



ประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบและเชื้อรา *Metarhizium guizhouense*
PSUM02 ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)
ในมันขี้หนู (*Coleus parvifolius* Benth.)

Efficacy of Crude Protease and *Metarhizium guizhouense* PSUM02 in Controlling
Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) in Chinese potato
(*Coleus parvifolius* Benth.)

อภิวิชญ์ ทองแก้วชวน

Apivit Thongkeawyuan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบและเชื้อรา *Metarhizium guizhouense*
PSUM02 ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)
ในมันขี้หนู (*Coleus parvifolius* Benth.)

Efficacy of Crude Protease and *Metarhizium guizhouense* PSUM02 in Controlling
Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) in Chinese potato
(*Coleus parvifolius* Benth.)

อภิวิชญ์ ทองแก้วชวน

Apivit Thongkeawyuan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบและเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในมันขี้หนู (*Coleus parvifolius* Benth.)

ผู้เขียน นายอภิวิชญ์ ทองแก้วยวน

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร. ธนัญชนก ไชยรินทร์)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรทิพย์ เรือนปานนท์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า)

.....กรรมการ
(ดร. ธนัญชนก ไชยรินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟ่างรุ่งแสง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร. ธัญชนก ไชยรินทร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นายอภิวิชญ์ ทองแก้ววน)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการขออนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายอภิวิชญ์ ทองแก้ววรรณ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีนเอสสกัดหยาบและเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (<i>Meloidogyne incognita</i>) ในมันขี้หนู (<i>Coleus parvifolius</i> Benth.)
ผู้เขียน	นายอภิวิชญ์ ทองแก้ววน
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

โปรตีนเอสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกลไกการเข้าทำลายแมลงและไส้เดือนฝอยศัตรูพืช โดยเชื้อราแมลงส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ขึ้นเพื่อย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวของเหยื่อ ในงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เอนไซม์โปรตีนเอสสกัดหยาบที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ในสภาวะการเลี้ยงด้วยอาหารแบบแข็ง และให้ทราบถึงประสิทธิภาพของสารละลายเอนไซม์โปรตีนเอสสกัดหยาบและสปอร์ของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในสภาพห้องปฏิบัติการ จากการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมในหัวมันขี้หนูทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและเทคนิคอณูชีววิทยาพบว่า เป็นไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* และนำไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้มาใช้ทดสอบในการศึกษาครั้งนี้ จากการทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสจากเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ในสภาวะการเลี้ยงด้วยอาหารแบบแข็งพบว่า รำข้าวสาลีและเพปโตนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสซึ่งแตกต่างจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างของแข็งกับของเหลว 1:3 ความเข้มข้นของเพปโตนอย่างน้อย 2.5% (w/v) ค่า pH 5.0 - 7.0 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 11 วัน และใช้ acetate buffer หรือ potassium phosphate buffer (KPB) ที่ pH 6.0 - 8.0 ในการสกัดเอนไซม์ สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดถึง 354.1 ± 2.2 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งเอนไซม์โปรตีนเอสที่ได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 84.5% เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส ไม่พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ นอกจากนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเอนไซม์โปรตีนเอสคือ 10 และ -20 องศาเซลเซียส โดยสามารถเก็บรักษาได้นานมากกว่า 6 เดือน โดยไม่เปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมเอนไซม์ และจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่ามีโปรตีนเพียง

แถบเดี่ยวซึ่งบ่งชนิดเป็นเอนไซม์โปรติเอสโดยมีขนาดโปรตีน 33 kDa ในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 มีประสิทธิภาพในยับยั้งการฟักไข่และควบคุมตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม (ระยะเข้าทำลาย) โดยมีอัตราการฟักไข่เท่ากับ 0% หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง และมีอัตราการตายของตัวอ่อนไส้เดือนฝอย 100% ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากการใช้ KPB สารฟิโพรนิล สารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ หรือสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 เพียงอย่างเดียว และชุดควบคุม (น้ำกลั่น) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อนำไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่บ่มด้วยสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติของเปลือกไข่และผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยรากปม ส่วนการใช้สปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 เพียงอย่างเดียวมีประสิทธิภาพในการควบคุมไข่ในระยะไข่อ่อนเท่านั้น ดังนั้นปัจจัยต่าง ๆ ล้วนมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง และการใช้สารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์เชื้อราสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ดี ทั้งนี้จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมและทดสอบในสภาพแปลงทดลองต่อไป

Thesis Title Efficacy of Crude Protease and *Metarhizium guizhouense* PSUM02 in Controlling Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) in Chinese potato (*Coleus parvifolius* Benth.)

Author Mr. Apivit Thongkaewyuan

Major Program Plant Pathology

Academic Year 2017

ABSTRACT

Protease is an enzyme which plays as an important role in the infection process of many entomopathogenic fungi by lysis protein of insect and plant-parasitic nematode cuticle. This research aimed to obtain crude protease with high activity produced from *Metarhizium guizhouense* PSUM02 under solid-state cultivation and to examine the efficiency of the crude protease and spores of *M. guizhouense* PSUM02 to control root-knot nematode under laboratory condition. The tested nematodes in this study were isolated from Chinese potato (*Coleus parvifolius* Benth.) and identified as *Meloidogyne incognita* by morphological and molecular characteristics. Under solid state cultivation of *M. guizhouense* PSUM02, the optimal factors for protease production were wheat bran and peptone used as carbon and nitrogen sources, respectively significantly different at an alpha level of 0.05 when compared with any other carbon and nitrogen sources. Moreover, the highest protease activity was 354.1 ± 2.2 U/ml when cultured on solid state media contained 1:3 of solid to liquid ratio, at least 2.5% (w/v) of peptone, pH 5.0 - 7.0, incubated at 25 °C for 11 day and used acetate buffer or potassium phosphate buffer (KPB) pH 6.0 - 8.0 for protease extraction. In addition, the stability of enzyme activity was tested. The activity decreased when incubated at temperature over 55 °C for 1 hr (84.5% remained) and no enzyme activity when incubated at 65 °C. The optimal storage temperatures were 10 and -20 °C, the protease activity was stable for over 6 months long. SDS-PAGE analysis showed one protein band that indicated as protease with molecular mass 33 kDa. In this study, crude protease in combination with spores of *M. guizhouense* PSUM02 exhibited the efficiency for

controlling egg hatching and mortality of 2nd stage juvenile (infective stage). No hatching of nematode eggs after 24 hr of incubation and the mortality rate of nematodes was 100% at 48 hr, which was significantly different ($P < 0.05$) with KPB, Fipronil, crude protease only, spores of *M. guizhouense* PSUM02 only and control (distilled water). The observation from scanning electron microscopic (SEM) demonstrated abnormal structures of egg shell and cuticle of *M. incognita* treating with crude protease and spore of *M. guizhouense* at 24 hours post incubation. In contrast, the use of spores of *M. guizhouense* PUM02 affected to early-stage eggs of *M. incognita* only. In conclusion, the optimal cultural factors were significant to the protease production from *M. guizhouense* PSUM02. Crude proteases in combination with spores of the fungus promoted the efficiency to control root-knot nematode. Furthermore, the potential of *M. guizhouense* PSUM02 and its crude protease to control root-knot nematode in the field need to be conducted.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. ธนัญชนก ไชยรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยให้คำปรึกษา คำชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ รวมถึงการแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และคอยให้กำลังใจเสมอมา

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนินันท์ พรสุริยา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรทิพย์ เรือนปานนท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ สันป่าเป้า กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้คือ สถานีวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ระยะเวลาที่ 2 และบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบพระคุณภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อำนวยความสะดวกสถานที่ในการทำวิจัยทั้งในห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง รวมถึงบุคลากรของภาควิชาการจัดการศัตรูพืชที่คอยให้ความช่วยเหลืองานด้านธุรการ

ขอขอบคุณโครงการห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศ ที่อำนวยความสะดวกให้ใช้เครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้ ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการจัดการศัตรูพืชและสัตว์วิทยาของพืช

ขอบคุณพ่อแม่ และคนในครอบครัว ผู้ที่เป็นกำลังใจ เป็นแรงผลักดัน ในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ที่เรียนปริญญาโท ปริญญาเอกทุกท่าน ที่เป็นกำลังใจให้คำปรึกษา และรับฟังชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณทุกท่านที่ไม่ได้ระบุนาม ที่คอยให้ความช่วยเหลือที่เป็นประโยชน์แก่การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(12)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	16
2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	17
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	32
4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	64
เอกสารอ้างอิง	65
ประวัติผู้เขียน	83

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ส่วนประกอบการเตรียมเจล SDS-PAGE	27
2 เปรียบเทียบลักษณะส่วนต่าง ๆ ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne incognita</i>	38
3 อัตราการฟักไข่ (%) ของไส้เดือนฝอยรากปมในห้องปฏิบัติการ	55
4 ปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดได้จากไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมหลังจากบ่มด้วย สารละลายที่ต่างกันนาน 168 ชั่วโมง	58
5 อัตราการตาย (%) ของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมในห้องปฏิบัติการ	59
6 ปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดได้จากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมหลังจาก บ่มด้วยสารละลายต่างกันนาน 168 ชั่วโมง	63

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะของมันขี้หนู; ต้นมันขี้หนู (ก) และ หัวมันขี้หนู (ข)	4
2 อาการรากปมของต้นมันขี้หนูที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม	5
3 ระยะการพัฒนากำตัวอ่อน (embryonic development) ของไส้เดือนฝอยรากปม	7
4 ภาพตัดตามขวางแสดงลำดับชั้นต่างๆ ของเปลือกไข่ (egg shell) และผนังลำตัวของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยอันดับ Tylenchida ที่อยู่ภายในไข่	7
5 รูปร่างของไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัย	8
6 รูปแบบรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือน	8
7 ลักษณะกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม	9
8 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปม	9
9 ลักษณะสปอร์ของ <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02	13
10 แผนผังการเพิ่มปริมาณต้นมันขี้หนูและไส้เดือนฝอยรากปม	18
11 การวัดบริเวณจุดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีเชื้อรา	22
12 ลักษณะไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศผู้	33
13 ลักษณะตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2	34
14 ลักษณะตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม	36
15 ลักษณะรอยย่นส่วนก้นของเพศเมียตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอยรากปม	37
16 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากปม	39
17 วงใสที่เกิดจากการย่อยเคซีนโดยเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 บนอาหาร casein agar	40
18 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 บนอาหารแบบแข็งที่ใช้แหล่งคาร์บอน(วัตถุดิบ)แตกต่างกัน	42
19 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 บนอาหารแบบแข็งที่ใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน	43
20 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 ที่บ่มเลี้ยงไว้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน	45
21 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 ในระยะเวลาการบ่มเชื้อต่าง ๆ บนอาหารแบบแข็ง	45

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
22 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 ในอัตราส่วนของแข็ง : ของเหลวที่แตกต่างกัน	46
23 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 โดยมี pH ใน mineral solution ที่ต่างกัน	46
24 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 ในอัตราความเข้มข้นของเพปโตินที่แตกต่างกัน	47
25 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 ที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์แตกต่างกัน	48
26 ผลของอุณหภูมิต่อค่าความเสถียรของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส	49
27 ระยะเวลาการเก็บรักษาเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์	50
28 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนในสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>M. guizhouense</i> PSUM02 ด้วยวิธี SDS-PAGE	51
29 อัตราการฟักไข่ของไข่เดือนฝอยรากปมเมื่อกระตุ้นด้วยสารเคมีที่ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ บ่ม 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน	52
30 ลักษณะของไข่ไข่เดือนฝอยรากปมหลังจากทดสอบด้วยสารในแต่ละกรรมวิธีที่ระยะ 24 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)	56
31 ลักษณะไข่ไข่เดือนฝอยรากปมหลังจากบ่มที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง	57
32 ไข่ไข่เดือนฝอยรากปมที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อรา <i>Metarhizium guizhouense</i> PSUM02 (ลูกศรสีดำ) ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง	57
33 ลักษณะการงอกเส้นใยของสปอร์เชื้อรา <i>M. guizhouense</i> PSUM02	61
34 ลักษณะผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไข่เดือนฝอยรากปมหลังจากแช่สารละลายต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM)	62
35 ลักษณะการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไข่เดือนฝอยรากปม	63

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

มันขี้หนู (*Coleus parvifolius* Benth.) เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กที่ปลูกในบางพื้นที่ในภาคใต้ของประเทศไทย เช่น ปลูกแซมในสวนยางพารา และสวนปาล์ม น้ำมันที่อายุไม่เกิน 3 ปี ส่งผลให้หารับประทานได้ยากและมีราคาสูง โดยในฤดูเพาะปลูกมีราคากิโลกรัมละ 20 – 30 บาท ส่วนนอกฤดูมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 60 – 80 บาท ปัจจุบันจึงมีการปลูกเพื่อเป็นการค้ามากขึ้นทำให้เกษตรกรมีรายได้เสริมจากการปลูกพืชหลักได้อีกด้วย เอมอร เพชรทอง และคณะ (2557) พบว่าโรครากปมสาเหตุจากไส้เดือนฝอย (root-knot nematode disease) เป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตมันขี้หนู โดยเกิดจากไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากและหัวมันขี้หนู ทำให้เกิดอาการรากบวมพองเป็นปุ่มปม ทอลำเลียงน้ำและอาหารดูดต้น ลำต้นแคระแกร็น หัวมันเจริญผิดปกติ รูปร่าง มีขนาดเล็ก คุณภาพและปริมาณผลผลิตลดลง (Baicheva *et al.*, 2002) จึงถือเป็นศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของมันขี้หนูชนิดหนึ่ง (มนตรี เอี่ยมวิมังสา และคณะ, 2554)

การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมทำได้หลายวิธี เช่น การเกษตรกรรม วิธีกล วิธีทางกายภาพ และการใช้สารเคมี เป็นต้น ซึ่งการใช้สารเคมีเป็นวิธีที่แพร่หลายเนื่องจากสะดวกและรวดเร็ว แต่การใช้สารเคมีก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในระบบนิเวศ ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค ส่วนการควบคุมโดยชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เชื้อรา *Metarhizium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อราแมลง (entomopathogenic fungus) ที่สามารถเพาะเลี้ยงง่าย มีชีวิตอยู่ในดินได้นานกว่า 3 ปี (Milner *et al.*, 1997) จากการศึกษาของ นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชินาจริยวงศ์ (2551) พบว่าเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 สามารถฆ่าแมลงวันผลไม้ได้ภายในระยะเวลา 5.3 ± 0.6 วัน นอกจากนี้ใช้ควบคุมแมลงแล้ว Ghayedi และ Abdollahi (2013) รายงานว่าสามารถควบคุมตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย *Heterodera avenae* ได้อีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อรา *Metarhizium* sp. สามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิดเพื่อย่อยสลายผนังลำตัวของแมลง แล้วเข้าไปเจริญอยู่ภายในตัว จนแมลงตายในที่สุด St. Leger และคณะ (1996) รายงานว่า *Metarhizium* sp. สร้างเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวแมลง และพบว่าเป็นเอนไซม์ชนิดแรกที่เชื้อราผลิตขึ้น ซึ่งเป็นจุดน่าสนใจเนื่องจากผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยคล้ายกับผนังลำตัวของแมลง คือ

ประกอบด้วยโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 70) รองลงมาได้แก่ ไคติน และอื่น ๆ (Boucias and Penland, 1998)

งานวิจัยครั้งนี้จึงให้ความสนใจศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 และเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ (crude protease) ที่ผลิตได้จากเชื้อราชนิดดังกล่าว เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งคาดหวังว่าการใช้สปอร์ของเชื้อราโดยตรง และเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบที่ได้จากจุลินทรีย์นี้จะสามารถเป็นทางเลือกเพื่อใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมอย่างปลอดภัย และนำไปสู่การเพิ่มปริมาณและคุณภาพผลผลิตมันสำปะหลัง ตลอดจนเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรในภาคใต้ นอกเหนือจากการปลูกยางพาราและปาล์มน้ำมัน

ตรวจเอกสาร

มันขี้หนู (Chinese potato)

มันขี้หนูเป็นพืชผักพื้นบ้านที่สำคัญชนิดหนึ่ง สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทยแต่นิยมปลูกมากในภาคใต้ (จิระ สุวรรณประเสริฐ และคณะ, 2535 ก) ซึ่งมันขี้หนูมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Coleus parvifolius* Benth. (synonym *C. tuberosus* Benth.) อยู่ในวงศ์ Labiatae มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา มีชื่อสามัญแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น Chinese potato, Country potato, Coleus potato, Frafra potato, Hausa potato, Native potato, Sudan potato และ Zulu potato

ปัจจุบันมันขี้หนูเป็นพืชที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรทางภาคใต้ เนื่องจากเกษตรกรปลูกเป็นพืชแซมในสวนยางพารา และสวนปาล์มนำมันที่อายุไม่เกิน 3 ปี หรือปลูกแบบหัวไร่ปลายนา (จิระ สุวรรณประเสริฐ, 2536 ข) มันขี้หนูเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็ก มีหัวใต้ดินที่พัฒนามาจากรากจนมีลักษณะเรียวยาวทำยาค่ายขี้หนู มีขนาดยาวประมาณ 2 – 3 เซนติเมตร เปลือกบางมีสีน้ำตาล (ภาพที่ 1 ก) ใบมีลักษณะเป็นวงรี ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อยคล้ายกับใบสะระแหน่ (ภาพที่ 1 ข) ดอกมีสีม่วงรวมกันเป็นช่อแทงขึ้นบริเวณปลายลำต้น เก็บเกี่ยวได้ในฤดูฝน มันขี้หนูสามารถนำไปประกอบอาหารคาวหวาน เช่น แกงกะทิ แกงส้ม แกงไตปลา ต้มกับเกลือ หรือเชื่อมเป็นขนมหวาน และสามารถนำมาผลิตแป้ง (ภูยีน ทศนเสถียร, 2543)

นอกจากนี้มันขี้หนูยังเป็นพืชทางการแพทย์ เนื่องจากมีการศึกษาที่พบว่า สารสกัดจากหัวมันขี้หนูสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อ HIV-1 ได้ (Supinya *et al.*, 2003) และสารสกัดจากใบมันขี้หนูสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี (สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ และสุภิญญา ติวตระกูล, 2548) โรคสำคัญที่เกิดการระบาดของต้นมันขี้หนู คือโรคเน่าเปียก (wet rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Choanephora* sp. (เอกรินทร์ ชูช่วย, 2553) และโรครากปมมีสาเหตุเกิดจากไส้เดือนฝอย (มนตรี เอี่ยมวิมังสา และคณะ, 2554)

ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.)

ปัจจุบันในประเทศไทยมีการรายงานพบไส้เดือนฝอยรากปมทั้งหมด 9 ชนิด ประกอบด้วย *Meloidogyne arenaria*, *M. exigua* (อรุณ จันทนโอ, 2505), *M. graminicola*, *M. hapla*, (สืบศักดิ์ สนธิรัตน์ และคณะ, 2530 ก), *M. incognita*, *M. javanica* (จรัส ชื่นราม และ อานนท์ บุญครอง, 2526), *M. microcephala* (Cliff and Hirschmann, 1984), *M. naasi*

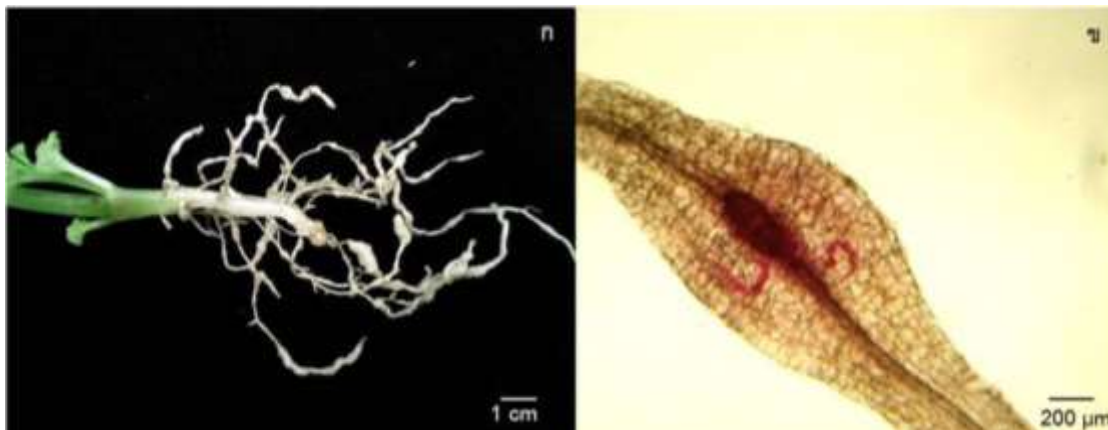
(ประชา ลีประเสริฐ, 2515) และ *M. thailandica* (Handoo et al., 2005) โดยชนิดที่พบมากที่สุดในประเทศไทย คือ ไล้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ซึ่งตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถผลิตไข่ที่สามารถฟักออกมาได้โดยไม่ต้องรับการผสมพันธุ์ (parthenogenesis) ทำให้ไล้เดือนฝอยรากปมเพิ่มปริมาณประชากรได้อย่างรวดเร็ว (Triantaphyllou, 1979) ประกอบกับเป็นสัตว์ที่มีจำนวนโครโมโซมหลายชุด (polyploid) จึงทำให้เกิดความผันแปรภายในชนิดของไล้เดือนฝอยรากปมได้ง่าย ส่งผลต่อความสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมหรือความอยู่รอดในธรรมชาติได้ดียิ่งขึ้น (Taylor and Sasser, 1978)



ภาพที่ 1 ลักษณะของมันขี้หนู; หัวมันขี้หนู (ก) และต้นมันขี้หนู (ข)

นอกจากนี้ไล้เดือนฝอยรากปมสามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ พืชไร่ พืชสวน และวัชพืช โดยเฉพาะพืชที่สร้างหัวใต้ดินจะได้รับความเสียหายมากที่สุด ซึ่งความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พันธุ์พืช อายุพืช จำนวนประชากรของไล้เดือนฝอย ระยะเวลา สภาพแวดล้อม รวมทั้งลักษณะของดิน เช่น อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น (ลีบศักดิ์ สนธิรัตน์, 2541 ข) โดยลักษณะอาการที่เกิดจากไล้เดือนฝอยรากปมที่สำคัญคือ อาการรากปม (root gall หรือ root knot) (ภาพที่ 2 ก) ท่อลำเลียงน้ำและอาหารถูกทำลาย พืชชะงักการเจริญเติบโตและเนื่องจากไล้เดือนฝอยรากปมใช้หลอดดูดอาหาร

(stylet) เจาะดูดกินน้ำเลี้ยงของพืช (ภาพที่ 2 ข) ทำให้เกิดช่องเปิดที่ทำให้เชื้อก่อโรคชนิดอื่น ๆ เข้าทำลายซ้ำตามบาดแผลที่มีการดูดกินของไส้เดือนฝอยรากปม ส่งผลให้พืชมีผลผลิตลดลง และตายในที่สุด (Mai, 1985; Baicheva et al., 2002)



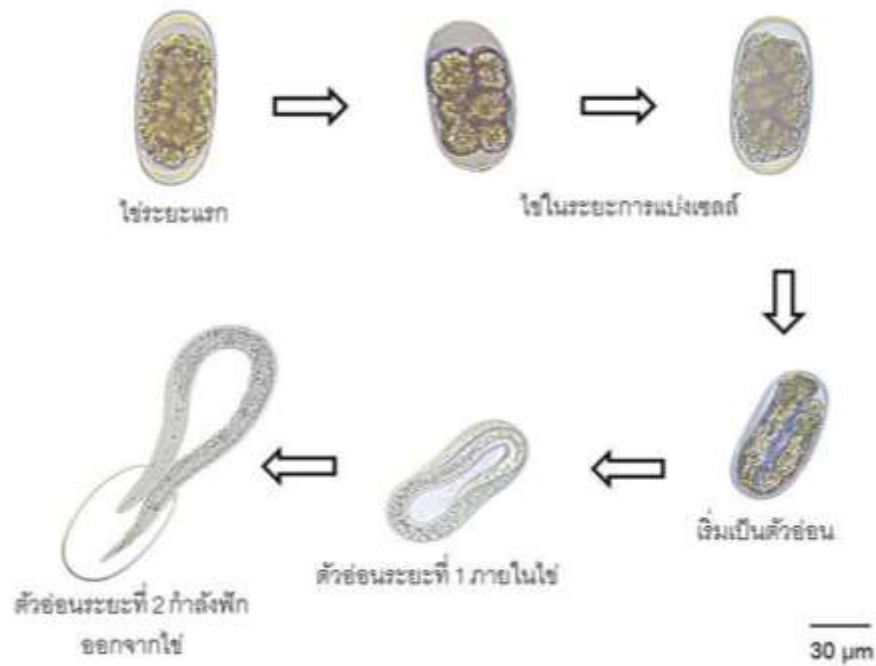
ภาพที่ 2 อาการรากปมของต้นมันขี้หนูที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม; ลักษณะรากปม (ก) และไส้เดือนฝอยรากปมภายในเนื้อเยื่อพืชที่ย้อมสี acid fuchsin (ข)

ลักษณะสัณฐานวิทยา และวงจรชีวิต

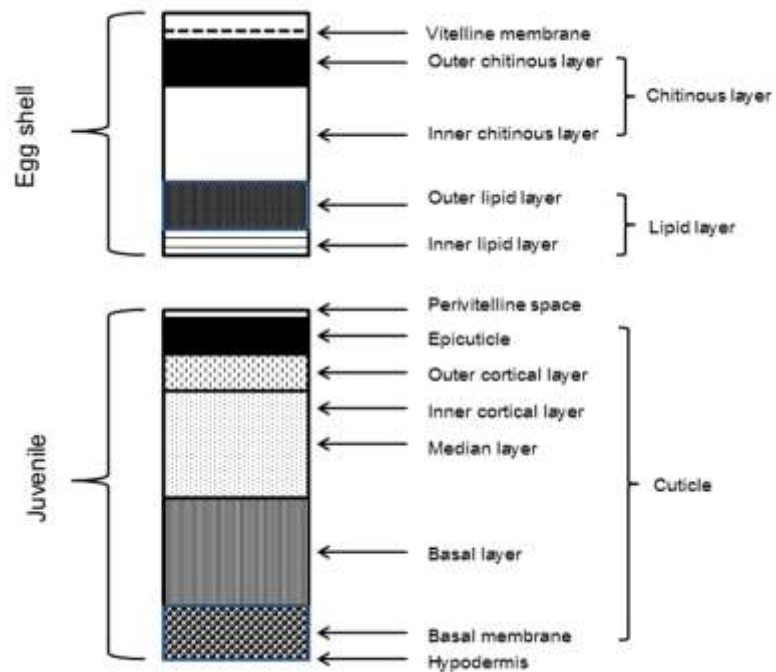
ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* จัดอยู่ในไฟลัม Nematoda อันดับ Tylenchida วงศ์ Meloidoynidae วงศ์ย่อย Meloidogyninae สกุล *Meloidogyne* (Hirschmann, 1985) ซึ่งไส้เดือนฝอยในสกุลนี้ชนิดที่สำคัญคือ *M. incognita* (ลีบศักดิ์ สนธิรัตน์ และคณะ, 2530 ก) ไส้เดือนฝอยรากปมเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) ไม่มีข้อปล้อง มีขนาดเล็ก ผนังลำตัวชั้นนอกสุดอาจมีรอยย่นคล้ายปล้อง (annule) ลำตัวโปร่งแสง และมีระบบต่าง ๆ ภายในร่างกายเหมือนกับสัตว์ชั้นสูงเกือบครบ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร (digestive system) ระบบสืบพันธุ์ (reproductive system) ระบบขับถ่ายของเสีย (excretory system) ระบบกล้ามเนื้อ (musculatory system) และระบบประสาท (nervous system) ส่วนระบบที่ไม่มีคือ ระบบหายใจ (respiratory system) และระบบไหลเวียนโลหิต (circulatory system) (Eisenback and Triantaphyllou, 1991) ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีอวัยวะที่สำคัญเรียกว่า stylet หรือหลอดดูดอาหารซึ่งมีลักษณะคล้ายท่อปลายแหลมใช้ในการเจาะเข้าทำลายและดูดอาหารจากเซลล์พืช

วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปมเริ่มจากไข่ไส้เดือนฝอยซึ่งมีรูปร่างยาวรี ผิวเรียบ ขนาดประมาณ 0.40×0.80 มม. อยู่ติดกันเป็นจำนวนมากมองเห็นเป็นกลุ่มไข่ (egg mass) ห่อหุ้มด้วยสารเหนียวคล้ายวุ้น (gelatinous matrix) ซึ่งไข่มีการแบ่งเซลล์เพื่อพัฒนาให้ได้เป็นตัวอ่อน

(juvenile) ระยะที่ 1 (1st stage juvenile; J1) โดยมีการลอกคราบ (molting) ภายในไข่ 1 ครั้ง และออกจากไข่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (2nd stage juvenile; J2) (ภาพที่ 3) ซึ่งเปลือกไข่และผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยรากปมมีส่วนประกอบเป็นชั้นต่าง ๆ หลายชั้นดังภาพที่ 4 โดยมีชั้น chitinous เป็นชั้นที่หนาที่สุด มีโปรตีนและไคตินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอยู่ในรูปของ chitin/protein complex และ lipoprotein ที่เป็นองค์ประกอบในชั้นอื่น ๆ (Wharton, 1986; Orion *et al.*, 2001) ตัวอ่อนระยะที่ 2 เป็นระยะเริ่มต้นที่สามารถเข้าทำลายพืชได้ (infective stage) โดยมีลักษณะเหมือนหนอนตัวกลม ความยาวประมาณ 300 – 500 ไมโครเมตร ส่วนหัวและหลอดดูดอาหารมีขนาดเล็ก ซึ่งในระยะนี้ยังไม่มีการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ (Eisenback and Triantaphyllou, 1991) หลังจากฟักออกจากไข่ประมาณ 18 ชั่วโมง ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 เริ่มเคลื่อนที่เข้าหารากพืช ซึ่งพืชบางชนิดมีการหลั่งสาร (root exudate) บางอย่างไปกระตุ้นให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้าหาราก (Thorne, 1961) จากนั้นตัวอ่อนระยะที่ 2 ใช้หลอดดูดอาหารแทงบริเวณรากที่ยังอ่อน และเข้าไปอาศัยอยู่ในรากพืช (Stirling, 1991) ไส้เดือนฝอยหลังเอนไซม์ทำให้พืชแบ่งเซลล์มากกว่าปกติ (hyperplasia) เกิดเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (giant cell) เนื่องจากเกิดการหลอมรวมเซลล์ใกล้เคียง บริเวณรอบส่วนหัวของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 5 – 9 เซลล์ ทำให้รากบวมพองออก จากนั้นไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 (3rd stage juvenile; J3), 4 (4th stage juvenile; J4) และตัวเต็มวัย ซึ่งตัวเต็มวัยเริ่มมีรูปร่าง (body shape) แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย โดยตัวเต็มวัยเพศเมียฝังตัวอยู่ในเซลล์พืช มีรูปร่างลักษณะอ้วนกลม (saccate form) คล้ายลูกแพร์ (pear shaped) (ภาพที่ 5 ก) ส่วนตัวเต็มวัยเพศผู้มีรูปร่างเรียวยาวคล้ายเส้นด้าย (vermiform) เช่นเดียวกับตัวอ่อนระยะที่ 2 แต่สามารถมองเห็นอวัยวะสืบพันธุ์ (spicule) ได้ชัดเจน (ภาพที่ 5 ข) เพศเมียตัวเต็มวัยมีลายเส้นที่เรียกว่ารอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ในตำแหน่งรอบอวัยวะสืบพันธุ์ (vulva) และช่องขับถ่าย (anus) ซึ่งลักษณะรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถระบุชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมได้ เนื่องจากแต่ละชนิดมีลายเส้นที่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 6) และสามารถวางไข่ได้โดยไม่ต้องอาศัยน้ำเชื้อของเพศผู้ โดยส่วนก้นถูกดันออกมาอยู่ใกล้ผิวรากพืชเพื่อสร้างกลุ่มไข่ออกมาภายนอกราก (ภาพที่ 7) ซึ่งไข่รวมกันอยู่ภายในถุง มีประมาณ 300 – 1000 ฟองต่อถุงไข่ ส่วนไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้เมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยจะออกมาภายนอกรากพืช ซึ่งวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปมตั้งแต่ระยะไข่จนเป็นตัวเต็มวัยและวางไข่อีกครั้งนั้นใช้เวลาต่างกันโดยเฉลี่ยประมาณ 3 – 5 สัปดาห์ (ภาพที่ 8) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และชนิดของพืช เป็นต้น (Taylor and Sasser, 1978)



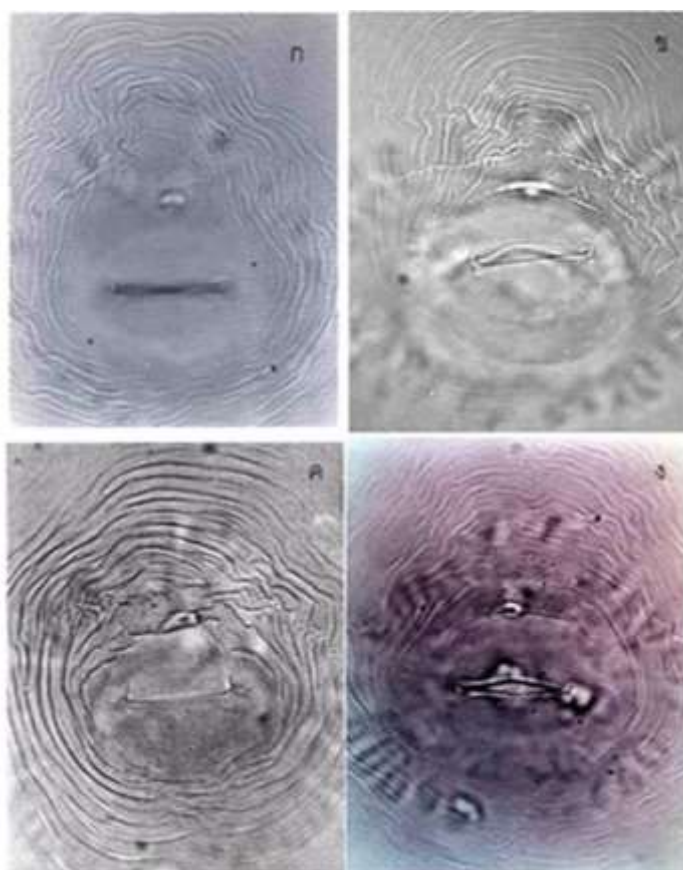
ภาพที่ 3 ระยะเวลาพัฒนาตัวอ่อน (embryonic development) ของไส้เดือนฝอยรากปม



ภาพที่ 4 ภาพตัดตามขวางแสดงลำดับชั้นต่างๆ ของเปลือกไข่ (egg shell) และผนังลำตัวของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยอันดับ Tylenchida ที่อยู่ภายในไข่ (ที่มา: Stirling, 1991)



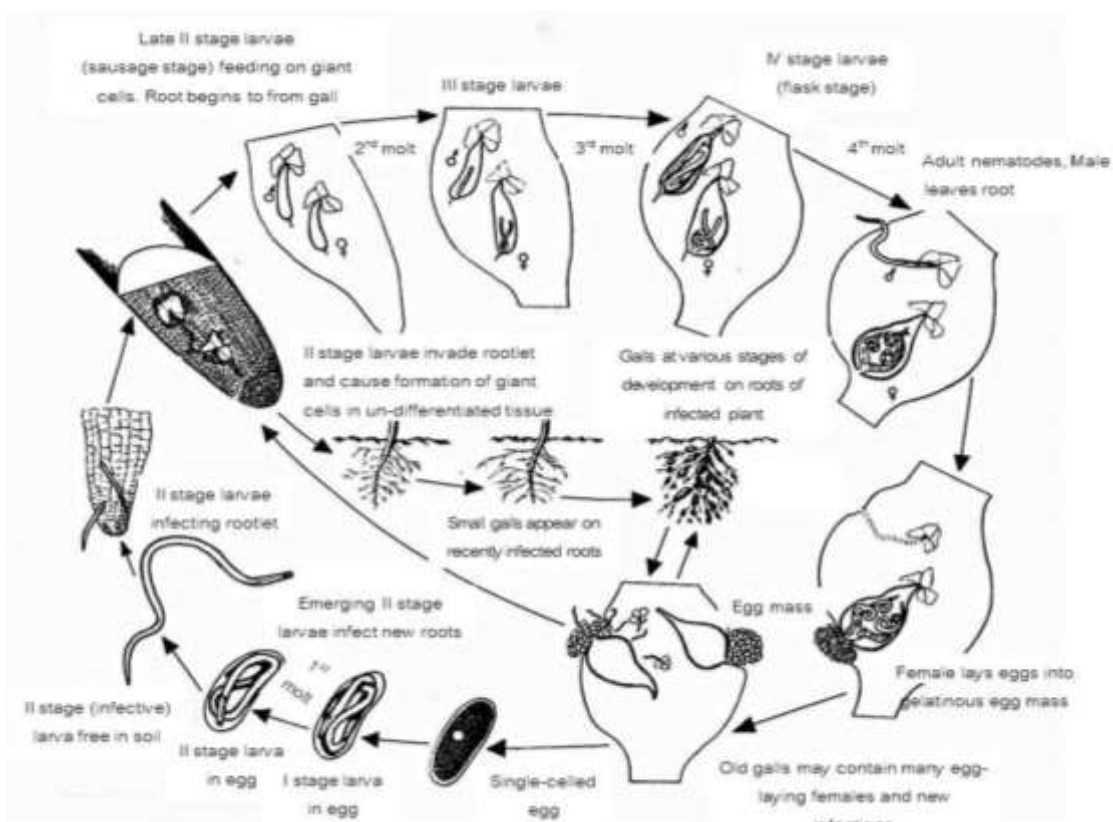
ภาพที่ 5 รูปร่างของไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัย; เพศเมีย (ก) และ เพศผู้ (ข) (ที่มา : Mitkowski and Abawi, 2003) (bar = 100 μ m)



ภาพที่ 6 รูปแบบรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด; *M. incognita* (ก), *M. javanica* (ข), *M. arenaria* (ค) และ *M. hapla* (ง) (ที่มา : Eisenback, 1985)



ภาพที่ 7 ลักษณะกลุ่มไข่ใต้ดินของรากปม



ภาพที่ 8 วงจรชีวิตของไข่ใต้ดินของรากปม (ที่มา : Agrios, 2005)

การตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมด้วยฐานฐานวิทยาและอนุชีววิทยา

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมสามารถทำได้ทั้งการศึกษาทางฐานฐานวิทยา ซึ่งลักษณะที่สำคัญได้แก่ การดูลักษณะรอยย่นส่วนกัน และการใช้วิธีทางอนุชีววิทยา ซึ่งการจำแนกไส้เดือนฝอยด้วยฐานฐานวิทยาจะต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ และใช้เวลามากในการตรวจสอบเพื่อเปรียบเทียบรายละเอียดต่าง ๆ ส่วนการจำแนกด้วยอนุชีววิทยาสามารถทำได้รวดเร็ว ดังนั้นในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมควรทำทั้ง 2 วิธีควบคู่กัน ซึ่งมีการศึกษาแล้วว่าให้ผลการจำแนกที่ตรงกัน (ธนากร จันทรมาลี และวราภรณ์ ประกอบ, 2553) จึงได้ยกตัวอย่างการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในประเทศไทยดังนี้

ธนากร จันทรมาลี และวราภรณ์ ประกอบ (2553) ศึกษาการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. บางไอโซเลทที่แยกจากดินบางพื้นที่ของภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดพบว่าทั้ง 10 ไอโซเลทที่แยกได้สามารถจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมโดยให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะรูปแบบรอยย่นส่วนกัน

สุรศักดิ์ แสนโคตร และคณะ (2554) ได้จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมในพื้นที่เพาะปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าเมื่อนำไปตรวจสอบชนิดโดยอาศัยลักษณะทางฐานฐานวิทยาโดยศึกษารูปแบบรอยย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย สามารถจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมได้ 2 ชนิด คือ *M. incognita* และ *M. javanica*

สฤชัย ขวัญเกื้อ และบัญชา ชินศิริ (2557) ศึกษาการใช้วิธีทางอนุชีวโมเลกุลในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายมันสำปะหลัง ในอำเภอด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา โดยอาศัยไพรเมอร์ TRNAH/MRH 106 ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการจำแนกมีขนาดเท่ากับ 561 base pair (bp) บ่งชี้ว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในเขตร้อนชื้น ได้แก่ *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. arenaria* และแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 3 ชนิด โดยการนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ MnlI ให้แถบดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากับ 344 และ 217 bp พบว่าตัวอย่างทั้ง 10 ไอโซเลท เป็นไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. incognita*

Ruanpanun และ Khun-In (2015) ได้จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายต้นข้าวบริเวณที่ราบสูงโดยใช้ลักษณะรอยย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. incognita* และเป็นรายงานแรกของประเทศไทยที่ไส้เดือนฝอยชนิดนี้เข้าทำลายต้นข้าว

การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

วิธีการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเกษตรกรรม โดยทำการไถพรวนดินตากแดดในช่วงฤดูแล้งนาน 2 – 4 สัปดาห์ สามารถทำลายไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ แต่สามารถควบคุมได้เฉพาะบริเวณผิวดินเท่านั้น และเหมาะสมสำหรับในบางพื้นที่และบางฤดูกาล (Taylor and Sasser, 1978) ส่วนการปลูกพืชหมุนเวียนสามารถลดจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยรากปมให้อยู่ในระดับต่ำ และไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยเลือกปลูกพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัยสลับกับการปลูกพืชหลักเพื่อลดประชากรไส้เดือนฝอยในดิน จากการทดลองของ Belcher และ Hussey (1977) พบว่าการปลูกพืชสกุลคราม (*Indigofera hirsuta*) ในดินที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และ *M. javanica* ก่อนปลูกต้นแตงกวา ทำให้ต้นแตงกวาเกิดโรครากปมน้อย และให้ผลผลิตสูงกว่าแปลงที่ปลูกแตงกวาหลังจากปลูกต้นข้าวฟ่าง หรือการใช้ต้นดาวเรือง โดยครามเป็นพืชที่ขับสาร thiophen ออกจากรากซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์คล้ายสารเคมีกำจัดไส้เดือนฝอยเพื่อไล่ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้ (สืบศักดิ์ สนธิรัตน์, 2541)

การใช้สารเคมีเป็นวิธีหนึ่งที่สะดวกและมีประสิทธิภาพสูง แต่ข้อเสียของการใช้สารเคมีคือ มีราคาแพง ส่งผลเสียในระบบนิเวศหากใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานและใช้เกินความจำเป็น (Jatala, 1985) การควบคุมไส้เดือนฝอยโดยชีววิธีเป็นวิธีที่นำสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูธรรมชาติมาใช้ควบคุมหรือทำลายไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ซึ่งให้ผลในการควบคุมซ้ำแต่สามารถควบคุมได้อย่างยั่งยืน และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม มนุษย์ ตลอดจนสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ โดยศัตรูธรรมชาติของไส้เดือนฝอยที่มีการศึกษาส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา ซึ่งเชื้อรา 15 สกุล มากกว่า 400 ชนิด สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยได้ (Stirling, 1984) เช่น เชื้อรา *Beauveria bassiana*, *Gliocladium catenlatum*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* และ *Verticillium chlamydosporium* (Olivares-Bernabeu and Lopez-Lorca, 2002; Eapen et al., 2005; Sun et al., 2006) ต่อมาได้มีการนำสารชีวภาพมาใช้ในการควบคุมโรค และแมลงศัตรูพืช เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี เช่น นำเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการกรองน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) ของเชื้อรา *Paecilomyces* sp. (Bonants et al., 1995), *Verticillium sucblasporium* (Lopez-Llorca, 1990) และ *Arthrobotrys oligospora* (Minglian et al., 2004) มาควบคุมไส้เดือนฝอย นอกจากนี้ ฤทธิไกร จันทะบุตร และคณะ (2554) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Neonothopanus nambi* และ *Pochonia* sp. ที่ความเข้มข้น 50% และ 100% สามารถควบคุมตัว

อ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมได้อย่างสมบูรณ์ในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากสาร secondary metabolites ที่เชื้อปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงซึ่งอาจเป็นทั้งเอนไซม์ และสารพิษมีผลต่อการควบคุมไส้เดือนฝอย (Sterner *et al.*, 1997)

เชื้อรา *Metarhizium guizhouense*

เชื้อรา *M. guizhouense* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง โดยจัดอยู่ในชั้น Sordariomycetes อันดับ Hypocreales วงศ์ Clavicipitaceae (Global Biodiversity Information Facility; GBIF) สามารถแยกได้จากดิน และแมลง สร้างสปอร์สีเขียวเข้มมีรูปร่างทรงกระบอกขนาดประมาณ 3 – 5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 9) สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA) และพบว่าสามารถสร้างสปอร์ได้เพิ่มขึ้นบนอาหาร sabouraud dextrose agar with yeast extract (SDAY) หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชินาจริยวงศ์, 2551) *M. guizhouense* มีลักษณะสปอร์ และการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชคล้ายคลึงกับ *M. anisopliae* ซึ่งเป็นที่รู้จักและศึกษาอย่างแพร่หลาย เชื้อราสร้างเส้นใย (germ tube) แทะทะลุผ่านผนังลำตัวแมลง โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ช่วยในการย่อยผนังลำตัวแมลง เช่น โปรติเอส และไคติเนส (Clarkson and Charmley, 1996) หรือสร้างสารพิษ (toxin) ในการศึกษาของ Sun และคณะ (2006) มีรายงานการเป็นปรสิตของเชื้อรา *M. anisopliae* ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. hapla* และพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถทำลายไข่ไส้เดือนฝอยได้มากถึง 83.4% มีอัตราการฟักไข่ได้เพียง 49% และทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 ได้ 32% จากการศึกษาของ ภารตี ศรีลาศักดิ์ และคณะ (2556) ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อรา *M. anisopliae* มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม โดยพบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอสสูงถึง 36.77 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) กับเชื้อราชนิดอื่น นอกจากนี้ Thaochan และ Chandrapatta (2016) ได้แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงเชื้อรา *M. guizhouense* บนอาหารเทียมแบบต่อเนื่อง ส่งผลให้เชื้อราลดความสามารถในการเข้าทำลายแมลง ลดความรุนแรงของโรค รวมถึงลดการผลิตเอนไซม์อีกด้วย ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อราผ่านแมลง พบว่าเชื้อราผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสได้สูงกว่าการเลี้ยงบนอาหารเทียมแบบต่อเนื่อง



ภาพที่ 9 ลักษณะสปอร์ของ *Metarhizium guizhouense* PSUM02

เอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของโปรตีนให้เป็นโพลิเปปไทด์และกรดอะมิโนต่าง ๆ มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเอนไซม์เปปติเดส (peptidase) ซึ่งสามารถพบได้จากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ พืช สัตว์ รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นแหล่งที่ดีและง่ายต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้ได้ในปริมาณมาก เอนไซม์โปรติเอสมีความสำคัญเชิงพาณิชย์โดยมียอดจำหน่ายสูงถึงร้อยละ 60 ของยอดขายเอนไซม์ทั้งหมด (Merheb *et al.*, 2007) เนื่องจากโปรติเอสสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลาย ๆ ประเภท เช่น การผลิตสารทำความสะอาด การผลิตสารซักฟอก และอุตสาหกรรมเครื่องหนัง (Rao *et al.*, 1998) โดยทั่วไปเอนไซม์โปรติเอสแบ่งกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 2 กลุ่มตามตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยา คือ เอนโดโปรติเอส (endoprotease) และเอ็กโซโปรติเอส (exoprotease) (Monod, 2002) ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มต่างกันที่ตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนโดโปรติเอสทำหน้าที่สลายพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งตรงกันข้ามกับเอ็กโซโปรติเอสสลายพันธะเปปไทด์บริเวณปลายของกรดอะมิโน (end-pieces of terminal amino acid) จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์กลุ่มเอนโดโปรติเอสได้แก่ *Aspergillus* spp., *Metarhizium anisopliae* (St. Lager *et al.*, 1989) และ *Verticillium dahlia* (Dobinson *et al.*, 1997) ส่วนจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสร้างเอ็กโซโปรติเอสได้ เช่น *Aspergillus*

oryzae (Labbe et al., 1987), *Bacillus* sp. (Gupta et al., 2002), *Pochonia rubescens* และ *P. chlamydosporia* (Larriba et al., 2012)

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular protease) (Ikasari and Mitchell, 1994) ทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้ง่ายและให้ผลผลิตเอนไซม์สูง ซึ่งการศึกษาของ Segers และคณะ (1994) ได้รายงานผลการศึกษากการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *V. chlamydosporium* พบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส และสามารถย่อยสลายสารตั้งต้น (substrate) ที่เป็นพอลิเมอร์ได้หลายชนิด นอกจากนี้เชื้อรา *M. anisopliae* สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่ทำงานได้เหมาะสมต่างกัน 3 ชนิด ตามค่า pH ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอสที่ทำงานได้ดีใน pH 5.5, 8.0 และ 9.0 โดยทั้ง 3 ชนิดถูกปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้ออิทธิเดช และคณะ (2553) พบว่าเชื้อรา *Metarhizium* spp. ไอโซเลท IPKKU 218 สร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดถึง 379.21 ยูนิต/มิลลิกรัม และสามารถควบคุมยุงลายตัวเต็มวัยได้ 78% นอกจากนี้ จิตรานนท์ สนิประเสริฐ (2550) และ Liu และคณะ (2004) ศึกษาการสร้างเอนไซม์โปรติเอส และโคติเนสของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ทำให้ทราบว่าเอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ชนิดแรกที่เชื้อปลดปล่อยออกมาในกระบวนการเข้าทำลายแมลงอาศัย

การผลิตเอนไซม์ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง (solid state cultivation)

การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็งเป็นวิธีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาเลี้ยงลงในวัตถุดิบแข็งที่ปราศจากน้ำอิสระหรือมีอยู่น้อย (absence or near-absence of free water) นั่นคือประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก ได้แก่ วัตถุดิบที่เป็นของแข็ง (solid) และส่วนที่เป็นของเหลว (liquid) ซึ่งเติมลงไปเพียงเล็กน้อยให้อยู่ในรูปความชื้นที่ถูกดูดซับไว้ด้วยของแข็งเท่านั้น วิธีการดังกล่าวถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น การผลิตขนมปัง เนยแข็ง อาหารหมักต่าง ๆ และปุ๋ยหมักชีวภาพ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เพื่อผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อใช้ทางการเกษตร โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถนำเมล็ดธัญพืช และวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์เพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ (Singh et al., 2009) ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบอาหารแข็งทำให้เชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ในเชิงปริมาณที่สูงมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบอื่น ๆ (Dunaevsky et al., 2000) และการแยกเอนไซม์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้ง่ายโดยการสกัดด้วยสารละลาย (Mitchell and Lonsane, 1992) ซึ่งปัจจัยต่าง ๆ เช่น แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน รวมถึงสภาวะต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา มีผลต่อการเจริญและส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ (Shivakumar, 2012)

จากการศึกษาของ Agrawal และคณะ (2005) พบว่ารำข้าวสาลีเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อรา *Beauveria feline* ในสภาพเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง และ Sandhya และคณะ (2005) ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว และอาหารแบบแข็ง พบว่า *A. oryzae* NRRL 1808 ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็ง สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงถึง 31.2 ยูนิต/กรัมวัสดุหมัก Ali และคณะ (2011) ทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *M. anisopliae* M408 ในอาหารเหลวที่มี N-acetylglucosamine และควิตติเคิลของหนอนใยฝักเป็นส่วนผสม พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 261.0 ± 2.4 ยูนิต/มิลลิลิตร

วัตถุประสงค์

1. เพื่ออธิบายปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02
2. เพื่อให้ได้เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ในสภาวะการเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง
3. เพื่อทราบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบและเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในมันขี้หนู (*Coleus parvifolius* Benth.)

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1 การเตรียมต้นมันซีหนูและการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมเพื่อใช้ในการทดสอบ

1.1 การเตรียมต้นมันซีหนู

นำหัวมันซีหนูที่แตกหน่อ ยาว 3 – 5 เซนติเมตร ลักษณะสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค จากพื้นที่แปลงเกษตรกร ตำบลเคิ่ง อำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช ปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6×6 นิ้ว บรรจุดิน (ตราดินยายดวล) ผสมทรายหยาบอัตรา 1 : 1 และนำไปตั้งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที และเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปปลูก หัวมันซีหนูหนึ่งหัวต่อกระถาง เมื่อต้นมันซีหนูอายุครบ 8 สัปดาห์ นำกิ่งพันธุ์ขนาดความยาวจากปลายยอดต้นมันซีหนูประมาณ 15 เซนติเมตร ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณต้นมันซีหนูเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (ภาพที่ 10)

1.2 การเตรียมไส้เดือนฝอยรากปมด้วยเทคนิค single isolation

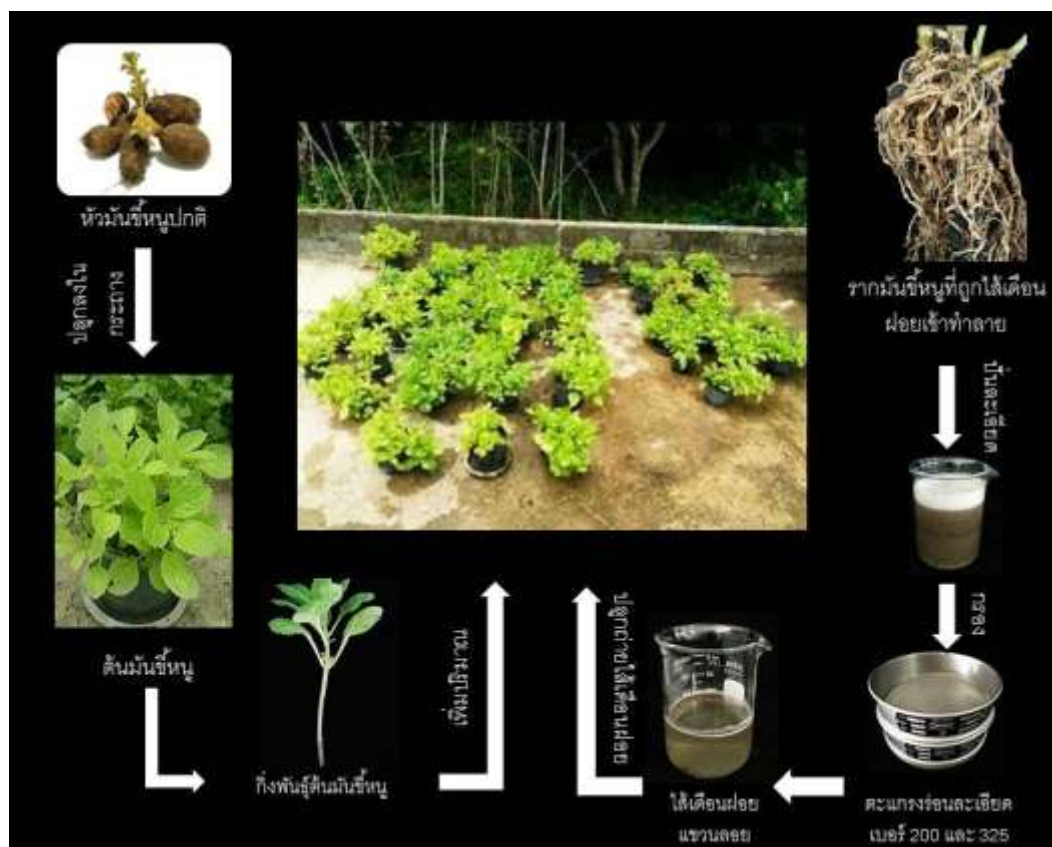
นำหัวมันซีหนูที่ได้จากพื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งมีลักษณะเป็นปมปมไปเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ โดยแยกกลุ่มไข่ออกจากไส้เดือนฝอยรากปมเพศเมียที่เข้าทำลายในหัวมันซีหนูจำนวน 1 กลุ่ม และย้ายกลุ่มไข่ออกไปแช่ในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อทิ้งไว้ 3 วัน เพื่อให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ตามวิธีการของ สญชัย ขวัญเกื้อ และ บัญชา ชินศรี (2557) จากนั้นนำตัวอ่อนระยะที่ 2 ไปปลูกถ่ายลงในต้นมันซีหนูที่ได้เตรียมไว้

1.3 การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม

แยกไส้เดือนฝอยจากรากต้นมันซีหนูในข้อ 1.2 ด้วยการดัดแปลงวิธี blending and sieving (Coyne and Ross, 2014) โดยนำรากต้นมันซีหนูมาล้างน้ำให้สะอาด ตัดรากให้มี ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และนำไปใส่ในเครื่องปั่นเติมน้ำให้ท่วม ใช้ความเร็วต่ำในการปั่น นาน 10 วินาที จากนั้นเทผ่านตะแกรงร่อนละเอียด (sieve เบอร์ 200 และ 325) และเตรียมไส้เดือนฝอยแขวนลอยในน้ำ (ภาพที่ 10) จากนั้นทำการปลูกถ่ายลงในต้นมันซีหนูที่เตรียมไว้ ส่วนไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศเมียบางส่วนนำไปจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอนุชีววิทยาถึงระดับชนิดต่อไป

1.4 การปลูกถ่ายไส้เดือนฝอยรากปมลงในต้นมันชี้หนู

ก่อนปลูกถ่ายไส้เดือนฝอยต้องรดน้ำต้นมันชี้หนูให้ชุ่ม จากนั้นเจาะดินให้เป็นรูห่างโคนต้น 1 เซนติเมตร จำนวน 3 รู เทไส้เดือนฝอยแขวนลอยลงไปในรูแล้วกลบดิน งดรดน้ำ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไส้เดือนฝอยยังอยู่ตรงบริเวณที่ต้องการ จากนั้นดูแลรดน้ำ วันละ 1 ครั้ง ใส่ปุ๋ย (15 - 15 - 15) ทุก ๆ เดือน ๆ ละครั้ง และตรวจสอบการเกิดรากปมเมื่อมันชี้หนูอายุ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 10 แผนผังการเพิ่มปริมาณต้นมันชี้หนูและไส้เดือนฝอยรากปม

2 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมในมันชี้หนู

2.1 การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยด้วยสัณฐานวิทยา

2.1.1 ไส้เดือนฝอยเพศผู้

นำตัวอย่างดินปลูกมันชี้หนูมาแยกไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้ด้วยตะแกรงกรองละเอียดเบอร์ 325 จากนั้นเขียนตัวอย่างไส้เดือนฝอยเพศผู้ลงบนสไลด์ นำสไลด์ลงผ่านไฟเพื่อให้ไส้เดือนฝอยหยุดการเคลื่อนไหว และวัดขนาดอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ความยาวและความกว้าง

ของลำตัว ความยาวส่วนหัว ความยาวหลอดดูดอาหาร ความยาวส่วนหาง และความยาวอวัยวะเพศ เป็นต้น นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับวิธีการของ Jepson (1987)

2.1.2. ไข่เดือนฝอยเพศเมีย

นำรากต้นมันขี้หนูที่เกิดปมที่มีกลุ่มไข่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ตัดเอาส่วนของรากบริเวณปมขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร และแช่ใน 45% (v/v) กรดแลคติก นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นแช่เอาไข่เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศเมียออกจากราก นำไปวัดขนาดของอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ความกว้างและยาวของลำตัว ขนาดส่วนคอ และขนาดหลอดดูดอาหาร เป็นต้น จากนั้นย้ายลงบนสไลด์ที่หยด mineral oil นำไปตัดรอยย่นส่วนก้นภายใต้กล้องสเตอริโอ โดยใช้เข็มปลายแหลมปากฉลามตัดระหว่างส่วนหัวและส่วนก้น (ธนากร จันทร์มาลี และวราภรณ์ ประกอบ, 2553) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับภาพมาตรฐานของ International *Meloidogyne* Project (IMP) (Taylor and Sasser, 1978; Eisenback *et al.*, 1981)

2.1.3 ตัวอ่อนไข่เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2

นำตัวอ่อนไข่เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 แช่ลงบนสไลด์ และวัดขนาดอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ลำตัว ความยาวส่วนหน้าของลำตัว (anterior body length) ส่วนใสของหาง (hyaline tail) ความยาวของหาง และความยาวของหลอดดูดอาหาร แล้วนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกชนิดของ Jepson (1987)

2.2 การจำแนกชนิดของไข่เดือนฝอยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของไข่เดือนฝอยรากปม

นำปมรากมันขี้หนูที่มีกลุ่มไข่ โดยแช่เอาตัวเต็มวัยเพศเมียจำนวน 20 ตัว บดในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่เติม 2X CTAB buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และเติม 2% (w/v) protease K ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดเอาของเหลวส่วนบน (epiphase) ใส่ลงในหลอดใหม่แล้วเติม isopropanol ซึ่งแช่เย็นในปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที เทส่วนลอย (supernatant) ทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ (ethanol 70%) นำไปหมุน

เหวี่ยงอีกครั้งโดยใช้เวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป (ดัดแปลงวิธีจาก ภรณ์ สว่างศรี, 2543)

2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ประยุกต์ใช้เทคนิค PCR ตามขั้นตอนของ Stanton และคณะ (1997) โดยใช้ไพรเมอร์ RK28S(F) (5'-CGGATAGAGTCGGCGTATC-3') และ MR(R) (5'-AACCGCTTCGGACTTCCACCAG-3') สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA template 2 ไมโครลิตร Forward Primer 1 ไมโครลิตร Reward Primer 1 ไมโครลิตร Dreamtaq Mastermix (Thermo Scientific™, Lithuania) 25 ไมโครลิตร และ RNase-free water 21 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง Thermal Cycler (BIO-RAD T100™) ตั้งค่าโปรแกรมระยะเวลาและอุณหภูมิดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ และ terminal extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที (Ye *et al.*, 2015) จากนั้นตรวจสอบผลผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV Transilluminator (BLOOK LED transilluminator, Taiwan)

2.2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) และวิเคราะห์ความเหมือนของนิวคลีโอไทด์

หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ หลังจากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้เทียบกับฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูลใน GenBank (website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อหาชนิดของไล้เดือนฝอยที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุด

2.2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไล้เดือนฝอยรากปมที่ได้จากการทดลอง และจากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความใกล้เคียงกับตัวอย่าง มาจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Clustal W (alignment) ในโปรแกรม BioEdit (Thompson *et al.*, 1994) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี neighbor joining ด้วยโปรแกรม MEGA 7

กำหนดค่าความเชื่อมั่น (Bootstrap analysis) ให้มีค่าเท่ากับ 1000 ซึ่งค่า Bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยค่า Bootstrap \geq 85% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับที่สูง

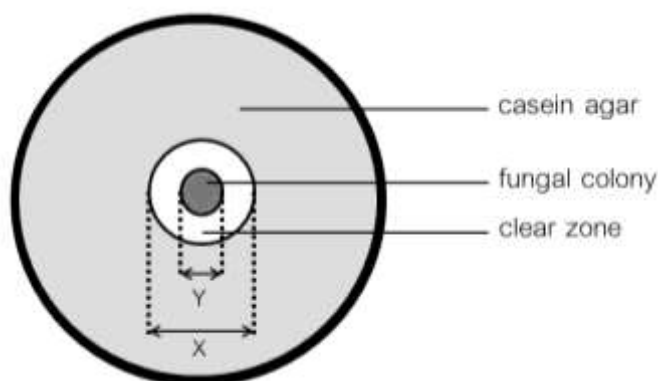
3 การเตรียมเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02

นำเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ศูนย์ภาคใต้ (นริศ ท้าวจันทร์ และคณะ, 2554) มาเพิ่มปริมาณโดยเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร บนอาหาร sabouraud dextrose agar with yeast extract (SDAY) ที่มีส่วนผสมได้แก่ dextrose 10.0 กรัม peptone 2.5 กรัม yeast extract 2.5 กรัม ผงวุ้น 20.0 กรัม และน้ำ 1 ลิตร โดยบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 27 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน หรือจนกว่าเชื้อราสร้างสปอร์ (นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชินาจริยวงศ์, 2551) จากนั้นเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอยเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) โดยนำน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อผสม 0.1% Tween 20 เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้กระจกสไลด์ชุดผิวหน้าโคโลนีเชื้อราเบา ๆ เทสปอร์ใส่ลงปิกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนับสปอร์ด้วย hemacytometer แล้วปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร

4 การคัดเลือกสูตรอาหาร และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

4.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Metarhizium guizhouense* PSUM02 เบื้องต้น

นำเชื้อราเขียว *M. guizhouense* PSUM02 ที่เลี้ยงในอาหาร SDAY นาน 7 วัน จากนั้นเจาะขึ้นวุ้นและนำมาวางบนอาหาร casein agar ที่มี 1% (w/v) เคซีน (casein) ในส่วนประกอบดังนี้ NaCl 3 มิลลิกรัม $MgSO_4$ 30 มิลลิกรัม KH_2PO_4 15 มิลลิกรัม และผงวุ้น 2 กรัม ต่อน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 14 วัน เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) รอบโคโลนีเชื้อราบนจานอาหาร casein agar (ภาพที่ 11)



ขนาดของวงใส = $X - Y$

X = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส

Y = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา

ภาพที่ 11 การวัดบริเวณจุดวงใส (clear zone) รอบโคโลนีเชื้อรา

4.2 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง (solid state cultivation)

4.2.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *Metarhizium guizhouense* PSUM02

เตรียมอาหารแข็งโดยนำเมล็ดธัญพืชและวัสดุเหลือใช้ทางเกษตร 11 ชนิด ได้แก่ ข้าวโอ๊ต ข้าวกล้อง จมูกข้าวสาลี ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วดำ ปลาป่น ผงนมถั่วเหลือง รำข้าวสาลี และลูกเดือย มาใช้เป็นวัตถุดิบ (แหล่งคาร์บอน) ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. guizhouense* PSUM02 ด้วยอาหารแบบแข็ง โดยนำวัตถุดิบมาบดละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ให้มีขนาดเล็ก จากนั้นละลาย 1% เพปโตน (w/v) ผสมลงใน mineral solution ที่มีส่วนประกอบคือ NaCl 0.1 กรัม MgSO₄ 0.1 กรัม และ KH₂PO₄ 0.2 กรัม และนำมาผสมกับวัตถุดิบเข้าด้วยกัน โดยมีอัตราส่วนผสมปริมาตรน้ำหนัก 1 : 4 (วัตถุดิบ 2.5 กรัม/ mineral solution 10 มิลลิลิตร) ต่อขวดชมพู 1 ขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นปลูกเชื้อราโดยใส่ชิ้นวุ้นเชื้อราขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น ต่อขวดชมพู 1 ขวด ป่มไว้นาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นสกัดสารละลายเอนไซม์ตามวิธีข้อ 6 และนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

4.2.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Metarhizium guizhouense* PSUM02

หลังจากคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลอง 4.2.1 จึงนำมาเป็นวัตถุดิบในการทดสอบหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เชื้อราสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยแหล่งไนโตรเจนที่นำมาทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ ammonium chloride (NH_4Cl), ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), peptone, potassium nitrate (KNO_3) และ yeast extract โดยผสมแหล่งไนโตรเจน 1% (w/v) ในสารละลาย mineral solution 10 มิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมใช้ mineral solution เพียงอย่างเดียว โดยปลูกถ่ายเชื้อราเหมือนกับวิธีการทดลองที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นำอาหารที่มีส่วนผสมของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดไปเลี้ยงเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ด้วยวิธีเดียวกันกับการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จากนั้นเมื่อครบ 7 วัน สกัดสารละลายเอนไซม์และนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

4.3 การทดสอบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02

4.3.1 อุณหภูมิ

เตรียมอาหารแบบแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากการทดลองข้อ 4.2 ในอัตราส่วน 1:4 จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 บ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ได้แก่ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นเมื่อครบระยะเวลาทำการสกัดสารละลายเอนไซม์และนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

4.3.2 ระยะเวลาการบ่มเชื้อ

เตรียมอาหารแบบแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากการทดลองข้อ 4.2 ในอัตราส่วน 1:4 จากนั้นนำไปเลี้ยงเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วสกัดสารละลายเอนไซม์ไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสทุก ๆ 2 วัน เป็นเวลาประมาณ 3 สัปดาห์

4.3.3 อัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว (S:L ratio)

เตรียมอาหารแบบแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้จากการทดลองข้อ 4.2 จากนั้นทดสอบอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบของแข็งและของเหลว (mineral solution) ดังนี้ คือ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 และ 1:6 แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 บ่ม

เชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 11 วัน จากนั้นสกัดสารละลายเอนไซม์เพื่อไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

4.3.4 ปริมาณไนโตรเจน

เลือกแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดจากการทดลอง 4.2.2 นำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยผสมลงใน mineral solution ในความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4% (w/v) นำอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแต่ละความเข้มข้นไปเลี้ยงเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 11 วัน จากนั้นสกัดสารละลายเอนไซม์เพื่อนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ต่อไป

4.3.5 ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH)

ตรวจสอบค่า pH ใน mineral solution ซึ่งผสมเพปโตน 2.5% (w/v) โดยปรับค่า pH ตั้งแต่ 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ด้วยสารละลาย 1 N NaOH และ 1 N HCl ส่วนชุดควบคุมไม่มีการปรับ pH จากนั้นนำอาหารแบบแข็งที่เติม mineral solution แต่ละ pH ไปเลี้ยงเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 11 วัน และสกัดสารละลายเอนไซม์เพื่อไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

4.4 การทดสอบบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โปรติเอส

เตรียมอาหารแข็งโดยมีรำข้าวสาลี และ 2.5% (w/v) เพปโตนที่ผสมใน mineral solution ในอัตราส่วน 1:3 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 11 วัน จากนั้นนำสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM acetate buffer (pH 5.0 และ 6.0), 50 mM potassium phosphate buffer; KPB (pH 6.0, 7.0, และ 8.0), 50 mM glycine – NaOH buffer (pH 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0) และ 50 mM hydroxide – chloride buffer (pH 11.0 และ 12.0) (Nakagawa *et al.*, 1985) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมนลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อสกัดสารละลายเอนไซม์ จากนั้นบดเชื้อราที่เกาะบนอาหารให้มีขนาดเล็กและกวนให้เข้ากันทำในถังที่บรรจุน้ำเย็น โดยบ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

4.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียร (stability) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

นำสารละลายเอนไซม์โปรติเอสที่ทราบค่ากิจกรรมของเอนไซม์แล้วเป็นค่าเริ่มต้น (initial activity; ia) จากนั้นตรวจสอบความเสถียรของค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

4.5.1 ผลของอุณหภูมิในการบ่ม

นำสารละลายเอนไซม์โปรติเอสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์แล้วนำไปบ่มใน heat box รุ่น MD-mini (Major Science, U.S.A.) ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่เหลืออยู่ (remaining activity)

4.5.2 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษา

เก็บรักษาเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20, 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหลืออยู่ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 6 เดือน

5 การตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease activity) ในเชิงปริมาณ

วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้เคซีน (casein) เป็นสารตั้งต้นมีส่วนผสม (reaction mixture) ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ 1 มิลลิลิตร และสารละลายเคซีนเข้มข้น 0.65% ใน 50 mM KPB pH 7.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา นาน 10 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 110 mM Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที นำส่วนใส 2 มิลลิลิตร มาใส่หลอดทดลอง จากนั้นเติม 500 mM Na_2CO_3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม 500 mM (v/v) Folin-Ciocalteu reagent (Folin and Ciocalteu, 1929) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer รุ่น UV 5300 (METASH, China) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Anson, 1938) ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) 1 ยูนิต (Unit; U) เป็นปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยเคซีนได้เป็นกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

การสร้างกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีน ทำได้โดยเตรียมสารละลาย 1.1 mM ไทโรซีนในหลอดทดลอง ซึ่งเติมสารละลายไทโรซีนความเข้มข้น 1.1 mM ปริมาตร 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 และ 0.50 มิลลิลิตร ส่วนหลอด blank ไม่ใส่สารละลายไทโรซีน จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติม 500 mM Na_2CO_3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม 500 mM (v/v) Folin-Ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer (METASH, UV5300) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำไปสร้างกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโน คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีน ดังสมการดังนี้ (Cupp-Enyard, 2008)

$$\text{Protease activity (U/ml)} = \frac{A \times (VT)}{(VE) \times (T) \times (VU)}$$

A = ความเข้มข้นของไทโรซีนที่ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

VT = ปริมาตรของสารละลายทั้งหมดในหลอดทดลอง (มิลลิลิตร)

VE = ปริมาตรของเอนไซม์ตัวอย่างที่ใช้ในหลอดทดลอง (มิลลิลิตร)

T = เวลาที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (นาที)

VU = ปริมาตรของสารละลายในหลอดคิวเวทท์

6 การสกัดเอนไซม์โปรตีเอสแบบสกัดหยาบ

หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 บนอาหารแข็งที่ได้ทดสอบ ในระยะเวลาที่กำหนดแต่ละการทดลองแล้ว นำมาสกัดเอนไซม์ด้วยการเติม 50 mM KPB pH 7.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บดเชื้อราที่เกาะบนอาหารให้มีขนาดเล็กและกวนให้เข้ากันทำในถังที่บรรจุ น้ำเย็น บ่มนาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใส ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองอีกครั้งด้วยเครื่องกรองแบบคที่เรียที่มีกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (Millipore filter) แบบสุญญากาศ จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร และนำไปวัดเอนไซม์โปรตีเอสต่อไป

7 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ด้วยเครื่อง Vertical Electrophoresis (OmniPage Mini, Cleaver Scientific, UK) จะประกอบด้วยเจล 2 ส่วน คือ 12% separating gel และ 4% stacking gel (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบเตรียมเจล SDS-PAGE

ส่วนประกอบ	4% Stacking gel (มิลลิลิตร)	12% Separating gel (มิลลิลิตร)
30% Acrylamide-0.8% Bis-acrylamide (w/v)	0.67	4
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.6
10% (w/v) SDS	0.05	0.1
10% (w/v) ammonium persulphate	0.05	0.1
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	0.005	0.01
Distilled water	2.975	3.2
Total	5.0	10.0

จากนั้นดูเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 5X loading dye (0.05% (w/v) bromophenol blue, 10% SDS, 20% glycerol, 10 mM mercaptoethanol และ 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8) อัตราส่วน 1:1 และนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการต้มไปแยกขนาดโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าตามวิธีการของ Laemmli (1970) โดยนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ดูกลงใส่ในช่องเจล โดยช่องแรกใส่โปรตีนมาตรฐาน (Protein ladder 10-250 kDa, BioLabs, UK) และช่องถัดไปใส่ตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบที่ได้จากการทดลอง จากนั้นเติม 1X SDS buffer ลงในอุปรกรณ์ให้ท่วมเจล และตั้งค่ากระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เวลา 15 นาที เมื่อตัวอย่างถึงชั้นเจล separating gel ให้ปรับกระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเป็น 120 โวลต์ นาน 60 นาที จากนั้นเมื่อครบระยะเวลาให้นำเจลออกมาย้อมสีด้วย staining solution (0.3% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid และ 45% distilled water) เป็นเวลา 10 นาที ล้างเจลด้วย destaining solution (20% methanol, 10% glacial acetic acid และ 70%

distilled water) 3 - 5 ครั้ง แช่ในน้ำเปล่าข้ามคืนแล้วตรวจดูการปรากฏของแถบโปรตีนเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

8 การคัดเลือกสารละลายเคมี (chemical solution) ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการพักไข่ไข่เดือนฝอยรากปม

เขี่ยกลุ่มไข่ออกจากตัวเต็มวัยเพศเมียที่เข้าทำลายรากมันขี้หนูประมาณ 15 - 20 กลุ่ม จากนั้นนำมาแช่ 1% sodium hypochlorite (NaOCl) นาน 3 นาที แล้วเขย่าแรง ๆ นาน 3 นาที กรองผ่านตะแกรงเบอร์ (mesh number) 500 แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (กนกพรรณ, 2544) หลังจากนั้นทำการนับจำนวนไข่ทั้งหมด ปรับความเข้มข้นไข่แขวนลอยให้ได้ 20 ฟอง/ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดไข่ไข่เดือนฝอยใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร จำนวน 20 ฟองต่อจานเลี้ยงเชื้อซึ่งไข่ที่ใช้ในการทดสอบมีระยะแตกต่างกัน จากนั้นทำการทดสอบสารละลายเคมีที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการพักไข่ไข่เดือนฝอย โดยสารละลายเคมีทดสอบได้แก่ zinc sulfate ($ZnSO_4$), zinc chloride ($ZnCl_2$), potassium nitrate (KNO_3), magnesium sulfate ($MgSO_4$) และ calcium chloride ($CaCl_2$) โดยแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 3 mM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีไข่ไข่เดือนฝอยจากการเตรียมในขั้นตอนแรก (Tefft *et al.*, 1982) จากนั้นบันทึกผลค่าเฉลี่ยอัตราการพักไข่ไข่เดือนฝอยทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน โดยเปรียบเทียบกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

9 การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ และสปอร์เชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ต่ออัตราการพักไข่ และการตายของตัวอ่อนไข่เดือนฝอยรากปม ระยะที่ 2

9.1 การเตรียมไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไข่เดือนฝอยรากปม

วิธีการเตรียมไข่ทำเช่นเดียวกับข้อ 8.1 จากนั้นเก็บไข่ไว้เพื่อการทดสอบผลของเอนไซม์โปรติเอสต่ออัตราการพักไข่ และนำกลุ่มไข่บางส่วนไปกระตุ้นให้พักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 โดยแช่ในสารละลายเคมีจากข้อ 8.2 บ่มไว้ที่มีด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Okada, 1971) และทำการแยกตัวอ่อนไข่เดือนฝอยระยะที่ 2 ที่พักออกจากไข่ทุก ๆ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี Baermann tray

(Whitehead and Hemming, 1965) และนับจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 ภายใต้กล้องสเตอริโอ ให้ได้ตัวอ่อนไข่เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 จำนวน 20 ตัว/ไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้การทดลองต่อไป

9.2 การทดสอบผลของเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบต่ออัตราการฟักไข่ของไข่เดือนฝอยรากปม

นำไข่ไข่เดือนฝอยที่เตรียมจากข้อ 9.1 มาล้างด้วยสารปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นดูดไข่แขวนลอยใส่ลงในไมโครเพลท 96 หลุม หลุมละ 1 ไมโครลิตร ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 100 ฟอง จากนั้นเติมสารละลายแต่ละกรรมวิธี โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร + ไข่ไข่เดือนฝอย

กรรมวิธีที่ 2 เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบที่ได้จากการทดลองที่ 4 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร + ไข่ไข่เดือนฝอย

กรรมวิธีที่ 3 สปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM02 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร+ ไข่ไข่เดือนฝอย

กรรมวิธีที่ 4 สารเคมีฟิโปรนิล (fipronil 5% (w/v) SC ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร + ไข่ไข่เดือนฝอย

กรรมวิธีที่ 5 เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ + สปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM02 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร+ ไข่ไข่เดือนฝอย

จากนั้นวิเคราะห์ผลโดยคำนวณอัตราการฟักไข่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไข่เดือนฝอยรากปมโดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (ยี่ห้อ Leica Microsystems รุ่น IDMI) ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธี

9.3 การทดสอบผลของเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบต่ออัตราการตายของตัวอ่อนไข่เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2

นำตัวอ่อนไข่เดือนฝอยระยะที่ 2 ที่ได้จากการกระตุ้นให้ฟักไข่ด้วยสารละลายเคมีในข้อ 8.2 เพื่อให้ได้ตัวอ่อนไข่เดือนฝอยระยะที่ 2 ที่อายุเท่ากันมาใช้ในการทดสอบ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง และล้างด้วยสารปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ดูดตัวอ่อนไข่เดือนฝอยระยะที่ 2

- ใส่ในไมโครเพท 96 หลุม หลุมละ 1 ไมโครลิตร ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 100 ตัว จากนั้นเติมสารละลายแต่ละกรรมวิธี โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ได้แก่
- กรรมวิธีที่ 1 น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร + ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2
- กรรมวิธีที่ 2 เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบที่ได้จากการทดลองที่ 4 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร + ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2
- กรรมวิธีที่ 3 สปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM02 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร+ ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2
- กรรมวิธีที่ 4 สารเคมีฟิโปรนิล (fipronil 5% (w/v) SC ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร + ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2
- กรรมวิธีที่ 5 เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ + สปอร์แขวนลอยของ *M. guizhouense* PSUM02 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร+ ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2

จากนั้นวิเคราะห์ผลโดยคำนวณอัตราการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 1 สัปดาห์และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธี

9.4 การศึกษาความผิดปกติของเปลือกไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำตัวอย่างไข่ และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมหลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมงในแต่ละกรรมวิธีดังข้อ 9.2 และ 9.3 มาศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM) โดยนำตัวอย่างมาแช่ลงในสารละลายที่มี 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1M phosphate buffer นาน 4 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1M phosphate buffer 3-4 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างมาตั้งน้ำออก (dehydrate) ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้น 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 % ตามลำดับ โดยแช่แต่ละความเข้มข้น 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที แล้วทำตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่อง critical point drier (CPD) หลังจากนั้นนำตัวอย่างแห้งมาติดบนแท่น stub ทำการเคลือบตัวอย่างด้วยอนุภาคทองคำ แล้วจึงนำไปศึกษาความผิดปกติของเปลือกไข่ และผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น Quanta 400

10 การวัดปริมาณโปรตีน

นำตัวอย่างไข่ และตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 จากการทดลองข้อ 9.2 และ 9.3 ในวันสุดท้ายของการบันทึกผล โดยดูดตัวอย่างแต่ละกรรมวิธีมา 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนต์ปีฟวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อให้ตัวอย่างตกตะกอนลงก้นหลอด แล้วดูดของเหลวออก 500 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 500 ไมโครลิตร ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เพื่อล้างเอนไซม์ที่ได้ทดสอบไว้ออกให้หมด นำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง Homogenizer (รุ่น D-160, DLAB) จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Bradford (1976) โดยดูดตัวอย่างแต่ละกรรมวิธีมา 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสาร Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรและคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovian serum albumin; BSA)

11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แต่ละการทดลองวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Analysis of Variance; ANOVA โปรแกรม statistical package for the social sciences (IBM SPSS version 22) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีด้วย Tukey's Range Test ส่วนในการคำนวณอัตราการฟักไข่และอัตราการตายของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยจากปมระยะที่ 2 (%) ดังวิธีการของ Sun และคณะ (2006)

$$\text{อัตราการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยจากปม (\%)} = \frac{\text{ตัวอ่อนระยะที่ 2}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{อัตราการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 (\%)} = \frac{\text{ตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่ตาย}}{\text{จำนวนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 ทั้งหมด}} \times 100$$

บทที่ 3

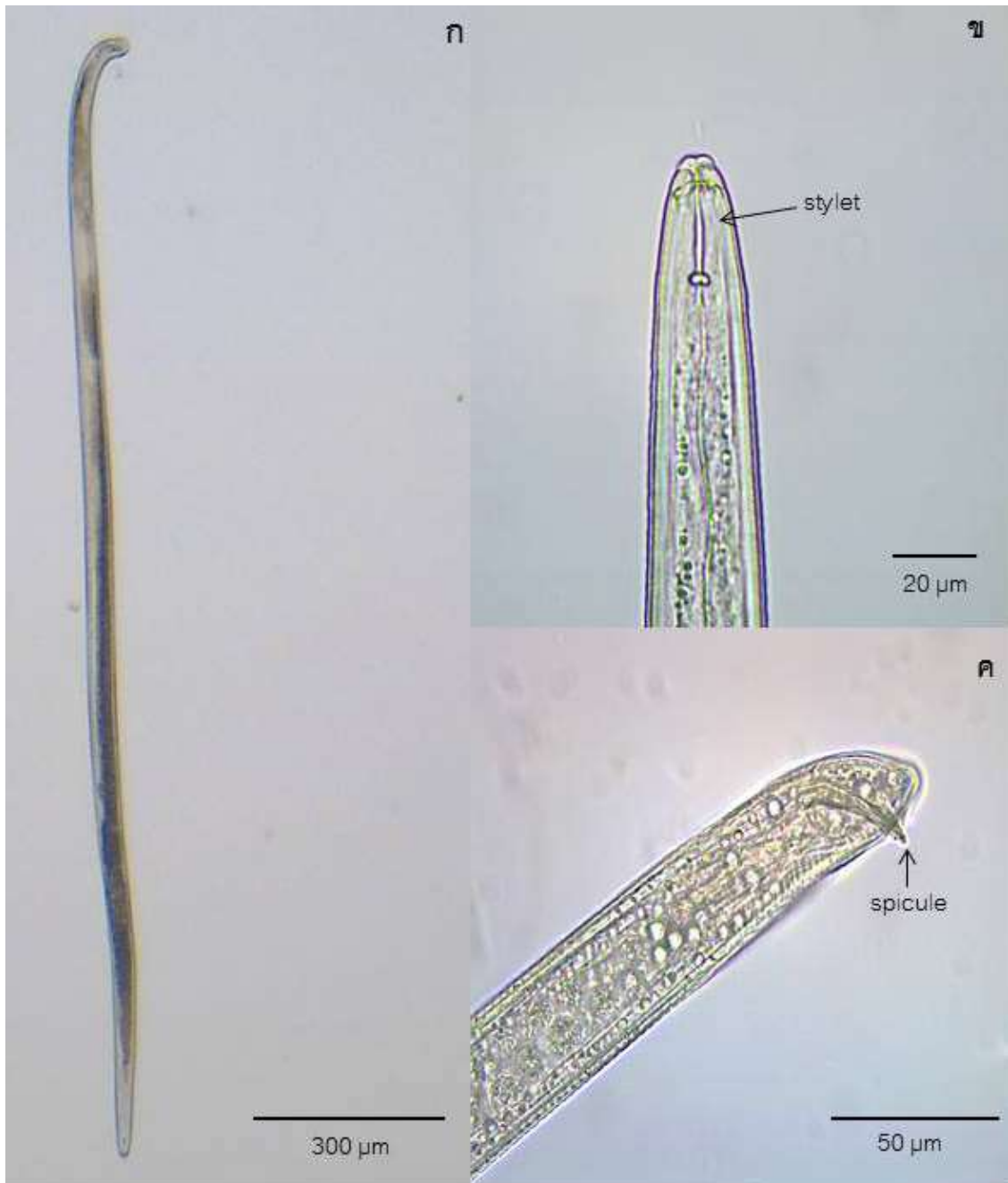
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 ผลการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมในมันขี้หนู

เมื่อนำตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายมันขี้หนูมาจัดจำแนกชนิดโดยเทียบเคียงกับคู่มือหนังสือของ Jepson (1987) และภาพมาตรฐานของ International *Meloidogyne* Project (Taylor and Sasser, 1978; Eisenback *et al.*, 1981) ซึ่งจำแนกได้เป็นไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* โดยมีลักษณะพื้นฐานวิทยาดังนี้

ไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศผู้

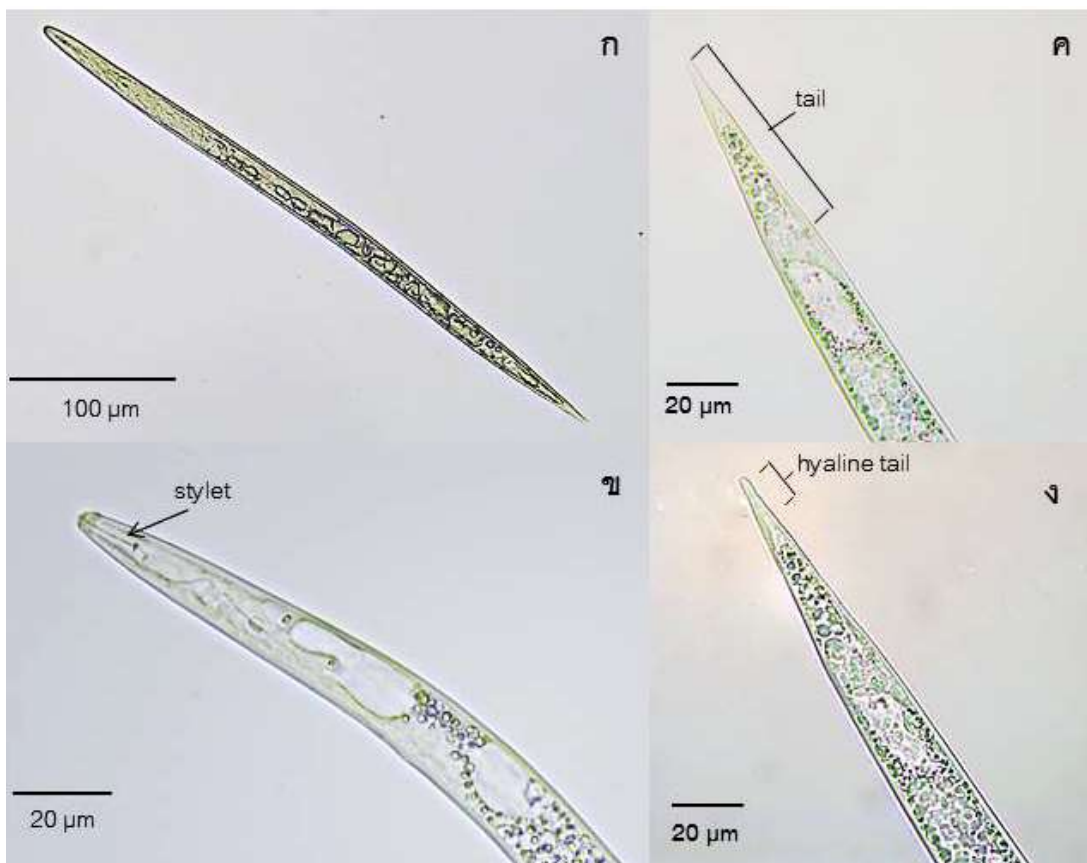
ลักษณะไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศผู้มีลำตัวเป็นเส้นด้าย (vermiform) เช่นเดียวกับตัวอ่อนระยะที่ 2 แต่มีขนาดที่ยาวกว่า (ภาพที่ 12 ก) ส่วนปลายหางมีลักษณะคล้ายครึ่งวงกลมและมองเห็นอวัยวะเพศ (spicule) ได้อย่างชัดเจน ซึ่งจากการวัดขนาดอวัยวะต่าง ๆ พบว่ามีความยาวลำตัวเฉลี่ย 1733.1 ± 127.2 ไมโครเมตร ความกว้างของลำตัว 33.0 ± 2.6 ไมโครเมตร ส่วนหัวมีลักษณะพิเศษต่างจากไส้เดือนฝอยชนิดอื่น สามารถสังเกตได้จากริมฝีปากด้านในกลมใหญ่ ตรงกลางเว้าและค่อนข้างสูงกว่าริมฝีปาก โดยมีความยาวส่วนหัวเฉลี่ย 6.7 ± 0.2 ไมโครเมตร และความยาวส่วนต้นของลำตัว (ระยะห่างจากหัวถึงปลายท่อหลอดดูดอาหาร) 24.9 ± 0.9 ไมโครเมตร สำหรับหลอดดูดอาหาร (stylet) มีลักษณะรูปร่างคล้ายกรวย แข็งแรง มีรูเปิดของท่อทางเดินอาหารอยู่ด้านล่างห่างจากปลายของหลอดดูดอาหารประมาณ 1 ใน 4 ของความยาวรูปร่างกรวย บริเวณปลายหลอดดูดอาหารมีลักษณะทู่ ไม่แหลม และส่วนหน้าของปุ่ม (knob) มีลักษณะคล้ายใบมีด ส่วน knob มีลักษณะกลมมนและยืดยาวออกทางด้านข้าง (ภาพที่ 12 ข) โดยวัดขนาดความยาวหลอดดูดอาหารเฉลี่ยได้ 18.8 ± 0.7 ไมโครเมตร และขนาดของอวัยวะเพศ มีความยาวเฉลี่ย 31.3 ± 2.0 ไมโครเมตร ซึ่งอยู่บริเวณใกล้กับส่วนหางมีลักษณะโค้งเล็กน้อย (ภาพที่ 12 ค)



ภาพที่ 12 ไข่เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศผู้; ลำตัว (ก), หลอดดูดอาหาร (ข) และอวัยวะเพศ (ค)

ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2

ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 มีลักษณะหัวท้ายเรียว (ภาพที่ 13 ก) และมีริมฝีปากเหมือนดัมเบล (dumbbell) สามารถวัดขนาดความยาวของลำตัวเฉลี่ยได้ 423.2 ± 23.2 ไมโครเมตร ความกว้างลำตัวมีขนาดเฉลี่ย 12.81 ± 1.6 ไมโครเมตร หลอดดูดอาหารสั้นกว่าเพศผู้ ตัวเต็มวัย (ภาพที่ 13 ข) โดยวัดขนาดความยาวเฉลี่ยได้ 11.2 ± 1.5 ไมโครเมตร ส่วนความยาวส่วนต้นของลำตัวมีค่าเฉลี่ย 15.2 ± 0.5 ไมโครเมตร สำหรับขนาดความยาวของหาง (ส่วนคอดลำตัวถึงปลายหาง) วัดได้ 49.8 ± 2.3 ไมโครเมตร และลักษณะปลายหางมีรูปร่างเรียวยาว (ภาพที่ 13 ค) และจะมีช่องว่างระหว่างปลายหางที่ไม่มีสี เรียกว่า hyaline tail ซึ่งสามารถวัดความยาวเฉลี่ยได้ 9.2 ± 0.8 ไมโครเมตร (ภาพที่ 13 ง)



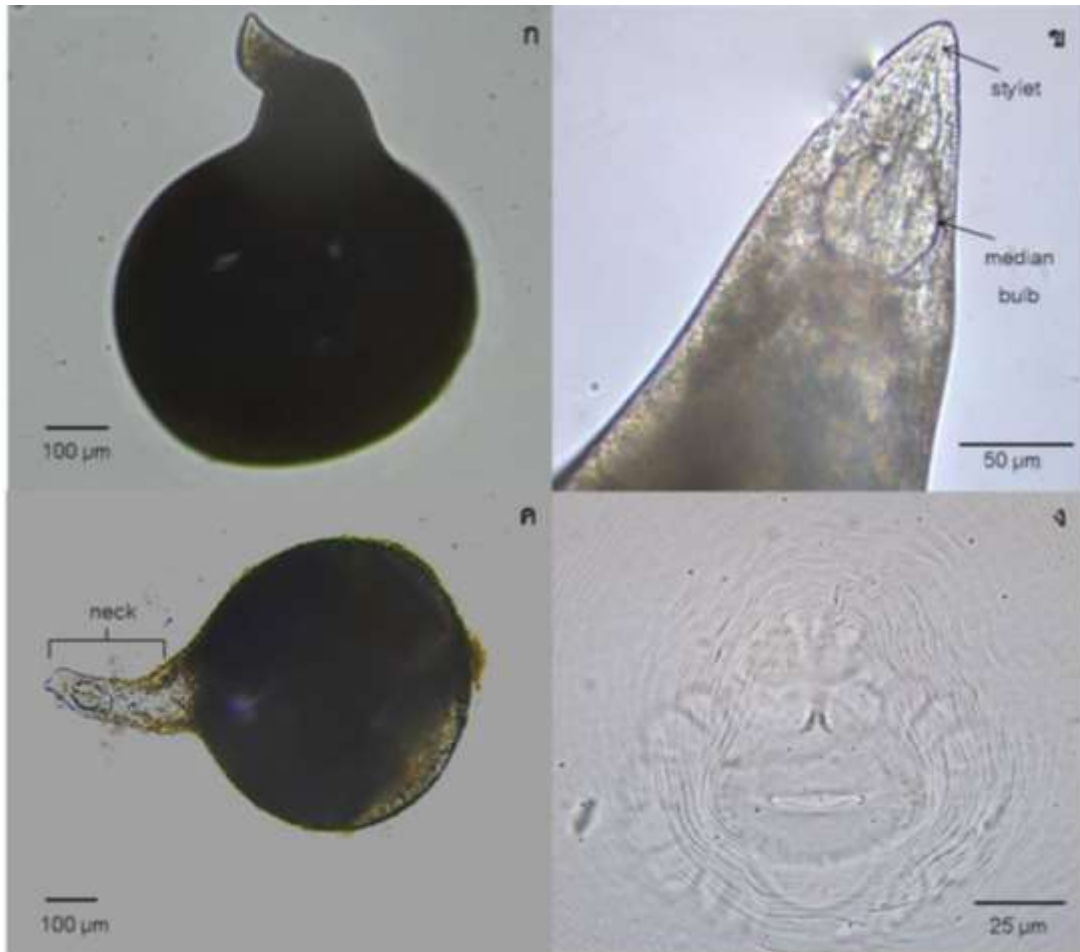
ภาพที่ 13 ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2; ลำตัว (ก), หลอดดูดอาหาร (ข), ส่วนหาง (ค) และปลายหางส่วนใส (ง)

ไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศเมีย

ตัวเต็มวัยเพศเมียในสกุล *Meloidogyne* spp. มีลักษณะแตกต่างจากเพศผู้ และไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่น ๆ เช่น *Aphelenchoides* spp., *Hirschmanniella* spp. และ *Radophorus* spp. (Dropkin, 1980) เป็นต้น โดยตัวเต็มวัยเพศเมียเปลี่ยนแปลงรูปร่างคล้ายลูกแพร์ (ภาพที่ 14 ก) ซึ่งมีขนาดความยาวลำตัว 665.9 ± 35.3 ไมโครเมตร และมีความกว้างลำตัว 450.5 ± 39.4 ไมโครเมตร ส่วนหลอดดูดอาหารมีลักษณะเช่นเดียวกับเพศผู้ (ภาพที่ 14 ข) ซึ่งมีขนาดความยาวเฉลี่ย 16.0 ± 1.0 ไมโครเมตร และความยาวส่วนคอ 237.6 ± 23.4 ไมโครเมตร (ภาพที่ 14 ค)

อีกหนึ่งลักษณะที่สำคัญ และได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม คือ รูปแบบของรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ของเพศเมียตัวเต็มวัย ซึ่งลักษณะลายเส้นสามารถบ่งบอกได้ถึงระดับชนิด โดยดูจากรูปแบบการเรียงตัว การขาดตอน และความเรียบของลายเส้น จากการจัดจำแนกลักษณะรอยย่นส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปมในมันขี้หนู มีลักษณะแนวเส้นกรอบด้านหลัง (dorsal arch) สูง เส้นรอยย่นค่อนข้างละเอียด และขาดเป็นเส้นสั้น ๆ เรียบจนเป็นแบบคลื่นหรือหยักศกเล็กน้อย (ภาพที่ 14 ง) ซึ่งมีลักษณะตรงกับไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และต่างจากไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น (ภาพที่ 15) และจากการจัดจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่ 2 มีขนาดอยู่ในช่วงเดียวกับงานวิจัยของ Kaur และคณะ (2016) (ตารางที่ 2)

เมื่อนำตัวเต็มวัยเพศเมียมาจัดจำแนกชนิดด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา และจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ภาพที่ 16) พบว่าตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมในครั้งนี้อยู่ในกลุ่มเดียวกับไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *M. javanica* และ *M. arenaria* ซึ่งไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่กล่าวมานั้นมีความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. hapla*, *M. graminis*, *M. exigua*, *M. minor*, *M. chiwoodi* และ *M. ichinohei* โดยสอดคล้องกับแผนภูมิวิวัฒนาการของ McClure และคณะ (2012) ที่รายงานว่าไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีวิวัฒนาการความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับไส้เดือนฝอย *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. paranaensis* และ *M. konaensis*



ภาพที่ 14 ลักษณะตัวเต็มวัยเพศเมียของไล้เดือนฝอยรากปม; รูปร่างตัวเต็มวัยเพศเมีย (ก), หลอดดูดอาหาร (ข), ส่วนคอ (ค) และ รอยย่นส่วนก้น (ง)



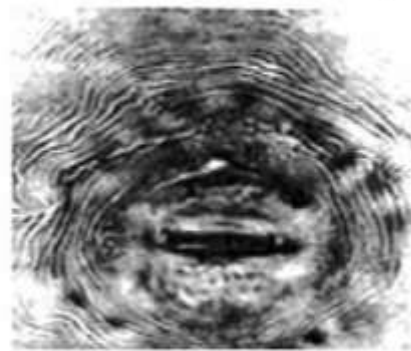
M. incognita (จากการศึกษาครั้งนี้)



M. incognita
(Taylor and Sasser, 1978)



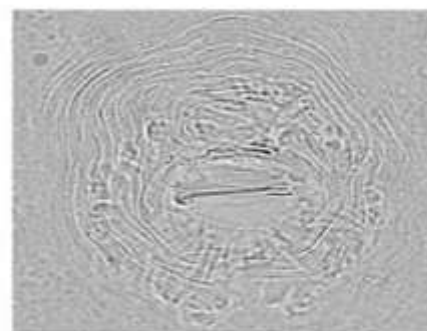
M. javanica
(kaur et al., 2016)



M. hapla
(Eisenback, 1981)



M. enterolobii
(Yang and Eisenback, 1983)

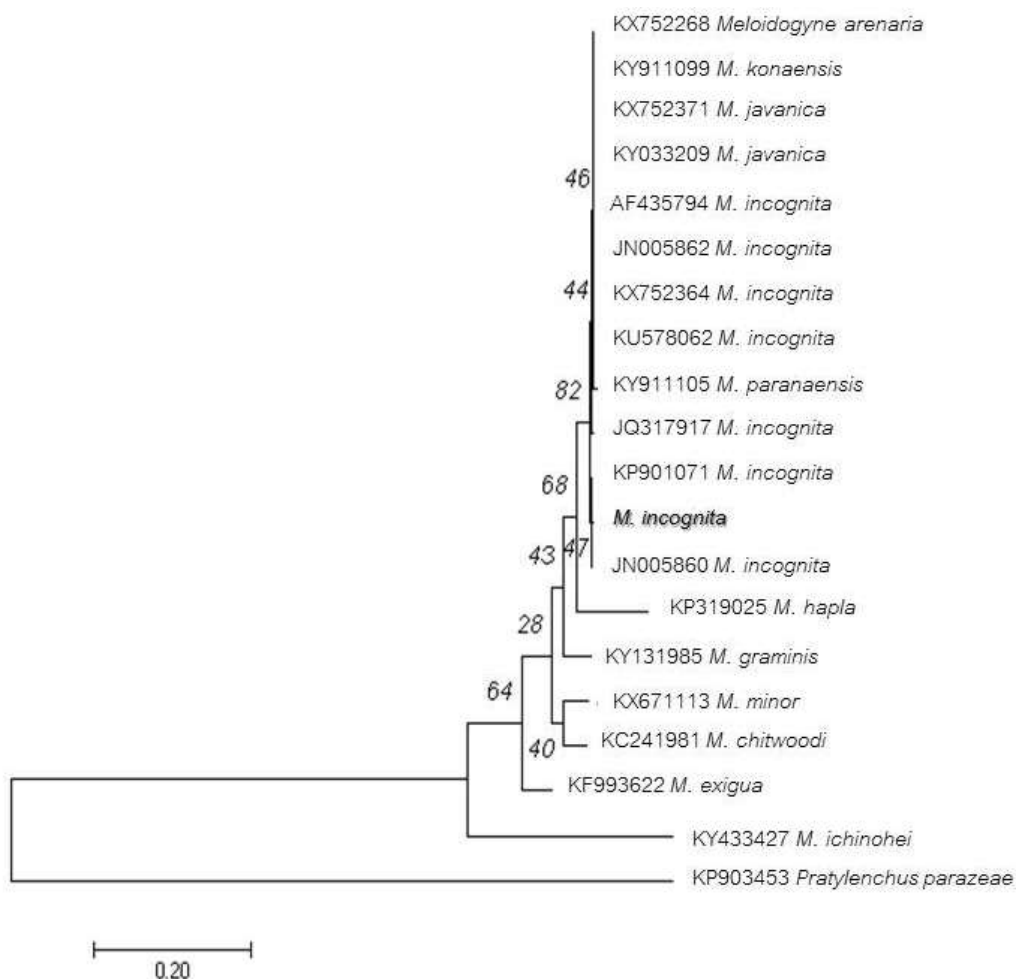


M. arenaria
(Aydinli and Mennan, 2012)

ภาพที่ 15 ลักษณะรอยย่นส่วนกันของเพศเมียตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอยรากปม

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะส่วนต่าง ๆ ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*

ลักษณะ (ไมโครเมตร)	การศึกษาใน ครั้งนี้	Kaur และคณะ (2016)	Jepson (1987)	Chiwood (1949)
เพศเมีย				
- ความยาว	630.6–701.2	482.4–746.2	510.0–690.0	510.0–690.0
- ความกว้าง	411.1–489.9	289.0–487.0	300.0–430.0	300.0–430.0
- ความยาวของคอ	214.2–261.0	175.0–311.0	–	–
- ความยาวของหลอดดูดอาหาร	15.0–17.0	12.2–17.4	15.0–16.0	15.0–16.0
เพศผู้				
- ความยาว	1605.9–1860.3	1727.0–2128.0	–	1200.0–2000.0
- ความกว้าง	30.4–35.6	20.4–39.6	–	–
- ความยาวส่วนหัว	6.5–6.9	5.9–8.0	–	–
- ความยาวของหลอดดูดอาหาร	18.1–19.5	18.6–20.9	23.0–26.0	23.0–26.0
- ความยาวลำตัวส่วนต้น	24.0–25.8	24.8–28.3	–	–
- ความยาวอวัยวะเพศ	29.3–33.3	20.4–39.8	–	34.0–36.0
ตัวอ่อนระยะที่ 2				
- ความยาว	400.0–446.4	335.0–428.0	337.0–403.0	360.0–393.0
- ความกว้าง	11.2–14.4	10.1–13.0	–	–
- ความยาวของหลอดดูดอาหาร	9.7–12.7	9.6–12.4	9.6–11.7	10.0
- ความยาวลำตัวส่วนต้น	14.7–15.7	12.5–15.3	–	–
- ความยาวของหาง	47.5–52.1	40.1–58.7	45.0–52.2	–
- ความยาวส่วนไส้ของหาง	8.4–10.0	5.6–11.7	6.3–13.5	–



ภาพที่ 16 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี neighbor joining มีค่า bootstrap 1,000 รอบ

2 การสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Metarhizium guizhouense* PSUM02

หลังจากนำเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 มาเลี้ยงบนอาหารรุ้นที่มีเคซีนเป็นองค์ประกอบหลัก พบว่าเชื้อราสามารถย่อยเคซีนในอาหารรุ้น แสดงให้เห็นเป็นวงใสล้อมรอบโคโลนีของเชื้อรา โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.9 ± 0.1 เซนติเมตร (ภาพที่ 17) ดังนั้นเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Thaochan and Chandrapatya (2016) พบว่าเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 สร้างเอนไซม์โปรติเอสบนอาหาร SDAY ผสม 3% skim milk ซึ่งบ่มเป็นเวลา 5 วัน โดยมีค่าเฉลี่ยของการเกิดวงใสอยู่ที่ระหว่าง 1.06 - 1.17 เซนติเมตร



ภาพที่ 17 วงใสที่เกิดจากการย่อยเคซีนโดยเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 บนอาหาร casein agar หลังบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

3 แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (solid state cultivation)

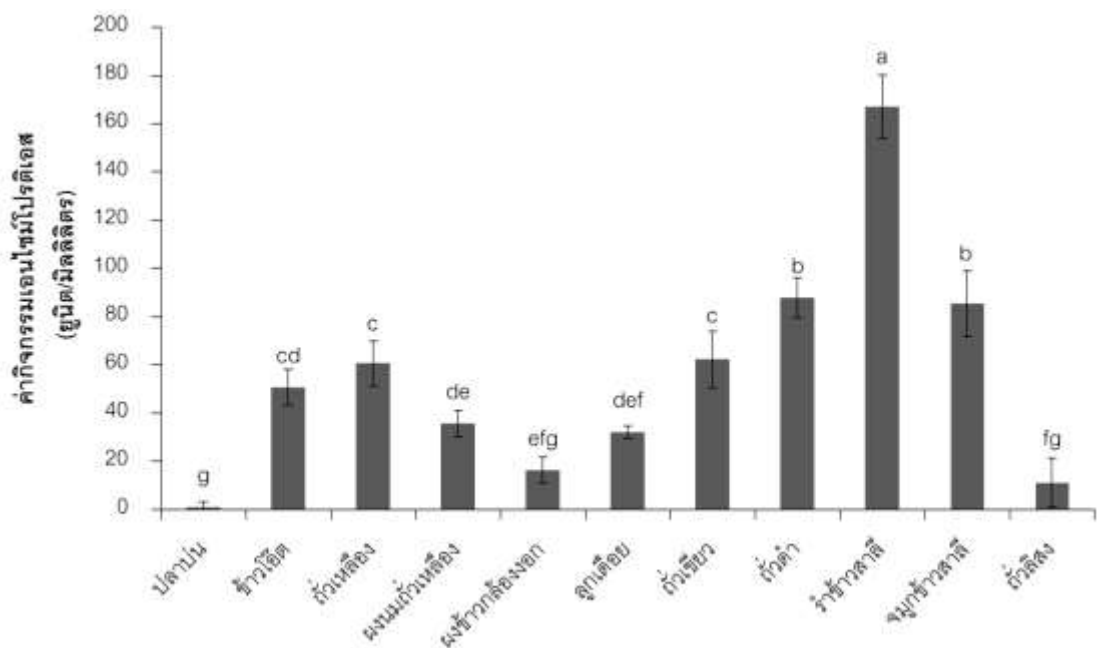
การเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารแข็งเหมาะสมกับเชื้อรามากกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากเชื้อรามีลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยทำให้การยึดเกาะ การดูดซึมสารอาหารจากแหล่งอาหารได้ดีกว่าในอาหารเหลว และผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบปลดปล่อยออกมาออกเซลล์ (Ikasari and Mitchell, 1994) ส่งผลให้ได้ผลผลิตในปริมาณมากกว่าและใช้ต้นทุนต่ำในการผลิต (Ali and Vidhale, 2013) ผลการทดสอบในครั้งนี้พบว่ารำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนที่กระตุ้นให้เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดจากแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 11 ชนิด โดยให้ค่าเอนไซม์โปรติเอส 167.1 ± 12.9 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ ถั่วดำ และจมูกข้าวสาลี มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 87.8 ± 8.3 และ 85.5 ± 13.0 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 18) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่ใส่เชื้อรา) ของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด พบว่าไม่มีการสร้างเอนไซม์โปรติเอสแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากรำข้าวสาลี และเมล็ดธัญพืชมีองค์ประกอบของโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 15 - 33 (Ralet *et al.*, 1990; กองโภชนาการ, 2544) ซึ่งการใช้รำข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์

โปรตีนเหมาะสมมากกว่าการใช้เมล็ดธัญพืช โดยยืนยันได้จากการทดลองของ Agrawal และคณะ (2005) ที่พบว่ารำข้าวสาลีเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์โปรตีน โดยเชื้อรา *Beauveria feline* ในสภาพเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่ารำข้าวสาลีเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนโดยเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Apergillus* sp. (Ellaiah et al., 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (Meena et al., 2013), *Bacillus* sp. (Uyar and Baysal, 2004) รวมถึงเชื้อรา *M. anisopliae* (Bhanu Prakash and Padmaja, 2012)

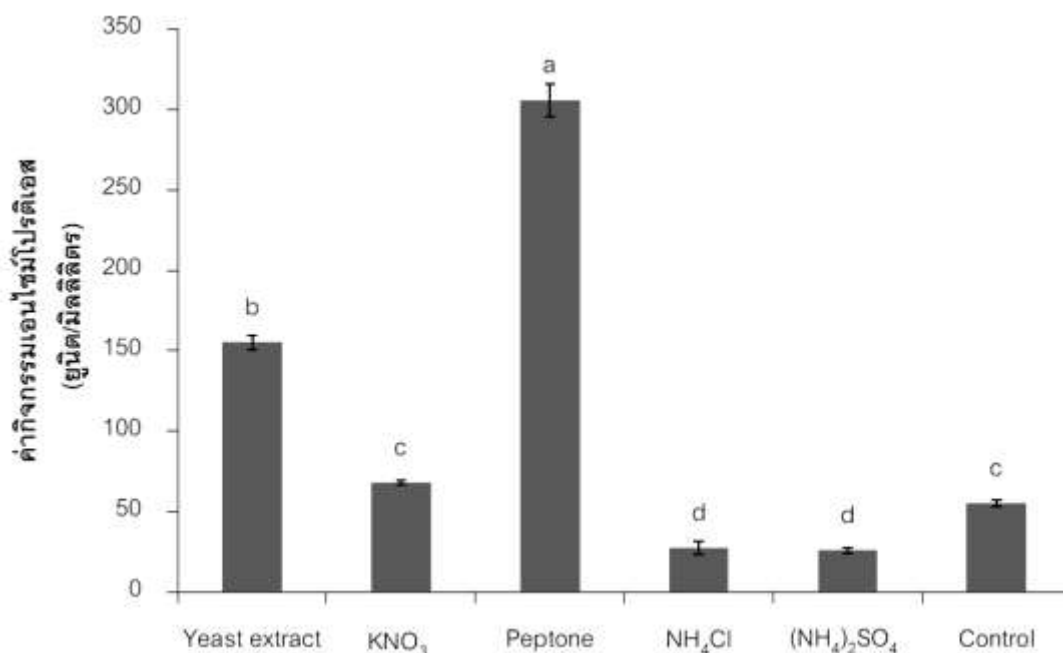
เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนหลักเพื่อทดสอบแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีน ซึ่งผลการทดลองแสดงในภาพที่ 19 ซึ่งให้เห็นว่า เมื่อใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ผลิตเอนไซม์โปรตีนได้สูงสุด 305 ± 10.2 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% รองลงมาได้แก่ yeast extract, KNO_3 , NH_4Cl และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ซึ่งมีค่าเอนไซม์โปรตีนวัดได้ 155.1 ± 4.5 , 67.93 ± 1.4 , 27.4 ± 4.3 และ 25.9 ± 1.6 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม (ใส่ mineral solution เพียงอย่างเดียว) มีค่าเอนไซม์โปรตีน 55.2 ± 2.3 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งเพปโตนเป็นสารอินทรีย์ที่สามารถส่งเสริมการเจริญและผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อราได้ (Kaur, 2011) จากรายงานของ Wiriya และคณะ (2014) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เชื้อรา *Termitomyces clypeatus* CMUTM005 เจริญได้ดี และ Bhunia และคณะ (2010) รายงานถึงการผลิตเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 โดยใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีนได้ดีกว่าใช้แหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ คือ โปแทสเซียมไนเตรต ยีสต์ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้

ดังนั้นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม มีส่วนสำคัญทำให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์โปรตีนได้เพิ่มมากขึ้น (Nehra et al., 2002) โดยการผลิตเอนไซม์โปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่นำมาเป็นแหล่งอาหารในการบ่มเชื้อรา (Chu et al., 1992) จากการทดลองครั้งนี้ เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนและเพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ผลิตเอนไซม์โปรตีนได้สูงสุดถึง 305.8 ± 10.2 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากการทดลองอื่น ๆ เช่น Ali และคณะ (2011) ทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีนจาก *M. anisopliae* M408 ในอาหารเหลวที่มี N-acetylglucosamine และคิวติเคิลของ

หนอนใยผักเป็นส่วนผสม พบว่ามีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 261.0 ± 2.4 ยูนิต/มิลลิลิตร และ Nahar และคณะ (2004) ทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในอาหาร YPG และ chitin พบว่าสามารถผลิตได้เพียง 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร นอกจากนี้ Tremacoldi และคณะ (2004) รายงานการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา *Aspergillus clavatus* ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง ที่มีกลูโคสและโปรตีนเป็นแหล่งคาร์บอน พบค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพียง 80 ยูนิต/มิลลิลิตร



ภาพที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 บนอาหารแบบแข็งที่ใช้แหล่งคาร์บอน(วัตถุดิบ)แตกต่างกัน
*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยวิธี Tukey's Range Test



ภาพที่ 19 กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 บนอาหารแบบแข็งที่ใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยวิธี Tukey's Range Test

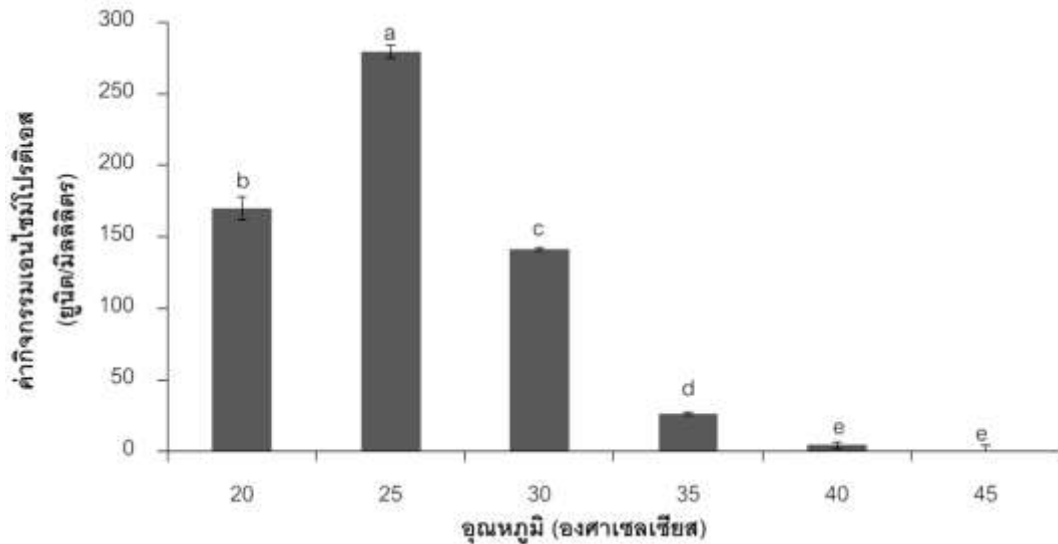
4 ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02

นอกจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่นำมาเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ยังมีสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ ที่เป็นปัจจัยต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอุณหภูมิเป็นหนึ่งปัจจัยที่มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ (Kamath *et al.*, 2010) จากการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย และการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสเท่ากับ 279.4 ± 4.2 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส 169.7 ± 8.0 และ 141.4 ± 1.0 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 20) สอดคล้องกับการทดลองของ Lu และคณะ (2004) ที่ชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* WZW3 บนอาหารแข็ง และเมื่อนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้เชื้อราผลิตเอนไซม์ได้น้อยลงอย่างต่อเนื่องสาเหตุเพราะเอนไซม์เสื่อมสภาพโดยเกิด

การสูญเสียคุณสมบัติของตัวเร่งปฏิกิริยาส่งผลให้โครงสร้างภายในของเอนไซม์อ่อนแอ ทำให้ไม่สามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนของโปรตีนได้ (Nagamani *et al.*, 2012) นอกจากนี้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 คือ 11 วัน ทำให้เอนไซม์โปรติเอสมีค่ากิจกรรมสูงสุดถึง 354.1 ± 2.2 ยูนิต/มิลลิลิตร และหลังจากวันที่ 11 พบว่าเชื้อราผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ลดลงอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 21) โดย Alagarsamy และคณะ (2006) พบว่าในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อเป็นช่วงที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์มาก เพื่อใช้ย่อยสลายอาหารที่ใช้ในการเจริญ และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ในปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน เนื่องจากการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อย่อยสลายอาหารลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากปริมาณของอาหาร หรือความชื้นในอาหารเริ่มหมดไป (Yeoman and Edwards, 1994)

ปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อราให้มีปริมาณที่มากขึ้น เช่น pH และความชื้น เป็นต้น (Jenitta *et al.*, 2015) จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าอัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว (รำข้าวสาลีและ mineral solution) ที่ 1:3 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากสามารถกระตุ้นให้เชื้อราสร้างเอนไซม์โปรติเอสถึง 161.6 ± 3.2 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าอัตราส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (ภาพที่ 22) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความชื้นเหมาะสมมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา (Divaker *et al.*, 2006) และทำให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น ตรงกับการทดลองของ Bakri และคณะ (2013) ที่พบว่าอัตราส่วนระหว่างรำข้าวสาลีและ mineral solution ที่ 1:3 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไฮลาเนสของเชื้อรา *Fusarium solani* นอกจากนี้ค่า pH ในอาหารและปริมาณความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์และการเจริญของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 เช่นกัน ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณการสร้างเอนไซม์โปรติเอสอยู่ที่ 5.0 - 7.0 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสระหว่าง 232.8 ± 2.2 - 237.2 ± 1.7 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบกับค่า pH อื่น (ภาพที่ 23) สอดคล้องกับการรายงานของ Hallsorth และ Magan (1996) พบว่า pH 5.0 - 8.0 เป็นช่วงที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *Metarhizium* spp. เนื่องจากค่า pH ในอาหารมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ การขนส่งสารอาหารผ่านเซลล์เมมเบรนและส่งเสริมการเจริญของเชื้อรา รวมถึงการผลิตเอนไซม์มาย่อยอาหารภายนอกเซลล์ (Ellaiyah *et al.*, 2002; Paranthaman *et al.*, 2009) ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือเพปโตนโดยมี

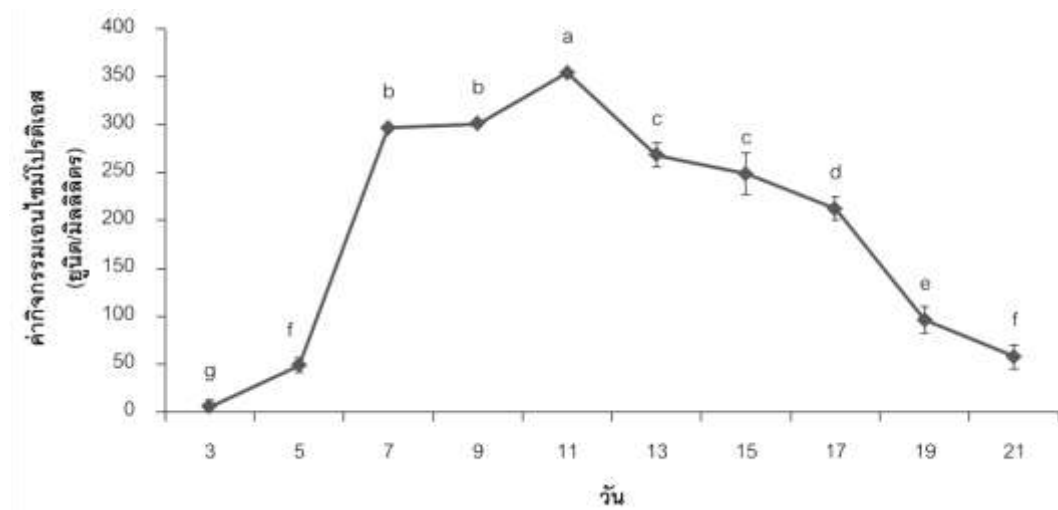
ปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 2.5 - 4.5% (w/v) สามารถกระตุ้นให้เชื้อราผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงขึ้นไปจนถึง 329.3 ± 4.8 - 350.6 ± 17.5 ยูนิต/มิลลิลิตร ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 20 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ที่ป้อนเลี้ยงไว้ในอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

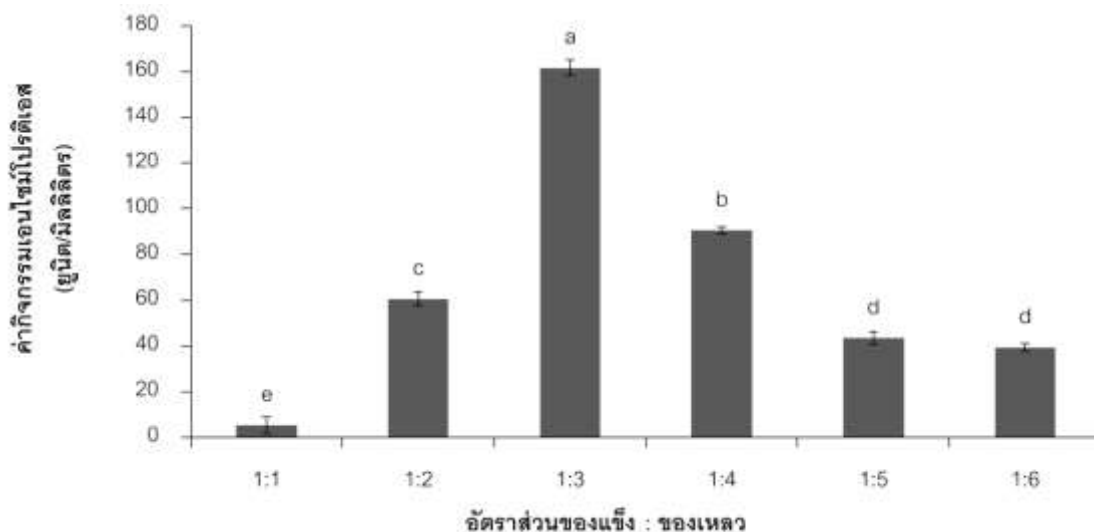
โดยวิธี Tukey's Range Test



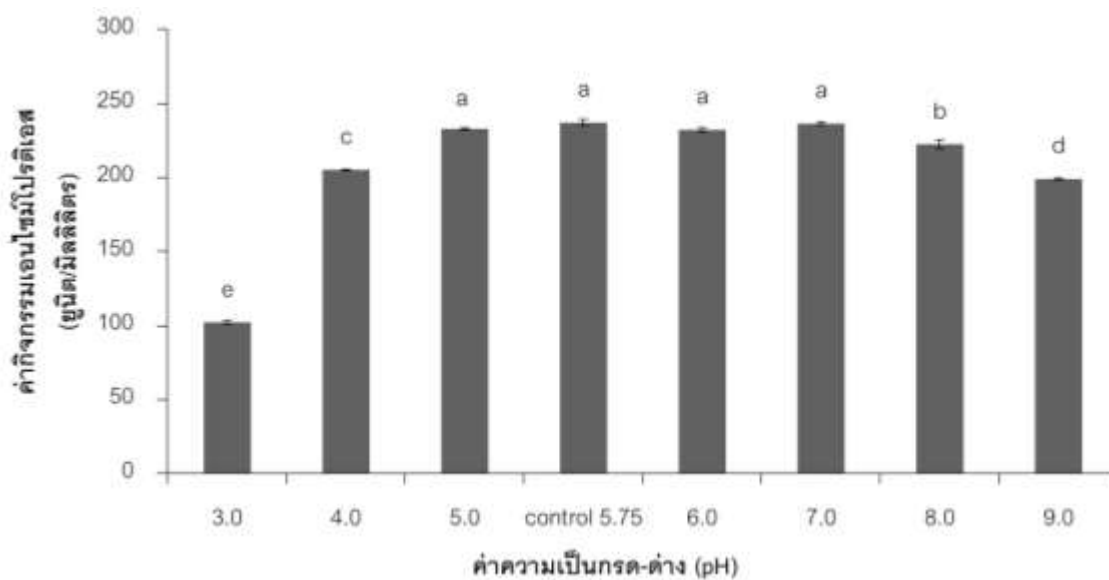
ภาพที่ 21 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ในระยะเวลาการป้อนเชื้อต่าง ๆ บนอาหารแบบแข็ง

*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดย

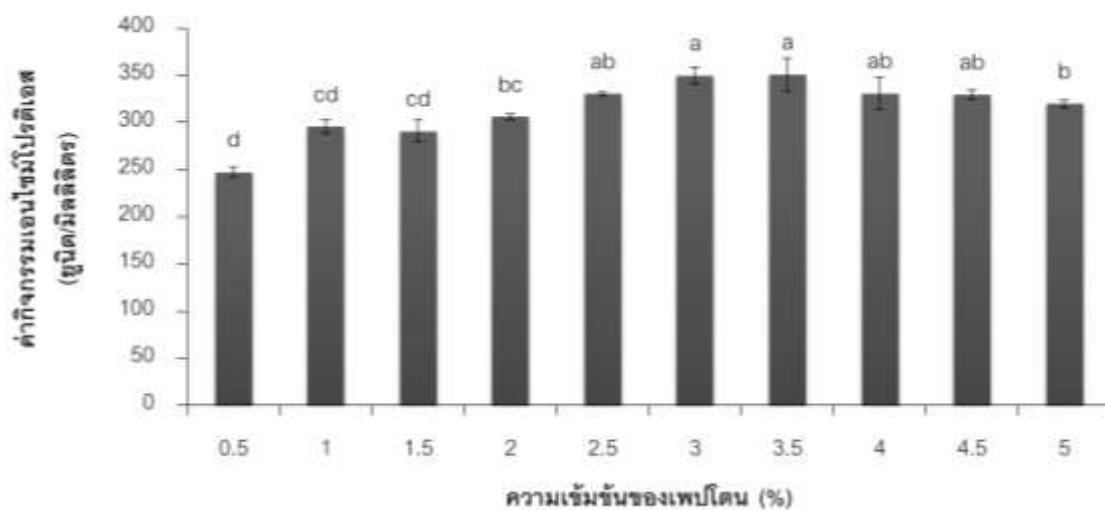
วิธี Tukey's Range Test



ภาพที่ 22 กิจกรรมของเอ็นไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ในอัตราส่วนของแข็ง : ของเหลวที่แตกต่างกัน
*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยวิธี Tukey's Range Test



ภาพที่ 23 กิจกรรมของเอ็นไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 โดยมี pH ใน mineral solution ที่ต่างกัน
*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยวิธี Tukey's Range Test

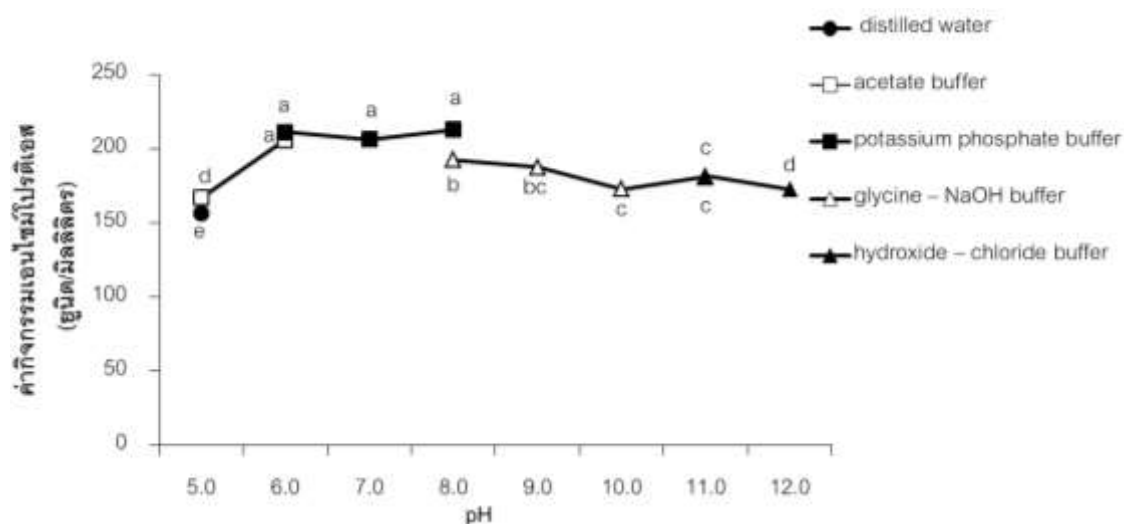


ภาพที่ 24 กิจกรรมของเอนไซม์ไพรอดีเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSU02 ในอัตราความเข้มข้นของเพปโตินที่แตกต่างกัน
*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยวิธี Tukey's Range Test

5 บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ไพรอดีเอส

โดยทั่วไปในธรรมชาติเชื้อราปลดปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายอาหารให้มีโมเลกุลเล็กลง ทำให้ง่ายต่อการดูดซึมและนำพลังงานที่ได้ไปใช้ในการเจริญ (Maciorowski *et al.*, 2007) ซึ่งการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งมีข้อได้เปรียบกว่าวิธีการเลี้ยงด้วยวิธีอื่น ๆ คือมีปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมาจากเชื้อรามากกว่า และยังเป็นวิธีที่นิยมเพาะเลี้ยงเชื้อราในทางอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งนอกจากอาหาร รวมถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากเชื้อราแล้ว ยังมีอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญคือบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด จากการทดลองครั้งนี้พบว่า การสกัดเอนไซม์ไพรอดีเอสด้วย acetate buffer, pH 6.0 และ KPb, pH 6.0 - 8.0 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรอดีเอสสูงกว่าการสกัดเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์อื่น ๆ ที่ใช้ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรอดีเอสระหว่าง 206.0 ± 3.8 - 212.7 ± 1.4 ยูนิต/มิลลิลิตร (ภาพที่ 25) โดยสอดคล้องกับการทดลองของ Nafi และคณะ (2013) รายงานไว้ว่าช่วง pH 7 - 9 เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไพรอดีเอส และการสกัดเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นกรดหรือด่างสูง จะทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรอดีเอสลดลง เนื่องจากเกิดการเสื่อมสภาพของโปรตีนทำให้โครงสร้างของ

โปรตีนเปลี่ยนไป (Sivaprakasam *et al.*, 2011) และ pH ระหว่างกลางถึงด่างอ่อนสามารถรักษาความเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอสได้ดีกว่า pH ในช่วงกรด (Ishwarya and Sangeetha, 2013; Singh *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016)



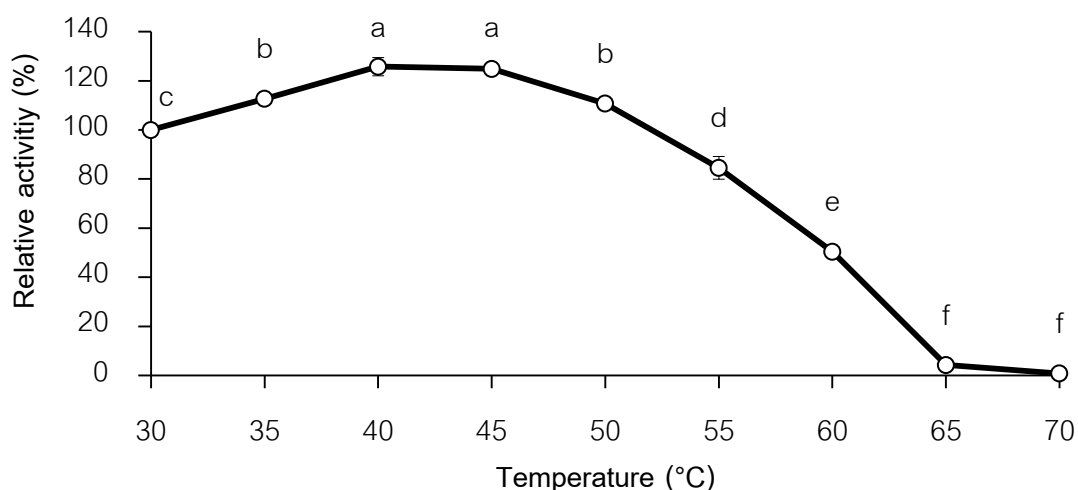
ภาพที่ 25 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ที่สกัดด้วยบัฟเฟอร์แตกต่างกัน
*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยวิธี Tukey's Range Test

6 ความเสถียร (stability) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในสภาพแวดล้อมต่างๆ

ความเสถียรของค่ากิจกรรมเอนไซม์มีความสำคัญอย่างมากต่อเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมที่ผลิตเอนไซม์เพื่อรักษาคุณภาพให้คงเดิม (Deb *et al.*, 2013) จากการทดสอบความเสถียรของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ภายใต้การเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแบบแข็ง ผลการทดลองพบว่าสารละลายเอนไซม์โปรติเอสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 20 เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 – 45 องศาเซลเซียสแตกต่างกับการบ่มที่อุณหภูมิอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และมีค่ากิจกรรมลดลงเรื่อย ๆ จนไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์อยู่เลยที่อุณหภูมิมากกว่า 65 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 26) สอดคล้องกับการทดลองอื่น ๆ เช่น สุภัทรรช และคณะ (2559) ศึกษาความเสถียรของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *B. bassiana* LARTC2 พบว่าเอนไซม์โปรติเอสสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 20 - 50 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าความเสถียรของเอนไซม์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ Bhanu Prakash และ

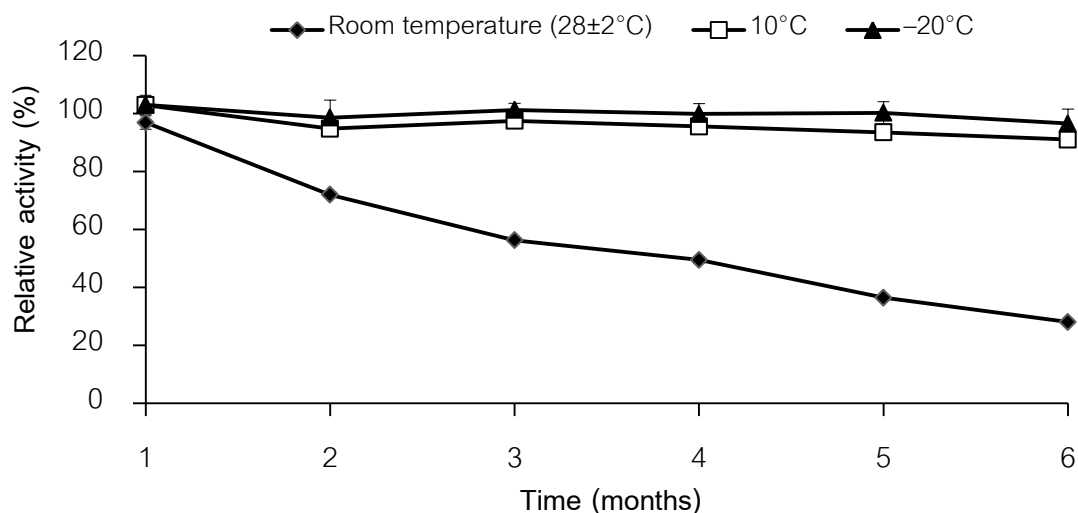
Padmaja (2012) พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเสถียรของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *M. anisopliae* สูงแต่ความเสถียรของกิจกรรมเอนไซม์ลดลงถึง 47.8 เปอร์เซ็นต์เมื่อถูกบ่มไว้ที่ 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Silva และคณะ (2016) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรติเอส คืออุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และความเสถียรของค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิสูงขึ้น (Usharni and Muthuraj, 2009)

อุณหภูมิยังเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเก็บรักษาเอนไซม์ดังภาพที่ 27 ผลการทดลองพบว่าเก็บสารละลายเอนไซม์โปรติเอสไว้ที่อุณหภูมิ 10 และ -20 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกับค่าเริ่มต้น แต่สารละลายเอนไซม์โปรติเอสที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส) มีค่ากิจกรรมลดลงถึง 72% เมื่อเก็บรักษานาน 6 เดือนสอดคล้องกับการทดลองของ Sarker และคณะ (2013) พบว่าเอนไซม์ที่ถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลง 66% แต่เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องค่ากิจกรรมลดลงเหลือเพียง 46% ดังนั้นการเก็บรักษาเอนไซม์ให้มีความคงที่สูงนั้นจึงไม่ควรถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพราะทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ (Paul *et al.*, 2007; Dep *et al.*, 2013) นอกจากนี้ อุณหภูมิที่ส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์แล้ว ยังมีไอออนโลหะบางชนิดที่สามารถช่วยให้เอนไซม์รักษาความเสถียรมากขึ้นอีกด้วย (Beg and Gupta, 2003; Padma and Ananthanarayan, 2008)



ภาพที่ 26 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยวิธี Tukey's Range Test



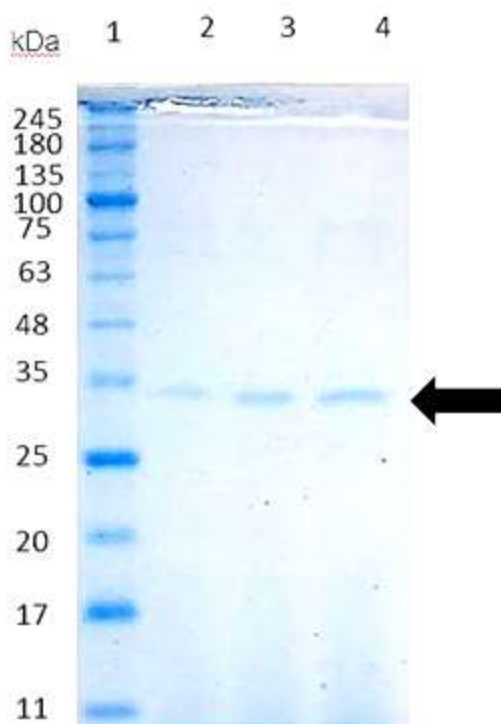
ภาพที่ 27 ระยะเวลาการเก็บรักษาเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์

7 ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำตัวอย่างสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 188.7 ± 1.4 ยูนิท/มิลลิลิตร มาแยกโปรตีนตามขนาดมวลโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE และเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์โปรติเอสในการศึกษาครั้งนี้ มีขนาดโมเลกุลประมาณ 33 kDa และปรากฏเพียงแคแถบเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 28) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Keppanan และคณะ (2017) ที่พบว่าโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 30 - 40 kDa ซึ่งในกลุ่มนี้เอนไซม์โปรติเอสมีขนาด 32 kDa ถูกผลิตขึ้นมาในความเข้มข้นที่สูงและรวดเร็วกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ Li และคณะ (2006) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Clonostachys rosea* มีขนาด 33 kDa อีกทั้ง Lopez-Lloca และ Robertson (1992), Segers และคณะ (1994) และ Bonants และคณะ (1995) ก็เคยรายงานว่ามีโปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Pochonia chlamydosporium* และ *Paecilomyces lilacinus* มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 32 - 33 kDa เช่นกัน ซึ่ง Fernandez-Lahore และคณะ (1998) ได้สรุปไว้ว่าเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อราสร้างขึ้นส่วนใหญ่ จะมีขนาดโมเลกุลระหว่าง 32 - 34 kDa

นอกจากเอนไซม์โปรติเอสแล้ว เอนไซม์อื่น ๆ ที่เชื้อรา *Metarhizium* spp. และราแมลงอื่น ๆ มักสร้างขึ้นเพื่อทำลายแมลงและไส้เดือนฝอย ได้แก่ เอนไซม์ไคติเนส และสาร

destruxins ก็สามารรถตรวจสอบได้ด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งมีขนาดโมเลกุลต่างจากเอนไซม์โปรติเอส นั่นคือเอนไซม์โคติเนสมีขนาดระหว่าง 40 - 60 kDa (Kang *et al.*, 1999; Baratto *et al.*, 2003) และสารพิษ destruxins มีขนาดเพียง 22 kDa (Strasser *et al.*, 2000) ตามลำดับ

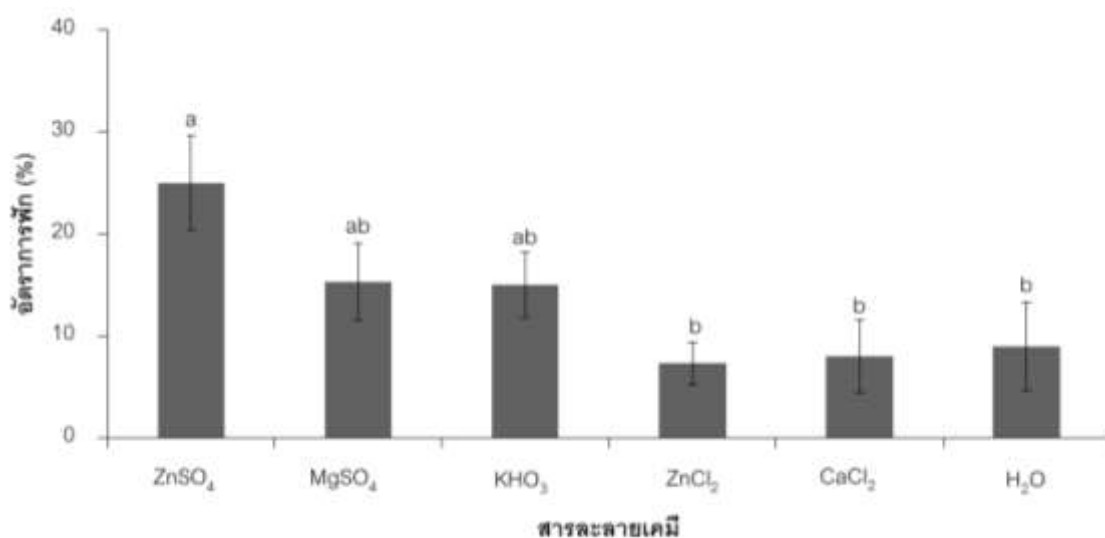


ภาพที่ 28 การวิเคราะห์ขนาดโปรตีนในสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบจากเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยหมายเลข 1 คือ โปรตีนมาตรฐาน หมายเลข 2 - 4 คือ เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบปริมาตร 5, 10 และ 15 ไมโครลิตร ตามลำดับ มีขนาด 33 kDa (ลูกศรสีดำ)

8 สารละลายเคมีที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการพักไข่ไข่เดือนฝอยรากปม

จากการทดสอบสารละลายเคมีต่อการกระตุ้นการพักไข่ไข่เดือนฝอยรากปม พบว่าสารละลาย $ZnSO_4$ ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการพักไข่ไข่เดือนฝอยรากปมได้ดีกว่าในชุดควบคุม (น้ำกลั่น) โดยให้อัตราการพักไข่ถึง $25.0 \pm 4.6\%$ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่น 95% กับสารละลาย $MgSO_4$ และ KNO_3 ซึ่งมีอัตราการพักไข่ 15.3 ± 3.8 และ $15.0 \pm 3.2\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 29) จากผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Behm และคณะ (1995) พบว่าสารละลาย $ZnSO_4$ สามารถ

กระตุ้นการพักไข่ของไส้เดือนฝอย *Heterodera glycines* ได้ดีกว่าในน้ำกลั่น ซึ่งให้เห็นว่า สารละลาย $ZnSO_4$ มีผลต่อการพักไข่ไส้เดือนฝอยรากปมต่างจากการพักไข่ตามธรรมชาติ เนื่องจากทำให้องค์ประกอบของเปลือกไข่ถูกทำลายส่งผลให้ไส้เดือนฝอยแทงตัวออกมาจากไข่ได้ง่ายขึ้น (Ogunfowora and Evans, 1976) ทั้งนี้ประสิทธิภาพการพักไข่ไส้เดือนฝอยไม่ได้มีเพียงแต่ สารละลายเคมีแต่ยังมีกับปัจจัยอื่น ๆ ที่สามารถกระตุ้นการพักไข่ไส้เดือนฝอยได้ดีขึ้น เช่น ความเข้มข้นของสาร อุณหภูมิ ระยะเวลา เป็นต้น (Clark and Shepherd, 1966; Wallace, 1966; Thompson and Tylka, 1997) นอกจากนี้สารละลายเคมีต่าง ๆ แล้ว ยังมีการรายงานของ Inserra และคณะ (1983) พบว่าสารที่พืชหลั่งออกจากรากสามารถกระตุ้นการพักไข่ของไส้เดือนฝอยได้ดีกว่าน้ำกลั่น แต่ให้ผลไม่ดีเท่าสารละลาย $ZnSO_4$ (Levene *et al*, 1998) และยังมีรายงานถึง สารเคมีกำจัดไส้เดือนฝอยศัตรูพืช เช่น aldicarb และ carbofuran ที่ความเข้มข้นน้อยสามารถกระตุ้นการพักไข่ของไส้เดือนฝอยได้ แต่ยับยั้งการพักไข่ได้ที่ความเข้มข้นสูง (Hough and Thomason, 1975)



ภาพที่ 29 อัตราการพักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมเมื่อกระตุ้นด้วยสารเคมีที่ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ บ่ม 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน

*ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยวิธี Tukey's Range Test

9 ผลของประสิทธิภาพสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ และสปอร์เชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ต่ออัตราการพักของไส้เดือนฝอยรากปม

เมื่อใช้สารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 พบว่ายับยั้งการพักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ 100% (อัตราการพักไข่เท่ากับ 0%) หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง ส่วนกรรมวิธีอื่นทั้งการใช้สปอร์ของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 สารฟิโพรนิล และเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบเพียงอย่างเดียว มีอัตราการพักไข่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึง 168 ชั่วโมง มีอัตราการพักไข่ 19.3 ± 15.6 , 23.1 ± 2.7 และ $27.0 \pm 2.8\%$ ตามลำดับ ต่างจากชุดควบคุม (น้ำกลั่น) และบัพเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์ (KPB) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติความเชื่อมั่น 95% โดยทั้ง 2 กรรมวิธี มีอัตราการพักไข่เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ถึง 48.2 ± 4.0 และ $49.2 \pm 0.5\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และเมื่อนำไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่แช่ในสารละลายแต่ละกรรมวิธีนาน 24 ชั่วโมง มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่แช่ในสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบร่วมกับสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 เกิดความเสียหายมากที่สุด โดยมีลักษณะเหี่ยวยุบและลีบแบน ซึ่งส่งผลทำให้อัตราการพักไข่เท่ากับ 0% ดังที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนกรรมวิธีที่ใช้สารฟิโพรนิล สารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ และสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 เกิดความเปลี่ยนแปลงที่เปลือกไข่แตกต่างจากไข่ไส้เดือนฝอยในชุดควบคุม และการใช้ KPB (ภาพที่ 30)

เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราเป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญในการย่อยผนังเปลือกไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมส่งผลต่อการแบ่งเซลล์ และการพัฒนาตัวอ่อนภายในไข่ให้ผิดปกติ (Tikhonov *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2004) โดย Tikhonov และคณะ (2002) รายงานว่าพื้นผิวของเปลือกไข่ไส้เดือนฝอย *Globodera pallida* ถูกทำลายด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Pochonia chlamydosporium* ซึ่งหนึ่งในเอนไซม์นั้นคือโปรติเอส และ Nguyen และคณะ (2007) พบว่าเอนไซม์สกัดหยาบจากเชื้อรา *Lecanicillium antillanum* ทำให้ผนังเปลือกไข่ชั้นในสุดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ถูกย่อยสลาย อากาศแทรกเข้าไปจนเห็นฟองอากาศและยับยั้งการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 (Perry and Trett, 1986; Mercer *et al.*, 1992) เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้ (ภาพที่ 31)

ในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 งอกเส้นใยแล้วเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยที่อยู่ในระยะแบ่งเซลล์เท่านั้น (ภาพที่ 32) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jatala และคณะ (1979) ที่รายงานไว้ว่าเชื้อรา *P. lilacinus* สามารถเข้าทำลายไข่

ระยะอ่อน (embryo) ได้สูงถึง 80 – 90% โดยเส้นใยเชื้อราเจริญแทงผ่านเปลือกไข่ได้เดือนฝอยรากปมส่งผลให้ชั้นในสุดของเปลือกไข่ที่เป็นชั้นไขมันถูกทำลายและเป็นแหล่งอาหารให้กับเชื้อราใช้ในการเจริญ แต่เมื่อไข่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงจนกลายเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 เชื้อราไม่สามารถแทงเส้นใยทะลุผ่านผนังไข่ได้เดือนฝอยได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเปลือกไข่ได้เดือนฝอยรากปมแต่ละชั้นมีความหนาต่างกัน (Wharton, 1980) และเมื่ออายุระยะไข่ได้เดือนฝอยรากปมเพิ่มขึ้น ความแข็งแรงของชั้นเปลือกไข่ก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน (Blaxter and Robertson, 1998; Fanelli *et al.*, 2005) ดังนั้นอายุระยะไข่ได้เดือนฝอยมีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา ซึ่งยืนยันได้จากการทดลองของ Chen และคณะ (2009) นำเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma pseudokoningii* SMF2 มาทดสอบกับไข่ได้เดือนฝอยรากปม โดยแช่ไว้ 24 ชั่วโมง ส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อไข่ที่อยู่ในระยะแบ่งเซลล์แต่ไม่ส่งผลกับไข่ที่พัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 และยังคงสอดคล้องกับการทดลองของ สมลักษณ์ วงษ์ธานี (2556) ที่รายงานไว้ว่าเชื้อรา *Aspergillus* sp. (EM01-07), *Fusarium* sp. (EM04-09), *Penicillium* sp. (SR04-12) และ *Trichoderma* sp. (SR03-03) มีศักยภาพในการเข้าทำลายไข่ของไข่ได้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่อยู่ในระยะแบ่งเซลล์ แต่เส้นใยเชื้อราไม่สามารถแทงเข้าไปทำลายตัวอ่อนของไข่ได้เดือนฝอยรากปมที่อยู่ภายในไข่ได้ จึงไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการฟักไข่ของไข่ได้เดือนฝอยรากปม

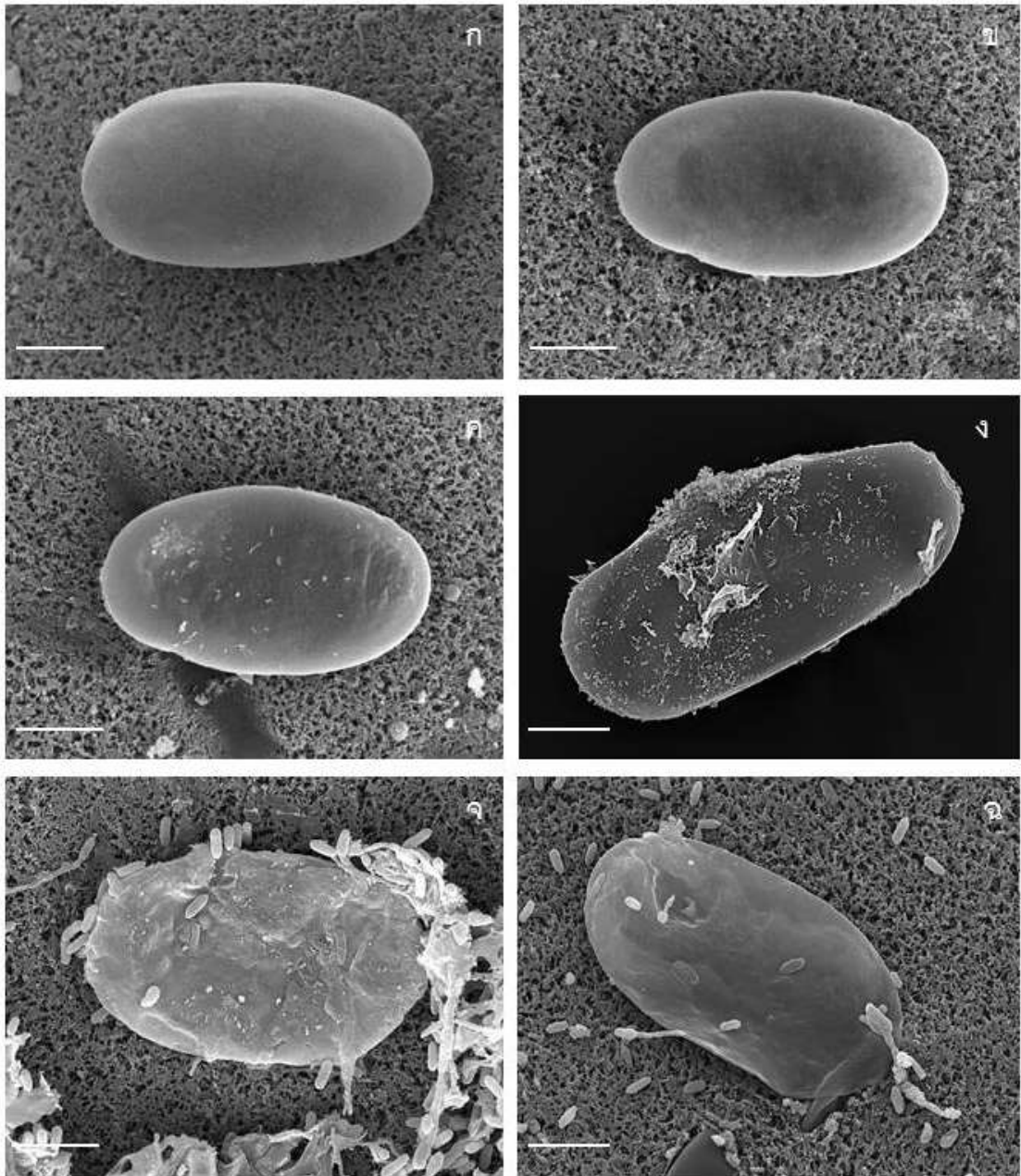
หลังจากบ่มไว้ 168 ชั่วโมง จึงนำไข่ของไข่ได้เดือนฝอยรากปมไปวัดปริมาณโปรตีนรวม พบว่าหลังจากบ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์เชื้อรา และสปอร์ของเชื้อราเพียงอย่างเดียวไม่สามารถวัดปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดจากไข่ได้เดือนฝอยได้ ทั้งนี้คาดว่าเป็นผลมาจากเอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของไข่ ซึ่งจากการวิจัยของ Tikhonov และคณะ (2002) พบว่าโปรตีนของเปลือกไข่ได้เดือนฝอยรากปมถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *Verticillium suchlasporium* ทำให้ความหนาของชั้นโปรตีนไข่ได้เดือนฝอยบางลง ดังนั้นเอนไซม์โปรติเอสจึงทำให้ปริมาณโปรตีนไข่ของไข่ได้เดือนฝอยรากปมลดลงอย่างมากจนไม่สามารถวัดค่าได้ แตกต่างจากวิธีการบ่มด้วยน้ำกลั่น KPB และฟิโบรินัล ที่พบว่าปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดได้จากไข่เท่ากับ $13.3 \pm 5.8 \times 10^{-3}$, $12.0 \pm 6.2 \times 10^{-3}$ และ $12.3 \pm 4.8 \times 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 อัตราการฟักไข่ (%) ของไข่เดือนฝอยรากปมในห้องปฏิบัติการ

กรรมวิธี	เวลา (ชั่วโมง)		อัตราการฟักไข่ของไข่เดือนฝอยรากปม (%) ^{**}				
	24	48	72	96	120	144	168
ชุดควบคุม (นำกลั่นฆ่าเชื้อ)	1.6±1.5a	7.7±2.2ab	17.0± 2.3b	23.8±1.4c	32.3±1.6d	40.3± 3.7c	48.2± 4.0c
โพแทสเซียมฟอสเฟตเฟลพเฟอร์	3.1±0.8a	7.2±1.5ab	11.9±3.1b	20.2±2.5bc	28.6±1.7cd	36.8±2.2bc	49.2±0.5c
สารฟิโพรนิล	2.3±1.3a	5.0±2.4ab	8.2±4.3ab	12.0±4.4b	15.1±0.7b	20.5±4.0bc	23.1±2.7b
เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ	4.9±1.8a	9.3±1.5b	11.3±3.9b	15.5±2.4bc	18.6±1.7bc	23.0±4.9bc	27.0± 2.8b
เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ + สปอร์ของเชื้อรา	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a	0.0±0.0a
สปอร์ของเชื้อรา	4.3±3.9a	7.3±4.6ab	10.3±5.7b	13.3±8.6bc	15.5±10.8b	18.7±15.8b	19.3±15.6b

*ค่าเฉลี่ย (5ซ้ำ) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

**ตัวอักษรที่เหมือนกันภายในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's Range Test



ภาพที่ 30 ลักษณะของไข่ได้เดือนฝอยรากปมหลังจากทดสอบด้วยสารในแต่ละกรรมวิธีที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM); ชุดควบคุม (น้ำกลั่น) (ก), โพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต (ข), สารฟิโพรนิล (ค), เอนไซม์โปรตีเอสสกัดหยาบ (ง), เอนไซม์โปรตีเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์ของเชื้อรา (จ) และสปอร์ของเชื้อรา (ฉ) (bar = 20 μ m)



ภาพที่ 31 ลักษณะไข่ไข่เดือนฝอยรากปมหลังจากบ่มที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง; ในน้ำกลั่น (ก) และ เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ (ข) (bar = 20 μ m)



ภาพที่ 32 ไข่ไข่เดือนฝอยรากปมที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 (ลูกศรสีดำ) ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 ปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดได้จากไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมหลังจากบ่มด้วยสารละลายที่ต่างกันนาน 168 ชั่วโมง

กรรมวิธี	ปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด ($\mu\text{g/ml}$)*
ชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	$13.3 \pm 5.8 \times 10^{-3}$
โพแทสเซียมฟอสเฟตเฟสบัฟเฟอร์	$12.0 \pm 6.2 \times 10^{-3}$
สารฟิโพรนิล	$12.3 \pm 4.8 \times 10^{-3}$
เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ	nd**
เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ + สปอร์ของเชื้อรา	nd**
สปอร์ของเชื้อรา	nd**

*ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนรวม \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (3 ซ้ำ)

**nd คือ ไม่สามารถวัดค่าได้

10 ประสิทธิภาพของสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ และสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ต่ออัตราการตายของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2

เมื่อใช้เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ทำให้ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมมีอัตราการตาย $49.7 \pm 6.8\%$ หลังจากการทดสอบ 24 ชั่วโมง และมีอัตราการตาย 100% ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างกับกรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% และหลังจากที่บ่มไว้นาน 168 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ใช้เอนไซม์สกัดหยาบเพียงอย่างเดียวและการใช้สารฟิโพรนิลมีอัตราการตายของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 ไม่แตกต่างกัน โดยมีอัตราการตายสูงถึง 79.9 ± 6.2 และ $74.5 \pm 3.8\%$ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ใช้ KPB การใช้สปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 เพียงอย่างเดียว และชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ทำให้ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 มีอัตราการตายเพียง 6.1 ± 0.4 , 3.2 ± 0.8 และ $1.7 \pm 0.0\%$ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 อัตราการตาย (%) ของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไข่เดือนฝอยรากปมในห้องปฏิบัติการ

กรรมวิธี	เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการตายของไข่เดือนฝอยระยะที่ 2 (%) ^{***}						
		24	48	72	96	120	144	168
ชุดควบคุม (นำกลั่นฆ่าเชื้อ)		1.0±0.9b	1.0±0.9d	1.6±0.1d	1.6±0.1d	1.6±0.1c	1.6±0.1c	1.7±0.0c
โพแทสเซียมฟอสเฟตฟอสฟอรัส		0.9±0.5b	3.2±0.9d	3.9±2.1d	4.2±1.7d	6.0±0.9c	6.1±0.4c	6.1±0.4c
สารฟิโพรนิล		7.6±3.1b	13.4±5.8c	33.0±7.7b	52.1±7.0b	54.8±7.8b	64.8±6.6b	74.5±3.8b
เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ		4.9±3.5b	20.1±2.3b	23.5±1.9c	27.7±0.6c	50.9±5.0b	61.8±4.2b	79.9±6.2b
เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ + สปอร์ของเชื้อรา		49.7±6.8a	100.00±0a	100.0±0.0a	100.0±0.0a	100.0±0.0a	100.0±0.0a	100.0±0.0a
สปอร์ของเชื้อรา		0.0±0.0b	0.1±0.0d	1.7±1.2d	3.2±0.8d	3.2±0.8c	3.2±0.8c	3.2±0.8c

*ค่าเฉลี่ย (5ซ้ำ) ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

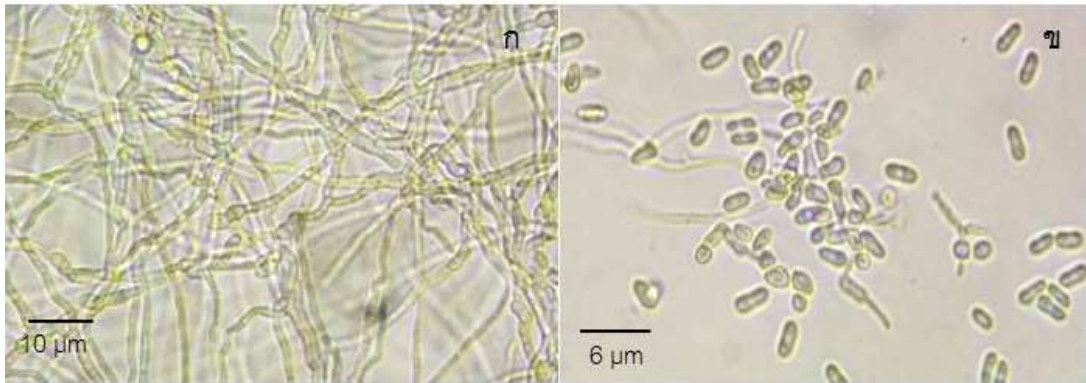
**ตัวอักษรที่เหมือนกันภายในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's Range Test

จากการทดสอบในครั้งนี้อย่างพบว่าเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบสามารถกระตุ้นให้สปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 งอกเส้นใยได้มากกว่าสปอร์เชื้อราที่อยู่ในน้ำ (ภาพที่ 33) ทำให้ประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปมเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสปอร์เชื้อราได้รับสารอาหารที่ปะปนอยู่ในสารละลายเอนไซม์ (Ji *et al.*, 2008)

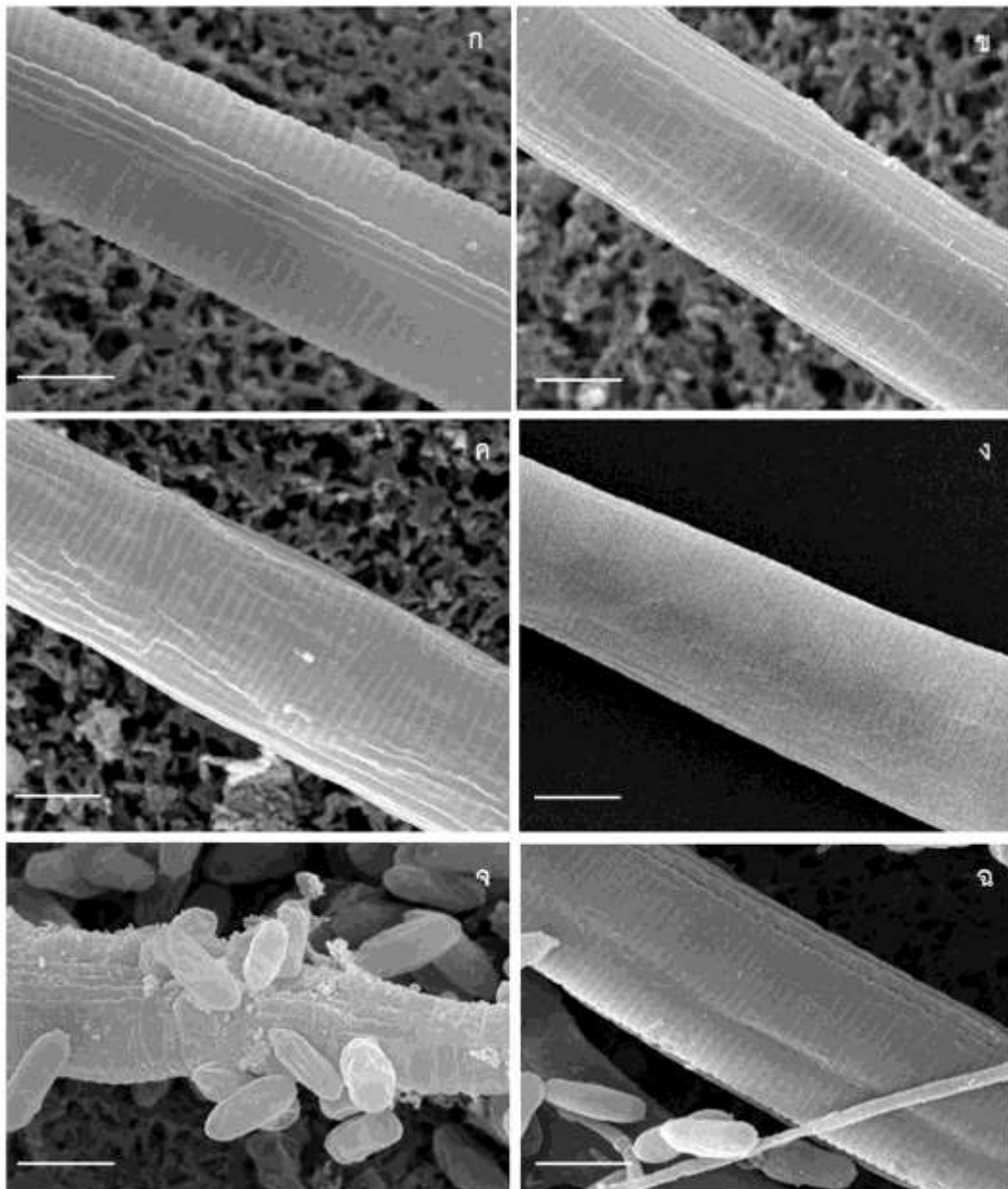
เมื่อนำตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมที่แช่ในสารละลายแต่ละกรรมวิธีนาน 24 ชั่วโมง มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 ทำให้ผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมถูกย่อยจนกลายเป็นบาดแผลอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งส่งผลทำให้มีอัตราการตายสูงดังที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนกรรมวิธีที่ใช้ KPB สารพิโปรนิล สารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ และสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 มีลักษณะผนังลำตัวปกติซึ่งไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (ภาพที่ 34)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่เชื้อราสร้างออกมาจึงมีบทบาทสำคัญต่อการเข้าทำลายผนังเซลล์ของไส้เดือนฝอยรากปม (Balaji *et al.*, 2002; Beg and Gupta, 2003; Lian *et al.*, 2007) เนื่องจากผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยรากปมส่วนใหญ่มีองค์ประกอบเป็นโปรตีน และไคตินเป็นหลัก (Peteira-Delgado and Hidalgo-Diaz, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ เช่น Wang และคณะ (2009) รายงานไว้ว่าเอนไซม์โปรติเอสสามารถยับยั้งตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย *Heterodera glycine* เช่นเดียวกับเอนไซม์โปรติเอสที่แยกได้จากเชื้อรา *Arthrobotrys oligospora* (Minglian *et al.*, 2004) Meyer และคณะ (2000) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrates) ที่ได้จากเชื้อรา *Trichoderma virens* G1-3 สามารถยับยั้งตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ และการทดลองของ รัตติกาล และคณะ (2554) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* PR87 ที่เลี้ยงในอาหาร arginine glycerol mineral salt broth นาน 7 วัน สามารถยับยั้งตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ 100% ภายใน 48 ชั่วโมง โดยมีลักษณะการตายคือลำตัวเหี่ยวตกร่างภายในลำไส้โปร่งใส แต่ผนังลำตัวไม่ย่อยสลายภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้อย่าง (ภาพที่ 35) เมื่อทดสอบใช้เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 เพียงอย่างเดียวพบว่าไม่สามารถทำให้ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมตายได้เนื่องจากตัวอ่อนมีการเคลื่อนที่หาอาหาร ส่งผลให้การแทงเส้นใยของเชื้อราเป็นไปได้อย่างจึงไม่สามารถเข้าทำลายตัวอ่อนได้ (Olivares-Bernabeu *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Stirling และ Mankau (1979) ที่พบว่าเชื้อรา *Dactylella oviparasitica* ไม่สามารถเข้าทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม

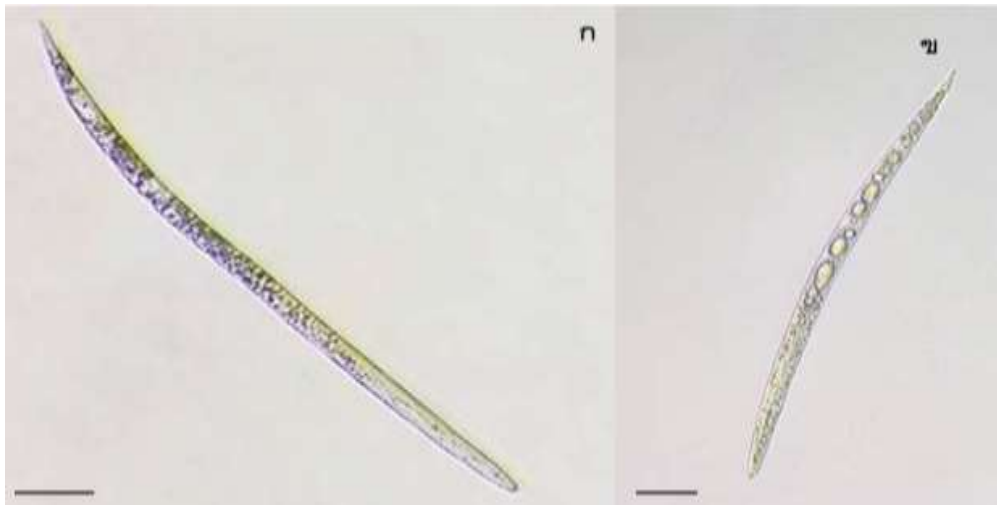
M. incognita และจากการทดลองของ อภรณ์ และคณะ (2560) ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไม่สามารถยับยั้งตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมได้เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 33 ลักษณะการงอกเส้นใยของสปอร์เชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02; สารละลาย เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ (ก) และน้ำกลั่น (ข)



ภาพที่ 34 ลักษณะผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมหลังจากแช่สารละลายต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM); ชุดควบคุม (น้ำกลั่น) (ก), โพลีเอทิลีนฟอสเฟต (ข), สารฟิโบริน (ค), เอนไซม์โปรตีเอสสกัดหยาบ (ง), เอนไซม์โปรตีเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์ของเชื้อรา (จ) และสปอร์ของเชื้อรา (ฉ) (bar = 5 μ m)



ภาพที่ 35 ลักษณะการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม; น้ำกลั่น (ก) และ เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ (ข) (bar = 50 μ m)

หลังจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยถูกแช่ในสารละลายของกรรมวิธีต่าง ๆ นาน 168 ชั่วโมง จึงนำไปวัดปริมาณโปรตีนรวมพบว่าหลังจากบ่มด้วยเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์เชื้อรา และสปอร์ของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถวัดปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดได้จากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยได้ ซึ่งปริมาณโปรตีนที่หายไปนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของตัวอ่อนไส้เดือนฝอย (Stirling; 1991; Khan *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2004) จึงทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงอย่างมากจนไม่สามารถวัดค่าได้ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ปริมาณโปรตีนรวมที่สกัดได้จากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมหลังจากบ่มด้วยสารละลายต่างกันนาน 168 ชั่วโมง

กรรมวิธี	ปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมด (μ g/ml)*
ชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	$11.4 \pm 4.9 \times 10^{-3}$
โพแทสเซียมฟอสเฟตเฟสฟเฟอร์	$11.4 \pm 4.4 \times 10^{-3}$
สารฟิโพรนิล	$10.1 \pm 3.2 \times 10^{-3}$
เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ	nd**
เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ + สปอร์ของเชื้อรา	nd**
สปอร์ของเชื้อรา	nd**

*ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนรวม \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (3 ซ้ำ)

**nd คือ ไม่สามารถวัดค่าได้

บทที่ 4

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM02 ภายใต้การเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ได้แก่ รำข้าวสาลี เพปโตน อัตราส่วนระหว่างของแข็งกับของเหลวคือ 1:3 ปริมาณเพปโตนอย่างน้อย 2.5% (w/v) ค่า pH ระหว่าง 5.0 - 7.0 บ่มเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 11 วัน ทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูง ซึ่งการใช้เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบร่วมกับสปอร์ของเชื้อรา *M. guizhouense* PSUM02 มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในมันขี้หนู ในสภาพห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เป็นการศึกษาที่ละปัจจัย (single factor) ซึ่งแต่ละปัจจัยอาจจะมีผลกระทบซึ่งกันและกัน และส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการทดสอบแบบหลายปัจจัย (multiple factors) เพื่อให้ทราบถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ และจึงต้องมีทดสอบในสภาพแปลงการทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กนกพรพรรณ โสมาศรี. 2544. ศักยภาพของเชื้อราในดินสำหรับการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) เชิงชีววิธีในมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2544) ตารางแสดงคุณค่าทางโภชนาการอาหารไทย (Nutritive Values of Thai Foods). กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การอาหารและยา. 136 หน้า
- จรัส ชื่นราม และอานนท์ บุญครอง. 2526. ไส้เดือนฝอยในประเทศไทย (ฉบับพิเศษ) เอกสารทางวิชาการของกลุ่มงานไส้เดือนฝอย ฉบับที่ 5. กองโรคพืช และจุลชีววิทยาม กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 136 หน้า
- จิตรานนท์ สีนประเสริฐ. 2550. การใช้เชื้อราก่อโรคกับแมลงเพื่อควบคุมไรขาวพริก *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) ในหม่อน *Morus alba* Linn. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) สาขาชีววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา. 85 หน้า
- จิระ สุวรรณประเสริฐ, สมรรถ จันทะโร และอดิศักดิ์ คำนวนศิลป์. 2535 การเปรียบเทียบมาตรฐานพันธุ์มันขี้หนู. หน้า 16 ในรายงานประจำปี 2535. สถานีทดลองพืชไร่สงขลา สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.
- จิระ สุวรรณประเสริฐ. 2536. การผลิตมันพื้นเมืองภาคใต้ : มันขี้หนูในเอกสารประกอบคำบรรยายในการฝึกอบรมหลักสูตรพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในท้องถิ่น 25-30 เมษายน 2536 ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา. 1 – 4.
- ภาวิน ทศนเสถียร. 2543. คุณสมบัติและการนำไปใช้ประโยชน์ของแป้งมันขี้หนู (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 1 – 3.
- ธนากร จันท์มาลี และวราภรณ์ ประกอบ. 2553. การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. บางไอโซเลทของไทยโดยเทคนิค PCR. ว.เกษตร 26 (ฉบับที่ 3) : 195 – 202.
- นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชินาจริยวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). ว.วิทยาศาสตร์เกษตร (ฉบับพิเศษ 39): 21 – 25.

- นริศ ท้าวจันทร์, อนุชิต ชินาจริยวงศ์ และวิวัฒน์ เสือสะอาด. 2554. ผลของเชื้อราโรคแมลง *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ต่อพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera papaya* (Diptera: Tephritidae). ว.วิทยาศาสตร์เกษตร (ฉบับพิเศษ 42): 339 – 342.
- ประชา ลีประเสริฐ. 2515. การศึกษาอนุกรมวิธาน และพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปมจากข้าวฝ่าง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- ภรณ์ สว่างศรี. 2543. การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในแมลงที่ดักจับจากหญ้าแพรงเป็นโรคใบขาว. วิชาปัญหาพิเศษ หลักสูตรปริญญาตรีเกษตรศาสตร์ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ภาวดี ศรีลาศักดิ์, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และศิริวัลย์ สิริมังครารัตน์. 2556. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราต่อกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* Chitwood และกิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลาย. ว.แก่นเกษตร 41 (ฉบับพิเศษ1): 226 – 231.
- มนตรี เอี่ยมวิม้งสา, สิริชัย สาธุวิจารณ์, ยุทธนา แสงโชติ และไตรเดช ช่ายทอง. 2554. วิธีการที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยศัตรูมันขี้หนู. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 499 – 501.
- ฤทธิไกร จันทะบุตร, อนันต์ หิรัญสาลี และวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2554. การใช้เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม. ว.แก่นเกษตร 39 (ฉบับพิเศษ) : 439 – 443.
- รัตติกาล ยุทธศิลป์, เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และอนันต์ หิรัญสาลี. 2556. ศักยภาพของเชื้อ *Streptomyces-PR87* ปฏิปักษ์ และวิธีการใช้สำหรับควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง. ว. แก่นเกษตร 41 (ฉบับพิเศษ): 213 - 219.
- สฤษฎ์ ขวัญเกื้อ และปัญญา ชินศิริ. 2557. การใช้วิธีทางชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายมันสำปะหลังในอำเภอ ด่านขุนทด จังหวัดนครราชสีมา. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการเกษตรของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 สาขาพืช, กรุงเทพฯ : 278 – 283.
- สมลักษณ์ วงษ์ธานี. 2556. เชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยในเขตภาคใต้ของประเทศไทยและประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood) ของพริก (*Capsicum* spp.) โดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์, สมชาย สขะกุล และ สกุกิจ สุขุใจมิตร. 2530. ไล่เดือนฝอยรากปมชนิดใหม่ของ ประเทศไทย. วารสารโรคพืช 7: 99 – 102.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2541. ไล่เดือนฝอยศัตรูพืชโรคและการจัดการ. สำนักพิมพ์วีวีซีเอ, กรุงเทพฯ.
- สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ และสุภิญญา ต้วตระกูล. 2548. องค์ประกอบเคมีในน้ำมันหอมระเหยและฤทธิ์ทางชีวภาพของใบมันขี้หนู (*Coleus parvifolius*). ว.สงขลานครินทร์ วทท. 27 (ฉบับพิเศษ2): 497 – 502.
- สุภัทรรช ทับศรี, คณิต วิชิตพันธ์ และสุกานดา วิชิตพันธ์. 2559. การศึกษาคุณสมบัติของไคตินเนสและโปรตีนเอสที่ผลิตจากราที่มีศักยภาพในการทำลายเปลือกแมลงสาบปะหลังสีชมพู (*Phenacoccus manihoti*). การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษาระดับชาติและนานาชาติ 2559 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 381- 391.
- สุรศักดิ์ แสนโคตร, อนันต์ หิรัญสาลี และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2554. การจัดจำแนกชนิด (species) และเรซ (race) ของไล่เดือนฝอยรากปมในพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาพืชจำเพาะ. ว.แก่นเกษตร 39 (ฉบับพิเศษ) : 213 – 218.
- อรุณ จันทนโอ. 2505. รายงานการสำรวจไล่เดือนฝอยศัตรูข้าวและชนิดอื่นบางชนิดในประเทศไทย. แผนกกีฏวิทยาและโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 15 หน้า
- อาภรณ์ ปั่นทองคำ, อนงค์นุช สาสนรักกิจ และอรอุมา เพี้ยซ้าย. 2560. ศักยภาพของราก่อโรคแมลง *Beauveria bassiana* และรา *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 55 สาขาพืช, กรุงเทพฯ: 165 - 171.
- อิทธิเดช พิริยะนิต, ศิวาลัย สิริมังกรรัตน์, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ หทัยรัตน์ อุไรวงศ์ และเบญจมาศ แก้วรัตน์. 2553. การควบคุมการแพร่ระบาดของตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ด้วยเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. และการโคลนยีนโปรตีนเอส (pr 1). ว. วิจัย มข. 15: 610 – 621.
- เอกรินทร์ ช่วยชู. 2553. ใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดป้องกันกำจัดโรคเน่าเปื่อยในมันขี้หนู [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://www.thaigreenagro.com/aticle.aspx?id=6593>. (10 มกราคม 2559)

- เอมอร เพชรทอง, อัจฉรา จิตตลดากร และอัจฉรา โพธิ์ดี. 2557. ผลของปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต ต้นทุนและผลตอบแทนของมันขี้หนูพันธุ์ควนเนียง 1. การจัดการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 4. 1 – 14.
- Agrawal, D., Patidar, P., Banerjee, T. and Patil, S. 2005. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria feline* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Biochem.* 40: 1131 – 1136.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press. 922 pp.
- Alagarsamy, S., Paul, D., Chandran, S., George, S. and Carlos, R. 2006. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49: 843 – 851.
- Ali, S.S. and Vidhale, N.N. 2013. Protease production by *Fusarium oxysporum* in solid-state fermentation using rice bran. *Am. J. Microbiol. Res.* 1: 45 – 47.
- Ali, S.S., Huang, Z., Qezang, W. and Ren, S.X. 2011. Production and regulation of extracellular protease from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the presence of diamondback moth cuticle. *Pakistan J. Zool.* 43: 1203 – 1213.
- Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79 – 89.
- Aydınlı, G. and Mennan, S. 2012. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from greenhouses in the Middle Black Sea Region of Turkey. *Turk. J. Zool.* 40: 675 – 685.
- Baicheva, O., Salkova, D. and Palazova, G. 2002. Root – knot nematode (*Meloidogyne goeldi*, 1887) species composition, pathogenicity and some problems for investigation. *Exp. Pathol. Parasitol.* 5: 21 – 24.
- Bakri, Y., Janhar, M. and Eddin Arabi, M.I. 2013. Xylanase production by *Fusarium solani* in solid state fermentation. *Research in Biotechnol.* 4:31 – 37.

- Balaji, V., Jesudason, M.V., Sricharan, G. and Subramanian, K. 2002. Detection of virulence attributes of *Burkholderia pseudomallei*. Indian J. Med. Res. 119 : 101 – 106.
- Baratto, C.M., Silva, M.V., Santi, L., Passaglia, L.M.P., Schrank, I.S., Vainstein, M.H. and Schrank, A. 2003. Expression and characterization of the 42 kDa chitinase from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* in *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 49: 723 – 726.
- Beg, Q.K. and Gupta, R. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. Enz. Microbiol. Technol. 32: 294 – 304.
- Behm, J.E., Tylka, G.L., Niblack, T.L., Wiebold, w.j. and Donald, P.A. 1995. Effects of zinc fertilization of corn on hatching of *Heterodera glycines* in soil. J. Nematol. 27: 164 – 171.
- Belcher, J.V. and Hussey, R.S. 1977. Influence of *Tagetes patula* and *Arachis hypogaea* on *Meloidogyne incognita*. Plant Dis. Rep. 61: 525 – 528.
- Bhanu Prakash, G.V.S. and Padmaja, V. 2012. Substrate effects and abiotic factors influencing protease enzyme production in the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. African J. Biotech.
- Bhunja, B., Dutta, D. and Chaudhuri, S. 2010. Selection of suitable carbon, nitrogen and sulphate source for the production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042. Not. Sci. Biol. 2: 56 – 59.
- Blaxter, M.L. and Robertson, W.M. 1998. The cuticle. In: Perry RN, Wright DJ (eds) The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. CABI, Wallingford, UK, 25 – 48.
- Bonants, P.J.M., Fitters, P.F.L., Thijs, H., Den Belder, B., Waalwijk, C. and Henfling, J.W.D.M. 1995. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. Microbiology (UK) 141: 775 – 784.

- Boucias, D.G. and Pendland, J.C. 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers: Massachusetts. 537 p.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 – 254.
- Chen, L.L., Liu, L.J., Shi, M., Song, X.Y., Zheng, C.Y., Chen, X.L. and Zhang, Y.U. 2009. Characterization and gene cloning of novel serine protease with nematicidal activity from *Trichoderma pseudokoningii* SMF2. *FEMS Microbiol. Lett.* 299: 135 – 142.
- Chitwood, B.G., 1949. Root-knot nematodes; a revision of the genus *Meloidogyne*, Goeldi 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 16, 90 – 103.
- Chu, M.I., Lee, C. and Li, S.T., 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Environ. Microbiol. Technol.* 14: 755 – 761.
- Clarke, A. J. and Shepherd, A. M. 1966. Inorganic ions and the hatching of *Heterodera* spp. *Ann. Appl. Biol.* 58: 497 – 508.
- Clarkson, J.M. and Charnley, A.K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.* 4: 197 – 203.
- Cliff, G.M. and Hirschman, H. 1984. *Meloidogyne microcephala* n. sp. (*Meloidogyne nidae*) a root-knot nematode from Thailand. *J. Nematol.* 16: 183 – 193.
- Coyne, D.L. and Ross, J.L. 2014. Protocol for Nematode Resistance Screening : Root – Knot Nematode, *Meloidoyge* spp. International Institute of Tropical Agriculture (IITA). Ibadan, Nigeria. 27 p.
- Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay- casein as a substrate. *J. Vis. Exp.* 19: 899.
- Deb, P., Talukdar, S.A., Mohsina, K., Sarker, P.K. and AbuSayem, S.M. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Plus* 2: 154 – 163.

- Divaker, G., Sunitha, M., Vasu, P., Udayshanker, P. and Elliah, P. 2006. Optimization of process parameters for alkaline protease production under solid state fermentation by *Thermoactinomyces thalpophilus* PEE 14. Indian J. Biotechnol. 5: 80 – 83.
- Dobinson, K.F., Lecomte, N. and Lazarovits, G. 1997. Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. Can. J. Microbiol. 43: 227 – 233.
- Dunaevsky, T.E., Gruban, T.N., Beliakova, G.A. and Belozersky, M.A. 2000. Enzymes secreted by filamentous fungi: regulation of secretion and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum*. Biochem. 65: 723 – 727.
- Dropkin, V.H. 1980. Introduction to plant nematology. New York, Wiley. 293 p.
- Eapen, S.J., Beena, B. and Ramana, K.V. 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. J. Invertebr. Pathol. 88: 218 – 225.
- Eisenback, J.D. 1985. Diagnostic characters useful in identification of the four most common species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). pp. 95-112 In: J.N. Sasser and C.C. Carter (Eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Vol. 1: Biology and Control. North Carolina State University and U.S. Agency for International Development, Raleigh, North Carolina.
- Eisenback, J.D. and Triantaphyllou, H.H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* species and races. pp. 191 – 274. In: W.R. Nickle (Ed). Manual of Agriculture Nematology. New York Marcel Dekker, Inc.
- Eisenback, J.D., Hirschmann, H., Sasser, J.N. and Triantaphyllou, A.C. 1981. A more complete characterization of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) with pictorial Key. IMP publication Raleigh, N.C.U.S.A.
- Elliah, P., Srinivasulu, B. and Adinarayana, K. 2002. A review on microbial alkaline proteases. J. Sci. Ind. Res. 61: 690 – 704.

- Ellaiyah, P., Raju, K.V., Adinarayana, K., Adinarayana, G., Prabhakar, T. and Premkumar, J., 2002. Bioactive rare actinomycetes from indigenous natural substrates of Andhra Pradesh. *Hindustan Antibiot. Bull.* 44: 17 – 24.
- Faneli, E., Di Vito, M., Jones, J.T. and De Giorgi, C. 2005. Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi *Gene* 349: 87 – 95.
- Fernandez-Lahore, H.M., Fraile, E.R. and Cascone, O. 1998. Aspartic proteinase recovery from solid state fermentation system. *J. Biotechnol.* 62:83 – 93.
- Folin, O. and Ciocalteau, V.J. 1929. On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* 73: 627 – 650.
- Ghayedi, S. and Abdollahi, M. 2013. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (hypocreales : clavicipitaceae), isolated from suppressive soils of the boyer-ahmad region, iran, against J2s of *Heterodera avenae*. *J. Plant Prot. Res.* 53: 165 – 171.
- Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 15 – 32.
- Handoo, Z.A., Skantar, A.M., Carta, L.K. and Erbe, E.F. 2005. Morphological and molecular characterization of a new root-knot nematode, *Meloidogyne thailandica* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae) parasitizing ginger (*Zingiber* spp.) in Thailand. *J. Nematol.* 37: 343 – 353.
- Hallsworth, J.E. and Magan, N. 1996. Culture age, temperature and pH affect polyol and trehalose accumulation in fungal propagules. *Appl. Environ. Microb.* 62: 2435 – 2442.
- Hirschmann, H. 1985. The classification of the family Meloidogynidae. pp. 66 – 67. *In*: K.R. Barker, C.C. Carter and Sasser, J.N. (Eds). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*. Volume II: Methodology. Raleigh, North Carolina, U.S.A.
- Hough, A. and Thomason, L.J. 1975. Effects of aldicarb on the behavior of *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne javanica*. *J. Nematol.* 7: 221 – 229.

- Ikasari, L. and Mitchell, D.A. 1994. Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 320 – 324.
- Inserra, R.N., Griffin, G.D. and Sisson, D.V. 1983. Effects of temperature and root leachates on embryogenic development and hatching of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla*. *J. Nematol.* 15: 123 – 127.
- Ishwarya, S. and Sangeetha, R. 2013. A new serine protease from the leaves of *Thespesia populnea*. *Prep. Biochem Biotechnol.* 43: 95 – 107.
- Jatala, P. 1985. Biological control of nematodes. pp. 303 – 308. *In: Sasser, J.N. and Carter, C.C. (Eds.). An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol 1: Biology and Control.* NCSU Plant Pathology and USAID.
- Jatala, P., Kaltenback, R. and Bacangel, M. 1979. *Meloidogyne incognita* acrita and *Globodera pallida* on potatoes (Abstr.). *J. Nematol.* 11: 303 – 303.
- Jenitta, J.X., Priya, E.S. and Gnanadoss, J.J. 2015. Optimization of culture conditions and inducers for improved protease production by *Penicillium griseofulvum* LCJ231 under submerged fermentation. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* 6: 152 – 160.
- Jepson, S.B. 1987. Identification of Root-Knot Nematodes. CABI, Wallingford, UK, 265 p.
- Ji, F., Casper, D.P., Brown, P.K, Spangler, D.A., Haydan, K.D. and Pettigrew, J.E. 2008. Effects of dietary supplementation of an enzyme blend on the ileal and fecal digestibility of nutrients in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 86: 1533 – 1543.
- Kamath, P., Subrahmanyam, V.M., Rao, J.V. and Raj, P.V. 2010. Optimization of cultural conditions for protease production by a fungal species. *Indian J. Pharm. Sci.* 72: 161 – 166.
- Kang, S.C., Park, S. and Lee, D.G. 1999. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 267 – 271.
- Kaur, S. 2011. Effect of carbon, nitrogen and trace elements on growth and sporulation of the *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim. *J. Yeast Fungal Res.* 2: 127 – 131.

- Kaur, S., Kang, S.S., Dhillon, N.K. and Sharma, A. 2016. Detection and characterization of *Meloidogyne* species associated with pepper in Indian Punjab. *Nematropica* 46: 209 – 220.
- Keppanan, R., Sivaperumal, S., Chandra Kanta, D., Akutse, K.S. and Wang, L. 2017. Molecular docking of protease from *Metarhizium anisopliae* and their toxic effect against model insect *Galleria mellonella*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 138: 8 – 14.
- Khan, A., Williams, K.L. and Nevalainen, H.K.M. 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biol. Control.* 31: 346 – 352.
- Labbe, R., Lindsay, T. and Walker, P.M. 1987. The extent and distribution of skeletal muscle necrosis after graded periods of complete ischemia. *J. Vasc. Surg.* 6: 152 – 157.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 – 685.
- Larriba, E., Martin-Nieto, J. and Lopez-Llorca, L.V. 2012. Gene cloning, molecular modeling and phylogenetics of serine protease SCP1 from nematophagous fungi *Pochonia rubescens* and *Pochonia chlamydosporia*. *Can. J. Microbiol.* 58: 815 – 827.
- Levene, B.C., Owen, M.D.K. and Tylka, G.L. 1998. Influence of herbicide application to soybeans on soybean cyst nematode egg hatching. *J. Nematol.* 30: 347 – 352.
- Li, J., Yang, J., Huang, X. and Zhang, K.Q. 2006. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochem.* 41: 925 – 929.
- Lian L.H., Tian, B.Y., Xiong, R., Zhu, M.Z., Xu, J. and Zhang, K.Q. 2007. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode population. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 262 – 269.

- Liu, Y., Wag, Z., Yin, Y., Cao, Y., Zhao, H. and Xia, Y. 2004. Expression, purification and characterization of recombinant *Metarhizium anisopliae* acid trehalase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 54: 66 – 72.
- Lopez-Llorca, L.V. 1990. Purification and properties of extracellular proteases produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. *Can J. Microbiol.* 36: 530 – 537.
- Lopez-Llorca, L.V. and Robertson, W.M. 1992. Immunocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. *Exp. Mycol.* 16: 261 – 267.
- Lu, Z.Y., Gao, S. and Jiang, Y. 2004. Screening of solid cultural condition for *Metarhizium anisopliae*. *China J. Appl. Environ. Biol.* 10: 223 – 225.
- Maciorowski, K. G., Herrera, P., Jones, F.T., Pillai, S.D. and Ricke, S.C. 2007. Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133: 109 – 136.
- Mai, W.F. 1985. Plant-parasitic nematodes their threat to agriculture. pp. 11 – 17. *In*: Sasser, J.N., and C.C. Carter (Eds.). *An Advanced Treatise on Meloidogyne*, Vol. 1: Biology and control. North Carolina State University and U.S. Agency for International Development., Raleigh, North Carolina.
- McClure, M.A., Nischwitz, C., Skantar, A.M., Schmitt, M.E. and Subbotin, S.A. 2012. Root-knot nematodes in golf course greens of the western United States. *Plant Dis.* 96: 635 – 647.
- Meena, P., Tripathi, A.D., Srivastava, S. and Jha, A. 2013. Utilization of agroindustrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using taguchi (DOE) methodology. *Biocata. Agric. Biotech.* 2: 210 – 216.
- Mercer, C.F., Greenwood, D.R. and Grant, J.L. 1992. Effect of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* Chitwood. *Nematologica* 38: 227 – 236.

- Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E. and Da-Silva, R. 2007. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chem.* 104: 127 – 131.
- Meyer, S.L.F., Massoud, S.I., Chitwood, D.J. and Roberts, D.P. 2000. Evaluation of *Trichoderma virens* and *Bulkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 2: 871 – 879.
- Milner, R.J., Staples, J.A. and Lutton, G.G. 1997. The effect of humidity on germination and infection of termites by the hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 69: 64 – 69.
- Minglian, Z., Minghe, M. and Kegin, Z. 2004. Characterization of a neutral serine protease and its full – length cDNA from the nematode – trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycologia* 96: 16 – 22.
- Mitchell, D.A. and Lonsane, D.K. 1992 Definition, characteristics and potential. pp 1 – 16. *In: Doelle, H.W., Mitchell, D.A. and Rolz, C.E. (Eds.). Solid Substrate Cultivation.* Elsevier, Amsterdam.
- Mitkowski, N.A. and Abawi, G.S. 2003. Root-knot nematodes. [online] available from: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/nematodes/pages/rootknotnematode.aspx>. (accessed on 5 June 2016).
- Monod, M., Jaccoud, S., Zaugg, C., Le´chenne, B., Baudraz, F. and Panizzon, R. 2002. Survey of dermatophyte infections in Lausanne area (Switzerland). *Dermatology* 205: 201 – 203.
- Morton, C.O., Hirsch, P.R. and Kerry, B.R. 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi – a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* 6: 161 – 170.
- Nafi, A., Foo, H.L., Jamilah, B. and Ghazali, H.M. 2013. Properties of proteolytic enzyme from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Int. Food Res. J.* 20: 363 – 368.

- Nagamani, B., Lakshmi, M.C., Sridevi, V. and Rajani, P. 2012. Production of protease from sesame oil cake by *Penicillium chrysogenum* under solid state fermentation. Int. J. Chem. Envirol. Pharma. Res. 3: 137 – 141.
- Nahar, P., Ghormade, V. and Deshpande, M.V. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. J. Invertebr. Pathol. 85: 80 – 88.
- Nakagawa, H., Yonemura, Y., Yamamoto, H., Ogura, N. and Sato, R. 1985. Spinach nitrate reductase. Purification, molecular weight, and subunit composition. Plant Physiol. 77: 124 – 128.
- Nehra, K.S., Dhillon, S., Chaudhary, K. and Singh, R. 2002. Production of alkaline protease by *Aspergillus* species under submerged and solid state fermentation. Ind. J. Microbiol. 42: 43 – 47.
- Nguyen, N.V., Kim, Y.J., Oh, K.T., Jung, W.J. and Park, R.D. 2007. The role of chitinase from *Lecanicillium antillanum* B-3 in parasitism to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* eggs. Biocontrol. Sci. Techn. 17: 1047 – 1058.
- Ogunfowora, A.O. and Evans, A.A.F. 1976. Factors affecting the hatch of eggs of *Meloidogyne naasi*, an example of diapause in a second-stage larva. Nematol. 23: 137 – 146.
- Okada, T. 1971. The effect of root diffusate and pre-soaking temperatures and pre-soaking periods on the hatching of *Heterodera glycines* Ichinohe. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 15: 215 – 221.
- Olivares-Bernabeu, C.M. and Lopez-Lorca, L.V. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. Rev. Iberoam. Micol. 19: 104 – 110.
- Orion, D., Kritzman, G., Meyer, S., Erbe, E. and Chitwood, D. 2001. A role of the gelatinous matrix in the resistance of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) eggs to microorganisms. J. Nematol. 33: 203 – 207.

- Padma, V.I. and Ananthanarayan, L. 2008. Enzyme stability and stabilization – Aqueous and non-aqueous environment (A review). *Process Biochem.* 43: 1019 – 1032.
- Paranthaman, R., Alagasundaram, K. and Indumathi, J. 2009. Production of protease from rice mill waste by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World J. Agr. Sci.* 5: 308 – 312.
- Paul, D., Rahman, A., Ilias, M. and Hoq, M. 2007. Production and characterization of keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* MZK-03 grown on feather mill. *Bangladesh. J. Microbiol.* 24(1): 57 – 61.
- Perry, R.N. and Trett, M.W. 1986. Ultrastructure of the egg shell of *Heterodera schachtii* and *H. glycines* (Nematoda: Tylenchida). *Rev. Nématol.* 9: 399 – 403.
- Peteira-Delgado, B. and Hidalgo-Diaz, L. 2009. VCP1 protease detection in *P.Chonia chlamydosporia* var. *catenulata* strain IMI SD 187. *Revista de Protección Vegeta.* 24: 166 – 172.
- Ralet, M.C, Thibault, J.F. and Della Valle, G. 1990. Influence of extrusion cooking on the physic-chemical properties of wheat bran. *J. Cereal Sci.* 11: 249 – 259.
- Rao, M.B., Aparna, M., Tanksale, M., Ghatge, S. and Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 597 – 635.
- Ruanpanun, P. and Khun-In, A. 2015. First report of *Meloidogyne incognita* caused root knot disease of upland rice in Thailand. *ISSAAS. J.* 21: 68 – 77.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. and Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochem.* 40: 2689 – 2694.
- Sarker, P.K., Talukdar, S.A., Deb, P., Sayem, S.M.A. and Mohsina, K. 2013. Optimization and partial characterization of culture conditions for the production of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* P003. *SpringerPlus* 2: 506 – 517.

- Segers, R., Butt, T.M., Kerry, B.R. and Peberdy, J.F. 1994. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins *in situ*. *Microbiology* 140: 2715 – 2723.
- Shivakumar, S. 2012. Production and characterization of an acid protease from a local *Aspergillus* sp. by solid substrate fermentation. *Arch. Appl. Sci. Res.* 4: 188 – 199.
- Silva, O.S., Oliveira, R.L., Souza-Motta, C.M., Figueiredo Porto, A.L. and Tatiana Souza Porto, T. 2016. Novel protease from *Aspergillus tamari* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. *Sci. Res.* 4: 125 – 143.
- Singh, A., Singh, N. and Bishnoi, N.R. 2009. Production of cellulases by *Aspergillus heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation. *Int. J. Civil Environ. Eng.* 1: 23 – 26.
- Singh, S.J., Singh, L.R., Devi, S.K., Singh, S.S. and Devi, C.B. 2015. Purification and Characterization of a Thermostable Caseinolytic Serine Protease from the Latex of *Euphorbia heterophylla* L. *Protein Pept. Lett.* 22: 828 – 835.
- Sivaprakasam, S., Dhandapani, B. and Mahadevan, S. 2011. Optimization studies on production of a salt-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain BC1 and its application on tannery saline wastewater treatment. *Brazilian J. Microbiol.* 42: 1506 – 1515.
- Stanton, J., Hugall, A. and Moritz, C. 1997. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Fund. Appl. Nematol.* 20: 261 – 268.
- Sterner, O., Etzel, W., Mayer, A. and Anke, H. 1997. Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematocidal activity from *Omphalotus olearius* I. Fermentation and biological activity. *Nat. Prod. Lett.* 10: 33 – 38.
- St. Leger, R.J., Butt, T.M., Staples, R.C. and Roberts, D.W. 1989. Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.* 13: 274 – 288.

- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. 1996. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1257 – 1264.
- Stirling, G.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology* 74: 55 – 60.
- Stirling, G.R. 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects. Redwood Press Ltd., Melksham.
- Stirling, G.R. and Mankau, R. 1979. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode eggs by *Dactylella oviparasitica*. *J. Nematol.* 11: 282 – 288.
- Strasser, H., Vey, A. and Butt, T.M. 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Sci. Techn.* 10: 717 – 735.
- Sun, M.H., Gao, L., Shi, Y.X., Li, B.J. and Liu, X.Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. *J. Invertebr. Pathol.* 93: 22 – 28.
- Supinya, T., Hirotsugu, M., Norio, N., Masao, H., Takuya, K., Toru, O., Tomokazu, Y., Tamio, F., Tanomjit, S., Supreeya, Y., Pranee, R. and Sukanya D.A. 2003. HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*. *Phytother. Res.* 17: 232 – 239.
- Taylor, A.L. and Sasser, J.N. 1978. Biological Identification and Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species). North Carolina State University and U.S. Agency for International Development, Raleigh, North Carolina.
- Tefft, P. M., Rende, J.F. and Bone, L.W. 1982. Factors influencing egg hatching of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* Race 3. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 49: 258 – 265.
- Thaochan, N. and Chandrapatya, A. 2016. The phenotypic and metabolic properties of *Metarhizium guizhouense* on *Corcyra cephalonica*. *Mycosphere* 7: 214 – 225.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weight, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673 – 4680.
- Thompson, J.M. and Tylka, G.L. 1997. Differences in hatching of *Heterodera glycines* egg-mass and encysted eggs in vitro. *J. Nematol.* 29: 315 – 321.
- Thorne, G. 1961. *Principles of Nematology*. Mc.Graw-Hill Book Company, Inc, New York, Toronto, London. 533 p.
- Tikhonov, V.E., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J. and Jansson, H.B. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genet. Biol.* 35: 67 – 78.
- Tremacoldi, C.R., Watanabe, N.K. and Carmona, E.C. 2004. Production of extracellular acid proteases by *Aspergillus clavatus*. *J. microbial.* 20: 639 – 642.
- Triantaphyllou, A.C. 1979. Cytogenetics of rootknot nematodes. pp. 85-109 *In*: Lamberti, F., and C. E. Taylor (Eds.). *Root-knot Nematodes (Meloidogyne Species)*. Systematics, Biology and Control. Academic Press, New York.
- Usharani, B. and Muthuraj, M. 2009. Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. *Global J. Mol. Sci.* 4: 180 – 186.
- Uyar, F. and Baysal, Z. 2004. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. *Process Biochem.* 39: 1893 – 1898.
- Wallace, H. R. 1966. The influence of moisture stress on the development, hatch and survival of *Meloidogyne javanica*. *Nematol.* 12: 57 – 69.
- Wang, B., Liu, X.Y., Wu, W.P., Liu, X.Z. and Li, S.D. 2009. Purification, characterization, and gene cloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode-endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Microbiol. Res.* 164: 665 – 673.

- Wang, Z., Yang, W., Sun, L., Zhu, B., Li, D. and Liu, C. 2016. Characterization of a neutral protease gene of *Bacillus subtilis* isolated from the guts of *Bombyx mori*. Pakistan J. Zool. 48: 179 – 185.
- Wiriya, J., Kavinlertvatana, P. and Lumyong, S. 2014. Effects of different culture media, carbon and nitrogen sources and solid substrates on growth of Termitomyces Mushrooms. Chiang Mai J. Sci. 43: 542 – 556.
- Wharton, D.A. 1980. Nematode eggshells. Parasitology 81: 447 – 463.
- Wharton, D.A. 1986. A Functional Biology of Nematodes. Croom Helm, London. 192 p.
- Whitehead, A.G. and Hemming, J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Ann. Appl. Biol. 55: 25 – 38.
- Yang, B. and Eisenback, J.D. 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China. J. Nematol. 15: 381 – 391.
- Ye, W., Zeng, Y. and Kerns, J. 2015. Molecular characterisation and diagnosis of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from turfgrasses in North Carolina, USA. PLoS ONE 10: e0143556. doi: 10.1371/journal.pone.0143556.
- Yeoman, K.N. and Edwards, C. 1994. Protease production by *Streptomyces thermovulgaris* grown on rapemeal-derived media. J. Appl. Bacteriol. 77: 264 – 270.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นายอภิวิชญ์ ทองแก้วยวน	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5810620041	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2558

ทุนการศึกษา

- ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสนับสนุนจากสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และ ทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ระยะเวลา 2

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

อภิวิชญ์ ทองแก้วยวน และธนัญชนก ไชยรินทร์. 2559. การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง. ว.แก่นเกษตร 44 (ฉบับพิเศษ1): 924 – 929.

อภิวิชญ์ ทองแก้วยวน, ณิชชา ฝาและ, วนัสนันท์ ลิ้มสุวรรณมณี, เอกพัชร เขียดดา และธนัญชนก ไชยรินทร์. 2559. ประสิทธิภาพของการใช้สารสกัดสะเดา สารเคมีกำจัดเชื้อรา และเชื้อรา *Metarhizium guizhoense* PSUM02 ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในต้นมะเขือเทศ. ว.พืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 3 (ฉบับพิเศษ1): 36 - 42.

Thongkaewyuan, A. and Chairin, T. 2016. Effect of Selected Chemical Compound Solutions on Stimulating Hatch of Root-Knot Nematode Eggs. The 10th IMT-GT UNINET Conference 2016 (Bioscience: The Element of Life) during 1 - 2 December 2016 at conference Room, 8th floor, LRC building. Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, Thailand (Poster)