บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> : การทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

1.1 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

จากการสำรวจ และศึกษาลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสพริก จากแปลงเกษตรกรที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในเขต อ.สันทราย อ.แม่ริม และตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ พบผลพริกที่แก่จัด หรือผลเริ่มสุก มีลักษณะอาการรอยช้ำเป็นแอ่งลึกลงไปเล็กน้อย มีแผลสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ ขนาดของแผลแตกต่างกัน บางผลอาจมีแผลใหญ่ยาวถึงสองในสามส่วนของผลพริก ซึ่งทำให้ผลพริกเน่าทั้งผล และมักจะพบโครงสร้างของเชื้อราที่เรียกว่า acervulus 2 ลักษณะคือ มีลักษณะเป็นจุดเล็กๆ สีดำเรียงซ้อนกันเป็นวง และกลุ่ม acervulus สีส้มบนแผล ลักษณะอาการที่พบรุนแรง คือ ผลพริกจะโค้งงอ บิดเบี้ยวคล้ายกุ้งแห้ง ผลจะร่วงก่อนกำหนด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สุชีลา (2549) และ Than *et al*. (2008)

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากผลพริกในเขตจังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อราสาเหตุได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท โดยแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จาก อ.สันทรายได้จำนวน 51 ไอโซเลท อ.แม่ริม 9 ไอโซเลท ตลาด 35 ไอโซเลท อ.เมือง จ.พิจตร 3 ไอโซเลท และ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 2 ไอโซเลท (ตาราง 10) เมื่อนำมาจัดจำแนกชนิดของเชื้อราตามลักษณะสปอร์โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Sutton (1992) สามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุได้ 2 ชนิด คือ *Colletotrichum gloeosporioides* (73 ไอโซเลท) และ *C. capsici* (27 ไอโซเลท) (ตาราง 10) ซึ่งพบว่าแผลที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีลักษณะแผลกลมรีขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 1-2 เซนติเมตร หรืออาจจะขยายใหญ่มากว่านี้ เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวลงเป็นแอ่ง เมื่อเริ่มเกิดใหม่ๆ แผลมีสีเหลืองส้ม และมี acervulus สีเหลืองส้มเรียงซ้อนกันเป็นวงๆอยู่ในบริเวณแผล และแผลค่อนข้างแฉะเมื่อเป็นนานๆแผลจะกลายเป็นสีน้ำตาลดำ (ภาพ 12A) สอดคล้องกับงานวิจัยของ สุชีลา (2549) และ อรพรรณและคณะ (2550) ที่พบเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในประเทศไทย 2 ชนิด คือ *Colletotrichum capsici* (Syd.) Bult. & Bisby และ *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-10 วัน เชื้อจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 9 เซนติเมตร โคโลนีมีสีขาวฟูตรงกลางโคโลนีมีสีเทา หลังจากนั้นเชื้อเริ่มสร้างกลุ่มสปอร์สีส้มบนโคโลนี (ภาพ 12B) เมื่อตรวจดูลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X พบสปอร์เซลล์เดียว สีใส รูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) ขนาด 9-24 X 3-4.5 ไมครอน และไม่พบ setae (ภาพ 12C) ส่วนแผลที่เกิดจากเชื้อรา *C. capsici* มีสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอน มีจุดสีน้ำตาลเข้มเรียงซ้อนกันเป็นวงอยู่ในบริเวณแผล และแผลค่อนข้างแห้ง (ภาพ 13A) โคโลนีสีเทาเข้มเจริญเรียบติดผิวอาหาร พบกลุ่มก้อนสีดำบนโคโลนี (ภาพ 13B) เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X พบสปอร์เซลล์เดียวใส รูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว (falcate) ขนาด 9-14 X 6.5-11.5 ไมครอน และพบ setae สีดำ (ภาพ 13C) สอดคล้องกับรายงานของสุชีลา (2549), อรพรรณ และคณะ (2550), Than *et al*. (2008) และ Pring *et al*. (1995)

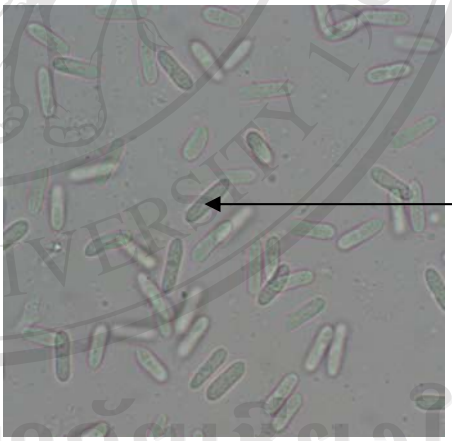
ตาราง 10 จำนวนเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ

ลำดับที่	ที่มา	จำนวนเชื้อราสาเหตุ		รวม (ไอโซเลท)
		C. gloeosporioides	*C. capsici*	
1	อ.สันทราย จ.เชียงใหม่	37	14	51
2	อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่	8	1	9
3	ตลาด จ.เชียงใหม่	26	9	35
4	อ.เมือง จ.พิจิตร	1	2	3
5	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	1	1	2
	รวม	**73**	**27**	**100**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A

B



C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 12 อาการโรคแอนแทรคโนสพริก และลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

A. อาการโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

B. โคโลนีบนอาหาร PDA ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 10 วัน

C. สปอร์ของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

A

B C

ภาพ 13 อาการโรคแอนแทรคโนสพริก และลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

A. อาการโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก

B. โคโลนีบนอาหาร PDA ภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 10 วัน

C. สปอร์ของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ต่อสารกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิม

จากการทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกจำนวน 100 ไอโซเลท บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 1.0, 10, 100, 500 และ 1000 µg/ml พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับสูง (highly resistant: HR; ≥ 500 µg/ml) จำนวน 43 ไอโซเลท (ภาพ 14) โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 27 ไอโซเลท และ *C. capsici* จำนวน 16 ไอโซเลท (ตาราง 11) ส่วน เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับปานกลาง (moderately resistant: MR; ≤ 100 µg/ml) มีจำนวน 5 ไอโซเลท (ภาพ 14) โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 4 ไอโซเลท และ *C. capsici* จำนวน 1 ไอโซเลท (ตาราง 11) และเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราได้เล็กน้อย (weakly resistant: WR; ≤ 10 µg/ml) มีจำนวน 3 ไอโซเลท (ภาพ 14) โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 1 ไอโซเลท และ *C. capsici* จำนวน 2 ไอโซเลท (ตาราง 9) นอกจากนี้ พบเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อรา (sensitive: S;≤ 1 µg/ml) จำนวน 49 ไอโซเลท (ภาพ 14) โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 41 ไอโซเลท และ *C. capsici* จำนวน 8 ไอโซเลท (ตาราง 11) สอดคล้องกับรายงานของ Sariah (1989) ได้ทดลองแยกเชื้อรา *Colletotrichum capsici* จำนวน 340 ไอโซเลท จากตัวอย่างพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราเบโนมิลซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซล ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 µg/ml พบว่า เชื้อรา *C. capsici* สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราเบโนมิลความเข้มข้น 1000 µg/ml และเมื่อนำเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราเบโนมิลไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้น 1.2, 5, 10, 25, 50 และ 100 µg/ml พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้เช่นเดียวกัน และจากการศึกษาของ Peres *et al*. (2004) พบเชื้อรา *C. gloesporiodes* สาเหตุโรค postbloom fruit drop ในส้มเกิดการต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราเบโนมิล เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราเบโนมิลที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1.0, 10, 100 และ 1,000 µg/ml โดยเชื้อราสามารถเจริญได้ในอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราเบโนมิล ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/ml

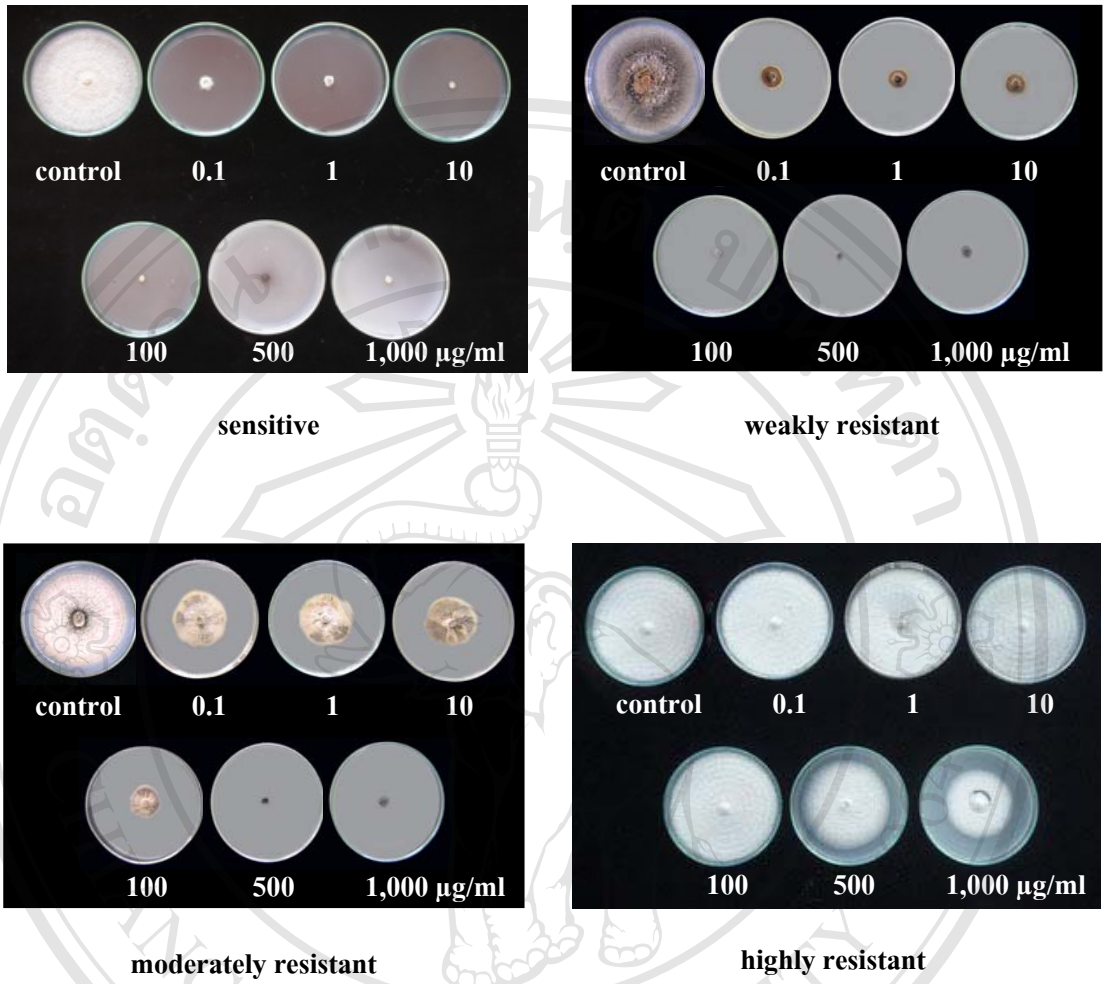
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 11 จำนวนเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับต่างๆ

ลำดับที่	ระดับความต้านทาน*	จำนวนเชื้อราสาเหตุ		รวม (ไอโซเลท)
		C. gloeosporioides	*C. capsici*	
1	sensitive (S)	41	8	49
2	weakly resistant (WR)	1	2	3
3	moderately resistant (MR)	4	1	5
4	highly resistant (HR)	27	16	43
	รวม	**73**	**27**	**100**

*S; $\leq$ 1 µg/ml, WR; $\leq$ 10 µg/ml, MR; $\leq$ 100 µg/ml, HR; $\geq$ 500 µg/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 14 การทดสอบระดับความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar) ภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

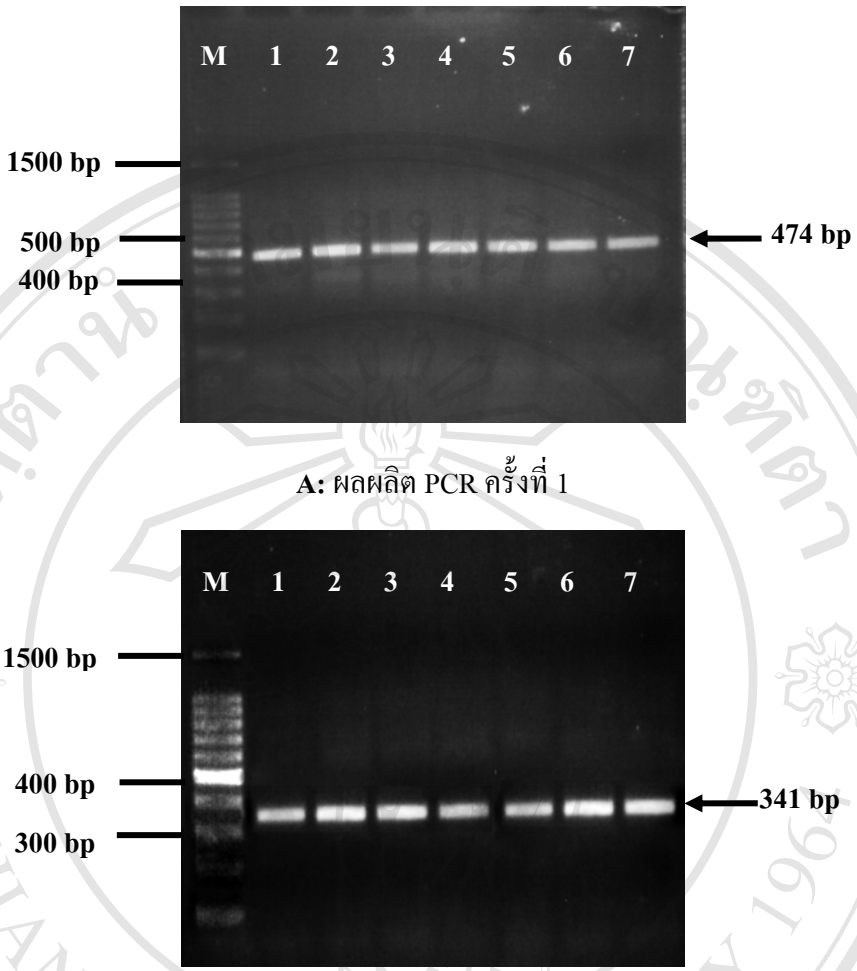
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การทดลองที่ 2</u> : การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

2.1 เพิ่มปริมาณยีน beta-tubulin ด้วยเทคนิค Nested PCR

จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกจำนวน 21 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับสูง (HR) จำนวน 15 ไอโซเลท เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับปานกลาง (MR) จำนวน 1 ไอโซเลท เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราได้เล็กน้อย (WR) จำนวน 2 ไอโซเลท และเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อรา (S) จำนวน 3 ไอโซเลท โดยใช้ Nuclospin Plant Kit® ร่วมกับไนโตรเจนเหลว พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอเชื้อราสาเหตุได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งยีน beta-tubulin จากตัวอย่างเชื้อราทั้ง 16 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค nested PCR (nested polymerase chain reaction) ซึ่งในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 1 (1st PCR) ใช้ไพรเมอร์ forward TB2L (5'-GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC-3') และ reverse TB2R (5'-TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG-3') สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลท และเมื่อตรวจสอบโดยใช้ gel electrophoresis บน 1% agarose gel พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 474 คู่เบส (ภาพ 15A) จากนั้นเพิ่มผลผลิตที่ได้จาก 1st PCR โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน beta-tubulin (2nd PCR) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ forward CTB2F1 (5'-TCC AAG ATC CGT GAGG -3') และ reverse CTB2R1 (5'-AAG AAG TGG ACG GG -3') ที่ออกแบบให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงตำแหน่ง beta-tubulin ซึ่งอยู่ถัดเข้ามาจากไพรเมอร์คู่แรก พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 341 คู่เบส (ภาพ 15B)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



A: ผลผลิต PCR ครั้งที่ 1

B: ผลผลิต PCR ครั้งที่ 2

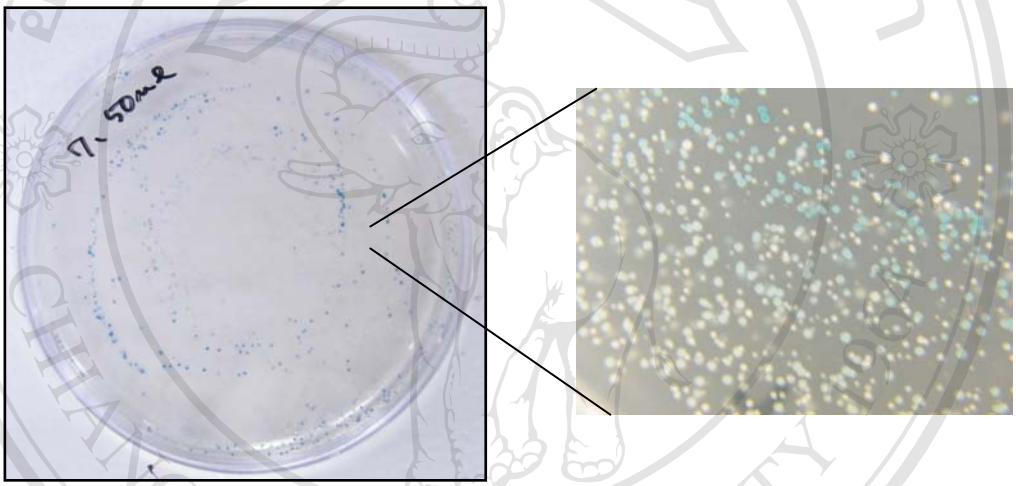
ภาพ 15 เจลอิเล็กโทรโฟริซีสบน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน beta-tubulin (*TUB2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกด้วยเทคนิค Nested PCR

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA digested by *Hind III*
1 = ไอโซเลท Cc1 (weakly resistant; WR)
2 = ไอโซเลท Cc4 (highly resistant; HR)
3 = ไอโซเลท Cg5 (highly resistant; HR)
4 = ไอโซเลท Cc7 (highly resistant; HR)
5 = ไอโซเลท Cc9 (weakly resistant; WR)
6 = ไอโซเลท Cc11 (moderately resistant; MR)
7 = ไอโซเลท Cg14 (highly resistant; HR)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

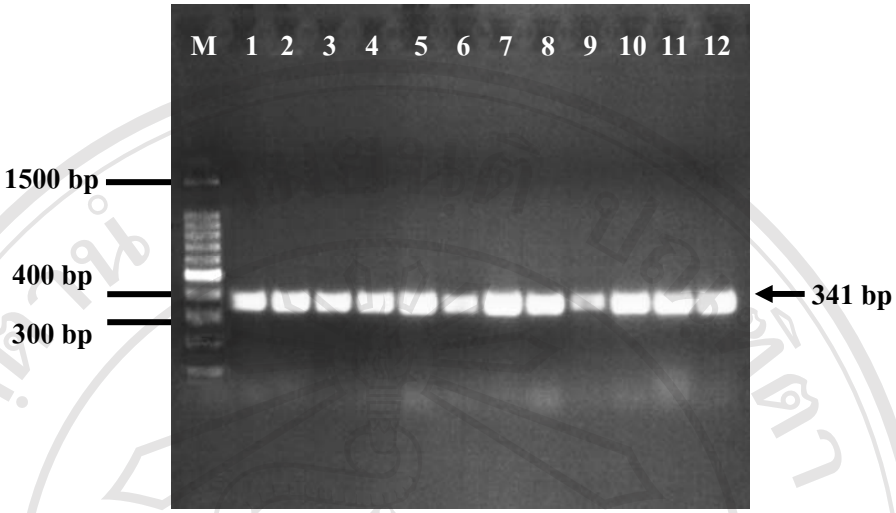
2.2 การทำ Transformation และ Colony direct PCR

จากการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายพลาสมิด T-vector pGEM®Easy ซึ่งมีส่วนของ insert gene ของ beta-tubulin ขนาด 341 bp โดยคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร LB ผสมสาร ampicilin (ภาพ 16) มาทำ colony direct PCR เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นว่าโคโลนีที่เลือกมานั้นมีส่วนของ insert gene หรือไม่ ซึ่งพบว่าจากการทำ colony direct PCR แล้วนำมาตรวจสอบบน 1% agarose gel พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 341 bp (ภาพ 17) แสดงให้เห็นว่าโคโลนีที่คัดเลือกมานั้นมีส่วนของ insert gene ที่ต้องการ จากนั้นเลือกโคโลนีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมาสกัดเอาส่วนของ plasmid ที่มี insert gene ที่ต้องการนำไปทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7 และ Sp6



ภาพ 16 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Escherichia coli* ที่เจริญบนอาหาร Luria-Bertani (LB) ผสมสาร 130mM ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37^{O}C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 17 เจลอิเล็กโทรโฟริซีสบนบน 1% agarose gel ของเชื้อ *Escherichia coli* ที่มีส่วน insert gene ของยีน beta-tubulin (*TUB2*) ยีน ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ DNA digested by *Hind III*

1, 2, 3 และ 4 = ไอโซเลท Cc1 (weakly resistant)

5, 6, 7 และ 8 = ไอโซเลท Cc4 (highly resistant)

9, 10, 11 และ 12 = ไอโซเลท Cg5 (highly resistant)

*แต่ละตัวอย่างคัดเลือกมาจากโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Escherichia coli*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรม

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกจำนวน 21 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (S) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ Cc8, Cg24 และ Cg30 เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราได้เล็กน้อย (WR) จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Cc1 และ Cc9 เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับปานกลาง (MR) จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ Cg46 เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับสูง (HR) จำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ Cg5, Cg22, Cg14, Cg23, Cg27, Cg28, Cg40, Cg44, Cc43, Cc53, Cg60, Cg73, Cg75, Cc78 และ Cg86 (ตาราง 12) มาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนกับข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank (NCBI: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) พบลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันกับบางส่วนของยีน beta-tubulin gene (*TUB2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession No. U14138) ประมาณ 93-99 % (ภาคผนวก ค) แสดงให้เห็นว่านิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นส่วนของ insert gene beta-tubulin ที่ต้องการ

จากนั้นเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของยีน *TUB2* ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession No. U14138) ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W (ภาพ 18) จากฐานข้อมูล GenBank (NCBI) กับบางส่วนของยีน *TUB2* ของเชื้อราที่ทำการศึกษา พบว่าเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อรา (S) จำนวน 3 ไอโซเลท และเชื้อราที่ต้านทานสารกำจัดเชื้อราได้เล็กน้อย (WR) จำนวน 1 ไอโซเลท ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน สอดคล้องกับรายงานของ Wong *et al*. (2008) ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนในเชื้อรา *Colletotrichum cereal* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในหญ้า ที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล และ Yarden and Katan (1993) ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนในเชื้อรา *Botrytis cineria* สาเหตุโรคราสีเทาที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม แต่พบเชื้อราไอโซเลท Cc9 (WR) มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 225 โดยเปลี่ยนจาก leucine (C**T**G) เป็น proline (C**C**G) และ codon 243 โดยเปลี่ยนจาก proline (C**C**G) เป็น leucine (C**T**G) นอกจากนี้เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับปานกลาง (MR) ไอโซเลท Cg46 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 162 โดยเปลี่ยนจาก methionine (GC**A**) เป็น valine (GC**G**) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 และ 200 (ตาราง12, ภาพ 18) ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Koenraadt *et al*. (1992) ที่พบว่าเชื้อรา *Penicillium aurantiogrisrum*, *P. itailcum*, *Venturia inaequalis*, *V. pirina* และ *Tapesia yallundae* ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซลระดับปานกลาง (MR) จะมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 200 โดยเปลี่ยนจาก phenylalanine (T**T**C) เป็น tyrosine (T**A**C) และไม่พบการเปลี่ยนแปลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 และกรดอะมิโนตำแหน่งอื่นๆ และจากรายงานของ Yarden and Katan (1993) ที่พบเชื้อรา *Botrytis cineria* สาเหตุโรคราสีเทาที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซลระดับปานกลาง (MR) มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 200 โดยเปลี่ยนจาก phenylalanine (T**T**C) เป็น tyrosine (T**A**C) และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198

ส่วนเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับสูง (HR) ได้แก่ Cg5, Cg14, Cg23, Cg27, Cc43, Cc53, Cg60, Cg73 และ Cg86 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 เพียงตำแหน่งเดียว โดยเปลี่ยนจาก glutamic acid (G**A**G) เป็น alanine (G**C**G) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wen-Hsin *et al.* (2006) ที่ศึกษาความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล พบว่าเชื้อราที่สามารถต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรากลุ่มดังกล่าวได้ในระดับสูงนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่ง codon 198 โดยเปลี่ยนจาก glutamic acid (G**A**G) ไปเป็น alanine (G**C**G) และจากการศึกษาของ Peres *et al.* (2004) ที่ทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสส้มต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่ต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก G**A**G เป็น G**C**G มีผลทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก glutamic acid เป็น alanine ในตำแหน่ง codon 198 จึงส่งผลให้เชื้อราต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อราที่ต้านทานสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซล ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 โดยเปลี่ยนจาก glutmaic acid (G**A**G) เป็น alanine (G**C**G) เพียงตำแหน่งเดียว ได้แก่ เชื้อรา *C. cereale* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในหญ้า (Wong *et al*., 2008) *Venturia inaequalis* เชื้อราสาเหตุโรคสแคปในแอปเปิ้ล *V. pirina*, *P. aurantiogriseum* และ *P. expansum* (Koenraadt *et al*., 1992) *P. expansum* (Sholberg *et al*., 2004) *Botryotinia fuckeliana* (Park *et al*., 1997) *Helminthosporium solani* (McKay and Cooke.,1997; Cunha and Rizzo., 2003) *Monilinia fructicola* (Ma *et al*., 2003) *Tapesia yallundae* และ *T. acuformis* (Albertini *et al*., 1999) นอกจากนี้ยังพบเชื้อราชนิดต่างๆ ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 ซึ่งไม่ได้เปลี่ยนจาก glutamic acid (G**A**G) ไปเป็น alanine (G**C**G) แต่เปลี่ยนจาก glutamic acid (G**A**G) ไปเป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ดังรายงานของ Koenraadt *et al.* (1992) ที่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 จาก glutamic acid (**G**AG) เป็น lysine (**A**AG) ในเชื้อรา *M. fructicola*, *P. aurantiogriseum, P. digitatum, Sclerotinia homoeococarpa* และ *V. inqequalis* และตำแหน่ง codon 198 โดยเปลี่ยนจาก glutamic acid (G**A**G) เป็น glycine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(G**G**G) ในเชื้อรา *V. inqequalis* ต่อมาในปี 1997 McKay และ Cooke พบเชื้อรา *H. solani* มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 จาก glutamic acid (G**A**G) เป็น glutamine (**C**AG) และปี 1999 Albertini *et al.* พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 เปลี่ยนจาก glutamic acid (G**A**G) เป็น glutamine (**C**AG), เปลี่ยนจาก glutamic acid (G**A**G) เป็น glycine (G**G**G) และ เปลี่ยนจาก glutamic acid (**G**AG) เป็น lysine (**A**AG) ในเชื้อรา *T. yallundae* และ *T. acuformis* นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *P. expansum* มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 จาก glutamic acid (G**A**G) เป็น valine (G**T**G)

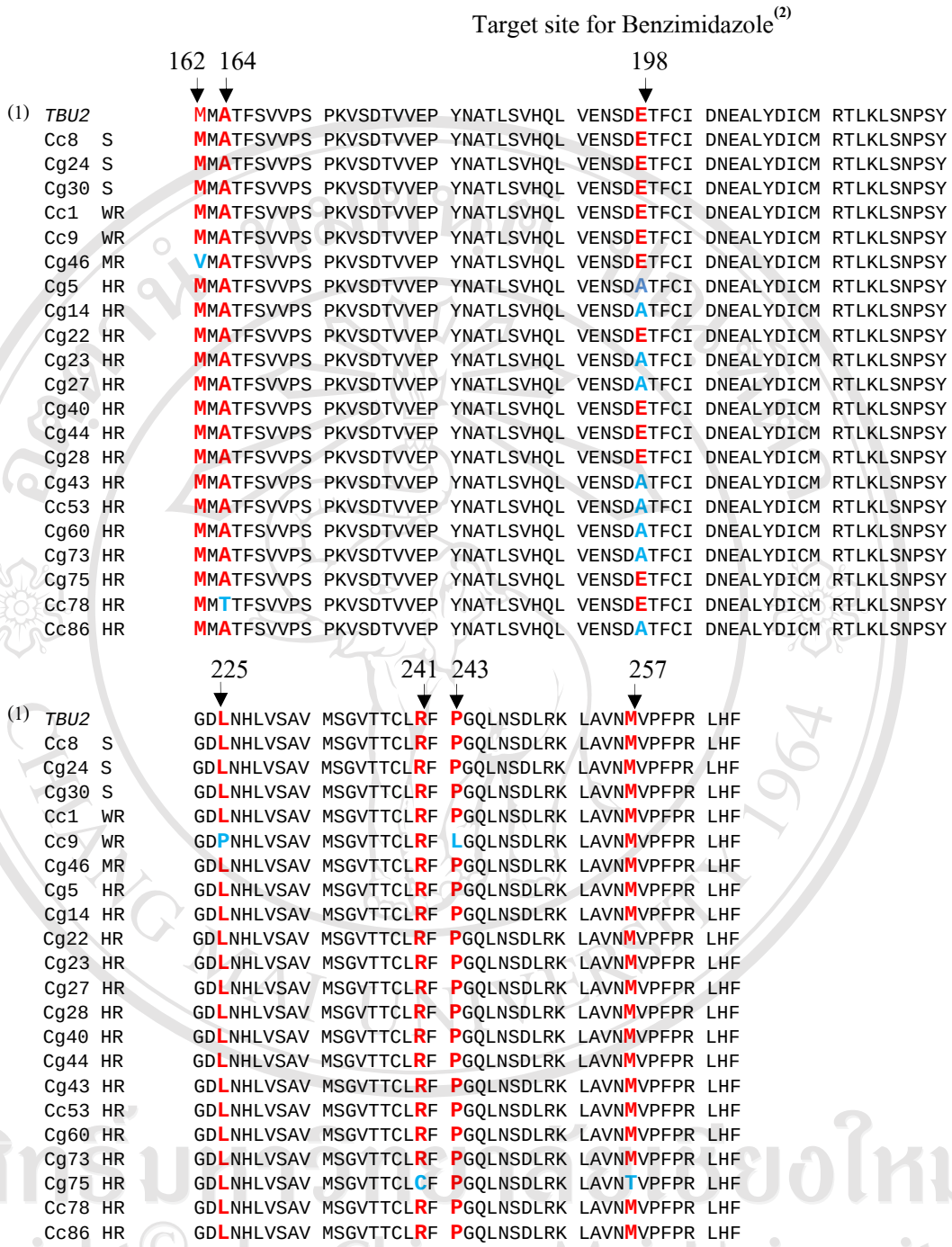
นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อราสายพันธุ์ HR บางไอโซเลทที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 198 และ 200 ได้แก่ไอโซเลท Cg75 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ codon 241 โดยเปลี่ยนจาก arginine (G**C**G) เป็น cysteine (G**T**G) และ codon 257 โดยเปลี่ยนจาก methionine (CA**T**) เป็น threonine (CA**C**) ไอโซเลท Cc78 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 164 โดยเปลี่ยนจาก alanine (**G**CC) เป็น threonine (**A**CC) (ตาราง12, ภาพ 18) ทั้งนี้ได้มีรายงานการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล ในตำแหน่งอื่นนอกจากตำแหน่ง codon 198 และ 200 ดังนี้ ตำแหน่ง codon 6 เปลี่ยนจาก histidine (**C**AC) เป็น tyrosine (**T**AC) (Ma *et al*., 2003) ตำแหน่ง codon 50 เปลี่ยนจาก tyrosine (T**A**C) เป็น cysteine (T**G**C) (McKay *et al*.,1998) ตำแหน่ง codon 167 เปลี่ยนจาก phenylalanine (T**T**C) เป็น tyrosine (T**A**C) (Gafur *et al*., 1998; Baraldi *et al*., 2003) และ ตำแหน่ง codon 240 เปลี่ยนจาก leucine (TT**G**) เป็น phenylalanine (TT**C**) (Albertini *et al*., 1999; Ma *et al*., 2005)

ส่วนเชื้อรา HR ไอโซเลท Cg22, Cg28, Cg40 และ Cg44 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในช่วงบางส่วนของยีน *TUB2* (ตาราง12, ภาพ 18) และเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 µg/ml พบเชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ทั้ง 2 ระดับ สอดคล้องกับรายงานของ Peres *et al*. (2004) ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 และ 200 หรือในตำแหน่งอื่นของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสส้มบางไอโซเลทที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราเบโนมิล ซึ่งการที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่ง codon 200 ของเชื้อราสายพันธุ์ HR นี้ อาจเป็นไปได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในช่วงของ beta-tubulin ในช่วงอื่น ที่ไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ ดังนั้นควรมีการศึกษาต่อไปว่าเชื้อรา HR มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในช่วงในของยีน beta-tubulin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าปัจจุบันมีเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมีแนวโน้มที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเพิ่มมากขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ถึงระดับโมเลกุลของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับต่างๆ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียงตำแหน่งเดียว ก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันไป และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวอาจส่งผลให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ และต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 ถ้าเกิดมีการเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่งนี้จะส่งผลให้เชื้อราต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง และถ้ามีการเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่ง codon 200 จะส่งผลให้เชื้อราเกิดการต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราในระดับปานกลาง ซึ่งการที่เชื้อราเกิดการต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเกิดขึ้นเนื่องจาก เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ทำให้สารป้องกันกำจัดเชื้อราไม่สามารถเข้าไปยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ใน microtubule ของเชื้อราได้ (Osmani and Oakley, 1991) ดังนั้นควรมีการจัดการเกี่ยวกับแปลงปลูกของเกษตรกรให้เหมาะสม โดยลดการใช้สารเคมีที่เสี่ยงต่อการทำให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ ไม่ใช้สารเคมีชนิดดูดซึม (systemic fungicide) ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานควร เพราะสารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึมมีผลทำให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ หากจะต้องใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราก็ควรใช้สารต่างกลุ่มสลับกันไป เช่น สลับกับการใช้สารเคมีชนิดไม่ดูดซึม (contact fungicide) หรือการใช้สารชีวภัฑณ์ และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 18 เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนในบางส่วนของยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกกับยีน beta-tubulin (*TUB2*)[(1)] ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U14138).

[(1)] Buhr and Dickman (1994) [(2)] Peres *et al.* (2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 12 การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

ลำดับที่	ไอโซเลท	สายพันธุ์	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (codon)						
			162	164	198	225	241	243	257
1	*TUB2*	S[3]	M[1] GCA	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
2	Cc8[2]		M GCA	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
3	Cg24		M GCA	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
4	Cg30		M GCA	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
5	Cc1	WR	M GCA	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
6	Cc9		M GCA	A GCC	E GAG	**P** CCG	R GCG	**L** CTG	M CAT
7	Cg46	MR	**V** GCG	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
8	Cg5	HR	M GCA	A GCC	**A** GCG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
9	Cg14		M GCA	A GCC	**A** GCG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
10	Cg22		M GCA	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
11	Cg23		M GCA	A GCC	**A** GCG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
12	Cg27		M GCA	A GCC	**A** GCG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT

[1]A = alanine, C = cysteine, E = glutamate, L= leucine, M = methionine, P = proline, R = arginin, T = threonine, V = valine

[2] Cc = *Colletotrichum capsici*, Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*

[3]S = sensitive(≤ 1 µg/ml), WR= weakly resistant (≤ 10 µg/ml), MR = moderately resistant (≤100 µg/ml), HR= highly resistant (≥500 µg/ml)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 12 (ต่อ) การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

ลำดับที่	ไอโซเลท	สายพันธุ์	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (codon)						
			162	164	**198**	225	241	243	257
13	Cg28[2]	HR[3]	M[1] GCA	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
14	Cg40		M GCA	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
15	Cg44		M GCA	A GCC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
16	Cg43		M GCA	A GCC	**A** GCG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
17	Cc53		M GCA	A GCC	**A** GCG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
18	Cg60		M GCA	A GCC	**A** GCG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
19	Cg73		M GCA	A GCC	**A** GCG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
20	Cg75		M GCA	A GCC	E GAG	L CTG	**C** GTG	P CCG	**T** CAC
21	Cc78		M GCA	**T** ACC	E GAG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT
22	Cc86		M GCA	A GCC	**A** GCG	L CTG	R GCG	P CCG	M CAT

[1] A = alanine, C = cysteine, E = glutamate, L= leucine, M = methionine, P = proline, R = arginin, T = threonine, V = valine

[2] Cc = *Colletotrichum capsici*, Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*

[3] S = sensitive($\leq$ 1 µg/ml), WR= weakly resistant ($\leq$ 10 µg/ml), MR = moderately resistant ($\leq$ 100 µg/ml), HR= highly resistant ($\geq$ 500 µg/ml)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การทดลองที่ 3</u>: การทดสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *Colletotrichum* sp และการจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีส

3.1. การเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดิน

จากการนำตัวอย่างดินจำนวน 7 ตัวอย่าง จาก อุทยานแห่งชาติดอยปุย กาแล และแปลงปลูกพริกใน อ. สันทราย มาอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสบนอาหารแข็ง 4 ชนิด ได้แก่ CSA (caseine starch agar), CA (chitin agar), OMA (oatmeal agar) และ SEA (soil extract agar) พบดินที่อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสได้ทั้งหมด 122 และ 69 ไอโซเลท ตามลำดับ (ตาราง13) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้จำนวน 122 ไอโซเลท ทั้งนี้อาจเกิดจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิตั้งแต่ 60^{O}C ขึ้นไปอยู่จำนวนมาก ส่วนดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อาจมีจำนวนของเชื้อแอคติโนมัยซีสอยู่น้อยเนื่องจากถูกความร้อนทำลายและไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 13 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร 4 ชนิด

แหล่งที่มา	60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง					120°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง				
	CSA*	CA	OMA	SEA	รวม (ไอโซเลท)	CSA	CA	OMA	SEA	รวม (ไอโซเลท)
ดอยปุย 1	2	3	-	10	15	-	-	-	10	10
ดอยปุย 2	-	-	-	1	1	-	-	-	-	0
ดอยปุย 3	-	-	26	11	37	-	-	6	4	10
ดอยปุย 4	3	-	4	1	8	1	-	-	-	1
ดอยปุย 5	6	-	7	1	14	-	-	7	10	17
กาแล	6	-	6	3	15	-	-	3	18	21
สันทราย	21	-	2	9	32	-	-	-	10	10
รวม (ไอโซเลท)	38	3	45	36	**122**	1	0	16	52	**69**

*CSA = caseine starch agar, CA = chitin agar, OMA = oatmeal agar, SEA = soil extract agar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

75

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

จากการนำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จำนวน 122 และ 69 ไอโซเลทตามลำดับ มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโสในพริก พบเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้มากกว่า 75% จำนวน 32 ไอโซเลท (ตาราง 14 และ 15, ภาพ 19) ประสิทธิภาพในการยับยั้งที่อยู่ในช่วง 61-75% จำนวน 2 ไอโซเลท และที่น้อยกว่า 50% จำนวน 86 ไอโซเลท (ตาราง 14) ส่วนที่อุณหภูมิ 120^{O}C พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่มากกว่า 75% จำนวน 15 ไอโซเลท (ตาราง 14 และ 16, ภาพ 20) และประสิทธิภาพในการยับยั้งที่อยู่ในช่วง 61-75% จำนวน 3 ไอโซเลท และที่น้อยกว่า 50% จำนวน 48 ไอโซเลท (ตาราง 14) สอดคล้องกับรายงานของ อภิญญา และคณะ (2545) พบ เชื้อแอคติโนมัยซีสสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคของมะม่วง และลำไย และ Cristina *et al*. (2006) พบเชื้อแอคติโนมัยซีสในกลุ่ม *Streptomyces* ที่แยกได้จากดิน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นเส้นใย และการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia eragrostides* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคใบจุดมันในประเทศบราซิลได้ สายพิณ และคณะ (2551) พบเชื้อแอคติโนมัยซีสในกลุ่ม *Streptomyces* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Botrytis* sp., และ *Curvularia* sp. ได้ตามลำดับ

ตาราง 14 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C และ 120^{O}C เป็นเวลา 24 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Colletotrichum* sp.สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีส (ไอโซเลท)		
	60^{O}C (24 ชั่วโมง)	120^{O}C (1 ชั่วโมง)	รวม (ไอโซเลท)
> 75%	32	15	47
61-75%	2	3	5
51-60%	2	3	5
< 50%	86	48	134
รวม	122	69	**191**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 15 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp.สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

ลำดับที่	ไอโซเลท*	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ลำดับที่	ไอโซเลท*	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	OMA60-1	100.00	17	SEA60-3	100.00
2	OMA60-2	100.00	18	SEA60-4	100.00
3	OMA60-7	100.00	19	SEA60-21	100.00
4	OMA60-8	100.00	20	SEA60-22	100.00
5	OMA60-10	100.00	21	SEA60-23	100.00
6	OMA60-15	100.00	22	SEA60-24	100.00
7	OMA60-16	100.00	23	SEA60-25	100.00
8	OMA60-17	100.00	24	SEA60-26	100.00
9	OMA60-18	100.00	25	SEA60-34	100.00
10	OMA60-33	100.00	26	SEA60-35	100.00
11	OMA60-36	100.00	27	CSA60-35	87.04
12	OMA60-39	100.00	28	SEA60-32	84.69
13	OMA60-42	100.00	29	OMA60-40	82.33
14	OMA60-43	100.00	30	SEA60-2	82.14
15	OMA60-44	100.00	31	SEA60-9	78.80
16	CTA60-1	100.00	32	CSA60-34	78.79

*CSA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C บนอาหาร caseine starch agar

CTA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C บนอาหาร chitin agar

OMA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C บนอาหาร oatmeal agar

SEA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C บนอาหาร soil extract agar

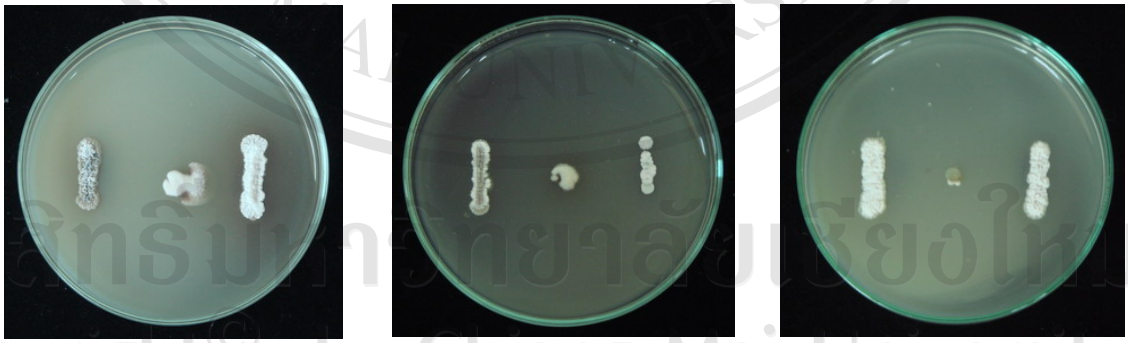
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

control SEA60-9 SEA60-10 CSA60-33 CSA60-34

78.80% 31.68% 29.23% 78.79%

OMA60-40 OMA60-41 CSA60-35 CSA60-37 CTA60-1 OMA60-33

82.33% 68.20% 87.04% 24.23% 100% 100%

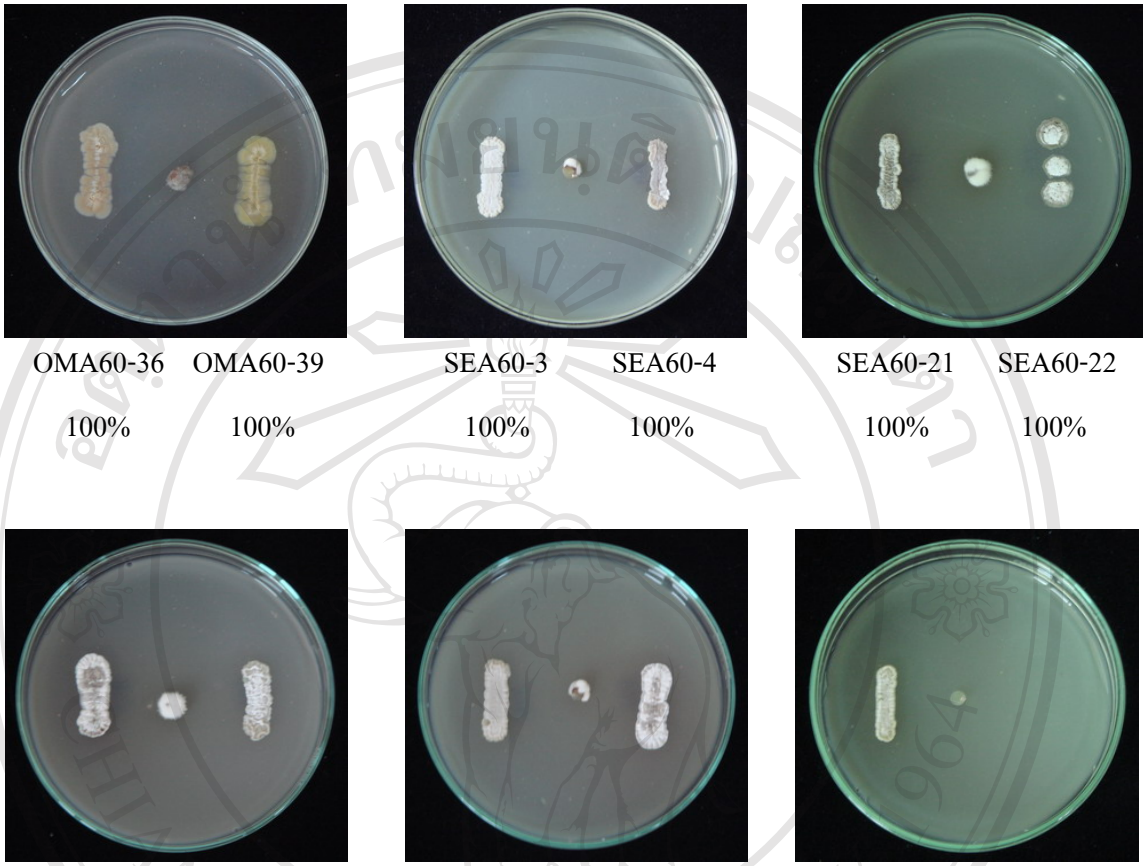


OMS60-1 OMS60-2 OMS60-7 OMS60-8 OMA60-15 OMA60-16

100% 100% 100% 100% 100% 100%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 19 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินอบฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก



ภาพ 19 (ต่อ) ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินอบฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 16 ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินที่อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120^{O}C ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum.* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

ลำดับที่	ไอโซเลท*	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
1	SEA120-3	100.00
2	SEA120-4	100.00
3	SEA120-28	100.00
4	SEA120-30	100.00
5	SEA120-31	100.00
6	SEA120-32	100.00
7	SEA120-37	100.00
8	SEA120-38	100.00
9	SEA120-45	100.00
10	SEA120-46	100.00
11	SEA120-34	85.87
12	SEA120-48	85.87
13	SEA120-29	84.1
14	OMA120-3	82.33
15	SEA120-13	81.15

OMA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร oatmeal agar

SEA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร soil extract agar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

control SEA120-13 SEA120-14 OMA120-3 OMA120-4

81.15 % 23.44 % 82.33 % 24.03 %

SEA120-27 SEA120-29 SEA120-33 SEA120-34 SEA120-3 SEA120-4

61.13 % 84.10 % 20.13 % 85.87 % 100 % 100 %

SEA120-28 SEA120-30 SEA120-31 SEA120-32 SEA120-37 SEA120-38

100 % 100 % 100 % 100 % 100 % 100 %

ภาพ 20 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินอบฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้มากกว่า 75% จำนวน 47 ไอโซเลท มาทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส บนอาหารแข็ง CCA โดยบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 $\pm$ 2 ^{O}C) เป็นเวลา 15 วัน พบเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สร้างวงใสบนอาหาร CCA มีจำนวน 34 ไอโซเลท (ตาราง 17 และ ภาพ 21)

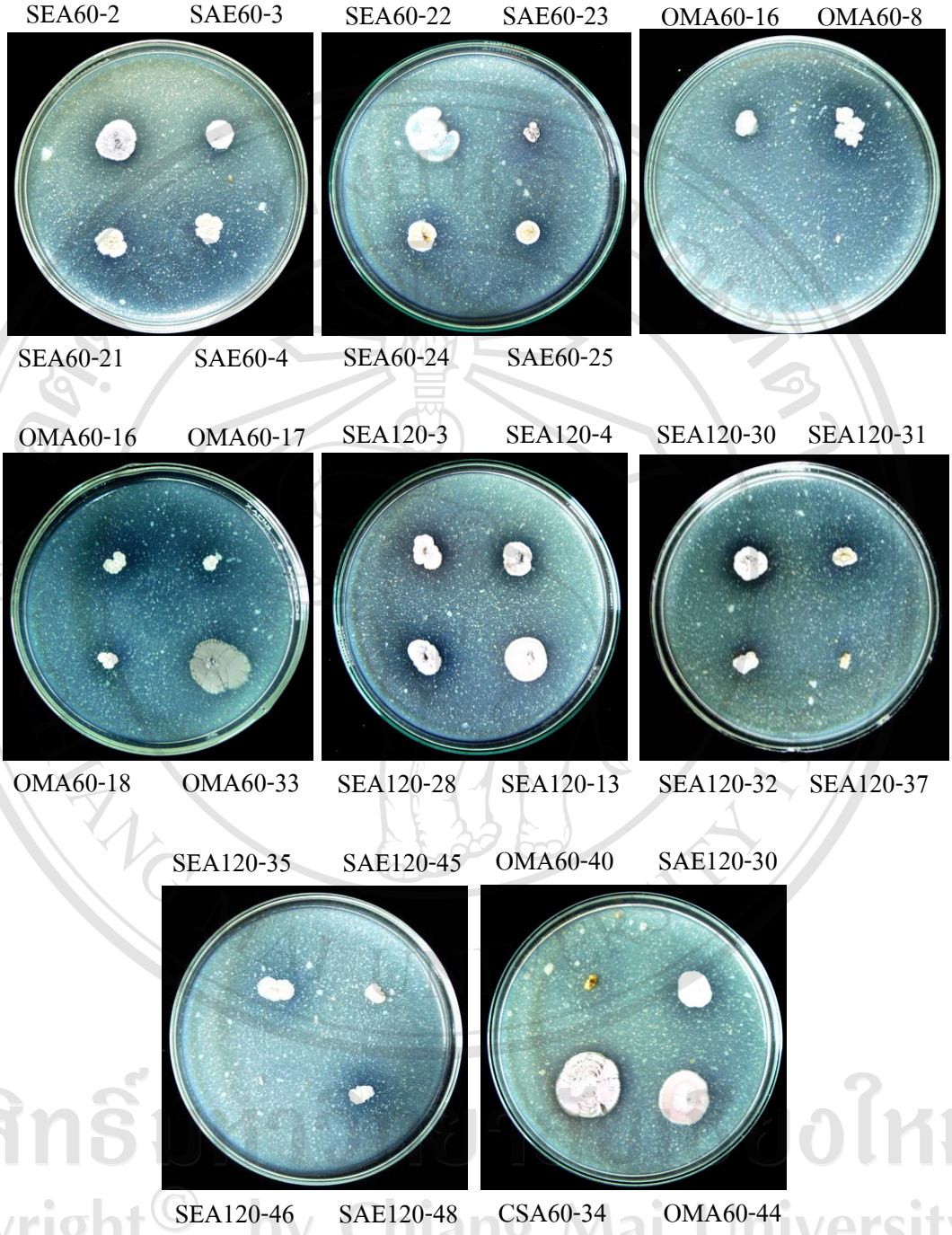
ตาราง 17 เชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง 15% colloidal chitin agar เป็นเวลา 15 วัน

ลำดับที่	ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยความกว้างวงใส (cm)	
		X	Y
1	OMA60-40*	2.17	2.24
2	SEA60-4	1.8	1.75
3	SEA60-22	1.7	1.9
4	SEA60-35	1.7	1.65
5	SEA60-21	1.5	1.37
6	SEA120-34	1.5	1.4
7	SEA60-32	1.45	1.45
8	SEA60-2	1.4	0.06
9	OMA60-17	1.34	1.37
10	SEA120-4	1.24	1.3
11	OMA60-18	1.23	0.87
12	OMA60-7	1.2	0.5
13	SEA120-3	1.15	0.8
14	SEA120-48	1.14	1.17
15	SEA120-28	1.13	1.20
16	OMA60-2	1.1	1.5
17	OMA60-16	1.1	1.03
18	SEA60-24	1.05	1.1
19	SEA120-31	1.05	1.25
20	SEA120-30	0.94	1.2
21	OMA60-1	0.86	0.9
22	SEA60-34	0.8	0.9
23	OMA60-10	0.78	0.58
24	SEA120-37	0.75	0.8
25	SEA60-9	0.6	0.8
26	SEA120-46	0.45	0.45
27	OMA60-36	0.43	0.46
28	OMA60-39	0.43	0.53
29	CSA60-35	0.4	0.17
30	SEA60-3	0.4	0.4
31	SEA60-26	0.30	0.16
32	SEA120-32	0.30	0.1
33	SEA120-38	0.30	1.2
34	SEA120-13	0.2	0.2

*OMA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C บนอาหาร oatmeal agar

SEA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C บนอาหาร soil extract agar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 21 ลักษณะวงใส (clear zone) บนอาหาร CCA (15% colloidal chitin agar) ที่ 15 วัน ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส จากเชื้อแอคติโนมัยซีส ซึ่งแยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

จากการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 โดยเทียบกับประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ผลิตภัณฑ์ทางการค้า ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกไอโซเลท Cg24 (S), Cg49 (WR), Cc11 (MR), Cc53 (HR) และ Cg60 (HR) แล้วนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติแบบ factorial in RCBD พบ NF, F และเชื้อราสาเหตุเกิดปฏิกริยาร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% ($p = 0.01$) (ภาคผนวก ง)

เมื่อนำค่า LSD ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติซึ่งมีค่าเท่ากับ 10.68 ($p=0.05$) ที่ความเชื่อมั่น 95% และ 14.04 ($p=0.01$) ที่ความเชื่อมั่น 99% พบเชื้อแอคติโนมัยซีส 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ดีได้แก่ SEA60-34, OMA60-7 และ SEA120-28 ตามลำดับ พบ NF ไอโซเลท SEA60-34 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ดีทุกไอโซเลท ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 53.3-75.0% และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 43.3-53.3% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($p=0.05$) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F ไอโซเลท SEA60-34 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราอยู่ในช่วง 28.3-50.0% ในขณะที่แบคทีเรีย *B. subtilis* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 43.3-53.3% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% รองลงมา NF ไอโซเลท OMA60-7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 53.3-66.7% ในขณะที่แบคทีเรีย *B. subtilis* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 51.7-53.3% ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วน F ไอโซเลท OMA60-7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 38.3-55.0% เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 51.7-53.3% พบว่า OMA60-7 (F) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแตกต่างกับแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ส่วน NF ไอโซเลท SEA120-28 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 43.3-58.3% ซึ่งไม่แตกต่างกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 43.3-58.3% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ F ไอโซเลท SEA120-28 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 0-25.0% ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำกว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 43.3-58.3% ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 18, ภาพ 22) สอดคล้องกับรายงานของ อภิญญา และคณะ (2545) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในมะม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และลำไย ด้วยวิธี paper disc method พบว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ไอโซเลท H11 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *Fusarium solani* สาเหตุโรคในมะม่วง และลำไย โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้นได้ 23.3 มิลลิเมตร และ 15.7 มิลลิเมตรตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF ทุกไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไม่ต่างกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ยกเว้น SEA60-34 (NF) ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ส่วน F พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่ำกว่า NF ในแต่ละไอโซเลท ทั้งนี้อาจเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF ยังมีเชื้อแอคติโนมัยซีสอยู่ และเชื้อแอคติโนมัยซีสนั้นอาจจะผลิตสารทุติยภูมิออกมายับยั้งเชื้อราสาเหตุ ซึ่งต่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F อาจมีสารทุติยภูมิในปริมาณที่จำกัดจึงไม่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ดี สอดคล้องกับการทดลองของ Cristina *et al*. (2006) พบเชื้อ *Streptomyces* sp. (AC26) ที่ผลิตสารทุติยภูมิ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia eragrostides* และ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคใบจุดมันได้ดี ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรานั้นจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารทุติยภูมิ ขณะที่เชื้อ *S. griseus* subsp. *griseus* พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุ และไม่สามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ ในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ SEA60-34, OMA60-7 และ SEA120-28 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ดีมาทำการทดสอบในขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลทต่างๆ

เชื้อแอคติโนมัยซีส	ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ[2] แอคติโนมัยซีส	% การยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* spp.[1]				
		Cg24 (S)	Cg49[4] (WR)[3]	Cc11 (MR)	Cc53 (HR)	Cg60 (HR)
SEA60-34	NF	61.67	75.00	58.33	53.33	70.00
	F	35.00	48.33	28.33	33.33	50.00
	B. subtilis[5]	48.33	43.33	53.33	46.67	50.00
OMA60-7	NF	61.67	53.33	60.00	58.33	66.67
	F	48.33	46.67	38.33	51.67	55.00
	B. subtilis	52.00	53.33	55.67	51.67	51.67
SEA120-28	NF	55.00	53.33	53.33	43.33	58.33
	F	11.67	25.00	0.00	10.00	1.67
	B. subtilis	43.33	45.00	58.33	48.33	45.00
OMA60-1	NF	51.67	60.00	48.33	46.67	53.33
	F	6.67	0.00	0.00	10.00	15.00
	B. subtilis	58.33	49.00	48.33	41.67	49.67
SEA120-4	NF	51.67	46.67	40.00	25.00	53.33
	F	3.33	0.00	3.33	21.67	0.00
	B. subtilis	46.67	48.33	55.00	48.33	48.33
SEA120-38	NF	50.00	50.00	43.33	50.00	55.00
	F	21.67	21.67	13.33	23.33	25.00
	B. subtilis	53.33	55.00	58.33	50.00	48.33
LSD (p = 0.01)			14.04%			
LSD (p = 0.05)			10.68%			
CV (%)			16.06%			

[1]ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

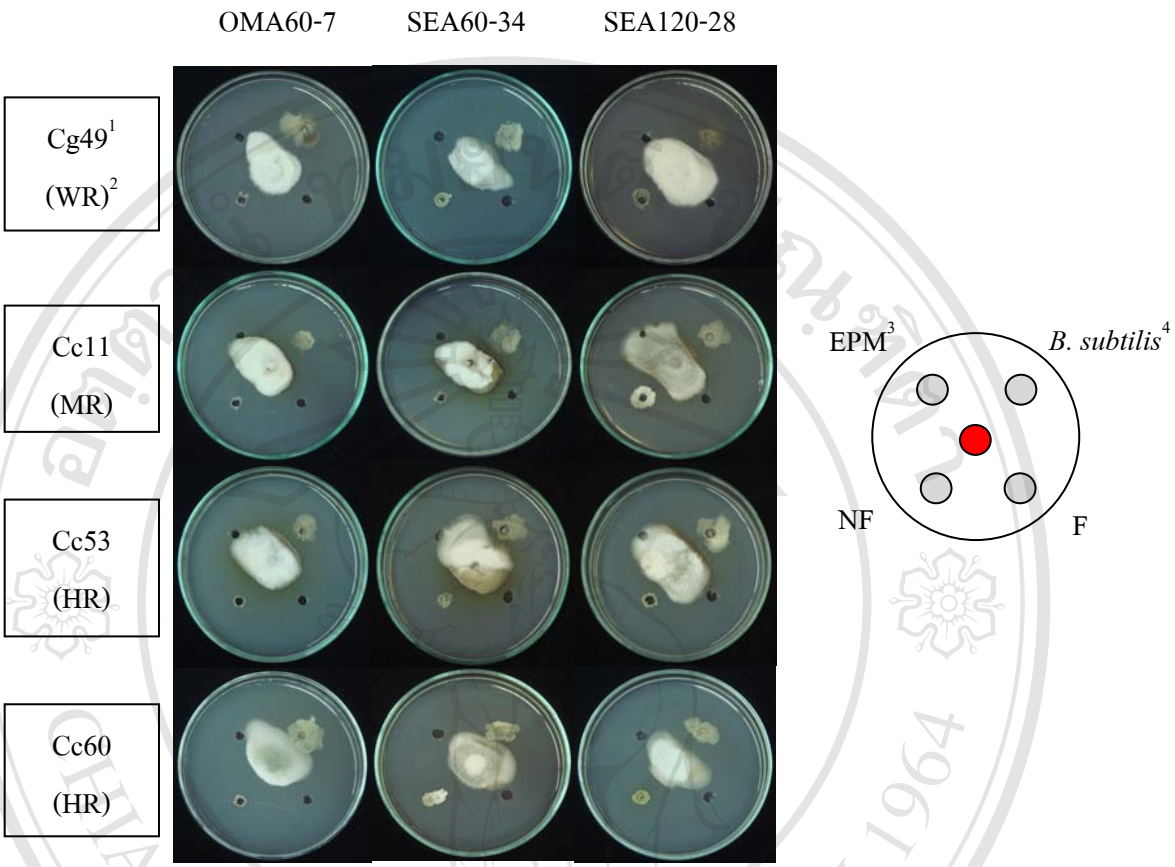
[2] NF = อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก, F = อาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก

[3]S = sensitive; $\leq$ 1 µg/ml, WR= weakly resistant; $\leq$ 10 µg/ml, MR = moderately resistant; $\leq$ 100 µg/ml, HR= highly resistant; $\geq$ 500 µg/ml

[4] Cc = *Colletotrichum capsici*, Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*

[5]*Bacillus subtilis* = ที่อัตราแนะนำ 1×10^9 CFU/g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 22 ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) ไอโซเลท OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg49, Cc11, Cc53 และ Cg60

[1]Cc = *Colletotrichum capsici*, Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*

[2]S = sensitive; $\leq$ 1 µg/ml, WR= weakly resistant; $\leq$ 10 µg/ml, MR = moderately resistant; $\leq$ 100 µg/ml, HR= highly resistant; $\geq$ 500 µg/ml

[3]EPM = enzyme production medium

[4]*Bacillus subtilis* = อัตราแนะนำ 1×10^9 CFU/g

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีส

การศึกษาลักษณะ และการจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง 15% colloidal chitin agar จำนวน 6 ไอโซเลทได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 ที่แยกได้จากดินที่อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 2 ระดับคือ อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาแยกบนอาหาร OMA และ SEA

เมื่อนำเชื้อราทั้ง 6 ไอโซเลท มาเลี้ยงบนอาหาร inhibitory mold agar (2IMA-2)เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส พบเชื้อแอคติโนมัยซีสมีลักษณะโคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้ง โคโลนีโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย (convex) บางโคโลนีแบนราบติดกับผิวอาหาร (flast) (ตาราง 19) นอกจากนี้ไม่พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสมีการสร้างรงควัตถุ (pigment) เมื่อนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X พบเชื้อแอคติโนมัยซีส ไอโซเลท OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 มีการสร้างเส้นใยแต่ไม่สร้างสปอร์ ส่วนไอโซเลท SEA120-28 และ SEA120-38 พบมีการสร้างเส้นใย และสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายลูกปัดต่อกันเป็นโซ่ ซึ่งคล้ายกับลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสในกลุ่ม *Streptomyces* (ภาพ 23)

จากการศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสบางไอโซเลทไม่มีการสร้างสปอร์ ทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีสได้ จึงได้นำเชื้อแอคติโนมัยซีสไปทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารในผนังเซลล์ DAP ของเชื้อแอคติโนมัยซีส และการจัดจำแนกโดยการใช้เทคนิคทางโมเลกุลในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 19 ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 (inhibitory mold agar-2)

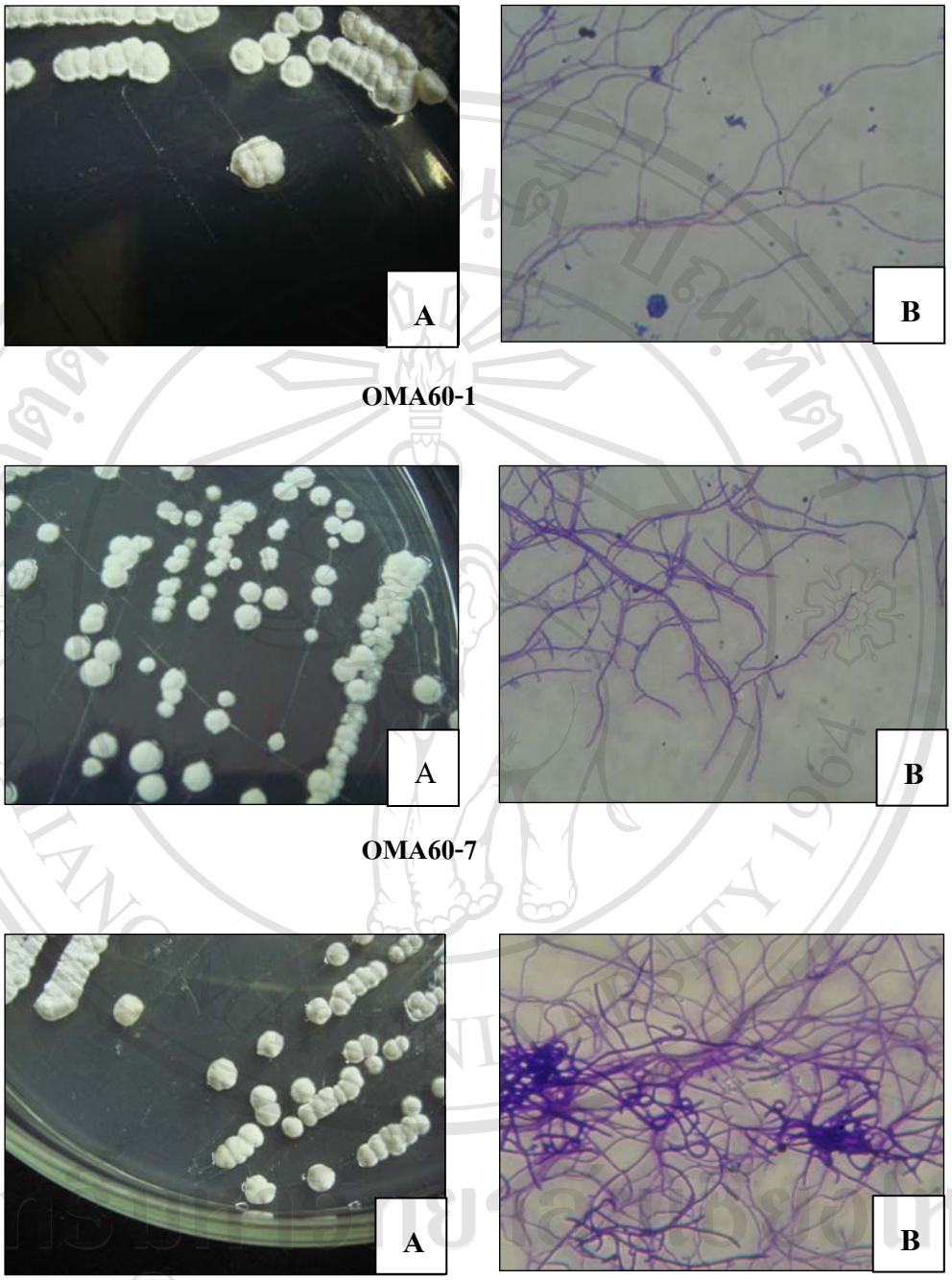
ลำดับที่	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสปอร์ (กำลังขยาย 100X)
1	OMA60-1*	โคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้ง และ โคโลนีโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย (convex)	ไม่พบการสร้างสปอร์
2	OMA60-7	โคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้ง และ โคโลนีโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย (convex)	ไม่พบการสร้างสปอร์
3	SEA60-34	โคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้ง และ โคโลนีโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย (convex)	ไม่พบการสร้างสปอร์
4	SEA120-4	โคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้ง และ โคโลนีโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย (convex)	ลักษณะสปอร์คล้ายลูกปัดต่อกันเป็นโซ่
5	SEA120-28	โคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้ง และ โคโลนีโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย (convex)	ไม่พบการสร้างสปอร์
6	SEA120-38	โคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้ง และ โคโลนีแบนราบติดกับอาหาร (flast)	ลักษณะสปอร์คล้ายลูกปัดต่อกันเป็นโซ่

*OMA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร oatmeal agar

SEA60 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร soil extract agar

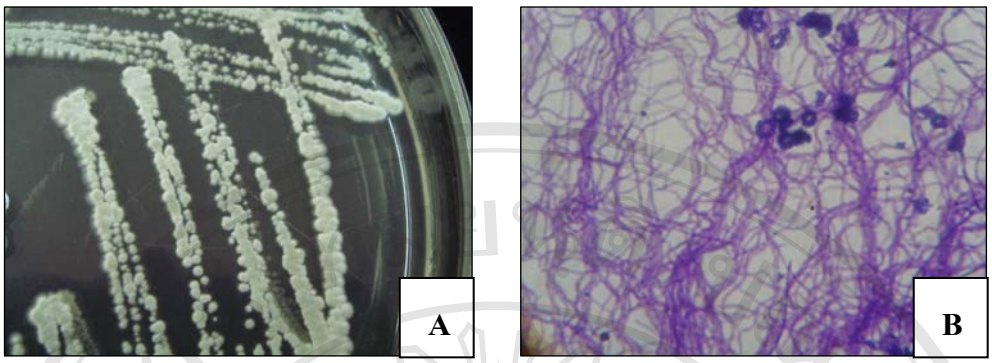
SEA120 = เชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร soil extract agar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

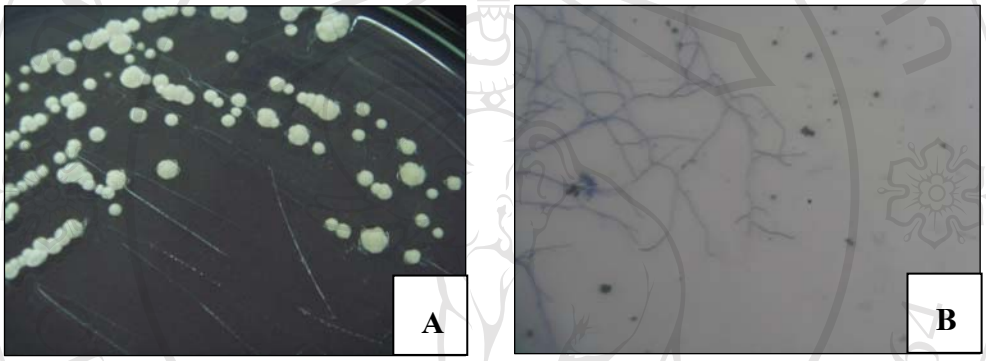


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

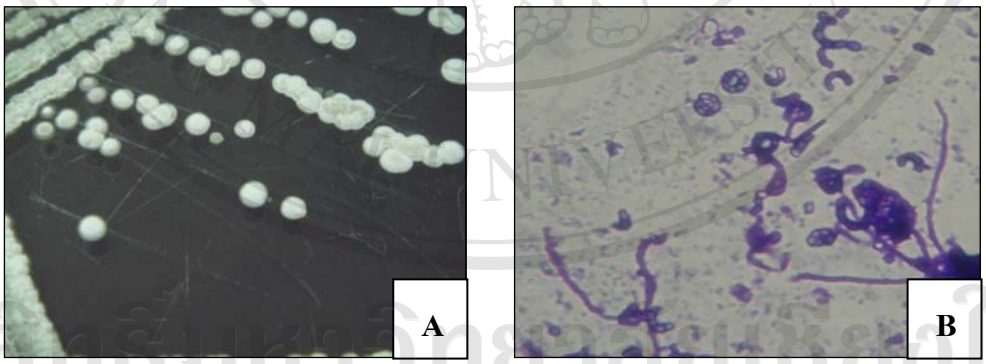
ภาพ 23 ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีส ไอโซเลทต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ inhibitory mold agar-2 (IMA-2) อายุ 7 วัน; A: ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 และ B: ลักษณะเส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X



SEA120-4



SEA120-28



SEA120-38

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

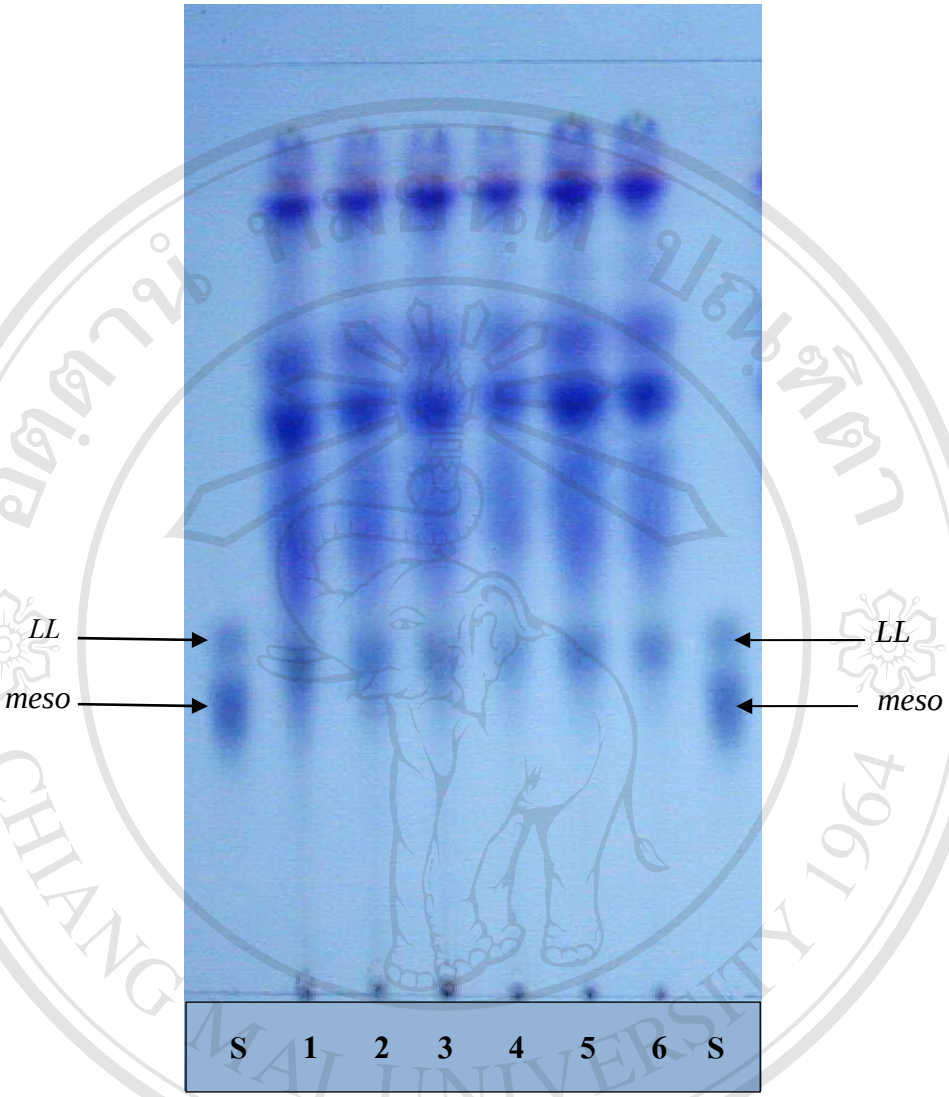
ภาพ 23 (ต่อ) ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีส ไอโซเลทต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ inhibitory mold agar-2 (IMA-2) อายุ 7 วัน; A: ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 และ B: ลักษณะ เส้นใย และสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X

3.5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบผนังเซลล์ diaminopimelic acid (DAP) ของเชื้อแอคติโนมัยซีส

จากการวิเคราะห์หา DAP ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยใช้วิธีการแยกสีของสารละลายที่ได้จากย่อยของผนังเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส เทียบกับสารละลายมาตราฐาน 0.01 M *LL*, *meso* – A_2pm โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (TLC) พบเชื้อแอคติโนมัยซีสที่นำมาวิเคราะห์จำนวนทั้งหมด 6 ไอโซเลทได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ DAP ชนิด LL (ภาพ 24) ซึ่งจัดได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้งหมดอยู่ในกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีส *Streptomyces* spp. เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีสกลุ่ม *Streptomyces* จะมี DAP ชนิด *LL* ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีสหายาก (rare actinomyces) มักมี DAP ชนิด *meso* สอดคล้องกับรายงานของ Lechevalier (1970) ที่พบ DAP ชนิด *LL* ในจีนัส *Streptomyces* และพบ DAP ชนิด *meso* ในจีนัสอื่น

การวิเคราะห์ DAP เป็นการวิเคราะห์เชื้อแอคติโนมัยซีสเบื้องต้นว่าจัดอยู่ในกลุ่มใด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 24 องค์ประกอบของผนังเซลล์ diaminopimelic acid (DAP) ของเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยวิธีการแยกสีของสารละลายมาตราฐานจากเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

S = Standard solution (สารละลายมาตราฐาน 0.01 M *LL*, *meso* A_2pm)

1 = เชื้อแอคติโนมัยซีส OMA60-1

2 = เชื้อแอคติโนมัยซีส OMA60-7

3 = เชื้อแอคติโนมัยซีส SEA60-34

4 = เชื้อแอคติโนมัยซีส SEA120-4

5 = เชื้อแอคติโนมัยซีส SEA120-28

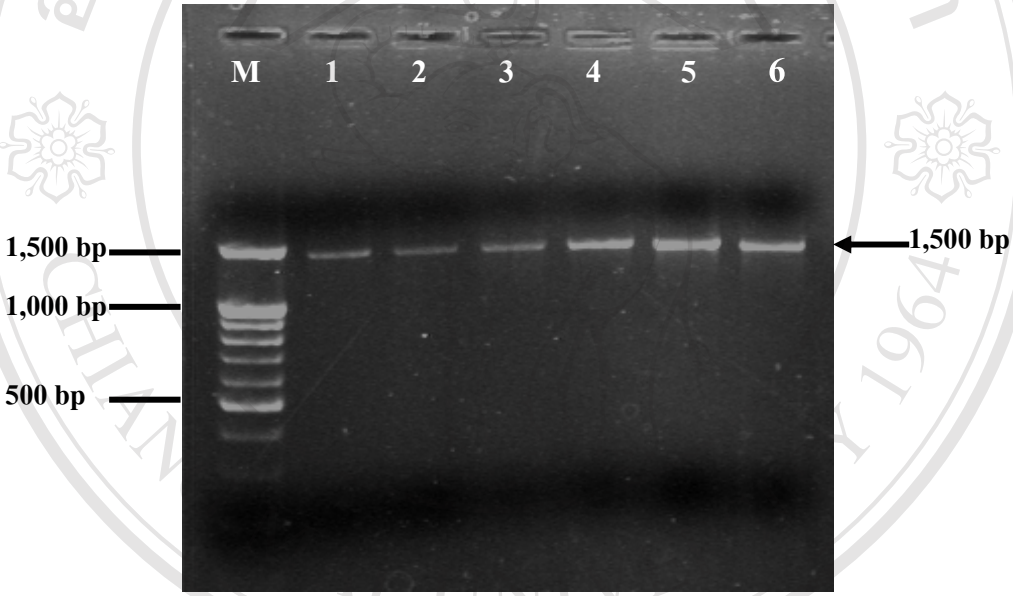
6 = เชื้อแอคติโนมัยซีส SEA120-38

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2 การจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีสด้วย 16S rDNA

3.5.2.1 เพิ่มปริมาณยีนตำแหน่ง 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR

จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 6 ไอโซเลทได้แก่ OMA60-1 OMA60-7 SEA34-60 SEA120-28 และ SEA120-38 และนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27f forward (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG -3′) และ 1492r reverse (5′-GGC TAC CTT GTT ACG ACTT-3′) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแอคติโนมัยซีสในส่วนของ 16S rDNA ได้ทุกไอโซเลท โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,500 bp เมื่อนำมาตรวจสอบบน 1% agarose gel (ภาพ 25)



ภาพ 25 เจลอิเล็กโทรโฟริซีสบน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ 27f/1492r ตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน 16S rDNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลทต่างๆ

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน
1 = OMA60-1
2 = OMA60-7
3 = SEA60-34
4 = SEA120-4
5 = SEA120-28
6 = SEA120-38

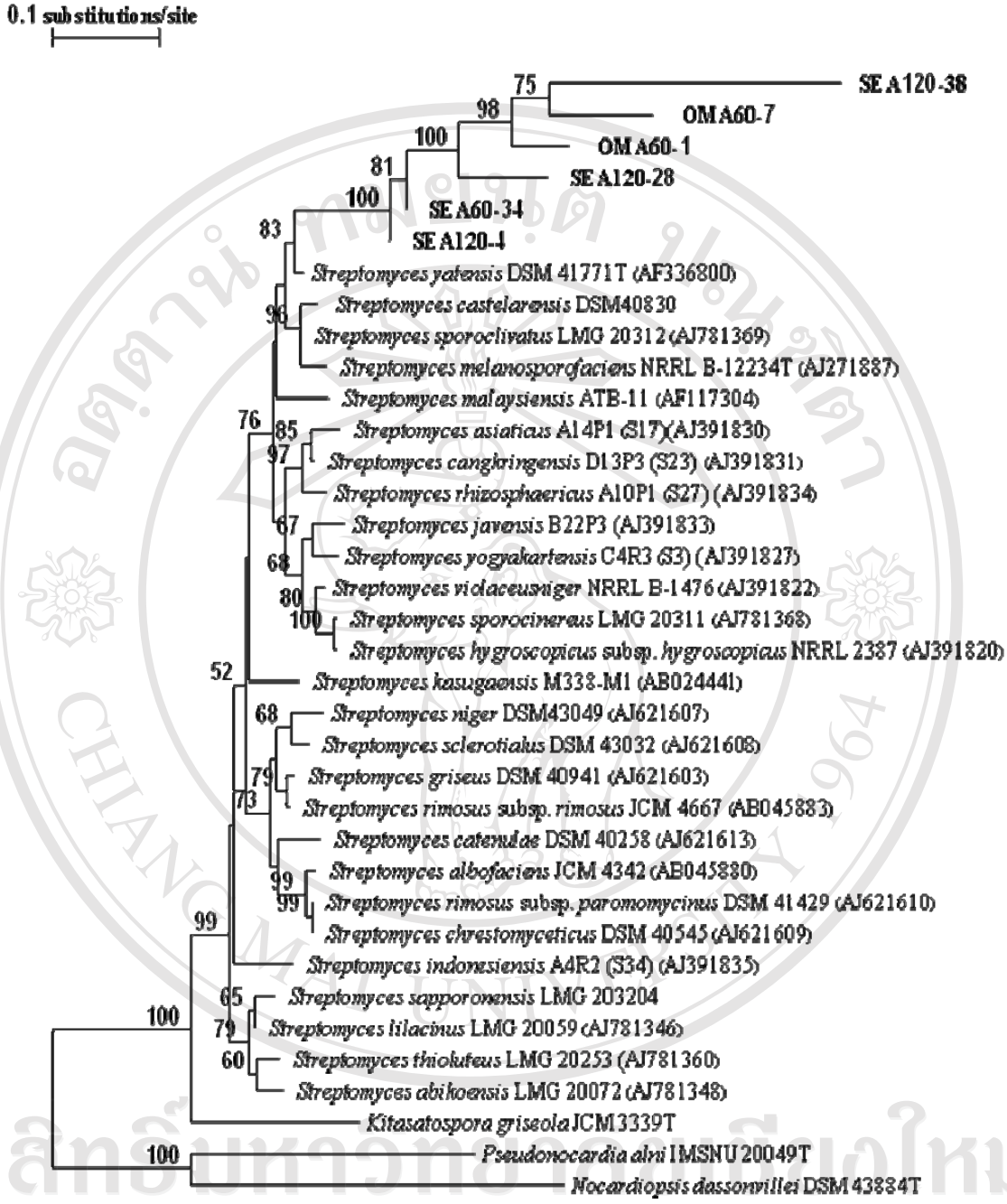
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5.2.2 วิเคราะห์หาระดับความสัมพันธ์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส (phylogenetic)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง 16S rDNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 6 ไอโซเลทได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-28 และ SEA120-38 มาเปรียบเทียบข้อมูลใน GenBank พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในสกุล *Streptomyces* จากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยซีสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับตัวอย่างเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลทมาจำนวน 30 สปีชีส์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการจัดเรียงข้อมูลด้วยโปรแกรม Phydit จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อด้วยโปรแกรม Treecon พบว่าเชื้อ แอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* แต่การจำแนกในระดับสปีชีส์ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลทมีความแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Streptomyces* สปีชีส์ต่างๆ เห็นได้จากการที่เชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท รวมกลุ่มกันเป็นกระจุกในแขนงที่แยกตัวออกมาจากเชื้อ *Streptomyces* สปีชีส์ต่างๆ ที่คัดเลือกไว้ โดยเชื้อแอคติโนมัยซีส SEA60-34 มีความคล้ายคลึงกับ SEA120-4 มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree เท่ากับ 100% และ SEA60-34 มีความคล้ายคลึงกับ SEA120-28, OMA60-1, SEA120-38 และ OMA60-7 ซึ่งมีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree เท่ากับ 81 % (ภาพ 26)

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (%similarity) ของเชื้อทั้งหมดด้วยโปรแกรม Phydit พบเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลท SEA60-34 และ SEA120-4 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces yatensis* (AF336800) เท่ากับ 97.63 และ 98.36% ตามลำดับ แต่พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 2 ไอโซเลทแยกกลุ่มออกมาจาก *S. yatensis* ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลท SEA120-28, OMA60-1, SEA120-38 และ OMA60-7 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces* สปีชีส์อื่น ที่คัดเลือกมาในช่วง 90.2-95.3% (ภาคผนวก ค) ซึ่งการที่ค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA ต่ำกว่า 97% บ่งชี้ว่าเชื้อดังกล่าวน่าจะเป็นเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งจากการทดลองอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินอุทยานสุเทพปุย มีความหลากหลายอยู่สูง และอาหาร SEA ที่ใช้ในการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสอาจสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ตามปกติไม่เจริญในอาหารทั่วไปได้ดี จะเห็นได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีประสิทธิภาพและเลือกมาทำการศึกษานั้นส่วนมากมาจากเชื้อที่แยกได้จากอาหาร SEA สอดคล้องกับการรายงานของ Takefumi *et al.* (2005) พบอาหาร soil extract agar (SEA) สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีและมีความหลากหลาย โดยพบว่าโคโลนีที่เจริญบนอาหาร SEA มีขนาดโคโลนีที่เล็ก และเจริญช้า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 26 Phylogenetic tree ของเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลท OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-28 และ SEA120-38

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การทดลองที่ 4:</u> การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส กับเมล็ดพันธุ์พริก และต้นกล้าพริก

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสกับเมล็ดพันธุ์พริกบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 ต่อการงอกของเมล็ดพริกหนุ่มพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า โดยแช่เมล็ดพันธุ์พริกทั้งสองชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F ไอโซเลทต่างๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นเพาะบนกระดาษชื้นเป็นเวลา 14 วัน บันทึกจำนวนเมล็ดพริกที่งอก และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติแบบ factorial in CRD พบว่าเมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า ที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส NF มีเปอร์เซ็นต์การงอกอยู่ในช่วง 95.0-97.0% และ 94.0-97.0% ตามลำดับ สำหรับเมล็ดพริกที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F มีเปอร์เซ็นต์การงอกอยู่ในช่วง 97.0-99.0% และ 91.0-96.0% ตามลำดับ ซึ่งเมล็ดพริกทั้ง 2 พันธุ์ ที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F ในแต่ละไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การงอกไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่แช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ แช่ในอาหาร EPM และแช่ในเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ผลิตภัณฑ์ทางการค้าในอัตราแนะนำ (1×10^9 CFU/g) พบว่าเมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมืองมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 99.0, 93.0 และ 90.5% ตามลำดับ สำหรับเมล็ดพริกพันธุ์การค้ามีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 95.0, 98.0 และ 97.0% ตามลำดับ และไม่พบการเจริญของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริกทั้ง 2 พันธุ์ (ตาราง 20, ภาพ 27)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 20 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพริก ที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง บันทึกผลภายหลังจากเพาะบนกระดาษชื้น เป็นเวลา 14 วัน

กรรมวิธี	เชื้อแอคติโนมัยซีส	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพริกหนุ่ม[1]	
		พันธุ์พื้นเมือง	พันธุ์การค้า
ชุดควบคุม			
แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว		99.00 a[2]	95.00 ab
แช่ในอาหาร EPM[3]		93.00 ab	98.00 ab
แช่ใน *Bacillus subtilis*[4]		90.50 b	97.00 ab
แช่ใน NF	OMA60-7	96.00 ab	97.00 ab
	SEA60-34	95.00 ab	94.00 ab
	SEA120-28	97.00 ab	94.00 ab
แช่ใน F	OMA60-7	97.00 ab	92.00 ab
	SEA60-34	99.00 a	91.00 b
	SEA120-28	98.00 ab	96.00 ab
LSD (*p=0.05*)		2.63	
CV (%)		5.81	

[1]ค่าเฉลี่ยจากการทดลองละ 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 25 เมล็ด)

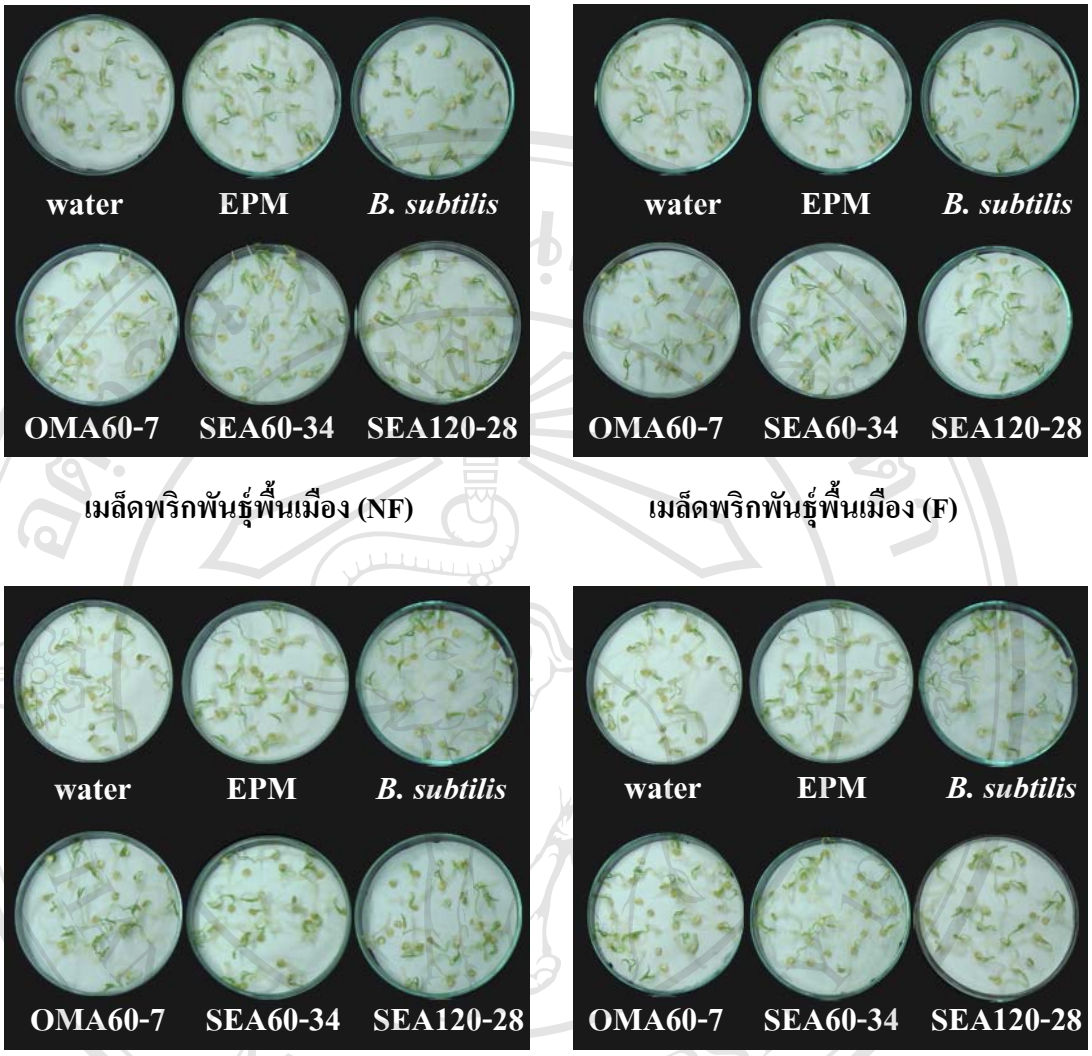
[2]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95%

[3]EPM = enzyme production medium

[4]*Bacillus subtilis* = ตามอัตราแนะนำ (1×10^9 CFU/g)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

\



เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง (NF) **เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง (F)**

เมล็ดพริกพันธุ์การค้า (NF) **เมล็ดพริกพันธุ์การค้า (F)**

ภาพ 27 การงอกของเมล็ดพริกหนุ่มพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า ภายหลังการเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น 14 วัน โดยแช่เมล็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และ อาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. กับต้นกล้าพริกในสภาพโรงเรือน

4.2.1 การทดสอบกับต้นกล้าพริกที่เมล็ดผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส

จากการนำเมล็ดพริกหนุ่มพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า ที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) ของเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 มาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน พบต้นกล้าพริกพันธุ์พื้นเมือง (ภาพ 28A) และ พันธุ์การค้า (ภาพ 28B) ที่ผ่านการแช่อาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F มีการเจริญเติบโตเท่ากับชุดควบคุมที่แช่เมล็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แช่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ EPM และแช่ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* โดยต้นพริกมีลำต้นแข็งแรงสมบูรณ์ มีส่วนสูงของลำต้นเฉลี่ย 43.6 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีส่วนสูงของลำต้นเฉลี่ย 44.5 เซนติเมตร

เมื่อนำต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ทั้ง 2 พันธุ์ ที่ผ่านการแช่เมล็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 มาปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg60 (HR) ด้วย spore suspension ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นบันทึกผลการเกิดโรคภายหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 10 วัน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี factorial in CRD พบว่าเมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมืองที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ SEA60-34 , SEA120-28 และ OMA60-7 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 76.7, 80.4 และ 83.6% ตามลำดับ ซึ่งไม่ต่างกับชุดควบคุมที่แช่เมล็ดใน *B. subtilis* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 77.7% ส่วนชุดควบคุมที่แช่เมล็ดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และในอาหาร EPM มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 90.6 และ 90.5% ตามลำดับ สำหรับเมล็ดพริกที่แช่ในอาหารลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA120-28 และ SEA60-34 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 86.9, 87.0 และ 88.1% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับการแช่เมล็ดใน NF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 21, ภาพ 29A) กรณีของเมล็ดพริกพันธุ์การค้าที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ SEA60-34 , SEA120-28 และ OMA60-7 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 63.9, 72.2 และ 75.0% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับชุดควบคุมที่แช่เมล็ดใน *B. subtilis* มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 69.5% ส่วนชุดควบคุมที่แช่เมล็ดในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว และอาหาร EPM มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 86.1 และ 88.0% ตามลำดับ สำหรับเมล็ดที่แช่อาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ SEA60-34 , SEA120-28 และ OMA60-7 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 82.7,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

83.7 และ 87.5% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการแช่เมล็ดใน NF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 21, ภาพ 29B)

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของเมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้าที่ผ่านการแช่ NF ของเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 3 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 63.9-75.0% และ 76.7%-83.6% ตามลำดับ ส่วนเมล็ดพริกพันธุ์การค้า และพันธุ์พื้นเมืองที่ผ่านการแช่ F มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 82.6%-87.5% และ 86.9%-88.1% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมล็ดพริกพันธุ์การค้ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าพันธุ์พื้นเมือง อาจเป็นไปได้ว่าเมล็ดพริกพันธุ์การค้าผ่านการคลุกเมล็ดด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช หรือเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้แข็งแรง และทนต่อสภาวะการเกิดโรคได้ดีกว่าเมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากเมล็ดพริกทั้ง 2 พันธุ์ ที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงกว่าเมล็ดพริกที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F อาจเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF ยังมีเชื้อแอคติโนมัยซีสอยู่ ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีสนั้นอาจจะผลิตสารทุติยภูมิออก และเชื้อแอคติโนมัยซีสอาจติดอยู่กับเมล็ดพันธุ์ ซึ่งเมื่อนำเมล็ดพันธุ์นั้นมาปลูกอาจมีเชื้อแอคติโนมัยซีสเจริญอยู่ในดินที่ปลูกนั้น ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีสที่เจริญอยู่อาจไปมีผลทำให้ต้นพริกสามารถทนต่อการเกิดโรค จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำ เมื่อเทียบกับการแช่เมล็ดในน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F ทั้งนี้อาจมีการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1* 2 3	4 5 6	4 5 6
ชุดควบคุม	F	NF

A: ต้นกล้าพริกพันธุ์พื้นเมือง

1 2 3	4 5 6	4 5 6
ชุดควบคุม	F	NF

B: ต้นกล้าพริกพันธุ์การค้า

ภาพ 28 ลักษณะต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่เมล็ดผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F)

*1 = แช่เมล็ดในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว

2 = แช่เมล็ดในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส EPM (enzyme production medium)

3 = แช่เมล็ดในเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (ผลิตภัณฑ์ทางการค้า)

4 = แช่เมล็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส OMA60-7

5 = แช่เมล็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส SEA60-34

6 = แช่เมล็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส SEA120-28

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 21 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่เมล็ดผ่านการแช่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) บันทึกผลการทดลองภายหลังการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Cg60 (HR) เป็นเวลา 10 วัน

กรรมวิธี	ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค[1]	
		พันธุ์พื้นเมือง	พันธุ์การค้า
ชุดควบคุม			
แช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว		90.55 a[2]	86.09 abc
แช่ด้วยอาหาร EPM[3]		90.53 a	88.00 ab
Bacillus subtilis[4]		77.67 bcde	69.45 ef
แช่ใน NF	OMA60-7	83.56 abcd	75.00 cdef
	SEA60-34	76.67 bcd	63.89 f
	SEA120-28	80.44 abcde	72.22 def
แช่ใน F	OMA60-7	86.88 abc	83.65 abcd
	SEA60-34	88.11 ab	82.65 abcd
	SEA60-28	87.00 abc	87.46 abc
LSD (*p=0.05*)		12.72	
CV (%)		5.07	

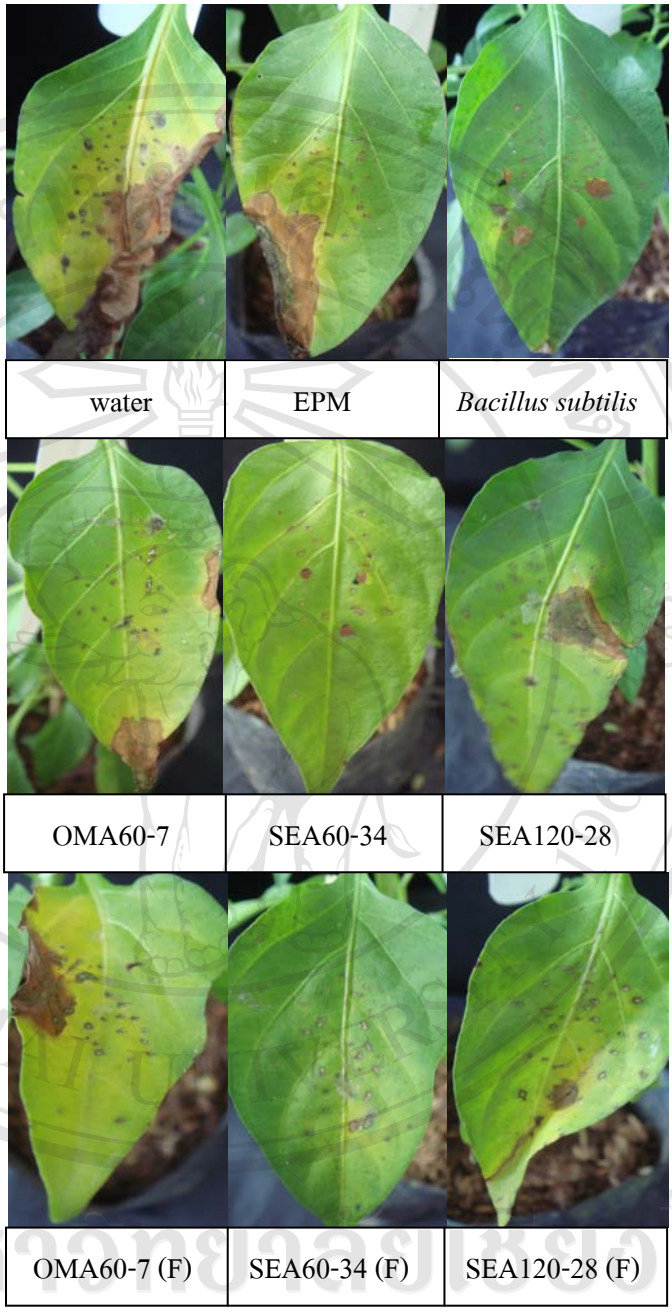
[1]ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 5 ซ้ำ

[2]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 95%

[3]EPM = enzyme production medium

[4]*Bacillus subtilis* = ตามอัตราแนะนำ (1×10^9 CFU/g)

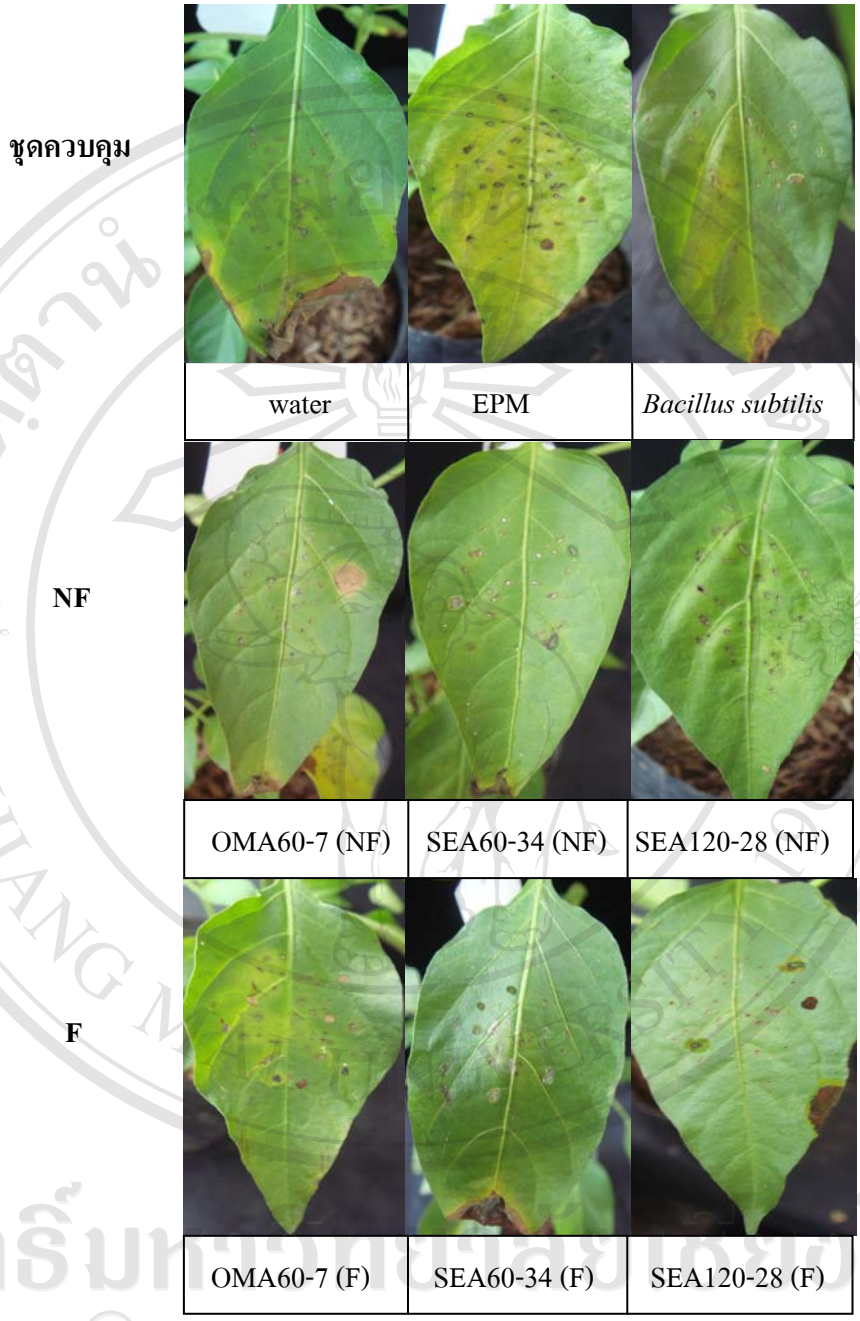
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



A: พริกหนุ่มพันธุ์พื้นเมือง

ภาพ 29 อาการบนใบของต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่ผ่านการแช่เมล็ดพริกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 ภายหลังการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg60 (HR: highly resistant) เป็นเวลา 10 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



B: พริกหนุ่มพันธุ์การค้า

ภาพ 29 (ต่อ) อาการบนใบของต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่ผ่านการแช่เมล็ดพริกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 ภายหลังการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg60 (HR: highly resistant) เป็นเวลา 10 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.2 การฉีดพ่นอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสกับต้นกล้าพริก

จากการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 ที่มีประสิทธิภาพในการควบเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องปฏิบัติการได้ดี มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg60 (HR) ที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง โดยกรรมวิธีการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F 2 วิธี ได้แก่ ฉีดพ่นก่อนและหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ด้วย spore suspension ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร โดยทดสอบกับต้นกล้าพริกหนุ่มพันธุ์การค้าที่มีอายุ 45 วัน บันทึกผลหลังปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 10 วัน โดยวัดระดับการเกิดโรค คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติแบบ factorial in CRD พบว่าการฉีดพ่น NF และ F ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 38.3-46.7% และ 55.0-58.3% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมคือฉีดพ่นด้วยอาหาร EPM หลังปลูกเชื้อราสาเหตุตาม มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 91.0% สำหรับการฉีดพ่น NF และ F ภายหลังปลูกเชื้อราสาเหตุมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 41.0-46.0% และ 58.3-61.3% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมคือ ฉีดพ่นด้วยอาหาร EPM ก่อน และหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 91.0 และ 89.67% ตามลำดับ (ตาราง 22, ภาพ 30 และ 31) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF กับการฉีดพ่นด้วย *B. subtilis* ตามอัตราแนะนำ (1×10^9 CFU/g) ทั้ง 2 วิธี ได้แก่ การฉีดพ่นก่อน และหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 44.7% และ 45.3% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ส่วนการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F มีความแตกต่างกับการฉีดพ่นด้วย *B. subtilis* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีเชื้อแอคติโนมัยซีสเจริญอยู่ และสามารถผลิตสารทุติยภูมิต่างๆออกมาได้ จึงทำให้ไปยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้มีประสิทธิภาพดีกว่า เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) อาจมีสารทุติยภูมิในปริมาณที่จำกัด และไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ สอดคล้องกับรายงานของ Mutitu *et al*. (2008) ที่ใช้สารทุติยภูมิที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในอาหารเหลว มาฉีดพ่นบนต้นกล้ามะเขือเทศ ก่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และหลังการปลูกเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคใบไม้ในมะเขือเทศ พบว่าสารทุติยภูมิที่ได้จากเชื้อแอคติโนมัยซีส ไอโซเลท 28P และ CS35 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้ 30.8 และ 19.8% ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 22 เปรียบเทียบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg60 (HR) ด้วยวิธีการฉีดพ่น NF และ F เชื้อแอคติโนมัยซีสก่อน และหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุ (บันทึกผลหลังปลูกเชื้อสาเหตุ 10 วัน)

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค[1]
ชุดควบคุม	
ไม่ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุ	0.00 a[2]
ปลูกเชื้อราสาเหตุ	92.67 b
พ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ EPM[3] + ปลูกเชื้อราสาเหตุ	91.00 b
พ่นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*[4] + ปลูกเชื้อราสาเหตุ	44.67 e
ปลูกเชื้อราสาเหตุ + พ่นอาหารเลี้ยงเชื้อ EPM	89.67 b
ปลูกเชื้อราสาเหตุ + พ่นแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*	45.33 e
ชุดทดสอบ	
พ่น NF ไอโซเลท OMA60-7 + ปลูกเชื้อราสาเหตุ	42.00 e
พ่น NF ไอโซเลท SEA60-34 + ปลูกเชื้อราสาเหตุ	38.34 e
พ่น NF ไอโซเลท SEA120-28 + ปลูกเชื้อราสาเหตุ	46.70 de
พ่น F ไอโซเลท OMA60-7 + ปลูกเชื้อราสาเหตุ	58.33 c
พ่น F ไอโซเลท SEA60-34 + ปลูกเชื้อราสาเหตุ	55.00 cd
พ่น F ไอโซเลท SEA120-28 + ปลูกเชื้อราสาเหตุ	58.33 c
ปลูกเชื้อราสาเหตุ + พ่น NF ไอโซเลท OMA60-7	43.00 e
ปลูกเชื้อราสาเหตุ + พ่น NF ไอโซเลท SEA60-34	41.03 e
ปลูกเชื้อราสาเหตุ + พ่น NF ไอโซเลท SEA120-28	46.00 de
ปลูกเชื้อราสาเหตุ + พ่น F ไอโซเลท OMA60-7	58.33 c
ปลูกเชื้อราสาเหตุ + พ่น F ไอโซเลท SEA60-34	60.00 c
ปลูกเชื้อราสาเหตุ + พ่น F ไอโซเลท SEA120-28	61.33 c
LSD (*p=0.01*)	9.32
CV (%)	9.56

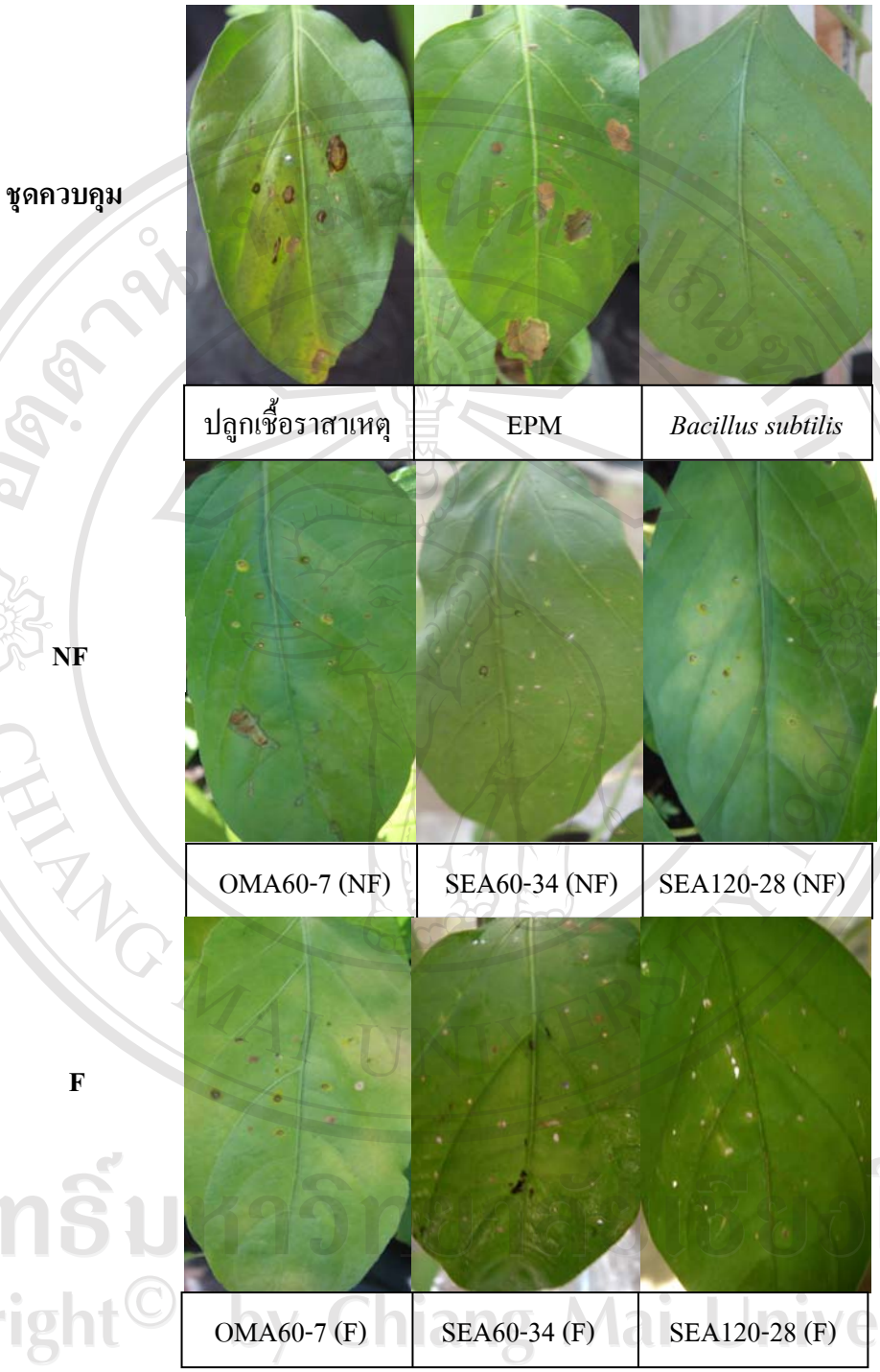
[1]ค่าเฉลี่ยคิดจากการทดลอง 3 ซ้ำ

[2]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ความเชื่อมั่น 99%

[4]EPM = enzyme production medium

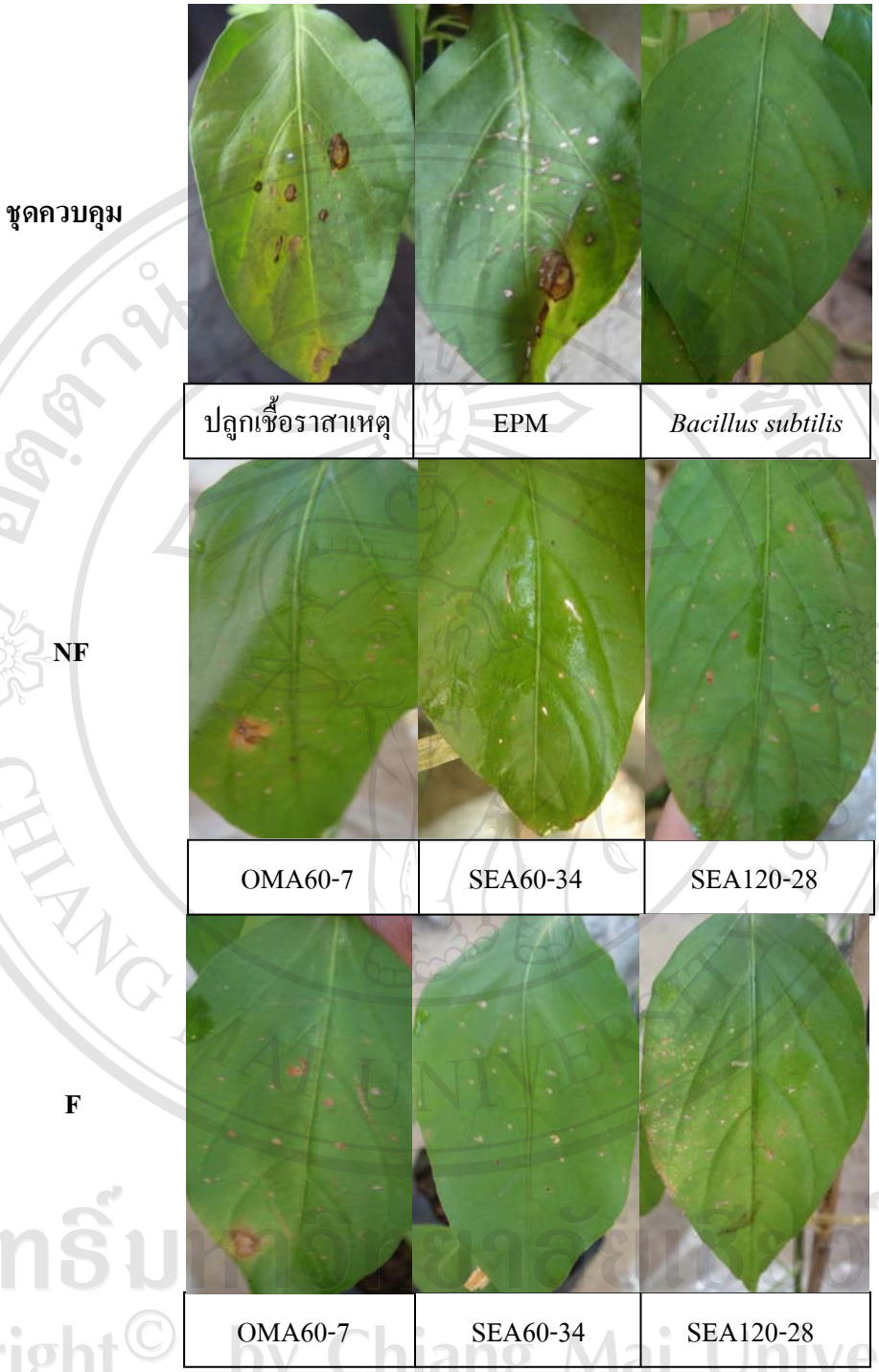
[3]*Bacillus subtilis* = ตามอัตราแนะนำ (1×10^9 CFU/g)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 30 อาการบนใบของต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 ก่อนปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg60 (highly resistant)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

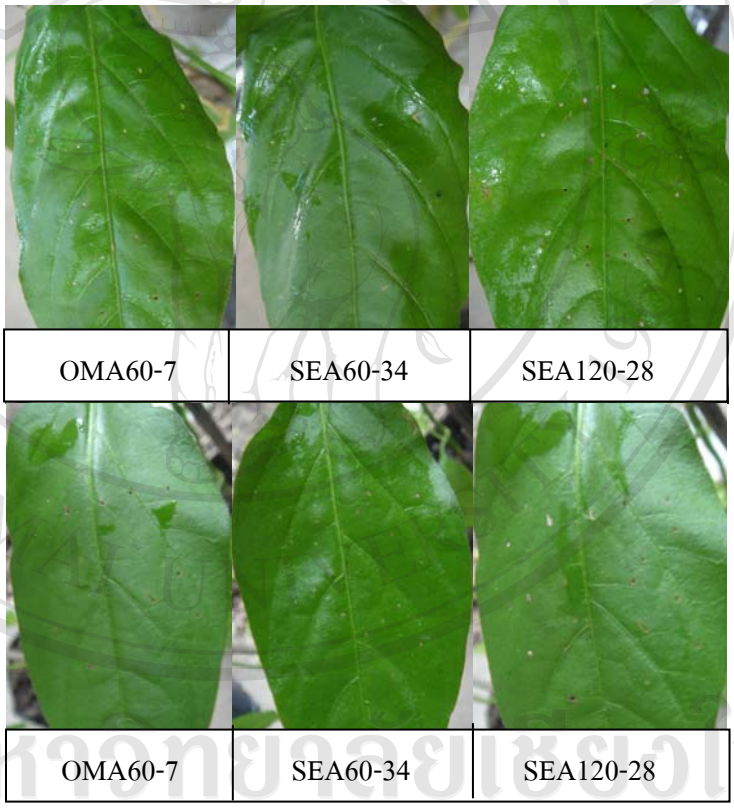


ภาพ 31 อาการบนใบของต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg60 (highly resistant) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2.3 การทดสอบการก่อให้เกิดโรคของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสกับต้นกล้าพริก ในสภาพโรงเรือน

ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) โดยฉีดพ่นอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, SEA60-34 และ SEA120-28 บนต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน พบว่าภายหลังจากฉีดพ่น NF และ F เป็นระยะเวลา 10 วัน ต้นกล้าพริกไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยอาหาร EPM (ภาพ 32)



ภาพ 32 อาการบนใบของต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ภายหลังฉีดพ่นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) เป็นเวลา 10 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved