บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

การสำรวจโรคของกุหลาบจากสวนกุหลาบบริเวณพื้นที่ราบ ต.ร้องวัวแดง อ.สันกำแพง จ.เชียงใหม่ และ อ.เมือง (สวนสาธารณะบวกหาด) จ.เชียงใหม่ และบริเวณพื้นที่สูง ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมีแนวโน้มที่จะเกิดการต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มของเบนซิมิดาโซล ซึ่งเป็นสารเคมีที่เกษตรกรมีการใช้อยู่จริง จึงได้ทำการศึกษาและเก็บตัวอย่างโรคมาตรวจสอบที่ห้องปฏิบัติการ พบเชื้อสาเหตุคือ *Colletotrichum gloeosporioides* อาการแสดงให้เห็นเป็นจุดแผลลักษณะค่อนข้างกลมเกิดขึ้นบนผิวใบ ระยะแรกแผลจะเป็นสีน้ำตาลแก่และจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ระยะต่อมาเนื้อเยื่อตรงกลางจุดจะตายและเปลี่ยนเป็นสีขาวหรือสีขี้เถ้า พบตุ่มสีดำขนาดเล็ก (fruiting body) กระจายอยู่ทั่วบริเวณจุดแผล รอบจุดอาจมีสีเหลืองหรือสีแดงล้อมรอบ และใบจะร่วงในที่สุด เมื่อตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยวิธี Free hand sectioning technique แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเชื้อราสร้างสปอร์ (spore) เซลล์เดียว สีใส ลักษณะหัวท้ายมน (cylindrical)

การทดสอบความสามารถของสารเคมีในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicides) ได้แก่สารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (คาร์เบนดาซิม บีโนมิล และไทโอฟาเนต เมทธิล) สารกลุ่มกลุ่มไตรอะโซล (ไซโปรโคนาโซล และเฮกซะโคนาโซล) และสารกลุ่มอะคริลามายด์ (เบนาแล็กซิล) และทดสอบความสามารถของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดสัมผัส (contact fungicides) ได้แก่ กลุ่มไดไทโอคาร์บาเมต (แมนโคเซ็บ) กลุ่มฟาโลไนไตร์ (คลอโรธาโรนิล) และกลุ่มอินออร์แกนิค (คอปเปอร์ ออกซีคลอไรด์) พบเชื้อราแสดงการต้านทานสูง (highly resistance) กับสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซลทุกชนิด จำนวน 3 ไอโซเลท คือ SC-020, SC-021 และ SC-038 เพราะถูกยับยั้งการเจริญได้เพียง 0-2.35% ที่ความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.01$ และพบว่าสารเคมีที่นำมาใช้ในการควบคุมเชื้อรากลุ่มไตรอะโซล (ไซโปรโคนาโซล) กลุ่มอะคริลามายด์ กลุ่มไดไทโอคาร์บาเมต กลุ่มฟาโลไนไตร์ และกลุ่มอินออร์แกนิค ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ มีเพียงแต่ลดการเจริญของเชื้อราให้ช้าลงเท่านั้น พบว่าการทดสอบสารเฮกซะโคนาโซล (กลุ่มไตรอะโซล) ที่อัตราแนะนำ 50 ppm สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดเท่ากับ 100% กับเชื้อราจำนวน 12 ไอโซเลท ที่ความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.01$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในกุหลาบจำนวนทั้งสิ้น 4 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท SC-017 (S) SC-020 (HR) SC-021 (HR) และ SC-038 (HR) ที่ได้ทำการทดสอบความอ่อนแอและต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนซิมิดาโซล แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ beta-tubulin (TBU2) gene ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ specific primers CTBF/CTBR ผลจากการทำ PCR จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 341 bp และนำผลผลิตจาก PCR ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสของ beta-tubulin (TBU2) gene

การศึกษาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ไอโซเลทที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าไอโซเลท SC-017 (S) มีความเหมือนกับบางส่วนของ beta-tubulin (TBU2) gene *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Accession No. U14138) ถึง 100% และไอโซเลท SC-020 (HR), SC-021 (HR) และ SC-038 (HR) เมื่อเปรียบเทียบกับ GenBank แล้วพบว่ามีความเหมือนกับบางส่วนของ beta-tubulin (TBU2) gene *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Accession No. U14138) ถึง 99% โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,286 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ adenine (A) เป็น cytosine (C) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโน codon 198 โดย glutamic acid (G<u>A</u>G) ถูกแทนที่ด้วย alanine (G<u>C</u>G) ดังนั้นสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกุหลาบ ไอโซเลท SC-020 (HR), SC-021 (HR) และ SC-038 ที่ต้านทานต่อสารเบนซิมิดาโซลเป็นเชื้อราที่เกิดการกลายพันธุ์เปลี่ยนเป็นเชื้อที่ต้านทานต่อสารเคมี โดยมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก adenine (A) เป็น cytosine (C) ที่ตำแหน่ง 1,286 เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโน codon 198 โดย glutamic acid (G<u>A</u>G) จะถูกแทนที่ด้วย alanine (G<u>C</u>G)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved