แบบฟอร์ม 3

เอกสารแนบ 3

แบบฟอร์มรายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2557

1. แผนงานวิจัย **วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช**

2. โครงการวิจัย **วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี**

กิจกรรมที่ 3 **การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช**

กิจกรรมที่ย่อย 3.2. **การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช**

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) **การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย-รากปม**

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) **-**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

ธิติยา สารพัฒน์ **ไตรเดช ข่ายทอง** **ธารทิพย ภาสบุตร** **มนตรี เอี่ยมวิมังสา**

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

---

5. บทคัดย่อ

การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) โดยการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและพืช 4 วิธีคือ การแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ ไข่ ตัวเต็มวัยเพศเมียและตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม โดยการแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม และการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้น สามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ 156 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา 2 ชนิด (species) 8 สกุล (genera) ได้แก่เชื้อ *Trichoderma harzianum* และ *Paecilomyces lilacinus* สกุล *Trichoderma* sp. *Monacrosporium* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Fusarium* sp. *Verticillium* sp. *Paecilomyces* sp. *Anthrobotrys* sp. และเชื้อราอื่นที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้

การทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.)ในระดับเรือนทดลอง โดยใช้เชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 และ 2 *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 และ 2 และ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 1 - 2 ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ 6 ใส่ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 2 ให้ผลดีทั้งในการลดจำนวน

ไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศซึ่งกรรมวิธีอื่นๆไม่สามารถลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

รหัสการทดลอง 03 04 54 01 03 02 03 54

6. คำนำ

ในปัจจุบันพืชผลทางการเกษตรมีสารเคมีตกค้างทำให้มีผลต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของผู้บริโภค การนำจุลินทรีย์เข้ามาควบคุม กำจัด ศัตรูพืช เช่น แมลง และ โรคพืช นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทในการทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (กองกีฏและสัตววิทยา, 2537)ในประเทศไทยจุลินทรียที่นำมาใชประโยชนในการควบคุมทางชีววิธี (Biological control) เชน เชื้อรา *Chaetomium* sp. (เกษม, 2533) และ *Trichoderma* sp. (จิระเดช และคณะ, 2535) ถูกนำมาใชควบคุมโรคพืชโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อราศัตรูพืช ส่วนโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ยังมีการศึกษาวิจัยกันนอย ถึงเชื้อราที่เปนปฏิปกษตอไสเดือนฝอยศัตรูพืช (Plant-parasitic nematodes)โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไส้เดือนฝอยรากปมซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยที่มีการระบาดมากที่สุด และมีพืชอาศัยมาก ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมี วัตถุประสงคเพื่อรวบรวมเชื้อราปฏิปกษตอไสเดือนฝอยรากปมแลวนำไปทดสอบศักยภาพ ในการควบคุม พรอมทั้งพัฒนากรรมวิธีเพื่อการผลิตเปนสารชีวภัณฑ(Bio-nematicide product) ต่อไป

ไส้เดือนฝอยรากปม(Root-knot nematode; *Meloidogyne* spp.) เป็นไส้เดือนฝอยที่พบแพร่หลายในหลายจังหวัดและมีพืชอาศัยมากที่สุด (มากกว่า 2,000 ชนิด) เมื่อเปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยชนิดอื่น พืชอาศัยที่ถูกทำลายเสียหายมากได้แก่ พืชตระกูลมะเขือ เช่น พริก มะเขือเทศ มะเขือเปราะ พืชตระกูลแตง พืชตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลถั่ว ขิง ฝรั่ง มันฝรั่ง ข้าวฟ่าง ยาสูบ พริกไทย และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด ลักษณะอาการ รากพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมทำลายจะบวมและพองออก มักจะเกิดเป็นปมที่ปลายราก รากพืชไม่งอกยาวต่อไป พืชที่ถูกทำลายในระยะกล้าต้นจะแคระแกรน (มนตรี, 2538)

เชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยเป็นกลุ่มของเชื้อราที่สามารถเข้าทำลายและเป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย (Nematophagous fungi) มีทั้งที่เป็นปรสิตของไข่และตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย เชื้อราที่สร้างโครงสร้างขึ้นมาดักจับไส้เดือนฝอยเป็นอาหาร แม้กระทั่งเป็น endoparasites โดยใช้ สปอร์ทำลายไส้เดือนฝอย ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาศักยภาพของเชื้อราเหล่านี้ให้เป็น biocontrol agents ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืช Jansson and Lopez-Llorco (2001) ได้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามกลไกการเข้าทำลายของเชื้อดังนี้

กลุ่มที่เป็นกลุ่มเชื้อราที่สร้างโครงสร้างไว้ดักจับไส้เดือนฝอย ซึ่ง Barron (1977) แบ่งโครงสร้างต่างๆดังนี้ เช่น *Stylopage* spp. *Cystopage* spp. *Monacrosporium cionopagum* *M. ellipsosporum* และ *Arthrobotrys oligospora* *Arthrobotrys dactyloides* และ *Dactylella leptospora*

กลุ่มที่ 2 Endoparasitic fungi เชื้อราในกลุ่มนี้ต้องอาศัยการการเจริญภายในตัวของไส้เดือนฝอย และมีข้อจำกัดในการเจริญในดิน โดย Kerry and Jaffee (1997) เช่นเชื้อราที่เข้าทำลายไส้เดือนฝอยโดยการสร้างสปอร์เข้าจับกับผนังลำตัวของไส้เดือนฝอย เช่น *Hirsutella rhossiliensis Drechmeria coniospora* และ*Verticillium* spp.

กลุ่มที่ 3 Egg and female-parasites เป็นปรสิตของ ไข่ และ ตัวอ่อนระยะที่สองของ ไส้เดือน-ฝอย ซึ่งจากรายงานของ เชื้อราในกลุ่มนี้มีอยู่ทั่วไปในดินและสามารถแยกเชื้อได้จากไข่ ไส้เดือนฝอย *Heterodera*, *Globodera* และ *Meloidogyne* และยังคงสามารถอยู่ในดินได้แม้ว่าไม่มีไส้เดือนฝอย เช่น *Acremonium*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Paecilomyces* และ *Verticillium chlamydosporium* (Kerry and Jaffee, 1997)

กลุ่มที่ 4 Toxin-producing fungi เป็นกลุ่มของเชื้อราที่สร้าง mycotoxin ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เช่น *Pleurotus* sp. และ *Coprinus* sp. Barron (1977)
การวิจัยนี้จะรวบรวมเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยในประเทศไทยซึ่งคาดว่าน่าจะมีหลายชนิดและเป็นศักยภาพที่รอการค้นหาและพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ต่อไป

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1.ตัวอย่างดินและพืช
2.ไส้เดือนฝอยรากปม(*Meloidogyne* spp.)
3. .สารเคมี และวัสดุเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น PDA WA streptomycin
4. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ แบบ stereo
5.อุปกรณ์พื้นฐานของห้องปฏิบัติการ เช่น หม้อนึ่งความดัน ตู้อบเครื่องแก้ว ตู้เย็น ไมโครเวฟ แก๊สหุงต้ม เข็มเขี่ย สไลด์ จานเลี้ยงเชื้อ หลอดแก้ว ที่วางหลอด parafilm สำลี ถุงมือยาง กล่องชื้น(moist chamber) ตะเกียง และแอลกอฮอล์ เป็นต้น
6.อุปกรณ์และสารเคมี ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย เช่น ตะแกรง กรวย (วิธีการแยกเชื้อ) โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl)

วิธีการ

- **วิธีปฏิบัติการทดลอง**

1.การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ๆมีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวนตัวอย่ขึ้นอยู่กับขนาดพื้นที่ เก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรครากปมและดินบริเวณรอบๆรากพืช โดยใช้พลั่วขุดดินบริเวณผิวหน้าดิน ลึกประมาณ 10 ซม. แยกตัวอย่างดินและตัวอย่างพืช ใส่ถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลของแหล่งที่เก็บดิน เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการทำการแยกเชื้อ

2. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม แบ่งการแยกเชื้อราเป็น 4 ส่วนคือ แยกเชื้อราจาก กลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (eggs) ตัวเต็มวัยเพศเมีย และ ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม ดังนี้

- การแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

จากตัวอย่างพืชรากปมใช้เข็มเขี่ยกลุ่มไข่นำมาฆ่าเชื้อใน 1 % โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl)นาน 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางบน 0.8% WA (water agar) ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร

-การแยกเชื้อราจากไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

นำรากปมของพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยทำลาย มาทำความสะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนปม แช่ในน้ำยา 2% โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl) ในขวดแล้วเขย่า เพื่อละลายเมือกหุ้มถุงไข่ จะได้ไข่แยกเป็นฟองเดี่ยวๆล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนตะแกรง 400 mesh เก็บ suspension หลังจากนั้น ดูด suspension 1 มิลลิลิตร ไปทำ spread plate บน 0.8% WA (water agar) ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร

-การแยกเชื้อราจากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม

จากตัวอย่างพืชรากปมใช้เข็มเขี่ยตัวเต็มวัยเพศเมีย นำมาฆ่าเชื้อใน 2 % โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์ (NaOCl) นาน 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางบน 0.8% WA ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร

-การแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม

นำรากปมของพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยทำลาย มาทำความสะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนปม แช่ในน้ำยา 2%โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl) ในขวดแล้วเขย่า เพื่อละลายเมือกหุ้มถุงไข่ จะได้ไข่แยกเป็นฟองเดี่ยวๆ ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนตะแกรง 500 mesh เก็บ suspension นำไปใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 วัน ให้ไส้เดือนฝอยออกจากไข่ เพื่อเตรียมใช้เป็นเหยื่อล่อ จากตัวอย่างดิน นำดินตัวอย่างละ 1 กรัม โปรยบน0.8% WA ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร จากนั้นใส่ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม ประมาณ 100-200 ตัวต่อ มิลลิลิตร

ทุกวิธีการเมื่อทำเสร็จแล้ว ทำการบ่มเชื้อ 3-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) และตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา เมื่อพบจึงใช้เข็มเขี่ยทำสไลด์เพื่อศึกษารายละเอียด บันทึกภาพ บันทึกประวัติ และ เมื่อเชื้อราเจริญขึ้นมา ใช้เข็มเขี่ย hyphal tip ของเชื้อราแต่ละโคโลนีลงใน slant PDA (Potato Dextrose Agar) แต่ละ isolate นับเป็น 1 isolate

3.การทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมในกระถางทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ 8 กรรมวิธี

กรรมวิธี 1. *Fusarium* sp. ไอโซเลท ที่ 1

กรรมวิธี 2. *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 1

กรรมวิธี 3. *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 1

กรรมวิธี 4. *Fusarium* sp. ไอโซเลท ที่ 2

กรรมวิธี 5. *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 2

กรรมวิธี 6. *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 2

กรรมวิธี 7. ควบคุม ไส้เดือนฝอยไม่ใส่เชื้อรา

กรรมวิธี 8. ควบคุม ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย และไม่ใส่เชื้อรา (ปกติ)

หมายเหตุ ;กรรมวิธีที่ 8 ไม่นำมาร่วมวิเคราะห์สถิติ

3.1 เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งการระบาดของโรครากปม โดยประยุกต์วิธีเก็บตัวอย่างของ Souza *et.al.* (2007) โดยเก็บตัวอย่างดินซึ่งมีความลึกอยู่ในช่วงประมาณ 0-25 เซนติเมตร นำดินจาก 10 จุดที่เก็บมาคลุกเคล้ารวมกันโดยมีน้ำหนักโดยประมาณ 500 กรัม นำใส่ถุงพลาสติก รัดปากถุงให้แน่นใส่ในลังน้ำแข็งนำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ

3.2 การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่าง

หลังจากได้ตัวอย่างดินแล้วทำการแยกไส้เดือนฝอยโดยการใช้ตะแกรงและกรวย (Cobb sieving & Baerman funnel method) ตรวจตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

3.3. เลี้ยงไส้เดือนฝอยเพื่อเพิ่มปริมาณ

จากข้อ 2 เมื่อตรวจตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำแล้วพบว่าเป็นไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp.จึงนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน ดังนี้

- ใช้เข็มหรือไม้ไผ่เหลาปลายเขี่ยไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp.ที่พบแต่ละตัวลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร
- การเตรียมพืชเลี้ยงไส้เดือนฝอยเพื่อเพิ่มปริมาณโดยปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาจำนวน 20 ต้นในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุดินนึ่งฆ่าเชื้อ 0.8 ลิตร กระถางละ 1 ต้น
- การปลูกเชื้อ ทำหลังจากปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาได้ 15 วัน โดยนำไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp. จากข้อ 3.1 จำนวน 100 ตัวในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อราดลงบนดินปลูกในกระถางมะเขือเทศที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2 หลังจากทำการปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลา 35 วัน จึงสามารถนำมาเตรียมเป็น inoculum ของไส้เดือนฝอยที่จะใช้ในการปลูกเชื้อในพืชทดสอบได้

3.4. การเตรียมพืชทดสอบ โดยปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุดินนึ่งฆ่าเชื้อ 0.8 ลิตร กระถางละ 1 ต้น

3.5. การปลูกเชื้อ ทำหลังจากปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาได้ 15 วัน มีขั้นตอนดังนี้

- เตรียม inoculum ของไส้เดือนฝอย ดังนี้เขี่ยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอย โดยนำกระถางมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3 ทำการคว่ำกระถางเพื่อนำต้นมะเขือเทศออกจากกระถางเคาะดินออกอย่างเบา

มือแล้วล้างรากมะเขือเทศให้สะอาด จากนั้นใช้คีมปากคีบขนาดเล็กคีบกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ)วางบนภาชนะสำหรับฟักไข่ไส้เดือนฝอยซึ่งมีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มฟักไข่ไส้เดือนฝอย ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

-การปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยลงในดินปลูกของกระถางมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่ได้ เตรียมไว้ในแล้วดังนี้ เมื่อไส้เดือนฝอยฟักจากไข่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 นำมานับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ แล้วปรับปริมาตรให้มีตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย ปริมาณประมาณ 1500 ตัวต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร ต่อกระถางมะเขือเทศ 1 กระถาง ซึ่งเป็นจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (initial population ; *Pi*)

-เตรียม inoculum ของเชื้อรา ดังนี้นำเชื้อราแต่ละไอโซเลท เพาะเลี้ยงบน PDA เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำ suspension โดยล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และการปลูกเชื้อรา นำ suspension จำนวน 25 มิลลิลิตรราดลงบนดินปลูกในกระถางที่ได้ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยเป็นเวลา 7 วัน

3.6.ทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมตามกรรมวิธีตามแบบและวิธีการทดลอง

3.7.ตรวจผลการทดลอง โดยทำหลังจากทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมแล้วเป็นเวลา 45 วัน ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ 1) การนับจำนวนไส้เดือนฝอย ที่พบในดินปลูกและรากมะเขือเทศ 2) อัตราการขยายพันธุ์ (Reproductive factor value ; *Rf*) 3) การวัดดัชนีการเกิดรากปม

-การนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่พบในดินปลูกและมะเขือเทศ โดยแยกไส้เดือนฝอยจากดินโดยนำดิน 500 กรัมจากกระถางทดลอง มาแยกไส้เดือนฝอยโดยการใช้ตะแกรงและกรวย (Cobb sieving & Baerman funnel method) ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

-แยกไส้เดือนฝอยจากมะเขือเทศ โดย นำรากมะเขือเทศ ทั้งหมดมา แยกไส้เดือนฝอยด้วยโดยวิธี Blender centrifugal flotation แล้วตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำจำนวนไส้เดือนฝอยที่ได้จากดินปลูกและ รากมะเขือเทศรวมกันเป็นจำนวนไส้เดือนฝอยสิ้นสุด (final population ; *Pf*)

-การวัดดัชนีการเกิดรากปม

ถอนต้นมะเขือเทศ พร้อมรากเพื่อประเมินการเกิดปมโดยประยุกต์ใช้เกณฑ์ประเมินระดับการเกิดโรคตาม Taylor and Sasser (1978) และ Hussey and Boerma, (1981) ดังนี้

0= รากไม่ปรากฏอาการปม

1= รากปรากฏอาการปม 1-10 % ของระบบร

2= รากปรากฏอาการปม 11-25 % ของระบบราก

3= รากปรากฏอาการปม 26-50 % ของระบบราก

4=รากปรากฏอาการปม 51-75 % ของระบบราก

5=รากปรากฏอาการปมมากกว่า 75 % ของระบบราก

8. ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้นปีงบประมาณ 2554 สิ้นสุด 2557 รวม 4 ปี

เริ่มทดลอง ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2557

9. สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเกษตรกร ในพื้นที่การระบาดของโรค จ.นครปฐม ราชบุรี สมุทรสาคร ตาก อุบลราชธานี

10. ผลการทดลองและวิจารณ์

ในปี 2554-2556 เชื้อราที่สามารถแยกเชื้อได้มาจากการแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม การแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง และแยกเชื้อราจากไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม เนื่องจากการแยกจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมนั้นใช้ดินเป็นองค์ประกอบของวิธีการซึ่งสามารถแยกเชื้อราที่อาศัยในดินรวมมาด้วย การการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราได้มากว่าจากไข่เดี่ยวๆของไส้เดือนฝอยรากปมอาจเพราะขั้นตอนการละลายเมือกหุ้มถุงไข่ เก็บ suspension เกิดการปนเปื้อนมาก ส่วนการแยกเชื้อราจากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมในการทดลองนี้ยังไม่สามารถทำได้ พืชที่แยกเชื้อราได้มาก ได้แก่ ฝรั่ง ผักเสี้ยนผี บวบ ตำแยแมว และหญ้ายาง เป็นเพราะความถี่ของการได้ตัวอย่าง และปริมาณตัวอย่าง และส่วนใหญ่เป็นวัชพืชที่อยู่ในแปลงทั่วไปอาจจะไม่ได้รับสารเคมีกำจัดเชื้อรา แหล่งที่สามารถแยกเชื้อราได้เช่น แหล่งดินแปลงผักเก่า มันขี้หนู พริก มะเขือเทศ องุ่น มันฝรั่ง มะเขือยาว ขิง กะหล่ำปลี ข้าวโพด คะน้า แครอท ผักโขมหนาม มะเขือเปราะ แตงโม เป็นต้น โดยแยกได้ถึง 156 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา 2 ชนิด (species) 8 สกุล (genera) ได้แก่เชื้อ *Trichoderma harzianum* และ *Paecilomyces lilacinus* สกุล *Trichoderma* sp. *Monacrosporium* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Fusarium* sp. *Verticillium* sp. *Paecilomyces* sp. *Anthrobotrys* sp. และเชื้อราอื่นที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้

ในปี 2557 ทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) โดยใช้เชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 และ 2 *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 และ 2 และ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 1 - 2 ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ 6 ใส่ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 2 ให้ผลดีทั้งในการลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศซึ่งกรรมวิธีอื่นๆไม่สามารถลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 1และ ตารางที่ 2) ส่วนน้ำหนักแห้งของต้นมะเขือเทศและน้ำหนักรากสดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

กรรมวิธีที่ 2 *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 ทำให้พืชทดลองตายไป 3 ต้น ทำให้ไม่สามารถนำมาคำนวณทางสถิติร่วมกับกรรมวิธีอื่นๆได้ สามารถนำชนิดเชื้อรา *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 2 ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยในกระถางทดลองไปทดสอบศักยภาพในระดับแปลงทดลองได้

11. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) โดยการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและพืช 4 วิธีคือ การแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ ไข่ เต็มวัยเพศเมียและตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม โดยการแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม และการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ถึง 156 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา 2 ชนิด (species) 8 สกุล (genera) ได้แก่เชื้อ *Trichoderma harzianum* และ *Paecilomyces lilacinus* สกุล *Trichoderma* sp. *Monacrosporium* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Fusarium* sp. *Verticillium* sp. *Paecilomyces* sp. *Anthrobotrys* sp. และเชื้อราอื่นที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ ซึ่งในการทดลองนี้ควรจะเพิ่มในส่วนของการแยกเชื้อราโดยเฉพาะการแยกเชื้อโดยตรงจากส่วนของพืชที่เป็นโรคเข้ามาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้เชื้อราในกลุ่ม Endoparasitic fungi และส่วนตัวอย่างพืชควรเพิ่มชนิดของวัชพืชให้หลากหลายมากขึ้นเพื่อเพิ่มความหลากหลายของเชื้อรา ในการแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม และการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีแล้ว ส่วนการแยกเชื้อราจากไข่และตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม ต้องพัฒนาทักษะและปรับปรุงวิธีการให้ดีขึ้น เนื่องจากการแยกจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมนั้นใช้ดินเป็นองค์ประกอบของวิธีการซึ่งสามารถแยกเชื้อราที่อาศัยในดินรวมมาด้วย การการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราได้มากว่าจากไข่เดี่ยวๆของไส้เดือนฝอยรากปมอาจเพราะขั้นตอนการละลายเมือกหุ้มถุงไข่ เก็บ suspension เกิดการปนเปื้อนมาก ส่วนการแยกเชื้อราจากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมในการทดลองนี้ยังไม่สามารถทำได้

การทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) โดยใช้เชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลทที่ 1 และ 2 *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 และ 2 และ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 1 -2 ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ 6 ใส่ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 2 ให้ผลดีทั้งในการลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศซึ่งกรรมวิธีอื่นๆไม่สามารถลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

การใช้เชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเชื้อราบางชนิดอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อต้นพืชอาศัยด้วยเช่นกัน และแม้ว่าในการทดลองนี้จะได้เชื้อราปฏิปักษ์หลายไอโซเลท แต่ยังไม่สามารถทดศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ทุกไอโซเลทซึ่งจะนำมาทดสอบศักยภาพในเวลาอันเหมาะสมต่อไป

12. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์: ให้ระบุว่าผลงานที่สิ้นสุดได้นำไปใช้ประโยชน์ พัฒนาต่อหรือถ่ายทอดได้ในประเด็นอะไรบ้าง (ระบุเป็นข้อ ๆ)

งานวิจัยนี้นำไปใช้ประโยชน์ พัฒนาต่อหรือถ่ายทอดได้โดย

1.สามารถนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยในกระถางทดลองทดลองต่อในระดับแปลงทดลอง ได้อย่างน้อย 1 ไอโซเลท

13. คำขอบคุณ(ถ้ามี)

-

14. เอกสารอ้างอิง

กองกีฎและสัตววิทยา. 2537. ปญหาการใชสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพิ่มขึ้น กสิกร 67 (6) : 522 – 524.

เกษม สรอยทอง. 2533. ประสิทธิภาพของรา Chaetomium cochliodes และ Chaetomium curiculorum ในการปองกันโรคไหมขาว (Rice Blast) สาเหตุจากเชื้อ Pyricularia oryzae. แกนเกษตร. 18 (2) : 89 – 96.

จิระเดช แจมสวาง จินตนา ชนะ วรรณวิไล เกษนรา เฉลิมลาภ จิระประสิทธ สุพรรณี ชีววิริยกุล ธีรยุทธ ตูจินตา ศรปราชญ ชไนศวรรยางกุล วุฒิชัย ญาณอรรถ กัทลีวัลย สุขชวย และ สมนึก กายาผาด. 2535. การควบคุมโรคตนแหงของขาวบารเลยโดยวิธีคลุกเมล็ด ดวยผงมวลชีวภาพของเชื้อรา Trichoderma harzianum ขาวศูนยปฏิบัติการวิจัยและปลูกพืชทดลอง. 6(2) : 3 – 8.

มนตรี เอี่ยมวิมังสา. 2538. เอกสารวิชาการ ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช . กรมวิชาการเกษตร 190 น.

ศุภพงศ์ ภูวพัฒนะพันธุ์; ประชา ลี้ประเสริฐ; วิจัย รักวิทยาศาสตร์ สืบศักดิ์ สนธิรัตน .2537. เชื้อราที่ใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (Meloidogyne spp.) โดยใช้เชื้อรา Paecilomyces spp. และ Verticillium spp. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 212 น.

ภมรทิพย์ อักษรทอง .2546. เชื้อราปฏิปักษ์ตอไสเดือนฝอยในเขตภาคเหนือของประเทศไทยภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Canadian Biological Publications. Ontaria, Canada. 140 pp.

Dackman, C., Jansson, H.B. and B., Nordbring-Hertz 1992. Nematophagous fungi and their activities in soil. In:Soil Biochemistry. (eds. G. Stotzky and J.M., Bollag), MarcelDekker, New York: 95-103.

Gray, N. F. 1985. Ecology of nematophagous fungi: effect of soil moisture, organic matter, pHand nematode density on distribution. Soil Biol. Biochem. 17: 499-507.

Hao,Y.,Mo,M.,Su,H.and K,Zhang. 2005. Ecology of aquatic nematode-trapping hyphomycetes in southwestern China.Aquatic Microbiology Ecology. 40:175-181

Hussey, R. S., and H. R. Boerma. 1981. A greenhouse screening procedure for root-knot nematode resistance in soybeans. Crop Sci. 21:794-796.

Jansson, H.B., and L.V.,Lopez-Llorco.2001.Biology of nematophagous fungi. In

J.D.Misrha&B.W.HornZ Eds.),Tricomyces and other fungal group : Professor Robert W.Lichwardt commemoration volume(pp.145-173)Ennfield,NH :Science Publisher.Inc.

Kerry, B. R., and B. A. Jaffee. 1997. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. in The Mycota K. Esser and P. A. Lemke, eds., Vol. IV, pp. 204-218. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.

Souza, R. M., A. R. Volpato and A. P. Viana. 2007. Field assessment of different sampling. strategies for coffee plantations parasitized by *Meloidogy neexigua*. Nematropica 37: 345-355.

Verdejo-Lucas , S. C. Ornat, F. J. Sorribas, and A. Stchiegel.2002. Species of Root-knot Nematodes and Fungal Egg Parasites Recovered from Vegetables in Almerı ´a and Barcelona, Spain .Journal of Nematology 34(4):405–408.

15. ภาคผนวก (ถ้ามี)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมที่ตรวจพบจากตัวอย่างดินในกระถางทดลองของแต่ละกรรมวิธี

TABLE OF TRT (T) MEANS FOR NEMATODES (NO.\PL.)

TRT	RANKS	MEANS
T1	5	104.4 bc
T3	2	52.0 ab
T4	4	58.5 abc
T5	6	132.8 c
T6	1	15.5 a
T7	3	54.0 ab
MEAN		73.3

ค่าเฉลี่ยของจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยระดับนัยสำคัญที่ 5%

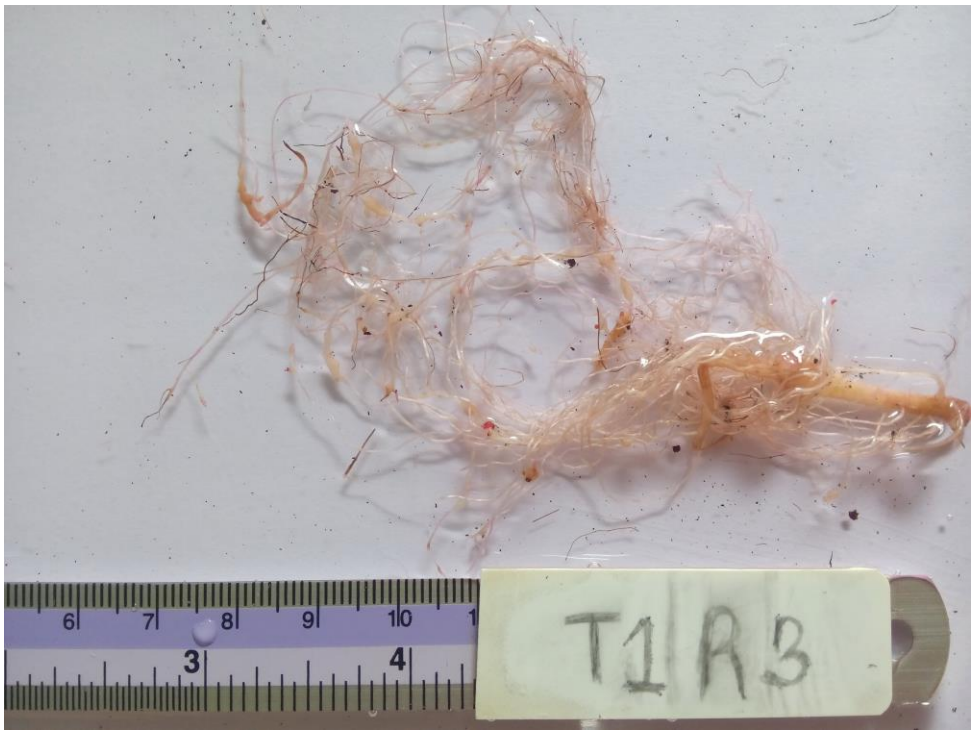
ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่ตรวจพบในรากมะเขือเทศของแต่ละกรรมวิธี

TABLE OF TRT (T) MEANS FOR NEMATODES (NO.\PL.)

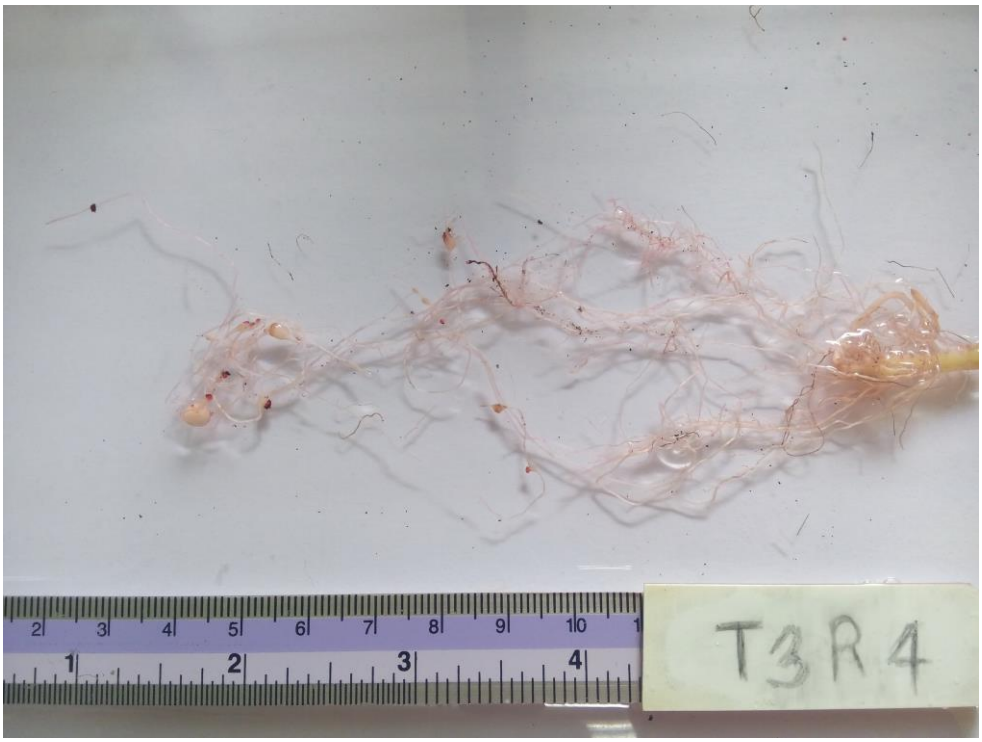
TRT	RANKS	MEANS
T1	5	25.6 bc
T3	2	8.5 a
T4	4	19.5 b
T5	6	32.2 c
T6	1	6.5 a
T7	3	19.0 b
MEAN		19.3

ค่าเฉลี่ยของจำนวนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยระดับนัยสำคัญที่ 5%

รูปภาพที่ 1- 5 แสดงตัวอย่างการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในกรรมวิธีที่ 1,2,3,5 และ 7 ซึ่งปรากฏกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม และลักษณะอาการปมของรากมะเขือเทศ



T2R5


T3R4

รูปภาพที่ 6 แสดงตัวอย่างการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในกรรมวิธีที่ 6 ซึ่งปรากฏกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม และลักษณะอาการปมของรากมะเขือเทศน้อย

รูปภาพที่ 7 แสดงตัวอย่างการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งไม่พบทั้งกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม และลักษณะอาการปมของรากมะเขือเทศ