

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกการเป็นปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้เชื้อ

Streptomyces griseus subsp. *formicus* เพื่อควบคุมโรครากขาว

ของยางพารา

Mechanism of Antagonistic and Applications of

Streptomyces griseus subsp. *formicus* to Control White Root Disease of

Rubber

คณะนักวิจัย

ปฐิมาพร ปลอดภัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ NAT560401S



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กลไกการเป็นปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้เชื้อ

Streptomyces griseus subsp. *formicus* เพื่อควบคุมโรครากขาว

ของยางพารา

Mechanism of Antagonistic and Applications of

Streptomyces griseus subsp. *formicus* to Control White Root Disease of

Rubber

คณะนักวิจัย

ปฏิมาพร ปลอดภัย

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2556 รหัสโครงการ NAT560401S

ชื่อโครงการวิจัย:

กลไกการเป็นปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้เชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการควบคุม
โรครากขาวของยางพารา

Mechanism of Antagonistic and Applications of *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* to
Control White Root Disease of Rubber

ชื่อผู้วิจัย

ดร.ปฎิมาพร ปลอดภัย

หน่วยงานที่สังกัด

ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

โทรศัพท์ 0-7428-6109

E-mail: patimapon.p@psu.ac.th

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ.....	-3-
รายการตาราง.....	-5-
รายการภาพประกอบ.....	-6-
กิตติกรรมประกาศ.....	-7-
บทคัดย่อ.....	-8-
Abstract.....	-8-
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 โรครากขาวของยางพารา	3
2.2 เชื้อ <i>Streptomyces</i> sp.....	4
2.3 การใช้ <i>Streptomyces</i> sp. เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	7
3.1 ทดสอบการยับยั้งของ <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> ต่อเชื้อราโรครากขาว.....	7
3.2 จำแนกชนิดของเชื้อราโรครากขาวด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล	7
3.3 ศึกษากลไกการยับยั้งของเชื้อ <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> ต่อเชื้อโรครากขาว	9
3.4 การเตรียมเชื้อ <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> ในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด มูลวัว และมูลไก่	10
3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของ <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> ในหลอดทดลอง	10
3.6 ประเมินศักยภาพของ <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> ในการควบคุมโรครากขาว	11

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	12
4.1 ทดสอบการยับยั้งของ <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> ต่อเชื้อราโรครากขาว	12
4.2 จำแนกชนิดของเชื้อราโรครากขาวด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล	13
4.3 ศึกษากลไกการยับยั้งของเชื้อ <i>Streptomyces</i> sp. ต่อเชื้อสาเหตุโรครากขาว	18
4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของ <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Rigidoporus microporus</i> ในหลอดทดลอง	23
4.5 ประเมินศักยภาพของ <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> ในการควบคุมโรครากขาว.....	24
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	25
เอกสารอ้างอิง.....	26
ภาคผนวก.....	29

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
Table 3.1 PCR reaction mixture components	8
Table 4.1 Antagonism of <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> on <i>Rigidoporus microporus</i> using dual culture technique on PDA plates	12
Table 4.2 Sequences producing significant alignments of <i>Rigidoporus microporus</i> RIG 56	15
Table 4.3 Percentage changes of ergosterol levels of <i>Rigidoporus microporus</i> RIG 56 treated	
Table 4.4 Antifungal effects of <i>Streptomyces</i> bioproducts against <i>Rigidiporus microporus</i> RIG 56 using suppressive soil technique	23
Table 4.5 Efficiency of <i>Streptomyces</i> bioproducts for controlling white root rot fungal disease under pot culture conditions	24

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบที่	หน้า
Fig. 4.1 SEM micrographs of <i>Rigidoporus microporus</i> hyphae. Control culture with normal fungi showing healthy hyphal growth (A). The hyphae treated with <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> shows hyphal tips appearing shriveled and undifferentiated (B).....	18
Fig. 4.2 GC-MS total-ion chromatogram of intracellular metabolite produced by <i>Rigidoporus microporus</i> RIG 56 treated with 1% DMSO for 24 h.....	20
Fig. 4.3 GC-MS total-ion chromatogram of intracellular metabolite produced by <i>Rigidoporus microporus</i> RIG 56 treated with <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>formicus</i> for 24 h.....	21
Fig. 4.4 GC-MS total-ion chromatogram of intracellular metabolite produced by <i>Rigidoporus microporus</i> RIG 56 treated with propiconazole at a concentration of 1,000 $\mu\text{g ml}^{-1}$	22

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในนี้ได้รับจัดสรรงบประมาณสนับสนุนทุนวิจัย ประเภททุนครูณาจารย์ ปีงบประมาณ 2556 และความร่วมมืออย่างดียิ่งจากภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำให้โครงการนี้ดำเนินมาด้วยดีตั้งแต่ต้นจนเสร็จสิ้นโครงการ คณะผู้ศึกษาขอขอบพระคุณผู้มีส่วนร่วมในการศึกษาดังกล่าวเป็นอย่างยิ่ง

คณะผู้วิจัย

ชื่อโครงการวิจัย: กลไกการเป็นปฏิปักษ์และการประยุกต์ใช้เชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการควบคุมโรครากขาวของยางพารา

ชื่อผู้วิจัย ดร.ปฎิมาพร ปลอดภัย

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

โรครากขาวของยางพาราเป็นโรคที่พบระบาดมากที่สุดในพื้นที่ปลูกทั่วโลก งานวิจัยนี้ได้นำเสนอการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการป้องกันพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Rigidoporus microporus* โดยทำการศึกษาผลของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *R. microporus* RIG 56 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ทำให้เส้นใยเชื้อราเจริญผิดปกติ เส้นใยแตกแขนงลดลง รวมทั้งปลายเส้นใยไม่เจริญ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อปฏิปักษ์ผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ผลการทดสอบในสภาพเรือนทดลองพบว่าเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ลดการเกิดโรครากขาวได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ดังนั้นการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์นี้จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะใช้เพื่อควบคุมการระบาดของโรครากขาวของยางพารา

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี, โรครากขาว, ยางพารา, *Streptomyces griseus*

Abstract

White root rot of rubber is one of the most important diseases affecting this crop worldwide. This work presents the evaluation of the capacity of *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* to protect rubber plants against *Rigidoporus microporus*. Effects of *S. griseus* subsp. *formicus* on morphology of plant pathogenic fungi *R. microporus* RIG 56 was observed by scanning electron microscopy. The micrographs of mycelia treated with *S. griseus* subsp. *formicus* illustrated aberrant surface morphology folding with the formation of short branches and undifferentiated tips. Secondary metabolite production by *S. griseus* subsp. *formicus* may inhibit the ergosterol biosynthesis pathway. In greenhouse experiments, application of *S. griseus* subsp. *formicus* significantly reduced the incidence of white root rot fungal disease compared with untreated controls. Introducing antagonistic bacteria represent an alternative or complementary strategy for the control of this disease.

Keywords: Biological control, White root rot, Rubber, *Streptomyces griseus*

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญลำดับต้น ๆ ของประเทศไทย เป็นยางที่กรี๊ดได้แล้วจำนวน 18,082,915 ไร่ มีผลผลิต 4,271,827 ตัน (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ปัญหาในการผลิตยางพาราที่สำคัญประการหนึ่งคือโรค ซึ่งมีทั้งโรคที่เกิดกับใบ หน้ากรี๊ด และราก โดยโรคที่เกิดกับรากก่อให้เกิดความเสียหายกับยางพารามากที่สุดในขณะนี้คือ โรครากขาว ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Rigidoporus microporus* (Sw.) Overeem (Syn. *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki) ซึ่งมีกระบาดอย่างรุนแรงในฤดูฝน โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีฝนตกชุก และความชื้นสูง เชื้อสามารถเข้าทำลายตั้งแต่ยางอายุ 1-2 ปี ทำให้ต้นที่เป็นโรครยืนต้นตาย และเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อแก่ต้นข้างเคียง ทำให้จำนวนต้นยางและผลผลิตลดลง อารมณ์ และคณะ (2553) สำรวจและประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจ ในปี 2551-2553 พบว่าพื้นที่ปลูกยางภาคใต้มีการระบาดของโรครากขาวกระจายในทุกพื้นที่ ทำให้ความเสียหายแก่แปลงยางในจังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด มีพื้นที่เสียหายจากโรครากขาว ทั้งหมด 1,929 ไร่ หรือร้อยละ 3.43 ของพื้นที่สวนยางที่พบโรค โดยพื้นที่สวนยางในจังหวัด นครศรีธรรมราช มีความเสียหายจากโรครากขาวต่อพื้นที่มากที่สุดร้อยละ 4.45 รองลงมาคือจังหวัดกระบี่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี พังงา ระนอง และ ภูเก็ต มีความเสียหายต่อพื้นที่ร้อยละ 4.15 3.81 3.08 3.02 1.91 และ 1.56 ตามลำดับ สวนยางที่พบเป็นโรครากขาวมีอายุเฉลี่ย 13 ปี มีความเสียหายและมีบริเวณที่เป็นโรคเฉลี่ย 0.61 ไร่ วิเคราะห์เป็นพื้นที่ปลูกยางของภาคใต้ตอนบนทั้งหมดจะพบว่าช่วงปี 2551-2553 มีพื้นที่เสียหายจากโรครากขาว ประมาณ 31,413 ไร่ หรือคิดความเสียหายต่อพื้นที่ปลูกร้อยละ 0.57 คิดเป็นมูลค่าผลผลิตยางที่สูญเสียประมาณ 848 ล้านบาท หากไม่มีการจัดการโรคในอีก 10 ปี เมื่อถึงเวลาโค่น คาดว่าจะมีพื้นที่เป็นโรครากมากขึ้นถึง 113,726 ไร่ คิดเป็นมูลค่าผลผลิตสะสม 10 ปี ไม่ต่ำกว่า 19,257 ล้านบาท และมูลค่าไม้ยางที่หายไปอีกประมาณ 5,200 ล้านบาท รวมมูลค่าที่สูญหายมากถึง 24,500 ล้านบาท สำหรับการศึกษาสวนยางเป็นโรคในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง จังหวัดสงขลา สตูล พัทลุง และตรัง จำนวน 392 แปลง เป็นพื้นที่เสียหายจากโรครากขาว คิดเป็นพื้นที่ร้อยละ 3.41 ของพื้นที่สำรวจ โดย จ.พัทลุง พบสวนยางเป็นโรครากขาวรุนแรงมากถึงร้อยละ 8.97 ของพื้นที่สวนยางที่พบโรคราก หากรวมความเสียหายจากโรครากขาวในพื้นที่ปลูกยางภาคใต้ของประเทศไทยทั้งหมดใน ปี 2551-2553 คาดว่ามีความเสียหายเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 1,600 ล้านบาท และภายใน 10 ปีคาดว่าประเทศไทยจะสูญเสียรายได้จากยางพาราไม่ต่ำกว่า 50,000 ล้านบาท

จึงเห็นได้ว่าโรครากขาวก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรง หากเกษตรกรละเลย ไม่หมั่นตรวจดูแปลง และควบคุมโรค โดยการกำจัดต้นและรากที่เป็นโรคออกจากแปลงเพื่อลดปริมาณเชื้อ การแก้ปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรครากขาวนั้น ควรใช้กัมมะถันรองกันหลุมสำหรับยางปลูกใหม่ในแหล่งที่เคยพบการระบาดของโรครากขาว

หากพบต้นที่เป็นโรคให้ขุดรากเผาทำลายหรืออาจขุดล้อมบริเวณต้นที่เป็นโรคเพื่อป้องกันการระบาดไปยังต้นอื่นในแถวเดียวกัน สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคได้แก่ cyproconazole fenicolonil hexaconazole propiconazole และ tridemorph แต่ค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากต้องขุดดินและทลายที่รากโดยตรง การใช้สารเคมีราดค่อนข้างสิ้นเปลือง ต้นทุนสูง ไม่คุ้มค่าใช้จ่าย การใช้วิธีควบคุมโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญมาก เนื่องจากการทดสอบเบื้องต้น คณะผู้วิจัยพบว่าสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* จากโครงการสูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Streptomyces* sp. ในการยับยั้งโรครากขาวของยางพารามีศักยภาพในการควบคุมโรคนี้อีกหนึ่ง ซึ่งหากได้งบประมาณสนับสนุนเพื่อพัฒนาเป็นสูตรตำรับเพื่อใช้ในแปลง ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกร

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งของ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อเชื้อ *Rigidoporus microporus*
2. ประยุกต์ใช้ปุ๋ยอินทรีย์หรือปุ๋ยคอกร่วมกับ *S. griseus* subsp. *formicus* เพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพารา

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษากลไกการยับยั้งของ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อเชื้อสาเหตุโรครากขาว และพัฒนาการใช้สูตรสำเร็จร่วมกับปุ๋ยอินทรีย์หรือปุ๋ยคอกเพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพาราในห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ปุ๋ยอินทรีย์ที่มีศักยภาพลดการเกิดโรครากขาวของยางพารา
2. เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารทางวิชาการในฐาน ISI หรือ SCOPUS อย่างน้อย 1 บทความ

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรครากขาวของยางพารา

โรครากขาวของยางพาราเกิดจากเชื้อ *R. microporus* จัดเป็นโรครากที่สำคัญที่สุดเนื่องจากเชื้อเข้าทำลายยางพาราทั้งในระยะยางอ่อน (1-5 ปี) ในกรณีที่พื้นที่นั้นเคยมีการปนเปื้อนของเชื้อนี้มาก่อน หรือทำให้เกิดความเสียหายกับยางในระยะต้นโต อายุมากกว่า 15 ปีขึ้นไป (พงษ์เทพ, 2523) อาการที่ปรากฏคือ ใบมีขนาดเล็กลง สีเหลือง ทรงพุ่มมีขนาดเล็ก ต่อมายืนต้นตาย เมื่อขุดดูรากปรากฏเส้นใยสีขาวเจริญแนบกับราก จึงมีชื่อเรียกโรครากขาวตามสีของเชื้อสาเหตุ เมื่อพืชแสดงอาการโรครยะหนึ่งก่อนหรือหลังพืชตาย มักพบดอกเห็ดสีส้มที่โคนต้น ดอกเห็ดมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม ไม่มีก้าน เจริญซ้อนกันเป็นชั้น ๆ ดอกอายุน้อยมีสีส้ม ขอบดอกขาว เมื่ออายุมากขึ้นดอกแข็งกระด้าง มีสีน้ำตาลแดง สร้างสปอร์จำนวนมาก แพร่กระจายต่อไป จากการศึกษาของ Nicole และ Benhamou (1991) พบว่าต้นยางอายุน้อยสามารถชักนำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่ายกว่าต้นยางอายุมาก ซึ่งกระบวนการการเข้าทำลายของเชื้อ *R. microporus* สามารถสรุปได้ 3 ขั้นตอนคือ

- (1) โรโซมอฟของเชื้อราเจริญอยู่บนผิวรากภายนอก (ectotrophic growth habit)
- (2) เมื่อไม่มีอาหารจากภายนอกเชื้อราจะเข้าทำลายเซลล์รากพืชโดยโรโซมอฟเปลี่ยนรูปร่างเป็นเส้นใยที่มีผนังเซลล์บางขึ้นเพื่อการเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช (infectious hyphae) และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม (morphogenetic) เพื่อปลดปล่อย extracellular enzymes เข้าย่อยสลายเนื้อไม้ เส้นใยของเชื้อเข้าสู่รากทางรูเปิดธรรมชาติ เช่น lenticels ทางบาดแผล หรือโดยการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยเซลล์ผิวรากของพืช ซึ่ง Nandris และคณะ (1987) รายงานว่ากระบวนการนี้เกิดขึ้นในสภาพดินขาดออกซิเจน
- (3) เส้นใยเจริญอยู่ภายในเซลล์พืชโดยการย่อยผนังเซลล์ของระบบท่อลำเลียงอาหาร และแพร่กระจายสู่เซลล์อื่นโดยการแทงผ่านทางช่องว่างและท่อต่าง ๆ ของเซลล์ จึงสามารถพบเส้นใยเชื้อราได้ทั้งระหว่างเซลล์ ในเซลล์ และในผนังเซลล์ และพบว่าเชื้อที่เชื้อราเจริญอยู่ภายในท่ออาหาร ทำให้น้ำยางตกตะกอนจับเป็นก้อน ส่งผลให้ปริมาณน้ำยางในต้นยางลดลงด้วย

จากการตรวจสอบเนื้อไม้ที่เป็นโรค พบว่าโครงสร้างของเซลล์ถูกทำลาย ส่วนของ middle lamella และผนังเซลล์ถูกย่อยสลาย ทั้งนี้เกิดจากเชื้อสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโครงสร้างของพืชได้ ซึ่งสามารถตรวจพบเอนไซม์ได้ในเนื้อเยื่อที่ถูกเชื้อทำลาย เช่น glycosidases (β -glucosidase α -galactosidase และ β -galactosidase) polysaccharidases (CM-cellulase pectinase และ xylanase) และ phenol oxidases (laccase และ peroxidase) เนื้อเยื่อพืชเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *R. microporus* พบการทำงานของ laccase ในปริมาณมาก ในขณะที่เชื้อราทำลายเนื้อไม้อื่น เช่น *Phellinus noxius* สร้าง glycosidase และ polysaccharidases เป็นหลัก

การแพร่ระบาดของโรคที่สำคัญคือแพร่ทางระบบราก เกษตรกรนิยมปลูกยางโดยมีระยะระหว่างต้น 2.5-3 เมตร และระยะระหว่างแถว 8 เมตร เมื่อดันหนึ่งเป็นโรคจึงสามารถแพร่จากรากถึงรากได้โดยง่าย ทำให้เกิดโรคต่อเนื่องจากต้นหนึ่งไปยังอีกต้นหนึ่งเป็นแถว (Nandris *et al.*, 1987) รวมทั้งสปอร์ของเชื้อสามารถแพร่ไปตามลมและน้ำ เข้าทำลายพืชได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม โรคนี้จัดเป็นโรคที่สำคัญในประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย อินเดีย ศรีลังกา ไทย แอฟริกาตะวันออก และแอฟริกาตะวันตก (Guyot and Flori, 2002) โดยในศรีลังกาพบว่า เสียหายต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ (Litanage de, 1977 อ้างถึงใน Guyot and Flori, 2002) ส่วนในไอวอรี โคสต์ พบการระบาดของโรคปีละ 2 เปอร์เซ็นต์ (Tran, Unpublished data, Guyot and Flori, 2002) ในประเทศไทยมีรายงานว่าจากการสำรวจโรคในสวนปลูกแทนสงเคราะห์ในจังหวัดปัตตานี ยะลา นราธิวาส และกระบี่ พบว่าต้นยางใหม่เป็นโรครากขาว 12-17 เปอร์เซ็นต์ (พงษ์เทพ, 2523) สำหรับมูลค่าความเสียหายนั้น Nandris และคณะ (1987) กล่าวว่าโดยทั่วไปต้นยางมีอายุเก็บเกี่ยว 25 ปี หากเชื้อเข้าทำลายมักก่อให้เกิดความเสียหายเป็นมูลค่าหลายแสนดอลลาร์ต่อเฮกแตร์

การใช้วิธีควบคุมโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญมาก เนื่องจากการทดสอบเบื้องต้นคณะผู้วิจัยพบว่าสูตรสำเร็จของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* มีศักยภาพในการควบคุมโรคนี้ระดับหนึ่ง โดยเชื้อ Streptomycetes เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สร้าง mycelium ที่แตกแขนงได้แบบเดียวกับเชื้อรา สร้างเส้นใยที่ผิวของโคโลนี (aerial mycelium) และสร้างเส้นใยที่เจริญลงไปในอาหาร (substrate mycelium) เชื้อในกลุ่มนี้สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ คาดกันว่าจากสารออกฤทธิ์ชีวภาพ 22,500 ชนิด ที่สร้างโดยเชื้อจุลินทรีย์ประมาณ 10,100 ชนิด สร้างโดยเชื้อใน order Actinomycetales โดยมีการคาดการณ์ว่า 7,630 ชนิด สร้างโดยเชื้อใน genus *Streptomyces* ซึ่งสารส่วนใหญ่ (6,550 ชนิด) จะเป็นยาปฏิชีวนะ (Berdy, 1995) ตัวอย่างยาปฏิชีวนะที่มีขายในท้องตลาด ทั้งยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราหลายชนิดที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ streptomycin spectinomycin neomycin tetracycline chlorotetracycline erythromycin clindamycin nystatin amphotericin B และ chloramphenicol เป็นต้น (Madigan *et al.*, 2009) ยาฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เช่น streptomycin (*S. griseus*) chloramphenicol (*S. venezuelae*) มีคุณสมบัติยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ยาฆ่าเชื้อรา เช่น candidin (*S. griseus*) (Lechevalier *et al.*, 1953) มีฤทธิ์ต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา polyoxin มีโครงสร้างเป็น nucleoside มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์เชื้อรา

2.2 เชื้อ *Streptomyces* sp.

Streptomyces spp. เป็นแบคทีเรียในวงศ์ Streptomycetaceae ซึ่งเป็นสกุลที่มีอยู่จำนวนมากและสำคัญที่สุดในแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะคล้ายเชื้อรา อาศัยอยู่ทั่วไปในดิน น้ำ อากาศ ฝุ่นละออง สามารถสร้างเส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ (aerial mycelium) และเจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (substrate mycelium) ลักษณะเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้นและมีหลายสี เช่น สีดำ ฟ้ำ น้ำตาล ฟ้า ขาว มะกอก ส้ม ม่วง ชมพู แดง ม่วงแดง เหลือง และเหลืองแกมเขียว เป็นต้น เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่

aerial mycelium จะสร้างสปอร์แบบไม่เคลื่อนที่รูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ แบบ rectus-flexibilis ซึ่งเป็นสปอร์เส้นตรง (straight) หรือโค้งงอ (flexuous) และแบบ spiral สปอร์มีลักษณะวงเกลียว วงกลมปลายเปิด รูปขอขดเป็นวงซ้อนกัน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร ลักษณะผิวสปอร์มี 5 แบบ คือ ผิวเป็นหนาม (spiny) ผิวเป็นขน (hairy) ผิวเป็นปุ่มปม (warty) ผิวเรียบ (smooth) และผิวย่น (rugose) (Tresner *et al.*, 1961) ลักษณะโคโลนีในระยะแรกผิวโคโลนีเรียบ เมื่ออายุมากขึ้น aerial mycelium จะพัฒนามาเป็นสปอร์ ทำให้ผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายแป้ง (powdery) หรือกำมะหยี่ (velvet) มีหลายสี เช่น สีขาว เทา แดง เหลือง น้ำเงิน เขียว และม่วง ซึ่งเป็นสีของสปอร์อยู่ด้านบน ส่วนด้านล่างโคโลนีซึ่งมีเส้นใยเจริญอยู่อาหารมักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อสร้างรงควัตถุเมลานิน (Taddei *et al.*, 2006) แต่อาจพบสีอื่นเช่นเดียวกับสีของสปอร์

2.3 การใช้ *Streptomyces* sp. เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช

Streptomyces sp. เป็นเชื้อที่มีประโยชน์ทางการเกษตรมาก มีรายงานการใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคหลายชนิด เช่น Zarandi และคณะ (2009) รายงานว่า เมื่อนำสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (*Pyricularia grisea*) ของข้าวมาผสมกับเชื้อ *S. sindeneusis* แล้วนำไปพ่นบนใบข้าวทำให้ต้นกล้าเกิดอาการไหม้น้อยลง Boukaew และคณะ (2011) พบว่าเชื้อ *S. philanthi* สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของโรครากและโคนเน่าได้ ขณะที่การใช้ *S. philanthi* และ *S. mycarofaciens* ลดโรคเหี่ยวเฉียวของพริกได้ การที่เชื้อสามารถยับยั้งเชื้อโรคได้เนื่องจากการสร้างสาร secondary metabolite และเอนไซม์กลุ่ม hydrolytic enzyme เช่น amylase cellulase chitinase hemicellulase glucanase และ xylanase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์เชื้อรา และนอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อสามารถผลิตสารฮอร์โมน Indole-3-acetic acid (IAA) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้

Streptomyces sp. สร้าง secondary metabolite ยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช

Yuan และ Crawford (1995) รายงานว่า *S. lydicus* WYEC 108 มีความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อโรคพืชโดยสร้างสาร extracellular antifungal metabolite ยับยั้งการงอกของ oospore และทำลายผนังเซลล์ของเชื้อ *Pythium ultimum* สาเหตุโรครากเน่าและเมล็ดเน่าของข้าวโพด

Bordoloi และคณะ (2002) พบว่า *Streptomyces* sp. ผลิตสาร 2-methyl heptylisonicotinate ยับยั้งเชื้อ *F. moniliforme* *F. oxysporum* *F. semitectum* *F. solani* และ *Rhizoctonia solani* ได้

Taechowisan และคณะ (2005) รายงานว่า *S. aureofaciens* CMUAc 130 สร้างสาร 5,7-dimethoxy-4-p-methoxyphenylcoumarin และ 5,7-dimethoxy-4-phenylcoumarin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *C. musae* และ *F. oxysporum*

Prabavathy และคณะ (2006) พบว่า semi-purified faction SPM5C-1 ที่ได้จาก *Streptomyces* sp. PM 5 (500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ลดการเกิดโรคไหม้ (*Pyricularia grisea*) และโรคกาบใบแห้ง (*R. solani*) ของข้าวได้ 76.1 และ 82.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Gopalakrishnan และคณะ (2011) พบว่าเชื้อ *S. tsusimaensis* CAI-24 *S. caviscabies* CAI-121 *S. setonii* CAI-127 และ *S. africanus* KAI-32 สามารถสร้าง siderophore hydrocyanic acid ยับยั้งเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* สาเหตุโรคเหี่ยวของถั่วเขียว

***Streptomyces* sp. สร้าง hydrolytic enzyme ย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อสาเหตุโรคพืช**

Quecine และคณะ (2008) พบว่าเชื้อ *S. diastatochromogenes* สร้าง chitinase ย่อยสลายผนังเซลล์เส้นใยเชื้อ *C. sublineolum* ได้

Prapagdee และคณะ (2008) พบว่า *S. hygroscopicus* SR A14 สร้าง chitinase และ β -1,3-glucanase ในระยะ exponential phase ถึงระยะ stationary phase เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *Sclerotium rolfsii* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสและโรคโคนเน่าของพริก ส่งผลให้เซลล์ยุบตัวและของเหลวภายในเซลล์ไหลออกมาสู่ภายนอก

Xue และคณะ (2013) พบว่า *S. cyaneofuscatus* ZY-153 *S. kanamyceticu* B-49 *S. rochei* X-4 และ *S. flavotricini* Z-13 สร้างเอนไซม์ chitinase β -1,3-glucosidase cellulase และ protease ยับยั้งการเจริญโดยย่อยผนังเซลล์เชื้อ *Verticillium dahlia* สาเหตุโรคเหี่ยวของฝ้ายและลดการเกิดโรคได้ 18.7-65.8 เปอร์เซ็นต์

***Streptomyces* sp. ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช**

Khamna และคณะ (2010) พบว่า *Streptomyces* sp. ผลิตฮอร์โมน IAA ที่ช่วยส่งเสริมการงอกและเพิ่มความยาวของรากพืช โดยพบว่าการแช่เมล็ดข้าวโพดและถั่วในน้ำเลี้ยงเชื้อ (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับการแช่ใน IAA ที่ความเข้มข้นเท่ากัน

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ทดสอบการยับยั้งของ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ต่อเชื้อราโรครากขาว

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี dual culture plate โดยเลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 5 วัน และนำเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* (ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการสูตรสำเร็จของจุลินทรีย์ประยุกต์ *Streptomyces* sp. ในการยับยั้งโรครากขาวของยางพารา) มาเลี้ยงในอาหาร glucose yeast extract malt extract agar (GYMA) เป็นเวลา 7 วัน และขีดเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา นำไปวางในแนวตรงข้ามเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร โดยในแต่ละไอโซเลททำ 4 ซ้ำ บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดรัศมีของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเชื้อและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (Chaurasia et al., 2005) จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(R_1 - R_2)/R_1] \times 100$$

R_1 = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม

R_2 = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารชุดทดสอบ

3.2 จำแนกชนิดของเชื้อราโรครากขาวด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

การเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อสกัด DNA

เลี้ยงเชื้อราโรครากขาว *R. microporus* RIG 56 (ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความรุนแรงในการเกิดโรค) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm หลังจากนั้นนำเชื้อราที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง (Grade 4 filter paper, Whatman®) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ล้างเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง หรือจนกว่าเส้นใยจะสะอาด ชับน้ำออกจากเส้นใยให้มากที่สุดด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การสกัด DNA ของเชื้อราโรครากขาว

สกัด DNA เชื้อราด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป innuPREP plant DNA (Analytikjena, Jena, Germany) โดยถ่ายเส้นใยเชื้อรา 180 มิลลิกรัม ลงในโถงบดยาแช่เย็นที่ปราศจากเชื้อ บดเส้นใยให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ย้ายเส้นใยลง receiver tube เติม lysis solution (SLS) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ Protinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใส่ prefilter (violet) ลงใน receiver tube ย้ายตัวอย่างใส่ในหลอด prefilter นำหลอดตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (อย่าทิ้ง

ของเหลวที่ผ่านการกรองใน receiver tube) ทำให้ DNA ตกตะกอน โดยใช้ binding solution (SBS) ลงในตัวอย่างผสมสารเข้าด้วยกันด้วยไมโครปิเปต ใส่ spin filter (green) ลงใน receiver tube อันใหม่ ใส่สารที่ผสมแล้วลงใน receiver tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใส (supernatant) และเอาสารที่อยู่ใน spin filter ไว้ ล้าง DNA โดยนำ spin filter มาใส่ใน receiver tube อันใหม่ เติม washing solution ปริมาตร 650 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ ทิ้งส่วนใส เก็บ DNA ที่สกัดได้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้

ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ใน Tris-acetate-EDTA buffer ถ้าตรวจสอบแล้วมี band DNA เกิดขึ้น เจือจาง DNA ด้วย Deionized water (DI) ในอัตราส่วน 1:10 หรือ 1:100 ก่อนทำ PCR กรณีไม่พบ band DNA ให้นำตัวอย่าง DNA ไปใช้ทำ Polymerase chain reaction (PCR) ได้โดยไม่ต้องเจือจาง

การเพิ่มปริมาณส่วน ITS โดยปฏิกิริยา PCR

เพิ่มปริมาณส่วน internal transcribed spacer (ITS) (White *et al.*, 1990) ได้แก่ ITS1 (5' TCCGTAGG TGAACCTGCGG 3') และ ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') โดยส่วนผสมของปฏิกิริยาของ PCR (PCR mixture) ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร (Table 3.1)

Table 3.1 PCR reaction mixture components

ส่วนผสม	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Genomic DNA	5.0
DEPC water	5.5
Forward primer	1.0
Reverse primer	1.0
Red Dye PCR Master Mix (Merck)	12.5
รวม	25.0

การทำปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

ผสมส่วนผสมต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1 เรียบร้อยแล้ว นำไปทำปฏิกิริยาภายในเครื่อง PCR ใช้ PCR profile ดังนี้

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส	3	นาที
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส	1	นาที
ขั้นที่ 3	55 องศาเซลเซียส	30	วินาที
ขั้นที่ 4	72 องศาเซลเซียส	1	นาที
ขั้นที่ 5	ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ		
ขั้นที่ 6	72 องศาเซลเซียส	10	นาที

การตรวจสอบปริมาณ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพของ PCR product ที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis นำ PCR product ปริมาตร 3 ไมโครลิตรผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 3 ไมโครลิตร load ลงใน 2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel ที่แช่อยู่ใน TAE buffer กระแสไฟฟ้า 100 volts นาน 30-60 นาที ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรวจสอบ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminators บันทึกภาพโดยใช้ gel documentation

การวิเคราะห์ลำดับเบส DNA (DNA sequencing)

ส่ง PCR products ที่เพิ่มปริมาณได้ เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสที่ Ward Medic LTD. หลังจากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาตรวจสอบลำดับเบสของเชื้อราโรครากขาวโดยนำลำดับเบส DNA ที่ได้ ใส่โปรแกรม BLAST search จากฐานข้อมูลใน GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อหาชนิดของเชื้อราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุด

3.3 ศึกษาผลกระทบยับยั้งของเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ต่อเชื้อโรครากขาว

3.3.1 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาด้วย Scanning electron microscope

เลี้ยงเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* บนอาหารGYMA เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสารและแพร่ซิมไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเลี้ยงเชื้อรา *R. microporus* RIG 56 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารจากเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* (ขั้นที่ 1) และเจาะบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อ *R. microporus* (ขั้นที่ 2) แล้วนำชิ้นวุ้นทั้งสองมาวางเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อโดยวางชิดกัน เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* แช่ใน 2.5 เปอร์เซ็นต์ glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer 3 ครั้ง จากนั้น dehydrate โดยแช่ตัวอย่างใน ethanol ที่ความเข้มข้น 50, 60, 70, 80, 90, และ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ทำให้แห้งด้วยเครื่อง critical point dryer นำตัวอย่างแห้งที่ได้มาตรึงบน stub และเคลือบ

ด้วยอนุภาคทองคำ คุณลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื้อราโดยใช้กล้อง scanning electron microscope (Quanta 400, FEI)

3.3.2 การยับยั้งการสังเคราะห์ ergosterol ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry
เลี้ยงเชื้อราโรครากขาว *R. microporus* RIG 56 ในพลาสติกที่มีอาหารเหลว glucose yeast extract malt extract broth (GYMB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* (10^8 cfu mL⁻¹) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกที่มีเชื้อราโรครากขาว เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบการเจริญของเส้นเชื้อรากับอาหารที่ผสมสารกำจัดเชื้อรา propiconazole ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO (negative control) หลังจากนั้นนำเชื้อราที่ได้กรองด้วยกระดาษกรอง (Grade 4 filter paper, Whatman®) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ล้างเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง หรือจนกว่าเส้นใยจะสะอาด ชับน้ำออกจากเส้นใยให้มากที่สุดด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการสกัด ergosterol จากเชื้อราตามกรรมวิธีของ Pinjon และคณะ (2003) และวิเคราะห์สารด้วย Trace GC-Ultra gas chromatograph coupled to ISQ mass detector (Thermo Scientific Inc., USA)

3.4 การเตรียมเชื้อ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด มูลวัว และมูลไก่
เตรียมปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด มูลวัว และมูลไก่ ปริมาตร 1,000 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ใส่แบคทีเรียแขวนลอย *S. griseus* subsp. *formicus* (10^8 cfu mL⁻¹) ที่เลี้ยงในอาหาร GYMB เป็นเวลา 3 วัน อัตราส่วน 100:1 (มิลลิลิตร:กิโลกรัม) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในหลอดทดลอง

การเตรียมเชื้อ เลี้ยงเชื้อ *R. microporus* RIG 56 บนอาหาร PDA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองขนาด 2.5 X 15 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เวลา 3 วัน

การเตรียมดิน นำดินมาผึ่งให้แห้งผสมด้วยเกลบอัตรา 9:1 โดยน้ำหนัก แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

การทดสอบ นำปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด (Bio Strep No 1) มูลวัว (Bio Strep No 2) และมูลไก่ (Bio Strep No 3) (ข้อที่ 3.4) มาผสมกับดินที่ฆ่าเชื้อแล้วอัตรา 10:100 (w/w) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 cfu g⁻¹ บรรจุลงในหลอดทดลองที่เลี้ยงเชื้อ *R. microporus* สูง 10 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน วัดระยะทางการเจริญของ

เส้นใยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้ดินนิ่งฆ่าเชื้อที่ผสมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ และดินนิ่งฆ่าเชื้อที่ผสม propiconazole (1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD ทดสอบ 5 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ดิน + *R. microporus* RIG 56 (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 ดิน + Bio Strep No 1 + *R. microporus* RIG 56

กรรมวิธีที่ 3 ดิน + Bio Strep No 2 + *R. microporus* RIG 56

กรรมวิธีที่ 4 ดิน + Bio Strep No 3 + *R. microporus* RIG 56

กรรมวิธีที่ 5 ดิน + สารกำจัดเชื้อรา propiconazole + *R. microporus* RIG 56

คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสูตร เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $\left[\frac{(D_1 - D_2)}{D_1} \right] \times 100$

D_1 = การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนดินชุดควบคุม

D_2 = การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เจริญบนดินชุดทดสอบ

3.6 ประเมินศักยภาพของ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการควบคุมโรครากขาว

นำต้นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 (อายุ 6 เดือน) ลงปลูกในบล็อกซีเมนต์ หลังย้ายปลูกเป็นเวลา 3 เดือน จึงทำการปลูกเชื้อบริเวณรากยาง โดยวางเปลือกหุ้มเมล็ดยางพาราที่ติดเชื้อ *R. microporus* ให้สัมผัสกับราก และคลุมด้วยใบยางพาราตามกรรมวิธีของ Ogbemor และคณะ (2013) เป็นเวลา 3 เดือน ทำการใส่ปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด ปุ๋ยมูลวัวที่มี *S. griseus* subsp. *formicus* บริเวณรอบ ๆ โคนต้นยางพารา ทุก ๆ 1 เดือน เป็นเวลา 1 ปี โดยทำการทดสอบกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 20 ต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD ประเมินความรุนแรงการเกิดโรค (ระดับ 1 = ต้นปกติ; ระดับ 2 = แสดงอาการใบเหลือง; ระดับ 3 = ต้นเหี่ยว; ระดับ 4 = ใบร่วง และระดับ 5 = ต้นตาย)

กรรมวิธีที่ 1 = ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)

กรรมวิธีที่ 2 = Bio Strep No 1

กรรมวิธีที่ 3 = Bio Strep No 2

กรรมวิธีที่ 4 = Propiconazole (1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

นำค่าจากการประเมินระดับความรุนแรงในการเกิดโรค มาคำนวณค่าดัชนีการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค} = \left(\frac{\text{ผลรวมการเป็นโรคแต่ละระดับ} \times 100}{\text{จำนวนต้น} \times \text{ระดับการเกิดโรคสูงสุด}} \right)$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรค} = 100 \left(\frac{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีทดสอบ} \times 100}{\text{ความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีควบคุม}} \right)$$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ทดสอบการยับยั้งของ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ต่อเชื้อราโรครากขาว

เมื่อนำเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* จำนวน 50 ไอโซเลท โดยวิธี dual culture plate บนอาหาร PDA ทำการตรวจผลโดยการวัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่เจริญเข้าหาแนวขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโรครากขาวทุกไอโซเลท โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ระหว่าง 74.29 - 95.71 เปอร์เซ็นต์ (Table 4.1)

การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเกิดขึ้นเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *S. griseus* subsp. *formicus* สร้างสาร secondary metabolites ออกมาซึ่งเป็นสารที่สามารถละลายน้ำและแพร่ซึมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Pridham and Tresner, 1974) ซึ่งสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเข้าใกล้หรือข้ามผ่านเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ไปได้

Table 4.1 Antagonism of *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* on *Rigidoporus microporus* using dual culture technique on PDA plates

Percentage of mycelial inhibition	<i>Rigidoporus microporus</i> isolates
90.00-100.00	RIG 17, RIG 20, RIG 38, RIG 40, RIG 47, RIG 49, RIG 51, RIG 52, and RIG 59 (n=9)
80.00-89.99	RIG 1, RIG 3, RIG 4, RIG 5, RIG 9, RIG 12, RIG 13, RIG 14, RIG 15, RIG 16, RIG 18, RIG 19, RIG 22, RIG 23, RIG 24, RIG 25, RIG 26, RIG 27, RIG 29, RIG 30, RIG 31, RIG 32, RIG 33, RIG 34, RIG 35, RIG 36, RIG 41, RIG 42, RIG 44, RIG 45, RIG 46, RIG 48, RIG 50, RIG 53, RIG 54, RIG 55, RIG 57, RIG 58, RIG 6, RIG 60, RIG 61, RIG 62, and RIG 64 (n=43)
70.00-79.99	RIG 7, RIG 10, RIG 11, RIG 28, RIG 39, RIG 43, RIG 56, and RIG 63 (n=8)

4.2 จำแนกชนิดของเชื้อราโรครากขาวด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

เพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อสาเหตุที่แยกมาเป็นเชื้อราสาเหตุโรครากขาว จึงทำการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค ITS โดยเลี้ยงเชื้อราโรครากขาวไอโซเลท RIG 56 (ผ่านการทดสอบแล้วว่ามี ความรุนแรงในการเกิดโรค) ในฟลาस्कที่มีอาหารเหลว PDB 50 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อราที่ได้ กรองด้วยกระดาษกรอง (Grade 4 filter paper, Whatman®) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ล้างเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง หรือจนกว่าเส้นใยจะสะอาด ชับน้ำออกจากเส้นใยให้มากที่สุดด้วยกระดาษซับที่ปราศจากเชื้อ ถ่ายเส้นใยเชื้อรา 200 มิลลิกรัม ลงในโถรงบดยาที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นบดเส้นใยให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว สกัด DNA เชื้อราด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป innuPREP Plant DNA (AJ Roboscreen GmbH) และตรวจสอบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์จาก 18S ribosomal RNA gene ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) คือ internal transcribed spacer 1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG'3) และ 4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC'3)

จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์หาลำดับเบส และวิเคราะห์หาสายพันธุ์ของเชื้อด้วยโปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูล NCBI จากการศึกษาพบว่าเชื้อราโรครากขาวไอโซเลท RIG 56 ที่คัดเลือกมา มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับเชื้อรา *Rigidoporus microporus* strain RL (Accession no. KM246744.1) 99.00 เปอร์เซ็นต์ (Table 4.2)

Rigidoporus microporus strain RL 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KM246744.1|Length: 669 Number of Matches: 2

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1086 bits (588)	0.0	603/610 (99%)	2/610 (0%)	Plus/Plus
Query	652	TTGCGATTCAGGGGTGTTGCTGGTTTTCTTTTTAACAGGAGAGAACATGTGCACGCCTCG	711		
Sbjct	37	TTGCG-TTCGGGGTGTGCTGGTTTTCTTTTTAACAGGAGAGAACATGTGCACGCCTCG	95		
Query	712	CAATCCATTCAAACCACACTTGTGCACTT CAGAGGGGGAGCCCTCTTGGCCTCTCCTT	771		
Sbjct	96	CAATCCATTCAAACCACACTTGTGCACTT CAGAGGGGGAGCCCTCTTGGCCTCTCCTT	155		
Query	772	CTTTCATCACTACAAACCACTTTAAAGTCTTTTGTATTTGTTGGTAACTATAATGTTAA	831		
Sbjct	156	CTTTCATCACTACAAACCACTTTAAAGTCTTTTGTATTTGTTGGTAACTATAATGTTAA	215		
Query	832	ATACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC	891		
Sbjct	216	ATACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC	275		
Query	892	GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC	951		
Sbjct	276	GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC	335		
Query	952	TCC TTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTT GAGTGT CGT GTAATTCTCAATCTCAAC -TT	1010		
Sbjct	336	TCC TTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTT GAGTGT CGT GTAATTCTCAATCTCAACTTT	395		
Query	1011	TTTTGTTGTGGATTGGATTTGGGAGCTTGT CGT GTC TCTTTC TATAATGAAAGAGGTTAG	1070		
Sbjct	396	TTTTGTTGTGGATTGGATTTGGGAGCTTGT CGT GTC TCTTTC TATAATGAAAGAGGTTAG	455		
Query	1071	ACTCTCCTTGAATGCATTAGCTCGGTCACGTAGTTTGCCCGACGGTTCACGGTGTGATAG	1130		
Sbjct	456	ACTCTCCTTGAATGCATTAGCTCGGTCACGTAGTTTGCCCGACGGTTCACGGTGTGATAG	515		
Query	1131	TCTCACTTCATCGCCGTTCTAACTGTTGGTGCC TGTGTTTTGCCGGCTTCTAATCTCTG	1190		
Sbjct	516	TCTCACTTCATCGCCGTTCTAACTGTTGGTGCC TGTGTTTTGCCGGCTTCTAATCTCTG	575		
Query	1191	GCCTCTTTTCAAAGTGGCCTTTACAC TTTTGATACTTGACCTCCAATCAGGAAGGATTA	1250		
Sbjct	576	GCCTCTTTTCAAAGTGGCCTTTACAC TTTTGATACTTGACCTCCAATCAGGTAGGATTA	635		
Query	1251	CCCGCTGAAC 1260			
Sbjct	636	CCCGCTGAAC 645			

Table 4.2 Sequences producing significant alignments of *Rigidoporus microporus* RIG 56

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Rigidoporus microporus</i> strain RL 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1086	2122	92%	0.0	99%	KM246744.1
<i>Rigidoporus microporus</i> isolate FRIM642 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1086	2125	93%	0.0	99%	HQ400708.1
<i>Rigidoporus microporus</i> isolate FRIM641 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1085	2122	93%	0.0	99%	HQ400707.1
<i>Rigidoporus microporus</i> isolate 590 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1062	2088	93%	0.0	98%	HQ400706.1
<i>Rigidoporus microporus</i> isolate FRIM646 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1059	2092	93%	0.0	98%	HQ400709.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher X1865 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1038	2040	88%	0.0	99%	KJ559473.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher M13 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1035	2031	88%	0.0	99%	KJ559474.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher X1864 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1033	2029	88%	0.0	99%	KJ559472.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher ED315 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1000	1978	88%	0.0	98%	KJ559459.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher AB102 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1000	1978	88%	0.0	98%	KJ559448.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher ED335 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	994	1967	88%	0.0	98%	KJ559465.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher ED332 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	994	1968	88%	0.0	98%	KJ559462.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher DT201 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	992	1965	88%	0.0	98%	KJ559450.1

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher AB101 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	992	1963	88%	0.0	98%	KJ559447.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher ED336 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	990	1959	88%	0.0	98%	KJ559466.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher ED333 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	990	1959	88%	0.0	98%	KJ559463.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher ED331 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	990	1959	88%	0.0	98%	KJ559461.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher DT203 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	990	1961	88%	0.0	98%	KJ559452.1
<i>Rigidoporus microporus</i> voucher ED334 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	989	1955	88%	0.0	98%	KJ559464.1

4.3 ศึกษาผลกระทบยับยั้งของเชื้อ *Streptomyces* sp. ต่อเชื้อสาเหตุโรครากขาว

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาด้วย Scanning electron microscope

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโรครากขาวที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ตรวจสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยใช้กล้อง scanning electron microscope พบว่าเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายนอกของเชื้อ *R. microporus* RIG 56 โดยมีผลยับยั้งและรบกวนการแบ่งเซลล์ของเชื้อ ทำให้ลักษณะและองค์ประกอบของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด ปลายเส้นใยมีลักษณะที่ผิดปกติ เช่น ลีบ บิดเบี้ยว และผิดรูปร่าง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีรูปร่างสมบูรณ์ (Fig. 4.1) ซึ่งการยับยั้งดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากการสร้างสาร secondary metabolites เช่น phenylacetic acid ($C_{10}H_{12}O_2$), geosmin ($C_{12}H_{22}O$), 4-aminoquinolin-2-ol ($C_9H_8N_2O$), 1,2-benzenedicarboxylic acid ($C_{10}H_8O_4$) โดยเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* (ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry)

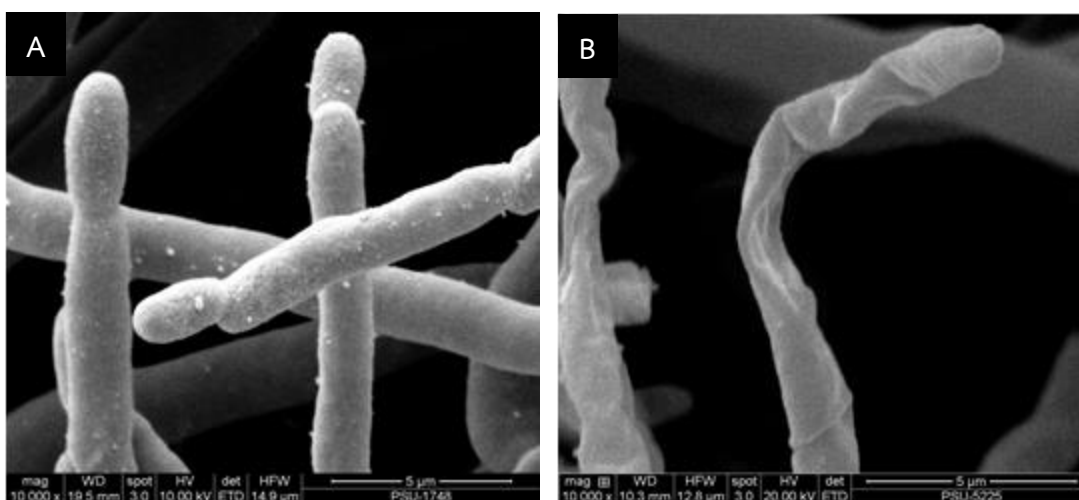


Fig. 4.1 SEM micrographs of *Rigidoporus microporus* hyphae. Control culture with normal fungi showing healthy hyphal growth (A). The hyphae treated with *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* shows hyphal tips appearing shriveled and undifferentiated (B).

4.3.2 การยับยั้งการสังเคราะห์ ergosterol ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry

ศึกษาการยับยั้งการสังเคราะห์ ergosterol ของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* (10^8 cfu mL⁻¹) ต่อการเจริญของเชื้อรา *R. microporus* RIG 56 เปรียบเทียบสารกำจัดเชื้อรา propiconazole ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 เปอร์เซ็นต์ DMSO ด้วยเครื่อง Trace GC-Ultra gas chromatograph coupled to ISQ mass detector พบว่าปริมาณสาร ergosta-5,7,22-trien-3-ol, (3 α ,22e) ของเชื้อรา *R. microporus* RIG 56 ในกรรมวิธีที่ผสมสารกำจัดเชื้อรา propiconazole และ *S. griseus* subsp. *formicus* มีปริมาณลดลงเท่ากับ 17.07 และ 66.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 4.3, Fig. 4.2-4.4) เป็นที่ทราบกันดีว่าสาร ergosta-5,7,22-trien-3-ol, (3 α ,22e) เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา มีหน้าที่ควบคุมการซึมผ่านเข้า-ออกของโมเลกุลต่าง ๆ เช่น น้ำ สารอาหาร ของเสีย และไอออนต่าง ๆ ดังนั้นหากเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย เซลล์จะถูกทำลายเช่นเดียวกัน

Table 4.3 Percentage changes of ergosterol levels of *Rigidoporus microporus* RIG 56 treated with *Streptomyces griseus* subsp. *formicus*

Chemical name	Peak area relative to control (%)	
	<i>Streptomyces</i>	Propiconazole
Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, (3 α ,22E)	66.35↓	17.07↓

↑=up-regulated; ↓=down-regulated

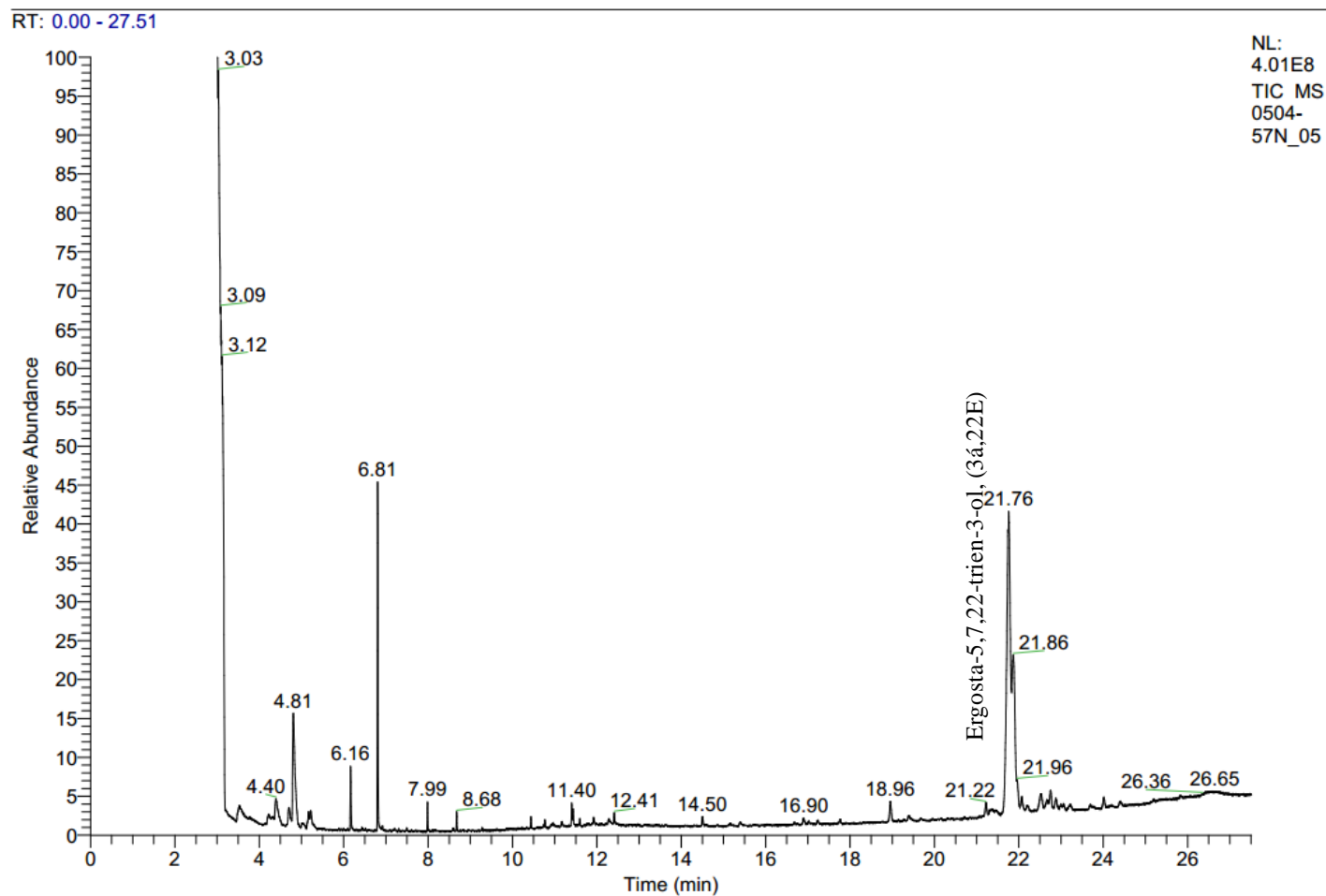


Fig. 4.2 GC-MS total-ion chromatogram of intracellular metabolite produced by *Rigidoporus microporus* RIG 56 treated with 1% DMSO for 24 h.

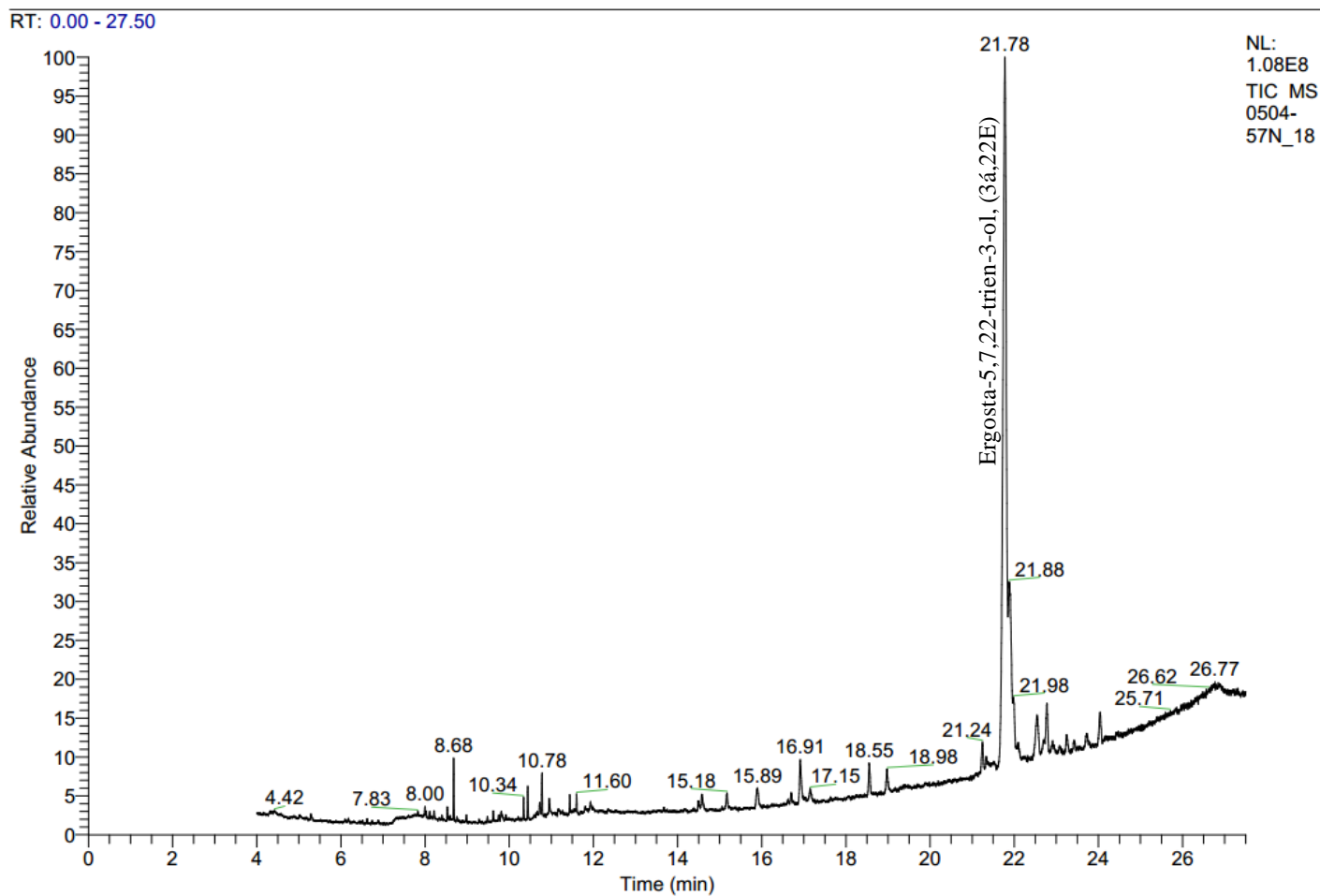


Fig. 4.3 GC-MS total-ion chromatogram of intracellular metabolite produced by *Rigidoporus microporus* RIG 56 treated with *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* for 24 h.

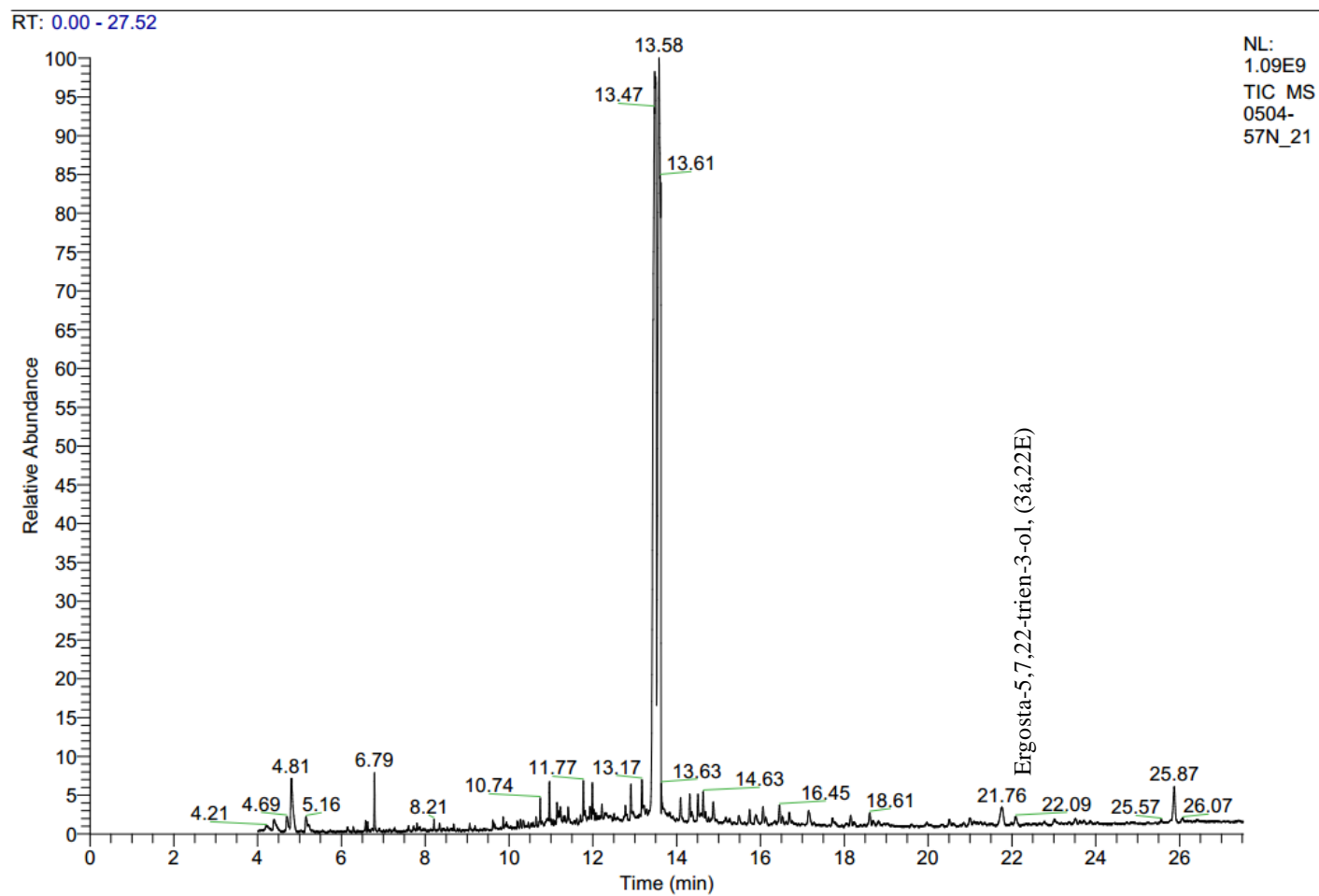


Fig. 4.4 GC-MS total-ion chromatogram of intracellular metabolite produced by *Rigidoporus microporus* RIG 56 treated with propiconazole at a concentration of 1,000 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rigidiporus microporus* ในหลอดทดลอง

ศึกษาประสิทธิภาพของ *S. griseus* subsp. *formicus* ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. microporus* RIG 56 ในดินบรรจุในหลอดทดลองเปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อรา propiconazole ด้วยเทคนิค suppressive soil technique พบว่า ปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด (Bio Strep No 1) มูลวัว (Bio Strep No 2) และมูลไก่ (Bio Strep No 3) ที่ผสมเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยโรครากขาวได้โดยมีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 43.27, 89.62 และ 36.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 4.4) ดังนั้นจึงคัดเลือกปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดและมูลวัวที่ผสมเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

Table 4.4 Antifungal effects of *Streptomyces* bioproducts against *Rigidiporus microporus* RIG 56 using suppressive soil technique

<i>Streptomyces</i> bioproduct	Percentage of mycelial inhibition \pm S.E.
Organic fertilizer (Bio Strep No 1)	43.27 \pm 1.35 b ^{1/}
Cow manure (Bio Strep No 2)	89.62 \pm 0.74 a
Chicken manure (Bio Strep No 3)	36.83 \pm 0.81 c
Propiconazole	32.69 \pm 0.80 d
Sterile distilled water	00.00 \pm 0.00 e

^{1/}Values are the means \pm standard error of the mean from three repeated experiments with four replications. Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at the level $P < 0.05$.

4.5 ประเมินศักยภาพของ *Streptomyces griseus* subsp. *formicus* ในการควบคุมโรครากขาว

ประเมินศักยภาพของ *S. griseus* subsp. *formicus* ในปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดและมูลวัวเพื่อควบคุมโรครากขาวของยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ที่เกิดจากเชื้อ *R. microporus* RIG 56 ในแปลงทดลองเปรียบเทียบกับสารกำจัดเชื้อรา propiconazole พบว่าปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด (Bio Strep No 1) และมูลวัว (Bio Strep No 2) ที่ผสมเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* สามารถลดการเกิดโรครากขาวได้โดยมีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 37.35 และ 34.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารกำจัดเชื้อรา propiconazole ที่มีเปอร์เซ็นต์ลดการเกิดโรครากขาวได้เท่ากับ 25.30 เปอร์เซ็นต์ (Table 4.5)

Table 4.5 Efficiency of *Streptomyces* bioproducts for controlling white root rot fungal disease under pot culture conditions

Treatment	White root rot score (1-5 scale)	Disease index (%)	Suppression efficacy (%)
Bio Strep No 1	2.60 ± 0.22 a ^{1/}	52.00 ± 4.32 a	37.35 ± 5.21 a
Bio Strep No 2	2.70 ± 0.17 a	54.00 ± 3.46 a	34.94 ± 4.17 ab
Propiconazole	3.10 ± 0.06 a	62.00 ± 1.15 a	25.30 ± 1.39 b
Untreated control	4.15 ± 0.17 b	83.00 ± 3.42 b	00.00 ± 00.00 c

^{1/}Values are the means ± standard error of the mean from three repeated experiments with four replications. Means within a column followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at the level P < 0.05.

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

โรครากขาวของยางพาราเป็นโรคที่สร้างความเสียหายรุนแรงและพบการระบาดมากที่สุดในขณะนี้ แม้ว่ายางพาราจะมีโรครบาดหลายชนิด และพันธุ์ยางที่นิยมปลูกในปัจจุบันจะอ่อนแอต่อโรค แต่ความรุนแรงและความสำคัญทางเศรษฐกิจของโรคขึ้นอยู่กับความแข็งแรงตามธรรมชาติของต้นยาง ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศและการปฏิบัติดูแลรักษาของเกษตรกรเป็นปัจจัยส่งเสริม โรครากขาวมีระบาดอย่างรุนแรงในช่วงฤดูฝน โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีฝนตกชุก เชื้อสามารถเข้าทำลายตั้งแต่ต้นยางอายุ 1-2 เดือน ทำให้ต้นยางที่เป็นโรคยืนต้นตาย สามารถแพร่กระจายเชื้อจากต้นหนึ่งไปสู่อีกต้นหนึ่งที่อยู่ข้างเคียงทำให้ต้นยางจำนวนมากเกิดโรค ส่งผลทำให้ผลผลิตและจำนวนของต้นยางลดลง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งของเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* ต่อเชื้อ *R. microporus* และพัฒนาวิธีการควบคุมโรครากขาวให้มีประสิทธิภาพและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. microporus* โดยมีผลยับยั้งและรบกวนการแบ่งเซลล์ของเชื้อราทดสอบ ทำให้ลักษณะและองค์ประกอบของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด ปลายเส้นใยมีลักษณะที่ผิดปกติ เช่น ลิบ บิดเบี้ยว และผิดรูปร่างเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีรูปร่างสมบูรณ์ ซึ่งเป็นผลมาจากการยับยั้งการสังเคราะห์สาร ergosta-5,7,22-trien-3-ol, (3 α ,22e) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการซึมผ่านเข้า-ออกของโมเลกุลต่าง ๆ เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย เซลล์เชื้อจะถูกทำลายเช่นเดียวกัน

การประยุกต์ใช้ปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดและมูลวัว ที่ผสมเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* สามารถลดการเกิดโรครากขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารกำจัดเชื้อรา propiconazole ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *S. griseus* subsp. *formicus* สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันโรครากขาวของยางพาราได้

เอกสารอ้างอิง

- พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2523. โรคและศัตรูยางพาราในประเทศไทยปี 2522. ว. ยางพารา 10: 12-19.
- ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2554. อรุณการพิมพ์. กรุงเทพฯ.
- อารมณ โรจน์สุจิตร์ สายใจ สุชาติกุล บุญปิยะธิดา แคล้วคล่อง สมคิด ดาน้อย ปราโมทย์ คาพุท และ ชูศักดิ์ สมมาตร. 2553. ศักยภาพของแม่ปุ๋ยบางชนิดต่อการยับยั้งและป้องกันการเกิดโรครากขาวของยางพาราสาเหตุจากเชื้อรา *Rigidoporus microporus* ในยางปลูกใหม่. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- Berdy, J.C. 1995. Bioactive microbial metabolites. J. Antibiot. 58: 1-28.
- Bordoloi, G.N. Kumari, B. Guha, A. Thakur, D. Bordoloi, M. Roy, M.K. and Bora, T.C. 2002. Potential of a novel antibiotic, 2-methylheptyl isonicotinate, as a biocontrol agent against Fusarium wilt of crucifers. Pest Manag. Sci. 58: 297-302.
- Boukaew, S. Chuenchit, S. and Petcharat, V. 2011. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of Sclerotium root and stem rot and Ralstonia wilt of chili pepper. BioControl 56: 365-374.
- Chaurasia, B. Pandey, A. and Palni, L.M.S. 2005. Distribution, colonization and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with central Himalayan rhododendrons. Forest. Ecol. Manag. 207: 315-324.
- Gopalakrishnan, S. Pande, S. Sharma, M. Humayun, P. Kiran, B.K. Sandeep, D. Vidya, M.S. Deepthi, K. and Rupela, O. 2011. Evaluation of Actinomycete isolates obtained from herbal vermicomposting for the biological control of Fusarium wilt of chickpea. Crop Prot. 30: 1070-1078.
- Guyot, A. and Flori, A. 2002. Comparative study for detecting *Rigidoporus lignosus* on rubber tree. Crop Prot. 21: 461-466.
- Khamna, S. Yokota, A. Peberdy, J.F. and Lumyong, S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. Eurasian J. BioSci. 4: 23-32.
- Lechevalier, R. Acker, F. Corke, C.T. Haenseler, C.M. and Waksman, S.A. 1953. Candicidin, a new antifungal antibiotic. Mycologia. 45: 155-171.

- Madigan, M.T. Martinko, J.M. Dunlap, P.V. and Clark, D.P. 2009. Brock Biology of Microorganism. Twelfth edition. Pearson, Benjamin Cummings, Pearson Education, Inc.
- Nandris, D. Nicole, M. and Geiger, J.P. 1987. Root rot diseases of rubber trees. *Plant Dis.* 71: 298-306.
- Nicole, M.R. and Benhamou, N. 1991. Cytochemical aspect of cellulose breakdown during the infection process of rubber tree roots by *Rigidoporus lignosus*. *Cytol. Histol.* 81: 1410-1412.
- Ogbebor, O.N. Omorusi, V.I. Adekunle, A.T. Orumwense, K. and Ijeh, K. 2013. Fast method for the detection of *Rigidoporus microporus* (Klotzsch) Imaz in *Hevea* plantation. *Int. J. Sci. Nat.* 4: 109-111.
- Prabavathy, R.V. Mathivanan, N. and Murugesan, K. 2006. Biological control of blast and sheath blight disease of rice using antifungal metabolite produced by *Streptomyces* sp. PM5. *Biol. Control* 39: 313-319.
- Prapagdee, B. Kuekulvong, C. and Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *J. Biol. Sci.* 4: 330-337.
- Pridham, T.G. and H.D. Tresner, 1974. Family Streptomycetaceae. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA
- Quecine, M.C. Araujo, W.L. Marcon, J. Gai, C.S. Azevedo, J.L. and Pizzirani-Kleiner, A.A. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *App. Microbiol.* 47: 486-491.
- Taddei, A. Rodriiguez, M.J. Marquez-Vilchez, E. and Castelli, C. 2006. Isolation and identification of *Streptomyces* spp. from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies I. *Microbiol. Res.* 161: 222-231.
- Taechowisan, T. Lu, C. Shen, Y. and Lumyong, S. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiol.* 151: 1691-1695.
- Tresner, H.D. Davies, M.C. and Backus, E.J. 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bacteriol.* 81: 70-80.
- White, T.J. Bruns, T. Lee, S.J.W.T. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* 18: 315-322.

- Xue, L. Xue, Q. Chen, Q. Lin, C. Shen, G. and Zhao, J. 2013. Isolation and evaluation of rhizosphere Actinomycetes with potential application for biocontrol of Verticillium wilt of cotton. *Crop Prot.* 43: 231-240.
- Yuan, W.M. and Crawford. D.L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *App. Envir. Microbiol.* 61: 3119-3128.
- Zarandi, M.E. Bojar, H.G.S. Dehkaei, P.T. Moosavi, A.S. Farokhi, P.R. and Aghighi, A. 2009. Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in greenhouse. *J. Biol. Sci.* 6: 194-199.