รายงานโครงการวิจัย

การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรและการใช้ประโยชน์

Conservation and Utilization of Agricultural Microorganisms

หัวหน้าโครงการวิจัย

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

NUCHANART TANGCHITSOMKID

ปี พ.ศ. 2561

รายงานโครงการวิจัย

การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรและการใช้ประโยชน์

Conservation and Utilization of Agricultural Microorganisms

หัวหน้าโครงการวิจัย

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

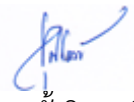
NUCHANART TANGCHITSOMKID

ปี พ.ศ. 2561

คำปรารภ

กรมวิชาการเกษตร เป็นแหล่งเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ทางการเกษตรที่มีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์จำนวนมาก มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ตามภารกิจโดยนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน ได้แก่ จุลินทรีย์ดิน จุลินทรีย์ย่อยสลาย จุลินทรีย์กำจัดศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช จุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว จุลินทรีย์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรม และสายพันธุ์เห็ด เป็นศูนย์กลางความรู้และเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์แต่ละชนิดและสายพันธุ์ซึ่งนับเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อการเกษตรของประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง ณ ปัจจุบัน มีความพร้อมด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตรในทุกมิติของการศึกษาค้นคว้า วิจัย มีบุคลากรเฉพาะสาขาวิชา องค์ความรู้ เทคโนโลยี กระบวนการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงภาคสนาม และจุลินทรีย์บางชนิดสามารถถ่ายทอดสู่ภาคการเกษตรและภาคเอกชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ กรมวิชาการเกษตร จึงมีศักยภาพที่จะเป็นผู้นำในด้านจุลินทรีย์ตามบทบาทและภารกิจ

อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องทางการเกษตรมีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ ดังนั้น การพยายามค้นหา เก็บรวบรวมจุลินทรีย์ชนิดและสายพันธุ์ใหม่ในประเทศไทย เพื่อนำมาวิจัยและพัฒนาไปสู่การใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่องยังคงเป็นภารกิจของนักวิจัย อันนำไปสู่การพัฒนาประเทศต่อไป



นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

มีนาคม 2562

สารบัญ	**หน้า**
กิตติกรรมประกาศ	5
ผู้วิจัย	5
บทนำ	6
บทคัดย่อ	7
การทดลองที่ 1 การเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดราปฏิปักษ์ควบคุมโรคราก้ปม	10
การทดลองที่ 2 การทดสอบคุณสมบัติการเพิ่มขยายราปฏิปักษ์ควบคุมโรคราก้ปมในอาหารต่างๆ	20
การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราก้ปมในระดับโรงเรือน	28
การทดลองที่ 4 การเก็บรวบรวม อนุรักษ์และจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง	40
การทดลองที่ 5 การประเมินศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการควบคุมแมลงศัตรูพืช	50
การทดลองที่ 6 การทดสอบคุณสมบัติการเพิ่มขยายไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในอาหารเทียม	61
การทดลองที่ 7 การเก็บรวบรวม จำแนก และคัดเลือกแบคทีเรียบีทีควบคุมแมลงศัตรูพืชเพื่ออนุรักษ์และใช้ประโยชน์	69
การทดลองที่ 8 การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์ทางการเกษตรและการบริการ	84
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	102

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยภายใต้โครงการ การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรและการใช้ประโยชน์ ได้รับความร่วมมือจากคณะนักวิจัย ดำเนินงานวิจัยอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 3 ปี (ปี 2559-2561) โดยได้รับการพิจารณาและสนับสนุนให้ดำเนินงานจากกรมวิชาการเกษตร และสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ ผลของงานเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สามารถนำไปต่อยอดสู่การประยุกต์ใช้และขยายผลสู่เกษตรกรต่อไป

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

มีนาคม 2562

ผู้วิจัย

นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวภรณี สว่างศรี	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
นางสาวอัครชาพรรณ กวางแก้ว	สังกัด ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร
นางเสริมพร กิ่งพุทธพงศ์	สังกัด ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร

บทนำ

จุลินทรีย์ทางการเกษตรมีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์จำนวนมาก ในระบบนิเวศเกษตร สามารถแบ่งได้หลายกลุ่มขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ที่อยู่อาศัย แหล่งอาหาร สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และความชื้น ที่มีผลต่อการดำรงชีวิต การใช้อาหาร และความอยู่รอดในสภาพธรรมชาตินั้นๆ โดยจุลินทรีย์ทางการเกษตรมีทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษต่อดินและพืชที่ปลูกในระบบนิเวศ ซึ่งนักวิจัยได้พยายามเก็บรวบรวมและจำแนกจุลินทรีย์จากสภาพแวดล้อมต่างๆ นำมาศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อการนำจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่ม ได้แก่ จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช จุลินทรีย์ย่อยสลาย จุลินทรีย์ดิน จุลินทรีย์อาหาร จุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว และจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานวิจัยพัฒนาด้านจุลินทรีย์ตั้งแต่การเก็บรวบรวม จัดจำแนกและเก็บรักษาให้คงความมีชีวิต การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มปริมาณ และการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอ็นไซม์ต่างๆ เพื่อพัฒนาไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรอย่างต่อเนื่อง เช่น แบคทีเรียไรโซเบียมตรึงไนโตรเจน แบคทีเรียบาซิลัสย่อยสลายเซลลูโลส แบคทีเรียบีทีกำจัดแมลง ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง และรากำจัดแมลง เป็นต้น โดยจุลินทรีย์บางชนิดมีการผลิตขยายและถ่ายทอดไปสู่ภาคการเกษตรมากกว่า 30 ปี ซึ่งมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง แต่อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มที่นำไปใช้ประโยชน์ยังมีข้อจำกัดของความแข็งแรงและศักยภาพในการนำไปใช้ เนื่องจากการนำขึ้นมาจากธรรมชาติและเลี้ยงเชื้อต่อเนื่องในสภาพห้องปฏิบัติการระยะเวลาหนึ่ง จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ลดลงหรือตายไป ดังนั้น การเก็บรวบรวมและอนุรักษ์จุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์ จึงควรมีการดำเนินการศึกษาเก็บรวบรวม จำแนก และคัดเลือกชนิด/สายพันธุ์อย่างต่อเนื่อง เพื่ออนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพตามความต้องการใช้หรือได้จุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีศักยภาพ/ประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์เดิม อันจะเกิดประโยชน์ต่อการใช้จุลินทรีย์จากความหลากหลายทางชีวภาพให้เกิดประโยชน์สูงสุด และสามารถนำไปใช้ทางการเกษตรได้จริง นอกจากนั้น ควรให้ความสำคัญการจัดการฐานข้อมูลจุลินทรีย์ที่มีอยู่มากกว่า 10,000 ไอโซเลท/ชนิด/สายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร หรือที่ได้จากการเก็บรวบรวมใหม่ ให้เป็นระบบที่สามารถสืบค้นรายละเอียดของตัวเชื้อได้อย่างรวดเร็ว มีแหล่งจัดเก็บรักษาให้คงความมีชีวิต รวมทั้งรายชื่อนักวิจัยผู้รับผิดชอบในแต่ละชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อให้เข้าถึงได้ง่าย สามารถบริการข้อมูล การขออนุญาตใช้จุลินทรีย์ และถ่ายทอดเทคโนโลยีต่างๆ แก่ผู้สนใจ โดยเป็นจุดเชื่อมโยงระหว่างนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้านไปสู่นักวิจัย นิสิต-นักศึกษา และเกษตรกร ผู้ต้องการต่อยอดหรือใช้ประโยชน์ และเชื่อมโยงกับฐานข้อมูลของหน่วยงานอื่นๆ เป็นเครือข่ายฐานข้อมูลจุลินทรีย์ของประเทศไทยอย่างเป็นระบบ สามารถสืบค้นได้สะดวก และรวดเร็วเพื่อให้ประเทศไทยเป็นผู้นำในกลุ่มอาเซียนด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตรและเทคโนโลยีในทุกๆ ด้าน สามารถนำไปขยายผล และ/หรือนำจุลินทรีย์หลากหลายชนิด/สายพันธุ์ที่มีศักยภาพไปวิจัยพัฒนาตามระบบการจัดการอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

โครงการวิจัยมีวิธีดำเนินการตั้งแต่ การเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชสายพันธุ์ใหม่ๆ ได้แก่ ราปฏิปักษ์ควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากปม ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง แบคทีเรียบีทีควบคุมแมลง ตามแหล่งที่อยู่อาศัยทุกภาคของประเทศ นำมาจำแนกสกุล/ชนิด รวมทั้งมีการประเมินคุณค่าของจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าว และทดสอบคัดเลือกที่มีศักยภาพสูง เพื่อการใช้ประโยชน์ทางการเกษตรทั้งในเชิงอนุรักษ์และ/หรือเชิงพาณิชย์ และทำการเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้คงความมีชีวิตและคุณสมบัติในแต่ละไอโซเลทสำหรับการพัฒนาต่อยอดไปใช้ประโยชน์ โดยครอบคลุมถึงการเก็บรวบรวมข้อมูลรายละเอียดของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตร ได้แก่ จุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช จุลินทรีย์ย่อยสลาย จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จุลินทรีย์ด้านอาหาร และอื่นๆ ของกรมวิชาการเกษตร เพื่อการบริการอย่างเป็นทางการ สำหรับการพัฒนาต่อยอดไปใช้ประโยชน์ พร้อมจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรทั้งสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ใหม่ สำหรับการสืบค้นอย่างรวดเร็วและถูกต้อง ตลอดจนเป็นแหล่งให้ความรู้ด้านจุลินทรีย์กับเกษตรกร นักวิจัย ภาคเอกชน และผู้สนใจ ได้เข้าถึงจุลินทรีย์และเทคโนโลยีการผลิตและใช้ได้สะดวก รวดเร็วยิ่งขึ้น

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ทางการเกษตรมีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์จำนวนมาก มีทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษต่อสภาพแวดล้อมและการเกษตรในระบบนิเวศ การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บรวบรวม จัดจำแนก คัดเลือก เก็บรักษาให้คงความมีชีวิต และการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเทียมเพื่อการนำไปใช้ได้จริง ได้แก่ ราปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช ไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียบีทีกำจัดแมลง พัฒนาไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรอย่างต่อเนื่อง สามารถเก็บรวบรวมและคัดเลือกได้ 1) ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. ที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม 70.05% เมื่อนำมาเพิ่มขยายในเมล็ดธัญพืชพบว่า เจริญได้ดีในเมล็ดข้าวฟ่างได้จำนวนสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 9.08×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากปมพริก โดยช่วยลดการเกิดปมได้ 50-75 % เมื่อใส่รา *Paecilomyces* sp. 2-4 ครั้ง 2) ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง แยกได้ 42 ไอโซเลท และกำหนดรหัสเป็นอักษรย่อชื่อจังหวัด จำแนกชนิดเป็น *Steinernema siamkayai* โดยวิธี cross mating นำมาเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากการประเมินศักยภาพในการเป็นสารชีวภัณฑ์ในห้องปฏิบัติการ คัดเลือกได้ *Steinernema* sp. KP, KB, RE และ UB isolate สามารถเคลื่อนที่เข้าหาแมลงเหยื่อล่อได้รวดเร็วที่สุด และมีศักยภาพในการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ และกลุ่มหนอนด้วง ได้ 38-100 % และพบว่าไส้เดือนฝอยไอโซเลท CM, PL, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, PR, BR, RJ และ CB เพาะขยายในอาหารสูตรไข่ผสมน้ำมันหมูและน้ำในอัตราส่วน 4 : 2 : 4 ให้ผลผลิต 7.9 8.2 9.2 11.2 7.6 10.8 12.8 13.2 13.8 15.5 8.2 11.8 17.2 5.8 10.5 9.2 และ 7.7 ล้านตัว

ต่ออาหาร 20 กรัม ตามลำดับ 3) แบคทีเรียบีที แยกโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลได้ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 30 ไอโซเลท ตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel พบว่ามีการสร้างผลึกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนเจาะสมอฝ้ายพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^8 มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย 100 % ที่เวลา 72 ชั่วโมง การเก็บรักษาแบคทีเรียบีที ที่อุณหภูมิ 4 -20 และ -80 องศาเซลเซียส พบว่าประสิทธิภาพลดลงตั้งแต่ระยะเวลา 3 เดือน

การจัดทำฐานข้อมูลด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตร โดยสร้างเป็น webpage และนำเข้าข้อมูลทดสอบการใช้งาน และเปิดใช้งานจริง ในชื่อ microorganism.expertdoa.com ประกอบด้วยประกอบด้วยเว็บเพจที่สามารถนำเสนอข้อมูลจุลินทรีย์ที่สำคัญ ข้อมูลนักวิจัย และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมถึงจุลินทรีย์ทางด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดโรคได้ครบทุกมิติ สามารถเข้าถึงข้อมูลกิจกรรมต่างๆ Link สู่ Social media ผู้ใช้สามารถดาวน์โหลดเอกสารไปใช้งานได้ และเข้าถึงได้อย่างรวดเร็วในระบบอินเทอร์เน็ตที่เผยแพร่ทาง website รวมทั้งนักวิจัย/เกษตรกร/ผู้สนใจนำองค์ความรู้ทางวิชาการและเทคโนโลยีด้านจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ไปต่อยอดใช้ประโยชน์ได้

ABSTRACT

Agricultural microorganisms have a species and many strain. They have useful and harmful to the environment and agriculture in the ecosystem. Therefore, conservation and utilization of microorganisms project, the objective is to collect, identification, selection, maintain and microbial culture in artificial media for practical use. Including, antagonistic fungi controlling plant diseases, entomopathogenic nematodes and bacteria BT controlling insect pests. 1) The antagonistic fungus *Paecilomyces* sp. which has the potential to destroy the eggs 70.05% of root knot nematodes. It can mass rearing in sorghum seeds. The highest number of spores is 9.08×10^5 spores per milliliter. *Paecilomyces* sp. has effect to control the root disease of chili by reduce the occurrence of 50-75% disease when application 2-4 times. 2)Entomopathogenic nematodes can be separated by 42 isolates and the code is the abbreviation for the province name. Identification as Steinernema siamkayai by cross mating method and stored in a moisture-carrying substance at 25 ° C. Based on the assessment of potential in the laboratory, Steinernema sp. KP, KB, RE and UB isolate used to test kill in the caterpillar group and the grub worm group. It was found that all 4 isolates had the potential to kill 38-100% in 48 hours. Mass

rearing in artificial media, chicken egg mixed with lard and water ratio 4: 2: 4 for 7 days incubation. The results showed that CM, LP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, PR, BR, RJ and CB for nematode production, 7.9, 8.2, 9.2, 11.2, 7.6, 10.8, 12.8, 13.2, 13.8, 15.5, 8.2, 11.8, 17.2, 5.8, 10.5, 9.2, and 7.7 million nematodes per 20 g of media, respectively. 3) Bt bacteria Isolated by using the molecular biology technique is *Bacillus thuringiensis*, 30 isolates. The tested with SDS PAGE technique using NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel. It was found that the protein molecules with the molecular weight range of 25-48 kDa were generated. When tested to kill the cotton bollworm, it was found that at the concentration of 108, the average cotton bollworm were 100% at 72 hours. BT storage at a temperature of 4 -20 and -80 degrees Celsius found that the efficiency has decreased since the period of 3 months. Establishing an agricultural microbial database by creating a webpage and importing data. Test usage and actually activated the name microorganism.expertdoa.com. It consists of a web page that can present important microbial information. Researcher information and utilization, including microorganisms in plant diseases and preventing all diseases. It can access information on various activities link to social media. Users can download documents to use and quickly access the internet system published on the website, including researchers / farmers / interested people Bring academic knowledge and microbial technology and microbial products to be useful.

การเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดราปฏิปักษ์ควบคุมโรครากปม
Culture Collection and Identification of Antagonistic Fungi for Controlling Root knot Disease

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ มัลลิกา แก้ววิเศษ
Nuchanart Tangchitsomkid and Mallika Kaewwises

คำสำคัญ (key words) : การเก็บรวบรวม จำแนกชนิด ราปฏิปักษ์ โรครากปม
culture collection, identification, antagonistic fungi, root knot disease

บทคัดย่อ (abstract)

การเก็บรวบรวมตัวอย่างดินและรากจากพื้นที่การระบาดของโรครากปม ได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท จันทบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ และเชียงราย รวมทั้งสิ้น 17 จังหวัด จำนวน 950 ตัวอย่าง และทำการแยกเชื้อราโดยวิธี Soil dilution plate method และ Soil plate method สามารถแยกได้ราปฏิปักษ์ได้ 59 ไอโซเลท กำหนดรหัสตามชื่อจังหวัดและจำนวนที่แยกได้คือ BR1-BR5, SK1-SK5, UB1-UB8, KK1-KK6, NS1-NS3, SB1-SB8, NP1-NP7, RB1-RB5, KB1-KB6, CB1, CM1-CM3 และ CR1-CR2 จำแนกได้รา 5 สกุล คือ *Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces* และ *Fusarium* และพบว่ารา *Paecilomyces* และ *Fusarium* สามารถทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเท่ากับ 70.05 และ 19.80 % ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อรา *Paecilomyces* และ *Fusarium* ในดินอบนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และตรวจความมีชีวิตที่ระยะเวลาเก็บ 6 เดือน พบว่าเชื้อรา *Paecilomyces* ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนรา *Fusarium* ไม่เจริญเติบโตในเวลา 6 เดือนเท่ากัน

Collection of soil and root samples from the outbreak areas of root knot diseases, Buriram, Si Sa Ket, Ubon Ratchathani, Nakhon Ratchasima, Surin, Maha Sarakham, Khon Kaen, Nakhon Sawan, Suphan Buri, Nakhon Pathom, Ratchaburi, Kanchanaburi, Chainat, Chanthaburi, Kamphaeng Phet, Chiang Mai and Chiang Rai. A total of 17 provinces in 950 samples and fungal isolation by soil dilution plate method and soil plate method were 59 isolates. Set the code according to the province name and the number that can be separated is BR1-BR5, SK1-SK5, UB1-UB8,

KK1-KK6, NS1-NS3, SB1-SB8, NP1-NP7, RB1-RB5, KB1-KB6, CB1, CM1 -CM3 and CR1-CR2 can be classified into 5 genera, namely, *Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces* and *Fusarium*. *Paecilomyces* and *Fusarium* can destroy the eggs of root-knot nematodes with an average of 70.05 and 19.80 %, respectively. When testing the storage of *Paecilomyces* and *Fusarium* in sterilized soil at 10 °C and checking the viability at 6 months of storage, *Paecilomyces* can still grow in the culture medium but *Fusarium* are not growing in the same 6 months.

บทนำ (Introduction)

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

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

ในปัจจุบันมีการศึกษาราที่แยกได้จากดินหลายชนิด มาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ได้แก่ รา *Paecilomyces lilacinus* เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย *M. incognita* และ *M. hapla* ในมะเขือเทศ และยังเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศอีกด้วย (Kiewnick and Sikora, 2006) รา *Arthrobotrys dactyloides* และ *A. brochopaga* สร้าง ring traps รัดรอบๆ ลำตัวของไส้เดือนฝอย *A. oligospora* สร้างตาข่ายเหนียว (sticky nets) รา *Dactylaria haptotyla* และ *Nematoctonus* spp. สร้าง sticky knobs รา *Drechmeria coniospora* และ *Hirsutella rhossiliensis* สร้างสปอร์เหนียว ซึ่งราแต่ละชนิดจะสร้างกับดักและสร้างเส้นใยเข้าไปเจริญในตัวไส้เดือนฝอย และไส้เดือนฝอยจะตายในที่สุด นอกจากนั้นยังมีราไมคอร์ไรซา ได้แก่ เวสิคูลาร์ อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา (วี-เอไมคอร์ไรซา) ซึ่งเป็นราที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืช โดยมีความสัมพันธ์แบบเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่พืช โดยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และลดการใช้ปุ๋ย ช่วยเพิ่มปริมาณการดูดธาตุฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และจุลธาตุอาหารให้มากขึ้น (Jackson *et al.,* 2002; Nikitas *et al.,* 2002; Bagyaraj, 1992) และยังช่วยให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในดินที่มีฟอสฟอรัสน้อย (มลชัย, 2541)

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

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

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

<u>อุปกรณ์</u>

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

2. สารเคมี ได้แก่ แอลกอฮอล์ โซเดียมคลอไรด์ กลีเซอรีน และ streptomycin

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

วิธีการ

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

2. การแยกราปฏิปักษ์ออกจากดินและรากพืชเป็นโรค

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

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

สำหรับรากที่วางบน GAN นั้นต้องเก็บในที่มืดเป็นเวลา 3-5วัน เนื่องจาก Rose Bengal เป็นพิษกับรา ในที่มีแสง จากนั้นเก็บราที่เจริญไว้บน slant PDA เพื่อนำมาจำแนกและเก็บรักษา

3. การจำแนกชนิดราปฏิปักษ์

3.1 ศึกษารูปร่างลักษณะและการสร้างสปอร์ของราที่เจริญบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง เพื่อตรวจดูลักษณะเส้นใย fruiting body รูปร่างลักษณะและการเกิดสปอร์

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

4. การประเมินศักยภาพของราปฏิปักษ์ในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

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

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

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

1. แหล่งเก็บตัวอย่างดินที่แยกได้เชื้อรา และกำหนดรหัสตามอักษรย่อชื่อจังหวัด (ภาษาอังกฤษ 2 ตัวอักษร)

2. รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเพื่อการจำแนกในระดับสกุล

3. สกุลของราปฏิปักษ์เข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

4. ความอยู่รอดและคงศักยภาพของราปฏิปักษ์ในดินนึ่งฆ่าเชื้อที่ 6 และ 12 เดือน

<u>เวลาสถานที่</u>

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2560

<u>สถานที่ดำเนินการ</u>

1. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

2. เก็บรวบรวมตัวอย่างดินในพื้นที่ระบาดของโรครากปม

ผลการทดลองและวิจารณ์

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

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

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

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

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

ตารางที่ 1 ราที่แยกได้จากตัวอย่างดินและรากในแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของโรครากปม

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

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

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างดินและรากในพื้นที่การระบาดของโรครากปม ได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท จันทบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ และเชียงราย รวมทั้งสิ้น 17 จังหวัด จำนวน 950 ตัวอย่าง และทำการแยกเชื้อราจากดินโดยวิธี Soil dilution plate

method และ Soil plate method บนอาหาร GAN และ ½ PDA สามารถแยกได้รา 56 ไอโซเลท และแยกได้จากชิ้นราก จำนวน 3 ไอโซเลท ด้วยวิธี IPP บนอาหาร WA กำหนดรหัสตามชื่อจังหวัด และจำนวนที่แยกได้คือ BR1-BR5, SK1-SK5, UB1-UB8, KK1-KK6, NS1-NS3, SB1-SB8, NP1-NP7, RB1-RB5, KB1-KB6, CB1, CM1-CM3 และ CR1-CR2 รวมแยกได้ 59 ไอโซเลท คิดเป็น 9.08 % ของจำนวน 950 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ 5 สกุล คือ *Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces* และ *Fusarium* และพบว่ารา *Paecilomyces* spp. BR3, NP3 และ UB1 isolate และ *Fusarium* spp. BR5 และ CB1 isolate สามารถทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเท่ากับ 70.05 และ 19.8 % ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อรา *Paecilomyces* และ *Fusarium* ในดินอบนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และตรวจความมีชีวิตที่ระยะเวลาเก็บ 6 เดือน พบว่าเชื้อรา *Paecilomyces* ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนรา *Fusarium* ไม่เจริญเติบโตในเวลา 6 เดือนเท่ากัน และที่เก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือน พบว่ารา *Paecilomyces* ไม่เจริญบนอาหาร PDA ราปฏิปักษ์ที่แยกได้นำไปเก็บรักษาเพื่อการพัฒนาต่อยอดเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชต่อไป

เอกสารอ้างอิง (References)

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

ศรศิลป์ บุญบันดาล. 2536. การแพร่กระจายและการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดในพื้นที่สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

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

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

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

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

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

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

การทดสอบคุณสมบัติการเพิ่มขยายราปฏิปักษ์ควบคุมโรครากปมในอาหารต่างๆ

Mass rearing of Antagonistic fungi for Controlling Root knot Disease

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ มัลลิกา แก้ววิเศษ

Nuchanart Tangchitsomkid and Mallika Kaewwises

คำสำคัญ (key words) : การเพาะขยาย ราปฏิปักษ์ โรครากปม

Mass rearing, antagonistic fungi, root knot disease

บทคัดย่อ (abstract)

การทดสอบเพาะขยายราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปม (*Meloidogyne* spp.) ในเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวโพด ลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเพาะเป็นเวลา 7 วัน พบว่ารา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate สามารถเจริญได้ดีและผลิตสปอร์ได้ปริมาณมากในเมล็ดข้าวฟ่าง มีจำนวนสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 9.08×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเมล็ดข้าวโพด เท่ากับ 7.64×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่วนในลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง มีค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ราเท่ากับ 3.29×10^5 2.36×10^5 และ $2..88\times10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อทำการทดสอบความสามารถของราที่เพาะขยายในเมล็ดธัญพืชทั้ง 5 ชนิด ในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมพบว่า มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ได้ระหว่าง 65-78 %

Enrichment of *Paecilomyces* sp. UB1 isolate to destroy the eggs of nematode causing root knot disease (*Meloidogyne* spp.) in 5 types of whole grains; including sorghum seeds, maize, millet, green beans and soybeans. It was incubate for 7 days. The result was found that *Paecilomyces* sp. UB1 isolate able to grow well and produced large amounts of spores in sorghum seeds. The highest number of spores is 9.08×10^5 spores per milliliter. Followed by corn seeds equal to 7.64×10^5 spores per milliliter. In millet, green beans and soybeans were average number of spores is 3.29×10^5 2.36×10^5 and $2..88 \times 10^5$ spores per milliliter, respectively. With statistical differences when testing the ability of the expanded in all 5 types of whole grains. In the destruction of the eggs of root knot nematodes, it was found that effectively destroying eggs between 65-78 %

บทนำ (Introduction)

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

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

Dunn (1983) สามารถแยกได้เชื้อรา *P. nostocoides* จาก cyst ของไส้เดือนฝอย *Heterodera zeae* แต่เนื่องจากมีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานและโครงสร้างใกล้เคียงกับเชื้อรา *P. lilacinus* มาก Godoy *et al.* (1983) พิจารณาเห็นว่าเป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์มาจากเชื้อรา *P. lilacinus*

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

ในปัจจุบันมีการศึกษาเชื้อราที่แยกได้จากดินหลายชนิด มาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ได้แก่ รา *Paecilomyces lilacinus* เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* และ *M. hapla* ในมะเขือเทศ และยังเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศอีกด้วย (Sikora, 1992) รา *Arthrobotrys dactyloides* และ *A. brochopaga* สร้าง ring traps รัดรอบๆ ลำตัวของไส้เดือนฝอย *A. oligospora* สร้างตาข่ายเหนียว (sticky nets) รา *Dactylaria haptotyla* และ *Nematoctonus* spp. สร้าง sticky knobs รา *Drechmeria coniospora* และ *Hirsutella rhossiliensis* สร้างสปอร์เหนียว ซึ่งราแต่ละชนิดจะสร้างกับดักและสร้างเส้นใยเข้าไปเจริญในตัวไส้เดือนฝอยและไส้เดือนฝอยจะตายในที่สุด นอกจากนั้นยังมีราไมคอร์ไรซา ได้แก่ เวสิคูลาร์ อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา (วี-เอไมคอร์ไรซา) ซึ่งเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืช โดยมีความสัมพันธ์แบบอำนวยประโยชน์ซึ่งกันและกัน สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่พืช โดยช่วยส่งเสริมการ

เจริญเติบโตของพืชและลดการใช้ปุ๋ย ช่วยเพิ่มปริมาณการดูดธาตุฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และจุลธาตุอาหารให้มากขึ้น (Jackson *et al.,* 2002; Nikitas *et al.,* 2002; Bagyaraj, 1992) และยังช่วยให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในดินที่มีฟอสฟอรัสน้อย (มลชัย, 2541) เชื้อราวี-เอไมคอร์ไรซา สามารถลดปริมาณความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศอย่างมีนัยสำคัญ และยังมีรายงานการลดความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยกับผักชนิดอื่นๆ ด้วย (Sikora and Schonbeck, 1995)

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

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

มนตรี (2538) ได้ศึกษาการใช้เชื้อราร่วมกับแง่งขิงที่มีไส้เดือนฝอยรากปม โดยใช้เชื้อรารองก้นหลุมก่อนปลูกแง่งขิงที่มีไส้เดือนฝอยรากปมสามารถลดปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมลงและให้ผลผลิตใกล้เคียงกับวิธีการใช้สารเคมี oxamyl จุ่มขิงก่อนปลูก

ในด้านการแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Paecilomyces* ได้มีการศึกษา การแยกเชื้อราจากดินที่นิยมใช้คือวิธี dilution plate (เลขา, 2533; จิรเดช, 2536) สำหรับการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณเชื้อรามีการใช้วัสดุหลายชนิดโดยมากจะใช้เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวบาเลย์ ข้าวโพด ข้าวเจ้า และข้าวฟ่าง ในประเทศไทย สุภกิจ (2532) และศรศิลป์ (2536) ใช้เมล็ดข้าวฟ่างเป็นวัสดุในการเพิ่มปริมาณเชื้อราและได้ผลดี

ดังนั้น รา *Paecilomyces* ที่แยกได้จากกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมในปี 2559 จึงควรนำมาทดสอบการเพาะขยายในเมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ เพื่อได้ปริมาณมากในการนำไปใช้ควบคุมโรครากปมในสภาพไร่ ซึ่งจะเป็นแนวทางการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีที่ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต และสภาพแวดล้อม ตลอดจนเพิ่มทางเลือกและการยอมรับของเกษตรกรในการควบคุมโรครากปมต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

<u>อุปกรณ์</u>

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

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงราปฏิปักษ์บนอาหารชนิดข้าวฟ่าง

กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงราปฏิปักษ์บนอาหารชนิดข้าวโพด

กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงราปฏิปักษ์บนอาหารชนิดลูกเดือย

กรรมวิธีที่ 4 เลี้ยงราปฏิปักษ์บนอาหารชนิดถั่วเขียว

กรรมวิธีที่ 5 เลี้ยงราปฏิปักษ์บนอาหารชนิดถั่วเหลือง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมเมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ แช่น้ำทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง เพื่อให้เมล็ดอ่อนตัว นึ่งสุกได้ง่ายไม่แข็งกระด้าง ทำการชาวเมล็ดธัญพืชขึ้นพักไว้ให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นนำไปใส่ในลังถึงที่มีผ้าขาวบางรองอยู่ ปิดฝาลังถึง เปิดไฟปานกลาง นึ่งจนเมล็ดเกือบสุก พักไว้จนเมล็ดเย็น ตักเมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ ปริมาณ 50 กรัม ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร อุดจุกสำลี ปิดทับด้วยกระดาษรัดยาง และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาพักไว้ให้เย็นและทำการเขย่าขวดเบาๆ ให้เมล็ดธัญพืชกระจายตัวออกจากกัน ทำการย้ายราปฏิปักษ์ชนิดที่มีศักยภาพในการทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย ลงบนเมล็ดธัญพืช ปฏิบัติภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ โดยเจาะตรงบริเวณขอบของโคโลนีราปฏิปักษ์ด้วย cork borer ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ภายในบรรจุเมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ นำไปบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนราปฏิปักษ์เจริญคลุมเมล็ดธัญพืช เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจนับสปอร์โดยการเจือจางสปอร์ของราปฏิปักษ์ที่เลี้ยงได้จากเมล็ดธัญพืชต่างๆ ด้วยวิธี ten fold serial dilution โดยเตรียมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดปริมาตร 25 มิลลิลิตร อุดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำ 0.05% Tween 80 ใส่ใน 5-7 หลอดต่อตัวอย่าง นำเมล็ดธัญพืชแต่ละชนิดที่มีราปฏิปักษ์เจริญอยู่ออกจาก Erlenmeyer flask น้ำหนัก 50 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง (Vortex mixer) ซึ่งได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10-1 ใช้ ไมโครปิเปตดูด spore suspension ที่ความเข้มข้น 10-1 ออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดน้ำกลั่นหลอดที่สองเขย่าให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10-2 และ 10-5 หรือจนกว่าความหนาแน่นของสปอร์จะเจือจางจนสามารถนับได้

การบันทึกข้อมูล ตรวจนับจำนวนสปอร์ของราปฏิปักษ์ โดยใช้ Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

2. การประเมินศักยภาพของราปฏิปักษ์ในการทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

ทำการทดสอบราปฏิปักษ์ที่เลี้ยงได้จากเมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ ในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมโดยหยดสปอร์รา ที่ความเข้มข้น 105 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และไข่ไส้เดือนฝอย

ความเข้มข้น 300 ฟองต่อ 50 ไมโครลิตร ลงในถาดหลุมชนิด Tissue culture plate แบบ 24-well หลังจากนั้นตรวจการเข้าทำลายของราทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน

การบันทึกข้อมูล ตรวจนับจำนวนไข่ที่ถูกทำลาย และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การทำลาย

เวลาสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2560

สถานที่ดำเนินการ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

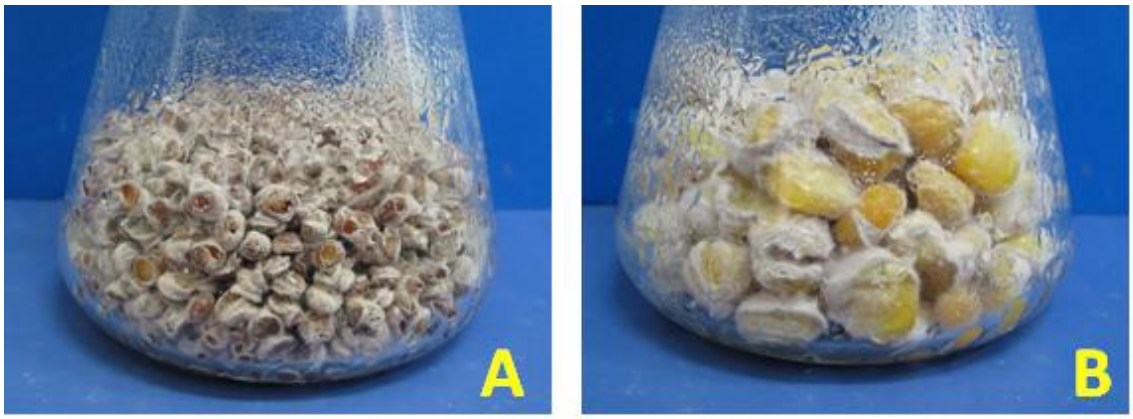
ผลการทดลองและวิจารณ์

การเพาะเลี้ยงรา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ในเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ทั้งหมดจำนวน 5 ซ้ำ พบว่า รา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate สามารถเจริญได้ดีและผลิตสปอร์ได้ปริมาณมากในข้าวฟ่าง รองลงมาคือข้าวโพด โดยพบว่าที่อายุ 3 วันหลังใส่เชื้อ มีเส้นใยราเจริญปกคลุมในข้าวฟ่างและข้าวโพด ส่วนในลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง มีเส้นใยของราเจริญอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่ออายุครบ 7 วัน พบว่าข้าวฟ่างและข้าวโพดมีเส้นใยของราเจริญปกคลุมทั่วทั้งหมด (ภาพที่ 1)

จากผลของการนับจำนวนสปอร์ของรา มีค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ที่เลี้ยงในข้างฟ่างสูงที่สุดเท่ากับ 9.08×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร รองลงคือการขยายในข้าวโพดเท่ากับ 7.64×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่วนในลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง มีค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ราเท่ากับ 3.29×10^5 2.36×10^5 และ $2..88\times10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันในทางสถิติ (ตารางที่ 1)

รา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate สามารถเจริญได้ดีและผลิตสปอร์ได้ปริมาณมากในข้าวฟ่างและข้าวโพด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Chioza and Ohga (2013) ที่พบว่า ส่วนของเส้นใยของรา *P. hepialid* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในข้าวฟ่าง ข้าวโพด และข้าวสาลี และที่สภาวะเจริญเติบโตที่ดีที่สุดอยู่ที่ pH ระหว่าง 6-9

เมื่อทำการทดสอบความสามารถของรา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ที่เพาะขยายในเมล็ดธัญพืชทั้ง 5 ชนิด ในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมพบว่า มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ได้ระหว่าง 65-78 %



ภาพที่ 1 รา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate สามารถเจริญได้ดีและผลิตสปอร์ได้ปริมาณมากในข้าวฟ่างและข้าวโพด ที่เวลาการบ่มเพาะ 7 วัน

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์รา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ที่เพาะเลี้ยงในเมล็ดธัญพืชชนิดต่าง ที่เวลา 7 วัน

ชนิดเมล็ดธัญพืช	ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ ($x10^5$)
ข้าวฟ่าง	9.08 a[1/]
ข้าวโพด	7.64 b
ลูกเดือย	3.29 c
ถั่วเขียว	2.36 d
ถั่วเหลือง	2.88 c
CV. (%)	12.8

[1/]ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การขยายเชื้อรา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปใช้กำจัดไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงเกษตร สามารถเพาะเลี้ยงได้ดีที่สุดในเมล็ดข้าวฟ่างนึ่ง พบว่าเชื้อราเจริญได้ดี ได้จำนวนสูงที่สุดเท่ากับ 9.08×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยข้าวฟ่างหาซื้อได้ง่าย มีราคาถูก และการเตรียมไม่ยุ่งยาก จึงเหมาะที่จะนำไปพัฒนาวิธีการให้เป็นเทคโนโลยีระดับเกษตรกรสามารถนำไปทำใช้เองได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง (References)

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2536. บทปฏิบัติการวิชานิเวศน์วิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 77 น.

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

เลขา มาโนช. 2533. บทปฏิบัติการราในน้ำและในดิน. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 140 น.

ศรศิลป์ บุญบันดาล. 2536. การแพร่กระจายและการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดในพื้นที่สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

การทดสอบประสิทธิภาพราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรครากปมในระดับโรงเรือน

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

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ มัลลิกา แก้ววิเศษ
Nuchanart Tangchitsomkid and Mallika Kaewwises

คำสำคัญ (key words) : ประสิทธิภาพ ราปฏิปักษ์ โรครากปม
Efficacy, antagonistic fungi, root knot disease

บทคัดย่อ (abstract)

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

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

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

บทนำ (Introduction)

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในภาคการเกษตร ทำความเสียหายต่อพืชผลของเกษตรกรอย่างต่อเนื่อง นอกจากก่อให้เกิดความสูญเสียของผลผลิตแล้ว ยังทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำ โดยการจัดการศัตรูพืชนั้น เกษตรกรมักเลือกวิธีใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช และมีการใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม สูงเกินค่าที่กำหนด ปริมาณการใช้มากขึ้นเรื่อยๆ จนเกิดปัญหาการดื้อยาของศัตรูพืช มีผลกระทบต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และการตกค้างของสารเคมีในผลิตผลตามมา ส่งผลถึงการส่งออกพืชผลเกษตร ก่อให้เกิดปัญหาการกีดกันทางการค้าภายใต้กรอบทางการค้าขององค์การการค้าโลกว่าด้วยเรื่องสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ในปัจจุบันเกษตรกรและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและเอกชนได้ตระหนักถึงพิษภัยดังกล่าว ทุกฝ่ายจึงหันมาให้ความสนใจการใช้สารชีวภัณฑ์ในการควบคุมศัตรูพืชเพื่อลดการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงในระดับที่ปลอดภัย ซึ่งได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาจนได้เป็นสารชีวภัณฑ์หลายชนิดที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทียบได้กับสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยมีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเป็นการค้าแล้ว เช่น แบคทีเรียบีเอส (*Bacillus subtilis*) ใช้ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวหรือโรคที่เกิดจากเชื้อราในดินของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด (พากเพียร และคณะ, 2543) แบคทีเรียบีที (*Bacillus thuringiensis*) ใช้ในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม (อัจฉรา, 2544) ไวรัสเอ็นพีวีกำจัดหนอนกระทู้หอม (อุทัย,

2544) และไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูผักคะน้า (นุชนารถ และสาโรจน์, 2547) เป็นต้น นอกจากนี้ น้ำหมักชีวภาพหรือที่เรียกกันว่าปุ๋ยอินทรีย์น้ำหรือน้ำสกัดชีวภาพ (Bio-extract) ซึ่งได้จากวัสดุเหลือทิ้งจากภาคการเกษตรและอุตสาหกรรม มูลสัตว์ วัชพืชน้ำ เศษผักผลไม้ที่ไม่ได้มาตรฐาน เป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งเกษตรกรสามารถนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชหรือทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้ แต่อย่างไรก็ตาม ศัตรูพืชอื่นๆ ที่ยังคงเป็นปัญหาและทำความเสียหายต่อพืชผลเกษตรทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นคือ โรครากปม มีสาเหตุจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการปลูกพืชผักและไม้ผลที่สำคัญ ได้แก่ ขิง พริก กระเจี๊ยบเขียว มันฝรั่ง และฝรั่ง พบแพร่ระบาดทั่วทุกภาคของประเทศ โดยความรุนแรงของโรครากปมมีผลให้ต้นพืชเกิดอาการเหี่ยวเฉา แคระแกร็น และผลผลิตลงลด รวมถึงคุณภาพของผลผลิตที่ไม่ได้มาตรฐานตามความต้องการ ความสูญเสียนี้เป็นผลมาจากระบบรากถูกทำลายอย่างรุนแรงเกิดเป็นปุ่มปม ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำและแร่ธาตุอาหารไปเลี้ยงส่วนต่างๆ ได้ (นุชนารถ, 2550) รวมถึงส่วนของหัวมันฝรั่งและแง่งขิงเสียรูปทรง (มนตรี, 2538) นอกจากนั้นไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปมมีพืชอาศัยกว้าง สามารถทำความเสียให้กับพืชอื่นๆ ได้หลายชนิดอีกด้วย โดยเฉพาะในพืชผัก-พืชหัว และไม้ดอก ได้แก่ แครอท มะเขือเทศ ผักชีฝรั่ง เยอบีร่า และปทุมมา เป็นต้น (Netscher and Sikora, 1990)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

<u>อุปกรณ์</u>

1. ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate และไข่ไส้เดือนฝอยรากปม

2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ potato dextrose agar (PDA) และข้าวฟ่าง

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการราวิทยา ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope และ Compound microscope เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ไมโครปิเปต หม้อนึ่งแรงดัน

4. สารเคมี ได้แก่ แอลกอฮอล์ โซเดียมคลอไรด์ กลีเซอรีน และ streptomycin

5. พืชทดสอบ (พริก)

<u>วิธีการ</u>

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

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ราปฏิปักษ์ 1 ครั้ง พร้อมปลูก

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ราปฏิปักษ์ 2 ครั้ง พร้อมปลูกและใส่ครั้งที่ 2 ที่ 15 วัน

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

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

กรรมวิธีที่ 5 ไม่ใส่ราปฏิปักษ์ (control)

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

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

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

5. ตรวจสอบเชื้อราปฏิปักษ์ในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย นำรากพริกที่ผ่านการวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากเรียบร้อยแล้วมาสุ่มเลือกกลุ่มไข่ โดยใช้ปากคีบคีบกลุ่มไข่ออกจากราก 5–10 กลุ่มต่อต้น ทำการฆ่าเชื้อที่ผิว โดยนำกลุ่มไข่ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำไปใส่ในหลอด

ทดลองแล้วเติม NaOCl 0.5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้กลุ่มไข่กระจายตัวออกจากกัน เทผ่านตะแกรงขนาด 500 mesh ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง เทไข่ที่อยู่เหนือตะแกรงใส่ลงในบีกเกอร์ ตั้งตกตะกอนดูดน้ำด้านบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนของไข่ เติม streptomycin sulfate 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง ทำการเจือจางปริมาณไข่โดยวิธี dilution plate method นำสารละลายของไข่ spread ลงบนอาหาร WA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตดูการเจริญของเชื้อราทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบว่ามีเส้นใยของราเจริญออกมาจากฟองไข่ ให้ทำการตัดปลายเส้นใยของราดังกล่าวมาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA เพื่อตรวจสอบรูปร่างลักษณะของโคโลนี เส้นใย และสปอร์

บันทึกข้อมูล

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

<u>เวลาสถานที่</u>

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

<u>สถานที่ดำเนินการ</u>

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลการทดลองและวิจารณ์

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

จากการตรวจสอบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทดสอบ โดยนำดินละลายน้ำและเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทุกกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาทดสอบศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าราปฏิปักษ์สามารถเข้าทำลายไข่ได้ 100 %

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

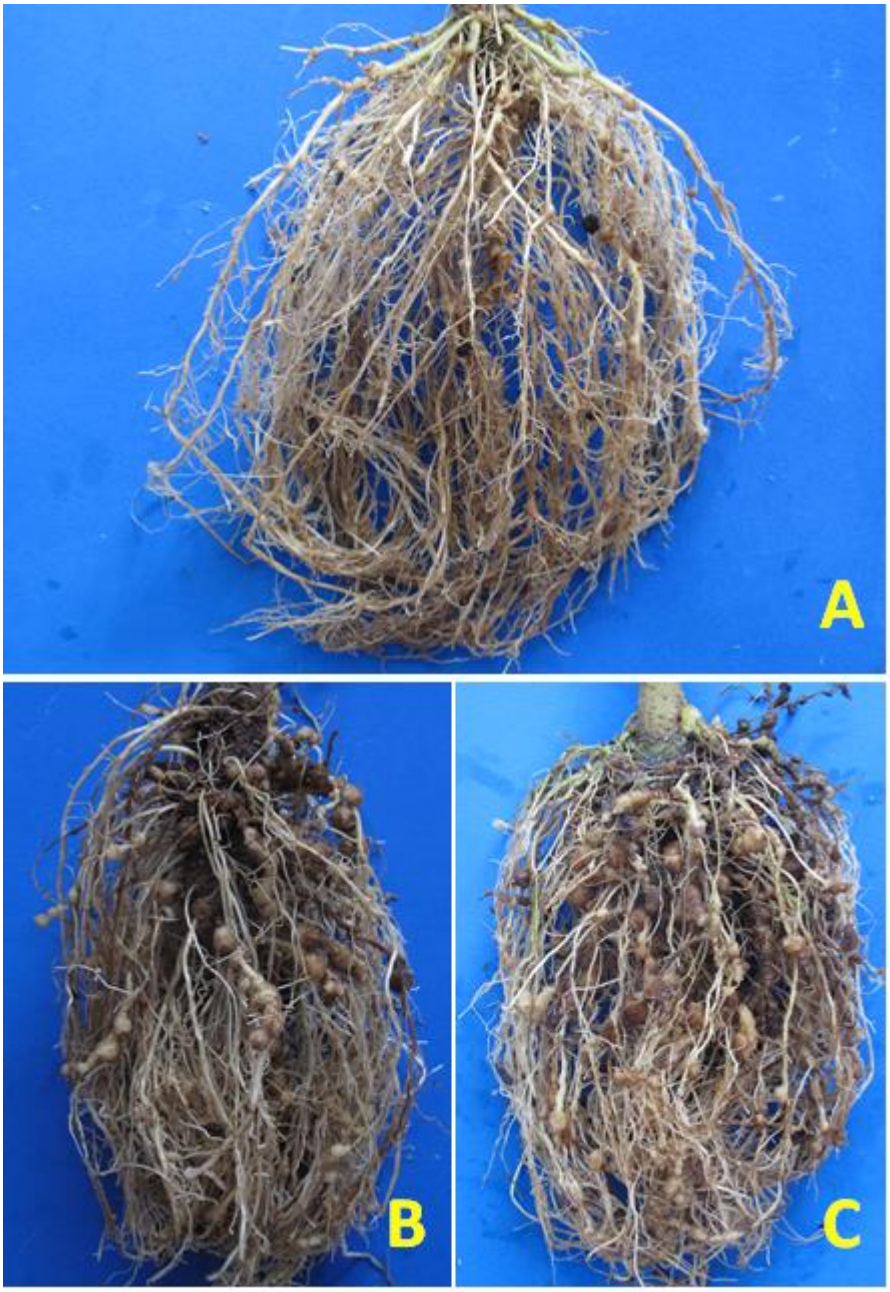
ตารางที่ 1 ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากเมื่อมีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปมพริกในสภาพโรงเรือน

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

Mi = ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita*

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

[2/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณโดยการใช้วิธี DMRT



ภาพที่ 1 ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากของต้นพริกอายุ 90 วัน เมื่อมีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate อัตรา 20 กรัมต่อต้น ควบคุมโรครากปม

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

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

C) ดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 5 (เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

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

เชื้อราปฏิปักษ์ Paecilomyces sp. UB1 isolate สามารถนำไปพัฒนาทดสอบในสภาพไร่ และขยายผลสู่เกษตรกรเพื่อควบคุมโรครากปมในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ พริก มะเขือ กระจี๊ยบเขียว และฝรั่ง

เอกสารอ้างอิง (References)

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

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

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

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

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

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

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

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

ศรศิลป์ บุญบันดาล. 2536. การแพร่กระจายและการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดในพื้นที่สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

การเก็บรวบรวม อนุรักษ์และจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง

Culture Collection and Identification of Entomopathogenic Nematodes

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

Nuchanart Tangchitsomkid and Boonruenrat Ruengwiset

คำสำคัญ (key words) : การเก็บรวบรวม จำแนกชนิด ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง

culture collection, identification, entomopathogenic nematodes

บทคัดย่อ (abstract)

การเก็บรวบรวมตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ นครปฐม ชัยนาท กาญจนบุรี อุทัยธานี อยุธยา ราชบุรี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น ร้อยเอ็ด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี รวม 18 จังหวัด จำนวน 878 ตัวอย่าง และทำการแยกไส้เดือนฝอยด้วย Galleria baiting technique ได้ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ใช้กำจัดแมลง จำนวน 42 ไอโซเลท จำแนกได้ 1 สกุล (*Steinernema* sp.) โดยวิธี cross mating กับ *S. siamkayai* และทำการเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตามรหัสที่กำหนดเป็นอักษรย่อชื่อจังหวัด ดังนี้ ภาคเหนือ *Steinernema* sp. CM, PL, KP, PB ภาคกลาง *Steinernema* sp. NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *Steinernema* sp. KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก *Steinernema* sp. PR, PJ และภาคตะวันออก *Steinernema* sp. CB จากการจำแนกโดยวิธีผสมข้ามพบว่าทุกไอโซเลท สามารถผสมพันธุ์กับ *S. siamkayai* ให้ลูกรุ่นใหม่ได้ ดังนั้นไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงที่แยกได้จากดิน 42 ไอโซเลท เป็นไส้เดือนฝอย *S. siamkayai*

Collection of soil samples from 18 provinces; Chiang Mai, Lampang, Kamphaeng Phet, Phetchabun, Nakhon Pathom, Chainat, Kanchanaburi, Uthai Thani, Ayutthaya, Ratchaburi, Buriram, Sisaket, Ubon Ratchathani, Khon Kaen, Roi Et, Phetchaburi, Prachuap Khiri Khan and Chanthaburi total 878 samples. The nematode separation with *Galleria* baiting technique. The fourty-two of entomopathogenic nematodes were classified into 1 genus (*Steinernema* sp.) by cross mating with *S. siamkayai* and keeping in a moisture-absorbing compound at 25 ° C. According to the code given as the abbreviation for the province name as follows: Northern *Steinernema* sp. CM, PL, KP, PB Central Region *Steinernema* sp. NP, CN, KB, UT, AT, RB Northeastern Steinernema sp. , RE, BR West Region *Steinernema* sp. PR, PJ and the Eastern region, *Steinernema* sp. CB. All isolates can cross mating with *S. siamkayai*. Therefore, insect nematodes that are isolated from soil 42 isolates are *S. siamkayai*.

บทนำ (Introduction)

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง (Entomopathogenic nematode) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่มีกระดูกสันหลัง มีลำตัวซีกซ้ายและซีกขวาเหมือนกัน เป็นพวกที่มีช่องลำตัวเทียม ลำตัวไม่เป็นข้อปล้อง มีผนังชั้นนอกเป็นรอยย่นยืดหยุ่นได้ มีระบบต่างๆ ภายในลำตัวประกอบด้วยระบบขับถ่ายทางผิวหนัง ระบบประสาท ระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ และระบบกล้ามเนื้อ ไม่พบระบบไหลเวียนโลหิต และระบบหายใจ มีรูปร่างลำตัวกลมยาวคล้ายเส้นด้ายหัวแหลมท้ายแหลม (filiform) ไส้เดือนฝอยเป็นพาราสิตภายในตัวแมลง และมีเพียง 2 วงศ์เท่านั้นที่ทำให้เกิดโรคในแมลงคือ family Steinernematidae และ Heterorhabditidae (นุชนารถ และคณะ, 2544)

ไส้เดือนฝอยในวงศ์ Steinernematidae เรียกชื่อสามัญว่า steinernematid ค้นพบครั้งแรกใน ค.ศ. 1923 โดย Steiner ในประเทศเยอรมัน ได้มีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยชนิดนี้เป็นเวลามากกว่า 90 ปี ซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยมีแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacterioceae สกุล *Xenorhabdus* sp. อยู่ร่วมกันในลักษณะพึ่งพาอาศัยหรือเรียกว่า symbiosis โดยเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) โดยไส้เดือนฝอยเป็นตัวพาแบคทีเรียเข้าสู่ตัวแมลง โดยผ่านทางช่องเปิดตามธรรมชาติของแมลง ได้แก่ ทางปาก ช่องขับถ่าย และรูหายใจทางผิวหนัง (spiracle) จากนั้นเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวแมลง (haemocoel) ซึ่งมีน้ำเลือด (haemolymph) ไส้เดือนฝอยจะปลดปล่อยแบคทีเรียสู่กระแสเลือดแมลง และร่วมกันสร้างสารพิษ ทำให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. เซลล์ของแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณในน้ำเลือดของแมลง และไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโตโดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียในการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบบจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เรียกการผสมพันธุ์แบบนี้ว่า amphimictic ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตอยู่ภายในแมลงที่ตายแล้วประมาณ 2-3 ชั่วอายุ ขึ้นอยู่กับขนาดของแมลง เมื่อแมลงเริ่มแห้งเป็นซาก ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่สาม (third-stage juvenile) จะสะสมอาหารสำรองประเภทไขมันสะสมบริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างผิวหนังกับกล้ามเนื้อช่องท้อง (hypodermal chord) และดูดกลืนเซลล์แบคทีเรียเก็บไว้ในช่องว่าง (lumen) ของลำไส้ส่วนหน้า และเคลื่อนตัวออกจากซากของแมลง เพื่อรอแมลงเหยื่อตัวใหม่ต่อไป (Akhurst and Boemare, 1990)

ความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย (nematode-bacterium complex) ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ ที่จะพัฒนาศัตรูธรรมชาติของแมลงชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะใช้กำจัดแมลงระยะตัวหนอนที่เป็นศัตรูสำคัญในพืช จึงมีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยในกลุ่มนี้ตั้งแต่เริ่มค้นพบครั้งแรก จนถึงปัจจุบันมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมได้สำเร็จตั้งแต่ ค.ศ. 1931 โดย Glaser ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ axenic culture ที่ไม่มีเซลล์ของ symbiotic bacteria ร่วมด้วย ต่อมามีการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเป็นแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย (Bedding, 1981) ซึ่งให้ผลผลิต

ไส้เดือนฝอยสูงกว่าแบบเดิม นอกจากนี้ ไส้เดือนฝอยยังได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลือดอุ่นและมนุษย์ รวมทั้งปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม (Gaugler and Kaya, 1990) ไส้เดือนฝอยจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางทั่วโลก ที่จะพัฒนาให้นำมาใช้ประโยชน์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) และไวรัส NPV (nuclear polyhedrosis virus) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูสำคัญต่างๆ โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชในพื้นที่ทำการเกษตร เป็นการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี (biological control agent) เพื่อช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและสภาพแวดล้อม

นอกจากนั้น นักวิจัยยังให้ความสำคัญในการค้นหาชนิดและสายพันธุ์ใหม่ๆ ในเขตต่างๆ ทั่วโลก ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย เอเชีย และบางประเทศในแอฟริกา เพื่อได้สายพันธุ์พื้นเมืองหลากหลายชนิด และศึกษาการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยในธรรมชาติของถิ่นที่อยู่ จากรายงานการกระจายตัวของไส้เดือนฝอย steinernematid ในภูมิภาคต่างๆ พบว่าในยุโรปตอนเหนือเท่ากับ 37-49 % และพบในทุกประเทศที่มีการสำรวจในทวีปยุโรป ได้แก่ สาธารณรัฐเชคโกสโลวาเกีย 36.8 % สวีเดน 25 % ฟินแลนด์ 5.8 % สาธารณรัฐไอร์แลนด์ 10.4 % นอร์เวย์ 18.3 % และสวิสเซอร์แลนด์ 26.5 % ในทวีปอเมริกามีการศึกษาการกระจายตัวและรายงานใน 5 ประเทศของอเมริกาเหนือ-กลางคือ แคนาดา สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก คิวบา และเปอร์โตริโก และใน 3 ประเทศของอเมริกาใต้คือ บราซิล อุรุกวัย และอาร์เจนตินา นอกจากนั้นยังมีรายงานในประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ส่วนในทวีปเอเชียมีการสำรวจและศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย รายงานใน 9 ประเทศ คือ ญี่ปุ่น จีน อินเดีย ศรีลังกา เกาหลี โอมาน มาเลเซีย เวียตนาม และไทย ในทวีปแอฟริกาได้รายงานการสำรวจค้นพบในประเทศเคนยา (นุชนารถ และคณะ, 2544)

ในปัจจุบันไส้เดือนฝอยมีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้กำจัดแมลงหลายชนิด โดยเฉพาะแมลงศัตรูสำคัญในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ กลุ่มหนอนผีเสื้อในอันดับ (order) Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้ผัก (common leafworm, *Spodoptera litura*) หนอนกระทู้หอม (beet armyworm, *S. exigua*) และหนอนเจาะสมอฝ้าย (American bollworm, *Heliothis armigera*) กลุ่มหนอนด้วงในอันดับ Coleptera เช่น ด้วงหมัดกระโดด (flea betle, *Phyllotreta sinuata*) หนอนด้วง Japanese beetle และด้วงงวงองุ่น (vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*) เป็นต้น ได้มีการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย steinernematid นำมาผลิตเป็นการค้า 6 ชนิด คือ *S. carpocapsae, S. glaseri, S. feltiae, S. riobrave, S. scapterisci* และ *S. kushidai* ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายทั่วโลกมากกว่า 40 บริษัท ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย ได้แก่ บริษัท MicroBio ผลิตไส้เดือนฝอย *S. feltiae* ควบคุมหนอนแมลงวันทำลายเห็ด (mushroom sciarids) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมด้วงงวงองุ่น (vine

weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys บริษัท Biosys ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง Japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (black vine weevil) (นุชนารถ และคณะ, 2544)

สำหรับในประเทศไทย งานวิจัยทางด้านไส้เดือนฝอยเริ่มมีการศึกษาค้นคว้าเมื่อประมาณปี 2530 โดยกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้นำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* All strain เป็นสายพันธุ์จากอเมริกาที่ผลิตเป็นการค้าทั่วโลก นำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเทียมและนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชสำคัญหลายชนิดประสบผลสำเร็จในสภาพไร่กับหนอนเจาะเปลือกลองกอง หนอนกระทู้หอมทำลายดอกดาวเรือง และด้วงหมัดผักทำลายผักกาดหัว เป็นต้น (วัชรี, 2534)

การค้นหาไส้เดือนฝอยที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เพื่อนำขึ้นมาพัฒนาและนำกลับไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้เพิ่มความสำคัญและมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ซึ่งดำเนินงานโดยนักวิจัยในแต่ละสาขาเพื่อค้นหาจุดสำคัญของการนำมาใช้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดมีข้อจำกัดในการนำไปใช้แตกต่างกันไป เช่น ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในดินร่วนปนทราย ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส (Kaya, 1977) เป็นต้น ข้อจำกัดดังกล่าวจึงต้องมีการค้นคว้าวิจัยข้อมูลพื้นฐานทั้งด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และพฤติกรรมการดำรงชีวิต ซึ่งข้อมูลทางวิชาการเหล่านี้มีความสำคัญยิ่งต่อการพัฒนาไส้เดือนฝอยที่พบตามธรรมชาติให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ การพยายามค้นหาไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ใหม่ในเขตต่างๆ ซึ่งมีความแตกต่างของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มของแสงอัลทราไวโอเลต แมลงอาศัย ชนิดและคุณสมบัติของดิน เพื่อนำสายพันธุ์พื้นเมืองมาใช้ควบคุมศัตรูพืชในท้องถิ่นที่มีสภาพแวดล้อมเดิม จึงเป็นงานวิจัยที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp. จำแนกได้ 61 ชนิด และสกุล *Heterorhabditis* spp. จำแนกได้ 16 ชนิด (http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/steinsp1.htm) รวมทั้งประเทศไทยได้เริ่มมีการสำรวจเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในปี 2539 สามารถแยกได้จำนวน 9 ไอโซเลท จัดอยู่ใน family Steinernematidae 8 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสตามจังหวัดที่พบคือ จังหวัดกาญจนบุรี (KBs) พิจิตร (PCs) อยุธยา (AYs) กาฬสินธุ์ (KSs) มหาสารคาม (MKs) ขอนแก่น (KKs) หนองคาย (NKs) และสระแก้ว (SKs) และ family Heterorhabditidae 1 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด (REh) (นุชนารถ และคณะ, 2543) 9 ไอโซเลท ได้นำมาศึกษาศักยภาพในการเป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมแมลง ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี มีศักยภาพในกำจัดแมลงได้หลายชนิดและเพาะเลี้ยงได้ง่ายในอาหารเทียมราคาถูก สามารถนำไปพัฒนาและขยายผลสู่เกษตรกรได้ตั้งแต่ปี 2546-2549 (นุชนารถ, 2546: 2547) และในปี 2550 สายพันธุ์ KBs มีศักยภาพในการกำจัดแมลงลดลง และการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมให้ผลผลิตต่ำลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น ในปี 2549-2553 จึงได้ทำการสำรวจรวบรวมและศึกษาไส้เดือน

ฝอยควบคุมแมลงสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งสามารถแยกได้สกุล *Steinernema* sp. ในพื้นที่จังหวัดกำแพงเพชร (KPs) ร้อยเอ็ด (REs) อุบลราชธานี (UBs) เพชรบูรณ์ (PBs) และสกุล *Heterorhabditis* sp. ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี (PRh) เมื่อทำการเปรียบเทียบศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการฆ่าแมลงพบว่า KPs มีศักยภาพในการกำจัดแมลงได้หลายชนิด REs กำจัดลูกน้ำยุงลาย และ PRh กำจัดเห็บวัว ไส้เดือนฝอย KPs และ REs สามารถผลิตขยายและเพิ่มปริมาณได้ง่ายในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำที่อัตราส่วน 5:2:3 สภาพการเลี้ยงแบบ axenic culture (นุชนารถ และ ณัฏฐิมา, 2552) จึงมีการใช้สายพันธุ์ KPs ทดแทน KBs ตั้งแต่ปี 2550 จนถึงปัจจุบัน รวม 7 ปี สายพันธุ์ KPs ยังคงศักยภาพในการกำจัดแมลงและยังให้ผลผลิตในอาหารเทียมคงที่และสม่ำเสมอ (นุชนารถ, 2552; นุชนารถ และคณะ, 2552; นุชนารถ, 2553) สำหรับไอโซเลทอื่นๆ นั้น เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมราคาถูกสูตรเดียวกันสภาพการเลี้ยงแบบ axenic culture ยังให้ผลผลิตต่ำ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

<u>อุปกรณ์</u>

1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope และ Compound microscope เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ กล่องบรรจุตัวอย่างดิน ไมโครปิเปต ถังเก็บรักษาความเย็น และกระดาษกรอง Whatman#2

2. สารเคมี ได้แก่ Hyamine แอลกอฮอล์ โซเดียมคลอไรด์ โพลิเมอร์ และทวิน 80

3. อาหารและวัสดุเลี้ยงแมลงอาศัย และแมลง *Galleria* sp.

<u>วิธีการ</u>

1. เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ครอบคลุม 4 ภาคของประเทศ สุ่มเก็บดินในระดับความลึก 10-15 ซม. จำนวน 5 จุดๆ ละประมาณ 300-500 กรัม นำมาคลุกเคล้ารวมกัน ใส่ถุงพลาสติกน้ำหนักประมาณ 1 กก. เท่ากับ 1 ตัวอย่างดิน ในแต่ละตัวอย่างครอบคลุมพื้นที่ 10 ตร.ม. นำตัวอย่างดินเก็บในถังรักษาความเย็น (20-24 °ซ) ขณะนำกลับห้องปฏิบัติการ และนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินต่อไป

2. การแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินโดยใช้เทคนิค Galleria baiting technique นำดินแต่ละตัวอย่างใส่กล่องพลาสติกประมาณ 300 กรัม วางหนอนกินไขผึ้งเป็นเหยื่อล่อตามเทคนิคของ Bedding and Akhurst (1975) บนผิวดินจำนวน 10-15 ตัว ปิดฝาและคว่ำกล่องพลาสติก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 $\pm$ 2°ซ เป็นเวลา 7 วัน ในดินที่มีไส้เดือนฝอยจะพบหนอนเหยื่อล่อตาย จากนั้นนำหนอนที่ตายมาผ่าซาก เพื่อตรวจหาไส้เดือนฝอยในซากหนอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ สำหรับของตัวอย่างดินอื่นๆ ถ้าหนอนเหยื่อไม่ตายภายในเวลา 10 วัน ตัวอย่างดินนั้นจะถูกคัดทิ้งไป

3. ทำ Koch' s postulates เพื่อยืนยันการเป็นไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในแมลง โดยนำหนอนที่ตายวางบนกระดาษกรองชุ่มน้ำ (White trap) ให้ได้ตัวอ่อนระยะ infective-stage

juvenile (IJ) ซึ่งจะเคลื่อนที่ออกมาจากซากหนอน นำ IJ มา infect กับหนอนชุดใหม่ ทิ้งไว้ประมาณ 5-7 วัน นำหนอนทดสอบมาผ่าพิสูจน์ตรวจการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ในตัวแมลงทดสอบ เพื่อยืนยันการเป็นศัตรูแมลงของไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นทำการกำหนดรหัสไส้เดือนฝอยตามสถานที่ที่แยกได้

4. การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยโดยใช้เทคนิคการผสมข้าม (Cross mating) เตรียมน้ำเลือด (haemolymph) ของหนอนกินไขผึ้ง โดยนำตัวหนอนฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 75 % ล้างผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง ใช้กรรไกรตัดขาคู่ที่สองของหนอนและบีบน้ำเลือดเก็บไว้ในหลอดทดสอบขนาด 1.5 มล. ที่อุณหภูมิ 4 ˚ซ ก่อนใช้ในการทดลอง จากนั้นเตรียมไส้เดือนฝอยระยะ IJ ที่แยกจากพื้นที่ต่างๆ นำแต่ละไอโซเลทใส่ลงไปในหยดน้ำเลือดของหนอนบนสไลด์หลุม โดยมีไส้เดือนฝอย *Steinernema siamkayai* ผสมสลับร่วมกับทุกไอโซเลท นำไปวางในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. ที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำ ปิดฝาจาน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 ˚ซ ตรวจสอบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM (Light microscope) ทุก 12 ชม. จนถึงระยะ young male (YM) และ young female (YF) เขี่ยไส้เดือนฝอยผสมสลับระหว่าง YM และ YF จำนวนอย่างละ 10 ตัว ของแต่ละชนิด ที่ใช้ทดสอบลงในหยดน้ำเลือดของหนอนบนสไลด์หลุม นำไปวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำ โดยมีไส้เดือนฝอยชนิดเดียวกันผสมกันเองเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิ 25±2 ˚ซ เป็นเวลา 10 วัน บันทึกผลการผสมพันธุ์และให้ลูกในแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM งานทดลองปฏิบัติซ้ำ 3 ครั้ง

5. การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยให้คงความมีชีวิตและศักยภาพในการเป็นสารชีวภัณฑ์ ทำการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile (IJ) แต่ละรหัส โดยการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในหนอนกินไขผึ้งที่วางใน Petri dish (เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม.) รองด้วยกระดาษกรอง (Whatman # 2) ใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 5,000 ± 500 ตัวในน้ำ 1 มล. ต่อหนอน 20 ตัว เก็บที่อุณหภูมิ 25±2 ˚ซ เป็นเวลา 2 วัน นำหนอนมาล้างผ่านแอลกอฮอล์ 75 % และผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำมาวางบน White trap เป็นเวลา 7 วัน ไส้เดือนฝอยระยะ IJ รุ่นใหม่จะเคลื่อนที่ออกจากซากหนอน IJ ที่ได้นำมาล้างด้วย hyamine 0.1 % เป็นเวลา 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวของไส้เดือนฝอย ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนเก็บในสารอุ้มความชื้น (สารโพลิเมอร์) ที่บรรจุในถุงพลาสติกรูปทรงสามเหลี่ยม บันทึกรหัสไส้เดือนฝอยและวันที่เก็บ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25±2 ˚ซ ไส้เดือนฝอยแต่ละรหัสทำการ re-culture ทุก 3 เดือน กับหนอนกินไขผึ้งตามวิธีการเดิม

<u>เวลาสถานที่</u>

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2559

<u>สถานที่ดำเนินการ</u>

1. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.
2. เก็บรวบรวมตัวอย่างดินครอบคลุมพื้นที่ 4 ภาค

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ นครปฐม ชัยนาท กาญจนบุรี อุทัยธานี อยุธยา ราชบุรี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น ร้อยเอ็ด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี รวม 18 จังหวัด จำนวน 878 ตัวอย่าง นำมาแยกไส้เดือนฝอยด้วย Galleria baiting technique ได้ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ใช้กำจัดแมลง จำนวน 42 ไอโซเลท โดยหนอนเหยื่อล่อ (*Galleria mellonella*) หรือหนอนกินไขผึ้ง มีลักษณะผิวเป็นสีดำ และลำตัวไม่เน่าเละ จึงจัดอยู่ใน family Steinernematidae genus *Steinernema* เมื่อนำไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท ทดสอบด้วยวิธีหยดไส้เดือนฝอยจำนวน 1,000 ตัว ต่อน้ำ 1 มล. บนตัวหนอนกินไขผึ้ง พบว่าหนอนกินไขผึ้งตายในเวลา 24-48 ชม. และทิ้งไว้ 7 วัน นำมาผ่าซากพบไส้เดือนฝอยขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนในซากหนอน แสดงว่าไส้เดือนฝอยทั้งหมดที่แยกได้จากดินในพื้นที่ต่างๆ จำนวน 42 ไอโซเลท เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลง จึงทำการกำหนดรหัสเพื่อเก็บรักษาเป็นอักษรย่อชื่อจังหวัดคือ ภาคเหนือ *Steinernema* sp. CM, PL, KP02, PB ภาคกลาง *Steinernema* sp. NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *Steinernema* sp. KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก *Steinernema* sp. PR, PJ และภาคตะวันออก *Steinernema* sp. CB นำแต่ละไอโซเลทเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บให้คงความมีชีวิตและมีศักยภาพในการเป็น bio-control agent ได้นาน 2-3 เดือน และมีการ re-culture ทุก 3 เดือน เพื่อรักษาความมีชีวิต

จากผลการเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงจากตัวอย่างดินใน 18 จังหวัด ของประเทศไทย 878 ตัวอย่าง แยกได้ 42 ไอโซเลท คิดเป็น 4.78 % ของจำนวนตัวอย่าง โดยแยกได้ในทุกจังหวัดที่มีการเก็บตัวอย่าง โดยในแต่ละจังหวัดที่เก็บมีจำนวนตัวอย่างดินระหว่าง 40-60 จุดเก็บ สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยเพียง 1-2 ตัวอย่างเท่านั้น ดังนั้น จำนวนตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บในแต่ละพื้นที่ จึงควรเก็บจำนวนตัวอย่างเฉลี่ย 48.8 ตัวอย่างต่อพื้นที่ (จังหวัด) จึงมีโอกาสแยกได้ไส้เดือนฝอยกลุ่มกำจัดแมลง

การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยที่เก็บรวบรวมได้ของภาคเหนือ *Steinernema* sp. CM, PL, KP02, PB ภาคกลาง *Steinernema* sp. NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *Steinernema* sp. KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก *Steinernema* sp. PR, PJ และภาคตะวันออก *Steinernema* sp. CB โดยวิธี cross mating พบว่าทุกไอโซเลทสามารถผสมพันธุ์และเพิ่มปริมาณได้กับ *S. siamkayai* ที่แยกได้จาก จ.กำแพงเพชร ในปี 2550 จึงจำแนกเป็นชนิด (species) เดียวกัน และเป็นสายพันธุ์ไทย และทุกไอโซเลทไม่สามารถผสมพันธุ์ได้กับ *S. carpocapsae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์การค้านำเข้ามาจากประเทศสหรัฐอเมริกา

จากการตรวจขนาดความยาวลำตัวของตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective stage) ของสายพันธุ์ไทย *S. siamkayai* เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศ *S. carpocapsae* ภายใต้กล้อง Compound microscope พบว่าสายพันธุ์ต่างประเทศจะมีขนาดลำตัวยาวกว่าสายพันธุ์ไทย และ

สายพันธุ์ไทยเมื่อหยุดนิ่ง ลำตัวจะตรง ที่ปลายหางโค้งหักศอกประมาณ 45 องศา ซึ่งพบลักษณะของลำตัวในทุกไอโซเลทเช่นกัน

การแยกไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ได้ในเขตร้อนชื้น เก็บรวบรวม และกำหนดรหัสในแต่ละพื้นที่ สามารถนำมาพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์ได้อย่างต่อเนื่อง โดยนำมาคัดเลือกศักยภาพในการเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืช ได้แก่ ทดสอบความทนทานต่อสภาพแวดล้อม การเพิ่มปริมาณได้มากในอาหารเทียม และมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงชนิดต่างๆ สามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ใช้ลดหรือทดแทนสารป้องกันกำจัดแมลงได้ต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

เก็บรวบรวมตัวอย่างดินจำนวน 878 ตัวอย่าง จาก 18 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ นครปฐม ชัยนาท กาญจนบุรี อุทัยธานี อยุธยา ราชบุรี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น ร้อยเอ็ด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี แยกได้ไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* sp. จำนวน 42 ไอโซเลท กำหนดรหัสเพื่อเก็บรักษาเป็นอักษรย่อชื่อจังหวัดคือ ภาคเหนือ *Steinernema* sp. CM, PL, KP02, PB ภาคกลาง *Steinernema* sp. NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *Steinernema* sp. KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก *Steinernema* sp. PR, PJ และภาคตะวันออก *Steinernema* sp. CB ทุกไอโซเลทเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีการ re-culture ทุก 3 เดือน เพื่อรักษาความมีชีวิต สามารถจำแนกชนิดโดยวิธีผสมข้ามเป็น *S. siamkayai*

เอกสารอ้างอิง (References)

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2543. ไส้เดือนฝอยที่มีประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช, น. 223-246. *ใน* พัฒนาการเกษตรไทยยุคเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2546. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่าย. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 20 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2547. การพัฒนากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่ายเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 182 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2553. การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในกลุ่มเกษตรอินทรีย์. ในสรุปผลการดำเนินงานโครงการเกษตรอินทรีย์ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 6 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช พรพิมล อธิปัญญาคม และหิรัญ หิรัญประดิษฐ์. 2544. งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandensis* n. sp. : การจำแนกชนิด คัดเลือกสายพันธุ์ และการผลิตขยายปริมาณ.

หน้า 1-71. ใน : รายงานผลงานวิจัยกองโรคพืชและจุลชีววิทยา 2544. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช และ หิรัญ หิรัญประดิษฐ์. 2543. การตรวจวิเคราะห์โดยชีววิธีเพื่อการคัดเลือกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 10 (3) : 1-12.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. ใน ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช. 2548. การใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. Thai isolate ควบคุมแมลงศัตรูพืช. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 55 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด อัจฉรา ตันติโชดก ดำรง เวชกิจ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การพัฒนาโรงงานต้นแบบและเทคโนโลยีการผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในเชิงพาณิชย์. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 53 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ขวัญชัย เจริญกุล สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. การพัฒนาชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดปลวกในเชิงพาณิชย์. ผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), กรุงเทพฯ. 131 หน้า.

วัชรี สมสุข. 2534. ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 182-197. *ใน* : เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. Pages 75-90. *In* : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Bedding, R.A. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27 : 109-114.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science* 614.

Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc. Florida. 365 p.

https//: nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/steinsp1.htm. All described species of the genera *Steinernema, Neosteinernema* and *Heterorhabditis*

Kaya, H.K. 1977. Development of DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperature. *J. Nematol.* 9 : 346-349.

Steiner, G. 1923. *Aplectana kraussei* n.sp. der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematoden-form, nebst Bemerkungen uber das Steitenorgan der parasitischen Nematoden. Page 24. In : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

การประเมินศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

Potential of Entomopathogenic Nematodes for Controlling Insect Pest

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ

Nuchanart Tangchitsomkid and Boonruenrat Ruengwiset

คำสำคัญ (key words) : ศักยภาพ ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง แมลงศัตรูพืช

Potential, entomopathogenic nematodes, insect pest

บทคัดย่อ (abstract)

การประเมินศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. จำนวน 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ CM, PL, KP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, BR, PR, PJ และ CB โดยวิธี Quadrant plate bio-assay พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. รหัส KP isolate เคลื่อนที่ในทิศทางเข้าหาหนอนเหยื่อล่อกับทิศทางตรงข้าม ที่เวลา 30 นาที มีค่าระยะทางเฉลี่ย (χ) สูงที่สุดเท่ากับ 51.93 รองลงมาคือ KB และ RE isolate เท่ากับ 48.88 และ 48.87 ในขณะที่ *S. siamkayai* KP strain สายพันธุ์เปรียบเทียบ เท่ากับ 55.82 และไส้เดือนฝอยรหัสที่มีค่าเฉลี่ยระยะทางน้อยที่สุด 3 ลำดับคือ ไส้เดือนฝอยรหัส PJ, CN และ NP isolate เท่ากับ 9.68 10.59 และ 12.68 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการทดสอบ Migration in sand column bioassay พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 18 ไอโซเลท เคลื่อนที่ในแนวดิ่งเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อในดินลึก 5 นิ้ว และหนอนเหยื่อล่อตาย 100% ที่เวลา 24 ชม. เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* KP strain โดยไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KP, KB, RE และ UB isolate นำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ และกลุ่มหนอนด้วง พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 4 ไอโซเลท มีศักยภาพในการฆ่าแมลงทั้ง 2 กลุ่ม ตาย 38-100 % ในเวลา 48 ชม.

Evaluation of the potential of *Steinernema* sp., 18 isolates isolated from soil in various areas; CM, PL, KP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE , BR, PR, PJ and CB by the Quadrant plate bio-assay method, found that the nematode *Steinernema* sp. KP isolate code moves in the direction toward the lure bait and opposite direction at 30 minutes with the average distance (χ), the highest is 51.93. Followed by KB and RE isolate equal to 48.88 and 48.87. While *S. siamkayai* KP strain were equal to 55.82. And code nematodes with the least average distance of 3 sequences was PJ, CN and NP isolate of 9.68 10.59 and 12.68 respectively. The results of the Migration in sand column bioassay showed that the 18 isolates moving vertically to destroy the lure bait in the deep soil 5 inches and the 100% dead lure worm that

lasts 24 hours as well as *S. siamkayai* KP strain by *Steinernema* sp. KP, KB, RE and UB isolate used to test kill in the caterpillar group and the grub worm group. It was found that all 4 isolates had the potential to kill 38-100% in 48 hours.

บทนำ (Introduction)

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง (Entomopathogenic nematode) ได้มีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้เป็นเวลามากกว่า 90 ปี ซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacterioceae สกุล *Xenorhabdus* sp. อยู่ร่วมกันในลักษณะพึ่งพาอาศัย หรือเรียกว่า symbiosis โดยเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) โดยไส้เดือนฝอยเป็นตัวพาแบคทีเรียเข้าสู่ตัวแมลงโดยผ่านทางช่องเปิดตามธรรมชาติของแมลง ได้แก่ ทางปาก ช่องขับถ่าย และรูหายใจทางผิวหนัง (spiracle) จากนั้นเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวแมลง (haemocoel) ซึ่งมีน้ำเลือด (haemolymph) ไส้เดือนฝอยจะปลดปล่อยแบคทีเรียสู่กระแสเลือดแมลง และร่วมกันสร้างสารพิษ ทำให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. เซลล์ของแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณในน้ำเลือดของแมลง และไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโตโดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียในการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบบจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เรียกการผสมพันธุ์แบบนี้ว่า amphimictic ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตอยู่ภายในแมลงที่ตายแล้วประมาณ 2-3 ชั่วอายุขึ้นอยู่กับขนาดของแมลง เมื่อแมลงเริ่มแห้งเป็นซาก ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่สาม (third-stage juvenile) จะสะสมอาหารสำรองประเภทไขมันสะสมบริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างผิวหนังกับกล้ามเนื้อช่องท้อง (hypodermal chord) และดูดกลืนเซลล์แบคทีเรียเก็บไว้ในช่องว่าง (lumen) ของลำไส้ส่วนหน้า และเคลื่อนตัวออกจากซากของแมลง เพื่อรอแมลงเหยื่อตัวใหม่ต่อไป (Akhurst and Boemare, 1990)

ความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ ที่จะพัฒนาศัตรูธรรมชาติของแมลงชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะใช้กำจัดแมลงระยะตัวหนอนที่เป็นศัตรูสำคัญในพืช จึงมีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยในกลุ่มนี้ตั้งแต่เริ่มค้นพบครั้งแรก จนถึงปัจจุบันมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมได้สำเร็จตั้งแต่ ค.ศ. 1931 โดย Glaser ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ axenic culture ที่ไม่มีเซลล์ของ symbiotic bacteria ร่วมด้วย ต่อมามีการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเป็นแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย (Bedding, 1981) ซึ่งให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าแบบเดิม นอกจากนี้ ไส้เดือนฝอยยังได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลือดอุ่นและมนุษย์ รวมทั้งปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม

(Gaugler and Kaya, 1990) ไส้เดือนฝอยจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางทั่วโลก ที่จะพัฒนาให้นำมาใช้ประโยชน์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) และไวรัส NPV (nuclear polyhedrosis virus) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูสำคัญต่างๆ โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชในพื้นที่ทำการเกษตร เป็นการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี (biological control agent) เพื่อช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและสภาพแวดล้อม

นอกจากนั้น นักวิจัยยังให้ความสำคัญในการค้นหาชนิดและสายพันธุ์ใหม่ๆ ในเขตต่างๆ ทั่วโลก ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย เอเชีย และบางประเทศในแอฟริกา เพื่อได้สายพันธุ์พื้นเมืองหลากหลายชนิด และศึกษาการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยในธรรมชาติของถิ่นที่อยู่ จากรายงานการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในภูมิภาคต่างๆ พบว่าในยุโรปตอนเหนือเท่ากับ 37-49 % และพบในทุกประเทศที่มีการสำรวจในทวีปยุโรป ได้แก่ สาธารณรัฐเชคโกสโลวาเกีย 36.8 % สวีเดน 25 % ฟินแลนด์ 5.8 % สาธารณรัฐไอร์แลนด์ 10.4 % นอร์เวย์ 18.3 % และสวิสเซอร์แลนด์ 26.5 % ในทวีปอเมริกามีการศึกษาการกระจายตัวและรายงานใน 5 ประเทศของอเมริกาเหนือ-กลางคือ แคนาดา สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก คิวบา และเปอร์โตริโก และใน 3 ประเทศของอเมริกาใต้คือ บราซิล อุรุกวัย และอาร์เจนตินา นอกจากนั้นยังมีรายงานในประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ส่วนในทวีปเอเชียมีการสำรวจและศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย รายงานใน 9 ประเทศ คือ ญี่ปุ่น จีน อินเดีย ศรีลังกา เกาหลี โอมาน มาเลเซีย เวียตนาม และไทย ในทวีปแอฟริกาได้รายงานการสำรวจค้นพบในประเทศเคนยา (นุชนารถ และคณะ, 2544)

ในปัจจุบันไส้เดือนฝอยมีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้กำจัดแมลงหลายชนิด โดยเฉพาะแมลงศัตรูสำคัญในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ กลุ่มหนอนผีเสื้อในอันดับ (order) Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้ผัก (common leafworm, *Spodoptera litura*) หนอนกระทู้หอม (beet armyworm, *S. exigua*) และหนอนเจาะสมอฝ้าย (American bollworm, *Heliothis armigera*) กลุ่มหนอนด้วงในอันดับ Coleptera เช่น ด้วงหมัดกระโดด (flea betle, *Phyllotreta sinuata*) หนอนด้วง Japanese beetle และด้วงงวงองุ่น (vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*) เป็นต้น ได้มีการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย steinernematid นำมาผลิตเป็นการค้า 6 ชนิด คือ *S. carpocapsae, S. glaseri, S. feltiae, S. riobrave, S. scapterisci* และ *S. kushidai* ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายทั่วโลกมากกว่า 40 บริษัท ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย ได้แก่ บริษัท MicroBio ผลิตไส้เดือนฝอย *S. feltiae* ควบคุมหนอนแมลงวันทำลายเห็ด (mushroom sciarids) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมด้วงงวงองุ่น (vine weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys บริษัท Biosys ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง Japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (black vine weevil) (นุชนารถ และคณะ, 2544)

การค้นหาไส้เดือนฝอยที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เพื่อนำขึ้นมาพัฒนาและนำกลับไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้เพิ่มความสำคัญและมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ซึ่งดำเนินงานโดยนักวิจัยในแต่ละสาขาเพื่อค้นหาจุดสำคัญของการนำมาใช้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดมีข้อจำกัดในการนำไปใช้แตกต่างกันไป เช่น ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในดินร่วนปนทราย ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส (Kaya, 1977) เป็นต้น ข้อจำกัดดังกล่าวจึงต้องมีการค้นคว้าวิจัยข้อมูลพื้นฐานทั้งด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และพฤติกรรมการดำรงชีวิต ซึ่งข้อมูลทางวิชาการเหล่านี้มีความสำคัญยิ่งต่อการพัฒนาไส้เดือนฝอยที่พบตามธรรมชาติให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ การพยายามค้นหาไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ใหม่ในเขตต่างๆ ซึ่งมีความแตกต่างของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มของแสงอัลทราไวโอเลต แมลงอาศัย ชนิดและคุณสมบัติของดิน เพื่อนำสายพันธุ์พื้นเมืองมาใช้ควบคุมศัตรูพืชในท้องถิ่นที่มีสภาพแวดล้อมเดิม จึงเป็นงานวิจัยที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp. จำแนกได้ 61 ชนิด และสกุล *Heterorhabditis* spp. จำแนกได้ 16 ชนิด (http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/steinsp1.htm) รวมทั้งประเทศไทยได้เริ่มมีการสำรวจเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในปี 2539 สามารถแยกได้จำนวน 9 ไอโซเลท จัดอยู่ใน family Steinernematidae 8 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสตามจังหวัดที่พบคือ จังหวัดกาญจนบุรี (KBs) พิจิตร (PCs) อยุธยา (AYs) กาฬสินธุ์ (KSs) มหาสารคาม (MKs) ขอนแก่น (KKs) หนองคาย (NKs) และสระแก้ว (SKs) และ family Heterorhabditidae 1 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด (REh) (นุชนารถ และคณะ, 2544) ทั้ง 9 ไอโซเลท ได้นำมาศึกษาศักยภาพในการเป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมแมลง ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี มีศักยภาพในกำจัดแมลงได้หลายชนิดและเพาะเลี้ยงได้ง่ายในอาหารเทียมราคาถูก สามารถนำไปพัฒนาและขยายผลสู่เกษตรกรได้ตั้งแต่ปี 2546-2549 (นุชนารถ, 2546: 2547) และในปี 2550 สายพันธุ์ KBs มีศักยภาพในการกำจัดแมลงลดลง และการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมให้ผลผลิตต่ำลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในปี 2549-2553 จึงได้ทำการสำรวจรวบรวมและศึกษาไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งสามารถแยกได้สกุล *Steinernema* sp. ในพื้นที่จังหวัดกำแพงเพชร (KPs) ร้อยเอ็ด (REs) อุบลราชธานี (UBs) เพชรบูรณ์ (PBs) และสกุล *Heterorhabditis* sp. ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี (PRh) เมื่อทำการเปรียบเทียบศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการฆ่าแมลงพบว่า KPs มีศักยภาพในการกำจัดแมลงได้หลายชนิด REs กำจัดลูกน้ำยุงลาย และ PRh กำจัดเห็บวัว อีพีเอ็น KPs และ REs สามารถผลิตขยายและเพิ่มปริมาณได้ง่ายในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำที่อัตราส่วน 5:2:3 สภาพการเลี้ยงแบบ axenic culture (นุชนารถ และ ณัฏฐิมา, 2552) จึงมีการใช้สายพันธุ์ KPs ทดแทน KBs ตั้งแต่ปี 2550 จนถึงปัจจุบัน รวม 7 ปี สายพันธุ์ KPs ยังคงศักยภาพในการกำจัดแมลงและยังให้ผลผลิตในอาหารเทียมคงที่และสม่ำเสมอ (นุชนารถ, 2552; นุชนารถ และคณะ, 2552; นุชนารถ, 2553) สำหรับไอโซ

เลทอื่นๆ นั้น เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมราคาถูกสูตรเดียวกัน สภาพการเลี้ยงแบบ axenic culture ยังให้ผลผลิตต่ำ ทำให้มีต้นทุนการผลิตสูง

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

<u>อุปกรณ์</u>

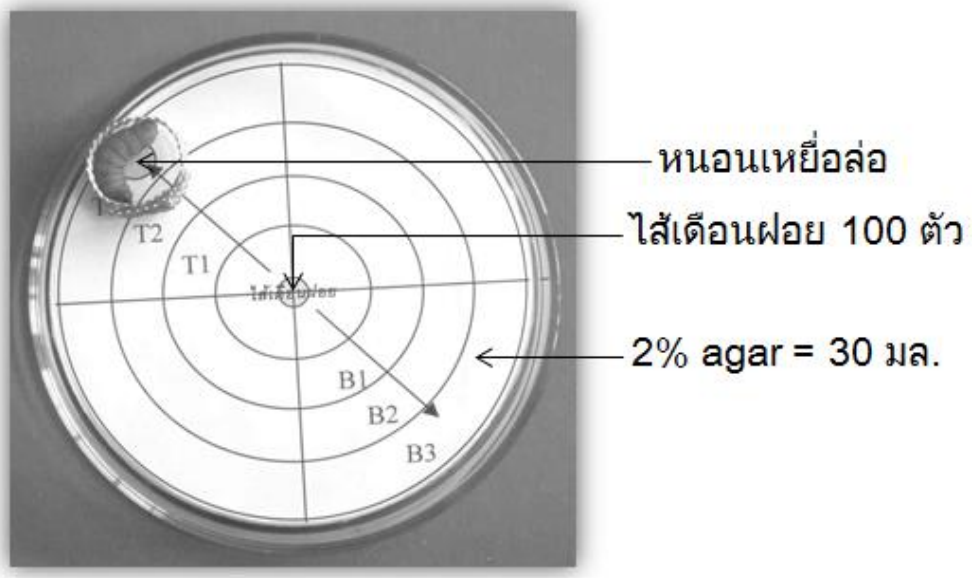
1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ที่แยกได้จากภาคเหนือ รหัส CM, PL, KP, PB ภาคกลาง รหัส NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รหัส KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก รหัส PR, PJ ภาคตะวันออก รหัส CB และไส้เดือนฝอย *Steinernema siamkayai* KP strain เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

2. วัสดุ-อุปกรณ์ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องแก้ว ผงวุ้น กระดาษกรอง

3. แมลงทดสอบกลุ่มหนอนด้วงและหนอนผีเสื้อ

<u>วิธีการ</u>

1. Quadrant plate bioassay (ดัดแปลงจาก Campbell, 1994) ตัดกระดาษเป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. นำมาขีดเส้นแบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน และขีดวงกลมจำนวน 3 วง ระยะห่าง 1 ซม. นำไปวางใต้จานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเท 2 % agar ปริมาตร 30 มล. ในจาน เมื่อวุ้นแข็งตัว เจาะวุ้นที่ริมจานและวางกรงตาข่ายทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. ที่บรรจุหนอนกินไขผึ้ง 1 ตัว เป็นเหยื่อล่อ ปฏิบัติการทดลองโดยนำไส้เดือนฝอยระยะ IJ ของแต่ละรหัส และมีไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ KPs เป็นตัวเปรียบเทียบอย่างละ 100±10 ตัวต่อจาน ที่อยู่ในน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร หยดที่จุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 วิธีการทดสอบ Quadrant plate bioassay

การบันทึกข้อมูล จำนวนไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อ (T1 T2 และ T3) และจำนวนไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ในทิศทางตรงข้าม (B1 B2 และ B3) ที่เวลา 10 20 และ 30 นาที ของไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด LM ทำซ้ำ 5 ครั้ง คำนวณค่าระยะทางเฉลี่ย (mean distance) ของการเคลื่อนที่โดยใช้สูตรของ Campbell (1994)

2. Migration in sand column bioassay (ดัดแปลงจาก Westerman and Godthelp, 1990) นำหนอนกินไขผึ้ง 1 ตัว วางในกระบอกพลาสติกทรงกลม (เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. สูง 5 ซม.) บรรจุดินทรายอบฆ่าเชื้อที่มีความชื้น 10 % ให้เต็มกระบอก นำไส้เดือนฝอยระยะ IJ ของแต่ละรหัสและสายพันธุ์ KPs เป็นตัวเปรียบเทียบ อย่างละ 100±10 ตัว ที่อยู่ในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าดินทราย ทำการทดสอบไอโซเลท/ชนิดละ 10 ซ้ำ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25±2 ˚ซ เป็นเวลา 5 วัน

การบันทึกข้อมูล การตายของหนอนกินไขผึ้งที่ถูกไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดเข้าทำลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ KPs และผ่าซากหนอนตรวจหาไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM

3. การทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการฆ่าแมลงกลุ่มหนอนผีเสื้อและหนอนด้วง ทำการทดสอบใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 9 ซม. ตามขนาดของแมลงทดสอบ (ระยะตัวหนอนหรือตัวเต็มวัย) วางด้วยกระดาษกรอง Whatman # 2 ใส่ไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท/ชนิด จำนวน 1,000 และ 2,000 ตัวในน้ำ 0.5 และ 1.0 มล. ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Petri dish 5 และ 9 ซม. ตามลำดับ นำแมลงแต่ละชนิดใส่ 3-10 ตัวต่อ Petri dish (ขึ้นกับขนาดของแมลง) มีวิธีการหยดน้ำกลั่นเป็น control เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

การบันทึกข้อมูล ตรวจนับการตายของแมลงแต่ละชนิดที่เวลา 24 และ 48 ชม. นำไปวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การตาย (% mortality) ของแมลงโดยใช้ Abbott's formula (1925)

เวลาสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2560

สถานที่ดำเนินการ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. ในการเข้าหาหนอนเหยื่อล่อ โดยใช้วิธี Quadrant plate bio-assay พบว่าการเคลื่อนที่ของไส้เดือนฝอยแต่ละรหัสตามแนวราบในทิศทางเข้าหาแมลงเหยื่อ (T1, T2, T3) และทิศทางตรงข้าม (B1, B2, B3) ที่เวลา 10 20 และ 30 นาที พบว่าไส้เดือนฝอยรหัส KP isolate มีค่าระยะทางเฉลี่ย (χ) ตามสูตรการคำนวณของ Campbell (1994) สูงที่สุดเท่ากับ 51.93 รองลงมาคือ KB และ RE isolate เท่ากับ 48.88 และ

48.87 ในขณะที่ *Steinernema siamkayai* KP strain สายพันธุ์เปรียบเทียบ เท่ากับ 55.82 และไส้เดือนฝอยรหัสที่มีค่าเฉลี่ยระยะทางน้อยที่สุด 3 ลำดับคือ ไส้เดือนฝอยรหัส PJ, CN และ NP isolate เท่ากับ 9.68 10.59 และ 12.68 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง (*Steinernema* sp.) ที่แยกได้ในจังหวัดต่างๆ ในการเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อ โดยวิธี Quadrant plate bio-assay

รหัสไส้เดือนฝอย	รวมการเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อ (T1+T2+T3)	รวมการเคลื่อนที่ในทิศทางตรงข้าม (B1+B2+B3)	ผลรวมจำนวนไส้เดือนฝอย (T+B)	ค่าเฉลี่ยระยะทาง (χ)[1/]
CM	18	10	28	17.9
PL	22	9	31	21.91
KP	52	7	59	51.93
PB	15	28	43	14.72
NP	13	32	45	12.68
CN	11	41	52	10.59
KB	49	12	61	48.88
UT	15	32	47	14.68
AT	16	11	27	15.89
RB	22	34	56	21.66
KK	26	22	48	25.78
UB	38	15	53	37.85
SK	40	21	61	39.79
RE	49	13	62	48.87
BR	20	18	38	19.82
PR	13	26	39	12.74
PJ	10	32	42	9.68
CB	19	32	51	18.68
S. siamkayai	56	18	74	55.82

[1/] χ = [(10xT1)+(20xT2)+(30xT3)] - [(10xB1)+(20xB2)+(30xB3)] / 100

ในขณะที่ผลการทดสอบ Migration in sand column bioassay พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 18 ไอโซเลท เคลื่อนที่ในแนวดิ่งเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อในดินลึก 5 นิ้ว และหนอนเหยื่อล่อตาย 100% ที่เวลา 24 ชม. เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* KP strain

จากผลของการศึกษาศักยภาพโดยวิธี Bio-assay ทั้ง 2 วิธีการ จึงได้ทำการคัดเลือกไส้เดือนฝอยไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงสุดในการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ ได้แก่ ไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. KP, KB และ RE isolate นำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ (หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนกระทู้ดาวเรือง หนอนเจาะสมอฝ้าย) และกลุ่มหนอนด้วง (ด้วงกุหลาบ ด้วงเต่าแตง หนอนด้วงทำลายรากพืช) และเพิ่มไอโซเลท UB ทดสอบร่วมด้วย พบว่าไส้เดือนฝอย KP isolate มีศักยภาพในการฆ่าแมลงกลุ่มหนอนผีเสื้อและหนอนด้วงได้ 90-100 % ภายในเวลา 48 ชม. รองลงมาคือ KB, UB และ RE isolate ตายระหว่าง 38-100 % โดยคำนวณ % การตายของแมลงตามวิธีของ Abbott's formula (1925) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงชนิดต่างๆ ที่ถูกไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KP, KB RE และ UB isolate เข้าทำลาย เป็นเวลา 48 ชม. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ไส้เดือนฝอยและชนิดของแมลง	ใส่ไส้เดือนฝอย			ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย			% การตาย 1/
	แมลงทดสอบ (n)	แมลงตาย (n)	แมลงมีชีวิต (n)	แมลงทดสอบ (n)	แมลงตาย (n)	แมลงมีชีวิต (n)	
ไส้เดือนฝอย KP isolate							
1. หนอนกระทู้ผัก	16	16	0	10	0	10	100
2. หนอนใยผัก	15	15	0	10	0	10	100
3. หนอนเจาะสมอฝ้าย	10	10	0	10	0	10	100
4. หนอนกระทู้ดาวเรือง	10	10	0	10	0	10	100
5. ด้วงกุหลาบ	10	10	0	10	0	10	100
6. ด้วงเต่าแตง	10	9	1	10	0	10	90
7. หนอนด้วงทำลายราก	10	9	1	10	0	10	90
ไส้เดือนฝอย KB isolate							
1. หนอนกระทู้ผัก	10	10	0	10	0	10	100
2. หนอนใยผัก	15	15	0	10	0	10	100
3. หนอนเจาะสมอฝ้าย	8	8	0	8	0	8	100
4. หนอนกระทู้ดาวเรือง	8	7	1	8	0	8	88
5. ด้วงกุหลาบ	12	10	2	10	0	10	80
6. ด้วงเต่าแตง	10	7	3	10	0	10	70
7. หนอนด้วงทำลายราก	7	5	2	7	0	7	71
ไส้เดือนฝอย RE isolate							
1. หนอนกระทู้ผัก	14	14	0	10	0	10	100
2. หนอนใยผัก	14	14	0	10	0	10	100
3. หนอนเจาะสมอฝ้าย	10	10	0	10	0	10	100
4. หนอนกระทู้ดาวเรือง	8	5	3	8	0	8	63
5. ด้วงกุหลาบ	8	4	4	8	0	8	50

ไส้เดือนฝอยและชนิดของแมลง	ใส่ไส้เดือนฝอย			ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย			% การตาย [1/]
	แมลงทดสอบ (n)	แมลงตาย (n)	แมลงมีชีวิต (n)	แมลงทดสอบ (n)	แมลงตาย (n)	แมลงมีชีวิต (n)	
6. ด้วงเต่าแตง	8	3	5	8	0	8	38
7. หนอนด้วงทำลายราก	7	3	4	7	0	7	43
ไส้เดือนฝอย UB isolate							
1. หนอนกระทู้ผัก	12	12	0	10	0	10	100
2. หนอนใยผัก	10	10	0	10	0	10	100
3. หนอนเจาะสมอฝ้าย	7	7	0	7	0	7	100
4. หนอนกระทู้ดาวเรือง	7	7	0	7	0	7	100
5. ด้วงกุหลาบ	10	5	5	10	0	10	50
6. ด้วงเต่าแตง	10	6	4	10	0	10	60
7. หนอนด้วงทำลายราก	8	4	4	8	0	8	50

$$^{1/}\%\ \text{การตาย} = \frac{(\text{แมลงมีชีวิตในกรรมวิธีไม่ใส่ไส้เดือนฝอย} - \text{แมลงมีชีวิตในกรรมวิธีใส่ไส้เดือนฝอย}) \times 100}{\text{แมลงมีชีวิตในกรรมวิธีไม่ใส่ไส้เดือนฝอย}}$$

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

ผลการทดลอง Quadrant plate bio-assay พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. รหัส KP isolate เคลื่อนที่ในทิศทางเข้าหาหนอนเหยื่อล่อกับทิศทางตรงข้าม ที่เวลา 30 นาที มีค่าระยะทางเฉลี่ย (χ) สูงที่สุดเท่ากับ 51.93 รองลงมาคือ KB และ RE isolate เท่ากับ 48.88 และ 48.87 ในขณะที่ *S. siamkayai* KP strain สายพันธุ์เปรียบเทียบ เท่ากับ 55.82 และไส้เดือนฝอยรหัสที่มีค่าเฉลี่ยระยะทางน้อยที่สุด 3 ลำดับคือ ไส้เดือนฝอยรหัส PJ, CN และ NP isolate เท่ากับ 9.68 10.59 และ 12.68 ตามลำดับ และผลการทดสอบ Migration in sand column bioassay พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 18 ไอโซเลท เคลื่อนที่ในแนวดิ่งเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อในดินลึก 5 นิ้ว และหนอนเหยื่อล่อตาย 100% ที่เวลา 24 ชม. เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* KP strain

ไส้เดือนฝอยไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงสุดในการเป็นสารชีวภัณฑ์ ได้แก่ ไส้เดือนฝอย รหัส KP, KB, RE และ UB isolate นำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ (หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนกระทู้ดาวเรือง หนอนเจาะสมอฝ้าย) และกลุ่มหนอนด้วง (ด้วงกุหลาบ ด้วงเต่าแตง หนอนด้วงทำลายรากพืช) พบว่าไส้เดือนฝอย 4 ไอโซเลท มีศักยภาพในการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ และกลุ่มหนอนด้วง มีเปอร์เซ็นต์การตายในแต่ละไอโซเลท เท่ากับ 38-100 % ในเวลา 48 ชม. สามารถนำไปพัฒนา ต่อยอดเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชต่อไป

เอกสารอ้างอิง (References)

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2546. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่าย. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 20 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2547. การพัฒนากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่ายเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 182 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2553. การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในกลุ่มเกษตรอินทรีย์. ในสรุปผลการดำเนินงานโครงการเกษตรอินทรีย์ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 6 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช พรพิมล อธิปัญญาคม และหิรัญ หิรัญประดิษฐ์. 2544. งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandensis* n. sp. : การจำแนกชนิด คัดเลือกสายพันธุ์ และการผลิตขยายปริมาณ. หน้า 1-71. ใน : รายงานผลงานวิจัยกองโรคพืชและจุลชีววิทยา 2544. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช และ หิรัญ หิรัญประดิษฐ์. 2543. การตรวจวิเคราะห์โดยชีววิธีเพื่อการคัดเลือกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 10 (3) : 1-12.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. ใน ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด อัจฉรา ตันติโชดก ดำรง เวชกิจ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การพัฒนาโรงงานต้นแบบและเทคโนโลยีการผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในเชิงพาณิชย์. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 53 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ขวัญชัย เจริญกุล สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. การพัฒนาชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดปลวกในเชิงพาณิชย์. ผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), กรุงเทพฯ. 131 หน้า.

Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. Pages 75-90. *In* : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Bedding, R.A. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27 : 109-114.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science* 614.

Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc. Florida. 365 p.

https//: nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/steinsp1.htm. All described species of the genera *Steinernema, Neosteinernema* and *Heterorhabditis*

Kaya, H.K. 1977. Development of DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperature. *J. Nematol.* 9 : 346-349.

การทดสอบคุณสมบัติการเพิ่มขยายไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในอาหารเทียม

Mass Production of Entomopathogenic Nematode in Artificial Media

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ
Nuchanart Tangchitsomkid and Boonruenrat Ruengwiset

คำสำคัญ (key words) : การเพาะเลี้ยง ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง
Mass Production, entomopathogenic nematodes

บทคัดย่อ (abstract)

การเพาะขยายไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในอาหารเทียม จำนวน 17 ไอโซเลท โดยมีไส้เดือนฝอย *Steinernema siamkayai* (KP strain) เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ด้วยอาหารสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำ ที่อัตราส่วน 4 : 2 : 4 เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ไส้เดือนฝอยไอโซเลท CM, LP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, PR, BR, RJ และ CB ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 จำนวน 7.9 8.2 9.2 11.2 7.6 10.8 12.8 13.2 13.8 15.5 8.2 11.8 17.2 5.8 10.5 9.2 และ 7.7 ล้านตัวต่ออาหาร 20 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์เปรียบเทียบ (KP strain) ได้ผลผลิตเฉลี่ย 16.8 ล้านตัวต่ออาหาร 20 กรัมเท่ากัน ไอโซเลทที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ RE เท่ากับ 17.2 ล้านตัวต่ออาหาร 20 กรัม และสูงกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ ซึ่งไอโซเลท RE เก็บได้จากพื้นที่ จ.ร้อยเอ็ด รองลงคือ KK และ RB เท่ากับ 15.5 และ 13.8 ล้านตัว ต่ออาหาร 20 กรัม แยกได้จาก จ.ขอนแก่น และ จ.ราชบุรี ตามลำดับ

Mass rearing of 17 entomopathogenic nematodes isolates in artificial media, chicken egg mixed with lard and water ratio 4: 2: 4 for 7 days incubation. As a comparison with *Steinernema siamkayai* (KP strain). The results showed that entomopathogenic nematodes isolates CM, LP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, PR, BR, RJ and CB for nematode production, 7.9 8.2 9.2 11.2 7.6 10.8 12.8 13.2 13.8 15.5 8.2 11.8 17.2 5.8 10.5 9.2 and 7.7 million nematodes per 20 g of media, respectively. While the comparison strain (KP strain) yielded an average of 16.8 million per 20 grams of media each. The highest yield isolates were RE, 17.2 million per 20 grams of media and higher than the comparison species, which isolates RE collected from Roi Et Province, followed by KK and RB equal to 15.5 and 13.8 million per media 20 grams separated from Khon Kaen and Ratchaburi, respectively.

บทนำ (Introduction)

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง (Entomopathogenic nematode) ได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเป็นเวลามากกว่า 90 ปี ซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacterioceae สกุล *Xenorhabdus* sp. อยู่ร่วมกันในลักษณะพึ่งพาอาศัยหรือเรียกว่า symbiosis โดยเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) โดยไส้เดือนฝอยเป็นตัวพาแบคทีเรียเข้าสู่ตัวแมลง โดยผ่านทางช่องเปิดตามธรรมชาติของแมลง ได้แก่ ทางปาก ช่องขับถ่าย และรูหายใจทางผิวหนัง (spiracle) จากนั้นเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวแมลง (haemocoel) ซึ่งมีน้ำเลือด (haemolymph) ไส้เดือนฝอยจะปลดปล่อยแบคทีเรียสู่กระแสเลือดแมลง และร่วมกันสร้างสารพิษ ทำให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. เซลล์ของแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณในน้ำเลือดของแมลง และไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโตโดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียในการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบบจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เรียกการผสมพันธุ์แบบนี้ว่า amphimictic ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตอยู่ภายในแมลงที่ตายแล้วประมาณ 2-3 ชั่วอายุ ขึ้นอยู่กับขนาดของแมลง เมื่อแมลงเริ่มแห้งเป็นซาก ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่สาม (third-stage juvenile) จะสะสมอาหารสำรองประเภทไขมันสะสมบริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างผิวหนังกับกล้ามเนื้อช่องท้อง (hypodermal chord) และดูดกลืนเซลล์แบคทีเรียเก็บไว้ในช่องว่าง (lumen) ของลำไส้ส่วนหน้า และเคลื่อนตัวออกจากซากของแมลง เพื่อรอแมลงเหยื่อตัวใหม่ต่อไป (Akhurst and Boemare, 1990)

ความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย (nematode-bacterium complex) ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ ที่จะพัฒนาศัตรูธรรมชาติของแมลงชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะใช้กำจัดแมลงระยะตัวหนอนที่เป็นศัตรูสำคัญในพืช จึงมีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยในกลุ่มนี้ตั้งแต่เริ่มค้นพบครั้งแรก จนถึงปัจจุบันมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมได้สำเร็จตั้งแต่ ค.ศ. 1931 โดย Glaser ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ axenic culture ที่ไม่มีเซลล์ของ symbiotic bacteria ร่วมด้วย ต่อมามีการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเป็นแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย (Bedding, 1981) ซึ่งให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าแบบเดิม นอกจากนี้ ไส้เดือนฝอยยังได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลือดอุ่นและมนุษย์ รวมทั้งปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม (Gaugler and Kaya, 1990) ไส้เดือนฝอยจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางทั่วโลก ที่จะพัฒนาให้นำมาใช้ประโยชน์ โดยมีการค้นหาชนิดและสายพันธุ์ใหม่ในเขตต่างๆ ทั่วโลก ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย เอเชีย และบางประเทศในแอฟริกา เพื่อได้สายพันธุ์พื้นเมืองหลากหลายชนิด รวมทั้งประเทศไทย ได้เริ่มมีการสำรวจเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงจำนวน 9 ไอโซเลท จัดอยู่ใน family Steinernematidae จำนวน 8 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสตามจังหวัดที่พบคือ จังหวัด

กาญจนบุรี (KBs) พิจิตร (PCs) อยุธยา (AYs) กาฬสินธุ์ (KSs) มหาสารคาม (MKs) ขอนแก่น (KKs) หนองคาย (NKs) และสระแก้ว (SKs) และ family Heterorhabditidae จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด (REh) (นุชนารถ และคณะ, 2543) 9 ไอโซเลท ได้นำมาศึกษาศักยภาพในการเป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมแมลง ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี มีศักยภาพในกำจัดแมลงได้หลายชนิดและเพาะเลี้ยงได้ง่ายในอาหารเทียมราคาถูก สามารถนำไปพัฒนาและขยายผลสู่เกษตรกรได้ตั้งแต่ปี 2546-2549 (นุชนารถ, 2546, 2547) และในปี 2550 สายพันธุ์ KBs มีศักยภาพในการกำจัดแมลงลดลง และการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมให้ผลผลิตต่ำลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในปี 2549-2553 จึงได้ทำการสำรวจรวบรวมและศึกษาไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งสามารถแยกได้สกุล *Steinernema* sp. ในพื้นที่จังหวัดกำแพงเพชร (KPs) ร้อยเอ็ด (REs) อุบลราชธานี (UBs) เพชรบูรณ์ (PBs) และสกุล *Heterorhabditis* sp. ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี (PRh) เมื่อทำการเปรียบเทียบศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการฆ่าแมลงพบว่า KPs มีศักยภาพในการกำจัดแมลงได้หลายชนิด REs กำจัดลูกน้ำยุงลาย และ PRh กำจัดเห็บวัว ไส้เดือนฝอย KPs และ Res สามารถผลิตขยายและเพิ่มปริมาณได้ง่ายในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำสะอาด ที่อัตราส่วน 5:2:3 สภาพการเลี้ยงแบบ axenic culture ได้ผลผลิตเฉลี่ย 250-300 ล้านตัวต่อหาร 1 ลิตร (นุชนารถ และ ณัฏฐิมา, 2552) จึงมีการใช้สายพันธุ์ KPs ทดแทน KBs ตั้งแต่ปี 2550 จนถึงปัจจุบันรวม 7 ปี สายพันธุ์ KPs ยังคงศักยภาพในการกำจัดแมลงและยังให้ผลผลิตในอาหารเทียมคงที่และสม่ำเสมอ (นุชนารถ, 2552; นุชนารถ และคณะ, 2552; นุชนารถ, 2553) สำหรับไอโซเลทอื่นๆ นั้น เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมราคาถูกสูตรเดียวกันสภาพการเลี้ยงแบบ axenic culture ให้ผลผลิตต่ำกว่า 250 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร

ในปี 2559 ได้มีการเก็บรวบรวมตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ นครปฐม ชัยนาท กาญจนบุรี อุทัยธานี อยุธยา ราชบุรี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น ร้อยเอ็ด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี รวม 18 จังหวัด จำนวน 878 ตัวอย่าง และทำการแยกไส้เดือนฝอยด้วย Galleria baiting technique ได้ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ใช้กำจัดแมลง จำนวน 17 ไอโซเลท (จังหวัด) จำแนกได้ 1 สกุล (*Steinernema* sp.) โดยวิธี cross mating กับ *S. siamkayai* และทำการเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตามรหัสที่กำหนดเป็นอักษรย่อชื่อจังหวัด ดังนี้ ภาคเหนือ *Steinernema* sp. CM, LP, PB ภาคกลาง *Steinernema* sp. NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *Steinernema* sp. KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก *Steinernema* sp. PR, PJ และภาคตะวันออก *Steinernema* sp. CB (นุชนารถ และ มัลลิกา, 2560) ไอโซเลทที่แยกได้นี้ จึงควรนำมาทดสอบเพาะขยายในอาหารเทียม สภาพการเลี้ยงแบบ axenic culture เพื่อได้ไอโซเลทที่มีศักยภาพในการเพิ่มปริมาณได้ไม่ต่ำกว่า 250 ล้านตัวต่อครั้งการผลิต เพื่อคัดเลือกนำไปใช้กำจัดแมลงในสภาพไร่ต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. จำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ CM, LP, KP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, BR, PR, PJ, และ CB

2. ไส้เดือนฝอย *Steinernema siamkayai* (KP strain) เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

3. อาหารเทียมเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย สูตรไข่ ได้แก่ ไขไก่ น้ำมันหมู ฟองน้ำ

4. อาหารและวัสดุเลี้ยงหนอนกินไขผึ้ง (*Galleria mellonella*)

5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง ชุดผลิตไส้เดือนฝอยพร้อมใช้ และภาชนะบรรจุอาหารเพาะเลี้ยง

6. สารเคมีและวัสดุเพาะเลี้ยง ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70% สารฆ่าเชื้อ Hyamine 0.1% และฟองน้ำแผ่น

วิธีการ

นำไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท (17 ไอโซเลท) และไส้เดือนฝอย *Steinernema siamkayai* KP strain (control) ทดสอบเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำ อัตราส่วน 4:2:4 นำไปคลุกกับฟองน้ำตัดขนาด 1x1 ซม. น้ำหนัก 40 กรัมต่ออาหาร 650 กรัม ได้เป็นก้อนอาหาร บรรจุในภาชนะพลาสติกทรงกระบอกมีฝาปิดขนาดความจุ 650 มล. น้ำหนักก้อนอาหาร 20 กรัมต่อภาชนะ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 90-100°ซ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นปล่อยให้อาหารเย็น จึงทำการใส่หัวเชื้อไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท จำนวน 50,000 ตัวต่อภาชนะ ตั้งวางบ่มเพาะในถุงตาข่ายกันแมลงเป็นเวลา 7 วัน ตามวิธีการของนุชนารถ (2558) ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 จากนั้นนำมาแยกล้างผลผลิตไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท โดยใส่น้ำ 500 มล. ลงในแต่ละภาชนะเพาะ ใช้มือบีบก้อนฟองน้ำให้ไส้เดือนฝอยหลุดออกมาอยู่ในน้ำ เอาก้อนฟองน้ำทิ้งไป ใช้ไมโครไปเปตดูด 1 มล. ใส่ลงในน้ำสะอาด 200 มล. ได้เป็นสารละลายไส้เดือนฝอย กวนให้ตัวไส้เดือนฝอยกระจายในน้ำ และใช้ไมโครไปเปตดูด 1 มล. ใส่จานตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ละไอโซเลทนับ 10 ภาชนะ คำนวณเป็นค่าเฉลี่ยผลผลิตไส้เดือนฝอยของแต่ละไอโซเลท คูณปริมาตรน้ำ 200 มล. ค่าเฉลี่ยที่นับได้เท่ากับจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยต่อ 1 มล. นำไปคูณปริมาตรน้ำตั้งต้น 500 มล. เท่ากับผลผลิตไส้เดือนฝอยต่อภาชนะ

การบันทึกข้อมูล จำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 ในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับ *Steinernema siamkayai* KP strain

เวลาสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการเพาะขยายไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง 17 ไอโซเลท ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมู และน้ำ เปรียบเทียบกับ *Steinernema siamkayai* (KP strain) พบว่า ไส้เดือนฝอย 17 ไอโซเลท ได้แก่ CM, PL, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, PR, BR, RJ และ CB สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเทียมสูตรไข่ ที่มีขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยากและมีต้นทุนต่ำ ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ axenic culture โดยไอโซเลทที่มีศักยภาพในการขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนในอาหารเทียมสูตรไข่ไก่เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 1) ได้ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 มากที่สุดคือ RE เท่ากับ 17.2 ล้านตัวต่อน้ำหนักก้อนอาหาร 20 กรัม และสูงกว่า KPs (ไอโซเลทที่ใช้เปรียบเทียบ ได้ผลผลิต 16.8 ล้านตัวต่อภาชนะเพาะ) ซึ่งไอโซเลท RE เก็บได้จากพื้นที่ จ.ร้อยเอ็ด รองลงคือ KK และ RB เท่ากับ 15.5 และ 13.8 ล้านตัวต่อน้ำหนักก้อนอาหาร 20 กรัม แยกได้จาก จ.ขอนแก่น และ จ.ราชบุรี ตามลำดับ สำหรับไอโซเลท CM, LP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, UB, SK, BR, PR, PJ, และ CB ได้ผลผลิต เท่ากับ 7.9 8.2 9.2 11.2 7.6 10.8 12.8 13.2 8.2 11.8 5.8 10.5 9.2 และ 7.7 ล้านตัวต่อภาชนะเพาะ ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำ บ่มเพาะเป็นเวลา 7 วัน สามารถเพิ่มปริมาณเต็มก้อนอาหาร พร้อมนำไปใช้พ่นกำจัดแมลงศัตรูพืช

ตารางที่ 1 ผลผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง 17 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับ *Steinernema siamkayai* (KP strain) เพาะขยายในอาหารเทียมสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำ เป็นเวลา 7 วัน

ลำดับที่	ไส้เดือนฝอยไอโซเลทต่างๆ	จำนวนไส้เดือนฝอย (ล้านตัว) ต่ออาหาร 20 กรัม
1	CM แยกได้จาก จ.เชียงใหม่	7.9
2	LP แยกได้จาก จ.ลำปาง	8.2
3	PB แยกได้จาก จ.เพชรบูรณ์	9.2
4	NP แยกได้จาก จ.นครปฐม	11.2
5	CN แยกได้จาก จ.ชัยนาท	7.6
6	KB แยกได้จาก จ.กาญจนบุรี	10.8
7	UT แยกได้จาก จ.อุทัยธานี	12.8
8	AT แยกได้จาก จ.พระนครศรีอยุธยา	13.2
9	RB แยกได้จาก จ.ราชบุรี	13.8
10	KK แยกได้จาก จ.ขอนแก่น	15.5
11	UB แยกได้จาก จ.อุบลราชธานี	8.2
12	SK แยกได้จาก จ.ศรีสะเกษ	11.8
13	RE แยกได้จาก จ.ร้อยเอ็ด	17.2
14	PR แยกได้จาก จ.เพชรบุรี	5.8
15	BR แยกได้จาก จ.บุรีรัมย์	10.5
16	PJ แยกได้จาก จ.ประจวบคีรีขันธ์	9.2
17	CB แยกได้จาก จ.จันทบุรี	7.7
18	*Steinernema siamkayai* (KP strain) (Control)	16.8

จากผลการทดสอบเพาะขยายไส้เดือนฝอยรวม 17 ไอโซเลท ในอาหารเทียมสูตรไข่ ตามกระบวนการของ นุชนารถ (2558) สามารถคัดเลือกได้ 3 ไอโซเลท คือ RE, KK และ RB มาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชผัก ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนคืบ หนอนเจาะสมอฝ้าย และด้วงหมัดผัก โดยใช้ในอัตรา 4-5 ภาชนะเพาะเลี้ยง หรือมีไส้เดือนฝอยระหว่าง 60-80 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร ซึ่งไส้เดือนฝอย KP strain เป็นสายพันธุ์ไทยที่มีการนำไปใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชในหลายพื้นที่ สามารถผลิตได้ในอาหารเทียมสูตรไข่ไก่ผสมน้ำหมูและน้ำ ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 300 ล้านตัวต่อรอบการผลิต 20 ภาชนะเพาะเลี้ยง นำไปใช้พ่นกำจัด

แมลงในแปลงผักได้ครอบคลุมพื้นที่ 1 ไร่ต่อครั้ง มีต้นทุนการผลิตเพียง 100 บาทต่อรอบการผลิต ช่วยลดต้นทุนการซื้อสารป้องกันกำจัดแมลงหรือสารชีวภัณฑ์อื่นๆ ได้มากกว่า 5 เท่า ไส้เดือนฝอย RE, KK และ RB ไอโซเลท จะเป็นสายพันธุ์ไทยที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นหัวเชื้อให้กับเกษตรกร นำไปเพาะขยายไส้เดือนฝอยใช้เองได้ด้วยเทคโนโลยีการผลิตแบบง่าย นำไปสู่การทำเกษตรปลอดภัย-เกษตรอินทรีย์ และไส้เดือนฝอยเป็นสารชีวภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยต่อเกษตรกรผู้ใช้ ผู้บริโภค รวมถึงปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อมอีกด้วย

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การเพาะขยายไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในอาหารเทียมสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำ ที่อัตราส่วน 4:2:4 เป็นเวลา 7 วัน จำนวน 17 ไอโซเลท โดยมีไส้เดือนฝอย *Steinernema siamkayai* (KP strain) เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ผลการทดลองพบว่า ไส้เดือนฝอยไอโซเลท CM, LP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, PR, BR, RJ และ CB ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 จำนวน 7.9 8.2 9.2 11.2 7.6 10.8 12.8 13.2 13.8 15.5 8.2 11.8 17.2 5.8 10.5 9.2 และ 7.7 ล้านตัวต่ออาหาร 20 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์เปรียบเทียบ (KP strain) ได้ผลผลิตเฉลี่ย 16.8 ล้านตัวต่ออาหาร 20 กรัมเท่ากัน

การใช้ประโยชน์จากผลงานวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อไส้เดือนฝอยสำหรับจำหน่าย/จ่ายแจกให้กับเกษตรกร หน่วยงาน และผู้สนใจ เพื่อผลิตและใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยการเพาะขยายไส้เดือนฝอยใช้เอง เป็นอีกหนึ่งเทคโนโลยีเพื่อการพึ่งพาตนเองอย่างยั่งยืน สำหรับเกษตรกรรายย่อยหรือกลุ่มเกษตรกรผลิตพืชผักอินทรีย์ ผักอนามัย ผักปลอดสารพิษ และกลุ่มเกษตรกรที่ประสบปัญหาแมลงดื้อยา ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย จึงเป็นชีวินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้เอง และมีศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด นำมาใช้ทดแทนหรือลดจำนวนครั้งของการใช้สารเคมี ได้ผลิตผลเกษตรที่ปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

เอกสารอ้างอิง (References)

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2543. ไส้เดือนฝอยที่มีประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช, น. 223-246. *ใน* พัฒนาการเกษตรไทยยุคเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2546. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่าย. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 20 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2547. การพัฒนากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่ายเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 182 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2553. การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในกลุ่มเกษตรอินทรีย์. ใน สรุปผลการดำเนินงานโครงการเกษตรอินทรีย์ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 6 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2558. การผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืชแบบทำใช้เอง กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 32 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. ใน ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ มัลลิกา แก้ววิเศษ. 2560. การเก็บรวบรวม อนุรักษ์และจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ปี 2560 กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 10 หน้า.

Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. Pages 75-90. *In* : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Bedding, R.A. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27 : 109-114.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science* 614.

Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc. Florida. 365 p.

การเก็บรวบรวม จำแนก และคัดเลือกแบคทีเรียบีทีควบคุมแมลงศัตรูพืชเพื่ออนุรักษ์และใช้ประโยชน์

Culture Collection and Identification of *Bacillus thuringiensis* for Utilization

บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ ภรณี สว่างศรี และ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

Boonruenrat Ruengwiset, Paranee Sawangsri and Nuchanart Tangchitsomkid

คำสำคัญ (key words) : การเก็บรวบรวม จำแนกชนิด แบคทีเรียบีที

culture collection, identification, Bt, *Bacillus thuringiensis*

บทคัดย่อ (abstract)

ในการอนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ได้ทำการเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดของบีที *(B.thuringiensis)* จากดินในภูมิภาคต่างๆทั่วประเทศ พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 57 ไอโซเลท จากการนำเชื้อ *B.thuringiensis* ตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าแบนที่ได้ส่วนใหญ่จะผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน จากการศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย ในระยะที่ 2 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^8 มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 คือ 72 ชั่วโมง และชุดควบคุมไม่มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย โดยลักษณะของตัวหนอนที่ตาย จะมีสีลำตัวเป็นสีดำ ลำตัวของตัวหนอนจะงอแข็ง วางตัวตะแครงข้างและไม่เคลื่อนไหวอีกต่อไป การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (Cotton bollworm) ในห้องปฏิบัติการโดยสุ่มทดสอบกับ *B. thuringiensis* 20 ไอโซเลท จากการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 40 % ที่อุณหภูมิ 4 ℃ ,-30 ℃, -80 ℃ เป็นระยะเวลา 3, 6 และ 12 เดือน พบว่า *B. thuringiensis* ทั้ง 20 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้

บทนำ (Introduction)

แบคทีเรีย *B. thuringiensis* ควบคุมแมลง ได้มีการค้นพบแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เป็นครั้งแรกราวศตวรรษที่ 20 โดย Ishiwata นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น โดยแยกเชื้อนี้ได้จากหนอนไหม (Bombyx mori) ที่เป็นโรค และตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า Bacillus sotto ต่อมาพบแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จาก mediteranean flour moth (*Anagesta kueniellia*) ได้มีการตั้งชื่อแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Bacillus thuringiensis* ตามชื่อเมือง Thuringen แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จัดจำแนกอยู่ใน Family Bacillaceae และ genus *Bacillus* เป็นกลุ่มของแบคทีเรียพวกที่สร้างสปอร์ได้ ติดสีแกรมบวก ต้องการออกซิเจน ให้ผลของปฏิกิริยา catalase เป็นผลบวก และให้ผลของปฏิกิริยา oxidase เป็นผลลบ ลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) กว้าง 1.0-1.2 ไมโครเมตร ยาว 3.0-5.0 ไมโครเมตร โคโลนีค่อนข้างใหญ่ (5.0-10.0 มิลลิเมตร) ลักษณะกลมบางชนิดรูปร่างไม่แน่นอน ในระยะการออกสปอร์ *B. thuringiensis* หลายๆ สายพันธุ์จะผลิตโปรตีนผลึก (proteinaceous inclusions) พร้อมกับโปรตีนคริสตัล (Crystal, Cry toxin) ซึ่งเป็น ประเภท δ-endotoxins โปรตีนนี้เองที่มีฤทธิ์เป็นสารกำจัดแมลง บีทีท็อกซินหรือครายท็อกซิน (Bt toxin หรือ Cry toxin) เป็นสารฆ่าแมลงที่ไม่มีอันตรายต่อมนุษย์ เนื่องจากว่าบีทีจะทำงานในระบบกระเพาะซึ่งเป็นเบส ซึ่งกระเพาะแบบนี้ไม่พบในกลุ่มสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเช่นมนุษย์ ดังนั้น จึงไม่มีอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงทั่วไปและมนุษย์ ในปัจจุบัน มีบีทีท็อกซินอยู่ทั้งหมด 57 ชนิด แต่ละชนิดมีผลต่อแมลงแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น Cry1Aa และ Cry2A มีผลต่อผีเสื้อและผีเสื้อกลางคืน ส่วน Cry5 มีผลต่อแมลงประเภทยุง บีทีจะทำงานก็ต่อเมื่อได้รับการบริโภคเข้าไปในแมลง ดังนั้น จึงมีผลเฉพาะแมลงบางกลุ่ม ทำให้แมลงที่ไม่ใช่ศัตรูพืชไม่ได้ถูกกำจัดไปด้วย จึงเป็นผลดีต่อระบบนิเวศน์ แต่พบว่าผลึกโปรตีนที่เป็นพิษส่วนใหญ่พบในหนอนผีเสื้อ (Lepidoptera) รองลงมาได้แก่ หนอนแมลงวันหรือยุง (Diptera) และด้วง (Coleoptera) (Vidyarthi *et al*., 2002; Martin *et al*., 2010)

ปัจจุบันมีการแยก B. thuringiensis (บีที) ออกมากกว่า 50,000 สายพันธุ์จากแหล่งต่าง ๆ (Sadder *et al*., 2006) มีรายงานว่าสามารถพบ *B. thuringiensis* ได้ตามแหล่งต่าง ๆ เช่น ดิน ฝุ่นของพืชผลต่าง ๆ ที่เก็บในยุ้งฉาง ซากของแมลง เมล็ดธัญพืช ดินในพื้นที่เกษตร ใต้พุ่มไม้ เป็นต้น *B. thuringiensis* ถูกเริ่มใช้ในรูปแบบของยาฆ่าแมลงในปี 1956 ในชื่อของ Thuricide ในปี 1991 พืชชนิดแรกที่ได้รับการตัดต่อทางพันธุกรรมให้สามารถผลิต *B. thuringiensis* ได้ออกมาจำหน่าย นั่นคือฝ้ายที่ผลิตสารพิษของ *B. thuringiensis* ในขณะนี้ มีพืชที่สามารถผลิตสารพิษนี้ปลูกอยู่เกือบ 200 ล้านเอเคอร์ทั่วโลก ทั้งนี้ รวมถึงข้าวโพดบีที ผ้าฝ้ายบีที ยาสูบบีที ข้าว และมะเขือเทศ

เชื้อบีทีเป็นเชื้อที่มีความปลอดภัยสูงและไม่เป็นสาเหตุที่ก่ออันตรายต่อมนุษย์ ปลา สัตว์ป่า หรือแมลงที่มีประโยชน์ ซึ่งช่วยในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ โดยเข้าทำลายแมลงเมื่อหนอนกินสปอร์และผลึกโปรตีนของเชื้อเข้าสู่กระเพาะอาหาร น้ำย่อยในกระเพาะอาหารของแมลงที่มีความ

เป็นกรด-ด่าง เหมาะสมกับเชื้อบีที จะย่อยผลึกโปรตีน และบีทีจะปล่อยสารพิษออกมาทำลายผนังกระเพาะอาหารของหนอนศัตรูพืช บีทีผ่านเข้าสู่ช่องว่างลำตัวแมลง ซึ่งมีกระแสเลือดไหลเวียนอยู่ ไปเจริญและเพิ่มปริมาณในเลือด เซลล์ และเนื้อเยื่อของแมลง แมลงจะเป็นอัมพาตและตายเนื่องจากโลหิตเป็นพิษ แมลงที่ได้รับเชื้อบีทีจะไม่อยากกินอาหารหรือหยุดกินอาหาร เชื่องช้า ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า ลำตัวเป็นสีน้ำตาลดำ และตายในที่สุด

ในการจำแนกบีทีนิยมใช้เทคนิคการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16SrDNA genes ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีฐานข้อมูลอ้างอิงจำนวนมากใน GenBank (Ben-Dov et al., 1997) นำมาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรมบลาสต์ ก็จะสามารถทราบชนิดของบีทีได้อย่างง่ายดาย (Altschul *et al.,* 1990 อ้างอิงโดย Shishir *et al.,* 2012) จุลินทรีย์เหล่านี้ นักวิจัยทั่วโลกได้ศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะการพยายามการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ใหม่ๆ จากแหล่งต่างๆ ขึ้นมาใช้ประโยชน์ทั้งในเชิงอนุรักษ์ และพัฒนาต่อยอดให้สามารถนำไปใช้ได้จริง

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

อุปกรณ์

1. NA agar
2. LB broth
3. หลอดทดลอง (tube)
4. ตู้บ่มเชื้อ
5. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)
6. spectrophotometer
7. microwave
8. pipette
9. water bart
10. plate
11. หม้อนึ่งความดันไอ (autocave)
12. Vortex
13. เครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell)
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
15. กระดาษเซลโลเฟน
16. ขวดใส่อาหาร (Duran)
17. เครื่องชั่งสาร

วิธีการ

1. การเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิด *Bacillus thuringiensis*

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินในแหล่งต่าง ๆ ตามธรรมชาติ และทำการเก็บตัวอย่างดิน ด้วยวิธีของ Attathom *et al.* (1996) โดยเก็บดินที่ความลึก 3-5 เซนติเมตรจากผิวหน้าดิน และบรรจุในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกวันและสถานที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดินมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ในดิน โดยนำตัวอย่างดินจำนวน 1 กรัม ผสมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ภายในหลอดทดลองที่ผ่าน

การฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex นาน 5 นาที เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายตัวและแยกชั้นออกจากดิน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้ดินตกตะกอน แล้วเทน้ำใสที่อยู่ส่วนบนใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีนำสารละลายดินมาเจือจางลง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 9:1 โดยใช้น้ำกลั่นจำนวน 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายดินจำนวน 0.2 มิลลิลิตรจากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นจนได้สารละลายดินที่ความเข้มข้น 10-3, 10-4 และ 10-5 ตามลำดับ สำหรับทำการ Spread plate เพื่อแยกเชื้อต่อไป จากนั้นนำสาร ละลายดินที่ระดับความเข้มข้น 10-3, 10-4 และ 10-5 มาทำการ Spread plate โดยหยดสารละลายดินจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร NA ที่เตรียมไว้เกลี่ยด้วยแท่งแก้ว และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเลือกเก็บกลุ่มเชื้อ (Colony) ที่มีลักษณะขาวขุ่น ขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของโคโลนีเชื้อ *Bacillus thuringiensis* บันทึกผลจำนวนเชื้อ *Bacillus thuringiensis* isolate ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างดินที่เก็บมา (อิศเรส, 2548) ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ Bt isolate โดยนำเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่แยกออกจากตัวอย่างดินมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธี streak plate จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาย้อมแกรมเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า ถ้าเป็นเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผลึกโปรตีน และสปอร์อยู่ภายในเซลล์ และจะติดสีของ Crystal Violet ทำการบันทึกลักษณะรูปร่างของเชื้อแต่ละ isolate จากนั้นเก็บเชื้อโคโลนีเดี่ยวอีกส่วนหนึ่งไปเลี้ยงต่อด้วยอาหารเหลว (Nutrient broth) สำหรับใช้เป็น Stock culture ซึ่งจะเก็บไว้ในกลีเซอโรลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่มีฝาปิด และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การจำแนกชนิดแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ ดูดตัวอย่างแบคทีเรียที่เลี้ยงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร มา 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที หลังจากเติม 1XTE buffer 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสที่เป็นของเหลวทิ้งเอาแต่ตะกอน (ทำซ้ำ 2 รอบ) หลังจากนั้นทำการละลายตะกอนด้วย 1XTE buffer 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 10%SDS 40 ไมโครลิตร และProteinase K (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 8 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (เขย่าทุก ๆ 15 นาที) หลังจากนำไปอุ่นเสร็จแล้วให้เติม 2X CTAB (นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้) 100 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (เขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมสาร Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) จำนวน 500 ไมโครลิตร คว่ำหลอดกลับไปกลับมาเพื่อให้สารละลายเข้ากันประมาณ 10นาที ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ นำหลอดไปวางบนน้ำแข็งที่เตรียมไว้ และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol 120 ไมโครลิตร กับ NaOAC 3M 10 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ

ประมาณ 10 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที ทำการเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีละลายตะกอนดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ด้วย TE buffer (ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8 และ 1 mM EDTA pH 8) จำนวน 20 ไมโครลิตร และ RNase จำนวน 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 20 นาทีเพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ ทำการตรวจเช็คผลด้วยวิธี Gel Electro phoresis เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทำพีซีอาร์ (Thermal cycler) โดยมีการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR ด้วย Taq Master mix 10 ไมโครลิตร น้ำ 7 ไมโครลิตร และไพเมอร์ 1 ไมโครลิตร รวมเป็น 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิริยา PCR ดังนี้ 3 step cycling (number of : 35 cycles)

- Denaturation เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส
- Annealing เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส
- Extension เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส
- Final extension เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

หลังสิ้นสุดปฏิริยา นำ PCR product มาแยกด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบแบนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber)

การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (Purification) ด้วยชุด Nucleospin Gel and PCR Clean-up (บริษัท MACHERE-NAGEL) นำตัวอย่างใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม NT1 (Binding Buffer) จำนวน 120 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน (กลับหลอดกลับไปกลับมา) หลังจากนั้นดูดใส่คอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ทำการเทของเหลวส่วนล่างทิ้ง แล้วเติม NT3 (Wash buffer) 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ต่อจากนั้นเทของเหลวส่วนล่างทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที นำคอลัมน์ไปปะกบกับหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ แล้วเติม NE (Elution buffer 5 mM Tris/HCl, PH 8.5) จำนวน 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที (ทำซ้ำ 2 รอบ) นำส่วนที่เป็นคอลัมน์ส่วนบนทิ้ง แล้วเก็บส่วนข้างล่างที่เป็นหลอดพลาสติก 1.5 มิลลิลิตร ไว้ จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequence) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูลที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม BlastN

การสกัดโปรตีนและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยเตรียมเชื้อ BT ที่คัดเลือกได้ ลงในอาหาร NA ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ทำการสกัดโปรตีนและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS PAGE นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เขี่ยเชื้อใสในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมด้วย 4 Loading buffer 20 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นตรวจเช็คผลด้วยเทคนิค SDS PAGE ด้วยชุด NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (NOVEX® by life technologise™)และใช้ protein molecular weight marker เป็น standard markerที่ 1 ชั่วโมง 110 แอมป์ 200 โวล์ต นำไปวิเคราะห์ขนาดของโปรตีน โดยเติม Simply Blue เขย่าทิ้งไว้ 30 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น NuPAGE

การตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE

การเตรียมเชื้อออลงเชื้อ *B.vthuringiensis* ที่คัดเลือกไว้ เลี้ยงลงในอาหาร LB agar ด้วยเทคนิค streak plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การสกัดโปรตีนและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

1. นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหาร LB broth 5 ml.

2.วัดค่า OD_{600} ค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer

3.เก็บเชื้อที่เลี้ยงได้ปริมาณ 2 ml.ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ เวลา 5 นาที และทิ้งส่วนใส

4.ล้างตะกอนด้วย 0.85 % NaCl 400 µl. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ เวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง และทิ้งส่วนใส

5.ละลายด้วย 50 Mm NaOH 100 µl. และบ่มทันทีที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

6.ดูด 6x loading dye 20 µl. เติมลงในหลอด 100 µl. ของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที

7.นำสารละลายที่ได้ load SDS-PAGE 30 µl. ด้วยเครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell) และใช้ Protein marker 5 µl. เป็น standard marker

การตรวจสอบขนาดโปรตีน SDS-PAGE

สารละลายที่ได้ load SDS-PAGE 30 µl. ด้วยเครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell) โดยใช้ 1X NUPAGE buffer โดยตั้งค่าเครื่องที่ 150 โวล์ต 100 แอมป์ เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ขนาดโปรตีนโดยการนำแผ่นเจลที่ได้ย้อมสี ด้วย Simply Bule Safe Stain ให้ท่วมแผ่นเจล เขย่าทิ้งไว้ 60 นาที และล้างสีออกด้วย Destainning buffer เก็บแผ่นเจลที่ได้ด้วยการตรึงด้วยกระดาษเซลโลเฟน

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Cotton bollworm*) ในห้องปฏิบัติการ

1. การเตรียมเชื้อ *B. thuringiensis*

เตรียมเชื้อ *B. thuringiensis* ทุกไอโซเลท โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง NA แล้วถ่ายเชื้อ 1 ไอโซเลท ลงในอาหารเหลว NB 10 ml. เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^8-10^9 cfu/ml วัดปริมาณของเซลล์เริ่มต้นของเชื้อที่เตรียมได้ โดยนำมาทำ Serial dilution และ Spread plate บนอาหาร NA จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนี และนำมาคำนวณหาปริมาณของเซลล์เริ่มต้น ดังสมการ

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย(Cfu/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจานอาหาร} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลง Petri dish}}$$

2. เตรียมอาหารทดสอบ

ตัดอาหารเทียมให้มีขนาด 0.5 x 0.5 x 0.5 ลูกบาศก์นิ้ว หยดสารละลายเชื้อ *B. thuringiensis* 1 ml ลงบนอาหารเทียม และนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

3. ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย

การทดสอบทำโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) แต่ละการทดลองทำจำนวน 6 ซ้ำ ใช้หนอนเจาะสมอฝ้ายระยะที่ 2 จำนวน 30 ตัว จากนั้นนำอาหารที่เตรียมไว้มาใส่ในถ้วยซึ่งแต่ละถ้วยจะประกอบ ด้วยอาหาร 1 ชิ้น กับหนอน 5 ตัว หลังจากนั้นทำการสังเกต และนับจำนวนหนอนที่ตายที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณหาการตายของหนอนอย่างแท้จริง

ดังสมการที่ 1 วิธีการของ Abbott's formula (1925)

$$p=c+(1-c)p'$$

เมื่อ c คือ อัตราการตายของหนอนใน control

p'คือ อัตราการตายที่ได้จากการทดลอง

p คือ อัตราการตายอย่างแท้จริง

4. การสกัดโปรตีนและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

- การเตรียมเชื้อ

ลงเชื้อ *B.thuringiensis* ที่คัดเลือกไว้ เลี้ยงลงในอาหาร NA agar ด้วยเทคนิค streak plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- การสกัดโปรตีนและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหาร NA broth 5 ml. วัดค่า OD_{600} ค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer เก็บเชื้อที่เลี้ยงได้

ปริมาณ 2 ml.ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ เวลา 5 นาที และทิ้งส่วนใส ล้างตะกอนด้วย 0.85 % NaCl 400 µl. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ เวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง และทิ้งส่วนใส ละลายด้วย 50 Mm NaOH 100 µl. และบ่มทันทีที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ดูด 6x loading dye 20 µl. เติมลงในหลอด 100 µl. ของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายที่ได้ load SDS-PAGE 30 µl. ด้วยเครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell) และใช้ Protein marker 5 µl. เป็น standard marker

- การตรวจสอบขนาดโปรตีน SDS-PAGE

สารละลายที่ได้ load SDS-PAGE 30 µl. ด้วยเครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell) โดยใช้ 1X NUPAGE buffer โดยตั้งค่าเครื่องที่ 150 โวล์ต 100 แอมป์ เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ขนาดโปรตีนโดยการนำแผ่นเจลที่ได้ย้อมสี ด้วย Simply Bule Safe Stain ให้ท่วมแผ่นเจล เขย่าทิ้งไว้ 60 นาที และล้างสีออกด้วย Destainning buffer เก็บแผ่นเจลที่ได้ด้วยการตรึงด้วยกระดาษเซลโลเฟน

3.เทคนิคการเก็บรักษาบีทีเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์

การเก็บรักษาแบคทีเรียบีที ให้คงความมีชีวิตและศักยภาพในการเป็นสารชีวภัณฑ์ โดยเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ได้ 3 แบบ คือ เก็บในอุณหภูมิเยือกแข็ง -80 องศาเซลเซียส เก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ปี โดยนำมาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี bioassay ทุกๆ 3 เดือน

ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายการทดสอบทำโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) แต่ละการทดลองทำจำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำจะใช้หนอนเจาะสมอฝ้ายระยะที่ 2 จำนวน 10 ตัว ตัดอาหารเทียมให้มีขนาด 0.5 x 0.5 x 0.5 ลูกบาศก์นิ้ว หยดสารละลายเชื้อ *B.thuringiensis* 1 ml. ลงบนอาหารเทียม หลังจากนั้นทำการสังเกต และนับจำนวนหนอนที่ตายที่เวลาต่าง ๆ แล้วนำมาคำนวณหาอัตราการตายของหนอน ตามวิธีการของ Dulmage *et al.* (1981)

อัตราการตายของหนอน (%)

$$\text{อัตราการตายของหนอนเจาะสมอฝ้าย} = (\%)\ \frac{\text{จำนวนของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่ตาย} \times 100}{\text{จำนวนหนอนเจาะสมอฝ้ายที่ทดลอง}}$$

<u>เวลาสถานที่</u>

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

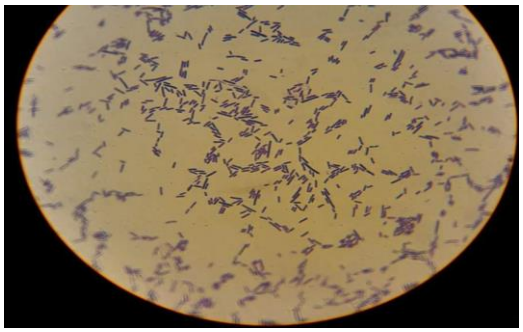
<u>สถานที่ดำเนินการ</u>

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิด *Bacillus thuringiensis*

จากผลการคัดแยกเชื้อเบื้องต้น ด้วยวิธี Spread plate โดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จากตัวอย่างดินทั้งหมด 117 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยการย้อมแกรม ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า เลือกโคโลนีที่ติดสีแกมบวกคือ Crystal Violet โดยมีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผลึกโปรตีน และสปอร์อยู่ภายในเซลล์



ภาพที่ 1 ลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า

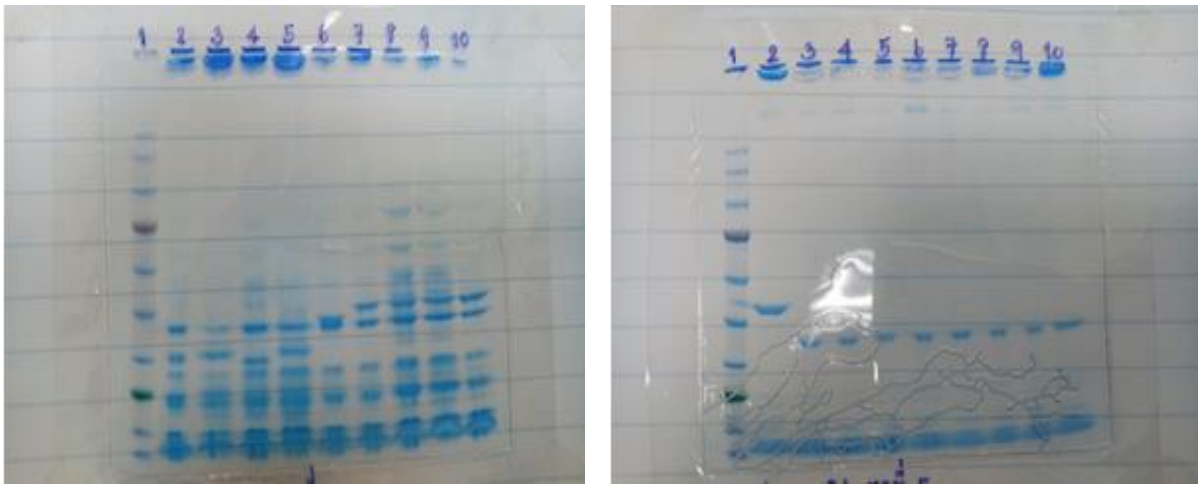
ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการทดสอบเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพเมอร์ btF-R และตรวจสอบผลด้วยการรันเจลด้วยเครื่อง Electro phoresis โดยใช้ความเข้มข้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ 180 โวลต์ 60 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบแบนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber) พบว่าได้ผลของพีซีอาร์ขนาดแถบแบนเท่ากับ 1500 pb เมื่อส่งผลพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม NCBI พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 31 ไอโซเลท

จากผลการคัดแยกเชื้อเบื้องต้น ด้วยวิธี Spread plate โดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จากตัวอย่างดิน สามารถแยกได้ทั้งหมด 113 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยการย้อมแกรมแล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า โคโลนีติดสีแกมบวกคือ Crystal Violet มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผลึกโปรตีน และสปอร์อยู่ภายในเซลล์

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการทดสอบเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพเมอร์ btF-R และตรวจสอบผล

ด้วยการรันเจลด้วยเครื่อง Electro phoresis โดยใช้ความเข้มข้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ 180 โวลต์ 60 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบแบนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber) พบว่าได้ผลของพีซีอาร์ขนาดแถบแบนเท่ากับ 1500 pb เมื่อส่งผลพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม NCBI พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 25 ไอโซเลท

ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE จากการนำ BT มาศึกษาการสร้างโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel ของบริษัท NOVEX® by life technologise™ และใช้ protein molecular weight marker เป็น standard marker ซึ่งประกอบไปด้วยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 11, 17, 25, 35, 48, 63, 75, 100,135 และ 180 กิโลดาลตัน พบว่า BT ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน

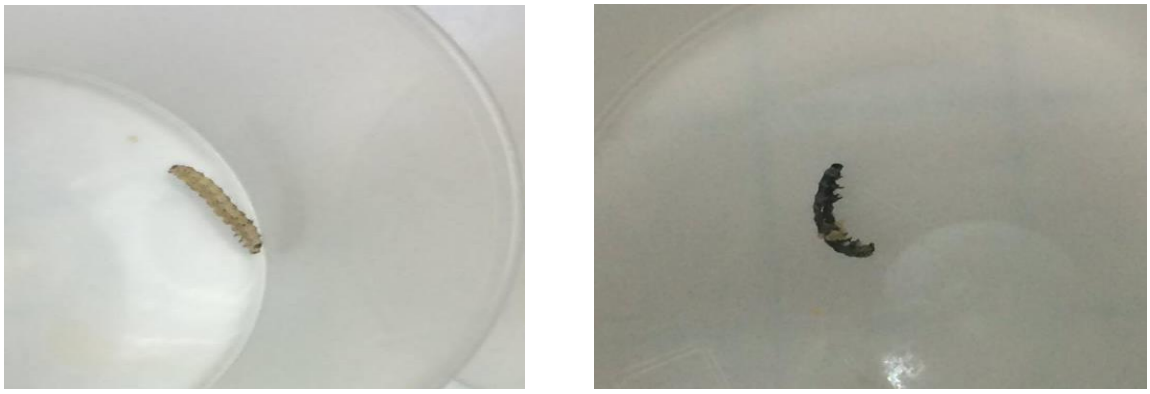


ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการทดสอบเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพเมอร์ btF-R และตรวจสอบผลด้วยการรันเจลด้วยเครื่อง Electro phoresis โดยใช้ความเข้มข้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ 180 โวลต์ 60 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบแบนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber) พบว่าได้ผลของพีซีอาร์ขนาดแถบแบนเท่ากับ 1500 pb เมื่อส่งผลพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม NCBI พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 58 ไอโซเลท

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย

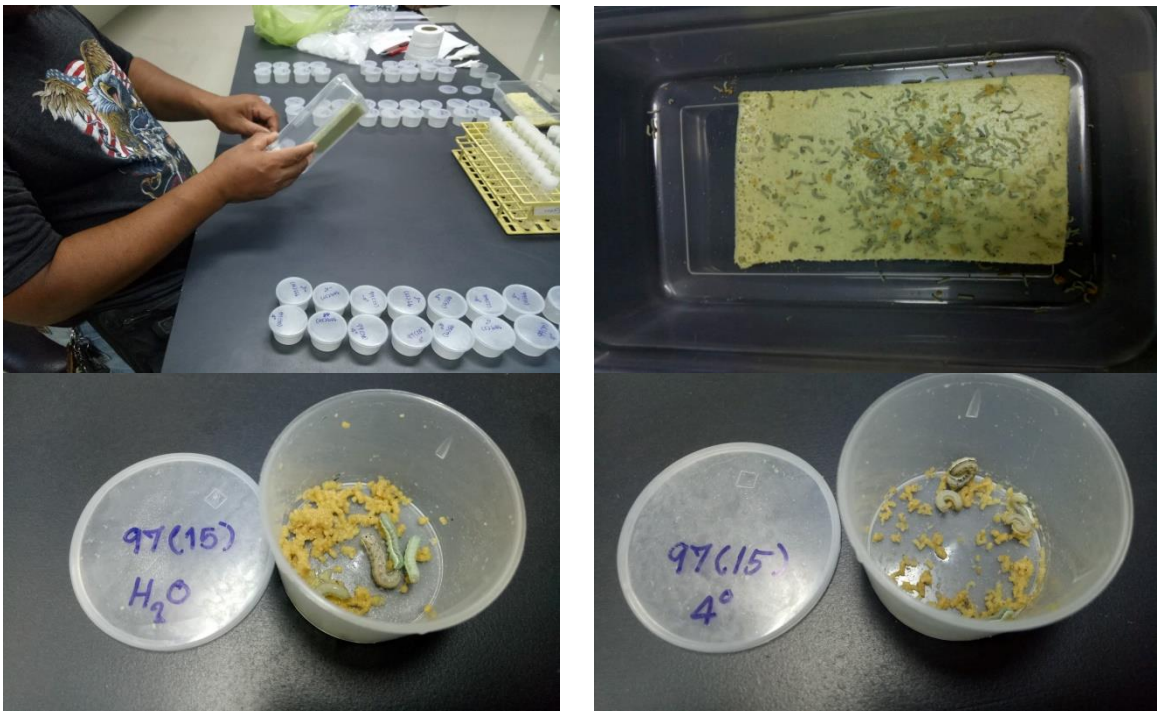
จากการศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่คัดเลือกได้จำนวน 57 ไอโซเลท ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย ในระยะที่2 ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 คือ 72 ชั่วโมง และชุดควบคุมไม่มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย สังเกตจากลักษณะลำตัวของตัวหนอน คือ ตัวหนอนที่มีชีวิตจะมีลักษณะลำตัวเป็นสีน้ำตาลอ่อน ตัวหนอนวางตัวคว่ำอยู่ตลอดเวลา และเคลื่อนที่ได้ปกติ (ภาพที่ 3) ส่วนลักษณะของตัวหนอนที่ตาย จะมีสีลำตัวเป็นสีดำ ลำตัวของตัวหนอนจะงอแข็ง วางตัวตะแครงข้าง และไม่เคลื่อนไหวอีกต่อไป (ภาพที่ 3) ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* เบื้องต้นนั้นจะแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ใช้นำมาทดสอบต้องเลี้ยง ให้เจริญจนถึงช่วง Free spore คือเป็นระยะที่สปอร์และผลึกโปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ เพื่อให้เชื้อมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเกิดพิษกับแมลง นั่นคือผลึกโปรตีนพร้อมที่เปลี่ยนรูปเป็นสารพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งผลการตายของหนอนที่ชัดเจนเนื่องจากเชื้อ *B. thuringiensis* อยู่ที่ประมาณ 3 วัน เพราะถ้าใช้เชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* ที่ยังไม่อยู่ในช่วง Free spore เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จะใช้เวลาในการเจริญต่ออีกระยะหนึ่งเพื่อทำการพัฒนาให้กลายเป็นสปอร์และผลึกโปรตีนที่สมบูรณ์ทำให้ระยะเวลาที่จะทำให้หนอนตายเพิ่มขึ้นไปอีก 1-2 วัน หรือหนอนอาจไม่ตายเลย เนื่องจากว่าหนอนมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนวัยมีความแข็งแรงพอที่จะต้านทานต่อเชื้อ *B.thuringiensis* ได้



ภาพที่ 3 หนอนเจาะสมอฝ้ายระยะที่2 ที่ตาย

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์อัตราการตายของหนอนเจาะสมอฝ้าย ที่ทดสอบเป็นระยะเวลา 3 วัน

ลำดับ	Isolate BT	0 เดือน	3 เดือน			6 เดือน			12 เดือน		
			4 ℃	-30℃	-80℃	4℃	-30℃	-80℃	4℃	-30℃	-80℃
1	BT_001	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	BT_002	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	BT_003	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	BT_004	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	BT_005	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	BT_006	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	BT_007	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	BT_008	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	BT_009	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	BT_010	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	BT_011	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	BT_012	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	BT_013	53	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	BT_014	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	BT_015	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	BT_016	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	BT_017	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	BT_018	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	BT_019	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	BT_020	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0



ภาพที่ 4 ผลการการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายในห้องปฏิบัติการ

3.เทคนิคการเก็บรักษาบีทีเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์

การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาบีทีเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ โดยการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (Cotton bollworm) ในห้องปฏิบัติการโดยสุ่มทดสอบกับ *B. thuringiensis* 20 ไอโซเลท จากการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 40 % ที่อุณหภูมิ 4 ℃ ,-30 ℃, -80 ℃ เป็นระยะเวลา 3, 6 และ 12 เดือน พบว่า *B. thuringiensis* ทั้ง 20 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาใน กลีเซอรอล 40 % ที่อุณหภูมิ 4 ℃ ,-30 ℃, -80 ℃ ลดประสิทธิภาพของเชื้อ *B.thuringiensis* ลงทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

ในการอนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ได้ทำการเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดของบีที *(B.thuringiensis)* จากดินในภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศ พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 57 ไอโซเลท จากการนำเชื้อ *B.thuringiensis* ตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าแบนที่ได้ส่วนใหญ่จะผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน จากการศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย ในระยะที่2 พบว่า มีเพียง เชื้อ *Bacillus thuringiensis* BT_001 ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็น ในวันที่ 3 คือ 72 ชั่วโมง และชุด

ควบคุมไม่มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย โดยลักษณะของตัวหนอนที่ตาย จะมีสีลำตัวเป็นสีดำ ลำตัวของตัวหนอนจะงอแข็ง วางตัวตะแครงข้าง และไม่เคลื่อนไหวอีกต่อไป ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* เบื้องต้นนั้นจะแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ใช้นำมาทดสอบต้องเลี้ยง ให้เจริญจนถึงช่วง Free spore คือเป็นระยะที่สปอร์และผลึกโปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ เพื่อให้เชื้อมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเกิดพิษกับแมลง นั่นคือผลึกโปรตีนพร้อมที่เปลี่ยนรูปเป็นสารพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งผลการตายของหนอนที่ชัดเจนเนื่องจากเชื้อ *B. thuringiensis* อยู่ที่ประมาณ 3 วัน เพราะถ้าใช้เชื้อในการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* ที่ยังไม่อยู่ในช่วง Free spore เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จะใช้เวลาในการเจริญต่ออีกระยะหนึ่งเพื่อทำการพัฒนาให้กลายเป็นสปอร์และผลึกโปรตีนที่สมบูรณ์ ทำให้ระยะเวลาที่จะทำให้หนอนตายเพิ่มขึ้นไปอีก 1-2 วันหรือหนอนอาจไม่ตายเลย เนื่องจากว่าหนอนมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนวัยมีความแข็งแรงพอที่จะต้านทานต่อเชื้อ *B.thuringiensis* ได้ เทคนิคการเก็บรักษาบีทีเพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย (Cotton bollworm) ในห้องปฏิบัติการโดยสุ่มทดสอบกับ *B. thuringiensis* 20 ไอโซเลท จากการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 40 % ที่อุณหภูมิ 4 ℃ ,-30 ℃, -80 ℃ เป็นระยะเวลา 3, 6 และ 12 เดือน พบว่า *B. thuringiensis* ทั้ง 20 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาใน กลีเซอรอล 40 % ที่อุณหภูมิ 4 ℃ ,-30 ℃, -80 ℃ ลดประสิทธิภาพของเชื้อ *B.thuringiensis* ลงทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้

เอกสารอ้างอิง (References)

Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sýnal, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. and Margalith, Y. 1997. Extended Screening
by PCR for seven cry-group genes from field-collected Strains of Bacillus thuringiensis. Applied and Environmental Microbiology, 63: 4883-4890.

Martin, P.A., Gundersen, D.E. and Blackburn, M.B. 2010. Distribution of phenotypes among Bacillus thuringiensis strains. Systematic and Applied Microbiology, 33:204- 208.

Shishir, A., Akter, A., Hassan, Md. H., Kibria, G., Ilias, M., Khan, S. N. and Hoq, M. Md. 2012. Characterization of locally isolated Bacillus thuringiensis for the Development of Eco-friendly Biopesticides in Bangladesh. JBiopest, 5 (Supplementary) : 216-222. (http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/Vol_5_0_216_222F.pdf).

Vidyarthi, A. S., Tyagi, R. D., Valero, J. R., Surampalli, R. Y. 2002. Studies on the production of *B. thuringiensis* based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. Water Research, New York, 36: 4850-4860. http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/General_Science/2551/Bs/PongsakornKa/appdx.pdf

การจัดทำฐานข้อมูลจุลินทรีย์ทางการเกษตรและการบริการ

Database of Agricultural Microbial and Information Access

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด อัครชาพรรณ กวางแก้ว และ เสริมพร กิ่งพุทธพงศ์

Nuchanart Tangchitsomkid, Ackarachapan Kwangkaew

and Sermporn Keungphuttaphong

คำสำคัญ (key words) : ฐานข้อมูล จุลินทรีย์ทางการเกษตร

Database, agricultural microorganisms

บทคัดย่อ (abstract)

การจัดการฐานข้อมูลด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตร ให้เป็นระบบฐานข้อมูลบนเว็บไซต์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมรายชื่อจุลินทรีย์ การเก็บรักษา ลักษณะการดำรงชีวิต และการใช้ประโยชน์จากหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร โดยออกแบบโครงสร้างระบบฐานข้อมูล จัดทำเว็บไซต์ ติดตั้งระบบบนโดเมน สร้างเว็บเพจและนำเข้าข้อมูล ทดสอบการใช้งาน และเปิดใช้งานจริง จากผลการดำเนินงาน จัดทำเว็บไซต์ที่ติดตั้งบนระบบ Webhost บนโดเมนชื่อ microorganism.expertdoa.com ประกอบด้วยเว็บเพจที่สามารถนำเสนอข้อมูลจุลินทรีย์ที่สำคัญ ข้อมูลนักวิจัย และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมถึงจุลินทรีย์ทางด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดโรคได้ครบทุกมิติ แบ่งออกเป็น หน้าหลักเพื่อเข้าถึงข้อมูลกิจกรรมต่างๆ ที่สามารถ Link สู่ Social media ที่เกี่ยวข้องเพื่อเพิ่มเส้นทางการสื่อสารอย่างต่อเนื่อง รวมทั้งจัดทำ QR-Code เพื่อการเข้าถึง และผู้ใช้สามารถดาวน์โหลดเอกสารไปใช้งานได้ เช่น จุลินทรีย์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย มีการติดตั้งเครื่องมือ Google analytics ใช้วัดผลการใช้งานเว็บไซต์ โดยพบจำนวนผู้เข้าชมเว็บไซต์มากกว่า 10,000 ครั้ง และมีการดาวน์โหลดเอกสารเผยแพร่ผ่านการสแกน QR-Code มากกว่า 2,000 ครั้ง นอกจากนั้นมีการพัฒนาเชื่อมโยงข้อมูลเชิงลึก ในเรื่องชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในชื่อ www.thaiepn.com และสามารถขยายสู่การใช้งานอื่นๆ ในอนาคตได้อย่างต่อเนื่อง

Database Management of agricultural microbial is a database system on the website. The objectives to collect of microorganisms groups, preservation, habitat and utilization from the Department of Agriculture. Database designing on the domain named microorganism.expertdoa.com. Database structure are create a website that is installed on the webhost system. The consists of a web page that can present important microbial data, researcher information and utilization Including microorganisms in plant diseases control. Divided into the main page to access information on various activities that can be linked to the relevant social

media in order to continuously increase the communication route as well as create a QR-Code for access. An users can download documents to use such as Thai entomopathogenic nematodes. Google analytics tools are used to measure website usage. The number of visitors to the site is more than 10,000 times and the document has been downloaded via more than 2,000 QR-Code scans. In addition, the development of in-depth data links to Thai entomopathogenic nematodes are more effective in the name www.thaiepn.com and can be extended to other applications In the future continuously.

บทนำ (Introduction)

กรมวิชาการเกษตร เป็นแหล่งเก็บรวบรวมจุลินทรีย์ทางการเกษตรที่มีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์จำนวนมาก ซึ่งกระจายตามหน่วยงานต่างๆ ที่มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ตามภารกิจโดยนักวิจัยที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน ได้แก่ จุลินทรีย์ดิน จุลินทรีย์ย่อยสลาย จุลินทรีย์กำจัดศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช จุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว จุลินทรีย์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรม และสายพันธุ์เห็ด รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ ได้แก่ เอ็นไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ และแอนติซีรัมเพื่อการตรวจสอบไวรัส-มายโคพลาสมาสาเหตุโรคพืช กรมวิชาการเกษตรจึงเป็นศูนย์กลางความรู้และเทคโนโลยีที่เกี่ยวกับจุลินทรีย์แต่ละชนิดและสายพันธุ์ซึ่งนับเป็นทรัพยากรชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อการเกษตรของประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง

ณ ปัจจุบัน กรมวิชาการเกษตร มีความพร้อมด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตรในทุกมิติของการศึกษาค้นคว้า วิจัย มีบุคลากรเฉพาะสาขาวิชา องค์ความรู้ เทคโนโลยี กระบวนการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงภาคสนาม และจุลินทรีย์บางชนิดสามารถถ่ายทอดสู่ภาคการเกษตรและภาคเอกชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ กรมวิชาการเกษตร จึงมีศักยภาพที่จะเป็นผู้นำในด้านจุลินทรีย์ตามบทบาทและภารกิจ แต่อย่างไรก็ตาม ชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์ องค์ความรู้ และเทคโนโลยีต่างๆ ของกรมวิชาการเกษตร ถูกแยกเก็บรักษาในแต่ละหน่วยงานตามกระบวนการเก็บรักษาและใช้ประโยชน์ โดยขีดวงจำกัดเฉพาะนักวิจัยในหน่วยงาน ไม่แพร่หลายเท่าที่ควร บุคคลภายนอกหรือผู้สนใจอื่นๆ ไม่สามารถรับรู้หรือเข้าถึงจุลินทรีย์ที่มีอยู่ไปใช้ประโยชน์ได้ หรือมีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่นำไปพัฒนาต่อยอด เป็นผลให้งานด้านจุลินทรีย์ของกรมวิชาการเกษตรไม่เป็นที่รู้จัก และไม่ทันต่อสถานการณ์ ซึ่งแตกต่างจากหน่วยงานอื่นๆ ได้แก่ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช.) และสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (สพภ./BEDO) ได้พยายามเข้ามามีบทบาทในเรื่องของจุลินทรีย์ทางการเกษตร ซึ่งให้ความสำคัญในการศึกษาค้นคว้าวิจัยตั้งแต่งานพื้นฐานประยุกต์ และพัฒนา โดยทำงานแบบบูรณาการร่วมกับหน่วยงานอื่นๆ ทั้งในด้านการเก็บรักษาเทคโนโลยีการผลิต และการนำไปใช้ประโยชน์ ตลอดจนเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ อย่างต่อเนื่อง แต่ในข้อเท็จจริง สวทช. หรือ BEDO ยังมีองค์ความรู้หรือเทคโนโลยีในจุลินทรีย์บางชนิด/สายพันธุ์เท่านั้น

ส่วนใหญ่เป็นเพียงการเก็บรวบรวมและพยายามจัดการข้อมูลจุลินทรีย์บางกลุ่มให้เป็นระบบ ซึ่งยังไม่ครอบคลุมการทดสอบในสภาพไร่ และการผลิตขยายในเชิงพาณิชย์ รวมทั้งขาดบุคลากรที่มีความรู้ในการถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ผู้ต้องการใช้

กรมวิชาการเกษตร จึงควรให้ความสำคัญงานด้านจุลินทรีย์ที่จะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการเกษตรของประเทศ เริ่มจากการจัดการข้อมูลด้านจุลินทรีย์ที่มีอยู่กระจัดกระจายตามหน่วยงานต่างๆ ให้เป็นระบบที่สามารถสืบค้นรายละเอียดของตัวเชื้อได้อย่างรวดเร็ว แหล่งจัดเก็บรักษา รวมทั้งรายชื่อนักวิจัยผู้รับผิดชอบในแต่ละชนิด/สายพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อให้เข้าถึงได้ง่าย โดยจัดตั้งให้เป็นศูนย์จุลินทรีย์ทางการเกษตร ที่สามารถบริการข้อมูลพร้อมการถ่ายทอดเทคโนโลยีต่างๆ เพื่อเป็นจุดเชื่อมโยงระหว่างนักวิจัยของกรมวิชาการเกษตรที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะด้าน ไปสู่บุคคลหรือหน่วยงานอื่นๆ ที่ต้องการใช้ ตลอดจนเป็นผู้นำในกลุ่มอาเซียนด้านจุลินทรีย์และเทคโนโลยีการผลิตและใช้ให้สามารถขับเคลื่อนผลงานวิจัยขยายผล และ/หรือนำจุลินทรีย์อีกหลากหลายชนิดไปใช้ประโยชน์ในเชิงสาธารณะและเชิงพาณิชย์ตามระบบการจัดการอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมรายชื่อจุลินทรีย์ทางการเกษตรที่มีการเก็บรักษาจากทุกหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร แบ่งเป็นหมวดหมู่ตามลักษณะการดำรงชีวิต/การใช้ประโยชน์ และออกแบบโครงสร้างระบบฐานข้อมูลบัญชีรายการจุลินทรีย์แต่ละชนิด/สายพันธุ์ และฐานข้อมูลนักวิจัยด้านจุลินทรีย์ ให้สามารถสืบค้นได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

1. การจัดการข้อมูลจุลินทรีย์ทางการเกษตรตามระบบฐานข้อมูล

1.1 สร้างแบบฟอร์มรายละเอียด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ แหล่งที่พบ กระบวนการจำแนกชนิด รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา สถานภาพ อายุการเก็บรักษา องค์ความรู้และเทคโนโลยีที่มีอยู่ การถ่ายทอด การนำไปใช้ประโยชน์ สถานที่เก็บรักษา ชื่อผู้รับผิดชอบ หน่วยงาน และรายละเอียดอื่นๆ

1.2 กำหนดกลุ่มจุลินทรีย์ตามการใช้ประโยชน์ ได้แก่ จุลินทรีย์ดิน จุลินทรีย์ย่อยสลาย จุลินทรีย์กำจัดศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช จุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว และจุลินทรีย์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรม และอื่นๆ พร้อมรายละเอียดของจุลินทรีย์ ชื่อผู้รับผิดชอบ และหน่วยงาน

ฐานข้อมูลจุลินทรีย์ในเวปไซต์กรมวิชาการเกษตร

http://microorganism.expertdoa.com/

1.กลุ่มจุลินทรีย์ ☐ จุลินทรีย์ ควบคุมศัตรูพืช

☐ จุลินทรีย์ย่อยสลาย

☐ จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

☐ จุลินทรีย์ที่เป็นอาหารและยา

☐ จุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว

☐ จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

☐ อื่นๆ (ระบุ).....

2.จุลินทรีย์ ☐ เห็ด ☐ รา ☐ แบคทีเรีย ☐ ไวรัส

☐ มายโคพาสมา ☐ไส้เดือนฝอย ☐ โปรโตรซัว ☐ ยีสต์

3.ชื่อวิทยาศาสตร์.....

4.ชื่อสามัญ.....

5.Strain No./Isolate No./Code No.....

6.แหล่งอาศัย-พื้นที่เก็บ(ตำบล/อำเภอ/จังหวัด).....

7.ลักษณะทางสัณฐานวิทยา..(รูปภาพจุลินทรีย์).....

8.ชีววิทยาของจุลินทรีย์ [การเจริญเติบโต การขยายพันธุ์ วงจรชีวิต และสภาพแวดล้อม (เช่น อุณหภูมิ pH แสง ความชื้นสัมพัทธ์ เป็นต้น)] .....

9.ความสำคัญของจุลินทรีย์.....

10.เทคโนโลยี/นวัตกรรม/สิ่งประดิษฐ์คิดค้นของจุลินทรีย์ (กระบวนการศึกษาวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์/อื่นๆ).....

.....

11.การเก็บรักษา.....

12.การนำจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์...(มี/ไม่มี).....

13.เอกสารเผยแพร่...(มี/ไม่มี).....

14.การขยายผล.....(มี/ไม่มี).....

15.ชื่อนักวิจัยเจ้าของผลงาน.....

หน่วยงาน.....

ที่อยู่.....

โทรศัพท์.....

e-mail.....

หมายเหตุ : เปิดดูข้อมูลได้ใน http://microorganism.expertdoa.com/

1.3 การออกแบบโครงสร้างระบบฐานข้อมูลจุลินทรีย์ ตามลำดับดังนี้

- รวบรวมข้อมูลและคัดกรองข้อมูลที่ต้องใช้ในการจัดทำเว็บไซต์
- ออกแบบเว็บไซต์และออกแบบระบบฐานข้อมูล
- จัดหาและเช่าเว็บโฮสและจดทะเบียนโดเมนและเช่าโดเมน
- ติดตั้งระบบเว็บไซต์
- สร้างระบบเมนูและโครงสร้างเว็บไซต์
- สร้างหน้าเว็บเพจสำหรับแสดงเนื้อหา
- นำเข้าข้อมูลเนื้อหาในหน้าต่างๆ
- ทดสอบการใช้งาน
- เปิดให้มีการใช้งานจริง
- ติดตามผลดูแลประเมินการใช้งานและปรับปรุงและพัฒนาข้อมูล

2. การจัดทำโครงสร้างระบบเว็บไซต์และการออกแบบ

โครงสร้างโดยรวมของเว็บจุลินทรีย์ (Microorganism Website) มุ่งเน้นการนำเสนอข้อมูลด้านจุลินทรีย์ของหน่วยงานกรมวิชาการเกษตร ที่ทำงานวิจัยด้านจุลินทรีย์ โดยมีองค์ประกอบหลักๆดังนี้

2.1 โครงสร้างการทำงานระบบ

ระบบได้ทำการติดตั้งบนระบบ Cloud หรือ Webhost สะดวกในการดูแล และจัดการ โดยไม่ต้องมีเครื่องแม่ข่ายไว้ที่หน่วยงาน ลดค่าใช้จ่ายเรื่องสถานที่วาง ผู้ดูแล ค่าจัดการอื่นๆ และเข้าถึงได้สะดวกจาก Cloud โดยตรง ช่วยลดปัญหาคอขวดในการเข้าถึงข้อมูลได้สะดวก รวดเร็ว

2.2 โครงสร้างข้อมูลเว็บไซต์จุลินทรีย์ ประกอบด้วยโครงสร้างเมนูสำหรับนำทางผู้ใช้งานสู่เนื้อหาของ

เว็บเพจหน้าต่างๆ ในเว็บไซต์ และโครงสร้างหน้าเว็บเพจ (เนื้อหาในการนำเสนอ) ประกอบด้วยเมนูหลักคือหน้าหลัก ข้อมูลจุลินทรีย์ ข้อมูลเชื้อจุลินทรีย์ ข้อมูลนักวิจัย โรคผักและการป้องกันกำจัด และติดต่อเรา

ในหน้าหลักจะบอกถึงวัตถุประสงค์และความสำคัญในการจัดทำเว็บไซต์กิจกรรม ซึ่งจะ Link ไปยัง Social media ที่นำมาช่วยในการนำเสนอเพิ่มเติมคือวีดีโอสาธิต วิธีและกิจกรรมที่มีประโยชน์สำหรับการนำความรู้ไปใช้ รวมถึง Facebook ที่จะสามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับผู้สนใจและผู้ร่วมกิจกรรมต่างๆ ที่ได้มีการจัดขึ้น

ข้อมูลจุลิทรีย์ในกลุ่มต่างๆ รายชื่อจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในกลุ่มนั้นๆ ชื่อสามัญทางวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ แหล่งอาศัย-พื้นที่เก็บเกี่ยว ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยาจุลินทรีย์ ความสำคัญของจุลินทรีย์ การเก็บรักษา การนำจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ เอกสารเผยแพร่ การขยายผล และชื่อนักวิจัยเจ้าของผลงาน

สำหรับจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ประโยชน์ และนำไปผลิตเป็นชีวภัณฑ์พร้อมนำไปใช้ได้ โดยมีเอกสารเผยแพร่ประกอบ ได้แก่ ชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย จะมีระบบ QR Code ให้เกษตรกร Scan และเข้าถึงเอกสารได้อย่างรวดเร็ว และสามารถดาวน์โหลดไปใช้ประโยชน์ได้ในทันทีที่ต้องการ (นุชนารถ, 2558)

จัดทำข้อมูลนักวิจัยนำเสนอรายละเอียดเพิ่มเติมของนักวิจัย ซึ่งสามารถเพิ่มเติมรายละเอียดได้ในภายหลัง

นอกเหนือจากข้อมูลจุลินทรีย์แล้ว ยังสามารถได้รู้จักกับข้อมูลเรื่อง โรคผักและการป้องกันกำจัด โรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ ลักษณะของโรค รวมถึงแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคพืชนั้นๆ (กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2554)

มีหน้าต่าง “ติดต่อเรา” ข้อมูลและรายละเอียดที่ใช้ในการติดต่อรวมถึงแผนที่ Google Map ที่สามารถนำทางผู้ติดต่อมายังหน่วยงานได้โดยสะดวก

<u>เวลาสถานที่</u>

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2558 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

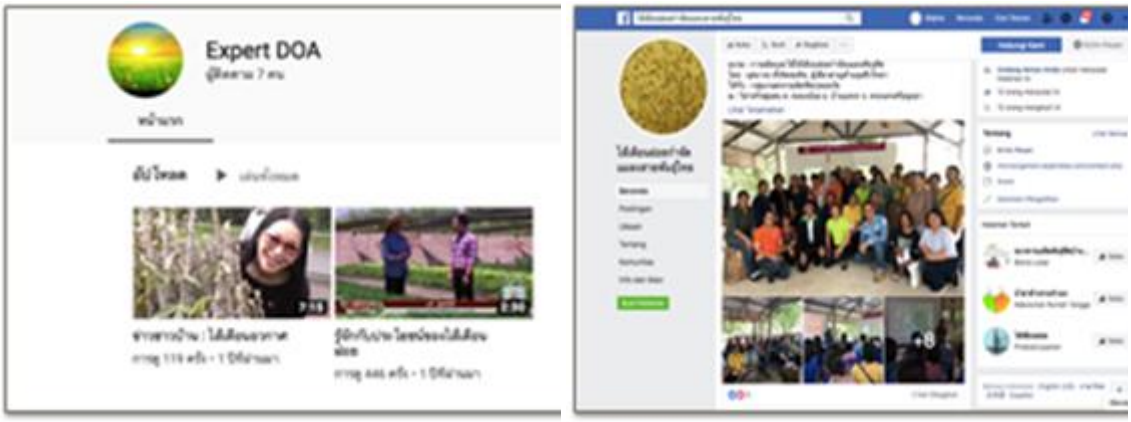
<u>สถานที่ดำเนินการ</u>

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

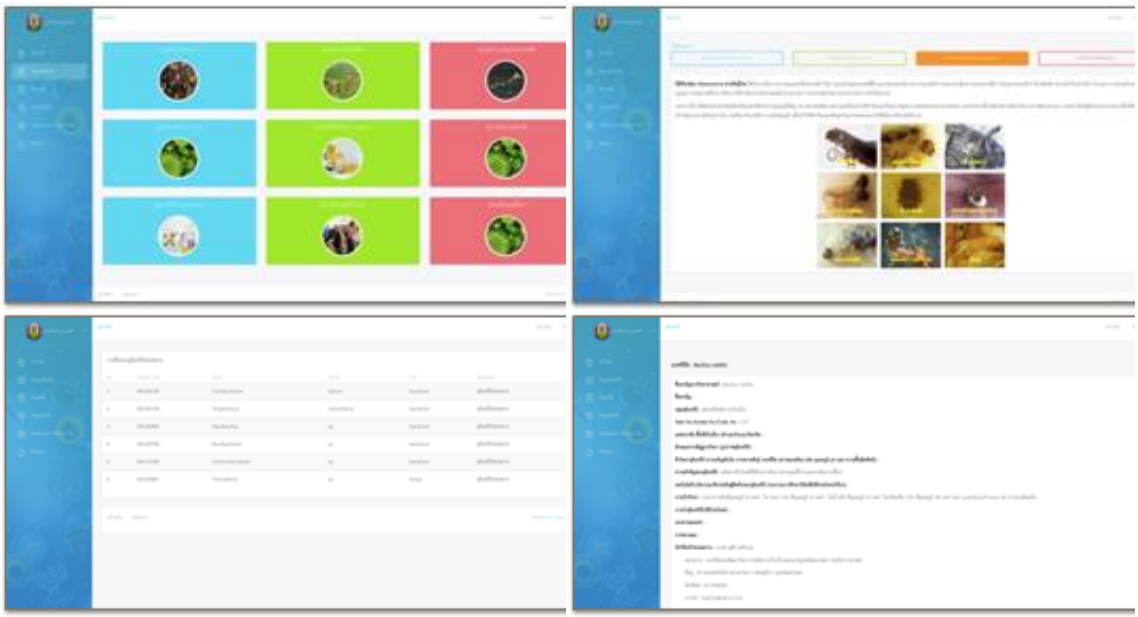
ผลการทดลองและวิจารณ์

จัดทำเว็บไซต์ที่มีเว็บเพจหรือหน้าต่างที่สามารถนำเสนอข้อมูลจุลินทรีย์ที่สำคัญ ข้อมูลนักวิจัย และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมถึงจุลินทรีย์ทางด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดโรคได้ครบทุกมิติ แบ่งออกเป็น หน้าหลักเพื่อเข้าถึงข้อมูลกิจกรรมต่างๆ ที่สามารถ Link สู่ Social media ที่เกี่ยวข้องเพื่อเพิ่มเส้นทางการสื่อสารอย่างต่อเนื่อง

Link สู่ Social Media



นำข้อมูลจุลินทรีย์ซึ่งได้รับจากนักวิจัยของหน่วยงานต่างๆ ของกรมวิชาการเกษตร ที่มีงานวิจัยด้านจุลินทรีย์ บรรจุลงในฐานข้อมูลจุลินทรีย์ได้เป็นเว็บเพจที่แสดงข้อมูลจุลินทรีย์พร้อมรายละเอียดที่สำคัญ



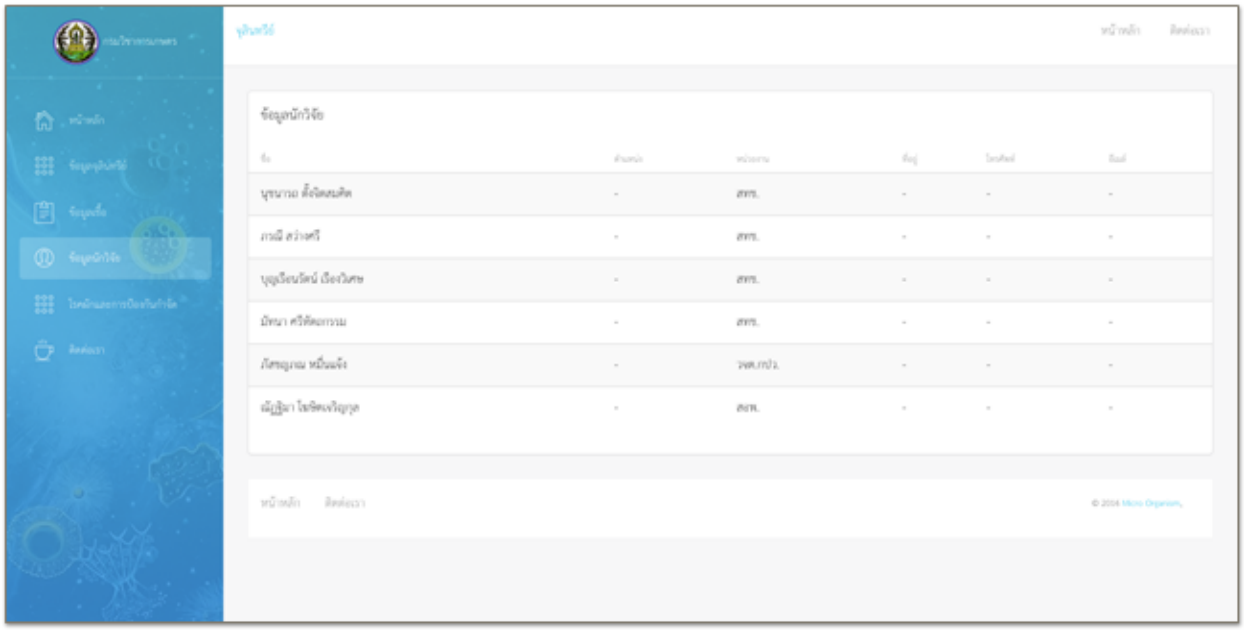
ภายในข้อมูลจุลินทรีย์กลุ่มใดที่มีเอกสารเผยแพร่ จะมีระบบ QR-Code เพื่อการเข้าถึง และผู้ใช้สามารถดาวน์โหลดเอกสารไปใช้งานได้ เช่น จุลินทรีย์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย

โรงผลิตขยายชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงระดับชุมชน
ดูขั้นตอนการผลิต
เทคโนโลยีการเพาะขยาย ชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงแบบทำใช้เอง

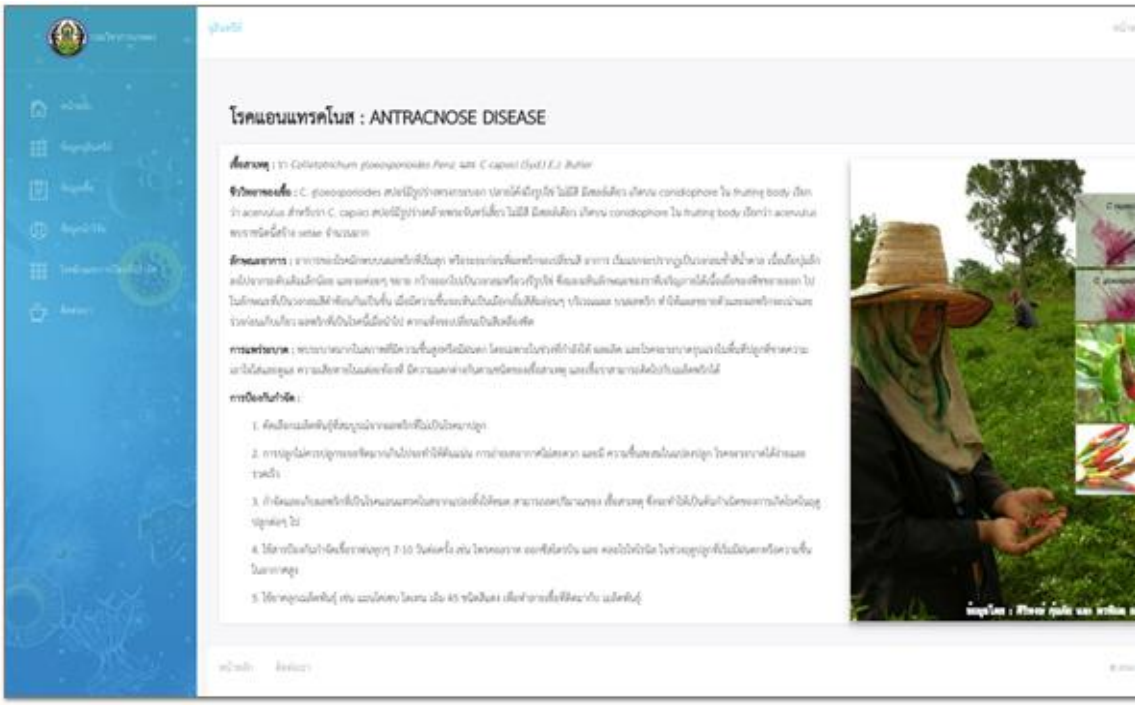
ข้อมูลจุลินทรีย์ แบ่งออกเป็นกลุ่มตามการใช้ประโยชน์ ได้แก่ จุลินทรีย์ดิน จุลินทรีย์ย่อยสลาย จุลินทรีย์กำจัดศัตรูพืช จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช จุลินทรีย์หลังการเก็บเกี่ยว และจุลินทรีย์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรม และอื่นๆ พร้อมรายละเอียดของจุลินทรีย์ ชื่อผู้รับผิดชอบ และหน่วยงาน

1. เว็บเพจ แสดงข้อมูลเชื้อจุลินทรีย์

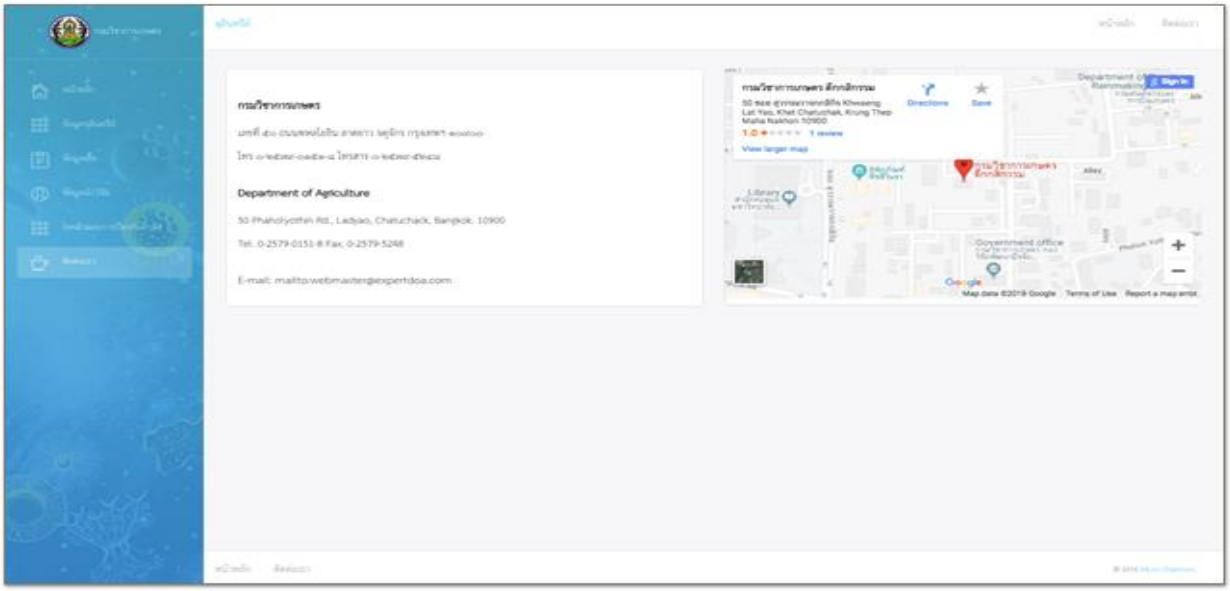
2. เว็บเพจ แสดงข้อมูลนักวิจัย



3. เว็บเพจ แสดงโรคผักและการป้องกันกำจัด



4. เว็บเพจ ติดต่อเรา

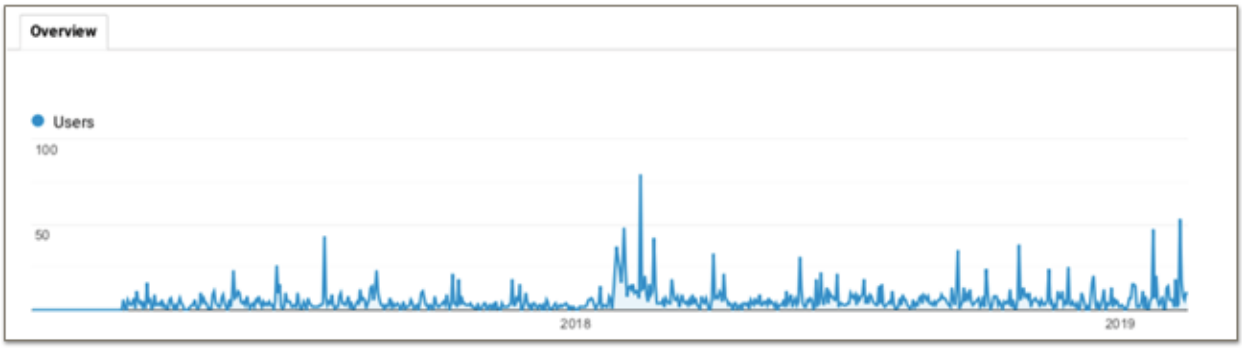


มีการเก็บข้อมูลการเข้าชมเว็บไซต์และมีผู้สนใจข้อมูลมากกว่า 10,000 ครั้ง โดยเข้ามาศึกษาและดาวน์โหลดเอกสารเผยแพร่ผ่านการ Scan QR-Code มากกว่า 2,000 ครั้ง ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการให้ความสนใจได้อย่างชัดเจนและวัดผลได้ จากการวัดผลการใช้งานตรงตามความเป็นจริงด้วยการติดตั้งเครื่องมือ Google analytics ที่ให้มุมมองการวัดผลการใช้งานเว็บไซต์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Page	Pageviews	Unique Pageviews	Avg. Time on Page	Entrances	Bounce Rate	% Exit	Page Value
	11,326 % of Total: 100.00% (11,326)	7,728 % of Total: 100.00% (7,728)	00:01:41 Avg for View: 00:01:41 (0.00%)	4,952 % of Total: 100.00% (4,952)	69.05% Avg for View: 69.05% (0.00%)	43.72% Avg for View: 43.72% (0.00%)	THB 0.00 % of Total: 0.00% (THB 0.00)
1. /nematode_production.php	2,785 (24.59%)	1,905 (24.65%)	00:03:08	1,834 (37.04%)	71.05%	62.12%	THB 0.00 (0.00%)
2. /product_plant.php	2,444 (21.58%)	1,819 (23.54%)	00:02:41	1,704 (34.41%)	71.83%	66.45%	THB 0.00 (0.00%)
3. /	624 (5.51%)	554 (7.17%)	00:01:28	544 (10.99%)	62.87%	64.26%	THB 0.00 (0.00%)
4. /microorganism_group.php?blink=active	569 (5.02%)	267 (3.45%)	00:00:31	22 (0.44%)	40.91%	8.08%	THB 0.00 (0.00%)
5. /product_technology.php	411 (3.63%)	315 (4.08%)	00:03:04	106 (2.14%)	60.38%	41.12%	THB 0.00 (0.00%)
6. /nematode_1.php	351 (3.10%)	276 (3.57%)	00:02:30	217 (4.38%)	76.96%	60.11%	THB 0.00 (0.00%)
7. /index.php?alink=active	347 (3.06%)	222 (2.87%)	00:01:19	37 (0.75%)	62.16%	29.68%	THB 0.00 (0.00%)
8. /index.php	288 (2.54%)	217 (2.81%)	00:01:24	79 (1.60%)	74.68%	35.42%	THB 0.00 (0.00%)
9. /nematode_production_web.php	275 (2.43%)	223 (2.89%)	00:03:12	97 (1.96%)	83.51%	56.36%	THB 0.00 (0.00%)
10. /product.php?elink=active	269 (2.38%)	172 (2.23%)	00:00:48	28 (0.57%)	57.14%	12.64%	THB 0.00 (0.00%)

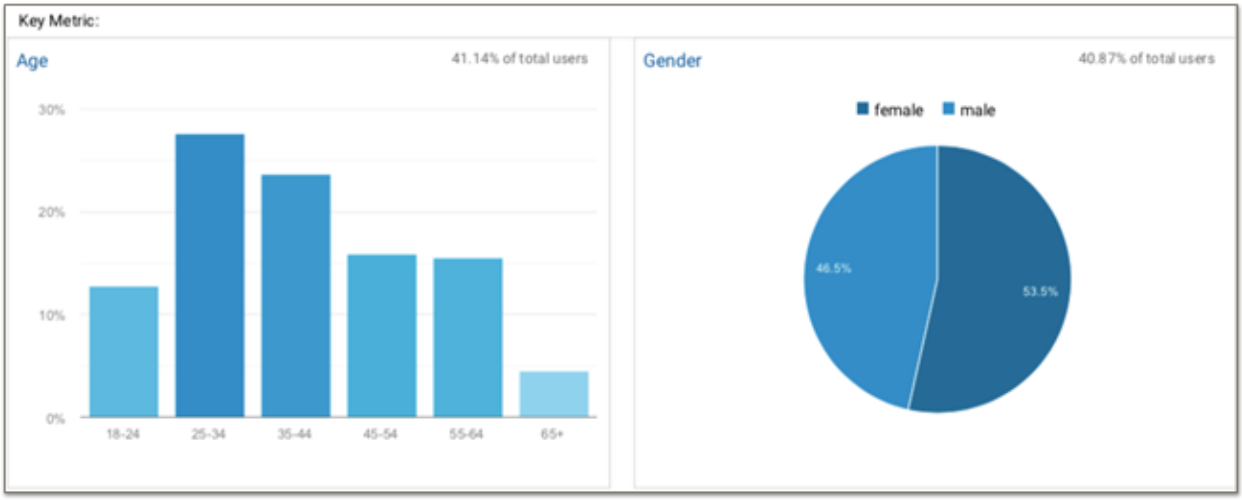
Rows 1 - 10 of 218

รวมถึงให้ข้อมูลการใช้งานในหลายๆ มิติอย่างครบถ้วน และให้ข้อมูลแสดงภาพรวมการเข้าใช้งานเว็บไซต์ทั้งหมด



ตลอดจนให้ข้อมูลอื่นๆ ได้แก่

1. ให้ข้อมูลแสดงการเข้าใช้งานแบ่งตามเพศ และช่วงอายุ



2. ให้ข้อมูลแสดงการเข้าใช้งานแบ่งตามตำแหน่งที่อยู่ของผู้เข้าใช้งาน ได้แก่ จังหวัด อำเภอ หรืออื่นๆ

Region	Acquisition			Behavior			Conversions		
	Users	New Users	Sessions	Bounce Rate	Pages / Session	Avg. Session Duration	Goal Conversion Rate	Goal Completions	Goal Value
	2,215 % of Total: 86.05% (2,574)	2,244 % of Total: 86.24% (2,602)	4,660 % of Total: 92.68% (5,028)	68.69% Avg for View: 69.05% (-0.52%)	2.36 Avg for View: 2.25 (4.56%)	00:02:17 Avg for View: 00:02:08 (6.67%)	0.00% Avg for View: 0.00% (0.00%)	0 % of Total: 0.00% (0)	THB 0.00 % of Total: 0.00% (THB 0.00)
1. Bangkok	1,733 (72.12%)	1,719 (76.60%)	3,700 (79.40%)	69.11%	2.36	00:02:19	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
2. Chiang Mai	53 (2.21%)	43 (1.92%)	95 (2.04%)	68.42%	2.28	00:02:01	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
3. Nakhon Pathom	53 (2.21%)	42 (1.87%)	73 (1.57%)	69.86%	1.77	00:01:31	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
4. Phra Nakhon Si Ayutthaya	47 (1.96%)	40 (1.78%)	63 (1.35%)	73.02%	2.62	00:01:56	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
5. Chon Buri	43 (1.79%)	35 (1.56%)	60 (1.29%)	66.67%	2.38	00:02:23	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
6. Nakhon Sawan	32 (1.33%)	27 (1.20%)	46 (0.99%)	58.70%	2.61	00:02:26	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
7. Khon Kaen	31 (1.29%)	25 (1.11%)	43 (0.92%)	69.77%	2.28	00:01:33	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
8. Nakhon Ratchasima	28 (1.17%)	18 (0.80%)	36 (0.77%)	69.44%	1.94	00:00:48	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
9. Songkhla	27 (1.12%)	21 (0.94%)	41 (0.88%)	58.54%	3.17	00:03:37	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
10. Phitsanulok	26 (1.08%)	22 (0.98%)	34 (0.73%)	67.65%	2.03	00:01:08	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)

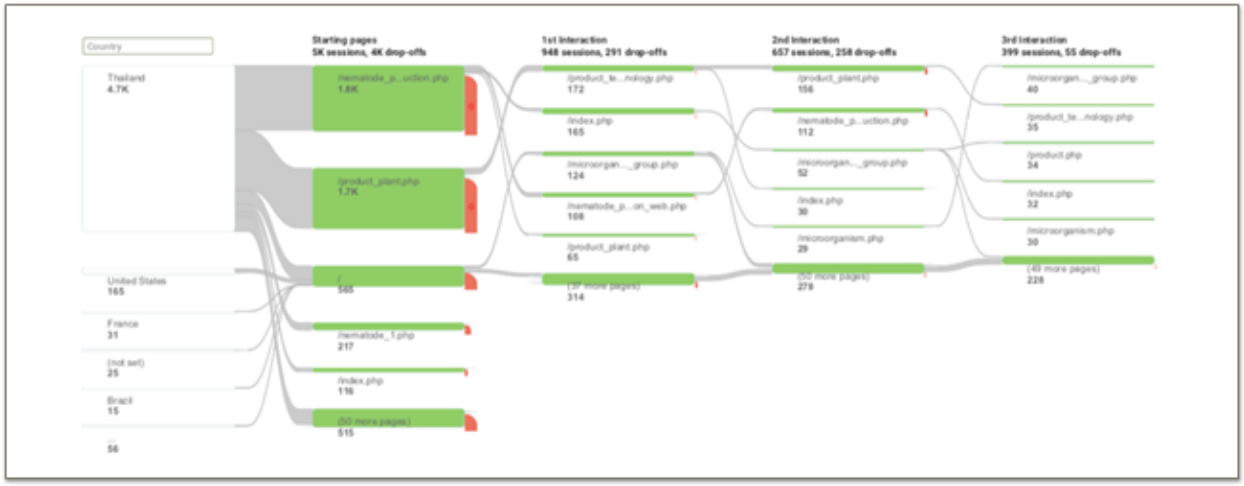
Rows 1 - 10 of 64

3. ให้ข้อมูลแสดงการเข้าใช้งานจากอุปกรณ์เครื่องคอมพิวเตอร์ (Desktop), Mobile, Tablet

Device Category	Acquisition			Behavior			Conversions		
	Users	New Users	Sessions	Bounce Rate	Pages / Session	Avg. Session Duration	Goal Conversion Rate	Goal Completions	Goal Value
	2,574 % of Total: 100.00% (2,574)	2,604 % of Total: 100.08% (2,602)	5,028 % of Total: 100.00% (5,028)	69.05% Avg for View: 69.05% (0.00%)	2.25 Avg for View: 2.25 (0.00%)	00:02:08 Avg for View: 00:02:08 (0.00%)	0.00% Avg for View: 0.00% (0.00%)	0 % of Total: 0.00% (0)	THB 0.00 % of Total: 0.00% (THB 0.00)
1. mobile	1,856 (72.08%)	1,883 (72.31%)	3,610 (71.80%)	72.74%	1.72	00:01:39	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
2. desktop	631 (24.50%)	632 (24.27%)	1,266 (25.18%)	59.08%	3.71	00:03:29	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)
3. tablet	88 (3.42%)	89 (3.42%)	152 (3.02%)	64.47%	2.80	00:02:29	0.00%	0 (0.00%)	THB 0.00 (0.00%)

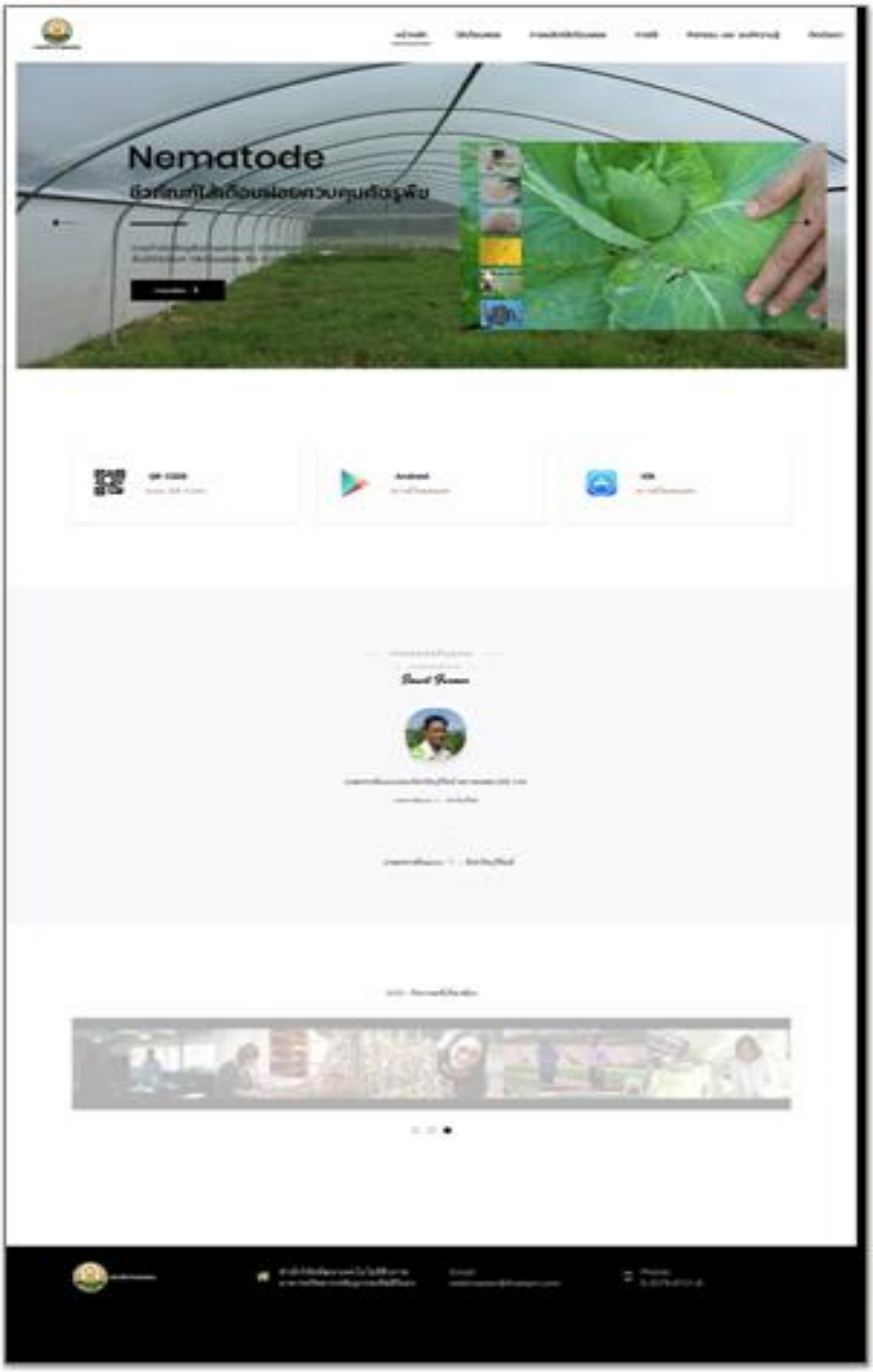
ข้อมูลนี้เป็นตัวชี้วัดว่า มีการเข้าใช้งานผ่านมือถือหรือ Smart phone ค่อนข้างสูง ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพัฒนาต่อยอดสู่การเข้าถึงโดย Mobile Application ซึ่งจะทำให้มีช่องทางให้ผู้สนใจเข้าใช้ได้สะดวกและรวดเร็วผ่านทางโทรศัพท์มือถือ

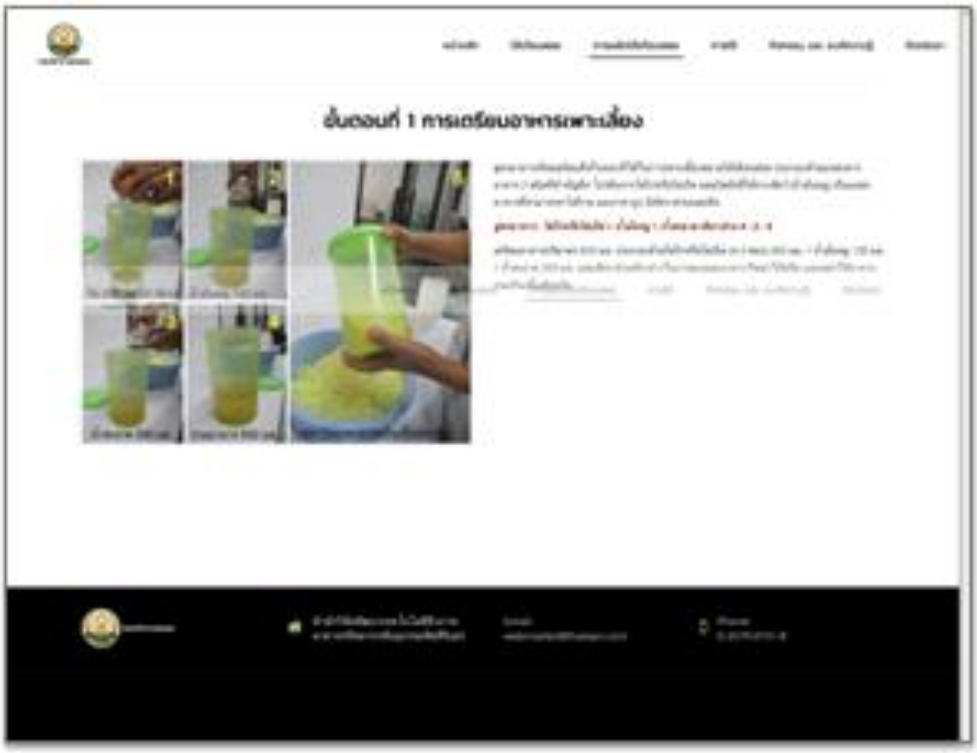
4. ให้ข้อมูลแสดงพฤติกรรมการเข้าใช้งานของผู้ใช้ว่ามีการเข้าใช้เว็บเพ็จหนึ่ง และไปใช้งานต่อที่เว็บเพจอื่นๆ เป็นลำดับ (User Flow)

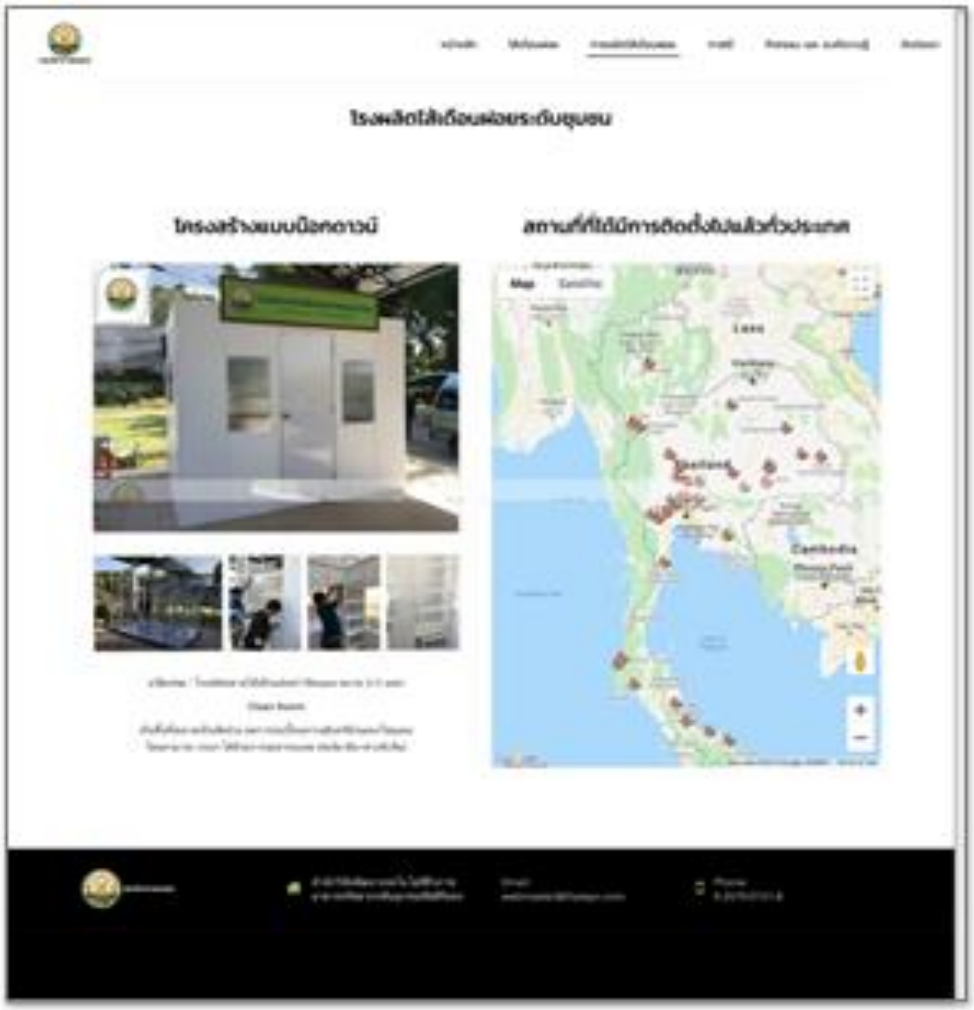


การพัฒนาต่อยอดด้านข้อมูล โดยได้มีการพัฒนาเพิ่มเว็บไซต์ที่ให้ข้อมูลทางด้านชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยโดยเฉพาะ จากเดิมที่รวมอยู่กับเว็บจุลินทรีย์ ซึ่งให้ความรู้เชิงลึกในเรื่องชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และสามารถขยายสู่การใช้งานอื่นๆ ในอนาคตอย่างต่อเนื่อง

(พัฒนาต่อเนื่องภายใต้โครงการขยายผลนวัตกรรมชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงครบวงจร) ในชื่อ www.thaiepn.com




ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง


โรงผลิตไส้เดือนฝอยระดับชุมชน
โครงสร้างแบบน็อคดาวน์
สถานที่ที่ได้มีการติดตั้งชุมชนทั่วประเทศ
Map
Satellite
Laos
Cambodia

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

การจัดการฐานข้อมูลด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตร โดยนำข้อมูลจากหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร มาออกแบบโครงสร้างระบบฐานข้อมูล จัดทำเว็บไซต์ ติดตั้งระบบบนโดเมน สร้างเว็บเพจและนำเข้าข้อมูล ทดสอบการใช้งาน และเปิดใช้งานจริง ในชื่อ microorganism.expertdoa.com ประกอบด้วยเว็บเพจที่สามารถนำเสนอข้อมูลจุลินทรีย์ที่สำคัญ ข้อมูลนักวิจัย และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมถึงจุลินทรีย์ทางด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดโรคได้ครบทุกมิติ สามารถเข้าถึงข้อมูลกิจกรรมต่างๆ Link สู่ Social media ที่เกี่ยวข้องเพื่อเพิ่มเส้นทางการสื่อสารอย่างต่อเนื่อง ผู้ใช้สามารถดาวน์โหลดเอกสารไปใช้งานได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ ผู้สนใจสามารถสืบค้นฐานข้อมูลจุลินทรีย์ทางการเกษตรเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ และสามารถเข้าถึงได้อย่างรวดเร็วในระบบอินเทอร์เน็ตที่เผยแพร่ทางเว็บไซต์ รวมทั้งนักวิจัย/เกษตรกร/ผู้สนใจ นำองค์ความรู้ทางวิชาการและเทคโนโลยีด้านจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ไปต่อยอดใช้ประโยชน์ได้

เอกสารอ้างอิง (References)

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2558. การผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืชแบบทำใช้เอง กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 32 หน้า.

กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2554. โรคผักและการป้องกันกำจัด. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.153 หน้า.

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1. ราปฏิปักษ์ แยกได้จาก 17 จังหวัด ไดแก่ บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครราชสีมา สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น นครสวรรค์ สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท จันทบุรี กำแพงเพชร เชียงใหม่ และเชียงราย จำนวน 950 ตัวอย่าง กำหนดรหัสตามชื่อจังหวัดและจำนวนที่แยกได้คือ BR1-BR5, SK1-SK5, UB1-UB8, KK1-KK6, NS1-NS3, SB1-SB8, NP1-NP7, RB1-RB5, KB1-KB6, CB1, CM1-CM3 และ CR1-CR2 จำแนกได้รา 5 สกุล คือ *Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Paecilomyces* และ *Fusarium* และพบว่ารา *Paecilomyces* และ *Fusarium* สามารถทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเท่ากับ 70.05 และ 19.80 % ตามลำดับ นำมาเชื้อรา *Paecilomyces* และ *Fusarium* เก็บรักษาในดินอบนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน พบว่าเชื้อรา *Paecilomyces* ยังสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนรา *Fusarium* ไม่เจริญเติบโตในเวลา 6 เดือนเท่ากัน เมื่อทำการทดสอบเพาะขยายราปฏิปักษ์ *Paecilomyces* sp. UB1 isolate ในเมล็ดธัญพืช 5 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวโพด ลูกเดือย ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเพาะเป็นเวลา 7 วัน พบว่ารา *Paecilomyces* sp. UB1 isolate สามารถเจริญได้ดีและผลิตสปอร์ได้ปริมาณมากในเมล็ดข้าวฟ่าง มีจำนวนสปอร์สูงที่สุดเท่ากับ 9.08×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเมล็ดข้าวโพด เท่ากับ 7.64×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ได้ระหว่าง 65-78 % จากการทดสอบประสิทธิภาพราปฏิปักษ์ (*Paecilomyces* sp.) ในการควบคุมโรครากปมพริกในระดับโรงเรือน พบว่าการใส่ราปฏิปักษ์ 2 3 และ 4 ครั้ง ช่วยลดการเกิดปม 50-75% ของระบบราก โดยมีดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 2.52 2.50 และ 2.33 ตามลำดับ (2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%) ในขณะที่การใส่ 1 ครั้ง และไม่ใส่ราปฏิปักษ์ มีดัชนีการเกิดปมที่รากพริกเท่ากับ 3.88 และ 4.79 (3 = เกิดปม 25-50 %; 4 = เกิดปม 50-75%) ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อตรวจนับจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยในดินปลูก มีจำนวนเท่ากับ 235 62 56 33 และ 825 ตัวต่อดิน 200 กรัม ของกรรมวิธีที่ 1-5 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทดสอบ โดยนำดินละลายน้ำและเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบเชื้อราปฏิปักษ์ในดินทุกกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำมาทดสอบศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าราปฏิปักษ์สามารถเข้าทำลายไข่ได้ 100 %

2. ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง แยกได้จากตัวอย่างดิน 18 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง กำแพงเพชร เพชรบูรณ์ นครปฐม ชัยนาท กาญจนบุรี อุทัยธานี อยุธยา ราชบุรี บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น ร้อยเอ็ด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี จำนวน 878 ตัวอย่าง ได้ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ใช้กำจัดแมลง จำนวน 42 ไอโซเลท จำแนกได้ 1 สกุล (*Steinernema* sp.) โดยวิธี cross mating กับ *S. siamkayai* และทำการเก็บรักษาในสารอุ้ม

ความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตามรหัสที่กำหนดเป็นอักษรย่อชื่อจังหวัด ดังนี้ ภาคเหนือ *Steinernema* sp. CM, PL, KP, PB ภาคกลาง *Steinernema* sp. NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ *Steinernema* sp. KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก *Steinernema* sp. PR, PJ และภาคตะวันออก *Steinernema* sp. CB จากการจำแนกโดยวิธีผสมข้ามพบว่าทุกไอโซเลท สามารถผสมพันธุ์กับ *S. siamkayai* ให้ลูกรุ่นใหม่ได้ ดังนั้นไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงที่แยกได้จากดิน 42 ไอโซเลท เป็นไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* จากการประเมินศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. จำนวน 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ CM, PL, KP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, BR, PR, PJ และ CB โดยวิธี Quadrant plate bio-assay พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. รหัส KP isolate เคลื่อนที่ในทิศทางเข้าหาหนอนเหยื่อล่อกับทิศทางตรงข้าม ที่เวลา 30 นาที มีค่าระยะทางเฉลี่ย (χ) สูงที่สุดเท่ากับ 51.93 รองลงมาคือ KB และ RE isolate เท่ากับ 48.88 และ 48.87 ในขณะที่ *S. siamkayai* KP strain สายพันธุ์เปรียบเทียบ เท่ากับ 55.82 ในขณะที่ผลการทดสอบ Migration in sand column bioassay พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 18 ไอโซเลท เคลื่อนที่ในแนวดิ่งเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อในดินลึก 5 นิ้ว และหนอนเหยื่อล่อตาย 100% ที่เวลา 24 ชม. เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* KP strain โดยไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KP, KB, RE และ UB isolate นำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ และกลุ่มหนอนด้วง พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 4 ไอโซเลท มีศักยภาพในการฆ่าแมลงทั้ง 2 กลุ่ม ตาย 38-100 % ในเวลา 48 ชม. เมื่อนำไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท และสายพันธุ์ KPs (control) มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำ เป็นเวลา 7 วัน และนำมานับจำนวนไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงได้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกับสายพันธุ์ KPs พบว่า ไส้เดือนฝอยไอโซเลท CM, PL, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, PR, BR, RJ และ CB ในอาหารสูตรไข่ผสมน้ำมันหมูและน้ำในอัตราส่วน 4 : 2 : 4 ให้ผลผลิต 7.9 8.2 9.2 11.2 7.6 10.8 12.8 13.2 13.8 15.5 8.2 11.8 17.2 5.8 10.5 9.2 และ 7.7 ล้านตัวต่อถุงเพาะ ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์ KPs ได้ผลผลิตเฉลี่ย 14.1-16.8 ล้านตัวต่อถุงเพาะ จากการเพาะขยายในอาหารสูตรดังกล่าว พบว่าไอโซเลทที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ RE เท่ากับ 17.2 ล้านตัวต่อน้ำหนักก้อนอาหาร 20 กรัม และสูงกว่า KPs (ไอโซเลทที่ใช้เปรียบเทียบ) ซึ่งไอโซเลท RE เก็บได้จากพื้นที่ จ.ร้อยเอ็ด รองลงคือ KK และ RB เท่ากับ 15.5 และ 13.8 ล้านตัวต่อน้ำหนักก้อนอาหาร 20 กรัม เป็นตัวอย่างดินจาก จ.ขอนแก่น และ จ.ราชบุรี

3. แบคทีเรียบีที จากผลการคัดแยกเชื้อเบื้องต้น จากตัวอย่างดินทั้งหมด 117 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าได้ผลของพีซีอาร์ขนาดแถบแบนเท่ากับ 1500 pb เมื่อส่งผลพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม NCBI พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 30 ไอโซเลท แล้วนำมาศึกษาการสร้างโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS

PAGE โดยใช้ NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel ของบริษัท NOVEX® by life technologise™ และใช้ protein molecular weight marker เป็น standard marker ซึ่งประกอบไปด้วยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 11, 17, 25, 35, 48, 63, 75, 100,135 และ 180 กิโลดาลตัน พบว่า BT ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน จากการศึกษาผลของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย ในระยะที่ 2 พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^8 มีผลทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตายเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 คือ 72 ชั่วโมง ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* เบื้องต้นนั้นจะแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ใช้นำมาทดสอบต้องเลี้ยง ให้เจริญจนถึงช่วง Free spore คือเป็นระยะที่สปอร์และผลึกโปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ เพื่อให้เชื้อมีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเกิดพิษกับแมลง นั่นคือผลึกโปรตีนพร้อมที่เปลี่ยนรูปเป็นสารพิษ เมื่อเข้าไปอยู่ในตัวแมลง การเก็บรักษา BT เพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในสภาวะต่างๆ นั้น ทำการเก็บรักษา 3 สภาวะ คือ 4 -20 และ -80 องศาเซลเซียส โดยมีจำนวนเชื้อทั้งหมด 57 isolate พบว่าประสิทธิภาพลดลงตั้งแต่ระยะเวลา 3 เดือน ในสภาพอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จึงควรหาเทคนิคการเก็บรักษาด้วยวิธีอื่นที่เหมาะสมต่อไป

4. การจัดการฐานข้อมูลด้านจุลินทรีย์ทางการเกษตร โดยนำข้อมูลจากหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร มาออกแบบโครงสร้างระบบฐานข้อมูล จัดทำเว็บไซต์ ติดตั้งระบบบนโดเมน สร้างเว็บเพจและนำเข้าข้อมูล ทดสอบการใช้งาน และเปิดใช้งานจริง ในชื่อ microorganism.expertdoa.com ประกอบด้วยเว็บเพจที่สามารถนำเสนอข้อมูลจุลินทรีย์ที่สำคัญ ข้อมูลนักวิจัย และการนำไปใช้ประโยชน์ รวมถึงจุลินทรีย์ทางด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดโรคได้ครบทุกมิติ สามารถเข้าถึงข้อมูลกิจกรรมต่างๆ Link สู่ Social media ที่เกี่ยวข้องเพื่อเพิ่มเส้นทางการสื่อสารอย่างต่อเนื่อง ผู้ใช้สามารถดาวน์โหลดเอกสารไปใช้งานได้ การนำไปใช้ประโยชน์ ผู้สนใจสามารถสืบค้นฐานข้อมูลจุลินทรีย์ทางการเกษตรเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ และสามารถเข้าถึงได้อย่างรวดเร็วในระบบอินเทอร์เน็ตที่เผยแพร่ทางเว็บไซต์ รวมทั้งนักวิจัย/เกษตรกร/ผู้สนใจ นำองค์ความรู้ทางวิชาการและเทคโนโลยีด้านจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ไปต่อยอดใช้ประโยชน์ได้

ข้อเสนอแนะ

งานด้านจุลินทรีย์นับเป็นงานวิจัยที่เกิดประโยชน์ต่อวงการเกษตร อุตสาหกรรม อาหารและยา มีผลกระทบทั้งในเชิงเศรษฐกิจ สังคม และชุมชน เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดได้มากมายทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังนั้น ควรมีการบูรณาการความร่วมมือระหว่างหน่วยงานวิจัยของสถาบันการศึกษาซึ่งทำงานเชิงลึกหรืองานวิจัยพื้นฐานจนถึงวิจัยประยุกต์ ร่วมมือกับหน่วยงานวิจัยภาครัฐ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และกระทรวงพลังงาน) และภาคเอกชน นำไปพัฒนาทดสอบในภาคสนามสู่การใช้ประโยชน์ได้จริงทั้งในเชิงสาธารณะและเชิงพาณิชย์