สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

7. อภิปรายผลการทดลอง

จากการประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (HR) จำนวน 95% จากผลการทดลองนี้ซึ่งแสดงการกลายพันธุ์ในระดับ phenotypic mutation บ่งชี้ว่ามีเชื้อราเกิดการปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอดและเกิดการต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวแฝงอยู่ในธรรมชาติขึ้นแล้ว เพราะพบเชื้อรากลุ่ม HR ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น $\geq$ 500 mg/l ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นในอัตราแนะนำ และมากกว่าอัตราแนะนำ โดยอาจเป็นผลมาจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคนี้มากเกินอัตราแนะนำและใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน มีผลสอดคล้องกับรายงานของ Sarish (1989), Farungsang *et al.* (1994), Sander *et al.* (2000), และ Kumar *et al.* (2007) ที่ตรวจสอบความต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในระดับ phenotype mutation พบเชื้อราดังกล่าวต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซลอยู่ในระดับสูง

จากการศึกษาความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาร์ซิมที่ระดับ genetic mutation โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB2* ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค PCR โดยสุ่มตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม HR และเชื้อรากลุ่ม S เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสเป็นกรดกรดอะมิโน เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงเฉพาะจุด พบจุดกลายพันธุ์ (point mutation) ของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 198 ของเชื้อรากลุ่ม HR กล่าวคือเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glutamic acid (E; GAG) ถูกแทนที่ด้วย alanine (A; GCG) บน codon ดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นตัวบ่งชี้ว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงเกิดการกลายพันธุ์ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาความต้านทานต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เกิดจุดกลายพันธุ์ ตรงตำแหน่ง codon ที่ 198 โดยศึกษาจากต้น northern jointvetch ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Buhr and Dickman, 1994) โรค postbloom fruit drop ของส้ม ในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐ และ เมืองเซาเปาโล ประเทศบราซิล (Peres *et al.*, 2004) โรคแอนแทรคโนสจากไม้ผลต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่น (Chung *et al.*, 2006), โรคแอนแทรคโนสของ *Limonium* spp. ในประเทศอิสราเอล (Maymon *et al.*, 2006) โรคแอนแทรคโนสของพริก และสตรอเบอร์รี่ ในประเทศเกาหลี (Kim *et al.*, 2007) และโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในประเทศจีนตอนใต้ (Ru-Lin and Jun-Sheng, 2007) ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับพันธุกรรมนี้ เป็นตัวบงชี้ที่แสดงให้เห็นชัดเจนขึ้นว่าความต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวของเชื้อราสามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลาน และเชื้อรากลุ่มที่กลายพันธุ์ต้านทานต่อสารเคมีที่กล่าวนี้ได้ปรากฏขึ้นแล้วในธรรมชาติ หรือ

แปลงปลูกของเกษตรกร และกำลังเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ เพราะฉะนั้นจำเป็นต้องแนะนำเกษตรกรให้ตระหนักถึงการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชอย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันเชื้อราเกิดความต้านทานต่อสารเคมีที่กำลังเกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าจะต้องมีการจัดการอย่างระมัดระวัง เพื่อให้เกิดการควบคุม และป้องกันกำจัดเชื้อโรคเป้าหมายให้มีประสิทธิภาพสูงสุด สำหรับการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนี้ ยังมีรายงานจาก Damicone and Smith (2009) ว่าสามารถสร้างความต้านทานข้าม (cross resistance) ได้ด้วย กล่าวคือ การที่เชื้อราสาเหตุโรคพืชสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งแล้ว ยังสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือคนละกลุ่มกันแต่มีกลไกการออกฤทธิ์เข้าทำลายเหมือนกันหรือคล้ายกัน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ที่แสดงให้เห็นว่าเกิดเชื้อราสายพันธุ์ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมนั้น อาจจะต้านทานต่อสารชนิดอื่นในกลุ่มเบนซิมิดาโซลด้วย จึงจำเป็นต้องแนะนำเกษตรกรให้ลดความเสี่ยงนี้โดยการใช้สารเคมีต่างกลุ่มสลับกัน หรือใช้หลักการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานมาใช้ในแปลงปลูก (integrated pest management) (Brent and Hollonmon, 1998; Staub, 1991; Dirou and Stovold, 2005; Prabakar *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008; Damicone and Smith, 2009) อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์เพื่อต้านทานต่อสารเคมีนั้น อาจเกิดจากยีนเดี่ยวๆ หรือหลายยีน ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีนอาจเกิดขึ้นจำเพาะตำแหน่งเดียว หรือเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

8. สรุปผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> : ความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา*Colletotrichum* spp. สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

1.1 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

จากการแยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง 17 สายพันธุ์ (เจ้าคุณทิพย์ โชคอนันต์ ฟ้าลั่น แก้ว เขียวมรกต เขียวเสวย ลิ้นงูเห่า มหาชนก มันขุนศรี น้ำดอกไม้ นารีลืมรัง อกร่อง เพชรบ้านลาด พิมเสนแรด ศาลายา และตลับนาค) จำนวน 150 ไอโซเลท ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) พบว่าเชื้อราทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ดังนี้ เมื่ออ่อนเส้นใยมีสีขาวต่อมาจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาและเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 วัน อัตราการเจริญเฉลี่ยเท่ากับ 9.97 $\pm$ 0.81 mmต่อวัน บางไอโซเลทสร้างกลุ่มสปอร์สีส้ม (spore mass) และพบเม็ด sclerotium สีดำฝังตัวอยู่ในอาหาร PDA มีลักษณะสปอร์รูปทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดียว ใส (ไม่มีสี) ขนาด 4.24 $\pm$ 0.11 x 17.69 $\pm$ 0.45 µm จากลักษณะดังกล่าวสามารถจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุเป็นเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1992)

1.2 ทดสอบความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการศึกษาความทนทานต่อสารคาร์เบนดาร์ซิมที่ระดับ phenotypic mutation โดยประเมินระดับความทนทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม 6 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0.1, 1.0, 10, 100, 500 และ 1000 mg/l พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (highly resistant; HR $\geq$ 500 mg/l) จำนวน 96 ไอโซเลท (72.52%) ระดับระดับปานกลาง (moderately resistant; MR $\leq$ 100 mg/l) จำนวน 1 ไอโซเลท (1.53%) และพบเชื้อราระดับอ่อนแอ (sensitive; S $\leq$ 1 mg/l) จำนวน 37 ไอโซเลท (24.7%) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อราที่ต้านทานระดับต่ำ (weakly resistant; WR $\leq$ 10 mg/l)

1.3 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (HR)

1.3.1 ลักษณะโคโลนี และเส้นใยของเชื้อรา

บนอาหาร PDA ที่ผสมคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 500 mg/l พบการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (HR) เท่านั้น โดยโคโลนีของเชื้อราที่เจริญจะมีสองลักษณะคือ โคโลนีที่เจริญแบบปกติเช่นเดียวกับการเจริญที่ระดับความเข้มข้น 0 mg/l และการเจริญแบบผิดปกติ คือเชื้อราบางไอโซเลทสร้าง pigment สีแดงม่วงออกมาจากจุดเจริญก่อนที่เส้นใยจะเจริญออกมา และบางไอโซเลทเชื้อราที่เจริญแบบผิดปกติ โคโลนีจะมีขนาดเล็ก เจริญได้ช้า ขอบโคโลนีหยัก เส้นใยสานตัวกันแน่นเป็นกระจุกในบริเวณที่วางโคโลนีลงไปบนอาหาร

เมื่อตรวจสอบลักษณะเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ (S และ HR) ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบเส้นใยของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ มีลักษณะเส้นใยไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้เชื้อราสายพันธุ์ HR ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ผสมคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 500 mg/l มีลักษณะเส้นใยไม่แตกต่างกัน

1.3.2 ลักษณะ conidium และการงอก germ tube บนเยื่อหอม

จากการทดสอบการงอกของ conidium เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วงบนเยื่อหอมลอยอยู่บนน้ำกลั่น และบนสารละลายสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น 500 mg/l พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (HR) เริ่มสร้าง germ tube หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/l เชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสายกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (HR) สร้าง germ tube ได้เร็วและยาวกว่าสายพันธุ์สายพันธุ์ปกติ (S) โดยในชั่วโมงที่ 24 หลังการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการงอกสูงสุด และมีความยาวของ germ tube ใกล้เคียงกัน

1.4 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

จากการศึกษาความทนทานต่อสารคาร์เบนดาร์ซิมที่ระดับ genetic mutation โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อรา *C. gloeosporioides* เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน beta-tubulin (*TUB2*) ด้วยเทคนิค nested-PCR เมื่อตรวจสอบผลปฏิกิริยาโดยวิธี gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 341 คู่เบส จากนั้นนำไป

วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อรากลุ่มต้านทานระดับสูง (HR) ทั้งแบบลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงแต่ไม่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง (silent mutation) และแบบลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง (missense mutation) สำหรับการเปลี่ยนแปลงแบบ missense mutation ปรากฏที่ตำแหน่ง codon 198 ที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม HR ทุกไอโซเลทมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glutamic acid (E; GAG) ถูกแทนที่ด้วย alanine (A; GCG) บน codon ดังกล่าว เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงจาก adenine (A) เป็น cytosine (C) การเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏบนตำแหน่งนี้เป็นจุดกลายพันธุ์ (point mutation) ที่อาจเป็นตัวบ่งชี้ว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงเกิดการกลายพันธุ์ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม ในขณะที่ตรงตำแหน่งนี้ของเชื้อรากลุ่ม S ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การทดลองที่ 2 : ประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ 2 ชนิด ได้แก่ จากต้นยูคาลิปตัสและไม้สะเดา ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าน้ำส้มควันไม้ทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2% (v/v) ขึ้นไป ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 100% สำหรับการทดสอบยับยั้งการงอกของ โคนิเดียที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำส้มควันไม้ทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1% (v/v) ขึ้นไป สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100% ซึ่งประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสที่ระดับความเข้มข้นน้อยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีกว่าน้ำส้มควันไม้สะเดา สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง โดยแช่มะม่วงในน้ำส้มควันไม้ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3% (v/v) เป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 นาที ก่อนการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าการแช่มะม่วงในน้ำส้มควันไม้ 1% (v/v) เป็นเวลา 1 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ในช่วง 55.17 – 100% ซึ่งเมื่อตรวจสอบคุณภาพของมะม่วงภายหลังจากแช่น้ำส้มควันไม้เป็นเวลา 16 วัน พบว่ากลิ่นจะหายไปในวันแรกหลังจากการแช่น้ำส้มควันไม้ และไม่พบอาการของโรคที่ผล ส่วนสีเปลือก และรสชาติของมะม่วงไม่ต่างจากมะม่วงก่อนนำมาแช่น้ำส้มควันไม้ ในขณะที่ชุดควบคุมพบว่าบนผลมะม่วงแสดงอาการของโรคทั่วทั้งผล