

การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*
โดยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp.
Biological Control of root-knot Nematode *Meloidogyne*
incognita by Spore suspension of *Trichoderma* spp.

วิไลวรรณ สารพงษ์, อมรศรี ขุนอินทร์^{1*}, สิริินภา ช่างโสภาส² และ วรณวิไล อินทนู¹
Wilaiwan Saraphong, Amonsri Khun-In^{1*}, Sirinapa Chungopast²,
and Wanwilai In-tanoo¹

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

² ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² Department of Soil Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author, Email: agramsk@ku.ac.th

Received: October 24, 2022;

Revised: April 5, 2023;

Accepted: May 19, 2023

บทคัดย่อ

โรครากปมจัดเป็นสาเหตุโรคที่สำคัญต่อการผลิตพืชอย่างมาก เนื่องจากไส้เดือนฝอยดังกล่าวมีพืชอาศัยที่กว้าง และเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วทำให้การควบคุมเป็นไปได้ยาก การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะควบคุมโรครากปมเพราะเชื้อรานี้สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) ในระดับห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งปลูกนาข้าวจังหวัดสุพรรณบุรี จังหวัดนครปฐม และจังหวัดพระนครศรีอยุธยา รวม 50 ไอโซเลท การทดสอบ พบว่ามีเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ Sp1, Sp4, Sp6.3/2, Ay10.1, DR 3.1/1, DR3.2, KU1.1/1, KU1.1/2 และ SPB04 ที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 และไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ เมื่อศึกษาหลักการเข้าทำลายพบว่าเชื้อราสามารถสร้างเส้นใยพัตริตตัวอ่อนระยะที่ 2 และสร้างเส้นใยเจริญคลุมทับกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยได้ สำหรับการทดสอบในเรือนทดลอง พบว่าเชื้อราทั้ง 9 ไอโซเลท สามารถลดการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในรากข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุม

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี, เชื้อรา *Trichoderma* spp., ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)

Abstract

Root-knot disease is a serious problem that effecting to plant production. The root-knot nematodes are among the most infected nematode with various hosts. Moreover, the behavior of root-knot nematodes live in soil which is difficult to manage. *Trichoderma* spp., present in natural areas as plant residues and effectively grow, are one of the biological methods used for control. The aim of this research was to evaluate spore suspension of *Trichoderma* spp. to control root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.) *in vitro* and *in vivo*. Fifty isolates of *Trichoderma* spp. were collected from rhizosphere soil of rice planting areas in Suphanburi, Phra Nakhon Si Ayutthaya and Nakhon Pathom Provinces. The finding indicated that 9 isolates; Sp1, Sp4, Sp6.3/2, Ay10.1, DR 3.1/1, DR3.2, KU1.1/1, KU1.1/2 and SPB04 could infect 2 nd stage juvenile (J2) and egg of root-knot nematodes. *Trichoderma* spp. mode of action was studied and found that fungal mycelium could wrap J2 of root-knot nematodes and developed mycelium cover egg masses. Under greenhouse condition, 9 isolates of *Trichoderma* spp. could absolutely reduce root-knot nematode infection when compared with control.

Keywords: Biological control, *Trichoderma* sp., root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)

บทนำ

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* เป็นสาเหตุที่สำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชทั่วโลก สร้างความเสียหายทั้งทางตรงและทางอ้อม (อมรศรี ขุนอินทร์, 2548) สามารถปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ทำให้แพร่กระจายได้ดีในสภาพภูมิอากาศที่หลากหลายโดยเฉพาะเขตร้อน Caillaud *et al.* (2008) มีการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis ทำให้สามารถขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว สำหรับประเทศไทยไส้เดือนฝอยชนิดนี้สามารถระบาดได้ทุกภาค ในปี 2563 อมรศรี ขุนอินทร์ (2563) ได้รายงานการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในข้าวนา น้ำลึก ซึ่งข้าวที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะแสดงอาการแคะแกร็น รากเป็นปุ่มปม (root knot, gall) ระบบท่อลำเลียงอาหารเกิดการอุดตัน ทำให้พืชต้งน้ำและธาตุอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ไม่เพียงพอ ทำให้ผลผลิตลดน้อยลง (อรพินท์ ทองอร่าม, 2556) การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี การควบคุมโดยเขตกรรม รวมไปถึงการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ อังคณา โรจน์ประจักษ์ และอมรศรี ขุนอินทร์ (2564) พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท T35-CO4, M4 และ O3-T34 สามารถลดการฟักตัวของกลุ่มไข่และการสร้างกลุ่มไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างเส้นใยพันรัด และสร้างเอนไซม์ เช่น โคติเนส, เซลลูเลส และกลูคาเนส ไปย่อยสลายผนังเซลล์ของไส้เดือนฝอยซึ่งมีส่วนประกอบของไคติน จากนั้นสร้างเส้นใยแทงเข้าไปและเจริญอยู่ภายในลำตัวทำให้ไส้เดือนฝอยสูญเสียความมีชีวิตเชื้อรา *Trichoderma* spp. ยังสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว สร้างสปอร์ได้ปริมาณมาก ช่วยให้สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชได้ดี และมีรายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. บางสายพันธุ์สามารถเป็นปรสิต(parasite) ของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2549) Sharon *et al.* (2007) ในปัจจุบันได้มีการนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. มาใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชทั้งเชื้อในดินและบนผิวพืชอย่างกว้างขวาง มะลิฉัตร พันธุ์มัย (2556) พบว่าสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพต่อการลดความรุนแรงโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *M. incognita* โดยการรดโคนต้นและการฉีดพ่นทางใบด้วยสารแขวนลอยสปอร์สามารถกระตุ้นให้ต้นแดงเกิดความต้านทานต่อโรครากปมได้ และ Ahmad Saad Al-Hazmi & Muhammad Tariq Javeed (2015) พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* และ *T. viride* ที่ความเข้มข้น 1010 สปอร์/กรัมของดิน มีประสิทธิภาพในการควบคุมและลดการเกิดโรครากปมในต้นมะเขือเทศได้ จากข้อมูลข้างต้นทำให้เราได้ข้อมูลพื้นฐานในการจัดการและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) ในระดับห้องปฏิบัติการและในเรือนทดลอง เพื่อเป็นแนวทางนำไปสู่การพัฒนาการผลิตชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์เพื่อประโยชน์ทางโรคพืชในอนาคต

ระเบียบวิธีวิจัย

1.การสุ่มเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Trichoderma* spp. และแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

สุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณใกล้รากปมข้าวจำนวน 500 กรัม จากแหล่งนาข้าวจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม และพระนครศรีอยุธยา ที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมพร้อมระบุตำแหน่งของพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง โดยวิธีเดินแบบซิกแซก จากนั้นนำตัวอย่างดินไปผึ่งลมให้แห้ง นำดินที่แห้งมาชั่งน้ำหนัก 1 กรัม มาเจือจางด้วยเทคนิค Dilution method ที่ความเข้มข้น 1×10^4 CFU/กรัม ใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยที่ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Martin's medium เมื่อครบ 3 วัน นำไปส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope ใช้เข็มเย็บที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขียนเส้นใย เชื้อรา *Trichoderma* spp. มาเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA (potato dextrose agar) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อราไป ศึกษาลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยา และนำเชื้อราบริสุทธิ์ไปเพิ่มจำนวนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อเก็บเป็นเชื้อ สำหรับใช้ในการทดลอง

2.การเตรียมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*

ทำไส้เดือนฝอยให้บริสุทธิ์โดยวิธี single egg mass inoculation พร้อมจำแนกชนิดโดยเทคนิคการตรวจรอยย่นส่วนกัน (perineal pattern) ตามวิธีของ Eisenback *et al.* (1981) จากนั้นนำกลุ่มไข่บริสุทธิ์ที่ได้มาล้างด้วย 1% sodium hypochlorite ตามวิธีการของ Ravichandra (2010) เพื่อนำไส้เดือนฝอยมาใช้ในการทดลอง ในส่วนของตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2)

ของไส้เดือนฝอยรากปม ให้นำกลุ่มไข่ที่ผ่านการทำความสะอาดไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน จะได้ตัวอ่อนระยะที่ 2 แล้วตัวอ่อนที่ได้นำไปปรับปริมาตรสำหรับการทดลอง 4.2

3. ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation จำนวน 50 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราทุกวัน จนครบ 7 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

4. การคัดเลือกและศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการฟักตัวของกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 50 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วย Hemacytometer ตามวิธีการของ น้ำค้าง สวัสดิ์ประดิษฐ์. (2557) มาใส่ใน 24 well-plate ตามด้วยกลุ่มไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 1 กลุ่มไข่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลกลุ่มไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย ตามวิธีการของ Khun-in *et al.* (2015) และจำนวนตัวอ่อนที่ฟักออกจากกลุ่มไข่ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด stereo microscope ที่เวลา 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ($P \leq 0.05$)

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*

นำตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 100 ตัว ใส่ในจาน 24 well-plate จากนั้นนำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลุมที่มีไส้เดือนฝอยรากปม ทำการทดลอง 5 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ บันทึกจำนวนไส้เดือนฝอยที่ตาย (ตัวเหยียดตรง) และจำนวนตัวอ่อนที่ถูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. เข้าทำลาย (พันรัด) ที่เวลา 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereoscopic microscope โดยดัดแปลงวิธีการจาก Sun *et al.* (2006) และ Khun-in *et al.* (2015) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA (water agar)

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. แต่ละไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA จากนั้นนำกลุ่มไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วางลงไป 1 กลุ่ม ห่างจากปลายเส้นใย 1 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง วางแผนการทดลอง แบบ CRD กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ และบันทึกจำนวนตัวอ่อนที่ฟักออกมาจากกลุ่มไข่ ที่เวลา 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereoscopic microscope และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ($P \leq 0.05$)

5. กลไกการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

หลังการทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการฟักตัวของกลุ่มไข่ การตายของไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 และต่อการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในหัวข้อที่ 4.1, 4.2 และหัวข้อที่ 4.3 ตามลำดับ นำมาศึกษาดูกลไกการเข้าทำลายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound microscope ที่กำลังขยาย 40x โดยดูลักษณะการเข้าทำลายของเส้นใยโดยตรงหรือพันรัดกลุ่มไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม บันทึกภาพโดยชุด Dino Capture 2.0 version 1.5.29.B

6. ประสิทธิภาพของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเกิดโรครากปมขาวในเรือนทดลอง

นำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยรากปมในระดับห้องปฏิบัติการ รวม 9 ไอโซเลท ได้แก่ Sp1, Sp4, Sp6.3/2, Ay10.1, DR 3.1/1, DR3.2, KU1.1/1, KU1.1/2, และ SPB04 มาทดสอบการเกิดโรครากปม ขาวโดยนำต้นข้าวสาลีพันธุ์ กข31 อายุ 15 วัน ปลูกลงแก้วพลาสติกใสขนาด 20 ออนซ์ ที่บรรจุดินที่ผ่านการ

อบฆ่าเชื้อแล้ว ใช้แท่งแก้วทำหลุมลึกประมาณ 1 นิ้ว ห่างจากต้น 1 นิ้ว ใช้ไม้โครปิเตตุดสปอร์แขวนลอยของแต่ละไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงไปหลุมตามกรรมวิธีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่แช่เมล็ดข้าวด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ก่อนปลูก

- ใส่ J2 อย่างเดียว (ชุดควบคุม)
- ใส่ J2 ก่อน 1 วัน ตามด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp.
- ใส่ J2 ตามด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

กรรมวิธีที่ 2 แช่เมล็ดข้าวด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปปลูก

- ใส่ J2 อย่างเดียว (ชุดควบคุม)
- ใส่ J2 ก่อน 1 วัน ตามด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp.
- ใส่ J2 ตามด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

รดน้ำปกติ เมื่อครบ 20 วัน หลังจากปลูกเขื่อนำมาบันทึกผลการทดลองโดยนำรากมาย้อมสี acid fuchsin เพื่อตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายต้นข้าวภายใต้กล้อง compound microscope

ผลการทดลอง

1. ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 50 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเจริญเต็มหน้าอาหารที่ 3 วัน และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เชื้อรา *Trichoderma* spp. มีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกัน คือเส้นใยเจริญลักษณะแผ่ราบไปกับผิวหน้าอาหาร ถึงฟูเล็กน้อย สร้างเส้นใยสีขาวบริเวณขอบโคโลนี บริเวณด้านในมีการสร้างสปอร์สีขาว ถึงเขียวมะกอกกระจายทั่วโคโลนี ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน Aness et al. (2010); พรามมาส เจริญรักษ์. (2559); อังคณา โรจน์ประจักษ์ และอมรศรี ขุนอินทร์ (2564) เชื้อราในสกุล *Trichoderma* spp. สามารถเจริญและสร้างส่วนขยายพันธุ์ได้รวดเร็วทั้งในสภาพแปลง และห้องปฏิบัติการ

2. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ

2.1 ประสิทธิภาพของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการฟักตัวของกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

จากการทดสอบเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 50 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ แต่มี 5 ไอโซเลท ได้แก่ SPB04, Ay10.1, DR3.1/1, Sp6.3/2 และ Sp4 สามารถเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 1) โดยไอโซเลท SPB04 ทำให้กลุ่มไข่ฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ต่ำที่สุด เพียง 4.67 ตัว รองลงมาคือ Ay10.1 ฟัก 6.67 ตัว หลังจากทดสอบ 120 ชั่วโมง

2.2 ประสิทธิภาพของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

จากการทดสอบเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่ามี 6 ไอโซเลท ได้แก่ SPB04, Sp1, Sp6.3/2, Sp4, DR3.2 และ KU1.1/1 เส้นใยสามารถพันรัดตัวอ่อน และทำให้ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมตายได้ดีที่สุด หลังจากทดสอบเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) โดยไอโซเลท SPB04 มีค่าเฉลี่ยการพันรัดตัวอ่อนระยะที่ 2 มากที่สุด คือ 26.75 ตัว รองลงมาคือ Sp1 มีค่าเฉลี่ยการพันรัดตัวอ่อนระยะที่ 2 คือ 20.75 ตัว

2.3 ประสิทธิภาพของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่ามี 4 ไอโซเลท ได้แก่ SPB04, Sp1, KU1.1/1 และ KU1.1/2 ที่สามารถสร้างเส้นใยเจริญคลุมทับกลุ่มไข่ ส่งผลให้การฟักตัวของกลุ่มไข่ไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยไอโซเลท SPB04 ทำให้กลุ่มไข่ฟักเป็นตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 ต่ำสุด เพียง 8.75 ตัว รองลงมาคือ Sp1 จำนวน 12.50 ตัว หลังจากทดสอบ 120 ชั่วโมง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. ประสิทธิภาพของสปอร์แขวนลอย และเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการฟักไข่และการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* หลังจากการทดสอบเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

Isolate	Spore Suspension			J2*		Mycelium
	Egg mass*			J2*		Egg mass*
	Hatched J2	Dead of Hatched J2	Colonize	colonize	dead	Hatched J2
Control	289.00 a	0.00 k	0.00 o	0.00 u	0.00 i	168.50 a
Sp 1	42.33 rs	1.33 gh	4.33 gh	20.75 b	3.25 a	12.50 xy
Sp 3.2	76.67 fg	2.67 de	5.00 fg	8.75 ef	0.75 fg	64.00 jk
Sp 3.3	54.33 mn	0.00 k	0.00 o	7.00 hi	0.75 fg	29.00 st
Sp 4	18.33 xy	0.33 jk	4.67 fg	15.00 c	2.50 ab	52.00 mn
Sp 4.1	76.00 fg	3.67 cd	6.67 cd	6.75 hi	1.25 de	73.00 hi
Sp 5.3/2	75.00 fg	0.00 k	8.33 ab	4.00 op	0.50 gh	68.25 ij
Sp 6.3/2	16.67 yz	2.00 fg	4.33 gh	18.50 b	2.00 bc	39.75 pq
Sp 7.1	63.67 ij	0.67 ij	1.67 mn	3.75 pq	0.25 hi	56.75 lm
Sp 7.3	62.00 jk	0.33 jk	1.33 no	7.50 gh	0.50 gh	56.00 lm
Ay 1.1/2	46.67 qr	0.00 k	5.33 fg	6.75 hi	2.00 bc	38.75 qr
Ay 1.2/2	40.67 st	0.00 k	3.67 hi	5.50 kl	0.50 gh	20.25 vw
Ay 8.2	35.00 uv	0.33 jk	2.33 kl	3.50 qr	0.00 i	59.25 kl
Ay 8.3/1	73.67 gh	2.00 fg	3.33 hi	3.75 pq	0.25 hi	58.00 lm
Ay 10.1	6.67 z	0.33 jk	1.00 no	11.50de	2.00 bc	50.75 no
Ay 10.2/2	38.67 tu	1.00 hi	3.33 hi	4.75mn	0.25 hi	112.75 cd
Ay 10.3/1	59.33 kl	2.67 de	6.00 de	3.75 pq	0.75 fg	25.00 uv
Ay 12.3/2	46.67 qr	1.67 gh	3.67 hi	5.25 lm	0.50 gh	54.25 lm
Ay 13.1/2	69.67 hi	1.67 gh	5.67 ef	9.25 ef	2.00 bc	13.50 xy
Ay 13.1/3	54.67 mn	1.67 gh	6.67 cd	3.25 rs	0.25 hi	36.75 rs
SPB 02	30.00 vw	0.67 ij	1.33 no	6.50 hi	1.50 cd	66.00 ij
SPB 04	4.67 z	0.00 k	1.00 no	26.75 a	2.25 bc	8.75 y
KU 1.1/1	56.00 lm	1.67 gh	9.33 ab	11.25de	1.00 ef	17.00 wx
KU 1.1/2	48.33 qr	1.33 gh	3.33 hi	10.75de	0.25 hi	26.50 tu
KU 1.2/1	50.00 pq	2.00 fg	3.33 hi	8.25 fg	0.50 gh	19.25 vw
NPT 11	35.33 uv	0.67 ij	3.67 hi	6.50 hi	0.50 gh	54.25 lm
MR 2.1	142.67 cd	5.00 bc	8.67 ab	9.00 ef	1.25 de	24.50 uv
MR 2.2	135.67 d	4.00 bc	6.00 de	5.25 lm	2.00 bc	20.00 vw
MR 2.3	71.33 hi	2.00 fg	3.33 hi	8.00 fg	0.50 gh	19.25 vw
DR 1.2/1	157.33 c	3.67 cd	10.67 a	4.00 op	1.25 de	92.60 ef
DR 1.2/2	89.67 ef	2.00 fg	3.67 hi	5.00mn	0.25 hi	56.00 lm
DR 1.2/3	206.00 b	6.67 a	11.00 a	6.00 jk	2.00 bc	65.25 ij
DR 3.1/1	14.33 yz	1.00 hi	1.67 mn	7.00 hi	0.25 hi	102.75 cd
DR 3.1/2	135.67 d	5.33 ab	7.33 bc	5.00mn	1.50 cd	99.50 de
DR 3.1/3	192.33 b	4.00 bc	10.00 ab	10.25de	1.50 cd	113.00 cd
DR 3.2	43.67 rs	2.33 ef	5.33 fg	12.25cd	1.75 bc	53.50 mn
KU/P 1.1	74.67 fg	0.67 ij	2.00 lm	6.25 ij	0.50 gh	19.25 vw
KU/P 1.1/1	53.00 no	0.67 ij	3.33 hi	5.75 kl	1.25 de	32.75 st
KU/P 1.1/2	50.33 pq	1.33 gh	3.33 hi	4.50 no	2.50 ab	68.25 ij
KU/P 1.1/3	67.67 hi	0.33 jk	2.00 lm	5.25 lm	0.00 i	43.25 op
KU/P 1.2	27.67 wx	1.67 gh	1.67 mn	4.25 no	1.50 cd	90.25 ef
KU/P 1.2/1	53.67 no	1.33 gh	3.00 ij	4.00 op	1.25 de	77.75 gh
KU/P 1.3	105.00 e	0.67 ij	2.00 lm	5.00mn	0.25 hi	86.00 fg
KU/P 3.1/1	79.33 fg	1.33 gh	2.33 kl	4.75mn	0.50 gh	63.50 jk
KU/P 12.3	83.67 fg	1.33 gh	2.00 lm	4.50 no	1.00 ef	86.00 fg
KU/P 12.3/1	91.33 ef	2.00 fg	2.33 kl	3.75 pq	1.00 ef	76.75 gh

ตารางที่ 1. ประสิทธิภาพของสปอร์แวนลอย และเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการฟักไข่และการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* หลังจากการทดสอบเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolate	Spore Suspension			J2*		Mycelium
	Egg mass*					Egg mass*
	Hatched J2	Dead of Hatched J2	Colonize	colonize	dead	Hatched J2
KU/P 13.1	194.67 b	0.00 k	2.67 jk	5.25 lm	0.50 gh	78.75 gh
KU/P 13.2	102.00 e	3.33 de	8.33 ab	5.25 lm	0.50 gh	116.00 c
KU/P 15.1	67.00 hi	1.67 gh	5.33 fg	6.75 hi	0.75 fg	100.75 de
KU/P 17. 1	72.33 hi	1.33 gh	2.33 kl	3.00 st	0.50 gh	28.75 tu
KU/P 17.2	51.67 op	1.67 gh	3.00 ij	2.25 tu	0.25 hi	141.50 b

*ค่าเฉลี่ย(ตัว) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกัน



รูปภาพที่ 1. เส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. เข้าทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 (A) ไข่และกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย-รากปม *Meloidogyne* sp. (B และ C) ลูกศรชี้หมายถึงเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp.

3. ประสิทธิภาพของสปอร์แวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. ในเรือนทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสปอร์แวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่ามีเชื้อรา 4 ไอโซเลต คือ SPB04, Sp1, Sp4, Sp6.3/2, และ KU1.1/1 ยังถือเป็น *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการควบคุมการเจริญและพัฒนาของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. โดยที่หลังการตรวจสอบมีศักยภาพในการลดจำนวนประชากรที่เข้าทำลายรากข้าวเพียง 166.0 และ 139.14 ตัว ในกรรมวิธีไม่แช่เมล็ดด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยรากปม และพบไส้เดือนฝอยรากปมในรากข้าว 155.71 และ 138.74 ตัวในกรรมวิธีแช่เมล็ดข้าว ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยรากปม เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุมที่พบไส้เดือนฝอยรากปมในรากข้าว 321.14 และ 275.71 ตัว โดยกรรมวิธีการนำเมล็ดข้าวไปแช่ด้วยสปอร์แวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ก่อนปลูก 24 ชั่วโมงและกรรมวิธีที่ไม่ได้แช่สปอร์แวนลอยก่อนปลูก มีจำนวนตัวอ่อนที่พบในรากข้าว ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อราในสกุล *Trichoderma* spp. มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bigirimana *et al.* (1997) พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถกระตุ้นให้พืชมีต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรค และไส้เดือนฝอยได้โดยการเปลี่ยนแปลงกระบวนการ transcriptomic การสร้างสารทุติยภูมิเพื่อให้พืชมีการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุได้รวดเร็ว

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเกิดโรครากปมหลังจากใส่ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. เป็นเวลา 20 วัน ในสภาพเรือนทดลอง

Isolate	Number of infected nematodes in rice root			
	Do not soak seed in spore suspension before planting ¹		Soak seed in spore suspension before planting ¹	
	J2 before 1 day + T	J2 + T	J2 before 1 day + T	J2 + T
Control	321.14a	275.71a	308.43a	278.29a
Sp1	172.57c	154.29d	165.86d	127.57f
Sp4	179.14c	159.29cd	168.14d	144.86def
Sp6.3/2	184.86c	161.86cd	174.43d	151.29de
KU1.1/1	192.29c	180.14c	171.57d	161.86cd
KU1.1/2	228.14b	210.57b	212.71c	177.86c
DR3.2	252.86b	224.14b	239.00b	212.86b
DR3.1/1	229.29b	204.29b	211.86c	180.14c
Ay10.1	245.86b	220.00b	233.14bc	206.57b
SPB04	166.00c	139.14d	155.71d	136.14ef

¹ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกัน ในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $P < 0.05$ by DMRT.

สรุปผล

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 50 ไอโซเลท พบว่า เชื้อราเจริญเติบโตได้รวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเจริญเต็มหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 3 วัน จากการทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยพบเชื้อรา *Trichoderma* spp. รวม 9 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเชื้อราไอโซเลท SPB04 มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายได้ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง และจากการศึกษากลไกการเข้าทำลายเชื้อราสามารถสร้างเส้นใยแทงและสร้างเส้นใยพันรัดตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมได้โดยตรง

อภิปรายผล

จากการทดลองพบว่า สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. มีศักยภาพในการทำลายกลุ่มไข่ และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมในห้องปฏิบัติการได้ ได้ตั้งแต่ช่วงเวลา 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมงโดยเชื้อดังกล่าวสร้างเส้นใยไปแทงและพันรัดกลุ่มไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Suarez *et al.* (2004) รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถเป็นปรสิตโดยตรงของไข่และตัวอ่อนหรือตัวเต็มวัย ด้วยการผลิต chitinase และ protease ซึ่งสามารถเข้าทำลายไข่และตัวอ่อนหรือตัวเต็มวัยได้ เนื่องจาก Chitin เป็นสาร homopolymer ประกอบขึ้นจาก β -1,4-linked ของ N-acetylglucosamine เป็น polymer ที่พบในส่วนประกอบของโครงสร้างของเปลือกไข่ไส้เดือนฝอย เมื่อเชื้อราสร้างเอนไซม์ไคตินเนส ออกมาทำให้สามารถย่อยผนังของไข่ได้เดือนฝอยได้ และเมื่อศึกษาระยะเวลาในการเข้าทำลายพบว่าเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น ประสิทธิภาพการเข้าทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 จะเพิ่มมากขึ้น และจากการนำเชื้อรามาทดลองการควบคุมโรครากปมในข้าวเชื้อราสามารถลดจำนวนประชากรในรากข้าวได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับแหล่งทุนสนับสนุนจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สวก.)

References

- จิระเดช แจ่มสว่าง. (2549). การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. นครปฐม. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน
- น้ำค้าง สวัสดิ์ประดิษฐ์. (2557). การใช้ไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* เพื่อยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
- พรวิมาส เจริญรักษ์. 2559. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma asperellum* ในการลดโรคเมล็ดด่าง ส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตของข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม.
- มะลิฉัตร พันธุ์มัย. (2556). การลดความรุนแรงของโรครากปมในแตงกวาเมื่อปลูกเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่รากหรือใบ. แก่นเกษตร, 41(1), 538-542.
- อมรศรี ชุนอินทร์. (2548). อิทธิพลของเห็ดบางชนิดที่มีผลต่อไส้เดือนฝอยรากปม. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. บัณฑิต-วิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อมรศรี ชุนอินทร์. (2563). การศึกษาประชากรไส้เดือนฝอยศัตรูข้าวและระดับรุนแรงของของโรคในพื้นที่ปลูกข้าว จังหวัดพระนครศรีอยุธยา. แก่นเกษตร, 48(6), 1374-1383.
- อรพินท์ ทองอร่าม. (2556). การแสดงออกของลักษณะทางกายภาพและความแปรปรวนของฝรั่งพันธุ์ทนทาน “KKUU-GGUU AARRDD N Noo.1.1” ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อังคณา โรจน์ประจักษ์และอมรศรี ชุนอินทร์. 2564. ศักยภาพของสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุม การฟักและการพัฒนาของ กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยสาเหตุรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในมะเขือเทศ. วารสาร เกษตรพระจอมเกล้า. 39(3): 198-205.
- Ahmad Saad Al-Hazmi, & Muhammad Tariq Javeed. (2015). **Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato.** Saudi Journal of Biological Sciences, 1319-1562.
- Aness, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L.G., Heraud, C. and Steinberg, C. 2010. **Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*.** Fungal Biology 114(9): 691-701.
- Bigirimana, J., De Meyer, G., Poppe, J., Elad, Y. and Höfte, M. 1997. **Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*.** Ghent University; Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen 62: 1001-1007.
- Caillaud, M. C., G. Dubreuil. M. Quentin, L.Perfus-Barbeoch, P. Lecomte, J. D. A. Engler, P. Abad, M.N.Rosso and B.Favery. 2008. Root-Knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of plant Physiology.**165: 104-113.
- Eisenback, J. D., H. Hirschmann, J. N. Sasser and A. C. Triantaphyllou. 1981. **A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.),** with a pictorial key. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina. 48 p.
- Khun-in, A., S .Sukhakul, C.Chamswarn, P.Tangkijchote and A. Sasnarukkit. 2015. Culture filtrate of *Pleurotus ostreatus* isolate Poa3 effect on egg mass hatching and juvenile of *Meloidogyne incognita* and its potential for biological control. Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences.21(1): 46-54.
- Ravichandra, N. G. 2010. Methods and techniques in plant nematology. Delhi, India: PHI Learning Pvt. Ltd. Sahebani, N., and Hadavi, N. 2008. Biological control of the root-knot nematode

Meloidogyne javanica by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology and Biochemistry 40(8): 2016-2020.

Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E., and Llobell, A. 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin -like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. Applied Microbiology and Biotechnology 65(1): 46-55.

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