รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย :** อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน
2. **โครงการวิจัย** : การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรเพื่อใช้ประโยชน์
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดราปฏิปักษ์ควบคุมโรครากปม

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Culture Collection and Identification of Antagonistic Fungi for Controlling Root knot Disease
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด
สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ
สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

การเก็บรวบรวมตัวอย่างดินและรากจากพื้นที่การระบาดของโรครากปม 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

6. คำนำ :

จุลินทรีย์ทางการเกษตรมีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์จำนวนมากในระบบนิเวศเกษตร สามารถแบ่งได้หลายกลุ่มขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ที่อยู่อาศัย แหล่งอาหาร สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และความชื้น ที่มีผลต่อการดำรงชีวิต การใช้อาหาร และความอยู่รอดในสภาพธรรมชาตินั้นๆ โดยจุลินทรีย์ทางการเกษตรมีทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษต่อดินและพืชที่ปลูกในระบบนิเวศ ซึ่งนักวิจัยได้เก็บรวบรวมและจำแนกจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมต่างๆ และนำมาศึกษาวิจัยพัฒนาเพื่อนำจุลินทรีย์เหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ และกรมวิชาการเกษตร เป็นอีกหนึ่งหน่วยงานวิจัยพัฒนาด้านจุลินทรีย์ตั้งแต่การเก็บรวบรวม จัดจำแนก และเก็บรักษาให้คงความมีชีวิต การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มปริมาณ และการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอ็นไซม์ต่างๆ เพื่อพัฒนาไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรอย่างต่อเนื่อง เช่น แบคทีเรียไรโซเบียมตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียบาซิลัสย่อยสลายเซลลูโลส ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง และรากำจัดแมลง เป็นต้น โดยจุลินทรีย์บางชนิดมีการผลิตขยายและถ่ายทอดไปสู่ภาคการเกษตรมากกว่า 30 ปี ซึ่งมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง แต่อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มที่นำไปใช้ประโยชน์ยังมีข้อจำกัดของความแข็งแรงและคุณสมบัติของการนำเป็นใช้ประโยชน์ เนื่องจากการนำขึ้นมาจากธรรมชาติและเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องในสภาพห้องปฏิบัติการระยะเวลาหนึ่ง จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ลดลงหรือตายไป

มีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมากกว่า 500 เรื่อง (Kerry, 1987) เป็นเรื่องเชื้อราใช้กับดักหรือห่วงดัก 57 % เชื้อราที่เป็น endoparasite 19 % แบคทีเรีย 5 % โปรโตซัว 3 % ริเค็ทเซีย 2 % ทาร์ดิเก็ด <1 % ไวรัส <1 % ไส้เดือนฝอย 7 % ไรต่างๆ 2 % โคเล็มโบลา 1 % เอ็นไคทิด < 1 % ทูเบลลาเรียล < 1 % แมลงชนิดอื่นๆ < 1 % จะเห็นได้ว่าเชื้อราได้มีการศึกษากันมากที่สุดรวม 76 % เชื้อราที่มีการศึกษากันมากได้แก่ เชื้อรา *Paecilomyces lilacinus, P. nostocoides* และ *Acremonium* spp. เป็นต้น โดย Jatala (1985; 1986) เป็นบุคคลแรกที่พบว่ารา *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson สามารถใช้ป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ได้ดี ซึ่งพบว่าราชนิดนี้สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้หลายชนิดรวมทั้งไส้เดือนฝอยรากปม และ cyst nematodes

ในปัจจุบันมีการศึกษาราที่แยกได้จากดินหลายชนิด มาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ได้แก่ รา *Paecilomyces lilacinus* เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย *M. incognita* และ *M. hapla* ในมะเขือเทศ และยังเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศอีกด้วย (Kiewnick and Sikora, 2006) 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 ซึ่งราแต่ละชนิดจะสร้างกับดักและสร้างเส้นใยเข้าไปเจริญในตัวไส้เดือนฝอย และไส้เดือนฝอยจะตายในที่สุด นอกจากนั้นยังมีราไมคอร์ไรซา ได้แก่ เวสิคูลาร์ อาร์บัส

คูลาร์ ไมคอร์ไรซา (วี-เอไมคอร์ไรซา) ซึ่งเป็นราที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืช โดยมีความสัมพันธ์แบบเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่พืช โดยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและลดการใช้ปุ๋ย ช่วยเพิ่มปริมาณการดูดธาตุฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และจุลธาตุอาหารให้มากขึ้น (Jackson *et al.,* 2002; Nikitas *et al.,* 2002; Bagyaraj, 1992) และยังช่วยให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในดินที่มีฟอสฟอรัสน้อย (มลชัย, 2541)

จากการสืบค้นข้อมูลจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย มีรายงานผลงานวิจัยโดย สืบศักดิ์ (2533) รายงานว่ามีรามากกว่า 400 ชนิดใน 15 สกุล ที่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้ นอกจากนั้น ศรศิลป์ (2536) ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับเชื้อราที่สามารถใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยได้มีจำนวน 33 สกุลด้วยกัน ในจำนวนนี้มีเชื้อราสกุล *Paecilomyces* รวมอยู่ด้วย

ดังนั้น การเก็บรวบรวมและอนุรักษ์ราปฏิปักษ์ จึงมีการดำเนินการศึกษาเก็บรวบรวม จำแนกและคัดเลือกชนิด/สายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง เพื่ออนุรักษ์ราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพตามความต้องการใช้ หรือได้จุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีศักยภาพ/ประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์เดิม อันจะเกิดประโยชน์ต่อการใช้จุลินทรีย์จากความหลากหลายทางชีวภาพให้เกิดประโยชน์สูงสุด และสามารถนำไปใช้ทางการเกษตรได้จริงต่อไป

7. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการราวิทยา ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope และ Compound microscope เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ไมโครปิเปต ถังเก็บรักษาความเย็น

2. สารเคมี ได้แก่ แอลกอฮอล์ โซเดียมคลอไรด์ กลีเซอรีน และ streptomycin

3. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Gochenaur's glucose ammonium agar (GAN), potato dextrose agar (PDA) และอาหาร Water agar (WA)

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างดินและรากจากแหล่งต่างๆ ครอบคลุม 4 ภาคของประเทศ ภาคละ 5 จังหวัดๆ ละ 20 ตัวอย่าง ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณแปลงปลูกพืชที่มีการระบาดของโรคพืช โดยใช้พลั่วมือขุดดินในระดับความลึกประมาณ 10-15 เซนติเมตร ตักดินน้ำหนักประมาณ 300 กรัม ใส่ถุงซิปล๊อค ปิดปากถุง ส่วนตัวอย่างรากพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลาย มีลักษณะอาการรากเป็นปุ่มปม ทำการเก็บรากพืชใส่ถุงซิปล๊อค ปิดปากถุง

2. การแยกราปฏิปักษ์ออกจากดินและรากพืชเป็นโรค

2.1 การแยกราจากดิน 2 วิธีคือ 1) Soil dilution plate method (Barron, 1978) ชั่งดินน้ำหนัก 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ใช้ปิเปตดูดสารละลายดินปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร ปฏิบัติเป็นลำดับ ได้ความเข้มข้นของสารละลายเจือจางตามลำดับเท่ากับ 10^{-2}, 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายของความเข้มข้น 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 1 มิลลิลิตร ทำ 5 ซ้ำ เทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ได้แก่ 1) อาหาร Gochenaur's glucose ammonium agar (GAN) ที่มีส่วนผสมของ Rose Bengal และ Streptomycin 2) อาหาร Half potato dextrose agar (½PDA) และ 3) อาหาร Water agar (WA) ลงบนสารละลายดินและหมุนจานเลี้ยงเชื้อเบาๆ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3-5 วัน หรือนานกว่านั้น เมื่อเชื้อเจริญบนอาหาร ใช้เข็มเขี่ยย้ายโคโลนีของราที่เจริญในจานเลี้ยงเชื้อทุกโคโลนีมาใส่ในอาหาร PDA ในหลอดทดสอบที่มีหน้าอาหารเอียง (slant) เพื่อเก็บเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกและเก็บรักษา 2) Soil plate method (Warcup, 1950) ใช้ช้อนตักดินแบบ microspatula ตักดินประมาณ 0.005-0.015 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร แล้วเททับเบาๆด้วยอาหารวุ้น 3 ชนิด ได้แก่ อาหาร GAN ที่มีส่วนผสมของ Rose Bengal และ Streptomycin อาหาร ½PDA และอาหาร WA ให้เม็ดดินกระจายทั่ว จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ในที่มืด ตรวจสอบการเจริญของราทุกๆ วัน เมื่อพบเส้นใยราเจริญ ทำการแยกราให้บริสุทธิ์ลงบน slant PDA สำหรับใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกและเก็บรักษา

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

3. การจำแนกชนิดราปฏิปักษ์

3.1 ศึกษารูปร่างลักษณะและการสร้างสปอร์ของราที่เจริญบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง เพื่อตรวจดูลักษณะเส้นใย fruiting body รูปร่างลักษณะและการเกิดสปอร์

3.2 ศึกษาลักษณะของเส้นใย สปอร์ fruiting body และลักษณะโครงสร้างอื่นๆ ของราใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound โดยใช้เข็มเขี่ยเส้นใยและสปอร์ นำมาวางบนแผ่นสไลด์ที่มีน้ำกลั่น ปิดทับด้วย cover slide แล้วนำไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์

4. การประเมินศักยภาพของราปฏิปักษ์ในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

ทำการทดสอบราปฏิปักษ์เข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปมระยะไข่ โดยหยดสปอร์ราแต่ละสกุลที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และไข่ไส้เดือนฝอยความเข้มข้น 300 ฟองต่อ 50 ไมโครลิตร ลงในถาดหลุมชนิด Tissue culture plate แบบ 24-well หลังจากนั้นตรวจการเข้าทำลายของราในแต่สกุลทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

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

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

1. แหล่งเก็บตัวอย่างดินที่แยกได้เชื้อรา และกำหนดรหัสตามอักษรย่อชื่อจังหวัด (ภาษาอังกฤษ 2 ตัวอักษร)

2. รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเพื่อการจำแนกในระดับสกุล

3. สกุลของราปฏิปักษ์เข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

4. ความอยู่รอดและคงศักยภาพของราปฏิปักษ์ในดินนึ่งฆ่าเชื้อที่ 6 และ 12 เดือน

เวลาสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2560

สถานที่ดำเนินการ

1. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

2. เก็บรวบรวมตัวอย่างดินในพื้นที่ระบาดของโรครากปม

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ :

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างดินและรากพืชเป็นโรครากปมจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท จันทบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ และเชียงราย รวมทั้งสิ้น 17 จังหวัด จำนวน 950 ตัวอย่าง และทำการแยกเชื้อราจากดินโดยวิธี Soil dilution plate method และ Soil plate method บนอาหาร Gauchnaur's glucose Ammonium Nitrate Agar (GAN) และ Haft potato dextrose agar ½ (PDA) สามารถแยกได้รา 56 ไอโซเลท และแยกได้จากชิ้นรากจำนวน 3 ไอโซเลท ด้วยวิธี Isolation from plant parts (IPP) บนอาหาร Water agar (WA) กำหนดรหัสตามชื่อจังหวัด รวมแยกได้ 59 ไอโซเลท คิดเป็น 9.08 % ของจำนวน 950 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากที่มีการระบาดของโรครากปม ได้นำมาเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA สามารถจำแนกในระดับสกุล (genera) โดยพิจารณาจากรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบราที่แยกได้จากดิน 4 สกุล ได้แก่ *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., และ *Trichoderma* spp. มีจำนวน 56 ไอโซเลท โดยพบจากตัวอย่างดินจังหวัดบุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี จันทบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย และแยกจากรากได้ 1 สกุลคือ *Paecilomyces* sp. จากตัวอย่างรากปมพริกในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี รากปมฝรั่งในพื้นที่จังหวัดนครปฐม และรากปมเมล่อนในพื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์ รวม 3 ไอโซเลท

เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การพบและแยกได้พบว่า รา *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. พบในดินทุกพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง และแยกได้ทั้งวิธี DP และ SP บนอาหาร GAN และ ½ PDA สำหรับรา *Trichoderma* spp. แยกด้วยวิธี DP บนอาหาร ½ PDA พบเฉพาะในตัวอย่างดินของแหล่งเก็บจังหวัดบุรีรัมย์ อุบลราชธานี ขอนแก่น สุพรรณบุรี นครปฐม และจันทบุรี และรา *Fusarium* spp. แยกได้จากตัวอย่างดินด้วยวิธี DP และ SP บนอาหาร GAN พบเฉพาะในตัวอย่างดินของแหล่งเก็บจังหวัดบุรีรัมย์ อุบลราชธานี สุพรรณบุรี นครปฐม และจันทบุรี

ตารางที่ 1 ราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากในแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของโรครากปม

พื้นที่เก็บ (จังหวัด)	จำนวนตัวอย่างดินและราก	จำนวนที่แยกได้	กำหนดรหัส
บุรีรัมย์	80	5	BR1-BR5
ศรีสะเกษ	45	5	SK1-SK5
อุบลราชธานี	30	8	UB1-UB8
นครราชสีมา	70	0	-
สุรินทร์	25	0	-
มหาสารคาม	25	0	-
ขอนแก่น	60	6	KK1-KK6
นครสวรรค์	55	3	NS1-NS3
สุพรรณบุรี	60	8	SB1-SB8
นครปฐม	60	7	NP1-NP7
ราชบุรี	70	5	RB1-RB5
กาญจนบุรี	50	6	KB1-KB6
ชัยนาท	80	0	-
จันทบุรี	50	1	CB1
กำแพงเพชร	60	0	-
เชียงใหม่	70	3	CM1-CM3
เชียงราย	60	2	CR1-CR2
17 จังหวัด	**950 ตัวอย่าง**	**59 ไอโซเลท**	

ผลการทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปมของรา 5 สกุล เปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่น พบว่ารา *Paecilomyces* spp. BR3, NP3 และ UB1 isolate และ *Fusarium* spp. BR5 และ CB1 isolate สามารถเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมและสร้างเส้นใยแทงเข้าไปในไข่ โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเท่ากับ 70.05 และ 19.8 % ตามลำดับ (ภาพที่ 1) ในขณะที่ไข่ที่แช่ในน้ำกลั่นยังคงปกติ ส่วนราอีก 3 สกุล คือ *Penicillium* spp. *Trichoderma* spp. และ *Aspergillus* spp. ไม่สามารถเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยได้

ภาพที่ 1 ลักษณะของราปฏิปักษ์ *Fusarium* sp. CB1 isolate (A) และ *Paecilomyces* sp. BR3 isolate (B) เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

เมื่อทำการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อรา *Paecilomyces* และ *Fusarium* ในดินอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และตรวจความมีชีวิตที่ระยะเวลาเก็บ 6 เดือน พบว่าเชื้อรา *Paecilomyces* ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนรา *Fusarium* ไม่เจริญเติบโตในเวลา 6 เดือนเท่ากัน และที่เก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน พบว่ารา *Paecilomyces* ไม่เจริญบนอาหาร PDA

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างดินและรากในพื้นที่การระบาดของโรครากปม ได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท จันทบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ และเชียงราย รวมทั้งสิ้น 17 จังหวัด จำนวน 950 ตัวอย่าง และทำการแยกเชื้อราจากดินโดยวิธี Soil dilution plate method และ Soil plate method บนอาหาร GAN และ ½ PDA สามารถแยกได้รา 56 ไอโซเลท และแยกได้จากชิ้นราก จำนวน 3 ไอโซเลท ด้วยวิธี IPP บนอาหาร WA 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 รวมแยกได้ 59 ไอโซเลท คิดเป็น 9.08 % ของจำนวน 950 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ 5 สกุล คือ *Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces* และ *Fusarium* และพบว่ารา *Paecilomyces* spp. BR3, NP3 และ UB1 isolate และ *Fusarium* spp. BR5 และ CB1 isolate 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 และที่เก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน พบว่ารา *Paecilomyces* ไม่เจริญบนอาหาร PDA

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เก็บรักษาเพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืช

11. เอกสารอ้างอิง

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

ศรศิลป์ บุญบันดาล. 2536. การแพร่กระจายและการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดในพื้นที่สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

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. *In* An Advanced Treatise on Meloidogyne Volume II: Biology and Control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina.

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

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

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.

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