รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน

2. โครงการวิจัย : การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรและการใช้ประโยชน์

3. ชื่อการทดลอง : การทดสอบประสิทธิภาพราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากปมในระดับโรงเรือน

: Efficacy of Antagonistic fungi for Controlling Root knot Disease in Greenhouse Condition

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ : โรครากปมสาเหตุจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* เป็นโรคสำคัญในพืชหลายชนิด มีผลกระทบต่อผลผลิตพืชเสียหายในระดับเศรษฐกิจ วิธีการป้องกันกำจัดโดยลดประชากรของไส้เดือนฝอยในดินเป็นวิธีที่ควรปฏิบัติ การนำเชื้อราที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยมาใช้ในการควบคุมโรค โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ในการควบคุมโรครากปม จึงทำการทดสอบจำนวนครั้งของการใช้เชื้อรากำจัดไส้เดือนฝอยรากปมในดินปลูกพริกสภาพโรงเรือน ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 กรรมวิธี 6 ซ้ำ คือ กรรมวิธีที่ 1 ใส่ราปฏิปักษ์ 1 ครั้ง พร้อมปลูก กรรมวิธีที่ 2 ใส่ราปฏิปักษ์ 2 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 ที่ 15 วัน กรรมวิธีที่ 3 ใส่ราปฏิปักษ์ 3 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 และ 3 ที่ 15 และ 30 วัน กรรมวิธีที่ 4 ใส่ราปฏิปักษ์ 4 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 3 และ 4 ที่ 15 30 และ 45 วัน และกรรมวิธีที่ 5 ไม่ใส่ราปฏิปักษ์ (control) ผลการทดลองพบว่าการใส่ราปฏิปักษ์ 2 3 และ 4 ครั้ง ช่วยลดการเกิดปม 50-75% ของระบบราก โดยมีดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 2.52 2.50 และ 2.33 ตามลำดับ (2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%) ในขณะที่การใส่ 1 ครั้ง และไม่ใส่ราปฏิปักษ์ มีดัชนีการเกิดปมที่รากพริกเท่ากับ 3.88 และ 4.79 (3 = เกิดปม 25-50 %; 4 = เกิดปม 50-75%) ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตรวจนับจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยในดินปลูก มีจำนวนเท่ากับ 235 62 56 33 และ 825 ตัวต่อดิน 200 กรัม ของกรรมวิธีที่ 1-5 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบราปฏิปักษ์ในดินทดสอบ พบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทุกกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาทดสอบศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมพบว่าราปฏิปักษ์สามารถเข้าทำลายไข่ได้ 100 %

ABSTRACT : Root gall disease caused by *Meloidogyne incognita* is an important disease in many plants. Affecting crop yields at the economic level. How to prevent and eliminate by reducing the population of nematodes in the soil is a practical method. The

objective is to test the effectiveness of *Paecilomyces* sp. UB1 isolate in controlling root gall disease. Therefore tested the number use, root-knot nematode removal in chilli soil, in greenhouse condition. According to the experimental plan, Completely Randomized Design (CRD) 5 treatments, 6 replications, ie, process 1, put the antagonistic mold 1 time and plant the second method, put the antagonistic mold 2 times and plant and put 2 times at 15 days At 15 and 30 days, method 4, put the antagonistic mold 4 times and planted and put 2 times 3 and 4, 15, 30 and 45 days 2, 3 and 4 times, helping to reduce the occurrence of 50-75% of the root system, with the occurrence index of 2.52 2.50 and 2.33 respectively (2 = less than 25% knot) While wearing 1 time and do not wear antagonistic mold There were 3.88 and 4.79 (3 = 25-50%; 4 = 50-75% nodule) respectively, with significant differences. When counting the number of embryos, stage 2 of the nematode in the planting soil With numbers equal to 235 62 56 33 and 825 characters per soil, 200 grams of processes 1-5, respectively And from checking the antagonistic mold in the test soil Found in all soil antagonistic fungi that were grown in culture media When tested for the ability to destroy the eggs of the root-knot nematode, the antagonistic fungus can destroy the eggs 100 %.

6. คำนำ

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในภาคการเกษตร ทำความเสียหายต่อพืชผลของเกษตรกรอย่างต่อเนื่อง นอกจากก่อให้เกิดความสูญเสียของผลผลิตแล้ว ยังทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำ โดยการจัดการศัตรูพืชนั้น เกษตรกรมักเลือกวิธีใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช และมีการใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม สูงเกินค่าที่กำหนด ปริมาณการใช้มากขึ้นเรื่อยๆ จนเกิดปัญหาการดื้อยาของศัตรูพืช มีผลกระทบต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และการตกค้างของสารเคมีในผลิตผลตามมา ส่งผลถึงการส่งออกพืชผลเกษตร ก่อให้เกิดปัญหาการกีดกันทางการค้าภายใต้กรอบทางการค้าขององค์การการค้าโลกว่าด้วยเรื่องสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ในปัจจุบันเกษตรกรและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและเอกชนได้ตระหนักถึงพิษภัยดังกล่าว ทุกฝ่ายจึงหันมาให้ความสนใจการใช้สารชีวภัณฑ์ในการควบคุมศัตรูพืชเพื่อลดการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงในระดับที่ปลอดภัย ซึ่งได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาจนได้เป็นสารชีวภัณฑ์หลายชนิดที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทียบได้กับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยมีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเป็นการค้าแล้ว เช่น แบคทีเรียบีเอส (*Bacillus subtilis*) ใช้ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวหรือโรคที่เกิดจากเชื้อราในดินของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด (พากเพียร และคณะ, 2543) แบคทีเรียบีที (*Bacillus thuringiensis*) ใช้ในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม (อัจฉรา, 2544) ไวรัสเอ็นพีวีกำจัดหนอนกระทู้หอม (อุทัย, 2544) และไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูผักคะน้า (นุชนารถ และสาโรจน์, 2547) เป็นต้น นอกจากนี้น้ำหมักชีวภาพหรือที่เรียกกันว่าปุ๋ยอินทรีย์น้ำหรือน้ำสกัดชีวภาพ (Bio-extract) ซึ่งได้จากวัสดุเหลือทิ้งจากภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม มูลสัตว์ วัชพืชน้ำ เศษผักผลไม้ที่ไม่ได้

มาตรฐาน เป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งเกษตรกรสามารถนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช หรือทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้ แต่อย่างไรก็ตาม ศัตรูพืชอื่นๆ ที่ยังคงเป็นปัญหาและทำความเสียหายต่อพืชผลเกษตรทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นคือ โรครากปม มีสาเหตุจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการปลูกพืชผักและไม้ผลที่สำคัญได้แก่ ขิง พริก กระเจี๊ยบเขียว มันฝรั่ง และฝรั่ง พบแพร่ระบาดทั่วทุกภาคของประเทศ โดยความรุนแรงของโรครากปมมีผลให้ต้นพืชเกิดอาการเหี่ยวเฉา แคระแกร็น และผลผลิตลงลด รวมถึงคุณภาพของผลผลิตที่ไม่ได้มาตรฐานตามความต้องการ ความสูญเสียนี้เป็นผลมาจากระบบรากถูกทำลายอย่างรุนแรงเกิดเป็นปุ่มปม ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำและแร่ธาตุอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ได้ (นุชนารถ, 2550) รวมถึงส่วนของหัวมันฝรั่งและแง่งขิงเสียรูปทรง (มนตรี, 2538) นอกจากนั้นไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปมมีพืชอาศัยกว้าง สามารถทำความเสียให้กับพืชอื่นๆ ได้หลายชนิดอีกด้วย โดยเฉพาะในพืชผัก-พืชหัว และไม้ดอก ได้แก่ แครอท มะเขือเทศ ผักชีฝรั่ง เยอบีร่า และปทุมมา เป็นต้น (Netscher and Sikora, 1990)

การป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยสามารถทำได้หลายวิธี วิธีที่เกษตรกรปฏิบัติคือการใช้สารป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยโดยใช้รองก้นหลุมหรือใช้สารอบดินก่อนปลูกพืช ซึ่งสารป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยเหล่านี้มีความเป็นพิษสูง คงประสิทธิภาพนานและสะสมอยู่ในดินและน้ำใต้ดิน เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ สิ่งมีชีวิต และสภาพแวดล้อมต่างๆ นอกจากการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแล้ว การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น รา แบคทีเรีย และไส้เดือนฝอยที่เป็นศัตรูธรรมชาติ พบว่ามีผลในการควบคุมโรครากปมในพืชต่างๆ เช่นกัน โดยมีรายงานการนำมาใช้ป้องกันกำจัดโรครากปม ได้แก่ การใช้รา *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* ในแง่งพันธุ์ขิง (มนตรี, 2538) การใช้รา *P. lilacinus* ควบคุมโรครากปมในผักกาดหอมช่วยลดการเกิดปมที่ระบบรากได้ (สุภกิจ, 2532) และการใช้ราวี-เอ ไมคอร์ไรซา สามารถลดปริมาณความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศและยังลดความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยกับผักชนิดอื่นๆ ด้วย (Sikora and Schonbeck, 1995; Sikora, 1992) รวมถึงแบคทีเรีย *Rhizobium* sp. มีอิทธิพลต่อการเกิดปมของไส้เดือนฝอยลดลง (เพิ่มศักดิ์, 2534)

การศึกษาการใช้จุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีมากกว่า 500 เรื่อง (Kerry, 1987) เป็นเรื่องเชื้อราใช้กับดักหรือห่วงดัก 57 % เชื้อราที่เป็น endoparasite 19 % แบคทีเรีย 5 % โปรโตซัว 3 % rickettsia 2 % tardigrade <1 % virus <1 % ไส้เดือนฝอย 7 % ไรต่างๆ 2 % collemmbola 1 % enchytrid < 1 % turbellarian < 1 % แมลงชนิดอื่นๆ < 1 % จะเห็นได้ว่าเชื้อราได้มีการศึกษากันมากที่สุดรวม 76% เชื้อราที่มีการศึกษากันมากได้แก่ เชื้อรา *Paecilomyces lilacinus, P. nostocoides* และ *Acremonium* spp. เป็นต้น

Jatala (1985; 1986) เป็นบุคคลแรกที่พบว่ารา *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson สามารถใช้ป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ได้ดี ซึ่งพบว่าราชนิดนี้สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้หลายชนิดรวมทั้งไส้เดือนฝอยรากปม และ cyst nematodes

Dunn (1983) สามารถแยกได้เชื้อรา *P. nostocoides* จาก cyst ของไส้เดือนฝอย*Heterodera zeae* แต่เนื่องจากมีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานและโครงสร้างใกล้เคียงกับเชื้อรา *P. lilacinus* มาก จึงพิจารณาเห็นว่าเป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์มาจากเชื้อรา *P. lilacinus*

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า *P. lilacinus* ที่แยกได้จาก isolate ต่างๆ มีความแตกต่างกันในความสามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอย บาง isolate ไม่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้ (Dunn *et al.,* 1982) ส่วนการใช้เชื้อราชนิดนี้ในสภาพไร่นั้นบางครั้งก็ไม่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยได้ ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อราอยู่เป็นจำนวนมาก (Hewett *et al.,* 1988) จึงเห็นได้ชัดว่าจำเป็นจะต้องมีการศึกษาข้อมูลเกี่ยวเชื้อราอีกมาก รวมทั้งปฏิกิริยาระหว่างเชื้อรากับไส้เดือนฝอย การอยู่รอดของเชื้อรา อาจอยู่ในรูปของการใช้อินทรียวัตถุที่มีอยู่ในดินหรือในรูปของการเป็นพาราสิตกับไส้เดือนฝอย ปริมาณและคุณภาพของอินทรียวัตถุที่มีอยู่ในดิน การแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นๆ สิ่งเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการเป็นพาราสิตต่อไส้เดือนฝอย (Stering, 1991)

ในปัจจุบันมีการศึกษาเชื้อราที่แยกได้จากดินหลายชนิด มาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ได้แก่ รา *Paecilomyces lilacinus* เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* และ *M. hapla* ในมะเขือเทศ และยังเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศอีกด้วย (Sikora, 1992) รา *Arthrobotrys dactyloides* และ *A. brochopaga* สร้าง ring traps รัดรอบๆ ลำตัวของไส้เดือนฝอย *A. oligospora* สร้างตาข่ายเหนียว (sticky nets) รา *Dactylaria haptotyla* และ *Nematoctonus* spp. สร้าง sticky knobs รา *Drechmeria coniospora* และ *Hirsutella rhossiliensis* สร้างสปอร์เหนียว ซึ่งราแต่ละชนิดจะสร้างกับดักและสร้างเส้นใยเข้าไปเจริญในตัวไส้เดือนฝอยและไส้เดือนฝอยจะตายในที่สุด นอกจากนั้นยังมีราไมคอร์ไรซา ได้แก่ เวสิคูลาร์ อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา (วี-เอไมคอร์ไรซา) ซึ่งเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืช โดยมีความสัมพันธ์แบบอำนวยประโยชน์ซึ่งกันและกัน สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่พืช โดยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและลดการใช้ปุ๋ย ช่วยเพิ่มปริมาณการดูดธาตุฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และจุลธาตุอาหารให้มากขึ้น (Jackson *et al.,* 2002; Nikitas *et al.,* 2002; Bagyaraj, 1992) และยังช่วยให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในดินที่มีฟอสฟอรัสน้อย (มลชัย, 2541) เชื้อราวี-เอไมคอร์ไรซา สามารถลดปริมาณความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศอย่างมีนัยสำคัญ และยังมีรายงานการลดความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยกับผักชนิดอื่นๆ ด้วย (Sikora and Schonbeck, 1995)

จากการสืบค้นข้อมูลจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย มีรายงานผลงานวิจัยโดย สืบศักดิ์ (2533) รายงานว่ามีเชื้อรามากกว่า 400 ชนิดใน 15 สกุล ที่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้

ศรศิลป์ (2536) ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับเชื้อราที่สามารถใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยได้มีจำนวน 33 สกุลด้วยกัน ในจำนวนนี้มีเชื้อราสกุล *Paecilomyces* รวมอยู่ด้วย

มนตรี (2538) ได้ศึกษาการใช้เชื้อรา *Paecilomyces* ร่วมกับแง่งขิงที่มีไส้เดือนฝอยรากปม โดยใช้เชื้อรารองก้นหลุมก่อนปลูกแง่งขิงที่มีไส้เดือนฝอยรากปมสามารถลดปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมลงและให้ผลผลิตใกล้เคียงกับวิธีการใช้สารเคมี oxamyl จุ่มขิงก่อนปลูก

นุชนารถ และมัลลิกา (2559) ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างดินและรากจากพื้นที่การระบาดของโรครากปม ได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี

นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท จันทบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ และเชียงราย รวมทั้งสิ้น 17 จังหวัด จำนวน 950 ตัวอย่าง และทำการแยกเชื้อราโดยวิธี Soil dilution plate method และ Soil plate method สามารถแยกได้ราปฏิปักษ์ได้ 59 ไอโซเลท กำหนดรหัสตามชื่อจังหวัดและจำนวนที่แยกได้คือ BR1-BR5, SK1-SK5, UB1-UB8, KK1-KK6, NS1-NS3, SB1-SB8, NP1-NP7, RB1-RB5, KB1-KB6, CB1, CM1-CM3 และ CR1-CR2 จำแนกได้รา 5 สกุล คือ *Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces และ Fusarium และพบว่ารา Paecilomyces* และ *Fusarium* สามารถทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเท่ากับ 70.05 และ 19.8 % ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อรา *Paecilomyces* และ *Fusarium* ในดินอบนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และตรวจความมีชีวิตที่ระยะเวลาเก็บ 6 เดือน พบว่าเชื้อรา *Paecilomyces* ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนรา *Fusarium* ไม่เจริญเติบโตในเวลา 6 เดือนเท่ากัน เมื่อนำ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate เพาะขยายในเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวโพด ลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเพาะเป็นเวลา 7 วัน พบว่ารา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate สามารถเจริญได้ดีและผลิตสปอร์ได้ปริมาณมากในเมล็ดข้าวฟ่าง มีจำนวนสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 9.08×105 สปอร์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเมล็ดข้าวโพด เท่ากับ 7.64×105 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่วนในลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง มีค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ราเท่ากับ 3.29×105 2.36×105 และ 2..88×105 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อทำการทดสอบความสามารถของราที่เพาะขยายในเมล็ดธัญพืชทั้ง 5 ชนิด ในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมพบว่า มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ได้ระหว่าง 65-78 % ดังนั้น รา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ที่แยกได้จากกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมในปี 2559 จึงควรนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากปมในสภาพโรงเรือน ซึ่งจะเป็นแนวทางการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีที่ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต และสภาพแวดล้อม ตลอดจนเพิ่มทางเลือกและการยอมรับของเกษตรกรในการควบคุมโรครากปมต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate และไข่ไส้เดือนฝอยรากปม
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ potato dextrose agar (PDA) และข้าวฟ่าง
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการราวิทยา ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope และ Compound microscope เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ไมโครปิเปต หม้อนึ่งแรงดัน
4. สารเคมี ได้แก่ แอลกอฮอล์ โซเดียมคลอไรด์ กลีเซอรีน และ streptomycin
5. พืชทดสอบ (พริก)

- วิธีการ

1. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 5 กรรมวิธี 6 ซ้ำ คือ

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ราปฏิปักษ์ 1 ครั้ง พร้อมปลูก

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ราปฏิปักษ์ 2 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 ที่ 15 วัน

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ราปฏิปักษ์ 3 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 และ 3 ที่ 15 และ 30 วัน

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ราปฏิปักษ์ 4 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 3 และ 4 ที่ 15 30 และ 45 วัน

กรรมวิธีที่ 5 ไม่ใส่ราปฏิปักษ์ (control)

2. ย้ายกล้าพริกอายุ 30 วัน ลงปลูกในดินร่วนปนทรายที่บรรจุกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว จำนวน 25 กระถาง ทำการปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยรากปมระยะไข่จำนวน 1,000 ฟองต่อต้น และใส่รา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ที่เพาะขยายในเมล็ดข้าวฟาง จำนวน 20 กรัมต่อกระถาง ตามกรรมวิธีกำหนด ดูแลพืชทดสอบเป็นเวลา 60 วัน

3. การวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก เมื่อต้นพริกมีอายุครบ 90 วัน ทำการถอนราก และล้างผ่านน้ำไหลเพื่อให้เศษดินและทรายที่ติดมาออกให้หมด นำไปวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากตามวิธี ของนุชนารถ และวราภรณ์ (2550) ดัดแปลงตามวิธีของ Hussey and Jansaen (2001) แบ่งเป็น 5 ระดับดังนี้ 0 =ไม่มีปม; 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย ; 2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%; 3 =เกิดปม 25-50%; 4 = เกิดปม 50-75%; และ 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก

4. ตรวจสอบจำนวนประชากรไส้เดือนฝอย *M. incognita* ตัวอ่อนระยะที่ 2 ในดิน ทำการแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินน้ำหนัก 300 กรัม โดยวิธี Cobb's sieving and Baermann funnel นำไปตรวจนับจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (Stereo microscope)

5. ตรวจสอบเชื้อราปฏิปักษ์ในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย นำรากพริกที่ผ่านการวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากเรียบร้อยแล้วมาสุ่มเลือกกลุ่มไข่ โดยใช้ปากคีบคีบกลุ่มไข่ออกจากราก 5–10 กลุ่มต่อต้น ทำการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยนำกลุ่มไข่ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำไปใส่ในหลอดทดลองแล้วเติม NaOCl 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้กลุ่มไข่กระจายตัวออกจากกัน เทผ่านตะแกรงขนาด 500 mesh ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เทไข่ที่อยู่เหนือตะแกรงใส่ลงในบีกเกอร์ ตั้งตกตะกอนดูดน้ำด้านบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนของไข่ เติม streptomycin sulfate 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง ทำการเจือจางปริมาณไข่โดยวิธี dilution plate method นำสารละลายของไข่ spread ลงบนอาหาร WA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตดูการเจริญของเชื้อราทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบว่ามีเส้นใยของราเจริญออกมาจากฟองไข่ ให้ทำการตัดปลายเส้นใยของราดังกล่าวมาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA เพื่อตรวจสอบรูปร่างลักษณะของโคโลนี เส้นใย และสปอร์

บันทึกข้อมูล

1. ดัชนีการเกิดปมทุกกรรมวิธี และวิเคราะห์ผลทางสถิติ
2. ตรวจนับจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 2 ในดินปลูก
3. ตรวจสอบประสิทธิภาพของราจากกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบประสิทธิภาพราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ในการควบคุมโรครากปมพริกในระดับโรงเรือน ซึ่งเชื้อราได้จากการเพาะขยายในเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ ใส่ในอัตรา 20 กรัมต่อต้น และใส่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* ระยะไข่ จำนวน 1,000 ฟองต่อต้นกล้าพริกอายุ 30 วัน ในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี 6 ซ้ำ คือ กรรมวิธีที่ 1 ใส่ราปฏิปักษ์ 1 ครั้ง พร้อมปลูก กรรมวิธีที่ 2 ใส่ราปฏิปักษ์ 2 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 ที่ 15 วัน กรรมวิธีที่ 3 ใส่ราปฏิปักษ์ 3 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 และ 3 ที่ 15 และ 30 วัน กรรมวิธีที่ 4 ใส่ราปฏิปักษ์ 4 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 3 และ 4 ที่ 15 30 และ 45 วัน และกรรมวิธีที่ 5 ไม่ใส่ราปฏิปักษ์ (control) ผลการทดลองพบว่าการใส่ราปฏิปักษ์ 2 3 และ 4 ครั้ง ช่วยลดการเกิดปม 50-75% ของระบบราก โดยมีดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 2.52 2.50 และ 2.33 ตามลำดับ (2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%) ในขณะที่การใส่ 1 ครั้ง และไม่ใส่ราปฏิปักษ์ มีดัชนีการเกิดปมที่รากพริกเท่ากับ 3.88 และ 4.79 (3 = เกิดปม 25-50 %; 4 = เกิดปม 50-75%) ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) เมื่อตรวจนับจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยในดินปลูก มีจำนวนเท่ากับ 235 62 56 33 และ 825 ตัวต่อดิน 200 กรัม ของกรรมวิธีที่ 1-5 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทดสอบ โดยนำดินละลายน้ำและเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทุกกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาทดสอบศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าราปฏิปักษ์สามารถเข้าทำลายไข่ได้ 100 %

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อราปฏิปักษ์สามารถเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย ทำให้ไข่ไม่ฟักเป็นตัวอ่อนกลับเข้าทำลายรากพริกได้ จึงสามารถลดประชากรไส้เดือนฝอยในดินและรากพืช ดังนั้น การนำราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ไปปรับใช้ในการควบคุมโรครากปมในสภาพแปลงพริกที่มีการระบาดของโรครากปม จึงเป็นอีกวิธีการป้องกันกำจัดโรครากปมอีกหนึ่งทางเลือกให้กับเกษตรกรที่ประสบปัญหาในพื้นที่ต่อไป

ตารางที่ 1 ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากเมื่อมีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปมพริกในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	วิธีการ	ดัชนีการเกิดปมที่ราก[1/]
1	ใส่ไส้เดือนฝอย Mi + ราปฏิปักษ์ P อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก	3.88 b[2/]
2	ใส่ไส้เดือนฝอย Mi + ราปฏิปักษ์ P อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่ครั้งที่ 2 ที่ 15 วัน	2.52 c
3	ใส่ไส้เดือนฝอย Mi + ราปฏิปักษ์ P อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่ครั้งที่ 2 และ 3 ที่ 15 และ 30 วัน	2.50 c
4	ใส่ไส้เดือนฝอย Mi + ราปฏิปักษ์ P อัตรา 20 กรัมต่อกระถาง พร้อมปลูก และใส่ครั้งที่ 2 3 และ 4 ที่ 15 30 และ 45 วัน	2.33 c
5	ใส่ไส้เดือนฝอย Mi (inoculated control)	4.79 a
	CV. (%)	6.20

Mi = ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita*

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

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณโดยการใช้วิธี DMRT

ภาพที่ 2 ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากของต้นพริกอายุ 90 วัน เมื่อมีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate อัตรา 20 กรัมต่อต้น ควบคุมโรครากปม

A) ดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 2 (เกิดปมน้อยกว่า 25% ของระบบราก) เมื่อใส่ราปฏิปักษ์จำนวน 2 3 และ 4 ครั้ง

B) ดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 4 (เกิดปม 50-75% ของระบบราก) เมื่อใส่ราปฏิปักษ์ 1 ครั้งพร้อมปลูก

C) ดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 5 (เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เชื้อราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ที่เพาะขยายในเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ ในอัตรา 20 กรัมต่อต้นพริก ในสภาพดินที่มีไส้เดือนฝอยรากปม สามารถลดการเกิดปมได้ 50-75% ของระบบราก โดยมีการใส่ราปฏิปักษ์จำนวนอย่างน้อย 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 พร้อมปลูก และครั้งที่ 2 ห่างกัน 15 วัน และไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อใส่เชื้อรา 3 และ 4 ครั้ง เมื่อนำเชื้อราที่เจริญบนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยมาทดสอบพบว่ายังคงมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ได้ 100 %

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำเชื้อราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ไปพัฒนาทดสอบในสภาพไร่ และขยายผลสู่เกษตรกรเพื่อควบคุมโรครากปมในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ พริก มะเขือ กระจี๊ยบเขียว และฝรั่ง

11. เอกสารอ้างอิง

พากเพียร อรัญนารถ นงรัตน์ นิลพานิชย์ วิชิต ศิริสันธนะ และสมคิด ดิสถาพร. 2543. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ Bacillus subtilis ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 10 (2) : 2-8.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2550. การควบคุมโรครากปมในพริก. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 4 น.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ วราภรณ์ ประกอบ. 2550. เทคนิคการคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม. 10 น.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ มัลลิกา แก้ววิเศษ. 2559. การเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดราปฏิปักษ์ควบคุมโรครากปม. ในรายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ปี 2560. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช. 2547. การใช้ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยกำจัดแมลงศัตรูผักคะน้า. วารสารวิชาการเกษตร 22(2) : 145-156.

เพิ่มศักดิ์ สุภาพรเหมินทร์. 2534. อิทธิพลของไส้เดือนฝอยรากปม (Meloidogyne incognita) ต่อผลผลิตและการเกิดปมของถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มนตรี เอี่ยมวิมังสา. 2538. ผลของสารเคมีและเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในแง่งพันธ์ขิง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

มลชัย กิตติศักดิ์มนตรี. 2541. ผลของเชื้อราเวสิคูลาร์ อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา ต่อการเจริญของปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* var. *altissima*) และการเข้าทำลายปอแก้วของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

ศรศิลป์ บุญบันดาล. 2536. การแพร่กระจายและการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดใน

พื้นที่สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุภกิจ สุขใจมิตร. 2532. อิทธิพลของ antagonist plants และเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อุทัย เกตุนุติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส เอ็น พี วี, หน้า 140-145. ใน : หลักและวิธีการผลิตผักอนามัย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ

อัจฉรา ตันติโชดก. 2544. บีที สารชีวินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูพืช. หน้า 146-148. ใน : หลักและวิธีการผลิตผักอนามัย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ

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

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

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

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

Hussey, R.S. and G.J.W. Jansaen. 2001. Root-knot nematodes : Meloidogyne species, pp. 43-70 In J.L. Starr, R. Cook and J. Bridge (eds.). Plant Resistance To Parasitic Nematodes. CAB Publishing, New York.

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

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

Jatala, P., 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 24 : 453-489.

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

Netscher, C. and R.A. Sikora. 1990. Nematode parasites of vegetables, pp. 237-283. In M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge (eds.). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International.

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

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

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

Sterring, G.R. 1991. Biological control of Plant Parasitic Nematode: Progress, Problem and Prospect. C.A.B. International, UK. 282 p.