

<http://journal.rmutp.ac.th/>

ความหลากหลายของจุลินทรีย์ดินในแปลงหม่อนที่เกิดโรครากเน่าและการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ

วารภรณ์ สุทธิสา* ณิชูนา สวัสดิ์พาณิชย์ สุนิสา หนูจิต และ สุมาลี ผิวขาว

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

รับบทความ 2 กรกฎาคม 2561 แก้ไขบทความ 26 กันยายน 2561 ตอรับบทความ 22 ตุลาคม 2561

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ดินในแปลงหม่อนที่เกิดโรครากเน่าจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ (ศมม.) 4 ศูนย์ ได้แก่ กาญจนบุรี ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ Nutrient agar (NA), Potato dextrose agar (PDA), Rose bengal agar (RBG) และ Modified selective fusarium agar (SFA) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA ได้ 24 ไอโซเลต ประกอบด้วย แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน มีเอนโดสปอร์แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม และ Actinomycetes นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 75 ไอโซเลต บนอาหาร PDA, RBG และ SFA ผลการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเป็นเชื้อราชนิดต่างๆ ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phytophthora* sp. และ *Rhizopus* sp. ส่วนการตรวจสอบยืนยันเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อ *F. solani* ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าหม่อน พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส ในทุกไอโซเลต แสดงว่า *Fusarium* spp. ที่แยกได้นั้นคือ *F. solani*

คำสำคัญ : จุลินทรีย์ดิน; ไพรเมอร์จำเพาะ; รากเน่าหม่อน

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร.: +668 1545 3454, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: waraporn.s@msu.ac.th

<http://journal.rmutp.ac.th/>

Diversity of Soil Microorganisms in Mulberry Root Rot Disease Fields and Detection of the Disease Pathogen by Specific Primer

Waraporn Sutthisa* Nattina Sawatphanit Sunisa Noojit and Sumalee Phiwkhaio

Faculty of science, Maharakham University
Khamriang, Kantarawichai, Maharakham, 44150

Received 2 July 2018; Revised 26 September 2018; Accepted 22 October 2018

Abstract

The diversity of soil microorganisms in mulberry root rot disease infesting fields was investigated from The Queen Sirikit Sericulture Center at Kanchanaburi, Khon Kaen, Sisaket and Ubon Ratchathani provinces. Isolation of the soil microorganisms was performed on four media as nutrient agar (NA), potato dextrose agar (PDA), rose bengal agar (RBG) and modified selective fusarium agar (SFA). Twenty-four bacterial isolates were arisen from NA including gram positive endospore forming rod, gram negative rod, gram positive cocci and Actinomycetes. Similarly, 75 isolates of fungi were gained from PDA, RBG and SFA and could be defined to be *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phytophthora* sp. and *Rhizopus* sp. by their morphological characteristics. Verification of the causal pathogen of mulberry root rot disease could be accomplished using specific primers for *F. solani* in which a DNA band at approximately 300 bp was revealed.

Keywords : Soil Microorganisms; Specific Primer; Mulberry Root Rot

* Corresponding Author. Tel.: +668 1545 3454, E-mail Address: waraporn.s@msu.ac.th

1. บทนำ

ดินเป็นวัตุธรรมชาติซึ่งเกิดจากการแปรสภาพทางชีวเคมีของหิน แร่ และอินทรีย์วัตถุ โดยทั่วไปดินมีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ สารอนินทรีย์ สารอินทรีย์ น้ำ และอากาศ ซึ่งดินในแต่ละแหล่งจะมีโครงสร้างและลักษณะของดินที่แตกต่างกัน หากเปรียบเทียบกับปริมาณดินทั้งหมดจะมีจุลินทรีย์เพียงร้อยละ 1 โดยจุลินทรีย์ที่พบส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรีย แอคติโนมัยสีท เชื้อรา สาหร่าย และโปรโตซัว เป็นต้น จุลินทรีย์ในดินจะแตกต่างกันไปตามชนิดของดิน แร่ธาตุ อินทรีย์สารในดิน ความชื้นของดิน เป็นต้น ในปัจจัยเหล่านี้ อินทรีย์สารหรือสารอาหารในดินมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นอย่างยิ่ง หากดินที่มีสารอินทรีย์มากก็มักมีจุลินทรีย์มากด้วย จุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยช่วยหมุนเวียนธาตุอาหารในดิน ซึ่งจุลินทรีย์อาจมีการแปรสภาพอินทรีย์วัตถุในดินพวกซากพืชหรือซากสัตว์ ให้กลายเป็นธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชได้จากงานวิจัย [1] ได้ทำการแยกเชื้อราจากดินชนิดต่างๆ ในฝั่งตะวันตกของประเทศจอร์เจีย บนอาหาร Czapek ที่มีการดัดแปลงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยพบว่าในดินแต่ละชนิดนั้นจะมี Zygomycetes, Ascomycete และ Deuteromycetes อยู่กระจายในดินทุกชนิด โดยดินที่ต่างชนิดกันพบว่ามีปริมาณเชื้อราแตกต่างกันไป ซึ่งในดินที่มีปริมาณเชื้อรามากนั้นเป็นดินที่มีแร่ธาตุและอิวมัสสูง ในปัจจุบันมีการทำการเกษตรที่ใช้ปุ๋ยเคมีอย่างกว้างขวาง เนื่องจากความต้องการของผลผลิตที่มากขึ้น จึงจำเป็นต้องการนำปัจจัยการผลิตอื่นๆ เพิ่มเข้ามามากขึ้น ทำให้เกิดปัญหาการใช้อย่างไม่สมดุลหรือเป็นการใช้อย่างทำลาย ซึ่งการกระทำเหล่านี้อาจทำให้จุลินทรีย์ส่วนหนึ่งตายไป แล้วทำให้อินทรีย์วัตถุส่วนหนึ่งหายไปด้วย เมื่อจุลินทรีย์หลายชนิดตายไปหรือลดจำนวนลง อัตราการเกิดกระบวนการหมุนเวียนธาตุอาหารในดินก็ลดน้อยลง

ไปด้วย สำหรับความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดิน โดยส่วนใหญ่พบว่าเป็นแบคทีเรียจำนวนมากที่สุด รองลงมาคือเชื้อรา โดยแบคทีเรียและเชื้อรามีหน้าที่ในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ และผลิตอิวมัสที่เปลี่ยนแปลงเป็นแร่ธาตุในดินให้เป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตทั้งจุลินทรีย์และพืช ซึ่งทั้งแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดสามารถก่อโรคในพืชได้ [2], [3]

โรครากเน่าหมอนเป็นปัญหาระดับประเทศและระดับทวีปเอเชีย ซึ่งเป็นอุปสรรคที่สำคัญอย่างยิ่งของผู้ประกอบอาชีพปลูกหมอนเลี้ยงไหม และก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงต่ออุตสาหกรรมการปลูกหมอนเลี้ยงไหมเนื่องจากโรคนี้อาจทำให้หมอนตายภายในเวลารวดเร็วหลังจากเป็นโรค กล่าวคือ หากพบโรคในแปลงปลูกภายใน 3 ปี หมอนทั้งแปลงจะตายทั้งหมด ส่งผลให้ผลผลิตลดลงและโรครามีแนวโน้มที่จะร้ายแรงเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกษตรกรบางรายต้องเปลี่ยนอาชีพไปทำการเกษตรอย่างอื่น โรคนี้อาจพบได้ทุกแห่ง และเป็นปัญหาการปลูกหมอนเลี้ยงไหม โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อการเกษตรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สามารถพบได้ในสภาพดินร่วนปนทรายมากกว่าดินเหนียว ดินไม่อุ้มน้ำ และดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ [4] โรครากเน่าหมอนพบครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2497 แต่ยังไม่สามารถยืนยันถึงเชื้อสาเหตุของโรคได้ จนกระทั่ง ปี ค.ศ. 2011 ได้มีการพิสูจน์ว่าเชื้อรา *Fusarium solani* เป็นสาเหตุของโรครากเน่าหมอน โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ [5] และมีความไวที่สามารถใช้ตรวจหาเชื้อโรคได้ตั้งแต่เริ่มเข้าสู่รากหมอนก่อนที่หมอนจะเป็นโรครากเน่าตาย การแยกและจัดจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. จากดินรอบรากและรากหมอนที่แสดงอาการรากเน่าที่ปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบ *Fusarium* spp. 11 สปีชีส์ ได้แก่ *F. Solani*, *F. Moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. Phaseoli*, *F. Dlamini*, *F. culmorum*, *F. dimerum*, *F. Graminearum*, *F. Beomiforme*, *F. scirpi* และ

F. Anthophilum ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อ *F. solani* มากที่สุดถึง 102 ไอโซเลต โดยตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะโคโลนี ขนาดและรูปร่างของ Microconidia และ Macroconidia ขนาดและชนิดของ Conidiophore ตรวจสอบการพบ Chlamydospore และจัดจำแนกด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)[6] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยถึงเชื้อสาเหตุโรครากเน่าหม่อนในพืชอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น การศึกษาในยาสูบพบว่า *Gelasinospora reticulate* เป็นสาเหตุโรครากเน่าของยาสูบ ซึ่งเป็นรายงานการพบครั้งแรกในประเทศจีน [7] และการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *Phytophthora sojae* พบว่าก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากในแปลงปลูกถั่วเหลืองของแคนาดา อัตราการเกิดและความรุนแรงของโรครากเน่า อาจเกิดจากความหนาแน่นของดินในแปลงปลูก ความชื้นในดินสูงต่อเนื่องเป็นเวลานาน และความไวของต้นถั่วเหลืองต่อเชื้อสาเหตุโรค [8] การจัดการโรครากเน่าในแต่ละพื้นที่จะมีวิธีการแตกต่างกันไป ทำให้สภาพและโครงสร้างของดินมีความแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลต่อความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ดินที่แตกต่างกัน ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในดินจากแปลงหม่อนที่เกิดโรครากเน่าจากพื้นที่ต่าง ๆ เพื่อให้ทราบถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่อยู่ในดิน และทราบปริมาณเชื้อรา *F. solani* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าหม่อน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีป้องกันและรักษาโรครากเน่าต่อไป

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างดินและเตรียมตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่แปลงหม่อนที่เคยเกิดโรครากเน่าระบาดมาทำการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคก่อนทำการปลูกหม่อนครั้งใหม่ จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ (สมม.) 4 ศูนย์ ได้แก่ สมม. กาญจนบุรี ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี โดยมีขั้นตอน

ดังต่อไปนี้ แบ่งพื้นที่ทั้งหมดเป็น 4 ส่วน ซึ่งในแต่ละส่วนเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 10 จุด รวมเป็น 1 กิโลกรัม โดยการเก็บดินแต่ละจุดให้ใช้พลั่วขุดดินเป็นรูปสี่เหลี่ยมประมาณ 15 เซนติเมตร หลังจากนั้นเก็บดิน โดยใช้พลั่วแซะดินข้างหลุมด้านเรียบ ให้ได้ดินเป็นแผ่นหนาประมาณ 2-3 เซนติเมตร จนถึงก้นหลุม นำตัวอย่างดินทั้ง 10 จุดที่ได้ มาคลุกเคล้าให้เข้ากันบนแผ่นพลาสติกให้ผสมกันจากนั้นทำตัวอย่างดินให้เป็นกอง แล้วแบ่งดินเป็น 4 ส่วน เท่าๆ กัน จากนั้นเก็บตัวอย่างจากกองดินเพียง 1 ส่วน ของดิน 1 กิโลกรัม ใส่ดินลงในถุงพลาสติกที่เตรียมไว้ นำตัวอย่างดินมาตากแห้งที่ลมโกรก โดยห้ามตากแดด ถ้าดินจับก้อนต้องทุบให้ละเอียดและเคล้าให้เข้ากัน [9]

2.2 การศึกษาจุลินทรีย์ในดิน

นำตัวอย่างดินที่ได้ในแต่ละแห่งมา 10 กรัม มาแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน 10-15 นาที แล้วพักให้ตกตะกอน จากนั้นวัดค่า pH ของสารละลายดิน แล้วทำการเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยใช้ค่าการเจือจาง 10^{-3} แล้วนำเชื้อมาเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ NA, PDA, RBG และ Modified SFA จำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบโคโลนี และนับจำนวนเพื่อคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ดิน แล้วบันทึกข้อมูลเบื้องต้น จากนั้นคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นเอียง นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อการศึกษาต่อไป โดยแบคทีเรียทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี ส่วนเชื้อราทำการศึกษาด้วยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการสังเกตลักษณะโคโลนี เส้นใย และสปอร์ โดยนำเชื้อราที่แยกได้ เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำมาทำ Wet Mount เพื่อตรวจสอบลักษณะใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3 ตรวจสอบเชื้อ *Fusarium solani* ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าในหม่อนด้วยไพรเมอร์จำเพาะ

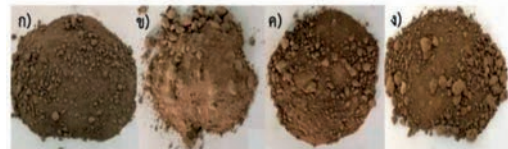
นำเชื้อรา *Fusarium* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 7 วัน มาเจาะบริเวณขอบของโคโลนี ด้วย Cork Borer แล้วย้ายชิ้นวัน 1 ขึ้นไปเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส สภาพเพาะ 120 รอบต่อนาที นาน 7 วัน เก็บเส้นใยโดยกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman no.1) ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปแยกสกัดดีเอ็นเอ [10] โดยนำ Genomic DNA ของเชื้อรามาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อรา *F. solani* [10] โดย PCR reaction ประกอบไปด้วย 5X *Taq* buffer 5 ไมโครลิตร, MgCl₂ (25 mM) 2 ไมโครลิตร, dNTPs mix (100 mM each) 0.2 ไมโครลิตร, Fsol-F1: GAGGACCCCTAACTCT (100 pmol/ml) 0.5 ไมโครลิตร, Fsol-R1: GGGACCGCCACTGTATT (100 pmol/ml) 0.5 ไมโครลิตร, *Taq* polymerase (Promega) (5 unit/ml) 0.125 ไมโครลิตร และ Genomic DNA ความเข้มข้น 100 ng/ml จำนวน 5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 25 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปฏิกริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denatured 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้เครื่อง DNA Thermal Cycle (Biometra, Model T-personal) นำ PCR produce ปริมาตร 5 µl ผสมกับ Loading Dye 2 µl (Gene DireX) แยกขนาดบนร้อยละ 2 Agarose Gel Electrophoresis ภายใต้อสภาพ 1X TBE ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที แล้วตรวจสอบแถบ DNA ด้วยเครื่อง Gel

Documentation (GENE GENIUS Bio Imaging System) [10]

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 การเก็บตัวอย่างดินและเตรียมตัวอย่างดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ 4 ศูนย์ ได้แก่ สมม. กาญจนบุรี ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี พบว่าตัวอย่างดินจากสมม. กาญจนบุรี มีลักษณะเนื้อดินเป็นสีน้ำตาลแดง ร่วน และมีค่า pH 7.15 ดินจาก สมม. ขอนแก่น มีลักษณะเนื้อดินเป็นสีน้ำตาลแดง ร่วน และมีค่า pH 6.77 ดินจาก สมม. ศรีสะเกษ มีลักษณะเนื้อดินเป็นสีน้ำตาล ร่วน และมีค่า pH 7.43 และดินจาก สมม. อุบลราชธานี มีลักษณะเนื้อดินมีสีน้ำตาลคล้ำ ร่วน และมีค่า pH 6.59 (รูปที่ 1) ซึ่งการระบาดของโรครากเน่าหม่อนจะพบในบริเวณที่เป็นดินร่วนปนทรายมากกว่าดินเหนียว และเชื้อราสาเหตุโรคเจริญได้ดีในสภาพดินที่เป็นกรดอ่อนถึงกลาง แต่อย่างไรก็ตามการเกิดโรครากเน่ายังมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น การตัดแต่ง พันธุ์หม่อน ความชื้นในดิน เป็นต้น [9]



รูปที่ 1 ลักษณะตัวอย่างดินจากจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ 4 ศูนย์

ก) สมม. อุบลราชธานี ข) สมม. ศรีสะเกษ

ค) สมม. ขอนแก่น ง) สมม. กาญจนบุรี

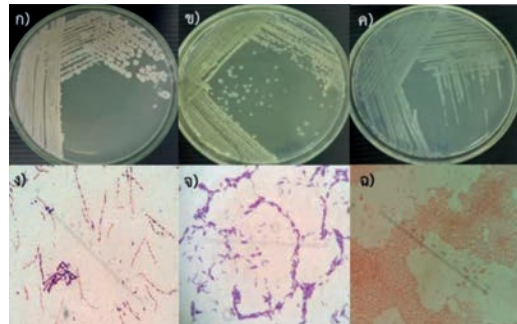
3.2 การศึกษาจุลินทรีย์ในดิน

จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแปลงหม่อนที่เกิดโรครากเน่าจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ (สมม.) 4 ศูนย์ ได้แก่ สมม.กาญจนบุรี ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี โดยนำตัวอย่าง

ดิน มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ NA, PDA, RBG และ modified SFA การแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA พบว่า สามารถคัดแยกแบคทีเรียทั้งหมดได้ 1.1×10^5 , 1.31×10^5 , 1.24×10^5 และ 1.43×10^5 CFU/ดิน 1 กรัม จาก สมม. กาญจนบุรี ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี ตามลำดับ การแยกเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า สมม. กาญจนบุรี สามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 2.53×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม สมม. ขอนแก่นสามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 1.55×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม สมม. ศรีสะเกษ สามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 4.94×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม และสมม. อุบลราชธานีสามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 2.73×10^3 CFU/ดิน 1 กรัม การแยกเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RBG พบว่า สมม. กาญจนบุรี สามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 9×10^3 CFU/ดิน 1 กรัม สมม. ขอนแก่นสามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 1×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม สมม. ศรีสะเกษ สามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 2.46×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม และสมม. อุบลราชธานี สามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 7.12×10^3 CFU/ดิน 1 กรัม และ การแยกเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified SFA พบว่า สมม. กาญจนบุรี สามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 1.7×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม สมม. ขอนแก่นสามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 1.59×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม สมม. ศรีสะเกษ สามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 3.92×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม และ สมม. อุบลราชธานีสามารถคัดแยกเชื้อราทั้งหมดได้ 2.73×10^4 CFU/ดิน 1 กรัม (ตารางที่ 1)

อาหารเลี้ยงเชื้อ NA สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต โดยได้จาก สมม. กาญจนบุรี 7 ไอโซเลต สมม. ขอนแก่น 7 ไอโซเลต สมม. ศรีสะเกษ 4 ไอโซเลต และสมม. อุบลราชธานี 6 ไอโซเลต จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้ดังนี้ แบคทีเรียรูปร่างท่อน แกรมบวก มีเอนโดสปอร์ แบคทีเรียรูปร่างท่อนแกรมลบ แบคทีเรียรูปร่างกลม แกรมบวก และ

Actinomyces sp. (รูปที่ 2, ตารางที่ 2) ซึ่งแบคทีเรียที่พบมากที่สุด คือ แบคทีเรียรูปร่างท่อน แกรมบวก มีเอนโดสปอร์ และเมื่อพิจารณาร่วมกับคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ เช่น การทดสอบ IMVic, Citrate test, Triple Sugar Iron Agar Test, Glucose Fermentation และ Sucrose Fermentation เป็นต้น (ตารางที่ 3) อาจจำแนกเป็น *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มักพบในดิน คือ *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* spp. [11] ซึ่ง *Bacillus* spp. สามารถเจริญในสภาวะ pH ต่างๆ เป็นช่วงกว้างตั้งแต่ pH 2-11 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ [12]



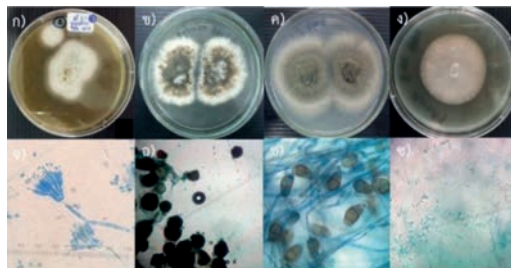
รูปที่ 2 ลักษณะโคโลนีและการติดสีแกรมของตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินจากแปลงหม่อนที่เกิดโรครากเน่าจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ

ก) โคโลนีสีขาวครีม รูปร่างไม่แน่นอน ทึบแสง
ข) โคโลนีสีเหลืองอ่อน รูปร่างกลม ทึบแสง
ค) โคโลนีสีครีม รูปร่างกลมเล็ก ทึบแสง
ง) แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน มีเอนโดสปอร์
จ) แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น
ฉ) แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้นที่กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 100X

อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, RBG และ Modified SFA สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 75 ไอโซเลต ประกอบด้วย สมม. กาญจนบุรี 16 ไอโซเลต สมม.

ขอนแก่น 15 ไอโซเลต สมม. ศรีสะเกษ 19 ไอโซเลต และ สมม. อุบลราชธานี 25 ไอโซเลต เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เป็นเชื้อรา *Aspergillus* sp. 24 ไอโซเลต *Chaetomium* sp. 6 ไอโซเลต *Curvularia* sp. 4 ไอโซเลต *Fusarium* sp. 9 ไอโซเลต *Penicillium* sp. 3 ไอโซเลต *Phytophthora* sp. 3 ไอโซเลต *Rhizopus* sp. 2 ไอโซเลต และ Unknown 24 ไอโซเลต (รูปที่ 3, ตารางที่ 2) เชื้อราที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Aspergillus* sp. อาจเนื่องมาจากค่า pH ที่เหมาะสำหรับการเจริญของรากลุ่มนี้ [13] และยังมีหลายการศึกษาที่ทำการแยก และจำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์จากแปลงหม่อนและตัวอย่างหม่อนที่เกิดโรครากเน่า ซึ่งพบเชื้อราหลายสกุล เช่น *Fusarium*, *Verticillium*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* และ *Phytophthora* [14] ซึ่งจากการวิจัยครั้งนี้พบว่าแยกเชื้อ *Fusarium* sp. ได้มากที่สุดจากดินในแปลงหม่อนจาก สมม. อุบลราชธานี

ซึ่งพบว่าดินมีค่า pH เป็นกรดอ่อนเป็นช่วงที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อรา และยังมีรายงานพบการระบาดของโรครากเน่าหม่อนด้วย



รูปที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานของตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากดินจากแปลงหม่อนที่เกิดโรครากเน่าจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ ก), จ) *Aspergillus* sp. ข), ฉ) *Chaetomium* sp. ค), ช) *Curvularia* sp. และ ง), ข) *Fusarium* sp. ที่กำลังขยายของเลนส์วัตถุ 40X

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อ (Spread Plate Technique)

| Medium | Microorganisms | Total Plate Count (CFU/1 g soil) | | | |
|--------|----------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | Queen Sirikit Sericulture Center (QSSC) | | | |
| | | Kanchanaburi | Khon Kaen | Srisaket | Ubon Rachathani |
| NA | Bacteria | 1.1x10 ⁵ | 1.31x10 ⁵ | 1.24x10 ⁵ | 1.43x10 ⁵ |
| PDA | Fungi | 2.53x10 ⁴ | 1.55x10 ⁴ | 4.94x10 ⁴ | 2.73x10 ³ |
| RBG | Fungi | 9x10 ³ | 1.00x10 ⁴ | 2.46x10 ⁴ | 7.12x10 ³ |
| SFA | Fungi | 1.7x10 ⁴ | 1.59x10 ⁴ | 3.92x10 ⁴ | 2.73x10 ⁴ |

ตารางที่ 2 การแยกและจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่แยกได้จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ 4 ศูนย์ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

| QSSC | Total isolates | Bacteria group | Isolates | Total isolates | Fungi | Isolates |
|-----------------|----------------|-------------------------------------|----------|----------------|-------------------------|----------|
| Kanchaburi | 7 | Rod shape, gram positive, endospore | 5 | 16 | <i>Aspergillus</i> sp. | 2 |
| | | | | | <i>Chaetomium</i> sp. | 2 |
| | | Rod shape, gram negative | 1 | | <i>Curvularia</i> sp. | 4 |
| | | Actinomycetes | 1 | | <i>Fusarium</i> sp. | 2 |
| | | | | | <i>Penicillium</i> sp. | 1 |
| | | | | | <i>Phytophthora</i> sp. | 1 |
| | | | | | Unknown | 4 |
| Khon Kaen | 7 | Rod shape, gram positive, endospore | 5 | 15 | <i>Aspergillus</i> sp. | 7 |
| | | | | | <i>Chaetomium</i> sp. | 1 |
| | | Rod shape, gram negative | 1 | | <i>Fusarium</i> sp. | 3 |
| | | Cocci shape, gram positive | 1 | | <i>Penicillium</i> sp. | 1 |
| | | | | | <i>Phytophthora</i> sp. | 1 |
| | | | | | Unknown | 2 |
| Srisaket | 4 | Rod shape, gram positive, endospore | 3 | 19 | <i>Aspergillus</i> sp. | 6 |
| | | | | | <i>Chaetomium</i> sp. | 1 |
| | | Actinomycetes | 1 | | <i>Fusarium</i> sp. | 1 |
| | | | | | <i>Penicillium</i> sp. | 1 |
| | | | | | <i>Phytophthora</i> sp. | 1 |
| | | | | | <i>Rhizopus</i> sp. | 1 |
| | | | | | Unknown | 8 |
| Ubon Rachathani | 6 | Rod shape, gram positive, endospore | 4 | 25 | <i>Aspergillus</i> sp. | 9 |
| | | | | | <i>Chaetomium</i> sp. | 2 |
| | | Cocci shape, gram positive | 2 | | <i>Fusarium</i> sp. | 3 |
| | | | | | <i>Rhizopus</i> sp. | 1 |
| | | | | | Unknown | 10 |

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากดินในแปลงหม่อนที่เกิดโรครากเน่าจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ 4 ศูนย์

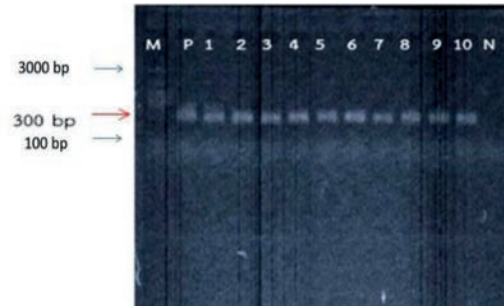
| Isolates | Gram | Shape | Indole | Methyl red | Voges- Proskauer | Citrate | TSI | Fermentation | | |
|-----------------------|------|-----------|--------|---------------|---------------------|---------|------------------|--------------|---------|--------|
| | | | | | | | | Glucose | Lactose | Sucose |
| KJ1N | + | Rod | - | + | - | - | A/K | + | - | + |
| KJ2N | + | Short Rod | - | + | - | + | K/K | + | - | + |
| KJ3N | + | Short rod | - | + | - | - | K/A | + | - | + |
| KJ4N | + | Short rod | - | + | - | - | K/A | + | - | + |
| KJ5N | - | Short rod | - | + | - | - | K/A | + | - | - |
| KJ6N | + | Rod | - | + | + | + | A/A | - | - | - |
| KJ7N | + | Rod | - | - | - | - | A/K | - | - | - |
| KK1N | + | Cocci | - | + | - | + | A/A | - | - | + |
| KK2N | + | Short rod | - | + | + | - | K/A | + | - | + |
| KK3N | + | Rod | - | + | - | + | K/K | + | - | + |
| KK4N | - | Short rod | - | + | - | + | K/K | + | - | + |
| KK5N | + | Rod | - | + | - | - | K/K | + | + | + |
| KK6N | + | Rod | - | + | - | - | K/K | + | + | + |
| KK7N | - | Short rod | - | + | - | + | K/AG | + | + | + |
| SK1 N | + | Rod | + | - | - | - | A/K | + | - | + |
| SK2N | + | Rod | + | - | - | + | A/A ⁺ | + | - | + |
| SK3N | + | short Rod | - | + | - | - | K/AG | + | + | + |
| SK4N | + | Rod | - | - | - | - | A/AG | + | + | + |
| UB1N | + | Rod | + | - | - | - | A/K | + | - | + |
| UB2N | + | Rod | + | + | - | - | A/K | + | - | + |
| UB3N | + | Short rod | - | + | - | - | A/K | + | - | - |
| UB4N | + | Short rod | - | - | - | - | K/K | - | - | - |
| UB5N | + | Cocci | - | + | - | + | A/A | - | - | + |
| UB6N | + | Cocci | - | + | - | + | A/K | - | - | - |
| <i>Bacillus</i> * | + | Rod | - | - | + | + | K/A | + | - | ± |
| <i>Pseudomonas</i> ** | - | Shot rod | - | - | - | + | K/A | + | - | + |

* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 3: The Firmicute, 2009

** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria, 2005

3.3 ตรวจสอบเชื้อ *Fusarium solani* ที่เป็นสาเหตุโรครากเน่าในหม่อนด้วยไพรเมอร์จำเพาะ

การตรวจหาเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าหม่อนด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *F. solani* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรครากเน่าหม่อน ด้วยเทคนิค PCR พบว่า *Fusarium* sp. ทุกไอโซเลตที่ทดสอบสามารถให้แถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 300 bp สอดคล้องกับงานวิจัยของวรารักษ์ [9] ที่ได้รายงานไว้ ซึ่งแสดงว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่แยกได้จากดินจากแปลงหม่อนที่เกิดโรครากเน่า คือ *F. solani* สาเหตุโรครากเน่าหม่อน (รูปที่ 4) ซึ่งในปี ค.ศ. 2011 ได้มีการพิสูจน์ว่าเชื้อ *F. solani* เป็นสาเหตุของโรครากเน่าหม่อน [5] และได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *F. solani* และไพรเมอร์นี้มีความไวที่สามารถใช้ตรวจหาเชื้อโรคได้ตั้งแต่เริ่มเข้าสู่รากหม่อนก่อนที่หม่อนจะเป็นโรครากเน่าตาย นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกมากที่ทำการตรวจหาเชื้อโรคด้วยวิธีดังกล่าว เช่น งานวิจัยของ Mishra และคณะ [15] ได้มีการศึกษาการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ *Fusarium* sp. ที่เป็นเชื้อก่อโรคเหี่ยวของฝรั่ง โดยนำตัวอย่างดินจากพื้นที่ต่างๆ 17 ตัวอย่าง มาทำการตรวจสอบเชื้อ *Fusarium* sp. ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1F (5'-CCAGAGGACCCCTAACTCT-3') และ ITS1R (5'-GCCTGAGGGTTGTAATGACG-3') ที่มีความจำเพาะต่อ *Fusarium* sp. ซึ่งจะให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 230 bp [15] เช่นเดียวกันกับวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว สามารถวินิจฉัยเชื้อโรคในดินได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 4 การตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อเชื้อรา *F. solani* สาเหตุโรครากเน่าหม่อน โดย lane M) Marker (100 bp DNA ladder), lane P) Positive (*F. solani*), lane 1-9) *Fusarium* sp., lane 10) *F. solani* isolates KE02-1-1 [10], lane N) Negative (dH₂O)

4. สรุป

จากการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแปลงหม่อนที่เกิดโรครากเน่าจากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ (คมม.) 4 ศูนย์ ได้แก่ คมม.กาญจนบุรี ขอนแก่น ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี โดยนำตัวอย่างดิน มาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ NA, PDA, RBG) และ Modified SFA สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้หลากหลายชนิด จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมีคาดว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่คือ *Bacillus* sp. ส่วนเชื้อราประกอบด้วย *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phytophthora* sp. และ *Rhizopus* sp. ซึ่งเมื่อทำการตรวจสอบยืนยันเชื้อรา *Fusarium* sp. ด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อ *F. solani* สาเหตุโรครากเน่าหม่อน พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 bp ในทุกไอโซเลต แสดงว่า *Fusarium* spp. ที่แยกได้นั้นคือ *F. solani* สาเหตุโรครากเน่าหม่อน

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์สมชาย ลือมันคง ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ ศรีสะเกษ ที่ช่วยอนุเคราะห์ตัวอย่างดิน และโครงการการสร้างพันธุ์หม่อนลูกผสมให้ทันต่อโรครากเน่า ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] L. Y. Kutateladze, N. G. Zakariashvili, M. D. Jobava, T. A. Burduli and T. A. Sadunishvili, "Microscopic fungi spread in different types of soils in Western Georgia," *Annals of agrarian science*, vol. 14, no. 3, pp. 227-232, Sep. 2016.
- [2] J. S. Singh, V. C. Pandey and D. P. Singh, "Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development," *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 140, no. 3-4, pp. 339-353, Mar. 2011.
- [3] S. Nimrat, *Soil Microbiology*, 1st ed. Bangkok: Odeon Store, 2016.
- [4] N. Sanoamuang, W. Saksirirat and P. Siritor, "Study of mulberry root rot disease in the future," *Khon Kaen Agricultural Journal*, vol. 15. no. 2, pp. 63-68, 1987.
- [5] W. Sutthisa and N. Sanoamuang, "Pathogenicity and Molecular Detection of *Fusarium solani* Form A and B on Root Rot of Mulberry," *KKU Research Journal*, vol. 16, no. 3, pp. 203-214, Mar. 2011.
- [6] W. Sutthisa, N. Sanoamuang and S. Chooprayoon, "Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp., the fungi associated with mulberry root rot disease in northeastern Thailand" *Thai Journal of Botany*, vol. 2, no. 1, pp. 25-39, 2010.
- [7] J. Wang, F. Kong, T. Zhao, C. Zhang, S. Zhang and C. Feng, "First report of tobacco root rot caused by *Gelasinospora reticulate*," *Crop Protection*, vol. 66, pp. 86-89, Dec. 2014.
- [8] K. F. Chang, S. F. Hwang, H. U. Ahmed, Q. Zhou, S. E. Strelkov, R. L. Conner, D. L. McLaren, M. A. Henriquez, M. W. Harding and G. D. Turnbull, "First report of *Phytophthora sojae* causing root rot in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] in Alberta, Canada," *Crop Protection*, vol. 91, pp. 49-56, Jan. 2017.
- [9] W. Sutthisa, "Etiology of *Fusarium* species on mulberry root rot disease and development of specific primer for detection of the pathogen," Ph.D. dissertation, Dept. Plant patho., Khan Kaen Univ., Khon Kaen, 2010.
- [10] Z. Zhang, J. Zhang, Y. Wang and X. Zheng, "Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 249, no. 1, pp. 39-47, Aug. 2005.
- [11] M. J. Brimecombe, F. A. A. M. De Leij and J. M. Lynch, *Rhizodeposition and microbial populations. Then rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface.*, Taylor & Francis

- Group, New York: CRC Press, 2007.
- [12] B. Petsuriyawong, N. Khunajakr and A. Wongwicham, "Isolation and identification of antifungal bacteria from soil," in *Proceeding of 50th Kasetsart University Annual Conference: Science, Natural Resources and Environment*, Kasetsart University, Thailand, 2012.
- [13] F. R. Passamani, T. Hernandez, N. A. Lopes, S. C. Bastos, W. D. Santiago and L. R. Batista, "Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes," *Journal of Food Protection*, vol. 77, no. 11, pp. 1947-1952, Nov. 2014.
- [14] S. Sontirat, *Plant Disease Management*, 1st ed. Bangkok: V.B. Book Center, 1997.
- [15] R. K. Mishra, B. K. Pandey, M. Muthukumar, N. Pathak and M. Zeeshan, "Detection of *Fusarium* wilt pathogens of *Psidium guajava* L. in soil using culture independent PCR (ciPCR)," *Saudi journal of biological sciences*, vol. 20, no.1, pp. 51-56, Jan. 2013.