

ผลของเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินต่อการเจริญของเชื้อรา
Colletotrichum gloeosporioides สาเหตุโรคแอนแทรคโนส
ของสตรอว์เบอร์รีที่ต้านทานต่อคาร์เบนดาซิม

Effect of Soil Actinomycetes on Growth of
Carbendazim-resistance *Colletotrichum gloeosporioides*
Causing Strawberry Anthracnose

วรุตม์ ใจปิ่น^{1/} และ สรัญยา ณ ลำปาง^{1/}
Waroot Jaipin^{1/} and Sarunya Nalumpang^{1/}

Abstract: Sixty three isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing strawberry anthracnose were collected from Samoeng, Muang, Mae Rim and Mae Chame districts, Chiang Mai province. Thirty-one of isolates showed highly resistance (HR) to carbendazim fungicide phenotype, and another five and twenty-seven isolates showed weakly resistance (WR) and sensitive (S), respectively. Six isolates of actinomycetes, i.e; NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 and NSP6, collected from Suthep-Pui National Park, were tested for their antifungal activity against *C. gloeosporioides* Cg_MCL8 (representative of highly resistance group) by dual culture method. All of six actinomycetes isolates could inhibit the mycelial growth of the tested fungus in range 76.18-79.52%. Then, actinomycetes grown in culture media as cell suspensions and culture filtrate, were tested for inhibitory effect on conidial germination of pathogen by slide culture technique, and showed percentage in range of 52.38-67.16% and 51.10-61.69%, respectively. Moreover, both cell suspensions and culture filtrate treated could inhibit conidial germination with time in term of delay germination. The elongation of cell suspensions treated germ tube at 6 h were 117.66 μ m in length, and 133.90 μ m in culture filtrate treated, while control were 261.90 μ m in length. Moreover, both cell suspensions and culture filtrate caused abnormality of spore germination.

Keywords: Soil actinomycetes, *Colletotrichum gloeosporioides*, strawberry anthracnose

^{1/} ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: เก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอว์เบอร์รีจากแปลงปลูกในเขตอำเภอ สะเมิง อำเภอเมือง อำเภอแมริม และอำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ ได้เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 63 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัด เชื้อราในระดับสูง (HR) ระดับต่ำ (WR) และอ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (S) จำนวน 31, 5 และ 27 ไอโซ เลท ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีตจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ซึ่งเป็นเชื้อแอคติโนไมซีตที่แยกจากดินบริเวณป่าอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย ในการยับยั้งการ เจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท Cg_MCL8 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราในกลุ่มสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อ สารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อแอคติโนไมซีตทั้ง 6 ไอโซเลท มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราอยู่ในช่วง 76.18-79.52 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ แอคติโนไมซีตที่เลี้ยงในอาหารเหลวในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate ในการยับยั้งการงอกสปอร์ของ เชื้อรา ด้วยวิธี slide culture พบว่าเมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราอยู่ในช่วง 52.38- 67.16 และ 51.10-61.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยังพบว่าเชื้อแอคติโนไมซีตที่เลี้ยงในอาหารเหลวในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate มีผลในการช่วยชะลอการงอกของ germ tube ซึ่งความยาวของ germ tube ในชุด ทดสอบมีความยาวเท่ากับ 117.66 และ 133.90 μm ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีความยาว germ tube เท่ากับ 261.90 μm อีกทั้งยังมีส่วนทำให้การงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคมีลักษณะผิดปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

คำสำคัญ: แอคติโนไมซีตจากดิน *Colletotrichum gloeosporioides* โรคแอนแทรคโนสสตรอว์เบอร์รี

คำนำ

สตรอว์เบอร์รีจัดเป็นไม้ผลชนิดหนึ่งที่มีการปลูก กระจายกันทั่วโลก ตั้งแต่แถบขั้วโลกลงมาถึงพื้นที่ในเขต ร้อน (ณรงค์ชัย, 2543) ผลสตรอว์เบอร์รีนอกจากใช้ รับประทานผลสดแล้วยังสามารถแปรรูปในเชิง อุตสาหกรรม เช่น แยม ไวน์ สตรอว์เบอร์รีอบแห้ง เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541) สำหรับในประเทศไทยมี พื้นที่ปลูกสตรอว์เบอร์รีส่วนใหญ่อยู่ทางภาคเหนือ เช่น บางอำเภอในจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย และพื้นที่ใน บางจังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดเลย และเพชรบูรณ์ ประเทศไทยมีการส่งออกผลสตรอว์เบอร์รี ในเชิงอุตสาหกรรมไปยังต่างประเทศ และสามารถทำ รายได้หลายร้อยล้านบาทต่อปี (ณรงค์ชัย, 2543) แต่การ ปลูก สตรอว์เบอร์รีมักประสบปัญหาเรื่องโรคและแมลงเข้า ทำลายหลายชนิดด้วยกัน โรคที่มีความสำคัญ เช่น โรค แอนแทรคโนส โรครากเน่าโคนเน่า โรคผลเน่า โรคราสีเทา เป็นต้น โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนส ซึ่งสามารถเข้า ทำลายทุกส่วนของสตรอว์เบอร์รี ทำให้ผลผลิตมีคุณภาพ ต่ำจนไม่สามารถนำออกจำหน่ายได้ สร้างความเสียหาย

แก่มูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Mass, 1988) การ ควบคุมโรคแอนแทรคโนสส่วนใหญ่เกษตรกรนิยมฉีดพ่น สารเคมีประเภทดูดซึมโดยเฉพาะสารในกลุ่มเบนซิมิดา โซล ได้แก่ คาร์เบนดาซิม และ เบนนิมิล เป็นต้น (ณรงค์ชัย, 2543) แต่การใช้สารเคมีประเภทดังกล่าวเมื่อใช้ติดต่อกัน เป็นระยะเวลานาน มีผลให้เชื้อราเกิดการปรับตัว กลายเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ซึ่งลักษณะการต้านทานเหล่านี้สามารถถ่ายทอดสู่รุ่น ลูกหลาน เกิดการเพิ่มจำนวน และแพร่ระบาดภายใน แปลงปลูก (ธรรมศักดิ์, 2543) โดยปัจจุบันพบเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ที่สร้างความต้านทานต่อสารป้องกัน กำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซลขึ้นแล้วในหลายประเทศ (Peres *et al.*, 2004; Ma and Michailides, 2005; Tashiro *et al.*, 2012) เมื่อเชื้อราเกิดการปรับตัวเป็นสาย พันธุ์ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ทำให้เกษตรกร ประสบปัญหาไม่สามารถควบคุมการเกิด และแพร่ระบาด ของโรคได้ จึงต้องใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราในปริมาณที่ เพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นการเพิ่ม ต้นทุนการผลิตอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้นการควบคุมโรค โดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดการใช้สารเคมี

อีกทั้งยังช่วยลดมลภาวะที่เกิดจากการใช้สารเคมีได้ (เกษม, 2532) การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสจากดินที่มีบทบาทในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในธรรมชาติ ทำให้เกิดความสมบูรณ์ทางระบบนิเวศ (Takizawa et al., 1993) มาควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอว์เบอร์รีเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดการใช้สารเคมีในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช และลดปัญหาการต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา อีกทั้งยังช่วยลดปัญหาด้านมลภาวะในสิ่งแวดล้อมอันเนื่องมาจากการใช้สารเคมี

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอว์เบอร์รี

เก็บรวบรวมตัวอย่างใบ ไหล และผลสตรอว์เบอร์รีที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส จากแหล่งปลูกสตรอว์เบอร์รี 4 แหล่ง ได้แก่ อำเภอสะเมิง อำเภอเมือง อำเภอแมริม และอำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี tissue transplanting method บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จากนั้นเก็บเชื้อราที่แยกได้ส่วนหนึ่งไว้ในอาหาร PDA ในหลอดเฉียง (slant) เพื่อใช้เป็น stock culture สำหรับศึกษาต่อไป

การประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้แก่ 0.1, 1, 10, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 mg/l จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลท แล้วย้ายเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบการเจริญของโคโลนีเชื้อรากับชุดควบคุมคืออาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ทำการ

ทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา และประเมินระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็น 4 ระดับ ได้แก่ ระดับ sensitive (S) คือเชื้อราที่สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 0-1 mg/l, ระดับ weakly resistance (WR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 1-10 mg/l, ระดับ moderately resistance (MR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 10-100 mg/l และระดับ highly resistance (HR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 100-1,000 mg/l [ดัดแปลงตามหลักเกณฑ์ของ Koenraad et al. (1992) และ Peres et al. (2004)]

ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

นำเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณป่าอุทยานแห่งชาติสุเทพ-ปุย (วรรณมน, 2553; ณัฐพงษ์, 2553) และผ่านการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เช่น เชื้อรา *Colletotrichum* sp. ของพริก (วรรณมน, 2553) และเชื้อรา *Cercospora* sp. ของผักกาดหอม (ณัฐพงษ์, 2553) โดยเชื้อแอกติโนไมซีสทั้งหมดจัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* (Suwan et al., 2012) จากนั้นเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสบนอาหาร casein starch agar (CSA) เป็นเวลา 10 วัน แล้วใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะผงสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสที่ติดบนผิวหน้าอาหาร glucose yeast malt agar (GYM) ยาว 3 เซนติเมตร ห่างจากขอบจานอาหาร 2 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สำหรับการทดสอบวางขึ้นรูนเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท Cg_MCL8 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราในกลุ่มสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

ระดับสูง (highly resistance; HR) ที่ได้จากการทดลองที่ 2 ลงบนผิวหน้าอาหาร GYM ห่างจากบริเวณที่ขีดเชื้อ แอคติโนไมซีต 5 เปอร์เซ็นต์ โดยทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) บันทึกผลโดยวัดรัศมีโคโลนีเพื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth; PIRG) โดยใช้สูตร $PIRG = [(R_1 - R_2) / R_1] \times 100$ โดยที่ R_1 และ R_2 คือ ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุในชุดควบคุม และในชุดทดสอบ ตามลำดับ และตรวจสอบลักษณะเส้นใยของเชื้อราที่เจริญร่วมกับเชื้อแอคติโนไมซีต ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวิธี slide culture

ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีตในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate ในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี slide culture

การเตรียมเชื้อแอคติโนไมซีตโดยเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีตที่เจริญบนอาหาร CSA ในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) ที่มีโคตินเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตร 150 ml จำนวน 15 ชิ้น เชื้อ (culture disc) บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกด้วยความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แบ่งอาหารเหลวออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกคืออาหารเหลวในรูปของ cell suspension และส่วนที่ 2 นำอาหารเหลวส่วนใสที่ได้มากรองด้วยชุดกรองแบคทีเรีย (Minisart®) ขนาดรูเท่ากับ 0.22 µm เก็บไว้เป็นอาหารเหลวในรูปของ culture filtrate

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท Cg_MCL8 ความเข้มข้น 10^5 spores/ml จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี slide culture โดยนำอาหารเหลว EPM (ชุดควบคุม) และเชื้อแอคติโนไมซีตที่เลี้ยงในอาหารเหลวในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate ปริมาตร 50 µl ผสมลงในสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา ปริมาตร 50 µl เขย่าให้เข้ากันก่อนนำมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร PDA จากนั้นตัดชิ้น

อาหารให้มีขนาด 1x1 cm วางบนกระจกสไลด์ ทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 28 ± 2 องศาเซลเซียส ประเมินผลโดยวัดเปอร์เซ็นต์ความงอก และความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อรา ที่เวลา 6, 9, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

ผลและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอว์เบอร์รี

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอว์เบอร์รีจากแปลงปลูกสตรอว์เบอร์รีในเขตจังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อราสาเหตุได้ทั้งหมด 63 ไอโซเลท เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรามีลักษณะการเจริญของเส้นใยในช่วงแรกเป็นสีขาว เมื่อเวลาผ่านไปจะเปลี่ยนเป็นสีขาวอมเทา สีเทาไปจนถึงสีน้ำตาลตามอายุของเชื้อรา สร้างกลุ่มสปอร์ (spore mass) สีส้มบนโคโลนี เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พบสปอร์เซลล์เดี่ยว สีไม่มีสี ขนาด $3.3-4.5 \times 13.5-17.8$ µm รูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) และสร้าง appressorium สีน้ำตาลอ่อน-เข้ม (ภาพที่ 1) เมื่อทำการจัดจำแนกตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1980) สามารถจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

การประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิม

จากการทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิม จำนวน 63 ไอโซเลท พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อรา *C. gloeosporioides* ตามระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิมได้ 3 กลุ่ม คือเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) จำนวน 31 ไอโซเลท เชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิมระดับต่ำ (WR) จำนวน 5 ไอโซเลท และเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา



Figure 1 Morphological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* causing strawberry anthracnose disease; (A) colony growth on potato dextrose agar for 10 days, (B) conidia (40X) and (C) appressorium (40X)

คาร์เบนดาซิม (S) จำนวน 27 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของของ Tashiro *et al.* (2012) ที่ได้ทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของลูกแพร์ญี่ปุ่นจำนวน 122 ไอโซเลท ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบโนมิล (benomyl) และ ไธโอฟลานเมทิล (thiophanate methyl) โดยการวาง ขึ้นวุ้นเชื้อราลงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบเชื้อราที่อยู่ในระดับอ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (S) จำนวน 12 ไอโซเลท และเชื้อราที่อยู่ในระดับต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราระดับสูง (HR) จำนวน 110 ไอโซเลท และจากการรายงานของ ธรรมศักดิ์ (2543) พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืชสามารถเกิดความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) ได้ เมื่อมีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน โดยทำให้เชื้อกลายพันธุ์ และต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราชนิดนั้น ๆ สอดคล้องกับการรายงานของ พรประพา และสร้อยยา (2553) ได้การศึกษาลักษณะของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) ที่ระดับ genetic mutation โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งบางส่วนของยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบว่าเชื้อรากลุ่ม HR มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 198 จาก glutamic acid (E) เป็น alanine (A) จึงส่งผลให้เชื้อราต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะ

การกลายพันธุ์ที่แสดงออกต่อสารคาร์เบนดาซิมในแปลงปลูก

ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งในการทดลองนี้ได้คัดเลือกทดสอบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท Cg_MCL8 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราในกลุ่มสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) โดยวิธี dual culture บนผิวหน้าอาหาร GYM พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* อยู่ในช่วง 76.18-79.52 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) ซึ่งถือว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท ที่นำมาทดสอบนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ในระดับสูง (เกษม, 2532) ซึ่งจากการศึกษาของ พรนภา และคณะ (2554) ได้รายงานเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท นี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ และเมื่อตรวจสอบลักษณะของ เส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในชุดทดสอบที่เจริญร่วมกับเชื้อแอกติโนไมซีสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยวิธี slide

Table 1 Efficacy of 6 actinomycetes isolates on inhibiting the mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate Cg_MCL8 by dual culture technique on glucose yeast malt agar (GYM) incubated for 10 days

Actinomycetes	Percent inhibition of colony growth ¹
NSP1	79.52 ^a
NSP2	76.18 ^a
NSP3	76.73 ^a
NSP4	77.61 ^a
NSP5	79.04 ^a
NSP6	78.57 ^a
%CV	2.06
LSD _{0.05}	2.85

¹ Average from 3 replications and means in a column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05

culture พบว่าปลายเส้นใยเชื้อราในชุดทดสอบถูกย่อยสลายทำให้บริเวณปลายเส้นใยเชื้อรามีขนาดสั้นเสมอกันไม่สามารถเจริญแผ่ขยายเส้นใยได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ El-tarabily *et al.* (2000) ที่ได้รายงานว่าเอนไซม์ β -1,3-glucanase และเอนไซม์ไคติเนสที่เชื้อแอคติโนไมซีส์สร้างขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อรา *Sclerotinia minor* สาเหตุโรค basal drop ของผักกาดหอมได้ โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีผลทำให้เส้นใยเชื้อราเหี่ยว แปร (plasmolysis) และทำให้เกิดการแตกสลายของผนังเซลล์ (lysis) ได้ โดยบทบาทของเอนไซม์ ไคติเนสจะย่อยสลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อรา

ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีส์ในรูปของ cell suspension และ culture filtrate ในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี slide culture

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนไมซีส์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ซึ่งจากการตรวจนับโคโลนีหลังจากบ่มโดยการเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อแอคติโนไมซีส์มีปริมาณเท่ากับ 3.30×10^5 , 2.80×10^6 , 5.90×10^6 ,

4.40×10^5 , 1.52×10^6 และ 7.80×10^5 cfu/ml ตามลำดับเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลต Cg_MCL8 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราในกลุ่มสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) พบว่าเชื้อแอคติโนไมซีส์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวทั้ง 2 รูปแบบ มีผลต่อการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุ โดยการใช้อเชื้อแอคติโนไมซีส์ในรูปของ cell suspensions มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราสาเหตุได้ดีกว่าการใช้อเชื้อแอคติโนไมซีส์ในรูปของ culture filtrate ในทุกช่วงเวลา เนื่องจากการใช้อเชื้อแอคติโนไมซีส์ในรูปของ cell suspensions มีสปอร์ของเชื้อแอคติโนไมซีส์ปะปนอยู่ ดังนั้นสปอร์ของเชื้อจึงสามารถเจริญ และสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ดีกว่าการใช้อเชื้อแอคติโนไมซีส์ในรูปของ culture filtrate ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ พรนภา และคณะ (2554) ที่ได้รายงานว่าการใช้อเชื้อแอคติโนไมซีส์ในรูปของ cell suspensions มีผลในการยับยั้งการงอกสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกที่สูงกว่าการใช้อเชื้อแอคติโนไมซีส์ในรูปของ culture filtrate ซึ่งจากการทดสอบเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง พบว่าการใช้อเชื้อแอคติโนไมซีส์ในรูปของ cell suspensions และ culture filtrate มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราอยู่ในช่วง 52.38-67.16 และ 51.10-61.69

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และมีความยาวของ germ tube อยู่ในช่วง 117.60-185.60 μm และ 133.90-203.50 μm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ germ tube มีความยาว 261.90 μm และเมื่อเวลาผ่านไปประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราจะค่อยๆ ลดลงไป ตามลำดับ (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 2 รูปแบบ มีประสิทธิภาพในการทำให้เชื้อรามีการเจริญช้าลง และชะลอการงอกของสปอร์เชื้อรา ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Soares *et al.* (2006) ศึกษาพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดิน

สามารถผลิตสารทุติยภูมิซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย และยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคใบจุดมันในประเทศบราซิลได้ อีกทั้งยังพบว่าการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 2 รูปแบบ มีผลทำให้สปอร์เชื้อราที่มีข้อปล้องที่สั้น เนื่องจากช่วงของผนังกันระหว่างเซลล์ในเส้นใยสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และมีการแตกแขนงเส้นใยที่เจริญจากโคนเดียวผิดปกติ โดยพบการแตกแขนงของเส้นใยมากกว่ายี่สิบยวอกไปต่างจากเส้นใยของโคนเดียวในชุดควบคุม (ภาพที่ 3) ซึ่งสอดคล้อง

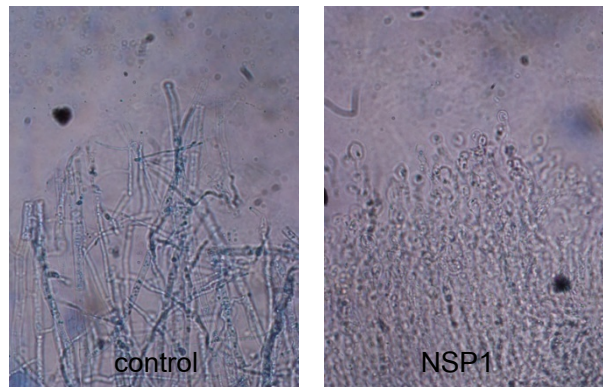


Figure 2 The mycelia of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate Cg_MCL8 causing strawberry anthracnose on glucose yeast malt agar (GYM), hyphal plasmolysis and cell lysis (arrow) were found after treated with the actinomycetes isolate NSP1 compared to the normality mycelia in untreated control

Table 2 Efficiency of actinomycetes on conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate Cg_MCL8 on potato dextrose agar according to incubation periods

Actinomycetes	Percentage of conidial germination inhibition ¹							
	6 h		9 h		12 h		18 h	
	CS ²	CF	CS	CF	CS	CF	CS	CF
NSP1	62.68 ^{ab}	57.74 ^{ab}	47.36 ^{ab}	44.60 ^{ab}	28.52 ^a	24.97 ^a	8.78 ^{ab}	5.41 ^{ab}
NSP2	67.16 ^a	61.69 ^{ab}	52.25 ^a	47.01 ^{ab}	30.55 ^a	27.31 ^a	10.18 ^a	5.80 ^{ab}
NSP3	52.38 ^{ab}	51.10 ^b	40.95 ^{ab}	37.77 ^b	22.85 ^a	19.81 ^a	6.42 ^{ab}	3.70 ^{ab}
NSP4	54.64 ^{ab}	52.36 ^{ab}	43.86 ^{ab}	41.76 ^{ab}	26.34 ^a	21.72 ^a	7.32 ^{ab}	1.38 ^b
NSP5	60.66 ^{ab}	56.10 ^{ab}	45.49 ^{ab}	41.80 ^{ab}	22.90 ^a	21.11 ^a	6.12 ^{ab}	4.13 ^{ab}
NSP6	53.95 ^{ab}	52.93 ^{ab}	39.73 ^{ab}	34.48 ^b	24.27 ^a	21.03 ^a	7.10 ^{ab}	4.54 ^{ab}
%CV	16.13		17.74		30.59		87.05	
LSD _{0.05}	15.48		12.87		12.51		8.67	

^{1/} Average from 3 replications. Means in a column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05

^{2/} CS: cell suspensions, CF: culture filtrate

กับ ชิงชัย (2553) รายงานว่าเชื้อแอกติโนไมซีส์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวมีผลทำให้สปอร์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริกมีลักษณะที่ผิดปกติ คือมีรูปร่างโป่งพอง และบวมออก

ความยาวของเส้นใยมีข้อปล้องที่สั้น และการงอกของเส้นใยจะเจริญเป็นกระจุก เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เส้นใยเจริญเป็นปกติ

Table 3 Effect of actinomycetes to germ tube length of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate Cg_MCL8 on potato dextrose agar according to incubation periods

Actinomycetes	Length of germ tube (μm) ¹					
	6 h		9 h		12 h	
	CS ²	CF	CS	CF	CS	CF
NSP1	117.60 ³	133.90	260.40	310.10	414.40	499.60
NSP2	135.40	162.90	230.20	281.80	407.20	482.20
NSP3	169.10	176.00	279.50	318.80	445.80	556.60
NSP4	168.50	196.40	329.40	424.20	448.00	523.00
NSP5	162.70	198.80	391.20	426.30	485.80	708.50
NSP6	185.60	203.50	361.70	448.70	525.80	721.60

^{1/} Average from 3 replications non significant

^{2/} CS: cell suspensions, CF: culture filtrate

^{3/} Compared with germ tube length at 6 h = 261.90 μm , 9 h = 573.80 μm and 12 h = unmeasurable

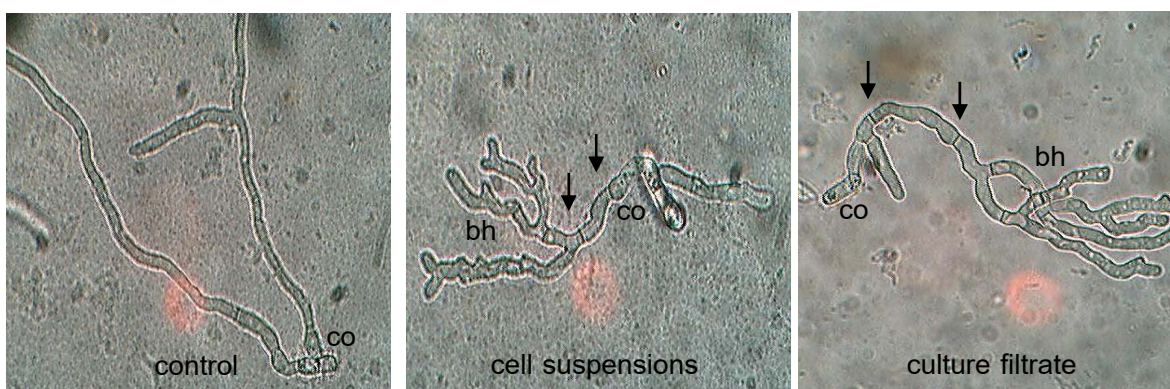


Figure 3 Abnormal growths, branchy hyphae (bh) and short septate hyphae (arrow), of *Colletotrichum gloeosporioides* isolate Cg_MCL8 conidia (co) after treated with cell suspensions and culture filtrate of isolate NSP1 for 12 hours compared to the normal growth of untreated control (40X)

สรุป

จากการแยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอว์เบอร์รีจากแหล่งปลูกสตรอว์เบอร์รีในอำเภอสะเมิง อำเภอเมือง อำเภอแมริม และอำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ สามารถรวบรวมเชื้อราได้ทั้งหมด 63 ไอโซเลท เมื่อนำมาประเมินความต้านทานต่อการป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อราสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อการป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) ระดับต่ำ (WR) และสายพันธุ์ที่อ่อนแอ (S) จำนวน 31, 5 และ 27 ไอโซเลทตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท Cg_MCL8 ซึ่งเป็นตัวแทนสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อการป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) โดยวิธี dual culture พบว่า เชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในระดับสูงอยู่ในช่วง 76.18-79.52 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงได้ประยุกต์ใช้เชื้อแอกติโนไมซีสในรูปแบบของ cell suspensions และ culture filtrate เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา โดยวิธี slide culture พบว่าการใช้ cell suspensions และ culture filtrate ของเชื้อ แอกติโนไมซีส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา โดยในทุกช่วงเวลาของการตรวจสอบผลพบว่าการใช้ cell suspensions มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงกว่าการใช้ culture filtrate ทุกไอโซเลท อีกทั้งยังพบว่าการใช้ cell suspensions และ culture filtrate มีผลในการชะลอการงอกของ germ tube และส่งผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์เชื้อรา มีลักษณะที่ผิดปกติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาโรคพืช และห้องปฏิบัติการศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เชื้อเพื่อสถานที่ในการทำวิจัย และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุน

ทุนวิจัยจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และกองทุนไอยัง-บางกอกโพสต์ ภายใต้การดูแลของมูลนิธิบางกอกโพสต์

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541. สตรอว์เบอร์รี. กองเกษตรสัมพันธ์ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 36 หน้า.
- เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคโดยชีววิธี. คณะเกษตรและเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 326 หน้า.
- ชิงชัย ไชยศิริ. 2553. ประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 81 หน้า.
- ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธวัช. 2543. สตรอว์เบอร์รี: พืชเศรษฐกิจใหม่. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 158 หน้า.
- ณัฐพงษ์ นวลดี. 2553. การวิเคราะห์พันธุกรรมและควบคุมเชื้อรา *Cercospora* spp. ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมโดยใช้เชื้อแอกติโนไมซีส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 164 หน้า.
- ธรรมศักดิ์ สมมาตรย์. 2543. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์ลินคอร์น, กรุงเทพฯ. 371 หน้า.
- พรนภา โตตรีชาติชาย ไชนงนุช และสร้อยยา ณ ลำปาง. 2554. ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร(พิเศษ) 42: 163-166.
- พรประพา คงตระกูล และสร้อยยา ณ ลำปาง. 2553. ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม. วารสารเกษตร 26(3): 203-212.

- วรรณมน บุญยั้ง. 2553. การวิเคราะห์ลักษณะและควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัด เชื้อราคาร์เบนดาซิมในพริก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 180 หน้า.
- El-tarabily, K. A., M. H. Soliman, A. H. Nassar, H. A. Al-Hassani, K. Sivasithamparam, F. McLenna and G. E. St. J. Hardy. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. Plant Pathology 49: 573-583.
- Koenraadt, K., S. C. Somerville and A. L. Jones. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistance field isolation of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. Phytopathology 82(11): 1342-1354.
- Ma, Z. and T. J. Michailides. 2005. Advance in understanding molecular mechanism of fungicides resistance and molecular detection of resistance genotype in phytopathogenic fungi. Crop Protection 24: 853-864.
- Mass, J. K. 1988. A Compendium of Strawberry Disease. The American Phytopathological Society. St. Pual, Minnesota. 98 p.
- Peres, N. A. R., N. L. Souza, T. L. Peever and L. W. Timmer. 2004. Benomyl sensitivity of isolation of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. Plant Disease 88(2): 125-130.
- Soares, A. C. F., C. S. Souza, M. S. Garriodo, J. O. Perea and N.S. Almeida. 2006. Soil Streptomycetes with *in vitro* activity against the yam pathogen *Curvularia eragrostides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Brazilian of Microbiology 37: 451-461.
- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK. 696 p.
- Suwan, N., W. Boonying and S. Nalumpang. 2012. Antifungal activity of soil actinomycetes to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Agricultural Technology 8(2): 725-737.
- Takizawa, M., R. R. Colwell and R. T. Hill. 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Applied and Environmental Microbiology 59: 997-1002.
- Tashiro, N., K. Manabe and Y. Ide. 2012. Emergence and frequency of highly benzimidazole-resistance *Colletotrichum gloeosporioides*, pathogen of Japanese pear anthracnose, after discontinued use of benzimidazole. Journal of General Plant Pathology 78: 221-226.