บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ส้มจัดอยู่ในตระกูล Rutaceae มีสมาชิกจำนวน 130 สกุล รวม 1,500 ชนิด ซึ่งพืชตระกูลนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 ตระกูลย่อย โดยมีตระกูลย่อยที่สำคัญที่สุด ได้แก่ ตระกูลย่อยส้ม (Orange Subfamily: Aurantioidae) มีสมาชิกเป็นไม้ผลเศรษฐกิจมากมาย เช่น ส้มต่าง ๆ (*Citrus* spp.) รวมทั้งไม้ผลที่มีคุณค่าในการเป็นต้นตอของไม้ผลเศรษฐกิจ เช่น มะตูม มะขวิด คัมควอท และส้มสามใบ (จตุพร และคณะ, 2541) พืชตระกูลนี้มีทั้งไม้ล้มลุกไม้ยืนต้นและไม้พุ่ม ใบมีทั้งชนิดใบเดี่ยวและใบประกอบ มีลักษณะแบบนิ้วมือและขนนก ส่วนของใบอาจมีการลดรูปเห็นเป็นหนาม ใบมีการเรียงตัวแบบตรงข้ามหรือสลับ ไม่มีหูใบชัด ต่อมน้ำมันที่ส่วนของใบมีลักษณะโปร่งแสง ดอกเป็นชนิดสมบรูณ์เพศและได้สมมาตรกัน มักเกิดเป็นช่อดอก ส่วนของกลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกกันอย่างเห็นได้ชัด จำนวนกลีบเลี้ยงและกลีบดอก มักเรียงตัวกันเป็นสองชั้น บางครั้งอาจพบเกสรตัวผู้ลดรูป รังไข่ที่ฐานของเกสรตัวเมียเป็นแบบ superior ovary คือรังไข่จะอยู่เหนือส่วนอื่นของดอก ลักษณะของรังไข่มีพูเห็นเด่นชัด จำนวน 4-5 ช่อง แต่ละช่องมีรังไข่ 1-2 อัน ภายในเมล็ดมีลักษณะเหยียดตรงหรือโค้ง ส่วนของเมล็ดอาจมีเนื้อเยื่อสะสมอาหารหรืออาจไม่มีก็ได้ เนื้อเยื่อของพืชอาจมีน้ำยางที่มีกลิ่นหอมระเหย (สวนส้ม 2000, 2545) ผล มีรูปร่างกลมแบน ผิวเปลือกสีอมเหลืองหรือส้มอมเหลือง จนถึงแดงอมส้ม ลักษณะผิวเปลือกจะเรียบมีต่อมน้ำมันอยู่ภายใน ส่วนเปลือกบางมีความหนาประมาณ 0.2-0.3 เซนติเมตร มีกลิ่นหอมแรงเปลือกด้านในมีสีเหลืองอ่อน ภายในหนึ่งผลประกอบด้วยกลีบผลจำ นวน 10-15 กลีบ แต่ละกลีบจะมีผนังบาง เนื้อมีน้ำมาก สีส้ม รสหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย ก้านผลมีขนาดสั้น ขนาดผลแตกต่างกันออกไปแล้วแต่พันธุ์ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 5-8 เซนติเมตร ยาว 4-7 เซนติเมตร ติดผลในลักษณะห้อยหัวลง (อภิชาติ, 2543) ในบรรดาผลไม้ต่างๆ ส้ม (*Citrus* spp.) จัดเป็นพืชสกุลใหญ่สกุลหนึ่งที่มีบทบาทและความผูกพันต่อการดำ รงชีวิตของมนุษย์มายาวนาน ส้มเป็นผลไม้ที่อยู่ในวงศ์ *Rutaceae* มีทั้งหมด 7 วงศ์ย่อย โดยวงศ์ย่อยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจคือ *Auranthioideae* การปลูกส้มได้แพร่กระจายไปยังประเทศต่างๆ ในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อนซึ่งมีความชื้นและสภาพอากาศที่เหมาะสม พื้นที่การปลูกส้มของโลกอยู่ที่ บริเวณเส้นรุ้งที่ 37 องศาใต้ ถึง 44 องศาเหนือ (สุนทร และสมศักดิ์, 2545) ส้มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม (รวี, 2542; อำไพวรรณและคณะ, 2544) ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. กลุ่มมะนาว (limes group) เป็น กลุ่มที่มีรสเปรี้ยวจัด ที่นิยมปลูกกันมาก ได้แก่ พันธุ์แป้น พันธุ์ไข่ พันธุ์อีมัน เป็นต้น

2. กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต (pummelos and grapefruits group) ได้แก่ส้มโอพันธุ์ต่าง ๆ เช่น พันธุ์ทองดี พันธุ์น้ำผึ้ง พันธุ์ขาวแตงกวา เป็นต้น

3. กลุ่มส้มติดเปลือก (orange group) เช่น ส้มเกลี้ยง ส้มเช้ง ส้มตรา เป็นต้น

4. กลุ่มส้มเปลือกล่อน (tangerine or mandarin group) เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มฟรีมองต์ ส้มโชกุนหรือส้มสายน้ำผึ้ง เป็นต้น

ในปัจจุบันการปลูกส้มในเมืองไทยสามารถแยกเป็นชนิดและพันธุ์ โดยแยกได้ตามกลุ่มส้ม ดังนี้ (นิด, 2544)

1. ส้มเปลือกล่อน (Mandarin) เป็นส้มที่นิยมปลูกมากที่สุดและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด พันธุ์ที่ปลูกประกอบไปด้วย

1.1 ส้มเขียวหวาน เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง เป็นพวกส้มเปลือกล่อน สามารถปอกเปลือกได้ง่าย ขนาดทรงพุ่มประมาณ 4-6 เมตร และสูงประมาณ 3.5-5 เมตร ผลมีขนาดสูงประมาณ 5-9 เซนติเมตร กว้าง 6-8 เซนติเมตร ค่อนข้างกลม แป้นเล็กน้อย บริเวณขั้วผลราบถึงเว้าเล็กน้อย ผิวผลเมื่อสุกสีเขียวอมเหลืองถึงเหลืองเข้ม ถ้าปลูกในที่ที่มีอากาศเย็นผิวผลจะมีสีเหลืองเข้ม เช่นแถบจังหวัดภาคเหนือของประเทศ ผิวผลเรียบมีต่อมน้ำมันถี่เต็มผิวของผล กลีบผลแยกจากกันได้ง่าย มีรกน้อย กุ้งมีขนาดสั้น รสชาติหวามอมเปรี้ยวเล็กน้อย มีเมล็ดน้อย ตั้งแต่ออกดอกถึงเก็บผลผลิตใช้เวลา 9 เดือน และเริ่มให้ผลผลิตหลังจากปลูกปีที่ 3 ขึ้นไป ปัจจุบันแหล่งปลูกส้มเขียวหวานได้กระจายไปตามแหล่งอื่น ๆ ของประเทศ ทั้งนี้ก็เพราะปัญหาการสะสมของโรคและแมลงในแหล่งปลูกเดิมซึ่งได้แก่แถบลพบุรี ปราจีนบุรี

1.2 ส้มโชกุนหรือส้มสายน้ำผึ้ง เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางเช่นเดียวกับส้มเขียวหวาน แต่ลักษณะทรงพุ่มจะโปร่งกว่า ใบจะมีสีเขียวเข้มกว่าส้มเขียวหวาน การแตกของกิ่งและใบจะเป็นลักษณะตั้งขึ้น ขนาดของใบเล็กกว่าส้มเขียวหวาน มีกลิ่นหอมคล้ายส้มจีนและพองแกน ลักษณะผลคล้ายส้มเขียวหวานมาก ขนาดผลปานกลาง เปลือกบางกว่าส้มเขียวหวาน ปอกง่าย มีกลิ่นหอม เนื้อผลแน่น ชานนิ่มกว่า และมีปริมาณน้ำส้มมาก รสชาติจะอมเปรี้ยว เมื่อสุกผลจะเป็นสีเหลืองแดงถึงสีเหลือง ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งปลูกและอุณหภูมิ

1.3 ส้มฟรีมองต์ เป็นส้มที่มีรสชาติหวานเข้มอมเปรี้ยว ขนาดทรงผลใกล้เคียงกว่าส้มเขียวหวานแต่จะแป้นมากกว่า ผิวไม่เรียบ ต่อมน้ำมันห่าง ผิวผลเป็นสีส้มถึงส้มแดง ทรงพุ่มตั้งโปร่ง อายุเก็บเกี่ยว 8 เดือน ปัจจุบันพบปลูกแถวภาคเหนือเพราะมีสีผิวดีเป็นที่นิยมของตลาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ส้มติดเปลือก (Orange) ที่นิยมปลูกมี 2 ชนิดคือ

2.1 ส้มตราหรือส้มเช้ง มีแหล่งปลูกแถบภาคกลาง ลักษณะผลโตกว่าส้มเขียวหวาน มีสีเขียวอมเหลือง มีทั้งพันธุ์ผิวเรียบและผิวขรุขระ ส่วนใหญ่นิยมปลูกพันธุ์ผิวขรุขระ เพราะผลผลิตสูงกว่า รสชาติหวานแหลมนิยมบริโภคสด

2.2 ส้มเกลี้ยง จัดเป็นส้มที่มีรสชาติดีอีกชนิดหนึ่ง มีกลิ่นหอมใช้คั้นน้ำส้มได้ดี ลำต้นขนาดปานกลาง สูง 5-7 เมตร ทรงต้นทึบกิ่งก้านแข็งแรง หนามใหญ่ ผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 เซนติเมตร มีขนาดสูงประมาณ 9-12 เซนติเมตร ลักษณะกลมสูง เมื่อแก่สีเขียวอมเหลืองคล้ายส้มตรา ผลมี 12 กลีบ เนื้อสีเหลือง รสหวานอมปรี้ยว

3. ส้มโอ (Pummelo) จัดเป็นส้มที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งและสามารถส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศได้มาก ส้มโอที่นิยมปลูกมีหลายพันธุ์ แต่ละพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันดังนี้

พันธุ์ขาวน้ำผึ้ง เนื้อแห้ง ผลโต รสชาติดีมาก หวานอมเปรี้ยว กลีบแยกจากกันง่าย กลิ่นหอม สีเนื้อคล้ายสีน้ำผึ้ง

พันธุ์ขาวทองดี จุดเด่นคือเนื้อสีชมพูอ่อน รสชาติหวาน ชานนิ่ม และฉ่ำน้ำ

นอกจากนี้ยังมีพันธุ์อื่น ๆ อีก เช่น ขาวพวง ขาวแป้น ท่าข่อย เป็นต้น

4. มะนาว (Lime) เป็นผลไม้สำหรับการประกอบอาหาร พบปลูกทั่วไปในประเทศไทย

คุณค่าทางอาหารของส้มสายน้ำผึ้ง (รัญ และรัชนี, 2551)

ส้มสายน้ำผึ้งให้เบต้าแคโรทีนและไลโคพีนสูง เมื่อรับประทาน 1 ส่วน หรือ 1 ผลขนาดใหญ่ (น้ำหนัก 155 กรัม รวมเปลือกและเมล็ด หรือ 122 กรัม ส่วนที่กินได้) จะได้เบต้าแคโรทีนและไลโคพีน 211 และ 3,521 ไมโครกรัมตามลำดับ และยังเป็นแหล่งของวิตามินซี เท่ากับร้อยละ 49 ของปริมาณที่แนะนำให้บริโภคใน 1 วัน มีโพแทสเซียมและใยอาหารคิดเป็นร้อยละ 8 ของปริมาณที่แนะนำให้บริโภคใน 1 วัน ส้มสายน้ำผึ้งมีรสชาติค่อนข้างหวาน มีน้ำตาล 10.5 กรัมส่วนที่กินได้ มีสารต้านอนุมูลอิสระ คือ โพลีฟีนอลค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้ชนิดอื่น และมีปริมาณน้ำค่อนข้างมาก คือส้ม 122 กรัม จะมีน้ำอยู่เกือบ 105 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โรครากเน่าและโคนเน่าของส้ม (อำไพวรรณ และคณะ, 2527)

โรครากเน่าและโคนเน่า จัดเป็นโรคที่รุนแรงและทำความเสียหายให้กับส้มมากที่สุดโรคหนึ่ง โดยเฉพาะโรครากเน่าโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อไฟทอฟธอรา เนื่องจากเป็นโรคที่ป้องกันกำจัดได้ยาก เชื้อสาเหตุของโรคอาศัยอยู่ในดินและน้ำ สามารถแพร่ระบาดได้กว้างขวาง

อาการของโรค

เชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายส้มได้ทางรากฝอย รากแขนง ที่ส่วนโคนต้น และตามบริเวณกิ่งใหญ่ใกล้โคนต้น อาการที่ปรากฏบนส่วนลำต้นหรือส่วนบนเช่นใบ อาจสังเกตอาการได้ยากมาก หากต้นส้มถูกทำลายที่ส่วนรากฝอยเพียงเล็กน้อย ส่วนบนต้นส้มอาจไม่แสดงอาการผิดปกติเลย เว้นแต่ว่าต้นส้มอาจเจริญไม่เต็มที่ ไม่ค่อยแตกใบ และบางครั้งอาจพบอาการใบอ่อนเหี่ยวคล้ายขาดน้ำ ในกรณีรากส้มถูกทำลายมาก ๆ บางกิ่งอาจแสดงอาการใบเหลืองตรงบริเวณเส้นกลางใบ ใบเหี่ยวคล้ายขาดน้ำ (หรือที่ชาวสวนเรียกว่า อาการใบกลับ) ใบร่วงกิ่งแห้งตายจากปลาย ผลส้มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและอาจร่วง เมื่อขุดดูรากพบว่ารากเน่าเป็นสีน้ำตาลแดงหรืออมส้ม เหนียว ไม่ยุ่ย สำหรับต้นส้มอายุ 5-6 ปีขึ้นไป บางครั้งอาจพบอาการเปลือกปริแตกตามบริเวณโคนต้น ส่วนเปลือกมักมีสีคล้ำ ค่อนข้างฉ่ำน้ำและอาจพบอาการยางไหลตรงบริเวณรอยแผล เมื่อถากส่วนเปลือกออกดู จะพบว่าเปลือกเน่าและยุ่ยมีแผลสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดงตรงบริเวณเนื้อโคนต้น หากปล่อยให้โรคลุกลามจะทำให้ต้นทรุดโทรมยากต่อการรักษาและป้องกันการระบาดของโรค

หากเชื้อไฟทอฟธอราติดไปกับหยดน้ำหรือถูกลมฝนพัดพาไปยังใบ ดอก และผลที่อยู่บนกิ่งล่างๆ ใกล้ระดับดิน หรือใกล้กับบริเวณแผลโคนเน่า เชื้อจะทำลายใบอ่อน ทำให้เกิดอาการเน่าหรือไหม้เป็นวงกลม สีน้ำตาลเข้มหรือน้ำตาลดำ ตรงบริเวณกลางใบ ขอบใบหรือปลายใบ ทำให้ใบหลุดร่วงได้ หากเกิดบนยอดอ่อน ยอดอ่อนนั้นจะเน่าแห้งเป็นสีดำสนิท ถ้าเชื้อเข้าทำลายดอก จะทำให้ดอกเน่าแห้ง และหากเข้าทำลายผลที่โตแล้ว โดยเฉพาะผลแก่ในระยะเข้าสี ผลจะเน่าเป็นสีน้ำตาล เริ่มจากแผลขนาดเล็กแล้วลุกลามเป็นแผลเน่าวงกลมหรือเน่าทั้งผล อาจมีเส้นใยและสปอร์สีขาวของเชื้อราไฟทอฟธอราเจริญอยู่บนแผล ผลจะร่วงเป็นจำนวนมาก เรียกอาการที่เกิดกับใบดอกและผลนี้ว่า โรคใบไหม้ ดอกเน่า และผลเน่า (brown rot) สาเหตุของโรคเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไฟทอฟธอรา (*Phytophthora parasitica* Dastur) โดยเชื้อนี้อาศัยอยู่ในดินและน้ำ แพร่กระจายโดยติดไปกับดินหรือส่วนของส้มที่เป็นโรค และสปอร์ซึ่งเป็นส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อ สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำที่ไหลผ่านรากหรือโคนต้นที่เป็นโรค พบโรคนี้ระบาดรุนแรงมากในส้มที่ปลูกแบบยกร่อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในปี 2003 Graham *et al.* ทำการศึกษาโรคของส้มที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* sp. โดยพบว่าเชื้อสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรครากเน่าโคนเน่าและโรคผลเน่าสีน้ำตาลของส้มเป็นเชื้อ *Phytophthora nicotianae* และเชื้อ *Phytophthora citrophthora* โดยเชื้อสามารถเข้าทำลายต้นกล้าส้มทำให้เกิดอาการ damping-off เข้าทำลายที่ระบบรากทำให้เกิดอาการรากเน่า (root rot) และยังสามารถเข้าทำลายผลส้มทำให้เกิดอาการผลเน่าสีน้ำตาล (brown rot) ซึ่งทำให้ผลผลิตของส้มลดลง โดยการป้องกันและกำจัดโรคนั้น ควรมีการแช่เมล็ดส้มด้วยน้ำร้อนก่อนนำไปเพาะเพื่อทำเป็นต้นตอ หรือใช้สารเคมีป้องกันกำจัเชื้อรา เช่น metalaxyl และ fosetyl-Al และจากการรายงานของ Bowman *et al.* (2007) พบว่าเชื้อสาเหตุของโรคทางดินที่สำคัญที่เข้าทำลายส้มในฟลอริด้านั้นคือเชื้อ *Phytophthora nicotianae* และ *Phytophthora palmivora* และศึกษาการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคเน่าของส้ม (*Phytophthora nicotianae* และ *Phytophthora palmivora*) ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยทำการสกัด DNA จากรากส้ม และเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคไปทำกระบวนการ PCR และ PCR-RFLP เพื่อแยกความแตกต่างของเชื้อและตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคที่แท้จริง โดยการทำ PCR นั้นใช้ specific primer คือ PNIC1 และ PNIC2 เพื่อจำแนกเชื้อ *Phytophthora nicotianae* ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรค และมีการนำไปเปรียบเทียบกับการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของเชื้อ การตรวจสอบทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาของเชื้อ เป็นต้น โดยการเข้าทำลายของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ ทำให้น้ำหนักของราก ยอด และต้นกล้าของส้มนั้นลดลง

การป้องกันกำจัด

1. สำหรับสวนส้มที่ปลูกใหม่และปลูกแบบยกร่อง ควรยกร่องไปตามแนวทิศเหนือ-ใต้ เพื่อให้ต้นส้มได้รับแสงแดดพอควร

2. การใส่ปุ๋ยคอกจะช่วยทำให้ดินโปร่งและมีสภาพดีขึ้น ระวังอย่าใส่มากเกินไปและอย่าใส่ใกล้กับโคนต้น

3. บำรุงต้นส้มให้แข็งแรง อย่าปล่อยให้ติดลูกมากจนเกินไป ระมัดระวังเรื่องการพรวนดินโดยไม่ทำให้เกิดแผลที่รากและโคนต้น

4. ตัดแต่งทรงพุ่มโคนต้นโดยเฉพาะกิ่งที่อยู่ใกล้ระดับดินควรตัดออกบ้าง เพื่อให้โคนต้นไม่รกทึบ ให้อากาศถ่ายเทและแสงแดดส่องถึงโคนต้น ในฤดูฝนควรมีการกำจัดวัชพืช

5. หมั่นตรวจดูสภาพของต้นส้มว่าแสดงอาการของโรครากเน่าและโคนเน่าหรือไม่ หากพบว่าโรคเริ่มระบาดและแน่ใจว่าเกิดจากเชื้อไฟทอฟธอราควรทำการฉีดพ่นด้วยสารเคมี ได้แก่ โฟซีธิล อาลูมีเนียม หรือมีทาแลคซิล ในอัตราตามคำแนะนำ หรือหากเกิดอาการโคนเน่า แผลเน่าช้ำ เปลือกแตกและยางไหล ให้ใช้มีดที่สะอาดและคม ถากส่วนเปลือกที่เป็นโรคออกให้หมด โดยไม่ให้กระทบกระเทือนต้นส้ม ใช้จุนสีผสมปูนขาวอัตราส่วน 1:1 ผสมน้ำและสีทาไม้พอให้เป็นแป้งเปียก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทาบริเวณรอยแผลให้ทั่ว สารเคมีอื่นๆ ที่ให้ผลดีได้แก่ คอปเปอร์ออกซีคลอไรด์ คอปเปอร์ออกไซด์ แคปตาโฟล โฟซีธิล อาลูมีเนียม มีทาแลกซิล เป็นต้น

6. เก็บรวบรวม ใบ ดอก ยอดอ่อน และผลที่เป็นโรค ทั้งที่อยู่บนต้นและร่วงบนดิน ทำลายโดยการเผา เพื่อลดแหล่งของเชื้อและการแพร่ระบาดของโรค

7. ต้นที่เป็นโรคมากหรือทรุดโทรมมาก ควรขุดเผาทำลาย แล้วราดดินบริเวณนั้นด้วยสารเคมีชนิดที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นปล่อยให้ดินตากแดดนาน 2-3 เดือน จึงปลูกส้มต้นใหม่แซมทาบริเวณโคนต้นที่ปลูกแซมด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อราโดยรอบสูงจากระดับพื้นดิน 1 ฟุต

ชีววิทยาของ *Phytophthora* (ทวี, 2548)

Phytophthora spp. อยู่ใน class Oomycetes ซึ่งมีลักษณะเด่นคือ สร้างสปอร์จากการไม่ผสมทางเพศ เรียกว่า zoospore ซึ่งมี 2 หาง (flagella) มีความยาวไม่เท่ากัน หางหนึ่งเป็นลักษณะแบบเส้นที่มีขนอ่อนโดยรอบคล้ายแปรงล้างขวด (tinsel flagellum) ทำหน้าที่ช่วยโบกให้ไปข้างหน้า อีกหางหนึ่งมีลักษณะคล้ายแส้ (whiplash flagellum) ทำหน้าที่ช่วยโบกให้ถอยหลังในการเคลื่อนย้าย หรือการว่ายน้ำของ zoospore ซึ่งเกิดขึ้นภายใน sporangium เชื้อ *Phytophthora* spp. เป็นสาเหตุโรคของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด ทั้งระยะกล้าและระยะต้นไม้ใหญ่ ในขณะนี้พืชผลโดยเฉพาะไม้ผล พืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับ ในประเทศไทยกำลังมีปัญหากับเชื้อนี้ค่อนข้างมาก

จีนัส *Phytophthora* เป็น 1 ใน 9 genera ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ในกลุ่ม Oomycetes ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีรูปร่าง และการเจริญคล้ายรา (fungus-like) และถูกกำหนดให้อยู่ในกลุ่ม Stramenopiles ซึ่งเป็นกลุ่มที่สร้าง zoospores มี 2 หาง ที่ความยาวไม่เท่ากัน การสร้าง zoospores ของ *Phytophthora* เกิดจากการแบ่งตัวของ cytoplasm ภายใน sporangia zoospores ดังกล่าวไม่มี cell wall แต่มี plasma-membrane เมื่อ zoospores ว่ายน้ำหรือเคลื่อนที่ไปเจอพืชอาศัย จะปลดหางทิ้งและเข้าสปอร์ (encyst) พร้อมกับมีการสร้าง cell wall ที่มีส่วนประกอบของ cellulose ทันที (ภายใน 5-10 นาที) สปอร์ดังกล่าวพร้อมที่จะงอกเส้นใยเข้าทำลายพืชโดยตรง

Phytophthora ส่วนมากมีการปรับตัวในการเป็นปรสิตของโรคพืชได้อย่างดี ในวงจรชีวิตมีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ประมาณ 50% ของ *Phytophthora* species ที่พบทั้งหมดเป็นกลุ่มที่ผสมตัวเอง (homothallic) เมื่อเข้าทำลายพืชได้แล้วจะมีการผสมตัวเองเกิด oospores ผนังหนาอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช ส่วนที่เหลือเป็นกลุ่มที่มีคู่ผสมต่างกัน (heterothallic) ระหว่าง 2 mating types (A1 และ A2) ที่ผสมเข้ากันได้ จึงจะเกิด oospores และ oospores เหล่านี้มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีเยี่ยม สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานหลายปีในเศษซากพืชหรืออินทรียวัตถุในดิน เป็นส่วนขยายพันธุ์ที่มีอายุยืนยาวกว่าสปอร์ชนิดอื่นๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจาก oospores แล้ว asexual spores ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นจำนวนมากบนเนื้อเยื่อของพืชอาศัย เช่น sporangia ของบางชนิด (species) เมื่อแก่หรือมีอายุสปอร์นี้จะหลุดจากก้านได้ง่าย ทำให้สามารถแพร่กระจายไปตามสายลมได้ไกล ส่วน sporangia พวกที่ไม่หลุดจากก้านจะอาศัยน้ำเป็นตัวกลางพาไปในลักษณะของสปอร์เคลื่อนที่ด้วยหางหรือ zoospores ที่มี 2 หาง ว่ายน้ำไปตามแรงดึงดูดของสารเคมีที่ผลิตหรือปล่อยออกมาจากรากพืชอาศัยที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง ทำให้ *Phytophthora* เปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างได้ดีตามสภาพแวดล้อมในหลายรูปแบบ ในวงจรชีวิตมีสปอร์ 4 ชนิด คือ sporangia, zoospores, chlamydospores และ oospores เชื้อ *Phytophthora* ส่วนมากเป็นพวกที่อาศัยอยู่ในดินบนเศษซากพืช บางระยะเวลาเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกับรากและโคนต้นพืช โดยมี oospores และ chlamydospores เป็นส่วนที่อยู่ข้ามฤดู

Phytophthora มีลักษณะพิเศษเฉพาะที่แตกต่างจากราทั่วไปหลายประการดังนี้

1. สารปฏิชีวนะ polyene (Pimaracin) มีประสิทธิภาพในการควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของราชนิดอื่น ๆ ยกเว้น *Phytophthora* ฉะนั้นจึงได้ใช้สารปฏิชีวนะตัวนี้ผสมในอาหารสังเคราะห์ใช้แยก *Phytophthora* โดยเฉพาะ

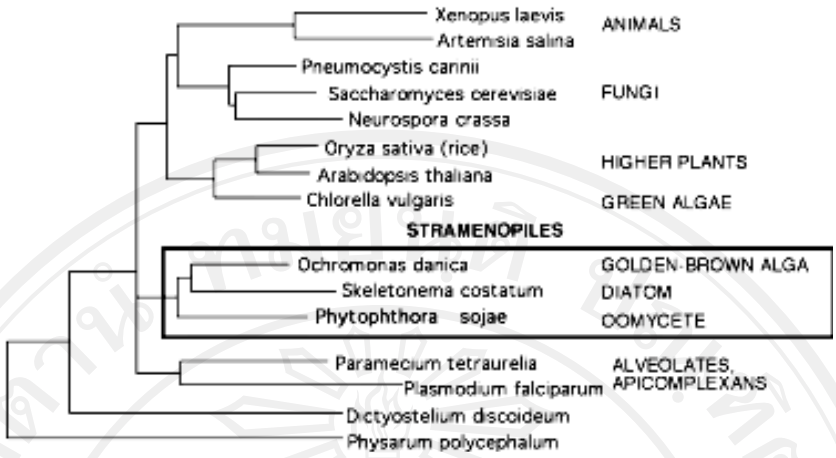
2. โดยธรรมชาติตลอดระยะการเจริญของเส้นใย *Phytophthora* อยู่ในลักษณะ diploid (2N) มีเพียงระยะสั้นๆ ที่เป็น haploid (N) คือการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ของ antheridium (เพศผู้) และ oogonium (เพศเมีย) ก่อนผสมกันเกิด oospore ซึ่งแตกต่างจากราอื่น ๆ ที่เป็น haploid

3. การศึกษาส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall) ของ *Phytophthora* มีส่วนประกอบของ cellulose และ β-glucan ซึ่งแตกต่างไปจากราอื่น ๆ ซึ่งมี chitin เป็นส่วนประกอบสำคัญ

4. *Phytophthora* ไม่สามารถสังเคราะห์ sterols ด้วยตัวมันเองเหมือนราชนิดอื่น ๆ จึงต้องการ sterols จากภายนอกมาใช้ในการเจริญและสร้างเซลล์สืบพันธุ์

5. การเกิดวิวัฒนาการของกลุ่ม Oomycetes รวมทั้ง *Phytophthora* มีความใกล้ชิดกับพวกสาหร่าย (heterokont algae) มากกว่าราจึงทำให้พวกนี้จัดอยู่ในสิ่งมีชีวิตคล้ายรา เพราะลักษณะของ zoospores มี 2 หาง ขนาดความยาวไม่เท่ากันและมีลักษณะรูปร่างภายนอกแตกต่างกัน ซึ่งเป็นลักษณะประจำ ที่สืบทอดมาจากบรรพบุรุษที่มีวิวัฒนาการมาด้วยกันและจากผลการศึกษาวิจัยในระดับโมเลกุลเรื่องความเหมือนของการเรียงลำดับของ small sub unit ribosomal RNA ซึ่งยืนยันจากการวิเคราะห์ส่วนประกอบในระดับโมเลกุลของกลุ่ม Oomycetes มีความแตกต่างไปจากราแต่มีความใกล้ชิดกับ heterokont algae มากกว่า (ภาพ 1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยูแคริโอตโดยอาศัยลำดับของยีน 16S rRNA ซึ่งดัดแปลงมาจาก Sogin and Silberman (1998) (Tyler, 2007)

การจัดลำดับชั้นของเชื้อ *Phytophthora* sp. (Agrios, 2005)

Kingdom Chromista

Phylum Oomycota

Class Oomycetes

Order Peronosporales

Family Pythiaceae

Genus *Phytophthora*

เชื้อ *Phytophthora* sp เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน สร้างเส้นใยไม่มีผนังกั้น แต่อาจสร้างผนังกั้นเมื่อมีอายุมากขึ้น การขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ โดยจะสร้างสปอร์ที่ว่ายน้ำได้เรียกว่า zoospore เกิดภายใน sporangium ซึ่งส่วนใหญ่มีรูปร่างลักษณะคล้ายผลมะนาว การขยายพันธุ์โดยใช้เพศ มีการสร้าง oospore ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่าง oogonium และ antheridium นอกจากนี้ เชื้อจะสร้าง chlamydospore ซึ่งเป็นสปอร์ผนังหนา สามารถพักตัวอยู่ในดินได้เป็นอย่างดี วงจรชีวิตของเชื้อ *Phytophthora* sp มีความซับซ้อนมากมักสร้างสปอร์ 4 ชนิด คือ

1. Sporangia (Greek: spora, seed + angeion, vessel) เป็น vegetative structures บางครั้งมีลักษณะคล้าย sexual spore ซึ่งจะงอก germ tube เพื่อสร้างเส้นใยใหม่ โดยที่ sporangia งอกโดยตรงเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมมีอาหารอุดมสมบรูณ์ มีน้ำน้อย และอุณหภูมิสูง ความชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

steral และออกซิเจนในอากาศจะมีผลต่อการสร้าง sporangia แสง near-UV ที่ช่วงคลื่น 320-475 nm สามารถกระตุ้นการสร้าง sporangia ได้ ส่วนแอมโมเนีย ธาตุ Cu^{+} และ pH ที่สูงจะมีผลต่อเชื้อโดยจะยับยั้งความสามารถในการสร้าง sporangia ได้

2. Zoospore เป็นสปอร์ที่สร้างภายใน sporangium ต้องมีน้ำและอุณหภูมิที่ต่ำประมาณ 15-18 องศาเซลเซียส ไม่มีผนังเซลล์ ไม่ต้องอาศัยเพศ มีรูปร่างคล้ายไต สามารถว่ายน้ำได้โดยมี flagella 2 เส้น สามารถว่ายน้ำได้ไกล 563 มิลลิเมตร ต่อชั่วโมง การว่ายน้ำต้องอาศัยช่องว่างภายในดินขนาด 50 ถึง 140 ไมโครเมตร การปะทะกับผิวหน้าของน้ำทำให้ zoospore ไม่สามารถกลับตัวได้และลดความสามารถในการเคลื่อนที่ลง ทิศทางการว่ายน้ำและการงอกจะขึ้นอยู่กับ amino acid ซึ่งได้แก่ serine, glutamate และ asparagines ซึ่งเป็นสารที่รากพืชปล่อยออกมา การเคลื่อนที่ของ zoospore จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น pH ต่ำ สัมผัสกับผิวหน้า และมีปริมาณ zoospore น้อย zoospore ถูกปล่อยออกจากช่องที่อยู่ตรงปลายของ sporangium การปล่อย zoospore นี้ ทำให้ปริมาณเชื้อที่สามารถเข้าทำลายพืชมีมากกว่าการที่ sporangium งอกโดยตรง เมื่อ zoospore พบกับพื้นที่ผิวที่เหมาะสมต่อการงอก รูปร่างจะเปลี่ยนเป็นทรงกลมสลัดหางทิ้ง และสร้าง germ tube อย่างรวดเร็ว เพื่อทำลายพืชและสร้างเส้นใยในการเจริญเติบโต มักจะเข้าสู่พืชทางรากหรือปากใบโดยตรง

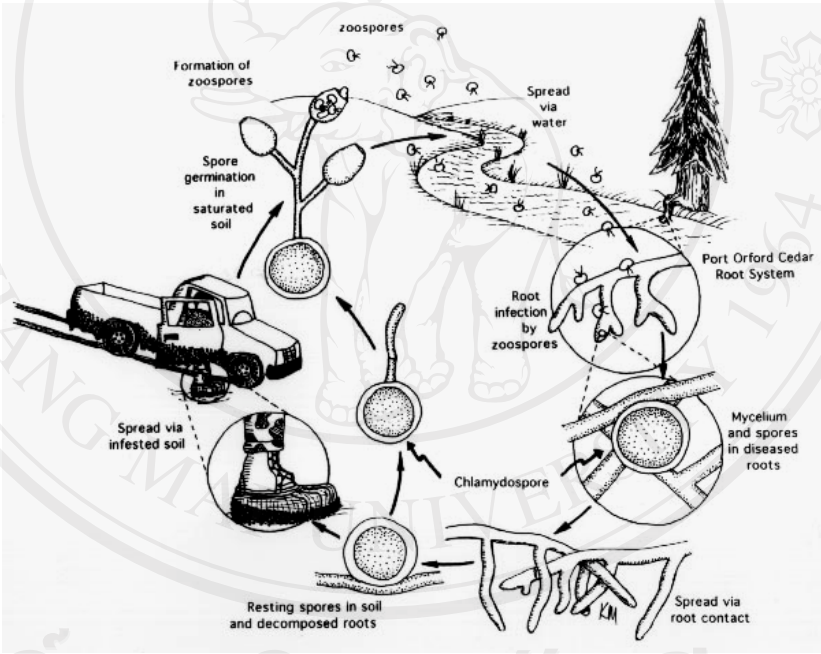
3. Oospore เป็นสปอร์ที่สร้างแบบอาศัยเพศ เกิดจากการรวมตัวกันของ gametangia ที่เรียกว่า oogonia และ antheridia การสร้าง oospore จะถูกยับยั้งด้วยแสงและอุณหภูมิซึ่งขึ้นอยู่กับแต่ละ species แต่ส่วนมากแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การสร้าง oospore มักจะต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเส้นใย อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 94:1 จะส่งเสริมการสร้าง oospore รวมไปถึงการปรากฏของแคลเซียมด้วย oospore เป็นสปอร์ที่มีลักษณะที่เหมาะสมต่อการพักตัว มักสร้างเมื่อมีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมแก่การเจริญแล้วจะงอก germ tube เพื่อสร้างเส้นใยเหมือน sporangia และ zoospore

4. Chlamydospore (Chlamys, clok + spora, seed) เป็นสปอร์ที่สร้างแบบไม่อาศัยเพศ เป็นเซลล์ที่สร้างภายในเส้นใย หรือปลายเส้นใย โดยเส้นใยสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้น เพื่อให้สามารถอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาสม เช่น อุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส มี sterol ในอาหารที่เจริญ และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูง (30:1) การงอกสามารถเกิดขึ้นเมื่ออาหารมีความอุดมสมบรูณ์มากขึ้นโดยเฉพาะ glucose และ asparagines

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วงจรชีวิตของเชื้อ *Phytophthora* spp.

สปอร์ของเชื้อ *Phytophthora* spp. สามารถพักตัวอยู่ในดินในรูป chlamydospores ได้เป็นระยะเวลานาน เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม สปอร์จะงอกเป็นเส้นใย และสร้าง sporangium ที่สามารถปล่อย zoospore ที่มีหางสองเส้น ซึ่งเคลื่อนที่ในน้ำ เข้าไปในพืชอาศัยและทำลายพืชนั้นได้โดยตรง การแพร่กระจายอาจเกิดโดยทางอ้อม เช่น เส้นใยหรือ sporangium ถูกลมหรือฝนพัดพาไปยังแหล่งเพาะปลูกอื่น ติดไปกับดินปลูกหรือกิ่งพันธุ์ เป็นต้น เชื้อกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่า ใบร่วง และรอยไหม้ของพืชหลายชนิด เช่น ยางพารา อาโวกาโด มะม่วง วานิลลา สับปะรด มะละกอ ส้ม มะเขือเทศ ทุเรียน และกล้วยไม้ เป็นต้น (Ristaino and Gumpertz, 2000) ตัวอย่างวงจรชีวิตของเชื้อ *Phytophthora* spp. (ภาพ 2)

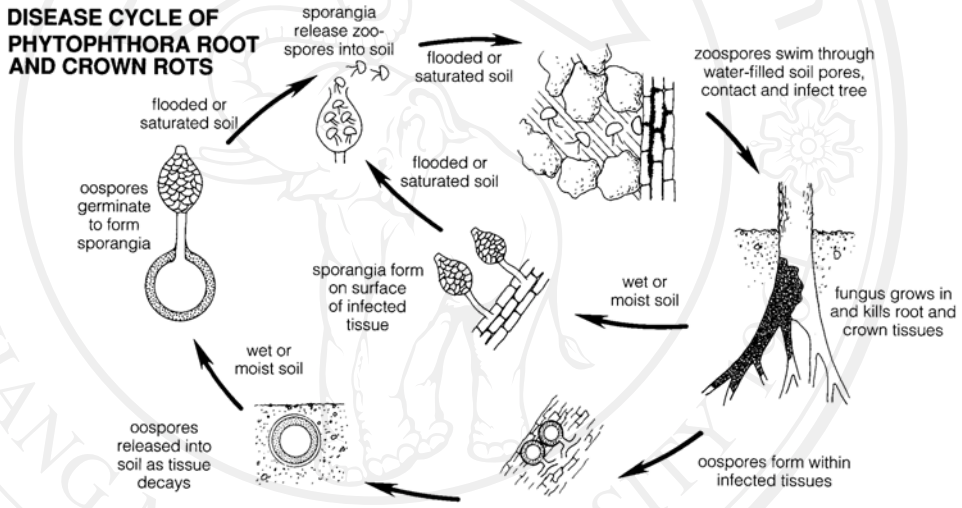


ภาพ 2 วงจรชีวิตของเชื้อ *Phytophthora* spp. (Hansen, 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วงจรการเกิดโรคของเชื้อ *Phytophthora* spp.

การเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชของเชื้อ *Phytophthora* spp. เริ่มจาก sporangium ปล่อย zoospore ไปบนผิวของพืช จากนั้น zoospore จะเข้าสปอร์ (encyst) และงอกออกมาเพื่อสร้างอะเพรสซอเรีย (appressoria) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ใช้เจาะเข้าไปในผิวของพืชอาศัย เส้นใยที่งอกต่อออกมาจากอะเพรสซอเรียสามารถแทรกเข้าไปกระจายในเซลล์ชั้นต่าง ๆ ของพืชอาศัย บริเวณที่มีการบุกรุกของรานี้มีลักษณะเป็นรอยไหม้สีน้ำตาล (necrosis) ซึ่งเส้นใยที่งอกออกมาในบริเวณรอยไหม้นี้ระหว่างเซลล์ที่ตายและยังมีชีวิตอยู่จะสามารถสร้าง sporangium เพื่อแพร่กระจายไปส่วนอื่นต่อไป (Judelson and Blance, 2005) (ภาพ 3)



ภาพ 3 วงจรการเกิดโรคของเชื้อ *Phytophthora* spp. (Wilcox, 1992)

การจำแนกชนิด (species) *Phytophthora* sp.

วิธีการจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาลักษณะของ sporangium ลักษณะการเกิด antheridium ขนาดของ oogonium การเกิด oospore ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป และความหนาของผนัง ลักษณะการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุดของการเจริญเติบโต และความจำเพาะเจาะจงกับ host (ขจรศักดิ์ และศรีสุรางค์, 2545) ซึ่งวิธีการเหล่านี้ใช้ระยะเวลาในการศึกษานาน และต้องอาศัยผู้ที่มีความรู้ ความชำนาญในการจัดจำแนกเชื้อราเป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังได้มีการนำเทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยา (serological techniques) มาใช้ในการแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Phytophthora* แต่ละ species อีกด้วย (Jones and Shew, 1988; McDonald *et al*., 1990; Grote and Gabler, 1999) แต่เทคนิคนี้ก็มิได้ถูกพัฒนา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อย่างต่อเนื่องด้วยเหตุผลที่ขาด antibodies ที่จำเพาะและมีขั้นตอนการผลิต monoclonal antibodies ที่ยุ่งยาก (Bonants *et al*., 1997) เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้ผลดีในการจัดจำแนกและตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อราโรคพืชเนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง แม่นยำ และรวดเร็วกว่าวิธีอื่น (Lacourt and Duncan, 1997; Schena *et al*., 2002; Ippolito *et al*., 2002) ในปี 2007 Bowman *et al* ศึกษาการจัดจำแนกเชื้อสาเหตุโรคเน่าของส้ม (*Phytophthora nicotianae* และ *Phytophthora palmivora*) ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล โดยทำการสกัด DNA จากรากส้ม และเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคไปทำกระบวนการ PCR และ PCR-RFLP เพื่อแยกความแตกต่างของเชื้อและตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคที่แท้จริง

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า *In vitro* enzymatic gene amplification ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1985 เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเฉพาะของบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลองโดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ซึ่งกระบวนการต่างๆ เลียนแบบจากการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอในสภาพธรรมชาติ (*In vitro* DNA replication) ซึ่งการทำปฏิกิริยา PCR ที่ต่อเนื่องซ้ำๆกัน จะพบว่ามีสายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นโดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ ดังนั้นเมื่อทำหลายๆ รอบของ PCR ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของทุกๆ รอบ ถ้าทำ PCR 20 รอบ ก็จะได้สายดีเอ็นเอเพิ่มเป็น 2^{21} สาย ถ้าทำปฏิกิริยา n รอบ ก็จะได้สายดีเอ็นเอเท่ากับ 2^{n+1} เมื่อประสิทธิภาพการผลิต 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยทั่วไปมักจะทำ PCR ประมาณ 30-40 รอบ ก็จะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็นจำนวนมากถึงพันล้านเท่าของจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบ
(อังสนา, 2546)

หลักการของเทคนิค PCR โดยใช้หลักเลียนแบบธรรมชาติของดีเอ็นเอที่ว่า โดยทั่วไปสายดีเอ็นเอสามารถจับคู่กันได้เพราะมีเบสคู่สมกัน (complementary) ดังนั้นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอชิ้นใหม่ในหลอดทดลองจึงใช้หลักการเดียวกัน โดยอาศัยดีเอ็นเอเดิมเป็นต้นแบบ (template) และอาศัยดีเอ็นเอสายสั้นๆ (primer) ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้น และมีเอนไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไป โดยเลือกจับนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด (dNTPs) คือ dATP, dCTP, dTTP และ dGTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบเดิม ดังนั้นก็จะได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้น (อังสนา, 2546) โดย PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดยใช้ primer 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ขั้นแรกเรียกว่า denaturation เป็นการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส ขั้นที่สองเรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงและจัดให้ primer สายสั้นๆ (14-30 mer) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้ช่วงอุณหภูมิ 37-60 องศาเซลเซียส ขั้นที่สามเรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของ primer ตามข้อมูลของต้นแบบดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้จะต้องมีคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดสามขั้นตอน จากขั้นตอนที่ 1-3 รวมกันเป็นหนึ่งรอบ (one cycle) ซึ่งจะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่จำนวนที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ จากขั้นที่หนึ่งถึงขั้นที่สามหมุนเวียนไปอีกหลายๆ รอบ จะเพิ่มปริมาณ (amplify) ดีเอ็นเอได้มากมาย (พิสสวรรณ, 2540)

ในการทำ PCR ต้องใช้สารเคมีต่างๆ ดังนี้ บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotide triphosphase: dNTPs) ประกอบด้วย dATP dCTP dGTP dTTP ส่วน primer ที่นิยมใช้คือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอเป้าหมายใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและที่มีคุณภาพไม่ดีนัก แต่ถ้าใช้คุณภาพดีจะได้ผลผลิตมากกว่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาและมีรายงานว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมมีผลต่อปฏิกิริยา และเอนไซม์ เลือกใช้เอนไซม์ที่ทนความร้อนได้ (thermostable DNA polymerase) ชนิดที่ใช้กันมากคือ *Taq* polymerase (สุรินทร์, 2545)

การแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และตัวกลางที่ใช้ด้วย

อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นโพลิเมอร์ของ D-galactose สลับกับ 3,6-anhydrogalactose แยกได้จากวุ้น (agar) เนื่องจากอะกาโรสจับตัวกับสารละลายต่างๆ ได้น้อยมาก จึงนิยมใช้เป็นตัวกลางในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอโดยทั่วไปจะใช้อิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นส่วนใหญ่เพราะมีช่วงที่ใช้ได้มากกว่า การเตรียมทำได้ง่ายและไม่มีอันตรายเมื่อเทียบกับโพลีอะครีลาไมด์ การทำอิเล็กโทรโฟรีซีสมักทำในแนวราบ (horizontal gel) (สุรินทร์, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (จิระเดช, 2544; กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2536)

การทำการเกษตรในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อโรคพืชเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะสารป้องกันและกำจัดเชื้อรา ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมมนุษย์และสัตว์ สารเคมีเป็นพิษตกค้างในสภาวะแวดล้อม ผลิตผลเกษตรและมีผลกระทบต่อผู้บริโภค การควบคุมโรคโดยชีววิธี หมายถึง การลดปริมาณของเชื้อโรคพืชหรือลดกิจกรรมของเชื้อโรคอันจะก่อให้เกิดโรคจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตซึ่งรวมทั้งพืชชั้นสูง และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) ยกเว้นผลจากการกระทำต่อเชื้อโรคโดยตรงจากมนุษย์ หรือมีความหมายอีกอย่างว่าการควบคุมโรคพืชโดยการใช้ศัตรูธรรมชาติ เช่น ตัวห้ำ ตัวเบียน และจุลินทรีย์ เพื่อลดระดับประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืชให้อยู่ในระดับที่พืชทนทานได้ เป็นการลดการเกิดโรค หรือลดความเสียหายของพืชที่เกิดจากเชื้อโรค ซึ่งอาจรวมไปถึงจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พันธุกรรม หรือผลผลิตที่เกิดจากพันธุกรรมด้วย การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีนี้เป็นวิธีการค่อนข้างใหม่สำหรับประเทศไทย แต่ในปัจจุบันเกษตรกรจำนวนมาก และนักวิชาการเกษตรสมัยใหม่เริ่มเห็นความสำคัญ และนิยมใช้แทนสารเคมีกันมากขึ้น มีการนำมาใช้เพื่อเพิ่มผลผลิต และแก้ปัญหามลพิษจากสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดโรคพืช ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อทำให้เกิดสมดุลทางธรรมชาติ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ในปัจุบันการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนิยมกระทำกันอยู่ 2 ประเภทคือ

1.) การใช้เชื้อที่มีอยู่หรือที่ผลิตขึ้นมาใหม่ทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยตรง ในกรณีเชื้อที่มีอยู่แล้ว อาจเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติทั่วไปหรืออาจเป็นจุลินทรีย์ที่มนุษย์เลี้ยงขึ้นมาจากธรรมชาติ แล้วปล่อยให้ทำลายกันเอง โดยการช่วยปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม หรือเร่งการเจริญเติบโตเชื้อปฏิปักษ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ การควบคุมโรคพืชส่วนใหญ่จะใช้วิธีนี้

2.) การใช้เชื้อพันธุ์ที่อ่อนแอกว่าทำลายหรือต่อต้านเชื้อสาเหตุโรคพืชพันธุ์ปกติ การใช้วิธีนี้คล้ายกับการฉีดวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดกับมนุษย์หรือสัตว์ทั่วไป เป็นการสร้างภูมิคุ้มกันหรือ cross protection ซึ่งมีการผลิตสารที่คล้ายวัคซีนออกมาใช้ เพื่อป้องกันโรคที่มีเชื้อสาเหตุที่รุนแรงกว่า ตัวอย่างเช่นการใช้ไวรัสสาเหตุโรคใบจุดวงแหวนของมะละกอสายพันธุ์ที่อ่อนแอใส่หรือพ่นลงบนพืชเพื่อป้องกันต้นมะละกอไม่ให้เป็นโรคด้วยเชื้อสายพันธุ์ที่รุนแรงกว่า เป็นต้น (สืบศักดิ์, 2540)

โดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกการควบคุมโดยชีววิธี 4 ประเภทด้วยกันคือ

1) การแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัย (competition) การที่สิ่งมีชีวิต 2 ชนิดหรือมากกว่าเจริญอยู่ด้วยกันและมีความต้องการอาหารและที่อยู่อาศัย เมื่ออาหารที่มีอยู่ไม่เพียงพอ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะเกิดการแข่งขันกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ธาตุอาหารและปัจจัยอื่นๆ สำหรับการเจริญเติบโต ซึ่งการแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัยของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถแย่งอาหารจากเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สาเหตุโรค ทำให้ปริมาณของสารอาหารซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของเชื้อสาเหตุของโรคลดลง เนื่องจาก จุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการแก่งแย่งอาหารหรือพื้นที่อาศัยได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุของโรคและมีความสามารถในการใช้สารอาหารได้มากชนิด และใช้ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้เจริญได้รวดเร็ว ทำให้พืชแข็งแรง มีผลผลิตที่สูงขึ้น (เกษม, 2532)

2) การทำลายชีวิต (antibiosis) เชื้อปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีนั้น จะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่และนับว่าเป็นกลไกชนิดแรกที่นำมาใช้ โดยเชื้อปฏิปักษ์จะมีความสามารถในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งหรือทำลายชีวิตของเชื้อโรคหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สร้างขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งมีผลในการกำจัดเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียก่อโรค (สมคิด, 2549)

3) การเป็นปรสิต (parasitism) คือการที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถเจริญอยู่ใกล้เคียงหรือบนส่วนของเชื้อโรคพืชแล้วเข้าทำลายเพื่อใช้อาหาร หรือสารประกอบต่าง ๆ จากเชื้อสาเหตุโรคพืช ปรสิตของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasite) แบ่งเป็น 2 พวก คือ necrotrophic mycoparasite เป็นพวกที่ต้องฆ่าหรือทำให้เชื้อโรคตายก่อนจึงจะสามารถใช้อาหารจากเส้นใยหรือสปอร์ การฆ่าอาจเกิดขึ้นโดยสร้างสารพิษหรือเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรค เช่น เอนไซม์ chitinase และ glucanase พวกที่สองคือ biotrophic mycoparasite เป็นพวกที่เจริญสัมผัสอยู่กับเส้นใยของเชื้อราโรคพืช แล้วแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในโดยไม่ทำให้ตาย กระบวนการเป็นปรสิตมักจะพบในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ผลิตเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายโดยเฉพาะการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค ตัวอย่างเอนไซม์หลักที่พบ คือ chitinase และ glucanase

4) การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced disease resistance) เป็นกลไกที่กำลังได้รับความสนใจศึกษากันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่เคยเป็นเชื้อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค แล้วสามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้

วิธีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (นิพนธ์, 2538)

มีการศึกษาเพื่อนำเอาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืช ซึ่งนิยมนำไปใช้กับโรคพืชที่เกิดบริเวณผิวราก (rhizoplane) หรือบริเวณผิวพืชที่อยู่เหนือดิน (phylloplane) ซึ่งการใช้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคที่บริเวณทั้งสองนี้จะมีกรรมวิธีการใช้ที่แตกต่างกัน

1. บริเวณผิวราก จะมีกรรมวิธีใช้เชื้อปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคได้หลายแบบแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสะดวกในการปฏิบัติของผู้ใช้ และแต่ละวิธีอาจให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไม่เท่ากันซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ตั้งแต่คุณสมบัติของพืชเองตลอดจนลักษณะของผลิตภัณฑ์เชื้อปฏิปักษ์ที่มีหลายรูปแบบดังนี้

1.1 การคลุกเมล็ด (seed treatment) นิยมใช้กับพืชที่ใช้เมล็ดเพาะปลูกโดยเมล็ดจะต้องมีขนาดไม่ใหญ่โตมากนัก ช่วยให้ปฏิบัติได้ง่ายและไม่สิ้นเปลืองผงเชื้อ หรือสารแขวนลอยของเชื้อมักนิยมใช้คลุกเมล็ดก่อนปลูก

1.2 การราดดิน (soil drench) เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ปฏิบัติกันมาก แต่จะไม่ค่อยสะดวกหากจะนำไปใช้ในสภาพไร่ของเกษตรกรที่อาจมีน้ำสะอาดไม่เพียงพอหรือขาดแคลนน้ำ และถ้าหากปลูกพืชเป็นปริมาณมากจะทำให้เกิดปัญหาความไม่สะดวกในการปฏิบัติยิ่งขึ้น

1.3 การคลุกดิน (soil amendment) เป็นวิธีการนำเอาผงของเชื้อหรือสารละลายเชื้อปฏิปักษ์ใส่ไปในดินและคลุกเคล้าผสมกันให้ทั่วก่อนปลูกพืช การใส่ในรูปของผงเชื้อ ค่อนข้างจะสะดวกกว่าในรูปของสารละลาย

1.4 การจุ่มราก (root dipping) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กับพืชที่ต้องเพาะเมล็ดแล้วย้ายกล้าไปปลูก เช่น มะเขือเทศ พริก หรือพืชที่มีเมล็ดพันธุ์ราคาแพง โดยจะต้องทำให้ดินบริเวณรากหลุดออกให้หมดก่อนนำไปจุ่มในสารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^8 cfu/ml แล้วจึงนำไปปลูกในแปลงต่อไป วิธีนี้จะทำให้เชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคได้ดีเพราะรากจะสัมผัสกับเชื้อได้หมดทุกส่วน ไม่ก่อให้เกิดช่องว่างให้เชื้อโรคเข้าทำลาย

2. บริเวณผิวพืชที่อยู่เหนือดิน การใช้มีรูปแบบที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก และมีวิธีใช้ที่นิยมเพียง 2 วิธี คือ

2.1 การทา (paste painting) เป็นวิธีที่นิยมใช้กับพืชยืนต้นที่ถูกทำลาย มีแผลปรากฏให้เห็นชัดเจนบนส่วนของต้นหรือกิ่ง บริเวณที่สามารถนำเอาเชื้อปฏิปักษ์ที่เตรียมให้มีความเข้มข้นและเหนียวไปทา เพื่อให้ยึดติดกับผิวพืชได้คงทน สามารถป้องกันและรักษาพืชให้คืนเป็นปกติ ถ้าหากเป็นพืชยืนต้นสูงๆ หรือพืชล้มลุกจะไม่สะดวกในการปฏิบัติ

2.2 การพ่น (spraying) เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากกับพืชที่ปลูกเป็นปริมาณมากหรือมีลำต้นสูง ซึ่งมีหลักการปฏิบัติเช่นเดียวกับการพ่นสารเคมีกำจัดโรคพืช โดยมากแล้วนิยมใช้เชื้อที่เลี้ยงบนอาหารมาทำเป็นสารละลายแล้วจึงนำไปพ่นลงบนพืช เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคที่แพร่ระบาดโดยปลิวไปกับลม ฝน เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบคทีเรียปฏิปักษ์

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นดิน น้ำ อากาศ หรือเจริญภายในต้นพืช ซึ่งกระบวนการทางสรีรวิทยาเพื่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ เกิดผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของสิ่งมีชีวิตอื่นบนโลก บางชนิดทำให้เกิดโรคในคน สัตว์และพืช บางชนิดทำประโยชน์ให้คน สัตว์ และพืชมีชีวิตที่สมบรูณ์ขึ้น บางกลุ่มทำให้เกิดผลเสียต่อสภาพแวดล้อม แต่บางกลุ่มช่วยปรับปรุงและรักษาสภาพแวดล้อมได้ดี ในดิน น้ำและอากาศให้มีสภาพดีขึ้นได้ ช่วยกำจัดสารพิษ ทั้งนี้เกิดจากกระบวนการทางสรีรวิทยาหรือ metabolism เพื่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย ซึ่งมนุษย์ได้หาประโยชน์จากกระบวนการดังกล่าว นำมาปรับปรุงใช้เพื่อความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของสิ่งมีชีวิตอื่นบนโลก (เสาวนีย์, 2547)

ในปัจจุบันมีการยอมรับและให้ความสนใจในการใช้แบคทีเรียในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งเรียกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถพบได้โดยทั่วไป เช่น จากดินบริเวณไรโซสเฟียร์ (rhizophere) ในเนื้อเยื่อพืช (endophyte) บนส่วนต่างๆ ของพืช (epiphyte) บนกิ่ง ดอก ใบ ผล และพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดมีคุณสมบัติในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งมีกลไกในการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุ 4 ประการ คือ

1) การแก่งแย่งอาหารและพื้นที่อาศัย (competition) การแข่งขันที่พบมากคือ การนำเอาธาตุอาหารหรือสารต่างๆ ที่มีอยู่ในดินมาใช้ในการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อโรคขาดสารอาหารและไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ เช่น แบคทีเรียในกลุ่มของ fluorescent pseudomonas *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. เป็นต้น มีความสามารถในการใช้สารอาหารได้หลายชนิดและเจริญอย่างรวดเร็วเข้าครอบครองพื้นที่บริเวณรากได้ทั้งหมด ซึ่งเป็นการแก่งแย่งที่อยู่อาศัยบริเวณรากพืช ทำให้เชื้อโรคไม่มีโอกาสเข้าทำลายรากได้และยังช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชและเพิ่มปริมาณของผลผลิตอีกด้วย จึงมีผู้ตั้งชื่อแบคทีเรียเหล่านี้และที่มีลักษณะใกล้เคียงกันนี้ว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) (อนุภาพ, 2536) ตัวอย่างการศึกษาของ มณจันทร์ (2536) รายงานว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP01 สามารถเข้าครอบครองพื้นที่ก่อนการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium roseum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวและโคนเน่าของกล้วยไม้ และเชื้อ *Pythium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้มโอ เมื่อนำ *B. subtilis* สายพันธุ์ NSRS 89-24 และ NSRS 89-26 คลุกเมล็ดข้าวหรือแช่เมล็ดพันธุ์ก่อนปลูก พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถลดความรุนแรงของโรคขอบใบแห้ง สาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. oryzae จากระดับความรุนแรงของโรค 94 เปอร์เซ็นต์ เป็น 19 และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ Lamessa and Zeller (2007) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียบริเวณรอบ ๆ รากของมันฝรั่ง มะเขือเทศ พริกหวาน กาแฟ และข้าวโพด เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรีย strain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

APF1 และ B2G มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวโดยทำให้การเกิดโรคลดลง 60 และ 56 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น 96 และ 70 เปอร์เซ็นต์ จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่า แบคทีเรีย strain APF1 คือ *Pseudomonas fluorescens* ส่วน B2G คือ *Bacillus subtilis* นอกจากนี้ ในปี 2005 Jiang *et al.* ได้ประเมินความสามารถและการประยุกต์ใช้ *Bacillus* sp. เพื่อควบคุมโรคไฟทอปทอร่าไบล์ท ของพริกหวานในสภาพแปลง โดยใช้ *Bacillus* sp. BB11, FH17 และ BF (BB11 ผสมกับ FH17 อัตราส่วน 1:1) จากการทดลองพบว่าการใช้ BF สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรค 60.3 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มปริมาณผลผลิตได้ถึง 200 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้ BB11 เพียงอย่างเดียวให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเป็น 55.8 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มปริมาณผลผลิตได้ 80.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ FH17 ให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเป็น 37.1 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มปริมาณผลผลิตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการทดลองใช้ BF 4 กรรมวิธี คือ 1. ผสม BF ในกาก rapeseed 2. ผสม BF ในกาก rapeseed แล้วหมักก่อนใช้ 3. พ่น BF 4. ราด BF จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ *Bacillus* sp. ที่เหมาะสมที่สุดคือ 10^6 cfu/ml และอัตราการใช้ในแต่ละกรรมวิธี คือ 15, 7.5, 15 และ 22.5 l/ha ตามลำดับ กรรมวิธีที่ 2 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด คือ 88 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น 43 เปอร์เซ็นต์

2. การสร้างสารทำลายชีวิต (antibiosis) เป็นกระบวนการที่เกิดจากการใช้สารที่สร้างขึ้นจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง สารดังกล่าวมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตและอาจมีผลในการทำลายชีวิตของเชื้อโรคได้ โดยสารที่สร้างจากแบคทีเรียปฏิปักษ์มี 4 ชนิดคือ

สารปฏิชีวนะ (antibiotic) เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีผลยับยั้งการเจริญหรือระงับกิจกรรมของเชื้อสาเหตุอย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย องค์ประกอบ คุณสมบัติทางเคมีและสภาพของอาหารที่ใช้เลี้ยง Oejijono *et al* (1993) พบว่ากลไกในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชของเชื้อ *Acinetobacter* sp., *Bacillus polymyxa*, *B. subtilis*, *Pseudomonas cepacia* และ *P. putida* เป็นการสร้างสารปฏิชีวนะมากกว่าการสร้างสาร siderophore นอกจากนี้เชื้อ *B. subtilis* A13 สร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ถึง 9 ชนิด เชื้อ *Bacillus* spp.สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารพวก polypeptide เช่น bacilysocin สามารถยับยั้งเชื้อ *Candida pseudotropicalis* และ *Cryptococcus neoformans* (Tamehiro *et al*., 2002) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Szczech and Shoda (2006) รายงานว่า *Bacillus subtilis* RB14-C มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ Iturin A ซึ่งเป็นสารชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค damping-off ของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mahadtanapuk *et al.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2007) ซึ่งใช้ *Bacillus* spp. ได้แก่ *B. amyloliquifaciens*, *B. licheniformis* และ *B. subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum musae* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในปทุมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) โดยวิธี dual culture พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. musae* ได้ และจากการศึกษาสารที่ *Bacillus* spp. สร้างขึ้นโดยวิธี paper chromatography พบว่าคือสาร Iturin A ซึ่งตรวจพบใน *B. amyloliquifaciens* และ *B. subtilis* แต่ไม่พบใน *B. licheniformis* Shoda (2000) รายงานว่า *B. subtilis* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, mycosubtilin, bacilysin, fengymycin และ mycobacillin ขึ้นอยู่กับอาหาร (substrate) ที่เหมาะสม

Bacteriocin เป็นโมเลกุลของโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากแบคทีเรียชนิดหนึ่งและมีผลจำเพาะเจาะจงในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในจีนัสเดียวกัน ตัวอย่างที่เห็นชัดสำหรับการควบคุมเชื้อโรคด้วยกลไกนี้ คือ การควบคุมโรค crown gall ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* โดยใช้แบคทีเรีย *A. radiobacter* strain K-84 ผลิตสาร bacteriocin ที่มีชื่อว่า Agrocin 84 มีการควบคุมโรค crown gall โดยใช้ *A. radiobacter* strain K-84 ในรูปแบบของการค้าตั้งแต่ปี 1973 ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ทางการค้า 3 ชนิด ที่มี *A. radiobacter* strain K-84 เป็นองค์ประกอบหลักและขายในตลาดทั่วโลก คือ Galltol A, Norbac 84-C และ Diegall ในปี 1991 ประเทศออสเตรเลียได้ทำพันธุวิศวกรรมกับ *A. radiobacter* strain K-84 เพื่อป้องกันการถ่ายทอดพลาสมิดที่มียีน Agrocin 84 ไปยังเชื้อโรคอื่นและได้ตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า มี *A. radiobacter* strain K1026 ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Nagall (กัญชลี, 2542) นอกจากนี้ Sigee (1993) อธิบายกลไลของสาร bacteriocin ในการเข้าทำลายแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชว่า สารนี้มีลักษณะคล้ายไวรัส สามารถจับกับโปรตีนในตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงภายใน periplasmic ของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ส่งผลให้เซลล์ของแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชเกิดความผิดปกติในการสังเคราะห์โปรตีนและยังพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดสามารถผลิตสาร bacteriocin ได้ เช่น *Pseudomonas syringae* ผลิตสาร syringcin และ *Corynebacterium* sp. ผลิตสาร corynecin

ไซเดอโรฟอร์ (siderophore) เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติชนิดหนึ่งแบบเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กหรือมีในปริมาณต่ำมาก ไซเดอโรฟอร์มีโครงสร้างหลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ปัจจุบันทราบลักษณะโครงสร้างทางเคมีแล้วไม่น้อยกว่า 200 โครงสร้าง จำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ ไฮดรอกซาเมต (hydroxamate) หรือไธโอไฮดรอกซาเมต (thiohydroxamate), คาเทโคเลท (cathecholate) หรือฟีโนเลท (phenolate) และคาร์บอกซิเลท (carboxylate) ในปี 2002 DÍaz deVillegas และคณะ พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* PSS สามารถผลิตสารไซเดอโรฟอร์มีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ทั้งในสภาพที่ไม่มี Fe^{3+} และมี Fe^{3+} สูง (284 μM) แต่ความเข้มข้นของ Fe^{3+} ไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราดังกล่าว นอกจากนี้ Cao *et al*. (2005) ได้ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเอนโดไฟต์จากรากกล้วยเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวในกล้วยที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.*cubense* พบว่า *Streptomyces* sp. strain S96 มีการสร้างสารไซเดอโรฟอร์ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุได้ โดยทำให้ต้นกล้วยเป็นโรคลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

เอนไซม์ (enzyme) แบคทีเรียปฏิปักษ์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อเชื้อสาเหตุ ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายโดยเฉพาะการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรค ตัวอย่างเอนไซม์หลักที่พบ คือ chitinase และ glucanase เอนไซม์chitinase จากเชื้อ *Streptomyces cinereoruber* และ *Streptomyces viridificans* สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของ *Aspergillus niger* และเชื้อราก่อโรคหลายชนิดได้ (Okazaki and Takawa., 1991; Gupta *et al*., 1995) ใน ค.ศ. 1996 Valois *et al*. รายงานว่าเชื้อ actinomycete จำนวน 200 strain สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Phytophthora* และพบว่ามีเชื้อ actinomycete จำนวน 13 strain ที่สามารถผลิตเอนไซม์ glucanases ได้ เช่น β-1,3-, β-1,4-, และ β-1,6-glucanases.ที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อ *Phytophthora* ได้ เนื่องจากเชื้อ *Phytophthora* นั้นมี glucans เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์

3. การเป็นปรสิต และตัวห้ำ (parasitism and predation) เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิตเข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบไม่มากและการใช้ควบคุมโรคพืชยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนการทำลายชีวิต ตัวอย่างเช่น *Erwinia urediniolytica* เข้าทำลาย predicel ของสปอร์เชื้อราสนิม *Bdellovibrio bacteriovorus* เป็นปรสิตของแบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* สาเหตุโรคใบไหม้ของถั่วเหลือง หรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* (Syn. *Bacillus penetrans*) ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุโรครากปม (สมคิด, 2549)

4. การชักนำให้เกิดการต้านทานโรค (induced disease resistance) เป็นกลไกที่ปัจจุบันกำลังให้ความสนใจศึกษาอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจาก เชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เคยเป็นเชื้อก่อโรค เมื่อนำมาทำให้เสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคไปแล้วสามารถจะชักนำหรือกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้ เช่น เกิดการกลายพันธุ์ในยีนเดียวของเชื้อรา *Colletotrichum magna* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของพืชตระกูลแตง (cucurbit) จะไม่ทำให้เกิดโรคแต่จะเจริญอยู่ในพืช ช่วยให้พืชทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคดั้งเดิมได้ หรือเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*) สายพันธุ์ไม่รุนแรง (avirulent) ที่มีชีวิตอยู่ สามารถชักนำให้พืชสร้างสาร tomatine ปลดปล่อยออกมาที่บริเวณราก ทำให้มะเขือเทศต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *R solanacearum* สายพันธุ์ดั้งเดิมได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Arwiyanto *et al*., 1994 อ้างโดย สมคิด, 2549) นอกจากนี้ Zehnder *et al*. (2000) รายงานว่า Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, และ *B. pumilus* เกี่ยวข้องกับการชักนำให้มะเขือเทศเกิดการต้านทานต่อไวรัส cucumber mosaic cucumo virus (CCMV) ซึ่งตรงกับรายงานของ Murphy and Zehnder (2000) พบว่าการใช้ *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, และ *B. pumilus* สามารถความรุนแรงของโรคที่เกิดจาก Tomato mottle virus ในมะเขือเทศ หรือในกรณีของ *Bacillus amyloliquefaciens* ช่วยชักนำให้ต้นยาสูบเกิดการต้านทานต่อไวรัส pepper mild mottle virus (PPMoV) โดยเกี่ยวข้องกับการสร้างกรด salicylic และ jasmonic ในกลไกการชักนำให้เกิดการต้านทานโรค (Ahn *et al*., 2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved