



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
สัญญาเลขที่ RDG5550073

โครงการย่อยที่ 1

ศักยภาพของแอคติโนมัยสิทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora*
สาเหตุโรคเส้นดำยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ

โดย ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว และคณะ

ตุลาคม 2556

สัญญาเลขที่ RDG5550073

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการย่อยที่ 1
ศักยภาพของแอคติโนมัยสิตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora*
สาเหตุโรคเส้นด้ายยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นายสิทธิธัตต์ สร้อยเพชรเกษม	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. นางอารี ทองทุ่ง	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
4. นางทัศนีย์ มีพยุง	คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปย่อรายงานสำหรับผู้บริหาร

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ศักยภาพของแอคติโนมัยสิทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
Phytophthora สาเหตุโรคเส้นดำยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ
 (ภาษาอังกฤษ) Biological control of black stripe of Para-rubber tree with
 actinomycetes crude extract

ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด และที่อยู่

ชื่อ-สกุล ดร.นารีนักษณ นาแก้ว

หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ที่อยู่ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
 มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์/โทรสาร (055) 964622/ 964770 E-mail: nnakaew@hotmail.com

ผู้ร่วมโครงการ

1. นายสิทธิรัตน์ สร้อยเพชรเกษม มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. นางอารี ทองทุ่ง มหาวิทยาลัยนเรศวร
3. นางทัศนีย์ มีพุง มหาวิทยาลัยนเรศวร

งบประมาณทั้งโครงการ 140,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินการ 12 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2555 – 31 กรกฎาคม 2556

ปัญหาที่ท้าวิจัยและความสำคัญ

โรคเส้นดำ (Black Stripe) เป็นโรคทางลำต้นของยางพาราที่มีความสำคัญ เนื่องจากทำลายหน้ากรีดซึ่งเป็นบริเวณเก็บเกี่ยวการป้องกันและกำจัดทำได้โดยการใส่สารเคมี ซึ่งอาจมีอันตรายต่อผู้ใช้หากไม่ระมัดระวัง และมีผลต่อสุขภาพของเกษตรกรที่ใช้สารเคมีนั้นๆ แนวทางป้องกันการระบาดของเชื้อโรคนี้อาจทำได้โดยใช้วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งให้ผลดีและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการค้นหาแอคติโนมัยสิทซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดที่ได้จากเชื้อไปใช้จริง

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสิทที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* และประเมินศักยภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทที่คัดเลือกได้เทียบกับสารเคมีที่แนะนำให้ใช้ในทางการเกษตร

ผลการดำเนินงาน

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual culture bioassay โดยเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสิท ไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ เปรียบเทียบกับ Metalaxyl โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และ เชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในทุเรียนที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาใช้ในการทดสอบ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาดจากแอคติโนมัยสิทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ดีกว่า Metalaxyl โดยให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคและสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากการวิชาการเกษตร เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ metalaxyl ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และมากกว่า 1 mg/ml ตามลำดับ

ผลจากการเปรียบเทียบต้นทุนในการผลิต พบว่าการใช้สารสกัดหยาดจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 ในการยับยั้งเชื้อราใช้ต้นทุนสูงกว่า metalaxyl 50 เท่า อย่างไรก็ตามถ้าได้มีการนำเอาสารสกัดหยาดไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ปริมาณสารที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อราจะน้อยลง ทำให้ต้นทุนของสารจะน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามต้องมีค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการทำให้สารบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย

สรุปผลการวิจัย

ผลจากการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ทั้ง 2 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคและสายพันธุ์ ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในทุเรียนที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร) ได้ดีกว่า metalaxyl ซึ่งปัจจุบันพบว่าเชื้อรา *Phytophthora* หลายสายพันธุ์สามารถต้านทานได้ และเมื่อพิจารณาถึงต้นทุนการผลิตพบว่าสารสกัดหยาดมีต้นทุนสูงกว่า 50 เท่า ซึ่งถ้ามีการพัฒนาด้านการผลิต และมีการทำให้สารมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงขึ้นและปริมาณที่ใช้จะน้อยลงอาจจะสามารถทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลงได้ ดังนั้นสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำมาใช้ทดแทนสารเคมี

ข้อเสนอแนะที่คาดว่าจะควรวิจัยเพิ่มเติม และวิธีการที่ควรพัฒนาต่อยอดสู่ภาคปฏิบัติจริง

ในงานวิจัยครั้งต่อไปควรมีการวิจัยเพิ่มเติมในเรื่องการทำให้สารสกัดหยาดมีความบริสุทธิ์มากขึ้น และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเพื่อหาค่า MIC และทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตอีกครั้งและควรมีการนำเอาสารสกัดหยาดหรือสารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นไปทดสอบหาปริมาณการใช้ในต้นยางที่เป็นโรคจริงเทียบกับ metalaxyl

ผลงานทางวิชาการที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

นำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

มีการนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมระดับนานาชาติเรื่อง Fungal Biodiversity and Biotechnology ที่จัดขึ้นเมื่อวันที่ 10-12 มกราคม 2557 ณ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จ. เชียงราย

รหัสโครงการ: RDG5550073
 ชื่อโครงการ โครงการวิจัยขนาดเล็กเรื่องยางพารา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์
 มหาวิทยาลัยนเรศวร
 ชื่อโครงการย่อยที่ 1 ศักยภาพของแอคติโนมัยสิทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
Phytophthora สาเหตุโรคเส้นดำยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ
 ชื่อนักวิจัย: ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว
 สังกัด: ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ม. นเรศวร
 โทรศัพท์: 055 964622
 E-mail: nnakaew@hotmail.com
 ระยะเวลาดำเนินโครงการ: 1 สิงหาคม 2555 – 31 กรกฎาคม 2556

บทคัดย่อ

โรคเส้นดำ (Black Stripe) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Phytophthora* เป็นโรคทางลำต้นของยางพาราที่มีความสำคัญ เนื่องจากทำลายหน้ากรีดซึ่งเป็นบริเวณเก็บเกี่ยวการป้องกันและกำจัดทำได้โดยใช้สารเคมี ซึ่งอาจมีอันตรายต่อผู้ใช้หากไม่ระมัดระวัง แนวทางป้องกันการระบาดของเชื้อโรคนี้อาจทำได้โดยใช้วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งให้ผลดีและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการควบคุมโรคเส้นดำโดยชีววิธี จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการค้นหาแอคติโนมัยสิทซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดที่ได้จากเชื้อไปใช้จริง

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual culture bioassay โดยเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ เปรียบเทียบกับ Metalaxyl โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และ เชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในทุเรียนที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาใช้ในการทดสอบผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ดีกว่า Metalaxyl โดยให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคและสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ metalaxyl ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ มากกว่า 1 mg/ml ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบต้นทุนในการผลิต พบว่าการใช้สารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 ในการยับยั้งเชื้อราใช้ต้นทุนสูงกว่า metalaxyl 50 เท่า ซึ่งถ้ามีการพัฒนาด้านทางการผลิต และมีการทำให้สารมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงขึ้นและปริมาณที่ใช้จะน้อยลงอาจจะสามารถทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลงได้ ดังนั้นสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำมาใช้ทดแทนสารเคมี

Project code: RDG5550073
Project title: Biological control of black stripe of Para-rubber tree with actinomycetes crude extract
Investigator: Dr. Nareeluk Nakaew
E-mail Address: nnakaew@hotmail.com
Project Period: 1 August 2555 – 31 July 2556

Abstract

Black stripe disease caused by *Phytophthora* spp. is a stem disease of para rubber trees. It is an important disease damaging the tapping area reach to reduction of latex yield. Use of chemical fungicides is able to control the disease but may harm to the farmers. However, biological approach to control the disease, which could be safer for human use and environment, has not yet been studied. Here, we aim to evaluate antifungal activity of some actinobacteria and their applicable extract for biological control of the disease in rubber trees farming. Based on *in vitro* antifungal test by dual culture technique, we found 75 bioactive isolates of actinobacteria that were able to inhibit growth of *Phytophthora* sp. Among all tested actinobacteria, an isolate A31 showed the most distinctive antifungal activity against the fungus by giving the largest inhibition zone of 55 mm. The isolate was then grown in a liquid medium (ISP2) for extraction of its cell-free culture fluid. Crude extract obtained by solvents (ethyl acetate) extraction was evaluated its minimum inhibitory concentrations (MICs) against 2 isolates of *Phytophthora* compared with a positive control, metalaxyl. Two isolates of *Phytophthora* include one isolated from diseased rubber tree (isolate 1) and other one causing rot disease in durian (isolate 2) provided by Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. It was shown that the crude extract revealed greater inhibition activities against both isolates of *Phytophthora* with MIC values of 0.1 mg/ml for isolate 1 and 1 mg/ml for isolate 2, compared to the control that showed higher MIC values of 0.5 and >1 mg/ml, respectively. Although investment cost for production of the crude extract derived from the isolate A31 was 50 times higher than the cost for chemical use, we still convince that purity increase of antifungal substances in the crude extract might reduce effective dose of the substances used and further reduce the investment cost for farmers. We concluded that the antifungal substances produced by the isolate A31 could be an alternative approach for sustainable control of the disease with less or no harm to human and environment.

ความสำคัญและความเป็นมาของการวิจัย

โรคเส้นดำ (Black Stripe) เป็นโรคทางลำต้นของยางพาราที่มีความสำคัญ เนื่องจากทำลายหน้ากรีดซึ่งเป็นบริเวณเก็บเกี่ยว โรคเส้นดำเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* พบระบาดมากในช่วงฤดูฝน หรือเมื่อมีหมอกลงจัด หรือมีความชื้นในอากาศสูง ลักษณะอาการของโรคบริเวณเหนือรอยกรีดในระยะแรกเปลือกจะเป็นรอยขีด ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นรอยบวมสีดำหรือสีน้ำตาล ขยายขึ้นลงเป็นเส้นตามแนวยืนของลำต้น เมื่อเงื่อนไขเปลือกออกดูจะพบรอยบวมสีดำนั้นเป็นลายเส้นดำบนเนื้อไม้อาการขั้นรุนแรงทำให้เปลือกของหน้ากรีดบริเวณที่เป็นโรคปริ เน่า มีน้ำยางไหลตลอดเวลา จนเปลือกเน่าหลุดไปในที่สุด เปลือกงอกใหม่เสียหายกรีดซ้ำไม่ได้ อายุการให้ผลผลิตของต้นยางจึงลดลง

การป้องกันและกำจัดทำได้โดยการใช้สารเคมี ซึ่งอาจมีอันตรายต่อผู้ใช้หากไม่ระมัดระวัง และมีผลต่อสุขภาพของเกษตรกรที่ใช้สารเคมีนั้นๆ แนวทางป้องกันการระบาดของเชื้อโรคนี้อาจทำได้โดยใช้วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งให้ผลดีและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการค้นหาแอคติโนไมยสิทธิ์ซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดที่ได้จากเชื้อไปใช้จริง

วัตถุประสงค์

เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนไมยสิทธิ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* และประเมินศักยภาพของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนไมยสิทธิ์ที่คัดเลือกได้เทียบกับสารเคมีที่แนะนำให้ใช้ในการเกษตร

ทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้อง

โรคทางลำต้นของยางพาราที่มีความสำคัญได้แก่ โรคเส้นดำ (Black Stripe) เนื่องจากทำลายหน้ากรีดซึ่งเป็นบริเวณเก็บเกี่ยว โรคเส้นดำมีสาเหตุมาจาก เชื้อรา *Phytophthora botryose* Chee. และ *P. palmivola* (Butler) Butler. (สถาบันวิจัยยาง, 2555) พบระบาดมากในช่วงฤดูฝน หรือ เมื่อมีหมอกลงจัด หรือมีความชื้นในอากาศสูง ลักษณะอาการของโรคบริเวณเหนือรอยกรีดในระยะแรกเปลือกจะเป็นรอยขีด ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นรอยบวมสีดำหรือสีน้ำตาล ขยายขึ้นลงเป็นเส้นตามแนวยืนของลำต้น เมื่อเงื่อนไขเปลือกออกดูจะพบรอยบวมสีดำนั้นเป็นลายเส้นดำบนเนื้อไม้อาการขั้นรุนแรงทำให้เปลือกของหน้ากรีดบริเวณที่เป็นโรคปริ เน่า มีน้ำยางไหลตลอดเวลา จนเปลือกเน่าหลุดไปในที่สุด เปลือกงอกใหม่เสียหายกรีดซ้ำไม่ได้ อายุการให้ผลผลิตของต้นยางจึงลดลง

การป้องกันและกำจัดทำได้โดยการใช้สารเคมี ซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพของเกษตรกรที่ใช้สารเคมีนั้นๆ หากไม่ระมัดระวัง และสารเคมีที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำให้ใช้ในการกำจัดเชื้อ *Phytophthora* ได้แก่ เมทาแลกซิล (metalaxyl) และ ฟอสเอทิล อลูมิเนียม (fosetyl-Aluminium) (สถาบันวิจัยยาง, 2555) โดย metalaxyl จะนิยมใช้กันมากที่สุด อย่างไรก็ตาม พบว่า ปัจจุบัน เชื้อรา *Phytophthora* สามารถที่จะต้านทานต่อ Metalaxyl ได้ ส่งผลให้การใช้ Metalaxyl ในการป้องกันและกำจัด เชื้อรามีประสิทธิภาพลดลง

(Davidse, 1981; Hunger *et al.*, 1982; Stack and Millar, 1985; Lamboy and Paxton, 1992; Bhat *et al.*, 1993)

ปัจจุบันการป้องกันและกำจัดเชื้อราก่อโรคพืชเป็นแนวทางหนึ่งที่น่ามาทดแทนการใช้สารเคมี จุลินทรีย์ที่เริ่มนำมาใช้ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสิท (Filonow and Lockwood, 1985) โดยเฉพาะ จินัส *Streptomyces* ได้ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชในพืชหลายชนิด (Merriman *et al.*, 1974; Liu, 1992; El-Abyad *et al.*, 1993; Hiltunen *et al.*, 1995; Jones and Samac, 1996; Paulsrud, 1996; Gyenis *et al.*, 1999) ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* ในพืชตระกูลถั่ว พบว่ามีการใช้แอคติโนมัยสิท จินัส *Streptomyces* (Jones and Samac, 1996), เชื้อรากลุ่ม *Hyphochytrium catenoides* (Hsu and Lockwood, 1984) และ แบคทีเรีย *Bacillus cereus* UW85 (Osburn *et al.*, 1995) ในพริกไทยพบว่าการ ใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา (Ezziyyani *et al.*, 2007) ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้การ ควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* ในยางพารา โดยชีววิธี

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น งานวิจัยในครั้งนี้ จึงมุ่งที่จะค้นหาแอคติโนมัยสิทซึ่งเป็นกลุ่มของ จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด โดยเฉพาะเชื้อในสกุล *Streptomyce* (Takizawa *et al.*, 1993) โดยนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดที่ ได้จากเชื้อไปใช้จริง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการระบาดของโรคด้วยชีววิธี ซึ่งให้ผลดีและไม่เป็น พิษต่อสิ่งแวดล้อม

วิธีการวิจัย

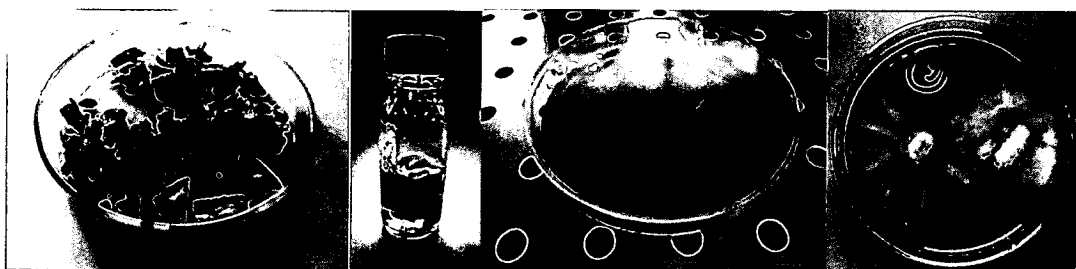
1. การแยกเชื้อราก่อโรคเส้นดำในยางพารา (ภาพ 1)

1.1 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของต้นยางที่เป็นโรคบริเวณหน้ายางจากสวนยางใน อ. วังทอง จังหวัด พิษณุโลก

1.2 ตัดชิ้นส่วนของต้นยางบริเวณที่เกิดโรคให้มีขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร ล้างด้วยน้ำปะปา จากนั้น นำไปล้างน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว

1.3 แช่ชิ้นส่วนที่ได้จากข้อ 1.1 ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 1% นาน 3-5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว

1.4 วางชิ้นส่วนพืชในข้อ 1.3 บนอาหาร water agar ที่เติม คอมแรมฟีนีคอล และ rose Bengal ป่มที่อุณหภูมิห้องจนเห็นเส้นใยของเชื้อราเจริญขึ้นมา จากนั้นย้ายเชื้อราโดยการตัดที่ปลายโคโลนีไป เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA



ภาพ 1 การแยกเชื้อราก่อโรคเส้นดำในยางพารา

1.5 ศึกษาลักษณะการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่แยกได้ได้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา

1.6 เก็บรักษาเชื้อราที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

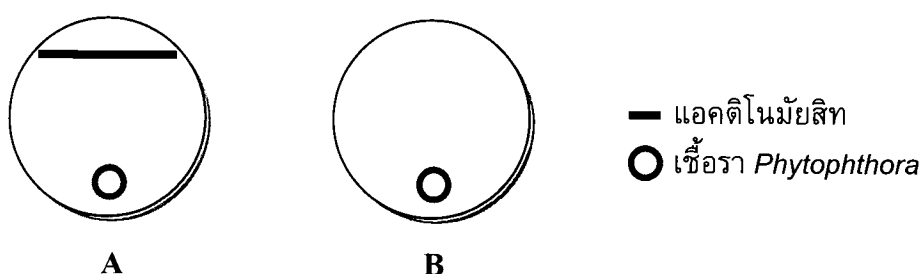
2. ทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราที่แยกได้

นำใบยางที่ไม่เป็นโรคมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาแล้วเช็ดให้สะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นำเข็มเย็บเยื่อมาสะกิดให้ใบยางเป็นแผล แล้วปลูกเชื้อ *Phytophthora* ลงไปโดยการหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ความเข้มข้น 2×10^4 สปอร์/มล. ลงบนแผลที่ได้ทำไว้ จากนั้นเก็บไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้องตรวจบันทึกผลการเกิดโรค บันทึกภาพ

3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา โดยแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett et al., 1996)

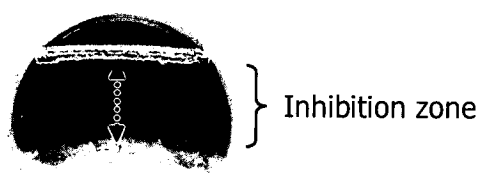
การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay ทำได้โดยเพาะเชื้อแอคติโนมัยสิท ลงบนด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะเชื้อรา *Phytophthora* ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA นาน 7 วัน ลงไปในด้านตรงข้ามกับเชื้อแอคติโนมัยสิท โดยมีชุดควบคุมคือ การเพาะเชื้อราลงบนจานอาหาร ISP2 ที่ไม่มีเชื้อแอคติโนมัยสิท โดยเพาะเชื้อราลงในแต่ละตำแหน่งเดียวกับที่ทำในชุดทดสอบ (โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละไอโซเลท) ดังภาพ 2



ภาพ 2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay

A: ชุดทดสอบ B: ชุดควบคุม

บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหาร วัดขนาดของโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) ดังภาพ 3 บันทึกในตารางบันทึกผล



ภาพ 3 การวัดขนาดของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone)

คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่ให้ขนาดของโซนการยับยั้งกว้างที่สุด นั่นคือ สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุด ไปประเมินศักยภาพเทียบกับสารเมทาแลกซิล ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ในทางการเกษตร

4. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกับสารเคมี

4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทในจานอาหาร ISP2 agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ตัดโคโลนีของเชื้อในอาหารวุ้น นำชิ้นวุ้นที่มีโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยสิท จำนวน 5 ชิ้นใส่ลงในอาหารเหลว ISP2 200 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าเพื่อให้อากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

4.2 เติมสารสกัด (ethyl acetate) ลงไปในอาหาร ข้อ 4.1 ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เขย่า ทุก 15 นาที

4.3 แยกส่วนของ ethyl acetate ออกมาทำการระเหย ethyl acetate ออกด้วยเครื่อง evaporator เก็บส่วนที่เหลือซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) เพื่อนำไปทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MIC)

4.4 เจือจางสารสกัดหยาบและสารเมทาแลกซิลที่ใช้ยับยั้งเชื้อราให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน (ความเข้มข้นของสารทั้งหมด) นำสารที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ปริมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหาร PDA ที่หลอมเหลว เขย่าให้สารและอาหารเข้ากัน จากนั้นนำอาหารที่สารความเข้มข้นต่างๆ เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้ว รองอาหารแข็งตัวเป็นวุ้น จากนั้นเพาะเชื้อราทดสอบลงไปโดยใช้ cork borer ที่ปลายเส้นใย แล้วนำชิ้นส่วนของวุ้นที่มีเชื้อราไปวางบนจานอาหาร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น) โดยมีชุดควบคุมคือจานอาหาร PDA ที่ไม่เติมสารใดๆ รองเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มเพลท จากนั้นวัดขนาดโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม และขนาดโคโลนีของเชื้อที่เจริญในจานทดสอบ นำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุมมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MIC) โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth-PIRG) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{PIRG} = \frac{(R1-R2)}{R1} \times 100$$

R1

เมื่อ R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานทดสอบ

โดยการทดสอบจะใช้เชื้อราที่แยกได้ เปรียบเทียบกับเชื้อราที่เชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

5. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 และ metalaxyl โดยการผลิตสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 ในอาหาร ISP2 ปริมาณ 1000 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7

วัน ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate 2000 ml ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator จะได้สารสกัดหยาบ ส่วนสาร metalaxyl ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ metalaxyl ที่มีขายในร้านค้า สารเคมีในทางการเกษตร ที่มีสารสำคัญคือ methyl N-(methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DLAlanine 25% WP โดยปริมาณ 1 กิโลกรัม มีราคาเท่ากับ 380 บาท

ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อราก่อโรคเส้นดำในยางพารา

ผลจากการนำเอาชิ้นส่วนของต้นยางบริเวณที่เกิดโรคมานำแยกเชื้อ *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเส้นดำ ผลปรากฏว่าได้เชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกับ *P. palmivola* คือ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จะลักษณะของโคโลนีเป็นแบบ stellate และเมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการสร้าง sporangia รูปร่างแบบ Ovoid และมีการสร้าง Chlamydospore แบบ Terminal chlamydospore ดังภาพ 4



ภาพ 4 ลักษณะโคโลนี, sporangia และ chlamydospore ของเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคเส้นดำ

4. ผลการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราที่แยกได้

ผลจากการนำใบยางที่ไม่เป็นโรคมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาแล้วเช็ดให้สะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นำเข็มเย็บเย็บเชื้อมาสะกิดให้ใบยางเป็นแผล แล้วปลูกเชื้อ *Phytophthora* ลงไปโดยการหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ความเข้มข้น 2×10^4 สปอร์/มล. ลงบนแผลที่ได้ทำไว้ จากนั้นเก็บไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิ พบว่าเชื้อราสามารถทำให้เกิดโรคบนใบยางได้ โดยใบยางมีลักษณะช้ำและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดังภาพ 7



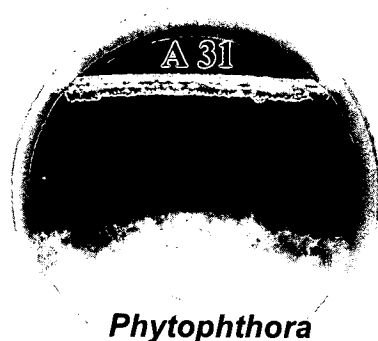
ภาพ 7 ลักษณะของใบยางพาราที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการปลูกเชื้อรา

3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสิท 28 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ดังตาราง 1 และไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม รองลงมาคือ ไอโซเลท A30 และ F1 โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 49 มิลลิเมตร และ 24 มิลลิเมตรตามลำดับ ดังภาพ 5

ตาราง 1 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ

ขนาดของโซนยับยั้ง (มม.)	จำนวน	ไอโซเลท
≥50	1	A31
40-49	1	A30
30-39	0	-
20-29	1	F1, A75
10-19	5	F2, F3, F6, A15, A17
0-9	67	F4, F5, F7, B2, B3, B4, B5, B6, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G18, G19, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8, I9, I10, J1



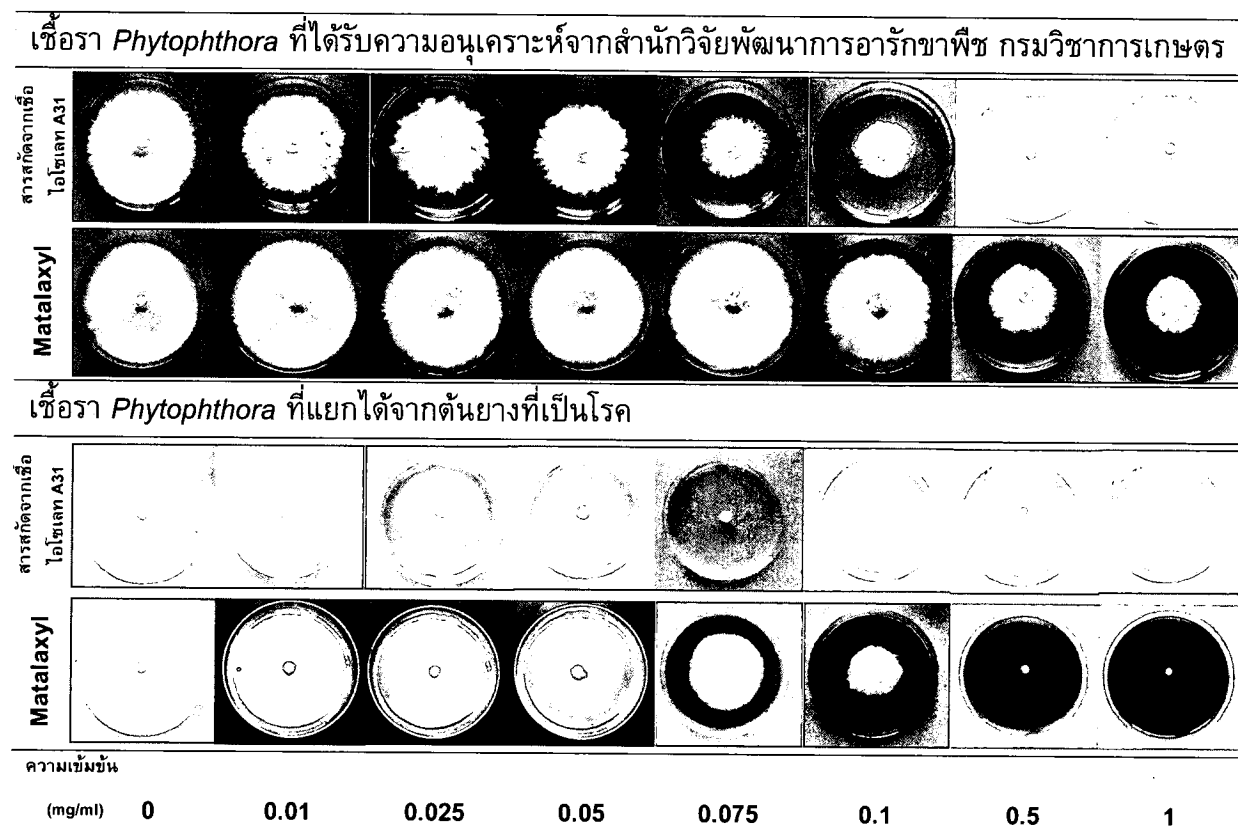
ภาพ 5 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31

4. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกับสารเคมี

ผลจากการนำสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเชื้อแอคติโนมัยสิท ไอโซเลท A31 มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* ได้ เปรียบเทียบกับ Metalaxyl โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และ เชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาใช้ในการทดสอบ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเชื้อไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกจากต้นยางที่เป็นโรคและเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 100 % ได้ค่า MIC เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ โดย metalaxyl สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกจากต้นยางที่เป็นโรคโดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 100 % ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml (MIC เท่ากับ 0.5 mg/ml) ส่วน เชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.25 % (MIC มีค่ามากกว่า 1 mg/ml) ดังตาราง 2

ตาราง 2 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกจากต้นยางที่เป็นโรคและเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตรโดยสารสกัดหยาบจากไอโซเลท A 31 เปรียบเทียบกับ metalaxyl ที่ความเข้มข้น 0-1 mg/ml

		ความเข้มข้น (mg/ml)							
		0	0.01	0.025	0.05	0.075	0.1	0.5	1
% การยับยั้งการเจริญ	เชื้อรา <i>Phytophthora</i> ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร								
	A 31	0	12.87	17.55	21.06	42.12	54.99	75.29	100
	Metalaxyl	0	0	0	0	0	6.25	37.50	56.25
	เชื้อรา <i>Phytophthora</i> ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค								
	A 31	0	2.34	10.53	37.44	78.39	100	100	100
	Metalaxyl	0	5.85	21.06	33.93	40.95	57.33	100	100



ภาพ 6 การยับยั้งเชื้อราเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกจากต้นยางที่เป็นโรคและเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร โดยสารสกัดหยาบจากไอโซเลท A 31 เปรียบเทียบกับ metalaxyl ที่ความเข้มข้น 0-1 mg/ml

5. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 และ metalaxyl โดยการผลิตสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 ทำโดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 ในอาหาร ISP2 ปริมาณ 1000 มล. (สูตร ISP2: yeast extract 4 กรัม, malt extract 10 กรัม, glucose 4 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate 2000 ml (ethyl acetate สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก จะมีการสูญเสียเนื่องจากการระเหยระหว่างการสกัดไม่เกิน 50 มิลลิลิตร) ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator นำตัวทำละลายกลับไปทำการสกัดสารใหม่อีก 9 รอบ

ผลการคิดต้นทุนการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 ปริมาณ 1 กรัม ดังตาราง 3

ตาราง 3 ต้นทุนการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 ปริมาณ 1 กรัม

ลำดับ	รายการ	ราคา(บาท)/หน่วย	ปริมาณที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
1	Yeast extract	990/500กรัม	4กรัม	7.92
2	Malt extract	1750/500กรัม	10 กรัม	35
3	glucose	96/1000กรัม	4 กรัม	0.384
4	Ethyl acetate	1000/ลิตร	50 มล	50
5	ประมาณค่าไฟ -เครื่องเยย่า 7 วัน	-	-	50
	- evaporator รอบละ 30 นาที (10 รอบ)	-	-	50
รวม				193.304

จากตาราง 3 พบว่าการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 ปริมาณ 1 กรัม ใช้ต้นทุน 193.304 บาทโดยประมาณ ส่วน metalaxyl ราคากรัมละ 0.38 บาท (1 กิโลกรัม มีราคาเท่ากับ 380 บาท) นั่นคือราคาดัชนีต่อกรัมของ metalaxyl ถูกกว่าประมาณ 50 เท่า แต่จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคพบว่า สารสกัดจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 และ metalaxyl ใช้ความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ นั่นคือต้องใช้ปริมาณ metalaxyl มากกว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิท 10 เท่าในการยับยั้งเชื้อรา ดังนั้นการใช้สารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทจึงใช้ต้นทุนสูงกว่า metalaxyl 50 เท่า

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลจากการนำเอาชิ้นส่วนของต้นยางบริเวณที่เกิดโรคเส้นดำมาแยกเชื้อ *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเส้นดำ ผลปรากฏว่าได้เชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกับ *P. palmivola* คือ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะลักษณะของโคโลนีเป็นแบบ stellate และเมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการสร้าง sporangia รูปร่างแบบ Ovoid และมีการสร้าง Chlamydospore แบบ Terminal chlamydospore ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของ *P. palmivola* ที่ Bush และคณะรายงานเอาไว้ในปี 2006 และเมื่อนำสารละลายสปอร์เอาเชื้อที่แยกได้ไปเพาะลงบนใบยางพาราที่ไม่เป็นโรค พบว่าสามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนใบได้ ดังนั้นเชื้อราที่แยกได้อาจเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเส้นดำในยางพาราจริง ในปี เนื่องจากเชื้อรา *Phytophthora* มีหลายสายพันธุ์ ตามที่ Waterhouse ได้ทำการจำแนกไว้ในปี ค.ศ.1973 คือสายพันธุ์ของเชื้อรา *Phytophthora* จำนวน 48 สายพันธุ์ ปัจจุบันมีการจำแนก *Phytophthora* ไปแล้ว 80 species ทั่วโลก เป็นเชื้อที่ระบาดได้รุนแรงโดยมีพืชที่เป็นพืชอาศัยกว่าหนึ่งพันชนิด สำหรับในประเทศไทยเชื้อรา *Phytophthora* ที่พบได้แก่ *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. cinnamomi* และ *P. botryosa*, *P. infestans* โดยเชื้อรา *Phytophthora botryose* Chee. และ *P. palmivola* (Butler) Butler. เป็นสาเหตุของโรคเส้นดำในยางพารา (สถาบันวิจัยยาง, 2555) ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิจัยว่าสารที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสิทในงานวิจัยครั้งนี้

นี้มีประสิทธิภาพจริงเมื่อนำไปใช้ งานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารในเชื้อรา 2 สายพันธุ์

ผลจากนำเชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกได้มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual culture bioassay โดยเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสิท 28 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร จากนั้นนำเอาสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 และ metalaxyl มาทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และ เชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในทุเรียนที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาใช้ในการทดสอบ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีกว่า Metalaxyl โดยให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคและสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ metalaxyl ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ มากกว่า 1 mg/ml ตามลำดับ Metalaxyl เป็นสารเคมีประเภทดูดซึมอยู่ในกลุ่ม acylalanines มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อราในกลุ่ม Oomycetes มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* (Ferrin และ Kabashima) แต่จากการวิจัยครั้งนี้ซึ่งพบว่า metalaxyl มีประสิทธิภาพด้อยกว่าสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิท อาจเนื่องมาจากปัจจุบันเชื้อรา *Phytophthora* สามารถที่จะต้านทานต่อ Metalaxyl ได้ ส่งผลให้การใช้ Metalaxyl ในการป้องกันและกำจัดเชื้อรามีประสิทธิภาพลดลง (Davidse, 1981; Hunger et al., 1982; Stack and Millar, 1985; Lamboy and Paxton, 1992; Bhat et al., 1993) มีรายงานวิจัยที่พบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมเชื้อราโรคพืชมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ metalaxyl ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้เช่น งานวิจัยของ สนชัย ในปี 2540 พบว่า การใช้เชื้อรา *Chaetomium* ในอัตรา 5 กรัม ต่อต้นสามารถลดการเกิดโรครากเน่าของทุเรียนได้ 85 % ในขณะที่การใช้ metalaxyl ในอัตรา 20 กรัม ต่อต้นสามารถลดการเกิดโรคได้ 70 % เช่นเดียวกับรายงานของวิเชียร ในปี 2544 พบว่าใช้ *Chaetomium* ในอัตรา 10 กรัมต่อต้น สามารถลดปริมาณของเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ในดินได้ และส่งผลให้ระดับอาการโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มลดลงด้วย ในขณะที่การใช้สารเคมี metalaxyl ในอัตรา 10 กรัมต่อต้น ไม่สามารถลดการเกิดโรคได้ ในปี ค.ศ. 2012 Loliam และคณะ พบว่าเชื้อ *Streptomyces rubrolavendulae* สามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora infestans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเน่าคอดินในมะเขือเทศ และพริกได้ดีกว่า metalaxyl

ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามาใช้ทดแทนสารเคมี ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสิทโดยเฉพาะ จินัส *Streptomyces* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ที่ปรากฏว่าสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่า metalaxyl ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการนำเชื้อ *Streptomyces* มาใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในพืชหลายชนิด เช่น *Streptomyces griseus* ใช้ควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากในแครอท (Merriman et al., 1974), *Streptomyces*

pulcher และ *Streptomyces canescens* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo-atrum* และ *Alternaria solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในต้นมะเขือเทศ (El-Abyad et al., 1993) และการใช้ *Streptomyces* 2 สายพันธุ์ในการควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าคอดิน (Damping-off) ในต้นบีท (Sadeghi et al., 2006) เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1996 Jones และ Samac ศึกษาการใช้เชื้อ *Streptomyces* ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* และ *Phytium* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่า (Root rot) และ โรคเน่าคอดิน ในถั่ว พบว่าเชื้อ *Streptomyces* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ได้ เช่นเดียวกับ Xiao และคณะ (2002) รายงานว่า *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในวอชิงตัน สามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora medicaginis* และ *Phytophthora sojae* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าของถั่วในห้องปฏิบัติการได้, Joo (2005) พบว่า *Streptomyces halstedii* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora capsici* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในพริก (*phytophthora blight*) ในปี ค.ศ. 2007 Ezziyyani และคณะ พบว่าการใช้เชื้อ *Trichoderma harzianum* ร่วมกับ *Streptomyces rochei* สามารถควบคุมการเกิดโรครากเน่าในพริกไทย ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Phytophthora capsici* ได้

ในด้านยางพาราพบว่ามีรายงานการศึกษาในปี พ.ศ. 2553 เกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora botryosa* และ *P. palmivora* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบร่วงของกล้วยพาราในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อรา *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Streptomyces* และ *Bacillus* หลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ (เสมอใจ และคณะ, 2553) สอดคล้องกับรายงานของ อรรณพ และคณะ ในปี พ.ศ. 2553 ที่นำเชื้อ *Trichoderma harzianu* (CB-PIN-01) *Trichoderma harzianum* (PM51) *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* (197KB) มาทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบร่วงและผกในยางพาราโดยวิธี dual culture พบว่า เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อราได้ ในขณะนั้นยังไม่พบรายงานการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ประเภทอื่นในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเส้นดำในยางพาราในด้านยางที่เป็นโรค แต่พบว่ามีการศึกษาการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทในปี พ.ศ. 2554 โดยกรรณิการ์ และคณะ พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท SR8.2 และ SR9.1 ซึ่งเป็นเชื้อ *Streptomyces lydicus* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora botryosa* Chee. ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคใบร่วง (*Phytophthora leaf fall*) และโรคเส้นดำ (black stripe) ได้ดีที่สุด

สรุปผลการวิจัย

1. ผลจากการนำเอาชิ้นส่วนของต้นยางบริเวณที่เกิดโรคเส้นดำมาแยกเชื้อ *Phytophthora* พบว่าได้เชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแบบ stellate เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการสร้าง sporangia รูปร่างแบบ Ovoid และมีการสร้าง Chlamydospore แบบ Terminal chlamydospore ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *P. palmivora*

2. ผลการนำสารละลายสปอร์ของเชื้อที่แยกได้ไปเพาะลงบนใบยางพาราที่ไม่เป็นโรค พบว่าสามารถทำให้เกิดโรคได้ ดังนั้นเชื้อราที่แยกได้สามารถทำให้เกิดอาการโรคบนใบได้

3. นำเชื้อแอสโคไดโนไมซิสที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual culture bioassay โดยใช้เชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อทดสอบ พบว่ามีเชื้อแอสโคไดโนไมซิส 28 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ และเชื้อแอสโคไดโนไมซิสไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

4. นำเอกสารสกัดหยาบของเชื้อแอสโคไดโนไมซิสไอโซเลท A31 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรากับสารเคมีคือ Metalaxyl โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และ เชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในทุเรียนที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากแอสโคไดโนไมซิสมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีกว่า Metalaxyl โดยให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคและสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ metalaxyl ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ มากกว่า 1 mg/ml ตามลำดับ

5. การเปรียบเทียบต้นทุนในการผลิต พบว่าการใช้สารสกัดหยาบจากแอสโคไดโนไมซิสไอโซเลท A31 ในการยับยั้งเชื้อราใช้ต้นทุนสูงกว่า metalaxyl 50 เท่า อย่างไรก็ตามถ้าได้มีการนำเอกสารสกัดหยาบไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ปริมาณสารที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อราจะน้อยลง ทำให้ต้นทุนของสารจะน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามต้องมีค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการทำให้สารบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งต้องทำการทดสอบเปรียบเทียบต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยครั้งต่อไปควรมีการวิจัยเพิ่มเติมในเรื่องการทำให้สารสกัดหยาบมีความบริสุทธิ์มากขึ้น และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเพื่อหาค่า MIC และทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตอีกครั้งและควรมีการนำเอกสารสกัดหยาบหรือสารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นไปทดสอบหาปริมาณการใช้ในต้นยางที่เป็นโรคจริงเทียบกับ metalaxyl

เอกสารอ้างอิง

- กรรณิการ์ ดวงมาลย์ และ อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต. 2554. "รายงานการวิจัยเรื่องการคัดแยกแอสโคไดโนไมซิสจากรากและดินรอบรากต้นยางพาราที่สามารถยับยั้ง *Corynespora cassiicola* และ *Phytophthora botryose*." [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://elibrary.trf.or.th/download_fullstep1.asp (4 กุมภาพันธ์ 2556)
- วิเชียร ดีทอง. 2544. การควบคุมและแมลงศัตรูส้มโชกุนโดยชีววิธีแบบผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 119 หน้า.

- สนชัย เพ็ชรพรหม. 2540. การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler โดยวิธีแบบผสมผสาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 120 หน้า.
- สถาบันวิจัยยาง. 2555. คำแนะนำโรคและอาการผิดปกติของยางพารา ปี 2555. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- เสมอใจ ชื่นจิตต์, วสันต์ เพชรรัตน์ และพรศิลป์ จันทวีเมือง. 2553. "รายงานการวิจัยเรื่องการประเมินการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบร่วง *Phytophthora* ของกล้ายางพารา." [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://natres.psu.ac.th/researchcenter/websitebio/research2_51.pdf (5 ตุลาคม 2556)
- อรรณพ ปิยะบุญ, นกัณห์ สุธารัตนพงศ์, วทัญญู ตั้งศิริอำนวย, ชลิต บุญพร้อมกุล, ถิรวัฒน์ วงศ์วิวัฒน์, ปรียาพร คงจรรักษ์. 2553. "การควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica* Dastur. สาเหตุโรคใบร่วงยางพารา โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์." วารสารวิชาการเกษตร 28, 2 (พฤษภาคม-สิงหาคม 2553): 120-133.
- Loliam, B., Morinaga, T., and Chaiyanan S. 2012. Biocontrol of *Phytophthora infestans*, Fungal Pathogen of Seedling Damping Off Disease in Economic Plant Nursery. *Psyche* doi:10.1155/2012/324317
- Bennett J. V., Brodie J. L., Benner E. J. and Kirby W. M. M. 1966. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol* 14(2): 170-177.
- Bhat, R. G., McBlain, B. A., and Schmitthenner, A. F. 1993. The inheritance of resistance to metalaxyl and to fluorophenylalanine in matings of homothallic *Phytophthora sojae*. *Mycol. Res.* 97, 865-870.
- Bush, E. A., Stromberg, E. L., Hong, C. X., Richardson, P. A., Kong, P. 2006. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia nursery irrigation water. *Plant Health Prog.* doi:10.1094/PHP-2006-0621-01-RS.
- Davidse, L. C. 1981. Resistance to acylalanine fungicides in *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Neth. J. Pl. Pathol.* 87, 11-24.
- El-Abyad, M. S., El-Sayed, M. A., El-Shanshoury, A. R., and El-Sabbagh, S. M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant Soil* 149, 185-195.
- Ezziyyani, M., Requena, M.E., Egea-Gilabert, C., Candela, M.E. 2007. Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Journal of Phytopathology* 155, 342-349
- Filonow, A. B., and Lockwood, J. L. 1985. Evaluation of several *Actinomycetes* and the fungus

- Hyphochytrium catenoides* as biocontrol agents for *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis.* **69**,1033–1036.
- Ferrin, D.M. and J.N. Kabashima. 1991. *In vitro* insensitivity to metalaxyl of isolates of *Phytophthora citricola* and *P. parasitica* from ornamental host in southern California. *Plant Dis.* **75**: 1041-1044.
- Gyenis, L., Anderson, N. A., and Ostry, M. E. 1999. Biological control of *Septoria* leaf spot and canker of hybrid poplar under field conditions. *Phytophthology* **89**, S31.
- Hsu, S. C., and Lockwood, J. L. 1984. Biological control of *Phytophthora* root rot of soybean by *Hyphochytrium catenoides* in greenhouse tests. *Phytopath. Z.* **109**, 139–146.
- Hunger, R. M., Hamm, P. B., Horner, C. E., and Hansen, E. M. 1982. Tolerance of *Phytophthora megasperma* isolates to metalaxyl. *Plant Dis.* **66**, 645–649.
- Jones, C. R., and Samac, D. A. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. *Biol. Control* **7**, 196–204.
- Lamboy, J. S., and Paxton, J. D. 1992. Metalaxyl sensitivity selection within *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Dis.* **76**, 932–936.
- Liu, D. 1992. "Biological Control of *Streptomyces scabies* and Other Plant Pathogens." Ph.D. thesis, University of Minnesota.
- Merriman, P. R., Price, R. D., and Kollmorgen, J. F. 1974. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Aust. J. Agric. Res.* **25**, 219–226.
- Osburn, R. M., Milner, J. L., Oplinger, E. S., Smith, R. S., and Handelsman, J. 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. *Plant Dis.* **79**, 551–556.
- Paulsrud, B. E. 1996. "Characterization of Antagonistic *Streptomyces* spp. from Potato Scab-Suppressive Soil and Evaluation of Their Biocontrol Potential against Potato and Non-potato Pathogens." M.S. thesis, University of Minnesota.
- Sadeghi, A., Hessian, A.R., Askari, H., Aghighi, S. and Shahidi Bonjar, G.H. 2006. Biological control potential of two *Streptomyces* isolates on *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. *Pak. J. Biol.Sci.*, **9**(5): 904-910.
- Stack, J. P., and Millar, R. L. 1985. Isolation and characterization of a metalaxyl-insensitive isolate of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Phytopathology* **75**, 1387–1392.
- Takizawa, M., Colwell, R. R. and Hill, R. T. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake bay. *Appl Environ Microbiol* **59**(4): 997-1002.
- Waterhouse, G.M. 1973. Peronosporales, Pages 165-185. In *The Fungi* Vol. IVB. G.C.

- Ainsworth, Frederick K. Sparrow and Alfred S. Sussman. (eds.). Academic Press, New York and London.
- Xiao, K., Kinkel, L.L. and Samac, D.A. 2002. Biological Control of *Phytophthora* Root Rots on Alfalfa and Soybean with *Streptomyces* *Biol. Control* **23**, 285–295.

ภาคผนวก

ศักยภาพของแอคติโนมัยสิทต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* สาเหตุโรคเส้นดำยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ

Biological control of black stripe of Para-rubber tree with actinomycetes crude extract

ดร. นารีลักษณ์ นาแก้ว

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ. พิษณุโลก

Dr. Nareeluk Nakaew

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical science,

Naresuan University, Phitsanulok

บทคัดย่อ

โรคเส้นดำ (Black Stripe) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Phytophthora* เป็นโรคทางลำต้นของยางพาราที่มีความสำคัญ เนื่องจากทำลายหน้ากรีดซึ่งเป็นบริเวณเก็บเกี่ยวการป้องกันและกำจัดทำได้โดยการใช้สารเคมี ซึ่งอาจมีอันตรายต่อผู้ใช้หากไม่ระมัดระวัง แนวทางป้องกันการระบาดของเชื้อโรคนี้อาจทำได้โดยใช้วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งให้ผลดีและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการควบคุมโรคเส้นดำโดยชีววิธี จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการค้นหาแอคติโนมัยสิทซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดที่ได้จากเชื้อไปใช้จริง

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual culture bioassay โดยเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 เพื่อเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้เปรียบเทียบกับ Metaxyl โดยเชื้อรา *Phytophthora* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และ เชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในทุเรียนที่ได้รับการอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาใช้ในการทดสอบผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ดีกว่า Metaxyl โดยให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคและสายพันธุ์ที่ได้รับการอนุเคราะห์มาจากการวิชาการเกษตร เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ metaxyl ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ มากกว่า 1 mg/ml ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบต้นทุนในการผลิต พบว่าการใช้สารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 ในการยับยั้งเชื้อราใช้ต้นทุนสูงกว่า metaxyl 50 เท่า ซึ่งถ้ามีการพัฒนาด้านทางการผลิตและมีการทำให้สารมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงขึ้นและปริมาณที่ใช้จะน้อยลงอาจจะสามารถทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลงได้ ดังนั้นสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 จึงเป็นอีกหนทางเลือกในการนำมาใช้ทดแทนสารเคมี

Abstract

Black stripe disease caused by *Phytophthora* spp. is a stem disease of para rubber trees. It is an important disease damaging the tapping area reach to reduction of latex yield. Use of chemical fungicides is able to control the disease but may harm to the farmers. However, biological approach to control the disease, which could be safer for human use and environment, has not yet been studied. Here, we aim to evaluate antifungal activity of some actinobacteria and their applicable extract for biological control of the disease in rubber trees farming. Based on *in vitro* antifungal test by dual culture technique, we found 75 bioactive isolates of actinobacteria that were able to inhibit growth of *Phytophthora* sp. Among all tested actinobacteria, an isolate A31 showed the most distinctive antifungal activity against the fungus by giving the largest inhibition zone of 55 mm. The isolate was then grown in a liquid medium (ISP2) for extraction of its cell-free culture fluid. Crude extract obtained by solvents (ethyl acetate) extraction was evaluated its minimum inhibitory concentrations (MICs) against 2 isolates of *Phytophthora* compared with a positive control, metaxyl. Two isolates of *Phytophthora* include one isolated from diseased rubber tree (isolate 1) and other one causing rot disease in durian (isolate 2) provided by Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. It was shown that the crude extract revealed greater inhibition activities against both isolates of *Phytophthora* with MIC values of 0.1 mg/ml for isolate 1 and 1 mg/ml for isolate 2, compared to the control that showed higher MIC values of 0.5 and >1 mg/ml, respectively. Although investment cost for production of the crude extract derived from the isolate A31 was 50 times higher than the cost for chemical use, we still convince that purity increase of antifungal substances in the crude extract might reduce effective dose of the substances used and further reduce the investment cost for farmers. We concluded that the antifungal substances produced by the isolate A31 could be an alternative approach for sustainable control of the disease with less or no harm to human and environment.

คำนำ

โรคทางลำต้นของยางพาราที่มีความสำคัญได้แก่ โรคเส้นดำ (Black Stripe) เนื่องจากทำลายหน้ากรีดซึ่งเป็นบริเวณเก็บเกี่ยว โรคเส้นดำมีสาเหตุมาจาก เชื้อรา *Phytophthora botryose* Chee. และ *P. palmivola* (Butler) Butler. (สถาบันวิจัยยาง, 2555) พบระบาดมากในช่วงฤดูฝน หรือ เมื่อมีหมอกลงจัด หรือมีความชื้นในอากาศสูง ลักษณะอาการของโรคบริเวณเหนือรอยกรีดในระยะแรกเปลือกจะเป็นรอยชำ ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นรอยบวมสีดำหรือสีน้ำตาล ขยายขึ้นลงเป็นเส้นตามแนวยีนของลำต้น เมื่อเงื่อนไขเปลือกออกจะพบรอยบวมสีดำนั้นเป็นลายเส้นดำบนเนื้อไม้อาการขั้นรุนแรงทำให้เปลือกของหน้ากรีดบริเวณที่เป็นโรคปริ เน่า มีน้ำยางไหลตลอดเวลา จนเปลือกเน่าหลุดไปในที่สุด เปลือกงอกใหม่เสียหายกรีดซ้ำไม่ได้ อายุการให้ผลผลิตของต้นยางจึงลดลง

การป้องกันและกำจัดทำได้โดยการใช้สารเคมี ซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพของเกษตรกรที่ใช้สารเคมีนั้นๆ หากไม่ระมัดระวัง และสารเคมีที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำให้ใช้ในการกำจัดเชื้อ *Phytophthora* ได้แก่ เมทาแลกซิล (metalaxyl) และ ฟอสเอทิล อลูมิเนียม (fosetyl-Aluminium) (สถาบันวิจัยยาง, 2555) โดย metalaxyl จะนิยมใช้กันมากที่สุด อย่างไรก็ตาม พบว่า ปัจจุบัน เชื้อรา *Phytophthora* สามารถที่จะต้านทานต่อ Metalaxyl ได้ ส่งผลให้การใช้ Metalaxyl ในการป้องกันและกำจัด เชื้อรามีประสิทธิภาพลดลง (Davidse, 1981; Hunger *et al.*, 1982; Stack and Millar, 1985; Lamboy and Paxton, 1992; Bhat *et al.*, 1993)

ปัจจุบันการป้องกันและกำจัดเชื้อราก่อโรคพืชเป็นแนวทางหนึ่งที่น่ามาทดแทนการใช้สารเคมี จุลินทรีย์ที่เริ่มนำมาใช้ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสิท (Filonow and Lockwood, 1985) โดยเฉพาะ จินัส *Streptomyces* ได้ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชในพืชหลายชนิด (Merriman *et al.*, 1974; Liu, 1992; El-Abyad *et al.*, 1993; Hiltunen *et al.*, 1995; Jones and Samac, 1996; Paulsrud, 1996; Gyenis *et al.*, 1999) ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* ในพืชตระกูลถั่ว พบว่ามีการใช้แอคติโนมัยสิท จินัส *Streptomyces* (Jones and Samac, 1996), เชื้อรากลุ่ม *Hyphochytrium catenoides* (Hsu and Lockwood, 1984) และ แบคทีเรีย *Bacillus cereus* UW85 (Osburn *et al.*, 1995) ในพริกไทยพบว่าการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา (Ezziyany *et al.*, 2007) ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้การควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* ในยางพารา โดยชีววิธี

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น งานวิจัยในครั้งนี้ จึงมุ่งที่จะค้นหาแอคติโนมัยสิทซึ่งเป็นกลุ่มของ จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด โดยเฉพาะเชื้อในสกุล *Streptomyces* (Takizawa *et al.*, 1993) โดยนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดที่ได้จากเชื้อไปใช้จริง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการระบาดของโรคด้วยชีววิธี ซึ่งให้ผลดีและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม

วิธีการวิจัย

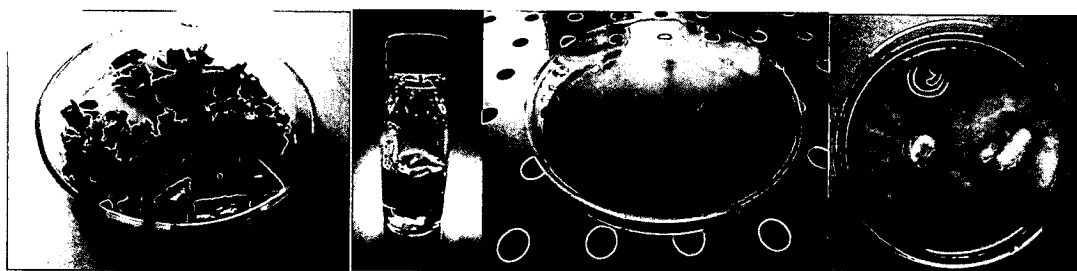
1. การแยกเชื้อราก่อโรคเส้นดำในยางพารา (ภาพ 1)

1.1 เก็บตัวอย่างชิ้นส่วนของต้นยางที่เป็นโรคบริเวณหน้ายางจากสวนยางใน อ. วังทอง จังหวัดพิษณุโลก

1.2 ตัดชิ้นส่วนของต้นยางบริเวณที่เกิดโรคให้มีขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร ล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นนำไปล้างน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว

1.3 แช่ชิ้นส่วนที่ได้จากข้อ 1.1 ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 1% นาน 3-5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว

1.4 วางชิ้นส่วนพืชในข้อ 1.3 บนอาหาร water agar ที่เติม คอมแรมฟีนิกอล และ rose Bengal บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเห็นเส้นใยของเชื้อราเจริญขึ้นมา จากนั้นย้ายเชื้อราโดยการตัดที่ปลายโคโลนีไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA



ภาพ 1 การแยกเชื้อราก่อโรคเส้นดำในยางพารา

1.5 ศึกษาลักษณะการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่แยกได้ใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา

1.6 เก็บรักษาเชื้อราที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. ทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราที่แยกได้

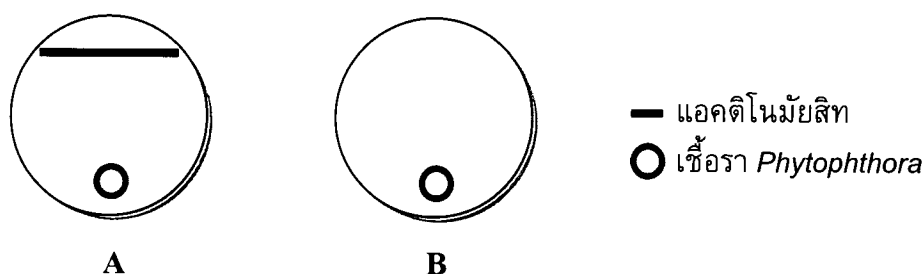
นำใบยางที่ไม่เป็นโรคมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาแล้วเช็ดให้สะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นำเข็มเย็บเชื้อมาสะกิดให้ใบยางเป็นแผล แล้วปลูกเชื้อ *Phytophthora* ลงไปโดยการหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ความเข้มข้น 2×10^4 สปอร์/มล. ลงบนแผลที่ได้ทำไว้ จากนั้นเก็บไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้องตรวจบันทึกผลการเกิดโรค บันทึกภาพ

3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา โดยแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Dual culture bioassay (Bennett et al., 1996)

การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay ทำได้โดยเฉพาะเชื้อแอคติโนมัยสิท ลงบนด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเพาะเชื้อรา *Phytophthora* ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA นาน 7 วัน ลงไปในด้านตรงข้ามกับเชื้อแอ

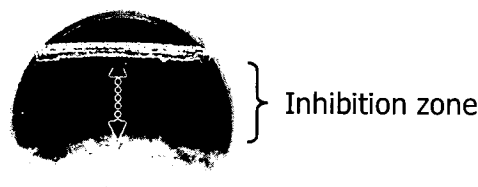
คดีโนมัยสัท โดยมีชุดควบคุมคือ การเพาะเชื้อราลงบนจานอาหาร ISP2 ที่ไม่มีเชื้อคดีโนมัยสัท โดยเพาะเชื้อราลงในตำแหน่งเดียวกับที่ทำในชุดทดสอบ (โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในเชื้อแต่ละไอโซเลท) ดังภาพ 2



ภาพ 2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture bioassay

A: ชุดทดสอบ B: ชุดควบคุม

บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหาร วัดขนาดของโซนการยับยั้ง (Inhibition zone) ดังภาพ 3 บันทึกในตารางบันทึกผล



ภาพ 3 การวัดขนาดของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone)

คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่ให้ขนาดของโซนการยับยั้งกว้างที่สุด นั่นคือ สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุดไปประเมินศักยภาพ เทียบกับสารเมทาแลกซิล ซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้ในทางการเกษตร

4. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากเชื้อแอดคิโนมัยสัทกับสารเคมี

4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อแอดคิโนมัยสัทในจานอาหาร ISP2 agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ตัดโคโลนีของเชื้อในอาหารวุ้น นำชิ้นวุ้นที่มีโคโลนีของเชื้อแอดคิโนมัยสัท จำนวน 5 ชิ้นใส่ลงในอาหารเหลว ISP2 200 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าเพื่อให้อากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

4.2 เด็ดสารสกัด (ethyl acetate) ลงไปในอาหาร ข้อ 4.1 ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เขย่า ทุก 15 นาที

4.3 แยกส่วนของ ethyl acetate ออกมาทำการระเหย ethyl acetate ออกด้วยเครื่อง evaporator เก็บส่วนที่เหลือซึ่งเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) เพื่อนำไปทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MIC)

4.4 เจือจางสารสกัดหยาบและสารเมทาแลกซิลที่ใช้ยับยั้งเชื้อราให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กัน (ความเข้มข้นของสารทั้งหมด) นำสารที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ปริมาณ 1 มิลลิลิตรใส่ลงในอาหาร PDA

ที่ลอมเหลว เขย่าให้สารและอาหารเข้ากัน จากนั้นนำอาหารที่สารความเข้มข้นต่างๆ เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเบลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว ร่อนอาหารแข็งตัวเป็นวัน จากนั้นเพาะเชื้อราทดสอบลงไปโดยใช้ cork borer ที่ปลายเส้นใย แล้วนำชิ้นส่วนของวุ้นที่มีเชื้อราไปวางบนจานอาหาร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น) โดยมีชุดควบคุมคือจานอาหาร PDA ที่ไม่เติมสารใดๆ ร่อนเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มเพลท จากนั้นวัดขนาดโคโลนีของเชื้อราในชุดควบคุม และขนาดโคโลนีของเชื้อที่เจริญในจานทดสอบ นำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราทั้งชุดทดสอบและชุดควบคุมมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (MIC) โดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth-PIRG) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{PIRG} = \frac{(R1-R2)}{R1} \times 100$$

R1

เมื่อ R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อในจานทดสอบ

โดยการทดสอบจะใช้เชื้อราที่แยกได้ เปรียบเทียบกับเชื้อราที่เชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

5. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนไมซีไทโซเลท A31 และ metalaxyl โดยการผลิตสารสกัดหยาบจากเชื้อแอคติโนไมซีไทโซเลท A31 ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีไทโซเลท A31 ในอาหาร ISP2 ปริมาณ 1000 มล. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate 2000 ml ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator จะได้สารสกัดหยาบ ส่วนสาร metalaxyl ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ใช้ metalaxyl ที่มีขายในร้านค้าสารเคมีในทางการเกษตร ที่มีสารสำคัญคือ methyl N-(methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DLAlanine 25% WP โดยปริมาณ 1 กิโลกรัม มีราคาเท่ากับ 380 บาท

ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อราก่อโรคเส้นดำในยางพารา

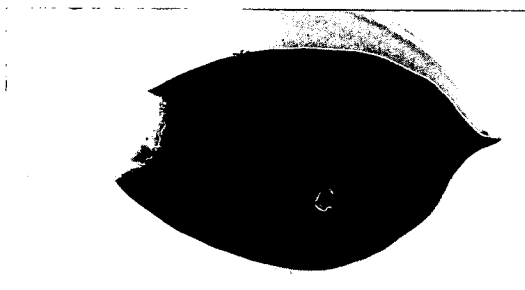
ผลจากการนำเอาชิ้นส่วนของต้นยางบริเวณที่เกิดโรคมายกเชื้อ *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเส้นดำ ผลปรากฏว่าได้เชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกับ *P. palmivola* คือ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จะลักษณะของโคโลนีเป็นแบบ stellate และเมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการสร้าง sporangia รูปร่างแบบ Ovoid และมีการสร้าง Chlamydospore แบบ Terminal chlamydospore ดังภาพ 4



ภาพ 4 ลักษณะโคโลนี, sporangia และ chlamydospore ของเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคเส้นดำ

4. ผลการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราที่แยกได้

ผลจากการนำใบยางที่ไม่เป็นโรคมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาแล้วเช็ดให้สะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นำเข็มเย็บเยื่อมาสะกิดให้ใบยางเป็นแผล แล้วปลูกเชื้อ *Phytophthora* ลงไปโดยการหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา ความเข้มข้น 2×10^4 สปอร์/มล. ลงบนแผลที่ได้ทำไว้ จากนั้นเก็บไว้ใน moist chamber ที่อุณหภูมิ พบว่าเชื้อราสามารถทำให้เกิดโรคบนใบยางได้ โดยใบยางมีลักษณะช้ำและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดังภาพ 7



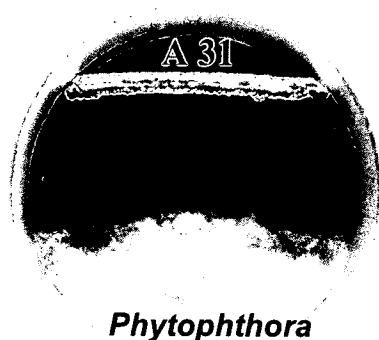
ภาพ 7 ลักษณะของใบยางพาราที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการปลูกเชื้อรา

3. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสิท 28 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ดังตาราง 1 และไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม รองลงมาคือ ไอโซเลท A30 และ F1 โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 49 มิลลิเมตร และ 24 มิลลิเมตรตามลำดับ ดังภาพ 5

ตาราง 1 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ของเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ

ขนาดของโซนยับยั้ง (มม.)	จำนวน	ไอโซเลท
≥50	1	A31
40-49	1	A30
30-39	0	-
20-29	1	F1, A75
10-19	5	F2, F3, F6, A15, A17
0-9	67	F4, F5, F7, B2, B3, B4, B5, B6, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G18, G19, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8, I9, I10, J1



ภาพ 5 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31

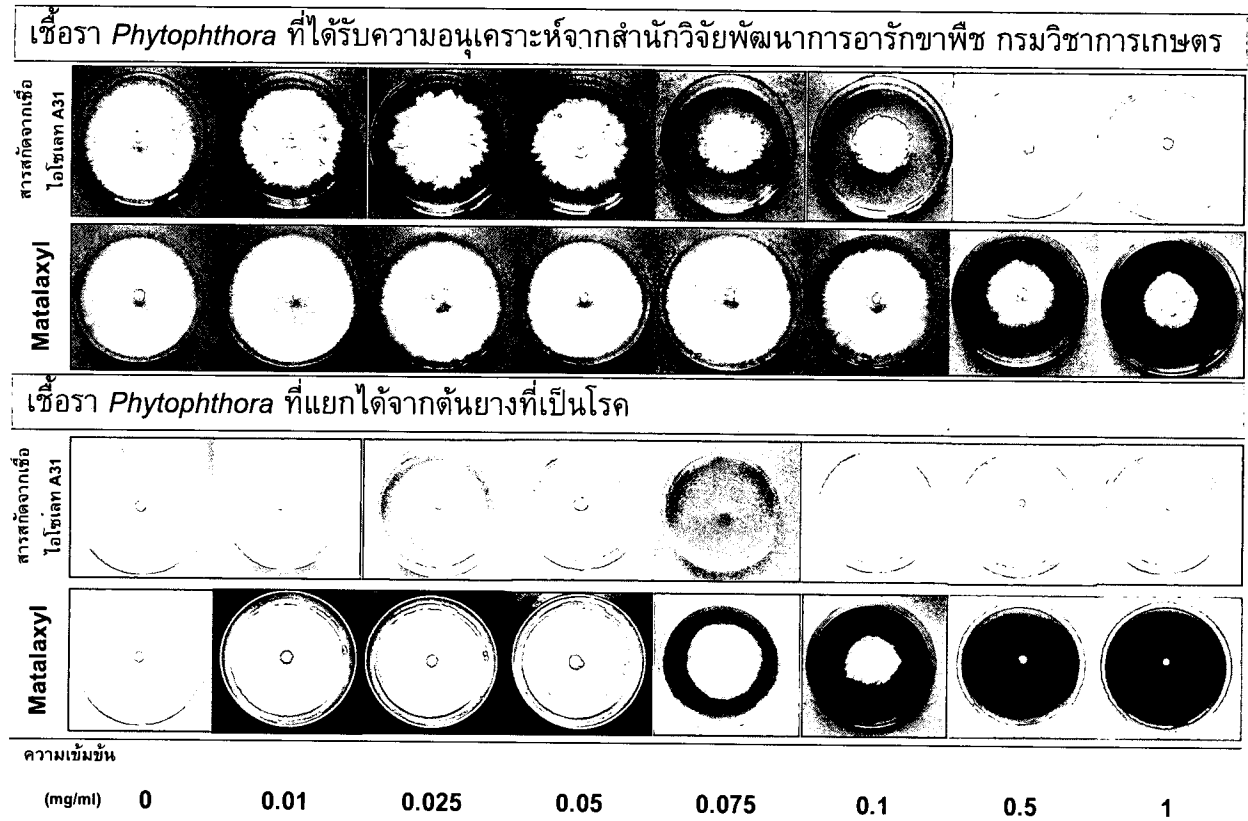
4. เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทกับสารเคมี

ผลจากการนำสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเชื้อแอคติโนมัยสิท ไอโซเลท A31 มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* ได้ เปรียบเทียบกับ Metalaxyl โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และ เชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาใช้ในการทดสอบ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเชื้อไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกจากต้นยางที่เป็นโรคและเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากการวิชาการเกษตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 100 % ได้ค่า MIC เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ โดย metalaxyl

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกจากต้นยางที่เป็นโรคโดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 100 % ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml (MIC เท่ากับ 0.5 mg/ml) ส่วน เชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.25 % (MIC มีค่ามากกว่า 1 mg/ml) ดังตาราง 2

ตาราง 2 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกจากต้นยางที่เป็นโรคและเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตรโดยสารสกัดหยาบจากไอโซเลท A 31 เปรียบเทียบกับ metalaxyl ที่ความเข้มข้น 0-1 mg/ml

		ความเข้มข้น (mg/ml)							
		0	0.01	0.025	0.05	0.075	0.1	0.5	1
% การยับยั้งการเจริญ	เชื้อรา <i>Phytophthora</i> ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร								
	A 31	0	12.87	17.55	21.06	42.12	54.99	75.29	100
	Metalaxyl	0	0	0	0	0	6.25	37.50	56.25
	เชื้อรา <i>Phytophthora</i> ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค								
	A 31	0	2.34	10.53	37.44	78.39	100	100	100
	Metalaxyl	0	5.85	21.06	33.93	40.95	57.33	100	100



ภาพ 6 การยับยั้งเชื้อราเชื้อ *Phytophthora* ที่แยกจากต้นยางที่เป็นโรคและเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร โดยสารสกัดหยาบจากไอโซเลท A 31 เปรียบเทียบกับ metalaxyl ที่ความเข้มข้น 0-1 mg/ml

5. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 และ metalaxyl โดยการผลิตสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 ทำโดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 ในอาหาร ISP2 ปริมาณ 1000 มล. (สูตร ISP2: yeast extract 4 กรัม, malt extract 10 กรัม, glucose 4 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย Ethyl acetate 2000 ml (ethyl acetate สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก จะมีการสูญเสียเนื่องจากการระเหยระหว่างการสกัดไม่เกิน 50 มิลลิลิตร) ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator นำตัวทำละลายกลับไปทำการสกัดสารใหม่อีก 9 รอบ

ผลการคิดต้นทุนการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 ปริมาณ 1 กรัม ดังตาราง 3

ตาราง 3 ต้นทุนการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 ปริมาณ 1 กรัม

ลำดับ	รายการ	ราคา(บาท)/หน่วย	ปริมาณที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
1	Yeast extract	990/500กรัม	4กรัม	7.92
2	Malt extract	1750/500กรัม	10 กรัม	35
3	glucose	96/1000กรัม	4 กรัม	0.384
4	Ethyl acetate	1000/ลิตร	50 มล	50
5	ประมาณค่าไฟ -เครื่องเขย่า 7 วัน	-	-	50
	- evaporator รอบละ 30 นาที (10 รอบ)	-	-	50
รวม				193.304

จากตาราง 3 พบว่าการผลิตสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 ปริมาณ 1 กรัม ใช้ต้นทุน 193.304 บาทโดยประมาณ ส่วน metalaxyl ราคากรัมละ 0.38 บาท (1 กิโลกรัม มีราคาเท่ากับ 380 บาท) นั่นคือราคาค่าต้นทุนต่อกรัมของ metalaxyl ถูกกว่าประมาณ 50 เท่า แต่จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคพบว่า สารสกัดจากแอคติโนมัยซิตไอโซเลท A31 และ metalaxyl ใช้ความเข้มข้น 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ นั่นคือต้องใช้ปริมาณ metalaxyl มากกว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิต 10 เท่าในการยับยั้งเชื้อรา ดังนั้นการใช้สารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยซิตจึงใช้ต้นทุนสูงกว่า metalaxyl 50 เท่า

วิจารณ์ผลการวิจัย

ผลจากการนำเอาชิ้นส่วนของต้นยางบริเวณที่เกิดโรคเส้นดำมาแยกเชื้อ *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเส้นดำ ผลปรากฏว่าได้เชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายกับ *P. palmivola* คือ เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะลักษณะของโคโลนี

เป็นแบบ stellate และเมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการสร้าง sporangia รูปร่างแบบ Ovoid และมีการสร้าง Chlamydospore แบบ Terminal chlamydospore ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของ *P. palmivora* ที่ Bush และคณะรายงานเอาไว้ในปี 2006 และเมื่อนำสารละลายสปอร์เชื้อที่แยกได้ไปเพาะลงบนใบยางพาราที่ไม่เป็นโรค พบว่าสามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนใบได้ ดังนั้นเชื้อราที่แยกได้อาจเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเส้นดำในยางพาราจริง ในปี เนื่องจากเชื้อรา *Phytophthora* มีหลายสายพันธุ์ ตามที่ Waterhouse ได้ทำการจำแนกไว้ในปี ค.ศ.1973 คือสายพันธุ์ของเชื้อรา *Phytophthora* จำนวน 48 สายพันธุ์ ปัจจุบันมีการจำแนก *Phytophthora* ไปแล้ว 80 species ทั่วโลก เป็นเชื้อที่ระบาดได้รุนแรงโดยมีพืชที่เป็นพืชอาศัยกว่าหนึ่งพันชนิด สำหรับในประเทศไทยเชื้อรา *Phytophthora* ที่พบได้แก่ *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. cinnamomi* และ *P. botryosa*, *P. infestans* โดยเชื้อรา *Phytophthora botryosa* Chee. และ *P. palmivora* (Butler) Butler. เป็นสาเหตุของโรคเส้นดำในยางพารา (สถาบันวิจัยยาง, 2555) ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นในผลการวิจัยว่าสารที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยสิทในงานวิจัยครั้งนี้มีประสิทธิภาพจริงเมื่อนำไปใช้ งานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารในเชื้อรา 2 สายพันธุ์

ผลจากนำเชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกได้มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual culture bioassay โดยเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสิท 28 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร จากนั้นนำเอาสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 และ metalaxyl มาทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และ เชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในทุเรียนที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาใช้ในการทดสอบ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีกว่า Metalaxyl โดยให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคและสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมวิชาการเกษตร เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ metalaxyl ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ มากกว่า 1 mg/ml ตามลำดับ Metalaxyl เป็นสารเคมีประเภทดูดซึมอยู่ในกลุ่ม acylalanines มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อราในกลุ่ม Oomycetes มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* (Ferrin และ Kabashima) แต่จากการวิจัยครั้งนี้ซึ่งพบว่า metalaxyl มีประสิทธิภาพด้อยกว่าสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิท อาจเนื่องมาจากปัจจุบันเชื้อรา *Phytophthora* สามารถที่จะต้านทานต่อ Metalaxyl ได้ ส่งผลให้การใช้ Metalaxyl ในการป้องกันและกำจัดเชื้อรามีประสิทธิภาพลดลง (Davidse, 1981; Hunger *et al.*, 1982; Stack and Millar, 1985; Lamboy and Paxton, 1992; Bhat *et al.*, 1993) มีรายงานวิจัยที่พบว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมเชื้อราโรคพืชมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ metalaxyl ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้เช่น งานวิจัยของ สนชัย ในปี 2540 พบว่า การใช้เชื้อรา *Chaetomium* ในอัตรา 5 กรัม ต่อต้นสามารถลดการเกิดโรครากเน่าของทุเรียนได้ 85 % ในขณะที่การใช้ metalaxyl ในอัตรา 20 กรัม ต่อต้นสามารถลดการเกิดโรคได้ 70 % เช่นเดียวกับรายงานของวิเชียร ในปี 2544 พบว่าใช้ *Chaetomium* ใน

อัตรา 10 กรัมต่อตัน สามารถลดปริมาณของเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ในดินได้ และส่งผลให้ระดับอาการโรครากเน่าและโคนเน่าของสั้มลดลงด้วย ในขณะที่การใช้สารเคมี metalaxyl ในอัตรา 10 กรัมต่อตัน ไม่สามารถลดการเกิดโรคได้ ในปี ค.ศ. 2012 Loliam และคณะ พบว่าเชื้อ *Streptomyces rubrolavendulae* สามารถยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora infestans* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเน่าคอดินในมะเขือเทศ และพริกได้ดีกว่า metalaxyl

ปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา มาใช้ทดแทนสารเคมี ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยสิทโดยเฉพาะ จินัส *Streptomyces* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ที่ปรากฏว่าสารสกัดจากแอคติโนมัยสิทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่า metalaxyl ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการนำเชื้อ *Streptomyces* มาใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในพืชหลายชนิด เช่น *Streptomyces griseus* ใช้ควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรครากในแครอท (Merriman et al., 1974), *Streptomyces pulcher* และ *Streptomyces canescens* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo-atrum* และ *Alternaria solani* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในต้นมะเขือเทศ (El-Abyad et al., 1993) และการใช้ *Streptomyces* 2 สายพันธุ์ในการควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าคอดิน (Damping-off) ในต้นบ๊วย (Sadeghi et al., 2006) เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1996 Jones และ Samac ศึกษาการใช้เชื้อ *Streptomyces* ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* และ *Phytium* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่า (Root rot) และ โรคเน่าคอดิน ในถั่ว พบว่าเชื้อ *Streptomyces* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ได้ เช่นเดียวกับ Xiao และคณะ (2002) รายงานว่า *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในวอชิงตัน สามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora medicaginis* และ *Phytophthora sojae* ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าของถั่วในห้องปฏิบัติการได้, Joo (2005) พบว่า *Streptomyces halstedii* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Phytophthora capsici* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในพริก (*phytophthora blight*) ในปี ค.ศ. 2007 Ezziyyani และคณะ พบว่าการใช้เชื้อ *Trichoderma harzianum* ร่วมกับ *Streptomyces rochei* สามารถควบคุมการเกิดโรครากเน่าในพริกไทย ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Phytophthora capsici* ได้

ในด้านงานพาราพบว่ามีการศึกษาในปี พ.ศ. 2553 เกี่ยวกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora botryosa* และ *P. palmivora* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบร่วงของกล้วยพาราในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อรา *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Streptomyces* และ *Bacillus* หลายสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ (เสมอใจ และคณะ, 2553) สอดคล้องกับรายงานของ อรรวรรณ และคณะ ในปี พ.ศ. 2553 ที่นำเชื้อ *Trichoderma harzianu* (CB-PIN-01) *Trichoderma harzianum* (PM51) *Bacillus subtilis* และ *Bacillus amyloliquefaciens* (197KB) มาทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบร่วงและผักเน่าในยางพารา โดยวิธี dual culture พบว่า เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อราได้ ในขณะนี้งานไม่พบรายงานการศึกษการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเส้นดำในยางพาราในด้านที่เป็นโรค แต่พบว่ามีการศึกษาการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยสิทในปี พ.ศ. 2554 โดยกรรณิการ์ และคณะ พบว่า เชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท SR8.2 และ

SR9.1 ซึ่งเป็นเชื้อ *Streptomyces lydicus* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora botryosa* Chee. ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคใบร่วง (*Phytophthora leaf fall*) และโรคเส้นดำ (black stripe) ได้ดีที่สุด

สรุปผลการวิจัย

1. ผลจากการนำเอาชิ้นส่วนของต้นยางบริเวณที่เกิดโรคเส้นดำมาแยกเชื้อ *Phytophthora* พบว่า ได้เชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแบบ stellate เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการสร้าง sporangia รูปร่างแบบ Ovoid และมีการสร้าง Chlamydospore แบบ Terminal chlamydospore ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *P. palmivola*

2. ผลการนำสารละลายสปอร์ของเชื้อที่แยกได้ไปเพาะลงบนใบยางพาราที่ไม่เป็นโรค พบว่าสามารถทำให้เกิดโรคได้ ดังนั้นเชื้อราที่แยกได้สามารถทำให้เกิดอาการโรคบนใบได้

3. นำเชื้อแอคติโนมัยสิทที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual culture bioassay โดยใช้เชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อทดสอบ พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสิท 28 ไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ และเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

4. นำเอาสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรากับสารเคมีคือ Metalaxyl โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และ เชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในทุเรียนที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีกว่า Metalaxyl โดยให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคและสายพันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากการวิชาการเกษตร เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ metalaxyl ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ มากกว่า 1 mg/ml ตามลำดับ

5. การเปรียบเทียบต้นทุนในการผลิต พบว่าการใช้สารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทไอโซเลท A31 ในการยับยั้งเชื้อราใช้ต้นทุนสูงกว่า metalaxyl 50 เท่า อย่างไรก็ตามถ้าได้มีการนำเอาสารสกัดหยาบไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ปริมาณสารที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อราจะน้อยลง ทำให้ต้นทุนของสารจะน้อยลง แต่อย่างไรก็ตามต้องมีค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการทำให้สารบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งต้องทำการทดสอบเปรียบเทียบต่อไป

คำขอบคุณ

โครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และได้รับคำปรึกษาและชี้แนะในด้านการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา *Phytophthora* และการทดสอบการก่อให้เกิดโรคจาก ดร. พเยาว์ ร่มรื่นสุขารมย์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ หัวหน้าสายงานอารักขาพืช ศูนย์วิจัยยางฉะเชิงเทรา

เอกสารอ้างอิง

- กรรณิการ์ ดวงมัลย์ และ อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต. 2554. “รายงานการวิจัยเรื่องการคัดแยกแอดติโนมัยสีทจากรากและดินรอบรากต้นยางพาราที่สามารถยับยั้ง *Corynespora cassiicola* และ *Phytophthora botryose*.” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://elibrary.trf.or.th/download_fullstep1.asp (4 กุมภาพันธ์ 2556)
- วิเชียร ดีทอง. 2544. การควบคุมและแมลงศัตรูส้มโชกุนโดยชีววิธีแบบผสมผสาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 119 หน้า.
- สนชัย เพ็ชรพรหม. 2540. การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler โดยวิธีแบบผสมผสาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 120 หน้า.
- สถาบันวิจัยยาง. 2555. คำแนะนำโรคและอาการผิดปกติของยางพารา ปี 2555. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- เสมอใจ ชื่นจิตต์, วสันต์ เพชรรัตน์ และพรศิลป์ จันทวีเมือง. 2553. “รายงานการวิจัยเรื่องการประเมินการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบร่วง *Phytophthora* ของกล้วยพารา.” [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://natres.psu.ac.th/researchcenter/websitebio/research2_51.pdf (5 ตุลาคม 2556)
- อรรณพ ปิยะบุญ, นกัณห์ สุธารัตนพงศ์, วทัญญู ตั้งศิริอำนวย, ชลิต บุญพร้อมกุล, ถิรวัฒน์ วงศ์วิวัฒน์, ปรียาพร คงจรรักษ์. 2553. “การควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica* Dastur. สาเหตุโรคใบร่วงยางพารา โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์.” วารสารวิชาการเกษตร 28, 2 (พฤษภาคม-สิงหาคม 2553): 120-133.
- Loliam, B., Morinaga, T., and Chaiyanan S. 2012. Biocontrol of *Phytophthora infestans*, Fungal Pathogen of Seedling Damping Off Disease in Economic Plant Nursery. *Psyche* doi:10.1155/2012/324317
- Bennett J. V., Brodie J. L., Benner E. J. and Kirby W. M. M. 1966. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol* 14(2): 170-177.
- Bhat, R. G., McBlain, B. A., and Schmitthenner, A. F. 1993. The inheritance of resistance to metalaxyl and to fluorophenylalanine in matings of homothallic *Phytophthora sojae*. *Mycol. Res.* 97, 865–870.
- Bush, E. A., Stromberg, E. L., Hong, C. X., Richardson, P. A., Kong, P. 2006. Illustration of key morphological characteristics of *Phytophthora* species identified in Virginia nursery irrigation water. *Plant Health Prog.* doi:10.1094/PHP-2006-0621-01-RS.
- Davidse, L. C. 1981. Resistance to acylalanine fungicides in *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Neth. J. Pl. Pathol.* 87, 11–24.

- El-Abyad, M. S., El-Sayed, M. A., El-Shanshoury, A. R., and El-Sabbagh, S. M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant Soil* **149**, 185–195.
- Ezziyyani, M., Requena, M.E., Egea-Gilabert, C., Candela, M.E. 2007. Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Journal of Phytopathology* **155**, 342-349
- Filonow, A. B., and Lockwood, J. L. 1985. Evaluation of several *Actinomycetes* and the fungus *Hyphochytrium catenoides* as biocontrol agents for *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Dis.* **69**, 1033–1036.
- Ferrin, D.M. and J.N. Kabashima. 1991. *In vitro* insensitivity to metalaxyl of isolates of *Phytophthora citricola* and *P. parasitica* from ornamental host in southern California. *Plant Dis.* **75**: 1041-1044.
- Gyenis, L., Anderson, N. A., and Ostry, M. E. 1999. Biological control of *Septoria* leaf spot and canker of hybrid poplar under field conditions. *Phytophthology* **89**, S31.
- Hsu, S. C., and Lockwood, J. L. 1984. Biological control of *Phytophthora* root rot of soybean by *Hyphochytrium catenoides* in greenhouse tests. *Phytopath. Z.* **109**, 139–146.
- Hunger, R. M., Hamm, P. B., Horner, C. E., and Hansen, E. M. 1982. Tolerance of *Phytophthora megasperma* isolates to metalaxyl. *Plant Dis.* **66**, 645–649.
- Jones, C. R., and Samac, D. A. 1996. Biological control of fungi causing alfalfa seedling damping-off with a disease-suppressive strain of *Streptomyces*. *Biol. Control* **7**, 196–204.
- Lamboy, J. S., and Paxton, J. D. 1992. Metalaxyl sensitivity selection within *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Dis.* **76**, 932–936.
- Liu, D. 1992. "Biological Control of *Streptomyces scabies* and Other Plant Pathogens." Ph.D. thesis, University of Minnesota.
- Merriman, P. R., Price, R. D., and Kollmorgen, J. F. 1974. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Aust. J. Agric. Res.* **25**, 219–226.
- Osburn, R. M., Milner, J. L., Oplinger, E. S., Smith, R. S., and Handelsman, J. 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. *Plant Dis.* **79**, 551–556.
- Paulsrud, B. E. 1996. "Characterization of Antagonistic *Streptomyces* spp. from Potato Scab-Suppressive Soil and Evaluation of Their Biocontrol Potential against Potato and Non-potato Pathogens." M.S. thesis, University of Minnesota.
- Sadeghi, A., Hessian, A.R., Askari, H., Aghighi, S. and Shahidi Bonjar, G.H. 2006. Biological

- control potential of two *Streptomyces* isolates on *Rhizoctonia solani*, the causal agent of damping-off of sugar beet. *Pak. J. Biol.Sci.*, 9(5): 904-910.
- Stack, J. P., and Millar, R. L. 1985. Isolation and characterization of a metalaxyl-insensitive isolate of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. *Phytopathology* **75**, 1387–1392.
- Takizawa, M., Colwell, R. R. and Hill, R. T. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake bay. *Appl Environ Microbiol* 59(4): 997-1002.
- Waterhouse, G.M. 1973. Peronosporales, Pages 165-185. In *The Fungi* Vol. IVB. G.C. Ainsworth, Frederick K. Sparrow and Alfred S. Sussman. (eds.). Academic Press, New York and London.
- Xiao, K., Kinkel, L.L. and Samac, D.A. 2002. Biological Control of *Phytophthora* Root Rots on Alfalfa and Soybean with *Streptomyces* *Biol. Control* **23**, 285–295.

**ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้
และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ**

วัตถุประสงค์	กิจกรรม ที่วางแผนไว้	กิจกรรม ที่ดำเนินการมา	ผลที่ได้รับ
เพื่อคัดเลือกเชื้อ แอ คติโนมัยสิตที่มี ความสามารถในการ ยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา <i>Phytophthora</i> และประเมินศักยภาพ ของสารสกัดจากเชื้อ แอคติโนมัยสิตที่ คัดเลือกได้เทียบกับ สารเคมีที่แนะนำให้ใช้ ในทางการเกษตร	1. ได้เชื้อราก่อโรคเส้นดำ สำหรับทดสอบการยับยั้งการ เจริญโดยแอคติโนมัยสิต	1. สามารถแยกเชื้อราก่อโรค เส้นดำในต้นยางเพื่อนำมาใช้ใน การทดสอบการยับยั้งการเจริญ โดยเชื้อแอคติโนมัยสิตที่เก็บ รักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ 2. ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อรา <i>P. palmivola</i> จากสำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช กรม วิชาการเกษตรเพื่อนำมาใช้ ทดสอบประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการเจริญโดยเชื้อแอคติโน มัยสิตร่วมกับเชื้อราที่แยกได้ จากต้นยางที่เป็นโรค	1. ได้เชื้อรา <i>Phytophthora</i> 2. สายพันธุ์เพื่อนำมาใช้ใน การทดสอบประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญโดย เชื้อแอคติโนมัยสิตที่เก็บ รักษาไว้ในห้องปฏิบัติการ
	2. ได้แอคติโนมัยสิตสายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อราก่อโรคเส้น ดำ	2. ทำการทดสอบหาแอคติโนมัย สิตสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการ เจริญของเชื้อราทดสอบได้ดี ที่สุด	2. ได้เชื้อแอคติโนมัยสิตไอ โซเลท A31 ซึ่งเป็นสาย พันธุ์ที่สามารถยับยั้งการ เจริญของเชื้อราทดสอบได้ ดีที่สุด
	3. ได้สารสกัดจากเชื้อแอคติ โนมัยสิตที่คัดเลือกได้	3. ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโน มัยสิตไอโซเลท A31 ในอาหาร เหลวและทำการสกัดสาร	3. ได้สารสกัดจากเชื้อแอ คติโนมัยสิตไอโซเลท A31 ในปริมาณที่มากพอที่จะ นำไปทดสอบประสิทธิภาพ ในการยับยั้งเชื้อรา
	4. ทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุด ที่ยับยั้งเชื้อราได้ (MIC) ของ สารสกัด และสารเคมีที่ใช้กัน ในทางการเกษตร และสามารถ ประเมินประสิทธิภาพของสาร สกัดที่ได้จากแอคติโนมัยสิต	4. ทดสอบหาความสามารถใน การยับยั้งเชื้อราของสารสกัด จากไอโซเลท A31 และ metalaxyl ที่ความเข้มข้น ต่างๆ กันเพื่อหาความเข้มข้นที่ ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการ เจริญของเชื้อราได้ (MIC)	4.1 ทราบค่าความเข้มข้น ต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อราได้ (MIC) ของสารสกัดหยาบ และ metalaxyl 4.2 ทราบว่าสารสกัดหยาบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ สูง กว่า metalaxyl

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องการนำโครงการนี้ไปใช้ประโยชน์

นำข้อมูลที่ได้ไปนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ

ศักยภาพของแอคติโนมัยสิทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora*



สาเหตุโรคเส้นดำยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ Biological control of black stripe of Para-rubber tree with actinomycetes crude extract

ดร. นาริลักษณ์ นานแก้ว

(ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.))



เรื่องย่อ

○ ผลการทดสอบความต้านทานในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Dual culture bioassay โดยเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลต พบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ ไอโซเลต A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

○ ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราโดยการเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้เปรียบเทียบกับ Metalexyl โดยใช้เชื้อรา *Phytophthora* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และเชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุของโรคในทุเรียนที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์ มาใช้ในการทดสอบ ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทธิ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ดีกว่า Metalexyl โดยให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค และสายพันธุ์ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกรมวิทยาศาสตร์ เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ metalexyl ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ มากกว่า 1 mg/ml ตามลำดับ

คำนำ

โรคเส้นดำ (Black Stripe) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Phytophthora* เป็นโรคทางสัณฐานวิทยาที่มีความสำคัญ เนื่องจากทำลายพืชน้ำกรีดซึ่งเป็นบริเวณเก็บเกี่ยวการป้องกันและกำจัดทำได้ยากโดยใช้สารเคมี ซึ่งอาจมีอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม แนวทางป้องกันโรคของเชื้อราที่อาจทำได้โดยใช้วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งไม่ผลัดและไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งปัจจุบันยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับการควบคุมโรคเส้นดำโดยชีววิธี จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้ ซึ่งเป็นการค้นหาแอคติโนมัยสิทธิ์ที่เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีที่สุด มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา เทียบกับสารเคมีที่แนะนำให้ใช้ในการเกษตร (Metalexyl) และศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดที่ได้จากเชื้อไปใช้จริง

ผลการทดลอง

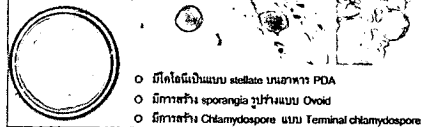
การแยกเชื้อราก่อโรคเส้นดำในยางพารา

ISOLATION



คั้นส่วนเนื้อยางสด แช่ในสารละลาย sodium hypochlorite, แช่ในน้ำ, แช่ในน้ำที่เติมสารละลาย PDA

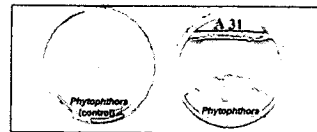
IDENTIFICATION



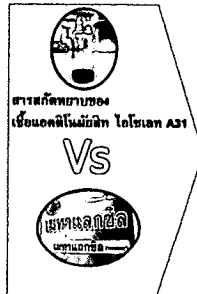
○ มีโคไดโนเป็นแบบ stellate บนอาหาร PDA
○ มีการสร้าง sporangia รูปสามเหลี่ยม Ovoid
○ มีการสร้าง Chlamydospore แบบ Terminal chlamydospore

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการของเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการจำนวน 75 ไอโซเลต พบว่ามีไอโซเลต A31 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากับ 55 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม



เปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์กับสารเคมี



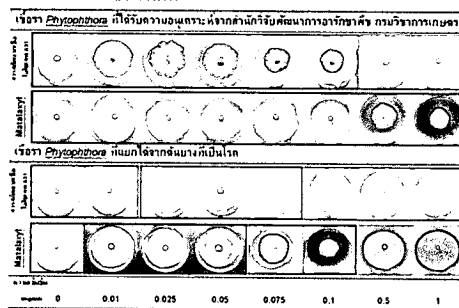
$$PIRG = \frac{(R1-R2)}{R1} \times 100$$

PIRG = Percent Inhibition of Radial Growth
R1 = ความยาวที่เชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์สามารถยับยั้ง
R2 = ความยาวที่เชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์สามารถยับยั้ง

Phytophthora

- สายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค
- สายพันธุ์ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์

ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดหยาบจากแอคติโนมัยสิทธิ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ดีกว่า Metalexyl โดยให้ค่า MIC ต่อสายพันธุ์ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรคและสายพันธุ์ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกรมวิทยาศาสตร์ เท่ากับ 0.1 และ 1 mg/ml ตามลำดับ ในขณะที่ metalexyl ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.5 และ มากกว่า 1 mg/ml ตามลำดับ



		ค่าเฉลี่ย (mm)							
		0	0.01	0.025	0.05	0.075	0.1	0.5	1
เชื้อรา Phytophthora ที่ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์	A 31	0	12.57	17.55	21.68	42.17	54.69	75.20	103.25
	Metalexyl	0	0	0	0	0	0.25	37.50	103.25
เชื้อรา Phytophthora ที่แยกได้จากต้นยางที่เป็นโรค	A 31	0	2.34	10.53	37.44	76.30	103	100	100
	Metalexyl	0	0.05	21.68	33.93	40.95	57.33	100	103

วิจารณ์ผลการทดลอง

- เชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ไอโซเลต A31 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์สูงกว่า metalexyl อย่างไรก็ตามถ้าได้มีการทำโดยวิธีอื่นๆอีกจะยิ่งทำให้เรามีประสิทธิภาพสูงขึ้น
- การวิจัยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ในการทดสอบ ซึ่งเชื้อรา *Phytophthora* ที่เป็นสาเหตุมากกว่า 2 สายพันธุ์ (สถานีวิจัยยาง, 2555) ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งในเชื้อสายพันธุ์อื่นเพิ่มเติมในงานวิจัยครั้งต่อไป
- เชื้อรา *Phytophthora* หายสาบสูญจากต้นยางที่ฉีด metalexyl (Hunger et al., 1982; Lamboy and Paxton, 1992; Bhat et al., 1993) ได้ ดังนั้นการให้สารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยสิทธิ์ไอโซเลต A31 จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่จะนำมาใช้ทดแทนสารเคมี

เอกสารอ้างอิง

- สถานีวิจัยยาง, 2555 ค่าแนะนำโรคและอาการผิดปกติของยางพารา ปี 2555 โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ, 77 หน้า.
- Hunger, R. M., Hamm, P. B., Homer, C. E., and Hansen, E. M. 1982. Tolerance of *Phytophthora megasperma* isolates to metalexyl. *Plant Dis.* 66, 645-649.
- Lamboy, J. S., and Paxton, J. D. 1992. Metalexyl sensitivity selection within *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Dis.* 76, 932-936.
- Bhat, R. G., McBlain, B. A., and Schmitthenner, A. F. 1993. The inheritance of resistance to metalexyl and to fluorophenylalanine in matings of homothallic *Phytophthora sojae*. *Mycol. Res.* 97, 865-870.

ตอบข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่อร่างรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการ
“ศักยภาพของแอคติโนมัยสิทธิ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Phytophthora สาเหตุโรคเส้นดำยางพาราในระดับห้องปฏิบัติการ”

ข้อคิดเห็น/ข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิ	ตอบข้อคิดเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิโดยนักวิจัย
<u>ความเห็นด้านการพิมพ์ (Editorial)</u> <u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1</u> 1. คำอธิบายภาพ ควรเขียนไว้ได้ภาพ	1. แก้ไขย้ายคำอธิบายภาพไปไว้ได้ภาพเรียบร้อยตามคำแนะนำ
<u>ความเห็นด้านวิชาการ (Technical)</u> <u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1</u> 1. ควรวิจารณ์ผลการทดลองเพิ่มเติม หรืออธิบายเหตุผลจากการทดลองในรายงานเพิ่มว่าทำไมการใช้ Metalaxyl จึงไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา Phytophthora ที่ได้รับจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และควรมีการอ้างอิงเอกสารประกอบการวิจารณ์ผล 2. การเขียนวิจารณ์ผลการวิจัย ในหน้าที่ 14 ยังไม่มีความเชื่อมโยงกับผลการวิจัย 3. การสรุปผลวิจัย ในหน้าที่ 16 ควรเขียนเป็นข้อๆ สรุปให้ชัดเจนว่าได้อะไรสั้นๆตามวัตถุประสงค์วิธีการทดลอง และผลที่คาดว่าจะได้รับอย่างไร ไม่ควรเขียนเหมือนกันซ้ำๆ ในทุกหัวข้อ 4. ควรทดลองเพิ่มเติมในเรือนทดลองและกับต้นยางที่แสดงอาการที่หน้ากรีต ไม่ใช่การทดสอบการเป็นโรคที่ในยาง และควรวิจัยร่วมกับนักวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญด้านโรคของยางพารา เพื่อยืนยันความถูกต้องของข้อมูลและกับต้นยางจริง	1. ได้วิจารณ์ผลการทดลองเพิ่มเติมเกี่ยวกับเหตุผลว่าทำไมการใช้ Metalaxyl จึงไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา Phytophthora ที่ได้รับจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรในวิจารณ์ผลการวิจัยหน้า 16 และเพิ่มเอกสารอ้างอิงประกอบการวิจารณ์ผลเรียบร้อยแล้ว 2. แก้ไขวิจารณ์ผลการทดลองให้มีความสอดคล้องกับผลการวิจัยตามที่ผู้ทรงคุณวุฒิเสนอแนะ 3. แก้ไขสรุปผลการวิจัยหน้า 16 ตามคำแนะนำของผู้ทรงคุณวุฒิ 4. เนื่องจากระยะเวลาในการวิจัยมีจำกัดทำให้ไม่สามารถทำการทดลองเพิ่มเติมในโครงการนี้ได้ ผู้วิจัยขอทำการวิจัยทดลองเพิ่มเติมตามผู้ทรงคุณวุฒิเสนอแนะในงานวิจัยครั้งต่อไป

<u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 2</u> 1. ควรเพิ่มเติมการอ้างอิงเอกสารที่ช่วยสนับสนุนผลการทดลอง เช่น เชื้อแอคติโนมัยซิสจีนัสไหน ช่วยควบคุมเชื้อ <i>Phytophthora</i> อย่างไร สอดคล้องกับผลการทดลอง หรือสนับสนุนการทดลองอย่างไร (ไม่ควรอ้างอิงเหมือนตรวจเอกสารทั้งย่อหน้า) 2. ควรเพิ่มเติมรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงาน ให้ผู้อื่นนำไปใช้ประโยชน์ในการดำเนินงานต่อได้ 3. ควรวิเคราะห์วิจารณ์ว่าทำไมสารสกัดหยาบ จึงมีประสิทธิภาพดีกว่าสารเคมี หากมีเอกสารอ้างอิงสนับสนุนจะทำให้ผลงานวิจัยน่าเชื่อถือมากขึ้น 4. ควรนำหลักการทางสถิติมาใช้ในการวิเคราะห์ผลข้อมูล เพื่อความน่าเชื่อถือ อย่างน้อยควรระบุจำนวนซ้ำของหน่วยการทดลอง 5. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิจัย และควรเพิ่มรายละเอียดในบางขั้นตอน เช่น วิธีการเปรียบเทียบศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากเชื้อแอคติโนมัยซิสกับสารเคมีทำอย่างไร ควรใส่รายละเอียดด้วย 6. วิธีวิจัยข้อ 4 ควรลำดับไว้เป็นข้อที่ 2 7. การวัด Inhibition zone ต้องเทียบกับ Control ที่วางเชื้อในลักษณะเดียวกันจึงจะเปรียบเทียบกันได้	1. แก้ไขวิจารณ์ผลการทดลองหน้า 15-17 ตามที่ผู้ทรงคุณวุฒิเสนอแนะเรียบร้อยแล้ว 2. เพิ่มเติมรายละเอียดในขั้นตอนการดำเนินงานในส่วนของวิธีการวิจัย หน้า 8-10 เรียบร้อยแล้ว 3. เพิ่มเติมเหตุผล ว่าทำไมสารสกัดหยาบ จึงมีประสิทธิภาพดีกว่าสารเคมี และเอกสารอ้างอิงในวิจารณ์ผลการวิจัยหน้า 16 4. ระบุจำนวนซ้ำของการทำการทดลองในวิธีการวิจัย หน้า 9 และ 10 5. แก้ไขและเพิ่มเติมรายละเอียดวิธีการทดลองตามที่ผู้ทรงคุณวุฒิเสนอแนะ 6. เปลี่ยนวิธีการวิจัยข้อ 4 เป็น ข้อ 2 ในหน้า 9 7. ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยการวางเชื้อในจานควบคุมในลักษณะเดียวกับจานทดสอบ แต่ไม่ได้บันทึกภาพไว้ จึงใช้ภาพถ่ายลักษณะของโคโลนีของเชื้อราในจานอาหารที่เคยถ่ายไว้แทน ดังนั้นเพื่อป้องกันการความสับสนที่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อมีผู้อ่านรายงานจึงขอตัดรูป ชุดควบคุมในภาพที่ 5 ในหน้า 12 ออกไป
---	---

8. ควรระบุชื่อของหน่วยการทดลอง 9. การแสดงผลยับยั้งเชื้อราของเชื้อแอนติโนมายสิท ควรแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเมื่อเทียบกับ Control หากทำได้ ควรแสดงผลวิเคราะห์เชิงสถิติ 10. ควรตรวจสอบการคำนวณความเข้มข้นของสารเคมีใหม่ โดยปกติสารเคมี Metalaxyl สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Phytophthora บนอาหารที่ผสมสารเคมีความเข้มข้นไม่เกิน 1 mg/l 11. ควรตรวจสอบการเขียนเอกสารอ้างอิง 12. ไม่ควรคัดลอกข้อความจากทฤษฎี แนวคิดในการวิจัย และผลงานที่เกี่ยวข้องมาใส่ในส่วนของการวิจารณ์ผลทั้งย่อหน้าโดยไม่ดัดแปลง 13. นำสารสกัดไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในแปลงก๊ริดเปรียบเทียบกับสารเคมี หากมีประสิทธิภาพดี ควรศึกษาการสกัดเป็นสารบริสุทธิ์เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ แล้วนำไปทดสอบอัตราการใช้ที่เหมาะสมอีกครั้งหนึ่ง 14. ยังเป็นผลการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น หากจะนำไปใช้ประโยชน์ควรศึกษาต่อว่าสารสกัดมีผลต่อการยับยั้งโรคในแปลงก๊ริดหรือไม่ อัตราการใช้ที่เหมาะสมควรเป็นเท่าไร และเกษตรกรจะนำไปผลิตใช้เองได้อย่างไร หากสกัดเป็นสารบริสุทธิ์เพื่อจำหน่ายแก่เกษตรกรจะมีต้นทุนมากน้อยเพียงใด	8. ระบุจำนวนซ้ำของการทำการทดลองในวิธีการวิจัย หน้า 9 และ 10 9. ผู้วิจัยได้แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไว้ในตารางที่ 2 เรียบร้อยแล้ว และได้แก้ไขเพิ่มเติมเรื่องการบ่งบอกเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในผลการวิจัยข้อ 4 หน้า 13 10. ความเข้มข้นที่คำนวณได้ถูกต้องแล้วหลังจากที่ทำการตรวจสอบใหม่สาเหตุที่ให้ผลต่างจากที่ผู้ทรงคุณวุฒิตั้งข้อสังเกตอาจจะเนื่องมาจากความบริสุทธิ์ของ metalaxyl ต่างกัน เนื่องจากสารที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นสารที่มีขายในร้านเคมีการเกษตร ซึ่งไม่ได้อยู่ในรูปสารบริสุทธิ์ 11. ตรวจสอบเอกสารอ้างอิง หน้า 18 และแก้ไขให้ถูกต้องเรียบร้อยแล้ว 12. ทำการแก้ไขดัดแปลงวิจารณ์การทดลองในหน้า 16 13. เนื่องจากระยะเวลาในการวิจัยมีจำกัดทำให้ไม่สามารถทำการทดลองเพิ่มเติมในโครงการนี้ได้ ผู้วิจัยขอทำการวิจัยทดลองเพิ่มเติมตามผู้ทรงคุณวุฒิเสนอแนะในงานวิจัยครั้งต่อไป 14. ผู้วิจัยจะนำคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ของผู้ทรงคุณวุฒิไปใช้ในการวิจัยในครั้งต่อไป
---	---

<u>ผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 3</u> 1. นำน้ำหนักความน่าเชื่อถือ ค่อนข้างน้อย เพราะผู้วิจัยไม่แจกแจงขั้นตอนวิธีการดำเนินการสร้างความน่าเชื่อถือว่าเป็นการดำเนินการที่ดีหรือไม่ ประกอบกับการวัดผลและการวิเคราะห์ผลกับชุดเปรียบเทียบไม่สอดคล้องกัน (ไม่เกี่ยวข้องกัน) 2. วิธีการทดลอง วิธีการวัดผล ควรปรับปรุง และเพิ่มเติมรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานให้เห็นและเข้าใจว่าผู้ทดลองดำเนินการอย่างไร จำนวนซ้ำที่ทำการทดลองมากพอ น่าเชื่อถือหรือไม่ ควรแจกแจง 3. ยังไม่เป็นเหตุและผลเท่าที่ควร ผลการทดลองและการดำเนินการ ไม่สอดคล้องกันยกตัวอย่าง การทดลองที่ 2 ภาพที่ 5 การดำเนินการทดลอง ชุดควบคุมกับชุดทดลองไม่ไปในแนวทางเดียวกัน 4. การวัดผลและการเปรียบเทียบไม่เกี่ยวข้องกับชุดควบคุม	1. เพิ่มเติมรายละเอียดในวิธีการวิจัยเพื่อให้ที่น่าเชื่อถือมากขึ้นแล้ว ส่วนเรื่องของการวัดผลและวิเคราะห์ผลนั้นผู้วิจัยได้ชี้แจงไปแล้วในการตอบข้อเสนอนะของผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 3 ในข้อ 3 และ 5 2. เพิ่มเติมรายละเอียดในวิธีการวิจัย หน้า 8- 10 เรียบร้อยแล้ว 3. ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา โดยแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Dual culture bioassay เรื่อง การวัด Inhibition zone ซึ่งต้องเทียบกับชุดควบคุม ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยการวางเชื้อในจานควบคุมในลักษณะเดียวกับจานทดสอบ แต่ไม่ได้บันทึกภาพไว้ จึงใช้ภาพถ่ายลักษณะของโคโลนีของเชื้อราในจานอาหารที่เคยถ่ายไว้แทน ดังนั้นเพื่อป้องกันการความสับสนที่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อมีผู้อ่านรายงานจึงขอตัดรูป ชุดควบคุมในภาพที่ 5 ในหน้า 12 ออกไป 4. ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา โดยแอคติโนมัยสิทที่มีในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Dual culture bioassay เรื่อง การวัด Inhibition zone ซึ่งต้องเทียบกับชุดควบคุม ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยการวางเชื้อในจานควบคุมในลักษณะเดียวกับจานทดสอบ แต่ไม่ได้บันทึกภาพไว้ จึงใช้ภาพถ่ายลักษณะของโคโลนีของเชื้อราในจานอาหารที่เคยถ่ายไว้แทน ดังนั้นเพื่อป้องกันการความสับสนที่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อมีผู้อ่านรายงานจึงขอตัดรูป ชุดควบคุมในภาพที่ 5 ในหน้า 12 ออกไป
---	---

5. การอธิบายการยับยั้งที่แสดงเป็นการเปรียบเทียบเฉพาะในชุดทดลองไม่เกี่ยวกับชุดควบคุม	5. ชุดควบคุมของการวิจัยในข้อนี้คือ เชื้อราที่วางลงบนจานอาหารซึ่งไม่ได้เติมสารอะไรเลย ซึ่งทำควบคู่ไปกับการทดสอบสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ผู้วิจัยจะทำการวัดขนาดของโคโลนีเพื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเมื่อเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มเพลท ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่า 0 แล้วเปรียบเทียบขนาดโคโลนีของเชื้อราในจานทดสอบที่มีการเติมสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังสมการในหน้า 10 ดังนั้นผลการวิจัยที่ได้ที่แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ก็คือ การนำขนาดโคโลนีของเชื้อราในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับชุดควบคุม
6. ควรตรวจสอบการคำนวณความเข้มข้นของสารเคมี และระบุเป็นความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์หรือสารเคมีทั้งหมด	6. ความเข้มข้นที่ใช้เป็นความเข้มข้นของสารเคมีทั้งหมด ซึ่งได้ระบุไว้ในวิธีการวิจัยข้อ 4.4
7. การพิสูจน์โรคได้พิสูจน์เฉพาะบนใบยาง ซึ่งไม่ได้พิสูจน์บนหน่ากรีตว่าสามารถทำให้เกิดโรคเส้นดำได้หรือไม่ ควรสรุปเพียง เชื้อที่แยกได้ทำให้เกิดอาการโรคบนใบ	7. แก้วใส่สรุปผลการวิจัยข้อ 2 หน้า 16 เป็นเชื้อราที่แยกได้ทำให้เกิดอาการโรคบนใบ