

ศักยภาพของสปอร์แวนลอยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมการฟักและการพัฒนาของ กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยสาเหตุรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในมะเขือเทศ

Potential of *Trichoderma* spp. Spore Suspension to Control Egg Hatchability and Development of Root-knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) in Tomatoes

อังคณา โรจน์ประจักษ์¹ และอมรศรี ขุนอินทร์^{1*}
Angkana Rotprachak¹ and Amornsri Khun-in^{1*}

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Trichoderma* spp. สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น เศษซากพืช อินทรีย์วัตถุ และดิน โดยส่วนมากรู้จักกันดีในฐานะของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มีการนำมาใช้ประโยชน์และศึกษาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญได้รวดเร็ว และมีการสร้างเอนไซม์หรือสารทุติยภูมิในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาศักยภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งการพัฒนาของกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปม *Meloidogyne incognita* ในมะเขือเทศ จากการทดสอบเชื้อราจำนวน 22 ไอโซเลต พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T35-CO4, M4 และ O3-T34 สามารถลดการฟักตัวของกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีการสร้างเส้นใยบริเวณกลุ่มไข่ที่ 72 ชั่วโมง เท่ากับ 100% และทำให้กลุ่มไข่มีการฟักตัวเท่ากับ 1.33, 1.50 และ 2.00% ตามลำดับ (ชุดทดลองควบคุมเท่ากับ 80.60%) สำหรับการทดสอบในโรงเรือน พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถลดการเกิดปม และการสร้างกลุ่มไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุม งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. นอกจากสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค และกระตุ้นความต้านทานของพืชได้แล้วนั้น ยังมีศักยภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอย ซึ่งจะใช้เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาเพื่อการควบคุม และลดการเข้าทำลาย รวมถึงชะลอการพัฒนาของไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปมในพืชอื่น ๆ ได้ต่อไป

คำสำคัญ: เชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอย ไส้เดือนฝอยรากปม การควบคุมโดยชีววิธี

Abstract

The fungi *Trichoderma* spp. can be found living naturally in various places such as plant residues, organic matter, and soils. Because they are antagonistic microorganisms that can be grown fast, they are often studied and used in various applications in microbiology and agriculture. The fungi are sometimes used to create enzymes or secondary substances that find application in the control of plant pathogens. The main aim of this research was to evaluate the ability of *Trichoderma* spp. to inhibit the egg hatching of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomatoes. Twenty-two isolates of *Trichoderma* spp. were used in this study. The findings indicated that 3 isolates; T35-CO4, M4, and O3-T34, exhibited the highest ability to inhibit the egg hatching of the root-knot nematode. The fungi infection reached 100% and the levels of egg hatching 1.33, 1.50, and 2.00% at 72 hours after incubation, respectively, compared to 80.6% for the control. The main result of the greenhouse experiment was that the 3 isolates of *Trichoderma* spp. mentioned above were able to effectively reduce galling and egg production in the plant roots, compared with control treatment. This research shows that *Trichoderma* spp. can be used to promote plant resistance and is a fungal agent that is antagonistic to nematodes. Furthermore, the fungi have the potential to be used in the biocontrol of root-knot nematodes that infect other plant species.

Keywords: nematophagous fungi, root-knot nematode, biocontrol

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*Corresponding author, Email: agramsk@ku.ac.th

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) จัดเป็นสาเหตุโรคที่สร้างความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจทั่วโลก มีพืชอาศัยมากกว่า 3,000 ชนิด (Evans et al., 1993; Perry and Starr, 2009) สามารถแพร่กระจายได้ดีในพื้นที่เขตร้อน (tropical to sub-tropical regions) นอกจากนี้ยังถูกจัดเป็น 1 ใน 10 ของไส้เดือนฝอยรากปมที่สร้างความเสียหายที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตด้านการเกษตรมากที่สุด (Jones et al., 2013) จากข้อมูลของ Manzanilla-Lopez et al. (2004) พบว่าไส้เดือนฝอยมีการระบาดที่รุนแรงและรวดเร็ว เนื่องมาจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีวงจรชีวิตสั้น มีระยะตัวอ่อนที่ 2 ซึ่งเป็นระยะที่สามารถเข้าทำลายและสร้างปมให้กับพืชอาศัยได้ โดยใช้เวลาเพียง 25-30 วัน อีกทั้งยังสามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ และไม่มีการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ (parthenogenesis reproduction) สร้างกลุ่มไข่ (egg masses) 1 กลุ่ม มีประมาณ 200-500 ฟอง ซึ่งสอดคล้องกับ Arayungsarit (1987) พบว่า ไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมในพื้นที่ปลูกข้าวของประเทศไทย หลังจากไข่ฟักตัวเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ประมาณ 24 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยจะเข้าไปอยู่ภายในรากข้าวได้และหลังจากฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 จะเจริญครบวงจรชีวิตภายใน 20 วัน และทำให้ผลผลิตลดลง 20-80% นอกจากนี้ยังพบว่าในพื้นที่เพาะปลูกพืชเศรษฐกิจอีกหลายชนิดยังได้รับความเสียหายจากไส้เดือนฝอยรากปม (สมชาย สุชะกุล, 2549)

การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่อยู่บริเวณดิน มีการปรับตัวให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมและการเปลี่ยนแปลงของพืชอาศัยได้ดี นอกจากนี้ข้อมูลทางนิเวศวิทยาและพฤติกรรมของไส้เดือนฝอยรากปมนั้นยังมีไม่เพียงพอที่จะใช้ในการประเมินเพื่อหาวิธีการควบคุมที่มีประสิทธิภาพได้ (สมชาย สุชะกุล, 2549) การควบคุมในอดีตจนถึงปัจจุบันจึงเน้นไปที่การปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์พืชที่สามารถทนทาน ต้านทานต่อการสร้างปม และการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย เพื่อลดความเสียหายของผลผลิตทางการเกษตร (Willason and Hussey, 1996) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีราดลงในบางส่วน แต่ยังไม่สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุได้ดีเท่าที่ควร โดยจากรายงานของ Wheeler et al. (2014) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการจัดการไส้เดือนฝอย *M. incognita* สาเหตุรากปมของฝ้ายในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยการใช้สารเคมีในการรมดินด้วย 1,3-dichloropropene (1,3-D) และศึกษาพันธุ์ฝ้ายที่ต้านทาน ผลการทดลองพบว่าการใช้สารเคมีสามารถลดการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมได้เพียงเล็กน้อย และการรมดินด้วยสารเคมี 1,3-D มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณไส้เดือนฝอยได้ดี แต่พบว่าการตกค้างในดินและพืชค่อนข้างสูง สำหรับพันธุ์ฝ้ายที่ต้านทาน พบว่าการเกิดปมของไส้เดือนฝอยน้อยลงแต่ปริมาณผลผลิตที่ได้ก็น้อยลงตามไปด้วย เนื่องจากการตอบสนองระหว่างพืชและไส้เดือนฝอยสาเหตุโรค ในปัจจุบันการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) ถูกนำมาประยุกต์ใช้ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการจัดการ และลดผลกระทบต่อการใช้และความเป็นพิษต่อเกษตรกรผู้ใช้และพืช รวมไปถึงผู้บริโภค

เชื้อรากลุ่ม filamentous fungi เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมแบบร้อนชื้น อีกทั้งขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว โดยการสร้างสปอร์ จากรายงานพบเชื้อราหลายชนิดที่มีศักยภาพในการควบคุม เช่น เชื้อรา *Paecilomyces lilacinus*, Mycorrhiza และ endophytic fungi อีกหลายชนิด (Galano et al., 1996; Poveda et al., 2020) นอกจากนี้เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma* spp.) ยังเป็นเชื้อราปฏิปักษ์อีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย จากรายงานของ Sahebani and Hadavi (2008) ทำการศึกษาศักยภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. javanica* และพบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถลดการฟักตัว และการเข้าทำลาย รวมถึงการสร้างปมของไส้เดือนฝอยได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีเชื้อรา *T. asperellum*-203, *T. atroviride* และ *T. viride* ที่มีรายงานถึงความสามารถในการควบคุมไส้เดือนฝอยในพืชอีกหลายชนิด (Sharon et al., 2001; Al-Hazmi and TariqJaveed, 2016) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อใช้เป็นแนวทางสำหรับการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยศัตรูพืช และพัฒนาสำหรับเป็นวิธีการควบคุมด้วยชีววิธีต่อไป

วิธีการศึกษา

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ที่ใช้ในการศึกษา

ไส้เดือนฝอย *M. incognita* จากรากมะเขือเทศในจังหวัดเพชรบุรี นำมาล้างดินและสิ่งสกปรกออก เชียกลุ่มไข่ใส่น้ำตาลถึงน้ำตาลอมแดงจากบริเวณรากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด stereo microscope จากนั้นทำให้ไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์โดยวิธี single mass inoculation และเพิ่มปริมาณกลุ่มไข่บนต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 21 วัน จากนั้นนำกลุ่มไข่ที่ได้มาล้างด้วย 1% sodium hypochlorite นาน 30 วินาที และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 รอบ ตามวิธีการของ Ravichandra (2010) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation จำนวน 22 ไอโซเลต ได้แก่ A18+A50 No.3, A40+A50 No.7, CB-Pin, F054, F107, 181, F254, M4, M33, M35, M49, O3-134, PQM, 35-C04, T50, T50-C04, T152, TL, TP, TV16, TV24 และ TV100 ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.จิระเดช แจ่มสว่าง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราทุกวัน จนครบ 4 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แต่ละกรรมวิธี มี 5 ซ้ำ

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 22 ไอโซเลต นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น 1×10^7 spore/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร water agar (WA) ที่มีส่วนผสมของ streptomycin 0.2 กรัมต่อลิตร บ่มได้แสง near UV ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* มาวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลกลุ่มไข่ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายตามวิธีการของ Khun-in et al. (2015) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด stereo microscope จากนั้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อราที่ทดสอบดังแสดงในสมการด้านล่าง เปรียบเทียบสถิติโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

$$\% \text{Mycelia infectivity} = \frac{\text{No. of J2 hatch in dH}_2\text{O} - \text{No. of J2 hatch in treatment}}{\text{No. J2 hatch in treatment}} \times 100$$

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการฟักตัวของไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 22 ไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ทำสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น 1×10^7 spore/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาเกลี่ยให้ทั่วผิวน้ำอาหาร water agar (WA) ที่มีส่วนผสมของ streptomycin 0.2 กรัมต่อลิตร บ่มได้แสง near UV ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* มาวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนตัวอ่อนของไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่ฟักออกจากไข่ โดยดัดแปลงวิธีการจาก Sun et al. (2006) และ Khun-in et al. (2015) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด stereo microscope คำนวณค่าเฉลี่ยตามสูตร

$$\text{Egg hatching rate} = \frac{\text{Juveniles}}{\text{Eggs} + \text{Juveniles}} \times 100$$

$$\text{Juvenile mortality} = \frac{\text{Dead juveniles}}{\text{Total juveniles}} \times 100$$

ผลของกลุ่มไข่ที่ถูกทำลายด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อพัฒนาการในการเข้าทำลายบนต้นมะเขือเทศ

นำกลุ่มไข่ที่สัมผัสเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่มีเปอร์เซ็นต์การควบคุมการฟักสูงจากการทดลองก่อนหน้านี้ มาทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายและก่อโรคในมะเขือเทศ โดยทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยด้วยกลุ่มไข่ที่สัมผัสเชื้อรา *Trichoderma* spp. ลงบริเวณโคนต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 14 วัน ดูแลรดน้ำตามปกติ จนครบ 30 วัน จากนั้นนำรากของมะเขือเทศมาย้อมสีรากโดยใช้ acid fuchsin in acetic acid ตรวจนับปม และกลุ่มไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด stereo microscope เป็นเวลา 3 วันหลังการปลูกเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แต่ละกรรมวิธี มี 5 ซ้ำ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ไส้เดือนฝอย *M. incognita* และเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่ใช้ในการศึกษา

ไส้เดือนฝอย *M. incognita* จากรากมะเขือเทศในจังหวัดเพชรบุรี นำมาเพิ่มปริมาณกลุ่มไซบอนด์นกลำมะเขือเทศอายุ 21 วัน เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป สำหรับเชื้อรา *Trichoderma* spp. พบว่าเชื้อราทั้ง 22 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกัน คือเส้นใยเจริญลักษณะแผ่ราบไปกับผิวหน้าอาหารถึงฟูเล็กน้อย สร้างเส้นใยสีขาวบริเวณขอบโคโลนี บริเวณด้านในมีการสร้างสปอร์สีเขียวถึงเขียวมะกอกกระจายทั่วโคโลนี เจริญรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยที่อายุ 1 วัน มีการเจริญของโคโลนีเฉลี่ย 2.68 เซนติเมตร โดยไอโซเลต M4 มีการเจริญมากที่สุด เท่ากับ 5.0 เซนติเมตร และไอโซเลตที่มีการเจริญของโคโลนีน้อยที่สุด คือ ไอโซเลต PQM มีการเจริญของโคโลนีเท่ากับ 1.6 เซนติเมตร และเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน พบว่าเชื้อราทั้ง 22 ไอโซเลต สามารถเจริญและสร้างเส้นใยเต็มจานเลี้ยงเชื้อ (9.0 เซนติเมตร) (Table 1) สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงความสามารถของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* spp. และเชื้อราในกลุ่ม *Hypocrea* ในการเจริญและสร้างส่วนขยายพันธุ์ได้รวดเร็วทั้งในสภาพแปลง และห้องปฏิบัติการ (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2553; พรามมาส เจริญรักษ์, 2559; Aness et al., 2010)

Table 1 Colony diameter of *Trichoderma* spp. 22 isolates incubated under near UV alternate darkness for 4 days.

Isolate name	Colony diameter (cm) ¹			
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
A18+A50	1.98c	5.4b	9.0a	9.0a
A40+A50	2.8bc	6.7a	9.0a	9.0a
CB-Pin	3.2b	6.5a	9.0a	9.0a
F054	2.3bc	8.1a	9.0a	9.0a
F107	2.1bc	5.3bc	9.0a	9.0a
F181	2.3bc	5.3bc	9.0a	9.0a
F254	2.1bc	5.5b	9.0a	9.0a
M33	3.7b	6.0b	6.5c	9.0a
M35	2.5bc	5.5b	5.0e	9.0a
M4	5.0a	7.0a	9.0a	9.0a
M49	2.5bc	6.5a	9.0a	9.0a
O3-T34	2.6bc	6.4ab	9.0a	9.0a
PQM	1.6c	6.0b	9.0a	9.0a
T152	3.2b	6.4b	9.0a	9.0a
T35-CO4	1.8c	5.3b	9.0a	9.0a
T50	2.3bc	6.4ab	9.0a	9.0a
T50+CO4	3.9b	7.0a	9.0a	9.0a
TL	2.6bc	5.0c	9.0a	9.0a
TP	2.4bc	5.4b	9.0a	9.0a
TV100	3.7b	7.0a	8.8ab	9.0a
TV16	1.9c	4.0c	9.0a	9.0a
TV24	2.4bc	5.3bc	7.2b	9.0a

¹ Means within the same column with a common letter are not significantly different at P<0.01 by DMRT.

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

จากการศึกษาเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ผลการทดลอง พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต M4, O3-T34 และ T35-CO4 จาก 22 ไอโซเลต สามารถเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีที่สุด โดยที่ 24 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ พบว่าไอโซเลต T35-CO4 มีการเข้าทำลายอยู่ที่ 40.0% รองลงมาคือ ไอโซเลต M4 และ O3-T34 มีการเข้าทำลายเท่ากันอยู่ที่ 20.0% และเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต สามารถเข้าทำลายกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยได้ 100% เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าบริเวณกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น เชื้อราดังกล่าวมีการพัฒนาโดยการสร้าง germ tube และ aerial mycelium ปกคลุมกลุ่มไข่ (Table 2, Figure 1) สอดคล้องกับรายงานของ Sharon et al. (2007) ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. atroviride* ในการลดการพัฒนาของกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอย *M. javanica* โดยผลการทดลองพบว่า เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถลดการพัฒนาและฟักของไส้เดือนฝอย *M. javanica* ได้ถึง 80.00% เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุม โดยกลไกการเข้าทำลายไข่และการชะลอการฟักนั้น เกิดจากความสามารถของเชื้อราในสกุล *Trichoderma* ในการสร้างเอนไซม์ chitinase และ protease ซึ่งสามารถย่อยสลายผนังของไข่และเซลล์ตัวอ่อน รวมถึงตัวเต็มวัยได้ ทั้งนี้ประสิทธิภาพจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา และระยะเวลาในการสัมผัส (Suarez et al., 2004; Gortari and Hours, 2008)

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อการฟักตัวของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการลดอัตราการฟักของไข่ไส้เดือนฝอยรากปม ผลการทดลองพบว่าให้ผลสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ คือเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต M4, O3-T34 และ T35-CO4 สามารถลดการฟักตัวของกลุ่มไข่เพื่อพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ซึ่งเป็นระยะที่เข้าทำลาย และก่อให้เกิดปมกับรากของพืชอาศัยได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่ 24 ชั่วโมงหลังการบ่มเชื้อ พบว่ากลุ่มไข่ที่สัมผัสเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต M4, O3-T34 และ T35-CO4 มีอัตราการฟักตัวเท่ากับ 0.0, 7.5 และ 0.8% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุมที่มีเปอร์เซ็นต์การฟักตัวเท่ากับ 47.5 เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ พบว่ากลุ่มไข่ที่สัมผัสเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต มีเปอร์เซ็นต์การฟักตัวสูงขึ้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การฟักของกลุ่มไข่ที่สัมผัสเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต เท่ากับ 1.6, 5.0 และ 4.5% ตามลำดับ แต่พบว่าการฟักตัวดังกล่าวยังมีอัตราการฟักน้อยมาก เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุมที่มีการฟักตัวเท่ากับ 75.0% สำหรับที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ พบว่ากลุ่มไข่ที่สัมผัสเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการฟักตัวของไส้เดือนฝอย โดยมีการฟักของกลุ่มไข่ลดลงเท่ากับ 1.50, 2.0 และ 1.33% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุมที่มีอัตราการฟักเท่ากับ 80.0% (Table 2)

จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า มีรายงานหลายฉบับที่ให้ผลสอดคล้องกัน คือพบว่าเชื้อราในสกุล *Trichoderma* สามารถลดการฟักตัวของกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมได้หลายชนิด อาทิ *M. incognita*, *M. javanica* และ *Globodera pallida* โดยมีกลไกการควบคุมหลายกรณี เช่น การเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* ที่รวดเร็ว ส่งผลให้มีการขัดขวางการเคลื่อนที่ของไส้เดือนฝอย ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase และ protease และการรวมของสปอร์เชื้อรา *Trichoderma* กับเมือกหุ้มตัวและกลุ่มไข่ (gelatinous) เป็นต้น (Sharon et al., 2007; Zhang et al., 2014; Martínez-Medina et al., 2017)

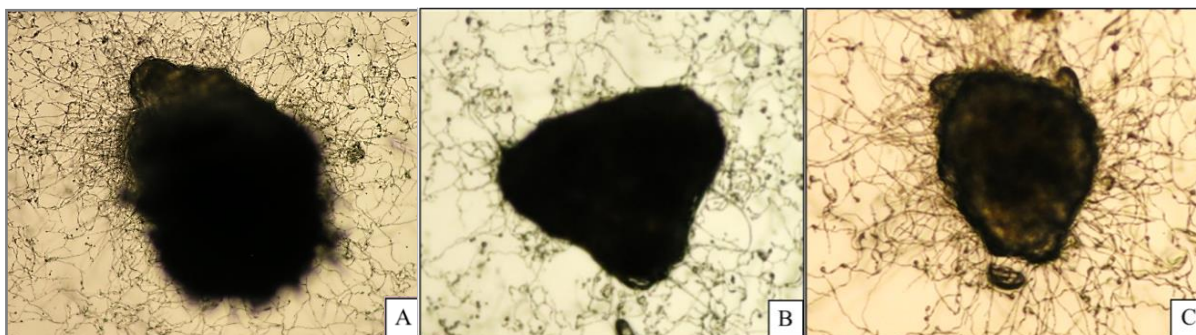


Figure 1 Egg masses of *Meloidogyne incognita* parasitized by spore suspension of *Trichoderma* spp. (A) isolate M4, (B) isolate O3-T34, and (C) isolate T35-CO4 after inoculation for 72 hours under compound microscope at 200X.

Table 2 Percentage of infection on egg mass and egg mass hatching of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* by *Trichoderma* sp. at 24, 48, and 72 hours after inoculation.

Isolate name	Mycelia infectivity (%) ¹			Egg mass hatching (%) ¹		
	24 hours	48 hours	72 hours	24 hours	48 hours	72 hours
Control	0.0b	0.0bc	0.0b	47.5a	75.0a	80.6a
A18+A50	0.0b	40.0ab	60.0ab	18.16cd	12.3de	3.6ij
A40+A50	0.0b	40.0ab	60.0ab	1.33ij	4.0gh	3.2jk
CB-Pin	0.0b	40.0ab	60.0ab	2.0ij	4.5gh	5.0hi
F054	0.0b	20.0b	60.0ab	13.6cd	7.6ef	4.5hi
F107	0.0b	40.0ab	40.0ab	15.0cd	19.6c	19.8de
F181	0.0b	20.0b	40.0ab	20.16c	9.3de	19.5de
F254	0.0b	20.0b	40.0ab	17.16cd	11.1de	15.5ef
M33	0.0b	20.0b	40.0ab	32.8b	13.6cd	19.8de
M35	0.0b	20.0b	40.0ab	13.5cd	20.0c	10.8fg
M4	20.0ab	80.0a	100.0a	0.0k	1.6h	1.50k
M49	0.0b	20.0b	40.0ab	33.0b	35.6b	45.5b
O3-T34	20.0ab	60.0ab	100.0a	7.5gh	5.0fg	2.0k
PQM	0.0b	20.0b	40.0ab	10.3ef	9.1de	12.0ef
T152	0.0b	40.0ab	40.0ab	15.6cd	5.5fg	23.5d
T35-CO4	40.0a	60.0ab	100.0a	0.8jk	4.5gh	1.33k
T50	0.0b	20.0b	60.0ab	12.1de	6.83ef	5.8hi
T50+CO4	0.0b	20.0b	60.0ab	1.33ij	6.66ef	4.0hi
TL	0.0b	20.0b	40.0ab	20.33c	19.3c	12.0ef
TP	0.0b	20.0b	40.0ab	5.5hi	7.3ef	34.3c
TV100	0.0b	20.0b	60.0ab	10.8de	8.6de	8.16gh
TV16	0.0b	20.0b	40.0ab	11.3de	15.5cd	17.5de
TV24	0.0b	20.0b	60.0ab	8.5fg	4.16gh	7.16gh

¹ Means within the same column with a common letter are not significantly different at $P < 0.01$ by DMRT.

ผลของกลุ่มเชื้อที่ถูกทำลายด้วยเชื้อรา *Trichoderma* spp. ต่อพัฒนาการในการเข้าทำลายบนต้นมะเขือเทศ

จากผลการทดลองที่ผ่านมา พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต M4, O3-T34 และ T35-CO4 มีศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ และลดการฟักตัวของกลุ่มไข่ได้เดือนฝอยรากปมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยเหตุนี้จึงได้นำกลุ่มไขดังกล่าวมาทดสอบความสามารถของการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในระดับโรงเรือน โดยการนำกลุ่มไข่ปลูกลงในมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 14 วัน ผลการทดลองพบว่า หลังการปลูกลงเป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T35-CO4 ยังถือเป็น *Trichoderma* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการควบคุมการเจริญและพัฒนาของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการตรวจจสอบ พบการสร้างปมเพียง 16.2 ปม และพบกลุ่มไข่เพียง 3.2 กลุ่มไข่ เทียบกับชุดทดลองควบคุมที่มีการสร้างปมถึง 53.4 ปม และกลุ่มไข่ 19.2 กลุ่ม และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง พบว่ามีการลดลงของปมและกลุ่มไข่ โดยมีปมเท่ากับ 14.0 ปม และกลุ่มไข่เท่ากับ 2.6 กลุ่ม (ชุดทดลองควบคุมพบปม 57.0 ปม และกลุ่มไข่ 21.2 กลุ่ม) และเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมงหลังการตรวจจสอบ พบว่าปริมาณปมและกลุ่มไข่ลดลงอย่างชัดเจน โดยมีจำนวนปมเท่ากับ 10.4 ปม และมีการสร้างกลุ่มไข่เพียง 1.2 กลุ่ม เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุมที่มีการสร้างปมเพิ่มมากขึ้นถึง 63.6 ปม และมีการพบกลุ่มไข่มากถึง 28.4 กลุ่มไข่ (Table 3)

จากการทดลองที่กล่าวมาทั้งหมด จะเห็นได้ว่าเชื้อราในสกุล *Trichoderma* spp. มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งแท้จริงแล้วเชื้อราในสกุลดังกล่าวส่วนใหญ่ก็มีกลไกในการเป็นปฏิปักษ์ที่ค่อนข้างหลากหลาย เช่น รายงานของ Calderón et al. (1993) และ Bigirimana et al. (1997) พบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถกระตุ้นให้พืชตระกูลถั่ว

ต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคและไส้เดือนฝอย โดยการเปลี่ยนแปลงกระบวนการ transcriptomic, proteomic และการสร้างสารทุติยภูมิชนิดอื่น ๆ เพื่อให้พืชมีการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุได้รวดเร็วขึ้น เช่น การให้พืชสร้างกรด salicylic acid ซึ่งเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกรณีมีการเข้าทำลายของศัตรูพืชได้รวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบกระบวนการที่คล้ายคลึงกันในพืชหลายชนิด (Hewezi et al., 2018; De Palma et al., 2019)

Table 3 Effects of *Trichoderma* spp. isolate M4, O3-T34, and T35-CO4 on infestation of *Meloidogyne incognita* in tomato under greenhouse condition.

Isolate name	Index of investigation ¹					
	Number of galls/root system			Number of egg mass/root system		
	24 hours	48 hours	72 hours	24 hours	48 hours	72 hours
Control	53.4a	57.0a	63.6a	19.2a	21.2a	28.4a
M4	20.4b	18.0b	12.0bc	2.6c	3.0b	2.4b
O3-T34	19.2bc	16.6bc	12.2b	3.8b	3.2b	2.2bc
T35-CO4	16.2c	14.0bc	10.4c	3.2bc	2.6c	1.2c
Healthy	0.0d	0.0c	0.0d	0.0d	0.0d	0.0d

¹ Means within the same column with a common letter are not significantly different at $P < 0.01$ by DMRT.

สรุปผลการศึกษา

เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 22 ไอโซเลต พบว่ามีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้อย่างรวดเร็ว โดยที่หลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 4 วัน เชื้อราสามารถเจริญได้เท่ากับ 9.0 เซนติเมตรในทุกไอโซเลต ทำการตรวจสอบความสามารถของเชื้อราในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ ลดอัตราการฟักตัว และลดการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* บนต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 14 วัน พบว่าให้ผลสอดคล้องกันทุกการทดลอง คือเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ M4, O3-T34 และ T35-CO4 มีศักยภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ ลดการฟักตัว และลดการเข้าทำลาย รวมถึงชะลอการพัฒนารากของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อราเพื่อเป็นทางเลือกในการควบคุมไส้เดือนฝอยสาเหตุรากปม ซึ่งยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปถึงความสามารถของเชื้อราในการจัดการความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ ผลกระทบต่อพืช รวมไปถึงการจัดจำแนกเชื้อราให้ถูกต้องตามหลักการ เพื่อให้งานวิจัยมีประสิทธิภาพและเป็นประโยชน์ต่อการเกษตรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จิระเดช แจ่มสว่าง ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรา *Trichoderma* spp. และคำแนะนำต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2553. ไตรโคเดอร์มา: เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรวมาส เจริญรักษ์. 2559. ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma asperellum* ในการลดโรคเมล็ดต่างส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตของข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม.
- สมชาย สุขะกุล. 2549. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช และการควบคุม. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Al-Hazmi, A. S., and TariqJaveed, M. 2016. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23(2): 288-292.
- Aness, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Heraud, C., and Steinberg, C. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology* 114(9): 691-701.
- Arayungsarit, L. 1987. Yield ability of rice varieties in fields infested with root-knot nematode. *IRRI* 12(5): 14.
- Bigirimana, J., De Meyer, G., Poppe, J., Elad, Y., and Höfte, M. 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Ghent University; Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen* 62: 1001-1007.
- Calderón, A. A., Zapata, J. M., Muñoz, R., Pedreño, M. A., and Barceló, A. R. 1993. Resveratrol production as a part of the hypersensitive-like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *New Phytologist* 124: 455-463.

- De Palma, M., Salzano, M., Villano, C., Aversano, R., Lorito, M., Ruocco, M., et al. 2019. Transcriptome reprogramming, epigenetic modifications and alternative splicing orchestrate the tomato root response to the beneficial fungus *Trichoderma harzianum*. *Horticulture Research* 6(5): 1-15.
- Evans, K, Trudgill, D. L., and Webster, J. M. 1993. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*. pp. 648. Cambridge, UK: University Press.
- Galano, C. D., Gapasin, R. M., and Lim, J. L. 1996. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* isolates for the control of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* (Kofoed and White) Chitwood) in sweet potato. *Annals of Tropical Research* 18: 4-12.
- Gortari, M. C., and Hours, R. A. 2008. Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. *Mycological Progress* 7(4): 221-238.
- Hewezi, T., Pantalone, V., Bennett, M., Stewart, C. N., and Burch-Smith, T. M. 2018. Phytopathogen-induced changes to plant methylomes. *Plant Cell Reports* 37: 17-23.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., et al. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9): 946-961.
- Khun-in, A., Sukhakul, S., Chamswarng, C., Tangkijchote, P., and Sasnarukkit, A. 2015. Culture filtrate of *Pleurotus ostreatus* isolate Poa3 effect on egg mass hatching and juvenile 2 of *Meloidogyne incognita* and its potential for biological control. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 21(1): 46-54.
- Manzanilla-Lopez, R. H., Kenneth, E., and Bridge, J. 2004. Plant diseases caused by nematodes. In *Nematology-advances and perspectives*. Volume II: Nematode management and utilization, Z. X. Chen, S. Y. Chen, and D. W. Dickson, eds. pp. 637-716. Cambridge, UK: CABI Publishing.
- Martínez-Medina, A., Fernández, I., Lok, G. B., Pozo, M. J., Pieterse, C. M., and Van Wees, S. C. 2017. Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytologist* 213: 1363-1377.
- Perry, R. N., and Starr, J. L. 2009. *Root-knot nematodes*. London, UK: CABI International.
- Poveda, J., Abril-Urías, P., and Escobar, C. 2020. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. *Frontiers in Microbiology* 11(992): 1-14.
- Ravichandra, N. G. 2010. *Methods and techniques in plant nematology*. Delhi, India: PHI Learning Pvt. Ltd.
- Sahebani, N., and Hadavi, N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry* 40(8): 2016-2020.
- Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O., and Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91(7): 687-693.
- Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., Nagan, H., Samuels, G. J., and Spiegel, Y. 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. *European Journal of Plant Pathology* 118(3): 247-258.
- Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E., and Llobell, A. 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(1): 46-55.
- Sun, M. H., Gao, L., Shi, Y. X., Li, B. J., and Liu, X. Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. *Journal of Invertebrate Pathology* 93(1): 22-28.
- Wheeler, T. A., Siders, K. T., Anderson, M. G., Russell, S. A., Woodward, J. E., and Mullinix, B. G. 2014. Management of *Meloidogyne incognita* with chemicals and cultivars in cotton in a Semi-Arid environment. *Journal of Nematology* 46(2): 101-107.
- Williason, V. M., and Hussey, R. S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8(10): 1735-1745.
- Zhang, S., Gan, Y., Xu, B., and Xue, Y. 2014. The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. *Biological Pest Control* 72: 1-8.

วันรับบทความ (Received date) : 24 มิ.ย. 63

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 9 ก.พ. 64

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 6 พ.ค. 64