บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาโรค พื้นที่การปลูก และการใช้สารเคมีในสวนกุหลาบ

ศึกษาพื้นที่ปลูกกุหลาบจากสวนกุหลาบบริเวณพื้นที่ราบซึ่งเป็นพื้นที่อยู่สูงจากระดับน้ำทะเล 340 เมตร ที่ ต.ร้องวัวแดง อ.สันกำแพง และ อ. เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) จ.เชียงใหม่ และบริเวณพื้นที่สูง ซึ่งเป็นพื้นที่อยู่สูงจากระดับน้ำทะเล 990 เมตร ที่ ต.โป่งแยง อ.แม่ริม ในเขต จ.เชียงใหม่ (ภาพ 8)

พบว่าสภาพพื้นที่ปลูกกุหลาบ ต.ร้องวัวแดง อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ เกษตรกรทำการปลูกกุหลาบมาแล้วเป็นระยะเวลาประมาณ 5 ปี และก่อนหน้าที่จะปลูกกุหลาบ ได้มีการปลูกพืชชนิดอื่นด้วย สภาพแปลงปลูกจะจัดในลักษณะเป็นแถวยาว โดยเว้นระยะทางเดินในแต่ละแถว พบว่าเมื่อถึงฤดูฝนตกชุก น้ำจะขังบริเวณระยะทางเดินของแปลงปลูกกุหลาบ และบางครั้งน้ำอาจล้นเข้ามาจนถึงโคนต้นของกุหลาบ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เชื้อสาเหตุโรคสามารถแพร่กระจายบริเวณแปลงปลูกได้อย่างรวดเร็ว ระหว่างที่ปลูกกุหลาบก็พบการเข้าทำลายของโรคและแมลงอยู่เป็นประจำ โดยโรคที่พบส่วนมากจะเป็นโรคใบจุดสีดำ โรคแอนแทรคโนส โรคราน้ำค้าง โรคราแป้ง โรคราสีเทา และโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเป็นต้น เกษตรกรจึงทำการฉีดพ่นสารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรคประมาณ 2-3 ครั้ง/สัปดาห์ และทำเช่นนี้ติดต่อกันเป็นประจำสม่ำเสมอ ซึ่งสารเคมีที่ใช้นั้นเป็นสารประเภทดูดซึม (systemic fungicides) ได้แก่ benomyl, carbendazim, thiabendazole และ thiophanate methyl เป็นต้น พบว่าระยะแรกสารเคมีที่ฉีดพ่นสามารถควบคุมโรคและแมลงได้ดี แต่เมื่อมีการฉีดพ่นสารเคมีต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานาน พบว่าไม่สามารถควบคุมโรคได้ เกษตรกรจึงเพิ่มปริมาณการใช้สารเคมี เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการจัดการเกี่ยวกับสภาพแปลงปลูก เช่นการกำจัดวัชพืช พรวนดินและตัดแต่งกิ่ง เช่นกัน

การปลูกกุหลาบในพื้นที่ อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) จ.เชียงใหม่ พบว่าเป็นการปลูกแบบไม้ประดับในสวน ไม่ได้ปลูกเพื่อการค้า แปลงที่ปลูกจึงมีขนาดเล็กเป็นหย่อมๆ จึงพบว่ามีการฉีดพ่นสารเคมีแต่ไม่มากนัก มีเพียงการบำรุง ดูแลรักษา และกำจัดวัชพืชที่เข้ามาทำลายบ้างเป็นบางครั้งเท่านั้น จากการที่ไม่ได้ดูแลกุหลาบอย่างสม่ำเสมอ จึงเป็นเหตุให้ต้นกุหลาบทรุดโทรมและเชื้อโรคเข้าทำลายได้เช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 8 สวนกุหลาบบริเวณพื้นที่ราบและพื้นที่สูงจังหวัดเชียงใหม่

ก. สวนกุหลาบบริเวณพื้นที่ราบ ต.ร้องวัวแดง อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่

ข. สวนกุหลาบบริเวณพื้นที่ราบ อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) จ.เชียงใหม่

ค. สวนกุหลาบบริเวณพื้นที่สูง ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับพื้นที่ปลูกกุหลาบ ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ พบว่าเกษตรกรได้ทำการปลูกกุหลาบมาเป็นระยะเวลาประมาณ 2 ปี และพื้นที่ ที่ใช้ปลูก ก็เป็นพื้นที่เพิ่งเริ่มทำการเกษตร โดยเริ่มมีการปลูกกุหลาบจากพื้นที่เปิดใหม่ สภาพพื้นที่อยู่บริเวณเชิงเขาที่มีอากาศเย็นตลอดทั้งปี ซึ่งเป็นสภาพอากาศที่เหมาะสำหรับปลูกกุหลาบทำให้ดอกมีคุณภาพดียิ่งขึ้น ฤดูหนาวอากาศเย็นจัด มีหมอกปกคลุมอย่างหนาแน่น สภาพแปลงจะมีลักษณะเป็นขั้นบันได เมื่อฝนตกน้ำฝนก็จะไหลลงสู่แนวดิ่ง จึงไม่พบลักษณะของน้ำขังบริเวณแปลงปลูก ระหว่างที่ทำการปลูกกุหลาบก็พบการเข้าทำลายของโรคและแมลงอยู่เป็นประจำ โดยโรคที่พบส่วนมากจะเป็นโรคใบจุดสีดำ โรคแอนแทรคโนส โรคราน้ำค้าง โรคราแป้ง และโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เกษตรกรจึงทำการฉีดพ่นสารเคมี เพื่อป้องกันและกำจัดโรคเหล่านี้ ถ้าเป็นช่วงเทศกาลซึ่งจะทำให้ดอกกุหลาบเป็นที่ต้องการของตลาดสูง ราคาของดอกกุหลาบสูงมากกว่าปกติ เกษตรกรจะใส่ปุ๋ยและพ่นยาเพื่อเร่งให้กุหลาบออกดอกและมีคุณภาพดอกดีที่สุด โดยระยะที่กุหลาบเริ่มให้ผลผลิต ดอกกุหลาบที่ยังตูมก็จะมีการหุ้มด้วยโฟมตาข่ายพลาสติก ซึ่งจัดว่าเป็นการรักษาคุณภาพของดอกให้คงทน สะดวกต่อการขนส่ง และยังทำให้คงความสวยงามได้นานวิธีอีกหนึ่ง (ภาพ 9) ขณะเดียวกันโรคและแมลงก็ยังคงรบกวนและสร้างความเสียหายให้กับแปลงปลูกกุหลาบเป็นประจำ โดยเกษตรกรจะทำการฉีดพ่นสารเคมีเป็นปริมาณมาก ประมาณ 2-3 ครั้ง ต่อสัปดาห์ ติดต่อกันตลอดระยะเวลาที่กุหลาบเริ่มออกดอกจนกระทั่งเก็บเกี่ยว ซึ่งสารเคมีที่ใช้ ได้แก่ carbendazim, propiconazole, prochloraz, azoxystrobin และ carbendazim ผสมกับ mancozeb แต่เมื่อเก็บเกี่ยวดอกจนเสร็จสมบูรณ์ เกษตรกรก็จะลดการใช้สารเคมีลงโดยเปลี่ยนมาเป็นการจัดการเกี่ยวกับแปลงปลูก เช่นการกำจัดวัชพืช พรวนดินและตัดแต่งกิ่ง เช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 9 การผลิตดอกกุหลาบโดยการหุ้มด้วยโฟมตาข่ายพลาสติก ที่สวนกุหลาบ ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

ก. การหุ้มด้วยโฟมตาข่ายพลาสติก เริ่มเมื่อดอกยังตูม

ข. เมื่อดอกพร้อมตัดจำหน่าย

2. การศึกษาลักษณะอาการและแยกเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

จากการสำรวจและศึกษาโรคแอนแทรคโนสของกุหลาบจากแปลงปลูกกุหลาบ พบว่าโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* อาการมักเกิดกับใบกุหลาบ ลักษณะแผลจะเป็นจุดค่อนข้างกลม ระยะแรกแผลจะเป็นสีน้ำตาลแก่และจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ระยะต่อมาเนื้อเยื่อตรงกลางจุดจะตายและเปลี่ยนเป็นสีขาวหรือ สีขี้เถ้า พบตุ่มสีดำ (fruiting body) ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วบริเวณจุดแผล ใบจะหลุดและทำให้ตรงกลางเป็นรู รอบจุดอาจมีสีเหลืองหรือสีแดงล้อมรอบ และใบจะร่วงในที่สุด (ภาพ 10) เมื่อตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยวิธี Free hand

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

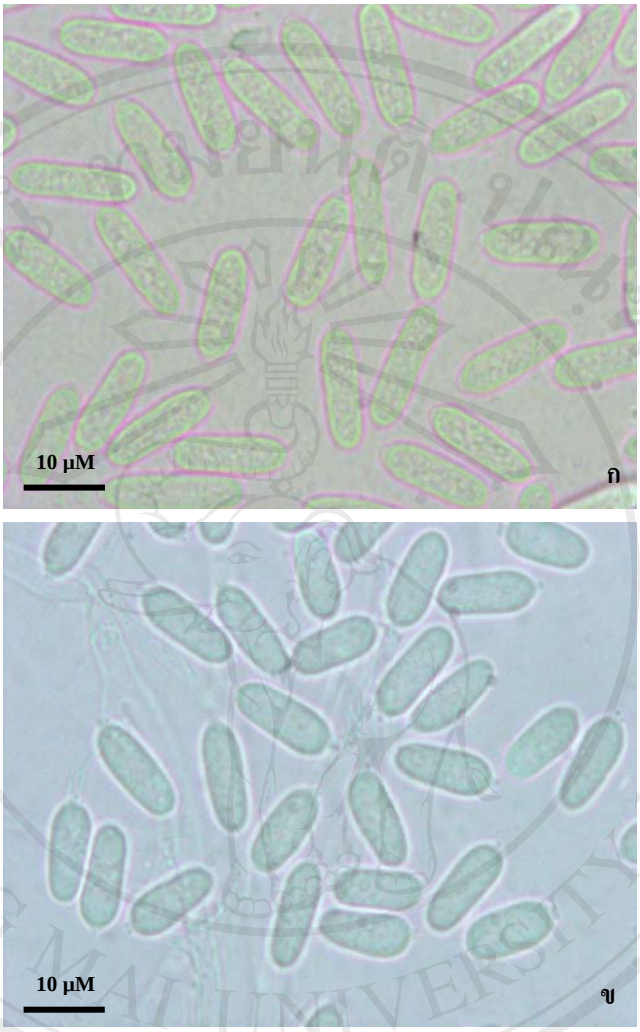
sectioning technique แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อราสร้างสปอร์ (spore) ลักษณะหัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดียว สีใส (ภาพที่ 11) การแยกเชื้อราสาเหตุ *C. gloeosporioides* จากสวนกุหลาบในบริเวณพื้นที่ราบและพื้นที่สูงในเขต จ.เชียงใหม่ พบว่า อ.สันกำแพง สามารถแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้จำนวน 38 ไอโซเลท อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) จำนวน 13 ไอโซเลท และ อ.แม่ริม จำนวน 42 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้นเป็น 93 ไอโซเลท (ตาราง 4)

ภาพ 10 ลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสบนใบของกุหลาบ

ก. แผลมีลักษณะเป็นจุดค่อนข้างกลม เนื้อเยื่อตรงกลางแผลจะแห้งตาย และเปลี่ยนเป็นสีขี้เถ้า

ข. อาการรุนแรง ใบกุหลาบจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และใบร่วงในที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 11 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ compound microscope (กำลังขยาย 1000 เท่า)

ก. ลักษณะสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ของไอโซเลท MC-002

ข. ลักษณะสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ของไอโซเลท MC-034

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 ไอโซเลทของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกเชื้อสาเหตุจากสวนกุหลาบ อ.สันกำแพง อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) และ อ.แม่ริม จ. เชียงใหม่ จำนวนทั้งสิ้น 93 ไอโซเลท

อ.สันกำแพง		อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด)	อ.แม่ริม	
ไอโซเลท	ไอโซเลท	ไอโซเลท	ไอโซเลท	ไอโซเลท
SC-001	SC-020	BC-001	MC-001	MC-022
SC-002	SC-021	BC-002	MC-002	MC-023
SC-003	SC-022	BC-003	MC-003	MC-024
SC-004	SC-023	BC-004	MC-004	MC-025
SC-005	SC-024	BC-005	MC-005	MC-026
SC-006	SC-025	BC-006	MC-006	MC-027
SC-007	SC-026	BC-007	MC-007	MC-028
SC-008	SC-027	BC-008	MC-008	MC-029
SC-009	SC-028	BC-009	MC-009	MC-030
SC-010	SC-029	BC-010	MC-010	MC-031
SC-011	SC-030	BC-011	MC-011	MC-032
SC-012	SC-031	BC-012	MC-012	MC-033
SC-013	SC-032	BC-013	MC-013	MC-034
SC-014	SC-033		MC-014	MC-035
SC-015	SC-034		MC-015	MC-036
SC-016	SC-035		MC-016	MC-037
SC-017	SC-036		MC-017	MC-038
SC-018	SC-037		MC-018	MC-039
SC-019	SC-038		MC-019	MC-040
			MC-020	MC-041
			MC-021	MC-042

กำหนดให้

SC คือ ไอโซเลทของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกจาก ต.ร้องวัวแดง อ.สันกำแพง จ. เชียงใหม่

BC คือ ไอโซเลทของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกจาก อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) จ.เชียงใหม่

MC คือ ไอโซเลทของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกจาก ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ. เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบความสามารถของสารคาร์เบนดาซิมในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

ทำการทดสอบความสามารถของสารคาร์เบนดาซิมในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ โดยทดสอบสารที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 500 ppm (อัตราแนะนำ 500 ppm) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม จำนวนทั้งสิ้น 93 ไอโซเลท เพื่อตรวจหาการต้านทานของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส พบว่าเชื้อราแสดงการต้านทานสารคาร์เบนดาซิมได้สูง (highly resistance) จำนวน 3 ไอโซเลท คือ SC-020, SC-021 และ SC-038 พบเชื้อราที่ไม่ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม (sensitive) จำนวน 90 ไอโซเลท โดยจากการทดลองนี้ไม่พบการต้านทานในระดับปานกลาง (moderately resistance) ต่อสารคาร์เบนดาซิม (ตาราง 5; ภาพ 12)

ตาราง 5 การตรวจหาการต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกจากสวนกุหลาบ อ.สันกำแพง อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) และ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ จำนวน 93 ไอโซเลท

ไอโซเลท	จำนวน	ชุดควบคุม	คาร์เบนดาซิม (ppm)				ลักษณะการต้านทาน
			1	10	100	500	
SC 001-019	19	+	-	-	-	-	S
SC 020-021	2	+	+	+	+	+	HR
SC 022-037	16	+	-	-	-	-	S
SC 038	1	+	+	+	+	+	HR
BC 001-013	13	+	-	-	-	-	S
MC 001-042	42	+	-	-	-	-	S
รวม	93						

กำหนดให้

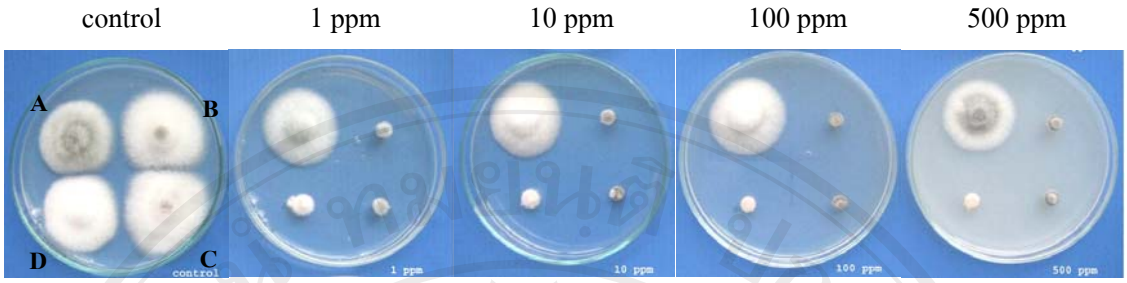
HR = (highly resistance isolate)

S = (sensitive isolate)

(+) = เชื้อราสามารถเจริญได้

(-) = เชื้อราไม่สามารถเจริญได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 12 การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 100 และ 500 ppm เมื่ออายุ 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควมคุม

A = เชื้อราไอโซเลท SC-021 (HR) B = เชื้อราไอโซเลท SC-022 (S)

C = เชื้อราไอโซเลท SC-023 (S) D = เชื้อราไอโซเลท SC-024 (S)

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

เลือกตัวแทนของเชื้อราจาก อ.สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) ใน จ.เชียงใหม่ โดยดูจากความสามารถในการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่ผสมสารเคมี จำนวนทั้งสิ้น 12 ไอโซเลท ได้แก่ SC-004, SC-017, SC-020, SC-021, SC-025, SC-034, SC-038, MC-002, MC-028, MC-034, BC-002 และ BC-012 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษาการเจริญที่อายุ 3 5 และ 7 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีในลักษณะแกน X และแกน Y แล้วจึงหาค่าเฉลี่ยการเจริญเติบโต ตรวจดูลักษณะของสี การสร้างเส้นใย และทำการบันทึกภาพลักษณะของโคโลนีที่อายุ 7 วัน เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบการต้านทานและความสามารถของสารเคมีในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคต่อไป พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ค่อนข้างเร็วถึงปานกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เส้นใยเชื้อรามีสีขาว สีเทา และสีเทาปนเขียว มีการสร้าง setae และ sclerotia จากนั้นทำการศึกษาลักษณะของสปอร์และแอพเพรสซอเรียม โดยการเลี้ยงราแบบ slide culture บนอาหาร ¼ PDA ที่อายุ 7 วัน พบว่าสปอร์ มีลักษณะหัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดียว สีใส ขนาดประมาณ 2.71-5.0 x 10.42-14.04 ไมครอน สร้างแอพเพรสซอเรียม (appressoriam) สีน้ำตาลรูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) ขนาดประมาณ 5.75-8.75 x 10.13-12.63 ไมครอน (ตาราง 6; ภาพ 13)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในกุหลาบที่แยกจากสวนกุหลาบ อ.สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) จ.เชียงใหม่ จำนวน 12 ไอโซเลท

Isolate	Colony				Spore (7 days)		Appressorium (7 days)		Setae	Sclerotia
	Characteristic	Growth (cm)			Size	Shape	Size	Shape		
		3 days	5 days	7 days						
SC-004	W	4.35	6.75	9.00	3.13x12.54	cylindrical	-	-	-	-
SC-017	W	4.60	7.60	9.00	2.79x13.54	cylindrical	5.88x12.63	clavate	+	+
SC-020	W	4.05	7.30	9.00	3.17x14.04	cylindrical	6.88x10.13	clavate	+	+
SC-021	G	4.10	7.25	8.90	2.83x12.71	cylindrical	7.25x12.00	clavate	+	+
SC-025	W	3.80	6.40	8.40	2.88x10.42	cylindrical	5.88x10.50	clavate	+	+
SC-034	G	4.25	7.45	9.00	3.38x12.88	cylindrical	6.75x12.88	clavate	+	+
SC-038	W	4.55	7.85	9.00	2.71x13.25	cylindrical	7.00x12.63	clavate	+	+
MC-002	GG	4.00	6.70	8.25	3.29x13.25	cylindrical	8.75x11.88	clavate	+	+
MC-028	W	4.60	8.15	9.00	2.96x11.96	cylindrical	5.75x12.25	clavate	+	+
MC-034	W	4.65	7.85	9.00	5.00x12.00	cylindrical	7.63x12.00	clavate	+	+
BC-002	W	4.05	6.90	8.50	4.38x10.79	cylindrical	7.38x11.25	clavate	-	-
BC-012	W	3.25	5.40	7.00	4.63x12.04	cylindrical	-	-	-	-

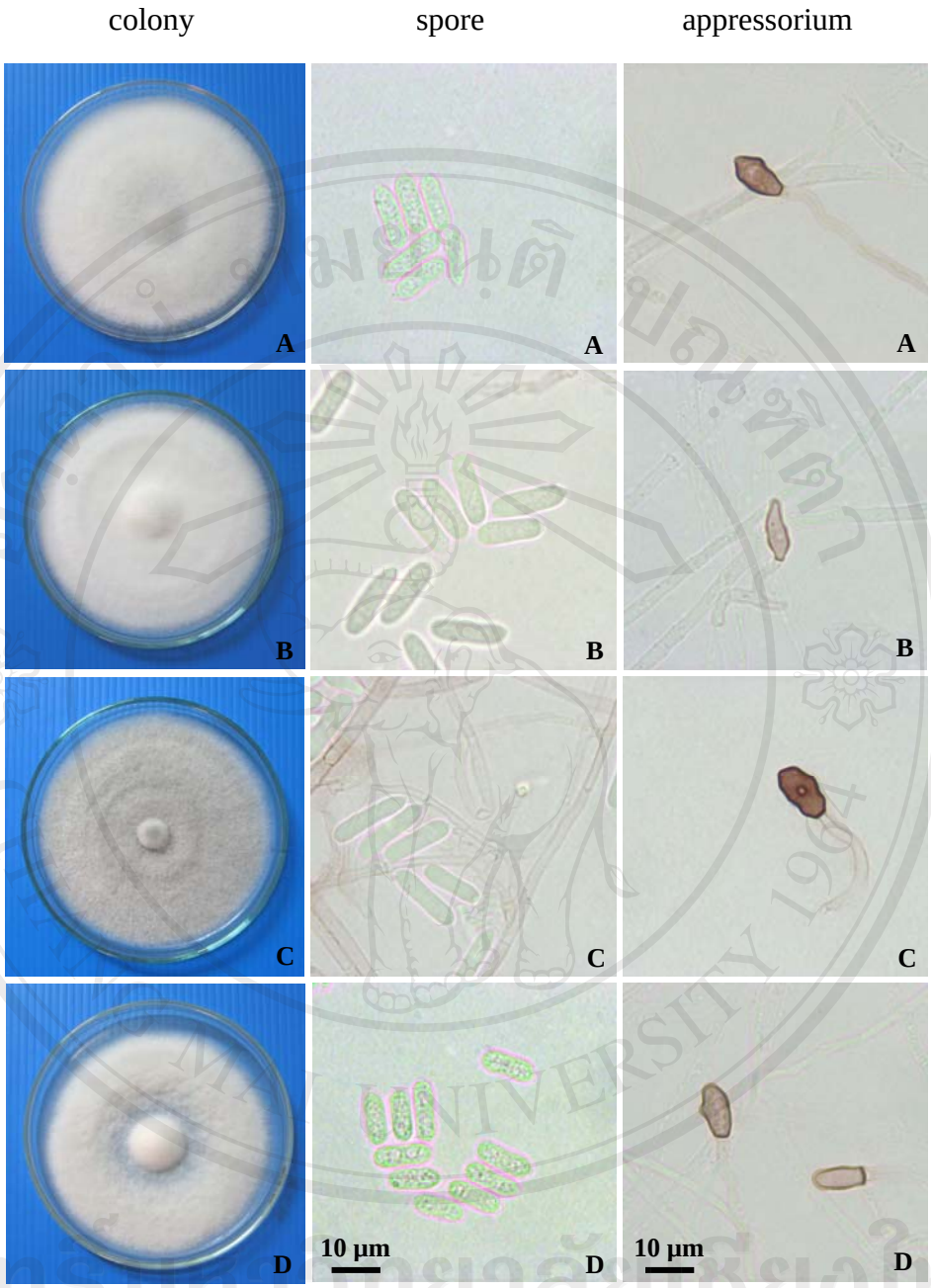
กำหนดให้

SC = ไอโซเลทที่แยกจาก อ.สันกำแพง MC = ไอโซเลทที่แยกจาก อ.แม่ริม BC = ไอโซเลทที่แยกจาก อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด)

W = white colony (โคโลนีสีขาว) G = gray colony (โคโลนีสีเทา) GG = gray/green colony (โคโลนีสีเทาปนเขียว)

\+ = present (มีการสร้าง) - = absent (ไม่พบการสร้าง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 13 ลักษณะโคโลนี (บนอาหาร PDA) สปอร์และแอพเพรสซอเรียม (บนอาหาร ¼ PDA) ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ ที่อายุ 7 วัน

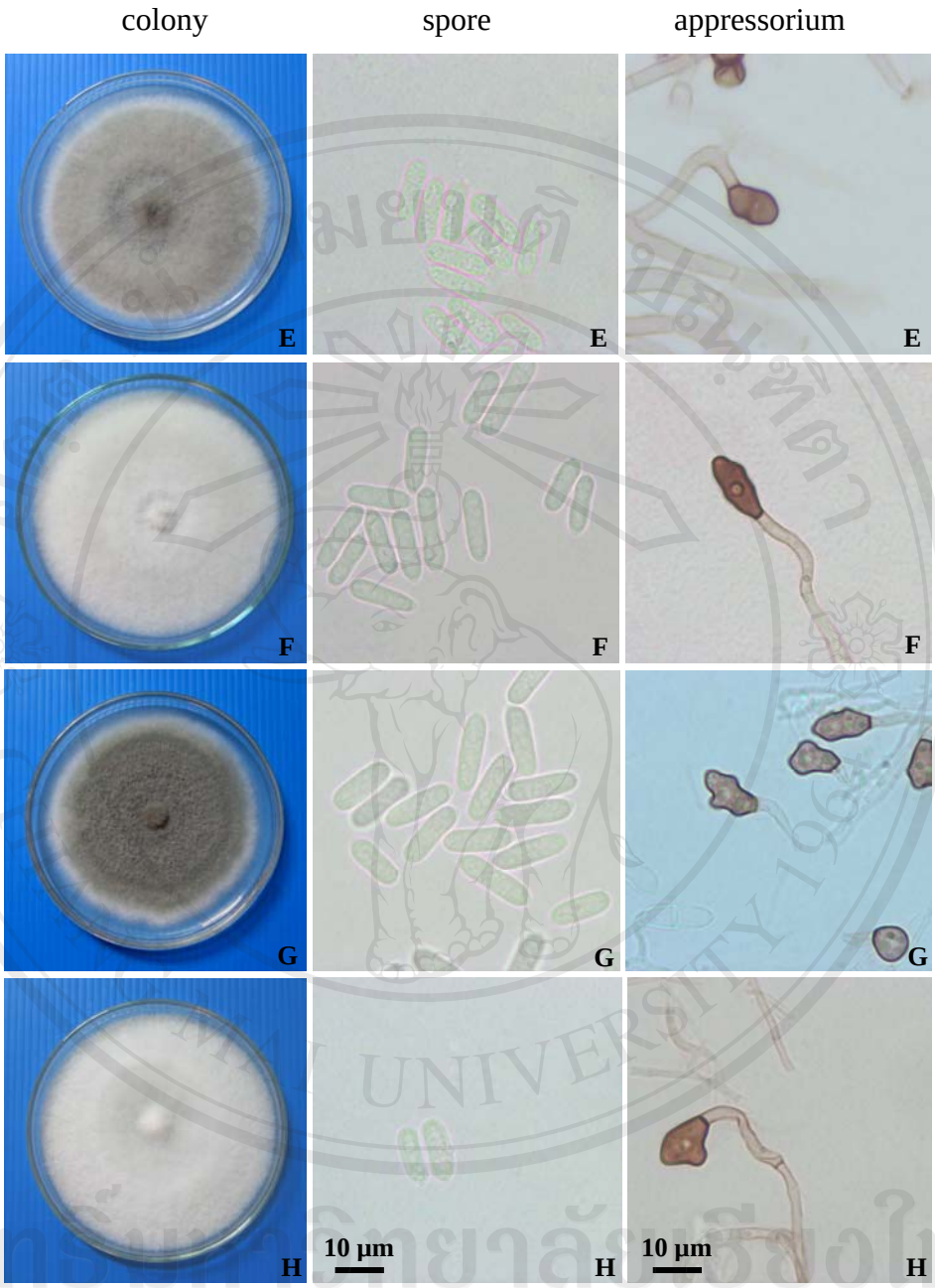
A = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท SC-017

B = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท SC-020

C = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท SC-021

D = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท SC-025

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 13 (ต่อ) ลักษณะโคโลนี (บนอาหาร PDA) สปอร์และแอพเพรสซอเรียม (บนอาหาร ¼ PDA) ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ ที่อายุ 7 วัน

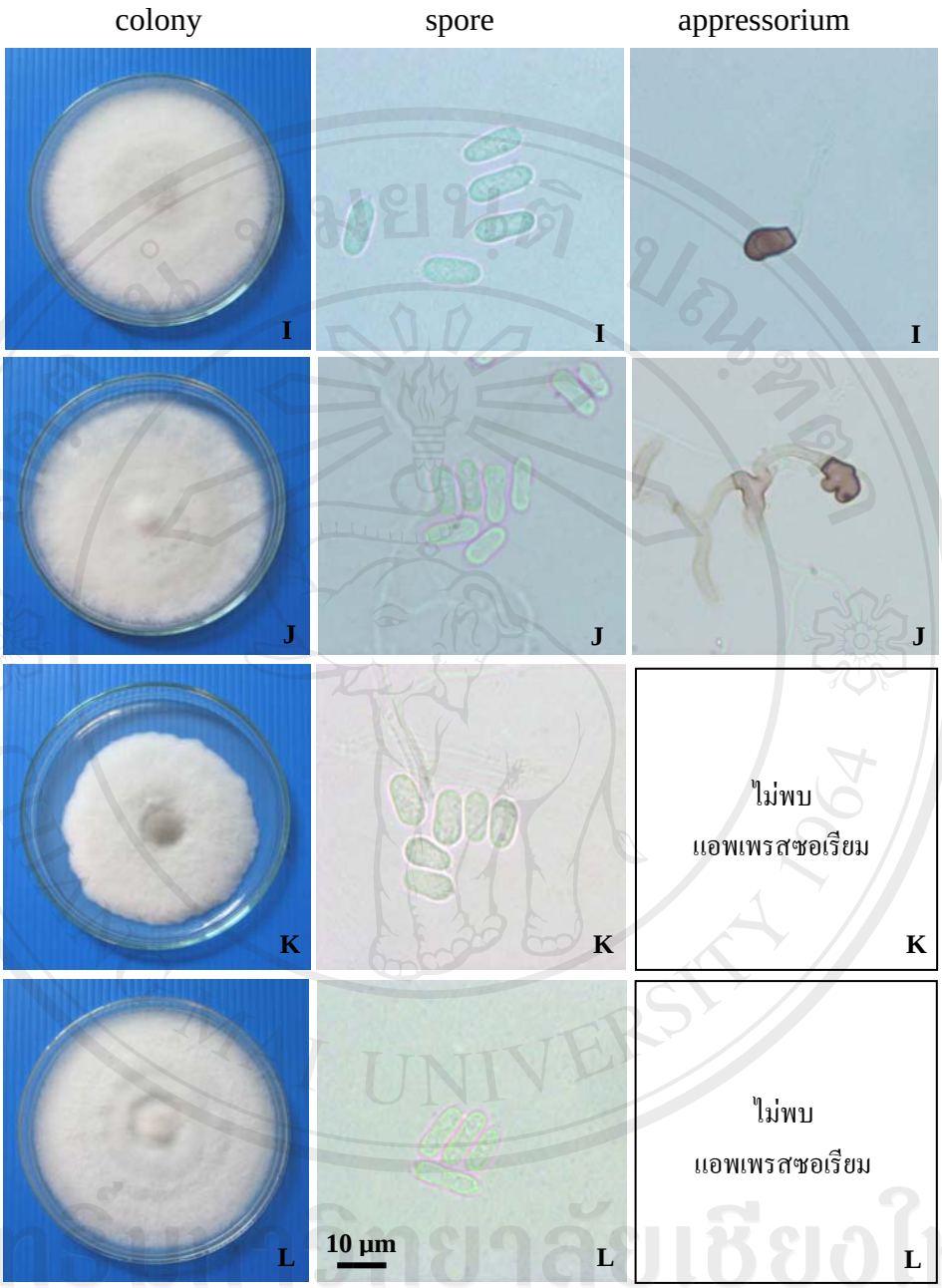
E = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท SC-034

F = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท SC-038

G = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท MC-002

H = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท MC-028

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 13 (ต่อ) ลักษณะโคโลนี (บนอาหาร PDA) สปอร์และแอพเพรสซอเรียม (บนอาหาร ¼ PDA) ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ ที่อายุ 7 วัน

I = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท MC-034

J = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท BC-002

K = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท BC-012

L = ลักษณะโคโลนี สปอร์ และ แอพเพรสซอเรียม ของไอโซเลท SC-004

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มต่างๆ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

5.1 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มเบนซิมิดาโซลในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

การทดสอบสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซล ซึ่งได้แก่ คาร์เบนดาซิม บีโนมิล และไทโอฟาเนต เมทธิล ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 500 ppm และชุดควบคุม กับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกได้จาก อ.สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ การทดสอบนี้ทำในห้องปฏิบัติการ และบันทึกเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยที่อายุ 3 วัน และนำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจำนวน 540 experimental units มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเกิดปัจจัยร่วม หรือเกิด interaction ระหว่าง fungicide x isolate x concentration (ตาราง 7) ซึ่งค่าเฉลี่ย treatment combination ทั้งหมดเสนอไว้ในตาราง 8 และ ภาพ 14 ภาพ 15 และภาพ 16 ส่วนค่า LSD ที่ใช้เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละคู่มีค่าเท่ากับ 8.29 ที่ความเชื่อมั่น 95% และ 10.92 ที่ความเชื่อมั่น 99% สำหรับการทดสอบครั้งนี้พบเชื้อที่ต้านทานสูง (highly resistance) ต่อสารเคมีจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ SC-020, SC-021 และ SC-038 ซึ่งแยกได้จาก อ.สันกำแพง โดยเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท เกิดการต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 3 ชนิดของสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล เพราะสารในกลุ่มนี้มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราที่เกิดการต้านทานได้ต่ำเพียง 0-2.35% เท่านั้น โดยการต้านทานสารเคมีในลักษณะนี้จัดได้ว่าเป็นการต้านทานแบบข้าม (cross resistance) ส่วนเชื้อที่ไม่แสดงการต้านทาน พบว่ามีการตอบสนองต่อสารเคมีแตกต่างกันไป ยกตัวอย่างเช่น เชื้อราไอโซเลท SC-004 จาก อ.สันกำแพง สารคาร์เบนดาซิมยับยั้งได้ 100% เมื่อใช้ในอัตราความเข้มข้น 10-500 ppm แต่ที่ความเข้มข้นต่ำคือที่ 1 ppm สารคาร์เบนดาซิมยับยั้งเชื้อราไอโซเลทนี้ได้ลดลงมาเหลือเพียง 72.08% เท่านั้น และหากพิจารณาเปรียบเทียบไอโซเลท SC-004 กับสารบีโนมิล พบว่าต้องใช้สารในอัตราสูงสุดจึงสามารถยับยั้งเชื้อได้ 100% สำหรับสารไทโอฟาเนต เมทธิล กับเชื้อราไอโซเลท SC-004 พบว่าที่อัตรา 10-500 ppm ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้สูงสุดอยู่ในช่วงระหว่าง 81.60-86.22% ซึ่งต่างกับกรรมวิธีที่ใช้ในอัตรา 1 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% เพราะที่ 1 ppm ความสามารถในการยับยั้งลดลงมาเหลือ 36.32%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติแบบ Factorial in CRD ของสารเคมีกลุ่มเบนซิมิดาโซล ซึ่งได้แก่ คาร์เบนดาซิม บีโนมิล และไทโอฟาเนต เมทธิล ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 500 ppm และชุดควบคุม ต่อการเจริญของเส้นใยที่อายุ 3 วันของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกจากสวน อ.สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

Source	df	SS	MS	F	*P*
Isolate (Is)	11	454720	41338	1550.16	0.0000
Fungicide (F)	2	11720	5860	219.74	0.0000
Concentration (C)	4	400046	100012	3750.39	0.0000
Is x F	22	5723	260	9.75	0.0000
Is xC	44	151979	3454	129.53	0.0000
F x C	8	1913	2392	89.71	0.0000
Is x F x C	88	17735	202	7.56	0.0000
Error	360	9600	27		
Total	539				

Grand mean = 51.33

CV (%) = 10.06

ตาราง 8 ความสามารถของสารเคมีกลุ่มเบนซิมิดาโซล ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 500 ppm และชุดควบคุม ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่แยกจาก อ.สันกำแพง (SC) อ.แม่ริม (MC) และ อ.เมือง (BC) จ.เชียงใหม่ ที่อายุ 3 วัน

Fungicide	Isolate	Growth (cm)[1]	Inhibition(%)[2]			
			1 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm
carbendazim	SC-004	3.58	72.08	100.00	100.00	100.00
	SC-017	3.65	65.70	85.58	100.00	100.00
	SC-020	3.45	1.44	1.44	1.44	1.44
	SC-021	3.58	1.88	1.88	1.88	1.88
	SC-025	3.42	66.31	100.00	100.00	100.00
	SC-034	3.92	100.00	100.00	100.00	100.00
	SC-038	3.73	0.00	0.44	0.44	0.44
	MC-002	3.12	100.00	100.00	100.00	100.00
	MC-028	3.62	63.60	100.00	100.00	100.00
	MC-034	3.78	100.00	100.00	100.00	100.00
	BC-002	2.68	75.28	100.00	100.00	100.00
	BC-012	2.73	57.31	100.00	100.00	100.00

[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของชุดควบคุม [2] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

LSD (p=0.01) = 10.92, LSD (p=0.05) = 8.29, CV (%) = 10.06

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 8 (ต่อ) ความสามารถของสารเคมีกลุ่มเบนซิมิดาโซล ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 500 ppm และชุดควบคุม ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่แยกจาก อ.สันกำแพง (SC) อ.แม่ริม (MC) และ อ.เมือง (BC) จ.เชียงใหม่ ที่อายุ 3 วัน

Fungicide	Isolate	Growth (cm)[1]	Inhibition(%)[2]			
			1 ppm	10 ppm	100 ppm	500 ppm
benomyl	SC-004	3.58	46.47	80.61	73.43	100.00
	SC-017	3.65	47.24	74.58	79.96	100.00
	SC-020	3.45	0.00	0.48	0.48	0.48
	SC-021	3.58	0.47	0.94	1.40	1.40
	SC-025	3.42	57.88	100.00	100.00	100.00
	SC-034	3.92	53.80	100.00	100.00	100.00
	SC-038	3.73	0.00	0.00	0.00	0.00
	MC-002	3.12	53.16	100.00	100.00	100.00
	MC-028	3.62	50.90	70.01	100.00	100.00
	MC-034	3.78	74.24	89.68	100.00	100.00
	BC-002	2.68	53.48	82.90	100.00	100.00
	BC-012	2.73	15.74	87.57	100.00	100.00
thiophanate methyl	SC-004	3.58	36.32	81.60	83.40	86.22
	SC-017	3.65	29.23	78.90	88.30	100.00
	SC-020	3.45	0.48	0.48	0.48	0.48
	SC-021	3.59	0.00	0.00	0.00	2.35
	SC-025	3.42	40.43	77.07	100.00	100.00
	SC-034	3.92	17.43	74.25	100.00	100.00
	SC-038	3.73	0.89	0.89	0.89	0.89
	MC-002	3.12	10.68	93.65	100.00	100.00
	MC-028	3.62	38.18	66.35	100.00	100.00
	MC-034	3.78	38.30	100.00	100.00	100.00
	BC-002	2.68	9.83	63.89	100.00	100.00
	BC-012	2.73	20.52	76.69	100.00	100.00

[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของชุดควบคุม

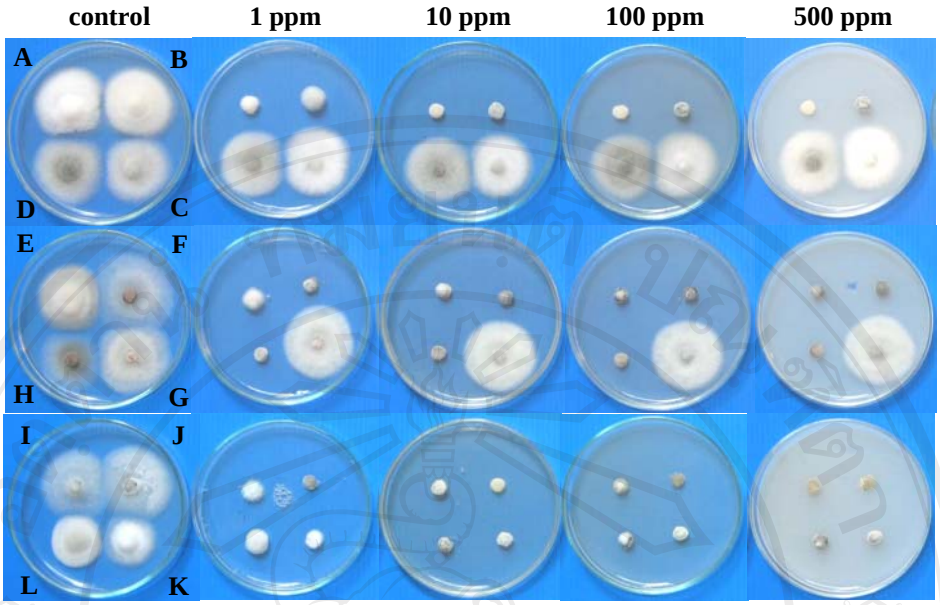
[2] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

LSD (p=0.01) = 10.92

LSD (p=0.05) = 8.29

CV (%) = 10.06

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 14 การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 100 และ 500 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่ออายุ 3 วัน

A = เชื้อราไอโซเลท SC-004 (S) B = เชื้อราไอโซเลท SC-017 (S)

C = เชื้อราไอโซเลท SC-020 (HR) D = เชื้อราไอโซเลท SC-021 (HR)

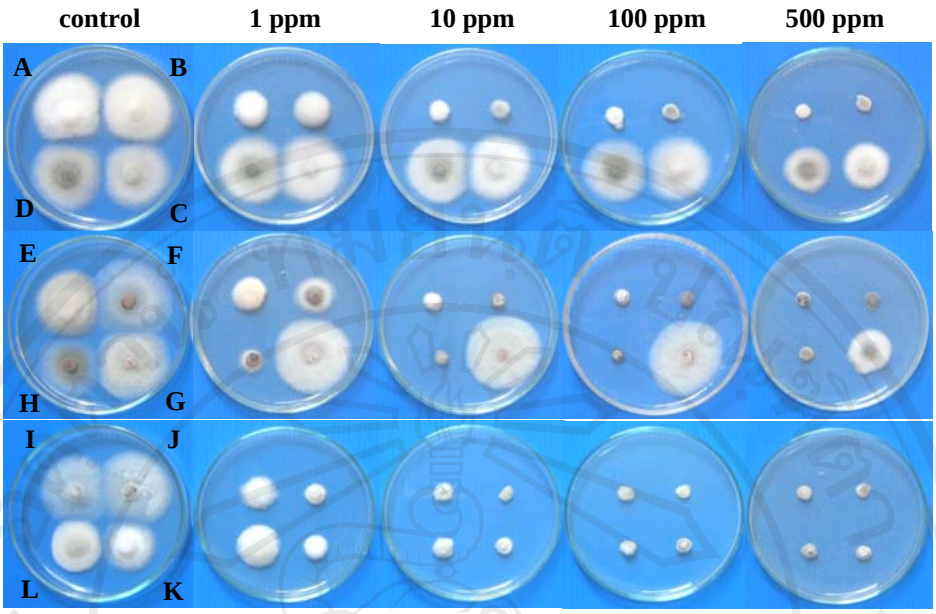
E = เชื้อราไอโซเลท SC-025 (S) F = เชื้อราไอโซเลท SC-034 (S)

G = เชื้อราไอโซเลท SC-038 (HR) H = เชื้อราไอโซเลท MC-002 (S)

I = เชื้อราไอโซเลท MC-028 (S) J = เชื้อราไอโซเลท MC-034 (S)

K = เชื้อราไอโซเลท BC-002 (S) L = เชื้อราไอโซเลท BC-012 (S)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 15 การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหาร PDA ที่ผสมสารบีโนมิล ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 100 และ 500 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่ออายุ 3 วัน

A = เชื้อราไอโซเลท SC-004 (S) B = เชื้อราไอโซเลท SC-017 (S)

C = เชื้อราไอโซเลท SC-020 (HR) D = เชื้อราไอโซเลท SC-021 (HR)

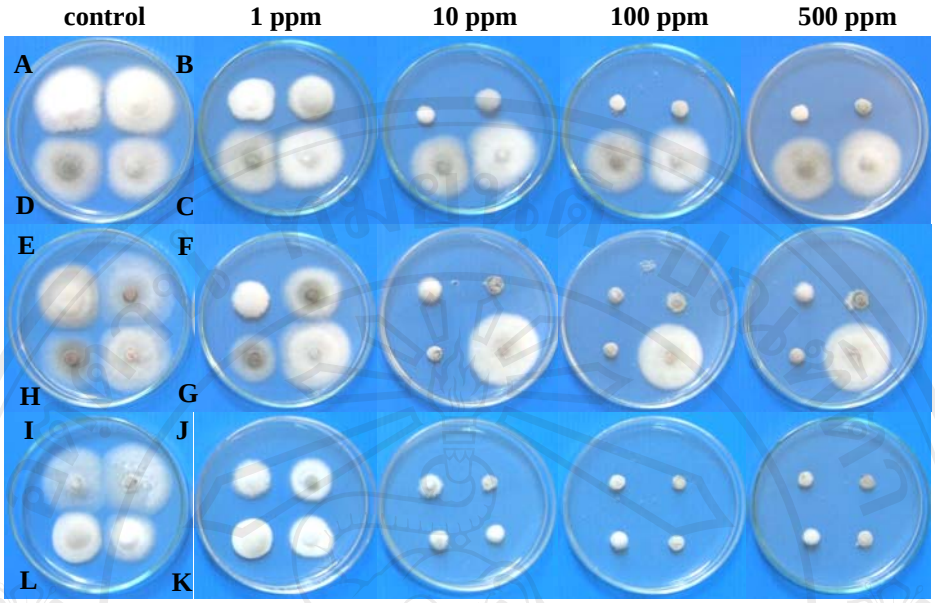
E = เชื้อราไอโซเลท SC-025 (S) F = เชื้อราไอโซเลท SC-034 (S)

G = เชื้อราไอโซเลท SC-038 (HR) H = เชื้อราไอโซเลท MC-002 (S)

I = เชื้อราไอโซเลท MC-028 (S) J = เชื้อราไอโซเลท MC-034 (S)

K = เชื้อราไอโซเลท BC-002 (S) L = เชื้อราไอโซเลท BC-012 (S)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 16 การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหาร PDA ที่ผสมสารไทโอฟาเนตเมทธิล ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 100 และ 500 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่ออายุ 3 วัน

A = เชื้อราไอโซเลท SC-004 (S) B = เชื้อราไอโซเลท SC-017 (S)

C = เชื้อราไอโซเลท SC-020 (HR) D = เชื้อราไอโซเลท SC-021 (HR)

E = เชื้อราไอโซเลท SC-025 (S) F = เชื้อราไอโซเลท SC-034 (S)

G = เชื้อราไอโซเลท SC-038 (HR) H = เชื้อราไอโซเลท MC-002 (S)

I = เชื้อราไอโซเลท MC-028 (S) J = เชื้อราไอโซเลท MC-034 (S)

K = เชื้อราไอโซเลท BC-002 (S) L = เชื้อราไอโซเลท BC-012 (S)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มไตรอะโซลในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

การทดสอบสารเคมีในกลุ่มไตรอะโซล ซึ่งได้แก่ สารไซโปรโคนาโซล ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 25 ppm และชุดควบคุม กับเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 12 ไอโซเลท จากแปลงปลูกกุหลาบ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของประสิทธิภาพสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แสดงไว้ในตาราง 9 ซึ่งพบว่า isolate และ concentration มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.01$ และเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่าง treatment combination ทั้งสองขึ้นด้วย ($p = 0.01$) เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของ treatment ต่างๆ พบว่าสารไซโปรโคนาโซลยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดที่อัตราความเข้มข้น 25 ppm กับเชื้อรา 2 ไอโซเลท คือ SC-025 และ SC-038 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 68.82 และ 71.30% ทั้ง 2 treatment นี้ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ข้อมูลแสดงไว้ในตาราง 10 และภาพ 17 และสารกลุ่มไตรอะโซล ที่นำมาทดสอบอีกชนิดหนึ่งคือสารเฮกซะโคนาโซล ซึ่งได้นำมาทดสอบที่อัตรา 0.1, 1, 10, 25, 50 ppm และชุดควบคุม ผลการวิเคราะห์ทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแสดงในตาราง 11 พบว่า isolate x concentration เกิด interaction ขึ้นที่ $p = 0.01$ โดยพบว่าสารเฮกซะโคนาโซลที่อัตราแนะนำคือ 50 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 12 ไอโซเลทได้เท่ากับ 100% ทั้งนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ต้านทานต่อสารกลุ่มเบนซิมิดาโซลได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นรองลงมาคือ 25 ppm ของเชื้อราไอโซเลท SC-025, BC-002 และ BC-012 สารเคมีสามารถยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.05$ แสดงข้อมูลในตาราง 12 และภาพ 17

5.3 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มอะคริลามายด์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

การทดสอบสารเคมีกลุ่มอะคริลามายด์ ซึ่งได้แก่ สารเบนาแล็กซิล ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 250, 500 ppm และชุดควบคุม กับเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยแสดงผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติไว้ในตาราง 13 พบว่า isolate x concentration เกิดปฏิกิริยาร่วมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.01$ โดยที่ความเข้มข้น 500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราไอโซเลท BC-002 ได้ดีที่สุด คือ 94.18% รองลงมาคือไอโซเลท MC-034 ยับยั้งได้ 84.51% ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.05$) และเมื่อพิจารณาสารเบนาแล็กซิลที่ความเข้มข้น 1 ppm กับชุดควบคุมพบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของเชื้อราบางไอโซเลทไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุม ยกตัวอย่างเช่นเชื้อราไอโซเลท SC-004 ที่ความเข้มข้น 1 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 7.43% ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% แสดงข้อมูลในตาราง 14 และภาพ 17

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 9 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติแบบ Factorial in CRD ของสารไซโปรโคนาโซล ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 25 ppm และชุดควบคุม ต่อการเจริญของเส้นใยที่อายุ 3 วันของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกจากสวน อ. สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

Source	df	SS	MS	F	*P*
Isolate (Is)	11	3571.3	324.7	136.69	0.0000
Concentration (C)	5	78269.9	15654.0	6590.81	0.0000
Is x C	55	8752.6	159.1	67.00	0.0000
Error	144	342.0	2.4		
Total	215				

Grand mean = 24.95

CV (%) = 6.18

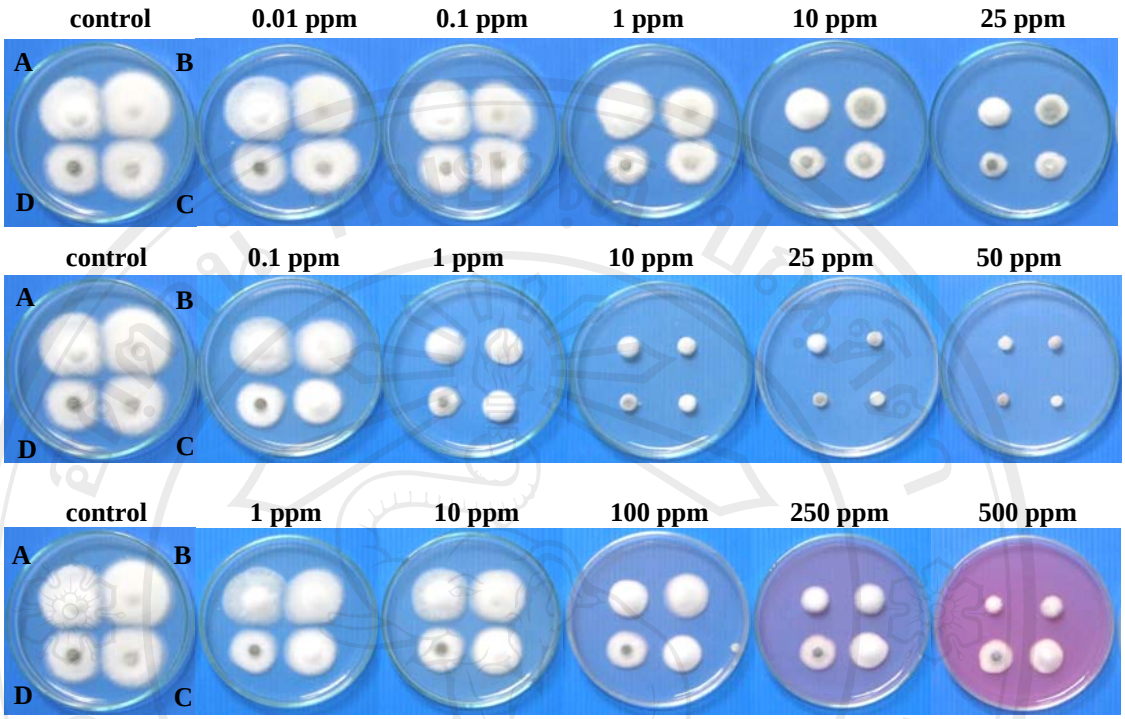
ตาราง 10 ความสามารถของสารไซโปรโคนาโซล ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10, 25 ppm และชุดควบคุม ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่แยกจาก อ.สันกำแพง (SC) อ.แม่ริม (MC) และ อ.เมือง (BC) จ.เชียงใหม่ ที่อายุ 3 วัน

Fungicide	Isolate	Growth (cm)[1]	Inhibition(%)[2]				
			0.01 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	25 ppm
cyproconazole	SC-004	3.43	7.76	13.58	17.47	32.52	52.42
	SC-017	3.67	17.27	21.82	28.19	40.46	53.18
	SC-020	3.42	22.93	27.32	34.15	37.56	58.05
	SC-021	3.03	25.16	32.96	39.54	41.72	50.00
	SC-025	3.37	3.00	5.94	12.86	57.90	68.82
	SC-034	3.65	5.94	9.59	13.23	44.74	58.43
	SC-038	3.72	7.62	13.45	18.83	56.51	71.30
	MC-002	3.13	1.08	5.29	11.69	44.66	54.77
	MC-028	3.52	5.68	10.91	16.11	22.74	47.40
	MC-034	3.85	7.35	8.64	13.40	47.19	62.78
	BC-002	2.88	2.30	14.44	20.23	49.15	58.40
	BC-012	3.07	7.06	21.18	29.32	41.83	49.98

[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของชุดควบคุม [2] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

LSD (p=0.01) = 3.28, LSD (p=0.05) = 2.49, CV (%) = 6.18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 17 การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหาร PDA ที่ผสมสารไซโปรโคนาโซล สารเฮกซะโคนาโซล และสารเบนาแล็กซิล ที่ 5 ระดับความเข้มข้น เมื่ออายุ 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ก. การเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารไซโปรโคนาโซล ที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.01, 0.1, 1, 10 และ 25 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ข. การเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารเฮกซะโคนาโซลที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0.1, 1, 10, 25 และ 50 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ค. การเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารเบนาแล็กซิลที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 100, 250 และ 500 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

A = เชื้อราไอโซเลท SC-004 (S) B = เชื้อราไอโซเลท SC-017 (S)

C = เชื้อราไอโซเลท SC-020 (HR) D = เชื้อราไอโซเลท SC-021 (HR)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 11 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติแบบ Factorial in CRD ของสารเฮกซะโคนาโซล ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 25, 50 ppm และชุดควบคุม ต่อการเจริญของเส้นใยที่อายุ 3 วันของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกจากสวน อ. สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

Source	df	SS	MS	F	*P*
Isolate (Is)	11	2350	213.6	14.19	0.0000
Concentration (C)	5	306616	61323.2	4072.89	0.0000
Is x C	55	5439	98.9	6.57	0.0000
Error	144	2168	15.1		
Total	215				

Grand mean = 52.84

CV (%) = 7.34

ตาราง 12 ความสามารถของสารเฮกซะโคนาโซล ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 25, 50 ppm และชุดควบคุมในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่แยกจาก อ.สันกำแพง (SC) อ.แม่ริม (MC) และ อ.เมือง (BC) จ.เชียงใหม่ ที่อายุ 3 วัน

Fungicide	Isolate	Growth (cm)[1]	Inhibition(%)[2]				
			0.1 ppm	1 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm
hexacomazole	SC-004	3.40	3.89	35.76	76.43	74.02	100.00
	SC-017	3.45	6.77	40.58	74.39	82.13	100.00
	SC-020	3.15	13.76	37.04	76.19	81.48	100.00
	SC-021	2.93	11.67	37.89	72.07	78.33	100.00
	SC-025	3.05	18.25	49.18	100.00	93.99	100.00
	SC-034	3.05	8.20	37.16	73.22	93.55	100.00
	SC-038	3.58	14.67	56.64	79.95	82.28	100.00
	MC-002	3.18	16.53	28.07	77.96	85.84	100.00
	MC-028	3.28	2.29	24.17	69.47	90.79	100.00
	MC-034	3.55	5.15	43.61	76.99	88.72	100.00
	BC-002	3.18	10.21	13.31	78.46	100.00	100.00
	BC-012	2.85	8.71	45.60	74.84	100.00	100.00

[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของชุดควบคุม [2] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

LSD (p=0.01) = 8.27

LSD (p=0.05) = 6.26

CV (%) = 7.34

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติแบบ Factorial in CRD ของสารเบนาแล็กซิลที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 250, 500 ppm และชุดควบคุม ต่อการเจริญของเส้นใยที่อายุ 3 วันของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกจากสวน อ. สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

Source	df	SS	MS	F	*P*
Isolate (Is)	11	8600	781.8	49.66	0.0000
Concentration (C)	5	123897	24779.4	1574.01	0.0000
Is x C	55	17197	312.7	19.86	0.0000
Error	144	2267	15.7		
Total	215				

Grand mean = 27.94

CV (%) = 14.20

ตาราง 14 ความสามารถของสารเบนาแล็กซิล ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100, 250, 500 ppm และชุดควบคุม ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่แยกจาก อ.สันกำแพง (SC) อ.แม่ริม (MC) และ อ.เมือง (BC) จ.เชียงใหม่ ที่อายุ 3 วัน

Fungicide	Isolate	Growth (cm)[1]	Inhibition(%)[2]				
			1 ppm	10 ppm	100 ppm	250 ppm	500 ppm
benalaxyl	SC-004	3.40	7.43	12.30	51.76	63.33	74.02
	SC-017	3.45	5.80	7.73	25.12	56.52	65.70
	SC-020	3.15	14.29	8.47	31.75	37.57	38.10
	SC-021	2.93	11.09	10.54	27.08	34.49	35.61
	SC-025	3.05	3.28	9.84	33.88	62.30	68.30
	SC-034	3.05	1.08	4.92	24.56	58.72	68.30
	SC-038	3.58	5.82	5.34	26.79	31.47	35.66
	MC-002	3.18	11.82	21.77	35.41	62.19	75.30
	MC-028	3.28	4.81	0.25	24.17	66.41	67.94
	MC-034	3.55	1.86	8.45	35.68	84.51	84.51
	BC-002	3.18	6.01	9.19	23.87	74.84	94.18
	BC-012	2.85	5.78	7.01	23.39	32.95	51.44

[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของชุดควบคุม [2] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

LSD (p=0.01) = 8.46

LSD (p=0.05) = 6.40

CV (%) = 14.20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5.4 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มไดไทโอคาร์บาเมต ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

การทดสอบสารเคมีกลุ่มไดไทด์โอคาร์บาเมต ได้แก่ สารแมนโคเซ็บ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 500, 1000, 2000 ppm และชุดควบคุม พบว่าเกิดปัจจัยร่วมระหว่าง isolate x concentration ($p = 0.01$) แสดงข้อมูลผลการวิเคราะห์ทางสถิติประสิทธิภาพของสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ไว้ในตาราง 15 พบว่าการทดสอบสารที่อัตราสูงสุด 2000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราไอโซเลท MC-034 และ MC-002 ได้ดีที่สุดคือ 94.81 และ 91.37% ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น $p = 0.01$ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราไอโซเลท SC-025 และ SC-034 ได้ 70.78 และ 72.60% แสดงข้อมูลในตาราง 16 และภาพ 18

5.5 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มฟาโลไนไตร์ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

การทดสอบสารเคมีกลุ่มฟาโลไนไตร์ ได้แก่ สารคลอโรธาโรนิล ที่ระดับความเข้มข้น10, 50, 250, 500, 1000 ppm และชุดควบคุม พบว่า isolate และ concentration เกิดปฏิกิริยาร่วมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.01$ (ตาราง 17) โดยสารคลอโรธาโรนิลที่ความเข้มข้น 1000 pm สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราไอโซเลท MC-002 ได้ดีที่สุดเท่ากับ 93.75% รองลงมาคือไอโซเลท SC-034 สารเคมีสามารถยับยั้งได้ 72.60% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p = 0.01$ แสดงข้อมูลในตาราง 18 และภาพ 18

5.6 การทดสอบความสามารถของสารเคมีกลุ่มอินออร์แกนิคในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

การทดสอบสารเคมีกลุ่มอินออร์แกนิค ได้แก่ สารคอปเปอร์ ออกซีคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น10, 100, 1000, 2000, 3500 ppm และชุดควบคุม พบการเกิดปัจจัยร่วมระหว่าง isolate x concentration ($p = 0.01$) ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงไว้ในตาราง 19 พบว่าที่ความเข้มข้น 3500 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด 75.60 และ 75.40% ของเชื้อราไอโซเลท MC-002 และ SC-020 ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% และที่ความเข้มข้นต่ำสุด 10 ppm สารเคมีไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราไอโซเลท SC-020, MC-028, BC-002 และ BC-012 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% แสดงข้อมูลในตาราง 20 และภาพ 18

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติแบบ Factorial in CRD ของสารแมนโคเซ็บ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 500, 1000, 2000 ppm และชุดควบคุม ต่อการเจริญของเส้นใยที่อายุ 3 วันของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกจากสวน อ. สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

Source	df	SS	MS	F	*P*
Isolate (Is)	11	9997.1	908.8	54.49	0.0000
Concentration (C)	5	70733.1	14146.6	848.19	0.0000
Is x C	55	12662.0	230.2	13.80	0.0000
Error	144	2401.7	16.7		
Total	215				

Grand mean = 27.98

CV (%) = 14.60

ตาราง 16 ความสามารถของสารแมนโคเซ็บ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 500, 1000, 2000 ppm และชุดควบคุม ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่แยกจาก อ.สันกำแพง (SC) อ.แม่ริม (MC) และ อ.เมือง (BC) จ.เชียงใหม่ ที่อายุ 3 วัน

Fungicide	Isolate	Growth (cm)[1]	Inhibition(%)[2]				
			10 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm	2000 ppm
mancozeb	SC-004	3.43	3.87	11.63	15.05	38.35	50.00
	SC-017	3.67	9.05	10.45	34.09	33.64	39.09
	SC-020	3.42	14.59	23.41	28.77	31.70	45.37
	SC-021	3.03	7.67	15.34	23.60	30.22	44.50
	SC-025	3.37	8.94	32.16	38.13	48.48	70.78
	SC-034	3.65	14.22	37.91	43.37	49.31	72.60
	SC-038	3.72	12.12	34.54	40.37	41.70	61.44
	MC-002	3.13	3.16	28.16	43.08	57.43	91.37
	MC-028	3.52	7.59	12.32	22.74	31.27	45.49
	MC-034	3.85	14.32	25.53	38.96	43.72	94.81
	BC-002	2.88	13.79	24.83	28.31	26.59	36.98
	BC-012	3.07	19.07	32.58	36.40	34.23	44.00

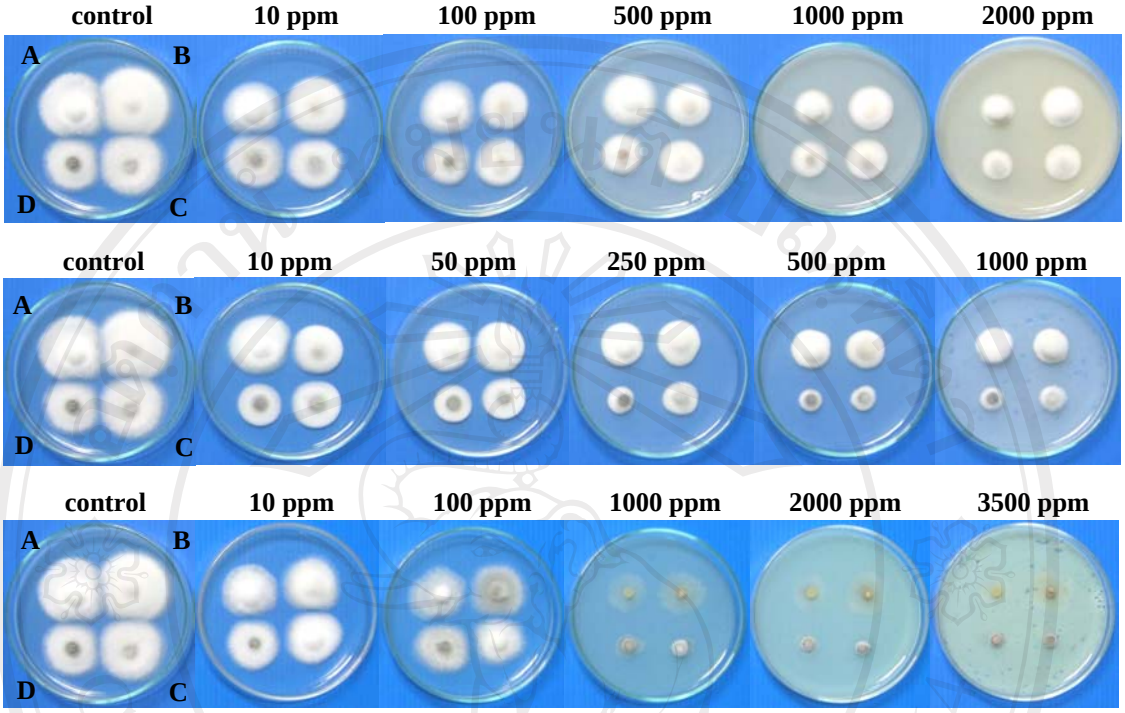
[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของชุดควบคุม [2] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

LSD (p=0.01) = 8.70

LSD (p=0.05) = 6.59

CV (%) = 14.60

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 18 การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหาร PDA ที่ผสมสารแมนโคเซ็บ สารคลอโรธาโรนิล และสารคอปเปอร์ ออกซีคลอไรด์ ที่ 5 ระดับความเข้มข้น เมื่ออายุ 3 วัน เปรียบเทียบกับชุดควมคุม

ก. การเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารแมนโคเซ็บ ที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 10, 100, 500, 1000 และ 2000 ppm เปรียบเทียบกับชุดควมคุม

ข. การเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคลอโรธาโรนิลที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 10, 50, 250, 500 และ 1000 ppm เปรียบเทียบกับชุดควมคุม

ค. การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคอปเปอร์ออกซีคลอไรด์ ที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 10, 100, 1000, 2000 และ 3500 เปรียบเทียบกับชุดควมคุม

A = เชื้อราไอโซเลท SC-004 (S) B = เชื้อราไอโซเลท SC-017 (S)

C = เชื้อราไอโซเลท SC-020 (HR) D = เชื้อราไอโซเลท SC-021 (HR)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติแบบ Factorial in CRD ของสารคลอโรธาโรนิล ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 250, 500, 1000 ppm และชุดควบคุม ต่อการเจริญของเส้นใยที่อายุ 3 วันของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกจากสวน อ. สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

Source	df	SS	MS	F	*P*
Isolate (Is)	11	11450.8	1041.0	233.50	0.0000
Concentration (C)	5	74074.4	14814.9	3323.13	0.0000
Is x C	55	8590.4	156.2	35.03	0.0000
Error	144	642.0	4.5		
Total	215				

Grand mean = 36.55

CV (%) = 5.78

ตาราง 18 ความสามารถของสารคลอโรธาโรนิล ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 250, 500, 1000 ppm และชุดควบคุม ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่แยกจาก อ.สันกำแพง (SC) อ.แม่ริม (MC) และ อ.เมือง (BC) จ.เชียงใหม่ ที่อายุ 3 วัน

Fungicide	Isolate	Growth (cm)[1]	Inhibition(%)[2]				
			10 ppm	50 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm
chlorothalonil	SC-004	3.43	4.38	20.38	31.06	37.87	42.72
	SC-017	3.67	31.36	21.81	35.91	40.91	53.18
	SC-020	3.42	27.31	29.26	42.43	59.99	62.91
	SC-021	3.03	29.68	33.51	46.16	59.90	67.03
	SC-025	3.37	28.21	33.66	35.13	39.60	46.02
	SC-034	3.65	21.45	36.52	52.03	68.49	72.60
	SC-038	3.72	33.63	37.22	50.23	64.57	66.82
	MC-002	3.13	37.23	48.41	62.77	70.23	93.75
	MC-028	3.52	14.21	22.27	42.19	46.91	51.18
	MC-034	3.85	25.55	37.22	48.91	51.07	61.90
	BC-002	2.88	26.59	38.74	49.16	52.02	52.60
	BC-012	3.07	30.41	41.83	42.37	45.63	33.69

[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของชุดควบคุม [2] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

LSD (p=0.01) = 4.50

LSD (p=0.05) = 3.41

CV (%) = 5.78

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติแบบ Factorial in CRD ของสารคอปเปอร์ ออกซีคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 1000, 2000, 3500 ppm และชุดควบคุม ต่อการเจริญของเส้นใยที่อายุ 3 วันของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ จำนวน 12 ไอโซเลท ที่แยกจากสวน อ. สันกำแพง อ.แม่ริม และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

Source	df	SS	MS	F	*P*
Isolate (Is)	11	11026	1002.4	100.14	0.0000
Concentration (C)	5	113305	22661.1	2263.93	0.0000
Is x C	55	11571	210.4	21.02	0.0000
Error	144	1441	10.0		
Total	215				

Grand mean = 27.58

CV (%) = 11.47

ตาราง 20 ความสามารถของสารคอปเปอร์ ออกซีคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 1000, 2000, 3500 ppm และชุดควบคุม ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่แยกจาก อ.สันกำแพง (SC) อ.แม่ริม (MC) และ อ.เมือง (BC) จ.เชียงใหม่ ที่อายุ 3 วัน

Fungicide	Isolate	Growth (cm)[1]	Inhibition(%)[2]				
			10 ppm	100 ppm	1000 ppm	2000 ppm	3500 ppm
copper oxychloride	SC-004	3.40	12.49	11.71	34.57	42.64	57.47
	SC-017	3.45	7.25	3.62	22.46	31.16	33.33
	SC-020	3.15	0.00	3.17	65.87	73.02	75.40
	SC-021	2.93	1.71	1.72	52.13	58.96	64.96
	SC-025	3.05	4.10	0.82	30.33	41.80	48.36
	SC-034	3.05	0.81	4.90	37.87	59.03	64.76
	SC-038	3.58	12.58	15.38	44.75	52.46	55.25
	MC-002	3.18	14.96	21.24	66.94	68.50	75.60
	MC-028	3.28	0.00	3.82	54.97	65.65	66.40
	MC-034	3.55	4.19	9.85	24.65	38.03	35.93
	BC-002	3.18	0.00	6.31	42.49	56.72	49.61
	BC-012	2.85	0.00	3.51	28.41	38.48	43.85

[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของชุดควบคุม [2] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 3 ซ้ำของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

LSD (p=0.01) = 6.74

LSD (p=0.05) = 5.11

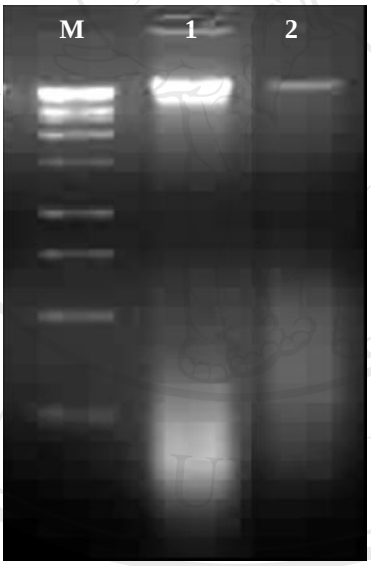
CV (%) = 11.47

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับยีนของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบที่มีผลต่อการต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนซิมิดาโซล

6.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อรา

จากผลการทำอิเลคโตรโฟริซิสใน agarose gel 1% เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของการสกัดดีเอ็นเอจากวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 พบว่าการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ 1 ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่มากกว่าวิธีที่ 2 ดังนั้นในการสกัดดีเอ็นเอเชื้อราครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีที่ 1 (ภาพ 19) จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในกุหลาบ จำนวนทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท ได้แก่ SC-017, SC-020, SC-021 และ SC-038 ที่ได้ทำการศึกษาการต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนซิมิดาโซลแล้ว และเพื่อจะนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ beta-tubulin (TBU2) gene ต่อไป (ภาพ 20)



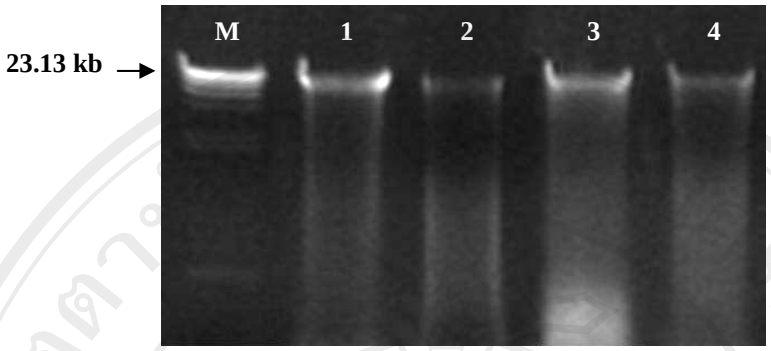
ภาพ 19 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2

แถวที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder

แถวที่ 1 = ไอโซเลท SC-021 สกัดโดยวิธีที่ 1

แถวที่ 2 = ไอโซเลท SC-021 สกัดโดยวิธีที่ 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



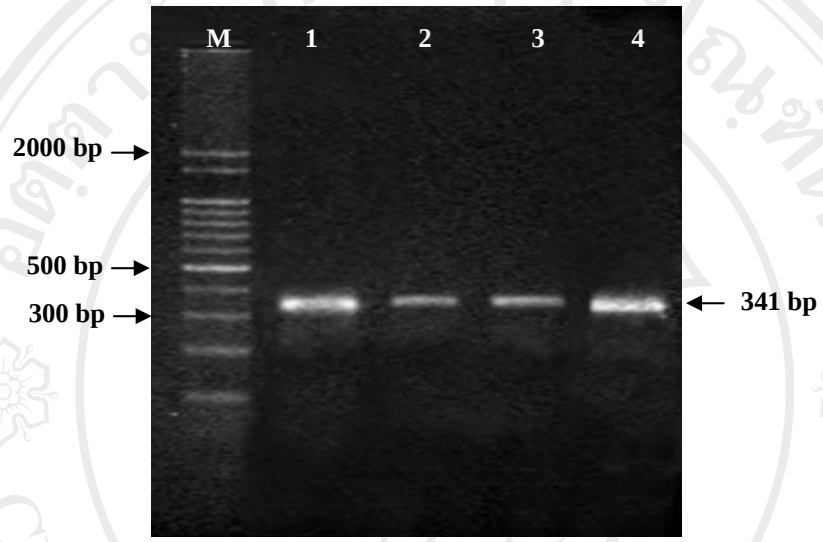
ภาพ 20 Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่สกัดได้

แถวที่ M	=	ดีเอ็นเอมาตรฐาน lambda DNA/*Hind*III
แถวที่ 1	=	ไอโซเลท SC-017 (S)
แถวที่ 2	=	ไอโซเลท SC-020 (HR)
แถวที่ 3	=	ไอโซเลท SC-021 (HR)
แถวที่ 4	=	ไอโซเลท SC-038 (HR)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราที่ตำแหน่ง beta-tubulin (TBU2) gene ด้วย forward primer CTBF (5'-TCCAAGATCCGTGAGG-3') และ reverse primer CTBR (5'-AAGAAGTGG AGACGGG-3') พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 341 bp (ภาพ 21)



ภาพ 21 Gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primers CTBF/CTBR ที่ตำแหน่งของ beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ

แถวที่ M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder
แถวที่ 1 = ไอโซเลท SC-017 (S)
แถวที่ 2 = ไอโซเลท SC-020 (HR)
แถวที่ 3 = ไอโซเลท SC-021 (HR)
แถวที่ 4 = ไอโซเลท SC-038 (HR)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในกุหลาบจาก 4 ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของเชื้อราที่แสดงการอ่อนแอและต้านทานต่อสารเบนซิมิดาโซล ได้แก่ ไอโซเลท SC-017 (S), SC-020 (HR), SC-021 (HR) และ SC-038 (HR) ด้วยเครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer

6.4 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 4 ตัวอย่างมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโนกับ GenBank พบว่าไอโซเลท SC-017 (S) ซึ่งอ่อนแอต่อสารเบนซิมิดาโซล (ภาพ 22) มีความเหมือนกับ beta-tubulin (TBU2) gene บางส่วนของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Accession No. U14138) ถึง 100% สำหรับไอโซเลท SC-020 (HR) (ภาพ 23) SC-021 (HR) (ภาพ 24) และ SC-038 (HR) (ภาพ 25) ซึ่งต้านทานต่อสารเบนซิมิดาโซล มีความเหมือนกับบางส่วนของ beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Accession No. U14138) ถึง 99% โดยพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 1,286 ซึ่ง adenine (A) เปลี่ยนเป็น cytosine (C) เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 198 โดย glutamic acid (G<u>A</u>G) จะถูกแทนที่ด้วย alanine (G<u>C</u>G)

จากนั้นทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพ 26) และเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโน (ภาพ 27) จากฐานข้อมูล GenBank กับบางส่วนของ beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อราที่ทำการศึกษา พบว่าเชื้อราไอโซเลท SC-017 (S), SC-020 (HR), SC-021 (HR) และ SC-038 (HR) มีความเหมือนกับเชื้อรา *Glomerella acutata* (Accession No. AB273716) และ *C. graminicola* (Accession No. M34492) นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,278 ของไอโซเลท SC-020(HR) และ SC-021 (HR) โดยมีการเปลี่ยนแปลงจาก cytosine (C) เป็น thymine (T) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งนี้จะไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

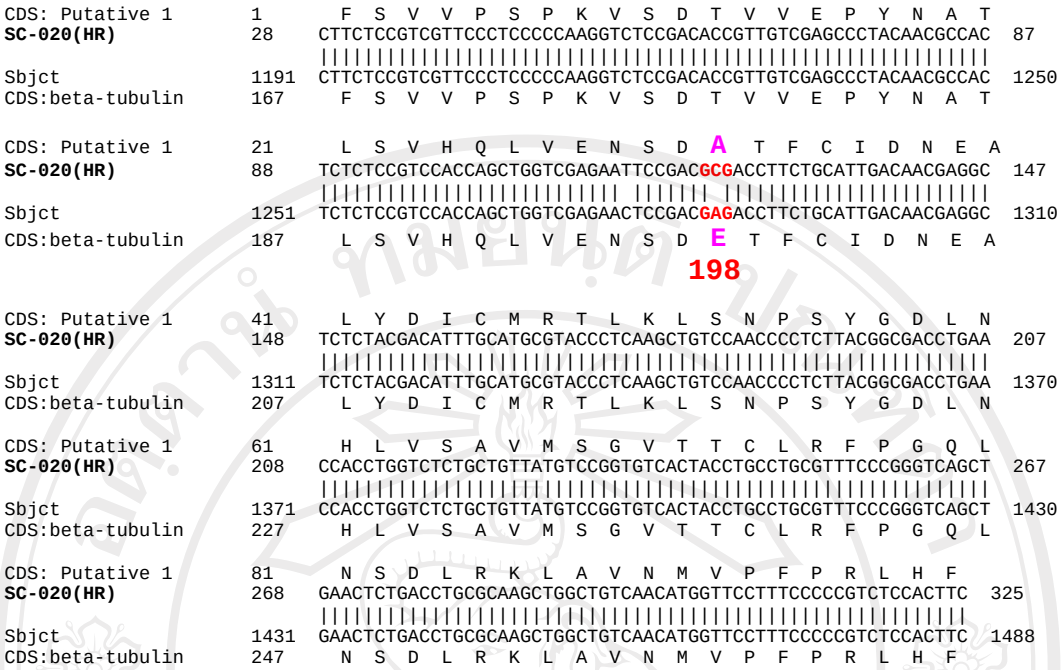
```
CDS: Putative 1       1      F  S  V  V  P  S  P  K  V  S  D  T  V  V  E  P  Y  N  A  T
SC-017(S)             28   CTTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCAC  87
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1191 CTTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCAC  1250
CDS:beta-tubulin      167    F  S  V  V  P  S  P  K  V  S  D  T  V  V  E  P  Y  N  A  T

CDS: Putative 1       21     L  S  V  H  Q  L  V  E  N  S  D  E  T  F  C  I  D  N  E  A
SC-017(S)             88   TCTCTCCGTCCACCAGCTGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGC  147
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1251 TCTCTCCGTCCACCAGCTGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGC  1310
CDS:beta-tubulin      187    L  S  V  H  Q  L  V  E  N  S  D  E  T  F  C  I  D  N  E  A
                                                          198

CDS: Putative 1       41     L  Y  D  I  C  M  R  T  L  K  L  S  N  P  S  Y  G  D  L  N
SC-017(S)             148  TCTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAA  207
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1311 TCTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAA  1370
CDS:beta-tubulin      207    L  Y  D  I  C  M  R  T  L  K  L  S  N  P  S  Y  G  D  L  N

CDS: Putative 1       61     H  L  V  S  A  V  M  S  G  V  T  T  C  L  R  F  P  G  Q  L
SC-017(S)             208  CCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAGCT  267
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1371 CCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAGCT  1430
CDS:beta-tubulin      227    H  L  V  S  A  V  M  S  G  V  T  T  C  L  R  F  P  G  Q  L

CDS: Putative 1       81     N  S  D  L  R  K  L  A  V  N  M  V  P  F  P  R  L  H  F
SC-017(S)             268  GAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTC  325
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1431 GAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTC  1488
CDS:beta-tubulin      247    N  S  D  L  R  K  L  A  V  N  M  V  P  F  P  R  L  H  F
```

ภาพ 22 เปรียบเทียบความเหมือน 100% ของ beta-tubulin (TBU2) gene บางส่วนของเชื้อรา SC 017 (S) กับ beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Accession No. U14138)

SC-017 (S) = Sensitive isolate

E = Glutamic acid (GAG)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 23 เปรียบเทียบความเหมือน 99% ของ beta-tubulin (TBU2) gene บางส่วนของเชื้อรา SC-020 (HR) กับ beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Accession No. U14138)

SC-020 (HR) = Highly resistance isolate

A = Alanine (GCG)

E = Glutamic acid (GAG)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
CDS: Putative 1       1       D  R  M  M  A  T  F  S  V  V  P  S  P  K  V  S  D  T  V
SC-021(HR)            1    CCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTG  60
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1172 CCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTG  1231
CDS:beta-tubulin      160     D  R  M  M  A  T  F  S  V  V  P  S  P  K  V  S  D  T  V

CDS: Putative 1       20    V  E  P  Y  N  A  T  L  S  V  H  Q  L  V  E  N  S  D  A  T
SC-021(HR)            61    TCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGCTGGTCGAGAATTCCGACGCGACCT  120
                            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||| |||||
Sbjct                 1232  TCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGCTGGTCGAGAACTCCGACGAGACCT  1291
CDS:beta-tubulin      180   V  E  P  Y  N  A  T  L  S  V  H  Q  L  V  E  N  S  D  E  T
                                                                                198

CDS: Putative 1       40    F  C  I  D  N  E  A  L  Y  D  I  C  M  R  T  L  K  L  S  N
SC-021(HR)            121   TCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACC  180
                            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1292  TCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACC  1351
CDS:beta-tubulin      200   F  C  I  D  N  E  A  L  Y  D  I  C  M  R  T  L  K  L  S  N

CDS: Putative 1       60    P  S  Y  G  D  L  N  H  L  V  S  A  V  M  S  G  V  T  T  C
SC-021(HR)            181   CCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCC  240
                            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1352  CCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCC  1411
CDS:beta-tubulin      220   P  S  Y  G  D  L  N  H  L  V  S  A  V  M  S  G  V  T  T  C

CDS: Putative 1       80    L  R  F  P  G  Q  L  N  S  D  L  R  K  L  A  V  N  M  V  P
SC-021(HR)            241   TGCGTTTCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTT  300
                            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1412  TGCGTTTCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTT  1471
CDS:beta-tubulin      240   L  R  F  P  G  Q  L  N  S  D  L  R  K  L  A  V  N  M  V  P

CDS: Putative 1       100   F  P  R  L  H
SC-021(HR)            301   TCCCCCGTCTCCAC  314
                            |||||||||||||
Sbjct                 1472  TCCCCCGTCTCCAC  1485
CDS:beta-tubulin      260   F  P  R  L  H
```

ภาพ 24 เปรียบเทียบความเหมือน 99% ของ beta-tubulin (TBU2) gene บางส่วนของเชื้อรา SC-021 (HR) กับ beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Accession No. U14138)

SC-021 (HR) = Highly resistance isolate

A = Alanine (GCG)

E = Glutamic acid (GAG)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
CDS: Putative 1       1       M  M  A  T  F  S  V  V  P  S  P  K  V  S  D  T  V  V  E
SC-038(HR)            5    GCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTCGAGC  64
                           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1178 GCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTCGAGC  1237
CDS:beta-tubulin      162     M  M  A  T  F  S  V  V  P  S  P  K  V  S  D  T  V  V  E

CDS: Putative 1       20    P  Y  N  A  T  L  S  V  H  Q  L  V  E  N  S  D  A  T  F  C
SC-038(HR)            65    CCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGCTGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCA  124
                            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct                 1238  CCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGCTGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCA  1297
CDS:beta-tubulin      182   P  Y  N  A  T  L  S  V  H  Q  L  V  E  N  S  D  E  T  F  C
                                                                          198

CDS: Putative 1       40    I  D  N  E  A  L  Y  D  I  C  M  R  T  L  K  L  S  N  P  S
SC-038(HR)            125   TTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTT  184
                            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1298  TTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTT  1357
CDS:beta-tubulin      202   I  D  N  E  A  L  Y  D  I  C  M  R  T  L  K  L  S  N  P  S

CDS: Putative 1       60    Y  G  D  L  N  H  L  V  S  A  V  M  S  G  V  T  T  C  L  R
SC-038(HR)            185   ACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTT  244
                            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1358  ACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTT  1417
CDS:beta-tubulin      222   Y  G  D  L  N  H  L  V  S  A  V  M  S  G  V  T  T  C  L  R

CDS: Putative 1       80    F  P  G  Q  L  N  S  D  L  R  K  L  A  V  N  M  V  P  F  P
SC-038(HR)            245   TCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCC  304
                            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct                 1418  TCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCC  1477
CDS:beta-tubulin      242   F  P  G  Q  L  N  S  D  L  R  K  L  A  V  N  M  V  P  F  P

CDS: Putative 1       100   R  L  H
SC-038(HR)            305   GTCTCCAC  312
                            ||||||||
Sbjct                 1478  GTCTCCAC  1485
CDS:beta-tubulin      262   R  L  H
```

ภาพ 25 เปรียบเทียบความเหมือน 99% ของ beta-tubulin (TBU2) gene บางส่วนของเชื้อรา SC-038 (HR) กับ beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Accession No. U14138)

SC-038 (HR) = Highly resistance isolate

A = Alanine (GCG)

E = Glutamic acid (GAG)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
SC-017(S)     CTGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTA 143
SC-020(HR)    CTGGTCGAGAATTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTA 143
SC-021(HR)    CTGGTCGAGAATTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTA 143
SC-038(HR)    CTGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTA 143
U14138        CTGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTA 1316
AB273716      CTGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTA 1162
M34492        CTGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTA 1531
                         *         *
                      1,278     1,286

SC-017(S)     CGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACC 193
SC-020(HR)    CGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACC 193
SC-021(HR)    CGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACC 193
SC-038(HR)    CGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACC 193
U14138        CGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACC 1366
AB273716      CGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACC 1212
M34492        CGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACC 1581

SC-017(S)     TGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGT 243
SC-020(HR)    TGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGT 243
SC-021(HR)    TGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGT 243
SC-038(HR)    TGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGT 243
U14138        TGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGT 1416
AB273716      TGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGT 1262
M34492        TGAACCACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGT 1611

SC-017(S)     TTCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGT 293
SC-020(HR)    TTCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGT 298
SC-021(HR)    TTCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGT 298
SC-038(HR)    TTCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGT 298
U14138        TTCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGT 1466
AB273716      TTCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGT 1312
M34492        TTCCCGGGTCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGT 1661

SC-017(S)     TCCTTTCCCCCGTCTCCAC 312
SC-020(HR)    TCCTTTCCCCCGTCTCCAC 312
SC-021(HR)    TCCTTTCCCCCGTCTCCAC 312
SC-038(HR)    TCCTTTCCCCCGTCTCCAC 312
U14138        TCCTTTCCCCCGTCTCCAC 1485
AB273716      TCCTTTCCCCCGTCTCCAC 1331
M34492        TCCTTTCCCCCGTCTCCAC 1680
```

ภาพ 26 การเปรียบเทียบความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ beta-tubulin (TBU2) gene จากเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบกับ beta-tubulin (TBU2) gene ที่มีรายงานไว้ใน GenBank

SC-017 (Sensitive isolate) SC-020 (Highly resistance isolate)

SC-021 (Highly resistance isolate) SC-038 (Highly resistance isolate)

Accession No. U14138 = beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*

Accession No. AB273716 = beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *Glomerella acutata*

Accession No. M34492 = beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C .graminicola*

* คือ ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

```
SC-017(S)       LVENSDETFCIDNEALYDICMRTLKLSNPSYGDLNHLVSAVMSGVTTCL 49
SC-020(HR)      LVENSDATFCIDNEALYDICMRTLKLSNPSYGDLNHLVSAVMSGVTTCL 49
SC-021(HR)      LVENSDATFCIDNEALYDICMRTLKLSNPSYGDLNHLVSAVMSGVTTCL 49
SC-038(HR)      LVENSDATFCIDNEALYDICMRTLKLSNPSYGDLNHLVSAVMSGVTTCL 49
AAA62875.2      LVENSDETFCIDNEALYDICMRTLKLSNPSYGDLNHLVSAVMSGVTTCL 240
BAF38476.1      LVENSDETFCIDNEALYDICMRTLKLSNPSYGDLNHLVSAVMSGVTTCL 240
AAA33046.1      LVENSDETFCIDNEALYDICMRTLKLSNPSYGDLNHLVSAVMSGVTTCL 240
                        *
                       198

SC-017          RFPGQLNSDLRKLAVNMVPFPRLH 73
SC-020          RFPGQLNSDLRKLAVNMVPFPRLH 73
SC-021          RFPGQLNSDLRKLAVNMVPFPRLH 73
SC-038          RFPGQLNSDLRKLAVNMVPFPRLH 73
AAA62875.2      RFPGQLNSDLRKLAVNMVPFPRLH 264
BAF38476.1      RFPGQLNSDLRKLAVNMVPFPRLH 264
AAA33046.1      RFPGQLNSDLRKLAVNMVPFPRLH 264
```

ภาพ 27 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบทั้ง 4 ไอโซเลท ที่แยกจาก ต.ร้องวัวแดง อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ กับที่มีรายงานไว้ใน GenBank

SC-017 (Sensitive isolate) SC-020 (Highly resistance isolate)

SC-021 (Highly resistance isolate) SC-038 (Highly resistance isolate)

Accession No. AAA62875.2 = beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*

Accession No. BAF38476.1 = beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *Glomerella acutata*

Accession No. AAA33046.1 = beta-tubulin (TBU2) gene ของเชื้อรา *C. graminicola*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

* คือ ตำแหน่ง 198 ที่มีลำดับกรดอะมิโนต่างไป