



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ยับยั้งโรครากขาวของยางพารา: การทดสอบในเรือนทดลอง

**Potential Use of Producing Bioactive Compounds PGPR Against White
Root Disease of Rubber: Greenhouse Tests**

โดย

ดร. มธุรส ชัยหาญ และ คณะ

กุมภาพันธ์ 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ศักยภาพการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ยับยั้งโรครากขาวของยางพารา: การทดสอบในเรือนทดลอง

Potential Use of Producing Bioactive Compounds PGPR Against White
Root Disease of Rubber: Greenhouse Tests

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 ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งโรค
รากขาวของยางพารา: การทดสอบในเรือนทดลอง
Potential Use of Producing Bioactive Compounds PGPR Against White Root
Disease of Rubber: Greenhouse Tests

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

ผู้ร่วมโครงการวิจัย	1. ศ.ดร. สายสมร ล้ายอง	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
	2. นายนิคม สุขจา	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

งบประมาณทั้งโครงการ 142,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2555 ถึง วันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2556

ปัญหาที่ทำวิจัยและความสำคัญ

จากงานวิจัยหัวข้อ “ศักยภาพการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งโรครากขาวยางพารา” (สัญญาเลขที่ RDG5450045) ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากสกว. ในปี 2554 นั้น เบื้องต้นพบว่า จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ที่แยกจากบริเวณดินรอบรากยางพาราต้นที่สมบูรณ์ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ สารกลุ่ม Phenazine, Siderophore, Lytic enzyme ได้แก่ Cellulase, β -glucanase, Chitinase และ Catalase ซึ่งมีผลในการยับยั้งราก่อโรครากขาว *Rigidoporus microporus* ได้ดีเมื่อทดสอบในระดับห้องทดลอง (*In vitro*) โดยวิธี dual culture technique ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดต่อยอดงานวิจัยในปี 2555 โดยจะศึกษาการยับยั้งราก่อโรครากขาวโดยจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR โดยทดสอบในระดับกระถาง (*In vivo*) เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งราก่อโรครากขาวในต้นยางชำถุง เพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพการยับยั้งราก่อโรครากขาวในยางพาราของจุลินทรีย์ PGPR สายพันธุ์ที่คัดเลือก เพราะหากจะพัฒนาผลิตภัณฑ์ PGPR ทางการค้า ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในระดับกระถางก่อนว่า จุลินทรีย์ที่คัดเลือกสามารถที่จะยับยั้งราก่อโรคได้จริงหรือไม่ เมื่อทดสอบในต้นยางชำถุง และ นำจุลินทรีย์ PGPR สายพันธุ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งราก่อโรครากขาว พัฒนาต่อยอดในรูปของผลิตภัณฑ์ PGPR ที่สะดวกนำไปใช้ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาวยางพารา ในระดับเรือนทดลอง

ผลการดำเนินงาน

1. การจำแนกแอกติโนมัยซีส ราก่อโรครากขาว และ การพิสูจน์การเกิดโรค (การจำแนกเชื้อ, การพิสูจน์การเกิดโรค)

การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีส และ ราก่อโรค *Rigidoporus microporus* ด้วยวิธีทางอนุพันธศาสตร์

จากการจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีสไอโซเลท Lac-17, Lac-19 และ LRB-14 ตามหลักการจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 9. (Williams *et al.*, 1994) พบว่าแอกติโนมัยซีสทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* spp. ซึ่งจากผลที่ได้ยังไม่สามารถจำแนกถึงระดับสปีชีส์ที่แน่ชัดได้ จึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA โดยให้ผลการวิเคราะห์ของแอกติโนมัยซีสไอโซเลท Lac-17 จำนวน 1,492 เบส, ไอโซเลท Lac-19 จำนวน 1,130 เบส, ไอโซเลท LRB-14 จำนวน 1,285 เบส และ ราก่อโรค *Rigidoporus microporus* จำนวน 559 เบส

การพิสูจน์การเกิดโรค (Pathogenicity test) ของรา *Rigidoporus microporus*

นำต้นยางชำถุงที่ทำการเพาะเลี้ยงอายุประมาณ 3 เดือน มาปลูกลงในกระถาง หลังจากนั้นใส่เชื้อราก่อโรครากขาวลงไป (10^8 spore/mL) เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ใส่เชื้อราก่อโรค ทำการสังเกตการเจริญของต้นยางชำถุง จากผลการทดลอง พบว่า ในชุดทดลองที่มีการเติมราก่อโรครากขาว รากของต้นยางชำถุงที่ตายจะไม่มีอาการเจริญยืดยาวออกมาในดินที่ปลูก และ ตรวจพบเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญคลุมอยู่ ส่วนของใบมีสีเหลือง และ เหี่ยว ซึ่งต่างจากรากของต้นยางชำถุงที่ไม่ได้เติมเชื้อราก่อโรค จะมีการเจริญตามปกติและไม่พบเส้นใยของเชื้อราปกคลุม ใบมีลักษณะสีเขียวและเจริญอย่างสมบูรณ์

การพิสูจน์การเกิดโรค (Pathogenicity test) ของแอกติโนมัยซีสสายพันธุ์ที่ยับยั้งราก่อโรครากขาว

จากการนำแอกติโนมัยซีสทั้ง 3 ไอโซเลท ได้แก่ *Streptomyces* Lac-17, *Streptomyces* Lac-19 และ *Streptomyces* LRB-14 มาทดสอบการเกิดโรคกับต้นยางชำถุง โดยการถ่าย *Streptomyces* เริ่มต้น (3×10^6 cell/mL) ลงไปบริเวณ ใบ และ ราก ผลการทดลองพบว่า *Streptomyces* ทั้ง 3 ไอโซเลท ดังกล่าวไม่ทำให้เกิดโรคกับส่วนใดๆ ของต้นยางพารา

2. การควบคุมโรครากขาวของยางพาราในเรือนทดลอง (การเตรียมต้นกล้ายาง, การเตรียมดิน และ PGPR ปฏิบัติ, กรรมวิธีในการทดสอบ, การบันทึกผล และ การวิเคราะห์ผล)

การเตรียมดิน และ การเตรียม PGPR ปฏิบัติ

ทำการเลี้ยง PGPR ปฏิบัติ ลงในอาหารเหลวเพื่อใช้ทดสอบการควบคุมโรครากขาว ในส่วนของดินที่นำมาทดสอบ คือ ดินแม่อน ที่จำหน่ายเป็นถุงสำเร็จรูป ผลิตโดย นพพรการเกษตร อำเภอแม่อน จังหวัดเชียงใหม่ และ ดินที่ขุดจากสวนยางพาราของเกษตรกร ในพื้นที่จังหวัดพะเยา

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในต้นยางชำถุงในกระถางปลูก

จากการออกแบบการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง ชุดทดลอง ละ 3 ซ้ำ เป็นระยะเวลา 5 เดือน พบว่า ผลของแอคติโนมัยซีทต่อต้านยางชำถุงให้ผลพอใช้ และ จากการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่า แอคติโนมัยซีท ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคในต้นยางชำถุงได้ผลพอใช้

การทดสอบการมีชีวิตอยู่รอดของ PGPR ปฏิบัติ ที่คัดเลือกได้ในดิน

ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณของแอคติโนมัยซีท ทั้ง 3 ไอโซเลท จะลดปริมาณลงหลังจากที่เติมลงในดิน ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมในขณะที่ทำการทดลอง อันได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ทำให้ PGPR ปฏิบัติ ที่เติมลงไปมีชีวิตอยู่น้อยลง

สรุปผลการวิจัย

Streptomyces Lac-17, *Streptomyces* Lac-19, *Streptomyces* LRB-14 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นยางพารา ให้ผลยับยั้งการเจริญของรากก่อโรครากขาว *Rigidoporus microporus* ได้ดีที่สุดในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อจัดจำแนกเชื้อโดยใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสใน 16S rRNA gene กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า แอคติโนมัยซีท ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* spp. ซึ่งยังไม่พบรายงาน การทำให้เกิดโรคในคนและพืช แต่เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในต้นยางชำถุงที่ปลูกในกระถาง กลับพบว่า ไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ อาจเนื่องจาก ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงไปมีน้อยเกินไป จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ หรือ รูปแบบของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นไม่เหมาะสม ประกอบกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ภายหลังจากการทดสอบความปลอดภัยของแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้ พบว่า แอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้ไม่ก่อให้เกิดโรคกับส่วนใดๆ กับต้นยางชำถุงเลย และ ไม่มีผลต่อการเจริญของต้นยางชำถุงในกระถางปลูกด้วย

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรรววิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

จากผลการทดลอง พบว่า แอคติโนมัยซีท 3 ไอโซเลท อันได้แก่ *Streptomyces* Lac-17, *Streptomyces* Lac-19, *Streptomyces* LRB-14 สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรครากขาว *Rigidoporus microporus* ได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการ และไม่ก่อให้เกิดโรค หรือ อาการผิดปกติกับต้นยางชำถุง ดังนั้น จึงมีแนวโน้มว่าจะสามารถนำแอคติโนมัยซีท ทั้ง 3 ไอโซเลท ช่วยป้องกัน และ ลดความรุนแรงในการเกิดโรครากขาวของยางพาราได้ แต่จาก ผลการทดสอบประสิทธิภาพการลดความรุนแรงของโรคในต้นยางชำถุงที่ปลูกในกระถาง กลับพบว่า PGPR ปฏิบัติการ สามารถลดความรุนแรงของโรครากขาวได้ในระดับที่พอใช้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อการทำงานของ PGPR ปฏิบัติการ โดยเฉพาะปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นของจุลินทรีย์ที่ใช้ ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค อีกประการหนึ่ง คือ รูปแบบของหัวเชื้อสดที่นำไปใช้ ต้องเหมาะสม เติร์มง่าย สะดวก และ สามารถนำพา PGPR ปฏิบัติการ ไปสู่บริเวณที่เกิดโรคได้ เช่น การนำวัสดุต่างๆ มาให้จุลินทรีย์เกาะอยู่ และ ฝังตัวอยู่ในวัสดุที่เตรียมหัวเชื้อ จนกระทั่งจุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณ และ เข้าไปฝังตัวอยู่ในอนุภาคของดินจนสามารถทนต่อการชะของน้ำได้ หากปรับปรุงตามขั้นตอน ดังกล่าว คาดว่าประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคจะเพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นการควบคุมเชื้อราก่อโรครากขาวโดยชีววิธีแม้ว่าจะสามารถคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดได้ แต่เมื่อนำไปใช้จริงในภาคปฏิบัติต้องมีการศึกษาปัจจัยอีกหลายด้านที่มีผลต่อการทำงานของแอคติโนมัยซีทด้วย เช่น อุณหภูมิ ค่าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ การมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ เป็นต้น คาดว่าประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคจะเพิ่มมากขึ้น

ผลงานทางวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

การเป็นวิทยากรรับเชิญบรรยาย ในหัวข้อเรื่อง Potential of Bioactive Compound from Rhizospheric Actinomycetes for Controlling Phytopathogenic Fungi Soil ระหว่างวันที่ 16-30 มิถุนายน 2556 ณ. Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology, Hanoi National Education University, Hanoi ประเทศเวียดนาม

รหัสโครงการ: RDG 5550068
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
ระยะเวลาดำเนินการ: 1 สิงหาคม พ.ศ. 2555 ถึงวันที่ 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2556

บทคัดย่อ

การทดลองนี้เป็นการทดสอบความสามารถของ PGPR ปฏิบัติกษ ในการควบคุมโรครากขาวของยางพารา (*Hevea brasiliensis*) ที่เกิดจาก *Rigidoporus microporus* โดยใช้ จุลินทรีย์กลุ่ม pseudomonads และ *Streptomyces* ในการควบคุมโรครากขาว การศึกษาครั้งนี้ได้นำจุลินทรีย์ PGPR ปฏิบัติกษ จำนวน 200 สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางพาราที่มีสุขภาพดี และ ดินบริเวณรอบรากยางพารา ทดสอบความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น phenazine, siderophore, เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของราก่อโรคพืช, เอนไซม์แคตาเลส และการควบคุมเชื้อราก่อโรครากขาวของยางพารา ควบคู่กับการจัดจำแนกชนิดของ PGPR ปฏิบัติกษ ไอโซเลท Lac -17, Lac -19 และ LBR -14 โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ควบคู่กับ การวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ จากการทดลอง พบว่า แอคติโนมัยซีส ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces seoulensis* Lac-19, *Streptomyces malaysiensis* Lac-17, *Streptomyces ahngroscopicus* LBR-14 โดย *Streptomyces malaysiensis* Lac-17 และ *Streptomyces seoulensis* Lac-19 ให้ผลการยับยั้งราก่อโรครากขาวได้ดีที่สุด และ แสดงความสามารถในการผลิต siderophore สามารถผลิตเอนไซม์catalase และ ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ไคตินเนส, เซลลูเลส และการผลิต phenazine ผลจากการศึกษาครั้งนี้ให้ข้อมูลที่ครอบคลุมถึงกลไกควบคุมทางชีวภาพ ของ *Streptomyces malaysiensis* Lac -17 ที่สามารถใช้ ในการควบคุมราก่อโรครากขาวในระดับแปลงทดลองได้

คำสำคัญ: การควบคุมทางชีวภาพ, *Streptomyces*, Siderophore , เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์,การผลิตPhenazine

Project code: RDG 5550068
Project title: Potential Use of Producing Bioactive Compounds PGPR Against White Root Disease of Rubber
Investigator: Dr. Mathurot Chaiharn
E-mail Address: mathurot@mju.ac.th
Project Period: 1 August 2555 to 30 July 2556

Abstract

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs) were tested for biological control of white root disease of rubber (*Hevea brasiliensis*) caused by *Rigidoporus microporus*. Antagonistic rhizobacteria, especially fluorescent pseudomonads and *Streptomyces*, are known to control of fungal root disease. In this present study, 200 strains were isolated from healthy rubber rhizospheric soil and screened as bioactive compound against *Rigidoporus microporus*, causal agent of white root disease such as phenazine, siderophore, cell-wall degrading enzyme, catalase and antifungal activity, *in vitro*. On the basis of dual culture assays, Lac-19, Lac-17 and LBR-14 strains were selected base on bioactive compound producing activities including catalase, chitinase and cellulase. Cell wall composition analysis and 16S rDNA homology, this strain identified as *Streptomyces seoulensis* Lac-19, *Streptomyces malaysiensis* Lac-17, *Streptomyces ahygroscopicus* LBR-14 and *Streptomyces malaysiensis* Lac-17 and *Streptomyces seoulensis* Lac-19 were shown higher antagonistic activity against white root disease. Furthermore, it was able to produce siderophore, positive reaction for catalase, chitinase and cellulase and negative reaction for phenazine production. Results from this study provide comprehensive information on biocontrol mechanisms of *Streptomyces malaysiensis* Lac-17 which can be used for controlling white root disease in the field.

Keywords: Biological control, *Streptomyces*, Siderophore, Cell wall degrading enzyme, Phenazine production

1. ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

โรครากขาวยางพาราเป็นโรคสำคัญที่พบแพร่ระบาดและทำความเสียหายต่อพื้นที่ปลูกยางทั้งบริเวณแหล่งปลูกยางใหม่ และ พื้นที่ปลูกยางเดิม โรครากขาว เกิดจาก *Rigidoporus microporus* (Fr.) โดยสามารถพบต้นยางที่เป็นโรคได้ตั้งแต่ 1-2 ปีแรก หากในแปลงปลูกมีแหล่งเชื้อเดิมอยู่สามารถพบต้นยางที่เป็นโรคได้ตั้งแต่เริ่มปลูก เมื่อระบบรากถูกทำลายจะแสดงอาการให้เห็นทางใบ ลักษณะโคนต้น และ ราก ที่เป็นโรคจะเห็นเส้นใยเชื้อราชัดเจนโดยเส้นใยอ่อนมีลักษณะสีขาวค่อนข้างหยาบ ปลายแบน เส้นใยแก่ มีลักษณะเป็นเส้นกลม นูนสีส้ม เรียกว่า ไรโซมอร์ฟ (Rhizomorph) เชื้อราจะเจริญปกคลุม และ เกาะติดแน่นกับผิวราก ลักษณะเนื้อไม้ที่เป็นโรค ในระยะแรกเนื้อไม้จะแข็ง สีขาว ในระยะรุนแรงจะเป็นสีขาวครีม เนื้อไม้ฟาม เบาและยุ่ย ลักษณะดอกเห็ดในช่วงที่มีความชื้นสูงจะพบดอกเห็ดบริเวณโคนต้น และ รากที่โผล่พ้นดินในต้นยางที่เป็นโรครุนแรง ลักษณะเป็นแผ่นครึ่งวงกลม ไม่มีขน ไม่มีก้านชูดอก ดอกอ่อนลื่นเหมือนหนัง ดอกแข็งกระด้าง สีของดอกด้านบนจะมีสีส้มแก่ และ ส้มอ่อนสลับกันเป็นวง ขอบดอกสีขาว สีของดอกเป็นสีส้มอ่อน และ มักขึ้นซ้อนเป็นชั้นๆ หากต้นยางเป็นโรครากขาวระยะรุนแรง จะทำให้ต้นยางยืนต้นตาย และ เป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อแก่ต้นยางข้างเคียงทำให้ผลผลิตต่อไร่ลดลง (Jayasuriya and Thennakoon, 2007) โรครากขาวในประเทศไทยมีแนวโน้มแพร่ขยาย และ ระบาดมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ปลูกยางแทนรอบใหม่ ปัญหาหลักของการระบาดโรค และ ความล้มเหลวในการป้องกันกำจัดโรค คือ การไม่ปฏิบัติตามคำแนะนำการควบคุมโรครากขาวของเกษตรกร ซึ่งมีวิธีค่อนข้างยุ่งยาก และ มีค่าใช้จ่ายสูง

ปัจจุบันเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีในการควบคุมโรครากขาวยางพารา เพราะ มีประสิทธิภาพเร็ว และ เห็นผลได้ดีกว่า แต่ การใช้สารเคมีมีราคาแพง ประกอบกับพื้นที่ปลูกยางบางแหล่งไม่มีสารเคมีเหล่านี้จำหน่าย จึงทำให้ไม่มีการกำจัดโรคของเกษตรกร นอกจากนี้การใช้สารเคมีในพื้นที่ปลูกยางเป็นเวลานาน มีผลกระทบทำให้ปริมาณจุลินทรีย์อื่นๆที่มีประโยชน์ในดินลดลง และ มีพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Haggag and Moamed, 2007) ยิ่งกว่านั้น ยังเป็นสาเหตุการดื้อยา และ การกลายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคบางชนิด (Kim and Hwang, 2007) ดังนั้นการควบคุมทางชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมรากก่อโรครากขาว วิธีนี้เป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อผู้ใช้และไม่เกิดสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม

2. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบศักยภาพต่อการป้องกันการติดเชื้อราโรครากขาวยางพาราในระดับเรือนทดลองของจุลินทรีย์ PGPR ปฏิบัติ

3. ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

การควบคุมทางชีวภาพเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้แทนสารเคมีในการควบคุมโรครากขาว วิธีที่นิยมใช้มากที่สุด คือ การใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และ ผลิตสารปฏิชีวนะควบคุมโรคพืชได้ (Guo *et al.*, 2002) กลไกควบคุมรากโรคโดย PGPR สามารถทำได้ทั้ง ทางตรงและทางอ้อม เช่น การผลิตเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์รากโรคพืช การผลิตสารพิษ การผลิตสารปฏิชีวนะ หรือ การเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อโรคในพืช ดังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ (Benitez *et al.*, 2004)

1. การสร้างสารทำลายชีวิต (Antibiosis) เป็นกระบวนการที่เกิดจากการใช้สารที่สร้างขึ้นจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง สารดังกล่าวมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและอาจมีผลในการทำลายชีวิตของเชื้อโรคได้ โดยสารที่สร้างจาก PGPR มี 4 ชนิด คือ

สารปฏิชีวนะ (Antibiotic) เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีผลยับยั้งการเจริญหรือระงับ กิจกรรมของเชื้อสาเหตุอย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ PGPR องค์ประกอบ คุณสมบัติทางเคมีและสภาพของอาหารที่ใช้เลี้ยง เช่น Notz *et al.* (2001) รายงานว่า *Pseudomonas fluorescence* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ 2,4-diacetylphloroglucinol มีผลในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช หรือกรณีของ *P. fluorescence* 2-79 สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ phenazine-1-carboxylic acid (PCA) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Gaeumannomyces graminis* เชื้อสาเหตุโรครากเน่าของข้าวสาลี (Ownlet *et al.*, 1991) Szczech and Shoda, (2006) รายงานว่า *Bacillus subtilis* RB 14-C มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ Iturin A ซึ่งเป็นสารชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค damping-off ของมะเขือเทศที่เกิดจาก *Rhizoctonia solani* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mahadtanapuk *et al.* (2007) ใช้ *Bacillus* spp. ได้แก่ *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา *Collectotrichum musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

Bacteriocin เป็นโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งและมีผลจำเพาะเจาะจงในการฆ่าแบคทีเรียอีกชนิดที่อยู่ในจีนัสเดียวกัน ตัวอย่างที่เห็นได้ชัด คือการควบคุมโรค crown gall ซึ่งเกิดจาก *Agrobacterium tumefaciens* โดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium radiobacter* strain K-84 ผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า Agrocin 84 มีการควบคุมโรค crown gall นอกจากนี้ Sige (1993) อธิบายกลไกของสาร bacteriocin สารนี้มีลักษณะคล้ายไวรัส สามารถเกาะจับกับโปรตีนในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงภายใน periplasmic membrane ของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ส่งผลให้เซลล์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชเกิดความผิดปกติในการสังเคราะห์โปรตีน ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ผลิตสาร bacteriocin ได้แก่ *Pseudomonas syringae* ผลิตสาร syringacin และ *Corynebacterium* sp. ผลิตสาร corynecin

ไซเดอโรฟออร์ (Siderophore) เป็นสารที่จุลินทรีย์ผลิตออกมา เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็ก หรือ มีในปริมาณต่ำมาก ไซเดอโรฟออร์จะไปจับกับธาตุเหล็กที่อยู่บริเวณรอบๆ รากพืช ดังนั้น ผลของการขาดธาตุเหล็กจะสามารถป้องกันเชื้อราก่อโรคพืชได้ โดยทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต และ สร้างสปอร์ได้ ไซเดอโรฟออร์มีโครงสร้างหลายลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ Hydroxamate หรือ thiohydroxamate, catecholate หรือ phenolate และ carboxylate การศึกษาของ Piyush *et al.* (2005) รายงานว่า *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 ที่แยกได้จากดินรอบราก มันฝรั่ง สามารถผลิตสารไซเดอโรฟออร์ ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาด (*Brassica campestris* var. Pusa Gold) มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมความยาว น้ำหนักทั้งในส่วนของราก และ ยอดของต้นพืช นอกจากนี้ Cao *et al.* (2005) ได้ทำการแยกแอดิโนมายซีสเอนโดไฟท์จากรากกล้วย เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวในกล้วยที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* พบว่า *Streptomyces* sp. strain S 96 มีการสร้างสารไซเดอโรฟออร์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้

เอนไซม์ (Enzyme) PGPR หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของรากก่อโรค เช่น chitinolytic enzyme จาก *B. cereus* และ *Enterobacter agglomerans* สร้างขึ้น มีผลต่อการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* (Pleban *et al.* 1997) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gil, (2005) ได้สกัดสารจาก *Streptomyces halstedii* AJ-7 เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora capsici* สาเหตุโรค Phytophthora blight ของพริกแดง จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ผลิต chitinase มีผลทำให้เส้นใยของรากก่อโรคผิดปกติ เส้นใยโป่งพอง และแตก นอกจากนี้ *Pseudomonas stutzeri* สามารถผลิตเอนไซม์ chitinase และ laminarinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ของรา *Fusarium solani* สาเหตุโรคเน่าได้

2. การแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัย (Competition) คือ การนำเอาธาตุอาหาร หรือ สารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินมาใช้ในการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อโรคขาดอาหารและไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ เช่น fluorescent pseudomonas, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. มีความสามารถในการใช้สารอาหารได้หลายชนิดและเจริญรวดเร็วเข้าครอบครองพื้นที่บริเวณรากพืชได้ทั้งหมดซึ่งเป็นการแก่งแย่งที่อยู่อาศัยของรากพืช ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเข้าทำลายรากได้ และ ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช และเพิ่มปริมาณผลผลิตอีกด้วย Lemessa and Zeller, (2007) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียบริเวณรอบรากของมันฝรั่ง มะเขือเทศ พริกหวาน กาแฟ และ ข้าวโพด เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากรา *Ralstonia solanacearum* โดยพบว่าแบคทีเรีย สายพันธุ์ APF 1 และ B2G มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยว

3. การเป็นปรสิต และ ตัวห้ำ (Parasitism and predation) จุลินทรีย์ที่เป็นปรสิตเข้าไปอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบไม่มาก และการใช้ควบคุมโรคพืชยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนการทำลายชีวิต เช่น *Erwinia uredinolytica* เข้าทำลาย pedicel ของสปรอร์ราสนิม *Bdellovibrio bacteriovorus* เป็นปรสิตของแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วเหลือง หรือ แบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne inconita* สาเหตุโรครากปม

4. การชักนำให้เกิดการต้านทานโรค (Induced disease resistance) จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคเมื่อทำให้เสียความสามารถในการเกิดโรคไปแล้ว สามารถจะชักนำ หรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายเชื้อโรคได้ เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ในยีนเดี่ยวของรา *Collectotrichum magna* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส ของพืชตระกูลแตงจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะเจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนทานต่อการเข้าทำลายไม่รุนแรง (avirulent) ที่มีชีวิตอยู่ และสามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณราก ทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการทำลายของ *Rhizoctonia solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้ (Arwiyanto et al., 1994) นอกจากนี้ Murphy and Zehnder, (2000) พบว่าการใช้ *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pumilus* สามารถลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจาก Tomato mottle virus ในมะเขือเทศ หรือ *Bacillus amyloliquefaciens* ช่วยชักนำให้ต้นยาสูบต้านทานต่อไวรัส pepper mild mottle virus (PPMoV) โดยการชักนำให้สร้างกรด salicylic และ jasmonic ในกลไกชักนำให้เกิดการต้านทานโรค (Ahn et al., 2002)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษา ค้นคว้า และ วิจัย การใช้จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR ในการควบคุมเชื้อก่อโรคในพืชชนิดต่างๆ เช่น Emmert and Habelsman, (1999) ศึกษาการนำแบคทีเรีย แกรมบวก กลุ่มที่สร้างสปอร์ ได้แก่ *Bacillus* และ *Streptomyces* มาใช้ในการควบคุมโรค พบว่า *B. cereus* และ *Streptomyces* spp. สามารถเจริญรุกรานพืช และ สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ทำให้พืชต้านทานต่อโรค Bernal, (2002) นำ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค พบว่าสามารถยับยั้งรา *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum* และ *Erwinia carotovora* ได้ Jetiyanon and Kloepper, (2002) ใช้ PGPR ในการยับยั้งการเจริญของรากก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ เชื้อก่อโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ ที่มีสาเหตุจาก *Ralstonia solanacearum* โรค anthracnose ในพริกไทย สาเหตุจาก *Collectotrichum gloeosporioides* โรครากเน่าโคนเน่าในผักกวางตุ้ง สาเหตุจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* และ โรคใบหงิกของแตงกวา สาเหตุจาก Cucumber mosaic virus (CMV) โดยทำการยับยั้งในห้องปฏิบัติการ พบว่า *Bacillus sphaericus*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* สามารถยับยั้ง *R. solani*, *C. gloeosporioides* และ *R. solanacearum* ได้ เมื่อมาทดสอบในเรือนทดลองโดยใช้เชื้อผสม พบว่า PGPR สามารถยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 4 ชนิด ได้ จึงคาดว่าเชื้อผสมน่าจะมีการออกฤทธิ์ส่งเสริมซึ่งกันและกันในการยับยั้งเชื้อก่อโรค Guo et al. (2004) ศึกษาการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ สาเหตุจาก *Ralstonia solanacearum* ในสภาพเรือนทดลอง โดยใช้ PGPR ได้แก่ *Serratia* sp., fluorescent *Pseudomonad* และ *Bacillus* sp. การทดลองได้ทำการเลี้ยงเชื้อ PGPR ในอาหาร 50 มิลลิลิตร เติราดบนดินที่มี *R. solanacearum* 2×10^5 CFU/ml เมื่อเริ่มลงเมล็ดพันธุ์ พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิต และลดการเกิดโรคได้

สำหรับผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพจากจุลินทรีย์กลุ่ม PGPR เพื่อใช้ในการควบคุมโรครากขาวยางพารา ยังไม่มีวางจำหน่ายในประเทศไทย จะพบแต่ผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อใช้ในการควบคุมโรคพืชชนิดต่างๆ แต่การใช้เชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการควบคุมโรค บางครั้งใช้ไม่ได้ผล หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก เชื้อรา *Trichoderma* spp ออกฤทธิ์ที่รุนแรง ทำลายทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดินโดยเฉพาะในจุลินทรีย์กลุ่มไมคอร์ไรซา (Mar Vazquez et al., 2000; Summerbell, 1987) ทำให้สมดุลทางธรรมชาติของจุลินทรีย์ในดินสูญเสียไป ดังนั้น จุลินทรีย์กลุ่ม PGPR จึงเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มที่น่าสนใจและเป็นแหล่งใหม่ๆ เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพเพื่อใช้ทางการค้า และ ไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆที่มีประโยชน์ในดิน

การวิจัยในครั้งนี้ ได้คัดเลือก PGPR สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านราก่อโรครากขาว *Rigidoporus microporus* ได้ดีที่สุดในระดับห้องปฏิบัติการ (ปี 2554) นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากขาวของยางพาราในระดับเรือนทดลอง (2555) เพื่อให้สามารถพัฒนาชีวภัณฑ์ PGPR ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งโรครากขาว สามารถนำไปผลิตให้อยู่ในรูปที่นำไปใช้ทางการค้า และสามารถแนะนำเกษตรกรนำไปใช้ป้องกันกำจัดโรครากขาวยางพาราได้

4. วิธีการ

1. การจำแนกสายพันธุ์แอคติโนมัยซีท และ ราก่อโรครากขาว *Rigidoporus microporus* และการพิสูจน์การเกิดโรค (การจำแนกเชื้อ, การพิสูจน์การเกิดโรค)

การจำแนกสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทไอโซเลท Lac-17, Lac-19, LRB-14 และราก่อโรค *Rigidoporus microporus* ที่คัดแยกได้จากโครงการ 1 ด้วยวิธีทางอนุพันศาสตร์

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของแอคติโนมัยซีทโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ(FavoPrepTM Tissue Genomic DNA Extraction Mini Sample Kit) หลังจากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสของยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction: PCR) และ ใช้ primer จำนวน 1 คู่ โดยอ้างอิงจาก Khamna *et al.* (2009) ได้แก่

27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1525R	AAGGAGGTGWTCCARCC (R=A/G, W= A/T)

จากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอร์เมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ (template) ซึ่งในส่วนผสมที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. 10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
2. BSA	2	ไมโครลิตร
3. 2.5 mM dNTP mix	4	ไมโครลิตร
4. 50M MgCl ₂	2.75	ไมโครลิตร
5. forward primer (20 □ M)	2	ไมโครลิตร
6. reverse primer (20 □ M)	2	ไมโครลิตร
7. Taq DNA polymerase (5U)	0.5	ไมโครลิตร
8. น้ำ DI	7.25	ไมโครลิตร
9. DNA template	2	ไมโครลิตร

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

Initial denaturation	94°C	2 นาที	} 35 รอบ
Denaturation	94°C	30 วินาที	
Annealing	55°C	30 วินาที	
Extension	72°C	30 วินาที	
Final extension	72°C	10 นาที	
Hold	4°C	จนกว่าจะนำมาใช้งาน	

ทำการตรวจสอบยีนที่ได้จากการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการทำให้เจลอิเล็กโทรโฟริซิส เตรียม อะกาโรสเจลหลอม และ เทลงในแม่พิมพ์ที่มีหัว (comb) เสียบอยู่แล้วปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสีติดตาม (loading dye) ในอัตราส่วน 5:2 และ หยดตัวอย่างลงในหลุมอะกาโรสเจล จากนั้นนำไปทำ อิเล็กโทรโฟริซิส ในเครื่อง Electrophoresis chamber โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วย Ethidium bromide ส่องภายใต้รังสี UV ตรวจสอบขนาดของยีนโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp + 1.5 kb DNA ladder

หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมาณรหัส 16S rRNA โดยนำผลิตภัณฑ์ของการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ primer 2 คู่ ได้แก่ 27F กับ 1525R สำหรับแอกติโนมัยซีส และ เชื้อราก่อโรครากขาว จะใช้ primer 2 คู่คือ ITS 4 กับ ITS 5 มาวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่ประมาณรหัส 16S rRNA และ 18S rRNA โดยวิธี direct sequencing โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนประมาณรหัส 16S rRNA ที่ First Base Laboratories Sdn. Bhd, Singapore

การพิสูจน์การเกิดโรค (Pathogenicity test) ของ *Rigidoporus microporus*

นำรากก่อโรค *Rigidoporus microporus* ในโครงการที่ 1 (2554) มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose agar (PDA) และ ทดสอบคุณสมบัติการเกิดโรค โดยมีวิธีโดยย่อ ดังนี้ นำรากก่อโรคเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ขี้เลื่อย 100 g, รำข้าว 3 g และ กลูโคส 2 g) บรรจุในถุงพลาสติก บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำต้นยางชำถุงที่มีดินผสมฆ่าเชื้อ (อัตราส่วน ดิน: ทราย: ปุ๋ยหมัก; 8:2:2) นำเอารากวางในกระถางถัดจากรากยางพารา สังเกตและบันทึกการเกิดโรค

2. การควบคุมโรครากขาวยางพาราในเรือนทดลอง (การเตรียมต้นกล้ายาง, การเตรียมดิน และ PGPR ปฏิบัติ, กรรมวิธีในการทดสอบ, การบันทึกผล และ การวิเคราะห์ผล)

การเตรียมต้นกล้ายาง

การเพาะต้นกล้ายางพาราโดยการเก็บเมล็ดยางพาราบริเวณสวนยางพาราของเกษตรกรในจังหวัดพะเยา จากนั้น ทำการคัดแยกเมล็ดที่สมบูรณ์ โดยการนำไปแช่น้ำ คัดเมล็ดที่ลอยน้ำทิ้ง เอาเฉพาะ เมล็ดส่วนที่จมน้ำมาเพื่อใช้ในการเพาะต้นกล้า สำหรับทดสอบการก่อโรค โดยทั่วไป ต้นกล้ายางพาราที่ใช้ทดสอบโรค จะมีอายุประมาณ 3-5 เดือน

การเตรียมดิน และ การเตรียม PGPR ปฏิบัติ

เตรียมสารละลาย PGPR โดยนำ PGPR ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งรากโรคขาว $\geq 80\%$ ในการทดสอบแบบ dual culture (จากงานวิจัยในปี 2554) จำนวน 3 ไอโซเลท คือ *Streptomyces* Lac 17, *Streptomyces* Lac 19 และ *Streptomyces* LRB 14 นำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารสูตร ISP-2 medium บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7-10 วัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 CFU/ml จากนั้นนำสารละลายจุลินทรีย์ปฏิบัติแต่ละชนิด และ สารละลายจุลินทรีย์ผสมของ *Streptomyces* sp. ผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อในปริมาณ 100 ml ต่อดิน 1 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มดินผสมเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นนำดินที่ผสมเชื้อใส่ลงถุงเพาะชำก่อนเตรียมปลูก

การควบคุมโรครากขาวยางพาราในระดับเรือนทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) มี 9 กรรมวิธี กรรมวิธี ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1. ต้นยางชำถุง
- กรรมวิธีที่ 2. ต้นยางชำถุง + *Rigidoporus microporus*
- กรรมวิธีที่ 3. ต้นยางชำถุง + *Rigidoporus microporus* + Lac-17
- กรรมวิธีที่ 4. ต้นยางชำถุง + *Rigidoporus microporus* + Lac-19
- กรรมวิธีที่ 5. ต้นยางชำถุง + *Rigidoporus microporus* + LRB-14
- กรรมวิธีที่ 6. ต้นยางชำถุง + *Rigidoporus microporus* + Lac-17 ผสมกับ Lac-19
- กรรมวิธีที่ 7. ต้นยางชำถุง + *Rigidoporus microporus* + Lac-17 ผสมกับ LRB-14
- กรรมวิธีที่ 8. ต้นยางชำถุง + *Rigidoporus microporus* + Lac-19 ผสมกับ LRB-14
- กรรมวิธีที่ 9. ต้นยางชำถุง + *Rigidoporus microporus* + สารเคมี (ซัลเฟอร์)

การทดลองนี้จะใช้ต้นยางชำถุง ที่มีลักษณะแข็งแรง ปราศจากโรคและแมลง นำมาย้ายปลูกลงดิน จากนั้น นำราก่อโรคที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA เป็นเวลานาน 7 วัน ตัดปลายเส้นใยเชื้อราด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จำนวน 1-3 ชิ้น ใส่ลงไปในถุงเพาะชำบริเวณใกล้เคียงกับรากยางพารา และทำการใส่ดินฆ่าเชื้อที่ผ่านการผสมจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ PGPR (10^8 CFU/ml) ลงในกระถาง โดยใน 1 กรรมวิธี ใช้ต้นยางชำถุง จำนวน 5 ต้น โดยแบ่งใส่ถุงเพาะชำ ถุงละ 1 ต้น และ ทำการรดสารละลายเซลล์จุลินทรีย์ PGPR ปฏิปักษ์ (10^8 CFU/mL) โดยทำการรดสารละลายเซลล์จุลินทรีย์ ปริมาตร 50 ml ต่อต้น เริ่มรดครั้งแรกหลังย้าย ต้นยางชำถุง ลงปลูกในกระถาง และ รดด้วยสารละลายเซลล์จุลินทรีย์ ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลานาน 150 วัน

การบันทึกผล และ การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

บันทึกผลต้นกล้ายางพาราที่แสดงอาการใบเหลืองโดยประเมินความรุนแรงของโรคด้วยสายตา ภายหลังจากปลูก 30, 60, 90, 120 และ 150 วัน โดยทำการแบ่งการเกิดโรค ตามวิธีของ Kaewchai and Soyong (2010) ดังนี้

ระดับที่ 1	: ต้นกล้าไม่เกิดโรค	ใบมีสีเขียว
ระดับที่ 2	: ต้นกล้ามีใบสีเหลือง	1-25 %
ระดับที่ 3	: ต้นกล้ามีใบสีเหลือง	26-50 %
ระดับที่ 4	: ต้นกล้ามีใบสีเหลือง	51-75 %
ระดับที่ 5	: ต้นกล้ามีใบสีเหลือง	76-100 %

ทำการบันทึกผล และ คำนวณค่า % Disease Reduction พร้อมกับตรวจนับปริมาณ PGPR ปฏิปักษ์ จากดินบริเวณรอบรากยางพารา บนอาหาร KB medium

ค่าต่างๆที่วัดได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และ รายงานเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0

5. ผลการวิจัย

1. การจำแนกแอกติโนมัยซีต และ ราก่อโรครากขาวยางพารา *Rigidoporus microporus* และ การพิสูจน์การเกิดโรค (การจำแนกเชื้อ, การพิสูจน์การเกิดโรค)

การจำแนกสายพันธุ์แอกติโนมัยซีต และ ราก่อโรครากขาวยางพารา *Rigidoporus microporus* ด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์

จากการจำแนกสายพันธุ์ของแอกติโนมัยซีตไอโซเลท Lac-17, Lac-19 และ LRB-14 ตามหลักการจำแนกอ้างอิงตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 9. (Williams *et al.*, 1994) พบว่าแอกติโนมัยซีต ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Streptomyces* spp. จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA โดยให้ผลการวิเคราะห์ของแอกติโนมัยซีต ไอโซเลท Lac-17 จำนวน 1,492 เบส, ไอโซเลท Lac-19 จำนวน 1,130 เบส, ไอโซเลท LRB-14 จำนวน 1,285 เบส และ ราก่อโรครากขาวยางพารา *Rigidoporus microporus* จำนวน 559 เบส ดังแสดงใน (ภาพ 1, 2, 3, 4) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA และ 18S rRNA กับลำดับเบสในฐานข้อมูลแสดงผลใน (ตาราง 1)

5'

GTGTAAAGGCCACTTTGAAAAAGAGGCCAGAGATTAGAAGCCGGCAAAAACACAGGCACCAACAG
TTA
GAACGGCGATGAAGTGAGACTATCACACCGTGAACCGTCGGGCAAACTACGTGACCGAGCTAATG
CATTCAAGGAGAGTCTAACCTCTTTATTATAGAAAGAGACACGACAAGCTCCCAAATCCAATCCAC
AACAAAAAAGTTGAGATTGAGAATTACACGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGG
AGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTT
CGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTATTTAACATTATAGT
TAACCAACAAATACAAAAGACTTTAAAGTGGTTTGTAGTGATGAAAGAAGGAGAGGCCAAGAAAGG
CTCCCCCTCTGAAGTGACAAGTGTGGTTTGAAATGGATTGCGAGGCGTGACATGTTCTCTCCTG
TTAAAAAGAAAACCAGCAACAACCCCG 3'

ภาพ 1 ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 18S rRNA ของรา *Rigidoporus microporus* จำนวน 559 เบส

5'

GGGGGGGGTGGGACAAGCCGTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGGTCGCCTGAT
CTC
CGTGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAGTG
GCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGC
AGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGA
GAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGTCGGATGT
GAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAG
ATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCG
GATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGCAG
CTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTGCACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT
TGACATACACCGGAAAACCGTGGAGACACGGTCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGG
CTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGT
GTTGCCAGCATGCCTTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGA
AGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCC
GGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTG
GGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAACACC 3'

ภาพ 2 ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแอคติโนมัยซีทไอโซเลท LRB-14 จำนวน 1,285 เบส

5'

CGACTTTCGGGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCT
GATC
TGCGATTACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACAGG
CTTTTTGAGACTCGCTCTACCTCACGGTTTCGCAGCTCATTGTACCTGCCATTGTAGCACGTGTGC
AGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGC
AGTCTCCTGTGAGTCCCCATCACCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCG
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTACACCG
ACCACAAGGGGGGCACTATCTCTAATGCTTTCGGGTGTATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCG
TTGCGTGAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAG
CCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGACGACGTGGAA
TGTGCCAACACCTAGTTCCACCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTC
CCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTC
CTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCCTACCACACTCTAGCCTGCC
CGTATCGACTGCAGACCCGAGGTTAAGCCTCGGGCTTTCACAACCGACGTGACAAGCCGCCTACG
AGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC
GTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTA
CAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATAT
TCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTC
TCAGGCCGGCTACCCGT 3'

ภาพ 3 ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของแบคทีเรียยีสต์ไอโซเลท Lac-19 จำนวน 1,130 เบส

5'

CCCCGGGGGGCTCTTTGTTGACTTCGTCCAATCGCCAGTCCCACCTTCGACGGCTCCCTCCACA
AGG
GTTGGGCCACCGGCTTCCGGTGTACCGACTTTTCGTGACCTGACCGGCGGTGGTACAAGGGCCG
GGAACGTATTCACCGCAACAATGCTGATCTGCGATTACTAACGACTCCCACTTCATGGGGGCGAGT
TGCAGACCCCAATCCGAAGTGAAGACCGGGTTTTTGAATTCGCTCCACCTCACGGCTTCCCAGCTC
ATTGTACCGGCCATTGGAACACGTGTGCAGCCCAAGAAATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCCT
CCCCACCTTCCTCCGAATTGACCCCGGCAGTCTCCTGTGAGTCCCCGGCATAACCCGCTGGGAAC
ACAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACCACAG
CCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCACCCATCTCCGGAAGTTTCCGGTGTATGTCA
AGCCTTGGAAGGGTCTTCGCGTTGCGTCCAATTAAGCCACATGCTCCGCCGCTTGGGCGGGCCC
CCGTCAATTCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAAGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGC
TGCGGCACGGACAACGTGAATGTCCCCCACACCTAGTTCCCAACGTTTACCGCGTGGACTACCA
AGGTATCTAATCCTGGTCGCTCCCCACGCTTTTCGCTCCTCAACGTCAGTATCGGCCAGAAATCCG
CCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGAAATCTGCGCATTTACCGCTACCCAGGAATTCCCGATCTC
CCCTACCCGAACCTCTAGCCTGCCCGTATCGAATGCAGACCCGGAGTTAAGCCCCGGGCTTTCACA
TCCGACGCGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTA
CGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTCACGC
TTCTTCCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATC
AGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA
GTCCCAGTGTGGCCGGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCCTGGTAGGCCATCACC
CCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATCCTGCACCGCCGGAGCTTTCCACACGTATCCCAT
GCGGGAACGCGTCATATCCGGTATTAGACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCCAGAGTGCAGGGCAGA
TTGCCACGTGTTACTCACCCGTTGCGCACTAATCCCCGGCGAAACCGGTTTCATCGTTCGACTTG
CATGTGTTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAACCTCTAAAA 3'

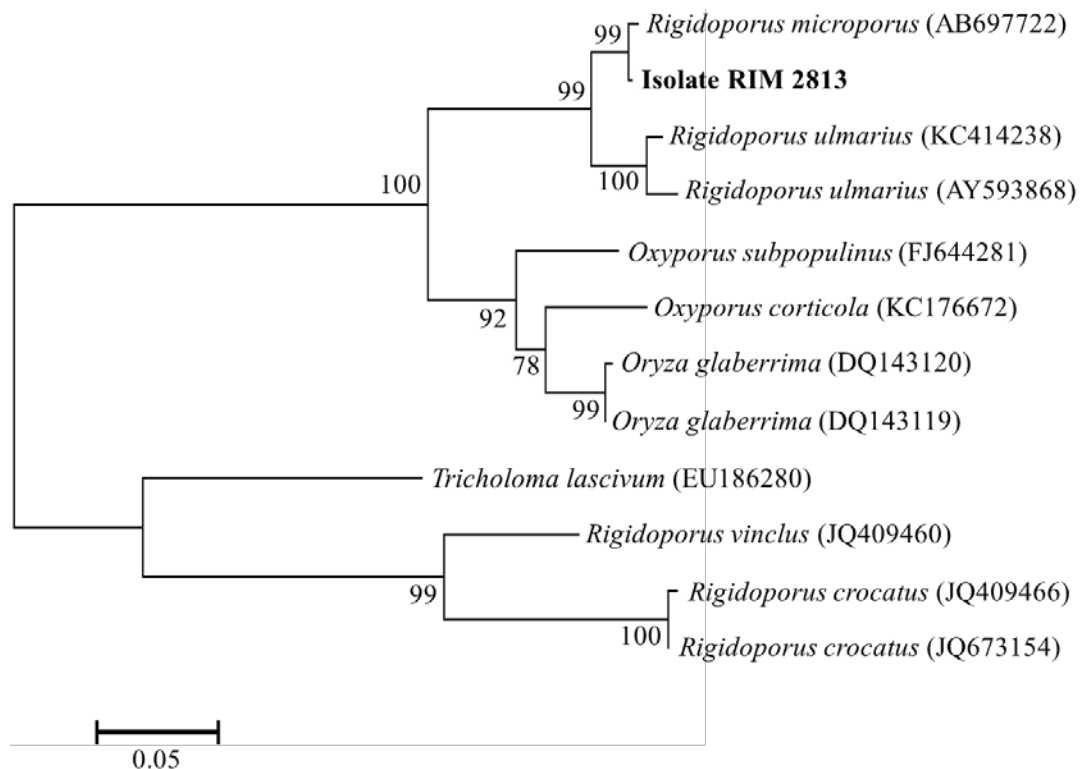
ภาพ 4 ลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ของ แอคติโนมัยซีท์ไอโซเลท Lac-17 จำนวน 1,493 เบส

ตาราง 1 ค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายของลำดับเบสบางส่วนของยีน 16S rRNA ของไอโซเลทที่ให้ผลยับยั้งดี กับ ลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank DNA database

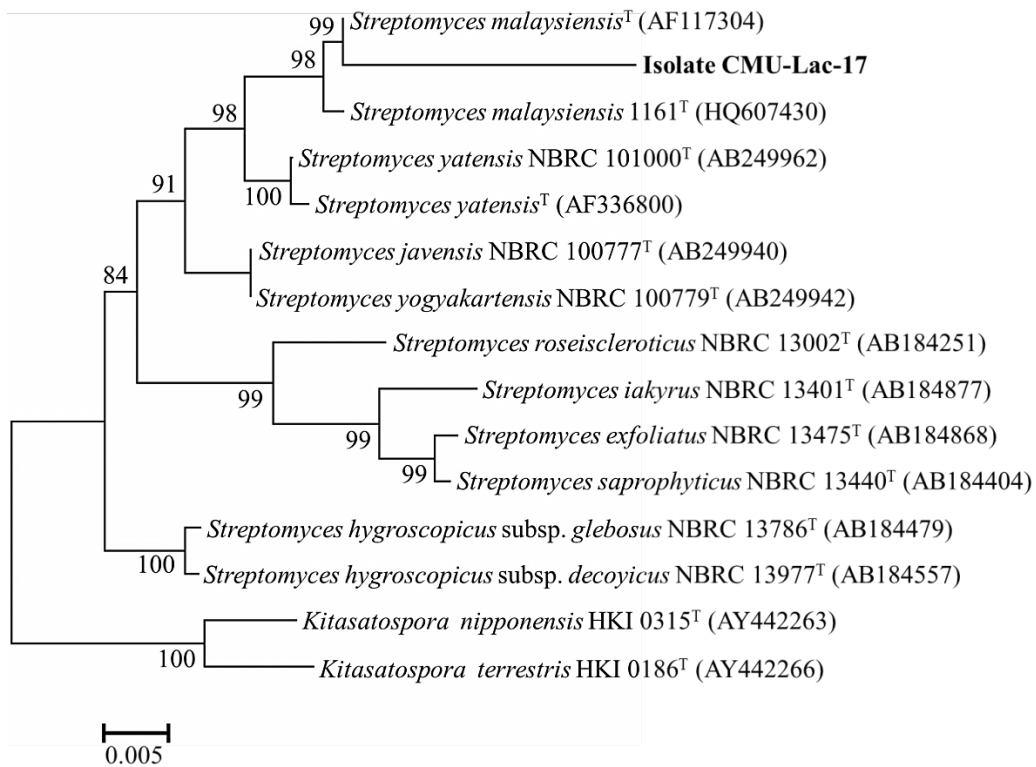
ไอโซเลท	สายพันธุ์ใกล้เคียง	accession number	เปอร์เซ็นต์ความคล้าย
Lac-17	<i>Streptomyces malaysiensis</i> ^T (AF117304)	KC252578	97%
Lac-19	<i>Streptomyces seoulensis</i> HBUM174550 ^T (FJ486370)	KF746344	99%
LRB-14	<i>Streptomyces ahygroscopicus</i> GIM8 ^T (HM246524)	KF746345	99%
RIM 2813	<i>Rigidoporus microporus</i> (AB697722)	-	99%

การศึกษาจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคถึงความสัมพันธ์ในระดับชีวโมเลกุล ด้วยการวิเคราะห์ ลำดับเบสของยีน 18S rRNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม *Rigidoporus* sp. เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ของเชื้อราใน ฐานข้อมูล GenBank โดยให้ผลการวิเคราะห์จำนวน 559 bp จากการทำ phylogenetic tree สามารถจัดเชื้อรา ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ *Rigidoporus microporus* มากที่สุดที่ระดับความคล้ายเท่ากับ 99% (ภาพ 5)

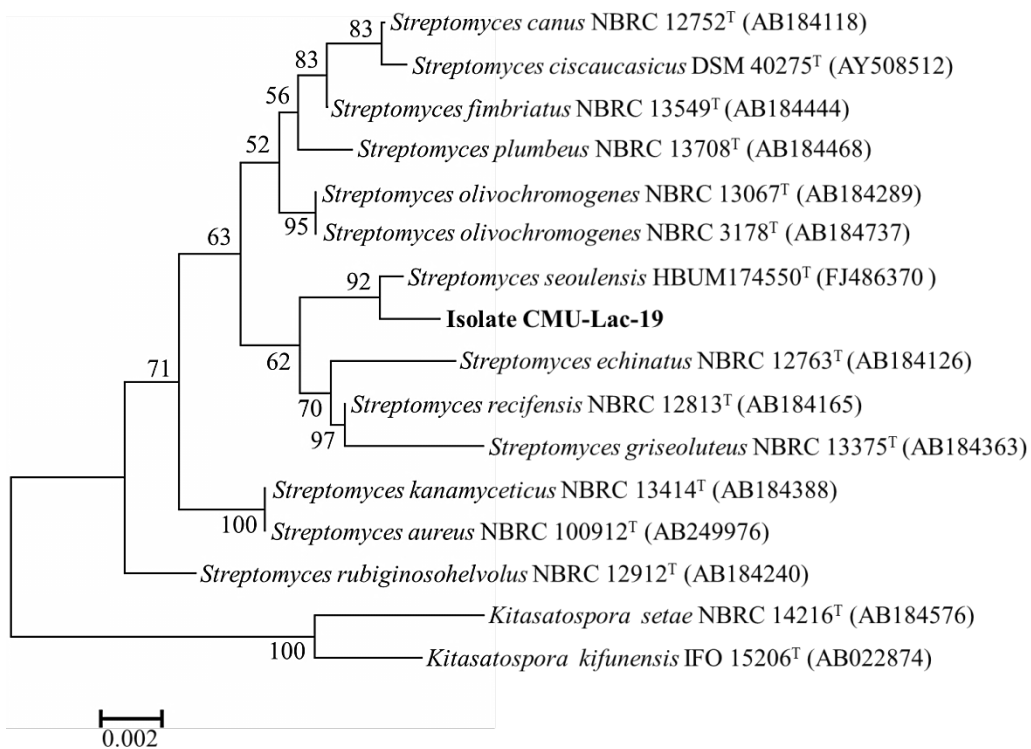
จากการนำลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัสของ 16S rRNA ของ แอคติโนมัยซีทไอโซเลท Lac-17, Lac-19 และ LRB-14 ซึ่งให้ผลยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้สูงสุด มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่บันทึกและรวบรวมไว้ใน Gen Bank DNA database พบว่าลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของ แอคติโนมัยซีท ไอโซเลท Lac-17, Lac-19 และ LRB-14 จัดอยู่ในกลุ่มของ *Streptomyces* ที่ระดับความเหมือน เท่ากับ 97%, 99% และ 99% ตามลำดับ จากนั้นนำเอาข้อมูลลำดับเบสของยีนที่ประมวลรหัส 16S rRNA ที่ได้มาทำการจัดกลุ่มโดยการนำ Phylogenetic tree ให้ผลแสดงดัง ภาพ 6-8



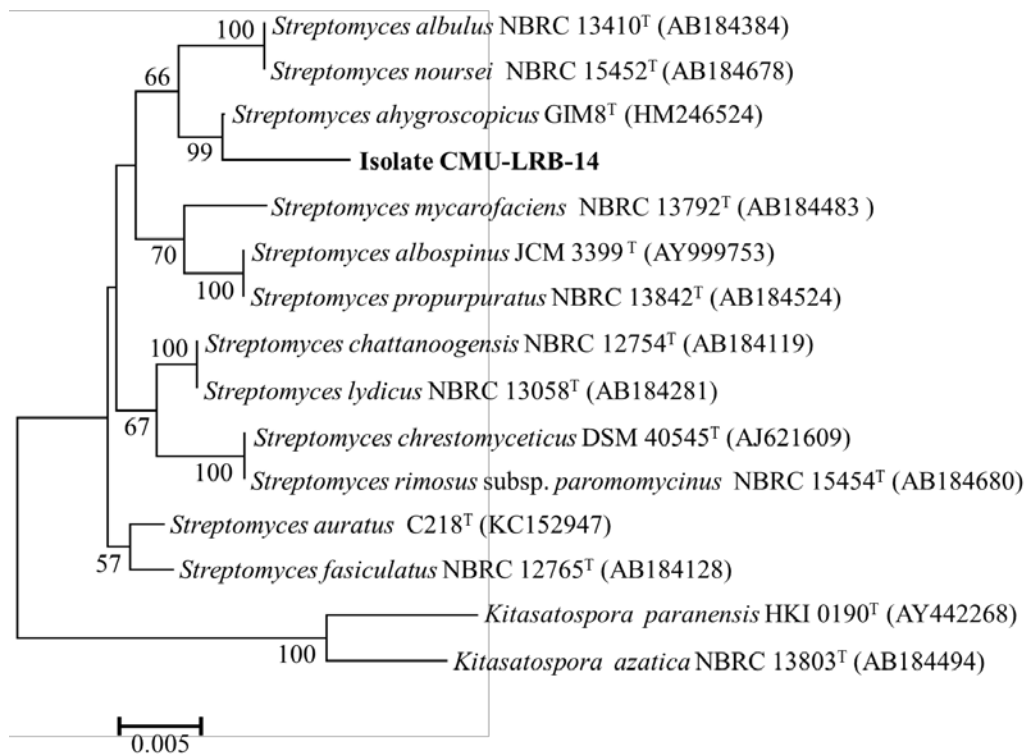
ภาพ 5 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ และ จัดกลุ่มเชื้อราที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank กับเชื้อราก่อโรคราขาว ไอโซเลท RIM 2813 ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ



ภาพ 6 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ และการจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีท์ที่ได้จาก GenBank กับ แอกติโนมัยซีท์ ไอโซเลท Lac-17 ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ



ภาพ 7 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของแอกติโนมัยซีท์ที่ได้จาก GenBank กับ แอกติโนมัยซีท์ ไอโซเลท Lac-19 ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ



ภาพ 8 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ และ จัดกลุ่มของแอสโคไมซีตที่ได้จาก GenBank กับ แอสโคไมซีต ไอโซเลท LRB-14 ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap ที่ 1000 ซ้ำ

การพิสูจน์การเกิดโรค (Pathogenicity test) ของราก่อโรครากขาว *Rigidoporus microporus*

จากการพิสูจน์การก่อโรค โดยนำต้นกล้วยพาราที่ทำการเพาะเลี้ยงอายุ 3 เดือน มาปลูกลงในกระถาง ซึ่งจะมีการผสมดิน, ทราย และ ปุ๋ย (ภาพ 9) หลังจากนั้นจะมีการเติมเชื้อราก่อโรครากขาว (10^8 spore/mL) ลงไป เปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ใส่เชื้อราก่อโรค จากนั้นทำการสังเกตการเจริญของต้นยางชำถุง (ภาพ 10) เพื่อสังเกตอาการที่เกิดขึ้น บันทึกผลการทดลอง



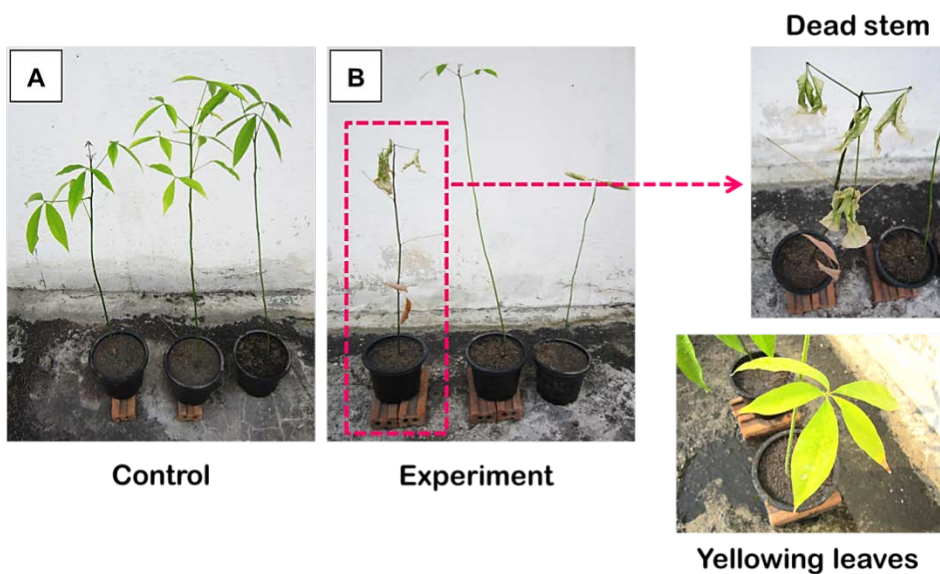
ภาพ 9 การผสมดินกับวัสดุอื่นๆ และการนำเชื้อราก่อโรครากขาวใส่ลงในกระถาง เพื่อทดสอบการก่อโรค



ภาพ 10 การพิสูจน์การเกิดโรคในกระถาง (A) ชุดควบคุม และ (B) ชุดทดสอบ

ผลการพิสูจน์โรคจากการสำรวจรากยางในต้นยางชำถุงที่ตายสำหรับชุดทดสอบ ที่มีการเติมเชื้อราก่อโรคราขาว *Rigidoporus microporus* RIM 2813 ลงไป เทียบกับต้นยางชำถุงในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมเชื้อราก่อโรค พบว่า รากของต้นยางชำถุงที่ตายไม่มีการเจริญยืดยาวออกมาในดินที่ปลูก และมีเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญคลุมอยู่ ประกอบกับ ต้นยางชำถุง แสดงอาการใบเหลือง เหี่ยว ซึ่งต่างจากต้นยางชำถุงที่ไม่ได้เติมเชื้อราจะมีการเจริญเต็มกระถาง และ ไม่มีเส้นใยของเชื้อราปกคลุม ใบมีลักษณะสมบูรณ์สีเขียว แสดงดังภาพ 11

The symptom of white root disease of rubber trees



ภาพ 11 การทดสอบเพื่อพิสูจน์การก่อโรคราขาวในต้นยางชำถุง (A) ชุดควบคุม และ (B) ชุดทดสอบ

การพิสูจน์การเกิดโรค (Pathogenicity test) ของแอคติโนมัยซีส์ปฏิบัติ

จากการนำ *Streptomyces* Lac-17, *Streptomyces* Lac-19 และ *Streptomyces* LRB-14 มาทดสอบการเกิดโรครากขาวกับต้นยางชำถุง พบว่า *Streptomyces* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่ทำให้เกิดโรคกับส่วนใดๆ ของต้นยางชำถุงทดสอบ

2. การควบคุมโรครากขาวของยางพาราในเรือนทดลอง (การเตรียมต้นกล้ายาง, การเตรียมดิน และการเตรียม PGPR ปฏิบัติ, กรรมวิธีในการทดสอบ, การบันทึกผล และการวิเคราะห์ผล)

การเตรียมต้นกล้ายางพารา

การเพาะต้นกล้ายางพาราโดยการเก็บเมล็ดยางพาราบริเวณสวนยางพาราของเกษตรกร ในจังหวัดพะเยา เมื่อได้มาแล้วทำการคัดแยกเมล็ดที่สมบูรณ์ โดยการนำไปแช่น้ำ คัดเมล็ดที่ลอยน้ำทิ้ง เอาเฉพาะเมล็ดส่วนที่จมน้ำมาเพื่อใช้ในการเพาะต้นกล้า สำหรับทดสอบการก่อโรค โดยต้นกล้ายางพาราที่ใช้ทดสอบโรคจะมีอายุประมาณ 3-5 เดือน (ภาพ 12)



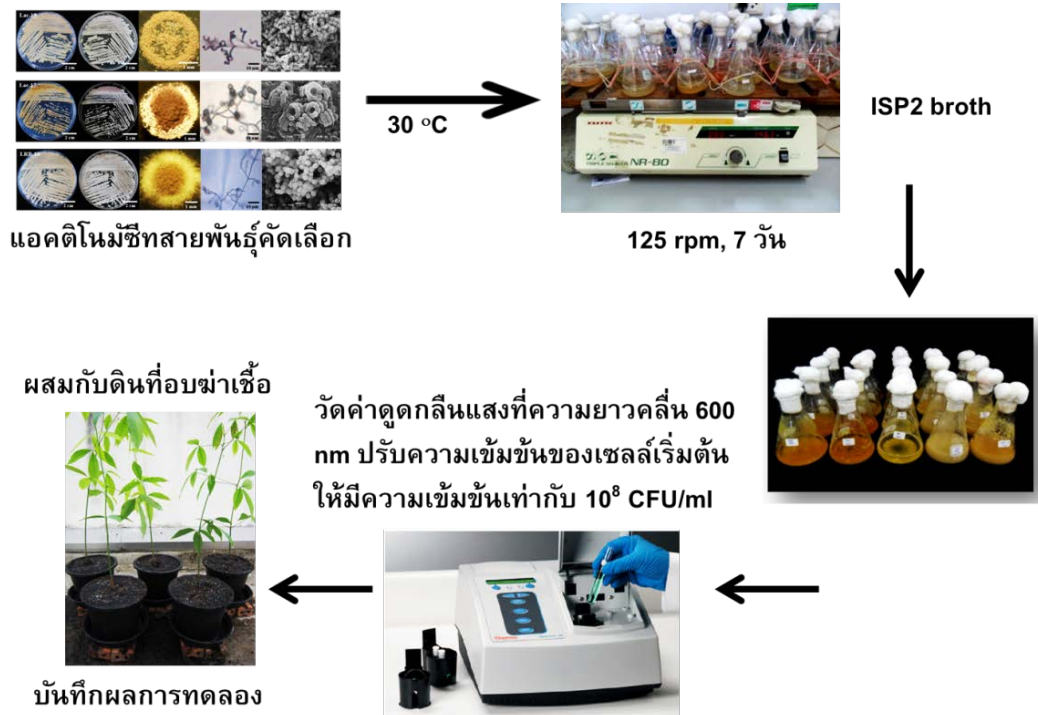
ภาพ 12 ลักษณะของต้นกล้ายางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ที่มีอายุประมาณ 3-5 เดือน

การเตรียมดิน และการเตรียม PGPR ปฏิบัติ

ทำการเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเหลวเพื่อใช้ทดสอบการควบคุมโรครากขาว ซึ่งในส่วนของดินที่จะนำมาทดสอบ คือ ดินแม่อน ที่มีจำหน่ายเป็นถุงสำเร็จรูป ผลิตโดย นพพรการเกษตร อำเภอแม่อน จังหวัดเชียงใหม่ และ ดินที่ขุดจากสวนยางพาราของเกษตรกร ในพื้นที่จังหวัดพะเยา

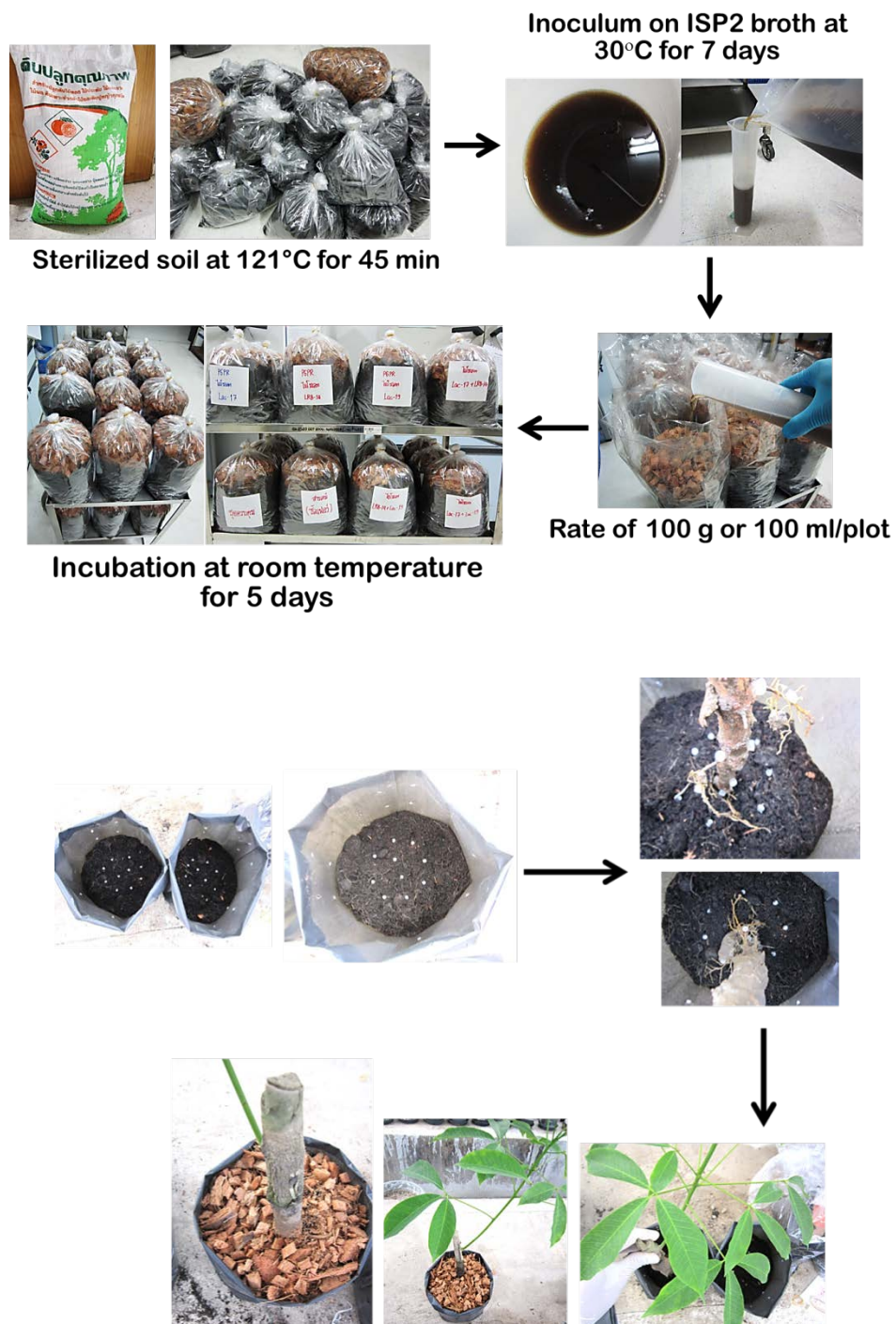


ภาพ 13 ดินตัวอย่างที่ใช้ในการเตรียม PGPR ปฏิบัติ และทดสอบการก่อโรค



ภาพ 14 กระบวนการเตรียมหัวเชื้อแอคติโนไมซีต

กรรมวิธีในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรครากขาวในต้นยางชำถุง : ระดับกระถาง



ภาพ 15 กระบวนการเตรียมเชื้อราในต้นยางชำถุงในกระถางปลูก

จากการออกแบบการทดลองทั้ง 9 ชุดการทดลอง (ภาพ 16) เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าผลของ *Streptomyces* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลท ต่อต้นยางชำถุงให้ผลพอใช้ และ จากการตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราในกระถางปลูก พบว่า แอคติโนมัยซีท ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคในต้นยางชำถุงระดับที่พอใช้ โดยดูได้จากใน กรรมวิธีทดลองที่มี ต้นยางชำถุง + ราก่อโรครากขาว (B) และ กรรมวิธีทดลองที่มี ต้นยางชำถุง + ราก่อโรครากขาว + แอคติโนมัยซีท (C-H) มีอัตราการตายของต้นยางชำถุงเกิดขึ้นเท่าๆ กัน และ ผลการทดสอบไม่ต่างกับการใช้สารเคมี (I) แสดงดังภาพ 17 โดยมีค่า Disease index (DI) ในระดับที่ใกล้เคียงกัน



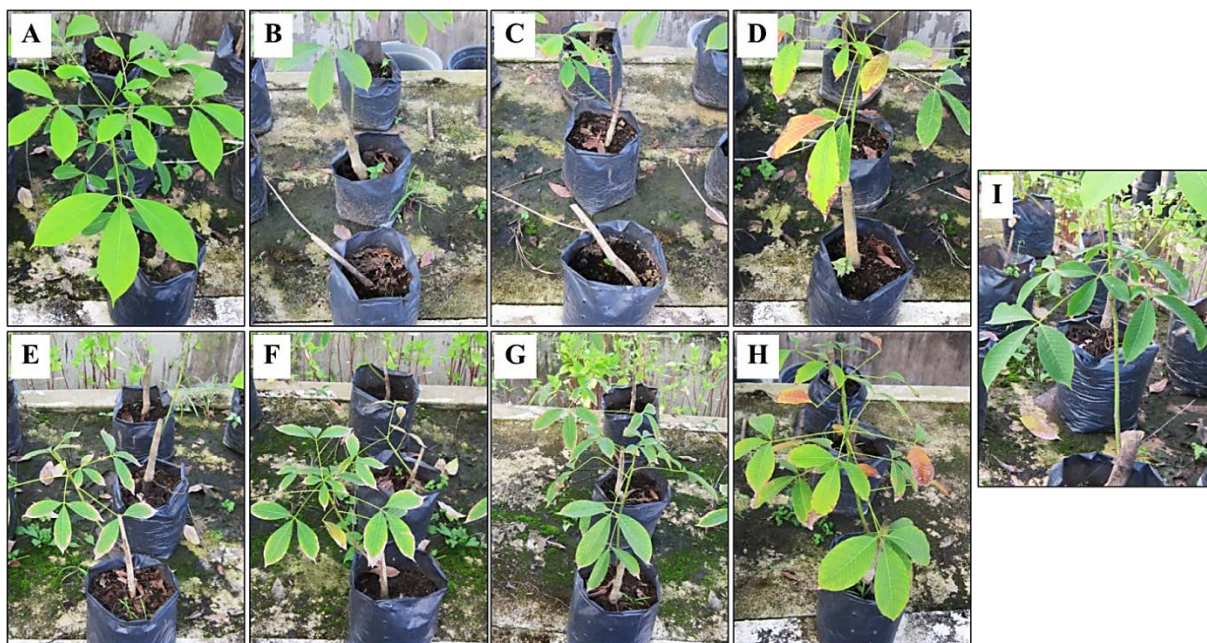
ภาพ 16 การควบคุมโรครากขาวยางพาราในระดับเรือนทดลองวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ทั้งหมด จำนวน 9 กรรมวิธี กรรมวิธี ละ 3 ซ้ำ

ตาราง 2 ค่า Disease index (DI) ภายหลังจากทดสอบกับราก่อโรค *Rigidoporus microporus* เป็นเวลา 5 เดือน

กรรมวิธี	DI*
1. Non-treated	Level 1
2. <i>Rigidoporus microporus</i>	Level 5
3. <i>Streptomyces</i> Lac-17 + <i>Rigidoporus microporus</i>	Level 4
4. <i>Streptomyces</i> Lac-19 + <i>Rigidoporus microporus</i>	Level 4
5. <i>Streptomyces</i> LRB-14+ <i>Rigidoporus microporus</i>	Level 2
6. <i>Streptomyces</i> Lac-17 + <i>Streptomyces</i> Lac-19 + <i>Rigidoporus microporus</i>	Level 3
7. <i>Streptomyces</i> Lac-17 + <i>Streptomyces</i> LRB-14 + <i>Rigidoporus microporus</i>	Level 3
8. <i>Streptomyces</i> Lac-19 + <i>Streptomyces</i> LRB-14+ <i>Rigidoporus microporus</i>	Level 3
9. Sulfur + <i>Rigidoporus microporus</i>	Level 2

หมายเหตุ: Level 1: ต้นกล้าไม่เกิดโรค ใบมีลักษณะสมบูรณ์ สีเขียว, Level 2: ต้นกล้ามีใบสีเหลือง 1-25 %, Level 3: ต้นกล้ามีใบสีเหลือง 26-50%, Level 4: ต้นกล้ามีใบสีเหลือง 51-75%, Level 5: ต้นกล้ามีใบสีเหลือง 76-100%,

* Disease index (DI),



ภาพ 17 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในกระถางปลูก ระยะเวลา 5 เดือน (A) ชุดควบคุม;

(B) *R. microporus* ; (C) *Streptomyces* Lac-17 + *R. microporus* ; (D) *Streptomyces* Lac-19 + *R. microporus* ;(E) *Streptomyces* LRB-14+*R.microporus* ;(F), *Streptomyces* Lac-17 + *Streptomyces* Lac-19 +*R. microporus* ; (G) *Streptomyces* Lac-17 + *Streptomyces* LRB-14 + *R. microporus* ; (H) *Streptomyces* Lac-19 + *Streptomyces* LRB-14 + *R. microporus*; (I) Sulfur + *R. microporus*

การทดสอบการมีชีวิตอยู่รอดของแอคติโนมัยซีสที่คัดเลือกได้ในดิน

ผลการทดลองพบว่า *Streptomyces* sp. ทั้ง 3 ไอโซเลท จะมีปริมาณลดลงหลังจากที่เติมลงดินในระยะต่างๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะในช่วงที่ทำการทดลอง มีปัจจัยต่างๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ ความชื้น สัมพัทธ์ในอากาศ หัวเชื้อเริ่มต้นที่น้อยเกินไป เป็นต้น ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่เติมลงไปมีชีวิตรอดน้อยลง

ตาราง 3 การตรวจนับปริมาณแอคติโนมัยซีทที่เติมลงไปดินในระยะเวลาต่างๆ (CFU/g soil)

กรรมวิธี	ระยะเวลา		
	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน
1. Non-treated	-	-	-
2. <i>Rigidoporus microporus</i>	-	-	-
3. <i>Streptomyces</i> Lac-17+ <i>R. microporus</i>	3.3×10^5	4.4×10^4	3.1×10^3
4. <i>Streptomyces</i> Lac-19+ <i>R. microporus</i>	3.8×10^5	2.2×10^4	2.6×10^3
5. <i>Streptomyces</i> LRB-14+ <i>R. microporus</i>	2.4×10^5	2.5×10^4	1.8×10^3
6. <i>Streptomyces</i> Lac-17+ <i>Streptomyces</i> Lac-19 + <i>R. microporus</i>	7.1×10^5	3.6×10^4	2.9×10^3
7. <i>Streptomyces</i> Lac-17+ <i>Streptomyces</i> LRB-14+ <i>R. microporus</i>	5.9×10^5	3.8×10^4	4.1×10^3
8. <i>Streptomyces</i> Lac-19+ <i>Streptomyces</i> LRB-14+ <i>R. microporus</i>	5.3×10^5	4.6×10^4	3.1×10^3
9. Sulfur+ <i>R. microporus</i>	-	-	-



ภาพ 18 การเจริญของจุลินทรีย์ภายหลังจากเติมลงไปดิน เป็นระยะเวลา 5 เดือน บนอาหาร King' B medium ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5-7 วัน

วิจารณ์ผลการทดลอง

แอสโคไมซีต ไอโซเลท Lac-17, Lac-19, LRB-14 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดีมากในห้องปฏิบัติการ เมื่อตรวจสอบด้วย 16S rRNA gene กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าแอสโคไมซีต ทั้ง 3 ไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* spp. จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากมาย และมีบทบาทสำคัญ คือ เป็นแหล่งของสารปฏิชีวนะหลายชนิดที่ใช้ในทางการแพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม และ สิ่งแวดล้อม งานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Sujatha *et al.* (2005) ได้มีการค้นพบสารปฏิชีวนะกลุ่ม polyketide ที่ผลิตโดย *Streptomyces psammoticus* BT-408 พบว่ามีความสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รา และ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อยา methicillin ได้ดี แต่เมื่อนำแอสโคไมซีต ทั้ง 3 ไอโซเลทไปใช้ในกระถางปลูก ประสิทธิภาพการลดความรุนแรงของโรครากขาวให้ผลพอใช้ สาเหตุที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราในกระถางปลูกให้ผลพอใช้ อาจเป็นเพราะ ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นของแอสโคไมซีตที่เติมลงไปมีปริมาณน้อย ซึ่งอาจจะไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญได้ โดยสอดคล้องกับผลการนับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ในดินหลังจากปลูกเป็นเวลา 5 เดือน พบว่า แอสโคไมซีตมีปริมาณลดลงมาก การควบคุมเชื้อราโรคพืชด้วยชีววิธี แม้ว่าจะสามารถคัดเลือกได้แอสโคไมซีตที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในห้องปฏิบัติการได้ดีแล้ว แต่เมื่อนำไปใช้ในแปลงปลูกจริงอาจจะไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากมีปัจจัยอีกหลายประการที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะปัจจัยสำคัญที่ควรคำนึงถึง คือ ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Ryan and Kinkel, 1997) อีกประการหนึ่ง คือ รูปแบบของหัวเชื้อสดที่นำไปใช้ ต้องเหมาะสม เตรียมง่าย สะดวก และสามารถนำพาเชื้อไปสู่บริเวณที่เกิดโรคได้ (Sabaratnam and Traquair 2002; Jayasuriya and Thennakoon 2007)

ดังนั้น ถ้าได้มีการเตรียมหัวเชื้อแอสโคไมซีตให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม และ มีการเติมหัวเชื้อลงไปเพิ่มเติมอีกหลังจากใส่ตอนปลูกครั้งแรก คาดว่าประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคจะเพิ่มมากขึ้น

ในด้านความปลอดภัยของการใช้แอสโคไมซีต พบว่า จากการทดสอบผลการก่อโรคในส่วนต่างๆ ของต้นยางชำถุงของแอสโคไมซีต ทั้ง 3 ไอโซเลท ที่นำไปใช้ ไม่ทำให้เกิดโรคในต้นยางพาราได้ และ จากการรวมวิธีการทดลองต้นยางชำถุงที่เติมแอสโคไมซีตลงไป เจริญเติบโตดีพอกับต้นยางชำถุง ที่ไม่ได้เติมเชื้ออะไรเลย แสดงให้เห็นว่าแอสโคไมซีต ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังกล่าว ไม่มีผลทำให้ต้นยางชำถุงเกิดโรคใดๆ และ จากการจัดจำแนก พบว่า แอสโคไมซีต ทั้ง 3 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* spp. ซึ่งยังไม่พบรายงานการก่อโรคทั้งใน คน สัตว์ และ พืช ดังนั้น การใช้แอสโคไมซีต ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังกล่าว จึงมีความปลอดภัยเมื่อนำไปใช้ในสภาพจริง

สรุปผลการทดลอง

แอสโคไมซีต ไอโซเลต Lac-17, Lac-19, LRB-14 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นยางพารา ให้ผลยับยั้งการเจริญของรา *Rigidoporus microporus* ได้ดีที่สุดในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อจัดจำแนกเชื้อโดยใช้การเปรียบเทียบลำดับเบสใน 16S rRNA gene กับฐานข้อมูล NCBI พบว่า แอสโคไมซีต ทั้ง 3 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* spp. ซึ่งยังไม่พบรายงานการทำให้เกิดโรคในคนและพืช แต่เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราในต้นยางชำถุงที่ปลูกในกระถาง กลับพบว่า ไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ อาจเนื่องมาจาก ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เติมลงไปมีน้อยเกินไปจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ และ รูปแบบของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นไม่เหมาะสม สำหรับการทดสอบความปลอดภัยของแอสโคไมซีตที่คัดเลือกได้ในการนำไปใช้งานจริง พบว่า แอสโคไมซีตที่คัดเลือกได้ไม่ก่อให้เกิดโรคกับส่วนใดๆ กับต้นยางชำถุงเลย และ ไม่มีผลต่อการเจริญของต้นยางชำถุงในกระถางปลูก

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลอง พบว่า แอสโคไมซีต ไอโซเลต Lac-17, Lac-19, LRB-14 สามารถยับยั้งราก่อโรครากขาว *Rigidoporus microporus* ได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการ และ ไม่ก่อให้เกิดโรคกับต้นยางชำถุง ดังนั้น จึงมีแนวโน้มว่าจะสามารถนำจุลินทรีย์ดังกล่าวไปช่วยป้องกัน และ ลดความรุนแรงในการเกิดโรครากขาวในยางพาราได้ แต่จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการลดความรุนแรงของโรคในต้นยางชำถุงที่ปลูกในระดับกระถาง กลับพบว่า สามารถลดความรุนแรงของโรคได้พอใช้ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นของจุลินทรีย์ที่ใช้ มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค อีกประการหนึ่ง คือ รูปแบบของหัวเชื้อสดที่นำไปใช้ ต้องเหมาะสม เตรียมง่าย สะดวก และสามารถนำพาแอสโคไมซีตไปสู่บริเวณที่เกิดโรคได้

ดังนั้น การควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชโดยชีววิธี แม้ว่าจะสามารถคัดเลือกแอสโคไมซีต ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดได้ แต่เมื่อนำไปใช้จริงในภาคปฏิบัติต้องมีการศึกษาปัจจัยอีกหลายด้านที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ด้วย เช่น อุณหภูมิ ค่าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ การมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์ เป็นต้น คาดว่าประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคจะเพิ่มมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย จากโครงการวิจัยยางพาราขนาดเล็กยางพารา ปี 2555 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

- Ahn, I.P., Lee, S.W. and Suh, S.C. (2008). Rhizoctonia-induced priming in arabidopsis is dependent on ethylene, jasmonic acid and NRP1. *Mol.Plant Microb. Interact* 20: 759 - 768.
- Arwiyanto, T., Goto, M., Tsuyumu, S. and Takikawa, Y. (1994). Biological control of bacterial wilt of tomato by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* isolated from *Trelitzia reginae*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 60: 421-430.
- Benitez, T., Rincon, M.A., Limon, M.C. and Codon, C.A. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Inter. Microb* 7: 249-260.
- Bernal, G., Illanes, A. and Ciampi, L. (2002). Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Biotech* 5: 1-5.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. and Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiol. Lett* 247: 147-152.
- Emmert, E. A. B. and Handelsman, J. (1999). Biocontrol of plant disease: a Gram positive perspective. *FEMS Micro. Letters* 171: 1-9.
- Guo, J.H., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H.L., Gong, L.Y., Zhang, L.X. and Sun, P.H. (2004). Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 29: 66 -72.
- Haggag, W.M. and Mohamed, H.A.A. (2007). Biotechnological aspects of microorganism used in plant biological control. *American Eurasian Journal Sustainable Agriculture* 1: 7-12.
- Jayasuriya, K.E. and Thennakoon, B.I. (2007). Biological control of *Rigidoporus microporus*, the cause of white root disease in rubber. *Ceylon J. Sci* 36: 9 -16.
- Jetiyanon, K. and Kloepper, J.W. (2002). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control* 24: 285 - 291.
- Kaewchai, S. and Soyong, K. (2010). Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. *J. Agri.Tech* 6: 349-363.

- Kim, B.S. and Hwang, B.K. (2007). Microbial fungicides in the control of plant disease. *J. Phytopatho* 155: 641-653.
- Lemessa, F. and Zeller, W. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in ethiopia. *Biol. Control* 42: 336-344.
- Mahadthanapuk, S., Yu, L.D., Cutter, R., Vilaithong, T and Anuntalabhochar, S. (2007). Mutation of *Bacillus licheniformis* using low-energy ion beam bombardment. *Surface Coat. Technol* 201: 8029-8033.
- Mar Vazquez, M., Cesar, S., Azon, R., Barea, J.M. (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecol* 15: 261-272.
- Notz, R. M., Maurhofer, U., Schnider, K., Duffy, B., Haas, D. and Defago, G. (2001). Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetyl phloroglucinol gene cluster in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO in the rhizosphere. *Phytopatho* 91: 873-881.
- Pleban, S., Chernin, L. and Chet, I. (1997). Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Lett. Appli. Microb* 25: 284-288.
- Sabaratnam, S. and Traquair, J.A. (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* Damping-off in tomato transplants. *Biol. control* 23: 245-253.
- Sigee, D.C. (1993). Bacterial plant pathology: Cell and molecular aspects. Cambridge University Press.
- Sujatha, P., Bapi Raju, K.V.V.S.N. and Ramana, T. (2005). Studies on a new marine *Streptomyces* BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res* 160: 119-126.
- Summerbell, R.C. (1987). The inhibitory effect of *Trichoderma* species and other soil microfungi on formation of mycorrhiza by *Laccaria bicolor* *in vitro*. *New Phytol* 105: 437-448.
- Szczeczek, M. and Shoda, M. (2006). The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB 14-C on its efficacy as a biocontrol agent *Rhizoctonia solani*. *J. Phytopatho* 154: 370-377.