

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 เชื้อชนิดนี้ไม่สามารถก่อโรครากเน่าในดินหม่อนที่มีอายุ 3 ปีขึ้นไปได้ จากผลการทดลองโรครากเน่าขึ้นอยู่กับพันธุ์และช่วงอายุของหม่อน จากการศึกษายังพบว่าสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินมีผลต่อการส่งเสริมหรือยับยั้งการระบาดของโรคในพืช เช่น เมื่อความชื้นและอุณหภูมิสูงจะส่งเสริมให้เกิดการระบาดของโรครุนแรงมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การเจริญและเพิ่มปริมาณของเชื้อสาเหตุโรคพืช ยังขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของดิน เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดมีความต้องการช่วงพีเอชที่ต่างกัน

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรครากเน่าของหม่อนในประเทศไทยมีอยู่น้อย ทำให้ไม่สามารถระบุเชื้อสาเหตุและปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม ที่มีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าในหม่อนได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการศึกษาคความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ปลูกหม่อน

ที่มีการระบาดของโรครากเน่า จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการระบุสาเหตุของการเกิดโรครากเน่าได้ งานวิจัยในครั้งนี้เน้นศึกษาความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียบริเวณรากหม่อนในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรครากเน่า ดำเนินการศึกษาได้ 2 วิธี คือ การคัดแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ และ การศึกษาความหลากหลายของโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ทั้งนี้ การศึกษาด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลสามารถบอกความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้มากกว่า การคัดแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการเลือกใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่มีความเหมาะสม สามารถทำให้การศึกษาความหลากหลายเป็นไปตามวัตถุประสงค์ เพื่อนำผลจากการศึกษาวิจัยไปใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดการระบาดของเชื้อสาเหตุโรครากเน่าในหม่อนต่อไป

วัตถุประสงค์

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

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 คือลักษณะของดอกที่เกสรเพศผู้และเพศเมียแยกกันทำให้เกิดการผสมพันธุ์ข้ามต้น แต่บางพันธุ์มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียในต้นเดียวกัน เมื่อดอกตัวเมียได้รับการผสมจะเปลี่ยนไปเป็นผล เรียก Sorosis ประกอบไปด้วยเมล็ดเล็กๆ จำนวนมาก เมื่อนำไปขยายพันธุ์จะเกิดการกลายเป็นพันธุ์ที่แตกต่างจากหม่อนพันธุ์พ่อแม่และสามารถเจริญได้ดีตั้งแต่เขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน (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) ในสหภาพโซเวียตพบพันธุ์หม่อนที่พบมากที่สุดคือ *M. multicaulis*, *M. tartarica* และ *M. nigra* (Datta, 2001) ประเทศอินโดนีเซีย พบ 7 พันธุ์คือ *M. alba* (varieties *tartanica* และ *macrophylla*), *M. nigra*, *M. multicaulis*, *M. australis*, *M. cathyana* 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.			✓				
Asia	China	626	✓			✓ ²	✓	✓	
	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	n.a.		✓					
	and Turkey								
	Tajikistan	n.a.	✓				✓		
	Turkmenistan	n.a.	✓	✓			✓		
	Viet Nam	n.a.	✓		✓		✓	✓	
	Bulgaria	n.a.					✓		
	France	n.a.			✓	✓ ¹	✓		✓
Europe	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.) เนื่องจากหนอนไหมสามารถเปลี่ยนโปรตีนจากหม่อนให้เป็นเส้นใยได้ดีกว่าพืชอื่นๆ ในปัจจุบันการทำอุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมจึงต้องมีการปลูกหม่อนควบคู่กันไปด้วย

พืชสมุนไพร

จากการศึกษาสารอัลคาลอย deoxynojirimycin (DNJ) จากส่วนเปลือกกรากหม่อน *Morus nigra* ได้นำมาผลิตยาชื่อ Homonojirimycin เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน ซึ่ง Fischer *et al.* (1995) จากมหาวิทยาลัยออกฟอร์ด รายงานว่า butyl DNJ มีผลต่อการยับยั้งโรคเอดส์ ผลการทดลองในสัตว์สามารถใช้ได้ผลดีในระดับหนึ่ง โดย DNJ ที่มีคุณสมบัติทางเคมีคล้ายกับกลูโคส จะไปเพิ่มโมเลกุลของน้ำตาลที่ผิวด้านนอกของเชื้อ HIV เกิดการขัดขวางการเข้าทำลายเซลล์ของเชื้อ HIV

อาหารและเครื่องดื่มมนุษย์

ในทวีปยุโรป ออสเตรเลียและอเมริกาเหนือ นิยมปลูกหม่อนไว้เป็นไม้ประดับและรับประทานผล ซึ่งหม่อนพันธุ์ลูกผสมที่ให้ผลผลิตใบสูงและให้ผลที่มีขนาดใหญ่ คือ พันธุ์บุรีรัมย์ 60 และนครราชสีมา 60 ชาวญี่ปุ่นจะนำยอดหม่อนและใบหม่อนมาทำชา จากการศึกษาของ Tsushida *et al.* (1987) พบสาร gamma-aminobutyric acid ในใบหม่อนได้พัฒนามาเป็น “Gabaron Tea” เพื่อใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูงในเวลาต่อมา

สารป้องกันกำจัดโรคพืช

Akira *et al.* (1978) พบว่าเนื้อเยื่อของกิ่งหม่อนบริเวณ cortex และ xylem สร้างสาร phytoalexins (PA) มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา จึงทำให้หม่อนมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราบางชนิด เช่น *Stigming mori* และ *Fusarium solani* เป็นสาเหตุทำให้กิ่งหม่อนแห้งตาย และพบว่าสารออกฤทธิ์ prenylflavon compound ที่สกัดได้จากส่วน epidermal cells ของลำต้นและรากหม่อน เช่น luwanon C, morucin, albanin A-H และ albafluran 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 ต้านทานต่อโรคราแป้งได้ดี และต้านทานเพลี้ยได้ระดับปานกลาง ข้อจำกัดของพันธุ์ คือ ท่อนพันธุ์ออกรากยาก ควรขยายพันธุ์ด้วยวิธีติดตาลงบนต้นต่อหม่อนพันธุ์ที่ออกรากง่าย ผ่านการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรเมื่อเดือนตุลาคม 2530 ใช้ชื่อย่อ “นม. 60”

พันธุ์บุรีรัมย์ 60

ลักษณะเด่นของพันธุ์ คือ มีการเจริญเติบโตและตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดี ใบมีขนาดใหญ่ หนา อ่อนนุ่ม ทรงต้นตั้งตรง ด้านทานต่อโรคใบด่าง และทนทานต่อโรคราแป้ง ได้พอสมควร ข้อจำกัดของพันธุ์ คือ ไม่เหมาะสมกับการปลูกในพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ หรือปริมาณน้ำฝน ไม่เพียงพอ 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 ในการขยายพันธุ์ด้วยท่อนพันธุ์จึงต้องใช้สารกระตุ้นการออกราก กรมวิชาการเกษตรรับรองเป็นพันธุ์หม่อนแนะนำ เมื่อวันที่ 30 กันยายน 2541 ใช้ชื่อย่อ “ศก. 33”

นอกจากพันธุ์หม่อนที่ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตรแล้ว ในประเทศไทยยังมีหม่อนพันธุ์พื้นเมืองอีกหลายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อใช้เป็นต้นพันธุ์ เนื่องจากมีความทนต่อสภาพแวดล้อมสูง เช่น หม่อนน้อย หม่อนตาดำ หม่อนสร้อย หม่อนไผ่ หม่อนหมี หม่อนจาก หม่อนสา หม่อนหยวก หม่อนใบมน หม่อนใบโพธิ์ หม่อนแม่ลูกอ่อน หม่อนแก้วชนบท หม่อนแก้วอุบลและหม่อนบางซื่อ ซึ่งการเรียกชื่อของหม่อนแต่ละพันธุ์แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น (วีระ, 2534) ในที่นี้จะยกตัวอย่างหม่อนพันธุ์พื้นเมืองที่เกษตรกรนิยมปลูกดังนี้

หม่อนน้อย

เป็นหม่อนที่ให้ดอกเพศผู้ มีกิ่งขนาดใหญ่ ตามาก ลักษณะใบหนา เป็นมัน สีเขียวแก่ คล้ายใบโพธิ์ ลักษณะเด่นของพันธุ์นี้คือ ทนแล้ง สามารถขยายพันธุ์ได้ง่ายโดยใช้กิ่งปักชำ สามารถให้ผลผลิต 1,500-2,000 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี ลักษณะด้อยคือ ไม่ต้านทานต่อโรครากเน่า

หม่อนสร้อย

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

หม่อนไผ่

เป็นหม่อนเพศเมีย กิ่งขนาดปานกลาง ลำกิ่งอ่อนโค้ง ใบมีลักษณะเว้า พื้นที่ใบน้อย ใบบางสากมือ ให้ผลิตต่ำ เหมาะสำหรับปลูกเป็นต้นตอ เนื่องจากมีความต้านทานต่อโรครากเน่า

หม่อนคุณไพ

เป็นหม่อนเพศเมีย กิ่งมีขนาดใหญ่ ไม่ค่อยมีกิ่งแขนง ลักษณะขอบใบโดยมากไม่เว้า ด้านข้าง ขอบใบมีลักษณะเป็นคลื่นใบบาง โดยเฉพาะส่วนยอด ใบเมื่อยู่นต้นจะเหี่ยวง่ายในช่วงแดดจัด 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 รากหม่อนจะยังลึกลงไปดินได้มากพอ เมื่อผ่านช่วงแล้งไปรวมถึงการใส่ปุ๋ยบำรุงต้นโดยมีธาตุอาหารที่จำเป็นครบตามความต้องการของพืช (ตารางที่ 2) ทำให้เกษตรกรสามารถเก็บผลผลิตใบหม่อนไปใช้ในการเลี้ยงไหมได้เร็วขึ้น

การเตรียมหลุม

การขุดเป็นหลุมๆ ตามระยะปลูก ขนาดกว้าง 50 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ลึกประมาณ 50 เซนติเมตร รองก้นหลุมด้วยเศษหญ้า ฟางแห้งหรือขี้วัวโศด คลุกด้วยปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก กลบดิน 1 ชั้นก่อนทำการปลูกหม่อน ขุดหลุมเป็นร่องยาวตามแถวปลูก ขนาดกว้างและลึก 50 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับความยาวของแปลงหม่อน ใช้เศษหญ้า ฟางข้าว ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมักรองก้นหลุม แล้วจึงนำดินที่ขุดขึ้นกลบแล้วจึงนำท่อนพันธุ์ปักตามระยะที่กำหนด

การดูแลรักษาสวนหม่อน

แปลงหม่อนที่ปลูกใหม่ ควรมีการกำจัดวัชพืชบ่อยๆ เนื่องจากต้องปลูกหม่อนในต้นฤดูฝนซึ่งระยะนี้วัชพืชขึ้นมาก จึงมีความจำเป็นต้องกำจัดวัชพืชในระยะแรก จากนั้นควรใส่ปุ๋ยอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากดินในแต่ละพื้นที่มีความอุดมสมบูรณ์แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 อิทธิพลปุ๋ยที่มีต่อผลผลิตของใบหม่อน

แร่ธาตุอาหารหลัก	ผลผลิต (กิโลกรัม)	ครรชนีเปรียบเทียบ
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 เนื่องจากยังไม่ทราบสาเหตุโรคที่แน่ชัด จากข้อสังเกตต่างๆ ไป พบว่าในสภาพที่ดินค่อนข้างเหนียวมาก หรือสภาพดินที่น้ำท่วมไม่พบโรคนี้ เช่น ชายฝั่งแม่น้ำโขง โดยเฉพาะเขตจังหวัดหนองคาย ไม่พบโรคนี้ทำลายต้นหม่อน อาการของโรครากเน่าจะเริ่มแสดงอาการให้เห็นเมื่อรากเริ่มเน่ามากแล้ว ใบหม่อนโดยเฉพาะส่วนยอดจะเริ่มเหี่ยว และบางส่วนของแต่ละใบจะไหม้คล้ายถูกน้ำร้อนลวก มีลักษณะอาการผิดปกติเรียกว่า "ตายนิ่ง" อาการไหม้จะลุกลามมากขึ้นเรื่อยๆ ในที่สุดจะลามลงไปสู่ใบและส่วนล่างๆ ของ

กึ่ง แล้วตายในที่สุด เมื่อชุดต้นหม่อนที่เป็นโรครากเน่าขึ้นมาปรากฏว่ารากบางส่วนเน่า โดยเปลือก รากจะล่อนและมีกลิ่นเหม็น การป้องกันและกำจัด สามารถทำได้โดยใช้หม่อนพันธุ์พื้นเมืองซึ่งอาจ ให้ผลผลิตต่ำกว่า แต่สามารถต้านทานโรคได้ดีกว่า เมื่อพบหม่อนที่เป็นโรคในแปลงให้ชุดหม่อนที่เป็น โรครากเน่าออก หรือพยายามหลีกเลี่ยงการทำให้รากหม่อนถูกตัดขาด (พรณี, 2531)

2. โรคราขาว (white root rot)

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Resellinia necatrix* ที่ทำลายรากหม่อน เชื้อจะสามารถเจริญ บนรากที่เน่า และสร้างเส้นใยสีขาว รวมกันเป็นกลุ่มคลุมอยู่บนรากทำให้มองเห็นรากกลายเป็นสี ขาว ในเมืองไทยพบหม่อนที่เป็นโรคนี้เพียงแห่งเดียว คือ สวนหม่อนของพระบาทสมเด็จพระ เจ้าอยู่หัวรัชกาลปัจจุบัน ในอำเภอหัวหิน และสวนหม่อนของเกษตรกรบริเวณใกล้เคียง มีโรค ระบาดอยู่เพียงเล็กน้อยประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากโรคนี้จะเกิดกับต้นหม่อนแล้ว ยังทำความ เสียหายแก่พืชชนิดอื่น เช่น ทับทิม เป็นต้น การป้องกันและกำจัด สามารถทำได้โดยใช้วิธีการชุดต้น หม่อนเผาทำลาย หากการระบาดมีความรุนแรงและลุกลามมาก ต้องกำจัดโดยใช้สารเคมี

3. โรคราแป้ง (powdery mildew)

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phyllactinia moricola* ทำความเสียหายแก่หม่อนมาก เพราะ ทำลายใบหม่อน แต่ไม่ทำให้หม่อนตายเหมือนโรคสองชนิดข้างต้น เชื้อเข้าทำลายที่ท้องใบ และ ส่วนใหญ่จะทำลายใบที่อยู่ประมาณกลางกิ่ง ส่วนที่เกิดโรคจะเจริญอยู่ในผิวใบหม่อนและสร้างเส้น ใยผงทะลุออกมา แล้วสร้างสปอร์ขึ้นเพื่อขยายพันธุ์ต่อไป สปอร์จะเกาะกันเป็นกลุ่มใหญ่คล้ายฝุ่น สีขาวเป็นวงตามท้องใบ หากอาการรุนแรงอาจพบด้านหน้าใบได้ เนื้อใบส่วนที่ถูกราแป้งเกาะดูจะ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และใบร่วงไปในที่สุด การป้องกันและกำจัดสามารถทำได้โดยการเผาทำลายใบ ที่เป็นโรค ทำลายโดยเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสม นำเชื้อราได้ดี และพืชยาสลายได้ในเวลาไม่เกิน 10 วัน เช่นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม เบนโนไมล์ (benmoyl)

4. เพลี้ยแป้ง (mealy bug)

เป็นแมลงประเภทปากดูด รูปร่างรี คล้ายรูปไข่ แมลงชนิดนี้จะดูดกินน้ำเลี้ยงของ ส่วนที่ยังอ่อนอยู่ของต้นหม่อน ทำให้รูปร่างของใบหม่อนผิดปกติ ใบหงิกงอ การเจริญเติบโตของ ยอดหม่อนจะชะงัก ขี้อระหว่างใบถี่เข้า และกิ่งบวมขึ้น พบการระบาดมากในช่วงฤดูร้อนต่อฤดูฝน

(ระหว่างเดือนมีนาคม-พฤษภาคม) และช่วงฤดูฝนต่อฤดูหนาว (ระหว่างเดือนตุลาคม-ธันวาคม) ซึ่งมดเป็นตัวช่วยการแพร่กระจายเพลี้ยแป้งไปตามที่ต่างๆ มดเหล่านี้ได้รับประโยชน์จากเพลี้ย คือ ได้น้ำหวานที่เพลี้ยขับถ่ายออกมาเป็นอาหาร

5. เพลี้ยหอยนิ่ม (soft scale)

เป็นแมลงประเภทปากแทงดูด รูปร่างกลมรี ค่อนข้างเรียวยาว ดูคืบตามส่วนของต้นหม่อนที่ยังอ่อน ทำให้หม่อนแคะแกร็นชะงักการเจริญเติบโต ระบาดมากในหน้าแล้ง ระหว่างเดือนพฤศจิกายน-มีนาคม ส่วนหม่อนเสียหายมากในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์และมีนาคม เนื่องจากระยะนี้หม่อนจะขาดน้ำทำให้ต้นอ่อนแอ เกิดการเข้าทำลายได้ง่าย

6. ค้างเข้ลำต้นหม่อน (mulberry stem borer)

เป็นแมลงประเภทแมลงปีกแข็ง (beetles) ส่วนใหญ่จะทำลายเฉพาะต้นหม่อน จะกัดกินกิ่งที่มีสีเขียวทำให้กิ่งเกิดรอยชำและหักได้ ทางเดินอาหารของกิ่งหม่อนถูกตัดขาด ยอดชะงักการเจริญเติบโต มักระบาดรุนแรงในสวนหม่อนที่ไม่มีการดูแลเอาใจใส่และไม่มีการตัดแต่งกิ่ง

7. เพลี้ยหอยดำ (black scales)

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

8. เพลี้ยไฟ (thrips)

เป็นแมลงตัวเล็กๆ ที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบหม่อน ใบหม่อนที่มีตัวอ่อนของเพลี้ยไฟ จะพบรอยขีดสีเหลืองอ่อน หรือเหลืองเข้มเล็กๆ คล้ายฝุ่น อยู่กระจัดกระจายทั่วๆ ไปทางด้านหลังใบ ใบหม่อนที่มีเพลี้ยดูดมากๆ จะทำให้หลังใบกร้าน และใบแคะแกร็นบางครั้งถึงกับทำให้ขอบใบหงิกม้วนเข้าหากัน ท้องใบมีสีน้ำตาล ระบาดมากในช่วงฤดูฝน สามารถใช้สารเคมีในการกำจัด

เช่น สารในกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟสและคาร์บาเมท (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>	สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของสตอเบอรี่
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของสับปะรด

2.1 โรครากและโคนเน่าของทุเรียนและส้ม (root and stem rot)

ในทุเรียนอาการเริ่มแรกคือ ใบจะเหลืองซีด ผิวดำน ไม่เป็นมัน และทยอยร่วง สำหรับส้มที่เป็นโรค เส้นกลางใบจะมีสีเหลือง จากนั้นใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเหี่ยวเหมือนขาดน้ำ ส่วนอาการที่รากและลำต้นของทุเรียนกับส้มเหมือนกันคือ รากมีสีน้ำตาลดำ สามารถดึงผิวรากหลุดออกได้ง่าย บนรากใหญ่พบอาการเน่าและรอยแผลสีน้ำตาลเมื่อถากผิวรากออก ส่วนอาการโคนเน่าจะพบบริเวณโคนต้นใกล้ระดับผิวดิน ช่วงที่มีความชื้นสูงมักจะมีเมือกไหลออกมา ถ้าถากเปลือกลำต้นออกพบว่าเนื้อไม้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง เชื้อสาเหตุของโรคคือ *Phytophthora* spp. การควบคุมโรคสามารถทำได้โดยหลีกเลี่ยงการบังคับให้พืชออกผลดกมากเกินไป เพราะจะทำให้ดินอ่อนแอหรือปรับปรุงสภาพดินให้อุดมสมบูรณ์ จัดระบบระบายน้ำให้ถ่ายเทได้สะดวก ในกรณีมีแผลที่ลำ

ต้นควรตากบริเวณที่เป็นโรคออกให้เหลือแต่บริเวณเนื้อเชื้อที่ดี แล้วทาด้วยสารเคมี เช่น metalaxyl และ fosetyl aluminum อาจใส่เชื้อรา *Tricoderma harzianum* ร่วมกับสารเสริมบริเวณโคนต้นเพื่อควบคุมอาการรากเน่า หรือใช้วิธีการอัดฉีดสารเคมี m-KP ชื่อสามัญคือ phosphonic acid ด้วยการฉีดเข็มลักษณะคล้ายเข็มฉีดยาเข้าสู่ลำต้น เพื่อช่วยให้ต้นพืชมีความต้านทานโรคมมากขึ้น

2.2 โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราใน form class Agronomycetes

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

โรคเน่าระดับดินที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* sp.

เกิดอาการแผลชำน้ำตาลรอบโคนต้นกล้าพืช ทำให้ต้นกล้าพับ มีอาการเช่นเดียวกับอาการที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pythium* sp. และ *Phytophthora* sp. แต่ถ้าเก็บไว้ในที่ชื้นต่อไปอีกระยะหนึ่งเชื้อราจะสร้างสเคลอโรเทียม (sclerotium) ปรากฏให้เห็นเป็นก้อนสีน้ำตาลอ่อน

โรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium* sp.

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

การควบคุมโรคที่เกิดจาก เชื้อราใน form-class Agronomycetes

ใช้สารเคมีประเภทดูดซึม เช่น carboxin หลุกเมล็ดก่อนปลูกหรือราดโคนต้นพืชเพื่อควบคุมเชื้อทั้งสองใช้จุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา *Tricoderma harzianum* และ *Gliocladium virens* หรือใช้วิธีเขตกรรม โดยกำจัดเศษซากพืชที่เป็นโรค ตากดินก่อนปลูก ใส่ปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยคอกเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ในดิน และจัดระบบการระบายน้ำ

2.3 โรคพืชที่เกิดจาก class Deuteromycetes

โรคใบจุด ใบไหม้ และเน่าของพืช (botrytis disease)

เป็นโรคที่พบมากที่สุดในพื้นที่ที่มีการปลูกผัก ไม้ดอก ไม้ประดับ ไม้ผล และพืชไร่ บางชนิด โดยเฉพาะที่ปลูกในเรือนกระจก โรคจะแสดงอาการที่ดอก ผล ลำต้น ใบ หัว และราก อาการของโรคคือ มีอาการไหม้ที่ดอก ผลเน่า และโคนเน่าระดับดิน อาการแคงเกอร์ (canker) หรือเน่าที่ลำต้นใบจุดหัวและรากเน่า ในสภาพอากาศชื้น เชื้อราจะสร้างสปอร์เห็นเป็นสีเทาบนเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค เชื้อสาเหตุโรค คือ *Botrytis* sp. การควบคุมโรคสามารถทำได้โดย กำจัดเศษซากพืชที่เป็นแหล่งอาศัยของเชื้อโรค ปรับปรุงสถานที่เก็บให้มีอากาศถ่ายเท หากสภาพการเพาะปลูกมีอากาศเย็น พบการระบาดของผักกาดหอมสามารถควบคุมโดยใช้ dichloran หรือ zineb หากเป็นต้นหอมหรือมะเขือเทศใช้ difolatan, dyrene หรือ maneb ควบคุมโรคผลเน่าของสตรอเบอร์รี่ด้วยการฉีดพ่น captan, thiran หรือ benomyl

3. โรครากเน่าในพืชชนิดต่างๆ

นอกจากโรครากเน่าจะเป็นปัญหาที่สำคัญในประเทศไทยแล้ว ในต่างประเทศก็นับได้ว่าเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตทางการเกษตรเป็นอันดับต้นๆ เช่นเดียวกัน ซึ่งมีตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโรครากเน่าของพืชตระกูลต่างๆ ดังนี้

Nemec (1970) ศึกษาเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับโรครากเน่าของสตรอเบอร์รี่ ใน Illinios 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) และเก็บตัวอย่างดินเหนียวจากพื้นที่ที่เป็นโรค ที่ความลึก 25 เซนติเมตรนำมาปลูกพืชทดสอบในโรงเรือนซึ่งมี 3 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วดำ 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 จากแปลงตัวอย่างทั้งหมด 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 แสดงอาการเป็นโรครากเน่ามากกว่า 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 จังหวัดอุดรธานี หนองคาย เชียงใหม่ และกรุงเทพฯ

ลักษณะอาการของโรค

หม่อนที่เป็นโรครากเน่า ลักษณะอาการของต้นหม่อนในพื้นที่ที่จะตายเป็นหย่อมและขยายลูกกลมไปเรื่อยๆ ใบและกิ่งจะเหี่ยวจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ายน้ำร้อนลวก โดยเริ่มจากขอบใบแล้วลูกกลมเข้าด้านใน ต่อมาจะแสดงอาการเหี่ยวทั้งต้น และตายในที่สุด เมื่อถอนต้นจะพบว่า โคนและรากที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลายมีสีน้ำตาลปนดำเน่าเปื่อย เปลือกหลุดลอกออกได้ง่าย และมีกลิ่นเหม็น ส่วนมากโรคจะเข้าทำลายระบบรากและลูกกลมไปบริเวณโคนต้นระดับใต้ดินและระดับ

เหนือดินประมาณ 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 ปี ขึ้นไป พบว่าเชื้อราชนิดนี้ไม่สามารถทำให้เกิดโรครากเน่าได้ นอกจากนี้ตรวจพบไส้เดือนฝอยอีก 11 ชนิด จากตัวอย่างหม่อนที่เป็นโรค ได้แก่ *Hoplolaimus* sp., *Tylenchorhynchus* sp., *Helicotylenchus* sp., *Criconimoides* sp., *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Paratylenchus* sp., *Tylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp., *Longidorus* 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 พบว่าแบคทีเรียในรากและบริเวณโคนต้นเป็นเชื้อ *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) ซึ่งจากการทดสอบการเกิดโรคในส่วน

ของบริเวณราก ต้องการทราบเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรครากเน่า ใช้เมล็ดข้าวบาร์เลย์ ที่มาเชื้อแล้ว ใส่เชื้อที่แยกได้จากส่วนของรากลงไปแล้วบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ จนเมื่อเมล็ดข้าวบาร์เลย์ ถูกปกคลุมด้วยเชื้อราแล้วจึงนำไปผสมกับวัสดุปลูกที่ใช้ในการปลูกหม่อน ซึ่งหม่อนที่ใช้ในการ ทดลองมีอายุ 4-6 เดือน และส่วนที่เป็นชุดควบคุมจะไม่ใส่เชื้อในเมล็ดข้าวบาร์เลย์ โดยหม่อนที่ ไม่ใส่ชุดควบคุมจะแสดงอาการเหี่ยวเมื่อใส่เชื้อลงไปแล้วเป็นเวลา 20 วัน หลังจากนั้นนำชิ้นส่วน ของรากซึ่งแสดงอาการเป็นโรครากเน่าแยกเชื้ออีกครั้งพบว่า เป็นเชื้อ *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Rhizoctonia solani* และ *Rosellinia necatrix*

Kazempour *et al.* (2006) ทำการศึกษาต่อจากการทดลองข้างต้น โดยใช้แบคทีเรียเชื้อ ปลูกพืชที่จะนำมาใช้ควบคุมการเกิดโรครากเน่าในหม่อน เริ่มจากแยกเชื้อมาจากรากหม่อนที่เป็น โรครากเน่า คัดแยกได้ทั้งหมด 165 ไอโซเลต พบแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต เท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็น เชื้อปฏิชีวนะ (เป็นแกรมลบ 3 ไอโซเลต แกรมบวก 2 ไอโซเลต) โดยพบว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas fluorescences* และ *Bacillus cereus* จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นเชื้อปฏิชีวนะด้วยวิธีการ เฉพาะ เช่น volatile antibiotic, diffusible antibiotic และการสร้างเอนไซม์ protease เป็นต้น ซึ่งทั้ง 2 เชื้อสามารถยับยั้งการก่อโรคของเชื้อราได้ดี เมื่อปลูกพืชทดสอบโดยใส่เชื้อที่คาดว่าจะสาเหตุ ของโรครากเน่า คือ *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Rhizoctonia solani* และ *Rosellinia necatrix* ลงไป จากนั้นใช้เชื้อปฏิชีวนะที่คัดแยกได้นำมาทำการ ทดสอบ พบว่าการเกิดโรคในแต่ละเชื้อลดลง 21.5 , 26.5, 25, และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้เชื้อ ปฏิชีวนะร่วมกับสารฆ่าเชื้อรา Roval T.S พบว่าการเกิดโรคในแต่ละเชื้อลดลง 16.5, 21, 21 และ 24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเชื้อ *Pseudomonas fluorescences* และ *Bacillus cereus* มีประสิทธิภาพใน การนำมาใช้เป็นเชื้อปฏิชีวนะเพื่อควบคุมโรครากเน่าของหม่อนได้

สุวิมล และคณะ (2552) ศึกษาผลการไถระเบิดดินดานและการใส่ปุ๋ยขี้หมูต่อการสร้างสปอร์ และการเข้าอาศัยภายในรากหม่อนของราไมคอร์ไรซา พบว่าพื้นที่ที่มีการใส่ปุ๋ยขี้หมูในอัตรา 0, 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ ในแปลงที่มีการไถระเบิดดินดานและการไถพรวนแบบดั้งเดิม พบว่า ราไมคอร์ไรซาสามารถสร้างสปอร์ได้สูงสุดเท่ากับ 106 สปอร์ต่อดิน 100 กรัม ในแปลงที่มีการไถ ระเบิดดินดานร่วมกับการใส่ปุ๋ยขี้หมูอัตรา 300 กิโลกรัมต่อไร่ แต่สร้างสปอร์ได้น้อยกว่าในแปลงที่มี การไถพรวนแบบดั้งเดิมร่วมกับการใส่ปุ๋ยขี้หมูทุกระดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อตรวจสอบ เปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยภายในรากหม่อนของราไมคอร์ไรซาทั้งในแปลงที่มีการไถระเบิดและไม่มี การไถระเบิดดินดานพบว่า ราไมคอร์ไรซามีเปอร์เซ็นต์เข้าอาศัยในรากหม่อนสูง โดยการไถทั้งสอง วิธีมีเปอร์เซ็นต์การเข้าอาศัยในรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ

สมภพ และคณะ (2552) ศึกษาผลของการใช้วัสดุปรับปรุงดินร่วมกับหม่อนพันธุ์ด้านทานต่อการเพิ่มผลผลิตหม่อนในเขตที่มีการแพร่ระบาดของโรครากเน่า พบว่าการใช้หม่อนพันธุ์พื้นเมือง เช่น พันธุ์คุณไผสามารถต้านทานการเกิดโรครากเน่าได้ 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 สำหรับเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยจักจั่นสามารถถ่ายทอดโรคได้น้อยลงเมื่อมีความชื้นลดลง 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 ในคำรับควบคุมใส่ conidial suspension 15 มิลลิลิตร ที่ sterile แล้ว ให้พืชเจริญที่ 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 ของพื้นที่ราก

ทั้งหมดมีอาการตาย จากนั้น นำส่วนของรากมาแยกเชื้อเพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกับที่มีการทดสอบ อบอุ่นของลำต้นและราก โดยใช้เวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความชื้นของดินมีผลต่อการก่อโรคของ *Codinaea fertilis* พืชที่อยู่ภายใต้สภาพความชื้นสูงจะมีความอ่อนแอมากกว่าพืชที่อยู่ภายใต้สภาพความชื้นต่ำ โดยพบว่ามีคะแนนของการเกิดโรคมามากกว่าพืชในคำรับควบคุม โดยพบว่ารากพืชจะอ่อนแอจากการเข้าทำลายและเน่า เนื่องจากสภาพความชื้นของดินต่ำ ดังนั้นความชื้นของดินจึงเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเกิดโรคในเชื้อรา ในดินที่แห้งอาจมีผลทำให้อาการของโรคเพิ่มขึ้นและนำไปสู่การลดลงของผลผลิตได้

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

Heritage and Harrigan (1984) ศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่เนื้อดิน ความชื้นดิน อายุของพืชต่อการเข้าทำลาย รูปแบบของการให้น้ำชลประทาน ที่มีผลต่อการคัดเลือกต้นดอกคำฝอยที่มีความต้านทานเชื้อ *Phytophthora crytozea* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่า พบว่าพืชที่ปลูกในเนื้อดินร่วนมีความทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อได้ดีกว่าเจริญเติบโตในดินทราย ความชื้นของดินถ้าเพิ่มจาก 88 เปอร์เซ็นต์เป็น 96 เปอร์เซ็นต์นั้น ส่งผลให้เชื้อสาเหตุของโรคพืชสามารถเข้าทำลายได้มากกว่าเช่นเดียวกัน ปัจจัยอายุของพืชต่อการเข้าทำลายพบว่า ในช่วงการออก (10 วันหลังปลูก) มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุของโรคพืชมากกว่าต้นที่มีการเจริญเต็มที่ในระยะออกดอก (90 วันหลังปลูก) ส่วนปัจจัยสุดท้ายคือ รูปแบบการชลประทานมีการเปรียบเทียบการให้น้ำ 2 ประเภทคือ การให้น้ำตามร่อง (furrow) ซึ่งเป็นการให้น้ำทางผิวดิน โดยปล่อยให้น้ำไหลในร่อง และการให้น้ำแบบฝั้น (border check) โดยปล่อยให้น้ำไหลท่วมแปลงเป็น

ผิวน้ำระหว่างคันดินสองคัน ซึ่งน้ำจะถูกส่งเข้าไปจากทางหัวแปลงจนกระทั่งกระจายไปยังท้ายแปลง พบว่า การให้น้ำแบบ ผิวน้ำส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคอย่างรุนแรงมากขึ้นกว่าการให้น้ำตามร่อง

Gill *et al.* (2001) ทำการศึกษาผลของความชื้นในดินต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกันต่อโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia* ในข้าวสาลี จากผลการทดลองพบว่า ความชื้นของดินในระดับที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของพืช (50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน) โรคมีการระบาดอย่างรุนแรงในสภาพอุณหภูมิต่ำ (10 องศาเซลเซียส) แต่ในสภาวะแห้งแล้ง (15 เปอร์เซ็นต์ ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน) กลับพบว่าการก่อโรคเหมือนกันทุกระดับของอุณหภูมิในการทดสอบ ในดินที่อบอุ่น (20 และ 25 องศาเซลเซียส) ที่ความชื้นสูง (50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน) การเกิดโรคในดินที่มีการรอบไอน้ำมีความรุนแรงมากกว่าในดินที่ไม่มีการรอบไอน้ำ เนื่องจากการรอบไอน้ำในดินไม่ใช่การฆ่าเชื้อโรค 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 และพบว่าการเกิดโรคมีความสัมพันธ์กับระบบการปลูกพืช สภาพแวดล้อม และการจัดการพืชในแปลง เช่น ดินที่มีระดับน้ำสูงเป็นสภาวะแวดล้อมที่เชื้อ *Pythium* sp. จะสามารถเกิดการระบาดได้อย่างรุนแรง หรือถ้าเกิดฝนตกหนักในช่วงที่เริ่มทำการย้ายปลูกพืช หลังจากนั้น 2-3 สัปดาห์ พืชจะแสดงอาการรากเน่าโคนเน่าจากเชื้อ *Pythium* sp. หรืออาการเหี่ยวจากเชื้อ *Fusarium* sp.

5.2 ธาตุอาหารพืช มีความเกี่ยวข้องกับค่าพีเอชของดิน ซึ่งส่งผลต่อความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืช โดยพืชอาจแสดงออกทางด้านสรีระหรืออาจแสดงอาการเป็นพิษจากการดูดใช้และสะสมของธาตุอาหารในปริมาณที่มากเกินไปหรืออาจแสดงอาการขาดธาตุอาหารได้ เช่น ธาตุแคลเซียม แมกนีเซียม และโพแทสเซียม ในสภาพดินที่เป็นกรดรุนแรงพบแคลเซียม โพแทสเซียมและแมกนีเซียมในระดับต่ำ ระดับพีเอชที่ส่งผลให้ดินมีแคลเซียมและแมกนีเซียมอย่างเพียงพอ อยู่ระหว่าง 5.5- 8.5 ถ้าสูงกว่า 8.5 พบปริมาณแคลเซียมต่ำ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา,

2548) สำหรับฟอสฟอรัส เมื่อดินเป็นกรดมากๆ จะส่งเสริมให้เกิดการตรึงฟอสเฟต ให้อยู่ในรูป เหล็กและอะลูมิเนียมฟอสเฟต ยากแก่การใช้ประโยชน์ เนื่องจากสารประกอบของฟอสเฟตทั้งสองรูป จะละลายน้ำได้ยาก ระดับพีเอช 6-7 เป็นระดับที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์ของฟอสเฟตในพืช เนื่องจากฟอสเฟตจะถูกตรึงน้อยที่สุด ดังงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับธาตุอาหารอื่นๆ ดังนี้

Elmer (1999) ศึกษาอิทธิพลของแอมโมเนียมซัลเฟตและการปลูกพืชหมุนเวียนต่อการ เกิดโรค black root rot ในสตรอเบอร์รี่ โดยเลือกพื้นที่ที่เคยเกิดโรค black root rot มาก่อน ทำการ ปลูกพืชหมุนเวียน 2 ชนิด คือ Saia oats, sorgho-sudangrass และมีแปลงควบคุมคือแปลงปลูกสตรอ เบอร์รี่พันธุ์ Honeoye จากนั้นทำการปลูกสตรอเบอร์รี่พันธุ์เดียวกันนี้เป็นพืชหลัก ทดสอบโดยการ ใส่ปุ๋ย 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมไนเตรท และแคลเซียมไนเตรท อัตราไนโตรเจนที่เท่ากัน หลังจาก นั้น 2 เดือน พบว่าแปลงที่มีการใส่ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตมีพื้นที่ใบและผลผลิตที่สูงกว่า พื้นที่ที่มี การใส่ปุ๋ยแคลเซียมไนเตรท สตรอเบอร์รี่ที่ปลูกในแปลงที่มีการปลูก Saia oats มาก่อนนั้น มีผลผลิต เพิ่มขึ้น 135 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เร็วกว่าแปลงควบคุม 38 เปอร์เซ็นต์ อิทธิพลของการปลูกพืชคลุมดินเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต และลดการเกิดโรค พบว่าแปลงที่ใส่ ปุ๋ยแอมโมเนียมไนเตรท พืชแข็งแรงกว่าแปลงที่ใส่ปุ๋ยแคลเซียมไนเตรท และการปลูกพืชคลุมดิน ทั้งสองชนิดเป็นพืชหมุนเวียนร่วมกับการใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตนั้นยังสามารถลดการเข้าทำลาย ของไส้เดือนฝอยได้อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงที่มีการปลูกสตรอเบอร์รี่อย่างต่อเนื่อง (แปลง ควบคุม) นอกจากนี้การปลูกพืชหมุนเวียนอีกชนิดหนึ่งคือ Garry oat ยังสามารถลดปริมาณเชื้อ *Rhizoctonia fragariae* ได้มีประสิทธิภาพเปรียบเทียบกับแปลงที่มีการปลูกสตรอเบอร์รี่อย่าง ต่อเนื่อง และผลที่เกี่ยวข้องกับการใช้ปุ๋ยแอมโมเนียมซัลเฟตคือ สามารถลดค่าพีเอช ในบริเวณราก พืชได้ประมาณ 0.2 unit ซึ่งมีผลต่อการลดปริมาณเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ในบริเวณรากพืช ได้ประมาณ 10-15 เท่า และมีผลต่อการสร้างใบ อีกทั้งส่งเสริมการดูดใช้และสะสมปริมาณ ไนโตรเจน โพแทสเซียม กำมะถัน แมงกานีส และทองแดง มากกว่าพืชที่ใส่ปุ๋ยแคลเซียมไนเตรท

Campanella *et al.* (2002) ศึกษากิจกรรมของเชื้อแคลเซียมในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. สาเหตุของโรครากเน่าสั้ม โดยผลของเชื้อแคลเซียม 10 ชนิดคือ แคลเซียม ซัลเฟต แคลเซียมออกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไนเตรท แคลเซียมอะซิเตต แคลเซียม เพนโทเทเนต แคลเซียมกลูโคเนต แคลเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคาร์บอเนต ใช้ในปริมาณความ เข้มข้นแตกต่างกันคือ 300, 600 และ 1,200 ppm จากผลการทดลองพบว่า สามารถลดการสร้าง zoospore และลดจำนวนเชื้อดังกล่าวในดินได้ แคลเซียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมแกลเตดสามารถ ลดความหนาแน่นของเชื้อที่มีอยู่ในดิน ในขณะที่เชื้อแคลเซียมทุกชนิด ยกเว้นแคลเซียมไนเตรท

แคลเซียมเพนโททีเนต และแคลเซียมกลูโคเนต พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดการติดเชื้อบริเวณรากเมื่อเปรียบเทียบกับคาร์บอวาม

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 (0-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 และมีผลต่อกลไกในการเกิดโรค 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 โดยปลูกในดินที่มีปริมาณออกซิเจน

น้อย พบว่า ออกซิเจนมีผลต่อการเจริญเติบโตในส่วนของรากและลำต้น ซึ่งออกซิเจนน้อยจะเพิ่มโอกาสในการเข้าทำลายโดยเชื้อ *Fusarium solani* และการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค ไม่เกี่ยวข้อง กับอายุของการงอกของเมล็ด 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 และการระบายอากาศจะเป็นปัจจัยในการยับยั้งการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบรากพืช ในดินที่มีการระบายน้ำเลวจะมีแนวโน้มโรคชีวิตและการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคพืชที่อาศัยอยู่ในดิน เช่น *Pythium*, *Phytophthora* และ *Aphanomyces* เช่นเดียวกับเชื้อ *Fusarium* และ *Verticillium* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคเหี่ยวในพืชจะแสดงอาการรุนแรงเมื่อดินมีความชื้นสูงมากกว่าดินแห้ง

Goodall et al. (1962) ได้ทำการเก็บข้อมูลของ วัตถุต้นกำเนิดดิน ชุดดิน ชั้นหน้าตัดดิน และเนื้อดิน ในพื้นที่ปลูกอโวคาโด เมือง Santa Barbara พบการระบาดของโรครากเน่าโคนเน่าในพืชนี้มาก โดยเชื้อสาเหตุของโรค คือ *Phytophthora* sp. พบว่า พื้นที่ที่มีความเสียหายจากโรครากเน่าโคนเน่าที่น้อยที่สุด คือ พื้นที่ที่มีวัตถุต้นกำเนิดเป็นแบบตะกอนน้ำพา ส่วนพื้นที่ที่ได้รับความเสียหายจากโรครากเน่าโคนเน่ามากที่สุด คือ บริเวณลานตะพักลำน้ำ ที่เป็นลักษณะของดินเหนียวอัดเป็นแผ่นแข็ง ส่วนเนื้อดินนั้นมีแนวโน้มว่าเนื้อดินละเอียดจะทำให้เกิดการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่า

Moore *et al.* (1989) ศึกษาการปรับปรุงโครงสร้างดินและการซาบซึมน้ำในสวนผลไม้ พบว่าตำรับการทดลองที่มีการใส่ยิปซัมร่วมกับการปลูกพืชคลุมดิน สามารถปรับสภาพดินให้มีโครงสร้างและมีการซาบซึมน้ำได้ดีที่สุด ซึ่งการปลูกพืชคลุมดินทำให้อุณหภูมิดินลดลงและส่งเสริมกิจกรรมของไส้เดือนที่อาศัยในดิน และในพื้นที่ที่มีการใส่ยิปซัมส่งเสริมให้ดินมีโครงสร้างและมีการซาบซึมน้ำได้ดีขึ้น ซึ่งการใส่ยิปซัมจะลดการฟุ้งกระจายของแร่ดินเหนียว ช่วยลดการเคลื่อนย้ายหรือชะล้างของอนุภาคดินเหนียวไปอุดช่องว่างในดินจะทำให้เป็นอุปสรรคการซาบซึมน้ำ

นุจรินทร์ (2554) กล่าวว่าความแน่นทึบและการอัดตัวแน่นของดินส่งผลกระทบต่อผลผลิตของพืช เช่น การงอกของเมล็ดพืช การเจริญเติบโตและการเจริญของระบบรากและปัญหาการเกิดโรคโคนเน่าในพืชบางชนิด เนื่องจากดินมีสภาพการระบายน้ำและอากาศไม่เพียงพอ ซึ่งยิปซัมสามารถปรับปรุงสภาพดินแน่นทึบของชั้นดินใต้ผิวดินได้ อีกทั้งยังช่วยปรับสภาพเนื้อดินในดินเหนียวให้มีความร่วนซุยเพิ่มมากขึ้น การเคลื่อนที่ของยิปซัมที่ละลายน้ำสามารถแทรกซึมลงไปในดินล่างได้ดีกว่าดินที่ไม่มีการใส่ยิปซัม ทำให้ดินมีความโปร่งพรุนมากขึ้นส่งผลให้น้ำและอากาศสามารถแทรกซึมเข้าไปในดินได้ดีขึ้น นอกจากนี้แคลเซียมเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการ ช่วยในการส่งเสริมการดูดธาตุอาหารของรากและการเจริญเติบโตทางด้านกิ่งก้าน

5.5 ค่าพีเอชของดิน มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเจริญเติบโตและการเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุของโรคพืช เนื่องจากเชื้อสาเหตุแต่ละชนิดนั้นมีความต้องการในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548) แบคทีเรียจะเจริญได้ดี เมื่อค่าพีเอชของดินใกล้เคียงเป็นกลาง เมื่อดินเป็นกรด แบคทีเรียจะทำงานได้ช้าลง ส่วนเชื้อราจะเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียเมื่อในสภาพดินเป็นกรด แม้ว่าจะเป็นค่าพีเอชที่เชื้อราก็สามารถเจริญได้เช่นกัน แต่จะน้อยกว่าแบคทีเรีย

Koike *et al.* (2003) พบว่าพีเอชดินเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลสำคัญต่อการพัฒนาของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช เช่น โรค clubroot ของพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งเป็นโรคที่ทำให้รากโตผิดปกติ 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 ระยะปลูกที่หนาแน่นจนเกินไป และระบบการให้น้ำ ยกตัวอย่างงานวิจัย ดังนี้

Gerlach *et al.* (1997) ศึกษาผลของชนิด ความหลากหลาย และความหนาแน่นของพืชที่มีผลต่อการตายของเมล็ดจากโรครากเน่าที่มีสาเหตุจาก *Armillaria* โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อประเมินอัตราการตายของเมล็ดที่เกิดจากโรครากเน่า การทดลองนี้เป็นการทดลองในระยะยาว เกี่ยวข้องกับความหนาแน่น ชนิดของพืช สมมุติฐานในเบื้องต้นคือ ถ้ามีการลดหรือเพิ่มความหนาแน่นของพืชแล้วจะลดอัตราการตายของเมล็ดได้ พื้นที่ทำการศึกษายู่ในบริเวณ 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 ไม้เนื้อแข็ง 40 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่ที่ 2 ปลูกพืช ตระกูลสน 80 เปอร์เซ็นต์ ไม้เนื้อแข็ง 20 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่ที่ 3 ปลูกพืช ตระกูลสน 30 เปอร์เซ็นต์ ไม้เนื้อแข็ง 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้น 6 เดือน จึงเก็บต้นพืชที่แสดงอาการรากเน่าไปตรวจสอบพบว่า ชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าคือ *Armillaria ostoyae* นอกจากนี้ในพื้นที่ที่ปลูกพืชทั้ง 10 ชนิดร่วมกัน พบการตายของ Balsam fir มากที่สุด และ Red oak น้อยที่สุด ส่วนระยะการปลูกซึ่งส่งเสริมการระบาดของโรคคือ ระยะที่ 0.25 เมตร เนื่องจากพืชมีอัตราการตายสูงสุด และผลการทดลองสุดท้ายเกี่ยวกับ อัตราส่วนและชนิดของพืช พบว่าพื้นที่ที่มีอัตราส่วนของพืชตระกูลสนมากนั้นจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Armillaria* มากกว่าพืชตระกูลไม้เนื้อแข็ง

Mohammadi (2011) ศึกษากิจกรรมและมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ดิน ซึ่งมีอิทธิพลจากการไถพรวนและการใส่ปุ๋ยจากผลผลิตของข้าวสาลีพบว่า การใส่ปุ๋ยคอก ปุ๋ยพืชสดร่วมกับปุ๋ยเคมีสามารถเพิ่มมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ดินได้สูงสุด และพื้นที่ที่มีการไถพรวนแบบน้อยที่สุด (minimum tillage) ส่งผลให้ข้าวสาลีให้ผลผลิตสูงสุด เนื่องจากจุลินทรีย์ดินจะมีความสัมพันธ์กับสุขภาพดิน (soil health) ระบบการไถพรวนและพันธุ์พืชส่งผลอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติต่อผลผลิต ซึ่งระบบการไถพรวนน้อยที่สุด ทำให้ข้าวสาลีให้ผลผลิตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับระบบการไถพรวนแบบดั้งเดิม (conventional tillage) และ ไม่ไถพรวน (non-tillage) ในการไถพรวนแบบดั้งเดิมนั้น ทำให้ผลผลิตของข้าวสาลิลดลง 8 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับระบบการไถพรวนแบบ น้อยที่สุด เนื่องจากการไถพรวนแบบดั้งเดิม ทำให้ความชื้นในดินลดลงจึงไม่แนะนำให้ใช้ในพื้นที่เพาะปลูกที่มีอากาศแห้งและยังส่งผลให้ดินมีการอัดตัวแน่นขึ้น จำกัดการเจริญของรากพืช เป็นสาเหตุให้ผลผลิตลดลงในเวลาต่อมา

6. เทคนิคการคัดแยกจุลินทรีย์ดิน

จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดินนั้น สามารถแบ่งได้ออกเป็น 6 ชนิด คือ แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซีท โปรโตซัว สาหร่าย และไวรัส การแยกเชื้อจุลินทรีย์ออกจากดิน และส่วนรากของพืชสามารถทำได้ง่ายโดยวิธีคัดแยก เป็นเทคนิคการทำให้เชื้อหรือตัวอย่างเจือจางลงด้วยน้ำหรือน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและทราบปริมาณที่แน่นอน การทำให้เชื้อเจือจาง เพื่อให้มีการเจริญของโคโลนีเดี่ยวของจุลินทรีย์จำนวนที่เหมาะสม (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2547) นอกจากนี้ยังมีการใช้ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกคือ คุณสมบัติความต้องการอาหาร ความต้องการทางด้านกายภาพ ลักษณะการเจริญบนอาหารที่เพาะเลี้ยง คุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา 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 ระหว่างพันธุ์แก้วสตึกและพันธุ์จากนครราชสีมา 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 หนั้วว ถั่วฝักยาว มะเขือเทศ ส้มเขียวหวาน เชื้อราจากน้ำในสวนส้มเขียวหวาน และพริกไทย กลุ่มเชื้อราจากลองกอง ลางสาด และวานิลลา เชื้อราจากเผือกและต้นแพงพวย ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อราที่ได้จากพืชอื่นๆ มาก ส่วนวิธี AFLP สามารถจัดกลุ่มเชื้อรา ออกได้ 3 กลุ่มตามลำดับวิวัฒนาการ คือกลุ่มเชื้อราจากทุเรียนและหนั้วว กลุ่มเชื้อราจากพริกไทย มะเขือเทศ ถั่วฝักยาว และส้มเขียวหวาน กลุ่มเชื้อราจากวานิลลา มะเขือเทศ ลองกอง และลางสาด ส่วนเชื้อราจากเผือก แพงพวยไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Phytophthora* sp. จากเผือกและแพงพวยมีความแตกต่างในระดับโมเลกุลกับเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคไม้ผลอื่นๆ

Wingfield *et al.* (2003) ศึกษาเกี่ยวกับการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจำแนกเชื้อ *Armillaria* ในประเทศชิลี อินโดนีเซียและมาเลเซีย โดยใช้วิธีการจำแนกจาก basidiocarp เป็น *Armillaria novae-zelandiae* และ *Armillaria limonea* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศชิลีและอาร์เจนตินา โดยการจำแนกจะใช้การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับ internal transcribed spacer (ITS) จากฐานข้อมูลที่เคยจำแนกไว้แล้วจาก GenBank ประเมินความสัมพันธ์ของแผนผัง

วิวัฒนาการ 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 ซ่อนปลูก
5. จานสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์
6. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
7. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
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

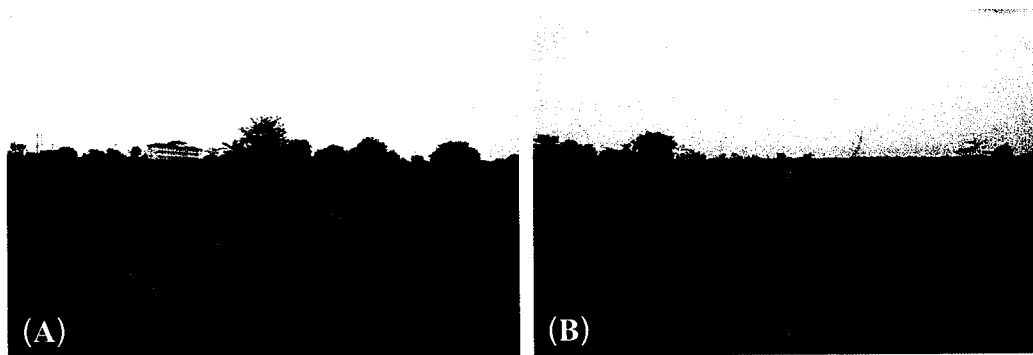
1.1 การเก็บตัวอย่างดินในภาคสนาม

สุ่มเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่แปลงปลูกหม่อนซึ่งเกิดปัญหาโรครากเน่า บริเวณแปลงทดลองหม่อนของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม (ภาพที่1) วางแผนการทดลองแบบ 2x8 Factorial in Randomized Complete Block Design (RCB) จำนวน 3 ซ้ำ มี 2 ปัจจัยดังนี้ ปัจจัยแรก

ประกอบด้วยการไถระเบิดและไม่ไถระเบิดดินดาน ปัจจัยที่สองประกอบด้วย การใส่ไม่คอร์ไรซา ร่วมกับการใส่ยิปซัม ได้แก่

- ดำเนินการทดลองที่ 1 ไม่ใส่ไม่คอร์ไรซา ไม่ใส่ยิปซัม
 - ดำเนินการทดลองที่ 2 ไม่ใส่ไม่คอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่
 - ดำเนินการทดลองที่ 3 ไม่ใส่ไม่คอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่
 - ดำเนินการทดลองที่ 4 ไม่ใส่ไม่คอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่
 - ดำเนินการทดลองที่ 5 ใส่ไม่คอร์ไรซา ไม่ใส่ยิปซัม
 - ดำเนินการทดลองที่ 6 ใส่ไม่คอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่
 - ดำเนินการทดลองที่ 7 ใส่ไม่คอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่
 - ดำเนินการทดลองที่ 8 ใส่ไม่คอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่
- มี 8 ดำเนินการทดลอง และมีหน่วยการทดลองทั้งหมด 48 แปลง

โดยมีจุดเก็บตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดินนอกพื้นที่แปลงปลูกหม่อน ตัวอย่างดินรอบโคน ต้นหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่ ทั้งที่เกิดโรครากเน่าและไม่เกิดโรครากเน่า และ ตัวอย่างดินบริเวณรากของต้นหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (บร. 60) และพันธุ์คุณไผ่ที่ไม่เกิดโรครากเน่า (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 ลักษณะดินหม่อนบริเวณส่วนเหนือดิน (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

เชื้อราเจริญอยู่ เพื่อให้แอลกอฮอล์กระจายเข้าสู่เส้นใยรา ก่อนที่แอลกอฮอล์จะแห้ง นำกระจกปิดสไลด์ วางบนน้ำยา lactophenol ซึ่งหยดอยู่ตรงกลางสไลด์แผ่นใหม่ ที่สไลด์แผ่นเดิมเขียนขึ้นวันที่หยดแอลกอฮอล์ 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 ขูดโคลนเชื้อให้ละลายร่วมกับสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นดูใส่หลอดขนาด 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 ปลอ่ยให้ส่วนที่เหลือ (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 เก็บสารละลายใสไว้แล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ผสมด้วย phenol: chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาณที่เท่ากัน และเหวี่ยงด้วยความเร็ว

แบคทีเรีย และอาหาร rose bengal agar (RB) ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเชื้อรา โดยดำเนินการในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นบ่มอาหารที่ spread plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน แล้วนำแบคทีเรียและเชื้อราที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อไปเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ โดยแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร NA ส่วน เชื้อราเลี้ยงในอาหาร RB เพื่อใช้เป็นเชื้อต้นแบบ การแยกแบคทีเรียและเชื้อราให้บริสุทธิ์ในสภาพปลอดเชื้อ 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 แล้วจึงกรีดตัดวุ้นอาหาร RB ให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจตุรัสใช้ปากคีบ คีบแท่งหลอดวางบนจานเพาะเชื้อ และใช้ปากคีบ คีบสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์เผาไฟ วางบนแท่งหลอดวางในจานเพาะเชื้อใช้คัตเตอร์ยกชิ้นวุ้น ซึ่งตัดเป็นสี่เหลี่ยมจตุรัสมาวางบนกลางสไลด์ในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำเชื้อราเดี่ยวที่คัดแยกไว้จากข้อ 1.2 มาแต่ละที่ตรงส่วนผิวหน้าทั้ง 4 ด้านของชิ้นวุ้นนำ กระจกปิดสไลด์ จุ่มแอลกอฮอล์ และเผาไฟแล้ว ปิดบนชิ้นวุ้นที่ปลูกเชื้อไว้แล้วหยดน้ำกลั่นลงให้ชุ่มนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งได้เส้นใยของราเจริญจนถึงขอบของกระจกปิดสไลด์ หลังจากบ่มจนเชื้อราเจริญดีแล้ว มาทำสไลด์กึ่งถาวร โดยยกกระจกปิดสไลด์ หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไปที่ตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ด้านใน ซึ่งมีเส้นใย

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 เทส่วนสารละลายที่ทิ้งและปล่อยให้ส่วนตะกอน (DNA) แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที แล้วละลาย DNA ที่ได้จาก TE buffer 20 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 หรือ -20 องศาเซลเซียส

ส่วนเชื้อรา น้ำ suspension ของเชื้อราที่เตรียมไว้ข้างต้น เติมสารสกัดเซลล์ ประกอบด้วย (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 ดูดสารละลายให้หมดใหม่ เติม isopropanol เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันเบาๆ นำไปปั่นที่ -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 ดูดสารละลายให้หมดใหม่ 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 เทสารละลายที่ทิ้ง 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 ปฏิกริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา 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 ปฏิกริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา 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) เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างตัวอย่างขึ้นดีเอ็นเอของแบคทีเรียและเชื้อราในแต่ละตัวอย่างโดยอาศัยการทำงานเอนไซม์ตัดจำเพาะ 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 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 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) 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

1.5 การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียและเชื้อรา โดยวิธีการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequencing)

นำลำดับเบสของดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์ที่ Macrogen Ltd. ประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated sequencer) รุ่น ABI3730XL ในการวิเคราะห์ จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ในฐานข้อมูลของ 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

ศึกษาโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการเปรียบเทียบกลุ่มประชากรจุลินทรีย์โดยพิจารณาความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากลักษณะ โครงสร้างประชากรจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินในบริเวณ (1) ดินนอกพื้นที่แปลงปลูกหม่อน (2) ตัวอย่างดินรอบโคนต้นหม่อนที่ไม่เกิดโรค และ (3) ตัวอย่างดินรอบโคนและดินบริเวณรากต้นหม่อนที่เกิดโรครากเน่า เพื่อศึกษาเชื้อที่มีลักษณะเด่น (dominant) สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการบ่งชี้ถึงการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ดินที่เข้าทำลายบริเวณรากหม่อนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) มีขั้นตอน ดังนี้

2.1.1 การสกัดสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน โดยนำตัวอย่างดินรอบโคนต้นหม่อนที่ไม่เกิดโรค ตัวอย่างดินรอบโคนและ ดินบริเวณรากต้นหม่อนที่เกิดโรค มาสกัดสาร

พันธุกรรม 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 เทส่วนสารละลายใสทิ้ง 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 เเข้มข้น 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 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 ปล่อยให้ส่วนที่เหลือนั้น (DNA) แห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที แล้วละลาย DNA ที่ได้จาก TE buffer 360 ไมโครลิตร และผสมด้วย 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 เก็บสารละลายใสไว้แล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ผสมด้วย phenol: chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาณที่เท่ากัน และเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำสารละลายใสที่ได้ผสมด้วย isopropanol ในปริมาณที่เท่ากันกับสารละลายใส และเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที แล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol 1 มิลลิลิตร และเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนสารละลายใสทิ้งและปล่อยให้ส่วนตะกอน (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 ที่ได้จากข้างต้นเป็นต้นแบบสารพันธุกรรมโดย นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 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 กรดฮิวมิก 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} เพื่อประเมินความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอเทียบกับโปรตีนและกรดฮิวมิก 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 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (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 extention 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 ยูนิตต่อไมโครลิตร) (Bioscience; Taiwan) 3.3 ไมโครลิตรผสมลงในหลอด eppendorf ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปฏิกริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา 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 การตรวจสอบคุณภาพ ผลิตภัณฑ์ 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 ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวแล้วดึงออกจากนั้นก็นำ 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 แล้วตรวจสอบเจลภายใต้แสง 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 ใช้ ผลิตภัณฑ์ PCR หยอดลงไป แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า ที่มีศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 420 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมสีด้วย SYBR green I nucleic

acid gel stain ที่เจือจาง 1:10,000 และนำเจลมาแช่ในสารละลาย 1xTAE buffer เพื่อล้างสีส่วนเกิน นาน 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 ตัดแถบชั้นดีเอ็นเอที่มีลักษณะเด่นซึ่งคาดว่าจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรครากเน่าในหม่อนทุกแถบ โดยใช้หลอดดูดตัวอย่างขนาดเล็ก (microtip) ที่ฆ่าเชื้อแล้วมาตัด 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 Qaulity One และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากความเข้มของลายพิมพ์และการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อราในพื้นที่ที่มีการจัดการแตกต่างกัน ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows เพื่อทราบถึงกลุ่มจุลินทรีย์ที่แทนด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับการจัดการดินแบบต่างๆ จากนั้นทำการส่งตัวอย่างดีเอ็นเอดังกล่าวไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ

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

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 DNA

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 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 ไมโครลิตร และ 10x template DNA (0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ปฏิบัติการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ทำที่ initiation denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extention 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 ปฏิบัติการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา 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 และน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อ (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 จึง บ่มในน้ำแข็งนาน 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 ส่วนเชื้อที่ไม่มีการโคลนหรือ ไม่มี insert gene จะเกิดโคโลนีเป็นสีฟ้า (QIAGEN, 2001)

2.3.3 เพิ่มปริมาณ insert gene ด้วย วิธี PCR โดยใช้ M 13 F และ R primer เพื่อเพิ่ม ปริมาณชิ้นส่วนของ DNA หรือ insert gene ที่ vector ได้รับมาจากการโคลนนิ่ง นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์หาความหลากหลายต่อไป ขั้นตอนการทำ PCR คือ ใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วไปจิ้ม เชื้อที่มีโคโลนีสีขาว (มี insert gene) ไม้จิ้มฟัน 1 อันต่อ 1 โคโลนี แล้วนำไปจุ่มลงในหลอด PCR ที่ บรรจุ pre-mixture หลอดละ 20 ไมโครลิตร โดยที่เตรียม pre-mixture 1,000 ไมโครลิตร จากการ ผสม น้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อ 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 เท่ากับจำนวนโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหารปฏิกิริยา สังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา 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 จากการผสมน้ำกลั่นมาเชื้อ 4.15 ไมโครลิตร และ 10x K buffer 0.65 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตรต่อหลอด และผสมให้เข้ากันด้วยปิเปต แล้วเติมผลิตภัณฑ์ PCR จาก stock ตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร ลงในหลอด ปิดฝาและนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารผสมที่ได้มาหลอดละ 4 ไมโครลิตร ผสมกับ pre-mixture ที่เตรียมจากการผสมน้ำกลั่นมาเชื้อ 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 จากนั้นบดและร่อนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หองค์ประกอบ

สมบัติและปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญ 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 ใช้กระบอกลูกบาศก์เซนติเมตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้กระดากกรองปิดบริเวณก้นกระบอกลูกบาศก์เซนติเมตรบริเวณที่ต้องการวัด จากนั้นรดด้วยยางรัด นำไปแช่น้ำที่มีความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เป็นเวลา 1 คืนหรือจนกระทั่งดินอิ่มตัวด้วยน้ำทั้งหมด นำกระดากกรองออก ทำความสะอาดบริเวณรอบกระบอกลูกบาศก์เซนติเมตร ปิดด้วยตะแกรงรองแล้วรองด้วยถาดรองอีกครั้ง เปิดฝาปิดกระบอกลูกบาศก์เซนติเมตรด้านบนออก สวมยางที่เชื่อมต่อระหว่างกระบอกลูกบาศก์เซนติเมตรกับท่อวัดระดับน้ำเข้าด้วยกัน และเตรียมภาชนะสำหรับรองน้ำที่ระบายออกมา เทน้ำลงในท่อวัดน้ำจนระดับสูงกว่าขีดบนของท่อ เริ่มจับเวลาบันทึกเมื่อน้ำผ่านขีดบน และบันทึกเวลาเมื่อ

ระดับน้ำผ่านซึดล่าง คำนวณเวลาที่น้ำใช้ในการเคลื่อนที่จากระดับซึดบนจนถึงซึดล่าง 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 = พื้นที่หน้าตัดของกระบอกเก็บตัวอย่างดิน
 L = ความยาวของกระบอกเก็บตัวอย่างดิน
 H_1 = ความสูงระดับน้ำซึดบน
 H_2 = ความสูงระดับน้ำซึดล่าง
 t = เวลาที่น้ำใช้เคลื่อนที่ระดับซึดบนจนถึงซึดล่าง (S)

การวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่

2.4.4 วิเคราะห์ค่าพีเอช โดยชั่งดินตัวอย่างกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ในกระบอกพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนดินและน้ำให้ละลายเข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ในระหว่างนี้ให้คนดินเป็นครั้งคราว เมื่อครบ 30 นาที นำไปวัดด้วย pH meter (Peech, 1965)

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

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

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

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 (ทศนีย์ และจรงค์ 2542) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ digestion และ distillation

Digestion คือ การย่อยตัวอย่างดิน (ผ่านตระแกรงร่อนขนาด 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) ร้อยละอินทรียวัตถุในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน 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

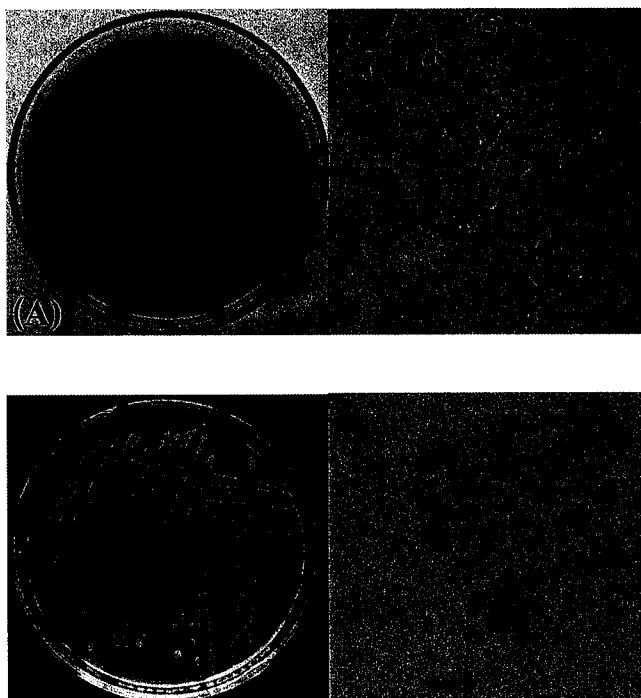
ตารางที่ 3 สมบัติทางกายภาพและเคมีบางประการก่อนและหลังทำการทดลองของตัวอย่างดิน
แปลงทดลองปลูกหม่อน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม

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

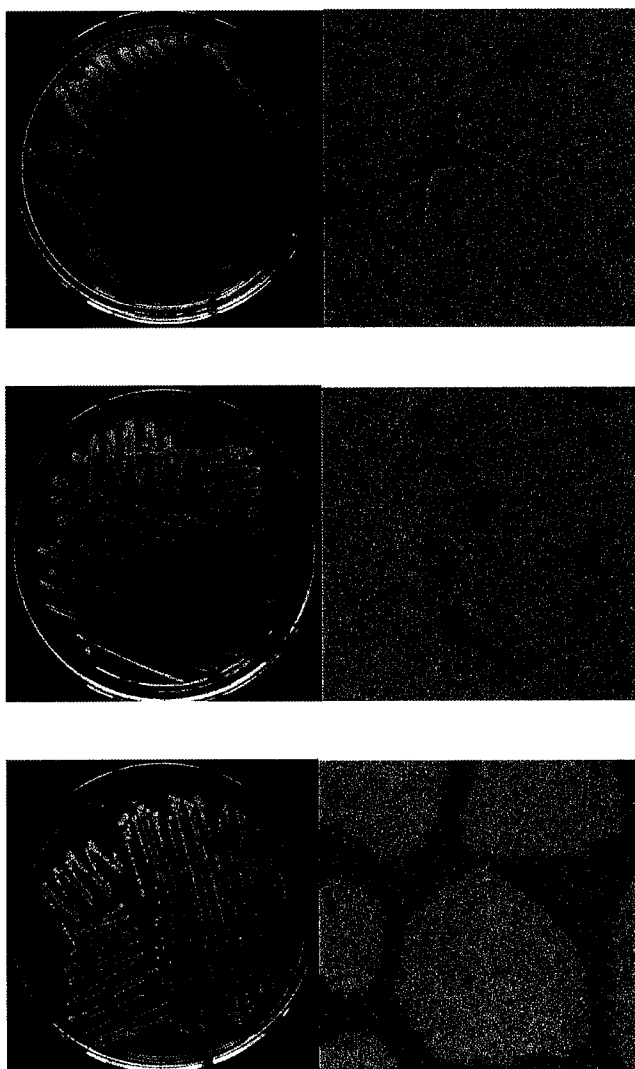
- หมายเหตุ**
- ^{1/} Pipette method (Kilmer and Alexander, 1949; Day, 1965)
 - ^{2/} pH meter (soil : water; 1:1) (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2548)
 - ^{3/} Electric conductometer (Richards, 1954)
 - ^{4/} Walkley and Black method (Walkley and Black, 1934)
 - ^{5/} Kjeldahl method (ทัศนีย์และจรงค์, 2542)
 - ^{6/} Bray II method (Bray and Kurtz, 1945)
 - ^{7/} Ammonium acetate method (Pratt, 1965)
 - ^{8/} Core method (Blake, 1965)
 - ^{9/} Falling Head Method (Klute, 1965)

2. การแยกจุลินทรีย์ และคัดเลือกจุลินทรีย์บริเวณรากหม่อน

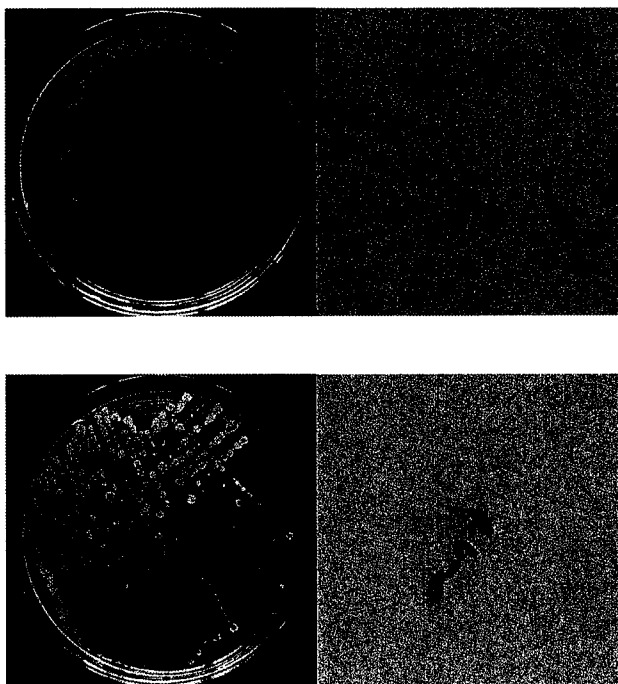
การแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณแปลงทดลองปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่า ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม ใช้เทคนิคการคัดแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและย้อมสีแบบแกรมโดยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ในพื้นที่ที่มีการปลูกหม่อนบริเวณที่เป็นโรครากเน่า พบแบคทีเรีย 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)



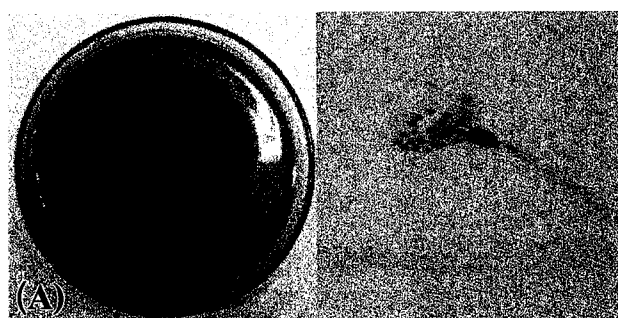
ภาพที่ 3 แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่ามี คือ *Bacillus megaterium* (A), *Bacillus subtilis* (B), *Bacillus cereus* (C), *Acinetobacter* sp. (D), *Klebsiella pneumonia* (E), *Enterobacter* sp. (F) และ *Cronobacter sakazakii* (G) ตามลำดับ



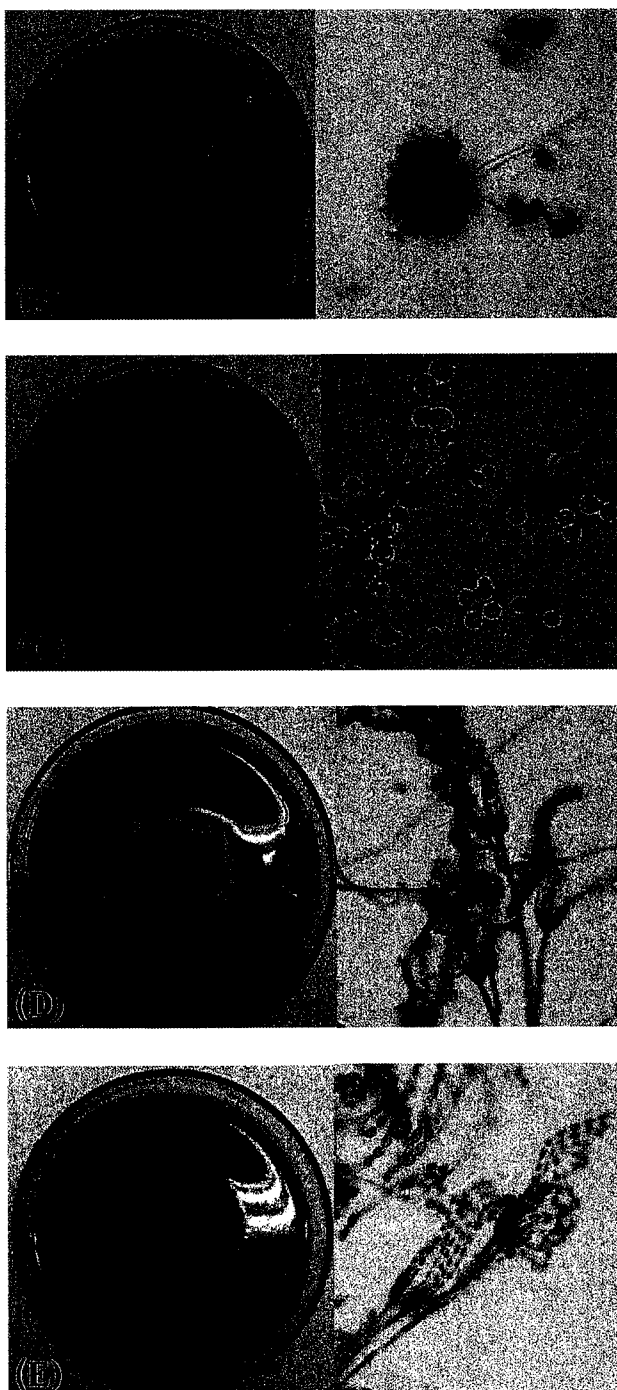
ภาพที่ 3 แบคทีเรียที่คัดแยกได้ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่า คือ *Bacillus megaterium* (A), *Bacillus subtilis* (B), *Bacillus cereus* (C), *Acinetobacter* sp. (D), *Klebsiella pneumonia* (E), *Enterobacter* sp. (F) และ *Cronobacter sakazakii* (G) ตามลำดับ (ต่อ)



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

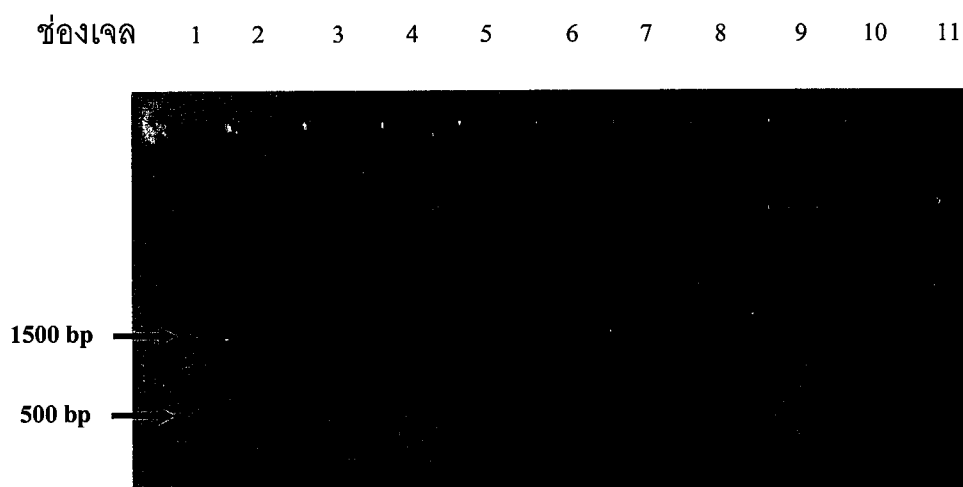


ภาพที่ 4 เชื้อราที่คัดแยกได้ในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรครากเน่า คือ *Aspergillus niger* (A), *Aspergillus terreus* (B), *Fusarium solani* (C), *Penicillium* sp. (D), *Aspergillus candidus* (E) และ *Emercilla nidulans* (F) ตามลำดับ (ต่อ)

3. การศึกษาโดยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

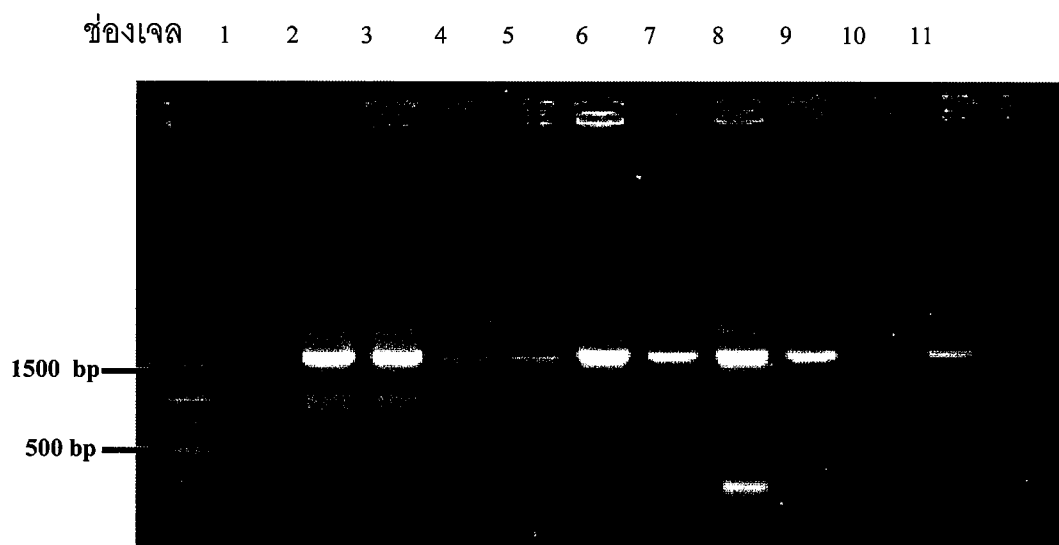
3.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อรา โดยใช้ส่วนของ ยีน 16S และ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ

เปรียบเทียบกลุ่มประชากรแบคทีเรียและเชื้อรา และความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียและเชื้อรา จากบริเวณรากหม่อน พันธุ์บุรีรัมย์ 60 และหม่อนพันธุ์คุณไพบที่เป็นโรคและไม่เป็นโรครากเน่า เพื่อศึกษาเชื้อที่มีลักษณะเด่น ผลการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อราและแบคทีเรียโดยวิธีของ Zhou *et al.* (1995) จากตัวอย่างดิน แสดงในภาพที่ 5 พบว่าขนาดของจีนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 10,000 bp

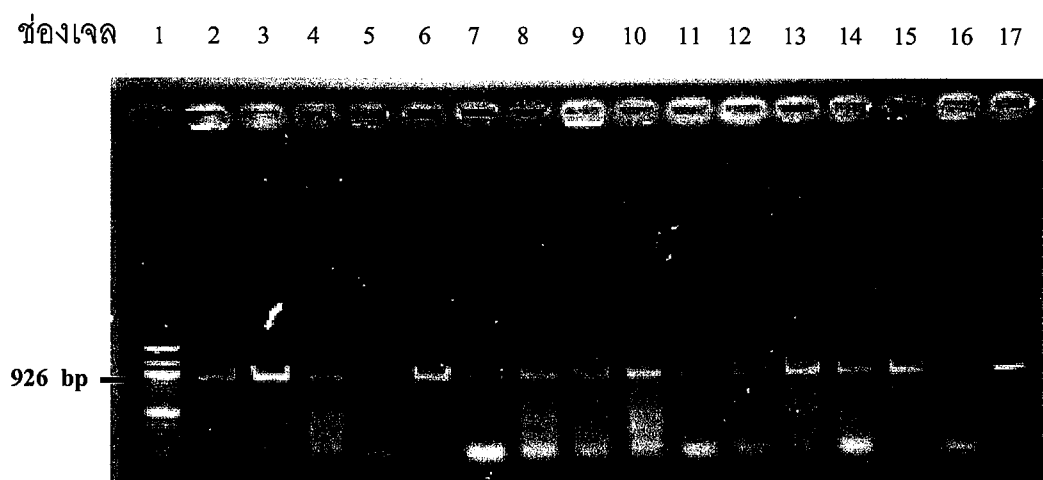


ภาพที่ 5 ผลการสกัดสารพันธุกรรมจุลินทรีย์จากตัวอย่างดิน ช่องเจลที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ช่องเจลที่ 2-11 คือ ตัวอย่างดินในพื้นที่บริเวณปลูกหม่อน

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



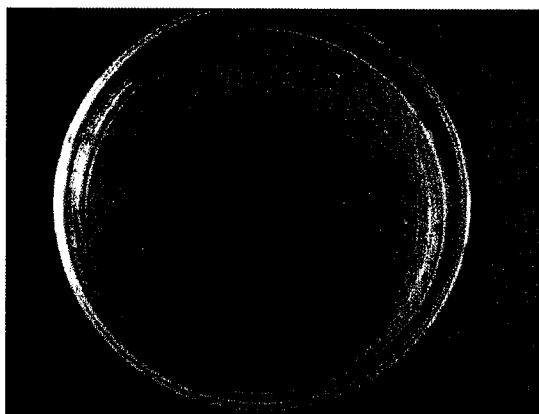
ภาพที่ 6 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 16S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ จากตัวอย่างดิน ช่องเจลที่ 1 คือ ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Tridye 100 bp; NEB Biolab) ช่องเจลที่ 2-11 คือ ตัวอย่างดิน ในพื้นที่บริเวณปลูกหม่อน



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)

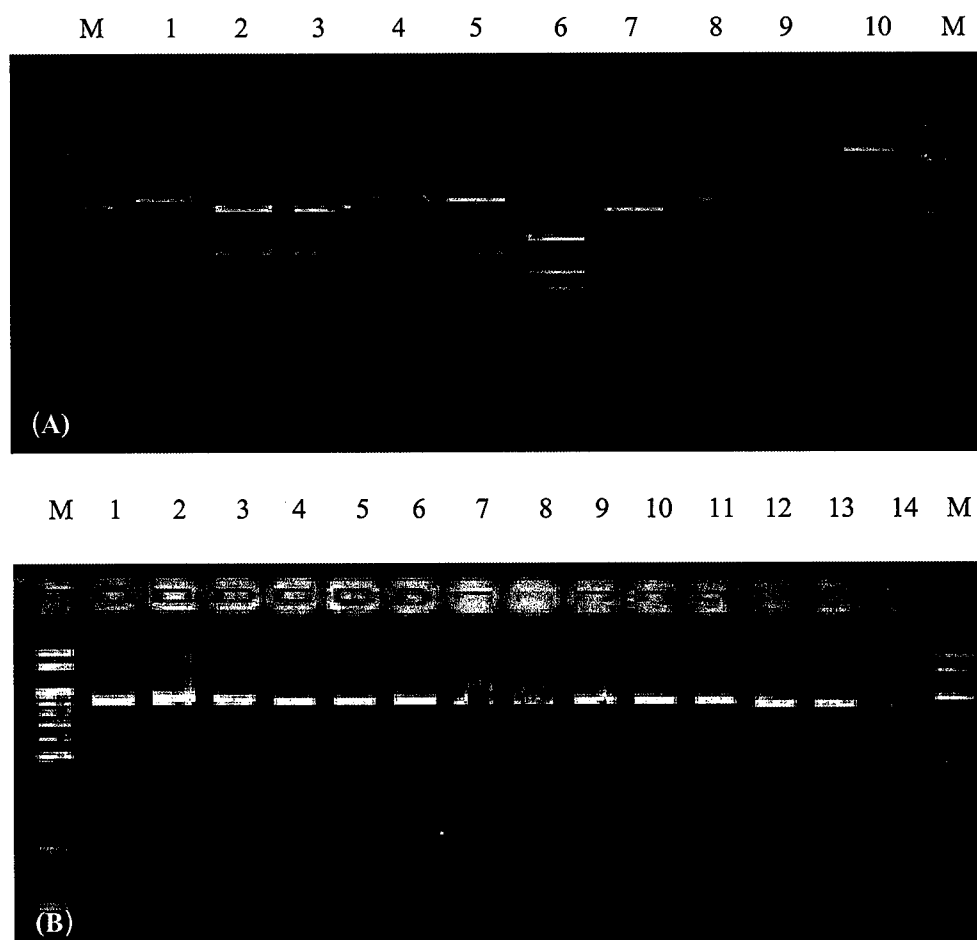
ศึกษาและเปรียบเทียบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ด้วยเทคนิคโคลนนิ่ง เพื่อแยกดีเอ็นเอของแบคทีเรียหลายชนิดที่ปะปนกันอยู่ออกจากกัน ในลักษณะดีเอ็นเอเดี่ยวของแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิค blue-white screening ตรวจสอบโคโลนีที่มี insert gene ซึ่งโคโลนีที่สีขาว คือมี insert gene ส่วนโคโลนีสีฟ้าคือไม่มี 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 และบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 50 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 59 โคลน ตัวอย่างดินบริเวณราก ปลูกหม่อนพันธุ์คุณไพ เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 15 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 18 โคลน และบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 116 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 146 โคลน ส่วนอื่นของ 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ในแต่ละตัวอย่างดินมีจำนวน insert gene ดังนี้ ตัวอย่างดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 เป็นโรครากเน่า มี insert gene ทั้งหมด 18 โคลน จากจำนวนโคลนทั้งหมด 80 โคลน ตัวอย่างดินบริเวณรากและบริเวณไม่เป็นโรครากเน่า 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

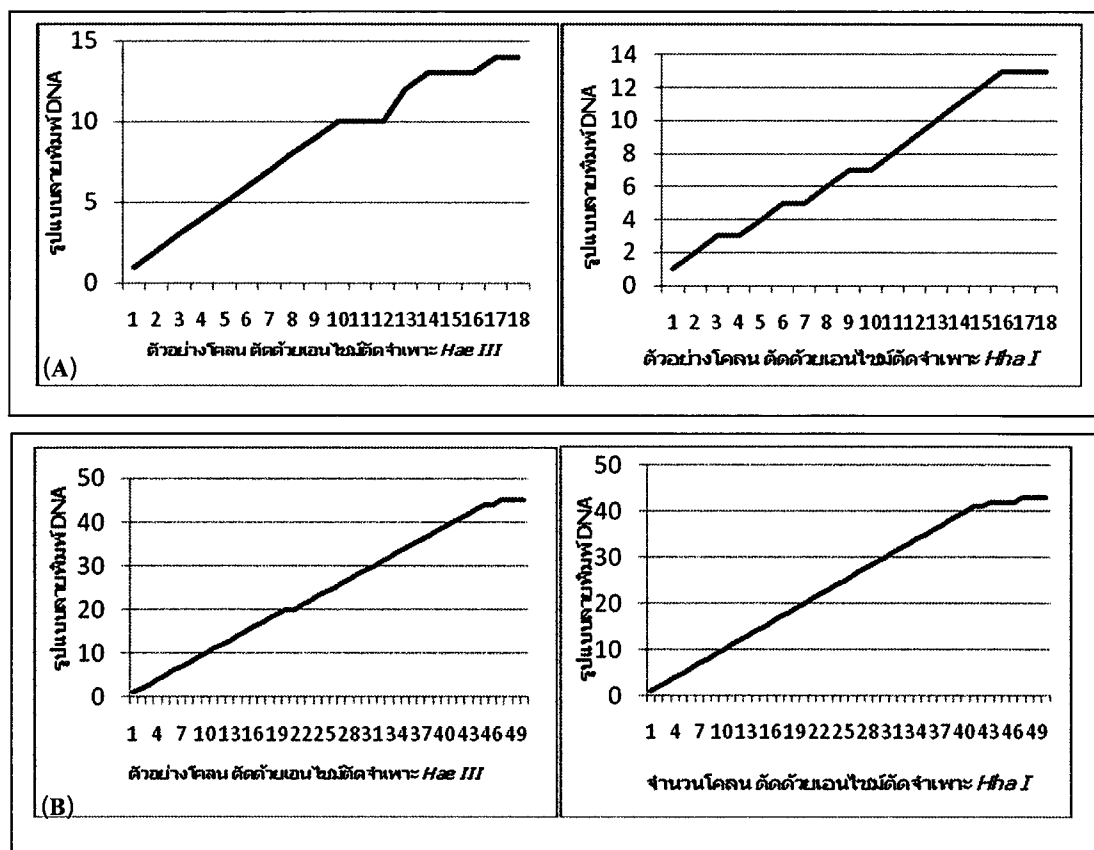
PCR ที่ได้จากการโคลนที่มี insert gene มาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hae* III ดังแสดงผลในภาพที่ 9



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) เหมือนพันธุ์กรรม 60 ที่ไม่เป็นโรครากเน่าและที่เป็นโรครากเน่ามาเปรียบเทียบ พบว่าเหมือนที่เป็นโรครากเน่ามีจำนวนโคลนที่มี insert gene และรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยกว่าเหมือนที่ไม่เป็นโรครากเน่า ส่วนการเปรียบเทียบรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากตัวอย่างของเหมือนพันธุ์คุณไพที่เป็นโรคและไม่เป็นโรครากเน่า พบว่ามีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏมีลักษณะแตกต่างกัน แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของแบคทีเรียที่เข้าอาศัยในบริเวณรากเหมือนที่เป็นโรครากเน่า และไม่เป็นโรค

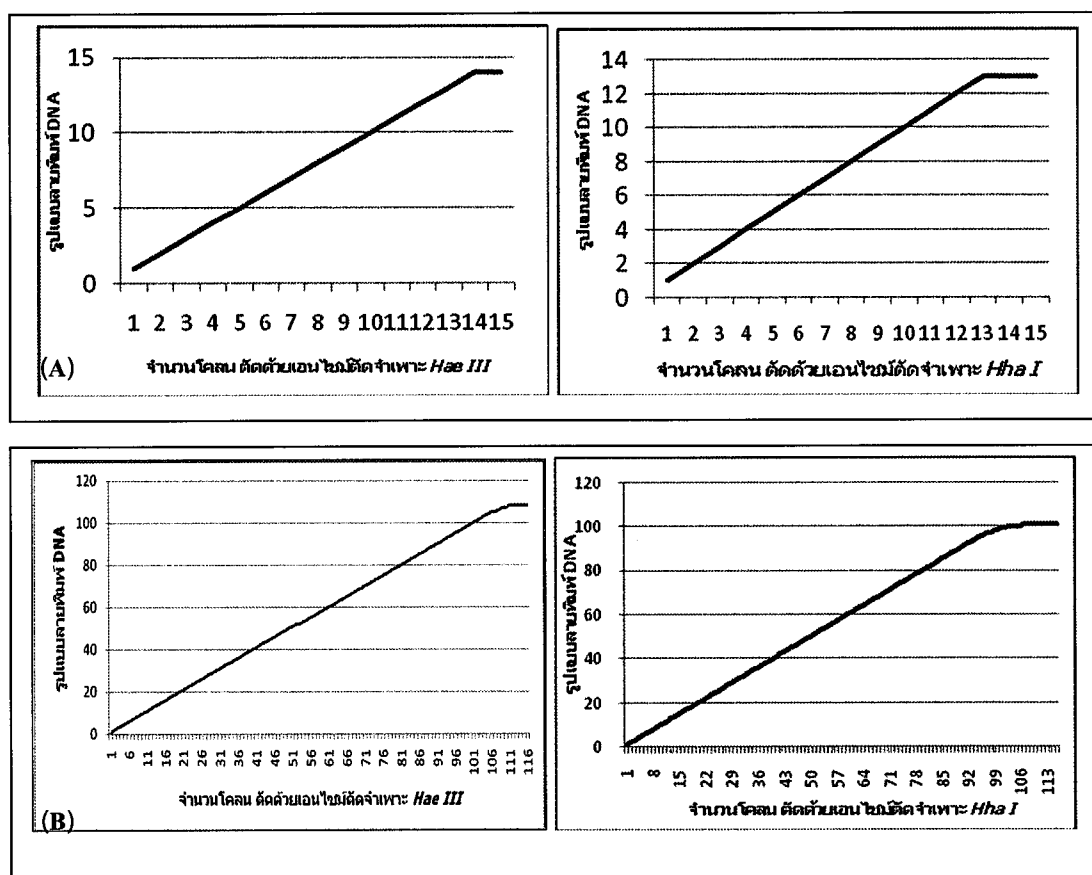
รากเน่ามีความแตกต่างกัน อีกทั้งยังพบว่าหม่อนที่เป็นโรครากเน่า มีจำนวนโคลนที่มี insert gene และรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ น้อยกว่าตัวอย่างรากหม่อนที่ไม่เป็นโรครากเน่า เนื่องจากหม่อนทั้ง 2 พันธุ์ มีการผลิตสารบริเวณขั้วราก (root exudate) ที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันส่งผลให้มีจุลินทรีย์อาศัยแตกต่างกัน (Nannipieri *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 สามารถจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียได้ 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 ความสัมพันธ์ระหว่างโคลนและรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากชิ้นส่วนอื่น 16S ไรโบโซมอลาร์เอ็นเอ 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 ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 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 และพันธุ์คุณไฟ

Code	Accession No.	Closet 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 ดินบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า			
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	GU25814.1	<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	AB519063.1	<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.	Closet match from BLASTN	Identify
หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากไม่เป็นโรครากเน่า			
P36	FJ551948.1	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%
หม่อนพันธุ์อุบลฯ 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%
หม่อนพันธุ์อุบลฯ 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
หม่อนพันธุ์อุณโพิ 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.	Closet match from BLASTN	Identify
หม่อนพันธุ์อุณไพ 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	GQ181035.1	<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.	Closet match from BLASTN	Identify
หม่อนพันธุ์คุณไฟ ดินบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า			
P157	EF220719.1	Uncultured Actinobacterium, clone FI-2M_G08	72%
P99	GU195887.1	Uncultured Actinobacterium, clone P2C12	82%
P102	AJ232961.1	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	DQ234232.1	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	AY038527.1	Uncultured Cyanobacterium 16S rRNA gene, partial sequence	82%
P66	AY542755.1	Uncultured Cyanobacterium, clone OS009	91%
P91	AY542756.1	Uncultured Cyanobacterium, clone OS009	85%
P67	AJ579904.1	Uncultured Cyanobacterium , clone DUB10	81%

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Code	Accession No.	Closet 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	GU300182.1	Uncultured Myxococcales bacterium, clone PSB011.C21_N12	88%
P228	FJ552362.1	Uncultured Myxococcales bacterium, clone LTSP_BACT_P6B15	83%

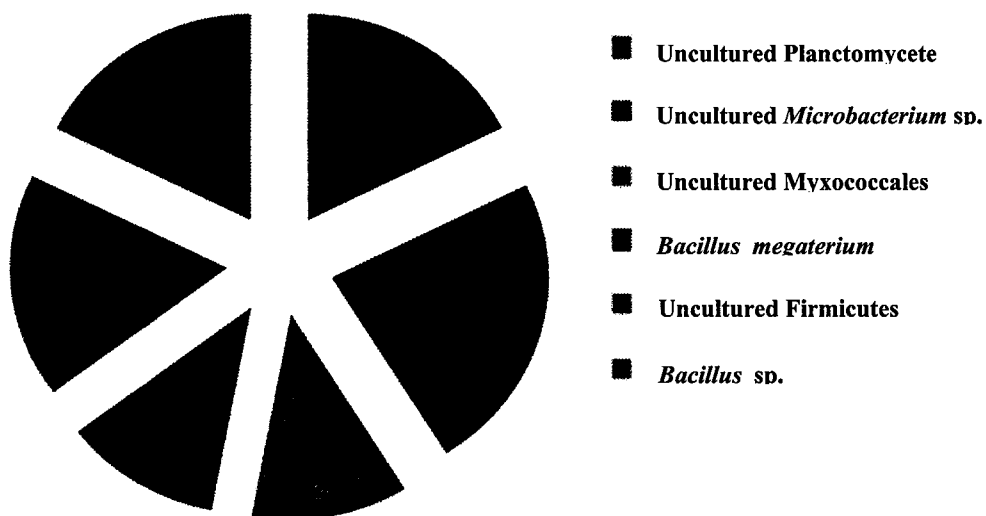
ตารางที่ 4 (ต่อ)

Code	Accession No.	Closest 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

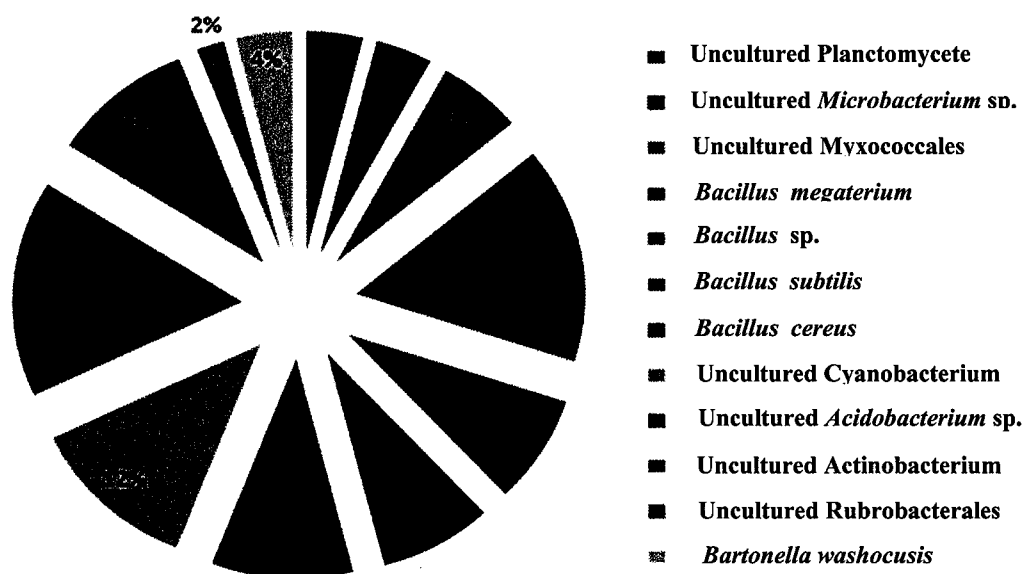
(A) ร้อยละและชนิดของแบคทีเรีย หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60

ในพื้นที่เป็นโรครากเน่า



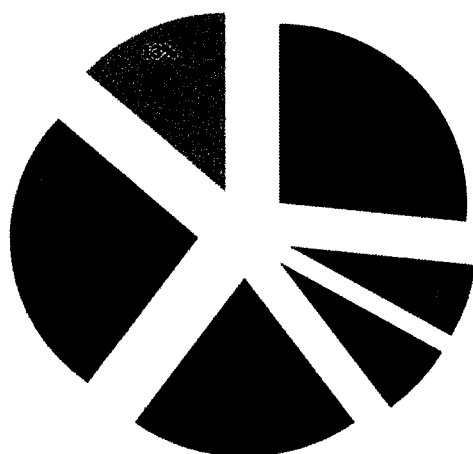
(B) ร้อยละและชนิดของแบคทีเรีย หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60

ในพื้นที่ไม่เป็นโรครากเน่า



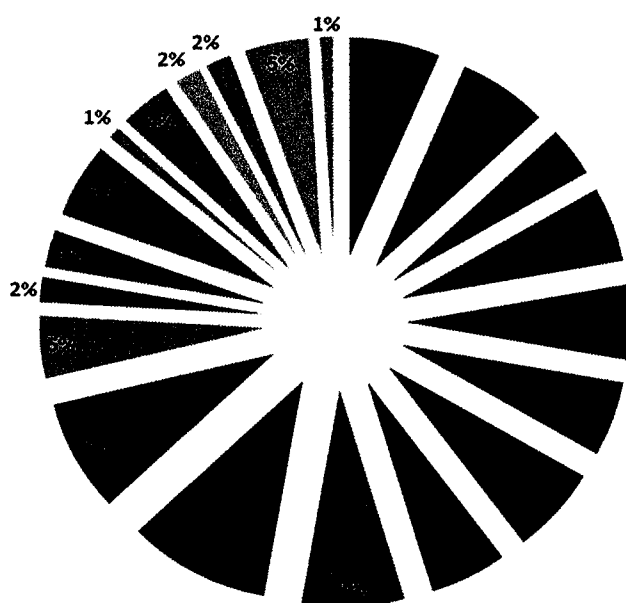
ภาพที่ 12 เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของแบคทีเรียในหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 จากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B)

(A) ร้อยละและชนิดของแบคทีเรีย หม่อนพันธุ์ คุณไฟ ในพื้นที่เป็นโรครากเน่า



- Uncultured *Microbacterium* sp.
- Uncultured Myxococcales
- *Bacillus megaterium*
- Uncultured Firmicutes
- *Bacillus* sp.
- Uncultured Actinobacterium
- Uncultured Peptococcaceae

(B) ร้อยละและชนิดของแบคทีเรีย หม่อนพันธุ์ คุณไฟ ในพื้นที่ไม่เป็นโรครากเน่า

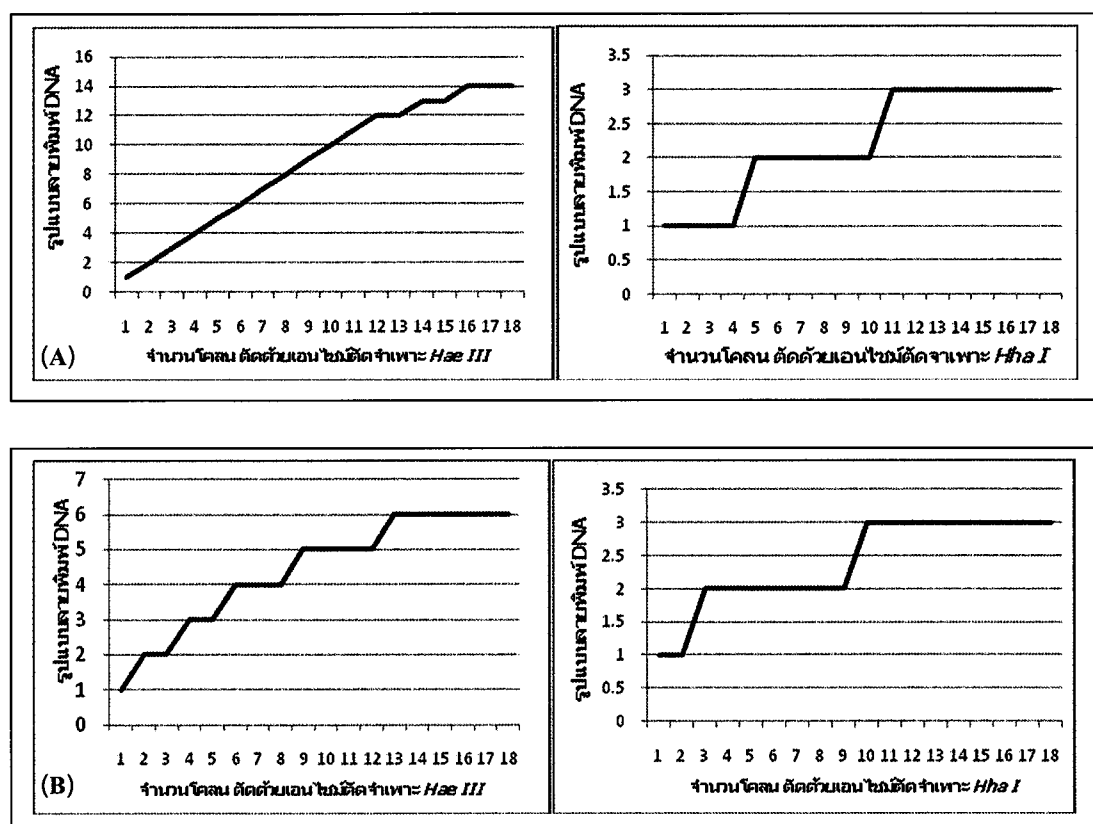


- Uncultured Planctomycete
- Uncultured *Microbacterium* sp.
- Uncultured Myxococcales
- *Bacillus megaterium*
- Uncultured Firmicutes
- *Bacillus* sp.
- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus cereus*
- Uncultured Cyanobacterium
- Uncultured *Acidobacterium* sp.
- Uncultured Actinobacterium
- Uncultured Comamonadaceae
- *Altererythrobacter* sp.
- Uncultured Gemmatimonadetes
- Uncultured *Brevibacillus* sp.
- Uncultured Bacterium
- Uncultured *Lautropia* sp.
- *Klebsiella* sp.
- *Cronobacter sakazakii*
- *Enterobacter* sp.
- *Microbacterium ginsengisoli*

ภาพที่ 13 เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของแบคทีเรียในหม่อนพันธุ์คุณไฟ 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. นอกจากนี้เชื้อ *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 และพันธุ์คุณไพที่ไม่เป็นโรครากเน่านั้นสามารถพบเชื้อ *Bacillus cereus* ได้แต่ในพื้นที่เกิดโรครากเน่ากลับไม่พบเชื้อ *Bacillus cereus* จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jing et al. (2009) ศึกษาผลของเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ Anti-8098A พบว่ามีประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ เนื่องจากเชื้อ *Bacillus cereus* สายพันธุ์ Anti-8098A สามารถเพิ่มปริมาณในดินได้อย่างรวดเร็วและสามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้อย่างมีนัยสำคัญ

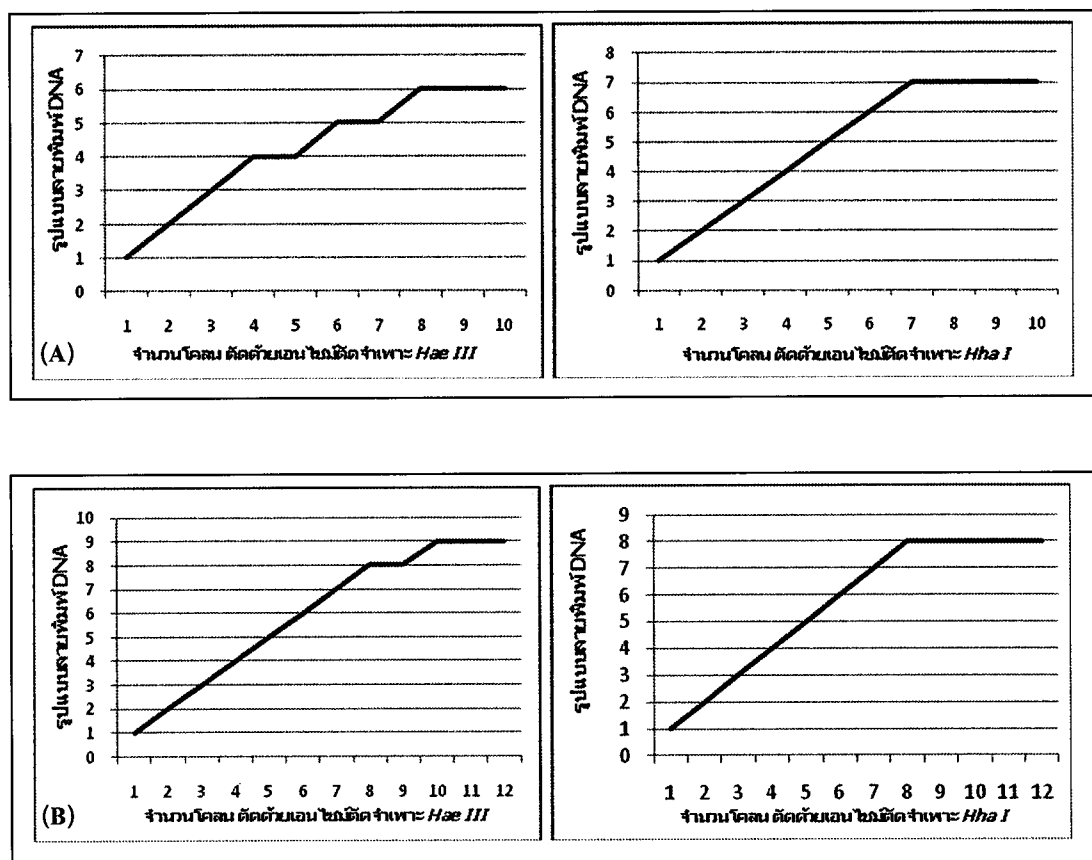
ทางสถิติและ Handelsman *et al.* (1990) ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกว่า 700 ชนิด และพบว่าเชื้อ *Bacillus cereus* UW85 มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งโรคโคนเน่าของถั่ว alfalfa ซึ่งมีเชื้อสาเหตุโรค คือ *Phytophthora megasperma* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและยังสามารถส่งเสริมการงอกของเมล็ดถั่ว alfalfa ได้อีกด้วย 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* สำหรับตัวอย่างหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ไม่เป็นโรครากเน่า (ภาพที่ 14B) เมื่อนำโคลนที่มี

insert gene 18 โคลนตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 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 ชนิดได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 5 รูปแบบ สามารถจำแนก

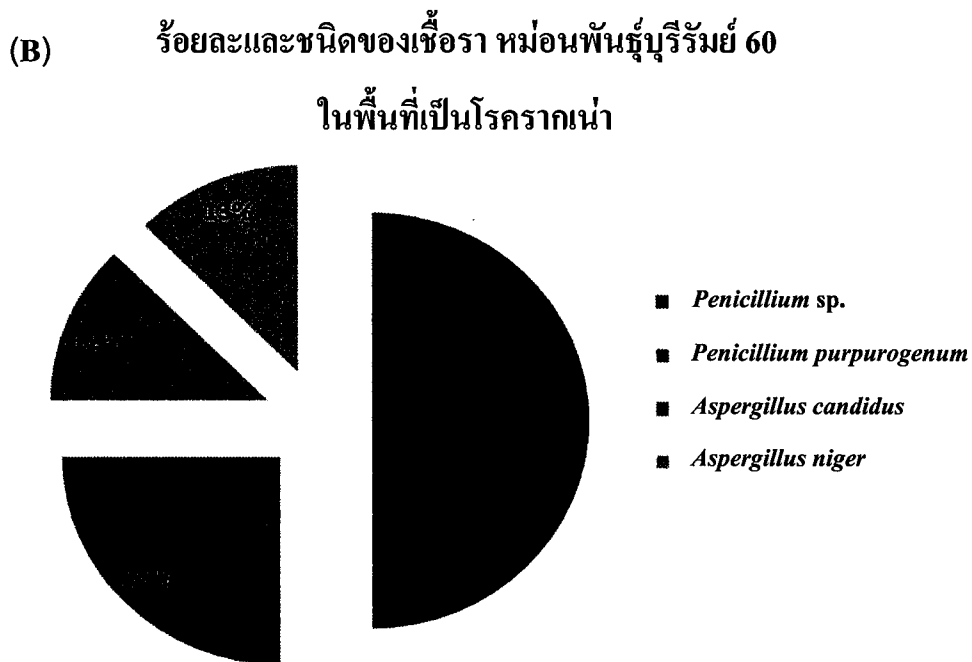
ชนิดของเชื้อราได้ 5 ชนิด ดังนี้ *Penicillium decumbens*, *Alternaria* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* และ *Aspergillus* sp. ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการจัดจำแนกจำนวนโคลนของตัวอย่างดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน 18S ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ของประชากรเชื้อราจากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไฟ

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%
P210	DQ365947.1	<i>Penicillium purpurogenum</i> , strain HS-A82	99%

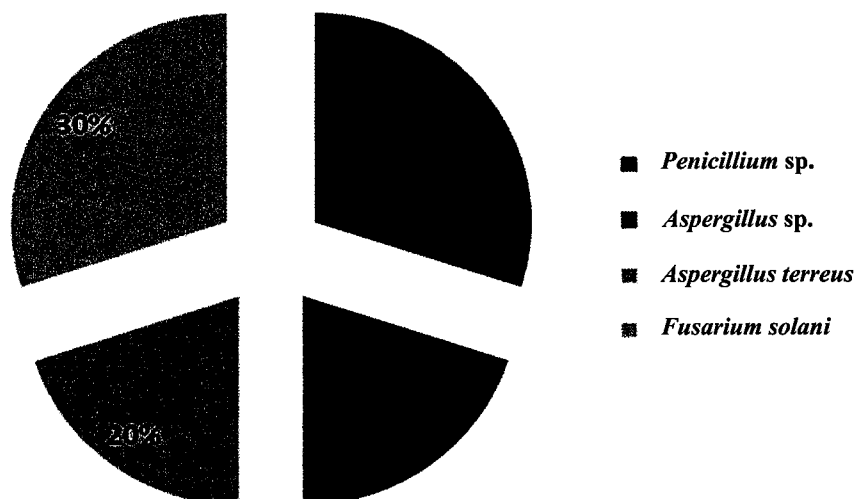
ตารางที่ 5 (ต่อ)

Code	Accession No.	Closest match from BLASTN	Identify
หม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ดินบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า			
P218	HQ434765.1	<i>Penicillium purpurogenum</i> , strain HDJZ-ZWM-26	92%
P205	FJ375305.1	<i>Penicillium</i> sp., CPCC 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%
หม่อนพันธุ์คุณไฟ 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%
หม่อนพันธุ์คุณไฟ ดินบริเวณรากไม้เป็นโรครากเน่า			
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%
P221	FJ458446.1	<i>Penicillium decumbens</i> , strain ML-017	91%
P212	GU573852.1	<i>Penicillium decumbens</i> , isolate K1	73%

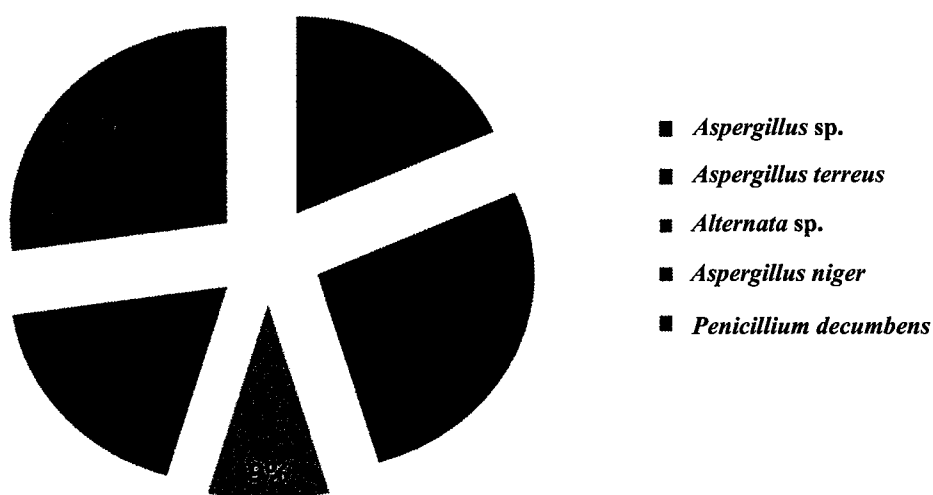


ภาพที่ 16 เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของเชื้อราจากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 จากดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็น โรครากเน่า (A) และไม่เป็นโรครากเน่า (B)

(A) ร้อยละและชนิดของเชื้อรา หม่อนพันธุ์คุณไพ
ในพื้นที่เป็นโรครากเน่า



(B) ร้อยละและชนิดของเชื้อรา หม่อนพันธุ์คุณไพ
ในพื้นที่ไม่เป็นโรครากเน่า



ภาพที่ 17 เปรียบเทียบจำนวนร้อยละและชนิดของเชื้อราจากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไพ จาก
ดินบริเวณรากหม่อนในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (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 Safeeulla (1984) ได้ศึกษาการใช้เชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่งแยกได้จากบริเวณรากของต้นกล้ากาแฟ นำมาใช้เป็นเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคคอกเน่าของต้นกล้ากาแฟ เนื่องจากเชื้อ *Aspergillus niger* จะอยู่ร่วมกับเชื้อ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคคอกเน่าในสภาวะปรสิต ทำให้เชื้อ *R. solani* ตายในที่สุด ดังนั้นเชื้อ *Aspergillus niger* จึงสามารถควบคุมโรคคอกเน่าในต้นกล้าของกาแฟได้ ส่วนในพื้นที่ปลูกหม่อนพันธุ์คุณไพในพื้นที่เป็นโรครากเน่า (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 Ogbabor (2008) โดยใช้เชื้อ *Aspergillus* sp. ในการยับยั้งโรคใบจุดยางพารา เกิดจากเชื้อสาเหตุ คือ *Colletotrichum gloeosporioides* โดยใช้เชื้อ *Aspergillus* sp. ซึ่งได้มาจากบริเวณผิวใบสามารถผลิตสารที่สามารถย่อย cytoplasm ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ได้

จากข้อมูลข้างต้นพบว่า ความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์และพันธุ์คุณไพที่พบในพื้นที่ที่ไม่เป็นโรครากเน่า 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

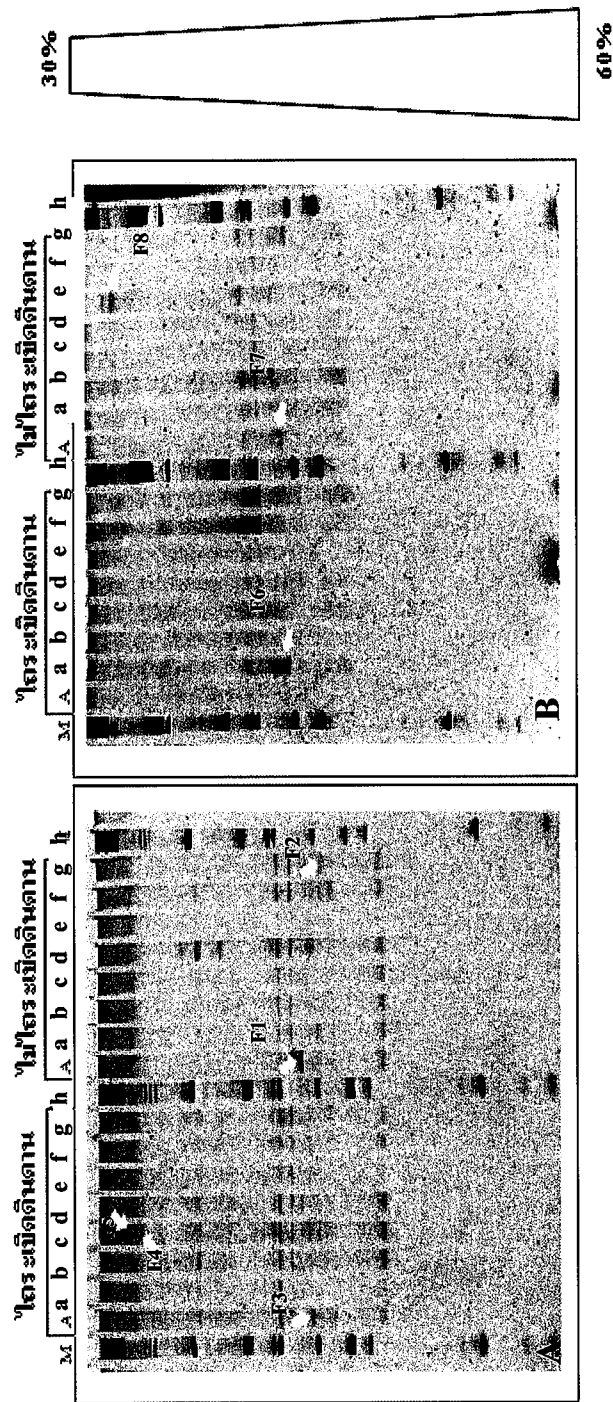
3.3 การเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรเชื้อราและแบคทีเรียในพื้นที่ปลูกหม่อนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรครากเน่า โดยเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) และการวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรม Canoco for Windows โดยวิธี principle component analysis (PCA) และ canonical correspondence analysis (CCA)

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

100 Bp marker

Biolab

Base Pairs	Mass (ng)
1,517	45
1,200	35
1,000	95
900	27
800	24
700	21
600	19
500/517	97
400	39
300	29
200	25
100	48



ภาพที่ 19 ลักษณะรูปแบบโครงสร้างประชากรของเชื้อราในบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (B) ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน

(a) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซาและยิปซัมกิโลกรัมต่อไร่, (b) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 200 กิโลกรัมต่อไร่, (c) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 300 กิโลกรัมต่อไร่, (d) ไม่ใส่ไมคอร์ไรซา ใส่ยิปซัม 400 กิโลกรัมต่อไร่, (e) ใส่ไมคอร์ไรซา ไม่ใส่ยิปซัม, (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)

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

Code	Accession No.	Closet 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 ชนิดของแบคทีเรียเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์คุณไฟ ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

Code	Accession No.	Closet 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%

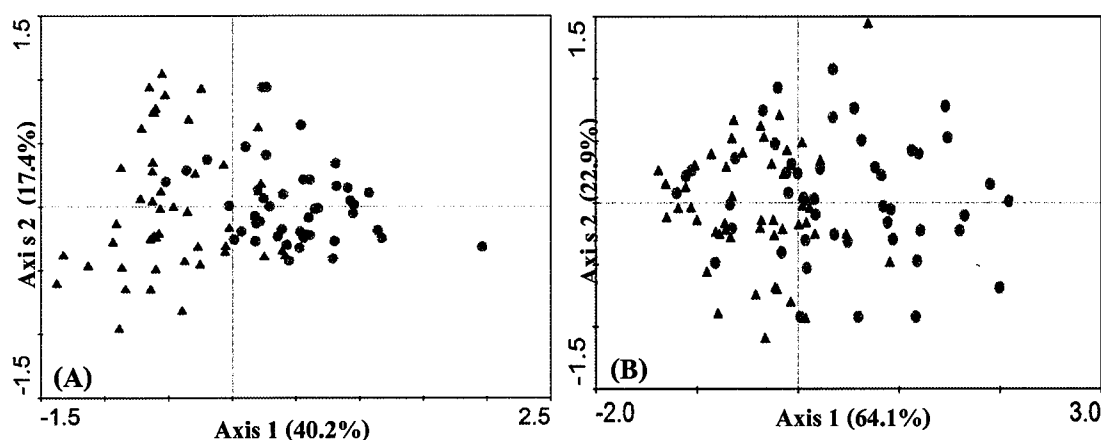
ตารางที่ 8 ชนิดของเชื้อราเด่น บริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่มีการจัดการดินแตกต่างกัน โดยใช้เทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE)

Code	Accession No.	Closest 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)

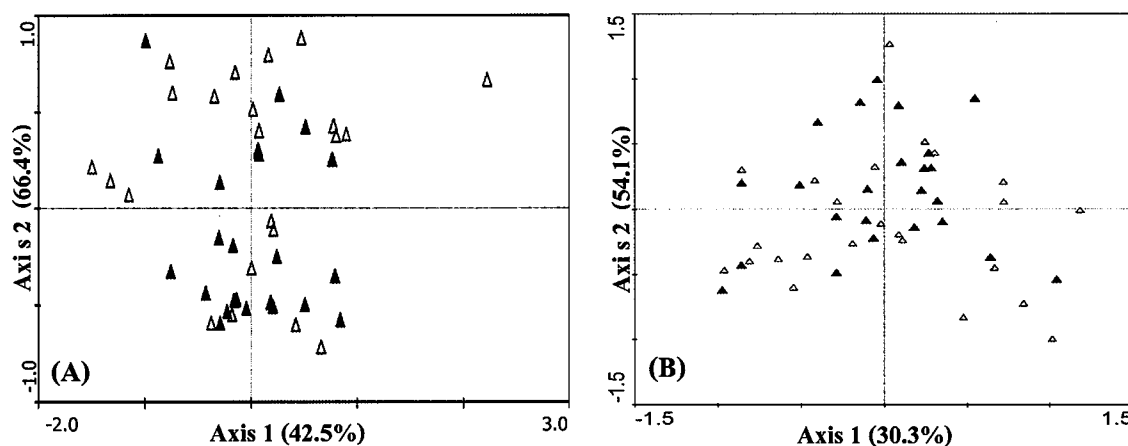
Code	Accession No.	Closest match from BLASTN	Identify
F8	HM165489.1	<i>Alternaria alternate</i> , strain S-f6	99%
F6	EU883597.1	<i>Aspergillus candidus</i> , strain MD-3	71%
F7	FJ458446.1	<i>Penicillium decumbens</i> , strain ML-017	75%

นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค 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)

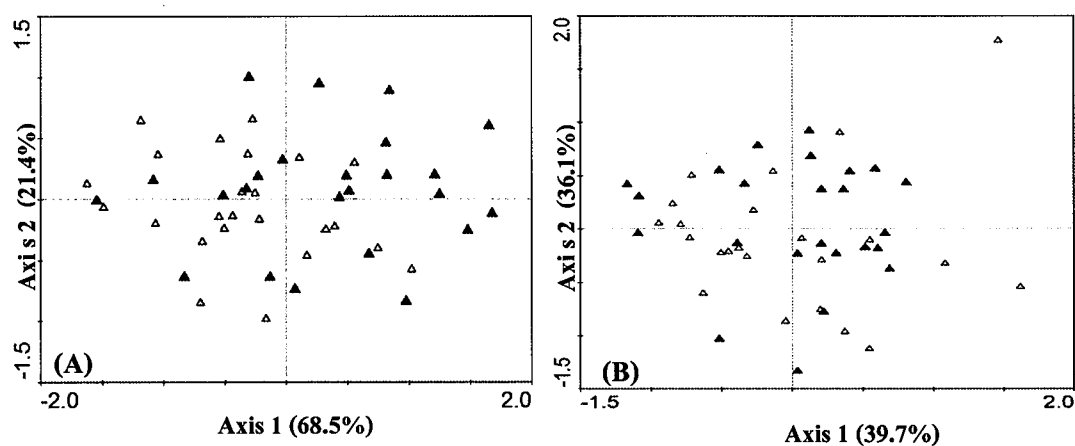


ภาพที่ 20 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (A) และเชื้อรา (B) จากดินบริเวณรากหม่อน พันธุ์บุรีรัมย์ 60 (●) และหม่อนพันธุ์คุณไผ่ (▲) ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA)

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

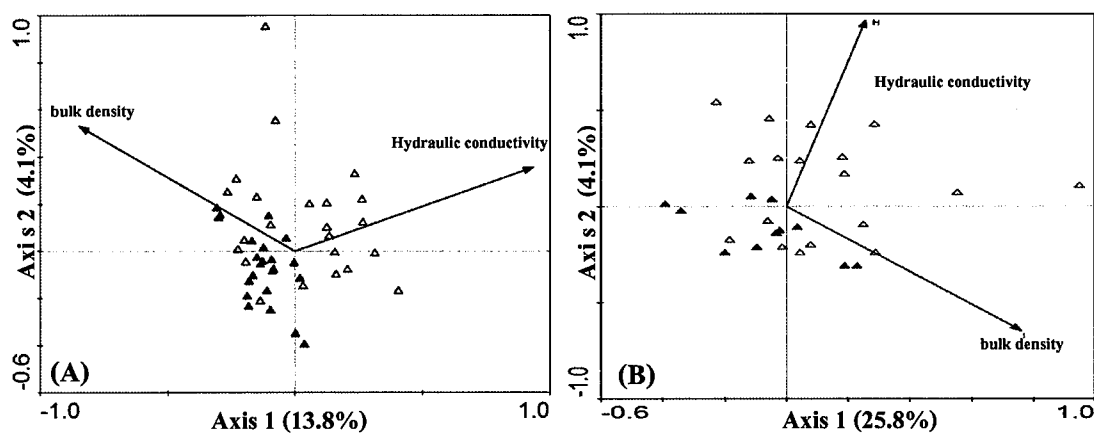


ภาพที่ 21 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรียจากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (B) ในบริเวณที่มีการไถ (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA)

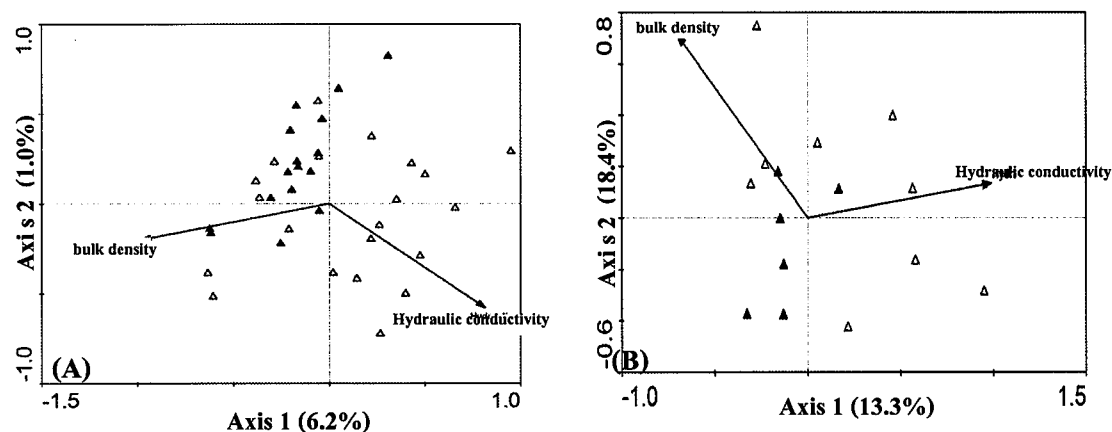


ภาพที่ 22 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรเชื้อราบริเวณรากของหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และหม่อนพันธุ์คุณไพ (B) ในบริเวณที่มีการไถ (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows วิธี principle component analysis (PCA)

จากภาพที่ 21 และ 22 พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 21A และ 22A) และพันธุ์คุณไพ (ภาพที่ 21B และ 22B) เมื่อมีการจัดการดินทางกายภาพโดยวิธีการไถระเบิดและไม่ไถระเบิดดินดานไม่ส่งผลในโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณรากของหม่อนทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน



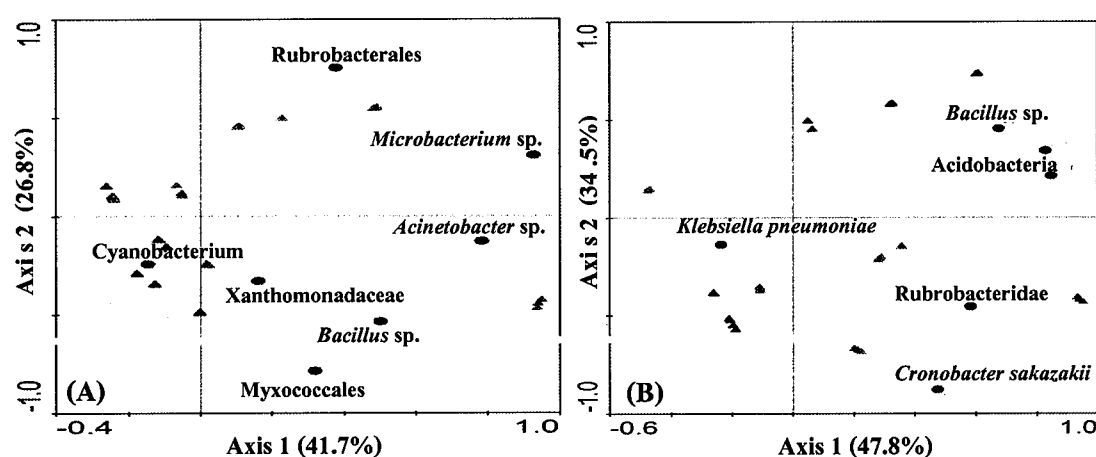
ภาพที่ 23 ความแตกต่างของโครงสร้างประชากรแบคทีเรีย (A) และเชื้อรา (B) จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) ร่วมกับค่าน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Canoco for Windows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



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

จากภาพที่ 23 และภาพที่ 24 พบว่าโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่ตามลำดับ ในพื้นที่ที่มีการไถและไม่ไถระเบิดดินดานเมื่อร่วมวิเคราะห์กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นสมบัติทางกายภาพของดินคือค่าน้ำ (hydraulic conductivity) พบว่าโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 23A และ 24A)

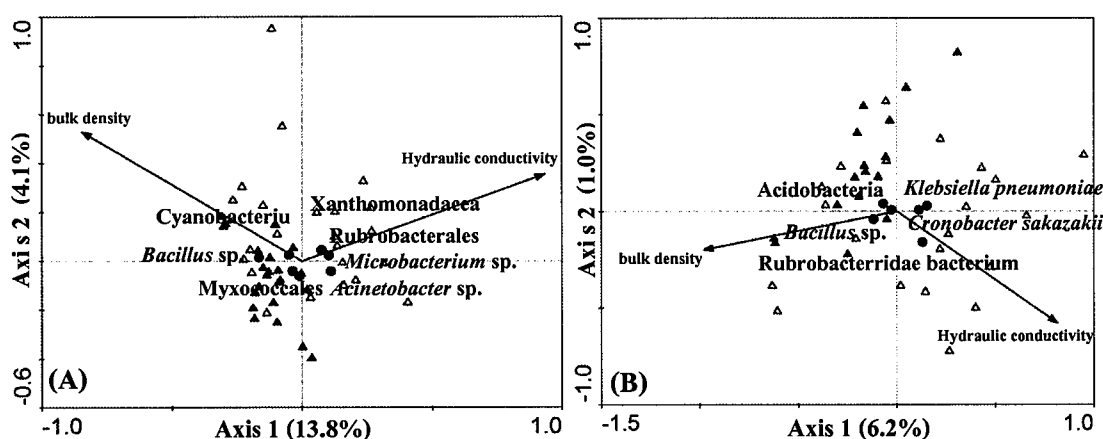
และพันธุ์คุณไพ (ภาพที่ 23B และ 24B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยวิธีการไถและไม่ไถระเบิดดินดาน บริเวณรากหม่อนทั้งสองพันธุ์แตกต่างกัน โดยพบว่าในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดานส่งผลทางด้านความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์กับค่าน้ำในดินที่ไม่มีการไถระเบิดดินดานจะมีค่าน้ำที่สูงกว่า จึงส่งผลให้จุลินทรีย์บริเวณรากมีความแตกต่างจากโครงสร้างประชากรจุลินทรีย์บริเวณรากหม่อนที่มีการไถระเบิดดินดาน เนื่องจากผลของการไถระเบิดดินดานส่งผลให้อนุภาคขนาดเล็กของดินเกิดการเคลื่อนย้ายไปสะสมในดินชั้นล่าง (Young and Geller, 1995) ส่งผลให้ค่าน้ำของดินต่ำ 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 ในพื้นที่ที่มีการไถและไม่ไถระเบิดดินดานเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลความหลากหลายของแบคทีเรียซึ่งในพื้นที่ที่ไม่มีการไถระเบิดดินดานทั้งในหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 25A) และคุณไพ (ภาพที่ 25B) มีแบคทีเรียเข้าอาศัยมากกว่าในพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดานโดยแบคทีเรียที่เข้าอาศัยในบริเวณดังกล่าว โดยส่วนใหญ่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และมีบทบาทส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น *Acidobacteria* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Cronobacter sakazakii* และ *Microbacterium* sp. ซึ่งในพื้นที่ทำการศึกษามีเนื้อดินแบบดินร่วนปนทรายแป้ง (silt loam) และมีการใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรเข้าจัดการพื้นที่ ทำให้สมบัติทางกายภาพของดินเปลี่ยนไปเนื่องจากกระบวนการไถพรวนและเครื่องจักรกลทางการเกษตรมีผลในทางลบต่อค่าการซาบซึมและการเก็บกักน้ำเป็นอย่างมาก รวมถึงการจับ

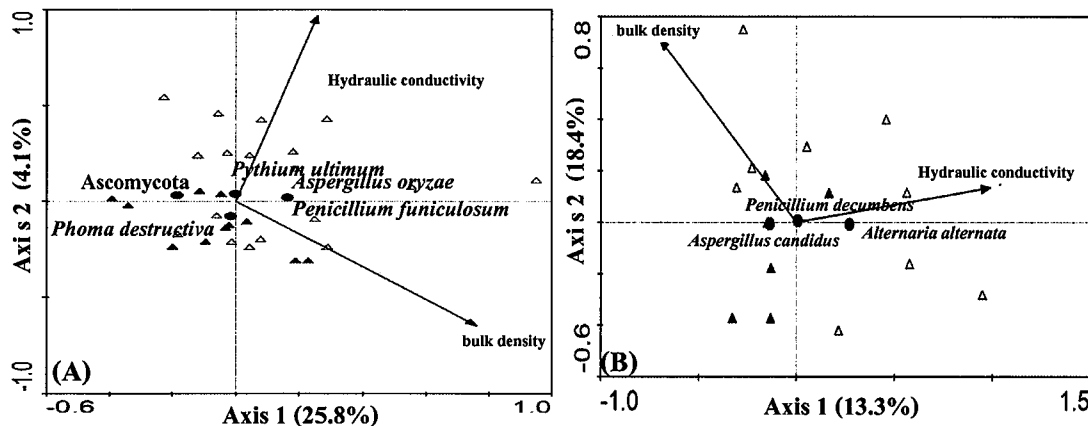
ตัวของดินจึงมีแนวโน้มที่จะเกิดชั้นดานและส่งผลกระทบต่อโครงสร้างประชากรและกิจกรรมของจุลินทรีย์ดิน (Sullivan, 2002)



ภาพที่ 26 ข้อมูลแบคทีเรียเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ร่วมกับค่าความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) และค่าการนำน้ำ (hydraulic conductivity) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis (DGGE) วิเคราะห์ด้วย โปรแกรม Canoco for Windows วิธี canonical correspondence analysis (CCA)

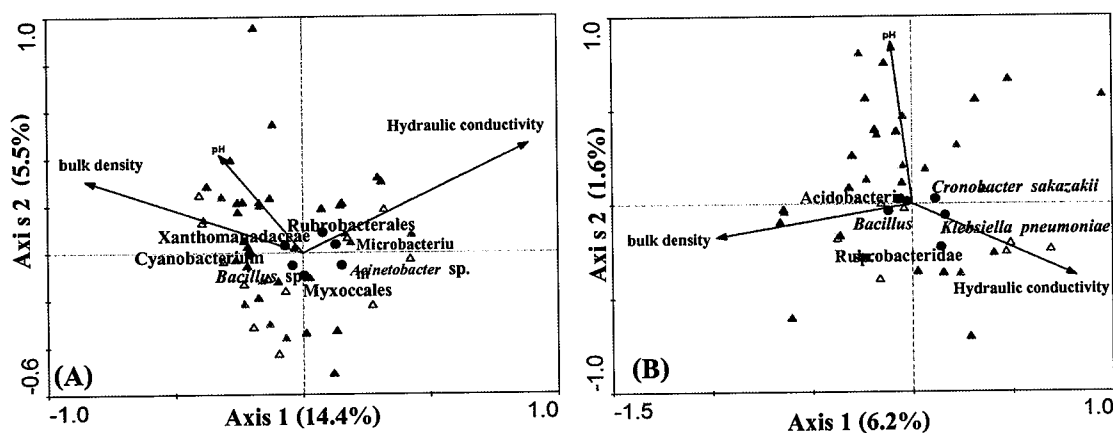
จากภาพที่ 26 ความหลากหลายของแบคทีเรียบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 26A) และคุณไพ (ภาพที่ 26B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดและไม่มีการไถระเบิดดินดาน พบว่าพื้นที่ที่ไม่มีการไถระเบิดดินดานส่งผลให้ค่าการนำน้ำในพื้นที่สูงและมีการเข้าอาศัยของแบคทีเรียมากกว่าพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน แบคทีเรียที่พบในบริเวณที่มีการจัดการโดยไม่ไถระเบิดดินดาน ส่วนมากมีสมบัติเป็นเชื้อออปิโกบักซ์และสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่น *Cronobacter sakazakii*, *Acidobacteria* และ *Microbacterium* sp. เป็นต้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Beuchat *et al.* (2009) ซึ่งรายงานว่าเชื้อ *Cronobacter sakazakii* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไปรวมถึงในดิน แต่โดยส่วนมากมักพบปนเปื้อนในอาหาร เช่น นมผงและธัญพืชขอบกรอบ (cereal) ส่วนเชื้อที่อยู่ในดินนั้นไม่มีรายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคพืช (Hartmann *et al.*, 2010; Schmid *et al.*, 2009) โดยพบได้ในบริเวณรากพืช เช่น มะเขือเทศและข้าวโพด นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการละลายฟอสเฟตและสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติก (IAA) เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและ Xue *et al.* (2009) รายงานว่าเชื้อ *Acinetobacter* sp. มีสมบัติเป็นเชื้อออปิโกบักซ์ต่อเชื้อก่อโรคเหี่ยว (bacterial wilt) และยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศ โดยส่งผลให้มะเขือเทศมีน้ำหนักและปริมาณผลผลิตเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ Etcheverry *et al.* (2009) และ Pereira *et al.* (2007) พบว่า

เชื้อ *Microbacterium* และ *Bacillus* มีประสิทธิภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อ *Fusarium* ในต้นและต้นอ่อนของข้าวโพดได้

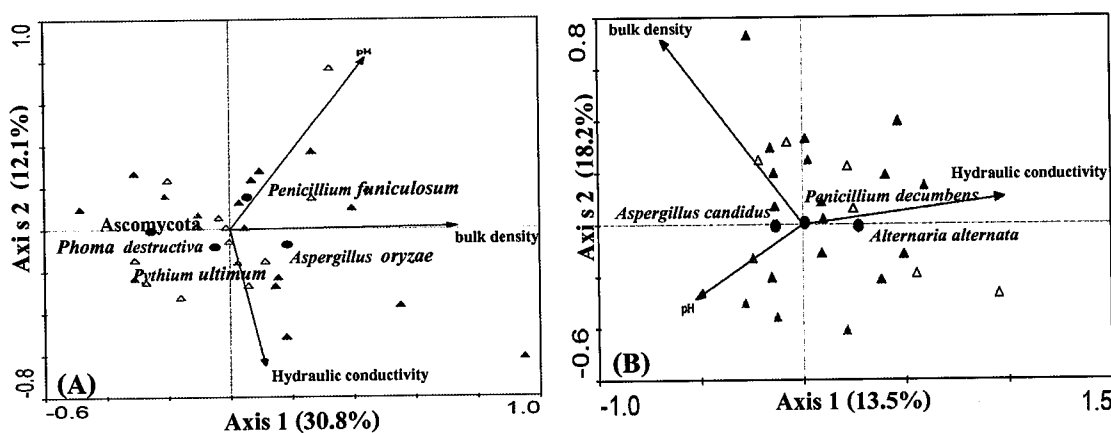


ภาพที่ 27 ข้อมูลเชื้อราเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไพ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดดินดาน (▲) และไม่ไถระเบิดดินดาน (△) วิเคราะห์ร่วมกับค่า น้ำน้ำ (hydraulic conductivity) และความหนาแน่นรวมของดิน (bulk density) จากเทคนิค denature gradient gel electrophoresis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

จากภาพที่ 27 ความหลากหลายของเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 27A) และ คุณไพ (ภาพที่ 27B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการไถระเบิดและไม่มีการไถระเบิดดินดาน มีผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับความหลากหลายของแบคทีเรียคือ พื้นที่ที่ไม่มีการไถระเบิดดินดานส่งผลให้ค่าน้ำในพื้นที่สูงและมีการเข้าอาศัยของเชื้อรามากกว่าพื้นที่ที่มีการไถระเบิดดินดาน เชื้อราที่พบในบริเวณที่มีการจัดการโดยไม่ไถระเบิดดินดานส่วนมากมีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ โดย Petersson and Johan (1995) และ Hashmi and Ghaffar (2006) พบว่าเชื้อ *Alternaria alternata* ก่อโรคมดเน่าในข้าวสาลี บาร์เลย์และข้าวฟ่าง ส่วนเชื้อ *Aspergillus candidus* ก่อโรคมดเน่าใน ข้าวบาร์เลย์ และ Guske *et al.* (2004) รายงานว่า เชื้อ *Phoma destructiva* เป็นเชื้อราที่ยับยั้งการงอกของ วัชพืชได้ซึ่งใช้ได้ทั้งในรูปแบบเชื้อกลุ่มและเชื้อเดี่ยว นอกจากนี้ Soyong *et al.* (2005) ยังพบว่าเชื้อ *Penicillium funiculosum* มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora cinnamomi*, *P. parasitica* และ *P. citrophthora* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าของส้มและกุหลาบพันธุ์



ภาพที่ 28 ข้อมูลแบคทีเรียเด่น จากดินบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (A) และพันธุ์คุณไผ่ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการใส่ปุ๋ย 4 อัตรา คือ ไม่ใส่ปุ๋ย (Δ), 200 กิโลกรัมต่อไร่ ($\blacktriangle$), 300 กิโลกรัมต่อไร่ ($\blacktriangle$) และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ ($\blacktriangle$) วิเคราะห์ร่วมกับค่าพีเอช (pH) ค่านำน้ำ (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) และพันธุ์คุณไผ่ (B) ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการใส่ปุ๋ย 4 อัตรา คือ ไม่ใส่ปุ๋ย (Δ), 200 กิโลกรัมต่อไร่ ($\blacktriangle$), 300 กิโลกรัมต่อไร่ ($\blacktriangle$) และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ ($\blacktriangle$) วิเคราะห์ร่วมกับค่าพีเอช (pH) ค่านำน้ำ (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 และพันธุ์คุณไผตามลำดับ ในพื้นที่ที่มีการจัดการดินโดยการใส่ปุ๋ยหมักในอัตราต่างกัน 4 อัตราคือ ไม่ใส่ปุ๋ยหมัก ใส่ปุ๋ยหมักอัตรา 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่เมื่อวิเคราะห์ร่วมปัจจัยทางเคมีของดินคือ ค่าพีเอช (pH) พบว่าความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 28A) และพันธุ์คุณไผ (ภาพที่ 28B) พื้นที่ที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยหมักมีค่าพีเอชต่ำกว่าพื้นที่ที่มีการใส่ปุ๋ยหมัก ซึ่งในการใส่ปุ๋ยหมักในอัตรา 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ พบว่ามีการเข้าอาศัยของแบคทีเรียมากกว่าในพื้นที่ที่ไม่มีการใส่ปุ๋ยหมัก โดยการใส่ปุ๋ยหมักซึ่งเป็นสารปรับปรุงดินสามารถลดการฟุ้งกระจายของอนุภาคดินเหนียวดิน ส่งผลให้อนุภาคดินรวมตัวกัน มีลักษณะเป็นโครงสร้างมากขึ้น (Baldock *et al.*, 1994; Sumner, 1993) ทำให้การระบายน้ำและอากาศดีขึ้นตามไปด้วย ทั้งนี้เกิดจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของปุ๋ยหมัก ซึ่งการใช้สารปรับปรุงดินที่มีองค์ประกอบของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เช่น ปูนขาวหรือปุ๋ยหมัก มีผลต่อการจับตัวของอนุภาคขนาดเล็กในดินซึ่งจะเพิ่มความสามารถในการจับตัวของดินให้ดียิ่งขึ้น (Chan and Heenan, 1999) ส่งผลให้บริเวณที่มีการเข้าอาศัยของแบคทีเรียที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญการพืช Sun *et al.* (2008) รายงานว่า เชื้อ *Acidobacteria* เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและเป็นเชื้อที่อาศัยในรากพืช (endophyte) ปัจจัยที่มีผลต่อการเข้าอาศัยในรากข้าวที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตนั้นพบว่าพีเอชของดินมีผลต่อการเจริญของเชื้อมากกว่าลักษณะการจัดการดินโดยการไถพรวน (Yin *et al.*, 2010) ช่วงพีเอช 4.7-5.5 มีความเหมาะสมต่อเชื้อ *Acidobacteria* สามารถเจริญได้ดีที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยในระดับชีววิทยาระดับโมเลกุลพบว่า พีเอชดินเป็นปัจจัยสำคัญในอาศัยอยู่และลักษณะของเชื้อกลุ่ม *Acidobacteria* ในดิน และยังเป็นปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกกลุ่มประชากรของเชื้อ *Acidobacteria* อีกด้วย นอกจากนี้งานทดลองโดยเทคนิคชีววิทยาระดับโมเลกุลยังบ่งชี้ดีกว่าพีเอชดินมีอิทธิพลต่อจำนวนของเชื้อและพบมากในสภาพแวดล้อมที่มีพีเอชต่ำ (Fierer *et al.*, 2007; Mannisto *et al.*, 2007; Lauber *et al.*, 2008)

ความหลากหลายของประชากรเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 29A) และพันธุ์คุณไผ (ภาพที่ 29B) มีผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกับความหลากหลายของแบคทีเรีย พบว่ามีแนวโน้มในการเข้าอาศัยของเชื้อก่อโรคน้อยลงและมีการเข้าอาศัยของเชื้อราซึ่งมีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ ช่วยลดการเกิดโรครากเน่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Menge *et al.* (1997) ซึ่งศึกษาการควบคุมโรครากเน่าของต้นอโวคาโดยวิธีการปลูกวัชพืชคลุมดินและการจัดการดิน สามารถลดโอกาสการเกิดโรครากเน่าโดย *Phytophthora cinnamomi* ในต้นอโวคาโดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการจัดการดินโดยใส่ปุ๋ยหมัก เนื่องจากส่งผลต่อเชื้อ *Phytophthora* ในกระบวนการสร้าง sporangial และ zoospore ซึ่งเป็นส่วนสืบพันธุ์ทำให้มีปริมาณลดลง นอกจากนี้ความยาวและความกว้างของเส้นใย (hypha) ยังลดลงด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยซึ่งใช้ปุ๋ยหมักในการปรับปรุงดิน สามารถลดความรุนแรงของโรครากเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Phytophthora* ได้หลายสายพันธุ์ (Von Broembsen and Decon, 1996, 1997; Chang *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1996) และมีการปรับปรุงดิน

ในแปลงปลูกเพื่อทดสอบความต้านทานของเชื้อ *Phytophthora* ในต้นอโวคาโดพบว่าประสิทธิภาพลดการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora* ทำให้การเกิดโรคมีความรุนแรงน้อยลง นอกจากนี้ยิปซัมยังสามารถลดการเกิดโรคโคนเน่าในส้มซึ่งเกิดจากเชื้อสาเหตุคือ *Phytophthora parasitica* (Nemec and Lee, 1992) และโรคฝักเน่าในถั่วลิสงซึ่งมีเชื้อสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิดร่วมกัน คือ *Pythium*, *Rhizoctonia* และ *Fusarium* (Bell *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ การศึกษาของ 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) เกี่ยวกับการลดการเกิดโรคลำต้นเน่าจากเชื้อ *Phytophthora* ในถั่วเหลืองโดยใช้ CaCl_2 และ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ พบว่าการใส่แคลเซียมมีอิทธิพลต่อการลดการเกิดโรคของเชื้อ *Phytophthora* เนื่องจาก แคลเซียมมีผลต่อความแข็งแรงของเนื้อเยื่อพืชอาศัยโดยการใส่แคลเซียมและสามารถลดการเจริญของเชื้อราได้โดยตรง การจัดการโดยการใส่สารละลายแคลเซียมความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ มีอิทธิพลต่อการจัดการโรคลำต้นเน่าในพื้นที่และยับยั้งการปลดปล่อย 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 สามารถอธิบายได้จากผลของการเข้า

ทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช คือ *Phytophthora nicotianae* ในมันฝรั่งและแอปเปิ้ลที่ลดน้อยลง เมื่อมีการ
ใส่ยิปซัมในพื้นที่ปลูก (Conway *et al.*, 1992)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและเชื้อราบริเวณรากหม่อนพันธุ์ริรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่โดยเทคนิคโคลนนิ่ง ในบริเวณรากหม่อนพันธุ์ริรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่ พบว่าในบริเวณรากหม่อนทั้งสองพันธุ์ในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่าและไม่เป็นโรครากเน่ามีการเข้าอาศัยของประชากรแบคทีเรียและเชื้อราแตกต่างกัน โดยในพื้นที่ปลูกหม่อนพันธุ์ริรัมย์ 60 และพันธุ์คุณไผ่ ที่ไม่เป็นโรครากเน่า มีความหลากหลายของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในบริเวณรากหม่อนมากกว่าในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่า ซึ่งแบคทีเรียที่เข้าอาศัยในบริเวณไม่เป็นโรครากเน่านั้น พบว่า 6 ชนิด มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

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

3. การวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Canoco for Windows วิธี PCA และ CCA เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรแบคทีเรียและเชื้อราในพื้นที่ที่เป็นโรครากเน่าและไม่เป็นโรครากเน่าร่วมกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมได้แก่ ค่าพีเอช ค่าน้ำหนักการไถยิปซัม การไถระเบิดดินดานและไม่ไถระเบิดดินดานพบว่า ปัจจัยหลักที่ส่งผลให้โครงสร้างประชากรแบคทีเรีย ซึ่งเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และเชื้อราเกิดความเปลี่ยนแปลงได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพคือ การจัดการดินโดยวิธีการไถและไม่ไถระเบิดดินดานซึ่งส่งผลต่อค่าน้ำหนักของดิน (hydraulic conductivity)

4. การจัดการดินโดยไถยิปซัมในอัตรา 200, 300 และ 400 กิโลกรัมต่อไร่ ส่งเสริมการเข้าอาศัยของแบคทีเรียและเชื้อราที่มีสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช คือ *Acidobacterium* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii* และ *Penicillium funiculosum* ซึ่งผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและเชื้อราด้วยวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์บริเวณรากหม่อน ด้วย

อาหารเลี้ยงเชื้อและเปรียบเทียบความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่ด้วยเทคนิคการโคลนนิ่ง รวมถึงวิธีการเปรียบเทียบโครงสร้างประชากรเชื้อราและแบคทีเรียในพื้นที่ปลูกหม่อนโดยใช้เทคนิค DGGE นั้นพบว่าทั้ง 3 วิธี พบจุลินทรีย์ที่อาศัยบริเวณรากหม่อนเป็นกลุ่มเดียวกัน