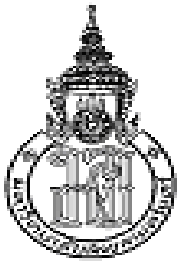


# เชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยในเขตภาคใต้ของประเทศไทยและประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) ของพริก (*Capsicum* spp.) โดยชีววิธี

# Nematophagus Fungi in Southern Thailand and Their Efficacy in Biocontrol of Root-knot Nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) on Chili (*Capsicum* spp.)

**สมลักษณ์ วงษ์ตานี**

**Somlak Wongtanee**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา**
**วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา**
**มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Pathology**
**Prince of Songkla University**
**2556**

**ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**

**ชื่อวิทยานิพนธ์** เชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยในเขตภาคใต้ของประเทศไทยและประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) ของพริก (*Capsicum* spp.) โดยชีววิธี

**ผู้เขียน** นายสมลักษณ์ วงษ์ตานี

**สาขาวิชา** โรคพืชวิทยา

---

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม**

.....

(ดร.มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม)

**คณะกรรมการสอบ**

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์พัลลภา กฤษณีไพบูลย์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

.....กรรมการ

(ดร.มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม)

.....กรรมการ

(ดร.ชนินันท์ พรสุริยา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอแสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นายสมลักษณ์ วงษ์ตานี)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายสมลักษณ์ วงษ์ตานี)

นักศึกษา

| | |
|---|---|
| **ชื่อวิทยานิพนธ์** | เชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยในเขตภาคใต้ของประเทศไทยและประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) ของพริก (*Capsicum* spp.) โดยชีววิธี |
| **ผู้เขียน** | นายสมลักษณ์ วงษ์ตานี |
| **สาขาวิชา** | โรคพืชวิทยา |
| **ปีการศึกษา** | 2555 |

## บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) ของพริกโดยชีววิธี ได้ใช้ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินในแปลงปลูกพริก ตัวอย่างชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ ตัวอย่างกลุ่มไข่ (egg mass) ของไส้เดือนฝอยรากปม และดินรอบๆต้นพริกที่เกิดโรครากปมในเขตภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกระบี่ ตรัง นครศรีธรรมราช นราธิวาส พังงา พัทลุง ภูเก็ต ยะลา สงขลา สตูล และสุราษฎร์ธานี สามารถแยกเชื้อรากลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยในห้องปฏิบัติการได้ 4 ชนิด ใน 2 สกุล ได้แก่ *Arthrobotrys oligospora*, *Monacrosporium bembicodes*, *M. aphrobrochum* และ *M. thaumasium* รวมทั้งสิ้น 54 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบเชื้อรากลุ่มที่เป็นปรสิตภายใน (endoparasites) ได้แก่ *Harposporium cycloides* แต่ไม่สามารถเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ได้ ส่วนเชื้อราที่แยกได้จากกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม และดินรอบรากต้นพริกที่เป็นโรครากปม มีจำนวนทั้งสิ้น 143 ไอโซเลท นำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (egg) และความสามารถในการลดอัตราการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จากการทดสอบพบว่า *Paecilomyces lilacinus* (EM06-08) และ *Trichoderma* sp. (SR06-05) เป็นเชื้อราที่มีศักยภาพในการควบคุม *M. incognita* โดยชีววิธี ดูได้จากประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ และกลุ่มไข่ เมื่อนำเชื้อราทั้งสองไอโซเลทและเชื้อรากลุ่มกับดักไส้เดือนฝอย ที่มีประสิทธิภาพที่สุดจากการทดสอบ จำนวน 2 ไอโซเลท ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดปมของรากพริกโดยชีววิธี พบว่าเชื้อรา *P. lilacinus* มีประสิทธิภาพในการทำให้ความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริกลดลง โดยไม่พบความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร carbofuran เมื่อทำการจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้เทคนิค PCR เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อรา *P. lilacinus*

| | |
|---|---|
| **Thesis Tiltle** | Nematophagus Fungi in Southern Thailand and Their Efficacy in Biocontrol of Root-knot Nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) on Chili (*Capsicum* spp.) |
| **Author** | Mr. Somlak Wongtanee |
| **Major Program** | Plant Pathology |
| **Academic Year** | 2012 |

## ABSTRACT

The study on efficacy of nematophagus fungi for control of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* Chitwood) was started from collecting soil samples of chili crop, submerged plant material, root gall and soil around root gall of chili in area of southern Thailand (Krabi, Nakhon Si Thammarat, Narathiwat, Phangnga, Phatthalung, Phuket, Satun, Songkhla, Surat Thani, Trang and Yala) for fungal isolation. Fifty-four isolates of nematode-trapping fungi were baited and isolated into pure culture. They were identified to 4 species in 2 genera as follow: *Arthrobotrys oligospora*, *Monacrosporium aphrobrochum, M. bembicodes* and *M. thaumasium.* The endoparasitic fungus, *Harposporium cycloides*, was also found infecting nematode but it could not be isolated into pure culture. In addition, 143 fungi were isolated from root knot egg mass attached to galled root and soil around root gall. Each fungal isolates was tested for their ability to colonize egg mass, egg and reduce egg hatching of *M. incognita* nematode. The result showed that *Paecilomyces lilacinus* (EM06-08) and *Trichoderma* sp. (SR06-05) exhibited high potential of biological control of *M. incognita* by infecting their egg or egg mass. Two species of egg colonizing and two species of nematode-trapping fungi were selected and further tested on potted chili for biological control of root-knot nematode. The result revealed that *P. lilacinus* showed highest efficacy in biological control of root-knot nematode of chili by reducing the galls on chili root and was not different from carbofuran treatment. The identification of *P. lilacinus* was confirmed by PCR and nucleotide sequencing technique and compared to the GenBank database.

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| สารบัญ | (8) |
| รายการตาราง | (9) |
| รายการตารางภาคผนวก | (10) |
| รายการภาพ | (11) |
| 1. บทนำ | 1 |
| บทนำต้นเรื่อง | 1 |
| ตรวจเอกสาร | 3 |
| วัตถุประสงค์ | 16 |
| 2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ | 17 |
| วัสดุและอุปกรณ์ | 17 |
| วิธีการทดลอง | 19 |
| 3. ผลการทดลอง | 31 |
| 4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง | 51 |
| เอกสารอ้างอิง | 55 |
| ภาคผนวก | 61 |
| ประวัติผู้เขียน | 70 |

# รายการตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | กลไกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราควบคุมไส้เดือนฝอย | 7 |
| 2. | สถานที่เก็บตัวอย่างและจำนวนไอโซเลทของเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยที่แยกเชื้อได้จากตัวอย่างดิน และจากชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ | 35 |
| 3. | เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราปฏิปักษ์กลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยที่พบจากการสำรวจ | 36 |
| 4. | ประสิทธิภาพของเชื้อราในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (egg) ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ | 41 |
| 5. | เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริก น้ำหนักรากสด น้ำหนักต้นสด และน้ำหนักผลผลิตของพริก ที่เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 60 วัน | 46 |

# รายการตารางภาคผนวก


| ตารางภาคผนวกที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | รหัสและจำนวนไอโซเลทของเชื้อราที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง | 64 |
| 2. | ชนิดและรหัสไอโซเลทของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน | 66 |
| 3. | ชนิดและรหัสไอโซเลทของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากชิ้นส่วนของพืชที่จม หรือลอยอยู่ในน้ำ | 67 |
| 4. | วิเคราะห์ความแปรปรวนระดับความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริก (ระดับ 0-5) เมื่ออายุ 60 วัน | 68 |
| 5. | วิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักรากสดของพริก เมื่ออายุ 60 วัน | 68 |
| 6. | วิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักต้นสดของพริก เมื่ออายุ 60 วัน | 68 |
| 7. | วิเคราะห์ความแปรปรวนผลผลิตพริก ที่เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 60 วัน | 69 |

# รายการภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | อุปกรณ์ท่อพีวีซี ที่ใช้ในการเตรียมกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม | 22 |
| 2. | *Monacrosporium aphrobrochum* (Drechsler) Subram. | 32 |
| 3. | *Monacrosporium bembicodes* (Drechsler) Subram. | 32 |
| 4. | *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler) de Hoog & Oorschot. | 33 |
| 5. | *Arthrobotrys oligospora* Fres. | 33 |
| 6. | *Harposporium cycloides* (endoparasites) | 34 |
| 7. | ตัวอย่างเชื้อราที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ และไข่ของ *M. incognita* | 38 |
| 8. | *P. lilacinus* ไอโซเลท EM06-08 | 40 |
| 9. | ระดับระดับความรุนแรงในการเกิดปมของรากในแต่ละกรรมวิธี | 47 |
| 10. | ผลผลิตยีน rDNA ของเชื้อราปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* | 50 |

# บทที่ 1
# บทนำ

## บทนำต้นเรื่อง

พริก (*Capsicum* spp.) เป็นพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งที่สามารถปลูกได้เกือบทั่วโลก ในประเทศไทย พริกถูกจัดให้เป็นพืชวัฒนธรรมของคนไทย มีการใช้ประโยชน์ทั้งในแง่ของการบริโภค ในรูปของเครื่องเทศสำหรับปรุงแต่งรสชาติ กลิ่นและสี ใช้เป็นพืชสมุนไพร และใช้ในพิธีกรรมต่างๆ นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการสกัดสารเผ็ดจากพริกที่เรียกว่า แคปไซซิน (capsaicin) ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา มาทำผลิตภัณฑ์ต่างๆเพื่อใช้ประโยชน์ด้านสุขภาพ เช่น กระตุ้นการทำงานของกระเพาะอาหาร กระตุ้นการไหลเวียนของโลหิต บำรุงหัวใจ บรรเทาอาการปวดเมื่อย ฉีดพ่นรักษาอาการโรคไซนัส รวมทั้งใช้เพื่อควบคุมน้ำหนัก นอกจากนี้ยังได้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น ใช้แทนแก๊สน้ำตาเพื่อปราบจลาจลและใช้เคลือบสายไฟและสายไฟเบอร์ออปติกส์ต่างๆ เพื่อป้องกันการกัดแทะของสัตว์ เนื่องจากพริกเป็นพืชที่มีคุณค่าทางอาหารและยา มีสี รสชาติที่ไม่อาจใช้ผลผลิตจากพืชอื่นๆทดแทนได้ จึงทำให้พริกเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ในด้านการผลิตนั้นมีการเพาะปลูกมานานควบคู่กับชาติไทย เริ่มจากปลูกพริกในลักษณะสวนครัวหลังบ้าน ต่อมาได้ปรับเปลี่ยนมาเป็นการปลูกพริกเพื่อการค้า เพื่อผลิตพริกสดและพริกแห้งสำหรับใช้ในการบริโภคและส่งโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเพื่อแปรรูปออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ รวมทั้งยังมีการผลิตเมล็ดพันธุ์พริกลูกผสมเพื่อการส่งออกด้วย จึงทำให้แนวโน้มการผลิตพริกเพิ่มสูงขึ้นทุกปี (กมล เลิศรัตน์, 2550)

พริกเป็นพืชที่มีศักยภาพในการผลิต เนื่องจากมีปริมาณการผลิตและมูลค่าสูง สามารถปลูกได้ในทุกภาคของประเทศ มีพื้นที่ปลูกรวมทั้งประเทศ 490,000 ไร่ ผลผลิตรวม 548,800 ตัน ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศ มีการส่งออกไปต่างประเทศในลักษณะของพริกสดและแปรรูป จุดเด่นพริกของประเทศไทย คือสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปีและปลูกได้ทุกภาค มีฐานพันธุกรรมที่แพร่หลาย มีลักษณะจำเพาะที่เป็นเอกลักษณ์ เช่น ความเผ็ด มีกลิ่นหอม สามารถแปรรูปได้หลากหลาย สำหรับการปลูกพริกในเขตภาคใต้ของประเทศไทยนั้น จากระบบรายงานข้อมูลภาวะการผลิตพืชแบบรายปี ซึ่งสำรวจข้อมูลโดยกรมส่งเสริมการเกษตร พบว่า ฤดูกาลเพาะปลูก ปี 2555/56 ภาคใต้มีพื้นที่ปลูกพริกประมาณ 54,500 ไร่ แหล่งผลิตพริกที่สำคัญของภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี พัทลุง และจังหวัดสงขลา ซึ่งพบว่า

การปลูกพริกในพื้นที่ภาคใต้ มีทั้งที่ปลูกไว้เพื่อจำหน่ายภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ ตลาดค้าพริกที่สำคัญของภาคใต้ ได้แก่ ตลาดหาดใหญ่ ตลาดหัวอิฐ และตลาดภูเก็ต ส่วนตลาดส่งออกพริกในต่างประเทศที่สำคัญ ได้แก่ ประเทศมาเลเซียและสิงคโปร์ (ปัญญา ยวงเกตุ, 2552)

ปัญหาที่สำคัญของการปลูกพริกคือ ศัตรูพืช ซึ่งมักพบการระบาดของแมลงศัตรูพริก ได้แก่ เพลี้ยไฟ ไรพริก และโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น เชื้อรา ไวรัส แบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย (นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ, 2552) ตามรายงานของ Chitwood, 2003 (อ้างถึงใน Almaghrabi *et al*., 2013) พบว่า ไส้เดือนฝอยก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตทางการเกษตรต่อปี คิดเป็นมูลค่า 125,000 ล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐอเมริกา โดยเฉพาะโรครากปมของพริกที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) นับว่าเป็นศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง เพราะเมื่อมีไส้เดือนฝอยรากปมเข้าสู่รากพริกในระยะกล้าเพียงตัวเดียว ภายในเวลา 20 วัน จะเพิ่มจำนวนประชากรในดิน 400-500 ตัว แล้วกลับเข้ามาทำลายระบบรากและขยายพันธุ์ต่อเนื่องทันที เมื่อต้นพริกอายุ 3 เดือน ไส้เดือนฝอยจะมีวงจรชีวิตรวม 3 ชั่วอายุ เกิดความเสียหายต่อพริกและสูญเสียผลผลิตมากกว่า 50% (นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, 2550) ไส้เดือนฝอยรากปมยังสามารถแพร่ระบาดได้ดีในเนื้อดินชนิดร่วนปนทราย แพร่ระบาดไปกับระบบการให้น้ำหรือไหลไปกับน้ำฝน รวมทั้งติดไปกับดินเพาะกล้าพริกและติดไปกับเครื่องมือเกษตรต่างๆ เช่น ล้อรถไถ ดินที่ติดไปกับรองเท้าของเกษตรกร และเครื่องมือเกษตรอื่นๆ (สรศักดิ์ มณีขาว และคณะ, 2552)

การป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมทำได้หลายวิธี เช่น การเขตกรรม การใช้พันธุ์ต้านทาน รวมทั้งการใช้สารเคมี ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่สุด แต่กรรมวิธีค่อนข้างยุ่งยาก และส่งผลกระทบต่อการเกิดสารพิษตกค้างในระบบนิเวศ การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธี (biological control) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษากันมาอย่างกว้างขวางและต่อเนื่อง โดยการนำศัตรูธรรมชาติมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอย และศัตรูธรรมชาติที่มีการศึกษากันมาก ส่วนใหญ่เป็นการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) จำพวกเชื้อรา หรือที่เรียกว่า nematophagus fungi ซึ่งมีรายงานว่าพบเชื้อรามากกว่า 30 สกุล (genus) และ 80 ชนิด (species) ที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยได้ (Sun *et al*., 2006)

**ตรวจเอกสาร**

**1. โรครากปมของพริก**

โรครากปมพริกเกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยวงจรของโรคเริ่มต้นจากตัวอ่อนระยะที่ 2 หรือระยะเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยที่แพร่กระจายอยู่ในดินปลูกพืช เจาะไชเข้าสู่รากพริกบริเวณปลายราก แล้วเคลื่อนที่ต่อไปยังท่อน้ำท่ออาหารและหยุดนิ่ง จากนั้นเริ่มดูดกินน้ำเลี้ยง และมีการเจริญเติบโตด้วยวิธีการลอกคราบจากตัวอ่อนระยะที่ 2 เป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 และระยะที่ 4 ตามลำดับ จากนั้นพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัย ที่มีทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยพบว่าพริกเป็นพืชอาหารที่ดี ไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายรากพริกจึงมีอัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นเพศเมียสูงกว่าเพศผู้ในสัดส่วน 4:1 ของจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลาย เพศเมียสามารถสร้างไข่ที่มีลักษณะเป็นกลุ่ม ซึ่ง 1 กลุ่มไข่ ประกอบด้วยไข่จำนวน 400-500 ฟอง หลังจากนั้นไข่จะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 ได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์กับเพศผู้ ตัวอ่อนจะลอกคราบภายในไข่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยระยะนี้จะออกจากไข่ลงสู่ดินและเข้าทำลายรากพืชต่อเนื่อง รวมวงจรชีวิตจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ถึงตัวอ่อนระยะที่ 2 อีกรุ่น ใช้เวลาเพียง 3-4 สัปดาห์เท่านั้น ดังนั้น การที่ไส้เดือนฝอยแพร่พันธุ์ได้ง่ายจึงเพิ่มปริมาณเชื้อในดินได้สูง ทำให้ความเสียหายของโรครากปมมีความรุนแรง (นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, 2550)

ลักษณะอาการของโรครากปม เมื่อถอนต้นพริกจะพบรากเป็นปุ่มปม สาเหตุจากไส้เดือนฝอยดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชบริเวณท่อน้ำท่ออาหาร มีผลทำให้เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกทำลายแบ่งตัวผิดปกติ เกิดเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ไปปิดกั้นทางเดินน้ำและแร่ธาตุอาหารจากรากไปเลี้ยงลำต้นส่วนเหนือดิน ทำให้พริกแสดงอาการเหี่ยวเฉา แคระแกร็น ทรุดโทรมหรือแห้งตายในที่สุด (สรศักดิ์ มณีขาว และคณะ, 2552)

**2. ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)**

**2.1 การจัดอันดับหมวดหมู่**

ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* Chitwood มีชื่อเดิมว่า *Oxyuris incognita* และ *M. incognita* var. *acrita* Chitwood, 1949 (สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 2538) การจัดอันดับหมวดหมู่ มีดังนี้

Phylum Nematoda

Class Heteroderidae

Order Tylenchida

Family Meloidogynidae

Genus *Meloidogyne*

Species *M. incognita*

**2.2 วงจรชีวิตและลักษณะสัณฐานวิทยา**

ไส้เดือนฝอยรากปมมีวงจรชีวิตแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ดังนี้

1. ระยะหากินเป็นอิสระ

ระยะไข่ เริ่มจากไข่เซลล์เดียวที่มีลักษณะยาวรี ผิวเรียบ ใส ขนาดประมาณ 0.04x0.08 มิลลิเมตร ซึ่งอยู่เป็นกลุ่มจำนวนหลายร้อยฟอง โดยมีสารเหนียวคล้ายวุ้น (gelatinous matrix) ห่อหุ้มอยู่ มองเห็นเป็นก้อนสีน้ำตาลเรียกว่า กลุ่มไข่ (egg mass) ติดอยู่ภายนอกราก ไข่จะพัฒนาการโดยแบ่งเซลล์ไปเรื่อยๆ จนเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 อยู่ในไข่ และมีการลอกคราบ (molting) ภายในไข่ 1 ครั้ง กลายเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 เมื่อได้รับความชื้นมากพอ ไข่จะฟักตัวอ่อนระยะที่ 2 ออกมา (Taylor and Sasser, 1978)

2. ระยะเป็นปรสิต

เริ่มจากตัวอ่อนระยะที่ 2 โดยตัวอ่อนระยะนี้จะออกจากไข่แล้วอยู่ในดิน มีชีวิตเป็นอิสระ เคลื่อนที่ระหว่างฟิล์มน้ำและผิวดิน ตัวอ่อนระยะนี้มีอาหารสะสม ได้แก่ ไขมัน 43% โปรตีน 23-24% อยู่ในเซลล์ของลำไส้เล็ก (พัลลภา กฤษณีไพบูลย์, 2534) ระยะนี้เป็นระยะที่เริ่มทำลายพืช (infective stage) โดยเคลื่อนที่ระหว่างฟิลม์น้ำเข้าหารากพืช บริเวณใกล้ปลายราก โดยอาศัยสารซึมจากราก (root exudate) ในการดึงดูดเข้าไปหา แล้วใช้หลอดดูดอาหาร (stylet) แทงลงไปในเซลล์ชั้นคอร์เทกซ์ (cortex) ของราก ส่วนหัวแทงลงลึกไปถึงเซลล์ไพริไซเคิล (pericycle) และเคลื่อนที่เข้าไปในราก โดยขนานลำตัวไปกับแนวราก ในระยะแรกๆจะฝังหลอดอาหารเข้ากับเซลล์พืช ซึ่งเป็นเซลล์ที่ต่อกับเซลล์ของท่อน้ำท่ออาหาร ไส้เดือนฝอยจะดูดกินน้ำเลี้ยงและสร้างน้ำลายไปกระตุ้น

เซลล์พืชบริเวณรอบๆหัวไส้เดือนฝอย 5-9 เซลล์ ให้มีขนาดโตขึ้นเป็นเซลล์ยักษ์ (giant cells) เซลล์ยักษ์จะทำหน้าที่เป็นที่พักน้ำเลี้ยงที่ซึมมาจากเซลล์ข้างเคียง โดยพบว่า nuclei และ nucleoli ของเซลล์ยักษ์มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ ไซโตพลาสซึมภายในเข้มข้นมากขึ้น โปรตีนในไซโตพลาสซึมมีมากกว่าในเซลล์ปกติ 10 เท่า นอกจากนี้เซลล์ที่อยู่รอบๆยังมีการแบ่งตัวมากผิดปกติ (hyperplasia) จึงทำให้รากบวมออก ไส้เดือนฝอยมีการลอกคราบอีก 3 ครั้งในรากพืช หลังจากลอกคราบครั้งที่ 3 ตัวอ่อนเพศเมียมีลำตัวพองออกเป็นถุง (saccate from) ลำตัวเอียงทำมุมกับราก ส่วนก้นถูกดันออกมาอยู่ใกล้ผิวราก ทำให้รากบริเวณนั้นขยายใหญ่เกิดเป็นปม ตัวเต็มวัยเพศเมียสร้างกลุ่มไข่ออกมานอกราก โดยไข่ถูกปล่อยออกมารวมกันอยู่ในถุงไข่ ซึ่งมีประมาณ 300-1,000 ฟอง ระยะเวลาเริ่มจากเกิดไข่จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยและออกไข่อีกครั้ง จะใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความชื้น ช่วงแสง ชนิดของพืชอาศัย ส่วนเพศผู้กระบวนการ metamorphosis เมื่อโตเต็มวัยก็ออกจากรากพืชมีชีวิตอยู่อย่างอิสระ รวมวงจรชีวิตประมาณ 3-5 สัปดาห์ (Taylor and Sasser, 1978)

**3. เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอย**

การนำจุลินทรีย์มาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ติดมาหรือตกค้างอยู่ในพืชผลทางการเกษตร มีผลต่อสุขภาพอนามัยของบุคคลและต่อสิ่งแวดล้อม เชื้อราจัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่นำมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยชีววิธี เนื่องจากเป็นศัตรูธรรมชาติของไส้เดือนฝอย ที่เรียกว่า เชื้อราปฏิปักษ์ โดยสามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะการเข้าทำลายไส้เดือนฝอย ได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มที่สร้างกับดักไส้เดือนฝอย กลุ่มที่เป็นปรสิตภายในของไส้เดือนฝอยที่ตัวเต็มวัยไม่ได้อยู่นิ่งกับที่ และกลุ่มที่เป็นปรสิตของไข่และตัวเต็มวัยที่มีรูปร่างเป็นถุง เหตุที่เชื้อราปฏิปักษ์เหล่านี้ได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างลึกซึ้งสืบเนื่องมาจากศักยภาพในการควบคุม ที่มีแนวโน้มสูงว่าจะสามารถควบคุมได้สำเร็จ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไข่และไส้เดือยฝอยที่มีรูปร่างเป็นถุง นอกจากนี้เชื้อราปฏิปักษ์ยังสามารถพบได้ในทุกกลุ่มหลักของเชื้อราทั้งหมด เชื้อราที่สร้างกับดักส่วนใหญ่สามารถดำรงชีวิตในรูป saprophyte ในดิน ส่วนเชื้อราที่เป็นปรสิตภายในมักดำรงชีวิตแบบ obligate parasite ในไส้เดือยฝอยและยังพบได้ทั่วไปในดินธรรมชาติทุกประเภท (Nordbring-Hertz *et al*., 2006)

**3.1 เชื้อรากับดักไส้เดือนฝอย (nematode-trapping fungi)**

เชื้อราดักไส้เดือนฝอย (nematode-trapping fungi) หรือบางครั้งเรียกว่า predatory fungi (Stirling, 1991) เชื้อราปฏิปักษ์กลุ่มนี้จะมีโครงสร้างกับดักหลากหลายรูปแบบ รูปแบบของโครงสร้างกับดักขึ้นอยู่กับ ชนิด สายพันธุ์ หรือสภาพแวดล้อมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยสภาพแวดล้อมที่มีชีวิตที่สำคัญที่สุดคือ ตัวไส้เดือนฝอยที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งจะกระตุ้นให้เชื้อราสร้างกับดักแบบต่างๆ โดยการไปสัมผัสกับเส้นใยของเชื้อราปฏิปักษ์ ความสามารถในการดักจับไส้เดือนฝอยขึ้นอยู่กับ การพัฒนาโครงสร้างเฉพาะของเส้นใยเชื้อราปฏิปักษ์ โดยจะมีการพัฒนาโครงสร้างของเส้นใยแบบพิเศษ เช่น เส้นใยเป็นตาข่าย ปุ่มปม กิ่งก้าน หรือวงแหวน ไส้เดือนฝอยจะถูกจับโดยสารเหนียวหรือวิธีกล ดังที่แสดงรูปแบบของกับดักไว้ในตารางที่ 1 และพบว่าเชื้อราสกุลเดียวกัน แต่ต่างสปีชีย์กันก็อาจมีรูปแบบของกับดักต่างกันได้ เช่น *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides*, *A. musiformis* และ *A. superba* ใช้เส้นใยแบบตาข่ายเป็นกับดัก แต่ *A. dactyloides* ใช้เส้นใยที่มีลักษณะเป็นวงแหวนในการดักจับ กับดักไม่จำเป็นต้องมีพัฒนาการเต็มรูปแบบก็สามารถจับไส้เดือนฝอยได้ เชื้อราบางชนิด เช่น *A. superba* จับไส้เดือนฝอยด้วยกิ่งที่มีสารกาวเหนียวหรือตาข่ายที่ยังไม่เจริญเต็มรูปแบบ นอกจากนี้สปอร์ที่เพิ่งงอกก็อาจดักจับไส้เดือนฝอยได้เมื่อปล่อยให้งอกเองตามธรรมชาติ เชื้อรา *A. oligospora* ที่กลายพันธุ์นอกจากจะสร้างสปอร์ที่มีสารกาวเหนียวตั้งแต่อยู่บนก้านชูสปอร์ ยังสร้างกับดักจำนวนมากบนเส้นใยด้วย แสดงถึงความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยในธรรมชาติ และยังสามารถเป็นปรสิตของเชื้อราชนิดอื่น โดยการพันและรัดรอบเส้นใยของเชื้อราชนิดอื่น แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการปรับตัวให้มีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย (Nordbring-Hertz *et al*., 2006)

**ตารางที่ 1** กลไกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราควบคุมไส้เดือนฝอย

| ชนิดของกลไก | ชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ | ชั้น (Class) |
|---|---|---|
| ตาข่ายเส้นใยที่มีสารกาวเหนียว (adhesive nets) | *Arthrobotrys oligospora*<br>*Arthrobotrys conoides*<br>*Arthrobotrys musiformis*<br>*Arthrobotrys superba*<br>*Duddingtonia flagrans* | Deuteromycetes |
| กิ่งก้านเส้นใยที่มีสารกาวเหนียว (adhesive branches) | *Monacrosporium gephyropagum* | Deuteromycetes |
| ตุ่มเส้นใยที่มีสารกาวเหนียว (adhesive knobs) | *Monacrosporium ellipsosporum*<br>*Monacrosporium haptotylum* | Deuteromycetes |
| วงแหวนแบบรัดตัวได้ (constricting rings) | *Arthrobotrys dactyloides*<br>*Arthrobotrys brochopaga* | Deuteromycetes |
| ตุ่มและสปอร์ที่มีสารกาวเหนียว (adhesive knobs and adhesive spores) | *Nematoctonus concurrens* | Basidiomycetes |
| สปอร์ที่มีสารกาวเหนียว (adhesive spores) | *Nematoctonus leiosporus*<br>*Drechmeria coniospora*<br>*Hirsutella rhossoliensis* | Basidiomycetes<br>Deuteromycetes |
| ไส้เดือนฝอยกินเข้าไป (ingested spores) | *Harposporium anguillulae* | Deuteromycetes |
| สปอร์ที่ว่ายน้ำได้ (zoospores) | *Catenaria anguillulae*<br>*Haptoglossa dickii* | Chytridiomycetes<br>Oomycetes |
| เส้นใยที่มีสารกาวเหนียว (adhesive hyphae) | *Stylopage hadra*<br>*Cystopage cladospora* | Zygomycetes |
| หยดสารพิษ (toxic droplets) | *Pleurotus ostreatus* | Basidiomycetes |
| เส้นใยโป่งพองที่ใช้แทงเข้าไปในไส้เดือนฝอย (appressoria) | *Pochonia chlamydosporia* | Deuteromycetes |

**ที่มา :** ดัดแปลงจาก Nordbring-Hertz และคณะ (2006)

**3.2 เชื้อราจำพวกปรสิตภายใน (endoparasites)**

เชื้อราจำพวกปรสิตภายในต่อไส้เดือนฝอยสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เชื้อราปรสิตภายในเข้าทำลายไส้เดือนฝอยด้วยสปอร์ โดยการเกาะติดกับผิวหนังของไส้เดือนฝอย หรือการที่ไส้เดือนฝอยกินสปอร์เข้าไป และเจริญอาศัยอยู่ภายใน ซึ่งได้แก่เชื้อรา *Drechmeria coniospora*, *Hirsutella rhossoliensis* และ *Catenaria anguillulae* เชื้อราปรสิตภายในสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในไส้เดือนฝอย พบว่า *D. coniospora* สร้างสปอร์ได้ถึง 1,000 สปอร์จากไส้เดือนฝอย 1 ตัว ในขณะที่ *H. rhossoliensis* สร้างสปอร์ได้ 100-1,000 สปอร์จากไส้เดือนฝอย 1 ตัว โดยสปอร์ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้มีหน่อ (bud) ซึ่งมีสารกาวเหนียวสำหรับยึดติดกับตัวไส้เดือนฝอย ส่วน *Harposporium anguillulae* จะสร้างสปอร์รูปร่างแบบพิเศษที่เมื่อไส้เดือนฝอยกลืนเข้าไป สปอร์จะไปติดอยู่ที่ oesophagus ของไส้เดือนฝอยและเริ่มเข้าทำลาย ณ จุดนั้น ขณะที่ *C. anguillulae* จะเข้าทำลายไส้เดือยฝอยด้วย zoospore ที่สลัดหาง และเกาะยึดติดกับผิวของไส้เดือนฝอย (Nordbring-Hertz *et al*., 2006)

เชื้อราที่ปรสิตภายในลำตัวของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชตลอดชีพจักรของรา เช่น *C. auxiliaries* ซึ่งเป็นปรสิตไส้เดือนฝอยเพศเมียของ *Heterodera schachtii*, *H. avenae* และ *Globodera* ส่วนเชื้อรา *Nematophthora gynophila* เข้าทำลายอยู่ภายในลำตัวของไส้เดือยฝอย *Heterodera carotae*, *H. cruciferae*, *H. goettingiana*, *H. schachtii* และ *H. trifolii* โดยปริมาณสปอร์ของเชื้อราจำนวนมากจะอยู่ภายในลำตัวของไส้เดือนฝอย ทำให้ลำตัวบวมเต่ง ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส สปอร์สามารถอยู่ในดินได้นานถึง 5 ปี เนื่องจากสปอร์มีผนังหนา (พัลลภา กฤษณีไพบูลย์, 2534)

**3.3 เชื้อราที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย (egg-parasitic fungi)**

เชื้อรากลุ่มนี้เป็นปรสิตต่อไส้เดือนฝอยได้ดีในขณะที่ไส้เดือนฝอยไม่เคลื่อนที่ เช่น ในระยะไข่ (Nordbring-Hertz *et al*., 2006) โดยเชื้อใช้เส้นใยแผ่ขยายรอบผนังของไข่ ต่อมาจะแทงทะลุเข้าไปภายในไข่และทำลายไข่ที่กำลังเจริญเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ เชื้อราที่พบเป็นชนิดแรก คือ *Verticillium chlamydosporium* ต่อมาพบอีกหลายชนิด เช่น *V. bulbillosum*, *Mortierella nana*, *Acremonium bacillosporum*, *Helicoon farinosum* และ *Paecilomyces lilacinus* ซึ่งสามารถเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita*, *Globodera papillida* และ *G. rostochiensis* เชื้อราบางชนิดจะเข้าทำลายทางช่องเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ หรือส่วนคอที่ฉีกขาด จากนั้นจะเจริญและแผ่เส้นใยล้อมรอบไข่ที่อยู่ภายในลำตัวของไส้เดือนฝอยอีกทีหนึ่ง โดยเชื้อรา *Verticillium* เป็นเชื้อที่สำคัญชนิดหนึ่งในกลุ่มนี้ ซึ่งมีการบันทึกไว้ว่าเชื้อสามารถเข้าทำลายถุงหรือไข่

ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne*, *Globodera* และ *Heterodera* ส่วนเชื้อรา *P. lilacinus* ที่พบกระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตอบอุ่น โดยเป็นเชื้อราที่มีสายพันธุ์ใกล้ชิดกับเชื้อรา *Penicillium* เป็นสายพันธุ์สำคัญสายพันธุ์หนึ่งที่ทำให้เกิดความสนใจในการนำมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยโดยชีววิธี (Stirling, 1991)

**4. การแยกเชื้อราปฏิปักษ์และการทดสอบศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย**

ภมรทิพย์ อักษรทอง (ม.ป.ป.) สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชบนที่สูงภายในศูนย์พัฒนาจำนวน 8 ศูนย์ ของมูลนิธิโครงการหลวง ได้แก่ ศูนย์พัฒนาหนองหอย แม่ปูนหลวง ขุนวาง ม่อนเงาะ แม่แฮ ปางดะ ห้วยน้ำริน และอ่างขาง จากนั้นนำดินมาแยกหาเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอย ด้วยวิธี Scattering method พบเชื้อรา *Monacrosporium bembicodes* (Drechsler) Subram. จากศูนย์พัฒนาหนองหอยและแม่ปูนหลวง เชื้อรา *M. aphrobrochum* (Drechsler) Subram. จากปางดะ เชื้อรา *Arthrobotrys oligospora* Fres. จากขุนวาง ม่อนเงาะ แม่แฮ ปางดะ และห้วยน้ำริน เชื้อรา *A. conoides* Drechsler จากหนองหอย แม่ปูนหลวง และอ่างขาง ส่วนศูนย์พัฒนาที่มีทั้ง *A. oligospora* Fres. และ *A. conoides* Drechsler ได้แก่ ศูนย์พัฒนาปางดะ ห้วยน้ำริน และขุนวาง

กนกพรรณ โสมาศรี (2544) ศึกษาศักยภาพของเชื้อราในดินสำหรับควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในมะเขือเทศ โดยแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมและตัวอย่างดินจากแปลงปลูกมะเขือเทศและพืชผัก ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน โดยนำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด 193 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปรสิตต่อกลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (egg) และตัวอ่อนระยะที่ 2 (juvenile stage 2 หรือ J2) ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* พบเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดี คือ *Curvularia lunata* (EKK 0101), *Paecilomyces lilacinus* (EKK 0503), *Penicillium* sp. (SKK 3003 และ SUD 0806) เมื่อนำเชื้อราดังกล่าวและเชื้อราจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) คือ *P. lilacinus* และ *T. harzianum* ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศพันธุ์สีดา ที่ปลูกในกระถางในสภาพเรือนทดลอง พบว่า การเจิญเติบโตของมะเขือเทศ (ความสูง น้ำหนักสด น้ำหนักรากสด) ความรุนแรงการเกิดปม (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อระบบราก) และจำนวน J2 ในดินปลูกมะเขือเทศ ซึ่งปลูกเชื้อราแต่ละไอโซเลทในอัตราต่างๆร่วมกับไส้เดือนฝอยรากปม มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยเชื้อรา *C. lunata* (EKK 0101) ทำให้มะเขือเทศมีการเจิญเติบโตดีที่สุด เชื้อรา *Penicillium* sp. (SKK 3003) ทำให้เกิดรากปมน้อยที่สุด

และพบจำนวน J2 ในดินน้อยที่สุดจากเชื้อรา *C. lunata* (EKK 0101) และ *Penicillium* sp. (SUD 0806)

ยุวดี ชูประภาวรรณ และคณะ (2550) สำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราในดินจากแหล่งปลูกพืชที่มีการระบาดของโรครากปมจากพืช 17 ชนิด ใน 31 แปลงปลูกในเขตภาคตะวันเฉียงเหนือตอนล่าง สามารถแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยได้ 618 ไอโซเลท เช่น *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, *Penicillium digitatum*, *P. purpurogenum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *Aspergillus niger* และ *A. parasiticus* และแยกเชื้อราจากดินได้ 1,207 ไอโซเลท เช่น *Lecanicillium tenuipes*, *Talaromyces flavus*, *Penicillium marneffei*, *P. lilacinus*, *Botrytis* sp., *Metarhizium anisopliae*, *P. spinulosum*, *P. frequentans*, *P. fungiculosum*, *P. nigrican*, *P. islandicum*, *Trichoderma* sp., *T. harmatum*, *Rhizopus* sp., *A. niger* และ *Aureobasidium* sp. เมื่อนำเชื้อราทั้งหมด 1,825 ไอโซเลท มาทดสอบการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) ของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) สามารถคัดเลือกเชื้อราได้จำนวน 60 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการเข้าทำลายไข่ (eggs) ไส้เดือนฝอยรากปม ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราสามารถเข้าทำลายไข่เฉลี่ยตั้งแต่ 1.60-84 เปอร์เซ็นต์ การฟักไข่ลดลงตั้งแต่ 10.31-53.90 เปอร์เซ็นต์ และสามารถควบคุมการเกิดปมที่รากถั่วเขียวได้ตั้งแต่ 0-95.83 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองดังกล่าว สามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีจำนวน 11 ไอโซเลท ได้แก่ *Lecanicillium tenuipes* (SYT14-11 และ SNM77-06), *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (EUB02-08), *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (EUB02-02, EYT11-09 และ EUB26-01), *Talaromyces flavus* (SSK17-07), *Penicillium marneffei* (SUB01-13), *Paecilomyces. lilacinus* (SSR21-09) และเชื้อราที่ยังไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้อีก 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท ESR41-06 และ SSR24-09

Cabanillas และคณะ (1989) นำเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* จำนวน 13 ไอโซเลท จากสถานที่ต่างๆ ที่มีความแตกต่างกันทางลักษณะภูมิศาสตร์ มาทดสอบอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพของเชื้อในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในมะเขือเทศ พบว่าเชื้อรา *P. lilacinus* ที่ควบคุม *M. incognita* ได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลทจากประเทศเปรู และไอโซเลทที่ผสมจากสถานที่ต่างๆร่วมกัน และพบว่าเชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 24 ถึง 30 องศาเซลเซียส โดยวัดจากน้ำหนักแห้งของเส้นใย เชื้อเจริญได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 12 ถึง 36 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิของดินสูงขึ้นจาก 16 ถึง 28 องศาเซลเซียส จะพบการเข้าทำลายของ *M. incognita* เพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) ของเชื้อ *P. lilacinus* ที่เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ผลการทดสอบยังพบอีกว่า การใช้เชื้อ *P. lilacinus* ในการควบคุม *M. incognita*

ส่งผลให้การเกิด gall ที่ราก อาการ necrosis และพัฒนาการของไข่ไส้เดือนฝอยลดลง และส่งเสริมการเจริญของส่วนยอด

Zhang และคณะ (1996a) สำรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ 2 ชนิด คือ *Monacrosporium guizhouense* และ *Monacrosporium yunnanense* จากทั้งหมด 22 ชนิด ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและโรครากปมในบางมณฑลของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน

Zhang และคณะ (1996b) สำรวจเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยในดินจากภูเขา Fanjing มณฑล Guizhou ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยการนำตัวอย่างดินที่ปะปนไปด้วยรากพืชที่ย่อยสลาย วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2% corn meal agar (CMA) โดยใช้ไส้เดือนฝอย *Paragrellus redivius* ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยหากินอิสระ (free-living nematode) จำนวน 1,000 ตัว เป็นเหยื่อล่อ โดยรายงานการพบ *Arthrobotrys obovata* ซึ่งเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ จากวิธีการคล้ายคลึงกันนี้ Liu และ Zhang (2003) รายงานการค้นพบเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ *Dactylella shizishanna* ที่ได้จากการสำรวจดินบนภูเขา Shizi ส่วน Su และคณะ (2005) รายงานการค้นพบเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ *Monacrosporium multiseptatum* ที่ได้จากสำรวจดินในมณฑลยูนาน ขณะที่ Yang และคณะ (2005) รายงานการค้นพบเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ *Dactylellina illaqueata* ที่ได้จากสำรวจดินในมณฑลยูนาน และได้ทำการวิเคราะห์ phylogenetic analysis ด้วย 18S rDNA ของเชื้อที่พบ เพื่อยืนยันการค้นพบเชื้อชนิดใหม่ ต่อมา Zhang และคณะ (2005) สำรวจดินในมณฑลยูนานตะวันตก พบเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ คือ *Dactylella zhongdianensis* เมื่อนำไปทดสอบศักยภาพการควบคุมไส้เดือนฝอยบนอาหาร Water Agar (WA) โดยใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช 2 ชนิด คือ *Bursaphelenchus xylophilus* และ *Meloidogyne arenaria* ร่วมกับ free-living nematode 1 ชนิด คือ *P. redivivus* พบว่า *Dactylella zhongdianensis* สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวข้างต้นได้ 75.6%, 80.3% และ 78.5% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Dactylella zhongdianensis* ไม่ได้เฉพาะเจาะจง (host specific) ต่อการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยชนิดใด

Amer-Zareen และคณะ (2000) แยกเชื้อราที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม โดยสำรวจและเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกพืชในประเทศปากีสถาน ที่แสดงอาการโรครากปม จำนวน 150 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อจากกลุ่มไข่ จากไข่ จากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม และจากดินในแปลงปลูก สามารถแยกเชื้อราที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปมได้ทั้งหมด 28 ชนิด จาก 16 สกุล โดยพบเชื้อที่ยังไม่เคยมีการรายงาน คือ *Aspergillus terreus*. *A. nidulans*, *A. ramarri* และ *Fusarium anthophellum* นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่เป็นการรายงานครั้งแรกในปากีสถาน ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Aspergillus* sp., *Acremonium butyri*,

*Alternaria alternata*, *Catenaria* sp., *Cephalosporium* sp., *Cladosporium cladosporoides*, *Cladosporium* sp., *Cunninghamella elegance*, *Curvularia lunata*, *Fusarium exosporium*, *Fusarium* sp., *Ulocladium atrum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Arthrobotys* sp. และ เชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ 1 ชนิด

Sharon และคณะ (2001) นำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* มาทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne javanica* พบว่า *T. harzianum* ทำให้ gall ที่รากลดลง และยังทำให้น้ำหนักสดของต้นมะเขือเทศที่ถูก *M. javanica* เข้าทำลายแล้วเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบสายพันธุ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ wild-type strain (WT) กับสายพันธุ์ proteinase Prb1-transformed line (P-2) พบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถควบคุมไข่ และ second-stage juveniles (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีพอกัน แต่สายพันธุ์ P-2 จะควบคุมกลุ่มไข่ได้ดีมากขึ้น

Li และคณะ (2003) รายงานการค้นพบเชื้อรา *Monacrosporium janus* ซึ่งเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยแบบสร้างกับดัก (nematode-trapping hyphomycete) สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Sclerotinia sclerotiorum* ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในถั่วเหลือง โดยพบว่า *M. janus* เป็น mycoparasite ที่มีกลไกการควบคุมโดยใช้เส้นใยไปพันรอบเส้นใยของ *S. sclerotiorum* และเจริญปกคลุมโครงสร้าง sclerotia ของ *S. sclerotiorum*

Hao และคณะ (2004) สำรวจเชื้อราในน้ำที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอย บริเวณทะเลสาบ Dianchi ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยนำไม้ที่จมอยู่ในน้ำมาแยกเชื้อ และนำตะกอนดินบริเวณผิวน้ำมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA ใช้ไส้เดือนฝอย *Paragrellus redivius* เป็นเหยื่อล่อ ซึ่งพบเชื้อรา *Dactylella* ชนิดใหม่ คือ *Dactylella dianchiensis* ต่อมา Hao และคณะ (2005) ศึกษานิเวศวิทยาของ nematode-trapping hyphomycetes ในน้ำทางภาคตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศ โดยเก็บตัวอย่างตะกอนดินใต้แหล่งน้ำต่างๆและสระบัวกว่า 1,000 ตัวอย่างมาแยกเชื้อ พบ nematode-trapping hyphomycetes ส่วนใหญ่ที่ระดับความลึกของน้ำ 20 เซนติเมตร และไม่พบเลยที่ระดับความลึกของน้ำ 4 เมตร โดยพบ nematode-trapping hyphomycetes ถึง 35 ไอโซเลท ส่วนมากได้แก่ *Arthrobotrys oligospora*, *A. musiformis*, *Monacrosporium thaumasium* และ *M. longiphorum* โดยพบว่าเป็นเชื้อที่สร้างกับดักแบบ adhesive networks มากที่สุด

Khan และคณะ (2006) ทดสอบการใช้เชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* และ *Monacrosporium lysipagum* ในการควบคุมไส้เดือนฝอย 3 ชนิด คือ ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne javanica*) ในมะเขือเทศ ไส้เดือนฝอย cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) ในข้าวบาร์เลย์ และไส้เดือนฝอย burrowing nematode (*Radopholus similis*) ในกล้วยที่เพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อ (tissue culture) ทำการทดสอบการควบคุมโดยใช้เชื้อแต่ละชนิดและใช้เชื้อทั้งสองร่วมกัน ผลการทดสอบพบว่า การเกิดปมในมะเขือเทศลดลง 62% ตัวอ่อนระยะ juveniles ของ *M. javanica* ลดลง 94% และ cyst ที่เกิดจาก *H. avenae* ลดลง 65% จากการใช้เชื้อทั้งสองร่วมกัน ส่วนการควบคุม *R. similis* พบว่าถ้าใช้เชื้อ *Monacrosporium lysipagum* อย่างเดียวสามารถควบคุมได้ 86% และควบคุมได้ 96% เมื่อใช้เชื้อทั้งสองร่วมกัน

Kiewnick และ Sikora (2006) ทดสอบการใช้เชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* strain 251 (PL251) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำการจำหน่ายในเชิงพานิชย์ ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในมะเขือเทศ พบว่า PL251 สามารถลดการเกิด gall ที่ราก 66% ลดจำนวนกลุ่มไข่ (egg mass) 74% และลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมบริเวณราก 71% นอกจากนี้ยังพบว่าการควบคุมจะได้ผลมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น conidia ของ PL251

Sun และคณะ (2006) แยกเชื้อราจากไข่และตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. ที่ได้จากการสำรวจรากพืช และดินที่พบการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 455 ไอโซเลท จาก 24 genus ซึ่งได้แก่ *Paecilomyces lilacinus* (49.3% จากไอโซเลททั้งหมด), *Fusarium* spp. (7.9%), *Pochonia chlamydosporia* (6.9%), *Penicillium* spp. (5.7%), *Aspergillus* spp. (3.2%) และ *Acremonium* spp. (2.8%) นอกจากนี้ยังพบ actinomycetes 52 ไอโซเลท (10.3%) โดยพบว่าเป็นเชื้อราและ actinomycetes ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไข่ไส้เดือนฝอย ซึ่งส่งผลต่อการฟักไข่และการเคลื่อนที่ของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยทั้งสิ้น 350 ไอโซเลท โดยมี 29.1% ที่เป็นปรสิตต่อไข่ไส้เดือนฝอยมากกว่า 90% หลังทดสอบได้ 4 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราและ actinomycetes จำนวน 17 ไอโซเลท ทำให้การฟักไข่ของไส้เดือนฝอยต่ำกว่า 10% และ 3 ไอโซเลท ยับยั้งการฟักไข่ได้ทั้งหมด หลังผ่านไป 7 วัน เมื่อนำเชื้อรา 17 ไอโซเลท และ actinomycetes 4 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพไปทดสอบในเรือนกระจก พบว่าลดการ gall ในรากมะเขือเทศได้ 13.4-58.9%

Su และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของสถานที่และฤดูกาลที่มีต่อ nematode-trapping fungi ในมูลปศุสัตว์ โดยทำการเก็บตัวอย่างมูลปศุสัตว์ 660 ตัวอย่าง จากที่ราบสูง 3 แห่ง ที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเลต่างกัน แถบมณฑลยูนานตะวันตก ประเทศจีน โดยนำมูลปศุสัตว์ 2-3 กรัม มา spread plates กับอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA ใส่ไส้เดือนฝอย *Paragrellus redivius* เป็นเหยื่อล่อประมาณ 200 ตัวต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบ nematode-trapping fungi ทั้งหมด 17 species โดยพบเชื้อรากลุ่มหลักๆที่พบจากที่ราบสูงทั้ง 3 แห่งที่เก็บตัวอย่าง คือ *Arthrobotrys oligospora*, *A. musiformis*, *Monacrosporium ellipsosporum* และ *M. thaumasium* โดยพบว่าเป็นเชื้อราที่สร้าง

กับดักแบบ adhesive networks มากที่สุด นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบ nematode-trapping fungi มากที่สุดในฤดูร้อน รองลงมา คือ ฤดูใบไม้ร่วง ฤดูใบไม้ผลิ และฤดูหนาว ตามลำดับ

Sharma และ Pandey (2009) ทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* โดยชีววิธี ในพืชสมุนไพร *Withania somnifera* โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces* lilacinus, *Arthrobotrys oligospora* และสารสกัดสะเดา (*Azadiracta indica*) เปรียบเทียบกับการควบคุมโดยใช้สารเคมี carbofuran โดยผลการทดสอบต่างๆ ที่ความเชื่อมั่นทางสถิติ 95% พบว่า gall ที่รากลดลงได้ดีที่สุดเมื่อใช้เชื้อ *T. harzianum* และสารเคมี carbofuran ในการควบคุม ตามมาด้วย *P. lilacinus*, *A. oligospora* และ Neem compound ตามลำดับ การใช้เชื้อ *P. lilacinus* ทำให้ได้น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวของยอดและรากมากที่สุด รองลงมาคือ การใช้เชื้อ *T. harzianum* ส่วนการใช้เชื้อ *A. oligospora* แสดงให้เห็นว่าความยาวของรากเพิ่มขึ้น การใช้สารสกัดสะเดามีส่วนช่วยในการส่งเสริมการเจริญ นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าการใช้สารเคมี carbofuran ส่วนยอดและรากมีน้ำหนักสด รากมีน้ำหนักแห้ง และความยาวรากดีกว่าการใช้สารสกัดสะเดา

Naserinasab และคณะ (2011) ประเมินความสามารถของเชื้อ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ BI ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne javanica* โดยทำ Culture filtrates ของเชื้อในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน โดยพบว่า ถ้าอัตราส่วนของเชื้อ *T. harzianum* สายพันธุ์ BI เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการควบคุม *M. Javanica* ก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

Shamalie และคณะ (2011) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Trichoderma viride* ที่ผสมกับวัสดุต่างๆที่ใช้ในการเพาะปลูก เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี Carbofuran ที่มีชื่อการค้าว่า Curator® ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ที่เข้าทำลายต้นใบบัวบก Gotukola (*Centella asiatica* L.) พบว่า เชื้อ *T. viride* ที่ผสมกับวัสดุต่างๆที่ใช้ในการเพาะปลูก ทั้งการผสมกับปุ๋ยหมัก ผสมกับมูลไก่ ผสมกับปุ๋ยเคมี และที่ผสมกับดิน มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมดีกว่าการใช้สารเคมี Carbofuran อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Zakaria และคณะ (2013) ศึกษาประสิทธิภาพของ soil bioagents ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* พบว่าเชื้อรา *Verticillium chlamydosporium* และ symbiotic แบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมทั้งแบบการใช้เชื้อเดี่ยวๆในการควบคุม หรือการใช้เชื้อทั้งสองชนิดควบคุมร่วมกัน

**5. การตรวจสอบชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยด้วยวิธีชีวโมเลกุล**

Ahrén และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาสายสัมพันธ์ของเชื้อรา nematode-trapping fungi และ closely related nonparasitic species จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ เชื้อราในสกุล *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella*, *Monacrosporium*, *Duddingtonia* ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่มีบรรพบุรุษเดียวกัน (monophyletic group) โดยทำการเพิ่มปริมาณยีนในส่วน 18S rDNA ด้วนเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ คือ NS1, NS8, 18S1rev, 18S2for, 18S2rev, 18S3for, 18s3rev, 18s4for, 18S4rev และ 18S5for เมื่อนำผลที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของเชื้อรา สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สร้างวงแหวนแบบรัดตัว (constricting rings), กลุ่มที่เป็น non-parasitic species และกลุ่มที่สร้างสารกาวเหนียว (adhesive) แบบต่างๆ (ตาข่าย, เส้นใย, ตุ่ม และ non-constricting rings)

Meyer และคณะ (2005) ศึกษาลักษณะสันฐานวิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อรา *Monacrosporium drechsleri* เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Monacrosporium* สายพันธุ์อื่นๆ โดยทำการสกัด DNA ของเชื้อไปทำการเพิ่มปริมาณยีนในส่วน internal transcribed spacers โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 และยีนในส่วน elongation factor 1-alpha (EF1-$\alpha$) โดยใช้ไพรเมอร์ 983F, 2218R, 1567RintB, 1577F และ 2212R ตามลำดับ เมื่อนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์สายสัมพันธ์ พบว่าเชื้อรา *M. drechsleri* มีสายสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *M. ellipsosporum*

Li และคณะ (2006) ศึกษาเชื้อรา nematode-trapping fungi จำนวน 2 ชนิด ที่ถูกค้นพบขึ้นมาใหม่ คือ *Dactylellina sichuanensis* และ *D. varietas* ซึ่งตรวจสอบจากลักษณะสันฐานและวิธีการทางชีวโมเลกุล โดยการสกัด DNA ของเชื้อไปทำการเพิ่มปริมาณยีนในส่วน small subunit ribosomal DNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ NS1 และ NS4 ยีนในส่วน large subunit ribosomal DNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LROR และ LR5 ยีนในส่วน internal transcribed spacers โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 และยีนในส่วน beta tubulin โดยใช้ไพรเมอ ร์Bt1A, Bt1B, Bt2A และ Bt2B ภายหลังวิเคราะห์สายสัมพันธ์แล้ว พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดจัดอยู่ในตระกูล Orbiliaceae

Zhang และคณะ (2013) ได้ใช้เทคนิค PCR ในการศึกษาความสัมพันธ์ของระบบนิเวศวิทยา ต่อความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของเชื้อรา *Arthrobotrys oligospora* ที่พบในประเทศจีน ผลที่ได้พบว่า ระบบนิเวศวิทยามีผลเพียงเล็กน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุ์กรรมของเชื้อ

**วัตถุประสงค์**

1. เพื่อสำรวจและรวบรวมเชื้อราที่มีพฤติกรรมเป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปมในเขตภาคใต้ของประเทศไทย
2. เพื่อทดสอบศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายพริกของเชื้อราทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง
3. เพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีชีวโมเลกุล
4. เพื่อเก็บรวบรวมสายพันธุ์เชื้อราจากการวิจัยในรูปของเชื้อบริสุทธิ์

# บทที่ 2
# วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

## วัสดุและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวด vial บีกเกอร์ flask กระบอกตวง haemacytometer แผ่นสไลด์ และ cover slip
2. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย loop มีดผ่าตัด แท่งแก้วสามเหลี่ยม ปากคีบ cork borer ตะเกียงแอลกอฮอล์ และอื่นๆ
3. microtube, pasture pipette, micro pipette, pipettes tip
4. กระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1
5. หม้อนึ่งความดัน
6. ตู้บ่มเชื้อ
7. ตู้เขี่ยเชื้อ
8. ตู้อบฆ่าเชื้อ
9. เครื่องเขย่าผสม (vortex mixture)
10. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด (analytical balance)
11. กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound และ stereo binocular
12. ตู้เย็น
13. ไมโครเวฟ
14. rotary shaker
15. กล้องถ่ายรูป
16. เครื่อง UV transilluminator
17. วัสดุและอุปกรณ์การเกษตร ได้แก่ เมล็ดพันธุ์พริก กะบะเพาะกล้า กระถางพลาสติก ขนาด 9x7 นิ้ว ป้ายพลาสติก ดินผสม พลาสติกคลุมแปลง ปุ๋ยสูตร 15-15-15 และปุ๋ยสูตร 46-0-0
18. ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*
19. ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืช *Steinernema carpocapsae*

**อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์**

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. Potato dextrose broth (PDB)
3. Water agar (WA)
4. Martin's medium
5. Luria-Bertani medium (LB Broth medium)

**สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

1. 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite (Clorox)
2. 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ ethanol
3. Streptomycin sulfate
4. $HgCl_2$
5. Carbofuran
6. สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน
7. ฟีนอล/คลอโรฟอร์ม
8. เอธิเดียมโบรไมด์
9. 2x Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (2 เปอร์เซ็นต์ CTAB, 100 มิลลิโมลาร์ Tris–HCl, 1.4 โมลาร์ NaCl, 20 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 8)
10. พลาสมิด pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA)
11. 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ใน 0.5x TBE บัฟเฟอร์
12. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)
13. QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)
14. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (Fermentas, Hanover, USA)
15. IPTG (Isopropyl-β-D Thiogalactopyranoside) (Fermentas, Hanover, USA)

**วิธีการทดลอง**

**1. การแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดิน และการทดสอบศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย**

**1.1 การเก็บตัวอย่างดิน**

ทำการเก็บตัวอย่างดินในแปลงปลูกพริกและพืชผัก จากพื้นที่ 10 จังหวัดในเขตภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกระบี่ ตรัง นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ภูเก็ต ยะลา สงขลา สตูล และสุราษฎร์ธานี โดยใช้เหล็กเจาะดิน (soil auger) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.50 เซนติเมตร เจาะลึก 20 เซนติเมตร ไม่จำกัดจำนวนหลุมขึ้นกับขนาดของพื้นที่ ให้ได้ตัวอย่างดินบรรจุในถุงพลาสติกขนาด 30x45 เซนติเมตร บันทึกวันที่และสถานที่เก็บโดยละเอียด นำดินมายังห้องปฏิบัติการ จากนั้นคลุกดินให้ทั่วเป็น composite soil

**1.2 การเตรียมไส้เดือนฝอยแขวนลอย (nematode suspension) และการแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดิน**

เตรียมไส้เดือนฝอยแขวนลอย (nematode suspension) เพื่อใช้เป็นเหยื่อล่อ โดยตักไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืช *Steinernema carpocapsae* นำมาใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ กวนเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำดินมาแยกหาเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยโดยวิธี Scattering method (ภมรทิพย์ อักษรทอง, 2545) โดยใช้ช้อนชาตักดิน 1 ช้อนพูน (ประมาณ 3 มิลลิกรัม) วางลงเบาๆ ตามแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri-dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่บรรจุอาหาร water agar (WA) 1.2% ใช้ micropipette ดูด nematode suspension ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วหยด nematode suspension ลงทั้ง 2 ด้านของแนวดินประมาณด้านละ 0.50 มิลลิลิตร โดยหยดเป็นแนวยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ขนานกับแนวดิน และห่างจากแนวดินประมาณ 2 เซนติเมตร นำจานแก้ววางเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) ตรวจสอบกิจกรรมการเป็นปฏิปักษ์ของ เชื้อราต่อไส้เดือนฝอยทุกวันด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo เมื่อพบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราต่อไส้เดือนฝอย ทำการบันทึกผลและถ่ายรูปเก็บไว้ ภายหลังจากที่เชื้อราได้รับอาหารเพียงพอจะสร้าง conidiophore พร้อม conidia ให้เตรียมเข็มเขี่ย (needle) ลนเปลวไฟที่ปลาย เสร็จแล้วย้าย conidiophore พร้อม conidia มาทำสไลด์กึ่งถาวรใน lactophenol cotton blue เพื่อจัดจำแนกชนิดเชื้อรา ส่วน conidia ที่เหลือนำมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยวิธี single spore isolation หรือ hypha tip isolation ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมกับสเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต (streptomycin sulfate)

ความเข้มข้น 500 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เชื้อราสร้าง conidia ให้ได้จำนวนมาก และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารเอียง PDA สำหรับใช้เป็น inoculum

**2. การแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ และการทดสอบศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย**

**2.1 การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราปฏิปักษ์**

ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ จากพื้นที่ป่าสงวนแห่งชาติพรุควนเคร็ง อ.ชะอวด จ.นครศรีธรรมราช พื้นที่ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร อ.สุไหงโก-ลก จ.นราธิวาส อ่างเก็บน้ำในพื้นที่สวนขวัญเมือง อ.เมือง จ.ยะลา และสระบัวในพื้นที่ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา โดยเริ่มจากการเตรียมจานชื้น (moist chamber) เตรียมโดยใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร โดยตัดกระดาษทิชชู่แบบหนาให้เท่ากับกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นนำมาใส่จานเลี้ยงเชื้อ 3-4 ชิ้น โดยชั้นบนสุดใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วพรมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทุกขั้นตอนกระทำโดยปราศจากการปนเปื้อน (aseptic technique) ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ ตัดให้มีความยาว 5 เซนติเมตร ใส่ในจานชื้น ซึ่งแต่ละจานใส่ตัวอย่าง 3-4 ชิ้น ตามความเหมาะสม นำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ หลังจากบ่มตัวอย่างชิ้นส่วนของพืช 3-4 วัน ทำการตรวจหาเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอย ที่ปรากฏบนตัวอย่างชิ้นส่วนของพืชภายใต้กล้อง stereo เมื่อพบเชื้อราทำการจดบันทึก และนำมาทำสไลด์กึ่งถาวรใน lactophenol cotton blue เพื่อจัดจำแนกชนิดเชื้อรา ทำการแยกเชื้อราที่ได้จากตัวอย่างชิ้นส่วนของพืชโดยใช้วิธี direct isolation ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต ความเข้มข้น 500 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เชื้อราสร้าง conidia ให้ได้จำนวนมาก และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารเอียง PDA สำหรับใช้เป็น inoculum

**2.2 การทดสอบศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย**

นำเชื้อราปฏิปักษ์ที่ได้จากข้อ 2.1 บนอาหาร PDA ที่อายุ 3-5 วัน ไปทดสอบศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา วางชิ้นวุ้นบนอาหาร WA 1.2% ที่บรรจุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร โดยวางในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางของจาน ให้ห่างจากขอบจานเข้ามาประมาณ 2 เซนติเมตร และใช้ micropipette ดูด nematode suspension ที่เตรียมไว้โดยวิธีการเหมือนข้อ 1 โดยดูดมาเพียง 1 มิลลิลิตร แล้วหยด nematode suspension ลงอีกด้านที่ตรงข้ามกับชิ้นวุ้นเป็นแนวยาวประมาณ 2 เซนติเมตร และห่างจากขอบจานเข้ามาประมาณ 2 เซนติเมตร

นำจานวางเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบกิจกรรมการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราต่อไส้เดือนฝอยทุกวันด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo เมื่อพบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราต่อไส้เดือนฝอย ทำการบันทึกผลและถ่ายรูปเก็บไว้

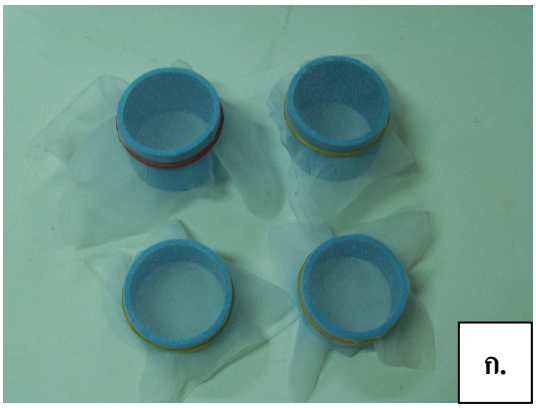
**3. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากกลุ่มไข่ (egg mass) ไส้เดือนฝอยรากปม และดินรอบรากต้นพริกที่เป็นโรครากปม**

**3.1 การเก็บตัวอย่างต้นพริกและดินรอบๆต้นพริกที่เกิดโรครากปม**

เก็บตัวอย่างต้นพริกและดินรอบๆต้นพริกที่เกิดโรครากปมได้ จำนวน 6 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกพริกในจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง ยะลา สงขลา สตูล และสุราษฎร์ธานี โดยเก็บจากแปลงที่มีต้นพริกแสดงอาการเหลืองหรือแคระแกร็น และขุดดินบริเวณรอบๆรากพริก ความลึกไม่เกิน 20 เซนติเมตร อย่างน้อย 500 กรัม ใส่ถุงพลาสติก บันทึกวันที่และสถานที่เก็บโดยละเอียด นำตัวอย่างมาทดสอบต่อที่ห้องปฏิบัติการ

**3.2 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากกลุ่มไข่ (egg mass) ไส้เดือนฝอยรากปม**

นำตัวอย่างรากพริกที่เป็นโรครากปมจากข้อ 3.1 ล้างน้ำเบาๆให้สะอาด เขี่ยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมมาทำการฆ่าเชื้อที่พื้นผิว (surface sterilization) โดยใส่กลุ่มไข่ลงในภาชนะพิเศษที่ทำด้วยท่อพีวีซี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร ที่ปิดส่วนปลายท่อด้วยผ้าไนลอน (ภาพที่ 1) แล้วนำกลุ่มไข่ไปแช่พร้อมเขย่าเบาๆในสารละลาย sodium hypochlorite (NaOCl) เข้มข้น 0.5% โดยปริมาตร นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้งๆละ 2 นาที จากนั้นนำกลุ่มไข่ไปวางบนอาหาร WA 1.2% ที่บรรจุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง (ยุวดี ชูประภาวรรณ และคณะ, 2550) เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากกลุ่มไข่ ใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต ความเข้มข้น 500 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เชื้อราสร้าง conidia ให้ได้จำนวนมาก และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารเอียง PDA สำหรับใช้เป็น inoculum



**ภาพที่ 1** อุปกรณ์ท่อพีวีซี ที่ใช้ในการเตรียมกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม
(ก) ลักษณะของท่อพีวีซี ที่ใช้ในการเตรียมกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม
(ข) กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่บรรจุในท่อพีวีซี แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

**3.3 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากดินรอบรากพริกที่เป็นโรครากปม**

นำตัวอย่างดินจากข้อ 3.1 มาผึ่งลมให้แห้ง นำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh นำดินน้ำหนัก 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เจือจางดินแขวนลอยครั้งละ 10 เท่า (tenfold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น $10^{-3}$ นำมาแยกเชื้อราโดยวิธี spread plate technique โดยดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Martin's medium ที่ผสมสเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต ความเข้มข้น 300 ppm ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และหมุนให้ดินแขวนลอยกระจายคลุกเคล้าในอาหารอย่างทั่วถึง นำไปบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราปรากฏบนอาหาร เลือกเก็บโคโลนีเชื้อราที่มีลักษณะแตกต่างกัน (ดัดแปลงจาก ยุวดี ชูประภาวรรณ และคณะ, 2550) โดยใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต ความเข้มข้น 500 ppm บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เชื้อราสร้าง conidia ให้ได้จำนวนมาก และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารเอียง PDA สำหรับใช้เป็น inoculum

**4. การเตรียมต้นกล้าพริก และการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดสอบ**

**4.1 การเตรียมต้นกล้าพริก**

นำเมล็ดพันธุ์พริกไปเพาะในกระบะเพาะขนาด 27x35 ตารางเซนติเมตร (72 หลุม) ที่บรรจุดินผสมนึ่งฆ่าเชื้อ หลุมละ 1 เมล็ด รดน้ำทุกวัน เมื่อครบ 2 สัปดาห์ ให้ปุ๋ยยูเรีย 46-0-0 จำนวน 10 กรัมต่อต้น แล้วรดน้ำต่อทุกวันจนอายุครบ 1 เดือน จึงคัดเลือกต้นกล้าพริกที่มีการเจริญเติบโตสม่ำเสมอกันไปใช้ในการทดสอบต่อไป

**4.2 การเตรียมไส้เดือนฝอยรากปมบริสุทธิ์**

ทำการเตรียมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ กนกพรรณ โสมาศรี (2544) เริ่มจากนำตัวอย่างต้นพริกที่เป็นโรครากปมที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในข้อ 3.1 เลือกปมรากที่มีกลุ่มไข่สีน้ำตาลของไส้เดือนฝอยรากปม ใช้ปากคีบปลายแหลมเลือกเก็บกลุ่มไข่ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ใส่ในขวด vial ที่บรรจุน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 กลุ่มไข่ นำไปปลูกเชื้อลงต้นพริกที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 ซึ่งได้ย้ายต้นกล้าพริกที่เตรียมไว้ไปปลูกในกระถางขนาด 9x7 นิ้ว ที่มีดินผสมนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และมีที่รองก้นกระถาง เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ทำการปลูกเชื้อโดยใส่กลุ่มไข่ จำนวน 1 กลุ่มไข่/ต้น ในหลุมที่เจาะลึกประมาณ 5 เซนติเมตร ใกล้กับรากพริก แล้วกลบดินฝังกลุ่มไข่ หลังจากปลูกเชื้อ 45 วัน นำรากปมของพริกบางส่วนมาเขี่ยเอาตัวเต็มวัยเพศเมีย ทำการตรวจรอยย่นบริเวณส่วนก้น (perineal pattern) เพื่อเป็นการยืนยันว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยเตรียมชิ้นส่วนก้น จำนวน 10 ชิ้น/สไลด์ ซึ่งมาจากรากพริกต้นเดียวกัน แล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound เปรียบเทียบรอยย่นบริเวณส่วนก้นที่พบกับภาพตัวอย่างมาตรฐานของ International Meloidogyne Project (IMP) ในหนังสือของ Taylor และ Sasser (1978)

**4.3 การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม**

เมื่อได้ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* บริสุทธิ์แล้ว นำรากและดินปลูกที่เหลือไปผสมกับดินนึ่งฆ่าเชื้อ บรรจุลงในกระถางขนาด 9x7 นิ้ว มีที่รองก้นกระถาง เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ย้ายต้นกล้าพริกที่เตรียมไว้มาลงในกระถาง รดน้ำวันละ 1 ครั้ง ใส่ปุ๋ยสูตรเสมอ 15-15-15 จำนวน 20 กรัมต่อต้นทุกๆ 2 สัปดาห์ จนพริกอายุ 60 วัน ซึ่งแสดงอาการรากปมชัดเจน ให้ทำตามวิธีการข้างต้นอีกครั้ง ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ เพื่อให้มีปริมาณรากปมเพียงพอสำหรับการทดสอบต่อไป

**5. การทดสอบการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม**

**5.1 การตรียมกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม**

เขี่ยกลุ่มไข่ที่มีสีน้ำตาลและขนาดใกล้เคียงกันของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จากรากพริกที่แสดงอาการรากปม ใส่ในท่อนท่อพีวีซี (PVC) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร ที่ปิดก้นด้วยผ้าไนลอน ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และแช่ใน $HgCl_2$ ใน ethanol ความเข้มข้น 1,000 ppm นาน 2 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีก 4 ครั้งๆละ 2 นาที (กนกพรรณ โสมาศรี, 2544)

**5.2 การทดสอบการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม**

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 1, 2.1, 3.2 และ 3.3 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 10-15 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา ย้ายชิ้นวุ้นวางบนกลางอาหาร WA 1.2% ที่บรรจุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร นำกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม จำนวน 4 กลุ่มไข่ วางรอบชิ้นวุ้นเชื้อรา โดยมีระยะห่างจากชิ้นวุ้นเชื้อราประมาณ 1 เซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 วัน ตรวจผลการเข้าทำลายกลุ่มไข่ภายใต้กล้อง stereo เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งใช้ชิ้นวุ้นอาหารที่ไม่มีเส้นใยเชื้อรา (กนกพรรณ โสมาศรี, 2544) ทำการตรวจกลุ่มเส้นใยที่เจริญบนกลุ่มไข่และประเมินผลการเข้าทำลายกลุ่มไข่เป็น 3 ระดับ ตามวิธีการของ ยุวดี ชูประภาวรรณ และคณะ (2550) คือ

ระดับ 1 : ไม่พบเส้นใยเชื้อราเข้าทำลายกลุ่มไข่ (not colonization)

ระดับ 2 : พบเส้นใยเชื้อราเข้าทำลายกลุ่มไข่ แต่เส้นใยไม่ปกคลุมกลุ่มไข่ทั้งหมด (colonization)

ระดับ 3 : พบเส้นใยเชื้อราเข้าทำลายกลุ่มไข่ โดยเส้นใยปกคลุมกลุ่มไข่หนาแน่นจนมองไม่เห็นกลุ่มไข่ (full colonization)

**6. การทดสอบการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม**

**6.1 การตรียมไข่ไส้เดือนฝอยรากปม**

นำกลุ่มไข่ที่มีสีน้ำตาลและขนาดใกล้เคียงกันของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite เข้มข้น 1% โดยปริมาตร นาน 3 นาที เพื่อละลายผนังกลุ่มไข่ ทำให้ไข่หลุดออกมา รินผ่านตะแกรงขนาด 500 mesh ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้งๆละ 2 นาที เทไข่ใส่บีกเกอร์ และทำสารแขวนลอย (suspension) ให้มีความหนาแน่นของไข่ประมาณ 100 ไข่/มิลลิลิตร โดยเขย่าทุกครั้งก่อนใช้ในการทดสอบ (กนกพรรณ โสมาศรี, 2544)

**6.2 การเตรียมเชื้อราบริสุทธิ์สำหรับทดสอบ**

คัดเลือกเชื้อราที่มีระดับในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ ในข้อ 4 ที่มีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ระดับ 2.5 ขึ้นไป มาทดสอบการเป็นปรสิตต่อไข่ไส้เดือนฝอยรากปม โดยเลี้ยงเชื้อราบริสุทธิ์ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10-15 วัน เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิเมตร เขย่าเบาๆตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วย haemacytometer ปรับสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ให้มีความเข้มข้น $1.5x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวด vial โดยเขย่าทุกครั้งก่อนใช้ในการทดสอบ (กนกพรรณ โสมาศรี, 2544)

**6.3 การทดสอบการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม**

ดูดไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่มีความหนาแน่น 100 ไข่/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร WA 1.2% ที่บรรจุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราความเข้มข้น $1.5x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงไปผสมบนอาหาร หมุนจานอาหารไปมาเบาๆ เพื่อให้สปอร์และไข่ไส้เดือนฝอยกระจายตัวสม่ำเสมอทั่วทั้งจานอาหาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน สังเกตการเข้าทำลายของเชื้อราเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ที่ไม่ใส่สปอร์ของเชื้อรา ตรวจผลการเข้าทำลายไข่ภายใต้กล้อง stereo โดยการนับไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายและจำนวนไข่ที่ฟัก เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ไข่ที่ถูกเชื้อราแต่ละไอโซเลทเข้าทำลาย และเปอร์เซ็นต์การลดลงของการฟักไข่ (ยุวดี ชูประภาวรรณ และคณะ, 2550)

**7. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมการเกิดปมของรากพริก**

**7.1 การเตรียม inoculum ของเชื้อรา**

นำเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลท จากการทดสอบการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ในข้อ 6.3 และเชื้อรากลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่ดีที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 10-15 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา ย้ายชิ้นวุ้นไปเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 5 ชิ้นต่อถุง บ่มไว้ในความมืดที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญคลุมเมล็ดข้างฟ่างนาน 20 วัน จึงนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (ยุวดี ชูประภาวรรณ และคณะ, 2550)

**7.2 การตรียมกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม**

วิธีการเตรียมเหมือนในข้อ 5.1 แล้วจึงบรรจุกลุ่มไข่ไว้ในขวด vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 กลุ่มไข่/ขวด เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

**7.3 การเตรียมต้นกล้าพริก**

วิธีการเตรียมเหมือนในข้อ 4.1 ทำการคัดเลือกต้นกล้าพริกที่มีการเจริญเติบโตสม่ำเสมอกันมาใช้ในการทดสอบ

**7.4 การปลูกเชื้อราลงบนต้นพริก**

นำดินนึ่งฆ่าเชื้อ 1.5 กิโลกรัม ผสมเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อราเจริญอยู่ 75 กรัม บรรจุลงในกระถางขนาด 9x7 นิ้ว ย้ายต้นกล้าพริกที่เตรียมไว้มาลงในกระถาง รดน้ำวันละ 1 ครั้ง เมื่อย้ายต้นพริกครบ 7 วัน จึงใส่กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่บรรจุในขวด vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร จำนวน 5 กลุ่มไข่/ต้น โดยหยอดลงในหลุมที่เจาะลึกประมาณ 4 เซนติเมตร ใกล้กับรากพริกแล้วกลบดิน วางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งการทดลองเป็น 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 20 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 : ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม + เชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 1

กรรมวิธีที่ 2 : ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม + เชื้อราปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 : ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม + เชื้อราปฏิปักษ์กลุ่มกับดักไส้เดือนฝอย ไอโซเลทที่ 1

กรรมวิธีที่ 4 : ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม + เชื้อราปฏิปักษ์กลุ่มกับดักไส้เดือนฝอย ไอโซเลทที่ 2

กรรมวิธีที่ 5 : ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม + Carbofuran 2.5 กรัม/กระถาง

กรรมวิธีที่ 6 : ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมอย่างเดียว (control)

กรรมวิธีที่ 7 : ต้นพริกปกติที่ไม่ปลูกเชื้อใดๆ (check)

รดน้ำวันละ 1 ครั้ง และใส่ปุ๋ยสูตรเสมอ 15-15-15 จำนวน 20 กรัมต่อต้น ทุกๆ 2 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ 60 วัน ประเมินความรุนแรงในการเกิดปม โดยคิดเปอร์เซ็นต์ตามดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก ซึ่งแบ่งได้เป็น 6 ระดับ ตามวิธีของ Hussey และ Jansaen (2001) ดังนี้

ระดับ 0 : ไม่มีปม

ระดับ 1 : มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย

ระดับ 2 : เกิดปมน้อยกว่า 25% ของระบบราก

ระดับ 3 : เกิดปม 25-50% ของระบบราก

ระดับ 4 : เกิดปม 51-75% ของระบบราก

ระดับ 5 : เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก

วิเคราะห์ผลการทดลองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan’s new multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ดัดแปลงวิธีการจาก กนกพรรณ โสมาศรี, 2544; ยุวดี ชูประภาวรรณ และคณะ, 2550)

**8. การจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมด้วยเทคนิค PCR**

**8.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ**

ดัดแปลงจากวิธีการของ Jeewon และคณะ (2002) โดยนำเชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมการเกิดปมของรากพริก จากการทดสอบในข้อ 7.4 นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นย้ายสปอร์เดี่ยวๆ ของเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-15 วัน เตรียมสปอร์แขวนลอยโดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่นและสปอร์ของเชื้อราให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลง flask ที่มีอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าต่อที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 วัน กรองเส้นใยของเชื้อราด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 ล้างสปอร์เชื้อราด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตรครั้งละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 2-3 ครั้ง เก็บเส้นใยราที่เตรียมได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปแยกสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

**8.2 การแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา**

การแยกสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา ดัดแปลงจากวิธีการของ Jeewon และคณะ (2002) โดยบดเส้นใยเชื้อราในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด นำเส้นใยเชื้อราที่บดละเอียดแล้วใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 2x Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (2 เปอร์เซ็นต์ CTAB, 100 มิลลิโมลาร์ Tris–HCl, 1.4 โมลาร์ NaCl, 20 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 8) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในหลอดหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลายฟีนอล/โคโรฟอร์ม (phenol/Chroloform; 1:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำสารละลายไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายส่วนน้ำใสที่อยู่ด้านบนออกใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ ใหม่ เติม 100 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ตากดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 15-20 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**8.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)**

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราในส่วนของ ribosomal DNA (rDNA) ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ทุกไอโซเลทด้วยเทคนิค PCR ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ นฤมล และคณะ (ม.ป.ป.) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5 (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3') เป็น forward primer และ ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') เป็น reverse primer (Meyer *et al.* , 2005) โดยมีขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาในหลอด PCR ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| ดีเอ็นเอเป้าหมาย | 2.0 | ไมโครลิตร |
| 10x PCR buffer | 2.0 | ไมโครลิตร |
| 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ | 1.0 | ไมโครลิตร |
| 10 มิลลิโมลาร์ dNTP | 1.0 | ไมโครลิตร |
| 100 พิโคโมลาร์ ITS5 | 0.7 | ไมโครลิตร |
| 100 พิโคโมลาร์ ITS4 | 0.7 | ไมโครลิตร |
| *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 0.1 | ไมโครลิตร |
| RNase-free water | 12.5 | ไมโครลิตร |

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำส่วนผสมเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ตั้งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็คโตโฟริซิส (agarose gel electrophoresis) ใน 0.5x TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบร์ไมด์ นาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (rDNA) ที่เพิ่มปริมาณได้บนเครื่อง UV transilluminator ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจล แยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)

**8.4 การโคลนยีน rDNA และ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์**

เชื่อมต่อชิ้นยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อราแต่ละไอโซเลทเข้ากับ พลาสมิด pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, Madison, USA) ทั้งนี้การเชื่อมต่อยีน rDNA ของเชื้อราแต่ละไอโซเลทกับพลาสมิด pGEM-T Easy จะทำแยกหลอดกันซึ่งในปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แต่ละหลอดประกอบด้วย

| | | |
|---|---|---|
| ดีเอ็นเอ (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 10.0 | ไมโครลิตร |
| 2x Rapid ligation buffer | 1.0 | ไมโครลิตร |
| พลาสมิด pGEM-T Easy (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) | 0.5 | ไมโครลิตร |
| เอนไซม์ T4 DNA Ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร) | 1.0 | ไมโครลิตร |
| น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ | 7.5 | ไมโครลิตร |

ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) เคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมแต่ละชนิดเข้าสู่ competent cell ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5$\alpha$ (Qiagen, Hilden, Germany) ด้วยวิธี Heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วแช่น้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นดูดสารละลายแบคทีเรียทั้งหมดใส่ลงในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2xYT+ Amp) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีน rDNA ของเชื้อราด้วยวิธี blue-white selection โดยดูดสารละลายเซลล์แบคทีเรียปริมาตรอย่างละ 300 ไมโครลิตร spread แยกกันบนอาหารแข็ง 2xYT+Amp ที่เติม IPTG (Isopropyl-$\beta$-D Thiogalactopyranoside) (Fermentas, Hanover, USA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ และ X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-$\beta$-D-galactoside) (Fermentas, Hanover, USA) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (Sambrook *et al*., 1989) ตรวจสอบโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 ตามวิธีการในข้อ 8.3 จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วย High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan) นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป โดยใช้คู่ไพรเมอร์ T7 และ SP6 และจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Blast)

# บทที่ 3
# ผลการทดลอง

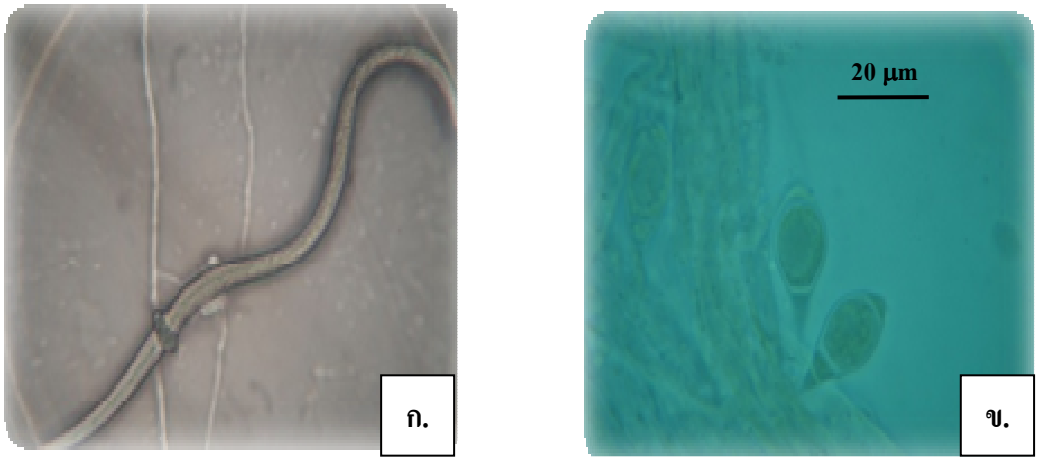
**1. การแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดิน และการทดสอบศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย**

เก็บตัวอย่างดินในแปลงปลูกพริกและพืชผัก จากพื้นที่ 10 จังหวัดในเขตภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดกระบี่ ตรัง นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ภูเก็ต ยะลา สงขลา สตูล และสุราษฎร์ธานี จำนวน 31 ตัวอย่าง เมื่อนำดินมาแยกหาเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยโดยวิธี Scattering method และตรวจสอบกิจกรรมการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราต่อไส้เดือนฝอย จากการสำรวจพบเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอย จำนวน 38 ไอโซเลท จำแนกเป็นเชื้อรากลุ่มกับดักไส้เดือนฝอย จำนวน 35 ไอโซเลท ได้แก่ *Arthrobotrys oligospora* จำนวน 4 ไอโซเลท, *Monacrosporium aphrobrochum* จำนวน 7 ไอโซเลท, *M. bembicodes* จำนวน 14 ไอโซเลท, และ *M. thaumasium* จำนวน 10 ไอโซเลท โดยเชื้อรา *M. aphrobrochum* (ภาพที่ 2) และ *M. bembicodes* (ภาพที่ 3) จะสร้างกับดักแบบวงแหวนรัดตัวได้ (constricting rings) ส่วน *M. thaumasium* (ภาพที่ 4) และ *A. oligospora* (ภาพที่ 5) จะใช้ตาข่ายเส้นใยที่มีสารกาวเหนียว (adhesive networks) ในการดักจับไส้เดือนฝอย นอกจากนี้ยังสำรวจพบเชื้อราในกลุ่มที่เป็นปรสิตภายใน (endoparasites) ได้แก่ *Harposporium cycloides* (ภาพที่ 6) จำนวน 3 ไอโซเลท รายละเอียดตามข้อมูลในตารางที่ 2

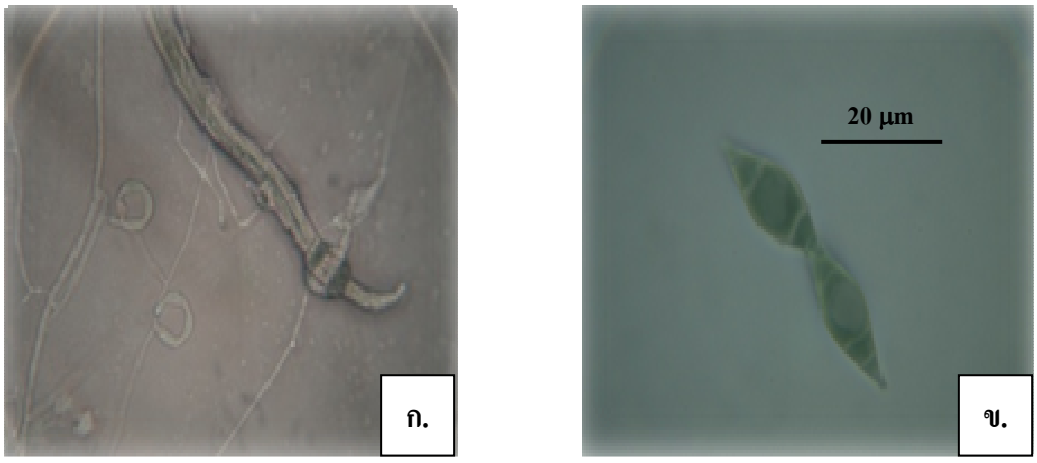
**2. การแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ และการทดสอบศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย**

เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ จากพื้นที่ป่าสงวนแห่งชาติพรุควนเคร็ง อำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช พื้นที่ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร อำเภอสุไหงโก-ลก จังหวัดนราธิวาส อ่างเก็บน้ำในพื้นที่สวนขวัญเมือง อำเภอเมืองยะลา จังหวัดยะลา และสระบัวในพื้นที่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยวิธี Moist chamber ตรวจหาเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอย ที่ปรากฏบนตัวอย่าง และตรวจสอบกิจกรรมการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราต่อไส้เดือนฝอย จากการสำรวจพบเชื้อรากลุ่มกับดักไส้เดือนฝอย จำนวน 19 ไอโซเลท ได้แก่ *A. oligospora* จำนวน 1 ไอโซเลท, *M. aphrobrochum* จำนวน 4 ไอโซเลท, *M. bembicodes*

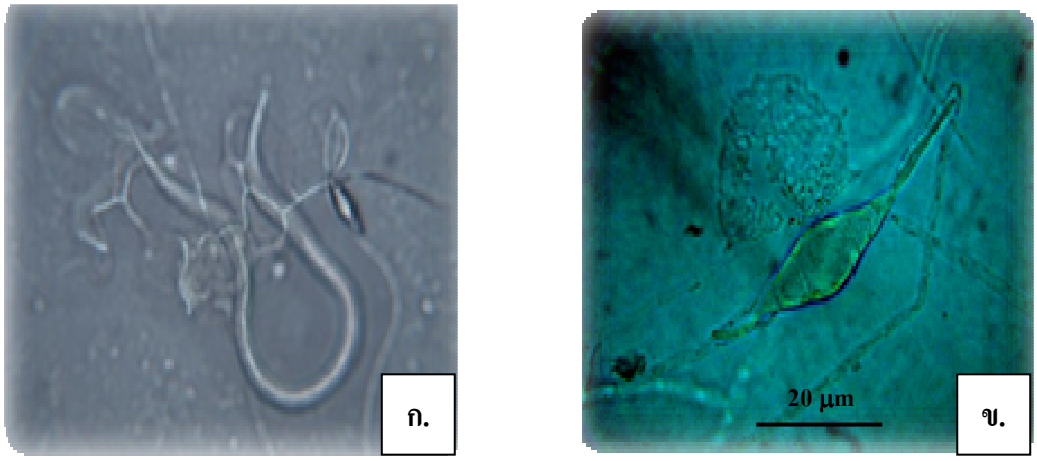
จำนวน 8 ไอโซเลท และ *M. thaumasium* จำนวน 6 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) สำหรับลักษณะของเชื้อราปฏิปักษ์กลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยที่พบ ทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3



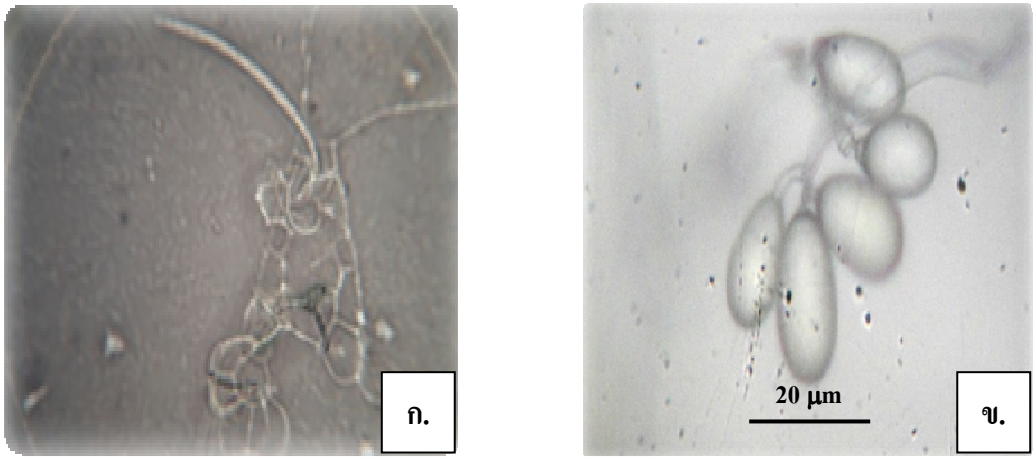

**ภาพที่ 2** *Monacrosporium aphrobrochum* (Drechsler) Subram.
(ก) วงแหวนรัดตัวได้ (constricting rings) ที่ใช้ในการดักจับไส้เดือนฝอย
(ข) ลักษณะ conidia



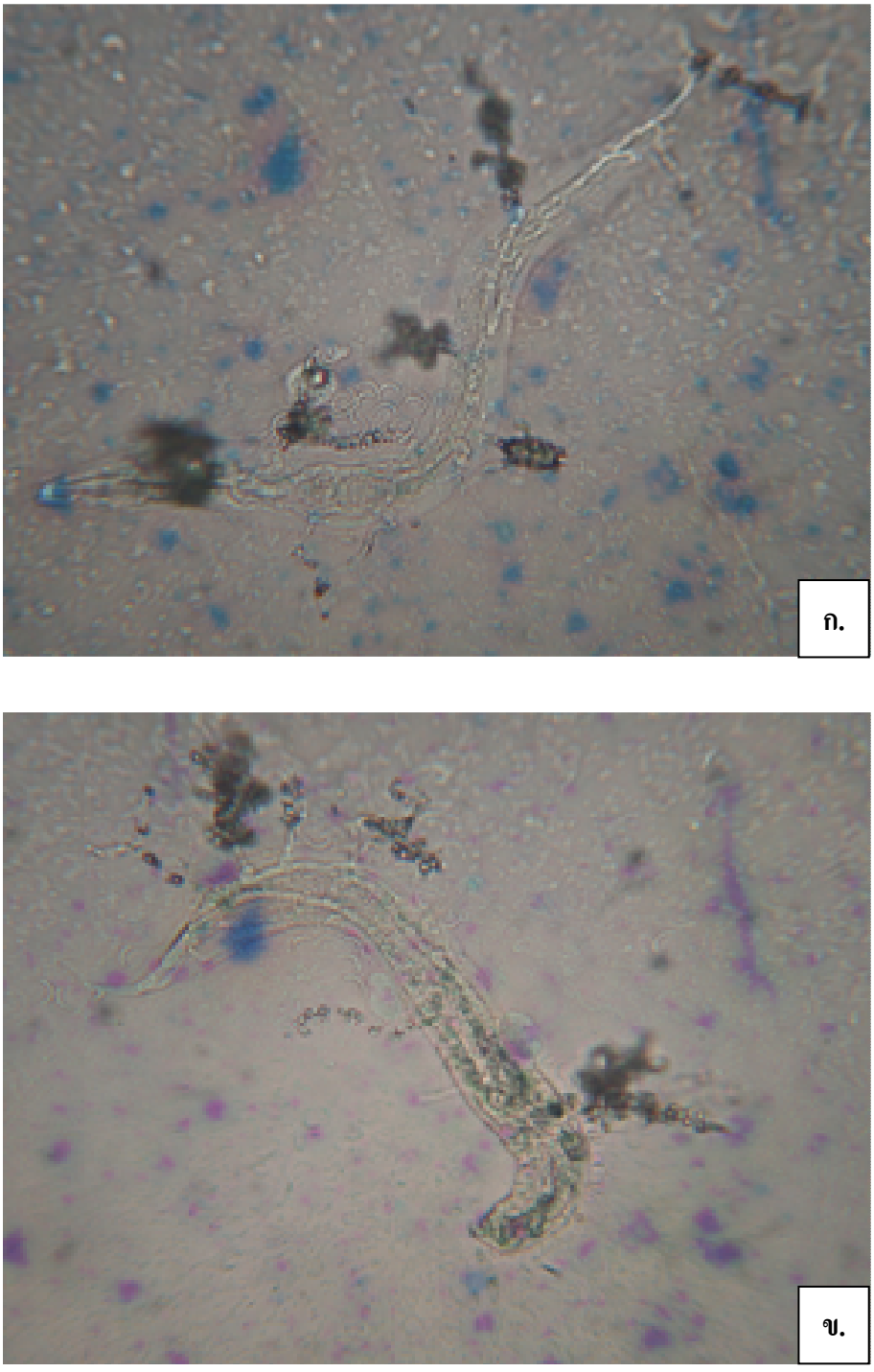

**ภาพที่ 3** *Monacrosporium bembicodes* (Drechsler) Subram.
(ก) วงแหวนรัดตัวได้ (constricting rings) ที่ใช้ในการดักจับไส้เดือนฝอย
(ข) ลักษณะ conidia




**ภาพที่ 4** *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler) de Hoog & Oorschot.
(ก) ตาข่ายเส้นใยที่มีสารกาวเหนียว (adhesive networks) ที่ใช้ในการดักจับไส้เดือนฝอย
(ข) ลักษณะ conidia




**ภาพที่ 5** *Arthrobotrys oligospora* Fres.
(ก) ตาข่ายเส้นใยที่มีสารกาวเหนียว (adhesive networks) ที่ใช้ในการดักจับไส้เดือนฝอย
(ข) ลักษณะ conidia




**ภาพที่ 6** *Harposporium cycloides* (endoparasites)

(ก) ไอโซเลท SS18-01

(ข) ไอโซเลท SS18-04

**ตารางที่ 2** สถานที่เก็บตัวอย่าง และจำนวนไอโซเลทของเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอย ที่แยกเชื้อได้จากตัวอย่างดิน และจากชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ

| จังหวัด | จำนวนไอโซเลท | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ***A. oligospora*** | ***M. aphrobrochum*** | ***M. bembicodes*** | ***M. thaumasium*** | ***H. cycloides*** |
| **ตัวอย่างดิน** | | | | | |
| กระบี่ (2 ตัวอย่าง) | 1 | - | - | 4 | - |
| ตรัง (1 ตัวอย่าง) | - | - | 2 | - | - |
| นครศรีธรรมราช (12 ตัวอย่าง) | 2 | 2 | - | - | - |
| พังงา (1 ตัวอย่าง) | - | - | 1 | 3 | - |
| พัทลุง (1 ตัวอย่าง) | - | - | - | - | - |
| ภูเก็ต (1 ตัวอย่าง) | - | - | 5 | - | 3 |
| ยะลา (1 ตัวอย่าง) | - | - | - | - | - |
| สงขลา (7 ตัวอย่าง) | 1 | 3 | 4 | 2 | - |
| สตูล (1 ตัวอย่าง) | - | - | - | - | - |
| สุราษฎร์ธานี (4 ตัวอย่าง) | - | 2 | 2 | 1 | - |
| **รวม (1)** | **4** | **7** | **14** | **10** | **3** |
| **ส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ** | | | | | |
| นครศรีธรรมราช | 1 | 2 | 4 | 1 | - |
| นราธิวาส | - | - | 2 | 2 | - |
| สงขลา | - | 1 | 1 | 2 | - |
| ยะลา | - | 1 | 1 | 1 | - |
| **รวม (2)** | **1** | **4** | **8** | **6** | **-** |
| **รวมทั้งสิ้น (1+2)** | **5** | **11** | **22** | **16** | **3** |

**ตารางที่ 3** เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราปฏิปักษ์กลุ่มกับดักไส้เดือนฝอย ที่พบจากการสำรวจ

| ลักษณะ | *A. oligospora* | *M. aphrobrochum* | *M. bembicodes* | *M. thaumasium* |
|---|---|---|---|---|
| - ชนิดกับดัก | ตาข่ายเส้นใย ที่มีสารกาวเหนียว (adhesive networks) | วงแหวนรัดตัวได้ (constricting rings) | วงแหวนรัดตัวได้ (constricting rings) | ตาข่ายเส้นใย ที่มีสารกาวเหนียว (adhesive networks) |
| - เส้นใย | ใส (hyaline) | ใส (hyaline) | ใส (hyaline) | ใส (hyaline) |
| - โคนิเดีย | | | | |
| รูปร่าง | คล้ายรูปไข่ (obovoid) | ทรงรี ตรงกลางโป่ง คล้ายกระสวย (broadly or spindle) | รูปทรงรี (ellipsoid) | ทรงรี ตรงกลางโป่ง คล้ายกระสวย (broadly or spindle) |
| ผนังกั้น | 1 | 2 | 2-3 | 2-3 |
| เม็ดสี | ใส (hyaline) | ใส (hyaline) | ใส (hyaline) | ใส (hyaline) |
| ความกว้าง (ไมครอน) | 11.33-14.17 | 14.63-15.98 | 12.19-14.82 | 15.42-17.97 |
| ความยาว (ไมครอน) | 21.18-23.40 | 29.19-31.65 | 32.82-34.99 | 34.69-39.15 |
| - การเจริญบนอาหาร PDA เมื่ออายุ 7 วัน (เซนติเมตร) | 9.00 | 7.96 | 7.88 | 7.42 |

**3. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากกลุ่มไข่ (egg mass) ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และดินรอบรากต้นพริกที่เป็นโรครากปม**

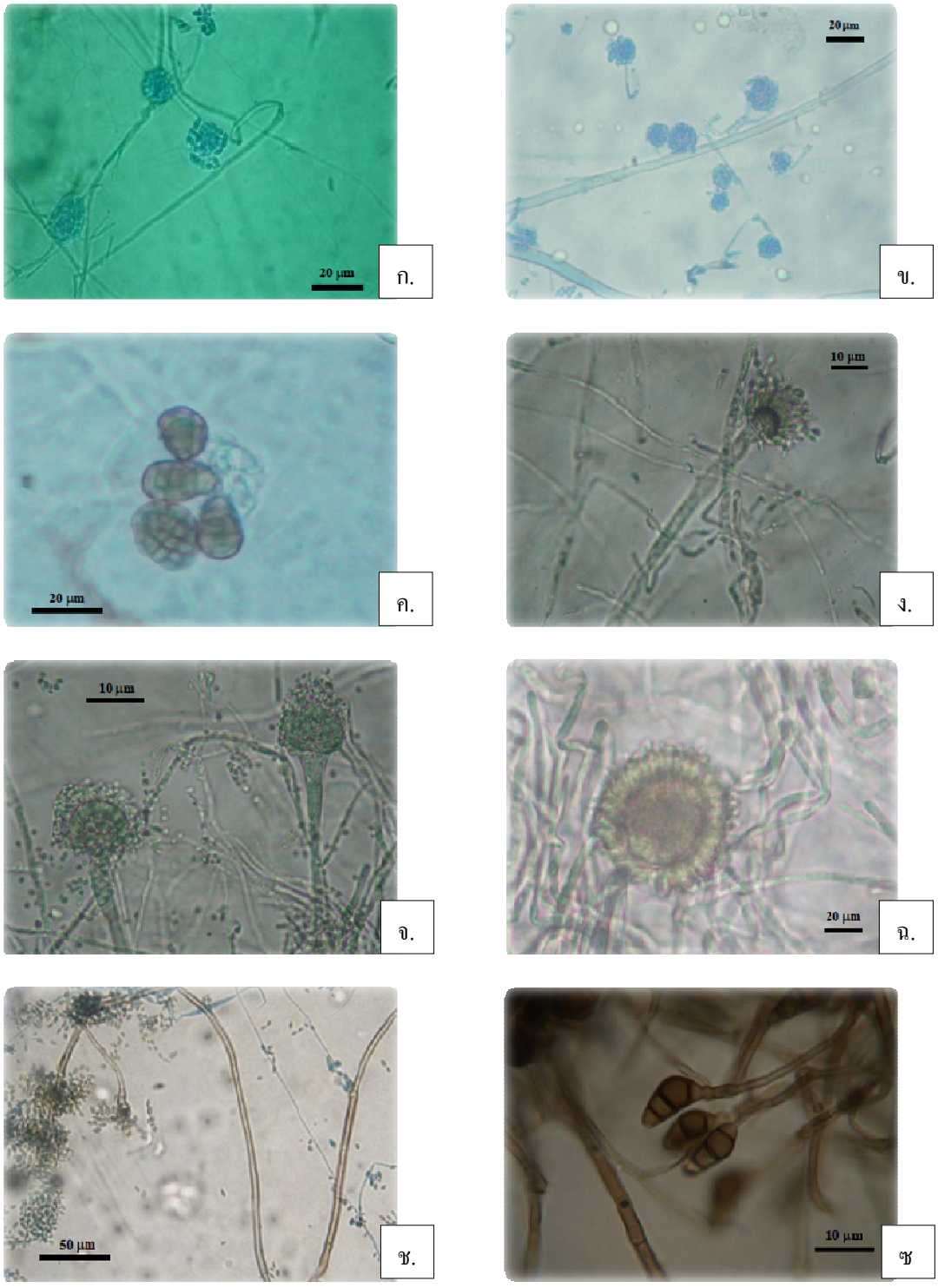
เก็บตัวอย่างต้นพริกและดินรอบๆต้นพริกที่เกิดโรครากปมได้ จำนวน 6 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกพริกในจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง ยะลา สงขลา สตูล และสุราษฎร์ธานี นำรากพริกมาแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ จำนวน 60 ไอโซเลท และแยกเชื้อราจากดินรอบรากต้นพริกที่เป็นโรครากปมได้ จำนวน 83 ไอโซเลท ตัวอย่างเช่น *Acremonium spp.*, *Acremonium murorum*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* spp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia* spp. *Curvularia deightonii*, *Fusarium* spp., *Fusarium acuminatum*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Trichoderma* spp. และ *Trichoderma harmatum*

ซึ่งเชื้อราบางไอโซเลทไม่ได้ทำการจำแนกชนิด เนื่องจากได้ทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ พบว่าไม่มีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

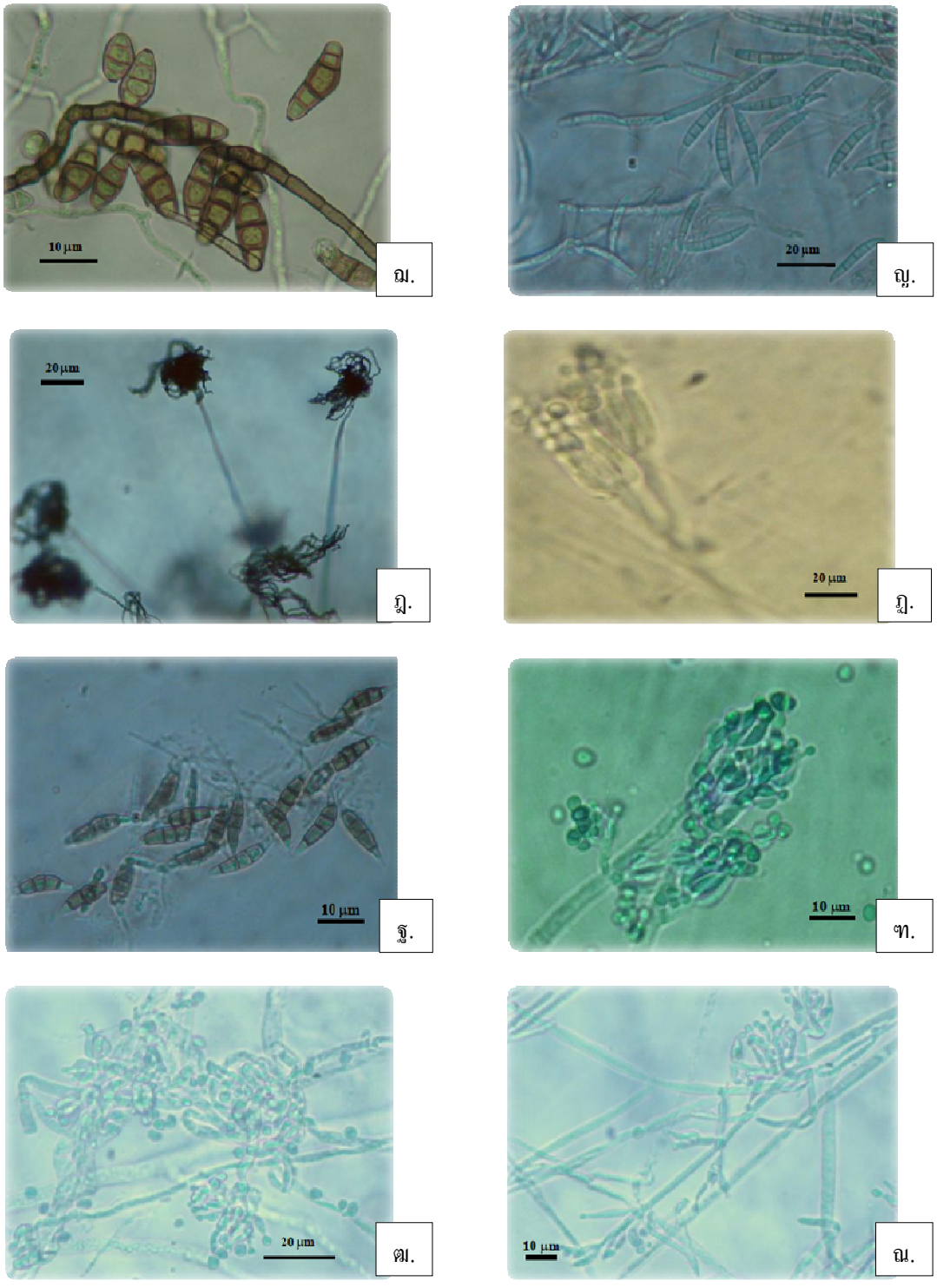
**4. การทดสอบการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita***

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ตัวอย่างชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ และตัวอย่างต้นพริกและดินรอบๆต้นพริกที่เกิดโรครากปม รวมทั้งสิ้น 197 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประเมินผลการเข้าทำลายกลุ่มไข่เป็น 3 ระดับ สามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีระดับในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ ที่มีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ระดับ 2.5 ขึ้นไปได้ จำนวน 71 ไอโซเลท (ภาพที่ 7) ตัวอย่างเช่น *Acremonium spp.*, *Acremonium murorum*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* spp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia* spp. *Curvularia deightonii*, *Fusarium* spp., *Fusarium acuminatum*, *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Trichoderma* spp. และ *Trichoderma harmatum*

เชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4) คือ *Aspergillus* sp. (EM01-07), *Curvularia* sp. (EM01-04), *Paecilomyces lilacinus* (EM06-08), *Penicillium* sp. (SR04-12) และ *Trichoderma* spp. (SR02-09 และ SR06-05) โดยเชื้อราสามารถสร้างเส้นใยคลุมส่วน gelatinous matrix ของกลุ่มไข่ทุกกลุ่มไข่ที่ทดสอบ (ระดับค่าเฉลี่ย 3.00) รองลงมาได้แก่ *Aspergillus* sp. (SR04-03), *Curvularia* sp. (SR05-09), *Fusarium* sp. (EM04-08), *Penicillium* sp. (SR02-06) และ *Trichoderma* sp. (SR03-03) ซึ่งสร้างเส้นใยคลุมกลุ่มไข่ได้ในระดับค่าเฉลี่ย 2.92




**ภาพที่ 7** ตัวอย่างเชื้อราที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ และไข่ของ *M. incognita*
(ก) *Acremonium* sp., (ข) *Acremonium murorum*, (ค) *Alternaria* sp., (ง) *Aspergillus* sp., (จ) *Aspergillus fumigatus*, (ฉ) *Aspergillus niger*, (ช) *Cladosporium cladosporioides*, (ซ) *Curvularia* sp.




**ภาพที่ 7** ตัวอย่างเชื้อราที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ และไข่ของ *M. incognita* (ต่อ)

(ฌ) *Curvularia deightonii*, (ญ) *Fusarium acuminatum*, (ฎ) *Paecilomyces lilacinus*,

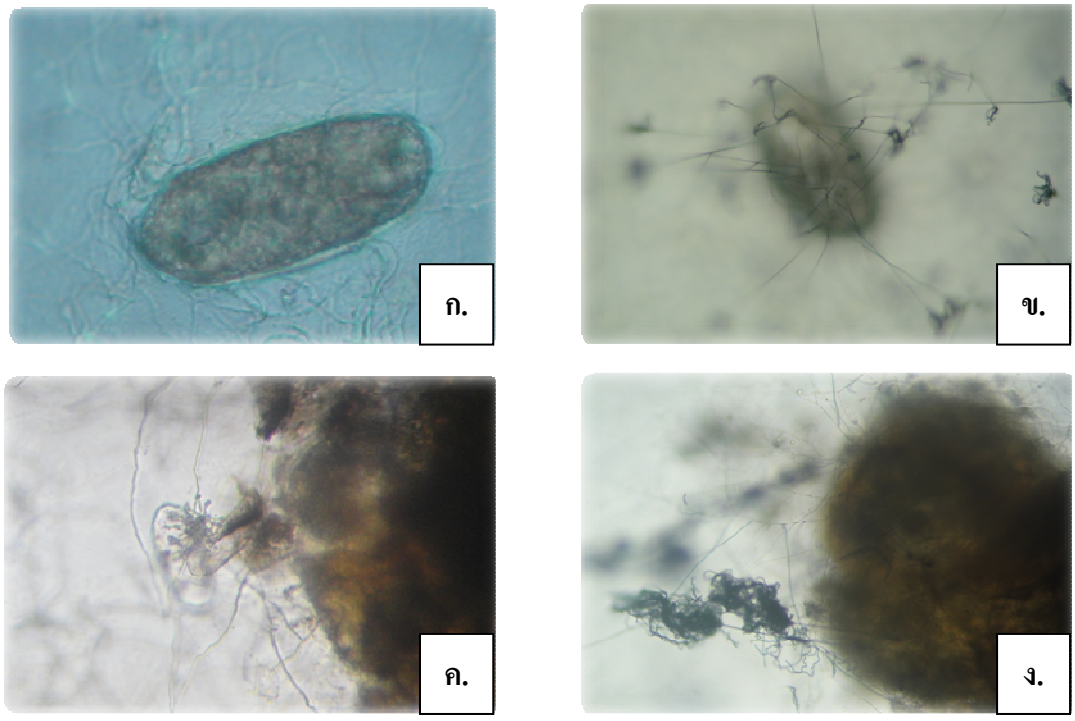
(ฏ) *Penicillium* sp., (ฐ) *Pestalotiopsis sp*., (ฑ) *Trichoderma* sp.1,

(ฒ) *Trichoderma* sp.2, (ณ) *Trichoderma harmatum*

**5. การทดสอบการเข้าทำลายไข่ (egg) ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita***

นำเชื้อราที่มีระดับในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ ที่มีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ระดับ 2.5 ขึ้นไป จำนวน 71 ไอโซเลท มาทดสอบ พบเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ของ *M. incognita* ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4) คือ *Paecilomyces lilacinus* (EM06-08) สามารถทำลายไข่ได้สูง 63.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *Trichoderma* sp. (SR06-05) และ *Curvularia* sp. (SR05-09) ซึ่งทำลายไข่ได้ 53.00 และ 49.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อราในกลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ได้ดีที่สุด คือ *Arthrobotry oligospora* (SS09-03) สามารถทำลายไข่ได้ 19.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *Monacrosporium thaumasium* (SS16-01) ซึ่งทำลายไข่ได้ 16.67 เปอร์เซ็นต์

สำหรับเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการลดอัตราการฟักไข่ของ *M. incognita* ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4) คือ *P. lilacinus* (EM06-08) สามารถลดอัตราการฟักไข่ได้สูง 52.33 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8) รองลงมา คือ *Curvularia* sp. (SR05-09) และ *Trichoderma* sp. (SR06-05) สามารถลดอัตราการฟักไข่ได้ 47.00 และ 45.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อราในกลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพในการลดอัตราการฟักไข่ได้ดีที่สุด คือ *A. oligospora* (SS09-03) สามารถลดอัตราการฟักไข่ได้ 16.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ *M. thaumasium* (SS16-01) ซึ่งสามารถลดอัตราการฟักไข่ได้ 15.67 เปอร์เซ็นต์




**ภาพที่ 8** *P. lilacinus* ไอโซเลท EM06-08 : ทำลายไข่ (ก. และ ข.) ทำลายกลุ่มไข่ (ค. และ ง.)

**ตารางที่ 4** ประสิทธิภาพของเชื้อราในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (egg) ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ

| เชื้อรา | ไอโซเลท | ระดับการเข้าทำลายกลุ่มไข่[1] | การเข้าทำลายไข่[2] (เปอร์เซ็นต์) | ลดอัตราการฟักไข่[3] (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|---|---|
| *Acremonium* spp. | EM03-03 | 2.67 | 13.00 ± 4.36 | 2.33 ± 2.31 |
| | EM03-04 | 2.42 | 5.67 ± 3.06 | 0.33 ± 0.58 |
| | SR05-04 | 2.00 | 9.33 ± 4.16 | 7.67 ± 6.66 |
| *Acremonium murorum* | EM01-03 | 2.50 | 9.67 ± 6.66 | 19.33 ± 3.51 |
| *Alternaria* sp. | EM05-01 | 2.58 | 6.67 ± 4.04 | 9.33 ± 3.51 |
| *Aspergillus* spp. | EM01-06 | 2.75 | 27.00 ± 13.08 | 27.00 ± 7.55 |
| | EM01-07 | 3.00 | 23.00 ± 7.00 | 7.67 ± 8.14 |
| | EM03-06 | 2.83 | 8.00 ± 5.00 | 7.00 ± 4.36 |
| | SR02-04 | 2.08 | 35.00 ± 13.11 | 17.00 ± 8.54 |
| | SR04-03 | 2.92 | 41.67 ± 19.35 | 16.33 ± 10.07 |
| *Aspergillus flavus* | SR06-15 | 2.33 | 3.33 ± 2.52 | 16.67 ± 10.79 |
| *Aspergillus fumigatus* | EM03-05 | 2.75 | 26.67 ± 7.02 | 3.67 ± 3.79 |
| | SR02-10 | 2.83 | 24.33 ± 6.43 | 12.67 ± 5.51 |
| | SR05-08 | 2.83 | 19.67 ± 9.61 | 14.00 ± 4.36 |
| *Aspergillus niger* | EM04-14 | 2.67 | 23.00 ± 6.24 | 24.67 ± 6.03 |
| | EM06-04 | 2.83 | 30.00 ± 15.10 | 23.00 ± 3.46 |
| | SR01-01 | 2.08 | 30.67 ± 7.51 | 29.00 ± 3.61 |
| | SR06-11 | 2.08 | 16.33 ± 10.21 | 13.67 ± 5.03 |

[1] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญปกคลุม จากจำนวน 4 กลุ่มไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

[2] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีสีดำหรือน้ำตาลและมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมา จากจำนวน 100 ไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

[3] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีอัตราของการฟักไข่ลดลง จากจำนวน 100 ไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

**ตารางที่ 4 (ต่อ)** ประสิทธิภาพของเชื้อราในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (egg) ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ

| เชื้อรา | ไอโซเลท | ระดับการเข้าทำลายกลุ่มไข่[1] | การเข้าทำลายไข่[2] (เปอร์เซ็นต์) | ลดอัตราการฟักไข่[3] (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|---|---|
| *Arthrobotry oligospora* | SS09-02 | 2.67 | 15.67 ± 5.86 | 11.00 ± 2.65 |
| | SS09-03 | 2.75 | 19.67 ± 4.04 | 16.33 ± 5.03 |
| *Cladosporium cladosporioides* | EM02-01 | 2.58 | 9.33 ± 5.86 | 10.33 ± 3.79 |
| *Curvularia* spp. | EM01-04 | 3.00 | 35.33 ± 10.97 | 23.00 ± 4.58 |
| | EM02-05 | 2.50 | 23.00 ± 4.00 | 10.33 ± 6.66 |
| | SR04-08 | 2.00 | 16.00 ± 4.36 | 10.00 ± 9.64 |
| | SR04-09 | 2.33 | 11.00 ± 6.08 | 4.67 ± 2.52 |
| | SR05-09 | 2.92 | 49.33 ± 4.51 | 47.00 ± 9.00 |
| *Curvularia deightonii* | SR01-14 | 2.33 | 19.33 ± 5.51 | 3.00 ± 1.00 |
| *Fusarium* spp. | EM03-07 | 2.83 | 23.67 ± 1.53 | 19.00 ± 8.54 |
| | EM04-07 | 2.42 | 21.00 ± 8.89 | 14.00 ± 6.56 |
| | EM04-08 | 2.92 | 27.33 ± 11.68 | 8.00 ± 4.00 |
| | EM04-09 | 2.50 | 22.00 ± 11.79 | 1.33 ± 1.15 |
| | SR03-01 | 2.92 | 21.00 ± 6.08 | 24.67 ± 4.16 |
| | SR06-17 | 2.42 | 21.67 ± 5.86 | 22.67 ± 6.03 |
| *Fusarium acuminatum* | EM01-08 | 2.17 | 25.00 ± 14.53 | 26.33 ± 7.57 |
| | EM04-02 | 2.83 | 18.00 ± 8.89 | 18.67 ± 4.04 |
| *Fusarium oxysporum* | EM06-09 | 2.75 | 21.33 ± 5.51 | 19.00 ± 2.65 |

[1] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญปกคลุม จากจำนวน 4 กลุ่มไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

[2] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีสีดำหรือน้ำตาลและมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมา จากจำนวน 100 ไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

[3] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีอัตราของการฟักไข่ลดลง จากจำนวน 100 ไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

**ตารางที่ 4 (ต่อ)** ประสิทธิภาพของเชื้อราในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (egg) ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ

| เชื้อรา | ไอโซเลท | ระดับการเข้าทำลายกลุ่มไข่[1] | การเข้าทำลายไข่[2] (เปอร์เซ็นต์) | ลดอัตราการฟักไข่[3] (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|---|---|
| *Monacrosporium bembicodes* | SS28-03 | 2.58 | 14.67 ± 4.04 | 8.33 ± 5.51 |
| | WS02-02 | 2.00 | 4.67 ± 2.08 | 7.33 ± 2.31 |
| *Monacrosporium thaumasium* | SS16-01 | 2.67 | 16.67 ± 10.60 | 15.67 ± 4.04 |
| | SS16-05 | 2.25 | 11.33 ± 7.51 | 11.00 ± 3.00 |
| | SS26-03 | 2.17 | 9.00 ± 6.24 | 13.33 ± 5.51 |
| *Paecilomyces* spp. | EM05-06 | 2.42 | 36.00 ± 8.89 | 15.67 ± 4.73 |
| | EM05-07 | 2.17 | 24.67 ± 10.21 | 27.33 ± 2.52 |
| *Paecilomyces lilacinus* | EM06-08 | 3.00 | 63.67 ± 8.50 | 52.33 ± 9.50 |
| | SR04-04 | 2.75 | 36.33 ± 10.60 | 10.67 ± 7.37 |
| *Penicillium* spp. | EM02-04 | 2.42 | 16.33 ± 7.51 | 13.33 ± 4.93 |
| | EM02-08 | 2.50 | 28.33 ± 5.69 | 23.33 ± 7.09 |
| | EM04-13 | 2.33 | 26.00 ± 7.00 | 24.67 ± 5.03 |
| | SR01-11 | 2.83 | 14.00 ± 4.58 | 5.67 ± 4.04 |
| | SR01-12 | 2.58 | 32.00 ± 11.53 | 21.00 ± 12.12 |
| | SR02-06 | 2.92 | 34.67 ± 7.09 | 19.67 ± 3.06 |
| | SR04-12 | 3.00 | 30.00 ± 10.82 | 9.67 ± 2.08 |
| | SR04-13 | 2.58 | 37.00 ± 11.00 | 25.67 ± 10.41 |
| | SR05-06 | 2.33 | 18.67 ± 11.55 | 24.67 ± 9.02 |
| | SR06-08 | 2.25 | 37.67 ± 3.06 | 27.33 ± 6.66 |

[1] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญปกคลุม จากจำนวน 4 กลุ่มไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

[2] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีสีดำหรือน้ำตาลและมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมา จากจำนวน 100 ไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

[3] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีอัตราของการฟักไข่ลดลง จากจำนวน 100 ไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

**ตารางที่ 4 (ต่อ)** ประสิทธิภาพของเชื้อราในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (egg) ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ

| เชื้อรา | ไอโซเลท | ระดับการเข้าทำลายกลุ่มไข่[1] | การเข้าทำลายไข่[2] (เปอร์เซ็นต์) | ลดอัตราการฟักไข่[3] (เปอร์เซ็นต์) |
|---|---|---|---|---|
| *Pestalotiopsis* spp. | SR05-01 | 2.00 | 8.67 ± 6.43 | 0.67 ± 0.58 |
| | SR05-05 | 2.42 | 5.00 ± 2.00 | 9.00 ± 5.29 |
| *Trichoderma* spp. | EM04-10 | 2.58 | 25.00 ± 14.11 | 30.00 ± 4.36 |
| | EM06-03 | 2.83 | 19.67 ± 5.69 | 9.33 ± 4.51 |
| | SR01-04 | 2.83 | 24.00 ± 7.00 | 3.00 ± 3.61 |
| | SR01-07 | 2.75 | 31.00 ± 3.61 | 10.00 ± 1.73 |
| | SR02-09 | 3.00 | 32.67 ± 8.39 | 11.67 ± 2.52 |
| | SR02-12 | 2.33 | 39.33 ± 7.09 | 24.33 ± 5.69 |
| | SR03-03 | 2.92 | 31.67 ± 6.03 | 5.00 ± 4.00 |
| | SR04-05 | 2.33 | 19.67 ± 4.93 | 11.33 ± 5.13 |
| | SR05-02 | 2.58 | 35.67 ± 6.11 | 10.33 ± 7.09 |
| | SR06-05 | 3.00 | 53.00 ± 5.57 | 45.33 ± 12.50 |
| | SR06-10 | 2.25 | 23.33 ± 7.77 | 6.33 ± 4.16 |
| *Trichoderma harmatum* | SR01-02 | 2.17 | 28.67 ± 14.36 | 31.00 ± 7.94 |
| | SR03-06 | 2.83 | 32.67 ± 6.11 | 23.00 ± 8.19 |
| | SR06-06 | 2.50 | 33.33 ± 6.03 | 29.33 ± 7.02 |
| Control | - | 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 2.33 ± 1.53 |

[1] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญปกคลุม จากจำนวน 4 กลุ่มไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

[2] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีสีดำหรือน้ำตาลและมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมา จากจำนวน 100 ไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

[3] คิดค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำของจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่มีอัตราของการฟักไข่ลดลง จากจำนวน 100 ไข่/จานเลี้ยงเชื้อ

**6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมการเกิดปมของรากพริก**

นำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่ดีที่สุด จากการทดสอบ จำนวน 2 ไอโซเลท และเชื้อรากลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่ดีที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลท มาทำการทดสอบ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งการทดลองเป็น 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 20 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ *Paecilomyces lilacinus* (EM06-08)

กรรมวิธีที่ 2 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ *Trichoderma* sp. (SR06-05)

กรรมวิธีที่ 3 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ *Arthrobotrys oligospora* (SS09-03)

กรรมวิธีที่ 4 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ *Monacrosporium thaumasium* (SS16-01)

กรรมวิธีที่ 5 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ สาร Carbofuran 2.5 กรัม/กระถาง

กรรมวิธีที่ 6 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมอย่างเดียว (control)

กรรมวิธีที่ 7 ต้นพริกปกติที่ไม่ปลูกเชื้อใดๆ (check)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's new multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 5) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริกเมื่ออายุ 60 วัน (ภาพที่ 9) พบว่าต้นพริกปกติที่ไม่ได้ปลูกเชื้อใดๆ (check) ไม่พบความรุนแรงในการเกิดปม คือ ระดับ 0.00 ส่วนต้นพริกที่ปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ร่วมกับสาร carbofuran มีระดับความรุนแรงในการเกิดปมน้อยที่สุด คือ 0.55 รองลงมาคือ การปลูกเชื้อร่วมกับ *P. lilacinus* และ *Trichoderma* sp. ที่ระดับ 0.85 และ 1.10 ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อเปรียบเทียบการปลูกเชื้อร่วมกับสาร carbofuran กับการปลูกเชื้อร่วมกับ *P. lilacinus* มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของการเกิดปมที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อร่วมกับ *Trichoderma* sp. มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

**ตารางที่ 5** เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริก น้ำหนักรากสด น้ำหนักต้นสด และน้ำหนักผลผลิตของพริก ที่เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 60 วัน

| ทรีตเมนต์ | ระดับความรุนแรงในการเกิดปมของราก[1] | น้ำหนักรากสด (กรัม) | น้ำหนักต้นสด (กรัม) | น้ำหนักผลผลิต (กรัม) |
|---|---|---|---|---|
| T1 : N + *P. lilacinus* (EM06-08) | 0.85 ± 0.11 bc[2] | 6.54 ± 0.21 b | 15.02 ± 0.33 b | 23.01 ± 0.54 b |
| T2 : N + *Trichoderma* sp. (SR06-05) | 1.10 ± 0.14 cd | 7.11 ± 0.29 ab | 17.19 ± 0.41 a | 27.29 ± 1.01 a |
| T3 : N + *A. oligospora* (SS09-03) | 1.40 ± 0.13 de | 4.97 ± 0.28 c | 13.84 ± 0.38 cd | 19.17 ± 0.51 c |
| T4 : N + *M. thaumasium* (SS16-01) | 1.50 ± 0.15 e | 3.86 ± 0.20 d | 13.16 ± 0.47 d | 16.50 ± 0.57 d |
| T5 : N + Carbofuran 2.5 กรัม/กระถาง | 0.55 ± 0.15 b | 7.63 ± 0.30 a | 17.31 ± 0.34 a | 28.74 ± 0.88 a |
| T6 : กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมอย่างเดียว (N) | 3.85 ± 0.15 f | 2.61 ± 0.14 e | 10.33 ± 0.32 e | 11.04 ± 0.54 e |
| T7 : ต้นพริกปกติที่ไม่ปลูกเชื้อใดๆ (check) | 0.00 ± 0.00 a | 4.99 ± 0.20 c | 14.73 ± 0.34 bc | 18.72 ± 0.67 c |
| C.V. (%) | 44.32 | 19.93 | 11.43 | 15.18 |

[1] ดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก แบ่งเป็น 6 ระดับ ตามวิธีของ Hussey และ Jansaen (2001)

ระดับ 0 : ไม่มีปม

ระดับ 1 : มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย

ระดับ 2 : เกิดปมน้อยกว่า 25% ของระบบราก

ระดับ 3 : เกิดปม 25-50% ของระบบราก

ระดับ 4 : เกิดปม 51-75% ของระบบราก

ระดับ 5 : เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก

[2] ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

N = กลุ่มไข่ (egg mass) ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

**ภาพที่ 9** ระดับความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริกในแต่ละกรรมวิธี

(T1) = กรรมวิธีที่ 1 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ *P. lilacinus* (EM06-08)

(T2) = กรรมวิธีที่ 2 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ *Trichoderma* sp. (SR06-05)

(T3) = กรรมวิธีที่ 3 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ *A. oligospora* (SS09-03)

(T4) = กรรมวิธีที่ 4 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ *M. thaumasium* (SS16-01)

(T5) = กรรมวิธีที่ 5 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ร่วมกับ สาร Carbofuran 2.5 กรัม/กระถาง

(T6) = กรรมวิธีที่ 6 ต้นพริกปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมอย่างเดียว (control)

(T7) = กรรมวิธีที่ 7 ต้นพริกปกติที่ไม่ปลูกเชื้อใดๆ (check)

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักรากสดของต้นพริก เมื่ออายุ 60 วัน พบว่าต้นพริกที่ปลูกเชื้อร่วมกับสาร carbofuran ทำให้ได้น้ำหนักเฉลี่ยรากสดสูงสุด 7.63 กรัม/ต้น รองลงมาคือ ปลูกเชื้อร่วมกับ *Trichoderma* sp. และ *P. lilacinus* ที่ทำให้ได้น้ำหนักรากสดเท่ากับ 7.11 กรัม/ต้น และ 6.54 กรัม/ต้น ตามลำดับ โดยพบว่าเมื่อเปรียบเทียบการปลูกเชื้อร่วมกับสาร carbofuran กับการปลูกเชื้อร่วมกับ *Trichoderma* sp. มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักรากสดที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อร่วมกับ *P. lilacinus* จะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักต้นสดของต้นพริก เมื่ออายุ 60 วัน พบว่าต้นพริกที่ปลูกเชื้อร่วมกับสาร carbofuran ทำให้ได้น้ำหนักต้นสดสูงสุด 17.31 กรัม/ต้น รองลงมาคือ ปลูกเชื้อร่วมกับ *Trichoderma* sp. และ *P. lilacinus* ซึ่งทำให้ได้น้ำหนักต้นสดเท่ากับ 17.19 กรัม/ต้น และ 15.02 กรัม/ต้น ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างการปลูกเชื้อร่วมกับสาร carbofuran และการปลูกเชื้อร่วมกับ *Trichoderma* sp. แต่จะพบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อร่วมกับ *P. lilacinus*

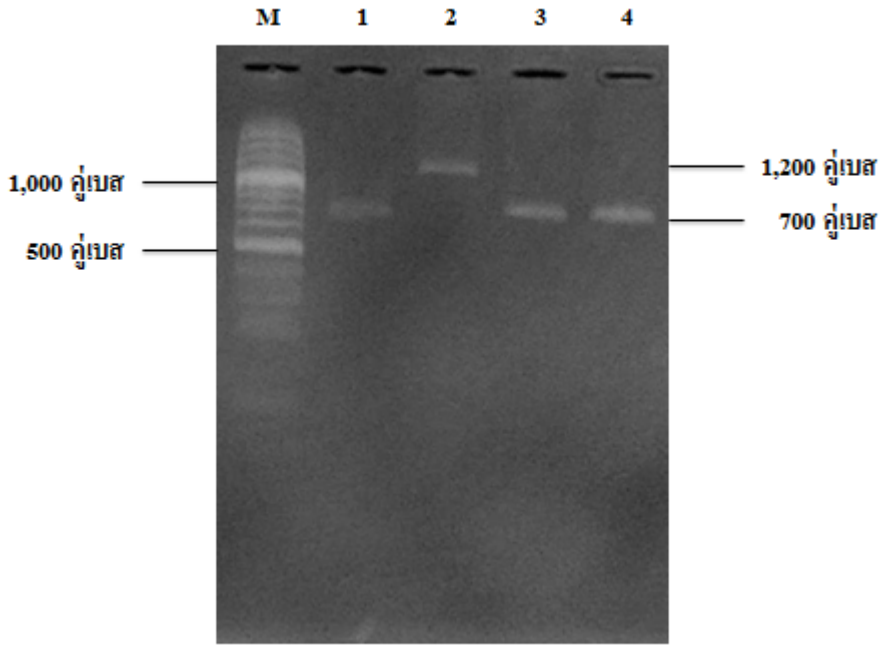
จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตพริก ที่เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 60 วัน พบว่าต้นพริกที่ปลูกเชื้อร่วมกับสาร carbofuran ทำให้ได้น้ำหนักผลผลิตพริกสูงสุด 28.74 กรัม/ต้น รองลงมาคือ ปลูกเชื้อร่วมกับ *Trichoderma* sp. และ *P. lilacinus* ซึ่งทำให้ได้น้ำหนักผลผลิตพริกเท่ากับ 27.29 กรัม/ต้น และ 23.01 กรัม/ต้น ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างการปลูกเชื้อร่วมกับสาร carbofuran และการปลูกเชื้อร่วมกับ *Trichoderma* sp. แต่จะพบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อร่วมกับ *P. lilacinus*

นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริก น้ำหนักรากสด น้ำหนักต้นสด และน้ำหนักผลผลิตของพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนรากปม ร่วมกับเชื้อราปฏิปักษ์ เปรียบเทียบกับต้นพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียว จะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าเมื่อเปรียบเทียบต้นพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียวกับต้นพริกที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อใดๆ ก็มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน

**7. การจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมด้วยเทคนิค PCR**

ทำการยืนยันผลการจำแนกเชื้อราปฏิปักษ์ที่พบว่าสามารถควบคุมการเกิดปมของรากพริกได้ จำนวนทั้งสิ้น 4 ชนิด ได้แก่ *Paecilomyces lilacinus* ไอโซเลท EM06-08, *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SR06-05, *Monacrosporium thaumasium* ไอโซเลท SS16-01 และ *Arthrobotrys oligospora* ไอโซเลท SS09-03 อีกครั้ง ด้วยเทคนิค PCR จากการเพิ่มปริมาณยีน rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ Internal Transcribed Spacer (ITS) และทำการตรวจสอบขนาดของยีน rDNA ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟริซิส ผลที่ได้พบว่าเชื้อรา *P. lilacinus* ไอโซเลท EM06-08, *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SR06-05 และ *M. thaumasium* ไอโซเลท SS16-01 จะให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส และ *A. oligospora* ไอโซเลท SS09-03 จะให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rDNA ขนาดประมาณ 700 คู่เบส ของเชื้อ *P. lilacinus* ไอโซเลท EM06-08, *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SR06-05 และ *M. thaumasium* ไอโซเลท SS16-01 และขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ของเชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท SS09-03 ที่เพิ่มปริมาณได้ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ rDNA ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อรา *P. lilacinus* ไอโซเลท EM06-08 มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rDNA ของเชื้อรา *P. lilacinus* มากถึง 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rDNA เชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SR06-05 มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rDNA ของเชื้อรา *T. asperellum* 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท SR06-05 ที่คัดเลือกได้เป็นเชื้อรา *T. asperellum* อย่างไรก็ตามในการทดลองไม่สามารถจำแนกเชื้อรา *M. thaumasium* (SS09-03) และเชื้อรา *A. oligospora* (SS16-01) ได้เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA ของเชื้อรา *M. thaumasium* (SS09-03) มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA ของเชื้อรา *M. thaumasium*, *M. eudermatum* และ *A. thaumasia* มากถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA ของเชื้อรา *A. oligospora* (SS16-01) มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. conoides*, *A. superba* และ *A. cladodes* 87 เปอร์เซ็นต์ ผลการจำแนกที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจน อาจมีสาเหตุมาจากการเลือกตำแหน่งของ ITS บนยีน rDNA ที่นำมาใช้ในการจำแนกมีความแตกต่างของยีนค่อนข้างน้อย ซึ่งการจำแนกเชื้อราแต่ละชนิดมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพื่อหาตำแหน่งของยีนที่เหมาะสมกับเชื้อราชนิดนั้นๆ




**ภาพที่ 10** ผลผลิตยีน rDNA ของเชื้อราปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ขนาดประมาณ 700 คู่เบส และ 1,200 คู่เบส จากปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4, M คือ DNA marker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas), ช่องที่ 1 คือ *P. lilacinus* (EM06-08) ช่องที่ 2 คือ *Trichoderma* sp. (SR06-05) ช่องที่ 3 คือ *A. oligospora* (SS16-01) และ ช่องที่ 4 คือ *M. thaumasium* (SS09-03) ตามลำดับ

# บทที่ 4
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

**1. การแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากตัวอย่างดิน จากชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ และการทดสอบศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย**

จากการสำรวจพบว่า *M. bembicodes* เป็นชนิดของเชื้อรากับดักไส้เดือนฝอยที่พบมากที่สุด ทั้งจากตัวอย่างดิน และจากตัวอย่างชิ้นส่วนของพืชที่อยู่ในแหล่งน้ำ เมื่อทำการเปรียบเทียบชนิดของเชื้อรากับดักไส้เดือนฝอยที่พบในเขตภาคใต้ กับที่พบในเขตภาคเหนือตามรายงานของ ภมรทิพย์ อักษรทอง (ม.ป.ป.) พบว่ามีความใกล้เคียงกัน โดยสำรวจพบเชื้อรากับดักไส้เดือนฝอยเหมือนกันถึง 3 ชนิด คือ *A. oligospora*, *M. aphrobrochum* และ *M. bembicodes* นอกจากนี้ผลสำรวจยังมีความใกล้เคียงกับที่สำรวจพบบริเวณที่ราบสูงของประเทศจีน จำนวน 2 ชนิด คือ *A. oligospora* และ *M. thaumasium* (Su *et al*., 2007)

รูปแบบของโครงสร้างกับดักของเชื้อขึ้นอยู่กับ ชนิด สายพันธุ์ สภาพแวดล้อมทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยสภาพแวดล้อมที่มีชีวิตที่สำคัญที่สุดคือ ตัวไส้เดือนฝอยที่ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งจะกระตุ้นให้เชื้อราสร้างกับดักแบบต่างๆ โดยการไปสัมผัสกับเส้นใยของเชื้อรา สำหรับเชื้อ *A. oligospora* ที่กลายพันธุ์นอกจากจะสร้างสปอร์ที่มีสารกาวเหนียวตั้งแต่อยู่บนก้านชูสปอร์ยังสร้างกับดักจำนวนมากบนเส้นใยด้วย แสดงถึงความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพในการดักจับไส้เดือนฝอยในธรรมชาติ และยังสามารถเป็นปรสิตของเชื้อราชนิดอื่น โดยการพันและรัดรอบเส้นใยของเชื้อราชนิดอื่น แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการปรับตัวให้มีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย (Nordbring-Hertz *et al*., 2006) ซึ่งเหมาะแก่การนำไปใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในระยะที่เคลื่อนที่ได้ เช่น การนำไปควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ขณะที่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (juvenile stage 2)

**2. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์จากกลุ่มไข่ (egg mass) ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และดินรอบรากต้นพริกที่เป็นโรครากปม**

เชื้อราที่แยกได้จากกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และดินรอบรากต้นพริกที่เป็นโรครากปม ส่วนใหญ่เป็น Imperfect fungi เช่น *Aspergillus* spp., *A. flavus*, *A. fumigates*, *A. niger*, *Curvularia* spp. *C. deightonii*, *Fusarium* spp., *F. acuminatum*, *F. oxysporum*,

*Paecilomyces* spp., *P. lilacinus*, *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. และ *T. harmatum* ซึ่งพบว่ามีจำนวนไอโซเลทของเชื้อ *Trichoderma* spp. มากที่สุดซึ่งเป็นเชื้อราในดินที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และมีศักยภาพในการแข่งขันกับเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิด รวมทั้งไส้เดือนฝอยรากปม โดยเข้าไปทำลายไข่และตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปม ทำให้พบโรคได้น้อยลง (กนกพรรณ โสมาศรี, 2544)

**3. การทดสอบการเข้าทำลายกลุ่มไข่ (egg mass) และไข่ (egg) ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita***

เชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ ไข่ และสามารถในการลดอัตราการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ดีที่สุด คือ *Paecilomyces lilacinus* (EM06-08) สามารถเข้าทำลายกลุ่มไข่ที่ระดับค่าเฉลี่ย 3.00 ทำลายไข่ได้ 63.67 เปอร์เซ็นต์ และลดอัตราการฟักไข่ได้ 52.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ กนกพรรณ โสมาศรี (2544) ยุวดี ชูประภาวรรณ และคณะ (2550) และ Kiewnick และ Sikora (2006) รองลงมาคือ *Trichoderma* sp. (SR06-05) ซึ่งสามารถเข้าทำลายกลุ่มไข่ที่ระดับค่าเฉลี่ย 3.00 ทำลายไข่ได้ 53.00 เปอร์เซ็นต์ และลดอัตราการฟักไข่ได้ 47.00 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่า *Trichoderma* sp. (SR06-05) มีความสามารถในการลดอัตราการฟักไข่น้อยกว่า *Curvularia* sp. (SR05-09) แต่ศักยภาพโดยรวมในการเข้าทำลายยังเหนือกว่า

ส่วนเชื้อรากลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ ไข่ และสามารถในการลดอัตราการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ดีที่สุด คือ *Arthrobotry oligospora* (SS09-03) สามารถเข้าทำลายกลุ่มไข่ที่ระดับค่าเฉลี่ย 2.75 ทำลายไข่ได้ 19.67 เปอร์เซ็นต์ และลดอัตราการฟักไข่ได้ 16.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Monacrosporium thaumasium* (SS16-01) ซึ่งสามารถเข้าทำลายกลุ่มไข่ที่ระดับค่าเฉลี่ย 2.67 ทำลายไข่ได้ 16.67 เปอร์เซ็นต์ และลดอัตราการฟักไข่ได้ 15.67 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดสอบในครั้งนี้ เชื้อราที่ทำลายกลุ่มไข่ได้ดี แต่เมื่อนำไปทดสอบการเข้าทำลายไข่กลับพบเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายน้อยกว่าเชื้อราที่เข้าทำลายกลุ่มไข่ได้ปานกลางหรือค่อนข้างต่ำ ตามรายงานของ Agudelo และคณะ (2004) และ Khan และคณะ (2004) (อ้างถึงในยุวดี ชูประภาวรรณ และคณะ, 2550) ว่า การที่เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีจนขึ้นปกคลุมกลุ่มไข่ได้นั้นเป็นเพียงการเจริญเติบโตอยู่บนสารเมือก (gelatinous matrix) ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มกลุ่มไข่เท่านั้น แต่ไม่สามารถแทงทะลุผ่านเปลือกไข่เข้าไปเจริญภายในไข่ไส้เดือนฝอยรากปมได้หรือเข้าไปได้น้อย ในขณะที่เชื้อราที่มีเข้าทำลายกลุ่มไข่ได้ต่ำอาจจะมีบทบาทของเอนไซน์ย่อยสลายที่ขับออกมา

นอกเซลล์ (extracellular enzyme) เช่น chitinase และ protease เข้ามาเกี่ยวข้องกับความสามารถของเส้นใยในการแทงทะลุเปลือกไข่เข้าไปทำลายไข่ที่อยู่ภายใน

นอกจากนี้ยังสังเกตได้ว่า เชื้อราที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายไข่ อาจจะไม่มีศักยภาพในการลดอัตราการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ในเปอร์เซ็นต์ที่ใกล้เคียงกัน ตัวอย่างเช่น *Aspergillus* sp. (EM01-07), *Fusarium* sp. (EM04-09), *Penicillium* sp. (SR04-12) และ *Trichoderma* sp. (SR03-03) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ในการลดอัตราการฟักไข่จะลดลงจากเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายไข่อย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อราเข้าทำลายไข่โดยแทงเส้นใยเข้าไป แต่ไม่สามารถแทงเส้นใยเข้าไปทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่อยู่ในไข่ได้

**4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมการเกิดปมของรากพริก**

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า สาร carbofuran มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดปมของรากพริกได้ดีที่สุด ทำให้ความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริกลดลง และทำให้การเจริญเติบโตของพริก (น้ำหนักรากสด น้ำหนักต้นสด น้ำหนักผลผลิต) เพิ่มขึ้น

สำหรับเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดปมของรากพริกได้ดี คือ *P. lilacinus* (EM06-08) และ *Trichoderma* sp. (SR06-05) โดยพบว่า *P. lilacinus* มีประสิทธิภาพในการทำให้ความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริกลดลงโดยไม่พบความแตกต่างกันในทางสถิติ แต่จะพบความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในการทำให้พริกเจริญเติบโต เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร carbofuran

ส่วน *Trichoderma* sp. ทำให้ความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริกลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sharon และคณะ (2001) โดยจะพบความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร carbofuran แต่ไม่พบความแตกต่างกันในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ *P. lilacinus* ถ้ามองในส่วนของการทำให้การเจริญเติบโตของพริกเพิ่มขึ้นนั้น จะไม่พบความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร carbofuran ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองของ Sharma และ Pandey (2009)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบเชื้อรากลุ่มกับดักไส้เดือนฝอยที่นำมาทดสอบ คือ *A. oligospora* (SS09-03) และ *M. thaumasium* (SS16-01) กับเชื้อราอีก 2 ชนิด คือ *P. lilacinus* (EM06-08) และ *Trichoderma* sp. (SR06-05) จะพบความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในส่วนของการทำให้การเจริญเติบโตของพริกเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการทำให้ความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริกลดลง ยกเว้น *A. oligospora* (SS09-03) ที่ไม่พบความแตกต่างกัน

ในทางสถิติในการทำให้ความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ *Trichoderma* sp. (SR06-05)

ในปัจจุบันที่กระแสของผู้บริโภคให้ความสำคัญกับการบริโภคพืชผักที่ปลอดภัยจากสารเคมี โดยเฉพาะกลุ่มผู้รักสุขภาพที่หันมาบริโภคพืชผักเหล่านี้มากขึ้น รวมถึงประเทศที่นำเข้าผลผลิตพืชผักก็ต้องการสินค้าที่มีมาตรฐาน และมักจะออกมาตรการกีดกันการใช้สารเคมีที่เกินระดับมาตรฐาน โดยเฉพาะเมื่อสาร carbofuran อยู่ในข่ายของสารเคมีทางการเกษตรที่เฝ้าระวัง ซึ่งมีประเทศที่ระงับหรือห้ามไม่ให้ใช้สารเคมีชนิดนี้แล้ว คือ สหภาพยุโรป และอเมริกา ดังนั้นการใช้สารชีวภัณฑ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อเพิ่มปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ให้ตรงตามมาตรฐานที่ผู้บริโภคหรือประเทศผู้ค้าต้องการ

**5. การจำแนกชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมด้วยเทคนิค PCR**

การจำแนกชนิดของเชื้อราปฏิปักษ์จำนวนทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท ที่สามารถใช้ควบคุมการเกิดปมของรากพริกได้ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน rDNA ตำแหน่ง ITS ของเชื้อราแต่ละชนิด กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank สามารถจำแนกเชื้อราได้ 2 ชนิด คือ *P. lilacinus* (EM06-08) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *P. lilacinus* 99 เปอร์เซ็นต์ และ *Trichoderma* sp. (SR06-05) ที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *T. asperellum* 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *M. thaumasium* (SS09-03) และ *A. oligospora* (SS16-01) ไม่สามารถยืนยันชนิดของเชื้อราได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากตำแหน่งของ ITS ที่เลือกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้อาจไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพื่อหาตำแหน่งที่เหมาะสมของ ITS ต่อการจำแนกเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ต่อไป

# เอกสารอ้างอิง

กนกพรรณ โสมาศรี. 2544. ศักยภาพของเชื้อราในดินสำหรับการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) เชิงชีววิธีในมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

กมล เลิศรัตน์. 2550. การผลิต การปลูก การแปรรูป และการตลาดของพริกและผลิตภัณฑ์พริกในประเทศไทย. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ระบบออนไลน์). เข้าถึงได้จาก http://www.trf.or.th/tips/x.asp?Art_ID=143 (เข้าถึงเมื่อ 2 พฤษภาคม 2553).

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2556. รายงานข้อมูลภาวะการผลิตพืช (รต.01) แบบรายปี 2555/56 (ระบบออนไลน์). เข้าถึงได้จาก http://production.doae.go.th/report/report_main2.php?report_type=1 (เข้าถึงเมื่อ 7 พฤษภาคม 2556).

นฤมล ตั้งธีระสุนันท์, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, เกษม สร้อยทอง, พิมพ์พรรณ สมมาตย์ และเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. ม.ป.ป. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS (ระบบออนไลน์). เข้าถึงได้จาก http://plantpro.doae.go.th/disease-research/L-4506.pdf (เข้าถึงเมื่อ 27 พฤษภาคม 2553).

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2550. การควบคุมโรครากปมในพริก. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 4 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, วราภรณ์ ประกอบ และสิริกุล วะสี. 2552. การคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม. รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 9. 24-26 พฤศจิกายน 2552. โรงแรมสุนีย์ แกรนด์ จังหวัดอุบลราชธานี. หน้า 331-341.

ปัญญา ยวงเกตุ. 2552. การปลูกพริกในภาคใต้. ศูนย์บริหารศัตรูพืชจังหวัดสงขลา (ระบบออนไลน์). เข้าถึงได้จาก http://pmc06.doae.go.th/chilly.htm (เข้าถึงเมื่อ 7 พฤษภาคม 2556).

พัลลภา กฤษณีไพบูลย์. 2534. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช. โครงการจัดตั้งภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. 307 หน้า.

ภมรทิพย์ อักษรทอง. (ม.ป.ป.). เชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ตอนที่ 1 เชื้อรา *Arthrobotrys oligospora* Fres. และราสกุลอื่นๆที่พบในแปลงปลูกพืชบนพื้นที่สูง (highland). ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ระบบออนไลน์). เข้าถึงได้จาก http://plantpro.doae.go.th/disease-research/B-06.pdf (เข้าถึงเมื่อ 2 พฤษภาคม 2553).

ภมรทิพย์ อักษรทอง. 2545. บทความสั้น: เทคนิคอย่างง่ายในการแยกเชื้อราปฏิปักษ์สกุล *Arthrobotrys* sp. จากดิน. วารสารเกษตร 18 : 88.

ยุวดี ชูประภาวรรณ, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, อนันต์ หิรัญสาลี และนิวัฒ เสนาะเมือง. 2550. การสำรวจ รวบรวมและประเมินประสิทธิภาพเชื้อราในดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม. วารสารแก่นเกษตร 35 : 104-114.

สรศักดิ์ มณีขาว, นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, พเยาว์ พรหมพันธุ์ใจ, นวลจันทร์ ศรีสมบัติ และบุญชู สายธนู. 2552. การทดสอบเทคโนโลยีการควบคุมโรครากปมพริกแบบเกษตรกรมีส่วนร่วม. รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 9. 24-26 พฤศจิกายน 2552. โรงแรมสุนีย์ แกรนด์ จังหวัดอุบลราชธานี. หน้า 355-369.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2538. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์รั้วเขียว. กรุงเทพฯ. 275 หน้า

Ahrén, D., Ursing, B.M. and Tunlid, A. 1998. Phylogeny of nematode trapping fungi based on 18S rDNA sequences. FEMS Microbiology Letters 158 : 179-184.

Almaghrabi, O.A., Massoud, S.I. and Abdelmoneim, T.S. 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Saudi Journal of Biological Sciences 20 : 57-61.

Amer-Zareen, Siddiqui, I.A. and Zaki, M.J. 2000. Fungal parasites of root-knot nematodes. Pakistan Journal of Biological Sciences 3 : 478-480.

Cabanillas, E., Barker, K.R. and Nelson, L.A. 1989. Growth of isolates of *Paecilomyces lilacinus* and their efficacy in biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. Journal of Nematology 21 : 164-172.

Hao, Y.E., Luo J. and Zhang K.Q. 2004. A new aquatic nematode-trapping hyphomycete. Mycotaxon 89 : 235-239.

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

Hussey, R.S. and Janssen, G.J.W. 2001. Root-knot nematodes : *Meloidogyne* species, Pages 43-70. *In* Starr, J.L., Cook R. and Bridge J. (eds). Plant Resistance to Parasitic Nematodes. CABI Publishing, New York. 103 pp.

Jeewon, R., Liew, E.C.Y. and Hyde, K.D. 2002. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences an morphological characters. Molecular Phylogenetics and Evolution 25 : 378-392.

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

Khan, A., Williams, K.L. and Nevalainen, H.K.M. 2006. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. BioControl 51 : 643-658.

Li, S.D., Miao, Z.Q., Zhang, Y.H. and Liu, X.Z. 2003. *Monacrosporium janus* sp. nov., a new nematode-trapping hyphomycete parasitizing sclerotia and hyphae of *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycological Research 107 : 888-894.

Li, Y., Jeewon, R., Hyde, K.D., Mo, M.H. and Zhang, K.Q. 2006. Two new species of nematode-trapping fungi: relationships inferred from morphology, rDNA and protein gene sequence analyses. Mycological Research 110 : 790-800

Liu, X.F. and Zhang, K.Q. 2003. *Dactylella shizishanna* sp. nov., from Shizi Mountain, China. Fungal Diversity 14 : 103-107.

Meyer, S.L.F., Carta, L.K. and Rehner, S.A. 2005. Morphological variability and molecular phylogeny of the nematophagous fungus *Monacrosporium drechsleri*. Mycologia 97 : 405-415.

Naserinasab, F., Sahebani, N. and Etebarian, H.R. 2011. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on Tomato. African Journal of Food Science 5 : 276-280.

Nordbring-Hertz, B., Jansson, H.-B. and Tunlid, A. 2006. Nematophagous fungi. Encyclopedia of Life Sciences (Online). Available from: http://www.ua.es/personal/hb.jansson/Reprints/N-Hertz%20et%20al%20ELS%202006.pdf (Accessed 17 May 2010).

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. 1. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1,659 pp.

Sharma, P. and Pandey, R. 2009. Biological control of root-knot nematode; *Meloidogyne incognita* in the medicinal plant; *Withania somnifera* and the effect of biocontrol agents on plant growth. African Journal of Agricultural Research 4 : 564-567.

Shamalie, B.V.T., Fonseka R.M. and Rajapaksha, R.G.A.S. 2011. Effect of *Trichoderma viride* and Carbofuran (Curator®) on Management of Root Knot Nematodes and Growth Parameters of Gotukola (*Centella asiatica* L.). Tropical Agricultural Research 23 : 61-69.

Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O. and Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Biological Control 91 : 687-693.

Stirling, G.R., 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. Wallingford CAB International. UK: Redwood Press Ltd. 282 pp.

Su, H., Hao, Y.E., Mo, M. and Zhang, H. 2007. The ecology of nematode-trapping hyphomycetes in cattle dung from three plateau pastures. Veterinary Parasitology 144: 293-298.

Su, H.Y., Li, Y., Mo, M.H. and Zhang, K.Q. 2005. *Monacrosporium multiseptatum*, a new predacious fungus from China. Mycotaxon 92: 193-196.

Sun, M. H., Gao, L., Shi, Y.X., Li, B.J. and Liu, X.Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. Journal of Invertebrate Pathology 93: 22-28.

Taylor, A.L. and Sasser, J.N. 1978. Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). International Meloidogyne Project. North Carolina State University. Raleigh, North Carolina. 111 pp.

Yang, D., Chen, W., Huang, Y., Mo, M. and Zhang, K. 2005. A new predatory fungus from China. Mycotaxon 89 : 235-239.

Zakaria, H. M., Kassab, A.S., Shamseldean, M.M., Oraby, M.M. and El-Mourshedy, M.M.F. 2013. Controlling the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in cucumber plants using some soil bioagents and some amendments under simulated field conditions. Annals of Agricultural Science (Online). Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2013.01.011 (Accessed 9 April 2013).

Zhang, J., Mo, M.H., Deng, J.S., Liu, X.F., Bi, T.J. and Zhang, K.Q. 2005. *Dactylella zhongdianensis* sp. nov., a new predacious antagonist of nematodes. Mycotaxon 92 : 289-294.

Zhang, Y., Qiao, M., Xu, J., Cao, Y., Zhang, K.Q. and Yu, Z.F. 2013. Genetic diversity and recombination in natural populations of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* from China. Ecology and Evolution 3 : 312-325.

Zhang, K.Q., Liu, X.Z. and Cao, L. 1996(a). A new species of *Arthrobotrys* from China. Mycological Research 100 : 274-276.

Zhang, K.Q., Liu, X.Z., Cao, L. and Gao, R.H. 1996(b). Nematophagous species of *Monacrosporium* from China. Mycological Research 100 : 527-530.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

**1. Martin's medium**

| | | |
|---|---|---|
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.5 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 1 | กรัม |
| Peptone | 5 | กรัม |
| Dextrose | 10 | กรัม |
| Agar | 20 | กรัม |
| Rose bongal (1%) | 3.3 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |
| Streptomycin sulfate | 30 | มิลลิกรัม |

**วิธีการ**

1. นำน้ำกลั่นผสมกับส่วนผสมที่เตรียมไว้ตามสูตร ยกเว้น streptomycin sulfate นำส่วนผสมเคี่ยวให้วุ้นละลายเข้ากันดี
2. นำส่วนผสมที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. ปล่อยให้พออุ่น เติม streptomycin sulfate แล้วเทอาหารในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

**2. Potato Dextose Broth (PDB)**

| | | |
|---|---|---|
| Potato | 200 | กรัม |
| Dextose | 20 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | กรัม |

**วิธีการ**

1. นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกและล้างให้สะอาด หั่นเป็นรูปลูกเต๋าขนาด 1 x 1 x 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มให้สุก กรองแยกเอาน้ำต้มมันฝรั่งมาผสมกับส่วนผสมอื่นๆตามสูตร
2. นำส่วนผสมที่ได้ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดทดลอง
3. นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

**3. Potato Dextose Agar (PDA)**

| | |
|---|---|
| Potato | 200 กรัม |
| Dextose | 20 กรัม |
| Agar | 15 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 กรัม |

**วิธีการ**

1. นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกและล้างให้สะอาด หั่นเป็นรูปลูกเต๋าขนาด 1 x 1 x 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มให้สุก กรองแยกเอาน้ำต้มมันฝรั่งมาผสมกับส่วนผสมอื่น ๆ ตามสูตร เคี่ยวให้วุ้นละลายเข้ากันดี
2. นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอด์น/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. ปล่อยให้พออุ่นแล้วเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

**4. Water Agar (WA) 1.2 %**

| | |
|---|---|
| Agar | 12 กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 กรัม |

**วิธีการ**

1. นำส่วนผสมเคี่ยวให้วุ้นละลายเข้ากันดี
2. นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที
3. ปล่อยให้พออุ่นแล้วเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

## ภาคผนวก ข

**ตารางภาคผนวกที่ 1** รหัสและจำนวนไอโซเลทของเชื้อราที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

| รหัสไอโซเลท | จำนวนไอโซเลท | ตัวอย่างที่แยก | แหล่งที่มา |
|---|---|---|---|
| SS01- | 2 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.อ่าวลึก จ.กระบี่ |
| SS02- | 3 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.อ่าวลึก จ.กระบี่ |
| SS03- | 2 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.เมือง จ.ตรัง |
| SS04- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ชะอวด จ.นครศรีธรรมราช |
| SS05- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ชะอวด จ.นครศรีธรรมราช |
| SS06- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.เชียรใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช |
| SS07- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.เชียรใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช |
| SS08- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช |
| SS09- | 2 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช |
| SS10- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช |
| SS11- | 1 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช |
| SS12- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ร่อนพิบูลย์ จ.นครศรีธรรมราช |
| SS13- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ระโนด จ.นครศรีธรรมราช |
| SS14- | 1 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ระโนด จ.นครศรีธรรมราช |
| SS15- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช |
| SS16- | 4 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ตะกั่วทุ่ง จ.พังงา |
| SS17- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ป่าบอน จ.พัทลุง |
| SS18- | 8 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ถลาง จ.ภูเก็ต |
| SS19- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.เมือง จ.ยะลา |
| SS20- | 1 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ควนเนียง จ.สงขลา |
| SS21- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ควนเนียง จ.สงขลา |
| SS22- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ควนเนียง จ.สงขลา |
| SS23- | 3 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ควนเนียง จ.สงขลา |
| SS24- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.บางกล่ำ จ.สงขลา |

| รหัสไอโซเลท | จำนวนไอโซเลท | ตัวอย่างที่แยก | แหล่งที่มา |
|---|---|---|---|
| SS25- | 4 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.บางกล่ำ จ.สงขลา |
| SS26- | 2 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา |
| SS27- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.ท่าแพ จ.สตูล |
| SS28- | 2 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี |
| SS29- | 3 | ดินแปลงปลูกพริก | อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี |
| SS30- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.พระแสง จ.สุราษฎร์ธานี |
| SS31- | - | ดินแปลงปลูกพริก | อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี |
| WS01- | 8 | ชิ้นส่วนพืชในแหล่งน้ำ | จ.นครศรีธรรมราช (ป่าพรุควนเคร็ง) |
| WS02- | 4 | ชิ้นส่วนพืชในแหล่งน้ำ | จ.นราธิวาส (ป่าพรุโต๊ะแดง) |
| WS03- | 3 | ชิ้นส่วนพืชในแหล่งน้ำ | จ.ยะลา (อ่างเก็บน้ำสวนขวัญเมือง) |
| WS04- | 4 | ชิ้นส่วนพืชในแหล่งน้ำ | จ.สงขลา (สระบัว) |
| EM01- | 10 | กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม | อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช |
| EM02- | 9 | กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม | อ.ป่าบอน จ.พัทลุง |
| EM03- | 7 | กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม | อ.เมือง จ.ยะลา |
| EM04- | 14 | กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม | อ.ควนเนียง จ.สงขลา |
| EM05- | 9 | กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม | อ.ท่าแพ จ.สตูล |
| EM06- | 11 | กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม | อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี |

| รหัสไอโซเลท | จำนวนไอโซเลท | ตัวอย่างที่แยก | แหล่งที่มา |
|---|---|---|---|
| SR01- | 18 | ดินที่พบโรครากปมของพริก | อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช |
| SR02- | 12 | ดินที่พบโรครากปมของพริก | อ.ป่าบอน จ.พัทลุง |
| SR03- | 6 | ดินที่พบโรครากปมของพริก | อ.เมือง จ.ยะลา |
| SR04- | 21 | ดินที่พบโรครากปมของพริก | อ.ควนเนียง จ.สงขลา |
| SR05- | 9 | ดินที่พบโรครากปมของพริก | อ.ท่าแพ จ.สตูล |
| SR06- | 17 | ดินที่พบโรครากปมของพริก | อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี |

**ตารางภาคผนวกที่ 2** ชนิดและรหัสไอโซเลทของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน

| เชื้อรา | ไอโซเลท | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| *Arthrobotrys oligospora* | SS02-02 | SS09-02 | SS09-03 | SS20-01 | |
| *Monacrosporium bembicodes* | SS03-01 | SS03-04 | SS16-04 | SS18-01 | SS18-02 |
| | SS18-03 | SS18-04 | SS18-05 | SS25-01 | SS25-02 |
| | SS25-03 | SS25-04 | SS28-02 | SS28-03 | |
| *Monacrosporium aphrobrochum* | SS11-02 | SS14-02 | SS23-01 | SS23-02 | SS23-03 |
| | SS29-02 | SS29-03 | | | |
| *Monacrosporium thaumasium* | SS01-02 | SS01-05 | SS02-01 | SS02-03 | SS16-01 |
| | SS16-03 | SS16-05 | SS26-02 | SS26-03 | SS29-04 |
| *Harposporium cycloides* | SS18-01 | SS18-02 | SS18-04 | | |

**ตารางภาคผนวกที่ 3** ชนิดและรหัสไอโซเลทของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากชิ้นส่วนของพืชที่จมหรือลอยอยู่ในน้ำ

| สถานที่ | ไอโซเลท | ชนิดของเชื้อรา | วัสดุที่พบ |
|---|---|---|---|
| จ.นครศรีธรรมราช | WS01-01 | *Arthrobotry oligospora* | ใบไม้ไม่ทราบชนิด |
| (พรุควนเคร็ง) | WS01-02 | *Monacrosporium aphrobrochum* | กิ่งไม้ไม่ทราบชนิด |
| | WS01-03 | *Monacrosporium aphrobrochum* | เปลือกไม้เสม็ด |
| | WS01-04 | *Monacrosporium bembicodes* | ใบกระถินณรงค์ |
| | WS01-05 | *Monacrosporium bembicodes* | กกไม่ทราบชนิด |
| | WS01-06 | *Monacrosporium bembicodes* | จอกแหนไม่ทราบชนิด |
| | WS01-07 | *Monacrosporium bembicodes* | ใบบัว |
| | WS01-08 | *Monacrosporium thaumasium* | สาหร่ายไม่ทราบชนิด |
| จ.นราธิวาส | WS02-01 | *Monacrosporium bembicodes* | ก้านบัว |
| (พรุโต๊ะแดง) | WS02-02 | *Monacrosporium bembicodes* | สาหร่ายไม่ทราบชนิด |
| | WS02-03 | *Monacrosporium thaumasium* | ใบสาคู |
| | WS02-04 | *Monacrosporium thaumasium* | ลูกหลุมพี |
| จ.ยะลา | WS03-01 | *Monacrosporium aphrobrochum* | ใบไผ่ |
| (อ่างเก็บน้ำสวนขวัญเมือง) | WS03-02 | *Monacrosporium bembicodes* | ใบประดู่ |
| | WS03-03 | *Monacrosporium thaumasium* | กิ่งไม้ไม่ทราบชนิด |
| จ.สงขลา | WS04-01 | *Monacrosporium aphrobrochum* | ใบบัว |
| (สระบัว) | WS04-02 | *Monacrosporium bembicodes* | วัชพืชน้ำไม่ทราบชนิด |
| | WS04-03 | *Monacrosporium thaumasium* | ผักตบชวา |
| | WS04-04 | *Monacrosporium thaumasium* | ผลไม้ทราบชนิด |

## ภาคผนวก ค

**ตารางภาคผนวกที่ 4** วิเคราะห์ความแปรปรวนระดับความรุนแรงในการเกิดปมของรากพริก (ระดับ 0-5) เมื่ออายุ 60 วัน

| Source | df | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| Treatment | 6 | 180.886 | 30.148 | 87.834* |
| Error | 133 | 45.650 | 0.343 | |
| Total | 139 | 226.536 | | |

C.V. 44.32%

*แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

**ตารางภาคผนวกที่ 5** วิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักรากสดของพริก เมื่ออายุ 60 วัน

| Source | df | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| Treatment | 6 | 394.380 | 65.730 | 56.992* |
| Error | 133 | 153.391 | 1.153 | |
| Total | 139 | 547.771 | | |

C.V. 19.93%

*แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

**ตารางภาคผนวกที่ 6** วิเคราะห์ความแปรปรวนน้ำหนักต้นสดของพริก เมื่ออายุ 60 วัน

| Source | df | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| Treatment | 6 | 701.568 | 116.928 | 42.507* |
| Error | 133 | 365.853 | 2.751 | |
| Total | 139 | 1,067.421 | | |

C.V. 11.43%

*แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

**ตารางภาคผนวกที่ 7** วิเคราะห์ความแปรปรวนผลผลิตพริก ที่เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 60 วัน

| Source | df | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| Treatment | 6 | 4,610.524 | 768.421 | 78.225* |
| Error | 133 | 1,306.495 | 9.823 | |
| Total | 139 | 5,917.019 | | |

C.V. 15.18%

*แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

# ประวัติผู้เขียน

**ชื่อ สกุล** นายสมลักษณ์ วงษ์ตานี

**รหัสประจำตัวนักศึกษา** 5110620029

**วุฒิการศึกษา**

| วุฒิ | ชื่อสถาบัน | ปีที่สำเร็จการศึกษา |
|---|---|---|
| วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ | 2547 |
| รัฐศาสตรบัณฑิต (ความสัมพันธ์ระหว่างประเทศและการเมืองการปกครองเปรียบเทียบ) | มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช | 2553 |

**ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน**

ตำแหน่ง นักวิชาการส่งเสริมการเกษตรชำนาญการ

สถานที่ทำงาน กลุ่มอารักขาพืช สำนักงานเกษตรจังหวัดนราธิวาส

**การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน**

สมลักษณ์ วงษ์ตานี และ วสันณ์ เพชรรัตน์. 2554. เชื้อรากับดักไส้เดือนฝอยในเขตภาคใต้ของประเทศไทย. รายงานการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 9 (วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์เพื่อสุขภาพ). วันที่ 30 มิถุนายน 2554. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. หน้า 76-82.