การผลิตขยายและการใช้แบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ไอโซเลตไทยในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*

Production and Application of Endemic *Pasteuria penetrans* Isolates for the Control of Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ รุ่งนภา ทองเครั่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง มันขี้หนู และพริก ในการเกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ระยะที่สอง ประชากรจาก จ. ตาก จ.จันทบุรี และ จ. ขอนแก่น และประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประชากรจาก จ. ตาก ดำเนินการในปีงบประมาณ 2559 พบว่า สปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง มันขี้หนู และพริก สามารถเกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ระยะที่สองประชากรจาก จ.ตาก ได้ดีที่สุด การทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประชากรจาก จ.ตาก ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ในกระถางทดลอง โดยการคลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรียอัตรา 3,000 10,000 และ 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม พบว่า แบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง อัตรา 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการลดประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในดิน และลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมบนรากมะเขือเทศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้พบว่าแบคทีเรีย *P. penetrans* ทุกไอโซเลต มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมประชากรจาก จ. ตาก ได้ในระยะยาว เนื่องจากสปอร์ของแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถเกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยในดินได้ 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อมีปริมาณสปอร์ในดินสูง นอกจากนี้แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตมีเปอร์เซ็นต์ในการเข้าทำลายและสร้างสปอร์ในตัวเต็มวัยเพศเมียสูงเช่นเดียวกัน

คำหลัก: ชีววิธี แบคทีเรียปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ การกำจัดศัตรูพืช โรครากปม

รหัสการทดลอง 03-05-59-02-02-00-05-59

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากปม (Root-knot nematodes: *Meloidogyne* spp.) มีพืชอาศัยมากกว่า 2,000 ชนิด แพร่ระบาดและทำลายพืชปลูกหลายชนิดในประเทศไทย เช่น พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ปทุมมา และฝรั่ง เป็นต้น โดยไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่สำคัญ คือ *M. incognita* และ *M. javanica* แนวทางการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม นอกจากการเขตกรรม และการใช้สารเคมีแล้ว การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมแบบชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้

แบคทีเรีย *P. penetrans* เป็นหนึ่งในศัตรูธรรมชาติที่มีการศึกษามาเป็นระยะเวลานาน และพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Gowen *et al.*, 2008) *Pasteuria* spp. เป็นแบคทีเรียปรสิต ที่สร้างเอ็นโดสปอร์ ติดสีแกรมบวก เป็นปรสิตที่ต้องเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพื่อการครบวงชีวิต (obligate parasite) การจำแนกชนิดของ *Pasteuria* spp. ปัจจุบันยังไม่ชัดเจนแต่มีการแบ่งออกอย่างคร่าวๆ เป็น 6 สปีชีส์ คือ *P. ramosa* เป็นปรสิตของ water flea (*Daphnia magna*) *P. thornei* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากแผล *Pratylenchus penetrans P. nishizawae* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Heterodera* spp. และ *Globodera* spp. *P. usage* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Belonolaimus longicaudatus P. hartismeri* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *M. ardensis* สำหรับ *P. penetrans* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. (Gowen *et al.*, 2008)

Chen and Dickson (1998) ได้รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับ *P. penetrans* ทั้งประวัติของแบคทีเรียชนิดนี้ รวมทั้งชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแบบชีววิธี *P. penetrans* เข้าทำลายไส้เดือนฝอย โดยสปอร์ที่อยู่ในดินจะเกาะติดกับผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอย เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากพืช และเริ่มชักนำเซลพืชเพื่อสร้างแหล่งอาหาร (feeding site) สปอร์ของ *P. penetrans* จะสร้าง germ tube แทงทะลุผ่านผนังลำตัวและพัฒนาเป็น dichotomous septate mycelium ในช่องว่างภายในลำตัวของไส้เดือนฝอย ต่อมา mycelium จะเข้าสู่ระยะ sporogenesis และสุดท้ายจะพัฒนาเป็น single sporangia ที่มี endospore อยู่ภายใน การสร้างสปอร์ของ *P. penetrans* ภายในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม จะทำลายการสร้างไข่ ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ และในระยะยาวจะทำให้ประชากรในดินลดลง ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง หากมีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะอยู่ที่ผนังลำตัวจำนวนมาก จะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการเข้าทำลายรากพืชลดลง (Sano and Gaspard, 1995; Adiko and Gowen, 1999)

มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมของ *P. penetrans* ในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริก ยาสูบ กระเจี๊ยบ องุ่น และข้าวสาลี เป็นต้น (Chen and Dickson, 1998) เอ็นโดสปอร์ของ *P. penetrans* สายพันธุ์ P20 จำนวน 10,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม สามารถควบคุมไส้เดือนฝอย *M. arenaria* race1 ในถั่วลิสงได้ (Chen *et al.*, 1996) สปอร์จำนวนน้อยของ *P. penetrans* ในดิน สามารถเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงระดับที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Chen *et al.*, 1996; Oostendrop *et al.*, 1991) ใน

การทดลองในกระถางพบว่า *P. penetrans* สามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 100 เท่า ภายใน 2-3 รอบของการปลูกพืช (Ali *et al*., 2005) ในแปลงปลูกยาสูบที่มีการระบาดอย่างรุนแรงของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* race1 และ *M. javanica* แต่ต่อมาพบว่ามีการระบาดลดลง เมื่อนำดินจากแปลงที่มีการระบาดลดลง (suppressive soil) มาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการพบว่า *P. penetrans* เป็นปัจจัยที่ทำให้การระบาดลดลง (Weibelzahl-Fulton *et al*., 1996) กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้รวบรวมและคัดเลือกแบคทีเรียชนิดนี้ในประเทศไทย เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากปมของพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้รวบรวมแบคทีเรียชนิดนี้จากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยได้หลายไอโซเลต (Khaithong *et al.,* 2012) และพบว่าบางไอโซเลตสามารถลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ (ไตรเดช และคณะ, 2558)

Stiring and Wachtel (1980) เสนอวิธีการผลิตสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* โดยใช้ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะบนผนังลำตัว จำนวน 5,000 ตัวต่อกระถางและแนะนำว่าสามารถปรับระดับของ inoculum เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตสปอร์ได้ Alves *et al*. (2008) ศึกษาปริมาณ inoculum และอายุของต้นมะเขือเทศที่เหมาะสมในการผลิตสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* พบว่าการใช้ต้นมะเขือเทศอายุ 30 และ 45 วันปลูกในกระถางความจุ 4 ลิตร และใส่ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะบนผนังลำตัว อัตรา 20,000 ตัวต่อกระถาง สามารถผลิตสปอร์ได้มากกว่าการใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน 5,000 ตัวต่อกระถางถึง 19 เท่า Rodrigues *et al*. (2003) ทดสอบพืช 4 ชนิดคือ มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) แตงกวาเจอร์กิ้น (*Cucumis anguria*) และโทงเทง (*Physalis angulata*) โดยการปลูกเชื้อด้วย *Meloidogyne* spp. พบว่ามะเขือเทศและโทงเทงเป็นพืชที่เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* มากที่สุด

โดยทั่วไปแบคทีเรีย *P. penetrans* จะมีความจำเพาะเจาะจงในการเข้าทำลายต่อไส้เดือนฝอยแต่ละสกุล Tzortzkakis *et al*. (1996) ทดสอบศักยภาพของ แบคทีเรีย *P. penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าการเกาะของสปอร์แบคทีเรียบนผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยรากปมมีความแปรปรวนที่เกิดจากความหลากหลายของ biotypes ของประชากรไส้เดือนฝอยรากปม ความสัมพันธ์ของอัตราการเกาะของสปอร์ กับความเข้มข้นของสปอร์ไม่เป็นลักษณะเชิงเส้นตรง (linear) ถึงแม้ว่าจะใช้สปอร์ที่ความเข้มข้นสูง ก็ไม่สามารถมั่นใจได้ว่าสปอร์จะเกาะและเข้าทำลายไส้เดือนฝอยทุกตัว นอกจากนี้ยังพบว่าการที่มีตัวอ่อนระยะที่สองที่มีสปอร์ของแบคทีเรียติดอยู่จำนวนมาก ไม่ได้ลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยได้มากขึ้นเสมอไป ทั้งนี้เป็นผลจากความแตกต่างของ biotypes ของไส้เดือนฝอยรากปม ตัวอ่อนระยะที่สองที่อาศัยอยู่ในดินหรือตัวอ่อนที่ใส่ลงในดินโดยการปลูกเชื้อ จะมีโอกาสสัมผัสกับสปอร์ของแบคทีเรียมากกว่าตัวอ่อนไส้เดือนฝอยที่ฟักออกจากกลุ่มไข่ที่อยู่ภายในหรือติดอยู่กับราก เนื่องจากตัวอ่อนที่ฟักออกมาจากกลุ่มไข่มีระยะทางในการเคลื่อนที่เข้าทำลายรากสั้นกว่า (Stirling, 1984) คุณสมบัติเหล่านี้จึงเป็นข้อจำกัดของการใช้แบคทีเรีย *P. penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม เนื่องจากไส้เดือนฝอยรากปมมีความหลากหลายของ

ชนิดและ biotypes ทำให้บางครั้งการใช้แบคทีเรีย *P. penetrans* เพียงอย่างเดียวในการควบคุมอาจไม่เพียงพอ (Tzortzakakis, *et al.*, 1997; Cetintas and Dickson, 2004) แบคทีเรีย *P. penetrans* สามารถลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยได้ แต่ไม่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้อย่างสมบูรณ์ (Darban *et al.*, 2005) เนื่องจากตัวอ่อนที่รอดจากการเข้าทำลายของแบคทีเรียยังคงสามารถเข้าทำลายรากและสร้างไข่ได้ในเวลาอันรวดเร็ว การใช้แบคทีเรีย *P. penetrans* ให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมจึงควรใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ (Tzortzakakis and Gowen, 1994) ซึ่งสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* นั้นสามารถใช้ร่วมกับสารป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอย (Daudi and Gowen, 1992) ร่วมกับอินทรียวัตถุชนิดต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (Chaudhary and Kaul, 2013) หรือร่วมกับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่นๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Frans *et al.*, 1992)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม

เลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมในรากมะเขือเทศในกระถาง โดยเริ่มจาก 1 กลุ่มไข่ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่บริสุทธิ์สำหรับการทดลอง ขยายเพิ่มปริมาณในรากมะเขือเทศพันธุ์สีดา แยกไข่ไส้เดือนฝอยจากรากโดยการตัดรากปมเป็นชิ้นขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และเขย่าใน 0.52 % Sodium Hypochlorite (คลอร็อก 10%) และเก็บไข่ไส้เดือนฝอยโดยการล้างผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่อง 25 ไมโครเมตร ด้วยน้ำสะอาด (Hussey and Barker, 1973) นำไข่ไส้เดือนฝอยใส่ลงบนตะแกรงไนลอนขนาดเล็กที่มีขนาดช่องประมาณ 25 ไมโครเมตร ซึ่งวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บตัวอ่อนระยะที่สอง ซึ่งฟักออกมาจากไข่และอยู่ในน้ำในจานเลี้ยงเชื้อไปใช้

การเตรียมสปอร์ของ *P. penetrans* เพื่อใช้ในการทดลอง

นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* ติดอยู่ที่ผนังลำตัวโดยวิธีปั่นเหวี่ยง (Hewlett and Dickson, 1994) ไปเลี้ยงในต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 30 วันที่ปลูกในดินอบฆ่าเชื้อ เก็บรากมะเขือเทศ 60 วันหลังใส่เชื้อ ล้างน้ำให้สะอาด แยกตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมที่ถูกเข้าทำลายใส่ในหลอด microcentrifuge tube ในน้ำกลั่น บดด้วยแท่งพลาสติก ปรับความเข้มข้นของสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น

การย้อมรากเพื่อตรวจนับกลุ่มไข่

ย้อมรากโดยการแช่รากในสาร Phloxine B ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 15 – 20 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด ตรวจนับจำนวนกลุ่มไข่บนรากด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (stereo microscope)

การตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายในราก จำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลาย และจำนวนสปอร์ภายในตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลาย

ย้อมรากด้วย acid fuchsin โดยแช่รากในสารละลาย chlorox 10% 4 นาที ล้างผ่านน้ำ 45 วินาที แล้วแช่น้ำทิ้งไว้ 15 นาทีเพื่อล้างคลอร็อกซ์ออกให้หมด นำรากใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำ 30-50 มิลลิลิตร ใส่สีย้อมราก acid fuchsin 1 มิลลิลิตร (เตรียมจาก acid fuchsin 3.5 กรัม + acetic acid 250 มิลลิลิตร + น้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร) ต้มรากเป็นเวลา 30 วินาที ในเตาไมโครเวฟจนเดือด ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำรากไปล้างน้ำให้สะอาด นำรากใส่ลงในบีกเกอร์ที่มี acidified glycerine 20-30 มิลลิลิตร นำไปต้มในเตาไมโครเวฟอีกครั้งจนเดือด ทิ้งไว้ให้เย็น ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายในรากโดยใช้เข็มเขี่ยแยกไส้เดือนฝอยออกจากราก และวัดเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกแบคทีเรีย *P. penetrans* เข้าทำลาย โดยสุ่มตัวเต็มวัยเพศเมียจำนวน 20 ตัว วางลงบนสไลด์แก้วปิดทับด้วยสไลด์แก้วอีกแผ่นแล้วตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (inverted microscope) ตรวจนับจำนวนสปอร์ภายในตัวเต็มวัยเพศเมีย โดยนำตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลายบดในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร ดูดใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำ 9.5 มิลลิลิตร เขย่าให้ทั่วโดยใช้เครื่องผสมสารนาน 30 วินาที ตรวจนับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

การแยกตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมจากตัวอย่างดิน

แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินโดยคลุกเคล้าตัวอย่างดินให้ทั่ว ชั่งน้ำหนัก และกวนในน้ำ 2 ลิตร กรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่าง และนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด

ทดสอบการเกาะของสปอร์แบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตต่างๆ บนผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* (2559)

วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD 3 x 3 จำนวน 5 ซ้ำ โดยมีปัจจัย A คือแบคทีเรีย *P. penetrans* 3 ไอโซเลต (A1, A2, A3) และปัจจัย B คือประชากรไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* 3 ประชากร (B1, B2, B3) โดยมีกรรมวิธีต่างๆ คือ

กรรมวิธีที่ 1 = A1B1 : *P. penetrans* (มันฝรั่ง) + *M. incognita* (จ.ตาก)

กรรมวิธีที่ 2 = A1B2 : *P. penetrans* (มันฝรั่ง) + *M. incognita* (จ. จันทบุรี)

กรรมวิธีที่ 3 = A1B3 : *P. penetrans* (มันฝรั่ง) + *M. incognita* (จ.ขอนแก่น)

กรรมวิธีที่ 4 = A2B1 : *P. penetrans* (มันขี้หนู) + *M. incognita* (จ.ตาก)

กรรมวิธีที่ 5 = A2B2 : *P. penetrans* (มันขี้หนู) + *M. incognita* (จ. จันทบุรี)

กรรมวิธีที่ 6 = A2B3 : *P. penetrans* (มันขี้หนู) + *M. incognita* (จ.ขอนแก่น)

กรรมวิธีที่ 7 = A3B1 : *P. penetrans* (พริก) + *M. incognita* (จ.ตาก)

กรรมวิธีที่ 8 = A3B2 : *P. penetrans* (พริก) + *M. incognita* (จ. จันทบุรี)

กรรมวิธีที่ 9 = A3B3 : *P. penetrans* (พริก) + *M. incognita* (จ.ขอนแก่น)

ทดสอบการเกาะของแบคทีเรีย *P. penetrans* 3 ไอโซเลตคือ ไอโซเลตจากมันฝรั่ง (PP122) มันขี้หนู (PP 720) และ พริก (PPR 70) กับประชากรไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จาก 3 แหล่งคือ มันฝรั่ง จ.ตาก พริกไทย จ. จันทบุรี และมะเขือเทศ จ.ขอนแก่น โดยใช้สปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* อัตรา 20,000 สปอร์/มิลลิลิตร นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง 300 ตัว ใส่ลงในเซลแขวนลอยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร บ่มที่ 28°C นาน 24 ชั่วโมง กรองผ่านตะแกรงขนาดช่อง 38 ไมโครเมตรเพื่อแยกสปอร์ออกจากไส้เดือนฝอย สุ่มตรวจนับการเกาะของสปอร์แบคทีเรียจากไส้เดือนฝอย 30 ตัว

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตต่างๆ ในการควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* (2559)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 กรรมวิธี 5 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีต่างๆ คือ

กรรมวิธีที่ 1 *P. penetrans* (มันฝรั่ง) อัตรา 3,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 *P. penetrans* (มันฝรั่ง) อัตรา 10,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม

กรรมวิธีที่ 3 *P. penetrans* (มันฝรั่ง) อัตรา 100,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม

กรรมวิธีที่ 4 *P. penetrans* (มันขี้หนู) อัตรา 3,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม

กรรมวิธีที่ 5 *P. penetrans* (มันขี้หนู) อัตรา 10,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม

กรรมวิธีที่ 6 *P. penetrans* (มันขี้หนู) อัตรา 100,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม

กรรมวิธีที่ 7 *P. penetrans* (พริก) อัตรา 3,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม

กรรมวิธีที่ 8 *P. penetrans* (พริก) อัตรา 10,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม

กรรมวิธีที่ 9 *P. penetrans* (พริก อัตรา 100,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม

กรรมวิธีที่ 10 ไม่คลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans*

ย้ายมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 4 สัปดาห์ปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว ที่ใส่ดินอบฆ่าเชื้อหนัก 200 กรัมที่คลุกด้วยผงสปอร์ของ *P. penetrans* ปริมาณตามกรรมวิธี ใส่ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 600 ตัว ลงในกระถาง โดยเจาะดินรอบต้นมะเขือเทศจำนวน 4 ช่อง ใช้ไปเปตหยอดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยที่อยู่ในน้ำลงในช่องแล้วกลบดินปิด ตรวจผลการทดลอง 60 วันหลังใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอย โดยวัดระดับการเกิดปมที่รากของมะเขือเทศด้วยการให้คะแนน ระดับ 0 = ไม่เกิดปม, 1 = เกิดปมเล็กน้อย (<10%), 2 =เกิดปม 11-25% ของระบบราก, 3 = เกิดปม 26-50% ของระบบราก, 4 = เกิดปม 51-75% ของระบบราก, 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก ตรวจนับจำนวนตัวอ่อนระยะที่สองในดินทั้งหมด และจำนวนตัวอ่อนระยะที่สองที่มีสปอร์เกาะ ตรวจนับจำนวนกลุ่มไข่ทั้งหมดบนราก ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายในรากและวัดเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมที่ถูก *P. penetrans* เข้าทำลาย

ทดสอบการผลิตขยาย *P. penetrans* ไอโซเลตไทยในมะเขือเทศ (2560)

ทดสอบการผลิตขยายสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตไทยในไส้เดือนฝอยรากปม โดยเลี้ยงในรากมะเขือเทศที่ปลูกในแก้วพลาสติก การปลูกมะเขือเทศในแก้วพลาสติกเป็นวิธีการที่ง่ายและประหยัดพื้นที่ แต่มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงคือความสัมพันธ์ของปริมาณรากมะเขือเทศและปริมาณไส้เดือนฝอย (inoculum) ที่เหมาะสม จึงจะสามารถผลิตสปอร์ได้ปริมาณมากที่สุด

ทดสอบจำนวนต้นต่อแก้วที่เหมาะสม โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกมะเขือเทศ 1 ต้นต่อแก้ว

กรรมวิธีที่ 2 ปลูกมะเขือเทศ 2 ต้นต่อแก้ว

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกมะเขือเทศ 3 ต้นต่อแก้ว

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกมะเขือเทศ 4 ต้นต่อแก้ว

เพาะเมล็ดมะเขือเทศในแก้วพลาสติกขนาดกว้าง 9 เซนติเมตร บรรจุวัสดุปลูกอบฆ่าเชื้อ (ดิน:ทราย อัตราส่วน 1:1) 500 กรัม ก้นแก้วเจาะรูร้อยเชือกสำหรับให้ความชื้นโดยแช่ปลายเชือกในกระบะพลาสติกที่บรรจุน้ำ เมื่อมะเขือเทศอายุ 7 สัปดาห์ ตรวจการเจริญเติบโตของรากถ่ายภาพ และชั่งน้ำหนักราก

ทดสอบความสามารถของรากมะเขือเทศในการรองรับปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมและการผลิตสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* โดยเลือกกรรมวิธีที่มีการเจริญเติบโตของรากดีที่สุดมาทดสอบความสามารถในการรองรับปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม และการผลิตสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* เพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสม วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอย 10,000 ตัว 1 ครั้ง

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยครั้งแรก 5,000 ตัว และใส่ซ้ำอีกครั้ง 5,000 ตัว หลังการใส่ครั้งแรก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยครั้งแรก 5,000 ตัว ใส่ครั้งที่สอง 5,000 ตัวหลังการใส่ครั้งแรก 7 วัน และใส่ครั้งที่สาม 5,000 ตัวหลังการใส่ครั้งแรก 14 วัน

เตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง แช่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยในเซลแขวนลอยของ *P. penetrans* จนตัวอ่อนมีสปอร์เกาะ 6-12 สปอร์/ตัว เริ่มนำตัวอ่อนที่มีสปอร์เกาะใส่ลงในมะเขือเทศ เมื่อมะเขือเทศอายุ 7 สัปดาห์ ตรวจผลการทดลอง 60 วันหลังใส่ไส้เดือนฝอยครั้งสุดท้าย ล้างรากมะเขือเทศให้สะอาด สุ่มตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยมาตรวจนับจำนวนสปอร์ ผึ่งรากให้แห้งสนิท บดรากให้ละเอียดและวัดปริมาณสปอร์ต่อรากบด 0.1 กรัม และคำนวณปริมาณสปอร์ที่ผลิตได้ทั้งหมด

ทดสอบความเข้ากันได้ของแบคทีเรีย *P. penetrans* กับสารสกัดจากสะเดา สารอะบาเมกติน และสารสารฟลูโอไฟแรม + ไตรฟลอกซี่สโตรบิน (2560)

ทดสอบความสามารถในการเกาะของสปอร์ *P. penetrans* หลังแช่ในสารเคมีชนิดต่างๆ วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สาร azadirachtin 0.1% SL

กรรมวิธีที่ 2 สาร สาร abamectin 1.8 % EC

กรรมวิธีที่ 3 สาร fluopyram + trifloxystrobin 25% + 25% W/V SC

กรรมวิธีที่ 4 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control)

ทำการทดลองซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ (Melki *et al.*, 1998) เตรียมสารเคมีแต่ละชนิดอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เตรียมเซลแขวนลอยของสปอร์ *P. penetrans* 25 มิลลิลิตร ซึ่งมีสปอร์อยู่ประมาณ 1 ล้านสปอร์ ผสมเซลแขวนลอยสปอร์กับสารเคมีเข้าด้วยกันตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง เทลงดินอบฆ่าเชื้อ 50 กรัม ซึ่งบรรจุอยู่ในกระบอก PVC ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร สูง 4 เซนติเมตร ซึ่งด้านล่างเป็นตะแกรงไนล่อนขนาดช่อง 1 มิลลิเมตร หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง จำนวน 1,000 ตัวลงในแต่ละกระบอก ปิดกระบอกด้วย plastic wrap ตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำกระบอกไปวางบนจานรองพลาสติกที่มีน้ำสะอาด สุ่มตัวอย่างไส้เดือนฝอยในน้ำ 30 ตัวไปตรวจนับปริมาณสปอร์ที่เกาะบนผนังลำตัว

ทดสอบผลของสารชนิดต่างๆ ต่อความสามารถในการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปม วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สาร azadirachtin 0.1% SL

กรรมวิธีที่ 2 สาร abamectin 1.8 % EC

กรรมวิธีที่ 3 สาร fluopyram + trifloxystrobin 25% + 25% W/V SC

กรรมวิธีที่ 4 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (Control)

เตรียมสารเคมีแต่ละชนิดความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร เตรียมเซลแขวนลอยของสปอร์ *P. penetrans* 500 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุสปอร์ประมาณ 1 ล้านสปอร์ ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารเคมีแต่ละชนิดลงในหลอด microcentrifuge 500 ไมโครลิตร กรรมวิธีควบคุมเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เขย่าให้ทั่วแล้วทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ล้างสปอร์แบคทีเรีย 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบนาน 1 นาที Inoculate สปอร์ลงในตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง โดยใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม 1,000 ตัวที่อยู่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 500 ไมโครลิตรลงในหลอด ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 9,500 รอบนาน 2 นาที นำไส้เดือนฝอยที่อยู่ในหลอดใส่ลงในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ไปใส่ลงในต้นมะเขือเทศอายุ 6 สัปดาห์ที่ปลูกในกระถางพลาสติกขนาด 3 นิ้ว บรรจุดินอบฆ่าเชื้อ 200 กรัม เมื่อครบ 60 วัน ตรวจนับจำนวนกลุ่มไข่ทั้งหมดบนราก ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายในรากและวัดเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย

รากปมที่ถูก *P. penetrans* เข้าทำลาย สุ่มตัวอย่างตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลายมานับปริมาณสปอร์

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แปลงข้อมูลจำนวนนับให้อยู่ในรูป log (x+1) ก่อนวิเคราะห์ข้อมูล

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2558 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเกาะของสปอร์แบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตต่างๆ บนผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

การทดสอบการเกาะผนังลำตัวตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง ของสปอร์แบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง มันขี้หนู และ พริก กับประชากรไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* 3 ประชากร คือ จ.ตาก จ.จันทบุรี และ จ.ขอนแก่น พบว่า แบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง มันขี้หนู และพริก สามารถเกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ระยะที่สองประชากรจาก จ.ตาก ได้ดีที่สุด โดยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง มันขี้หนู และ พริก สามารถเกาะผนังลำตัวของ *M. incognita* จ.ตาก เฉลี่ย 37.3 30.8 และ 9.4 สปอร์/ตัว ตามลำดับ แต่ต่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์บนผนังลำตัวของ *P. penetrans* ไอโซเลตพริก น้อยกว่าไอโซเลตมันฝรั่งและมันขี้หนูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต เกาะผนังลำตัวของ *M. incognita* ประชากร จ.จันทบุรี และ จ.ขอนแก่น ได้น้อยมาก และสปอร์ของ *P. penetrans* ไอโซเลตพริก ไม่เกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สอง *M. incognita* ประชากร จ.จันทบุรี ส่วนสปอร์ของ *P. penetrans* ไอโซเลตมันขี้หนู ไม่เกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สอง *M. incognita* ประชากร จ.ขอนแก่น

ประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตต่างๆ ในการควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง มันขี้หนู และพริก ที่ระดับปริมาณสปอร์ในดิน 3,000 10,000 และ 100,000 สปอร์/ดิน 1 กรัม ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประชากร จ.ตาก พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนตัวอ่อนระยะที่สองในดินลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อปริมาณสปอร์ในดินเพิ่มขึ้น โดยกรรมวิธีที่มีจำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยในดินน้อยที่สุดคือกรรมวิธีคลุกดินด้วยสปอร์แบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง อัตรา 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม มีจำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยในดิน 332 ตัว รองลงมาคือกรรมวิธีคลุกดินด้วยสปอร์แบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันขี้หนู อัตรา 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม มีจำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยในดิน 1,070 ตัว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่คลุกดินด้วยสปอร์

ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ซึ่งมีจำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยในดิน 5,024 ตัว จำนวนกลุ่มไข่ต่อราก ในกรรมวิธีคลุกดินด้วยสปอร์แบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง อัตรา 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม มีจำนวนน้อยที่สุดคือ 6 กลุ่มไข่ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งมีกลุ่มไข่ 56 กลุ่มไข่ต่อราก เปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนระยะที่สองในดินที่มีสปอร์เกาะ เพิ่มขึ้นในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* ทุกไอโซเลตในอัตราที่สูงขึ้น โดยเปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนระยะที่สองในดินที่มีสปอร์เกาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์แบคทีเรีย *P. penetrans* ทุกไอโซเลต อัตรา 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม เปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกแบคทีเรีย *P. penetrans* เข้าทำลายและมีสปอร์อยู่ภายในแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในบางกรรมวิธี กรรมวิธีที่มีเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลายสูงที่สุดคือ กรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง อัตรา 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม และกรรมวิธีที่มีเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลายต่ำที่สุดคือ กรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* ไอโซเลตมันขี้หนู อัตรา 3,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม ระดับการเกิดปมที่รากในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์แบคทีเรีย *P. penetrans* อัตรา 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม จะมีระดับการเกิดปมที่รากต่ำกว่า เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์แบคทีเรีย *P. penetrans* อัตราต่ำกว่า และกรรมวิธีที่ไม่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย

ทดสอบการผลิตขยาย *P. penetrans* ไอโซเลตไทยในมะเขือเทศ (2560)

การทดสอบจำนวนต้นมะเขือเทศที่เหมาะสมต่อแก้วพบว่า การปลูกมะเขือเทศ 4 ต้นต่อแก้วให้น้ำหนักรากต่อแก้วสูงที่สุด ขณะที่การปลูกมะเขือเทศ 1 ต้นต่อแก้วต้นมะเขือเทศมีความสูงมากที่สุด ความสูงของการปลูกพืช 2 3 และ 4 ต้นต่อแก้วไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) การใช้ต้นมะเขือเทศ 4 ต้นต่อแก้วอาจมีความเหมาะสมที่สุดในการเลี้ยง *P. penetrans* เมื่อทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *P. penetrans* โดยปลูกเชื้อ โดยตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองที่มีสปอร์เกาะผนังลำตัว ที่ปริมาณและจำนวนครั้งต่างๆ กัน พบว่าจำนวนสปอร์ที่ผลิตได้ต่อแก้วในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกันกับปริมาณสปอร์ในตัวเต็มวัยตัวเมียหนึ่งตัว ซึ่งสาเหตุที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอาจเนื่องจากข้อมูลมีความแปรปรวนสูง (ตารางที่ 4)

ทดสอบความเข้ากันได้ของแบคทีเรีย *P. penetrans* กับสารสกัดจากสะเดา สารอะบาเมกติน และสารสารฟลูโอไฟแรม + ไตรฟลอกซี่สโตรบิน (2560)

ในการทดลองการทดความสามารถในการเกาะของสปอร์ *P. penetrans* หลังแช่ในสารเคมีชนิดต่างๆ พบว่าไส้เดือนฝอยไม่เคลื่อนที่ลงมาในน้ำในจานรอง ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบปริมาณสปอร์บนตัวไส้เดือนฝอยได้ จึงต้องทำการทดลองใหม่ และอาจต้องแยกไส้เดือนฝอยรากปมออกจากดินโดยใช้สารละลายน้ำตาล ส่วนการทดลองผลของสารชนิดต่างๆ ต่อความสามารถในการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าการเข้าทำลายรากของไส้เดือนฝอยรากปม ในกรรมวิธีที่แช่สปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ในสารเคมีชนิดต่างๆ ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุมมาก ซึ่งอาจเกิดจากขั้นตอนการล้างสปอร์หลังจากแช่สารเคมีชนิดต่างๆ ไม่สะอาดเพียงพอ และอาจมีสารเคมีตกค้างอยู่กับสปอร์ ซึ่งถึงแม้ว่าอาจมีปริมาณที่ต่ำ แต่ก็มีผลต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมได้ จึงควรทำการ

ทดลองซ้ำและเพิ่มจำนวนครั้งในการล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นให้มากขึ้น เพื่อลดการปนเปื้อนของสารเคมี (ตารางที่ 5)

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* แต่ละโซเลตมีความสามารถในการเกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองแตกต่างกัน ทั้งในประชากรไส้เดือนฝอยเดียวกันและต่างประชากร ซึ่งสอดคล้องกับ Tzortzkakis *et al.* (1996) ที่ทดสอบศักยภาพของแบคทีเรีย *P. penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าการเกาะของสปอร์แบคทีเรียบนผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยรากปมมีความแปรปรวนที่เกิดจากความหลากหลายของ biotypes ของประชากรไส้เดือนฝอยรากปม ดังนั้นการนำแบคทีเรีย *P. penetrans* ไปใช้ในการควบคุมประชากรของไส้เดือนฝอยรากปม จำเป็นต้องตรวจสอบเบื้องต้นว่า แบคทีเรีย *P. penetrans* สามารถเกาะและเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปมประชากรนั้นๆ หรือไม่

การคลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* ไอโซเลต มันฝรั่ง มันขี้หนู และ พริก เพื่อควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จาก จ.ตาก สามารถลดปริมาณตัวอ่อนไส้เดือนฝอยในดินเมื่อสิ้นสุดการทดลอง การสร้างกลุ่มไข่บนรากในเกือบทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ยกเว้นกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง อัตรา 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้สปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตมันฝรั่ง มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการใช้ควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จาก จ.ตาก อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ไส้เดือนฝอยรากปมเพศเมียที่ถูกเข้าทำลายพบว่าไม่แตกต่างกันมากนักระหว่างแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตต่างๆ ซึ่งตัวเต็มวัยเพศเมียจะมีสปอร์ของแบคทีเรียอยู่ภายในและจะออกมาสู่ดินเมื่อตัวไส้เดือนฝอยย่อยสลาย สปอร์จะเกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและเข้าทำลายต่อไป ซึ่งในระยะยาวแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลตอื่นๆ อาจสามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จาก จ.ตาก ได้ดีเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจตัวอ่อนระยะที่สองในดินที่มีสปอร์เกาะ พบว่าตัวอ่อนระยะที่สองมีสปอร์เกาะ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ทุกไอโซเลตในอัตรา 100,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม จากผลการทดลองที่ได้ทำให้สามารถคาดได้ว่าแบคทีเรีย *P. penetrans* ทุกไอโซเลตจะสามารถควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จาก จ.ตาก ได้ในระยะยาว

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

แบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. penetrans* ไอโซเลตไทยจากหัวมันฝรั่ง มันขี้หนู และพริก มีความแตกต่างกันในการเกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมประชากรต่างๆ การนำสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไปใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมจึงจำเป็นต้องทดสอบว่าสปอร์ของ *P. penetrans* สามารถเกาะและเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปมประชากรนั้นๆ ได้หรือไม่

การทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. penetrans* ไอโซเลต มันฝรั่ง มันขี้หนู และพริก ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประชากรจาก จ.ตาก พบว่า ทุกไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ โดยเมื่อมีปริมาณสปอร์ในดินสูงขึ้นจะทำให้การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

Adiko, A. and S.R. Gowen. 1999. Effects of spores of *Pasteuria penetrans* on the motility of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. Russian Journal of Nematology 7:5–6.

Ali D.D., P.M. Ali, B.A. Ghaffar and M.S. Ahmed. 2005. The effect of different initial densities of nematode (*Meloidogyne javanica*) on the build-up of *Pasteuria penetrans* population. Journal of Zhejiang University SCIENCE 6B:113-118.

Chen, Z.X., D.W. Dickson, R. McSorley, D.J. Mitchell, and T.E. Hewlett. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology 28:159-168.

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิมังสา และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2558. *Pasteuria penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม. หน้า 193-200. ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 12 20-22 ตุลาคม 2558 ณ โรงแรมดุสิต ไอส์แลนด์ รีสอร์ท จังหวัดเชียงราย

Adiko, A. and S.R. Gowen. 1999. Effects of Spores of *Pasteuria penetrans* on the Motility of Second- stage Juveniles of *Meloidogyne incognita*. Russian Journal of Nematology 7:5–6.

Ali D.D., P.M. Ali, B.A. Ghaffar and M.S. Ahmed. 2005. The Effect of Different Initial Densities of Nematode (*Meloidogyne javanica*) on the Build-up of *Pasteuria penetrans* Population. Journal of Zhejiang University Science 6B:113-118.

Alves, F.R., L.G. de Freitas, P.R.P. Martinelli, S. Ferras and L.A. Maffia.2008. Influence of Inoculum Densities of *Meloidogyne* spp. and Host Plant Age on the Mass Production of *Pasteuria penetrans*. Nematologia Brasileira 32: 13-19.

Cetintas, R. and D. W. Dickson. 2004. Persistence and Suppressiveness of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria* Race 1. Journal of Nematology 36: 540-549.

Chaudhary K. K. and R. K. Kaul. 2013. Efficacy of *Pasteuria penetrans* and Various Oil Seed Cakes in Management of *Meloidogyne incognita* in Chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Agricultural Science and Technology 15: 617-626.

Chen, Z.X., D.W. Dickson, R. McSorley, D.J. Mitchell, and T.E. Hewlett. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by Soil Application of Endospores of *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology 28:159-168.

Chen, Z.X. and D.W. Dickson. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. Journal of Nematology 30:313-340.

Daudi, A.T. and S.R. Gowen. 1992. The Potential for Managing Root-knot Nematodes by Use of *Pasteuria penetrans* and Oxamyl Nematologia Mediterranea 20: 241-244.

Frans, A. A., M. De Leij, K. G. Davies and B. R. Kerry. 1992. The Use of *Verticillium chlamydosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr Alone and in Combination to Control Plant Parasitic Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* spp. Fundamental and Applied Nematology 15; 235-242.

Gowen, S, K.G. Davies and B. Pembroke. 2008. Potential Use of *Pasteuria* spp. in the Management of Plant Parasitic Nematodes. Pp. 205-219 in Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. Ciancio, A. and K.G. Mukerji, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Hewlett, T.E. and D.W. Dickson. 1993. A Centrifugation Method for Attaching Endospores of *Pasteuria* spp. to Nematodes. Supplement to Journal of Nematology 25(4S): 785-788.

Hussey, R. S., and K. R. Barker. 1973. A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp., Including a New Technique. Plant Disease Reporter 57:1025–1028.

Khaithong, T., M. Iemwimangsa, T. Sarapat, and P. Thammakijjawat. 2012. Collection of *Pasteuria penetrans* in Thailand. Page 133. In: The International Conference on Tropical and Sub- tropical Plant Diseases. Feb. 7-10, 2012. Chiang Mai, Thailand.

Melki, K.C., I.O. Giannakou, R. Pembroke and S.R. Gowen. 1998.The cumulative build-up of *Pasteuria penetrans* spores in root-knot nematode infested soil and the effect of soil applied fungicides on its infectivity. Fundamental and Applied Nematology 21: 679-683.

Oostendrop, M., D.W. Dickson and D.J. Mitchell. 1991. Population Development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 23:58-64.

Rodrigues, A.K., L.G. Freitas, A.A. Azevedo and S. FERRAZ. 2003. Development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne* spp. Parasitizing Different Host Plants. Fitopatologia Brasileira. 28: 267-272.

Sano, Z. and J.T. Gaspard. 1995. Differences in Mortality and Reproduction of *Meloidogyne incognita* Infected with Varied Amounts of *Pasteuria penetrans*. Japanese Journal of Nematology 25:129.

Stirling G.R. and M.F. Wachtel. 1980. Mass Production of *Bacillus penetrans* for the Biological Control of Root-knot Nematodes. Nematologica 26:308–312.

Stirling, G.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. Phytopathology 74: 55-60.

Tzortzakakis, E. A. and S.R. Gowen. 1994. Resistance of a Population of *Meloidogyne* spp. to Parasitism by the Obligate Parasite *Pasteuria penetrans*. Nematologica 40:258-266.

Tzortzakakis, E. A., A. G. D. R. Channer, S. R. Gowen and R. Ahmed. 1997. Studies on the Potential Use of *Pasteuria penetrans* as a Biocontrol Agent of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.). Plant Pathology 46:44–55.

Weibelzahl-Fulton, E., D.W. Dickson and E.B. Whitty. 1996. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in Field Soil. Journal of Nematology 28:43-49.

Table 1 Average number of spore attachment on 30 second stage juveniles of 3 *P. penetrans* isolates (potato, hausa potato, chili) on 3 population (Tak, Chantaburi, Khon Kaen) of *M. incognita*

P. penetrans isolates	*M. incognita* population†		
	Tak	Chantaburi	Khon Kaen
Potato	37.3 a	1.7 c	0.1 c
Hausa Potato	30.8 a	0.6 c	0 c
Chili	9.4 b	0 c	0.1 c

†Numbers in the same column with the same letter are not significantly different at 95% level by DMRT

Table 2 Average number of second stage juveniles (J2) in the soil, eggmasses number on root system, percentage of spore-encumbered J2, percentage of infected female, and root gall index

Treatment	Number of J2 in the soil †	Number of eggmasses on root system†	% spore - encumbered J2†	% infected female	Root gall index
1. Potato (3,000)	5,763 c	49 bc	25.0 d	68.8 ab	2.3
2. Potato (10,000)	4,078 c	61 bc	51.7 c	66.4 ab	2.4
3. Potato (100,000)	332 a	6 a	100.0 a	87.7 a	1.0
4. Hausa Potato (3,000)	5,660 c	51 bc	26.8 d	46.0 b	2.6
5. Hausa Potato (10,000)	2,286 bc	33 bc	44.4 c	59.3 ab	2.4
6. Hausa Potato (100,000)	1,070 ab	30 ab	100.0 a	72.0 ab	1.8
7. Chili (3,000)	9,727 c	52 bc	25.3 d	51.7 ab	2.7
8. Chili (10,000)	8,142 c	75 c	71.8 b	80.0 a	3.0
9. Chili (100,000)	3,456 bc	63 bc	100.0 a	84.0 a	2.2
10. Untreated (Control)	5,024 c	56 bc	0.0 e	0 c	2.8
F-test	**	**	**	**	
C.V. (%)	18.23	28.1	7.3	33.49	

† Numbers in the same column with the same letter are not significantly different at 95% level by DMRT

* = Significantly different at 95% level

** = Significantly different at 99% level

Table 3 Average plant height, plant weight, and root weight of tomatoes plants grown in a cup with different number of plants

Treatment	Height† (cm.)	Plant Weight (g)	Root Weight (g)
1 Plant	31.7 a	7.3	2.6 c
2 Plants	24.0 b	7.5	3.9 b
3 Plants	22.7 b	9.4	4.6 b
4 Plants	19.5 b	9.5	6.0 a
F-test	**	ns	**
C.V. (%)	65.29	73.29	31.69

† Numbers in the same column with the same letter are not significantly different at 95% level by DMRT

* = Significantly different at 95% level

** = Significantly different at 99% level

Table 4 Average number of *P. penetrans* spore produced per cup and average number of spore in single RKN female in different amount and time of inoculation

Treatment	Number of spore/cup (spore)	Number of spore in 1 RKN female (spore)
1. 10,000 juveniles 1 time	92,700,000	967,200
2. 5,000 juveniles 2 times	41,400,000	1,570,200
3. 5,000 juveniles 3 times	83,700,000	1,051,800

Table 5 Average numbers of eggmass per root and number of nematode per root of RKN second stage juvenile infected with *P. penetrans* spore previously soaked in different type of chemicals

Treatment	Number of eggmass per root	Number of nematodes in root	
		Mature female	Other stages
1. azadirachtin	2.6	19.8	12.4
2. abamectin	0	0.2	0
3. fluopyram + trifloxystrobin	2.4	27.2	24.4
4. Sterile water (Control)	28.2	105.8	41