ประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* ต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในพริก

Efficacy of Bioactive Compound from Luminescent Mushroom, *Neonothopanus nambi* on Root-Knot Nematode in Chilli

สุรีย์พร บัวอาจ[1/] นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด[1/] บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1/] วิลาวัณย์ ใคร่ครวญ[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

[2/]กลุ่มบริการวิชาการ สถาบันวิจัยพืชสวน

บทคัดย่อ

นำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* ไปใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ด้วยวิธีการประยุกต์ใช้ในรูปแบบของก้อนเชื้อในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โดยนำก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสงรองก้นหลุมก่อนปลูกพริก ในอัตรา 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อกระถาง จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดปมที่รากพริก ครบ 45 วัน หลังปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จำนวน 2,000 ไข่/กระถาง พบว่าทุกอัตราการใช้ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดี โดยเฉพาะที่อัตรา 10 กรัมต่อกระถาง สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากปมเพียง 12.40 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการใช้ก้อนเชื้อเห็ดรองลงมาที่อัตรา 20, 40, 30 และ 50 กรัมต่อกระถาง ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากปม 23.20, 25.40, 30.00 และ 30.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทุกอัตราการใช้ก้อนจากเชื้อเห็ดเรืองแสง มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่มีไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียว หรือการใช้สารเคมี carbofuran® ที่พบการเกิดปมสูงถึง 75.60 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากนั้นทดสอบอัตราการใช้ก้อนเชื้อจากเห็ดเรืองแสงในอัตราการที่ละเอียดขึ้นเพื่อได้ข้อมูลอัตราการใช้ก้อนเชื้อจากเห็ดเรืองแสงที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากที่สุด พบว่า ทุกอัตราการใช้ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อต้น สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดี โดยเฉพาะที่อัตรา 10 กรัมต่อกระถาง สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากปมเพียง 11.83 เปอร์เซ็นต์ รองลง คือ อัตรา 15, 20 และ 5 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ

รหัสการทดลอง 01-30-54-03-01-01-01-54

มีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากปม 12.25, 15.08 และ 23.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่มีไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียว ที่พบการเกิดปมสูงถึง 72.25 เปอร์เซ็นต์ และผลการเจริญเติบโตของพืชให้ผลสอดคล้องกัน ทั้งความสูงและน้ำหนักต้นสด พบว่าความสูงของพริก ที่อัตรา 10 กรัมต่อกระถาง มีผลทำให้พริกสูงมากที่สุด คือ 71.55 เซนติเมตร รองลงมา คืออัตราที่ 15, 20 และ 5 กรัมต่อกระถาง โดยมีความสูงเท่ากับ 63.63, 56.71 และ 49.71 ซม. ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่มีไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียว และกรรมวิธีที่ไม่มีการปลูกเชื้อใด ๆ ที่มีความสูงเพียง 43.36 และ 49.75 ซม. ตามลำดับ ส่วนผลของน้ำหนักต้นสด พบว่า ที่อัตรา 10 กรัมต่อกระถาง ทำให้พริกมีน้ำหนักต้นสดมากที่สุด คือ 113.48 กรัม รองลงมา คืออัตรา 15, 20 และ 5 กรัมต่อกระถาง โดยมีน้ำหนักสด 102.28, 63.98 และ 49.29 กรัม ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเทียบกับพริกที่มีไส้เดือนฝอยรากปมเพียงอย่างเดียว และกรรมวิธีที่ไม่มีการปลูกเชื้อใด ๆ ซึ่งให้น้ำหนักต้นสด 35.63 และ 33.48 กรัม ตามลำดับ

คำนำ

พริก (*Capsicum annumm* L.) เป็นพืชผักในวงศ์ Solanaceae ที่สามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ดีทั่วทุกภาคของประเทศไทย และยังปลูกได้ตลอดทั้งปี แหล่งปลูกพริกที่สำคัญอยู่ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งจังหวัดที่มีแหล่งปลูกพริกมาก ได้แก่ นครราชสีมา อุบลราชธานี ศรีสะเกษ ชัยภูมิ เชียงใหม่ นครสวรรค์ เพชรบูรณ์ เลย และกาญจนบุรี (ศศิธร, 2545) ในประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกพริกประมาณ 474,717 ไร่ ให้ผลผลิตประมาณ 333,672 ตัน มีการส่งออกทั้งในรูปผลสด และแปรรูป คิดเป็นมูลค่ากว่า 900 ล้านบาทต่อปี (วรรณภา และคณะ, 2550)

ปัญหาด้านโรคพืชที่สำคัญของพริก คือ โรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) ซึ่งส่งผลกระทบต่อพริกทั้งด้านปริมาณและคุณภาพเป็นอย่างมาก (ยุวดี และคณะ, 2550) การป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมมีหลายวิธี เช่น การไถพรวน การไขน้ำท่วม การปลูกพืชหมุนเวียน (จรัส และคณะ, 2534) การใช้อินทรียวัตถุ (อนันต์, 2525) การใช้พันธุ์ต้านทาน และการใช้สารเคมีเป็นต้น (นิรมิต, 2529) ซึ่งการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยโดยการใช้สารเคมีนั้น เป็นวิธีที่มีการลงทุนสูง และสารเคมีเหล่านี้เป็นอันตรายต่อผู้ใช้ที่ขาดความรู้และความระมัดระวัง ทำให้มีสารพิษตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และสภาพแวดล้อมได้ ดังนั้นการนำวิธีการอื่นที่ปลอดภัยและประหยัดค่าใช้จ่ายมาใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม จึงเป็นแนวทางที่ควรให้ความสำคัญ (Jatala, 1986) การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

ที่มีการศึกษาและนำมาใช้กันมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต และไม่ทำลายสภาพแวดล้อม มีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans*, เชื้อรา *Pochonia chlamydosporia, Arthobotrys dactyloides* และ *Paecilomyces lilacinus* (สืบศักดิ์, 2538; Jalata, 1985) แต่สำหรับการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา สามารถควบคุมได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีข้อจำกัด เช่น จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ หรือเพิ่มปริมาณได้น้อย ไม่พอที่จะนำไปใช้ควบคุมในพื้นที่กว้างๆ ไม่คงทนอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน และไม่สะดวกในการนำไปใช้ (กนกพรรณ, 2544)

ในต่างประเทศมีการศึกษาถึงการใช้ประโยชน์จากเห็ดเรืองแสงโดยนำสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ที่เป็นสาเหตุโรคพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจมากกว่า 3,000 ชนิด ทั้งในเขตหนาว และเขตร้อน (สืบศักดิ์, 2541) Sterner และคณะ (1997) รายงานว่าสาร secondary metabolite ที่ได้จาก culture filtrate โดยเลี้ยงเห็ด *Omphalotus olearius* ในอาหารเหลว yeast glucose malt (YMG) แล้วนำมาทดสอบกับไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) พบว่าสามารถยับยั้งไส้เดือนฝอยรากปมได้ จากการศึกษาพบว่าเห็ดเรืองแสงชนิดนี้จะสร้างสารพิษที่เรียกว่า omphalotin

Mayer และคณะ (1997) พบเห็ดเรืองแสง *O. olearius* ที่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycota เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YMG แล้วนำ culture filtrate ที่ได้มาทดสอบกับตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) พบว่า มีผลทำให้ J2 ตาย 90 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากใน culture filtrate มีสารพิษ omphalotin ซึ่งมีผลต่อระบบประสาทของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งสอดคล้องกับ Meyer และคณะ (2004) ที่รายงานว่าเชื้อราส่วนใหญ่สามารถผลิตสารที่มีผลต่อไส้เดือนฝอยรากปมที่เป็นสาเหตุโรคพืชได้ เช่น เชื้อรา *O. olearius* สามารถผลิตสาร omphalotin ซึ่งเป็นพิษต่อระบบประสาทของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*)

สุรีย์พร (2546) ได้ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการนำสารออกฤทธิ์จาก culture filtrate ของเห็ดเรืองแสง 2 ไอโซเลทที่พบในเขตโคกภูตากา ได้แก่ ไอโซเลท PW1 และไอโซเลท PW2 กับไอโซเลทที่พบในเขตมหาวิทยาลัยขอนแก่น (KKU) อีก 1 ไอโซเลท พบว่า culture filtrate ที่ระดับความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ตรวจผลที่ 48 ชั่วโมง หลังการทดสอบกับตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของไส้เดือนรากปม (*M. incognita*) พบว่าสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง ไอโซเลท PW2 มีผลต่ออัตราการตายของ J2 คิดเป็น 27.67 เปอร์เซ็นต์

สุรีย์พร (2550) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ PW1, PW2 และ KKU พบว่า การใช้ culture filtrates จากเห็ดเรืองแสง ไอโซเลท PW1 ปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อกระถาง สามารถลดจำนวนการเกิดปมที่รากได้ดีที่สุด คิดเป็น 81 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพโดยใช้เส้นใยจากก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสงควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศ พบว่า ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง ไอโซเลท PW2 ที่ผสมดินในอัตรา 30 กรัมต่อกระถาง มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือสามารถลดจำนวนการเกิดปมที่รากคิดเป็น 73 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงแนวทางการนำเอาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง (*N. nambi*) ไปใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธี

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ไอโซเลท PW2
2. ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*, Mi)
3. พริกพันธุ์หัวเรือ
4. อุปกรณ์ในการแยกไส้เดือนฝอย ได้แก่ ตะแกรง กรวย กล้องสเตอริโอ เป็นต้น
5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ฯลฯ
6. วัสดุในการเพาะเห็ด และโรงเรือนเพาะเห็ด
7. ดินปลูก และกระถางปลูกพริก
8. โรงเรือน และห้องบ่มก้อนเชื้อเห็ด

วิธีการ

1. แหล่งที่มาของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ทดสอบ

1.1 ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งได้จากแปลงปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในเขตพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกพริกที่สำคัญของประเทศไทย (รูปที่ 1)

รูปที่ 1 ลักษณะโรครากปมของพริกที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* เข้าทำลาย

1.2 เห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* ได้รับเชื้อเห็ดเรืองแสงจาก รศ.ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยใช้เชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi* ไอโซเลท PW2 (รูปที่ 2) ซึ่งแยกได้จากเห็ดเรืองแสงที่พบในเขตโคกภูตากา อำเภอเวียงเก่า จังหวัดขอนแก่น โดยเลี้ยงเชื้อเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) จากนั้นเก็บรักษาเชื้อเห็ดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

รูปที่ 2 ลักษณะเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi*; A: สภาพกลางวัน และ B: สภาพกลางคืน

ที่มา: Saksirirat และคณะ (2003)

2. การแยกและเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)

นำตัวอย่างพริกที่มีอาการรากปมมาตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปแบบรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมีย และเพิ่มปริมาณของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยนำเมล็ดพริกพันธุ์หัวเรือ มาแช่ใน

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 24 ชั่วโมง ไปเพาะลงกระบะเพาะขนาด 27 x 35 ตารางเซนติเมตร ที่บรรจุดินที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 เมล็ดต่อหลุม รดน้ำทุกเช้า เมื่อพืชอายุได้ 21 วัน ทำการถอนแยกให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม (ภาพที่ 3) หลังจากพืชตั้งตัวได้จึงใส่ปุ๋ยยูเรีย และรดน้ำทุกเช้าตามปกติ จนกระทั่งพริกมีอายุ 30 วัน ย้ายปลูกลง 1 ต้นต่อกระถาง ใส่ไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จำนวน 2,000 ฟองต่อกระถาง โดยใช้หลอดฉีดยาแบบพลาสติกขนาดเล็ก (5 มิลลิลิตร; มล.) ที่ปลอดเชื้อดูดไข่ไส้เดือนฝอยที่มีความเข้มข้นประมาณ 2,000 ไข่ต่อมล. ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อต้น (รูปที่ 4) รดน้ำและดูแลปกติ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

รูปที่ 3 ลักษณะต้นกล้าพริกพันธุ์หัวเรือ ที่ทำการถอนแยกให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม เมื่ออายุได้ 21 วัน

รูปที่ 4 การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* บนพริกพันธุ์หัวเรืออายุ 30 วัน หลังย้ายปลูก 1 ต้นต่อกระถาง โดยใส่ไข่ไส้เดือนฝอยรากปม จำนวน 2,000 ฟองต่อกระถาง ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อต้น

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในสภาพเรือนทดลอง

3.1 การเตรียมหัวเชื้อข้าวฟ่าง (ภาคผนวก) **โดย**นำขวดหัวเชื้อข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที ปล่อยให้เย็น จากนั้นนำเชื้อเห็ดเรืองแสงที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร เจาะตรงปลายเส้นใย แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อลงในขวดข้าวฟ่าง โดยให้ชิ้นวุ้นอยู่กึ่งกลางของขวดหัวเชื้อข้าวฟ่าง ลนปากขวด ปิดจุกสำลี หุ้มกระดาษ และรัดด้วยหนังยาง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เส้นใยเจริญเต็มขวดข้าวฟ่าง (รูปที่ 5)

รูปที่ 5 ลักษณะเส้นใยเชื้อเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* ที่เจริญบนขวดเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นเวลา 7 วัน

3.2 เตรียมก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง *N. nambi* (ภาคผนวก) คัดเลือกก้อนเชื้อขี้เลื่อยที่นึ่งฆ่าเชื้อ ที่ได้มาตรฐาน คือ ก้อนแน่น ไม่บวมหรือเบี้ยว และมีขนาดเท่าๆ กัน นำหัวเชื้อข้าวฟ่างที่เส้นใยเจริญเต็มขวด (ข้อ 3.2) เขย่าให้เมล็ดข้าวฟ่างร่วนออกจากกัน จากนั้นเทเมล็ดข้างฟ่างที่มีเชื้อเจริญเต็มขวด ประมาณ 15-20 เมล็ดลงบนก้อนเชื้อขี้เลื่อยที่นึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปเก็บในโรงบ่มเชื้อจนกว่าเส้นใยจะเดินเต็มก้อน จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป (รูปที่ 6)

รูปที่ 6 ลักษณะเส้นใยเชื้อเห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* ที่เจริญบนก้อนเชื้อขี้เลื่อย เป็นเวลา 45 วัน

3.3 เตรียมต้นพริก นำเมล็ดพริกพันธุ์หัวเรือ แช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเพาะลงกระบะเพาะขนาด 27 x 35 ตารางเซนติเมตร ที่บรรจุดินที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 เมล็ดต่อหลุม รดน้ำทุกเช้า เมื่อพืชอายุได้ 21 วัน ทำการถอนแยกให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม หลังจากพืชตั้งตัวได้แล้วจึงใส่ปุ๋ยยูเรีย และรดน้ำทุกเช้าตามปกติ จนกระทั่งพริกมีอายุ 30 วัน จึงนำมาใช้ในการทดลอง (รูปที่ 7)

รูปที่ 7 ลักษณะต้นกล้าพริกพันธุ์หัวเรือ อายุ 30 วัน สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในสภาพเรือนทดลอง

3.4 เตรียมไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยนำรากพริกที่เพิ่มปริมาณไว้ (ข้อ 2) ที่แสดงอาการรากปมและมีกลุ่มไข่สีน้ำตาลชัดเจน นำมาล้างให้สะอาด ตัดรากเป็นชิ้นสั้นๆ ขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร นำมาแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้แท่งแก้วกวนนาน 4 นาที เพื่อละลายสารที่ห่อหุ้มไข่ให้ไข่หลุดออกจากกัน (Barker, 1985) แล้วรินผ่านตะแกรงหยาบขนาด 32 เมช (mesh) เพื่อแยกเศษรากออกจากไข่ไส้เดือนฝอย ใช้สายยางฉีดน้ำไล่ไข่ที่อยู่บนตะแกรงลงในกะละมังพลาสติก เติมน้ำลงในกะละมังพลาสติกเกือบเต็มเพื่อเจือจางสาร

NaOCl ที่ตกค้างอยู่ จากนั้นเทผ่านตะแกรงละเอียดขนาด 500 เมช ใช้สายยางฉีดน้ำไล่ไข่ที่อยู่บนตะแกรงลงในกะละมังพลาสติกขนาดเล็กอีกครั้ง เติมน้ำลงในกะละมังพลาสติกเกือบเต็มแล้วเทผ่านตะแกรงละเอียดขนาด 500 เมช ทำเช่นนี้อีก 3 ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าไข่ไส้เดือนฝอยที่แยกได้ปราศจาก NaOCl และครั้งสุดท้ายเมื่อเทผ่านตะแกรงละเอียดขนาด 500 เมช ใช้สายยางฉีดน้ำไล่ไข่ที่อยู่บนตะแกรงลงในบีกเกอร์ จากนั้นนำไปคำนวณหาความหนาแน่นของปริมาณไข่ไส้เดือนฝอยต่อปริมาตรน้ำ 1 มิลลิลิตร โดยสุ่มจากบีกเกอร์ 3 ครั้งๆ ละ 5 มิลลิลิตร เทใส่ถาดนับซึ่งเป็นถาดพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด 6x6 ตารางเซนติเมตร ที่ก้นถาดขีดเป็นช่องสี่เหลี่ยมเล็กๆ ขนาดเท่ากันที่จำนวน 16 ช่อง นับไข่ไส้เดือนฝอยใต้กล้องสเตอริโอ แล้วคำนวณย้อนกลับว่าน้ำในบีกเกอร์มีไข่จำนวนเท่าใด ต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้ค่าเฉลี่ยจากการนับ 3 ครั้ง จากนั้นเตรียมไข่ไส้เดือนฝอยให้มีความเข้มข้นประมาณ 2,000 ไข่ต่อมิลลิลิตร (โดยคำนวณจากสมการในการเตรียมความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ $C_1V_1 = C_2V_2$ โดย C_1 คือ ความเข้มข้นที่มีอยู่ (ความเข้มข้นเริ่มต้น), V_1 คือ ปริมาณที่ต้องนำมาจากความเข้มข้นเริ่มต้น, C_2 คือ ความเข้มข้นใหม่ที่ต้องการและ V_2 คือ ปริมาณที่ต้องการเตรียม) เก็บไว้ในบีกเกอร์ และเขย่าทุกครั้งก่อนใช้ทดสอบ

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*)

โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) ประกอบด้วย 8 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ

กรรมวิธี 1 ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง 10 กรัม/หลุม+Mi 2,000 ฟอง/กระถาง

กรรมวิธี 2 ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง 20 กรัม/หลุม+Mi 2,000 ฟอง/กระถาง

กรรมวิธี 3 ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง 30 กรัม/หลุม+Mi 2,000 ฟอง/กระถาง

กรรมวิธี 4 ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง 40 กรัม/หลุม+Mi 2,000 ฟอง/กระถาง

กรรมวิธี 5 ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสง 50 กรัม/หลุม+Mi 2,000 ฟอง/กระถาง

กรรมวิธี 6 สารเคมี carbofuran® 3 กรัม/หลุม+Mi 2,000 ฟอง/กระถาง

กรรมวิธี 7 ใส่เฉพาะ Mi 2,000 ฟอง/กระถาง อย่างเดียว

กรรมวิธี 8 ไม่ใส่เชื้อ+ไม่ใส่ Mi

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u> นำก้อนเชื้อของเห็ดเรืองแสงที่มีเส้นใยเดินเต็มถุงมาขยี้ให้ก้อนเชื้อแยกออกจากกันแล้วคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นใส่ดินที่นึ่งฆ่าเชื้อลงในกระถางดิน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร แล้วรองก้นหลุมด้วยก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสงตามอัตราที่กำหนด คือ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัมต่อกระถาง แล้วนำต้นกล้าพริกพันธุ์หัวเรือ อายุ 30 วัน ที่เตรียมไว้ข้างต้น (ข้อ 3.3) จำนวน 1 ต้นต่อกระถาง จากนั้นใช้ micropipette ดูดไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร (มีความเข้มข้นของไข่ไส้เดือนฝอยประมาณ 2,000 ไข่ต่อมิลลิลิตร) รองก้นกระถางด้วยถาดรอง และดูแลรดน้ำตามปกติ (ภาพที่ 8)

การบันทึกข้อมูล เมื่อพริกอายุครบ 45 วัน วัดดรรชนีการเกิดปมที่รากตามวิธีของ Kinloch (1990) ซึ่งแบ่งเป็น 5 ระดับ ดังนี้ 0 ไม่มีปม, 1 มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย, 2 เกิดปมน้อยกว่า 25%, 3 เกิดปม 25-50%, 4 เกิดปม 50-75%, และ 5 เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก (รูปที่ 9)

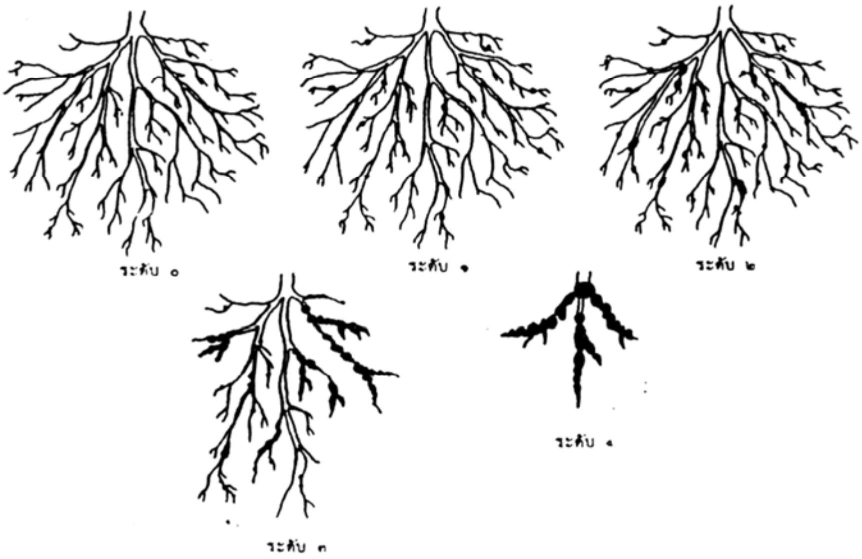
รูปที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในสภาพเรือนทดลอง

A: ลักษณะของเส้นใยก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสงที่ถูกขยี้ให้ก้อนเชื้อแยกออกจากกัน

B: ย้ายปลูกพริกพันธุ์หัวเรือ อายุ 30 วัน หลังรองก้นหลุมด้วยก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสงตามอัตราที่กำหนด คือ 10, 20, 30, 40 และ 50 กรัม

C: การใส่ไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยใช้ micropipette ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร

D: จัดเรียงกระถางตามแผนการทดลองแบบ RCB



รูปที่ 9 ไดอะแกรมเปรียบเทียบระดับการเกิดปม ซึ่งเกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ตั้งแต่ระดับ 0-4 โดยให้คะแนนระดับการเป็นโรครากปม ดังนี้ ระดับ 0 ต้นพืชไม่มีปมในระบบรากเลย, ระดับ 1 ต้นพืชมีปมที่ระบบราก 1-25% ของระบบราก, ระดับ 2 ต้นพืชมีปมที่ระบบราก 26-50% ของระบบราก, ระดับ 3 ต้นพืชมีปมที่ระบบราก 51-75 % ของระบบราก และระดับ 4 ต้นพืชมีปมที่ระบบราก 76-100% ของระบบรากหรือต้นแห้งตาย (4 เป็นระดับสูงสุด)

ที่มา: Kinloch (1990)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสง (*Neonothopanus nambi*) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในสภาพแปลงทดลองขนาดเล็ก

4.1 เตรียมแปลงปลูก โดยเตรียมแปลงขนาด 1 x 2.70 เมตร ระยะปลูก 50x40 เซนติเมตร จำนวน 6 แปลง (รูปที่ 10) จากนั้นปลูกถั่วเขียวแทนพริกสามเมล็ดต่อหลุม เมื่อถั่วเขียวอายุได้ 14 วัน ทำการถอนให้เหลือ สองต้นต่อหลุม จากนั้นใส่ไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จำนวน 2,000 ฟองต่อหลุม (ดังข้อ 3.4) จำนวน 5 แปลง (อีกหนึ่งแปลงไม่ใส่ไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เพื่อใช้สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบ) เมื่อถั่วเขียวอายุได้ 45 วัน ถั่วเขียวแสดงอาการรากปม จากนั้นตัดต้นถั่วเขียวทิ้ง โดยตัดห่างจากโคนต้นถั่วเขียวประมาณ 1 นิ้ว แล้วปรับสภาพดินเพื่อเตรียมการปลูกพริกเพื่อทดสอบอัตราการใช้ก้อนเชื้อจากเห็ดเรืองแสงในอัตราการที่ละเอียดขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลอัตราการใช้ก้อนเชื้อจากเห็ดเรืองแสงที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพมากที่สุดต่อไป (รูปที่ 11)