บทที่ 4
ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> : การทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

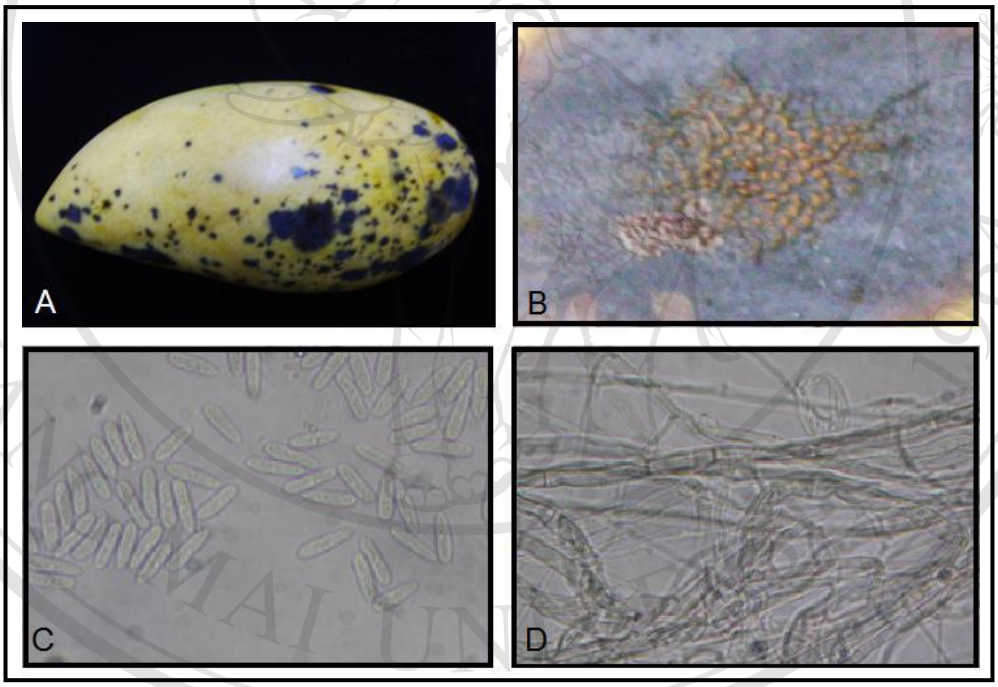
1.1 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง

จากการเก็บตัวอย่างใบและผลมะม่วงทั้งหมด 17 พันธุ์ (ตาราง 12) ที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ สวน และตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน นครนายก และพิษณุโลก นำมาตรวจภายใต้กล้อง stereo microscope พบว่าแผลมีลักษณะเป็นจุดสีดำขนาดใหญ่ รูปร่างกลมจนถึงรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดแตกต่างกันไป (ภาพ 24A) และบางแผลจะมีกลุ่มของโคนิเดียลักษณะเป็นหยดสีส้ม (spore mass) อยู่บนแผล (ภาพ 24B) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting method สามารถแยกเชื้อราสาเหตุได้ทั้งหมด 150 ไอโซเลท โดยแยกได้จากใบ 46 ไอโซเลท จากมะม่วง 16 สายพันธุ์ และจากผล 104 ไอโซเลท จากมะม่วง 8 สายพันธุ์ (ภาคผนวก ค) เมื่อบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จะเริ่มปรากฏเส้นใยเชื้อราเจริญบนผิวหน้าอาหาร PDA และเส้นใยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 - 10 วัน ซึ่งสามารถแบ่งโคโลนีออกได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ สีขาว (83.33 เปอร์เซนต์) สีเทาขาว (12 เปอร์เซนต์) และสีเทาเข้มจนถึงดำ (4.67 เปอร์เซนต์) เมื่อระยะเวลานานขึ้นโคโลนีในกลุ่มสีขาวจะมีสีเข้มขึ้นจนกลายเป็นสีเทา บางไอโซเลทจะสร้าง spore mass สีส้มตรงกลางโคโลนี และพบว่าเมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นเชื้อจะสร้างเม็ดสเคลอโรเตียสีดำรอบๆ โคโลนี (ภาพ 25)

เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรานี้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบโคนิเดียของเชื้อรามีเซลล์เดียว รูปไข่ หัวท้ายมน (cylindrical) ลักษณะใส ไม่มีสี มีขนาดอยู่ในช่วง 16.46-18.65 × 3.94-4.47 ไมโครเมตร (ภาพ 24C) สอดคล้องกับการรายงานของ Sutton (1992) กล่าวว่า ลักษณะทั่วไปของเชื้อรา *C. gloeosporioides* คือ สร้างเส้นใยฝังอยู่ในผิวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลแก่ แตกกิ่งก้าน มีผนังกั้นโคนิเดียม เกิดบนก้านโคนิดิโอฟอร์ เชื้อจะสร้างโคนิเดียมเดี่ยวๆ ไม่มีสี เซลล์เดียว ผนังบาง เรียบ ลักษณะรูปร่างรูปไข่ หรือยาวรี ตรงหรือโค้งงอ อาจจะมี guttule ลักษณะคล้ายฟองอากาศอยู่ภายใน และจากลักษณะดังกล่าว รวมถึงการจัดจำแนกด้วยวิธี Polymerace Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง ได้แก่ CgInt และ ITS4 เพิ่มปริมาณยีนในส่วน ITS rDNA แล้วได้ผลผลิตขนาด 450 คู่เบส (ภาพ 29) ทำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทราบแน่ชัดว่าเชื้อราสาเหตุที่แยกได้ คือเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ตามหลักเกณฑ์การจำแนกของ Sutton (1992) สอดคล้องกับรายงานของ Bailey and Jeger (1992) รายงานไว้ว่าโรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของมะม่วง เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งเข้าทำลายในส่วนต่างๆ ของมะม่วง และสามารถเกิดขึ้นได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของมะม่วง และเมื่อเขี่ยเส้นใยของเชื้อราไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบเส้นใยใส ไม่มีสี และมีผนังกั้น (ภาพ 24D) นอกจากนี้ พบว่าโคนิเดียของเชื้อรามีลักษณะเหมือนกันกับที่ตรวจพบบนส่วนของพืชที่เป็นโรค คือ รูปไข่ หัวท้ายมน เซลล์เดียว ใส ไม่มีสี



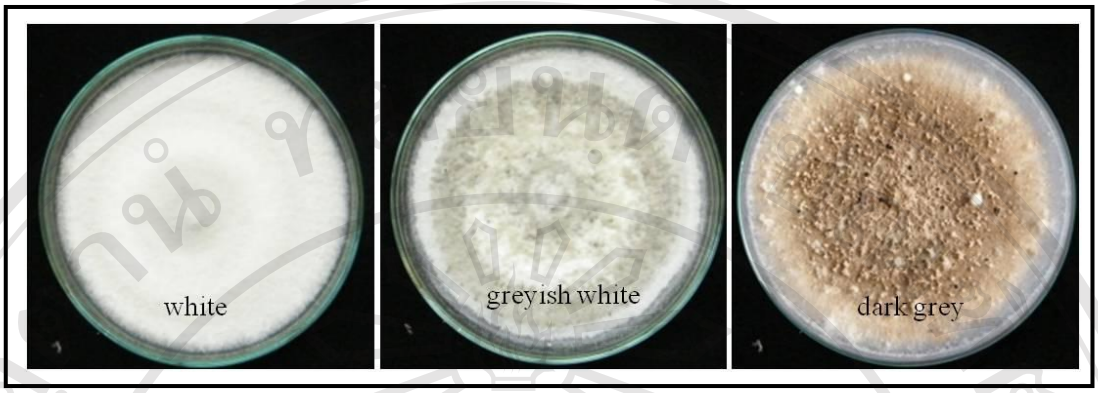
ภาพ 24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง; A: ลักษณะแผลบนผลมะม่วง, B: กลุ่มโคนิเดียสีส้มบนผลมะม่วง, C: โคนิเดีย (40X) และ D: เส้นใย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 12 เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้

สายพันธุ์	ชื่อย่อ	จำนวนเชื้อราที่แยกได้ (ไอโซเลท)	
		บริเวณที่แยก	
		ใบ	ผล
เจ้าคุณทิพย์	CKT	1	-
โชคอนันต์	CAN	4	19
ฟ้าลั่น	FL	2	2
แก้ว	K	3	5
เขียวมรกต	KMK	5	7
เขียวเสวย	KSW	4	-
ลิ้นงูเห่า	LNH	1	-
มหาชนก	MCN	9	-
มันขุนศรี	MKS	2	-
น้ำดอกไม้	NDM	6	53
นารีลืมรัง	NLR	2	-
อกร่อง	OR	1	1
พิมเสน	PS	2	4
แรด	R	1	-
ศาลายา	SLY	1	-
ตลับนาค	TLN	2	-
เพชรบ้านลาด	PBL	-	13
รวม		46	104

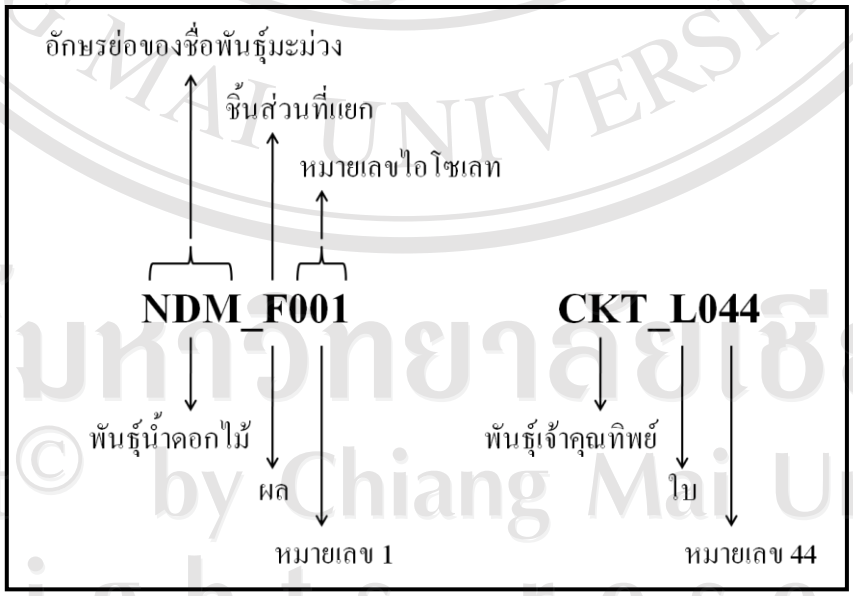
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 25 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) อายุ 10 วัน

การตั้งชื่อเชื้อรา

ตั้งชื่อเชื้อราโดยใช้อักษรย่อตามชื่อพันธุ์มะม่วงที่แยกมาได้ ดังนี้ เจ้าคุณทิพย์ (CKT), โชคอนันต์ (CAN), ฟ้าลั่น (FL), แก้ว (K), เขียวมรกต (KMK), เขียวเสวย (KSW), ลิ้นงูเห่า (LNH), มหาชนก (MCN), มันขุนศรี (MKS), นำดอกไม้ (NDM), นารีลืมรัง (NLR), อกร่อง (OR), เพชรบ้านลาด (PBL), พิมเสน (PS), แรด (R), ศาลายา (SLY) และ ตลับนาค (TLN) ตามด้วยส่วนที่เป็นโรค คือ ผล (F) หรือ ใบ (L) และลำดับไอโซเลท (1, 2, 3 ถึง 150) (ภาพ 26)



ภาพ 26 อักษรย่อแสดงการตั้งชื่อเชื้อรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนผลมะม่วง (Pathogenisity test)

จากการพิสูจน์เชื้อราสาเหตุของโรคด้วยการปลูกเชื้อบนผลม่วง โดยใช้มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สุกที่ปราศจากโรคและแมลง สุ่มเชื้อสาเหตุของโรคทั้งสายพันธุ์ highly resistance (HR) moderately resistance (MR) และ sensitive (S) มาทั้งหมด 58 ไอโซเลท (ตาราง 13) แล้วปลูกเชื้อบนผลมะม่วงโดยทำแผลที่ผิวมะม่วงแล้ววางชิ้นเชื้อ (culture disc) ผลละ 6 ชิ้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ อาหาร PDA นำไปเก็บไว้ในกล่องชื้น (moist chamber) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสังเกตอาการของโรค พบว่าเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 58 ไอโซเลท สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งบนใบและบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ได้ปลูกเชื้อลงไป ภายหลังจากบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 วัน พบว่าจะเริ่มปรากฏแผลที่มีสีน้ำตาล ซึ่งเป็นลักษณะปรากฏโดยทั่วไปบนพืชที่เป็นโรคแอนแทรคโนส และหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน พบว่าแผลมีสีเข้มขึ้นจนเกือบดำ แผ่ออกเป็นรูปวงกลม เกิดอาการตายของเซลล์ (necrotic) และไหม้ (ภาพ 27) ซึ่งแผลที่ปรากฏบนใบนั้นก็มีลักษณะเช่นเดียวกับแผลที่เกิดบนผลมะม่วง ส่วนในชุดควบคุม ไม่ปรากฏแผลหรือลักษณะอาการของโรคใดๆ (ภาพ 28)

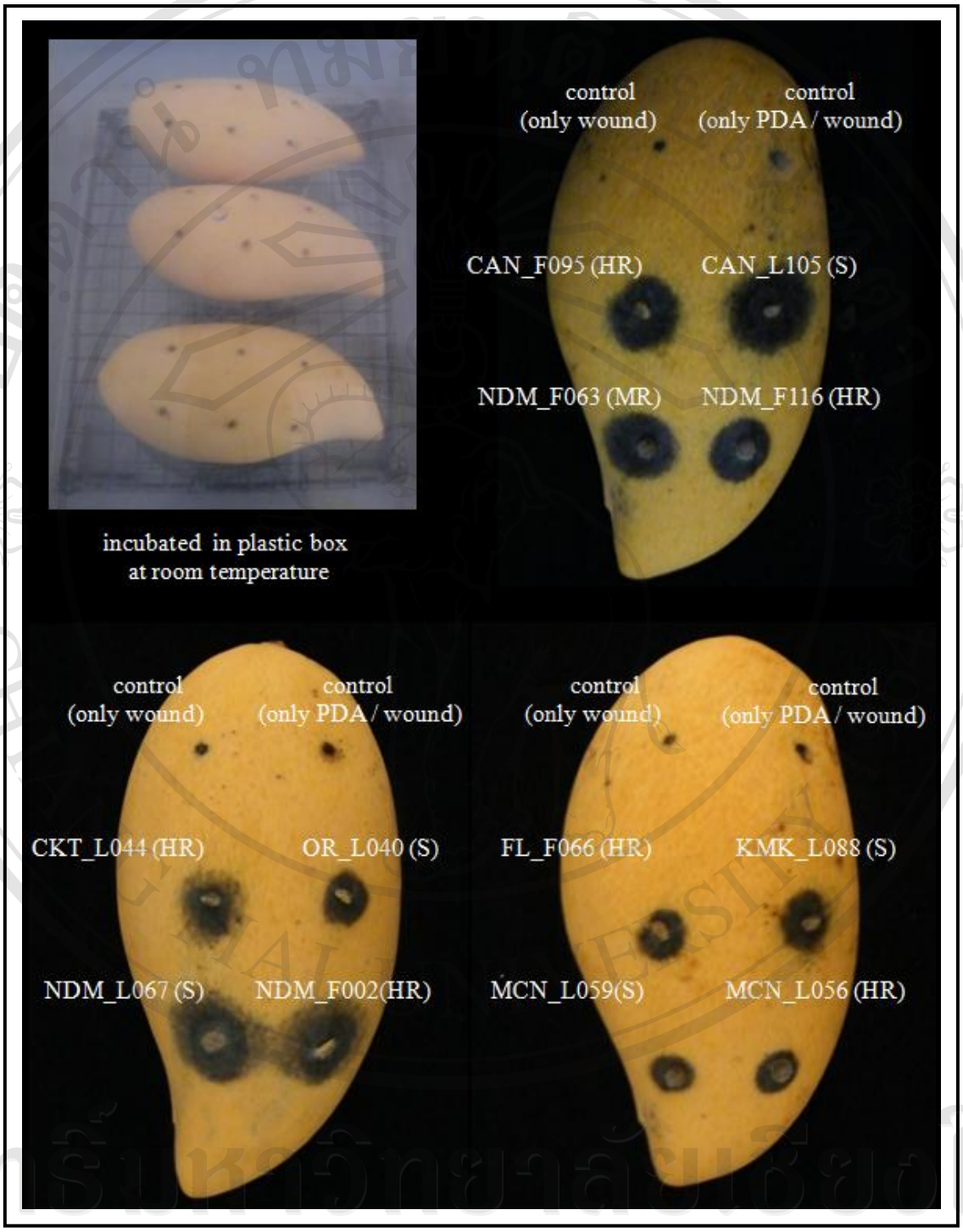
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 13 เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

พันธุ์	ระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม[1/]		
	HR	**MR**	**S**
1. เจ้าคุณทิพย์ (CKT)	CKT_L044	-	-
2. โชคอนันต์ (CAN)	CAN_F095 CAN_F146	-	CAN_F125 CAN_L080 CAN_L105
3. ฟ้าลั่น (FL)	FL_F066	-	FL_F003 FL_L079
4. แก้ว (K)	K_F103	-	K_L120
5. เขียวเสวย (KSW)	KSW_L085	-	KSW_L062
6. เขียวมรกต (KMK)	KMK_F135 KMK_L058	-	KMK_L088
7. ลิ้นงูเห่า (LNG)	-	-	LNG_L031
8. มหาชนก (MCN)	MCN_L056	-	MCN_L059 MCN_L070 MCN_L121
9. มันขุนศรี (MKS)	-	-	MKS_L086
10. น้ำดอกไม้ (NDM)	NDM_F002 NDM_F012 NDM_F014 NDM_F018 NDM_F026 NDM_F027 NDM_F038 NDM_F061 NDM_F106 NDM_F110 NDM_F116 NDM_F130 NDM_L078	NDM_F063	NDM_F006 NDM_F118 NDM_L057 NDM_L067 NDM_L068 NDM_L071 NDM_L096
11. นารีลืมรัง (NLR)	NLR_L047	-	NLR_L048
12. อกร่อง (OR)	OR_F126	-	OR_L040
13. เพชรบ้านลาด (PBL)	PBL_F033 PBL_F076 PBL_F131	-	PBL_F102
14. พิมเสน (PS)	PS_F114 PS_L082	-	PS_L032
15. แรด (R)	-	-	R_L087
16. ศาลายา (SLY)	-	-	SLY_L017
17. ตลับนาค (TLN)	TLN_L065	-	TLN_L060

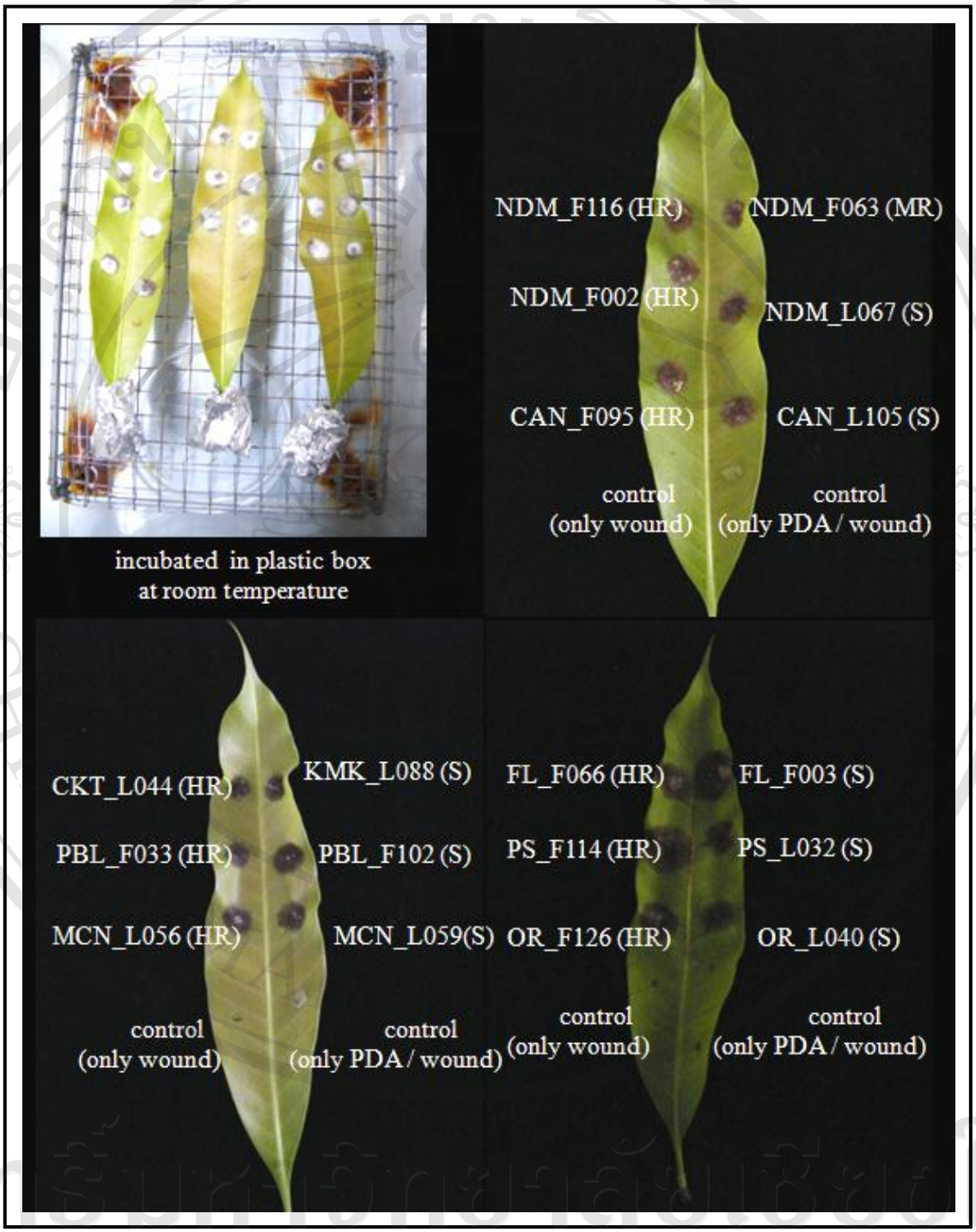
[1/]ระดับความต้านทาน; highly resistant (HR), moderately resistant (MR), sensitive (S): $\geq$ 500 µg/ml, $\leq$ 100 µg/ml, $\leq$ 1 µg/ml ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 27 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังจากปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเวลา 4 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

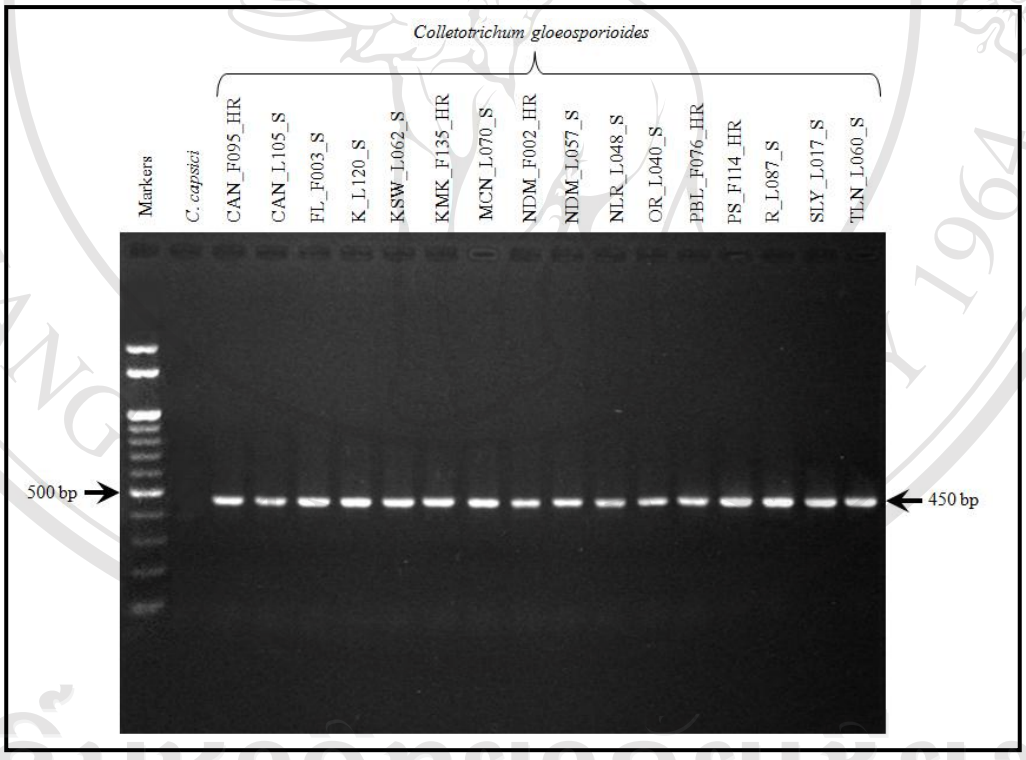


ภาพ 28 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดบนใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังจากปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเวลา 4 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยเทคนิค Polymerace Chain Reaction (PCR)

จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค 58 ไอโซเลท และเชื้อรา *C. capsici* ซึ่งเป็นชุดควบคุม โดยใช้ชุสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant Kit ร่วมกับไนโตรเจนเหลว แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* CgInt forward (5'-GGC CTC CCG CCC CCG GGCGC-3') และ ITS4 reverse (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAGGA-3') (White *et al*., 1990; Mills *et al*., 1992; Freeman *et al*., 2000)พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ทั้ง 58 ไอโซเลท โดยให้ผลผลิต PCR ขนาด 450 คู่เบส ในขณะที่ชุดควบคุมคือ ดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. capsici* ไม่พบผลผลิต PCR (ภาพ 29) ทำให้ทราบแน่ชัดว่าเชื้อราสาเหตุที่แยกได้ คือเชื้อรา *C. gloeosporioides*



ภาพ 29 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนตรงตำแหน่ง ITS ที่เฉพาะเจาะจงต่อการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงด้วยวิธี Polymerace Chain Reaction (PCR) โดยใช้ species-specific primer (CgInt และ ITS4) และใช้ 100-bp ladder เป็น marker ลูกศรด้านซ้ายชี้ตำแหน่งของ DNA ขนาด 500 คู่เบส และลูกศรด้านขวาแสดงแถบ DNA ของเชื้อราขนาด 450 คู่เบส (group-specific band)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 การประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

จากการประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 150 ไอโซเลท ต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม 6 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงเชื้อราจาก stock culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) จำนวน 112 ไอโซเลท (74.7 เปอร์เซนต์) ซึ่งได้จากการแยกเชื้อจากใบ 18 ไอโซเลท (12 เปอร์เซนต์) และผล 94 ไอโซเลท (62.7 เปอร์เซนต์) และระดับอ่อนแอ (S) 37 ไอโซเลท (24.7 เปอร์เซนต์) ซึ่งได้จากการแยกเชื้อจากใบ 28 ไอโซเลท (18.7 เปอร์เซนต์) และผล 9 ไอโซเลท (6 เปอร์เซนต์) ส่วนเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับปานกลาง (MR) มีเพียง 1 ไอโซเลท (0.6 เปอร์เซนต์) ซึ่งแยกได้จากผล (ตาราง 14) โดยในการทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อราที่ต้านทานระดับต่ำ (WR) (ภาพ 30) จากจำนวนเชื้อราที่ได้ทดสอบระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเห็นได้ว่า ส่วนมากเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้จากบริเวณใบจะอ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ในขณะที่เชื้อราที่แยกได้จากบริเวณผลจะมีความสามารถในการต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้มากกว่า แสดงให้เห็นว่าในการป้องกันกำจัดโรคที่บริเวณผลมีแนวโน้มที่จะใช้สารเคมีกำจัดได้ยาก และในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะใช้วิธีทางชีวภาพเข้ามาช่วยในการควบคุมโรคต่อไป และเมื่อตรวจสอบเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ S, MR และ HR ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรามีลักษณะโคโลนีปกติเช่นเดียวกับเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ แต่เมื่อนำปลายเส้นใยมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบเส้นใยของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการเจริญที่ผิดปกติจากเส้นใยที่เลี้ยงเฉพาะบนอาหาร PDA คือ มีการเจริญน้อยลง ปลายเส้นใยหงิกงอ และเส้นใยลีบ (ภาพ 31) สอดคล้องกับการศึกษาของกรองจิต (2530) เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยกล้องจุลทรรศน์-อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่าเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* sp. มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น บวมพอง โป่งกลม เรียงต่อกันเป็นข้อๆ เส้นใยจะเหี่ยวและเป็นร่องไปตามยาวเรียงอัดตัวกันแน่น และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope พบว่าเชื้อราสร้างสปอร์ผิดปกติไป เช่น รูปร่างเล็กและผอมลง หรือรูปร่างอ้วน และยาวขึ้น หรือหงิกงอ และจากการค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่าสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็นสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) ประเภทดูดซึม ซึ่งสอดคล้องกับธรรมศักดิ์ (2539) ได้รายงานว่า เชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดเกิดความทนทานต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล เมื่อมีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ซึ่งจะทำให้เชื้อกลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ และทนทานต่อสารกำจัดเชื้อราชนิดนั้นๆ ทำให้ไม่สามารถใช้สารกำจัดเชื้อราชนิดนั้นได้ผลอีกต่อไป โดยส่วนมากการเกิดความต้านทานในกลุ่มเบนซิมิดาโซลจะเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน beta-tubulin ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งจับของสารเบนซิมิดาโซล (benzimidazole binding site) (Ma and Michailides, 2005) การที่สารเบนซิมิดาโซลเข้าไปจับกับ beta-tubulin ของเชื้อราอย่างจำเพาะเจาะจง จะส่งผลรบกวนการทำงานของ microtubule โดยจะเข้าไปจับกับ heterodimeric subunit ของ tubulin molecule ซึ่งพบว่าการต้านทานสารเบนซิมิดาโซลของเชื้อรานั้น สารนี้จะไม่สามารถจับ หรือจับกับ heterodimeric subunit ของ tubulin molecule ได้น้อยลง (Davidse, 1986) ซึ่งมีผลทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชเกิดความต้านทานต่อสารนี้ โดยส่วนมากการเกิดความต้านทานเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) (Seiler, 1975) ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดในตำแหน่ง codon ต่างๆ การกลายพันธุ์ที่กล่าวมาเป็นการกลายพันธุ์ในระดับยีน (gene mutation) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเบส (A, T, C และ G) ในยีน โดยอาจเปลี่ยนที่ชนิดของเบส หรือลำดับของเบส ทำให้ยีนเปลี่ยนไป มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในสารพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ที่สร้างขึ้น โปรตีนที่สร้างขึ้นมานั้นเปลี่ยนสมบัติทางเคมีไปจากเดิม หรือหมดสภาพไป การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเรียกว่า point mutation มีผลทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนไปจากเดิม การกลายพันธุ์ในลักษณะนี้เป็นแบบการแทนที่คู่เบส (base-pair substitution) เกิดจากการมีเบสใดเบสหนึ่งในดีเอ็นเอปกติถูกแทนที่ด้วยเบสอีกชนิดหนึ่ง จึงทำให้ลำดับการเรียงตัวของเบสในดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป ทำให้มีลำดับการเรียงตัวของเบสใน codon เปลี่ยนไป โปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นก็จะเปลี่ยนแปลงไปด้วย การกลายพันธุ์ลักษณะนี้เรียกว่า substitution mutation (Cole *et al*., 1991; วรรณา และคณะ, 2548) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยตามประเภทของเบสที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น 2 รูปแบบ คือ transversion และ transition โดยที่การเปลี่ยนแปลงแบบ transversion เป็นการแทนที่กันของเบสจากเบส purine เปลี่ยนเป็น pyrimidine หรือจาก pyrimidine เปลี่ยนเป็น purine (Zhao and Winkler, 2000; Kino and Sugiyama, 2001) ส่วนการเปลี่ยนแปลงแบบ transition เป็นการที่เบสตัวเดิมและเบสตัวใหม่แทนที่กันเป็นประเภทเดียวกัน คือ การเปลี่ยนเบสจาก purine ไปเป็น purine เช่น ตำแหน่งเดิมที่เคยเป็น adenine (A) ถูกแทนที่ด้วย guanine (G) หรือการเปลี่ยนเบสจาก pyrimidine ไปเป็น pyrimidine เช่น ตำแหน่งที่เบสเป็น thymine (T) ถูกแทนที่ด้วย cytosine (C) (Itsukaichi *et al*., 2003) ด้วยเหตุนี้จึงควรมีการควบคุมโรคโดยชีววิธีร่วมกับการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืช โดยชีววิธีเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ หรือการนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมาใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (นิพนธ์, 2538) ซึ่งการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสจากดินในการควบคุมโรคพืชก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ เนื่องจากเชื้อ

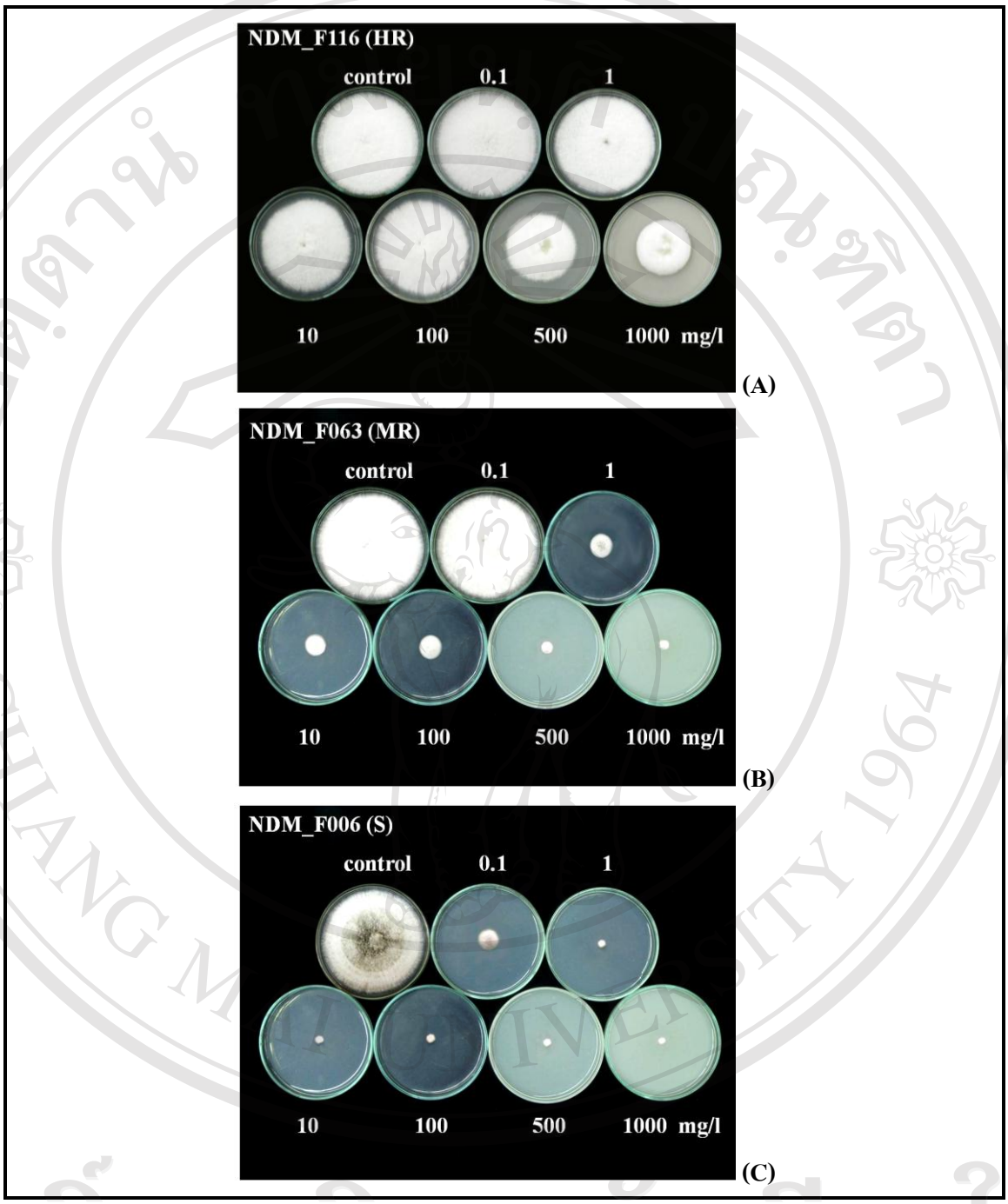
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอกติโนไมซีสเป็นจุลินทรีย์ในดินที่มีคุณสมบัติหลายประการ คือ การย่อยสลายอินทรียวัตถุ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ มีความสามารถในการนำไปควบคุมศัตรูพืช และมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ (มาลินี, 2540) ซึ่งจากคุณสมบัติเหล่านี้ ทำให้เชื้อแอกติโนไมซีสเป็นที่น่าสนใจในการนำมาควบคุมโรคพืช เพราะนอกจากเชื้อแอคคิโนมัยซีสจะมีคุณสมบัติในการควบคุมศัตรูพืชแล้วโดยการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เพื่อทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราแล้ว ยังช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืช และยังเป็นการช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในช่วงหลังการเก็บเกี่ยวอีกด้วย

ตาราง 14 เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

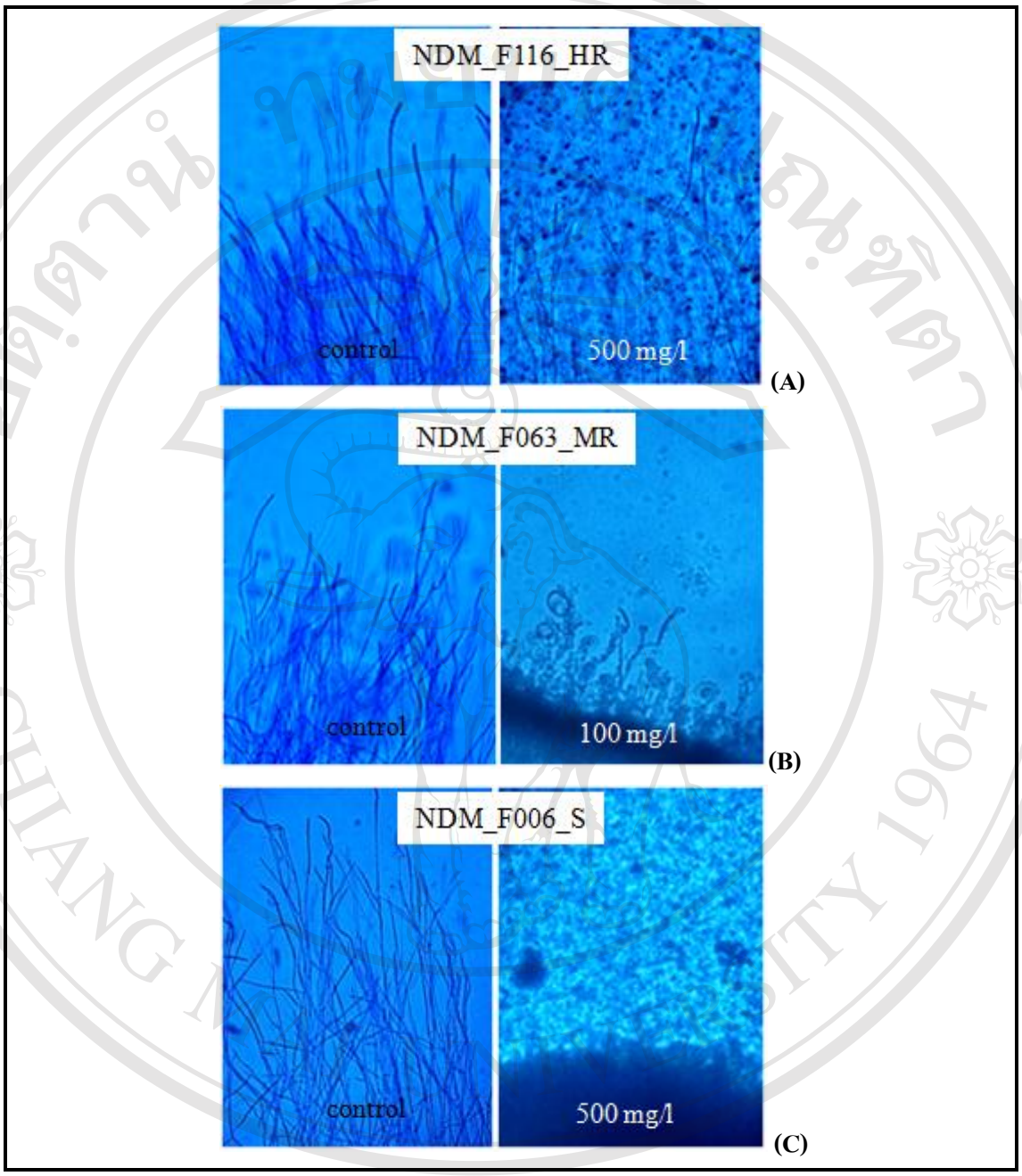
ระดับความต้านทานของเชื้อรา	ความเข้มข้นของสารคาร์เบนดาซิม (µg/ml)	จำนวนเชื้อรา (ไอโซเลท)	
		บริเวณที่แยก	
		ใบ	ผล
sensitive (S)	0-1	28	9
weakly resistance (WR)	0-10	-	-
moderately resistance (MR)	0-100	-	1
highly resistance (HR)	0-1000	18	54
รวม		**46**	**104**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 30 การทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน; A: highly resistant (HR), B: moderately resistant (MR) และ C: sensitive (S)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



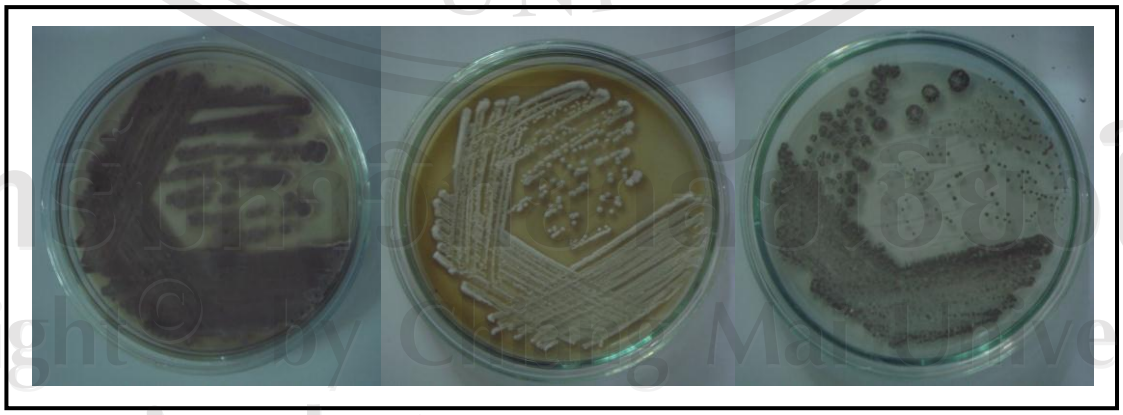
ภาพ 31 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า; A: highly resistant (HR) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร, B: moderately resistant (MR) ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ C: sensitive (S) ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การทดลองที่ 2</u> : การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง และการจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีส

2.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสจากดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณต่างๆ ได้แก่ เขตป่า ณ อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จำนวน 10 ตัวอย่าง น้ำตกห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จำนวน 3 ตัวอย่าง น้ำตกวังบัวบาน อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จำนวน 1 ตัวอย่าง อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่ จำนวน 1 ตัวอย่าง อ.แม่ลาน้อย จ.แม่ฮ่องสอน จำนวน 1 ตัวอย่าง และ อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน จำนวน 1 ตัวอย่าง (ตาราง 15) นำตัวอย่างดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วมาโรยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ soil extract agar (SEA) พบว่าเริ่มเกิดโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีส ซึ่งมีลักษณะเป็นจุดผลแป้งสีขาวเล็กๆ ในวันที่ 3 จากนั้นสุ่มเก็บโคโลนีโดยใช้ไม้จิ้มฟันฆ่าเชื้อแตะมาขีดลงบนผิวหน้าอาหาร 2 ชนิด คือ casein starch agar (CSA) และ yeast starch agar (YSA) ที่แบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในอาหาร 500 มิลลิกรัมต่อลิตร (อัตราแนะนำ) และชุดที่สองไม่ผสมสารใดๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่าสามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสได้ทั้งหมด 72 ไอโซเลท และเชื้อจะเจริญเต็มที่จนเห็นโคโลนีได้ชัดเจนได้ใน 10 วัน (ภาพ 32; ตาราง 15) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อแอกติโนไมซีสบริสุทธิ์ทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้แม้ผ่านการอบด้วยอุณหภูมิสูงถึง 120 องศาเซลเซียส และบางส่วนยังสามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม แสดงให้เห็นเบื้องต้นว่า หากนำเชื้อแอกติโนไมซีสเหล่านี้ไปประยุกต์ใช้ในสภาพโรงเรือนหรือนำไปใช้ในสภาพแปลงจริง ซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่ไม่สามารถควบคุมได้ เช่น แสงแดด หรือการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค เชื้อแอกติโนไมซีสเหล่านี้ก็ยังจะสามารถทนทานได้ในระดับหนึ่ง



ภาพ 32 ลักษณะเชื้อแอกติโนไมซีสที่เจริญบนอาหาร casein starch agar (CSA) เป็นระยะเวลา 10 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 15 เชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกได้จากดินป่าธรรมชาติจากแหล่งต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

แหล่งที่มา	จำนวนเชื้อที่แยกได้ (ไอโซเลท)	
	ประเภทของอาหาร	
	ผสมสารคาร์เบนดาซิม	ไม่ผสมสารคาร์เบนดาซิม
อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย จ. เชียงใหม่	-	6
น้ำตกห้วยแก้ว จ. เชียงใหม่	7	17
น้ำตกวังบัวบาน จ. เชียงใหม่	1	1
อ. อมก๋อย จ. เชียงใหม่	10	16
อ. ปางมะผ้า จ. แม่ฮ่องสอน	10	1
อ. แม่ลาน้อย จ. เชียงใหม่	2	1
	30	42

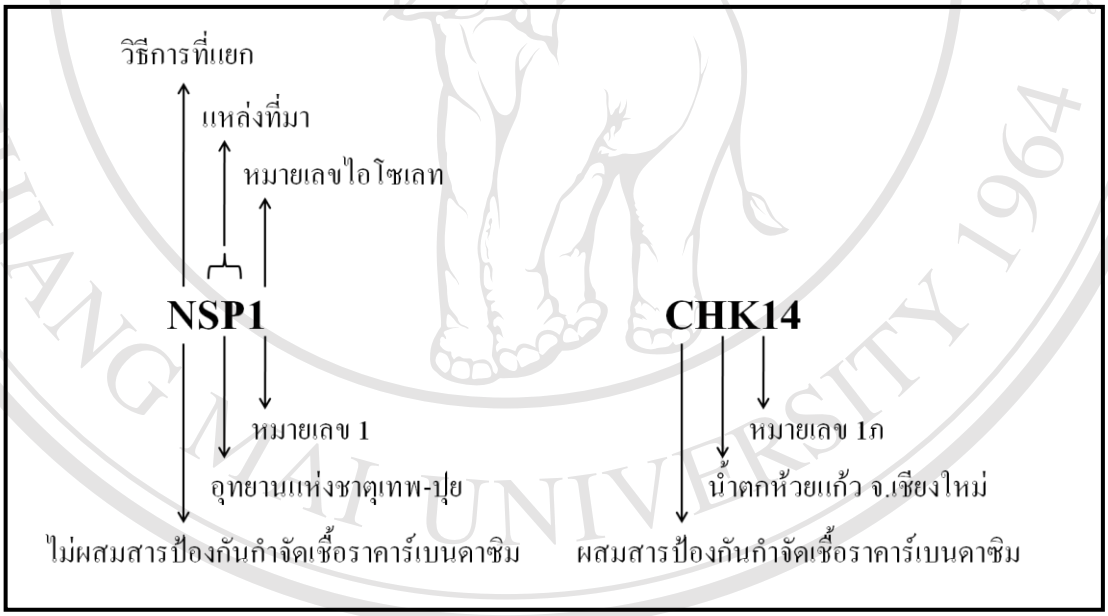
2.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

จากการทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) ของเชื้อแอกติโนไมซีสจากดินทั้ง 72 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง ด้วยวิธี dual culture technique บนอาหาร glucose yeast extract-malt extract Agar (GYM) พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ในช่วง 28.57 - 76.66 เปอร์เซนต์โดยเชื้อแอกติโนไมซีสที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ มีเพียง 15 ไอโซเลท เท่านั้น ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK8, NOK9, NOK10, NHK11, NHK12, NOK13, CHK14 และ NHK15 ซึ่งเป็นเชื้อแอกติโนมัยซีสที่แยกได้จากบริเวณของ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ทั้งหมด จึงได้ตั้งชื่อไอโซเลทแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ตัวนี้ (ภาพ 33) รวมถึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนต่อไป (ตาราง 16)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตั้งชื่อเชื้อแอกติโนไมซีส

ตั้งชื่อเชื้อแอกติโนไมซีสโดยใช้อักษรย่อตามวิธีการที่แยกมาได้ ดังนี้ อาหารที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (C) และอาหารที่ไม่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (N) ตามด้วยสถานที่ของแหล่งที่มา ได้แก่ อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่ (SP), น้ำตกห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่ (HK), น้ำตกวังบัวบาน อ.เมือง จ.เชียงใหม่ (WB), อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่ (OK), อ.แม่ลาน้อย จ.แม่ฮ่องสอน (HH) และ อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน (PM) ตามด้วยลำดับไอโซเลท (1, 2, 3 ถึง 15) (ภาพ 33) ซึ่งเชื้อแอกติโนไมซีสที่ได้รับการตั้งชื่อจะมีเฉพาะตัวที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM_F012 มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ เท่านั้น (ตาราง 1**6)**



ภาพ 33 อักษรย่อแสดงการตั้งชื่อเชื้อแอกติโนไมซีส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 16 รายชื่อเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกได้จากดิน และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง

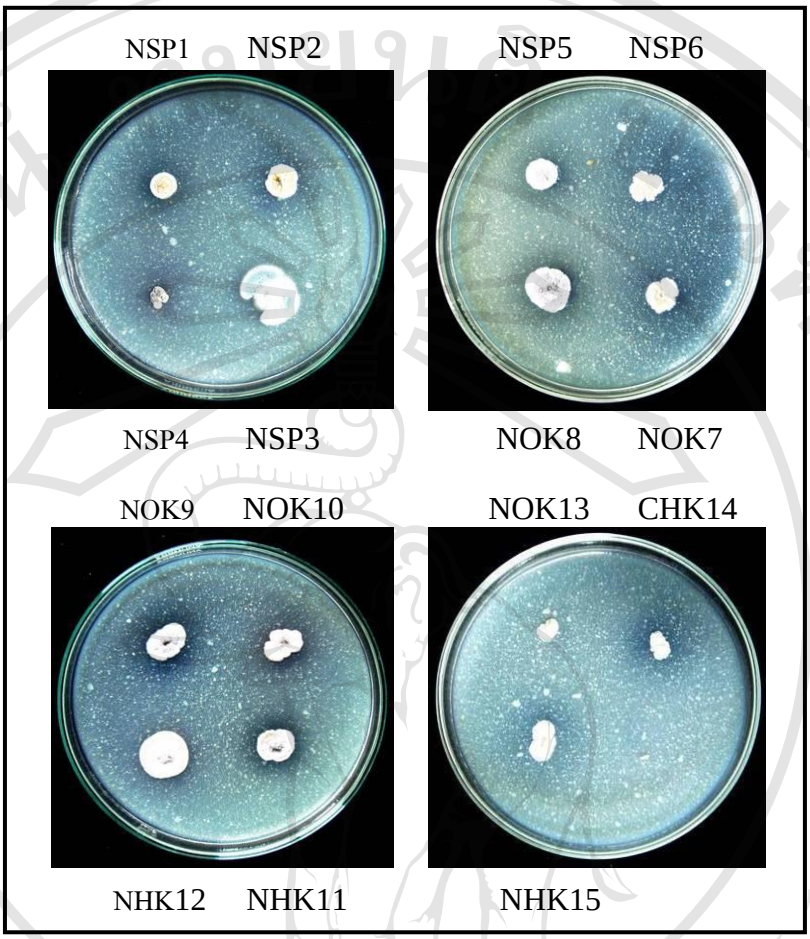
ลำดับ	ไอโซเลท	เปอร์เซนต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา	แหล่งที่มา
1.	NSP1	76.66	อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ. เมือง จ. เชียงใหม่
2.	NSP2	66.66	อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ. เมือง จ. เชียงใหม่
3.	NSP3	75.55	อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ. เมือง จ. เชียงใหม่
4.	NSP4	75.52	อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ. เมือง จ. เชียงใหม่
5.	NSP5	73.33	อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ. เมือง จ. เชียงใหม่
6.	NSP6	65.70	อุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย อ. เมือง จ. เชียงใหม่
7.	NOK7	69.23	อ. อมก๋อย จ. เชียงใหม่
8.	NOK8	62.64	อ. อมก๋อย จ. เชียงใหม่
9.	NOK9	59.34	อ. อมก๋อย จ. เชียงใหม่
10.	NOK10	59.34	อ. อมก๋อย จ. เชียงใหม่
11.	NHK11	59.34	น้ำตกห้วยแก้ว อ. เมือง จ. เชียงใหม่
12.	NHK12	58.24	น้ำตกห้วยแก้ว อ. เมือง จ. เชียงใหม่
13.	NOK13	54.95	อ. อมก๋อย จ. เชียงใหม่
14.	CHK14	53.83	น้ำตกห้วยแก้ว อ. เมือง จ. เชียงใหม่
15.	NHK15	50.55	น้ำตกห้วยแก้ว อ. เมือง จ. เชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

เมื่อนำเชื้อแอกติโนไมซีสจากดินที่แยกได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK8, NOK9, NOK10, NHK11, NHK12, NOK13,CHK14 และ NHK15 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM_F012 ได้มากกว่า 50 เปอร์เซนต์มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง 15% colloidal chitin agar (CCA) โดยบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทุกไอโซเลทสามารถสร้างวงใส (inhibition zone) บนอาหาร CCA ได้ (ภาพ 34) แสดงว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สอดคล้องกับรายงานของ พรนภา (2554) ที่ได้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาสปอร์ออก (F) 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 โดยวัดได้จาก *N*-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเทรต โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) และใช้ *N*-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาค่า enzyme activity โดยวัดตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทุกไอโซเลทมีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสในลักษณะที่คล้ายคลึงกันคือ ในช่วงแรก (1 - 2 วัน) มีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสขึ้นเพียงเล็กน้อย ต่อมาเอนไซม์จะถูกสร้างเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 และ NSP6 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อโดยมีค่าเท่ากับ 0.080, 0.111, 0.051, 0.151 และ 0.110 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อแอกติโนไมซีทไอโซเลท NSP5 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส สูงสุดในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.094 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเอนไซม์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในแต่ละไอโซเลท พบว่าแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP4 สร้างเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p = 0.05$) ซึ่งจากรายงานนี้ สามารถยืนยันได้ว่า inhibition zone ที่เชื้อแอกติโนไมซีสสร้างขึ้นมานี้ คือ เอนไซม์ไคติเนส ไม่ใช้สารปฏิชีวนะหรือสารทุติยภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 34 ลักษณะวงใส (inhibition zone) บนอาหารแข็ง 15% colloidal chitin agar (CCA) ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 15 วัน ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อแอกติโนไมซีส ซึ่งแยกจากจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

2.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

จากการเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 - 13 วัน ซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อเขย่าเป็นเวลา 5 วัน ได้เท่ากับ 0.076, 0.055, 0.033, 0.045, 0.032 และ 0.099 ตามลำดับ นำอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF; non-filtrate culture) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F; filtrate culture) มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง (highly resistance; HR) ด้วยวิธี agar well diffusion method โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด (NF และ F) มาทดสอบเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน และทดสอบทุกๆ วัน จนครบ 13 วัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ (ภาพ 35) แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดนี้ มีคุณสมบัติในการแพร่ผ่านวุ้นได้ วิธีการทดสอบนี้ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส สอดคล้องกับรายงานของ อภิญญา และคณะ (2545) พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงและลำไยได้ ในขณะที่ Ana *et al.* (2006) พบว่าเชื้อซแอกติโนไมซีสในกลุ่ม *Streptomyces* ที่แยกได้จากดิน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย รวมถึงการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia eragrostides* และ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคใบจุดมัน (yam; *Dioscorea cayennensis* Lam) ในประเทศบราซิลได้ ในขณะที่ สายพิณ และคณะ (2551) พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสในกลุ่ม *Streptomyces* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger Botrytis* sp. และ *Curvularia* sp. ได้ ตามลำดับ ส่วน Kim *et al.* (1999) พบสารปฏิชีวนะ As 1 A ที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces libani* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. capsici* สาเหตุของโรคใบไหม้ในพืชได้ นอกจากนี้ Nawani and Kapadnis (2004) พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. NK1057 สามารถสร้าง extracellular chitinase ทั้งแบบ endochitinase และ chitobiosidase ซึ่ง chitobiosidase ที่เชื้อผลิตได้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* และยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อ *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการทดสอบพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F (ภาพ 35) เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีเชื้อแอกติโนไมซีสเจริญอยู่ในอาหาร ทำให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิออกมาได้อย่างต่อเนื่อง จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคได้สูงกว่า แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F อาจมีสารทุติยภูมิอยู่ในปริมาณจำกัด ทำให้มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเกิดโรคได้ โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ให้เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราอยู่ในช่วง 28.89 - 77.50 เปอร์เซนต์ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ให้เปอร์เซนต์การยับยั้งในช่วง 20.74 - 67.59 เปอร์เซนต์ (ตาราง 17) เชื้อแอกติโนไมซีสที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือไอโซเลท NSP4 และ NSP1ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเฉลี่ย 59.56 และ 58.89 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ตาราง 18) สอดคล้องกับรายงานของ วรรษมน (2553) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก พบว่าเปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของ เส้นใยเชื้อราที่เกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) มีค่าสูงกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F) โดยพบเชื้อแอกติโนไมซีส 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ดี ได้แก่ NSP2, NSP1 และ NSP3 มีเปอร์เซนต์ยับยั้งในช่วง 53.33 - 75.00 เปอร์เซนต์ 53.33 - 66.67 เปอร์เซนต์ และ 43.33 - 58.33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโดยวิธี agar well diffusion method ทำให้ทราบว่าสารทุติยภูมิต่างๆ ที่เชื้อแอกติโนไมซีสผลิตได้นั้นมีคุณสมบัติในการแพร่ โดยสามารถแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำให้เห็นลักษณะของเส้นใยเชื้อราตรงบริเวณที่มีการหยดอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งชนิด NF และ F ที่มีการเจริญช้ากว่าชุดควบคุม และการเกิดลักษณะของวงใส (inhibition zone) ในการทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา สำหรับการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด โดยเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP1 มีประสิทธิภาพสูงสุดวันที่ 3 – 7 ส่วนเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP2 มีประสิทธิภาพสูงสุดวันที่ 3 และ 7 ในขณะที่เชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP3 NSP5 และ NSP6 มีประสิทธิภาพสูงสุดในวันที่ 3 และเชื้อแอกติโนมัยซีสไอโซเลท NSP4 มีประสิทธิภาพสูงสุดในวันที่ 7 (ภาพ 36; ตาราง 17) ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อราสูงที่สุดคือ 3 - 7 วัน และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ เมื่อเก็บรักษาในระยะเวลาที่นานขึ้น (ภาพ 37) สอดคล้องกับรายงานของอุไรวรรณ์ (2552) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากกล้วยไม้ และดินบริเวณรอบรากพืชในแปลงปลูก ซึ่งเมื่อนำมาศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าเชื้อ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SRA14 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Streptomyces* sp. ไอโซเลท SRA14 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าอาหารที่เก็บจากช่วง stationary มีประสิทธิภาพดีกว่าช่วง exponential อย่างมีนัยสำคัญ และรายงานของพรนภา (2554) ที่ได้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาสปอร์ออก (F) 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 โดยวัดได้จาก *N*-acetylglucosamine ที่ถูกปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเทรต โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959) และใช้ *N*-acetylglucosamine ในการทำกราฟมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาค่า enzyme activity โดยวัดตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทุกไอโซเลทมีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสในลักษณะที่คล้ายคลึงกันคือ ในช่วงแรก (1 - 2 วัน) มีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสขึ้นเพียงเล็กน้อย ต่อมาเอนไซม์จะถูกสร้างเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยแอคติโนมัยซีทไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 และ NSP6 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงที่สุดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อโดยมีค่าเท่ากับ 0.080, 0.111, 0.051, 0.151 และ 0.110 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อแอกติโนไมซีทไอโซเลท NSP5 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส สูงสุดในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.094 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเอนไซม์มีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในแต่ละไอโซเลท พบว่าแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP4 สร้างเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p = 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 17 ประสิทธิภาพของเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 7 วัน

เชื้อแอกติโนไมซีส (ไอโซเลท)	อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส[2/]	เปอร์เซนต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (%)[1/]												
		อายุของอาหารเลี้ยงเชื้อ (วัน)												
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
NSP1	NF	70.00	64.17	64.17	62.22	69.54	56.60	65.36	52.24	59.75	58.42	48.06	43.93	54.84
	F	63.33	67.50	67.50	63.81	67.50	64.76	60.00	64.25	63.48	63.49	34.84	49.46	31.82
NSP2	NF	77.50	62.50	62.50	65.55	65.37	67.18	58.93	45.81	51.85	52.52	43.54	60.01	74.19
	F	60.00	59.17	59.17	54.28	59.17	48.10	43.81	53.22	49.50	51.51	39.29	49.46	45.45
NSP3	NF	74.17	71.67	71.67	61.46	65.21	44.19	40.15	42.86	34.52	36.94	30.00	75.24	77.14
	F	60.00	56.67	56.67	40.00	46.67	38.10	44.04	39.65	28.31	30.53	34.38	50.51	43.75
NSP4	NF	70.38	63.33	63.33	61.11	75.19	65.08	66.19	53.69	64.20	67.68	57.53	56.06	64.52
	F	65.00	60.00	60.00	57.14	65.83	49.50	51.43	54.57	55.11	53.49	47.16	50.54	50.00
NSP5	NF	76.67	74.17	74.17	65.63	66.25	47.81	59.85	64.76	58.87	58.18	37.78	69.52	68.57
	F	63.33	57.50	57.50	44.45	55.00	40.95	45.75	42.68	42.46	38.65	41.67	41.41	43.75
NSP6	NF	68.33	70.00	70.00	63.55	67.50	44.76	55.68	34.28	30.81	39.68	28.89	61.91	62.86
	F	50.00	52.50	52.50	33.30	38.33	27.62	28.73	30.73	20.74	26.64	33.34	56.57	37.50

ปัจจัย A (เชื้อปฏิปักษ์)	**	$LSD_{.01}$ = 1.803
ปัจจัย B (ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส)	**	$LSD_{.01}$ = 1.041
ปัจจัย C (อายุอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส)	**	$LSD_{.01}$ = 2.655
A*B*C	**	$LSD_{.01}$ = 9.198
CV	8.02%	

[1/] ค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ

[2/] NF = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก, F = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P \leq 0.01$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 18 ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 - 15 วัน ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 7 วัน

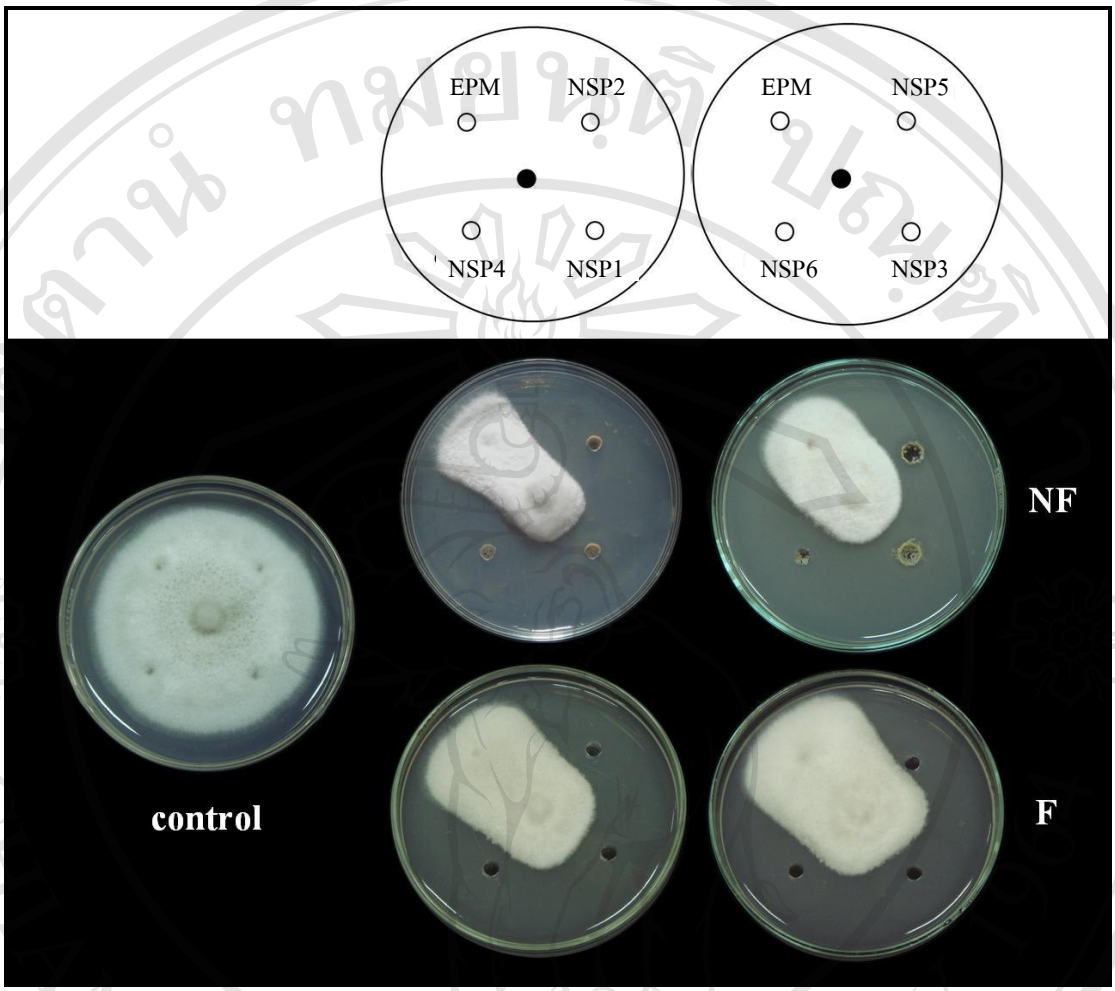
เชื้อแอกติโนไมซีส (ไอโซเลท)	เปอร์เซนต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราเฉลี่ย[1/]
NSP1	58.89 a[2/]
NSP2	56.16 b
NSP3	49.79 c
NSP4	59.56 a
NSP5	45.65 d
NSP6	55.28 b
%CV	8.02
$LSD_{0.05}$	1.80

[1/]ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F) บ่มเป็นเวลา 3 - 13 วัน

[2/]ค่าเฉลี่ยตัวอักษรแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% เปรียบเทียบโดยวิธี Factorial in CRD

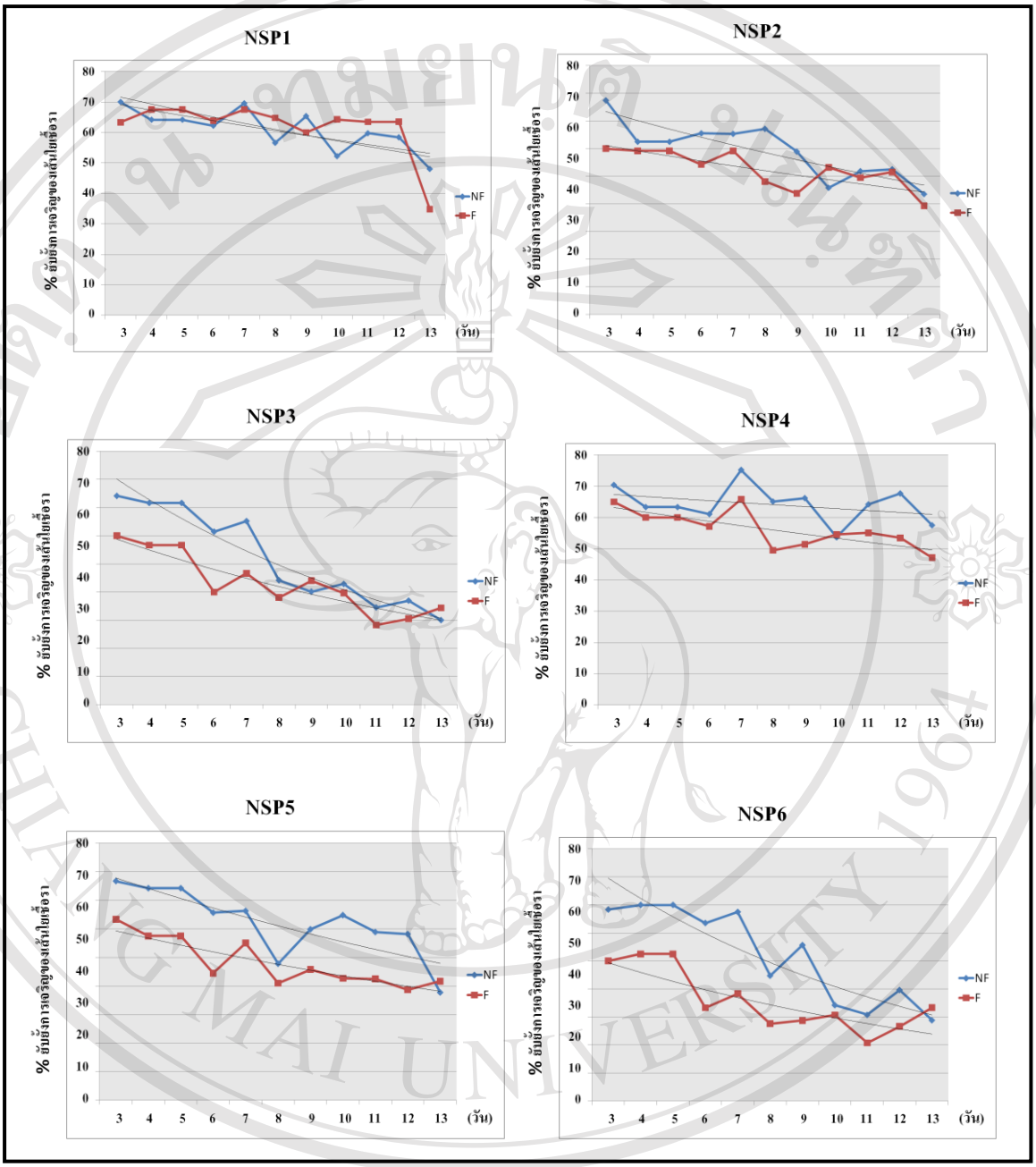
* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P \leq 0.01$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



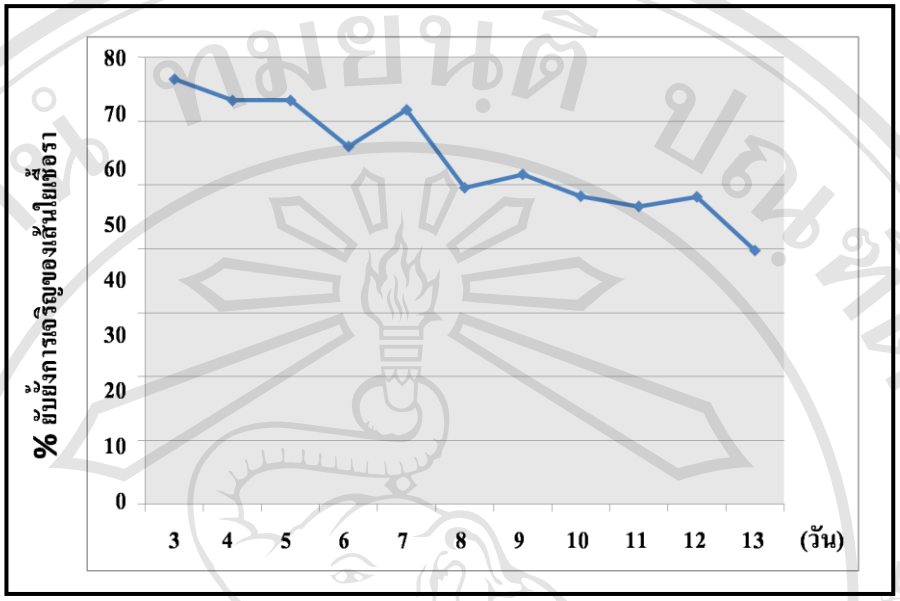
ภาพ 35 ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส บ่มเป็นเวลา 3 วัน ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง ด้วยวิธี agar well diffusion method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 7 วัน; NF: อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก และ F: อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 36 แนวโน้มประสิทธิภาพของช่วงเวลาที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส เมื่อบ่มเป็นเวลา 3-13 วัน ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 7 วัน; NF: อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก, F: อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก และ (———) แนวโน้มประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F) อายุ 3-13 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 37 ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 - 15 วัน ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 7 วัน

2.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา

จากการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F) จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง ไอโซเลท NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง (highly resistance; HR) ด้วยเทคนิค slide culture โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ เมื่อตรวจวัดผลที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เช่นเดียวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ยังมีเชื้อแอกติโนไมซีสเจริญอยู่ในอาหาร ทำให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิออกมาได้อย่างต่อเนื่อง จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคได้สูงกว่า แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F อาจมีสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทุติยภูมิอยู่ในปริมาณจำกัด ทำให้มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา ได้ ซึ่งจากการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด (NF และ F) ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด เมื่อบ่มโดยเขย่าเป็นเวลา 3 วัน ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคได้ ซึ่งต่างจากประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด (NF และ F) จะเริ่มมีประสิทธิภาพเมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 3 - 4 วัน และประสิทธิภาพจะลดลงเรื่อยๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด (NF และ F) เมื่อบ่มโดยเขย่าเป็นเวลา 5 วัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์สูงที่สุด โดยจากการตรวจการงอกของสปอร์เชื้อราที่ 6 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 70.73 - 88.98 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4, NSP1 และ NSP2 โดยมีประสิทธิภาพ 88.98, 88.01 และ 86.25 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 30.25 – 43.30 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP2, NSP3, NSP1, NSP4 และ NSP5 โดยมีประสิทธิภาพ 43.30, 42.26, 41.24, 40.38 และ 39.54 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ จากการตรวจการงอกของสปอร์เชื้อราเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เริ่มลดลง โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 65.86 – 83.28 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 และ NSP1 โดยมีประสิทธิภาพ 83.28 และ 82.94 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 25.52 – 31.88 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 และ NSP1 โดยมีประสิทธิภาพ 31.88 และ 30.82 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และจากการตรวจสอบการงอกของสปอร์เชื้อราที่ 18 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 67.71 – 54.26 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 โดยมีประสิทธิภาพ 67.71 เปอร์เซนต์ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 14.22 - 19.14 เปอร์เซนต์ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 โดยมีประสิทธิภาพ 14.22 เปอร์เซนต์ และจากการตรวจการงอกของสปอร์เชื้อราเมื่อเพาะเลี้ยงสปอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเส้นใยของเชื้อราเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดการงอกของสปอร์ได้ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่สามารถวัดการเจริญของ เชื้อราได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 (ตาราง 19; ภาพ 38)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด (NF และ F) เมื่อบ่มโดยเขย่าเป็นเวลา 7 วัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ต่ำกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มเป็นเวลา 5 วัน โดยจากการตรวจการงอกของสปอร์เชื้อราที่ 6 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 41.20 - 70.30 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 และ NSP1 โดยมีประสิทธิภาพ 70.30 และ 66.55 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 20.56 – 40.15 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 โดยมีประสิทธิภาพ 40.15 เปอร์เซนต์ จากการตรวจการงอกของสปอร์เชื้อราเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เริ่มลดลง โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 24.55 – 61.43 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 โดยมีประสิทธิภาพ 61.43 เปอร์เซนต์ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 8.12 - 38.12 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 โดยมีประสิทธิภาพ 38.12 เปอร์เซนต์ แต่ตั้งแต่เวลา 18 ชั่วโมง เป็นต้นไป พบว่าเส้นใยของเชื้อราเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดการงอกของสปอร์ได้ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่สามารถวัดการเจริญของเชื้อราได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 (19; ภาพ 37)

จากการตรวจวัดการงอกของสปอร์เชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด (NF และ F) เมื่อบ่มโดยเขย่าเป็นเวลา 5 วัน โดยตรวจสอบการงอกของ germ tube เมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์ปกติที่เวลา 0 ชั่วโมง ซึ่งมีขนาดเฉลี่ย 16.46-18.65 × 3.94-4.47 ไมโครเมตร พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง สปอร์เชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF germ tube งอกเป็นความยาวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 6.93 – 10.2 ไมโครเมตร ซึ่งงอกยาวกว่าสปอร์เชื้อราปกติที่ 0 ชั่วโมง ประมาณ 1.5 เท่า ส่วนสปอร์เชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F germ tube งอกเป็นความยาวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 15.08 – 19.69 ไมโครเมตร ซึ่งงอกยาวกว่าสปอร์เชื้อราปกติที่ 0 ชั่วโมง ประมาณ 2 เท่า ในขณะที่สปอร์ของเชื้อราในชุดควบคุม germ tube งอกเป็นความยาวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 31.36 – 38.68 ไมโครเมตร ซึ่งงอกยาวกว่าสปอร์เชื้อราปกติที่ 0 ชั่วโมง ประมาณ 3 เท่า ส่วนความกว้างของสปอร์มีขนาดเท่ากับชุดควบคุม (ตาราง 20) แสดงให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงทั้งชนิด NF และ F ไม่มีผลต้อขนาของเชื้อราสาเหตุโรค แต่มีผลในการชะลอการงอก germ tube และจากการตรวจสอบลักษณะความผิดปกติของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค ที่เจริญร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งอายุ 5 และ 7 วัน พบสปอร์เชื้อรามีลักษณะปกติเช่นเดียวกับสปอร์เชื้อราในชุดควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ภาพ 38) โดยไอโซเลท NSP4 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์สูงสุดได้ถึง 88.98 เปอร์เซนต์ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ประสิทธิภาพสูงสุด 40.38 เปอร์เซนต์ ส่วนไอโซเลท NSP1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์สูงสุดได้ถึง 88.01 เปอร์เซนต์ และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่ประสิทธิภาพสูงสุด 41.24 เปอร์เซนต์ (ตาราง 19) ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสมีผลเพียงชะลอการเจริญของเชื้อราเท่านั้น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัญฐานวิทยาของ เชื้อราแต่อย่างใด

จากการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส เมื่อบ่มโดยเขย่าเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุรคแอนแทรคโนสมะม่วง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด (NF และ F) ที่บ่มเป็นเวลา 3 วัน ยังไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ แต่จะมีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 5 วัน และประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน สอดคล้องกับหลายรายงาน ได้แก่ จิราภรณ์ (2553) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด บ่มเป็นเวลา 5 และ 7 วัน ในการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าว 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Curvularia luntana* และ *Helminthosporium oryzae* ฉวีวรรณ (2553) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด บ่มเป็นเวลา 5 และ 7 วัน ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว ชิงชัย (2553) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด บ่มเป็นเวลา 5 และ 7 วัน ในการควบคุมเชื้อรา *F. moniliforme* f.sp. *capsici* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก และวราพรรณ์ (2553) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด บ่มเป็นเวลา 5 และ 7 วัน ในการควบคุมเชื้อรา *F. moniliforme* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกัน เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคเมื่อบ่มเป็นเวลา 5 วัน และเริ่มลดลงเมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน แต่ให้ผลการทดลองแตกต่างจากรายงานของ จันทร์ฉาย (2553) ซึ่งได้ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด บ่มเป็นเวลา 5 และ 7 วัน ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ที่ติดมากับเมล็ดข้าว พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่บ่มเป็นเวลา 7 ยังคงมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่บ่มเป็นเวลา 5 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 19 ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ในการควบคุมการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrihum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ตรวจสอบผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ที่เวลา 6, 12 และ 18 ชั่วโมง

เชื้อแอกติโนไมซีส (ไอโซเลท)	เปอร์เซนต์ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา (%)[1/]											
	อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสบ่มเป็นเวลา 5 วัน						อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสบ่มเป็นเวลา 7 วัน					
	NF[2/]			F			NF			F		
	6 ชม.	12 ชม.	18 ชม.	6 ชม.	12 ชม.	18 ชม.	6 ชม.	12 ชม.	18 ชม.	6 ชม.	12 ชม.	18 ชม.
NSP1	88.01 a[3/]	82.94 a	65.04 ab	41.24 a	30.82 a	18.55 ab	66.55 a	50.20 b	-[4/]	35.42 b	24.29 b	-
NSP2	86.25 a	76.71 b	59.88 c	43.30 a	28.59 ab	18.25 ab	53.23 b	24.55 e	-	20.56 d	8.12 d	-
NSP3	79.36 b	72.71 b	57.42 cd	42.26 a	27.94 ab	17.42 ab	41.20 c	42.15 c	-	25.14 c	21.18 c	-
NSP4	88.98 a	83.28 a	67.71 a	40.38 a	31.88 a	19.14 a	70.30 a	61.43 a	-	40.15 a	38.12 a	-
NSP5	77.16 b	65.86 c	60.85 bc	39.54 a	27.94 ab	16.51 b	45.79 c	33.95 d	-	22.11 cd	10.14 d	-
NSP6	70.73 c	66.34 c	54.26 d	30.25 b	25.52 b	14.22 c	42.00 c	40.81 c	-	22.03 cd	21.95 bc	-
%CV	3.84	3.39	4.04	7.50	8.65	6.83	5.10	6.54	-	7.53	8.29	-
$LSD_{0.05}$	5.58	4.50	4.37	5.27	4.43	2.11	4.84	4.90	-	3.69	3.04	-

[1/]ค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ

[2/]NF = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก, F = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก

[3/]ค่าเฉลี่ยตัวอักษรแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

[4/]เส้นใยเจริญจนไม่สามารถวัดค่าได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 20 ความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง ที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส อายุ 5 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ตรวจสอบผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ที่เวลา 6 ชั่วโมง

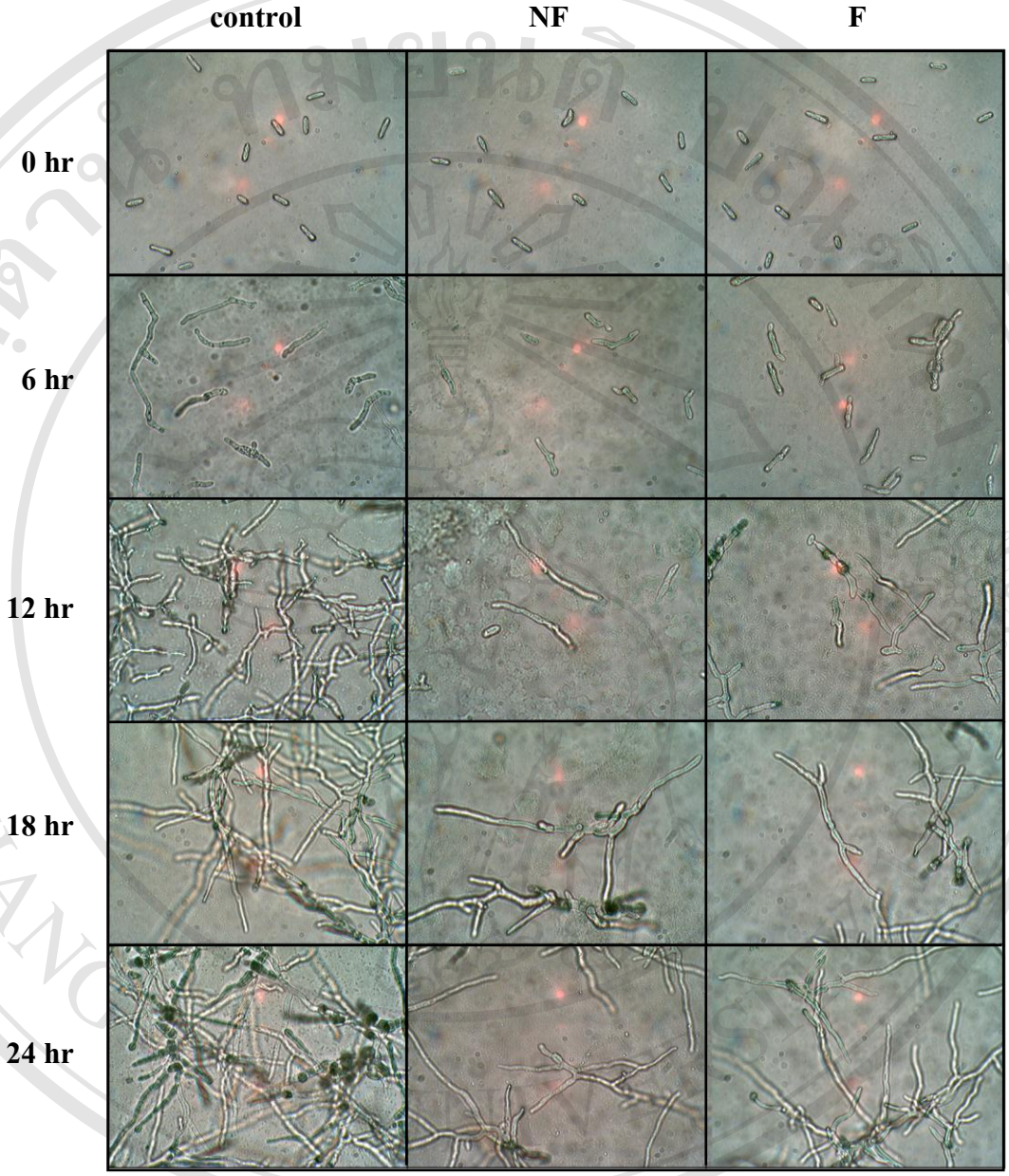
เชื้อแอกติโนไมซีส (ไอโซเลท)	ขนาดสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค (µm)[1/]			
	ความยาว germ tube		ความกว้างของสปอร์	
	NF[2/]	NF	NF	F
NSP1	7.16[3/]	15.98	4.09	4.31
NSP2	8.16	16.12	4.13	4.23
NSP3	7.28	17.83	3.96	3.99
NSP4	6.93	15.08	3.89	4.38
NSP5	8.25	18.61	4.17	4.01
NSP6	10.2	19.69	4.39	4.58

[1/] ค่าเฉลี่ยจำนวน 10 ซ้ำ

[2/] NF = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก, F = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก

[3/] เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีความยาว germ tube เฉลี่ยอยู่ในช่วง 31.36 – 38.68 µm และมีความกว้างของสปอร์ในช่วง 3.86 - 4.62

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 38 ลักษณะของสปอร์เชื้อรา *Colletotrihum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง ภายหลังจากการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ไอโซเลท NSP4 บ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า; NF: อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก และ F: อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งเกิดโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนผลมะม่วง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีส จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง โดยการปลูกเชื้อบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปราศจากโรคและแมลง นำมาล้างทำความสะอาด แล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% ethanol ผึ่งให้แห้ง จากนั้นปลูกเชื้อบนผลมะม่วงโดยเตรียมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในรูป spore suspension ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลตร ใช้ไมโครปิเปตดูด spore suspension และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F) อย่างละ 150 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ บันทึกผลในวันที่ 4 หลังการปลูกเชื้อ โดยบันทึกผลจากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์ของแผล แล้วคำนวณหาเปอร์เซนต์ยับยั้งการเกิดโรคเทียบกับชุดควบคุม คือ ปลูกเชื้อด้วย spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียว พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ที่บ่มเป็นเวลา 5 วัน มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้ในช่วง 22.55 - 37.80 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4, NSP3 และ NSP5 โดยมีประสิทธิภาพ 37.80 34.69 และ 34.69 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่บ่มเป็นเวลา 5 วัน สามารถลดการเกิดโรคในช่วง 16.56 - 28.62 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 และ NSP3 โดยมีประสิทธิภาพ 28.62 และ 27.24 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ที่บ่มเป็นเวลา 7 วัน ลดการเกิดโรคได้ในช่วง 24.14 - 33.24 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 โดยมีประสิทธิภาพ 33.24 เปอร์เซนต์ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ที่บ่มเป็นเวลา 7 วัน ลดการเกิดโรคในช่วง 15.17 - 22.69 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP3 โดยมีประสิทธิภาพ 22.69 เปอร์เซนต์ (ตาราง 21; ภาพ 39) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้ในระดับต่ำ (ภาคผนวก ก) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ที่บ่มเป็นเวลา 3 วัน ไม่สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงได้ สอดคล้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อรา เนื่องจากทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิด NF และ F จะเริ่มมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่ออายุ 5 วัน และมีประสิทธิภาพลดลงเมื่ออายุของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น

จากการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงนั้น จะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ใกล้เคียงกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF จะมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้สูงกว่าเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ยังมีเชื้อแอกติโนไมซีสเจริญอยู่ในอาหาร ทำให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิออกมาได้อย่างต่อเนื่อง จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งโรคได้สูงกว่า แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F อาจมีสารทุติยภูมิอยู่ในปริมาณจำกัด ทำให้มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเกิดโรคได้ สอดคล้องกับรายงานของ Mutitu *et al.* (2008) ที่ใช้สารทุติยภูมิที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในอาหารเหลวมาฉีดพ่นบนต้นกล้ามะเขือเทศก่อนและหลังการปลูกเชื้อรา *Phytophthora* sp. สาเหตุโรคใบไหม้ในมะเขือเทศ พบว่าสารทุติยภูมิที่ได้จากเชื้อแอกติโนไมซีส ไอโซเลท 28P และ CS35 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุได้ 30.8 และ 19.8 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ พรนภา (2554) ได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด (NF และ F) ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* บนเมล็ดพริก โดยปลูกเชื้อบนเมล็ดพริกด้วยการแช่ใน spore suspension ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าเมล็ดพริกปลูกเชื้อราทั้ง 2 ชนิด คือ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ให้ประสิทธิภาพเท่ากัน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 65.33 เปอร์เซนต์ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 63.33 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซนต์ความงอกเท่ากับ 83.33 และ 76.67 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

สำหรับผลของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด (NF และ F) ต่อมะม่วง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อผลมะม่วง ซึ่งจะเห็นได้จากบริเวณที่หยดอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ไม่พบอาการผิดปกติใดๆ มีเพียงรอยช้ำที่เกิดจากการทำแผลเท่านั้น (ภาพ 39) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่ประสบความสำเร็จในการนำอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสไปในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง ซึ่งเห็นได้จากเปอร์เซนต์การลดการเกิดโรค (อยู่ในช่วง 15.17 – 37.80 เปอร์เซนต์) ยังอยู่ในระดับต่ำ (ภาคผนวก ก) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาด้านการนำไปประยุกต์ใช้เพิ่มเติม เช่น การฉีดตั้งแต่ระยะออกดอก เป็นต้น เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรค เนื่องจากโรคแอนแทรคโนสเป็นโรคแฝง (latent infection) สามารถทำให้เกิดโรคขึ้นได้กับทุกระยะการเจริญเติบโตของผลมะม่วง โดยทั่วไปแล้วการติดเชื้อนั้นจะเกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาของผลมะม่วงแต่อยู่ในลักษณะของการเข้าทำลายแบบแฝงก่อนที่ผลจะสุก (Spould และ Shrenk, 2000) โดยเชื้อจะมีการพักแฝงตัวอยู่ในผลมะม่วงในรูปของเส้นใยที่เจริญแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ในชั้น epidermis และ subepidermis ลึกลงไปในผิวผลมะม่วง 2 - 3 ชั้นของผิวของเซลล์จากผิวนอกสุด ซึ่งจะยังไม่มีการแสดงอาการของโรค และเริ่มมีการพัฒนาเป็นอาการของโรคแอนแทรคโนสเมื่อผลมะม่วงเริ่มสุก ภายหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับผลิตผลได้เป็นอย่างมาก (นิพนธ์, 2542) รวมถึงการทดสอบในด้านของการป้องกัน โดยการหยดอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทิ้งไว้ก่อนการปลูกเชื้อ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการป้องกันโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง และเพื่อทดสอบในแง่ของการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานโรคในการสร้างภูมิคุ้มกันอีกด้วย

ตาราง 21 ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส บ่มเป็นเวลา 5 และ 7 วัน ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนผลมะม่วง ตรวจสอบผลหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน

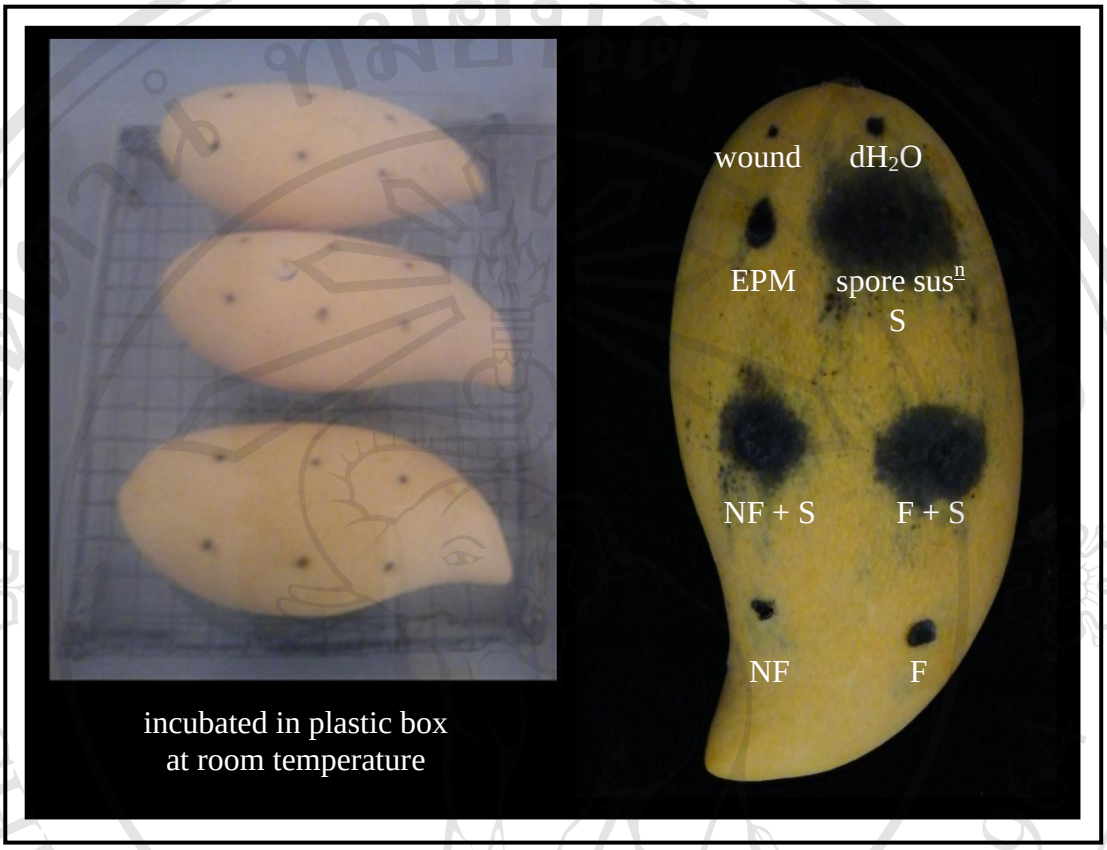
เชื้อแอกติโนไมซีส (ไอโซเลท)	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์ยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง (%)[1/]			
	อาหารเลี้ยงเชื้อบ่มเป็นเวลา 5 วัน		อาหารเลี้ยงเชื้อบ่มเป็นเวลา 7 วัน	
	NF[2/]	F	NF	F
NSP1	28.62 ab[3/]	21.10 ab	25.58 ab	19.72 ab
NSP2	28.69 ab	20.62 ab	27.11 ab	16.56 ab
NSP3	34.69 a	27.24 a	24.14 b	22.69 a
NSP4	37.80 a	28.62 a	33.24 a	21.18 ab
NSP5	34.69 a	24.21 ab	31.72 ab	21.04 ab
NSP6	22.55 b	16.56 b	24.21 b	15.17 b
%CV	18.30	22.33	16.71	20.20
$LSD_{0.05}$	10.15	9.16	8.23	6.97

[1/]ค่าเฉลี่ยจำนวน 3 ซ้ำ

[2/]NF = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก, F = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก

[3/]ค่าเฉลี่ยตัวอักษรแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD (Least Significant Difference)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 39 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ หลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP4 ที่บ่มเป็นระยะเวลา 5 วัน และตรวจสอบผลหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน; wound: ทำแผล, dH_2O: น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ, EPM: อาหารเลี้ยงเชื้อ enzyme production medium, spore sus^n หรือ S: spore suspension ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร, NF: อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก และ F: อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

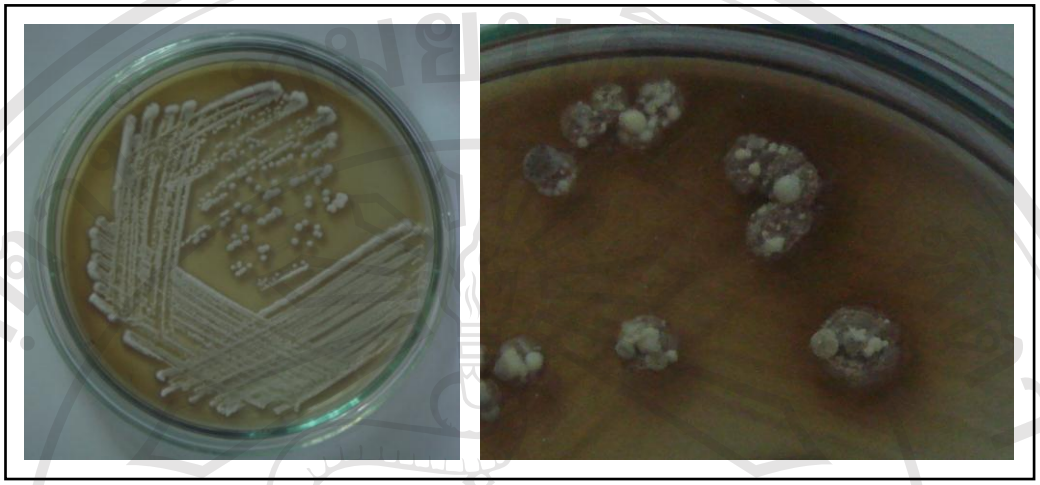
2.4 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนไมซีส

2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและสปอร์ โดยวิธี inclined coverslip

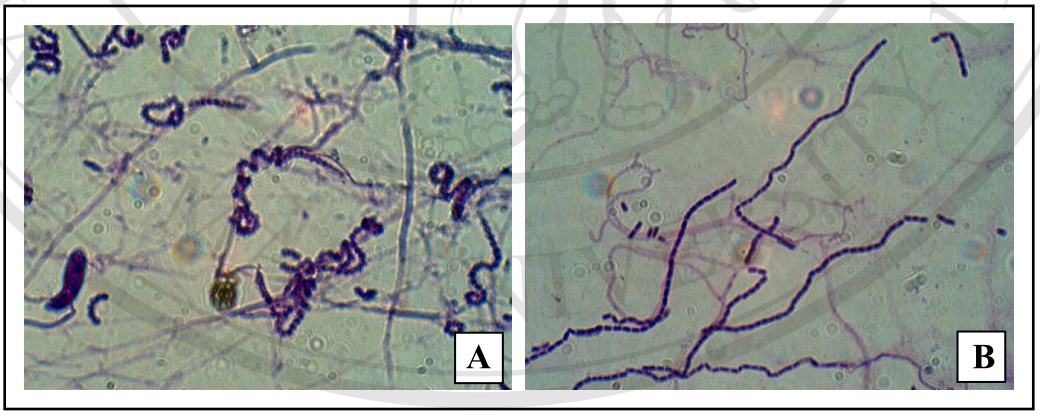
เมื่อนำเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกจากดินในเขตป่าในบริเวณต่างๆ ของจังหวัดเชียงใหม่และแม่ฮ่องสอน จำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK8, NOK9, NOK10, NHK11, NHK12, NOK13, CHK14 และ NHK15 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM_F012 ได้มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ มาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและสปอร์โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร yeast extract malt extract agar (ISP-2) เป็นเวลา 15 วัน พบเชื้อแอกติโนไมซีส ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP6, NOK8, NOK9, NHK12, NOK13 และ NHK15 มีลักษณะโคโลนีขาว ผิวโคโลนีย่น ขรุขระ เป็นจีบเข้าสู่กลางโคโลนีนูนขึ้น (convex) บนอาหาร เลี้ยงเชื้อ ยกเว้นไอโซเลท NSP5, NOK7, NOK10, NHK11 และ CHK14 ซึ่งมีโคโลนีแบนราบ (flat) และพบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP5 และ NSP6 ที่สร้างรงควัตถุ (pigment) สีน้ำตาลออกมารอบๆ โคโลนี (ภาพ 40) ส่วนอีก 10 ไอโซเลท ไม่พบการสร้างรงควัตถุบนอาหาร ISP-2 (ตาราง 22)

เมื่อตรวจสอบลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ด้วยวิธี inclined coverslip พบเชื้อแอกติโนไมซีสมีการสร้างสปอร์รูปทรงกลมขนาดเล็ก ซึ่งมีทั้งลักษณะแบบขดม้วนต่อกันเป็นวง (coil) คล้ายขดลวดสปริง (ภาพ 41) ได้แก่ ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK9, NOK13 และ NHK15 และสปอร์แบบต่อกันเป็นสายโซ่ยาว (fragmenting branched aerial hypha) (ภาพ 41) ได้แก่ ไอโซเลท NOK8, NOK10, NHK11, NHK12 และ CHK14 (ภาพ 41; ตาราง 22) ซึ่งคล้ายกับลักษณะของสายสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสในจีนัส *Streptomyces* ตามรายงานของ Cross (1970) กล่าวว่าเชื้อแอกติโนไมซีสที่มีการสร้างสปอร์แบบสายโซ่ยาว (polysporous) จีนัส *Streptomyces* เป็นตัวอย่างที่ดีในการศึกษาสปอร์กลุ่มนี้ เนื่องจากมีการสร้างสปอร์บน aerial mycelium เป็นสายโซ่ยาวโดยมีจำนวนสปอร์มากกว่า 50 สปอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

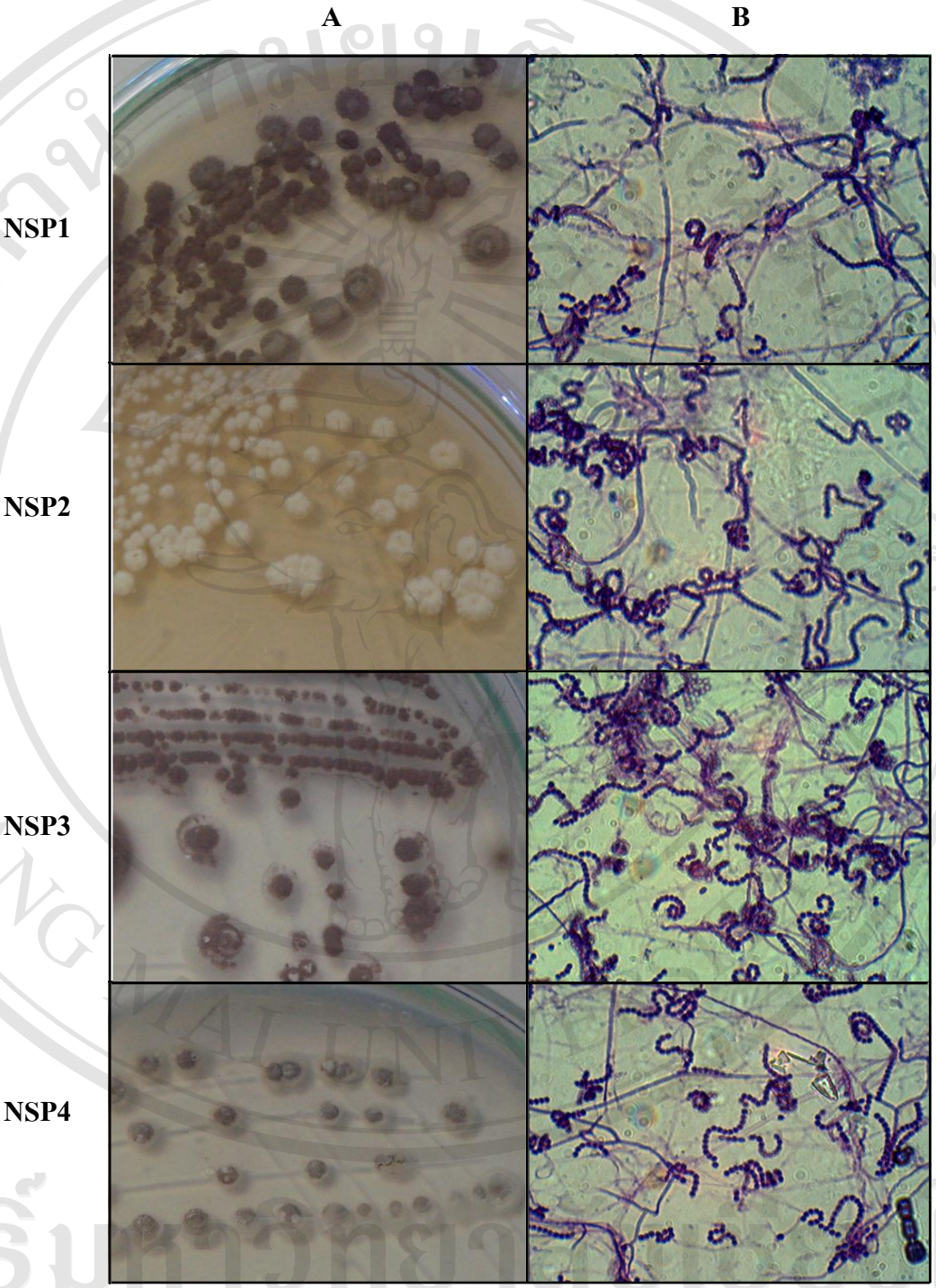


ภาพ 40 ลักษณะรงควัตถุ (pigment) เชื้อแอกติโนไมซีส บ่มเป็นเวลา 15 วัน ที่สร้างขึ้น บนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP-2)



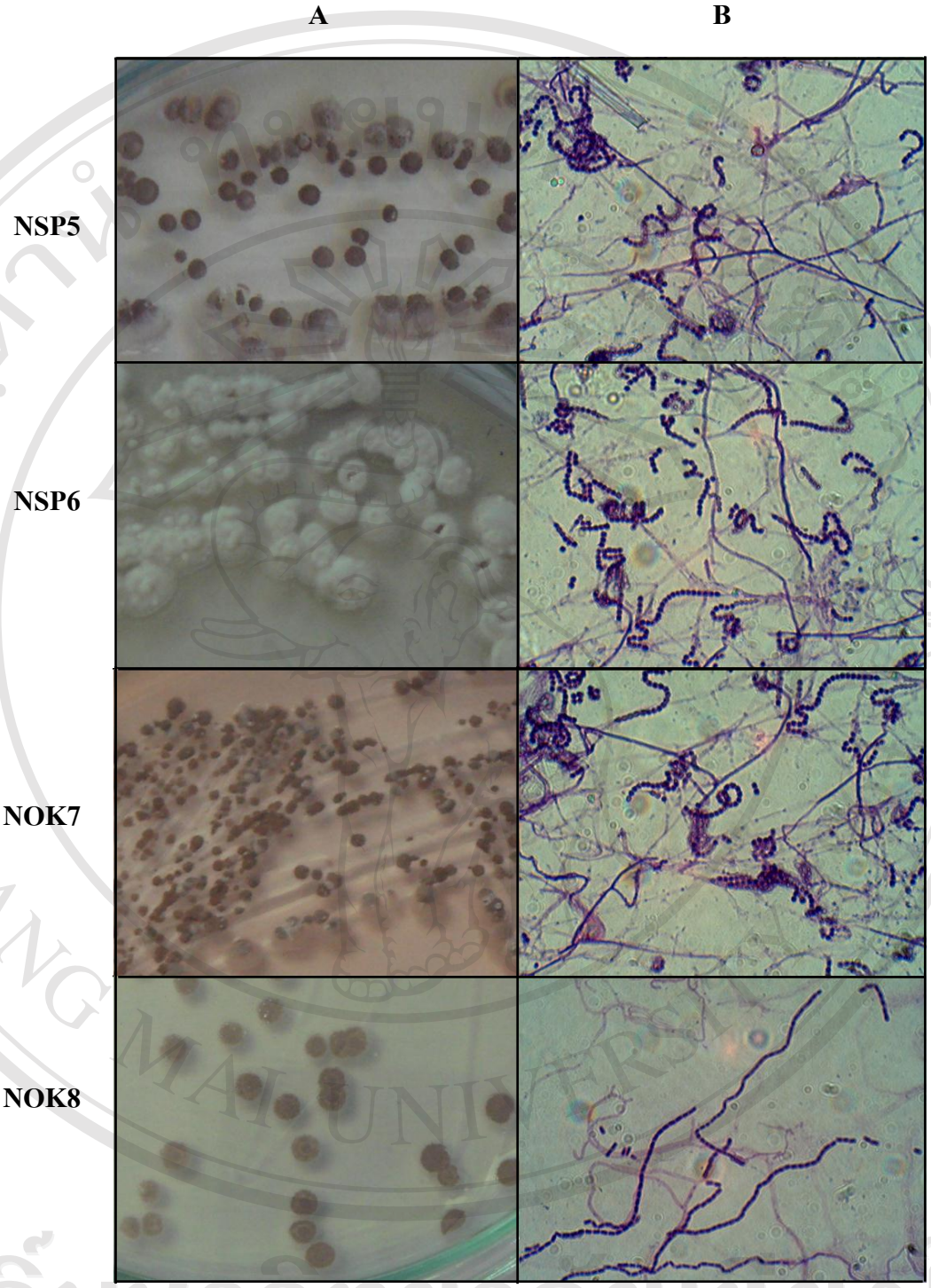
ภาพ 41 ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีส บ่มเป็นเวลา 15 วัน ที่สร้างขึ้น บนอาหาร yeast extract malt-extract agar (ISP-2) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า; A: สปอร์แบบขดม้วนต่อกันเป็นวง (coil) คล้ายขดลวดสปริง และ B: สปอร์แบบต่อกันเป็นสายโซ่ยาว (fragmenting branched aerial hypha)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



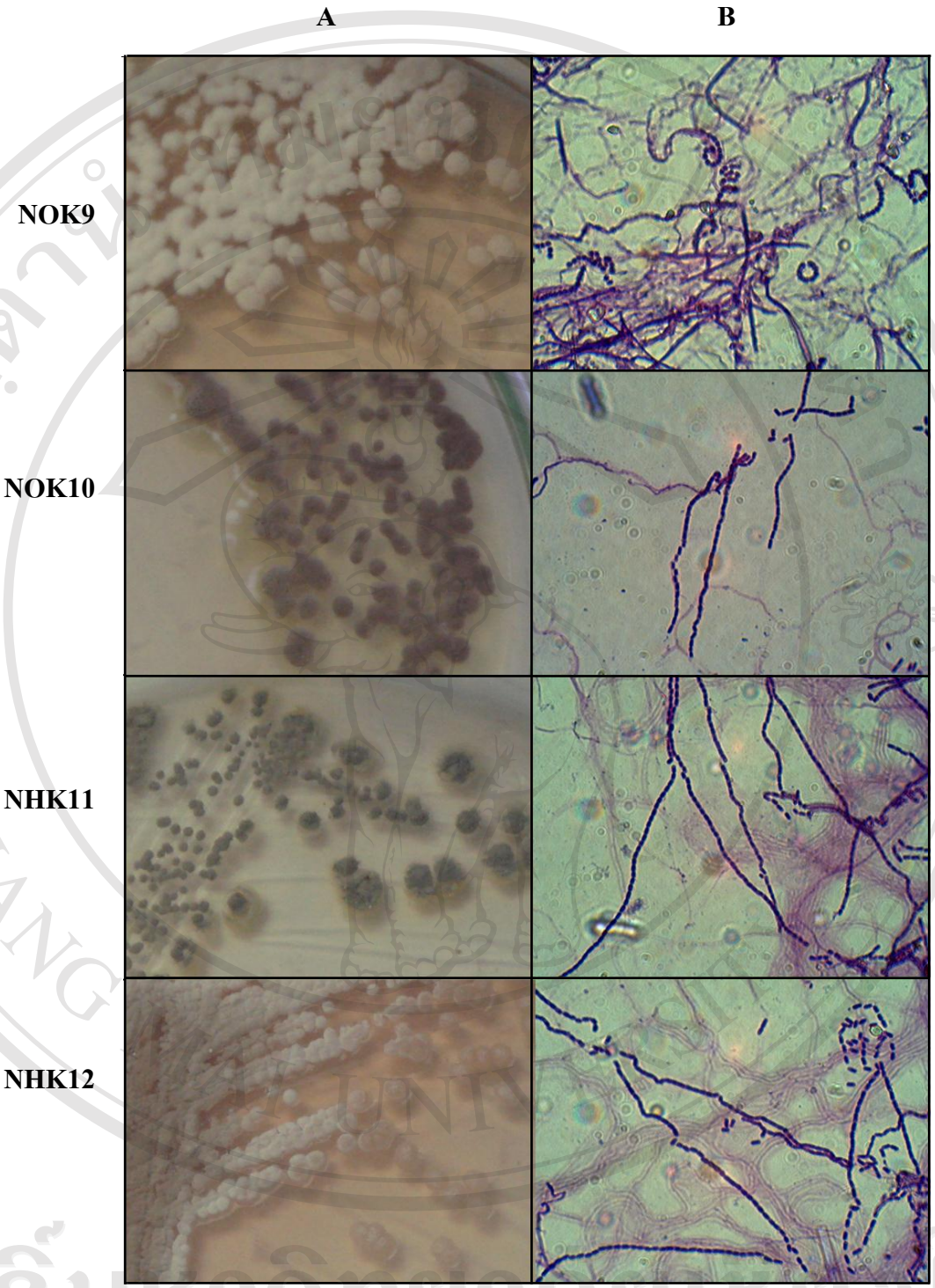
ภาพ 42 ลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลทต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeaset extract-malt extract agar (ISP-2) บ่มเป็นเวลา 15 วัน; (A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 และ (B) ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



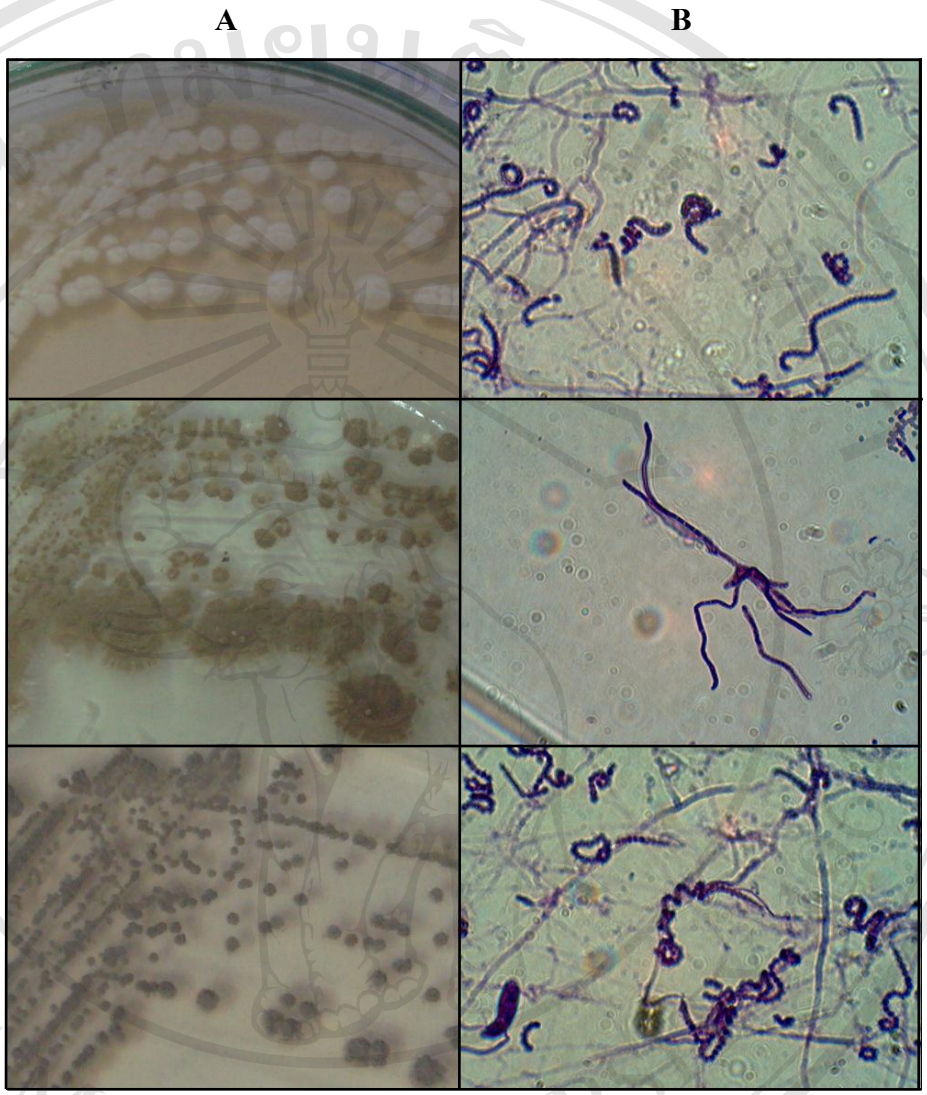
ภาพ 42 (ต่อ) ลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลทต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeaset extract-malt extract agar (ISP-2) บ่มเป็นเวลา 15 วัน; (A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 และ (B) ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 42 (ต่อ) ลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลทต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeaset extract-malt extract agar (ISP-2) บ่มเป็นเวลา 15 วัน; (A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 และ (B) ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 42 (ต่อ) ลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลทต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeaset extract-malt extract agar (ISP-2) บ่มเป็นเวลา 15 วัน; (A) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP-2 และ (B) ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 22 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกจากดินในเขตป่าในบริเวณต่างๆ ของจังหวัดเชียงใหม่

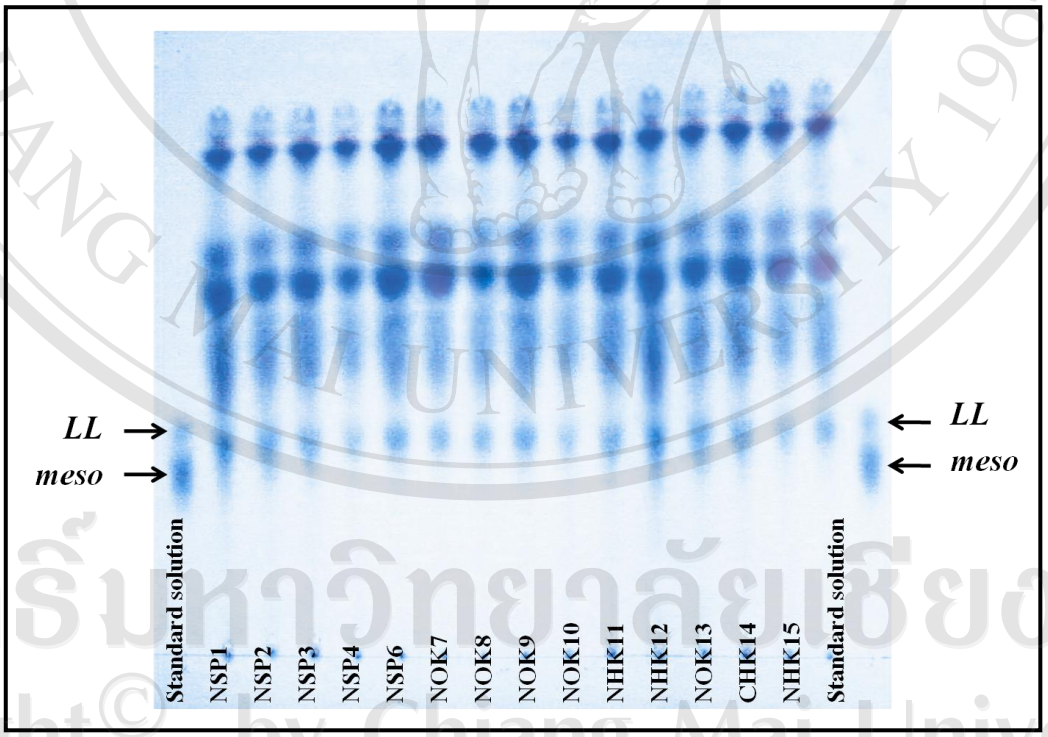
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	โครงสร้างทางสัณฐานวิทยา*														
	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	NSP6	NOK7	NOK8	NOK9	NOK10	NHK11	NHK12	NOK13	CHK14	NHK15
1. โคโลนีสีขาวครีม	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
2. โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเทาเมื่อแก่	/	X	/	/	X	/	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3. โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเทาดำเมื่อแก่	X	/	X	X	/	X	/	/	X	/	/	/	/	/	/
4. ของโคโลนีย่น	/	/	/	/	X	/	X	/	/	X	X	/	/	X	/
5. การสร้างรงควัตถุ (pigment)	/	/	/	X	/	/	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6. การสร้างสปอร์	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
7. สายสปอร์แบบ coil	/	/	/	/	/	/	/	X	/	X	X	X	/	X	/
8. สายสปอร์แบบ fragmenting branched	X	X	X	X	X	X	X	/	X	/	/	/	X	/	X

*โครงสร้างทางสัณฐานวิทยา; / มีโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา, X ไม่มีโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบผนังเซลล์ diaminopimelic acid (DAP) ของเชื้อแอกติโนไมซีส

เมื่อนำเชื้อแอกติโนไมซีสจากดินที่แยกได้จำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK8, NOK9, NOK10, NHK11, NHK12, NOK13, CHK14 และ NHK15 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM_F012 ได้มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ มาวิเคราะห์องค์ประกอบในผนังเซลล์เชื้อแอกติโนไมซีส เทียบกับสารละลายมาตรฐาน 0.01 M *LL*, *meso* – A_2pm โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography; TLC) พบเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ DAP ชนิด *LL* (ภาพ 43) ซึ่งเชื้อแอกติโนไมซีสที่มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ DAP ชนิด *LL* มีทั้งหมด 5 จีนัส ได้แก่ *Streptomyces*, *Sporichthya*, *Streptoverticillium*, *Microellobospora* และ *Nocardioides* (Microbiologyprocedure, 2009) แต่ในการระบุสปีชีส์ที่แน่นอนยังต้องมีการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ เพิ่มเติม ได้แก่ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rDNA เป็นต้น

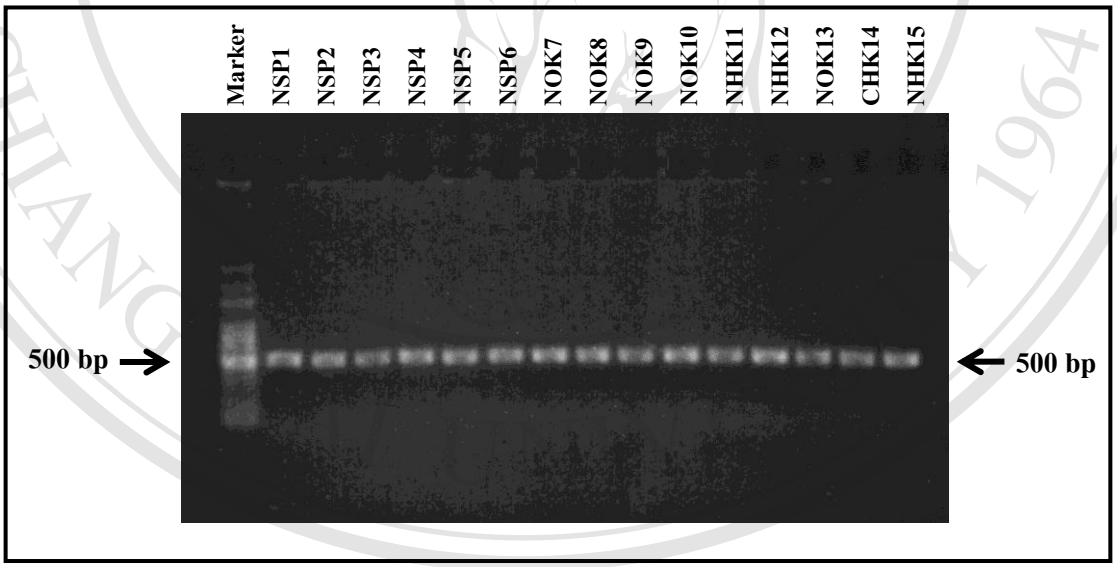


ภาพ 43 การตรวจสอบ diaminopimelic acid (DAP) องค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนไมซีส โดยวิธี thin layer chromatography (TLC); Standard solution = สารละลายมาตรฐาน 0.01 M *LL* and *meso* A_2pm)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.3 การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยใช้แทคนิค 16S rDNA sequencing

จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกได้จากดิน จำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK8, NOK9, NOK10, NHK11, NHK12, NOK13, CHK14 และ NHK15 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM_F012 ได้มากกว่า 50 เปอร์เซนต์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant Kit ร่วมกับไนโตรเจนเหลว พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแอกติโนไมซีสได้ทุกไอโซเลท เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ 16Sf forward (5'-TCA CGG AGA GTT TGA TCCTG-3') และ 16Sr reverse (5'-GCG GCT GCT GGC ACG TAGTT-3') สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 15 ไอโซเลท และเมื่อตรวจสอบโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส (ภาพ 44)



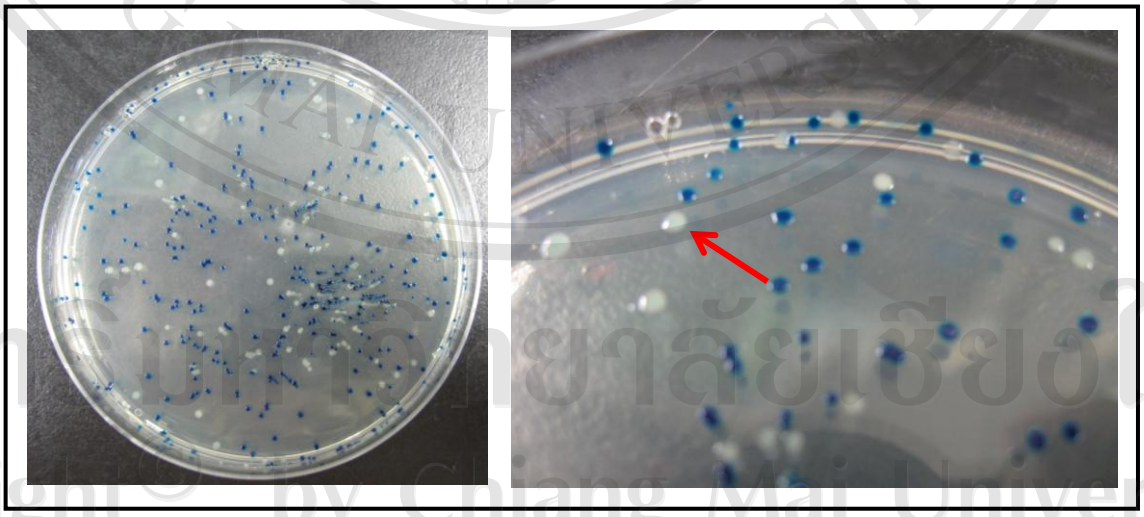
ภาพ 44 การเพิ่มปริมาณบางส่วนของ 16S rDNA gene ที่เฉพาะเจาะจงต่อการจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีส ด้วยวิธี Polymerace Chain Reaction (PCR) โดยใช้ specific primer (16Sf และ 16Sr) และใช้ 100 คู่เบส ladder เป็น marker ลูกศรชี้ด้านซ้ายแสดงตำแหน่งของดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส และลูกศรที่ชี้ด้านขวาแสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอของเชื้อแอกติโนไมซีส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำ Transformation และ colony direct PCR

นำผลผลิตจาก PCR ที่ได้มาโหลดบน 1 เปอร์เซนต์ low melting point gel (Invitrogen®) เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานต่อ 6X loading dye ในอัตราส่วน 8:2 ไมโครลิตร แล้วตรวจสอบโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ (ขนาด 500 คู่เบส) ใส่ลงใน T-vector pGEM® Easy แล้วดูดลงใน competent cell (*Escherichia coli*) เพื่อทำการตัดต่อยีน จากนั้นดูด competent cell ใส่ลงใน SOC medium บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) ที่ผสม 130 มิลลิโมล ampicillin เคลือบผิวหน้าด้วย 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-*β-D* galacto pyranoside (X-gal) และ Isopropyl- *β-D* -thiogalactopy ranoside (IPTG) เพื่อใช้ในการคัดเลือกโคโลนี

จากการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการถ่ายพลาสมิด T-vector pGEM® Easy ซึ่งมีส่วน insert ของยีน 16S rDNA ขนาด 500 มิลลิโมล โดยคัดเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหาร LB ผสมสาร ampicillin (ภาพ 45) มาทำ colony direct PCR เพื่อตรวจสอบเบื้อต้นว่าโคโลนีที่เลือกมานั้น มีส่วนของ insert gene หรือไม่ ซึ่งจากการทำ colony direct PCR แล้วนำมาตรวจสอบบน 1% agarose gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 500 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าโคโลนีที่คัดเลือกมานั้นมีส่วนของ insert gene ที่ต้องการ จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมาสกัดเอาส่วนของ plasmid ที่มี insert gene ที่ต้องการไปทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7 และ Sp6 ซึ่งเป็นไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพ 45 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เจริญบนอาหาร Luria-Bertani (LB) ผสมสาร 130 mM ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง; ลูกศรที่ชี้คือ โคโลนีที่ถูกคัดเลือก เนื่องจากมีส่วนส่วนของ insert gene

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

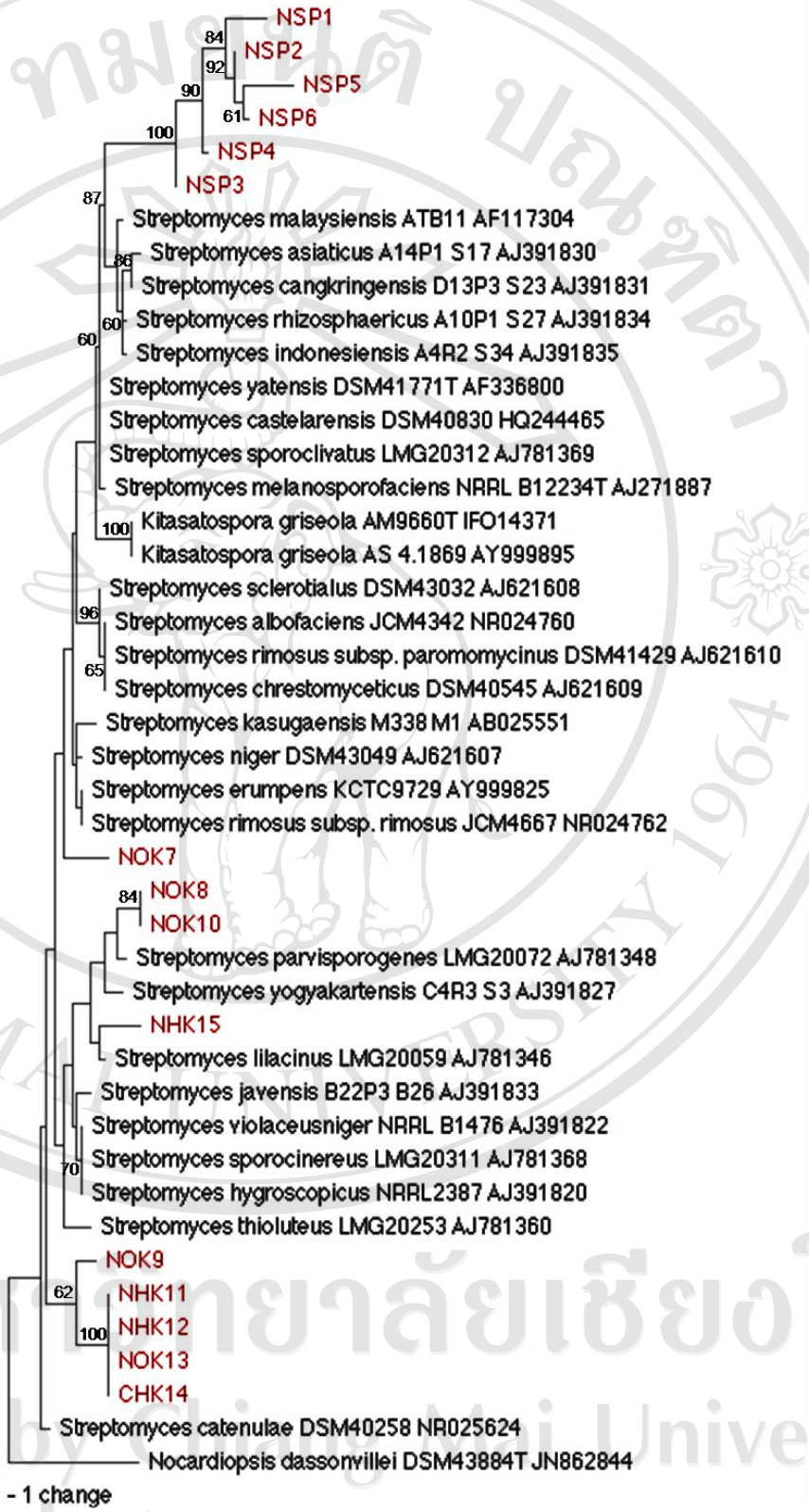
เมื่อนำเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท ไปตรวจสอบและวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์และจำแนกชนิดด้วยเทคนิค 16S rDNA Sequencing โดยใช้ไพรเมอร์ 16Sf และ 16Sr ซึ่งได้ PCR product ที่มีขนาด 500 คู่เบส เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องในการจัดจำแนก เมื่อได้ลำดับเบสที่ต้องการ นำไปเข้าโปรแกรม BLAST เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลใน Gene Bank พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA ของทุกตัวอย่าง เปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม MEGA5 แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม PUAP (Bootstrap = 1000) พบว่าจากตัวอย่างเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกแบบได้เป็น 4 กลุ่ม (clade) กลุ่มแรก ได้แก่ ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 กลุ่มที่สอง ได้แก่ NOK7 กลุ่มที่สาม ได้แก่ NOK8, NOK10 และ NHK15 ส่วนกลุ่มที่สี่ ได้แก่ NOK9, NHK11, NHK12, NOK13 และ CHK14 โดยจากตัวอย่างเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท มีเพียง 3 ไอโซเลท เท่านั้น ที่สามารถจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ ได้แก่ ไอโซเลท NOK8 และ NOK10 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *S. parvisporogenes* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง (% similarity) ที่ 97.98 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ง) มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 84 เปอร์เซนต์ (ภาพ 46) ส่วนไอโซเลท NHK15 มีระดับความคล้ายคลึงกับเชื้อ *S. lilacinus* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง 97.63 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ง) ในขณะที่ไอโซเลท NHK11, NHK12, NOK13 และ CHK14 ที่มีระดับความคล้ายคลึงกัน 100 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ง) มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 100 เปอร์เซนต์ (ภาพ 46) และมีความคล้ายคลึงกับไอโซเลท NOK9 ด้วยระดับความคล้ายคลึง 96.53 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ง) มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 62 เปอร์เซนต์ (ภาพ 46) ซึ่งจัดอยู่ใน basal clade รวมถึงไอโซเลท NOK7 ยังไม่สามารถจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ เนื่องจากไม่มีความคล้ายคลึงกับสปีชีส์ใดบน phylogenetic tree เช่นเดียวกับแอกติโนไมซีสอีก 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ที่สามารถจัดจำแนกได้เพียงระดับจีนัสเท่านั้น เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มีความแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Streptomyces* สปีชีส์ต่างๆ ที่นำมาจาก Gen bank ทั้งหมดจำนวน 26 ชนิด เห็นได้จากการที่เชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท รวมกลุ่มกันเป็นกระจุกในแขนงที่แยกตัวออกมาจากเชื้อ *Streptomyces* สปีชีส์ต่างๆ ที่คัดเลือกไว้ มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 100 เปอร์เซนต์ (ภาพ 46) และเมื่อดูเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึง พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 12 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK9,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NHK11, NHK12, NOK13 และ CHK14 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces* spp. สปีชีส์อื่นใน phylogenetic tree ต่ำกว่า 97 เปอร์เซนต์ ซึ่งการที่ค่าเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA ต่ำกว่า 97 เปอร์เซนต์ นั้น คาดว่าเชื้อดังกล่าวน่าจะเป็นเชื้อแอกติโนไมซีสสายพันธุ์ใหม่ (new species) ซึ่งจากการทดลองอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกได้จากดินธรรมชาติมีความหลากหลายอยู่สูง และอาหาร SEA ที่ใช้ในการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสอาจสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ตามปกติไม่เจริญในอาหารทั่วไปได้ดี จะเห็นได้ว่าเชื้อแอกติโนไมซีสที่มีประสิทธิภาพ และเลือกมาทำการศึกษานั้นส่วนมากมาจากเชื้อที่แยกได้จากอาหาร SEA สอดคล้องกับการรายงานของ Takefumi *et al.* (2005) พบอาหาร soil extract agar (SEA) สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีและมีความหลากหลาย โดยพบว่าโคโลนีที่เจริญบนอาหาร SEA มีขนาดโคโลนีที่เล็ก และเจริญช้า

ในการจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีสในการศึกษานี้ ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA ซึ่งมีขนาด 500 คู่เบส (จากทั้งหมด 1,500 คู่เบส) ทำให้การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีสบางสปีชีส์ใน phylogenetic tree มีความคล้ายคลึงกันถึง 100 เปอร์เซนต์ ได้แก่ *S. violaceusniger*, *S. sporocinereus* และ *S. hygroscopicus* ที่มีความคล้ายคลึงกันถึง 100 เปอร์เซนต์ มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 70 เปอร์เซนต์ หรือ *S. albofaciens*, *S. rimosus* subsp. *Paromomycinus* และ *S. chrestomyceticus* ที่มีความคล้ายคลึงกันถึง 100 เปอร์เซนต์ มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 65 เปอร์เซนต์ เป็นต้น (ภาพ 46) แต่เมื่อตรวจสอบลำดับ นิวคลีโอไทด์ทั้ง 1,500 คู่เบสแล้ว พบว่ามีนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่งที่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า หากใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 1500 คู่เบส ในการจัดจำแนกจะทำให้เกิดความแตกต่างมากกว่านี้ เช่นเดียวกับตัวอย่างเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NHK11, NHK12, NOK13 และ CHK14 ที่มีความคล้ายคลึงกันถึง 100 เปอร์เซนต์ มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 100 เปอร์เซนต์ หากใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,500 คู่เบส อาจสามารถจัดแนกความแตกต่างได้มากขึ้น หรืออาจสามารถยืนยันได้แน่ชัดว่าเป็นสปีชีย์เดียวกันก็ได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 46 Phylogenetic tree ของเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK8, NOK9, NOK10, NHK11, NHK12, NOK13, CHK14 และ NHK15

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved