



การพัฒนาศักยภาพของเห็ดกินได้สกุล *Pleurotus* และเอนไซม์โปรติเอสเพื่อควบคุม
ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)

**Antagonistic Potential Improvement of Edible Mushroom, Genus *Pleurotus* and
Its Protease for Controlling Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*)**

กัญญาณี ไชยะดิษฐ์

Kanyani Chaiyadit

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

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การพัฒนาศักยภาพของเห็ดกินได้สกุล *Pleurotus* และเอนไซม์โปรติเอสเพื่อควบคุม
ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)

Antagonistic Potential Improvement of Edible Mushroom, Genus *Pleurotus* and
Its Protease for Controlling Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*)

กัญญาณี ไชยะดิษฐ์

Kanyani Chaiyadit

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

2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาศักยภาพของเห็ดกินได้สกุล *Pleurotus* และเอนไซม์โปรติเอสเพื่อ
ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)

ผู้เขียน นางสาวกัญญาณี ไชยะดิษฐ์

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนัญชนก ไชยรินทร์)

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ เรือนปานันท์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนัญชนก ไชยรินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟ้างู๋สง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนัญชนก ไชยรินทร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(นางสาวกัญญาณี ไชยะดิษฐ์)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาวกัญญาณี ไชยะดิษฐ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาศักยภาพของเห็ดกินได้สกุล <i>Pleurotus</i> และเอนไซม์โปรติเอสเพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (<i>Meloidogyne incognita</i>)
ผู้เขียน	นางสาวกัญญาณี ไชยะดิษฐ์
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2565

บทคัดย่อ

เห็ดกินได้สกุล *Pleurotus* มีรายงานว่า เป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเนื่องจาก *Pleurotus* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวและเปลือกไข่ของไส้เดือนฝอย รวมไปถึงส่งผลต่อการพัฒนาการของตัวอ่อน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ 1) เพื่อให้ได้เห็ดสกุล *Pleurotus* ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในสภาพห้องปฏิบัติการและสามารถควบคุมโรครากปมของมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน 2) เพื่อให้ได้เอนไซม์โปรติเอสสกัดหายจากเห็ดสกุล *Pleurotus* และ 3) เพื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในห้องปฏิบัติการ โดยทำการคัดเลือกเห็ดสกุล *Pleurotus* จำนวน 8 ไอโซเลต ซึ่งพบว่า *P. pulmonarius* No.3 และ *P. ostruatus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการฟักไข่ และเพิ่มอัตราการตายของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 และจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์เบื้องต้นด้วยวิธี agar diffusion พบว่า *Pleurotus* ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ และเมื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำเลี้ยงเชื้อ พบว่า *P. pulmonarius* No.3 มีค่ากิจกรรม 0.27 ± 0.04 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่า *P. ostruatus* ที่มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.06 ± 0.00 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นจึงเลือก *P. pulmonarius* No.3 มาใช้ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็งเพื่อกระตุ้นการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ข้าวโอ๊ตบดหยาบ 6 กรัม และสารละลาย KH_2PO_4 pH 5.0 ความเข้มข้น 1.5-2.5 % (w/v) ปริมาตร 6-8 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน และสกัดด้วย acetate buffer pH 5.0 ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดย *P. pulmonarius* No.3 เพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 0.41 ± 0.00 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายเอนไซม์สกัดหายที่ได้มีความคงที่ของค่ากิจกรรมเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง และค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหาย คือ -20 องศาเซลเซียส โดยเก็บได้นานมากกว่า 6 เดือน นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นใยเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม

(Optimized *Pleurotus*) หรือเรียกแทนว่า “OP” จากการวิจัยในสภาพห้องปฏิบัติการ ทำให้ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยร่ากปมระยะที่ 2 ตาย 100 % หลังจากทดสอบเป็นเวลา 4 วัน และการใช้ OP ร่วมกับเอนไซม์สกัดหยาบยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยร่ากปมได้ 100 % เช่นกัน จากนั้นเมื่อทดสอบการควบคุมโรคร่ากปมในมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน พบว่า OP ปริมาตร 2 ส่วน (14 g)/กระถาง (OP2) ทำให้ร่ากมะเขือเทศ มีจำนวนปม 35.67 ± 5.24 ปม จำนวนกลุ่มไข่ 15.00 ± 0.89 และ Reproduction factor (Rf) เท่ากับ 0.68 ± 0.02 ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ OP2 ร่วมกับเอนไซม์โปรตีนเอสสกัดหยาบ ซึ่งมีจำนวนปม จำนวนกลุ่มไข่ และ Rf เท่ากับ 37.67 ± 2.88 ปม, 17.33 ± 1.37 และ 0.61 ± 0.02 ตามลำดับ ทั้งนี้การใช้ OP เพียงอย่างเดียว และการใช้ OP ร่วมกับเอนไซม์โปรตีนเอสสกัดหยาบลดการเกิดร่ากปม จำนวนกลุ่มไข่ และ Rf ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเมื่อย้อมร่ากด้วย acid fuchsin พบว่าไส้เดือนฝอยร่ากปมของมะเขือเทศ ที่ทดสอบด้วย OP มีการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะ 3 (J3) หรือตัวอ่อนระยะที่ 4 (J4) และตัวเมียตัวเต็มวัยช้ากว่าในกรรมวิธีอื่น ๆ

Thesis Title Antagonistic Potential Improvement of Edible Mushroom, Genus *Pleurotus* and Its Protease for Controlling Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*)

Author Ms. Kanyani Chaiyadit

Major Program Plant Pathology

Academic Year 2022

ABSTRACT

Edible mushroom Genus *Pleurotus* have been reported as the antagonistic fungi against plant-parasitic nematodes. One of the main rules of their nematicidal ability is the production of protease, that is important to degrade cuticle and eggshell of nematodes, and affect the development of nematode juvenile. Therefore, the objectives of this study were (1) to select Genus *Pleurotus* for controlling root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in laboratory and control root knot disease in tomato under greenhouse condition, (2) to find out the nematicidal efficiency of crude protease from *Pleurotus*, and (3) to find out the optimal factors for protease production under the laboratory condition. From eight isolates of tested *Pleurotus*, *P. pulmonarius* No.3 and *P. ostruatus* showed the ability to inhibit egg hatching and increase the mortality of infective juveniles. These two *Pleurotus* could produce protease when primary detected by agar diffusion method. Specific activity of protease under protein-enriched media was 0.27 ± 0.04 U/mg protein from *P. pulmonarius* No.3., that higher than protease produced from *P. ostruatus* (0.06 ± 0.00 U/mg protein). Therefore, *P. pulmonarius* No.3 was selected to find out the optimal condition affecting protease production under solid state cultivation in the laboratory. It was found that the highest protease activity was 0.41 ± 0.00 U/ml when cultured on solid state media contained 6 grams of coarse oats, 6-8 ml of 1.5-2.5 % (w/v) KH_2PO_4 pH 5.0, incubated at 28°C for 7 days, and 50 mM acetate buffer pH 5.0 was used for protease extraction. The activity of crude protease stabilized when incubated at $40\text{-}50^\circ\text{C}$ for 4 hr and the activity was decreased when incubated at $60\text{-}70^\circ\text{C}$ for 1 hr. At -20°C was the optimal temperature for long term storage of crude protease for over 6 months. Under laboratory condition, the optimized *Pleurotus* (*P. pulmonarius* No. 3), called "OP", completely killed infective juvenile (J2) of root-knot nematode (percentage of mortality as 100) at 4 day post inoculation and OP in combination with crude

protease inhibited nematode egg hatching 100 %, as well. Regarding under greenhouse condition, the number of root gall 35.67 ± 5.24 , egg masses 15.00 ± 0.89 and reproduction factor (Rf) was 0.68 ± 0.02 when tomato plants were treated by the OP in concentration of 14 g per pot (OP2). There was no significant difference when compared to OP2 in combination with crude protease, the number of galls, egg masses and Rf were 37.67 ± 2.88 , 17.33 ± 1.37 and 0.61 ± 0.02 , respectively. However, the treatments of individual OP2 and OP2 in combination with crude protease significantly inhibited root gall disease in tomato ($p < 0.05$) when compared to untreated control. After staining with acid fuchsin, slowly developing of J2 to 3rd stage juvenile (J3) or 4th stage juvenile (J4) and to adult female was presented in tomato roots with OP treatment.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนัญชนก ไชยรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ และการแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนินันท์ พรสุริยา และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ เรือนปานันท์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ แก้ไขข้อบกพร่อง ให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ทูบ โครงการเรียนดี คณะทรัพยากรธรรมชาติ และทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา สาขาวิชาสัตวศาสตร์และการจัดการ วิชาเอกการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และความสะดวกในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ และครอบครัว ผู้เป็นกำลังใจสำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ และผู้เป็นแรงผลักดัน รวมถึงพี่ เพื่อน และน้อง ๆ ที่เรียนปริญญาโททุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

	หน้าที่
บทคัดย่อ	(1)
ABSTRACT	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการภาพ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	11
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดสอบ	12
3. ผลและวิจารณ์	25
4. สรุปผลการทดลอง	56
เอกสารอ้างอิง	57
ประวัติผู้เขียน	67

รายการตาราง

ตารางที่		หน้าที่
1.	ระดับการเกิดปมที่ราก	23
2.	ประสิทธิภาพของเห็ดสกุล <i>Pleurotus</i> ที่ยับยั้งการพักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i>	26
3.	ประสิทธิภาพของเห็ดสกุล <i>Pleurotus</i> ต่อการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i>	27
4.	ประสิทธิภาพของ cell-free culture filtrate จาก <i>P. pulmonarius</i> No.3 และ <i>P. ostruatus</i> ต่อการยับยั้งการพักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i>	31
5.	ประสิทธิภาพของ cell-free culture filtrate จาก <i>P. pulmonarius</i> No.3 และ <i>P. ostruatus</i> ต่อการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i>	32
6.	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ค่าปริมาณโปรตีนรวม และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสใน cell-free culture filtrate ของเชื้อเห็ดสกุล <i>Pleurotus</i>	33
7.	ประสิทธิภาพของเห็ดสกุล <i>P. pulmonarius</i> No.3 ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสมและเอนไซม์โปรติเอสสกัดยับยั้งต่อการพักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i>	46
8.	ประสิทธิภาพของเห็ดสกุล <i>P. pulmonarius</i> No.3 ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสมและเอนไซม์โปรติเอสสกัดยับยั้งต่อการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i>	47
9.	การประเมินการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne incognita</i> ในมะเขือเทศ หลังจากการทดสอบด้วย Optimized <i>Pleurotus</i> เป็นเวลา 30 วัน	49
10.	ความสูงต้นและความยาวรากมะเขือเทศ หลังจากการทดสอบด้วย Optimized <i>Pleurotus</i> ต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i> เป็นเวลา 30 วัน	50

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้าที่
11.	การประเมินการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne incognita</i> ในมะเขือเทศ หลังจากการทดสอบด้วย Optimized <i>Pleurotus</i> และเอนไซม์ โปรติเอสสกัดหยาบเป็นเวลา 30 วัน	52
12.	การประเมินการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne incognita</i> ในมะเขือเทศ หลังจากการทดสอบด้วยเห็ดสกุล <i>Pleurotus</i> และเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเวลา 30 วัน	53

รายการภาพ

ภาพที่		หน้าที่
1.	โครงสร้างผนังลำตัวของไส้เดือนฝอย	3
2.	อาการรากปมของมะเขือเทศที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม	5
3.	รูปแบบรอยย่นส่วนก้น (perineal patterns) ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne</i> ตัวเต็มวัยเพศเมีย บางสปีชีส์	5
4.	วงจรชีวิตไส้เดือนฝอยรากปม	6
5.	ลักษณะเส้นใยของเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No. 3 (PP-3) เข้าทำลายไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i> หลังการทดสอบ 48 ชั่วโมง	27
6.	การเจริญของเส้นใย <i>P. pulmonarius</i> No.3 (บน) และ <i>P. ostruatus</i> (ล่าง) บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ระยะเวลา 3 วัน ที่บ่มในอุณหภูมิต่าง ๆ	28
7.	การสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อสกุล <i>Pleurotus</i> บนอาหาร colloidal chitin agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน	29
8.	การเกิดวงใสของเชื้อสกุล <i>Pleurotus</i> บนอาหาร skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน	30
9.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	34
10.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	35
11.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้ธาตุอาหารต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	36
12.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	37

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
13.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	38
14.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อบ่มที่ 28 °C เป็นระยะเวลาต่างกัน ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	39
15.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อปรับความเป็นกรดต่างของของเหลวในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	40
16.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อปรับปริมาณของสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	41
17.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อปรับอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	41
18.	ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่ pH ต่างกันในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>P. pulmonarius</i> No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง	42
19.	ผลของอุณหภูมิต่อค่าความคงที่ (stability) ของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ	43
20.	ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อค่าความคงที่ (stability) ของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ	44
21.	เส้นใยของ <i>P. pulmonarius</i> No.3 ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เข้าทำลายไข่ (A) และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i> (B) หลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง (Bar = 20 µm)	45
22.	การใช้ Optimized <i>Pleurotus</i> 3 ส่วน ในกระถางต้นมะเขือเทศทดสอบ; (A) เส้นใยอัดแน่นและน้ำท่วมขัง (B) ดอกเห็ด	50
23.	ลักษณะรากปมของมะเขือเทศที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne incognita</i> ในมะเขือเทศ 10, 20, และ 30 วัน (Bar = 20 µm)	54
24.	รากปมของมะเขือเทศที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne incognita</i> ที่ย้อมด้วย acid fuchsin เป็นเวลา 10, 20, และ 30 วัน	55

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. เป็นสาเหตุของโรครากปม (root knot disease) จัดเป็นศัตรูพืชที่มีพืชอาศัยกว้างมากกว่า 2,500 ชนิด ซึ่งทำความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้ง พืชผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ ไม้ผล และพืชไร่ ทำให้พืชที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายมีผลผลิตลดลง และสามารถพบไส้เดือนฝอยชนิดนี้ทั้งในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาวของโลก (Wesemael *et al.*, 2011; Vestergård, 2019) โดยไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* ชนิดที่สำคัญ เช่น *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognia* และ *M. javanica* สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 7 ชนิด สร้างความเสียหายร้อยละ 90 (Singh *et al.*, 2015)

การป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเกษตรกรรม การใช้พันธุ์ต้านทาน และการใช้สารเคมี เป็นต้น ซึ่งการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละวิธีมีข้อจำกัดแตกต่างกันไป เช่น การใช้สารเคมี เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีต้นทุนสูง เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในระบบนิเวศ (Noling and Becker, 1994; Kalaiselvia *et al.*, 2019) ดังนั้น การนำวิธีการอื่นที่ปลอดภัย และประหยัดค่าใช้จ่ายมาใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมจึงได้รับความสนใจมากขึ้น อีกทั้งปัจจุบันผู้บริโภคมีความสนใจเรื่องอาหารปลอดภัย และระบบเกษตรอินทรีย์ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น จึงมีงานวิจัยเพื่อหาวิธีควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแทนที่ใช้สารเคมี และลดผลกระทบที่เกิดกับระบบนิเวศ ได้แก่ การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธีซึ่ง Heydari และคณะ (2006) ได้ทดสอบความสามารถของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ได้แก่ *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. cornucopiae*, *P. florida* และ *P. eryngii* ในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. javanica* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate) จาก *P. ostreatus* ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่เคลื่อนที่ภายใน 24 ชั่วโมง จากนั้นเส้นใยของเห็ดจึงเข้าทำลายภายในตัวไส้เดือนฝอย Barron และ Thorn (1986) ทดสอบปล่อยไส้เดือนฝอยลงไปบริเวณขอบโคโลนีของ *Pleurotus* spp. ที่เจริญบนอาหาร water agar พบว่าไส้เดือนฝอยหยุดเคลื่อนที่ จากนั้นเส้นใยของเชื้อเห็ดแทงเข้าไปในตัวและไส้เดือนฝอยถูกย่อยสลายภายใน 2-3 วัน โดยในงานวิจัยนี้เชื้อเห็ด *P. ostreatus* มีประสิทธิภาพในการฆ่า

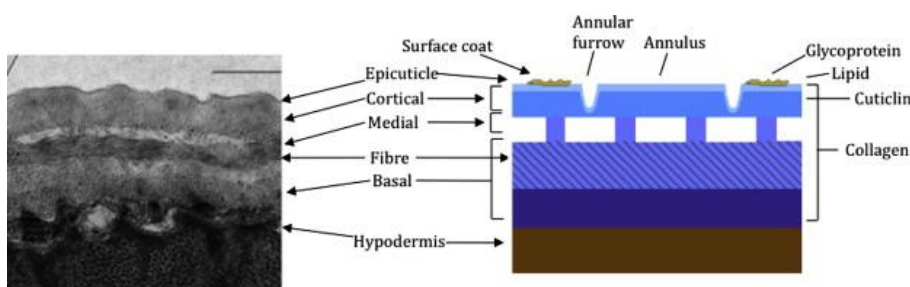
ไส้เดือนฝอยสูงที่สุด 96 % นอกจากนี้ Inácio และคณะ (2015) รายงานว่าเห็ดสกุล *Pleurotus* สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวของไส้เดือนฝอย จึงมีส่วนช่วยให้เส้นใยแทงทะลุผนังลำตัวไส้เดือนฝอยแล้วดูดกินสารอาหารภายในตัวอ่อนได้ สอดคล้องกับ Genier และคณะ (2015) รายงานว่า เห็ด *P. ostreatus* ลดจำนวนตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย *Panagrellus* sp. ลง 42 % ภายใน 24 ชั่วโมง และพบว่า *P. ostreatus* ผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อย่อยผนังลำตัวไส้เดือนฝอย โดยงานวิจัยส่วนใหญ่เน้นการนำเห็ดสกุล *Pleurotus* มาทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส แต่ยังไม่มีการหาสถานะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

จากที่กล่าวมาข้างต้น การใช้เห็ดสกุล *Pleurotus* จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่ามาศึกษาต่อเพื่อใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส และหาสถานะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อนำไปควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในมะเขือเทศให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

ตรวจเอกสาร

1. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

ไส้เดือนฝอยเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และมีระบบอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายคล้ายสัตว์ชั้นสูงแต่ไม่ครบทุกระบบ คือมีระบบทางเดินอาหาร ระบบกล้ามเนื้อ ระบบประสาท ระบบขับถ่าย และระบบสืบพันธุ์ แต่ไม่มีระบบหายใจ และระบบหมุนเวียนเลือด ลักษณะลำตัวไม่เป็นปล้องแต่ผนังชั้นนอกเป็นรอยย่นคล้ายปล้องซึ่งเกิดเฉพาะผิวหนังเท่านั้น ผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยมี 3 ชั้น โดยประกอบด้วย ชั้นนอกหรือคิวติเคิล (cuticle), ชั้นกลางหรือชั้นไฮโปเดอริส (hypodermis) และชั้นในหรือชั้นกล้ามเนื้อ (muscular layer) ผิวชั้นนอกประกอบด้วยแผ่นโปรตีนใสทำหน้าที่เป็นโครงร่างยึดหดได้ และช่วยในเรื่องการเคลื่อนที่ของไส้เดือนฝอย ซึ่งประกอบด้วย คอลลาเจน ซึ่งเป็นโปรตีนมากกว่า 80% ของโปรตีนที่ละลายน้ำ ชั้นคิวติเคิลนั้นอุดมไปด้วยไขมันและถูกเคลือบทับด้วยสารเคลือบผิวที่มีไกลโคโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับคิวติเคิล (Singh and Sulston, 1978) (ภาพที่ 1) ความยาวเฉลี่ยของไส้เดือนฝอยอยู่ระหว่าง 0.2-2.0 มิลลิเมตร และมีลักษณะ sexual dimorphism คือไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเพศผู้ และรูปร่างของเพศเมียและเพศผู้ มีความต่างกันมาก



ภาพที่ 1 โครงสร้างผนังลำตัวของไส้เดือนฝอย (ที่มา: Page *et al.*, 2014)

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช หรือ Plant-parasitic nematodes (PPNs) เป็นปรสิตชนิดหนึ่งที่ทำลายในพืช ซึ่งไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีวิธีการเข้าทำลายพืชที่แตกต่างกันสามารถจัดกลุ่มตามลักษณะการเข้าทำลาย (feeding position) โดยอาศัยลักษณะการเข้าทำลาย และการเคลื่อนที่ภายในเนื้อเยื่อของพืช ได้แก่ ไส้เดือนฝอยปรสิตภายนอก (ectoparasitic nematode) ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชปรสิตกึ่งภายใน (semi-endoparasitic nematode) และไส้เดือนฝอยปรสิตภายใน (endoparasitic nematode) (Williamson and Hussey, 1996) ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเหล่านี้จึงส่งผลกระทบต่อเจริญเติบโตของพืชและคุณภาพของผลผลิต รวมถึงมีความสามารถในการทำลายความต้านทานของพืชและทำให้พืชอ่อนแอต่อเชื้อโรคพืชอื่น ๆ (Manzanilla-López *et al.*, 2004)

ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ถือเป็นไส้เดือนฝอยปรสิตภายในที่สำคัญสกุลหนึ่งที่ทำลายพืชทางเศรษฐกิจมากที่สุดในโลก (Trudgill and Blok, 2001) ทำให้ผลผลิตทั่วโลกสูญเสียประมาณ 10 พันล้านยูโรต่อปี

การจัดจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมตามหลักอนุกรมวิธานมีดังนี้ (Chitwood, 1949)

Kingdom Animalia

Phylum Nematoda

Class Secernentea

Order Tylenchida

Family Meloidogynidae

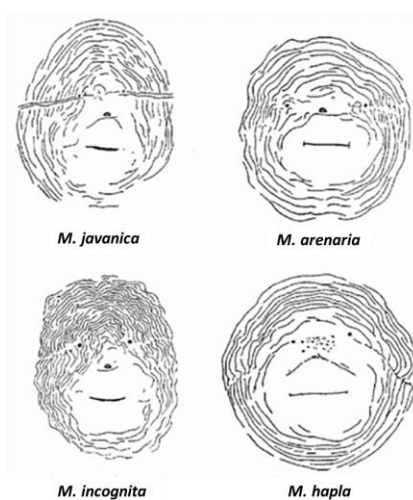
Genus *Meloidogyne*

Mitkowski และ Abawi (2003) รายงานว่าไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดคือ *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. incognita* และ *M. javanica* พืชที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะแสดงอาการที่เรียกว่า รากปม (root gall หรือ root knot) โดยรากมีลักษณะบวมพองเป็นปุ่มปมไม่เป็นระเบียบ และกุดสั้น (ภาพที่ 2) เนื่องจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองใช้อวัยวะที่มีลักษณะคล้ายเข็มที่เรียกว่า stylet แทะเข้าสู่เซลล์รากพืชและปล่อยเอนไซม์เพื่อเข้าทำลาย จากนั้นไส้เดือนฝอยจึงเคลื่อนที่ไปสู่เนื้อเยื่อชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) ของพืช และฝังส่วนหัวบริเวณรอบ ๆ เนื้อเยื่อลำเลียง (vascular tissue) ส่วนลำตัวทอดขนานไปตามแนวยาวของรากในชั้นคอร์เท็กซ์ เซลล์ของพืชบริเวณท่อลำเลียงอาหารมีขนาดใหญ่ผิดปกติ เรียกว่า เซลล์ยักษ์ (giant cell) จากนั้นไส้เดือนฝอยจะดูดกินสารอาหารจากพืช ซึ่งหลังจากตัวอ่อนระยะที่สองเข้าทำลายพืชจะเกิดอาการรากปมขึ้นภายใน 1-2 วัน และหากไส้เดือนฝอยเข้าทำลายอย่างรุนแรง รากของพืชจะถูกทำลายมากจนพืชไม่สามารถให้ผลผลิตได้ และตายในที่สุด (Anwar *et al.*, 2007)



ภาพที่ 2 อาการรากปมของมะเขือเทศที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม
(ที่มา: Anwar *et al.*, 2007)

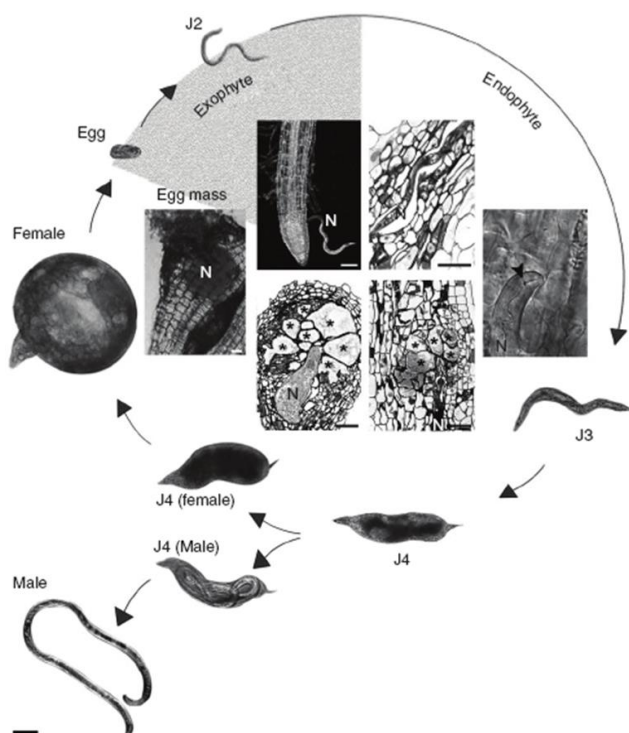
ไส้เดือนฝอยรากปมเพศเมียตัวเต็มวัยมีรูปร่างอ้วนกลมคล้ายลูกแพร์ (pear shaped) เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-0.7 มิลลิเมตร และจะวางไข่เป็นกลุ่มโดยมีสารเหนียวคล้ายวุ้น (gelatin) ห่อหุ้มอยู่นอกลำตัว และไส้เดือนฝอยรากปมเพศเมียตัวเต็มวัยมีลายเส้นบริเวณก้นเรียกว่า รอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ซึ่งลักษณะรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมียนี้นำไปใช้เพื่อระบุชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมได้ เนื่องจากไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิดมีลายเส้นที่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 3) ส่วนเพศผู้ตัวเต็มวัยมีรูปร่างเรียวยาวคล้ายเส้นด้าย (vermiform) เช่นเดียวกับตัวอ่อนระยะที่สอง (Mitkowski and Abawi, 2003)



ภาพที่ 3 รูปแบบรอยย่นส่วนก้น (perineal patterns) ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* ตัวเต็มวัยเพศเมีย บางสปีชีส์ (ที่มา: Stirling *et al.*, 1999)

วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปม

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. มีการขยายพันธุ์แบบ mitotic parthenogenesis คือ ไส้เดือนฝอยเพศเมียจะสามารถสร้างไข่ได้เองและไข่สามารถฟักออกมาเป็นตัวอ่อน โดยที่ไม่ต้องมีการปฏิสนธิกับไส้เดือนฝอยเพศผู้ จึงทำให้ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และทำให้วางไข่ได้เป็นจำนวนมาก อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์อยู่ระหว่าง 24-27 องศาเซลเซียส เริ่มจากไส้เดือนฝอยเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่ม (egg mass) ที่มีสารเหนียวคล้ายวุ้นห่อหุ้มอยู่ โดย 1 กลุ่มไข่อาจมีไข่ได้ถึง 1,500 ฟอง ไข่พัฒนาการโดยแบ่งเซลล์ไปเรื่อย ๆ เป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 อยู่ภายในไข่ จากนั้นลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 และฟักออกจากไข่ โดยระยะนี้เป็นระยะที่เริ่มเข้าทำลายพืช จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective juvenile; IJ) และไส้เดือนฝอยมีการลอกคราบอีก 3 ครั้งในรากพืช หลังจากลอกคราบครั้งสุดท้าย ตัวอ่อนเพศเมียจะไม่เคลื่อนย้ายตำแหน่งที่ดูดกินสารอาหาร โดยเพศเมียเริ่มพองตัวขึ้นเรื่อย ๆ จนเป็นถุงกลม (saccate) อยู่ภายในรากพืชอาศัย และไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียสร้างกลุ่มไข่ออกมานอกราก ส่วนไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศผู้ ออกจากรากพืชดำรงชีวิตอยู่อย่างอิสระภายในดิน (ภาพที่ 4) โดยเฉลี่ยไส้เดือนฝอยรากปมจะเจริญครบวงจรชีวิตใน 25 วัน แต่อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไส้เดือนฝอยและสภาพแวดล้อม (Mitkowski and Abawi, 2003)



ภาพที่ 4 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปม (ที่มา: Abad *et al.*, 2008)

2. กลไกการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อราต่อไส้เดือนฝอย

เชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอย (Nematophagous fungi) เป็นเชื้อราที่เป็นศัตรูโดยธรรมชาติกับไส้เดือนฝอย ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ (1) nematode-trapping fungi เชื้อราที่สร้างกับดักเส้นใยเป็นโครงสร้างพิเศษเพื่อจับไส้เดือนฝอย เช่น กลุ่มกาวเหนียว ตาข่ายเหนียว หรือห้วงมรณะ เช่น *Arthrobotrys oligospora*, *A. superba* และ *Monacrosporium haptotylum* (Swe *et al.*, 2009) (2) endoparasite คือเชื้อราที่เป็นปรสิตภายใน โดยโคนิเดียจะเกาะติดกับผิวไส้เดือนฝอยและสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยผนังลำตัว จากนั้นจึงแทงเส้นใยเข้าทำลายและดูดกินสารอาหารภายในตัวของไส้เดือนฝอย ยกตัวอย่างราในกลุ่มนี้ เช่น *Catenaria* sp., *Helicocephalum oliogosporum*, *Harposporium rhynchosporum* และ *Plesiospora globose* (Barron, 1978) (3) egg-parasitic fungi เชื้อราที่เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย โดยใช้ appressorium เข้าไปดูดซับสารอาหารจากไข่หรือลำตัวไส้เดือนฝอย เช่น *Pochonia chlamydosporia*, *Lecanicillium lecanii* และ *Meria coniospora* (Olivares-Bernabeu and Lopez-Llorca, 2002) และ (4) toxin-producing fungi เชื้อราที่ทำให้ไส้เดือนฝอยหยุดเคลื่อนไหวด้วยสารพิษ เช่น *Pleurotus ostreatus*, *P. pulmonarius* และ *P. eryngii* (Marlin *et al.*, 2019) สาเหตุที่เชื้อราปฏิปักษ์ได้รับความสนใจ และมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเนื่องจากเชื้อราปฏิปักษ์เหล่านี้สามารถเลี้ยงได้ง่ายภายในห้องปฏิบัติการ และมีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืช โดยเชื้อราทุกกลุ่มสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยผนังลำตัว (cuticle) ของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยได้ (Liu *et al.*, 2009)

3. เห็ดสกุล *Pleurotus*

เห็ดที่กินได้หรือเชื้อราที่กินได้ในป่า ถูกรวบรวมและบริโภคโดยผู้คนมาเป็นเวลาหลายพันปี และคาดว่าประมาณ 2,000 สายพันธุ์ ถือเป็นเห็ดที่กินได้ที่สำคัญ (Moore *et al.*, 2005) เห็ดไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ จึงต้องย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในการดำรงชีพและมีความสำคัญอย่างมากในการหมุนเวียนธาตุอาหารในระบบนิเวศ เพื่อเป็นประโยชน์แก่พืช สัตว์ และ จุลินทรีย์ในธรรมชาติ (Subramanian and Anantharaman, 1995) เห็ดเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับใช้ในการประกอบอาหาร เนื่องจากมีค่าแคลอรีต่ำ มีปริมาณโปรตีน 23.22 g/100 g คาร์โบไฮเดรต 63.17 g/100 g ฟอสฟอรัส 104.13 g/100 g และไฟเบอร์สูง 34.0 g/100 g และปริมาณไขมันต่ำ 4.71 g/100 g (Furlani and Godoy, 2007) Verma (2002) รายงานว่า การผลิตเห็ดเชิงพาณิชย์ 4 ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ *Agaricus bisporus*, *Calocybe indica*, *Pleurotus* spp. และ *Volvariella* spp.

ในบรรดาเห็ดที่กินได้หลายชนิด *Pleurotus* spp. เป็นที่ยอมรับในวงกว้าง เห็ดสกุล *Pleurotus* มีลักษณะที่สำคัญ คือ หมวกดอก (cap หรือ pileus) มีลักษณะคล้ายหอยนางรม มีลักษณะ

ผิวเรียบ เมื่อดอกเห็ดบานด้านใต้ของหมวกเห็ดมีลักษณะเป็นกรีบ (gill) ลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ สีขาว ก้านดอก (stalk) ยาวปานกลาง และต่อเนืองคิดเป็นเนื้อเดียวกับหมวกดอกเห็ด เห็ดสกุลนี้อาจเกิดเป็นดอกเดี่ยวโดยมีวงจรชีวิตเป็นแบบเห็ดทั่วไปที่ขึ้นบนไม้ เห็ดในสกุลนางรมจัดอยู่ใน

Kingdom Fungi

Phylum Basidiomycota

Class Agaricomycetes

Order Agaricales

Family Pleurotaceae

Genus *Pleurotus*

มักพบเจริญอยู่ในธรรมชาติในเขตอบอุ่น เห็ดในสกุลนางรมเป็นเห็ดที่สามารถปรับตัวในการเจริญได้ง่าย จึงมีการนำมาเพาะปลูกทางการค้าในหลายประเทศทั่วโลก และมีการผลิตที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (ป๋องพาล, 2547) และมี 12 สายพันธุ์ที่รู้จักกันดี ได้แก่ *P. calyptratus*, *P. cornucopiae*, *P. cystidiosus*, *P. djamor*, *P. dryinus*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. populinus*, *P. pulmonarius*, *P. purpleoolivaceus* และ *P. tuber-regium* (Ahmed *et al.*, 2009) เห็ด *Pleurotus* spp. มีประโยชน์หลากหลายเช่น ยา โภชนาการ การบำบัดทางชีวภาพของสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อน (Wasser, 2002) และเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่มีอุตสาหกรรมและการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ เช่น ด้านไวรัส ด้านเนื้องอก ยาปฏิชีวนะ ด้านแบคทีเรียฤทธิ์ลดคอเลสเตอรอลและภูมิคุ้มกัน (Cohen *et al.*, 2002)

4. การควบคุมไส้เดือนฝอยโดยเห็ดสกุล *Pleurotus*

การใช้เห็ดสกุลนางรมในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้มีการศึกษาวิจัยอย่างแพร่หลาย จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ใช้และผู้บริโภคในปัจจุบัน จากการศึกษาของ Barron และ Thorn (1986) พบว่าเห็ดสกุล *Pleurotus* สามารถผลิตหยดสารพิษ (toxin droplets) บน aerial hypha เมื่อไส้เดือนฝอยสัมผัสจะทำให้ไส้เดือนฝอยเป็นอัมพาตส่งผลให้การเคลื่อนที่ช้าลง จากนั้นเชื้อราสร้างเส้นใยแทงเข้าไปในตัวไส้เดือนฝอย เช่นเดียวกับ Palizi และคณะ (2009) ศึกษาความสามารถของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ได้แก่ *P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. florida*, *P. flabellatus* และ *P. eryngii* ในการควบคุมไส้เดือนฝอย โดยพบว่าไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ช้าลง ไส้เดือนฝอยบางตัวถูกเส้นใยเห็ดเข้าทำลาย ซึ่ง *P. ostreatus* สามารถทำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ช้าลงมากที่สุด 90 % ภายใน 24 ชั่วโมง อมรศรี ขุนอินทร์ และคณะ (2548) พบว่าเห็ด *P. ostreatus* สามารถลดการเกิดโรครากปมของฝรั่งที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *M. incognita* ได้ดี โดยพบว่าเมื่อใส่ก้อนเชื้อราเห็ดนางรมสังการี 10 และ 40 กรัม ลงในกระถางที่

ปลุกฝังสามารถลดการเกิดโรครากปมได้ ซึ่งแตกต่างกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใส่เชื้อเห็ดนางรม ซึ่งการวิจัยมีนัยสำคัญทางสถิติ Pimenta และ คณะ (2017) ได้ทดสอบความสามารถของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ในการควบคุมตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเห็ดในสกุล *Pleurotus* สามารถผลิตสารอินทรีย์ระเหย (volatile organic compounds) ส่งผลให้ปริมาณของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมลดลงอย่างรวดเร็ว และ Genier และ คณะ (2015) รายงานว่าเห็ด *P. ostreatus* สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวของไส้เดือนฝอย เนื่องจากผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากถึง 80 % (Page *et al.*, 2014) ส่งผลให้ตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยตายถึง 95.2 % และส่งผลต่อการฟักของไข่ทำให้ตัวอ่อนที่ฟักออกมาไม่สามารถมีชีวิตรอดในดินได้

5. เอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โปรตีนและโพลีเปปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้น ๆ จึงเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีน (Kandasamy *et al.*, 2016) เอนไซม์โปรติเอสแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในโซโมเลกุลของโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Neurospora* (Mamo and Assefa, 2018), *Pleurotus eryngii* (Wang and Ng, 2001) และ *P. ostreatus* (Dohmae *et al.*, 1995) และ เอกโซเปปติเดส (exopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Ustilago maydis* (Mercado-Flores *et al.*, 2017) และ *Pseudoxanthomonas mexicana* (Sakamoto *et al.*, 2014) จากรายงานของ Shaba และ Baba (2012) พบว่าเชื้อเห็ด *P. ostreatus* ที่แยกได้จากกองขี้เลื่อยสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด 1.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร/นาที่ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง Wang และ Ng (2001) ได้ศึกษาเห็ด 6 สายพันธุ์ในกลุ่ม basidiomycetes พบว่า *P. eryngii* มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์อื่น ๆ Hanlon และคณะ (1982) รายงานว่าการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีความสำคัญในอุตสาหกรรมเอนไซม์ เนื่องจากมีปัจจัยต่าง ๆ ที่ช่วยส่งเสริมให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ไอออนของโลหะ และปัจจัยทางกายภาพ เช่น pH อุณหภูมิ ความหนาแน่นของเชื้อ ออกซิเจนละลายน้ำ และเวลาในการบ่ม เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายประการที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น pH อัตราส่วนคาร์บอน และไนโตรเจน รวมไปถึง

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (Gupta *et al.*, 2002) ดังนั้น การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์จึงสามารถกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นได้ โดยการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม (optimization condition) (Ooi *et al.*, 2021)

6. การเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง (solid state cultivation)

การเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์โดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ การเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (submerged culture) และการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง (solid culture) ที่มีความชื้นอยู่ โดยวิธีการที่ผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรมส่วนมากใช้วิธี submerged culture แต่เป็นวิธีการที่มีต้นทุนสูง และยังมีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ส่วนการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธี solid culture เป็นการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแบบแข็งที่ใช้ของแข็งที่ปราศจากน้ำอิสระหรือมีน้ำอยู่น้อยเป็นวัสดุหลัก แต่มีความชื้นเพียงพอเหมาะสมแก่การเจริญของจุลินทรีย์ (Bastos *et al.*, 2016) และเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อรา จากการศึกษาของ Gerbec และคณะ (2015) พบว่าอาหารแบบแข็งที่เตรียมจากเปลือกและเมล็ดของลูกเดือยเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อรา *Hericium erinaceus* (เห็ดขามาบูซิดาเกะ) และมีการใช้เห็ด *P. ostreatus* เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์โดยการเลี้ยงบนอาหารแบบแข็งและอาหารเหลว พบว่า *P. ostreatus* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 3×10^5 ยูนิต/ลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน บนอาหารแบบแข็งซึ่งเชื้อเห็ดสามารถเจริญได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว (Mazumder *et al.*, 2009) นอกจากนี้ Iandolo และคณะ (2011) ยังพบว่า *P. ostreatus* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดี โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงถึง 34,000 ยูนิต/ลิตร ในการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็งที่มีเปลือกและเมล็ดของมะเขือเทศเป็นสับสเตรต Shnyreva และคณะ (2017) ได้ทดสอบเห็ดสกุล *Pleurotus* 9 ชนิด โดยการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง พบว่า *P. sajor-caju*, *P. ostreatus* และ *P. pulmonarius* สามารถผลิตดอกเห็ดเพิ่มขึ้น 74 %, 72 % และ 61 % ตามลำดับ และได้ทำการวิจัยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *P. sajor-caju* ภายใต้สภาวะดังกล่าว ที่มีข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน และ แอมโมเนียมไนเตรต (ammonium nitrate) เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด Yang และ Chiu (1986) รายงานว่าโปรติเอสเป็นกลุ่มที่สำคัญที่สุดของเอนไซม์อุตสาหกรรมที่ใช้ทั่วโลก และการผลิตโปรติเอสด้วยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแบบแข็งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว นอกจากนี้ กิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตในการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารแบบแข็งยังมีความคงตัวต่อ pH และคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากกว่าที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว กล่าวคือเอนไซม์ชนิดที่ผลิตด้วยอาหารแบบแข็งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในช่วง pH ที่กว้างขึ้นและทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ดีกว่าเอนไซม์

ชนิดเดียวกันที่ผลิตด้วยอาหารแบบเหลว (Battaglino *et al.*, 1991) Aguilar และ คณะ (2001) กล่าวว่า การเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว และการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งถูกนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์อุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น อินเวอร์เทส อะไมเลส เพคติเนส แทนนาส และ โปรติเอส ซึ่งในทุกกรณีสำหรับเอนไซม์ที่ผลิตโดยอาหารแข็งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าค่ากิจกรรมที่ได้มาจากการเลี้ยงแบบอาหารเหลว

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อให้ได้เห็ดสกุล *Pleurotus* ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในสภาพห้องปฏิบัติการ และควบคุมโรครากปมในสภาพโรงเรือน
2. เพื่อให้ได้เอนไซม์โปรติเอสสกัดหายจากเห็ดสกุล *Pleurotus*
3. เพื่อทราบสถานะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในห้องปฏิบัติการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เห็ดสกุล *Pleurotus* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงเพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดสอบ

1. การเตรียมเชื้อเห็ด และการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมเพื่อใช้ในการทดสอบ

1.1 การเตรียมเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus*

นำเห็ดสกุล *Pleurotus* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เห็ดภูฐาน (*P. pulmonarius*) จำนวน 4 ไอโซเลต เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) 1 ไอโซเลต เห็ดเป่าฮื้อ (*P. cystidiosus*) 2 ไอโซเลต และเห็ดนางรมฮังการี (*P. ostruatus*) 1 ไอโซเลต ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร มาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ซึ่งประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม กลูโคส 20 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยเขี่ยเชื้อเห็ดจากหลอดทดลองลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (Sufiate *et al.*, 2017)

1.2 การเตรียมตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*

นำรากต้นมะเขือเทศที่แสดงอาการรากปมมาล้างดินออก และตัดรากบริเวณที่มีกลุ่มไข่แก่จำนวน 1 กลุ่ม เป็นชิ้นขนาด 1-2 เซนติเมตร ล้างน้ำผ่านตะแกรงหยาบ จากนั้นนำรากไปแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite (NaOCl) เข้มข้น 0.6 % นาน 3 นาที พร้อมเขย่าเบา ๆ เพื่อช่วยละลายสารเหนียวและให้ไข่กระจายออกจากกัน แล้วเทผ่านตะแกรงร่อนละเอียด mesh number 500 ล้างไข่ที่ติดค้างบนตะแกรงด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 4 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที และเก็บรวบรวมไข่ที่แยกเป็นฟองเดี่ยว ๆ เทลงในบีกเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (Marla *et al.*, 2008) จากนั้นรอให้ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยฟักออกจากไข่ตามธรรมชาติโดยเทน้ำที่มีไข่ไส้เดือนฝอยบนกระดาษทิชชูที่วางบนตะแกรงขนาดเล็ก และวางตะแกรงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งไข่ฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (Hussey and Barker, 1973)

2. การคัดเลือกเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไข่ และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ

2.1 การเป็นปฏิปักษ์ของเห็ดสกุล *Pleurotus* ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 เซนติเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณปลายเส้นใยของเห็ดสกุล *Pleurotus* อายุ 7 วัน ที่เจริญบนจานอาหาร PDA มาวางลงบนอาหาร 1 % water agar (WA) ในจานหลุมขนาด 24 หลุม (24 well plate) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในน้ำ 10 ไมโครลิตรซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางบริเวณปลายเส้นใยจำนวน 15 ฟอง/หลุม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) แบ่งเป็น 9 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเส้นใยครอบคลุมไข่ ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ฟักออกมาจากไข่ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวกลับ (inverted microscope) (DMi1, Leica, Germany) และเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งเป็นไข่บนอาหาร WA ที่ไม่มีเห็ดสกุล *Pleurotus* เจริญอยู่ คำนวณการฟักเป็นเปอร์เซ็นต์จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การฟักไข่} = \frac{\text{จำนวนไข่ไส้เดือนฝอยที่ฟัก} \times 100}{\text{จำนวนไข่ไส้เดือนฝอยทั้งหมด}}$$

2.2 การเป็นปฏิปักษ์ของเห็ดสกุล *Pleurotus* ต่อตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 เซนติเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณปลายเส้นใยของเห็ดสกุล *Pleurotus* อายุ 7 วัน ที่เจริญบนจานอาหาร PDA มาวางลงบนอาหาร 1 % water agar (WA) ในจานหลุมขนาด 24 หลุม (24 well plate) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในน้ำ 10 ไมโครลิตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางบริเวณปลายเส้นใย จำนวน 15 ตัว/หลุม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์แบ่งเป็น 9 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส สังเกตการตายที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ตาย และสังเกตลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวกลับ และเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 บนอาหาร WA ที่ไม่มีเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus* เจริญอยู่ แล้วคำนวณการตายเป็นเปอร์เซ็นต์จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตาย} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยที่ตาย} \times 100}{\text{จำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยทั้งหมด}}$$

3. การตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดสกุล *Pleurotus*

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณปลายเส้นใยของเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองข้อ 2 อายุ 7 วัน บนอาหาร PDA วางบนจานอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25, 28, 30 และ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเห็ดสกุล *Pleurotus*

4. การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสและไคติเนสเบื้องต้นด้วยวิธี agar diffusion

4.1 การสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเห็ดสกุล *Pleurotus*

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณปลายเส้นใยของเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองข้อ 2 วางลงบนอาหาร skim milk agar ที่ pH 7.0 ซึ่งประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัม glucose 20 กรัม ผงวุ้น 17 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ที่มี skim milk 1% (w/v) เป็นสับสเตรต จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสโดยดูจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) รอบโคโลนีเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus* บนจานอาหารที่ทดสอบ (Pundir *et al.*, 2012)

4.2 การสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเห็ดสกุล *Pleurotus*

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขึ้นรู้นบริเวณปลายเส้นใยของเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองข้อ 2 วางลงบนอาหาร colloidal chitin agar (CCA) ที่ pH 4.7 ซึ่งประกอบด้วย $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 กรัม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0 กรัม KH_2PO_4 2.0 กรัม citric acid monohydrate 1.0 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม Tween-80 200 ไมโครลิตร 1% colloidal chitin 4.5 กรัม bromocresol purple 0.15 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหาร CCA ทุกวัน โดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงเมื่อเห็ดสกุล *Pleurotus* สร้างเอนไซม์ไคติเนส (Agrawal and kotasthane, 2012)

5. การตรวจสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell-free culture filtrate; CF) จากเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus* ต่อการเข้าทำลายไข่ และตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากลม

5.1 การเตรียม cell-free culture filtrate จากเห็ดสกุล *Pleurotus*

นำเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 2 อายุ 7 วัน ที่เจริญบนจานอาหาร PDA มาเจาะบริเวณปลายเส้นใยด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร และย้ายชิ้นวุ้นจำนวน 3 ชิ้นลงในอาหารเหลว 4 ชนิด ได้แก่ potato dextrose broth (PDB), PDB ที่มี 1 % casein, อาหาร PDB ที่มี 1 % skim milk และน้ำกลั่น (control) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน กรองแยกเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นนำส่วนใสเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสกรองด้วย membrane filter (Sartorius, Germany) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อให้ปลอดเชื้อ จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการกรองไปใช้ในการทดลองต่อไป (Oyewole *et al.*, 2011)

5.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ cell-free culture filtrate ต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากลม *Meloidogyne incognita*

นำไข่ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 15 ฟอง/ซ้ำ/กรรมวิธี ใส่ลงในจานหลุมขนาด 24 หลุม (24 well plate) ที่มี CF ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม (control) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ บันทึกจำนวนตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ที่ฟักออกจากไข่หลังจากการบ่ม 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (Heydari *et al.*, 2006)

5.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของ cell-free culture filtrate ต่อการเข้าทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากลม *Meloidogyne incognita*

นำ J2 ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 15 ตัว/ซ้ำ/กรรมวิธี ลงในจานหลุมขนาด 24 หลุม ที่มี CF ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม (control) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ บันทึกจำนวน J2 ที่ตายหลังจากการบ่มที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ (Heydari *et al.*, 2006)

6. การวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในเชิงปริมาณและการวัดปริมาณโปรตีน

6.1 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีของ Anson (1938) โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.5 นำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยใช้เคซีน (casein) ความเข้มข้น 0.65 % เป็นสารตั้งต้น บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 110 mM Trichloroacetic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใส 2 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นเติม 500 mM Na₂CO₃ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลายฟอลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล (Folin & Ciocalteu's Phenol reagent) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer รุ่น UV 5300 (METASH, China) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้ไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์ 1 หน่วย (Unit; U) เท่ากับปริมาตรของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาของการย่อยเคซีนให้ได้ 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Protease activity) ด้วยสมการ

$$\text{Protease activity (U/ml)} = (\text{Ty} \times \text{Vt}) / (\text{Ve} \times \text{T} \times \text{V})$$

Ty คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ไมโครโมล)

Vt คือ ปริมาตรของสารละลายในหลอดทดลองที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

Ve คือ ปริมาตรของเอนไซม์ที่นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (มิลลิลิตร)

V คือ ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ในหลอดทดลองที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

T คือ เวลาที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรต (นาที)

6.2 การวัดปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลาย bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 0, 80, 160, 240, 320 และ 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรรวมในแต่ละหลอดให้ครบ 500 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) 450 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer และวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เป็นเวลา 7-10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ความเข้มข้น 0 ไมโครลิตรเป็น blank นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานของ BSA

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากสารละลายตัวอย่าง โดยใช้ตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบแทนสารละลาย BSA และทำเช่นเดียวกับการวัดโปรตีนมาตรฐานที่กล่าวมาข้างต้น แต่ใช้ปริมาณสารละลายตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปคำนวณเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐาน BSA (Bradford, 1976) และคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ด้วยสมการ

$$\text{Specific activity (U/ mg protein)} = \frac{\text{protease activity (U/mL)}}{\text{total protein (mg/mL)}}$$

7. การคัดเลือกสูตรอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจากเห็ดสกุล *Pleurotus*

7.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเห็ดสกุล *Pleurotus* ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง (solid state cultivation)

7.1.1 การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

นำธัญพืชและวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรมาเป็นวัตถุดิบหลักในส่วนของ solid substrate เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ รำข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต (หยาบและป่น) กากถั่วเหลือง กากกาแฟ ลูกเดือย (หยาบและป่น) ถั่วเขียว (หยาบและป่น) และถั่วดำ (หยาบและป่น) โดยผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อวัตถุดิบ 10 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่ผ่านการคัดเลือก จำนวน 3 ชิ้น ใสลงใน solid substrate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 7 วัน จากนั้นสกัดเอนไซม์แบบหยาบ และนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป (อภิวิชญ์ ทองแก้ววน และธนัญชนก ไชยรินทร์, 2559)

7.1.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ทดสอบหาแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยนำแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ urea, potassium nitrate, casein, ammonium chloride (NH_4Cl), peptone, ammonium sulfate และ yeast extract ผสมกับน้ำกลั่นและแหล่งคาร์บอนที่ได้จากการทดสอบ 7.1.1 จากนั้นนำไปเลี้ยงเห็ดสกุล *Pleurotus* บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาจึงสกัดเอนไซม์แบบหยาบ และนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป (อภิวิญญ์ ทองแก้ววน และธนัญชนก ไชยรินทร์, 2559)

7.1.3 การคัดเลือกธาตุอาหารที่เหมาะสม

ทดสอบหาธาตุอาหารที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยนำธาตุอาหาร ได้แก่ magnesium sulfate (MgSO_4), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) และ sodium chloride (NaCl) ผสมกับน้ำกลั่นและใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการทดสอบ 7.1.1 และ 7.1.2 ตามลำดับ แล้วนำไปเลี้ยงเห็ดสกุล *Pleurotus* บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสกัดเอนไซม์แบบหยาบ และนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

หลังจากคัดเลือกธาตุอาหารที่ได้ผลดี จึงนำไปทดสอบหาความเข้มข้นของสารละลายธาตุอาหารชนิดนั้นที่เหมาะสม โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 และ 4.5 % (w/v) จากนั้นนำไปเลี้ยงเห็ดสกุล *Pleurotus* บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสกัดเอนไซม์แบบหยาบ และนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

7.2 การทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus* เพื่อกระตุ้นการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ทดสอบสถานะที่อาจมีผลต่อการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็งได้แก่

7.2.1 อุณหภูมิ

นำเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่คัดเลือกจากการทดลองข้อ 2 และ 3 เลี้ยงในอาหารแบบแข็งที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 7.1 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 28, 30, 35 และ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 7 วัน จากนั้นสกัดเอนไซม์แบบหยาบ และนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

7.2.2 ระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อ

นำเห็ดศกกุล *Pleurotus* ที่คัดเลือกจากการทดลองข้อ 2 และ 3 เลี้ยงในอาหารแบบแข็งที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 7.1 และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากการทดลองข้อ 7.2.1 เป็นระยะเวลา 3, 5, 7, 9, 11, 13 และ 15 วัน จากนั้นสกัดเอนไซม์แบบหยาบ และนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

7.2.3 pH

ทำการปรับค่า pH ของสารละลาย (liquid phase) ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 ด้วย 0.1 N sodium hydroxide และ 0.1 N hydrochloric acid แล้วนำไปผสมกับส่วนของ solid substrate ที่ได้จากการทดลองข้อที่ 7.1 ไปเลี้ยงเห็ดศกกุล *Pleurotus* ที่คัดเลือกจากการทดลองข้อ 2 และ 3 แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม (ตามการทดลอง 7.2.1 และ 7.2.2) จากนั้นสกัดเอนไซม์แบบหยาบ และนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

7.2.4 อัตราส่วนของแข็งและของเหลว (solid: liquid ratio) ที่เหมาะสม

เตรียมอาหารแบบแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้จากการทดลองข้อที่ 7.1 นำมาทดสอบอัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว ดังนี้ 2:2, 3:3, 4:4, 5:5, 6:6, 7:7, 8:8, 9:9 และ 10:10 กรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงเห็ดศกกุล *Pleurotus* ที่คัดเลือกจากการทดลองข้อ 2 และ 3 บ่มไว้ที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม (ตามการทดลอง 7.2.1 และ 7.2.2) จากนั้นสกัดสารละลายเอนไซม์เพื่อนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป

8. การสกัดเอนไซม์โปรติเอสแบบสกัดหยาบ

ตรวจสอบบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โดยหลังจากเลี้ยงเชื้อเห็ดศกกุล *Pleurotus* บนอาหารแข็งที่ทดสอบในแต่ละการทดลองแล้ว จากนั้นนำมาสกัดเอนไซม์ด้วยการเติม 50 mM glycine-HCl buffer (pH 3.0 และ 4.0), 50 mM acetate buffer (pH 4, 5.0 และ 6.0), 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0, 7.0, และ 8.0) และ 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เส้นใยกระจายตัวออกจากสับสเตรด (ทำในอ่างน้ำเย็น) บ่มนาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนใส ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany) เพื่อให้ปลอดเชื้อ จากนั้นเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ในหลอดเซนต์ปีวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อไป (อภิวิชญ์ทองแก้ววน และ ธนัญชนก ไชยรินทร์, 2559)

9. การตรวจสอบความคงที่ (stability) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

9.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงที่

นำสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ทุก ๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Naidu, 2011)

9.2 ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อความคงที่

นำสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบไปวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น (initial activity) จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20, 4, 10 และ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 6 เดือน

10. การตรวจสอบประสิทธิภาพของเห็ดสกุล *Pleurotus* และเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

10.1 การยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีไข่ไส้เดือนฝอย 30 ฟอง ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1: P + E

กรรมวิธีที่ 2: OP + E

กรรมวิธีที่ 3: C + E

กรรมวิธีที่ 4: OP + C + E

กรรมวิธีที่ 5: น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ + E (ชุดควบคุม)

เมื่อ P = เส้นใยเห็ด *Pleurotus* ที่เลี้ยงบน PDA, E = ไข่ไส้เดือนฝอยรากปม, OP = เส้นใยเห็ด *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารและสภาวะที่เหมาะสม (optimized *Pleurotus*) จากการทดลองที่ 7 และ C = เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ

บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 สังเกตการเจริญของเส้นใยที่ปกคลุมหรือแทงเส้นใยเข้าไปในภายในไข่ และนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ฟัก

ออกมาจากไข่ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวกลับ
เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และคำนวณเปอร์เซ็นต์การฟักด้วยสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การฟักไข่} = \frac{\text{จำนวนไข่ไส้เดือนฝอยที่ฟัก} \times 100}{\text{จำนวนไข่ไส้เดือนฝอยทั้งหมด}}$$

10.2 การทดสอบการตายของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 กรรมวิธี กรรมวิธี
ละ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีตัวอ่อนไส้เดือนฝอย 30 ตัว ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1: P + ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 (J2)

กรรมวิธีที่ 2: OP + J2

กรรมวิธีที่ 3: C + J2

กรรมวิธีที่ 4: OP + C + J2

กรรมวิธีที่ 5: น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ + J2 (ชุดควบคุม)

บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 สังเกตการ
ตายทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 วัน โดยนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ตาย และสังเกตลักษณะการเข้า
ทำลายของเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิดหัวกลับ เปรียบเทียบกับ
กรรมวิธีควบคุม และคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายด้วยสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตาย} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยที่ตาย} \times 100}{\text{จำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยทั้งหมด}}$$

11. การตรวจสอบประสิทธิภาพของเห็ดสกุล *Pleurotus* และเอนไซม์โปรติเอสสกัดยับยั้งการ ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในสภาพโรงเรือน

เตรียมต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์พวงชมพู 2 (ตราครุฑแดง) โดยนำเมล็ดแช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำลงถาดเพาะกล้า รดน้ำทุกเช้า หลังจากพีชอายุ ได้ 7 วันจึงย้ายไปปลูก
ในกระถางพลาสติก เพื่อใช้ทำการทดลองถัดไป

11.1 การทดสอบประสิทธิภาพเห็ด *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีตัวอ่อนไส้เดือนฝอยจำนวน 200 ตัว ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1: OP 1 ส่วน + J2

กรรมวิธีที่ 2: OP 2 ส่วน + J2

กรรมวิธีที่ 3: OP 3 ส่วน + J2

กรรมวิธีที่ 4: J2

กรรมวิธีที่ 5: ชุดควบคุม (ต้นมะเขือเทศที่ไม่ใส่ J2)

เมื่อ OP = Optimized *Pleurotus* ประกอบด้วยเส้นใย *Pleurotus* ที่คัดเลือกแล้วจากการทดลองข้อ 2 บนสับสเตรต (1 ส่วน เท่ากับ 7 กรัม)

11.2 ทดสอบประสิทธิภาพของเห็ดสกุล *Pleurotus* ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยแบ่งการทดลองเป็น 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีตัวอ่อนไส้เดือนฝอยจำนวน 200 ตัว ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1: OP ในปริมาณที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 11.1 + C + J2

กรรมวิธีที่ 2: C + J2

กรรมวิธีที่ 3: OP ในปริมาณที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 11.1

กรรมวิธีที่ 4: C

กรรมวิธีที่ 5: J2

กรรมวิธีที่ 6: ชุดควบคุม (ต้นมะเขือเทศที่ไม่ใส่ J2)

เมื่อ C = Crude protease ที่มีค่ากิจกรรม 0.41 ± 0.00 หน่วย/มิลลิลิตร

ย้ายต้นมะเขือเทศอายุ 1 เดือนลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว จำนวน 1 ต้น/กระถาง ตามการทดลอง 11.1 และ 11.2 แต่ละกระถางใส่ดิน 210 กรัม และทำการใส่ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จำนวน 200 ตัว/ต้น ลงไปในดินบริเวณใกล้รากต้นมะเขือเทศ หลังจาก 2-3 วัน จึงรดน้ำได้ตามปกติ

บันทึกผลการทดลองหลังจากใส่ไส้เดือนฝอยรากปมในวันที่ 10, 20 และ 30 โดยเก็บข้อมูล ดังนี้

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของคันทะเขือเทศ

ทำการวัดความสูงของลำต้นจากโคนถึงปลายยอด (เซนติเมตร) และวัดความยาวรากจากโคนถึงราก (เซนติเมตร)

การตรวจสอบการเกิดโรครากปม

ทำการนับจำนวนปม วัดขนาดปมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereoscopic microscope) และประเมินระดับการเกิดปมที่ราก ตามวิธีของ Taylor and Sasser (1978) ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 ระดับการเกิดปมที่ราก

จำนวนปม	ระดับปม
0	0
1-2	1
3-10	2
11-30	3
31-100	4
100+	5

ที่มา : Taylor and Sasser (1978)

ตรวจสอบการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยภายในรากมะเขือเทศด้วยการย้อมสี

ตัดรากขนาด 1-2 เซนติเมตร แล้วนำรากแช่ในสารละลาย 5 % NaOCl นาน 4 นาที ล้างด้วยน้ำก๊อกโดยเปิดให้ไหลผ่านรากประมาณ 45 วินาที นำรากที่ได้ไปย้อมสีด้วยการใช้ acid fuchsin โดยวางบีกเกอร์ที่มีตัวอย่างรากในสีย้อมบน hotplate ในตู้ดูดควัน จากนั้นนำรากล้างให้น้ำไหลผ่านเบา ๆ รากที่ย้อมสำเร็จลักษณะเนื้อเยื่อจะใส และเห็นไส้เดือนฝอยติดสีชมพูแดง แต่หากล้างด้วยน้ำเปล่าแล้วไม่ชัดเจนให้ล้างด้วย acidified glycerine เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที ถึง 1 นาที (ดัดแปลงวิธีการจาก Byrd *et al.*, 1983) จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

การสำรวจประชากรไส้เดือนฝอยรากปม

แยกไส้เดือนฝอยจากดินโดยใช้วิธี Sieving method and the modified Baermann's funnel techniques (Barker, 1985) โดยนำดินในกระถางที่ทดสอบแช่ในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใช้ไม้คนต่อเนื่อง 10 วินาที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เทน้ำผ่านตะแกรงร่อนหยาบ และกรองด้วยตะแกรงขนาด 60, 100, 200 และ 325 mesh ตามลำดับ จากนั้นใช้กระบอกน้ำฉีดให้ทั่วตะแกรง 325 mesh ลงในบีกเกอร์ และนำมาเทลงบนกระดาษทิชชูที่มีตะแกรงเหล็กวางบนกรวยที่ต่อกับสายยางที่ปลายกรวยและหนีบด้วยคลิป จากนั้นเติมน้ำลงบนกรวยให้ท่วมกระดาษทิชชู แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปล่อยน้ำจากกรวยผ่านสายยางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน counting dish จากนั้นนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และคำนวณค่า reproduction factor (Rf) ตามสมการดังนี้ (Oostenbrink, 1966; Proitea *et al.*, 2008)

$$Rf = Pf / Pi$$

โดย Pf (final population) คือ จำนวนไส้เดือนฝอยที่พบหลังจากการทดสอบ และ Pi (initial population) คือ จำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้น

12. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) โปรแกรม statistical package for the social sciences (IBM SPSS Version 22) โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

13. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาวนวัฒนกรรมการเกษตรและการจัดการ วิชาเอกการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

14. ระยะเวลาในการวิจัย

ทำการวิจัยตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2562 ถึงกันยายน 2564

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. เห็ดสกุล *Pleurotus* ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไข่ และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากลม *Meloidogyne incognita* เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ

จากการคัดเลือกเห็ดสกุล *Pleurotus* จำนวน 8 ไอโซเลตในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากลม *M. incognita* โดยประเมินจากการยับยั้งการฟักของไข่และอัตราการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าหลังจากทดสอบ 24 ชั่วโมง *P. pulmonarius* No.3 (PP-3) และ *P. ostruatus* (PO) ทำให้ไข่ของไส้เดือนฝอยรากลมมีเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำ คือ 5.00 ± 1.49 และ 8.33 ± 2.85 % ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่มีอัตราการฟักไข่คิดเป็น 16.67 ± 3.85 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และเมื่อทดสอบ 48 ชั่วโมง PP-3 และ PO มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 13.33 ± 3.44 และ 13.33 ± 3.44 ตามลำดับ และที่ 72 ชั่วโมง มีอัตราการฟักไข่คิดเป็น 28.33 ± 4.47 และ 31.67 ± 2.85 % ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่มีอัตราการฟักไข่คิดเป็น 60.00 ± 4.87 % (ตารางที่ 2)

สำหรับการประเมินการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 พบว่าหลังจากทดสอบ 24 ชั่วโมง *P. pulmonarius* No.3 (PP-3) และ *P. ostruatus* (PO) ทำให้ไส้เดือนฝอยรากลมมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง คือ 23.33 ± 3.85 และ 18.33 ± 2.85 % ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยชุดควบคุมมีอัตราการการตายเพียง 6.67 ± 2.43 % และอัตราการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ยังเพิ่มขึ้นตามลำดับ หลังจากทดสอบ 48 และ 72 ชั่วโมง จนสูงสุดถึง 71.67 ± 9.22 และ 66.67 ± 11.67 % เมื่อทดสอบกับ PP-3 และ PO ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ดังนั้นจึงคัดเลือก *P. pulmonarius* No.3 และ *P. ostruatus* เพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การที่ตัวอ่อนระยะที่ 2 มีการเคลื่อนที่ช้าลงหลังจากการทดสอบด้วยเส้นใยเห็ดทั้ง 2 ชนิด สอดคล้องกับการทดลองของ Khan *et al.* (2014) และ Barron และ Thorn (1986) โดยสาเหตุที่ทำให้ไส้เดือนฝอยหยุดเคลื่อนที่หรือเป็นอัมพาต เนื่องจากเชื้อเห็ด *Pleurotus* มีการสร้างสารพิษ (nematotoxin) ที่เรียกว่า ostreatin จากนั้นเส้นใยของเชื้อเห็ดแทงเข้าไปในตัวของไส้เดือนฝอยและย่อยสลายภายใน 2-3 วัน เช่นเดียวกับ ฤทธิไกร จันทะบุตร และคณะ (2555) นำเชื้อเห็ดในสกุล *Pleurotus* ได้แก่ *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* ทดสอบการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากลม พบว่าเส้นใยของเชื้อเห็ดสามารถปกคลุมกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากลมได้เร็วกว่าเชื้อราในกลุ่มอื่น หลังจากทดสอบเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งพินิจะ ชุมวิริยะสุขกุล และนิวัฒ เสนาะเมือง (2556) พบว่า เห็ด

สกุล *Pleurotus* มีประสิทธิภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยได้ 85-100 % ภายใน 24 ชั่วโมง โดยในการศึกษาครั้งนี้พบหยดสารพิษ (toxin droplets) ลักษณะคล้ายหยดน้ำที่เส้นใย (ภาพที่ 5A) และภายในเวลา 48 ชั่วโมงเส้นใยเห็ดแทงเข้าไปในไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย (ภาพที่ 5B และ C)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของเห็ดสกุล *Pleurotus* ที่ยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การฟัก ^{1/}		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
PO	8.33 ± 2.85 ^{bc}	15.00 ± 3.75 ^{bc}	31.67 ± 2.85 ^c
PC-1	13.33 ± 4.22 ^{ab}	18.33 ± 2.85 ^{bc}	35.00 ± 5.09 ^{bc}
PC-2	15.00 ± 3.75 ^{ab}	26.67 ± 5.44 ^b	45.00 ± 3.75 ^{bc}
PS	10.00 ± 1.72 ^b	16.67 ± 1.72 ^{bc}	33.33 ± 2.43 ^{bc}
PP-1	15.00 ± 2.85 ^{ab}	25.00 ± 2.85 ^b	41.67 ± 4.47 ^{bc}
PP-2	16.67 ± 3.85 ^a	28.33 ± 4.47 ^{ab}	50.00 ± 7.10 ^{ab}
PP-3	5.00 ± 1.49 ^c	13.33 ± 3.44 ^c	28.33 ± 4.47 ^c
PP-4	10.00 ± 3.85 ^b	23.33 ± 3.84 ^{bc}	33.33 ± 4.87 ^{bc}
กรรมวิธีควบคุม	16.67 ± 3.85 ^a	30.00 ± 5.16 ^a	60.00 ± 4.87 ^a

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± SE (n=4) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)

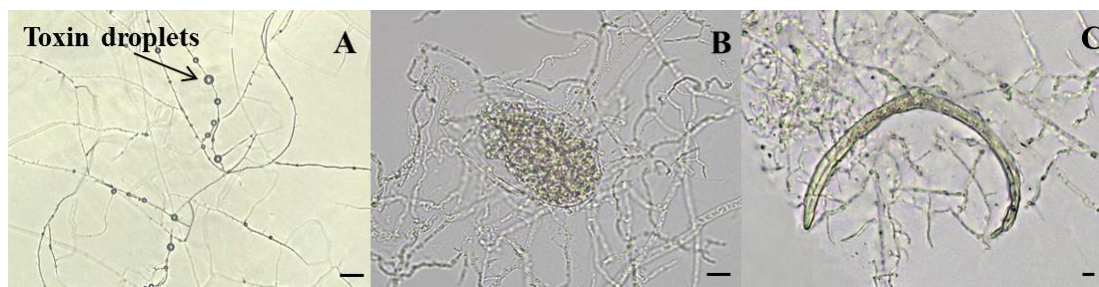
เมื่อ PO = *P. ostruatus*, PC-1 = *P. cystidiosus* No.1, PC-2 = *P. cystidiosus* No.2, PS = *P. sajor-caju*, PP-1 = *P. pulmonarius* No.1, PP-2 = *P. pulmonarius* No.2, PP-3 = *P. pulmonarius* No.3 และ PP-4 = *P. pulmonarius* No.4

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของเห็ดสกุล *Pleurotus* ต่อการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ^{1/}		
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
PO	18.33 ± 2.85 ^{ab}	28.33 ± 4.22 ^{ab}	66.67 ± 11.67 ^a
PC-1	11.67 ± 3.75 ^{bc}	23.33 ± 2.98 ^{bc}	40.00 ± 2.43 ^{bc}
PC-2	10.00 ± 1.72 ^{bc}	21.67 ± 2.85 ^{bc}	30.00 ± 1.72 ^{bc}
PS	13.33 ± 2.43 ^{bc}	25.00 ± 3.75 ^{ab}	45.00 ± 2.85 ^b
PP-1	11.67 ± 1.49 ^{bc}	21.67 ± 2.85 ^{bc}	31.67 ± 3.75 ^{bc}
PP-2	8.33 ± 2.85 ^{bc}	16.67 ± 3.85 ^{bc}	36.67 ± 3.85 ^{bc}
PP-3	23.33 ± 3.85 ^a	35.00 ± 3.85 ^a	71.67 ± 9.22 ^a
PP-4	13.33 ± 4.22 ^{bc}	23.33 ± 3.85 ^{bc}	41.67 ± 2.85 ^{bc}
กรรมวิธีควบคุม	6.67 ± 2.43 ^c	11.67 ± 2.85 ^c	21.67 ± 4.47 ^c

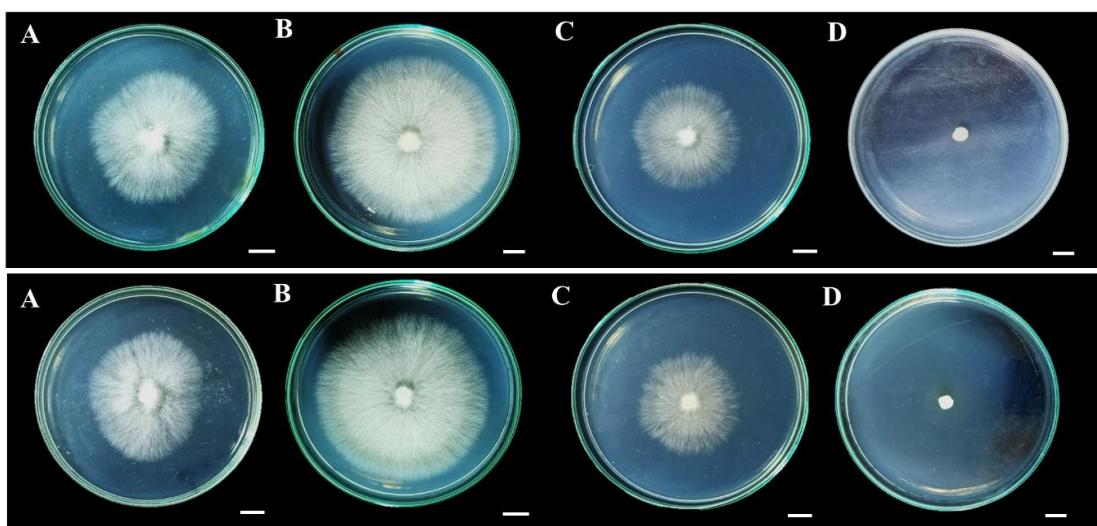
^{1/} ค่าเฉลี่ย ± SE (n=4) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)

เมื่อ PO = *P. ostruatus*, PC-1 = *P. cystidiosus* No.1, PC-2 = *P. cystidiosus* No.2, PS = *P. sajor-caju*, PP-1 = *P. pulmonarius* No.1, PP-2 = *P. pulmonarius* No.2, PP-3 = *P. pulmonarius* No.3 และ PP-4 = *P. pulmonarius* No.4



ภาพที่ 5 ลักษณะเส้นใยของเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No. 3 (PP-3) เข้าทำลายไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* หลังการทดสอบ 48 ชั่วโมง; (A) หยดสารพิษที่เกิดจากเส้นใย (toxin droplets), (B) เส้นใยเข้าทำลายไข่ และ (C) เส้นใยเข้าทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 (Bar = 20 μ m)

จากการตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใย *P. pulmonarius* No.3 และ *P. ostruatus* บนอาหาร PDA ในระยะเวลา 3 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส *P. pulmonarius* No.3 และ *P. ostruatus* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 7.0 ± 0.13 และ 6.9 ± 0.07 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 6) สอดคล้องกับรายงานของ Hoa และ Wang (2015) ที่ทดสอบสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเห็ด *Pleurotus* โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA และ yam dextrose agar (YDA) บ่มที่อุณหภูมิ 16, 20, 24, 28, 32 และ 36 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อเห็ด *P. ostreatus* และ *P. cystidiosus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

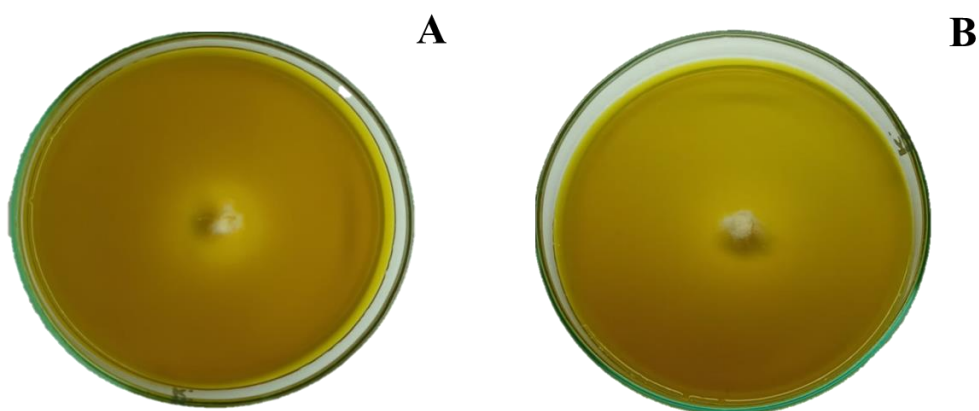


ภาพที่ 6 การเจริญของเส้นใย *P. pulmonarius* No.3 (บน) และ *P. ostruatus* (ล่าง) บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ระยะเวลา 3 วัน ที่บ่มในอุณหภูมิต่าง ๆ; (A) 25 °C, (B) 28 °C, (C) 30 °C และ, (D) 35 °C (bar = 1 cm)

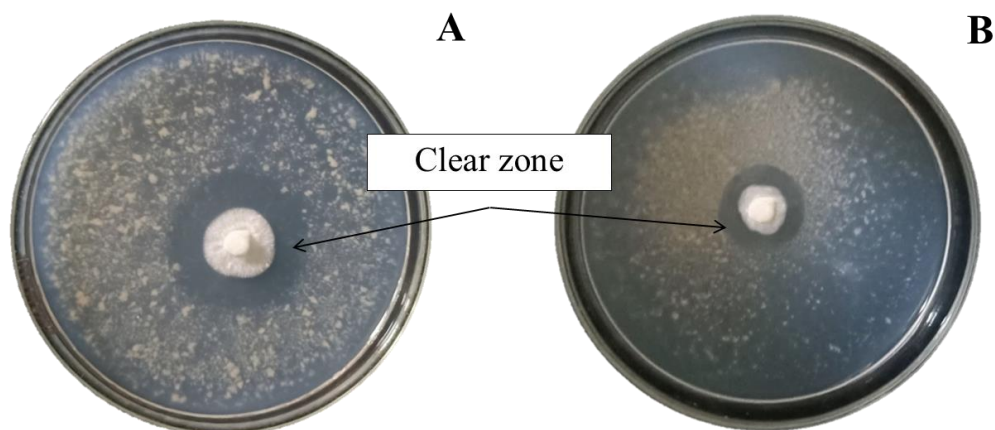
2. การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังลำตัวไส้เดือนฝอยของเห็ดสกุล *Pleurotus*

เอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์โปรติเอสถือเป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยย่อยสลายผนังลำตัวและเปลือกไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม (Dackman *et al.*, 1989) ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่า *P. pulmonarius* No.3 และ *P. ostruatus* ไม่สร้างเอนไซม์ไคตินเนสจากการทดสอบเบื้องต้น เนื่องจากพบว่าอาหารทดสอบไม่เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นม่วง (ภาพที่ 7) แต่จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสพบว่า *P. pulmonarius* No.3 และ *P. ostruatus* สร้างวงใสล้อมรอบโคโลนี วัดความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางได้ 4.50 ± 0.40 และ 1.90 ± 0.12 เซนติเมตร

ตามลำดับ ในระยะเวลา 3 วัน (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของราในสกุล *Pleurotus* เช่น Bano และคณะ (2016) พบว่า *P. eryngii* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง Genier และคณะ (2015) ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวไส้เดือนฝอย และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหรือสิ่งมีชีวิตที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยเอนไซม์โปรติเอสจากเห็ดสกุล *Pleurotus* ส่งผลให้ตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย *Panagrellus* sp. มีปริมาณลดลง 95.2 % ในระยะเวลา 3 วัน กลไกสำคัญในกระบวนการแทงเส้นใยเข้าทำลายไส้เดือนฝอย คือการที่เห็ดสกุล *Pleurotus* สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวของไส้เดือนฝอย ครอบคลุมการฟักของไข่ และทำให้ตัวอ่อนที่ฟักออกมาไม่สามารถมีชีวิตรอดในดินได้ (Inácio *et al.*, 2015)



ภาพที่ 7 การสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อเห็ด *Pleurotus* บนอาหาร colloidal chitin agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน; (A) *P. pulmonarius* No.3 และ(B) *P. ostruatus*



ภาพที่ 8 การเกิดวงใสของเชื้อสกุล *Pleurotus* บนอาหาร skim milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน; (A) *P. pulmonarius* No.3 และ (B) *P. ostreatus*

3. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (CF) จากเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus* ต่อการเข้าทำลายไข่ และตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปม

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ส่งผลกระทบต่อไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม โดยประเมินอัตราการฟักไข่ และอัตราการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าที่ 24 ชั่วโมง CF จากการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 (PP-3) ในอาหาร PDB , PDB + 1 % casein และอาหาร PDB + 1 % skim milk ทำให้ไส้เดือนฝอยมีการฟักไข่คิดเป็น 10.00 ± 7.07 , 8.00 ± 8.37 และ 10.00 ± 7.07 % ตามลำดับ ที่ 48 ชั่วโมง CF จากการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 (PP-3) ในอาหาร PDB , PDB + 1 % casein และอาหาร PDB + 1 % skim milk ทำให้ไส้เดือนฝอยมีการฟักไข่คิดเป็น 16.00 ± 5.48 , 10.00 ± 7.07 และ 20.00 ± 7.07 % ตามลำดับ สำหรับ *P. ostruatus* (PO) ที่ 24 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยมีการฟัก 8.00 ± 8.37 , 8.00 ± 4.47 และ 6.00 ± 8.94 % และที่ 48 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยมีอัตราการฟักไข่คิดเป็น 14.00 ± 11.40 , 14.00 ± 5.48 และ 16.00 ± 11.40 % ตามลำดับ แตกต่างจากชุดควบคุมที่มีอัตราการฟัก 16.00 ± 8.94 และ 32.00 ± 8.37 % ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 4)

cell-free culture filtrate จาก *P. pulmonarius* No.3 (PP-3) ในอาหาร PDB , PDB + 1 % casein และอาหาร PDB + 1 % skim milk ทำให้ตัวอ่อนระยะที่ 2 มีการตายคิดเป็น 70.00 ± 7.07 , 72.00 ± 13.04 และ 62.00 ± 8.37 % ตามลำดับ และ CF จาก *P. ostruatus* ทำให้ตัวอ่อนระยะที่ 2 มีอัตราการตายคิดเป็น 66.00 ± 11.40 , 68.00 ± 8.37 และ 62.00 ± 8.37 % ตามลำดับ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง แตกต่างจากชุดควบคุมที่มีอัตราการตายเพียง 4.00 ± 5.48 % อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่

ความเข้มข้น 95 % และการตายของไส้เดือนฝอยมีเปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้น หลังจากการทดสอบ 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 5)

Sharma (1994) รายงานว่า ไส้เดือนฝอย *Aphelenchoides composticola* หยุดการเคลื่อนที่ ในน้ำเลี้ยงเชื้อจากเห็ดสกุล *Pleurotus* ภายใน 2 ถึง 4 ชั่วโมง ส่งผลต่อการฟักไข่ และการตายของ ตัวอ่อนไส้เดือนฝอย เช่นเดียวกับ Palizi และคณะ (2009) ที่รายงานว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของเห็ดสกุล *Pleurotus* เพิ่มอัตราการตายของไส้เดือนฝอย *Heterodera schachtii* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใน น้ำเลี้ยงเชื้อมีสารพิษ ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นกรด linoleic acid และมีเอนไซม์โปรติเอสซึ่งมีผลต่อ การทำลายโปรตีน หรือคอลลาเจน ที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวไส้เดือนฝอย (cuticle) และ gelatinous matrix ที่ผนังกลุ่มไข่ (egg mass) รวมไปถึงมีผลต่อพัฒนาการของตัวอ่อนไส้เดือนฝอย (Satou *et al.*, 2008)

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของ cell-free culture filtrate จาก *P. pulmonarius* No.3 และ *P. ostruatus* ต่อการยับยั้งการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

<i>Pleurotus</i>	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การฟัก ^{1/}		
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
PP-3	PDB	10.00 ± 7.07 ^b	16.00 ± 5.48 ^{bc}	18.00 ± 4.47 ^{bc}
	PDB + 1% casein	8.00 ± 8.37 ^{bc}	10.00 ± 7.07 ^d	14.00 ± 8.94 ^c
	PDB + 1% skim milk	10.00 ± 7.07 ^b	20.00 ± 7.07 ^b	26.00 ± 5.48 ^b
PO	PDB	8.00 ± 8.37 ^{bc}	14.00 ± 11.40 ^c	18.00 ± 8.37 ^{bc}
	PDB + 1% casein	8.00 ± 4.47 ^{bc}	14.00 ± 5.48 ^c	18.00 ± 4.47 ^{bc}
	PDB + 1% skim milk	6.00 ± 8.94 ^c	16.00 ± 11.40 ^{bc}	24.00 ± 5.48 ^{bc}
control	distilled water	16.00 ± 8.94 ^a	32.00 ± 8.37 ^a	66.00 ± 13.42 ^a

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± SD (n=5) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกัน ทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)

PP-3 = *P. pulmonarius* No.3 และ PO = *P. ostruatus*

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของ cell-free culture filtrate จาก *P. pulmonarius* No.3 และ *P. ostruatus* ต่อการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากลม *M. incognita*

<i>Pleurotus</i>	อาหารเลี้ยงเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การตายตัวอ่อนระยะที่ 2 (%) ^{1/}		
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
PP-3	PDB	22.00 ± 17.89 ^a	70.00 ± 7.07 ^a	92.00 ± 10.95 ^a
	PDB + 1% casein	22.00 ± 13.04 ^a	72.00 ± 13.04 ^a	88.00 ± 13.04 ^a
	PDB + 1% skim milk	8.00 ± 8.37 ^{ab}	62.00 ± 8.37 ^a	90.00 ± 14.14 ^a
PO	PDB	20.00 ± 12.25 ^a	66.00 ± 11.40 ^a	94.00 ± 8.94 ^a
	PDB + 1% casein	24.00 ± 11.40 ^a	68.00 ± 8.37 ^a	90.00 ± 14.14 ^a
	PDB + 1% skim milk	14.00 ± 5.48 ^{ab}	62.00 ± 8.37 ^a	96.00 ± 8.94 ^a
control	distilled water	2.00 ± 4.47 ^b	4.00 ± 5.48 ^b	8.00 ± 8.37 ^b

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± SD (n=5) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)

PP-3 = *P. pulmonarius* No.3 และ PO = *P. ostruatus*

P. pulmonarius No.3 ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ผสม 1% casein และ *P. ostruatus* ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ผสม 1% skim milk มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นมากกว่าการเลี้ยงด้วยอาหาร PDB คือ 0.272 ± 0.464 และ 0.171 ± 0.157 หน่วย/มิลลิกรัม โปรตีน (ตารางที่ 6) ซึ่ง Bano และคณะ (2018) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อเห็ด *Pleurotus* คือการเลี้ยงด้วยอาหารที่มี casein เป็นส่วนประกอบ เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน Benmrad และคณะ (2019) ศึกษาสายพันธุ์ *Pleurotus* เพื่อทดลองการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเลี้ยงราในอาหารที่มี skim milk เป็นส่วนประกอบ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 10,500 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Sufiatea และคณะ (2017) ได้ศึกษาผลของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเห็ดสกุล *Pleurotus* เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอย พบว่าเอนไซม์โปรติเอสมีคุณสมบัติในการทำลายผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 32.74 หน่วย/มิลลิลิตร สามารถฆ่าตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยได้ 90 % ภายใน 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ค่าปริมาณโปรตีนรวม และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสใน cell-free culture filtrate ของเชื้อเห็ดสกุล *Pleurotus*

ไอโซเลท	อาหารเลี้ยงเชื้อ	Protease activity (U/ml) ^{1/}	Total protein (mg/ml) ^{1/}	Specific activity (U/mg protein) ^{1/}
PP-3	Control (PDB)	0.013 ± 0.005 ^b	0	0
	+ 1% casein	0.039 ± 0.010 ^a	2.195 ± 0.040 ^b	0.272 ± 0.040 ^a
	+ 1% skim milk	0.025 ± 0.004 ^a	2.886 ± 0.110 ^b	0.022 ± 0.001 ^d
PO	Control (PDB)	0.019 ± 0.004 ^b	0	0
	+ 1% casein	0.043 ± 0.004 ^a	9.408 ± 0.030 ^a	0.063 ± 0.000 ^c
	+ 1% skim milk	0.036 ± 0.001 ^a	0.386 ± 0.120 ^c	0.171 ± 0.010 ^b

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± SE (n=5) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)

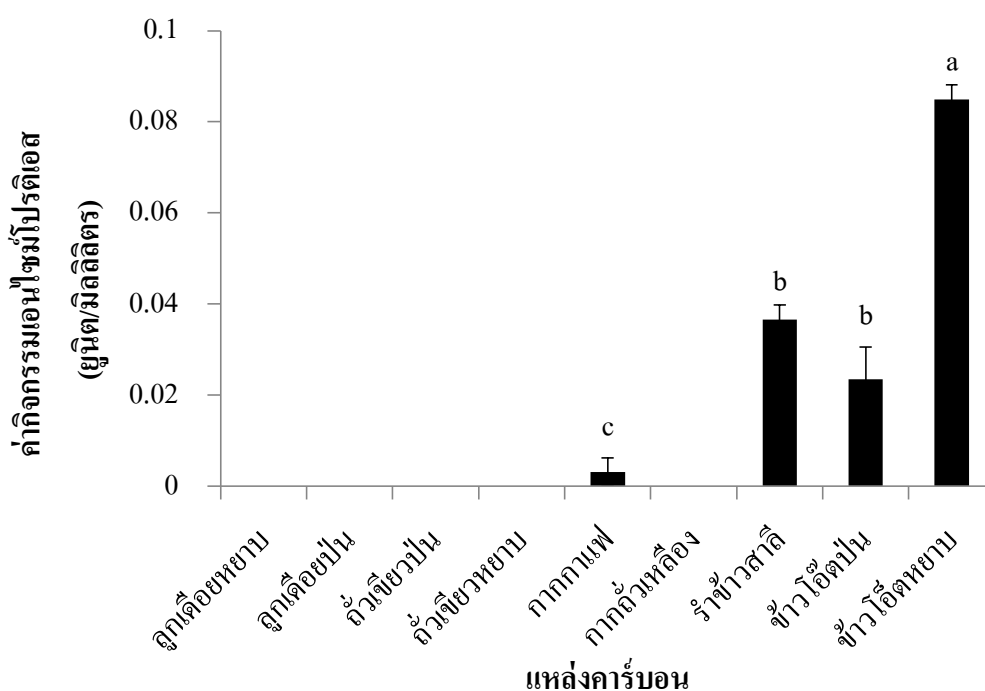
PP-3 = *P. pulmonarius* No.3 และ PO = *P. ostruatus*

จากงานวิจัยในครั้งนี้พบว่า *P. pulmonarius* No.3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการฟักไข่เพิ่มเปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำเลี้ยงเชื้อสูงกว่า *P. ostruatus* ดังนั้นจึงเลือกใช้ *P. pulmonarius* No.3 เป็นตัวแทนในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์โปรติเอสด้วยอาหารแบบแข็งต่อไป

4. แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง (solid state cultivation)

อาหารแบบเหลว (submerged culture) และอาหารแบบแข็ง (solid state culture) ถูกนำมาใช้เพื่อผลิตเอนไซม์อุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น เอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์เพคตินเอส เอนไซม์แทนเนส และเอนไซม์โปรติเอส (George *et al.*, 1997) ซึ่งพบว่าสำหรับเอนไซม์ที่ผลิตโดยอาหารแบบแข็งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าที่ผลิตจากอาหารแบบเหลว (Yang and Wang, 1999) ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว มักพบปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น และเชื้อราเจริญได้ช้า สอดคล้องกับ Tunga และคณะ (1998) ที่รายงานว่า การเลี้ยงเชื้อราในอาหารแบบเหลวเป็นวิธีการที่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น และมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการตรวจสอบบางปัจจัยในการเลี้ยงในอาหารเหลว เช่น การวัดมวลชีวภาพจุลินทรีย์ (microbial biomass) และการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น

การวิจัยครั้งนี้ ของแข็ง (solid phase) ในการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็งที่เหมาะสมเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *P. pulmonarius* No.3 และกระตุ้นการผลิตเอนไซม์โปรติเอสคือข้าวโอ๊ตบดหยาบ มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดคือ 0.084 ± 0.11 ยูนิต/มิลลิลิตร ต่างจากการใช้ธัญพืชและวัสดุทางการเกษตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 9) เส้นใยของ *P. pulmonarius* No.3 ที่เลี้ยงในข้าวโอ๊ตบดหยาบสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว ส่วนอาหารที่ใช้วัตถุดิบอื่น ๆ พบว่าเส้นใยหีดเจริญช้าและมีความหนาแน่นน้อยจึงอาจส่งผลให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่ำ ดังนั้น ข้าวโอ๊ตจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเส้นใยของ *P. pulmonarius* No.3 และการสร้างเอนไซม์โปรติเอส

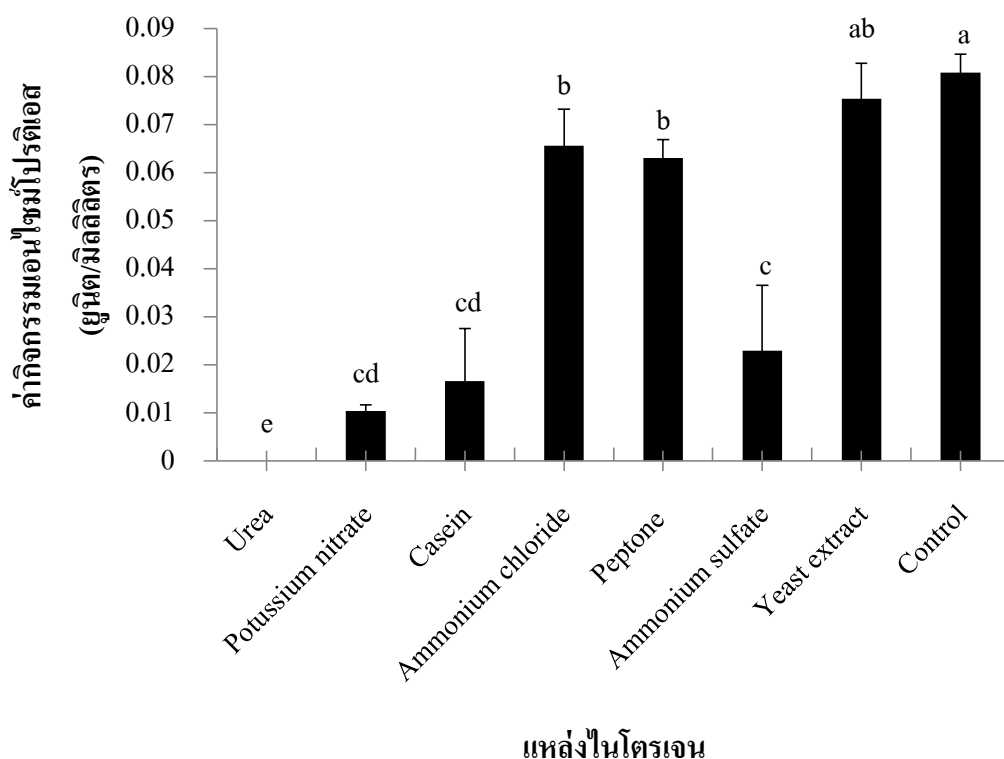


ภาพที่ 9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อหีด *P. pulmonarius* No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

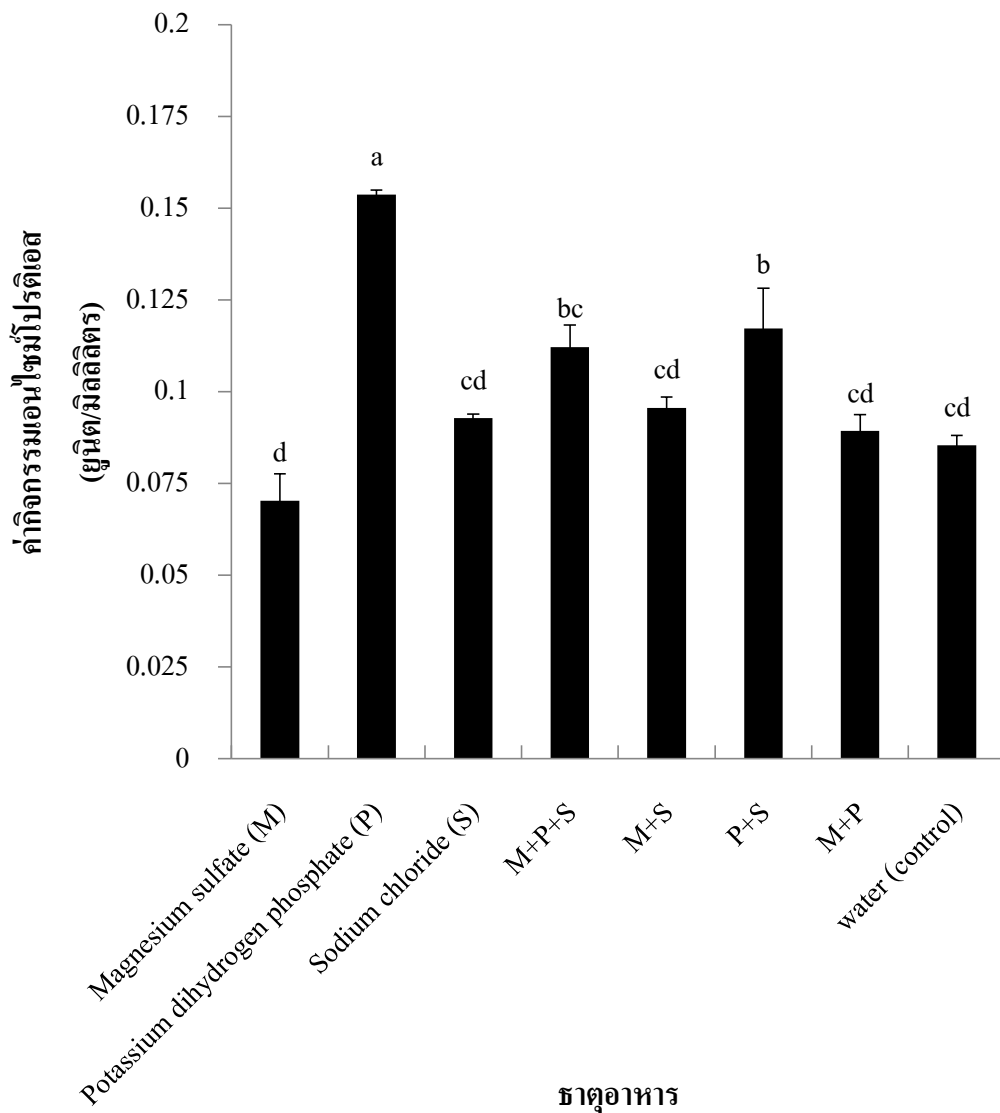
จากการรายงานของ Tsopmo และคณะ (2010) พบว่าข้าวโอ๊ตเป็นธัญพืชที่ให้ปริมาณโปรตีนสูงสุดในบรรดาธัญพืชส่วนใหญ่ และเมื่อพิจารณาแหล่งสับสเตรตต่าง ๆ และจากผลการศึกษาของ Nguyen และคณะ (2020) พบว่าข้าวสาลีและข้าวไรย์เป็นธัญพืชที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยของ *P. eryngii* มากที่สุด ในขณะที่ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยของ *P. ostreatus* ทั้งนี้สับสเตรตที่มีพื้นที่ผิวขนาดใหญ่และมีรูพรุน มีอิทธิพลต่อการเพิ่มอัตรา

การเจริญของเส้นใย ด้วยเหตุนี้ข้าวบาร์เลย์และข้าวโอ๊ตที่มีขนาดใหญ่และมีรุกรุนมากกว่าข้าวสาลี และข้าวไรย์ จึงทำให้เส้นใยของ *P. ostreatus* ที่เลี้ยงบนข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เลย์เจริญเร็วกว่า *P. eryngii* ที่เลี้ยงบนข้าวสาลีและข้าวไรย์ (Tinoco *et al.*, 2001)

เมื่อเติม yeast extract, ammonium chloride และ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนผสม กับข้าวโอ๊ตบดหยาบ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสมีค่ากิจกรรม 0.08 ± 0.01 , 0.06 ± 0.00 และ 0.02 ± 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร ต่างจากแหล่งไนโตรเจนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ กรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น) กลับไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 10) จากนั้นเมื่อทดสอบการเติมธาตุอาหารพบว่าเมื่อเติมสารละลาย potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ลงในข้าวโอ๊ตบดหยาบเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา *P. pulmonarius* No.3 เอนไซม์โปรติเอสมีค่ากิจกรรม 0.15 ± 0.001 ยูนิต/มิลลิลิตร ต่างจากธาตุอาหารอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 11)



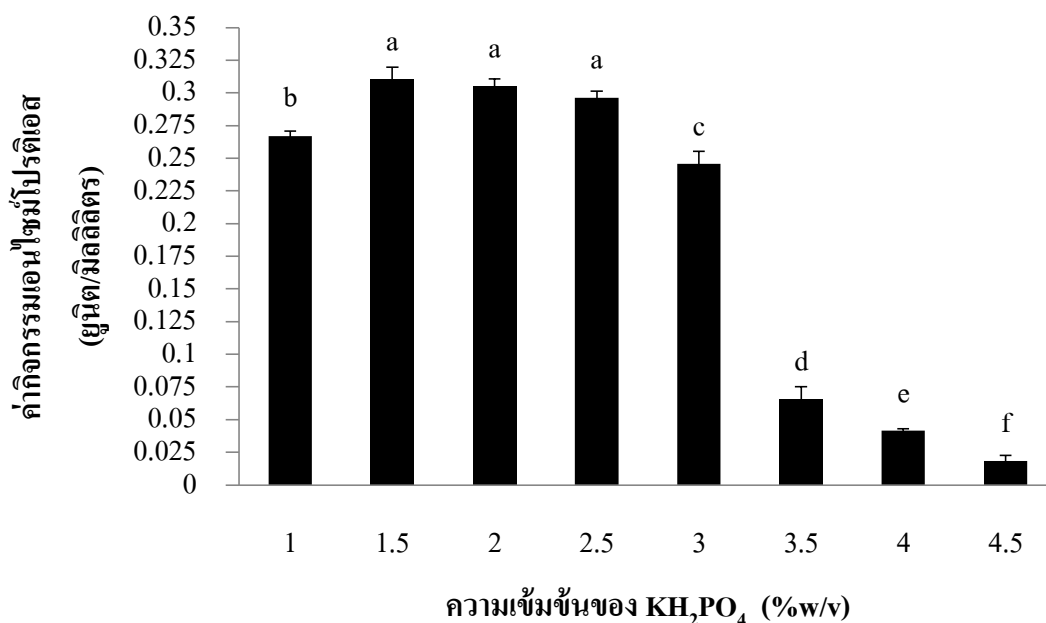
ภาพที่ 10 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง



ภาพที่ 11 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรติเอสเมื่อใช้ธาดูอาหารต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

ความเข้มข้นของสารละลาย KH_2PO_4 ที่ 1.5, 2 และ 2.5 % (w/v) เมื่อเติมลงไปในช่วงการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ผลิตเอนไซม์ไพรติเอสได้ดียิ่งขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.29 ± 0.00 ถึง 0.31 ± 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างกับปริมาณความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 12) รายงานวิจัยของ Paranthaman และคณะ (2009) และ Kamath และคณะ (2010) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแบบแข็งและเติม KH_2PO_4 เป็นส่วนประกอบในอาหาร มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรติเอสเพิ่มสูงขึ้น Chang และ Miles (2009) ได้อธิบายว่าอาหารที่มีโพแทสเซียมเป็นส่วนประกอบสามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อเห็ด *Pleurotus*

นอกจากนี้ Curvetto และคณะ (2002) รายงานว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนและธาตุอาหาร 1.75 ถึง 2.20% เหมาะสมสำหรับการสร้างเส้นใยของเห็ด และความเข้มข้นของสารที่น้อยถือเป็นการลดต้นทุนในการเลี้ยงเชื้อ (Spaargaren, 1996)

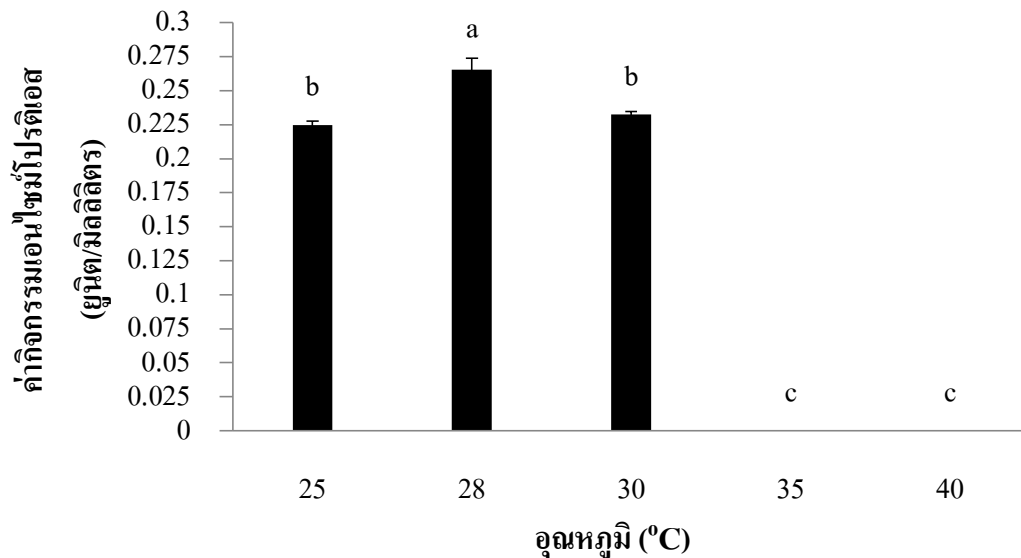


ภาพที่ 12 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเมื่อ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ในสถานการณ์เลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

5. สถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนโดย *P. pulmonarius* No.3

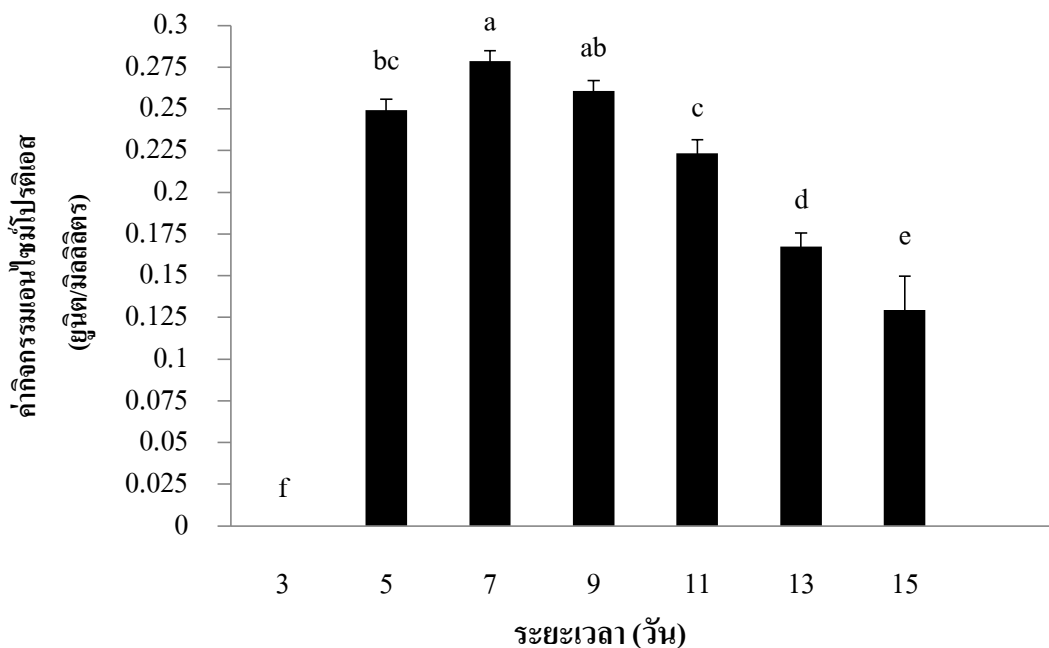
หลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเส้นใยของ *Pleurotus* spp. เช่น สูตรอาหาร อุณหภูมิ แหล่งของคาร์บอน และไนโตรเจน เป็นต้น (Sofi *et al.*, 2014) เช่นเดียวกับ Eira (2003) รายงานว่าการอยู่รอดและการเพิ่มเส้นใยของเห็ดนั้นสัมพันธ์กับปัจจัยหลายประการ เช่น อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจน แหล่งแร่ธาตุ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น และขนาดอนุภาคของสับสเตรต ในการกระตุ้นให้เห็ดสกุล *Pleurotus* ผลิตเอนไซม์โปรตีนบนอาหารแบบแข็งนอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 บนอาหารที่มีข้าวโอ๊ตผสมสารละลาย KH_2PO_4 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนสูงที่สุดคือ 0.26 ± 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างกับการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 13) ซึ่ง Adebayo-Tato และคณะ (2011) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเส้นใยของเชื้อ *P. ostreatus* คือ 25-30 องศาเซลเซียส



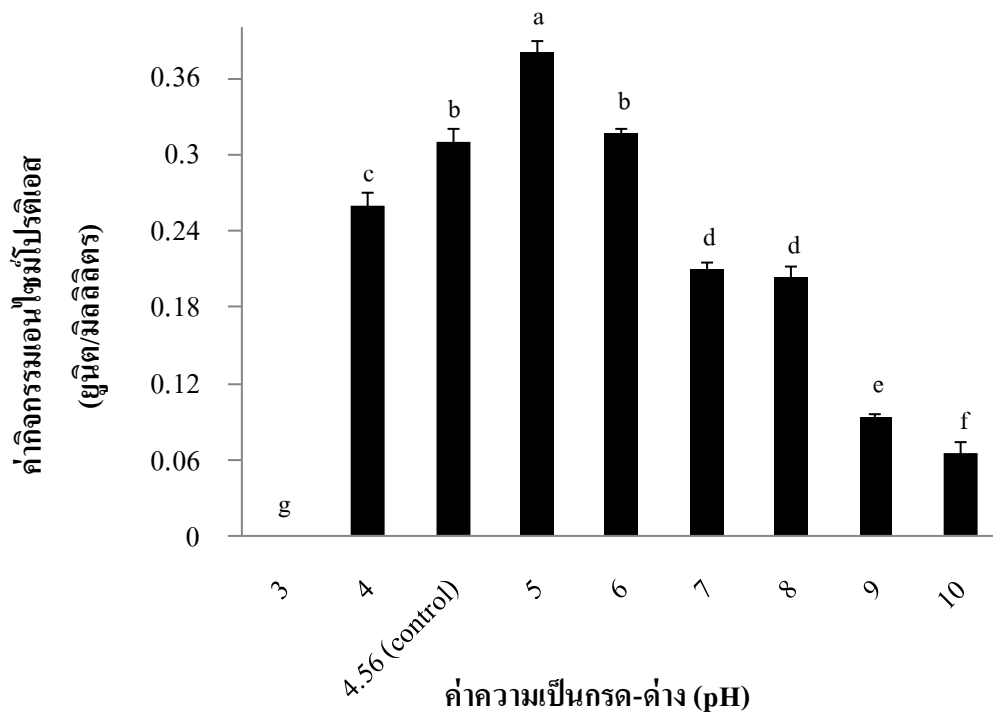
ภาพที่ 13 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรอดีเอสเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *P. pulmonarius* No.3 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่างกัน พบว่าในวันที่ 7 และ 9 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรอดีเอสเพิ่มสูงขึ้นที่ 0.28 ± 0.01 และ 0.26 ± 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรอดีเอสลดลงอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่วันที่ 11 ของการเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 14) สอดคล้องกับรายงานของ Iandolo และคณะ (2011) ที่พบว่าเชื้อ *P. ostreatus* และ *Trametes versicolor* ที่เลี้ยงด้วยอาหารแบบแข็งที่มีเปลือกและเมล็ดมะเขือเทศเป็นส่วนประกอบ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรอดีเอสเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 4 วัน และเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 หลังจากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรอดีเอสจึงเริ่มลดลง



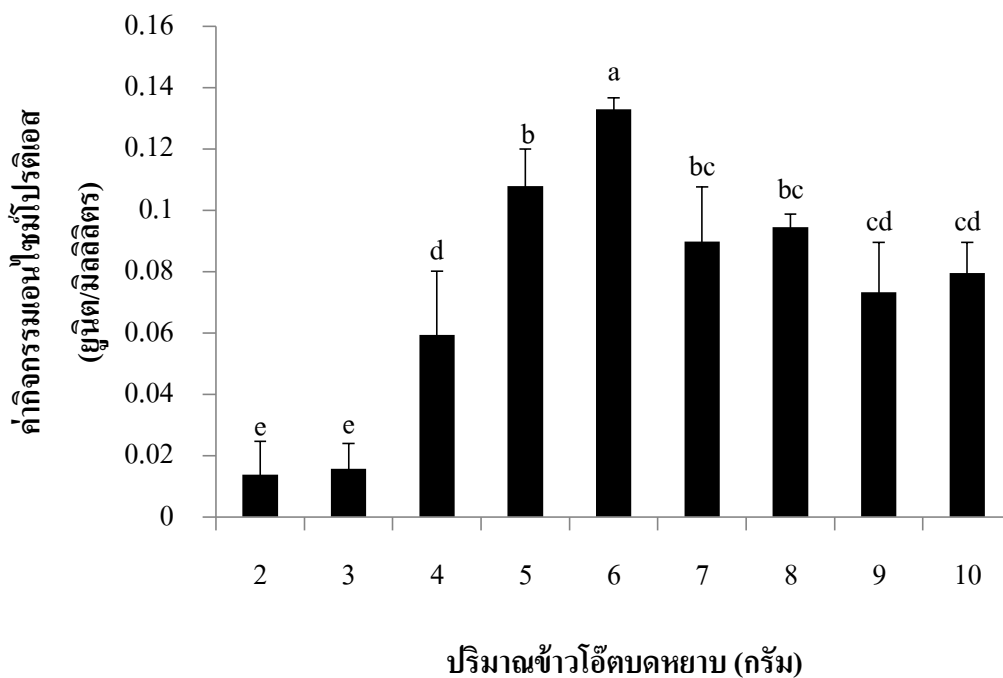
ภาพที่ 14 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อบ่มที่ 28 °C เป็นระยะเวลาต่างกัน ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

จากการทดสอบค่าความเป็นกรดต่างในของเหลว (liquid phase) ที่ผสมในข้าวโอ๊ต พบว่าที่ pH 5.0 มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้ *P. pulmonarius* No.3 ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงขึ้นโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.38 ± 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร (ภาพที่ 15) ซึ่งจากการรายงานของ Chang และ Miles (2009) พบว่า pH 5.0 และ 5.5 ส่งผลให้เส้นใยเห็ด *Pleurotus* sp. เจริญได้ดี และเส้นใยเจริญช้าลงเมื่อ pH สูงขึ้น นอกจากนี้ Adebayo-Tato (2011) รายงานว่า pH ที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus niger* คือในช่วง pH 5.0-7.0 ซึ่งค่า pH ของอาหารที่สูงขึ้นส่งผลต่อกระบวนการสร้างเอนไซม์ การขนส่งสารประกอบต่าง ๆ ในเซลล์เมมเบรน และการเผาผลาญเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ (Sandhya et al., 2005)

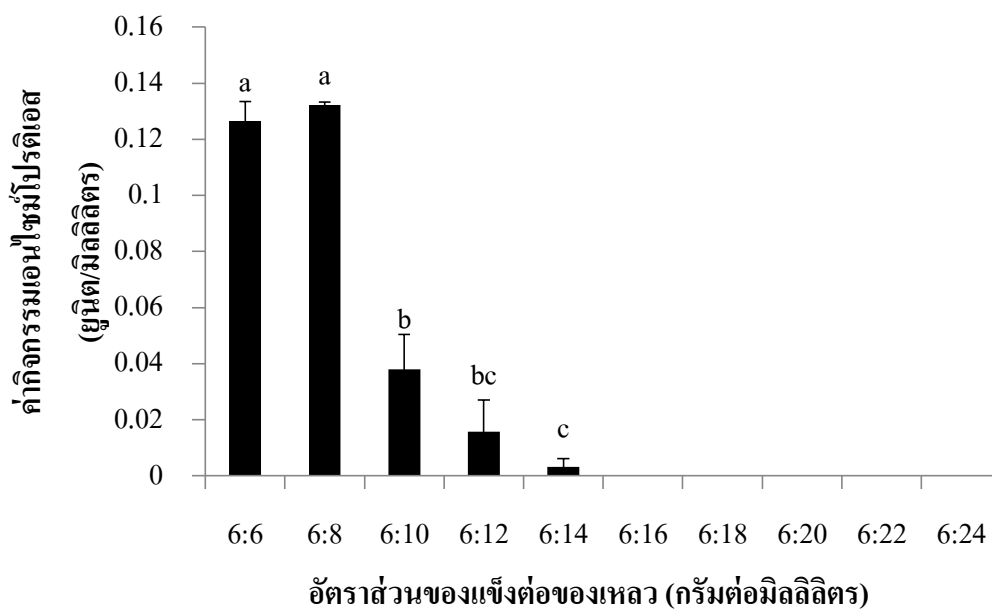


ภาพที่ 15 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไพรติเอสเมื่อปรับความเป็นกรดต่างของของเหลวในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

ปริมาณของแข็ง (solid phase) ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 คือ ข้าวโอ๊ตบดหยาบ 6 กรัมโดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไพรติเอส 0.12 ± 0.00 ยูนิต/มิลลิลิตร แตกต่างจากปริมาณอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 16) จากนั้นเมื่อได้ปริมาณของของแข็งที่เหมาะสมแล้ว จึงทดสอบอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลว (S:L ratio) ซึ่งพบว่า ข้าวโอ๊ตบดหยาบและสารละลาย KH_2PO_4 pH 5.0 ในอัตราส่วน 6:6 และ 6:8 (g:ml) เป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อรา *P. pulmonarius* No.3 ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไพรติเอสเท่ากับ 0.13 ± 0.01 และ 0.11 ± 0.10 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ แตกต่างจากอัตราส่วนอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 17) ซึ่ง Curvetto และคณะ (2002) รายงานว่า เส้นใยของ *P. ostreatus* เจริญได้ดีเมื่อมีการปรับอัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลวในการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง



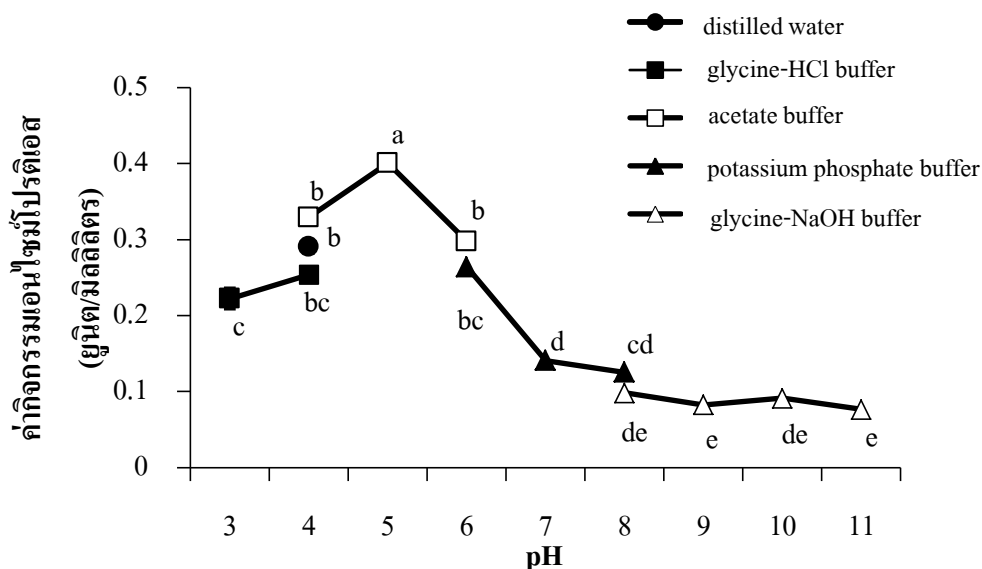
ภาพที่ 16 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อปรับปริมาณของสับสเตรตในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ในสถานะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง



ภาพที่ 17 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเมื่อปรับอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ในสถานะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

6. บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์

เอนไซม์ที่ *P. pulmonarius* No.3 ผลิตขึ้นบนอาหารแบบแข็งจำเป็นต้องสกัดออกมาให้อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้พบว่า acetate buffer pH 5.0 มีประสิทธิภาพในการสกัดเอนไซม์โปรตีนที่ผลิตโดยรา *P. pulmonarius* No.3 ได้ดีที่สุดในค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.40 ± 0.00 ยูนิต/มิลลิลิตร (ภาพที่ 18) ซึ่งรายงานหลายฉบับที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์โปรตีนโดยเชื้อจุลินทรีย์ชี้ให้เห็นว่า pH ที่เหมาะสมของบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์โปรตีน คือในช่วง 5.0-8.0 เช่น pH 7.0 เหมาะสำหรับการสกัดเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ *Aspergillus niger* (Ahmed *et al.*, 2011) การใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 4.0-7.0 ในการสกัดเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อรา *P. giganteus* ส่งผลให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรตีนสูงแต่ค่า pH ที่ 8.0 ขึ้นไปกลับทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรตีนลดลงอย่างต่อเนื่อง (Kumla *et al.*, 2011)



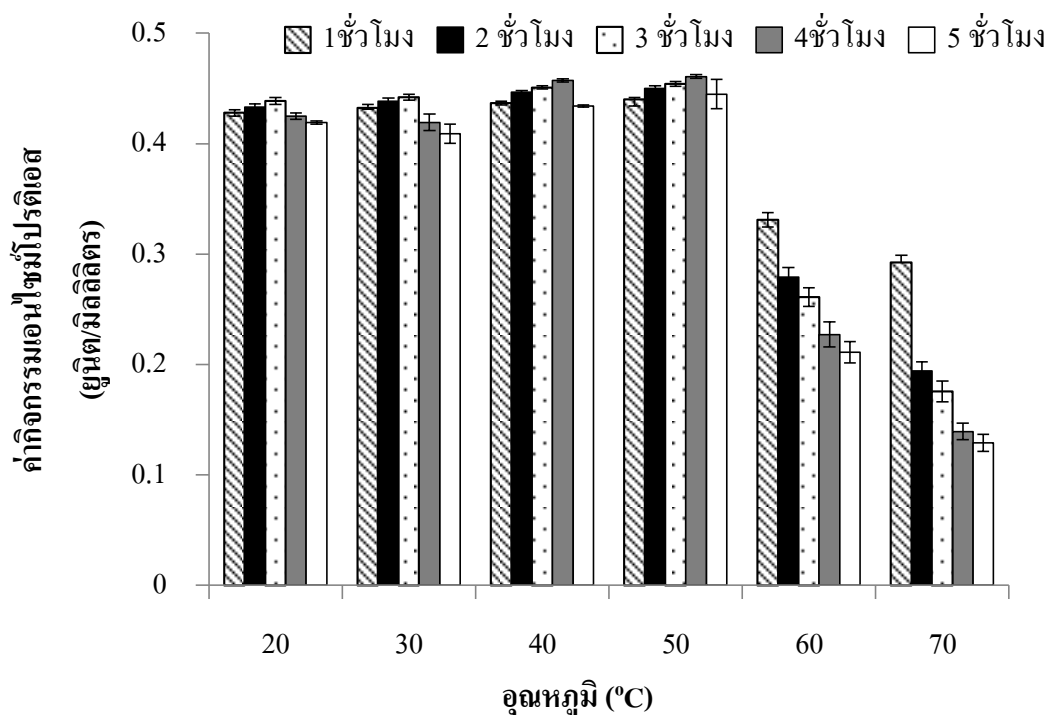
ภาพที่ 18 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่ pH ต่างกันในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแบบแข็ง

ดังนั้น เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *P. pulmonarius* No.3 ในอาหารที่มีข้าวโอ๊ต 6 กรัม และ 1.5-2.5 % KH_2PO_4 pH 5.0 ปริมาตร 6-8 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน และสกัดด้วย 50 mM acetate buffer pH 5.0 ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง

0.41 ± 0.00 ยูนิต/มิลลิลิตร หรือคิดเป็น 4.6 เท่า จากเดิมที่ไม่ได้ทดสอบแหล่งอาหารและสภาวะที่เหมาะสม (0.09 ± 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร)

7. ความคงที่ (stability) ของค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

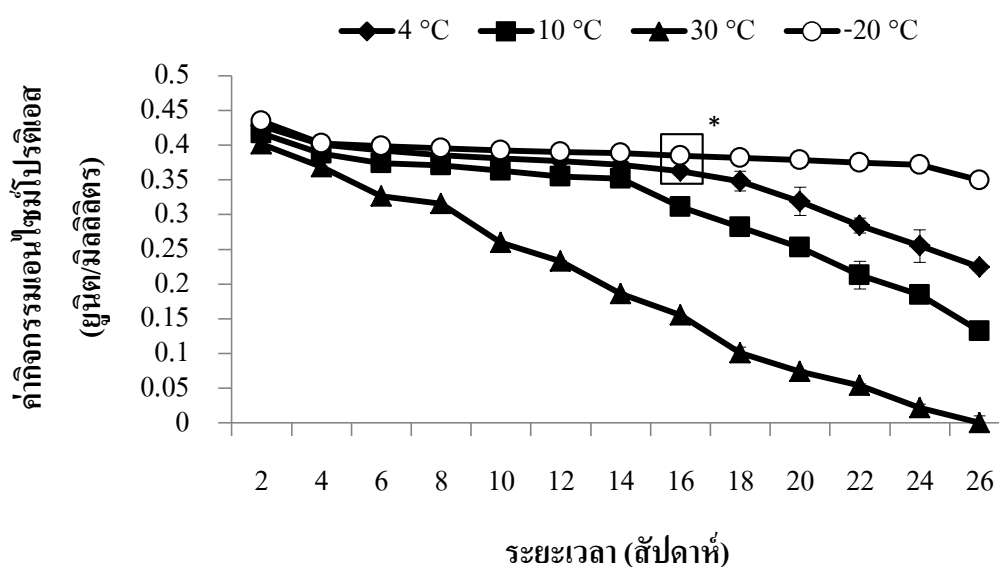
เมื่อป้อนสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงเมื่อป้อนเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อป้อนเป็นเวลา 5 ชั่วโมง แต่เมื่อป้อนสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตั้งแต่นับชั่วโมงที่ 1 (ภาพที่ 19) จากรายงานวิจัยของ Shaba และ Baba (2012) พบว่าสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตจากโดยเชื้อ *P. ostreatus* และเชื้อ *Gleophyllum sepiarium* สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 50-70 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลง



ภาพที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อค่าความคงที่ (stability) ของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ คือที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งในสัปดาห์ที่ 16 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเก็บรักษานานกว่า 16 สัปดาห์ควรเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพราะค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียง 5.17 % จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 2) แต่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2

องศาเซลเซียส) ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างต่อเนื่องจนเท่ากับ 0 ในสัปดาห์ที่ 26 (ภาพที่ 20) สอดคล้องกับ Ahmed (2011) ที่รายงานว่า การเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) นาน 30 วัน ทำให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงเหลือ 85 % Sattar (2018) รายงานว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลง 33.0 % หลังจากระยะเวลาเก็บรักษา 30 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส และ พิมพ์พร ศรีสันติแสง และคณะ (2556) พบว่า หากเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน เอนไซม์มีค่ากิจกรรมลดลงเพียง 8.75 % แสดงให้เห็นว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์มีความคงที่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

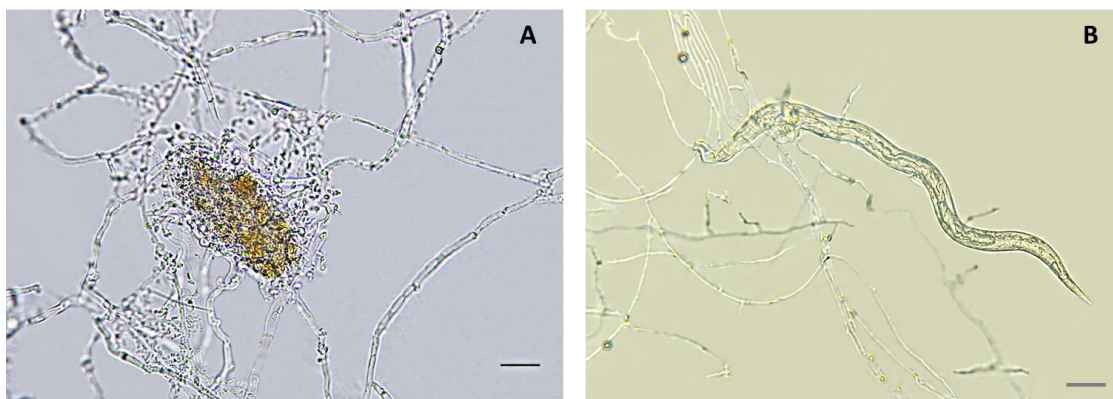


ภาพที่ 20 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อค่าความคงที่ (stability) ของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ

8. ประสิทธิภาพของเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม (optimized *Pleurotus*) และเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ และการใช้เส้นใยรา *Pleurotus* ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ ทำให้ไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมไม่ฟักเป็นตัวอ่อน (เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ = 0) แตกต่างจากกรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 7)

สำหรับการประเมินอัตราการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) พบว่ากรรมวิธีที่ทดสอบด้วยเส้นใยรา *Pleurotus* ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมทำให้ J2 ตาย 100 % หลังจากทดสอบ 4 วัน แตกต่างจากกรรมวิธี อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % (ตารางที่ 8) ทั้งนี้เส้นใยรา *P. pulmonarius* No.3 ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสมสามารถเข้าทำลายไข่และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ใน 24 ชั่วโมง ดังภาพแสดงที่ 21



ภาพที่ 21 เส้นใยของ *P. pulmonarius* No.3 ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เข้าทำลายไข่ (A) และตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* (B) หลังการทดสอบ 24 ชั่วโมง (Bar = 20 μ m)

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของเห็ดสกุล *P. pulmonarius* No.3 ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสมและเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบต่อการฟักไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

กรรมวิธี	การฟักไข่ (%) ^{1/}														
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14	Day 15
P	0b	2.67 ±3.65a	6.00 ±2.788a	10.67 ±2.79a	17.33 ±5.48a	18.00 ±4.47b	20.67 ±4.35b	26.67 ±4.08b	29.33 ±3.65b	30.00 ±2.36b	31.33 ±2.98b	35.333 ±2.98b	38.67 ±2.98b	38.67 ±2.98b	38.67 ±2.98b
OP	0b	2.67 ±3.65a	6.67 ±4.082a	8.00 ±2.98a	10.67 ±3.65b	13.33 ±2.36b	18.00 ±5.58b	22.67 ±4.35b	24.00 ±2.79b	25.33 ±1.83b	26.00 ±1.49c	26.00 ±1.49c	26.00 ±1.49c	26.00 ±1.49c	26.00 ±1.49c
C	0b	0b	0b	0b	0c	0c	0c	0c	0c	0c	0d	0d	0d	0d	0d
OP +C	0b	0b	0b	0b	0c	0c	0c	0c	0c	0c	0d	0d	0d	0d	0d
water	1.33 ±1.83a	3.30 ±2.36a	5.33 ±3.80a	8.00 ±1.83a	17.33 ±3.65a	33.33 ±4.08a	47.33 ±4.94a	50.67 ±4.35a	59.33 ±7.96a	63.33 ±7.07a	71.33 ±5.58a	78.00 ±3.80a	86.67 ±4.08a	93.33 ±5.27a	100.00 ±0a

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (n=5) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)

P = เส้นใย *Pleurotus* บนอาหาร PDA, OP = เส้นใย *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสม (Optitized *Pleurotus*),

C = เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของเชื้อสกุล *P. pulmonarius* No.3 ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสมและเอนไซม์โปรติเอสสกัดยับยั้งการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*

กรรมวิธี	การตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 (%) ^{1/}														
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14	Day 15
P	24.00 ±2.79a	46.67 ±4.08a	67.33 ±4.35a	79.33 ±5.96b	91.33 ±6.91b	98.00 ±2.98a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.0 0±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a
OP	26.00 ±2.79a	50.67 ±2.79a	73.33 ±4.71a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a	100.00 ±0a
C	1.333 ±1.83b	3.33 ±2.36b	9.33 ±4.35b	13.33 ±2.36c	17.33 ±2.79c	20.67 ±2.79b	24.00 ±3.65b	28.67 ±2.98b	35.33 ±5.06b	41.33 ±3.80b	45.33 ±3.80b	49.33 ±3.65b	53.33 ±3.333b	59.33 ±4.94b	66.00 ±4.94b
OP+C	0.67 ±1.49b	2.67 ±2.79b	8.00 ±3.80b	13.33 ±5.27c	18.00 ±5.06c	22.00 ±3.80b	24.67 ±2.99b	28.00 ±3.80b	33.33 ±3.33b	40.00 ±5.27b	46.00 ±5.48b	50.67 ±5.48b	54.67 ±3.80b	60.67 ±5.48b	69.33 ±6.41b
water	0c	0c	0c	0d	0.67 ±1.49d	1.33 ±1.83c	3.33 ±2.36d	4.00 ±1.49d	4.00 ±1.49d	4.67 ±1.83d	5.33 ±1.83d	6.67 ±2.36d	7.33 ±2.79d	8.00 ±1.83d	8.67 ±1.83d

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (n=5) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้งของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)

P = เส้นใย *Pleurotus* บนอาหาร PDA, OP = เส้นใย *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสม (Optimized *Pleurotus*),
C = เอนไซม์โปรติเอสสกัดยับยั้ง

9. ประสิทธิภาพของเห็ด *P. pulmonarius* No.3 ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม และเอนไซม์โปรติเอสสกัดยับยั้งการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในสภาพโรงเรือน

หลังจากการทดสอบในสภาวะห้องปฏิบัติการ และพบว่า *P. pulmonarius* No.3 ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมและเอนไซม์โปรติเอสสกัดยับยั้งสามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ จึงนำมาทดสอบการยับยั้งโรครากปมในมะเขือเทศภายใต้สภาวะโรงเรือน โดยพบว่าในแง่ของจำนวนปม ระดับการเกิดปม และ Reproduction factor (Rf) ของกรรมวิธีที่ใช้ OP 3 ส่วน มีความแตกต่างจากกรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ มีจำนวน 16.00 ± 3.90 ปม การเกิดปมระดับ 3 และค่า Rf เท่ากับ 0.52 ± 0.03 แต่ขนาดปมและจำนวนถุงไข่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้ OP 2 ส่วน (ตารางที่ 9) และเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นมะเขือเทศที่ทดสอบพบว่ากรรมวิธีที่ใช้ OP 3 ส่วน ความสูงของต้นและความยาวของรากเท่ากับ 37.58 ± 2.87 และ 14.93 ± 0.40 เซนติเมตร ตามลำดับ มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 10) ทั้งนี้สาเหตุที่ต้นมะเขือเทศเตี้ย และรากกุดสั้น เมื่อใช้ OP 3 ส่วน อาจมีสาเหตุเนื่องจากมีเส้นใยของ *P. pulmonarius* No.3 มากเกินไปจนอัดแน่นทำให้น้ำท่วมขังภายในกระถางและเกิดดอกเห็ดขึ้น (ภาพที่ 22) จึงส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยาของต้นมะเขือเทศดังกล่าว ดังนั้น จึงเลือกใช้ OP ปริมาณ 2 ส่วน (OP 2) ในการทดลองร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสสกัดยับยั้งต่อไป

ตารางที่ 9 การประเมินการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในมะเขือเทศ หลังจากการทดสอบด้วย Optimized *Pleurotus* เป็นเวลา 30 วัน

กรรมวิธี	จำนวนปม	ขนาดปม (มม.)	ระดับการเกิด ปม	จำนวนกลุ่ม ไข่	Rf
OP 1 + J2	40.67±1.37b	1.49±0.40b	4	23.00±1.79b	0.76±0.01b
OP 2 + J2	35.67±5.24b	1.39±0.17b	4	15.00±0.89c	0.68±0.02c
OP 3 + J2	16.00±3.90c	1.18±0.40b	3	13.33±1.86c	0.52±0.03d
J2	77.00±5.57a	2.05±0.36a	4	41.67±2.73a	1.47±0.01a
Control (without J2)	0	-	0	0	-

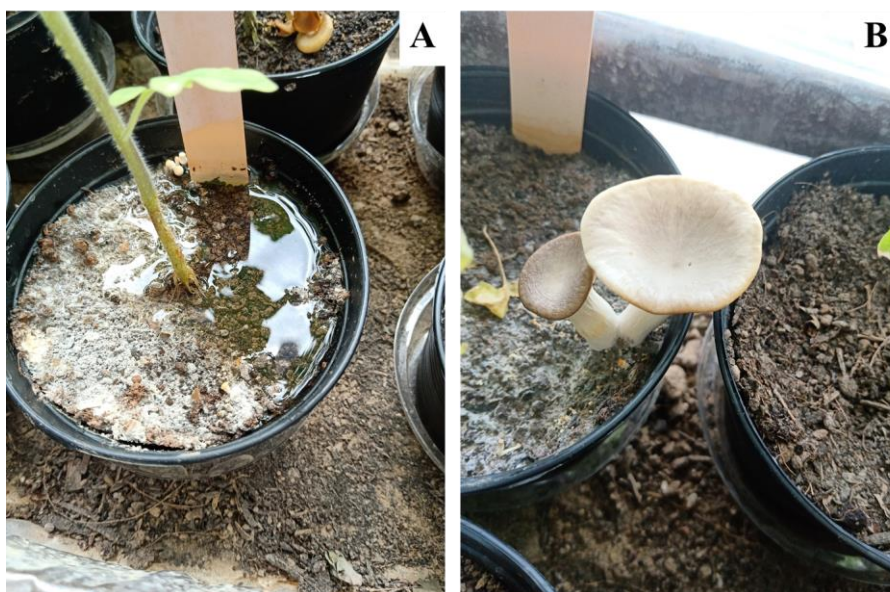
^{1/} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (n=3) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์ของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)
 OP = เส้นใยเห็ด *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสม (Optimized *Pleurotus*),
 C = เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ, J2 = ตัวอ่อนระยะที่สอง

ตารางที่ 10 ความสูงต้นและความยาวรากมะเขือเทศ หลังจากการทดสอบด้วย Optimized *Pleurotus* ต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* เป็นเวลา 30 วัน

กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)
OP 1 + J2	40.90±3.68ab	23.6±0.30c
OP 2 + J2	42.67±2.25ab	32.4±1.37b
OP 3 + J2	37.58±2.87b	14.93±0.40d
J2	44.83±2.30a	29.53±1.45bc
Control (without J2)	45.73±2.77a	37.67±0.77a

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (n=3) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์ของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)

OP = เส้นใยเห็ด *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสม (Optimized *Pleurotus*), C = เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ, J2 = ตัวอ่อนระยะที่สอง



ภาพที่ 22 การใช้ Optimized *Pleurotus* 3 ส่วน (OP 3) ในกระถางต้นมะเขือเทศทดสอบ; (A) เส้นใยอัดแน่นและน้ำท่วมขัง และ (B) เกิดดอกเห็ด

กรรมวิธีที่ใช้ OP 2 ส่วน รากมะเขือเทศเกิดปมจำนวน 35.67 ± 5.24 ปม จำนวนตุ่มไข่ 15.00 ± 0.89 และ Rf เท่ากับ 0.68 ± 0.02 ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้ OP 2 ส่วน ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ ซึ่งมีจำนวนปม จำนวนตุ่มไข่ และ Rf เท่ากับ 37.67 ± 2.88 , 17.33 ± 1.37 และ 0.61 ± 0.017 ตามลำดับ และแตกต่างจากการใช้เอนไซม์สกัดหยาบ เพียงอย่างเดียวซึ่งทั้งสองกรรมวิธี (OP2 และ OP2+C) ลดการเกิดรากปม จำนวนตุ่มไข่ และ Rf ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ 95 % เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการควบคุม (ตารางที่ 11) และเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นมะเขือเทศ พบว่าความสูงของต้นในทุกกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ทุกกรรมวิธีมีความยาวรากแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีมี J2 เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งกรรมวิธีใช้ PO2 ทำให้ความยาวราก ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (without J2) (ตารางที่ 12) แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ โปรติเอสสกัดหยาบ มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้โดยไม่มีผลต่อ ความสูงของต้นและความยาวของราก

ตารางที่ 11 การเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในมะเขือเทศ หลังจากการทดสอบด้วย Optimized *Pleurotus* และเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบเป็นเวลา 30 วัน

กรรมวิธี	จำนวนปม	ขนาดปม (มม.)	ระดับการ เกิดปม	จำนวนกลุ่ม ไข่	Rf
OP 2 + J2	35.67±5.24c	1.39±0.17c	4	15.00±0.89c	0.68±0.02c
OP 2 + C + J2	37.67±2.88c	1.46±0.36bc	4	17.33±1.37c	0.61±0.02c
C + J2	52.00±3.26b	1.62±0.27b	4	24.00±1.79b	0.97±0.01b
J2	77.00±5.59a	2.05±0.36a	4	41.67±2.73a	1.47±0.01a
Control (without J2)	0	-	0	0	-

^{1/} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (n=3) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์ของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)
 OP = เส้นใยเห็ด *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสม (Optimized *Pleurotus*),
 C = เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ, J2 = ตัวอ่อนระยะที่สอง

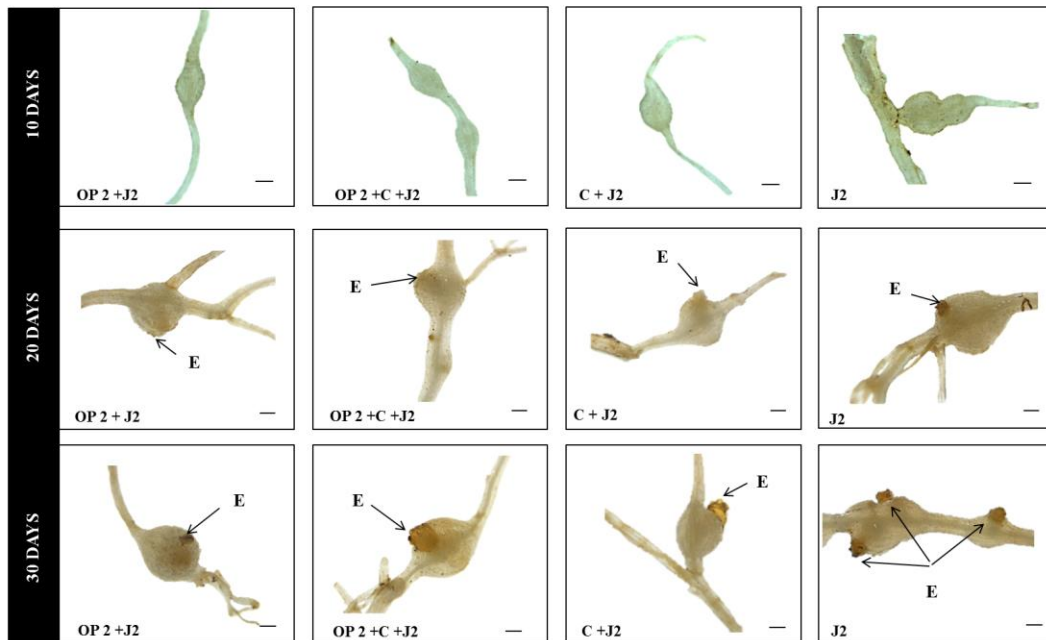
ตารางที่ 12 การประเมินการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในมะเขือเทศ หลังจากการทดสอบด้วยเห็ดสกุล *Pleurotus* และเอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเวลา 30 วัน

กรรมวิธี	ความสูงต้น (ซม.)	ความยาวราก (ซม.)
OP 2	44.83±2.30a	33.76±1.45bc
OP 2 + C + J2	40.60±3.87a	31.30±2.49c
C + J2	42.00±5.44a	34.80±1.09ab
C	44.13±2.87a	37.67±2.73a
J2	44.67±2.88a	29.53±1.45d
Control (without J2)	45.73±2.77a	37.67±0.77a

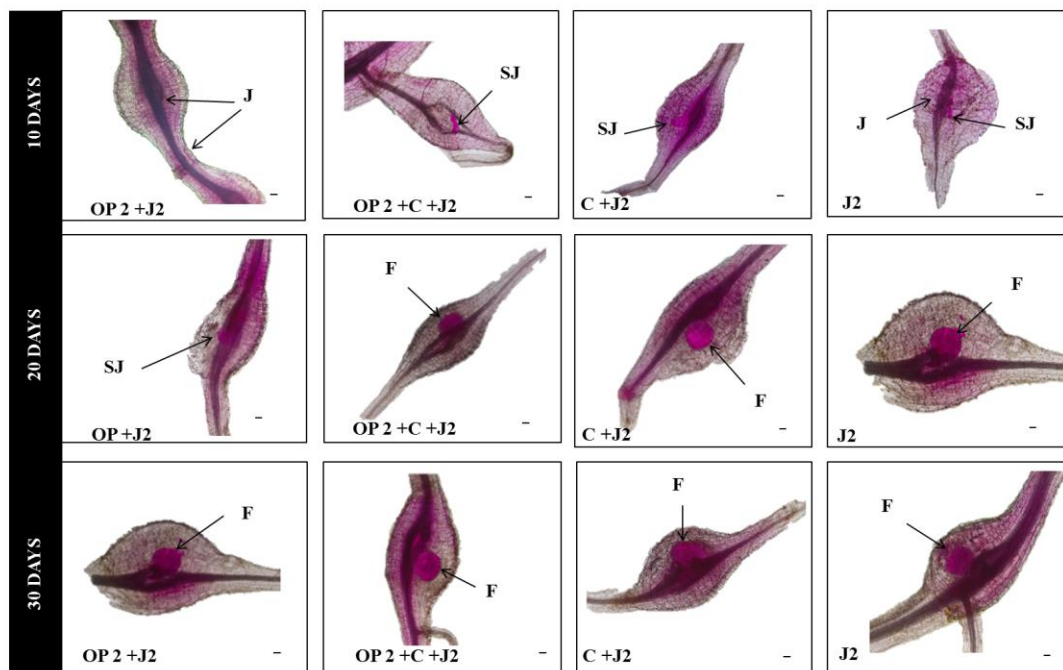
^{1/} ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (n=3) ที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์ของตารางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเปรียบเทียบโดย Duncan's New Multiple Range test ($p > 0.05$)

OP = เส้นใยเห็ด *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสม (Optitized *Pleurotus*), C = เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ, J2 = ตัวอ่อนระยะที่สอง

เมื่อพิจารณาลักษณะปมที่รากมะเขือเทศพบการสร้างกลุ่มไข่ (egg mass) ในวันที่ 20 ในทุกกรรมวิธี แต่ต้นมะเขือเทศที่มีเพียง J2 เกิดกลุ่มไข่จำนวนมากและเป็นกลุ่มไข่แก่มากกว่ากรรมวิธีอื่นที่ทดสอบด้วย Optitized *Pleurotus* (OP) และเอนไซม์สกัดหยาบ สังเกตได้จากสีของกลุ่มไข่ที่มีสีน้ำตาลเข้ม ดังภาพที่ 23 และเมื่อย้อมรากปมของมะเขือเทศด้วย acid fuchsin ทำให้สังเกตเห็นว่ากรรมวิธีที่มี OP ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 พัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ 3 (J3) หรือ ตัวอ่อนระยะที่ 4 (J4) ที่มีรูปร่างคล้ายไส้กรอก (sausage shaped juvenile) ตลอดจนพัฒนาเป็นตัวเมียตัวเต็มวัยได้ช้ากว่ากรรมวิธีอื่น ๆ (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 23 ลักษณะรากปมของมะเขือเทศที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* เป็นเวลา 10, 20, และ 30 วัน; E = egg mass (Bar = 20 μ m)
 OP = เส้นใยเห็ด *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสภาวะที่เหมาะสม (Optitized *Pleurotus*), C = เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ, J2 = ตัวอ่อนระยะที่สอง



ภาพที่ 24 รากปมของมะเขือเทศที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* เป็นเวลา 10, 20, และ 30 วันที่ย้อมด้วย acid fuchsin; J = juvenile, SJ = sausage shaped juvenile และ F = female (Bar = 20 μ m)
 OP = เส้นใยเห็ด *Pleurotus* ที่เลี้ยงในอาหารแบบแข็งและสถานะที่เหมาะสม (Optitized *Pleurotus*), C = เอนไซม์โปรติเอสสกัดหยาบ, J2 = ตัวอ่อนระยะที่สอง

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

P. pulmonarius No.3 สามารถยับยั้งการฟักไข่และทำให้ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีการตายเพิ่มขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยการเลี้ยงเชื้อ *P. pulmonarius* No.3 ด้วยอาหารแบบแข็งในสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ข้าวโอ๊ตบดหยาบ 6 กรัม สารละลาย KH_2PO_4 1.5-2.5 % (w/v) pH 5.0 ในอัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวคือ 6:6-6:8 (กรัม:มิลลิลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน และสกัดด้วย 50 mM acetate buffer pH 5.0 ซึ่งการใช้เส้นใยรา *Pleurotus* ที่ผ่านการเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม (Optimized *Pleurotus*) ร่วมกับเอนไซม์โปรตีนเอสสกัดหยาบมีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในสภาพห้องปฏิบัติการ และสามารถลดการเกิดโรครากปมของมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน

เอกสารอ้างอิง

- พินนะ ชุมวิริยะสุขกุล และ นิวัฒน์ เสนาะเมือง. 2556. กลไกและประสิทธิภาพของเห็ดบางชนิดในการควบคุมไส้เดือนฝอย. ว.แก่นเกษตร 41:521–526.
- คำเกิง ป็องพาล. 2547. เอกสารประกอบคำบรรยายวิชา พศ.413 การผลิตเห็ด (Mushroom Production). สาขาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่. 183 หน้า
- พิมพ์พร ศรีสันติแสง โสภิตา ปัญญานวล สายพิน ทานัชฌาสัย และ วรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ. 2556. ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51: สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์, สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. หน้า 209–216.
- ฤทธิไกร จันทะบุตร วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ อนันต์ หิรัญสาลี. 2555. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita* Chitwood). แก่นเกษตร 40 (ฉบับพิเศษ): 424–430.
- อมรศรี ชุนอินทร์ สมชาย สุขะกุล จิระเดช แจ่มสว่าง และ ประภาพร ตั้งกิจโชติ. 2548. อิทธิพลของเห็ดบางชนิดที่มีต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* วิทยานิพนธ์ในระดับปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิวิชญ์ ทองแก้ววน และ ธนัญชนก ไชยรินทร์. 2559. การคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ในสภาพการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารแข็ง. แก่นเกษตร 44 (ฉบับพิเศษ 1): 924–929.
- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G. J., and Deleury, E. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. Nature Biotechnology 26: 909–915.
- Adebayo-Tato, B.C., Jonathan, S.G., Popoola, O.O. and Egbomuche, R.C. 2011. Optimization of growth conditions for mycelial yield and exopolysaccharride production by *Pleurotus ostreatus* cultivated in Nigeria. African Journal of Microbiology 5: 2130–2138.
- Agrawal, T. and Kotasthane, A.S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. SpringerPlus 1: 73–83.

- Ahmed, T., Islam, M.S., Haque, T. and Abusyed, M. 2009. The Effect of Manufacturing Methods and Different Shapes on the Release Pattern of Diclofenac Sodium Matrix Tablet. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2: 76–80.
- Ahmed, M.E., El-Zelaky, O. A., Aiad, K.M. and Shehata, E.I. 2011. Response of small ruminants to diets containing reed forage either as fresh, silage or hay versus berseem hay. *Egyptian Journal of Sheep and Goats Sciences* 6: 15–26.
- Anson, M.L. 1938. Estimation of pepsin papain and cathepsin with heamoglobin. *General Physiology* 22: 79–89.
- Anwar, S.A., Zia, A., Hussain, M. and Kamran, M. 2007. Host suitability of selected plants to *Meloidogyne incognita* in the Punjab, Pakistan. *International Journal of Nematology* 17: 144–150.
- Bano, S., Dahot, M.U. and Naqvi, S. 2016. Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. *Journal of Biotechnology* 13: 193–198.
- Bano, S., Dahot, M.U., Naqvi, S. and Qureshi, A.S. 2018. Characterization of crude protease produced by *pleurotus eryngii* atcc 90888. *University of Sindh Journal of Animal Sciences* 2: 3–11.
- Barker, K.R. 1985. Nematode extraction and bioassays. *Methodology*. North Carolina State University Graphics: Raleigh 2: 19–35.
- Barron, G.L. and Thorn, R.G. 1986. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Biological Publications* 65: 774–778.
- Barron, G.L. 1978. Nematophagous fungi; endoparasites in Ontario and their ability to parasitize *Rhabditis terricola*. *Microbial Ecology* 4: 157–163.
- Bastos, R.G., Motta, F.L. and Santana, M.H.A. 2016. Oxygen transfer in the solid-state cultivation of *Drechslera monoceras* on polyurethane foam as an inert support. *Chemical Engineering* 33: 1678–4383.
- Battaglino, M., Hergo, M., Pilosof, A.M.R. and Bartholomai, G.B., 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid fermentation. *Microbial Biotechnology* 35: 292–296.
- Benmradi, M.O., Mechri, S., Jaouadi, N.Z., Elhoul, M.B., Rekik, H., Sayadi, S., Bejar, S., Kechaoui, N. and Jaouadi, B. 2019. Characterization of a novel thermostable protease

- from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. *BMC Biotechnology* 19: 43–60.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Byrd, Jr.D.W., Kirkpatrick, T. and Barker, K.R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissue for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 14: 142–143.
- Chang, S.T. and Miles, P. 2009. *Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact*. Washington. 477 pp.
- Chitwood, B.G. 1949. Root-knot nematodes – part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Göldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 16: 90–104.
- Cohen, R., Persky, L. and Hadar, Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 582–594.
- Curvetto, N., Figlas, D., Devalis, R. and Delmastro, S. 2002. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH₄⁺and/or Mn (II). *Bioresource Technology* 84: 171–176.
- Cohen, R., Persky, L. and Hadar, Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 582–594.
- Dackman, C., Chet, I. and Nordbring-Hertz, B. 1989. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: infection and enzymatic activity. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 201–208.
- Dohmae, N., Hayashi, K., Miki, K., Tsumuraya, Y. and Hashimoto, Y. 1995. Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59: 2047–2080.
- Eira, A.F. 2003. Cultivo do “cogumelo do sol” *Agaricus blazei* (Murrill) SS. *Heinemann*. Vicosa: Aprenda Facil 203 pp.
- Furlani, R.P.Z. and Godoy, H.T. 2007. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. *Food Science and Technology* 27: 154–157.

- Genier, H.L.A., Soares, F. E. F., Queiroz, J.H., Gouveia, A.S., Araújo, J.V., Braga, F.R., Pinheiro, I.R. and Kasuya, M.C.M. 2015. Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. *Biotechnology* 5: 1496–1503.
- George, S., Raju, V., Subramanian, V. and Jarayaman, K. 1997. Comparative study of protease production in solid-state fermentation versus submerged fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16: 381–382.
- Gerbec, B., Tavčar, E., Gregori, A., Kreft, S. and Berovic, M. 2015. Solid state cultivation of *Hericium erinaceus* biomass and erinacine A production. *Bioprocessing and Biotechniques* 5: 210–215.
- Gonzalez-Aguilar, G.A., Buta, J.G. and Wang, C.Y., 2001, Methyl jasmonate reduces chilling injury symptoms and enhances colour development of “Kent” mangoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 1244–1249.
- Gupta, R., Beg, Q., Khan, S. and Chauhan, B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Microbiology and Biotechnology* 60: 381–395.
- Hanlon, G.W., Hodges, N.A. and Russel, A.D. 1982. The Influence of Glucose, Ammonium and Magnesium Availability on the Production of Protease and Bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *Journal of Genetic and Microbiology* 128: 845–851.
- Heydari, R., Pourjam, E. and Goltapeh, E.M. 2006. Antagonistic Effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica in vitro*. *Plant Pathology Journal* 5: 173–177.
- Hoa, H.T., and Wang, C.L. 2015. The effects of temperature and nutritional conditions on Mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology* 43: 14–23.
- Hussey, R.S. and Barker, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025–1028.
- Iandolo, D., Piscitelli, A., Sannia, G. and Faraco, V. 2011. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Biochemistry and Biotechnology* 163: 40–51.

- Inácio, F.D., Ferreira, R.O., Araujo, C.A.V., Brugnari, T., Castoldi, R., Peralta, R.M. and Souza, C.G.M. 2015. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. *BioMed Research International* 1: 1–10.
- Kalaiselvia, D., Mohankumara, A., Shanmugama, G., Thiruppathia, G., Nivithab, S. and Sundararaja, P. 2019. Altitude-related changes in the phytochemical profile of essential oils extracted from *Artemisia nilagirica* and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. *Industrial Crops and Products* 139: 1–8.
- Kale, S.J., Nath, P., Kannaujia, P. and Dukare, A. 2021. Hydrogen Peroxide Washing Induced Changes in Postharvest Quality of Button Mushrooms (*Agaricus bisporus*) during Storage. *Journal of Food and Agriculture Research* 1: 119–130.
- 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 Journal of Pharmaceutical Sciences* 72: 161–6.
- Kandasamy, S., Muthusamy, G., Balakrishnan, S., Duraisamy, S., Thangasamy, S., Seralathan, K. and Chinnappan, S. 2016. Optimization of protease production from surface-modified coffee pulp waste and corncobs using *Bacillus* sp. by SSF. *Chemical Sciences* 6: 167–178.
- Khan, A., Saifullah, Iqbal, M. and Hussain, S. 2014. Organic control of phytonematodes with *Pleurotus* species. *Pakistan Journal of Nematology* 32: 155–161.
- Kumla, J., Danell, E., Bussaban, B. and Lumyong, S. 2011. Suitable growth conditions and nutrition factors on in vitro culture of *Phlebopus portentosus* (Boletales). *Chiang Mai Journal of Science* 38: 156–159.
- Liu, X., Xiang, M. and Che, Y. 2009. The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience* 50: 20–25.
- Manzanilla- López, R.H., Franco, J., Peteira, B. and Kerry, B. 2004. *Nacobbus aberrans*: Its molecular diagnosis in soil and potato tubers. Programs and Abstracts of ONTA 34th Annual Meeting, Puerto Vallarta, Mexico (October 4-8, 2004) 83 pp.
- Mamo, J. and Assefa, F. 2018. The role of microbial aspartic protease enzyme in food and beverage industries. *Food Quality* 15 pp.

- Marla, S.R., Huettel, R.N. and Mosjidis, J. 2008. Evaluation of *Crotalaria juncea* populations as hosts and antagonistic crops to manage *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Nematropica* 38: 155–161.
- Marlin, M., Wolf, A., Alomran, M., Carta, L. and Newcombe, G. 2019. Nematophagous *Pleurotus* Species consume some nematode species but are themselves consumed by others. *Forests* 10: 401–404.
- Mazumder, S., Basu, K.S. and Mina, M. 2009. Laccase production in solidstate and submerged fermentation by *Pleurotus ostreatus*. *Engineering in Life Sciences* 9: 45–52.
- Mercado-Flores, Y., Hernández-Rodríguez, C., Ruiz-Herrera, J. and Villa-Tanaca, L. 2017. Proteinases and exopeptidases from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* 95: 327–339.
- Mitkowski, N.A. and Abawi, G.S. 2003. Reproductive fitness on lettuce of *Meloidogyne hapla* from New York State vegetable fields. *Nematology* 5: 77–83.
- Moore, D., Walsh, C., and Robson, G.D. 2005. A search for developmental gene sequences in the genomes of filamentous fungi. *Applied Mycology and Biotechnology* 5: 169–188.
- Nadeem, M., Qazi, J.I. and Baig, S. 2010. Enhanced production of alkaline protease by a mutant of *Bacillus licheniformis* N-2 for dehairing. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53: 1015–1025.
- Naidu, K.S. 2011. Characterization and purification of protease enzyme. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1: 107–112.
- Nguyen, T.M. and Ranamukhaarachchi, S.L. 2020. Effect of different culture media, grain sources and alternate substrates on the mycelial growth of *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 23: 223–230.
- Noling, J.W. and Becker, J.O. 1994. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. *Nematology* 26: 573–586.
- Ooi, C.K., Rasit, N. and Abdullah, W.R.W 2021. Optimization of protease from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation utilizing shrimp shell substrate. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11: 14809–14824.

- Olivares-Bernabeu, C.M. and Lopez-Llorca, L.V. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 104–110.
- Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen (Landbouwhogeschool Wageningen)* 66: 1–46.
- Oyewole, O.A., Oyeleke, S.B., Dauda, B.E.N. and Emiade, S. 2011. Production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus niger* and *Penicillium frequestans* isolated from abattoir effluent. *Microbiology* 1: 174–180.
- Page, A.P., Stepek, G., Winter, A.D. and Pertab, D. 2014. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target?. *Parasitology* 4: 133–141.
- Paranthaman, R. Alagusundaram, K. and Indhumathi, J. 2009. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences* 5: 308–312.
- Palizi, P.E., Goltapeh, M., Pourjam E. and Safaie, N. 2009. Potential of oyster mushrooms for the biocontrol of sugar beet nematode (*Heterodera Schachtii*). *Plant Protection Research* 49: 27–33.
- Pimenta, L., Ferreira, M.A., Pedroso, M.P. and Campos, V.P. 2017. Wood-associated fungi produce volatile organic compounds toxic to root-knot nematode. *Scientia Agricola* 74: 303–310.
- Proiteab, K., Carneirob, R., Falcãob, R., Gomesb, A., Leal-Bertiolib, S., Guimarãesb, P. and Bertiolic, D. 2008. Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology* 57: 974–980.
- Pundir, R.K., Rana, S. and Tyagi, H. 2012. Studies on compatibility of fungal alkaline protease with commercially available detergents. *Modern Biochemistry* 1: 41–56.
- Romero, O., Huerta, M., Damián, M., Macías, A., Tapia, A., Parraguirre, J. and Juárez, J. 2010. Evaluación de la capacidad productiva de *Pleurotus ostreatus* con el uso de hoja de plátano (*Musa paradisiaca* L.; CV. Roatan) deshidratada, en relación con otros sustratos agrícolas. *Agronomía Costarricense* 34: 53–63.
- Sakamoto, Y., Suzuki, Y., Iizuka, I., Tateoka, C., Roppongi, S., Fujimoto, M., Inaka, K., Tanaka, H., Masaki, M., Ohta, K., Okada, H., Nonaka, T., Morikawa, Y., Nakamura, K.T.,

- Ogasawara, W. and Tanakaa, N. 2014. S46 peptidases are the first exopeptidases to be members of clan pa. *Scientific* 4: 4977–4984.
- 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 Biochemistry* 40: 2689–2694.
- Satou, T., Kaneko K., LI, W. and Koike, K. 2008. The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31: 574–576.
- Sattara, H. Amana, A. Javeda, U. and Qade, S.A.U. 2018. Polyacrylamide beads: Polymer entrapment increases the catalytic efficiency and thermal stability of protease. *Molecular Catalysis* 466: 81–87.
- Shaba, A.M. and Baba, J. 2012. Screening of *Pleurotus ostreatus* and *Gleophyllum Sepiarium* strains for extracellular protease enzyme production bayero. *Pure and Applied Sciences* 5: 187–190.
- Sharma, V.P. 1994. Potential of *Pleurotus sajor-caju* for biocontrol of *Aphelenchoides composticola* in *Agaricusbisporus* cultivation. *Mushroom Research* 3: 15–20.
- Shnyreva, A.A., Kozhevnikova, E.Y., Barkov, A.V. and Shnyreva, A.V. 2017. Solid-state cultivation of edible oyster mushrooms, *Pleurotus* spp. under laboratory conditions. *Advances in Microbiology* 7: 125–136.
- Singh, S., Singh, B. and Singh, A.P. 2015. Nematodes: a threat to sustainability of agriculture. *Procedia Environmental Sciences* 29: 215–216.
- Sofi, B., Ahmad, M. and Khan, M. 2014. Effect of different grains and alternate substrates on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) production. *African Journal of Microbiology* 8: 1474–1479.
- Spaargaren, D.H. 1996. The design of culture media based on the elemental composition of biological material. *Biotechnology* 45: 97–102.
- Stirling, G., Nicol, J. and Reay, F. 1999. Advisory services for nematode pests operational guidelines. Rural Industries Research and Development Corporation 120 pp.
- Subramanian, R. and Anantharaman, V. 1995. Reliability analysis of a complex standby redundant systems. *Reliability Engineering & System Safety* 48: 57–70.

- Sufiatea, B.L., Freitas Soaresa, F.E., Moreiraa, S.S., Souza Gouveiaa, A.D., Monteirob, T.S.A., Freitasb, L.G. and Queiroza, J.H. 2017. Nematicidal action of *Pleurotus eryngii* metabolites. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 12: 216–219.
- Swe, A., Jeewon, R., Pointing, S.B. and Hyde, K.D. 2009. Diversity and abundance of nematode-trapping fungi from decaying litter in terrestrial, freshwater and grove habitats. *Biodiversity and Conservation* 18: 1695–1714.
- Taylor, A.L. and Sasser, J.N. 1978. *Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne spp.)*. Department of Plant Pathology, North Carolina State University, United States Agency for International Development., Raleigh, North Carolina, USA. English language 111 pp.
- Tinoco, R., Pickard, M.A. and Vazquez, D.R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology* 32: 331–335.
- Trudgill, D.V. and Blok, C. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Phytopathology* 39: 53–77.
- Tsopmo, A., Cooper, A. and Jodayree, S. 2010. Enzymatic hydrolysis of oat flour protein isolates to enhance antioxidative properties. *Food Science and Technology* 2: 206–212.
- Tunga, R., Banerjee, R. and Bhattacharyya, B.C. 1998. Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation. *Bioprocess Engineering* 19: 187–190.
- Vestergård, M. 2019. Trap crops for *Meloidogyne hapla* management and its integration with supplementary strategies. *Applied Soil Ecology* 134: 105–110.
- Wang, H. and Ng, T.B. 2001. Pleureryn a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289: 750–755.
- Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Microbiol Biotechnol* 60: 258–274.
- Wesemael, W.M.L., Viaene, N. and Moens, M. 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) in Europe. *Nematology* 13: 3–16.
- Williamson, V.M. and Hussey, R.S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8: 1735–1745.

- Yang, S.S. and Chiu, W.F. 1986. Protease production with sweet potato residue by solid state fermentation. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* 19: 276–288.
- Yang, S.S. and Wang, J.Y. 1999. Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica Acad* 40: 259–265.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวกัญญาณี ไชยะดิษฐ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6210620003

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2562

ทุนการศึกษา

- ทุนโครงการเรียนดี คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Chaiyadit, K. and Chairin, T. (2022). Potential of edible mushroom *Pleurotus* spp. for controlling root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and their cuticle degrading enzyme production. Songklanakarin Journal of Science and Technology 44: 60–65.

