

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุดปีงบประมาณ 2561

1. แผนงานวิจัย

2. โครงการวิจัย

การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราใน
ผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์

กิจกรรมที่ 1

วิธีการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในพื้นที่เพาะปลูกถั่วลิสง

3. ชื่อการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Aspergillus flavus*,
A. tamarii และ *A. nomius* ในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์
ที่สร้างสารพิษ

Efficacy of *Aspergillus flavus*, *A. tamarii* and *A. nomius* as
Biocontrol Agents against *A. flavus* Toxigenic Strain

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง

อัจฉราพร ศรีจุฑานุกุล กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว
และแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผู้ร่วมงาน

วัชรวิทย์ วิทยวรรณกุล สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
มัทนา วานิชย์ ศูนย์วิจัยพืชไร่นานกแก้ว

5. บทคัดย่อ

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. flavus* 561, *A. tamarii* 538 และ *A. nomius* 401 เพื่อควบคุมเชื้อรา *A. flavus* A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและลดปริมาณแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นานกแก้วในปี 2560-2561 เมื่อนำสารกรอง มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษด้วยวิธี poisoned food บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษได้ 30-40% เมื่อนำมาทดสอบการสร้างสารพิษใน YES medium พบว่า *A. nomius* 401 มีการสร้างสารพิษในอาหารเหลวจึงยังไม่นำมาใช้

การทดลองในโรงเรือน ประกอบด้วย 2 เชื้อราทดสอบ (561 และ 538) เพื่อหารูปแบบที่มีประสิทธิภาพและนำมาพัฒนาเป็นรูปแบบการนำไปใช้ในสภาพแปลงให้เหมาะสม กำหนดให้แต่ละกระถางประกอบด้วย 2 กรรมวิธีการปลูกเชื้อ ได้แก่ 1) สารละลายสปอร์ (1×10^5 conidia/ml) และ 2) สารกรอง (1:5 v/v) กำหนดรูปแบบวิธีการใช้ ได้แก่ 3) การพ่น และ 4) ราดดิน 5) การใช้ทั้ง 2 อย่างร่วมกันรวม 3 ครั้ง โดยมีชุดควบคุมดินผสม A39 และชุดควบคุมน้ำเปล่า วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 10 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ การทดลองที่ 1 พบว่าการพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 (1×10^5 conidia/ml) รวม

3 ครั้ง พบปริมาณการเจริญครอบครองเมล็ดของเชื้อราปฏิปักษ์ที่ดีที่สุด 100% ปริมาณผลผลิตสูงสุดโดยน้ำหนักฝักสดเฉลี่ย 35.11 กรัม และน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ย 7.88 กรัม โดยพบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* 561 มากที่สุด คือ 100.0×10^2 cfu/g soil ที่ระยะ 30 วันหลังปลูกถั่วลิสง หลังจากนั้นปริมาณลดลงอยู่ในระดับ 99.8×10^2 cfu/g soil เชื้อรา *A. flavus* 561 สามารถเจริญอยู่ในดินบริเวณเขตรากถั่วลิสงได้ตลอดฤดูปลูก จนกระทั่งครบ 90 วันหลังเก็บฝักถั่วลิสง เมื่อนำเมล็ดถั่วลิสงมาตรวจปริมาณสารพิษโดยวิธี ELISA พบว่าสามารถลดปริมาณสารพิษ AFB₁ ลดลงได้ 29.63% ในการทดลองที่ 2 พบว่ากรรมวิธีที่ดีที่สุดคือรดด้วยสารกรองและพ่นสปอร์ โดยน้ำหนักฝักสดเฉลี่ย 35.11 กรัม และน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ย 7.88 กรัม พบปริมาณเชื้อรา 538 คือ 1.5×10^2 cfu/g soil ที่ระยะ 30 วันหลังปลูก หลังจากนั้นปริมาณเพิ่มขึ้นอยู่ในระดับ 2.6×10^2 cfu/g soil เชื้อรา 538 สามารถเจริญอยู่ในดินบริเวณเขตรากถั่วลิสงได้ตลอดฤดูปลูก และค่า AFB₁ กรรมวิธีที่ดีที่สุด คือ รดด้วยสารกรอง และรดและพ่นสปอร์แวนลอย 15 วัน 3 ครั้ง พบปริมาณสารพิษลดลง 33.96% และ 20.47% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 1 (ดินผสมเชื้อรา A39) **การทดลองในสภาพแปลงทดลอง** ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 จำนวน 2 แปลง (field crops) กำหนดระยะเวลาการพ่น 561 พ่นทุก 15, 30 และ 45 วัน และการพ่นทุก 15 วันรวม 3 ครั้ง การปลูกเชื้อรา A39 จะดำเนินการก่อนการพ่น 561 โดยแปลงที่ 1 จากการประเมินปริมาณเชื้อราทั้งหมด 4 ครั้ง พบว่ากรรมวิธีที่ดีที่สุดของทั้ง 2 แปลงคือ การพ่น 15 และ 30 วัน และการพ่นทุก 15 วัน 3 ครั้ง แปลงที่ 1 สามารถควบคุมเชื้อราและสามารถลดสารพิษได้อย่างสมบูรณ์ (100%) และแปลงที่ 2 ให้ผลสอดคล้องกับ 1 ซึ่งมีค่าระดับสารพิษที่ลดลงที่ระดับ 65.28-82.90% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (ดินผสม A39 อย่างเดียว) และพบว่าในกรรมวิธีพ่น 561 เพียงอย่างเดียว มีประสิทธิภาพการลดปริมาณสารพิษจากดินตามธรรมชาติได้ > 70% ซึ่งเชื้อรา 561 สามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดเชื้อรา เพื่อนำไปปรับใช้กับถั่วลิสงและผลิตผลเกษตรในเชิงพาณิชย์ได้

Abstract

Effect of three non-toxicogenic *Aspergillus* strains viz., *A. flavus* 561, *A. tamarii* 538 and *A. nomius* 401 on pre-and post-harvest aflatoxin reduction in peanut cultivar Tainan9. Research were conducted in Khon Kaen Field Crop Research Center, Thailand (Started in 2017-2018). Efficacy of those strains could suppressed toxigenic *A. flavus* A39 by poisoned food technique against toxigenic strain A39 by approximately 30-40%. Those two stains (561 and 538) did not produce AFB₁ while 401 found high amount of AFB₁ production which investigated by cultured in yeast extract sucrose (YES) medium and analyzed by ELISA. **Under greenhouse conditions**, use of two strains (561 and 538) in the form of (i) conidia suspension (1×10^5 conidia/ml) and (ii) culture filtrate (1:5 v/v) investigated together with used as (iii) spray and (iv) soil drench treatment or as spray and soil drench treatment plus three spray applications (15, 30 or 45 days after planting (DAP)) in a RCBD with 10

treatments and three replications. Toxigenic *A. flavus* A39 strain was inoculated into planting media at the same time with the planting of peanut. Application of a spray of conidia *A. flavus* 561 (1×10^5 conidia/ml) was the most effective in reducing aflatoxin contamination and total colonize on peanut seeds. Grain from treated and untreated were analyzed for AFB₁ at 90 days after harvest resulted in reducing AFB₁ by 29.63%. Application of culture filtrate by soil drench plus spray of conidia *A. tamarii* 538 (1×10^5 conidia/ml) were the most effective in reducing AFB₁ contamination. Grain from treated and untreated were analyzed for AFB₁ at a level of 33.96-20.47%. **Under field condition,** Use of *A. flavus* 561 (1×10^5 conidia/ml) of spray suspension 100 liter/rai on whorl plant plus different times application (15 or 30 DAP, and 15 DAP plus 3 times were competitive exclusion of aflatoxin producer (infested with the toxigenic A39) by native non-toxigenic *A. flavus* 561 strain resulted from distribution of *A. flavus* 561 to displace aflatoxin producers (A39) during crop development, displacement results in the average percent reduction AFB₁ concentrations in harvested grain was 65.28-100%, without differences in 2 crops. Moreover, the average percent reduction in AFB₁ concentration in naturally contaminated peanut fields in crop 2 was 71.73-86.08%, and that the strain 561 was the most effective in reducing aflatoxin contamination in peanut cultivar Tainan 9 for the first time in Thailand. Research indicates that 561 can be development as a biocontrol fungicide to control aflatoxin contamination in peanut and agricultural product produced in Thailand with the commercial product.

6. คำนำ

การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แข่งขันการใช้ทรัพยากรตามธรรมชาติ (competitive exclusion) ในสกุล *Aspergillus* จินัส Hyphomycetes มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อราสกุลเดียวกันที่สร้างสารพิษ เป็นการสร้างระบบภูมิคุ้มกันให้ถั่วลิสงและธัญพืชต่างๆ ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะเข้ายึดครองพื้นผิวของเมล็ด ทำให้เชื้อราที่สร้างสารพิษในเมล็ดธัญพืชไม่สามารถเข้ายึดเกาะได้ นอกจากนี้เชื้อ competitive exclusion จะสร้างเอนไซม์ไปรบกวนการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน และเชื้อที่สร้างสารพิษถูกขับออกจากพืช บางชนิดยังสามารถสร้างกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid) ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อที่สร้างสารพิษด้วย ดังนั้น การเพิ่มให้เชื้อประจำถิ่นเร็วขึ้น จะช่วยป้องกันสารพิษที่เกิดตามธรรมชาติอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เพิ่มความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ประเทศแอฟริกา สหรัฐอเมริกา (Cotty, 2006) รวมทั้งอินโดนีเซีย (Dharmaputra, 2003) ซึ่งประสบปัญหาการปนเปื้อนสารพิษแอฟลาทอกซิน มีการวิจัยนำเชื้อราสกุล *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ไม่

สร้างสารแอฟลาทอกซิน มาลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตรตั้งแต่ในแปลงเพาะปลูกพืชไร่ เชื้อราในกลุ่มนี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการค้นพบและได้แสดงศักยภาพในการควบคุมดีที่สุด มีกลไกการบวกรสร้างเอนไซม์ ที่จำเป็นต่อกระบวนการสร้างสารพิษ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ และเอนไซม์ ยับยั้งหรือทำลายเส้นใยของเชื้อราชนิดเดียวกันแต่เป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ กลไกการควบคุมนี้เป็นลักษณะแข่งขันแย่งพื้นที่การเจริญเติบโต (competitive exclusion) ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อราเป้าหมายสูง ตลอดจนมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เชื้อรา *Aspergillus* ที่ไม่สร้างสารพิษที่มีการผลิตเป็นชีวภัณฑ์เชิงพาณิชย์ในสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันได้ผ่านการทดสอบจากองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อม (U.S. Environmental Protection Agency; EPA) อนุญาตให้ใช้เชื้อดังกล่าวในกระบวนการผลิตพืช ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วลิสง มะเดื่อฝรั่ง ฝ้าย และพืศหาชิโอ (Dorner, 2004) เป็นที่ยอมรับและนำไปใช้ในประเทศที่พัฒนาแล้ว โดย Wicklow *et al.* (1988) และ Dorner *et al.* (1999) พบว่าเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ไม่สร้างสารพิษ แอฟลาทอกซิน สามารถควบคุมการเข้าทำลายเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษในข้าวโพดระยะก่อนเก็บเกี่ยวได้ดี สอดคล้องกับ Kilman (1993) และ Cotty (2006) พบว่า *A. flavus* สายพันธุ์ไม่สร้างสารพิษ สามารถรบกวนกระบวนการเข้าทำลายและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ ดังนั้น เพื่อลดการใช้สารเคมี ตลอดจนรักษาสมดุลทางธรรมชาติ และแก้ปัญหาการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา การศึกษาครั้งนี้จึงวิจัยและพัฒนาเอาวิธีการควบคุมแบบชีววิธีมาใช้ในการลดปริมาณแอฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตร ตลอดจนนำเชื้อรา competitive fungi มาใช้ประโยชน์

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อรา *A. flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษและ *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดต่าง ๆ
3. กล้องจุลทรรศน์
4. อุปกรณ์เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสปอร์แขวนลอยและสารกรองจากเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. flavus* *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ ที่ผ่านการคัดเลือกจากผลงานวิจัยปี พ.ศ. 2554-56 และให้ผลดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39) และยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซิน โดยการเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน เตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย 1.0×10^6 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร และนำเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ไปเตรียมสารกรอง (culture filtrate) โดยย้ายรามาเลี้ยงในอาหารเหลว

Czapek's Dox Broth (CzB) และอาหารเหลว Malt extract broth (MEB) ในขวดลูกชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน กรองเส้นใย ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน จนได้สารกรองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

2. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและปริมาณสารแอฟลาทอกซินในสภาพโรงเรือน

นำสปอร์แขวนลอยและสารกรองที่ได้จากการทดลองปีที่ 1 มาทดสอบการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39) และควบคุมปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างในสภาพโรงเรือน โดยมีวิธีการ ดังนี้

เตรียมดินปลูกถั่วลิสงที่มีเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (A39) โดยนำสปอร์แขวนลอยเชื้อราที่มีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^6 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตร 100 มิลลิลิตร/ดิน 2.5 กิโลกรัม (อัตรา 1 : 25 โดยปริมาตร/น้ำหนัก) ผสมโดยคลุกเชื้อรากับวัสดุเพาะประกอบด้วยดินและพีทมอส (อัตรา 2 : 1) ให้เข้ากัน นำดินที่ใส่เชื้อแล้วใส่กระถางจำนวน 15 กิโลกรัม/กระถาง ก่อนปลูกถั่วลิสง เมื่อถั่วลิสงอายุ 15 วัน ทำการพ่นและรดตามกรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 10 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ เชื้อรา 3 สายพันธุ์ ดังนี้

A. flavus → กรรมวิธีที่ 1 รดด้วยสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 2 พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 3 รดและพ่นสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 4 รดด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 6 รดและพ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 7 รดสปอร์และพ่นสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 8 รดสารกรองและพ่นสปอร์ ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 9 ชูตควบคุม ดินผสมเชื้อรา A39
กรรมวิธีที่ 10 ชูตควบคุม น้ำเปล่า

A. tamarii → กรรมวิธีที่ 1 รดด้วยสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 2 พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 3 รดและพ่นสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 4 รดด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 6 รดและพ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 7 รดสปอร์และพ่นสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 8 รดสารกรองและพ่นสปอร์ ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 9 ชุตควบคุม ดินผสมเชื้อรา A39
 กรรมวิธีที่ 10 ชุตควบคุม น้ำเปล่า

A. nomius → กรรมวิธีที่ 1 รดด้วยสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 2 พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 3 รดและพ่นสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 4 รดด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 6 รดและพ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 7 รดสปอร์และพ่นสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 8 รดสารกรองและพ่นสปอร์ ทุก 15 วัน 3 ครั้ง
 กรรมวิธีที่ 9 ชุตควบคุม ดินผสมเชื้อรา A39
 กรรมวิธีที่ 10 ชุตควบคุม น้ำเปล่า

การบันทึกผล : อัตราเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดถั่วลิสงเมื่อถึงอายุเก็บเกี่ยว 90-120 วัน โดยถอนต้นออกจากถุง ปลิดฝักถั่วลิสง และผึ่งให้แห้งจนความชื้นเหลือ 9 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปกะเทาะ สุ่มนำเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยคลอรีน (เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 5 นาที นำเมล็ดมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Glycerin (DG18) Agar + streptomycin เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนเมล็ดที่มีการติดเชื้อรา และวัดการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง สุ่มเมล็ด 100 กรัม ของแต่ละกรรมวิธีมาบดให้ละเอียด หลังจากนั้นนำมาชั่ง 20 กรัมเพื่อวัดปริมาณสารแอฟลาทอกซินด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและปริมาณสารแอฟลาทอกซินในสภาพแปลงทดลอง

1. เตรียมเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 และ *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (39) เลี้ยงและขยายเชื้อราด้วยอาหาร Potato dextrose agar (PDA)
2. ปลุกเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ (39) โดยพ่นเชื้อระหว่างแถวให้เข้ากับหน้าดินในอัตรา 1.0×10^5 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ลิตร/ไร่ พร้อมกับปลุกถั่วลิสง
3. การปฏิบัติในแปลงทดลอง โดยปลุกถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ใช้ระยะปลูก 20x50 เซนติเมตร หลุมละ 2 ต้น จำนวน 30 หลุม/กรรมวิธี โดยทุกกรรมวิธี จะปลุกคันด้วย border row ในระหว่างทุกๆ 5 แถวของ

ถั่วลิสง เพื่อเป็นแนวป้องกัน การปนเปื้อนจากกรรมวิธีอื่น ก่อนปลูกพ่นสารกำจัดวัชพืชเมโทลาคลอร์ อัตรา 500 มิลลิลิตรต่อไร่ ใส่ปุ๋ยเคมีเกรด 12-24-12 อัตรา 25 กิโลกรัมต่อไร่ โดยโรยข้างแถวและพรวนดินกลบ พุนโคน (อายุ 20 วัน) กำจัดวัชพืชครั้งที่ 2 พร้อมใส่ปุ๋ยคอกอัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ (อายุ 40 วัน) ให้น้ำต้น ถั่วลิสงตามกรรมวิธีต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ RCB ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ตามกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15 วัน + ปลูกเชื้อรา A39

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 30 วัน + ปลูกเชื้อรา A39

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 45 วัน + ปลูกเชื้อรา A39

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15, 30, 45 วัน + ปลูกเชื้อรา A39

กรรมวิธีที่ 5 ไม่พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 + ปลูกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 6 ไม่พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 + ไม่ปลูกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม)

การบันทึกข้อมูล: วันปลูก วันงอก วันเก็บเกี่ยว ตรวจหาปริมาณเชื้อราโดยวิธี Soil dilution plate method ก่อนและหลังจากปลูกเชื้อโดยนำตัวอย่างดินมา spread บนอาหาร Dichloran glycerine 18 Agar (DG18) ผสม streptomycin วัดอัตราเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ด และอัตรา เปอร์เซ็นต์การลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อรา *A. flavus* ในวัสดุเพาะที่ระยะเวลา 0 15 30 และ 45 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง ดินจากแต่ละกรรมวิธี มาตรวจนับปริมาณเชื้อราโดยวิธี Soil plate method บนอาหาร Dichloran Glycerin (DG18) Agar ที่ผสม streptomycin และทำการวัดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ด ถั่วลิสง เมื่อถึงอายุเก็บเกี่ยว 90-120 วัน โดยถอนต้นออกจากกระถาง ปลิดฝักถั่วลิสง และผึ่งให้แห้งจน ความชื้นเหลือ 9 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปกะเทาะ สุ่มนำเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด มาฆ่าเชื้อ ที่ผิวด้วยคลอรีน (เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 5 นาที นำเมล็ดมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 Agar เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนเมล็ดที่มีการติดเชื้อรา และวัดการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสง สุ่มเมล็ด 100 กรัม ของแต่ละกรรมวิธีมาบดให้ละเอียด หลังจากนั้นนำมาชั่ง 20 กรัม เพื่อวัดปริมาณสาร แอฟลาทอกซินด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ระยะเวลา ตุลาคม 2559 - กันยายน 2561 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เตรียมสปอร์แขวนลอยและสารกรองจากเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ

1.1 วิธีการเตรียมสปอร์แขวนลอยเชื้อราเพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ

ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตสปอร์ของเชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่คัดเลือกจากผลงานวิจัยปี 2556 จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *A. flavus* (400 และ 561) *A. tamarii* (538 และ 588) และ *A. nomius* (401) และสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ *A. flavus* A39 พบว่า ทุกสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตดี มีการผลิตโคโคนีสีขาวและสปอร์เป็นสีเขียว บนอาหาร PDA และ DG18 ซึ่งสามารถเจริญเติบโตเต็มที่ยานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ในจานเพาะเชื้อขนาด 9.0 cm ภายในวันที่ 7 ของการบ่มเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 31-33°C และแสงธรรมชาติ (ตารางที่ 1 และ 2) ผลการเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตบนอาหารทั้ง 2 ชนิด ในแต่ละช่วงเวลา พบว่าเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ แสดงอัตราการเจริญที่ต่างกัน คือ บนอาหาร PDA จะมีการเจริญเติบโตของเส้นใย และโคโคนีในแนวราบภายในระยะเวลา 2 วัน และสร้างก้านชูสปอร์เพื่อผลิตสปอร์ในวันที่ 3 และจะมีค่าอัตราการเจริญเต็มที่ในวันที่ 3, 4, 5 เป็นต้นไป (ตารางที่ 1) ในขณะที่บนอาหาร DG18 จะมีค่าอัตราการเจริญที่ลดลงในวันที่ 3, 4, 5 เป็นต้นไป (ตารางที่ 2) เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 มีส่วนผสมสารปฏิชีวนะ ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการผลิตสปอร์ ซึ่งผลการวัดปริมาณสปอร์แขวนลอยของเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และ DG18 พบว่าเชื้อรา *Aspergillus* spp. ทุกสายพันธุ์ แสดงอัตราการผลิตสปอร์บนอาหาร PDA มากกว่า DG18 จึงเลือก PDA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสปอร์ โดยทุกสายพันธุ์สามารถนำไปผลิตสปอร์แขวนลอยเชื้อราที่มีความเข้มข้น 1.0×10^6 หน่วยโคโคนี/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบการควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษในสภาพโรงเรือนได้

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว 5 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในสภาพอุณหภูมิ 31-33 องศาเซลเซียส และแสงธรรมชาติมีเชื้อรา A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษเป็นตัวเปรียบเทียบ

สายพันธุ์เชื้อรา	การเจริญเติบโตของเชื้อรา (ชม.) ภายใต้อุณหภูมิห้อง (31-33°C) และแสงธรรมชาติ					เปรียบเทียบปริมาณสปอร์ของเชื้อราเมื่ออายุได้ 7 วัน (จำนวนสปอร์/ลบ.ชม.)
	^{1/} วันที่ 3	^{1/} วันที่ 4	^{1/} วันที่ 5	^{1/} วันที่ 6	^{1/} วันที่ 7	
401	4.47 a	5.91 b	7.10 b	7.89 a	8.02 a	3.88×10^6
400	4.52 a	5.94 b	7.04 b	7.89 a	8.02 a	5.5×10^6
538	4.77 b	6.17 a	7.23 a	7.82 a	7.95 a	4.25×10^6
588	4.01 d	5.29 b	6.28 d	7.20 c	7.67 b	1.95×10^7
561	4.21 c	5.57 c	6.68 c	7.59 b	7.88 a	1.71×10^7
A39	2.51 e	3.07 d	3.64 e	4.36 d	4.82 c	2.16×10^7
(%) CV	2.1	3.9	2.2	6.4	1.9	

หมายเหตุ : ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ Duncan's multiple range test t ($P \leq 0.05$) ค่าเฉลี่ย 9 ซ้ำ

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว 5 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 ในสภาพอุณหภูมิ 31-33 องศาเซลเซียส และแสงธรรมชาติ มีเชื้อรา A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษเป็นตัวเปรียบเทียบ

สายพันธุ์เชื้อรา	การเจริญเติบโตของเชื้อรา (ชม.) ภายใต้อุณหภูมิห้อง (31-33°C) และแสงธรรมชาติ					เปรียบเทียบปริมาณสปอร์ของเชื้อราเมื่ออายุได้ 7 วัน (จำนวนสปอร์/ลบ.ชม.)
	^{1/} วันที่ 3	^{1/} วันที่ 4	^{1/} วันที่ 5	^{1/} วันที่ 6	^{1/} วันที่ 7	
401	3.61 abc	5.16 b	6.53 a	7.68 a	8.20 a	1.36x10 ⁷
400	3.54 abc	5.04 ab	6.32 a	7.51 a	8.10 b	1.06x10 ⁷
538	3.92 a	5.19 a	6.43 a	7.45 ab	7.66 ab	7.45x10 ⁶
588	3.40 bc	4.57 abc	5.58 ab	6.61 b	7.17 c	4.20x10 ⁶
561	3.37 bc	4.50 bc	5.59 ab	6.58 b	7.31 c	1.83x10 ⁷
A39	3.21 c	4.03 c	5.06 b	5.94 c	7.31 d	2.76x10 ⁷
(%) CV	10.2	12.1	11.2	8.4	7.0	

หมายเหตุ : ^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวดิ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ Duncan's multiple range test t (P≤0.05) ค่าเฉลี่ย 9 ซ้ำ

1.2 วิธีการเตรียมสารกรองเชื้อราเพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารกรองของเชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่เลี้ยงในอาหารเหลว CZB และ MEB ด้วยวิธี poisoned food บน PDA เป็นเวลา 7 พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* A39 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEB ได้ และพบว่าเชื้อรา *A. nomius* 401 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญดีที่สุด คือ 39.71 รongลงมา คือ เชื้อรา *A. tamaraii* 588, *A. flavus* 561, *A. tamaraii* 538 และ *A. flavus* 400 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) จึงเลือก MEB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารกรอง

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของสารกรองจากเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ 5 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษในระดับห้องปฏิบัติการ

สายพันธุ์	อาหารเหลว 1% CZB		อาหารเหลว 1% MEB	
	^{1/} เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี	% การยับยั้งการเจริญเส้น	^{1/} เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี	% การยับยั้งการเจริญเส้น
	<i>A. flavus</i> (A39) (ชม.)	โดย <i>A. flavus</i> (A39)	<i>A. flavus</i> (A39) (ชม.)	โดย <i>A. flavus</i> (A39)
<i>A. nomius</i> 401	4.83	28.97	4.10	39.71
<i>A. flavus</i> 400	6.67	1.91	4.67	31.32
<i>A. tamaraii</i> 538	4.53	33.38	4.60	32.35
<i>A. tamaraii</i> 588	7.43	-	4.33	36.32
<i>A. flavus</i> 561	7.00	-	4.57	32.79
Control (A39)	6.80	0.00	6.80	0.00
(%) CV	26.9		22.1	

หมายเหตุ : ^{1/} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P≤0.01)

ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

- = ไม่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของ *A. flavus* (A39)

2. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* *A. tamarii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและปริมาณสารแอฟลาทอกซินในสภาพโรงเรือน

ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในสภาพโรงเรือนที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นานี้

2.1 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 ในการควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและปริมาณสารแอฟลาทอกซิน (26 กรกฎาคมถึง 16 กันยายน 2559)

ผลการตรวจนับปริมาณเชื้อราในวัสดุเพาะ หลังการจัดการด้วยกรรมวิธีการใช้สปอร์ และสารกรองจากเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* ทั้งสองชนิด คือ *A. flavus* 561 และ A39 ในกระถางปริมาณ $5.3-32.0 \times 10^2$ cfu/g soil ตรวจพบปริมาณ A39 สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษปริมาณ $10.7-100.0 \times 10^2$ cfu/g soil จากการทดสอบใช้รูปแบบต่างๆ เชื้อรา 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ พบว่าปริมาณเชื้อรา 561 ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากเชื้อเริ่มต้นในสัปดาห์ที่ 3 และพบเชื้อราตลอดฤดูปลูก ทุกครั้งที่ตรวจนับพบว่ากรรมวิธีรดด้วยสปอร์แขวนลอย (T1) และพ่นด้วยสปอร์แขวนลอย (T2) สามารถตรวจพบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ รดและพ่นด้วยสปอร์แขวนลอย (T3), รดด้วยสปอร์แขวนลอยและรดด้วยสารกรอง (T8) และรดด้วยสปอร์แขวนลอยและพ่นด้วยสารกรอง (T7) ส่วนกรรมวิธีใช้สารกรองจากเชื้อรา (T4, T5 และ T6) ตรวจพบเชื้อราในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมดินผสมเชื้อรา *A. flavus* (A39) (T9) ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม (T10 น้ำเปล่า) ตรวจไม่พบเชื้อรา (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ปริมาณเชื้อราในวัสดุเพาะของการทดสอบการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษในถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ $\times 10^2$ cfu/g soil			
	^{1/} ระยะเวลา (วัน)			
	ก่อนปลูกเชื้อ	15 (A39)	30 (561)	60 (561)
1. รดด้วยสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0	8.0	95.3	95.0
2. พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0	6.7	100.0	99.8
3. รดและพ่นสปอร์แขวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0	32.0	87.3	87.4
4. รดด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0	8.0	10.7	10.7
5. พ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0	5.3	10.7	10.8
6. รดและพ่นด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0	9.3	29.3	29.4
7. รดด้วยสปอร์และพ่นสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0	5.3	74.0	74.2
8. รดด้วยสารกรองและพ่นสปอร์ ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0	10.0	82.7	82.8
9. ชุดควบคุมดินผสมเชื้อรา A39	0	15.3	30.0	29.92
10. ชุดควบคุมน้ำเปล่า	0	0	^{2/} 8.7	^{2/} 3.3

หมายเหตุ : ^{1/} ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

^{2/} *A. flavus* ที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ

ผลการตรวจความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ในการครอบครองผิวเมล็ดถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยว ผลผลิต เมื่อครบ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีพ่นด้วยสปอร์แขวนลอย (T2) เชื้อราปฏิปักษ์ 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษมีการเจริญครอบครองผิวเมล็ดถั่วลิสงได้ดีที่สุด (ภาพที่ 1) โดยเชื้อราสามารถเจริญครอบครองผิวเมล็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีรดด้วยสปอร์แขวนลอย (T1) และรดด้วยสปอร์และพ่นสารกรอง (T7) เชื้อราสามารถเจริญครอบครองผิวเมล็ดได้ 66.67 และ 60.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4) สำหรับการใส่สารกรองจากเชื้อราปฏิปักษ์ พบว่า กรรมวิธีพ่นด้วยสารกรอง (T5) มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษดีกว่ากรรมวิธีรดด้วยสารกรอง (T4) ซึ่งไม่พบเชื้อรา *A. flavus* ใด ๆ

การเก็บผลผลิตถั่วลิสง พบว่า ทุกกรรมวิธีมีน้ำหนักฝักสดและน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยกรรมวิธีที่มีผลผลิตสูงสุด คือ กรรมวิธีพ่นด้วยสปอร์แขวนลอย (T2) มีน้ำหนักฝักสดเฉลี่ย 35.11 กรัม และน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ย 7.88 กรัม และกรรมวิธีควบคุม (T9) มีน้ำหนักฝักสดเฉลี่ย 33.22 กรัม และน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ย 8.41 กรัม เมื่อตรวจค่า Aflatoxin B₁ ทุกกรรมวิธีนั้นไม่ได้แสดงความแตกต่างใดๆ ทางสถิติ ($P \leq 0.01$) โดยที่กรรมวิธีรดด้วยสารกรองและพ่นสปอร์ (T8) และกรรมวิธีพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา (T2) พบปริมาณสารพิษลดลงจากกรรมวิธีควบคุม 1 (ดินผสมเชื้อรา A39) 25.99 และ 17.69% ตามลำดับ และกรรมวิธีควบคุม 2 (น้ำเปล่า) 36.73 และ 29.63% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักฝักสด น้ำหนักเมล็ด จำนวนเชื้อรา *A. flavus* 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่พบในเมล็ด และปริมาณแอฟลาทอกซิน หลังจากเก็บเกี่ยวถั่วลิสงสายพันธุ์ไทนาน 9 เป็นเวลา 90 วัน

กรรมวิธี	1/ น้ำหนักฝักสด (กรัม/ต้น)	1/ น้ำหนักเมล็ด (กรัม/ต้น)	(% <i>A. flavus</i> 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในเมล็ด)	2/ ปริมาณแอฟลาทอกซิน (พีพี)	3/ %การลดลงของสารพิษ (%RD)	
					ควบคุม 1	ควบคุม 2
1. รดด้วยสปอร์แขวนลอย 15 วัน 3 ครั้ง	27.33 ^{1/ab}	4.51 ^{1/bc}	66.67	3.55	-	-
2. พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา 15 วัน 3 ครั้ง	35.11 a	7.88 ab	100.00	2.28	17.69	29.63
3. รดและพ่นสปอร์แขวนลอย 15 วัน 3 ครั้ง	30.78 ab	5.95 abc	30.00	2.73	1.44	15.74
4. รดด้วยสารกรอง 15 วัน 3 ครั้ง	19.22 b	3.89 c	-	3.19	-	1.54
5. พ่นด้วยสารกรอง 15 วัน 3 ครั้ง	24.44 ab	5.29 abc	-	3.92	-	-
6. รดและพ่นด้วยสารกรอง 15 วัน 3 ครั้ง	25.11 ab	4.50 bc	-	3.37	-	-
7. รดด้วยสปอร์และพ่นสารกรอง 15 วัน 3 ครั้ง	29.67 ab	5.79 abc	60.00	4.12	-	-
8. รดด้วยสารกรองและพ่นสปอร์ 15 วัน 3 ครั้ง	30.78 ab	5.67 abc	40.00	2.05	25.99	36.73
9. ชุดควบคุมดินผสมเชื้อรา A39 (ควบคุม 1)	33.22 a	8.41 a	-	2.77	-	-
10. ชุดควบคุมน้ำเปล่า (ควบคุม 2)	25.55 ab	6.28 abc	-	3.24	-	-
(%) CV	24.7	30.6	-	41.6		

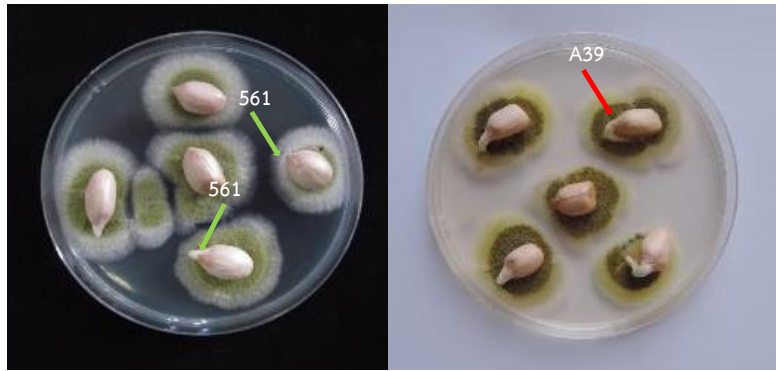
หมายเหตุ : 1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

2/ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

3/ %การลดลงของสารพิษ = $\frac{\text{ปริมาณสารพิษชุดควบคุม} - \text{ปริมาณสารพิษชุดทดสอบ}}{\text{ปริมาณสารพิษชุดควบคุม}} \times 100$

ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

- = หาค่าไม่ได้



T2 ฟันสปอร์แวนลอยเชื้อรา 561

T9 ชุดควบคุมดินผสมเชื้อรา A39

ภาพที่ 1 ความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ ในการเจริญครอบครองเมล็ด ถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 บนอาหาร DG 18 Agar + streptomycin หลังฟันเชื้อปฏิปักษ์รวม 3 ครั้ง เมื่อครบ 90 วันหลังปลูก

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. tamarii* 538 ในการควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและปริมาณสารแอฟลาทอกซิน (14 กุมภาพันธ์ถึง 18 พฤษภาคม 2560)

การตรวจนับครั้งที่ 1 ก่อนปลูกเชื้อตรวจไม่พบเชื้อรา *Aspergillus* sp. ไต ๆ ในครั้งที่ 2 (15 วัน) พบเชื้อรา A39 ทุกกรรมวิธีปริมาณ $16.4-40.3 \times 10^2$ cfu/g soil และปริมาณ A39 จะลดลงจากเชื้อเริ่มต้น ในครั้งที่ 1 ในครั้งที่ 3 และ 4 (30 และ 60 วัน) ในกรรมวิธีควบคุม (ดินผสมเชื้อรา A39) การตรวจนับในครั้งที่ 3 และ 4 (30 และ 60 วัน) อัตราส่วนเชื้อราปฏิปักษ์ 538 : เชื้อราที่สร้างสารพิษ A39 ในกรรมวิธีรด และฟันด้วยสปอร์แวนลอย (T3) ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *A. tamarii* 538 มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ กรรมวิธีควบคุม (ดินผสมเชื้อรา *A. flavus* (A39) และน้ำเปล่า) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ปริมาณเชื้อราในวัสดุเพาะ และปริมาณแอฟลาทอกซินของการทดสอบการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *A. tamarii* 538 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษในถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ในสภาพโรงเรือน ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นานแก่น

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ 538 : A39 $\times 10^2$ cfu/g soil			
	ก่อนปลูกเชื้อ	15 วัน	30 วัน	60 วัน
1. รดด้วยสปอร์แวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0.0 : 0.0	0.0 : 40.3	1.2 : 41.0	1.9 : 5.6
2. ฟันสปอร์แวนลอยเชื้อรา ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0.0 : 0.0	0.0 : 37.4	0.9 : 14.4	0.4 : 13.6
3. รดและฟันสปอร์แวนลอย ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0.0 : 0.0	0.0 : 16.4	9.2 : 1.8	3.2 : 4.8
4. รดด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0.0 : 0.0	0.0 : 25.3	0.0 : 8.0	0.0 : 10.9
5. ฟันด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0.0 : 0.0	0.0 : 35.7	0.0 : 10.9	0.0 : 21.3
6. รดและฟันด้วยสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0.0 : 0.0	0.0 : 16.2	0.0 : 9.1	0.0 : 24.7
7. รดด้วยสปอร์และฟันสารกรอง ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0.0 : 0.0	0.0 : 17.7	1.5 : 22.7	2.6 : 7.3
8. รดด้วยสารกรองและฟันสปอร์ ทุก 15 วัน 3 ครั้ง	0.0 : 0.0	0.0 : 22.7	0.1 : 12.1	0.1 : 11.0
9. ชุดควบคุมดินผสมเชื้อรา A39	0.0 : 0.0	0.0 : 39.8	0.0 : 18.3	0.0 : 24.2
10. ชุดควบคุมน้ำเปล่า	0.0	0.2	^{1/} 2.4	^{1/} 0.7

หมายเหตุ : ^{1/} *A. flavus* ที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติ

ผลการตรวจความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ในการครอบครองผิวเมล็ดถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยว ผลผลิตไม่พบเชื้อรา 538 และเชื้อราที่สร้างสารพิษ A39 และผลผลิตถั่วลิสงทุกกรรมวิธีมีน้ำหนักฝักสดและน้ำหนักเมล็ดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน โดยกรรมวิธีที่มีผลผลิตสูงสุดคือ รดด้วยสารกรองและพ่นสปอร์ (T8) และค่า Aflatoxin B₁ กรรมวิธีที่ดีที่สุด คือ รดด้วยสารกรอง (T4) และรดและพ่นสปอร์แวนลอย 15 วัน 3 ครั้ง พบปริมาณสารพิษลดลง 33.96% และ 20.47% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 1 (ดินผสมเชื้อรา A39) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักฝักสด น้ำหนักเมล็ด จำนวนเชื้อรา *A. tamaritii* 538 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่พบในเมล็ด และปริมาณแอฟลาทอกซิน หลังจากเก็บเกี่ยวถั่วลิสงไต้หวัน 9 เป็นเวลา 90 วัน

กรรมวิธี	^{1/} น้ำหนักฝักสด (กรัม/ต้น)	^{1/} น้ำหนักเมล็ด (กรัม/ต้น)	(% <i>A. tamaritii</i> 538 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในเมล็ด)	^{1/} ปริมาณแอฟลาทอกซิน (พีพีบี)	^{2/} %การลดลงของสารพิษ (%RD)	
					ควบคุม 1	ควบคุม 2
1. รดด้วยสปอร์แวนลอย 15 วัน 3 ครั้ง	108.67	29.82	-	10.73	-	-
2. พ่นสปอร์แวนลอยเชื้อรา 15 วัน 3 ครั้ง	97.33	26.22	-	10.16	4.15	-
3. รดและพ่นสปอร์แวนลอย 15 วัน 3 ครั้ง	93.67	24.46	-	8.43	20.47	-
4. รดด้วยสารกรอง 15 วัน 3 ครั้ง	88.67	18.13	-	7.00	33.96	4.11
5. พ่นด้วยสารกรอง 15 วัน 3 ครั้ง	89.00	22.71	-	9.27	12.55	-
6. รดและพ่นด้วยสารกรอง 15 วัน 3 ครั้ง	96.67	21.22	-	10.63	-	-
7. รดด้วยสปอร์และพ่นสารกรอง 15 วัน 3 ครั้ง	114.00	22.69	-	12.87	-	-
8. รดด้วยสารกรองและพ่นสปอร์ 15 วัน 3 ครั้ง	118.33	36.05	-	9.43	11.04	-
9. ชุดควบคุมดินผสมเชื้อรา A39 (ควบคุม 1)	113.67	30.46	-	10.60	-	-
10. ชุดควบคุมน้ำเปล่า (ควบคุม 2)	88.67	17.54	-	7.30	-	-
(%) CV	38.0	43.8	-	36.1		

หมายเหตุ : ^{1/} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

$$\text{\%การลดลงของสารพิษ} = \frac{(\text{ปริมาณสารพิษชุดควบคุม} - \text{ปริมาณสารพิษชุดทดสอบ})}{\text{ปริมาณสารพิษชุดควบคุม}} \times 100$$

ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

- = หาค่าไม่ได้

เนื่องจากได้มีการทดสอบการสร้างสารพิษในอาหารเหลว YES ก่อนนำไปทดสอบใช้ในโรงเรือนพบว่าเชื้อรา *A. nomius* 401 มีการสร้างสารพิษในอาหารเหลวจึงยังไม่นำมาใช้ทดสอบในโรงเรือนทดสอบในการทดลองนี้

3. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* *A. tamaritii* และ *A. nomius* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษและปริมาณสารแอฟลาทอกซินในสภาพแปลงทดลอง

นำเชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 มาทดสอบพ่นในแปลง จำนวน 2 แปลง ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 8 ดังนี้

แปลง 1 เริ่มดำเนินการวันที่ 23 กรกฎาคม (วันปลูก) ถึง 23 ตุลาคม 2561 (เก็บผลผลิต) ได้ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อราในวัสดุเพาะทั้งหมด 4 ครั้ง ในครั้งที่ 1 ก่อนปลูกเชื้อตรวจไม่พบเชื้อรา

Aspergillus sp. ไต ๆ การตรวจนับในครั้งที่ 2 (15 วัน) พบเชื้อรา A39 ทุกกรรมวิธีปริมาณ 1.7-15.2 x 10² cfu/g soil และปริมาณเชื้อรา A39 จะลดลงจากเชื้อเริ่มต้นในครั้งที่ 1 การตรวจนับในครั้งที่ 3 และ 4 (30 และ 45 วัน) กรรมวิธีที่ 1 และ 4 ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* 561 มากที่สุด

แปลง 2 เริ่มดำเนินการวันที่ 3 สิงหาคม(วันปลูก) ถึง 30 ตุลาคม 2561 (เก็บผลผลิต) ได้ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อราในวัสดุเพาะทั้งหมด 4 ครั้ง ในครั้งที่ 1 ก่อนปลูกเชื้อตรวจไม่พบเชื้อรา *Aspergillus* sp. ไต ๆ การตรวจนับในครั้งที่ 2 (15 วัน) พบเชื้อรา A39 ทุกกรรมวิธีปริมาณ 0.2-8.1 x 10² cfu/g soil และปริมาณเชื้อรา A39 จะลดลงจากเชื้อเริ่มต้นในครั้งที่ 1 การตรวจนับในครั้งที่ 3 และ 4 (30 และ 45 วัน) กรรมวิธีที่ 1 และ 4 ตรวจพบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* 561 มากที่สุด

ตารางที่ 8 ปริมาณเชื้อราในวัสดุเพาะของการทดสอบการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *A. flavus* 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษในการควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษในถั่วลิสงพันธุ์เทวนาน 9 ในสภาพแปลงทดลอง

แปลงที่	กรรมวิธี	^{1/} ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ 561 : A39 x 10 ² cfu/g soil			
		ก่อนปลูกเชื้อ	15 วัน	30 วัน	45 วัน
1	1 พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15 วัน + ปลูกเชื้อรา A39	0.0 : 0.0	0.0 : 3.6	2.4 : 1.6	1.2 : 0.0
	2 พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 30 วัน + ปลูกเชื้อรา A39	0.0 : 0.0	0.0 : 2.1	0.0 : 1.8	3.0 : 0.0
	3 พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 45 วัน + ปลูกเชื้อรา A39	0.0 : 0.0	0.0 : 3.4	0.0 : 3.3	0.0 : 1.6
	4 พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15, 30, 45 วัน + ปลูกเชื้อรา A39	0.0 : 0.0	0.0 : 1.7	2.4 : 0.9	2.9 : 0.0
	5 ไม่พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 + ปลูกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม 1)	0.0 : 0.0	0.0 : 15.2	0.0 : 4.7	0.0 : 2.0
	6 ไม่พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 + ไม่ปลูกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม 2)	0.0	0.0	0.0	0.0
2	1 พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15 วัน + ปลูกเชื้อรา A39	0.0 : 0.0	0.0 : 2.1	7.5 : 1.1	0.5 : 0.0
	2 พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 30 วัน + ปลูกเชื้อรา A39	0.0 : 0.0	0.0 : 3.7	0.0 : 1.4	0.3 : 0.0
	3 พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 45 วัน + ปลูกเชื้อรา A39	0.0 : 0.0	0.0 : 6.9	0.0 : 0.0	0.0 : 2.8
	4 พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15, 30, 45 วัน + ปลูกเชื้อรา A39	0.0 : 0.0	0.0 : 8.1	0.7 : 0.0	3.4 : 0.0
	5 ไม่พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 + ปลูกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม 1)	0.0 : 0.0	0.0 : 0.2	0.0 : 0.5	0.0 : 0.5
	6 ไม่พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 + ไม่ปลูกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม 2)	0.0	0.0	0.0	0.0

หมายเหตุ : ^{1/} ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

การตรวจความสามารถของเชื้อราปฏิปักษ์ในการครอบครองผิวเมล็ดถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต เมื่อครบ 90 วัน ไม่พบเชื้อรา 561 และเชื้อราที่สร้างสารพิษ A39 สอดคล้องกับค่า Aflatoxin B₁ กรรมวิธีที่ดีที่สุด คือ พ่นเชื้อรา *A. flavus* 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15 วัน (T1), 30 วัน (T2) และพ่นทุก 15, 30, 45 วัน (T4) แปลงที่ 1 ไม่พบปริมาณสารพิษ และแปลงที่ 2 พบปริมาณสารพิษลดลงที่ระดับ 0.33-0.67 พีพีบี เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ดินผสมเชื้อรา A39) และไม่พ่นเชื้อรา (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักเมล็ดแห้ง จำนวนเชื้อรา *A. flavus* 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษที่พบในเมล็ด และปริมาณแอฟลาทอกซิน หลังจากเก็บเกี่ยวถั่วลิสงไทนาน 9 เป็นเวลา 90 วัน

แปลงที่	กรรมวิธี	^{1/} น้ำหนัก เมล็ด (กรัม/แปลง)	^{1/} ปริมาณ แอฟลาทอกซิน (พีพีบี)	^{2/} %การลดลง ของสารพิษ (%RD) control 1	^{2/} %การลดลง ของสารพิษ (%RD) control 2
1	1. พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15 วัน + ปลุกเชื้อรา A39	71.63	0.00	100.00	-
	2. พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 30 วัน + ปลุกเชื้อรา A39	57.12	0.00	100.00	-
	3. พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 45 วัน + ปลุกเชื้อรา A39	64.10	0.23	56.60	-
	4. พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15, 30, 45 วัน + ปลุกเชื้อรา A39	58.04	0.00	100.00	-
	5. ไม่พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 + ปลุกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม 1)	54.51	0.53	-	-
	6. ไม่พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 + ไม่ปลุกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม 2)	70.01	0.00	-	-
2	1. พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15 วัน + ปลุกเชื้อรา A39	106.74	0.67	65.28	71.73
	2. พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 30 วัน + ปลุกเชื้อรา A39	100.03	0.33	82.90	86.08
	3. พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 45 วัน + ปลุกเชื้อรา A39	106.22	1.40	27.46	40.93
	4. พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 เมื่อต้นถั่วลิสงอายุ 15, 30, 45 วัน + ปลุกเชื้อรา A39	105.62	0.50	74.09	78.90
	5. ไม่พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 + ปลุกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม 1)	121.73	1.93	-	-
	6. ไม่พ่นเชื้อรา <i>A. flavus</i> 561 + ไม่ปลุกเชื้อรา A39 (ชุดควบคุม 2)	135.94	2.37	-	-

หมายเหตุ : ^{1/} ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.01$)

^{2/} %การลดลงของสารพิษ = $\frac{(\text{ปริมาณสารพิษชุดควบคุม} - \text{ปริมาณสารพิษชุดทดสอบ})}{\text{ปริมาณสารพิษชุดควบคุม}} \times 100$

ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ปริมาณสารพิษชุดควบคุม

- = หาค่าไม่ได้

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ *Aspergillus flavus* 561 ในสภาพแปลงทดลองจำนวน 2 แปลง (crops) พบว่า การใช้สปอร์แขวนลอยเชื้อรา 561 พ่นหลังการปลูกถั่วลิสง 15 และ 30 วัน สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ดีที่สุด ถึง 65.28-100%

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการควบคุมการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในถั่วลิสง โดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus flavus* 561 สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ นำไปปรับใช้ในแปลงถั่วลิสง

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์โรงเรือนปลูกพืชทดลอง และแปลงปลูกถั่วลิสงสำหรับงานทดลอง และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ที่ทำให้งานทดลองสำเร็จด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

- Cotty P.J. and J.E. Mellon. 2006. Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. *Mycotoxin Res.* 22: 110-117.
- Dharmaputra, O.S. 2003. Control of Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in peanuts using nonaflatoxigenic *A. flavus*, *A. niger* and *Trichoderma harzianum*. *BIOTROPICA* (21) : 32-44.

- Dorner J.W. 2004. Biological control of aflatoxin contamination of crops. J. Toxicol. Toxin Rev. 23(2&3) :425–450.
- Dorner, J.W., Cole, R.J. and D.T. Wicklow. 1999. Aflatoxin reduction in corn through field application of competitive fungi. Journal of Food Protection 62(6): 650-656.
- Kilman, S. 1993. Food-safety strategy pits germ vs. germ. The Wall street Journal, March 16, B2.
- Wicklow, D.T., B.W. Horn, O.L. Shotwell, C.W. Hesseltine and R.W. Caldwell. 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. Phytopathology 78: 68 - 74.