว่า รา *Pochonia chlamydosporia* YT008 ที่เก็บรักษาที่ 1 เดือนที่อุณหภูมิ 4°ซ มีดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากพริกในระดับต่ำที่ ระดับ 1-2 สำหรับชีวภัณฑ์ที่เก็บเป็นเวลา 4 เดือน ก่อให้เกิดรากปมสูงกว่า ที่ระดับ 1.4-3.6 (ยุวดี และสุภาวดี, 2557) จะเห็นได้ว่าข้อมูลการศึกษาเชื้อรากลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยโดยเฉพาะสายพันธุ์ของรา *Arthrobotrys* ยังมีไม่มากนัก งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ของรา *Arthrobotrys* กับไส้เดือนฝอยรากปมที่เป็นโฮสต์ หาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณราและทดสอบประสิทธิภาพของรา *Arthrobotrys* สองสายพันธุ์คือ รา *A. oligospora* และ *A. javanica* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืชเศรษฐกิจ ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ต้นพริก (*Capsicum annuum*) เป็นโมเดล

วิธีดำเนินงาน

1. การทดสอบการเจริญของรา *Arthrobotrys* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

รา *A. oligospora* สายพันธุ์ BCC 3847 และ *A. javanica* สายพันธุ์ BCC 7879 ที่ได้จากศูนย์ชีววัสดุประเทศไทย (Thailand Bioresource Research Center; TBRC) ถูกทดสอบการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายราลงบนอาหาร PDA, oat meal agar (OMA) และ corn meal agar (CMA) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. (เบอร์ 1) วางกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ วัดการเจริญเติบโตของเส้นใย (จากเส้นผ่าศูนย์กลางของของโคโลนี และตรวจสอบความหนาแน่นของเส้นใยโดยการบันทึกภาพถ่ายทุกวันเป็นเวลา 10 วัน โดยสังเกตความฟูของเส้นใยบนหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ) นำค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีรามาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) วางแผนการทดสอบแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) การทดสอบนี้ทำซ้ำ 2 ครั้ง ในแต่ละครั้ง แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT)

2. การเพิ่มปริมาณเส้นใยของรา *Arthrobotrys* ในอาหารเหลว

ราอาร์โทโบทริสทั้งสองสายพันธุ์ถูกตรวจวัดการเพิ่มปริมาณเส้นใยในอาหารเหลวเพื่อใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม โดยแบ่งออกเป็น 3 กรรมวิธี ได้แก่ จำนวนชิ้นวุ้นตั้งต้นของรา 1, 2 และ 4 ชิ้น ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ชิ้นวุ้นราตั้งต้นขนาด 1x1 ซม. ถูกตัดจากราบนอาหาร PDA อายุ 7 วันและย้ายลงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ โดยไม่ต้องนำไปเขย่า วัดการเจริญเติบโตของราที่ระยะเวลา 7 และ 10 วัน โดยการชั่งน้ำหนักเส้นใยสด (fresh mycelia) ที่แยกอาหาร PDB ออกด้วยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman™ เบอร์ 1 นำค่าเฉลี่ยของน้ำหนักเส้นใยสดของรามาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) การทดสอบนี้ทำซ้ำ 2 ครั้ง ในแต่ละครั้ง แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

3. การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของรา *Arthrobotrys* ต่อไส้เดือนฝอยรากปมในระดับห้องปฏิบัติการ

ในการทดสอบปฏิสัมพันธ์ด้านความเป็นปฏิปักษ์ของรา *A. oligospora* BCC 3847 และ *A. javanica* BCC 7879 ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* บนสภาพดินจำลอง โดยผสมดินร่วน (ดินสีดา):ดินทราย ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ตากดินให้แห้งแล้วนำมาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 150°ซ เป็นเวลา 3 วัน ใส่ดินผสมปริมาณ 1 กรัมลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. หยดสารแขวนลอยตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะ J2 จำนวน 1,000±100 ตัวใน 1 มล. จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.75 ซม. (เบอร์ 3) เจาะเส้นใยราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน วางบริเวณกึ่งกลาง ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อบนหน้าผิวดินโดยคว่ำส่วนของราให้สัมผัสกับผิวดิน ตรวจสอบกิจกรรมและลักษณะของราและไส้เดือนฝอยรากปมโดยสังเกตลักษณะของราที่เจริญบนผิวดิน ความมีชีวิต การเคลื่อนไหว และการติดกับดักราของไส้เดือนฝอยรากปมทุกวันเป็นเวลา 9 วัน บันทึกรูปภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo และ compound microscope

ในการทดสอบปฏิสัมพันธ์ ตามเทคนิค Dual culture ของ Skidmore and Dickinson (1976) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. (เบอร์ 1) เจาะเส้นใยราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.2% Water Agar ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. ที่เติม สารปฏิชีวนะ Streptomycin ความเข้มข้น 0.35 mg/ml และ Tetracycline hydrochloride 0.05 mg/ml วางห่างจากขอบจานอาหารเข้ามา 2 ซม. เมื่อราเจริญแผ่ปลายเส้นใยห่างจากเส้นที่ขีดไว้สำหรับไส้เดือนฝอยเป็นระยะ 0.5 ซม. (ประมาณ 5-7 วัน) นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะ J2 ปริมาตร 0.1 มล. หยดลงฝั่งตรงข้ามกับเชื้อราเป็นแนวยาว 2 ซม. ห่างจากขอบจานอาหารเข้ามา 2 ซม. บ่มจานอาหารไว้ที่อุณหภูมิ 25±2°ซ ตรวจสอบกิจกรรมการเป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยของราโดยการสังเกตและตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ตายและติดห่วงกับดักกาวเหนียวของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) มี 2 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย *T*-test ($p < 0.05$)

4. การตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเส้นใยแบบพิเศษของรา *Arthrobotrys* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตัวอย่างรา *A. oligospora* BCC 3847 และ *A. javanica* BCC 7879 ถูกเตรียมสำหรับตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยเลี้ยงราบน 1.2% Water agar เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นตัดชิ้นวุ้นของราลงใน 24-well plate เติม 5% Glutaraldehyde ลงไปให้ท่วมตัวอย่างเพื่อเป็นขั้นตอนของการ Pre-fixation นำตัวอย่างเก็บไว้ที่ 4°ซ เพื่อเป็นการรักษาอุณหภูมิ เป็นเวลา 1.50-2 ชั่วโมง (หรือสามารถเก็บไว้ข้ามคืนได้) นำตัวอย่างมาล้างด้วย Phosphate buffer เป็นจำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นเติม 2% Osmium tetroxide ให้ท่วมตัวอย่างเป็นเวลา 1.50-2 ชั่วโมง เก็บรักษาตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จึงเข้าสู่กระบวนการในขั้นตอนของ Post-fixation โดยการ Dehydrate ด้วย ethanol series 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% อย่างละ 1 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และ 100% อย่างละ 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที และในขั้นตอนของ 70% สามารถแช่ตัวอย่างทิ้งไว้ข้ามคืนได้ เมื่อตัวอย่างที่ผ่านการขจัดน้ำออกแล้ว จะนำตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤตโดยเติม Amyl acetate ให้ท่วมตัวอย่างเป็นเวลา 7 นาที แล้วนำตัวอย่างเข้าเครื่อง Critical Point Dryer (CPD) ตามขั้นตอนของเครื่องจนกว่าตัวอย่างจะแห้ง นำตัวอย่างที่แห้งแล้วไปติดลงบนฐานรอง (stub) โดยใช้ Carbon tape เป็นตัวกลางสำหรับยึดติด แล้วนำไปฉาบผิวด้วยทอง (Gold sputtering) เป็นเวลา 60 วินาทีอย่างละ 1 ครั้ง เก็บตัวอย่างไว้ในตู้ควบคุมความชื้นหรือภาชนะดูดความชื้น

5. การทดสอบความมีชีวิตรอดของรา *Arthrobotrys* ในดินในระดับห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยแบ่งการทดลองของราออกเป็น 3 กรรมวิธี (น้ำหนักเส้นใยสด 2, 4 และ 8 กรัม) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยเพาะเลี้ยงเส้นใยสดในอาหาร PDB เป็นเวลา 10 วัน นำเส้นใยสดใส่ลงในดินร่วนปนทรายผสมกันอัตราส่วน 1:1 ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ในกระถางพลาสติกขนาดความสูง 5 นิ้ว ห่างจากขอบกระถาง 2.5 ซม. ปิดทับด้วยดิน รดน้ำวันละ 1 ครั้ง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของราทุก ๆ 15 วัน เป็นเวลา 45 วัน โดยเพาะเลี้ยงราจากสารละลายดินปริมาตร 0.5 มล. บนอาหาร PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะ Streptomycin ความเข้มข้น 0.35 mg/ml และ Tetracycline hydrochloride 0.05 mg/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณโคโลนีราต่อตัวอย่างดิน 1 กรัม (CFU/กรัม) โดยใช้สูตร ประชากรรา = (จำนวนโคโลนีเฉลี่ย x Dilution factor)/ปริมาตรของสารละลายดิน นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

6. การทดสอบประสิทธิภาพของรา *Arthrobotrys* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมของพริกในระดับโรงเรือนทดสอบ

สำหรับการเตรียมต้นกล้าพริก นำเมล็ดพริกพันธุ์หัวเรือ (บริษัทเจียไต๋) เพาะเมล็ดในวัสดุเพาะกล้า (พีทมอส) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุในถาดหลุม ๆ ละ 1 เมล็ด รดน้ำวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) จนกระทั่งต้นกล้ามีอายุ 3 สัปดาห์ ย้ายลงในกระถางขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว ที่บรรจุดินร่วนปนทรายที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 1 ต้นต่อกระถาง รดน้ำวันละ 1 ครั้ง บำรุงต้นพืชโดยให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 1-2 เม็ดต่อต้นต่อสัปดาห์ ให้ต้นกล้าได้รับแสงแดดอย่างเพียงพอจนอายุครบ 4 สัปดาห์ จึงนำมาใช้ในการทดลอง

สำหรับการเตรียมเส้นใยของรา เตรียมเส้นใยสดจากการนำชิ้นวุ้นตั้งต้นของราขนาด 1x1 ซม. จำนวน 4 ชิ้นย้ายลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มล. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ โดยไม่ต้องนำไปเขย่า เป็นเวลา 10 วัน กรองแยกอาหาร PDB ด้วยกระดาษกรอง Whatman™ เบอร์ 1 เก็บเส้นใยสดในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 50 มล. ชั่งน้ำหนัก เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. ได้เส้นใยสดพร้อมใช้สำหรับนำไปทดสอบต่อไป

ไส้เดือนฝอยรากปมบริสุทธิ์ถูกเตรียมโดยคัดเลือกกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมจากรากต้นพริกที่ได้ปลูกไส้เดือนฝอยลงไปเป็นเวลา 45 วัน เก็บกลุ่มไข่ที่แก่แล้วลงในบีกเกอร์ (สังเกตจากสีของไข่ มีลักษณะสีส้มออกแดง) ล้างน้ำให้สะอาด นำไปแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite (NaOCl) เข้มข้น 0.525% นาน 3 นาที พร้อมกับเขย่าเบา ๆ เพื่อให้ไข่กระจายตัวออกจากกัน จากนั้นเทผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh เพื่อเอาเศษรากออก นำไปเทผ่านตะแกรงขนาด 400 mesh อีกครั้ง ล้างไข่ที่ติดค้างบนตะแกรงจนกระทั่งไม่มีกลิ่นของสารละลาย sodium hypochlorite หลงเหลืออยู่ นำสารแขวนลอยไข่ไปปรับให้มีความหนาแน่น 1000 ไข่ต่อน้ำ 1 มล. โดยย้ายไข่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นอยู่ ปรับปริมาตรให้ได้ 500 มล. (ปริมาตรน้ำขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้) จากนั้นสุ่มไข่ปริมาตร 1 มล. จากบีกเกอร์ เจือจางในน้ำกลั่น 150 มล. ตรวจนับไข่ไส้เดือนฝอยในจานสำหรับนับไส้เดือนฝอย (Nematode counting dishes) ซึ่งก้นจานขีดแบ่งเป็นช่อง 18 ช่อง ตรวจนับไข่ไส้เดือนฝอยที่อยู่ในแต่ละช่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ จากนั้นคำนวณปรับความหนาแน่นของไข่ในสารละลายให้ได้ 1000 ไข่/มล. จากสูตร (จำนวนไข่นับครั้งที่ 1 + จำนวนไข่นับครั้งที่ 2)/2 x ปริมาตรน้ำที่เจือจางครั้งที่ 1 x ปริมาตรน้ำที่เจือจางครั้งที่ 2

ในการทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการใช้รา *Arthrobotrys* ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม นำต้นกล้าพริกอายุ 4 สัปดาห์ที่เจริญเติบโตในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว ใส่สารแขวนลอยไข่ไส้เดือนฝอย ความเข้มข้น 1000±100 ไข่/มล. จำนวน 1 มล. ลงในรูลึกประมาณ 2 ซม. ที่ห่างจากโคนต้นประมาณ 1 ซม. ใส่เส้นใยสดของราปริมาณ 2 กรัมฝั่งตรงข้ามกับสารแขวนลอยไข่ไส้เดือนฝอย ห่างจากโคนต้นประมาณ 1-2 ซม. แล้วกลบดิน ในกรรมวิธีที่ปลูกไข่ไส้เดือยฝอยจะเว้นการรดน้ำเป็นเวลา 1 วัน หลังจากนั้นรดน้ำวันละ 1 ครั้ง บำรุงต้นพืชโดยให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 1-2 เม็ดต่อต้นต่อสัปดาห์ โดยจัดกรรมวิธีในการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กระถาง แต่ละกระถางปลูกพืช 1 ต้น ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1รา *A. oligospora* + *M. incognita* พร้อมกัน

กรรมวิธีที่ 2 รา *A. javanica* + *M. incognita* พร้อมกัน

กรรมวิธีที่ 3 รา *A. oligospora* เป็นเวลา 15 วัน ตามด้วย *M. incognita*

กรรมวิธีที่ 4 รา *A. javanica* เป็นเวลา 15 วัน ตามด้วย *M. incognita*

กรรมวิธีที่ 5 *M. incognita* เป็นเวลา 10 วัน ตามด้วย *A. oligospora*

กรรมวิธีที่ 6 *M. incognita* เป็นเวลา 10 วัน ตามด้วย *A. javanica*

กรรมวิธีที่ 7 *M. incognita* อย่างเดียว (Positive control)

กรรมวิธีที่ 8 ไม่ใส่ทั้งรา *Arthrobotrys* และ *M. incognita* (negative control)

วัดประสิทธิภาพของราต่อการควบคุมโรครากปมในพริกหลังจากปลูกราและไส้เดือนฝอยรากปมไปแล้วที่ 45 วัน โดยวัดความสูงของลำต้น (ซม.) ความยาวราก (ซม.) และตรวจนับความรุนแรงของการเกิดปมที่ราก (จำนวนปม) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ในการทดสอบปริมาณที่เหมาะสมต่อการใช้รา *Arthrobotrys* ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม เส้นใยของราปริมาณ 2, 4 และ 8 กรัม ถูกทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการใช้ราที่กล่าวไว้ข้างต้นและจัดกรรมวิธีในการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กระถาง แต่ละกระถางปลูกพืช 1 ต้น ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 รา *A. oligospora* ปริมาณ 2 กรัม เป็นเวลา 15 วัน ตามด้วย *M. incognita*

กรรมวิธีที่ 2 รา *A. javanica* ปริมาณ 2 กรัม เป็นเวลา 15 วัน ตามด้วย *M. incognita*

กรรมวิธีที่ 3 รา *A. oligospora* ปริมาณ 4 กรัม เป็นเวลา 15 วัน ตามด้วย *M. incognita*

กรรมวิธีที่ 4 รา *A. javanica* ปริมาณ 4 กรัม เป็นเวลา 15 วัน ตามด้วย *M. incognita*

กรรมวิธีที่ 5 รา *A. oligospora* ปริมาณ 8 กรัม เป็นเวลา 15 วัน ตามด้วย *M. incognita*

กรรมวิธีที่ 6 รา *A. javanica* ปริมาณ 8 กรัม เป็นเวลา 15 วัน ตามด้วย *M. incognita*

กรรมวิธีที่ 7 *M. incognita* อย่างเดียว (Positive control)

กรรมวิธีที่ 8 ไม่ใส่ทั้งรา *Arthrobotrys* และ *M. incognita* (negative control)

ประสิทธิภาพของราต่อการควบคุมโรครากปมของพริกถูกตรวจวัดหลังจากปลูกราและไส้เดือนฝอยรากปมไปแล้วที่ 45 วัน ตรวจนับความรุนแรงของการเกิดปมที่ราก (จำนวนปม) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

ผลการศึกษา

1. การเจริญของรา *Arthrobotrys* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

ราอาร์โทโบทริสที่ถูกเลี้ยงบนอาหาร PDA, OMA และ CMA เมื่อประเมินการเจริญของราโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีบนจานอาหาร พบว่า ราทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญบนอาหาร OMA ในช่วง 3-7 วันแรก ได้มากกว่า PDA และ CMA แต่หลังจากนั้นจะค่อย ๆ เจริญจนเต็มจานอาหารที่ระยะเวลา 10 วัน จากนั้นนำค่าเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของรามาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยรา *Arthrobotrys* พบว่า ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสาม ที่ 7 และ 10 วัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) **(Table 1)** อย่างไรก็ตามเส้นใยของราทั้งสองสายพันธุ์บนอาหาร PDA มีความหนาแน่นมากกว่าบนอาหาร OMA และ CMA ด้วยการสังเกต บันทึกผลและเปรียบเทียบความหนาแน่นและความฟูของเส้นใย จึงเลือกใช้อาหาร PDA สำหรับเลี้ยงราเพื่อเป็นหัวเชื้อ (stock culture) ในการทดสอบต่อไป

Table 1 Radial growth of *Arthrobotrys oligospora* and *A. javanica* on three different culture media: potato dextrose agar (PDA); oat meal agar (OMA); and CMA (corn meal agar)

	Radial growth (cm)							
	A. oligospora				***A. javanica***			
	Incubation (days)				**Incubation (days)**			
Culture medium	1	3	7	10	1	3	7	10
PDA	0.0[a] ± 0.0	2.6[b] ± 0.2	8.3[b] ± 0.4	9.0[a] ± 0.0	1.5[b] ± 0.4	4.3[b] ± 0.4	8.8[a] ± 0.4	9.5[a] ± 0.7
OMA	0.0[a] ± 0.0	3.4[a] ± 0.5	8.8[a] ± 0.4	9.5[a] ± 0.7	1.8[a] ± 0.6	5.1[a] ± 0.6	8.8[a] ± 0.4	9.5[a] ± 0.7
CMA	0.0[a] ± 0.0	2.5[c] ± 0.2	8.2[b] ± 1.1	9.5[a] ± 0.7	1.2[c] ± 0.4	3.8[c] ± 0.3	8.8[a] ± 0.4	9.5[a] ± 0.7

[†] Mean in the same column with different letters are significantly different (DMRT, $p < 0.05$)

2. ความเป็นปฏิปักษ์ของรา *Arthrobotrys* ต่อไส้เดือนฝอยรากปมในระดับห้องปฏิบัติการ

เพื่อตรวจสอบกลไกการก่อโรคและทำลายไส้เดือนฝอยของรา *Arthrobotrys* ทั้งสองสายพันธุ์ ในการตรวจสอบบริเวณชิ้นวุ้นรา *A. oligospora* และ *A. javanica* ที่วางไว้หน้าผิวดิน พบว่า ราทั้งสองสามารถเจริญแผ่เส้นใยบริเวณผิวหน้าของดินอย่างรวดเร็ว

และเจริญแทรกลงไปตามอนุภาคของดิน **(Figure 1b, d)** อีกทั้งมีไส้เดือนฝอยจำนวนหนึ่งเข้ามาอาศัยและติดกับดักของเส้นใยราอยู่บนชิ้นวุ้น เนื่องจากเส้นใยของรามีสารกาวเหนียวและสร้างตาข่ายเส้นใยที่มีสารกาวเหนียว (adhesive nets) นอกจากนี้ยังตรวจสอบพบว่าบริเวณที่มีไส้เดือนฝอยอาศัยอยู่หรือเคลื่อนที่ผ่าน ราจะสร้างห่วงกับดักกาวเหนียว (adhesive trap) ที่เป็นเส้นใยแบบพิเศษจำนวนมากขึ้นมา เมื่อไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ไปบนชิ้นวุ้นและสัมผัสกับเส้นใยที่มีสารกาวเหนียวทำให้ไม่สามารถดิ้นหลุดจากเส้นใยได้ ในบางครั้งเส้นใยจะสร้างตุ่มกาวเหนียว (adhesive knobs) เพื่อยึดติดหรือสร้างห่วงรัดพันล้อมรอบตัว จากนั้นจะสร้างเส้นใยผ่านเข้าไปในตัวไส้เดือนฝอยเพื่อดูดซับของเหลวและเจริญเติบโตเบียดเบียนอวัยวะต่าง ๆ อยู่ภายใน จนท้ายที่สุดตัวไส้เดือนฝอยจะถูกย่อยสลายภายในเวลา 6-9 วัน **(Figure 2)**

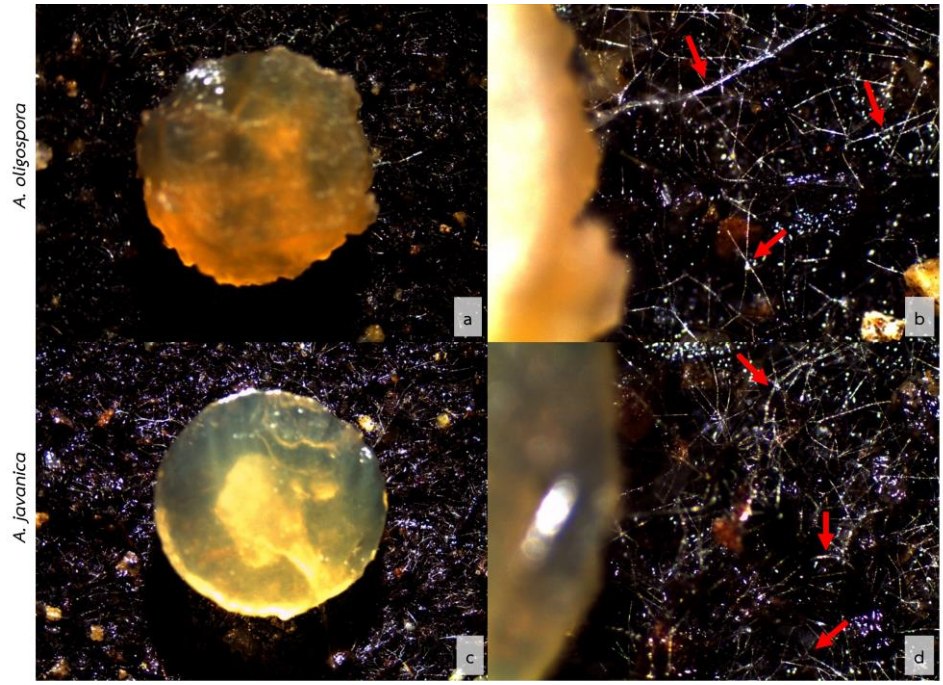


Figure 1 Growth of *Arthrobotrys oligospora* or *A. javanica* on the soil surface. An agar piece of *A. oligospora* or *A. javanica* culture was dissected by cork borer (No. 3; 7.5 mm diameter) and used as inoculum for transferring onto the soil mixed with RKN. *A. oligospora* (a) and *A. javanica* (c) hyphae grew extensively on the soil surface (arrows) and infiltrated through soil particle (b, d).

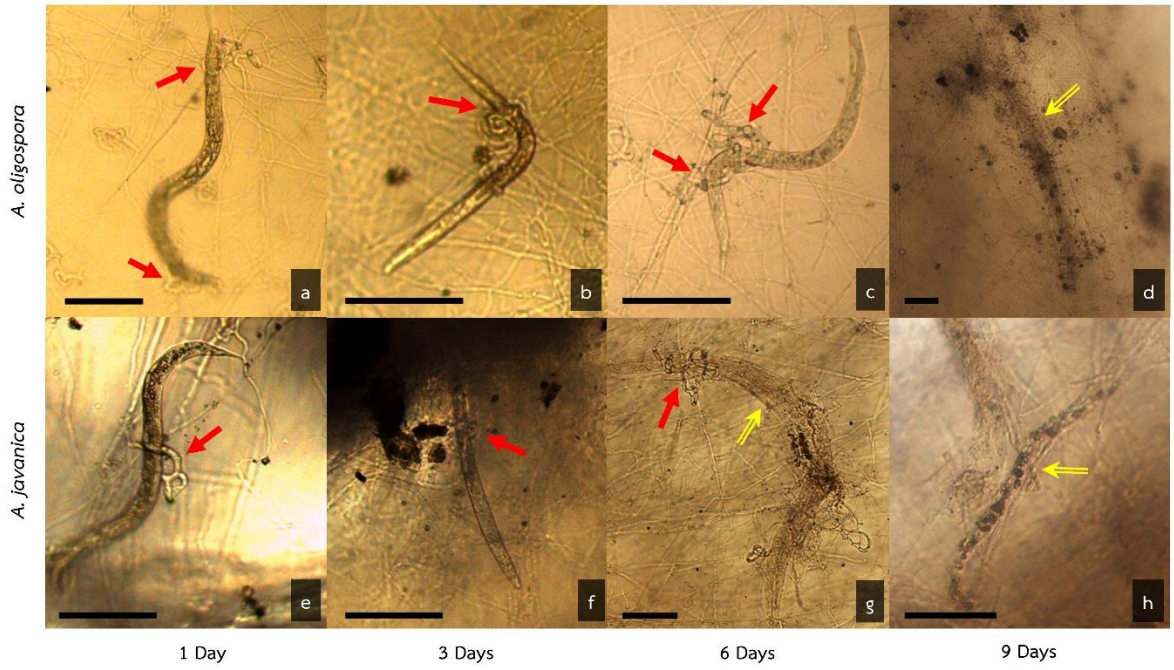


Figure 2 Interactions between root knot nematodes and *Arthrobotrys oligospora* (a-d) and *A. javanica* (e-h) observed under compound microscopy. It is noted that *Arthrobotrys* trapping structures and infected nematodes being degraded are indicated by red and yellow arrows, respectively. Bars, 100 µm.

จากประสิทธิภาพการดักจับไส้เดือนฝอยบนอาหารแข็ง รา *A. oligospora* สามารถสร้างห่วงกับดักกาวเหนียวดักจับไส้เดือนฝอยรากปมและก่อให้เกิดการตายมากกว่า *A. javanica* ในวันที่ 3 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีอัตราการตายของไส้เดือนฝอยรากปมในวันที่ 3 คือ 25, 6 ตัว และวันที่ 5 คือ 28, 9 ตัวตามลำดับ **(Table 2)** ราอาร์โทโบทริสโดยเฉพาะ *A. oligospora* สามารถสร้างโครงสร้างพิเศษหลากหลายประเภทเพื่อดักจับไส้เดือนฝอย ได้แก่ ร่างแหกับดัก (adhesive net) วงแหวนดักจับ (constricting ring) และห่วงดักจับ (adhesive loop) เมื่อมีการติดกับของไส้เดือนฝอยรากปม ราจะสร้างห่วงกับดักกาวเหนียวบริเวณที่ไส้เดือนฝอยรากปมสัมผัสกับราเพิ่มขึ้นอีกหลายห่วง รวมทั้งสร้างตุ่มกาวเหนียว (adhesive knob) เพื่อยึดตัวไส้เดือนฝอยให้แน่นหนามากยิ่งขึ้น ท้ายที่สุดรา *Arthrobotrys* เจาะทะลุผ่านผิวหนังเข้าไปเจริญเส้นใยภายในตัวไส้เดือนฝอยรากปม **(Figure 3)**

Table 2 Mortality of the infective second-stage juveniles (J2) of root knot nematode infected with the two *Arthrobotrys* strains Data shown are mean ± S.E.M

Incubation (days)	Mortality of root knot nematodes by mycosis (%)	
	A. oligospora	*A. javanica*
0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3	25.4* ± 6.0	6.5 ± 3.8
5	28.4* ± 8.9	9.0 ± 6.0
7	33.6 ± 14.6	16.5 ± 3.1

The asterisks indicate statistical significance between mean of the *A. oligospora* treatment and that of the *A. javanica* treatment (*t*-test, $P < 0.05$)

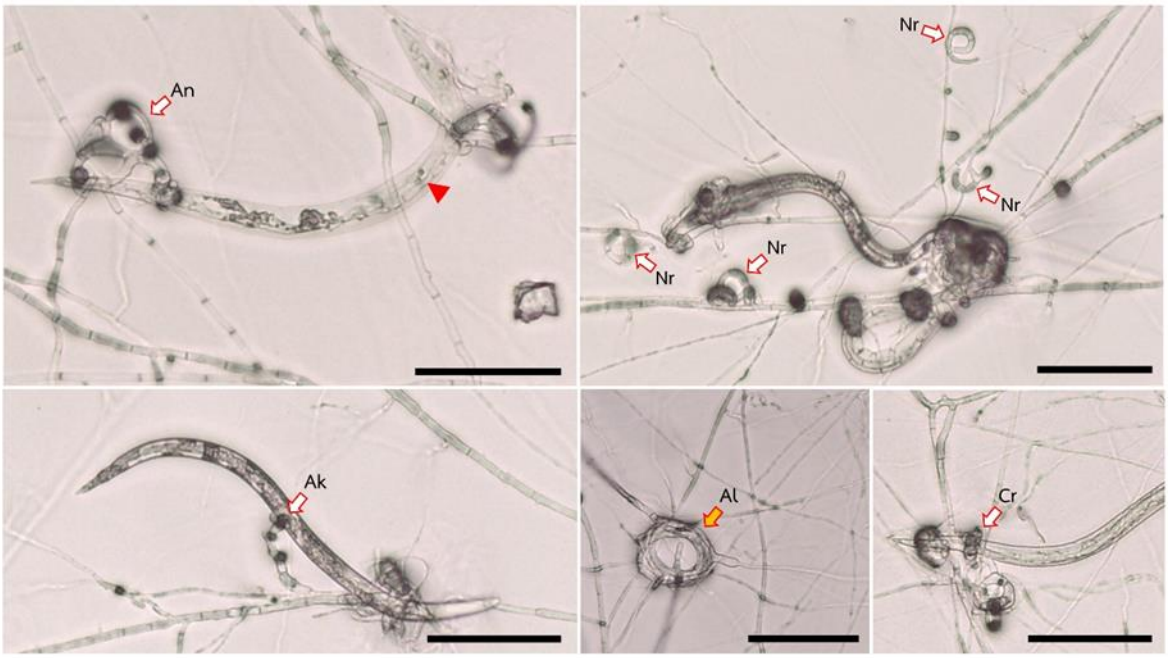


Figure 3 Various nematode-trapping structures of *Arthrobotrys oligospora* and *A. Javanica*. Abbreviations of the structures are as following. **Ak**, adhesive knob, **Al**, adhesive loop; **An**, adhesive net; **Cr**, constricting ring; **Nr**, non-constricting ring. *Arthrobotrys* hyphae were detected inside the nematodes (arrowhead). (Bar, 100 um)

3. ตรวจสอบลักษณะโคนิเดียและโครงสร้างของเส้นใยแบบพิเศษที่เป็นวงซ้อนกันหลายชั้นในรูปแบบเงื่อนปมของรา *Arthrobotrys oligospora* BCC 3847

เมื่อตรวจสอบรา *Arthrobotrys* ทั้งสองสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะพบเส้นใยเจริญได้ดีในสภาวะอาหารสมบูรณ์ แต่เมื่อนำราไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นที่มีสารอาหารน้อย ราจะถูกกระตุ้นให้สร้างโคนิเดียมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่แห้งหรือมีความร้อนสูง โคนิเดียของ *A. oligospora* มีสองเซลล์และรูปร่างคล้ายลูกแพร์ โดยมีด้านโค้งมนและด้านแหลม ผนังเซลล์จะอยู่ในตำแหน่งค่อนไปทางด้านแหลมมากกว่า **(Figure 4a, c)** นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตเห็นการสร้าง Chlamydospore ซึ่งมีลักษณะทรงกลม ผิวเรียบและมีสีเข้ม ขึ้นมาในสภาวะดังกล่าวด้วย เนื่องจากรา *Arthrobotrys* ดำรงชีพแบบผู้ล่า เมื่อมีการพบเจอกันระหว่างไส้เดือนฝอยรากปมกับรา ราจะถูกกระตุ้นให้สร้างเส้นใยแบบพิเศษเพื่อดักจับไส้เดือนฝอยดังกล่าวถึงข้างต้น โครงสร้างดักจับพิเศษที่พบได้น้อยครั้งในรา *Arthrobotrys* สายพันธุ์อื่น ๆ คือ ‘ห่วงกับดักกาวเหนียว’ (adhesive loop) ที่เป็นลักษณะของห่วงวงแหวนซ้อนทับกัน 3-4 ชั้น โดยเป็นการซ้อนของวงสลับกันคล้ายเงื่อนปม **(Figure 4b, d)** ซึ่งจะช่วยเพิ่มความหนาแน่นในการรัดจับโฮสต์ของรา *A. oligospora* BCC 3847

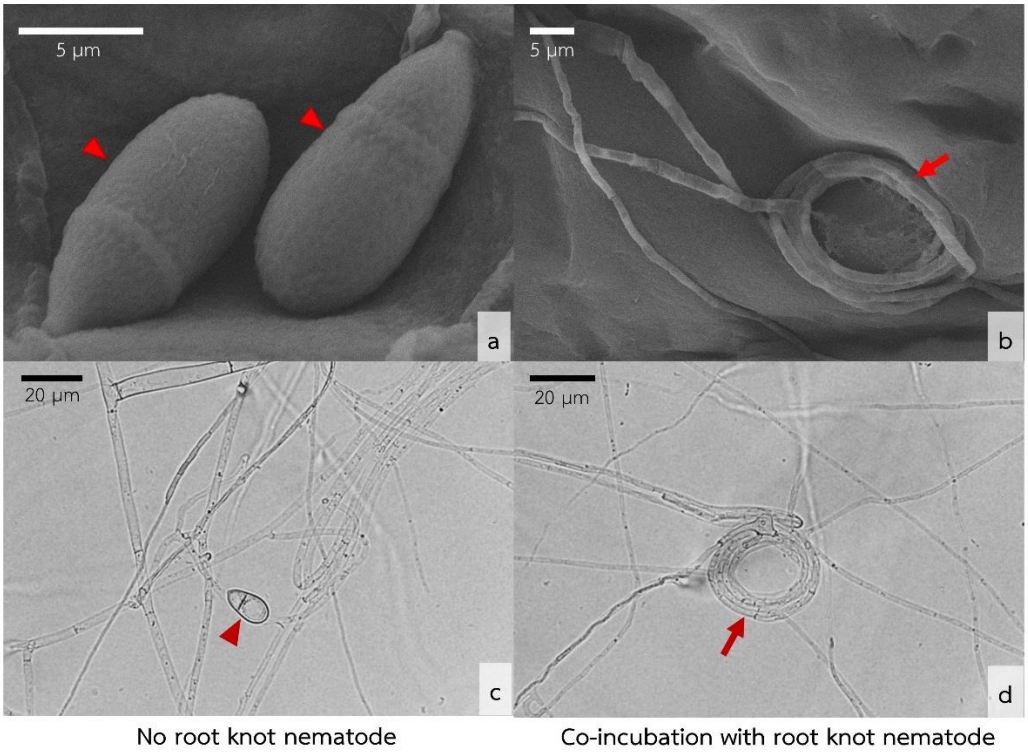


Figure 4 Scanning electron and light microscopy of *A. oligospora* conidia (a, c; indicated by arrowheads) and adhesive loop (b, d; marked with arrows). Bars, 5 and 10 µm, respectively

4. เส้นใยรา *Arthrobotrys* ที่ถูกเพิ่มปริมาณในอาหาร potato dextrose broth

สำหรับการนำรา *Arthrobotrys* ไปใช้เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม การศึกษาสภาวะการเลี้ยงเพื่อให้ได้เส้นใยปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์จึงมีความสำคัญ จำนวนชิ้นวุ้นตั้งต้นของราอาร์โทโบทริสทั้งสองสายพันธุ์ที่ 4 ชิ้น ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB ให้น้ำหนักเส้นใยสดมากกว่าชิ้นวุ้นตั้งต้นจำนวน 1 และ 2 ชิ้น ที่ระยะเวลา 7 และ 10 วัน เมื่อนำข้อมูลน้ำหนักเส้นใยสดของรามาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบจำนวนชิ้นวุ้นตั้งต้นของราที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเส้นใยสด พบว่า จำนวนชิ้นวุ้นตั้งต้น 4 ชิ้น เลี้ยงราที่ระยะเวลา 10 วัน เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเส้นใยที่สุด **(Table 3)**

Table 3 Fresh mycelial weight of *Arthrobotrys* after incubation with different amount of inocula. Data shown are mean ± S.E.M

Inoculum (number of agar pieces)	Fresh mycelial weight per 50 ml PDB[†]			
	A. oligospora		*A. javanica*	
	7 days	10 days	7 days	10 days
1	$1.2^{c} \pm 0.2$	$1.6^{c} \pm 0.2$	$2.5^{b} \pm 0.3$	$2.5^{c} \pm 0.3$
2	$1.7^{b} \pm 0.1$	$1.9^{b} \pm 0.1$	$2.6^{b} \pm 0.2$	$3.0^{b} \pm 0.1$
4	$2.3^{a} \pm 0.1$	$2.7^{a} \pm 0.1$	$3.7^{a} \pm 0.2$	$4.1^{a} \pm 0.3$

[†] Mean in the same column with different letters are significantly different (DMRT, $p < 0.05$)

5. ประสิทธิภาพของรา *Arthrobotrys* ทั้งสองสายพันธุ์ต่อโรครากปมของพริกในโรงเรือน

เมื่อพิจารณาการเกิดปมที่รากของพริก กรรมวิธีที่ใส่รา *A. oligospora* และ *A. javanica* ก่อนเป็นเวลา 15 วันสามารถควบคุมการเกิดปมที่รากได้ดีกว่าทุกกรรมวิธี โดยวิเคราะห์จำนวนปมในรากพริก พบว่า ในกรรมวิธีที่ใส่รา *A. oligospora* และ *A. javanica* ในดินก่อนเป็นเวลา 15 วันสามารถลดการเกิดรากปมได้ 63-66% เทียบกับชุดที่ใส่ไส้เดือนฝอยอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ราพร้อมกับไส้เดือนฝอยและกรรมวิธีที่ใส่ราหลังใส่ไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเวลา 10 วัน **(Table 4)**

นอกจากนี้ต้นพริกในกรรมวิธีที่ใส่รา *A. javanica* เป็นเวลา 15 วันก่อนใส่ไส้เดือนฝอยรากปมให้ความสูงของต้นพริกสูงกว่าต้นพริกที่ใส่ไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียว **(Table 4)** อย่างไรก็ตามในกรรมวิธีอื่น ๆ ต้นพริกมีความสูงกว่าต้นพริกในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียวเช่นเดียวกัน ยกเว้นในกรรมวิธีที่ใส่ *A. oligospora* พร้อมกับไส้เดือนฝอย ในทางสถิติ ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกรรมวิธีต่าง ๆ ($p < 0.05$) สำหรับการตรวจวัดความยาวราก พบว่า ทุกกรรมวิธีให้ความยาวรากของต้นพริกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) **(Table 4)**

Table 4 Efficacy of root knot nematode (RKN) biological control by *Arthrobotrys oligospora* (Ao) and *A. javanica* (Aj) in greenhouse trials of chili peppers was determined by the occurrence of root galls and shoot and root length at 45th day after inoculation. Data shown are mean ± S.E.M.

Treatment	Number of galls per plant†	Shoot length (cm)†	Root length (cm)†
Simultaneous inoculation of Ao & *M. incognita*	**41.0**^{ab} ± 9.5	**22.7**^{b} ± 3.1	**13.3** ^{ab} ± 4.2
15-day pre-application of Ao	**30.0**^{ab} ± 17.0	**29.5**^{ab} ± 4.5	**11.0**^{b} ± 1.0
15-day pre-application of Aj	**33.3**^{ab} ± 6.4	**33.7**^{ab} ± 3.2	**12.7**^{ab} ± 2.1
10-day post-application of Ao	**96.0**^{a} ± 1.5	**30.7**^{ab} ± 6.0	**18.0**^{a} ± 7.0
10-day post-application of Aj	**58.0**^{ab} ± 16.0	**31.0**^{ab} ± 3.5	**12.0**^{ab} ± 4.4
M. incognita only	**89.0**^{a} ± 63.0	**22.7**^{b} ± 9.2	**12.7**^{ab} ± 4.2
Un-inoculated control‡	**0.0**^{b} ± 0.0	**37.7**^{a} ± 11.0	**17.3**^{ab} ± 1.5

† Mean in the same column with different letters are significantly different (DMRT, $p < 0.05$)

‡ Un-inoculated control, no additions of *Arthrobotrys* and *M. Incognita*

ในการทดสอบเพื่อหาปริมาณเส้นใยรา *Arthrobotrys* ที่เหมาะสม เมื่อพิจารณาการเกิดปมที่รากของพริกในกรรมวิธีที่ใส่รา *A. oligospora* และ *A. javanica* ปริมาณ 2, 4 และ 8 กรัมต่อกระถาง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเวลา 15 วัน กับกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียว พบว่า กรรมวิธีที่ใส่รา *A. oligospora* ปริมาณ 2-8 กรัมสามารถลดการเกิดรากปมได้สูงสุด โดยลดลงไปถึง 93-94% เทียบกับการใส่ไส้เดือนฝอยอย่างเดียว **(Figure 5, Table 5)** การใส่รา *A. javanica* ส่งผลต่อการลดลงของจำนวนรากปมเช่นเดียวกัน โดยลดลงไป 63-74% อย่างไรก็ตาม ปริมาณเส้นใยในช่วง 2-8 กรัมต่อกระถาง ไม่ส่งผลถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพริก

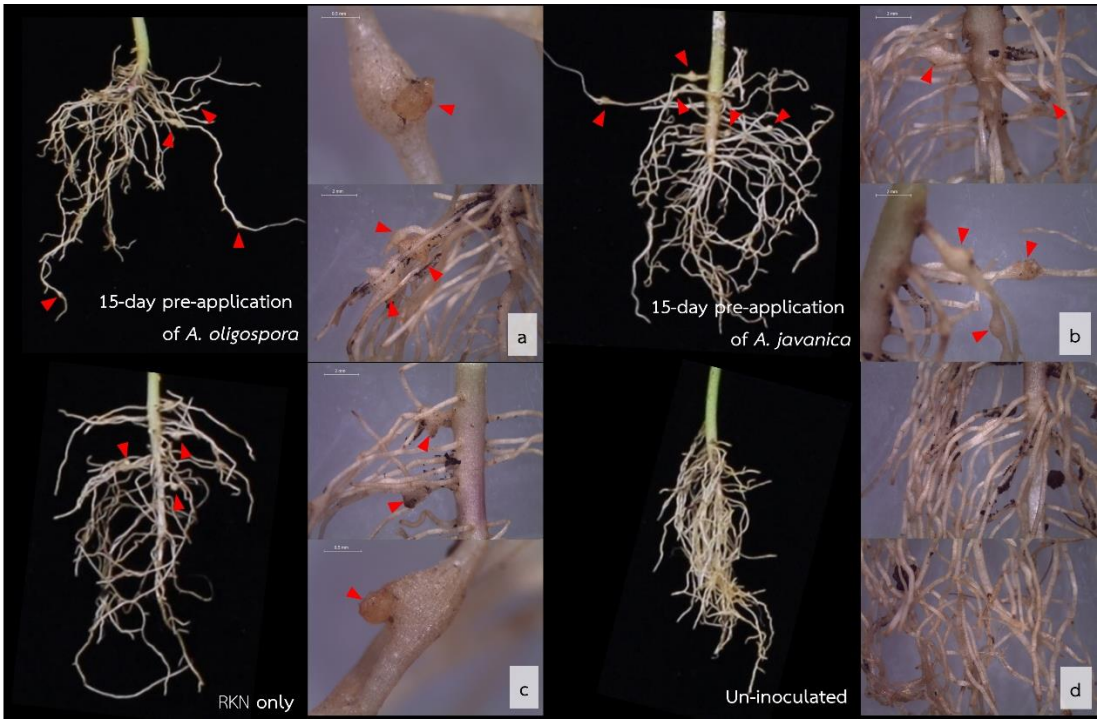


Figure 5 Formation of some root galls and eggs mass (red arrows) on chili peppers pre-applied with *Arthrobotrys oligospora* (a) and *A. javanica* (c) compared with the severely–infested root in the treatment with root knot nematodes only (b) and healthy roots in an un-inoculated control (d)

Table 5 Occurrence of root galls in efficiency assays of root knot nematode (RKN) biological control by 15-day pre-application with different amount of *A. oligospora* and *A. javanica* hyphae

Treatments	Number of root galls per plant[†]
A. oligospora, 2 g	**4.4**[c] ± 2.1
A. oligospora, 4 g	**3.8**[c] ± 1.9
A. oligospora, 8 g	**4.0**[c] ± 3.1
A. javanica, 2 g	**22.2**[b] ± 11.7
A. javanica, 4 g	**24.0**[b] ± 7.8
A. javanica, 8 g	**16.8**[bc] ± 7.8
M. incognita only	**64.4**[a] ± 54.4
Un-inoculated control[‡]	**0.0**[c] ± 0.0

[†] Mean in the same column with different letters are significantly different (DMRT, $p < 0.05$)

[‡] Un-inoculated control, no additions of *Arthrobotrys* and *M. incognita*

6. การรอดชีวิตของรา *Arthrobotrys* ทั้งสองสายพันธุ์ในดิน

ผลการศึกษาความมีชีวิตของรา *Arthrobotrys* ในดินพบว่า รา *A. oligospora* ทั้ง 2 และ 8 กรัม สามารถมีชีวิตรอดในดินได้มากกว่ารา *A. javanica* อย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 0, 15 และ 30 วันหลังการถ่ายเชื้อลงดิน **(Table 6)** โดยเมื่อถ่ายเชื้อ 2 กรัมลงในดิน

พบปริมาณรา *A. oligospora* ที่ 201, 479 และ 700 CFUs ต่อกรัม ในขณะเดียวกันพบปริมาณรา *A. javanica* ที่ 16, 215 และ 320 ต่อกรัมของดิน ตามลำดับ เช่นเดียวกับการถ่ายรา *A. oligospora* 8 กรัม หลังจากถ่ายเชื้อไปแล้ว 0, 15 และ 30 วัน พบปริมาณของรา ที่คงเหลืออยู่ที่ 540, 648 และ 1395 CFUs ต่อกรัม ส่วนรา *A. javanica* พบเพียง 44, 604 และ 92 CFUs ต่อกรัม นอกจากนี้ยังพบว่ารา *A. oligospora* และ *A. javanica* มีแนวโน้มเพิ่มปริมาณในดินมากขึ้นจากวันเริ่มต้นและยังพบว่าเมื่อถึงช่วงการทดสอบที่ 30 วัน ราทั้งสองชนิดค่อย ๆ เพิ่มขึ้น มีปริมาณค่า CFUs มากกว่าวันเริ่มต้น ยกเว้นในรา *A. javanica* ที่ 8 กรัมพบว่ามีปริมาณราลดลงจากวันเริ่มต้นโดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แสดงให้เห็นว่ารา *A. oligospora* และ *A. javanica* สามารถเพิ่มปริมาณและเจริญคงอยู่ในดินได้ดีในช่วงระยะเวลาหนึ่ง แต่รา *A. javanica* นั้นพบปริมาณน้อยกว่าและเสื่อมสภาพได้รวดเร็วกว่า *A. oligospora*

Table 6 Viability of the two *Arthrobotrys* strains in the soil

Amount of fungal inoculum per pot (gram)	Number of *Arthrobotrys* (CFUs per gram of soil)[†]					
	Day 0		Day 15		Day 30	
	AO	*AJ*	*AO*	*AJ*	*AO*	*AJ*
2	210.0^{b} ± 42.4	16^{c} ± 8.5	479^{c} ± 1.4	215^{d} ± 7.1	700^{b} ± 169.7	320^{bc} ± 141.4
8	540^{a} ± 127.3	44^{bc} ± 19.8	648^{a} ± 17.0	604^{b} ± 19.8	1395^{a} ± 1395	92.5^{c} ± 53.0

[†] Mean in the same 2 columns with different letters are significantly different ($p > 0.05$; DMRT)

สรุปและอภิปราย

ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงลึกระหว่างไส้เดือนฝอยรากปมและรา *Arthrobotrys* ยืนยันว่าราและไส้เดือนฝอยมีความเป็นปฏิปักษ์ต่อกัน โดยไส้เดือนฝอยเป็นโฮสต์ที่จำเพาะเจาะจงของรา *Arthrobotrys* ทั้งสองสายพันธุ์ โดยเฉพาะรา *A. oligospora* BCC 3847 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบโครงสร้างพิเศษเพื่อดักจับไส้เดือนฝอยรากปมที่หลากหลาย ได้แก่ ร่างแหกับดัก (adhesive net) วงแหวนดักจับ (constricting ring) และห่วงดักจับ (adhesive loop) โครงสร้างเหล่านี้จะสร้างขึ้นหลังจากที่รับรู้ว่ามีไส้เดือนฝอยเข้ามาอาศัยอยู่บริเวณใกล้เคียง เมื่อไส้เดือนฝอยติดกับดักเส้นใยเหล่านี้ รา *A. oligospora* BCC 3847 จะสร้างโครงสร้างเพิ่มเติมคือ ตุ่มกาวเหนียว (adhesive knob) เพื่อยึดติดกับตัวไส้เดือนฝอยให้แน่นหนายิ่งขึ้น และตุ่มเหนียวนี้จะเป็นบริเวณที่ราสร้างเส้นใยเพื่อแทงเข้าไปภายในและเจริญอยู่ภายในลำตัวของไส้เดือนฝอยจากนั้นค่อย ๆ ดูดซับของเหลว เจริญเบียดเบียนอวัยวะต่าง ๆ ภายใน เกิดการย่อยสลายของอวัยวะภายในลำตัว หลังจากนั้นจึงแทงเส้นใยทะลุออกมา ช่วงเวลาการก่อโรคและทำลายของรา *Arthrobotrys* ทั้งสองสายพันธุ์ใช้เวลา 6-9 วัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราไส้เดือนฝอย nematophagous fungi ของ Nordbring-Hertz et al. (1995) ซึ่งพบความแตกต่างของโครงสร้างพิเศษหรือ infection structures หลากหลายรูปแบบขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของรา เช่น เส้นใยตาข่ายที่มีสารเหนียว ตุ่มกาวเหนียว ห่วงวงแหวน และสร้างสารสร้างพิษเข้าทำลายไส้เดือนฝอย (Liu et al., 2009) หรือแม้แต่ราสกุลเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์กันก็อาจมีรูปแบบของโครงสร้างพิเศษที่แตกต่างกันได้ เช่น ในกลุ่มของ *Arthtobotrys* พบโครงสร้างพิเศษ 2 รูปแบบ คือ ร่างแหกับดัก (adhesive net) และวงแหวนดักจับที่สามารถขยายขนาดเพื่อขดรัดตัวไส้เดือนฝอยได้ (constricting ring) ในขณะที่ *Pochonia chlamydosporia* สามารถสร้าง appressoria เพื่อเข้าทำลายไส้เดือนฝอย (Nordbring-Hertz et al., 2006) ในรายงานของ Zopf (1888) ระบุว่า รา *A. oligospora* สร้างโครงสร้างพิเศษที่เป็นโครงสร้างตาข่ายดักจับไส้เดือนฝอย แล้วแทงทะลุผ่านผนังลำตัว เจริญเส้นใยและค่อย ๆ ย่อยอวัยวะภายในลำตัว หลังจากไส้เดือนฝอยตาย เส้นใยจะแทงทะลุออกจากซาก สร้าง conidiophores และ conidia การยึดเกาะอย่างแน่นหนาของโครงสร้างดักจับกับตัวไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าเกิด

จากการจับกันระหว่างเลคติน (lectin) ของราและตัวรับที่เป็นคาร์โบไฮเดรตและอยู่บนพื้นผิวของไส้เดือนฝอย (Hays and Watson, 2019) นอกจากนี้ในรา *A. oligospora* ยังสามารถสร้างโครงสร้างพิเศษงอกออกมาจากโคนิเดียได้โดยตรงโดยไม่ต้องมีระยะของการสร้างเส้นใยนั้นก็สามารถดักจับไส้เดือนฝอยได้ด้วย (Dackman and Nordbring-Hertz, 1992) นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ ยังพบลักษณะโครงสร้างพิเศษที่แตกต่างจากที่มีรายงานก่อนหน้า คือ ห่วงดักจับ (adhesive loop) ที่เรียงซ้อนกันหลายวง เมื่อศึกษาโครงสร้างพิเศษภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ทำให้เห็นชั้นของบ่วงซ้อนทบสานตัวกันอย่างซับซ้อน แต่ละชั้นของบ่วงสามารถสร้างตุ่มเหนียวที่ช่วยยึดติดกับตัวไส้เดือนฝอยได้อย่างมีอิสระต่อกัน ทำให้สามารถยึดเกาะติดได้ดี ไส้เดือนฝอยมีโอกาสดิ้นหลุดจากบ่วงกับดักได้น้อยลง และเข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้ดีมากยิ่งขึ้น นั่นอาจจะทำให้บ่วงดังกล่าวเป็นลักษณะเด่นเฉพาะตัวของรา *A. oligospora* BCC 3847 ข้อมูลความจำเพาะเจาะจงของรา *Arthrobotrys* ทั้งสองสายพันธุ์และความเป็นปฏิปักษ์นี้ช่วยยืนยันเพิ่มเติมได้ว่า สามารถนำรา *Arthrobotrys* สองสายพันธุ์นี้ไปประยุกต์ใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพริกหรือรวมถึงพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ ที่ประสบปัญหาไส้เดือนฝอย ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

ในการตรวจวัดประสิทธิภาพการควบคุมไส้เดือนฝอย เมื่อนำรา *Arthrobotrys* ทั้งสองชนิดไปใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยในพริกโดยการนำราไปปลูกถ่ายก่อนใส่ไส้เดือนฝอย 15 วัน ผลที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าช่วยลดการเกิดโรครากปมได้ดีในพริก ทั้งนี้การถ่ายราลงในดินก่อนนั้น ทำให้ราได้อาศัยเวลางอกและเจริญครอบคลุมพื้นที่ในดินก่อน เมื่อพบไส้เดือนฝอยรากปมหรือมีการระบาดของไส้เดือนฝอย ราก็จะสร้างเส้นใยโครงสร้างแบบพิเศษ (trapping structures) ต่าง ๆ ขึ้นมา เพื่อดักจับและจัดการกับไส้เดือนฝอยรากปมที่เป็นศัตรูพืชของพืชเศรษฐกิจเหล่านี้ได้ ซึ่งในทางปฏิบัติในแปลงปลูก เกษตรกรอาจคาดการณ์ช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตของต้นพืชที่อยู่ในช่วงเสี่ยง (susceptible period) รวมทั้งปัจจัยสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการเกิดการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม (เช่น ความชื้นในดินที่สูง) และใช้รา *Arthrobotrys* ก่อนที่จะเกิดการระบาดในช่วงเวลานั้น ๆ ก็จะสามารถควบคุมและลดการเกิดโรครากปมได้

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการควบคุมการเกิดโรครากปมของรา *A. oligospora* BCC 3847 และ *A. javanica* BCC 7879 พบว่า *A. oligospora* BCC 3847 สามารถลดการเกิดโรครากปมได้มีประสิทธิภาพมากกว่า *A. javanica* BCC 7879 แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตินัก ดังนั้น การใช้รา *A. oligospora* BCC 3847 หรือราทั้งสองชนิดร่วมกันอาจเป็นแนวทางการจัดการไส้เดือยฝอยรากปมได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ นอกจากนี้ เนื่องจากการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยรายังมีความยุ่งยากและใช้เวลา การใช้ประโยชน์จากราทั้งสองชนิดนี้ ยังคงต้องหาวิธีการผลิตที่เหมาะสมเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยให้ได้ในเวลาสั้นลงและใช้ต้นทุนต่ำ รวมทั้งพัฒนาวิธีการเก็บรักษาและวิธีการนำไปใช้อย่างเหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพของราสูงสุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกลุ่มบริหารการวิจัย พัฒนา และนวัตกรรม (RDI) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ไตรเดช ข่ายทอง, ธิติยา สารพัฒน์, มนตรี เอี่ยมวิมังสา และเสงี่ยม แจ่มจำรูญ. 2554. ประสิทธิภาพของสาร abamectin ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมันฝรั่ง. สำนักวิจัยอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. แหล่งข้อมูล: https://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=1108. ค้นเมื่อ 2 มิถุนายน 2564.

ไตรเดช ข่ายทอง และมนตรี เอี่ยมวิมังสา. 2554. การใช้ปอเทืองควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมันฝรั่ง. รายงานผลวิจัยประจำปี 2554 สำนักวิจัยอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. แหล่งข้อมูล: https://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=307 ค้นเมื่อ 2 มิถุนายน 2564

สุรีย์พร บัวอาจ, บุษราคัม อุดมศักดิ์, นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2557. ประสิทธิภาพของก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* Speg. ต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) ในพริก.วารสารวิชาการเกษตร. 32: 393-398.

มยุรฉัตร ทัดเทียม. 2554. การผลิตมวลชีวภาพของเชื้อรา *Pochonia chlamydosporia* var. catenulate และประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (Meloidogyne incognita) ในมะเขือเทศ. วารสารวิจัย มข. 16 (4): 348-358.

ยุวดี ชูประภาวรรณ และ สุภาวดี แก้วระหัน. 2557. รายงานการประเมินชีวภัณฑ์เชื้อรา *Pochonia chlamydosporia* YT008 ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม. แก่นเกษตร. 42(3): 661-667

สุมาลี เม่นสิน. 2550. การคัดเลือกและผลิตเชื้อราปฏิปักษ์ (*Arthtobotrys* sp.) เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในผักกาดหอมห่อ. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

Agrios G. N. 1997. Plant Pathology. San Diego: Academic Press.

Dackman, C., and B. Nordbring-Hertz. 1992. Conidial trap – a new survival structure of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Mycological Research. 96: 194-198.

Jansson, H. B, and L. V. Lopez-Llorca. 2001. Biology of nematophagous fungi. P. 145-173. In: Misra JK & Horn BW (eds). *Mycology: Trichomycetes, Other Fungal Groups and Mushrooms*. Enfield: Science Publishers.

Kerry, B.R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology. 38: 423-454.

Kiewnick, S., and R. A. Sikora. 2003. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* (strain 251) for the control of root-knot nematodes. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 68: 123-128.

Liu, X., M. Xiang, and Y. Che. 2009. The living strategy of nematophagous fungi. Mycosscience 50: 20-25.

Nansen, P. 1993. Current and future prospects for control of ostertagiasis in northern Europe-examples from Denmark. Vet Parasitol. 46: 3-21.

Nordbring-Hertz, B., H. B. Jansson, and E. Friman. 1995. Nematophagous Fungi. *Film No C1851* Göttinggen, Germany: Institutfür den Wissenschaftlichen Film.

Nordbring-Hertz, B., H.B. Jansson, and A. Tunlid. 2006. Nematophagous fungi. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley, USA.

Nordmeyer, D. 1992. The search for novel nematicidal compounds. P. 281–293. In: F.J. Gommers and W. Th. Maas (eds) Nematology from molecules to ecosystem. European Society of Nematologists, Inc. Invergowrie, Dundee, Scotland.

Sasser, J. N. 1980. Root knot nematodes: A global menace to crop production. Plant Disease. 64: 36-41.

Skidmore, A. M., and C. M. Dickinson. 1976. Colony interactions and hyphal interference between sepatoria nodorum and phylloplane fungi. Transactions of the British Mycological Society. 66: 57-64.

Su, H., Y. Zhou, J. Zhou, H. Feng, D. Jiang, K. Q. Zhang, and J. Yang. 2017. Trapping devices of nematode- trapping fungi: Formation, evolution, and genomic perspectives. Biology Reviews. 92: 357-368.

Hays, Z., and D. Watson. 2019. Fungal Ecology, Diversity and Metabolites. ED-TECH Press, UK.

Zopf, W. 1888. Zur Kenntnis der Infektions-Krankheiten neiderer Thiere. Nova Acta Leop Acad Naturf Halle 52: 7.