บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎีและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไส้เดือนฝอยรากปม

ไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode) จัดเป็นไส้เดือนฝอยที่สำคัญที่สุดในจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูพืชด้วยกัน ทำความเสียหายเป็นวงกว้างไปทั่วโลก จึงมีองค์กร lnternational Meloidogyne Project (IMP) จัดตั้งขึ้นมา เพื่อหาทางป้องกันกำจัด เช่น การหาพันธุ์ต้านทานและการศึกษาเพื่อให้มีความเข้าใจในเรื่องไส้เดือนฝอยรากปมมากยิ่งขึ้น และมีประเทศต่างๆ ทั่วโลก เป็นสมาชิกประมาณ 70 ประเทศ รวมทั้งประเทศไทยด้วย

ไส้เดือนฝอยรากปมมีพืชอาศัยมากกว่า 2,500 ชนิด มี chromosome หลายคู่ ทำให้มีพืชอาศัยกว้างมาก ซึ่งนักวิชาการไส้เดือนฝอยตั้งสมมติฐานว่าเป็นวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากปมเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม เพื่อความอยู่รอดมีการสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ซึ่งส่วนมากเป็นแบบ parthenogenesis ชนิดลด chromosome ลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง (meiotic parthenogenesis) หรือไม่ลด chromosome (mitotic parthenogenesis) โดยที่ไข่ไม่ต้องได้รับการผสมจากเชื้อตัวผู้ก็สามารถเจริญเป็นตัวอ่อนได้ และตัวเมีย 1 ตัว สามารถออกไข่ได้ 300-1,000 ฟอง Taylor & Sasser (1978) คำนวณไว้ว่าถ้าตัวเมียหนึ่งตัวออกไข่ได้ 500 ฟอง และถ้ามีเพียง 5% ที่รอดชีวิตภายในเวลา 4 เดือน ก็สารถเพิ่มจำนวนประชากรได้ถึง 4 เท่า คิดเป็นจำนวนได้ถึง 390,625 ตัว

อนุกรมวิธานของไส้เดือนฝอยรากปม

Phylum Nemata
Clase Secementea
Order Tylenchida
Family Heteroderidae
Sub – Family Heteroderidae
Genus Meloidogyne
Species incognita

ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม

1. การใช้ลักษณะต่างๆ ของตัวเมียเต็มวัยและตัวอ่อนระยะที่สอง (Franklin, 1979)
   1.1 ลักษณะต่างๆ ของตัวเมียเต็มวัยที่ใช้ในการจำแนกชนิด
   - ริ้วรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern)
   - รูปร่างของส่วนหัว และหลอดดูดอาหาร (spear หรือ stylet)
   - ความยาวของหลอดดูดอาหาร

- ตำแหน่งของรูเปิดระบบขับถ่าย

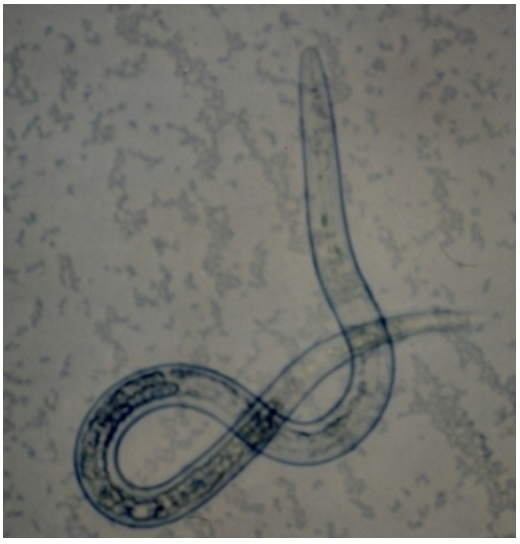
1.2 ลักษณะต่างๆ ของตัวอ่อนระยะที่สองที่ใช้ในการจำแนกชนิด

- รูปร่างของส่วนหัวและหลอดดูดอาหาร
- ความยาวของลำตัวและความยาวของส่วนหาง
- ความยาวของหลอดดูดอาหาร
- ตำแหน่งของเฮมิโซนิด (hemizonid)
- ตำแหน่งของรูเปิดระบบขับถ่าย

2. การใช้ลักษณะต่างๆ ของตัวผู้เต็มวัยในการจำแนกชนิด (Eisenback et al., 1981)

ลักษณะของตัวผู้มีประโยชน์ในการจำแนกไส้เดือนฝอยเพียงบางชนิดโดยดูจากรูปร่างลักษณะของส่วนหัว หลอดดูดอาหารและเส้นข้างลำตัว

ปัจจุบันในประเทศไทยมีรายงานว่าพบไส้เดือนฝอยรากปม 8 ชนิด คือ *M. incognita*, *M. javanica*, *M. graminicola*, *M. arenaria* (จรัส และอานนท์, 2526) *M. hapha* (สืบศักดิ์ สนธิรัตน และคณะ, 2530) *M. exigua* (อรุณ, 2505) *M. microcephala* (Cliff & Hirschma, 1984) และ *M. naasi* (ประชา ลี้ประเสริฐ, 2515) ที่ระบาดมากที่สุดในประเทศไทยคือ *M. incognita* มีทั้งในพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ พืชไร่ ไม้ผล และในวัชพืชหลายประเภท (จรัส และอานนท์, 2526; สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 2532) ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ระยะ J2 larva แสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ไส้เดือนฝอยรากปม *M .incognita* ระยะ J2 larva
ที่มา http://www.ibwf.de/ibwf_mainframe_r.htm

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* นี้มีรูปร่างแตกต่างกันในเพศผู้และเพศเมียกล่าวคือ ตัวอ่อนระยะที่ 2 ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีรูปร่างยาวเรียวคือประมาณ 380-450 ไมโครเมตร กว้าง 331-520 ไมโครเมตร (Whitehead, 1968) spear แข็งแรงยาวประมาณ 10-7 ไมโครเมตร รังไข่มี 2 อันรูปร่างโค้งไปทางส่วนหัว ส่วนปลายของลำตัวมีลักษณะกลมมีช่องเปิดอวัยวะสืบพันธุ์และทวารหนัก ซึ่งมี rectal gland จำนวน 6 ต่อม ทำหน้าที่ผลิตสารเมือกออกมาปิดคลุมกลุ่มไข่เพื่อป้องกันอันตราย นอกจากนี้บริเวณช่องเปิดอวัยวะสืบพันธุ์มีรอยย่นรอบๆ ช่องเปิดดังกล่าว รอยย่นนี้เรียกว่า perineal pattern ซึ่งใช้เป็นหลักสำคัญในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย ไส้เดือนฝอยเพศเมียฝังส่วนของลำตัวในรากของพืช ส่วนของกลุ่มไข่หุ้มด้วยสารที่คล้ายเจลาติน กลุ่มไข่ของ *M. incognita* มีปริมาณไข่จำนวน 250-525 ฟอง ไข่ที่อยู่ในกลุ่มไข่สามารถฟักออกเป็นตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่อนำกลุ่มไข่ไปแช่ในน้ำ นอกจากนี้ถ้าตัดเอากลุ่มไข่ออกมาแล้วนำไปเก็บไว้ที่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.3 โมลาร์ (0.3 M NaCl) นาน 30 เดือน เมื่อนำมาแช่ในน้ำอีกไข่สามารถฟักออกเป็นตัวได้ ไม่เฉพาะแต่น้ำเท่านั้นที่ทำให้ไข่สามารถฟักออกเป็นตัว สารซึมจากราก (root diffusate) สามารถกระตุ้นให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวได้มากกว่า 14-30 % เมื่อเปรียบเทียบกับไข่ที่ฟักในน้ำ อย่างไรก็ตามความชื้นในดินมีส่วนทำให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนได้ดีกว่าวารซึมจากรากในไส้เดือนฝอย *M. incognita* ไข่ฟักเป็นตัวอ่อนในดินที่มีความชื้นและมีสารสกัดจากรากพืชตระกูลถั่วมากกว่าในน้ำกลั่นธรรมดา

ตัวเต็มวัยเพศผู้ มีรูปร่างเหมือนระยะตัวอ่อนคือ มีรูปร่างยาวเรียวประมาณ 1,108-1,953 ไมโครเมตร ผนังลำตัวใสมีรอยย่นเล็กน้อย spear ยาวประมาณ 20-24 ไมโครเมตร อัณฑะมีจำนวน 1 อัน ลักษณะหางสั้น โค้งมน และที่ปลายหางมี spicule ที่เห็นได้ชัด

วงจรชีวิต

วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปมมี 2 ระยะ (สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 2532) คือ

1. ระยะหากินเป็นอิสระ

ระยะนี้ไข่ของไส้เดือนฝอยอยู่ในกลุ่มไข่ ซึ่งหุ้มด้วยสารพวกเจลาติน และมีน้ำเป็นองค์ประกอบ กลุ่มไข่หลุดออกจากปมเมื่อรากเน่าเปื่อยและตกลงในดิน บางครั้งอาจพบว่ายังคงอยู่ภายในปมของรากถ้าสภาพอากาศแห้งแล้งน้ำภายในกลุ่มไข่ระเหยทำให้ถุงไข่มีลักษณะย่น ผิวของกลุ่มไข่แข็งและเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีการแข็งตัวของน้ำเมือกภายในกลุ่มไข่

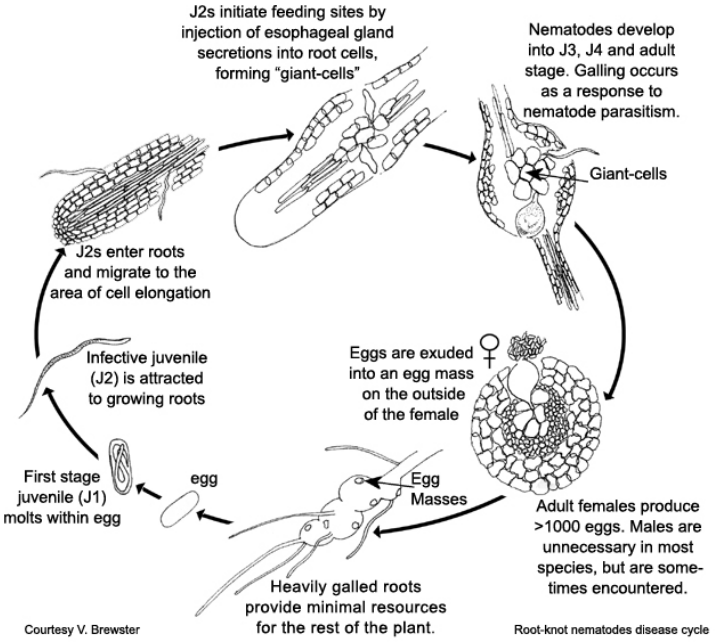
ถ้าสภาพอากาศในดินมีความชื้นมากที่ทำให้ไข่ฟักออกมาเป็นตัวแล้ว ไข่ฟักออกเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 และเคลื่อนที่อยู่ระหว่างฟิล์มของน้ำที่ผิวดิน มีชีวิตเป็นอิสระ ตัวอ่อนระยะนี้จะสะสมอาหาร ได้แก่ ไขมัน 43 % และโปรตีน 23 - 24 % อยู่ภายในเซลล์ของลำไส้เล็ก เมื่ออุณหภูมิสูงอาหารสะสมถูกนำไปใช้มาก ถ้าอุณหภูมิต่ำ และความชื้นสูงอาหารถูกใช้ไปน้อย

โดยทั่วไปตัวอ่อนระยะที่ 1 ลอกคราบอยู่ในไข่ซึ่งอยู่ในกลุ่มไข่อีกทีหนึ่ง ดังนั้นเมื่อตัวอ่อนระยะที่ 1 ลอกคราบออกจากไข่จึงกลายเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ในระยะนี้เซลล์สืบพันธุ์ยังไม่เจริญเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้หรือเพศเมียอย่างเด่นชัด ถ้าภายในดินมีอาหารเพียงพอและสภาพแวดล้อมเหมาะสม เซลล์สืบพันธุ์เปลี่ยนแปลงเป็นรูปตัววี และเจริญเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย มีรังไข่ 2 อัน และเคลื่อนที่เข้าหาราก ซึ่ง

อธิบายต่อในระยะเป็นปรสิตกับรากพืช ถ้าภายในดินมีอาหารไม่อุดมสมบูรณ์ และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เซลล์อวัยวะสืบพันธุ์มีรูปร่างยาว และเจริญเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ มีอัณฑะ 1 อัน อวัยวะภายในอื่น ๆ เริ่มเจริญเต็มที่ ต่อมารูปร่างของลำตัวขยายใหญ่เล็กน้อย โดยขยายตามความยาวมากกว่าความกว้างมี spear เห็นชัดเจน ตัวอ่อนระยะที่ 4 และ 5 ไม่กินอาหาร อยู่กับที่ระยะหนึ่งก่อนจากนั้นจึงหาอาหารตามรากพืช ใช้ส่วนของ spear แทงลงไปเซลล์ของพืชบริเวณชั้นที่เซลล์กำลังยืดตัวและรากขนอ่อน จากนั้นเคลื่อนที่มาอาศัยอยู่ในดินคอยดูดน้ำเลี้ยงจากรากพืชภายนอก

2. ระยะเป็นปรสิต

ตัวอ่อนระยะที่สองเคลื่อนที่เข้าหาราก โดยเข้าทำลายบริเวณปลายรากที่อยู่เหนือหมวกรากขึ้นมาเล็กน้อย ซึ่งบริเวณนี้มีเนื้อเยื่อเจริญของรากอยู่ระยะนี้ตัวอ่อนระยะที่ 2 ใช้สเปียร์แทงลงไปในเซลล์ชั้น cortex ของรากและฝังตัวเฉพาะส่วนหัวและแทงลงไปถึงเซลล์ชั้น pericycle และหยุดนิ่งอยู่กับที่ต่อมาเริ่มเจริญเป็นตัวเต็มวัย ตัวเมียเมื่อเริ่มฟักไข่จนฟักเป็นตัวอ่อนใช้เวลาประมาณ 9 วัน ที่อุณหภูมิ 27 ºC และใช้เวลา 31 วัน ที่อุณหภูมิ 16.5 ºC นอกจากนี้ ใช้เวลาประมาณ 15-18 วัน ในการขยายขนาดและเจริญเป็นเพศเมียที่สมบูรณ์ การลอกคราบครั้งที่ 3 ใช้เวลา 1 วัน สำหรับการลอกคราบครั้งที่ 4 (ครั้งสุดท้าย) เป็นไปอย่างรวดเร็ว และเห็นรอยคราบติดอยู่ ระยะที่ 3-4 ใช้เวลา 2-3 วัน โดยเริ่มเห็นอวัยวะบางอย่างชัดเจนขึ้น เช่น อวัยวะสืบพันธุ์ อวัยวะย่อยอาหาร เป็นต้น รวมระยะเวลาทั้งหมดประมาณ 20-27 วัน หรืออาจใช้เวลาน้อยกว่าหรือมากกว่านี้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไส้เดือนฝอย อุณหภูมิและพืชอาศัยที่เหมาะสม หลังจากนั้นอีกประมาณ 1 อาทิตย์ เพศเมียเริ่มวางไข่



ภาพที่ 2.2 วงจรการก่อโรคของไส้เดือนฝอยรากปม *M .incognita*
ที่มา http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/Nematodes/Pages/RootknotNematode.aspx

การเกิดปม

มีสาเหตุเกิดจาก (สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 2541)

1. Hypertrophy เกิดจากการที่เซลล์ของรากมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นผิดปกติ เนื่องจากเอนไซม์ของไส้เดือนฝอยรากปมเข้าไปละลายผนังเซลล์ที่อยู่รอบๆ ส่วนหัวแล้วมารวมกันเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ เรียกว่า giant cell เป็นเซลล์ที่คอยให้อาหารแก่ไส้เดือนฝอยตลอด ทำให้เกิดการบวมของราก

2. Hyperplasia เกิดจากการที่เซลล์ที่อยู่รอบๆ ตัวไส้เดือนฝอย ถูกอิทธิพลของเอนไซม์ทำให้บริเวณที่โคนเกิดการแบ่งเซลล์ผิดปกติอย่างรวดเร็ว ทำให้มีการแบ่งเซลล์มาก เนื้อเยื่อบริเวณนั้นบวมใหญ่ออกมารอบราก เกิดจากการที่ไส้เดือนฝอยตัวเมียขยายขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้รากเกิดเป็นปมเกิดขึ้น ถ้ามีไส้เดือนฝอยหลายตัว ปมก็มีขนาดใหญ่ขึ้นมาก

ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ไส้เดือนฝอยหรือพยาธิพืช เป็นศัตรูพืชอีกกลุ่มหนึ่งที่สามารถทำความเสียหายหรือทำอันตรายให้กับพืชได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม หรือทั้ง 2 ทาง ในเวลาเดียวกันความเสียหายทางตรงที่เกิดขึ้นคือการทำให้ต้นพืชไม่เจริญเติบโต แคระแกรนเพราะถูกแย่งอาหาร ส่วนที่ถูกทำลายเสียหายผิดปกติหรือแห้งตายไป ความเสียหายทางอ้อมคือการลดคุณภาพของผลผลิตและการเปิดทางให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเข้าลำลายซ้ำเติมหรือเกิดเป็น secondary invasion ซึ่งปรากฏการณ์นี้พบเห็นกันอยู่ทั่วไป (สืบศักดิ์ สนธิรัตน, 2541)

โดยทั่วไปความเสียหายของพืชมากน้อยแค่ไหน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น พันธุ์พืช อายุของพืช ลักษณะและวิธีการทำลาย จำนวนประชากรเมื่อแรกเริ่มเข้าทำลาย ระยะเวลา สภาพแวดล้อม ซึ่งรวมทั้งสภาพ และชนิดของดิน อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในดิน ตัวอย่างการเกิดโรคในพืชผลที่เกิดจากการทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม ได้แก่

โรครากปมในข้าว จัดเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของข้าวในประเทศที่มีการปลูกข้าวทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งพบในแหล่งปลูกข้าวทั่วไปรวมทั้งข้าวนาดอน ข้าวไร่ และข้าวขึ้นน้ำของทุกภาค สาเหตุเกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม (Meloidogyne) หลายชนิด (species)

โรครากปมในข้าวโพด เกิดจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. ซึ่งโดยทั่วไปมักไม่ทำความเสียหายกับข้าวโพดและการเกิดโรคนี้พบเฉพาะแห่งเท่านั้น โดยทั่วไปพบว่า การเกิดเซลล์ยักษ์เริ่มเห็นได้ชัดเมื่อพืชถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายเพียง 6 วัน จากนั้นจึงเริ่มแสดงอาการ chlorosis ข้าวโพดบางพันธุ์เป็นปมน้อย แต่บางพันธุ์ก็เป็นปมมาก วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยปมกับข้าวโพดมีประมาณ 30 วัน ถ้าอาการของโรครุนแรงมีผลทำให้ผลผลิตลดลงได้มากเช่นกัน

โรครากปมในพืชเส้นใย ได้แก่ ฝ้าย ปอ หม่อน เป็นต้น เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปมที่มีหลายชนิด จัดเป็นโรคที่สำคัญที่สุดในบรรดาโรคที่เกิดจากไส้เดือนฝอยทุกชนิด

โรครากปมในไม้ดอก ไม้ประดับ ซึ่งเป็นพืชอีกกลุ่มหนึ่งที่มีปัญหากับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชทั่วไปทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* หลายชนิดส่วนใหญ่การสำรวจพบ *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. hapla* ทำให้เกิดอาการรากปม ซึ่งถ้าปลูกในแปลงหรือ

ในกระถางที่รวมกันอยู่เป็นพื้นที่กว้าง อาการแคระแกรน ใบเหลืองซีด สามารถเห็นกระจัดกระจายได้ทั่วแปลง

โรครากปมในพืชผัก พืชผักจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก เนื่องจากสรีรวิทยาของพืชผักอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย พืชกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญในอาชีพการเกษตรของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ซึ่งโรครากปมจัดเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชผักทุกชนิด พบอยู่ทั่วไปและทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการปลูกผักทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ที่สำคัญมี 4 ชนิด คือ *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. hapla* อาการทำให้เกิดปมที่ระบบราก ลักษณะของปมต่างจากปมที่เกิดจากแบคทีเรียในพืชตระกูลทั่วไป ปมที่เกิดนี้ถ้ายิ่งมีจำนวนปมมาก ความสูญเสียย่อมมีมากตามไปด้วย เนื่องจากพืชไม่สามารถดูดน้ำและอาหารได้อย่างเต็มที่ การพองโตของเซลล์จนเกิดเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่เรียกเซลล์ยักษ์และของตัวไส้เดือนฝอยในระบบรากเอง ทำให้ระบบท่อน้ำ-อาหาร ถูกอุดตันหรือบิดเบี้ยวไป โดยทั่วไปลักษณะของปมมีตั้งแต่กลม กลมรี กลมยาวหรือรูปร่างคล้ายกระบอง มีขนาดเท่าหัวเข็มหมุดเช่นปมพริก จนถึงปมขนาดใหญ่เช่นปมของมะเขือเทศ ทำให้การเจริญเติบโตของพืชทุกชนิดลดลง ความเสียหายย่อมมีมากเมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายในขณะที่พืชอายุน้อยหรืออยู่ในระยะที่เป็นต้นกล้า เช่นแปลงเพาะกล้ามะเขือเทศเมื่อถูก *M. incognita* เข้าทำลายมีความสูงของต้นเพียง 6 นิ้วก็ออกดอกและมีผลขนาดเท่าเมล็ดถั่วเหลือง เมื่อถอนดูจึงพบว่าระบบรากเสียหายมาก รากเหลือน้อยและเป็นปมเต็มไปหมด อาการของโรคมีมากในบริเวณที่เป็นดินทรายหรือดินร่วนปนทราย ในแปลงที่เป็นดินเหนียวมีน้อย

การวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย

อาการโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยมีลักษณะเฉพาะ ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยโรคในเบื้องต้น จะใช้วิธีตรวจจากอาการโรคเช่นเดียวกับเชื้อชนิดอื่น จากนั้นจึงตรวจลักษณะอื่นๆ

1. อาการโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย

ไส้เดือนฝอย (nematodes) อยู่ใน Kingdom : Animalia ไส้เดือนฝอยหลายพันชนิดอาศัยอิสระอยู่ในน้ำหรือในดิน ได้รับอาหารจากสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กๆ และหลายร้อยชนิดเป็นปรสิตอาศัยอยู่กับพืชและทำให้พืชเป็นโรค ไส้เดือนฝอยทำให้พืชเป็นโรคโดยแสดงอาการที่รากและส่วนเหนือดิน ได้แก่ รากปม รากแผล ใบไหม้ และเมล็ดบวม โรคที่ระบาดและเป็นบัญหาสำคัญทั่วโลก ได้แก่ โรครกปม โรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยมีลักษณะอาการ ดังนี้

- อาการรากปม (root knot) ลักษณะปมอาจเล็กหรือใหญ่แตกต่างกันไปตามชนิดของไส้เดือนฝอยและตามชนิดพืชที่พบ ปมที่เกิดมีลักษณะเหมือนการบวมพองของราก ปมมีลักษณะกลมและมีขนาดใหญ่ประมาณ ½ นิ้ว หรือมากกว่านั้น ลักษณะปมอวบน้ำ (succulent) พบในมะเขือเทศ แตงสควอช รักเร่ แตกต่างจากปมรากถั่ว ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับมีเม็ดกลมๆ ขนาดเล็กมาติดที่ราก

- อาการรากแผล (root lesion) เกิดแผลสีน้ำตาลบนราก ซึ่งในระยะแรกแผลมักมีขนาดเล็ก จากนั้นแผลจะขยายลามไปทั่วทั้งราก

- อาการรากกุด (stubby root) ส่วนของปลายรากไม่เจริญยืดยาว ทำให้เกิดลักษณะรากกุด ปลายรากจะบวมใหญ่กว่าปกติ

- เมล็ดบวม (seed gall) ไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายส่วนของเมล็ดพืช จะทำให้เมล็ดมีลักษณะบวม โตกว่าปกติได้หลายเท่า

- ใบไหม้ (leaf blight) พบโรคใบไหม้ที่เกิดจากไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเกิดกับเบญจมาศ โดยใบเป็นสีน้ำตาล

- ต้น ใบและดอกบิดเบี้ยว เสียรูปร่าง (malformation)

- แคระแกรน (stunting) พืชชะงักการเจริญ ส่วนใบมักจะมีสีซีด อาการนี้พบร่วมกับอาการที่รากถูกทำลาย

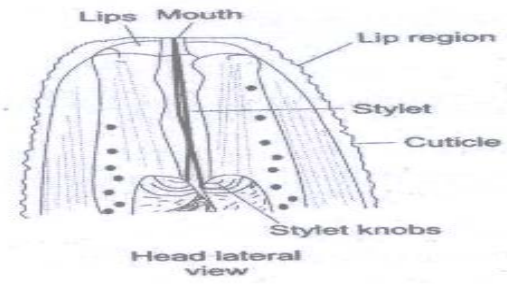
2. การตรวจสอบโรคที่เกิดจากไส้เดือนฝอย

2.1 การแยกไส้ฝอยจากดิน

โดยการเก็บดินหรือตัวอย่างพืชมาแยกไส้เดือนฝอย โดยวิธีที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่ การใช้ตะแกรง ซึ่งตะแกรงที่ใช้จะมีขนาดต่างกัน คือ 20, 100, 200 และ 325 mesh (จำนวนช่องต่อพื้นที่ 1 ตารางนิ้ว) โดยนำดิน 500 กรัม ผสมน้ำ 4 ลิตร หลังจากการผสมให้เข้ากันดี ให้เทผ่านตะแกรง 60 mesh เพื่อกำจัดดินที่มีขนาดใหญ่ออกไป โดยเก็บส่วนที่ไหลผ่านตะแกรง จากนั้นให้นำมาผ่านตะแกรง 100, 200 และ 325 mesh ส่วนน้ำที่ผ่านตะแกรงขนาด 325 mesh ให้ทิ้งได้ ไส้เดือนฝอยที่เก็บได้บนตะแกรงขนาด 100 mesh จะเป็นไส้เดือนฝอยขนาดใหญ่ ส่วนไส้เดือนฝอยที่เก็บได้บนตะแกรงขนาด 200 และ 325 mesh จะมีขนาดเล็กลงตามลำดับ โดยไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืชทุกชนิดจะคงอยู่บนตะแกรง 325 mesh จากนั้นให้นำไส้เดือนฝอยที่เก็บรวบรวมไว้ ไปแยกด้วยวิธีการใช้กรวยแยก เก็บตัวไส้เดือนฝอยและนำไปจำแนกเชื้อโดยดูลักษณะรูปร่าง และส่วนประกอบต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2 การตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

ใช้วิธีการตรวจดูโครงสร้างส่วนหัวของไส้เดือนฝอยซึ่งไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคพืชมีลักษณะเฉพาะที่สำคัญ คือ จะต้องประกอบด้วย stylet หรือ spear จากนั้นให้ตรวจรูปร่าง และการขดตัวของไส้เดือนฝอย ซึ่งใช้ในการวินิจฉัยโรค



ภาพที่ 2.3 ภาพวาดส่วนประกอบบริเวณหัวของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช
ที่มา Agrios, 2005

2.1 การตรวจไส้เดือนฝอยด้วยเทคนิคพีซีอาร์

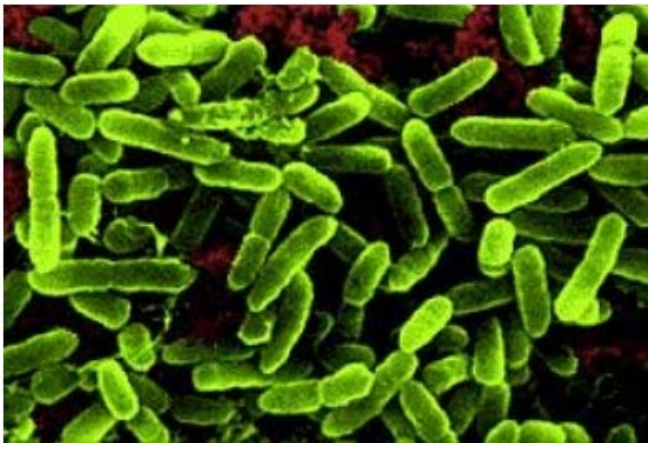
แม้ว่าไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจะมีขนาดใหญ่กว่าสิ่งมีชีวิตสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะเชื้อโรคกลุ่มจุลินทรีย์ แต่การตรวจสอบไส้เดือนฝอยในระดับชนิด ต้องใช้เทคนิคเฉพาะ เช่น การตรวจรอยหยักบริเวณส่วนก้นของไส้เดือนฝอย ดังนั้นการนำเทคนิคการตรวจสอบในระดับโมเลกุลมาใช้ จะช่วยให้จำแนกได้ง่ายขึ้น รวมทั้งเป็นประโยชน์ในการสืบสายทางบรรพบุรุษ โดยมีรายงานไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อไส้เดือนฝอยศัตรูพืช *Meloidogyne* spp. ให้เลือกใช้

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

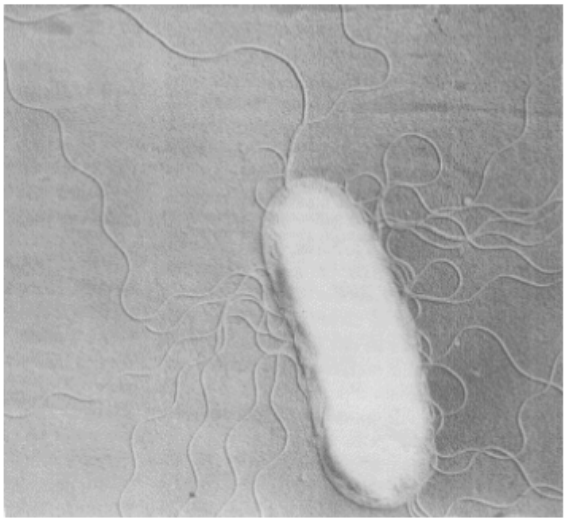
Plant Growth Promoting Rhizobacteria หรือ PGPR เป็นกลุ่มของแบคทีเรียหลากหลาย species และหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งกลุ่มของ PGPR ส่วนใหญ่จะอยู่ในสกุล Pseudomonas, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacter* และ *Serratia* เป็นต้น (ตัวอย่างเซลล์ของ PGPR ดังแสดงในรูปที่ 4 - 6) โดย PGPR จะสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. พวกที่มีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกันกับพืช หรือที่เรียกว่าความสัมพันธ์แบบ Symbiosis คือแบคทีเรียจำพวกที่สามารถเข้าสู่รากพืชแล้วเกิดกระบวนการต่างๆ ที่จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้

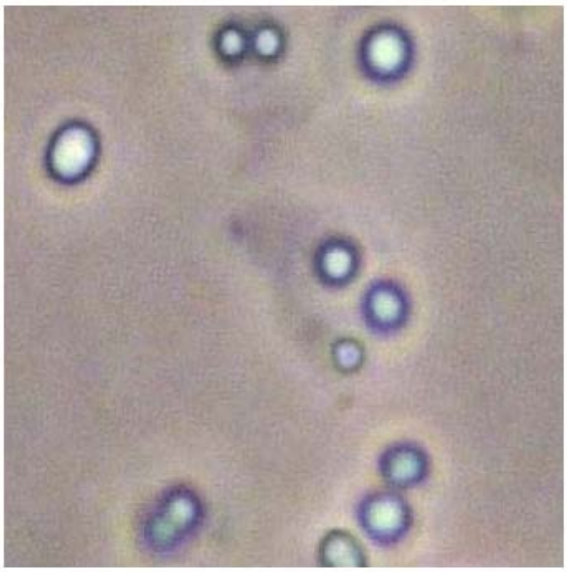
2. พวกที่อาศัยแบบอิสระในดิน (Free-living form) และจะพบอยู่ใกล้ๆ บริเวณรากพืช โดยแบคทีเรียจำพวก PGPR จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ช่วยให้ผลการผลิตของพืชสูงขึ้น



ภาพที่ 2.4 *Pseudomonas* spp.
ที่มา : http://www.astrosurf.com/lombry/bioastrocontamin-alh84001.hml



ภาพที่ 2.5 *Azospirillum* spp.
ที่มา : http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/baby/azospiri.html



ภาพที่ 2.6 *Azotobacter* spp.
ที่มา : http://www-micro.msb.le.ac.uk/video/Azotobacter.htlm

กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชมีได้ 2 ทางคือ โดยทางตรงและทางอ้อม ดังนี้

กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยทางตรง ได้แก่

- ช่วยย่อยธาตุฟอสฟอรัสในดินให้อยู่ในรูปแบบที่เป็นประโยชน์ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ได้มากขึ้น
- สร้างปุ๋ยไนโตรเจนให้กับพืช
- ผลิตสาร phytohormones เช่น Auxin, Cytokinin, Gibberelin เป็นต้น
- ช่วยลดความเข้มข้นของเอทธิลีนในพืช
- สามารถผลิตซิเดอร์โรฟอร์ (Siderophores) ช่วยนำธาตุเหล็กไปให้พืชใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น

กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยทางอ้อม ได้แก่

- ช่วยในการควบคุมโรคพืช ทั้งโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคพืช (ดังตารางที่ 2.1) และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช
- ผลิตสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชได้
- ผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้
- ผลิตสาร Anifungal Metabolites
- จำกัดปริมาณธาตุเหล็กที่เป็นประโยชน์ของเชื้อโรคพืช ทำให้สามารถป้องกันการแพร่พันธุ์ และขยายจำนวนของเชื้อโรคพืชได้ โดยการผลิตซิเดอร์โรฟอร์ (Siderophores)

ตัวอย่างของแบคทีเรียที่เป็น PGPR ดังสรุปในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่าง Plant Growth Rhizobacteria

Azorhizobium caulinodans	*Citrobacter freundii*
Azospirillum amazonense	*Curtobacterium flaccumfaciens*
Azospirillum halopraeferens	*Enterobacter agglomerans*
Azospirillum irakense	*Enterobacter cloacae*
Azospirillum lipoferum	*Erwinia herbicola*
Azospirillum brasilense	*Flavomans ovyzihabitans*
Azotobacter Chroococcum	*Hydrogenophaga pseudoflava*
Bacillus cereus	*Klebsiella planticola*
Bacillus coagulans	*Klebsiella ascorbata*
Bacillus laterosporus	*Klebsiella cryovcrescens*
Bacillus licheniformis	*Phyllobacterium rubiacearum*
Bacillus macerans	*Pseudomonas aeruginosa*
Bacillus megaterium	*Pseudomonas aureofaciens*
Bacillus mycoides	*Pseudomonas corrugate*
Bacillus pasteurii	*Pseudomonas fluorescens*
Bacillus polymyxa	*Pseudomonas marginalis*
Bacillus pumilus	*Pseudomonas putida*
Bacillus sphaericus	*Pseudomonas rubrilineans*
Bacillus subtilis	*Rathyibacter rathayi*
Burkholderia cepacia	*Serratia marcescens*
Burkholderia gladioli	*Stenotrophominas sp.*
Burkholderia graminis	*Streptomyces griseoviridis*
Burkholderia vietnamensis	

ที่มา : Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G. & Penrose, D. M. (1999)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่าง PGPR ที่ช่วยในการควบคุมเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช

PGPR	เชื้อราสาเหตุโรคพืช	ชนิดพืช
Actinoplanes spp.	*Pythinum ultimum* *Rhizoctonia solani*	Table beet Table beet
Bacillus spp.	*Gaeumannaomyces graminis* var. *tritici*	ข้าวสาลี
Bacillus subtilis GB03	*Fusarium oxysporum* sp. *ciceris*	ถั่วเขียว
B. subtills BACT-D	*Pythium oxysporum* sp. *ciceris*	มะเขือเทศ
Burkholderia cepacia A3R	*Fusarium graminearum* *Fusarium* spp.	ข้าวสาลี ข้าวสาลี
Burkholderia cepacia PHQM 100	*Phythium* spp.	ข้าวโพด
Comamonas acidovorans HF42	*Magnaporthe poae*	Kentucky bluegrass
Enterobacter sp. BF14	*Magnaporthe poae*	Kentucky bluegrass
Psendomonas chloroaphis MA342	*Dreshlera graminea* *D. avenea* *Ustilago avenea*	ข้าวบาเล่ย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวโอ๊ต
P. chloroaphis PCL1391	*Fusarium oxysporum* sp. *Radicis-lycopersici*	มะเขือเทศ
P. fluorescens	*Fusarium oxysporum* sp. *raphani*	หัวผักกาด
P. fluorescens Q8rl-96	*Gaeumannaomyces graminis*	ข้าวสาลี
P. fluorescens VO61	*Pythinum ultimum* *Rhizoctonia solani*	ข้าว
P. putida	*Fusarium oxysporum* sp. *Raphani*	หัวผักกาด
Stenotrophomonas maltophilia C3	*Rhizoctonia solani*	Tall fescue

ที่มา : Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G. & Penrose, D. M. (1999)

กลไกการให้ธาตุอาหารและการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช

แบคทีเรีย PGPR จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ 2 ทาง คือ โดยทางตรงและทางอ้อม ดังต่อไปนี้ ซึ่งจะกล่าวถึง กลไกในทางอ้อมก่อน

กลไกทางอ้อม

ซิเดอร์โรฟอร์ (Siderophores)

ธาตุเหล็กจัดเป็นธาตุอาหารมีปริมาณมากบนพื้นผิวโลก แต่โดยทั่วไปธาตุเหล็กอยู่ในรูปของสารประกอบที่ลายละน้ำได้ยาก หรือไม่สามารถละลายน้ำได้เลย ความสามารถในการละลายน้ำของเหล็กมีประมาณ 10^{-19} ที่ pH 7.4 ซึ่งปริมาณของการละลายได้เท่านี้นั้นไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ดังนั้นจากความต้องการเพื่อการอยู่รอด จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในดินจึงต้องผลิตสารที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อธาตุเหล็กสูง ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (0.5 - 1.5 กิโลดาลตัน) ที่เรียกว่าซิเดอร์โรฟอร์ขึ้นมา

PGPR สามารถป้องกันการแพร่พันธุ์หรือป้องกันการขยายจำนวนของเชื้อโรคพืชได้โดยการผลิตซิเดอร์โรฟอร์ขึ้นมา โดยซิเดอร์โรฟอร์จะไปจับกับธาตุเหล็กที่อยู่บริเวณรอบๆ รากพืช ดังนั้นผลจากการขาดธาตุเหล็กจะสามารถป้องกันเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้คือ ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชไม่สามารถแพร่พันธุ์ได้นั่นเอง แต่พืชจะไม่ได้รับผลกระทบจากการลดลงของธาตุเหล็กในบริเวณนั้นเพราะว่า พืชสามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นของธาตุเหล็กต่ำๆ น้อยกว่า (ประมาณ 1000 เท่า) ของจุลินทรีย์ โดยนักวิทยาศาสตร์พบว่าในสภาพแวดล้อมที่ขาดธาตุเหล็ก หรือมีธาตุเหล็กในปริมาณน้อย จะกระตุ้นให้จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดมีการสร้างซิเดอร์โรฟอร์มากขึ้น และในทางกลับกัน การสร้างจะถูกยับยั้งเมื่อในสภาพแวดล้อมมีปริมาณของธาตุเหล็กมากขึ้น ยกเว้นในกลุ่มของแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีธาตุเหล็กอยู่เลย ใน *Pseudomonas putida* นั้นสามารถผลิตซิเดอร์โรฟอร์ได้ในปริมาณมากและมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อรา ที่ทำให้โรคในมะเขือเทศ ในบางรายงานกล่าวว่า mutant ของแบคทีเรียสายพันธุ์ P. *aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างซิเดอร์โรฟอร์ได้น้อยนั้นจะไม่สามารถป้องกัน โรค damping off จากเชื้อรา *Phythium* ได้

เอนไซม์ (Enzymes)

PGPR บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้โดยไปย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราเหล่านั้น

มีรายงานว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria บางสายพันธุ์เช่น *Pseudomonas stutzeri* สามารถผลิตเอนไซม์ extracellular chitinase และเอนไซม์ laminarinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยเส้นสายของเชื้อรา *Fusarium solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากเน่าได้ (Lim et al., 1991)

และได้มีรายงานว่า PGPR สายพันธุ์ *P. cepacia* สามารถผลิตเอนไซม์ B-1, 3-glucanase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยเส้นสายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Rhizoctinia solani*, *Sclerotium rolfii* และ *Phytium ultimum* ได้ (Fridlender et al., 1993)

สารปฏิชีวนะ (antibiotics)

หนึ่งในกลไกที่สำคัญในการที่ PGPR จะป้องกันการแพร่พันธุ์ หรือขยายจำนวนของเชื้อโรคพืชก็คือความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics)

ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย PGPR ได้แก่ agrocin 84, agrocin 434, 2, 4-diacetylphloroglucinol, herbicolin, oomycin, phenazines, pyoluteorin, pyrrolnitrin เป็นต้น

สารต้านเชื้อรา (Antifungal Metabolites)

นอกจาก PGPR จะสามารถผลิตซิเดอร์โรฟอร์ และสารปฏิชีวนะซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการต้านทานเชื้อโรคพืชแล้ว PGPR บางชนิด ยังสามารถผลิตสารต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ด้วย เช่น *Pseudomonas fluorescens* สามารถสังเคราะห์ hydrogen cyanide ซึ่งทำให้ *Pseudomonas* สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดได้ ตัวอย่างเช่น สามารถยับยั้ง *Thielabiopsis basicola* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรค black root rot ในยาสูบได้ (Ramette et al., 2003)

ในบางรายงานกล่าวว่า จุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์รวมทั้ง *Cladosporium weneckii*, *Pseudomonas cepacia* และ *P. solanacearum* สามารถย่อยสลายสารประกอบ fusaric acid ได้ซึ่งสารประกอบ fusaric acid ตัวนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายในพืชหลังจากที่พืชถูกเข้าทำลายโดย *Fusarium* (Ramamoorthy *et al*., 2001)

กลไกทางตรง

ซิเดอร์โรฟอร์ (Siderophores)

ดังที่กล่าวไปแล้วว่าซิเดอร์โรฟอร์นั้นคืออะไรในหัวข้อกลไกทางอ้อม ดังนั้นในหัวข้อกลไกทางตรงจึงขอกล่าวถึงความสำคัญของซิเดอร์โรฟอร์ในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืชในทางตรง (ช่วยในการนำเอาธาตุเหล็กเข้าสู่พืช) และกลไกการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์โดยโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์

กลไกทั่วไปของการนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์โดยโมเลกุลซิเดอร์โรฟอร์นั้นประกอบไปด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ

1. เริ่มการสังเคราะห์โมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์ จากนั้นจึงแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปสู่สิ่งแวดล้อม
2. ซิเดอร์โรฟอร์จับกับธาตุเหล็ก แล้วถูกดึงกลับเข้าสู่เซลล์ โดยกระบวนการ active transport
3. ปลดปล่อยโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์ที่ดึงธาตุเหล็กออกแล้วคืนสู่ภายนอกเซลล์

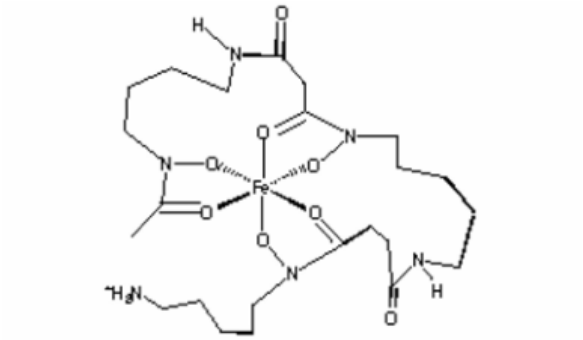
เมื่อโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์เข้าจับกับธาตุเหล็กแล้วนั้น โมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์จะจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ซึ่งทำหน้าที่เป็น receptor protein จากนั้นจะถูกขนย้ายผ่านเข้ามายังผนังเซลล์ โดยกระบวนการ active transport กล่าวคือ สาร ATP ที่ผนังเซลล์จะเป็นตัวกระตุ้นให้โปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มี ATP เกาะอยู่แล้ว โดยการส่งผ่านพลังงานทำให้ธาตุเหล็กเข้าสู่ภายในส่วนของ cytoplasm ได้ ทั้งนี้แต่

และชนิดของซิเดอร์โรฟอร์เองจะมีความจำเพาะเจาะจงต่างกันไปกับโปรตีนต่างๆ ที่ผนังเซลล์ด้วย เมื่อโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์ที่จับธาตุเหล็กถูกนำผ่านเข้ามายังผนังเซลล์แล้ว ธาตุเหล็กก็จะปลอดปล่อยออกจากโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์ โดยอาศัยกลไกสำคัญ 3 ขั้นตอนแรก เมื่อโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์ที่มีธาตุเหล็กจับอยู่ก่อนที่จะเข้ามายัง cytoplasm นั้น บริเวณโมเลกุลที่เป็น ligand ที่เชื่อมกับธาตุเหล็กจะถูกสลาย เช่น เอนโซม์ esterase จะเข้าทำปฏิกิริยากับซิเดอร์โรฟอร์กลุ่ม entorebactin หรือธาตุเหล็ก อาจถูกปลอดปล่อยโดยปฏิกิริยาเคมีแบบ reduction เมื่อธาตุเหล็กถูกปลอดปล่อยออกจากโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์แล้ว ส่วนที่เป็นโมเลกุลของซิเดอร์โรฟอร์เอง อาจถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปจากเดิมหรือไม่ก็ได้ แล้วจึงถูกปลดปล่อยออกสู่นอกเซลล์ไปสู่สิ่งแวดล้อมเพื่อจับกับธาตุเหล็กต่อไป

ตัวอย่างกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างซิเดอร์โรเฟอร์

Streptomyces

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะสร้างซิเดอร์โรฟอร์จำพวกที่เรียกว่า Ferrioxamine ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ diamines และ carboxylic acid ปัจจุบันพบว่า Ferrioxamine มีด้วยกันทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ Ferrioxamine $\mathbf{A_1}$, $\mathbf{A_2}$, B, $\mathbf{D_1}$, $\mathbf{D_2}$, E, G และ I นอกจาก Ferrioxamine จะพบในสกุลอื่นๆ ด้วย เช่น *Arthrobacter*, *Chromobacterium*, *Pseudomonads* และ *Erwinia herbicola* เป็นต้น (Teaumroong & Boonkerd, 1996)



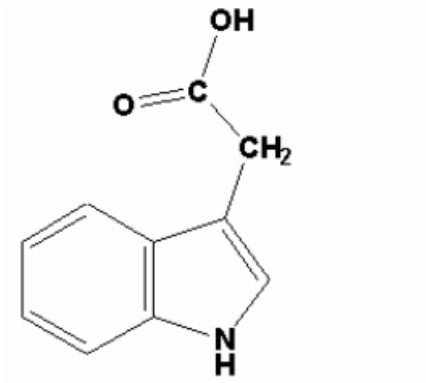
ภาพที่ 2.7 โครงสร้าง ferrioxamine B

Bacillus

แบคทีเรียในกลุ่มที่นิยมศึกษา ได้แก่ *Bacillus megaterium* ซึ่งสร้างซิเดอร์โรฟอร์ที่ชื่อ Schizokinen ส่วน *B. subtilis* นั้นสร้างซิเดอร์โรฟอร์ชื่อ DHB-glycine การนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ด้วย Schizokinen พบว่ามีบทบาทร่วมกับซิเดอร์โรฟอร์กลุ่มอื่นด้วยเช่น Ferrioxamine และในขณะเดียวกัน DHB-glycine ก็มีบทบาทร่วมกับสารประกอบที่มีกลุ่มของ phenol ด้วย (Teaumroog & Boonkerd, 1996)

ฮอร์โมนพืช (phytohormones)

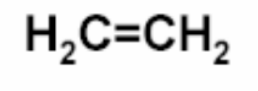
การผลิต phytohormones โดย PGPR เป็นกลไกที่สำคัญในการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ ในการเจริญเติบโตของพืช โดยรายงานเกี่ยวกับการผลิต phytohormones จาก PGPR ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่บทบาทของ phytohormones กลุ่มที่เรียกว่า Auxins ซึ่ง phytohormones ในกลุ่มของ Auxins ก็ได้แก่ indole-3-acetic acid (IAA) ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการยืดตัวของเซลล์ (cell elongation), การแบ่งเซลล์ (cell division) และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (cell differentiation)



ภาพที่ 2.8 โครงสร้าง indole-3-acetic acid (IAA)

เอธิลีน (Ethylene)

เอธิลีน (Ethylene) เป็นฮอร์โมนพืชเพียงตัวเดียวที่อยู่ในรูปแก๊ส โดยพืชสร้างขึ้นเพื่อใช้ควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาการต่างๆ เช่น การออกดอก, การสุกของผล และมีผลต่อการเหลืองและการร่วงของใบด้วย

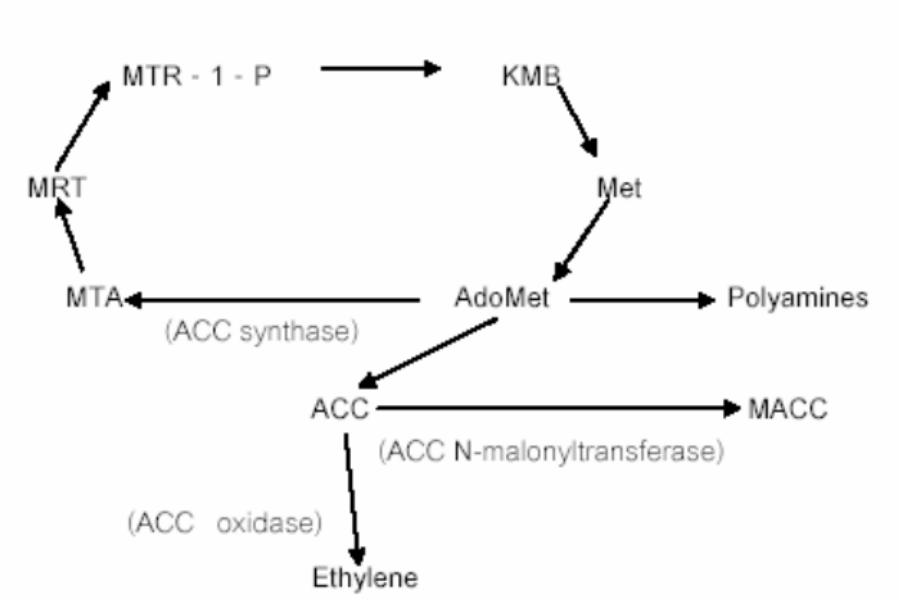


ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของเอธิลีน

วิถีการสังเคราะห์เอทธิลีนเริ่มจากกรดอะมิโนเมไธโอนีน (Methionine) ทำปฏิกิริยากับ ATP เกิด S-adenosylmethionine (SAM) ต่อมา SAM จะเปลี่ยนเป็น 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) และ ACC จะสลายตัวเป็นเอทธิลีน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ฝังตัวอยู่ในเยื่อหุ้มแวคิวโอลคือ EFE (ethylene forming enzyme) จากการศึกษาพบว่าขั้นตอนที่จำกัดอัตราการสังเคราะห์เอทธิลีน คือขั้นตอนการสร้าง ACC จาก SAM ซึ่งCATAIYSE โดยเอนไซม์ ACC synthase ซึ่ง

ถูกกระตุ้นโดยปัจจัยภายนอก เช่น การเกิดแผล การขาดน้ำ เป็นต้น และปัจจัยภายใน เช่น ปริมาณออกซิเจนสูง กระบวนการสุกของผล เป็นต้น

นอกจากนี้ PGPR บางชนิดยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชผ่านกลไกของเอ็นไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase ได้อีกทางหนึ่งด้วย และยังพบว่าเมื่อ PGPR สังเคราะห์ออกซิน ได้ในปริมาณสูง ก็จะมีการสังเคราะห์ เอนไซม์ ACC synthase สูงด้วยซึ่งทราบผลมาจากการที่พบปริมาณ ACC สูงขึ้นในพืชนั้นเอง หลังจากนั้น แบคทีเรียจะย่อย ACC โดยเอนไซม์ 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase แล้วเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย และ alphaketobutyrate และถ้าระดับของเอทธิลีนมีปริมาณที่สูงเกินไปก็จะสามารถยับยั้งการงอกและสามารถยับยั้งการยืดยาวของรากพืชได้ และจากการที่แบคทีเรียสามารถย่อย ACC ได้ ดังนั้นระดับ ACC ก็จะต่ำลงจนทำให้อยู่ภายในระดับที่ไม่สามารถจะยับยั้งการเจริญของรากและการงอกได้นั่นเอง



Met = Methionine **AdoMet** = adenosylmethionine

ACC = 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid **MTR** = methylthioribose

MACC = malonyl ACC (inactive) **MTR-1-P** = methylthioribose-1-phosphate

MTA = methylthioadenine **KMB** = 2-keto-4-methylbutyrate

ภาพที่ 2.10 วิถีการสังเคราะห์เอทธิลีน

ในขณะนี้ยังไม่มีหัวเชื้อ PGPR ที่ผลิตและใช้ในเชิงการค้าภายในประเทศไทย แต่มีรายงานการใช้ PGPR เป็นหัวเชื้อเชิงการค้าในต่างประเทศแล้วดังสรุปในตารางที่ 3 และมีรายงานการทดสอบและทดลองใช้ *Azotobacter* spp. และ *Azospirillum* spp. เป็นหัวเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืชภายในประเทศไทยแล้ว

ตารางที่ 2.3 หัวเชื้อ Plant Growth Promoting Rhizobacteria เชิงการค้าที่ใช้ในต่างประเทศ

เชื้อ	ชื่อทางการค้า	เชื้อสาเหตุโรคพืช/โรค	ชนิดของพืช	การประยุกต์ใช้งาน
Agrobacterium raiodbacter	Galltrol-A	โรค Crown Gall ที่เกิดจากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*	ไม้ผล, ถั่ว, ไม้ประดับ	แบบ Cell suspension ใช้แช่กับเมล็ดพืช, ใช้กับต้นกล้าพืช, กิ่งปักชำ, ราก, ลำต้น และใส่ลงบนดิน
Agrobacterium raiodbacter	Nogall	*Agrobacterium tumefaciens*	ต้นไม้ใหญ่	แบบ Cell suspension ใช้แช่กับรากพืช
Agrobacterium raiodbacter	Diegall	*Agrobacterium tumefaciens*	ต้นไม้ใหญ่	แบบ Cell suspension ใช้แช่กับรากพืช
Agrobacterium raiodbacter	Norbac 84C	โรค Crown Gall ที่เกิดจากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*	ไม้ผล, ถั่ว, ไม้ประดับ	แบบ Cell suspension ใช้แช่กับรากพืชหรือลำต้น, ใช้จุ่มกับกิ่งปักชำ หรือใช้พ่น
Bacillus subtilis	Epic	*Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. และ *Aspergillus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่เข้าทำลายรากพืช	ฝ้าย, พืชจำพวกถั่ว	เป็นผงแบบแห้ง อาจใช้ร่วมกับยาฆ่าเชื้อรา เพื่อใช้เป็น seed treatment
Bacillus subtilis	Kodiak	*Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. และ *Aspergillus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อโรคที่เข้าทำลายรากพืช	ฝ้าย, พืชจำพวกถั่ว	เป็นผงแบบแห้ง อาจใช้ร่วมกับยาฆ่าเชื้อรา

ที่มา : Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G. & Penrose, D. M. (1999)

เชื้อ	ชื่อทางการค้า	เชื้อสาเหตุโรคพืช/โรค	ชนิดของพืช	การประยุกต์ใช้งาน
Bacillus subtilis	System 3	เชื้อที่เข้าทำลายต้นกล้า	ข้าวบาเลย์, ถั่วลิสง, ถั่วเหลือง, ฝ้าย, ข้าว	ใช้เป็น seed treatment ในกระบะปลูกพืช
Burkholderia cepacia	Blue circle	*Fursarium* spp., *Pythium* spp. และพวก nematodes	พืชผัก	ใช้เป็น seed treatment โดยผสมร่วมกับดินพีท หรือใช้ร่วมกันกับตอนให้น้ำ
Burkholderia cepacia	intercept	*Rhizoctonia solant*, *Fursarium* spp.	ข้าวโพด, ฝ้าย, พืชผัก	-
Pseudomonas fluorescens	BlightBan A506	*Erwinia amylovora*	อัลมอลล์, แอปเปิ้ล, เชอร์รี่, ลูกแพร, มันฝรั่ง, สเตอเบอร์รี่, ลูกพีช	Wettable powder ใช้หลังจากการเก็บเกี่ยวกับพวกไม้ผล โดยอาจใช้แบบฉีดพ่น หรือใช้แช่ก็ได้
Pseudomonas fluorescens	Mycotsop	*Fusarium* spp., *Alternaria brassicola*, *Phomopsis* spp., *Botrytis* spp., *Botrytis* spp., *Pythium* spp., *Phytopthora* spp.	ไม้ประดับ, พืชผล	ใช้รดลงบนหน้าดิน, ใช้ฉีดพ่น หรือใช้ผสมร่วมกันกับระบบการให้น้ำ

ที่มา : Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G. & Penrose, D. M. (1999)

การทำการเกษตรของประเทศไทยตลอดระยะเวลา 50 กว่าปีที่ผ่านมา ได้ใช้พื้นที่ป่าไม้ไปมาก เป็นเหตุให้ปริมาณฝนตกลดน้อยลง และตกไม่ถูกต้องตามฤดูกาล ขาดการปรับปรุงบำรุงดินอย่างถูกต้อง นำมาซึ่งต้องใช่ปุ๋ยเคมีอย่างมากเพื่อเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอกับความต้องการของพลเมืองที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อใส่ปุ๋ยเคมีมากเกินไป เป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต และก็จะทำให้ต้นพืชอ่อนแอได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีฆ่าแมลงและเชื้อโรคกันมากขึ้น ผลที่เกิดขึ้นคือดินเสื่อมโทรม ปลูกพืชไม่ขึ้น สารพิษตกค้างในผลผลิต ดิน น้ำ คน และสัตว์เจ็บป่วย คนทั่วโลกจึงหันมาสนใจทำการเกษตรแบบไม่ใช้สารเคมีหรือการเกษตรแบบอินทรีย์มากขึ้น และการประยุกต์ใช้ PGPR จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรอินทรีย์ และได้เข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการทำการเกษตรแบบไม่ใช้สารเคมี แต่เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีการใช้หัวเชื้อ PGPR ในการเกษตรในประเทศไทยอย่างจริงจัง ดังนั้นการทดลอง และวิจัยเกี่ยวกับการช่วยประสิทธิภาพ

การเจริญเติบโตของพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อที่จะเพิ่มความมั่นใจในการใช้ PGPR ในระบบการเกษตรที่แท้จริงนั่นเอง

Recombinant-DNT (rDNT) Technology

Recombinant-DNT (rDNT) Technology เป็นเทคนิคหลักที่ใช้ในการผลิตโปรตีนที่ต้องการในสภาวะที่จำลองสภาพธรรมชาติขึ้นมา โดยเป็นวิธีการที่ใช้ถ่ายทอดยีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งไปสู่สิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งเริ่มต้นการคัดแยกยีนที่มีรหัสสำหรับโปรตีนดังกล่าว หลังจากนั้นจะสอดแทรกยีนดังกล่าวเข้าไปยังเวคเตอร์ที่เหมาะสม ได้แก่ พลาสมิด (plasmid) ซึ่งเป็นดีเอนเอที่อยู่นอกเหนือจากโครโมโซม มักพบในแบคทีเรีย พลาสมิดจะถูกนำพาเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้น จึงเป็นการสร้างสายดีเอนเอ โดยแทรกสายดีเอนเอเข้าไปสู่ชุดของดีเอนเอที่แตกต่างกัน จึงเรียกว่า recombinant-DNT (rDNT) เทคนิคนี้ใช้ในการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อสร้างสิ่งมีชีวิตที่มีคุณสมบัติใหม่โดยการเติมชิ้นส่วนของดีเอนเอจากสิ่งมีชีวิตอื่นสู่สิ่งมีชีวิตชนิดที่ต้องการและให้สิ่งมีชีวิตชนิดใหม่สร้างโปรตีนที่ถูกถอดรหัสโดยสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่จากท่อนดีเอนเอใหม่ที่แทรกเข้าไป ยีนที่มีรหัสในการแสดงออกของโปรตีนจากสิ่งมีชีวิตชนิดแรกจะถูกสอดแทรกเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านชนิด prokaryotes (เช่น แบคทีเรีย) หรือ eukaryotes (ยีสต์ เซลล์แมลง หรือเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) จากนั้นจะต้องคัดเลือกโคลนของเซลล์เจ้าบ้านที่ภายในมีพลาสมิดที่มียีนที่ต้องการอยู่และเพิ่มปริมาณเซลล์เจ้าบ้านโคลนดังกล่าวให้มีจำนวนมากขึ้น และสามารถสกัดนำเอาผลิตภัณฑ์ของยีนมาใช้ประโยชน์ได้เพื่อการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป ผลิตภัณฑ์ของยีน อาจอยู่ภายในเซลล์ อยู่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ หรือถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ละลายปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ก็ได้

การเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้านในกระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับความซับซ้อนของโมเลกุลที่จะผลิต และการคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์และประสิทธิภาพในการหมักหรือการเพาะเลี้ยงเซลล์ เทคโนโลยีขั้นต้นในการผลิตทำใน *E. coli* เนื่องจากมีความเข้าใจในชีววิทยาระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตนี้ หลังจากนั้นก็ได้มีการพัฒนามาใช้เซลล์ eukaryotes มากขึ้น ความแตกต่างระหว่าง rDNA ในเซลล์เจ้าบ้านชนิด prokaryotes กับ eukaryotes คือ ใน prokaryotes มักจะมีการผลิตโปรตีนได้ในความเข้มข้นที่สูงกว่า และอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียมักไม่ซับซ้อน เตรียมได้ง่าย ราคาไม่แพง แต่โปรตีนที่ผลิตได้จะไม่มีการดัดแปลงโครงสร้างของโปรตีนมีขนาดใหญ่มากอาจสร้างได้ช้าและไม่สมบูรณ์ ข้อจำกัดเหล่านี้อาจทำให้ต้องแสดงออกโปรตีนใน eukaryotes ดังนั้น การเลือกชนิดของเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนจึงมีความสำคัญและส่งผลอย่างมากต่อกระบวนการตรวจสอบวิธีการผลิต การทำให้บริสุทธิ์ การตรวจวิเคราะห์ และการตรวจสอบโปรตีนปนเปื้อน

อินซูลินเป็นโปรตีนชนิดแรกที่ใช้เทคโนโลยีนี้ในการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมและนำมาใช้เป็นยา แต่เดิมอินซูลินได้จากการสกัดตับอ่อนของวัว สุกร และสัตว์ชนิดอื่นๆ เพื่อนำมาใช้ในผู้ป่วยเบาหวาน แต่เนื่องจากอินซูลินจากสัตว์มีโครงสร้างปฐมภูมิ (ลำดับของกรดอะมิโน) แตกต่างจากอินซูลินของมนุษย์ ดังนั้น อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ยา จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยี rDNA เพื่อผลิตอินซูลินมนุษย์ โดยใช้ E.coli เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่รับเอาชิ้นส่วนดีเอนเอของยีนอินซูลินของมนุษย์เข้าไป *E. coli* นี้จึงสามารถสร้างอินซูลินมนุษย์ได้ปัจจุบันเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย

กระบวนการผลิต Recombinant Protein ในระดับอุตสาหกรรม

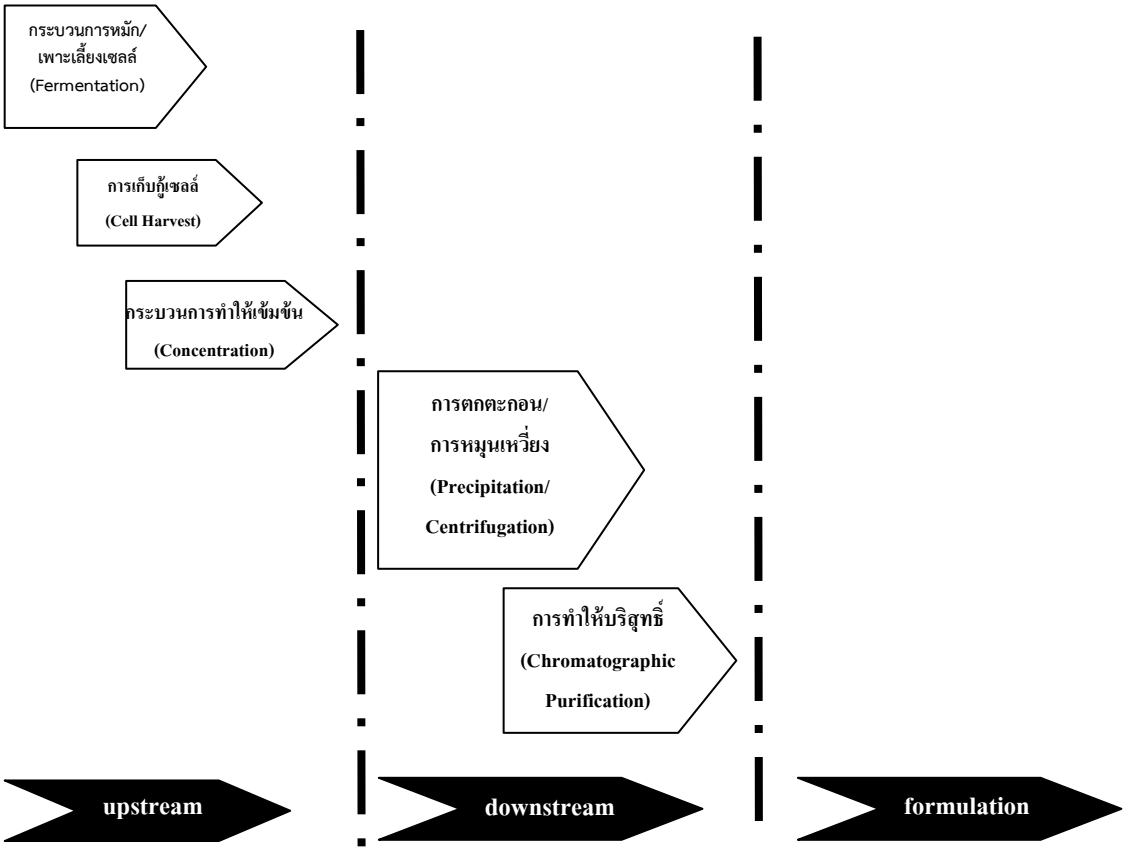
ในอุตสาหกรรมการผลิต recombinant Protein สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. Upstream processing หมายถึง กระบวนการขั้นแรกสุดในการผลิตชีวเภสัชภัณฑ์ โดยเริ่มต้นตั้งแต่ การเลี้ยงและเพิ่มจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาณที่ต้องการใน bioreactor จนเซลล์สามารถผลิตสารสำคัญได้ปริมาณที่เหมาะสม

2. Downstream processing หมายถึง กระบวนตั้งแต่การรวบรวมสาระสำคัญและการทำให้บริสุทธิ์ในกระบวนการผลิตชีวเภสัชภัณฑ์ ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์ในกระบวนการแรก ซึ่งประกอบด้วยสองส่วนย่อยคือ การแยก และการทำให้บริสุทธิ์ จนได้ final bulk product

3. Formulation หมายถึง การตั้งตำรับชีวเภสัชภัณฑ์ หลังจากที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้วจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย (finish product) ที่มีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัย

แผนภูมิแสดงกระบวนการผลิต Recombinant Protein ในระดับอุตสาหกรรม



การผลิตโดยใช้ Prokaryotic Cell

ในการผลิตโดยใช้แบคทีเรียมักจะทำให้เกิดข้อดีและข้อเสียที่ต่างจาก eukaryotes ในทฤษฎีโปรตีนที่ผลิตใน *E. coli* มักสามารถทำได้ง่าย ได้ผลผลิตในปริมาณสูงในเวลาอันรวดเร็ว แต่โปรตีนที่ผลิตได้มักจะไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลซึ่งมีความจำเป็นต่อการ folding ที่ถูกต้อง นอกจากนี้โปรตีนที่ถูกสร้างจาก *E. coli* จะได้ methionyl derivatives ที่จะไม่พบในโปรตีนธรรมชาติและมีการสลายตัวของโปรตีนได้ง่าย จากเอนไซม์ protease ที่ปนเปื้อนมา นอกจากนี้ยังต้องมีการกำจัด endotoxin ที่มักจะปนเปื้อนมาในกระบวนการผลิต

การทดสอบความคงตัวด้านพันธุกรรม (genetic stability) ในระหว่างกระบวนการผลิต อาจทำได้โดยการสกัดแยกและหาลำดับกรดนิวคลีอิก หรือโดยการทำ DNA restriction mapping ซึ่งอาจยืนยันผลโดยการทำ peptide mapping ของโปรตีนที่สร้างเสร็จในแต่และรุ่นการผลิต ดังนั้นการควบคุมสภาวะการหมักที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อควบคุมการย่อยสลายโปรตีนเป้าหมายให้น้อยที่สุด ซึ่งเป็นกระบวนการที่มักจะเป็นปัญหาในการหมักด้วย *E. coli* และทำให้ได้ yield ต่ำ นอกจากนี้ยังต้องมีการตรวจสอบ conformation ของโปรตีนและ potency ในกระบวนการผลิต

การผลิตโดยใช้ Eukaryotic Cell

การใช้ eukaryotes มีการพัฒนามายาวนานเพื่อผลิตวัคซีนในอุตสาหกรรมการผลิตเภสัชภัณฑ์ภายหลังจากที่มีการนำเทคโนโลยี rDNA มาใช้เพื่อก้าวข้ามข้อจำกัดในการผลิตด้วย E.coli ซึ่งโดยหลักแล้วมักจะใช้แก้ปัญหาเพื่อผลิตสารจำพวก glycoprotein เนื่องจากในเซลล์จำพวกนี้จะมีการหลั่งสารโปรตีนดังกล่าวและมีการ folding ตามโครงสร้างปฐมภูมิ ทุติยภูมิ ตติยภูมิเหมือนกับโปรตีนในธรรมชาติ แต่ในขั้นต้นของการพัฒนาการผลิตด้วยวิธีการนี้ยังไม่คุ้มค่ากับการลงทุน ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาให้มีการแสดงออกของโปรตีนได้ดีขึ้น และสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ Chinese Hamster Ovary (CHO) cells ประกอบกับการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้มีการเติบโตที่เหมาะสมและการพัฒนาเซลล์ให้กลายเป็น immortal cell lines ทำให้การผลิตโปรตีนด้วยระบบนี้มีความเป็นไปได้ในระดับอุตสาหกรรม แต่ยังมีข้อวิตกเกี่ยวกับการใช้เซลล์จำพวกนี้ เนื่องจากอาจไม่ปลอดภัยหากเซลล์ดังกล่าวมีการปนเปื้อน

เซลล์จำพวกอื่นที่ใช้ ได้แก่ เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง ซึ่งการสร้างโปรตีนและการดัดแปลงโครงสร้างใกล้เคียงกับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมการประยุกต์ใช้ยีสต์สายพันธุ์ Saccharomyces cerevisiae เพื่อผลิตโปรตีนก็มีวิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องและมีข้อดีที่เหนือกว่าใน *E. coli* กล่าวคือ ยีสต์สามารถสร้าง glycoprotein และ monoclonal antibody ได้

ในกระบวนการผลิตโดยใช้สิ่งมีชีวิตเป็นรากฐานสำคัญของเทคโนโลยีชีวภาพ ในกระบวนการผลิตจึงต้องมีการควบคุมกระบวนการเพื่อประกันว่า มี genetic stability, ได้ yield สม่ำเสมอและไม่มีการปนเปื้อนจาก adventitious organism นอกจากนี้ในการผลิตโปรตีนจาก eukaryotes ยังต้องมีการตรวจสอบว่ามี oncogenic DNA/RNA ปนเปื้อนมาด้วยหรือไม่ รวมทั้งต้องมีการตรวจหาสารปนเปื้อนที่มาจากอาหารเลี้ยงเซลล์

การทดสอบความคงตัวด้านพันธุกรรมทำได้ยากกว่าใน E.coli แต่จะมีวิธีการอื่นที่ใช้แทนได้คือ peptide mapping ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มี resolution และ sensitivity ที่ดีเพียงพอในการตรวจสอบการ

ผ่าเหล่าได้ นอกจากนี้ การตรวจสอบว่า ปราศจาก adventitious organisms ในเซลล์เพาะเลี้ยงก็เป็นสิ่งสำคัญโดยจะต้องแสดงว่า ไม่มีการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา ผู้ผลิตยังต้องแสดงให้เห็นว่าไม่มี mycoplasmas และ adventitious viruses ด้วย นอกจากนี้ degree ของการเติมหมู่น้ำตาลอาจส่งผลกระทบต่อค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของโปรตีนในสิ่งมีชีวิต รวมทั้งความแรง (potency) และความเป็นแอนติเจน (antigenicity) ถึงแม้ว่าการตรวจสอบการเติมหมู่น้ำตาลของผลิตภัณฑ์จะทำได้ยาก แต่การตรวจสอบและควบคุมสภาวะการเลี้ยงเซลล์ก็จะเป็นตัวบ่งชี้ให้แน่ใจในกระบวนการผลิตที่สม่ำเสมอ

ขั้นตอนการรวบรวมโปรตีน และการทำให้บริสุทธิ์

การเก็บเกี่ยวโปรตีน ไม่ว่าจากกระบวนการหมัก (fermentation) โดยแบคทีเรียหรือยีสต์หรือจากเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ก็ต้องอาศัยเทคนิคการแยกสกัดให้บริสุทธิ์ต่างๆ เช่น chromatofocusing, reversed-phase chromatography, hydrophobic interaction chromatography, charge-transfer chromatography, size-exclusion chromatography (molecular sizing), ion-exchange chromatography, affinity chromatography เป็นต้น ทั้งนี้ การเลือกวิธีในการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์จะขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเทคนิคการแยกเหล่านี้เพื่อแยกโปรตีนที่ต้องการออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมักจะมีสารปนเปื้อนที่ต่างกันไป จึงต้องมีการวางแผนกระบวนการผลิตอย่างเป็นขั้นตอน

ข้อได้เปรียบของการผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงและยีสต์ที่เหนือกว่าจากแบคทีเรีย คือ โปรตีนดังกล่าวมักจะถูกขับออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยง ซึ่งอาศัยเพียงกระบวนการการแยกเซลล์ออก ซึ่งทำได้ง่ายด้วยการใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง ส่วยผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก *E. coli* นั้นมักจะอยู่ภายในเซลล์แบคทีเรียต้องอาศัยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกออกและต้องใช้กระบวนการทำให้บริสุทธิ์อย่างรวดเร็ว เนื่องจากมี protease มากและ protease ปนเปื้อนมาเหล่านี้ มักจะเป็นสารปนเปื้อนที่สำคัญและส่งผลต่อกระบวนการการผลิตเนื่องจากถูกแยกออกได้ลำบากและทำให้กระบวนการผลิตยุ่งยากซับซ้อน อีกทั้งยังส่งผลต่อความคงตัวของผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วย

การตรวจหาปริมาณโปรตีนเป้าหมาย

วิธีการวิเคราะห์ทั่วไป

ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพมักจะมีวิธีวิเคราะห์ที่ประยุกต์ใช้อยู่ แต่วิธีการวิเคราะห์ต่างๆ อาจทำได้แตกต่างกัน และอาจขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

Protein Content

การวิเคราะห์หา Protein Content ใช้ในการหาปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ วิธีการวิเคราะห์หา Protein Content ทำได้ยาก และต้องมีการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ วิธีการวิเคราะห์บางอย่างเช่น การวัดด้วย UV spectrophotometry และการวัดปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl เป็นการหาปริมาณโปรตีนสัมบูรณ์ที่ไม่ต้องอาศัย reference standards อย่างไรก็ตาม วิธีการวิเคราะห์หาโปรตีนอื่นๆ เช่น Lowry protein, biuret, และการวิเคราะห์กรดอะมิโน ต้องใช้สารมาตรฐานและให้ค่าที่แม่นยำ ทั้งนี้การวัด

protein content เป็นวิธีการวัดที่มีความสำคัญที่สุด เพราะการวิเคราะห์อื่น เช่น potency ก็ต้องอาศัยการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วย

ในการหา protein content ทำได้หลายวิธี ในหลายจุดของกระบวนการผลิตในแต่ละผลิตภัณฑ์ สำหรับโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง วิธีการที่ง่ายสุดในการวิเคราะห์ protein content อาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ของสารละลายโปรตีน โดยคำนวณจากค่า absorptivity ปละประยุกต์ใช้สำหรับโปรตีนที่มีองค์ประกอบเป็น aromatic amino acid ได้แก่ tyrosine, tryptophan และ phenylalanine แต่สารช่วยในตำรับบางชนิด อาจดูดกลืนแสงยูวีในช่วงเดียวกัน และอาจรบกวนการทดสอบ

การตรวจหาปริมาณโปรตีนเป้าหมายเป็นการวัด total protein content ในตัวอย่าง โดยจะไม่รวมถึงอนุพันธ์ที่ไม่ออกฤทธิ์ เช่น des-amino forms, oxidized forms หรือ polymeric forms วิธีที่ใช้ในการตรวจหา ได้แก่ วิธี high performance chromatography เพื่อหาปริมาณของโปรตีนเป้าหมายและอนุพันธ์อื่นๆ โดยตรวจวัดการดูดกลืนแสง UV และหาพื้นที่ใต้พีค ปัจจุบัน มักจะใช้วิธีดังกล่าวทดแทนวิธีทาง bioassay เนื่องจากมีราคาถูกกว่า และมีความแม่นยำมากกว่า วิธีการวิเคราะห์เหล่านี้ได้แก่ amino acid analysis, Kjeldahl analysis, Kjeldahl analysis ultraviolet spectrometry และ high-performance chromatography

Total Protein

ในการตรวจสอบหา total protein นั้น ทำได้ยากนัก โดยมีวิธีหลากหลายที่มีความไวเพียงพอในการตรวจหาปริมาณ ดังนั้นในการเลือกวิธีวิเคราะห์ส่วนใหญ่จะเลือกตามความสะดวกการวิเคราะห์ชนิดของตัวอย่าง ปริมาณที่ต้องใช้ ความบริสุทธิ์ สารที่อาจรบกวนวิธีวิเคราะห์ ความไว และระยะเวลาที่ต้องใช้วิเคราะห์ วิธีที่นิยมใช้ มีตั้งแต่ UV spectrophotometry, Kjeldahl assay,bicinchoinic acid (BCA) assay, biuret assay, Bradford assay, Lowry assay

ในการหาปริมาณ มักจะใช้การวิเคราะห์จากโปรตีนทั้งหมด (total protein) ที่พบในตัวอย่างที่มีความบริสุทธิ์ วิธีวิเคราะห์ในเชิงปริมาณที่ใช้กันอยู่ได้แก่ amino acid analysis, Kjeldahl หรือ UV absorbance ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปไม่บริสุทธิ์ อาจใช้วิธีการทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น ELISA ในการประเมินหา ปริมาณของตัวยาออกฤทธิ์

Immunoassays

Immunoassays ใช้สำหรับตรวจสอบตัวยาสำคัญเพื่อยืนยัน และตรวจหาปริมาณโปรตีนที่สนใจหรือตรวจหาสารปนเปื้อนเช่น host cell protein ที่ทราบชนิด ปริมาณที่ปนเปื้อน เนื่องมาจากกระบวนการผลิตมีในปริมาณน้อย ดังนั้นวิธีการทาง immunoassay จึงต้องมีความไว และความจำเพาะเพียงพอที่จะตรวจวัดสารปนเปื้อนเหล่านี้ โดยอาจใช้ในการตรวจวัดโปรตีนที่ปนเปื้อนมากจาก *E. coli* หรือ CHO protein นอกจากนี้ immunoassays ยังใช้ในการตรวจหา potency ของ monoclonal antibodies โดยใช้แอนติเจนที่เหมาะสม

วิธีการทาง immunoassays เป็นการวิเคราะห์ที่อาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งวิธีการที่นิยมใช้ ได้แก่ radioimmunoassay (RIA) และ enzyme-linked immunsorbent assays (ELISAs) แต่ในปัจจุบันนิยมใช้ ELISA ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการตรวจ impurity ที่ใช้กันมากได้แก่ sandwich ELISA ซึ่งต้องอาศัยแอนติบอดีสองชนิดในการสอบ

ELISA (Enzyme Immunsorbent Assays) เป็นเทคนิคการิเคราะห์ทางด้านชีวเคมีที่อาศัยหลักการของอิมมิวโนวิทยา เพื่อตรวจสอบว่า มีแอนติเจนหรือแอนติบอดีอยู่ในตัวอย่าง มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในทางการแพทย์ตรวจเพื่อวินิจฉัยโรค ในปัจจุบันนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพในอุตสาหกรรม ในการตรวจวิเคราะห์จำเป็นต้องมีแอนติบอดีอย่างน้อยหนึ่งชนิดที่จำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนที่เราต้องการตรวจสอบ โดยทั่วไปแล้ว แอนติบอดีที่ใช้มักจะมีการติดฉลากด้วยเอนไซม์ สารที่จะต้องการตรวจวิเคราะห์จะถูกทำให้ติดอยู่บนผิวของหลุมทดสอบของ microtitration plate และเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากลงไปเพื่อจับกับสารนั้น แล้วจึงล้างแอนติบอดีส่วนเกินออก การแปลผลทำได้โดยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของสารตั้งต้นที่เติมลงไปภายหลัง ซึ่งปริมาณสีที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กับปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ยังหลงเหลืออยู่ในหลุมทดสอบ เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีความไวสูง นอกจากนี้ ยังใช้ประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของชีวเภสัชภัณฑ์ต่างๆ ได้โดยไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง

วิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Electrophoresis

Electrophoresis Assays เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่ง่าย และมีประสิทธิภาพ ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และ homogeneity ของโปรตีน และเป็นวิธีการตรวจสอบความคงตัวของโปรตีน เนื่องจากวิธีดังกล่าว ตรวจสอบความคงตัวของโปรตีนทางด้านโมเลกุลและองค์ประกอบทางเคมี อันส่งผลทำให้เกิดกระบวนการ denaturation, aggregation, oxidation, deamidation วิธีการทำ electrophoresis มีประโยชน์เนื่องจากทำได้ง่าย และใช้ตัวอย่างในปริมาณน้อยเพียงระดับไมโครกรัม มีสองวิธีที่นิยมมากในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเทคโนโลยีชีวภาพ คือ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ isoelectric focusing (IEF)

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) เป็นเทคนิคในการแยกสารโดยอาศัยกระแสไฟฟ้าทำให้สารที่จะแยกเคลื่อนที่ในตัวกลางที่มีชื่อว่า polyacrylamide gel โดยทั่วไปมักจะใช้แยกโปรตีนดีเอนเอหรืออาร์เอนเอตามขนาดของโมเลกุล ดังนั้นจึงใช้สำหรับตรวจสอบความบริสุทธิ์ น้ำหนักโมเลกุล และเอกลักษณ์ของโปรตีนได้ ในการแยกโปรตีนมักจะต้องทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพโดยใส่ sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งทำให้รูปร่างของโปรตีนเหมือนกัน คือเป็นสายโซ่ ทำให้แยกความแตกต่างของโปรตีนต่างชนิดกันได้จากแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นบน polyacrylamide gel จึงเรียกว่า Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งใช้แยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างกันของน้ำหนักโมเลกุลในสภาวะที่มี anionic detergent คือ SDS ซึ่งจะให้ประจุลแก่โปรตีน โปรตีนตัวอย่างจะถูก denature เพื่อทำลายพันธะภายในโมเลกุลชนิดที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ จากนั้นเมื่อให้กระแสไฟฟ้าเพื่อแยกโปรตีนผ่านตัวกลางคือ polyacrylamide โปรตีนจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางเป็นสัดส่วนผกผันกับมวลโมเลกุล ดังนั้น หากตัวอย่างมีการเสื่อมสภาพจะทำให้สายโปรตีนขาดออกและแสดงให้เห็นว่า มีโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กกว่าอยู่ในตัวกลาง ขณะที่หากเกิด aggregation ก็จะทำให้มีขนาดใหญ่กว่าตัวอย่าง (แต่ต้องทำในสภาวะ non-denature) ใช้ในการตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในสภาพที่ถูก denature ด้วยสารลดแรงตึงผิว คือ sodium dodecyl sulfate (SDS) ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ และความบริสุทธิ์แต่ไม่ใช่ในการหาปริมาณ ทั้งนี้อาจใช้ร่วมกับ immunoblotting เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของโปรตีน

Isoelectric Focusing (IEF) เป็นเทคนิคทาง electrophoresis ที่ใช้ในการแยกสารตามค่า isoelectric point (pl) ใช้เพื่อวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของตัวอย่าง และหาอนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของโปรตีนที่ทำให้มีค่า pl ที่เปลี่ยนไป เช่น phosphorylated forms หรือ glycosylated forms ประจุที่อยู่บนโมเลกุลของโปรตีนเกิดจากหมู่ฟังก์ชั่นที่เป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน ค่า pH ที่ทำให้ประจุสุทธิของโปรตีนเป็นศูนย์ จะเรียกว่า Isoelectric pH (pl) โปรตีนเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่สามารถเกิด pH gradient และจะหยุดเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในบริเวณที่เท่ากับ isoelectric pH เนื่องจากประจุสุทธิเป็นศูนย์ วิธีนี้ใช้สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีนและยืนยันว่า โปรตีนมี homogeneity โดยพิจารณาจากรูปแบบของแถบโปรตีนที่ปรากฏว่ามีค่า pl ที่ถูกต้อง นอกจากนี้ยังใช้ตรวจสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ชีวภาพ การเกิด protein deamidation ในผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บไว้ช่วงหนึ่งจะทำให้มีค่า pl ลดลง นอกจากนี้ IEF ยังสามารถใช้ตรวจสอบสภาวะการเกิด glycosylation ของไกลโคโปรตีนซึ่งพบได้หลายแถบ เนื่องมาจากมีองค์ประกอบชนิด sialic acid การแปลผลจาก IEF gel จะมีความซับซ้อนและยุ่งยากกว่า SDS-PAGE มักจะไม่ค่อยใช้ในการหาปริมาณ แต่ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของโปรตีน

2D-electrophoresis เป็นการประยุกต์นำเอาเทคนิคการแยกสองวิธีคือ isoelectric focusing และ SDS-PAGE เข้าด้วยกัน เพื่อใช้ในการหาลายพิมพ์นิ้วมือของตัวอย่าง โดยทำการแยกตาม ค่า pl ด้วย isoelectric focusing ก่อน จากนั้นจึงแยกตามน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS- PAGE ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ และความบริสุทธิ์ของโปรตีน รวมทั้งใช้แยกอนุพันธ์ต่างๆ แต่ไม่ใช้ในการหาปริมาณ

Capillary Electrophoresis (CE) หรือ Capillary Zone Electrophoresis (CZE) เป็นเทคนิคในการแยกสารที่มีประจุโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของประจุภายใต้สนามไฟฟ้าในตัวกลางที่นำไฟฟ้าได้ ซึ่งบรรจุอยู่ใน capillary ขนาดเล็ก ภายในบรรจุตัวกลางที่เหมาะสม เช่น polyacrylamide, agarose หรือ ampholyte (สำหรับแยกตาม isoelectric points) มีสารละลายอิเลคโตรไลท์ที่เหมาะสม การแยกเกิดจากแรงทางไฟฟ้าและ electro-osmotic flow สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเทคนิค electrophoresis ปกติ ทำให้แยกได้รวดเร็วและมีความแม่นยำ ใช้ประมาณตัวอย่างน้อย (1 ถึง 10 pl) สามารถนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนเพื่อหาขนาดโมเลกุลและตรวจสอบความบริสุทธิ์และเอกลักษณ์ของโปรตีนได้

วิธีวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟี

High-performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลที่อาจไม่สามารถแยกได้ด้วย electrophoresis เป็นเทคนิคมีความสามารถในการแยกได้ดี มีความเที่ยงตรง ใช้สำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ หาความบริสุทธิ์ และวิเคราะห์ปริมาณ ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับหลักการที่ใช้ ได้แก่ high-performance ion-exchange chromatography (HPIEC) ใช้แยกตามชนิดประจุ, reversed-phase high- performance liquid chromatography (RP-HPLC) ใช้แยกตาม hydrophobicity และ high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) ใช้แยกตามน้ำหนักโมเลกุล

โครมาโตกราฟีจึงเป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมานานในการทำให้สารอินทรีย์ขนาดเล็กและโปรตีนบริสุทธิ์และใช้ในการตรวจสอบความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ หรือสารเติมแต่งอื่นในเภสัชภัณฑ์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการหาความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์จำพวก recombinant ได้เป็นอย่างดี แต่การทำโครมาโตกราฟีของโปรตีนมีความยากลำบาก เนื่องจากโปรตีนมีขนาด รูปร่าง ประจุ และ

hydrophobicity ต่างๆ เทคนิคโครมาโตกราฟีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบ recombinant protein ได้แก่ RP - HPLC, HPIEC, HPSEC และ HIC ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ใช้ในการแยก และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน และตรวจระดับของ impurtities และ degradation product

High-performance lon-exchange Chromatography (HPIEC) เป็นวิธีที่สำคัญในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยการแยกโมเลกุลโดยอาศัยความแตกต่างกันของประจุสุทธิบนโมเลกุล และยังมีประโยชน์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ และปริมาณของโปรตีน และใช้สำหรับหา impurities ได้แก่ oxidized (มักเกิดขึ้นกับหมู่ methionine) และ deamidation (มักเกิดขึ้นกับหมู่ glutamine และ asparagines) หรือในรูปโปรตีนที่ถูกตัดให้สั้นลง

High-performance Size-exclusion Chromatography (HPSEC) เป็นเทคนิคในการแยกสารโดยอาศัยความแตกต่างกันของขนาดโมเลกุล เทคนิคนี้ใช้ในการตรวจสอบ aggregation หรือ fragmentation ของโปรตีนในตำรับ หรือตรวจหาสิ่งปนเปื้อนจากกระบวนการหมัก

Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) ใช้แยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของ hydrophobicity ใช้ในการวิเคราะห์ ทำให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบคุณลักษณะของ hydrophobic proteins

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

สืบศักดิ์ สนธิรัตน (1996) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ในการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปมกับ enzyme activity ของเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* 5 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย 100 % 4 สายพันธุ์ คือ AK 3-09 AK6-03 NK 1-14 NK 1 - 15 สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 66 % คือ NK 1 -12 เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Penicilium turbatum* สายพันธุ์ที่ไม่ทำลายไข่เลย พบว่า *P. lilacinus* ทุกสายพันธุ์สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ แต่ *Penicilium turbatum* ไม่สร้างอนไซม์นี้ เชื้อราสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 100 % สร้าง chitobiotic ได้น้อยกว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 66.6 % 3.3 - 4.0 แต่สร้าง protease และ glucoamylase ได้มากกว่าสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 66 % 1.2 - 4.2 และ 20 - 120 เท่า ตามลำดับ

มัทนา วานิชย์ และคณะ (2007) ได้ศึกษาศักยภาพของเชื้อรา 3 กลุ่ม คือ *Verticilium* spp., *Pleurotus* spp. (*P. abalones*, *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju*) และ *Omphalotus* sp. ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยนำ culture filtrate ที่ความเข้มข้น 50 % และ 80% ของเชื้อรา 3 กลุ่ม ที่เลี้ยงบนอาหารเหลวต่างชนิดกัน ทดสอบการตายของตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) และการฟักออกของกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม พบว่า culture filtrate ความเข้มข้นความ 50 % และ 80% ของเชื้อราในกลุ่ม *Omphalotus* ทุกไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) และ yeast malt glucose (YMG) มี%การตายของ J2 มากที่สุด (100%) ส่วนเชื้อราในกลุ่ม *Verticilium* spp.พบว่า filtrate ความเข้มข้น 50 % และ 80% ของไอโซเลต 11, 60 ในอาหาร PDB และมีเปอร์เซ็นต์การตายของ J2 ไอโซเลต 11, 34 ในอาหาร Czapek dox broth (Cz) มีเปอร์เซ็นต์การตายของ J2 ปรากฏผลชัดเจนที่ เวลา 72 ชั่วโมง (17-47%) ส่วนไอโซเลต 12 ในอาหาร Cz ปรากฏผลชัดเจน ที่เวลา 96 ชั่วโมง (17 %, 37 % ตามลำดับ) และเฉพาะ filtrate 80 % ของไอโซเลต 21 ในอาหาร PDB ปรากฏผลชัดเจนที่เวลา 72 ชั่วโมง (37%) ส่วนเชื้อราในกลุ่ม *Pleurotus* spp. พบว่า filtrate ทั้ง 50 %

และ 80 % ของเชื้อ P. *ostreatus* ทำให้ J2 ตายมาก ปรากฏผลชัดเจน ที่ 48 ชั่วโมง (27 %, 77 %) ส่วน *P. abalones* และ *P. sajor-caju* ปรากฏผลการตายของ J2 ที่เวลา 72 ชั่วโมง (17 - 40%) ส่วนการทดสอบ culture filtrate กับการออกของกลุ่มไข่ พบว่า culture filtrate 50 % ของเชื้อราทั้ง 3 กลุ่ม ทำให้การฟักของกลุ่มไข่ลดลงมากที่สุดที่ 96 ชั่วโมง (ลดลง 59-90%) โดยที่ culture filtrate ของเชื้อรา *Verticillium* spp.ไอโซเลต 21 ในอาหาร PDB และ Cz และไอโซเลต 60 ในอาหาร Cz ของเชื้อราในกลุ่ม *Omphalotus* sp. ไอโซเลต PW1 ในอาหาร PDB และ YMG และของเชื้อรา *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* ในอาหาร PDB มีเปอร์เซ็นต์การฟักของกลุ่มไข่ลดลงมากที่สุด

พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ และคณะ (2544) ได้ศึกษาการควบคุมทางชีววิธีในไส้เดือนฝอย *M. incognita* ของมะเขือเทศโดยราอาบัสคูลาร์ไมคอร์ไรซาและแบคทีเรีย โดยเก็บตัวอย่างดินจากแปลงมะเขือเทศ 5 แหล่ง คือ จังหวัดนครปฐมนครราชสีมา ชลบุรี เพชรบุรี และหนองคาย นำมาแยกสปอร์ราอาบัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา พบว่ามี 11 ชนิดที่สามารถคือ *Acaulospora scrobiculata* 1, *Acaulospora scrobiculata 2, Glomus* sp.1, *Glomus* sp.2, *Glomus* sp.3, *Glomus fasciculatum, Glomus geosporum, Glomus leptotichum, Glomus occultum, Scutellospora erythropa* และ unknown นอกจากนั้นยังทำการแยกแบคทีเรียจากผิวของสปอร์ของราไมคอร์ไรซา ได้ทั้งหมด 29 ไอโซเลต จากดินบริเวณรอบๆ รากมะเขือเทศและจากรากมะเขือเทศได้ 35 ไอโซเลต ผลของแบคทีเรียบริเวณดินรอบๆราก Plant Health Promoting Rhizobacteria (PHPR) ต่อการเจริญและควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในต้นมะเขือเทศ พบว่าแบคทีเรียในดินบริเวณรอบๆ ราก ไอโซเลตที่ 9 สามารถลดการเกิดปมจากไส้เดือนฝอยได้มากที่สุด โดยมีดัชนีการเข้าทำลาย 25 % มีความสูง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นมากกว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ และต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ผลของแบคทีเรียรอบผิวสปอร์ของของราไมคอร์ไรซา Mycorrhiza Helper Bacteria (MHB) ต่อมะเขือเทศพบว่า *Acinetobacter baumannii* สามารถลดการเกิดปมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีดัชนีการเข้าทำลาย 40 % มีความสูง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นมากกว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ การศึกษาความสัมพันธ์ร่วมระหว่างรา ไมคอร์ไรซา PHPR และ MHB ต่อการเจริญและการควบคุมไส้เดือนฝอยของมะเขือเทศ พบว่าการปลูกเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงเชื้อเดียว ทำให้มะเขือเทศมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าที่ไม่ปลูกเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ การปลูกเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดร่วมกัน มีแนวโน้มที่ทำให้การเจริญของต้นมะเขือเทศดีขึ้น และลดการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมมากกว่า control ส่วนการปลุกเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิดร่วมกัน ไม่มีผลต่อการเจริญของมะเขือเทศแต่ลดการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม

สืบศักดิ์ สนธิรัตน (2549) ได้ศึกษาผลของสารสกัดและ root exudates จากพืชบางชนิด ได้แก่ สะเดา ดาวเรือง สาบเสือ ละหุ่ง พิกุล ยี่โถ ประทัดจีน เลี่ยน และยูคาลิปตัส ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 1:1 มีความเป็นพิษสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 1:10 การใช้เวลา 24 ชั่วโมงทำ immersion test มีความเป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยสูงกว่าเวลา 12 ชั่วโมง การทดสอบประสิทธิภาพ root exudate ของดาวเรืองและสาบเสือ ความเข้มข้น 100 % มีความเป็นพิษค่อนข้างสูง มีระดับการเกิดปมเพียง 0.4 แต่ความเข้มข้น 50 % และ 10 % ไม่ได้ผล การทดสอบสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์โดยวิธีราดดิน ที่ความเข้มข้น 1 : 1 มีความเป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยสูงมีระดับการเกิดปมเพียง 0.2 - 0.4 ความเข้มข้นต่ำกว่านี้ไม่ได้ผล

Lian และคณะ (2007) ได้ศึกษาบทบาทและ mechanism ของเอนไซม์ proteases จาก *Bacillus* sp. ซึ่งเป็น rhizobacteria ในการควบคุม nematode โดยแยก *Bacillus* sp. strain RH219 จากดิน พบว่าเอนไซม์ proteases Apr 219 ที่หลั่งออกมานอกเซลล์มีคุณสมบัติในการทำลาย cuticle ของ nematode โดย (protease activity units: 930 U ml^{-1} ที่ 37 °C, pH 7.0) ฆ่าไส้เดือนฝอยได้ 73 % ภายใน 24 ชั่วโมง และหลังจากนั้น 48 ชั่วโมง ฆ่าไส้เดือนฝอยได้ 97 % นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ proteases นี้มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ proteases ที่สร้างจาก *Brevibacillus laterosporus* strain G4 และ *Bacillus nematocida*

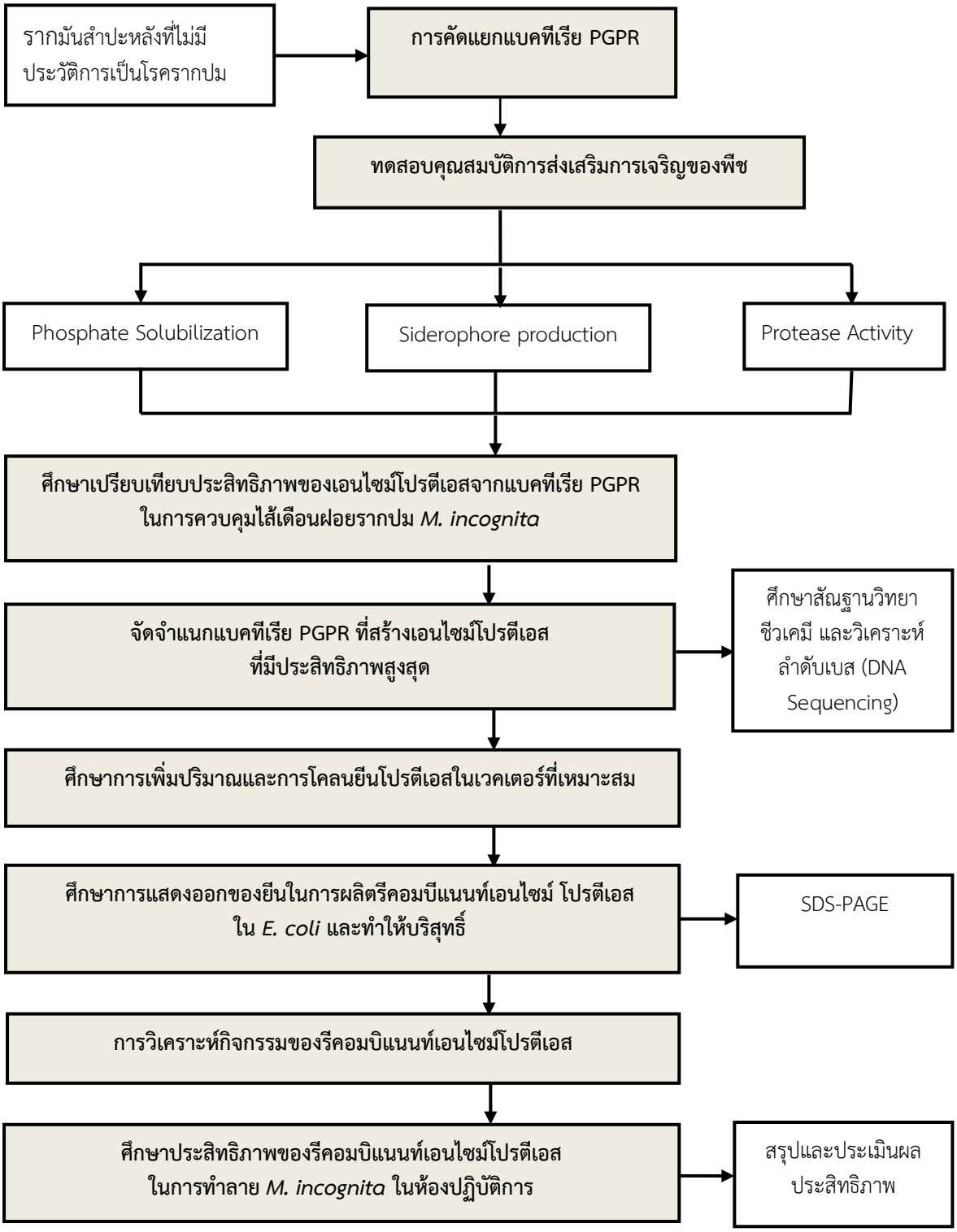
Siddiqui และคณะ (2005) ได้ศึกษาเอนไซม์ proteases หลั่งออกมานอกเซลล์ของ *Pseudomonas fluorescens* CHA0 ที่มิวเทชันที่ GacA-controlled aprA gene (encoding the major extra-cellular protease) หรือ gacA regulatory gene พบว่ามีคุณสมบัติในการควบคุมทางชีววิธีต่อ root-knot nematode *M. incognita* ที่เข้าทำลายต้นถั่วเหลือง โดย Culture supernatants ของ strain CHA0 สามารถทำลายไข่และตัวอ่อนระยะ juveniles ของ *M. incognita* ดังนั้น AprA protease จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธี

สมมติฐานการวิจัย

รีคอมบีแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตขึ้นมีประสิทธิภาพในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* อีกทั้งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและสะดวกแก่การนำไปใช้ในพื้นที่เกษตรกรรม

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชและการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสเพื่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัยดังนี้



ภาพที่ 2.11 กรอบแนวคิดการวิจัย