# รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง การตรวจหาการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ในมะม่วงน้ำดอกไม้โดยใช้ลักษณะโครงสร้างทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของมะม่วง และวิธีทางอณูชีววิทยา

Detection of Quiescent Infection of Anthracnose Fungal Pathogen in "Nam Dok Mai" Mango by Using Physiological and Morphological Charateristics of Mango and Molecular Biology Technique

คณะผู้วิจัย

| | |
|---|---|
| ดร.ปริญญา จันทรศรี | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี |
| ผศ.ดร.วิชชา สอาดสุด | สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว |
| ผศ.ดร.อุราภารณ์ สอาดสุด | สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว |
| นายพงศธร ธรรมถนอม | สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี |
| นายรัฐพล พรประสิทธิ์ | สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว |
| นายพิเชษฐ์ น้อยมณี | สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว |



โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
# โครงการ
# การตรวจหาการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ในมะม่วงน้ำดอกไม้โดยใช้ลักษณะโครงสร้างทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของมะม่วงและวิธีทางอณูชีววิทยา


จัดทำโดย

คณะผู้จัดทำโครงการ



โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
# โครงการ
# การตรวจหาการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ในมะม่วงน้ำดอกไม้โดยใช้ลักษณะโครงสร้างทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของมะม่วงและวิธีทางอณูชีววิทยา

Detection of Quiescent Infection of Anthracnose Fungal Pathogen in "Nam Dok Mai" Mango by Using Physiological and Morphological Characteristics of Mango and Molecular Biology Technique


คณะผู้วิจัย

1. ดร. ปริญญา จันทรศรี สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
2. ผศ. ดร. วิชชา สอาดสุด สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
3. ผศ. ดร. อุราภรณ์ สอาดสุด สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
4. นายพงศธร ธรรมถนอม สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
5. นายรัฐพล พรประสิทธิ์ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
6. นายพิเชษฐ์ น้อยมณี สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว

ผู้ช่วยนักวิจัย

1. นางสาวศศิธร การะบุญ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว

# กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยโครงการวิจัยการตรวจหาการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้โดยใช้ลักษณะโครงสร้างทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของมะม่วงและวิธีทางอณูชีววิทยา ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนครุภัณฑ์เครื่องมือ และบุคลากรในการดำเนินวิจัยของโครงการ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.ยิ่งมณี ตระกูลพัว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือวิเคราะห์ด้านอณูชีววิทยาระดับโมเลกุล

ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลิดา เล็กสมบูรณ์ คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่อำนวยความสะดวกและให้ความอนุเคราะห์ในการใช้ครุภัณฑ์วิจัยที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราในระดับเนื้อเยื่อพืช

ขอขอบคุณ กลุ่มชมรมผู้ผลิตมะม่วงเพื่อการส่งออก อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ โดยคุณเจริญ คุ้มสุภา หัวหน้ากลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งคุณนันต์ ทองรัตน์ สมาชิกกลุ่ม ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำการทดลองคือสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองและให้ความร่วมมือเป็นอย่างดียิ่งกับทางคณะผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

# บทคัดย่อ

ทำการสำรวจเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองอายุ 5 ปีในแหล่งปลูกอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างฤดูการผลิตในเดือนตุลาคม 2552 ถึงเดือนเมษายน 2553 ตั้งแต่ระยะตัดแต่งถึงระยะเก็บเกี่ยว จำนวนประชากรของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสทั้งหมด เปลี่ยนแปลงไปตามพัฒนาการของมะม่วงในแต่ละช่วงอายุและสภาพของอากาศ การเขตกรรมมีบทบาทสำคัญในการลดการเข้าทำลายของเชื้อ ด้วยวิธีการรักษาความสะอาดในสภาพสวน และกำจัดเศษพืชหลังการตัดแต่งกิ่ง ในขณะที่สวนที่ไม่มีการจัดการจะส่งผลให้มะม่วงเป็นโรครุนแรง การฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราอย่างเป็นระบบระหว่างการเจริญของมะม่วงสามารถลดจำนวนประชากรของเชื้อราได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยได้กำหนดโปรแกรมฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ได้แก่ คอปเปอร์ออกไซด์ คอปเปอร์อ๊อกซี่คลอไรด์ แมนโคเซ็บ คาร์เบนดาซิม อะซ๊อกซี่สโตรบิน และโปรคลอราซ สลับกันทุก 15 วัน รวม 11 ครั้ง ตั้งแต่ระยะตัดแต่งกิ่งจนถึงระยะห่อผล พบว่าให้ประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในสวนมะม่วง จากการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ สามารถแยกเชื้อส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส ได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชที่เก็บในระยะตัดแต่งกิ่งจนถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยการกระตุ้นการเจริญของเชื้อราด้วยสารพาราควอท และจากการศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อในโครงสร้างในระดับเนื้อเยื่อของมะม่วงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถแสดงให้เห็นการงอกของโคนิเดียบนผิวใบ และแทงทะลุผ่านชั้นคิวติเคิลและผนังเซลล์โดยอาศัยโครงสร้างที่เรียกว่าแอพเพรสซอเรียม และเข้าไปเจริญเป็นเส้นใยภายในเซลล์อีพิเดอมัล ในจำนวนชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากส่วนของดอก ก้าน ใบ กิ่งและผลทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวทั้งหมด 21 ไอโซเลต ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจำแนกชนิด ตรวจพบว่าเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 15 ไอโซเลต และ *C. acutatum* จำนวน 6 ไอโซเลต

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบมะม่วงในห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนใบ โดยสามารถตรวจพบกลุ่มสปอร์สีส้มบนรอยแผลไหม้สีน้ำตาลหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน ในการใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลเพื่อจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอน-แทรคโนส โดยการเพิ่มปริมาณส่วนของ rDNA ITS regions ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะของเชื้อ *C. gloeosporioides* (*Cg*Int) และ *C. acutatum* (*Ca*Int2) กับ ITS4 universal primer และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อการจำแนกในระดับสปีชี่ส์ของเชื้อในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ร่วมกับวิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ สามารถช่วยสนับสนุนและยืนยันผลว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองของแหล่งปลูกอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่.

# Abstract

A survey of anthracnose was conducted in 'Nam Dok Mai Si Thong' mango orchards at Prao district, Chiang Mai Province, from October 2009 to April 2010 with 5 year-old trees of the mango from pruning stage to harvesting stage. The total anthracnose pathogen populations varied with developmental stage, and with prevailing climatic conditions. The cultural practices played an important role on mango infection whereby orchard sanitation and particularly cleaning and pruining reduced the infection rates. Orchards with no care, in contrast, yielded the most heavily infested mango samples. The impact of a spray fungicide regime during mango development significantly decreased the total fungal populations. It was found that every treatment of copper oxide, copper oxychloride, mancozeb, carbendazim, azoxystrobin and prochloraz applied at 15 days interval for 11 times from pruning to before bagging gave good efficacy to control anthracnose disease in mango orchards. In a laboratory investigation, *Colletotrichum* spp. played the main role of anthracnose symptom which could be isolated from tissue samples during pruning and harvesting. The fungal pathogens were isolated by using paraquat technique to induce the growth of the fungi. The internal infection and colonization processes of *Colletotrichum* spp. on mango tissues were examined using histological techniques. The results showed that the conidia of *Colletotrichum* spp. germinated on leaf surface and following cuticular penetration via an appressorium, subsequent steps of invasion involved hyphal growth within the cuticle and within the cell walls of epidermal cells. Morphological characteristics of 21 *Colletotrichum* spp. isolates were determined. Fifteen isolates from flower, peduncle, leaf, branch, immature fruit and harvest fruit samples were identified as *C. gloeosporioides* while only six isolates as *C. acutatum.* Pathogenicity tests conducted on detached mango leaves showed that both species were pathogenic. Necrotic lesions produced orange conidial masses 7 days after inoculation. Molecular identification of the *Colletotrichum* species was carried out through amplification of rDNA ITS regions by means of *C. gloeosporioides* (*Cg*Int) and *C. acutatum* (*Ca*Int2) specific primer PCR combining the use of ITS4 universal primer. Restriction enzyme digestion technique was applied for the determination in species level and additional confirm by specific pairs of primer in Polymerase Chain Reaction. Molecular biology characteristic assay was used complementary to morphological results and confirmed *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* causing anthracnose in 'Nam Dok Mai Si Thong' mango orchards at Prao district, Chiang Mai province.

# สารบาญ


| | หน้าที่ |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| บทคัดย่อภาษาไทย | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | จ |
| สารบาญ | ฉ |
| สารบาญตาราง | ช |
| สารบาญภาพ | ซ |
| รายละเอียดโครงการ | 1 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| วิธีการดำเนินงานวิจัย | 7 |
| ผลการทดลอง | 12 |
| วิจารณ์ผลการทดลอง | 28 |
| สรุปผลการทดลอง | 32 |
| ผลที่ได้จากการวิจัยและแนวทางงานวิจัยในอนาคต | 33 |
| เอกสารอ้างอิง | 36 |
| ภาคผนวก | 38 |

# สารบาญตาราง


| ตารางที่ | | หน้าที่ |
|---|---|---|
| 1 | ผลประเมินการเกิดโรคแอนแทรคโนสในแปลงปลูกมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง ที่ในระยะการเจริญต่างๆ ของมะม่วงและชนิดสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ที่ใช้พ่นในระยะต่างๆ | 13 |
| 2 | ความถี่ของการเกิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากตัวอย่างมะม่วงที่ เก็บในระยะต่างๆ ที่ผ่านการกระตุ้นด้วย paraquat หลังการบ่มไว้เป็นเวลา 3 -7 วัน ในสภาพห้องปฏิบัติการ | 16 |
| 3 | ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผลที่เกิดขึ้นบนใบมะม่วงใน ห้องปฏิบัติการ หลังการปลูกเชื้อสาเหตุแอนแทรคโนสที่แยกได้จากส่วน ต่างๆของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองจากสวนอำเภอพร้าว หลังการบ่มเชื้อไว้ 5 ถึง 7 วัน | 26 |

# สารบาญภาพ


| ภาพที่ | | หน้าที่ |
|---|---|---|
| 1 | แสดงการจัดเรียงตัวของยีนและส่วนอื่นๆใน rDNA loci ของ eukaryotes | 5 |
| 2 | ผลการประเมินการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่เกิดขึ้นในระยะการเจริญต่างๆของมะม่วงในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่ใช้ในการทดลองทั้ง 3 แหล่งในเขตอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ | 14 |
| 3 | ระยะการเจริญเติบโตของต้นมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่พบการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนส | 15 |
| 4 | เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการเกิดเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ตรวจพบจากตัวอย่างมะม่วงที่เก็บ ในระยะต่างๆที่ผ่านการกระตุ้นด้วย paraquat หลังการบ่มไว้เป็นเวลา 3-7 วัน | 17 |
| 5 | ลักษณะของกิ่งก้านบริเวณส่วนยอด ผล และใบของมะม่วงที่ผ่านการกระตุ้นด้วย paraquat แล้วบ่มไว้ในกล่องรักษาความชื้นประมาณ 3 ถึง 5 วัน เกิดกลุ่มเส้นใยและกลุ่มสปอร์ขึ้นบริเวณผิวและมีสีที่ปรากฏแตกต่างกัน | 18 |
| 6 | ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่เจริญบนอาหาร acidified potato dextrose agar | 19 |
| 7 | ลักษณะ acervulus (fruiting body) ที่ประกอบไปด้วย conidia และ setae ของเชื้อ *Colletotrichum* spp.ที่เจริญบนผิวใบมะม่วง | 20 |
| 8 | ลักษณะของโคนิเดียของเชื้อ *Colletotrichum* spp. | 20 |
| 9 | เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เจริญแบบแฝงภายในเนื้อเยื่อจากส่วนใบของมะม่วงที่ตัดด้วย microtome ผ่านการย้อมสี cotton blue | 21 |
| 10 | เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เจริญแบบแฝงภายในเนื้อเยื่อจากส่วนใบของมะม่วงแสดงตำแหน่งของสปอร์หรือ conidium, appressorium, infection vesicle และ subcuticular hypha | 22 |
| 11 | ภาพจาก Transmission Electron Microscope ที่แสดงให้เห็นโครงสร้างของส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. | 22 |
| 12 | ภาพจาก Transmission Electron Microscope ที่แสดงให้เห็นโครงสร้างของappressorium ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. | 23 |
| 13 | การจำแนกเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Colletotrichum* spp. โดยอาศัย polymerase chain reaction | 24 |

# สารบาญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้าที่ |
|---|---|---|
| 14 | เชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Colletotrichum* spp.ที่แยกจากมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองถูกจำแนกเป็น 2 กลุ่มคือ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* โดยอาศัยเทคนิค ITS-RFLP กับคู่ของ Primers | 25 |
| 15 | ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุแอนแทรคโนสบนใบมะม่วงในห้องปฏิบัติการ | 27 |

# รายละเอียดโครงการ

---

**ชื่อโครงการวิจัย**

การตรวจหาการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้โดยใช้ลักษณะโครงสร้างทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของมะม่วงและวิธีทางอณูชีววิทยา

Detection of Quiescent Infection of Anthracnose fungal pathogen in “Nam Doc Mai” Mango by Using Physiological and Morphological Characteristics of Mango and Molecular Biology Technique

**หัวหน้าโครงการ**

ดร.ปริญญา จันทรศรี

ตำแหน่ง พนักงานมหาวิทยาลัยสายวิชาการ ตำแหน่งนักวิจัย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

**วันที่เริ่มสัญญา และวันที่สิ้นสุดสัญญา**

1 เมษายน 2552 – 31 มีนาคม 2553 (ขอขยายเวลาถึง สิงหาคม 2553)

1. **บทนำ** (Introduction)

การผลิตมะม่วงเพื่อการส่งออกของประเทศไทย ยังประสบปัญหากับการเกิดโรคแอนแทรค-โนสในผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะม่วงน้ำดอกไม้ เป็นมะม่วงที่มีศักยภาพสูงในการส่งออกไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ แต่ปัจจุบันนี้ ปัญหาของโรคผลเน่าหลังเก็บเกี่ยวที่เกิดจากโรคแอนแทรคโนส นับว่าเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการส่งออกของมะม่วง ซึ่งโรคนี้เกิดจากการทำลายของเชื้อรา *Collectotrichum gloeosporioides (Penz) Penz and Sacc.* สาเหตุที่เกิดโรคนี้ เนื่องจากการปลูกมะม่วงของเกษตรกรในพื้นที่แต่ละแห่ง ยังไม่มีระบบการจัดการที่ดีในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส ซึ่งควรจะปฏิบัติตั้งแต่ในสวนจนกระทั่งหลังเก็บเกี่ยว จากการที่ขาดระบบการจัดการที่ดี จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดเข้าทำลายของเชื้อรา โดยลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญแฝงอยู่กับมะม่วงในทุกระยะของการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะแทงช่อ ติดดอก ออกผล จนกระทั่งมาปรากฏพบอาการชัดเจนเมื่อมะม่วงสุกแก่หลังเก็บเกี่ยว

ปัจจุบันเป็นที่ทราบดีว่าเกษตรกรมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชอย่างแพร่หลายกับสวนมะม่วง แต่ยังปรากฏว่าไม่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ผล นอกจากนี้ผลกระทบที่ตามมาก็คือความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคที่มีต่อผู้บริโภค การทำลายระบบนิเวศน์และสภาพแวดล้อม และการ

ชักนำให้เชื้อก่อโรคพืชเกิดการต้านทานต่อยามากขึ้น อีกทั้งการใช้สารเคมีอย่างมากกับผลิตผลทางการเกษตร ทำให้มีสารตกค้าง จึงไม่เป็นที่ยอมรับในตลาดต่างประเทศ เนื่องจากที่ผ่านมายังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจนเกี่ยวกับลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญแบบแฝงของเชื้อที่อยู่ตามส่วนต่างๆของต้นมะม่วง หากมีการตรวจสอบถึงลักษณะการเข้าทำลายโดยการนำวิธีการทั้งทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของเชื้อ และวิธีการทางอณูชีววิทยาเข้ามาร่วมในการตรวจสอบการเข้าทำลายหรือติดตามการเจริญแบบแฝงของเชื้อในทุกระยะการเจริญของมะม่วง ซึ่งจะได้รับทราบผลการติดตามการเจริญแบบแฝงของเชื้อนี้อย่างถูกต้องและชัดเจนมากยิ่งขึ้น ผลที่ได้จะสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบและประเมินวิธีการที่ปฏิบัติในสภาพสวนมะม่วง ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของการปฏิบัติด้านเขตกรรม (cultural practice)เพื่อดูแลบำรุงรักษาต้น และการใช้สารเคมี (chemical control measure) ต่างๆ ว่าวิธีการที่นำมาใช้ในการควบคุมป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสที่มีอยู่ในปัจจุบันนั้น แท้จริงแล้วมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุของโรคนี้ได้อย่างตรงเป้าหมายหรือไม่ โดยจะสามารถบอกได้ถึงการปรากฏอยู่ของเชื้อราก่อโรคในระดับเนื้อเยื่อของพืช

<u>วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย</u>

1. เพื่อต้องการทราบและติดตามการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้ในทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ติดดอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยว
2. เพื่อนำวิธีการตรวจสอบทางโครงสร้างสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของพืช ใช้ติดตามดูตำแหน่งการเจริญของเชื้อรา ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ electron microscope และนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการทางอณูชีววิทยาที่มีความไวในการตรวจสอบ ได้แก่การพัฒนาชุดไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยใช้เทคนิค ITS-PCR
3. เพื่อเป็นการพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อราที่เจริญแบบแฝงภายในเนื้อเยื่อพืช สำหรับนำไปใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการควบคุมหรือป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ทั้งการใช้สารเคมีและวิธีการทางเขตกรรม ว่าวิธีการที่ใช้ควบคุมโรคเหล่านี้ สามารถใช้ได้อย่างตรงเป้าหมายและมีประสิทธิภาพดีเพียงใด

<u>ขอบเขตของโครงการวิจัย</u>

การตรวจสอบในระดับโครงสร้างของเซลล์ของเนื้อเยื่อของมะม่วงโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ทั่วไปทั้งแบบ compound และ stereomicroscope และ transmission electron microscope ใช้ติดตามดูตำแหน่งการเจริญของเชื้อรา ที่สัมพันธ์กับระยะต่างๆของการเจริญเติบโตและพัฒนาการของมะม่วงในระยะการบำรุงรักษา จนถึงระยะเก็บเกี่ยว และตัวอย่างดังกล่าวจะใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาที่มีความไว(sensitivity) ในการตรวจสอบและให้ผลที่แน่นอนกว่า หลักการคือการพัฒนาชุดไพรเมอร์ (primer) ที่จะใช้ในปฏิกิริยา PCR ที่มีความจำเพาะต่อ rDNA loci ของเชื้อรา *Colletotrichum sp.* โดยอาศัยข้อมูลที่มีการรายงานถึงการนำ rDNA

loci ซึ่งแสดงความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อราชนิดต่างๆได้ในระดับ genus มาใช้อ้างอิง เพื่อจำแนกเชื้อราและสิ่งมีชีวิตต่างๆได้ถึงระดับ genus และ species ต่อไป และ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยาดังกล่าวจะได้รับการออกแบบและพัฒนาให้มีความจำเพาะเจาะจงสูงที่สุด และให้มีความไวสูงจนสามารถใช้กับตัวอย่างที่เก็บในปริมาณน้อยๆจากภาคสนาม เพื่อทำให้เกิดความยืดหยุ่นในการปฏิบัติงานจริง ขณะเดียวกันจะได้นำวิธีการที่เกี่ยวเนื่องกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) ที่เหมาะสมบางตัวมาใช้ เพื่อช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต (ITS-RFLP) ซึ่งได้เคยมีรายงานการวิจัยในต่างประเทศถึงการนำไปประยุกต์กับการตรวจสอบเชื้อชนิดต่างๆแล้ว ร่วมกับวิธีการข้างต้น ข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบทั้ง 2 วิธีการ และผลสัมฤทธิ์ของโครงการ จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการหามาตรการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงได้อย่างตรงจุด หลังจากที่ได้ทราบตำแหน่งการเข้าเจริญ (colonize) ของเชื้อราในเนื้อเยื่อมะม่วงที่อยู่ในระยะการเจริญต่างๆกัน

<u>ตัวชี้วัดความสำเร็จของโครงการ</u>

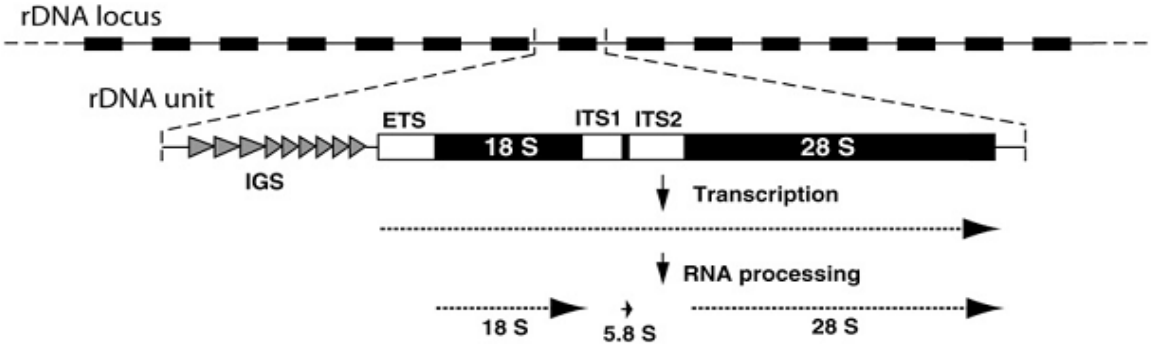
สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อราที่เจริญแบบแฝงภายในเนื้อเยื่อพืช สำหรับนำไปใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการควบคุมหรือป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ให้สามารถควบคุมและกำจัดเชื้อแฝงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ทั้งการใช้สารเคมีและวิธีการทางเขตกรรมหรืออื่นๆ ว่าวิธีการที่ใช้ควบคุมโรคเหล่านี้ โดยผลจากการดำเนินการวิจัยนี้ จะเป็น**ข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่**ทางสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สามารถนำมาพัฒนาการตรวจสอบวิเคราะห์เชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่เจริญแฝงอยู่ในผลมะม่วง ก่อนที่จะส่งออกไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ เป็นการรับประกันให้แก่บริษัทผู้ส่งออกด้านความเสี่ยงต่อการเข้าทำลายของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสที่เจริญแฝงอยู่ และนอกจากนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจในพืชผักผลไม้ชนิดอื่นๆต่อไปในอนาคต

## 2. **การตรวจเอกสาร** (Literature Reviews)

จากรายงานที่ได้มีการตรวจสอบในระดับโครงสร้างของเซลล์ของเนื้อเยื่อของมะม่วงโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ทั่วไปทั้งแบบ compound และ stereomicroscope และ transmission electron microscope (TEM) เพื่อดูผลของสภาวะต่างๆได้แก่อุณหภูมิที่มีต่อ lenticel ของมะม่วง (เสาวณีย์, 2551) ซึ่งวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อพืชเพื่อใช้ในการตรวจสอบในระดับโครงสร้างเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์นี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการติดตามการเจริญแบบแฝงของเชื้อรา และจะทำให้ทราบถึงตำแหน่งของการเจริญของเชื้อราภายในเนื้อเยื่อพืช ที่อาจจะเจริญแฝงอยู่ในบริเวณชั้น epidermis , cambium และ lenticel ที่เกิดจาก parenchyma หรือ cork cambium ภายหลังจากที่เชื้อเข้าสู่พืช

การนำวิธีการทางอณูชีววิทยาเข้ามาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคพืช ถือว่าเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำในการตรวจสอบ โดยอาศัยหลักพื้นฐานความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และการสังเคราะห์สารพันธุกรรมในระดับโมเลกุล Ribosomal RNA (rRNA) เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นอย่างยิ่งในขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนต่างๆของเซลล์ของ eukaryotic cells ในเซลล์ที่มีความสามารถหรือมีอัตราการสังเคราะห์โปรตีนสูงจำเป็นต้องมีการสังเคราะห์ rRNA ในปริมาณที่สูงตาม เพื่อใช้เป็นองค์ประกอบหลักของกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนนั้น rRNA ประกอบด้วย 3 units คือ small ribosomal subunit (18s RNA) และ large ribosomal subunits 2 units (5.8S และ 28S) มีต้นแบบการสังเคราะห์มาจาก DNA (rDNA) ที่มีการเรียงตัวของยีน 3 ช่วงนี้ในลักษณะ large tandem arrays ที่ยาวมาก (เรียกโดยรวมว่า rDNA loci แสดงดังภาพที่1)

โดยจำนวน repeats ที่ซ้ำและยาวมากนี้ เป็นการประกันถึงปริมาณ rRNA จำนวนมากที่เซลล์จะสามารถผลิตได้เมื่อต้องการ จากการศึกษาพบว่าทั้งรูปแบบและลำดับการเรียงตัวของส่วน DNA ต่างๆใน rDNA loci นี้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในช่วงระยะเวลาวิวัฒนาการอันยาวนานของแต่ละสิ่งมีชีวิต จากลักษณะดังกล่าวนี้ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จึงทำให้วิธีการทางอณูชีววิทยามีความแม่นยำในการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ตลอดจนการที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบหาชนิดของเชื้อราก่อโรคด้วย




**ภาพที่** 1 แสดงการจัดเรียงตัวของยีนและส่วนอื่นๆใน rDNA loci ของ eukaryotes จะพบการเรียงตัวของ 18S, 5.8S และ 28S ซึ่งถูกนำหน้าด้วย intergenic spacers (IGS), external transcribed spacer (ETS) cและถูกคั่นระหว่างยีนด้วย Internal transcribed spacer (ITS1 และ ITS2) รวมเป็น 1 repeat unit (Thomas, H.E. and Eickbush, D.G ., 2007)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยหลายเรื่องที่ได้แสดงถึงการศึกษาและการนำลักษณะเฉพาะของลำดับการเรียงตัวของ DNA และจำนวนซ้ำของ repeating units ใน rDNA loci มาใช้เพื่อหาเอกลักษณ์และจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างๆออกจากกัน วิธีวิจัยดังกล่าวมีความถูกต้องแม่นยำสูงโดยเฉพาะ เมื่อนำผลที่ได้ไปประมวลร่วมกับผลทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ โดยจำนวนซ้ำใน rDNA loci นี้มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ

เชื้อรากลุ่ม *Colletotrichum* spp. เป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในไม้ผลหลายชนิด การจำแนกชนิดของเชื้อราในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่อาศัยหลักพื้นฐานทางสรีรวิทยาเช่นเดียวกับที่ใช้ในการจำแนกเชื้อหลายชนิด แต่เนื่องจากการที่เชื้อกลุ่มนี้มีพืชอาศัยที่กว้าง หลากหลายชนิด จึงทำให้การจำแนกชนิดของเชื้อตามหลักอนุกรมวิธานแบบเดิม อาจทำให้การจำแนกชนิดของเชื้อมีโอกาสผิดพลาด ดังนั้นการนำวิธีการทางอนูชีววิทยาระดับโมเลกุลมาร่วมกับวิธีการตรวจสอบทางลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ จะสามารถช่วยให้การจำแนกชนิดของเชื้อได้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น (Whitelaw-Weckert *et al*., 2007)

การใช้ oligonucleotides ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อในกลุ่ม *Colletotrichum* spp. ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการแยกความแตกต่างในระดับ species ของเชื้อกลุ่มนี้โดยวิธี Polymerase Chain reaction (PCR) (Freeman *et al*., 1998) ด้วยเหตุนี้การนำวิธีการทางอนูชีววิทยาร่วมกับวิธีจำแนกแบบเดิมที่ใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อหรือ conventional identification techniques จะเป็นประโยชน์ในการช่วยจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพืชหลายชนิด

หทัยชนก (2546) รายงานการสร้างชุด primer เพื่อใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของ *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในเมล็ดพริก โดยอาศัยวิธี PCR ซึ่งโดยหลักการแล้วอาศัยความจำเพาะเจาะจงของลำดับการเรียงตัวของ DNA ใน ITS region เฉพาะ *Colletotrichum* ทำให้จำแนกการมีอยู่ของเชื้อราดังกล่าวออกจากเชื้อแอบแฝงชนิดอื่นๆได้

Jitareerat และคณะ(2006) รายงานการตรวจการปนเปื้อนแอบแฝงของ *Colletotrichum gloeosporioides* ใน มะม่วงที่ยังดิบหรือเขียวอยู่ ออกจากเชื้อชนิดอื่นๆ โดยอาศัยลักษณะเฉพาะของการเรียงตัวของ DNA ในบริเวณเดียวกันทำให้สามารถแยก *Colletotrichum* ออกจาก *Phomopsis* sp., *Lasiodiplodia* sp. และ *Aspergilus* sp. ได้ เป็นต้น

Pandey และคณะ (2003) ได้อาศัยวิธีการที่เรียกว่า ITS-RFLP ซึ่งโดยหลักการก็คือการเพิ่มปริมาณ DNA fragments จาก conserved region ใน rDNA loci ของสิ่งมีชีวิตต่างๆที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำมาตัดหรือย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme ) ที่เหมาะสม ซึ่งทำให้สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Guignardia* sp. ได้ในระดับ species ได้

โดยสรุปจะเห็นได้ว่าวิธีทางอณูชีววิทยาดังกล่าว เมื่อนำมาประยุกต์เข้าร่วมกับวิธีการตรวจทางโครงสร้างสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาในระดับเนื้อเยื่อพืชเพื่อติดตามการเจริญแบบแฝงของเชื้อราก่อโรค จะเพิ่มความถูกต้องแม่นยำ ให้กับผลการทดสอบได้เป็นอย่างมากและสามารถใช้เป็นวิธีการประเมินผลเพื่อตรวจสอบว่าวิธีการที่ใช้ในการควบคุมหรือป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสในปัจจุบัน มีประสิทธิภาพเพียงใดในการลดหรือกำจัดปริมาณเชื้อราสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส

**3. วิธีการดำเนินงานวิจัย** (Methodology)

***3.1 การเลือกพื้นที่สำหรับเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสและใช้เป็นแปลงทดสอบ***

เลือกพื้นที่ทดลองเป็นสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองในเขตอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่โดยเลือกสวนทดสอบ 3 แปลง แปลงละจำนวน 25 ต้น ต้นมะม่วงอายุเฉลี่ย 5 ปี ของสมาชิกกลุ่มผู้ผลิตมะม่วงเพื่อการส่งออก อ.พร้าว 78 ม.4 ต.ป่าไหน อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ ซึ่งประกอบด้วยสวนที่ 1 มีการระบบการควบคุมโรคโดยวางโปรแกรมการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรามาแล้ว 1 ปี สวนที่ 2 เป็นแปลงใหม่ที่วางระบบการควบคุมโรค และสวนที่ 3 เป็นสวนที่มีประวัติการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนส การวางระบบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสเริ่มจากการจัดการสภาพสวนด้วยการเขตกรรมคือวิธีการรักษาความสะอาดในสภาพสวนและกำจัดเศษพืชหลังการตัดแต่งกิ่ง และการกำจัดวัชพืชภายในสวนตลอดระยะเวลาทดลอง และฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทสารสัมผัส ได้แก่ คอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ คอปเปอร์ออกไซด์ และแมนโคเซ็บ สารประเภทดูดซึม ได้แก่ คาร์เบนดาซิม โปรคลอราซ และอะซ๊อกซี่สโตรบิน (ที่เกษตรกรใช้เป็นประจำในพื้นที่) โดยฉีดพ่นสลับกันระหว่างสารสัมผัสและสารชนิดดูดซึมในอัตราที่แนะนำข้างฉลาก ทุก 2 สัปดาห์ รวม 15 ครั้ง ตั้งแต่ระยะหลังตัดแต่งกิ่ง (ตุลาคม 2552 ) จนถึงระยะห่อผล (มีนาคม 2553) ด้วยเครื่องพ่นสารแบบเครื่องยนต์ (High pressure engine sprayer) ใช้ปริมาณน้ำเฉลี่ย 5 ลิตรต่อต้น ในสวนที่ 1 และ 2 ในขณะที่สวนที่ 3 ใช้เป็นสวนเปรียบเทียบคือมีการปฏิบัติดูแลตามปกติของเกษตรกร กำหนดเกณฑ์ในการประเมินโรคแอนแทรคโนส คิดจากพื้นที่ตลอดทรงพุ่มของต้นที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส ซึ่งให้ระดับคะแนนตามเกณฑ์ ดังนี้

0 = ไม่พบการเกิดโรค หรือไม่มีรอยแผล (ระดับดี)
1 = มีรอยแผล เป็นบริเวณพื้นที่ 1- 25% (ระดับปกติ)
2 = มีรอยแผล เป็นบริเวณพื้นที่ 21- 50% (ระดับปานกลาง)
3 = มีรอยแผล เป็นบริเวณพื้นที่ 51- 80% (ระดับรุนแรง)
4 = มีรอยแผล เป็นบริเวณพื้นที่มากกว่า 80% หรือใบตาย (ระดับรุนแรงมาก)

โดยนำมาใช้ประเมินการเกิดโรคในแปลงทดสอบ และแปลงที่มีการปฏิบัติดูแลตามปกติของเกษตรกรเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ตรวจผลโดยให้คะแนนอาการของโรคทุก 2 สัปดาห์ก่อนการพ่นสารเคมีครั้งต่อไปจนกระทั่งระยะอายุผล 110 วันหลังดอกบาน และเก็บตัวอย่างทุกครั้งก่อนการฉีดพ่นสารเคมีในแต่ละครั้งเพื่อมาทำการแยกเชื้อราสาเหตุโดยการใช้ paraquat ชักนำให้เนื้อเยื่อสลายและกระตุ้นให้ส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราปรากฏ โดยนำตัวอย่างมะม่วงที่เก็บมาในระยะต่างๆแช่ใน 95% ethanol 30 วินาที NaOCl 2% 5 นาที และ 0.4% paraquat 5 นาที ผึ่งให้แห้ง บ่มไว้ในกล่องเก็บรักษาความชื้น จนส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราปรากฏนำมาเพาะเลี้ยงบน acidified potato dextrose agar ( PDA + 25 % lactic acid อัตรา 0.1%) ทำการแยก

เชื้อบริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงไว้บนอาหาร PDA โดยทั้งหมดนี้จะทำการเก็บตัวอย่างมะม่วงตั้งแต่ระยะหลังตัดแต่งกิ่ง และแตกช่อใบใหม่ ระยะดอก ระยะผลอ่อน ระยะผลแก่และผลหลังเก็บเกี่ยว

### *3.2 การตรวจสอบการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงทุกระยะการเจริญในสภาพสวนจนถึงผลมะม่วงหลังเก็บเกี่ยว*

*3.2.1 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคภายในโครงสร้างในระดับเนื้อเยื่อของพืช*

ตัวอย่างมะม่วงที่เก็บทุกระยะการเจริญของมะม่วง ได้แก่ส่วน กิ่งก้านและใบ นำมาศึกษาโครงสร้างโดยรวมภายใต้ stereomicroscope เพื่อตรวจบริเวณที่จะนำมาตัดชิ้นส่วนพืชด้วย microtome ให้มีความหนาประมาณ 0.01 มม. ย้อมเนื้อเยื่อด้วย cotton blue ศึกษาภายใต้ compound microscope เพื่อตรวจสอบตำแหน่งการเจริญของเชื้อภายในเนื้อเยื่อ และเพื่อติดตามพัฒนาการของเชื้อที่เข้าทำลายพืชในระดับเซลล์จากเนื้อเยื่อบริเวณเดียวกัน ได้นำมาเตรียมตัวอย่างด้วยขั้นตอนดังนี้คือ Primary fixative ด้วย glutaraldehyde 2.5 % ใน ใน 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) เป็นเวลา 24 ชม. แล้วใช้ $OsO_4$ 1%ใน phosphate buffer เป็น post fixative จากนั้นผ่านขั้นตอนการทำ Dehydration ตามลำดับตั้งแต่ 35% 50% 70% 80% 90% และ 100% infiltrate ด้วย acetone เพื่อแทนที่น้ำ ก่อนนำไป embedding และ polymerization ในแม่พิมพ์ (JB-4 Embedding Medium Polysciences, Inc., Warrington, PA) เททับด้วย resin เหลวให้เต็มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 70 °C เจือจาง (dilution) resin 1:2, 1:1, 2:1, 1:0, และ 1:0 ใน 95 % ethanol ก่อนนำไปตัดด้วย ultramicrotome (Model 820; American Optical, NY) ชิ้นส่วนที่ตัดความหนา 3 µm นำมาย้อม 0.05% acid fuchsin เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น mounted บน glass slides แล้วตรวจสอบภายใต้ compound microscope และชิ้นส่วนที่ย้อมด้วย uranyl acetate และ lead acetate แล้วตรวจสอบภายใต้ Transmission electron microscope (TEM)

*3.2.2 การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีการทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุล*

ก) การวินิจฉัยโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างมะม่วงในข้อ 1 ที่เก็บในระยะหลังตัดแต่งกิ่ง และแตกช่อใบใหม่ ระยะดอก ระยะผลอ่อน ระยะผลแก่และผลหลังเก็บเกี่ยว ทั้งที่แสดงและยังไม่แสดงรอยแผลของโรค มากระตุ้นด้วย paraquat และแยกเชื้อบริสุทธิ์ไว้บนอาหาร acidified PDA นำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยตรวจจาก ลักษณะสีโคโลนี รูปร่างและขนาดของโคนิเดีย เป็นต้น เทียบกับเอกสารอ้างอิงและทำการจัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้

ข) การวินิจฉัยโดยอาศัยวิธีการทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุล

*การใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)* - นำเชื้อราแต่ละไอโซเลตที่แยกได้มามาสกัด DNA โดยเก็บส่วนของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA ลงใน microfuge tube ขนาด 2 ml

ให้ได้ประมาณ 3 ใน 4 ของหลอด ซึ่งใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Freeman และคณะ (2000) และจากตัวอย่างมะม่วง ทั้งที่แสดงและยังไม่แสดงรอยแผลของโรค โดยการเตรียม DNA อาศัยวิธีมาตรฐานของ *Sambrook* และ *MacCallum (2001)* แล้วสกัด DNA ด้วย Fungal genomic DNA extraction kit (Favogen, USA.) ทำการเพิ่มปริมาณของ DNA ด้วยไพรเมอร์ (primer) ITS-1 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' และ ITS-4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' คู่กับไพรเมอร์ของ *C. gloeosporioides* (*Cg*Int) (GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG) และ *C. acutatum* (*Ca*Int2) (GGGGAAGCCTCTCGCGG)

ในการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ PCR reactions total volume = 20 µl ประกอบด้วย genomic DNA 10 – 100 ng, 1X Tag buffer (Vivantis, Poland), 10mM Tris-HCL ,pH 9.0 ; 50 mM KCL, dNTP อย่างละ 0.2 mM, ไพรเมอร์อย่างละ1 µM ,Taq polymerase 0.5 Unit (Vivantis, Poland), $MgCl_2$ 1.5 mM นำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PTC-Thermocycler ; MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยปรับ PCR condition ดังนี้ initial DNA denaturation 5 นาทีที่ 95 °C ตามด้วย 25 รอบของ 30 วินาที ที่ 95°C, 30 วินาที ที่ 55°C และ 30 วินาที 72°C หลังจากที่ทำปฏิกิริยาครบจำนวนรอบทั้งหมดแล้วบ่มต่อที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที นำ PCR product ที่ได้ มาตรวจสอบด้วย gel electrophoresis บน 1.5 % agarose gel ใน Tris-acetate-EDTA buffer ย้อมใน ethidium bromide แล้วตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างของชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (positive controls คือ *C. acutatum* CIAT isolate : TOM 021 และ *C. gloeosporioides* CIAT isolate : 1613 negative control คือ *C. fragariae* isolate : 120-S )

*การวินิจฉัยโดยอาศัยเทคนิค ITS-RFLP* - คู่ของ Primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA จาก ITS region ของ rDNA จาก ตัวอย่าง DNA ที่เตรียมได้จากเส้นใยของเชื้อรา รวมทั้งเงื่อนไขต่างๆที่ใช้ในการทำการทดลอง อาศัยวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Pandey และคณะผู้วิจัย (2003) โดยการทำ ITS-RFLP นั้น PCR products ที่ได้จากแต่ละตัวอย่าง จะถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes)

**Restriction enzyme digestion of amplified rDNA**

ทำการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของ ribosomal DNA ในช่วง ITS1-5.8s-ITS2 ของ mitochondria โดยคู่ primer ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ปฏิกิริยา PCR (20 µl) ประกอบด้วย DNA template 10 ng, 1X Taq polymerase buffer dNTPs อย่างละ 0.2 mM, ไพรเมอร์อย่างละ1 µM, Taq polymerase 1 Unit (Vivantis, Chino, USA.) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD PTC—200, BIO-RAD, USA.)โดยปรับ PCR condition ดังนี้ initial DNA denaturation 5 นาทีที่ 95 °C ตามด้วย 30 วินาที ที่ 95°C, 30 วินาที ที่ 55°C และ 30 วินาที 72°C (รวม 25 รอบ) และที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการตัด PCR products ดังกล่าวด้วย *Rsa*I และ *Hae*III แยกกัน โดยในหลอดทดลองประกอบด้วย reaction buffer 1x, PCR products 10-15 ng และ 200 U

ของ *Rsa*I และ *Hae*III และ distilled water นำไปบ่มที่ 37°C นาน 6 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่ 85°C นาน 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบโดยการทำ gel electrophoresis บน agarose gel (1.5%) ใน 0.5x Tris-boric acid-EDTA buffer

**Species specific amplification by PCR**

ทำการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอใน mitochondria ในช่วง ITS1-5.8s-ITS2 โดยอาศัยคู่ของ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงในระดับ specie ของ *Colletotrichum spp*. โดยอาศัยเทคนิค PCR ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Freeman และคณะ (2000)
ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบ *C. acutatum* คือ

5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3' (*Ca*Int2)

และที่ใช้ในการตรวจสอบ *C. gloeosporioides* คือ

5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3' (*Cg*Int)

โดยแต่ละตัวจะใช้คู่กับ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ปฏิกิริยา PCR (20 µl) ประกอบด้วย DNA template 10 – 100 ng, 1X Taq buffer dNTPs อย่างละ 0.2 mM, ไพรเมอร์อย่างละ1 µM, Taq polymerase 0.5 Unit (Vivantis, Chino, USA.) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (BIO-RAD PTC—200 , BIO-RAD, USA.)โดยปรับ PCR condition ดังนี้ initial DNA denaturation 5 นาที ที่ 95 °C ตามด้วย 30 วินาที ที่ 95°C, 30 วินาที ที่ 55°C และ 30 วินาที 72°C (รวมทั้งสิ้น 25 รอบ) และที่ 72°C เป็นเวลา 5 นาที นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้มาตรวจสอบโดยการทำ gel electrophoresis บน agarose gel (1.5%) ใน 0.5x Tris-acetate-EDTA buffer นำมาย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

*3.2.3 การวินิจฉัยผลและสรุปข้อมูล*

ผลการทดลองที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR และ ITS-RFLP จะถูกประมวลร่วมกัน การทดลองในส่วนของ PCR จะทำอย่างน้อย 3 ครั้งในแต่ละชุดการทดลองย่อย เพื่อยืนยันความถูกต้องของระบบ PCR ก่อนจะสรุปผลร่วมกับการตรวจสอบเชื้อในโครงสร้างในระดับเนื้อเยื่อพืช

*3.3* ***การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุที่แยกจากมะม่วง***

เชื้อราที่ผ่านการตรวจสอบทางลักษณะสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยาระดับโมเลกุล นำมาเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร acidified PDA บ่มไว้จนสร้างกลุ่มสปอร์บนเส้นใยบนอาหาร แล้วขูดส่วนสปอร์มาเตรียมเป็นสารแขวนลอยของสปอร์( spore suspension ) ให้มีความเข้มข้น $10^6$ สปอร์ต่อ มล. ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปลูกเชื้อบนใบมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการเช็ดผิวใบด้วย 70% ethanol แล้วหยดสปอร์ของเชื้อปริมาตร 50 µl ลงบนรอยแผลที่ใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อแล้วทำแผลบนใบ บ่มไว้ในกล่องบ่มเชื้อ 5 - 7 วัน โดยรักษาความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 95% บันทึกอาการเกิดโรค

## 4. ผลการทดลอง

### *4.1 การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส*

ใช้สวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเขตอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ของคุณนันต์ ทองรัตน์ (ซึ่งเป็นสมาชิกกลุ่มผู้ผลิตมะม่วงเพื่อการส่งออก อ.พร้าว 78 ม.4 ต.ป่าไหน่ อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ ซึ่งมีคุณเจริญ คุ้มสุภา เป็นประธานกลุ่ม) โดยใช้สวนของคุณนันต์ ทองรัตน์ เป็นพื้นที่สวนมะม่วงสำหรับใช้ในการทดลองของโครงการการจัดการระบบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้เพื่อการส่งออกเป็นโครงการที่ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ในปีงบประมาณ 2551 จำนวนต้น 25 ต้น เพื่อใช้เป็นแปลงทดสอบหลักและใช้สวนใกล้เคียงอีก 2 แหล่ง เพื่อเป็นการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญแบบแผ่งของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพื้นที่สวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองบริเวณข้างเคียงที่ไม่เคยวางระบบการควบคุมโรคแอนแทรคโนส จำนวนอีก 25 ต้น เพื่อนำมาวางโปรแกรมการฉีดพ่นสารเคมีเช่นเดียวกับแปลงทดสอบหลัก โดยใช้เป็นแปลงทดสอบรอง และเลือกต้นมะม่วงอีก 25 ต้นสำหรับใช้เป็นแปลงควบคุม (control) สำหรับการวางระบบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในปีที่ 2 ในแปลงทดสอบหลัก วางโปรแกรมการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราเช่นเดียวกับช่วงฤดูกาลปลูกในปีที่ผ่านมา ซึ่งได้เริ่มโปรแกรมการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราตั้งแต่เดือนตุลาคม 2552 หลังจากที่เกษตรกรมีการตัดแต่งกิ่งรอบ 2 โดยฉีดพ่นสารเคมีชนิดสัมผัสสลับกับสารดูดซึม ทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งถึงระยะห่อผลจึงหยุดการฉีดพ่นสารเคมี และก่อนการฉีดพ่นสารเคมีแต่ละครั้งเก็บตัวอย่างมะม่วงมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ตามระยะต่างๆของการเจริญเติบโตของมะม่วง โดยตัวอย่างมะม่วงที่เก็บในระยะต่างๆ การประเมินผลการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่ดูจากลักษณะอาการที่ปรากฏในแปลงที่ใช้ทดสอบ และโปรแกรมการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ ภาพที่ 2 และ 3

**ตารางที่ 1** ผลประเมินการเกิดโรคแอนแทรคโนสในแปลงปลูกมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่ในระยะการเจริญต่างๆ ของมะม่วงและชนิดสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ใช้พ่นในระยะต่างๆ

| ระยะการเจริญ | สารเคมีที่ใช้พ่น | แปลงทดสอบที่1 (แปลงทดสอบหลัก) | แปลงทดสอบที่2 (แปลงทดสอบรอง) | แปลงทดสอบที่3 (แปลงเปรียบเทียบ) |
|---|---|---|---|---|
| ก่อนตัดแต่ง | - | 2.5 | 1.7 | 2.2 |
| หลังตัดแต่งกิ่ง | คอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ | 2 | 1.5 | 2.7 |
| แตกช่อ | คาร์เบนดาซิม | 1.7 | 1.7 | 1.7 |
| ติดดอก | แมนโคเซป | 1.9 | 1.6 | 1.9 |
| ติดดอก | อมิสตา | 1.5 | 1.3 | 1.7 |
| ดอกตูม-เริ่มบาน | คอปเปอร์ออกไซด์ | 1.5 | 1.5 | 1.4 |
| ดอกบานเต็มที่ | โปรคลอราซ | 1.5 | 1.6 | 1.6 |
| ผลอ่อน | คอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ | 1.6 | 1.2 | 2.5 |
| ผลอ่อน | อมิสตา | 1.5 | 1.9 | 2.4 |
| 50 วันหลังดอกบาน | แมนโคเซป | 1.7 | 1.8 | 1.5 |
| 70 วันหลังดอกบาน | โปรคลอราซ | 2 | 2.2 | 2.7 |
| 80 วันหลังดอกบาน | คอปเปอร์ออกไซด์ | 2.4 | 1.9 | 2.8 |
| 100 วันหลังดอกบาน | - | 1.5 | 1.7 | 3.3 |
| 110 วันหลังดอกบาน | - | 1.2 | 1.6 | 2.7 |
| ระยะเก็บเกี่ยว | - | 1.9 | 2.2 | 3.2 |

0 = ไม่พบการเกิดโรค หรือไม่มีรอยแผล (ระดับดี)

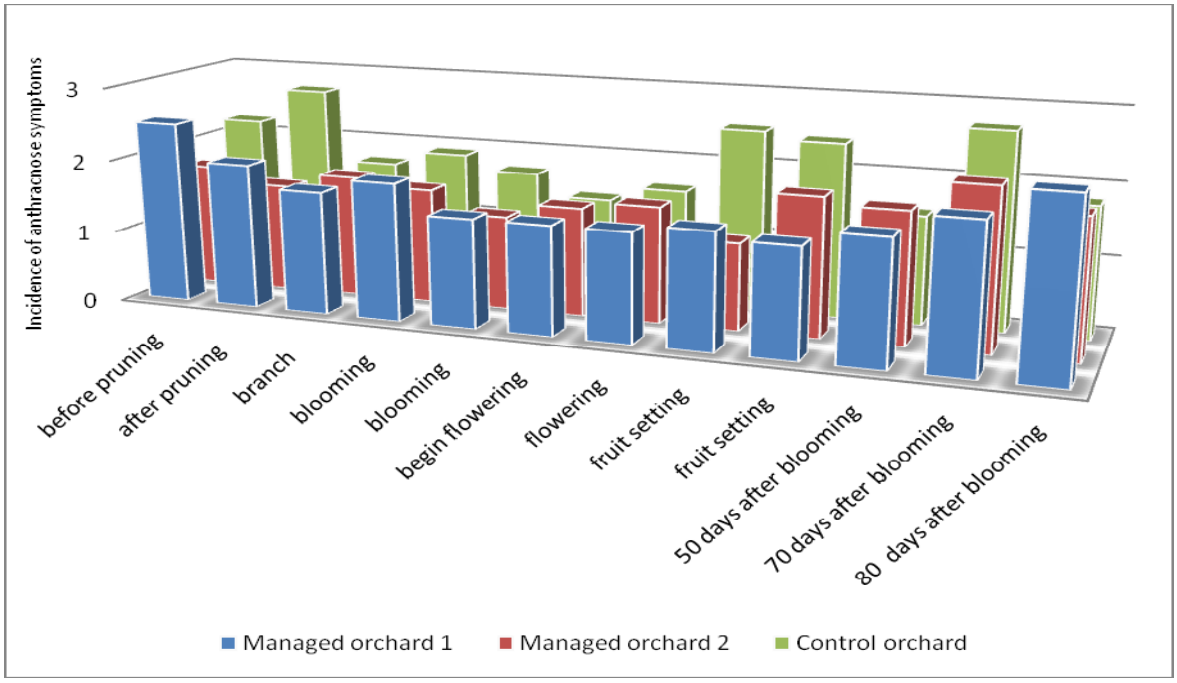
1 = มีรอยแผล เป็นบริเวณพื้นที่ 1- 25% (ระดับปกติ)

2 = มีรอยแผล เป็นบริเวณพื้นที่ 21- 50% (ระดับปานกลาง)

3 = มีรอยแผล เป็นบริเวณพื้นที่ 51- 80% (ระดับรุนแรง)

4 = มีรอยแผล เป็นบริเวณพื้นที่มากกว่า 80% หรือใบตาย (ระดับรุนแรงมาก)

disease assessment by visual rating : 0 - 4




**ภาพที่** 2 ผลการประเมินการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่เกิดขึ้นในระยะการเจริญต่างๆของมะม่วงในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่ใช้ในการทดลองทั้ง 3 แหล่งในเขตอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่

เมื่อนำตัวอย่างจากส่วนต่างๆของต้นมะม่วงมาตรวจสอบความถี่ในการเกิดเชื้อสาเหตุโรคที่เจริญจากตัวอย่างทดสอบ โดยการกระตุ้นด้วย paraquat ผลจากตารางที่ 2 และภาพที่ 4 แสดงให้เห็นว่าการจัดการระบบการควบคุมโรคนั้นมีแนวโน้มว่าสามารถลดการเกิดของโรคได้โดยจะเห็นว่าความถี่ของการเกิดโรคลดลงได้มากในระยะตั้งแต่ตัดแต่งกิ่งไปจนถึงติดผลอ่อน หลังจากนั้นพบว่าความถี่ของการเกิดโรคสูงขึ้นเนื่องมาจากสภาพอากาศที่แปรปรวนมีฝนและหมอกลงดังที่กล่าวไปแล้วในข้างต้น แต่ต่อมาความถี่ของการเกิดโรคก็ลดลงตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับแปลงที่ไม่ได้รับการจัดการระบบการควบคุมโรคก็แสดงให้เห็นว่ามีอาการของโรคเกิดขึ้นสูงกว่าแปลงที่มีการจัดการ

**(ก)**

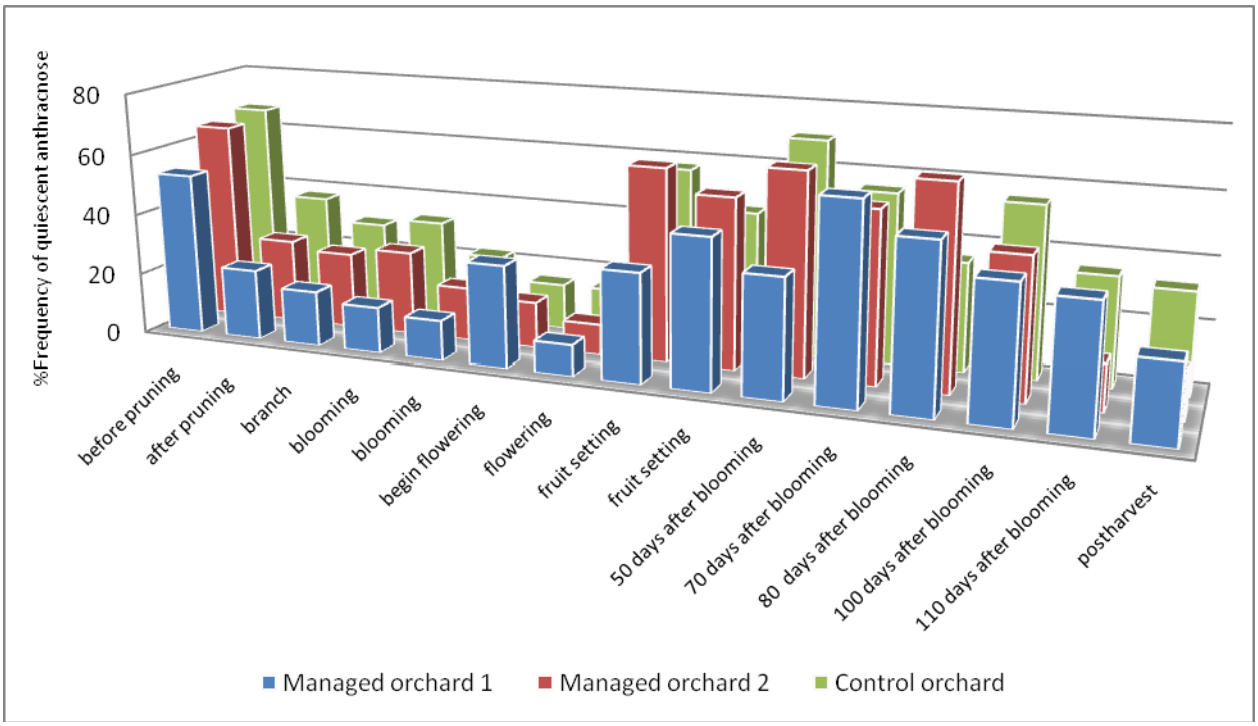
**(ข)**

**(ค)**

**ภาพที่** 3 ระยะการเจริญเติบโตของต้นมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่พบการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนส (ก) ระยะแตกใบอ่อน (ข) ระยะใบแก่ และ (ค) ระยะออกดอก

**ตารางที่** 2 ความถี่ของการเกิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากตัวอย่างมะม่วงที่เก็บในระยะต่างๆ ที่ผ่านการกระตุ้นด้วย paraquat หลังการบ่มไว้เป็นเวลา 3 -7 วัน ในสภาพห้องปฏิบัติการ

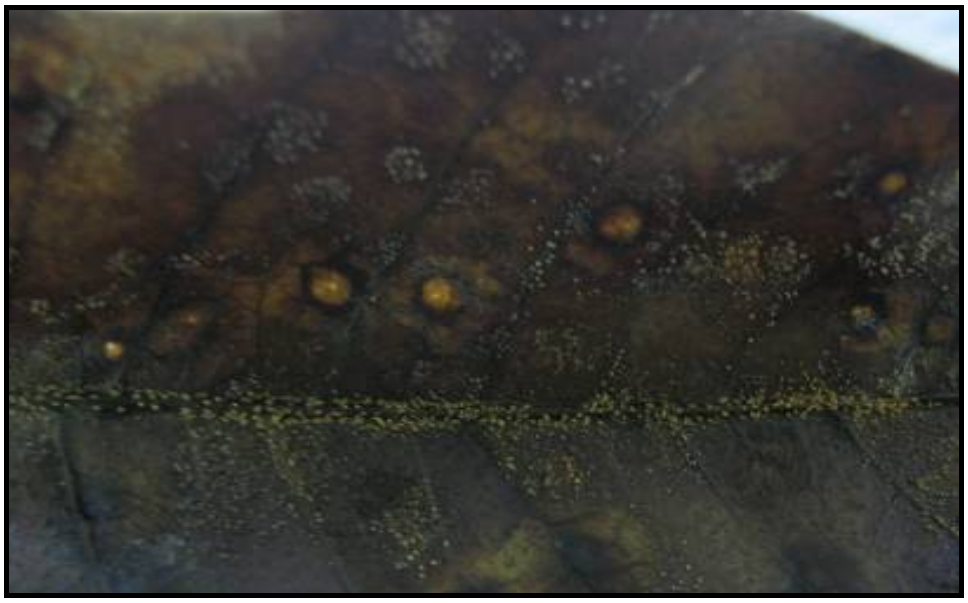
| **ระยะการเจริญของมะม่วง** | **ความถี่ในการพบเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (%)** | | |
|---|---|---|---|
| | **แปลงทดสอบที่** 1 | **แปลงทดสอบที่** 2 | **แปลงเปรียบเทียบ** |
| ก่อนตัดแต่ง | 53 | 65 | 67.5 |
| หลังตัดแต่งกิ่ง | 23 | 27.5 | 37.5 |
| แตกช่อ | 18 | 25 | 30 |
| ติดดอก | 15 | 27.5 | 32.5 |
| ติดดอก | 13 | 17.5 | 22.5 |
| ดอกตูม-เริ่มบาน | 33 | 15 | 15 |
| ดอกบานเต็มที่ | 10 | 10 | 15 |
| ผลอ่อน | 35 | 62.5 | 57.5 |
| ผลอ่อน | 48 | 55 | 45 |
| 50 วันหลังดอกบาน | 38 | 65 | 70 |
| 70 วันหลังดอกบาน | 63 | 55 | 55 |
| 80 วันหลังดอกบาน | 53 | 65 | 35 |
| 100 วันหลังดอกบาน | 43 | 45 | 55 |
| 110 วันหลังดอกบาน | 40 | 15 | 35 |
| ผลหลังการเก็บเกี่ยว | 25 | 15 | 32.5 |

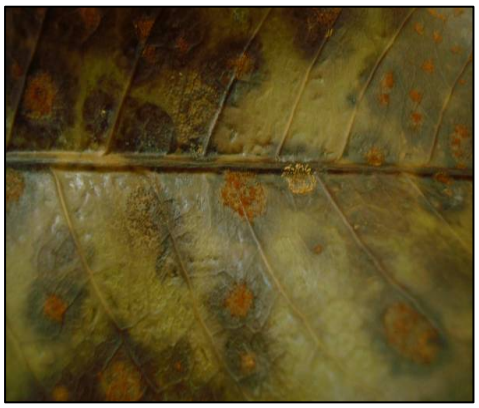



**ภาพที่** 4 เปอร์เซ็นต์ความถี่ของการเกิดเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ตรวจพบจากตัวอย่างมะม่วงที่เก็บในระยะต่างๆที่ผ่านการกระตุ้นด้วย paraquat หลังการบ่มไว้เป็นเวลา 3-7 วัน

### *4.2 ผลการแยกเชื้อราและการตรวจสอบชนิดของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส*

ตัวอย่างมะม่วงทุกระยะการเจริญ ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยสาร paraquat พบว่าเนื้อเยื่อส่วนบริเวณใบพืชจะเสื่อมสภาพเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลออกดำ เกิดกลุ่มของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ เกาะอยู่บริเวณผิวตัวอย่างพืชที่ใช้ทดสอบ โดยพบลักษณะของกลุ่มสปอร์ (spore mass) มีระดับสีที่แตกต่างกันตั้งแต่น้ำตาล แดง เหลือง และส้ม โดยเฉพาะกลุ่มสปอร์สีส้มที่เกิดขึ้นชัดเจนบนรอยแผลของผล แสดงให้เห็นความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรค (ภาพที่ 5)



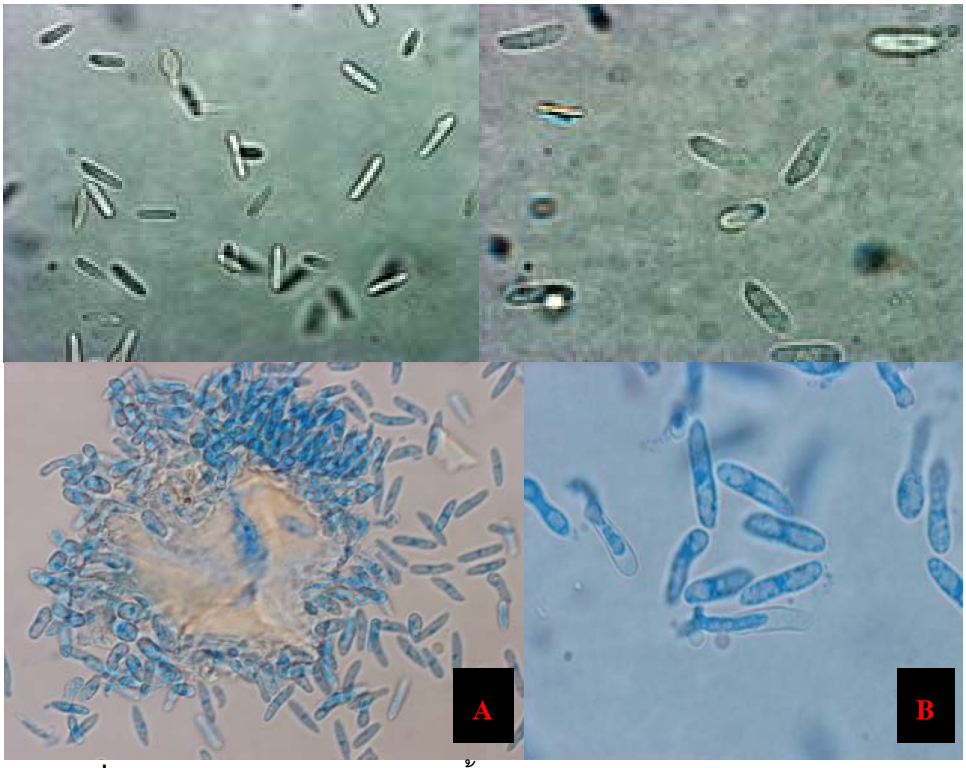


**ภาพที่** 5 ลักษณะของกิ่งก้านบริเวณส่วนยอด ผล และใบของมะม่วงที่ผ่านการกระตุ้นด้วย paraquat แล้วบ่มไว้ในกล่องรักษาความชื้นประมาณ 3 ถึง 5 วัน เกิดกลุ่มเส้นใยและกลุ่มสปอร์ขึ้นบริเวณผิวและมีสีที่ปรากฏแตกต่างกัน

เมื่อนำเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้จากส่วนของ ดอก กิ่งก้าน ใบ และผลของมะม่วงทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร acidified PDA เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ สามารถจัดจำแนกเชื้อในกลุ่ม *Colletotrichum* spp.ได้จำนวนทั้งหมด 21 ไอโซเลต ที่ทำการคัดแยกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏโดยตรวจสอบลักษณะของโคโลนีและการสร้างกลุ่มสปอร์ที่เจริญบนอาหาร PDA ตลอดจนการตรวจสอบลักษณะของโครงสร้าง fruiting body ที่เรียกว่า acervulus ที่ประกอบไปด้วยสปอร์หรือโคนิเดีย (spore or conidia) และ setae หรือ spines ของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่เจริญบนผิวใบมะม่วง (ภาพที่ 6 และ 7) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Compound microscope โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง (Barnet and Barry, 2003) สามารถจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีลักษณะของโคนิเดียค่อนข้างยาวเป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายมน มีความยาวตั้งแต่ 12 - 20 µm และกว้าง 3.5 - 6 µm และมีลักษณะของเส้นใยเป็นสีเทาออกเขียว ซึ่งกำหนดเป็นกลุ่มไอโซเลต P5Rn ซึ่งประกอบด้วย P5R1 ถึง P5R15 และกลุ่มที่มีลักษณะของโคนิเดียค่อนข้างรีหัวท้ายแหลมมีความยาวตั้งแต่ 8 - 13 µm และกว้าง 2 - 5 µm และมีลักษณะของเส้นใยเป็นสีเทาซึ่งกำหนดเป็นกลุ่มไอโซเลต P6Rn ซึ่งประกอบด้วย P6R1 ถึง P6R6 (ภาพที่ 8)

**ภาพที่ 6** ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่เจริญบนอาหาร acidified potato dextrose agar กลุ่มไอโซเลต P5Rn (A) มีลักษณะของเส้นใยเป็นสีเทาออกเขียว สร้างกลุ่มสปอร์สีเหลืองและกลุ่มไอโซเลต P6Rn (B) มีลักษณะของเส้นใยเป็นสีเทา สร้างกลุ่มสปอร์สีส้ม

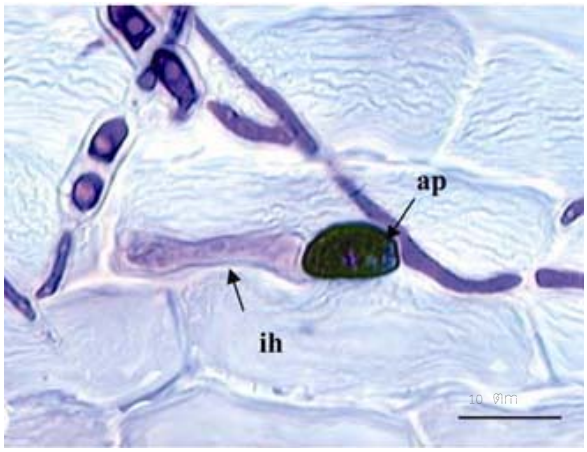
**ภาพที่** 7 ลักษณะ acervulus (fruiting body) ที่ประกอบไปด้วย conidia และ setae ของเชื้อ *Colletotrichum* spp.ที่เจริญบนผิวใบมะม่วง ที่ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) กำลังขยาย 40 เท่า กลุ่มไอโซเลต P5Rn (A) และกลุ่มไอโซเลต P6Rn (B)



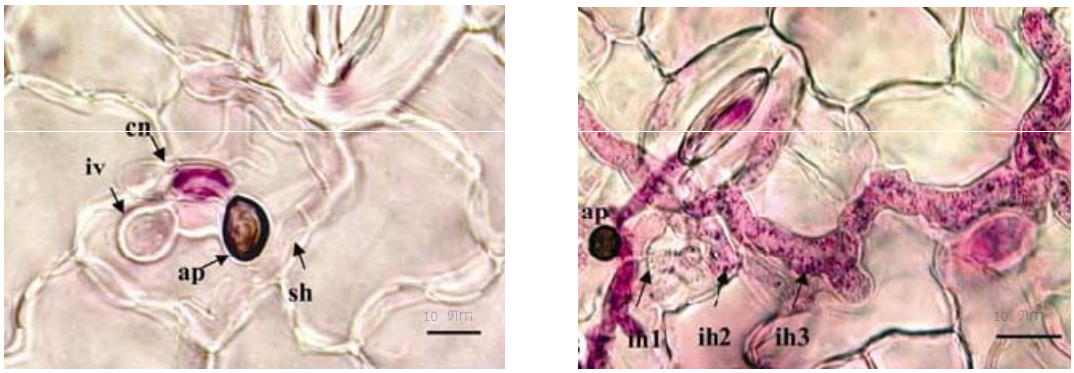

**ภาพที่** 8 ลักษณะของโคนิเดียของเชื้อ *Colletotrichum* spp. กลุ่มไอโซเลต P5Rn (A) และลักษณะของโคนิเดียของเชื้อ *Colletotrichum* spp. กลุ่มไอโซเลต P6Rn (B)

### 4.2.1 **การตรวจสอบเชื้อราก่อโรคภายในโครงสร้างในระดับเนื้อเยื่อของพืช**

ตัวอย่างมะม่วงที่เก็บจากระยะต่างๆของการเจริญ ได้แก่ ส่วนยอดหรือกิ่งอ่อน ที่เกิดขึ้นหลังการตัดแต่ง นำมาศึกษาโครงสร้างโดยรวมภายใต้กล้องชนิด stereomicroscope เพื่อตรวจบริเวณที่จะนำมาตัดชิ้นส่วนพืชด้วย microtome ให้มีความหนาประมาณ 0.01 มม. ย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี cotton blue ศึกษาภายใต้กล้อง compound microscope ที่แสดงให้เห็นการแทง (penetration) ของเส้นใยของเชื้อภายในเนื้อเยื่อพืช หรือ internal hypha ที่งอกมาจาก appressorium (ภาพที่ 9) และติดตามพัฒนาการของเชื้อที่เข้าทำลายพืชในระดับเซลล์จากเนื้อเยื่อจากส่วนใบมะม่วงที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างแล้วตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome เพื่อตรวจดูการเจริญของเชื้อภายในเนื้อเยื่อพืชภายใต้กล้อง compound microscope ได้แสดงให้เห็นลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เจริญแบบแฝงภายในเนื้อเยื่อจากส่วนใบของมะม่วงและตำแหน่งของสปอร์หรือโคนิเดีย appressorium และเส้นใยที่เจริญภายในเนื้อเยื่อพืช (subcuticular hypha) ที่เจริญแฝงอยู่ในภายในเซลล์ epidermal และเส้นใยภายในเนื้อเยื่อพืช (internal hyphae) ที่งอกมาจาก appressorium ภายในโครงสร้างระดับเนื้อเยื่อบริเวณปากใบ (ภาพที่ 8) และการตรวจสอบภายใต้กล้อง Transmission Electron Microscope (TEM) แสดงให้เห็นโครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากตัวอย่างมะม่วงบริเวณยอดที่เก็บในระยะหลังตัดแต่งกิ่ง และใบมะม่วงที่นำมาตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคภายในโครงสร้างในระดับเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 10 และ 11)

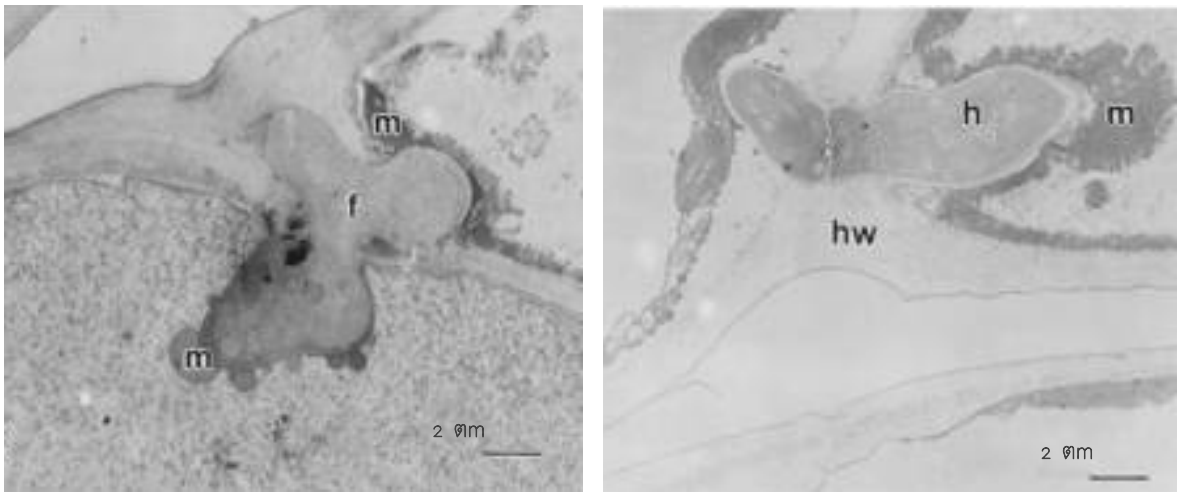



**ภาพที่** 9 เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เจริญแบบแฝงภายในเนื้อเยื่อจากส่วนใบของมะม่วงที่ตัดด้วย microtome ผ่านการย้อมสี cotton blue แล้วตรวจภายใต้ compound microscope แสดงตำแหน่งการแทงทะลุ (penetration) ของเส้นใยของเชื้อภายในเนื้อเยื่อพืช หรือ internal hypha (ih) ที่งอกมาจาก appressorium (ap) (Bar =10 micrometer)




**ภาพที่ 10** เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เจริญแบบแฝงภายในเนื้อเยื่อจากส่วนใบของมะม่วง แสดงตำแหน่งของสปอร์หรือ conidium (cn) appressorium (ap), infection vesicle (iv), และ subcuticular hypha (sh) ที่เจริญแฝงอยู่ในภายในเซลล์ epidermal (ภาพซ้าย) และแสดงเส้นใยภายในเนื้อเยื่อพืช (internal hyphae (ih1,2,3) ที่งอกมาจาก appressorium (ap) (ภาพขวา ) (Bar =10 micrometer)

**ภาพที่ 11** ภาพจาก Transmission Electron Microscope ที่แสดงให้เห็นโครงสร้างของส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากตัวอย่างมะม่วงบริเวณยอด ที่เก็บในระยะหลังตัดแต่งกิ่งที่นำมาตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคภายในโครงสร้างในระดับเนื้อเยื่อ [c = cuticle; f = เชื้อรา (fungal cell); hw = ผนังเซลล์พืช (host wall)] (Bar = 2 micrometer)

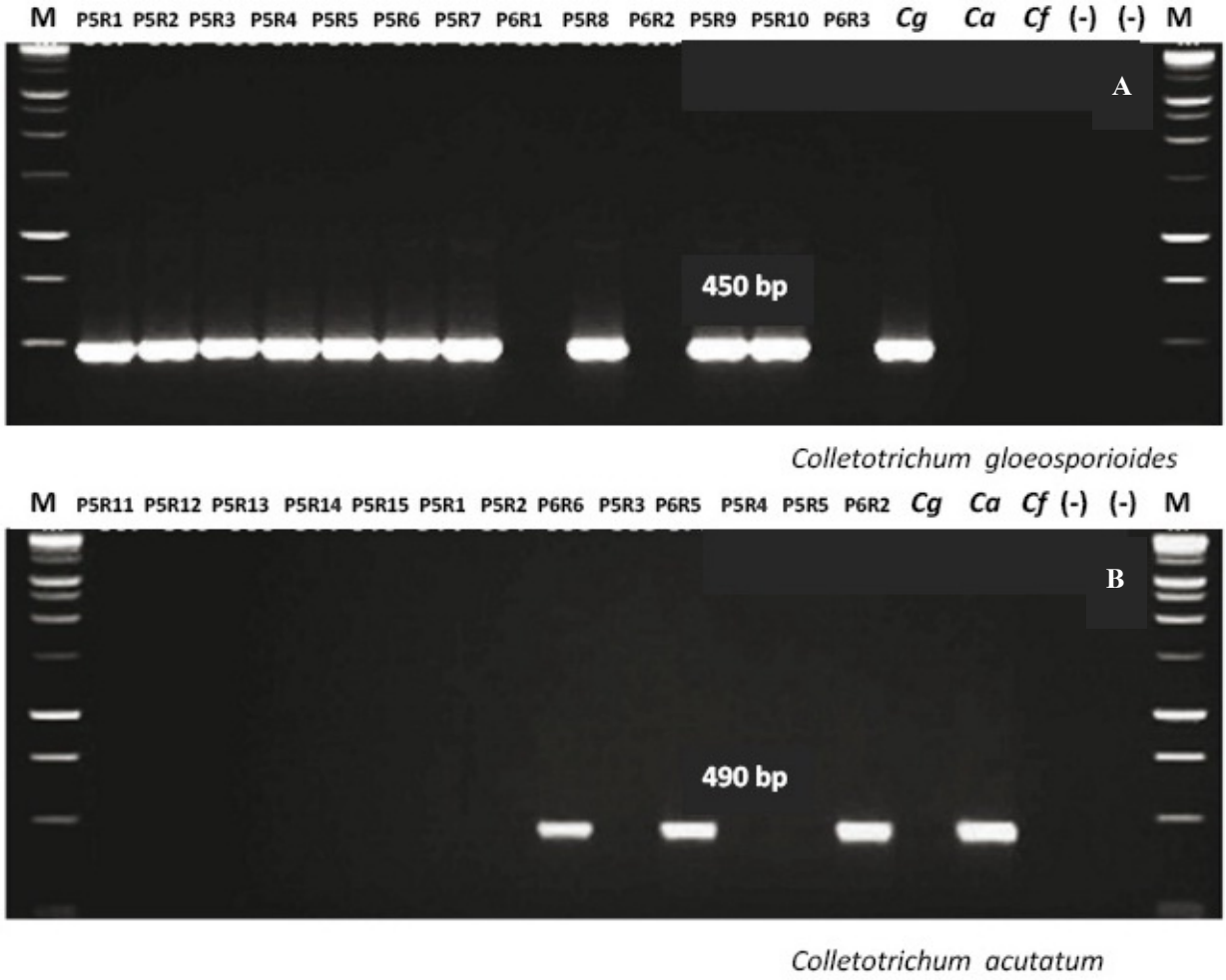



**ภาพที่** 12 ภาพจาก Transmission Electron Microscope ที่แสดงให้เห็นโครงสร้างของ appressorium (ภาพซ้าย) ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แทงทะลุ (penetrate) ผ่านเซลล์เนื้อเยื่อใบมะม่วงที่นำมาตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคภายในโครงสร้างในระดับเนื้อเยื่อ และส่วนของเส้นใยที่แทงทะลุผ่านเซลล์เนื้อเยื่อของใบมะม่วง (ภาพขวา) f = fungal cell (เชื้อรา); m = mesophyll (มีโซฟิลล์) ; h = hypha (เส้นใยเชื้อรา) ; hw = host wall ( ผนังเซลล์พืช); Bar = 2 micrometer)

### 4.2.2 การตรวจสอบเชื้อราก่อโรคโดยวิธีการทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุล

*ก. การวินิจฉัยโดยอาศัยเทคนิค PCR*

การใช้วิธีทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธี polymerase chain reaction สำหรับคู่ของ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิด ของ *Colletotrichum* sp. คือคู่ primer ITS4-*Cg*Int (จำเพาะต่อ C. *gloeosporioides*) และคู่ primer ITS4-*Ca*Int2 (จำเพาะต่อ *C. acutatum*,) สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ 2 ชนิด จากตัวอย่างมะม่วง คือ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* ซึ่งจะให้ PCR products ขนาด 450 และ 490 bp ในกลุ่มไอโซเลต P5Rn (1-15) และในกลุ่มไอโซเลต P6Rn (1-6) (ภาพที่ 13 )

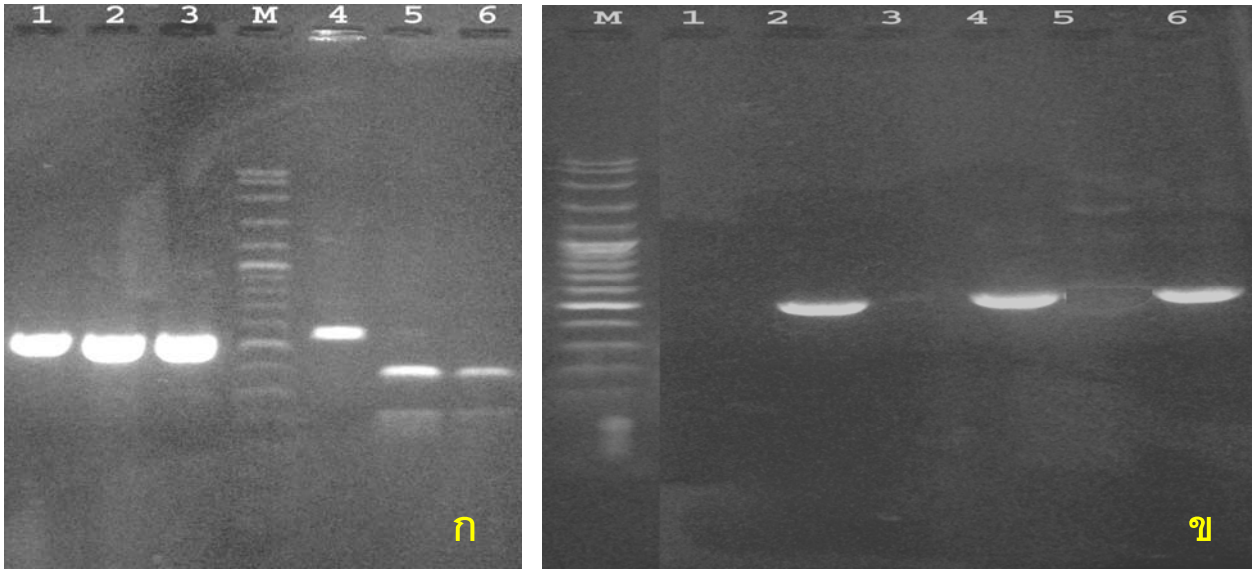



**ภาพที่** 13 การจำแนกเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Colletotrichum* spp. โดยอาศัย polymerase chain reaction และคู่ของ primer ITS4-CgInt (จำเพาะต่อ *C. gloeosporioides*), คู่ primer ITS4-CaInt2 (จำเพาะต่อ *C. acutatum*) ซึ่งจะให้ PCR products ขนาด 450 และ 490 bp ตามลำดับ (Ca = *C. acutatum* positive control; (Cg = *C, gloeosporioides* positive control; (Cf = *C. fragariae* (-) negative control

ผลการวินิจฉัยโดยอาศัยเทคนิค ITS-RFLP กับคู่ของ Primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA จาก ITS region ของ rDNA จาก ตัวอย่าง DNA ที่เตรียมได้จากเส้นใยของเชื้อรา โดย PCR products ที่ได้จากแต่ละตัวอย่าง จะถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) และจากการนำชิ้นส่วนของ rDNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น RsaI ทำให้สามารถแบ่งเชื้อราที่นำมาทดสอบได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะที่ถูกย่อยได้หรือไม่ได้ด้วย RsaI พบว่ากลุ่มไอโซเลต P5Rn อยู่ในกลุ่มที่ถูกย่อยได้ และกลุ่มไอโซเลต P6Rn จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่ถูกย่อย ขณะที่ HaeIII ไม่สามารถทำให้เกิดความแตกต่างในกลุ่มตัวอย่างเชื้อราที่นำมาทดสอบ

ทั้งหมด กล่าวคือตัวอย่างทั้งหมดถูกย่อยได้และแสดงรูปแบบของ bands หลังการทำ gel electrophoresis ที่เหมือนกัน ซึ่งไม่ได้นำมาแสดงผลในที่นี้

ดังนั้นผลที่ได้จากการตรวจสอบการเจริญแบบแฝงของเชื้อราก่อโรคโดยอาศัย polymerase chain reaction และคู่ของ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อราในกลุ่ม *Colletotrichum* spp. คือคู่ primer ITS4-*Cg*Int (จำเพาะต่อ C. *gloeosporioides*) และคู่ primer ITS4-*Ca*Int2 (จำเพาะต่อ *C. acutatum*,) สามารถตรวจพบและจำแนกความแตกต่างของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ทั้ง 2 ชนิด จากตัวอย่างมะม่วงที่เก็บมาจากสวนอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งจะให้ PCR products ขนาด 450 และ 490 bp ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของการย่อย rDNA ข้างต้นด้วย RsaI ทำให้สามารถสรุปได้ว่ากลุ่มไอโซเลต P5Rn คือเชื้อ *C. gloeosporiodes* ขณะที่กลุ่มไอโซเลต P6Rn คือ *C. acutatum* (ภาพที่ 14)




**ภาพที่** 14 เชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Colletotrichum* spp. ที่แยกจากมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองถูกจำแนกเป็น 2 กลุ่มคือ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* โดยอาศัยเทคนิค ITS-RFLP กับคู่ของ Primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA จาก ITS region ของ rDNA จากตัวอย่าง DNA ที่เตรียมได้จากเส้นใยของเชื้อรา โดย PCR products ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ภาพ ก และ ข) โดยสามารถจำแนกกลุ่มไอโซเลต P5Rn คือ เชื้อ *C. gloeosporiodes* ขณะที่กลุ่มไอโซเลต P6Rn คือ *C. acutatum*

**ภาพ ก**. PCR product ที่ไม่ได้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ อยู่ทางด้านซ้ายของ DNA ladder : Lane 1 และ 4 ; ไอโซเลต P5R1, Lane 2 และ 5 ;ไอโซเลต P6R2, Lane 3 และ 6 ; ไอโซเลต P5R12, L; 100 bp DNA ladder (Vivantis, Chino, USA.)

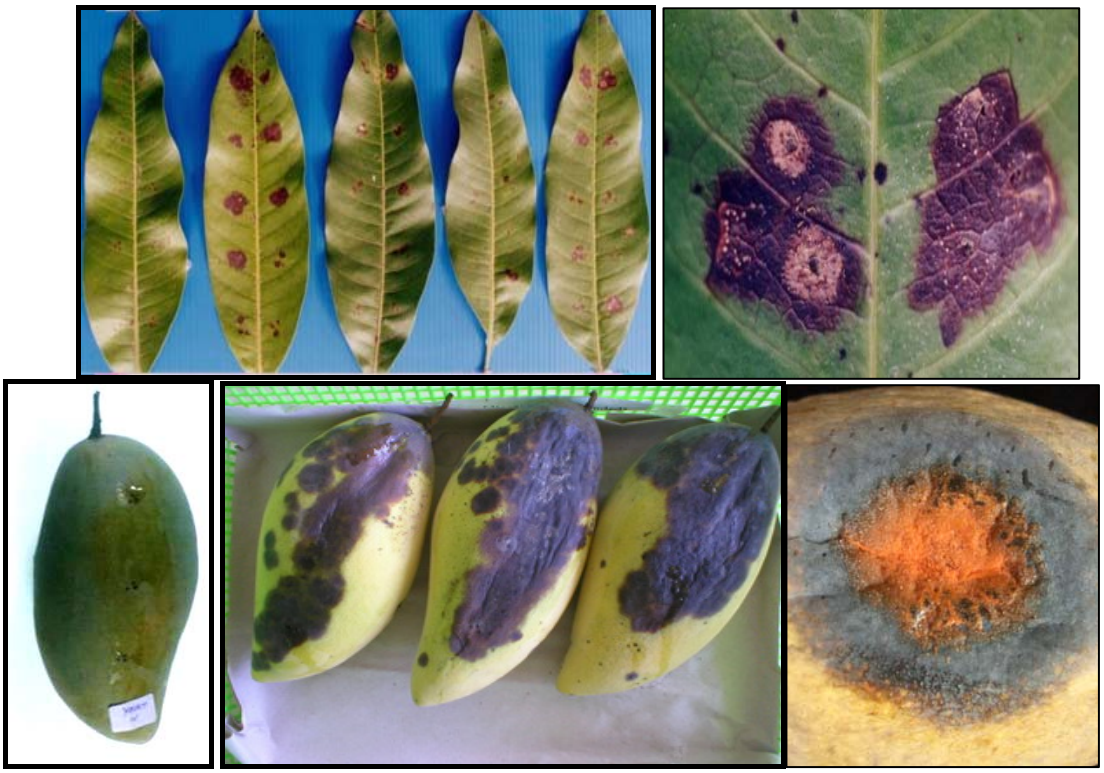
**ภาพ ข**. เชื้อราในกลุ่ม *Colletotrichum* spp.ที่แยกจากมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองถูกจำแนกเป็น 2 กลุ่ม คือ*C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* โดยอาศัยไพรเมอร์ ITS4-*Cg*Int (lane 1-3) และไพรเมอร์ ITS4-*Ca*Int2 (lane 4-6) ตามลำดับ Lane 1 และ 4; ไอโซเลต P5R1, Lane 2 และ 5; ไอโซเลต P6R2, Lane 3 และ 6 ; ไอโซเลต P5R12 L; 100 bp DNA ladder (Vivantis, Chino, USA.)

### 4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราแอนแทรคโนสที่แยกจากมะม่วง

ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุแอนแทรคโนสที่แยกจากส่วนต่างๆของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองจากสวนอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 21 ไอโซเลต บนส่วนต่างๆ ของมะม่วงในห้องปฏิบัติการพบว่าทุกไอโซเลตสามารถทำให้เกิดรอยแผลไหม้สีน้ำตาลดำ (necrotic) และเกิดกลุ่มสปอร์ (spore masses) บนรอยแผลที่สังเกตได้ในระยะเวลา 5 ถึง 7 วันหลังการปลูกเชื้อ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผลแตกต่างกันออกไป โดยเชื้อในกลุ่ม P6Rn (P6R1 – 6) ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผลที่มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อในกลุ่ม P5Rn (P5R1 – 15) ดังแสดงในตารางที่ 3 ภาพที่ 15

**ตารางที่** 3 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผลที่เกิดขึ้นบนใบมะม่วงในห้องปฏิบัติการ หลังการปลูกเชื้อสาเหตุแอนแทรคโนสที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองจากสวนอำเภอพร้าว หลังการบ่มเชื้อไว้ 5 ถึง 7 วัน

| **ชนิดของเชื้อ / ตำแหน่งที่แยกเชื้อ** | **ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผล (มิลลิเมตร) และจำนวนไอโซเลตทดสอบ (n)** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **ใบ** | **ผลก่อนและหลังเก็บเกี่ยว** | **กิ่งก้าน** | **ดอก** |
| ***สวนที่ 1*** | | | | |
| *Cg* (P5Rn: 1-9) | 11.37 (n = 3) | 12.40 (n = 2) | 14.02 (n = 2) | 14.02 (n = 2) |
| *Ca* (P6Rn: 1-6) | 15.57 (n = 2) | 18.62 (n = 2) | 18.00 (n = 2) | ไม่ได้ทดสอบ |
| ***สวนที่ 2*** | | | | |
| *Cg* (P5Rn: 10-15) | 12.16 (n = 2) | 13.24 (n = 2) | 14.38 (n = 2) | ไม่ได้ทดสอบ |



**ภาพที่** 15 ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุแอนแทรคโนสบนใบมะม่วงในห้องปฏิบัติการ

ภาพบนซ้าย : (จากซ้ายไปขวา ) ใบมะม่วงที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบและใบที่ปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอยของสปอร์ของเชื้อไอโซเลตต่างๆ

ภาพบนขวา : รอยแผลที่ปรากฏขึ้นบนใบหลังการปลูกเชื้อ 5 - 7 วันและกลุ่มสปอร์ที่เกิดขึ้น

ภาพล่าง : (จากซ้ายไปขวา ) การทำแผลบนมะม่วงและรอยแผลที่ปรากฏขึ้นบนผลมะม่วงหลังการปลูกเชื้อ 5 - 7 วันและการสร้างกลุ่มสปอร์สีส้มบนรอยแผล

## 5. วิจารณ์ผลการทดลอง

สวนมะม่วงที่ใช้เป็นแปลงทดสอบ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีการวางระบบการควบคุมโรคโดยวิธีเขตกรรมและการวางโปรแกรมการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค หลังการตัดแต่งกิ่งจนถึงระยะเก็บเกี่ยว มีอัตราการเกิดโรคแอนแทรคโนสลดลงตามลำดับ คือตั้งแต่หลังการตัดแต่งกิ่งจนถึงมะม่วงอายุ 110 วันหลังดอกบาน จากการให้คะแนนโดยการประเมินจากลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏ พบว่าอัตราการเกิดโรคในแปลงและความถี่ของเชื้อราแอนแทรคโนสที่ตรวจจากตัวอย่างมะม่วงที่เก็บในระยะต่างๆ ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในแปลงทดสอบที่ 1 ที่เคยวางโปรแกรมการควบคุมโรคแอนแทรคโนสมาแล้วในฤดูกาลก่อนหน้านี้(ภายใต้โครงการ การจัดการระบบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้เพื่อการส่งออก ที่ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปี 2551) และแปลงทดสอบที่ 2 ซึ่งได้วางโปรแกรมการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในช่วงระยะเวลาดำเนินการทดลองของโครงการ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับแปลงที่มีการปฏิบัติดูแลตามปกติของเกษตรกร (ซึ่งมีการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ก็ต่อเมื่อพบอาการของโรคและใช้สารเคมีชนิดดูดซึมเป็นหลัก) พบว่าในแปลงที่ไม่ได้รับการจัดการระบบการควบคุมโรคนั้น จะมีอัตราการเกิดโรคที่สูงกว่าในแทบทุกระยะการเจริญของมะม่วง อย่างไรก็ตามจากแนวโน้มของการเกิดโรคนั้นจะเห็นว่าในช่วงแรกและช่วงสุดท้ายจะมีอาการของโรคที่สูงกว่าระยะอื่นๆ เนื่องจากในช่วงแรกที่เริ่มเข้าทำการฉีดพ่นสารเคมีตามระบบการควบคุมโรคนั้น ในพื้นที่ปลูกมะม่วงอำเภอพร้าว มีการสะสมของโรคมาก่อนแล้ว จึงทำให้ยังมีการเกิดโรคที่สูงอยู่ และในระยะหลังจากติดผลอ่อนแล้วเกษตรกรจะลดการฉีดพ่นสารเคมี ประกอบกับสภาพอากาศที่มีการแปรปรวนมีฝนตกและหมอกในตอนเช้า ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ จึงทำให้มีอัตราการเกิดโรคสูงขึ้น แต่จะเห็นว่าเมื่อมีการวางระบบการจัดการเข้าไปควบคุม การเกิดและแพร่กระจายของโรคแอนแทรคโนสในสวนที่มีการควบคุมโรคตามระบบที่วางไว้ มีแนวโน้มที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด

เมื่อนำตัวอย่างที่เก็บจากส่วนต่างๆของต้นมะม่วงที่เก็บในระยะการเจริญต่างๆ มาตรวจสอบการเจริญแบบแฝงของเชื้อโดยการกระตุ้นด้วย paraquat จะเห็นว่าความถี่ของเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสที่เจริญแบบแฝงภายในส่วนต่างๆของมะม่วง ลดลงในระยะตั้งแต่ตัดแต่งกิ่งไปจนถึงติดผลอ่อน จากการติดตามการเกิดโรคระหว่างสวนที่มีการจัดการระบบการควบคุมโรคแอนแทรคโนส กับสวนที่มีการปฏิบัติตามปกติของเกษตรกรที่มีการใช้สารเคมีประเภทดูดซึมฉีดพ่นเมื่อพบอาการของโรคและมีการใช้อย่างต่อเนื่องเพราะประสบปัญหาในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส ซึ่งตรงกับรายงานของ Kumar และคณะ (2007) เกี่ยวกับการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดเดียวติดต่อกัน จะมีผลต่อการพัฒนาความต้านทานของเชื้อราก่อโรคต่อสารเคมีที่ใช้ แต่ในสวนที่มีการจัดการ พบว่าการจัดการระบบควบคุมโรคโดยการวางโปรแกรมการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมละสัมผัส สลับกันทุก 15 วันจนถึงระยะห่อผล สามารถลดการเกิดโรคได้ทั้งในสภาพสวน และสามารถลดการเจริญแบบแฝงของเชื้อจากตัวอย่างมะม่วงที่เก็บในระยะต่างๆได้ผลดี แต่

การที่ยังพบสภาวะการเกิดโรคแอนแทรคโนสในแปลงทดสอบ เพราะในสภาพพื้นที่ปลูกมะม่วงของอำเภอพร้าว ในช่วงระยะเวลาที่ทำการทดลอง มีการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศ โดยมีฝนตกนอกฤดู ตลอดจนในฤดูหนาวมีสภาพอากาศที่เย็นและมีหมอกลงจัดในตอนเช้า แต่ในช่วงกลางวันมีอุณหภูมิที่สูงขึ้น ทำให้เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรค ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศเป็นสภาวะที่ไม่สามารถควบคุมได้ และเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่มีผลต่อระบบการจัดการ ดังนั้นวิธีการเขตกรรมและการฉีดพ่นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพโดยการวางโปรแกรมฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่เหมาะสมตลอดระยะเวลาการเจริญและพัฒนาการของผลมะม่วง จึงยังคงมีความจำเป็น และต้องกระทำอย่างต่อเนื่องในฤดูปลูกต่อๆไป อย่างไรก็ตาม การที่จะทำให้การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในพื้นที่ปลูกมะม่วงของอำเภอพร้าวอย่างมีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องดำเนินการวางระบบการจัดการควบคุมได้แก่การจัดการด้านเขตกรรมเพื่อรักษาความสะอาดในบริเวณสวน และการวางโปรแกรมการฉีดพ่นสารเคมีที่เหมาะสม อย่างต่อเนื่องเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ปี เพื่อเป็นการกำจัดแหล่งของเชื้อก่อโรคที่สะสมมาเป็นเวลานาน อีกทั้งบริเวณสวนใกล้เคียงหรือของกลุ่มสมาชิกรายอื่นๆของชมรมผู้ปลูกมะม่วงเพื่อการส่งออก ควรจะมีการดำเนินการในลักษณะเดียวกันด้วย เพื่อเป็นการทำความสะอาดพื้นที่จากการที่เป็นแหล่งสะสมของเชื้อติดต่อกันเป็นเวลานาน ทำให้พื้นที่ปลูกมะม่วงของอำเภอพร้าว ไม่เป็นแหล่งสะสมของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสอีกต่อไป จากนั้นจึงจะสามารถลดปริมาณการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราลงในปีต่อๆไปได้

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเข้าทำลายของเชื้อในโครงสร้างระดับเนื้อเยื่อของมะม่วงด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ Compound Microscope และ Transmission Electron Microscope แสดงให้เห็นว่าเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสมีการเจริญแบบแฝงอยู่ในทุกระยะการเจริญของมะม่วง ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการทดลองในการใช้ paraquat กระตุ้นให้เนื้อเยื่อพืชจากตัวอย่างมะม่วงที่เก็บในระยะการเจริญต่างๆกัน เกิดการเสื่อมสลายเพื่อให้เชื้อที่เจริญแฝงอยู่ปรากฏออกมา เนื่องจากเชื้อที่เจริญแฝงอยู่นั้นจะปรากฏออกมาเมื่อเซลล์พืชเข้าสู่ระยะเสื่อมสลาย (senescence) การใช้ paraquat จะช่วยทำให้เซลล์พืชเสื่อมสลายเร็วขึ้น สำหรับในกรณีเซลล์พืชปกติ สามารถตรวจสอบโครงสร้างและส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ในเนื้อเยื่อพืชที่เก็บมาจากสวนที่มีประวัติการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนส โดยอาศัยวิธีการทาง Histopathology ซึ่งได้แก่การนำตัวอย่างพืชมาผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังกล่าวข้างต้น โดยการที่สามารถตรวจสอบเชื้อที่เจริญแบบแฝงภายในเนื้อเยื่อพืชที่มีพัฒนาการเจริญในระยะต่างๆ จะเป็นแนวทางที่สามารถทำให้การวางแผนควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถป้องกันกำจัดได้อย่างตรงเป้าหมาย

อย่างไรก็ตามหากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อได้แก่ สภาพอากาศร้อนและมีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศค่อนข้างสูง และในช่วงฤดูหนาวมีหมอกลงจัดในตอนเช้า แต่อุณหภูมิจะสูงขึ้นในช่วงกลางวัน ซึ่งเป็นสภาพภูมิอากาศที่พบในพื้นที่ปลูกของอำเภอพร้าว เป็นปัจจัยที่นอกเหนือการควบคุม สภาพแวดล้อมดังกล่าวจะส่งเสริมให้เชื้อที่เจริญแฝงอยู่นั้นปรากฏออกมาให้เห็นเป็นรอยแผลตามส่วนต่างๆ

ของมะม่วง ดังนั้นการวางระบบการควบคุมโรคในสภาพสวนจึงมีความจำเป็นต้องเลือกใช้วิธีการที่เหมาะสม เพื่อเป็นการกำจัดและลดปริมาณของเชื้อภายในสภาพสวนทั้งในเรื่องของการเลือกใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราและวิธีเขตกรรมที่เกี่ยวข้องกับการรักษาความสะอาดภายในสวน เพื่อไม่ให้เป็นแหล่งสะสมเชื้อโรค

การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่แยกได้จากสวนมะม่วง จำนวน 3 แหล่งปลูก ของอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง โดยสามารถแบ่งกลุ่มไอโซเลตของเชื้อแอนแทรคโนสที่แยกได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ให้ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเป็นสีเทาออกเขียว สร้างกลุ่มสปอร์ สีเหลืองรวมทั้งสิ้น 15 ไอโซเลต (P5Rn : P5R1 – P5R15) โดยให้ลักษณะของโคนิเดียหรือสปอร์รูปทรงกระบอกหัวท้ายมนมีความยาวตั้งแต่ 12 - 20 µm และกว้าง 3.5 - 6 µm รวมทั้งสิ้น 15 ไอโซเลต (P5Rn : P5R1 – P5R15) ซึ่งใกล้เคียงกับลักษณะของ *C. gloeosporioides* และกลุ่มที่มีลักษณะของโคโลนีบนอาหารโคนิเดียสีขาวปนเทา สร้างกลุ่มสปอร์สีส้ม โดยให้ลักษณะของโคนิเดียหรือสปอร์รูปค่อนข้างรีหัวท้ายแหลมมีความยาวตั้งแต่ 8 - 13 µm และกว้าง 2 - 5 µm รวมทั้งสิ้น 6 ไอโซเลต( P6Rn : P6R1 – P6R6) ซึ่งใกล้เคียงกับลักษณะของ *C .acutatum*

เพื่อเป็นการยืนยันผลถึงความถูกต้องในการจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุ จึงได้นำวิธีการทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธี polymerase chain reaction สำหรับคู่ของ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิด ของ *Colletotrichum* sp. คือคู่ primer ITS4-*Cg*Int (จำเพาะต่อ C. *gloeosporioides*) และคู่ primer ITS4-*Ca*Int2 (จำเพาะต่อ *C. acutatum*) และการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง โดยเมื่อทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8s –I TS2 แล้วย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ RsaI ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสได้ 2 ชนิด จากตัวอย่างมะม่วง คือ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* ซึ่งจะให้ PCR products ขนาด 450 และ 490 bp ในกลุ่มไอโซเลต P5Rn(1-15) และในกลุ่มไอโซเลต P6Rn (1-6) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมีมากกว่าหนึ่งชนิดจากแหล่งปลูกมะม่วงของอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่แยกได้จากสวนมะม่วงดังกล่าวที่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ *C. acutatum* ยังเป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่มีรายงานในศรีลังกาเป็นครั้งแรก (Jayasinghe and Fernando, 2009) โดยผลการศึกษาเป็นการยืนยันการจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกมะม่วงอำเภอพร้าวมีความแตกต่างกันอย่างน้อย 2 ชนิด คือ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* และทั้ง 2 ชนิดนี้เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบมะม่วงในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถทำให้เกิดรอยแผลไหม้สีน้ำตาลดำ (necrotic) และเกิดกลุ่มสปอร์ (spore masses) บนรอยแผลที่สังเกตได้ในระยะเวลา 5 ถึง 7 วันหลังการปลูกเชื้อ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผลแตกต่างกันออกไป โดยเชื้อ *C. acutatum* ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางรอยแผลที่มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* ซึ่งในสภาพสวนมะม่วง อาการรอยแผลแอนแทรคโนสที่ปรากฏบนใบก็มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสทั้งสองชนิด เป็นเชื้อราสาเหตุที่สำคัญในการเกิดโรคแอนแทรคโนส

ของแหล่งปลูกมะม่วงอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ จากเดิมที่เคยเข้าใจและมีรายงานว่าเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง เกิดจากเชื้อ *C. acutatum* เพียงชนิดเดียว ด้วยเหตุนี้จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่ผ่านมาให้ผลในการควบคุมโรคไม่ดีเท่าที่ควร เพราะมีเชื้อสาเหตุมากกว่าหนึ่งชนิดซึ่งส่งผลให้มีการต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ควบคุมโรคแตกต่างกัน จากรายงานของ Lydia และคณะ (2006) เชื้อรา *C. acutatum* มีความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราเช่น เบนโนมิล และ อะซ๊อกซี่สโตรบิน (อมิสตา) มากกว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่จัดว่าเป็น common species ของสาเหตุการเกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอีกหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *C. acutatum* มีความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิม ที่ใช้ในพืชหลายชนิด (Jayasinghe and Fernando, 2009) ซึ่งถือว่าเป็นจุดสำคัญในการจัดการระบบการควบคุมโรคในแต่ละพื้นที่ปลูก และทำให้สามารถตอบคำถามได้ว่าทำไมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น อมิสตา จึงใช้ไม่ได้ผลในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในบางพื้นที่ ดังนั้นการที่จะวางระบบการควบคุมโรคจึงมีความจำเป็นต้องทราบข้อมูลของตัวเชื้อสาเหตุที่แท้จริงก่อน วิธีการจำแนกชนิดของเชื้อตามวิธีการดั้งเดิมโดยยึดหลักทางลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ การนำวิธีการทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลมาช่วยในการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุจึงมีประโยชน์และจะทำให้ทราบความหลากหลายของพันธุกรรมของตัวเชื้อสาเหตุในกลุ่ม *Colletotrichum* ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น.

- **ปัญหาและอุปสรรคของการดำเนินการโครงการ**

เนื่องจากเครื่องมือทางด้านอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวหลายชุดไม่อยู่ในสภาพพร้อมใช้งาน ในช่วงระยะเวลาดำเนินการของโครงการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่อง gel electrophoresis และ ชุดถ่ายภาพ เป็นต้น ทำให้การดำเนินงานตามแผนในโครงการวิจัยล่าช้า และแผนที่จะพัฒนาห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลของสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ไม่สามารถดำเนินการต่อไปได้ อย่างไรก็ตาม คณะวิจัยของโครงการ ได้แก้ปัญหาโดยขอความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือจากหน่วยงานอื่นๆ เช่น ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการใช้เครื่องมือทางด้านอณูชีววิทยาระดับโมเลกุล และ ศูนย์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการกลาง และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร-กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ให้การสนับสนุนการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ซึ่งทำให้การดำเนินงานวิจัยสามารถดำเนินการต่อไปได้.

## 6. สรุปผลการทดลอง

การจัดการระบบการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองของอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ โดยการรักษาความสะอาดภายในสวนและการวางโปรแกรมการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมและสัมผัส สลับกันทุก 15 วันจนถึงระยะห่อผล สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ โดยความถี่ของเชื้อราแอนแทรคโนสที่ตรวจพบจากตัวอย่างมะม่วงระยะต่างๆมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสวนที่มีการปฏิบัติตามปกติของเกษตรกร อย่างไรก็ตามสภาพอากาศที่แปรปรวน ฝนที่ตกนอกฤดูกาล และหมอกลงจัดในช่วงเช้าในพื้นที่ปลูกมะม่วงอำเภอพร้าว เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของโรคที่มากขึ้นและเป็นสภาวะที่ไม่สามารถควบคุมได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสวนที่ไม่ได้รับการจัดการระบบการควบคุมโรค ยังคงแสดงให้เห็นว่าสวนที่มีการจัดการ สามารถควบคุมการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้

ผลการศึกษาการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides* ในช่วงระยะตัดแต่งกิ่งจนถึงระยะติดช่อดอกของสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองอายุ 5 ปีในแหล่งปลูกอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ในระหว่างเดือนตุลาคม 2552 ถึงกุมภาพันธ์ 2553 และเมื่อนำตัวอย่างใบและกิ่งมะม่วงที่เก็บในระยะต่างๆมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับการจำแนกชนิดโดยวิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถแยกเชื้อราแอนแทรคโนสที่มีความแตกต่างได้ 2 กลุ่ม โดยการตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราในระดับเนื้อเยื่อพืชด้วย compound microscope และ transmission electron microscope แสดงให้เห็นการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุในระดับเนื้อเยื่อ เริ่มจากการงอกของสปอร์หรือโคนิเดียจากผิวพืช สร้างโครงสร้างที่เรียกว่า appressorium เพื่อแทงทะลุ cuticle และผนังเซลล์พืช เข้าไปเจริญเป็นเส้นใยอยู่ภายใน (internal hypha) และผลจากการใช้เทคนิคพีซีอาร์และการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง โดยเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในช่วง ITS1-5.8s –I TS2 แล้วย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ Rsal ทำให้สามารถจำแนกตัวอย่างเชื้อราทั้งหมดที่ทำการตรวจสอบจำนวน 21 ไอโซเลต ออกเป็น 2 กลุ่ม จากนั้นใช้ไพรเมอร์สองชุดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในการจำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคที่พบ โดยไพรเมอร์ ITS-4/CaInt จำเพาะต่อเชื้อ *C. gloeosporiodes* ขณะที่ ไพรเมอร์ ITS-4/CaInt2 จำเพาะต่อเชื้อ C. *acutatum* จากผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ร่วมกับการใช้วิธี PCR สามารถจำแนกเชื้อราแอนแทรคโนสได้ 2 ชนิด จากเชื้อทั้งหมดที่แยกได้จาก ตัวอย่างมะม่วงที่เก็บในระยะการเจริญต่างๆจากสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองของแหล่งปลูกอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ โดยสามารถระบุได้ว่าเชื้อในกลุ่มไอโซเลต P5Rn คือ *C. gloeosporioides* และกลุ่มไอโซเลต P6Rn คือ *C. acutatum* และเชื้อทั้งสองชนิดสามารถทำให้เกิดอาการของโรคบนใบมะม่วง เมื่อนำมาปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ และเชื้อทั้งสองชนิดเป็นเชื้อราสาเหตุที่สำคัญในการเกิดโรคแอนแทรคโนส ในแหล่งปลูกมะม่วง อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่.

## ผลที่ได้จากการวิจัยและแนวทางงานวิจัยในอนาคต

สวนมะม่วงที่ใช้เป็นแปลงทดสอบของชมรมผู้ปลูกมะม่วงเพื่อการส่งออก อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ที่มีการวางระบบการควบคุมโรคโดยวิธีเขตกรรมและการวางโปรแกรมการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค หลังการตัดแต่งกิ่งจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ได้ดำเนินการวางระบบจัดการควบคุมโรค ได้แก่การจัดการเขตกรรมที่ดี โดยกำจัดเศษซากพืชหลังการตัดแต่งและวัชพืชออกจากแปลงและรักษาความสะอาดภายในแปลงอยู่เสมอ โดยกำจัดเศษใบที่ร่วงหล่นภายใต้ทรงพุ่มของต้น ไม่ให้มีการสะสมอยู่บริเวณโคนต้นและกลายเป็นแหล่งสะสมของของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ได้มีการวางโปรแกรมฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยฉีดพ่นสลับระหว่างสารชนิดสัมผัสและสารชนิดดูดซึม ทุก 2 สัปดาห์ ตั้งแต่หลังการตัดแต่งจนกระทั่งถึงระยะห่อผล พบว่าอัตราการเกิดโรคแอนแทรคโนสในแปลงทดสอบที่มีการวางระบบจัดการปีที่ 1 และ 2 มีอัตราการเกิดโรคลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับแปลงควบคุมที่มีการปฏิบัติดูแลตามปกติของเกษตรกร ที่ยังคงมีอัตราการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่สูง แต่ด้วยสาเหตุจากสภาพอากาศของอำเภอพร้าวที่มีฝนตกนอกฤดูกาลในช่วงฤดูปลูกที่ผ่านมาและมีหมอกจัดในฤดูหนาว แต่มีอุณหภูมิสูงขึ้นในช่วงกลางวัน ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุ จึงทำให้แปลงที่มีการวางระบบจัดการยังพบการเกิดโรคแอนแทรคโนสอยู่บ้าง อีกทั้งแปลงทดสอบอยู่ท่ามกลางสภาพแวดล้อมของสวนมะม่วงของเกษตรกรรายอื่นๆที่ยังคงมีการดูแลจัดการสวนตามปกติอย่างที่เคยปฏิบัติของเกษตรกร จึงทำให้แหล่งปลูกมะม่วงของอำเภอพร้าว ยังคงเป็นแหล่งของเชื้อโรคแอนแทรคโนส ดังนั้นการวางระบบจัดการควบคุมโรคแอนแทรคโนสให้ได้ผลจำเป็นต้องให้มีการปฏิบัติดูแลของเกษตรกรทุกรายเหมือนๆกัน และต้องทำอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 3 ปี อีกทั้งสภาพอากาศที่แปรปรวนในแต่ละฤดูกาลผลิต เป็นปัจจัยภายนอกที่ไม่สามารถควบคุมได้ การกำจัดแหล่งสะสมของเชื้อโรคให้หมดไปมากที่สุดหรือการทำความสะอาดพื้นที่ จะเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดปัญหาการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนสและจะสามารถลดปริมาณการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราลงได้ในอนาคต ซึ่งในพื้นที่ปลูกมะม่วงอำเภอพร้าวมีศักยภาพที่สามารถทำได้ เพราะเกษตรกรมีการร่วมกลุ่มเป็นชมรม หากมีการร่วมมือร่วมใจปฏิบัติในแนวทางเดียวกัน ปัญหาโรคแอนแทรคโนสในพื้นที่ก็จะลดลงและหมดไปในที่สุด

ผลจากการวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบลักษณะการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนส จากการตรวจสอบการเจริญแบบแฝงของเชื้อราสาเหตุจากตัวอย่างพืชที่เก็บจากทุกระยะการเจริญของมะม่วง ได้แสดงให้เห็นว่ามีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสอยู่แล้วในต้นพืช นอกจากนี้ยังมีโอกาสพบเชื้อราที่แพร่กระจายจากแหล่งอื่นมาตกลงบนผิวพืชและสามารถเข้าทำลายพืชซ้ำเติมได้อีก เชื้อราสามารถเจริญภายในเนื้อเยื่อพืชและรอโอกาสที่ปรากฏออกมาเมื่อพืชอยู่ในระยะการเจริญเติบโตที่เต็มที่ ซึ่งในสภาพสวนจะสามารถพบอาการของโรคที่ชัดเจนในใบที่เจริญเต็มที่และผลแก่หรือผลหลังการเก็บเกี่ยว ด้วยเหตุที่เชื้อมีการเจริญแบบแฝงอยู่แล้วในทุกส่วนและทุกระยะการเจริญของพืช หากเราสามารถตรวจสอบว่าภายในสวนมีการแฝงตัวของเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสอยู่แล้ว ตั้งแต่ระยะที่ยังไม่ตรวจพบอาการของโรคออกมาให้เห็น ก็จะช่วยให้การวางระบบการควบคุมโรคในสวนมะม่วงได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นการแก้ปัญหาตั้งแต่ต้นเหตุ

การนำวิธีการทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อราสาเหตุโรคพืช ได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เพราะให้ผลความถูกต้องมากกว่าวิธีการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุแบบเดิมที่อาศัยการตรวจสอบจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก เพราะปัจจุบันมีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อราก่อโรคแต่ละชนิดมีความหลากหลายในสายพันธุ์และมีผลต่อวิธีการควบคุมโรค เพราะเชื้อแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสารเคมีที่ใช้ป้องกันกำจัดไม่เหมือนกัน และเป็นเหตุผลที่ว่าทำไมสารเคมีชนิดเดียวกันที่ใช้ควบคุมโรคในพื้นที่หนึ่งได้ผลดี แต่กลับไม่สามารถควบคุมโรคได้ในอีกพื้นที่หนึ่ง ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่มีความแตกต่างกันอย่างน้อย 2 ชนิดคือ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* ซึ่งจากรายงานในต่างประเทศเชื้อ *C. acutatum* มีความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึม (Jayasinghe and Fernando, 2009) ได้แก่ กลุ่มคาร์เบนดาซิม และอะซ๊อกซี่สโตรบิน (Amista ) ที่นิยมใช้กันแพร่หลายในกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกมะม่วง โดยเฉพาะพื้นที่ภาคเหนือตอนบน ได้ดีกว่า *C. gloeosporioides*

**แนวทางการพัฒนาต่อไป**

การตรวจสอบเบื้องต้นหรือทำ early detection มีความสำคัญในแง่ของการคัดกรองผลมะม่วงที่มีเชื้อก่อโรคเจริญแฝงอยู่ โดยเฉพาะเชื้อแอนแทรคโนสในมะม่วงซึ่งอยู่ในระยะเก็บเกี่ยว เตรียมที่จะส่งออกจำหน่ายทั้งตลาดภายในและนอกประเทศ หลักการก็คือการตรวจสอบการมีอยู่ของเชื้อในเนื้อเยื่อผิวของผล โดยอาศัยหลักการทำ PCR ที่มีความไวในการตรวจสอบหรือ sensitivity สูงมากๆ (high sensitivity PCR) และเป็นแนวทางในการพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อแบบรวดเร็ว สามารถตรวจสอบเชื้อจากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะม่วงได้โดยตรง และมีความไวและความแม่นยำสูงในการตรวจสอบ

แนวทางในการพัฒนาต่อไปจากผลที่ได้จากการวิจัยนี้ คือการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสโดยวิธีการสุ่มตัวอย่างจากแต่ละแหล่งปลูก ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้งผิวและเนื้อของผล แช่ในสารละลายที่จะทำหน้าที่รักษาสภาพ(preserve)ของเซลล์เนื้อเยื่อ และทำหน้าที่เป็น lysis reagent ไปในตัว แล้วนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้ high sensitivity PCR และตรวจสอบผลด้วย gel electrophoresis ขั้นตอนทั้งหมดสามารถดำเนินการแล้วเสร็จภายในเวลา 2 วัน วิธีการนี้ให้ความถูกต้องแม่นยำในระดับสูงเนื่องมาจากการออกแบบ specific primers ที่มีความจำเพาะกับเชื้อราแต่ละชนิด และการมี positive และ negative control ในชุดการทดสอบแต่ละครั้ง จะสามารถให้ข้อมูลได้ว่ามะม่วงจากแหล่งผลิตดังกล่าวมีเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสแฝงอยู่หรือไม่ วิธีการนี้สามารถให้ข้อมูลในเชิงคุณภาพและปริมาณ (qualitative and quantitative ) แต่ยังต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะทางและการทำงานในห้องปฏิบัติการร่วมด้วย

หลักการที่เป็นไปได้ สำหรับการทำ early detection อีกประการหนึ่งก็คือ การสร้างชุดทดสอบ (test kit) ที่สามารถตรวจสอบได้เสร็จสิ้นกระบวนการทั้งหมดในแปลงปลูก หรือที่โกดังที่เก็บรวบรวมผลผลิตเพื่อเตรียมส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ โดยอาศัยการเก็บตัวอย่างในลักษณะเดียวกัน คือจากผิวเปลือกและ

เนื้อเยื่อตื้นๆของผลมะม่วงอย่างสุ่ม แล้วนำมาผ่านขบวนการย่อยสลาย (lysis)ในสารละลายที่เตรียมสำหรับการสกัด DNA ของเชื้อราออกจากเนื้อเยื่อพืช แล้วใช้แถบกระดาษ (paper strip) ที่เคลือบสารที่มีความจำเพาะต่อเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส ซึ่งจะทำให้สามารถระบุการมีอยู่ของเชื้อราในเนื้อเยื่อพืชได้ แต่วิธีการนี้สามารถให้ข้อมูลในเชิงคุณภาพเท่านั้น โดยหลักการนี้ แม้ว่าจะให้ผลในการตรวจสอบที่รวดเร็ว แต่ยังมีข้อจำกัดบางประการเกี่ยวกับข้อจำกัดของจำนวนเชื้อที่เจริญแฝงอยู่ในชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อที่นำมาตรวจสอบ และค่าใช้จ่ายในการพัฒนาชุดตรวจสอบ.

# เอกสารอ้างอิง

หทัยชนก คงแก้ว 2546. การพัฒนาชุดไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจ *Colletotrichum* spp. บนเมล็ดพริก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย 68 หน้า.

Baayen R.P., Bonants, P.J.M., Verkley, G., Carroll, G.C., van der Aa HA, de Weerdt M., van Brouwershaven, I.R., Schutte, G.C., Maccheroni, W., Glienke de Blanco, C. and Joseph, S. and MacCallum, P. 2001. Molecular Cloning : A Laboratory Manual *(Third Edition)* CSH press USA.

Barnet, H.L. and B. Barry. 2003. IIlustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. APS Press, St. Paul, MN. pp. 188-191.

Freeman,S., T.Katan, and E.Shabi. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. *Plant Dis. 82, 596-605.*

Freeman, S., Minz, D.,Jurkevitch, E., Maymon, M., and Shabi, E. (2000). Molecular Analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits*. Phytopathol*. 90(6):608-614.

Jayasinghe, C.K., and Fernando, T.H.P.S. (2009). First Report of *Colletotrichum acutatum* on *Mangifera indica* in Sri Lanka. *Cey.J.Sci. (Bio. Sci.) 38 (1): 31 – 34.*

Jitareerat P., Wongs-Aree, C. and Sangchote, S. 2006. Detection of quiescent infection of *Colletotrichum gloeosporioides* on green mango fruit by polymerase chain reaction. *ISHS Acta Horticulturae. 712: 927 – 936.*

Kumar, A. S., Reddy, N. P. E., Reddy, K. H., and Devi, M. C. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathol. Bull. 16: 157-160.*

Lydia, I.R., Yanaliz, L.N., Robert, J.M., Teresa, S. and Michael, J.D. 2006. Occurrence and Distribution of *Colletotrichum* spp. on mango (*Mangifera indica* L.,) in Puerto Rico and Florida,USA. *Plant Pathol. 5(2): 191 -198.*

Pandey, A.K., Sudhakara R.M. and Suryanarayanan, T.2003. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic Phyllosticta from different tropical trees. *Mycology Research. 107 (4): 439 – 444.*

Thomas H. E. and D. G. Eickbush. 2007. Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes. *Genetics, Vol. 175: 477-485.*

Whitelaw-Weckert, M., S. Curtin, R. Huang, C. Steel, C. Blanchard, and P. Roffey. 2007. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Collectotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathol. 56, 448-463.*

# ภาคผนวก

**ตารางแสดง** การเก็บตัวอย่างมะม่วงในระยะการเจริญเติบโตต่างๆ และการฉีดพ่นสารเคมีควบคุมโรคแอนแทรคโนส ภายในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่

| ครั้งที่ | วันที่เก็บตัวอย่าง | ประเภทของตัวอย่าง | วันที่พ่นสารเคมี | ชนิดสารเคมี |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 5 ต.ค. 2552 | ยอด กิ่ง ใบ | 13 ต.ค. 2552 | คอปเปอร์ออกซี่คลอไรด์ |
| 2 | 21 ต.ค. 2552 | กิ่ง ใบ | 27 ต.ค. 2552 | คาร์เบนดาซิม (ผง) |
| 3 | 6 พ.ย. 2552 | กิ่ง ใบ | 10 พ.ย. 2552 | แมนโคเซป |
| 4 | 24 พ.ย. 2552 | กิ่ง ใบ | 26 พ.ย. 2552 | อมิสตา |
| 5 | 9 ธ.ค. 2552 | กิ่ง ใบ | 12 ธ.ค. 2552 | คอปเปอร์ออกไซด์ |
| 7 | 23 ธ.ค. 2552 | กิ่ง ใบ | 25 ธ.ค. 2552 | อมิสตา |
| 8 | 6 ม.ค. 2553 | กิ่ง ใบ ช่อดอก | 6 ม.ค. 2553 | โปรคลอราซ |
| 9 | 2 ก.พ. 2553 | กิ่ง ใบ ช่อดอก | 2 ก.พ. 2553 | คาร์เบนดาซิม |
| 10 | 18 ก.พ. 2553 | ใบ ผลอ่อน | 18 ก.พ. 2553 | แมนโคเซป |
| 11 | 3 มี.ค. 2553 | ใบ ผลอ่อน | 3 มี.ค. 2553 | โปรคลอราซ |