ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างเชื้อราโครงการปลาสวยงามในเขตภาคกลาง

ดับ	วัน/เดือน/ปี	จังหวัด	ฟาร์มที่อยู่	ชนิดปลา	ตำแหน่งเก็บ	ชนิดเชื้อรา
1	3 / 10 / 49	ราชบุรี	ตลาดส่งออกปลาสวยงาม	ปลาใบไม้	ครีบหาง	*Achlya*
2	3 / 10 / 49	กรุงเทพฯ (จตุจักร)	ร้านรวมปลาหมอไทย	ปลากะโห้ ตัวที่ 1	ลำคอ	*Achlya* *Achlya*
3	3 / 10 / 49	กรุงเทพฯ (จตุจักร)	ร้านรวมปลาหมอไทย	ปลากะโห้ ตัวที่ 2	บริเวณเหงือก	*Achlya* *Saprolegnia*
4	14 / 10 / 49	ราชบุรี	ศิริรัตน์	ปลาแป้นมาเลเซีย	ตัวที่ 1 เหงือก ตัวที่ 2 โคนครีบหาง	*Achlya* *Achlya* *Achlya*
5	15 / 10 / 49	นครปฐม	สมชาย ทำกินรวย	บอลลูนขาว	ครีบหลัง	*Achlya* *Saprolegnia*
6	15 / 10 / 49	นครปฐม	สมชาย ทำกินรวย	บอลลูนดำ	ครีบหลังข้างลำตัว	*Achlya*
7	15 / 10 / 49	นครปฐม	สมชาย ทำกินรวย	บอลลูนดำ	ครีบหลัง ทั้ง 3 ตัว ตัวที่ 1 ตัวที่ 2 ตัวที่ 3	 *Achlya* *Achlya* *Leptolegnia*
8	18 / 10 / 49	หนองคาย	องุ่นฟาร์ม	ปลาทอง	ข้างลำตัวตรงกลางด้านซ้าย	*Saprolegnia*
9	25 / 10 / 49	อุบลราชธานี	ร้านปลาหมอสี	หมอสี	เหงือก	*Saprolegnia* *Achlya*
10	25 / 10 / 49	ร้อยเอ็ด	ศูนย์วิจัยพัฒนาประมง	หางนกยูง	ลำตัว	*Saprolegnia*
11	28 / 10 / 49	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	หางนกยูง	ลำตัว	*Leptolegnia*
12	30 / 10 / 49	ร้อยเอ็ด	ร้านเอสพีปลาสวยงาม	หางนกยูง	ลำตัว	*Saprolegnia*
13	30 / 10 / 49	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	บอลลูนดำ	ลำตัว	*Saprolegnia*
14	30 / 10 / 49	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	บอลลูนดำ	ลำตัว	*Achlya*
17	2 / 12 / 49	ขอนแก่น	ร้านขายปลา 5 มข.	เสือพ้นน้ำ	ผิวลำตัว	*Saprolegnia*
18	2 / 12 / 49	ขอนแก่น	ร้านขายปลา 5 มข.	ปี๊กเป้า	ผิวลำตัว	*Saprolegnia*
20	2 / 12 / 49	ขอนแก่น	ร้านขายปลา 1 มข.	หางนกยูง	ผิวลำตัว	*Achlya*
เดับ	**วัน/เดือน/ปี**	**จังหวัด**	**ฟาร์มที่อยู่**	**ชนิดปลา**	**ตำแหน่งเก็บ**	**ชนิดเชื้อรา**

ดับ	วัน/เดือน/ปี	จังหวัด	ฟาร์มที่อยู่	ชนิดปลา	ตำแหน่งเก็บ	ชนิดเชื้อรา
22	8 / 12 / 49	กรุงเทพฯ (จตุจักร)	ร้านรวมปลาหมอไทย	เสือพ้นน้ำ	ครีบหาง + ครีบก้น	*Saprolegnia*
23	8 / 12 / 49	กรุงเทพฯ (จตุจักร)	ร้านเล็ก	ทอง	ครีบหาง	*Aphanomyces*
24	10 / 12 / 49	นครปฐม	สมชาย ทำกินรวย	บอลลูนส้ม	ครีบล่างข้างลำตัว	*Achlya*
25	10 / 12 / 49	นครปฐม	สมชาย ทำกินรวย	บอลลูนดำ	ครีบหลังข้างลำตัว	*Achlya*
26	10 / 12 / 49	นครปฐม	สมชาย ทำกินรวย	บอลลูนดำ	ครีบหลัง	*Saprolegnia*
27	10 / 12 / 49	นครปฐม	สมชาย ทำกินรวย	บอลลูนดำ	ลำตัว	*Saprolegnia*
28	10 / 12 / 49	นครปฐม	สมชาย ทำกินรวย	บอลลูนดำ	โคนครีบหลัง	*Saprolegnia*
29	10 / 12 / 49	นครปฐม	เสี่ยตุ้ม	ทอง	ตามลำตัว	*Achlya*
30	11 / 12 / 49	ราชบุรี	ศิริรัตน์	ทอง	ครีบหลัง	*Achlya*
31	11 / 12 / 49	ราชบุรี	ถวิล	ลูกผึ้งดำ	เหงือก	*Achlya*
32	16 / 01 / 50	มหาสารคาม	บ่อ 3 ประมง คณะเทคโนฯ มรม.	หางนกยูง	ข้างลำตัวด้านขวา	*Saprolegnia*
33	11 / 02 / 50	ขอนแก่น	นางฟ้าไรน้ำ มข.	สอด	ลำตัว	*Achlya*
34	11 / 02 / 50	ขอนแก่น	นางฟ้าไรน้ำ มข.	หางนกยูง	ครีบหลัง	*Aphanomyces*
35	11 / 02 / 50	ขอนแก่น	รุ่งทิพย์ มข.	หางนกยูง	บริเวณปาก	*Saprolegnia*
36	11 / 02 / 50	ขอนแก่น	รุ่งทิพย์ มข.	หางนกยูง	ข้างลำตัวด้านซ้าย	*Leptolegnia*
37	11 / 02 / 50	ขอนแก่น	รุ่งทิพย์ มข.	หางนกยูง	ข้างลำตัว	*Achlya*
38	11 / 02 / 50	ขอนแก่น	รุ่งทิพย์ มข.	หางนกยูง	โคนหาง	*Leptolegnia*
39	11 / 02 / 50	ขอนแก่น	บ้านปลา มข.	ปี๊กเป้า	ลำตัว	*Achlya*
40	11 / 02 / 50	ขอนแก่น	รุ่งทิพย์ มข.	หางนกยูง	ข้างลำตัว	*Achlya*
41	21 / 04 / 50	หนองคาย	องุ่น	หางนกยูง ตย.1	ลำตัว	*Achlya*
42	21 / 04 / 50	หนองคาย	องุ่น	หางนกยูง ตย.2	ลำตัว	*Achlya*
43	21 / 04 / 50	หนองคาย	องุ่น	หางนกยูง ตย.3	ลำตัว	*Saprolegnia*
43	21 / 04 / 50	หนองคาย	องุ่น	หางนกยูง	โคนครีบหาง	*Achlya*
44	21 / 04 / 50	หนองคาย	องุ่น	บอลลูนส้ม	โคนหางด้านขวา	*Achlya*
45	21 / 04 / 50	ขอนแก่น	เกษตรปลาทอง	บอลลูนดำ 1	ลำตัว	*Achlya*
46	21 / 04 / 50	ขอนแก่น	เกษตรปลาทอง	บอลลูนดำ 2	ลำตัว	*Achlya*
47	21 / 04 / 50	ขอนแก่น	รุ่งทิพย์ มข.	บอลลูนส้ม	ลำตัว	*Saprolegnia*
48	12 / 05 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	บอลลูนดำ	ครีบข้างลำตัว	*Achlya*

50	12 / 05 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	หางนกยูง	โคนหาง	*Saprolegnia*
51	14 / 05 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	บอลลูนดำ	ครีบก้น	*Saprolegnia*
52	18 / 05 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	บอลลูนส้ม	ครีบหลัง	*Saprolegnia*
53	17 / 05 / 50	ขอนแก่น	นาย มข.	สอดส้ม	ครีบหลัง	*Achlya*
54	26 / 06 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	นิล	ข้างลำตัวซ้ายขวา	*Saprolegnia*
55	20 / 06 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	ไข่ปลาคาร์ป	-	*Achlya*
56	11 / 09 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	ตาโปน	ครีบหูด้านซ้าย	*Saprolegnia*
57	11 / 09 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	ไข่ปลาทอง	-	*Achlya*
58	11 / 09 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	ไข่ปลาตาโปน	-	*Achlya*
59	11 / 09 / 50	มหาสารคาม	คณะเทคโนฯ มรม.	ไข่ปลาดุก	-	*Achlya*

Studies on fungal infection and disease prevention in ornamental fish in the Central and Northeastern parts of Thailand

Phadee, P.[1*], Areechon N.[2], Hanjavanit C[3] and Hatai K.[4]

[1] *Department of Agriculture, Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University, Thailand*
[2] *Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Thailand*
[3] *Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kean University, Thailand*
[4] *Division of Fish Diseases, Nippon Veterinary and Life Science University, Tokyo, Japan*

Abstract

One hundred isolates of water moulds isolated from ornamental fish from the northeast and central part of Thailand were mostly belongs to Order Saprolegniales and Family Saprolegniaceae. Among the family, genus *Achlya* was dominantly followed by *Saprolegnia*, *Aphanomyces* and *Leptolegnia*, respectively. Biological characteristics of 4 genera including effects of temperature, salinity (sodium chloride, NaCl) and pH on hyphal growth showed the fungi grew at temperature in a range of 10-30°C, 1-2% NaCl, and pH 5-10. Artificial infections of 4 fungal genus to balloon fish *Xiphophorus hellari*, and goldfish *Carassius auratus* revealed secondary infection.

The effect of 15 chemicals and 7 Thai herbals to 4 fungal genera were examined. Results showed malachite green is the most effective chemical to against water moulds and both fresh and powder herbs found garlic and galingal showed excellent results on fungistatic by different concentrations. Phylogenic tree analysis based on internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and 5.8S of the species showed some variations among the 4 genus. Some of isolated fungi found as new species based on morphological and molecular characteristics.

Keywords: Ornamental fish, Fungal diseases of fish, Water molds, Biological Characteristics, Artificial infection, Fungistatic and Phylogenetic tree

Corresponding author. P. Phadee
Tel.: 0-4372-5439; Fax: 0-4372-5429
E-mail: panaratana@hotmail.com

โรคเชื้อราและป้องกันรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราในปลา ในเขตภาคตะออกเฉียงเหนือ

Fungal Diseases in Economically Fishes and Disease Prevention in ortheast of Thailand

ปณรัตน์ ผาดี[1] ธีรภาพ นครชัย[2] และวรรณภา เหลี่ยมสิงขร[3]

Panarat Phadee[1], Teeraparp Nakornchai[2] and Wannapa Liamsingkorn[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาเชื้อราในปลาเศรษฐกิจจากฟาร์มปลาเอกชน ร้านขายปลาตู้สวยงาม และหน่วยงานของรัฐในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 7 จังหวัด ระหว่างเดือนมกราคม 2549 ถึง เดือนธันวาคม 2549 ทำการเก็บตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อราทั้งหมด 456 ตัว พบเชื้อรา 43 ชนิด ที่จำแนกอยู่ในชั้น Oomycetes ที่พบว่ามีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดเป็นอย่างมาก คือ เชื้อราในลำดับ Saprolegniales วงศ์ Saprolegniaceae สกุลที่พบมากที่สุด คือ *Achlya* ซึ่งพบในทุกแหล่งที่ทำการศึกษา รองลงมา คือ สกุล *Saprolegnia*, *Aphanomyces* และสกุล *Leptolegnia* ตามลำดับ จากการศึกษายังพบว่า ชนิดของเชื้อราที่แยกได้ไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดของปลาแต่มีแนวโน้มที่จะมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่ทำการศึกษา ผลการศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อราที่แยกได้ พบว่า เชื้อราเหล่านี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 10-35°C แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40°C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ที่ 20-30°C ผลของความเค็มต่อการเจริญของเชื้อราพบว่า เชื้อราทุกชนิดเจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีความเค็มหรือความเค็มต่ำ ตั้งแต่ 0-1% NaCl ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญตั้งแต่ความเข้มข้น 2% NaCl จากการทดลองพบว่าเชื้อราที่สามารถทนต่อสภาพที่มีความเค็มมากที่สุดคือ *Saprolegnia* รองลงมาคือ *Leptolegnia* sp., *Aphanomyces* spp. และ *Achlya* spp. ตามลำดับ ส่วนผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อราพบว่า pH เชื้อราสามารถเจริญได้ในช่วง pH 5-10 ยกเว้น *Aphanomyces* spp. ที่ไม่สามารถเจริญใน pH 4 ได้ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญจะอยู่ในช่วง pH 6-8 ส่วนที่ pH 10 เชื้อราส่วนใหญ่สามารถเจริญได้บ้างเล็กน้อย แต่รูปร่างของใยราจะผิดปกติไป

การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราต่อปลาตะเพียนขาวและปลาสอด พบว่าเฉพาะเชื้อ *Aphanomyces* sp. สามารถทำให้ปลาตะเพียนขาวแสดงอาการติดเชื้อรา ส่วนการทดลองในปลาสอดพบว่าเชื้อราทั้ง 4 ชนิด สามารถทำให้ปลาสอดแสดงอาการติดเชื้อราได้ในสภาวะที่มีความเครียดเท่านั้น

คำสำคัญ : โรคเชื้อราในปลา, ราน้ำ, ความสามรถในการก่อโรค และลักษณะทางชีววิทยา

---

[1] Ph.D., ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาโรคสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อ. เมือง จ. มหาสารคาม 44

[2] วท.บ. (เกษตรศาสตร์) คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อ. เมือง จ. มหาสารคาม 44000

[3] วท.บ. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อ. เมือง จ. มหาสารคาม 44000

Abstract

Water moulds, isolated economically important freshwater fish from fish farming, Fisheries Research Center and fish aquarium, were classified as Class Oomycetes mostly belonged to Order Saprolegniales, Family Saprolegniaceae. Among the family, Genus *Achlya* was dominantly obtained from the sites studied. Others genera such as *Saprolegnia* and *Aphanomyces* and *Leptolegnia* were also found. The results proposed that geographical difference, rather than infected fish species has played an important role on the species diversity of the water moulds.

On study of effects of temperature on hyphal growth the water moulds grew at a temperature range of 10-30°C, but not at 40°C, with an optimal temperature range of 25-30°C. Effect of salinity (sodium chloride, NaCl) on the fungal growth showed that the fungi grew up to, 1-2% NaCl, whereas slow growing, irregular and abnormal colony in high concentration. The optimum concentrations were 0-1% NaCl. From the study of effects of pH on hyphal growth, the results showed that the fungi could grown during pH 5-10. An optimal pH range of water moulds was 6-8, regardingly, however some of the genus *Aphanomyces* could grow in strong acidic condition (pH 4).

Key words: Fungal diseases of fish, Water molds, Pathogenicity test, Biological characteristics

บทนำ

การเพาะเลี้ยงปลาเป็นอาชีพที่มีความสำคัญมากในประเทศไทยทั้งทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และโภชนาการ เนื่องจากเป็นทั้งอาชีพหลักและอาชีพรองของเกษตรกร นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งโปรตีนราคาถูก อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงปลาในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา (intensive system) มักทำให้ปลาเกิดความเครียด ภูมิคุ้มกันโรคของปลาลดลง ส่งผลให้ปลาเกิดโรคในที่สุด ซึ่งการเกิดโรคในปลาจะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อผลผลิตปลา โรคปลาที่เกิดในปลามีสาเหตุหลายประการ ได้แก่ การติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และปรสิต ในส่วนของแบคทีเรียและไวรัสนั้น ได้มีผู้ทำการศึกษากันอย่างแพร่หลายทั้งภายในและต่างประเทศ ขณะที่การศึกษาโรคที่เกิดจากเชื้อรานั้นมีการศึกษากันมากเฉพาะในต่างประเทศเท่านั้น ส่วนในประเทศไทยมีรายงานการเกิดโรคนี้น้อยมาก โดยมีรายงานเพียงเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค epizootic ulcerative syndrome ที่เกิดจากเชื้อราชนิด *Aphanomyces invadans* หรือ *A. piscicida* เท่านั้น

โรคที่เกิดจากเชื้อราที่สร้างความเสียหายให้กับการเพาะเลี้ยงปลาชนิดต่างๆ โดยส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Saprolegniaceae หรือที่เรียกว่า รานำ้ (water moulds) ที่มีรายงาน คือ สกุล *Achlya*, *Aphanomyces*, *Saprolegnia*, *Allomyces*, *Isoachlya*, *Leptomitus*, *Pythium*, *Calyptralegnia*, *Pythiopsis* และ *Thraustotheca* เชื้อราสำคัญที่พบบ่อยและก่อให้เกิดโรคต่อปลาเพาะเลี้ยง หรือปลาที่อาศัยตามแหล่งน้ำธรรมชาติ และปลาสวยงาม คือ สกุล *Aphanomyces*, *Saprolegnia* และ *Achlya* ซึ่งในประเทศไทยยังมีรายงานเรื่องนี้ไม่มากนัก ถึงแม้ว่าจะมีนักวิจัยได้ทำการศึกษาโรคที่เกิดจากเชื้อราในประเทศไทยในระดับหนึ่ง แต่การศึกษาในระดับอนุกรมวิธานยังมีค่อนข้างน้อย ไม่ว่าจะเป็นการศึกษาในปลา กุ้ง ไข่ปลาหรือไข่กุ้ง อีกทั้งการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อการเกิดโรคในสัตว์น้ำ กลไกของการเกิดโรค การป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราก็ยังมีน้อย เป็นที่ทราบกันดีว่าโรคที่เกิดจากเชื้อรานั้นก่อให้เกิดความเสียหายต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อราสามารถก่อโรคในปลาได้ทุกระยะ ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาชนิดของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในปลาเศรษฐกิจในเขตภาคตะวันออกเฉียง-เหนือ โดยศึกษาถึงชนิดและความหลากหลายของเชื้อราด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาควบคู่ไปกับลักษณะทางชีววิทยาบางประการของเชื้อรา ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราในกลุ่ม Oomycestes ที่มีต่อการเกิดโรคในปลาตะเพียนขาวและปลาสอด

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อรา (fungal Collection & isolation) ทำการเก็บตัวอย่างของเชื้อรา จากไข่ปลา และปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจทั้งจากฟาร์มเอกชน ร้านขายปลาตู้สวยงาม และหน่วยงานของรัฐในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 7 จังหวัด ประกอบด้วย มหาสารคาม ขอนแก่น กาฬสินธุ์ ยโสธร ร้อยเอ็ด อุบลราชธานี และหนองคาย ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2549

นำตัวอย่างปลาที่ติดโรคจากเชื้อรา มาทำการแยกเชื้อโดยตัดชิ้นเนื้อบริเวณที่ติดเชื้อรามาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ GY agar (glucose–yeast extract agar) ประกอบด้วย glucose 1% (APS Ajex Tinechem), yeast extract 0.25% (Difco) และ agar 1.5% ตามสูตรของ Hatai and Egusa (1979) ส่วนการแยกเชื้อราไข่ปลาก็ทำเช่นเดียวกัน โดยหยิบไข่ปลาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Sigma) กับสเตรปโตมัยซิน (Sigma) ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบ่มไว้ที่อุณหภูมิ

20°C เมื่อโคโลนีของเชื้อราเจริญขึ้นมา จึงทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (purification) ด้วยวิธี single spore culture ตามวิธีของ Seymour (1970) และศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราที่พบในแต่ละครั้งในการเก็บตัวอย่าง โดยสุ่มนับจำนวนโคโลนีที่ได้จากการทำ single spore culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจำนวนตัวอย่างที่เก็บอยู่ระหว่าง 10-50 ตัวอย่าง ขึ้นกับปริมาณของปลา เพื่อดูว่าเชื้อราในสกุลใดหรือชนิดใดเป็น dominant species ในแต่ละแหล่งที่เก็บตัวอย่าง แล้วเก็บรักษาตัวอย่างโดยต่อเชื้อ (sabcaltured) ทุกๆ 2 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน ขึ้นกับชนิดของเชื้อรา เพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การจำแนกชนิดของเชื้อรา (fungal identification) การศึกษาครั้งนี้จะทำการจำแนกชนิดของเชื้อราจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) ได้แก่ ลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การจำแนกชนิดเชื้อรา ทำได้โดยการนำเชื้อราที่แยกได้นำมาทำการเลี้ยงในน้ำประปาที่ผ่านการฆ่า เชื้อ เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือ การสร้าง zoosporangia เพื่อตรวจสอบการปล่อย zoospores ของเชื้อราแต่ละชนิด โดยการตัดชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราเจริญอยู่ลงเลี้ยงใน GY broth และบ่มเชื้อที่ 20-25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างในน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงในน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 20-25°C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง สังเกตรูปแบบการสร้างและการปล่อย zoospores เพื่อจำแนกเชื้อราในระดับสกุล (genus) (Seymour, 1970) จากนั้นการทำการจำแนกในระดับชนิด (spices) โดยการเหนี่ยวนำให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการใส่เมล็ด hemp ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาล่อ zoospore ให้เกาะ (Coker, 1923; Seymour,1970) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 10, 15, 20 และ 25°C สังเกตการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ 1 วัน หรือจนกว่าเชื้อราจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เก็บข้อมูลลักษณะต่างๆ เพื่อประกอบการจำแนกชนิด ได้แก่ ขนาดและจำนวนของ oogonia, oocytes/oogonium และลักษณะของ mature oocytes และ antheridia เป็นต้น แล้วทำการจำแนกตามวิธีของ Willoughby *et al.* (1983), Seymour (1970), Howard *et al.* (1970), Johnson (1956), Scott (1961), Khallil (2001), Rattan *et al.* (1978) และ Coker (1923) สำหรับสายพันธุ์ที่ไม่สามารถกระตุ้นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ในห้องปฏิบัติการจะจัดจำแนกถึงระดับสกุลเท่านั้น

3. การศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาบางประการของเชื้อรา ทำการคัดเลือกเชื้อรา จากสกุล *Achlya* spp., *Aphanomyces* spp., *Saprolegnia* spp. และ *Leptolegnia* sp. มาจำนวน 7 สายพันธุ์ โดยเป็นเลือกตัวแทนของแต่ละสกุลๆ ละ 2 สายพันธุ์ ยกเว้น *Leptolegnia* คัดเลือกมาเพียง 1 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ RMF 49007, RMF 49014, RMF 49030, RMF 49043, RMF 49004, RMF 49009 และ RMF 49028 ตามลำดับ ซึ่งรายละเอียดและที่มาของเชื้อราแสดงไว้ในตารางที่ 1 ทุกสายพันธุ์จะทำการศึกษา 3 ซ้ำ ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ทำการศึกษา

3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทำการตัดโคโลนีเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่บริเวณปลายเส้นใยด้วย Cork borer No.2 มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ตรงจุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40°C ตามลำดับ แต่ละสายพันธุ์ ทำการทดลองชนิดละ 3 ซ้ำ สังเกตการเจริญเติบโตของโคโลนี และทำการวัดขนาดทุกวันจนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

3. 2 การศึกษาผลของความเค็ม (sodium chloride: NaCl) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทำการตัดโคโลนีของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ด้วย Cork borer No.2 มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง GY ซึ่งมี NaCl เข้มข้น 0, 1, 2, 3 และ 4% ตามลำดับ ตรงจุดกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20°C แต่ละสายพันธุ์ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ สังเกตการ

เจริญของโคโลนี และวัดขนาดของใยราทุกวัน จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

3.3 การศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต่อการเจริญของเชื้อรา ทำการตัดโคโลนีของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ด้วย Cork borer No.2 เลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GY ซึ่งปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 โดยใช้ NaOH และ HCl เป็นสารละลายในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 20°C แต่ละสายพันธุ์ทำการทดลองชนิดละ 3 ซ้ำ สังเกตการเจริญเติบโตของโคโลนี และวัดขนาดทุกวัน จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

4. การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา (pathogenicity test)

4.1 การเตรียมปลาทดลอง

- ปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) ใช้ทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราในสกุล *Aphanomyces*, *Achlya*, *Saprolegnia* และ *Leptolegnia* โดยวิธีการฉีด (injection challenge)

- ปลาสอด (*Xiphophorus maculates*) ใช้ทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสกุล *Achlya*, *Aphanomyces*, *Saprolegnia* และ *Leptolegnia* โดยวิธีการแช่ (bath challenge)

4.2 การเตรียม zoospores เพื่อทำการทดสอบกับปลา ทำการเลือกชนิดของเชื้อรามาทดสอบ โดยเลือกจากเชื้อรา 4 สกุลๆ ละ 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Achlya* sp. (RMF 49014), *Aphanomyces* sp. (RMF 49030), *Saprolegnia* sp. (RMF 49009) และ *Leptolegnia* sp. (RMF 49028) จากนั้นเตรียม zoospores ของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ ตามวิธีของ Hussein and Hatai (1999) จากนั้นทำการแยกใยราออกจากน้ำที่มี zoospores โดยการกรองด้วย millipore filter papers ขนาด 0.45 μm แล้วนับจำนวน zoospores ด้วย haemocytometer

4.3 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราโดยวิธีการฉีด นำปลาดุกขนาดประมาณ 20-50 กรัมต่อตัว มาเลี้ยงรวมกันในบ่อซีเมนต์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อทำการปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพห้องทดลอง ให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน หลังจากนั้นจึงฉีดสารละลาย zoospores ของเชื้อราทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้น $1x10^2$, $1x10^3$, $1x10^4$ และ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อด้านซ้ายใต้ครีบหลังด้วยเข็มฉีดยา ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร กลุ่มทดลองละ 10 ตัว ส่วนกลุ่มควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ฉีดด้วยน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เลี้ยงปลาที่ทดสอบในตู้ ปลาที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C สังเกตอาการปลาทุกวันจนกระทั่งปลาเกิดอาการป่วยจึงตัดชิ้นเนื้อบริเวณที่เกิดแผลมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำการแยกเชื้อเพื่อตรวจสอบดูชนิดของเชื้อรา ว่าเกิดจากเชื้อราที่ฉีดเข้าไปหรือไม่

4.4 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราโดยวิธีการแช่ นำปลาสอดขนาด 0.5-1.0 กรัมต่อตัว มาเลี้ยงรวมกันในตู้กระจกในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพห้องทดลองที่ 25°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน จากนั้นนำมาทดสอบกับเชื้อราทั้ง 4 ชนิด โดยทำการดึงเกล็ดด้านซ้ายใต้ครีบหลังของปลาออก 2-3 เกล็ด แล้วนำไปแช่ลงในน้ำในตู้ที่มีน้ำ 10 ลิตร และมี zoospores ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^2$, $1x10^3$, $1x10^4$ และ $1x10^5$ เซลล์ต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 15°C เพื่อทำให้ปลาเกิดความเครียด ทำการทดลองความเข้มข้นละ 2 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว จากนั้นสังเกตอาการของปลาที่จนกระทั่งปลาป่วยแล้วทำการตรวจสอบเช่นเดียวกับปลาที่ทดสอบด้วยการฉีด

ผลการวิจัย

1. ชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากปลาเศรษฐกิจในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราในชั้น Oomycetes ที่แยกได้จากปลาในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จำนวน 43 ชนิด จากปลา 456 ตัว (ตารางที่ 1) ระหว่างเดือนมกราคม 2549 ถึงเดือนธันวาคม 2549 ปลาที่เก็บตัวอย่างเป็นปลาที่ติดเชื้อรา โดยพบเส้นใยราเจริญบริเวณอวัยวะต่างๆ ทั้งผิวหนัง เหงือก และครีบต่างๆ (ภาพที่ 1) ปลาที่พบเชื้อรามากที่สุดคือ ปลาดุก รองลงมาคือปลานิล ปลาตะเพียนขาว และปลาหางนกยูง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในปลาดุกจะพบในไข่เป็นส่วนใหญ่ การศึกษาครั้งนี้พบเชื้อรา 4 สกุล คือ *Achlya*, *Saprolegnia* (ภาพที่ 2) *Aphanomyces* (ภาพที่ 3) และ *Leptolegnia* (ภาพที่ 4) โดยพบเชื้อราในสกุล *Achlya* มากที่สุด ในเกือบทุกจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง รองลงมาคือ *Saprolegnia, Aphanomyces* และ *Leptolegnia* ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เชื้อราในสกุล *Achlya* ที่พบมากคือ *A. bisexualis* รองลงมาคือ *A. ambisexualis* และ *A. klebsiana* (ภาพที่ 5 และ 6) แต่เชื้อราในสกุลนี้ส่วนใหญ่ไม่สร้างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ สำหรับสกุล *Saprolegnia* ชนิดที่พบมากที่สุด คือ *S. diclina* รองลงมาคือ *S. ferax* และ *S. paradiclina* (ภาพที่ 7) สำหรับเชื้อราในสกุล *Aphanomyces* นั้นไม่สร้างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จึงไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ ส่วน *Leptolegnia* พบเล็กน้อยและพบเฉพาะจากไข่ปลาในจังหวัดมหาสารคาม และไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเช่นกัน

2. ลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อราที่แยกได้

2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา

จากเชื้อราทั้ง 4 สกุลที่ทดสอบพบว่าเชื้อราในสกุล *Saprolegnia* มีอัตราการเจริญสูงที่ทุกระดับอุณหภูมิที่ทำการศึกษา ยกเว้นที่ 40°C รองลงมาคือ *Leptolegnia* sp., *Aphanomyces* spp. และ *Achlya* spp. โดยสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-30°C และอัตราการเจริญจะลดลงที่อุณหภูมิ 35°C อย่างไรก็ตามเชื้อราในสกุล *Achlya* และ *Aphanomyces* สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30-35°C สำหรับเชื้อราในสกุล *Saprolegnia* จะเจริญได้เล็กน้อยที่อุณหภูมิ 30°C และเชื้อราทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาจะตายที่อุณหภูมิ 40°C (ภาพที่ 8) โดยไม่มีเส้นใยเจริญออกมาจากส่วนของ GY agar ที่ตัดด้วย Cork borer No. 2 มาวางบน GY agar จากการสังเกตพบว่าส่วนของไซโตพลาสซึมภายในเส้นใยจะเสื่อมสลายไป

2.2 ผลของความเค็ม (NaCl) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา

จากเชื้อราทั้ง 4 สกุล พบว่าเชื้อราทุกชนิดเจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีความเค็มหรือความเค็มต่ำกว่า 1% NaCl พบเฉพาะ *Saprolegnia* spp. ที่สามารถเจริญได้ที่ 2% NaCl และเจริญเล็กน้อยที่ 3% NaCl แต่ลักษณะของใยราจะผิดปกติไป ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆ อีก 3 ชนิด ไม่สามารถเจริญตั้งแต่ 2% NaCl จะเห็นว่าเชื้อราที่สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีความเค็มสูงรองลงมาคือ *Leptolegnia* sp., *Aphanomyces* spp. และ *Achlya* spp.ตามลำดับ (ภาพที่ 9) อย่างไรก็ตาม เชื้อราที่เจริญในสภาพที่มีความเค็มสูงจะทำให้ลักษณะของใยราหงิกงอและผิดปกติ

2.3 ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อรา

เชื้อราทั้ง 4 สกุลที่ทำการศึกษาสามารถเจริญได้ในช่วง pH 4-9 ยกเว้น *Aphanomyces* spp. ที่ไม่สามารถเจริญใน pH 4 ได้ และเจริญได้ช้ากว่าสกุลอื่นๆ ที่ pH 5 และ 6 เชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ pH 6-8 (ตารางที่ 2) ส่วนที่ pH 10 เชื้อราส่วนใหญ่สามารถเจริญได้บ้างเล็กน้อย แต่รูปร่างของใยราจะผิดปกติไป

3. ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราต่อปลาตะเพียนขาวและปลาสอด

3.1 ผลการทดสอบต่อปลาตะเพียนขาว

จากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Achlya* sp., *Saprolegnia* sp., *Aphanomyces* sp. และ *Leptolegnia* sp. โดยการฉีดสายละลาย zoospore เข้าที่กล้ามเนื้อ

บริเวณใต้โคนครีบหลังและเหนือเส้นข้างลำตัว ที่ความเข้มข้นต่างคือ $1x10^2$, $1x10^3$, $1x10^4$ และ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยฉีดตัวละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วเลี้ยงในตู้ปลาที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C สังเกตอาการปลาทุกวันจนกระทั่งปลาเกิดอาการป่วย จากผลการทดลองพบว่า เชื้อราส่วนใหญ่ไม่ทำให้ปลาตะเพียนขาวเกิดโรคในระหว่างการทดลอง ยกเว้นแสดงอาการตกเลือดและมีจุดแดงเล็กน้อยเฉพาะในปลาที่ฉีดด้วยเชื้อ *Aphanomyces* sp. ที่ความเข้มข้น $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่อาการดังกล่าวจะหายไปเป็นปกติเมื่อเวลาผ่านไปในสัปดาห์ที่ 3 แสดงว่าเชื้อเหล่านี้ไม่ใช่สาเหตุที่แท้จริงในการก่อให้เกิดโรคในปลาตะเพียนขาวเช่นกัน

3.2 ผลการทดสอบต่อปลาสอด

จากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Achlya* sp., *Saprolegnia* sp., *Aphanomyces* sp. และ *Leptolegnia* sp. โดยทำการดึงเกล็ดด้านซ้ายใต้ครีบหลังของปลาออก 3 เกล็ด แล้วนำไปแช่ลงในน้ำในตู้ที่มีน้ำ 10 ลิตร และมี zoospores ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^2$, $1x10^3$, $1x10^4$ และ $1x10^5$ เซลล์ต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 15°C เพื่อทำให้ปลาเกิดความเครียด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 พบว่า เชื้อราทุกชนิดสามารถก่อให้ปลาสอดติดโรคได้ ขึ้นกับความเข้มข้นของเชื้อและสภาวะแวดล้อมที่ก่อให้เกิดความเครียด จะพบว่าปลาสอดที่แช่ใน zoospores เชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้น $1x10^5$, $1x10^4$ และ $1x10^3$ เซลล์ต่อลิตร สามารถก่อให้เกิดโรคได้เมื่อถูกดึงเกล็ดออก ส่วนปลาที่ไม่ถูกดึงเกล็ดออกจะมีเฉพาะ *Saprolegnia* sp. และ *Leptolegnia* sp. เท่านั้นที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ โดยปลาที่ติดเชื้อราจะแสดงอาการเซื่องซึม ว่ายน้ำช้า และมีปุยของเชื้อราเกาะบริเวณผิวลำตัว (ภาพที่ 14) เมื่อทำการแยกเชื้อจากปลาป่วยก็พบว่า เป็นเชื้อที่ทำการทดลองจริง แสดงว่าเชื้อเหล่านี้สามารถทำให้เกิดโรคได้จริงแต่ต้องอยู่ในสภาวะที่มีความเครียด จากผลการทดลองพบว่า *Saprolegnia* sp. สามารถในการก่อให้เกิดโรคสูงที่สุดในทุกความเข้มข้น รองลงมาคือ *Leptolegnia* sp., *Achlya* sp. และ *Aphanomyces* sp. ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาเชื้อราจากแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทั้งหมด 20 แห่ง ทั้งจากตัวปลา และไข่ปลาที่กำลังทำการเพาะฟัก พบว่า โดยมากจะพบเชื้อราในช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 25°C อย่างไรก็ตามในช่วงที่อุณหภูมิสูงยังสามารถแยกเชื้อราได้บ้าง ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราในชั้น Oomycetes มากที่สุด และเชื้อที่มีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดเป็นอย่างมาก คือ เชื้อราในลำดับ Saprolegniales วงศ์ Saprolegniaceae สกุล *Achlya* ซึ่งพบในทุกแหล่งที่ทำการศึกษา รองลงมาคือ สกุล *Saprolegnia*, *Aphanomyces* และ *Leptolegnia* ตามลำดับ และยังพบเชื้อรากลุ่ม imperfect ที่เป็นเชื้อราชั้นสูงจำนวนหนึ่ง เชื้อราส่วนใหญ่จะแยกได้จากผิวหนังลำตัว ครีบต่างๆ และไข่ ตามลำดับ ปลาที่แยกเชื้อได้มีทั้งปลาที่ใช้เป็นอาหาร และปลาสวยงาม ทั้งปลาเลี้ยงและปลาตามธรรมชาติ และพบ *Achlya bisexualis* และ *Saprolegnia diclina* มากที่สุด อย่างไรก็ตามปัญหาที่มักพบในการจัดจำแนกคือ เชื้อราที่แยกได้ไม่สร้างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ทำให้ผลการศึกษาในบางส่วนยังไม่ชัดเจน ทำให้ยังไม่สามารถจำแนกในระดับชนิด (species) ได้ จากผลการศึกษาชี้ว่าชนิดของเชื้อราที่แยกได้มีแนวโน้มว่าจะมีความสัมพันธ์กับแหล่งน้ำที่ ทำการศึกษา โดยไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดของปลาแต่ประการใด ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อราในลำดับ Pythiales สกุล *Pythium* ดังเช่นที่นิลุบล และคณะ (2543) ได้สำรวจพบในไข่ปลาดุกอุยในเขตจังหวัดขอนแก่น เมื่อ พ.ศ. 2542 ซึ่งสันนิษฐานจะเป็น saprophytic fungi ที่เข้ามาเกาะอาศัยเท่านั้น ส่วนสกุล *Aphanomyces* และ

Leptolegnia นั้นยังไม่สามารถจำแนกในระดับชนิดได้ เนื่องจากไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนิลุบล และคณะ (2543) ที่ทำการสำรวจเชื้อราในไข่ปลาเศรษฐกิจในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ Kitancharoen (1997) ที่ได้ทำการสำรวจเชื้อราที่พบบนไข่ปลากลุ่ม Salmonids ที่พบปัญหาเชื้อราไม่สร้าง oogonia และ antheridia ทำให้ยากแก่การจำแนกชนิด

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อราจำนวน 7 สายพันธุ์ จาก 4 สกุลที่แยกได้ พบว่าเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-35°C แต่ที่ 40°C ไม่สามารถเจริญได้ ส่วนที่อุณหภูมิ 5°C มีเฉพาะ *Saprolegnia* และ *Leptolegnia* เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ แต่จะเจริญช้าและลักษณะใยราจะผิดปกติไป เชื้อราส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30°C อัตราการเจริญจะลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ 35°C และจะตายที่อุณหภูมิ 40°C จากการสังเกตพบว่าส่วนของไซโตพลาสซึมภายในเส้นใยจะเสื่อมสลายไป ซึ่งต่างจากการศึกษาของนิลุบล และคณะ (2543) ที่รายงานว่า เชื้อราสกุล *Achlya, Saprolegnia, Aphanomyces* และสกุล *Pythium* สามารถเจริญและมีชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 4-30 °C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราส่วนใหญ่ คือ 25°C อุณหภูมิต่ำ (10°C) จะทำให้ระยะเวลาในการสร้างสปอร์ของเชื้อราในสกุล *Saprolegnia* และ *Achlya* ยาวนานขึ้น ในขณะที่ *Aphanomyes* และ *Pythium* นั้นจะสร้างได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า คือ ที่ 20°C โดยที่อุณหภูมิ 10 และ 30°C นั้น ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราทั้งสองสกุล จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเชื้อราในชั้น Oomycetes สามารถพบอยู่ทั่วไปทั้งจากปลาในธรรมชาติและปลาในฟาร์มเลี้ยง และเมื่อเปรียบเทียบกับ Kitancharoen (1997) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกัน ถึงแม้จะทำการศึกษาในกลุ่มปลาที่แตกต่างกัน แสดงว่าคุณสมบัติทางกายภาพนี้สัมพันธ์กับชนิดของเชื้อรามากกว่าแหล่งที่พบหรือชนิดของปลา

จากการศึกษาผลของความเค็มต่อเชื้อราทั้ง 4 สกุล พบว่าเชื้อราทุกชนิดเจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีความเค็มหรือความเค็มต่ำ ระหว่าง 0-1% NaCl โดยพบเฉพาะ *Saprolegnia* spp. สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้น 2% NaCl และเจริญเล็กน้อยที่ 3% NaCl แต่ลักษณะของใยราจะผิดปกติไป ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆ ไม่เจริญตั้งแต่ความเข้มข้น 2% NaCl รองลงมา คือ *Leptolegnia* sp., *Aphanomyces* spp. และ *Achlya* spp. ที่สามารถทนต่อความเค็มได้ ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chukanhom (2004) ที่รายงานว่า เชื้อราในกลุ่ม Oomyces จะเจริญได้ดีในช่วงความเค็ม 1-2% หากความเค็มสูงกว่านั้นจะมีผลต่อการเจริญและรูปร่างของเซลล์ จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่า เชื้อราที่เจริญในสภาพที่มีความเค็มสูงจะทำให้ลักษณะของใยราหงิกงอ

การศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากปลาจำนวน 7 สายพันธุ์ พบว่า pH มีผลต่อการเจริญของเชื้อราโดยเชื้อราส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่ pH ตั้งแต่ 5.0-10.0 โดยช่วง pH 6.0-8.0 จะเจริญได้ดีที่สุด มีเพียง *Achlya* และ *Saprolegnia* เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่ pH 4 ซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อราสายพันธุ์นี้อาจทำให้เกิด internal saprolegniasis ได้เหมือนเช่นที่เกิดในปลากลุ่ม salmonids (Hatai and Egusa, 1977) ที่สามารถทนต่อ pH ที่เป็นกรดในกระเพาะของปลาได้ แต่เส้นใยจะผิดปกติในระยะแรก อันเป็นผลเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมมีผลต่อขบวนการเมตาบอลิซึม และการสังเคราะห์สารต่างๆ ของเชื้อรา (Kitancharoen *et al.*, 1996)

การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราทั้ง 4 สกุล โดยการฉีดสารละลาย zoospore สู่กล้ามเนื้อปลาตะเพียนขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองพบว่า เชื้อราส่วนใหญ่ ไม่ทำให้ปลาตะเพียนขาวเกิดโรคในระหว่างการทดลอง ยกเว้นปลาตะเพียนขาวจะแสดงอาการตกเลือด และมีจุดแดงเล็กน้อยเฉพาะในปลาที่ฉีดด้วยเชื้อ

Aphanomyces sp. ที่ความเข้มข้น $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่อาการดังกล่าวจะหายไปเป็นปกติเมื่อเวลาผ่านไปในสัปดาห์ที่ 3 แสดงว่า เชื้อเหล่านี้ไม่ใช่สาเหตุที่แท้จริงในการก่อให้เกิดโรคในปลาตะเพียนขาว แต่จะเป็นเชื้อรอโอกาสจะเข้าทำอันตรายต่อปลาเมื่อปลาอยู่ในสภาวะที่อ่อนแอ ปริมาณเชื้อมีมากขึ้นและสภาพแวดล้อมเสื่อมลงจะส่งผลให้ปลาเป็นโรคได้ (ปณรัตน์, 2549) และไม่สามารถเจริญภายในเนื้อเยื่อปลาได้

จากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสกุล *Achlya* sp., *Saprolegnia* sp., *Aphanomyces* sp. และ *Leptolegnia* sp. ต่อปลาสอดที่ถูกดึงเกล็ดด้านซ้ายใต้ครีบหลังของปลาออก 3 เกล็ด แล้วนำไปเลี้ยงในตู้ที่มีมี zoospores ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ควบคุมอุณหภูมิที่ 15°C เพื่อทำให้ปลาเกิดความเครียด จากผลการทดลองพบว่า เชื้อราทุกชนิดสามารถก่อให้ปลาสอดติดโรคได้ โดยขึ้นกับความเข้มข้นของเชื้อ ส่วนปลาที่ไม่ถูกดึงเกล็ดออกจะมีเฉพาะ *Saprolegnia* sp. และ *Leptolegnia* sp. เท่านั้นที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ โดยปลาที่ติดเชื้อราจะแสดงอาการเซื่องซึม ว่ายน้ำช้า และมีปุยของเชื้อราเกาะบริเวณผิวลำตัว เมื่อทำการแยกเชื้อจากปลาป่วยก็พบว่าเป็นเชื้อที่ทำการทดลองจริง แสดงว่าเชื้อเหล่านี้สามารถทำให้เกิดโรคได้จริงแต่ต้องอยู่ในสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียด จะเห็นว่า *Saprolegnia* sp. สามารถในการก่อให้เกิดโรคสูงที่สุดในทุกความเข้มข้นและทุกสภาพรองลงมาคือ *Leptolegnia* sp., *Achlya* sp. และ *Aphanomyces* sp. ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเกษตรกรเจ้าของฟาร์มทุกท่าน สำหรับตัวอย่างปลาป่วยที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

นิลุบล ยูอาสะ, ประภาส โฉลกพันธ์รัตน์ และสนอง เทียบสี. 2543. โรคเชื้อราที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจและการป้องกันโรค. รายงานการวิจัย ประจำปี 2543. ขอนแก่น: ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปณรัตน์ ผาดี. 2549. โรคและการวินิจฉัยโรคปลา. คณะเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยมหา-สาคาม, มหาสารคาม. 148 หน้า.

Chukanhom, K. 2004. Studies on fungal diseases of freshwater fishes in Southeast Asia. Ph.D. Thesis, Tokyo: Nippon Veterinary and Animal Science University.

Coker, W.C. 1923. The Saprolegniaceae, with notes on other water molds. North Carolina: North Carolina state University Press, Chapel Hill.

Hatai, K. and S. Egusa. 1977. Studies on visceral mycosis of saimonid fry-ll Characteristics of fungi isolated from the adominal cavity of amago salmon fry. Fish Pathology 11:187-193.

Howard, K.L., R. Seymour and T.W. Johnson. 1970. Aquatic fungi of Iceland: Saprolegniaceae. Journal of Elisha Mitchell Science Society 86: 63-79.

Hussein, M.M.A. and Hatai K. 1999. *Saprolegnia salmonis* sp. nov. isolated from sockeye salmon, *Onchorhynchus nerka*. Mycoscience 40: 387-391.

Johnson, T.W. 1956. The genus *Achlya*: morphology and taxonomy. University of Michigan Press, London.

Kallil, A.M.A. 2001. The Family Saprolegniaceae. Assiut: Botany Department, Faculty of Science, Assiut University, Egypt.

Kitancharoen, N., K. Yuasa and K. Hatai. 1996. Effect of pH and temperature on growth of

Saprolegnia diclina and *S. parasitica* isolated from various sources. Mycoscience 37: 385-390.

Kitancharoen, N. 1997. Stucres on fungal infection in salmonids eggs. Thesis. Nippon Veterinary and Animal Science University. Tokyo, Japan. 139 p.

Rattan, S.S., T.M. Muhsin and A.L.S. Ismail. 1978. Aquatic fungi of Iraq: Species of *Dictyuchus* and *Calyptralegnia*. Sydowia 31: 112-121.

Scott, W.W. 1961. A monograh of the genus *Aphanomyces*. Virginia: Technical Bulletin 151, Virginia Agricultural Experiment Station, Blacksburg, USA.

Seymour, R.L. 1970. The genus *Saprolegnia*. Nova Hedwigia 19: 1-124.

Willoughby, L.G., C.B. McGrory and A.D. Pickering. 1983. Zoospore germination of *Saprolegnia* pathogenic to fish. Trans. British Mycological Society 80:421-435.