

Thesis Title	Control of Root Knot Nematode in Vegetable Crop by Nematophagous Fungi	
Author	Miss Sumalee Mensin	
Degree	Doctor of Philosophy (Plant Pathology)	
Thesis Advisory Committee		
	Assoc. Prof. Dr. Chaiwat To-anun	Advisor
	Lect. Dr. Sarunya Valyasevi	Co-advisor
	Lect. Dr. Ratchadawan Cheewangkoon	Co-advisor

Abstract

Isolation of nematophagous fungi of root knot nematode *Meloidogyne incognita* from infested soil in the planting areas and in the organic matter rich areas of 4 provinces e.g. Chiang Mai, Chiang Rai, Nakorn Sawan and Mae Hong Son, Thailand. Eight highly effective fungi were selected and identified, using morphological characteristics and molecular techniques. It was found that isolate DLO1-001 and MTI2-001 are *Arthrobotrys oligospora*; isolate JDI1-001 and MPI1-003 are *A. thaumasia*; isolate MSO1-001, its characteristics is close to *A. musiformis* whereas isolate API3-001 is *A. conoides* while isolate KJO1-003 and WJI1-003 are *Pochonia* sp. and *Paecilomyces* sp., respectively. All 6 isolates of *Arthrobotrys* destroyed J2 of *M. incognita* at 90-100% by using adhesive net; *Pochonia* sp. and *Paecilomyces* sp. use their hyphae to penetrate through egg walls.

Studying factors affecting growth and sporulation of 8 isolates of nematophagous fungi in the laboratory e.g. 6 kinds of media, 5 temperature levels, 4 light settings, and 3-10 pH levels. It was shown that CMA stimulated good growth of all isolates while PCA stimulated sporulation. Every isolates grew quickly and produced numerous spores at 25°C and 30°C. At 24 hr. dark condition the fungi produced only mycelium while at 24 hr. light condition the fungi produced spores. All the tested fungi could grow and produce spore better at pH 8 and pH 7 than at pH 3-6 and pH 9-10.

A study on impact of 14 pesticides e.g. 6 insecticides, 5 fungicides and 3 herbicides on growth inhibition of 8 isolates of nematophagous fungi by adding into PDA at 1/3x, 1/2x, 1x and 2x of the recommended rates at laboratory conditions. Results showed that 3 insecticides e.g. dazomet, carbaryl and chlorpyrifos; 3 fungicides e.g. metalaxyl mixed with mancozeb, fosetyl aluminium and quintozene mixed with etridiazole and 2 herbicides e.g. paraquat dichloride and oxyfluorfen could inhibit growth and sporulation of the fungi. These pesticides inhibited growth of *Arthrobotrys* spp. more than *Pochonia* sp. and *Paecilomyces* sp. while the insecticides lambda-cyhalothrin, dinitroterfuran and methomyl; the fungicides tolclofos methyl and propamocarb hydrochloride and the herbicide glyphosate-isopropylammonium had small effect on fungal growth.

Testing methods on multiplication of 8 isolates of nematophagous fungi on 7 kinds of cereals in different mixture to induce biomass production and sporulation in the laboratory prior to field application. Results showed that coarsely ground corn grain medium was best on inducing sporulation of all tested fungi while rice grain

medium, rice grain mixed with V8 juice and crushed corn grain mixed with V8 juice media showed sporulation on inducing spore production of *Arthrobotrys oligospora* isolate MTI2-001, *A. conoides* isolate API3-001 and *Paecilomyces* sp. isolate WJI1-003. The three isolates were cultured on 8 kinds of liquid media on shaker for 14 days. The fungi were incubated in a clean room at $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 7 days. It was found that the liquid medium namely enteromorphothoraceae was most suitable for increasing fresh and dry weight of mycelium together with stimulating spore production.

Comparison on effectiveness of various applications of 8 isolates of nematophagous fungi on stimulating plant growth and reducing root knot nematode population was carried out in the greenhouse. Results showed that the fungal biomass mixed with two seedling media could increase germination of head lettuce seed up to higher than 90%. Biomass of *Arthrobotrys conoides* isolate API3-001 could stimulate root length most, whereas biomass of *Paecilomyces* sp. isolate WJI1-003 could increase fresh and dry weight of head lettuce most. When the seedlings were transferred to the planting pots that had been inoculated with *Meloidogyne incognita*, it was found that the seedlings in the fungal biomass media could grow well except root length especially Medium 2 amended with *Paecilomyces* sp. isolate WJI1-003 and *Pochonia* sp. isolate KJO1-003. However, the effectiveness was not good enough on root knot reduction when compared to the control treatment. On the other hand, the application of cow dung manure amended with fungal biomass incubated in the soil inside the planting pots for 7 days before transplantation of the seedlings, it was found that the root length and fresh weight of head lettuce shoot were higher than the controls; *Paecilomyces* sp. isolate WJI1-003 was the best of all. Moreover, all

applications could reduce a number of knots per root of head lettuce and baby cos lettuce by 85.75-97.51% especially *A. oligospora* isolate MTI2-001 and *A. conoides* isolate API3-001 showed most effective results.

Comparison of seedling medium 1 and medium 2 amended with each isolate of fungal biomass was made with head lettuce planted in the field. It was found that all the applications increased growth parameters except plant height; seedling medium 1 amended with *Paecilomyces* sp. isolate WJI1-003 was best on increasing fresh weight and dry weight of shoots, but not much on knot reduction which was in the range of 33.16-71.28%.

Experiment was made by using 3 most effective isolates of nematophagous fungi for control of root knot nematode in head lettuce planting plots one of which having chemical fertilizer and another without chemical fertilizer. Comparison was made by adding biomass of each fungus in each treatment. Results showed that all fungal amended treatments together with dazomet soil fumigation increased growth of the lettuce compared to controls. The treatment on using No.3 fungal biomass could increase fresh weight of the lettuce and reduce number of root knot more. Results from using fungal biomass of NO.1 mixed with No.2 and No.3; using No.2 mixed with No.3 and using No.1 mixed with No.2 at the rate of 1:1 showed very high percentages of root knot reduction by 99.37, 99.16 and 96.03% respectively. For the plots without chemical fertilizer, the fungal biomass of No.1 mixed with No.3 could increase stem height and fresh weight and reduced root knot at 89.52%.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในพืชผักด้วยเชื้อราทำลายไส้เดือนฝอย	
ผู้เขียน	นางสาวสุมาลี เม่นสิน	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (โรคพืช)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยวัฒน์ โตณันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.สรัญญา วัลยะเสวี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร.รัชดาวรรณ ชีวังกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อราทำลายไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* จากดินในแหล่งปลูกพืชที่มีไส้เดือนฝอยรากปมระบาดและพื้นที่ที่มีอินทรีหวัดอุปริมานสูงใน 4 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย นครสวรรค์ และแม่ฮ่องสอน ประเทศไทย จากนั้นคัดเลือกรากที่มีประสิทธิภาพสูงได้ 8 ไอโซเลท และจำแนกชนิดของเชื้อราตามลักษณะทางกายภาพและเทคนิคทางโมเลกุล พบว่า ไอโซเลท DLO1-001 และ MTI2-001 เป็น *Arthrobotrys oligospora* ไอโซเลท JDI1-001 และ MPI1-003 เป็น *A. thaumasia* ไอโซเลท MSO1-001 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *A. musiformis* ในขณะที่ไอโซเลท API3-001 เป็น *A. conoides* ส่วนไอโซเลท KJO1-003 และ WJI1-003 เป็น *Pochonia* sp. และ *Paecilomyces* sp. ตามลำดับ *Arthrobotrys* ทั้ง 6 ไอโซเลท ทำลายตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ระยะที่ 2 (J2) ระดับ 90-100% โดยการสร้างห้วงตาข่ายดักจับ ส่วน *Pochonia* sp. และ *Paecilomyces* sp. ทำให้ไข่ฝ่อ 70-75% ด้วยการใช้เส้นใยแทงผนังของไข่ไส้เดือนฝอย

ทำการศึกษาปัจจัยทางกายภาพสำหรับการเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด อุณหภูมิ 5 ระดับ แสง 4 ลักษณะ และความเป็นกรดด่างระดับ 3 ถึง ระดับ 10 ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างหน่วยสืบพันธุ์ของเชื้อราทำลายไส้เดือนฝอยทั้ง 8 ไอโซเลท ปรากฏว่าอาหาร CMA ช่วยส่งเสริมให้เชื้อราทุกไอโซเลทมีการเจริญเติบโตที่ดี ส่วน PCA กระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์ เชื้อราทุกไอโซเลทเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสร้างสปอร์จำนวนมากที่อุณหภูมิ 25

และ 30 องศาเซลเซียส สภาวะไม่ได้รับแสงตลอด 24 ชั่วโมงชักนำให้เชื้อราสร้างเส้นใยและการให้แสงตลอด 24 ชั่วโมงส่งเสริมการสร้างสปอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราทั้งหมดที่ทำการทดสอบสามารถเจริญและสร้างสปอร์ได้ดีที่ pH 8 และ pH 7 เมื่อเทียบกับ pH 3-6 และ pH 9-10

ทำการศึกษาผลของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช 14 ชนิด ได้แก่ สารกำจัดแมลง 6 ชนิด สารกำจัดเชื้อรา 5 ชนิด และสารกำจัดวัชพืช 3 ชนิด โดยนำมาผสมในอาหาร PDA ที่ 1/3, 1/2, 1 และ 2 เท่าของอัตราแนะนำ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทำลายไส้เดือนฝอย 8 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่า สารเคมีกำจัดแมลง 3 ชนิด ได้แก่ คาโซเม็ท กาบาริลและคลอไพริฟอส สารกำจัดเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ เมทาแลกซิลผสมแมนโคเซ็บ ฟอสอีธิลอลูมิเนียม และควินโตซีนผสมอีทรีโคอะโซล และสารกำจัดวัชพืช 2 ชนิด ได้แก่ พาราควอตไดคลอไรด์ และอ็อกซีฟลูอร์เฟน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา โดยที่สารดังกล่าวมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. มากกว่าเชื้อรา *Pochonia* sp. และ *Paecilomyces* sp. ส่วนสารกำจัดแมลงแลมปดาไซฮาโลทริน ไดโนโตรทีฟูรานและเมโทมิล สารกำจัดเชื้อราโทโคลฟอสเมทิลและไพราโมคาร์บไฮโดรคลอไรด์ และสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเซตไอโซโพรพิลแอมโมเนียมมีผลยับยั้งต่อเชื้อราเพียงเล็กน้อย

การทดสอบวิธีการเพิ่มปริมาณเชื้อราทำลายไส้เดือนฝอย 8 ไอโซเลท บนอาหาร 7 ชนิด ที่ประกอบด้วยเมล็ดธัญพืชต่างชนิดกันและผสมกับสารอาหารในรูปแบบต่างๆ เพื่อชักนำให้เชื้อราสร้างชีวมวล (biomass) และสปอร์ในสภาพห้องปฏิบัติการก่อนการนำไปใช้งานในสภาพแปลงปลูก ผลปรากฏว่าอาหารเมล็ดข้าวโพดบดหยาบชักนำให้เชื้อราทุกชนิดสร้างสปอร์ดีที่สุด ในขณะที่อาหารเมล็ดข้าวเจ้า เมล็ดข้าวเจ้าผสมน้ำผักรวม(V8 juice) และเมล็ดข้าวโพดผสมน้ำผักรวมมีความเฉพาะเจาะจงในการชักนำการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Arthrobotrys oligospora* ไอโซเลท MTI2-001 เชื้อรา *A. conoides* ไอโซเลท API3-001 และเชื้อรา *Paecilomyces* sp. ไอโซเลท WJI1-003 ทำการเลือกเชื้อราที่เจริญเติบโตดีและมีประสิทธิภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยสูงสุด 3 ไอโซเลท ได้แก่ *A. oligospora* ไอโซเลท MTI2-001, *A. conoides* ไอโซเลท API3-001 และ *Paecilomyces* sp. ไอโซเลท WJI1-003 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 8 ชนิด บนเครื่องเขย่า 14 วัน และบ่มเชื้อต่อเนื่องในห้องที่สะอาด ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่า วิธีนี้ช่วยเพิ่มชีวมวลเส้นใยและการสร้างสปอร์ โดยอาหารเหลวชื่อ enteromophthoraceae เหมาะสมที่สุดสำหรับชักนำให้เชื้อราดังกล่าวเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเส้นใย รวมทั้งกระตุ้นการสร้างสปอร์

ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพรูปแบบการใช้งานเชื้อราปฏิปักษ์ 8 ไอโซเลต ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและการลดประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในผักกาดหอมห่อ ผลการทดสอบในโรงเรือนแสดงให้เห็นว่า การผสมชีวมวลเชื้อรากับวัสดุเพาะกล้าที่เปรียบเทียบกัน 2 สูตร ทำให้การงอกของเมล็ดในผักกาดหอมห่อเพิ่มขึ้นสูงกว่า 90% ชีวมวลเชื้อรา *Arthrobotrys conoides* ไอโซเลต API3-001 ส่งเสริมให้รากต้นกล้ามีความยาวมากที่สุด ส่วนชีวมวลเชื้อรา *Paecilomyces* sp. ไอโซเลต WJI1-003 ทำให้ต้นกล้าผักกาดหอมห่อน้ำหนักต้นสดและน้ำหนักต้นแห้งสูงสุด และเมื่อนำต้นกล้าดังกล่าวไปปลูกในกระถางทดลองที่มีไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* พบว่า วิธีนี้ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชยกเว้นด้านความยาวรากโดยเฉพาะอย่างยิ่งชีวมวลเชื้อรา *Paecilomyces* sp. ไอโซเลต WJI1-003 และเชื้อรา *Pochonia* sp. ไอโซเลต KJO1-003 ที่ผสมกับวัสดุเพาะกล้าสูตร 2 แต่วิธีการผสมชีวมวลเชื้อรากับวัสดุเพาะกล้าไม่สามารถลดการทำลายจากไส้เดือนฝอยรากปมในผักกาดหอมห่อได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม สำหรับวิธีการใช้ชีวมวลเชื้อราผสมกับปุ๋ยคอกแล้วนำไปรองก้นกระถางทดสอบ และหมักทิ้งไว้ 7 วันก่อนย้ายต้นกล้าลงปลูก ช่วยให้ต้นผักกาดหอมห่อและเบบี๋คอสเพิ่มความยาวรากและน้ำหนักต้นสด โดยชีวมวลเชื้อรา *Paecilomyces* sp. ไอโซเลต WJI1-003 ให้ผลดีที่สุด และการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยทั้ง 8 ไอโซเลต ด้วยวิธีนี้ สามารถลดจำนวนปมไส้เดือนฝอยต่อต้นในผักกาดหอมห่อและเบบี๋คอสได้ในระดับ 85.75-97.51% โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลต MTI2-001 และ *A. conoides* ไอโซเลต API3-001

ผลการทดสอบในสภาพแปลงปลูกพบว่า การใช้ต้นกล้าผักกาดหอมห่อที่เพาะในวัสดุเพาะกล้าสูตร 1 และสูตร 2 ผสมกับชีวมวลเชื้อราแต่ละไอโซเลตเปรียบเทียบกันแสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 กรรมวิธีช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตทุกด้านยกเว้นความสูง โดยชีวมวลเชื้อรา *Paecilomyces* sp. ไอโซเลต WJI1-003 ทำให้น้ำหนักต้นสดและน้ำหนักต้นแห้งมีค่าสูงสุดแต่ไม่ทำให้จำนวนปมลดลงมากนัก อยู่ระหว่าง 33.16-71.28 เพอร์เซ็นต์

การเปรียบเทียบการใช้เชื้อราทำลายไส้เดือนฝอยประสิทธิภาพสูงสุด 3 ไอโซเลต เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงปลูกผักกาดหอมห่อที่ใช้ปุ๋ยเคมีและไม่ใช้ปุ๋ยเคมี ได้แก่ คำรับ 1 เชื้อรา *Arthrobotrys oligospora* ไอโซเลต MTI2-001, คำรับ 2 เชื้อรา *A. conoides* ไอโซเลต API3-001 และคำรับ 3 เชื้อรา *Paecilomyces* sp. ไอโซเลต WJI1-003 โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับวิธีการใช้สารเคมีและสารชีวภัณฑ์การค้า ผลปรากฏว่าทุกคำรับที่มีการใช้เชื้อราและการรมดินด้วยสารเคมีดาโซเม็ททำให้ผักกาดหอมห่อในแปลงที่ใช้ปุ๋ยเคมีเจริญเติบโตมากกว่า

ชุดควบคุมโดยเชื้อราดำรับ 3 ช่วยเพิ่มน้ำหนักต้นสดและลดจำนวนรากปมไส้เดือนฝอยต่อต้าน ในขณะที่การใช้เชื้อราดำรับ 1 ผสมดำรับ 2 และดำรับ 3 การใช้เชื้อราดำรับ 2 ผสมดำรับ 3 และเชื้อราดำรับ 1 ผสมดำรับ 2 อัตรา 1:1 เหมาะสำหรับใช้ลดปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยจำนวนปมที่ลดลงมีค่า 99.37, 99.16 และ 96.03% สำหรับการทดสอบในแปลงที่ไม่ได้ใช้ปุ๋ยเคมีพบว่า การใช้เชื้อราดำรับ 1 ผสมดำรับ 3 เป็นกรรมวิธีที่ดีสำหรับการเพิ่มความสูง และน้ำหนักต้นสด รวมทั้งช่วยลดการสร้างรากปมได้ถึง 89.52%