บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1. ศึกษาลักษณะอาการของโรครากเน่าของส้ม

จากการศึกษาลักษณะโรครากเน่าของส้มพบว่าเชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายส้มได้ทางรากฝอย รากแขนง เมื่อขุดดูรากพบว่ารากเน่าเป็นสีน้ำตาลแดงหรืออมส้ม (ภาพ 6ก) มีอาการใบเหลืองตรงบริเวณเส้นกลางใบ ใบเหี่ยวคล้ายขาดน้ำ (ภาพ 6ข) บางครั้งอาจพบอาการเปลือกปริแตกตามบริเวณกิ่ง ส่วนเปลือกมักมีสีคล้ำ ค่อนข้างฉ่ำน้ำและอาจพบอาการยางไหลตรงบริเวณรอยแผล (ภาพ 6ค) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อำไพวรรณ และคณะ (2527) ที่ได้รายงานว่าเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้มสามารถเข้าทำลายส้มได้ทางรากฝอย รากแขนง ที่ส่วนโคนต้น และตามบริเวณกิ่งใหญ่ใกล้โคนต้น และจากการรายงานของ Graham and Menge (1999) พบว่าเชื้อ *Phytophthora* spp. เป็นเชื้อสาเหตุโรคทางดินที่เข้าทำลายส้ม โดยจะทำให้ผลผลิตของส้มลดลงและแพร่ระบาดไปทั่วโลก

ภาพ 6 ลักษณะอาการของโรครากเน่าของส้มที่ปลูกในสวนส้ม อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

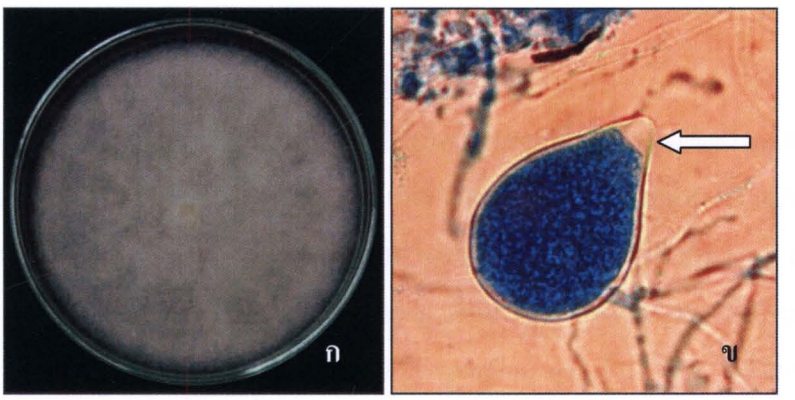
ก. อาการรากเน่าเป็นสีน้ำตาลแดงหรืออมส้ม

ข. อาการใบเหลืองตรงบริเวณเส้นกลางใบ และใบเหี่ยวคล้ายขาดน้ำ

ค. อาการเปลือกปริแตกตามบริเวณโคนต้นหรือกิ่ง พบอาการยางไหลตรงบริเวณรอยแผล

4.2. แยกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม

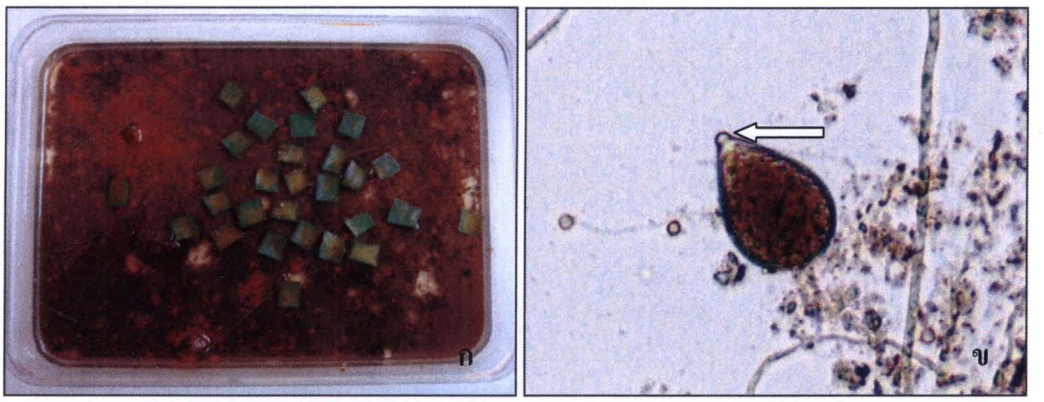
การแยกเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าของส้มจากสวนส้มจำนวน 6 สวน ในอำเภอฝาง พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ มีลักษณะเส้นใยละเอียด สีขาว เจริญฟูขึ้นเหนือผิวหน้าอาหาร จนเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมากระตุ้นให้สร้าง sporangium โดยเลี้ยงเชื้อที่แยกได้บน PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตัดชิ้นวุ้นของเชื้อที่เลี้ยงไว้เป็น ชิ้นเล็ก ๆ นำมาใส่ใน plate ที่ฆ่าเชื้อแล้ว plate ละ 10 ชิ้น แล้วเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ท่วมชิ้นวุ้น แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 วัน คอยตรวจการสร้าง sporangium ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเป็นเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่มีการสร้าง sporangium คล้ายผลมะนาว ตรงปลายมองเห็น papilla ชัดเจน (ภาพ 7) ซึ่งเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้มี 6 ไอโซเลท ได้แก่ OR01, OR02, OR03, OR04, OR05 และ OR06 โดยทั้ง 6 ไอโซเลทนี้ได้จากการแยกเชื้อด้วยวิธีล่อเชื้อจากดินจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้ใบส้มเป็นเหยื่อล่อ (ภาพ 8)



ภาพ 7 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR01

ก. ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะสีขาว ฟู ละเอียด บนอาหาร PDA อายุ 9 วัน

ข. ลักษณะ sporangium รูปมะนาว มี papilla ตรงปลาย (ศรชี้) ที่กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพ 8 วิธีการแยกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม และลักษณะของเชื้อ *Phytophthora* sp.
ก. การแยกเชื้อด้วยวิธีล่อเชื้อจากดินจากต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้ใบส้ม
ข. sporangium รูปมะนาว มี papilla ตรงปลาย (ศรชี้) ที่กำลังขยาย 100 เท่า ที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืชที่ใช้เป็นเหยื่อล่อ

4.3. ทดสอบความสามารถของเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Phytophthora* spp.ทั้ง 6 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ OR01, OR02, OR03, OR04, OR05 และ OR06 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบโคนต้นที่แสดงอาการของโรคโดยใช้ใบส้มเป็นเหยื่อล่อ มาทำการพิสูจน์โรคโดยวิธี Koch's postulation โดยการปลูกเชื้อด้วย mycelia disc บนต้นกล้าส้ม อายุ 5 เดือนบนจานอาหาร WA ที่ทำแผลบริเวณใบและราก หลังจากปลูกเชื้อนาน 5 วัน พบว่ามีเชื้อ *Phytophthora* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท คือ OR01, OR02, OR03 และ OR04 ที่ทำให้ต้นกล้าส้มแสดงอาการใบเหลืองซีด เริ่มจากบริเวณที่ทำแผล มีเส้นใยสีขาวเจริญคลุมทั่วบริเวณใบ ต่อมาใบจะเป็นแผลฉ่ำน้ำสีน้ำตาลและลุกลามไปสู่ยอด เมื่อเขี่ยเส้นใยมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นเชื้อ *Phytophthora* spp. มีการสร้าง sporangium ที่มี papilla ชัดเจนและมี zoospore อยู่ภายใน เมื่อเวลาผ่านไปอาการของโรคจะรุนแรงขึ้นจนในวันที่ 20 หลังจากปลูกเชื้อ พบการลุกลามของเส้นใยไปที่บริเวณราก ต่อมาต้นส้มจะตายในที่สุด (ภาพ 9-10) ส่วนการปลูกเชื้อด้วย mycelia disc ที่โคนต้นกล้าส้มอายุ 6 เดือน ที่ปลูกลงในกระถาง นาน 45 วัน พบว่ามีเชื้อ *Phytophthora* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท คือ OR03 ที่ทำให้ต้นส้มเริ่มแสดงอาการใบเหลือง เกิดแผลฉ่ำน้ำสีน้ำตาลที่บริเวณยอด เมื่อปลูกเชื้อนาน 43 วัน ต้นส้มจะเหี่ยวทั้งต้น และตาย เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพ 11-12) ส่วนเชื้อ *Phytophthora* spp. ไอโซเลท OR01, OR02 และ OR04 นั้นทำให้ต้นส้มแสดงอาการน้อยมาก

ภาพ 9 ลักษณะต้นกล้าส้มอายุ 5 เดือน ที่แสดงอาการฉ่ำน้ำสีน้ำตาลที่บริเวณใบ มีเส้นใยสีขาวเจริญคลุมทั่วทั้งต้น ระยะเวลา 20 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าส้มปกติในชุดควบคุม

ก. ต้นกล้าส้มปกติในชุดควบคุม

ข. ต้นกล้าส้มที่แสดงอาการหลังทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR01

ค. ต้นกล้าส้มที่แสดงอาการหลังทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR02

ง. ต้นกล้าส้มที่แสดงอาการหลังทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR03

จ. ต้นกล้าส้มที่แสดงอาการหลังทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR04

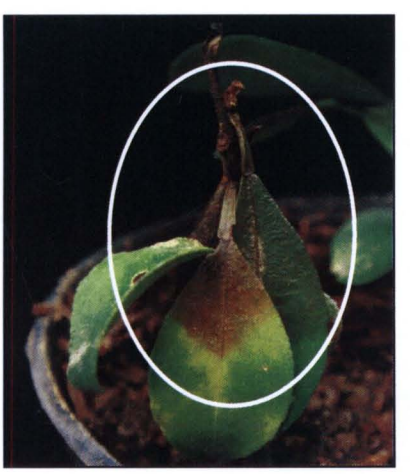
ภาพ 10 การเจริญลุกลามของเส้นใยสู่บริเวณรากต้นส้มที่ทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR03 หลังปลูกเชื้อนาน 20 วัน บนต้นส้มอายุ 5 เดือน

ภาพ 11 ลักษณะอาการของต้นส้มอายุ 6 เดือน หลังการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp. นาน 45 วัน

ก. ต้นส้มปกติในชุดควบคุม

ข. ต้นส้มปกติในชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อด้วยอาหารเปล่า

ค. ต้นส้มที่แสดงอาการใบเหลือง เกิดแผลฉ่ำน้ำสีน้ำตาลที่บริเวณยอดหลังทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR03



ภาพ 12 ลักษณะอาการแผลฉ่ำน้ำสีน้ำตาลที่บริเวณยอดต้นส้ม หลังทำการปลูกเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR03 นาน 45 วัน

4.4 แยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินรอบ ๆ ราก

จากการแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบ ๆ รากส้ม จากสวนส้ม 5 สวน ในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยการทำ serial dilution บนอาหาร NA พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 54 ไอโซเลท และจากดินบริเวณรอบ ๆ รากพริกกะเหรี่ยง ที่ตำบลสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 13 ไอโซเลท และจากดินบริเวณรอบ ๆ รากมะเขือเทศ ที่ตำบลสบโขง อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท สามารถแยกแบคทีเรียได้รวมทั้งสิ้น 88 ไอโซเลท และได้นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ขั้นต้นพบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญ จำนวน 9 ไอโซเลท (ตาราง 1) จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อไป

ตาราง 1 จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท

แหล่งที่มาของดิน	จำนวนที่แยกได้ (ไอโซเลท)	จำนวนไอโซเลท แบคทีเรียปฏิปักษ์ ที่มีประสิทธิภาพจากการ ทดสอบขั้นต้น
สวนส้ม อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่	54	4
พริกกะเหรี่ยง ตำบลสบเมย จังหวัดแม่ฮ่องสอน	13	0
มะเขือเทศ ตำบลสบโขง อำเภออมก๋อย จังหวัดเชียงใหม่	21	5
รวม	88	9

4.5. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม โดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์

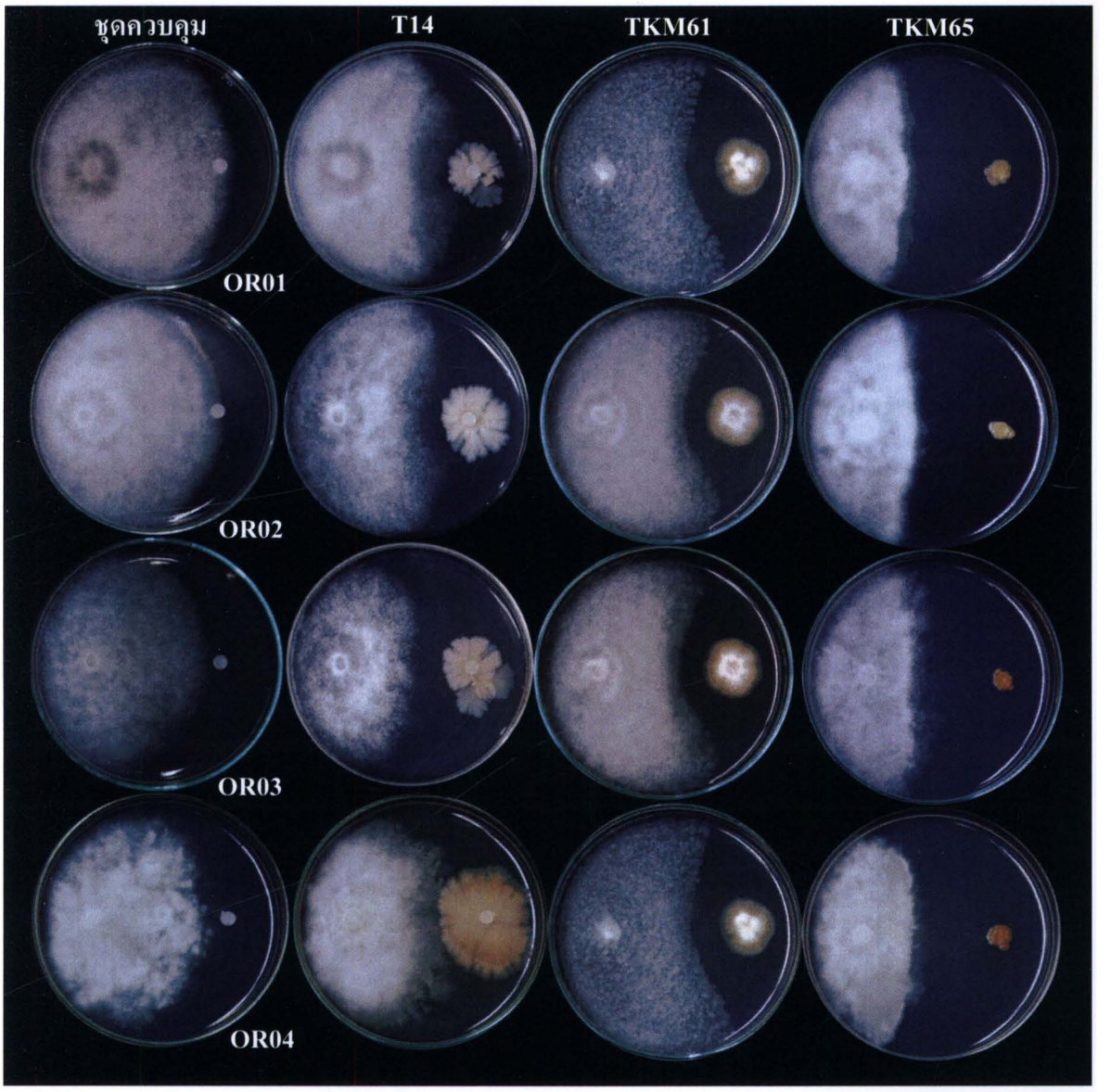
จากนั้นนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 9 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ T14, TKM61 และ TKM65 พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่เกิด interaction ระหว่างกัน แสดงว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1 ไอโซเลท สามารถควบคุมเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้ในทิศทางเดียวกัน และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM65 ให้ประสิทธิภาพสูงสุด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง 55.00-58.00 รองลงมาคือแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท TKM61 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง 35.50-40.00 ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท T14 ให้ประสิทธิภาพต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งระหว่าง 24.25-27.25 (ตาราง 2, ภาพ 13) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากบริเวณรอบ ๆ รากพืชนั้นมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จะมีกลไกในการยับยั้งต่างกันไป เช่น การสร้าง antibiotic สาร siderophore หรือเอนไซม์ เช่น chitinase และ lytic enzyme เป็นต้น (Jigang *et al.*, 2005) ซึ่ง เสาวนีย์ (2547) และ Lumsden *et al.* (1995) ได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ต่างกัน เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บางไอโซเลทมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุบางชนิดได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุอีกชนิดหนึ่งได้ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดมีคุณลักษณะ กระบวนการทางสรีรวิทยา รวมทั้งบทบาทที่แตกต่างกัน และพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อยู่บริเวณรอบ ๆ รากพืช เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ควบคุมโรคทางชีววิธี ซึ่งจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืชนี้สามารถป้องกันรากพืชไม่ให้ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อสาเหตุได้ โดยกลไกในการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุของโรคมีหลายวิธี เช่น การทดลองของ Queiroz and Melo (2006) ที่รายงานว่าเชื้อ *Serratia marcescens* R-35 เป็นเชื้อจุลินทรีย์บริเวณรอบๆ รากส้มที่ใช้ในการควบคุมโรคโดยชีววิธีได้ดี และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora parasitica* โดยมีกลไกการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคคือ เชื้อ *Serratia marcescens* R-35 จะเข้าไปเจริญภายในเส้นใยและ sporangium ของเชื้อ *Phytophthora parasitica* และเกิดขบวนการ metabolism ทำให้เกิดการแตกของเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรค เชื้อจึงไม่สามารถเข้าทำลายต้นส้มได้

ตาราง 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp.สาเหตุโรครากเน่าของส้มทั้ง 4 ไอโซเลท โดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหารPDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ในห้องปฏิบัติการ

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งในเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท[1]	ไอโซเลทของแบคทีเรียปฏิปักษ์		
	T14	TKM61	TKM65
OR01	27.25 e[2]	38.00 cd	58.00 a
OR02	24.50 ef	35.50 d	56.50 ab
OR03	24.25 f	39.00 c	55.50 ab
OR04	26.75 ef	40.00 c	55.00 b
LSD (*P*=0.01)		2.89	
CV (%)		5.04	

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

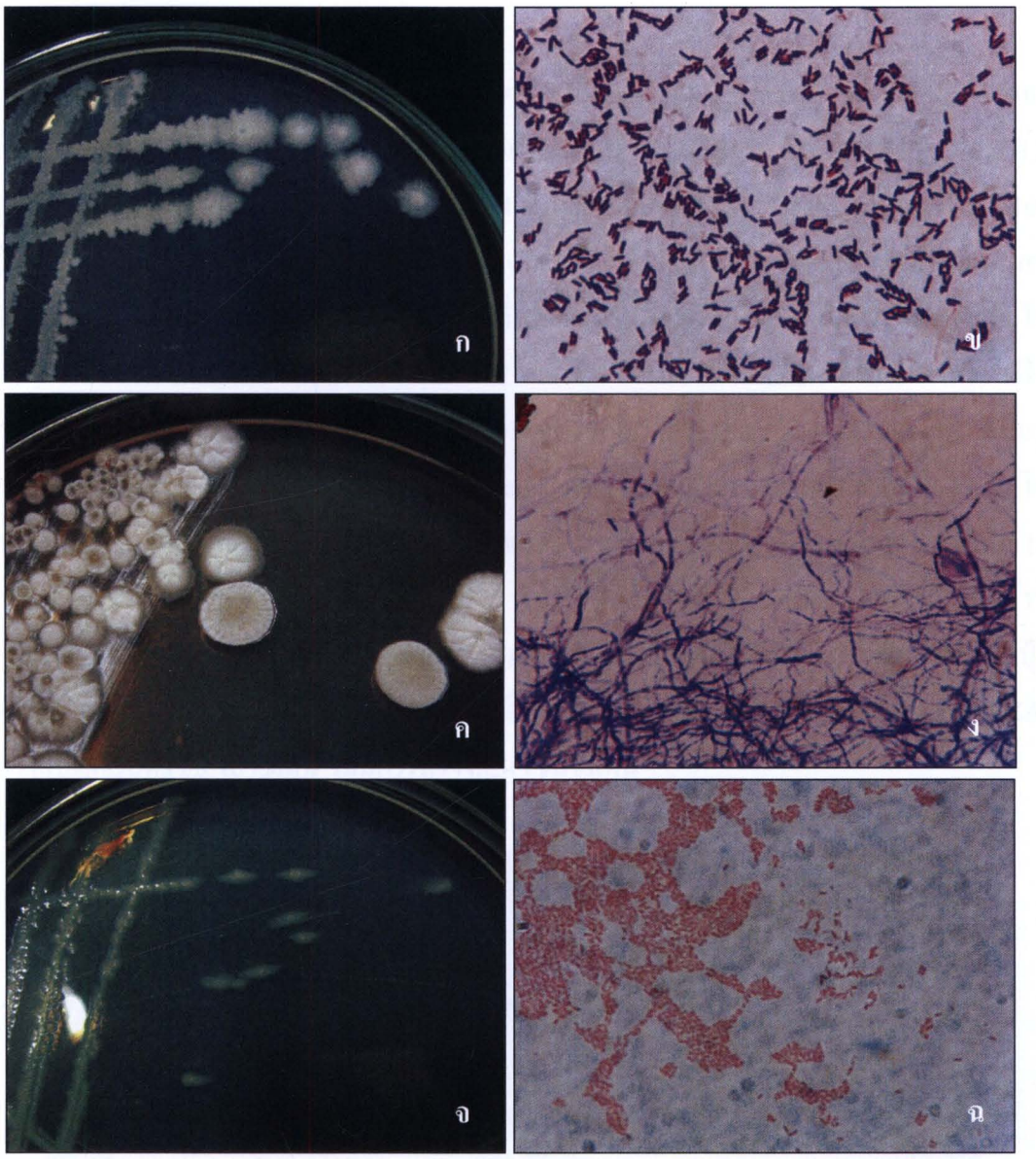


ภาพ 13 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท (T13, T14 และ TKM61) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท (OR01, OR02, OR03 และ OR04) โดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์

4.6. ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์

4.6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท ได้แก่ T14, TKM61 และ TKM65 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA พบว่าในแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T14 มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น และแห้ง รูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าโคโลนีขรุขระเป็นรอยย่น ขอบหยัก ผิวนูนเล็กน้อยจากผิวหน้าอาหาร ลักษณะการติดสีแกรมติดสีแกรมบวกและมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM61 มีลักษณะโคโลนีสีเทาอ่อน ผิวโคโลนีย่นเป็นจีบเข้าสู่กลางโคโลนี มีการสร้าง pigment สีน้ำตาลในอาหาร NA ลักษณะการติดสีแกรมติดสีแกรมบวก เชื้อสร้างสปอร์ต่อกันเป็นสายยาว และแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM65 มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองใส เป็นเมือก ขนาดเล็ก รูปร่างไม่แน่นอน ผิวหน้าโคโลนีนูน และเรียบเป็นมันวาว ลักษณะการติดสีแกรมติดสีแกรมลบและมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) (ภาพ 14)



ภาพ 14 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆ บนอาหาร NA ที่อายุ 48 ชั่วโมง และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ก. ลักษณะการเจริญ ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T14

ข. การติดสีแบบแกรมบวก ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T14

ค. ลักษณะการเจริญ ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM61

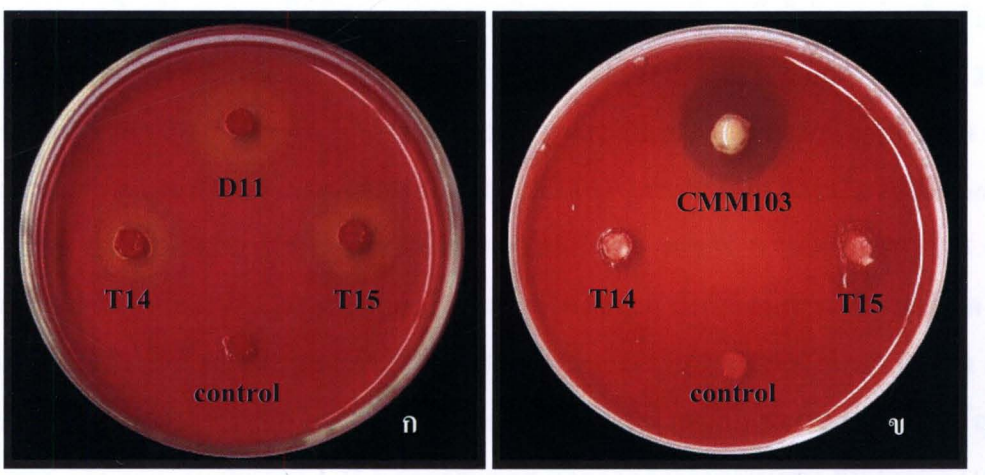
ง. การติดสีแบบแกรมบวก ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM61

จ. ลักษณะการเจริญ ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM65

ฉ. การติดสีแบบแกรมลบ ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM65

4.6.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase, phosphatase และ chitinase ของแบคทีเรียทั้ง 88 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรียแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท คือ T14, T15, D10, D11, B02, TKM11, TKM21, TKM31, TKM41, TKM62, TKM63, CMM91, CMM103 และ CMM104 มีการสร้างเอนไซม์ cellulase บนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC) โดยที่ไอโซเลท D11, T15 และ T14 มีการสร้างเอนไซม์มากที่สุด ซึ่งให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส เท่ากับ 25.5, 21.5 และ 15.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ cellulase ยังสามารถนำไปใช้เป็นส่วนช่วยในการย่อยเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้อีกด้วย (Gong *et al.*, 1999) เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ phosphatase บนอาหาร czapec solution agar (CZA) พบแบคทีเรียเพียง 1 ไอโซเลท คือ CMM103 ที่มีการสร้างเอนไซม์ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเท่ากับ 16 มิลลิเมตร (ภาพ 15) สุฐิตา และทวีรัตน์.(2552) รายงานว่า เอนไซม์ phosphatase มีประโยชน์ด้านการย่อยสลายหินฟอสเฟตเพื่อปลดปล่อยธาตุอาหารสู่ดิน และยังใช้ในกระบวนการเตรียมปุ๋ยชีวภาพได้ และจากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ chitinase บนอาหาร colloidal chitin agar (CCA) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 88 ไอโซเลท ไม่มีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้



ภาพ 15 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase และ phosphatase ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ

ก. การสร้างเอนไซม์ cellulase บนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC) ของแบคทีเรียไอโซเลท D11, T14 และ T15 (เกิดวงใสบนอาหารทดสอบ)

ข. การสร้างเอนไซม์ phosphatase บนอาหาร czapec solution agar (CZA) ของแบคทีเรียไอโซเลท CMM103 (เกิดวงใสบนอาหารทดสอบ)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

4.7. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยใช้เทคนิค PCR

4.7.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phytophthora* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.7.1.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Phytophthora* spp.

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Phytophthora* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ได้แก่ 16 25 และ 31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ วัดการเจริญของโคโลนีทุกวันเป็นเวลา 8 วัน พบว่าการเจริญของโคโลนีในวันที่ 8 อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยมีการเกิด interaction ระหว่างกัน และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *Phytophthora* spp. ไอโซเลท OR01, OR02 และ OR03 นั้น มีรัศมีการเจริญสูงที่สุดคือ 44.00-45.00 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 25 และ 31 องศาเซลเซียส และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR04 มีรัศมีการเจริญคือ 32.06 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีรัศมีการเจริญคือ 25.94 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่แตกต่างกันกับเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR02 ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส และมีรัศมีการเจริญคือ 23.50 มิลลิเมตร ส่วนเชื้อ *Phytophthora* spp. ไอโซเลท OR01 และ OR03 มีรัศมีการเจริญคือ 19.44 และ 16.75 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส และเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR04 มีรัศมีการเจริญต่ำที่สุดคือ 14.00 มิลลิเมตร (ตาราง 3) โดยที่อุณหภูมิ 25 และ 31 องศาเซลเซียส เชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท นั้นมีรัศมีการเจริญสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hyun *et al.* (2001) และ Bhai และ Sarma (2003) ที่ว่าเชื้อ *Phytophthora* spp. สาเหตุของโรคที่เกิดกับส้ม สามารถเจริญบนอาหาร PDA ได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 4-35 องศาเซลเซียส และจากการรายงานของ Klisiewicz (1977) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *Phytophthora parasitica* นั้น คือ 27-33 องศาเซลเซียส

ตาราง 3 ขนาดรัศมีของโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงในอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 8 วัน

เชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท[1]	ขนาดรัศมีการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. (มม.) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ		
	16 องศาเซลเซียส	25 องศาเซลเซียส	31 องศาเซลเซียส
OR01	19.44 d[2]	45.00 a	45.00 a
OR02	23.50 c	45.00 a	45.00 a
OR03	16.75 de	44.00 a	45.00 a
OR04	14.00 e	32.06 b	25.94 c
LSD (P=0.01)		2.7985	
CV (%)		4.34	

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4.7.1.2 ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp.

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินบริเวณโคนต้นส้มที่แสดงอาการของโรค มาเลี้ยงบนอาหารแต่ละชนิด ได้แก่ CMA, PDA, CA และ WA ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดอัตราการเจริญของเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* sp. แต่ละไอโซเลท พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยมีการเกิด interaction ระหว่างกัน และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR04 มีอัตราการเจริญสูงที่สุดคือ 11.60 มิลลิเมตรต่อวัน เมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMA ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส ลักษณะเส้นใยของเชื้อมีสีขาว เจริญฟูบนผิวหน้าอาหาร รองลงมาคือเชื้อ *Phytophthora* spp. ไอโซเลท OR01 , OR02 และ OR03 มีอัตราการเจริญคือ 11.042, 10.792 และ 10.833 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ บนอาหาร CMA ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถัดมาคือเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR02 ที่เลี้ยงบนอาหาร CA มีอัตราการเจริญคือ 6.46 มิลลิเมตรต่อวัน ลักษณะเส้นใยของเชื้อมีสีขาวฟูเล็กน้อย เจริญบาง ๆ แนบไปกับผิวหน้าอาหาร

เชื้อ *Phytophthora* spp. ไอโซเลท OR01 , OR02, OR03 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และ OR04 ที่เลี้ยงบนอาหาร CA มีอัตราการเจริญคือ 5.83, 5.39, 5.83 และ 5.48 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ เชื้อ *Phytophthora* spp. ไอโซเลท OR01, OR03 และ OR04 มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเลี้ยงบนอาหาร CA โดยมีอัตราการเจริญคือ 5.05, 5.48 และ 4.92 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ ถัดมาคือเชื้อ *Phytophthora* spp. ไอโซเลท OR01 และ OR02 ที่เลี้ยงบนอาหาร WA มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีอัตราการเจริญคือ 4.38 และ 4.29 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ เชื้อ *Phytophthora* spp. ไอโซเลท OR03 และ OR04 มีอัตราการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเลี้ยงบนอาหาร WA โดยมีอัตราการเจริญคือ 3.35 และ 3.38 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ โดยมีลักษณะเส้นใยสีขาวเจริญบาง ๆ บนผิวหน้าอาหาร ส่วนเชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR04 มีอัตราการเจริญต่ำที่สุดคือ 2.74 มิลลิเมตร ต่อวัน เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA (ตาราง 4)

ตาราง 4 อัตราการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหารชนิดต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส

เชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท[1]	อัตราการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. บนอาหารชนิดต่าง ๆ (มม./วัน)			
	CMA[2]	PDA	CA	WA
OR01	11.04 ab[3]	5.83 d	5.05 e	4.29 g
OR02	10.79 b	5.83 d	6.46 c	4.38 fg
OR03	10.83 b	5.39 de	4.92 ef	3.35 h
OR04	11.60 a	2.74 i	5.48 de	3.38 h
LSD (*P*=0.01)			0.5679	
CV (%)			4.71	

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2] CMA (Corn Meal Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), CA (Carrot Agar), WA (Water Agar)

[3] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4.7.1.3 ศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phytophthora* spp.

การเจริญของเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากดินบริเวณโคนต้นส้มที่แสดงอาการของโรคทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เชื้อสามารถเจริญได้ค่อนข้างดี เส้นใยของเชื้อมีลักษณะฟู ละเอียด สีขาว ลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA เป็นแบบ Arachnoid คือมีการเจริญเป็นรูปใยแมงมุม เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่ออายุ 8 วัน เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยของเชื้อใส ไม่มีสี ไม่มี septum กั้น เส้นใยมีลักษณะเรียบ มีการสร้าง sporangium ได้ 2 แบบ คือ ellipsoid และ ovoid

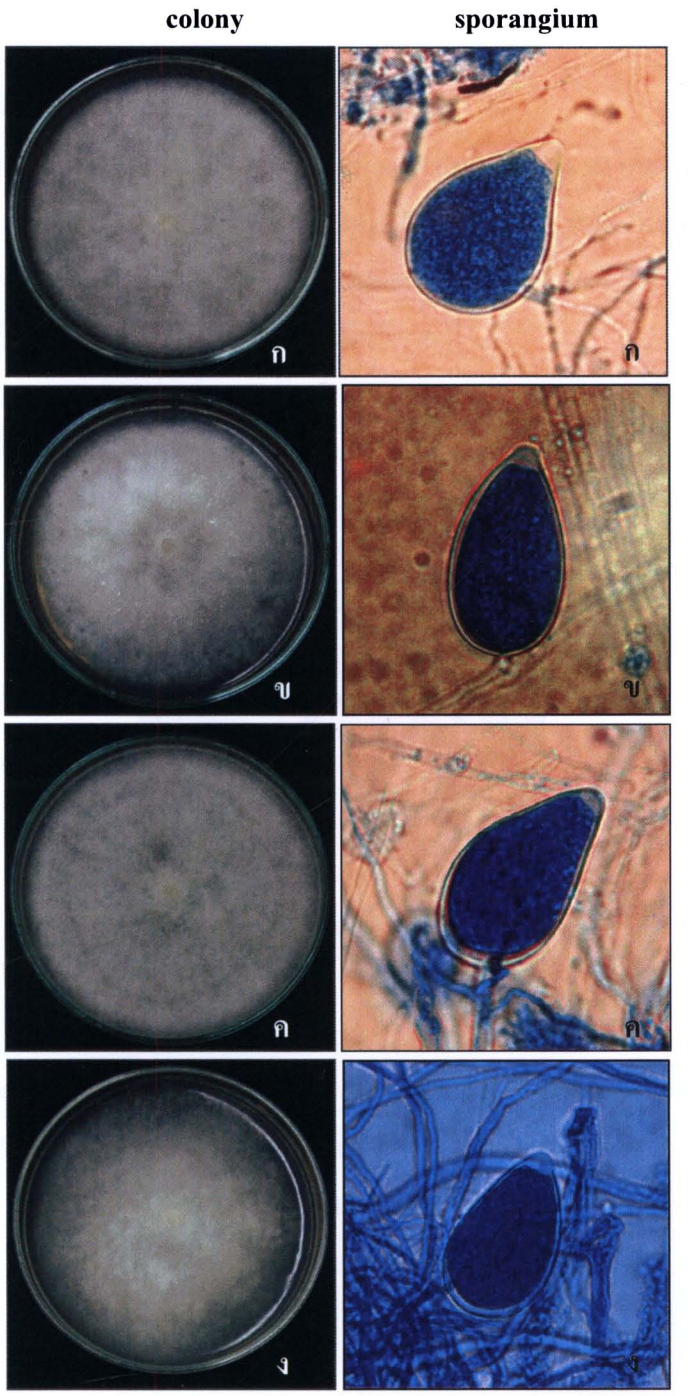
เชื้อ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR01 sporangium มีขนาดเฉลี่ย (เฉลี่ยจาก 50 sporangium) มีความกว้างประมาณ 34.15 µm มีความยาวประมาณ 48.05 µm มีค่าอัตราส่วน L/B ratio เท่ากับ 1.40 ภายใน sporangium มี zoospores เป็นจำนวนมาก ไอโซเลท OR02 sporangium มีขนาดเฉลี่ย (เฉลี่ยจาก 50 sporangium) มีความกว้างประมาณ 22.85 µm มีความยาวประมาณ 34.55 µm มีค่าอัตราส่วน L/B ratio เท่ากับ 1.51 ภายใน sporangium พบ zoospores เป็นจำนวนมาก ไอโซเลท OR03 มีขนาดของ sporangium เฉลี่ย (เฉลี่ยจาก 50 sporangium) โดยมีความกว้างประมาณ 21.60 µm มีความยาวประมาณ 37.55 µm มีค่าอัตราส่วน L/B ratio เท่ากับ 1.74 ภายใน sporangium พบ zoospores เป็นจำนวนมาก ส่วนไอโซเลท OR04 มีขนาดของ sporangium เฉลี่ย (เฉลี่ยจาก 50 sporangium) โดยมีความกว้างประมาณ 30.70 µm มีความยาวประมาณ 42.90 µm มีค่าอัตราส่วน L/B ratio เท่ากับ 1.40 ภายใน sporangium พบ zoospores เป็นจำนวนมาก (ตาราง 5) (ภาพ 16)

ตาราง 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phytophthora* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท บนอาหาร PDA

Isolate	Pattern	Size (µm)[1]	L/B ratio	Shape	Papilla[2]
OR01	Arachnoid	34.15x48.05	1.40	ellipsoid	+
OR02	Arachnoid	22.85x34.55	1.51	ellipsoid	+
OR03	Arachnoid	21.60x37.55	1.74	ellipsoid	+
OR04	Arachnoid	30.70x42.90	1.40	ovoid	+

หมายเหตุ [1] ค่าเฉลี่ยจาก 50 sporangium

[2] + คือ มี papilla



ภาพ 16 ลักษณะโคโลนีและ sporangium ของเชื้อ บนอาหาร PDA อายุ 8 วัน

ก. ลักษณะโคโลนี และ sporangium ของ *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR01

ข. ลักษณะโคโลนี และ sporangium ของ *Phytophthora* sp ไอโซเลท OR02

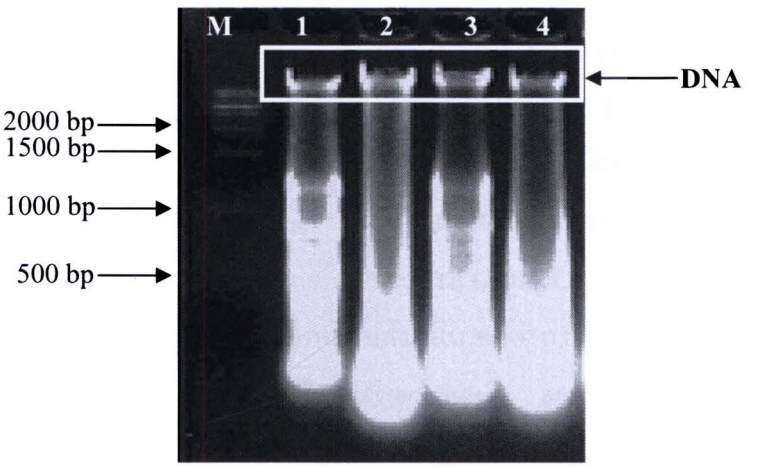
ค. ลักษณะโคโลนี และ sporangium ของ *Phytophthora* sp ไอโซเลท OR03

ง. ลักษณะโคโลนี และ sporangium ของ *Phytophthora* sp ไอโซเลท OR04

4.7.2 การจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* spp.

4.7.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Phytophthora* spp.

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากดินบริเวณโคนต้นส้มที่แสดงอาการของโรค ทั้ง 4 ไอโซเลท คือ OR01, OR02, OR03 และ OR04 เมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยวิธี agarose gel electrophoresis (ภาพ 17) จากภาพแถบดีเอ็นเอที่ได้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีคุณภาพและมีปริมาณดี



ภาพ 17 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของ total DNA จากเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท

แถวที่ M = DNA มาตรฐาน 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR01

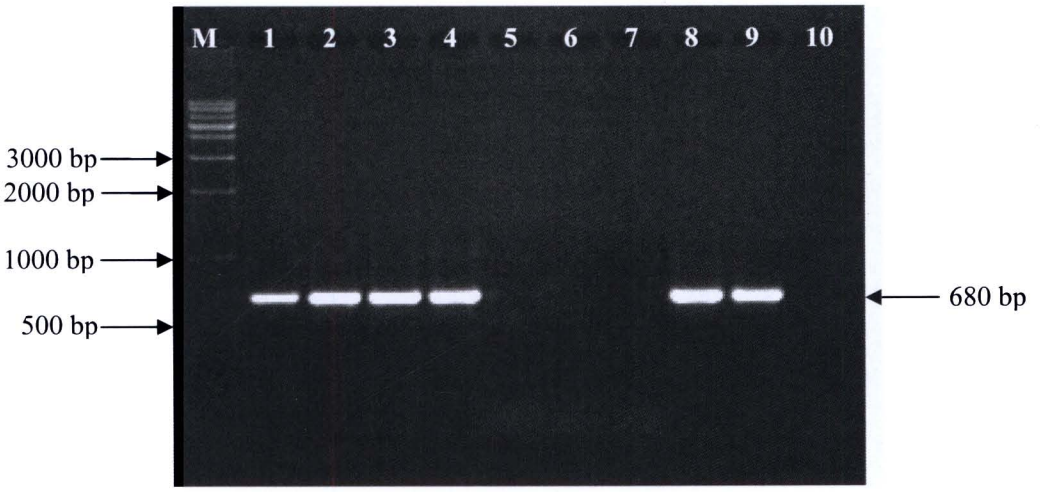
แถวที่ 2 = *Phytophthora* sp.ไอโซเลท OR02

แถวที่ 3 = *Phytophthora* sp.ไอโซเลท OR03

แถวที่ 4 = *Phytophthora* sp.ไอโซเลท OR04

4.7.2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 4.7.2.1 และสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของ เชื้อ *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากพืชชนิดอื่นที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* sp. ได้แก่ พริกหวาน 1 ไอโซเลท ผลส้มโอ (เชียงราย) 1 ไอโซเลท กล้วยไม้ 1 ไอโซเลท ส้มโอ (ราชบุรี) 1 ไอโซเลท และส้ม (กำแพงเพชร) 1 ไอโซเลท เพื่อใช้เปรียบเทียบ กับเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากส้มทั้ง 4 ไอโซเลท เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดแยกจากเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้งหมดด้วย specific primer ของเชื้อ *P. parasitica* Par1s (forward primer) (5'-ACGTTTGGGCTTCGGCCTGATT-3') และ Par2a (reverse primer) (5'-GATGCATACCG AAGTACACATTA-3'), specific primer ของเชื้อ *P. palmivora* Pal1s (forward primer) (5'-CACGTGAACCGTATCAAAACT-3') และPal2a (reverse primer) (5'-CAATCATACCAC CACAGCTGA-3') และ specific primer ของเชื้อ *P. capsici* CAPFW (forward primer) (5'-TTTAGTTGGGGGTCTTGTACC-3') และ CAPRV2 (reverse primer) (5'-TACGGTTCACC AGCCCATCA-3') พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 680 bp จากการเพิ่มปริมาณของ specific primer Par1s และ Par2a ที่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อ *P. parasitica* จากตัวอย่างเชื้อ *Phytophthora* spp. ไอโซเลท OR01, OR02, OR03 และ OR04 ซึ่งทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถแยกได้จากดินบริเวณโคนต้นส้มที่แสดงอาการของโรค และพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 680 bp จากตัวอย่างเชื้อ *Phytophthora* sp. จากส้มโอ (ราชบุรี) และส้ม (กำแพงเพชร) ที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบกับเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดอื่นและน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพ 18) สอดคล้องกับรายงานของ อำไพวรรณ และคณะ (2527) ที่พบว่าโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มที่ทำความเสียหายมากในประเทศไทย เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไฟทอฟธอรา (*P. parasitica* Dastur) นอกจากนี้เชื้อ *P. parasitica* ยังเป็นเชื้อที่สำคัญที่เข้าทำลายส้มในประเทศบราซิล และในฟลอริด้า โดยทำให้เกิดอาการโคนเน่าและรากเน่ากับต้นตอของส้มในสภาพโรงเรือน และยังยากต่อการป้องกันกำจัดอีกด้วย (Queiroz and Melo, 2006: Zitko *et al.*, 1987) และพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 595 bp จากการเพิ่มปริมาณของ specific primer CAPFW และ CAPRV2 จากตัวอย่างเชื้อ *Phytophthora* sp. สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อ *P. capsici* ที่แยกได้จากพริกหวาน เปรียบเทียบกับเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดอื่นและน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพ 19) ส่วนการเพิ่มปริมาณของ specific primer Pal1s และ Pal2a พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 648 bp จากตัวอย่างเชื้อ *Phytophthora* sp. สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อ *P. palmivora* ที่แยกได้จากกล้วยไม้ เปรียบเทียบกับเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดอื่นและน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว (ภาพ 20)



ภาพ 18 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primer Par1s/Par2a จากเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรค

แถวที่ M = DNA มาตรฐาน 1000 bp DNA ladder
แถวที่ 1 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR01
แถวที่ 2 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR02
แถวที่ 3 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR03
แถวที่ 4 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR04
แถวที่ 5 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากผลส้มโอ (เชียงราย)
แถวที่ 6 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากกล้วยไม้
แถวที่ 7 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากพริกหวาน
แถวที่ 8 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากดินปลูกส้มโอ (ราชบุรี)
แถวที่ 9 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากดินปลูกส้ม (กำแพงเพชร)
แถวที่ 10 = น้ำเปล่า (negative control)

ภาพ 19 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primer Pal1s และ Pal2a จากเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรค

แถวที่ M = DNA มาตรฐาน 1000 bp DNA ladder
แถวที่ 1 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR01
แถวที่ 2 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR02
แถวที่ 3 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR03
แถวที่ 4 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR04
แถวที่ 5 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากผลส้มโอ (เชียงราย)
แถวที่ 6 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากกล้วยไม้
แถวที่ 7 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากพริกหวาน
แถวที่ 8 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากดินปลูกส้มโอ (ราชบุรี)
แถวที่ 9 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากดินปลูกส้ม (กำแพงเพชร)
แถวที่ 10 = น้ำเปล่า (negative control)

ภาพ 20 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primer CAPFW และ CAPRV2 จากเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรค

แถวที่ M = DNA มาตรฐาน 1000 bp DNA ladder
แถวที่ 1 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR01
แถวที่ 2 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR02
แถวที่ 3 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR03
แถวที่ 4 = *Phytophthora* sp. ไอโซเลท OR04
แถวที่ 5 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากผลส้มโอ (เชียงราย)
แถวที่ 6 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากกล้วยไม้
แถวที่ 7 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากพริกหวาน
แถวที่ 8 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากดินปลูกส้มโอ (ราชบุรี)
แถวที่ 9 = *Phytophthora* sp. ที่แยกได้จากดินปลูกส้ม (กำแพงเพชร)
แถวที่ 10 = น้ำเปล่า (negative control)

4.8. ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora parasitica* สาเหตุของโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง

4.8.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อพืช

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อพืชของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T14, TKM61 และ TKM65 และแบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในห้องปฏิบัติการคือแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13 ที่สามารถสังเคราะห์ IAA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB โดยวิเคราะห์การสร้างฮอร์โมนพืชด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งมีความเข้มข้นของ IAA เท่ากับ 1,270.00 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ปนัดดา และอังสนา, 2552) พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 4 ไอโซเลทดังกล่าวไม่ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติ เมื่อทำการวัดความสูงของต้นส้ม ภายหลังจากการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 28 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM61 ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นส้มดีที่สุด โดยให้ความสูงของต้นส้มเป็น 6.35 เซนติเมตร รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13, T14 และ TKM65 พบว่าในทุกกรรมวิธีให้ความสูงของต้นส้มไม่แตกต่างกัน โดยให้ความสูงของต้นส้มเป็น 5.27, 5.18 และ 5.20 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งกรรมวิธีในชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น) ให้ความสูงของต้นส้มเป็น 6.03 เซนติเมตร และกรรมวิธีในชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA) ให้ความสูงของต้นส้มเป็น 4.85 เซนติเมตร (ตาราง 6) จากนั้นทำการวัดความสูงของต้นส้ม ภายหลังจากการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 75 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM61 และ TKM65 ช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นส้มดีที่สุด โดยให้ความสูงของต้นส้มเป็น 9.92และ 9.04 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13 และ T14 ให้ความสูงของต้นส้มไม่แตกต่างกัน โดยให้ความสูงเป็น 8.25 และ 7.96 เซนติเมตร ตามลำดับ ในชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น) และชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA) ให้ความสูงเป็น 8.83 และ 9.46 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตาราง 6, ภาพ 21) เมื่อทำการวัดน้ำหนักสดของต้นส้ม ภายหลังจากการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 75 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM61 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 1.36 กรัมต่อต้น กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13, T14 และ TKM65 มีน้ำหนักสดเฉลี่ยไม่แตกต่างกันคือ 1.10, 1.08 และ 1.05 กรัมต่อต้น ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีในชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น) กรรมวิธีในชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA) มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 1.01 และ 1.16 กรัมต่อต้น ตามลำดับ (ตาราง 7) และจากการวัดน้ำหนักแห้งของต้นส้ม ภายหลังจากการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 75 วัน พบว่ามีความแตกต่าง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM61 และ TKM65 มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 0.53 และ 0.54 กรัมต่อต้น ตามลำดับ กรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13 และ T14 มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ยต่ำที่สุดเท่ากันคือ 0.40กรัมต่อต้น ส่วนกรรมวิธีในชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น) กรรมวิธีในชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA) มีน้ำหนักสดเฉลี่ย 0.45 และ 0.42 กรัมต่อต้น ตามลำดับ (ตาราง 7) จากการศึกษาของ Siddiqui and Mahmood (1999) และ Nelson (2004) ได้รายงานเกี่ยวกับ Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ว่าเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในด้านการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ด การเข้าครอบครองราก การพัฒนาของราก เพิ่มความยาวรากและการแตกแขนงของรากพืช การละลายธาตุอาหารในดิน การค้นพบแบคทีเรีย PGPR สามารถกระตุ้น หรือ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ทั้งนี้ขึ้นกับความสามารถในการครอบครองและความเหมาะสมของการเข้าสู่รากพืช (Kumar, 1999) แบคทีเรียดังกล่าวได้แก่ กลุ่ม *Bacillus, Pseudomonas, Acetobacter, Azotobacter* และ *Azospirillum* ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่บริเวณรอบรากพืช หรืออาจอยู่ภายในรากพืช สามารถดำรงชีพแบบอิสระโดยมีกลไกในการควบคุมโรคของเชื้อ PGPR หลายประการ เช่น การผลิต siderophore, antibiotic, bacteriocins และกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน (induce systemic resistance: ISR) เป็นต้น เชื้อ PGPR แต่ละชนิดมีกลไกที่แตกต่างกันในการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานขึ้นในพืช เชื้อ PGPR ต่างชนิดและเชื้อต่างสายพันธุ์กันก็มีการแสดงออกแตกต่างกันด้วย (Loon *et al.*, 1998)

ตาราง 6 ความสูงของต้นส้ม อายุ 8 เดือน หลังการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณโคนต้นส้ม 28 วัน และ 75 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) [1] หลังใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ 28 วัน	ความสูงของต้น (เซนติเมตร) [1] หลังใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ 75 วัน
ชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น)	6.03 a[2]	8.83 ab
ชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA)	4.85 b	9.46 ab
ไอโซเลท T13	5.27 b	8.25 b
ไอโซเลท T14	5.18 b	7.96 b
ไอโซเลท TKM61	6.35 a	9.92 a
ไอโซเลท TKM65	5.20 b	9.04 ab
LSD	(*P*=0.01) 0.7036	(*P*=0.05) 1.5142
CV (%)	16.97	20.77

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 12 ซ้ำ

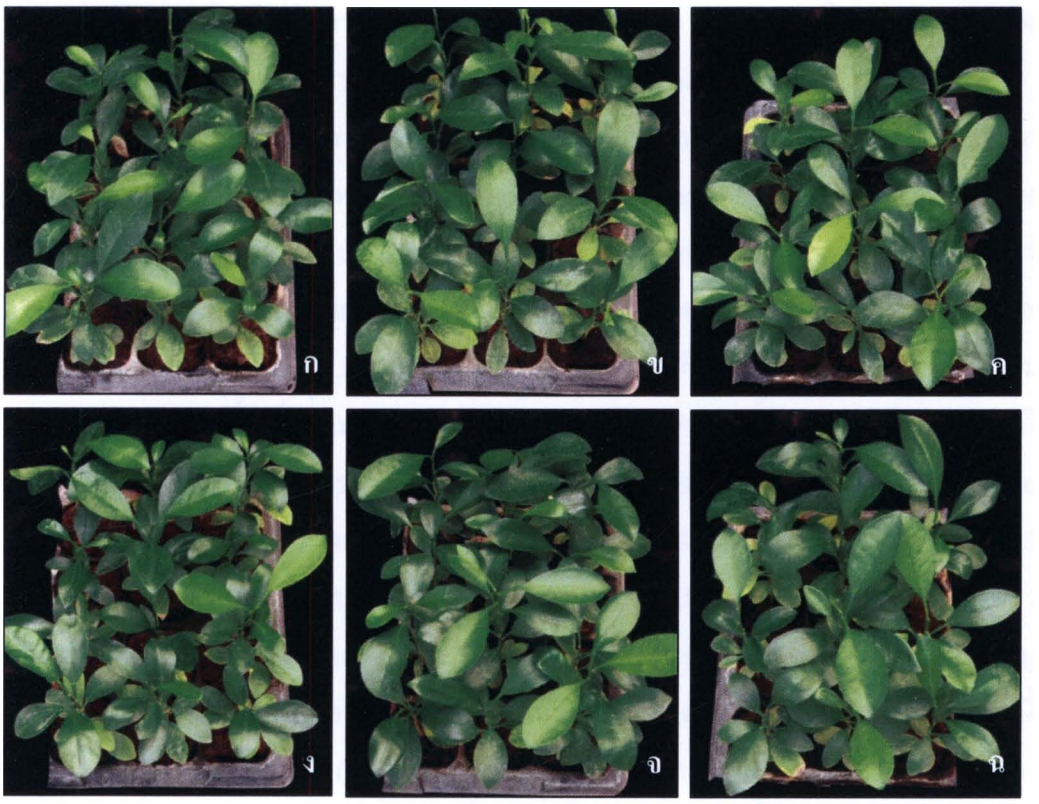
[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99 และ95 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 7 น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของส้มอายุ 8 เดือน หลังการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณโคนต้นส้ม 75 วัน

แบคทีเรียปฏิปักษ์	น้ำหนักสด (กรัม)[1]	น้ำหนักแห้ง (กรัม)[1]
ชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น)	1.01 b[2]	0.45 ab
ชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA)	1.16 b	0.42 b
T13	1.10 b	0.40 b
T14	1.08 b	0.40 b
TKM61	1.36 a	0.53 a
TKM65	1.05 b	0.44 ab
LSD	(*P*=0.01) 0.1495	(*P*=0.05) 0.1092
CV (%)	13.66	24.78

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 12 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99 และ 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพ 21 เปรียบเทียบต้นส้มอายุ 8 เดือน แต่ละกรรมวิธีหลังจากใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 75 วัน

ก. ชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น)

ข. ชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่ได้จากการเทลงบนผิวหน้าอาหาร NA)

ค. ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13

ง. ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T14

จ. ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM61

ฉ. ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM65

4.8.2 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora parasitica* สาเหตุของโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13, T14, TKM61 และ TKM65 ในการควบคุมโรครากเน่าของส้มที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora parasitica* จากการจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้เทคนิค PCR ในขั้นตอน 4.7.2.2 แล้วตรวจผลการทดลองโดยวัดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคหลังการปลูกเชื้อ 75 วัน เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ พบว่าชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น) และชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA) ที่ปลูกเชื้อสาเหตุ ให้ระดับการเกิดโรคสูงสุดเท่ากันเป็น 3.50 ส่วนกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13, T14, TKM61 และ TKM65 มีระดับการเกิดโรคที่ไม่แตกต่างกัน โดยให้ระดับการเกิดโรคเป็น 1.00, 1.33, 1.08, 1.33 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมพืชปกติ ต้นส้มแสดงอาการปกติ (ตาราง 8, ภาพ 22) จากนั้นตรวจผลการทดลองโดยวัดระดับความรุนแรงในการเกิดโรครากเน่าหลังการปลูกเชื้อ 75 วัน เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ พบว่าชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA) ให้ระดับการเกิดอาการรากเน่าสูงสุดเป็น 3.67 รองลงมาคือ ชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น) ที่ปลูกเชื้อสาเหตุ ให้ระดับการเกิดอาการรากเน่าไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM65 โดยให้ระดับการเกิดอาการรากเน่าเป็น 2.83 และ 2.17 ตามลำดับ และกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13 และ T14 ให้ระดับการเกิดอาการรากเน่าเป็น 1.50 และ 1.83 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKM61 ให้ระดับการเกิดอาการรากเน่าเป็น 1.08 ในขณะที่ชุดควบคุมพืชปกติรากของส้มแสดงอาการปกติ (ตาราง 8, ภาพ 23) ซึ่งผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับรายงานของ องอาจ และคณะ (2534) ที่ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., และ *Pseudomonas* sp. จากดินบริเวณรากส้ม โดยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *P. parasitica* สาเหตุของโรครากเน่า Phytophthora ของส้มเขียวหวานและเชื้อจุลินทรีย์นั้นยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้อีกด้วย เมื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคบนต้นกล้าส้ม พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. นั้นสามารถควบคุมโรครากเน่าในต้นกล้าส้มได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนต้นที่รอดตายสูงกว่าชุดควบคุม 50 เปอร์เซ็นต์ เชื้อที่สามารถควบคุมได้รองลงมาคือเชื้อ *Trichoderma* sp.และแสดงให้เห็นว่าในสภาพธรรมชาติดินบริเวณรอบ รากส้ม มีจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora parasitica* ที่ทำให้เกิดรากเน่าของส้มเขียวหวานได้ ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T14 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora parasitica* ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการ และในสภาพเรือนทดลองนั้นสามารถสร้าง

เอนไซม์ cellulase ได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นั้นสอดคล้องกับรายงานของ Downer *et al.* (2001) โดยทำการศึกษาการควบคุมเชื้อ *Phytophthora cinnamomi* ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคในอโวกาโด โดยใช้เอนไซม์ cellulase (β-1,4-glucanase) และ laminarinase (β-1,3-glucanase) บ่มร่วมกับเส้นใย, zoospores, chlamydospores และ zoospores cysts พบว่าสามารถลดการพัฒนา เส้นใย, sporangium และ chlamydospores เนื่องจากเชื้อ *Phytophthora cinnamomi* มีส่วนประกอบของผนังเซลล์คือ cellulose (β-1,4-linked glucans) และ β-1,3- และ β-1,6-linked glucans และสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ cellulose ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13 นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora parasitica* ภายในห้องปฏิบัติการได้ แต่จากการทดสอบการควบคุมสาเหตุของโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลองนั้นพบว่าสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้มได้ เนื่องจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13 นั้นสามารถสังเคราะห์ฮอร์โมน IAA ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และทำให้ต้นพืชแข็งแรง (ปนัดดา และอังสนา, 2552) สามารถต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ ดังที่ Probanaza *et al.* (2002) รายงานว่าการใส่แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* กับการปลูกต้นกล้า Alder *(Alnus glutinosa)* พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของต้น Alder ได้อย่างดีเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้ใส่เชื้อ โดยเฉพาะการมีระบบรากที่สมบรูณ์ พื้นที่ผิวของใบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นบทบาทมาจากสารประกอบกลุ่ม auxin และ gibberellin ที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ ซึ่งจาการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora parasitica* ได้ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง ซึ่งงานทดลองนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัย เพื่อหาวิธีการพัฒนาแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ทดแทนสารเคมี เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีที่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและทางอ้อม

ตาราง 8 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora parasitica*. สาเหตุโรครากเน่าของส้ม

กรรมวิธี	จำนวนต้นที่ตาย	ระดับการเกิดอาการเหี่ยว[1]	ระดับการเกิดอาการรากเน่า[1]
ชุดควบคุมพืชปกติ	-	1.00 b[2]	1.00 d
ชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น) + ปลูกเชื้อสาเหตุ P	1	2.50 a	2.83 b
ชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA) + ปลูกเชื้อสาเหตุ P	4	2.50 a	3.67 a
แบคทีเรียปฏิปักษ์ T13 + ปลูกเชื้อสาเหตุ P	-	1.00 b	1.50 cd
แบคทีเรียปฏิปักษ์ T14+ ปลูกเชื้อสาเหตุ P	1	1.33 b	1.83 c
แบคทีเรียปฏิปักษ์ TKM61+ ปลูกเชื้อสาเหตุ P	-	1.08 b	1.08 d
แบคทีเรียปฏิปักษ์ TKM65+ ปลูกเชื้อสาเหตุ P	1	1.33 b	2.17 bc
LSD (*P=0.01*)		1.1460	0.6911
CV (%)		68.92	31.72

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 12 ซ้ำ

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบ โดยวิธี Least-significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

P = เชื้อ *Phytophthora parasitica* ไอโซเลท OR03

หมายเหตุ ระดับความรุนแรงของการเกิดอาการเหี่ยว

1 = ไม่แสดงอาการเหี่ยว

2 = แสดงอาการเหี่ยวเล็กน้อยหรือเหี่ยวบางส่วน

3 = แสดงอาการเหี่ยว

4 = แสดงอาการเหี่ยว 50-80% และ/หรือใบร่วง

5 = แสดงอาการเหี่ยว 80-100% หรือต้นส้มตาย

ระดับความรุนแรงของการเกิดอาการรากเน่า

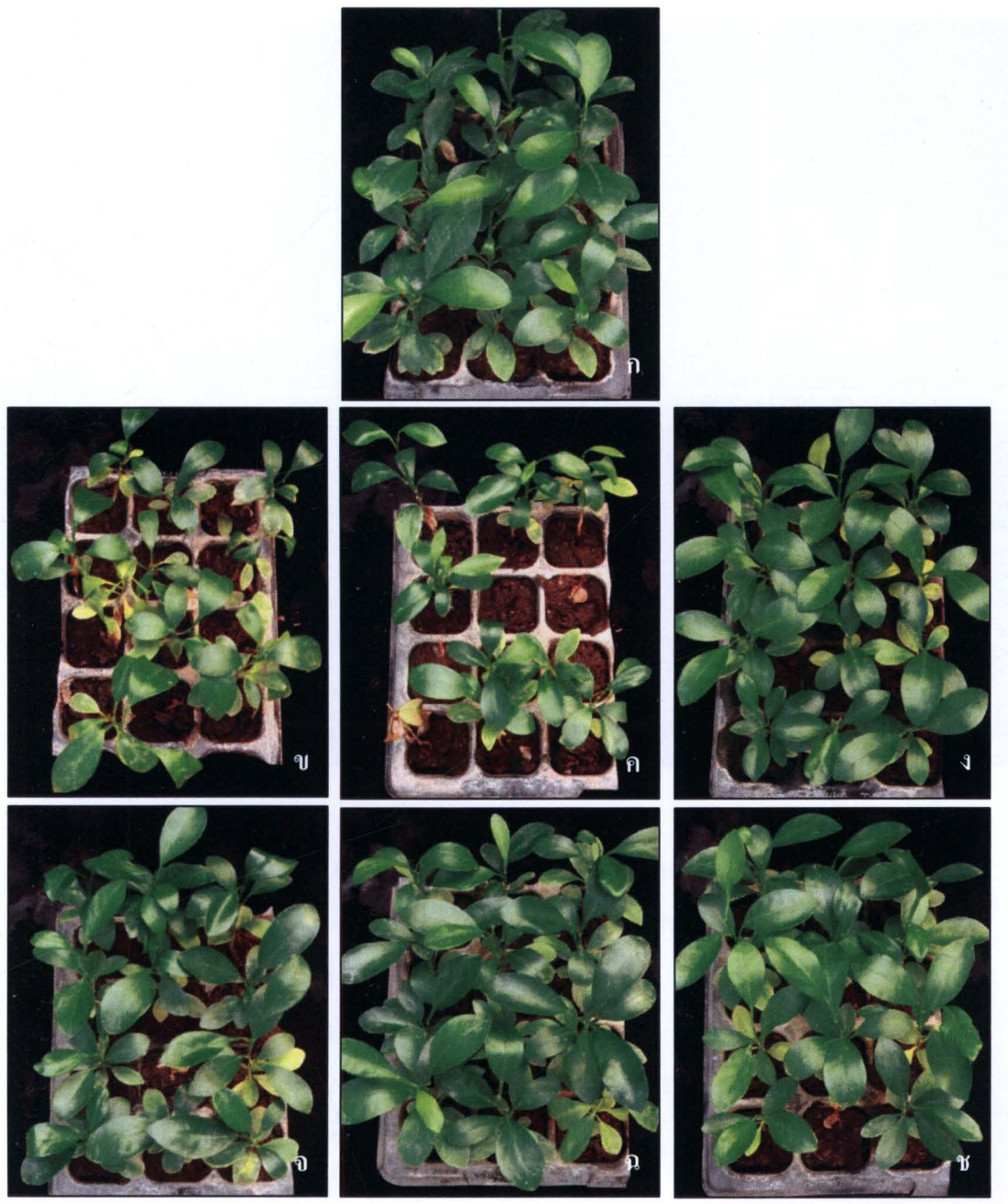
1 = ไม่แสดงอาการรากเน่า

2 = แสดงอาการรากเน่า 1-10% หรือส่วนมากมีรากที่สมบรูณ์

3 = แสดงอาการรากเน่า 11-50% หรือมีรากที่สมบรูณ์เป็นบางส่วน

4 = แสดงอาการรากเน่า 50-80% หรือมีรากที่สมบรูณ์เพียงเล็กน้อย

5 = แสดงอาการรากเน่า 80-100% หรือไม่มีรากที่สมบรูณ์เลย



ภาพ 22 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรครากเน่าของส้มอายุ 8 เดือน ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora parasitica* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท

ก. ชุดควบคุมพืชปกติ

ข. ชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น) + ปลูกเชื้อสาเหตุ P

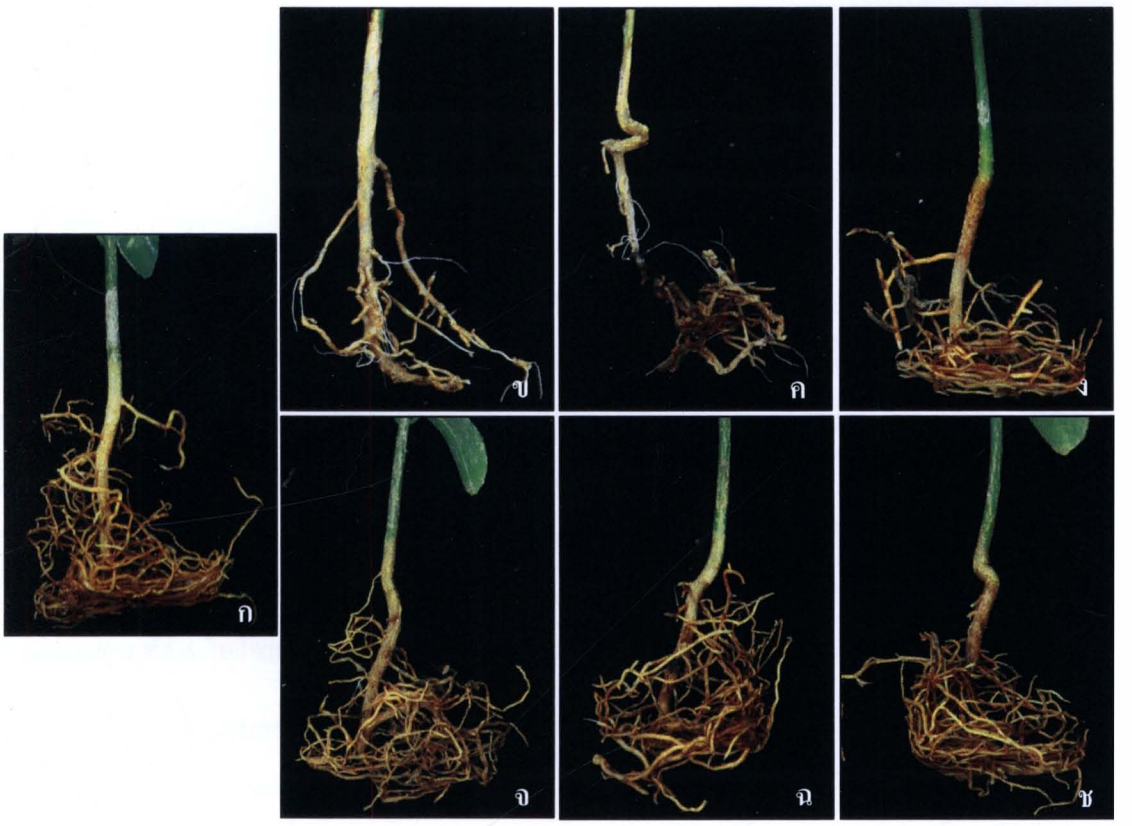
ค. ชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA) + ปลูกเชื้อสาเหตุ P

ง. T13 + ปลูกเชื้อสาเหตุ P

จ. T14+ ปลูกเชื้อสาเหตุ P

ฉ. TKM61+ ปลูกเชื้อสาเหตุ P

ช. TKM65+ ปลูกเชื้อสาเหตุ P



ภาพ 23 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรครากเน่าของส้มอายุ 8 เดือน ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora parasitica* ของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท

ก. ชุดควบคุมพืชปกติ

ข. ชุดควบคุม 1 (น้ำกลั่น) + ปลูกเชื้อสาเหตุ P

ค. ชุดควบคุม 2 (น้ำกลั่นที่เทลงบนผิวหน้าอาหาร NA) + ปลูกเชื้อสาเหตุ P

ง. T13 + ปลูกเชื้อสาเหตุ P

จ. T14+ ปลูกเชื้อสาเหตุ P

ฉ. TKM61+ ปลูกเชื้อสาเหตุ P

ช. TKM65+ ปลูกเชื้อสาเหตุ P

P = *Phytophthora parasitica*