บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ผักกาดหอมห่อ

ในประเทศไทยมีการปลูกผักกาดหอมมานานแล้ว ทางภาคเหนือจะเรียกผักกาดหอมว่าผักกาดยี ส่วนทางภาคกลางจะเรียกว่าผักสลัด (สุทธิชัย, 2543) สาขาพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (2550) รายงานผ่านทางเว็บไซต์ว่า ผักสลัดหรืออีกชื่อคือผักกาดหอม (lettuce) จัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Asteraceae (Compositae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lactuca sativa* L. มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชียและยุโรป เป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินทุกชนิด แต่ปลูกได้ดีในดินร่วนปนทรายที่มีการระบายน้ำและระบายอากาศดี ความเป็นกรดด่างในดินที่เหมาะสมคือ 6.0-6.8 พื้นที่ปลูกควรได้รับแสงเต็มที่ตลอดวัน ผักกาดหอมใบเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศเย็นอุณหภูมิไม่สูงมากอยู่ที่ 21-26 องศาเซลเซียส ส่วนผักกาดหอมห่ออุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่างช่วง 15-21 องศาเซลเซียส หากปลูกในสภาพที่อุณหภูมิสูงเกินจะทำให้ผักกาดหอมมีรสขมและแทงช่อดอกเร็ว

เมฆ (2544) รายงานว่าปัจจุบันผักกาดหอมสามารถแบ่งออกเป็น 5 สายพันธุ์ใหญ่ๆ ตามลักษณะต้น ได้แก่

1). สลัดปลีหรือผักกาดหอมห่อ (crisp-head)

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *L. sativa* var *capitata* L. ใบมีลักษณะบาง ขนาดใหญ่ เปราะหักง่าย ห่อหัวแน่นคล้ายกะหล่ำปลี ใบจะกรอบกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ใบนอกมีสีเขียวเข้ม ใบในมีสีขาวปนเหลืองทนทานต่อการขนส่ง ผักกาดหอมชนิดนี้ ได้แก่ พันธุ์เกรทเลค (Great Lake) นิวยอร์ค (New York) อิมพีเรียล (Imperial) โปรกรีสส์ (Progress) เป็นต้น

2). สลัดกึ่งห่อหรือหัวห่อไม่แน่น (butterhead หรือ bibb)

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *L. sativa* var *capitata* L. ใบจะห่อหลวมๆ ใบอ่อนนุ่มไม่กรอบ ผิวใบเป็นมันคล้ายเคลือบด้วยเนยหรือน้ำมันที่ผิวใบ ปลูกได้ดีในสภาพอากาศหนาวเย็น ไม่ทนต่ออากาศร้อน ให้รสชาติดี แต่ไม่ทนต่อการขนส่ง พันธุ์ที่นิยมได้แก่ พันธุ์บิ๊กบอสตัน (Big Boston) ไวท์บอสตัน (White Boston) เป็นต้น

3). สลัดต้น (stem lettuce หรือ celtuce)

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *L. sativa* var *asparagina* ลักษณะลำต้นอวบสูง นิยมปลูกเพื่อนำลำต้นมาบริโภคเท่านั้น ใบเล็กหนาสีเข้ม ใบจะเกิดขึ้นต่อๆ กันไปถึงช่อดอก ไม่นิยมปลูกหรือบริโภคในประเทศไทยมากนัก นิยมกันมากในทวีปยุโรป แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ พันธุ์ที่มีหัวขนาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใหญ่ ได้แก่ พันธุ์ปารีสไวท์ (Paris White) ไวท์ฮาท (White Heart) และพันธุ์ที่มีหัวขนาดเล็ก ได้แก่ พันธุ์ลิทเติ้ลเจม (Little Gem)

4). ผักกาดหอมใบ (leaf lettuce)

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *L. sativa* var *crispa* L. ลักษณะใบจะไม่ห่อเป็นหัว มีจำนวนใบมาก รูปร่างและสีต่างกันขึ้นกับพันธุ์ที่ปลูก สามารถทนอากาศร้อนในประเทศไทยได้ดีว่าสายพันธุ์อื่น และนิยมบริโภคมากที่สุด แบ่งย่อยออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีสีเขียวทั้งต้นได้แก่ พันธุ์ Grand Rapids Simpson's Curled Boston Curled และ Slobott เป็นต้น และชนิดที่มีสีน้ำตาลทั้งต้น ได้แก่ พันธุ์ Prize Head

5). ผักกาดหวาน (cos หรือ romaine)

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *L. sativa* var *longifolia* Bailey ใบมีลักษณะตั้งตรงยาวและห่อ ใบมีสีเขียวเข้มเนื้อหนา เส้นใบนูนเด่นออกจากด้านหลังใบ ปลายใบโค้งเข้าคล้ายหัว

ผักกาดหอมห่อ (head lettuce) เป็นผักที่มีสีเขียวค่อนข้างอ่อน ใบห่อเป็นหัว เนื้อใบหนา กรอบเป็นแผ่นคลื่น ผักในตระกูลนี้มีปริมาณวิตามินซีและไนโตรแคโรทีนพอประมาณ แต่มีโฟเลตค่อนข้างสูง ช่วยป้องกันโรคโลหิตจาง ผักกาดหอมห่อนิยมบริโภคสดมีความกรอบและหวาน ใช้เป็นเครื่องเคียงของเนื้อย่างต่างๆ ลาบ น้ำพริกหรือผัดไทย กรมส่งเสริมเกษตร (2550) รายงานผ่านทางเว็บไซต์ในไตรมาสที่ 3 ปี 2549 ว่า ประเทศไทยมีพื้นที่การปลูกผักกาดหอมรวม 1,749 ไร่

2. ไส้เดือนฝอย

ไส้เดือนฝอยจัดอยู่ใน Phylum Nemata แบ่งออกเป็น 2 class คือ Adenophorea และ Secernentea โดยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชอยู่ในทั้ง 2 class คือ class Adenophorea ของ order Dorylaimida และ class Secernentea ของ order Tylenchida ซึ่งใน order นี้ประกอบด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ ของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชทั้งหมด ในปัจจุบันมีการจำแนกไส้เดือนฝอยไว้ประมาณ 15,000 ชนิด (species) จากที่คาดว่าจริงๆ มีจำนวนทั้งหมดมากกว่า 500,000 ชนิด (นุชนารถ, 2546)

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีผลต่อพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม ในทางตรงทำให้พืชแคระแกรน ไม่เจริญเติบโต ซึ่งเป็นผลมาจากรากบวมพองหรือรากเป็นแผล ความเสียหายทางอ้อมคือ ทำให้ผลผลิตลดลง ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบบ่อยและเกิดปัญหากับพืชหลายชนิดคือ ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) การควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีหลายวิธีได้แก่ การปลูกพืชหมุนเวียน การเขตกรรม การไขน้ำท่วมแปลง การไถดินตากแดด การใช้พันธุ์ต้านทาน การปลูกพืชสลับ เช่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดาวเรือง การปลูกพืชดักไส้เดือนฝอย เช่น พืชสกุล *Hespuris* ถั่ว Crotalaria หรือการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุม ตัวอย่างเช่นตัวห้ำ Tardigrade Turbellarians Collembola Enchytraeid Rickettsia ไร โปรโตซัว ไวรัส และแบคทีเรีย (สืบศักดิ์, 2541)

สืบศักดิ์ (2538) รายงานเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ว่าสามารถทำลายพืชต่าง ๆ มากกว่า 60 ชนิด การวัดขนาดตัวเต็มวัยเพศเมียมีขนาดความยาว 500-723 μ ความกว้าง 331-520 μ ความยาว stylet 13-16 μ ไส้เดือนฝอยชนิดนี้มีลำตัวกลม esophagus มีการพัฒนาโดยมีลิ้นที่ขยายตัวได้ใน metacorpus ส่วน isthmus สั้นซ้อนทับ basal bulb ลักษณะ perineal pattern เป็นเส้นขยุกขยิก lateral field เป็นเส้นสานกันคล้ายส้อม dorsal arch สูง การศึกษาตัวอย่างดินและพืชของ International Meloidogyne Project พบว่า 72 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั่วโลกเป็นไส้เดือนฝอย *M. incognita* ใน race 1 และอีก 15 เปอร์เซ็นต์ เป็น race 2 ไส้เดือนฝอยชนิดนี้อาศัยอยู่ในภูมิประเทศตั้งแต่เส้นรุ้งที่ 40 องศาเหนือถึง 30 องศาใต้ มีพืชอาศัยกว้างสามารถมีชีวิตอยู่ในดินที่มีอุณหภูมิเฉลี่ย 18-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์อยู่ระหว่าง 24-27 องศาเซลเซียส เพศเมียมีการขยายพันธุ์แบบ mitotic parthenogenesis ประชากรมีจำนวนโครโมโซม 2 แบบ คือ 2n = 32-36 (diploid) และ 2n = 40-46 (triploid) โดยกลุ่มประชากร triploid พบกระจายอยู่ทั่วไป วงจรชีวิตเริ่มจากไข่ผ่านสู่ spermatheca พบการแบ่งโครโมโซมในระยะ prophase 1 จนเข้าสู่ระยะ metaphase เมื่อไข่ตกถึงมดลูกสามารถนับจำนวนโครโมโซมได้ จากนั้นพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 อยู่ในไข่ ตัวอ่อนระยะที่ 2 ฟักออกจากไข่และเข้าสู่พืชอาศัย เพศเมียเริ่มพองขึ้นเรื่อย ๆ จนเป็นถุงกลม (saccate) อยู่ภายในรากพืชอาศัย เมื่อโตเต็มที่จึงออกไข่ ส่วนเพศผู้เกิดขบวนการ metamorphosis รวมวงจรชีวิตประมาณ 3-5 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความชื้น ประเทศไทยไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้เป็นศัตรูพืชที่สำคัญที่สุดในบรรดาไส้เดือนฝอยศัตรูพืชทั้งหมด งานวิจัยความเสียหายของพืชที่เกิดจาก *M. incognita* ในผักกาดหอมห่อคือ ความสูงจะลดลงสูงสุด 32.33-39.9 % และน้ำหนักสดลดลง 43.2-47.9 %

นุชนารถ (2546) กล่าวว่าไส้เดือนฝอยรากปมโดยทั่วไปมีชีวิตที่คล้ายคลึงกันคือ เริ่มจากไข่ซึ่งต่อมาพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะที่หนึ่งภายในไข่ หลังจากนั้นตัวอ่อนระยะที่หนึ่งมีการลอกคราบกลายเป็นตัวอ่อนระยะที่สองอยู่ภายในไข่ เช่นเดียวกันเมื่อเป็นตัวอ่อนระยะที่สองได้สักระยะหนึ่งตัวอ่อนดังกล่าวจึงออกจากไข่ลงสู่ดินและเข้าทำลายรากพืช ดังนั้นตัวอ่อนระยะนี้จึงเรียกว่า ระยะทำลาย (infective stage) เมื่อตัวอ่อนระยะที่สองเข้าไปในรากพืชที่บริเวณใกล้ปลายรากแล้วตัวอ่อนดังกล่าวจะมีการเคลื่อนที่ผ่าน cortex เข้าไปสู่บริเวณท่อลำเลียง (vascular tissue) และทำการฝังส่วนหัวเข้าไปดูดกินน้ำเลี้ยงในบริเวณนั้น เมื่อตัวอ่อนเริ่มมีการดูดอาหาร ลำตัวจะอ้วนขึ้นพร้อม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทั้งมีการลอกคราบอีก 3 ครั้ง ภายในระยะเวลารวดเร็วคือ ประมาณ 3 ถึง 5 วัน กลายเป็นตัวอ่อนระยะที่สามและระยะที่สี่ซึ่งไม่ดูดอาหาร จนในที่สุดเป็นตัวเต็มวัยมีรูปร่างคล้ายลูกสาลี่ (pear-shaped) ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียมีการออกไข่ในถุงหุ้มที่เป็นสารเมือก (gelatinous matrix) โดยในถุงหุ้มดังกล่าวประกอบไปด้วยไข่จำนวน 100-1,000 ฟอง อย่างไรก็ตามจำนวนไข่ดังกล่าวขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมเป็นสำคัญ วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยเมื่อรวมเวลาจากไข่ถึงไข่ ประมาณ 25-30 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ดังนั้นโดยทั่วไปแล้วใน 1 ฤดูปลูกของพืช ไส้เดือนฝอยจึงสามารถครบวงจรชีวิตได้มากกว่า 1 วงจรชีวิต

North Carolina State University (2002) รายงานผ่านทางเว็บไซต์ถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของเซลล์พืชอาศัยหลังจากที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลาย รวมทั้งการพัฒนาของตัวไส้เดือนฝอยว่า หลังจากไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้ามาอยู่ในเซลล์พืชไส้เดือนฝอยจะหลั่งสารจาก esophagal gland รวมทั้งฮอร์โมนและเอนไซม์ เพื่อใช้ในการสร้างและรักษาที่อยู่อาศัย หลังจากนั้นตัวไส้เดือนฝอยจะมีการพัฒนารูปร่างในส่วน longitudinal muscles จากตัวอ่อนระยะที่ 2 เป็นระยะที่ 3 ระยะที่ 4 จนถึงระยะตัวเต็มวัยซึ่งเคลื่อนที่ไม่ได้ โดยมากเซลล์ลำเลียงที่ไม่ได้ทำหน้าที่เฉพาะมักจะกลายเป็นที่อยู่ของไส้เดือนฝอย ปกติคือ xylem parenchyma cells หลังจากนั้นเซลล์บริเวณนี้จะมีการเพิ่มขนาดถึง 100 % จากการเกิด hypertrophy และยังพบว่าภายในเซลล์ดังกล่าวจะมี mitochondria และ nuclei (40-100 ต่อเซลล์) ผนังเซลล์บริเวณนี้จะหนาขึ้นเพื่อให้ไส้เดือนฝอยสามารถดูดซับแร่ธาตุจากเซลล์ข้างเคียงในต้นพืชได้สะดวก

ไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode) สร้างความเสียหายให้กับพืชหลายชนิดในรัฐมิชิแกน ได้แก่ บีทรูท บร็อคโคลี่ กะหล่ำปลี แครอท กะหล่ำดอก เซเลอรี่ พืชตระกูลแตง มะเขือม่วง พืชตระกูลกระเทียม หอม ผักกาดหอม พาร์สนิพ พริกไทย มันฝรั่ง ฟักทอง มะเขือเทศ เป็นต้น ความผิดปกติที่พบจะอยู่ในรูปการเกิดปมที่ราก ต้นพืชแสดงอาการใบเหลือง เหี่ยว การเจริญเติบโตช้ากว่าปกติทั้งทางลำต้นและราก ผลผลิตของพืชลดลงและมีคุณภาพต่ำ (Bird, 2006) สำหรับในประเทศไทย ยุทธศักดิ์ (2542) รายงานว่าไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) จำนวน 15 กลุ่มไข่ (โดยเฉลี่ย 446 ฟอง ต่อกลุ่มไข่) เข้าทำลายผักกาดหอมใบ คะน้า ผักชี แตงกวาและกระเจี๊ยบเขียวอายุ 0 และ 30 วัน ทำให้เกิดความเสียหายดังนี้คือ ถ้าเข้าทำลายที่อายุ 0 วัน ความเสียหายที่เกิดกับผักกาดหอมในการทดลองฤดูฝนและฤดูหนาวพบว่า ความสูงลดลง 32.33 และ 39.90 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต้นสดลดลง 47.99 และ 43.21 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้งลดลง 51.35 และ 52.17 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักรากสดเพิ่มขึ้น 30.30 และ 28.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักรากแห้งเพิ่มขึ้น 12.50 และ 23.53 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเกิดปมที่รากเฉลี่ย 3.6 และ 3.5 ส่วนการเข้าทำลายที่อายุ 30 วันพบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผักกาดหอมมีความสูงลดลง 18.56 และ 13.39 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต้นสดลดลง 24.17 และ 19.83 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักรากแห้งเพิ่มขึ้น 31.25 และ 35.29 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเกิดปมที่รากเฉลี่ย 3 และ 2.9 ปม ตามลำดับ

3. เชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอย

3.1 การแบ่งกลุ่มเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอย

Nordbring-Hertz *et al.* (2006) กล่าวถึงเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยว่าเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถฆ่าและย่อยสลายไส้เดือนฝอยโดยการใช้โครงสร้างพิเศษที่เกิดจากเส้นใยเรียกว่า ห่วง (trap) หรือสปอร์จับไส้เดือนฝอยที่มีรูปร่างคล้ายเส้นด้ายหรือใช้ปลายของเส้นใยบุกรุกไข่และ cyst ไส้เดือนฝอย ก่อนที่จะเข้าทำลายผนังเซลล์และย่อยสลายตัวไส้เดือนฝอย รายละเอียดรูปแบบโครงสร้างของเชื้อราที่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยแสดงในตารางที่ 1 (Table 1)

Waller and Faedo (1996) จำแนกเชื้อราตามลักษณะทางสัณฐานและโครงสร้างพิเศษสำหรับดักจับไส้เดือนฝอยได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

1. Endoparasitic (endozoic) fungi เป็นเชื้อราที่เข้าทำลายไส้เดือนฝอยโดยการสร้างสปอร์เหนียว ซึ่งจะงอกและแทงผ่านเข้าไปหรือเกาะติดกับผิวด้านนอกของไส้เดือนฝอย

2. Egg-parasite fungi เชื้อรากลุ่มนี้มีความสามารถในการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยระยะไข่โดยเฉพาะไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematodes) และ cyst nematodes ตัวอย่างเชื้อราเช่น *Paecilomyces lilacinus*, *Acremonium strictum*

3. Predacious fungi เป็นเชื้อราที่สร้างโครงสร้างพิเศษบนเส้นใยในการดักจับไส้เดือนฝอย ได้แก่โครงสร้างปมเหนียว (adhesive knob) ตาข่ายเหนียว (adhesive network) และแบบห่วงรัด (constricting ring) ตัวอย่างเชื้อราที่สำคัญได้แก่ *Trichothecium* sp. *Dactylaria* spp. *Stylopage* sp. และ *Arthrobotrys* spp. (Webster, 1980)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Table 1 Typical infection structures of some nematophagous fungi

Infection structure	Species	Taxonomic classification
Adhesive nets	*Arthrobotrys oligospora*	Deuteromycetes
	A. conoides	
	A. musiformis	
	A. superba	
	Duddingtonia flagrans	
Adhesive branches	*Monacrosporium gephyropagum*	Deuteromycetes
Adhesive knobs	*M. ellipsosporum*	Deuteromycetes
	M. haptotylum	
Constricting rings	*A. dactyloides*	Deuteromycetes
	A. brochopaga	
Adhesive knobs and adhesive spores	*Nematoctonus concurrens*	Basidiomycetes
Adhesive spores	*N. leiosporus*	Basidiomycetes
	Drechmeria coniospora	Deuteromycetes
	Hirsutella rhossoliensis	
Ingested spores	*Harposporium anguillulae*	Deuteromycetes
Zoospores	*Catenaria anguillulae*	Chytridiomycetes
	Haptoglossa dickii	Oomycetes
Adhesive hyphae	*Stylopage hadra*	Zygomycetes
	Cystopage cladospora	
Toxic droplets	*Pleurotus ostreatus*	Basidiomycetes
Appressoria	*Pochonia chlamydosporia*	Deuteromycetes

แหล่งที่มา: Nordbring-Hertz *et al.* (2006)

เราสามารถพบเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยพวกนี้ได้ทั่วไป โดยเฉพาะดินที่มีอินทรียวัตถุสูง วิธีการแยกเชื้อรานี้แบบง่ายทำโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า soil sprinkling เริ่มจากการนำดิน 1 กรัมมาโรยบนบนอาหาร water agar (WA) จากนั้นใช้สารแขวนลอยไส้เดือนฝอยเป็นตัวล่อ โดยมากในเขตอบอุ่นจะพบเชื้อราสกุล *A. oligospora* มากที่สุด (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006) นอกจากวิธีการดังกล่าวแล้ว ภมรทิพย์ (2546) สามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยจากดินด้วยวิธี soil scattering method ซึ่งมีขั้นตอนการทำคล้ายกับวิธีข้างต้น แต่เปลี่ยนจากการโรยดินทั่วจานอาหารมาเป็นการโรยดินตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางแทน ผลปรากฏว่าพบเชื้อราสกุล *A. oligospora* และ *A. conoides*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 เชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอย (*Arthrobotyrs* spp.)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. คือโคโลนีมีลักษณะแผ่ขยายออกไปบนอาหาร เส้นใยบางและใสหรือมีสีเทาจนถึงสีชมพู conidiophore ลักษณะตั้งตรง ใส มีผนังกั้นและรูปร่างแบบ simple หรือแตกกิ่งก้าน (blanched) บริเวณส่วนปลายของ conidiophore จะพบกลุ่มของ conidia ที่มีสองเซลล์ ในบางสปีชีย์มีหนึ่งเซลล์หรือหลายเซลล์ conidia ใสอยู่บนกิ่งก้าน conidiophore ที่มีลักษณะคล้ายซี่ฟัน (denticle) บ่อยครั้งพบว่ามี conidial head เกิดขึ้นระหว่างเซลล์ (intercalary) โดย conidiophore ที่สร้างขึ้นมาใหม่ เชื้อราบางสปีชีย์จะสร้างกับดักในการจับไส้เดือนฝอยแบบตาข่ายเหนียว (adhesive network) อาทิเช่น *A. oligospora* *A. conoides* *A. musiformis* *A. arthrobotryoides* *A. entomophaga* *A. robusta* เป็นต้น (Jansson and Nordbring-Hertz, 1980) เชื้อราที่สร้างกับดักแบบ adhesive knob ตัวอย่างเช่นรา *A. haptolyla* *A. dasgupture* (Boag *et al*., 1988) ส่วนเชื้อราที่มีโครงสร้างกับดักแบบ constricting ring เช่น *A. dactyloides* (Balan and Nancy, 1972) หรือแบบ adhesive branced ได้แก่ *A. perpasta*

ในต่างประเทศมีการศึกษาเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. โดยเฉพาะสกุลที่พบได้ทั่วไปและมีศักยภาพในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอย เช่น *A. oligospora* และ *A. conoides* ผลการศึกษาด้านกายภาพ สัณฐานวิทยาและสภาพการอยู่รอดในสิ่งแวดล้อม พบว่าเมื่อนำรา *A. oligospora* มาเลี้ยงบนอาหาร oat meal agar (OA) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โคโลนีเชื้อราจะมีสีชมพูอ่อน conidiophore ตั้งตรง สูง 350-450 ไมโครเมตร conidia รูปไข่ปลายมน (obovoid) ขนาด 22-27 × 8-15 ไมโครเมตร โดยมีเซลล์ส่วนปลายกว้างที่สุด เมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นจะสร้าง chlamydospore รูปร่างกลม สีเหลือง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9-20 ไมโครเมตร เชื้อราชนิดนี้จับไส้เดือนฝอยโดยการสร้างเส้นใยลักษณะเป็น adhesive network ปกติพบในดินทั่วไปที่มี pH ประมาณ 5.5 และ conidia งอกได้ 100 % ในดิน แต่จะไม่สร้างห่วงดักจับไส้เดือนฝอย ถ้ามีการเติมปุ๋ยพืชสดหรือคาร์โบไฮเดรตจะกระตุ้นให้เชื้อราเกิดกิจกรรมการดักจับขึ้น สำหรับเชื้อรา *A. conoides* จะมีโคโลนีสีขาว conidiophore ตั้งตรง สูง 150-400 ไมโครเมตร conidia รูปร่างเหมือนผลสาลี่ (pyriform) บางครั้งคล้ายกระบองสั้นๆ (clavate) มีสองเซลล์ เซลล์บนยาวและกว้างกว่าเซลล์ล่าง conidia มีขนาด 18-36 × 8-15 ไมโครเมตร chlamydospore มีสีเหลือง ลักษณะกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 7-17 ไมโครเมตร เชื้อราสร้างเส้นใยหลายระนาบ สำหรับดักจับไส้เดือนฝอย (Domsch *et al*., 1980)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลไกในการสร้างห่วงและกระบวนการดักจับไส้เดือนฝอย

Nordbring-Hertz *et al.* (2006) รายงานว่าเชื้อราปฏิปักษ์สกุล *Arthrobotrys* spp. ส่วนใหญ่เป็นพวก saprophytic fungi มากกว่า endoparasites เชื้อราสกุลนี้หลายชนิดไม่สร้างห่วงเอง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะการปรากฏตัวของไส้เดือนฝอยซึ่งเป็นแหล่งอาหารของเชื้อราได้เป็นอย่างดี การสร้างห่วงของราชนิดนี้เกิดจาก peptides ขนาดเล็กร่วมกับกรดอะมิโนชนิดที่ไม่มีขั้วและสามารถสร้างสารระเหยหรืออาจเกิดจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนภายในเซลล์ร่วมกับไส้เดือนฝอยอยู่ในสภาวะที่มีสารอาหารน้อยชักนำให้เกิดการสร้างห่วงขึ้นมา ในบางครั้งอาจพบว่าเชื้อราอยู่ในระยะที่สืบพันธุ์ได้ (teleomorphs) ตัวอย่างเช่นราปฏิปักษ์ *Arthrobotrys* spp., *Monacrosporium* spp. และ *Dactylella* spp. (anamorphs) หลังการจำแนกพบว่าเป็นเชื้อราในสกุล *Orbilia* spp.; class Discomycetes (Ascomycetes)

Subramanian (1983) รายงานว่าเชื้อรา *A. oligospora* สามารถดักจับไส้เดือนฝอยขนาดใหญ่ถึง 500-600 ไมโครเมตร หลังจากติดกับดักไส้เดือนฝอยจะแห้งตาย โดยเส้นใยของเชื้อราจะแทงผ่านเข้าไปในลำไส้ของไส้เดือนฝอยและส่งอวัยวะที่มีลักษณะกลมเข้าไปในช่องว่างของลำตัวเพื่อดูดสารอาหารต่างๆภายในจนหมด ไส้เดือนฝอยจะตายภายใน 2 ชั่วโมง หลังจากติดกับดักและจะปรากฏ conidiophore และ conidia ของเชื้อราขึ้นบนผิวของไส้เดือนฝอยที่ตายแล้ว

เชื้อรา *A. oligospora* จะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า tube แทงผ่านผนังเซลล์ ขั้นตอนนี้เกิดจากกระบวนการ hydrolytic enzymes solubilizing กับผนังเซลล์ รวมทั้งมีการกระตุ้นให้เกิดแรงดันในการแทงเส้นใยเพื่อเข้าทำลายไส้เดือนฝอย ปกติผนังเซลล์ของไส้เดือนฝอยประกอบด้วย collagen และ proteases ซึ่งส่วนใหญ่เป็น subtilisin-type ของ serine proteases การสร้าง tube และการพัฒนาของ bulb เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างพิเศษและลักษณะทางสรีระของเส้นใยเชื้อราอย่างกะทันหันเพื่อเข้าทำลายไส้เดือนฝอย ภายใน bulb และเส้นใยที่ทำหน้าที่พิเศษ (trophic hyphae) จะประกอบด้วยอวัยวะเช่นเดียวกับเซลล์ปกติและมี endoplasmatic reticulum เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแล้วจะเกิดการสร้างหยดไขมันในเส้นใยพิเศษ ซึ่งรวมไปถึงการสะสมและการเก็บสารอาหารที่ได้จากการทำลายไส้เดือนฝอย นอกจากนี้การสร้างหยดไขมันยังเกิดได้จากการเก็บสะสมสารอาหารที่มาจากพืชอาศัย ทั้งนี้เพื่อนำไปผลิตเป็น lectin (ALO) น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ปริมาณมากภายใน cytoplasm (Rosen *et al.*, 1996) ในขั้นตอนเริ่มแรกของการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยที่เกิดจากเชื้อรา *A. oligospora* จะมีการสังเคราะห์และสะสม ALO อย่างรวดเร็ว เพื่อช่วยในการแทงผ่านผนังเซลล์และย่อยสลายตัวไส้เดือนฝอย โดยจะพบ ALO มากในส่วนของเส้นใยเชื้อราที่ทำหน้าที่พิเศษเพื่อเข้าทำลายไส้เดือนฝอย (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Tunlid and Jansson (1991) รายงานถึงเชื้อรา *A. oligospora* ว่าสามารถผลิตเอนไซม์ extracellular proteases ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ซึ่งตรวจสอบได้จากการเกิด hydrolysis ของ chromogenic substrate Azocoll และถูกยับยั้งการทำงานได้จาก phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ serine protease inhibitors ยังพบว่ามีโอกาสถูกยับยั้งการทำงานบางส่วนได้จาก aspartate protease inhibitor pepstatin รวมทั้งสารยับยั้ง cysteine protease inhibitor [L-trans-epoxysuccinyl-leucylamide-(4-guanidino)-butane or E-64] การแยกส่วนประกอบของสารด้วย gel electrophoresis ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ protease ได้หลายชนิดรวมทั้ง multiple serine proteases ส่วนหน้าที่ของ protease ในการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยถูกตรวจสอบได้โดยการให้ protease inhibitors กับเชื้อรา ผลปรากฏว่าไม่มีสารยับยั้งชนิดใดมีผลกับความเหนียวของห่วงดักจับไส้เดือนฝอย แต่การให้สาร serine protease inhibitor PMSF antipain chymostatin หรือ metalloprotease inhibitor phenanthroline กับห่วงเชื้อราสามารถลดประสิทธิภาพการเคลื่อนไหวของห่วงได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสารยับยั้ง cysteine และ aspartic proteases ให้ผลในทางตรงข้าม

Ahman *et al.* (2002) รายงานถึงเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยว่าเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน ปัจจุบันใช้เป็นจุลินทรีย์ที่ควบคุมโรคของพืชและสัตว์ทางชีวะวิธี ประสิทธิภาพของเชื้อราสามารถแก้ไขได้โดยการตัดต่อยีน subtilisin-like extracellular serine protease (*PII*) มักพบในเชื้อรา *A. oligospora* ซึ่งยีนนี้มีความสำคัญต่อการสร้างห่วงในการดักจับไส้เดือนฝอย ส่วนใหญ่จะไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในช่วงการเข้าทำลาย แต่จะพบในช่วงที่เชื้อราฆ่าและเจริญบนตัวไส้เดือนฝอย ฉะนั้นการหายไปของยีนชนิดนี้ในเชื้อราจึงมีผลกับประสิทธิภาพการทำลายไส้เดือนฝอย เชื้อรา mutant ที่มีการใส่ยีนนี้ลงไปจะเพิ่มความสามารถในการสร้างห่วง ประสิทธิภาพการดักจับและฆ่าไส้เดือนฝอย ในปัจจุบันจึงนิยมการตัดต่อและถ่ายยีน (genetic transformation) มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้างห่วงและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยของเชื้อราปฏิปักษ์ *A. oligospora* และยีนที่นิยมศึกษามากคือ ยีนกลายพันธุ์ของเอนไซม์ protease (*PII*)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสัมพันธ์ของเชื้อรากับพืชอาศัย

Bordallo *et al.* (2002) ทำการศึกษารูปแบบในการอาศัยบริเวณรากพืชของเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายระยะไข่และเชื้อราที่สร้างห่วงในการดักจับไส้เดือนฝอย ผลการทดลองพบว่า *A. oligospora P. chlamydosporia* และเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดอื่นๆ เจริญอยู่บริเวณรากของพืชได้ เชื้อราสามารถเจริญได้ทั้งภายในและภายนอกรากด้วยการใช้ appressoria แทงผ่านผนังเซลล์เข้าสู่ epidermis และ cortex cells แต่จะไม่เข้าไปในส่วนของ vascular tissues ในขณะเดียวกันพืชจะทำการสร้างโครงสร้างบางอย่างขึ้นมา เช่น papillae lignitubers และโครงสร้างอื่นที่มาจากผนังเซลล์ เพื่อป้องกันตัวเองจากการบุกรุก แต่โครงสร้างดังกล่าวไม่สามารถป้องกันการเจริญของเชื้อราบริเวณรากได้ เชื้อราจึงอยู่ในสภาพเป็น endophytic fungi ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า *A. oligospora* เพียงชนิดเดียวที่มีการตอบสนองต่อสารเคมีบริเวณรากพืช

เชื้อรา *A. oligospora* และ *Verticillium chlamydosporium* สามารถเจริญบนรากต้นข้าวบาร์เลย์และต้นมะเขือเทศได้โดยการแทง appressoria เข้าไปในส่วนของ epidermis และยังพบว่า *V. chlamydosporium* สามารถเจริญและสร้าง chlamydospores ในบริเวณ epidermis ของรากมะเขือเทศด้วย ซึ่งเชื้อราจะแทงเส้นใยผ่านทาง papillae นอกจากนี้ยังพบว่าต้นข้าวบาร์เลย์และมะเขือเทศจะมีการปล่อยสารประกอบพวก phenolic รวมทั้ง lignin โปรตีนและเซลโลสบริเวณ papillae ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น เชื้อราทั้ง 2 ชนิดสามารถอาศัยอยู่บริเวณ epidermis ได้นานถึง 3 เดือน หลังจากที่ถูกปลูกเชื้อลงไป นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราสามารถที่จะเจริญอยู่ภายในรากพืชพวกใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ได้และเชื้อรา *A. oligospora* มีแนวโน้มที่จะทำให้รากต้นข้าวบาร์เลย์เกิดผลกระทบมากกว่ารา *V. chlamydosporium* โดยรวมแล้วเชื้อราทั้ง 2 ชนิดมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณผนังเซลล์ แต่ไม่ได้ขัดขวางการเจริญของต้นพืช

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง

บัญชาและคณะ (ไม่ระบุปีที่พิมพ์) กล่าวว่าการใช้อินทรียวัตถุที่มีคุณสมบัติในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมคลุกลงไปดินนั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและน่าจะมีความเหมาะสมกับสภาพการปลูกพืชในประเทศไทย เนื่องจากการใช้สารเคมีทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง มีพิษตกค้างต่อผู้บริโภคและต่อสิ่งแวดล้อม

ทรงศักดิ์ (2542) รายงานถึงปฏิกิริยาระหว่างแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท กับเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จำนวน 10 ไอโซเลท ผลการทดลองพบว่ามีเชื้อที่ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อต้านกัน 60 คู่ เกิดปฏิกิริยาต่อกันเล็กน้อย 11 คู่ และเกิดปฏิกิริยาต่อต้านกันรุนแรง 29 คู่ การนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อปฏิปักษ์คู่ที่ไม่ต่อต้านกันมาควบคุมโรครากปมของผักกาดหอมในสภาพโรงเรือนทดลองนั้น พบว่าการใช้เชื้อรา *P. lilacinus* ร่วมกับ *T. harzianum* ช่วยลดการเกิดปมได้ใกล้เคียงกับการใช้รา *P. lilacinus* ร่วมกับ NK-05 และ chitosan ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม โดยทำให้เกิดปม 65 66 และ 104 ปมต่อต้น ตามลำดับ

จักรพงศ์ (2544) ทำการแยกเชื้อรา *Arthrobotrys* spp. จากดินบริเวณรอบๆรากพืชที่นำมาจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวางและศูนย์ฯ แกน้อย โดยใช้ 2 วิธี คือ การโรยดินลงบนผิวหน้าของอาหาร (soil sprinkling method) และวิธีละลายดินให้เจือจางแล้วละเลงลงบนผิวของอาหาร (soil dilution plating method) ผลการทดลองพบว่าวิธีการโรยดินลงบนผิวหน้าของอาหารเท่านั้นที่สามารถแยก *Arthrobotyrs* spp. ได้ 3 ไอโซเลท จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar) CMA (corn meal agar) และ PA (prune juice agar) พบว่า ไอโซเลท 2 และ 3 มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้กันมาก โดยเจริญได้ดีบนอาหาร PDA และ CMA และเจริญได้ช้าบนอาหาร PA

นฤมล (2547) แยกเชื้อจากดินในแปลงปลูกเบญจมาศ จากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ โดยวิธี scattering method ได้เชื้อรา *Arthrobotrys* spp. 2 ไอโซเลท จำแนกได้เป็น *A. oligospora* และ *A. conoides* จากนั้นนำเชื้อราทั้งสองมาเปรียบเทียบการเจริญบนอาหาร PDA (ชุดควบคุม) และอาหาร PDA ผสมสารไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้น 750 1,500 3,000 3,750 และ 4,500 ppm ทำการปลูกเชื้อโดยวิธี CDT (culture disc technique) ผลปรากฏว่าสารไกลโฟเสทมีผลกับลักษณะทางกายภาพของเชื้อรา โดยที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 750 ppm ขึ้นไป เชื้อราเจริญช้า การสร้างสปอร์ลดน้อยลงและเส้นใยมีรูปร่างผิดปกติ ที่ระดับความเข้มข้น 3,000 ppm ซึ่งเป็นอัตราแนะนำต่ำสุดที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำในการกำจัดหญ้าคาพบว่า เชื้อเจริญได้แต่ไม่สร้าง conidia ส่วนที่ความเข้มข้น 3,750 และ 4,500 ppm เชื้อราไม่เจริญเติบโต แม้ว่าได้ทำการตรวจสอบต่อไปเป็นเวลา 1 เดือน หลังปลูกเชื้อ

Tunlid *et al.* (1992) รายงานว่าเชื้อรา *A. oligospora* จะสร้างโครงสร้างพิเศษแบบ 3 มิติ (three-dimensional structure) ที่สร้างกาวเหนียวและรัดตัวไส้เดือนฝอย โดยการสร้าง lectin ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะเจาะจงกับผิวหนังของไส้เดือนฝอยที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ปกติจะพบ lectin บริเวณผิวของกับดัก

Duponnois (1995) ศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา *A. oligospora* 2 สายพันธุ์ (ORS 18692 S7 และ ORS 18692 S5) ที่เก็บมาจากซิมีกัลในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายต้นมะเขือเทศพบว่า เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถดักจับตัวอ่อนไส้เดือนฝอย *Meloidogyne*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mayaguensis สูงถึง 98 % ในเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราอยู่ในช่วงระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างมีค่า 5.6 โดยสภาพกรดยับยั้งการเจริญของเชื้อ และก่อนทำการทดสอบเชื้อราชนิดนี้กับไส้เดือนฝอยรากปม *M. mayaguensis* หรืออาจร่วมกับไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. อื่นๆในสภาพแปลงปลูกกับต้นมะเขือเทศ เชื้อราจะถูกผสมกับปุ๋ยหมักก่อนที่จะนำไปใส่ในหลุมปลูก ผลการทดสอบพบว่าช่วงฤดูหนาว (28 °C) เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถลดจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยและช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของต้นกล้า เช่นเดียวกับการทดสอบในสภาพแปลงปลูกช่วงฤดูร้อน (35 °C) อาจสรุปได้ว่าการผสมเชื้อรากับปุ๋ยหมักสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเข้าทำลายของเชื้อราและเพิ่มการเจริญของต้นกล้าได้

Moore-Lamdee and Elizabeth (1996) กล่าวว่าลักษณะโครงสร้างกาวเหนียวที่สำคัญที่สุดคือ รูปแบบตาข่ายเหนียว (adhesive network) ห่วงจะเกิดขึ้นเมื่อปลายเส้นใยที่แยกตัวออกมาเกิดการโค้งและต่อเชื่อมเข้าด้วยกัน (anastomose) ระหว่างภายในเส้นใยเดียวกันหรือเส้นใยที่เป็นต้นกำเนิดจนเกิดการสร้างเป็นห่วงเดียวหรือห่วงตาข่าย

Morgan *et al.* (1997) ศึกษาอิทธิพลของระดับธาตุอาหาร อุณหภูมิและความหนาแน่นของตัวอ่อนไส้เดือนฝอย *Heligmosomoides polygyrus* ระยะที่ 3 ต่อความสามารถในการดักจับไส้เดือนฝอยของเชื้อรา *A. oligospora* *D. flagrans* และ *M. megalosporum* ผลการทดลองพบว่าทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อการดักจับไส้เดือนฝอยของรา *A. oligospora* และ *M. megalosporum* การลดความเข้มข้นของธาตุอาหารทำให้เชื้อราเพิ่มการสร้างห่วงมากขึ้น แต่ไม่มีผลกระทบกับเชื้อรา *D. flagrans* นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนตัวอ่อนที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เชื้อรามีการสร้างห่วงเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

Ashour and Mostafa (1999) รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. oligospora* กับโลหะหนัก ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆในสภาพห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแคดเมียมเป็นพิษกับเชื้อรามากที่สุด อย่างไรก็ตาม zinc 10 ppm เป็นโลหะหนักชนิดเดียวที่สามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสภาพการเลี้ยงเชื้อราที่มี zinc 600 ppm และ manganese 200 ppm เหมาะสมต่อการสร้างห่วง ในทางตรงข้ามแคดเมียมเกือบทุกความเข้มข้น ยกเว้นที่ 0.1 ppm ยับยั้งการสร้างห่วง ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าเชื้อรามีการเจริญลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวมากกว่าแบบแข็ง สำหรับการทดลองในสภาพแปลงปลูกพบว่าโลหะทั้ง 4 ชนิด มีผลต่อความยาวและน้ำหนักของรากต้นทานตะวันที่ไม่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย ส่วนกรรมวิธีที่ใช้เชื้อรา *A. oligospora* พบว่าเชื้อราสามารถลดจำนวนปมและกลุ่มไข่ที่เกิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากไส้เดือนฝอย *M. incognita* ได้ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีอื่น ผลการทดลองยังพบว่าการใช้ zinc หรือ manganese ชนิดเดียวหรือทั้ง 2 ชนิดร่วมกับรา *A. oligospora* สามารถลดจำนวนปมรวมทั้งกลุ่มไข่ดีกว่าการใช้เชื้อราเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามการใช้รา *A. oligospora* ร่วมกับ zinc 600 ppm หรือ 1,000 ppm กับต้นทานตะวันที่ถูกไส้เดือนฝอย *M. incognita* ทำลายทำให้น้ำหนักรวมของต้นมีค่า 18.50 และ 16.58 ตามลำดับ ส่วนในแปลงทดลองที่ใช้เชื้อราเพียงอย่างเดียวหรือใช้เชื้อราร่วมกับแคดเมียมหรือตะกั่ว ผลปรากฏว่าจำนวนของปมและกลุ่มไข่ที่พบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลกระทบของโลหะต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราพบว่าในสภาพแปลงปลูกโลหะหนักจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์น้อยกว่าในสภาพห้องปฏิบัติการและที่สำคัญการใช้โลหะหนักที่ความเข้มข้นสูงๆ จะทำให้เกิด phytotoxicity กับต้นทานตะวัน

Akhtar and Malik (2000) รายงานว่าอินทรียวัตถุที่พบในดินสามารถกระตุ้นกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้ การสลายตัวของอินทรียวัตถุดังกล่าวมีผลต่อการสะสมของสารประกอบจำเพาะภายในดินซึ่งอาจมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดไส้เดือนฝอย โดยปกติอินทรียวัตถุส่วนใหญ่จะได้มาจากผลผลิตทางชีวภาพ ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม การเกษตรและจากกิจกรรมทางชีวภาพอื่นๆ การควบคุมไส้เดือนฝอยสามารถทำได้ด้วยการปรับปรุงโครงสร้างของดินและปุ๋ย การเพิ่มระดับความต้านทานของพืช ซึ่งอาจเป็นในรูปการปล่อยสารพิษที่มีผลกับไส้เดือนฝอย การเพิ่มจำนวนปรสิตพวกที่เป็นเชื้อรา แบคทีเรียหรือพวกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยชนิดอื่น

Khan *et al.* (2001) รายงานว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* ร่วมกับ *T. harzianum* ที่มีคุณสมบัติในการเป็นราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยซึ่งแยกได้จากอินทรียวัตถุในดินที่มีไส้เดือนฝอยรากปมอยู่ สามารถชะลอความสามารถในการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *M. incognita* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการผสมเชื้อรา *P. lilacinus* ร่วมกับ *T. harzianum* กับอินทรียวัตถุสามารถควบคุมจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยรากปม ลดการเกิดโรครากปมและยังเพิ่มความแข็งแรงให้กับต้นพืชด้วยเช่นกัน

Duponnois *et al.* (2001) ศึกษาถึงผลของการใช้ใบพืช (leaf biomass) ในการปรับปรุงดินปลูกมะเขือเทศและการอยู่รอดของเชื้อรา *A. oligospora* ไอโซเลท ORS 18697 ใบพืชที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *Acacia mangium* *Acacia holosericea* *Eucalyptus camaldulensis* *Casuarina equisetifolia* *Azadirachta indica* และ *Sorghum vulgare* ผลการทดลองพบว่า *Acacia holosericea* ทำให้เชื้อราเพิ่มปริมาณในดินมากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Renato and Jaime (2003) รายงานถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา *A. oligospora* ต่อการควบคุมไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายรากของต้นส้ม (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb) ในสภาพห้องปฏิบัติการ หลังจากที่เลี้ยงเชื้อราซึ่งได้มาจาก Departamento de Nematologia บนอาหาร WA สภาพไม่ได้รับแสง 15 วัน ภายในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส พบว่า 24 ชั่วโมง หลังจากที่ใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 ตัวเมียไม่เต็มวัยและตัวผู้ ทั้งหมดถูกเชื้อราเข้าทำลาย

Alves and Campos (2003) ศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของรา *A. conoides D. flagrans P. lilacinus P. variotii M. doedycoides* และ rhizobacterium ต่อการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne javanica* และ *M. incognita* race 3 ที่ทำลายมะเขือเทศพันธุ์ Santa Clara และอ่อนแอต่อไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. การทดลองนี้ถูกศึกษาใน 3 สภาพแวดล้อม ได้แก่ 1). สภาพโรงเรือนที่ไม่ควบคุมอุณหภูมิ 2). สภาพห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส 3). ใน water bath ที่บรรจุดินอยู่ข้างใน ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 29-30 องศาเซลเซียส และตั้งไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า *M. javanica* และ *M. incognita* race 3 มีการสืบพันธุ์ใน water bath มากกว่าสภาพอื่น ผลการทดลองยังพบว่าสภาพใน water bath และอุณหภูมิห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ต้นมะเขือเทศมีขนาดของปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอยใหญ่กว่าสภาพโรงเรือนที่ไม่ควบคุมอุณหภูมิ นอกจากนี้สภาพทดสอบใน water bath และห้องที่ควบคุมอุณหภูมิยังส่งผลให้เชื้อรา *A. conoides* และ rhizobacterium ลดจำนวนปมของ *M. incognita* race 3 ($P< 0.05$) และยังพบว่า *A. conoides* สามารถลดจำนวนไข่ของไส้เดือนฝอย *M. incognita* race 3 ด้วยเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Gomez *et al.* (2003a) รายงานถึงลักษณะนิเวศทางชีววิทยาและคุณสมบัติของเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอย *Arthrobotrys* spp. ที่แยกได้จากคิวเบน พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราได้เป็น *A. oligospora* ทั้ง 2 ไอโซเลท การทดสอบปฏิกิริยาร่วมระหว่างเชื้อรากับอุณหภูมิ (isolate-temperature parameters) ผลปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งตรวจสอบได้จากเชื้อราทั้ง 2 มีการเจริญเหมือนกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราคือ 25 องศาเซลเซียส ในทางตรงข้ามที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเชื้อราเจริญเติบโตได้น้อยมาก ส่วนการสร้างสปอร์พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ (A-31 และ A-37) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในแง่การตอบสนองต่ออุณหภูมิและการพัฒนาการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Gomez *et al.* (2003b) รายงานถึงผลการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *A. oligospora* 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากคิวเบน เพื่อควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* สภาพห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ารา *A. oligospora* สายพันธุ์ A-31 มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายดีกว่า A-37 โดยเปอร์เซ็นต์การทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 ของเชื้อราสายพันธุ์แรกมีค่า 86 % และสายพันธุ์ที่ 2 มีค่า 70 %

Kanitkar and Kanitkar (2003) รายงานถึงเชื้อรา *A. oligospora* KTS 1001 ว่าเป็นเชื้อที่สร้างห่วงได้จากเส้นใย เพื่อใช้ในการดักจับและฆ่าไส้เดือนฝอย สามารถพบเชื้อราชนิดนี้ในดินทั่วไป โดยเฉพาะดินที่มีอินทรียวัตถุสูงและสามารถแยกเชื้อรานี้จาก Martin's rose bengal agar ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายไส้เดือนฝอยสภาพห้องปฏิบัติการบนอาหารทดสอบ WA ผสม rose bengal พบการสร้างห่วงภายใน 1 สัปดาห์ หลังจากที่ใส่ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมลงไป (เพิ่มขึ้นช่วงวันที่ 4 ถึงวันที่ 8 วัน) หลังจากที่ไส้เดือนฝอยถูกจับ ภายใน 24 ชั่วโมงเชื้อราจะทำการย่อยสลายไส้เดือนฝอยเหลือชิ้นส่วนเพียง 20 % นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจาก 5 วัน ที่ทำการทดสอบไส้เดือนฝอยจำนวน 300 ตัว ต่อจานอาหาร ถูกเชื้อราฆ่าและเพิ่มขึ้นเป็น 330 ตัว ในวันที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบจำนวนไส้เดือนฝอยที่ตายในจานอาหารทดสอบกับชุดควบคุมผลปรากฏว่าจำนวนไส้เดือนฝอยที่ตายภายนอกห่วงรัดมีจำนวนไม่แตกต่างกัน

Lysek and Nordbring-Hertz (2004) ศึกษาเชื้อรา *A. oligospora* เกี่ยวกับจำนวนและการกระจายห่วงรัดหลังจากที่ใส่ไส้เดือนฝอยลงไปในจานทดสอบที่อุณหภูมิ 21องศาเซลเซียส เชื้อราชนิดนี้จะเริ่มสร้างห่วงรัดภายใน 42.3±0.8 ชั่วโมง ทั้งนี้การสร้างห่วงจะขึ้นอยู่กับความยาวนานของแสงที่เชื้อราได้รับในช่วง 24 ชั่วโมง (แสง 10 ชั่วโมง สลับกับมืด 14 ชั่วโมง) นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิมีผลกับการยืดยาวของเส้นใย แต่ไม่มีผลกับระยะเวลาในการสร้างห่วงดักจับ ค่าเฉลี่ยของการเจริญและการสร้างสปอร์เกี่ยวข้องกับสภาพการได้รับแสง (LD-cycles) เพียงอย่างเดียวเท่านั้นและยังพบว่าในเวลาหนึ่งวันจะยังไม่พบการสร้างห่วงของเชื้อรา จนกว่าจะถึง 42 ชั่วโมงเป็นต้นไป

Jaffee (2004) ศึกษาผลการใช้อินทรียวัตถุเพื่อส่งเสริมการทำงานของเชื้อรา *Dactylellina haptotyla* และ *A. oligospora* ในแปลงอุ่นโดยการใช้ soil cages ลักษณะเป็นท่อ polyvinyl chloride ที่มีตะแกรงปิดตรงส่วนปลาย ตรวจหาปริมาณเชื้อรา *D. haptotyla* และ *A. oligospora* ที่หลงเหลืออยู่ในอินทรียวัตถุ 2 ชนิด ในไร่อุ่น 2 แห่ง การทดสอบเริ่มจากบรรจุดินจากแปลงอุ่นปริมาตร 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ดินแห้งหนักประมาณ 120 กรัม) เชื้อราที่จะทดสอบซึ่งอยู่ในรูปของ alginate pellets; น้ำหนักเส้นใย 1.9 มิลลิกรัม และใบอุ่นหรือใบอัลฟาฟาที่แห้ง ปริมาตร 0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

360 720 มิลลิกรัม หรือ 0 4,500 9,000 kg ha^{-1} ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันแล้วใส่ลงใน cage ดังกล่าว ปรับส่วนผสมทั้งหมดให้มีค่าอัตราส่วน C:N ที่ 28:1 และ 8:1 ตามลำดับ cage จะถูกฝังในแปลงองุ่นและขุดขึ้นมาหลังจากฝังนาน 25-39 วัน เพื่อนำดินไปตรวจหาความหนาแน่นของประชากรเชื้อราและปริมาณการดักจับไส้เดือนฝอย ในห้องปฏิบัติการ ผลการตรวจสอบพบว่าอินทรียวัตถุที่เกิดจากใบอัลฟาฟาปริมาณน้อยๆ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของรา *D. haptotyla* ในทางตรงข้ามอินทรียวัตถุที่เกิดจากใบอัลฟาฟาปริมาณมากไม่ส่งเสริม สำหรับรา *A. oligospora* พบว่าอินทรียวัตถุที่ได้จากใบอัลฟาฟาปริมาณมากสามารถเพิ่มความหนาแน่นของเชื้อราได้ แต่เชื้อราดักจับไส้เดือนฝอยน้อยมากหรือไม่ดักจับเลย จึงสรุปได้ว่าการดักจับและความหนาแน่นของประชากรไส้เดือนฝอยจะมีความสัมพันธ์กับเชื้อรา *D. haptotyla* แต่ไม่เกิดกับรา *A. oligospora*

Ghahfarokhi *et al.* (2004) รายงานผลการศึกษาเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยในประเทศอิหร่าน จากตัวอย่างดินจำนวน 150 ตัวอย่าง และจากตัวอย่างมูลแกะ 138 ตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกตรวจหาเชื้อราบนอาหาร chloramphenicol-2 % water agar (CHF-WA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้ไส้เดือนฝอย *Haemonchus contortus* ระยะที่ 3 เป็นเหยื่อล่อและตรวจสอบพฤติกรรมของเชื้อราในระยะเวลา 2 เดือน ผลการตรวจสอบพบ *Arthrobotrys* spp. 3 ไอโซเลทในตัวอย่างดิน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ *A. oligospora* IRAN 877 C IRAN 878 C และ IRAN 879 C แต่ไม่พบเชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยในตัวอย่างมูลแกะ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเข้าทำลายตัวอ่อนระยะที่ 3 ของไส้เดือนฝอย *H. contortus* กับ *A. oligospora* CBS 111.37 *A. oligospora* CBS 251.82 และ *D. flagrans* CBS 583.91 ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน พบว่าเชื้อราที่แยกได้สามารถลดการพัฒนาของไส้เดือนฝอยได้ 75-85 % ในขณะที่ประสิทธิภาพการเข้าทำลายอยู่ในช่วง 51-85 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อการทำลายไส้เดือนฝอยของเชื้อรา *A. oligospora* strains IRAN 877 C และ CBS 111.37 ชี้ให้เห็นว่าเชื้อราสามารถลดจำนวนตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย *H. contortus* ได้ประมาณ 95 % ที่อุณหภูมิระหว่าง 15 ถึง 25 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ 10 และ 30 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การลดลงมีค่า 30 % และ 50 % ตามลำดับ จึงสามารถสรุปได้ว่า *A. oligospora* ที่แยกได้ในงานวิจัยครั้งนี้มีแนวโน้มในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยที่อาศัยอยู่ในสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ (gastrointestinal nematodes of ruminants)

Nordbring-Hertz and Odham (2005) ศึกษาถึงสารระเหยที่ปล่อยออกมาจากไส้เดือนฝอยหากินอิสระซึ่งตรวจสอบได้จากเทคนิค gas chromatography และ mass spectrometry ไส้เดือนฝอยจำนวน 5-200 ตัว จะถูกตรวจสอบการปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย ampoule

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

technique ในขณะที่แอมโมเนีย (total NH_3+NH_4^+) กรดอะซิติกและกรดโพรพิโนอิกถูกตรวจสอบจากการแช่ไส้เดือนฝอยในน้ำโดยตรงและแขวนลอยนาน 1-3 วัน ผลการตรวจสอบพบว่าใน 1 วัน ไส้เดือนฝอย 1 ตัว จะปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา 80 นาโนกรัม แอมโมเนีย 1-5 นาโนกรัม กรดอะซิติกและโพรพิโนอิก 0.5 และ 1.0 พิโคกรัม สารระเหยดังกล่าวจะชักนำให้เชื้อรา *A. oligospora* สร้างห่วงเพื่อดักจับไส้เดือนฝอย นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศที่ 5-10 % (v/v) สามารถยับยั้งการสร้างห่วง ในขณะที่แอมโมเนียกระตุ้นการเกิดห่วง สำหรับกรดอะซิติกและโพรพิโนอิก ผลการทดสอบเกี่ยวกับความเข้มข้นชี้ให้เห็นว่ากรดทั้ง 2 ตัวไม่มีผลกระทบกับการสร้างห่วงของเชื้อรา *A. oligospora*

Woodward *et al.* (2005) ศึกษาถึงผลของสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช 2 ชนิดคือ chlorothalonil และ myclobutanil ต่อระดับความทนทานของ *A. oligospora* ในสภาพห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาพบว่าสารเคมีทั้ง 2 ชนิดลดการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ 10 mg kg^{-1} นอกจากนี้ยังพบว่า *A. oligospora* ไม่สามารถลดประชากรไส้เดือนฝอย *Criconemella ornata* ในดินที่มีสารเคมี chlorothalonil น้อยกว่า 5 mg kg^{-1} และ myclobutanil ที่มีปริมาณน้อยมาก แต่จำนวนประชากรไส้เดือนฝอยลดลงมากที่สุดในแปลงที่ใส่ *A. oligospora* ร่วมกับการได้รับสารเคมีกำจัดเชื้อราดังกล่าว ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อราใน bentgrass ไม่ได้ขัดขวางประสิทธิภาพของเชื้อรา *A. oligospora* แต่อย่างไรก็ตามเชื้อรานี้อาจไม่ได้ลดจำนวนไส้เดือนฝอยลงตามที่ได้เข้าใจกันมาก่อนหน้านี้

Santiago *et al.* (2006) รายงานว่าเชื้อรา *P. lilacinus* เป็นเชื้อราที่ใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยและสามารถแยกจากแปลงปลูกได้ง่าย งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาสายพันธุ์เชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne paranaensis* ในมะเขือเทศพันธุ์ Santa Clara สภาพโรงเรือนทดลอง ผลการทดลองหลังจากปลูกเชื้อราปริมาตร 50 กรัม ที่เจริญบนเมล็ดข้าวนึ่งฆ่าเชื้อ ลงในดินปลูกมะเขือเทศเป็นระยะเวลานาน 45 วัน พบว่าทุกๆ กรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อราลงไปจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยมีปริมาณลดลงโดยเชื้อรา *P. lilacinus* ไอโซเลท UEL pae 05 08 09 13 20 21 38 41 44 54 ESALQ 831 และ e832 สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถมีชีวิตรอดอยู่ในดินได้ในปริมาณที่สูง

Atkins (2007) รายงานเกี่ยวกับเชื้อรา *A. conoides* ว่าอยู่ใน Deuteromycete เป็นเชื้อราที่สร้างห่วงเพื่อดักจับไส้เดือนฝอย หลังจากนั้นจะแทงเส้นใยเพื่อฆ่าและย่อยสลายไส้เดือนฝอยภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมง สามารถพบเชื้อราชนิดนี้ได้ในดินทั่วไป ผลการทดสอบระดับความเป็นกรด ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราชนิดนี้พบว่ายิ่งระดับความเป็นกรดสูงขึ้นการสร้างห่วงและการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เจริญจะลดลง ส่วนที่ระดับความเป็นด่างสูงพบว่า เชื้อราสามารถเจริญได้ดี แต่จะลดการสร้างห่วงลง สรุปได้ว่าการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ไส้เดือนฝอยสามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในปัจจุบันที่ลดการใช้สารเคมี เพื่อแก้ปัญหาการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยซึ่งทำความเสียหายให้กับผลผลิต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved