ห้องสมุดกรมพัฒนาที่ดิน

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดเลือกจุลินทรีย์ดินที่มีประสิทธิภาพควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืช

Effective selection of microbial against root knot nematode

โดย

นายพิสิฏฐ์ กิมยงค์

นางนวลจันทร์ ชะบา

นางจันจิรา แสงสีเหลือง

นางสาวพนิดา ปรีเปรมโมทย์

ทะเบียนวิจัยเลขที่ : 61 63 17 09 020001 005 105 01 23

กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการจัดการมลพิษทางดินและน้ำ

กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน

กรมพัฒนาที่ดิน

แบบ วจ.3

แบบรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทะเบียนวิจัย 61 63 17 09 020001 005 105 01 23

ชื่อโครงการวิจัย การคัดเลือกจุลินทรีย์ดินที่มีประสิทธิภาพควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืช

ผู้รับผิดชอบ นายพิสิฏฐ์ กิมยงค์ นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ

หน่วยงาน กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน

ผู้ร่วมดำเนินการ นางนวลจันทร์ ชะบา นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ

นางจันจิรา แสงสีเหลือง นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ

นางสาวพนิดา ปรีเปรมโมทย์ นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ

หน่วยงาน กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน

เริ่มต้น เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2561 สิ้นสุด เดือน กันยายน พ.ศ. 2563

รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 2 ปี

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ทางการเกษตร และโรงเรือนทดลอง กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานทั้งสิ้น

ปีงบประมาณ	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน	รวม
2562	-	150,000	150,000
2563	-	150,000	300,000

แหล่งงบประมาณที่ใช้ กรมพัฒนาที่ดิน

พร้อมนี้ได้แนบรายละเอียดประกอบตามแบบฟอร์มที่กำหนดมาด้วยแล้ว

ลงชื่อ .....

(นายพิสิฏฐ์ กิมยงค์)

ผู้รับผิดชอบโครงการ

ลงชื่อ .....

(.....)

ประธานกรรมการกลั่นกรองผลงานวิชาการของหน่วยงานต้นสังกัด

วันที่ .....เดือน.....พ.ศ. .....

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 61 63 17 09 020001 005 105 01 23

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) : การคัดเลือกจุลินทรีย์ดินที่มีประสิทธิภาพควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืช

(ภาษาอังกฤษ) : Effective selection of microbial against root knot nematode.

กลุ่มชุดดินที่ -

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ทางการเกษตร และโรงเรือนทดลอง
กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

ผู้ร่วมดำเนินการ

หัวหน้าโครงการ: นายพิสิฏฐ์ กิมยงค์ นักวิชาการเกษตร ปฏิบัติการ
กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

ผู้ร่วมดำเนินการ: นางนวลจันทร์ ชะบา นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ
นางจันจิรา แสงสีเหลือง นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ
นางสาวพนิดา ปรีเปรมโมทย์ นักวิชาการเกษตร ชำนาญการพิเศษ
กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

บทคัดย่อ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ดินที่มีประสิทธิภาพควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืชดำเนินการระหว่างปี 2552-2563 ณ ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ และโรงเรือนทดลอง กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ดินที่มีประสิทธิภาพควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืช พบว่า ตัวอย่างดินที่เก็บในภาคสนามในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา นครปฐม นครสวรรค์ เพชรบูรณ์ และเพชรบุรี สามารถแยกจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา 4 ไอโซเลต และแบคทีเรีย 101 ไอโซเลต นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้มาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนส พบว่า เชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสตอบสนองต่อการควบคุมโรครากปมได้ถึง 58 ไอโซเลต และส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสตอบสนองต่อการควบคุมโรครากปมได้เพียง 3 ไอโซเลต และมีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ไม่เกิน 60 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย 5 ไอโซเลต ซึ่งพิจารณาจากเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสมาจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยสกัดดีเอ็นเอ และนำส่งวิเคราะห์ลำดับเบส ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย และไม่เป็นเชื้อก่อโรค ได้แก่ NW7-A3, NW9-A1, NT4-2 และ NT2-2 และนำเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมไส้เดือนฝอย พบว่า ความสูงของต้นมะเขือเทศหลังปลูก 30 และ 37 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 6, 4, 3 และ 5 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด หลังปลูก 44 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาตำรับที่ 3, 6, 5 และ 4 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด และหลังปลูก 51 และ 58 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือตำรับที่ 5, 3, 6 และ 4 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด

หลักการและเหตุผล

เนื่องจากการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม Meloidogyne spp. พบในหลายพื้นที่และทำความเสียหายมากที่สุดในแทบทุกภาคของประเทศไทย(จรัส, 2525) มีผลเสียหายกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ซึ่งไส้เดือนฝอยรากปม M. incogina สามารถเข้าทำลายพืชต่างๆ ได้มากโดยเฉพาะพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล โดยไส้เดือนฝอยรากปมใช้พืชเป็นที่อยู่อาศัย(สืบศักดิ์, 2538)

โดยทั่วไปการระบาดของไส้เดือนฝอยรากฝอยสามรถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วถึงแม้จะมีประชากรในดินอยู่ในระดับต่ำ และหากเกิดการระบาดค่อนข้างรวดเร็วเนื่องจากไส้เดือนฝอยมีการสืบพันธุ์แบบ pathenogenesis ซึ่งไส้เดือนฝอยเพศเมียสร้างไข่สามารถฟักออกมาเป็นตัวโดยไม่ต้องได้รับการผสมจากเพศผู้ (สืบศักดิ์, 2541) สำหรับการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำและธาตุอาหารไปเลี้ยงยังส่วนต่างๆของพืชได้ โดยเฉพาะความรุนแรงของการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม มีผลทำให้ต้นพืชเกิดอาการเหี่ยวเฉา แคระเกร็น และผลผลิตลดลง ส่งผลกระทบต่อการผลิตพืชทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ

การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมจากการใช้วิธีชีววิธี(biological control) ซึ่งปัจจุบันมีการศึกษาคัดแยกจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นการควบคุมที่มีความปลอดภัยในการบริโภคอาหารและรักษาคุณภาพของผลผลิตจากพืชเศรษฐกิจในพื้นที่การปลูกมันฝรั่งของประเทศไทย

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกจุลินทรีย์ดินที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืช
2. ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมมะเขือเทศโดยผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในสภาพโรงเรือนกระจก

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) มีรูปร่างแตกต่างทั้งในเพศผู้และเพศเมีย โดยตัวอ่อนระยะที่ 2 ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีรูปร่างยาวเรียวดีคือประมาณ 380 – 450 ไมโครเมตร กว้าง 331 – 520 ไมโครเมตร (whitehead, 1968) spear แข็งแรงยาวประมาณ 10 – 17 ไมโครเมตร รังไข่มี 2 อันรูปร่างโค้งไปทางส่วนหัว ส่วนปลายของลำตัวมีลักษณะกลมมีช่องเปิดอวัยวะสืบพันธุ์และทวารหนัก ซึ่งมี rectal gland จำนวน 6 ต่อม ทำหน้าที่ผลิตสารเมือกออกมาปัดคลุมกลุ่มไข่เพื่อป้องกันอันตราย นองจากนี้บริเวณช่องเปิดอวัยวะสืบพันธุ์มีรอยย่นรอบๆ ช่องเปิดดังกล่าวรอยย่นนี้เรียกว่า perineal pattern ซึ่งใช้เป็นหลักสำคัญในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย ไส้เดือนฝอยเพศเมียฝังส่วนของลำตัวลึกในรากของพืช ส่วนของกลุ่มไข่ด้วยสารที่คล้ายเจลาติน กลุ่มไข่ของ M. *incognita* มีปริมาณไขจำนวน 250 – 525 ฟอง ไข่ที่อยู่ในกลุ่มไข่สามารถฟักออกเป็นตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่อนำกลุ่มไข่ไปแช่ในน้ำ นอกจากนั้นถ้าตัดเอากลุ่มไข่ออกมาแล้วนำไปเก็บไว้ที่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลา (0.3 M Nacl) นาน 30 เดือน เมื่อนำมาแช่ในน้ำอีกไข่สามารถฟักออกมาเป็นตัวได้ ไม่เฉพาะแต่น้ำ

เท่านั้นที่ทำให้ไข่สามารถฟักออกเป็นตัว สารซึมจากราก(root diffusate) สามารถกระตุ้นให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวได้มากกว่า 14 – 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับไข่ที่ฟักในน้ำ อย่างไรก็ตามความชื้นในดินมีส่วนทำให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนได้ดีกว่าสารซึมจากรากไส้เดือนฝอย M. incognita ไข่ฟักเป็นตัวอ่อนในดินที่มีความชื้นและมีสารสกัดจากพืชตระกูลถั่วมากกว่าในน้ำกลั่นธรรมดา (สืบศักดิ์, 2532)

ตัวเต็มวัยเพศผู้ มีรูปร่างเหมือนระยะตัวอ่อนคือ มีรูปร่างยาวเรียวประมาณ 1,108 – 1,953 ไมโครเมตร ผนังลำตัวใสมีรอยย่นเล็กน้อย spear ยาวประมาณ 20 – 24 ไมโครเมตร อัณฑะมีจำนวน 1 อัน ลักษณะสั้น โค้งมน และที่ปลายหางมี spicule ที่เห็นได้ชัดเจน ไส้เดือนฝอยรากปมเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง(invertebrate) ลำตัวกลมและเรียวยาว ไม่มีข้อปล้อง ขนาดเล็ก มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า (อนันต์, 2529) ไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะแตกต่างกันโดยเพศเมียมีรูปร่างอ้วนกลมคล้านขนมทองหยอด (saccate form) ฝังตัวอยู่ในรากพืช ส่วนเพศผู้มีลำตัวเรียวยาวรูปร่างคล้ายหนอนตัวกลม เคลื่อนที่เข้าออกรากพืชอย่างอิสระ (มัทนา, 2551)

วงจรชีวิต สืบศักดิ์ (2532) รายงานว่าวงจรชีวิตของรากปมมี 2 ระยะ คือ

1. ระยะหากินเป็นอิสระ ระยะนี้ไข่ของไส้เดือนฝอยอยู่ในกลุ่มไข่ซึ่งถูกหุ้มด้วยสารพวกเจลาติน เมื่อความชื้นในดินสูงทำให้ไส้เดือนฝอยรากปมฟักออกจากไข่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 เคลื่อนที่อยู่ระหว่างฟิล์มของน้ำผิวดิน

2. ระยะเป็นปรสิต ตัวอ่อนระยะที่ 2 เคลื่อนที่เข้าหารากพืชได้ด้วยสารที่ปลดปล่อยออกมาจากราก(root exudate) และคาร์บอนไดออกไซด์จากจุลินทรีย์ โดยไส้เดือนฝอยฝังตัวเฉพาะส่วนหัวอยู่บริเวณเซลล์ของรากต่อมาเจริญเป็นตัวเต็มวัยและวางไข่เพื่อขยายพันธุ์ต่อไป

ปัจจุบันในประเทศไทยมีรายงานวา พบไส้เดือนฝอยรากปม 8 ชนิด คือ M. incognita, M. javanica, M. graminicola, M. arenaria (จรัส และ อานนท, 2526) M. hapha (สืบศักดิ์ และคณะ, 2530) M. exigua (อรุณ, 2505) M. microcephala (Cliff and Hirschmann, 1984) และM. naasi (ประชา, 2515) ที่ระบาดมากที่สุดในประเทศไทยคือ M. incognita มีทั้งในพืชผัก ไมดอกไมประดับ พืชไร ไมผล และในวัชพืชหลายประเภท (สืบศักดิ์, 2532)

ลักษณะอาการของพืชที่เกิดจากการทำลายฝอยรากปม

เซลล์บริเวณรากพืชถูกทำลายโดยตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมด้วยการใช้หลอดอาหาร(stylet) ดูดน้ำและอาหารจากเซลล์ดังกล่าว จากนั้นแบ่งตัวผิดปกติ ขยายรวมกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่เรียกว่า เซลล์ยักษ์(giant cell) ส่งผลให้รากบวมเป็นปุ่มปม ปิดท่อลำเลียงน้ำและอาหารจากรากส่งไปยังลำต้นส่วนบนทำให้ต้นพืชหยุดการเจริญเติบโต ในฝรั่งหยุดการเจริญเติบโต ทำให้ต้นโทรม (slow deline) ใบเปลี่ยนสีคล้ายอาการขาดธาตุอาหารออกดอกติผลน้อย และผลมีขนาดเล็กไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ การเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยยังส่งเสริมให้เกิดภาวะโรคร่วม (disease complex) จากเชื้อรา *Fuarium oxysporum* และ *Phythium* sp. ทำให้ความสูญเสียของโรครุนแรงมากขึ้น (สมชาย, 2549)

การระบาดในพืชทำให้ต้นจะแคระแกรนและเหี่ยวในเวลาแดดจัดเนื่องจากเกิดเป็นปม ทำให้การเคลื่อนที่ของน้ำและแร่ธาตุไม่สะดวก ในมันฝรั่งขนาดของหัวเล็กลงที่สำคัญคือบริเวณรอบๆ หัว จะ

เกิดอาการที่เรียกว่า ผิวหูด หรือผิวคางคก เพราะมีไส้เดือนฝอยรากปมฝังตัวอยู่ ถ้านำไปทำพันธุ์ หรือปล่อยไว้ในแปลง ก็จะแพร่สู่ดินอีก ถ้านำไปทอดเป็นมันฝรั่งทอดกรอบ(potato chips) บริเวณขอบขงแผ่นมันฝรั่งก็จะขาดแหว่งหรือเป็นสีดำไม่รับซื้อ ซึ่งประเทศไทยระบาดมากในพื้นที่จังหวัดตาก

การควบคุมโดยชีววิธี ซึ่งมีจุลินทรีย์ในดินหลายชนิด ซึ่งการควบคุมโดยแบคทีเรียที่มีการศึกษากันมากไดแก Pasteuria penetrans เปนแบคทีเรียประเภท obligate parasite ที่เฉพาะเจาะจงกับไส้เดือนฝอย การทำลายไส้เดือนฝอย (Sasser, 1989) โดยสปอรที่สัมผัสสวน cuticle ของไส้เดือนฝอยสปอรงอกเขาไปภายในเวลาประมาณ 8 วัน หลังจากที่ตัวอ่อนเข้าไปในรากพืชเส่นใยแทงผาน cuticle เขาไปเจริญในชองวางของลำตัวไส้เดือนฝอยและสร้าง endospore อยูภายใน เมื่อไส้เดือนฝอยตายเซลลถูกยอยสลายสปอรของแบคทีเรียจึงออกมาปะปนอยู่ในดินและเข่าทำลายตัวออนที่อยูบริเวณรอบๆ ตอไปแบคทีเรียทำใหระบบการทำงานของไสเดือนฝอยเสื่อม ไมสามารถเจริญเติบโตเปนตัวแก่หรือสามารถเจริญเปนตัวเต็มวัย และขยายพันธุ์ได้นอย

การควบคุมโดยเชื้อราที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยที่เป็นสาเหตุของโรค ซึ่งมีมากกว่า 400 ชนิด 15 สกุล สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้ (สืบศักดิ์. 2553) แบ่งออกเป็น

1. เชื้อราที่เข้าทำลายไส้เดือนฝอยโดยตรง เช่น *Nematophthora gynophila* ทำลาย *Globodera rostochiensis*, *Heterodera avenae* ได้

2. เชื้อราที่เข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอย เช่น *Verticillium chlamydosporium* ทำลาย *M. incognita* และ *M. javanica* เชื้อรา *Paecilomyces* sp. ทำลาย *M. incognita* เชื้อรา *P. nostocoides* ทำลาย M. incognita และเชื้อรา *Maria conispora* ทำลายไส้เดือนฝอยรากปมหลายชนิด

3. เชื้อราที่สร้างห่วงหรือกับดักที่เป็นกาวเหนียวและดูดกินตัวไส้เดือนฝอย ได้แก่ เชื้อราในสกุล *Arthrobotrys dactyloides*, *A. irregularis, A. conodes*

เชื้อราที่สำคัญและมีแนวโน้มว่าจะสามารถใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยได้ดี ได้แก่ *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Catenaria* sp., *Cylindrocarpon* sp., *Exophiala* sp., *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp., *Hirsutella* sp., *Humicola* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., และ *Pythium* sp.

นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้เชื้อราชนิดใหม่ๆ เช่น Thomas *et al*.(1989) ทดลองใช้เชื้อรา mycorrhiza 6 ชนิด ควบคุม *M. incognita* ในการปลูกต้นกระวาน พบว่า *Gigaspora margarita* และ *Glomus fasciculatum* เป็น mycorrhiza ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการประชากร *M. incognita* ส่วนเชื้อราที่ได้รับความสนใจมากในการใช้เป็น parasite ของไส้เดือนฝอยคือ *V. chlamydosporium* และ *Paecilomyces* sp. (Sasser, 1989) เชื้อราทั้งสองชนิดเป็น non obligate parasite ของตัวเมีย ไขของ Cyst และ root – knot nematode ซึ่ง *Paecilomyces* sp. โดยพบว่า เชื้อราชนิดนี้สามารถลดประชากรของ root – knot nematode(*Meloidogyne* sp.) และได้ทดสอบในแปลงมันฝรั่งและได้ผลดี จึงมีการทดลองกันอย่างกว้างขวางในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ (P. Javala, 1980) ในประเทศไทยได้มีการนำเชื้อราหลายชนิดมาควบคุมไส้เดือนฝอย แต่ที่มีประสิทธิภาพในการทำลาย

ไส้เดือนฝอยได้ดีคือ เชื้อรา *Paecilomyces* sp. คมกฤช(2539) ได้ทดสอบนำเชื้อรา *Paecilomyces* sp. แต่ละสายพันธุ์มาทดสอบพบว่า เชื้อรา *Paecilomyces* sp. ทุกสายพันธุ์มีแนวโน้มในการเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดี สุภกิจ(2532) ทดลองใช้เชื้อรา P. *liacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่เข้าทำลายผักกาดหอมในกระถางสภาพโรงเรือนด้วยเชื้อรา อัตรา 2 4 6 และ 8 กรัมต่อต้นต่อกระถาง พบว่า ความสูง น้ำหนัก ต้นสด น้ำหนักรากสด และอัตราการเกิดปมมีความแตกต่างกันทางสถิติ มนตรี(2538) ทดลองใช้เชื้อรา P. *liacinus* ควบคุมโรครากปมในแง่งขิงที่เกิดจาก *M. incognita* พบว่า ช่วยลอความเสียหายของผลผลิตขิงได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้สาร oxamyl อัตรา 48 มิลลิกรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ทำให้ผลผลิตขิงเสียหายเพียง 7 – 10 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับการปลูกขิงที่เป็นโรคแง่งหูดซึ่งไม่มีการปฏิบัติใดๆ ทำให้ผลผลิตลอลง 33.09 เปอร์เซ็นต์ ทรงศักดิ์ (2540) นำเชื้อรา *P. lilacinus* ร่วมกับ *T. harzianum* เพื่อควบคุมโรครากปมของผักกาดหอมที่เกิดจาก M. incognita ในสภาพเรือนทดลอง พบว่า เกิดปมน้อยที่สุด อนุชา(2537) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงในการเข้าทำลายกับ enzyme activity ของเชื้อรา P. lilacinus 5 สายพันธุ์ พบว่า ความรุนแรงในการเข้าทำลายมีความสัมพันธุกับ enzyme activity โดยเชื้อราสามรถสร้างเอนไซม์ chitinase เพื่อทำลายไส้เดือนฝอยได้

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

ระยะเวลาทำการวิจัย เดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - เดือนกันยายน พ.ศ. 2563

สถานที่ทำการทดลอง กองเทคโนโลยีชีวภาพทางดิน กรมพัฒนาที่ดิน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างดิน เช่น พลั่วมือ ถุงพลาสติก ถังน้ำแข็ง เป็นต้น
2. สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์ทางด้านจุลชีววิทยา ได้แก่ สารเคมีในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง จานเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น
3. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง
4. เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ
5. ปุ๋ยเคมี
6. อุปกรณ์สำหรับการศึกษาในสภาพโรงเรือนทดลอง เช่น กระถาง ดินเพาะเมล็ด ดินปลูก

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินในบริเวณรากพืชชนิดต่างๆ ในพื้นที่การเกษตรทั่วประเทศ โดยเก็บทั้งดินและรากใส่ในถุงพลาสติกรัดให้แน่นเก็บไว้ในกล่องเย็น และนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

ห้องสมุดกรมพัฒนาที่ดิน

1) การแยกจุลินทรีย์

ทำการแยกจุลินทรีย์ดิน โดยแยกเป็นแบคทีเรียและรา ใช้วิธี Spread plate ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อมาเจือจางให้มีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม (10^{-3}-10^{-5}) แล้ว Spread ลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน และ subculture จนได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บรักษาเพื่อศึกษาขั้นตอนต่อไป

2) การทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนส

2.1) นำเชื้อบริสุทธิ์มาทดสอบโดยใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ที่คัดแยกได้มาแตะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar และ Chitin selective agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C และ 45°C เป็นเวลา 3-7 วัน สังเกตวงใส (clear zone) ที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารและ วัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (Ø) ของวงใส คัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.2) การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์โปรทีเอส และไคติเนส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ protease โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อ จากข้อ 1. ปริมาณ 1 มล. ใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 1 มล. ทุก ๆ หลอดเติมสารละลายเคซีน (casein) เข้มข้น 1 % ใน 0.1 molar photphate buffer pH 7.0 จำนวน 1 มล. เขย่าให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิ 37 ℃ เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา นาน 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น 10 % จำนวน 3 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 37 ℃ นาน 20 นาที ดูดส่วนใสไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 0.5 มล. มาเติม 0.4 molar Na_2CO_3 จำนวน 2.5 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 1 Folin Ci°Calteu reagent จำนวน 0.5 มล. ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 ℃ นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 nm ดัดแปลงตามวิธีของ Yang และ Wang (1999) ค่าดูดกลืนแสงที่ได้นำไปอ่านค่าเพื่อแปลงเป็นปริมาณกรดอะมิโน ที่ถูกย่อยออกจาก casein นำค่าไปคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน (tyrosine equivalent) ที่ถูกย่อยออกจากเคซีน กิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (specific activity) 1 หน่วย (unit) ประเมินจากปริมาณกรดอะมิโน (tyrosine equivalent) 1 umol ที่ถูกย่อยจากเคซีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนใน 1 ชั่วโมงใน reaction mixture

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ไคติเนส นำน้ำเลี้ยงเชื้อ จากข้อ 1. จำนวน 0.1 มล. บ่มร่วมกับสารละลาย colloidal chitin 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 molar acetate buffer pH 5.0 จำนวน 0.9 มล. ที่อุณหภูมิ 37 ℃ นาน 1 ชม. (ดัดแปลงจาก Saksirirat and Hoppe, 1991) ปริมาตร 0.1 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วย Vortex mixer หยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดไปต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi (1952) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ 1 หน่วย (unit) ประเมินจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (N-acetylglucosamine equivalent) คิดเป็น 1 umol ที่ถูกย่อยออกจาก colloidal chitin ใน 1 ชม./มก.โปรตีนใน reaction mixtu โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ N-acetylglucosamine

3) การทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

การทดสอบกิจกรรมการควบคุมไส้เดือนฝอย โดยวิธี bioassay นำไส้เดือนฝอยจำนวน 200 ตัว ใส่ลงในส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อ 300 ul ใส่ลง 1.5 ml Eppendorf tube และใส่ สารปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ anpicillin 50 ug/mlและ kanamycin 30 ug/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-10 ชั่วโมง นำไปนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ตายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และมี น้ำเปล่าเป็นตำรับควบคุม

3. การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย 5 ไอโซเลท มาจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลวข้ามคืนปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่หลอด microcentrifuge tube นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม Nuclei lysis solution 600 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติม RNase solution 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 15-60 นาที เติม Protein precipitation solution 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มบนน้ำแข็งนาน 5 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดส่วนใส ใส่หลอดใหม่เติม isopropanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ดูดส่วนใสทิ้งล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Rehydration solution 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Wizard Genomic DNA Purification Kit)

ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตรประกอบด้วยดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร , 0.25 mM dNTPs (dATP,dCTP,dTTP,dGTP) 0.40 ไมโครลิตร, 1X buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 μM universal primer 16S rDNA (16S 9f: GAG TTT GAT CCT GGC TCA G และ16S 1512 r: ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT) และ 2.5 unit Taq DNA Polymerase ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส 1 วินาที annealing 55 องศาเซลเซียส 2 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle ผลผลิต PCR ที่ได้ 5 ไมโครลิตร นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1.0% agarose gel ใน 1X TAE buffer และผลผลิต PCR อีกส่วนนำส่งวิเคราะห์ลำดับเบส

4. การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมมะเขือเทศในสภาพโรงเรือนทดลอง

1) การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 6 ตำรับทดลอง จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้

ตำรับที่ 1 ควบคุม (ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยรากปม และจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม)

ตำรับที่ 2 ใส่ไส้เดือยฝอยรากปม (ไม่ใส่จุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม)

ตำรับที่ 3 ใส่สารเคมีควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

ตำรับที่ 4 ใส่แบคทีเรียควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม isolate ที่ 1 (NW7-A3)

ตำรับที่ 5 ใส่แบคทีเรียควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม isolate ที่ 2 (NW9-A1)

ตำรับที่ 6 ใส่แบคทีเรียควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม isolate ที่ 3 (NT2-2)

2) การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอย นำรากปมมะเขือเทศจากต้นอายุ 60-90 วัน มาล้างด้วยน้ำให้สะอาด จากนั้นตัดให้มีขนาด 3-5 ซม. แช่ในสารละลายคลอร็อก 20% (sodium hypochlorite 1.0%) นำไปกวนด้วยเครื่องกวนราก 4 นาที เพื่อแยกไข่ออกจากราก แล้วรินผ่านตระแกรงหยาบ 32 เมช ฉีดน้ำไล่ไข่ที่อยู่บนตระแกรงลงในกะละมัง เติมน้ำลงในกะละมังเพื่อเจือจางคลอร็อก จากนั้นเทผ่านตระแกรง 500 เมช ฉีดน้ำไล่ไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่อยู่บนตระแกรงลงในกะละมังอีกครั้ง ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง ในครั้งสุดท้ายฉีดน้ำไล่ไข่ที่อยู่บนตระแกรงลงในบีกเกอร์ สุ่มตรวจนับความหนาแน่นของไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่แขวนลอยในน้ำ โดยสุ่มจากบีกเกอร์ครั้งละ 5 มล. เทใส่ถาดนับพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด 6x6 ซม. ซึ่งมีขีดเป็นช่องสี่เหลี่ยมเล็กๆ ขนาดเท่ากันที่ก้นถาด ตรวจนับภายใต้กล้องสเตอริโอ ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วคำนวณปรับความหนาแน่นของไข่ให้ได้ความหนาแน่นประมาณ 1,000 ไข่ในน้ำ 1 มล.

3) การเตรียมต้นกล้ามะเขือเทศ นำเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ลูกท้อ มาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิว ตามวิธีการของ Mohammmed et al. (2008) จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะในถาดเพาะขนาด 28x54 ซม. (50 หลุม) ใช้พีทมอสที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นวัสดุเพาะ รดน้ำวันละ 1 ครั้ง จนมะเขือเทศอายุได้ 3 สัปดาห์ จึงนำมาทดลอง

4) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วนำไป centrifuge นำเชื้อที่ตกตะกอนไผสมน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อนำไปทดสอบ โดยใช้เชื้อ ที่มีปริมาณเท่ากัน 10^{7} -10^{9} CFU/ml

5) การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม นำตัวอย่างดินที่เก็บจากแหล่งที่พบการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม ผสมกับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:1 นำไปใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 ซม.ปลูกต้นมะเขือเทศอายุ 30 วันลงในกระถางดูแลรักษาต้นมะเขือเทศโดยรดนำวันละ 1 ครั้งและให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุก 2 สัปดาห์ เมื่อมะเขือเทศอายุครบ 60 วัน ทำการถอนต้นมะเขือเทศแล้วล้างราก ตรวจสอบรากปมที่ต้นมะเขือเทศ และนำไปคัดแยกไส้เดือนฝอยรากปม รวมถึงไข่ไส้เดือนฝอยรากปม นำมาทำสารแขวนลอย

6) ใส่สารแขวนลอยไข่ไส้เดือนฝอย ความเข้มข้น 1,000 ไข่/มล. จำนวน 5 มล. ลงในรูลึกประมาณระดับรากมะเขือเทศ ห่างโคนต้นประมาณ 4 ซม. จำนวน 5 รูๆ ละ 1 มล. รอบโคนต้นมะเขือเทศอายุ 30 ซึ่งรองก้นหลุมด้วยเชื้อรา และแบคทีเรียควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ดูแลรักษาต้นมะเขือเทศโดยรดน้ำวันละ 1 ครั้งและให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุก 2 สัปดาห์

7) การเก็บข้อมูล วัดประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียต่อการควบคุมโรครากปมของมะเขือเทศหลังจากปลูก 55 วัน โดยวัดความสูงของต้นมะเขือเทศ นำหนักสด ความรุนแรงของการเกิดปมที่ราก โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์พื้นที่รากที่เกิดปมต่อระบบราก ตรวจนับจำนวนกลุ่มไข่และจำนวนไข่ต่อรากมะเขือเทศทั้งต้น แล้วแปลงค่าเป็นจำนวนไข่ต่อราก 1 กรัม

8) การวิเคราะห์ข้อมูล เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย DMRT

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การเก็บตัวอย่างดิน

1. เก็บตัวอย่างดินจากแต่ละภูมิภาคของประเทศ ได้แก่

1) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่

(1) ตำบลไทยสามัคคี อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา

2) ภาคกลาง ได้แก่

(1) ตำบลกระตีบ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

(2) ตำบลหนองงูเหลือม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

(3) ตำบลคลองจินดา อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม

(4) ตำบลนครสวรรค์ตก อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์

(5) ตำบลหัวดง อำเภอเก้าเลี้ยว จังหวัดนครสวรรค์

(6) ตำบลบางม่วง อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์

(7) ตำบลบึงเสนา อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์

(8) ตำบลเขาทอง อำเภอพยุหคีรี จังหวัดนครสวรรค์

(9) ตำบลหนองโพ อำเภอตาคลี จังหวัดนครสวรรค์

(10) ตำบลตาคลี อำเภอตาคลี จังหวัดนครสวรรค์

(11) ตำบลน้ำชน อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์

(12) ตำบลท่าแดง อำเภอหนองไผ่ จังหวัดเพชรบูรณ์

3) ภาคตะวันตก ได้แก่

(1) ตำบลวังไคร้ อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี

การทดลองที่ 2 การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

1. การแยกจุลินทรีย์

ตัวอย่างดินที่เก็บในภาคสนามจากแต่ละภูมิภาคดังกล่าวในการทดลองที่ 1 สามารถแยกจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา 4 ไอโซเลต และแบคทีเรีย 101 ไอโซเลต

2. การทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนส

1) ขนาด colony clear zone และค่า SE ของแบคทีเรียในอาหาร SM (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ขนาด colony clear zone และค่า SE ของแบคทีเรียในอาหาร SM

รหัสเชื้อ	ขนาดโคโลนี (มม.)	ค่าเฉลี่ย Clear zone (มม.)	SE ((ความกว้างของวงใสทั้ง 2 ด้าน/เส้นผ่านศูนย์กลาง colony) x 100)
NW1-A1	10.5	10.25	195.24
NW1-A2	8.5	11.25	264.71
NW1-A3	6.5	1.75	53.85
NW2-A1	6	0	0.00
NW2-A2	4	0	0.00
NW2-A3	9	10.75	238.89
NW2-A4	9	9.5	211.11
NW2-A5	10.5	11.25	214.29
NW3-A1	15	7.25	96.67
NW3-A2	3	0	0.00
NW3-A3	5.5	0	0.00
NW3-A4	16	11.75	146.88
NW3-A5	6	4.75	158.33
NW4-A1	12.5	10.75	172.00
NW4-A2	7	10.5	300.00
NW4-A3	11.5	10.75	186.96
NW4-A4	7	11	314.29
NW4-A5	30.5	2	13.11
NW5-A1	7.5	0	0.00
NW5-A2	5.5	10.25	372.73
NW5-A3	13.5	6	88.89
NW6-A1	20	7.25	72.5
NW6-A2	7.5	12	320.00
NW6-A3	13.5	11.5	170.37
NW6-A4	0	0	0.00
NW7-A1	9.5	10.25	215.79
NW7-A2	10	0	0.00
NW7-A3	13	11.25	173.08

NW7-A4	11	8.5	154.55
NW7-A5	9.5	10.25	215.79
NW7-A6	7	9.5	271.43
NW7-A7	9.5	10	210.53
NW7-A8	9	10.25	227.78
NW8-A1	10	0	0.00
NW8-A2	8	6.25	156.25
NW8-A3	14	11.5	164.29
NW8-A4	3.5	2.25	128.57
NW8-A5	0.5	0	0.00
NW9-A1	6.5	9.5	292.31
NW9-A2	8	10.75	268.75
NW9-A3	0	0	0.00
NW9-A4	3.5	11.75	671.43
NW10-A1	7	11.75	335.71
NW10-A2	5	0	0.00
NW10-A3	7	11.75	335.71
NW10-A4	5.5	5	181.82
NW10-A5	8	1	25.00
NW10-A6	7.5	2.5	66.67
NW11-A1	12.5	13.25	212.00
NW11-A2	12	10.25	170.83
NW11-A3	12.5	0	0.00
NW11-A4	11	5.25	95.45
NW11-A5	7	9.75	278.57
NW11-A6	8.5	8.5	200.00
NW11-A7	8.5	0	0.00
NW12-A1	7.5	10.75	286.67
NW12-A2	2	0	0.00
NW12-A3	8.5	7	164.71
NW12-A4	15	9	120.00
NW12-A5	12	10	166.67
NW13-A1	14	0	0.00

NW13-A2	10	0	0.00
NW13-A3	11	0	0.00
NW13-A4	0	0	0.00
NW13-A5	0	0	0.00
NW13-A6	7	7	200
NW13-A7	4.5	2.5	111.11
NW13-A8	6.5	12	369.23
NW13-A9	12	11	183.33
NW13-A10	13.5	11.75	174.07
NW14-A1	20.5	9.25	90.24
NW14-A2	9.5	9	189.47
NW14-A3	6.5	6.5	200.00
NW14-A4	6.5	7.25	223.08
NW15-A1	0	0	0.00
NW15-A2	9.5	6	126.32
NW15-A3	13	0	0.00
NW15-A4	7	5.25	150.00
NW15-A5	6.5	6.5	200.00
NW16-A1	11.5	14	243.48
NW16-A2	9	9.75	216.67
NW16-A3	11.5	9.25	160.87
NW16-A4	5.5	11.5	418.18
NW16-A5	18.5	9.25	100.00
KR1/1	11.5	15.25	265.22
KR1/2	11	10.75	195.45
NT1/1	8	9.5	237.5
NT2/1	9.5	9	189.47
NT2/2	10	10.25	205.00
NT3/1	8	10.75	268.75
NT4/2	9.5	10	210.53
NT4/3	7.5	5.75	153.33
NT4/4	7.5	4.25	113.33
NT5/1	9.5	9.5	200.00

NT6/1	0	0	0.00
NT6/3	6	5.5	183.33
PB1/1	6	5.5	183.33
PB2/1	6.5	0	0.00
PB2/2	7.5	0	0.00
PB3/1	9.5	12.5	263.16
PB3/2	8.5	0	0.00
PB4/1	12.5	9.25	148.00
PB4/2	9.5	11	231.58
PB4/3	8.5	10.75	252.94
PBR1/1	10	8.5	170.00
PBR2/1	12.5	9.75	156.00
PBR3/1	12.5	12.75	204.00
PBR4/1	15	7.75	103.33
PBR4/2	9	11.5	255.56
PBR5/1	8.5	9.25	217.65
PBR6/1	6	4.25	141.67
PBR7/2	7.5	9.5	253.33
PBR8/1	9.5	9.75	205.26

2) ขนาด colony clear zone และค่า SE ของแบคทีเรียในอาหาร Chitin agar (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ขนาด colony clear zone และค่า SE ของแบคทีเรียในอาหาร Chitin agar

รหัสเชื้อ	ขนาดโคโลนี (มม.)	ค่าเฉลี่ย Clear zone (มม.)	SE ((ความกว้างของวงใสทั้ง 2 ด้าน/เส้นผ่านศูนย์กลาง colony) x 100)
NW1-A1	2	0	0.00
NW1-A2	3	0	0.00
NW1-A3	0	0	0.00
NW2-A1	3	0	0.00
NW2-A2	0	0	0.00
NW2-A3	7	3	85.71

NW2-A4	11	3.5	63.64
NW2-A5	0	0	0.00
NW3-A1	5	0	0.00
NW3-A2	0	0	0.00
NW3-A3	4	0	0.00
NW3-A4	6	0	0.00
NW3-A5	5	0	0.00
NW4-A1	3	0	0.00
NW4-A2	4	0	0.00
NW4-A3	4	0	0.00
NW4-A4	4	0	0.00
NW4-A5	4	2	100
NW5-A1	2	0	0.00
NW5-A2	1	0	0.00
NW5-A3	6	3	100
NW6-A1	3	0	0.00
NW6-A2	2	0	0.00
NW6-A3	4	0	0.00
NW6-A4	5	0	0.00
NW7-A1	3	0	0.00
NW7-A2	4	0	0.00
NW7-A3	5	0	0.00
NW7-A4	4	0	0.00
NW7-A5	3	0	0.00
NW7-A6	5	0	0.00
NW7-A7	6	0	0.00
NW7-A8	6	0	0.00
NW8-A1	4	0	0.00
NW8-A2	6	0	0.00
NW8-A3	4	0	0.00
NW8-A4	0	0	0.00
NW8-A5	0	0	0.00
NW9-A1	4	0	0.00

NW9-A2	3	0	0.00
NW9-A3	4	0	0.00
NW9-A4	5	0	0.00
NW10-A1	4	0	0.00
NW10-A2	0	0	0.00
NW10-A3	4	0	0.00
NW10-A4	5	0	0.00
NW10-A5	13	0	0.00
NW10-A6	11	0	0.00
NW11-A1	0	0	0.00
NW11-A2	0	0	0.00
NW11-A3	4	0	0.00
NW11-A4	3	0	0.00
NW11-A5	3	0	0.00
NW11-A6	1	0	0.00
NW11-A7	5	0	0.00
NW12-A1	4	0	0.00
NW12-A2	3	0	0.00
NW12-A3	4	1	0.00
NW12-A4	7	1	28.57
NW12-A5	7	0	28.57
NW13-A1	0	0	0.00
NW13-A2	6	0	0.00
NW13-A3	4	0	0.00
NW13-A4	0	0	0.00
NW13-A5	0	0	0.00
NW13-A6	5	0	0.00
NW13-A7	1	0	0.00
NW13-A8	5	0	0.00
NW13-A9	4	4	200.00
NW13-A10	5	4	160.00
NW14-A1	5	0	0.00
NW14-A2	3	0	0.00

NW14-A3	5	0	0.00
NW14-A4	6	0	0.00
NW15-A1	4	0	0.00
NW15-A2	5	0	0.00
NW15-A3	0	0	0.00
NW15-A4	5	0	0.00
NW15-A5	4	0	0.00
NW16-A1	4	0	0.00
NW16-A2	5	0	0.00
NW16-A3	3	0	0.00
NW16-A4	3	0	0.00
NW16-A5	7	0	0.00
KR1/1	0	0	0.00
KR1/2	0	0	0.00
NT1/1	0	0	0.00
NT2/1	4	0	0.00
NT2/2	6	0	0.00
NT3/1	5	0	0.00
NT4/2	0	0	0.00
NT4/3	3	0	0.00
NT4/4	5	0	0.00
NT5/1	0	0	0.00
NT6/1	0	0	0.00
NT6/3	6	0	0.00
PB1/1	3	0	0.00
PB2/1	3	0	0.00
PB2/2	3	0	0.00
PB3/1	5	0	0.00
PB3/2	4	0	0.00
PB4/1	7	0	0.00
PB4/2	5	0	0.00
PB4/3	4	0	0.00
PBR1/1	5	0	0.00

PBR2/1	4	0	0.00
PBR3/1	6	0	0.00
PBR4/1	6	0	0.00
PBR4/2	3	0	0.00
PBR5/1	5	0	0.00
PBR6/1	0	0	0.00
PBR7/2	4	0	0.00
PBR8/1	5	0	0.00

3. การทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอย

1) เชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

รหัสเชื้อ	จำนวนไส้เดือนฝอยที่ตาย (4 ตัว/ 1หลุม)					เปอร์เซ็นต์การตาย					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	เฉลี่ย
NW1-A1	4	3	4	4	4	100	75	100	100	100	95
NW1-A2	4	4	4	3	2	100	100	100	75	50	85
NW2-A3	2	2	2	3	4	50	50	50	75	100	65
NW2-A4	4	4	4	3	4	100	100	100	75	100	95
NW2-A5	0	1	0	2	2	0	25	0	50	50	25
NW3-A1	4	4	4	4	4	100	100	100	100	100	100
NW3-A4	1	1	2	3	1	25	25	50	75	25	40
NW3-A5	3	1	2	2	3	75	25	50	50	75	55
NW4-A1	4	3	1	3	3	100	75	25	75	75	70
NW4-A2	4	3	4	2	3	100	75	100	50	75	80
NW4-A3	4	3	4	4	4	100	75	100	100	100	95
NW5-A3	3	2	3	2	2	75	50	75	50	50	60
NW6-A1	2	4	3	2	3	50	100	75	50	75	90
NW6-A3	3	4	4	4	3	75	100	100	100	75	90
NW7-A1	3	4	3	4	4	75	100	75	100	100	90
NW7-A3	4	4	4	4	4	100	100	100	100	100	100

NW7-A4	3	4	4	3	4	75	100	100	75	100	90
NW7-A5	3	3	4	3	4	75	75	100	75	100	85
NW7-A6	4	3	3	4	4	100	75	75	100	100	90
NW7-A7	3	3	2	4	4	75	75	50	100	100	80
NW7-A8	2	1	3	2	3	50	25	75	50	75	55
NW9-A1	4	4	4	3	4	100	100	100	75	100	95
NW9-A2	3	3	4	4	3	75	75	100	100	75	85
NW9-A4	2	0	2	3	2	50	0	50	75	50	45
NW10-A1	2	4	4	4	3	50	100	100	100	75	85
NW10-A3	4	3	2	3	2	100	75	50	75	50	70
NW10-A5	2	2	2	3	2	50	50	50	75	50	55
NW10-A6	2	3	2	2	1	50	75	50	50	25	50
NW11-A1	3	1	2	2	2	75	25	50	50	50	50
NW11-A2	3	4	3	4	4	75	100	75	100	100	90
NW11-A5	3	4	4	4	3	75	100	100	100	75	90
NW11-A6	4	4	4	3	4	100	100	100	75	100	95
NW12-A1	1	4	3	4	4	25	100	75	100	100	80
NW12-A4	2	3	3	3	2	50	75	75	75	50	65
NW12-A5	4	4	2	2	3	100	100	50	50	75	85
NW13-A6	3	4	3	4	2	75	100	75	100	50	80
NW13-A7	3	3	1	3	2	75	75	25	75	50	60
NW13-A8	3	2	4	4	4	75	50	100	100	100	85
NW13-A9	2	2	1	1	0	50	50	25	25	0	30
NW13-A10	0	0	1	1	0	0	0	25	25	0	10
NW14-A1	3	4	3	4	4	75	100	75	100	100	90
NW14-A2	4	2	4	4	3	100	50	100	100	75	85
NW14-A3	3	4	4	3	4	75	100	100	75	100	90
NW15-A4	2	3	1	3	2	50	75	25	75	50	55
NW16-A1	3	4	1	4	4	75	100	25	100	100	80
NW16-A2	4	4	4	4	3	100	100	100	100	75	95
NW16-A5	0	1	0	0	0	0	25	0	0	0	5
KR1/2	4	3	4	4	3	100	75	100	100	75	90
NT2/1	4	3	4	4	3	100	75	100	100	75	90

NT2/2	4	4	4	4	4	100	100	100	100	100	100
NT3/1	3	4	3	4	4	75	100	75	100	100	90
NT4/2	4	4	4	4	4	100	100	100	100	100	100
PB3/1	3	3	3	3	2	75	75	75	75	50	70
PB4/1	2	4	4	4	3	50	100	100	100	75	85
PB4/2	1	2	4	3	4	25	50	100	75	100	70
PBR1/1	4	3	4	4	4	100	75	100	100	100	95
PBR4/1	4	4	3	4	4	100	100	75	100	100	95
PBR5/1	3	3	4	3	4	75	75	100	75	100	85

2) เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

รหัสเชื้อ	จำนวนไส้เดือนฝอยที่ตาย (4 ตัว/ 1หลุม)					เปอร์เซ็นต์การตาย					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	เฉลี่ย
NW1-A1	3	2	3	2	2	75	50	75	50	50	60
NW1-A2	2	1	3	1	2	50	25	75	25	50	45
NW2-A3	2	3	2	2	3	50	75	50	50	75	60

การทดลองที่ 3 การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย 5 ไอโซเลท ซึ่งพิจารณาจากผลจากการทดลองที่ 2 หัวข้อย่อยที่ 3) การทดการควบคุมไส้เดือนฝอย มาจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยสกัดดีเอ็นเอ และนำส่งวิเคราะห์ลำดับเบส ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย และไม่เป็นเชื้อก่อโรค ได้แก่ NW7-A3, NW9-A1, NT4-2 และ NT2-2

การทดลองที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมมะเขือเทศในสภาพโรงเรือนทดลอง

วัดประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียต่อการควบคุมโรครากปมของมะเขือเทศหลังจากปลูก 30, 37, 44, 51 และ 58 วัน โดยวัดความสูงของต้นมะเขือเทศ (กราฟที่ 1) รายละเอียดดังนี้

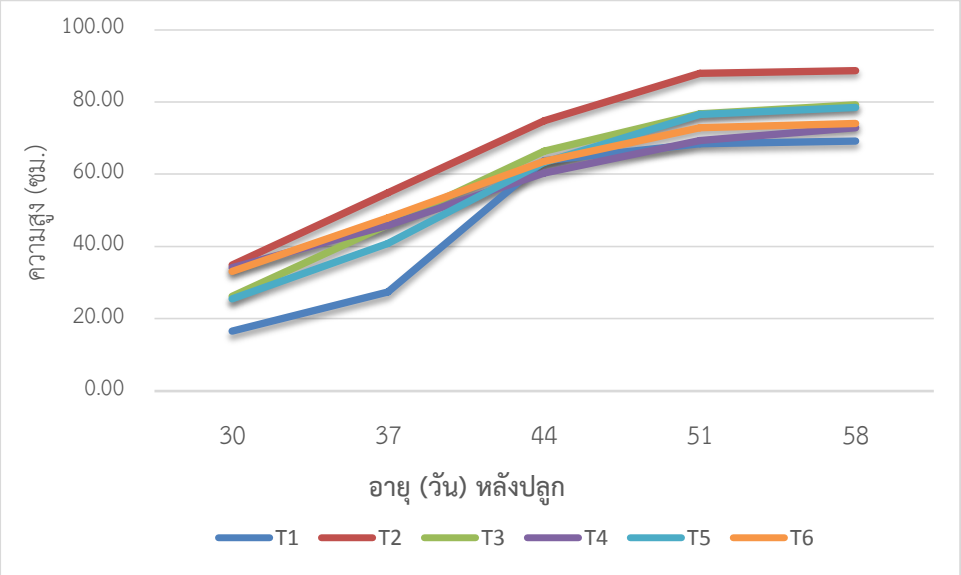
1. หลังปลูกมะเขือเทศ 30 วัน พบว่า ตำรับการที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 6, 4, 3 และ 5 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด

2. หลังปลูกมะเขือเทศ 37 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 6, 4, 3 และ 5 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด

3. หลังปลูกมะเขือเทศ 44 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 3, 6, 5 และ 4 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด

4. หลังปลูกมะเขือเทศ 51 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 5, 3, 6 และ 4 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด

5. หลังปลูกมะเขือเทศ 58 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 5, 3, 6 และ 4 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด



กราฟที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียต่อการควบคุมโรครากปมของมะเขือเทศหลังจากปลูก 30, 37, 44, 51 และ 58 วัน โดยวัดความสูงของต้นมะเขือเทศ

สรุปผลการทดลอง

1. ตัวอย่างดินที่เก็บในภาคสนามจากแต่ละภูมิภาคดังกล่าวในการทดลองที่ 1 สามารถแยกจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา 4 ไอโซเลต และแบคทีเรีย 101 ไอโซเลต

2. ขนาด colony clear zone และค่า SE ของแบคทีเรียในอาหาร SM ให้ผลดีกว่าขนาด colony clear zone และค่า SE ของแบคทีเรียในอาหาร Chitin agar

3. การทดสอบการควบคุมไส้เดือนฝอย โดยเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ตอบสนองต่อการควบคุมโรครากปมได้ดีกว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสตอบสนองต่อการควบคุมโรครากปมได้ถึง 58 ไอโซเลต และส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสตอบสนองต่อการควบคุมโรครากปมได้เพียง 3 ไอโซเลต และมีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ไม่เกิน 60 เปอร์เซ็นต์

4. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย 5 ไอโซเลต ซึ่งพิจารณาจากเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสมาจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยสกัดดีเอ็นเอ และนำส่งวิเคราะห์ลำดับเบส ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย และไม่เป็นเชื้อก่อโรค ได้แก่ NW7-A3, NW9-A1, NT4-2 และ NT2-2

5. ความสูงของต้นมะเขือเทศหลังปลูก มีรายละเอียดดังนี้

1) หลังปลูกมะเขือเทศ 30 และ 37 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 6, 4, 3 และ 5 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด

2) หลังปลูกมะเขือเทศ 44 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมา ตำรับที่ 3, 6, 5 และ 4 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด

3) หลังปลูกมะเขือเทศ 51 และ 58 วัน พบว่า ตำรับที่ 2 มีความสูงมากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับที่ 5, 3, 6 และ 4 ส่วนตำรับที่ 1 มีความสูงน้อยที่สุด

ข้อเสนอแนะ

ควรนำจุลินทรีย์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมพืชที่คัดเลือกได้ไปทดสอบในพืชทดลองชนิดอื่นที่มีการระบาด และเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย ได้แก่ พริก มันฝรั่ง เป็นต้น เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพในการควบคุม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการจัดการไส้เดือนฝอยรากปมในพื้นที่ที่ปลูกมะเขือเทศ จากการควบคุมโดยชีววิธีที่ปลอดภัยและสะดวกสำหรับเกษตรกรและผู้บริโภค

2. ส่งเสริมการนำเทคโนโลยีชีวภาพที่มีอยู่ในดินมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการเกษตรในพื้นที่ระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม

3. ทราบต้นทุนเบื้องต้นในการจัดการโดยชีววิธี เพื่อเป็นข้อมูลในการนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมสำหรับเกษตรกร

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

เมื่อผลการดำเนินการวิจัยสิ้นสุดจะได้จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืช (มะเขือเทศ) ซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้ประโยชน์ได้ จัดทำแผ่นผับ คู่มือการส่งเสริม การจัดนิทรรศการ รวมทั้งการถ่ายทอดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพสู่เจ้าหน้าที่รัฐ เผยแพร่ผ่านเครือข่ายหมอดินอาสา กลุ่มเกษตรกร เครือข่ายเกษตรอินทรีย์ หน่วยภาครัฐและเอกชน ต่อไป

ห้องสมุดกรมพัฒนาที่ดิน

เอกสารอ้างอิง

คมกฤช เพียภูเขียว. 2539. **ประสิทธิภาพของการผสมสายพันธุเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ตอการเขาทำลายไขไสเดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*).** วิทยานิพนธปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร, กรุงเทพฯ.

จรัส ชื่นงาม. 2525. **ไส้เดือนฝอยในประเทศไทย**. เอกสารวิชาการของกลุ่มไส้เดือนฝอย. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

จรัส ชื่นรามและอานนท บุญครอง. 2526. **ไสเดือนฝอยในประเทศไทย (ฉบับเพิ่มเติม)**. เอกสารทางวิชาการของกลุมงานไสเดือนฝอย. ฉบับที่ 5. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ, กรุงเทพฯ.

ทรงศักดิ์ จันทรอุดม. 2540. **การควบคุมไสเดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ของผักโดยปฏิกิริยาสัมพันธระหวางเชื้อแบคทีเรียและเชื้อปฏิปกษบางชนิด**. วิทยานิพนธปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร, กรุงเทพฯ.

ประชา ลี้ประเสริฐ. 2515. **การศึกษาอนุกรมวิธานและพืชอาศัยของไสเดือนฝอยรากปมจากขาวฟาง.** วิทยานิพนธปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร, กรุงเทพฯ.

มนตรี เอี่ยมวิมังสา. 2538. **ผลของสารเคมีและเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ตอไสเดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในแงงพันธุขิง**. วิทยานิพนธปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร, กรุงเทพฯ.

สุภกิจ สุขใจมิตร. 2532**. อิทธิพลของ Antagonistic plants และเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ตอไสเดือนฝอยรากปม**. วิทยานิพนธปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร, กรุงเทพฯ.

มัทนา วานิชย์. 2551. ศักยภาพของเชื้อราบางชนิดในการควบคุมไส้เดือนฝอย (*Meloidogyne incognita* Chitwood). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มนตรี เอี่ยมวิมังสา ไตรเดช ข่ายทอง และประยูร สมฤทธิ์. 2543. โรคหัวหูดในมันฝรั่ง. น. 33 *ใน* **เอกสารการประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา** กรมวิชาการเกษตร วันที่ 8 – 20 มีนาคม 2543 ณ โรงแรมลองบีช อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2533. **หลักการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยชีววิธี**. ว. โรคพืช 10(3-4) : 47 – 56

สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2538. **ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2541. **ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช: โรคและการจัดการ**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน, สมชาย สุขะกุล และสุภกิจ สุขใจมิตร. 2530. ไสเดือนฝอยรากปมชนิดใหม่ของประเทศไทย. **วารสารโรคพืช.** 7(2): 99–102.

ห้องสมุดกรมพัฒนาที่ดิน

สมชาย สุขะกูล. 2549. **ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชและการควบคุม.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

อรุณ จันทนโอ. 2505. **รายงานการสำรวจไสเดือนฝอยศัตรูขาวและชนิดอื่นบางชนิดในประเทศไทย.** แผนกกีฏวิทยาและโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร, กรุงเทพฯ.

อนันต์ หิรัญสาลี. 2529. **ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช**. ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

อนุชา ธีรวุฒิธร. 2537. **ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ตางสายพันธุในการเขาทำลายไขไสเดือนฝอยรากปม**. วิทยานิพนธปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร.

Cliff, G.M. and H. Hirschman. 1984. *Meloidogyne microcephala* sp. (*Meloidogynenidae*), a root-knot nematode from Thailand. **J. Nematol.** 16: 183-193.

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

Thomas, G.V., P. Sundararaju, S.S. Ali and S.K. Ghai. 1989. In dividual and interactive effct of VA mycorrhizal fungi and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita,* aon cardamon. **Tropical Agriculture** 66 : 21-24.

Sasser, J.N. 1989. **Plant parasitic Nematode : the Farmer's Hidden Enemy**. Univ. Graphics,
North Carolina State Univ., Releigh, North Carolina.

ห้องสมุดกรมพัฒนาที่ดิน