บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจโรคแอนแทรคโนสพริกหนุ่มในแปลงของเกษตรกร อ.สันทราย อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ และจากตลาดต่างๆ พบโรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญของพริก มักจะเกิดโรคก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งทำลายผลผลิตเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมีแนวโน้มที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดดูดซึม (systemic fungicide) และจัดอยู่ในกลุ่มเบนซิมิดาโซล ซึ่งเป็นสารกำจัดเชื้อราที่เกษตรกรนิยมใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกรที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในเขต อ. สันทราย อ. แม่ริม และจากตลาด มาแยกเชื้อราสาเหตุภายในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถแยกเชื้อราสาเหตุได้จำนวน 100 ไอโซเลท และเมื่อจัดจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยา โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) สามารถจำแนกเชื้อราออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 73 ไอโซเลท และ *Colletotrichum capsici* จำนวน 27 ไอโซเลท

เมื่อนำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จำนวน 100 ไอโซเลท มาทดสอบระดับความต้านทานบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบเชื้อราสาเหตุมีระดับความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่แตกต่างกันดังนี้ เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับสูง (highly resistant: HR; $\geq$ 500 µg/ml) จำนวน 43 ไอโซเลท เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับปานกลาง (moderately resistant: MR; $\leq$ 100 µg/ml) จำนวน 5 ไอโซเลท เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราได้เล็กน้อย (weakly resistant: WR; $\leq$ 10 µg/ml) จำนวน 3 ไอโซเลท และเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อรา (sensitive;$\leq$ 1 mg/l) จำนวน 44 ไอโซเลท และเมื่อคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจำนวน 21 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็น HR 15 ไอโซเลท WR 2 ไอโซเลท MR 1 ไอโซเลท และS 3 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณบางส่วนของยีน beta-tubulin (*TUB2*) ด้วยเทคนิค Nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ในการเพิ่มปริมาณคือ TB2L/TB2R และ ไพรเมอร์ CTBF/CTBR จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณบางส่วนของยีน beta-tubulin (*TUB2*) พบเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งต่างๆ และการเปลี่ยนแปลงของลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นิวคลีโอไทด์ดังกล่าว ส่งผลให้กรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลงดังนี้ เชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อรา (S) และเชื้อราที่ต้านทานสารกำจัดเชื้อราได้เล็กน้อย (WR) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน แต่พบเชื้อราสายพันธุ์ WR ไอโซเลท Cc9 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 225 เปลี่ยนจาก leucine (C**T**G) เป็น proline (C**C**G) และ 243 เปลี่ยนจาก proline (C**C**G) เป็น leucine (C**T**G) เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับปานกลาง (MR) ไอโซเลท Cg46 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 162 เปลี่ยนจาก methionine (GC**A**) เป็น valine (GC**G**) ส่วนเชื้อราที่ต้านทานสารกำจัดเชื้อราได้เล็กน้อย (WR) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน แต่พบเชื้อราสายพันธุ์ WR ไอโซเลท Cc9 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 225 เปลี่ยนจาก leucine (C**T**G) เป็น proline (C**C**G) และ 243 เปลี่ยนจาก proline (C**C**G) เป็น leucine (C**T**G) เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับปานกลาง (MR) ไอโซเลท Cg46 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 162 เปลี่ยนจาก methionine (GC**A**) เป็น valine (GC**G**) ส่วนเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับสูง (HR) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 โดยเปลี่ยนจาก glutamic acid (G**A**G) เป็น alanine (G**C**G) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 200 ซึ่งตำแหน่ง codon 198 และ 200 ถ้าเกิดมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่งนี้ จะส่งผลให้เชื้อราเกิดการต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีเชื้อราสายพันธุ์ HR บางไอโซเลท ที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 198 และ 200 ได้แก่ไอโซเลท Cg75 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ codon 241 เปลี่ยนจาก arginine (G**C**G) เป็น cysteine (G**T**G) และ codon 257 เปลี่ยนจาก methionine (CA**T**) เป็น threonine (CA**C**) ไอโซเลท CF78 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 164 เปลี่ยนจาก alanine (**G**CC) เป็น threonine (**A**CC) ส่วนเชื้อราไอโซเลท Cg22, Cg28, Cg40 และ Cg44 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในช่วงบางส่วนของ beta-tubulin gene (*TUB2*) (ตาราง 12, ภาพ 18)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกมีแนวโน้มที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแนวทางในการควบคุมเชื้อราสาเหตุให้ลดระดับความต้านทานต่อสารเคมี คือการควบคุมโดยชีววิธี ควบคู่กับการใช้สารเคมีในการควบคุม ซึ่งเชื้อแอคติโนมัยซีสเป็นแนวทางหนึ่งที่นำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุ เนื่องจากเชื้อแอคติโนมัยซีสสามารถผลิตสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ จากการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-28 และ SEA120-38 (เชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส) ในการยับยั้งการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เจริญเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ CF24 (S), CF49 (WR), CF11 (MR), CF53 และ CF60 (HR) พบเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ดีคือ SEA60-34, OMA60-7 และ SEA120-28 ตามลำดับ โดยพบว่าเชื้อแอคติมัยซีส SEA60-34 (NF) มีประสิทธิภาพในการยับยังเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 53.33-75.0% โดยเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* (ตามอัตราแนะนำ) ส่วน F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ไม่ดีเท่ากับ NF โดยพบ F ไอโซเลท OMA60-7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด อยู่ในช่วง 38.33-55.0% รองลงมาคือ SEA60-34 และ SEA120-38 (ตาราง 13, ภาพ 17)

เมื่อศึกษาถึงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีส OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 ที่เจริญบนอาหาร Inhibitory Mold Agar-(2IMA-2) พบเชื้อแอคติโนมัยซีสมีลักษณะโคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้ง โคโลนีโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย (convex) บางโคโลนีแบนราบติดกับอาหาร (flast) ไม่พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสมีการสร้างรงควัตถุ (pigment) เมื่อนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบเชื้อแอคติโนมัยซีส ไอโซเลท OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 มีการสร้างเส้นใย แต่ไม่สร้างสปอร์ ส่วนไอโซเลท SEA120-28 และ SEA120-38 พบมีการสร้างเส้นใย และสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายลูกปัดต่อกันเป็นโซ่ซึ่งคล้ายกับลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสในกลุ่ม *Streptomyces* sp. เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มาทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารในผนังเซลล์ DAP พบเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มี DAP ชนิด *LL* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. และเมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอและทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบเชื้อแอคติโนมัยซีสจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* sp. นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่คัดเลือกมาจาก GeneBank ในช่วง 90.21-95.28% ซึ่งน้อยกว่า 97% และถ้ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงต่ำกว่า 97% จะจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

จากการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 3 ไอโซเลทได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ดีภายในห้องปฏิบัติการมาทดสอบกับเมล็ดพริกหนุ่มพันธุ์การค้า และพันธุ์พื้นเมือง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F ไม่ส่งผลให้เมล็ดมีการงอกที่ผิดปกติ และไม่ได้กระตุ้นการงอกของเมล็ดให้เจริญเร็วกว่าชุดควบคุม ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม 3 ชนิด ได้แก่ แช่ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส EPM และแช่ในเชื้อแบคทีเรีย *B. subtillis* (ตามอัตราแนะนำ) เมื่อนำเมล็ดพริกทั้งสองชนิดที่ผ่านการแช่ด้วย NF

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และ F มาปลูก พบต้นกล้ามีความแข็งแรง และสมบูรณ์เมื่อเทียบกับชุดควบคุม 3 ชนิด ได้แก่ เมล็ดที่ผ่านการแช่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว แช่อาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส EPM และแช่ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtillis* (ตามอัตราแนะนำ) โดยต้นกล้าพริกที่เจริญไม่มีความแตกต่างกัน จากนั้นจึงปลูกเชื้อราสาเหตุ ไอโซเลท Cg60 (HR) บนต้นกล้าพริกหนุ่มพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า พบว่าเมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า ที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงกว่า เมล็ดที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF ซึ่งเมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมืองที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติมัยซีสชนิด F และ NF มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 86.9-88.1% และ 76.7-83.6% ตามลำดับ สำหรับเมล็ดพริกพันธุ์การค้าที่แช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F และ NF มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 82.7-87.5% และ 63.9-75.0% ตามลำดับ (ตาราง 21, ภาพ 29A และ 29B) นอกจากนี้เมล็ดพริกทั้งสองพันธุ์ที่ผ่านการแช่ใน NF ไอโซเลท SEA60-34 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไม่แตกต่างจากการแช่เมล็ดในเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* (ตามอัตราแนะนำ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ซึ่งการแช่เมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมืองในเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* และ NF ไอโซเลท SEA60-34 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 77.7 และ 76.7% ตามลำดับ ส่วนการแช่เมล็ดพริกพันธุ์การค้าใน *B. subtilis* (ตามอัตราแนะนำ) และ NF ไอโซเลท SEA60-34 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 69.5 และ 63.9% ตามลำดับ (ตาราง 21, ภาพ 29A และ 29B)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F กับต้นกล้าพริกหนุ่มพันธุ์การค้า โดยฉีดพ่น NF และ F 2วิธีการ ได้แก่ การฉีดพ่นก่อน และหลังการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Cg60 (HR) พบว่ากรณีการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคได้ดีกว่าการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด F โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคดังนี้ การฉีดพ่นด้วย 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) ทั้ง 2 วิธี ได้แก่ การฉีดพ่นก่อน และหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 44.7% และ 45.3% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ส่วนการฉีดพ่นด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารเลี้ยงเชื้อแอคติมัยซีสชนิด F มีความแตกต่างกับการฉีดพ่นด้วย *B. subtilis* (ตามอัตราแนะนำ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (ตาราง 22, ภาพ 30 และ 31) และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7 SEA120-34 และ SEA120-28 มาทดสอบความสามารถในการทำให้ต้นกล้าเกิดโรค กับต้นกล้าพริกหนุ่มพันธุ์การค้า พบเชื้อแอคติโนมัยซีสทัง 3 ไอโซเลท ไม่ก่อให้เกิดโรคกับต้นพริก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved