



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ยับยั้งโรครากขาวของยางพารา

Potential use of producing bioactive compounds PGPR against white root
disease of rubber

โดย ดร. มธุรส ชัยหาญ และคณะ

กรกฎาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ยับยั้งโรครากขาวของยางพารา

Potential use of producing bioactive compounds PGPR against white root
disease of rubber

คณะผู้วิจัย

1. ดร. มธุรส ชัยหาญ
2. ศ.ดร. สายสมร ลำยอง
3. นายนิคม สุธดา

สังกัด

- คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

บทสรุปย่อรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ ศักยภาพการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งโรครากขาวของยางพารา
Potential use of producing bioactive compounds PGPR against white root disease of rubber

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ดร. มธุรส ชัยหาญ
หน่วยงาน หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ที่อยู่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์มือถือ 081-2888866
โทรศัพท์/โทรสาร (053) 127153
E-mail mathurot@mju.ac.th; bebee103@gmail.com

ผู้ร่วมโครงการวิจัย 1. ศ.ดร. สายสมร ลำยอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. นายนิคม สุธดา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

งบประมาณทั้งโครงการ 149,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ 9 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2554 ถึงวันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2555

ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญ

โรครากขาวของยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เป็นปัญหาสำคัญต่อการเจริญของต้นยางพาราในระยะยาว ปัจจุบันมักใช้สารเคมีในการควบคุมโรค ทำให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและเกษตรกรเอง รวมไปถึงเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตน้ำยางอีกด้วย การควบคุมโรคโดยชีววิธี จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี โดยการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่มีกลไกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในดินได้หลายวิธี เช่น การผลิตไซโตไคน์ การผลิตสารปฏิชีวนะ การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของรากก่อโรค หรือ การผลิตสารเมตาบอไลต์บางชนิดที่สามารถควบคุมการเจริญของรากก่อโรคควบคุมไปกับการเลือกใช้กลายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคสูงมาปลูก ทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรครากขาวของยางพารา วิธีการดังกล่าวสามารถลดการใช้สารเคมี ลดต้นทุนในการผลิต ตลอดจนช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมและก่อให้เกิดการเกษตรที่ยั่งยืน

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จากดินบริเวณรากยางพาราที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่สามารถยับยั้งรากก่อโรครากขาวในยางพารา

ผลการดำเนินงาน

1. การแยกและจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดที่เจริญบริเวณสวนยางพารา และรากบริเวณต้นยางพาราที่ล้มตาย ของเกษตรกร ตำบลทุ่งกล้วย อำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา เพื่อใช้ในการแยกเชื้อราก่อโรครากขาว *R. microporus* พบว่าไม่สามารถแยกเชื้อราก่อโรครากขาวได้ อาจเนื่องมาจากบริเวณพื้นที่ดังกล่าว ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรครากขาว จึงได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราก่อโรครากขาว จาก ดร.นาริรักษ์ นาแก้ว คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มาใช้ในการทดลองครั้งนี้แทน

2. การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินตัวอย่าง

ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างจากดินบริเวณรอบรากต้นยางพารา โดยเทคนิค Spread plate ลงบนอาหาร King' B medium พบว่าสามารถแยกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ได้ทั้งหมดจำนวน 78 ไอโซเลท เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียจำนวน 45 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลท

3. การทดสอบความสามารถในการผลิตสาร phenazine

นำเอา PGPR บริสุทธิ์จากข้อ 2 มาทดสอบความสามารถในการผลิตสาร phenazine โดยการเลี้ยงบนอาหาร King' B medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน และ นำมาตรวจผลโดยการนำไปส่องใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร พบว่ามีจำนวน 27 ไอโซเลท ที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อส่องใต้แสง UV

4. ความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอรั

จากการนำจุลินทรีย์ใน Stock culture ทั้งหมดจำนวน 78 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอรั โดยการเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Chrome Azurole S (CAS) บ่มในที่มืด พบว่ามีจำนวน 17 ไอโซเลท (21.8%) สามารถสร้างไซเดอโรฟอรัได้ โดยให้ค่าวงใสอยู่ระหว่าง 6-31 มิลลิเมตร และในชุดการทดลองดังกล่าว ไอโซเลท PSB-1 ให้ผลการสร้างไซเดอโรฟอรัได้สูงที่สุด โดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 31 มิลลิเมตร

5. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด จำนวน 78 ไอโซเลท ในอาหาร Carboxy Methyl Cellulose (CMC) พบว่าจุลินทรีย์ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้งหมดจำนวน 22 ไอโซเลท คิดเป็น 28.2% ของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด โดยในชุดการทดลอง พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลท PSB-10 ให้ค่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด โดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 30 มิลลิเมตร

6. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

จากการทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด จำนวน 78 ไอโซเลท ในอาหาร Chitin agar พบว่าจุลินทรีย์ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ทั้งหมดจำนวน 15 ไอโซเลท คิดเป็น 19.2% ของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด โดยในชุดการทดลอง พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลท LRB-7 ให้ค่าการผลิตไคติเนส ได้สูงที่สุด โดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 27 มิลลิเมตร

7. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส

จากการทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด จำนวน 78 ไอโซเลท จุลินทรีย์ทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลส ได้ทั้งหมดจำนวน 30 ไอโซเลท คิดเป็น 38.5% ของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด โดยผลบวกสังเกตจากลักษณะการเกิดฟองก๊าซ และผลลบไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆเกิดขึ้น

8. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรค (Primary Screening)

จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้จำนวน 78 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการรุกรานปฏิชีวนะเบื้องต้นยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่ามีจำนวน 24 ไอโซเลท (30.8%) ให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี และพบว่าแอคติโนมัยซีทไอโซเลท Lac-17 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด (84.1%) รองลงมาคือ แอคติโนมัยซีทไอโซเลท LRB-14 (81.7%) และแอคติโนมัยซีทไอโซเลท Lac-19 (80.2%) ตามลำดับ จึงทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรครากขาวในระดับกระถาง (ปี 2555) ต่อไป

9. การระบุชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือก

ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าจุลินทรีย์ที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาวได้ดีที่สุดโดยดูจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *R. microporus* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ไอโซเลท Lac-17, ไอโซเลท LRB-14 และไอโซเลท Lac-19 ให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุด ตามลำดับ เมื่อทำการจัดจำแนก พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลท

สรุปผลการวิจัย

แอคติโนมัยซีท ไอโซเลท Lac-17, ไอโซเลท LRB-14 และไอโซเลท Lac-19 ให้เปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาวได้ดีที่สุดในสภาพห้องปฏิบัติการ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแอคติโนมัยซีทดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรครากขาวในระดับกระถาง (งานวิจัย ปี 2555) อย่างไรก็ตามการจะนำมาใช้งานจริงต้องมีการศึกษาปัจจัยอื่นเพิ่มเติม เช่น สภาพแวดล้อมสำหรับการเจริญของเชื้อ, กระบวนการเตรียมหัวเชื้อ, ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงความคุ้มทุนทางเศรษฐศาสตร์ เพื่อผลิตชีวภัณฑ์ในรูปแบบพร้อมใช้งานต่อไป

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

1. ควรมีการศึกษาผลของ *Streptomyces* sp. Lac-17, *Streptomyces* sp. LRB-14 และ *Streptomyces* sp. Lac-19 ในการยับยั้งการเจริญของ *R. microporus* ในต้นยางพารา เพื่อเกษตรกรสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง

2. ควรมีการศึกษากระบวนการพัฒนาหัวเชื้อเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป โดยการศึกษากระบวนการเตรียมหัวเชื้อ ต้องเตรียมง่าย สะดวก และมีประสิทธิภาพเมื่อนำไปใช้งานในสภาพแวดล้อมจริง

3. ควรพัฒนาชีวภัณฑ์สำเร็จรูปจาก *Streptomyces* sp. Lac-17, *Streptomyces* sp. LRB-14 และ *Streptomyces* sp. Lac-19 เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

ผลงานทางวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

- นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 (วทท 38) “The 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 38)” ระหว่างวันที่ 17-19 ตุลาคม 2555 ณ ดิเอ็มเพรส คอนเวนชัน ฮอลล์ จังหวัดเชียงใหม่

รหัสโครงการ: RDG 5450045
ชื่อโครงการ: ศักยภาพการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งโรครากขาวของยางพารา
ชื่อนักวิจัย: ดร. มธุรส ชัยหาญ
สังกัด: หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
โทรศัพท์/โทรสาร (053) 127153 มือถือ 081-2888866
E-mail address mathurot@mju.ac.th; bebee103@gmail.com
ระยะเวลาดำเนินการ: 1 สิงหาคม 2554 ถึง 30 มิถุนายน 2555

บทคัดย่อ

โรครากขาวของยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* เป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกรชาวสวนยาง การคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพื่อใช้ในการควบคุมโรคแบบชีววิธี งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Pseudomonas* และแอคติโนมัยซีท เพื่อใช้ควบคุมเชื้อราก่อโรครากขาว จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากดินรอบรากต้นยางพาราที่แข็งแรง โดยใช้อาหาร King'B medium สามารถแยกจุลินทรีย์ได้ทั้งหมดจำนวน 78 ไอโซเลท เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย 45 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซีท 33 ไอโซเลท ซึ่งแอคติโนมัยซีทสามารถแบ่งออกเป็น กลุ่ม *Streptomyces* จำนวน 19 ไอโซเลท (57.6%), อยู่ในกลุ่ม non-streptomyces จำนวน 10 ไอโซเลท (30.3%) และที่ยังไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้ จำนวน 4 ไอโซเลท (12.1%) หลังจากนั้นนำจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้ ทดสอบความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้แก่ ความสามารถในการผลิตไซโตโรฟอรัส ความสามารถในการผลิตสารในกลุ่ม phenazine ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของรากก่อโรค ความสามารถในการผลิตแคตาเลส และความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ พบว่าจุลินทรีย์ทดสอบจำนวน 17 ไอโซเลท (21.8%) สามารถสร้างไซโตโรฟอรัสได้ และเมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหาร CMC พบว่ามีจำนวน 22 ไอโซเลท (28.2%) สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส พบว่ามีจำนวน 15 ไอโซเลท (19.2%) ที่สามารถผลิตไคตินเนสได้ และผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส พบว่ามีจำนวน 30 ไอโซเลท (38.5%) ให้ผลบวกกับการทดสอบเอนไซม์แคตาเลส ผลการทดสอบความสามารถต่อการยับยั้ง *R. microporus* ด้วยวิธี dual culture พบว่ามี 24 ไอโซเลท (30.8%) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ โดยแอคติโนมัยซีท Lac-17, LRB-14 และ Lac-19 มีกิจกรรมการยับยั้งรากก่อโรคได้ดีที่สุด 84.1%, 81.7% และ 80.2% ตามลำดับ เมื่อนำแอคติโนมัยซีททั้ง 3 ไอโซเลท มารับุขชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคุมไปกับการวิเคราะห์ 2-6, diaminopimelic acid (DAP) พบว่าเป็นแบบ LL-DAP จึงจัดจำแนกอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp.

คำสำคัญ: การควบคุมทางชีวภาพ, จุลินทรีย์ปฏิปักษ์, ไซโตโรฟอรัส, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Project code: RDG 5450045
Project title: Potential use of producing bioactive compounds PGPR against white root disease of rubber
Investigator: Dr. Mathurot Chaiham
E-mail Address : mathurot@mju.ac.th; bebee103@gmail.com
Project Period: 1 August 2554 – 30 June 2555

Abstract

White root disease of rubber caused by *Rigidoporus microporus* is a key issue. Biological control using PGPR are the alternative way to combat the fungal pathogen. We selected *Pseudomonas* and actinomycete from rhizospheric soil of rubber for controlling white root disease. After isolation using King'B medium, the total of 78 bacterial isolates were isolated and morphology study. These bacteria were classified as 45 isolates of bacteria and 33 isolates of actinomycete. All actinomycete could be divided into groups; 19 isolates (57.6%) were streptomycetes, 10 isolates (30.3%) were non-streptomycetes, and 4 isolates (12.1%) does not indicate the types. Furthermore, all of isolates were test for antagonistic activity to pathogenic fungi such as siderophore production, phenazine production, cell-wall degrading enzyme production and antibiotic production. The results were show that 17 isolates (21.8%) produced siderophore, 22 isolates (28.2%) to produce the enzyme cellulase after cultivated on CMC agar, 15 isolates (19.2%) were produce chitinase and 30 isolates (38.5%) were produced catalase. Moreover, we checked the antagonistic activities against *R. microporus* by dual culture technique, the result was show that 24 isolates (30.8%) were inhibited the growth of fungal pathogens especially isolates Lac-17, LRB-14 and Lac-19 show high level to inhibited the fungal pathogen as 84.1%, 81.7% and 80.2% respectively. After identification by the morphological analysis and actinomyces cell wall composition with the 2-6, diaminopimelic acid (DAP) and LL-DAP, isolates Lac-17, LRB-14 and Lac-19 were classified as *Streptomyces* sp.

Key Words: Biological control, Antagonist, Siderophore, Bioactive compounds

1. ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

ยางพาราเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โรครากขาวจาก *R. microporus* สามารถพบได้ในพื้นที่ปลูกยางทั่วโลก เช่น อินโดนีเซีย มาเลเซีย ศรีลังกา และ ไทย โดยเฉพาะในประเทศไทย พบการระบาดอย่างมากในช่วงฤดูฝน เนื่องจากมีความชื้นสูงและสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของรากก่อโรค (Guyot and Flori, 2002) โดยโรครากขาวจาก *R. microporus* สามารถพบเห็นการเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป โดยรากดังกล่าวจะแทงเส้นใยเข้าไปในเนื้อเยื่อ ทำให้การทำงานของเซลล์รากเสียหายไม่สามารถดูดน้ำ ดูดอาหารได้เต็มที่ ทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงของยางพาราค่อยๆ ลดลงเมื่อระบบรากถูกทำลาย ยางพาราจะแสดงอาการให้เห็นที่ทรงพุ่ม ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแกมส้ม ใบร่วงหมดต้น ขอบใบม้วนเข้าด้านใน ถ้าตรวจดูที่รากบริเวณรากที่ถูกราเข้าทำลายจะปรากฏเส้นใยสีขาวบางเจริญปกคลุม เกาะติดแน่นกับผิวราก ลักษณะของเส้นใยมีสีขาวปลายแบน เมื่อเส้นใยอายุมากขึ้นจะกลายเป็นเส้นใยกลมทึบสีเหลืองซีด เนื้อไม้บริเวณรากที่เป็นโรคในระยะแรกจะแข็งกระด้างเป็นสีน้ำตาลซีด ในระยะรุนแรง จะกลายเป็นสีครีม หากพบในที่ชื้นแฉะจะอ่อนนุ่ม ในช่วงที่ฝนตกจะมีดอกเห็ดเกิดขึ้นบริเวณโคนต้น หรือ ส่วนรากที่โผล่พ้นดิน ลักษณะดอกเห็ดจะซ้อนกันหลายชั้น ผิวด้านบนสีเหลืองแกมส้ม ขอบสีขาว ส่วนผิวด้านล่างมีสีส้มแดงหรือสีน้ำตาล ถ้าตัดดอกเห็ดตามขวางจะเห็นเส้นใยเป็นสีขาวและชั้นล่างเป็นน้ำตาลแดงชัดเจน อาการที่เกิดขึ้นกับยางพารา คือ ยางพารามีอาการใบเหลือง หรือจุดปื้นเหลืองทั่วบริเวณใบ ใบมีขนาดเล็กลง ไม่มีการแตกยอด น้ำยางไม่ไหล พบเส้นใยสีขาว หรือเหลืองขึ้นบริเวณโคนต้นคล้ายตาข่าย บางต้นพบดอกเห็ดลักษณะคล้ายเห็ดหลินจือ แต่มีขอบดอกสีขาว (http://www.weloveshopping.com/template/a13/show_article.php?qid=70813&shopid=127087) รากดังกล่าวจะเข้าทำลายระบบรากทำให้การดูดซึมน้ำธาตุและอาหารของพืชลดลง ส่งผลให้พืชเกิดอาการแคระแกร็น ผลผลิตลดลง หากเกิดรุนแรงมีผลทำให้ต้นยางยืนต้นตาย (Guyot and Floriz, 2002) โรครากขาวเป็นปัญหาหลักต่อการปลูกยางพาราทำให้เกษตรกรผู้ปลูกยางพาราสูญเสียรายได้และผลผลิต อีกทั้งการใช้สารเคมีในการควบคุมโรครากขาว เช่น propiconazole, hexaconazole, triazole, triadimenol, PCNB, pentachlorophenol (PCP), Phenol (Jayaratne *et al.*, 1997) มีราคาแพงได้ผลในระยะสั้น และต้องใช้ในการควบคุมโรคอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดการดื้อต่อสารเคมีของเชื้อก่อโรคและสารเคมีดังกล่าวยังทำลายจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดิน (Haggag and Mohamed, 2007) ฉะนั้น การควบคุมโดยชีววิธี (biocontrol) อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง หากใช้ได้ผลจะสามารถปฏิบัติได้ง่าย ต้นทุนไม่แพง และเป็นการช่วยอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม

การควบคุมโรคโดยชีววิธี จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไฮโดรฟอรั หรือจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะบางชนิด ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถลดการใช้สารเคมี ลดต้นทุนในการผลิต ตลอดจนช่วยรักษาสภาพแวดล้อมและก่อให้เกิดการเกษตรที่ยั่งยืน

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ที่ก่อโรครากขาวในยางพารา

2. เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด มาประยุกต์ใช้งานจริงบนกระถางปลูกในเรือนทดลอง (SPR; 2555)

3. ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันราคายางและผลิตภัณฑ์จากยางมีราคาสูงมากขึ้นทำให้เกษตรกรนิยมปลูกต้นยางมากขึ้น โดยเฉพาะมีการส่งเสริมให้ปลูกมากขึ้นบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีอัตราการตายของยางพาราที่ปลูกในภาคเหนือและภาคอีสานและปัญหาสำคัญของยางพารา คือ โรคพืช สาเหตุหนึ่งเกิดจากโรครากขาวที่เกิดจาก *R. microsporus* โดยเชื้อราจะเข้าทำลายทางรากและแทงเส้นใยเข้าไปในเนื้อเยื่อ ทำให้การทำงานของเซลล์รากเสียหาย การดูดน้ำดูดอาหารเป็นไปไม่ได้ไม่เต็มที่ การสังเคราะห์แสงลดลง พืชแสดงอาการไม่สมบูรณ์โดยใบไหม้หลังการผลัดใบแต่ละรุ่นมีขนาดเล็กลง ทรงพุ่มเล็กลง ต้นตาย ทำให้ผลผลิตน้ำยางที่ได้ลดลง สำหรับต้นอ่อน ถ้าหากถูกเชื้อทำลายและมีอาการรุนแรง ทำให้ต้นตาย ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีบางชนิด เช่น tridemorph cyproconazole propiconazole และ hexaconazole ในการควบคุมโรครากขาว (สถาบันวิจัยยาง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549) ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาในระยะสั้นเท่านั้นและการใช้สารเคมีต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาว นาน ทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาของโรค ปัจจุบันการศึกษาหาวิธีการควบคุมโรคโดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่างๆ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยในการควบคุมโรคพืช โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อต้นพืช หากใช้ได้ผลสามารถจะนำไปปฏิบัติได้ง่าย ต้นทุนไม่แพง และเป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม การควบคุมโรคโดยชีววิธี (Biocontrol) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้ผลดี โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) โดยการใช้ราและแบคทีเรีย การควบคุมโรคดังกล่าวเน้นการควบคุมโรคที่ทำลายส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดินมากกว่าส่วนของพืชที่ทำลายโดยเชื้อโรคเหนือดินโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ซึ่งมีวิธีควบคุมโรคได้ 4 ลักษณะ คือ

1. การแข่งขัน (Competition) ได้แก่ การแย่งใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครองพื้นที่ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญ หรืออาศัยบริเวณเชื้อปฏิปักษ์ เช่น *Pseudomonas fluorescens* ผลิตสาร siderophore ช่วยในการยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis var tritici* สาเหตุโรค Take all ของข้าวสาลี ทำให้เชื้อราไม่สามารถเข้าทำลายรากของข้าวสาลี ทำให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติและให้ผลผลิตที่ดีขึ้น (Farhan et al., 2010)

2. การทำลายชีวิต (antibiosis) โดยสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติเข้าทำลายเชื้อโรคได้ อาทิเช่น สารพิษ (toxin) H_2O_2 หรือ สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ดังรายงานการใช้ *Agrobacterium radiobacter* K 84 ผลิตสาร bacteriocin ชื่อว่า agrocin 84 ยับยั้งเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สาเหตุโรค crown gall (Glick et al., 1999)

3. การเป็นปรสิต (parasitism) โดยเข้าไปทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น *Erwinia uredinolytica* เข้าทำลาย pedicel สปอร์เชื้อราสนิม (Glick et al., 1999)

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (Induced disease resistance) การชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ในยีนเดียวของ *Colletotrichum magna* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของแตง จะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะเจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิมได้ (Redman et al., 1999)

จากข้อมูลเบื้องต้นจุลินทรีย์ที่ผลิตไซเดอโรฟอรัส (Siderophore producing microorganisms) หรือจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษและสารปฏิชีวนะ หรือจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ จึงเป็นกลุ่มที่น่าสนใจเพื่อใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ที่มีศักยภาพและมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด ร่วมกับการสร้างสารพิษ สารปฏิชีวนะ และสร้างเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ (cell-wall degrading enzymes) เช่น chitinase, β -(1,3)-glucanase รวมทั้งสร้าง cellulase เพื่อย่อยสลายเศษซากพืช ซึ่งเป็นแหล่งอาหารและที่อยู่อาศัยของเชื้อราก่อโรคในดินบางชนิด (Weller, 1988) ไซเดอโรฟอรัส คือสารที่สามารถจับกับธาตุเหล็กที่อยู่บริเวณรอบๆ รากพืช การขาดธาตุเหล็กในดินทำให้เชื้อราโรคพืชไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตสารปฏิชีวนะบางชนิดควบคู่ไปด้วย ทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านทานโรคพืชได้สูง

จากรายงานในต่างประเทศมีการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตไซเดอโรฟอรัสในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น *Pseudomonas putida* ที่สามารถผลิตไซเดอโรฟอรัสได้ในปริมาณมาก ใช้ในการควบคุม *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคในมะเขือเทศ (Ramamoorthy et al., 2002) *P. aeruginosa* สามารถป้องกัน damping off จาก *Phythium* sp. (Tambong and Hoftte, 2001) *P. fluorescens* สามารถสังเคราะห์ hydrogen cyanide ที่ยับยั้งการเจริญของ *Thielaviopsis basicola* ซึ่งเป็นสาเหตุโรค black root ในยาสูบ (Ramette et al., 2003) *Cladosporium wernneckii*, *Burkholderia cepacia*, *P. solanacearum* สามารถย่อยสลายสารประกอบ fusaric acid ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหายในพืช หลังจากถูกทำลายโดย *Fusarium* (Ramamoorthy et al., 2001) นอกจากนี้จุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Bacillus subtilis* BACT-D ใช้ในการควบคุม damping off จาก *Phythium aphanidermatum* ในมะเขือเทศ *Burkholderia cepacia* A3R ควบคุมโรครากเน่าจาก *F. graminearum* ในข้าวสาลี *P. fluorescens* VO61 ควบคุมโรครากเน่าจาก *Pythium ultimum* และ *Rhizoctonia solani* ในข้าว และ *P. putida* ควบคุมโรครากเน่าจาก *F. oxysporum* sp. *raphani* ในหัวผักกาด (Glick et al., 1999)

สำหรับในประเทศไทยมีงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์น้อยมากในการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตไซเดอโรฟอรัสในการควบคุมโรคพืช เช่น การใช้ *Bacillus* sp. ในการควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma harzianum*) ของเห็ดหูหนู (พรศิลป์ และวุฒิชัย, 2551) ประกอบกับในขณะนี้ยังไม่มีหัวเชื้อ PGPR ที่ผลิตและใช้ในเชิงการค้าภายในประเทศไทย แต่มีรายงานการใช้ PGPR เป็นหัวเชื้อเชิงการค้าในต่างประเทศแล้วดังสรุปในตารางที่ 1 และมีรายงานการทดสอบและทดลองใช้ *Azotobacter* spp. และ *Azospirillum* spp. เป็นหัวเชื้อเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืชภายในประเทศไทยแล้วแต่ยังไม่มีผลการทดลองใช้ในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษา PGPR ที่สามารถนำไปใช้ได้ดีในเชิงพาณิชย์และการผลิตเชิงการค้า

จากความรู้และข้อมูลผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น การควบคุมโรคพืชทางชีววิธีโดยการพัฒนาจุลินทรีย์ปฏิกิริยาให้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้จริงเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี และจุลินทรีย์ปฏิกิริยาสามารถใช้ได้หลากหลายวิธีเทียบเท่ากับการใช้สารเคมี ตั้งแต่การคลุกเมล็ดก่อนปลูก การผสมเชื้อกับวัสดุปลูก และการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยลงในดินและบนพืช (จิรเดช และคณะ, 2546) การควบคุมโรครากขาวให้มีประสิทธิภาพสูงโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิกิริยาคือการควบคู่กับการป้องกันและกำจัดโรครากขาวโดยวิธีอื่นๆ เช่น ไม่ควรใช้จุลินทรีย์ปฏิกิริยาร่วมกับสารเคมีปราบศัตรูพืช การควบคุมและดูแลเรื่องความ

เป็นกรดต่าง (pH 5.8-6.3) ของดิน เพื่อเหมาะต่อจุลินทรีย์ปฏิบัติต่อโรครากขาว และ ป้องกันไม่ให้พืชเกิดสภาวะเครียด ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้พืชอ่อนแอ เกิดโรครากขาว การใส่ปุ๋ยเคมีร่วมกับธาตุอาหารรองและอาหารเสริม ทำให้ดินได้รับธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองที่เพียงพอ ทำให้พืชแข็งแรง การเตรียมพื้นที่ปลูกให้ปลอดโรค หลังการเตรียมดินควรปลูกพืชคลุมดินตระกูลถั่ว เพื่อปรับสภาพดินให้เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดินบางชนิด และ การใส่จุลินทรีย์ปฏิบัติรอกันหลุมก่อนปลูกพืชสามารถลดการแพร่เชื้อได้ การใช้จุลินทรีย์ปฏิบัติป้องกันการทำลายของเชื้อโรคอย่างต่อเนื่อง ทำให้จุลินทรีย์ปฏิบัติที่ใช้ได้มีโอกาสสัมผัสกับรากพืชก่อนที่จะเชื้อโรคจะเข้าทำลายจึงเป็นวิธีที่ดี และสามารถควบคุมการก่อโรครากขาวได้

การประยุกต์ใช้ PGPR จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรอินทรีย์ เนื่องจาก PGPR เป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ มีคุณสมบัติช่วยปรับปรุงคุณภาพดินเพิ่มความต้านทานให้แก่พืชตามธรรมชาติ และช่วยเพิ่มผลผลิตแก่เกษตรกรได้ในระยะยาว สามารถใช้ทดแทนผลิตภัณฑ์เคมี ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมและไม่ส่งผลเสียต่อเกษตรกรผู้ใช้ นอกจากนี้การใช้ PGPR ได้เข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการทำเกษตรแบบไม่ใช้สารเคมี แต่เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีการใช้หัวเชื้อ PGPR ในการเกษตรในประเทศไทยอย่างจริงจังดังนั้นการวิจัยเกี่ยวกับการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อที่จะเพิ่มความมั่นใจในการใช้ PGPR ในระบบการเกษตรที่แท้จริงนั่นเอง

4. วิธีการ

4.1 การเก็บตัวอย่างโรคและการแยกเชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา

เก็บตัวอย่างยางพาราที่เป็นโรครากขาวจาก *R. microporus* ทำการแยกเชื้อสาเหตุโดยวิธี transplanting บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยการตัดชิ้นส่วนของรากที่เป็นโรค ฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วยการแช่ในสารละลายคลอริก 10% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้งและวางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นตัดส่วนปลายของเส้นใยวางลง PDA อีกครั้ง และเก็บในอาหาร PDA slant เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุ

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นทำ slide culture โดยการตัดชิ้นส่วน PDA จากขอบโคโลนีเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 5x5 มิลลิเมตร ปิดทับด้วย cover slip นำ slide culture วางในจานเลี้ยงเชื้อ ให้ความชื้นโดยใช้สำลีชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำ cover slip ย้อมด้วย lactophenol cotton blue และศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิบัติ

4.3.1 ความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ

สุมตัวอย่างดินจากแปลงปลูกยางพารา โดยขุดลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร (Kochutheresiamma et al., 1988) จดละประมาณ 100 กรัม จากนั้น นำมาแยกจุลินทรีย์ปฏิบัติที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ

โดยทำการ ตักดิน 1 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสมและ แยกเชื้อจากตัวอย่างดินโดยเทคนิค spread plate บนอาหาร King'B medium (KB) (Farah *et al.*, 2006) บ่มใน อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน จุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารดังกล่าว แสดงคุณสมบัติสามารถผลิต สารปฏิชีวนะ ทำการเก็บเชื้อ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.3.2 ความสามารถในการผลิตไซโตโรฟอรัส

นำจุลินทรีย์จาก Stock culture มาทดสอบความสามารถในการผลิตไซโตโรฟอรัส โดยการ เพาะเลี้ยงบนอาหาร Chrome Azurole S (CAS) (Alexander and Zuberer, 1991) บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน จุลินทรีย์ที่แสดงลักษณะวงใสบนอาหารดังกล่าว คือจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซโตโร ฟอรัส ทำการเก็บเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.3.3 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำจุลินทรีย์จาก Stock culture มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการ เพาะเลี้ยงบนอาหาร Carboxy Methyl Cellulose (CMS) บ่มที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน ทดสอบ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการรดด้วย 1% methyl red (Cattelan *et al.*, 1999) ทิ้งไว้ 5 นาที และ ล้างออกด้วยสารละลาย NaCl หลายๆครั้ง จนสีส่วนเกินหลุดออกทั้งหมด จุลินทรีย์ที่แสดง ลักษณะวงใสบนอาหารดังกล่าว คือจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ทำการเก็บเชื้อเพื่อใช้ในการ ศึกษาต่อไป

4.3.4 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

นำจุลินทรีย์จาก Stock culture มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยการ เพาะเลี้ยงบนอาหาร Chitin agar (Sahoo *et al.*, 1999) บ่มที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน จุลินทรีย์ที่ แสดงลักษณะวงใสบนอาหารดังกล่าว คือจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส ทำการเก็บเชื้อเพื่อใช้ในการ ศึกษาต่อไป

4.3.5 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส

นำจุลินทรีย์จาก stock culture มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส โดยการ เพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 1 loop ผสมกับสารละลาย 3 % H₂O₂ ปริมาตร 50 μ L บนแผ่นสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที สังเกตการเกิดฟองก๊าซ แสดงผลคือ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส

4.4 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรค

Primary Screening

นำ Cork borer ที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะขึ้นรู้นของ *R. microporus* วางในจานเพาะเชื้อตรงจุดศูนย์กลาง จากนั้นถ่ายจุลินทรีย์ทดสอบที่ให้ผลบวกในการทดลอง ที่ (4.3.2)-(4.3.5) อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือหลายๆ อย่างลงในจานเลี้ยงราทดสอบ 2 จุด ในแนวจัดรัสโดยห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 1.5 เซนติเมตร และในชุด ควบคุมไม่มีการวางแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง การเจริญ โดยการคำนวณจาก

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (Percent inhibition of radial growth-PIRG)

$$\text{PIRG} = (R1-R2)/R1 * 100$$

R1 = ความยาวรังสีของโคโลนีในจานควบคุม

R2 = ความยาวรังสีของโคโลนีในจานทดสอบ

4.5 การระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคที่ให้น้ำผ่านศูนย์กลางของวงใสกว้างที่สุด

นำจุลินทรีย์ที่ให้น้ำผ่านศูนย์กลางวงใสกว้างที่สุดมาระบุชนิดโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีตามที่ระบุใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9^{ed} (Holt *et al.*, 1994)

4.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมด วิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's multiple range ด้วยโปรแกรม SPSS

5. ผลการวิจัย

5.1 การเก็บตัวอย่างโรคและการแยกเชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา

จากการเก็บตัวอย่างเห็ดที่เจริญบริเวณสวนยางพารา และรากบริเวณต้นยางพาราที่ล้มตาย ของเกษตรกร ตำบลทุ่งกล้วย อำเภอภูซาง จังหวัดพะเยา เพื่อใช้ในการแยกเชื้อราก่อโรครากขาว *R. microporus* (ภาพ 1-2) พบว่าดอกเห็ดที่นำมาแยกเชื้อราก่อโรค จะมีสีน้ำตาลแดงลักษณะคล้ายเห็ดหลินจือ บางชนิดดอกเห็ดมีสีดำปนขาวบริเวณขอบ ซึ่งทำการแยกเชื้อสาเหตุโดยวิธี transplanting บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยการตัดชิ้นส่วนของเห็ด และรากต้นยางพาราวางบนอาหาร PDA ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นตัดส่วนปลายของเส้นใยวางลงบนอาหาร PDA อีกครั้ง



ภาพ 1 การโค่นล้มของต้นยางพาราที่สันนิษฐานว่าเกิดการติดเชื้อโรค ของเกษตรกรในจังหวัดพะเยา



ภาพ 2 ดอกเห็ดที่เจริญบริเวณสวนยางพาราซึ่งสันนิษฐานว่าจะเป็สาเหตุของโรครากขาวในต้นยางพารา

จากการทดลองพบว่าไม่สามารถแยกเชื้อราก่อโรครากขาวได้ อาจเนื่องมาจากบริเวณพื้นที่ดังกล่าว ไม่ใช่แหล่งระบาดของโรครากขาว จึงได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราก่อโรครากขาว จาก ดร.นารีรักษ์ นาแก้ว คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งเป็นสายพันธุ์ positive strain ที่ทางอาจารย์ และผู้วิจัยจากสถาบันยางได้แยกมาศึกษาจากพื้นที่ภาคใต้ มาใช้ในการทดลองครั้งนี้แทน

2. การจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุ

จากการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรครากขาว โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อดังกล่าวมีลักษณะของเส้นใยเป็นสีขาว และสร้างสปอร์สีขาว โดยเส้นใยเจริญเติบโตแผ่ขยายโดยรอบจนมองเห็นลักษณะเป็นวงกลมแผ่กระจายออก มีการเจริญแบบ Radial growth สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (ภาพ 3) และเมื่อนำมาตรวจสอบเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเส้นใยมีผนังกันตามขวาง (septate hypha) และอัดตัวกันแน่นเป็นแท่งคล้ายลำต้น (ภาพ 4)



ภาพ 3 การเจริญแบบ Radial growth และลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *R. microsporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน



ภาพ 4 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *R. microsporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 400X

3. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

3.1 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินบริเวณสวนยางพาราในพื้นที่จังหวัดพะเยา ตัวอย่างละประมาณ 50-100 กรัม จำนวน 6 จุดตัวอย่าง เพื่อใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ซึ่งลักษณะพื้นที่ปลูกยางพาราของเกษตรกรจะอยู่บริเวณเชิงเขา (ภาพ 5) โดยดินที่นำมาใช้แยกเชื้อจุลินทรีย์จะมีลักษณะร่วนซุย มีเศษใบไม้ทับถมกัน (ภาพ 6)



ภาพ 5 บริเวณพื้นที่ปลูกต้นยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดพะเยา และพื้นที่ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างดิน เพื่อใช้ในการทดลอง



ภาพ 6 ตัวอย่างดินบริเวณรอบรากต้นยางพาราที่ทำการฝังให้แห้งเป็นเวลา 7 วัน

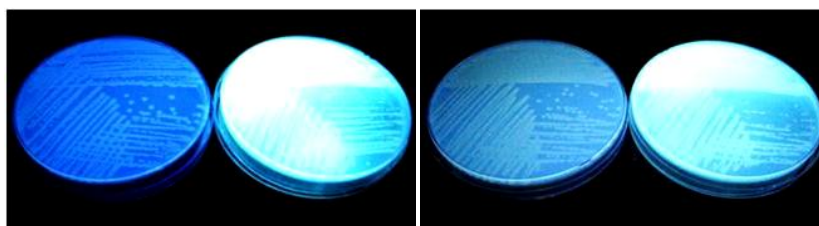
3.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินและลักษณะของจุลินทรีย์ที่แยกได้

ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างจากดินบริเวณรอบรากต้นยางพารา โดยเทคนิค spread plate ลงบนอาหาร King' B medium (ภาพ 7) โดยดินที่นำมาแยกมีค่า pH ระหว่าง 5.6-7.1 พบว่าสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน ได้ทั้งหมดจำนวน 78 ไอโซเลท เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียจำนวน 45 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซีทจำนวน 33 ไอโซเลท



ภาพ 7 การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ บนอาหาร King' B medium ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-5 วัน

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย ที่แยกได้จำนวน 45 ไอโซเลท โดยนำมาตรวจสอบการเรืองแสง ส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความเข้มแสง 365 นาโนเมตร ซึ่งทำให้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีการเรืองแสงเบื้องต้น อยู่ในกลุ่ม *Pseudomonas* sp. พบว่าจุลินทรีย์ทดสอบมีการเรืองแสงจำนวน 27 ไอโซเลท (ภาพ 8-9)

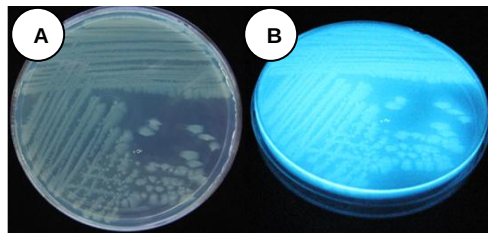


ภาพ 8 การเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความเข้มแสง 365 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ



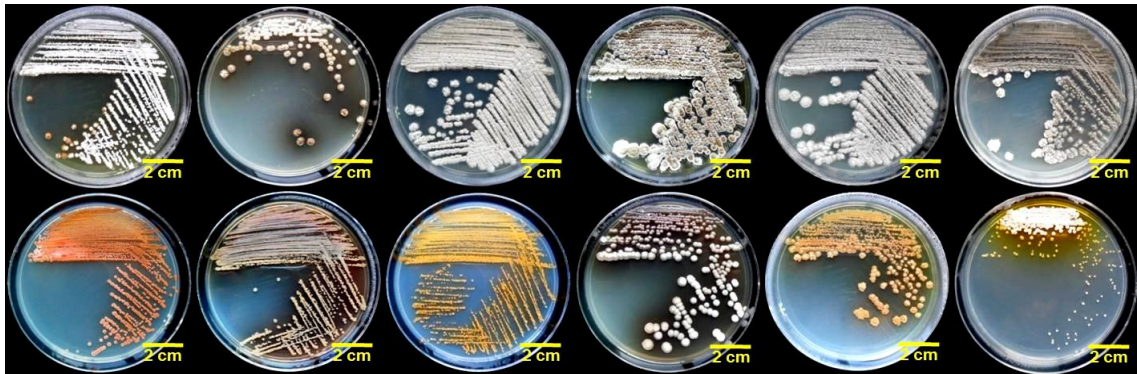
ภาพ 9 ลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas* sp. ส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความเข้มแสง 365 นาโนเมตร จะเกิดการเรืองแสงของเชื้อ

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงลงบนอาหาร CAA พบว่ามีจำนวน 19 ไอโซเลท สามารถเจริญบนอาหาร CAA ได้ และเรืองแสงเมื่อนำมาส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความเข้มแสง 365 นาโนเมตร (ภาพ 10)



ภาพ 10 การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย บนอาหาร CAA (A), ไม่ได้ส่องดูภายใต้แสง UV (B), เมื่อส่องดูภายใต้แสง UV ที่ความเข้มแสง 365 นาโนเมตร

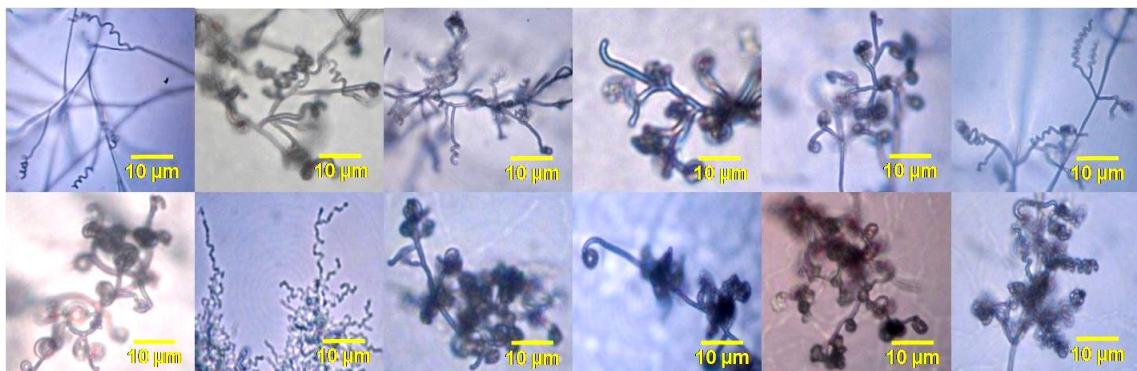
ผลการนำแอดิโนไมซีทที่แยกได้จำนวน 33 ไอโซเลท มาศึกษาทางสัณฐานวิทยาควบคู่ไปกับการทำ chemotaxonomy พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม streptomycetes จำนวน 19 ไอโซเลท (57.6%), อยู่ในกลุ่ม non-streptomycetes จำนวน 10 ไอโซเลท (30.3%) และที่ยังไม่สามารถบ่งบอกชนิดได้ จำนวน 4 ไอโซเลท (12.1%) เมื่อนำมาตรวจสอบสีของเส้นใยใต้อาหาร (substrate mycelium), เส้นใยเหนืออาหาร (aerial mycelium) และ รงค์วัตถุสี (soluble pigment) พบว่าจะมีลักษณะของสีที่แตกต่างกันออกไป ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของแอดิโนไมซีสได้ (ภาพ 11) สำหรับลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบลักษณะแตกต่างทั้งขนาด และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น โคโลนีเป็นลอน ปุยฟูเหมือนผงแป้ง หยักย่น คล้ายขนสัตว์ บางไอโซเลทมีการสร้างหยดน้ำออกมาด้วย เป็นต้น (ภาพ 12) เมื่อตรวจสอบลักษณะของเส้นใย โดยทำการย้อม แบบ simple stain ด้วยสีย้อม methylene blue และนำมาตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการจัดเรียงตัวของเซลล์ และสปอร์ พบว่ามีลักษณะของสปอร์ที่แตกต่างกันออกไป บางไอโซเลท สปอร์บิดเป็นเกลียวคล้ายสปริง สปอร์ต่อกันเป็นลูกโซ่ เส้นใยเรียบขนาดของเส้นใยไม่สม่ำเสมอ มีแขนงแตกออกเป็นกิ่งก้านสาขา และเส้นใยสม่ำเสมอสร้างสปอร์ (ภาพ 13)



ภาพ 11 การเจริญของแอคติโนมัยซีทตัวอย่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 12 ลักษณะโคโลนีเตี๋ยวของแอคติโนมัยซีทตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 medium บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ



ภาพ 13 ลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใย และสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 400X ของแอคติโนมัยซีทตัวอย่าง ด้วยวิธีการย้อมแบบ simple strain ด้วยสีย้อม methylene blue

3.3 ความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอร์

จากการนำจุลินทรีย์ใน Stock culture ทั้งหมดจำนวน 78 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอร์ โดยการเพาะเลี้ยงลงบนอาหาร Chrome Azurole S Agar (CAS) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 7-14 วัน ในที่มีด พบว่ามีจำนวน 17 ไอโซเลท (21.8%) สามารถเจริญและเกิดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CAA และ สามารถเปลี่ยนสีของอาหาร CAA จากสีน้ำเงิน เป็นสีอื่นๆ ได้ ความสามารถในการเกิดวงใส และการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงถึงความสามารถในการผลิตสารในกลุ่มสร้างไซเดอโรฟอร์

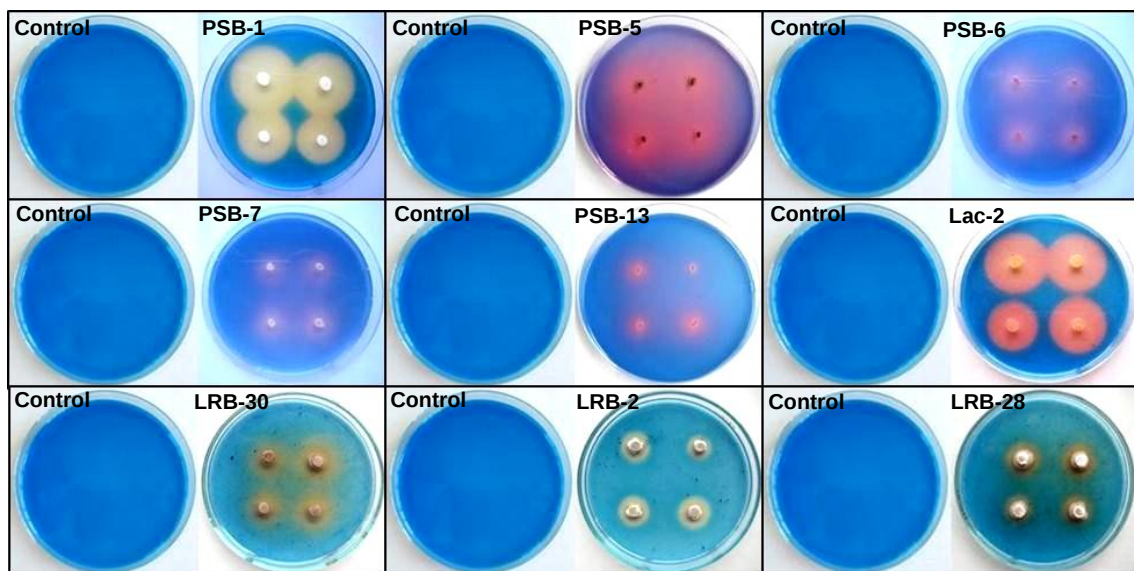
ได้ โดยในชุดการทดลองพบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลท PSB-1 ให้ค่าการผลิตไซเดอโรฟอร์ที่สูงที่สุด โดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 31 mm แสดงดังตาราง 1 และภาพ 14

ตาราง 1 ผลเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตการสร้างไซเดอโรฟอร์ของแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีทจำนวน 17 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) ^a	ไอโซเลท	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) ^a
PSB-1	31±0.5 ^a	Lac-2	26±0.3 ^b
PSB-5	22±0.1 ^c	Lac-17	7±0.1 ^{gh}
PSB-6	10±0.1 ^{fg}	Lac-19	6±0.1 ^h
PSB-7	10±0.2 ^{fgh}	LRB-5	13±0.3 ^{def}
PSB-12	12±0.1 ^{def}	LRB-28	14±0.1 ^{de}
PSB-13	7±0.2 ^{gh}	LRB-29	14±0.2 ^{de}
PSB-15	1.1±0.2 ^{ef}	LRB-30	13±0.1 ^{def}
PSB-17	15±0.1 ^d	LRB-33	11±0.2 ^{def}
PSB-21	19±0.1 ^c	<i>R. microporus</i> ^b	ND
<i>R. microporus</i> ^b	ND		

^a ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการทดลอง 3 ซ้ำ), ^b ชุดควบคุม ND = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ อักษรที่กำกับด้านขวาของแต่ละตัว เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ ทดสอบโดย Duncan's multiple range



ภาพ 14 ความสามารถในการสร้างไซเดอโรฟอร์ของเชื้อแบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินรอบรากต้นยางพารา บนอาหาร CAS บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-14 วัน

3.4 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ผลการทดลองเพื่อตรวจสอบหาเอนไซม์เซลลูเลส ของไอโซเลททั้งหมดที่แยกได้ มาทดสอบบนอาหาร Carboxy methyl cellulose agar (CMC) เพื่อดูการสร้างวงใสของจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่าจุลินทรีย์

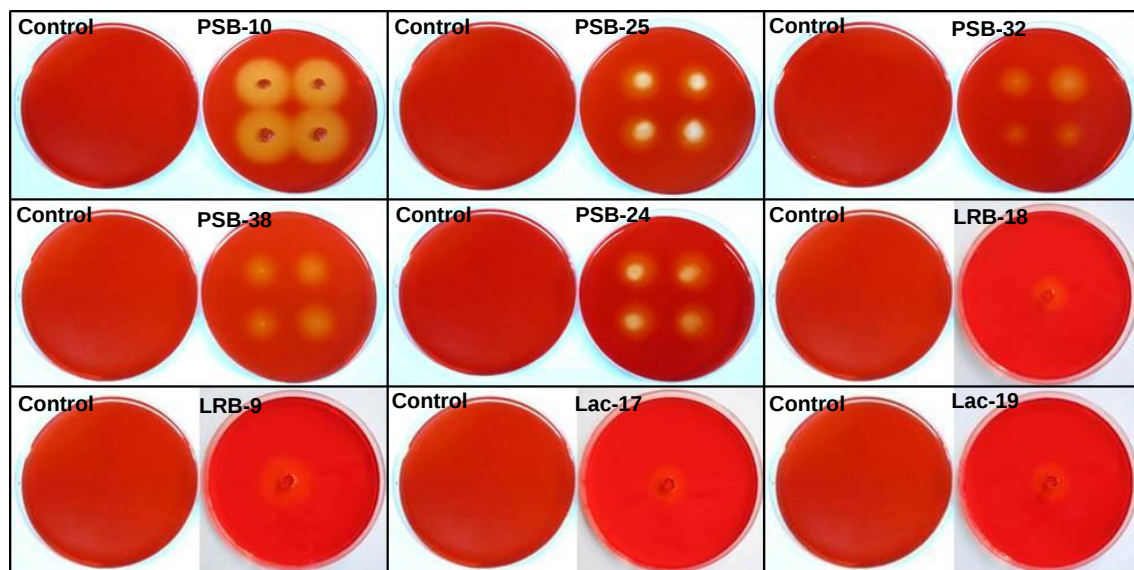
ทดสอบ สามารถเกิดวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังกล่าวได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลท (28.2%) ลักษณะการเกิดวงใส แสดงถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อย่อยสลาย cellulose ที่ใช้เป็นซับสเตรท โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลท และแอคติโนมัยซีทจำนวน 10 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ไอโซเลท PSB-10 ให้ค่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด โดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 30 mm แสดงดังตาราง 2 และภาพ 15

ตาราง 2 ผลเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของจุลินทรีย์ 22 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) ^a	ไอโซเลท	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) ^a
LRB-7	16±0.1 ^{fg}	PSB-3	6±0.1 ⁱ
LRB-9	27±0.1 ^b	PSB-10	30±0.1 ^a
LRB-20	16±0.1 ^{hi}	PSB-24	17±0.1 ^{fg}
LRB-33	18±0.1 ^{defg}	PSB-25	16±0.1 ^{fg}
Lac-1	17±0.1 ^{efgh}	PSB-26	17±0.1 ^{efgh}
Lac-2	9±0.1 ^k	PSB-28	19±0.1 ^{def}
Lac-17	22±0.2 ^c	PSB-31	20±0.2 ^{de}
Lac-18	16±0.1 ^{fg}	PSB-32	10±0.3 ^{jk}
Lac-19	20±0.1 ^{cd}	PSB-37	16±0.3 ^{hi}
Lac-23	12±0.1 ^j	PSB-38	16±0.1 ^{ghi}
PSB-1	6±0.1 ⁱ	PSB-42	14±0.2 ⁱ
<i>R. microporus</i> ^b	ND	<i>R. microporus</i> ^b	ND

^a ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการทดลอง 3 ซ้ำ), ^b ชุดควบคุม ND = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

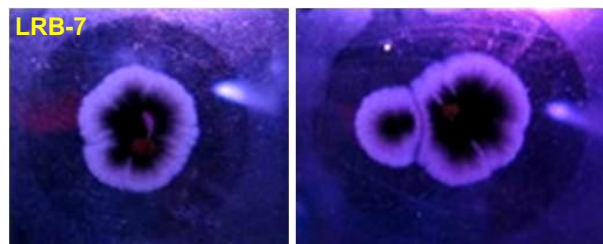
หมายเหตุ อักษรที่กำกับด้านขวาของแต่ละตัว เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ ทดสอบโดย Duncan's multiple range



ภาพ 15 แสดงตัวอย่างความสามารถของแบคทีเรีย และแอคติโนมัยซีทในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส สังเกตจากบริเวณใสรอบโคโลนี เมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMC บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน และ เททับด้วยสี Congo Red (1%)

3.5 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Chitin agar บ่มที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน จากการทดลองพบว่า มีจำนวน 15 ไอโซเลท (19.2%) สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ โดยในชุดการทดลองพบว่า จุลินทรีย์ไอโซเลท LRB-7 ให้ค่าการผลิตไคตินเนส ได้สูงที่สุด โดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 27 mm แสดงดังตาราง 3 และภาพ 16



ภาพ 16 ความสามารถของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท LRB-7 ในการเกิดวงใสบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Chitin agar บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3-5 วัน

ตาราง 3 ผลเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ปรากฏบนอาหาร Chitin agar ของเชื้อแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท จำนวน 15 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) ^a	ไอโซเลท	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร) ^a
LRB-1	23±0.2 ^b	PSB-5	15±0.1 ^{ef}
LRB-7	27±0.1 ^a	PSB-7	16±0.2 ^e
LRB-9	20±0.1 ^{bcd}	PSB-13	18±0.3 ^{de}
LRB-11	22±0.1 ^{bc}	PSB-17	12±0.1 ^{fg}
LRB-14	11±0.2 ^g	PSB-20	18±0.2 ^{de}
Lac-17	12±0.1 ^g	PSB-24	19±0.3 ^{cd}
Lac-19	11±0.2 ^g	PSB-28	12±0.2 ^{fg}
Lac-23	13±0.3 ^{fg}	<i>R. microporus</i> ^b	ND
<i>R. microporus</i> ^b	ND		

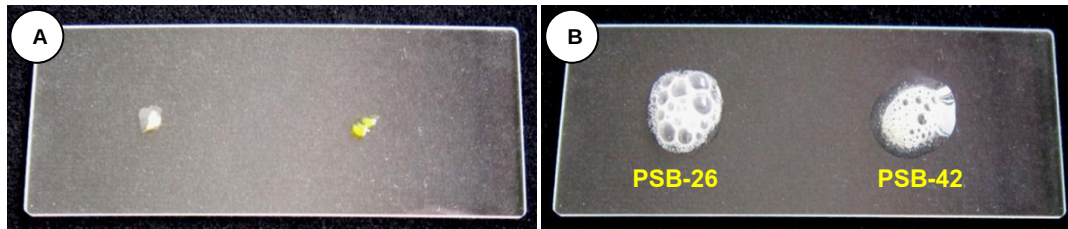
^a ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการทดลอง 3 ซ้ำ), ^b ชุดควบคุม ND = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ อักษรที่กำกับด้านขวาของแต่ละตัว เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ ทดสอบโดย Duncan's multiple range

3.6 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส

การทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์แคตาเลส พบว่ามีจำนวน 30 ไอโซเลท (38.5%) เกิดฟองแก๊สขึ้นเมื่อหยดด้วยสารละลาย 3% H_2O_2 (ภาพ 17) จัดจำแนกเป็นแบคทีเรีย 16 ไอโซ

เลข ได้แก่ (PSB-1, PSB-2, PSB-3, PSB-4, PSB-7, PSB-9, PSB-10, PSB-13, PSB-14, PSB-17, PSB-18, PSB-26, PSB-29, PSB-37, PSB-41 และ PSB-42) แอคติโนมัยซีท 14 ไอโซเลท ได้แก่ (LRB-3, LRB-6, LRB-12, LRB-14, LRB-15, LRB-17, LRB-18, LRB-19, LRB-20, LRB-24, LRB-25, LRB-30, Lac-17 และ Lac-19)



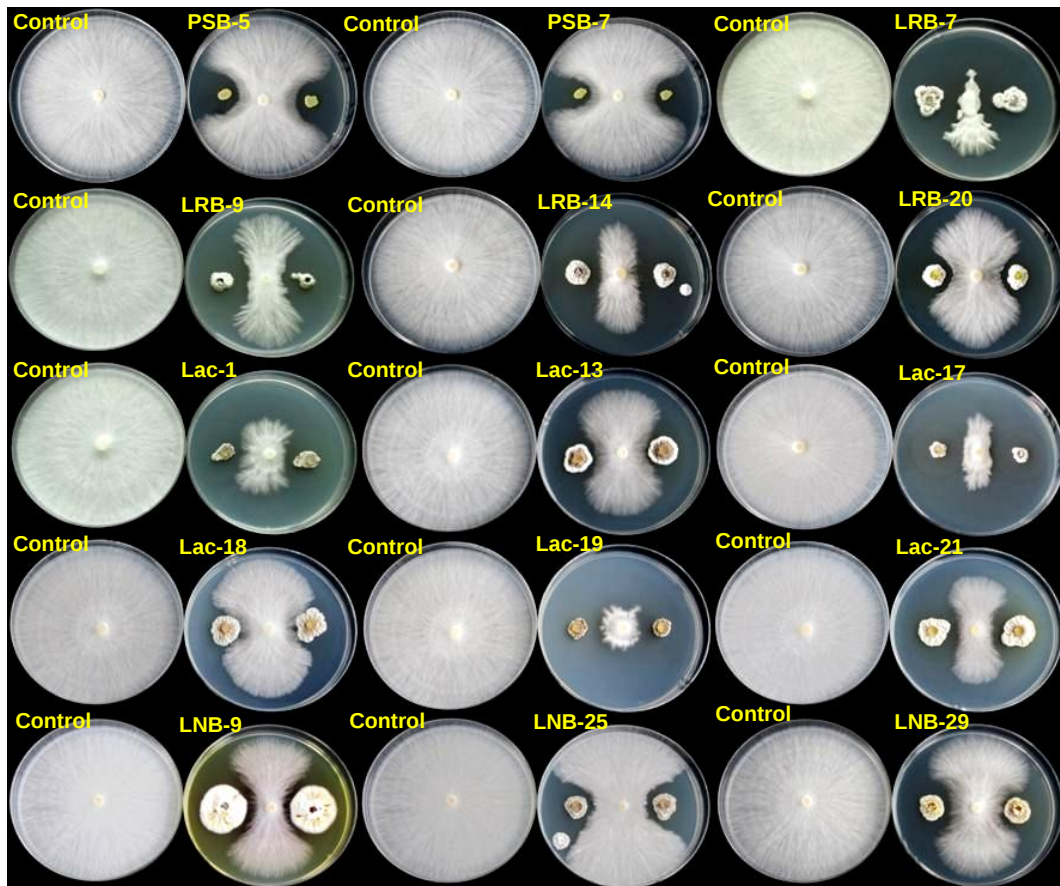
หมายเหตุ A, ชุดควบคุม; B, ชุดทดสอบ

ภาพ 17 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคตาเลสของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อหยดด้วยสารละลาย 3% H_2O_2 ปริมาตร 50 μ l จะปรากฏฟองแก๊ส

4. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรค (Primary Screening)

ในการแยกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่ได้จากบริเวณรอบรากยางพารา สามารถแยกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ได้ทั้งหมด 78 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *R. microporus* โดยใช้วิธี dual culture พบว่าจุลินทรีย์ PGPR จำนวน 24 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *R. microporus* ได้ดีในวันที่ 5 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 37.3-84.1% และพบว่าแอคติโนมัยซีทไอโซเลท Lac-17 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด (84.1%) รองลงมาคือ แอคติโนมัยซีทไอโซเลท LRB-14 (81.7%) และแอคติโนมัยซีทไอโซเลท Lac-19 (80.2%) ตามลำดับ (ตาราง 5 และภาพ 18) จึงทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรครากขาวในระดับกระถาง (ปี 2555) ต่อไป

เมื่อทำการศึกษาลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่ถูกทดสอบด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR พบว่าเส้นใยจะมีความผิดปกติไปจากเดิม คือเส้นใยจะหดสั้น เหี่ยว รวมตัวกันเป็นกระจุก ไม่เจริญแผ่ออกไป เมื่อเทียบกับเส้นใยของเชื้อราปกติ (ภาพ 19)



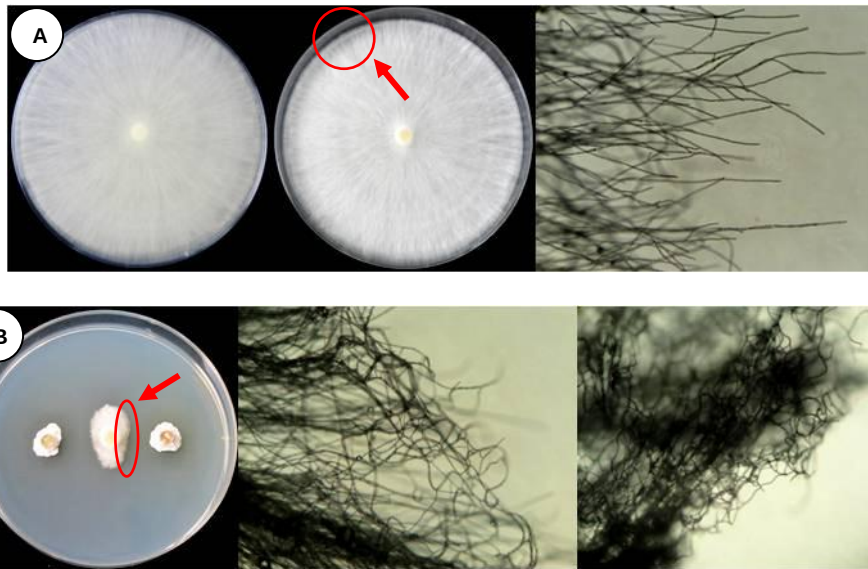
ภาพ 18 ผลการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช *R. microporus* โดยเชื้อแบคทีเรียและแอคติโนมัยซีท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5-7 วัน

ตาราง 4 ผลเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *R. microporus* โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จำนวน 24 ไอโซเลท โดยวิธีการทดสอบแบบ dual culture bioassay ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%) ^a	ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%) ^a
<i>R. microporus</i>		<i>R. microporus</i>	
Lac-1	60.3±1.4 ^d	LNB-9	56.3±1.4 ^{de}
Lac-13	57.9±3.6 ^d	LNB-25	46.8±1.4 ^{fgh}
Lac-17	84.1±1.4 ^a	LNB-29	50.8±3.6 ^{ef}
Lac-18	50.8±5.0 ^{ef}	PSB-1	56.3±2.7 ^{de}
Lac-19	80.2±1.4 ^a	PSB-5	62.7±1.4 ^{cd}
Lac-21	69.0±2.4 ^b	PSB-6	57.1±2.4 ^{de}
Lac-23	42.1±3.6 ^{hi}	PSB-7	61.1±1.4 ^d
LRB-7	79.4±2.7 ^a	PSB-13	50.8±3.6 ^{ef}
LRB-9	70.6±2.7 ^b	PSB-16	46.0±7.7 ^{fgh}
LRB-14	81.7±3.6 ^a	PSB-24	37.3±3.6 ⁱ
LRB-20	67.5±2.7 ^{bc}	PSB-34	42.9±4.1 ^{hi}
LRB-34	43.7±6.0 ^{gh}	PSB-38	49.2±5.0 ^{fg}
<i>R. microporus</i> ^b	ND	<i>R. microporus</i> ^b	ND

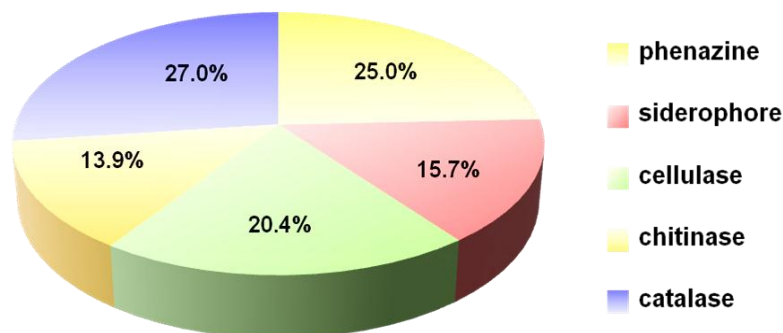
^a ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการทดลอง 3 ซ้ำ), ^b ชุดควบคุม ND = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

หมายเหตุ อักษรที่กำกับด้านขวาของแต่ละตัว เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ ทดสอบโดย Duncan's multiple range



ภาพ 19 ลักษณะเส้นใยของเชื้อราก่อโรครากขาวที่ผลิตปกติไปจากชุดควบคุม โดยการวาง dual culture test กับ *Streptomyces* sp. Lac-17 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5-7 วัน

หมายเหตุ (A) ชุดควบคุม **(B)** ชุดการทดลอง

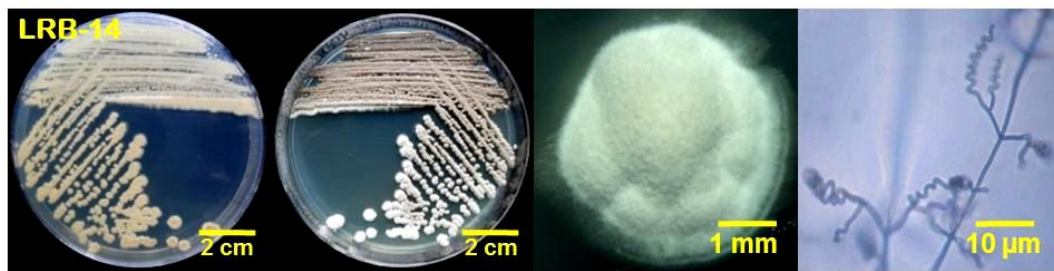


ภาพ 20 ผลความสามารถของจุลินทรีย์ PGPR ในการผลิตสารควบคุมรา *R. microporus* เมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์

5. การระบุชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่คัดเลือกเพื่อทดสอบการยับยั้งราก่อโรคในระดับกระถาง (SPR; ปี 2555)

ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าจุลินทรีย์ที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรครากขาวได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลท Lac 17, ไอโซเลท LRB 14 และไอโซเลท Lac 19 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลท จัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีททั้งหมด เมื่อทำการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวจะลักษณะเด่นคือ โคลนีเป็นผงแป้ง เมื่อตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยบิดเป็นเกลียว มีการแตกแขนงออกมาจากแกน

ลักษณะของสีของเส้นใย จะเป็นสีน้ำตาล ไม่มีการสร้างรงควัตถุสี (ภาพ 21-23) ผลการวิเคราะห์ DAP ที่ เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ พบว่าเป็นแบบ LL-DAP จึงจัดจำแนกอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp.

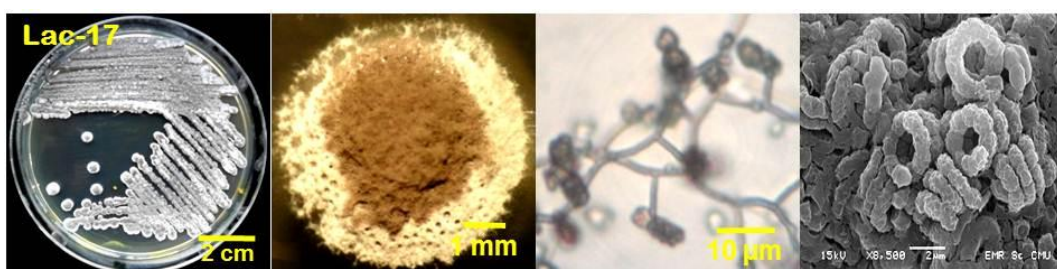


ภาพ 21 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของ *Streptomyces* sp. LRB-14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 medium บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 22 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของ *Streptomyces* sp. Lac-19 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 medium บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

สำหรับไอโซเลท Lac 17 ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อรา *R. microporus* ได้สูงที่สุดนั้น เมื่อทำการ เพาะเลี้ยงลงบนอาหารชนิดต่างๆ พบว่าเจริญได้ดีในอาหาร ISP2, ISP5 และ ISP7 แต่พบการเจริญน้อย เมื่อเลี้ยงใน ISP9 (ตาราง 5) เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) จะพบว่าสปอร์มีการเรียงตัวกันเป็นสาย บิดเป็นเกลียว มีผิวสปอร์ขรุขระ (ภาพ 23)



ภาพ 23 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของ *Streptomyces* sp. Lac-17 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 medium บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วันและ ลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดง ลักษณะสปอร์บิดเป็นเกลียว และมีผิวสปอร์ขรุขระ

ตาราง 5 ลักษณะสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติในการเจริญบนอาหารชนิดต่างๆ ของ *Streptomyces* sp. Lac-17 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *R. microporus*

อาหาร	<i>Streptomyces</i> sp. Lac-17			
	การเจริญ	เส้นใยเหนืออากาศ	เส้นใยใต้อาหาร	สีรงควัตถุ
ISP No. 1	ปานกลาง	Whitish gray	Pale brown	-
ISP No. 2	ดีมาก	Dark Yellowish Brown	Dark Yellow	-
ISP No. 3	ปานกลาง	Dark Grayish Yellowish Brown	Grayish Yellowish Brown	-
ISP No. 4	ปานกลาง	Grayish Yellowish Brown	Light Grayish Yellowish Brown	-
ISP No. 5	ดีมาก	Light Grayish Yellowish Brown	Brilliant Greenish Yellow	-
ISP No. 6	ปานกลาง	Light Grayish Yellowish Brown	Moderate Olive Brown	-
ISP No. 7	ดีมาก	Dark Olive Brown	Gray brown	-
ISP No. 8	ปานกลาง	Dark Grayish Yellow	Brilliant Greenish Yellow	-
ISP No. 9	น้อย	None	Grayish Yellow	-
Hickey–Tresner	ปานกลาง	Dark Grayish Yellowish Brown	Grayish Yellowish Brown	-
Nutrient agar	ปานกลาง	Light Grayish Yellowish Brown	Grayish Yellow	-
PDA	ปานกลาง	Grayish Yellowish Brown	Dark Grayish Yellow	-

* สีอ้างอิงตามหนังสือเทียบมาตรฐาน: Manual of Color Names (1987)

หมายเหตุ ISP No. 1, Tryptone-yeast extract agar; ISP No. 2, yeast extract-malt extract agar; ISP No. 3, oatmeal agar; ISP No. 4, inorganic salts-starch agar; ISP No. 5, glycerol-asparagine agar; ISP No. 6, peptone-yeast extract-iron agar; ISP No. 7, tyrosine agar; ISP No. 8, nitrate medium; ISP No. 9, carbon utilization agar

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพาราจากแหล่งปลูกยางใหม่ บริเวณพื้นที่ภาคเหนือตอนบน พบว่าไม่สามารถแยกเชื้อราก่อโรคได้ อาจเนื่องมาจากบริเวณพื้นที่สวนยางที่ไปเก็บตัวอย่าง ไม่ใช่แหล่งของโรค จึงทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อราก่อโรคได้ เพราะการระบาดของโรครากขาวนั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมหลายประการ เช่น ลักษณะของดินต้องเป็นดินทรายหรือดินร่วน ค่า pH ต้องอยู่ระหว่าง 5-6 มีปริมาณฝนมากกว่า 4,000 มิลลิเมตรต่อปี และมีปริมาณน้ำในดิน 80-90% จึงจะเหมาะสมต่อการเกิดโรค (Soekirman, 2006) และประกอบกับบริเวณพื้นที่ปลูกยางทางภาคเหนือมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อราก่อโรครากขาว จึงทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อราก่อโรคได้ สำหรับการคัดแยกจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR จะเน้นไปที่กลุ่ม *Pseudomonas* และ *Streptomyces* เพราะส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่สร้างสาร antibiotic ยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ และจากผลการทดสอบความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของ PGPR ต่อ เชื้อรา *R. microporus* พบว่า PGPR แต่ละไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคต่างกัน เนื่องจากจุลินทรีย์ PGPR แต่ละไอโซเลทมีวิธีการยับยั้ง *R. microporus* ที่แตกต่างกัน เนื่องจากความหลากหลายของกลุ่ม PGPR สามารถสร้างกลไกการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) การผลิตเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของราก่อโรค (Cell-wall degrading enzyme) การผลิตไซเดอโรฟออร์ (Siderophore) และการผลิตสาร metabolites บางชนิดที่มีความสำคัญในการป้องกันโรค (Glick *et al.*, 1999) นอกจากนี้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR มีกลไกการแย่งแย่งอาหาร (competition) โดย PGPR สามารถเจริญและเพิ่มจำนวน

อย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถแก่งแย่งอาหารและเข้าครอบครองบริเวณรากพืชได้รวดเร็วกว่าเชื้อก่อโรค ทำให้เชื้อก่อโรคขาดสารอาหาร และชะงักการเจริญเติบโต (Farhan *et al.*, 2010)

จากการรายงานก่อนหน้านี้ จะเห็นได้ว่าการพัฒนาเชื้อกลุ่มดังกล่าวขึ้นเป็นการค้าแล้วในรูปของ Bioinoculant (Bloemberg and Lugtenberg, 2001) โดยเฉพาะ *Streptomyces griseoviridis* ได้นำมาควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และมาผลิต เป็นสารชีวภัณฑ์ในชื่อการค้า Mycostop® โดยการคลุกเมล็ดก่อนปลูก (Brain and Deborah, 2002) การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ พบว่าแอคติโนมัยซีทในจีนัส *Streptomyces* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรครากขาวได้ดีกว่า แบคทีเรียในจีนัส *Pseudomonas* เนื่องจาก *Streptomyces* เป็นจุลินทรีย์ที่ผลิต สารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ได้มากกว่า 70 % และสามารถผลิตเอนไซม์กลุ่ม hydrolysis ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้ง แบคทีเรีย รา ไวรัส โปรโตซัว และไส้เดือนฝอย เป็นต้น (Ruanpanan *et al.*, 2010) อีกทั้งยังมีความสำคัญในการควบคุมโรคด้วยชีววิธีด้วย เนื่องจากสามารถผลิตสารต่างๆ ได้ เช่น vitamins, alkaloids, plant growth factors, enzymes และ enzymes inhibitors (Shahdi *et al.*, 2004) จึงเป็นที่ยอมรับในการใช้ควบคุมเชื้อราก่อโรคในพืช ตัวอย่างเช่น การใช้ *Streptomyces* เพื่อควบคุมโรค Anthracnose ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Colletotrichum* spp. ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคดังกล่าวได้ดีในสภาพห้องปฏิบัติการ (Intra *et al.*, 2011) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้มีการกล่าวถึงการนำ *Streptomyces* spp. มาใช้ลดความรุนแรงของโรคพืชหลังการเพาะเมล็ดหรือกล้าพืชได้ (Cao *et al.*, 2004; Bressan and Figueredo, 2005; Prapagdee *et al.*, 2008)

การควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชโดยชีววิธี ถึงแม้ว่าจะสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดได้แล้วนั้น แต่เมื่อนำไปใช้งานจริงต้องมีการศึกษาปัจจัยอีกหลายด้านที่มีผลต่อการทำงานของเชื้อ โดยเฉพาะจำนวนหัวเชื้อตั้งต้นในการใช้เป็น biocontrol รวมไปถึงกระบวนการเตรียมหัวเชื้อให้มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานในสภาวะแวดล้อมจริงด้วย

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ PGPR จากดินรอบรากต้นยางพาราโดยส่วนใหญ่เน้นไปที่กลุ่ม *Pseudomonas* และ *Streptomyces* เมื่อนำไอโซเลททั้งหมดมาทดสอบการสร้างไซเดอโรฟออร์ พบว่ามี 17 ไอโซเลท (21.8%) สามารถสร้างไซเดอโรฟออร์ได้ และเมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่ามีจำนวน 22 ไอโซเลท (28.2%) สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ การตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่ามีจำนวน 15 ไอโซเลท (19.2%) ที่สามารถผลิตได้ และผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส พบว่ามีจำนวน 30 ไอโซเลท (38.5%) และเมื่อทดสอบความสามารถการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อ *R. microporus* พบว่า *Streptomyces* sp. Lac-17, *Streptomyces* sp. LRB-14 และ *Streptomyces* sp. Lac-19 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราก่อโรคได้ดีที่สุด 84.1%, 81.7% และ 80.2% ตามลำดับ ดังนั้นจึงทำการคัดเลือก แอคติโนมัยซีทไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาว ไปทดสอบในระดับเรือนทดลองต่อไป (SPR; 2555)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาผลของ *Streptomyces* sp. Lac-17, *Streptomyces* sp. LRB-14 และ *Streptomyces* sp. Lac-19 ในการยับยั้งการเจริญของ *R. microporus* ในต้นยางพารา เพื่อเกษตรกรสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง
2. ควรมีการศึกษากระบวนการพัฒนาหัวเชื้อเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป โดยการศึกษากระบวนการเตรียมหัวเชื้อ ต้องเตรียมง่าย สะดวก และมีประสิทธิภาพเมื่อนำไปใช้งานในสภาพแวดล้อมจริง
3. ควรพัฒนาชีวภัณฑ์สำเร็จรูปจาก *Streptomyces* sp. Lac-17, *Streptomyces* sp. LRB-14 และ *Streptomyces* sp. Lac-19 เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย จากโครงการวิจัยยางพาราขนาดเล็กลงยางพารา ปี 2554 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

- จิรเดช แจ่มสว่าง, วรณวิไล อินทนู, รวิชัย คุ่มช้าง และ วาริน อินทนา. การควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* โดยใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ชนิดสดคลุกเมล็ดและใส่วัสดุเพาะกล้า. น. 43. รายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 6: 24-27 พฤศจิกายน 2546. โรงแรมโซฟิเทลราชาออคิต จ. ขอนแก่น
- พรศิลป์ สีเผือก และวุฒิชัย สีเผือก. ผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ต่อการควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma harianum*) ของเห็ดหูหนู (*Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc.). *Agricultural Sci. J.*, 2551, 39, 205-208.
- โรคและศัตรูยางพาราที่สำคัญในประเทศไทย. สถาบันวิจัยยาง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549.
- Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fert. Soils*, 1991, 12, 39-45.
- Bloemberg, G.V., and Lugtenberg, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biotecontrol by rhizobacteria. *Curr. Opi. Plant Biol.*, 2001, 4, 343-350.
- Bressan, W., and Figueredo., J.E.F. Biological control of *Stenocarpella maydis* in maize seed with Aatagonistic *Streptomyces* sp. isolates. *J. Phytopathology*, 2005, 153, 623-626.
- Brian, B.M.G. and Deborah, R.F. Biological control of plant pathogens:research, commercialization, and application in the USA.[On-line]. Available from : <http://www.apsnet.org/online/feature/biocontrol/links.html>, 2002.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou., S. Isolatisation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2004, 39, 425-430.

- Cattelan, A.J., Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J. Screening of plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, 1999, 63, 1670-1680.
- Farah, A., Iqbal, A. and Khan, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth-promoting activity. *Microbial. Res.*, 2006, 63, 11-19.
- Farhan, H.F., Hameed, A.T. and Aobad, H.M. The Biological activity of some *Pseudomonas* sp. isolates on growth of three plant pathogenic fungi under incubator conditions. *Adv. Environ. Biol.*, 2010, 4, 53-57.
- Glick, B.R., Pattern, C.L., Holguin, G. and Penrose, D.M. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press. London, 1999, 267.
- Guyot, J. and Floria, A. Comparative study for detecting *Rigidoporus lignosus* on rubber tree. *Crop Protect.*, 2002, 21, 461-466.
- Haggag, W.M. and Mohamed, H.A.A. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *Am-Eurasian J. Sustain. Agric.*, 2007, 1, 7-12.
- Holt, J.G., Kneng, N.R., Sheath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed, Williams and Wikins Co. Baltimore, 1994.
- Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T., Igarashi, Y. and Panbangred, W. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. *BMC Res. Notes.*, 2011, 4, 98.
- Jayarathne, R., Jayasinghe, C.K. and Wettasinghe, P.C. Economical and less hazardous fungicide for management of white root disease. *Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka*, 1997, 80, 20-29.
- Kochuthresiamma, J., Kothandaraman, R. and Jacob, M. Actinomycetes population of rubber growing soils and its antagonistic activity against *Phytophthora meadii* (Mc Rae). *Indian J. Nat. Rubber Res.*, 1988, 1, 27-30.
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C. and Mongkolsuk, S. Antifungal potential of extracellular metabolite produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.*, 2008, 4, 330-337.
- Ramamoorthy V., Viswanathan R., Raguchander T., Prakasan V. and Samiyappan R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 2001, 20, 1-11.
- Ramamoorthy, V., Raguchander, T. and Samiyappan, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* disease by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2002, 108, 429-441.

- Ramette, A., Frapolli, M., Defago, G. and Monerme, Y. Phylogeny of HCN synthesis-encoding hcn BC genes in biocontrol fluorescent pseudomonas and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Mol. Plant Microbe. Interact.*, 2003, 16, 525-535.
- Redman, R.S., Freeman, S., Clifton, D.R., Morrel, J., Brown, G. and Rodriguez, R.J. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. *Plant Physiol.*, 1999, 119, 795-804.
- Ruanpanun, P., Tangchitsomkid, N., Hyde K.D. and Lumyong, S. Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 26, 1569–1578.
- Sahoo, A., Agarwal, N., Kamra, D.N., Chudhary, L.C. and Pathak, N.N. Influence of the level of molasses in de-oiled rice bran-based concentrate mixture on rumen fermentation pattern in crossbred cattle calves. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1999, 80, 83-90.
- Shahidi Bonjar, G.H., Fooladi, M.H., Mahdavi, M.J. and Shahghasi., A. Broadspectrum, a novel antibacterial from *Streptomyces* sp. *Biotechnology*, 2004, 3, 126-130.
- Soekirman, P. Current status white root disease on *Hevea* rubber in Indonesia. Paper presented in the International Workshop on White Root Disease of *Hevea* Rubber. 28 November 2006, Salatiga, Indonesia. 6 pages.
- Tambong, J.T. and Hofte, M. Phenazine and involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2001, 107, 511-521.
- Weller, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1988, 26, 379–407.

เว็บไซต์ที่เกี่ยวข้อง

- http://www.weloveshopping.com/template/a13/show_article.php?qid=70813&shopid=127087

ภาคผนวก

สรุปข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิต่อโครงการ
“ศักยภาพการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งโรครากขาวของยางพารา” สัญญาเลขที่ RDG5450045

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ชี้แจงโดยนักวิจัย
ความคิดเห็นด้านการพิมพ์ (Editorial) 1. การเขียนเอกสารอ้างอิงยังไม่ถูกต้องตามหลักการเขียน ขอให้ตรวจสอบและแก้ไขให้ถูกต้อง เช่น ปี พ.ศ. ควรอยู่ต่อท้ายชื่อผู้เขียน ชื่อผู้แต่ง หรือหน่วยงาน ไม่ใช่ขึ้นต้นด้วยชื่อเรื่อง เรียงลำดับเอกสารอ้างอิงตามตัวอักษร ก-ฮ และ A-Z 2. ตรวจสอบชื่ออ้างอิงในเนื้อหาให้ตรงกับชื่อในเอกสารอ้างอิง เช่น “Jayasinghe” เป็นต้น ความเห็นด้านวิชาการ 1. ตรวจสอบลักษณะอาการของโรค โดยเฉพาะในบทคำนำ บรรทัดที่ 16 ที่กล่าวว่า พบเส้นใยสีขาว หรือเชื้อราบริเวณโคนต้นคล้ายตาข่าย บางต้นพบดอกเห็ดหลินจือ นักวิจัยควรระบุแหล่งที่มา 2. วิธีการ 2.1 การเก็บตัวอย่างโรคและการแยกเชื้อสาเหตุโรครากขาวของยางพารา นักวิจัยระบุตัวอย่างยางพาราที่เป็นโรครากขาวจาก <i>R. microporus</i> หมายความว่า ผู้วิจัยได้ทราบแน่นอนแล้วว่าอาการหรือชิ้นส่วนที่เก็บมาแยกแยกเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ เป็นโรครากขาวแน่นอน อย่างไรก็ตามขอเสนอแนะว่า หากไม่มั่นใจนักวิจัยควรอธิบายในลักษณะตัวอย่างที่คล้ายโรครากขาวของยางพารา (รวมทั้งดอกเห็ดด้วย) เพราะจะส่งผลถึงผลการแยกเชื้อที่รายงานในลำดับต่อมา	การพิมพ์ (Editorial) 1. คณะผู้จัดทำได้ตรวจสอบและแก้ไขเอกสารอ้างอิงตามหลักการเขียนให้ถูกต้อง และ ตรวจสอบชื่ออ้างอิงในเนื้อหาให้ตรงกับชื่อในเอกสารอ้างอิง ด้านวิชาการ 1. <u>บทนำ</u> บรรทัดที่ 16 ได้เพิ่มแหล่งที่มาของดอกเห็ดที่นำมาศึกษา 2. <u>วิธีการ</u> 2.1 เพิ่มคำอธิบายลักษณะตัวอย่างดอกเห็ดที่เก็บมาแยกเชื้อ ที่น่าจะเป็นเห็ดก่อโรคคล้ายโรครากขาวของยางพารา 2.2 ในการทดลองปี 54 นี้ ดูเพียงแต่ลักษณะภายใต้กล้อง การจำแนกเชื้อ คณะผู้วิจัยจะทำการ จำแนกเชื้อระดับโมเลกุลของตำแหน่ง 18S RNA ซึ่งจะทำให้การจำแนกในปี 2555 โดยลักษณะทาง morphology บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถระบุและจำแนกชนิดของเชื้อราก่อโรคได้ถูกต้อง 100 % จึงจำเป็นต้องตรวจสอบโดยใช้ 18S RNA แทนวิธีการดังกล่าว

2.2 น่าจะเป็นการศึกษาลักษณะทาง morphology บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะหากศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุจะมีกระบวนการและรายละเอียดมากกว่านี้

3. ผลการวิจัย

3.1 นักวิจัยได้ตรวจสอบลักษณะของโรคหรือไม่ และมีลักษณะอย่างไร ก่อนที่จะนำมาแยกเลี้ยงเชื้อ และดอกเห็ดที่เก็บมาใช้ดอกเห็ดที่ทำให้เกิดโรคหรือไม่ หรือเป็นดอกเห็ดอื่น ควรศึกษาข้อมูลก่อนทำการเก็บตัวอย่าง สาเหตุที่ไม่สามารถแยกเชื้อราได้อาจขึ้นกับเทคนิคและวิธีการความสามารถของผู้ปฏิบัติงาน

3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุ ได้เสนอให้ปรับปรุงหัวข้อวิจัยไว้ในวิธีการแล้ว เพื่อความเหมาะสม

3.3 ในกรณีที่สามารถผลิต spore ของเชื้อราชนิดนี้ได้บนเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อ หากพบ spore ควรแสดงภาพตัวอย่างให้เห็น

3.4 Sterigma เป็นลักษณะคล้ายก้านรูปสปอร์ ซึ่งในที่นี้ spore คือ basidiospore จะอยู่บนยอด basidium พบได้ในดอกเห็ดเท่านั้น ให้นักวิจัยตรวจสอบดูว่า มี spore และมี sterigma บนเส้นใยบนอาหาร PDA (ควรกลับไปตรวจสอบใหม่) ตามที่รายงานหรือไม่ ซึ่งควรแสดงภาพประกอบด้วย และควรค้นคว้าข้อมูลให้มากกว่านี้ว่า เชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อราประเภทใด การจะพบ spore ได้ ต้องได้จากดอกเห็ดเท่านั้น ซึ่ง basidium และ sterigma ของดอกเห็ดชนิดนี้ตรวจสอบค่อนข้างยากมาก

3.5 Actinomycetes ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคที่ดีที่สุด 3 isolates ที่คัดเลือกไว้ (Lac-17, LRB-14, Lac-19) ไม่ใช่ isolate ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพได้ดี โดยเฉพาะ LRB-14 แสดงว่ากลไกการยับยั้งเชื้อโรครากขาว อาจไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ หรือเป็นกลไกที่เกิดขึ้นร่วมกับกลไกอื่น หากสามารถศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อโรครากขาวให้ชัดเจนในห้องปฏิบัติการได้ก่อนที่จะนำไปทดสอบในเรือนทดลอง จะเพิ่มโอกาสในการนำเชื้อไปใช้ในการควบคุมโรคได้มากกว่า เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์

3. ผลการวิจัย

3.1-3.4 นักวิจัยได้ศึกษาข้อมูลก่อนทำการเก็บตัวอย่าง สาเหตุที่ไม่สามารถแยกเชื้อราไม่ได้ขึ้นกับข้อบกพร่องของเทคนิคและวิธีการความสามารถของผู้ปฏิบัติงาน แต่ ขึ้นอยู่กับการไม่สามารถหาตัวอย่างเชื้อราก่อโรครากขาว ยางพาราในบริเวณพื้นที่ภาคเหนือได้ และตัวอย่างที่นำมาแยก ภายหลังจากการศึกษาแล้ว เป็นเชื้อราสายพันธุ์อื่น คณะผู้วิจัยได้ขอความอนุเคราะห์เชื้อราโรครากขาว จากทาง ดร. นาริลักษณ์ นาแก้ว สายพันธุ์ positive strain ที่ทางอาจารย์ท่านและผู้วิจัยจากสถาบันยางได้แยกมาศึกษาจากพื้นที่ภาคใต้ และทางคณะผู้วิจัย นำเชื้อรา isolate ที่ได้มา จำแนกระดับโมเลกุลของตำแหน่ง 18S RNA อีกครั้งหนึ่ง เพื่อยืนยัน isolate ที่ได้มาเป็นเชื้อราก่อโรครากขาวจริง ก่อนทำการทดสอบ dual culture technique

3.5-3.6 Actinomycetes Lac-17, LRB-14, Lac-19 ที่คัดเลือกไว้ มีความเป็นไปได้ที่จะผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น สารปฏิชีวนะ สารยับยั้งเชื้อรา หรือ volatile compound ชนิดอื่น กลไกการยับยั้งอาจทำงานร่วมกัน หรือ ทำงานเดี่ยวๆ การศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ สามารถทำได้ แต่ต้องใช้เวลาทดสอบ 1-2 ปีเต็ม โดยเริ่มจาก การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารปฏิชีวนะ การสกัดสารออกฤทธิ์ด้วยตัวทำละลาย การแยกสารสกัดหยาบโดยเทคนิค TLC การทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิค column chromatography การระบุมวลสารโดยเทคนิค GC-MS การระบุโครงสร้างโดย NMR, HPLC ซึ่งหากทางผู้ทรงคุณวุฒิมีความเห็นว่าควรศึกษากลไกการยับยั้งเชื้อโรครากขาวให้ชัดเจนในห้องปฏิบัติการได้ก่อนที่จะนำไปทดสอบในเรือนทดลอง ในปี 2555-2556 ทางคณะผู้วิจัยขอศึกษาในส่วนของโครงสร้างสารก่อน จึงสามารถทดสอบในเรือนทดลองในปี 2557 ได้ เพราะการระบุชนิดของสารและกลไกที่แน่นอนต้องใช้เวลา

ควบคุมโรค จะทำให้ควบคุมสภาพแวดล้อมเมื่อนำไปใช้ได้ดีขึ้น 3.6 หากคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากผลการทำ primary screening เพียงอย่างเดียว โดยไม่คำนึงถึงความสามารถในการผลิตสารทางชีวภาพของเชื้อ ก็เท่ากับผลการทดลองที่ได้จากการทดลองตามวิธีการที่ 4.3 (การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์) ไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ใดๆ เลย ควรทบทวนด้วย 3.7 โครงการนี้เน้นการใช้จุลินทรีย์ PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา หากคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากการทำ primary screening เพียงอย่างเดียว ควรทบทวนว่าจะบรรลุตามวัตถุประสงค์ของโครงการหรือไม่ ข้อสังเกต 1. ผู้วิจัยควรจะทราบว่าภาคเหนือไม่พบการเกิดโรครากขาวของยางพารา จึงไม่สามารถแยกเชื้อได้ การที่สันนิษฐานว่าเป็นโรครากขาว ผู้วิจัยต้องเข้าใจ รู้อาการของต้นยาง ลักษณะของเชื้อ แม้แต่สามารถแยกชนิดของดอกเห็ดว่าเป็นเชื้อราก่อโรคอะไร 2. ผู้ประเมินเคยให้ข้อสังเกตแล้วว่า โรครากขาวระบาดทางภาคใต้ ไม่พบการระบาดทางภาคเหนือ จึงไม่ควรทำงานในภาคเหนือ หรือเอาเชื้อไปทดลองในภาคเหนือ เพราะอาจเกิดการระบาดได้ถ้าเชื้อรานั้นแพร่ไปในดิน 3. pH ที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อโรครากขาวคือ pH 5.8-6.3 หรือจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บางชนิด pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ pH 7 หรือเป็นกลาง แต่ pH ที่เหมาะสมกับยางพาราคือ pH 4.5-5.5 ซึ่งเป็นกรด ซึ่งหาก pH เกิน 6.0-6.5 จะมีปัญหากับต้นยาง ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์จึงไม่น่าจะเจริญเติบโตได้ในดินปลูกยางที่มี pH ช่วง 4.5-5.5 ดังนั้นปัจจุบันจึงยังไม่มีความแนะนำการใช้ biocontrol กับยางพารา แม้แต่งานวิจัยของประเทศอินเดีย ซึ่งสามารถใช้ได้เพียงในห้องปฏิบัติการเท่านั้น	ไม่สามารถทำให้เสร็จภายในปี 2555 ได้ทั้งหมด 3.7 โครงการนี้เน้นการใช้จุลินทรีย์ PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา คณะผู้ทดลองไม่ได้คัดเลือกจากการทำ primary screening เพียงอย่างเดียว แต่ได้เลือกเชื้อทดสอบที่ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการ นำมาทดสอบกับต้นกล้ายางพาราในสภาพเรือนทดลอง (<i>In vivo</i>) หากเชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ไหนให้ผลในการควบคุมโรครากขาวยางพาราได้ดีในระดับเรือนทดลอง จึงนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในโครงการปีสุดท้าย และคณะผู้วิจัยได้ทบทวนแล้วว่าสามารถ บรรลุตามวัตถุประสงค์ของโครงการได้ ข้อสังเกต เห็นควรตามข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ
--	--