

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจโรคแอนแทรกโนสพริกหนุ่มในแปลงของเกษตรกร อ.สันทราย อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ และจากตลาดต่างๆ พบโรคแอนแทรกโนสเป็นโรคที่สำคัญของพริก มักจะเกิดโรคก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งทำลายผลผลิตเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมีแนวโน้มที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดดูดซึม (systemic fungicide) และจัดอยู่ในกลุ่มเบนซิมิดาโซล ซึ่งเป็นสารกำจัดเชื้อราที่เกษตรกรนิยมใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกรที่ใช้สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสพริกในเขต

อ. สันทราย อ. แม่ริม และจากตลาด มาแยกเชื้อราสาเหตุภายในห้องปฏิบัติการ โดยสามารถแยกเชื้อราสาเหตุได้จำนวน 100 ไอโซเลท และเมื่อจัดจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยา โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) สามารถจำแนกเชื้อราออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 73 ไอโซเลท และ *Colletotrichum capsici* จำนวน 27 ไอโซเลท

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

นิวคลีโอไทด์ดังกล่าว ส่งผลให้กรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลงดังนี้ เชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อรา (S) และเชื้อราที่ต้านทานสารกำจัดเชื้อราได้เล็กน้อย (WR) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน แต่พบเชื้อราสายพันธุ์ WR ไอโซเลท Cc9 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 225 เปลี่ยนจาก leucine (CTG) เป็น proline (CCG) และ 243 เปลี่ยนจาก proline (CCG) เป็น leucine (CTG) เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับปานกลาง (MR) ไอโซเลท Cg46 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 162 เปลี่ยนจาก methionine (GCA) เป็น valine (GCG) ส่วนเชื้อราที่ต้านทานสารกำจัดเชื้อราได้เล็กน้อย (WR) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน แต่พบเชื้อราสายพันธุ์ WR ไอโซเลท Cc9 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 225 เปลี่ยนจาก leucine (CTG) เป็น proline (CCG) และ 243 เปลี่ยนจาก proline (CCG) เป็น leucine (CTG) เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับปานกลาง (MR) ไอโซเลท Cg46 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 162 เปลี่ยนจาก methionine (GCA) เป็น valine (GCG) ส่วนเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราระดับสูง (HR) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 โดยเปลี่ยนจาก glutamic acid (GAG) เป็น alanine (GCG) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 200 ซึ่งตำแหน่ง codon 198 และ 200 ถ้าเกิดมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่งนี้ จะส่งผลให้เชื้อราเกิดการต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ HR บางไอโซเลท ที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 198 และ 200 ได้แก่ไอโซเลท Cg75 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ codon 241 เปลี่ยนจาก arginine (GCG) เป็น cysteine (GTG) และ codon 257 เปลี่ยนจาก methionine (CAT) เป็น threonine (CAC) ไอโซเลท CF78 มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 164 เปลี่ยนจาก alanine (GCC) เป็น threonine (ACC) ส่วนเชื้อราไอโซเลท Cg22, Cg28, Cg40 และ Cg44 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในช่วงบางส่วนของ beta-tubulin gene (*TUB2*) (ตาราง 12, ภาพ 18)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกมีแนวโน้มที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งแนวทางในการควบคุมเชื้อราสาเหตุให้ลดระดับความต้านทานต่อสารเคมี ก็คือการควบคุมโดยชีววิธี ควบคู่กับการใช้สารเคมีในการควบคุม ซึ่งเชื้อแอสคิตินัมยีสเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการควบคุมเชื้อราสาเหตุ เนื่องจากเชื้อแอสคิตินัมยีสสามารถผลิตสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งเชื้อราสาเหตุได้ จากการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอสคิตินัมยีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอสคิตินัมยีสออก (F) จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-28 และ SEA120-38 (เชื้อแอสคิตินัมยีสที่สามารถผลิตเอนไซม์โคโคตินเนส) ในการยับยั้งการ

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

เมื่อศึกษาถึงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแอสโคดิโนมัยซิส OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 ที่เจริญบนอาหาร Inhibitory Mold Agar (2IMA-2) พบเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสมีลักษณะโคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้ง โคโลนีโค้งนูนขึ้นเล็กน้อย (convex) บางโคโลนีแบนราบติดกับอาหาร (flat) ไม่พบว่าเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสมีการสร้างรงควัตถุ (pigment) เมื่อนำเชื้อที่ได้มาศึกษาลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบเชื้อแอสโคดิโนมัยซิส ไอโซเลท OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 มีการสร้างเส้นใย แต่ไม่สร้างสปอร์ ส่วนไอโซเลท SEA120-28 และ SEA120-38 พบมีการสร้างเส้นใย และสปอร์ที่มีลักษณะคล้ายลูกปิดต่อกันเป็นโซ่ซึ่งคล้ายกับลักษณะสปอร์ของเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสในกลุ่ม *Streptomyces* sp. เมื่อนำเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสทั้ง 6 ไอโซเลท มาทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารในผนังเซลล์ DAP พบเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสทั้ง 6 ไอโซเลท มี DAP ชนิด LL ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* sp. และเมื่อนำเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสทั้ง 6 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอและทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสจัดอยู่ในจีโนม *Streptomyces* sp. นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสทั้ง 6 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่คัดเลือกมาจาก GeneBank ในช่วง 90.21-95.28% ซึ่งน้อยกว่า 97% และถ้ามีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงต่ำกว่า 97% จะจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

จากการคัดเลือกเชื้อแอสโคดิโนมัยซิสจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ดีภายในห้องปฏิบัติการ มาทดสอบกับเมล็ดพริกหนุ่มพันธุ์การค้า และพันธุ์พื้นเมือง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอสโคดิโนมัยซิส ชนิด NF และ F ไม่ส่งผลให้เมล็ดมีการงอกที่ผิดปกติ และไม่ได้กระตุ้นการงอกของเมล็ดให้เจริญเร็วกว่าชุดควบคุม ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม 3 ชนิด ได้แก่ แช่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว แช่น้ำอาหารเลี้ยงเชื้อแอสโคดิโนมัยซิส EPM และแช่ในเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* (ตามอัตราแนะนำ) เมื่อนำเมล็ดพริกทั้งสองชนิดที่ผ่านการแช่ด้วย NF

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

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอสคิตินอิมยชีสชนิด NF และ F กับต้นกล้าพริกหนุ่มพันธุ์การค้า โดยฉีดพ่น NF และ F 2 วิธีการ ได้แก่ การฉีดพ่นก่อน และหลังการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Cg60 (HR) พบว่ากรณีการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอสคิตินอิมยชีสชนิด NF มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคได้ดีกว่าการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอสคิตินอิมยชีสชนิด F โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคดังนี้ การฉีดพ่นด้วย NF และ F ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 38.3-46.7% และ 55.0-58.3% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมคือฉีดพ่นด้วยอาหาร EPM หลังปลูกเชื้อราสาเหตุตาม มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 91.0% สำหรับการฉีดพ่น NF และ F ภายหลังปลูกเชื้อราสาเหตุมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 41.0-46.0% และ 58.3-61.3% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมคือ ฉีดพ่นด้วยอาหาร EPM ก่อน และหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 91.0 และ 89.67% ตามลำดับ (ตาราง 22, ภาพ 30 และ 31) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอสคิตินอิมยชีสชนิด NF กับการฉีดพ่นด้วย *B. subtilis* (ตามอัตราแนะนำ) ทั้ง 2 วิธี ได้แก่ การฉีดพ่นก่อน และหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 44.7% และ 45.3% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ส่วนการฉีดพ่นด้วย

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