

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

การเกิดโรคในพืช (เกษม, 2532, บรรพด, 2525 และ ประสาทพร, 2534)

การเกิดโรคพืชชนิดหนึ่งๆ ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพ ซึ่งปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ อุณหภูมิของดิน ความเป็นกรด-ด่างของดิน การหมุนเวียนของน้ำ ส่วนปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ จุลินทรีย์ต่อต้าน (antagonist) จุลินทรีย์แข่งขัน และความหนาแน่นของเชื้อก่อโรค เป็นต้น ซึ่งการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยใช้สารเคมี เป็นวิธีที่เกษตรกรใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีข้อดีคือ สะดวกรวดเร็วและใช้ได้ง่าย นอกจากนี้ยังเห็นผลรวดเร็ว ผู้ใช้สามารถมองเห็นแมลงตายหรือใบพืชที่ไม่เป็นโรคภายหลังการฉีดพ่นยา แต่ก็มีข้อเสียหลายประการคือ ต้นเปลี่ยนเนื่องจากสารเคมีบางชนิดมีราคาแพง นอกจากนี้ยังควบคุมได้เพียงระยะสั้น และที่สำคัญคือ มีพิษตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม การควบคุมโดยจุลินทรีย์จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจ เนื่องจากมีข้อดีหลายประการคือ มีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อสัตว์ชนิดอื่น ไม่มีพิษตกค้าง จุลินทรีย์หลายชนิดผลิตได้ง่ายและราคาถูก ซึ่งในธรรมชาติมีพฤติกรรม การควบคุมกันเองของสิ่งมีชีวิตอยู่แล้วจึงไม่ทำให้สมดุลย์ของระบบนิเวศน์เสียไป แต่อย่างไรก็ตาม การควบคุมโดยจุลินทรีย์ ก็มีข้อเสียเช่นกันคือ ต้องกำหนดเวลาที่จะใช้ให้ถูกต้องและต้องเพาะเชื้อให้ได้ตามเวลา และที่สำคัญคือ สภาพแวดล้อมของสถานที่ที่ใช้ต้องเหมาะสม จึงจะทำให้เกิดผลในการควบคุมดีที่สุด

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช เรียกว่า จุลินทรีย์ต่อต้าน (antagonist) ซึ่งกระบวนการต่อต้าน (antagonism) เกิดจากกระบวนการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) และการทำลายเชื้อโรคพืช (lysis) การแข่งขันซึ่งกันและกัน (competition) และการเป็นปรสิต (parasitism)

ความหมายของการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี (เกษม, 2532 และ สมคิด, 2540)

ค.ศ. 1965 Garret นิยามความหมาย การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธีไว้ว่า “ในสภาวะแวดล้อมใดๆ ก็ตาม จุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิต (ที่ไม่ใช่คน) ที่ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชลดปริมาณเป็นผลให้ลดความรุนแรงของโรคลงได้”

ค.ศ. 1972 Johnsen และ Curl ให้ความหมายไว้ว่า “การควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพรวม หมายถึง การลดลงของโรคและปริมาณเชื้อสาเหตุโรค (และอาจเป็นผลโดยตรงหรือทางอ้อม) โดยการชักนำเชื้อจุลินทรีย์หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดเข้าไปยับยั้ง (ต่อต้าน) เชื้อสาเหตุโรคหรือการปรับสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการดำรงอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์มีประโยชน์นั้นๆ”

ค.ศ. 1974 Baker และ Cook ให้ความหมายดังนี้ “การที่จุลินทรีย์หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิดที่ทำให้ปริมาณเชื้อโรค หรือกิจกรรมของเชื้อโรคที่มีต่อพืชลดน้อยลง หรือหยุดนิ่ง”

ค.ศ. 1978 Agrios กล่าวว่า “การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอาจเปรียบได้กับการเลือกใช้พันธุ์พืชที่มีความต้านทานโรคไปต้านทานเชื้อโรคนั้นๆ เช่นเดียวกับเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เข้าไปต่อต้านเชื้อโรคหรือไปทำลายเชื้อโรคโดยตรง”

พ.ศ. 2532 เกษม ได้ให้ความหมายของการควบคุมโดยชีววิธีไว้ว่า หมายถึง “การลดปริมาณของเชื้อก่อโรคหรือการลดกิจกรรมการเกิดโรคของเชื้อโรคหรือปรสิตที่อยู่ในระยะที่มีปฏิกิริยา (active) หรือระยะที่พักตัว (dormant) ด้วยการใส่สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่าเข้ามาทำการป้องกันกำจัด เพื่อให้บรรลุผลสำเร็จโดยวิธีธรรมชาติหรือโดยการจัดการสิ่งแวดล้อม สิ่งอาศัย จุลินทรีย์ต่อต้านหรือด้วยการนำจุลินทรีย์ต่อต้าน (antagonist) ชนิดหนึ่งหรือมากกว่ามาใช้ในการควบคุม”

วัตถุประสงค์ของการควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อโรคพืชโดยทั่วไป ก็คือ การลดการเกิดโรคโดยลดปริมาณเชื้อก่อโรคด้วยการลดความมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อโรค ในระยะที่ปลูกพืชและเป็นการลดการสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อโรคที่มีชีวิตหรือลดการแพร่กระจายของการเจริญเติบโตของเส้นใยรา ลดการติดเชือบนสิ่งอาศัยและลดความเสียหายในการเข้าทำลายของเชื้อโรค

การควบคุมจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชโดยจุลินทรีย์

Hadar *et al.* (1979) ได้ศึกษาการควบคุม *Rhizoctonia solani* โดยใช้ wheat bran culture ของ *Trichoderma harzianum* พบว่า *T. harzianum* จะสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น เมื่อเจริญในอาหารที่มี laminarin หรือไคตินเป็นแหล่งคาร์บอน *T. harzianum* จะสร้าง β -1,3 glucanase และ chitinase เป็นต้น เมื่อทดลองในสภาพเรือนกระจกโดยนำ wheat bran culture มาใส่ในดินที่มีเชื้อ *R. solani* พบว่า สามารถควบคุมโรคเน่าคอดินในถั่ว มะเขือเทศ และเมล็ดพืชได้ดี เมื่อใช้ pentachloronitrobenzene ร่วมกับ *T. harzianum* จะ

ช่วยลดการเกิดโรคได้ 13-40 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ใช้ *T. harzianum* เพียงอย่างเดียวจะช่วยลดการเกิดโรคได้ 26 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ pentanitrochlorobenzene เพียงอย่างเดียวจะไม่สามารถลดการเกิดโรคได้

Elad et al. (1980) ได้ศึกษาการควบคุม *R. solani* และ *Sclerotium rolfsii* โดย *T. harzianum* พบว่า *T. harzianum* สามารถย่อยสลายเส้นใยของ *R. solani* และ *S. rolfsii* ได้ *T. harzianum* เจริญได้ดีกว่า *S. rolfsii* และจะเข้าทำลายโดยการแทงเส้นใยเข้าไปในสภาวะที่มี pentanitrochlorobenzene ความเข้มข้นสูง pH สูงหรืออุณหภูมิต่ำ เป็นต้น เมื่อทดลองในสภาวะเรือนกระจก พบว่า wheat bran culture จะช่วยลดการเกิดโรคในถั่วได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพจะแปรผกผันกับอุณหภูมิ เมื่อนำมาทดลองในแปลงปลูก พบว่า จะช่วยลดการเกิดโรคจาก *S. rolfsii* หรือ *R. solani* ในถั่ว ฝ้าย และมะเขือเทศ และยังทำให้ถั่วมีผลผลิตเพิ่มขึ้นด้วย

Elad et al. (1981) ได้ศึกษาการควบคุม *R. solani* ที่ทำให้เกิดโรคในคาร์เนชั่น โดย *T. harzianum* พบว่าเมื่อนำ wheat bran culture ของ *T. harzianum* มาทดสอบความสามารถในการควบคุม *R. solani* ซึ่งทำให้เกิดโรคลำต้นเน่าในคาร์เนชั่นในแปลงปลูกร่วมกับ methyl bromide โดยใช้ *T. harzianum* 150 กรัม/ตารางเมตร (น้ำหนักแห้ง) จะลดการเกิดโรคได้ 70 เปอร์เซ็นต์ และการควบคุมโรคจะได้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ *T. harzianum* คลุกกับรากก่อนการปลูก

Javaswal et al. (1993) ศึกษาการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของ *Pseudomonas cepacia* 2 สายพันธุ์คือ RJ 3 และ ATCC 52796 ต่อเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด เช่น *M. phaseolina*, *Trichoderma viridae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium roseum*, *Phytophthora megasperma* var. *sojae*, *Helminthosporium turcicum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* และ *Fusarium moniliforme* พบว่า สายพันธุ์ RJ 3 จะสร้างสารที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราคือ pyrrolnitrin และทั้ง 2 สายพันธุ์ จะสร้างสารประกอบพวก volatile compound ซึ่งยังไม่ทราบชนิดออกมาด้วย และพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ จะมีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์และมีกลไกการเข้าทำลายเหมือนกัน

Bhatnagar (1995) ศึกษาการควบคุมโรคเหี่ยวใน pigeon-pea ที่เกิดโดย *Fusarium udum* โดยใช้ *T. harzianum* และ *Aspergillus niger* ร่วมกับยาฆ่าเชื้อรา 2 ชนิดคือ Foltaf 80 W (Captafol 80%) และ Blue Copper-50 พบว่า จะช่วยลดการเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้ยาฆ่าเชื้อราเพียงอย่างเดียว

Bettiol (1996) ได้รายงานเกี่ยวกับการควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธีในประเทศบราซิล ซึ่งมีการศึกษาในพืชหลายชนิดด้วยกันคือ

1. การควบคุมเชื้อ Tristeza virus โดยใช้สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรค ซึ่งจะชักนำให้พืชสร้างภูมิคุ้มกัน Tristeza virus เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในส้ม (*Citrus sinensis*) กล่าวคือ จะทำให้ต้นส้มมีการเจริญเติบโตช้าและขนาดของผลส้มจะลดลง จึงมีการแก้ปัญหาโดยการทำให้ cross protection กับสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค พบว่าต้นส้มจะมีการเจริญเติบโต และไม่เกิดอาการจาก Tristeza virus นอกจากนี้ผลผลิตยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย

2. การควบคุมโรคจุดดำ (tar spot) ที่ทำให้เกิดโรคในมะพร้าวโดย *Acremonium alternatum* และ *Ac. persicinum* แยก *Ac. alternatum* จากปากใบของ *Coccothraupis palmarum* และ *Catacauma torrendiella* โดยการฉีดพ่น *Ac. alternatum* 10^7 เซลล์/มล. หลังจากฉีดพ่นเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า *Ac. alternatum* จะเจริญคลุมปากใบถึง 80% และการติดเชื้อจะลดลง นอกจากนี้ยังทำให้มะพร้าวติดผลเพิ่มขึ้นอีกด้วย ต่อมาจึงมีการใช้ *Ac. alternatum* ร่วมกับ *Ac. persicinum* โดยฉีดพ่นตั้งแต่เริ่มติดผลพบว่า สามารถควบคุมโรคได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์แทนการใช้สารเคมีจะลดค่าใช้จ่ายได้ถึง 5 เท่า

3. การควบคุม *Phytophthora cactorum* ที่ทำให้เกิดโรคในแอปเปิ้ลโดย *T. viridae*, *P. cactorum* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในแอปเปิ้ล จึงมีการนำ *T. viridae* มาใช้ร่วมกับ methyl bromide หรือ formaldehyde เพื่อควบคุมโรค

4. การควบคุม *Botrytis cinerea* ที่ทำให้เกิดโรคในสตอเบอรี่ โดย *Gliocladium roseum* โดยการฉีดพ่นสปอร์ความเข้มข้น 10^7 conidia/ml อาทิตย์ละ 1 ครั้ง ในช่วงที่สตอเบอรี่ออกดอกและในช่วงที่ติดผล ซึ่งพบว่าการควบคุมจะได้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับยาฆ่าเชื้อรา

5. การควบคุมโรคใบไหม้ในต้นยาง (*Hevea brasiliensis*) โดย *Dicyma pulvinata* โรคใบไหม้ในต้นยางเกิดจาก *Microcyclus ulei* โดยเชื้อจะเข้าทำลายใบอ่อนทำให้พืชอ่อนแอ จึงมีการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคตั้งแต่ยังเป็นต้นอ่อน และได้ค้นคว้าวิธีทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ โดยการโคลนต้นยางที่ทนทานต่อโรคใบไหม้ แต่วิธีนี้จะทำให้เชื้อก่อโรคเกิดการผันแปรมากยิ่งขึ้น จึงหันมาใช้ *D. pulvinata* แทน ส่วนในอเมริกาใต้ได้ใช้วิธีการฉีดพ่นสปอร์ของ *D. pulvinata*, *Sporothrix* และ *Hirsutella* เพื่อควบคุมโรคใบไหม้ แมลงเคาทอง และไร

6. การควบคุมโรคราสนิมในกาแฟและถั่ว และโรคราแป้งขาวในแตงกวา และ *Zucchini squash* โดย *B. subtilis* การควบคุมโรคน้ำค้างจะใช้ทั้งเซลล์แห้งและใช้สารที่ปล่อยออกมา หรือใช้ผลผลิตที่เกิดจากการหมัก และใช้เซลล์ผสมน้ำ กาแฟ และถั่วที่เป็นโรคจะมีใบที่ติดโรคถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำผลผลิตจาก *B. subtilis* ความเข้มข้น 1,000 ppm จะมีใบที่ติดโรค ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น เป็น 10,000 ppm จะไม่พบใบกาแฟที่ติดเชื้อเลย ส่วนการควบคุมโรคจาก *Sphaerotheca fuliginea* ใน *Zucchini squash* และ

แตงกวาโดยการฉีดพ่นผลผลิตจาก *B. subtilis* ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ppm พบว่าสามารถควบคุมโรคราแป้งขาวในแตงกวา และช่วยลดการเกิดแผลที่ผิวใบได้ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Zucchini squash* จะฉีดพ่นโดยใช้ความเข้มข้น 5,000 ppm ทุกๆ 2, 4 และ 6 วัน พบว่าจะช่วยลดการเกิดแผลที่ผิวใบได้ 100, 98 และ 95 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Chanto and Ulate (1996) ศึกษาการควบคุม *Mycena citricolor* ซึ่งทำให้เกิดโรคใบจุดในกาแฟโดย *Bacillus* sp. พบว่าการใช้ cell-free supernatant และ ethanolic extract จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. UCR-236 สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. citricolor* ได้เมื่อทดสอบโดยวิธี Oxford cylinder method และเมื่อนำมาทดสอบใน moisture chamber พบว่าจำนวนใบที่ติดเชื้อจะลดลง

Trejo-Estrada (1998) ศึกษาการยับยั้งการเจริญเชื้อราโรคพืช 7 ชนิดคือ *Pythium aphanidermatum* No.39, *Gaeumannomyces graminis* FL-151 และ *G. graminis* FL-179, *Colletotrichum graminicola*, *R. solani* MSU, *Microdochium nivale* และ *Sclerotinia homeocarpa* โดยแอคติโนมัยซีต *Streptomyces violaceusniger* YCED 9 พบว่าแอคติโนมัยซีตจะผลิตสารปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ nigericin, geldanamycin และสารประกอบเชิงซ้อนพวก macrocyclic lactone antibiotic ซึ่งจะตรวจพบ nigericin บริเวณดินและหญ้าที่เพาะ YCED 9 ลงไป และเมื่อเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ในอาหารที่มีหญ้าหรือฟางเป็นส่วนประกอบจะช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารปฏิชีวนะได้ ส่วนการทดลองในสภาพเรือนกระจกพบว่า สามารถควบคุมโรคที่เกิดโดย *R. solani* และ *Sclerotinia homeocarpa* ได้บางส่วน โดยสปอร์ของ YCED 9

สมคิด (2540) รายงานถึง การศึกษาของ Haque *et al.* ใน ค.ศ.1991 ซึ่งได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์กับเชื้อก่อโรคพืชหลายชนิด โดยการคลุกเมล็ดหรือราดดินด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ได้ผลดังตาราง 1

ตาราง 1 ผลการควบคุมเชื้อโรคต่างๆ โดยการคลุกเมล็ดหรือราดดินด้วยเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อปฏิปักษ์	เชื้อก่อโรค	สาเหตุของโรค
<i>Gliocladium virens</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	รากเน่าของกระเจี๊ยบ ทานตะวัน
<i>T. harzianum</i>	<i>R. solani</i>	ถั่วเขียว และถั่วเหลือง
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>M. phaseolina</i>	รากเน่าถั่วเหลืองและกระเจี๊ยบ
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>M. phaseolina</i>	รากเน่าถั่วเหลืองและทานตะวัน
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>M. phaseolina</i>	รากเน่าถั่วเหลือง
<i>T. harzianum</i>	<i>R. solani</i>	โรคกล้าแห้งและรากเน่า
<i>G. virens</i>		กระเจี๊ยบ ทานตะวัน ถั่วเหลือง
<i>P. lilacinus</i>		และถั่วเขียว

ตาราง 1 (ต่อ)

เชื้อปฏิปักษ์	เชื้อก่อโรค	สาเหตุของโรค
<i>B. subtilis</i> <i>Streptomyces</i> sp.	<i>R. solani</i>	โรคกล้าแห้งและรากเน่า กระเจียบ ทานตะวัน ถั่วเหลือง และถั่วเขียว
<i>T. harzianum</i> <i>G. virens</i> <i>P. lilacinus</i> <i>B. subtilis</i>	<i>Fusarium</i> sp.	โรคกล้าแห้งและรากเน่า กระเจียบ และถั่วเหลือง
<i>Streptomyces</i> sp. <i>T. harziaum</i> <i>B. subtilis</i>	<i>Fusarium</i> sp.	โรครากเน่าของทานตะวัน

ไคติน (รพีพรรณ, 2536, Deshpande, 1986 and Knorr, 1991)

ไคตินเป็นสารพอลิเมอร์ที่มีไนโตรเจนในโครงสร้าง ซึ่งมีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ประมาณว่าในปีหนึ่งๆ จะมีไคตินจากเปลือกกุ้งและปูในทะเลถึงหนึ่งร้อยล้านตัน และเป็นไคตินที่ได้จากของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล ประมาณ 1.2×10^5 เมตริกตันต่อปี (ตาราง 2) ไคตินเป็นส่วนประกอบสำคัญของเปลือกกุ้งและผนังลำตัวแมลงรวมทั้งกระดองปูและปลาหมึก นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราและยีสต์ รวมทั้งสัตว์ชั้นต่ำที่ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ เช่น

ไคตินเป็นสารโครงสร้าง ที่มีอยู่ร่วมกับสารชนิดอื่น เป็นสารประกอบเชิงซ้อน เช่น ใน exoskeleton ของแมลง ไคตินจะอยู่ร่วมกับโปรตีน ในหอยเปลือกแข็งพบไคตินอยู่กับแคลเซียมคาร์บอเนตและโปรตีน ส่วนไคตินที่อยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราจะอยู่ร่วมกับโกลิแซคคาไรด์ และในสิ่งมีชีวิตอื่นเป็นดังตาราง 3 ประมาณกันว่าในปีหนึ่งๆ จะมีไคตินจากเชื้อราประมาณ 3.2×10^4 เมตริกตัน (ตาราง 4)

ตาราง 2 ปริมาณไคตินจากเปลือกกุ้งและปูที่เป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล
ในสหรัฐอเมริกาและจากทั่วโลก (Knorr, 1991)

Product	Dry waste (10 ³ metric tons)		Chitin (10 ³ metric tons)	
	Worldwide	U.S.	Worldwide	U.S.
Shellfish	154		39	
Crab		17		6
Shrimp		78		39
Krill	801		56	
Clam/oyster	482		22	
Squid	21		1	
Total	1,458	95	118	45

ตาราง 3 การกระจายและองค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบไคตินในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ
(Deshpande, 1986)

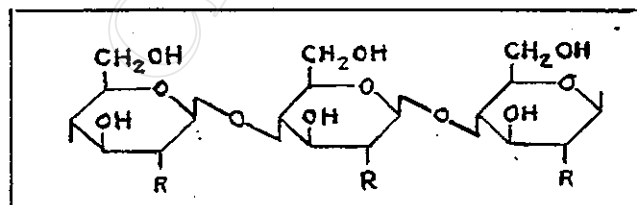
Organisms	Structures	inorganic constituents	main other organic constituents
Fungi	cell walls	-	glucans and mannans
algae: chlorophyceae	cell walls	-	cellulose
Protozoa	cyst walls and shell	silica and iron	proteins and lipids
Annelida	chetae, jaws	unidentified	tannins and proteins
Mollusca	jaws, radula and shell	calcium, iron and silica	conchiolin and protein
Arthropoda	cuticle	calcium	arthropodins and mucins
Tunicata	peritrophic membrane	-	-

ตาราง 4 ปริมาณไคตินในเส้นใยของเชื้อราบางชนิด (Knorr, 1991)

Fungus	Chitin content (%)
<i>Mucor rouxii</i>	9.4
<i>Aspergillus phoenicis</i>	23.7
<i>Aspergillus niger</i>	42
<i>Neurospora crassa</i>	8.0-11.9
<i>Penicillium chrysogenum</i>	19.5-42
<i>Trichoderma viridae</i>	12-22
<i>Saccharomycopsis gutulata</i>	2.3
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	13
<i>Histoplasma capsulatum</i>	25.8
<i>Histoplasma farciminosum</i>	40
<i>Tremella mesenterica</i>	3.7
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	11

โครงสร้างของไคติน (รพีพรรณ, 2536 และ Deshpande, 1986)

ไคตินเป็นโพลีเมอร์สายตรง ที่มีหน่วยย่อยคือ N-acetylglucosamine สูตรโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส โดย OH group ที่ C-2 ของกลูโคสถูกแทนที่ด้วย acetylamino group กลายเป็น N-acetyl-2-amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose ซึ่งแต่ละหน่วยจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 เช่นเดียวกับเซลลูโลส (ภาพ 1)



Cellulose : R = OH

Chitin : R = NHCOCH₃

Chitosan : R = NH₂

ภาพ 1 โครงสร้างของไคติน

คุณสมบัติของไคติน (Muzzarelli, 1977)

ไคตินมีคุณสมบัติที่เด่นชัดคือ ไม่ละลายน้ำหรือตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ไป แต่ละลายได้ในกรดเข้มข้น และ anhydrous formic acid มีมวลโมเลกุล 1.036×10^6 ดาลตัน ย่อยสลายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 200 องศาเซลเซียส

การย่อยสลายไคตินโดยเอนไซม์ (Shaikh and Deshpande, 1993)

การย่อยไคติน โดย chitinolytic enzyme อย่างสมบูรณ์ ผลที่ได้คือ monomer ของ N-acetyl-D-glucosamine เอนไซม์กลุ่มนี้พบในจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ

1. endo-chitinases เป็นเอนไซม์ที่ตัดโพลีเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine อย่างสุ่มได้ diacetylchitobiose และ triacetylchitobiose

2. N-acetyl glucosaminidases หรือ chitobiase หรือ N-acetyl hexosaminidases จะเข้าทำปฏิกิริยากับ dimer, diacetylchitobiose และอาจตัดโพลีเมอร์จาก non-reducing end ด้วย

การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไคติเนส (Shaikh and Deshpande, 1993)

1. ใช้ chitinase-chitosanase-gold complex เพื่อศึกษาดำแหน่งของไคติน/ไคโตซานในเซลล์ เชื้อราส่วนใหญ่จะมีผนังเซลล์ที่เป็นโพลีแซคคาไรด์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โดยมีไคตินและไคโตซานเป็นส่วนประกอบมากที่สุด จึงมีการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างและตำแหน่งที่แน่นอน โดยในปี ค.ศ.1988 มีการใช้ lectin ที่เชื่อมต่อกับอนุภาคแขวนลอยของทอง ซึ่งจำเพาะกับ monosaccharide เพื่อศึกษาดำแหน่งของน้ำตาลในเนื้อเยื่อพืชและเชื้อรา ต่อมาในปี ค.ศ.1989 ได้มีการใช้ wheat germ agglutinin-gold complex และ chitinase gold complex เป็นตัวติดตาม N-acetyl-D-glucosamine ในผนังเซลล์ของพืชและเชื้อราก่อโรคพืช

2. Fungal protoplast technology

ได้มีการนำโปรโตพลาสต์มาใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์ผนังเซลล์ การหลั่งเอนไซม์ การเปลี่ยนรูปของสารสเตียรอยด์ โดยใช้เอนไซม์ไคตินเนสจาก *Trichoderma harzianum* มีรายงานเกี่ยวกับการนำ chitinase และ laminarinase ที่แยกได้จากเชื้อราที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง ได้แก่ *Paecilomyces varioti* มาใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์ของ *Malbranchea sulfurea* ซึ่งเป็นเชื้อราที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงเช่นกัน (Gautam et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีการ

หอยรวมโปรโตพลาสต์ของ *T. harzianum* Rifai (ATCC 32173) 2. สายพันธุ์ แล้วนำมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* และ *Pythium aphanidermatum* พบว่าสายพันธุ์ใหม่จะเจริญปกคลุมเชื้อราโรคพืช ได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และเมื่อทดลองในสภาพเรือนกระจก พบว่าสายพันธุ์ใหม่จะมีความสามารถในการควบคุมโรคเน่าคอดินจาก *R. solani* ได้ดีกว่าสายพันธุ์เดิม (Pe'er and Chet, 1990)

3. นำมาเตรียม chito-oligosaccharides

ปัจจุบันได้มีการนำโอลิโกแซคคาไรด์มาใช้ในหลายๆ ด้าน เช่น ใช้ chitohexose และ chitoheptaose เป็น antitumor เป็นต้น โดยพบว่า chitosanase จาก *Bacillus* sp. จะให้ผลผลิตเป็นไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และไคตินเอนจาก *Vibrio alginolyticus* จะให้ผลผลิตจากการย่อย colloidal chitin เป็น chitotriose และ chitopentaose

4. นำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

ในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมที่มีเปลือกกุ้งและปลา เป็นกากเหลือทิ้งสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารในการเลี้ยงยีสต์เพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดียว ในปี ค.ศ.1981 Revah-Moiseer และ Carroad ได้ใช้ *Serratia marcescens* เป็นตัวย่อยกากไคตินในอาหารที่ใช้เลี้ยงยีสต์ *Pichia kudriavezevii* และมีการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากของเสีย (chitinous waste) โดยใช้ไคตินเอนจาก *Myrothecium verrucaria* และ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อใช้ในการเลี้ยงสัตว์

5. ใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพ

ไคตินเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของราและแมลงที่ทำให้เกิดโรคในพืชที่มีท่อลำเลียง โดยไม่พบไคตินในพืชที่มีท่อลำเลียง ไคตินจึงเป็นเป้าหมายของสารฆ่าเชื้อราและแมลง สำหรับเอนไซม์ไคตินเอนจะพบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยมีหน้าที่ต่างกันออกไป โดยไคตินเอนในเชื้อราจะทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของผนังเซลล์ ส่วนไคตินเอนในแมลงจะทำหน้าที่ในการพัฒนาของ exoskeleton และไคตินเอนในแบคทีเรียจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการย่อยสารอาหารต่างๆ ได้มีการนำเอาไคตินเอนจากจุลินทรีย์มาใช้เป็นสารต้านเชื้อรา เช่น ใช้ไคตินเอนจาก *S. marcescens* ร่วมกับ β -glucanase, propan-2-ol และ polyethylene lauryl ether โดยนำไปฉีดพ่นในไรข้าวที่เป็นโรคใบไหม้จาก *Pyricularia oryzae* และยังเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพต่อ *R. solani* ที่ทำให้เกิดโรคในฝ้าย และ *Sclerotium rolfsii* ที่ทำ

ให้เกิดโรคในถั่วเหลือง ส่วน *Arthrobacter* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของ *Fusarium moniliforme* var. *Subglutinans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค pine pitch canker นอกจากนี้เชื้อรา *T. harzianum* เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการยับยั้งการเจริญเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด ซึ่งมีกลไกในการยับยั้งที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร volatile/non-volatile antibiotic และ hydrolytic enzyme หลายชนิด เช่น glucanase, proteinase และ chitinase เป็นต้น ในปี ค.ศ.1975 Smirnoff ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้ไคตินเอสในการควบคุมหนอนที่เข้าทำลายตาไม้ของต้นสนโดยการใช้สารพิษจาก *Bacillus thuringiensis* ในการกำจัด ตัวอ่อน ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับเอนไซม์ไคตินเอส

Chamsuwan (1996) ได้ผลิต *Trichoderma harzianum* ในรูปผงเพื่อความสะดวกในการใช้งาน โดยพบว่า เมล็ดข้าวบาร์เลย์และถั่วเหลืองที่เคลือบด้วย spore suspension ของ *T. harzianum* (CB-Pin-01) สามารถป้องกันโรคจากการติดเชื้อ โดย *Sclerotium rolfsii* และโรคเน่าคอคิน จาก *Pythium aphanidermatum* โดยเคลือบเมล็ดข้าวบาร์เลย์ด้วยสปอร์ของ *T. harzianum* (CB-Pin-01) และปลูกใน 3 จังหวัดคือ เชียงราย ลำปาง และกาฬสินธุ์ เป็นเวลา 2 ปี ผลปรากฏว่าจะสามารถลดการเกิดโรคไหม้ได้และเมื่อเติมสารอาหาร และสารอินทรีย์ร่วมกับ *T. harzianum* ลงไปในดินที่ปลูกมะเขือเทศ จะช่วยลดการเกิดโรคลำต้นเน่าที่เกิดจาก *S. rolfsii* ได้ และเมื่อเติมลงไปในดินที่ปลูกทุเรียน จำนวน 50 g/m² จะช่วยลดการเกิดโรครากเน่าโดย *Phytophthora palmivora* ได้ จึงได้มีการพัฒนา UNIGREEN UN-1[®] ต่อมาโดยภาควิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ตั้งแต่ 15 กรกฎาคม 1996 และได้จดทะเบียนเป็น biofungicide ในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชื้อราในดินที่ก่อโรคพืชหลายชนิด

Hallmann (1999) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียในดิน rhizosphere และในรากของฝ้าย ซึ่งสัมพันธ์กับการควบคุมจำนวน nematode พบว่า เมื่อเติมไคตินลงไปในดินในการปลูกฝ้ายครั้งที่ 1 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักจะสามารถกำจัด nematode ได้ และสามารถลดการติดเชื้อจาก *Meloidogyne incognita* ในการปลูกฝ้ายครั้งที่ 2 ในดินและ rhizosphere ที่มีไคตินจะพบชนิดของแบคทีเรียหลากหลายมากกว่าดินที่ไม่มีไคติน ซึ่งประกอบด้วย *Aureobacterium testaceum*, *Corynebacterium aquaticum* และ *Rathayibacter tritici* ส่วน *Burkholderia cepacia* จะพบทั้งดินและ rhizosphere ที่มีและไม่มีไคติน แต่จะพบในดินที่มีไคตินมากกว่า ส่วน *Phyllobacterium rubiacearum* เป็น endophyte ที่พบได้ยากแต่สามารถกระตุ้นให้เพิ่มจำนวนได้โดยการเติมไคตินลงไป แสดงให้เห็นว่าสารอินทรีย์เป็นตัวทำให้จำนวนแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงทั้งในดิน rhizosphere และในรากพืช

ส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา

ราส่วนใหญ่จะมีผนังเซลล์ที่มีโครงสร้างแข็งแรง โดยส่วนประกอบของสารโครงสร้างจะมีผลต่อรูปร่างของรา เช่น การสร้างโคโลนี การสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ส่วนประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ของราเป็นโพลีแซคคาไรด์ รวมทั้งพบว่า มีโปรตีน ไขมัน และสารอื่นๆ อยู่ด้วย ซึ่งส่วนประกอบทางเคมีของฟังไจแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งถือได้ว่าเป็นข้อมูลที่สำคัญในทางอนุกรมวิธานของฟังไจได้อย่างหนึ่ง โดยสามารถจัดแบ่งกลุ่มฟังไจออกตามชนิดของส่วนประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ ดังตาราง 5

ตาราง 5 ส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา โดย Bartnicki-Garcia ค.ศ. 1968 (Deacon, 1984)

Cell wall category	Taxonomic group
1. Chitin-glucan	Chytridiomycetes
2. Cellulose-glucan	Oomycetes
3. Chitosan-Chitin	Zygomycotina
4. Chitin-glucan	Ascomycotina
	Basidiomycotina
	Deuteromycotina
5. Mannan-glucan	Ascomycotina (yeast)
6. Mannan-chitin	Basidiomycotina (yeast)

การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชโดยเอนไซม์ไคตินเนส

Elad *et al.* (1982) ศึกษา β -1,3-glucanase และไคตินเนส โดย *T. harzianum* ในอาหารที่มี laminarin และไคตินหรือมีผนังเซลล์ของ *S. rolfii* เป็นแหล่งคาร์บอน โดย activity ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะสูงมากเมื่อเจริญในอาหารที่มี sclerotia ของ *S. rolfii* ส่วน activity ของ protease และ lipase จะตรวจพบเมื่อ antagonist สัมผัสกับเส้นใยของ *S. rolfii*

Shapira *et al.* (1989) ได้ทำการ subclone สาย DNA ที่มีชิ้น Chi A จาก *Serratia marcescens* เข้าไปในพลาสมิด pBR 322 โดยให้ชื่อว่า pCHIA ซึ่งได้ชักนำเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* พบว่า สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้ เมื่อนำไปผสม *S. rolfii* ด้วย เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าบริเวณปลายของเส้นใยจะเกิดการไหม้ ซึ่งพบว่าไคตินเนสที่เตรียมได้นี้มีประสิทธิภาพในการลดการก่อโรคจาก *S. rolfii* ในถั่ว และ *R. solani* ในสภาพเรือนกระจก

Vyas *et al.* (1989) ศึกษาเอนไซม์ไคตินเนสจาก *Myrothecium verrucaria* และความสามารถในการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยพบว่า *M. verrucaria* จะผลิตเอนไซม์ไคตินเนสในอาหารที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนและเมื่อเติมยูเรียความเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้น 4 เท่าภายใน 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และ activity ของเอนไซม์จะเพิ่มมากที่สุด เมื่อเติม oxgall ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยผนังเซลล์ของ *S. rolfii*, *Fusarium* sp. และ *Streptomyces* sp. โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ กลูโคส และ NAG ที่ปลดปล่อยออกมาเทียบกับ Novozym-234 หรือ Onozuka R-10 พบว่า ค่า enzyme activity ของ *M. verrucaria* สูงกว่า Novozym-234 หรือ Onozuka R-10 5-6 เท่า นอกจากนี้ปริมาณ NAG จาก *M. verrucaria* ยังสูงกว่า Novozym-234 หรือ Onozuka R-10 อีกด้วย

Cherif and Benhamou (1990) พบว่า *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างของถ่านหินที่เก็บมาจาก New Brunswick สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสออกมายับยั้งการเจริญของ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ใน dual culture test เมื่อตรวจสอบโดยใช้ SEM พบว่าการยับยั้งนั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์โดยผนังเซลล์จะยุบลงอย่างรวดเร็ว และสูญเสีย turgor pressure จากการเพาะเชื้อ *Fusarium* ลงไป N-acetylglucosamine residue ในผนังเซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลาต่างๆ กัน และทำให้เกิดการรั่วไหลของไซโตพลาสซึม แสดงให้เห็นว่าการย่อยผนังเซลล์ดังกล่าวอาจเกิดจากสารที่ถูกปลดปล่อยออกมา

Martin (1991) ศึกษาไคตินเนสและไคตินเอส/ไลโซไซม์ ในน้ำยางดิบของ *Hevea brasiliensis* โดยนำน้ำยางดิบจากต้นยางที่ปลูกในสภาพเรือนกระจกมาปั่นแยกด้วยความเร็ว 50,000 g ซึ่งแยกได้เป็น 3 ส่วนคือ rubber particle, cytosol และ large pellet ซึ่งพบว่าส่วนนี้จะมี activity ของไคตินเอส/ไลโซไซม์ สูงถึง 98% โดยวัด activity ของไลโซไซม์จากอัตราการย่อยผนังเซลล์ของ *Micrococcus lysodeikticus* และจะถูกชักนำให้เพิ่มขึ้นได้ถึง 30 เท่า โดยกาซเอทิลีนหรือ abiotic และ biotic stress อื่นๆ อีกหลายชนิด

Robert *et al.* (1990) ศึกษาผลของ extracellular metabolite จาก *Gliocladium virens* ที่มีต่อการงอกของ sporangia และการเจริญของ *Pythium ultimum* โดยเฉพาะเลี้ยง *G. virens* ในอาหาร minimal medium ที่เติมสารสกัดจากรำข้าว 5 เปอร์เซ็นต์ หรือเส้นใยของ *P. ultimum* พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของ sporangia และยับยั้งการเจริญของ *P. ultimum* ได้ โดยพบ gliotoxin, laminase, amylase, carboxymethyl cellulase chitinase และ protease

activity ในน้ำเลี้ยงของ *G. virens* ที่เติมสารสกัดจากรำข้าว 5 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่า จะให้ความร้อนแก่น้ำเลี้ยงหรือแยกเอนไซม์ออกโดยการทำให้ size-fractionamide การยับยั้งก็ยังคงเกิดขึ้น และเมื่อนำ gliotoxin ที่ได้จากการแยกเอนไซม์ พบว่าเป็นสารชนิดเดียวที่สามารถยับยั้งการงอกของ sporangia และยับยั้งการเจริญของ *P. ultimum*

Lorito *et al.* (1993) ศึกษาการควบคุม *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* และ *Uncinula necator* โดย *Enterobacter* และ *Pseudomonas* ร่วมกับ chitinolytic enzyme 2 ชนิดจาก *T. harzianum* สายพันธุ์ P₁ โดยมีแนวคิดที่ว่า chitinolytic enzyme จะช่วยปลดปล่อยสารอาหารจากเส้นใยของเชื้อราเป้าหมาย ซึ่งแบคทีเรียที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพจะนำสารอาหารเหล่านี้ไปใช้เพื่อเพิ่มจำนวน จากผลการทดลอง พบว่า chitinolytic enzyme จะทำให้การเจริญของ *E. cloacae* เพิ่มขึ้นและทำให้แบคทีเรียจับกับเส้นใยของราได้ดียิ่งขึ้น ถึงแม้ในอาหารจะมี D-glucose หรือ sucrose ความเข้มข้นสูง ก็ตาม และการยับยั้งการงอกของสปอร์และการงอกของเส้นใยจาก germ tube ของ *B. cinerea*, *F. solani* และ *U. necator* จะเพิ่มขึ้นโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อราพร้อมกับเซลล์แบคทีเรีย *E. cloacae* ยกเว้น *Pseudomonas* spp.

Di Pietro *et al.* (1993) พบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อราของ *G. virens* strain 41 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีไคตินเป็นส่วนประกอบสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิดได้และสามารถแยกสารปฏิชีวนะที่มีชื่อว่า gliotoxin ได้อีกด้วย น้ำกรองเลี้ยงเชื้อรามีส่วนประกอบของ chitinolytic enzymes ชนิดต่างๆ คือ chitin 1,4- β -chitobiosidase และ glucan N-acetyl- β -D-glucosaminidase เมื่อนำ endochitinase ที่บริสุทธิ์ มาทดสอบผลยับยั้งการงอกของโคนิเดีย และการงอกของเส้นใยจาก germ tube ของ *B. cinerea* พบว่า endochitinase ความเข้มข้น 150 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *B. cinerea* และทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย โดยทำให้ส่วนปลายของเส้นใยไหม้ และเมื่อใช้ endochitinase ร่วมกับ gliotoxin จะสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ทั้งหมด

Gunaratna and Balasubramanian (1994) นำ *Acremonium obclavatum* ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อราสนิม *Puccinia arachidis* มาเลี้ยงในอาหาร Czapek's Dox medium ที่เติมผนังเซลล์ของ *Ac. obclavatum* และ colloidal chitin 0.1 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของ uredospore และยับยั้งการเจริญของ germ tube ของ *P. arachidis* ได้ และได้ทดลองหาค่าประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคตินเนส พบว่า Hg และ Mn ที่ความเข้มข้น 10 mM สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 100 และ 89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Chernin *et al.* (1997) ศึกษา chitinolytic activity จากเชื้อ *Enterobacter agglomerans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในดินที่ด้านการเจริญเชื้อราโรคพืช ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่สลายไคตินในอาหารที่มี colloidal chitin 0.2% w/v เป็นแหล่งคาร์บอน ตรวจพบเอนไซม์ทั้งหมด 4 ชนิดคือ N-acetyl- β -D-glucosaminidase 2 ชนิด endo-chitinase และ chitobiosidase มีน้ำหนักโมเลกุล 89,000, 67,000, 59,000 และ 50,000 ดาลตัน ตามลำดับ และใช้ *E. agglomerans* ต่อด้าน *R. solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในฝ้ายโดยทดลองในเรือนเพาะชำพบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 64-86% และ *E. agglomerans* ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์จะไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้

De la Cruze *et al.* (1995) ศึกษาเอนไซม์ จาก *Trichoderma* sp. พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีไคตินเป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิต β -1, 6-glucanase อย่างน้อย 2 ชนิด ร่วมกับ enzyme hydrolase ชนิดอื่นๆ เมื่อนำ extracellular β -1, 6-glucanase มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 43,000 และมีค่า isoelectric point เป็น 5.8 เอนไซม์ที่ได้มีความจำเพาะกับพันธะ β -1, 6 และมีความสามารถในการย่อย pustulan อีกทั้งทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์เกิดความเสียหาย และเมื่อใช้ร่วมกับเอนไซม์ β -1, 6-glucanase และไคตินเนสจะสามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราทดสอบ ได้แก่ *Botrytis cinerea*, *Gibberella fujikuroi* และ *Phytophthora syringae* ได้

Kobayashi *et al.* (1995) แยกแบคทีเรียที่ผลิตไคตินเนสจากดินโดยเทคนิค mycelial baiting method และจำแนกได้เป็น *Xanthomonas maltophilia* 3451 และ *Serratia marcescens* GMS พบว่าสามารถยับยั้งการก่อโรค summer patch ใน Kentucky bluegrass ได้ 70 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Wannissorn *et al.* (1995) นำน้ำเลี้ยงจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตไคตินเนสยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น *Lasiodiplodia* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp. และ *Rhizopus* sp.

Wang and Chang (1997) ได้ศึกษาเกี่ยวกับ bifunctional chitinase/lysozyme จากโปรคาริโอท โดยทดลองใน *Pseudomonas aeruginosa* K-187 พบว่า เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ จะได้ไคตินเนส 2 type ด้วยกันคือ FI และ FII เอนไซม์ทั้ง 2 type มีไลโซไซม์ ซึ่งสามารถย่อยสลายเซลล์ของ *Staphylococcus aureus*, *Ps. aeruginosa* M-1001 และ K-187 ได้ ส่วนการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ โดย paper disc method พบว่าไคตินเนสทั้ง 2 type สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้เกือบทุกชนิด ยกเว้น *Ps. aeruginosa* K-187

Chernin *et al.* (1997) ได้ทำการโคลนยีน *chi A* จาก *E. agglomerans* และชักนำเข้าสู่ *E. coli* JM 109 พบว่า *E. coli* JM 109 จะสร้าง *endochitinase* ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Fusarium oxysporum* และ *E. coli* สายพันธุ์ใหม่นี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *R. solani* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และยับยั้งการเกิดโรครากเน่าในเมล็ดฝ้ายภายใต้สภาวะเรือนกระจกด้วย

ณัฐจิรา (2540) ศึกษาผลยับยั้ง *Cladosporium* sp. โดยเชื้อราที่ผลิตไคตินเนส จำนวน 41 ไอโซเลท โดย cylinder plate method พบว่ามี 2 ไอโซเลทที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญ *Cladosporium* sp. คือ ไอโซเลท 3 และ 24 ซึ่งเป็น *Trichoderma* sp. และ *Penicillium* sp. ตามลำดับ และมีขนาดของวงไตเป็น 16.0 และ 21.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนค่า enzyme activity มีค่าเท่ากับ 300 และ 410 mU/ml ตามลำดับ และมีค่า specific activity เท่ากับ 2860 และ 3310 mU/mg ตามลำดับ

เครือวัลย์ (2541) ศึกษาผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. โดยแบคทีเรียที่ผลิตไคตินเนส โดย poisonous food technique จากแบคทีเรีย จำนวน 23 ไอโซเลท พบว่า *Bacillus* sp. M₁₆, *Bacillus* sp. M₁₅ และ *Bacillus* sp. S₃ ให้ผลยับยั้งดีที่สุด โดย *Bacillus* sp. M₁₆, *Bacillus* sp. M₁₅ และ *Bacillus* sp. S₃ ให้ผลยับยั้ง *Alternaria* sp. เป็น 73%, 66% และ 67% ตามลำดับ ให้ผลยับยั้ง *Cladosporium* sp. เป็น 71.4%, 64.3% และ 51.4% ตามลำดับ และให้ผลยับยั้ง *Lasiodiplodia* sp. เป็น 84.4%, 73% และ 75.2% ตามลำดับ มีค่า enzyme activity เป็น 2.51, 0.79 และ 3.26 mu/ml ส่วนค่า specific activity เป็น 1.95, 1.25 และ 0.5 mU/mg ตามลำดับ

ชีววิทยาของเชื้อราก่อโรคบางชนิด

จากการศึกษาโรคในลำไยหลังการเก็บเกี่ยว มักมีสาเหตุมาจากเชื้อรา

ธิดา (2535) แยกเชื้อราจากผลลำไยที่แสดงอาการของโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยว พบเชื้อรา 7 ชนิด ได้แก่ *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. เชื้อราที่พบมากในผลลำไยที่แสดงอาการของโรคผลเน่า ได้แก่ *Lasiodiplodia* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. พบรองลงมาได้แก่ *Cladosporium* sp. และ *Fusarium* sp.

Chantrasri *et al.* (1995) แยก epiphytic fungi จากใบของลำไยในเขตอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน พบเชื้อรา 9 จินัส โดยพบ *Cladosporium* sp. ด้วยความถี่สูงสุด รองลงมาคือ *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Curvularia* sp. และ *Trichoderma* sp. และยังพบเชื้อราทั้ง 9 จินัส บนผลลำไยอีกด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือก *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* sp. เป็นเชื้อราทดสอบ

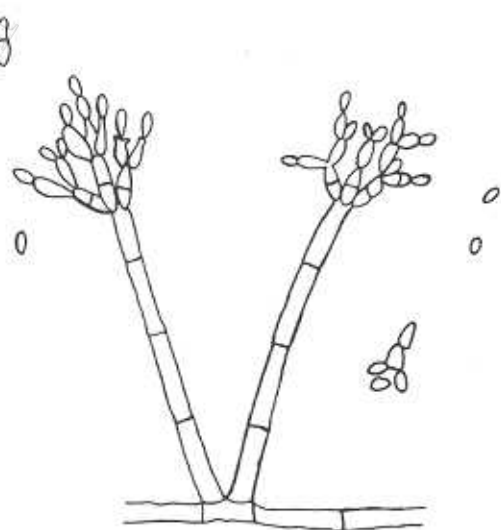
Cladosporium sp. (Ernst, 1950 และ Ingold and Hudson, 1993)

Cladosporium เป็นราใน Division *Deuteromycotina* สร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศที่มีการแพร่กระจายสูง โดยจะสร้างโคนิเดียใหม่บนยอดของโคนิเดียเดิม ก้านชูโคนิเดียมีสีและแตกกิ่งได้ โคนิเดียสีเข้ม 1 หรือ 2 เซลล์แตกต่างกันทั้งรูปร่างและขนาด รูปร่างหรือรูปกระบอก และอาจมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน บางชนิดรูปร่างแบบผลมะนาว เป็นปรสิตของพืชชั้นสูงหรือเป็นแซพโฟรไฟท์

Cladosporium sp. สร้างสปอร์ที่ปล่อยอย่างอิสระสู่อากาศ ทำให้มีการแพร่กระจายสูงและพบได้ง่ายที่สุด พบว่ามีสภาวะที่เป็นปรสิตได้ โดยเมื่อสปอร์ดกกระทบผิวใบพืช เชื้อราชนิดนี้จะมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และแพร่กระจายปกคลุมทั่วผิวพืชของเห็นคล้ายเขม่าดำ จึงถูกเรียกว่า ราเขม่า



10 μm



10 μm

ภาพ 2 ลักษณะ *Cladosporium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

Fusarium sp. (ประสาทร, 2534 และ Dhavises, 1990)

Fusarium sp. เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว และโรคนำในพืชหลายชนิด ปกติจะสร้างโคนidium 2 ชนิดคือ macroconidia เป็นโคนidiumขนาดใหญ่มีหลายเซลล์ เกิดบน sporodochium และ microconidia เป็นโคนidiumขนาดเล็กเซลล์เดียวเกิดบนเส้นโคนิดิอูฟอร์เดี่ยวๆ หรือบนกิ่งก้านที่แตกออกไปจากเส้นใย บางครั้งอาจสร้าง chlamydospore และ sclerotium ได้อีกด้วย

Fusarium sp. จะเข้าทำลายส่วนท่อน้ำท่ออาหารของพืชทั้งส่วนใต้ดินและเหนือดิน ทำให้ท่อน้ำท่ออาหารอุดตันและต้นพืชจะเหี่ยวตายในที่สุด เช่น

F. moniliforme ทำให้เกิดโรคยอดฝักคาบหรือโรคน้ำวของข้าว และโรคนำในรากและลำต้นของอ้อย

F. solani ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับมันฝรั่ง

F. solani f. *lisi* ทำให้เกิดโรคนำกับถั่วลิสง

F. oxysporum f. *lycopersici* ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับมะเขือเทศ

F. oxysporum f. *cubense* ทำให้เกิดโรคตายพลายกับกล้วย

F. oxysporum f. *niveum* ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับแตงโม

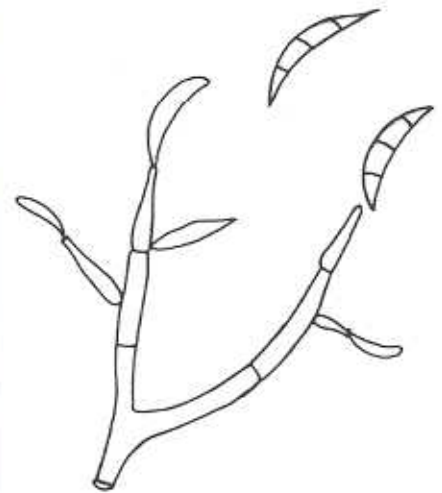
F. lini ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับป่าน

F. lignosus ทำให้เกิดโรครากขาวของยางพารา

F. noxia ทำให้เกิดโรครากสีน้ำตาลของยางพารา



10 μ m



10 μ m

ภาพ 3 ลักษณะ *Fusarium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

Lasiodiplodia sp. (Johnson and Sangchote, 1994 และ Matsuura *et al.*, 1998)

Lasiodiplodia sp. เส้นใยสีเข้ม (น้ำตาล) มีผนังกันตามขวาง โคนิไดโอฟอร์สั้น ไม่มีกึ่งก้าน โคนิเดียสีเข้ม มี 2 เซลล์ เมื่อแก่มีรูปไข่หรือยาว เป็น parasitic หรือ saprophytic สร้าง pycnidia และ stromata แพร่กระจายและถ่ายทอดได้ทั้งในน้ำ อากาศ และดิน นอกจากนี้พบว่า เป็น endophyte ด้วย มักก่อโรคใบพืชตระกูลแตง แครอท แรตดิช *Lasiodiplodia* บางชนิด เช่น *L. theobromae* จะผลิตสารที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เช่น jasmonic acid และ mellein เป็นต้น



ภาพ 4 ลักษณะ *Lasiodiplodia* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สปอร์มีขนาดตั้งแต่ 10-12.5x 20-25 ไมโครเมตร