การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora botryosa* ของยางพาราโดยชีววิธี

Screening of Bacterial Antagonists for Biological Control of *Phytophthora botryosa* in *Hevea brasiliensis*

นริสา จันทร์เรือง

Narisa Chanruang

เลขหมู่ QR75 น46 2543 ฉ.2

Order Key

Bib Key 201907

31 ส.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2543

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora botryosa* ของยางพาราโดยชีววิธี
ผู้เขียน	นางนริสา จันทร์เรือง
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ซื่นจิตต์))

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสมอใจ ซื่นจิตต์)

.....กรรมการ
(อาจารย์สุทธิรักษ์ แซ่หลิม)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.นพรัตน์ บำรุงรักษ์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอมอบคุณหนังสือ ธรรมการวิสุทธิ์
ห้องสมุดและสารสนเทศ
วิทยาเขตหาดใหญ่
ใส่รับรอง
วันที่ 31 ต.ค. 2543

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora botryosa* ของยางพาราโดยชีววิธี
ผู้เขียน	นางนริสา จันทร์เรือง
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2542

บทคัดย่อ

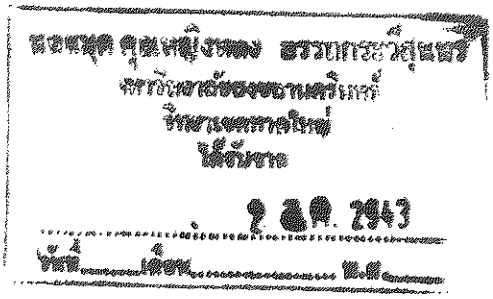
ทำการแยกแบคทีเรียจากดินในสวนยางพาราจำนวน 17 แหล่ง ใน 7 จังหวัดทางภาคใต้ ได้แบคทีเรียจำนวน 340 สายพันธุ์ นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora botryosa* Chee ของยางพาราโดยวิธี dual culture พบแบคทีเรียจำนวน 18 สายพันธุ์ โดยมีแบคทีเรียจำนวน 13 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตแบบเกิดเป็นบริเวณใส และแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้เส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญได้

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 18 สายพันธุ์ ในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. botryosa* บนเนื้อเยื่อยางพาราโดยการทดสอบบนก้านใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ด้วยวิธีการของ Chee (1968) พบแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ B102 B163 B166 B204 B233 B245 และ B308 ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ได้ดี และจากการทดสอบบนใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ได้ดี จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ B166 B308 B204 และ B163

จากการทดสอบประสิทธิภาพในเรือนทดลอง พบแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B166 B204 และ B233 มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* โดยเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์ B166 และ B204 มีความสามารถในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa* พบประชากรของแบคทีเรียจำนวนมากบนก้านใบยางพาราหลังจากพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 และ 4 วัน และยังคงพบประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์บนก้านใบยางพาราหลังจากพ่นเชื้อ 7 วัน แต่มีจำนวนน้อยกว่า

การจำแนกชนิดแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดี จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ B131 B166 B204 และ B233 พบแบคทีเรีย 2 สกุลคือ *Bacillus* sp. มี 2 สายพันธุ์ คือ B131 และ B204 และ *Pseudomonas* sp. มี 1 สายพันธุ์ คือ B233 สำหรับอีก 1 สายพันธุ์ คือ B166 ไม่สามารถจำแนกชนิดได้



Thesis Title	Screening of Bacterial Antagonists for Biological Control of *Phytophthora botryosa* in *Hevea brasiliensis*
Author	Mrs. Narisa Chanrueng
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	1999

Abstract

Antagonistic bacteria were isolated from pararubber growing soils taken from 17 locations in 7 provinces in the South of Thailand. Isolation yielded 340 isolates of bacteria, in which 13 of these effectively inhibited mycelial growth of *Phytophthora botryosa* Chee by dual culture technique on agar medium. Five isolates were found to rapidly growing on agar medium. Eighteen isolates of the selected bacteria were tested further for their effectiveness to suppression disease symptom on petioles of pararubber RRIM 600 using Chee method. Seven isolates (B102, B163, B166, B204, B233, B245 and B308) showed good disease suppression on petioles of pararubber and four isolates (B166, B308, B204, and B163) showed good disease suppression on pararubber leaves. Further test showed that two isolates (B166 and B204) were effective in suppressing *Phytophthora* leaf fall disease in the glasshouse conditions. After bacterial application by spraying, the population of bacteria had declined slightly after application. Identification of the effective isolates of bacteria revealed that B131 and B204 were *Bacillus* sp., while B233 was *Pseudomonas* sp. and B166 was the unidentified bacterium.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสมอใจ ชื่นจิตต์ กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำช่วยเหลือในการศึกษาวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ อาจารย์สุทธิรักษ์ แซ่หลิม และรองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร กรรมการสอบ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องเพิ่มเติม ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของอาจารย์ทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคุณปัทมา ชนะสงคราม ศูนย์วิจัยยางสงขลา ที่กรุณาแนะนำและช่วยเหลือในการเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด คุณสากล สุวลักษณ์ ภาควิชาพยาธิ คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือในการตรวจสอบและถ่ายภาพตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด เป็นอย่างดี คุณอารมย์ สมบัติมาก ที่กรุณาช่วยเหลือในการล้างและอัดภาพ

ขอขอบพระคุณ คุณลัดดา นิลรัตน์ ที่กรุณาแนะนำและช่วยเหลือในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ซึ่งให้ความช่วยเหลือและความสะดวกต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสำหรับความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ของงานวิจัยที่ได้รับจากคุณประภา พัฒนกุล คุณอุบล เล็กสุทธิ์ และเจ้าหน้าที่ในงานอารักขาพืช ศูนย์วิจัยยางสงขลา อ.หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ และศูนย์วิจัยยางสงขลา สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ที่ให้โอกาสในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับ คุณแม่ คุณสุรพล จันทร์เรือง เด็กหญิงกนกอร จันทร์เรือง และเด็กหญิงกนกวรรณ จันทร์เรือง ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจด้วยดีตลอดมา

นริสา จันทร์เรือง

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบาญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการภาพ	(9)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	14
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	15
วัสดุ	15
อุปกรณ์	15
วิธีการ	16
3. ผลการทดลอง	25
4. วิจารณ์	54
5. สรุป	59
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก	69
ประวัติผู้เขียน	71

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารา	5
2	เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อรา *P. botryosa* และ *P. palmivora*	6
3	แหล่งที่เก็บตัวอย่างดินจำนวน 17 แหล่ง จาก 7 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย	26
4	แหล่งที่เก็บตัวอย่างโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ในภาคใต้ของประเทศไทย	28
5	การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* แต่ละสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	29
6	จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. botryosa* จากแบคทีเรียจำนวน 340 สายพันธุ์	34
7	เปรียบเทียบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	35
8	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเกิดโรคบนก้านใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 หลังปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *P. botryosa* 6 วัน	38
9	พื้นที่แผลบนใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 หลังปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *P. botryosa* 6 วัน	43
10	เปรียบเทียบความยาวแผลบนก้านใบยางพาราจากการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนการปลูกเชื้อรา *P. botryosa* 1 4 และ 7 วัน บนพุ่มใบยางพารา	45
11	จำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนก้านใบยางพาราหลังจากพ่นเชื้อ 1 วัน, 4 วัน และ 7 วัน	50

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทั่วไปของ sporangium และ oogonium ของเชื้อรา *P. botryosa*	7
2	ลักษณะอาการของโรคยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa*	10
3	วิธีการคัดเลือกแบคทีเรียบนเนื้อเยื่อยางพาราในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง	23
4	ลักษณะของก้านใบยางที่เป็นโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ในธรรมชาติ	27
5	ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *P. botryosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LBAและ PDA	31
6	ลักษณะของ sporangium และ mycelium ของเชื้อรา *P. botryosa* สายพันธุ์ P2	31
7	ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* สายพันธุ์ P2	32
8	ลักษณะการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์กลุ่มที่เกิดเป็นบริเวณใส	36
9	ลักษณะการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์กลุ่มที่เจริญเติบโตเร็ว	36
10	ลักษณะการควบคุมการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* ที่ผ่านการจุ่มด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์บนก้านใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ได้ดี	39
11	ลักษณะการควบคุมการเข้าทำลายของzoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* ที่ผ่านการจุ่มด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์บนก้านใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ปานกลาง	40
12	ลักษณะที่ไม่สามารถควบคุมการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* ที่ผ่านการจุ่มด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์บนก้านใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600	41

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ผลของการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 4 และ 7 วันก่อนการปลูกเชื้อ *P. botryosa* ต่อการควบคุมการเกิดโรคบนพุ่มใบยางพาราในเรือนทดลอง	46
14	ความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B 166 ในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *P. botryosa* หลังพ่นเชื้อราสาเหตุบนพุ่มใบ 14 วัน	47
15	ความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B 204 ในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *P. botryosa* หลังพ่นเชื้อราสาเหตุบนพุ่มใบ 14 วัน	48
16	เปรียบเทียบลักษณะของพุ่มใบยางพาราที่พ่นเชื้อรา *P. botryosa* กับพุ่มใบยางพาราที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ B166	49
17	ลักษณะทางสัณฐานของเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการย้อมสีแกรม	52
18	ลักษณะของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)	53

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย และเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของเกษตรกรในภาคใต้ นับตั้งแต่ปีพ.ศ.2534 ประเทศไทยผลิตยางส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลก (ณรงค์ สุจเร, 2536) ในปีพ.ศ. 2541 มีศักยภาพการผลิตอยู่ในระดับ 2 ล้านตัน/ปี ทำรายได้ให้ประเทศสูงถึง 35,379 ล้านบาท ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยางประมาณ 12.4 ล้านไร่ (สถาบันวิจัยยาง, 2540) มีการพัฒนาสวนยางพาราด้วยการปลูกด้วยยางพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตสูงทดแทนยางพื้นเมืองที่เป็นสวนยางเก่าที่ให้ผลผลิตต่ำ (สมพงษ์ สุขมาก, 2536) ซึ่งในอดีตยางพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกจะมีความแข็งแรงตามธรรมชาติ ทำให้ต้นยางสามารถต้านทานต่อการเกิดโรค แต่เมื่อมีการนำยางพันธุ์ดีมาปลูกทดแทน ทำให้ประสบปัญหาโรคยางพาราเพิ่มขึ้น (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2522) ปัญหาโรคยางพาราของประเทศไทยที่สำคัญในปัจจุบัน ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp.ระบาดทำความเสียหายรุนแรงที่สุด โรคอื่น ๆ อาทิ โรคราแป้ง โรคใบจุดนูน โรคใบจุดก้างปลา โรคใบจุดตานก ตลอดจนโรคเปลือกเน่า โรคราสีชมพู และโรครากชนิดต่าง ๆ มีเกิดขึ้นทั่วไป และระบาดเป็นครั้งคราวตามสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2531) เชื้อรา *Phytophthora* sp. ที่ทำให้เกิดโรคกับยางพารามีหลายชนิด แต่ในประเทศไทยที่พบส่วนมากเป็นเชื้อรา *P. botryosa* ซึ่งสามารถเข้าทำลายต้นยางได้ทุกระยะ ตั้งแต่ต้นกล้าจนถึงต้นยางใหญ่ และเกือบทุกส่วนของต้นยาง โดยเกิดทั้งบนฝัก ใบ ยอด กิ่งก้าน และลำต้น จึงนับเป็นเชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญและเป็นอันตรายต่อยางพารามากที่สุด (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2522)

ปัญหาที่สำคัญของยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* คือการเข้าทำลายยางพาราในระยะต้นยางใหญ่หลังเปิดกรีด มีผลกระทบต่อผลผลิตโดยตรง เช่น โรคใบร่วงและฝักเน่า (Phytophthora leaf fall and pod rot) หากมีใบร่วงมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ผลผลิตของยางพาราลดลงประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังทำให้ฝักยางเน่าเสียหาย เกิดการขาดแคลนเมล็ดยางสำหรับการขยายพันธุ์ยาง (เวท ไทยนุกูล, 2525) โรคเส้นดำ (black stripe) เป็นโรคที่เชื้อรา *P. botryosa* เข้าทำลายหน้ากรีด ทำให้เปลือกเน่าเสียหาย ไม่สามารถกรีดซ้ำบนหน้า

เดิมได้ เป็นผลทำให้ระยะการให้ผลผลิตขาดหายไปมากกว่าครึ่งหนึ่งที่ควรจะได้ (พงษ์เทพ ขจรไชยกุล, 2512) เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ ในระยะต้นยางเล็กในแปลงกล้ายาง แปลงกิ่งตาขยายพันธุ์ยางและยางชำถุง จะประสบปัญหาโรคใบร่วงและตายจากยอด (Phytophthora leaf fall and die back) มีผลทำให้ต้นยางชะงักการเจริญ แคระแกร็น และบางครั้งยืนต้นตาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตภาคใต้ตอนล่าง ซึ่งเป็นแหล่งผลิตพันธุ์ยางที่สำคัญของประเทศไทย มีแนวโน้มการระบาดของโรคค่อนข้างมาก คือในแปลงขยายพันธุ์กิ่งตายางและแปลงเพาะยางชำถุง มีการผลิตพันธุ์ยาง RRIM 600 ซึ่งมีความอ่อนแอมากต่อเชื้อรา *P. botryosa* (สมพงษ์ สุขมาก, 2536) เป็นจำนวนร้อยละ 72.0 และ 71.8 ตามลำดับ (ศูนย์วิจัยยางสงขลา, 2541) ดังนั้นโรคใบร่วงและตายจากยอดที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* อาจก่อให้เกิดผลเสียหายทางเศรษฐกิจต่อแปลงขยายพันธุ์กิ่งตายาง และแปลงยางชำถุงเป็นอย่างมาก จึงจำเป็นต้องหาแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

ในปัจจุบันมาตรการการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีมีบทบาทมากยิ่งขึ้น โดยเป็นมาตรการที่มีการใช้ประโยชน์จากสิ่งที่มีอยู่ในธรรมชาติ และไม่ทำลายสภาพแวดล้อมหรือก่อเกิดมลพิษ การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีร่วมกับการจัดการสภาพแวดล้อม อาจเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาแก้ปัญหาทางโรคพืชได้ (นลินี จาริกภากร และคณะ, 2534) แต่การศึกษาทางด้านชีววิธีในประเทศไทยยังอยู่ในระยะเริ่มต้น และในบางกรณีมีการผลิตเป็นการค้าบ้างแล้วก็ตาม (สมคิด ดิสถาพร, 2540) เช่น มีการผลิตเชื้อรา *Trichoderma* sp. (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2538) เชื้อรา *Chaetomium* sp. (เกษม สร้อยทอง, 2538) และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (นิพนธ์ ทวีชัย, 2538) เพื่อการวิจัยและเพื่อการค้า เป็นต้น แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษามาตรการทางชีววิธีในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ของยางพารา ดังนั้นการศึกษาและค้นคว้าหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa* จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนาด้านเทคโนโลยีทางชีวภาพทางโรคพืช เพื่อนำไปใช้ผสมผสานร่วมกับการป้องกันกำจัดโรคยางพาราวิธีการอื่น ๆ อย่างมีประสิทธิภาพ

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญและความเสียหายทางเศรษฐกิจ

โรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ของยางพารา ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตยางพารา จึงมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย โรคนี้พบระบาดครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2493 ที่อำเภอแกลง จังหวัดระยอง พบต้นยางพาราแสดงอาการใบร่วงเนื่องจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ประมาณ 100,000 ต้น (นิยม จิ้วจิ้น และฤกษ์ ศยามานนท์, 2513) จากการสำรวจโดยพงษ์เทพ ขจรไชยกูลในปี พ.ศ.2519 พบโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ระบาดคลุมพื้นที่ปลูกยางกว่า 6 แสนไร่ มีใบร่วงประมาณ 80-100 เปอร์เซ็นต์ของพุ่มใบยางพื้นเมืองที่เป็นโรครุนแรงในบางท้องที่ ให้ผลผลิตลดลงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ฉะนั้นเมื่อประเมินผลเสียหาย คาดว่าผลผลิตยางที่ลดลงในปีนั้น ประมาณ 8 พันเมตริกตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 80 ล้านบาท ในปี พ.ศ.2522 มีรายงานการระบาดของโรคใบร่วงประมาณ 12,000 ไร่ (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2523) ในประเทศมาเลเซีย เมื่อปี พ.ศ. 2509 มีรายงานการระบาดของโรคใบร่วงครั้งใหญ่ ที่มีความรุนแรงมากเกิดขึ้นที่เกาะลังกาวี ทำให้ยางพันธุ์ PB 86 RRIM 600 และ Tjir 1 เป็นโรคใบร่วงประมาณ 15,000 ไร่ ในประเทศอินเดียได้มีผู้ประเมินความเสียหายเนื่องจากโรคใบร่วงของยางพารา ซึ่งประมาณว่าผลผลิตจะลดลง ถ้าเชื้อรา *Phytophthora* sp. ระบาดจนทำให้ใบร่วงมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของใบทั้งหมด และหากปล่อยให้โรคระบาดโดยไม่มีการควบคุมจนใบร่วงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ผลผลิตลดลง 30-50 เปอร์เซ็นต์ (Chee, 1969b) Jayarathnam และคณะ (1994) ใช้หลักเกณฑ์ว่าถ้าเกิดใบร่วงถึง 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับที่มีความรุนแรงเพียงพอที่ทำให้ผลผลิตเสียหายในระดับที่ควรได้รับการควบคุม

ความสูญเสียเนื่องจากการระบาดของโรคเส้นดำที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. มีผลทำให้หน้ากรีดเน่าเสียหายไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ถ้าต้นยางเป็นโรคเส้นดำอย่างรุนแรง เปลือกงอกใหม่เสียหายไม่สามารถกรีดยางซ้ำบนหน้าเดิมได้ ทำให้ระยะการให้ผลผลิตขาดหายไปมากกว่าครึ่งหนึ่งที่ควรจะได้ (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2522)

โรคใบร่วงและตายจากยอดที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. มีความสำคัญคือ เชื้อราเข้าทำความเสียหายต่อต้นยางเล็กในแปลงต้นกล้ายาง แปลงกิ่งตาขยายพันธุ์ยางและแปลงยางชำถุง (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2531) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตภาคใต้ตอนล่าง ซึ่งเป็นแหล่งผลิตพันธุ์ยางที่สำคัญของประเทศไทย มีแนวโน้มการระบาดของโรคค่อนข้างมาก จากการสำรวจของ

ศูนย์วิจัยยางสงขลาในปี พ.ศ.2541 รายงานว่ามีแปลงขยายพันธุ์กิ่งตายางจำนวน 100 แปลง เป็นเนื้อที่ปลูกประมาณ 1,177 ไร่ แปลงขยายพันธุ์ต้นกล้ายางจำนวน 50 แปลง เป็นเนื้อที่ปลูกประมาณ 1,528 ไร่ และแปลงเพาะยางชำถุงจำนวน 134 แปลง ซึ่งผลิตยางชำถุงได้ประมาณ 6 ล้านต้น ที่สำคัญคือในแปลงขยายพันธุ์กิ่งตายางและแปลงเพาะยางชำถุงมีการผลิตพันธุ์ยาง RRIM 600 ซึ่งมีความอ่อนแอมากต่อเชื้อรา *Phytophthora* sp. นี้ อาจก่อให้เกิดผลเสียหายทางเศรษฐกิจต่อแปลงขยายพันธุ์กิ่งตายางและแปลงเพาะยางชำถุงเป็นอย่างมาก (สมพงษ์ สุขมาก, 2536; ศูนย์วิจัยยางสงขลา, 2541)

2. เชื้อราสาเหตุ

เชื้อรา *Phytophthora* sp. ที่ทำให้เกิดโรคกับยางพารามีหลายชนิด (ตารางที่ 1) แต่ในประเทศไทยพบเชื้อราสาเหตุโรคมีอยู่ 3 ชนิด คือ *P. botryosa* Chee (Chee,1969a) , *P. palmivora* (Butler) Butler (Tsao *et al.* , 1976) และ *P. nicotianae* var. *parasitica* Breda de Haan (อุบล คือประโคนและคณะ, 2520) ส่วนมากที่พบทำลายยางพาราในประเทศไทยจะเป็นเชื้อรา *P. botryosa* ซึ่ง Chee ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1969 โดยทำการแยกเชื้อจากก้านใบยางพาราที่เป็นโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp.ในประเทศมาเลเซียและไทย ซึ่งนอกจากจะทำลายยางพาราแล้วยังพบว่าเป็นสาเหตุของโรคผลเน่าในโกโก้และเผือกได้เช่นกัน (Chee and Wastie, 1970)

P. botryosa เมื่อเจริญบนอาหาร lima bean agar มีลักษณะแตกต่างจาก *P. palmivora* คือมีการเจริญเติบโตของเส้นใยช้าและไม่ฟองฟู่ เส้นใยเจริญแนบไปกับผิวอาหารและสร้าง chlamydospore ที่มีขนาดเล็กกว่า *P. palmivora* (Chee, 1969a) (ตารางที่ 2)

P. botryosa มีลักษณะคล้ายคลึงกันมากกับเชื้อรา *P. meadii* แต่ sporangium ของ *P. meadii* มีขนาดเฉลี่ย 48x24 µm. และมีขนาดใหญ่กว่า *P. botryosa* เล็กน้อย ซึ่งมีขนาดเฉลี่ย 28x15 µm. (Oudemans and Coffey, 1991)

P. botryosa เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA มี sporangium ขนาดเล็ก มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม รูปร่างเป็นรูปไข่ ขนาด 28x15 µm. มี pedicel สั้นป่านกลาง ขนาดประมาณ 5-20 µm. papilla เห็นไม่ชัด chlamydospore เกิดปลายเส้นใย รูปร่างกลม ผนังบาง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15-30 µm. antheridium เป็นแบบ amphigynous มีขนาด 14x13 µm. oogonium มีขนาด 22-24 µm. มีผนังหนา เส้นใยใส (hyaline) ผนังบาง ไม่มีผนังกั้น (non-septate) (อุบล คือประโคน และคณะ, 2520; Chee, 1969a) (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ชนิดของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่ทำให้เกิดโรคในยางพารา

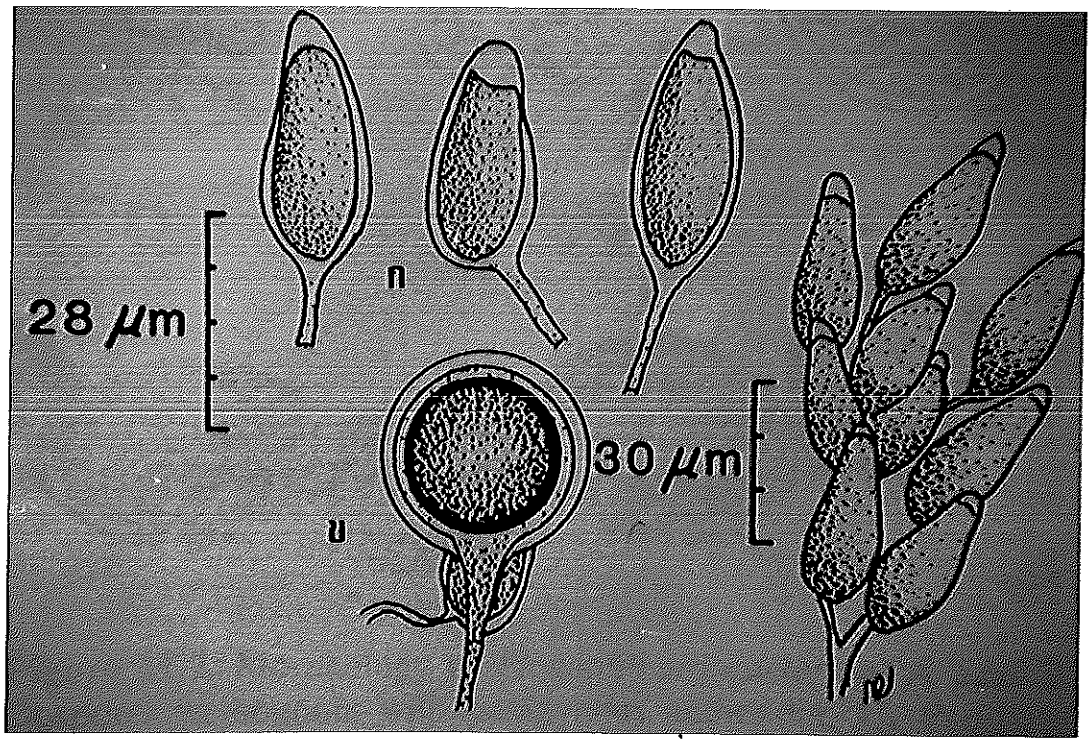
ชนิดของเชื้อรา	ประเทศที่พบ
P. arecae	อินเดีย
P. botryosa	มาเลเซีย, ไทย
P. cactorum	จีน, รัสเซีย
P. citricola	ศรีลังกา
P. citrophthora	จีน, ไอเวอรี่โคสต์, อินโดนีเซีย
P. colocasiae	จีน
P. heveae	มาเลเซีย
P. meadii	คองโก, อินเดีย, อินโดนีเซีย
	มาเลเซีย, ไนจีเรีย, ศรีลังกา
P. nicotianae	อินเดีย, มาเลเซีย, ไทย
P. palmivora	บราซิล, พม่า, แคมารูน, จีน, อินเดีย,
	อินโดนีเซีย, มาเลเซีย, ฟิลิปปินส์,
	ศรีลังกา, ไทย, อูกันดา
P. phaseoli	ฟิลิปปินส์

ที่มา : ดัดแปลงจาก Erwin และ Ribeiro (1996)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อรา *P. botryosa* และ *P. palmivora*

ลักษณะ	*P. botryosa*	*P. palmivora*
Chlamydospore	14-20 µm. (เฉลี่ย 18.7 µm.)	30-45 µm.
Oogonium	23-30 µm.	21-40 µm.
Oospore	21-24 µm.	16-30 µm.
Zoospore	รูปร่างกลม มีขนาดเล็ก	รูปร่างกลม มีขนาดเล็ก
Sporangium	รูปไข่ ขนาดเล็กประมาณ 28x15 µm. เห็น papilla ไม่ชัด มีก้าน (pedicel) สั้นปานกลาง ขนาด 5 –20 µm.	รูปไข่ที่ค่อนข้างยาวมีขนาดใหญ่กว่า *P.botryosa* ขนาดเฉลี่ย 55.5x33 µm. เห็น papilla ชัดเจน มีก้านค่อนข้างสั้นขนาด 2-5 µm.
Mycelium	ไม่มีผนังกั้น	ไม่มีผนังกั้น
Chlamydospore	เกิดที่ส่วนปลายของเส้นใย มีรูปร่างกลม ผนังบาง เส้นผ่านศูนย์กลาง 14-30 µm.	เกิดที่ส่วนปลายและตอนกลางของเส้นใย มีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 30-45 µm.
Sporangium shape	ovoid	ellipsoidal, ovoid
Antheridium	14x13 µm.	11x10 µm
Mating types	-	A1, A2

ที่มา : อุบล คือประโคน และคณะ (2520), Erwin และ Ribeiro (1996) ,



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของ sporangium (ก) และ oogonium (ข) ของเชื้อรา *P. botryosa*

(Oudemans and Coffey, 1991)

3. ลักษณะอาการโรค

เชื้อรา *P. botryosa* สามารถเข้าทำลายต้นยางได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ยางเล็กจนถึงยางใหญ่ และเกือบทุกส่วนของต้น ตั้งแต่ฝัก ใบ ยอด กิ่งก้าน และหน้ากรีด โดยเชื้อรา *P. botryosa* สามารถทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ของยางพาราต่อเนื่องกัน ดังนี้ (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2512)

3.1 **โรคใบร่วงและฝักเน่า** (Phytophthora leaf fall and pod rot)

ฝักยางถูกเชื้อเข้าทำลายก่อน ในขณะที่สภาพแวดล้อมเหมาะสม ฝักแสดงอาการเน่าดำและแขวนค้างอยู่บนต้นยางพารา ในระยะต่อมาฝักจะร่วงหล่นตามธรรมชาติ เชื้อราสาเหตุจะแพร่กระจายเข้าทำลายใบ ทำให้ใบยางร่วงหล่นจากต้นในขณะที่มีสีเขียวสดและสีเหลือง ลักษณะที่ปรากฏเด่นชัดคือ มีรอยช้ำ ดำ อยู่บริเวณก้านใบ และที่จุดกึ่งกลางของรอยช้ำมีหยดน้ำยางเกาะติดอยู่ เมื่อนำใบยางเป็นโรคมาสะบัดไปมาเบาๆ ใบย่อยจะหลุดทันที ซึ่งต่างกับใบยางที่ร่วงหล่นตามธรรมชาติ บางครั้งพบอาการบนใบเห็นเป็นแผลสีเขียวปนเทาฉ่ำน้ำ มักเริ่มจากขอบใบเข้าไป ขนาด 2-2.5 เซนติเมตร หรือเป็นทั้งแผ่นใบ (ภาพที่ 2ก)

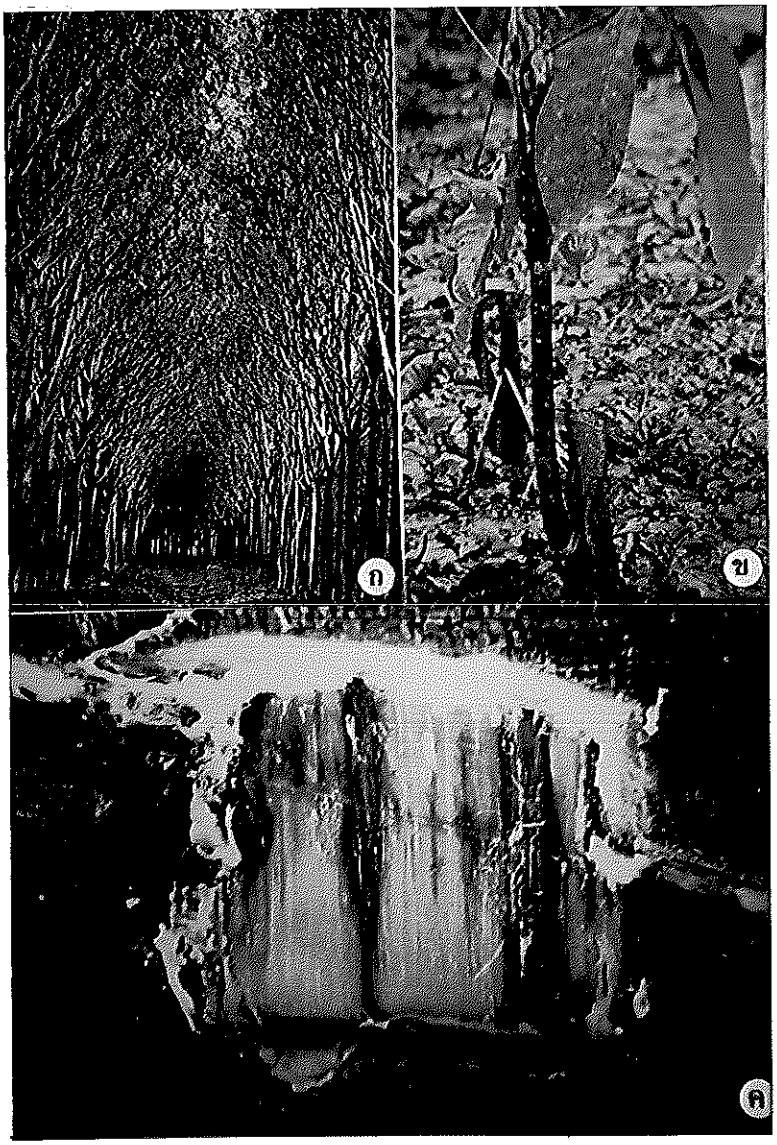
ในต้นยางอ่อนที่ยังไม่มีฝัก บริเวณยอดอ่อนจะถูกเชื้อราเข้าทำลายก่อน ทำให้ยอดเน่า ต่อมาเชื้อราเข้าทำลายก้านใบและแผ่นใบในที่สุด

3.2 **โรคเส้นดำ** (black stripe)

โรคเส้นดำเกิดจากน้ำฝนชะล้างเชื้อราสาเหตุจากฝัก ใบ ยอด และกิ่งก้าน ลงมายังหน้ากรีด ทำให้เกิดโรคเส้นดำ ซึ่งจะเกิดหลังจากโรคใบร่วงระบาดแล้วประมาณ 1-2 เดือน อาการระยะแรกเกิดบริเวณเหนือรอยกรีดเป็นรอยช้ำ มีสีผิดปกติ ระยะต่อมากลายเป็นรอยปุ่มสีดำหรือน้ำตาลดำ เป็นเส้นขยายลงตามแนวขนานกับลำต้น เมื่อเฉือนเปลือกออกจะเห็นรอยปุ่มสีดำนั้นเป็นลายเส้นดำบนเนื้อไม้ อาการเมื่อเข้าระยะรุนแรง เปลือกหน้ากรีดบริเวณที่เป็นโรคจะปริ เน่าและมีน้ำยางไหล และเปลือกเน่าหลุดออกมาในที่สุด ทำให้หน้ากรีดเสียหาย เปลือกงอกใหม่กรีดซ้ำไม่ได้ (ภาพที่ 2ค)

3.3 โรคใบร่วงและตายจากยอด (Phytophthora leaf fall and die back)

โรคใบร่วงและตายจากยอดที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ของต้นยางเล็กในแปลงปลูก แปลงกิ่งตา หรือแปลงขยายพันธุ์ รวมทั้งยางชำถุง แสดงอาการกิ่งก้านหรือยอดแห้งตาย โดยตายจากปลายกิ่งหรือปลายยอดเข้าหาส่วนโคนที่ละน้อย และถ้าอาการแห้งตายเป็นไปอย่างรวดเร็ว ต้นยางจะแห้งตายตลอดต้นในระยะเวลาอันสั้น (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2522) เชื้อราสามารถเข้าทำลายยอดอ่อนที่กำลังเจริญ ทำให้ยอดเน่าเป็นสีน้ำตาล ต่อมาเชื้อลุกลามเข้าทำลายก้านใบและแผ่นใบ ทำให้ใบเหี่ยวเน่าและร่วง เกิดอาการตายจากยอดลงมา บางครั้งพบเชื้อสาเหตุเข้าทำลายใบและก้านใบ ทำให้ใบเหี่ยวเน่าและร่วง จากนั้นลุกลามไปยังยอดอ่อน เห็นเป็นอาการสีดำแห้งตายลงมาจากปลายยอด หรือปลายกิ่งเข้าหาโคนต้น และในต้นยางติดตา เมื่อเชื้อราเข้าทำลายถึงแผ่นตาที่ติดไว้ ยอดทั้งยอดจะแห้งตายไปในที่สุด (RRIM, 1979) (ภาพที่ 2ข)



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรคยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa*

ก โรคใบร่วงและฝักเน่า

ข โรคใบร่วงและตายจากยอด

ค โรคเส้นดำ

4. วงจรการเกิดโรค

เชื้อรา *P. botryosa* แพร่กระจายจากแผลที่ใบหรือกิ่งก้านบนต้น โดย sporangium ที่อยู่ในละอองน้ำที่เกิดจากฝนตกลงบนส่วนของพืช ทำให้เกิดแผ่นน้ำบนแผล sporangium ที่มีรูปร่างกลมรีหรือคล้ายผลมะนาว (oval หรือ lemon shape) จะพัฒนาโครงสร้าง zoospore ซึ่งมีขนาดเล็ก เมื่ออุณหภูมิเย็นลง zoospore จะถูกปลดปล่อยออกจาก sporangium และสามารถแพร่กระจายไปกับน้ำฝนหรือปลิวไปกับละอองน้ำ เข้าทำลายส่วนต่าง ๆ ของยางโดยตรง หรืองอกเป็นเส้นใยที่สามารถเข้าทำลายยางได้โดยตรง (พิพัฒน์ เชี่ยงหลิว, 2540)

เชื้อรา *P. botryosa* มีการอยู่รอดในสภาพธรรมชาติโดยโครงสร้าง oospore และ chlamydospore ซึ่งมีผนังหนา สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม จึงสามารถอยู่รอดในสภาพปราศจากพืชอาศัย หรืออยู่รอดโดยอาศัยบนส่วนของพืชที่ถูกทำลาย เช่น ฝัก ยอด และเปลือกบนต้นยาง หรือเศษพืชอาศัยที่อยู่บนดิน (Johnston, 1989) หรือบนชิ้นส่วนของต้นยางที่ถูกทำลายร่วงหล่นอยู่บนดินหรือฝังอยู่ใต้ดิน เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม oospore จะงอกและสร้าง sporangium และ zoospore ขยายพันธุ์แพร่กระจายโดยอาศัยฝนและลมไปยังส่วนต่าง ๆ ของต้นยาง เมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสม ทำให้เกิดโรคใบร่วงและฝักเน่าระบาด (Thankamma, 1983) นอกจากนั้น sporangium และ zoospore จะแพร่กระจายเข้าทำลายยอดอ่อนของต้นยางเล็กที่อยู่ในบริเวณเดียวกัน หรือใกล้เคียงกับแปลงยางที่เป็นโรคใบร่วง เมื่อเข้าสู่ฤดูแล้ง เชื้อราจะสร้าง oospore และ chlamydospore ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีผนังหนาอยู่บนส่วนของต้นยางที่แห้งตายและเข้าทำลายยอดใหม่อีกครั้ง (RRIM, 1979)

5. สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

การระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* เกิดขึ้นเมื่อสภาพภูมิอากาศชื้นเป็นระยะเวลานาน และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ของเชื้อรา (Peries, 1969) การเกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนและจำนวนวันฝนตก โรคจะเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางและรุนแรง ในระยะที่มีฝนตกหนักติดต่อกันเป็นเวลาหลายวันในบริเวณที่มีเชื้อรา *Phytophthora* sp. ระบาดอยู่ ซึ่งมักเกิดขึ้นในระหว่างเดือนมิถุนายน ถึงเดือนพฤศจิกายน ของทุก ๆ ปี โดยบริเวณชายฝั่งตะวันตก เช่น จังหวัดระนอง พังงา ภูเก็ต กระบี่ ตรัง และสตูล จะปรากฏโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. เกิดขึ้นก่อนบริเวณชายฝั่งตะวันออก เช่น จังหวัดสุราษฎร์ธานี

นครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา ทั้งนี้เนื่องจากฤดูกาลของลมมรสุมที่เกิดขึ้นก่อนและหลังในท้องที่ดังกล่าว (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2522) เชื้อรามีการพัฒนาการอย่างรวดเร็วหลังจากเริ่มฤดูมรสุม ประมาณ 2-3 สัปดาห์ (Liyanage and Wheeler, 1991) สภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์และแพร่กระจายคือ อุณหภูมิที่ 26 องศาเซลเซียส มีฝนตกติดต่อกันอย่างน้อย 4 วัน ปริมาณน้ำฝนอย่างต่ำ 2.5 มิลลิเมตร และความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาอย่างน้อย 14 ชั่วโมง (Lim, 1982) และหากอุณหภูมิต่ำกว่า 26 องศาเซลเซียส มักมีการระบาดของโรครุนแรง เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ sporangium จะสร้าง zoospore จำนวนมากแทนการงอกของ sporangium เข้าทำลายต้นยางอย่างรวดเร็วและรุนแรง

6. การป้องกันและกำจัดโรค

การใช้พันธุ์ต้านทานนับเป็นวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp.ที่ได้ผลดีที่สุดในปัจจุบัน แต่ยังมีข้อจำกัดคือต้องใช้ระยะเวลานานในการปรับปรุงพันธุ์ยางที่มีลักษณะเป็นยางพันธุ์ดี ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณสมบัติต้านทานต่อโรค การทดสอบพันธุ์ยางต้องใช้เวลานานไม่น้อยกว่า 20 ปี เพื่อให้ได้ผลแน่นอนเป็นที่เชื่อถือได้ สำหรับยางพารายังเป็นปัญหาว่าความต้านทานต่อโรค จะได้ผลอยู่ตลอดชั่วอายุของต้นยางหรือไม่ เพราะต้นยางมีอายุการปลูกยาวนานประมาณ 25-30 ปี นอกจากนี้เชื้อราทุกชนิดมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมอยู่ตลอดเวลา และสามารถเข้าทำลายพันธุ์พืชอาศัยที่เคยมีความต้านทานได้ จากรายงานการสำรวจโรคในปี พ.ศ.2522 พบว่ายางพันธุ์GT1ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. กลับสูญเสียความต้านทานต่อโรคนี้ไป ซึ่งอาจเนื่องมาจากสาเหตุดังกล่าวนี้ ปัจจุบันพันธุ์ยางที่ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ได้แก่ BPM 24 สงขลา 36 RRIC 110 BPM 1 และ RRIT 250 เป็นต้น ส่วนพันธุ์ยางที่อ่อนแอต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ได้แก่ RRIM 600 PB 255 เป็นต้น (พงษ์เทพ ขจรไชยกูล, 2520, 2521; สถาบันวิจัยยาง, 2540)

การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเช่นกัน เพราะสะดวกและให้ผลในการควบคุมรวดเร็วกว่าวิธีการอื่น โดยทำการพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราปกคลุมใบยาง 6 สัปดาห์ ในแปลงยางใหญ่ ก่อนเข้าสู่ฤดูมรสุม พบว่าสามารถลดการระบาดของโรคได้ ในประเทศอินเดีย ควบคุมโรคใบร่วงและฝักเน่าโดยวิธีพ่นสารเคมี copper-in-oil ทางอากาศ ด้วย

เครื่องบินหรือเฮลิคอปเตอร์ วิธีนี้มีข้อจำกัดคือค่าใช้จ่ายสูง และต้องเป็นสวนยางขนาดใหญ่ ปัจจุบันมีการใช้เครื่องพ่นหมอก (thermal fogging) พ่นสารเคมีควบคุมโรคใบร่วงและฝักเน่า ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าเครื่องพ่นสารเคมีธรรมดา แต่มีราคาแพงทำให้ค่าใช้จ่ายสูงเช่นกัน สวนยางในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นสวนยางขนาดเล็ก และโรคใบร่วงในยางใหญ่ไม่รุนแรงถึงกับทำให้ต้นยางตาย แต่ทำให้ผลผลิตลดลง เมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการพ่นสารเคมีจึงไม่คุ้มทุน ฉะนั้นจึงทำการป้องกันกำจัดเฉพาะโรคเส้นดำและโรคใบร่วงที่เกิดกับต้นยางเล็ก ในบริเวณที่มีพื้นที่ที่มีโรคใบร่วงและฝักเน่าระบาด การพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรามีความจำเป็นมากสำหรับแปลงยางข้างเคียงที่เป็นยางเล็ก เพราะเชื้อราสามารถเข้าทำลายยอดอ่อนและใบ ทำให้ใบร่วงและตายจากยอดลงมา เมื่อพบต้นยางเกิดการตายจากยอดลงมา ให้ตัดส่วนที่ถูกทำลายทิ้ง โดยตัดตรงใต้รอยแผลลงมาประมาณ 2 นิ้ว และทาสารเคมีกำจัดเชื้อราตรงรอยตัด ปัจจุบันสารเคมีที่แนะนำให้ใช้ในการป้องกันและกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. คือ metalaxyl, fosetyl Al และ oxidixyl+mancozeb (RRIM, 1979, Chee, 1985; Tan, 1988 ;Johnston, 1989;)

สำหรับมาตรการทางชีววิธี มีรายงานว่าสถาบันวิจัยยางอินเดียได้ทำการทดลองแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. meadii* จากดินในแหล่งปลูกยางพารา และพบจุลินทรีย์ในดินพวกแอคติโนมัยซีส ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. meadii* ในห้องปฏิบัติการได้ดี (Kochuthresiamma *et al.*, 1988) Sutton และ Peng (1993) รายงานว่ามีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาควบคุมโรคใบจุดดำของยางพารา (black crust) ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Phyllachora huberi (Catacauma huderi)* สามารถควบคุมได้โดยการฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยของเชื้อรา *Cylindosporium concentricum* และ *Dicyma pulvinata* เพียงครั้งเดียว สำหรับการควบคุมโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* โดยมาตรการทางชีววิธียังไม่มีการศึกษามาก่อน

วัตถุประสงค์

1. แยกและคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. botryosa* จากดินในแหล่งปลูกยางพารา
2. ศึกษาแนวทางในการควบคุมและป้องกันการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ของยางพาราโดยชีววิธีในสภาพเรือนทดลอง

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. กิ่งตายางพันธุ์ RRIM 600
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา
   - Potato dextrose agar (PDA)
   - Lima bean agar (LBA)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
   - Thornton's standardized medium (TSM)
   - Pseudomonas agar F (Difco)
   - Nutrient agar (NA)
4. ถุงเพาะชำดำ ขนาด 8"x15"
5. หน้าดินและขี้เลื่อย
6. ถุงพลาสติกใส ขนาด 16"x24"
7. สีย้อมเชื้อรา cotton blue
8. เอทธิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
9. คลอร็อกซ์ (clorox) 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์
10. กระบอกพ่น (foggy sprayer)
11. ผ้าเทปสี
12. ป้ายพลาสติก (tag)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเลี้ยงเชื้อ ฟลาสก์ บีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดเลี้ยงเชื้อ ปิเปต และเครื่องแก้วอื่น ๆ
2. อุปกรณ์ในการแยกเชื้อ ได้แก่ เข็มเขี่ย ลูป มีดผ่าตัด ตะเกียงแอลกอฮอล์

3. เครื่องชั่ง (balance)
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
5. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
6. ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow)
7. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
8. กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
9. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)
10. กล้องถ่ายรูป (camera)
11. เครื่องนับเซลล์ (haemacytometer)
12. ตู้เย็น (refrigerator)

วิธีการ

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินสวนยางพาราที่เป็นโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa*

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณในสวนยางพาราที่เป็นโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P.botryosa* เก็บดินโดยเจาะดินจากผิวดินลงไปลึก 15 เซนติเมตร (Kochuthresiamma *et al.*,1988) โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง แหล่งละ 6 จุด กระจายทั่วพื้นที่สวนยาง จำนวน 17 แหล่ง จาก 7 จังหวัดในภาคใต้ คือ สงขลา (1 แหล่ง) นราธิวาส (4 แหล่ง) ยะลา (3 แหล่ง) ปัตตานี (2 แหล่ง) ตรัง (3 แหล่ง) สตูล (1 แหล่ง) และกระบี่ (3 แหล่ง)

1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียจากตัวอย่างดินให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี soil dilution plate โดยนำตัวอย่างดินทั้ง 6 จุด ของแต่ละแหล่งมาผสมกัน ทำการชั่งดินตัวอย่าง น้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าให้เข้ากัน แล้วทำ serial dilution จนถึงที่ระดับ 10^{-5} ใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยของตัวอย่างดินจาก serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-2}- 15^{-5} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Pseudomonas agar F และ Thormton's standardized medium ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยวิธี spread plate

technique ทำ 3 ซ้ำ บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน ทำการย้าย single colony ของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารทั้งสองชนิดลงเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) slant โดยสุ่มเก็บแหล่งละ 20 สายพันธุ์ นำไปบ่มไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. botryosa* ต่อไป

2. การแยกเชื้อรา *P. botryosa*

2.1 การเก็บตัวอย่างโรคและการแยกเชื้อสาเหตุจากก้านใบยางพารา

เชื้อรา *P. botryosa* สามารถแยกได้จากส่วนต่างๆ ของยางพาราที่เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. เช่น ใบยาง ก้านใบ กิ่งก้าน และลำต้น ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างก้านใบยางพาราที่เป็นโรคจากสวนยางพาราที่มีโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ระบาด นำมาแยกเชื้อราสาเหตุให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี tissue transplanting method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) โดยทำการตัดชิ้นส่วนของใบหรือก้านใบตรงส่วนที่เป็นแผลออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร ด้วยใบมีดผ่าตัด นำไปฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการแช่ในสารละลาย คลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2-4 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำชิ้นส่วนไปวางบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วเพื่อดูดซับน้ำให้แห้งก่อนนำไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารละลาย lactic acid 25 เปอร์เซ็นต์ (V/V) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3-5 วัน สังเกตการเกิดเส้นใยบนชิ้นส่วนทุกวัน จากนั้นทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการตัดแยกส่วนปลายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จานใหม่ หลังจากบ่มเชื้อต่อไปเป็นเวลา 7 วัน ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหาร PDA slant นำไปเก็บไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุและการพิสูจน์โรค

2.2.1 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุ

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากก้านใบยางที่เป็นโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ในข้อ 2.1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LBA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อ นำไปวางลงบนจุดกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเลี้ยงเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำ slide culture โดยการตัดอาหารวุ้น LBA บริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราเป็นรูปสี่เหลี่ยมจตุรัส ขนาด 5x5 มิลลิเมตร

วางบนแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว และปิดทับก้อนเชื้อด้วย cover slip นำ slide culture ไปวางในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 9.0 เซนติเมตร ให้ความชื้นโดยใช้สำลีชุบน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเลี้ยงไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเอาก้อนเชื้อออกและย้อมเส้นใยเชื้อราด้วย lactophenol cotton blue นำไปศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ key ของ Stamps และ Waterhouse (1990)

2.2.2 การพิสูจน์โรค

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากก้านยางที่เป็นโรคในข้อ2.1 มาทำเป็นสารแขวนลอยของเชื้อ โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา LBA เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำน้ำเย็นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ เทสารแขวนลอยของเชื้อราลงใน บีกเกอร์ นำไปไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมสารแขวนลอยให้มีความเข้มข้นประมาณ $2x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร (ประภาพัฒนกุลและคณะ, 2529; Chee, 1968)

ทำการปลูกเชื้อกับยางชำถุงอายุประมาณ 1.5 ปี โดยนำสารแขวนลอยของเชื้อรา ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมสารจับใบ (Tween 20) 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดพ่นพุ่มใบยางอายุประมาณ 2 สัปดาห์ ให้ความชื้นโดยการคลุมด้วยถุงพลาสติกที่พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 24 ชั่วโมง ทำการบันทึกลักษณะอาการของโรคหลังปลูกเชื้อ 10 วัน เมื่อต้นยางแสดงอาการของโรค

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากแหล่งปลูกยางในห้องปฏิบัติการ

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa*

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งปลูกยางพารามาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธี dual culture

นำเชื้อรา *P. botryosa* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน และแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เป็นเวลา 2 วัน ทำการทดสอบ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะโคโลนีของเชื้อรา *P. botryosa* นำมาวางลงด้านใดด้านหนึ่งบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร บ่มเชื้อไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 วัน แล้วปลูกเชื้อแบคทีเรียลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้าน

ตรงข้ามกับเชื้อรา *P. botryosa* โดยให้เชื้อรา *P. botryosa* และเชื้อแบคทีเรียมีระยะห่างกัน 5 เซนติเมตร นำไปบ่มไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ทำการบันทึกผลหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน โดยการวัด clear zone ที่เกิดขึ้นระหว่างเชื้อรา *P. botryosa* กับแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) มี 4 ซ้ำ

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* บนก้านยางพารา

3.2.1 การเตรียมวัสดุทดลอง

ใช้ก้านยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อรา *P. botryosa* โดยเลือกเก็บให้มีขนาดสม่ำเสมอ อายุประมาณ 2 เดือน นำก้านยางมาปลิดใบย่อยทิ้ง ทำความสะอาดผิวก้านยางด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง จากนั้นจุ่มหัวท้ายของก้านยางด้วยขี้ผึ้งหลอมอุ่น ทำเครื่องหมายแต่ละกรรมวิธีโดยใช้ผ้าเทปสีพันก้านยาง (Chee,1968)

3.2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (นลินี จาริกภากร และคณะ, 2534) ใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 4 จาน เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นประมาณ $1x10^6$ cfu/ml นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ haemacytometer

3.2.3 การเตรียมเชื้อราสาเหตุ

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *P. botryosa* โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา Lima bean agar (LBA) เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำน้ำเย็นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา 4 จาน เทสารแขวนลอยเชื้อราลงในบีกเกอร์ จากนั้นนำไปไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมสารแขวนลอยให้มีความเข้มข้นประมาณ $2x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer (ประภา พัฒนกุลและคณะ, 2529; Chee, 1968)

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการป้องกันการเกิดโรคบนก้านใบยางพารา

นำก้านยางทั้งก้านมาแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นประมาณ $1X10^6$ cfu/ml ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร โดยใช้ก้านยาง 5 ก้านต่อแบคทีเรีย 1 ชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำก้านยางมาจุ่มแช่ในสารแขวนลอยของเชื้อรา *P. botryosa* ที่มีระดับน้ำเชื้อสูง 0.5 นิ้ว มีความเข้มข้นประมาณ $2X10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำบีกเกอร์ใส่ไว้ในถุงพลาสติกที่พรมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ชื้น ผูกปากถุงพลาสติก นำไปบ่มไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน (ประภา พัฒนกุลและคณะ, 2529; Chee, 1968;) หลังจากนั้นนำก้านยางที่บ่มมาประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยการวัดความยาวของรอยแผลที่ยาวที่สุดนับจากโคนก้านใบ เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ได้แช่แบคทีเรีย วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design (CRD) มี 5 ซ้ำ (ภาพที่ 3ก)

3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* บนใบยางพารา

3.3.1 การเตรียมวัสดุทดลอง

ใช้ใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ระยะเพสลาด อายุประมาณ 2 สัปดาห์ โดยเลือกเก็บให้มีขนาดสม่ำเสมอ ทำความสะอาดผิวใบด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง พันโคนใบด้วยสำลีชุบน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปวางบนตะแกรงที่หล่อด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในกล่องพลาสติก

3.3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (นลินี จาริกภากร และคณะ, 2534) ใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วขูดผิวหน้าอาหารเบาๆ โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 4 จาน เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นประมาณ $1X10^6$ cfu/ml นับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer

3.3.3 การเตรียมเชื้อราสาเหตุ

เตรียมเชื้อรา *P. botryosa* โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเชื้อรา *P. botryosa* บริสุทธิ์ที่เลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LBA ไปวางตรงกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ LBA จานใหม่ นำไปบ่มไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน

3.3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการป้องกันการเกิดโรคบนใบยางพาราในห้องปฏิบัติการ

นำใบยางอ่อนในสารแขวนลอยแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นประมาณ $1x10^6$ cfu/ml โดยใช้ใบยาง 5 ใบต่อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 ชนิด นำไปวางบนตะแกรงที่หล่อน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วไว้ในกล่องพลาสติก ทำการบ่มไว้ในกล่องพลาสติก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะเชื้อรา *P. botryosa* อายุ 10 วัน ใช้ปลายเข็มเขี่ยก้อนเชื้อขึ้นมาวางบนด้านล่างใบยางที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยเชื้อราลง บ่มใบยางไว้ในกล่องพลาสติกเป็นเวลา 4 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้อง ประเมินการเกิดโรคโดยวัดพื้นที่แผลที่เกิดอาการเน่าดำโดยวิธีการลอกพื้นที่แผลด้วยกระดาษไขลอกลาย นำไปนับจำนวนช่องบนกระดาษกราฟ แล้วนำไปคำนวนพื้นที่เป็นตารางมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับ control ที่ปลูกเชื้อรา *P. botryosa* เพียงอย่างเดียว วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) มี 3 ซ้ำ (ภาพที่ 3ช)

4. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa* ของยางพาราในเรือนทดลอง

4.1 การเตรียมวัสดุทดลอง

นำเมล็ดยางพาราที่เก็บจากสวนยาง ลงปลูกในแปลงที่เตรียมดินอย่างดี โดยวิธีการเรียงเมล็ด เมื่อต้นกล้ายางอายุประมาณ 6-8 เดือน หรือลำต้นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.2 เซนติเมตร ที่ระดับ 10 เซนติเมตรจากพื้นดิน ทำการติดตาเขียวด้วยยางพันธุ์ RRIM 600 หลังจากติดตาแล้ว 21 วัน ทำการเปิดตาที่ติดสำเร็จ และปล่อยไว้ในแปลงอย่างน้อย 1 สัปดาห์ จึงย้ายปลูกในถุงเพาะชำขนาด 8"X15" ที่บรรจุหน้าดินผสมขี้เลื่อยยางพารา อัตรา 2 :1 ส่วน นำยางชำถุงไปไว้ในเรือนทดลอง และบำรุงรักษาให้ต้นยางชำถุงเจริญเติบโตและแข็งแรง(นิรนาม, 2532)(ภาพที่3ค)

4.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (นลินี จาริกภากร และคณะ, 2534) ใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใช้แท่งแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วขูดผิวหน้าอาหารเบาๆ โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 4 จาน เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นประมาณ $1x10^6$ cfu/ml นับจำนวนเซลล์โดยใช้ haemacytometer

4.3 การเตรียมเชื้อราสาเหตุ

เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อรา *P. botryosa* โดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา LBA เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำน้ำเย็นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใช้แท่งแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วขูดผิวหน้าอาหารเบา ๆ โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา 4 จาน เทสารแขวนลอยเชื้อราลงในบีกเกอร์ จากนั้นนำไปไว้ในตู้เย็น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมสารแขวนลอยให้มีความเข้มข้นประมาณ $2x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร นับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemacytometer (ประภา พัฒนกุลและคณะ, 2529; Chee, 1968)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการป้องกันการเกิดโรคบนต้นกล้ายางพาราในสภาพเรือนทดลอง

ทำการปลูกเชื้อเมื่อยางชำถุงอายุประมาณ 1.5 ปี คัดเลือกยางชำถุงที่เริ่มแตกยอดใหม่ทำเครื่องหมายไว้ ทำการปลูกเชื้อเมื่อพุ่มใบอายุ 2 สัปดาห์ โดยใช้วิธีการฉีดพ่นพุ่มใบด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยประมาณ $1x10^6$ cfu/ml ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมสารจับใบ (Tween 20) 0.5 มิลลิลิตร และสารแขวนลอยของเชื้อรา *P. botryosa* ที่มีความเข้มข้นของสารแขวนลอยประมาณ $2x10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมสารจับใบ 0.5 มิลลิลิตร ตามกรรมวิธีในการทดลอง ให้ความชื้นโดยการคลุมด้วยถุงพลาสติกที่พ่นน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 24 ชั่วโมง บันทึกผลหลังปลูกเชื้อรา *P. botryosa* เป็นเวลา 14 วัน โดยการวัดความยาวแผลที่ก้านใบที่เป็นโรค วางแผนการทดลองแบบ Factorial in RCB จำนวน 3 ซ้ำๆละ 1 ต้น มี 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา มี 7 ระดับ คือ B131 B163 B166 B204 B233 B308 และ *P. botryosa* ปัจจัยที่ 2 คือ จำนวนวันในการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนการปลูกเชื้อรา มี 3 ระดับ คือ 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน

ภาพที่ 3 วิธีการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์บนเนื้อเยื่อยางพาราในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง

ก การปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *P. botryosa* บนก้านยาง ตามวิธีการของ Chee(1968)

ข การปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *P. botryosa* บนใบยาง

ค การปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *P. botryosa* กับยางชำถุง พันธุ์ RRIM 600 ในเรือนทดลอง

5. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa*

ตรวจสอบจำนวนประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากฉีดพ่นลงบนพุ่มใบยางที่ระยะเวลาต่างๆ กัน คือ ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนพ่นเชื้อรา *P. botryosa* เป็นเวลา 7 วัน 4 วัน และ 1 วัน เพื่อศึกษาเปรียบเทียบปริมาณประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่พบบนพื้นผิวของเนื้อเยื่อก้านยางพารา ภายหลังจากการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เวลาต่างๆ กัน โดยใช้วิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ด้วยการนำก้านใบยางที่พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ น้ำหนัก 1 กรัม มาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 3-5 มิลลิเมตร นำไปใส่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า vertex แล้วทำ serial dilution จนถึงที่ระดับ 10^{-6} ใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยจากระดับความเข้มข้น 10^{-2} -10^{-6} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่แท่งแก้วปาดบนอาหารให้ทั่ว แล้วนำไปบ่มไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) มี 4 ซ้ำ

6. จำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa*

จำแนกสกุลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต และควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *P. botryosa* ได้ดีโดยใช้วิธีการทางชีวเคมีในการจำแนกสกุล ตามวิธีการของ Schaad (1980) และตรวจสอบลักษณะสัณฐานของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการย้อมสีแกรมโดยได้รับความอนุเคราะห์จากคุณลัดดา นิลรัตน์ และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. **การแยกเชื้อแบคทีเรียในดินจากสวนยางที่เป็นโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa***

จากการเก็บตัวอย่างดินในบริเวณสวนยางพาราที่เป็นโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ในเขตภาคใต้ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินจำนวน 17 แหล่ง จาก 7 จังหวัด แหล่งละ 6 จุด กระจายทั่วพื้นที่สวนยาง (ตารางที่ 3)

แล้วนำมาทำการแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้แบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 340 สายพันธุ์

ตารางที่ 3 แหล่งที่เก็บตัวอย่างดินจำนวน 17 แหล่ง จาก 7 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย

ตัวอย่างที่	อำเภอ	จังหวัด	ลักษณะสวน
1.	หาดใหญ่	สงขลา	กิ่งตา*
2.	สุคิริน	นราธิวาส	กิ่งตา
3.	สุไหงปาดี	นราธิวาส	กิ่งตา
4.	แว้ง	นราธิวาส	ยางใหญ่**
5.	ยี่งอ	นราธิวาส	ยางใหญ่
6.	กรงปินัง	ยะลา	ยางใหญ่
7.	ยะหา	ยะลา	ยางใหญ่
8.	บันนังสตา	ยะลา	ยางใหญ่
9.	นาประดู่	ปัตตานี	ยางเล็ก ***
10.	โคกโพธิ์	ปัตตานี	ยางเล็ก
11.	ย่านตาขาว	ตรัง	ยางเล็ก
12.	วังวิเศษ	ตรัง	กล้ายาง
13.	เขาช่อง	ตรัง	กิ่งตา
14.	ควนกาหลง	สตูล	ยางใหญ่
15.	ในช่อง	กระบี่	ยางใหญ่
16.	คลองท่อม	กระบี่	กิ่งตา
17.	ในช่อง	กระบี่	ยางเล็ก

* แปลงขยายพันธุ์กิ่งตา

** ยางหลังเปิดกรีด

*** ยางก่อนเปิดกรีด

2. การแยกเชื้อรา *P. botryosa*

2.1 การเก็บตัวอย่างโรคและการแยกเชื้อสาเหตุ

การเก็บตัวอย่างโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* จะเก็บในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกชุกและความชุ่มชื้นสูงซึ่งเป็นช่วงที่โรคระบาด จึงทำการเก็บตัวอย่างโรคในช่วงเดือนกรกฎาคม-ธันวาคม เป็นระยะที่มีโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ระบาดในเขตภาคใต้ โดยสามารถสังเกตลักษณะอาการของโรคคือใบยางร่วงหล่นจากต้นขณะที่มีสีเขียวสด มีฝักเน่าดำแขวนค้างอยู่บนต้น ลักษณะที่ปรากฏเด่นชัดคือมีรอยช้ำ ดำ อยู่บริเวณก้านใบ และที่จุดกึ่งกลางของรอยช้ำมีหยดน้ำยางเกาะติดอยู่ (ภาพที่ 4)

จากการเก็บตัวอย่างก้านใบที่เป็นโรคใบร่วงของยางพันธุ์ RRIM 600 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใบร่วง จากสวนยาง 7 แหล่ง จำนวน 7 สายพันธุ์ ในเขตภาคใต้ (ตารางที่ 4) และนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ พบว่าเชื้อราที่เจริญเติบโตบนอาหาร PDA มีลักษณะเส้นใยสีขาว ฟองฟู ค่อนข้างหยาบ และในแต่ละสายพันธุ์ มีลักษณะเหมือนกัน จากการวัดการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราในแต่ละสายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่มีความแตกต่างอย่างเด่นชัด (ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์ P2 ที่แยกได้จากก้านยางในสวนยางอำเภอคลองท่อม จังหวัดกระบี่ ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีมาเป็นตัวแทนของเชื้อรา *P. botryosa* สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

ภาพที่ 4 ลักษณะของก้านใบที่เป็นโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ในธรรมชาติ

ตารางที่ 4 แหล่งที่เก็บตัวอย่างโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อ *P. botryosa* ในภาคใต้ของประเทศไทย

สายพันธุ์รา	พันธุ์ยาง	ส่วนที่เก็บ	สถานที่เก็บ
P1	RRIM 600	ก้านใบ	อ.เขาช่อง จ.ตรัง
P2	RRIM 600	ก้านใบ	อ.คลองท่อม จ.กระบี่
P3	RRIM 600	ก้านใบ	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา
P4	RRIM 600	ก้านใบ	อ.โคกโพธิ์ จ.ปัตตานี
P5	RRIM 600	ก้านใบ	อ.สุไหงปาดี จ.นราธิวาส
P6	RRIM 600	ก้านใบ	อ.บันนังสตา จ.ยะลา
P7	RRIM 600	ก้านใบ	อ.ควนกาหลง จ.สตูล

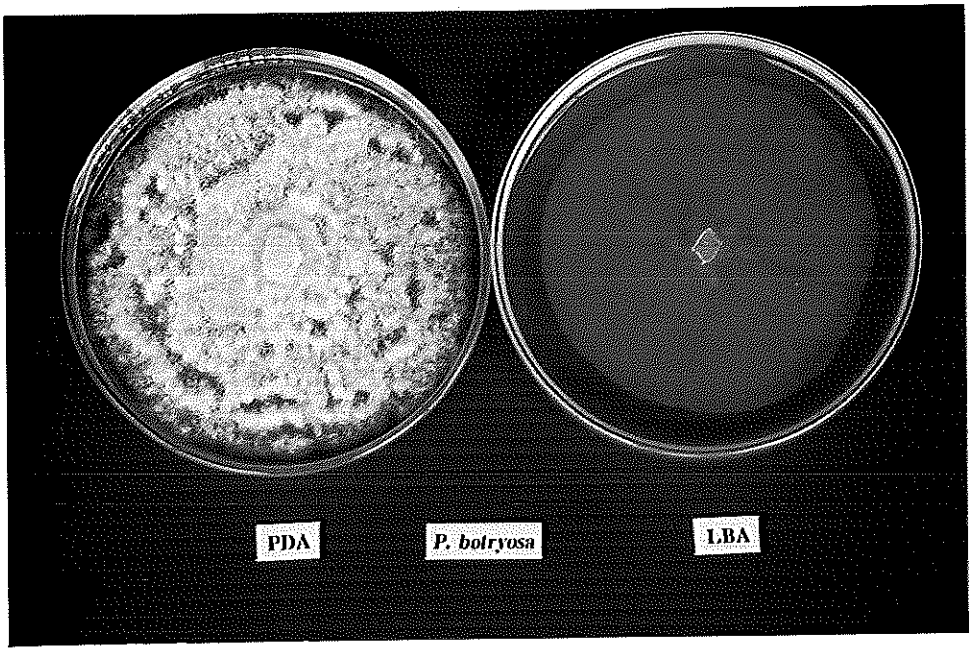
ตารางที่ 5 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* แต่ละสายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA

สายพันธุ์	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย (มม.)			
	3	5	7	(วัน)
P1	37.0	66.5	87.5	
P2	42.0	79.0	90.0	
P3	38.0	68.5	88.5	
P4	37.5	74.0	90.0	
P5	38.5	76.0	90.0	
P6	39.5	76.5	90.0	
P7	41.0	78.0	90.0	

2.2 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุ

จากการนำเชื้อราบริสุทธิ์ สายพันธุ์ P2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ LBA จำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้ key ของ Stamps และ Waterhouse (1990) พบว่าลักษณะของเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ค่อนข้างหยาบ มีสีขาว ฟองฟู เจริญหนาแน่น เส้นใยเป็นแบบ aerial mycelium การเจริญเติบโตของเส้นใยช้า (3 วัน เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 34 มิลลิเมตร) sporangium เจริญกระจายอยู่ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเส้นใยของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร LBA ค่อนข้างบาง ละเอียด เส้นใยเจริญแนบไปบนอาหารเป็นรูปแฉกดาว(stellate) สีใส sporangium เจริญหนาแน่นอยู่ตรงส่วนกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ การเจริญเติบโตของเส้นใยช้า ไม่แตกต่างกับที่เลี้ยงบนอาหาร PDA แต่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LBA มีการผลิต sporangium จำนวนมาก (ภาพที่ 5)

ลักษณะสัณฐานของเชื้อราพบว่า เส้นใยใส (hyaline) ผนังบาง แตกสาขา ไม่มีผนังกั้น (non septate) มี sporangium รูปไข่ (ovoid) ขนาดเล็กประมาณ 34x19 µm (ภาพที่ 6)มีก้าน (pedicel) สั้นปานกลางขนาดประมาณ 2.7 µm อยู่กันเป็นกลุ่มก้อน (clumps) zoosporeมีรูปร่างกลม ขนาดเล็ก ลักษณะของเส้นใยและ sporangium ที่พบมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ Chee (1969a) และอุบล คือประโคนและคณะ (2520) ได้รายงานไว้



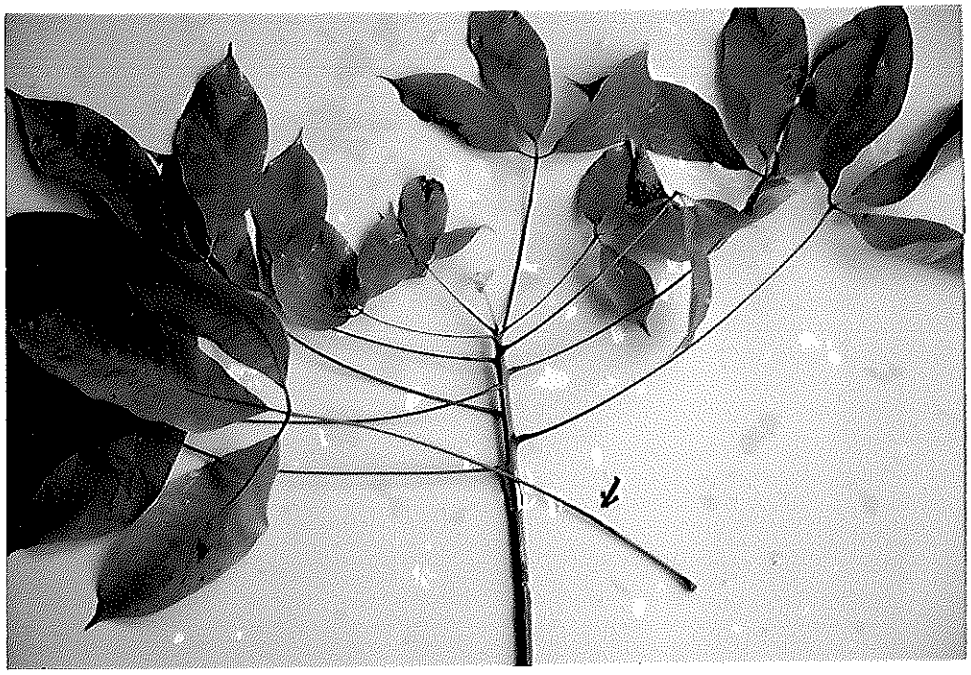
ภาพที่ 5 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *P. botryosa* สายพันธุ์ P2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ LBA และ PDA

ภาพที่ 6 ลักษณะของ sporangium และ mycelium ของเชื้อรา *P. botryosa* สายพันธุ์ P2 (1,000x) ย้อมด้วย cotton blue

2.3 การทดสอบการเกิดโรค

จากการตรวจสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อราที่แยกได้กับยางชำถุง พบว่าที่ก้านใบมีแผลสีน้ำตาลดำ ไม่พบหยดน้ำยางเกาะตรงกลางแผล ส่วนที่ใบเป็นรอยช้ำฉ่ำน้ำ และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแกมส้มก่อนที่จะร่วง(ภาพที่7) นำก้านใบที่เป็นโรคมาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร LBA พบเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยใสบาง ละเอียด เจริญแนบไปบนพื้นผิวอาหาร sporangia รูปไข่ เป็นลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อราที่แยกได้ และนำมาปลูกเชื้อกับยางชำถุง

จากการศึกษาเชื้อราที่แยกจากตัวอย่างโรคใบร่วง ทั้งลักษณะเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางจุลสัณฐานของเส้นใยและสปอร์ รวมทั้งลักษณะอาการของโรคและการแยกเชื้อกลับ (re-isolation)ได้เชื้อในลักษณะเช่นเดิมจึงสามารถสรุปได้ว่าเชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อร *P. botryosa* ที่เป็นสาเหตุโรคใบร่วงของยางพารา



ภาพที่ 7 ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* สายพันธุ์ P2

3. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากแหล่งปลูกยางในการยับยั้งเชื้อรา *P. botryosa* ในห้องปฏิบัติการ

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa*

จากการนำแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งปลูกยางภาคใต้ตอนล่าง ทั้ง 17 แหล่ง จำนวน 340 สายพันธุ์ ทดสอบกับเชื้อรา*P. botryosa* P2 บริสุทธิ์ที่แยกได้จากก้านใบยางพาราพบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* จำนวน 18 สายพันธุ์จาก 7 แหล่งคือ แว้ง (2 สายพันธุ์) ยะหา (2 สายพันธุ์) โคกโพธิ์ (5 สายพันธุ์) ย่านตาขาว(3 สายพันธุ์) วังวิเศษ (2 สายพันธุ์) ควนกาหลง (1 สายพันธุ์) และคลองท่อม (3 สายพันธุ์) (ตารางที่ 6) โดยพบลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* เป็น 2 แบบคือ แบบยับยั้งการเจริญของเส้นใย โดยเกิดเป็นบริเวณใส (clear zone) และแบบเจริญอย่างรวดเร็ว และทำให้เส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญได้ (ตารางที่ 7) แบคทีเรียที่มีผลในการยับยั้งเส้นใยเชื้อราในลักษณะที่เกิดบริเวณใส มีจำนวน 13 สายพันธุ์ คือ B102 B106 B114 B163 B166 B177 B185 B233 B234 B235 B242 B307 และ B308 (ภาพที่ 8) ส่วนแบคทีเรียที่เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและทำให้เส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญได้ มีจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ B122 B131 B204 B205 และ B245 (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 6 จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. botryosa* จากแบคทีเรีย จำนวน 340 สายพันธุ์

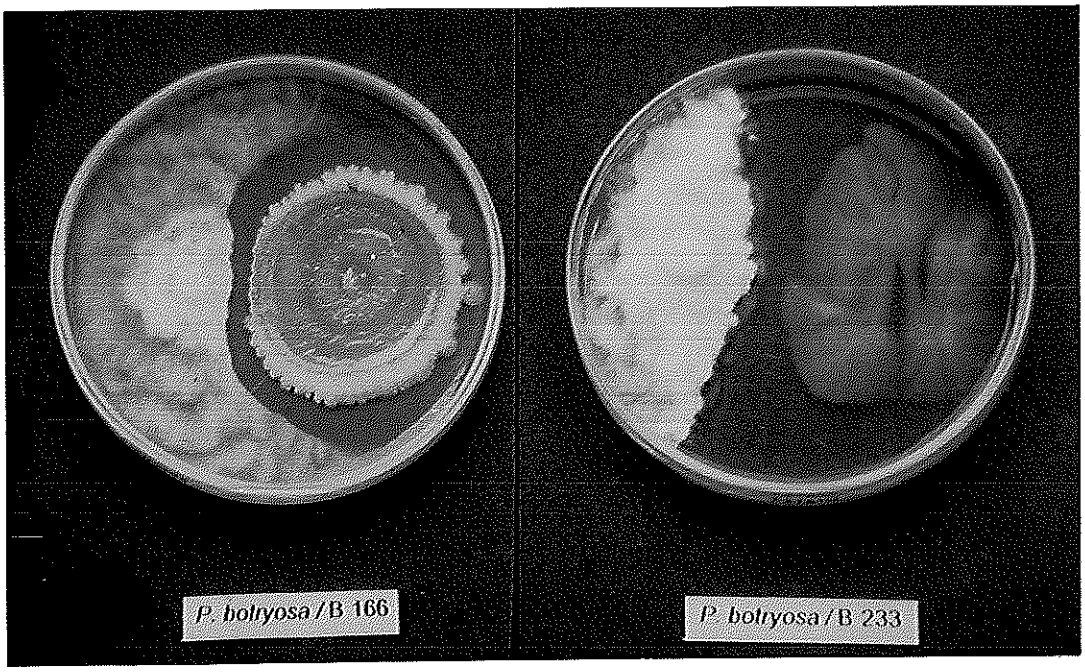
	แหล่งเก็บดิน	จำนวน สายพันธุ์
1.	อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา	-
2.	อ.สุคิริน จ. นราธิวาส	-
3.	อ.สุไหงโกลก จ. นราธิวาส	-
4.	อ.แว้ง จ. นราธิวาส	2
5.	อ.ยี่งอ จ. นราธิวาส	-
6.	อ.กรงปินัง จ. ยะลา	-
7.	อ.ยะหา จ. ยะลา	2
8.	อ.บันนังสตา จ. ยะลา	-
9.	อ.นาประดู่ จ. ปัตตานี	-
10.	อ.โคกโพธิ์ จ. ปัตตานี	5
11.	อ.ย่านตาขาว จ. ตรัง	3
12.	อ.วังวิเศษ จ. ตรัง	2
13.	อ.เขาช่อง จ. ตรัง	-
14.	อ.ควนกาหลง จ. สตูล	1
15.	อ.ในช่อง จ. กระบี่	-
16.	อ.คลองท่อม จ. กระบี่	3
17.	อ.ในช่อง จ. กระบี่	-
	รวม	18

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

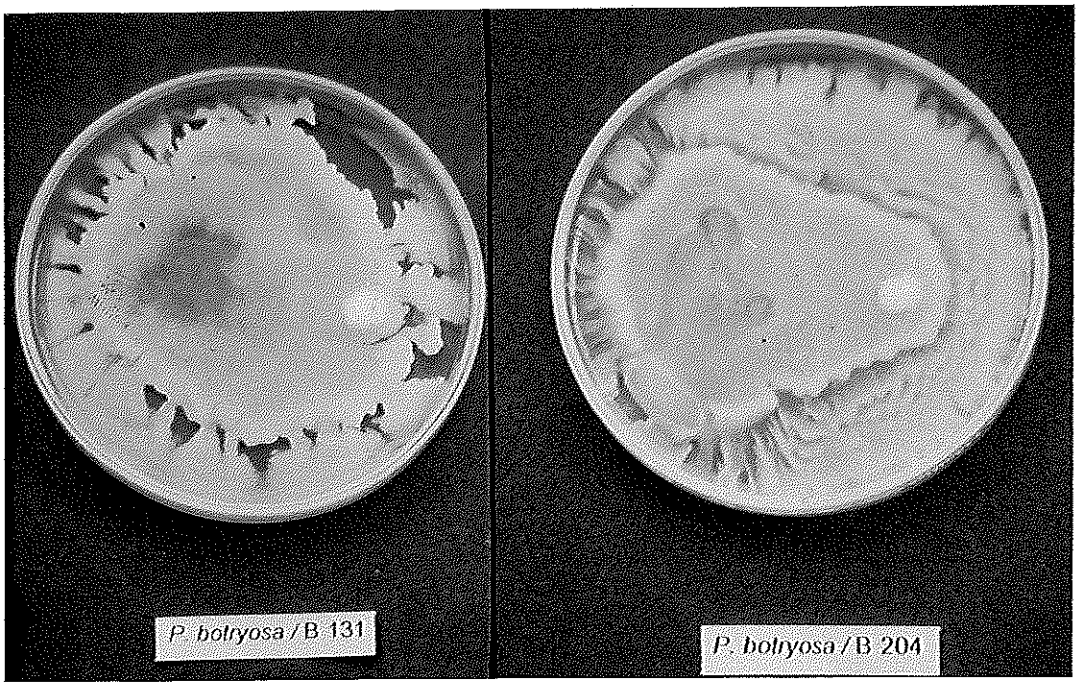
แบคทีเรียปฏิปักษ์	บริเวณใส (มม.)*
B102	6.3
B106	5.7
B114	5.8
B122	-
B131	-
B163	6.1
B166	5.8
B177	12.6
B185	7.6
B204	-
B205	-
B233	14.1
B234	5.1
B235	10.8
B242	7.6
B245	-
B307	19.9
B308	19.4
LSD $P < 0.05$	2.46

* วัดบริเวณใส (clear zone) หลังปลูกเชื้อ 7 วัน เป็นค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

\- ไม่เกิดบริเวณใสแต่แบคทีเรียเจริญอย่างรวดเร็ว ทำให้สายราไม่สามารถเจริญได้



ภาพที่ 8 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์กลุ่มที่เกิดเป็นบริเวณใส (clear zone)



ภาพที่ 9 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์กลุ่มที่เจริญเติบโตเร็ว

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* บนก้านใบยางพารา

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *P. botryosa* แบบ dual culture จำนวน 18 สายพันธุ์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของzoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* บนก้านใบยางพารา พันธุ์ RRIM 600 ทำการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการวัดความยาวแผล พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทำให้ความยาวแผลแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีจำนวน 15 สายพันธุ์ โดยมีความยาวแผลอยู่ในช่วง 0.96 ถึง 5.04 เซนติเมตร และมีจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่ความยาวแผลไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดควบคุม คือ B234 B114 และ B185 ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถยับยั้งการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* ตามความยาวแผลบนก้านใบยางพาราได้ 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายได้ดี มีความยาวแผลเล็กน้อย อยู่ในช่วง 0.96-2.48 ซม. ได้แก่ B163 B204 B166 B233 B308 B245 และB102 (ภาพที่ 10)

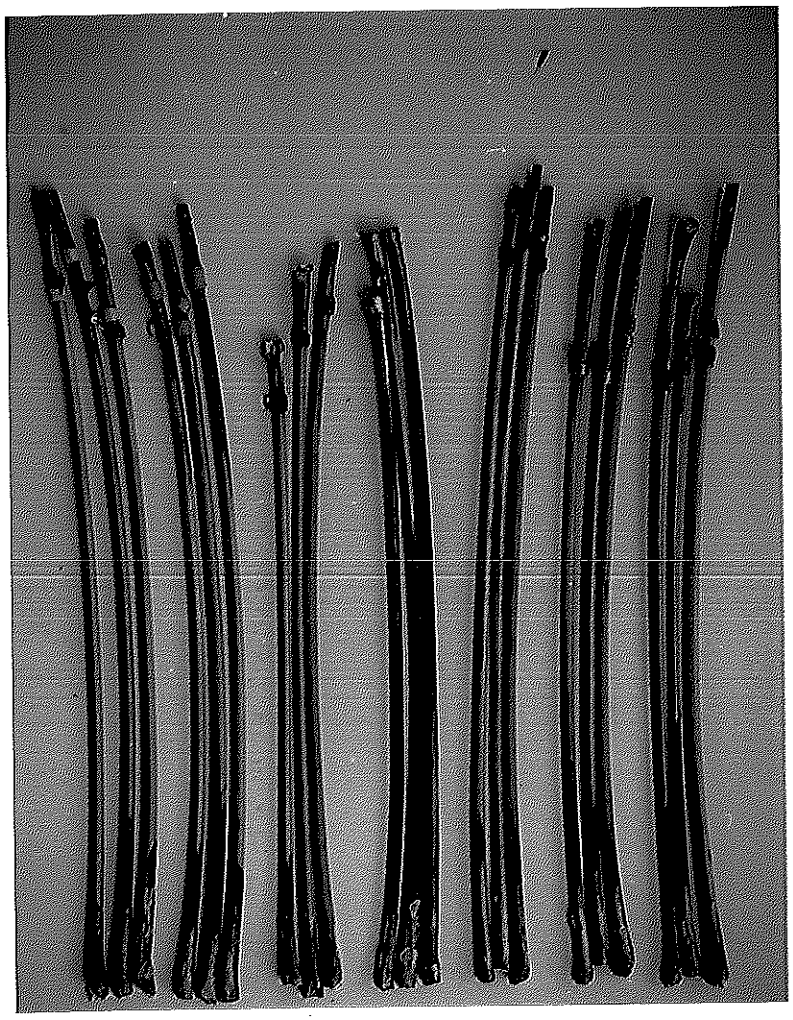
กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายได้ปานกลาง มีความยาวแผลปานกลาง อยู่ในช่วง 3.12-4.70 ซม. ได้แก่ B106 B205 B177 B122 B131 B242 B117 และ B235 (ภาพที่ 11)

กลุ่มที่ 3 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถยับยั้งการเข้าทำลายได้ มีความยาวแผลมาก อยู่ในช่วง 5.04-8.42 ซม. ได้แก่ B307 B234 B114 และ B185 (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเกิดโรคบนก้านยาง พันธุ์ RRIM 600 หลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *P. botryosa* 6 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์	ค่าเฉลี่ยความยาวแผล (ซม.)*	
Control	9.24	a
B185	8.42	ab
B114	6.72	abc
B234	5.38	abcd
B307	5.04	bcde
B235	4.70	bcde
B242	4.66	bcde
B131	4.22	bcde
B122	3.70	bcde
B177	3.56	bcde
B205	3.50	bcde
B106	3.12	bcde
B102	2.48	cde
B245	2.10	de
B308	2.10	de
B233	2.08	de
B166	2.00	de
B204	1.84	de
B163	0.96	e
CV (%)	54.57	

* ค่าเฉลี่ยความยาวแผลที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละวิธีการแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ภาพที่ 10 ลักษณะการควบคุมการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* ที่ผ่านการจุ่มด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์บนก้านยางพันธุ์ RRIM 600 ได้ดี (ความยาวแผลอยู่ในช่วง 0.96-2.48 ซม.)

ภาพที่ 11 ลักษณะการควบคุมการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* ที่ผ่านการจุ่มด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์บนก้านยางพันธุ์ RRIM 600 ได้ปานกลาง (ความยาวแผลอยู่ในช่วง 3.12-4.70 ซม.)

ภาพที่ 12 ลักษณะที่ไม่สามารถควบคุมการเข้าทำลายของzoosporeของเชื้อรา *P. botryosa* ที่ผ่านการจุ่มด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์บนก้านยางพันธุ์ RRIM 600 (ความยาวแผลอยู่ในช่วง 5.04-8.42 ซม.)

3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* บนใบยางพารา

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* แบบ dual culture จำนวน 18 สายพันธุ์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* บนใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ทำการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการวัดพื้นที่แผลที่ถูกทำลายโดยเปรียบเทียบกับพื้นที่แผลของชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อรา *P. botryosa* อย่างเดียว ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีพื้นที่แผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุม มีจำนวน 7 สายพันธุ์ เรียงลำดับจากน้อยไปหามาก คือ B166 B308 B204 B163 B131 B235 และ B233 ตามลำดับ โดยมีขนาดพื้นที่แผล คือ 1390 1441 1818 1834 2069 2114 และ 2241 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 9) โดยมีแบคทีเรียปฏิปักษ์ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ของเชื้อรา *P. botryosa* ได้ดีที่สุด มีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ B166 B308 B204 และ B163 โดยทำให้พื้นที่แผลลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง

ตารางที่ 9 พื้นที่แผลบนใบยางพันธุ์ RRIM 600 หลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *P. botryosa* 6 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์	ค่าเฉลี่ยพื้นที่แผล (มม.^{2})*
Control	3500 a
B185	3567 a
B114	3287 ab
B122	2733 abc
B102	2616 abc
B177	2584 abc
B242	2582 abc
B234	2548 abc
B205	2538 abc
B245	2440 abc
B307	2420 abc
B106	2382 abc
B233	2241 bc
B235	2114 bc
B131	2069 bc
B163	1834 c
B204	1818 c
B308	1441 c
B166	1390 c
CV (%)	28.77

* ค่าเฉลี่ยพื้นที่แผลที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละวิธีการ แสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลจากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราบนก้านใบยางพาราและใบยางพารา สามารถคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีได้จำนวน 6 สายพันธุ์ ซึ่งจะนำไปทดสอบประสิทธิภาพในสภาพเรือนทดลอง คือ B204 B131 B166 B308 B163 และ B233

4. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa* ของยางพาราในเรือนทดลอง

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากห้องปฏิบัติการ จำนวน 6 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบในสภาพเรือนทดลอง โดยวิธีการปลูกเชื้อกับพุ่มใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ประเมินผลโดยการวัดความยาวแผลบนก้านใบที่เป็นโรค โดยมีวิธีการปลูกเชื้อรา *P. botryosa* เพียงอย่างเดียวเป็นชุดควบคุม ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ มีค่าเฉลี่ยความยาวแผลต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่าค่าเฉลี่ยความยาวแผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 6 สายพันธุ์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เรียงลำดับจากน้อยไปหามาก (มม.) คือ B166 (0.63) B204 (0.90) B233 (1.93) B131 (2.04) B163 (3.70) และ B308 (4.5) ตามลำดับ

ผลจากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมการเกิดโรค โดยการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนการปลูกเชื้อรา *P. botryosa* 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยความยาวแผลบนก้านใบยางพารา ในวิธีการปลูกเชื้อก่อน 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถควบคุมการเกิดโรคในวิธีการปลูกเชื้อก่อน 1 วัน ได้ดีที่สุด รองลงมาคือวิธีการปลูกเชื้อก่อน 4 วัน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวิธีการปลูกเชื้อก่อน 7 วัน ที่มีผลในการควบคุมการเกิดโรคได้ไม่ดี (ตารางที่ 10 และภาพที่ 13)

ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *P. botryosa* ในเรือนทดลอง พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์บางสายพันธุ์ ได้แก่ B166 B204 B233 และ B131 มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* โดยเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์ B166 และ B204 มีความสามารถในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด (ภาพที่14 และ ภาพที่15)

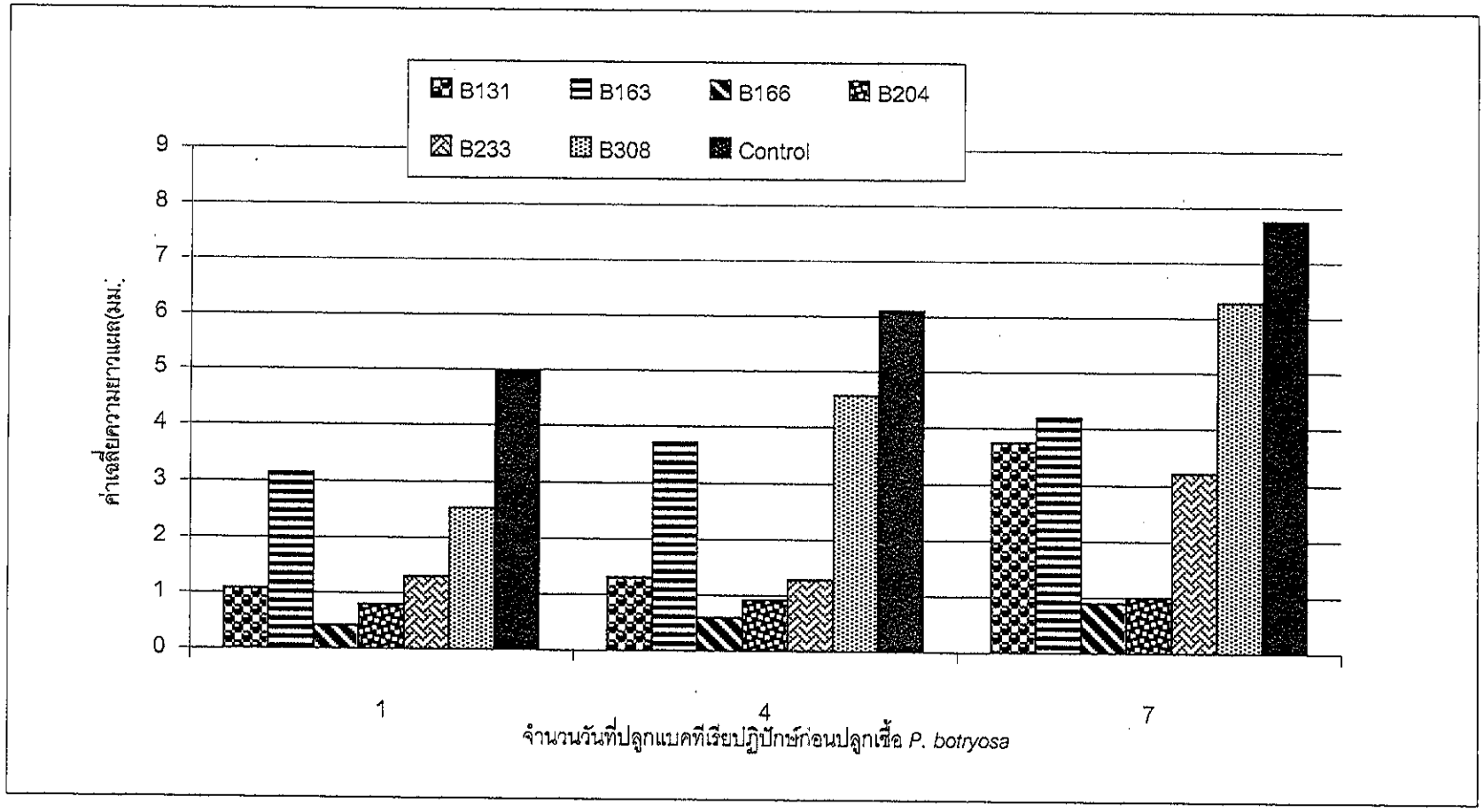
จากการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียวบนพุ่มใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่ทำให้เกิดโรคกับพุ่มใบยางพารา (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบความยาวแผลจากการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อรา *P. botryosa*บนฟุ่มใบยางพารา โดยการพ่นก่อนปลูกเชื้อรา 1 วัน 4 วัน และ 7 วัน

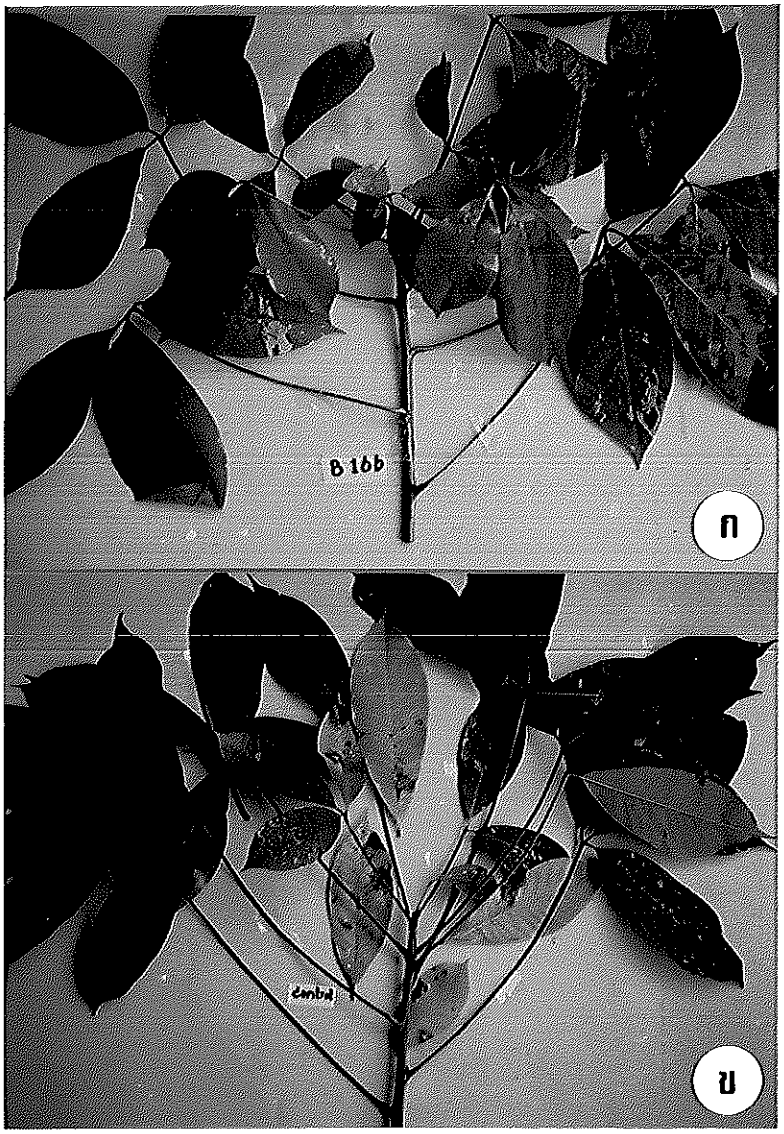
สายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์	ค่าเฉลี่ยความยาวแผล (มม.)			สายพันธุ์-เฉลี่ย
	1	4	7 (วัน)	
B 131	1.1	1.3	3.8	2.1 d
B 163	3.2	3.7	4.2	3.7 c
B 166	0.4	0.6	0.9	0.6 f
B 204	0.8	0.9	1.0	0.9 e
B 233	1.3	1.3	3.2	1.9 d
B 308	2.5	4.6	6.3	4.5 b
P. botryosa	5.0	6.1	7.6	6.9 a
วัน-เฉลี่ย*	2.0 c	2.6 b	4.0 a	

CV = 6.3%

* ค่าเฉลี่ยความยาวแผลระหว่างค่าเฉลี่ยของสายพันธุ์แบคทีเรียปฏิปักษ์ หรือระหว่างค่าเฉลี่ยของวันที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 13 ผลของการปลูกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 4 และ 7 วัน ก่อนการปลูกเชื้อ *P.botryosa* ต่อการควบคุมการเกิดโรคบนพุ่มใบยางพาราในเรือนทดลอง



ภาพที่ 14 ความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B166 ในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *P. botryosa* หลังพ่นเชื้อราสาเหตุบนพุ่มใบ 14 วัน

ก พ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนพ่นเชื้อราสาเหตุ 1 วัน

ข พ่นเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว

ภาพที่ 15 ความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ B 204 ในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *P. botryosa* หลังพ่นเชื้อราสาเหตุบนพุ่มใบ 14 วัน

ก พ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ก่อนพ่นเชื้อราสาเหตุ 1 วัน

ข พ่นเชื้อราสาเหตุอย่างเดียว

ภาพที่ 16 เปรียบเทียบลักษณะของพุ่มใบยางพาราที่พ่นเชื้อรา *P. botryosa* (ก) กับ พุ่มใบยางพาราที่พ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ B166 (ข)

5. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa*

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *P. botryosa* ในเรือนทดลอง จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ B 166 B 204 และ B 233 มาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรบนก้านใบยางพารา หลังจากพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 , 4 และ 7 วัน พบว่า จำนวนประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากพ่นเชื้อ 1 วัน มีจำนวนมากที่สุด และยังคงพบประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากพ่นเชื้อ 7 วัน แต่จำนวนประชากรน้อยกว่าประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากพ่นเชื้อ 1 และ 4 วัน สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ B 204 มีการเปลี่ยนแปลงประชากรไม่มากนัก (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 จำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนก้านยางหลังจากพ่นเชื้อ 1 4 และ 7 วัน

สายพันธุ์	จำนวนประชากรของเชื้อแบคทีเรีย (cfu./g)		
	หลังพ่น 1 วัน	หลังพ่น 4 วัน	หลังพ่น 7 วัน[ก]
B166	1.2×10^5	7.0×10^4	6.0×10^4
B204	2.3×10^5	1.7×10^5	1.4×10^5
B233	1.6×10^5	3.6×10^4	1.6×10^4

ก วันที่ตรวจสอบจำนวนภายหลังการพ่นเชื้อแบคทีเรีย

6. จำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa*

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa* จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ B131 B166 B204 และ B233 มาจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยศึกษาลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา การย้อมสี การเจริญเติบโตและความสามารถในการใช้อาหารเฉพาะ คุณสมบัติการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Schaad (1980) (ภาพที่ 17) และตรวจสอบรูปร่างโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด(SEM) (ภาพที่ 18)

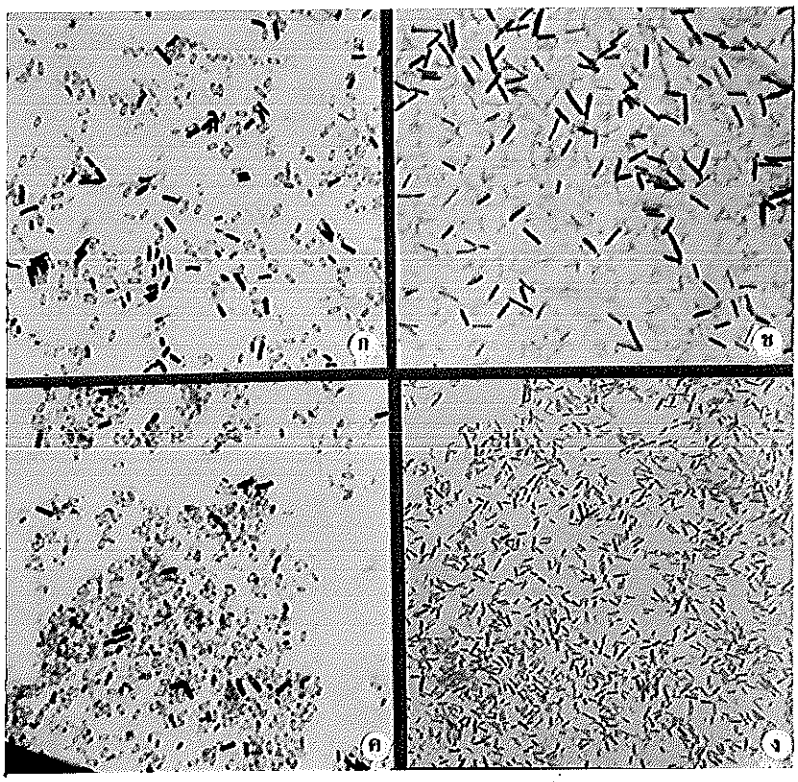
ผลจากการจำแนกได้แบคทีเรีย 2 สกุลคือ *Bacillus* sp. มีจำนวน 2 สายพันธุ์ (B131 และ B204) และ *Pseudomonas* sp. มีจำนวน 1 สายพันธุ์ (B233) สำหรับอีก 1 สายพันธุ์ ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (B166)

B131 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน มีขนาดความยาว 1-1.6 µm มีการสร้างendospore

B166 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน มีขนาดความยาว 2.5-3.3 µm

B203 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน มีขนาดความยาว 2-3 µm มีการสร้างendospore

B233 เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน มีขนาดความยาว 0.7-1 µm



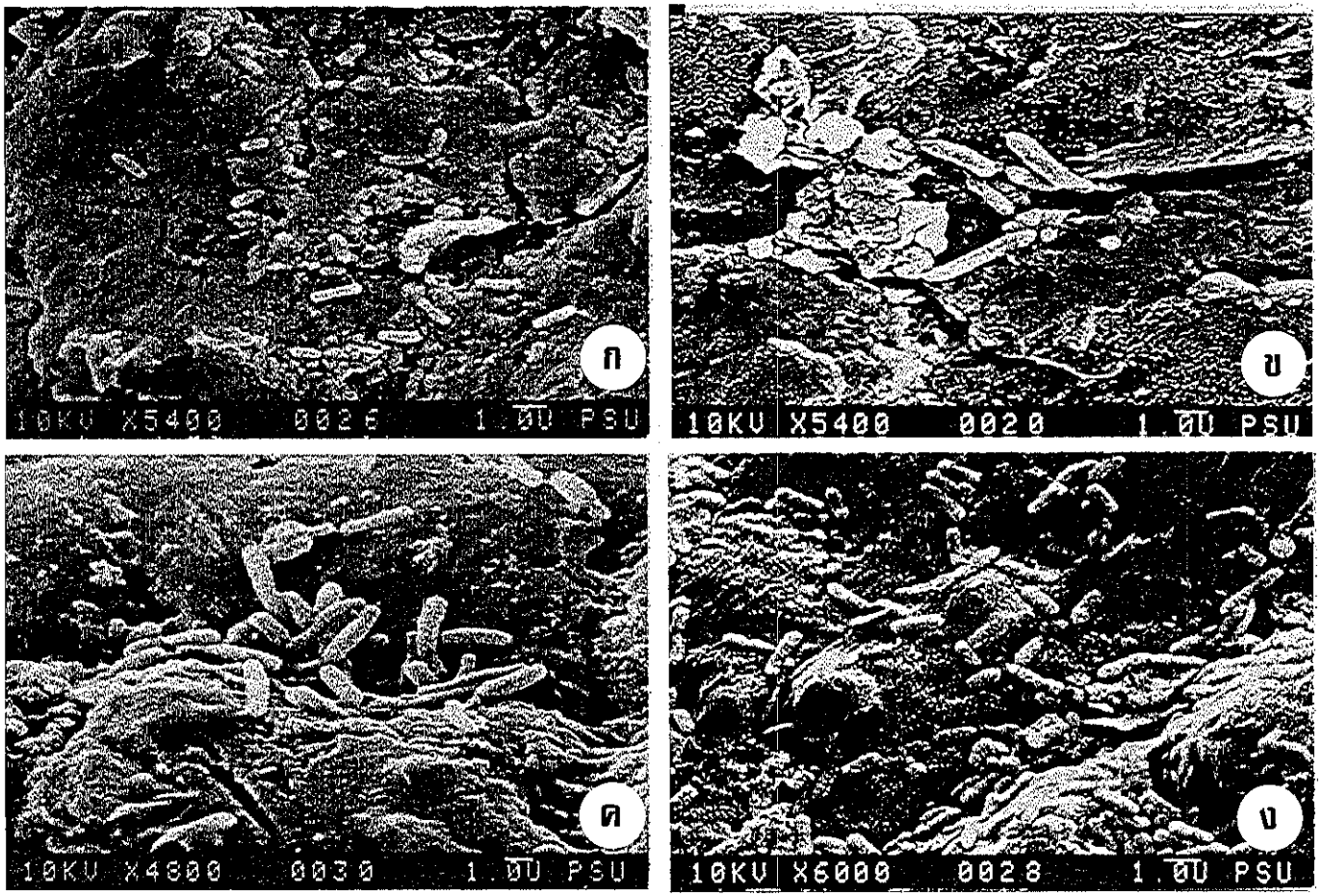
ภาพที่ 17 ลักษณะทางสัณฐานของเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยการย้อมสีแกรม

ก *Bacillus* sp. (B131)

ข Unidentified (B166)

ค *Bacillus* sp. (B204)

ง *Pseudomonas* sp. (B233)



ภาพที่ 18 ลักษณะทางสัณฐานของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ก *Bacillus* sp. (B131)
ข Unidentified (B166)
ค *Bacillus* sp. (B204)
ง *Pseudomonas* sp. (B233)

บทที่ 4

วิจารณ์

งานทดลองนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยพื้นฐาน ที่นำเอาวิธีการทางชีววิธีมาใช้ในการควบคุมโรคของยางพาราที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ซึ่งขั้นตอนในการศึกษาเริ่มจากการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินในสวนยางที่มีการเกิดโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* นำมาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. botryosa* ในสภาพห้องปฏิบัติการ และในสภาพเรือนทดลอง

การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียในดินจากสวนยางที่มีการเกิดโรคใบร่วง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่สวนยางจำนวน 17 แหล่ง ใน 7 จังหวัดของภาคใต้ ได้แบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 340 สายพันธุ์ มีรายงานไว้ว่าการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. ซึ่งเป็น soil-borne โดยชีววิธี ควรนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่ในดินปลูกยางมาใช้ในการทดลองควบคุม (Kochuthresiamma *et al.*, 1988) ทั้งนี้เนื่องจากแหล่งดังกล่าว จุลินทรีย์ปฏิปักษ์น่าจะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการระบาดของโรค การทดลองนี้จะทำการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดิน ทั้งนี้เนื่องจากมีรายงานว่าดินสวนยางเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์หลายชนิด เช่น Kochuthresiamma และคณะ (1988) รายงานว่าจากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากดินปลูกยางจากแหล่งต่าง ๆ ประเทศอินเดีย พบจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียมากกว่าเชื้อราและแอคติโนมัยซีส เช่นเดียวกันกับรายงานของ Subba Rao (1977) ที่พบว่าจุลินทรีย์ที่พบในดินสวนยางพาราเป็นแบคทีเรียจำนวนมาก นอกจากนั้น Hebbar และคณะ (1991) ยังรายงานว่ามีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพหลายตัว ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดซึ่งแยกได้จากใบ ราก และส่วนต่าง ๆ ของต้นพืช เชื้อที่แยกได้จากใบพืชส่วนใหญ่คือแอคติโนมัยซีส และแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนเชื้อที่แยกจากราก ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp. และ *Bacillus* sp. เป็นต้น ดังนั้นเพื่อให้มีโอกาสได้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มากขึ้น จึงควรแยกเชื้อปฏิปักษ์จากแหล่งต่าง ๆ เช่น ดินรอบราก (rhizosphere soil) ผิวราก (rhizoplane) ลำต้น และใบของยางพารา ในแหล่งปลูกยางพาราต่าง ๆ ทั่วภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อจะได้มีโอกาสได้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora botryosa* มากยิ่งขึ้น

การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากแบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 340 สายพันธุ์ นำมาคัดเลือกเบื้องต้นโดยวิธีทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. botryosa* โดยดูจากการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งวิธีนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้จำนวนมาก สะดวก รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายไม่มาก แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถทราบข้อมูลทางด้านชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งบางครั้งพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่สามารถสร้างสารปฏิชีวนะหรือสร้างได้เล็กน้อยเมื่ออยู่บนต้นพืช (Fravel, 1988) ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ, ความชื้นในสวนยาง และธาตุอาหารบนใบ มีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพในการป้องกันโรค จากการคัดเลือกพบแบคทีเรียจำนวน 18 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* และพบลักษณะการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเป็น 2 แบบคือ แบบยับยั้งการเจริญเติบโต โดยเกิดเป็นบริเวณใส (clear zone) จำนวน 13 สายพันธุ์ และแบบเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้เส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญได้ จำนวน 5 สายพันธุ์ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยอาศัยความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยจะทำได้ง่าย แต่แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เหมาะสมกับการนำไปควบคุมการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ควรเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยรวมทั้งสามารถทำลาย sporangium และยับยั้งการปลดปล่อย zoospore ของ sporangium ได้ด้วย แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่พบว่ามีการผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Phytophthora* sp. ได้แก่ *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Flavobacterium* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Malajczuk ,1983) จากการทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ในการทดลองนี้กับเส้นใยของเชื้อรา *P. botryosa* พบการเกิดบริเวณยับยั้งเป็นบริเวณใส และจากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการทดลองนี้ ก็พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* ก็อยู่ในสกุล *Bacillus* (สายพันธุ์ B204 และ B131) และ *Pseudomonas* (สายพันธุ์ B233) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Malajczuk, (1983)

หลังจากทำการคัดเลือกได้แบคทีเรียปฏิปักษ์หลายสายพันธุ์ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การนำไปทดสอบกับเนื้อเยื่อพืช ซึ่งอาจให้ผลในการต่อต้านหรือไม่ก็ได้ ขึ้นกับว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถเจริญและดำรงชีวิตอยู่บนเนื้อเยื่อพืช และแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถสร้างสารพิษหรือสารปฏิชีวนะในปริมาณที่เพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้บนเนื้อเยื่อพืชหรือไม่ (Baker *et al.*, 1983) จากการ

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. botryosa* ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนหนึ่งที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* และมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore บนก้านใบยางพารา และใบยางพารา เช่น B163 B166 B233 และ B308 ในทางตรงข้ามพบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์บางสายพันธุ์ ที่มี inhibition zone มาก แต่ความสามารถในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราบนเนื้อเยื่อไม่ดี อย่างเช่น แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B307 และ B106 ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าว่าการผลิตสารปฏิชีวนะ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ น่าจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาพที่แบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าบนเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นการจะใช้ประโยชน์แบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจในสภาพธรรมชาติ จึงน่าที่จะต้องศึกษาการผลิตสูตรตำรับซึ่งมีแหล่งพลังงานที่เหมาะสมเป็นส่วนประกอบเพื่อให้แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดีและสามารถควบคุมการเกิดโรคได้เช่นเดียวกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ และเมื่อพัฒนาสูตรตำรับจนดีและมีประสิทธิภาพแล้ว การนำไปใช้ควบคุมโรคใบร่วงโดยเกษตรกรจะมีความเป็นไปได้มากยิ่งขึ้น

จากการจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดี พบแบคทีเรีย 2 สกุลคือ *Bacillus* และ *Pseudomonas* แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ส่วนใหญ่มีการผลิตสารปฏิชีวนะ (Katz and Demain, 1977) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านทานเชื้อรา (Murray and Seddon, 1986) อย่างเช่น *Bacillus brevis* สามารถผลิตสาร Gramicidin S (Ovchinnikov and Ivanov, 1982) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของ conidia (Edwards and Seddon, 1992) *B. subtilis* ผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น Iturin จะออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราและยีสต์ (Gueldner *et al.*, 1988) surfactin เป็นสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Bernheimer and Avigad, 1970) แบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. fluorescens* สร้างสารปฏิชีวนะ Phenazin (Thomashaw *et al.*, 1990) นอกจากนั้น Malajczuk (1983) รายงานไว้ว่าสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดย *Bacillus* sp.และ *Pseudomonas* sp. มีฤทธิ์ยับยั้งการปลดปล่อย zoospore ของ sporangium ของเชื้อรา *Phytophthora cinnamomi, P. citrophthora, P. crytogea* และ *P. parasitica* ดังนั้นจึงควรทำการทดลองเพิ่มเติมในการสกัดและทดสอบสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. ที่แยกได้และมีประสิทธิภาพในการทดลองนี้เพื่อที่จะได้เข้าใจกลไกการยับยั้งเชื้อรา *P. botryosa* ได้ดียิ่งขึ้นอันจะนำไปสู่การใช้มาตรการทางชีววิธีที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสภาพเรือนทดลอง

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากสภาพห้องปฏิบัติการ จำนวน 6 สายพันธุ์คือ แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas* sp. (B233), unidentified (B163), unidentified (B166), *Bacillus* sp. (B204), *Bacillus* sp. (B131) และ unidentified (B308) มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *P. botryosa* ในสภาพเรือนทดลอง พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์บางสายพันธุ์ ของ *Bacillus* sp. ได้แก่ B 131 และ B 204 มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botyosa* ในเรือนทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B 204 และ B 131 คือ เชื้อ *Bacillus* sp. ที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora* sp. (Małajczuk, 1983) นอกจากนั้นเชื้อทั้งสองชนิดนี้ยังสามารถสร้างendospore (ภาพที่ 17ก และ17ค) ที่มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี น่าจะได้รับการพัฒนาในแง่ของการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบร่วงในสภาพแปลงต่อไปในอนาคต เนื่องจากโดยทั่วไปการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น จะทำการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนพืชก่อนที่เชื้อโรคจะเข้าทำลาย ดังนั้นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์โดยเฉพาะพวกแบคทีเรียควรมีความสามารถในการเจริญครอบครอง พื้นที่ผิวใบได้ดี เพื่อหาอาหารและเจริญเติบโตสามารถอยู่รอดในธรรมชาติ (นิพนธ์ ทวีชัย, 2538) ดังนั้นการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *Bacillus* sp. (สายพันธุ์ B204 และ B131) ที่มีการสร้างโครงสร้างที่สามารถอยู่อาศัยข้ามฤดู อันได้แก่ endospore ฉีดพ่นก่อนเกิดโรคน่าจะมีผลในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ได้ดีกว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์อื่น ๆ เช่น แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B166 ที่ไม่มีโครงสร้างดังกล่าว

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa*

จากระยะเวลาในการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 วัน, 4 วัน และ 7 วัน ก่อนการพ่นเชื้อรา *P. botryosa* พบว่าปริมาณของแบคทีเรียปฏิปักษ์มีจำนวนมากหลังจากพ่นเชื้อ 1 วัน และ 4 วัน ส่วนปริมาณของแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังพ่นเชื้อ 7 วัน พบจำนวนประชากรน้อยลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่สามารถคงและอยู่ขยายจำนวนได้มากในสภาพแวดล้อม ในลักษณะเช่นนี้ การควบคุมโรคจำเป็นต้องทำการพ่นซ้ำหลายครั้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* มีระยะเวลาการระบาดของโรคที่ยาวนานตลอดช่วงฤดูฝน และควรทำการพ่นก่อนที่เชื้อราจะเข้าทำลาย จากการศึกษาพบแบคทีเรียบางสายพันธุ์คือ B204 มีประชากรเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ B204 สามารถดำรงชีวิตและเจริญอยู่บนเนื้อเยื่อยางพาราได้ดีในสภาพแวดล้อมที่เหมาะกับการระบาดของโรคใบร่วงที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* ทั้งนี้เนื่อง

จากสายพันธุ์ B204 เป็นแบคทีเรียจำพวก *Bacillus* sp. ที่สามารถสร้าง endospore ที่มีความคงทนและสามารถอยู่ได้ในช่วงเวลาที่ยาวนาน ซึ่งการที่สายพันธุ์ B204 มีการเจริญได้รวดเร็ว เป็นผลทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. botryosa* ได้ ทำให้การเกิดโรคลดลง

สำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ยังไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ (B166) unidentified และ *Pseudomonas* sp. (B233) มีการเปลี่ยนแปลงประชากรหลังจากพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 4 วัน และ 7 วัน โดยมีปริมาณประชากรลดลงตามลำดับ แต่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีเช่นกัน(ตารางที่10) ทั้งนี้เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่อาจสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี แบคทีเรียปฏิปักษ์ลักษณะเช่นนี้ควรทำการพ่นซ้ำหลายครั้งตลอดช่วงระยะเวลาการระบาดของโรคที่ยาวนาน เพื่อป้องกันเชื้อรา *P. botryosa* เข้าทำลายใบที่เริ่มผลิออกมาใหม่ และเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับยับยั้งเชื้อราสาเหตุที่เพิ่มจำนวนขึ้นในสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมกับการระบาดของโรค (Dickinson, 1986)

บทที่ 5

สรุป

1. **การแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา *P. botryosa***

แยกเชื้อแบคทีเรียในดินจากสวนยางพารา โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่สวนยางจำนวน 17 แหล่ง ใน 7 จังหวัดทางภาคใต้ ได้แบคทีเรียจำนวน 340 สายพันธุ์ และสุ่มเก็บตัวอย่างก้านใบที่เป็นโรคใบร่วงของยางพันธุ์ RRIM 600 จากสวนยาง 7 แหล่งใน 7 จังหวัดทางภาคใต้ ได้เชื้อรา *P. botryosa* จำนวน 7 สายพันธุ์

2. **การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสภาพห้องปฏิบัติการ**

แบคทีเรียที่แยกได้จำนวน 340 สายพันธุ์ นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *P. botryosa* โดยวิธี dual culture พบแบคทีเรียจำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ B106, B114, B163, B166, B177, B185, B233, B234, B235, B242, B307 และ B308 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตโดยเกิดเป็นบริเวณใส (clear zone) และจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ B122, B131, B204, B205 และ B245 สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ทำให้เส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญได้

3. **การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์บนเนื้อเยื่อยางพาราในห้องปฏิบัติการ**

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 18 สายพันธุ์ ในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. botryosa* บนเนื้อเยื่อยางพารา โดยทดสอบบนก้านยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ได้ดี จำนวน 7 สายพันธุ์คือ B102, B163, B166, B204, B233, B245 และ B308 และทดสอบบนใบยางพาราพันธุ์ RRIM 600 พบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของ zoospore ได้ดีจำนวน 4 สายพันธุ์คือ B163, B166, B204 และ B308

จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. botryosa* บนเนื้อเยื่อยางพารา สามารถคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพได้จำนวน 6 สายพันธุ์คือ B131, B163, B166, B204, B233 และ B308

4. การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ในสภาพเรือนทดลอง

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากสภาพห้องปฏิบัติการ จำนวน 6 สายพันธุ์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อรา *P. botryosa* ในสภาพเรือนทดลอง พบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. botryosa* จำนวน 3 สายพันธุ์คือ B166, B204 และ B233

5. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *P. botryosa*

จากระยะเวลาในการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 4 และ 7 วันก่อนการพ่นเชื้อรา *P. botryosa* พบประชากรของแบคทีเรียจำนวนมากบนก้านยางหลังจากพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 และ 4 วัน และยังคงพบประชากรของแบคทีเรียบนก้านยางหลังพ่นเชื้อ 7 วัน แต่มีจำนวนประชากรน้อยลง

6. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดี จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ B131, B166, B204 และ B233 พบแบคทีเรีย 2 สกุลคือ *Bacillus* sp. มี 2 สายพันธุ์คือ B131 และ B204 และ *Pseudomonas* sp. มี 1 สายพันธุ์คือ B233 สำหรับสายพันธุ์ B166 ไม่สามารถจำแนกชนิดได้

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2538. การใช้คีโตเมียมควบคุมเชื้อสาเหตุทำให้เกิดโรคพืช. รายงานการประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช. โรงแรมรามาการ์เดน กรุงเทพมหานคร.หน้า 170-190.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2538. การผลิตและการประยุกต์ใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช.รายงานการประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช.โรงแรมรามาการ์เดน. กรุงเทพมหานคร.หน้า 151-169.

ณรงค์ สุจเร. 2536. การพัฒนาสวนยางพาราในประเทศไทย. เอกสารวิชาการเรื่องยาง. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. หน้า 7.

นิยม จิ้วจิ้น และ ฤกษ์ ศยามานนท์. 2513. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสภาพดินฟ้าอากาศกับการเกิดโรคใบร่วงของยางพาราในปีพ.ศ. 2512-2513. เอกสารทางวิชาการกองพืชพันธุ์กรมกสิกรรม หน้า 2.

นิรนาม. 2532. วัสดุปลูกและการปลูก. คำแนะนำวิชาการการปลูกสร้างสวนยาง, สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. หน้า 23-37.

นลินี จาริกภากร, พาณี หนูนิ่ม,บุญมี วารินสอาด, พิรุณ จันทรกุล และมนูญ เอนกชัย. 2534. การป้องกันกำจัดโรคข้าวโดยเชื้อบัคเตรี *Bacillus subtilis*. รายงานการสัมมนาทางวิทยาการความก้าวหน้าเทคโนโลยีชีวภาพ : การกสิกรรมและสิ่งแวดล้อม 12-14 พ.ย. 2534 โรงแรมเชียงใหม่ออร์คิด เชียงใหม่. หน้า 257-272.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยชีวภาพ. รายงานการประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช. โรงแรมรามาการ์เดน. กรุงเทพมหานคร. หน้า 112-124.

ประภา พัฒนกุล, นริสา จิโรจน์วณิชชากร, บัญญัติ สิทธิผล และพงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2529. การคัดพันธุ์ยางต้านทานโรคใบร่วงไฟทอปโทรา. รายงานประจำปี 2529.กลุ่มอารักขาพืช. ศูนย์วิจัยยางสงขลา. หน้า 2-6.

ประภา พัฒนกุล. 2540. โรคใบยางพารา. เอกสารประกอบการบรรยายแก่เจ้าหน้าที่นิคมสร้างตนเอง กรมประชาสงเคราะห์ ระหว่างวันที่ 17-21 มีนาคม 2540. หน้า 12-13.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2512. โรคของยางพาราที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา.วารสารกีฏวิทยาและโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 5(3): 61-66.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2520. การระบาดของโรคใบร่วงไฟทอปโทราของยางพาราในปี 2519. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 10(5): 427-436.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2521. การป้องกันและกำจัดโรคของยางพาราที่เกิดจากเชื้อไฟทอปโทรา. เอกสารสัมมนาวิชาการศูนย์วิจัยการยาง พฤศจิกายน 2521. หน้า 1-14.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2522. โรคและศัตรูยางพารา. เอกสารฉบับที่ 13 กันยายน 2522. ศูนย์วิจัยยางสงขลา. หน้า 24-33.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2523. โรคและศัตรูยางพาราในประเทศไทย ปี 2522. วารสารยางพารา 1(1) : 12-29.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2531. โรคยางพาราที่สำคัญทางเศรษฐกิจในปัจจุบันและอนาคต. รายงานการประชุมเรื่องสถานภาพยางพาราในปัจจุบันและแนวทางวิจัยและพัฒนาในทศวรรษหน้า. ณ สถาบันวิจัยยาง กรุงเทพมหานคร 22-25 สิงหาคม 2531. หน้า 66-78.

พิพัฒน์ เซี่ยงหลิว. 2540. ข้อสังเกตโรคใบร่วงของยางพาราในภาคใต้. ข่าวสารโรคพืช และจุลชีววิทยา 7(1):10-13.

เวท ไทยนุกูล. 2525. การสูญเสียเนื่องจากโรคใบร่วงของยางพารา. วารสารยางพารา 3(2) : 63-65.

ศูนย์วิจัยยางสงขลา.2541.กำลังการผลิตพันธุ์ยางและต้นยางชำถุงในเขตภาคใต้ตอนล่างปี 2541. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1.

สมพงษ์ สุขมาก. 2536. การปรับปรุงพันธุ์ยางพารา. เอกสารวิชาการเรื่องยาง. สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร.หน้า 15-36.

สถาบันวิจัยยาง. 2540. คำแนะนำพันธุ์ยางปี 2540. วารสารยางพารา 17(1):5-23.

สมคิด ดิสถาพร. 2540. การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 77-88.

อุบล คือประโคน, สมศักดิ์ เสียงก้อง และ สัญชัย ตันตยาภรณ์. 2520. เชื้อรา *Phytophthora* ชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 23 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 409-421.

Andrews J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Ann. Rev. Phytopathol. 30 : 603-635.

Baker, C.J., Stavely, J.R., Stavely, J.R., Thomas, C.A., Sasser, M., and Mac Fall, J.S.. 1983. Inhibitory effects of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on the development of rust pustules on bean leaves. Phytopathol. 73 : 148-1152.

Baker, K.F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 25 : 67-85.

Blakeman, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganism in relation to biological control. In Biological Control in the Phylloplane. Eds. C.E. Windels and S.E. Lindow. The American Phytopathol. Soc. St. Paul. Minnesota. pp. 6-30.

Boland, G.J. 1990. Biological control of plant diseases with fungal antagonists : challenges and opportunities. Canadian J. Pl. Path. 12 : 295-299.

Chee, K.H. 1968. Phytophthora leaf disease in Malaysia. Natural Rubber Conference. J. Rubb. Res. Inst. Malaya 21(1) : 79-87.

Chee, K.H., 1969 a . Variability of Phytophthora species from *Hevea brasiliensis*. Trans. Br. mycol. Soc. 52(3) : 425-436.

Chee, K.H. 1969 b. Leaf fall due to *Phytophthora botryosa*. Planters' Bull. 104 : 190-198.

Chee, K.H. 1985. Diseases of Hevea in south Bahia. Brazil, caused by *Phytophthora* sp. Planter ; 61 : 299-305.

Chee, K.H., and Wastie, R.L. 1970. Black pod disease of cacao. Planter , 46 : 294-297.

Cook, R.J., and Baker K.F. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathol. Soc., St. Raul, Minnesota. 539. pp.

Cook, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopathol. 31 : 53-80.

Dickinson, C.H. 1986. Adaptations of micro-organisms to climatic conditions affecting Acrial plant surfaces. In Cicrobiology of the Phyllosphere, Eds. N.J. Fokkema and J. van den Heuvel, Cambridge University Press, pp. 77-100.

Edwards, S.G. and Seddon, B. 1992. *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerca* on protected Chinese cabbage. In : Recent Advances in Botrytis Research. Eds K. Verhoeff, N.E. Malathrakis and B. Williamson. Pudoc Scientific Publisher, Wageningen. pp. 267-271.

Erwin, D.C. and Ribeiro O.K. 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. The American Phytopath. Soc. Minnesota, USA. 555 pp.

Hirano, S.S. and Upper, C.D. 1986. Temporal, spatial and genetic variability of leaf associated bacterial populations. In Microbiology of the Phyllosphere. Eds. N.J. Fokkema and J. van den Heuvel. Cambridge University Press. pp. 235-251.

Johnston, A. 1989. Diseases and pests.In Rubber Eds C.C. Webster & W.J. Baulkwill Longman Scientific & Technical: 419-458.

Jayarathnam, K., Jacob C.M., Idicula S.p. and Edathil. T.T. 1994. Incidence of abnormal leaf fall disease in clone RRIT 105 in traditional rubber growing areas, pp. 59-63. In Symposium on Disease of Hevea, 21-22 Nov. 1994. Inter. Rubb. Res.and Dev. Board, Cochin, India. pp. 59-63.

Katz, E and Demain, A.L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus* : chemistry, biogenesis and poossible functions. Bact. Rev. 41 : 449-474.

Kochuthresiamma, J., Kothandaraman, R. and Jacob, M. 1988. Actinomycetes population of rubber growing soils and its antagonistic activity against *Phytophthora meadii* (Mc Rae). Indian J. Nat. Rubb. Res. 1(1) : 27-30.

Lim, T.M. 1982. A forecasting system for use in the chemical control of Phytophthora leaf fall on plantation rubber in Malaysia (Abstr.). Workshop on Phytophthora diseases of tropical cultivates plants. Kerala India. pp.272.

Liyanage, N.I.S., and Wheeler, B.E.J. 1991. Survival of *Phytophthora meadii* in Sri Lanka soil. Pl. Pathol. 40 : 436-444.

Malajczuk, N. 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora*. In Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. Eds. D.C. Erwin, S. Bartnichi and P.H. Tsao. The American Phytopathol. Soc. St. Paul Minnesota. pp 197-218.

Mckeen, C.D., Reilly, C.C. and Pusey P.L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathol. 79 : 136-139.

Murray, T. and Seddon, B. 1986. Antibiotic-producing bacilli and biocontrol against fungal plant pathogens. J. App. Bact. 61 pp.

Oudemans, P., and coffey M.D. 1991. A revised systematics of twelve papillate Phytophthora species based on isozyme analysis. Mycol; Res. 95 : 1025-1046.

Ovchinnikov, Y.A. and Ivanov, V.T. 1982. The cyclic peptides : structures, conformation and function. In : The Protein. Eds. H. Neurath and R.L. Hill. Insterscience Publishers, New York. 5 : 310-642.

Peries, O.S. 1969. Studies on epidemiology of Phytophthora leaf disease on *Hevea brasiliensis* in Ceylon. J. Rubb. Res. Inst. Malaya 21 (1) : 73-78.

RRIM. 1979. Phytophthora diseases of rubber in peninsular Malaysia. Planters' Bull. 158 : 11-19.

Schaad, N.W. 1980. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The Amer. Phytopath. Soc. St. Paul, Minnesota. 72 pp.

Stamps, D.J. and Waterhouse, G.M. 1990. Revised Tabular Key to the Species of Phytophthora. C.A.B. Internat. Mycol. Inst. 33 pp.

Subba Rao, N.S. 1977. Soil Micro-organisms and Plant Growth. Oxford and IBH Publishing Company. New Delhi. 289 pp.

Sutton, J.C.and Peng, G. 1993. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in crop systems. Ann. Rev. Phytopathol. 31 : 156-159.

Tan, A.M. 1988. Stem and Panel Diseases. Rubb. Res. Inst. Malaysia, Lecture note : 15-18.

Thankamma, L. 1983. Phytophthora species on eight indigenous host species in south India and their pathogenicity on rubber. Indian Phytopathol. 36(1) : 17-23.

Thomashow, L.S. Weller, D.MI, Bonsall. R.F. and Pierson, L.S. 1990. Production of the antibiotic phenazine 1-carboxylic acid by fluorescent Pseudomonas species in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 908-912.

Tsao, P.H.,Chew-Chin, N. and Syamananda, R. 1976. Occurrence of *Phytophthora palmivora* on *Hevea* rubber in Thailand. Pl. Dis. Report. 59 : 955-958.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Pseudomonas agar F, (Difco)

Commercially available for King's B medium agar for *Psudomonas* sp. cultivation.

Proteose peptone # 3 (Difco)	20.0	g.
K_2HPO_4. 3 H2O	1.5	g.
$MgSO_4$. 7 H2O	1.5	g.
Agar	15.0	g.
Glycerol	15.0	g.
Distilled water	1000	ml.

Thornton's Standardized Agar

Agar	15.0	g.
K_2HPO_4	1.0	g.
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.2	g.
$CaCl_2$	0.1	g.
NaCl	0.1	g.
KNO_3	0.5	g.
Asparagine	0.5	g.
Mannitol	1.0	g.
Distilled water	1000	ml.

Nutrient agar

Beef extract	10.0	g.
Peptone	10.0	g.
NaCl	5.0	g.
Agar	2.0	g.
Distilled water	1000	ml.

Potato dextrose agar

Potato (peeled and sliced)	200.0	g.
Dextrose	20.0	g.
Agar	17.0	g.
Distilled water	1000	ml.

Lima bean agar (Difco)

Commercially available for *Phytophthora* sp. cultivation

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางนริสา จันทร์เรือง

วัน เดือน ปีเกิด 2 พฤศจิกายน 2501

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2524