

บทที่ 2

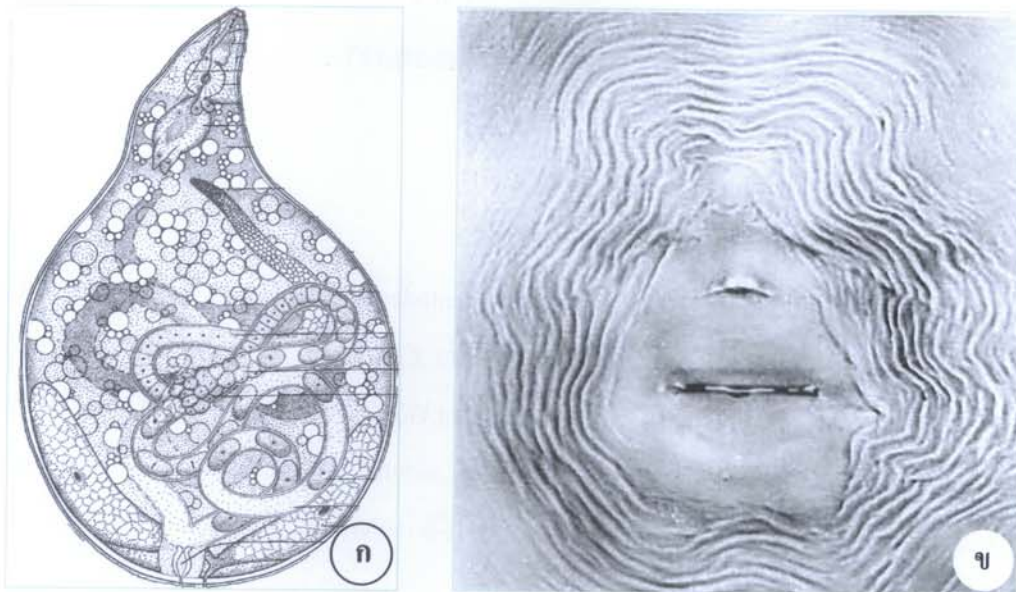
การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของไส้เดือนฝอยรากปม

ไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) เป็นไส้เดือนฝอยที่มีความสำคัญมากที่สุดชนิดหนึ่ง (Jatala, 1985) ซึ่ง Chitwood ได้แยกไส้เดือนฝอยรากปมออกจากสกุล *Heterodera* ไปไว้ในสกุล *Meloidogyne* ซึ่ง Goeldi จัดจำแนกไว้ในปี ค.ศ. 1892 โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างรอยบนส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมีย (Baicheva et al., 2002) (ภาพที่ 1) ไส้เดือนฝอยรากปมระบาดได้ดีในเขตร้อน โดยสามารถเข้าทำลายพืชได้อย่างกว้างขวางทั้งพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ พืชไร่ ไม้ผล และวัชพืช พืชที่ถูกทำลายจะแสดงอาการรากบวมพอง เป็นปุ่มปมไม่เป็นระเบียบ (root knot, gall) และกุดสั้น (ภาพที่ 2) ท่อลำเลียงน้ำและอาหารอุดตัน ลำต้นแคระแกร็น ส่งผลให้พืชมีผลผลิตลดลง หรือตายในที่สุด (Mai, 1985; Tedford and Fortnum, 1988; Baicheva et al., 2002) ความเสียหายคิดเป็นมูลค่าผลผลิตที่สูญเสียทั่วโลกประมาณ 100,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐอเมริกา (Eapen et al., 2005) ซึ่ง *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. hapla* เป็นชนิดที่มีความสำคัญมากที่สุดที่เป็นสาเหตุทำความเสียหายแก่พืชผลทางการเกษตรถึงร้อยละ 95 จากจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมที่พบทั้งหมด หรือทำให้เกิดความเสียหายกับพืชประมาณร้อยละ 10 - 15 จากความเสียหายที่เกิดจากศัตรูพืชอื่นๆ ทั้งหมด และพืชผักเป็นกลุ่มที่ได้รับความเสียหายมากที่สุด (สืบศักดิ์, 2541; Baicheva et al., 2002) เนื่องจากไส้เดือนฝอยรากปมมีการสืบพันธุ์แบบเพศเมียสามารถขยายพันธุ์ได้โดยไม่ต้องได้รับการผสมจากเพศผู้ (parthenogenesis) และสามารถออกไข่ได้ปริมาณมากจึงทำให้ไส้เดือนฝอยเพิ่มปริมาณประชากรอย่างรวดเร็ว ประกอบกับเป็นสัตว์ที่มีจำนวนโครโมโซมหลายชุด (polyploidy) จึงทำให้เกิดความผันแปรภายในชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมได้สูง ซึ่งส่งผลต่อความสามารถเพิ่มจำนวนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมเพื่อความอยู่รอดในธรรมชาติได้ดีขึ้น (Taylor and Sasser, 1978)

2. รูปร่างลักษณะทั่วไป

ไส้เดือนฝอย (nematode) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดเล็ก อยู่ใน Phylum nematoda โดยทั่วไปมีลำตัวกลมยาวคล้ายเส้นด้ายมีลักษณะเป็นแบบ bilateral symmetry ไม่มีขาหรือปล้อง



ภาพที่ 1 ลักษณะตัวเต็มวัยเพศเมีย (ก) และรอยย่นบริเวณส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* (ข)

ที่มา: Eisenback (1985)



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการรากเป็นปุ่มปม (ก) และตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม คูณกินภายในราก (ข)

ที่มา: Ferris (1999) และสมชาย (2549)

ลำตัวโปร่งแสง พบได้ทั่วไปทั้งในดิน น้ำจืด น้ำเค็ม หรือ เป็นศัตรูกับพืชหรือสัตว์ มีระบบทางสรีรวิทยาต่างๆในตัวคล้ายสัตว์ชั้นสูง แต่ไม่ครบทุกระบบ เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบสืบพันธุ์ ระบบประสาท ระบบขับถ่าย และระบบกล้ามเนื้อ ไข่เดือนฝอยเป็นสัตว์แยกเพศ ส่วนใหญ่เพศผู้และ เพศเมียมีรูปร่างเหมือนกัน แต่ตัวเมียในระยะตัวเต็มวัยมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ (sexual dimorphism) ลำตัวคงรูปร่างอยู่ได้ด้วยแรงดันของเหลวที่อยู่ภายใน (hydrostatic skeleton) มีการเจริญเติบโตจนเป็นตัวเต็มวัยโดยการลอกคราบ ไข่เดือนฝอยที่เป็นศัตรูพืชมีความยาวลำตัวโดยเฉลี่ยประมาณ 0.5-2.0 มิลลิเมตร เข้าทำลายพืชโดยใช้หลอดดูดอาหาร (stylet) รูปร่างคล้ายท่อในช่องปากแทงผนังเซลล์พืชเพื่อดูดกินสารอาหารผ่านทางท่อภายใน ลักษณะการดูดกินพืชอาจเข้าไปทั้งตัว (endoparasite) ส่วนหัวเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อพืช (semi-endoparasite) และกลุ่มที่ดูดกินภายนอก รากพืช (ectoparasite) โดยใช้เฉพาะ stylet แทงเข้าไปดูดกินภายในเนื้อเยื่อพืช (อนันต์, 2529; สืบศักดิ์, 2541)

ไข่เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) เป็นไข่เดือนฝอยศัตรูพืชที่สำคัญมากที่สุดในกลุ่มของไข่เดือนฝอยด้วยกันเอง (Jatala, 1985) ซึ่ง Ferris (1999) ได้จัดจำแนก (classification) ไข่เดือนฝอยรากปมไว้ดังนี้

Phylum Nematoda

Class Secernentea

Order Tylenchida

Suborder Tylenchina

Super family Tylenchoidea

Family Heteroderidae

Subfamily Meloidogyninae

Genus Meloidogyne

Species *Meloidogyne* spp. (73 specises)

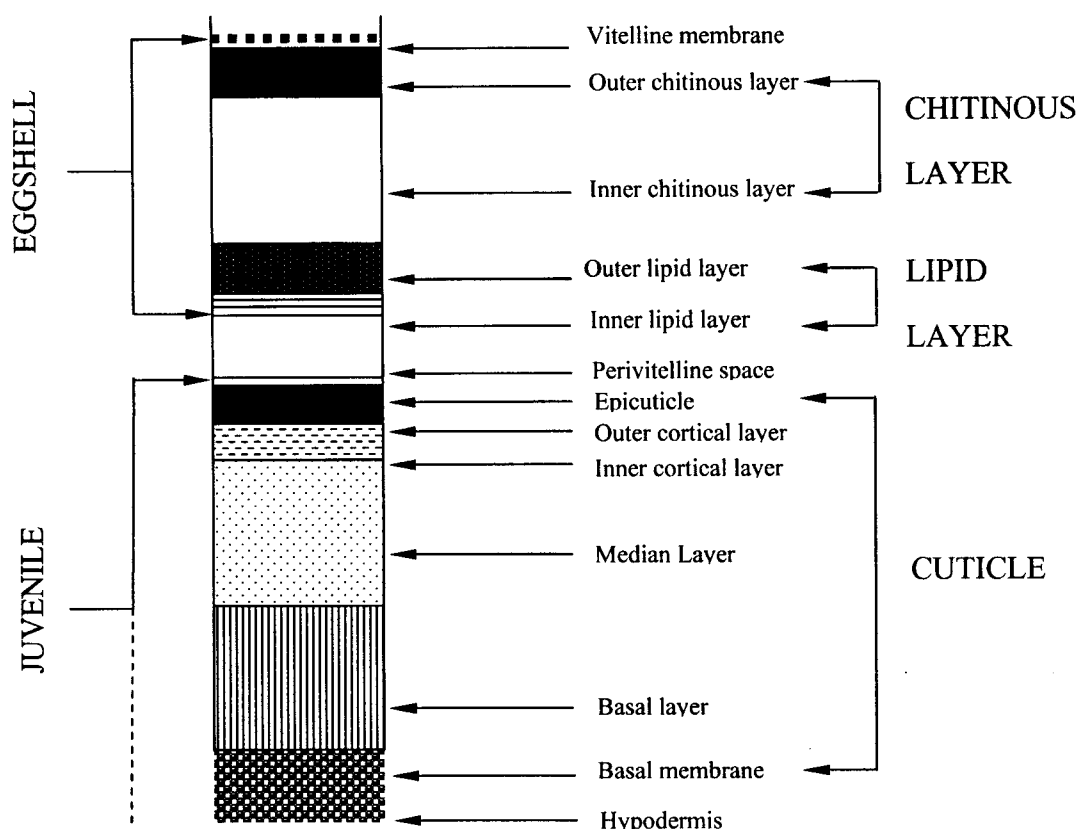
ซึ่งไข่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดคือร้อยละ 47 จากตัวอย่างดินจำนวน 662 ใน 76 ประเทศ รวมทั้งในประเทศไทย (สืบศักดิ์ และคณะ, 2530) ไข่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เป็นไข่เดือนฝอยในกลุ่ม sexual dimorphism กล่าวคือ มีรูปร่างแตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ในระยะที่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ตอนต้น รูปร่างของเพศผู้และเพศเมีย มีรูปร่างกลมยาวเรียว (vermiform) คล้ายกัน และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในตอนปลายของระยะ เพศเมียหางเริ่มหดสั้นเข้า ลำตัวพองออก เริ่มมีรูปร่างกลมขึ้นจนคล้ายถุง (saccate) มีรอยคอด

บริเวณส่วนหัว และพองกลมบริเวณส่วนท้ายเมื่อเป็นตัวเต็มวัย ส่วนตัวเต็มวัยเพศผู้ยังคงมีรูปร่างเรียวยาว หางมน ตัวเต็มวัยเพศเมียมีขนาดความยาวประมาณ 700 μm กว้าง 400 μm ส่วนเพศผู้มีความยาวประมาณ 1400 μm กว้าง 30 μm (Eisenback, 1985) ไข่เดี่ยวฟอยรากลมประกอบด้วยผนังลำตัว 3 ชั้น ได้แก่ ผนังลำตัวชั้นนอกสุด (cuticle) ผนังลำตัวชั้นกลาง (hypodermis) และ ผนังลำตัวชั้นในสุด (somatic muscles) ซึ่งผนังลำตัวชั้น cuticle ของไข่เดี่ยวฟอยรากลมในระยะตัวอ่อนที่ 2 และตัวเต็มวัยเพศผู้ ชั้น cuticle ประกอบด้วยชั้นต่างๆ 3 ชั้น คือ ชั้นนอกสุด (cortical layer) ชั้นกลาง (medial layer) และชั้นในสุด (basal layer) ส่วนตัวเต็มวัยเพศเมียชั้น cuticle ไม่พบชั้นผนังชั้นกลาง (Eisenback, 1985) ผิวหนังชั้น cuticle นี้มีส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญส่วนใหญ่เป็นโปรตีน มีไขมันและ คาร์โบไฮเดรต เป็นองค์ประกอบรวม จึงทำให้ไข่เดี่ยวฟอยรากลมทนต่อสารเคมีชนิดต่างๆ รวมทั้งสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี (Wharton, 1986) ไข่เดี่ยวฟอยรากลมมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ผิวเรียบใส รูปร่างเป็นท่อนสั้น (rod shape) มีขนาดความยาวประมาณ 95 μm และกว้าง 40 μm (Eisenback, 1985) และมักอยู่รวมเป็นกลุ่มไข่ (egg mass) ติดอยู่ภายนอก ราก โดยมีสารเมือกเหนียว (gelatinous matrix) ซึ่งมีองค์ประกอบเป็นสาร mucopolysaccharide และโปรตีนห่อหุ้มกลุ่มไข่เอาไว้เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำของไข่รวมทั้งปกป้องไข่จากการถูกศัตรูเข้าทำลาย (Bird and Soeffky, 1971; Stirling, 1991; Orion et al., 2001) ซึ่งภายในกลุ่มไข่มีไข่ตั้งแต่ประมาณ 300 – 1,000 ฟอง (Taylor and Sasser, 1978) ไข่เดี่ยวฟอยรากลมประกอบด้วยเปลือก (egg shell) 3 ชั้น (ภาพที่ 3) คือ ชั้นนอกสุด (outer vitelline layer) มีความหนาประมาณ 30 มิลลิเมตร มีองค์ประกอบเป็น lipoprotein ชั้นกลาง (chitinous or middle chitinous layer) เป็นชั้นที่มีความหนามากที่สุดโดยมีความหนาประมาณ 400 nm. ประกอบด้วยสารไคติน (chitin) ที่ถูกล้อมรอบด้วยโปรตีนอยู่ในรูป chitin/protein complex ซึ่งใน *M. incognita* โปรตีนที่พบส่วนใหญ่เป็น proline โดยมีสัดส่วนปริมาณสารไคตินร้อยละ 30 และโปรตีนร้อยละ 50 จัดเป็นชั้นที่ให้ความแข็งแรงที่สุด และชั้นในสุดเป็นชั้นไขมันบางๆ (inner lipid or inner glycolipid layer) ที่อยู่ในรูป lipoprotein ซึ่งมีบทบาทต่อความต้านทานของสารเคมี โดยการควบคุมสารที่ซึมผ่านเข้าและออกของเปลือกไข่ (Perry and Wright, 1998; Khan et al., 2004)

3. วงจรชีวิต

การเจริญเติบโตของไข่เดี่ยวฟอยรากลมมีวงจรชีวิต เริ่มจากไข่ (egg) ที่มีรูปร่างยาวรี มีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปจนเป็นตัวอ่อน (juvenile) ระยะที่ 1 อยู่ภายในไข่ และลอกคราบ (molting) ครั้งที่ 1 เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) แล้วจึงฟักออกมาจากเปลือกไข่มาอยู่ในดิน และเริ่มเคลื่อนที่เข้าหารากพืชโดยมีสารที่ซึมออกจากรากพืช (root exudates) เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญและสามารถเข้าไป

ในรากพืชหลังการฟักออกจากไข่ประมาณ 18 ชั่วโมง (Stirling, 1991) จากนั้นใช้หลอดดูดอาหาร (stylet) เลือกแทงเข้าบริเวณเซลล์ที่ต้องการบริเวณเหนือมวกรากเล็กน้อยพร้อมจับเอนไซม์ออกมาช่วยในการแทงผ่านสู่ราก และแทรกตัวเข้าสู่รากและขนานตัวไปกับความยาวราก โดยการเคลื่อนที่ไประหว่างเซลล์ (Perry and Wright, 1998) ผ่านเข้าไปอยู่ในเซลล์พืชชั้น cortex เข้าสู่ส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อท่อลำเลียง (vascular tissue) เมื่อเลือกเซลล์ที่ต้องการได้แล้ว ใช้ stylet ดูดกินสารอาหารจากเซลล์พืช ทำให้เซลล์พืชบริเวณรอบๆ หัวไส้เดือนฝอยจำนวน 5 – 9 เซลล์ ขยายใหญ่ผิดปกติที่เรียกว่า “เซลล์ยักษ์” (giant cells) เซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่เป็นที่สะสมสารอาหารที่ซึมออกมาจากเซลล์บริเวณใกล้เคียง และไส้เดือนฝอยดูดกินสารอาหารจากเซลล์ยักษ์นี้ นอกจากนี้เซลล์ที่อยู่รอบๆ เซลล์ยักษ์มีการแบ่งตัวมากกว่าปกติ (hyperplasia) ทำให้รากเริ่มบวมพอง



ภาพที่ 3 ภาพตัดตามขวางแสดงลำดับชั้นต่างๆของเปลือกไข่ (egg shell) จนถึงตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ของไส้เดือนฝอยอันดับ Tylenchida

ที่มา : Stirling (1991)

ขณะเดียวกันตัวไส้เดือนฝอยเริ่มขยายขนาดใหญ่มากขึ้น และลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 โดยเพศเมียจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างชัดเจนและลอกคราบอีกครั้งเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 ซึ่งเพศเมียมีรูปร่างอ้วนกลมเป็นถุง (saccate form) ลำตัวเอียงทำมุมกับราก หันส่วนก้นไปอยู่บริเวณใกล้ผิวราก สร้างถุงไข่ และ gelatinous matrix ออกมาห่อหุ้มไข่ (eggs) เป็นกลุ่มไข่ (egg mass) ที่มักเป็นสีน้ำตาล และยื่นออกมาที่ผิวภายนอกรากพืช โดยหนึ่งกลุ่มไข่มีไข่ประมาณ 300 ถึง 1,000 ฟอง และนอกจากนี้เพศเมียสามารถขยายพันธุ์ได้เองโดยไม่ต้องอาศัยการผสมจากเพศผู้ (parthenogenesis) วงจรชีวิตตั้งแต่เป็นตัวอ่อนจนเป็นตัวเต็มวัยที่มีไข่มีระยะเวลาไม่แน่นอน ขึ้นกับพืช อุณหภูมิ ความชื้นในดิน ชนิดพืชอาศัย และช่วงแสง ส่วนเพศผู้เมื่อผ่านระยะ metamorphosis ยังคงรูปร่างปกติ โดยเมื่อลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 รูปร่างยาวขึ้นพร้อมกับมีการพัฒนาของอวัยวะเพศ เมื่อเป็นตัวเต็มวัยจะผสมพันธุ์กับเพศเมียแล้วออกจากรากมาอยู่ในดิน และมีวงจรชีวิตประมาณ 3–5 สัปดาห์ (ภาพที่ 4)

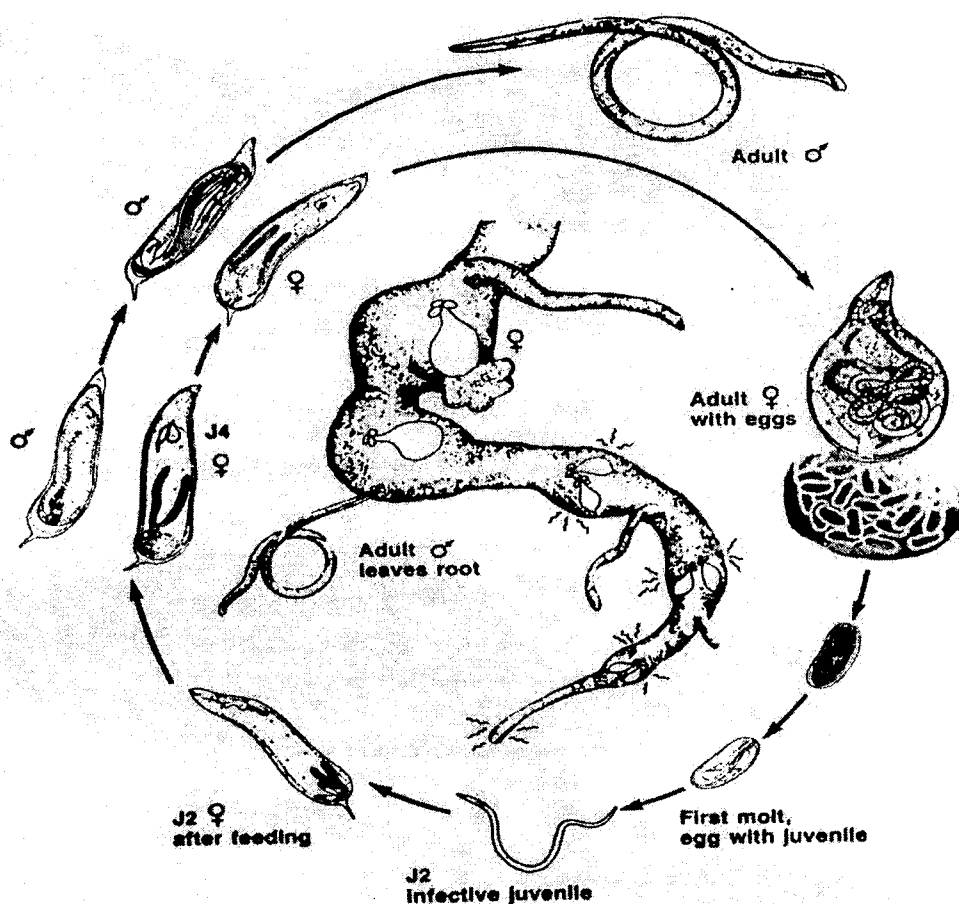
4. การแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากปม

มีรายงานว่าไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ที่ทำความเสียหายให้กับพืชปลูกทั่วโลกประมาณ 73 ชนิด (Ferris, 1999) โดยมักพบการระบาดของ *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. arenaria* ในเขตร้อน ส่วนเขตหนาวพบการระบาดของ *M. hapla* โดยที่ *M. incognita* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดถึงร้อยละ 47 (สืบศักดิ์ และคณะ, 2530) รองลงมาได้แก่ *M. javanica* และ *M. arenaria* ตามลำดับ (Taylor and Sasser, 1978) สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการสำรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 8 ชนิด ได้แก่ *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. exigua*, *M. microcephalola* และ *M. naasi* (คมกฤษ, 2539) และชนิดที่พบระบาดแพร่หลายที่สุดคือ *M. incognita* โดยทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในพืชมากมายหลายชนิด ทั้งพืชผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ พืชไร่ และไม้ผล (สืบศักดิ์ และคณะ, 2530)

5. ความเสียหายของพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม

เนื่องจากไส้เดือนฝอยรากปมสามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจทุกประเภท โดยเฉพาะพืชผัก พบความเสียหายในหลายตระกูล เช่น Solanaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Chenopodiaceae, Compositae, Umbelliferae, Cruciferae และ Malvaceae เช่น พริก มะเขือเทศ ยาสูบ มะเขือ กระเจี๊ยบเขียว กะหล่ำปลี แครอท ผักคื่นช่าย และมันเทศ เป็นต้น จากรายงานของ International Meloidogyne Project (IMP) ที่มีการศึกษาการลดลงของผลผลิตพืชจากการเข้าทำลายของ *Meloidogyne* spp. ในหลายประเทศ เช่น ในประเทศเม็กซิโกผลผลิตของถั่ว มะเขือเทศ กาแฟ และ

แตงกวา และ แครอท เป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* โดยข้าวโพดลดลงร้อยละ 30-100 (Sosa-Moss, 1985) ซึ่ง Bafokzura (1983) พบว่า มะเขือเทศ มีจำนวนปม และจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ต่อกลุ่มไข่มาก ส่วนกะหล่ำปลี และ พริก เป็นพืชที่ค่อนข้างทนทานต่อการเข้าทำลายหรือเป็นพืชอาศัยที่ไม่ค่อยดี ซึ่ง Huang และคณะ (1986) พบว่าแครอทพันธุ์ Brasilia และ Tropical เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานส่วนพันธุ์ Nantes Superior และ Shin Kuroda เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของ *M. javanica* สำหรับพริก Lindsey และ Clayshulte (1982) รายงานว่าพริกเผ็ด (pungent pepper) สายพันธุ์ Big Jim, Jalapeno และ New Mexico No.6 ที่ปลูกในแปลงขนาดเล็ก อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของ *M. incognita* โดยในแปลงที่มีปริมาณตัวอ่อนระยะที่ 2 และ ปริมาณไข่ตั้งแต่ 385 ถึง 4,230 ต่อดิน 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร



ภาพที่ 4 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. โดยตัวอ่อนระยะที่ 2 เข้าคูคินรากพืชในรากพืช แล้วพัฒนาเป็นตัวอ่อนวัยที่ 3, 4 และตัวเต็มวัยภายในรากพืช ซึ่งจากภาพไม่แสดงตัวอ่อนระยะที่ 3

ที่มา : Nickle (1992)

ทำให้พริกแสดงอาการแคะแกร็นอย่างรุนแรง น้ำหนักต้นแห้ง น้ำหนักผลแห้ง และจำนวนผลผลิตลดลงเมื่อเทียบกับแปลงที่ไม่มีไส้เดือนฝอย นอกจากนี้ยังพบว่าพริกสายพันธุ์ Jalapeno, New Mexico 6-4 และ Sandia อ่อนแอต่อ *M. incognita* เช่นเดียวกัน โดยพันธุ์ New Mexico 6-4 อ่อนแอมากที่สุด มีน้ำหนักผลลดลงร้อยละ 10 เมื่อดินปลูกมีความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยจำนวน 12 ไข่หรือตัวอ่อนระยะที่ 2 ต่อดิน 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ส่วนพันธุ์ Sandia และ Jalapeno มีจำนวนผลพริกต่อต้นลดลง เมื่อดินปลูกมีความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยจำนวนตั้งแต่ 33 และ 95 ไข่หรือตัวอ่อนระยะที่ 2 ต่อดิน 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ (Thomas et al., 1995) ส่วนในพริกหวาน (sweet pepper) ประชากรเริ่มต้นของ *M. incognita* ตั้งแต่ 0.165 ตัวต่อดิน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะทำให้ผลผลิตของพริกหวาน (sweet pepper) ลดลง (Di Vito et al., 1992)

ในประเทศไทยสำรวจพบการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมและทำความเสียหายในแปลงปลูกพืชให้กับพืชชนิดต่างๆ เช่น มันสำปะหลัง ถั่วเหลือง เผือก มะละกอ มะเขือเทศ มะเขือม่วง มะเขือยาว กระเจี๊ยบเขียว แตงไทย แตงโม ผักกาดหอม ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว ไร่ค้าง บวบ และสตวอช เป็นต้น (นัยนา, 2526; นุชนารถ, 2528; อนุชา, 2537; อนันต์ และพิศาล, 2538; กนกพรธม, 2544) และได้ศึกษาถึงผลกระทบที่มีต่อการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด สติรวงศ์ (2526) ศึกษาพบว่า ถ้าใส่กลุ่มไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* จำนวน 5 กลุ่มไข่ต่อต้น ในกล้ามะเขือเทศอายุ 0-2 สัปดาห์ จะทำให้มะเขือตายภายใน 5-6 สัปดาห์ สุรางค์ (2526) ทำการศึกษาพบว่าที่ระดับจำนวนประชากรตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ *M. incognita* 500, 2,000 และ 5,000 ตัว ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของกระเจี๊ยบเขียวลดลง และทำให้น้ำหนักเมล็ดแห้งลดลงร้อยละ 20.54, 18.54 และ 39.19 ตามลำดับ ยุทธศักดิ์ (2530) ศึกษาพบว่า กลุ่มไข่ของ *M. incognita* จำนวน 15 กลุ่มไข่สามารถลดการเจริญเติบโตของผักกาดหอมทั้งความสูงและน้ำหนัก โดยพบความเสียหายน้อยในผักกาดหอมที่มีอายุมากขึ้น จากการทดสอบในฤดูฝนและฤดูหนาวพบว่าการปลูกผักกาดหอมพร้อมใส่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* จะให้ความสูงลดลงร้อยละ 32.33 และ 39.90 น้ำหนักต้นสดลดร้อยละ 47.99 และ 43.21 และมีอัตราการเกิดปมที่รากในระดับ 3.6 และ 3.5 ตามลำดับ ในขณะที่ผักกาดหอมที่ถูก *M. incognita* เข้าทำลายเมื่ออายุ 30 วัน มีความสูงลดลงร้อยละ 18.56 และ 13.39 น้ำหนักต้นสดลดร้อยละ 24.17 และ 19.83 อัตราการเกิดปมที่รากในระดับ 3 และ 2.9 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สืบศักดิ์ (2541) รายงานว่า *M. incognita* เป็นชนิดที่พบระบาดและทำความเสียหายให้กับผักมากที่สุด โดยสามารถลดผลผลิตรวม และความสูงของมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ลงได้ร้อยละ 51 และ 18 ตามลำดับ จากการทดสอบในกระถาง และพบการระบาดทำความเสียหายในแปลงปลูกพืชให้กับพืชชนิดต่างๆ เช่น มะละกอ มะเขือเทศ มะเขือม่วง มะเขือ

ยาว กระเจี๊ยบเขียว แดงไทย แดงโม ผักกาดหอม ถั่วเขียว ถั่วฝักยาว ไร่ค่าง บวบ และ สควอช เป็นต้น (อนุชา, 2537; กนกพรรณ, 2544)

6. การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

การป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมมีหลายวิธีการ Taylor และ Sasser (1978) รายงานว่าการไถพรวนดินตากแดดในช่วงฤดูแล้ง นาน 2-4 สัปดาห์ ทำลายไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมที่อยู่บริเวณผิวดินได้ แต่วิธีนี้อาจมีข้อจำกัดในบางพื้นที่และบางฤดูกาล

การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่ดีและประหยัด แต่อาจต้านทานต่อไส้เดือนฝอยระยะหนึ่งเท่านั้นเนื่องจากไส้เดือนฝอยสามารถปรับตัวเข้าทำลายพืชได้ นอกจากนี้พืชที่ต้านทานต่อไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลหนึ่ง อาจเป็นพืชอ่อนแอต่อไส้เดือนฝอยสกุลอื่นหรือไส้เดือนฝอยสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิด (species) ได้ และการปลูกพืชในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันอาจทำให้พืชสูญเสียความต้านทานได้เช่นกัน (Giebel, 1982)

การปลูกพืชหมุนเวียนโดยเลือกพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัยปลูกสลับมักไม่ค่อยได้ผลเนื่องจากไส้เดือนฝอยรากปมมีพืชอาศัยกว้าง อย่างไรก็ตาม Rhoades (1976) พบว่าการปลูก hairy indigo (*Indigofera hirsuta*) ในดินที่มีการระบาดของ *M. incognita* และ *M. javanica* ก่อนแล้วปลูกแตงกวาตามหลัง ทำให้แตงกวาเกิดโรครากปมน้อยและได้ผลผลิตสูงกว่าแตงกวาที่ปลูกตามหลังข้าวฟ่างและโสน การวางแผนการปลูกพืชที่ดีจะช่วยลดจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยรากปมให้อยู่ในระดับต่ำสุดที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยปลูกพืชที่ต้านทานก่อนเพื่อลดจำนวนไส้เดือนฝอยในดิน เมื่อปลูกพืชหลักซึ่งอ่อนแอต่อไส้เดือนฝอย ทำให้ช่วงต้นฤดูปลูกยังมีประชากรไส้เดือนฝอยต่ำ จะช่วยลดความเสียหายจากพืชได้ และเมื่อประชากรไส้เดือนฝอยเพิ่มสูงขึ้นในปลายฤดูพืชก็ทำการลดปริมาณไส้เดือนฝอยในดินโดยการปลูกพืชต้านทานหมุนเวียนต่อไป (Taylor and Sasser, 1978)

วิธีการใช้พืชต้าน (antagonistic plant) เช่น ดาวเรือง ละหุ่ง และเบญจมาศในบางสายพันธุ์สามารถลดจำนวนประชากรของ *M. incognita* ได้โดยตัวอ่อนตายเมื่อเข้าไปในราก ทำให้รากไม่เป็นปม (Hackney and Dickerson, 1975) Belcher และ Hussey (1977) พบว่าเมื่อตัวอ่อนระยะที่สองเข้าไปในรากดาวเรืองจะเกิดการตายเนื่องจากเกิด hypersensitive necrotic ของเซลล์ราก โดยภายใน 2 สัปดาห์สามารถลดจำนวน *M. incognita* ได้ร้อยละ 97 แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งไส้เดือนฝอยมีความผันแปรสูงขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและสายพันธุ์ของดาวเรือง กับชนิด และสายพันธุ์ (race) ของ *Meloidogyne* spp.

การใช้สารเคมีเป็นวิธีการที่สะดวกและมีประสิทธิภาพสูง สารเคมีหลายชนิดที่ใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดี เช่น aldicarb, carbofuran, chloropicrin, 1, 3-D, DBCP, D-D mixture, EDB, ethoprop, fenamiphos, fensulfothio, methyl bromide, oxamyl, methan, thionazin เป็นต้น (Taylor and Sasser, 1978; Dropkin, 1980; Jonhson, 1985) แต่ปัญหาของการใช้สารเคมีเหล่านี้คือมีราคาแพง จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่เฉพาะ พร้อมทั้งส่งผลกระทบต่อมาในเรื่องสารพิษตกค้างในระบบนิเวศน์เมื่อมีการใช้เป็นระยะเวลานาน และใช้อย่างเกินความจำเป็น (Taylor and Sasser, 1978; Jatala, 1985)

การควบคุมโดยชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษากันมากและเป็นระยะเวลายาวนานซึ่งจะมีบทบาทสำคัญในอนาคตต่อการนำมาใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดของการกำจัดไส้เดือนฝอยรากปม

7. การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธี

การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธี เป็นวิธีการนำสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูธรรมชาติมาใช้ในการควบคุมหรือทำลายไส้เดือนฝอย แม้จะเป็นวิธีการที่ได้ผลช้า แต่ให้ผลในการควบคุมอย่างยั่งยืน และที่สำคัญปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนสิ่งมีชีวิตอื่นๆ รวมทั้งมนุษย์มากกว่าการใช้สารเคมี โดยเฉพาะสารที่มีคุณสมบัติย่อยสลายตัวช้า มีการศึกษาการนำศัตรูธรรมชาติมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ศัตรูธรรมชาติของไส้เดือนฝอยมีหลายกลุ่ม เช่น

7.1 เชื้อรา (Nematophagous fungi)

เชื้อราที่ทำลายไส้เดือนฝอยรากปม เป็นศัตรูธรรมชาติที่มีการศึกษาวิจัยกันมาก มีรายงานพบเชื้อราจำนวน 15 สกุล (genus) มากกว่า 400 ชนิด (species) ที่สามารถทำลายไส้เดือนฝอยได้ (Stirling, 1984) ลักษณะของการทำลายโดยการเป็นปรสิต (parasite) หรือเป็นตัวห้ำ (predator) ต่อไส้เดือนฝอยในระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราตามลักษณะของการทำลายได้หลายกลุ่ม เช่น

7.1.1 เชื้อราสร้างห้วงหรือกับดักกาวเหนียว (Nematode – trapping fungi)

เชื้อรากลุ่มนี้มีชื่อเรียกอื่นๆว่า predatory fungi เนื่องจากสามารถสร้างโครงสร้างพิเศษเพื่อใช้ดักจับไส้เดือนฝอย ซึ่ง Stirling (1991) และ Kerry และ Jaffee (1997) รายงานว่าเชื้อราสามารถสร้างโครงสร้างพิเศษที่มีรูปร่าง 6 แบบ ตามภาพที่ 5 ได้แก่

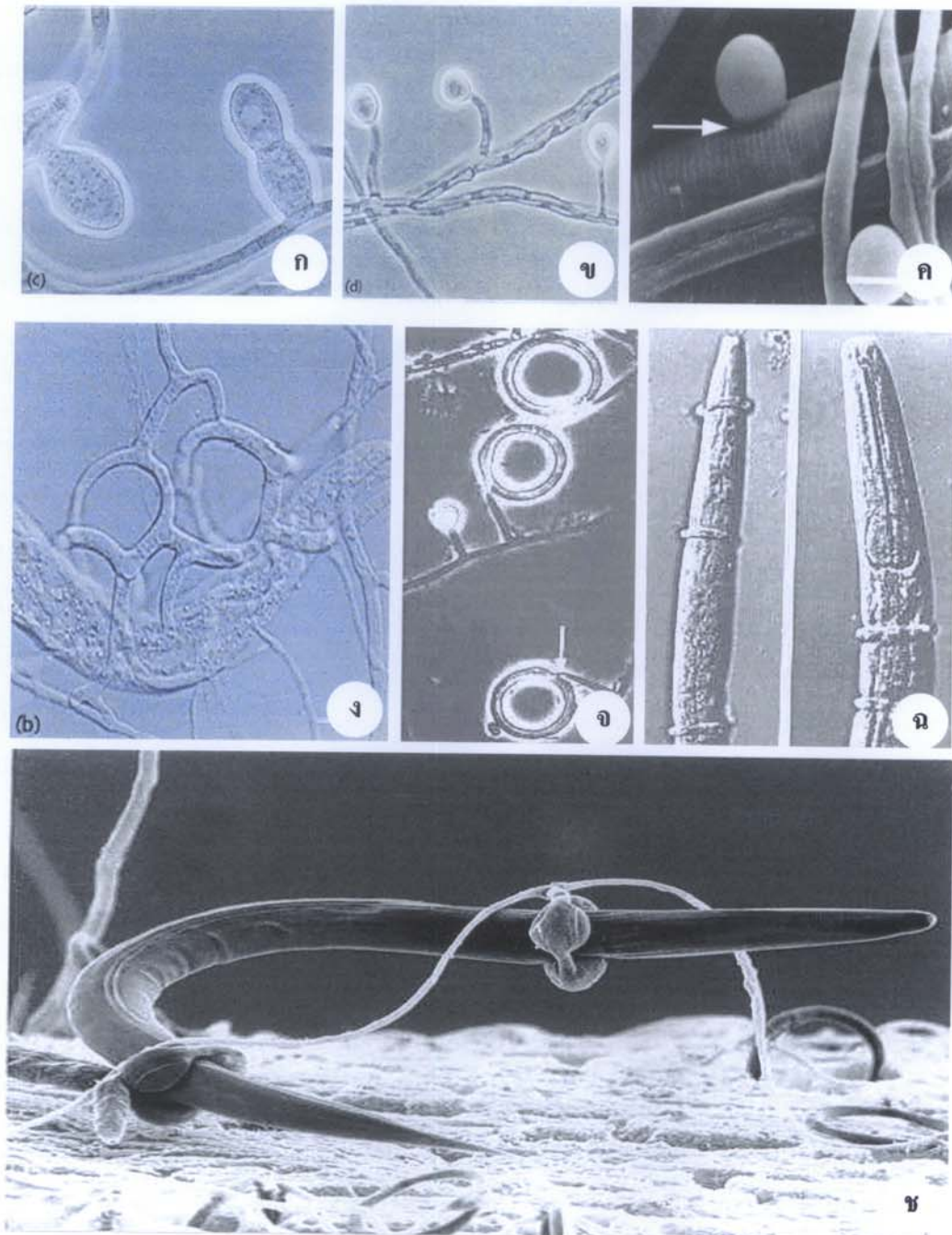
ก. **Adhesive hypha** โดยเส้นใยเชื้อราสร้างสารสีเหลืองที่มีคุณสมบัติเป็นกาวเหนียวเพื่อใช้ดักจับไส้เดือนฝอย

ข. Adhesive branches เป็นเส้นใยที่เจริญแตกกิ่งก้านออกไปจากเส้นใยเดิมเพื่อใช้เป็นโครงสร้างพิเศษสำหรับดักจับไส้เดือนฝอย โดยโครงสร้างนี้ประกอบด้วย 1-3 เซลล์ (ภาพที่ 5 ก) และสร้างสารที่มีลักษณะเป็นกาวเหนียว เชื้อราที่สร้างโครงสร้างนี้เพื่อทำลายไส้เดือนฝอยรากปม เช่น *Monacrosporium cionopagum* (Jaffee and Muldonn, 1995)

ค. Adhesive knob โดยเชื้อราสร้างเส้นใยพิเศษ ก้านสั้น หรือไม่มี และแตกแขนงจากด้านข้าง บริเวณส่วนปลายมีลักษณะโป่งออกเป็นก้อนกลม และเป็นตุ่มเหนียวเพื่อใช้ดักจับไส้เดือนฝอย (ภาพที่ 5 ข และ ค) เชื้อราที่สร้างโครงสร้างนี้เพื่อทำลายไส้เดือนฝอยรากปม เช่น *Monacrosporium ellipsosporum* (Jaffee and Muldonn, 1995)

ง. Adhesive networks เป็นกับดักเส้นใยที่พัฒนามาจาก adhesive branches โดยเส้นใยเจริญเป็นร่างแหและแตกกิ่งก้าน ที่บริเวณปลายเส้นใยม้วนงอเข้ามาชนและรวมกับเส้นใยเดิม (parent hypha) เกิดเป็นวงแหวนเส้นใย (loops) ขึ้น และสร้างวงแหวนเส้นใยวงใหม่บนวงแหวนเดิม หรือบนเส้นใยเดิม จนกระทั่งเกิดเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อน ลักษณะเป็นบ่วงตาข่ายเหนียว 2 หรือ 3 ระนาบ (two or three - dimentional networks) (ภาพที่ 5 ง) เชื้อราที่สร้างโครงสร้างนี้เพื่อทำลายไส้เดือนฝอยรากปม เช่น *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis* ซึ่งจากการทดสอบในกระถางพบว่า *A. conoides* สามารถลดการเกิดปม และจำนวนไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่รากข้าวโพด โดยตัวอ่อนระยะที่ 2 ลดลงมากกว่าร้อยละ 84 ซึ่งประสิทธิภาพการควบคุมขึ้นอยู่กับอุณหภูมิดิน ช่วงเวลา และ ปริมาณเชื้อที่ใส่เชื้อลงไปดิน ซึ่งเชื้อราจะมีประสิทธิภาพในการควบคุม *M. incognita* ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิดิน 25 °ซ โดยใส่เชื้อราลงไปในดินนาน 2 สัปดาห์แล้วจึงใส่ *M. incognita* ตามลงไป (Al-Hazmu et al., 1982)

จ. Non – constricting ring เป็นกับดักเส้นใยที่มีลักษณะเป็นวงแหวน โดยเป็นห่วงวงแหวนที่ประกอบด้วย 3 เซลล์ที่เกิดบนก้านที่เจริญมาจากเส้นใย การทำลายเกิดขึ้นเมื่อไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้าไปในห่วง ส่วนของเส้นใยเชื้อราที่บริเวณสัมผัสไส้เดือนฝอยจะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า extracellular fibrils ที่ทำหน้าที่คล้าย appressorium สำหรับยึดจับตัวไส้เดือนฝอยให้แน่นเพื่อให้เส้นใยเชื้อราแทงผ่านผนัง cuticle ได้ง่ายขึ้น (ภาพที่ 5 จ และ ฉ) เชื้อราที่สร้างโครงสร้างนี้เพื่อทำลายไส้เดือนฝอยรากปม เช่น *A. conoides* ซึ่งมีรายงานการศึกษาที่พบว่าเชื้อรา *A. conoides* มีประสิทธิภาพทำให้การเกิดโรครากปมข้าวโพดที่เกิดจาก *M. incognita* ลดลงได้ดีที่สุดเมื่อปลูกเชื้อราลงไปในดินก่อนปลูกไส้เดือนฝอยและข้าวโพดเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 25 °ซ รวมทั้งทำให้การเจริญเติบโตของข้าวโพดดีขึ้นด้วย (Al-Hazmu et al., 1982)



ภาพที่ 5 ลักษณะโครงสร้างพิเศษแบบต่างๆของเชื้อราในกลุ่ม nematode – trapping fungi
 (ก) adhesive branches; (ข, ค) adhesive knobs; (ง) adhesive networks;
 (จ, ฉ) non-constricting ring และ (ซ) ไข่เคียวฝอยที่ถูก constricting ring บีบรัด

ที่มา : คัดแปลงจาก Hertz และคณะ (2002)

ฉ. **Constricting ring** เป็นกับดักเส้นใยที่มีลักษณะคล้าย non-constricting ring เกิดจากเส้นใยเชื้อราแตกแขนงออกมาจากเส้นใยเดิมทางด้านข้าง ส่วนปลายเส้นใยเจริญโค้งลงมาชนและหลอมรวมกันกับเส้นใยเดิมที่ทำหน้าที่เป็นก้าน เกิดเป็นห่วงวงแหวนที่ประกอบไปด้วย 3 เซลล์ที่มีก้านสั้นๆ วงแหวนนี้จะทำหน้าที่พองตัวและบีบรัดไส้เดือนฝอยที่เคลื่อนที่ผ่านวงแหวนนี้ (ภาพที่ 5 ข) จากนั้นวงแหวนจะงอกเส้นใย (penetration tube) แทะผ่านผนังชั้นนอก (cuticle) ของไส้เดือนฝอยแล้วพัฒนาเส้นใยที่มีรูปร่างที่เรียกว่า infection bulb ภายในตัวไส้เดือนฝอย เพื่อย่อยองค์ประกอบภายในตัวไส้เดือนฝอยสำหรับเป็นอาหารต่อไป เชื้อราที่สร้างโครงสร้างนี้เพื่อทำลายไส้เดือนฝอยรากปม เช่น *A. dactyloides*

ในการศึกษาการนำมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม Santose และคณะ (1992) พบว่าเชื้อราในกลุ่ม nematode – trapping fungus หลายชนิดเช่น *A. conoides*, *A. musiformis*, *A. robusta*, *M. ellipsosporum*, *Dactylaria thaumasin* สามารถเข้าทำลายกลุ่มไข่ ไข่ และตัวอ่อนวัย 2 ของ *M. incognita* ได้ในห้องปฏิบัติการ แต่มีเพียงเฉพาะเชื้อรา *M. ellipsosporum* เท่านั้นที่มีศักยภาพในการควบคุม *M. incognita* ในมะเขือเทศที่ปลูกในกระถาง โดยสามารถลดจำนวนการเกิดปมและ กลุ่มไข่ในราก และจำนวนตัวอ่อนวัย 2 ในดินได้อย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อราชนิดอื่นๆ แต่ในการศึกษาของ Persson และ Jasson (1999) ที่คัดเลือกเชื้อรา *A. dactyloides*, *A. superb*, *M. ellipsosporum* และ *M. geophyropagum* ซึ่งอาศัยอยู่ในบริเวณราก (rhizosphere) มะเขือเทศได้ดี มาศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และ *M. javanica* ในมะเขือเทศที่ปลูกในกระถาง พบว่าเชื้อราทั้ง 4 ชนิดไม่มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดปมที่ราก

7.1.2. Endoparasitic fungi

เชื้อรากุ่มนี้เป็นปรสิตภายในตัวไส้เดือนฝอย ไม่สามารถเจริญเติบโตหรือเจริญเติบโตได้อย่างจำกัดเมื่ออยู่ภายนอกลำตัวไส้เดือนฝอย เข้าทำลายโดยใช้สปอร์ เมื่อสปอร์เข้ามาสัมผัสกับผิวชั้น cuticle ของไส้เดือนฝอยจะมีการสร้าง adhesive pad ลักษณะเป็นแผ่นปกคลุมสปอร์บริเวณส่วนที่สัมผัสกับผิวไส้เดือนฝอยเพื่อยึดเกาะ และมืองค์ประกอบเป็นสารโปรตีนคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งเอ็นไซม์บางชนิด จากนั้นสร้าง appressorium ขึ้นเพื่อใช้แทงผ่าน cuticle ของไส้เดือนฝอย ในการนำมาใช้ประโยชน์ควบคุมไส้เดือนฝอย Jasson และคณะ (1985) ศึกษาในเรือนปลูกพืชทดลองพบว่า สปอร์เชื้อรา *Meria coniospora* ปริมาณ 10^1 ถึง 10^7 สามารถลดการเกิดปมในรากมะเขือเทศที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และ *M. javanica* เข้าทำลายได้ไม่ว่าจะเป็นการใส่สปอร์ลงไปในดินโดยตรง หรือใส่เชื้อราในรูปตัวไส้เดือนฝอยที่มีเชื้อรา *M. coniospora* เข้าทำลาย ต่อมา Stirling (1991) รายงาน เชื้อรา *Hirsutella rhossiliensis* ที่แยกได้

จาก *M. incognita* แต่เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ในแปลงปลูกมะเขือเทศที่ถูก *M. javanica* เข้าทำลาย พบว่าเชื้อรามีประสิทธิภาพในการยับยั้งไส้เดือนฝอยได้ต่ำ (Tedford et al., 1993)

Jaffee และ Muldoon (1997) ศึกษาการนำเส้นใยเชื้อรา *H. rhossiliensis*, *M. ellipsosporum* และ *M. cionopagum* ที่ผลิตในรูปผงอัลจีเนต (alginate pellets) เพื่อควบคุมตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ *M. javanica* พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ชนิดสามารถลดการเข้าทำลายต้นกล้ากะหล่ำปลีของตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่ปลูกในกระถาง โดยเชื้อรา *M. cionopagum* ให้ประสิทธิภาพการควบคุมดีที่สุด สามารถลดการเข้าทำลายได้ร้อยละ 40-90 เมื่อใช้เมล็ดเชื้ออัตรา 0.24-0.94 เม็ดต่อตารางเซนติเมตร แต่เมื่อนำไปทดสอบในแปลงปลูกพบเฉพาะเชื้อ *M. cionopagum* ที่ควบคุมไส้เดือนฝอยได้ โดยใช้เชื้ออัตรา 0.5 เม็ดต่อตารางเซนติเมตรสามารถยับยั้งไส้เดือนฝอยเข้าทำลายต้นกล้ามะเขือเทศได้ถึงร้อยละ 73

7.1.3. โดยการเป็นปรสิตชั่วคราว (facultative parasite)

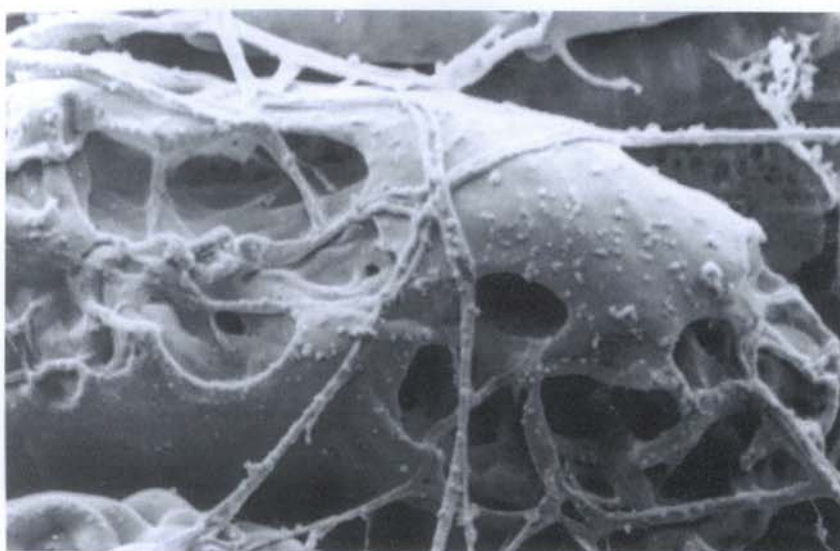
มีเชื้อราหลายชนิดที่ดำรงชีวิตในลักษณะเป็นปรสิตชั่วคราวต่อไส้เดือนฝอยโดยเข้าทำลายไส้เดือนฝอยในระยะ sedentary stages คือระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย และระยะไข่ ราในกลุ่มนี้อาจจะมีศักยภาพในการลดจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยได้ดีกว่า nematode - trapping fungi (Jatala, 1985) เพราะไม่ต้องสร้างโครงสร้างพิเศษเพื่อการเข้าทำลายไส้เดือนฝอย สามารถดำรงชีวิตและแพร่พันธุ์อยู่ได้แม้ภายในดินที่ไม่มีไส้เดือนฝอย (Kerry and Jaffee, 1997) และที่สำคัญกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมจะง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อรามากกว่าตัวไส้เดือนฝอยซึ่งมีการเคลื่อนที่หาอาหาร (migratory parasites) ระยะไข่เป็นระยะที่อ่อนแอต่อการทำลายของไส้เดือนฝอยมากที่สุด เนื่องจากเกาะอยู่ที่บริเวณผิวของรากพืช แต่ไข่ที่อยู่ในปมภายในรากอาจจะรอดพ้นจากการทำลายของเชื้อราได้ดีกว่า (Stirling, 1991) เชื้อราที่เป็นปรสิตต่อไส้เดือนฝอยรากปมมีรายงานไว้หลายชนิด เช่น *Verticillium chlamydosporium* (Syn. *Pochonia chlamydosporia*), *V. balanoides*, *V. lecanii*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. nostocoides*, *P. variotii*, *Gliocladium catenulatum*, *G. roseum*, *Geotrichum* sp., *G. nigrovirens*, *Drechmeria coniospora*, *Dactylella oviparasitica*, *Cylindrocarpon* sp., *Cladosporium cladosporoides*, *Fusarium* spp., *Trichoderma harzianum*, *Penicillium* spp., *Chaetomium* sp., *Aspergillus* spp., *Beauveria brassicae*, *Metarhizium anisopliae*, *Monolia* sp., *Pythium* sp., *Stachybotrys* sp. และ *Tolypocladium* sp. เป็นต้น (Jatala, 1985; 1986; Morgan – Jone et al., 1981; Santose et al., 1992; Olivares et al., 2002; Eapen et al., 2005; Sun et al, 2006)

เชื้อราชนิดที่มีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวาง คือ *Paecilomyces lilacinus* เป็นเชื้อราที่มีรายงานประสบความสำเร็จในการนำมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม โดยเป็นปรสิตต่อกลุ่มไข่และตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) (Godoy et al., 1983; Jatala, 1986) โดย Jatala และคณะ (1979) ศึกษาพบเชื้อรา *P. lilacinus* เข้าทำลายไข่และตัวเต็มวัยไส้เดือนฝอยรากปมในมันฝรั่งได้ภายใน 10-12 วัน โดยเฉพาะเข้าทำลายไข่ที่บริเวณคัพภะ (embryo) ได้สูงถึงร้อยละ 80-90 และทำให้มันฝรั่งในแปลงปลูกเกิดปมน้อยกว่าแปลงทดสอบที่ไม่ใส่เชื้อรา *P. lilacinus* และการใส่เชื้อราลงไปแปลงพร้อมกับปลูกมันฝรั่งให้ผลในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีกว่าใส่เชื้อราก่อนการปลูกมันฝรั่ง Jatala (1986) ได้กล่าวถึงกลไกการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปม โดยเส้นใยเชื้อราเจริญปกคลุม gelatinous matrix ที่ห่อหุ้มกลุ่มไข่ไว้ จากนั้นเจริญแทงผ่านเปลือกไข่ ผ่านชั้น vertilline layer ชั้น cutin และชั้นไขมันตามลำดับเข้าไปทำลายคัพภะและตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยที่อยู่ภายในไข่พร้อมเจริญเติบโตสร้างเส้นใยมากมาย เปลือกไข่มีลักษณะผิดปกติไป โดย vertilline layer แยกเป็น 3 ชั้น ชั้น chitin เปลี่ยนเป็น vacuole ส่วนชั้นในสุดคือชั้นไขมันหายไปพร้อมกับไข่และตัวอ่อนถูกทำลาย โดยมีแต่เส้นใยเชื้อราเจริญแทนที่ และเส้นใยเชื้อราที่อยู่ในไข่อาจแทงเส้นใยผ่านเปลือกไข่ออกสู่ภายนอกเพื่อทำลายไข่ที่อยู่ข้างเคียงด้วย โดยตัวเต็มวัยเพศเมียถูกเชื้อราเข้าทำลายผ่านทางช่องเปิดขับถ่ายของเสีย (anus) และช่องคลอด (vulva) Croshier และคณะ (1985) ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุม *M. javanica* โดยเชื้อรา *P. lilacinus* ในมะเขือเทศที่ปลูกในกระถาง โดยใส่ไข่ของ *M. javanica* จำนวน 100 ฟองต่อกระถางเป็นเวลา 30 วันก่อนใส่เชื้อรา *P. lilacinus* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าว ในอัตรา 0.005, 0.15, 0.75 และ 1.1 กรัมต่อกระถาง ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราสามารถเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยได้ร้อยละ 52.37, 61.32 และ 76.25 ตามลำดับ ต่อมา Dube และ Smart (1987) นำเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* มาใช้ร่วมกับเชื้อรา *P. lilacinus* เพื่อควบคุม *M. incognita* ที่เข้าทำลายมะเขือเทศ ยาสูบ และพริก ผลการศึกษาพบว่าพืชที่ใช้เชื้อร่วมกันมีจำนวนกลุ่มไข่ การเกิดปมลดลง และผลผลิตของพืชสูงกว่าการใช้เชื้อรา *P. lilacinus* หรือใช้เชื้อแบคทีเรีย เพียงอย่างเดียว โดยประสิทธิภาพการควบคุม *M. incognita* ไม่แตกต่างทางสถิติกับต้นพืชที่ไม่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย Cabanillas และคณะ (1988) ศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อรากมะเขือเทศที่ถูก *M. incognita* เข้าทำลาย เปรียบเทียบกับรากมะเขือเทศที่ใช้เชื้อรา *P. lilacinus* ร่วมกับการปลูกไส้เดือนฝอยเพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปม พบว่าเส้นใยเชื้อราเจริญเติบโตในเซลล์รากมะเขือเทศได้ดี ไม่พบอาการรากเป็นปมและการเกิดเซลล์ยักษ์ (giant cell) ในเนื้อเยื่อรากมะเขือเทศ แต่พบลักษณะดังกล่าวในรากมะเขือเทศถูกไส้เดือนฝอยรากเข้าทำลายเพียงอย่างเดียว ต่อมา Cabanillas และคณะ (1989) ได้ศึกษาการควบคุมโรครากปมมะเขือเทศพบว่าเชื้อรา *P. lilacinus* ไอโซเลตจากเปรู และไอโซเลตผสมจากหลายๆ

แหล่ง ให้ประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดปมที่รากดีที่สุด โดยปัจจัยของดินมีผลต่อประสิทธิภาพการควบคุม ซึ่งอุณหภูมิดินในช่วง 16-28 °C ทำให้รากมะเขือเทศเกิดปมมากและอัตราไข่ที่ถูกเชื้อรา *P. lilacinus* เข้าทำลายก็เพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน Mittal และคณะ (1995) ได้นำสาร chitin ผสมลงไปในดินปลูกสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อรา *P. lilacinus* ต่อการควบคุม *M. incognita* ในมะเขือ มะเขือเทศ และถั่วหัวช้าง (*Cicer arietinum*) ที่ปลูกในกระถาง โดยพืชทดสอบมีจำนวนปมต่อน้ำหนักราก 1 กรัมต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว หรือต้นที่ใส่เพียงเชื้อรา *P. lilacinus* เพื่อควบคุมโรค นอกจากนี้ยังพบว่าทำให้พืชมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นด้วย และ ถ้าใช้เชื้อรา *P. lilacinus* ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* ลงไปในดินที่มีอินทรีย์วัตถุ สามารถควบคุมประชากร *M. incognita* และลดการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเพิ่มความแข็งแรงให้กับต้นมะเขือเทศด้วย (Khan et al., 2001) ด้วยประสิทธิภาพดังกล่าว ทำให้มีการนำเชื้อรา *P. lilacinus* ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพเพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ภายใต้ชื่อการค้า “Paecil”, “Nemacheck” (Kiewnick and Sikora, 2006) และ “MeloCon WG” (Environment Protection Agency, 2005) ซึ่งได้รับรองและขึ้นทะเบียนการค้าในประเทศสหรัฐอเมริกาแล้ว ซึ่งสารชีวภัณฑ์ “MeloCon WG” มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* ในมะเขือเทศเมื่อใส่ลงไปดินก่อนย้ายกล้ามะเขือเทศลงปลูก 6 วัน และสามารถลดการเกิดปมที่ราก จำนวนกลุ่มไข่ และประชากรไส้เดือนในรากได้ร้อยละ 66, 74 และ 71 ตามลำดับ โดยปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่จะสามารถควบคุมการเกิดปม และ ประชากรไส้เดือนฝอยในรากได้ร้อยละ 50 (effective concentration : EC₅₀) จะอยู่ในช่วง 0.097 กรัม และ 0.08 กรัมต่อดิน 1 กรัม หรือปริมาณเชื้อ 1.29 x 10⁶ และ 9.88 x 10⁵ CFU ต่อดิน 1 กรัม ตามลำดับ (Kiewnick and Sikora, 2006) สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษานำเชื้อรา *P. lilacinus* ควบคุม *M. incognita* ของมะเขือเทศ (สุกกิจ และสืบศักดิ์, 2531) บรอกโคลี ผักกาดเขียววางตุ้ง และ เบญจมาศ (ศรีศิลป์, 2536) ที่ปลูกในกระถางได้ผลดี

เชื้อรา *Verticillium chlamydosporium* (Syn. *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare and Gams) เป็นเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษากันมากถึงศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม เป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดินรอบๆ รากพืชหลายชนิด สามารถเข้าทำลายไข่ และตัวเต็มวัยเพศเมียไส้เดือนฝอยรากปม (ภาพที่ 6) โดยเชื้อราสร้างเส้นใยเจริญเติบโตได้ดีบนกลุ่มไข่ และสร้าง dictyochlamydospore ซึ่งเป็นสปอร์ที่มีหลายเซลล์ ผนังหนา เกิดบนก้านสั้นๆ สำหรับการอยู่รอดในช่วงไม่มีไส้เดือนฝอยรากปมในดินและสร้าง conidia บน phialides ที่สำคัญคือไม่พบการแทงเส้นใยเข้าไปทำลายรากพืช (Jaffee and Kerry, 1997) จากการศึกษาของ De Leij และคณะ (1993) พบว่าเมื่อนำเชื้อรา *V. chlamydosporium* ใส่ลงไปในแปลงปลูกมะเขือเทศ สามารถลดจำนวน

ประชากรของ *M. incognita* และ *M. hapla* ได้มากกว่าร้อยละ 90 และสารเคมีกำจัดไส้เดือนฝอยไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในดินหรือประสิทธิภาพการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมเมื่อนำมาใช้ร่วมกัน Kerry และ Bourne (1996) กล่าวว่าศักยภาพของเชื้อ *V. chlamydosporium* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมจะได้ผลดีถ้ามีการนำไปใช้ในพืชที่ค่อนข้างต้านทานต่อไส้เดือนฝอยและเป็นพืชที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อในดินรอบๆรากพืช (rhizosphere) ในรากมะเขือเทศการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. chlamydosporium* ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ใส่ลงไปดินและการมีหรือไม่มี *M. incognita* ในรากพืช (Leij et al., 1992)



ภาพที่ 6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นไข่ของ *M. incognita* ที่ถูกเชื้อรา *Verticillium chlamydosporium* เข้าทำลาย

ที่มา : Seger (1994)

Bourne และ Kerry (1999) พบว่าพืชแต่ละชนิดส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. chlamydosporium* ในดินรอบๆรากได้ต่างกัน ส่งผลต่อระดับความอ่อนแอของพืชต่อการเข้าทำลายไส้เดือนฝอย ในดินที่มีความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยรากปมน้อย หรือเป็นพืชที่ค่อนข้างต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม มักจะมีขนาดปมที่รากเล็กกว่าพืชที่เป็นพืชอ่อนแอ (ดินรอบๆรากมีความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยรากปมมาก) และทำให้กลุ่มไข่ (egg mass) ที่อยู่บริเวณผิวรากปมที่มีขนาดเล็กนี้มีโอกาสถูกเชื้อรา *V. chlamydosporium* เข้าทำลายได้มากกว่ากลุ่มไข่ของรากพืชที่มีขนาดปมใหญ่ เนื่องจากกลุ่มไข่บางส่วนที่ฝังอยู่ภายในปมรอดพ้นการทำลายของเชื้อรา และพบว่า ถ้าใส่ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมอย่างน้อย 500 ตัว ลงไปในดินที่ปลูก

มะเขือเทศ และคะน้า จะกระตุ้นการการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. chlamydosporium* ในดินรอบๆ รากได้ดี และพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *V. chlamydosporium* ได้ต่างกัน โดยเชื้อราจะเจริญเติบโตในดินได้มากขึ้นเมื่อใส่ไส้เดือนฝอยเพิ่ม ลงไปในดินที่ปลูกข้าวโพดและมะเขือเทศ แต่การใส่ dictyochlamydospore ของเชื้อราลงไปใน ดินอัตรามากกว่าปกติ (50,000 spore ต่อดิน 1 กรัม) ไม่ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อดีขึ้น และไม่ พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความหนาแน่นของเชื้อ *V. chlamydosporium* ในดินรอบรากกับ สัดส่วนการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอย เนื่องจากพืชบางชนิดเช่นมะเขือเทศสร้างปมขนาดใหญ่ทำ ให้ไข่ที่อยู่ภายในปมรอดพ้นจากการถูกทำลาย ซึ่ง Stirling และคณะ (1979) รายงานว่าเชื้อรา *V. chlamydosporium* ไม่เจริญเข้าไปในชั้น cortex ของรากพืช ดังนั้นกลุ่มไข่ที่อยู่ภายในปมขนาดใหญ่จึงรอดพ้นจากการทำลายของ *V. chlamydosporium* และต่อมาได้พบว่าเชื้อรา *Pochonia chlamydosporia* (Syn. *V. chlamydosporium*) สามารถนำมาใช้ร่วมกับ สารเคมี oxamyl เพื่อ ควบคุมโรครากปม โดยลดอัตราการเกิดปม และการสร้างไข่ในรากมะเขือเทศที่ถูก *M. javanica* เข้าทำลายได้ (Verdejo et al., 2003) แต่ก็มีกรายงานผลการศึกษาวิจัยที่พบว่าเชื้อรา *V. chlamydosporium* ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมได้ โดย Gaspard และ คณะ (1990) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของเชื้อรา *V. chlamydosporium* และ *P. lilacinus* ในดินที่มี การระบาดของ *M. incognita* พบว่าปริมาณ *V. chlamydosporium* ในดินมีความสัมพันธ์ในเชิงบวก กับจำนวน *M. incognita* และ *P. lilacinus* ส่วนปริมาณเชื้อ *P. lilacinus* มีความสัมพันธ์ในเชิง บวกกับปริมาณของเชื้อ *V. chlamydosporium* แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณของ *M. incognita* ที่อยู่ในดิน และเมื่อทดลองนำต้นกล้ามะเขือเทศที่ถูก *M. incognita* เข้าทำลายปลูกลงในดินที่มาจากแหล่งปลูกมะเขือเทศของ Northern California ซึ่งมีทั้ง *M. incognita* เชื้อรา *P. lilacinus* และ/ หรือ *V. chlamydosporium* อยู่ในดิน แล้วตรวจนับปริมาณเชื้อราทั้งสองชนิดรวมทั้ง *M. incognita* หลังจากใส่ไส้เดือนฝอย 10 สัปดาห์ พบว่าในดินปลูกมะเขือเทศที่มี *M. incognita* เข้าทำลายพบ ปริมาณเชื้อรา *V. chlamydosporium* และ *P. lilacinus* เพิ่มขึ้นมากกว่าในดินปลูกมะเขือเทศที่ไม่ ใส่ไส้เดือนฝอย และ ค่าดัชนีการขยายพันธุ์ (reproductive index, Pf/Pi) ของตัวอ่อนไส้เดือนฝอย รากปมระยะที่ 2 อยู่ระหว่าง 47.1 ถึง 295.6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *V. chlamydosporium* และ *P. lilacinus* ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งประชากรของ *M. incognita* ในดิน

Windham และคณะ (1993) รายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลต T-12 ที่เพาะเลี้ยงในรำข้าวสาลี สามารถยับยั้งการขยายพันธุ์ของ *M. incognita* ใน white clover ที่ ปลูกในกระถางได้ โดยจำนวนไข่ต่อรากน้ำหนัก 1 กรัมลดลงร้อยละ 38 และ 58 ในพันธุ์ Regal และ พันธุ์ SC-1 ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกระถางที่ไม่ใส่เชื้อรา นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา

Trichoderma virens strain GI-3 สามารถลดจำนวนไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ *M. incognita* ในรากพริกยักษ์ (bell pepper) ที่ปลูกในกระถางได้ร้อยละ 58 เมื่อเปรียบเทียบกับกระถางที่ไม่ใส่เชื้อรา และการใช้ *T. virens* strain GI-3 ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* ไม่สามารถควบคุมการขยายพันธุ์ของ *M. incognita* ได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ (Meyer et al., 2001) ในประเทศไทย Thienhirun (1997) ทำการศึกษาการควบคุมโรคผักกาดหอมพบว่าเชื้อรา *Trichoderma piluliferum* และ *T. harzianum* ในอัตรา 20 กรัม (20×10^7 CFU) ต่อแปลงปลูกขนาด 1 ตารางเมตร สามารถควบคุม *M. incognita* ได้ โดยทำให้ผักกาดหอมมีน้ำหนักต้นสดและน้ำหนักรากสดเพิ่มขึ้น ลดการเกิดปมที่ราก และมีจำนวนเชื้อราอยู่รอดในดินได้สูงกว่าแปลงที่ไม่ใส่เชื้อราอย่างมีนัยสำคัญ (2544) ศึกษาพบว่าเชื้อรา *Curvalaria lunata* ไอโซเลต EKK 0101 และ *Penicillium* sp. ไอโซเลต SUD 1806 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากปมมะเขือเทศที่ถูก *M. incognita* เข้าทำลายได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง

เชื้อรา *Dactylella oviparasitica* ที่แยกจากกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมเมื่อนำไปทดสอบการเป็นเชื้อราปรสิตต่อไส้เดือนฝอยรากปมบนอาหารวุ้น water agar (WA) และในพืชปลูกพบว่าเชื้อราสามารถเข้าทำลายไข่และยับยั้งการฟักไข่ของ *M. incognita* แต่ไม่สามารถเข้าทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 ขณะที่เชื้อรา *Aspergillus* sp., *Fusarium solani*, *Mucor* sp., *Rhizoctonia solani* และ *Trichoderma* sp. ไม่ทำลายไส้เดือนฝอยทั้งระยะไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 (Stirling and Mankau, 1978) ซึ่งกลไกการเข้าทำลายโดยเส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วบนกลุ่มไข่และสร้าง appressorium เพื่อแทงเข้าทำลายเปลือกไข่ เชื้อรานี้จะเข้าทำลายไข่ที่อยู่ในลักษณะรวมเป็นกลุ่มไข่มากกว่าไข่ที่อยู่แบบกระจาย (Stirling and Mankau, 1979) Zuckerman และคณะ (1994) รายงานว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* strain PD-42 มีศักยภาพในการนำมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยสามารถลดการเกิดปมในรากมะเขือเทศที่ปลูกในกระถางที่ถูก *M. incognita* เข้าทำลายได้ร้อยละ 55-60 และลดการเกิดปมที่รากพริกที่ปลูกในแปลงรวมทั้งทำให้พริกมีผลผลิตเพิ่มขึ้น และพบกรด oxalic และ citric รวมทั้งสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 8,000 ใน culture filtrate ของเชื้อราซึ่งอาจมีบทบาทต่อการทำลายไส้เดือนฝอย นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *Aspergillus tamari*, *Aspergillus ustus*, *Drechslera* sp, *Humicola* sp. และ *Scopulariopsis* sp. เข้าทำลายไข่และตัวเต็มวัยเพศเมียของ *M. incognita* (Eapen et al., 2005) มีผลการศึกษาพบสาร 4,15-diacetylvalenol และ diacetoxyscirpenol ซึ่งสร้างโดยเชื้อรา *Fusarium equiseti* สามารถยับยั้งการฟักไข่และการเคลื่อนที่ของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ *M. incognita* (Nitao et al., 2001) เช่นเดียวกับเชื้อรา *Fusarium solani* ที่มีรายงานเข้าทำลายตัวเต็มวัยเพศเมียและไข่ของ *M. javanica* โดยสามารถลดการเกิดปม จำนวนกลุ่มไข่ และประชากรไส้เดือนฝอยในดินของมะเขือเทศที่ปลูกใน

กระถางได้ร้อยละ 38, 50 และ 38 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกระถางที่ไม่ใส่เชื้อรา และให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อนำไปทดสอบในแปลงปลูก รวมทั้งทำให้ความสูง และน้ำหนักต้นมะเขือเทศเพิ่มสูงขึ้นด้วย (Zareen et al., 2001)

7.2 ศัตรูธรรมชาติอื่นๆ

7.2.1 เชื้อราไมคอร์ไรซา (Mycorrhizal fungi)

เป็นกลุ่มเชื้อราที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืชแล้วสร้างเส้นใยในลักษณะเป็นร่างแหออกไปในดิน เพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ของรากในการดูดซึมและเคลื่อนย้ายธาตุอาหาร โดยเฉพาะธาตุฟอสฟอรัส (Stirling, 1991) จากการศึกษาในระดับเรือนปลูกพืชทดลองพบว่าราไมคอร์ไรซาสามารถลดความเสียหายของพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายได้ โดยถ้าใส่เชื้อราลงไปในดินก่อนใส่ไส้เดือนฝอยเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วัน สามารถลดการเกิดปมที่ราก และจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยในดิน รวมทั้งเพิ่มความสูง น้ำหนักต้นสด และปริมาณฟอสฟอรัสของถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) ที่ถูก *M. incognita* เข้าทำลาย ส่วนปริมาณไนโตรเจนพบปริมาณสูงขึ้นหลังใส่เชื้อราลงไปในดินก่อนเป็นเวลา 30 วัน (Osman et al., 1990) นอกจากนี้เชื้อราไมคอร์ไรซา *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* หรือ *Glomus viscosum* สามารถลดความรุนแรงในการเกิดปมที่ราก และยับยั้งการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในกิ่งชำต้นมะกอกที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เข้าทำลายได้ร้อยละ 6.3-36.8 และ 11.8-31.5 ตามลำดับ รวมทั้งทำให้ต้นมะกอกมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นร้อยละ 88.9 (Castillo et al., 2006) และถ้าใส่เชื้อราไมคอร์ไรซา (*Glomus* sp.) ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* เพื่อควบคุม *M. incognita* ในมะเขือเทศที่ปลูกในกระถาง จะทำให้ประชากรไส้เดือนฝอยในดินลดลงร้อยละ 57-61 เมื่อเปรียบเทียบกับกระถางที่ไม่ใส่เชื้อปรสิตทั้งสอง และมะเขือเทศมีการเจริญเติบโตดีขึ้น (Talavera et al., 2002)

7.2.2 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่มีการศึกษากันมากคือเชื้อ *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr ซึ่งมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมทั้งการทดสอบในระดับเรือนปลูกพืชทดลอง (Dube and Smart, 1987) และในสภาพแปลงปลูก (Stirling, 1984) เชื้อ *P. penetrans* มีความเฉพาะเจาะจงสูงกับชนิดไส้เดือนฝอย สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศและสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย และมีชีวิตรอดได้ยาวนานในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้ง (Mankau, 1980; Oostendorp et al., 1990) เชื้อแบคทีเรียเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปมโดยการใส่สปอร์ (endospore) เกาะที่ผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม จากนั้นจะแทงเส้นใย (germ tube) เข้าไปภายในลำตัวไส้เดือนฝอย เกิดเป็น vegetative hyphae เกิดเป็นสายโคโลนีในบริเวณผนังชั้น hypodermis และ pseudocoelome เส้นใยแตกแขนงแบบ dichotomously

branch มีผนังกัน และปลายเส้นใยขยายขนาดใหญ่ขึ้นเป็น sporangium ภายใน sporangium บรรจุ endospore ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้หรือเป็นตัวเต็มวัยที่มีการขยายพันธุ์ได้ต่ำ เมื่อไส้เดือนฝอยตาย endospore ถูกปล่อยออกมาสู่ดินผ่านทางผนังลำตัวที่แตก และสามารถเข้าทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยได้ต่อไปอีก (Sayre and Wergin, 1977; Mankau, 1980) ต่อมา Weibelzahl-Fulton และคณะ (1996) นำดินจากแปลงปลูกยาสูบที่มีการระบาดของอย่างต่อเนื่องของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และ *M. javanica* มาศึกษาพบว่า endospores ของ *P. penetrans* ในดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแบบหมดจก (autoclave) จะถูกทำลายมากกว่าที่อยู่ในดินที่ผ่านความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ แต่เชื้อราที่อยู่ในดินทั้งสองแบบถูกความร้อนทำลายหมด และเมื่อนำดินที่ผ่านความร้อนด้วยกรรมวิธีต่างๆ ไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรครากปมในยาสูบพันธุ์ Coker 371 Gold ที่ปลูกในกระถางด้วยดินที่ผ่านความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ ดินที่ฝังลมให้แห้ง และดินที่ไม่ผ่านกรรมวิธีใดๆ ผลการศึกษาพบว่าต้นยาสูบมีอัตราการเกิดปม จำนวนกลุ่มไข่ จำนวนไข่ในระบบรากน้อยกว่าต้นที่ปลูกในดินที่ผ่านความร้อนโดยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจาก *P. penetrans* ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ในดินที่ผ่านความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ ดินที่ฝังลมให้แห้ง

สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ นั้น Li และคณะ (2001) ศึกษาประสิทธิภาพของสารกรอง (culture filtrates) ของเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* BC-1 ที่เลี้ยงในอาหาร nutrient broth สามารถยับยั้งการฟักไข่ และการเคลื่อนที่ของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ *M. incognita* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Robert และคณะ (2005) ที่พบว่า culture filtrates ของเชื้อแบคทีเรีย *B. cepacia* BC-1 และเชื้อ *Serratia marcescens* ไอโซเลต N1-6, N1-14 และ N2-4 สามารถยับยั้งการฟักไข่ของ *M. incognita* สาเหตุโรครากปมของแตงกวาได้ โดยทำให้ไข่ฟักเพียงร้อยละ 11, 6, 4 และ 6 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ nutrient agar เป็นตัวทดสอบที่มีเปอร์เซ็นต์ไข่ฟักร้อยละ 30

Meyer และคณะ (2005) ศึกษาประสิทธิภาพ culture filtrate ของเชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต S99-60 ต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* สาเหตุโรคในแตงเทศบนอาหารวุ้น พบว่า culture filtrate ของเชื้อสามารถผลิตสารประกอบที่สามารถยับยั้งการฟักไข่ และกิจกรรมของตัวอ่อนวัย 2 โดย culture filtrate ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียนาน 9 วันมีประสิทธิภาพในการลดการฟักไข่ได้ดีกว่า culture filtrate ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพียง 3 วัน อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง แต่เมื่อนำไปทดสอบในเรือนปลูกพืชทดลองกลับพบว่าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถยับยั้งการการสร้างไข่ของ *M. incognita* ในรากของแตงเทศได้

Siddiqui และคณะ (2000) รายงานพบเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ได้ และถ้านำไปใช้ร่วมกับเชื้อรา *P. lilacinus* จะ

สามารถลดการเข้าทำลายมะเขือเทศโดยไส้เดือนฝอยที่ปลูกในแปลงขนาดเล็กได้ดีกว่าการใช้เพียงเชื้อราหรือแบคทีเรียอย่างเดียว และเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 7.4×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเกิดปมในรากมะเขือเทศที่ปลูกในกระถางที่มีปริมาณตัวอ่อนระยะที่ 2 ของ *M. javanica* จำนวน 500 ตัวต่อต้นได้ดีที่สุด และจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ในดินที่ใส่เชื้อ *P. aeruginosa* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (Siddiqui and Haque, 2001)

7.2.3 เชื้อไวรัส (Virus)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคของไส้เดือนฝอยที่เกิดจากเชื้อไวรัสยังอยู่ในวงจำกัด มีรายงานว่าไวรัสทำให้ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีอาการเฉื่อยชา ตัวอ่อนไม่สามารถทำให้เกิดปมที่รากพืชได้ แต่เมื่อนำไส้เดือนฝอยที่เป็นโรคไปตรวจสอบ กลับไม่พบอนุภาคของเชื้อไวรัสในตัวไส้เดือนฝอย (Jatala, 1986)

7.2.4 ไส้เดือนฝอยตัวห้ำ (Predaceous nematodes)

เป็นศัตรูธรรมชาติอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษาวิจัยกันมาก Stirling (1991) ได้จัดจำแนกไส้เดือนฝอยตัวห้ำเป็น 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม monochids ซึ่งมีช่องปากกว้างและภายในช่องปากมีฟันที่แข็งแรงสำหรับกัดกินเหยื่อ กลุ่มที่สองคือกลุ่ม dorylaimides ที่บริเวณช่องปากมีหลอดดูดอาหารแบบ onchiostyle สำหรับแทงเข้าไปในร่างกายเหยื่อและดูดกินของเหลวภายใน กลุ่มที่สามเป็นกลุ่มที่มีรูปร่างขนาดเล็กคือ aphelenchids สามารถทำลายเหยื่อที่มีขนาดโตกว่าได้โดยใช้หลอดดูดอาหารที่มีลักษณะแบบ aphelenchoid stylet แทงผ่านลำตัวและปล่อยสารพิษที่ทำให้เหยื่อเป็นอัมพาตในทันที และกลุ่มสุดท้ายคือกลุ่ม diplogasterids ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยตัวห้ำที่ดูดกินเชื้อแบคทีเรีย ปัญหาที่สำคัญของไส้เดือนฝอยตัวห้ำเหล่านี้คือไม่มีความจำเพาะต่อไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสามารถกินเหยื่อได้ทั้งที่เป็นพืชและสัตว์ได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืช Khan และ Park (2006) ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยตัวห้ำ *Mononchoides striatus* ต่อการควบคุมโรครากปมของมะเขือเทศพันธุ์ Pusa Ruby ที่ปลูกในกระถางที่ซึ่งถูกไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เข้าทำลาย พบว่าการใส่ *M. striatus* ลงไปในกระถางก่อนเป็นเวลา 2 วันแล้วจึงใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยตามลงไป สามารถลดการเกิดปม การสร้างกลุ่มไข่ และจำนวนประชากรของ *M. incognita* ได้ และเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของมะเขือเทศ โดยประสิทธิภาพการควบคุม *M. incognita* จะเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณไส้เดือนฝอยตัวห้ำที่ใส่เพิ่มลงไปในกระถาง แต่ไม่พบประสิทธิภาพการควบคุมถ้าใส่ไส้เดือนฝอยตัวห้ำ *M. striatus* หลังจากใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยไปแล้ว 2 วัน

7.2.5 ไร (Nematophagous mites)

มีการศึกษาไม่กว้างขวางนักเกี่ยวกับการนำไรมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอย Inseera และ Davis (1983) รายงานว่าไร laelapid mite (*Hypoaspis aculeifer*) สามารถทำลายและกินสารเมือกเหนียว (gelatinous matrix) ที่ห่อหุ้มกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. hapla* และ *M. chitwoodi* ที่เจริญอยู่บนรากมะเขือเทศได้

7.2.6 สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ (Miscellaneous invertebrates)

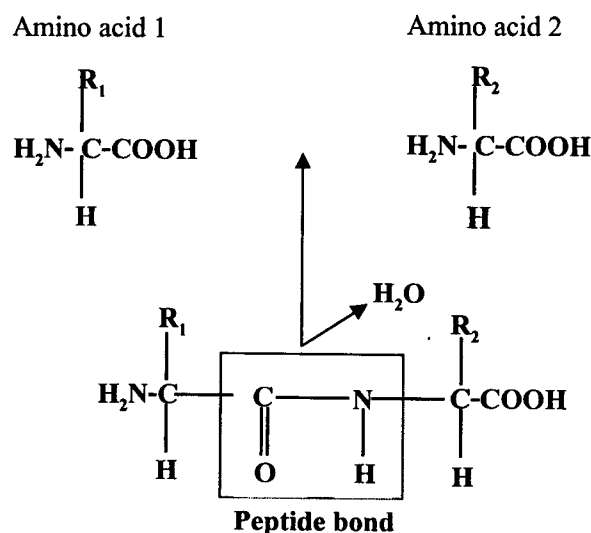
Stirling (1991) รายงานว่าสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆรวมทั้งโปรตัวชั่ว พยาธิตัวแบนและไส้เดือน สามารถทำลายไส้เดือนฝอยได้ แต่ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการเป็นตัวห้ำ สัตว์ที่มีการศึกษาได้แก่ พยาธิตัวแบน (Turbellarians; *Adenoplea* sp.) ที่แยกได้จากดินบริเวณเรือนปลูกพืชทดลอง สามารถเป็นตัวห้ำไส้เดือนฝอยได้หลายชนิด โดยการกินตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ในอัตรา 4 ตัวต่อชั่วโมงต่อพยาธิตัวห้ำเต็มวัยหนึ่งตัว ทั้งนี้อัตราการทำลายไส้เดือนฝอยขึ้นอยู่กับขนาดช่องว่างระหว่างอนุภาคเม็ดดินที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของพยาธิ

8. บทบาทของเอนไซม์ย่อยสลายที่สร้างนอกเซลล์ของเชื้อราในดินต่อไส้เดือนฝอยรากปม

เอนไซม์มีบทบาทต่อการกระบวนการเข้าทำลายของเชื้อราโดยเฉพาะเอนไซม์ย่อยสลายที่สร้างออกมานอกเซลล์ เช่น lipase, chitinase และ protease ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อราที่เข้าทำลายแมลง (entomppgenous fungi) (Paris and Feron, 1997) ในไส้เดือนฝอยรากปม เปลือกไข่ (egg shell) เป็นบริเวณที่ถูกเชื้อราปรสิตเข้าทำลาย (infection sites) (Khan et al., 2004) เปลือกไข่เป็นโครงสร้างที่ประกอบไปด้วยชั้นต่างๆหลายชั้น โดยมีชั้น chitinous ที่เป็นชั้นที่หนาที่สุด มีโปรตีนและโคคินเป็นองค์ประกอบสำคัญที่อยู่ในรูปของ chitin/protein complex และ lipoprotein ที่เป็นองค์ประกอบในชั้นอื่นๆ (Wharton, 1986; Orion et al., 2001) จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบความหนาแน่นของแสงอิเล็กตรอนดำรอบๆ appressorium และ penetration hypha ของเชื้อรา แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างเอนไซม์ย่อยเปลือกไข่ขณะแทงเส้นใยเข้าทำลาย (Morgan-Jones et al., 1983; Lopez-Lloca and Roberson, 1992) ซึ่งต่อมา Bonants และคณะ 1995 ได้รายงานว่าการปฏิบัติต่อไส้เดือนฝอยหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดเพื่อย่อยสลายองค์ประกอบเหล่านี้ได้เช่น protease, chitinase รวมทั้งเอนไซม์ย่อยสลายสารอื่นๆ เป็นต้น ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของการควบคุมโดยชีววิธี

8.1 เอนไซม์ protease

เอนไซม์ protease เป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่เชื้อราปฏิปักษ์ใช้เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่มีอยู่ในโครงสร้างต่างๆของกลไกการเข้าทำลาย โดยทำหน้าที่ย่อยสลายสารประกอบโปรตีนที่มีอยู่ในโครงสร้างต่างๆของไส้เดือนฝอยเพื่อให้ได้กรดอะมิโน (amino acid) (ภาพที่ 7) สำหรับเป็นแหล่งสารอาหารของเชื้อราต่อไป นอกจากนี้จุลินทรีย์อื่นๆก็สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้เช่นกัน (De Macro and Felix, 2002; Geremia et al., 1993) โดย Schenck และคณะ (1980) รายงานเป็นครั้งแรกว่าเชื้อรา *Arthrobotrys amerospora* สร้างเอนไซม์ collagenase จากการนำ culture filtrate บ่มร่วมกับ



ภาพที่ 7 โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีน

ที่มา: คัดแปลงจาก Dodson (2006)

Azocoll ซึ่งเป็น substrate สำเร็จรูปของการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease ส่วนเชื้อราที่เป็นปรสิตรต่อไข่ไส้เดือนฝอยมีรายงานพบเอนไซม์ protease (P32) และได้ศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์เป็นครั้งแรกในเชื้อ *Verticillium suchlasporium* และพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้ในเชื้อรา *Arthrobotrys oligospora* ด้วย (Tikhonov et al., 2002) ซึ่งเอนไซม์นี้อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม เนื่องจากพบว่าขณะเส้นใยเชื้อราแทงผ่านเปลือกไข่ ผนังเปลือกไข่ชั้น vitelline จะแยกออกจากกัน และตรวจพบการสลายตัวของชั้นไคตินและไขมัน (Stirling et al., 1991) ต่อมา Segers และคณะ (1994) ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Verticillium chlamydosporium* (Syn. *Pochonia chlamydosporia*) สร้างเอนไซม์ protease โดยเมื่อนำเอนไซม์

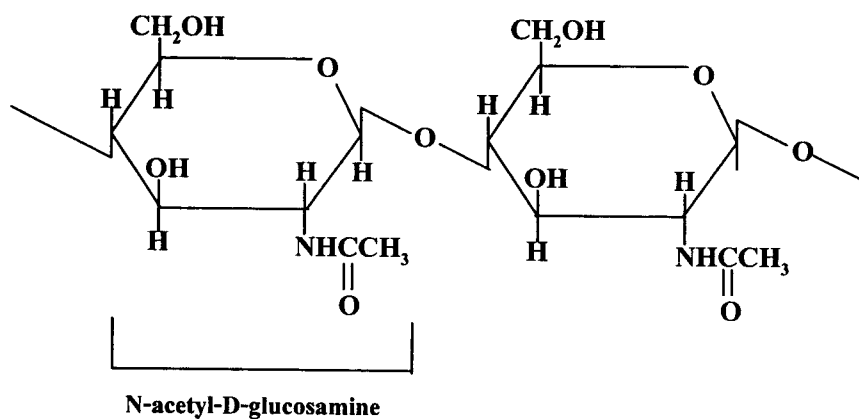
บริสุทธิ์เข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มร่วมกับไข่ของ *M. incognita* อุณหภูมิ 23 °ซ นาน 48 ชั่วโมงสามารถย่อยสลายโปรตีนจากผนังชั้นนอกของเปลือกไข่ได้เอนไซม์นี้มีลักษณะคล้าย protease chymoelastase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่พบในเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* และราในกลุ่ม hyphomycete และเอนไซม์นี้อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายไข่ได้เอนฝอย สอดคล้องกับการศึกษาของ Lopez-Llorca และคณะ (2002) ที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease จากสปอร์ของเชื้อรา *Pochonia chlamydosporia* (Syn. *Verticillium chlamydosporium*) ในปริมาณสูงขณะเข้าทำลายไข่ของ *M. javanica* ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งของเชื้อราต่อการเข้าทำลายไข่ได้เอนฝอยในช่วงแรกของการทำลาย Tikhonov และคณะ (2002) ศึกษาพบว่าเอนไซม์ protease ทั้งหมดที่เชื้อราปฏิปักษ์ต่อไข่ได้เอนฝอยสร้างคือ subtilisin-like serine protease ซึ่งส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงในช่วง pH 8.0 ถึง 9.0 และมีความสามารถย่อยผิวหนังและเปลือกไข่ได้เอนฝอยได้ Khan และคณะ (2004) พบว่าเอนไซม์ proteinase กิ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเชื้อ *P. lilacinus* strain 25 สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเปลือกไข่ของ *M. javanica* โดยไข่ที่ถูกบ่มด้วยเอนไซม์ protease ของเชื้อรา (ความเข้มข้นโปรตีน 0.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 21 ± 1 °ซ นาน 6 วัน ตรวจพบชั้นไขมันหายไป ส่วนชั้นไคตินจะบางกว่าไข่ที่ไม่ได้ถูกบ่มด้วยเอนไซม์ สอดคล้องกับรายงานของ Bonants และคณะ (1995) ที่รายงานว่าเอนไซม์ protease ยับยั้งการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของไข่ได้เอนฝอยรากปม และพบความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์กับความรุนแรงในการในการเข้าทำลายไข่ *M. incognita* โดยเชื้อรา *P. lilacinus* สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ได้ร้อยละ 100 สามารถสร้าง protease ได้มากกว่าสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ได้ร้อยละ 66.6 ในปริมาณ 1.2 ถึง 4.2 เท่า (สปีซัคคี่, 2539)

8.2 เอนไซม์ chitinase

เอนไซม์ chitinase ที่เชื้อราสร้างขึ้นมีความสำคัญและเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตโดยเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ และบทบาทการใช้สารอาหาร (Papavizas, 1985; Takaya et al., 1998) โดยเฉพาะในเชื้อราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช (mycoparasites fungi) เชื้อราปฏิปักษ์ต่อไข่ได้เอนฝอย (nematophagous fungi) รวมทั้งเชื้อราทำลายแมลง (entomopathogenic fungi) เอนไซม์ chitinase เป็นโปรตีนที่ย่อยสลายไคตินได้โดยการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) พันธะ β -1,4-glycosidic bond ให้เป็นโมโนเมอร์ของไคตินคือ N-acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) ไคตินเป็นสารประกอบที่เกิดจากการเชื่อมกันของ N-acetyl-D-glucosamin ด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic bond (Felse and Panda, 1999) ดังแสดงในภาพที่ 8 โดยทั่วไปไคตินมี 3 รูปแบบ คือ α -ไคติน β -ไคติน และ γ -ไคติน (Gooday, 1990) ส่วน เอนไซม์ chitinase สามารถจำแนกออกเป็น 3 ชนิด (Harman et al., 1993; Sahai and Manocha, 1993) ได้แก่

8.2.1 Endochitinase (EC 3.3.1.14) หรือ chitinase ทำหน้าที่ในการย่อยสลายไคตินโดยสลายพันธะ β -1, 4-glycosidic bond ได้ chitotetraose, chitotriose และ chitobiose

8.2.2 Exochitinase หรือ chitobiosidases ทำหน้าที่ย่อยสลายโมเลกุลของ chitobiose ให้อยู่ในรูปของ monosaccharides หรือ oligosaccharides



ภาพที่ 8 โครงสร้างทางชีวเคมีของไคติน

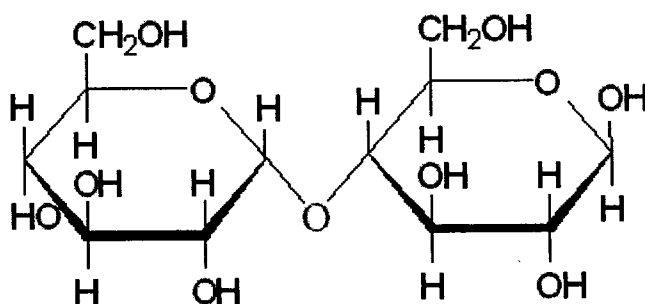
ที่มา : Austin (2006)

8.2.3 N-acetyl- β -glucosaminidases หรือ chitobiases (EC 3.2.1.30) ทำหน้าที่ย่อยสลาย chitobiose, chitotriose และ chitotetraose ให้เป็น N-acetylglucosamine (GlcNAc) ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อรา *Trichoderma* spp. สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ทั้ง 3 ชนิด โดยเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ P1 สร้างเอนไซม์ chitinase ขนาด 40 กิโลดาลตัน (kDa) สามารถย่อยสลายไคตินได้ผลผลิตสุดท้ายเป็น chitobiose (Harman et al., 1993) ส่วนในเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ TM พบเอนไซม์ β -1,4-N-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.30) ทำหน้าที่ย่อยสลายไคตินเป็น N-acetylglucosamine (GlcNAc) และเอนไซม์ endochitinase (EC 3.2.1.14) ทำหน้าที่ย่อยสลายไคติน โดยตัดแบบสุ่มภายในสายของไคติน (Haran et al., 1996) เอนไซม์ chitinase ที่พบในเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปมมีบทบาทต่อการแทงผ่านเปลือกไข่ ซึ่งมีไคตินเป็นองค์ประกอบหลัก สืบศักดิ์ (2539) พบว่าเชื้อรา *P. lilacinus* สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ได้ร้อยละ 100 สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ 0.11 - 0.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร สร้าง chitobiase ได้ 0.45-5.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร ขณะที่สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ได้ร้อยละ 66.6 สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ 0.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร สร้าง chitobiase ได้ 19.30 หน่วยต่อมิลลิลิตร Olivares และคณะ (2002) ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในเชื้อ

ราที่เป็นปรสิตต่อไข่ไส้เดือนฝอยรากปมบนอาหารแข็ง พบว่าเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ต่ำกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เฉพาะในช่วงแรกๆของการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. chlamydosporia* (Syn. *V. chlamydosporium* var. *chlamydosporia*) strain 76 เท่านั้น ส่วนเชื้อรา *Lecanicillium lecanii*, *P. chlamydosporia* strain 64 และ *P. lilacinus* ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ Tikhonov และคณะ (2002) พบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในเชื้อรา *V. chlamydosporium* และ *V. suchlasporium* จากการนำ culture filtrate บ่มร่วมกับ colloidal chitin ที่ pH 4.7 อุณหภูมิ 40 °C นาน 6-24 ชั่วโมง และเมื่อสกัดให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติสามารถบ่งชี้ได้เป็น endochitinase (CHI43) ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงในช่วง pH 5.2 ถึง 7.0 และมีค่า pIs 7.6 และ 7.9 สำหรับเชื้อ *V. suchlasporium* และ *V. chlamydosporium* ตามลำดับ ส่วน endochitinase (CHI43) จากเชื้อ *V. suchlasporium* ที่บ่มร่วมกับไข่ของ *Globodera pallida* ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 16 ชั่วโมง สามารถทำลายไข่ให้กับเปลือกไข่ได้ แต่เปลือกไข่จะเสียหายมากขึ้นถ้าบ่มไข่ร่วมกับทั้ง endochitinase (CHI43) และ protease (P32) สอดคล้องกับการศึกษาของ Khan และคณะ (2004) ที่พบว่าเอนไซม์ chitinase กิ่งบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากเชื้อ *P. lilacinus* strain 25 สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเปลือกไข่ของ *M. javanica* โดยไข่ที่ถูกบ่มด้วยเอนไซม์ chitinase (ความเข้มข้นโปรตีน 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 21±1 °C นาน 6 วัน ตรวจพบว่าเปลือกไข่เกิดช่องว่างขนาดใหญ่ในชั้นโคติน ส่วนชั้น vitelline layer เกิดการแตกชั้น และถ้านำทั้งเอนไซม์ chitinase และ protease มาบ่มร่วมกับไข่พร้อมกัน พบว่าโครงสร้างของเปลือกไข่เสียหายมากที่สุด โดยชั้นไขมันในเปลือกไข่ถูกทำลายหายไป ชั้นโคตินแตกตัวและถูกย่อยสลายไปเป็นส่วนใหญ่ ส่วนชั้น vitelline สูญเสียคุณสมบัติทางเคมี แต่ยังคงเกาะติดกับชั้นโคติน และเอนไซม์นี้ยังทำให้การอัตราการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยลดลงด้วยเช่นกัน

8.3 เอนไซม์ glucoamylase

เอนไซม์ amylase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายแป้งซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันเป็นลูกโซ่ด้วยพันธะ α (1→4), α (1→6) โดยจะตัดที่ละหน่วยของ glucose จากปลาย non-reducing end สุดท้ายจะได้เป็นโมเลกุลกลูโคส (Schellart et al., 1976) เอนไซม์ amylase มี 2 แบบคือ α -amylase (α -1,4-glucan 4-glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.1.) และ glucoamylase (α -1,4-glucan glucohydrolase E.C. 3.2.1.3.) ซึ่ง α -Amylase ทำหน้าที่ตัดตรงตำแหน่ง α (1→4) glycosidic แบบสุ่มได้เป็น glucan, dextrin ที่มีขนาดความยาว 2-6 หน่วยกลูโคส ดังภาพที่ 9 ความเป็นกรดค่าที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 6.5 -8.0 ส่วน glucoamylase เป็นเอนไซม์ที่พบมากในเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ และมีบทบาทสำคัญในแง่ของการเป็น



ภาพที่ 9 โครงสร้างของน้ำตาลกลูโคส

ที่มา : Anonymous (2006)

เอนไซม์ที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม (industrial enzyme) ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำตาลกลูโคส การผลิตสารปฏิชีวนะ กรดอะมิโน เอทานอล และกรดอินทรีย์ที่รับประทานได้ เชื้อราหลายสกุลมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ เช่น *Rhizopus*, *Endomyces* หรือ *Aspergillus niger* (Rajoka and Yasmeen, 2005) Schellart และคณะ (1976) ศึกษาพบเชื้อรา *Trichoderma viride* สายพันธุ์ CBS 354.44 สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายออกมานอกเซลล์จากการย่อยแป้ง ซึ่งส่วนใหญ่เป็น glucoamylase มีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในแง่ของการนำไปใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธีค่อนข้างน้อย ในส่วนของรากปฏิบัติต่อไส้เดือนฝอยรากปมนั้นบทบาทของเอนไซม์ glucoamylase มีความสำคัญต่อการย่อยคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของสารเมือกเหนียว (gelatinous matrix) และของเหลวที่อยู่ในไข่ไส้เดือนฝอย จากการศึกษาของ สืบศักดิ์ (2539) พบว่า cultrate filtrate เชื้อรา *P. lilacinus* ที่บ่มร่วมกับสารละลายแป้งที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 10 นาที มีกิจกรรมของเอนไซม์ glucoamylase โดยเชื้อราสายพันธุ์ทำลายไข่ได้ร้อยละ 100 พบกิจกรรมเอนไซม์จำนวน 0.061-0.360 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่าประมาณ 20-120 เท่าของสายพันธุ์ทำลายไข่ได้ร้อยละ 66.6 ที่ตรวจพบเพียง 0.003 หน่วยต่อมิลลิลิตร

9. การบ่งชี้ชนิดเชื้อราที่ทำลายไส้เดือนฝอยรากปม

9.1 การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา เช่น ลักษณะโคโลนี ลักษณะเส้นใย ก้านชูสปอร์ สปอร์ โครงสร้างขยายพันธุ์อื่นๆทั้งในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (perfect state) และระยะสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (imperfect stage) รวมทั้งชนิดและวิธีการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยของเชื้อราเป็นลักษณะที่สำคัญที่นำมาใช้ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอย โดยอาศัยคู่มือ

บ่งชี้ที่มีรายละเอียดของกุญแจอนุกรมวิธาน (identification key) ที่สามารถบ่งชี้ได้ถึงระดับสกุล และชนิด คู่มือนี้สามารถสืบค้นได้จากตำรา วารสาร หรือเว็บไซต์ เช่น Barnett และ Hunter (1972), Domsch และคณะ (1980), Gilman (1985) และ Zare และคณะ (2004) เป็นต้น มีรายงานว่าเชื้อรา ปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยเป็นเชื้อราที่สามารถพบได้ในทุกกลุ่มของเชื้อรา โดย Kerry และ Jaffee (1997) กล่าวว่าเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยจัดจำแนกไว้ในกลุ่ม Chytridiomycota, Oomycota, Zygomycotin, Deuteromycota, Basidiomycotina แต่ไม่พบใน Ascomycotina ถึงแม้ว่าเชื้อราบาง ชนิด เช่น *Verticillium* และ *Hirsutella* ในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะถูกจัดไว้ในกลุ่ม Ascomycotina เช่นเดียวกับรายงานของ Hertz และคณะ (2002) ที่พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์พบทั้งในรา ชั้นต่ำในกลุ่ม Oomycetes, Chytridiomycetes, Zygomycetes ราชันสูงในกลุ่ม Ascomycetes, Basidiomycetes และ Deuteromycetes แต่เชื้อราปฏิปักษ์ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ Deuteromycetes ส่วนเชื้อราปฏิปักษ์ที่สร้างห้วงกับดักกาวเหนียวเป็นเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม Zygomycetes, Basidiomycetes และ Hyphomycetes โดยราในกลุ่ม Hyphomycetes เป็นกลุ่มใหญ่ สุดและมีความสำคัญ เช่น *Arthrobotrys*, *Monacrosporium*, *Dactylella* และ *Dactylaria* ส่วนเชื้อรา ในสกุล *Nematoctonus* จัดจำแนกต่างไปจากราสร้างห้วงกับดักกาวเหนียวในกลุ่ม Deuteromycetes อื่นๆ เนื่องจากเส้นใยเชื้อราชนิดนี้สร้าง clamp connection ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในรากกลุ่ม Basidiomycetes และราบางไอโซเลตพบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ (fruiting bodies) เป็นดอก เห็ด Gams (1987) จัดจำแนกเชื้อรา *V. chlamydosporium* และ *Diheterospora chlamydosporia* เป็นเชื้อเดียวกับ *V. chlamydosporium* var. *chlamydosporium* ซึ่งสร้าง dictyochlamydospores เป็น จำนวนมากบนก้านสั้นๆที่อยู่บนเส้นใย สปอร์ (phialoconidia) ไม่ต่อเป็นลูกโซ่ และจัดเชื้อรา *Verticillium catenulatum* และ *Diheterospora catenulate* เป็นเชื้อเดียวกันกับเชื้อรา *V. chlamydosporium* var. *catenulatum* โดยสปอร์จะเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ และผิวของ dictyochlamydospores ลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ (wart-like escrescences) นอกจากนี้ *V. catenulatum* บางชนิดถูกจัดไว้เป็นเชื้อราชนิดเดียวกับ *V. suchlasporium* var. *catenulatum* ซึ่ง dictyochlamydospores แห่ (submerged) ในอาหารวุ้นและสร้างสปอร์ต่อกันเป็นลูกโซ่ ซึ่งต่างจาก เชื้อรา *V. suchlasporium* var. *suchlasporium* ที่สปอร์มีลักษณะแห้ง (dry head) สอดคล้องกับ การศึกษาของ Kerry (2001) ที่พบว่าเชื้อรา *Verticillium* มีความแตกต่างของเชื้อในระดับต่ำกว่า ระดับชนิด (species) เช่น *V. chlamydosporium* var. *chlamydosporium*, *V. chlamydosporium* var. *catenulatum*, *V. suchlasporium* var. *suchlasporium*, *V. suchlasporium* var. *catenulatum* และ *Verticillium psalliotae* ซึ่ง *V. chlamydosporium* เป็นชนิดที่พบมากที่สุด โดยในระยะสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศจัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycota ชั้น Hyphomycetes สร้าง resting spors หรือ

dictyochlamydospores บนก้านสั้นๆและเมื่อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะถูกจัดไว้ในกลุ่ม *Cordyceps* ในปี 1974 Samson ได้จัดจำแนกเชื้อรา *P. lilacinus* ไว้ในกลุ่ม Hyphomycetes โดยเชื้อราสร้างเส้นใยสีขาว ผนังเรียบมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-4.0 ไมโครเมตร ต่อมาเมื่อสร้างสปอร์สีเปลี่ยนไปเป็นสีม่วง ก้านชูสปอร์ยาวประมาณ 400 – 600 ไมโครเมตร เกิดบน aerial hypha ขนาด phialide ประมาณ 7.5-9.0 x 2.5-3.0 ไมโครเมตร conidia ต่อกันเป็นลูกโซ่ รูปร่างเป็นวงรี หรือ fusiform ผนังเรียบ ไม่มีสีหรือสีม่วงขนาด 2.5-3.0 x 2.0-2.2 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง chlamydospore (อนุชา, 2539) ซึ่งเลข (2533) รายงานว่ามีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายเชื้อรา *Penicillium*, *Gliocladium* และ *Scopulariopsis* และมีระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศเป็น *Byssochlamys fulsa*

9.2 การจัดจำแนกโดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล

ลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่เรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบในแบบต่างๆบนสายดีเอ็นเอ (DNA) เป็นข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic information) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ข้อมูลเหล่านี้ควบคุมการแสดงลักษณะต่างๆหรือฟีโนไทป์ (phenotype) ของสิ่งมีชีวิตผ่านทางอาร์เอ็นเอ (RNA) ในขบวนการสังเคราะห์โปรตีน การถ่ายทอดทางพันธุกรรมเกิดจากกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) โดยอาศัยกระบวนการลอกรหัสจากดีเอ็นเอมาเป็นอาร์เอ็นเอ (transcription) แล้วจึงแปลรหัสจากอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีน (translation) นอกจากการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอแล้ว ยังมีกระบวนการซ่อมแซม (DNA repair) และการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) ซึ่งมีความสำคัญในการคงอยู่และสร้างความหลากหลายให้กับสิ่งมีชีวิต นิวคลีโอไทด์คือหน่วยย่อยของดีเอ็นเอ ที่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ น้ำตาลดีออกซีไรโบส (2'-deoxyribose) หมู่ฟอสเฟต และสารประกอบพวกเบส ซึ่งเบสมี 2 ประเภท คือ พิวรีน (purine) ได้แก่ adenine (A), guanine (G) และไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ cytosine (C), thymine (T) โดยเบสจะต่ออยู่กับน้ำตาล แล้วมีหมู่ฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างตำแหน่ง 5' ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับตำแหน่ง 3' ของน้ำตาลอีกโมเลกุลหนึ่ง ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester) (Darbre, 1999; สุรินทร์, 2543) เกิดเป็นสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) ที่มีทิศทางปลายหนึ่งเป็นปลาย 5' และอีกปลายหนึ่งเป็นปลาย 3' เกิดเป็นดีเอ็นเอเป็นเส้นยาว มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helix) ที่เกิดจากสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายเรียงตัวขนานและกลับทิศทางกัน มีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตอยู่รอบนอกของเกลียว ส่วนเบสจับคู่กันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) โดย A จับคู่กับ T มี 2 พันธะ และ G คู่กับ C มี 3 พันธะ อยู่ในแนวระนาบเกือบตั้งฉากกับแกนของเกลียว ลักษณะเกลียวจะหมุนครบรอบยาว 3.4 นาโนเมตร (nm) หรือเท่ากับ 34 องศา (A°) ทุก 10 คู่เบส (base pair) ทำให้เบสแต่ละคู่อยู่ห่างกัน 0.34 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียวคู่เท่ากับ 2 นาโนเมตร การพัน

เกลียวทำให้เกิดร่อง 2 ขนาดเรียกว่า major groove และ minor groove (Watson and Crick, 1953 อ้างถึงใน สุรินทร์, 2543)

การศึกษาทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพรวมทั้งการเทคนิคต่างๆทางชีวโมเลกุลพัฒนาอย่างต่อเนื่องหลังจากการค้นพบว่าดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมในปีค.ศ. 1944 โดย Avery, MacLeod และ McCarty ต่อมาในปี 1953 Watson และ Crick ได้เสนอโครงสร้างของดีเอ็นเอ และ Nathans และ Smith สามารถแยกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme หรือ restriction endonuclease) ชนิดแรกได้ในปีค.ศ. 1970 (สุรินทร์, 2543) ต่อมาการศึกษาในระดับโมเลกุลมากขึ้น ทำให้เทคนิคด้านการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรุดหน้าไปอย่างรวดเร็ว เช่น เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR), การโคลนยีน (gene cloning), เทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger print) การประดิษฐ์เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (automatic sequencer) การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อการวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวโมเลกุล และด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatic) เป็นต้น การจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างๆรวมทั้งเชื้อราได้มีการนำวิธีการทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากการจัดจำแนกโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบต่างๆที่อยู่บนเส้นสายดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงมีความแม่นยำสูงและรวดเร็วในการจัดจำแนกกว่าวิธีการอื่นๆ

9.2.1 การใช้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

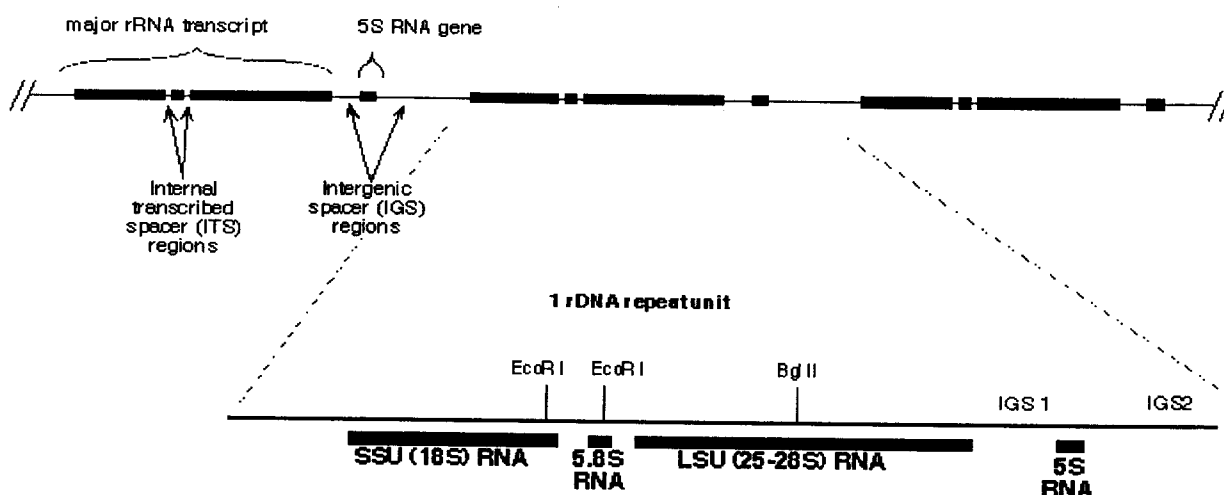
เป็นการจำแนกโดยอาศัยหลักการพื้นฐานของเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ที่ใช้หลักการความแตกต่างของชนิดและปริมาณประจุในการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้า เป็นการแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ตามขนาดและรูปร่างบนเจลอะกาโรส (agarose) หรือ เจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) และใช้เทคนิคทางโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker technique) มาช่วยตรวจหาจุดหรือตำแหน่ง (locus) ที่มีความผันแปรเปรียบเทียบกับเพื่อบอกความแตกต่าง ตัวอย่าง เช่น เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) เทคนิคเหล่านี้เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่ทำให้ได้ดีเอ็นเอขนาดต่างๆกัน ส่วนเทคนิค AFLP และ ARDRA ได้นำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) มาร่วมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย นอกจากนี้ยังมีเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) คือ การเพิ่มปริมาณบางส่วนของจีโนมโดยสุ่มใช้ไพรเมอร์ที่มีสายสั้นๆไม่เฉพาะเจาะจงกับตำแหน่งที่อยู่บนจีโนมและเป็นเทคนิคเดียวกับ arbitrary primed PCR (AP-PCR) ที่สุ่มเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีสายสั้นๆ เพียง 10 นิวคลีโอไทด์ (10-mer primer) จากจำนวนชุดของไพรเมอร์สายสั้นๆ จำนวนมากที่เรียกว่า arbitrary primer ซึ่งบางครั้งไพรเมอร์ไม่สามารถทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดี

เอ็นเอได้ แต่มีบางไพรเมอร์ที่เลือกมาสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้หลายขนาด โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดอาจมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเฉพาะตัว เทคนิคและวิธีการเหล่านี้จึงสามารถนำมาช่วยในการจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของเชื้อราได้ (Cobb and Clarkson, 1993; Guarro et al., 1999) สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส เพชรรัตน์ (2545) ได้กล่าวไว้ว่าเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมาจากบางส่วนของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ซึ่งกระบวนการต่างๆ เลียนแบบจากการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอในสภาพธรรมชาติ (*in vivo* DNA replication)

9.2.2 การใช้ข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็น

เป็นการบ่งชี้ชนิดสิ่งมีชีวิตโดยใช้ข้อมูลลำดับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างไรโบโซม (ribosomal RNA gene, rDNA) rDNA เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างไรโบโซม (ribosom) ที่พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1,800 เบส ไรโบโซมมีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ประกอบด้วยไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA, rRNA) และไรโบโซมอลโปรตีน (ribosomal protein) ในเชื้อราซึ่งเป็นพวกยูคาริโอต (eukaryote) มีไรโบโซมขนาด 80S ประกอบด้วย large subunit และ small subunit ที่มีขนาด 60S และ 40S ตามลำดับ โดย large subunit ประกอบด้วยไรโบโซมอล 5S rRNA, 5.8S rRNA และ 28S rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 49 ชนิด สำหรับ small subunit ประกอบด้วย 18S rRNA รวมอยู่กับโปรตีนประมาณ 33 ชนิด (Watson et al., 2004) โดย ribosomal RNA gene (rDNA) มีการเรียงตัวซ้ำๆ กัน (repeated copy) แบบต่อเนื่อง (ภาพที่ 10) แต่ละซ้ำ (repeat unit) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน (coding region) ซึ่งเป็นส่วน 35S และ 5S โดยส่วน 35S จะถอดรหัสไปเป็น 18S rRNA, 5.8S rRNA และ 28S rRNA และบริเวณที่มีลำดับเบสแต่ไม่สามารถแปลรหัสการสังเคราะห์โปรตีน (non-coding region) และเรียกบริเวณนี้ว่า nontranscribed spacer (NTS) หรือ intergenic spacer (IGS) (Guarro et al., 1999)

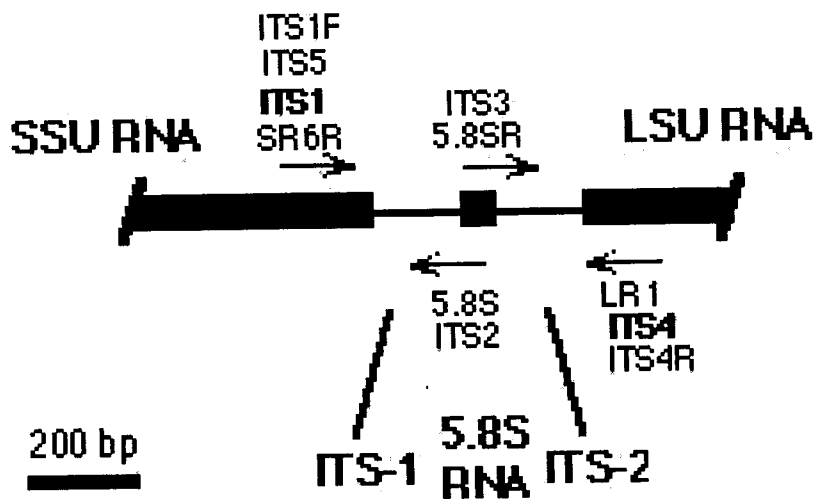
ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างไรโบโซม (rDNA) เป็นส่วนที่ถูกนำมาใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตรวมทั้งเชื้อรา เนื่องจากพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในปริมาณมากและค่อนข้างเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) หรือมีความผันแปรต่ำ (highly conservative region) และเป็นบริเวณที่ยีนมีรหัสสำหรับการสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (rRNA) ชนิดต่างๆ



ภาพที่ 10 ลักษณะการเรียงตัวของ ribosomal RNA gene

ที่มา: Vilgalys Lab (1994)

นอกจากนี้บน rDNA ในส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้ทำหน้าที่ในการสร้างไรโบโซม (non-coding rRNA regions) โดยเฉพาะในส่วน internal และ external transcribed spacers (ITS และ ETS) เป็นบริเวณที่ไม่มีรหัสสำหรับยีนใด และเป็นส่วนที่มีความผันแปรในลำดับนิวคลีโอไทด์มาก (variable region) โดย ITS มีตำแหน่งอยู่บริเวณ upstream และ downstream ของยีน 5.8S rDNA ซึ่งเรียกว่า ITS1 และ ITS2 ตามลำดับ (ภาพที่ 11) บริเวณนี้จึงถูกนำมาใช้ศึกษาจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยใช้สำหรับแยกความแตกต่างระดับชนิดหรือในระดับที่ต่ำกว่าชนิด (Guarro et al., 1999; Skouboe et al., 1999) โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของ ITS ของไรโบโซมดีเอ็นเอ สำหรับไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของ ITS ของไรโบโซมดีเอ็นเอ ดังแสดงตารางที่ 1 (Guarro et al., 1999) เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อเราได้แล้ว จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน (gene) ดังกล่าวกับฐานข้อมูลใน GenBank



ภาพที่ 11 ตำแหน่งของ internal transcribed spacer (ITS) ของ ribosomal RNA gene

ที่มา: Vilgalys Lab (1994)

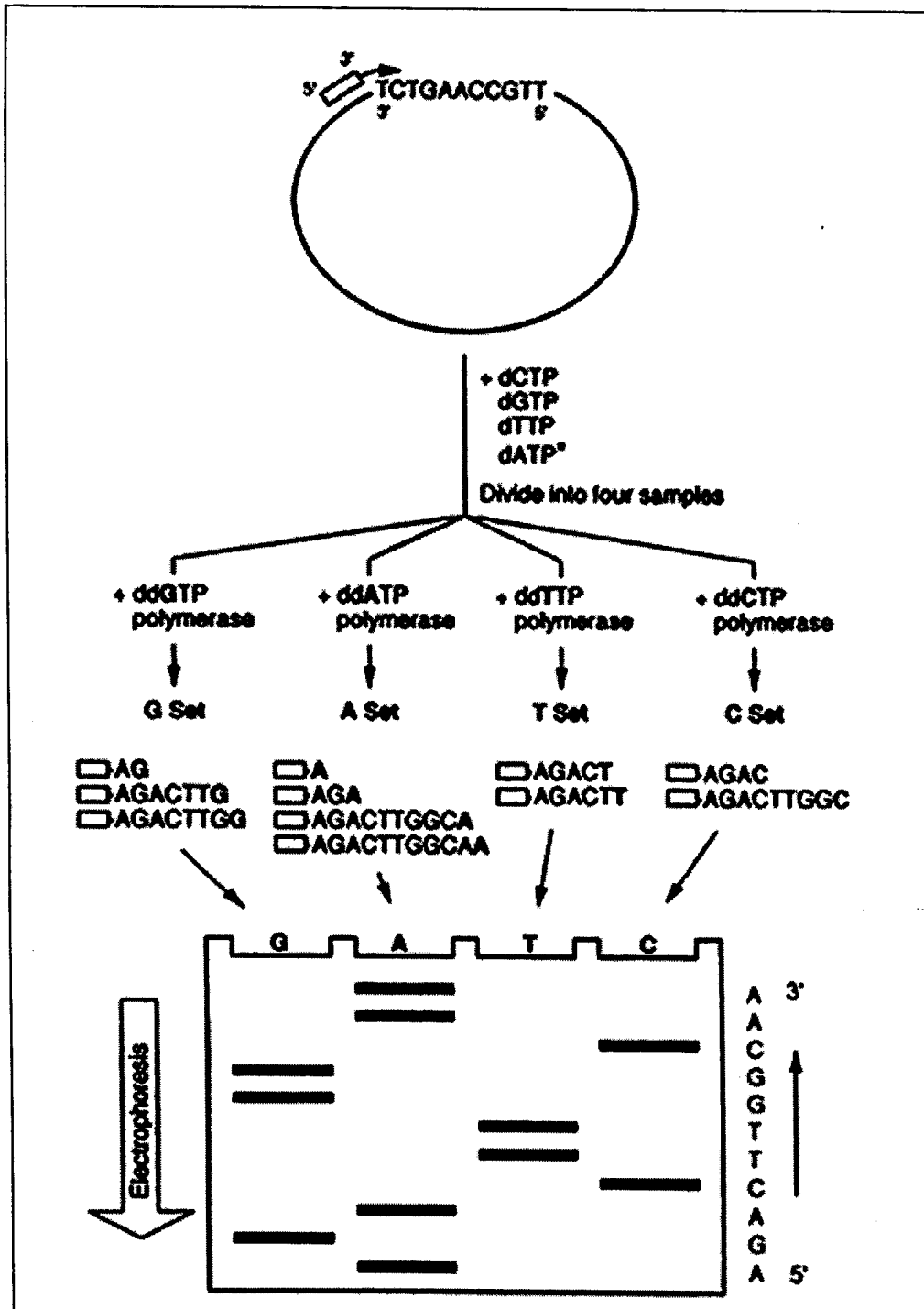
ตารางที่ 1 ไพรมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

ไพรมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	อ้างอิงจาก
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White และคณะ (1990)
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White และคณะ (1990)
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White และคณะ (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White และคณะ (1990)
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White และคณะ (1990)
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes และ Bruns (1993)
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes และ Bruns (1993)
5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG	Vilgalys lab (1994)
5.8SR	TCGATGAAGAACGCAGCG	Vilgalys lab (1994)
SR6R	AAGWAAAAGTCGTAACAAGG	Vilgalys lab (1994)

ที่มา : คัดแปลงจาก White และคณะ (1990); Gardes และ Bruns (1993) และ Vilgalys lab (1994)

9.2.2.1 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) สามารถกระทำได้โดยวิธีทางเอนไซม์ (chain-termination method) และวิธีทางเคมี (chemical degradation method) (Wilson and Mardis, 1997) ซึ่งมีหลักการอย่างเดียวกัน คือแยกดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ออกเป็นสายเดี่ยว แล้วตัดหรือทำลายดีเอ็นเอให้ขาดตรงนิวคลีโอไทด์หนึ่งนิวคลีโอไทด์ใดในสื่อนิวคลีโอไทด์อย่างจำเพาะ จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลโพลีอะครีลาไมด์ และอ่านผลจากการติดฉลากสายดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสง (fluorescent tagging) หรือกัมมันตภาพรังสี (radioactive labeling) วิธีการทางเอนไซม์เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยการนำไปทำปฏิกิริยาแยกกันเป็น 4 หลอดทดลองตามชนิดของเบสคือหลอด A, T, C และ G ทุกหลอดทดลองมีสารต่างๆ เหล่านี้เหมือนกัน ได้แก่ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบ (single-stranded DNA template), ไพรเมอร์, เอนไซม์ DNA polymerase I และไดออกซินิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dTTP, dCP และ dGTP โดยมีชนิดใดชนิดหนึ่งติดด้วยสารกัมมันตภาพรังสี และแต่ละปฏิกิริยามีไม่เหมือนกันคือไดออกซินิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต dideoxynucleotide triphosphate; ddATP) ซึ่งแต่ละหลอดใส่ไม่เหมือนกันคือใส่ ddATP ในหลอด A, ddTTP ในหลอด T, ddCTP ในหลอด C และ ddGTP ใน หลอด G (Micklos and Freyer, 2003) เมื่อเริ่มปฏิกิริยา เอนไซม์ DNA polymerase I สร้างดีเอ็นเอสายคู่สมขึ้น ซึ่งเอนไซม์นี้ต้องการไพรเมอร์ในการเริ่มต้น จึงจะต่อยนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าทางด้าน 3' ของไพรเมอร์ การสังเคราะห์สายนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์จะหยุดเมื่อเอนไซม์สุมจับกับไดออกซินิวคลีโอไทด์ เนื่องจากตำแหน่ง 3' ของไดออกซินิวคลีโอไทด์ขาดหมู่ไฮดรอกซิล (-HO) จากผลของปฏิกิริยา ทำให้ในแต่ละหลอดทดลองมีดีเอ็นเอสายใหม่จำนวนมากและมีความยาวแตกต่างกัน และนำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและตรวจสอบโดยทำออโตเรดิโอกราฟี (autoradiography) ซึ่งจะปรากฏแถบสีดำในแต่ละแถวบนฟิล์มเอกซเรย์ ซึ่งสามารถอ่านลำดับเบสได้โดยเริ่มจากด้านล่างของแผ่น (ปลาย 5') เรียงขึ้นไปเรื่อยๆ (ปลาย 3') ดังแสดงในภาพที่ 12 ลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้นี้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายคู่สม ดังนั้นต้องทำการกลับนิวคลีโอไทด์อีกครั้งจึงจะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์นิวคลีโอไทด์เหมือนสายต้นแบบ (สุรินทร์, 2543) ปัจจุบันได้ได้มีการพัฒนาเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ (automated DNA sequencer) โดยอาศัยหลักการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบวิธีเอนไซม์ เพื่อความสะดวก รวดเร็ว และเพิ่มความสามารถในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และติดฉลากสารเรืองแสงไว้ที่ไดออกซินิวคลีโอไทด์ แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี โดยตรวจจับและวิเคราะห์ช่วงคลื่นของการเรืองแสงเมื่อชิ้นดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเคลื่อนตัวผ่านลำแสงเลเซอร์ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วย โดยเบส

A มีสีเขียว, เบส T มีสีแดง, เบส C มีสีน้ำเงิน และ เบส G มีสีเหลือง (Micklos and Freyer, 2003) ทำให้มีการแสดงลำดับเบสในรูปกราฟแบบ real-time



ภาพที่ 12 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีทางเอนไซม์

ที่มา: Volckaert และคณะ (1993)

9.2.2.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ การนำข้อมูลลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ ทำให้ทราบถึงบริเวณที่มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน และเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบนดีเอ็นเอสายใหม่เปรียบเทียบกับ (alignment) กับลำดับเบสของสายดีเอ็นเออื่น ทำให้ทราบถึงบริเวณที่ลำดับเบสที่มีความคล้ายคลึงกัน (homologous sequence) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ การเปรียบเทียบลำดับเบสที่สนใจกับลำดับเบสของดีเอ็นเออื่นทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database) สามารถวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อการวิเคราะห์ โปรแกรมที่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลายคือ blastn เป็นโปรแกรมที่อยู่ในกลุ่มของโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ซึ่งพัฒนาโดย National Center for Biotechnology Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถใช้งานผ่านทางอินเทอร์เน็ต เว็บไซต์ที่ให้บริการคือ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> และโปรแกรม CLUSTAL ซึ่งคิดค้นและพัฒนาโดยนักวิจัยจาก European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ประเทศเยอรมนี ที่สามารถเปรียบเทียบลำดับเบสได้สูงสุด 100 sequence ในคราวเดียวกัน (multiple sequence alignment) สามารถใช้งาน ClustalW ผ่านทางอินเทอร์เน็ตเชื่อมต่อไปยังเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> ปัจจุบัน GenBank (NCBI), EMBL สหภาพยุโรป และ DNA Database of Japan (DDBJ) ประเทศญี่ปุ่นเป็นองค์กรหลักที่เก็บรวบรวมข้อมูลทางชีวสารสนเทศ

9.3 การใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA ในการจัดจำแนกเชื้อราปฏิภักซ์ต่อไส้เดือนฝอยและเชื้อราปฏิภักซ์อื่นๆ

Hertz และคณะ (2002) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 18S rDNA ในเชื้อราชนิดต่างๆรวมทั้งราที่สร้างห้วงกับดักกาวเหนียว พบว่าเชื้อราในสกุล *Arthrobotrys* spp., *Dactylaria* spp. และ *Monacrosporium* spp. มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogeny) อย่างใกล้ชิดกันและสอดคล้องกับการสร้างเส้นใยพิเศษที่ใช้ดักจับไส้เดือนฝอยที่เหมือนกัน แต่รูปร่างลักษณะสปอร์และก้านชูสปอร์แตกต่างกัน ต่อมา Zare และ Gams (2004) ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA และหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อรา *Verticillium* spp. รวมทั้ง *Verticillium* section *Prostrata* ในระดับชนิดพบว่า ความยาวคู่เบสของยีนบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 อยู่ระหว่าง 476- 558 คู่เบส ซึ่งบริเวณ 5.8S เป็นบริเวณอนุรักษ์ที่สุดและบริเวณ ITS มีความแตกต่างของจำนวนคู่เบสมากที่สุด จากการนำวิธีทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดกลุ่มเชื้อรา *Verticillium* spp. ได้ 4 clades ซึ่ง clades D เป็นกลุ่มเชื้อราที่มีก้านชูสปอร์ลักษณะ

หมอบราบ (prostrate) หรือตั้งตรง (erect) และส่วนใหญ่เป็นปฏิปักษ์ต่อไข่และซิสต์ (cysts) ของไส้เดือนฝอย และเชื้อ *V. chlamydosporium* var. *catenulatum* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *V. chlamydosporium* var. *chlamydosporium* และพบความแตกต่างระหว่างเชื้อ *V. chlamydosporium* และ *V. suchlasporium* อย่างชัดเจน แม้ว่าจะอยู่ใน clades เดียวกันก็ตาม และเรียกชื่อเชื้อราสกุล *Verticillium* ใหม่เป็น *Pochonia* ซึ่งราในสกุลนี้ส่วนใหญ่เป็นปรสิตต่อซิสต์และไข่ไส้เดือนฝอย เช่น *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Syn. *V. chlamydosporium* var. *chlamydosporium*, *Diheterospora chlamydosporia*, *D. heterospora*, *Pochonia humicola*) *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Syn. *Diheterospora catenulate*, *Verticillium catenulatum*, *V. chlamydosporium* var. *catenulatum*), *Pochonia suchlasporia* var. *catenata* (Syn. *V. suchlasporium* var. *catenatum*) เป็นต้น

Hermosa และคณะ (2004) ได้จัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 17 ไอโซเลต จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ ITS2 (White et al., 1990) ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีการจำแนก 16 ไอโซเลตเป็นเชื้อรา *T. harzianum* และอีก 1 ไอโซเลตเป็นเชื้อรา *T. viride* พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 560 ถึง 600 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากการใช้ไพรเมอร์ ITS1 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม ClustalW สามารถจัดกลุ่มของเชื้อรา *Trichoderma* ได้ 4 กลุ่ม คือ *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum* และ *T. atroviride* - *T. koningii* สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากการใช้ไพรเมอร์ ITS2 พบว่า *T. atroviride* จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ *T. atroviride*-*T. koningii* Curran และคณะ (1994) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *Metarhizium* โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ซึ่งเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ TW81 และ AB28 พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ได้มีขนาดประมาณ 601 คู่เบส และเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสสามารถจัดจำแนกเชื้อราสกุลนี้ได้เป็น 3 ชนิด คือ *M. anisopliae*, *M. flavoviride* และ *M. album* และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกออกเป็นสองสายคือ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride*/ *M. album* ซึ่งภายในวิวัฒนาการของเชื้อ *M. anisopliae* ยังสามารถแยกออกได้อีกเป็นสองกลุ่ม