



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

..... วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

ปริญญา

..... ปฐพีวิทยา

..... ปฐพีวิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์ดินในพื้นที่ปลูกหม่อนที่มีปัญหาโรครากเน่า

Microbial Diversity Under Root Rot Infested Area of Mulberry Cultivation

นามผู้วิจัย นางสาวบุษราคัม ผนังทอง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศวพร สุขผล, ประ.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์สุกมาศ พนิชศักดิ์พัฒนา, D.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สมภพ จงรวยทรัพย์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุเทพ ทองแพ, วท.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์ดินในพื้นที่ปลูกหม่อนที่มีปัญหาโรครากเน่า

Microbial Diversity Under Root Rot Infested Area of Mulberry Cultivation

โดย

นางสาวบุษราคัม สนิททอง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุษราคัม ฝนิกทอง 2554: ความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์ดินในพื้นที่ปลูกหม่อนที่มี
ปัญหาโรครากเน่า ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ปฐพีวิทยา) สาขาปฐพีวิทยา ภาควิชา
ปฐพีวิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศวพร สุกผล, ประ.ด.
127 หน้า

โรครากเน่าเป็นโรคระบาดที่สำคัญของหม่อน ซึ่งวัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อศึกษาความ
หลากหลายและคัดแยกเชื้อราและแบคทีเรียจากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่ที่เกิดการระบาดของโรค
รากเน่า เปรียบเทียบความแตกต่างของโครงสร้างประชากรเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรครากเน่า
และไม่เกิดโรครากเน่าในหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพล และผลของสมบัติทางกายภาพและ
ทางเคมีของดินหลังการจัดการดินต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรเชื้อราและแบคทีเรีย
บริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพล ทำการศึกษาโครงสร้างประชากรเชื้อราและ
แบคทีเรียด้วยเทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ร่วมกับการศึกษาสมบัติทาง
กายภาพและทางเคมีซึ่งมีบทบาทต่อการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ก่อโรคในพื้นที่ และทำการศึกษาความ
หลากหลายของประชากรเชื้อราและแบคทีเรียบริเวณรากของหม่อนพันธุ์คุณไพล และพันธุ์บุรีรัมย์ 60
ด้วยเทคนิค cloning พบว่า ในหม่อนทั้ง 2 พันธุ์ มีการเข้าอาศัยของเชื้อราและแบคทีเรียบริเวณราก
แตกต่างกัน โดยพบว่าบริเวณรากของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพลที่ไม่เป็นโรครากเน่ามี
แบคทีเรียประชากรหลัก คือ *Acidobacteria* และ *Microbacterium* ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์ของเชื้อราดิน
สาเหตุของโรครากเน่าและเมล็ดเน่า ส่วนความหลากหลายของประชากรเชื้อราในหม่อนทั้ง 2 พันธุ์ ที่
เป็นโรครากเน่ามีประชากรหลัก คือ *Pythium ultimum* และ *Fusarium solani* เป็นเชื้อสาเหตุของการ
เกิดโรครากเน่าและโรคเน่าคอดินในไม้ประดับและพืชเศรษฐกิจหลายชนิด

ผลการศึกษารูปแบบการเขตกรรมเพื่อลดโอกาสการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครากเน่า
ส่งผลให้สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดินเกิดการเปลี่ยนแปลง อีกทั้งยังส่งผลต่อการ
เปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของเชื้อราและแบคทีเรียบริเวณรากหม่อนในพื้นที่ที่มีการระบาดของ
โรครากเน่า นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย canonical correspondence analysis (CCA) พบว่าการ
จัดการดินโดยวิธีไม่ไถระเบิดดินดานและใส่ยิปซัมในอัตราคือ 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ ส่งผล
ให้ดินมีสภาพน้ำสูงชื้นและความหนาแน่นรวมของดินต่ำลง รวมทั้งค่าพีเอชในช่วง 5.5-5.9
มีแนวโน้มที่จะช่วยลดการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ก่อโรครากเน่าในหม่อนได้

Budsaracum Phaneukthong 2011: Microbial Diversity Under Root Rot Infested Area of Mulberry Cultivation. Master of Science (Soil Science), Major Field: Soil Science, Department of Soil Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Savaporn Supaphol, Ph.D. 127 pages.

Root rots are the major epidemic diseases affecting mulberry plants. This study is initiated with an aim to attain the appropriate cultivation techniques that will reduce environmental factors favoring the prevalence of the causative agents in the mulberry cultivation areas. In designing the experimental plots for the field studies, one of the major considerations was given to evaluating the effects of subsurface tilling against conventional tilling of the cultivation areas and within these parameters the biological controlling effects resulting from the inoculation and no inoculation of mycorrhizal fungi were investigated. Management of soil physical condition through applying gypsum to the experiment plots under study at the rate of 0, 200, 300 and 400 kg rai⁻¹ was also investigated. The diversity and the microbial community structure of the soil were determined using the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Analyses of the soil physical and chemical properties that affect the infection of the causative agents in the host plants in the areas under study were also performed.

Outcomes of the studies of the diversities of the community structures of fungi and bacteria at the rhizosphere of the mulberry of the Khunpai and Buriram 60 varieties using gene cloning techniques revealed that from the microbial community structures were different both varieties of mulberries. In healthy plants of both varieties, the predominant microbial strains encountered at their rhizosphere were bacteria belong to the genus of *Acidobacteria* and *Microbacterium*. These microorganisms strains are antagonistic to the root rots and seed rots of both varieties of mulberry plants. As for rhizosphere community structures of the mulberry plants infected with root rot diseases, the prevalent varieties of microorganisms encountered were *Pythium ultimum* and *Fusarium solani* which are found to be the major causative agents of root rots and stem rots of many varieties of ornamental plants and many plant varieties of economic significance. The outcome of this study indicates that certain activities aimed to reduced the opportunities for infection of the causative agents of root rot diseases in the host plants led to some changes in the physical and chemical structure of soil as well as the changes in the community structures of fungal and bacterial communities at the rhizosphere of mulberry plants in the root rot epidemic areas. Analysis using the canonical correspondence analytical technique indicates that conventional till soil management with application of gypsum at high level of up to 200, 300 and 400 kg rai⁻¹ resulted in higher water conductivity and lower bulk density of soil with an average pH range of 5.5-5.9 has a tendency to reduce the devastating effects of the root rot causative agents.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศวพร สุขผล ประธานกรรมการ ศาสตราจารย์ ดร.ศุภมาส พนิชศักดิ์พัฒนา ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง และดร. สมภพ จงรวยทรัพย์ กรรมการร่วม และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชลี สุทธิประการ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยในการสอบประมวลความรู้ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดลองการทดลอง ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำในเรื่องการเขียนและการวางแผนการทดลอง ตลอดจนการแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์และขอขอบคุณดร.พิทยากร ลิ้มทอง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการเขียนวิทยานิพนธ์ทำให้เล่มวิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตร ทุกท่านที่อนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ และเครื่องมือสำหรับการทดลองตลอดจนคำแนะนำในการทำการทดลองและขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาปฐพีวิทยาทุกคนที่คอยอำนวยความสะดวกให้ตลอดเวลาที่เรียนมา

ขอขอบคุณเพื่อน พี่และน้องที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางดินทุกคนที่เป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำช่วยเหลือและให้กำลังใจกันเสมอ

สุดท้ายขอขอบคุณครอบครัว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พ่อและแม่ ที่เป็นกำลังใจและบอกให้อดทนเมื่อพบกับช่วงเวลาที่ยากลำบาก และขอบคุณญาติพี่น้องทุกคนที่เป็นกำลังใจให้เสมอมา

บุษราคัม ฝืนิกทอง

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

| | หน้า |
|----------------------------|------|
| สารบัญ | (1) |
| สารบัญตาราง | (2) |
| สารบัญภาพ | (4) |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 3 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 34 |
| อุปกรณ์ | 34 |
| วิธีการ | 34 |
| ผลและวิจารณ์ | 53 |
| สรุปและข้อเสนอแนะ | 101 |
| สรุป | 101 |
| ข้อเสนอแนะ | 103 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง | 104 |
| ภาคผนวก | 120 |
| ประวัติการศึกษาและการทำงาน | 127 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 1 | พื้นที่การใช้ประโยชน์และศึกษาหม่อนในประเทศต่างๆ ทั่วโลก (x 1,000 ha) | 5 |
| 2 | อิทธิพลปุ๋ยที่มีต่อผลผลิตของใบหม่อน | 12 |
| 3 | สมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการของตัวอย่างดินแปลงทดลองปลูกหม่อน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม | 54 |
| 4 | ผลการจัดจำแนกจำนวน โคลนตัวอย่างดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ของประชากรแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปลูกหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่ | 66 |
| 5 | ผลการจัดจำแนกจำนวน โคลนของตัวอย่างดีเอ็นเอในส่วนของยีน 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ของประชากรเชื้อราจากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่ | 80 |
| 6 | ชนิดของแบคทีเรียเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) | 89 |
| 7 | ชนิดของแบคทีเรียเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไผ่ ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) | 89 |
| 8 | ชนิดของเชื้อราเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) | 90 |
| 9 | ชนิดของเชื้อราเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไผ่ ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) | 90 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่ | | หน้า |
|--------------|---|------|
| 1 | ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาดิน | 121 |
| 2 | ค่าการนำไฟฟ้า electric conductivity (EC) | 121 |
| 3 | ปริมาณของอินทรีย์วัตถุ (%) | 122 |
| 4 | ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%) | 122 |
| 5 | ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P; BrayII) | 123 |
| 6 | ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K; NH_4OAc) | 123 |
| 7 | ส่วนประกอบของอาหาร nutrient agar (NA) | 124 |
| 8 | ส่วนประกอบของอาหาร rose bengal agar (RB) | 124 |
| 9 | ส่วนประกอบของอาหาร LB agar | 125 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | หน้า |
|--------|------|
| 1 | 36 |
| 2 | 36 |
| 3 | 55 |
| 4 | 57 |
| 5 | 60 |
| 6 | 61 |
| 7 | 61 |
| 8 | 62 |
| 9 | 63 |

สารบัญญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 10 | ความสัมพันธ์ระหว่างโคลนและรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนยีน 16S ไรบโไซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ <i>Hae</i> III และ <i>Hha</i> I จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B) | 64 |
| 11 | ความสัมพันธ์ระหว่างโคลนและรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนยีน 16S ไรบโไซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ <i>Hae</i> III และ <i>Hha</i> I จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไผ่ เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B) | 65 |
| 12 | เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของแบคทีเรียในหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 จากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B) | 76 |
| 13 | เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของแบคทีเรียในหม่อนพันธุ์คุณไผ่ จากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B) | 76 |
| 14 | ความสัมพันธ์ระหว่างโคลนและรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนยีน 18S ไรบโไซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ <i>Hae</i> III และ <i>Hha</i> I จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B) | 78 |
| 15 | ความสัมพันธ์ระหว่างโคลนและรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนยีน 18S ไรบโไซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ <i>Hae</i> III และ <i>Hha</i> I จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไผ่ เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B) | 79 |
| 16 | เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของเชื้อราจากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 จากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B) | 83 |
| 17 | เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของเชื้อราจากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไผ่ จากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B) | 84 |

สารบัญญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 18 | ลักษณะรูปแบบโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (B) ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน (a) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซาและยิปซัมกิโกรัมต่อไร่, (b) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่, (c) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่, (d) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่, (e) ใส่ไมคอร์ไรซาไม่ใส่ยิปซัม, (f) ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่, (g) เท่ากับ ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่และ (h) ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่ พร้อมแสดงตำแหน่งที่มีการตัดเจลเพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (B1-B13) โดยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) ซึ่งกำหนดให้ M เท่ากับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) | 87 |
| 19 | ลักษณะรูปแบบโครงสร้างประชากรของเชื้อราในบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (B) ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน (a) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซาและยิปซัมกิโกรัมต่อไร่, (b) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่, (c) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่, (d) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่, (e) ใส่ไมคอร์ไรซาไม่ใส่ยิปซัม, (f) ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่, (g) เท่ากับ ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่และ (h) ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่ พร้อมแสดงตำแหน่งที่มีการตัดเจลเพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา (F1-F8) โดยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) ซึ่งกำหนดให้ M เท่ากับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) | 88 |
| 20 | ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (A) และเชื้อรา (B) จากดิน ริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (●) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (▲) ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA) | 91 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 21 | ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียจากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (B) ใน บริเวณที่มีการไถ (▲) และไม่ไถ ระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA) | 92 |
| 22 | ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรเชื้อราบริเวณรากของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (B) ในบริเวณที่มีการไถ (▲) และไม่ไถระเบิดดิน ดาน(△) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA) | 92 |
| 23 | ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (A) และเชื้อรา (B) จากดิน บริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ในพื้นที่ที่มีการจัดการดิน โดยการไถระเบิดดิน ดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) ร่วมกับค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) วิเคราะห์ด้วย โปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA) | 93 |
| 24 | ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (A) และเชื้อรา (B) จากดิน บริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพ ในพื้นที่ที่มีการจัดการดิน โดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) ร่วมกับค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA) | 93 |
| 25 | ข้อมูลแบคทีเรียเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดิน ดาน (▲) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA) | 94 |

สารบัญญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 26 | ข้อมูลแบคทีเรียเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ร่วมกับค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน(bulk density) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วย โปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA) | 95 |
| 27 | ข้อมูลเชื้อราเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ร่วมกับค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA) | 96 |
| 28 | ข้อมูลแบคทีเรียเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการใส่ยิปซัม 4 อัตรา คือ ไม่ใส่ยิปซัม (△), 200 กิโลกรัมต่อไร่ (▲), 300 กิโลกรัมต่อไร่ (▲) และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ (▲) วิเคราะห์ร่วมกับค่าพีเอช (pH) ค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA) | 97 |
| 29 | ข้อมูลเชื้อราเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการใส่ยิปซัม 4 อัตรา คือ ไม่ใส่ยิปซัม (△), 200 กิโลกรัมต่อไร่ (▲), 300 กิโลกรัมต่อไร่ (▲) และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ (▲) วิเคราะห์ร่วมกับค่าพีเอช (pH) ค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA) | 98 |

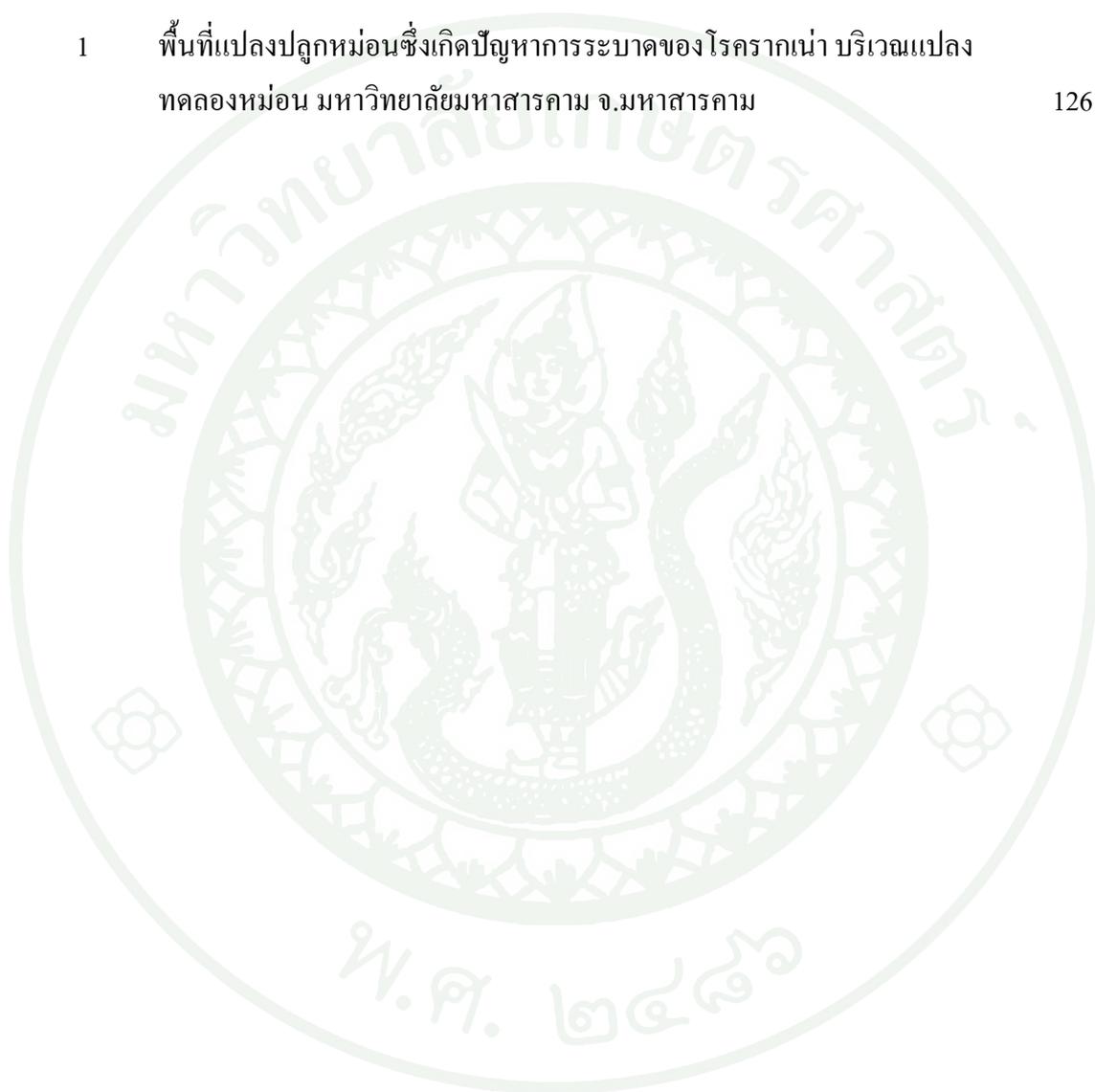
สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

- 1 พื้นที่แปลงปลูกหม่อนซึ่งเกิดปัญหาการระบาดของโรครากเน่า บริเวณแปลง
ทดลองหม่อน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม

126



ความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์ดินในพื้นที่ปลูกหม่อนที่มีปัญหาโรครากเน่า

Microbial Diversity Under Root Rot Infested Area of Mulberry Cultivation

คำนำ

หม่อน (*Morus* spp.) เป็นไม้ยืนต้นจำพวกไม้พุ่ม อยู่ในวงศ์ Maraceae มีลักษณะประจำพันธุ์ คือ มียาง ขนที่ใบและเส้นใย ใบมีรูปร่างแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ ใช้ประโยชน์ในการบริโภค เช่น ผลและใบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใบหม่อนใช้เป็นอาหารหลักในการเลี้ยงหนอนไหม (*Bombyx mori* Linn.) ในประเทศไทยมีการปลูกหม่อนกันอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ในปัจจุบันการปลูกหม่อนกำลังประสบปัญหาเกี่ยวกับการระบาดของโรคในหลายพื้นที่ เป็นผลให้เกิดการขาดแคลนใบหม่อนในการเลี้ยงไหมและการแปรรูป โรคของหม่อนที่สำคัญ ได้แก่ โรครากเน่า ราแป้งและราสนิม โรครากเน่าถือเป็นโรคระบาดที่สำคัญของหม่อน พบการระบาดได้ในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกหม่อน โดยเฉพาะในพื้นที่ที่เป็นดินร่วนปนทราย (sandy loam) เช่น จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น และมหาสารคาม เป็นต้น อาการของโรครากเน่าในหม่อน เริ่มจากอาการรากเน่า ใบจะเหี่ยวจากส่วนยอดลงมา และบางส่วนของใบจะไหม้คล้ายถูกน้ำร้อนลวก อาการไหม้จะลุกลามไปสู่ใบและส่วนล่างของกิ่ง จนกระทั่งตายในที่สุด เชื้อสาเหตุโรครากเน่าที่สำคัญในพืชชนิดต่างๆ รวมทั้งพืชในตระกูลเดียวกับหม่อน เช่น *Pythium* sp., *Fusarium* sp. และ *Rhizoctonia* sp. สำหรับโรครากเน่าของหม่อนในประเทศไทยนั้นยังไม่ทราบเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริง จากการศึกษาเบื้องต้นของกรมวิชาการเกษตร (2523) พบว่าเชื้อรา *Botryodiplodia* sp. เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าในหม่อน แต่เมื่อทำการทดสอบกลับพบว่า เชื้อชนิดนี้ไม่สามารถก่อโรครากเน่าในต้นหม่อนที่มีอายุ 3 ปีขึ้นไปได้ จากผลการทดลองโรครากเน่าขึ้นอยู่กับพันธุ์และช่วงอายุของหม่อน จากการศึกษายังพบว่าสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินมีผลต่อการส่งเสริมหรือยับยั้งการระบาดของโรคในพืช เช่น เมื่อความชื้นและอุณหภูมิสูงจะส่งเสริมให้เกิดการระบาดของโรครุนแรงมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การเจริญและเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคพืช ยังขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของดิน เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดมีความต้องการช่วงพีเอชที่แตกต่างกัน

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรครากเน่าของหม่อนในประเทศไทยมีอยู่น้อย ทำให้ไม่สามารถระบุเชื้อสาเหตุและปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม ที่มีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าในหม่อนได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่มีการระบาดของโรครากเน่า จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการระบุสาเหตุของการเกิดโรครากเน่าได้ งานวิจัยในครั้งนี้เน้นศึกษาความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียบริเวณรากหม่อนในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรครากเน่า ดำเนินการศึกษาได้ 2 วิธี คือ การคัดแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ และการศึกษาความหลากหลายของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ทั้งนี้ การศึกษาด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลสามารถบอกความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้มากกว่า การคัดแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเลือกใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่มีความเหมาะสม สามารถทำให้การศึกษาความหลากหลายเป็นไปตามวัตถุประสงค์ เพื่อนำผลจากการศึกษาวิจัยไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดการระบาดของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าในหม่อนต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายและคัดแยกเชื้อราและแบคทีเรียจากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่ที่เกิดการระบาดของโรครากเน่า
2. เปรียบเทียบความแตกต่างของโครงสร้างประชากรเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าและไม่ก่อให้เกิดโรครากเน่าในหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่
3. ผลของสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของดินหลังการจัดการดินต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรเชื้อราและแบคทีเรียบริเวณรากของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่

การตรวจเอกสาร

1. หม่อนและพื้นที่การปลูกหม่อนทั่วโลก

1.1 หม่อนและการปลูกหม่อนทั่วโลก

หม่อน เป็นพืชที่มีการกระจายอยู่ทั่วโลกและมีการนำหม่อนแต่ละส่วนไปใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย (ตารางที่ 1) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus* spp. เป็นไม้ยืนต้นจำพวกไม้พุ่ม อยู่ในวงศ์ Maraceae มีลักษณะประจำพันธุ์คือ มียาง มีขนที่ใบ มีเส้นใย ใบมีรูปร่างแตกต่างกัน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548) เป็นพืชประเภท Dioecious คือลักษณะของดอกที่เกสรเพศผู้และเพศเมียแยกต้นกันทำให้เกิดการผสมพันธุ์ข้ามต้น แต่บางพันธุ์มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียในต้นเดียวกัน เมื่อดอกตัวเมียได้รับการผสมจะเปลี่ยนไปเป็นผล เรียก Sorosis ประกอบด้วยเมล็ดเล็กๆ จำนวนมาก เมื่อนำไปขยายพันธุ์จะเกิดการกลายพันธุ์ที่แตกต่างจากหม่อนพันธุ์พ่อแม่และสามารถเจริญได้ดีตั้งแต่เขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน (วีระ, 2534)

ในทวีปเอเชียพบพันธุ์ของหม่อนสกุล *Morus* ทั้งหมด 68 ชนิดและถือเป็นสกุลสำคัญ (Datta, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศจีนมีการปลูกหม่อนสกุลหลัก 4 ชนิด คือ White mulberry (*Morus alba*), Lu mulberry (*M. multicaulis*), Mountain mulberry (*M. bombycis*) และ Guangdong mulberry (*M. atropurpurea*) (Huo, 2000) ทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์หม่อนที่ปลูกมากกว่าหนึ่งพันชนิด ในประเทศอินเดีย พบว่านิยมปลูกหม่อนพันธุ์ *M. indica*, *M. alba*, *M. serrata* และ *M. laevigata* โดยมีการปลูกมากทางตอนเหนือของประเทศ (Ravindran *et al.*, 1997) ในสหภาพโซเวียตพันธุ์หม่อนที่พบมากที่สุดคือ *M. multicaulis*, *M. tartarica* และ *M. nigra* (Datta, 2001) ประเทศอินโดนีเซีย พบ 7 พันธุ์คือ *M. alba* (varieties *tartarica* และ *macrophylla*), *M. nigra*, *M. multicaulis*, *M. australis*, *M. cathayana* และ *M. miorovra* (Katsumata, 1972) ในประเทศเวียดนามพบหม่อนสกุล *Morus* มากกว่า 100 พันธุ์ โดยพันธุ์ที่สำคัญ คือ *M. alba*, *M. nigra* และ *M. laevigata* (Katsumata, 1973) และจากการรายงานของ Ammal (1960) พบว่า *M. rubra* เป็นหม่อนเพียงพันธุ์เดียวที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองของอเมริกา แต่พันธุ์หม่อนที่ได้รับความนิยมที่สุดในโลกก็คือ *M. alba* และ *M. indica*

ตารางที่ 1 พื้นที่การใช้ประโยชน์และศึกษาหม่อนในประเทศต่างๆ ทั่วโลก (x 1,000 ha)

| | Country | Area | Utilization | | | | Research | | |
|---------|-----------------------|--------|-------------|-------|--------|----------------|----------|--------|------|
| | | | Silk | Fruit | Forage | Other* | Agr. | Breed. | Feed |
| Africa | Egypt and Tunisia | n.a.** | √ | √ | | | √ | | |
| | Ethiopia | n.a. | √ | | | | √ | | |
| | Kenya | n.a. | √ | | √ | | √ | | √ |
| | Madagascar | n.a. | √ | | | | √ | | |
| | Tanzania | n.a. | | | √ | | | | √ |
| | Argentina and Bolivia | n.a. | | | | √ ¹ | | | |
| | Brazil | 38 | √ | | √ | | √ | √ | √ |
| | Colombia | n.a. | √ | | √ | | √ | | |
| America | Costa Rica | n.a. | | | √ | | √ | | √ |
| | Cuba | <1 | | | √ | | √ | | √ |
| | Dominican Rep. | <1 | | | √ | | | | |
| | El Salvador | <1 | | | √ | | | | √ |
| | Guatemala | n.a. | | | √ | | | | √ |
| | Honduras and Panama | <1 | | | √ | | | | |
| | Mexico | <1 | √ | √ | √ | √ ¹ | √ | | √ |
| | Panama | <1 | | | √ | | | | |
| | Peru | n.a. | | | | √ ¹ | | | |
| | Saint Vincent | <1 | | | √ | | | | |
| | United States | n.a. | | | | √ ¹ | | | √ |
| | Afghanistan | n.a. | | | √ | | | | |
| | China | 626 | √ | | | √ ² | √ | √ | |
| Asia | India | 280 | √ | | √ | √ ³ | √ | √ | √ |
| | Indonesia | n.a. | √ | | | | | | |
| | Japan | n.a. | √ | √ | √ | √ ² | √ | √ | √ |
| | Korea | n.a. | √ | | √ | | √ | √ | |

ตารางที่ 1 (ต่อ)

| | Country | Area | Utilization | | | | Research | | |
|--------|------------------------------------|------|-------------|-------|--------|----------------|----------|--------|------|
| | | | Silk | Fruit | Forage | Other* | Agr. | Breed. | Feed |
| | Kyrgyzstan | n.a. | √ | √ | | | √ | | |
| | Malaysia | n.a. | √ | | | | √ | | |
| | Pakistan | n.a. | √ | | √ | | √ | | |
| | Philippines | n.a. | √ | | | | √ | | |
| Asia | Syrian Arab Republic and Turkey | n.a. | | √ | | | | | |
| | Tajikistan | n.a. | √ | | | | √ | | |
| | Turkmenistan | n.a. | √ | √ | | | √ | | |
| | Viet Nam | n.a. | √ | | √ | | √ | √ | |
| | Bulgaria | n.a. | | | | | √ | | |
| Europe | France | n.a. | | | √ | √ ¹ | √ | √ | |
| | Greece | n.a. | | | | √ ¹ | | | |
| | Italy | n.a. | | | | √ ¹ | √ | √ | |
| | Poland | n.a. | | | | | √ | | |
| | Spain | n.a. | | | | √ ² | | | |

หมายเหตุ * Other uses **Data not available

¹ Landscaping and gardening ² Medicinal and infusion ³ Handicrafts and cabinet work

ที่มา: Sánchez (2000)

1.2 การใช้ประโยชน์ของหม่อนในประเทศไทย

ในประเทศไทยมีการนำหม่อนมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน จึงมีการรวบรวมประโยชน์ของหม่อนจาก กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2548) คือ

อาหารหนอนไหม

ใบหม่อนมีปริมาณโปรตีน 22.6 คาร์โบไฮเดรต 42.2 ไขมัน 4.6 ความชื้น 6.6 เส้นใย และเถ้า 24.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นพืชอาหารที่ดีที่สุดสำหรับหนอนไหม (*Bombyx mori* Linn.) เนื่องจาก หนอนไหมสามารถเปลี่ยน โปรตีนจากหม่อนให้เป็นเส้นใยได้ดีกว่าพืชอื่นๆ ในปัจจุบันการทำ อุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมจึงต้องมีการปลูกหม่อนควบคู่กันไปด้วย

พืชสมุนไพร

จากการศึกษาสารอัลคาลอย deoxynojirimycin (DNJ) จากส่วนเปลือกกรากหม่อน *Morus nigra* ได้นำมาผลิตยาชื่อ Homonojirimycin เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน ซึ่ง Fischer *et al.* (1995) จากมหาวิทยาลัยฮ็อกฟอร์ด รายงานว่า butyl DNJ มีผลต่อการยับยั้งโรคเอดส์ ผลการ ทดลองในสัตว์สามารถใช้ได้ผลดีในระดับหนึ่ง โดย DNJ ที่มีคุณสมบัติทางเคมีคล้ายกับกลูโคส จะ ไปเพิ่ม โมเลกุลของน้ำตาลที่ผิวด้านนอกของเชื้อ HIV เกิดการขัดขวางการเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อ HIV

อาหารและเครื่องดื่มมนุษย์

ในทวีปยุโรป ออสเตรเลียและอเมริกาเหนือ นิยมปลูกหม่อนไว้เป็นไม้ประดับและ รับประทานผล ซึ่งหม่อนพันธุ์ลูกผสมที่ให้ผลผลิตใบสูงและให้ผลที่มีขนาดใหญ่ คือ พันธุ์ริรัมย์ 60 และนครราชสีมา 60 ชาวญี่ปุ่นจะนำยอดหม่อนและใบหม่อนมาทำชา จากการศึกษากอง Tsushida

et al. (1987) พบสาร gamma-aminobutyric acid ในใบหม่อนได้พัฒนามาเป็น “Gabaron Tea” เพื่อ ใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูงในเวลาต่อมา

สารป้องกันกำจัดโรคพืช

Akira *et al.* (1978) พบว่าเนื้อเยื่อของกิ่งหม่อนบริเวณ cortex และ xylem สร้างสาร phytoalexins (PA) มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา จึงทำให้หม่อนมีความสามารถในการต้านทาน ต่อเชื้อราบางชนิด เช่น *Stigming mori* และ *Fusarium solani* เป็นสาเหตุทำให้กิ่งหม่อนแห้งตาย

และพบว่าสารออกฤทธิ์ prenylflavon compound ที่สกัดได้จากส่วน epidermal cells ของลำต้นและรากหม่อน เช่น luwanon C, morucin, albanin A-H และ albufuran A-B สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Rosellinia necatrix* สาเหตุของโรครากขาวของหม่อนได้

อาหารสัตว์

ใบหม่อนนอกจากเป็นอาหารของหนอนไหมดังที่กล่าวมาในข้างต้น ยังสามารถนำมาใช้เป็นอาหารในสัตว์ประเภทเคี้ยวเอื้อง และสัตว์ขนาดเล็ก เช่น กระต่ายและแพะได้อีกด้วย (Sánchez, 2000)

1.3 พันธุ์ของหม่อนที่ได้รับการรับรองจากกรมวิชาการเกษตร

จากข้อมูลของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2548) ได้รวบรวมพันธุ์หม่อนที่ได้รับการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ให้เหมาะสมกับการให้ผลผลิตแก่เกษตรกรทั้งหมด 5 พันธุ์ ดังนี้

พันธุ์นครราชสีมา 60

ลักษณะเด่นของพันธุ์ คือ เจริญเติบโตได้ดีในสภาพพื้นที่ทั่วไป ลักษณะใบนุ่ม หนาปานกลาง ใบมีคุณค่าทางอาหารสูง ทรงต้นตั้งตรง ด้านทานต่อโรคราแป้งได้ดี และด้านทานเพลี้ยได้ระดับปานกลาง ข้อจำกัดของพันธุ์ คือ ท่อนพันธุ์ออกรากยาก ควรขยายพันธุ์ด้วยวิธีติดตาลงบนต้นต่อหม่อนพันธุ์ที่ออกรากง่าย ผ่านการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรเมื่อเดือนตุลาคม 2530 ใช้ชื่อย่อ “นม. 60”

พันธุ์บุรีรัมย์ 60

ลักษณะเด่นของพันธุ์ คือ มีการเจริญเติบโตและตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดี ใบมีขนาดใหญ่ หนา อ่อนนุ่ม ทรงต้นตั้งตรง ด้านทานต่อโรคใบด่าง และทนทานต่อโรคราแป้งได้พอสมควร ข้อจำกัดของพันธุ์ คือ ไม่เหมาะสมกับการปลูกในพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ หรือปริมาณน้ำฝนไม่เพียงพอ ผ่านการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรเมื่อเดือนตุลาคม 2530 ใช้ชื่อย่อ “บร. 60”

พันธุ์บุรีรัมย์ 51

ลักษณะเด่นของพันธุ์บุรีรัมย์ 51 คือ ปลูกได้ในทุกสภาพพื้นที่ ทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งได้ดีกว่าพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ใบมีความอ่อนนุ่ม ก้านใบสั้น มีข้อปล้องถี่ ทรงต้นตั้งตรง ด้านทานต่อโรคใบด่างปานกลาง กรมวิชาการเกษตรให้เป็นพันธุ์หม่อนแนะนำ เมื่อวันที่ 3 มิถุนายน 2541 ใช้ชื่อย่อ “บร. 51”

พันธุ์ศรีสะเกษ 33

ลักษณะเด่นของพันธุ์ศรีสะเกษ 33 คือ ด้านทานต่อโรคใบด่างได้ดีกว่าพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และนครราชสีมา 60 มีข้อจำกัด คือ ท่อนพันธุ์ออกรากยาก ในการขยายพันธุ์ด้วยท่อนพันธุ์จึงต้องใช้สารกระตุ้นการงอกราก กรมวิชาการเกษตรรับรองเป็นพันธุ์หม่อนแนะนำ เมื่อวันที่ 30 กันยายน 2541 ใช้ชื่อย่อ “สก. 33”

นอกจากพันธุ์หม่อนที่ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรแล้ว ในประเทศไทยยังมีหม่อนพันธุ์พื้นเมืองอีกหลายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อใช้เป็นต้นพันธุ์ เนื่องจากมีความทนต่อสภาพแวดล้อมสูง เช่น หม่อนน้อย หม่อนดำ หม่อนสร้อย หม่อนไผ่ หม่อนหมี หม่อนจาก หม่อนสา หม่อนหยวก หม่อนไบมน หม่อนไบโพธิ์ หม่อนแม่ลูกอ่อน หม่อนแก้วขนบท หม่อนแก้วอุบลและหม่อนบางชื่อ ซึ่งการเรียกชื่อของหม่อนแต่ละพันธุ์แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น (วิระ, 2534) ในที่นี้จะยกตัวอย่างหม่อนพันธุ์พื้นเมืองที่เกษตรกรนิยมปลูกดังนี้

หม่อนน้อย

เป็นหม่อนที่ให้ดอกเพศผู้ มีกิ่งขนาดใหญ่ ตามาก ลักษณะใบหนา เป็นมัน สีเขียวแก่คล้ายใบโพธิ์ ลักษณะเด่นของพันธุ์นี้คือ ทนแล้ง สามารถขยายพันธุ์ได้ง่ายโดยการใช้กิ่งปักชำ สามารถให้ผลผลิต 1,500-2,000 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ลักษณะด้อยคือ ไม่ต้านทานต่อโรครากเน่า

หม่อนสร้อย

เป็นหม่อนให้ดอกเพศผู้ กิ่งแตกแขนง มีขนาดใหญ่ ใบมีทั้งลักษณะขอบเรียบและขอบเว้า ใบบาง เที่ยวเร็ว ผิวใบสากมือ ทนแล้ง สามารถให้ผลผลิตได้ 2,000 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี

หม่อนไผ่

เป็นหม่อนเพศเมีย กิ่งขนาดปานกลาง ลำกิ่งอ่อนโค้ง ใบมีลักษณะเว้า พื้นที่ใบน้อย ใบบางสากมือ ให้ผลผลิตต่ำ เหมาะสำหรับปลูกเป็นต้นตอ เนื่องจากมีความต้านทานต่อโรครากเน่า

หม่อนคุณไพ

เป็นหม่อนเพศเมีย กิ่งมีขนาดใหญ่ ไม่ค่อยมีกิ่งแขนง ลักษณะขอบใบโดยมากไม่เว้า ด้านข้าง ขอบใบมีลักษณะเป็นคลื่น ใบบาง โดยเฉพาะส่วนยอด ใบเมื่ออยู่บนต้นจะเหยียดง่ายในช่วงแดดจัด ไม่ทนแล้ง ให้ผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรครากเน่า

1.4 การปลูกหม่อน

ในการปลูกหม่อนนั้น สถาบันวิจัยหม่อนไหม (2535) ได้รวบรวมปัจจัยในการปลูกหม่อนซึ่งต้องมีการพิจารณาร่วมกันหลายปัจจัย ดังนี้

การเลือกพื้นที่ปลูก

หม่อนสามารถเจริญเติบโตได้ดีในที่ดอนน้ำไม่ขัง หม่อนสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนปนทรายจนถึงดินเหนียวที่มีความอุดมสมบูรณ์ หน้าดินลึก ระบายน้ำได้ดีในฤดูฝน เก็บน้ำได้ดีในหน้าแล้ง ดินไม่เป็นกรดหรือด่างจัดจนเกินไป หรือค่าพีเอชของดินอยู่ระหว่าง 6.0-6.5

การเตรียมดิน

ไถดิน เพื่อพลิกหน้าดิน ตากแดดไว้ 2-3 วัน ทำการไถอีกครั้งเพื่อกำจัดแมลงศัตรูและควบคุมจุลินทรีย์ เชื้อโรค และวัชพืช จากนั้นใส่ปุ๋ยอินทรีย์ ไร่ละประมาณ 1,200 กิโลกรัม เพื่อปรับปรุงสมบัติดินทางกายภาพและชีวภาพ แล้วไถกลับ กำหนดระยะปลูกให้เหมาะสมเพื่อเตรียมปลูก

ระยะปลูก

ระยะปลูกของหม่อนจะแตกต่างจากการปลูกพืชชนิดอื่นๆ เนื่องจากหม่อนเป็นพืชใช้ประโยชน์จากใบ การกำหนดระยะปลูกต้องคำนึงถึงทิศทาง ควรปลูกจากทิศเหนือไปยังทิศใต้ เพราะต้นหม่อนจะได้รับแสงแดดตลอดวัน นอกจากนี้ยังคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ถ้าดินมีความอุดมสมบูรณ์ดี ระยะปลูกหม่อนควรกว้าง เพื่อต้นหม่อนจะสามารถเจริญเติบโตแตกกิ่งก้านได้เต็มที่ ถ้าเป็นหม่อนที่แตกกิ่งก้าน ระยะปลูกควรจะห่างกันเพื่อต้นหม่อนจะได้แตกกิ่งก้านได้สะดวก

ระยะเวลาการปลูกหม่อน

สามารถปลูกหม่อนในช่วงใดก็ได้ ถ้าให้น้ำชลประทาน แต่ถ้าไม่สามารถให้ได้ ควรปลูกในช่วงต้นฤดูฝน ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม-มิถุนายน เนื่องจากหม่อนต้องได้รับฝนที่ยาวนานเกิน 6 เดือน หม่อนจึงจะสามารถเจริญเติบโตได้ รากหม่อนจะหยั่งลึกลงไปดินได้มากพอ เมื่อผ่านช่วงแล้งไปพร้อมถึงการใส่ปุ๋ยบำรุงต้น โดยมีธาตุอาหารที่จำเป็นครบตามความต้องการของพืช (ตารางที่ 2) ทำให้เกษตรกรสามารถเก็บผลผลิตใบหม่อนไปใช้ในการเลี้ยงไหมได้เร็วขึ้น

การเตรียมหลุม

การขุดเป็นหลุมๆ ตามระยะปลูก ขนาดกว้าง 50 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ลึกประมาณ 50 เซนติเมตร รองก้นหลุมด้วยเศษหญ้า ฟางแห้งหรือซังข้าวโพด คลุกด้วยปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก กลบดิน 1 ชั้นก่อนทำการปลูกหม่อน ขุดหลุมเป็นร่องยาวตามแถวปลูก ขนาดกว้างและลึก 50

เช่นติเมตร ความยาวเท่ากับความยาวของแปลงหม่อน ใช้เศษหญ้า ฟางข้าว ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมักรองก้นหลุม แล้วจึงนำดินที่ขุดขึ้นกลบแล้วจึงนำท่อนพันธุ์ปักตามระยะที่กำหนด

การดูแลรักษาสวนหม่อน

แปลงหม่อนที่ปลูกใหม่ ควรมีการกำจัดวัชพืชบ่อยๆ เนื่องจากต้องปลูกหม่อนในต้นฤดูฝนซึ่งระยะนี้วัชพืชขึ้นมาก จึงมีความจำเป็นต้องกำจัดวัชพืชในระยะแรก จากนั้นควรใส่ปุ๋ยอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากดินในแต่ละพื้นที่มีความอุดมสมบูรณ์แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 อิทธิพลปุ๋ยที่มีต่อผลผลิตของใบหม่อน

| แร่ธาตุอาหารหลัก | ผลผลิต (กิโลกรัม) | ดรรชนีเปรียบเทียบ |
|--------------------|-------------------|-------------------|
| ปุ๋ย N-P-K | 1,871 | 100 |
| ปุ๋ย N-P-O | 1,851 | 97 |
| ปุ๋ย N-O-K | 1,701 | 91 |
| ปุ๋ย O-P-K | 759 | 40 |
| ไม่ใส่ปุ๋ย (O-O-O) | 763 | 41 |

หมายเหตุ ปุ๋ย N เท่ากับ ไนโตรเจน P เท่ากับ ฟอสฟอรัส K เท่ากับ โพแทสเซียม O เท่ากับ ไม่มีแร่ธาตุอาหาร

ที่มา: กรมวิชาการเกษตร (2548)

1.6 โรคและแมลงที่สำคัญของหม่อน

1. โรครากเน่า (root rot disease)

เป็นโรคที่สำคัญที่สุดของหม่อน เพราะมีการระบาดอยู่กระจัดกระจายทั่วไป ทั้งในที่ดอนและที่ลุ่ม เมื่อหม่อนเป็นโรคนี้แล้ว ไม่สามารถรักษาได้ เนื่องจากยังไม่ทราบเชื้อสาเหตุโรคที่แน่ชัด จากข้อสังเกตต่างๆ ไป พบว่าในสภาพที่ดินค่อนข้างเหนียวมาก หรือสภาพดินที่น้ำท่วมไม่

พบโรคนี้ เช่น ชายฝั่งแม่น้ำโขง โดยเฉพาะเขตจังหวัดหนองคาย ไม่พบโรคนี้ทำลายต้นหม่อน อาการของโรครากเน่าจะเริ่มแสดงอาการให้เห็นเมื่อรากเริ่มเน่ามากแล้ว ใบหม่อนโดยเฉพาะส่วนยอดจะเริ่มเหี่ยว และบางส่วนของแต่ละใบจะไหม้คล้ายถูกน้ำร้อนลวก มีลักษณะอาการผิดปกติเรียกว่า "ตายนิ่ง" อาการไหม้จะลุกลามมากขึ้นเรื่อยๆ ในที่สุดจะลามลงไปสู่ใบและส่วนต่างๆ ของกิ่ง แล้วตายในที่สุด เมื่อชุดต้นหม่อนที่เป็นโรครากเน่าขึ้นมาปรากฏว่ารากบางส่วนเน่า โดยเปลือก รากจะล่อนและมีกลิ่นเหม็น การป้องกันและกำจัด สามารถทำได้โดยใช้หม่อนพันธุ์พื้นเมืองซึ่งอาจให้ผลผลิตต่ำกว่า แต่สามารถต้านทาน โรคได้ดีกว่า เมื่อพบหม่อนที่เป็นโรคในแปลงให้ชุดหม่อนที่เป็นโรครากเน่าออก หรือพยายามหลีกเลี่ยงการทำให้รากหม่อนถูกตัดขาด (พรรณี, 2531)

2. โรคราขาว (white root rot)

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Resellinia necatrix* ที่ทำลายรากหม่อน เชื้อจะสามารถเจริญบนรากที่เน่า และสร้างเส้นใยสีขาว รวมกันเป็นกลุ่มคลุมอยู่บนรากทำให้มองเห็นรากกลายเป็นสีขาว ในเมืองไทยพบหม่อนที่เป็นโรคนี้เพียงแห่งเดียว คือ สวนหม่อนของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวรัชกาลปัจจุบัน ในอำเภอหัวหิน และสวนหม่อนของเกษตรกรบริเวณใกล้เคียง มีโรคระบาดอยู่เพียงเล็กน้อยประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากโรคนี้จะเกิดกับต้นหม่อนแล้ว ยังทำความเสียหายแก่พืชชนิดอื่น เช่น ทับทิม เป็นต้น การป้องกันและกำจัด สามารถทำได้โดยใช้วิธีการชุดต้นหม่อนเผาทำลาย หากการระบาดมีความรุนแรงและลุกลามมาก ต้องกำจัดโดยใช้สารเคมี

3. โรคราแป้ง (powdery mildew)

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phyllactinia moricola* ทำความเสียหายแก่หม่อนมาก เพราะทำลายใบหม่อน แต่ไม่ทำให้หม่อนตายเหมือนโรคสองชนิดข้างต้น เชื้อเข้าทำลายที่ท้องใบ และส่วนใหญ่จะทำลายใบที่อยู่ประมาณกลางกิ่ง ส่วนที่เกิดโรคจะเจริญอยู่ในผิวใบหม่อนและสร้างเส้นใยแทงทะลุออกมา แล้วสร้างสปอร์ขึ้นเพื่อขยายพันธุ์ต่อไป สปอร์จะเกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่คล้ายฝุ่นสีขาวเป็นวงตามท้องใบ หากอาการรุนแรงอาจพบด้านหน้าใบได้ เนื้อใบส่วนที่ถูกราแป้งเกาะจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และใบร่วงไปในที่สุด การป้องกันและกำจัดสามารถทำได้โดยการเผาทำลายใบที่เป็นโรค ทำลายโดยเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสม นำเชื้อราได้ดี และพืษยาสลายได้ในเวลาไม่เกิน 10 วัน เช่น สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม เบนโนมิล (bennomyl)

4. เพลี้ยแป้ง (mealy bug)

เป็นแมลงประเภทปากดูด รูปร่างรี คล้ายรูปไข่ แมลงชนิดนี้จะดูดกินน้ำเลี้ยงของส่วนที่ยังอ่อนอยู่ของต้นหม่อน ทำให้รูปร่างของใบหม่อนผิดปกติ ใบหงิกงอ การเจริญเติบโตของยอดหม่อนจะชะงัก ข้อระหว่างใบถี่เข้า และกิ่งบวมขึ้น พบการระบาดมากในช่วงฤดูร้อนต่อฤดูฝน (ระหว่างเดือนมีนาคม-พฤษภาคม) และช่วงฤดูฝนต่อฤดูหนาว (ระหว่างเดือนตุลาคม-ธันวาคม) ซึ่งมดเป็นตัวช่วยการแพร่กระจายเพลี้ยแป้งไปตามที่ต่างๆ มดเหล่านี้ได้รับประโยชน์จากเพลี้ย คือ ได้น้ำหวานที่เพลี้ยขับถ่ายออกมาเป็นอาหาร

5. เพลี้ยหอยนิ่ม (soft scale)

เป็นแมลงประเภทปากแทงดูด รูปร่างกลมรี ค่อนข้างเรียวยาว ดูดกินตามส่วนของต้นหม่อนที่ยังอ่อน ทำให้หม่อนแคระแกร็นชะงักการเจริญเติบโต ระบาดมากในหน้าแล้ง ระหว่างเดือนพฤศจิกายน-มีนาคม ส่วนหม่อนเสียหายมากในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์และมีนาคม เนื่องจากระยะนี้หม่อนจะขาดน้ำทำให้ต้นอ่อนแอ เกิดการเข้าทำลายได้ง่าย

6. ตัวงเจาะลำต้นหม่อน (mulberry stem borer)

เป็นแมลงประเภทแมลงปีกแข็ง (beetles) ส่วนใหญ่จะทำลายเฉพาะต้นหม่อน จะกัดกินกิ่งที่มีสีเขียวทำให้กิ่งเกิดรอยชำและหักได้ ทางเดินอาหารของกิ่งหม่อนถูกตัดขาด ยอดชะงักการเจริญเติบโต มักระบาดรุนแรงในสวนหม่อนที่ไม่มีการดูแลเอาใจใส่และไม่มีการตัดแต่งกิ่ง

7. เพลี้ยหอยดำ (black scales)

เพลี้ยหอยดำที่โตเต็มที่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร สามารถพบอยู่ทั่วๆ ไปในพื้นที่ทุกแห่งที่มีการปลูกหม่อน เพลี้ยจะเกาะอยู่ตามกิ่ง หรือถูกมดพาไปยังส่วนต่างๆ ของต้นหม่อน แล้วดูดกินน้ำเลี้ยงจากส่วนที่แตกใหม่ของต้นหม่อน ทำให้หม่อนแคระแกร็น เพลี้ยชนิดนี้จะเกาะต้นหม่อนแล้วดูดกินน้ำเลี้ยงจนกระทั่งวางไข่แล้วตายไป มีการระบาดของเพลี้ยชนิดนี้มากในช่วงหน้าแล้งและอาจพบบ้างในฤดูฝน

8. เพลี้ยไฟ (thrips)

เป็นแมลงตัวเล็กๆ ที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบหม่อน ใบหม่อนที่มีตัวอ่อนของเพลี้ยไฟ จะพบรอยขีดสีเหลืองอ่อน หรือเหลืองเข้มเล็กๆ คล้ายฝุ่น อยู่กระจัดกระจายทั่วๆ ไปทางด้านหลังใบ ใบหม่อนที่มีเพลี้ยดูดมากๆ จะทำให้หลังใบกร้าน และใบแคระแกร็นบางครั้งถึงกับทำให้ขอบใบหงิกม้วนเข้าหากัน ท้องใบมีสีน้ำตาล ระบาดมากในช่วงฤดูฝน สามารถใช้สารเคมีในการกำจัด เช่น สารในกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมท (organophosphate and carbamate) (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2548)

2. โรครากเน่าที่เป็นปัญหาในประเทศไทย

คณาจารย์ภาควิชาโรคพืช (2544) ได้ทำการรวบรวมไว้พอสังเขปดังนี้

โรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา Sub-division Mastigomyconita; class Oomycetes

ราใน class นี้ จัดเป็นราชั้นต่ำหรือราน้ำ (water mold หรือ aquatic fungi) สร้างเส้นใยแบบที่ไม่มีผนังกัน (coenocytic hypha) ขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (asexual reproduction) โดยการสร้าง zoospore ภายใน zoosporangium และขยายพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual reproduction) โดยการสร้าง oospore ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของเซลล์สืบพันธุ์สองชนิด คือ antheridium และ oogonium เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญได้แก่

| | |
|---------------------------------|---|
| <i>Phythium aphanidermathum</i> | สาเหตุโรค damping-off ของต้นกล้าพืชหลายชนิด |
| <i>Phytophthora palmivora</i> | สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน |
| <i>Phytophthora parasitica</i> | สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของส้มและสับปะรด |
| <i>Phytophthora fragariae</i> | สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของสตรอเบอรี่ |
| <i>Phytophthora cinnamomi</i> | สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของสับปะรด |

2.1 โรครากและโคนเน่าของทุเรียนและส้ม (root and stem rot)

ในทุเรียนอาการเริ่มแรกคือ ใบจะเหลืองซีด ผิวด้าน ไม่เป็นมัน และทยอยร่วง สำหรับ ส้มที่เป็นโรค เส้นกลางใบจะมีสีเหลือง จากนั้นใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเขียวเหมือนขาคั่ว ส่วน อาการที่รากและลำต้นของทุเรียนกับส้มเหมือนกันคือ รากมีสีน้ำตาลดำ สามารถดึงฝักรากหลุดออก ได้ง่าย บนรากใหญ่พบอาการเน่าและรอยแผลสีน้ำตาลเมื่อตากฝักรากออก ส่วนอาการโคนเน่าจะ พบบริเวณ โคนต้นใกล้ระดับผิวดิน ช่วงที่มีความชื้นสูงมักจะมีเมือกไหลออกมา ถ้าหากเปลือกลำต้น ออกพบว่าเนื้อไม้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง เชื้อสาเหตุของโรคคือ *Phytophthora* spp. การควบคุม โรคสามารถทำได้โดยหลีกเลี่ยงการบังคับให้พืชออกผลดกมากเกินไป เพราะจะทำให้ต้นอ่อนแอ หรือปรับปรุงสภาพดินให้อุดมสมบูรณ์ จัดระบบระบายน้ำให้ถ่ายเทได้สะดวก ในกรณีมีแผลที่ลำ ต้นควรตากบริเวณที่เป็นโรคออกให้แห้งแต่บริเวณเนื้อเยื่อที่ดี แล้วทาด้วยสารเคมี เช่น metalaxyl และ fosethyl aluminum อาจใส่เชื้อรา *Tricoderma harzianum* ร่วมกับสารเสริมบริเวณ โคนต้นเพื่อ ควบคุมอาการรากเน่า หรือใช้วิธีการอัดฉีดสารเคมี m-KP ชื่อสามัญคือ phosphonic acid ด้วยการ ใช้ เข็มลักษณะคล้ายเข็มฉีดยาเข้าสู่ลำต้น เพื่อช่วยให้ต้นพืชมีความต้านทาน โรคมากขึ้น

2.2 โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราใน form class Agronomycetes

เชื้อราใน form-class Agronomycetes คือ เชื้อราที่มีเพียงเส้นใย หรือเรียกว่า Mycelia Sterilia ได้แก่ เชื้อรา *Rhizoctonia* sp. และ *Sclerotium* sp. ระบบสืบพันธุ์แบบใช้เพศของเชื้อรา ดังกล่าวจัดอยู่ใน sub-division Basidiomycotina

โรคเน่าระดับดินที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* sp.

เกิดอาการแผลชำสีน้ำตาลรอบ โคนต้นกล้าพืช ทำให้ต้นกล้าพับ มีอาการเช่นเดียวกับ อาการที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Phytophthora* sp. แต่ถ้าเก็บไว้ในที่ชื้นต่อไปอีก ระยะเวลาหนึ่งเชื้อราจะสร้างสเคลอโรเทียม (sclerotium) ปรากฏให้เห็นเป็นก้อนสีน้ำตาลอ่อน

โรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium* sp.

อาการของพืชจะเหมือนกับอาการของมะเขือเทศที่ถูก *Fusarium* sp. เข้าทำลาย ถ้าสังเกตบริเวณโคนต้นจะพบเส้นใยสีขาวและเม็ดสเคลอโรเทียม (sclerotium) กลม ขนาดเล็ก สีน้ำตาลคล้ายเมล็ดผักกาด หรือบางครั้งอาจอยู่ใต้ผิวดินลงไปเล็กน้อย โรคนี้อาจเรียกว่าโรคโคนเน่า เนื่องจากเชื้อเข้าทำลายบริเวณโคนของมะเขือเทศที่กำลังจะแก่จัดและให้ผล แต่ถ้าเข้าทำลายต้นกล้าก็จะทำให้ต้นหักพับและแห้งตาย

การควบคุมโรคที่เกิดจาก เชื้อราใน form-class Agronomycetes

ใช้สารเคมีประเภทดูดซึม เช่น carboxin คลุกเมล็ดก่อนปลูกหรือราดโคนต้นพืชเพื่อควบคุมเชื้อทั้งสองใช้จุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา *Tricoderma harzianum* และ *Gliocladium virens* หรือใช้วิธีเกษตรกรรม โดยกำจัดเศษซากพืชที่เป็นโรค ตากดินก่อนปลูก ใส่ปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยคอกเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ในดิน และจัดระบบการระบายน้ำ

2.3 โรคพืชที่เกิดจาก class Deuteromycetes

โรคใบจุด ใบไหม้ และเน่าของพืช (botrytis disease)

เป็นโรคที่พบมากที่สุดในท้องถิ่นที่มีการปลูกผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ ไม้ผล และพืชไร่บางชนิด โดยเฉพาะที่ปลูกในเรือนกระจก โรคจะแสดงอาการที่ดอก ผล ลำต้น ใบ หัว และราก อาการของโรคคือ มีอาการไหม้ที่ดอก ผลเน่า และโคนเน่าระดับดิน อาการแคงเกอร์ (canker) หรือเน่าที่ลำต้นใบจุดหัวและรากเน่า ในสภาพอากาศชื้น เชื้อราจะสร้างสปอร์เห็นเป็นสีเทาบนเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค เชื้อสาเหตุโรค คือ *Botrytis* sp. การควบคุมโรคสามารถทำได้โดย กำจัดเศษซากพืชที่จะเป็นแหล่งอาศัยของเชื้อโรค ปรับปรุงสถานที่เก็บให้มีอากาศถ่ายเท หากสภาพการเพาะปลูกมีอากาศเย็น พบการระบาดของในผักกาดหอมสามารถควบคุมโดยใช้ dichloran หรือ zineb หากเป็นต้นหอมหรือมะเขือเทศใช้ difolatan, dyrene หรือ maneb ควบคุมโรคผลเน่าของสตรอเบอรี่ด้วยการฉีดพ่น captan, thiran หรือ benomyl

3. โรครากเน่าในพืชชนิดต่างๆ

นอกจากโรครากเน่าจะเป็นปัญหาที่สำคัญในประเทศไทยแล้ว ในต่างประเทศก็นับได้ว่าเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตทางการเกษตรเป็นอันดับต้นๆ เช่นเดียวกัน ซึ่งมีตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรครากเน่าของพืชตระกูลต่างๆ ดังนี้

Nemec (1970) ศึกษาเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับโรครากเน่าของสตรอเบอร์รี่ ใน Illinois โดยเลือกพื้นที่ 2 พื้นที่ ที่มีดินแตกต่างกัน คือ ดิน Bluford silt loam และดิน Hosmer silt loam ซึ่งพื้นที่ทั้งสองทำการปลูกสตรอเบอร์รี่เพื่อการค้า พบว่า สตรอเบอร์รี่ที่ปลูกในดิน Bluford silt loam แสดงอาการของโรคมากกว่าสตรอเบอร์รี่ที่ปลูกในดิน Hosmer silt loam และเมื่อนำมาแยกเชื้อ พบว่ามีเชื้อราทั้งหมด 8 ชนิดด้วยกัน คือ *Pythium* sp., *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Trichoderma* sp., *Rhizoctonia* sp., *Penicillium citrinum* และ *Penicillium purpogenum* โดยพบว่า *Rhizoctonia* sp. และ *Pythium* sp. เป็นเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าที่สามารถพบได้ทั้งสองพื้นที่

Anderson (1985) ทำการศึกษาโรครากเน่าและโรคเหี่ยวของถั่วเขียว ในเมือง Ontario ประเทศแคนาดา โรครากเน่าและโรคเหี่ยวของถั่วเขียวนั้นในปี ค.ศ 1979 และ 1980 เป็นสาเหตุสำคัญในการสูญเสียผลผลิต พืชแสดงอาการโรครากเน่าในช่วงที่มีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น โดยพบในพื้นที่ที่เป็นดินเหนียว ส่วนโรคเหี่ยวนั้นจะเกิดมากในช่วงท้ายของการสร้างฝักในพื้นที่ที่เป็นดินเหนียวหรือดินทราย การศึกษาวิจัยโดยเก็บตัวอย่างของพืชและทำความสะอาด หลังจากนั้นจึงนำไปเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar (PDA) และเก็บตัวอย่างดินเหนียวจากพื้นที่เป็นโรค ที่ความลึก 25 เซนติเมตรนำมาปลูกพืชทดสอบในโรงเรือนซึ่งมี 3 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และต้นคาวา แล้วทำการประเมินโรคหลังการปลูก 8 สัปดาห์ เมื่อทำการจำแนกเชื้อที่เข้าทำลายแล้วพบว่า *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium oxysporum* และ *Fusarium* sp. ซึ่งแยกได้จากพืชที่เป็นโรคนั้น เป็นโรคที่เกิดในโรงเรือน เชื้อ *Rhizoctonia solani* และ *Thielaviopsis basicola* เป็นเชื้อที่ทำลายส่วนรากและส่วนที่ต่ำกว่าลำต้น ส่วน *Fusarium oxysporum* และ *Fusarium* sp. นั้นพบว่าไม่สามารถทำให้เกิดโรคในสภาพโรงเรือนได้

Kimpinski and Johnston (1985) ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการเกิดโรครากเน่าและจำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยในแปลงปลูกข้าวบาร์เลย์บนเกาะ Prince Edward จากแปลง

ตัวอย่างทั้งหมด 45 แปลงและปลูกข้าวบาร์เลย์ 4 พันธุ์ คือ Birka, Bruce, Perth และ Volla เก็บตัวอย่างพืชและตัวอย่างดินที่ติดกับรากพืช โดยตัวอย่างพืชแต่ละพื้นที่จะถูกประเมินความเป็นโรคตามวิธีของ Ledingham *et al.* (1973) ส่วนไส้เดือนฝอยจะถูกแยกออกจากดินแต่ละพื้นที่นำมาคำนวณเพื่อหาจำนวน/กรัมของรากแห้ง จำนวนต่อกิโลกรัมของดินแห้ง และแปลงให้อยู่ในรูป logarithms เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ยของประชากรไส้เดือนฝอย วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและค่าความสัมพันธ์ไส้เดือนฝอยสกุลสำคัญที่เป็นปรสิตของพืชคือ stunt nematodes (*Tylenchorhynchus* spp.) และ root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) จากผลการทดลองพบว่าไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายรากส่วนใหญ่คือ *Pratylenchus penetrans* และเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าคือ *Bipolaris sorokiniana* จำนวนประชากรไส้เดือนฝอย *Tylenchorhynchus* spp. นั้นพบในแปลงที่ปลูกข้าวบาร์เลย์พันธุ์ Birka และ Perth มากกว่าในแปลงที่ปลูกพันธุ์ Bruce และ Volla ส่วนไส้เดือนฝอย *Pratylenchus* spp. ไม่มีนัยสำคัญต่อพันธุ์ใด จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า แนวโน้มของการเกิดโรครากเน่าและจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยนั้นมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับไส้เดือนฝอย *Tylenchorhynchus* spp. และมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับ *Pratylenchus penetrans* ในดินและราก

Hsiang *et al.* (1995) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรครากเน่า ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Pythium* กับการเกิดโรค dieback ในฤดูหนาวของสนามหญ้า ในเมือง Ontario และ Quebec ประเทศแคนาดา ซึ่งโรค dieback ที่เกิดในสนามหญ้าหรือสนามกอล์ฟนั้น มักเกิดในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วงที่มีอากาศเย็นและชื้น ผลการวิจัยพบว่า เชื้อ *Pythium* เป็นสาเหตุโรครากเน่า นั้นมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรค dieback ด้วยเช่นกัน ในการทดลองได้มีการแยกเชื้อจาก creeping bentgrass และ annual bluegrass ได้ทั้งหมด 14 ไอโซเลต จากส่วนรากและยอด 7 ไอโซเลต คือ *Pythium graminicola* 5 ไอโซเลต *Pythium torulosum* และ 2 ไอโซเลต *Pythium ultimum* และทำการทดสอบความรุนแรงของการเกิดโรคในหญ้าชนิดต่างๆ พบว่า perennial ryegrass แสดงอาการเป็นโรครากมากกว่า creeping bentgrass โดยเชื้อ *Pythium ultimum* ทำให้เกิดโรคที่รุนแรงมากกว่า *Pythium graminicola* และ *Pythium torulosum* นอกจากนี้อาการรุนแรงของโรคยังพบในอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มากกว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจากการทดสอบเชื้อราในโรงเรือนพบว่า Oospore และ Sporangia ของ *Pythium* สามารถพบได้จากตัวอย่างที่เพาะเชื้อลงไป จึงสรุปได้ว่า เชื้อ *Pythium* เป็นสาเหตุของโรค dieback ที่เกิดขึ้นในสนามหญ้าช่วงฤดูหนาวในเมือง Ontario และ Quebec

4. โรครากเน่าของหม่อน

โรครากเน่าของหม่อน เป็นโรคร้ายแรงสำหรับการผลิตหม่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า สภาพของดินที่เกิดการระบาดของโรครากเน่า มีลักษณะเนื้อดินเป็นแบบร่วนปนทราย (sandy loam) เช่น จังหวัดมหาสารคาม ขอนแก่น บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ นครพนม และอุบลราชธานี เป็นต้น แต่สำหรับบริเวณที่ยังไม่พบรายงานการระบาดของโรครากเน่า พบว่า ดินในบริเวณดังกล่าวมีลักษณะเนื้อดินเป็นดินเหนียว (clay) ได้แก่ จังหวัดอุดรธานีหนองคาย เชียงใหม่ และกรุงเทพฯ

ลักษณะอาการของโรค

หม่อนที่เป็นโรครากเน่า ลักษณะอาการของต้นหม่อนในพื้นที่จะตายเป็นหย่อมและขยายลุกลามไปเรื่อยๆ ใบและกิ่งจะเหี่ยวจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ายน้ำร้อนลวก โดยเริ่มจากขอบใบแล้วลุกลามเข้าด้านใน ต่อมาจะแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น และตายในที่สุด เมื่อถอนต้นดูจะพบว่าโคนและรากที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลายมีสีน้ำตาลปนดำเน่าเปื่อย เปลือกหลุดลอกออกได้ง่าย และมีกลิ่นเหม็น ส่วนมากโรคจะเข้าทำลายระบบรากและลุกลามไปบริเวณโคนต้นระดับใต้ดินและระดับเหนือดินประมาณ 1 ฟุต หากนำหม่อนมาปลูกในบริเวณที่เคยมีการระบาดของโรครากเน่ามาก่อน หม่อนก็จะเป็นโรครากเน่าตายได้ หม่อนจะแสดงอาการหลังจากปลูกไปได้ 2 เดือน 1 ปี ซึ่งสามารถมีการระบาดของโรคได้ตลอดทั้งปี และพบว่าช่วงที่มีการระบาดมากที่สุดคือ ช่วงฤดูฝน

โรครากเน่าของหม่อนเป็นโรคที่มีการศึกษามานาน แต่ก็ยังไม่สามารถทราบสาเหตุของโรคที่แท้จริง ในปัจจุบันก็ยังคงมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับโรครากเน่าของหม่อนนี้อยู่ จากการศึกษาของกรมวิชาการเกษตร (2523) พบว่า เมื่อนำตัวอย่างดินจากหม่อนที่เป็นโรคและส่วนต่างๆ มาวิเคราะห์พบเชื้อราทั้งหมด 8 ชนิดด้วยกัน คือ *Botryodiplodia* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Pythium* sp., *Macrophomina* sp., *Neocosmospora* sp., *Sphaeropsis* sp. และ *Sclerotium* sp. แบคทีเรีย 3 ชนิด และไม่สามารถระบุชนิดได้ 2 ชนิด เมื่อนำเชื้อราและแบคทีเรียดังกล่าวมาเพาะที่รากหรือโคนต้น พบเชื้อ *Botryodiplodia* sp. เท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรครากเน่าในหม่อนได้ โดยหม่อนที่ใช้ทดลองนี้มีอายุ 2, 4 และ 6 เดือน เมื่อนำเชื้อ *Botryodiplodia* sp. ไปเพาะที่รากหรือโคนต้นหม่อนที่มีอายุ 3 ปีขึ้นไป พบว่าเชื้อราชนิดนี้ไม่สามารถทำให้เกิดโรครากเน่าได้ นอกจากนี้ตรวจพบไส้เดือนฝอยอีก 11 ชนิด จากตัวอย่างหม่อนที่เป็นโรค ได้แก่ *Hoplolaimus* sp., *Tylenchorhynchus* sp.,

Helicotylenchus sp., *Criconimoides* sp., *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Paratylenchus* sp., *Tylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp., *Longidoros* sp. และ *Diptherophora* sp.

นวลจันทร์ (2502) ศึกษาโรครากเน่าของหม่อน ในปี พ.ศ. 2500 มีรายงานเกี่ยวกับโรคใบไหม้ (bacteria blight) ของหม่อนที่เกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas mori* ลักษณะสำคัญประกอบด้วยใบ กิ่ง และเปลือกตาย ส่งผลให้หม่อนตายทั้งต้น และต่อมาพบการรายงานว่าเกิดโรคระบาดของต้นหม่อนขึ้นในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ลักษณะอาการทั่วไปคล้ายคลึงกับโรค bacteria blight ที่ได้กล่าวมาในข้างต้น แต่มีอาการเน่าบริเวณรากและโคนต้นใกล้พื้นดินเพิ่มขึ้นด้วย พบว่าแบคทีเรียในรากและบริเวณ โคนต้นเป็นเชื้อ *Diplodia* spp. จึงมีการพิสูจน์แต่ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Diplodia* spp. อาจไม่ใช่เชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรครากเน่า ดังที่ตั้งสมมุติฐานไว้ เนื่องจากหม่อนไม่แสดงอาการเป็นโรคเมื่อนำเชื้อ *Diplodia* spp. เพาะลงในต้นหม่อน อย่างไรก็ตามเชื้อดังกล่าวอาจจะเป็นเชื้อทุติยภูมิที่จะเข้าทำลายซ้ำ เมื่อเชื้อปฐมภูมิเข้าทำลายไปแล้ว

Kasempour and Kamran (2006) ศึกษาเกี่ยวกับโรครากเน่าในหม่อน จังหวัด Guilan ประเทศอิหร่าน โดยทำการศึกษาระหว่างปี ค.ศ. 2002-2004 พบว่าเมื่อเก็บตัวอย่างจากส่วนต่างๆ ของหม่อนในพื้นที่แตกต่างกัน เพื่อหาเชื้อสาเหตุของโรคที่เกิดขึ้นจากส่วนต่างๆ ของหม่อน โดยเลือกส่วนราก ใบที่เป็นโรคใบจุดและแคงเกอร์ (canker) ซึ่งจากการทดสอบการเกิดโรคในส่วนของบริเวณราก ต้องการทราบเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรครากเน่า ใช้เมล็ดข้าวบาร์เลย์ ที่นำเชื้อแล้วใส่เชื้อที่แยกได้จากส่วนของรากลงไปแล้วบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จนเมื่อเมล็ดข้าวบาร์เลย์ ถูกปกคลุมด้วยเชื้อราแล้วจึงนำไปผสมกับวัสดุปลูกที่ใช้ในการปลูกหม่อน ซึ่งหม่อนที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 4-6 เดือน และส่วนที่เป็นชูดควบคุมจะไม่ใส่เชื้อในเมล็ดข้าวบาร์เลย์ โดยหม่อนที่ไม่ใช่ชูดควบคุมจะแสดงอาการเหี่ยวเมื่อใส่เชื้อลงไปแล้วเป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนของรากซึ่งแสดงอาการเป็นโรครากเน่าแยกเชื้ออีกครั้งพบว่า เป็นเชื้อ *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Rhizoctonia solani* และ *Rosellinia necatrix*

Kazempour et al. (2006) ทำการศึกษาต่อจากการทดลองข้างต้น โดยใช้แบคทีเรียเชื้อปฏิบัณที่จะนำมาใช้ควบคุมการเกิดโรครากเน่าในหม่อน เริ่มจากแยกเชื้อมารากหม่อนที่เป็นโรครากเน่า คัดแยกได้ทั้งหมด 165 ไอโซเลต พบแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต เท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิบัณ (เป็นแกรมลบ 3 ไอโซเลต แกรมบวก 2 ไอโซเลต) โดยพบว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas fluorescences* และ *Bacillus cereus* จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นเชื้อปฏิบัณด้วยวิธีการ

เฉพาะ เช่น volatile antibiotic, diffusible antibiotic และการสร้างเอนไซม์ protease เป็นต้น ซึ่งทั้ง 2 เชื้อสามารถยับยั้งการก่อโรคของเชื้อราได้ดี เมื่อปลูกพืชทดสอบโดยใส่เชื้อที่คาดว่าจะเป็สาเหตุของโรครากเน่า คือ *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Rhizoctonia solani* และ *Rosellinia necatrix* ลงไป จากนั้นใช้เชื้อปฏิภักย์ที่คัดแยกได้นำมาทำการทดสอบ พบว่าการเกิดโรคในแต่ละเชื้อลดลง 21.5, 26.5, 25, และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้เชื้อปฏิภักย์ร่วมกับสารฆ่าเชื้อรา Roval T.S พบว่าการเกิดโรคในแต่ละเชื้อลดลง 16.5, 21, 21 และ 24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเชื้อ *Pseudomonas fluorescenes* และ *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นเชื้อปฏิภักย์เพื่อควบคุมโรครากเน่าของหม่อนได้

ศุวิมล และคณะ (2552) ศึกษาผลการไถระเบิดดินดานและการใส่ยิปซัมต่อการสร้างสปอร์และการเข้าอาศัยภายในรากหม่อนของราไมคอร์ไรซา พบว่าพื้นที่ที่มีการใส่ยิปซัมในอัตรา 0, 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ ในแปลงที่มีการไถระเบิดดินดานและการไถพรวนแบบดั้งเดิม พบว่าราไมคอร์ไรซาสามารถสร้างสปอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 106 สปอร์ต่อดิน 100 กรัม ในแปลงที่มีการไถระเบิดดินดานร่วมกับการใส่ยิปซัมอัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ แต่สร้างสปอร์ได้ต่ำกว่าในแปลงที่มีการไถพรวนแบบดั้งเดิมร่วมกับการใส่ยิปซัมทุกระดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยภายในรากหม่อนของราไมคอร์ไรซาทั้งในแปลงที่มีการไถระเบิดและไม่มีการไถระเบิดดินดานพบว่า ราไมคอร์ไรซามีเปอร์เซ็นต์เข้าอาศัยในรากหม่อนสูง โดยการไถทั้งสองวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยในรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ

สมภพ และคณะ (2552) ศึกษาผลของการใช้วัสดุปรับปรุงดินร่วมกับหม่อนพันธุ์ต้านทานต่อการเพิ่มผลผลิตหม่อนในเขตที่มีการแพร่ระบาดของโรครากเน่า พบว่าการใช้หม่อนพันธุ์พื้นเมือง เช่น พันธุ์คุณไพสามารถต้านทานการเกิดโรครากเน่าได้ และการใส่เชื้อไมคอร์ไรซาในดินสามารถลดความรุนแรงของการแพร่ระบาดของโรครากเน่าในหม่อนได้ สำหรับการจัดการดินที่มีสภาพอัดตัวแน่นควรมีการไถระเบิดดินดานเพื่อให้รากหม่อนเจริญได้ดี อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่ส่งเสริมการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครากเน่า

การเกิดโรคพืชนั้น ตามสภาพธรรมชาติมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง 3 ประการด้วยกัน จึงสามารถทำให้พืชเกิดโรคได้อย่างสมบูรณ์ คือ พืชอาศัย เชื้อสาเหตุโรค และสภาพแวดล้อมที่เอื้อต่อการเข้าทำลายของสาเหตุโรคพืชได้แก่ ความชื้น อุณหภูมิ ค่าพีเอชของดิน เนื้อดิน และปริมาณธาตุอาหารบางชนิด เป็นต้น

5.1 ความชื้นของดิน เกี่ยวข้องกับการทำให้พืชอมน้ำ ส่งผลให้เกิดสภาพอ่อนแอได้ง่าย และก่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคพืชต่างๆ เช่น เชื้อราและแบคทีเรีย (สุดฤดี, ม.ป.ป.) นอกจากนี้ยังเป็นพาหะหรือตัวแพร่กระจายทำให้มีการถ่ายทอดโรคได้ เช่น เชื้อราและไส้เดือนฝอย สามารถถ่ายทอดโรคได้ดีเมื่อมีความชื้น สำหรับเพ็ชร์อ่อนและเพ็ชร์จกจั่นสามารถถ่ายทอดโรคได้น้อยลงเมื่อมีความชื้นลดลง ยกตัวอย่างงานวิจัยดังต่อไปนี้

Waipara *et al.* (1996) ศึกษาอิทธิพลของความชื้นดินที่มีผลในการก่อโรคของ *Codinaea fertilis* ต่อ White Clover ซึ่งมีผลต่อการเจริญของรากและลำต้น เนื่องจาก White Clover เป็นพืชอาหารสัตว์ที่สำคัญในประเทศนิวซีแลนด์ เริ่มการทดลองโดยหว่านเมล็ด White clover ลงในแปลง แปลงละ 70 กรัม ในดินที่มีค่าพีเอช 5.6 และมีการรมด้วย Chloroform แบ่งความชื้นของดิน ออกเป็น 4 ระดับ คือ 40, 50, 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นปล่อยให้พืชเจริญ 5 สัปดาห์ แล้วใส่เชื้อ *Codinaea fertilis* ลงไป 2 สายพันธุ์ ใช้ conidial suspension ในแต่ละ plot 15 มิลลิลิตร ใส่ในระดับความลึก 10 เซนติเมตรและทำแบบเดียวกันอีก 2 ครั้งใน 3 วันต่อมา ในตำบลควบคุมใส่ conidial suspension 15 มิลลิลิตร ที่ sterile แล้วให้พืชเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์โดยให้แสง 16 ชั่วโมง เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์ พืชจะถูกถอนออกแล้วล้างให้สะอาด นำมาวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเกิดโรครากเน่าและให้คะแนนการเกิดโรคเป็น 5 ระดับตั้งแต่ 1-5 คือ 1 เท่ากับ ไม่มีแผลและอาการของรากที่ถูกทำลาย และ 5 เท่ากับ 81-100 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่รากทั้งหมดมีอาการตาย จากนั้น นำส่วนของรากมาแยกเชื้อเพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกับที่มีการทดสอบ อบอุ่นของลำต้นและราก โดยใช้เวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความชื้นของดินมีผลต่อการก่อโรคของ *Codinaea fertilis* พืชที่อยู่ภายใต้สภาพความชื้นสูงจะมีความอ่อนแอกว่าพืชที่อยู่ภายใต้สภาพความชื้นต่ำ โดยพบว่ามีความหนาแน่นของการเกิดโรครากมากกว่าพืชในตำบลควบคุม โดยพบว่ารากพืชจะอ่อนแอจากการเข้าทำลายและเน่า เนื่องจากสภาพความชื้น

ของดินต่ำ ดังนั้นความชื้นของดินจึงเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเกิดโรคในเชื้อรา ในดินที่แห้งอาจมีผลทำให้อาการของโรคเพิ่มขึ้นและนำไปสู่การลดลงของผลผลิตได้

Besoain *et al.* (2005) ศึกษาผลของระยะเวลาในการอิมมัตวด้วยน้ำของดินต่อการพัฒนาตัวของโรค เนื่องจากโรครากเน่าของอโวคาโดที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Phytophthora cinnamomi* เข้าทำลายและมีการกระจายของเชื้อสาเหตุโรคนี้อันไปทั่วโลก โดยส่วนมากมักเกี่ยวข้องกับชนิดของดินและระยะเวลาการขังน้ำในพื้นที่ปลูกอโวคาโดที่มีอาการของรากเน่า มักมีอาการเหี่ยว ใบเล็กหรืออาจหลุดร่วง ใบบางส่วนอาจมีอาการไหม้ ทำการทดลองโดยนำ *Phytophthora cinnamomi* ใส่ลงไปในพื้นที่พืช พบว่า พืชแสดงอาการเหี่ยว เหลือง ใบไหม้ การเจริญเติบโตลดลง จำนวนใบ และพื้นที่ใบน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นไม้ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ สำหรับช่วงเวลาในการขังน้ำมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อเปอร์เซ็นต์ของโรครากเน่าในต้นไม้ที่ใส่เชื้อลงไป มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อพื้นที่ใบในการทดลองที่มีการใส่เชื้อ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติกับส่วนของลำต้นในการทดลองที่ไม่มีการใส่เชื้อ ระยะเวลาในการขังน้ำมีนัยสำคัญทางสถิติต่อความสูงของลำต้น จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ถ้ามีการท่วมขังของน้ำเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทุก 2 สัปดาห์ ก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดโรครากเน่าได้

Heritage and Harrigan (1984) ศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่เนื้อดิน ความชื้นดิน อายุของพืชต่อการเข้าทำลาย รูปแบบของการให้น้ำชลประทาน ที่มีผลต่อการคัดเลือกต้นดอกคำฝอยที่มีความต้านทานเชื้อ *Phytophthora crytogea* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่า พบว่าพืชที่ปลูกในเนื้อดินร่วนมีความทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อได้ดีกว่าเจริญเติบโตในดินทราย ความชื้นของดินถ้าเพิ่มจาก 88 เปอร์เซ็นต์เป็น 96 เปอร์เซ็นต์นั้น ส่งผลให้เชื้อสาเหตุของโรคพืชสามารถเข้าทำลายได้มากกว่าเช่นเดียวกัน ปัจจัยอายุของพืชต่อการเข้าทำลายพบว่า ในช่วงการงอก (10 วันหลังปลูก) มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุของโรคพืชมากกว่าต้นไม้ที่มีการเจริญเต็มที่ ในระยะออกดอก (90 วันหลังปลูก) ส่วนปัจจัยสุดท้ายคือ รูปแบบการชลประทานมีการเปรียบเทียบการให้น้ำ 2 ประเภทคือ การให้น้ำตามร่อง (furrow) ซึ่งเป็นการให้น้ำทางผิวดิน โดยปล่อยให้น้ำไหลในร่อง และการให้น้ำแบบฝั้น (border check) โดยปล่อยให้น้ำไหลท่วมแปลงเป็นฝั้นระหว่างคันดินสองคัน ซึ่งน้ำจะถูส่งเข้าไปจากทางหัวแปลงจนกระทั่งกระจายไปยังท้ายแปลง พบว่า การให้น้ำแบบ ฝั้นส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคอย่างรุนแรงมากขึ้นกว่าการให้น้ำตามร่อง

Gill *et al.* (2001) ทำการศึกษาผลของความชื้นในดินต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* ในข้าวสาลี จากผลการทดลองพบว่า ความชื้นของดินในระดับที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของพืช (50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน) โรคมักมีภาวะอย่างรุนแรงในสภาพอุณหภูมิต่ำ (10 องศาเซลเซียส) แต่ในสภาวะแห้งแล้ง (15 เปอร์เซ็นต์ ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน) กลับพบว่าการก่อโรคเหมือนกันทุกระดับของอุณหภูมิในการทดสอบ ในดินที่อบอุ่น (20 และ 25 องศาเซลเซียส) ที่ความชื้นสูง (50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน) การเกิดโรคในดินที่มีการอบไอน้ำมีความรุนแรงมากกว่าในดินที่ไม่มีการอบไอน้ำ เนื่องจากการอบไอน้ำในดินไม่ใช่การฆ่าเชื้อโรค แต่มีผลต่อจุลินทรีย์บางชนิดที่อ่อนแอต่อความร้อนซึ่งอาจรวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชนี้ด้วย ดังนั้นจึงเป็นการชี้ให้เห็นว่า ในการยับยั้งเชื้อโรคพืชในธรรมชาตินั้นจะต้องอยู่ภายใต้ปัจจัยหลายประการและเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

Rusuku and Gatabazi (1997) ศึกษาการเกิดและการแพร่กระจายของเชื้อราซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชที่เกิดกับถั่วในประเทศรวันดา พบว่า เชื้อรา *Pythium* sp. มีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดโรครากเน่าของถั่วในประเทศรวันดา สามารถแยกได้ 40 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างทั้งหมดใน 6 พื้นที่ คือ Kigali, Butare, Gikongora, Cyangugu, Gisenyi และ Kibungo โดยในแต่ละพื้นที่พบเชื้อรา 19, 40, 33, 33, 60 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราทั้งหมด และพบว่า การเกิดโรคมีความสัมพันธ์กับระบบการปลูกพืช สภาพแวดล้อม และการจัดการพืชในแปลง เช่น ดินที่มีระดับน้ำสูงเป็นสภาวะแวดล้อมที่เชื้อ *Pythium* sp. จะสามารถเกิดการระบาดได้อย่างรุนแรง หรือถ้าเกิดฝนตกหนักในช่วงที่เริ่มทำการย้ายปลูกพืช หลังจากนั้น 2-3 สัปดาห์ พืชจะแสดงอาการรากเน่าโคนเน่าจากเชื้อ *Pythium* sp. หรืออาการเหี่ยวจากเชื้อ *Fusarium* sp.

5.2 ธาตุอาหารพืช มีความเกี่ยวข้องกับค่าพีเอชของดิน ซึ่งส่งผลต่อความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช โดยพืชอาจแสดงออกทางด้านสรีระหรืออาจแสดงอาการเป็นพิษจากการ ดูดใช้ และสะสมของธาตุอาหารในปริมาณที่มากจนเกินไปหรืออาจแสดงอาการขาดธาตุอาหารได้ เช่น ธาตุแคลเซียม แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ในสภาพดินที่เป็นกรดรุนแรงพบแคลเซียม โพแทสเซียมและแมกนีเซียมในระดับต่ำ ระดับพีเอชที่ส่งผลให้ดินมีแคลเซียมและแมกนีเซียมอย่างเพียงพอ อยู่ระหว่าง 5.5- 8.5 ถ้าสูงกว่า 8.5 พบปริมาณแคลเซียมต่ำ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) สำหรับฟอสฟอรัส เมื่อดินเป็นกรดมากๆ จะส่งเสริมให้เกิดการตรึงฟอสเฟต ให้อยู่ในรูปเหล็กและอะลูมิเนียมฟอสเฟต ยากแก่การใช้ประโยชน์ เนื่องจากสารประกอบของฟอสเฟตทั้งสองรูป

จะละลายน้ำได้ยาก ระดับพีเอช 6-7 เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ของฟอสเฟตในพืช เนื่องจากฟอสเฟตจะถูกตรึงน้อยที่สุด ดังงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับธาตุอาหารอื่นๆ ดังนี้

Elmer (1999) ศึกษาอิทธิพลของแอมโมเนียมซัลเฟตและการปลูกพืชหมุนเวียนต่อการเกิดโรค black root rot ในสตรอเบอร์รี่ โดยเลือกพื้นที่ที่เคยเกิดโรค black root rot มาก่อน ทำการปลูกพืชหมุนเวียน 2 ชนิด คือ Saia oats, sorgho-sudangrass และมีแปลงควบคุมคือแปลงปลูกสตรอเบอร์รี่พันธุ์ Honeoye จากนั้นทำการปลูกสตรอเบอร์รี่พันธุ์เดียวกันนี้เป็นพืชหลัก ทดสอบโดยการใส่ปุ๋ย 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมไนเตรท และแคลเซียมไนเตรท อัตราไนโตรเจนที่เท่ากัน หลังจากนั้น 2 เดือน พบว่าแปลงที่มีการใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตมีพื้นที่ใบและผลผลิตที่สูงกว่า พื้นที่ที่มีการใส่ปุ๋ยแคลเซียมไนเตรท สตรอเบอร์รี่ที่ปลูกในแปลงที่มีการปลูก Saia oats มาก่อนนั้น มีผลผลิตเพิ่มขึ้น 135 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เร็วกว่าแปลงควบคุม 38 เปอร์เซ็นต์ อิทธิพลของการปลูกพืชคลุมดินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต และลดการเกิดโรค พบว่าแปลงที่ใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมไนเตรท พืชแข็งแรงกว่าแปลงที่ใส่ปุ๋ยแคลเซียมไนเตรท และการปลูกพืชคลุมดินทั้งสองชนิดเป็นพืชหมุนเวียนร่วมกับการใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นยังสามารถลดการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยได้อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงที่มีการปลูกสตรอเบอร์รี่อย่างต่อเนื่อง (แปลงควบคุม) นอกจากนี้การปลูกพืชหมุนเวียนอีกชนิดหนึ่งคือ Garry oat ยังสามารถลดปริมาณเชื้อ *Rhizoctonia fragariae* ได้มีประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับแปลงที่มีการปลูกสตรอเบอร์รี่อย่างต่อเนื่อง และผลที่เกี่ยวข้องกับการใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตคือ สามารถลดค่าพีเอช ในบริเวณรากพืชได้ประมาณ 0.2 unit ซึ่งมีผลต่อการลดปริมาณเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ในบริเวณรากพืชได้ประมาณ 10-15 เท่า และมีผลต่อการสร้างใบ อีกทั้งส่งเสริมการดูดใช้และสะสมปริมาณไนโตรเจน โพแทสเซียม กำมะถัน แมงกานีส และทองแดง มากกว่าพืชที่ใส่ปุ๋ยแคลเซียมไนเตรท

Campanella *et al.* (2002) ศึกษากิจกรรมของเกลือแคลเซียมในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุของโรครากเน่าส้ม โดยผลของเกลือแคลเซียม 10 ชนิดคือ แคลเซียมซัลเฟต แคลเซียมออกไซด์ แคลเซียมโพรฟิไอเนต แคลเซียมไนเตรท แคลเซียมอะซิเตต แคลเซียมเพนโททีเนต แคลเซียมกลูโคเนต แคลเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคาร์บอเนต ใช้ในปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 300, 600 และ 1,200 ppm จากผลการทดลองพบว่า สามารถลดการสร้าง zoospore และลดจำนวนเชื้อดังกล่าวในดินได้ แคลเซียมโพรฟิไอเนตและแคลเซียมแลคเตตสามารถลดความหนาแน่นของเชื้อที่มีอยู่ในดิน ในขณะที่เกลือแคลเซียมทุกชนิด ยกเว้นแคลเซียมไนเตรท

แคลเซียมเพนโททีเนต และแคลเซียมกลูโคเนต พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดการติดเชื้อบริเวณรากเมื่อเปรียบเทียบกับคาร์บอซิม

Keel *et al.* (1988) ศึกษาการขาดธาตุเหล็กซึ่งมีผลในการยับยั้งการเกิดโรครากเน่าของใบยาสูบ โดยใช้ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ CHA0 ภายใต้สภาวะ Gnotobiotic ซึ่งเป็นสภาวะจำลองให้เห็นการเจริญของรากในดินที่มีการจัดการต่างกัน จากการทดลองพบว่า *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ CHA0 มีความสามารถต้านทานต่อโรครากเน่า ซึ่งมีสาเหตุของโรคคือ *Thielaviopsis basicola* ของใบยาสูบ ภายใต้สภาวะ Gnotobiotic เมื่อมีการจัดการดินด้วยแร่ดินเหนียว Vermiculite ลงไป แต่ในทางกลับกัน เมื่อจัดการดินด้วยแร่ Illite พบว่าประสิทธิภาพของ *Pseudomonas fluorescens* ลดลง แต่เมื่อมีการใส่ $FeCl_3$ ร่วมกับ Illite ส่งผลให้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* สามารถทำงานได้ดีขึ้น สำหรับเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ พบว่า CHA 400 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Thielaviopsis basicola* คล้ายกับสายพันธุ์ CHA0 แต่เมื่อใส่ Illite และ Fe^{3+} chelated ร่วมกับ ethylenediaminedi (*o*-hydroxyphenylacetic acid) (FeEDDHA) กลับมีประสิทธิภาพการยับยั้งไม่ดีเหมือนสายพันธุ์ CHA0 เนื่องจากปริมาณของเหล็กที่เป็นประโยชน์ในแร่ Vermiculite มีมากกว่า Illite ส่งผลต่อการสร้างไฮโดรเจนไซยาไนด์ของ *Pseudomonas fluorescens* จากสมมุติฐานการทดลองเบื้องต้นคือ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ที่ผลิตโดย *Pseudomonas fluorescens* มีผลต่อการยับยั้งของเชื้อสาเหตุโรคพืช

5.3 อุณหภูมิของดิน ในการเกิดโรคนั้น อุณหภูมิมีความสัมพันธ์อย่างมากกับความชื้น (สุคฤดี, ม.ป.ป.) เมื่อมีความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม ส่งเสริมการเกิดโรคและทำให้มีการแพร่ระบาดของโรคมากขึ้น อุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงเกินไปมีผลต่อความต้านทานโรคของพืช เนื่องจากพืชจะเกิดความเครียด และมีผลต่อกลิไกในการเกิดโรค เช่น penetration, colonization และ invasion เป็นต้น

Koike *et al.* (2003) อุณหภูมิดินเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากดินที่มีอุณหภูมิต่ำจะส่งผลให้เชื้อสาเหตุโรคพืชมีการเจริญช้าลงและลดความรุนแรงของโรค ส่วนในดินที่มีอุณหภูมิสูง เชื้อสาเหตุโรคพืชจะสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว

Miller and Burke (1985) ศึกษาเกี่ยวกับผลของดินที่มีออกซิเจนน้อยต่อการระบาดของโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* ในถั่ว โดยใช้อายุของการงอกและอุณหภูมิของดินเป็นตัวชี้วัด พืชที่นำมาใช้ในการทดลองมีอายุ 7, 12 และ 19 วัน โดยปลูกในดินที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย พบว่า ออกซิเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตในส่วนของรากและลำต้น ซึ่งออกซิเจนน้อยจะเพิ่มโอกาสในการเข้าทำลายโดยเชื้อ *Fusarium solani* และการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค ไม่เกี่ยวข้องกับอายุของการงอกของเมล็ด ส่วนอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้เกิดโรครากเน่าเพิ่มขึ้น

5.4 เนื้อดิน (Soil texture) เกี่ยวข้องกับขนาดและช่องว่างของดิน ซึ่งมีผลต่อการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคพืช และจุลินทรีย์ดิน นอกจากนี้ยังรวมถึงความจุแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation exchange capacity) การมีประจุลบของดินมีผลต่อจุลินทรีย์ทั้งทางตรงและทางอ้อม (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) เช่น มีผลต่อการดูดธาตุอาหาร ที่เกิดขึ้นในสารละลายดิน และปรับสมดุลของไฮโดรเจนไอออน (H^+) ไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงที่เร็วจนเกินไป ทำให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมได้ง่ายขึ้น และ multivalent cation ที่ถูกดูดซับอยู่บนอนุภาคดินเหนียวหรือสารอินทรีย์ ช่วยเกาะยึดเชื่อมโยงกับประจุลบบนเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะบนผิวอนุภาคเหล่านั้นได้ นอกเหนือไปจากการเกาะยึดโดยการสร้างสารออกมาเชื่อมโยงโดยเซลล์ของจุลินทรีย์เอง

Koike *et al.* (2003) พบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น เนื้อดิน มีผลมาจากอนุภาคของแร่และโครงสร้างดินซึ่งมาจากการจัดเรียงตัวของกลุ่มอนุภาคดิน มีผลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่บริเวณรากพืช ในพื้นที่ที่มีการระบายน้ำ และการระบายอากาศดีจะเป็นปัจจัยในการยับยั้งการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบรากพืช ในดินที่มีการระบายน้ำเลวจะมีแนวโน้มรอดชีวิตและการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดิน เช่น *Pythium*, *Phytophthora* และ *Aphanomyces* เช่นเดียวกับเชื้อ *Fusarium* และ *Verticillium* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคเหี่ยวในพืชจะแสดงอาการรุนแรงเมื่อดินมีความชื้นสูงมากกว่าดินแห้ง

Goodall *et al.* (1962) ได้ทำการเก็บข้อมูลของ วัตถุต้นกำเนิดดิน ชุดดิน ชั้นหน้าตัดดิน และเนื้อดิน ในพื้นที่ปลูกอโวคาโด เมือง Santa babara พบการระบาดของโรครากเน่าโคนเน่าในพืชนี้มาก โดยเชื้อสาเหตุของโรค คือ *Phytophthora* sp. พบว่า พื้นที่ที่มีความเสียหายจากโรคราก

เนาโคนเน่าน้อยที่สุด คือ พื้นที่ที่มีวัตถุต้นกำเนิดเป็นแบบตะกอนน้ำพา ส่วนพื้นที่ที่ได้รับความเสียหายจากโรครากเนาโคนเน่ามากที่สุด คือ บริเวณลานตะพักลำน้ำ ที่เป็นลักษณะของดินเหนียวอัดเป็นแผ่นแข็ง ส่วนเนื้อดินนั้นมีแนวโน้มว่าเนื้อดินละเอียดจะทำให้เกิดการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่า

Moore *et al.* (1989) ศึกษาการปรับปรุงโครงสร้างดินและการซาบซึมน้ำในสวนผลไม้ พบว่าค่าการทดลองที่มีการใส่ยิปซัมร่วมกับการปลูกพืชคลุมดิน สามารถปรับสภาพดินให้มีโครงสร้างและการซาบซึมน้ำได้ดีที่สุด ซึ่งการปลูกพืชคลุมดินทำให้อุณหภูมิดินลดลงและส่งเสริมกิจกรรมของไส้เดือนที่อาศัยในดิน และในพื้นที่ที่มีการใส่ยิปซัมส่งเสริมให้ดินมีโครงสร้างและการซาบซึมน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งการใส่ยิปซัมจะลดการฟุ้งกระจายของแร่ดินเหนียว ช่วยลดการเคลื่อนย้ายหรือชะล้างของอนุภาคดินเหนียวไปอุดช่องว่างในดินจะทำให้เป็นอุปสรรคการซาบซึมน้ำ

นุจรินทร์ (2554) กล่าวว่าความแน่นทึบและการอัดตัวแน่นของดินส่งผลกระทบต่อผลผลิตของพืช เช่น การงอกของเมล็ดพืช การเจริญเติบโตและการเจริญของระบบรากและปัญหาการเกิดโรครากเน่าในพืชบางชนิด เนื่องจากดินมีสภาพการระบายน้ำและอากาศไม่เพียงพอ ซึ่งยิปซัมสามารถปรับปรุงสภาพดินแน่นทึบของชั้นดินใต้ผิวดินได้ อีกทั้งยังช่วยปรับสภาพเนื้อดินในดินเหนียวให้มีความร่วนซุยเพิ่มมากขึ้น การเคลื่อนที่ของยิปซัมที่ละลายน้ำสามารถแทรกซึมลงไป ในดินล่างได้ลึกกว่าดินที่ไม่มีการใส่ยิปซัม ทำให้ดินมีความโปร่งพรุนมากขึ้นส่งผลให้น้ำและอากาศสามารถแทรกซึมเข้าไปในดินได้ดีขึ้น นอกจากนี้แคลเซียมเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการ ช่วยในการส่งเสริมการดูดธาตุอาหารของรากและการเจริญเติบโตทางด้านกิ่งก้าน

5.5 ค่าพีเอชของดิน มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุของโรคพืช เนื่องจากเชื้อสาเหตุแต่ละชนิดนั้นมีความต้องการในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) แบคทีเรียจะเจริญได้ดี เมื่อค่าพีเอชของดินใกล้เป็นกลาง เมื่อดินเป็นกรด แบคทีเรียจะทำงานได้ช้าลง ส่วนเชื้อราจะเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียเมื่อในสภาพดินเป็นกรด แม้ว่าจะเป็นอย่าง เชื้อราก็สามารถเจริญได้เช่นกัน แต่จะน้อยกว่าแบคทีเรีย

Koike *et al.* (2003) พบว่าพีเอชดินเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลสำคัญต่อการพัฒนาของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เช่น โรค clubroot ของพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งเป็นโรคที่ทำให้รากโต

ผิดปกติ โดยความรุนแรงของโรคจะเกิดในดินกรด (พีเอชต่ำกว่า 5.7) และความรุนแรงของโรคลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นในช่วง 5.7-6.2 และอาการของโรคหายไปเมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 7.3-7.4

Narisawa *et al.* (2005) ศึกษาผลของความหนาแน่นของเชื้อ ค่าความชื้นและค่าพีเอชดิน เมื่อใช้ร่วมกับเชื้อ *Heteroconium chaetospora* ซึ่งเป็นปฏิปักษ์ของโรค clubroot ในพืชตระกูลกะหล่ำ พบว่าปัจจัยที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของโรค คือ ค่าพีเอชของดินต่ำประมาณ 5.5 และค่าความชื้นในดิน 80% ส่วนปัจจัยที่มีนัยสำคัญยิ่งต่อการลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช คือ ค่าพีเอชของดินสูงช่วง 6.3-7.2 และความชื้นในดิน 40-60% และพบว่าเชื้อ *H. chaetospora* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งโรค clubroot ในกะหล่ำ เมื่อสภาพดินความชื้นต่ำส่งผลให้เชื้อสาเหตุของโรคพืชมีความหนาแน่นของสปอร์ต่ำตามไปด้วย

5.6 การเขตกรรมและการควบคุมโรค ปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการพัฒนาของโรคได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม (สุดฤดี, ม.ป.ป.) เช่น การเลือกพื้นที่ในการปลูก การเตรียมแปลง การเลือกส่วนขยายพันธุ์ที่ปลอดเชื้อ ทำให้มีการแพร่เชื้อสู่แปลงปลูกได้น้อยลง การใช้วัสดุปลูก การเคลื่อนย้ายพืชจากพื้นที่หนึ่งไปสู่อีกพื้นที่หนึ่ง และการปฏิบัติทางเขตกรรม เช่น การปลูกพืชชนิดเดียวกันตลอดทั้งปี ระยะเวลาที่หนาแน่นจนเกินไป และระบบการให้น้ำ ยกตัวอย่างงานวิจัย ดังนี้

Gerlach *et al.* (1997) ศึกษาผลของชนิด ความหลากหลาย และความหนาแน่นของพืชที่มีผลต่อการตายของเมล็ดจากโรครากเน่าที่มีสาเหตุจาก *Armillaria* โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อประเมินอัตราการตายของเมล็ดที่เกิดจากโรครากเน่า การทดลองนี้เป็นการทดลองในระยะยาว เกี่ยวข้องกับความหนาแน่น ชนิดของพืช สมมุติฐานในเบื้องต้นคือ ถ้ามีการลดหรือเพิ่มความหนาแน่นของพืชแล้วจะลดอัตราการตายของเมล็ดได้ พื้นที่ทำการศึกษาอยู่ในบริเวณ Cloquet Forestry Center ในเมือง Minnesota ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งพืชที่พบในพื้นที่มีความหลากหลายทั้งหมด 10 ชนิด คือ Aspen (*Populus tremuloides*), Black spruce (*Picea mariana*), Jack pine (*Pinus banksiana*), Red oak (*Quercus rubra*), Balsam fir (*Abies balsamea*), Sugar maple (*Acer saccharum*), Tamarack (*Larix laricina*), Eastern white pine (*Pinus strobus*), White spruce (*Picea glauca*) และ Yellow birch (*Betula alleghaniensis*) แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนด้วยกันคือ การทดลองที่ 1 ทดสอบเกี่ยวกับชนิดของพืชและความหนาแน่น ซึ่งมีระยะห่างระหว่างแถวคือ 0.25, 0.5, 1 และ 2 เมตร ใช้ชนิดของพืชทั้ง 10 ชนิด การทดลองที่ 2 ใช้พืช 3 ชนิดปลูกร่วมกัน แบ่งออกเป็น 3 พื้นที่ย่อย โดยพื้นที่ที่ 1 ปลูกพืช ตระกูลสน 60 เปอร์เซ็นต์ ไม้

เนื้อแข็ง 40 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่ที่ 2 ปลุกพืช ตระกูลสน 80 เปอร์เซ็นต์ ไม้เนื้อแข็ง 20 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่ที่ 3 ปลุกพืช ตระกูลสน 30 เปอร์เซ็นต์ ไม้เนื้อแข็ง 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น 6 เดือน จึงเก็บ ต้นพืชที่แสดงอาการรากเน่าไปตรวจสอบพบว่า ชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าคือ *Armillaria ostoyae* นอกจากนี้ในพื้นที่ที่ปลุกพืชทั้ง 10 ชนิดร่วมกัน พบการตายของ Balsam fir มากที่สุด และ Red oak น้อยที่สุด ส่วนระยะการปลุกซึ่งส่งเสริมการระบาดของโรคคือ ระยะที่ 0.25 เมตร เนื่องจากพืชมีอัตราการตายสูงสุด และผลการทดลองสุดท้ายเกี่ยวกับ อัตราส่วนและชนิดของ พืช พบว่าพื้นที่ที่มีอัตราส่วนของพืชตระกูลสนมากขึ้นจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Armillaria* มากกว่าพืชตระกูลไม้เนื้อแข็ง

Mohammadi (2011) ศึกษากิจกรรมและมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ดิน ซึ่งมีอิทธิพลจากการ ไถพรวนและการใส่ปุ๋ยจากผลผลิตของข้าวสาลีพบว่า การใส่ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสดร่วมกับปุ๋ยเคมี สามารถเพิ่มมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ดิน ได้สูงสุด และพื้นที่ที่มีการไถพรวนแบบน้อยที่สุด (minimum tillage) ส่งผลให้ข้าวสาลีให้ผลผลิตสูงสุด เนื่องจากจุลินทรีย์ดินจะมีความสัมพันธ์กับ สุขภาพดิน (soil health) ระบบการไถพรวนและพันธุ์พืชส่งผลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อ ผลผลิต ซึ่งระบบการไถพรวนน้อยที่สุด ทำให้ข้าวสาลีให้ผลผลิตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ เปรียบเทียบกับการไถพรวนแบบดั้งเดิม (conventional tillage) และ ไม่ไถพรวน (non-tillage) ใน การไถพรวนแบบดั้งเดิมนั้น ทำให้ผลผลิตของข้าวสาลิลดลง 8 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับการ ไถ พรวนแบบ น้อยที่สุด เนื่องจากการไถพรวนแบบดั้งเดิม ทำให้ความชื้นในดินลดลงจึงไม่แนะนำให้ ใช้ในพื้นที่เพาะปลูกที่มีอากาศแห้งและยังส่งผลให้ดินมีการอัดตัวแน่นขึ้น จำกัดการเจริญของราก พืช เป็นสาเหตุให้ผลผลิตลดลงในเวลาต่อมา

6. เทคนิคการคัดแยกจุลินทรีย์ดิน

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินนั้น สามารถแบ่งได้ออกเป็น 6 ชนิด คือ แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติ โนมายซีท โปรโตซัว สาหร่าย และไวรัส การแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกจากดิน และส่วนรากของพืช สามารถทำได้ง่ายโดยวิธีคัดแยก เป็นเทคนิคการทำให้เชื้อหรือตัวอย่างเจือจางลงด้วยน้ำหรือน้ำเกลือ ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและทราบปริมาณที่แน่นอน การทำให้เชื้อ เจือจาง เพื่อให้มีการเจริญของโคโลนีเดี่ยวของจุลินทรีย์จำนวนที่เหมาะสม (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2547) นอกจากนี้ยังมีการใช้ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกคือ คุณสมบัติความต้องการอาหาร ความต้องการทางด้านกายภาพ ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง คุณสมบัติทางด้านสัณฐาน

วิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี คุณสมบัติของส่วนประกอบทางเคมี คุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน และคุณสมบัติทางด้านพันธุกรรม

ในการศึกษาความหลากหลายและการจำแนกจุลินทรีย์โดยอาศัยความแตกต่างข้างต้นนั้น แบ่งออกเป็น 2 วิธีหลัก คือ การจำแนกโดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ และการจำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งสามารถศึกษาได้อย่างหลากหลายและให้ผลได้อย่างถูกต้องมากที่สุด

7. งานวิจัยที่มีการใช้เทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุลเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหม่อนและความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืช

มะลิวัลย์ และคณะ (2546) ได้ทำการศึกษา รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค random amplification polymorphic DNA (RAPD) และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหม่อนพื้นเมืองของไทย โดยใช้ primer 16 ชนิด และหม่อน 25 พันธุ์ พบว่ามีความหลากหลายของพันธุกรรมสูงมาก ซึ่งจากการจับคู่เปรียบเทียบความเหมือนจากลักษณะทางพันธุกรรม ระหว่างพันธุ์ได้ค่าความเหมือนต่ำสุด ระหว่างพันธุ์แก้วสติ๊กและพันธุ์จากนครราชสีมา และมีความเหมือนสูงสุดในหม่อนกินผล ระหว่างพันธุ์วาวี และพันธุ์บ้านหลวง ซึ่งจากผังความสัมพันธ์ของหม่อนทั้งหมดแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มหลัก ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกต้นพ่อแม่พันธุ์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ศรีสุข และคณะ (2546) ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่า โดยใช้ความเหมือนและความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เทคนิคในการศึกษา คือ random amplification polymorphic DNA (RAPD) และ amplification fragment length polymorphic (AFLP) ผลจากการทดลองด้วยวิธี RAPD สามารถจัดกลุ่มความใกล้ชิดของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าเชื้อราจากทุเรียนมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอยู่ในกลุ่มเดียวกัน กับเชื้อราจาก หน้าวัว กล้วยไม้ ละหุ่ง ส้มเขียวหวาน เชื้อราจากน้ำในสวนส้มเขียวหวาน และพริกไทย กลุ่มเชื้อราจากลองกอง ลางสาด และวานิลลา เชื้อราจากเผือกและต้นแพงพวย ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อราที่ได้จากพืชอื่นๆ มาก ส่วนวิธี AFLP สามารถจัดกลุ่มเชื้อรา ออกได้ 3 กลุ่มตามลำดับวิวัฒนาการ คือกลุ่มเชื้อราจากทุเรียนและหน้าวัว กลุ่มเชื้อราจากพริกไทย ละหุ่ง กล้วยไม้ และส้มเขียวหวาน กลุ่มเชื้อราจากวานิลลา มังคุด ลองกอง และลางสาด ส่วนเชื้อราจากเผือก แพงพวยไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา

Phytophthora sp. จากเหือกและแพงพวยมีความแตกต่างในระดับโมเลกุลกับเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไม้ผลอื่นๆ

Wingfield *et al.* (2003) ศึกษาเกี่ยวกับการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจำแนกเชื้อ *Armillaria* ในประเทศชิลี อินโดนีเซียและมาเลเซีย โดยใช้วิธีการจำแนกจาก basidiocarp เป็น *Armillaria nouae-zelandiae* และ *Armillaria limonea* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศชิลีและอาร์เจนตินา โดยการจำแนกจะใช้การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับ internal transcribed spacer (ITS) จากฐานข้อมูลที่เคยจำแนกไว้แล้วจาก GenBank ประเมินความสัมพันธ์ของแผนผังวิวัฒนาการ ผลการศึกษาพบว่าลำดับพันธุกรรมเชื้อราส่วน ITS ที่จำแนกมาจาก basidiocarps จากประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซียมีความเหมือนกับ *Armillaria nouae-zelandiae* ส่วนลำดับพันธุกรรมเชื้อรา ITS ที่จำแนกมาจาก basidiocarps จากประเทศชิลีและอาร์เจนตินานั้นเหมือนกับ *Armillaria limonea*

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ขวดเก็บตัวอย่าง
2. ถังพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่างดิน
3. ถังเก็บความเย็น
4. อุปกรณ์การเก็บดิน ได้แก่ ซ้อนปลูก
5. งานสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์
6. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
7. หม้อนึ่งความดันไอ
8. กล้องจุลทรรศน์
9. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น LM-530-2 (MRC; Isreal)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น 3-18K (Sortorius; UK)
11. เครื่อง DNA thermal cycle (Techne; UK)
12. เครื่อง mini gel system รุ่น Mupid-exU (ADVANCE, Japan)
13. เครื่อง denaturing gradient gel electrophoresis (SCIE-PLAS; UK)
14. เครื่อง gel document (Bio-Rad, Japan)
15. เครื่อง incubator shaker (MEMMERT; Germany)
16. ตู้ laminar flow รุ่น HRN (HARUNA; Japan)
17. เครื่องบดย่อยตัวอย่าง (FastPrep[®]-24; USA)

วิธีการ

1. การแยกจุลินทรีย์ดินจากบริเวณรากหม่อน

1.1 การเก็บตัวอย่างดินในภาคสนาม

สุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่แปลงปลูกหม่อนซึ่งเกิดปัญหาโรครากเน่า บริเวณแปลงทดลองหม่อนของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม (ภาพที่1) วางแผนการทดลองแบบ 2x8

Factorial in Randomized Complete Block Design (RCB) จำนวน 3 ซ้ำ มี 2 ปัจจัยดังนี้ ปัจจัยแรก ประกอบด้วย การไถ่ระเบิดและไม้ไถ่ระเบิดดินดาน ปัจจัยที่สองประกอบด้วย การใส่ไม้ออร์โรชา ร่วมกับการใส่ปุ๋ยหมัก ได้แก่

- ตำรับการทดลองที่ 1 ไม่ใส่ไม้ออร์โรชา ไม่ใส่ปุ๋ยหมัก
 - ตำรับการทดลองที่ 2 ไม่ใส่ไม้ออร์โรชา ใส่ปุ๋ยหมัก 200 กิโลกรัมต่อไร่
 - ตำรับการทดลองที่ 3 ไม่ใส่ไม้ออร์โรชา ใส่ปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัมต่อไร่
 - ตำรับการทดลองที่ 4 ไม่ใส่ไม้ออร์โรชา ใส่ปุ๋ยหมัก 400 กิโลกรัมต่อไร่
 - ตำรับการทดลองที่ 5 ใส่ไม้ออร์โรชา ไม่ใส่ปุ๋ยหมัก
 - ตำรับการทดลองที่ 6 ใส่ไม้ออร์โรชา ใส่ปุ๋ยหมัก 200 กิโลกรัมต่อไร่
 - ตำรับการทดลองที่ 7 ใส่ไม้ออร์โรชา ใส่ปุ๋ยหมัก 300 กิโลกรัมต่อไร่
 - ตำรับการทดลองที่ 8 ใส่ไม้ออร์โรชา ใส่ปุ๋ยหมัก 400 กิโลกรัมต่อไร่
- มี 8 ตำรับการทดลอง และมีหน่วยการทดลองทั้งหมด 48 แปลง

โดยมีจุดเก็บตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดินนอกพื้นที่แปลงปลูกหม่อน ตัวอย่างดินรอบโคน ต้นหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพ ทั้งที่เกิดโรครากเน่าและไม่เกิดโรครากเน่า และตัวอย่างดินบริเวณรากของต้นหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ปร. 60) และพันธุ์คุณไพที่ไม่เกิดโรครากเน่า (ภาพที่ 2) โดยการเก็บจะสวมถุงมือแล้วใช้ช้อนปลูกปาดให้พื้นที่บริเวณโคนที่จะเก็บดินเรียบเสมอกัน จากนั้นใช้ช้อนปลูกขุดดินบริเวณดังกล่าว ลึกลงไปหนึ่งช้อนปลูก (ประมาณ 15 เซนติเมตร) และเก็บดินใส่หลอดเก็บตัวอย่างที่ปลอดเชื้อทำการบรรจุหลอดเก็บตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น ซึ่งก่อนเก็บตัวอย่างดินในแต่ละบริเวณจะล้างช้อนปลูกด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และน้ำสะอาด เช็ดให้แห้ง เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ส่วนดินบริเวณรากจะใช้ช้อนปลูกขุดลงไปจนกระทั่งพบรากของต้นหม่อนแล้วจึงเก็บดินในส่วนที่เกาะอยู่กับรากของต้นหม่อนใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่เตรียมไว้ แล้วบรรจุลงในกล่องเก็บความเย็น จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งการคัดแยกเชื้อราและแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน



ภาพที่ 1 สภาพพื้นที่แปลงทดลองปลูกหม่อน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (A) และบริเวณแปลงปลูกหม่อนที่แสดงอาการโรครากเน่า (B)



ภาพที่ 2 ลักษณะต้นหม่อนบริเวณส่วนเหนือดิน (A) และรากหม่อนที่แสดงอาการโรครากเน่า (B)

1.2 การคัดแยกจุลินทรีย์จากดิน (direct isolation)

วิเคราะห์ปริมาณและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ดิน ทั้งประชากรของแบคทีเรีย และเชื้อรา จากตัวอย่างดินทั้งหมด โดยใช้เทคนิคการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อทำการรวบรวมจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน โดยจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมายคือ กลุ่มแบคทีเรีย และเชื้อรา ซึ่งเป็นกลุ่มที่คาดว่าจะจะเป็นจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่า

ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl 9 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้ได้สารละลายดิน ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำสารละลายดินดังกล่าวเจือจาง (10-fold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} ตามลำดับ แล้วนำมา spread plate บนอาหารแข็ง nutrient agar (NA) ซึ่งเป็นอาหารสำหรับ

แบคทีเรีย และอาหาร rose bengal agar (RB) ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเชื้อรา โดยดำเนินการในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นบ่มอาหารที่ spread plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำแบคทีเรีย และเชื้อราที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อไปเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โดยแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร NA ส่วน เชื้อราเลี้ยงในอาหาร RB เพื่อใช้เป็นเชื้อต้นแบบ การแยกแบคทีเรียและเชื้อราให้บริสุทธิ์ ในสภาพปลอดเชื้อ ทำได้โดยใช้วิธี cross streak plate บ่มไว้ในอุณหภูมิห้อง จนกว่าเชื้อจะเจริญเติบโต เก็บแบคทีเรียและเชื้อราที่ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเอียง (slant) ของอาหาร NA และ RB เพื่อใช้เป็นเชื้อต้นแบบและใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียและเชื้อราต่อไป

1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียและเชื้อรา

1.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย ทำได้โดยใช้เทคนิคการย้อมสีแบคทีเรียแบบแกรม (Benson, 2005) มีขั้นตอน คือ ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง หยดน้ำกลั่นซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อลงบนสไลด์ ใช้ลวดเขี่ยเชื้อที่เผาไฟแล้วแตะแบคทีเรียชนิดเดียวที่ได้คัดแยกได้จากข้อ 1.2 นำมาสเมียร์ (smear) บนสไลด์ ปล่อยให้รอยสเมียร์แห้ง จากนั้นนำสไลด์มาผ่านเปลวไฟไปมาซ้ำๆ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เชื้อติดอยู่บนสไลด์ได้ดีขึ้น หยดสี crystal violet ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 20 วินาที เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ล้างด้วยแอลกอฮอล์จนกระทั่งไม่มีสีม่วงของ crystal violet ละลายออกมา แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ย้อมทับด้วยสี safranin O ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 20 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดูลักษณะการติดสีแกรมรูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ เพื่อนำไปใช้จำแนกกลุ่มแบคทีเรียต่อไป

1.3.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงบนสไลด์ (Benson, 2005) มีขั้นตอนคือ ใช้คัตเตอร์จุ่มแอลกอฮอล์ เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วจึงกรีดตัดวัฒนธรรมอาหาร RB ให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสใช้ปากคิบบีบแบ่งลงวง วางบนจานเพาะเชื้อ และใช้ปากคิบบีบสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟ วางบนแท่งหลอดลงในจานเพาะเชื้อใช้คัตเตอร์ยกชิ้นวุ้น ซึ่งตัดเป็นสี่เหลี่ยมจตุรัส มาวางบนกลางสไลด์ในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำเชื้อราเดี่ยวที่คัดแยกไว้จากข้อ 1.2 มาแตะที่ตรงส่วนผิวหน้าทั้ง 4 ด้านของชิ้นวุ้นนำ กระจกปิดสไลด์ จุ่มแอลกอฮอล์ และเผาไฟแล้ว ปิดบนชิ้นวุ้นที่ปลูกเชื้อไว้แล้วหยดน้ำกลั่นลงให้ชุ่มนำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิห้องจนกระทั่งได้เส้นใยของราเจริญจนถึงขอบของกระจกปิดสไลด์ หลังจากบ่มจนเชื้อราเจริญดีแล้ว มาทำสไลด์กึ่งถาวร โดยยกกระจก

ปิดสไลด์ หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไปที่ตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ด้านใน ซึ่งมีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ เพื่อให้แอลกอฮอล์กระจายเข้าสู่เส้นใยรา ก่อนที่แอลกอฮอล์จะแห้ง นำกระจกปิดสไลด์ วางบนน้ำยา lactophenol ซึ่งหยดอยู่ตรงกลางสไลด์แผ่นใหม่ ที่สไลด์แผ่นเดิมเขี่ยขึ้นวุ้นทิ้ง หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วหยดน้ำยา lactophenol ลงตรงไปกลางสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะของโครงสร้างเชื้อรา และจำแนกสกุล (genus) ของเชื้อรา นำมาจัดกลุ่มและจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

1.4 การศึกษาแบคทีเรียและเชื้อรา โดยวิธี 16S และ 18S identification

1.4.1 การสกัดสารพันธุกรรมของแบคทีเรียและเชื้อรา ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhou *et al.*, (1995) นำแบคทีเรียและเชื้อราชนิดเดี่ยว ซึ่งแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร NA และเชื้อราเลี้ยงในอาหาร RB ทำเป็น suspension โดยดูดสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ใส่จานเลี้ยงเชื้อในข้างต้น ขูดโคโลนีเชื้อให้ละลายร่วมกับสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นดูดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

นำ suspension ของแบคทีเรียที่เตรียมไว้ข้างต้น เติมสารสกัดเซลล์ ประกอบด้วย (50 mM Tris-HCl buffer (พีเอช 8.0) 100 mM EDTA และ 10 เปอร์เซ็นต์ SDS) 500 ไมโครลิตร และ ใส่ glass bead เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร นำเข้าเครื่องบดย่อยตัวอย่าง (FastPrep®-24; USA) ความเร็ว 5.5 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนสารละลายใสไว้แล้วผสมด้วย 5M potassium acetate ปริมาตร 1/3 ของสารละลายใส แล้วบ่มต่อในน้ำแข็ง 15 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใสผสมด้วย 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของสารละลายใส และ isopropanol ในปริมาณที่เท่ากัน นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นเทส่วนสารละลายใสทิ้ง ปล่อยให้ส่วนที่เหลือ (DNA) แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้วละลาย DNA ที่ได้ด้วย TE buffer 360 ไมโครลิตรและผสมด้วย NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร, CTAB ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อ NaCl ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 45 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วผสมด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาณที่เท่ากัน เหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000

รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายใส่ไว้แล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ผสมด้วย phenol: chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาณที่เท่ากัน และเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ผสมด้วย isopropanol ในปริมาณที่เท่ากันกับสารละลาย และเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol 1 มิลลิลิตร และเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนสารละลายทิ้งและปล่อยให้ส่วนตะกอน (DNA) แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที แล้วละลาย DNA ที่ได้ด้วย TE buffer 20 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

ส่วนเชื้อรานำ suspension ของเชื้อราที่เตรียมไว้ข้างต้น เติมสารสกัดเซลล์ประกอบด้วย (100 mM Tris-HCl buffer (พีเอช 8.0), 50 mM EDTA, 500 mM NaCl และ 10 mM 2-Mercaptoethanol) 500 ไมโครลิตร และ ใส่ glass bead เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร และ 20 เปอร์เซ็นต์ SDS 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องบดย่อยตัวอย่าง (FastPrep® -24; USA) ความเร็ว 5.5 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol เข้มจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันเบาๆ นำไปบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนด้วย TE buffer 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 8 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของสารละลายในหลอด และเติม isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 75 เปอร์เซ็นต์ ethanol 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งและละลายตะกอนด้วย TE buffer 100 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel) ที่ศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

1.4.2 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S และ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ตัวอย่างดีเอ็นเอ ที่ได้จะใช้เป็นต้นแบบสารพันธุกรรมในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนของ 16S และ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ โดยใช้เทคนิค PCR ด้วย universal primer ที่ประกอบไปด้วย forward primer AF1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), reverse primer 1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3') สำหรับแบคทีเรียและ forward primer UF1 (5'-CGA ATC GCA TGG CCT TG -3'), reverse primer S3 (5'-AGT CAA ATT AAG CCG

CAG -3') สำหรับเชื้อราตามลำดับ เริ่มจากเตรียม PCR mixture ของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ โดยผสมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 103 ไมโครลิตร, 10x Taq PCR buffer (Bioscience; Taiwan) 20 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTPs mixture 1.2 ไมโครลิตร (Bioscience; Taiwan), 10 μ M primer AF1 จำนวน 20 ไมโครลิตร, 10x primer 1541R 20 ไมโครลิตร, Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Bioscience; Taiwan) 1 ไมโครลิตรและ 10x template DNA (0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปฏิกริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยา PCR ทำที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 25 รอบและตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Techne; UK) ส่วน 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ทำเช่นเดียวกัน เตรียม PCR mixture โดยผสมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 103 ไมโครลิตร, 10x Taq PCR buffer (Bioscience; Taiwan) 20 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs mixture 1.2 ไมโครลิตร (Bioscience; Taiwan), 10 μ M primer UF1 จำนวน 20 ไมโครลิตร, 10 μ M primer S3 20 ไมโครลิตร, Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Bioscience; Taiwan) 1 ไมโครลิตรและ 10x template DNA (0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปฏิกริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยา PCR ทำที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 20 วินาที จำนวน 30 รอบและตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Techne; UK) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel) ที่ศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

1.4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียและเชื้อราโดยเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างตัวอย่างขึ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรียและเชื้อรา ในแต่ละตัวอย่างโดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hha* I และ *Hae* III ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีลำดับเบสจำเพาะ 4 คู่เบส มีจุดตัดระหว่าง G-C ทำให้สามารถจำแนกรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ถูกตัดได้ง่าย ขั้นตอนคือ เตรียม pre-mixture 4.8 ไมโครลิตรต่อหลอด จากการผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4.15 ไมโครลิตร และ 10x K buffer 0.65 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะ ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรต่อหลอด และผสมให้เข้ากันด้วยไปเปต แล้วเติมผลิตภัณฑ์ PCR จาก stock ตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร ลงในหลอด ปิดฝาและนำไปบ่ม

ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำสารผสมที่ได้มาหลอดละ 4 ไมโครลิตร ผสมกับ pre-mixture ที่เตรียมจากการผสมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และ 10x K buffer ในสัดส่วน 1.4:0.6 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมบนกระดาษพาราฟิล์ม เพื่อนำมาทำ 2.5 เปอร์เซ็นต์ large agarose gel electrophoresis ใน 0.5 TBE buffer โดยเปิดเครื่อง electrophoresis ด้วยความต่างศักย์ของ กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45-60 นาที หรือจนกระทั่งสีของ BPB (bromophenolblue) เคลื่อน มาถึงปลายอีกด้านหนึ่งของเจล จากนั้นก็นำเจลมาย้อมสีด้วย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาส่องภายใต้แสง ultraviolet พร้อมทั้งบันทึกภาพ ภาพเจลที่ได้จะ ปรากฏรูปแบบแถบของชิ้นส่วน DNA ขนาดต่างๆ ของแต่ละโคลน ถ้าปรากฏแถบของขนาด DNA ที่มีรูปแบบที่เหมือนกันก็แสดงว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน ซึ่งก็สามารถนำต้นแบบของ ผลิตภัณฑ์ PCR หลอดใดหลอดหนึ่งและต้นแบบของหลอดอื่นๆ ที่มีรูปแบบแตกต่างกันไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อหาลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรียต่อไป

1.5 การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียและเชื้อรา โดยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequencing)

นำลำดับเบสของดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์ที่ Macrogen Ltd. ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated sequencer) รุ่น ABI3730XL ในการวิเคราะห์ จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของ กลุ่มจุลินทรีย์ในฐานข้อมูลของ national center for biotechnology information (NCBI) ใช้โปรแกรม basic local alignment search tools (BLASTN) จากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2. การศึกษาโดยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

2.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ดิน

ศึกษาโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการเปรียบเทียบกลุ่มประชากร จุลินทรีย์โดยพิจารณาความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากลักษณะ โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์จากตัวอย่าง ดินในบริเวณ (1) ดินนอกพื้นที่แปลงปลูกหม่อน (2) ตัวอย่างดินรอบโคนต้นหม่อนที่ไม่เกิดโรค และ (3) ตัวอย่างดินรอบโคนและดินบริเวณรากต้นหม่อนที่เกิดโรครากเน่า เพื่อศึกษาเชื้อที่มี ลักษณะเด่น (dominant) สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการบ่งชี้ถึงการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ดิน

ที่เข้าทำลายบริเวณรากหม่อนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) มีขั้นตอน ดังนี้

2.1.1 การสกัดสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน โดยนำตัวอย่างดินรอบโคนต้นหม่อนที่ไม่เกิดโรค ตัวอย่างดินรอบโคนและ ดินบริเวณรากต้นหม่อนที่เกิดโรค มาสกัดสารพันธุกรรม ด้วยวิธีของ Zhou *et al.* (1995) โดยเริ่มสกัดด้วยการผสมตัวอย่างดิน 0.1 กรัม กับ soil-extraction buffer (50 mM Tris-HCl buffer (พีเอช 8.0) และ 100 mM EDTA) 500 ไมโครลิตร ด้วย sterile pastle ใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม soil-extraction buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำสารผสมไปเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนสารละลายใส่ทิ้ง เติม soil-extraction buffer ปริมาตร 380 ไมโครลิตร ผสมลงในส่วนตะกอนที่เหลือ และใส่เอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อย่อยผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ จากนั้นใส่เอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ผสม 10 เปอร์เซ็นต์ SDS 100 ไมโครลิตร และ RNase ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร vortex แล้วปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นแช่แข็ง (freeze) ที่อุณหภูมิประมาณ -80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำมาละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทำการ freeze และ thaw อีกครั้งแล้วนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนสารละลายใส่ไว้แล้วผสมด้วย 5M potassium acetate ปริมาตร 1/3 ของสารละลายใส่ แล้วปั่นต่อน้ำแข็ง 15 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใสผสมด้วย 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของสารละลายใส่ และ isopropanol ในปริมาณที่เท่ากัน นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นเทส่วนสารละลายใส่ทิ้ง ปล่อยให้ส่วนที่เหลือ (DNA) แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้วละลาย DNA ที่ได้ด้วย TE buffer 360 ไมโครลิตรและผสมด้วย NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร, CTAB ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อ NaCl ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 45 ไมโครลิตร แล้วปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วผสมด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาณที่เท่ากัน เหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บสารละลายใส่ไว้แล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายใส่ที่ได้ผสมด้วย phenol: chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาณ

ที่เท่ากัน และเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้ผสมด้วย isopropanol ในปริมาณที่เท่ากับสารละลาย และเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol 1 มิลลิลิตร และเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนสารละลายทิ้งและปล่อยให้ส่วนตะกอน (DNA) แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที แล้วละลาย DNA ที่ได้จาก TE buffer 20 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

2.1.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 16S และ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ใช้ตัวอย่าง DNA ที่ได้จากข้างต้นเป็นต้นแบบสารพันธุกรรม โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.1.1 มาวัดหาปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแยก โดยดูดสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer (Beckman DU-530) ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 220-320 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารอื่น โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 (A_{260}), 230(A_{230}) และ 280นาโนเมตร (A_{280}) สำหรับดีเอ็นเอ กรดนิวคลีอิก และโปรตีนตามลำดับ (Zhou *et al.*, 1995) และค่าที่อ่านได้จะมีความถูกต้องเมื่ออยู่ระหว่าง 0.15-1.0 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เท่ากับ 1 หมายถึงความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($A_{260} = 1 = 50$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร DNA) หรือความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะมีค่า $A_{260} = 20$ ซึ่งใช้สำหรับอ้างอิงในการคำนวณปริมาณดีเอ็นเอ และคุณภาพของดีเอ็นเอพิจารณาจากค่า A_{260}/A_{280} และ A_{260}/A_{230} เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนและกรดนิวคลีอิก ที่ปนเปื้อนอยู่หลังจากการสกัดแยกตามลำดับสำหรับดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8 ถึง 1.9 (Ausubel *et al.*, 1997)

ในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนยีน 16S และ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ใช้เทคนิค PCR ด้วย universal primer ที่มีความจำเพาะกับช่วง V3 region ของ 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (Medlin *et al.*, 1998) ประกอบไปด้วย forward primer VFC (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') ซึ่งมี GC-clamp และ reverse primer VR (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Muyzer *et al.*, 1993) โดยผสมสารต่อไปนี้ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ใช้ DNA ต้นแบบ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร(50 นาโนกรัม), 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร (Bioscience; Taiwan), 50 mM $MgCl_2$ 1.5 ไมโครลิตร, 10X deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) mixture 1 ไมโครลิตร (Bioscience; Taiwan), 10 mM VFC และ VR ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase (5 ยูนิตต่อ

ไมโครลิตร) (Bioscience; Taiwan) 0.2 ไมโครลิตรผสมลงในหลอด eppendorf ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปฏิบัติการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Techne; UK) ในกรณีของยีน 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ทำเช่นเดียวกันโดย ประกอบไปด้วย forward primer FR1-gc (5'- CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC GAI CCA TTC AAT CGG TAI T -3') ซึ่งมี GC-clamp และ reverse primer FF 390 (5'- CGA TAA CGA ACG AGA CCT -3') (Vainio, 2000) ปริมาตรสุดท้ายของสารผสมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ใช้ DNA ต้นแบบ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม), 10x PCR buffer (Bioscience; Taiwan) 5 ไมโครลิตร, 10 μ M deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) mixture 1.3 ไมโครลิตร (Bioscience; Taiwan), 10 μ M VFC และ VR ไมโครลิตร 1.6 ไมโครลิตร และ Taq polymerase (5 หน่วยต่อไมโครลิตร) (Bioscience; Taiwan) 3.3 ไมโครลิตรผสมลงในหลอด eppendorf ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปฏิบัติการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ที่ initiation denaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที denaturing 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 30 รอบและตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Techne; UK)

2.1.3 การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose electrophoresis เตรียม 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ในสารละลาย 0.5x TBE buffer (Sambrook *et al.*, 1989) เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำเทใส่ใน gel tray และเสียบ gel comb ที่งัดไว้จนเจลแข็งตัวแล้วดึงออกจากนั้นก็นำ agarose gel ไปวางในเครื่อง electrophoresis ที่มี 0.5x TBE buffer อยู่ ผสม 0.5x TBE buffer, 10x loading buffer และ ผลิตภัณฑ์ PCR ในอัตราส่วน 5:1:4 แล้วนำสารผสมที่ได้ไปหยอดใส่ช่องเจล โดยหยอด marker (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ลงในช่องเจลแรกและช่องเจลสุดท้ายเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นตั้งค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30-40 นาที เสร็จแล้วนำเจลแช่ ethidium bromide ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยแช่ในน้ำหรือ 0.5x TBE buffer เป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจสอบผลภายใต้แสง UV-B พร้อมถ่ายรูปเก็บไว้

2.1.4 การทำ denature gradient gel electrophoresis (DGGE) เตรียม polyacrylamide gel และการทำ denature gradient gel electrophoresis โดยวิธีการของ Supaphol *et al.* (2005) โดยใช้ความเข้มข้นของ polyacrylamide gel เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ หนา 0.75 มิลลิเมตร ใน 1xTAE buffer (0.04 M Tris base + 0.02 M Sodium acetate+1.0 mM EDTA และปรับพีเอช 7.4) DGGE มีความแตกต่างของ denaturant คือ urea-formamide gradient ตั้งแต่ 20 เปอร์เซ็นต์ ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย urea-formamide 100 เปอร์เซ็นต์ ได้จาก formamide 40 เปอร์เซ็นต์ (vol/vol) และ urea เข้มข้น 7.0 M ใช้ผลิตภัณฑ์ PCR หยอดลงไป แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า ที่มีศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 420 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมสีด้วย SYBR green I nucleic acid gel stain ที่เจือจาง 1:10,000 และนำเจลมาเขย่าในสารละลาย 1xTAE buffer เพื่อล้างสีส่วนเกินนาน 30 นาที แล้วนำเจลมาส่องด้วย SYBR gel document

2.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและประชากรเชื้อรา ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows ด้วยวิธี principle component analysis (PCA) และ canonical correspondence analysis (CCA)

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจาก DGGE เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ตัดแถบขึ้นดีเอ็นเอที่มีลักษณะเด่นซึ่งคาดว่าน่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรครากเน่าในหม่อนทุกแถบ โดยใช้หลอดดูดตัวอย่างขนาดเล็ก (microtip) ที่มาเชื่อมแล้วมาตัด แล้วใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่บรรจุ Milli-Q water 30 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดสารละลายใส 1 ไมโครลิตร ทำการยืนยันผลว่าเป็นดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว (single band DNA) โดยทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วย primer VFC และ VR เหมือนวิธี PCR ข้างต้น จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้เพื่อรอผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอและคัดเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

2.2.2 การเลือกแถบ DNA จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย นำรูปภาพเจล ซึ่งได้จากการทำ electrophoresis ทำการเปลี่ยนความเข้มของลายพิมพ์แต่ละแถบดีเอ็นเอ แสดงเป็นค่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม Quality One และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากความเข้มของลายพิมพ์และการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อราในพื้นที่ที่มีการจัดการแตกต่างกัน ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows เพื่อ

ทราบถึงกลุ่มจุลินทรีย์ที่แทนด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับการจัดการดินแบบต่างๆ จากนั้นทำการส่งตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ

2.2.3 การหาลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย นำลำดับเบสของดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์ที่ Macrogen Ltd. ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated sequencer) รุ่น ABI3730XL ในการวิเคราะห์ จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ในฐานข้อมูลของ national center for biotechnology information (NCBI) ใช้โปรแกรม basic local alignment search tools (BLASTN) จากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> เพื่อใช้ในการจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

2.3 การศึกษาและเปรียบเทียบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ด้วยเทคนิคการโคลนนิ่ง (cloning)

จากขั้นตอนการสกัดในข้อ 2.1.1 นำตัวอย่างดินที่ได้จากการเก็บตัวอย่างพื้นที่ปลูกหม่อน ที่เหลือจากการทำ DGGE ทั้ง 2 ซ้ำรวมกัน มาทำการสกัด DNA ด้วยวิธีของ Zhou *et al.* (1995) ซึ่งมีขั้นตอนเหมือนการสกัด DNA สำหรับการทำให้ DGGE

2.3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S และ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ตัวอย่าง DNA ที่ได้จะใช้เป็นต้นแบบสารพันธุกรรมในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนของ 16S และ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ โดยใช้เทคนิค PCR ด้วย universal primer ที่ประกอบไปด้วย forward primer AF1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3'), reverse primer 1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3') และ forward primer UF1 (5'-CGA ATC GCA TGG CCT TG -3'), reverse primer S3 (5'-AGT CAA ATT AAG CCG CAG -3') ตามลำดับ เริ่มจากเตรียม PCR mixture ของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ โดยผสมน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ 103 ไมโครลิตร, 10x Taq PCR buffer (Bioscience; Taiwan) 20 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTPs mixture 1.2 ไมโครลิตร (Bioscience; Taiwan), 10 μM primer AF1 จำนวน 20 ไมโครลิตร, 10x primer 1541R 20 ไมโครลิตร, Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Bioscience; Taiwan) 1 ไมโครลิตร และ 10x template DNA (0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปฏิกริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยา PCR ทำที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 25 รอบและตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Techne; UK) ส่วน 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ทำเช่นเดียวกัน เตรียม PCR mixture โดยผสมน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 10³ ไมโครลิตร, 10x Taq PCR buffer (Bioscience; Taiwan) 20 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs mixture 1.2 ไมโครลิตร (Bioscience; Taiwan), 10 µM primer UF1 จำนวน 20 ไมโครลิตร, 10 µM primer S3 20 ไมโครลิตร, Taq polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Bioscience; Taiwan) 1 ไมโครลิตรและ 10x template DNA (0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปฏิบัติตามขั้นตอนการตั้งเครื่องดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ทำที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 20 วินาที จำนวน 30 รอบและตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Techne; UK)

2.3.2 ตรวจสอบคุณภาพของ ผลิตภัณฑ์ PCR โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis เช่นเดียวกับการตรวจสอบ ผลิตภัณฑ์ PCR ในการทำ DGGE จากนั้นทำ cloning โดยผสมผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 1-4 ไมโครลิตร กับ pDrive cloning vector (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) (QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit; Germany) 1 ไมโครลิตร, 2x ligation master mix (QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit; Germany) 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ (QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit; Germany) ให้ได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ช่วงอุณหภูมิ 4-16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ligation จากนั้นนำสารผสมที่ได้ปริมาตร 1-2 ไมโครลิตรผสมกับ QIAGEN EZ competent cells 50 ไมโครลิตร (QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit; Germany) เพื่อให้เกิดกระบวนการ transformation จึงบ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วให้ความร้อนโดยแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาทีและแช่น้ำแข็งอีกครั้ง เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำ SOC medium (QIAGEN PCR Cloning^{plus} Kit) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมนลงในสารผสมที่ได้แล้วไปเลี้ยงเชื้อบนจานอาหาร LB agar ที่มี ampicillin, X-gal และ IPTG ผสมอยู่ และนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 15-18 ชั่วโมง จะพบการเจริญของเชื้อ โดยเชื้อที่มีการโคลนนิ่งหรือมี insert gene จะเกิดโคโลนีสีขาว ส่วนเชื้อที่ไม่มีเกิดการโคลนนิ่งหรือ ไม่มี insert gene จะเกิดโคโลนีเป็นสีฟ้า (QIAGEN, 2001)

2.3.3 เพิ่มปริมาณ insert gene ด้วย วิธี PCR โดยใช้ M 13 F และ R primer เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ DNA หรือ insert gene ที่ vector ได้รับมาจากการโคลนนิ่ง นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์หาความหลากหลายต่อไป ขั้นตอนการทำ PCR คือ ใช้ไม้อิมพ่นที่ฆ่าเชื้อแล้วไปอิมพ่นเชื้อที่มีโคโลนีสีขาว (มี insert gene) ไม้อิมพ่น 1 อันต่อ 1 โคโลนี แล้วนำไปจุ่มต่อในหลอด PCR ที่บรรจุ pre-mixture หลอดละ 20 ไมโครลิตร โดยที่เตรียม pre-mixture 1,000 ไมโครลิตร จากการผสม น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 617 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer (Bioscience; Taiwan) 100 ไมโครลิตร, 2.5mM dNTPs 80 ไมโครลิตร(Bioscience; Taiwan), 10x primer (M13 F และ M13 R) 2 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase (15 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร) (Bioscience; Taiwan) 3 ไมโครลิตร จึงได้จำนวนหลอด PCR เท่ากับจำนวนโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารปฏิกริยา สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยา PCR ทำที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 20 วินาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Techne; UK) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis

2.3.4 การทำ restriction fragment length polymorphism (RFLP) เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างตัวอย่างชิ้น DNA ในแต่ละโคลนโดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hha* I และ *Hae* III ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีลำดับเบสจำเพาะ 4 คู่เบส มีจุดตัดระหว่าง G-C ทำให้สามารถจำแนกรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ถูกตัดได้ง่าย ขั้นตอนคือ เตรียม pre-mixture 4.8 ไมโครลิตรต่อหลอด จากการผสมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 4.15 ไมโครลิตร และ 10x K buffer 0.65 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรต่อหลอด และผสมให้เข้ากันด้วยไปเปต แล้วเติมผลิตภัณฑ์ PCR จาก stock ตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร ลงในหลอด ปิดฝาและนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารผสมที่ได้มาหลอดละ 4 ไมโครลิตร ผสมกับ pre-mixture ที่เตรียมจากการผสมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ และ 10x K buffer ในสัดส่วน 1.4:0.6 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมบนกระดาษพาราฟิล์ม เพื่อนำมาทำ 2.5 เปอร์เซ็นต์ large agarose gel electrophoresis ใน 0.5 TBE buffer โดยเปิดเครื่อง electrophoresis ด้วยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45-60 นาที หรือจนกระทั่งสีของ BPB (bromophenolblue) เคลื่อนมาถึงปลายอีกด้านหนึ่งของเจล จากนั้นก็นำเจลมาย้อมสีด้วย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาส่องภายใต้แสง ultraviolet พร้อมทั้งบันทึกภาพ ภาพเจลที่ได้จะปรากฏรูปแบบแถบของชิ้นส่วน DNA ขนาดต่างๆ

ของแต่ละโคลน ถ้าปรากฏแถบของขนาด DNA ที่มีรูปแบบที่เหมือนกันก็แสดงว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน ซึ่งก็สามารถนำต้นแบบของ ผลิตภัณฑ์ PCR หลอดใดหลอดหนึ่งและต้นแบบของหลอดอื่นๆ ที่มีรูปแบบแตกต่างกันไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อหาลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของแบคทีเรียต่อไป ตามวิธีการในข้อ 2.2.3

2.4 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และเคมีของดินในพื้นที่ปลูกหม่อน

ในการวิเคราะห์คุณสมบัติดังกล่าวของดินเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติของดิน ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยในการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครากเน่า โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างดินนำตัวอย่างดินทั้งหมด ตากให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นบดและร่อนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบสมบัติและปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญ เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพดินเพื่อการปลูกพืช ค่าวิเคราะห์ประกอบด้วย

การวิเคราะห์ทางกายภาพ ได้แก่

2.4.1 การกระจายของอนุภาคดิน (soil particle size distribution) โดยวิธี pipette method (Kilmer and Alexander, 1949; Day, 1965) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์นำมาแจกแจงกลุ่มของเนื้อดิน (soil textural class) โดยการเปรียบเทียบกับชั้นเนื้อดินตามเกณฑ์ของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (USDA textural class) (Soil Survey Division Staff, 1993)

2.4.2 วิเคราะห์ค่าความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) โดยวิธี clod method (Blake, 1965) นำตัวอย่างดินโดยเก็บแบบ undisturbed sampling มาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักคงที่แล้วบันทึกน้ำหนักอบแห้ง จากนั้นคำนวณหาความหนาแน่นรวมของดินจากสูตร

$$D_b = \frac{W_{ods}}{V_t}$$

D_b = ความหนาแน่นรวม (กรัม/ ลูกบาศก์เซนติเมตร)

W_{ods} = น้ำหนักดินอบแห้ง (กรัม)

V_t = ปริมาตรทั้งหมดของดิน (ลูกบาศก์เซนติเมตร)

2.4.3 วิเคราะห์ค่าน้ำของดิน (hydraulic conductivity) โดยวิธี falling head method (Klute, 1965) เตรียมตัวอย่างดินที่ใช้ในการทดลองโดยเป็นตัวอย่างดินที่เก็บโดยวิธี undisturbed soil sampling ใช้กระบอกลูกบาศก์ขนาด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้กระดาษกรองปิดบริเวณก้นกระบอกลูกบาศก์ตัวอย่างดินบริเวณที่ต้องการวัด จากนั้นรัดด้วยยางรัด นำไปแช่น้ำที่มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เป็นเวลา 1 คืนหรือจนกระทั่งดินอิ่มตัวด้วยน้ำทั้งหมด นำกระดาษกรองออก ทำความสะอาดบริเวณรอบกระบอกลูกบาศก์ตัวอย่างดิน ปิดด้วยตะแกรงรองแล้วรองด้วยกระดาษอีกชั้น เปิดฝาปิดกระบอกลูกบาศก์ตัวอย่างดินด้านบนออก สวมยางที่เชื่อมต่อระหว่างกระบอกลูกบาศก์ตัวอย่างดินกับท่อวัดระดับน้ำเข้าด้วยกัน และเตรียมภาชนะสำหรับรองน้ำที่ระบายออกมา เติมน้ำลงในท่อวัดน้ำจนระดับสูงกว่าระดับน้ำของท่อ เริ่มจับเวลาบันทึกเมื่อน้ำผ่านระดับน้ำ และบันทึกเวลาเมื่อระดับน้ำผ่านระดับน้ำต่ำกว่า คำนวณเวลาที่น้ำใช้ในการเคลื่อนที่จากระดับน้ำจนถึงระดับน้ำต่ำกว่า จากนั้นนำเวลาที่ได้อ่านหาค่า K_s

$$K_s = 2.3 \frac{a}{A} \left[\frac{L}{t} \right] \log \left[\frac{H_1}{H_2} \right]$$

K_s = สัมประสิทธิ์การนำน้ำของดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (cm/s)

a = พื้นที่หน้าตัดของท่อวัดระดับน้ำ

A = พื้นที่หน้าตัดของกระบอกลูกบาศก์ตัวอย่างดิน

L = ความยาวของกระบอกลูกบาศก์ตัวอย่างดิน

H_1 = ความสูงระดับน้ำระดับบน

H_2 = ความสูงระดับน้ำระดับล่าง

t = เวลาที่น้ำไหลเคลื่อนที่ระดับน้ำระดับบนจนถึงระดับน้ำระดับล่าง (S)

การวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่

2.4.4 วิเคราะห์ค่าพีเอช โดยชั่งดินตัวอย่างกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ในกระบอกลูกบาศก์ขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคณดินและน้ำให้ละลายเข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ในระหว่างนี้ให้คณดินเป็นครั้งคราว เมื่อครบ 30 นาที นำไปวัดด้วย pH meter (Peech, 1965)

2.4.5 วิเคราะห์ปริมาณอินทรียวัตถุ (เปอร์เซ็นต์ OM) โดยวิธี Walkley-Black titration (Walkley and Black, 1934) เป็นการทำให้ปฏิกิริยา wet oxidation โดยใช้ตัวอย่างดินที่บดละเอียด (ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร) สูตรการคำนวณ คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ organic carbon} = \frac{(\text{me K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 - \text{me FeSO}_4) \times 0.003 \times 100 \times 1.33}{\text{weight of sample in grams}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ อินทรียวัตถุ} = \% \text{ organic carbon} \times 1.72$$

2.4.6 วิเคราะห์สภาพการนำไฟฟ้า (EC) โดยวัดสภาพการนำไฟฟ้าของสารสกัดอิ่มตัวของดิน (saturation extract) วัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง electrical conductivity bridge (Richards, 1954)

วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญ (N, P, K, Ca และ Mg)

2.4.7 วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) วิธี Kjeldahl method (ทศนิยม และจรงค์ 2542) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ digestion และ distillation

Digestion คือ การย่อยตัวอย่างดิน (ผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร) ด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่อุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส

Distillation เป็นขั้นตอนการกลั่นสารละลายที่ได้จากการย่อยและดักจับไนโตรเจนด้วย H_3BO_3 indicator

$$\text{เปอร์เซ็นต์ N} = \frac{\text{ml HCl used (sample-blank titration)} \times \text{normality ของ HCl} \times 1.4}{\text{weight of soil sample (grams)}}$$

2.4.8 ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available phosphate) โดยวิธีสกัด Bray II (Bray and Kurtzk, 1945) สกัดดินด้วยตัวอย่างสารละลาย Bray II จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 2 แล้วนำสารละลายไปวัดปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 882 นาโนเมตร

2.4.9 วิเคราะห์หาโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K) นำตัวอย่างดินมาสกัดด้วยสารละลาย NH_4OAc เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 30 นาทีกรองด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 2 วิเคราะห์หาโพแทสเซียมด้วยเครื่อง atomic absorption spectrophotometer (Pratt, 1965)



ผลและวิจารณ์

1. สมบัติของดินที่นำมาศึกษา

ผลการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของดินจากบริเวณแปลงทดลองปลูกหม่อนของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม แสดงในตารางที่ 3 พบว่าเนื้อดินในพื้นที่ไถระเบิดและไม่ไถระเบิดดินดาน คือ ดินร่วนปนทรายแป้ง (silt loam) ค่าพีเอชของดินในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดานเท่ากับ 6.08 และในพื้นที่ไม่ไถระเบิดดินดานเท่ากับ 5.70 จัดเป็นดินกรดปานกลาง (moderately acid) (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) สภาพการนำไฟฟ้า (EC) ในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน และในพื้นที่ไม่ไถระเบิดดินดาน เท่ากับ 0.2 จัดเป็นดินไม่เค็ม (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548) ร้อยละอินทรีย์วัตถุในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน และในพื้นที่ไม่ไถระเบิดดินดาน เท่ากับ 0.53 และ 0.35 จัดอยู่ในระดับต่ำและต่ำมากตามลำดับ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548) และไนโตรเจนทั้งหมดในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน และในพื้นที่ไม่ไถระเบิดดินดาน เท่ากับ 1.42 และ 1.48 กรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ ซึ่งจัดอยู่ในระดับต่ำมาก (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน และในพื้นที่ไม่ไถระเบิดดินดาน เท่ากับ 14.42 และ 12.82 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จัดอยู่ในระดับปานกลาง (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548) โพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน และในพื้นที่ไม่ไถระเบิดดินดาน เท่ากับ 62.56 และ 49.37 กรัมต่อกิโลกรัมจัดอยู่ในระดับปานกลางและต่ำตามลำดับ (กรมพัฒนาที่ดิน, 2548) ความหนาแน่นรวมของดินในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน และในพื้นที่ไม่ไถระเบิดดินดาน เท่ากับ 1.60 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร จัดอยู่ในระดับค่อนข้างสูงและค่าน้ำหนักของดิน ในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน และในพื้นที่ไม่ไถระเบิดดินดาน เท่ากับ 10.50 และ 28.21 เซนติเมตรต่อชั่วโมงจัดอยู่ในระดับเร็วปานกลางและเร็วมากตามลำดับ ซึ่ง ปัจจัยทางกายภาพคือ การจัดการดินโดยวิธีการไถและไม่ไถระเบิดดินดาน ส่งผลต่อค่าน้ำหนักของดิน (hydraulic conductivity) โดยพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดานส่งผลให้มีค่าน้ำหนักต่ำ โดยทั่วไปแล้วเมื่อมีการไถระเบิดดินดานมักจะมีค่าน้ำหนักสูง แต่ในกรณีนี้อาจเกิดจากเนื้อดินในพื้นที่มีอนุภาคทรายแป้ง (silt) ถึงร้อยละ 52-65 ของเนื้อดินซึ่งจัดเป็นเนื้อดินประเภทดินร่วนปนทรายแป้ง (silt loam) เมื่อดินถูกรบกวนจน เม็ดดินแตกออก ทำให้อนุภาคขนาดเล็ก เช่นอนุภาคดินเหนียวและอนุภาคขนาดทรายแป้งไปอุดช่องว่างในโครงสร้างดินทำให้เกิดชั้นดานขึ้น ส่งผลให้ค่าน้ำหนักของดินในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดานมีค่าน้ำหนักต่ำกว่าในพื้นที่ที่ไม่มีการไถระเบิดดินดาน

ตารางที่ 3 สมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการก่อนและหลังทำการทดลองของตัวอย่างดิน
แปลงทดลองปลูกหม่อน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม

| สมบัติของดิน | ก่อนการทดลอง | หลังการทดลอง | |
|---|--------------|----------------|-------------------|
| | | ไถระเบิดดินดาน | ไม่ไถระเบิดดินดาน |
| Texture ^{1/} | nd. | silt loam | silt loam |
| Sand (g kg ⁻¹) | nd. | 220 | 280 |
| Silt (g kg ⁻¹) | nd. | 650 | 520 |
| Clay (g kg ⁻¹) | nd. | 130 | 200 |
| pH ^{2/} | 5.65 | 6.08 | 5.70 |
| EC _e ^{3/} (dS m ⁻¹) | nd. | 0.20 | 0.20 |
| OM ^{4/} (%) | 0.54 | 0.53 | 0.35 |
| Total N ^{5/} (g N kg ⁻¹) | nd. | 1.42 | 1.48 |
| Avail.P ^{6/} (mg P kg ⁻¹) | 3.25 | 14.42 | 12.82 |
| Avail.K ^{7/} (mg K kg ⁻¹) | 63.0 | 62.56 | 49.37 |
| Bulk density ^{8/} (Mg m ⁻³) | nd. | 1.61 | 1.61 |
| Hydraulic conductivity ^{9/} (cm hr ⁻¹) | nd. | 10.50 | 28.21 |

หมายเหตุ

^{1/} Pipette method (Kilmer and Alexander, 1949; Day, 1965)

^{2/} pH meter (soil : water; 1:1) (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)

^{3/} Electric conductometer (Richards, 1954)

^{4/} Walkley and Black method (Walkley and Black, 1934)

^{5/} Kjeldahl method (ทัศนีย์และจรงค์ษ์, 2542)

^{6/} Bray II method (Bray and Kurtz, 1945)

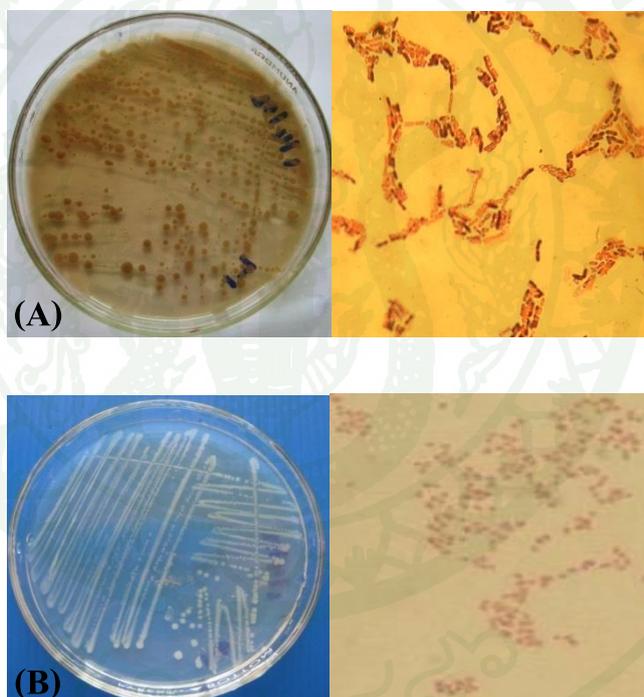
^{7/} Ammonium acetate method (Pratt, 1965)

^{8/} Core method (Bla78ke, 1965)

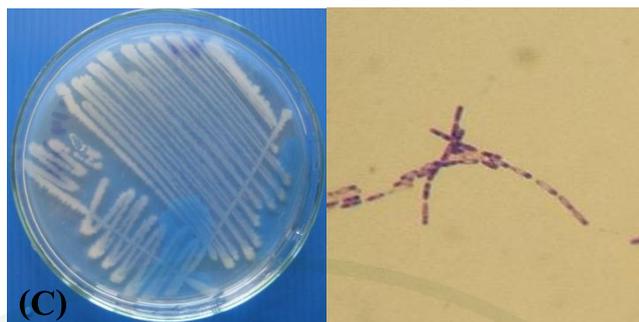
^{9/} Falling Head Method (Klute, 1965)

2. การแยกจุลินทรีย์ และคัดเลือกจุลินทรีย์บริเวณรากหม่อน

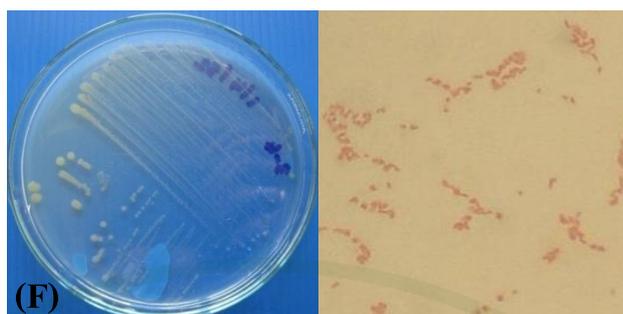
การแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณแปลงทดลองปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่า ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม ใช้เทคนิคการคัดแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและย้อมสีแบบแกรมโดยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ในพื้นที่ที่มีการปลูกหม่อนบริเวณที่เป็นโรครากเน่า พบแบคทีเรีย 7 ชนิด คือ *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter* sp., *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter* sp. และ *Cronobacter sakazakii* (ภาพที่ 3) และเชื้อรา 5 ชนิด คือ *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium solani*, *Penicillium* sp. และ *Aspergillus candidus* (ภาพที่ 4)



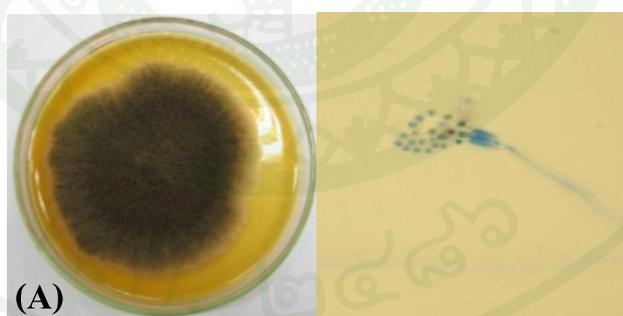
ภาพที่ 3 แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่ามี คือ *Bacillus megaterium* (A), *Bacillus subtilis* (B), *Bacillus cereus* (C), *Acinetobacter* sp. (D), *Klebsiella pneumonia* (E), *Enterobacter* sp. (F) และ *Cronobacter sakazakii* (G) ตามลำดับ



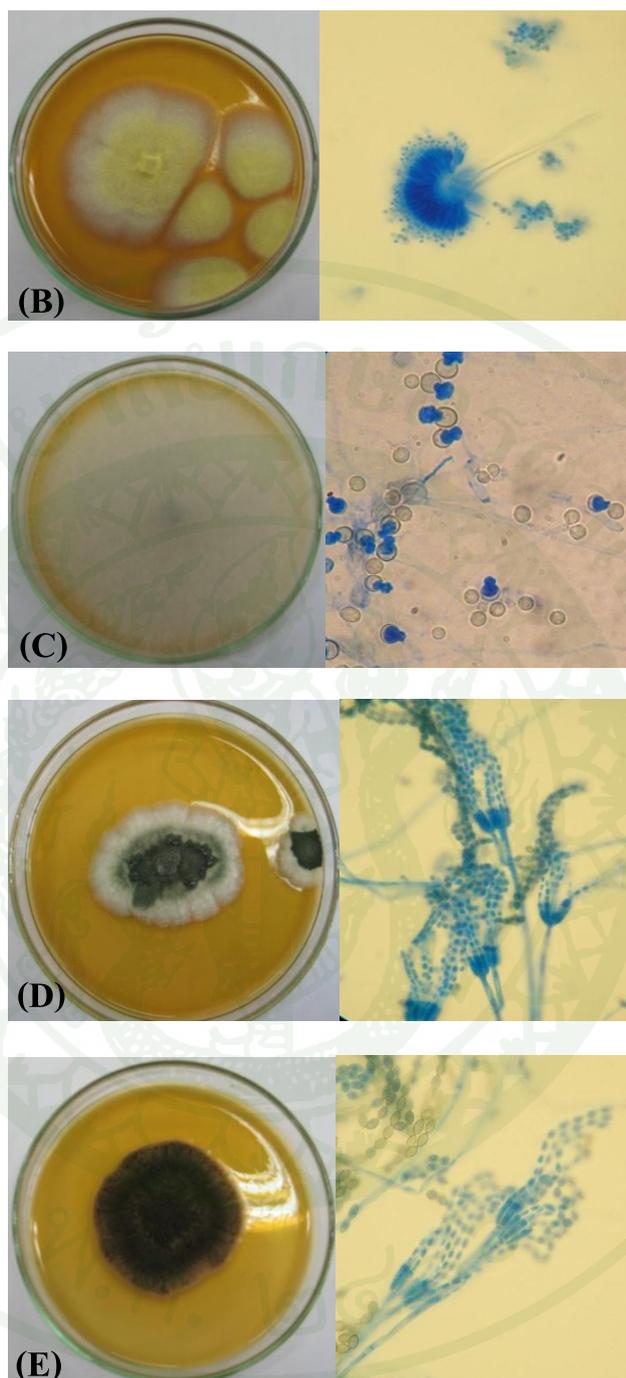
ภาพที่ 3 แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่า คือ *Bacillus megaterium* (A), *Bacillus subtilis* (B), *Bacillus cereus* (C), *Acinetobacter* sp. (D), *Klebsiella pneumonia* (E), *Enterobacter* sp. (F) และ *Cronobacter sakazakii* (G) ตามลำดับ (ต่อ)



ภาพที่ 3 แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่า คือ *Bacillus megaterium* (A), *Bacillus subtilis* (B), *Bacillus cereus* (C), *Acinetobacter* sp. (D), *Klebsiella pneumonia* (E), *Enterobacter* sp. (F) และ *Cronobacter sakazakii* (G) ตามลำดับ (ต่อ)



ภาพที่ 4 เชื้อราที่คัดแยกได้ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่า คือ *Aspergillus niger* (A), *Aspergillus terreus* (B), *Fusarium solani* (C), *Penicillium* sp. (D), *Aspergillus candidus* (E) และ *Emercilla nidulans* (F) ตามลำดับ



ภาพที่ 4 เชื้อราที่คัดแยกได้ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่า คือ *Aspergillus niger* (A), *Aspergillus terreus* (B), *Fusarium solani* (C), *Penicillium* sp. (D), *Aspergillus candidus* (E) และ *Emercilla nidulans* (F) ตามลำดับ (ต่อ)

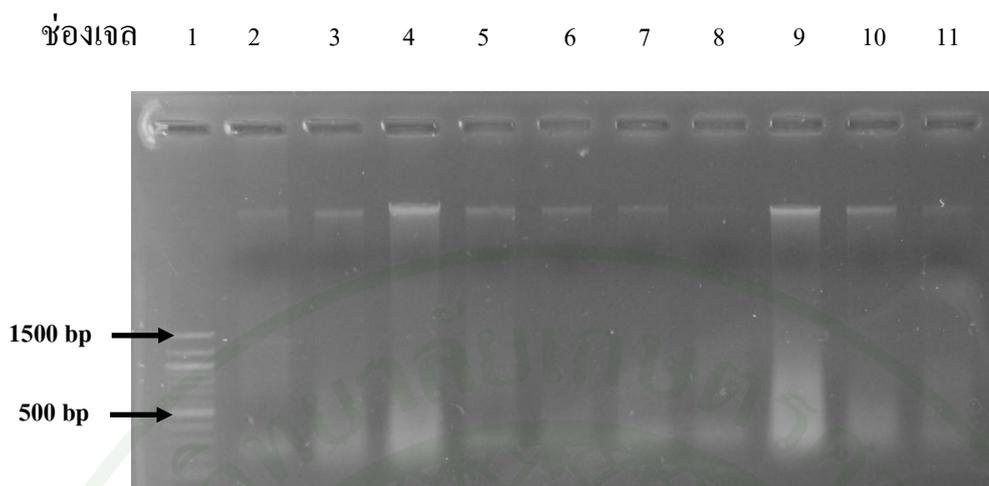


ภาพที่ 4 เชื้อราที่คัดแยกได้ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่า คือ *Aspergillus niger* (A), *Aspergillus terreus* (B), *Fusarium solani* (C), *Penicillium* sp. (D), *Aspergillus candidus* (E) และ *Emercilla nidulans* (F) ตามลำดับ (ต่อ)

3. การศึกษาโดยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

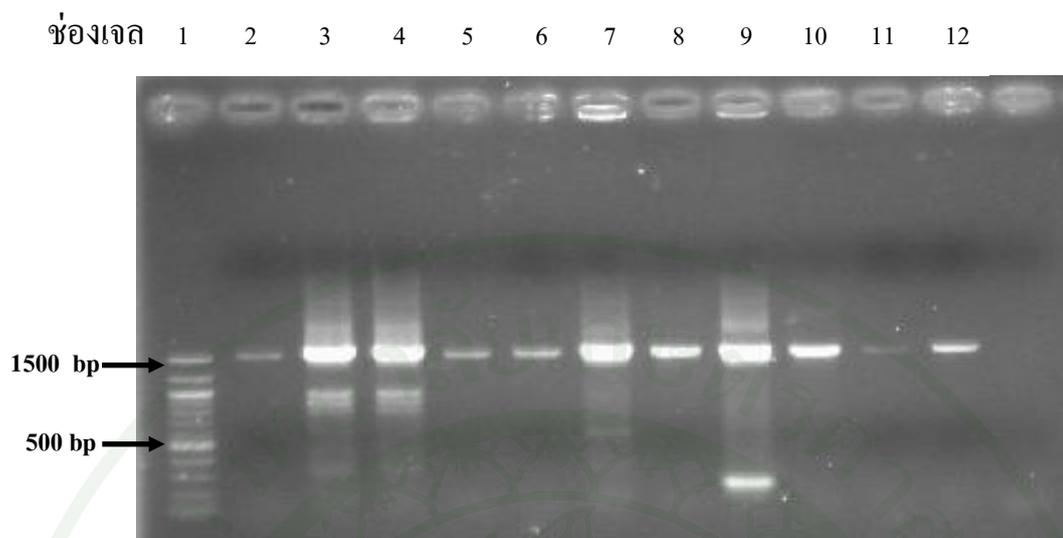
3.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อรา โดยใช้ ส่วนของ ยีน 16S และ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ

เปรียบเทียบกลุ่มประชากรแบคทีเรียและเชื้อรา และความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียและเชื้อรา จากบริเวณรากหม่อน พันธุ์บุรีรัมย์ 60 และหม่อนพันธุ์คุณไพที่เป็นโรคและไม่เป็นโรครากเน่า เพื่อศึกษาเชื้อที่มีลักษณะเด่น ผลการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อราและแบคทีเรีย โดยวิธีของ Zhou *et al.* (1995) จากตัวอย่างดิน แสดงในภาพที่ 5 พบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 10,000 bp

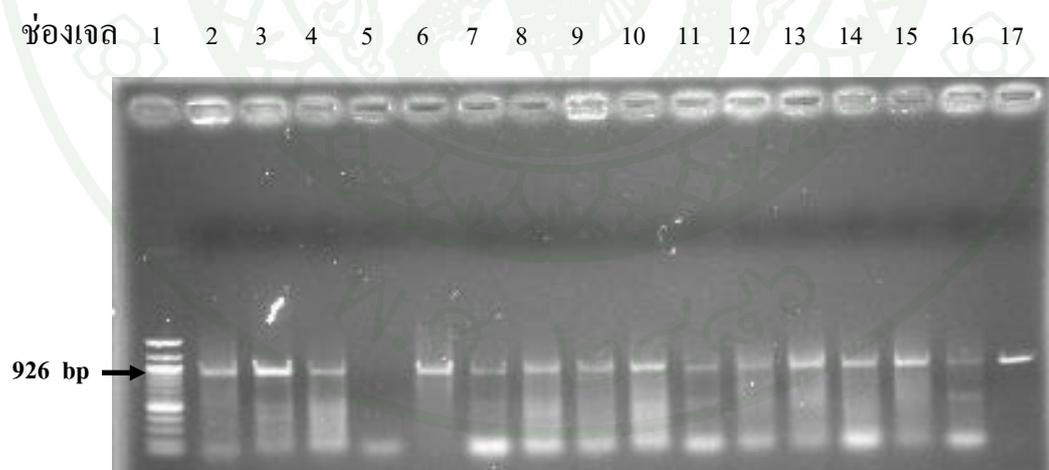


ภาพที่ 5 ผลการสกัดสารพันธุกรรมจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน ช่องเจลที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ช่องเจลที่ 2-11 คือ ตัวอย่างดินในพื้นที่บริเวณปลูกหม่อน

จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนในตำแหน่ง 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ โดยวิธี PCR ขึ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 1,500 bp เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรแบคทีเรีย (ภาพที่ 6) และทำการเพิ่มปริมาณในส่วนของ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ขึ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 626 bp (ภาพที่ 7) เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรเชื้อรา ผลการเพิ่มปริมาณยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง



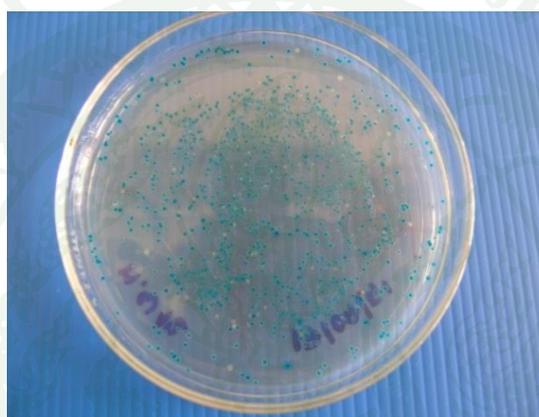
ภาพที่ 6 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ จากตัวอย่างดิน ช่องเจลที่ 1 คือ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ช่องเจลที่ 2-11 คือ ตัวอย่างดิน ในพื้นที่บริเวณปลูกหม่อน



ภาพที่ 7 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ จากตัวอย่างดิน ช่องเจลที่ 1 คือ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ช่องเจลที่ 2-17 คือ ตัวอย่างดิน ในพื้นที่บริเวณปลูกหม่อน

3.2 การศึกษาและเปรียบเทียบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ด้วยเทคนิคการโคลนนิ่ง (cloning)

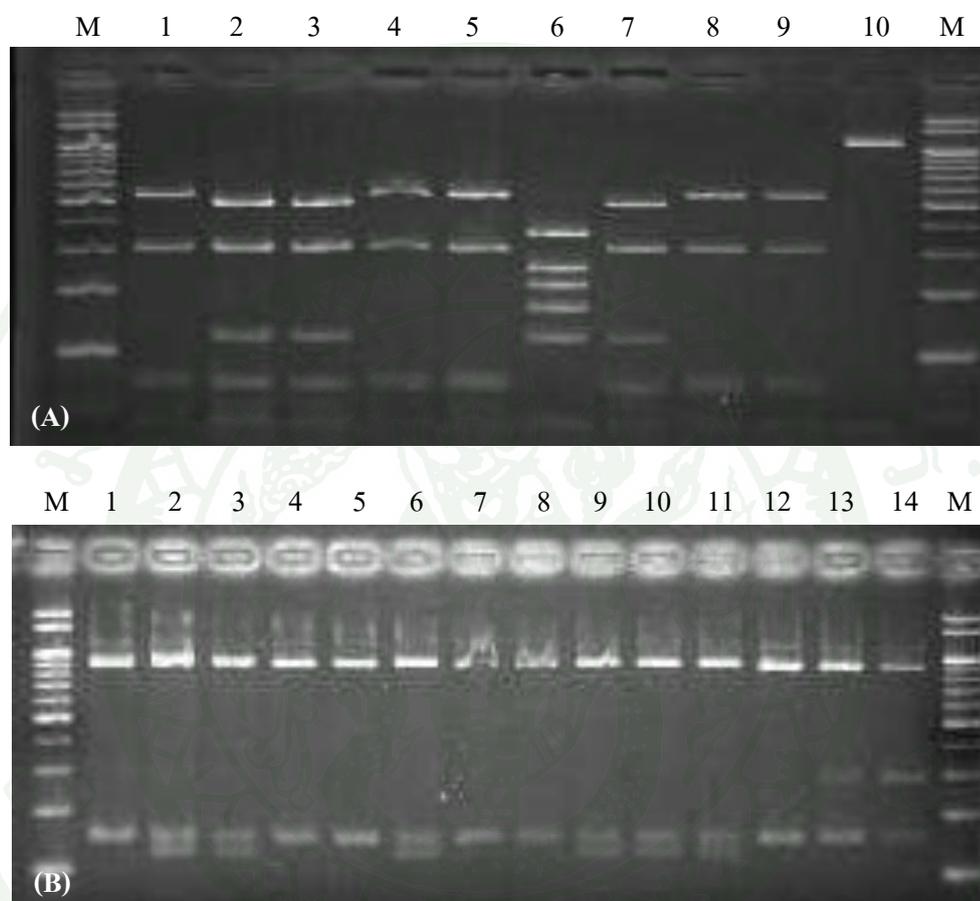
ศึกษาและเปรียบเทียบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ด้วยเทคนิคโคลนนิ่ง เพื่อแยกดีเอ็นเอของแบคทีเรียหลายชนิดที่ปะปนกันอยู่ออกจากกัน ในลักษณะดีเอ็นเอเดี่ยวของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิค blue-white screening ตรวจสอบโคโลนีที่มี insert gene ซึ่งโคโลนีที่สีขาว คือมี insert gene ส่วนโคโลนีสีฟ้าคือไม่มี insert gene (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การตรวจสอบโคลนที่มี insert gene โดยเทคนิค blue-white screening

การคัดเลือกจำนวนโคลนที่มี insert gene ในส่วน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ แต่ละตัวอย่างดิน ดังนี้ ตัวอย่างดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 18 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 26 โคลน และบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 50 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 59 โคลน ตัวอย่างดินบริเวณราก ปลูกหม่อนพันธุ์คุณไพ เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 15 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 18 โคลน และบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 116 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 146 โคลน ส่วนยีนของ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ในแต่ละตัวอย่างดินมีจำนวน insert gene ดังนี้ ตัวอย่างดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 18 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 80 โคลน ตัวอย่างดินบริเวณรากและบริเวณไม้เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 18 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 20 โคลน ส่วนตัวอย่างดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพ เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 10 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 20 โคลน และบริเวณที่ไม่เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 12 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 14 โคลน จากนั้นนำตัวอย่างผลิตภัณฑ์

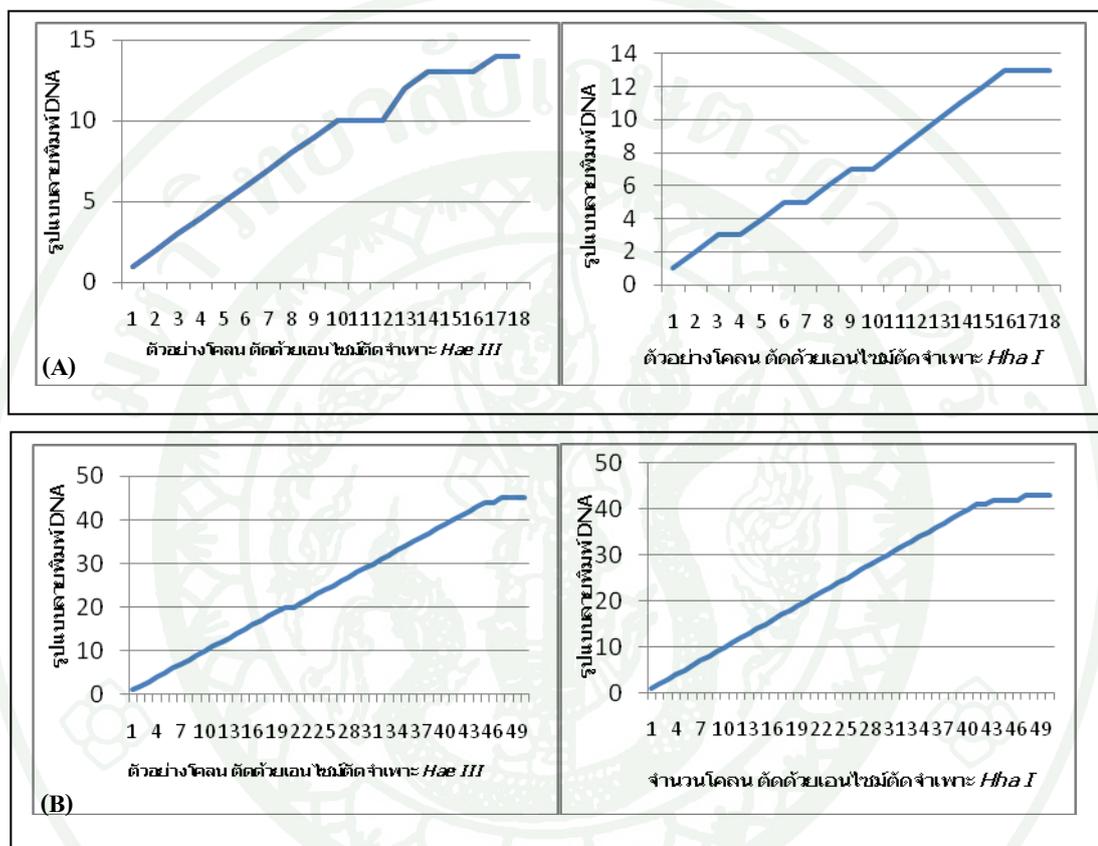
PCR ที่ได้จากการโคลนที่มี insert gene มาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hae* III ดังแสดงผลในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากตัวอย่างโคลน ซึ่งมี insert gene โดยใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) ตัดด้วย เอนไซม์ *Hae* III (A) และเอนไซม์ *Hha* I (B)

เมื่อนำรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เหมือนพันธุ์ริ้วมัย 60 ที่ไม่เป็นโรครากเน่าและที่เป็นโรครากเน่ามาเปรียบเทียบ พบว่าเหมือนที่เป็นโรครากเน่ามีจำนวนโคลนที่มี insert gene และรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยกว่าเหมือนที่ไม่เป็นโรครากเน่า ส่วนการเปรียบเทียบรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากตัวอย่างของเหมือนพันธุ์คุณไฟที่เป็นโรคและไม่เป็นโรครากเน่า พบว่ามีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏมีลักษณะแตกต่างกัน แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคทีเรียที่เข้าอาศัยในบริเวณรากเหมือนที่เป็นโรครากเน่า และไม่เป็นโรค

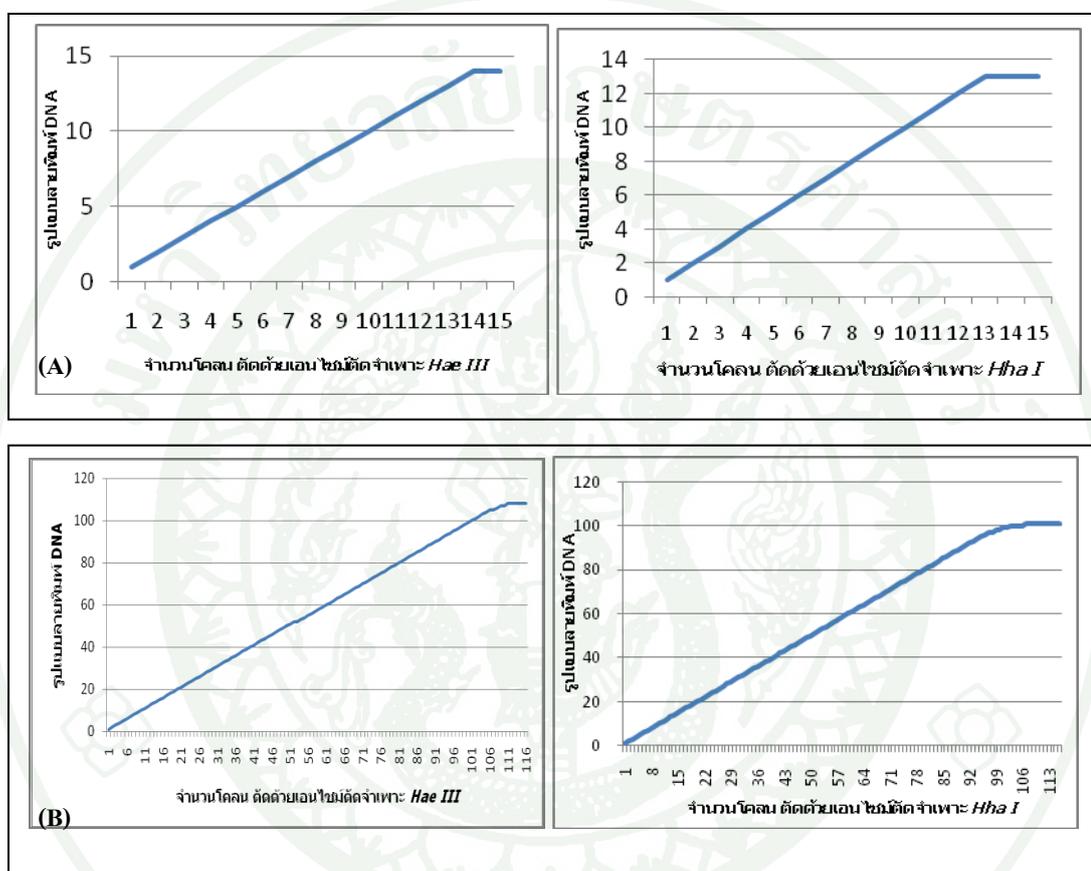
รากเน่ามีความแตกต่างกัน อีกทั้งยังพบว่าหม่อนที่เป็นโรครากเน่า มีจำนวนโคลนที่มี insert gene และรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ น้อยกว่าตัวอย่างรากหม่อนที่ไม่เป็นโรครากเน่า เนื่องจากหม่อนทั้ง 2 พันธุ์ มีการผลิตสารบริเวณขั้วราก (root exudate) ที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันส่งผลให้มีจุลินทรีย์อาศัยแตกต่างกัน (Nannipieri *et al.*, 2008)



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างโคลนและรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae III* และ *Hha I* จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B)

จากภาพที่ 10A เมื่อนำโคลนที่มี insert gene 18 โคลน จากตัวอย่างหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นโรครากเน่า ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae III* และ *Hha I* ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 6 รูปแบบ สามารถจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียได้ 3 กลุ่มดังนี้ *Planctomycete*, *Myxococcales*, *Firmicutes* และ 3 ชนิดคือ *Microbacterium sp.*, *Bacillus megaterium* และ *Bacillus sp.* และจากตัวอย่างหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ไม่เป็นโรครากเน่า (ภาพที่ 10B) เมื่อนำโคลนที่มี insert gene 50 โคลนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 13 รูปแบบ สามารถจำแนก

กลุ่มของแบคทีเรียได้ 6 กลุ่มดังนี้ *Cyanobacterium*, *Acidobacteriaceae*, *Actinobacterium*, *Myxococcales*, *Planctomycete*, *Rubrobacterales* และ 7 ชนิด คือ *Acidobacterium* sp., *Bartonella* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Microbacterium* sp. ดังตารางที่ 6



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างโคลนและรูปแบบของสายพันธุ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae III* และ *Hha I* จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพ เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B)

จากภาพที่ 11 A เมื่อนำโคลนที่มี insert gene 15 โคลน จากตัวอย่างหม่อนพันธุ์คุณไพ ที่เป็นโรครากเน่า ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae III* และ *Hha I* ได้รูปแบบสายพันธุ์ดีเอ็นเอ 6 รูปแบบ สามารถจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียได้ 3 กลุ่มคือ *Peptococcaceae*, *Actinobacterium* และ *Myxococcales* และ 3 ชนิดคือ *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp. และ *Bacillus megaterium* และจากตัวอย่างหม่อนพันธุ์คุณไพ ไม่เป็นโรครากเน่า (ภาพที่ 11B) เมื่อนำโคลนที่มี insert gene

116 โคลนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 22 รูปแบบ สามารถจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียได้ 9 กลุ่ม ดังนี้ *Cyanobacterium*, *Acidobacterium*, *Actinobacterium*, *Comanadaceae*, *Plancomycetes*, *Gemmatimonadetes*, *Rubrobacteridae*, *Firmicutes*, *Myxococcales* และ 13 ชนิด คือ *Alterierythrobacter* sp., *Brevibacillus* sp., *Lautropia* sp., *Paenibacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp. และ *Microbacterium ginsengisoli* ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการจัดจำแนกจำนวนโคลนตัวอย่างดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ของประชากรแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่ปลูกหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพ

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|---|---------------|--|----------|
| หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากเป็นโรครากเน่า | | | |
| P6 | HM584904.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain ANFLR1 | 88% |
| P2 | HQ432905.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain 249 | 90% |
| P11 | HQ415814.1 | <i>Bacillus</i> sp., MRG3 | 91% |
| P1 | FR718966.1 | <i>Bacillus</i> sp., strain TUB3 | 93% |
| P9 | GQ927166.1 | <i>Bacillus</i> sp., G4-1 | 92% |
| P10 | FJ444761.1 | Uncultured Firmicutes bacterium, clone 4y-106 | 88% |
| P19 | GU583823.1 | Uncultured Firmicutes bacterium, clone BB10 | 84% |
| P30 | EU980290.1 | Uncultured Firmicutes bacterium, clone TH_h44 | 90% |
| P12 | DQ989491.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone HKT972 | 90% |
| P13 | GU300233.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone PSB011.C21_I10 | 85% |
| P27 | HQ183912.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone De3129 | 88% |
| P20 | AM936915.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone CM14H11 | 84% |
| P14 | DQ646283.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone 18-63 | 79% |
| P26 | GU300429.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone PSB011.C21_G18 | 86% |
| P4 | AY395366.1 | Uncultured Planctomycete, clone EB1047 | 79% |
| P8 | AM397040.1 | Uncultured Planctomycete, clone C11.81 | 86% |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|--|---------------|--|----------|
| หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า | | | |
| P24 | HM799127.1 | Uncultured Planctomycete, clone PRTBB8760 | 87% |
| P37 | HQ222600.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain R12 | 94% |
| P34 | HM439510.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain S12 | 93% |
| P43 | GQ344804.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain DC2 | 92% |
| P23 | FJ982659.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain JBE0008 | 93% |
| P42 | GU250814.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain BR4 | 91% |
| P55 | HM480345.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain EIF18 | 89% |
| P58 | HM439508.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain S19 | 88% |
| P60 | EU221370.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain B2P2 | 91% |
| P57 | HM771671.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain PPB18 MB18 | 86% |
| P31 | HM480343.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain EIF11 | 93% |
| P49 | HQ423376.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain P3 | 92% |
| P54 | GQ901066.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain BBD-216-3d | 89% |
| P41 | EU156325.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain MA 3.3 | 91% |
| P32 | DQ208676.1 | <i>Bacillus</i> sp., KL2B1 | 90% |
| P56 | GQ927171.1 | <i>Bacillus</i> sp., G2-10 | 85% |
| P74 | EU685818.1 | <i>Bacillus</i> sp., PK-9 | 78% |
| P48 | HM061684.1 | <i>Bacillus</i> sp., CD (2010) | 90% |
| P59 | HQ650233.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain S6 | 90% |
| P45 | AY881643.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain CICC10048 | 91% |
| P71 | GQ903727.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain NKY-12 | 87% |
| P78 | FN393806.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain ES-131 | 91% |
| P28 | AB519062.1 | <i>Bartonella washoensis</i> , strain: DR3-1 | 79% |
| P29 | AB519062.1 | <i>Bartonella washoensis</i> , strain DR3-1 | 84% |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|--|---------------|--|----------|
| หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า | | | |
| P15 | HM438213.1 | Uncultured Acidobacteriaceae bacterium, clone T312D4 | 93% |
| P5 | GU300442.1 | Uncultured Acidobacteriaceae bacterium, clone PSB011.C21_K22 | 87% |
| P18 | FJ551972.1 | Uncultured Acidobacteriaceae bacterium, clone BACT_P4P05 | 84% |
| P7 | FJ752897.1 | Uncultured <i>Acidobacterium</i> sp., clone NdGal155 | 81% |
| P17 | EU223942.1 | Uncultured <i>Acidobacterium</i> sp., clone 64 | 90% |
| P51 | HQ183988.1 | Uncultured <i>Acidobacterium</i> sp., clone De187 | 85% |
| P50 | HQ018527.1 | Uncultured <i>Acidobacterium</i> sp., clone R4CP3R1B05 | 80% |
| P21 | HM196333.1 | Uncultured <i>Acidobacterium</i> sp., clone IFU_Y45 | 91% |
| P84 | GU195813.1 | Uncultured Actinobacterium, clone P1H08 | 83% |
| P86 | HM065554.1 | Uncultured Actinobacterium, clone SC085 | 75% |
| P44 | GQ894679.1 | Uncultured Actinobacterium, clone T3-65C_D01 | 82% |
| P75 | GU300434.1 | Uncultured Actinobacterium, clone PSB011.C21_G09 | 89% |
| P22 | FJ552691.1 | Uncultured Actinobacterium, clone LTSP_BACT_P6P21 | 82% |
| P3 | EU276548.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone Plot03-B04 | 89% |
| P38 | HM748584.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone ss2206 #8 | 84% |
| P47 | HM222415.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone OK4.01 | 89% |
| P40 | GQ894489.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone T3-455C_F12 | 83% |
| P46 | AB334281.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone: DoCY-61 | 87% |
| P39 | HM475009.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone GsGc_2_1 | 76% |
| P35 | FJ444664.1 | Uncultured Microbacterium sp., clone 2y-10 | 85% |
| P62 | AM936896.1 | Uncultured Microbacterium sp., clone CM14E11 | 93% |
| P36 | FJ551984.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone LTSP_BACT_P4P17 | 91% |
| P53 | FJ418119.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone SDU-W4-219 | 89% |
| P61 | EU437509.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone D030-W1-73 | 84% |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|--|---------------|---|----------|
| หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า | | | |
| P36 | FJ551984.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone LTSP_BACT_P4P17 | 91% |
| P33 | GU323636.1 | Uncultured Planctomycete, clone hsh-8-2 | 92% |
| P52 | HM208524.1 | Uncultured Planctomycete, clone WR38 | 89% |
| P25 | FJ551414.1 | Uncultured Rubrobacterales bacterium, clone LTSP_BACT_P3G01 | 84% |
| หม่อนพันธุ์คุณไผ่ ดินบริเวณรากเป็นโรครากเน่า | | | |
| P77 | GU188936.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain BCHCNZ279 | 93% |
| P79 | HM481467.1 | <i>Bacillus</i> sp., enrichment culture clone 1PS36 | 90% |
| P81 | FR695469.1 | <i>Bacillus</i> sp., strain CCMM B655 | 89% |
| P80 | HQ317199.1 | <i>Bacillus</i> sp., DYJL-H | 92% |
| P72 | GU195823.1 | Uncultured Actinobacterium, clone P1H11 | 92% |
| P88 | HM798643.1 | Uncultured Actinobacterium, clone PRTAB7704 | 94% |
| P89 | HM065537.1 | Uncultured Actinobacterium, clone SC047 | 90% |
| P63 | HM065540.1 | Uncultured Actinobacterium, clone SC055 | 90% |
| P73 | AM936915.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone CM14H11 | 93% |
| P70 | HM133592.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone Micr16S | 91% |
| P82 | FJ542914.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone A10-02D | 95% |
| P87 | EU029295.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone M120 | 89% |
| P83 | FJ552484.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone LTSP_BACT_P6H01 | 97% |
| P64 | EU016416.1 | Uncultured Peptococcaceae bacterium, clone HS07Ba10 | 75% |
| P74 | EF703065.1 | Uncultured Peptococcaceae bacterium, clone MS093A1_F12 | 94% |
| หม่อนพันธุ์คุณไผ่ ดินบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า | | | |
| P90 | GU166344.1 | <i>Altererythrobacter</i> sp., JM27 | 78% |
| P161 | HQ157567.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain EPB-8 | 90% |
| P143 | Z84576.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain WSBC10037 | 89% |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|---|---------------|--|----------|
| หม่อนพันธุ์คุณไพ ดินบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า | | | |
| P148 | HM771668.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain PPB13 MB13 | 87% |
| P145 | GQ342295.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain CG-T2 | 88% |
| P149 | GU250812.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain BL1 | 89% |
| P167 | GU116563.1 | <i>Bacillus cereus</i> , strain WYLW1-6 | 93% |
| P139 | GU906882.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain B196 | 86% |
| P124 | HQ009875.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain KPE62104H | 86% |
| P132 | GU573515.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain IAB56 | 87% |
| P176 | HM064042.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain HMI 19 | 90% |
| P133 | HM771662.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain PPB7 MB7 | 81% |
| P159 | GQ497140.1 | <i>Bacillus megaterium</i> , strain KKK 3 | 86% |
| P152 | FJ348004.1 | <i>Bacillus</i> sp., GGC-D | 87% |
| P169 | HM771641.1 | <i>Bacillus</i> sp., RK-1(2010) | 86% |
| P144 | FR727714.1 | <i>Bacillus</i> sp., strain IMT04 | 88% |
| P150 | EU754023.1 | <i>Bacillus</i> sp., AS1 | 85% |
| P168 | HM233973.1 | <i>Bacillus</i> sp., IHB B 2282 | 82% |
| P164 | HQ204327.1 | <i>Bacillus</i> sp., M09 | 85% |
| P146 | HQ415804.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain MRK2 | 89% |
| P134 | HQ452341.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain B-916 | 88% |
| P153 | GU301907.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain A2 | 86% |
| P160 | HQ415803.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain MRG11 | 82% |
| P142 | EF423591.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain F8712 | 87% |
| P147 | HQ316917.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain P71 | 83% |
| P151 | AF234849.1 | <i>Bacillus subtilis</i> , strain FO-029a | 82% |
| P178 | FJ624473.1 | <i>Cronobacter sakazakii</i> , strain CFS-FSMP | 86% |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|---|---------------|---|----------|
| หม่อนพันธุ์คุณไฟ ดินบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า | | | |
| P123 | GU122197.1 | <i>Cronobacter sakazakii</i> , strain 05CHPL43 | 89% |
| P126 | HQ018805.1 | <i>Enterobacter</i> sp., DHM-1T | 88% |
| P140 | HQ436444.1 | <i>Enterobacter</i> sp., R1-17 | 95% |
| P135 | GQ406570.1 | <i>Enterobacter cloacae</i> , strain R8-2 | 84% |
| P125 | HM161865.1 | <i>Enterobacter</i> sp., strain 3BJN7 | 87% |
| P177 | HM160521.1 | <i>Enterobacter</i> sp., PD11 | 85% |
| P141 | HM989008.1 | <i>Klebsiella</i> sp., KB02 | 87% |
| P154 | HM135446.1 | <i>Klebsiella</i> sp., 0103 , | 88% |
| P165 | GQ181053.1 | <i>Microbacterium ginsengisoli</i> , strain BLN1 | 93% |
| P232 | FN392677.1 | <i>Microbacterium</i> sp., isolate As3-5 | 87% |
| P92 | EF072748.1 | Uncultured Acidobacteriales bacterium, clone GASP-WA2S3_E01 | 78% |
| P174 | EU979080.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone g71 | 84% |
| P158 | FJ037185.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone U000107187 | 80% |
| P104 | GU195933.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone P3E08 | 85% |
| P110 | EU980247.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone TH_g62 | 83% |
| P114 | EU729308.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone B50 | 86% |
| P119 | AJ534633.1 | Uncultured Acidobacterium bacterium , clone JG36-TzT-54 | 86% |
| P109 | AJ582046.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone JG36-GS-69 | 92% |
| P115 | AJ619064.1 | uncultured Acidobacteria bacterium, clone MTAF8 | 94% |
| P116 | AY694588.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone JAB SMS 36 | 86% |
| P121 | AY743361.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone 20 | 80% |
| P76 | FM253026.1 | Uncultured Actinobacterium, clone NL10BD-01-F10 | 90% |
| P96 | DQ828196.1 | Uncultured Actinobacterium, clone DOK_BIODYN_clone543 | 83% |
| P98 | EF220719.1 | Uncultured Actinobacterium, clone FI-2M_G08 | 72% |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|---|---------------|---|----------|
| หม่อนพันธุ์คุณไพ ดินบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า | | | |
| P157 | EF220719.1 | Uncultured Actinobacterium, clone FI-2M_G08 | 72% |
| P99 | GU195887.1 | Uncultured Actinobacterium, clone P2C12 | 82% |
| P102 | AJ232691.1 | Uncultured Actinobacterium, WB013 | 85% |
| P113 | AJ232690.1 | Uncultured Actinobacterium, WB012 | 87% |
| P94 | AJ232694.1 | Uncultured Actinobacterium, WB016 | 89% |
| P101 | AY192047.1 | Uncultured Actinobacterium 16S r RNA gene, partial sequence | 87% |
| P100 | HQ044781.1 | Uncultured <i>Alterierythrobacter</i> sp., clone F5OHPNU07IEUK4 | 87% |
| P138 | GU574427.1 | Uncultured bacterium, clone 72 | 87% |
| P156 | EF419403.1 | Uncultured <i>Brevibacillus</i> sp., clone 4PN65 | 85% |
| P155 | DQ188362.1 | Uncultured <i>Brevibacillus</i> sp., clone BL030B72 | 89% |
| P130 | EF419401.1 | Uncultured <i>Brevibacillus</i> sp., clone 4PN57 | 91% |
| P129 | GU245921.1 | Uncultured <i>Brevibacillus</i> sp., clone 075 | 83% |
| P137 | AB451535.1 | Uncultured <i>Brevibacillus</i> sp., clone DHUP4 | 93% |
| P93 | DQ234232.2 | Uncultured Comamonadaceae bacterium, clone DS150 | 75% |
| P112 | HM856553.1 | Uncultured Comamonadaceae bacterium, clone YL192 | 95% |
| P105 | GU300382.1 | Uncultured Comamonadaceae bacterium, clone PSB011.C21_M12 | 93% |
| P108 | GQ891819.1 | Uncultured Comamonadaceae bacterium, clone G61 | 100% |
| P118 | GQ228649.1 | Uncultured Comamonadaceae bacterium, clone 1RH7 | 86% |
| P65 | GU552226.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone D-16S-122 | 71% |
| P64 | AJ007640.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone 25/4-2 | 86% |
| P69 | AY038527.2 | Uncultured Cyanobacterium 16S rRNA gene, partial sequence | 82% |
| P66 | AY542755.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone OS009 | 91% |
| P91 | AY542755.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone OS009 | 85% |
| P67 | AJ579904.1 | Uncultured Cyanobacterium , clone DUB10 | 81% |

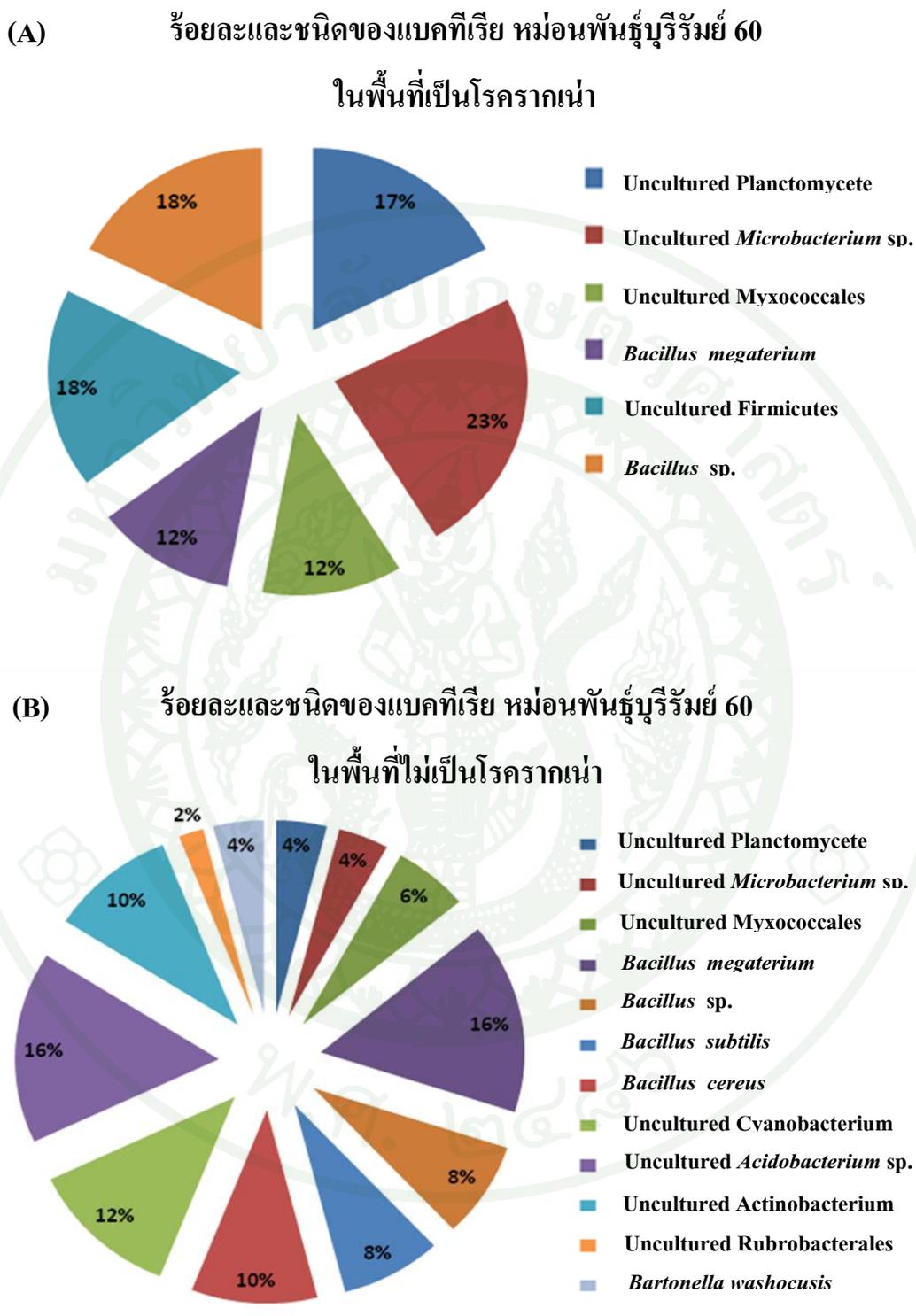
ตารางที่ 4 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|---|---------------|--|----------|
| หม่อนพันธุ์คุณไพ ดินบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า | | | |
| P68 | EU019408.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone UFDCBA_30f | 91% |
| P92 | AY038565.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone CD2C3 | 75% |
| P172 | EF074778.1 | Uncultured Firmicutes bacterium, clone GASP-WC1W2_G06 | 83% |
| P107 | FN421311.1 | Uncultured Firmicutes bacterium, clone GoM156_Bac129 | 83% |
| P122 | FN421154.1 | Uncultured Firmicutes bacterium, clone GoM87_Bac36 | 91% |
| P128 | FJ609969.1 | Uncultured Firmicutes bacterium, clone B95-1A | 90% |
| P131 | EU626479.1 | Uncultured Firmicutes bacterium, clone A16S_80 | 85% |
| P175 | EF706503.1 | Uncultured Firmicutes bacterium, clone MS070A1_C01 | 90% |
| P171 | DQ829512.1 | Uncultured Gemmatimonadetes bacterium, clone NOFERT_598 | 82% |
| P106 | GU195855.1 | Uncultured Gemmatimonadetes bacterium, clone P2A12 | 82% |
| P117 | GU195840.1 | Uncultured Gemmatimonadetes bacterium, clone P2H07 | 85% |
| P.190 | DQ016727.1 | Uncultured <i>Lautropia</i> sp., clone 2.6 | 79% |
| P179 | HQ183872.1 | Uncultured <i>Lautropia</i> sp., clone De25 | 86% |
| P127 | DQ016727.1 | Uncultured <i>Lautropia</i> sp., clone 2.6 | 91% |
| P136 | AY807005.1 | Uncultured <i>Lautropia</i> sp., clone IS023B92 | 88% |
| P162 | EU816944.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone r-43 | 88% |
| P166 | HM983495.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone GE7GXPU01DW358 | 87% |
| P163 | HQ067777.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone F5OHPNU07IAYMW | 85% |
| P233 | AM936915.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone CM14H11 | 87% |
| P226 | FJ543063.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone B09-05A | 91% |
| P230 | DQ989491.1 | Uncultured <i>Microbacterium</i> sp., clone HKT972 | 91% |
| P231 | GU300181.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone PSB011.C21_N12 | 90% |
| P229 | GU300181.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone PSB011.C21_N12 | 88% |
| P228 | FJ552362.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone LTSP_BACT_P6B15 | 83% |

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closet match from BLASTN | Identify |
|--|---------------|--|----------|
| หม่อนพันธุ์คุณไพ ดินบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า | | | |
| P227 | FJ550785.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone LTSP_BACT_P1G16 | 89% |
| P97 | AJ290184.1 | Uncultured Planctomycete, clone DSP26 | 97% |
| P170 | AM935647.1 | Uncultured Planctomycetales bacterium, clone AMCA9 | 77% |
| P120 | AY360649.1 | Uncultured Planctomycetales bacterium, clone M10Ba61 | 92% |
| P111 | AJ534691.1 | Uncultured Planctomycetales bacterium, clone S15A-MN16 | 90% |
| P95 | AY360603.1 | Uncultured Planctomycetales bacterium, clone M10Ba13 | 94% |
| P111 | AJ575117.1 | Uncultured Planctomycetales bacterium, clone 6 | 81% |
| P103 | AJ616293.1 | Uncultured Planctomycete, clone DEL78 | 87% |

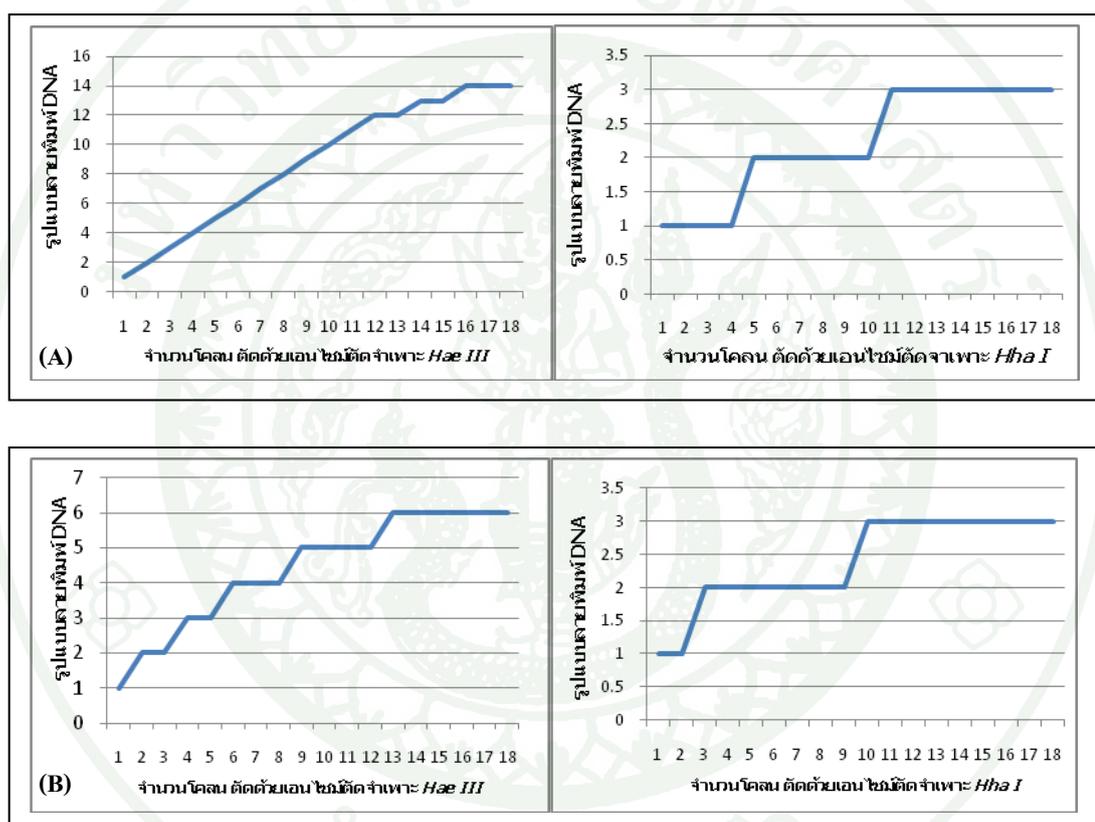
จากภาพที่ 12A การจัดจำแนกแบคทีเรียในพื้นที่ปลูกหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่า พบว่ามีแบคทีเรีย 3 กลุ่ม คือ Plantomycete, Myxococcales, Firmicutes และ 3 ชนิด คือ *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp. และ *Bacillus megaterium* โดยจากการศึกษาพบว่า แบคทีเรียกลุ่ม Firmicutes เป็นกลุ่มที่พบในแปลงฝ้ายที่แสดงอาการเป็นโรค (Zhang *et al.*, 2010) ส่วนในพื้นที่ที่ไม่เป็นโรครากเน่า (ภาพที่ 12B) มีแบคทีเรีย 5 กลุ่ม คือ *Plantomycete*, *Myxococcales*, *Cyanobacterium*, *Actinobacterium*, *Rubrobacterales* และ 7 ชนิด คือ *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Acidobacterium* sp. และ *Bartonella washoensis* ซึ่งพบว่าในพื้นที่ที่มีการรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและมีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์หลายชนิด เช่น *Bacillus* sp. ส่งเสริมการเจริญเติบโตของทานตะวัน (Forchetti *et al.*, 2007) *Bacillus megaterium* ส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นสน (Trivedi and Pandey, 2007) และ *Bacillus cereus* เป็นเชื้อปฏิปักษ์ใน alfalfa (Silo-Suh *et al.*, 1994) สำหรับพื้นที่ปลูกหม่อนพันธุ์คุณไพที่เป็นโรครากเน่า



ภาพที่ 12 เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของแบคทีเรียในหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 จากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B)

จากภาพที่ 13A มีแบคทีเรีย 4 กลุ่ม คือ *Myxococcales*, *Firmicutes*, *Actinobacterium*, *Peptococcaceae* และ 3 ชนิด คือ *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium* และ *Microbacterium* sp. เปรียบเทียบกับพื้นที่ที่ไม่เป็นโรครากเน่าพบว่า มีแบคทีเรีย 7 กลุ่ม คือ *Plantomycete*, *Myxococcales*, *Cyanobacterium*, *Actinobacterium*, *Firmicutes*, *Comamonadaceae*, *Gemmatimonadetes* และ 9 ชนิด คือ *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Acidobacterium* sp., *Bartonella washoensis*, *Brevibacillus* sp., *Lautropia* sp., *Klebsella* sp., *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter* sp. และ *Microbacterium ginsengisoli* โดยจุลินทรีย์บางชนิดมีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ คือ *Bacillus megaterium* เป็นเชื้อปฏิปักษ์ในพริกไทย (Akgül and Mirik, 2008) *Bacillus cereus* เป็นเชื้อปฏิปักษ์ใน Sugarbeet (Moussa, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชตระกูลถั่วคือ *Bacillus subtilis* (Lee et al., 2005) ซึ่งกลุ่มประชากรของแบคทีเรียของหม่อนทั้ง 2 พันธุ์ในพื้นที่ที่ไม่เป็นโรครากเน่าพบกลุ่มประชากรแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็น plant promoting และเชื้อปฏิปักษ์มากกว่าในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่า กิจกรรมของแบคทีเรียกลุ่มนี้อาจส่งผลในการยับยั้งหรือลดการเกิดโรคในพืชได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Os and Ginkel (2001) ซึ่งพบว่ามวลชีวภาพและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดินมีความสามารถยับยั้งการเกิดโรครากเน่าของหัว iris จากเชื้อ *Pythium* ได้ โดยกลไกของจุลินทรีย์ดินที่ลดการก่อโรคของเชื้อ *Pythium* คือ ยับยั้งการงอกของ sporangia และย่อยสลายเส้นใยเชื้อ *Pythium* ทำให้การเจริญลดลงและในพื้นที่ที่มีการปลูกหม่อนทั้งสองพันธุ์มีแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์อยู่ เช่น *Bacillus* sp. สอดคล้องกับการศึกษาการใช้แบคทีเรียเพื่อเป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราของ Gheorghe et al. (2008) โดยใช้เชื้อราทดสอบคือ *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Fusarium* sp. พบว่าแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. นอกจากนี้ เชื้อ *Acidobacter* และ *Microbacterium* เป็นเชื้อปฏิปักษ์ สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรครากเน่า และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dikin et al. (2007) และ Hunter et al. (2006) อีกทั้งในหม่อน 2 พันธุ์ที่เป็นโรครากเน่าพบเชื้อ *Fusarium solani* และ *Pythium ultimum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าในไม้ประดับและพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kucharek and Michell (2000) ในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้ในพื้นที่ปลูกหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพที่ไม่เป็นโรครากเน่าสามารถพบเชื้อ *Bacillus cereus* ได้แต่ในพื้นที่เกิดโรครากเน่ากลับไม่พบเชื้อ *Bacillus cereus* จากการศึกษาพบว่า เชื้อ *Bacillus cereus* มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jing et al. (2009) ศึกษาผลของเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ Anti-8098A พบว่ามีประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ เนื่องจากเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ Anti-8098A สามารถเพิ่ม

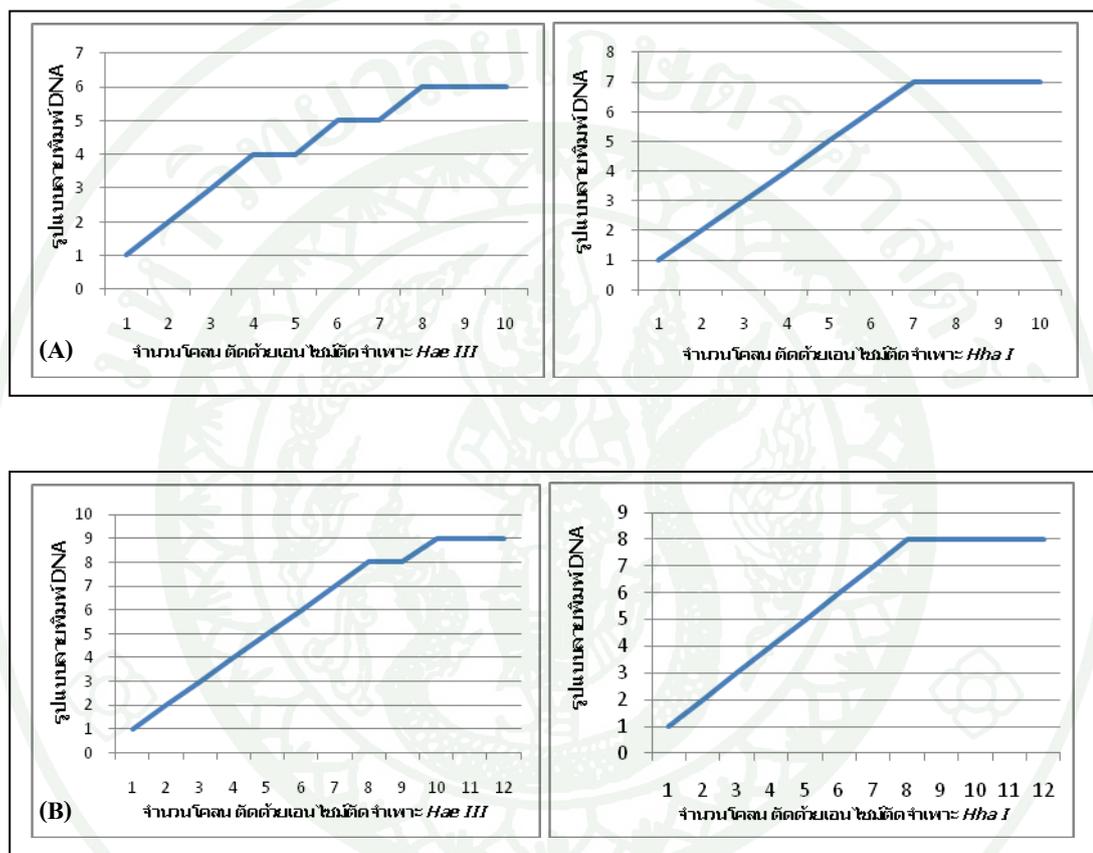
ปริมาณในดินได้อย่างรวดเร็วและสามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและ Handelsman *et al.* (1990) ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า 700 ชนิด และพบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* UW85 มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งโรคโคนเน่าของถั่ว alfalfa ซึ่งมีเชื้อสาเหตุโรคคือ *Phytophthora megasperma* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและยังสามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดถั่ว alfalfa ได้อีกด้วย ซึ่งวิธีนำไปใช้ประโยชน์ คือการนำเชื้อ *Bacillus cereus* UW85 คลุกเมล็ดก่อนปลูก



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างโคลนและรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนยีน 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae* III และ *Hha* I จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B)

จากภาพที่ 14A เมื่อนำโคลนที่มี insert gene 18 โคลน จากตัวอย่างหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นโรครากเน่า ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae* III และ *Hha* I ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 7 รูปแบบ สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราได้ 7 ชนิด ดังนี้ *Pythium ultimum*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Penicillium purpurogenum*, *Ascomycota sp.*, *Aspergillus terreus* และ *Aspergillus*

candidus สำหรับตัวอย่างหม่อนพันธุ์วีรัมย์ 60 ไม่เป็นโรครากเน่า (ภาพที่ 14B) เมื่อนำโคลนที่มี insert gene 18 โคลนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 4 รูปแบบ สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราได้ 4 ชนิด ดังนี้ *Penicillium* sp., *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus niger* และ *Aspergillus candidus* ดังตารางที่ 5



ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างโคลนและรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนยีน 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae III* และ *Hha I* จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพ เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B)

จากภาพที่ 15A เมื่อนำโคลนที่มี insert gene 10 โคลน จากตัวอย่างหม่อนพันธุ์คุณไพ เป็นโรครากเน่า ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Hae III* และ *Hha I* ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 6 รูปแบบ สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราได้ 5 ชนิด ดังนี้ *Aspergillus terreus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. และ *Fusarium solani* และจากตัวอย่างหม่อนพันธุ์คุณไพ ไม่เป็นโรครากเน่า (ภาพที่ 15B) มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน เมื่อนำโคลนที่มี insert gene

12 โคลน ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 5 รูปแบบ สามารถจำแนกชนิดของเชื้อเราได้ 5 ชนิด ดังนี้ *Penicillium decumbens*, *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* และ *Aspergillus* sp. ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการจัดจำแนกจำนวน โคลนของตัวอย่างดีเอ็นเอในส่วนของยีน 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ของประชากรเชื้อราจากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพ

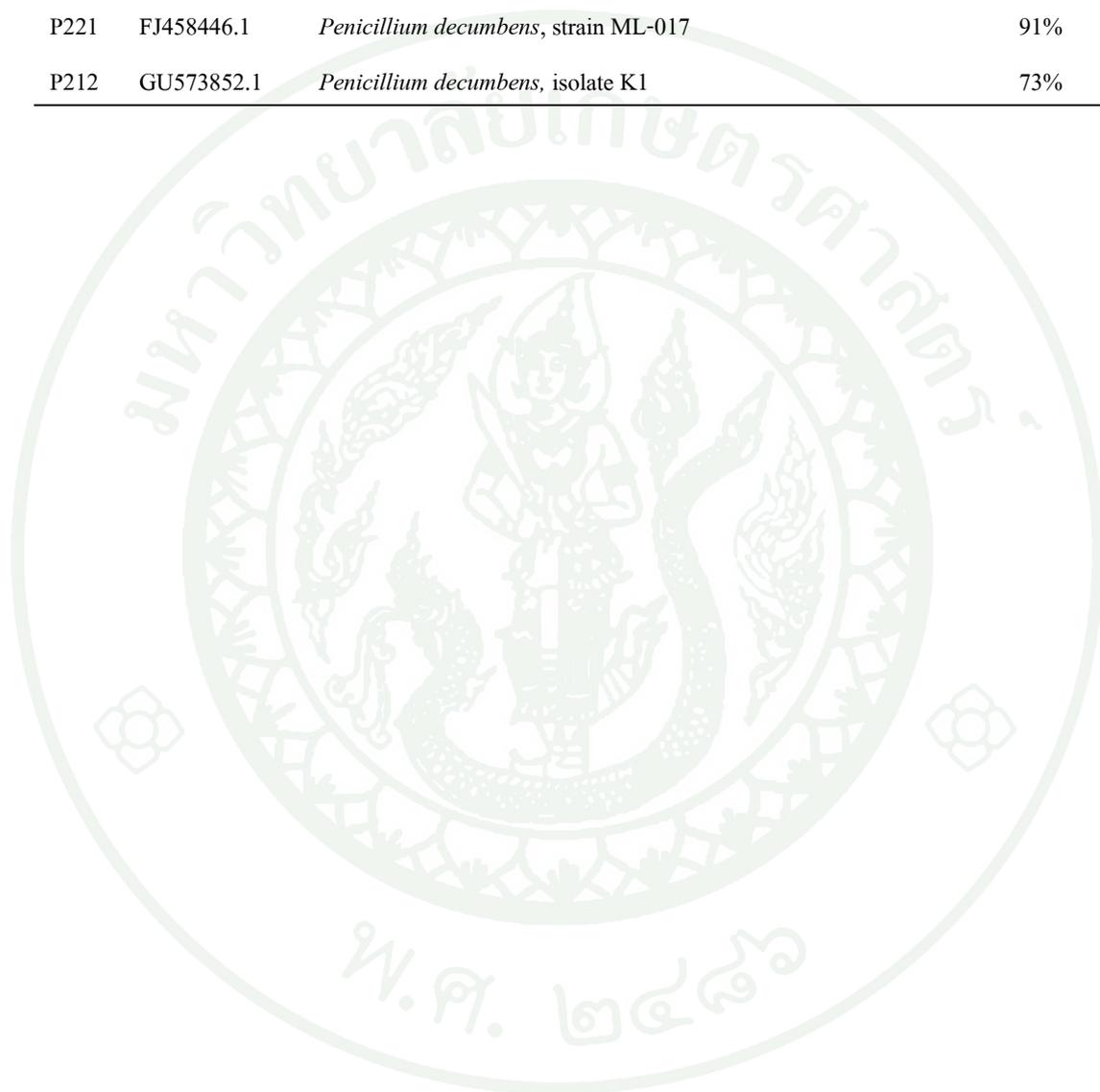
| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|--|---------------|---|----------|
| หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากเป็นโรครากเน่า | | | |
| P123 | EU723492.1 | <i>Ascomycota</i> sp., NIOCC F30 | 98% |
| P191 | EF638701.1 | <i>Ascomycete</i> sp., strain LMSA1.08.031 | 92% |
| P193 | HQ025971.1 | <i>Alternaria</i> sp., 118 | 83% |
| P196 | FJ210505.1 | <i>Alternaria</i> sp. JJP-2009a, isolate 56629-6-90-E | 91% |
| P200 | FJ515320.1 | <i>Alternaria</i> sp., CPCC 480721 | 92% |
| P192 | GQ461911.1 | <i>Aspergillus terreus</i> , isolate UOA/HCPF 10213 | 79% |
| P203 | FJ842764.1 | <i>Aspergillus terreus</i> , strain PNR2 | 88% |
| P224 | AY373843.1 | <i>Aspergillus candidus</i> , strain SRRC 310 | 89% |
| P202 | HM536999.1 | <i>Aspergillus</i> sp., LQ21 | 99% |
| P216 | EU301661.1 | <i>Aspergillus</i> sp., HZ-35 | 81% |
| P225 | HM801881.1 | <i>Aspergillus</i> sp., 06 SMR-2010 | 84% |
| P195 | HM535374.1 | <i>Aspergillus</i> sp., G-3 | 90% |
| P122 | GU372899.1 | <i>Penicillium</i> sp., MCB-2010a | 92% |
| P124 | FJ950741.1 | <i>Penicillium</i> sp., MH7 | 82% |
| P198 | HQ589145.1 | <i>Penicillium purpurogenum</i> , strain LP55 | 89% |
| P201 | DQ793166.1 | <i>Pythium ultimum</i> , clone T2S5Pulp5 | 75% |
| P209 | HM747034.1 | <i>Pythium ultimum</i> , isolate F-1550 | 88% |
| P218 | HQ022030.1 | Uncultured <i>Ascomycota</i> , clone 6Bart1172S | 88% |
| หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า | | | |
| P198 | EU263601.1 | <i>Aspergillus candidus</i> , strain DFVB1 | 95% |
| P223 | EF068267.1 | <i>Aspergillus niger</i> , strain JC | 90% |

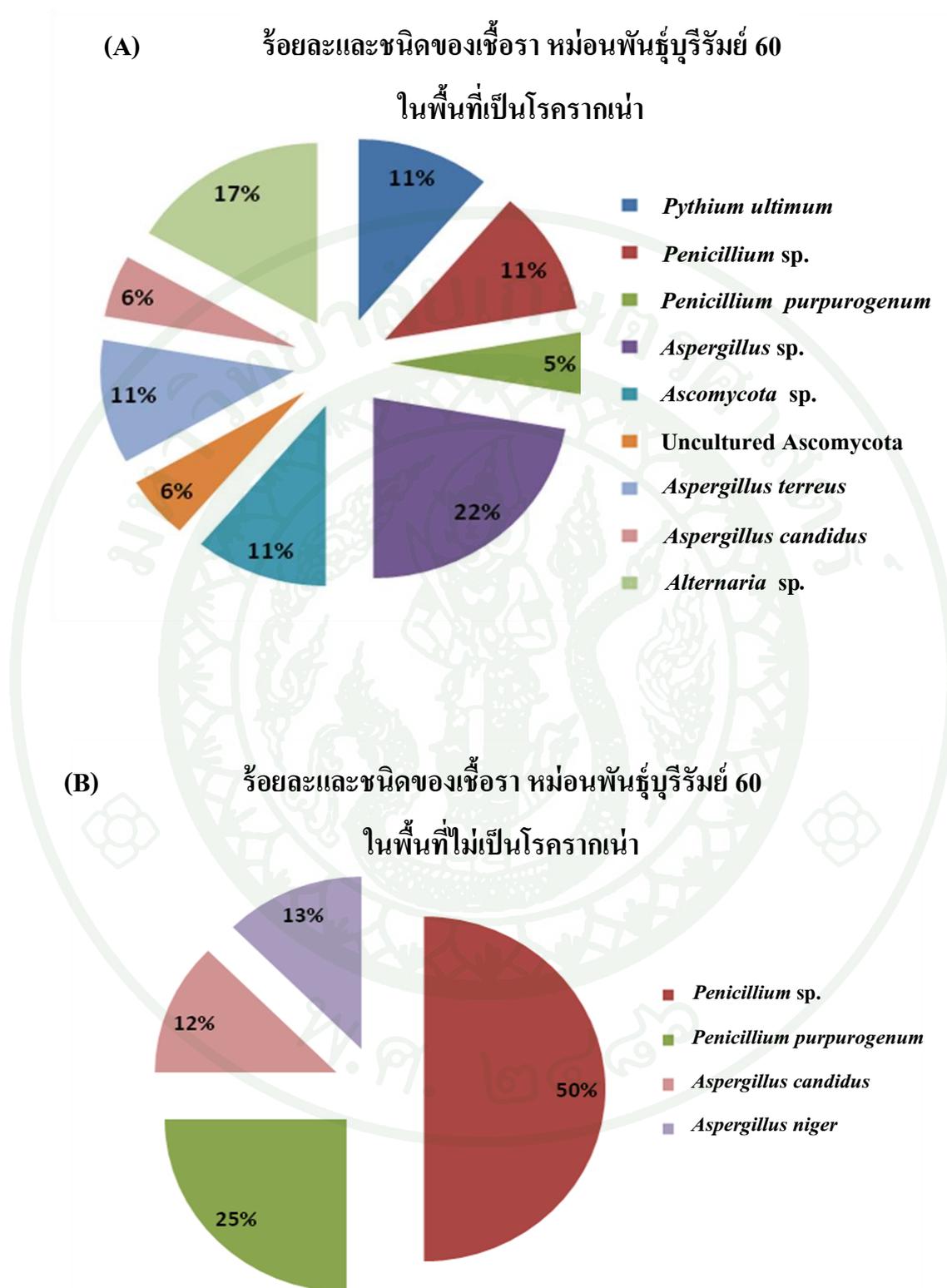
ตารางที่ 5 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closet match from BLASTN | Identify |
|--|---------------|--|----------|
| หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า | | | |
| P210 | DQ365947.1 | <i>Penicillium purpurogenum</i> , strain HS-A82 | 99% |
| P218 | HQ434765.1 | <i>Penicillium purpurogenum</i> , strain HDJZ-ZWM-26 | 92% |
| P205 | FJ375305.1 | <i>Penicillium</i> sp., CPCPC 1400022 | 99% |
| P194 | GU944770.1 | <i>Penicillium</i> sp., YW01 | 98% |
| P214 | FN868877.1 | <i>Penicillium</i> sp., BLE22 | 87% |
| P197 | GU595047.1 | <i>Penicillium</i> sp., H4463 | 89% |
| หม่อนพันธุ์คุณไผ่ ดินบริเวณรากเป็นโรครากเน่า | | | |
| P188 | DQ681346.1 | <i>Alternaria</i> sp., CR-2006a | 87% |
| P211 | HM536999.1 | <i>Aspergillus</i> sp., LQ21 | 76% |
| P222 | FJ459892.1 | <i>Aspergillus</i> sp., ACR-PR | 90% |
| P207 | GU227345.1 | <i>Aspergillus terreus</i> , strain HDJZ-ZWM | 77% |
| P215 | GQ461911.1 | <i>Aspergillus terreus</i> , isolate UOA/HCPF 10213 | 88% |
| P204 | EF397944.1 | <i>Fusarium solani</i> , strain 421502 | 84% |
| P189 | AB470904.1 | <i>Fusarium solani</i> , isolate DSCF5 | 77% |
| P199 | EU719659.1 | <i>Fusarium solani</i> , strain LW-1 | 93% |
| P182 | HM161749.1 | <i>Penicillium</i> sp., Y12 EG-2010 | 90% |
| P185 | GU985207.1 | <i>Penicillium</i> sp., SF58 | 93% |
| หม่อนพันธุ์คุณไผ่ ดินบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า | | | |
| P186 | HM754629.1 | <i>Alternaria</i> sp., ZJ9-6B | 88% |
| P219 | GU325677.1 | <i>Aspergillus niger</i> , strain P20-09 | 76% |
| P220 | HQ397705.1 | <i>Aspergillus niger</i> , 18S ribosomal RNA gene | 86% |
| P180 | EU770325.1 | <i>Aspergillus</i> sp., ZL-2008 | 90% |
| P181 | HM535365.1 | <i>Aspergillus</i> sp., A-18 | 85% |
| P208 | DQ489561.1 | <i>Aspergillus terreus</i> , strain W0707 | 73% |
| P187 | HQ398234.1 | <i>Aspergillus terreus</i> , strain CCTCC AF93041 | 90% |
| P184 | GQ461903.1 | <i>Aspergillus terreus</i> , isolate UOA/HCPF 5704 | 92% |
| P217 | GU573852.1 | <i>Penicillium decumbens</i> , isolate K1 | 72% |

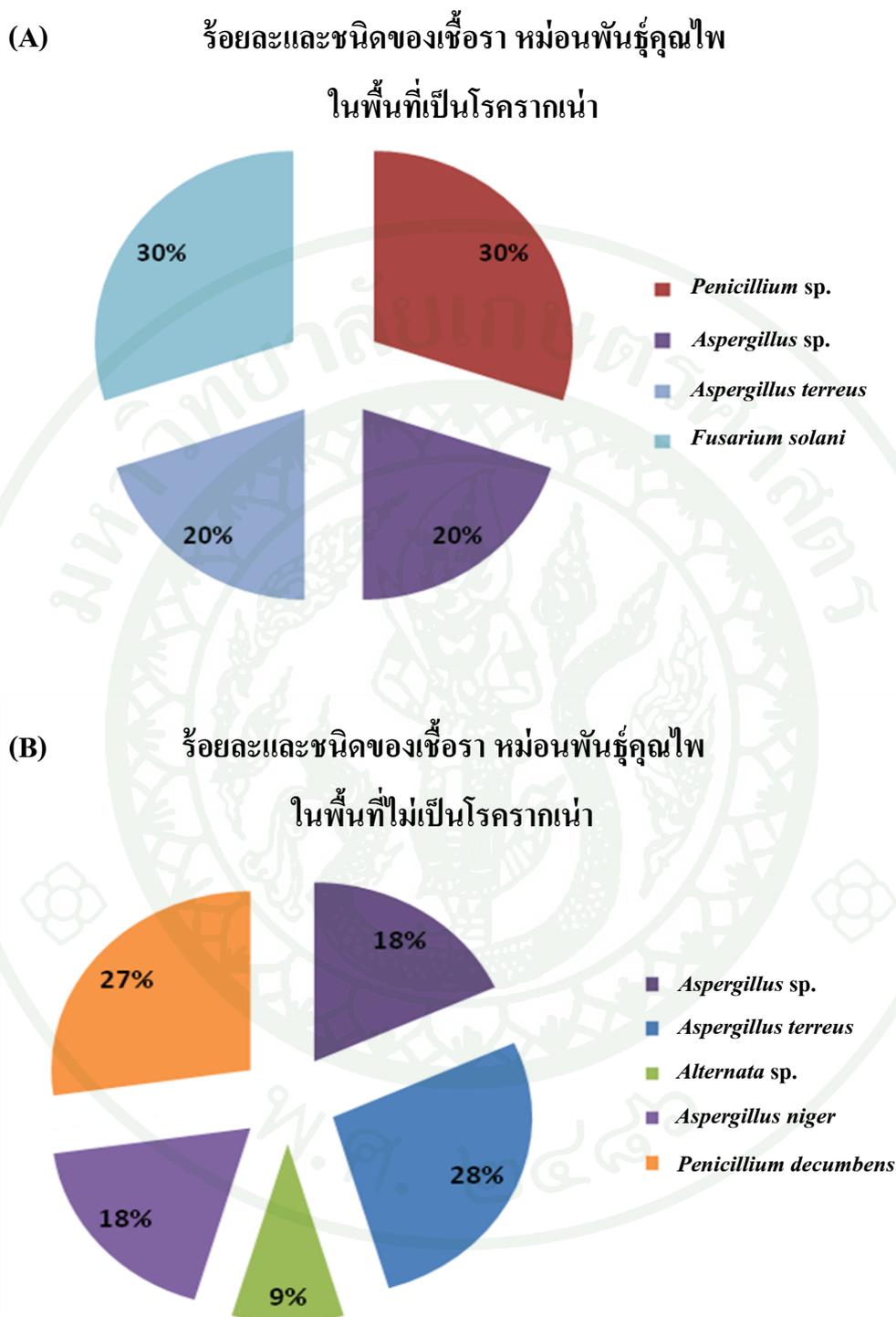
ตารางที่ 5 (ต่อ)

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|---|---------------|--|----------|
| หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า | | | |
| P221 | FJ458446.1 | <i>Penicillium decumbens</i> , strain ML-017 | 91% |
| P212 | GU573852.1 | <i>Penicillium decumbens</i> , isolate K1 | 73% |





ภาพที่ 16 เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของเชื้อราจากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 จากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B)



ภาพที่ 17 เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของเชื้อราจากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพ จากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B)

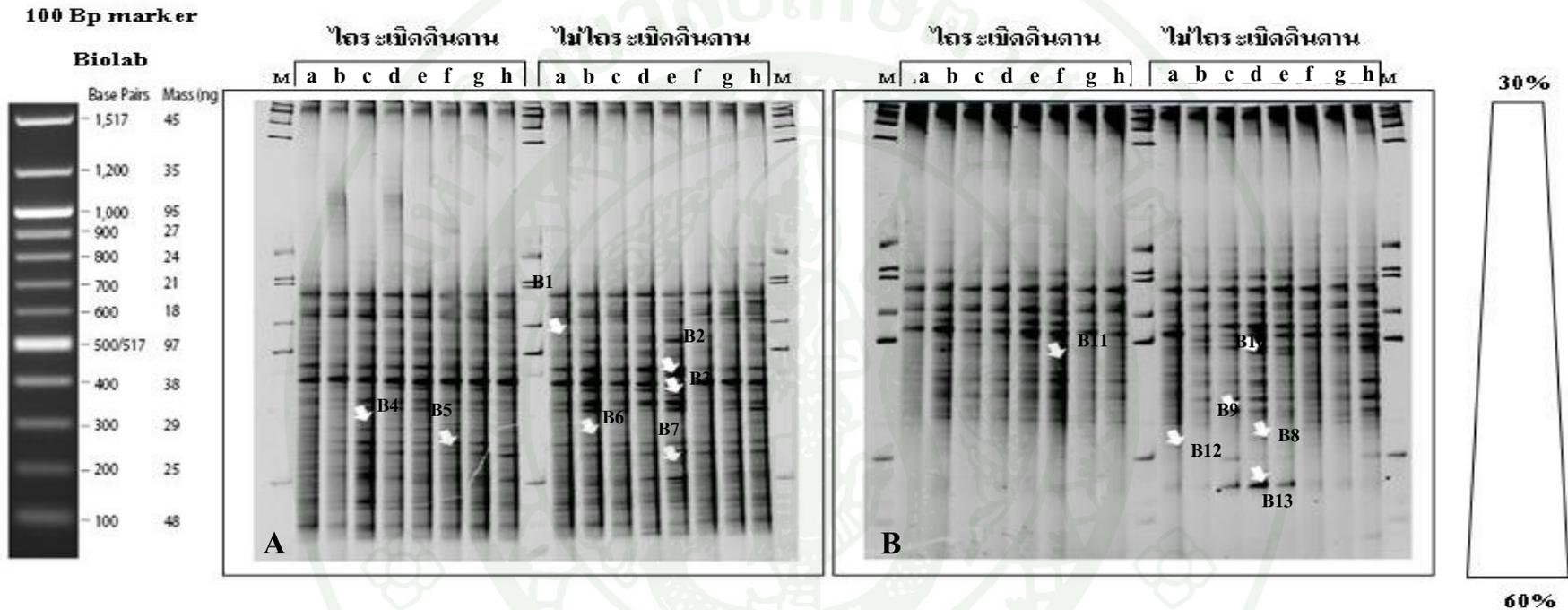
จากภาพที่ 16A การจัดจำแนกเชื้อราในพื้นที่ปลูกหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่า มีเชื้อราทั้งหมด 9 ชนิด คือ *Penicillium* sp., *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus* sp., *Ascomycota* sp. และ *Aspergillus candidus* และเป็นเชื้อราก่อโรค 3 ชนิด คือ *Pythium ultimum*, *Aspergillus terreus* และ *Alternaria* sp. ส่วนในพื้นที่ที่ไม่เป็นโรครากเน่า (ภาพที่ 16B) มีเชื้อราทั้งหมด 4 ชนิด คือ *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus candidus* มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ 2 ชนิด คือ *Penicillium* sp. และ *Aspergillus niger* โดย Venkatasubbaiah and Safeulla (1984) ได้ศึกษาการใช้เชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่งแยกได้จากบริเวณรากของต้นกล้ากาแฟ นำมาใช้เป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคคอกเน่าของต้นกล้ากาแฟ เนื่องจากเชื้อ *Aspergillus niger* จะอยู่ร่วมกับเชื้อ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคคอกเน่าในสภาวะปรสิติก ทำให้เชื้อ *R. solani* ตายในที่สุด ดังนั้นเชื้อ *Aspergillus niger* จึงสามารถควบคุมโรคคอกเน่าในต้นกล้าของกาแฟได้ ส่วนในพื้นที่ปลูกหม่อนพันธุ์คุณไพลในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (ภาพที่ 17A) มีเชื้อราทั้งหมด 4 ชนิด คือ *Penicillium* sp. และ *Aspergillus* sp. เป็นเชื้อราก่อโรค 2 ชนิดคือ *Aspergillus terreus* และ *Fusarium solani* ซึ่งก่อโรครากเน่าในถั่ว (Widdo and Tati, 2009) และพบว่าสามารถคัดแยกได้จากดินบริเวณรากหม่อนที่เป็นโรครากเน่า Kazempour *et al.* (2006) ในขณะที่พื้นที่ที่ไม่เป็นโรครากเน่า (ภาพที่ 17B) มีเชื้อราทั้งหมด 5 ชนิด คือ *Aspergillus terreus*, *Alternaria* sp., *Penicillium decumbens* และ *Aspergillus niger* เป็นเชื้อปฏิปักษ์ 1 ชนิด คือ *Aspergillus* sp. จากการศึกษาของ Evueh and Ogbemor (2008) โดยใช้เชื้อ *Aspergillus* sp. ในการยับยั้งโรคใบจุดของพารา เกิดจากเชื้อสาเหตุ คือ *Colletotrichum gloeosporioides* โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. ซึ่งได้มาจากบริเวณผิวใบสามารถผลิตสารที่สามารถย่อย cytoplasm ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้

จากข้อมูลข้างต้นพบว่า ความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์และพันธุ์คุณไพลที่พบในพื้นที่ที่ไม่เป็นโรครากเน่า มีการเข้าอาศัยของเชื้อแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมากกว่าในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่า ทั้งนี้เชื้อที่มีสมบัติดังกล่าวเมื่อเข้าอาศัยในบริเวณรากหม่อน จึงมีบทบาทในการลดการเกิดโรคระบาดในระบบรากและส่งเสริมการเจริญเติบโตของหม่อนได้ กลุ่มเชื้อปฏิปักษ์ที่พบ คือ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ BR4 และ BL1 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่พบในแปลงผัก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ DC (2010) เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นทานตะวัน *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ MUR3, B2P2 และ P3 ส่งเสริมการสร้างปมในถั่วฮอรัสแกรม (*Macrotyloma uniflorum* L.) รวมทั้งมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวสาลี และบริเวณรากพืชอื่นๆ ส่วนในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่า มีเชื้อที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการ

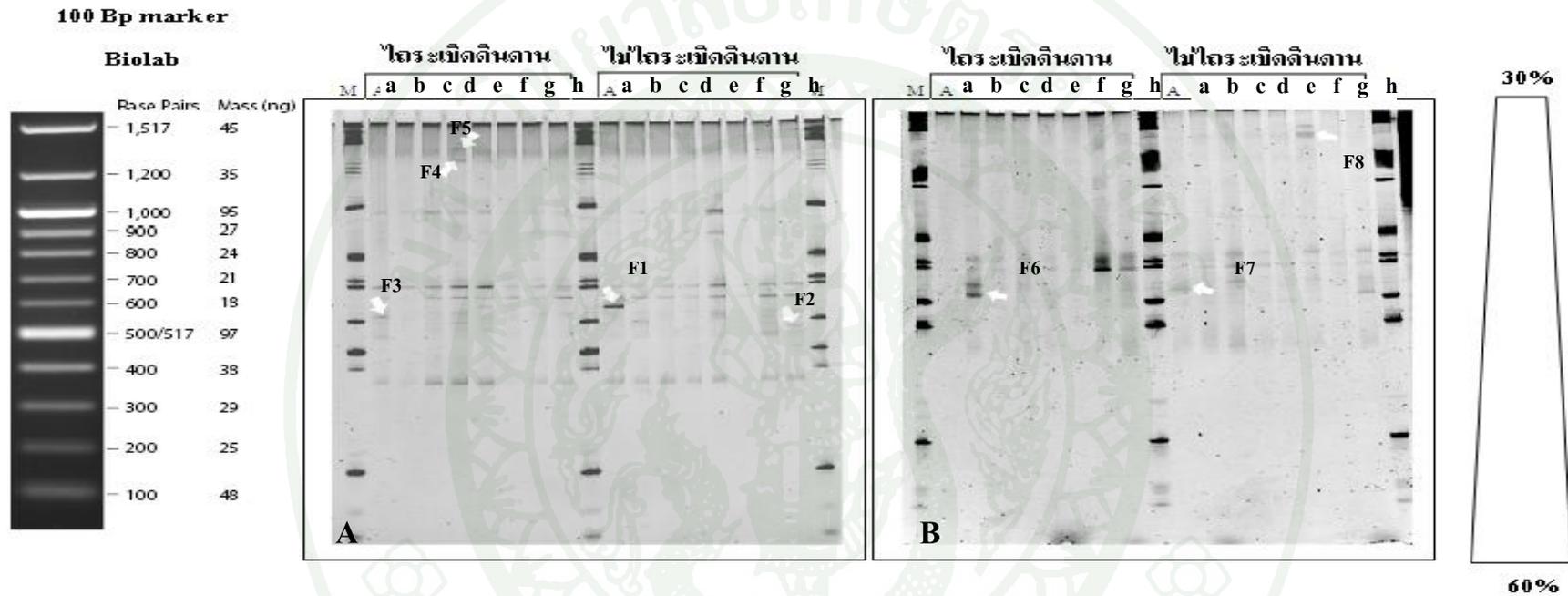
เจริญเติบโตน้อยกว่าและพบเพียง 2 ชนิด คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TUB3 และ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ 249

3.3 การเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรเชื้อราและแบคทีเรียในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรครากเน่า โดยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) และการวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม Canoco for Windows โดยวิธี principle component analysis (PCA) และ canonical correspondence analysis (CCA)

การเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อรา ได้แบ่งแปลงออกเป็นแปลงหลักและแปลงย่อย แปลงหลัก คือ พื้นที่ที่มีการไถและไม่มีการไถระเบิดดินดาน และแปลงย่อยคือการควบคุมทางชีวภาพ คือ การใส่ไมคอร์ไรซาและไม่ใส่ไมคอร์ไรซา การจัดการกายภาพ คือ การใส่ปุ๋ยหมักในอัตราที่แตกต่างกัน 4 อัตรา คือ 0, 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่และวิเคราะห์โครงสร้างประชากรเชื้อราและแบคทีเรียในพื้นที่ที่มีการจัดการแตกต่างกันร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total N) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) ปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ (exchangeable K) ค่านำน้ำ (hydraulic conductivity) ความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC) พีเอช (pH) และ ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (% OM) ซึ่งพบประชากรแบคทีเรียและเชื้อราเด่น (dominant species) ดังแสดงในภาพที่ 18 และ 19



ภาพที่ 18 ลักษณะรูปแบบโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (B) ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน (a) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซาและยิปซัมกิโกรัมต่อไร่, (b) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่, (c) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่, (d) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่, (e) ใส่ไมคอร์ไรซาไม่ใส่ยิปซัม, (f) ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่, (g) เท่ากับ ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่และ (h) ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่ พร้อมแสดงตำแหน่งที่มีการตัดเจลเพื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย (B1-B13) โดยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) ซึ่งกำหนดให้ M เท่ากับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab)



ภาพที่ 19 ลักษณะรูปแบบโครงสร้างประชากรของเชื้อราในบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (B) ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน (a) ไม่ใส่ไม่คอรไรชาและยิปซัมกิโลกรัมต่อไร่, (b) ไม่ใส่ไม่คอรไรชา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่, (c) ไม่ใส่ไม่คอรไรชา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่, (d) ไม่ใส่ไม่คอรไรชา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่, (e) ใส่ไม่คอรไรชาไม่ใส่ยิปซัม, (f) ใส่ไม่คอรไรชา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่, (g) เท่ากับ ใส่ไม่คอรไรชา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่และ (h) ใส่ไม่คอรไรชา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่ พร้อมแสดงตำแหน่งที่มีการตัดเจลเพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา (F1-F8) โดยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) ซึ่งกำหนดให้ M เท่ากับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab)

ตารางที่ 6 ชนิดของแบคทีเรียที่เรียดเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

| Cod e | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|-------|---------------|---|----------|
| B7 | GQ289378.1 | <i>Acinetobacter</i> sp., 40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 99% |
| B3 | HM573364.1 | <i>Bacillus</i> sp., EB462 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 97% |
| B2 | AM403722.1 | <i>Microbacterium</i> sp., EP31 16S rRNA gene | 68% |
| B5 | EU276548.1 | Uncultured Cyanobacterium, clone Plot03-B04 | 74% |
| B4 | DQ646283.1 | Uncultured Myxococcales bacterium, clone 18-63 | 84% |
| B6 | FJ551414.1 | Uncultured Rubrobacterales bacterium, clone BACT_P3G01 | 85% |
| B1 | EF072606.1 | Uncultured Xanthomonadaceae bacterium, clone WA2S2_G08 | 90% |

ตารางที่ 7 ชนิดของแบคทีเรียที่เรียดเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพ ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

| Code | Accession No. | Closest match from BLASTN | Identify |
|------|---------------|---|----------|
| B8 | GU727684.1 | <i>Cronobacter sakazakii</i> , strain NC1006 | 98% |
| B13 | EF466143.1 | <i>Klebsiella pneumonia</i> , strain XJRML-1 | 99% |
| B11 | DQ829269.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone NOFERT_clone313 | 86% |
| B12 | GU195787.1 | Uncultured Acidobacteria bacterium, clone P1A04 | 76% |
| B10 | EU703234.1 | Uncultured <i>Bacillus</i> sp., clone XZNM34 | 91% |
| B9 | AY395438.1 | Uncultured Rubrobacteridae bacterium, clone EB1119 | 93% |

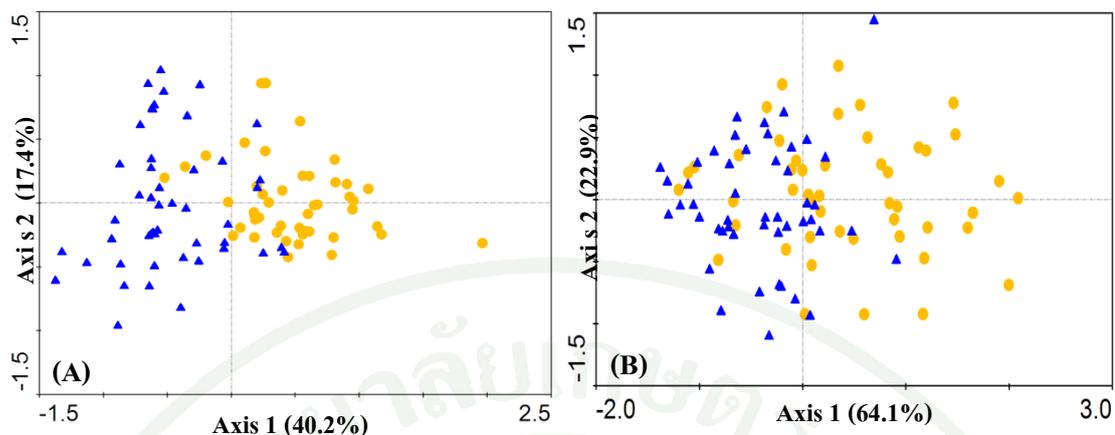
ตารางที่ 8 ชนิดของเชื้อราเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

| Code | Accession No. | Closet match from BLASTN | Identify |
|------|---------------|---|----------|
| F3 | HQ292335.1 | <i>Aspergillus oryzae</i> , strain ZJZ | 83% |
| F2 | AF245251.1 | <i>Penicillium funiculosum</i> , strain KTCTC 16063 | 99% |
| F5 | AB454203.1 | <i>Phoma destructive</i> , isolate MUCC0064 | 95% |
| F1 | DQ793165.1 | <i>Pythium ultimum</i> , clone T2S5Pulp3 | 91% |
| F4 | FJ207509.1 | Uncultured Ascomycota, clone C134_1 | 88% |

ตารางที่ 9 ชนิดของเชื้อราเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพ ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

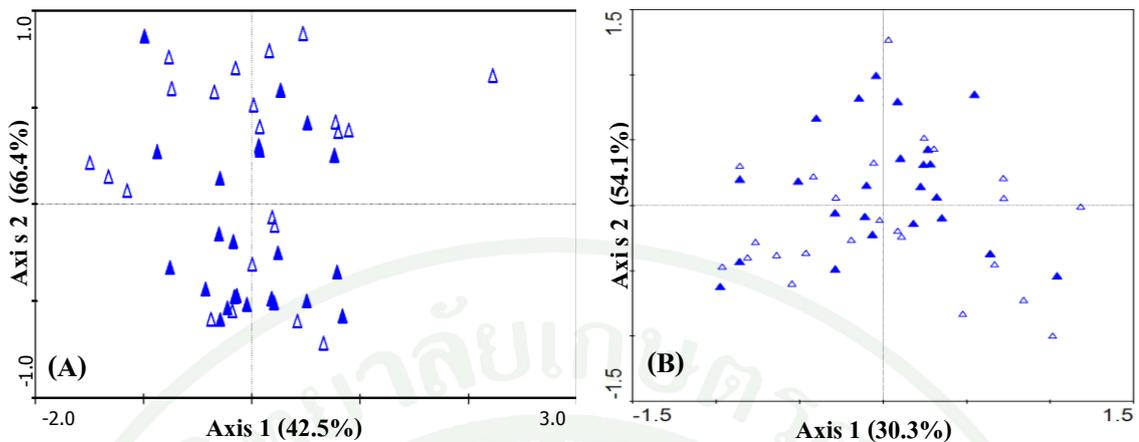
| Code | Accession No. | Closet match from BLASTN | Identify |
|------|---------------|--|----------|
| F8 | HM165489.1 | <i>Alternaria alternate</i> , strain S-f6 | 99% |
| F6 | EU883597.1 | <i>Aspergillus candidus</i> , strain MD-3 | 71% |
| F7 | FJ458446.1 | <i>Penicillium decumbens</i> , strain ML-017 | 75% |

นำข้อมูลจากการวิเคราะห์หลายพหุมิติอันได้จากเทคนิค DGGE มาวิเคราะห์ PCA และ CCA เป็นการวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม โดยใช้ฐานข้อมูลในการวิเคราะห์ 2 ประเภทด้วยกัน คือ ข้อมูลชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในพื้นที่ (species data) และข้อมูลปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (environmental data) ซึ่งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในการทดลองประกอบไปด้วย ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total N) ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P) ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (exchangeable K) ค่านำน้ำ (hydraulic conductivity) ความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC) พีเอช (pH) และ ปริมาณอินทรีย์วัตถุ (% OM)

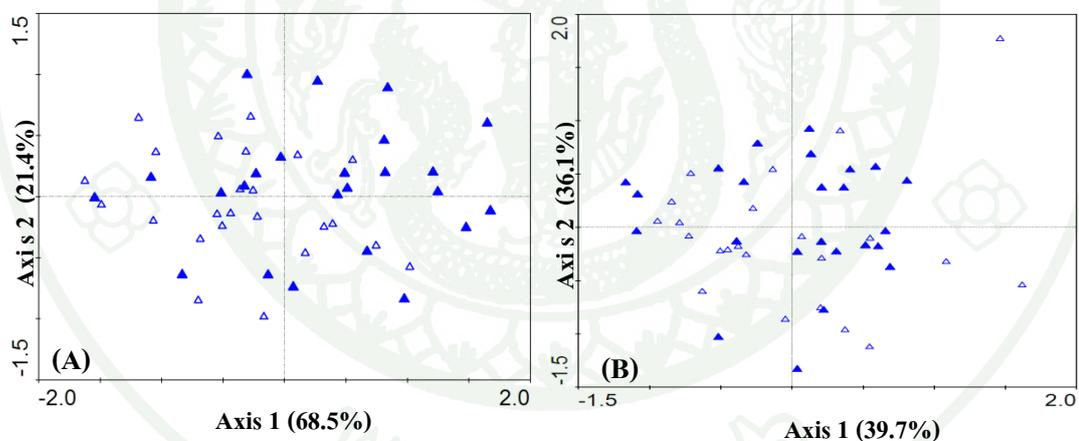


ภาพที่ 20 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (A) และเชื้อรา (B) จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (●) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (▲) ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA)

จากภาพที่ 20 แสดงให้เห็นว่าในหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และหม่อนพันธุ์คุณไพ มีโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (ภาพที่ 20A) และเชื้อรา (ภาพที่ 20B) แตกต่างกัน โดยแกน X และแกน Y แสดงค่าการกระจายของข้อมูล ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nunan *et al.* (2005) ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชกับโครงสร้างประชากรแบคทีเรียบริเวณรากของหญ้าพันธุ์ต่างๆ โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล พบว่ามีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่างกันซึ่งเกิดจากการปลดปล่อยของสารประกอบบริเวณรากที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ladygina and Hedlund (2010) ศึกษาอิทธิพลของชนิดพืชต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ดินและสารประกอบคาร์บอนในบริเวณรากพืช พบว่าในพืชต่างชนิดกันมีความหลากหลายของจุลินทรีย์เข้าอาศัยต่างกัน เนื่องจากในรากพืชแต่ละชนิดมีสารประกอบคาร์บอนที่ถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งสารประกอบดังกล่าวจะดึงดูดชนิดของจุลินทรีย์ให้เข้าอยู่อาศัยต่างกันเพื่อใช้สารประกอบเหล่านั้นเป็นแหล่งพลังงาน



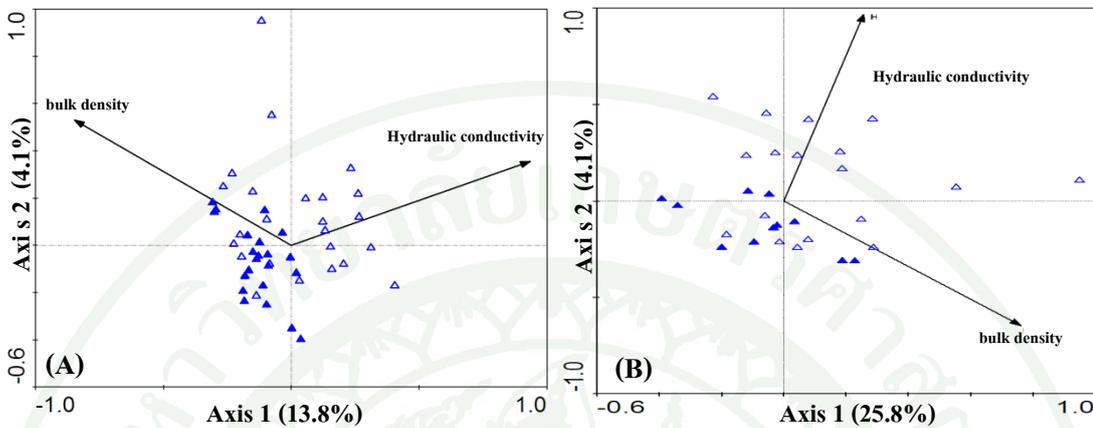
ภาพที่ 21 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียจากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไผ่ (B) ในบริเวณที่มีการไถ (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA)



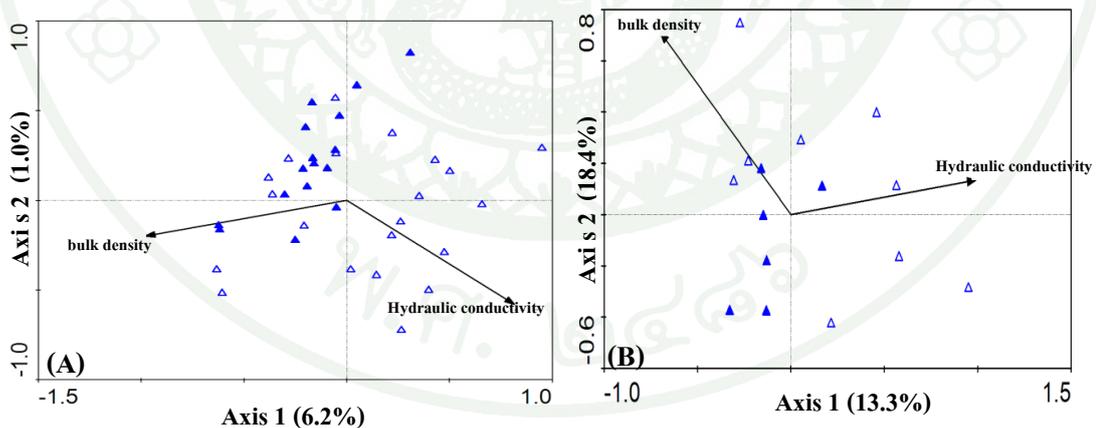
ภาพที่ 22 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรเชื้อราบริเวณรากของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไผ่ (B) ในบริเวณที่มีการไถ (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA)

จากภาพที่ 21 และ 22 พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 21A และ 22A) และพันธุ์คุณไผ่ (ภาพที่ 21B และ 22B) เมื่อมีการ

จัดการดินทางกายภาพโดยวิธีการไถระเบิดและไม่ไถระเบิดดินดานไม่ส่งผลในโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณรากของหม่อนทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน

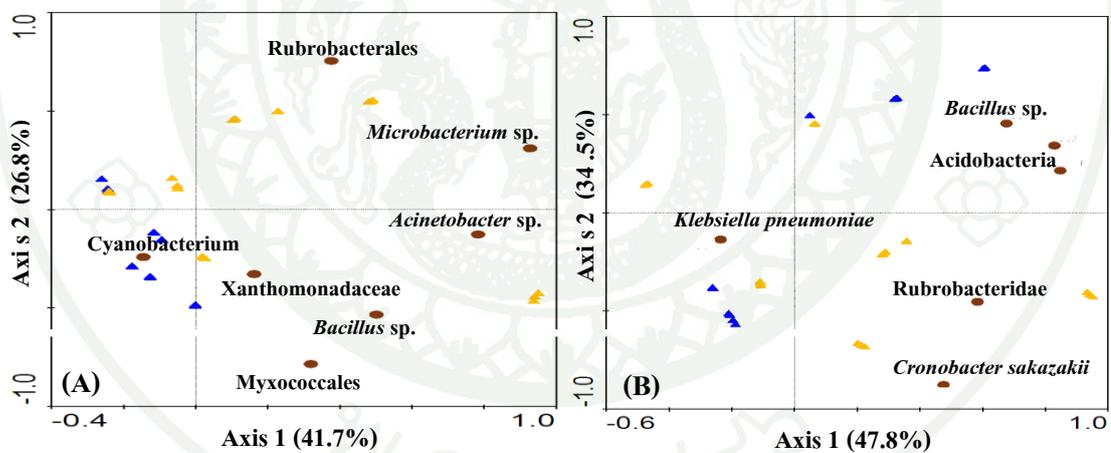


ภาพที่ 23 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (A) และเชื้อรา (B) จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) ร่วมกับค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA)



ภาพที่ 24 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (A) และเชื้อรา (B) จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพ ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) ร่วมกับค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA)

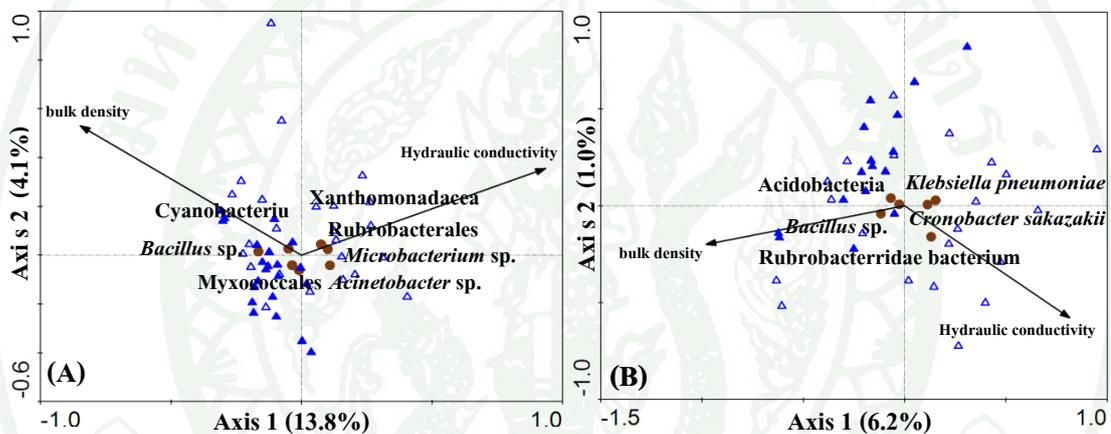
จากภาพที่ 23 และภาพที่ 24 พบว่าโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพตามลำดับ ในพื้นที่ที่มีการไถและไม่ไถระเบิดดินดานเมื่อร่วมวิเคราะห์กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นสมบัติทางกายภาพของดินคือค่านำน้ำ (hydraulic conductivity) พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 23A และ 24A) และพันธุ์คุณไพ (ภาพที่ 23B และ 24B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยวิธีการไถและไม่ไถระเบิดดินดาน บริเวณรากหม่อนทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน โดยพบว่าในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดานส่งผลทางด้านความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์กับค่านำน้ำในดินที่ไม่มีการไถระเบิดดินดานจะมีค่านำน้ำที่สูงกว่า จึงส่งผลให้จุลินทรีย์บริเวณรากมีความแตกต่างจากโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณรากหม่อนที่มีการไถระเบิดดินดาน เนื่องจากผลของการไถระเบิดดินดานส่งผลให้อนุภาคขนาดเล็กของดินเกิดการเคลื่อนย้ายไปสะสมในดินชั้นล่าง (Young and Geller, 1995) ส่งผลให้ค่านำน้ำของดินต่ำ สอดคล้องกับปริมาณช่องว่างในดินที่มีผลต่อปริมาณออกซิเจนแพร่ผ่านในดิน (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) เป็นผลให้โครงสร้างของจุลินทรีย์บริเวณดังกล่าวเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม



ภาพที่ 25 ข้อมูลแบคทีเรียเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (▲) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA)

จากภาพที่ 25 พบว่าโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพตามลำดับ ในพื้นที่ที่มีการไถและไม่ไถระเบิดดินดานเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลความหลากหลายของแบคทีเรียซึ่งในพื้นที่ที่ไม่มีการไถระเบิดดินดานทั้งในหม่อน

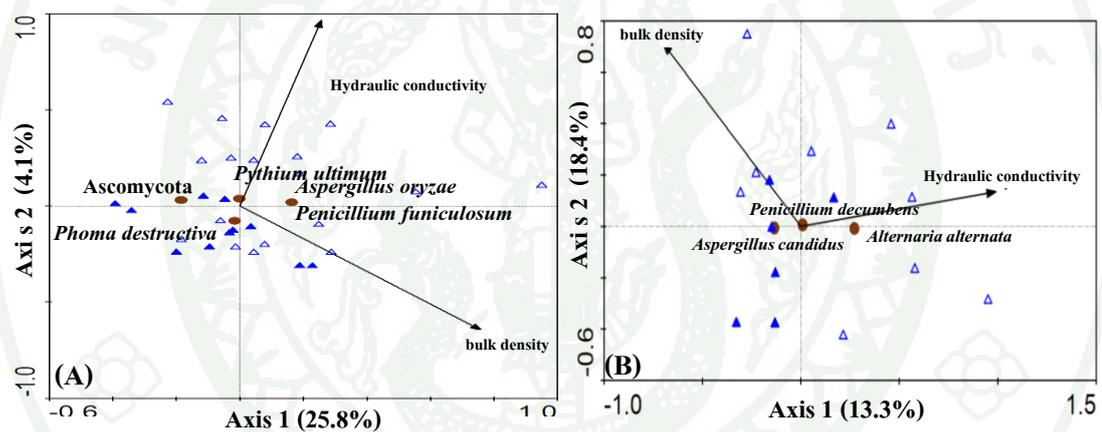
พันธุ์ริรมย์ 60 (ภาพที่ 25A) และคุณภาพ (ภาพที่ 25B) มีแบคทีเรียเข้าอาศัยมากกว่าในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน โดยแบคทีเรียที่เข้าอาศัยในบริเวณดังกล่าว โดยส่วนใหญ่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ และมีบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น *Acidobacteria* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Cronobacter sakazakii* และ *Microbacterium* sp. ซึ่งในพื้นที่ทำการศึกษามีเนื้อดินแบบดินร่วนปนทรายแป้ง (silt loam) และมีการใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรเข้าจัดการพื้นที่ ทำให้สมบัติทางกายภาพของดินเปลี่ยนไปเนื่องจากระบบการไถพรวนและเครื่องจักรกลทางการเกษตรมีผลในทางลบต่อการซึมน้ำและการเก็บกักน้ำเป็นอย่างมาก รวมถึงการจับตัวของดินจึงมีแนวโน้มที่จะเกิดชั้นดานและส่งผลต่อโครงสร้างประชากรและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน (Sullivan, 2002)



ภาพที่ 26 ข้อมูลแบคทีเรียเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์ริรมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณภาพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ร่วมกับค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA)

จากภาพที่ 26 ความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณรากหม่อนพันธุ์ริรมย์ 60 (ภาพที่ 26A) และคุณภาพ (ภาพที่ 26B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดและไม่มีการไถระเบิดดินดาน พบว่าพื้นที่ที่ไม่มีการไถระเบิดดินดานส่งผลให้ค่าน้ำในพื้นที่สูงและมีการเข้าอาศัยของแบคทีเรียมากกว่าพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน แบคทีเรียที่พบในบริเวณที่มีการจัดการโดยไม่ไถระเบิดดินดาน ส่วนมากมีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น *Cronobacter sakazakii*, *Acidobacteria* และ *Microbacterium* sp. เป็นต้น สอดคล้องกับงานวิจัย

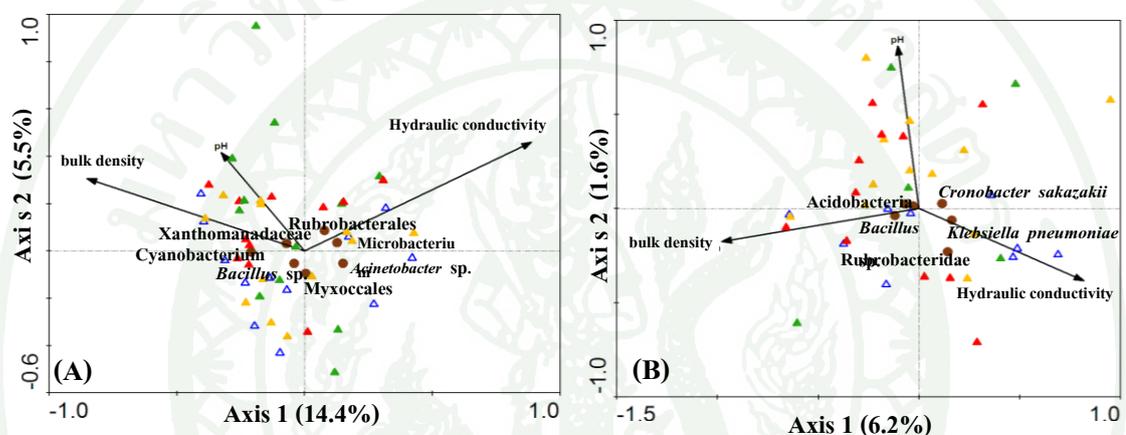
ของ Beuchat *et al.* (2009) ซึ่งรายงานว่าเชื้อ *Cronobacter sakazakii* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปรวมถึงในดิน แต่โดยส่วนมากมักพบปนเปื้อนในอาหาร เช่น นมผงและธัญพืชขบกรอบ (cereal) ส่วนเชื้อที่อยู่ในดินนั้นไม่มีรายงานว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช (Hartmann *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 2009) โดยพบได้ในบริเวณรากพืช เช่น มะเขือเทศและข้าวโพด นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการละลายฟอสเฟตและสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติก (IAA) เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และ Xue *et al.* (2009) รายงานว่าเชื้อ *Acinetobacter* sp. มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรคเหี่ยว (bacterial wilt) และยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ โดยส่งผลให้มะเขือเทศมีน้ำหนักและปริมาณผลผลิตเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ Etcheverry *et al.* (2009) และ Pereira *et al.* (2007) พบว่าเชื้อ *Microbacterium* และ *Bacillus* มีประสิทธิภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อ *Fusarium* ในดินและดินอ่อนของข้าวโพดได้



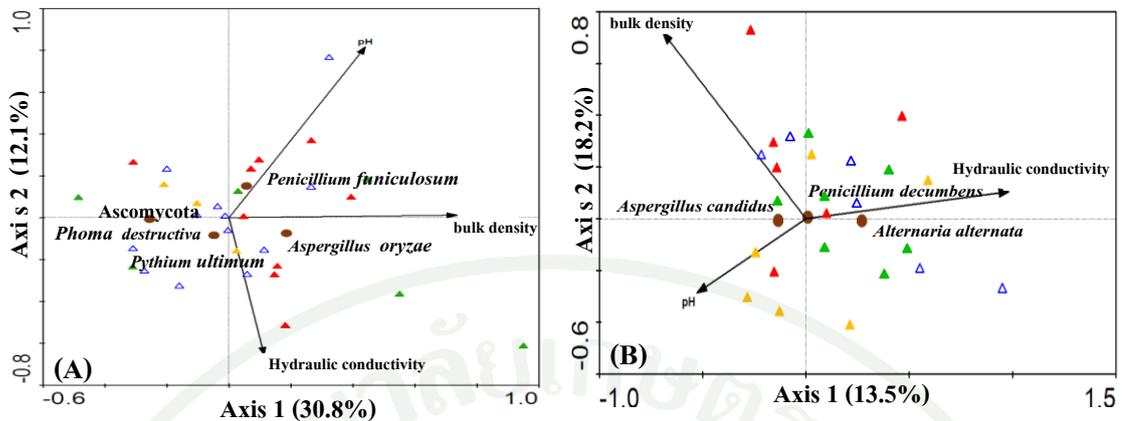
ภาพที่ 27 ข้อมูลเชื้อราเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ร่วมกับค่าน้ำน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA)

จากภาพที่ 27 ความหลากหลายของเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 27A) และคุณไพ (ภาพที่ 27B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดและไม่มีการไถระเบิดดินดาน มีผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับความหลากหลายของแบคทีเรียคือ พื้นที่ที่ไม่มีการไถระเบิดดินดานส่งผลให้ค่าน้ำน้ำในพื้นที่สูงและมีการเข้าอาศัยของเชื้อรามากกว่าพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน เชื้อราที่พบในบริเวณที่มีการจัดการโดยไม่ไถระเบิดดินดานส่วนมากมีสมบัติเป็นเชื้อ

ปฏิบัติและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ โดย Petersson and Johan (1995) และ Hashmi and Ghaffar (2006) พบว่า เชื้อ *Alternaria alternata* ก่อโรคมืดเน่าในข้าวสาลี บาร์เลย์และข้าวฟ่าง ส่วนเชื้อ *Aspergillus candidus* ก่อโรคมืดเน่าใน ข้าวบาร์เลย์ และ Guske *et al.* (2004) รายงานว่า เชื้อ *Phoma destructiva* เป็นเชื้อราที่ขยับยั้งการงอกของวัชพืชได้ซึ่งใช้ได้ทั้งในรูปแบบเชื้อกลุ่มและเชื้อเดี่ยว นอกจากนี้ Soyong *et al.* (2005) ยังพบว่าเชื้อ *Penicillium funiculosum* มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิบัติเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora cinnamomi*, *P. parasitica* และ *P. citrophthora* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าของส้มและกุหลาบพันปี



ภาพที่ 28 ข้อมูลแบคทีเรียเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการใส่ปุ๋ย 4 อัตรา คือ ไม่ใส่ปุ๋ย (Δ), 200 กิโลกรัมต่อไร่ (\blacktriangle), 300 กิโลกรัมต่อไร่ (\blacktriangle) และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ (\blacktriangle) วิเคราะห์ร่วมกับค่าพีเอช (pH) ค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA)



ภาพที่ 29 ข้อมูลเชื้อราเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการใส่ยิปซัม 4 อัตรา คือ ไม่ใส่ยิปซัม (Δ), 200 กิโลกรัมต่อไร่ (\blacktriangle), 300 กิโลกรัมต่อไร่ (\blacktriangle) และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ (\blacktriangle) วิเคราะห์ร่วมกับค่าพีเอช (pH) ค่าน้ำน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA)

จากภาพที่ 28 และ 29 พบว่าความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไพตามลำดับ ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการใส่ยิปซัมในอัตราต่างกัน 4 อัตราคือ ไม่ใส่ยิปซัม ใส่ยิปซัมอัตรา 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่เมื่อวิเคราะห์ร่วมปัจจัยทางเคมีของดินคือ ค่าพีเอช (pH) พบว่าความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 28A) และพันธุ์คุณไพ (ภาพที่ 28B) พื้นที่ที่ไม่มีการใส่ยิปซัมมีค่าพีเอชต่ำกว่าพื้นที่ที่มีการใส่ยิปซัม ซึ่งในการใส่ยิปซัมในอัตรา 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ พบว่ามีการเข้าอาศัยของแบคทีเรียมากกว่าในพื้นที่ที่ไม่มีการใส่ยิปซัม โดยการใส่ยิปซัมซึ่งเป็นสารปรับปรุงดินสามารถลดการฟุ้งกระจายของอนุภาคดินเหนียวดิน ส่งผลให้อนุภาคดินรวมตัวกัน มีลักษณะเป็นโครงสร้างมากขึ้น (Baldock *et al.*, 1994; Sumner, 1993) ทำให้การระบายน้ำและอากาศดีขึ้นตามไปด้วย ทั้งนี้เกิดจากแคลเซียมไอออนซึ่งเป็นองค์ประกอบของยิปซัมซึ่งการใช้สารปรับปรุงดินที่มีองค์ประกอบของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เช่น ปูนขาวหรือยิปซัม มีผลต่อการจับตัวของอนุภาคขนาดเล็กในดินซึ่งจะเพิ่มความสามารถในการจับตัวของดินให้ดียิ่งขึ้น (Chan and Heenan, 1999) ส่งผลให้บริเวณที่มีการเข้าอาศัยของแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญการพืช Sun *et al.* (2008) รายงานว่า เชื้อ *Acidobacteria* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและเป็นเชื้อที่อาศัยในรากพืช (endophyte) ปัจจัยที่มีผลต่อการเข้าอาศัยในราก

ข้าวที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตนั้นพบว่าพีเอชของดินมีผลต่อการเจริญของเชื้อมากกว่าลักษณะการจัดการดินโดยการไถพรวน (Yim *et al.*, 2010) ช่วงพีเอช 4.7-5.5 มีความเหมาะสมต่อเชื้อ *Acidobacteria* สามารถเจริญได้ดีที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยในระดับชีววิทยาระดับโมเลกุลพบว่าพีเอชดินเป็นปัจจัยสำคัญในอาศัยอยู่และลักษณะของเชื้อกลุ่ม *Acidobacteria* ในดิน และยังเป็นปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกกลุ่มประชากรของเชื้อ *Acidobacteria* อีกด้วย นอกจากนี้งานทดลองโดยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุลยังบ่งชี้อีกว่าพีเอชดินมีอิทธิพลต่อจำนวนของเชื้อและพบมากในสภาพแวดล้อมที่มีพีเอชต่ำ (Fierer *et al.*, 2007; Mannisto *et al.*, 2007; Lauber *et al.*, 2008)

ความหลากหลายของประชากรเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 29A) และพันธุ์คุณไพ (ภาพที่ 29B) มีผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกับความหลากหลายของแบคทีเรียพบว่ามีความโน้มในการเข้าอาศัยของเชื้อก่อโรคน้อยลงและมีการเข้าอาศัยของเชื้อราซึ่งมีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ ช่วยลดการเกิดโรครากเน่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Menge *et al.* (1997) ซึ่งศึกษาการควบคุมโรครากเน่าของต้นอโวคาโดโดยวิธีการปลูกวัชพืชคลุมดินและการจัดการดิน สามารถลดโอกาสการเกิดโรครากเน่าโดย *Phytophthora cinnamomi* ในต้นอโวคาโดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการจัดการดินโดยใช้ยิปซัม เนื่องจากส่งผลต่อเชื้อ *Phytophthora* ในกระบวนการสร้าง sporangial และ zoospore ซึ่งเป็นส่วนสืบพันธุ์ทำให้มีปริมาณลดลง นอกจากนี้ความยาวและความกว้างของเส้นใย (hypha) ยังลดลงด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยซึ่งใช้ยิปซัมในการปรับปรุงดินสามารถลดความรุนแรงของโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Phytophthora* ได้หลายสายพันธุ์ (Von Broembsen and Decon, 1996, 1997; Chang *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1996) และมีการปรับปรุงดินในแปลงปลูกเพื่อทดสอบความต้านทานของเชื้อ *Phytophthora* ในต้นอโวคาโดพบว่าประสิทธิภาพผลการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora* ทำให้การเกิดโรคมีความรุนแรงน้อยลง นอกจากนี้ยิปซัมยังสามารถลดการเกิดโรคโคนเน่าในส้มซึ่งเกิดจากเชื้อสาเหตุคือ *Phytophthora parasitica* (Nemec and Lee, 1992) และโรคฝักเน่าในถั่วลิสงซึ่งมีเชื้อสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิดร่วมกัน คือ *Pythium*, *Rhizoctonia* และ *Fusarium* (Bell *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Heyman *et al.* (2007) โดยศึกษาความเข้มข้นของแคลเซียมในดินที่มีผลต่อการยับยั้งโรครากเน่าของถั่วลิสงพบว่าระดับแคลเซียมมีผลต่อการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Lewis, 1973; Broadbent and Baker, 1974; Engelhard, 1989; Von Broembsen and Deacon, 1997) เนื่องมาจากการสร้าง zoospore ของเชื้อสาเหตุโรคจะถูกยับยั้งโดยความเข้มข้นของแคลเซียมช่วงหนึ่งและมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของ oomycete ซึ่งเป็นส่วนสืบพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรค (Deacon and Mitchell, 1985; Conolly *et al.*, 1999) จากการศึกษาของ Sugimoto *et al.* (2005)

เกี่ยวกับการลดการเกิดโรคกล้าต้นเน่าจากเชื้อ *Phytophthora* ในถั่วเหลืองโดยใช้ CaCl_2 และ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ พบว่า การใส่แคลเซียมมีอิทธิพลต่อการลดการเกิดโรคของเชื้อ *Phytophthora* เนื่องจากแคลเซียมมีผลต่อความแข็งแรงของเนื้อเยื่อพืชอาศัยโดยการใส่แคลเซียมและสามารถลดการเจริญของเชื้อราได้โดยตรง การจัดการโดยการใส่สารละลายแคลเซียมความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ มีอิทธิพลต่อการจัดการโรคกล้าต้นเน่าในพื้นที่และยับยั้งการปลดปล่อย zoospore ของเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งใช้ได้ผลดีเมื่อแคลเซียมอยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ (Bateman and Lumsden, 1965; Volpin and Elad, 1991; Conway *et al.*, 1992) ซึ่ง Kao and Ko (1986) และ Von Broembsen and Deacon (1997) กล่าวว่า ระดับแคลเซียมสูงสามารถยับยั้งการเจริญและการปลดปล่อย zoospore จากเชื้อสาเหตุโรคได้ในพื้นที่การเกษตร ยังสอดคล้องกับงานทดลองข้างต้นคือ แคลเซียมในปริมาณสูงสามารถยับยั้ง zoospore ของ *Phytophthora* ได้อย่างรวดเร็ว

นอกจากนี้ยังมีทฤษฎีอื่นที่สนับสนุนผลของแคลเซียมไอออนต่อความต้านทานต่อโรคพืช เช่น การลดความรุนแรงของโรค ซึ่งเป็นผลมาจากความแข็งแรงของผนังเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นโดยการใส่แคลเซียม (Bateman and Lumsden, 1965; Volpin and Elad, 1991; Conway *et al.*, 1992) โดยกลไกสำคัญของการลดความรุนแรงของเชื้อ เริ่มจากการส่งสัญญาณของแคลเซียมไอออนต่อเซลล์พืชที่ได้รับการกระตุ้น มีความสำคัญต่อกิจกรรมของพืชในด้านการตอบสนองการเข้าทำลายของโรคพืช เช่น การสังเคราะห์ phytoalexin (สารสังเคราะห์ที่พืชผลิตขึ้นเมื่อลำต้นหรือรากถูกทำลาย) เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำของยีนที่มีหน้าที่แสดงออกต่อเซลล์ที่ตายแล้ว (Knight *et al.*, 1991) ซึ่งแคลเซียมมีความสำคัญต่อเนื้อเยื่อพืช เนื่องจากแคลเซียมไอออนช่วยรักษาความสมบูรณ์ของโครงสร้างและการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) และผนังเซลล์ (cell wall) เพิ่มความต้านทานแก่พืชอาศัยต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Wisniewski *et al.*, 1995; Biggs *et al.*, 1997) และเนื่องจากแคลเซียมเป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์และ middle lamella และความสัมพันธ์ของ pectin และแคลเซียมไอออนในผนังเซลล์ สามารถอธิบายได้จากผลของการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช คือ *Phytophthora nicotianae* ในมันฝรั่งและแอปเปิ้ลที่ลดน้อยลง เมื่อมีการใส่ยิปซัมในพื้นที่ปลูก (Conway *et al.*, 1992)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่ โดยเทคนิคโคลนนิ่ง ในบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่ พบว่าในบริเวณรากหม่อนทั้งสองพันธุ์ในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่าและไม่เป็นโรครากเน่ามีการเข้าอาศัยของประชากรแบคทีเรียและเชื้อราแตกต่างกัน โดยในพื้นที่ปลูกหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่ที่ไม่เป็นโรครากเน่า มีความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบริเวณรากหม่อนมากกว่าในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่า ซึ่งแบคทีเรียที่เข้าอาศัยในบริเวณไม่เป็นโรครากเน่า นั้น พบว่า 6 ชนิด มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2. หม่อนพันธุ์คุณไผ่ในพื้นที่ที่ไม่เป็นโรครากเน่ามีความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียเข้าอาศัยมากกว่าบริเวณอื่น รวมถึงชนิดแบคทีเรียที่พบ เป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น *Acidobacterium* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* และ *Cronobacter sakazakii* เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากหม่อนพันธุ์คุณไผ่เป็นหม่อนที่มีสมบัติต้านทานโรครากเน่าได้ ส่วนหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 พบการเข้าอาศัยของแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์น้อยกว่าอีกทั้งบริเวณรากของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เป็นโรครากเน่า พบการเข้าอาศัยของเชื้อ *Pythium ultimum* สำหรับบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไผ่ที่เป็นโรครากเน่า พบการเข้าอาศัยของเชื้อ *Fusarium solani* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าในพืชหลายชนิด

3. การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Canoco for Windows วิธี PCA และ CCA เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อราในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่าและไม่เป็นโรครากเน่าร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ค่าพีเอช ค่าน้ำหนักการใส่ปุ๋ย窒 การไถระเบิดดินดานและไม่ไถระเบิดดินดานพบว่า ปัจจัยหลักที่ส่งผลให้โครงสร้างประชากรแบคทีเรีย ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเชื้อราเกิดความเปลี่ยนแปลงได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพคือ การจัดการดิน โดยวิธีการไถและไม่ไถระเบิดดินดานซึ่งส่งผลต่อค่าน้ำหนักของดิน (hydraulic conductivity)

4. การจัดการดินโดยใส่ยิปซัมในอัตรา 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ ส่งเสริมการเข้าอาศัยของแบคทีเรียและเชื้อราที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ *Acidobacterium* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii* และ *Penicillium funiculosum* ซึ่งผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและเชื้อราด้วยวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์บริเวณรากหม่อน ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อและเปรียบเทียบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ด้วยเทคนิคการโคลนนิ่ง รวมถึงวิธีการเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรเชื้อราและแบคทีเรียในพื้นที่ปลูกหม่อน โดยใช้เทคนิค DGGE นั้น พบว่าทั้ง 3 วิธี พบจุลินทรีย์ที่อาศัยบริเวณรากหม่อนเป็นกลุ่มเดียวกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพมีความหลากหลายของแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ รวมถึงแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชมากกว่าหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ส่งผลให้หม่อนพันธุ์คุณไพเป็นหม่อนพันธุ์ต้านทานโรครากเน่า ดังนั้นพันธุ์หม่อนที่ควรปลูกเพื่อป้องกันโรครากเน่าในพื้นที่ ควรเลือกปลูกหม่อนพันธุ์คุณไพ
2. พื้นที่ที่มีเนื้อดินประเภทดินร่วนปนทรายแข็ง มีแนวโน้มการเกิดชั้นดานได้ง่ายจากการจัดการดินโดยวิธีการไถระเบิดดินดานและใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตร เพื่อลดปัญหาการเกิดชั้นดานซึ่งมีผลต่อการซาดซึมและการเจริญของรากพืช ส่งผลต่อการเกิดโรคเกี่ยวกับระบบรากพืช ควรจัดการดินโดยวิธี การไถพรวนแบบดั้งเดิม (conventional tillage) หรือการไถพรวนแบบอนุรักษ์ (conservation tillage)
3. ควรใส่ยิปซัมในอัตรา 200 กิโลกรัมต่อไร่ เพื่อส่งเสริมให้ดินมีโครงสร้างดีขึ้นและยับยั้งการปลดปล่อย zoospore ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เสริมสร้างความแข็งแรงของผนังเซลล์พืชและกระตุ้นการสร้าง phytoalexin ซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันตัวเองของพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของแคลเซียมไอออนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของยิปซัม
4. การจัดการดินที่เหมาะสมควรมีการจัดการดินร่วมกันทั้งทางกายภาพและชีวภาพ ได้แก่ การไถพรวนแบบดั้งเดิม และการใส่ยิปซัมในอัตรา 200 กิโลกรัมต่อไร่ ร่วมกับการใส่ไมคอร์ไรซาเพื่อปรับโครงสร้างและรักษาความชื้นของดินในฤดูแล้งและลดการขังน้ำในดิน ซึ่งมีผลต่อการเกิดโรคต่อระบบรากหม่อนในฤดูฝน รวมทั้งเชื้อไมคอร์ไรซาจะช่วยให้การลดโอกาสเชื้อก่อโรคในการเข้าทำลายรากหม่อนได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548. การปลูกหม่อน. แหล่งที่มา: <http://www.moac.go.th/builder/mu/mul.php>, 20 ธันวาคม 2550.

กรมพัฒนาที่ดิน กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2548. รายงานการจัดการทรัพยากรดิน ปลูกพืชเศรษฐกิจหลักตามกลุ่มชุดดิน เล่ม 1 ดินบนพื้นที่ราบต่ำ. กรมพัฒนาที่ดิน, กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. 2523. หม่อน-ไหม. งานทะเบียนและประมวลผลสถิติกองแผนงาน, กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. 2548. การดูแลรักษาสวนหม่อน. แหล่งที่มา: <http://www.moac.go.th/builder/mu/images/menu258.html>, 4 เมษายน 2551.

คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2548. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นุจรินทร์ ศิริวาลย์. 2554. การปรับปรุงคุณภาพดินโดยยิปซัมเพื่อความยั่งยืนทางการเกษตร. **RMUTP Res. J.** 5: 118-126.

นวลจันทร์ หอมไกรลาศ. 2502. โรครากเน่าของต้นหม่อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทัศนีย์ อัดตะนันท์ และ จงรักย์ จันทร์เจริญสุข. 2542. การวิเคราะห์ดินและพืช. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พรรณี ศรีบรรเทา. 2531. เทคนิคการเลี้ยงไหมสำหรับประเทศไทย. กองนิคมเสริมสร้างตนเองกรมประมงสงเคราะห์, กรุงเทพฯ.

มะลิวัลย์ กอสกุล, พินัย ห่องทองแดง, อมรรัตน์ พรหมบุญ และ พรรณภา สักดิ์สูง. 2546.

รูปแบบดีเอ็นเอ อาร์เอพีดีและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหม่อนพื้นเมืองไทย, น. 185-192 ใน การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41: สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ภาคอุษวีวิทยา. 2547. **จุลชีวะวิทยาปฏิบัติการ**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เจ้าพระยาการพิมพ์จำกัด, กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2544. **บทปฏิบัติการโรคพืช
วิทยาเบื้องต้น**. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วีระ สังคมพิทักษ์. 2534. **เทคนิคการทำธุรกิจการเกษตร หม่อนใหม่ แผนใหม่**. วชิรนาการพิมพ์,
กรุงเทพฯ.

ศรีสุข พูนผลกุล, ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และ กิตติศักดิ์ กิรติยะอังกูร. 2544. **เทคโนโลยีชีวภาพกับ
งานวิจัยด้านการเกษตร**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด,
กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยหม่อนใหม่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2535. **ไหมไทย**. กรม
วิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. ม.ป.ป. **การระบาดของโรคพืช**. เอกสารประกอบการสอน วิชา Plant
Protection and Pest Control แหล่งที่มา:
http://www2.csc.ku.ac.th/~prapat/Epidemiology_of_plant_disease.pdf, 3 เมษายน 2551.

สุดฤดี ประเทืองวงศ์. ม.ป.ป. **ลักษณะอาการทั่วไปของโรคพืช**. เอกสารประกอบการสอน วิชา
Plant protection and pest control. แหล่งที่มา: [http://
www2.csc.ku.ac.th/~prapat/General_symptoms_of_plant_disease.pdf](http://www2.csc.ku.ac.th/~prapat/General_symptoms_of_plant_disease.pdf), 3 เมษายน 2551.

สุวิมล กลศึก, สมภพ จงรวยทรัพย์, กานดา ฉัตรไชยศิริ และ ศิริลักษณ์ แก้วสุรลิขิต. 2552. ผลของการไถพรวนและการใช้ปุ๋ยขี้หมูต่อการสร้างสปอร์และการเข้าอาศัยภายในรากหม่อนของราไมคอร์ไรซา. กรมหม่อนไหม, กรุงเทพฯ.

สมภพ จงรวยทรัพย์, อนุสรณ์ เทียนศิริฤกษ์, อมรรักษ์ คิใจเดียว และ รังษิ เจริญสถาพร. 2552. การใช้วัสดุปรับปรุงดินร่วมกับหมอนพันธุ์ต้านทานต่อการเพิ่มผลผลิตหม่อนในเขตที่มีการแพร่ระบาดของโรครากเน่าจังหวัดมหาสารคาม. แหล่งที่มา: http://www.itqthaisilk.com/research/abstract.php?r_id=35, 24 เมษายน 2554.

Akgül, D.S. and M. Mirik. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. **J. Plant Path.** 90: 29-34.

Akira, S. T. Kohei, D. Noriyuki and T. Kokochi. 1978. Increase in peroxidase-and polyphenoloxidase-activities and production of antifungi substances in mulberry shoots following wounding or infection by pathogenic fungi. **Ann. Phyto. Soc. Japan** 44: 121-136.

Ammal, E.K. 1960. The effect of Himalayan uplift on the genetic composition of the flora in Asia. **JIBS.** 39: 327-333.

Anderson, T.R. 1985. Root rot and wilt of mung bean in Ontario. **Can. Plant Dis. Surv.** 65: 3-4.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. 1997. **Current Protocols in molecular biology.** John Wiley and Sons, New York.

Baldock, J.A., M. Aoyama, J.M. Oades, R.H. Susanto, C.D. Grant. 1994. Structural amelioration of a south Australian redbrown earth using calcium and organic amendments. **Aust. J. Soil Res.** 32: 571-594.

- Bateman, D.F. and R.D. Lumsden. 1965. Relation of calcium content and nature of the pectic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology** 55: 734-738.
- Benson, H.J. 2005. **Microbiological Applications**. 9th ed. McGraw-Hill, New York.
- Bell, D.K., A.S. Csinos and M.E. Walker. 1988. Gypsum and lime effects on the germination quality and fungal infection of peanut seed. **Appl. Agri. Res.** 3: 153-159.
- Besoain, X., C. Arenas, E. Salgado and B.A Latorre. 2005. Effect of soil flooding on the development of avocado (*Persea Americana*) root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. **Cienc. Agraria.** 43: 79-84.
- Beuchat, L.R., H. Kim, J.B. Gurtler, L.C Lin, J.H Ryu and G.M. Richards. 2009. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival growth and inactivation. **Int. J. Food Microbiol.** 136: 204-213.
- Biggs, A.R., M.M. El-Kholi, S. El-Neshawy and R. Nickerson. 1997. Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. **Plant Dis.** 81: 339-403.
- Blake, G.R. 1965. Bulk Density, pp. 374-390. In A. Klute, ed. **Methods of Soil Analysis. Part I. Agronomy Monograph no.9.** American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin.
- Bray, R.H and L.T. Kurtz. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soil. **Soil Sci.** 59: 37-59.
- Broadbent, P. and K.F. Baker. 1974. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* in soils suppressive and conducive to root rot. **Aust. J. Agri. Res.** 25: 121-137.

- Campanella, V., A. Ippolito and F. Nigro. 2002. Activity of calcium salt in controlling *Phytophthora* root rot of citrus. **Crop Prot.** 21: 751-756.
- Chan, K.Y. and D.P. Heenan. 1999. Lime-induced loss of soil organic carbon and effect on aggregate stability. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 63: 1841-1844.
- Chang, X. and P.F. Morris. 1998. External calcium controls the developmental strategy of *Phytophthora sojae* cysts. **Mycologia.** 90: 269-275.
- Conolly, M.S., N. Williams, C.A. Heckman, and P.F. Morris. 1999. Soybean isoflavones trigger a calcium influx in *Phytophthora sojae*. **Fungal Gen. Bio.** 28: 6-11.
- Conway, W.S., C.E. Sams, R.G. McGuire and A. Kelman. 1992. Calcium treatment of apples and potatoes to reduce post-harvest decay. **Plant Dis.** 76: 329-334.
- Datta, R.K. 2001. **Mulberry Cultivation and Utilization in India.** In FAO Electronic Conference on Mulberry for Animal Production. Available source: www.fao.org/DOCREP/005/x9895E/x9895e02.htm, January 4, 2009.
- Day, P.R. 1965. Particle fractionation and particle size analysis, pp. 545-567. In C.A. Black, ed. **Methods of Soil Analysis. Part I.** Agronomy, No.9. Amer. Soc. of Agron. Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Deacon, J.W. and R. Mitchell. 1985. Toxicity of oat roots, oat root extracts and saponins to zoospores of *Pythium* spp. and other fungi. **Tran. British Myco. Soc.** 84: 479-487.
- Dikin, A., K. Sijam, J. Kadir and I.A. Seman. 2007. Mode of action of antimicrobial substances from *Burkholderia multivorans* and *Microbacterium testaceum* against *Schizophyllum commune*. **Fr. Int. J. Agric. Biol.** 9: 311-314.

- Elmer, W.H. 1999. Influence of ammonium sulfate and rotation crop on strawberry black root rot. **Am. Phytopathol. Soc.** 83: 119-123.
- Engelhard, A.W. 1989. **Soilborne plant pathogens; management of diseases with macro- and microelements.** APS, St. Paul, Minn.
- Etcheverry, M.G., S. Andrea, N. Andrea, R.M.S. Vilas Boas, P. Paola and B. Paola. 2009. Biological interactions to select biocontrol agents against toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* from Maize. **Mycopathologia.** 167: 287-295.
- Evueh, G.A. and N.O. Ogbebor. 2008. Use of phylloplane fungi as biocontrol agent against *Colletotrichum* leaf disease of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Afr. J. Biotechnol.** 7: 2569-2572.
- Forchetti, G., O. Masciarelli, S. Alemano, D. Alvarez and G. Abdala. 2007. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 76: 1145-1152.
- Fierer, N., J.L. Morse, S.T. Berthrong, E.S. Bernhardt and R.B. Jackson. 2007. Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. **Ecology.** 88 : 2162-2173.
- Fischer, P.B., M. Collin, G.B. Karlsson, W. James, T.D. Butters, S.J. Davis, S. Gordon, R.A. Dwek and F.M. Platt. 1995. The R-Glucosidase inhibitor N-Butyldeoxynojirimycin inhibit human immune deficiency virus entry at the level of post-CD4 binding. **J. Virol.** 69: 5791-5797.
- Gerlach, J.P., P.B. Reich, K. Puettmann and T. Baker. 1997. Species, diversity, and density affect tree seeding mortality from *Armillaria* root rot. **Can. J. For. Res.** 27: 1509-1512.

- Gheorghe, A., J. Luiza, V. Anca, P. Florina, R. Andreea and R. Anca. 2008. **Biological control of phytopathogen microorganism with antagonist bacteria.** Available source: www.aidic.it/IBIC2008/webpapers/64Gheorghe.pdf, January 4, 2009.
- Gill, J.S., K. Sivasithamparam and K.R.J. Smettem. 2001. Effect of soil moisture at different temperature on *Rhizoctonia* root rot of wheat seedings. **Plant Soil** 231: 91-96.
- Goodall, G.E., D.M. Hansen and R.M. Burns. 1962. Santa Barbara country avocado root rot soil survey. Yearbook . **Cali. Avocado Soc.** 46: 63-71.
- Guske, S., B. Schulz and C. Boyle. 2004. Biocontrol options for *Cirsium arvense* with indigenous fungal pathogens. **Euro. Weed Res. Soc.** 44: 107-116.
- Handelsman, J., R. Sandra, E.H. Mester, L. Wunderlich and C.R. Grau. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 713-718.
- Hashmi, F.M.H. and A. Ghaffar. 2006. Seed-borne mycoflora of wheat, sorghum and barley. **Pak. J. Bot.** 38: 185-192.
- Hartmann, I., C. Paula, L. Angelika, S. Roger, E. Leo and R. Kathrin. 2010. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. **App. Env. Micro.** 76 : 2251-2261.
- Heritage, A.D. and E.K.S. Harrigan. 1984. Environment factors influencing safflower screening for resistance to *Phytophthora cryptogea*. **Plant Dis.** 68: 767-769.
- Heyman, F., B. Lindahl, L. Persson, M. Wikstrom and S. Jan. 2007. Calcium concentrations of soil affect suppressiveness against *Aphanomyces* root rot of pea. **Soil Biol. Biochem.** 39: 2222-2229.

- Hsiang, T., C. Wu, L. Yang and L. Liu. 1995. *Pythium* root rot associated with cool-season dieback of turfgrass in Ontario and Quebec. **Can. Plant Dis. Surv.** 72: 191-195.
- Hunter, P.J., G.M. Petch, L.A. Calvo-Bado, T.R. Pettitt, N.R. Parsons, J. Morgan and J.M. Whipps. 2006. Differences in microbial activity and microbial populations of peat associated with suppression of damping-off disease caused by *Pythium sylvaticum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 6452-6460.
- Huo, Y. 2000. **Mulberry Cultivation and Utilization in China**. In FAO Electronic conference on mulberry for animal production. Available source: www.fao.org/ag/aga/AGAP/frg/Mulberry/Papers/PDF/Yongkang.pdf, January 4, 2009.
- Jackson, S.L. and A.R. Hardham. 1996. A transient rise in cytoplasmic free calcium is required to induce cytokinesis in zoosporangia of *Phytophthora cinnamomi*. **Eur. J. Cell Biol.** 69: 180-188.
- Jing, Z.Y., X.R. Feng, L.Y. Zhi, S. Huai and B. Liu. 2009. Effect of biocontrol strain ANTI-8098A of *Bacillus cereus* on pathogenicity of *Ralstonia solanacearum*. **Chinese J. Biol. Cont.** 25: 41-47.
- Kao, C.W. and W.H. Ko. 1986. The role of calcium and microorganisms in suppression of cucumber damping-off caused by *Pythium splendens* in a Hawaiian soil. **Phytopathology** 76: 221-225.
- Kasempour, M.N. and E. Kamran. 2006. A review of fungi disease on mulberry trees (*Morus alba*) in Guilan province. **Sericologia.** 46: 219-228.
- Kasempour, M.N., E. Kamran and M. Afsaneh. 2006. Biological control of root rot in mulberry by antagonistic bacteria. **Sericologia.** 46: 149-169.

- Katsumata, F. 1972. Mulberry species in west java and their peculiarities. **J. Seri. Sci. Japan** 42: 213-223.
- Katsumata, F. 1973. Mulberry species in south Vietnam. **J. Seri. Sci. Japan** 42: 81-88.
- Keel, C., C. Voisard, C.H. Berling, G. Kahr and G. Défago. 1988. Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0 under gnotobiotic condition. **Plant Dis.** 79: 584-589.
- Kilmer, V.J. and L.T. Alexander. 1949. Method of making mechanical analysis of soils. **Soil Sci.** 68: 15-24.
- Kimpinski, J. and H.W. Johnston. 1985. Incident of root rot and nematode in barley field in Prince Edward island. **Can. Plant Dis. Surv.** 65:15-16.
- Klute, A. 1965. Laboratory Measurement of Hydraulic Conductivity of Unsaturated Soil, pp. 253-261. In C.A. Black, ed. **Method of Soil Analysis. Part I.** Agronomy No.9. Klute. Amer. Soc. Agron., Madison, Wisconsin, USA.
- Knight, M.R., A.K. Cambel, S.M. Smith and A.J. Trewavas. 1991. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium. **Nature** 352: 524-526.
- Koike, S.T., V.S. Krishna, R.D. Michael and A.T. Thomas. 2003. **Vegetable diseases caused by soilborne pathogens.** Available source: <http://anrcatalog.ucdavis.edu>, April 27, 2011.
- Kucharek, T. and D. Mitchell. 2000. **Diseases of agronomic and vegetable crops caused by *Pythium*.** Available source: <http://128.227.207.24/takextpub/FactSheet/pp53.pdf>, January 4, 2009.

- Ladygina, N. and K. Hedlund. 2010. Plant species influence microbial diversity and carbon allocation in the rhizosphere. **Soil Biol. Biochem.** 42: 162-168.
- Lauber, C.L., M.S. Strickl, M.A. Bradford and N. Fierer. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biol. Biochem.** 40: 2407-2415.
- Ledingbam, R. J., T. Atkinson, R. Horricksr, J. Mills, L. Pienin and R. Tinling. 1973. Wheat losses root rot in the prairie provinces of Canada. **Plant Dis. Surv.** 53: 113-122.
- Lee, K.D., Y. Bai, D. Smith, H.S. Han and Supanjani. 2005. Isolation of plant-growth-promoting endophytic bacteria from bean nodules. **J. Agri. Biol. Sci.** 1: 232-236.
- Lewis, J.A. 1973. Effect of mineral salts on *Aphanomyces euteiches* and *Aphanomyces* root rot of peas. **Phytopathology** 63: 989-993.
- Mannisto, M.K., M. Tirola and M.M. Haggblom. 2007. Bacterial communities in arctic fields of finnish lapland are stable but highly pH-dependent. **FEMS Microbiol. Ecol.** 59: 452-465.
- Medlin, L., H.J. Elwood, S. Stickel and M.L. Sogin. 1998. The Characterization of enzymatically amplified eukaryote 16S like rRNA coding regions. **Gen.** 71: 491-499.
- Menge, J.A., D. Crowley, H. Ohr, M. Crowley, E. Pond, B. Mckee, B. Faber, G. Bender, P. Mauk, J. Downer and K. Steddum. 1997. Biocontrol of *Phytophthora* root rot of avocado with mulch and biocontrol agents. **Cali. Avocado Res. Sym.** 35: 31-33.
- Miller, D.E. and D.W. Burke. 1985. Effects of low soil oxygen on *Fusarium* root rot beans with respect to seeding age and soil temperature. **Plant Dis.** 69: 328-330.

- Mohammadi, K. 2011. Soil microbial activity and biomass as influenced by tillage and fertilization in wheat production. **Am-Euras. J. Agric. Environ. Sci.** 10: 330-337.
- Moore, D.C., M.J. Singer and W.H. Olson. 1989. Improving orchard soil structure and water penetration. **Cali. Agri.** 43: 7-9.
- Moussa, T.A.A. 2002. Studies on biological control of sugar beet pathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. **J. Biol. Sci.** 2: 800-804.
- Muyzer, G., E.C. De Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reactions-amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 695-700.
- Nannipieri, P., J. Ascher, M.T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, G. Renella and F. Valori. 2008. Effects of root exudates in microbial diversity and activity in rhizosphere soils. **Soil Biol.** 15: 339-365.
- Narisawa, K., M. Shimura, F. Usuki, S. Fukuhara and T. Hashiba. 2005. Effects of pathogen density, soil moisture and soil pH on biological control of clubroot in chinese cabbage by *Heteroconium chaetospira*. **Plant Dis.** 89: 285-290.
- Nemec, S. 1970. Fungi associated with strawberry root rot in Illinois. **Mycologia.** 41: 331-346.
- Nemec, S. and O. Lee. 1992. Effects of preplant deep tillage of soil amendments on soil mineral analysis, citrus growth, production and tree health. **Soil Till. Res.** 23: 317- 331.

- Nunan, N., T.J. Daniell, B.K. Singh, A. Papert, J.W. McNicol and J.I. Prosser. 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils characterized using molecular techniques. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 6784-6792.
- Os van, G.J. and J.H. Van Ginkel. 2001. Suppression of *Pythium* root rot in bulbous Iris in relation to biomass and activity of the soil microflora. **Soil Boil. Biochem.** 33: 1447-1454.
- Peech, M. 1965. Hydrogen-ion Activity, pp. 914-925. In C.A. Black, ed. **Methods of Soil Analysis, Part II, Chemical and Microbiological Properties** No. 9, Amer. Soc. Agron. Madison, Wisconsin, USA.
- Pereira, P., N. Andrea and E. Miriam. 2007. Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and Fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. **Biol. Con.** 42: 281-287.
- Petersson, S. and S. Johan. 1995. Biocontrol of mold growth in high moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 1027-1032.
- Pratt, P.E. 1965. Potassium, pp. 1022-1030. In C.A. Black, ed. **Methods of Soil Analysis. Part II.** Agronomy No. 9. Amer. Soc. of Agron., Madison, Wisconsin, USA.
- QIAGEN. 2001. **QIAGEN PCR Cloning Handbook**. Available source: www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=2062 -, January 4, 2009.
- Ravindran, S., R.A. Ananda, N.V. Girish, A. Tikander, P. Mukherjee and K. Thangavelu. 1997. Distribution and variation in mulberry germplasm. **Indi. J. Pant Gen. Res.** 10: 233-242.

- Richard, L.A. (ed.). 1954. **Dianosis and Improvement of Saline and Akali soils.** U.S. Salinity Laboratory, U.S. Dept. Agr. Hbk. 60.
- Rusuku, G. and M. Gatabazi. 1997. Occurrence and distribution in Rwamda of soilborne fungi pathogenic to the common bean. **Plant Dis.** 81: 445-449.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual.** 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez, M.D. 2000. **World distribution and utilization of Mulberry and its potential for animal feeding.** In FAO Electronic Conference on Mulberry for Animal Production. Available source: <http://www.fao.org/WaICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGA/AGAP/FRG/Mulberry/Papers/PDF/Intro.pdf>, March 6, 2011.
- Schmid, M., I. Carol, G. Iti, S. Roger, H. Andreas, H. Anton, J. Bhavanath , E. Leo , R. Kathrin and L. Angelika. 2009. Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. **Res. Microbiol.** 160: 608-614.
- Silo-Suh, L.A., B.J. Lethbridge, S.J. Raffel, H. He, J. Clardy and J. Handelsman. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 2023-2030.
- Soil Survey Division Staff. 1993. **Soil survey manual.** USDA-SCS. Agric. Handb. 18. U.S. Govt. Print. Office, Washington, DC.
- Soytong, K., W. Srinon, K. Rattanacherdchai, S. Kanokmedhakul and K. Kanokmedhakul. 2005. Application of antagonistic fungi to control anthracnose disease of grape. **J. Agri. Biotec.** 1: 33-41.

- Sugimoto, T., M. Aino, M. Sugimoto and K. Watanabe. 2005. Reduction of *Phytophthora* stem rot disease on soybeans by the application of CaCl_2 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. **Phytopathology** 15: 536-543.
- Sullivan, P. 2002. **Drought Resistant soil**. Available source: <http://www.attra.ncat.org/attra-pub/PDF/drought.pdf>, March 19, 2011.
- Sumner, M.E. 1993. Sodic soils - new perspectives. **Aust. J. Soil Res.** 31: 683-750.
- Sun, L., Q. Fubin, X. Zhang, D. Xin, D. Xiuzhu and S. Wei. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Micro. Ecol.** 55: 415-424.
- Supaphol, S. 2005. **Intrinsic Bioremediation and The Molecular Analysis of Microorganisms in Hydrocarbon Contaminated Thai Soil**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- Trivedi, P. and P. Anita. 2007. Plant growth promotion abilities and formulation of *Bacillus megaterium* strain B 388 (MTCC6521) isolated from a temperate Himalayan location. **Indi. J. Micro.** 48: 342-347.
- Tsushida, T., T.Murai, M. Omori and J. Okamoto. 1987. Production of new type tea containing a high level of c-aminobutyric acid. **Nippon Nogeikagaku Kaishi.** 61: 817-822.
- Vainio, E.J. and J. Hantura. 2000. Direct analysis of wood inhibiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis amplified ribosomal DNA. **J. Cambridge** 104: 927-936.
- Venkatasubbaiah, P. and K. M. Safeeulla. 1984. *Aspergillus niger* for biological control of *Rhizoctonia solani* on coffee seeding. **Int. J. Pest Manag.** 30: 401-406.

- Volpin, G. and Y. Elad. 1991. Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to Botrytis blight. **Phytopathology** 81: 1390-1394.
- Von Broembsen, S.L. and J.W. Deacon. 1996. Effects of calcium on germination and further zoospore release from zoospore cysts of *Phytophthora parasitica*. **Mycol. Res.** 100 : 1498-1504.
- _____ and _____. 1997. Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation systems. **Phytopathology**. 87: 522-528.
- Waipara, N.W., M.E. Di Menna, A.L.J. Cole and R.A Skipp. 1996. Soil moisture effect on root rot white clover caused by *Codinaa fertilis*. **N.Z. Plant Prot. Soc.** 42: 216-219.
- Walkley, A. and I.A. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method of determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil sci.** 37 : 29-38.
- Widodo, B. and B. Tati. 2009. Supression of *Fusarium* root rot and Sounthern blight on peanut by soil solarization. **J. ISSAAS** 15: 118-125.
- Wingfield, B.D., P. Bloomer, G.S. Ridley and M.J. Wingfield. 2003. Molecular identification and phylogeny of *Armillaria* isolates from South America and Indo-Malaysia. **Mycologia**. 95: 285-293.
- Wisniewski, M., S. Droby, E. Chalutz and Y. Eilam. 1995. Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* in vitro and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. **Plant Pathol.** 44: 1016-1024.

- Xue, Q.Y., C. Yu, L. Shi-Mo, C. Li-Feng, D. Guo-Chun, G. Da-Wei and G. Jian-Hua. 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against Ralstonia wilt of tomato. **Biocontrol** 48: 252-258.
- Yin, C., K.L. Jones, D.E. Peterson, K.A. Garrett, S.H. Hulbert and T.C. Paulitz. 2010. Member of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. **Soil Biol. Chem.** 42: 2111-2118.
- Young, F.J. and A.W. Geller. 1995. **Soil Survey of Audrain County**. National Cooperative Soil Survey, USDA-NRCS, Columbia, MO.
- Zhang, Y., B.H. Du, Z.G. Jin, Z.H. Li, H.N. Li Song and Y.Q. Ding. 2010. Analysis of bacterial communities in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton (*Gossypium* sp.) at different plant growth stages. **Plant Soil** Source: www.springerlink.com/index/96Q2G17X0207N192.pdf, January 12, 2011.
- Zhou, J., M.A. Bruns and M.T. James. 1995. DNA recovery from soils of diverse composition. **Amer. Soc. Micro.** 62: 316-322.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ระดับความรุนแรงของปฏิกิริยาดิน

| ระดับ (rating) | พิสัย (rang) |
|---|--------------|
| เป็นกรดรุนแรงมากที่สุด (ultra acid) | <3.5 |
| เป็นกรดรุนแรงมาก (extremely acid) | 3.5-4.5 |
| เป็นกรดจัดมาก (strongly acid) | 4.5-5.0 |
| เป็นกรดจัด (strongly acid) | 5.1-5.5 |
| เป็นกรดปานกลาง (moderately acid) | 5.6-6.0 |
| เป็นกรดเล็กน้อย (slightly acid) | 6.1-6.5 |
| เป็นกลาง (neutral) | 6.6-7.3 |
| เป็นด่างเล็กน้อย (slightly alkaline) | 7.4-7.8 |
| เป็นด่างปานกลาง (moderately alkaline) | 7.9-8.4 |
| เป็นด่างจัด (strongly alkaline) | 8.5-9.0 |
| เป็นด่างจัดมาก (very strongly alkaline) | >9.0 |

ที่มา: คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา (2541)

ตารางผนวกที่ 2 ค่าการนำไฟฟ้า (electric conductivity (EC))

| ระดับ (rating) | พิสัย (dS/m) |
|----------------|-------------------------|
| ต่ำมาก (VL) | 0-2.0 ดินไม่เค็ม |
| ต่ำ (L) | 2.0-4.0 ดินเค็มเล็กน้อย |
| ปานกลาง (M) | 4.0-8.0 ดินเค็มปานกลาง |
| สูง (H) | 8.0-12.0 ดินเค็มสูง |
| สูงมาก (VH) | 12.0-16.0 ดินเค็มสูงมาก |

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 3 ปริมาณของอินทรีย์วัตถุ (%)

| ระดับ (rating) | พิสัย (%) |
|------------------|-----------|
| ต่ำมาก (VL) | <0.5 |
| ต่ำ (L) | 0.5-1.0 |
| ค่อนข้างต่ำ (ML) | 1.0-1.5 |
| ปานกลาง (M) | 1.5-2.5 |
| ค่อนข้างสูง (MH) | 2.5-3.5 |
| สูง (H) | 3.5-4.5 |
| สูงมาก (VH) | >4.5 |

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 4 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (%)

| ระดับ (rating) | พิสัย (%) |
|----------------|-----------|
| ต่ำมาก (VL) | <0.1 |
| ต่ำ (L) | 0.1-0.2 |
| ปานกลาง (M) | 0.2-0.5 |
| สูง (H) | 0.5-0.75 |
| สูงมาก (VH) | >0.75 |

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 5 ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (available P; Bray II)

| ระดับ (rating) | ฟอสฟอรัส (mg/kg) |
|------------------|------------------|
| ต่ำมาก (VL) | <3 |
| ต่ำ (L) | 3-5 |
| ค่อนข้างต่ำ (ML) | 6-10 |
| ปานกลาง (M) | 11-15 |
| ค่อนข้างสูง (MH) | 16-25 |
| สูง (H) | 26-45 |
| สูงมาก (VH) | >45 |

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 6 ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (available K; NH_4OAc)

| ระดับ (rating) | ฟอสฟอรัส (mg/kg) |
|----------------|------------------|
| ต่ำมาก (VL) | <30 |
| ต่ำ (L) | 30-60 |
| ปานกลาง (M) | 60-90 |
| สูง (H) | 91-120 |
| สูงมาก (VH) | >120 |

ที่มา: กรมพัฒนาที่ดิน (2548)

ตารางผนวกที่ 7 ส่วนประกอบของอาหาร nutrient agar (NA)

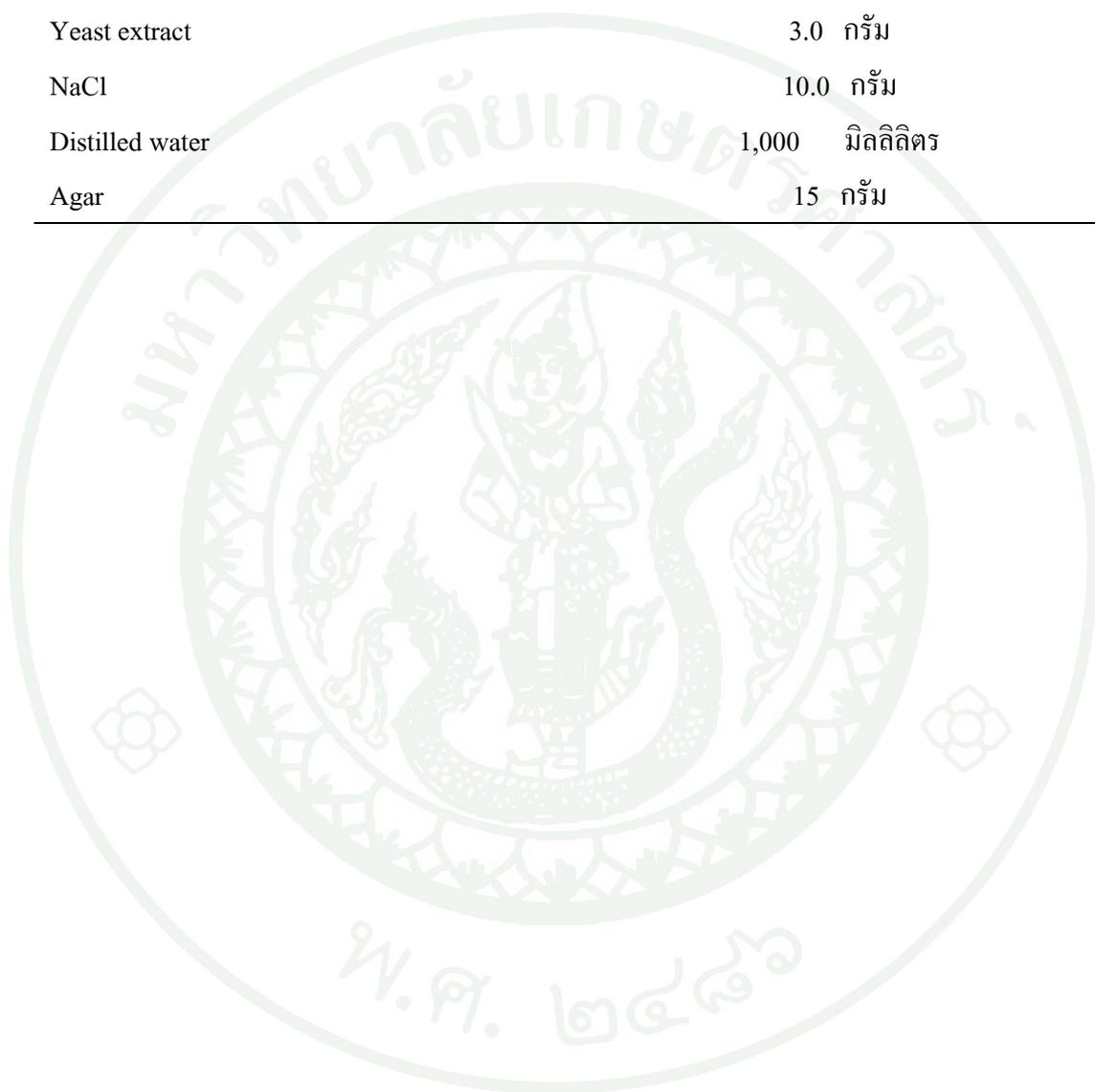
| สารเคมี | ปริมาณ |
|-----------------|-----------------|
| Peptone | 5.0 กรัม |
| Yeast extract | 3.0 กรัม |
| Distilled water | 1,000 มิลลิลิตร |
| Agar | 15 กรัม |

ตารางผนวกที่ 8 ส่วนประกอบของอาหาร rose bengal agar (RB)

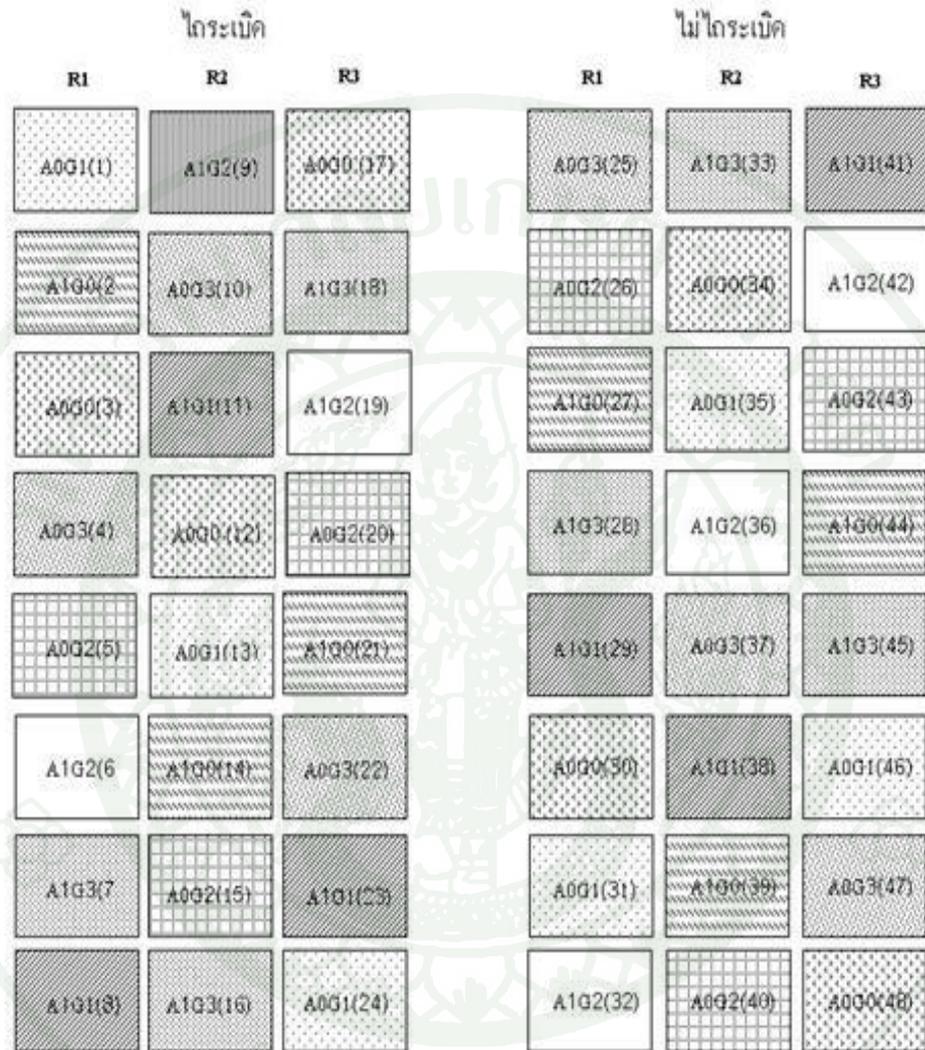
| สารเคมี | ปริมาณ |
|---------------------------------------|-----------------|
| Glucose | 10.0 มิลลิลิตร |
| Peptone | 5.0 มิลลิลิตร |
| K ₂ HPO ₄ | 1.0 มิลลิลิตร |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.5 มิลลิลิตร |
| Streptomycin | 30 มิลลิกรัม |
| Rose Bengal | 0.035 มิลลิกรัม |
| Distilled water | 1,000 มิลลิลิตร |
| Agar | 20 กรัม |

ตารางผนวกที่ 9 ส่วนประกอบของอาหาร LB agar

| สารเคมี | ปริมาณ |
|-----------------|-----------------|
| Peptone | 5.0 กรัม |
| Yeast extract | 3.0 กรัม |
| NaCl | 10.0 กรัม |
| Distilled water | 1,000 มิลลิลิตร |
| Agar | 15 กรัม |



แบบ



- | | | | | | |
|--|-----|---|--|------|--|
| | A0C | ไม่ใส่ไม่คอรโรชา ไม่ใส่ | | A1G0 | ใส่ไม่คอรโรชา ไม่ใส่ยิปซัม |
| | A0G | ไม่ใส่ไม่คอรโรชา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่ | | A1G1 | ใส่ไม่คอรโรชา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่ |
| | A0C | ไม่ใส่ไม่คอรโรชา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่ | | A1G2 | ใส่ไม่คอรโรชา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่ |
| | A0C | ไม่ใส่ไม่คอรโรชา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่ | | A1G3 | ใส่ไม่คอรโรชา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่ |

ภาพผนวกที่ 1 พื้นที่แปลงปลูกหม่อนซึ่งเกิดปัญหาการระบาดของโรครากเน่า บริเวณแปลงทดลองหม่อน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

| | |
|----------------------|---|
| ชื่อ-นามสกุล | นางสาวบุษราคัม ฝืนิกทอง |
| วัน เดือน ปีเกิด | 28 กุมภาพันธ์ 2528 |
| สถานที่เกิด | โรงพยาบาลรามาริบัติ กรุงเทพมหานคร |
| ประวัติการศึกษา | วท.บ. (วิทยาศาสตร์เกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2549 |
| ทุนการศึกษาที่ได้รับ | ทุนผู้ช่วยบัณฑิตวิจัย ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) |