บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 21 ไอโซเลท คือ แอปเปิ้ล 1 ไอโซเลท, กล้วย 4 ไอโซเลท, มะม่วง 4 ไอโซเลท, มะละกอ 4 ไอโซเลท และส้ม 4 ไอโซเลท (ตาราง 7) จากเชื้อราทั้งหมด 147 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากแอปเปิ้ล 1 ไอโซเลท, กล้วย 28 ไอโซเลท, ฝรั่ง 18 ไอโซเลท, มะม่วง 40 ไอโซเลท, มะละกอ 25 ไอโซเลท และส้ม 35 ไอโซเลท โดยศึกษาจากลักษณะของ colony รูปร่างและขนาดของ conidium และ appressorium การสร้าง/ไม่สร้าง sclerotium และ setae จากนั้นจัดจำแนก สปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1992) พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 3 สปีชีส์คือ

กลุ่มที่ 1 คือเชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชอาศัย 4 ชนิด คือ ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ และส้ม ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *C. gloeosporioides* คือ เส้นใยฟู สีขาว แล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียวจนถึงสีเทาเข้ม รูปร่าง conidium คล้ายแคปซูลหัวท้ายมน (cylindrical) หรือมนด้านหนึ่งและอีกแหลมที่ปลายอีกด้านหนึ่ง ขนาดประมาณ 2.5-12.3 x 7.5-20.0 ไมโครเมตร สร้าง appressorium ส่วนใหญ่รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) สีน้ำตาล ขนาดประมาณ 4.9-24.6 x 3.7-12.3 ไมโครเมตร สร้าง setae และ scerotium ในบางไอโซเลท (ตาราง 8)

กลุ่มที่ 2 คือเชื้อรา *C. musae* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วย ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อราชนิดนี้คือ เส้นใยเจริญเร็ว ลักษณะเส้นใยฟูและบาง สีเทา สร้าง mass เป็นหยดสีส้มจำนวนมาก ในบริเวณที่เส้นใยเจริญ conidium ลักษณะคล้ายแคปซูลหัวท้ายมน (cylindrical) ขนาดประมาณ 4.5-5.5 x 10.0-17.50 ไมโครเมตร ซึ่งคล้ายกับ conidium ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* แต่ conidium ของเชื้อรามีขนาดไม่แน่นอน และพบว่ารูปร่างของ appressorium มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ (irregular) สีน้ำตาลเข้ม ขนาดประมาณ 9.8-19.7 x 7.4-17.2 ไมโครเมตร ในขณะที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* สร้าง appressorium คล้ายกระบอง จึงสามารถใช้แยกเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์ออกจากกันได้อย่างชัดเจน (ตาราง 8)

กลุ่มที่ 3 คือเชื้อรา *C. acutatum* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของแอปเปิ้ล ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อราชนิดนี้คือ เส้นใยละเอียดคล้ายกำมะหยี่ เจริญช้า และติดผิวอาหาร สีส้มอมเทา conidium ลักษณะคล้ายลูกรักบี้หัวท้ายแหลม (fusiform) ขนาด 2.5-5.0 x 7.5-13.75 ไมโครเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

appressorium มีสีน้ำตาล รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) ขนาดประมาณ 9.8-19.1 x 4.9-9.8 ไมโครเมตร ไม่สร้าง setae (ตาราง 8) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ พัชรา (2543) ศรัญญา (2544) เอมอร (2544) และรัฐกร (2549) ที่พบว่าเชื้อรา *C. gloeosprorioides* สามารถเข้าทำลายฝรั่ง มะม่วง มะละกอ และส้ม เชื้อรา *C. musae* เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสกล้วย และเชื้อรา *C.acutatum* เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสแอปเปิ้ล

เมื่อนำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ซึ่งเป็นสารป้องกันกำจัดโรคพืชชนิดดูดซึมที่เกษตรกรนิยมใช้ในการควบคุมโรค แอนแทรคโนสทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวโดยการเลี้ยงบนอาหาร PDA ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim 7 ระดับความเข้มข้นคือ 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 ppm และทำการประเมินระดับความทนทานของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim 4 ระดับคือ ทนทานมาก (highly resistance; HR), ทนทานปานกลาง (moderately resistance; MR), ทนทานน้อย (weakly resistance; WR), และไม่ทนทาน (สายพันธุ์ปกติ) (sensitive; S) พบว่ามีเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 70 ไอโซเลท (คิดเป็น 47.62% ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด) (ตาราง 10) ซึ่งแยกได้จากแอปเปิ้ล 1 ไอโซเลท, กล้วย 1 ไอโซเลท, ฝรั่ง 5 ไอโซเลท, มะม่วง 26 ไอโซเลท, มะละกอ 4 ไอโซเลท และส้ม 32 ไอโซเลท (ตาราง 9 และ 10) สามารถทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในระดับสูง (500 และ 1000 ppm) ได้ โดยในการทดสอบครั้งนี้ไม่พบเชื้อราที่มีความทนทานปานกลาง (MR) และเชื้อราที่มีความทนทานน้อย (WR)

เมื่อนำเชื้อราทั้งหมด 21 ไอโซเลทจากสายพันธุ์ปกติ 10 ไอโซเลท และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim 11 ไอโซเลท (ตาราง 11) มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารกำจัดเชื้อรา carbendazim พบว่าการเจริญของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm โคโลนีของเชื้อราจะมีลักษณะกลม ขอบโคโลนีเรียบ เส้นใยเจริญฟู เส้นใยสีขาว ต่อมาจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาแกมเขียว หรือสีส้มอมเทา (ภาพ 17 A และ B) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm จะพบการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim เท่านั้น โดยโคโลนีของเชื้อราที่เจริญจะมีสองลักษณะคือ โคโลนีที่เจริญแบบปกติเช่นเดียวกับการเจริญที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ภาพ 17 C) และการเจริญแบบผิดปกติโดยเชื้อราบางไอโซเลทพบการสร้าง pigment สีแดงม่วงออกมาจากจุดเจริญก่อนที่เส้นใยจะเจริญออกมา (ภาพ 17 D) ในบางไอโซเลทเชื้อราที่เจริญแบบผิดปกติ โคโลนีจะมีขนาดเล็ก เจริญได้ช้า ขอบโคโลนีหยัก เส้นใยสานตัวกันแน่นเป็นกระจุกในบริเวณที่วางโคโลนีลงไปบนอาหาร ใน (ภาพ 17 E และ F)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำเส้นใยเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์มาตรวจสอบลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบพบว่าลักษณะของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR) มีลักษณะที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพ 18)

จากการทดสอบการงอกของเชื้อราที่แยกได้จากผลไม้ 6 ชนิด พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้นั้นส่วนใหญ่ conidium ทั้งสองสายพันธุ์จะเริ่มงอก germ tube ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 6 ชั่วโมงและมีอัตราการงอกเพิ่มขึ้นเรื่อย เมื่อนำ conidium ของเชื้อรา มาทดสอบการงอกบนเยื่อหอมที่ลอยอยู่บนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ปกติ (S) จะงอก germ tube ได้ลดลง ส่วนสายพันธ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim พบว่า อัตราการงอกจะลดลงในช่วงแรก แต่ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง อัตราการงอกและความยาว germ tube จะใกล้เคียงกันกับชุดที่ลอยอยู่ในน้ำกลั่น (ตาราง 12, ภาพ 19-30)

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าส้มเป็นผลไม้ที่สามารถทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazimในระดับสูง (HR) มากถึง 91.43% ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดจากส้ม เนื่องจากส้มเป็นผลไม้ที่มีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคในปริมาณที่สูง และใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่อง ทำให้สารป้องกันกำจัดเชื้อราดังกล่าวไม่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราได้อีกต่อไป เกษตรจึงต้องเพิ่มปริมาณการใช้ให้สูงขึ้นหรือใช้บ่อยขึ้น เป็นสาเหตุให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์เพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ในธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Spalding (1982) และ Jeffries *et al*. (1990) รายงานว่าทั้ง benomyl และ carbendazim สามารถชักนำให้เชื้อต้านทานต่อสารเคมีกลุ่มนี้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา benomyl เมื่อใช้ในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวในปริมาณที่มากเกินไป นอกจากนี้วรรษมน (2549) ยังรายงานว่าจากการทำการสำรวจความทนทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสส้มต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ที่ปลูกใน ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ พบว่ามีเชื้อรา 36.84 % ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด สามารถทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ในระดับสูง (HR) ธรรมศักดิ์ (2543) กล่าวว่าการกลายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อให้ทนทานต่อสารเคมีจะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการใช้สารเคมีนั้นๆ ติดต่อกันเป็นเวลานานและต่อเนื่อง และความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดโรคพืชชนิดดูดซึม จะเกิดขึ้นได้เร็วกว่าสารป้องกันกำจัดโรคพืชชนิดสัมผัสตาย โดยความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมจะเกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการใช้ติดต่อกันนาน 2-3 ปีเท่านั้น

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ตามอัตราแนะนำ 5 ชนิด เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim พบว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยทั้งสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อรา carbendazim (HR) ได้ 100% ได้ดีที่สุด คือ mancozeb และสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยได้รองลงมา คือ carboxin, captan, benomyl และ carbendazim ตามลำดับ (ตาราง 13-18 และภาพ 31-42) จากการทดลองพบว่า benomyl และ carbendazim นั้น ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสายพันธุ์ทนทานต่อสารกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR) โดยลักษณะการเจริญเส้นใยของเชื้อราจะคล้ายคลึงกับที่เจริญบนอาหารชุดควบคุม คือ มีโคโลนีสีขาวและเส้นใยฟู ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา copper oxychloride ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ (S และ HR) แต่มีผลทำให้เส้นใยมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป โดยเส้นใยลีบแบน เจริญติดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และโคโลนีเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองอ่อน หรือสีน้ำตาลเข้ม (ภาพ 32, 34, 36, 38, 40 และ 42) นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim สามารถทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา benomyl ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม benzimidazole ได้เช่นกัน โดยในสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim สารป้องกันกำจัดเชื้อรา benomyl สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ตั้งแต่ 38.12-80.32% (ตาราง 13-18 และภาพ 31-42) โดยความต้านทานต่อสารเคมีในลักษณะนี้จัดว่าเป็นความต้านทานข้าม (cross resistance)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการงอก conidium ของเชื้อราบนเยื่อหอมที่ลอยอยู่ในสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับ conidium ที่ลอยอยู่ในน้ำกลั่น พบว่า mancozeb มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของ conidium ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้ดีที่สุด (100%) ทั้งในสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR) และสารกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของ conidium รองลงมา คือ carboxin, captan, copper oxychloride และ benomyl ตามลำดับ (ตาราง 19, 21, 23, 25, 27 และ 29, ภาพ 43, 45, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58 และ 60)

ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา copper oxychloride เป็นสารที่ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการงอกของ conidium ในทางตรงกันข้ามกลับส่งเสริมการงอก germ tube ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ และในบางการทดลองสารเคมีดังกล่าวจะเร่งให้ germ tube งอกได้เร็วขึ้น แต่ germ tube ที่งอกออกมาจะมีลักษณะลีบยาว (ตาราง 19, 21, 23, 25, 27 และ 29, ภาพ 43, 45, 46, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57, 58 และ 60) และสร้าง appressorium ได้น้อยลง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดียวกันที่เจริญในน้ำกลั่น (ตาราง 20, 22, 24, 26, 28 และ 30, ภาพ 44, 45, 47, 48, 50, 51, 53, 54, 56, 57, 59 และ 60)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 5 ชนิดมีผลทำให้ germ tube งอกช้าลง และเมื่อ germ tube งอกออกมายังมีผลทำให้เชื้อราสร้าง appressorium ได้ปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นในกรณีของเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พบว่า benomyl ไม่มีผลในการยับยั้งการงอกของ conidium และการสร้าง appressorium เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตาราง 20, 22, 24, 26, 28 และ 30, ภาพ 44, 45, 47, 48, 50, 51, 53, 54, 56, 57, 59 และ 60)

จากการทดลองครั้งนี้พบว่า mancozeb,carboxin และ captan เป็นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของ conidium เชื้อราได้ดีที่สุด ซึ่งสารเคมีดังกล่าวเป็นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่กรมวิชาการเกษตร (2550) แนะนำให้ใช้หมุนเวียนในแปลงปลูกสลับกับสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim เพื่อป้องกันการกลายพันธุ์ของเชื้อรา ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิลซึ่งเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่ม benzimidazole เช่นเดียวกับสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ได้ต่ำ (38.12%) ซึ่งความทนทานต่อสารเคมีในกลุ่ม benzimidazole ที่เกิดขึ้นจัดเป็นความต้านทานข้าม (cross resistance) ที่เชื้อราสามารถต้านทานต่อสารเคมีได้มากกว่า 1 ชนิดในสารเคมีกลุ่มเดียวกัน จากการศึกษาพบว่ามีรายงานการเกิดความต้านทานข้ามต่อสารเคมีในกลุ่ม benzimidazole ในเชื้อราหลายชนิดเช่น *Cercospora beticola* (Karaoglanidis and Bardas, 2006) *Colletotrichum capsici* (Sariah, 1989) *Colletotrichum gloeosporioides* (Wen-Hsin *et al.,* 2006) *Penicillium* spp. (Sholberg *et al*., 2004) *Venturia inaequalis* (Koenraadt *et al*., 1992) เป็นต้น

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กระชาย ข่า และขิง ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากผลไม้ทั้ง 6 ชนิด พบว่า กระชาย ความเข้มข้น 5% ประสิทธภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่แยกได้จาก ฝรั่ง, มะม่วง, มะละกอ สายพันธุ์ปกติได้ดีที่สุด 52.68, 61.91 และ 62.73% ตามลำดับ, ข่า ความเข้มข้น 5% สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ที่แยกได้จากแอปเปิ้ล, ฝรั่ง และมะละกอ สายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR)ได้ดีที่สุด 53.99, 55.46 และ 63.99% ตามลำดับ นอกจากนี้ ข่า ความข้มข้น 5% ยังสามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่แยกได้จากส้มสายพันธุ์ปกติ (S)ได้ดีที่สุดอีกด้วย โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 61.78% ส่วนขิงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกล้วยได้ทั้งสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR)ได้ดีที่สุด 50.75 และ 50.61% ตามลำดับ นอกจากนี้ขิง ความเข้มข้น 5% ยังควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วง และส้ม สายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR)ได้ดีที่สุดอีกด้วย 56.34 และ 51.25% ตามลำดับ (ตาราง 31, 33, 35, 37, 39 และ 41, ภาพ 61, 63, 64, 66, 67, 69, 70, 72, 73, 75, 76 และ 78) และจากการทดลองครั้งนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยังพบว่าสมุนไพรทั้งสามชนิดดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ได้ดีขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสมุนไพรมากขึ้น โดยสมุนไพรของเชื้อราทั้งสามชนิดไม่มีผลทำให้ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเปลี่ยนแปลงไปแต่อย่างใด เพียงแต่มีผลให้เชื้อรามีอัตราการเจริญลดลงเท่านั้น และเมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมาสร้าง DR curve เพื่อใช้ในการหาค่า ED_{50} หรือค่าที่ทำให้ทราบปริมาณของสมุนไพรที่มีผลในการยับยั้งการของเส้นใยเชื้อราลงครึ่งหนึ่ง พบว่าค่า ED_{50} ที่ได้จะมีค่าความเข้มข้นของสมุนไพรมากกว่า 5% ดังนั้นหากต้องการควบคุมการเจริญของเส้นใยให้มากยิ่งขึ้น ก็ต้องใช้ผงสมุนไพรที่มีค่ามากกว่า 5% ขึ้นไป (ตาราง 32, 34, 36, 38, 40 และ 42, ภาพ 62, 63, 65, 66, 68, 69, 71, 72, 74, 75, 77 และ 78) สอดคล้องกับการศึกษาของ สุภัทรา (2548ข) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำมันระเหยที่ได้จากสมุนไพรวงศ์ขิง 3 ชนิด คือ กระชาย ข่า และขิง ในการต่อต้านการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 6 ชนิด คือ *C. capsici* (2 สายพันธุ์), *C. gloeosporioides* (2 สายพันธุ์), *Dothiorella* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Pythium aphanidermatum* พบว่า น้ำมันระเหยที่มีประสิทธิภาพดีในการศึกษาครั้งนี้ คือน้ำมันระเหยที่ได้จากกระชาย และขิง ความเข้มข้น 1,000 ppm ในอาหาร PDA โดยน้ำมันกระชายมีผลทำให้เชื้อรา *C. capsici* (สายพันธุ์170), *Dothiorella* sp. และ *P. aphanidermatum* ไม่สามารถเจริญได้ และทำให้การเจริญของเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ลดลง 88 % น้ำมันระเหยที่สกัดจากขิงสามารถทำให้การเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (สายพันธุ์ 163), *C. gloeosporioides* (สายพันธุ์ 458), *L. theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. และ *P. aphanidermatum* ลดลง 69, 73, 82, 65 และ 64% ตามลำดับ และจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากสมุนไพรวงศ์ขิงในการต่อต้านการเจริญของเส้นใยของรา 6 ชนิด คือ *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *Dothiorella sp., Lasiodiplodia theobromae, Pestalotiopsis sp.* และ *Pythium aphanidermatum* พบว่า สารสกัดหยาบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี คือ สารสกัดที่ได้จากขิง ความเข้มข้น 10,000 ppm ในอาหาร PDA โดยสารสกัดหยาบจากขิง มีผลทำให้การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบลดลง ระหว่าง 83-87%

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าความสามารถในการควบคุมการเจริญของเชื้อราทั้งสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim โดยสมุนไพรมีค่าไม่แตกต่างกัน (อยู่ระหว่าง 50-65%)

ธรรมศักดิ์ (2543) กล่าวว่าเมื่อนำค่าที่ได้จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารเคมีมาสร้าง DR curve เพื่อหาค่า ED_{50} จากความลาดเอียงของ DR curve ซึ่งค่า ED_{50} เป็นค่าที่นิยมใช้กันมากในการศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีชนิดต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารพิษ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพรต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบว่าระดับความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุดในทุกการทดลองคือที่ระดับความเข้มข้น 5% แต่ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราโดยใช้สมุนไพรระดับความเข้มข้น 5% ยังควบคุมโรคได้ไม่ดีนัก (ต่ำกว่า 70%) ซึ่งเมื่อนำเอาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราในแต่ละการทดลองไปสร้าง DR curve พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 5% มีค่า probit ของการยับยั้งเกิน 5 มาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นในการทดสอบครั้งต่อๆ ไปจึงควรมีการเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารสมุนไพรให้สูงขึ้น

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง beta-tubulin gene ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากตัวอย่างเชื้อราจำนวน 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแอปเปิล 1ไอโซเลท, กล้วย 1 ไอโซเลท, ฝรั่ง 3 ไอโซเลท, มะม่วง 6 ไอโซเลท, มะละกอ 2 ไอโซเลท และส้ม 5 ไอโซเลท (ตาราง 43) โดยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ primer 2 ชนิด คือ TB2L (5′-GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC-3′) และ TB2R (5′-TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG-3′) (Buhr and Dickman, 1994) สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลท จากตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.ที่แยกได้จาก ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ และส้ม (ตาราง 43) โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 474 คู่เบส (ภาพ 79-82) ซึ่งการทดลองครั้งนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งบางส่วนของยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากแอปเปิล และกล้วย อาจจะเนื่องมาจากไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ TB2L/TB2R เป็นไพร์เมอร์ที่ออกแบบโดยอาศัยต้นแบบจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (U14138) ซึ่งไพร์เมื่อดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งบางส่วนของยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *C. acutatum* ที่แยกได้จากแอปเปิล และเชื้อรา *C. musae* ที่แยกได้จากกล้วย เนื่องจากเป็นเชื้อราต่างสปีชีส์กัน

เมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนในตำแหน่งยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.ที่แยกได้จาก ฝรั่ง มะม่วง มะละกอ และส้ม จำนวน 16 ตัวอย่าง ที่เป็นตัวแทนของเชื้อราที่แสดงความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ด้วยเครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 16 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลที่มีรายงานใน NCBI พบว่ามีความเหมือนกันบางส่วนกับยีน beta-tubulin (*TUB2*) ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (U14138) ประมาณ 97-98% เมื่อเปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวนิวคลีโอไทด์บางส่วนในตำแหน่งยีน beta-tubulin ทั้ง 16 ตัวอย่าง และยีน *TUB2* ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม CLUSTAL W จาก The DNA Data Bank of Japan (DDBJ) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความผันแปร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไปบางส่วน (ข้อมูลดังแสดงในภาพ 83) และเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างกรดอะมิโนของทั้ง 16 ตัวอย่าง และของยีน TUB2 ด้วยโปรแกรม CLUSTAL W พบการเปลี่ยนแปลงของเบสที่จำเพาะของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 198 จาก glutamic acid (GAG) เป็น alanine (GCG) ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน beta-tubulin ซึ่งมักจะพบในเชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา benomyl (Peres *et al.,* 2004) ส่วนความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งอื่นๆ ไม่มีผลทำให้เบสที่จำเพาะของกรดอะมิโนในตำแหน่งอื่นๆ เปลี่ยนแปลง (ตาราง 44 ภาพ 83 และ 84)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับกับการทดลองของ Wen-Hsin *et al.* (2006) ที่ทำการศึกษาความทนทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่ม benzimidazole พบว่าเชื้อราที่สามารถทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรากลุ่มดังกล่าวได้นั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่จำเพาะของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 198 จาก glutamic acid ไปเป็น alanine และจากการศึกษาของ Peres *et al.* (2004) ที่ทดสอบความทนทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสส้ม ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่ม benzimidazol จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่แสดงความทนทานต่อสารเคมีเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ beta-tubulin (*TUB2*) gene พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่ทนทานต่อสารเคมีดังกล่าวเกิดการเปลียนแปลงจาก GAG เป็น GCG มีผลทำให้เบสที่จำเพาะของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก glutamic acid เป็น alanine ในตำแหน่งที่ 198 เชื้อราจึงสามารถทนทานต่อสารเคมีในกลุ่มดังกล่าวได้

จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์แม้เพียงตำแหน่งเดียว มีผลต่อการแปลรหัสของกรดอะมิโน ซึ่งส่งผลให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ให้ทนทานต่อสารเคมีขึ้นได้ จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่า ปัจจุบันนี้มีเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim มีปริมาณพอสมควร หากไม่รีบแก้ไขปัญหานี้ อาจจะกลายเป็นปัญหาที่ยากจะแก้ไขในอนาคตได้ เนื่องจากเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ไปเป็นเชื้อที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา จะขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ จนไม่สามารถใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราใดๆ ควบคุมได้ สาเหตุของการกลายพันธุ์ของเชื้อนี้ อาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น เกษตรกรใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดเดียวอยู่เรื่อยๆ ไม่มีการสลับเปลี่ยนใช้สารชนิดอื่นบ้าง หรือมีการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราเกินความจำเป็นและเกินอัตราที่แนะนำให้ใช้ ซึ่งการใช้สารเคมีนี้ มีผลเสียทางอ้อมต่อเกษตรเอง โดยทำให้เกิดมลพิษ สารเคมีเป็นพิษตกค้างในดิน ส่งผลให้โครงสร้างของดินเสียหาย ไม่เหมาะต่อการเพาะปลูก ดังนั้น หลักปฏิบัติเพื่อเป็นการป้องกันกำจัดเชื้อที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา เกษตรกรควรใช้สารเคมีเท่าที่จำเป็นเท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และหากจะต้องใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราก็ควรใช้สารต่างกลุ่มสลับกันไป ไม่ควรใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึม ชนิดเดียวกันติดต่อกันไปนานๆ เพราะสารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึมมีผลทำให้เชื้อกลายพันธุ์ จึงควรใช้สลับกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทไม่ดูดซึม ซึ่งตัวอย่างจากการทดลองนี้ ทำให้ทราบว่า ควรใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา mancozeb หรือ carboxin เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของ conidium ได้ 100% และเพื่อคำนึงถึงสิ่งแวดล้อมนั้น หากเป็นไปได้ ควรหันมาใช้สารสกัดสมุนไพร หรือสารชีวภัณฑ์ต่างๆ ถึงแม้ว่าสารที่ได้จากพืชนี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไม่ถึง 100 % ก็ตาม แต่ควรนำมาใช้ร่วมสลับกับการใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัดโรคพืช นอกจากนี้ยังมีสารที่ได้จากพืชบางชนิด ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อโดยตรง แต่กลับไปมีผลช่วยกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานให้กับตัวพืชเอง (resistance mechanism) หากพืชสามารถสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาได้ จะถือว่าเป็นสิ่งที่ดีมาก เพราะพืชจะสามารถต้านทานต่อเชื้อได้ทุกชนิด ซึ่งงานทดลองในเรื่องการกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานให้กับตัวพืชเองนั้น เป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่งและน่าจะศึกษาให้มากขึ้นในอนาคต เพราะเราจะได้ไม่ต้องใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัดโรคพืชอีกต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved