การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม

Selection and Isolation of nematophagous fungi of root-knot nematode.

ธิติยา สารพัฒน์ ไตรเดช ข่ายทอง

ธารทิพย ภาสบุตร มนตรี เอี่ยมวิมังสา

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) โดยการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและพืช 4 วิธีคือ การแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ ไข่ เต็มวัยเพศเมียและตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม โดยการแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม และการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดี โดยแยกได้ถึง 61 ไอโซเลทจากทั้งหมด 65 ไอโซเลท ต้องดำเนินการวิจัยต่อเพื่อเพิ่มความหลากหลายของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-03-02-03-54

คำนำ

ในปัจจุบันพืชผลทางการเกษตรมีสารเคมีตกค้างทำให้มีผลต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของผู้บริโภคการนำจุลินทรีย์เข้ามาควบคุม กำจัด ศัตรูพืช เช่น แมลง และ โรคพืช นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทในการทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (กองกีฏและสัตววิทยา, 2537)ในประเทศไทยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมทางชีววิธี (Biological control) เช่น เชื้อรา *Chaetomium* sp. (เกษม, 2533) และ *Trichoderma* sp. (จิระเดช และคณะ, 2535) ถูกนำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อราศัตรูพืช ส่วนโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ยังมีการศึกษาวิจัยกันน้อย ถึงเชื้อราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยศัตรูพืช (Plant-parasitic nematodes)โดยเฉพาะอย่างยิ่งไส้เดือนฝอยรากปมซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยที่มีการระบาดมากที่สุด และมีพืชอาศัยมาก ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมี วัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปมแล้วนำไปทดสอบศักยภาพ ในการควบคุม พร้อมทั้งพัฒนากรรมวิธีเพื่อการผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์(Bio-nematicide product) ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.ตัวอย่างดินและพืช

2.ไส้เดือนฝอยรากปม(*Meloidogyne* sp.)

3. .สารเคมี และวัสดุเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น PDA WA streptomycin

4. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ แบบ stereo

5.เข็มเขี่ย สไลด์ และ coverslide จานเลี้ยงเชื้อ หลอดแก้วและที่วางหลอด parafilm สำลี ถุงมือยาง กล่องชื้น(moist chamber) ตะเกียง ก๊าซ แอลกอฮอล์

6.หม้อนึ่งความดัน ตู้อบเครื่องแก้ว ตู้เย็น ไมโครเวฟ แก๊สหุงต้ม เตา หม้อ

7.อุปกรณ์และสารเคมี ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย เช่น ตะแกรง กรวย (วิธีการแยกเชื้อ) โซเดียมไฮโปรคลอไรท์(NaOCl)

8.ป้ายแสดงกรรมวิธี สมุดบันทึก

วิธีการ

เก็บตัวอย่างจากแหล่งที่มีโรครากปม นำมาหาเชื้อราปฏิปักษ์โดยวิธีการต่างๆ

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1.การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่าง 6 ครั้ง โดยเก็บจากพื้นที่ที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวนตัวอย่างขึ้นอยู่กับขนาดพื้นที่ เก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรครากปมและดินบริเวณรอบๆรากพืช โดยใช้พลั่วขุดดินบริเวณผิวหน้าดิน ลึกประมาณ 10 ซม. แยกตัวอย่างดินและตัวอย่างพืช ใส่ถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลของแหล่งที่เก็บดิน เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการทำการแยกเชื้อ

2. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม

แบ่งการแยกเชื้อราเป็น 4 ส่วนคือ แยกเชื้อราจาก กลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (eggs) ตัวเต็มวัยเพศเมีย และ ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม ดังนี้

2.1. การแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

จากตัวอย่างพืชรากปมใช้เข็มเขี่ยกลุ่มไข่นำมาฆ่าเชื้อใน 1 % โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์ (NaOCl)นาน 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางบน 0.8% WA (water agar) ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร

2.2 . การแยกเชื้อราจากไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

นำรากปมของพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยทำลาย มาทำความสะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนปม แช่ในน้ำยา2% โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl) ในขวดแล้วเขย่า เพื่อละลายเมือกหุ้มถุงไข่ จะได้ไข่แยกเป็นฟองเดี่ยวๆล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนตะแกรง 400 mesh เก็บ suspension หลังจากนั้น ดูด suspension 1 มิลลิลิตร ไปทำ spread plate บน 0.8% WA (water agar) ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร

2.3. การแยกเชื้อราจากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม

จากตัวอย่างพืชรากปมใช้เข็มเขี่ยตัวเต็มวัยเพศเมีย นำมาฆ่าเชื้อใน 2 % โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl) นาน 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางบน 0.8% WA ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร

2.4. การแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม

นำรากปมของพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยทำลาย มาทำความสะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนปม แช่ในน้ำยา 2%โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl) ในขวดแล้วเขย่า เพื่อละลายเมือกหุ้มถุงไข่ จะได้ไข่แยกเป็นฟองเดี่ยวๆล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนตะแกรง 500 mesh เก็บ suspension นำไปใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 วัน ให้ไส้เดือนฝอยออกจากไข่ เพื่อเตรียมใช้เป็นเหยื่อล่อ จากตัวอย่างดิน นำดินตัวอย่างละ 1 กรัม โปรยบน0.8% WA ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร จากนั้นใส่ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม ประมาณ 100-200 ตัวต่อ มิลลิลิตร

ทุกวิธีการเมื่อทำเสร็จแล้ว ทำการบ่มเชื้อ 3-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) และ ตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา เมื่อพบจึงใช้เข็มเขี่ยทำสไลด์เพื่อศึกษารายละเอียด บันทึกภาพ บันทึกประวัติ และ เมื่อเชื้อราเจริญขึ้นมา ใช้เข็มเขี่ย hyphal tip ของเชื้อราแต่ละโคโลนีลงใน slant PDA (Potato Dextrose Agar) แต่ละ isolate นับเป็น 1 isolate

- การบันทึกข้อมูล
  บันทึกข้อมูลเชื้อราที่แยกได้จากวิธีการต่างๆ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้นปีงบประมาณ 2554 สิ้นสุด 2558 รวม 5 ปี

เริ่มทดลอง ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2554

สถานที่

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเกษตรกร ทั่วไป

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อราที่สามารถแยกเชื้อได้มาจากการแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม การแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง และแยกเชื้อราจากไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม เนื่องจากการแยกจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมนั้นใช้ดินเป็นองค์ประกอบของวิธีการซึ่งสามารถแยกเชื้อราที่อาศัยในดินรวมมาด้วย การการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราได้มากว่าจากไข่เดี่ยวๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมอาจเพราะขั้นตอนการละลายเมือกหุ้มถุงไข่ เก็บ suspension เกิดการปนเปื้อนมาก ส่วนการแยกเชื้อราจากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมในการทดลองนี้ยังไม่สามารถทำได้

พืชที่แยกเชื้อราได้มาก ได้แก่ ฝรั่ง ผักเสี้ยนผี บวบ ตำแยแมว และหญ้ายาง เป็นเพราะความถี่ของการได้ตัวอย่าง และปริมาณตัวอย่าง และส่วนใหญ่เป็นวัชพืชที่อยู่ในแปลงทั่วไปอาจจะไม่ได้รับสารเคมีกำจัดเชื้อรา

เชื้อราที่สามารถแยกเชื้อได้ จากการจัดจำแนกเบื้องต้น ส่วนใหญ่อยู่ใน สกุล *Trichoderma* sp. *Monacrosporium* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Fusarium* sp. *Verticillium* sp. *Paecilomyces* sp. *Anthrobotrys* sp. และอื่น ที่ยังไม่สามารถจำแนกได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม และการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรงนั้นสามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีแล้ว ควรเพิ่มตัวอย่างพืชและดิน เพื่อให้ได้เชื้อราที่มีความหลากหลายขึ้น ส่วนการแยกเชื้อราจากไข่และตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม ต้องพัฒนาทักษะและปรับปรุงวิธีการให้ดีขึ้น

และในส่วนของการแยกเชื้อรานั้นจะนำวิธีการหาเชื้อราโดยตรงจากส่วนของพืชที่เป็นโรคเข้ามาเพิ่มเติม ส่วนตัวอย่างพืชจะเพิ่มชนิดของวัชพืชให้หลากหลายมากขึ้นเพื่อเพิ่มความหลากหลายของเชื้อรา

เอกสารอ้างอิง

กองกีฏและสัตววิทยา. 2537. ปัญหาการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพิ่มขึ้น กสิกร 67 (6) : 522 – 524.

เกษม สร้อยทอง. 2533. ประสิทธิภาพของรา Chaetomium cochliodes และ Chaetomium curiculorum ในการป้องกันโรคไหม้ข้าว (Rice Blast) สาเหตุจากเชื้อ Pyricularia oryzae. แก่นเกษตร. 18 (2) : 89 – 96.

จิระเดช แจ่มสว่าง จินตนา ชนะ วรรณวิไล เกษนรา เฉลิมลาภ จิระประสิทธ์ สุพรรณี ชีววิริยกุล ธีรยุทธ ตู้จินดา ศรปราชญ์ ชไนศวรรยางกุล วุฒิชัย ญาณอรรถ กัทลีวัลย์ สุขช่วย และสมนึก กายาผาด. 2535. การควบคุมโรคต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์โดยวิธีคลุกเมล็ด ด้วยผงมวลชีวภาพของเชื้อรา Trichoderma harzianum ข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและปลูกพืชทดลอง. 6(2) : 3 – 8.

ภาคผนวก

ค่าฐานนิยม

วิธีการแยกเชื้อรา บริสุทธิ์ของเชื้อรา ปฏิปักษ์ของ ไส้เดือนฝอยราก ปม	1.แยกจากกลุ่มไข่	2.แยกไข่	3.ตัวเต็มวัยเพศเมีย	4.ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย รากปม
จำนวนisolate	21	4	-	40

จำนวน isolate	แหล่ง	จำนวน isolate	แหล่ง
2	ดินแปลงผักเก่า	10	ผักเสี้ยนผี
3	มันขี้หนู	2	พริก
1	มะเขือเทศ	5	ตำแยแมว
3	มันฝรั่ง	5	หญ้ายาง
0	องุ่น	4	มะเขือยาว
1	ขิง	1	กะหล่ำปลี
1	ข้าวโพด	1	คะน้า
0	แครอท	4	ผักโขมหนาม
12	ฝรั่ง	3	มะเขือเปราะ
1	แตงโม	6	บวบ