บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างใบและผลมะม่วงทั้งหมด 17 พันธุ์ ที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ สวน และตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน นครนายก และพิษณุโลก นำมาตรวจภายใต้กล้อง stereo microscope พบว่าแผลมีลักษณะเป็นจุดสีดำขนาดใหญ่ รูปร่างกลมจนถึงรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดแตกต่างกันไป และบางแผลจะมีกลุ่มของโคนิเดีย ลักษณะเป็นหยดสีส้ม (spore mass) อยู่บนแผล ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting method สามารถแยกเชื้อราสาเหตุได้ทั้งหมด 150 ไอโซเลท โดยแยกได้จากใบ 46 ไอโซเลท จากมะม่วง 16 สายพันธุ์ และจากผล 104 ไอโซเลท จากมะม่วง 8 สายพันธุ์ 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 และพบว่าเมื่อเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น เชื้อจะสร้างเม็ดสเคลอโรเตียสีดำรอบๆ โคโลนี เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรานี้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบเส้นใยใส ไม่มีสี และมีผนังกั้น ส่วนโคนิเดียของเชื้อรามีเซลล์เดียว รูปไข่หัวท้ายมน (cylindrical) ลักษณะใส ไม่มีสี มีขนาดอยู่ในช่วง 16.46-18.65 × 3.94-4.47 ไมโครเมตร และจากลักษณะดังกล่าว รวมถึงการจัดจำแนกด้วยวิธี Polymerace Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง ได่แก่ CgInt และ ITS4 เพิ่มปริมาณยีนในส่วน ITS rDNA แล้วได้ผลผลิตขนาด 450 คู่เบส ทำให้ทราบแน่ชัดว่าเชื้อราสาเหตุที่แยกได้ คือเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ตามหลักเกณฑ์การจำแนกของ Sutton (1992)

จากการพิสูจน์เชื้อราสาเหตุของโรคด้วยการปลูกเชื้อบนผลม่วง โดยใช้มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สุกที่ปราศจากโรคและแมลง สุ่มเชื้อสาเหตุของโรคทั้งสายพันธุ์ highly resistance (HR) moderately resistance (MR) และ sensitive (S) มาทั้งหมด 58 ไอโซเลท แล้วปลูกเชื้อบนผลมะม่วงเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ อาหาร PDA เพื่อสังเกตอาการของโรค พบว่าเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 58 ไอโซเลท สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งบนใบและบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ได้ปลูกเชื้อลงไป ภายหลังจากบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 2 วัน พบว่าจะเริ่มปรากฏแผลที่มีสีน้ำตาล ซึ่งเป็นลักษณะปรากฏโดยทั่วไปบนพืชที่เป็นโรคแอนแทรคโนส และหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน พบว่าแผลมีสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มขึ้นจนเกือบดำ แผ่ออกเป็นรูปวงกลม เกิดอาการตายของเซลล์ (necrotic) และไหม้ ซึ่งแผลที่ปรากฏบนใบนั้นก็มีลักษณะเช่นเดียวกับแผลที่เกิดบนผลมะม่วง ส่วนในชุดควบคุม ไม่ปรากฏแผลหรือลักษณะอาการของโรคใดๆ

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 โดยในการทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อราที่ต้านทานระดับต่ำ (WR) และเมื่อตรวจสอบเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ S, MR และ HR ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรามีลักษณะโคโลนีปกติเช่นเดียวกับเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ แต่เมื่อนำปลายเส้นใยมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบเส้นใยของ เชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการเจริญที่ผิดปกติจากเส้นใยที่เลี้ยงเฉพาะบนอาหาร PDA คือ มีการเจริญน้อยลง ปลายเส้นใยหงิกงอ และเส้นใยลีบ และจากการค้นคว้าเพิ่มเติมพบว่าสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็นสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) ประเภทดูดซึม เมื่อมีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะทำให้เชื้อสาเหตุโรคกลายพันธุ์ และทนทานต่อสารกำจัดเชื้อราชนิดนั้นๆ ทำให้ไม่สารถใช้สารกำจัดเชื้อราชนิดนั้นๆ ได้ผลอีกต่อไป โดยส่วนมากการเกิดความต้านทานในกลุ่มเบนซิมิดาโซลจะเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน beta-tubulin ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งจับของสารเบนซิมิดาโซล ด้วยเหตุนี้จึงควรมีการควบคุมโรคโดยชีววิธีร่วมกับการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ หรือการนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมาใช้ควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ซึ่งการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสจากดินในการควบคุมโรคพืชก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยวิธีทางชีวภาพ เนื่องจากเชื้อแอกติโนไมซีสเป็นจุลินทรีย์ในดินที่มีคุณสมบัติหลายประการ คือ การย่อยสลายอินทรียวัตถุ มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม ความสามารถในการตรึงไนโตรเจนและละลายฟอสเฟตในรูปที่พืชนำไปใช้ได้ มีความสามารถในการนำไปควบคุมศัตรูพืช และมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ ซึ่งจากคุณสมบัติเหล่านี้ ทำให้เชื้อแอกติโนไมซีสเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่น่าสนใจในการนำมาควบคุมโรคพืช เพราะนอกจากเชื้อแอคติโนมัยซีสจะมีคุณสมบัติในการควบคุมศัตรูพืชแล้วโดยการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เพื่อทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราแล้ว ยังช่วยในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นพืช และยังเป็นการช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในช่วงหลังการเก็บเกี่ยวอีกด้วย

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 พบว่าสามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสได้ทั้งหมด 72 ไอโซเลท และเชื้อจะเจริญเต็มที่จนเห็นโคโลนีได้ชัดเจนได้ใน 10 วัน โดยจากการทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) ของเชื้อแอกติโนไมซีสจากดินทั้ง 72 ไอโซเลท นี้ ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง (highly resistance; HR) ด้วยวิธี dual culture technique บนอาหาร 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. เชียงใหม่ ทั้งหมด จึงได้ตั้งชื่อไอโซเลทแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ตัวนี้ รวมถึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพในขั้นตอนต่อไป

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 เปอร์เซนต์ มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง 15% colloidal chitin agar (CCA) โดยบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทุกไอโซเลทสามารถสร้างวงใส (inhibition zone) บนอาหาร CCA ได้ แสดงว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้

จากนั้นได้คัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงไอโซเลท NDM_F012 ได้มากกว่า 70 เปอร์เซนต์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) เป็นเวลา 3 – 15 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แล้วแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF; non-filtrate culture) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F; filtrate culture) มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง ไอโซเลท NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง (highly resistance; HR) ด้วยวิธี agar well diffusion method โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด (NF และ F) มาทดสอบเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน และทดสอบทุกๆ วัน จนครบ 15 วัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดนี้ มีคุณสมบัติในการแพร่ผ่านวุ้นได้ วิธีการทดสอบนี้ จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ให้เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราอยู่ในช่วง 28.89 - 77.50 เปอร์เซนต์ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ให้เปอร์เซนต์การยับยั้งในช่วง 20.74 - 67.59 เปอร์เซนต์ต์ เชื้อแอกติโนไมซีสที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือไอโซเลท NSP4 และ NSP1ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเฉลี่ย 59.56 และ 58.89 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนช่วงเวลาที่เหมาะสมที่อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด คือ เชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP1 มีประสิทธิภาพสูงสุดวันที่ 3 – 7 ส่วนเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP2 มีประสิทธิภาพสูงสุดวันที่ 3 และ 7 ในขณะที่เชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลท NSP3 NSP5 และ NSP6 มีประสิทธิภาพสูงสุดในวันที่ 3 และเชื้อแอกติโนมัยซีสไอโซเลท NSP4 มีประสิทธิภาพสูงสุดในวันที่ 7 ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อราสูงที่สุดคือ 3 - 7 วัน และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ เมื่อเก็บรักษาในระยะเวลาที่นานขึ้น

จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด (NF และ F) ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคด้วยเทคนิค 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

อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ที่บ่มเป็นเวลา 3 วัน ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคได้ แต่จะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 5 โดยจากการตรวจการงอกของสปอร์เชื้อราที่ 6 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 70.73 - 88.98 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 โดยมีประสิทธิภาพ 14.22 เปอร์เซนต์ และจากการตรวจการงอกของสปอร์เชื้อราเมื่อเพาะเลี้ยงสปอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเส้นใยของเชื้อราเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดการงอกของสปอร์ได้ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่สามารถวัดการเจริญของ เชื้อราได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12

อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิด บ่มเป็นเวลา 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 เปอร์เซนต์ต์ 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 โดยมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประสิทธิภาพ 38.12 เปอร์เซนต์ แต่ตั้งแต่เวลา 18 ชั่วโมง เป็นต้นไป พบว่าเส้นใยของเชื้อราเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดการงอกของสปอร์ได้ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่สามารถวัดการเจริญของเชื้อราได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12

จากการตรวจวัดการงอกของสปอร์เชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งสองชนิดที่บ่มเป็นเวลา 5 วัน โดยตรวจสอบการงอกของ germ tube เมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์ปกติที่เวลา 0 ชั่วโมง ซึ่งมีขนาดเฉลี่ย 16.46-18.65 × 3.94-4.47 ไมโครเมตร พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง สปอร์เชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF 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 โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ NSP4 และ NSP1 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบลักษณะความผิดปกติของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรค ที่เจริญร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งอายุ 5 และ 7 วัน พบสปอร์เชื้อรามีลักษณะปกติเช่นเดียวกับสปอร์เชื้อราในชุดควบคุม 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 ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสมีผลเพียงชะลอการเจริญของเชื้อราเท่านั้น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อราแต่อย่างใด

ส่วนในการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลโดยการปลูกเชื้อบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปราศจากโรคและแมลง แล้วปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในรูป spore suspension ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลตร บนผลมะม่วง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ บันทึกผลในวันที่ 4 หลังการปลูกเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF บ่มเป็นเวลา 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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 บ่มเป็นเวลา 5 วัน สามารถลดการเกิดโรคในช่วง 16.56 - 28.62 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 และ NSP3 โดยมีประสิทธิภาพ 28.62 และ 27.24 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF บ่มเป็นเวลา 7 วัน ลดการเกิดโรคได้ในช่วง 24.14 - 33.24 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 โดยมีประสิทธิภาพ 33.24 เปอร์เซนต์ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F บ่มเป็นเวลา 7 วัน ลดการเกิดโรคในช่วง 15.17 - 22.69 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP3 โดยมีประสิทธิภาพ 22.69 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้ในระดับต่ำ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด บ่มเป็นเวลา 3 วัน ไม่สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงได้ สอดคล้องกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อรา เนื่องจากทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งชนิด NF และ F จะเริ่มมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่ออายุ 5 วัน และมีประสิทธิภาพลดลงเมื่ออายุของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น

สำหรับผลของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด (NF และ F) ต่อมะม่วง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อผลมะม่วง ซึ่งจะเห็นได้จากบริเวณที่หยดอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ไม่พบอาการผิดปกติใดๆ มีเพียงรอยช้ำที่เกิดจากการทำแผลเท่านั้น แต่ในการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่ประสบความสำเร็จในการนำอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสไปในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง ซึ่งเห็นได้จากเปอร์เซนต์ต์การลดการเกิดโรค (อยู่ในช่วง 15.17 – 37.80 เปอร์เซนต์) ยังอยู่ในระดับต่ำ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาด้านการนำไปประยุกต์ใช้เพิ่มเติมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการนำไปใช้สูงสุด

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 ที่สร้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รงควัตถุ (pigment) สีน้ำตาลออกมารอบๆ โคโลนี ส่วนอีก 10 ไอโซเลท ไม่พบการสร้างรงควัตถุบนอาหาร ISP-2 เมื่อตรวจสอบลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ด้วยวิธี inclined coverslip พบเชื้อแอกติโนไมซีสมีการสร้างสปอร์รูปทรงกลมขนาดเล็ก ซึ่งมีทั้งลักษณะแบบขดม้วนต่อกันเป็นวง (coil) คล้ายขดลวดสปริง ได้แก่ ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK9, NOK13 และ NHK15 และสปอร์แบบต่อกันเป็นสายโซ่ยาว (fragmenting branched aerial hypha) ได้แก่ ไอโซเลท NOK8, NOK10, NHK11, NHK12 และ CHK14 ซึ่งคล้ายกับลักษณะของสายสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสในจีนัส *Streptomyces*

จากนั้นศึกษาการจัดจำแนกเพิ่มเติม โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบในผนังเซลล์เชื้อแอกติโนไมซีส เทียบกับสารละลายมาตรฐาน 0.01 M *LL*, *meso* – A_2pm โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography; TLC) พบเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ DAP ชนิด *LL* ซึ่งเชื้อแอกติโนไมซีสที่มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ DAP ชนิด *LL* มีทั้งหมด 5 จีนัส ได้แก่ *Streptomyces*, *Sporichthya*, *Streptoverticillium*, *Microellobospora* และ *Nocardioides* แต่ในการระบุสปีชีส์ที่แน่นอนยังต้องมีการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ เพิ่มเติม ได้แก่ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rDNA เป็นต้น

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 มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 84 เปอร์เซนต์ ส่วนไอโซเลท NHK15 มีระดับความคล้ายคลึงกับเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

S. lilacinus มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง 97.63 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ไอโซเลท NHK11, NHK12, NOK13 และ CHK14 ที่มีระดับความคล้ายคลึงกัน 100 เปอร์เซนต์ มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 100 เปอร์เซนต์ และมีความคล้ายคลึงกับไอโซเท NOK9 96.53 เปอร์เซนต์ มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 62 เปอร์เซนต์ 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 เห็นได้จากการที่เชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท รวมกลุ่มกันเป็นกระจุกในแขนงที่แยกตัวออกมาจากเชื้อ *Streptomyces* สปีชีส์ต่างๆ ที่คัดเลือกไว้ มีระดับความเชื่อมั่นของ bootstrap values บน phylogenetic tree 100 เปอร์เซนต์ และเมื่อดูเปอร์เซนต์ต์ความคล้ายคลึง พบว่าแอกติโนไมซีสทั้ง 12 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK9, NHK11, NHK12, NOK13 และ CHK14 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces* spp. สปีชีส์อื่นใน phylogenetic tree ต่ำกว่า 97 เปอร์เซนต์ ซึ่งการที่ค่าเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA ต่ำกว่า 97 เปอร์เซนต์ นั้น คาดว่าเชื้อดังกล่าวน่าจะเป็นเชื้อแอกติโนไมซีสสายพันธุ์ใหม่ (new species)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved