การใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยชีววิธี

APPLICATION OF GEL ELECTROPHORESIS FOR IDENTIFICATION OF *COLLETOTRICHUM* SPP. AND BIOLOGICAL CONTROL OF MANGO ANTHRACNOSE 'S CAUSAL AGENT

T034560

วีระณีย์ ศรีพรมสุข

VEERANEE SRIPROMSUK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2542

ISBN 974-622-573-1

ลขหมู่.....
ลขทะเบียน 34560
น, เดือน, ปี 16 พ.ย. 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการ
ค้า การโฆษณา หรือดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

APPLICATION OF GEL ELECTROPHORESIS FOR IDENTIFICATION OF *COLLETOTRICHUM* SPP. AND BIOLOGICAL CONTROL OF MANGO ANTHRACNOSE 'S CAUSAL AGENT

VEERANEE SRIPROMSUK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN PLANT PEST MANAGEMENT TECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
1999

ISBN 974-622-573-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 1999

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยชีววิธี
ชื่อนักศึกษา	นางสาววีระณีย์ ศรีพรมสุข
รหัสประจำตัว	38065302
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
พ.ศ.	2542
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. เกษม สร้อยทอง
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ. ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร
	ผศ. ดร. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์

บทคัดย่อ

จากการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 24 isolates โดยสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีส และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราด้วยวิธี cluster analysis พบว่าสามารถใช้เทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีสในการแบ่งกลุ่มของเชื้อราได้ตามตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ปรากฏ ซึ่งเชื้อราดังกล่าวได้ถูกแบ่งเป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ *กลุ่มที่ 1* มี 8 isolates ได้แก่ C007-1 (ส้มโชกุน ตาก), St002 (สตรอเบอรี่), C004 (ส้มเขียวหวาน แพร่), Pea001 (ถั่วลิสง), C003 (ส้มเขียวหวาน แพร่), Sb001 (โหระพา), Sb002 (โหระพา) และ C005 (ส้มโอ) *กลุ่มที่ 2* มี 13 isolates ได้แก่ A001 (วาสนา), A003 (อมรเบิกฟ้า), M001 (มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์), Pep001 (พริกไทย), M003 (มะม่วงพันธุ์อกร่อง), Pay001 (มะละกอ), C001 (ส้มโชกุน ลำปาง), C007-2 (ส้มโชกุน ตาก), C006-1 (ส้มเขียวหวาน ตาก), Bf001 (ตาลแดง), Sap001 (ชมพู่), A002 (หนวดปลาหมึก) และ M002-2 (มะม่วงพันธุ์เขียวเสวย) *กลุ่มที่ 3* มี 2 isolates ได้แก่ Ban001 (กล้วยน้ำว้า) และ C002 (ส้มโชกุน ลำปาง) และ *กลุ่มที่ 4* มี 1 isolate ได้แก่ Ft001 (ปาล์มหางหมาป่า) ซึ่งจากการจัดกลุ่มของเชื้อราดังกล่าวข้างต้น พบว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่อยู่ในกลุ่มที่ 2 มีความสอดคล้องกับกลุ่มของเชื้อราที่ทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ โดยเฉพาะใน isolate M002-2 ซึ่งทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงที่สุด รองลงมาคือ isolate M001 และ A001 ตามลำดับ ซึ่ง isolate M002-2 ดังกล่าวยังสามารถทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสกับพืชอาศัยชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ละมุด ฝรั่ง มะกอกน้ำ ขนุน มะเขือเทศ พริกหยวก และถั่วลิสง เป็นต้น นั่นแสดงว่า มีความเป็นไปได้ในการที่จะนำเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีสมาใช้เพื่อแยกกลุ่มของเชื้อราตามตำแหน่งของโปรตีนได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความรวดเร็วและแม่นยำกว่าวิธีการแบ่งแยกทางสัณฐานวิทยาซึ่งใช้แต่ลักษณะภายนอกเท่านั้น และจากการทดสอบหาสภาพอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 และจุลินทรีย์ต่อต้าน ได้แก่ *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China พบว่าเชื้อราทุกชนิดสามารถเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร PDA ที่ระดับ pH 6-7 เมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim บนสภาพอาหารดังกล่าวของเชื้อราทั้งหมด พบว่า *C. gloeosporioides* M002-2, *T. harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China มีความต้านทานต่อ carbendazim ได้ถึงระดับความเข้มข้น 0.8 ppm ในขณะที่ *Ch. globosum* Cg8 และ *Ch. cupreum* Cc9 มีความต้านทานต่อ carbendazim ที่ระดับความเข้มข้น 0.4 ppm เท่านั้น

จากการทดสอบศักยภาพของจุลินทรีย์ต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 โดยวิธี bi-culture บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ทั้ง *Ch. globosum* และ *Ch. cupreum* มีศักยภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตได้ 60 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อโรคพืชได้ 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุดถึง 90 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Application of Gel Electrophoresis for Identification of *Colletotrichum* spp. and Biological Control of Mango Anthracnose's causal agent
Student	Miss Veeranee Sripromsuk
Student ID.	38065302
Degree	Master of Science
Programme	Plant Pest Management Technology
Year	1999
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Kasem Soythong
Thesis Co-advisor	Asst. Prof. Dr. Tanimnun Jeanaksorn
	Asst. Prof. Dr. Wirat Phuwiwat

ABSTRACT

Comparative identification of 24 *Colletotrichum* isolates were studied by using morphological and gel electrophoresis methods. According to cluster analysis of protein bands, the 24 isolates were classified into 4 groups as follows: *Group 1* there were 8 isolates namely; C007-1 (tangerine ,Tak), St002 (strawberry), C004 (tangerine, Phrae), Pea001 (peanut), C003 (tangerine, Phrae), Sb001 (sweet basil), Sb002 (sweet basil), and C005 (pomelo). *Group 2* there were 13 isolates namely, A001 (dracaena), A003 (mandivila), M001 (mango var. Chokanan), Pep001 (pepper), M003 (mango var. Ok-rong), Pay001 (papaya), C001 (tangerine, Lampang), C007-2 (tangerine, Tak), C006-1 (tangerine, Tak), Bf001 (red latan palm), Sap001 (rose apple), A002 (scheffera) and M002-2 (mango var. Kheow-sa-wei) *Group 3* there were 2 isolates namely, Ban001 (banana) and C002 (tangerine, Lampang) and *Group 4* there was 1 isolate namely, Ft001 (fox tail palm). *C. gloeosporioides* in Group 2 was closely related to the virulent isolates for mango var. Chokanan in pathogenicity tests, especially isolate M002-2 showed the highest disease incidence and followed by isolate M001 and A001, respectively. Moreover, the virulent isolate M002-2 also showed to cause the anthracnose symptoms on various tested host plants such as, tangerine, sapodilla, guava, *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz., jack fruit, tomato, sweet pepper and peanut. From the above result, it can be concluded that gel electrophoresis technique could be

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

employed for classifying the fungal pathogen into groups according to the bands of protein present in the fungi. This technique is quite rapid and more accurate than morphological classification since this technique is based on fungal proteins. From the effect of different media and acidity levels on the growth of *C. gloeosporioides* M002-2 and antagonistic fungi, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 and transformant of *T. harzianum* China were conducted *in vitro*. It was shown that the suitable medium and acidity level for the growth of colony and spore production of all tested fungi were potato dextrose agar at pH 6-7. The resistance to carbendazim of those fungi were also tested on potato dextrose agar. The results showed that *C. gloeosporioides* M002-2., *T. harzianum* T88-2 and transformant of *T. harzianum* China (carried R-gene to carbendazim) had the highest resistance to chemical fungicide, carbendazim, upto 0.8 ppm. whereas *Ch. globosum* Cg8 and *Ch. cupreum* Cc9 showed the resistance to carbendazim only at 0.4 ppm.

The potential of antagonistic fungi against *C. gloeosporioides* was tested using bi-culture method on PDA amended with carbendazim. Results showed that *Ch. globosum* and *Ch. cupreum* inhibited 60 percent of *C. gloeosporioides* growth and 80 percent of spore production whereas the highest potential of inhibition, 90 percent, was observed in *T. harzianum*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. เกษม สร้อยทอง อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร และ ผศ. ดร. วิรัตน์ ภูวิวัฒน์ อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี และขอขอบคุณ Prof. Dr. Yang Qian สถาบันเทคโนโลยีฮาร์บิน สาธารณรัฐประชาชนจีน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรา transformant of *Trichoderma harzianum* China ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มี R-gene to carbendazim มาทดสอบในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และสิ่งแวดล้อม ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการทำแห้งตัวอย่างเชื้อรา ตลอดจน ขอขอบพระคุณ ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ดร. สุพร นุชดำรงค์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

ขอขอบคุณ ดร. สุรพล เศรษฐบุตร ภาควิชาเทคนิคเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราด้วยวิธี cluster analysis ในโปรแกรม SPSS

ขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาทุกคนที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

วีระณีย์ ศรีพรมสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... VIII

สารบัญภาพ..... XI

สารบัญตารางผนวก..... XIV

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 4

1.3 ขอบเขตการวิจัย..... 4

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

การศึกษาการจำแนกเชื้อรา สภาพที่เหมาะสม

และความสามารถทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Colletotrichum* spp..... 5

การศึกษาการจำแนกเชื้อราโดยใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีส..... 7

การศึกษาการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum* และเชื้อโรคพืชชนิดอื่นๆ

โดยใช้จุลินทรีย์ต่อต้าน..... 9

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 11

บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 19

4.1 การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืช

ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ..... 19

4.1.1 การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา..... 19

4.1.2 การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

โดยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีส..... 45

4.2 การทดสอบหาสายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

isolates ต่างๆ ต่อการเกิดโรครุนแรงบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์..... 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* isolate M002-2 บนพืชอาศัย (host range) ชนิดอื่นๆ 55

4.4 การทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 60

4.5 การทดสอบความต้านทานต่อสารเคมี carbendazim ของจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 71

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหารผสมสารเคมี carbendazim (Bi-culture test with chemical) 78

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย 88

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 97

เอกสารอ้างอิง 102

ภาคผนวก 109

ภาคผนวก ก ตารางข้อมูล 110

ภาคผนวก ข สูตรสารละลาย 115

ประวัติผู้เขียน 117

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 แสดงเชื้อ *Colletotrichum* species ต่างๆ ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิดกัน..... 20

4.2 แสดงการปรากฏและไม่ปรากฏแถบโปรตีนของเชื้อรา *Colletotrichum* และ *Chaetomium cupreum* ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบโปรตีนเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบโปรตีนเป็น 0..... 49

4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ความถี่ของการเกิดและไม่เกิดแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันบางตำแหน่งของเชื้อราทั้ง 4 กลุ่ม..... 50

4.4 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนใบมะม่วงโซคอนันต์หลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* isolates ต่างๆ โดยวิธี detached leaves เป็นเวลา 10 วัน..... 52

4.5 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนพืชอาศัยประเภทไม้ผลหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 โดยวิธี detached leaves หรือ detached fruits..... 56

4.6 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนพืชอาศัยประเภทพืชผักและถั่วลิสงหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 โดยวิธี detached leaves หรือ detached fruits..... 56

4.7 แสดงค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหารที่มีระดับ pH แตกต่างกัน ที่อายุ 4 วัน..... 66

4.8 แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนอาหารที่มีระดับ pH แตกต่างกัน ที่อายุ 25 วัน..... 67

4.9 แสดงค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 6 วัน..... 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.10 แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 25 วัน 73

4.11 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ 73

4.12 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Chaetomium globosum* Cg8 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน 80

4.13 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Chaetomium globosum* Cg8 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน 80

4.14 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Chaetomium cupreum* Cc9 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน 81

4.15 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Chaetomium cupreum* Cc9 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน 81

4.16 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Trichoderma harzianum* T88-2 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน 82

4.17 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Trichoderma harzianum* T88-2 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน 82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.18 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ transformant of *Trichoderma harzianum* China ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 20 วัน..... 83

4.19 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ transformant of *Trichoderma harzianum* China ที่มีผลต่อเชื้อ.*Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 20 วัน..... 83

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

3.1 แสดงเครื่องมือการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส 12

4.1 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate A001 21

4.2 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate A002 22

4.3 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate A003 23

4.4 แสดงเชื้อ *Colletotrichum musae* Isolate Ban001 24

4.5 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate Bf001 25

4.6 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate C001 26

4.7 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate C002 27

4.8 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate C003 28

4.9 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate C004 29

4.10 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate C005 30

4.11 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate C006-1 31

4.12 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate C007-1 32

4.13 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate C007-2 33

4.14 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate Ft001 34

4.15 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate M001 35

4.16 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate M002-2 36

4.17 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate M003 37

4.18 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate Pay001 38

4.19 แสดงเชื้อ *Colletotrichum lindemuthianum* Isolate Pea001 39

4.20 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate Pep001 40

4.21 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate Sap001 41

4.22 แสดงเชื้อ *Colletotrichum dematium* Isolate Sb001 42

4.23 แสดงเชื้อ *Colletotrichum dematium* Isolate Sb002 43

4.24 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioiodes* Isolate St002 44

4.25 แสดงการเกิดแถบโปรตีนของเชื้อ *Colletotrichum* isolates ต่างๆ
โดยเทคนิค SDS-PAGE 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.26 แสดงการเกิดแถบโปรตีนของเชื้อ *Colletotrichum* isolates ต่างๆ โดยเทคนิค SDS-PAGE 47

4.27 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Colletotrichum* 24 isolates และ *Chaetomium cupreum* (control) 48

4.28 แสดงการเกิดโรคบนใบมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์หลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* isolates ต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน 53

4.29 แสดงการเกิดโรคบนใบมะม่วงเขียวเสวยหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเวลา 10 วัน 54

4.30 แสดงการเกิดโรคบนพืชอาศัยประเภทไม้ผลหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 57

4.31 แสดงการเกิดโรคบนพืชอาศัยประเภทพืชผักและถั่วลิสงหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 58

4.32 แสดงการเข้าทำลายของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนผลฝรั่งที่อายุ 8 วัน 59

4.33 แสดงเชื้อ *Chaetomium globosum* Cg8 62

4.34 แสดงเชื้อ *Chaetomium cupreum* Cc9 63

4.35 แสดงเชื้อ *Trichoderma harzianum* T88-2 64

4.36 แสดงเชื้อ transformant of *Trichoderma harzianum* China 65

4.37 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 ที่อายุ 4 วัน 68

4.38 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Chaetomium globosum* Cg8 (บน) และ *Chaetomium cupreum* Cc9 (ล่าง) ที่อายุ 4 วัน 69

4.39 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Trichoderma harzianum* T88-2 ที่อายุ 4 วัน (บน) และ transformant of *T. harzianum* China ที่อายุ 30 วัน (ล่าง) 70

4.40 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 6 วัน 74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.41 แสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านบนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 75

4.42 แสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านบนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 6 วัน..... 76

4.43 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความต้านทานต่อสารเคมี carbendazim ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 *Chaetomium globosum* Cg8 *Ch. cupreum* Cc9 *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *Trichoderma harzianum* China..... 77

4.44 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Chaetomium* ร่วมกับ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน..... 84

4.45 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Trichoderma harzianum* T88-2 ร่วมกับ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน..... 85

4.46 แสดงเชื้อ *Trichoderma harzianum* T88-2 พันรัดเส้นใยของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 ที่อายุ 6 วัน: 400 เท่า..... 86

4.47 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ transformant of *Trichoderma harzianum* China (อายุ 30 วัน) ร่วมกับ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 (อายุ 20 วัน) บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ 87

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวกที่ หน้า

1 ก. แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหารชนิดต่างๆ ที่อายุ 4 วัน..... 110

2 ก. แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนอาหารชนิดต่างๆ ที่อายุ 25 วัน..... 111

3 ก. ANOVA แสดงค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichodermaharzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหารชนิดต่างๆ ที่อายุ 4 วัน..... 112

4 ก. ANOVA แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนอาหารชนิดต่างๆ ที่อายุ 25 วัน..... 112

5 ก. แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim..... 113

6 ก. แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim..... 113

7 ก. แสดงการเจริญเติบโต (ซม.) ของ transformant of *Trichoderma harzianum* China บน PDA ผสมสารเคมี carbendazim..... 114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นไม้ผลที่นิยมปลูกกันมากในประเทศไทย ซึ่งสามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศ และสามารถปลูกได้ดีในดินแทบทุกชนิด อีกทั้งยังทนต่อความแห้งแล้งและทนน้ำได้ดีพอสมควร การปลูกมะม่วงนอกจากจะปลูกไว้เพื่อบริโภคภายในประเทศนับตั้งแต่ปลูกไว้ในบริเวณบ้านและปลูกเพื่อการค้าเป็นสวนขนาดใหญ่แล้ว ก็ยังสามารถส่งเป็นสินค้าออกได้อีกด้วย ซึ่งพบว่าสามารถทำรายได้ให้ประเทศในปีหนึ่งๆ คิดเป็นเงินหลายล้านบาทเดียว โดยแหล่งผลิตมะม่วงที่สำคัญของไทย ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ราชบุรี ปทุมธานี นครราชสีมา เชียงใหม่ และปราจีนบุรี ซึ่งผลผลิตมะม่วงที่สามารถส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศมีทั้งมะม่วงสด และมะม่วงบรรจุกระป๋อง โดยมะม่วงสดมีประเทศลูกค้าที่สำคัญ ได้แก่ ฮ่องกง มาเลเซีย สิงคโปร์ ญี่ปุ่น และไต้หวัน ส่วนมะม่วงบรรจุกระป๋องมีประเทศลูกค้าที่สำคัญ คือ ออสเตรเลีย แคนาดา เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา (อารมณ์, 2537) นอกจากนี้ยังพบว่าหลายๆ ประเทศในเขตร้อนก็นิยมปลูกมะม่วงกันมากเช่นเดียวกัน และในปัจจุบันนี้การผลิตมะม่วงของประเทศไทยได้รับการพัฒนาขึ้นเป็นอย่างมาก ซึ่งเป็นผลมาจากความร่วมมือในการค้นคว้าวิจัยไม้ผลชนิดนี้จากหลายๆ ฝ่ายที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขยายพันธุ์มะม่วง ตลอดจนการคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ การเปลี่ยนยอดพันธุ์ การดูแลรักษาให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ การบรรจุหีบห่อที่ดี และการส่งเสริมทางด้านการตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ โดยมีมะม่วงหลายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาและเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ พันธุ์น้ำดอกไม้ เขียวเสวย อกร่อง หนังกลางวัน พิมเสน แรด และโชคอนันต์ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้การผลิตมะม่วงจะได้รับการพัฒนาอย่างที่กล่าวมาแล้ว ปัจจัยหนึ่งซึ่งจะมีผลต่อการจำกัดการผลิตทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของมะม่วง นั่นก็คือปัญหาจากโรคพืช ซึ่งพบว่าได้สร้างความเสียหายให้แก่มะม่วงเป็นจำนวนมากในแต่ละปี

สำหรับกลุ่มสาเหตุโรคพืชที่นับว่ามีความสำคัญมากที่สุดคือสาเหตุจากเชื้อรา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะม่วงที่สำคัญหลายโรค เช่น โรคใบจุด โรครากเน่า โรคยางไหล โรคราดำ และโรคผลเน่า ส่วนโรคที่มีความสำคัญมากเป็นอันดับหนึ่งคือโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. และเป็นชื่อเรียกลักษณะอาการของโรคที่มีแผลเป็นจุดมีขอบเขต การเรียกชื่อโรคนี้จะจำกัดเฉพาะโรคที่เกิดกับเชื้อราที่มีการสร้าง conidia บน fruiting structure ที่มีลักษณะคล้ายจานก้นลึกที่เรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acervulus ได้แก่เชื้อราใน genus *Pestalotia, Melanconium* และ *Epicoccum* เป็นต้น สำหรับเชื้อรา *Colletotrichum* นี้ก็เป็นเชื้อราอีก genus หนึ่งที่รู้จักกันมานาน และในปัจจุบันพบว่าเชื้อดังกล่าวนอกจากจะทำความเสียหายให้แก่มะม่วงแล้วยังสามารถทำความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจอื่นๆ ได้อย่างกว้างขวางนับตั้งแต่พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผล โดยสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะของการเจริญเติบโตและทุกส่วนของพืช (Bailey and Jeger,1992) โรคนี้พบว่าเชื้อสาเหตุเริ่มแรก (primary inoculum) มักจะติดมากับเมล็ดจากต้นที่เป็นโรค (seed borne) (Balardin *et al.*,1997) หรือเชื้อดำรงชีพอยู่บนเศษซากพืชที่ตกค้างอยู่บนดิน และจะระบาดได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้นและมีฝนตกชุก หรือมีหมอกลงจัด โดยมักจะปลิวไปกับลม ฝน หรือติดมากับแมลง ตลอดจนเครื่องมือการเกษตรต่างๆ นอกจากนั้นยังเป็นโรคที่สำคัญหลังการเก็บเกี่ยว (post-harvest) ของพืชแทบทุกชนิดอีกด้วย ซึ่งจะทำให้ผลไม้เน่าเกิดความเสียหายมาก

ถึงแม้พืชที่เป็นโรคนี้จะแสดงอาการแตกต่างกันตามชนิดและตามส่วนของพืชที่เชื้อราเข้าทำลายแต่การเรียกชื่อก็ยังคงเรียก "แอนแทรคโนส" ตามชื่อที่เป็นสาเหตุดังกล่าว ลักษณะอาการที่เกิดกับพืชมักแสดงอาการเป็นแผลจุด (spot) หรือแผลลามทำให้เกิดอาการแห้งตาย (blight) แผลจะมีสีน้ำตาลหรือดำ บางครั้งจะเห็น fruiting structure สีดำเรียงตัวกันเป็นวงๆ ที่แผล สำหรับแผลที่เกิดกับพืชอวบน้ำหรือผลไม้แผลมักจะมีลักษณะบุ๋มยุบลงไปในเนื้อเยื่อพืชและเชื้อรามักสร้างสารที่เป็นเมือกเหนียวๆ (slime masses) สีชมพูอมส้มปกคลุม conidia

จากสาเหตุที่เชื้อรา *Colletotrichum* สามารถเข้าทำลายพืชได้อย่างกว้างขวางโดยพืชชนิดหนึ่งๆ อาจถูกเชื้อ *Colletotrichum* หลายๆ species เข้าทำลาย ตัวอย่างเช่น สตรอเบอร์รี่ในประเทศสหรัฐอเมริกา และอิสราเอล ซึ่งมีเชื้อสาเหตุโรคถึง 3 ชนิดคือ *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* (Freeman and Katan, 1997; King *et al.*, 1997) ในทำนองเดียวกันเชื้อ *Colletotrichum* ชนิดหนึ่งๆ ก็มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิดได้เช่นเดียวกัน ดังเช่นรายงานของ Adaskaveg and Hartin (1997) และ Timmer *et al.* (1998) ที่พบว่าเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของอัลมอนด์ (almond) ท้อ ถั่วพีแคน (pecan) แอปเปิ้ล และสตรอเบอรี่ เกิดจากเชื้อราชนิดเดียวกันคือ *C. acutatum* จากสาเหตุนี้เองจึงทำให้เกิดความสับสนในการจำแนกเชื้อ *Colletotrichum* ขึ้น ถึงแม้ว่านักโรคพืชบางกลุ่มได้ทำการจำแนกเชื้อโดยอาศัยอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน หรืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (optimal temperature) แตกต่างกัน ตลอดจนการผลิตสารบางอย่างหรือ pigment ของเชื้อราเข้ามาร่วมด้วย เช่น *C. acutatum* มักจะสร้างสารสีแดงบนอาหาร ซึ่งต่างจาก *C. gloeosporioides* ที่พบว่า culture มักมีสีขาวถึงเทาเข้มและมักมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่า *C. acutatum* (Freeman *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามปัญหาดังกล่าวก็ไม่ได้หมดไป เนื่องจากเชื้อราถึงแม้จะเป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างพืชอาศัยหรือต่างสภาพการเจริญเติบโตก็จะมีผลทำให้สีของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

culture ขนาด และรูปร่างของสปอร์ตลอดจนลักษณะโครงสร้างต่างๆ แตกต่างกันได้ (Surveyer, *et al.*, 1995; Adaskaveg and Hartin, 1997; Freeman, *et al.*, 1998) ซึ่งการจัดจำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เพียงอย่างเดียวอาจจะไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่าง specie ได้ ด้วยข้อจำกัดต่างๆ ที่กล่าวมาเหล่านี้จึงได้นำเอาเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) เข้ามาช่วยเพื่อจำแนกเชื้อราให้ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว รวมทั้งเพื่อสนับสนุนงานด้านอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Colletotrichum* ในอนาคตด้วย

และเนื่องจากเชื้อรา *Colletotrichum* ทำให้พืชเกิดความเสียหายได้อย่างกว้างขวางตามที่กล่าวมาแล้ว จึงทำให้เกิดการระบาดของโรคแอนแทรคโนสเป็นไปอย่างกว้างขวางเช่นเดียวกัน และเป็นผลทำให้เกษตรกรมีการใช้สารเคมีเข้ามาควบคุมโรคดังกล่าวมากขึ้นในแต่ละปี ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าสารเคมีนอกจากจะให้ผลดีในการป้องกันกำจัดโรคพืชแล้ว ส่วนมากยังก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ ตามมามากมาย เช่น การเกิดมลพิษในสภาพแวดล้อม การมีพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์เกษตร ตลอดจนเป็นต้นเหตุชักนำให้จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวได้ด้วย เพราะฉะนั้นในด้านการป้องกันกำจัด จึงน่าจะนำเอาวิธีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเข้ามาใช้เพื่อให้สอดคล้องกับกระแสของโลกที่มุ่งเน้นให้มีการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในการจัดจำแนกเชื้อ *Colletotrichum* spp. โดยใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีสร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตลอดจนทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์และพืชอาศัยอื่นๆ เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นในการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนส อีกทั้งศึกษาประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ต่อต้าน *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 โดยมีรายงานการใช้จุลินทรีย์ต่อต้านดังกล่าวในการควบคุมเชื้อโรคพืชอย่างได้ผลมาแล้ว เช่น ใช้ควบคุมเชื้อ *Fusarium*, *Phytophthora* และ *Botrytis* เหล่านี้เป็นต้น (เกษม, 2535; Elad *et al.*, 1992; Heller and Theiler, 1994; Kahl *et al.*, 1995) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ลองนำเอาจุลินทรีย์ต่อต้านดังกล่าวมาควบคุมเชื้อ *Colletotrichum* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพต่อการควบคุมเชื้อโรคพืชดังกล่าว นอกจากนั้นยังได้นำ transformant of *T. harzianum* China ซึ่งเป็นเชื้อราที่ไม่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ต่อต้าน แต่ได้รับการตัดต่อ gene เพื่อให้มีคุณสมบัติทนทานต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim โดย Qian *et al.* (1996) รายงานว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถต้านทานต่อ carbendazim ได้ถึงระดับความเข้มข้น 150 ppm ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าปกติที่มีการใช้สารเคมีดังกล่าวในการควบคุมโรคพืชทั่วๆ ไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากหากเชื้อราดังกล่าวสามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อโรคพืชได้ ดังนั้นในการนี้จึงได้ลองนำ transformant ดังกล่าวมาใช้เพื่อทดสอบความมีคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ต่อต้านอีกคุณสมบัติหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ศึกษาการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) ร่วมกับวิธีการจำแนกโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology)

1.2.2 เพื่อทดสอบหาสายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่จำแนกอยู่ใน specie เดียวกันและเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมากที่สุด ต่อการเกิดโรคแอนแทรคโนสรุนแรงบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

1.2.3 เพื่อทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุดต่อการเกิดโรคบนพืชอาศัย (host range) ชนิดอื่นๆ

1.2.4 เพื่อทดสอบหาสภาพอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อรา *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุด

1.2.5 เพื่อทดสอบความต้านทานของจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อรา *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุด ต่อสารเคมี carbendazim

1.2.6 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุดในสภาพที่มีสารเคมี carbendazim

1.3 ขอบเขตการวิจัย

เก็บตัวอย่างพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจประเภทไม้ผล พืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับในบริเวณเขตภาคกลางและภาคเหนือของประเทศไทย ที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส จำแนกเชื้อราโดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับการใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ทำการคัดเลือก isolate ของเชื้อ *Colletotrichum* ที่สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ ตลอดจนทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัยชนิดอื่นๆ ทดสอบหาสภาพอาหารและระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum* และจุลินทรีย์ต่อต้าน ทดสอบความต้านทานของเชื้อโรคพืชและจุลินทรีย์ต่อต้านต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา (carbendazim) ตลอดจนทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum* ในสภาพที่มีสารเคมีกำจัดเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาการจำแนกเชื้อรา สภาพที่เหมาะสม และความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Colletotrichum* spp.

Natural *et al.* (1994) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความต้องการอาหารและความเป็นกรด-ด่างของเชื้อ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของหน้าวัว (*Anthurium andreanum*) พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตโดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและสร้างสปอร์มากที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ pH 5.5 เมื่อบ่มในอุณหภูมิห้อง ส่วนบนอาหาร corn meal agar, carrot decoction agar และ tomato fruit decoction agar พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตดี แต่ปริมาณการสร้างสปอร์น้อยกว่าในอาหาร PDA

Denoyes and Baudry (1995) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อ *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอรี่ในประเทศฝรั่งเศส จำนวน 16 isolates โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา พบว่า 14 isolates เป็นเชื้อ *C. acutatum* โดยมีรูปร่าง conidia เป็นแบบ fusiform conidia และมีการเจริญเติบโตช้า ส่วน 2 isolates ที่เหลือเป็น *C. gloeosporioides* ซึ่งมีรูปร่าง conidia เป็นแบบ cylindrical conidia และมีการเจริญเติบโตเร็ว สำหรับความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *C. gloeosporioides* ในสตรอเบอรี่พันธุ์อ่อนแอ พันธุ์ต้านทานปานกลาง และพันธุ์ต้านทานมากอยู่ในระดับต่ำ ในขณะที่ *C. acutatum* สามารถแบ่งระดับความสามารถในการทำให้เกิดโรคออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกทำให้เกิดโรครุนแรงในพันธุ์ต้านทานปานกลางและต้านทานมาก ส่วนกลุ่มที่สองทำให้เกิดโรครุนแรงในพันธุ์ต้านทานปานกลาง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในพันธุ์ต้านทานมาก

Thomas and Frederiksen (1995) ได้ศึกษาถึงการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. graminicola* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของข้าวฟ่างในอาหารต่างชนิดกัน พบว่าในอาหารแข็งคือ potato dextrose agar และ oat meal agar พบการสร้างสปอร์ซึ่งมีรูปร่างแบบ falcate ภายในระยะเวลา 7 วัน โดยมีจำนวนการสร้างสปอร์ประมาณ 21×10^4 และ 25×10^4 conidia ต่อตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนในอาหารเหลวคือ Fries's liquid medium และ potato dextrose broth พบการสร้างสปอร์ที่มีรูปร่างแบบ oval ภายในระยะเวลา 2 วันโดยมีจำนวนการสร้างสปอร์เท่ากับ 1.3×10^6 และ 2.8×10^6 conidia ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และใน potato dextrose broth พบว่า oval conidia ลดจำนวนลงในวันที่ 4 ถึงวันที่ 6 แต่กลับมีการสร้าง falcate conidia ขึ้นมาแทน และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในระยะเวลา 10 วันพบ falcate conidia มีจำนวนอยู่ระหว่าง 1.9 x 10^6 ถึง 4.6 x 10^6 conidia ต่อมิลลิลิตร

Byrne *et al.* (1997) รายงานการปลูกเชื้อโดยใช้ conidial suspension ของเชื้อ *C. coccodes* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะเขือเทศ ที่ความเข้มข้น 5 x 10^5 conidia ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยหยดลงบนใบมะเขือเทศ และบ่มภายใต้สภาพความชื้นสูงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจนับการงอกของ conidia และการสร้าง appressoria ทุก 2 ชั่วโมง พบว่า ใบมะเขือเทศที่บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีปริมาณการงอกของ conidia สูงที่สุดถึง 68.3 เปอร์เซ็นต์ และพบการสร้าง melanized appressoria มากที่สุดถึง 62 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการสร้าง unmelanized appressoria พบมากที่สุดเพียง 38.3 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

Goes and Kimati (1997a; 1997b) ทำการศึกษาเชื้อ *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของส้มในประเทศบราซิล พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มคือ SGO (slow-growing orange), KLA (key lime anthracnose) และ FGG (fast-growing gray) ซึ่งเชื้อดังกล่าวมักจะทำให้ผลอ่อนของส้มร่วงและกลีบดอกเกิดจุดแห้งตาย โดยกลุ่มใหญ่ที่พบและทำให้เกิดโรคมากที่สุดคือ FGG และพบว่าเชื้อจากกลุ่มดังกล่าวมีการสร้าง appressoria ชนิด lobated มากที่สุด ส่วนกลุ่ม SGO และ KLA สร้าง appressoria จำนวนน้อย ซึ่งเป็นชนิด clavate และ round appressoria ตามลำดับ

Norman and Strandberg (1997) ศึกษาโรคแอนแทรคโนสของ leatherleaf fern ในรัฐฟลอริดา ซึ่งเกิดจากเชื้อ *C. acutatum* และเป็นสาเหตุทำให้ผลผลิตของพืชตระกูลเฟิร์นบางชนิดลดลงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในเศษซากพืช และสามารถมีชีวิตรอดได้นานมากกว่า 3 เดือนภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ ส่วนความมีชีวิตรอดของ conidia และ sclerotia ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อดินอยู่ในสภาพที่มีความชื้น 12 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป แต่ในสภาพดินแห้งพบว่า conidia สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานถึง 12 เดือน และ conidial suspension ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 100 conidia ต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อบนใบ leatherleaf fern ได้

Sanogo *et al.* (1997) ศึกษาความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนสของมะเขือเทศซึ่งเกิดจากเชื้อ *C. coccodes* ในเพนซิลวาเนีย ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนและระยะเวลาที่ฝนตก รวมทั้งยังขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิในบรรยากาศด้วย โดยพบว่าทุกๆ 4 วันที่ทำการสำรวจตั้งแต่วันที่ 27 สิงหาคม 2536 ถึง 29 สิงหาคม 2537 เมื่อมีฝนตกทำให้ผลมะเขือเทศเกิดการติดเชื้อ 15 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น Sanoko and Pennypacker (1997) ยังพบการงอกของ sclerotia ของเชื้อ *C. coccodes* 2 ประเภท หลังจากวาง sclerotia บนกระดาษกรองที่มีความชื้นซึ่งวางอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในจานเลี้ยงเชื้อทั้งหุ้มด้วย parafilm และไม่หุ้ม โดยบ่มจานเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ 10-34 องศาเซลเซียส ภายใต้ช่วงแสงสว่าง 14 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน พบว่าในจานเลี้ยงเชื้อที่หุ้มด้วย parafilm มีการงอกของ sclerotia เป็นจำนวนมาก ส่วนจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกห่อหุ้มมีการสร้าง setae และ conidial masses สีส้มอ่อนบน sclerotia และพบจำนวน colony forming unit (cfu) ของ sclerotia ในจานเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ห่อหุ้มด้วย parafilm มากกว่าในจานเลี้ยงเชื้อที่ถูกห่อหุ้ม และในสภาพภายใต้แสงสว่างพบจำนวน cfu มากกว่าในสภาพมืดเช่นเดียวกัน

การศึกษาการจำแนกเชื้อราโดยใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

อิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) เป็นวิธีการแยกและวิเคราะห์ชีวโมเลกุลที่มีประจุในสารละลายหรือตัวกลาง (supporting medium) ออกจากกันภายใต้สนามไฟฟ้า ซึ่งตัวกลางที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ agarose gel และ polyacrylamide gel แต่ที่ใช้กันมากสำหรับอิเลคโตรโฟรีซีสของโปรตีนก็คือ polyacrylamide gel หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่ง SDS-PAGE เป็นวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนระหว่างขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โดยมีหลักการคือ โปรตีนที่มีประจุเป็นลบจะถูกบังคับให้เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุเป็นบวกในอัตราส่วนผกผันกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน การเคลื่อนที่นี้จะถูกต้านโดยปฏิกิริยาระหว่างสารกับร่างแหของเจล ซึ่งทำหน้าที่เป็น molecular sieve ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโปรตีน จึงขึ้นอยู่กับขนาด และประจุของโปรตีน (พิณทิพ, 2536) เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีสดังกล่าวจึงมักถูกนำมาใช้ในการแยกและวิเคราะห์โปรตีนให้บริสุทธิ์ ตลอดจนใช้ในการศึกษาปริมาณ โครงสร้าง และคุณสมบัติบางประการของโปรตีน สำหรับงานทางด้านโรคพืชได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในงานวิจัยเช่นเดียวกัน ดังเช่นในรายงานของ Chen *et al.* (1992) ที่ได้รายงานการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Trichoderma reesei* ซึ่งเจริญบนฟางข้าวฟ่าง โดยนำมาเลี้ยงใน culture filtrate และทำการสกัดเอนไซม์โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 2 ชนิดคือ beta-glucosidase I และ beta-glucosidase II โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 71 และ 114 kDa ตามลำดับ นอกจากนั้น La-Grange *et al.* (1996) ยังพบว่าเชื้อรา *T. reesei* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ beta-xylanase ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 27 kDa ได้อีกด้วย

Ji and Kuc (1995; 1997) ใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการแยกเอนไซม์ beta-1,3-glucanase และ chitinase จากต้นแตงกวา ฟักทอง และ squash หลังจากถูกปลูกเชื้อด้วย *C. lagenarium* โดยพบว่า beta-1,3-glucanase มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 38 kDa นอกจากนั้นยังสามารถพบเอนไซม์ดังกล่าวในต้นข้าวที่เกิดการติดเชื้อ *Rhizoctonia solani* (โรค sheath blight) และเมื่อทำการแยกโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนทั้งหมด 16 แถบ ซึ่งมีน้ำหนัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลอยู่ในช่วง 20-90 kDa และ 6 แถบจะเป็นโปรตีนที่เกิดขึ้นเนื่องจากพืชได้รับการกระตุ้นจากการติดเชื้อ (Bera and Purkayastha, 1997)

Tsigos and Bouriotis (1995) ใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ในการแยกเอนไซม์ chitin deacetylase ซึ่งผลิตโดยเชื้อ *C. lindemuthianum* ให้บริสุทธิ์ โดยพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 150 kDa

Vagvolgyi *et al.* (1996) ทำการศึกษา isozyme ซึ่งผลิตโดยเชื้อ *Mucor piriformis* สาเหตุโรคผลเน่าใน pear จำนวน 59 isolates โดยใช้วิธี polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ถึง 6 ชนิดด้วยกัน คือ catalase, alpha-esterase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase และ superoxide dismutase และพบว่ามี pattern ของ isozyme ทั้งหมด 7 patterns ด้วยกัน

Wattad *et al.* (1997) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ pectate lyase ของเชื้อ *C. gloeosporioides* หลังจากปลูกเชื้อลงบนผล avocado พบว่าเนื้อเยื่อพืชที่เริ่มติดเชื้อใหม่ๆ จะมีปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวมากกกว่าในเนื้อเยื่อพืชที่เกิดแผลเน่าเรียบร้อยแล้ว นอกจากนั้นยังพบว่าผลมะม่วงและผลกล้วยที่ถูกปลูกเชื้อด้วย *C. gloeosporioides* และ *C. musae* ตามลำดับ ก็สามารถผลิตเอนไซม์ pectate lyase ได้เช่นเดียวกัน โดยพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 38-41 kDa

นอกจากนั้นนักวิจัยได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการจำแนกเชื้อโรคพืชโดยใช้แยกความแตกต่างของโปรตีนระหว่าง species ควบคู่ไปกับการนำไปจำแนกโดยวิธีสัณฐานวิทยา (morphology) ตลอดจนใช้ในการศึกษาทางด้านโปรตีนเพื่อดูความแปรปรวนทั้งภายในและระหว่าง species ของเชื้อโรคพืช ดังเช่น ศึกษาความแตกต่างระหว่าง species ของเชื้อ *Armillaria* (Fox, 1993) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องดังต่อไปนี้คือ

Latorre *et al.* (1995) ได้ใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการเปรียบเทียบเชื้อ *Phytophthora cryptogea* isolates ต่างๆ พบว่า *P. cryptogea* สาเหตุโรครากเน่าของกีวีในชิลี จำนวน 33 isolates มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *P. cryptogea* ที่แยกได้จากกีวี แอบเปิ้ล และเชอรี่ในแคลิฟอร์เนีย โดยพบว่าเกิดแถบโปรตีนจำนวน 4 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30-45 kDa แต่เชื้อราทั้งสองแหล่งกลับมีความแตกต่างจาก *P. cryptogea* ทั้ง 4 isolates จากนิวยอร์ค และแตกต่างจาก *P. cactorum, P. cinnamomi, P. citricola, P. citrophthora, P. megasperma* และ *Pythium ultimum* อย่างเห็นได้ชัด

Hunt and Ekramoddoullah (1996) ใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการแยกความแตกต่างของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของพืชตระกูลสน คือเชื้อ *Inonotus tomentosus* จำนวน 7 isolates *I. circinatus* จำนวน 6 isolates และ *Phellinus pini* จำนวน 7 isolates พบว่า เฉพาะเชื้อ *P. pini*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่านั้นที่สร้างแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27.6 และ 39.7 kDa ซึ่งเชื้อราดังกล่าวมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *I. tomentosus* มากกว่าใน *I. circinatus* เนื่องจากว่าแถบโปรตีนบางแถบที่สร้างโดย *P. pini* ก็สามารถพบแถบโปรตีนดังกล่าวในบาง isolates ของ *I. tomentosus* ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนั้นยังสามารถจำแนกเชื้อ *I. circinatus* ออกเป็น 2 กลุ่มคือ eastern group (Atlantic Canada) และ western group (British Columbia) ได้อีกด้วย

Taisoo *et al.* (1996) ศึกษาความแตกต่างของเห็ดหอม (*Lentinus edodes*) ที่ประเทศเกาหลี จำนวน 7 isolates โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบว่า ตัวอย่างจาก mycelium และ fruiting bodies ต่างก็เกิดแถบโปรตีนหลักที่มีน้ำหนักโมเลกุลเหมือนกันคือ 58, 46, 37 และ 32 KDa โดยตัวอย่างจาก fruiting bodies พบว่ามี 3 strains ที่เกิดแถบโปรตีนแตกต่างออกไปในตำแหน่งที่มีน้ำหนักโมเลกุล 52 KDa ส่วนตัวอย่างจาก mycelium ที่พบความแตกต่างออกไปคือมี 2 strains ที่เกิดแถบโปรตีน 36 KDa 1 strain พบแถบโปรตีน 45 KDa และ 1 strain พบ 30 kDa

การศึกษาการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum* และเชื้อโรคพืชชนิดอื่นๆ โดยใช้จุลินทรีย์ต่อต้าน

การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยใช้จุลินทรีย์ต่อต้านนั้น มีรายงานที่แสดงถึงความสำเร็จต่อการใช้จุลินทรีย์ต่อต้านดังกล่าว โดย เกษม (2535) รายงานว่าเม็ดยาเชื้อที่ผลิตจาก *Ch. cupreum* สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศซึ่งเกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในสภาพไร่ได้โดยสามารถลดอัตราการเกิดโรคให้เหลือเพียง 7 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และในทำนองเดียวกันกับ Elad *et al.* (1992) รายงานว่าการใช้ *T. harzianum* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *B. cinerae* สาเหตุโรค grey mould ของมะเขือเทศ แตงกวา และสตรอเบอรี่ได้ นอกจากนั้น Amemiya *et al.* (1994) ได้รายงานการใช้สารสกัด chaetoglobosin A ซึ่งสกัดได้จากเชื้อ *Chaetomium globosum* ในการควบคุมโรค *Verticillium* wilt ของมะเขือเทศ พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Verticillium dahliae* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. albo-atrum* และ *Rhizoctonia solani* ได้อีกด้วย อีกทั้งเชื้อ *Ch. globosum* สายพันธุ์ที่มีการสร้างสาร BHT และ chaetomin ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pythium ultimum* สาเหตุโรค damping-off ของ sugarbeet ได้เช่นเดียวกัน (Dio Pietro *et al.*, 1992) รวมทั้ง Kahl *et al.* (1995) ได้รายงานว่า จุลินทรีย์ต่อต้านดังกล่าวสามารถจำกัดการเจริญเติบโตและยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *B. cinerae* สาเหตุโรคเน่าของ lily ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Heller and Theiler (1994) ได้ศึกษาถึงการใช้เชื้อ *Ch. globosum*, *Gliocladium virens* และ *T. viride* ในการเป็น antagonists และ mycoparasites ของเชื้อ *Phytophthora* 4 species คือ *P. cinnamoni*, *P. cactorum*, *P. fragariae* และ *P. nicotinae* พบว่า antagonist ทั้งสามชนิดสามารถเจริญครอบคลุมไปบนโคโลนีของเชื้อ *Phytophthora* และสามารถทำลายเซลของเชื้อให้แตกได้ นอกจากนั้นยังพบว่าสารเคมี benlate มีผลทำให้ประสิทธิภาพของ antagonist ลดลง โดยเมื่อทดสอบใน dual culture พบว่า antagonist ลดความ active ลงหลังจากถูก treated ด้วยสารเคมีเป็นเวลา 77 วัน

Hwang and Kim (1995) รายงานการใช้สารปฏิชีวนะ tubercidin ซึ่งสกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces violaceoniger* ในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides*, *Phytophthora capsici* และ *Magnaporthe grisea* ในต้นพริกทั้งในสภาพ *in vitro* และ *in vivo* พบว่าสาร tubercidin ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. capsici* และ *M. grisea* ได้ดีกว่า *C. gloeosporioides* ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพเท่ากับหรือมากกว่าการใช้สารเคมี metalaxyl และพบว่า tubercidin ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้เกิดความเป็นพิษ (phytotoxic) ต่อต้นพืชได้

Freitas and Pizzinatto (1997) ศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของฝ้ายซึ่งเกิดจากเชื้อ *C. gossypii* โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescent* และ *Bacillus* ในห้องปฏิบัติการ พบว่าการทดสอบบนอาหาร King B *P. fluorescent* เกือบทุก isolate สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gossypii* ได้ ส่วนการทดสอบบนอาหาร PDA พบว่า เชื้อ *P. fluorescent* เพียง 2 isolates และ *Bacillus* ทุก isolate สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้ สำหรับการทดสอบในโรงเรือนโดยทำการปลูกเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อโรคพืชลงในเมล็ดและสังเกตการงอก พบว่าใน treatment ที่มีการปลูกเชื้อ *C. gossypii* จะลดความสามารถในการงอกของเมล็ดลง และ *P. fluorescent* 4 isolates มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าในกรณีที่ไม่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชลงไปเท่านั้น ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชเท่านั้น แต่ไม่มีคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gossypii*

Lo *et al.* (1997) ศึกษาการใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 ควบคุมเชื้อ *Pythium* สาเหตุโรครากเน่าใน creeping bentgrass โดยใช้วิธีพ่น conidial suspension และใช้เม็ดยาเชื้อ พบว่าทั้งสองวิธีสามารถลดการเกิดโรครากเน่าได้ทั้งในสภาพโรงเรือนและในสภาพไร่ และพบว่าประชากรของ *T. harzianum* บริเวณรอบๆ รากพืชมีปริมาณเพิ่มขึ้น 10-100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ทำการเก็บตัวอย่างพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส และนำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting จากนั้นย้ายเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มภายใต้อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เจริญเป็นเชื้อบริสุทธิ์และเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.1 การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology)

ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ของเชื้อราบริสุทธิ์ข้างต้นทุก isolates โดยศึกษาลักษณะโคโลนี สีของ culture รูปร่างและขนาดของสปอร์ ตลอดจนโครงสร้างต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทำการจำแนกเชื้อ (identification) ให้อยู่ในระดับ species ที่ถูกต้อง

3.1.2 การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Gel electrophoresis : ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli, 1970)

นำเชื้อรา *Colletotrichum* บริสุทธิ์ที่แยกได้ข้างต้นมาจำแนกโดยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีส โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้คือ

3.1.2.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อรา

นำเชื้อรามาเลี้ยงใน flask (ขนาด 250 มิลลิลิตร) ซึ่งบรรจุอาหาร PDB อยู่ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ 5 flask ต่อ 1 isolate และนำ flask ทั้งหมดที่ทำการปลูกเชื้อแล้วมาบ่มบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดนำเชื้อราที่เลี้ยงได้มากรองบนผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อ และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำ mycelial mat เข้าเครื่อง freeze dry เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อทำให้แห้ง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งตัวอย่างเชื้อราที่ผ่านการ freeze dry เรียบร้อยแล้ว isolate ละ 1 กรัม นำมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) บนโกร่งที่ผ่านการแช่เย็น เติม extraction buffer ตัวอย่างละ 9 มิลลิลิตรและบดบนน้ำแข็งจนกว่าเซลเชื้อราแตก จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ให้ตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 rpm. เป็นเวลา 20 นาที ดูด

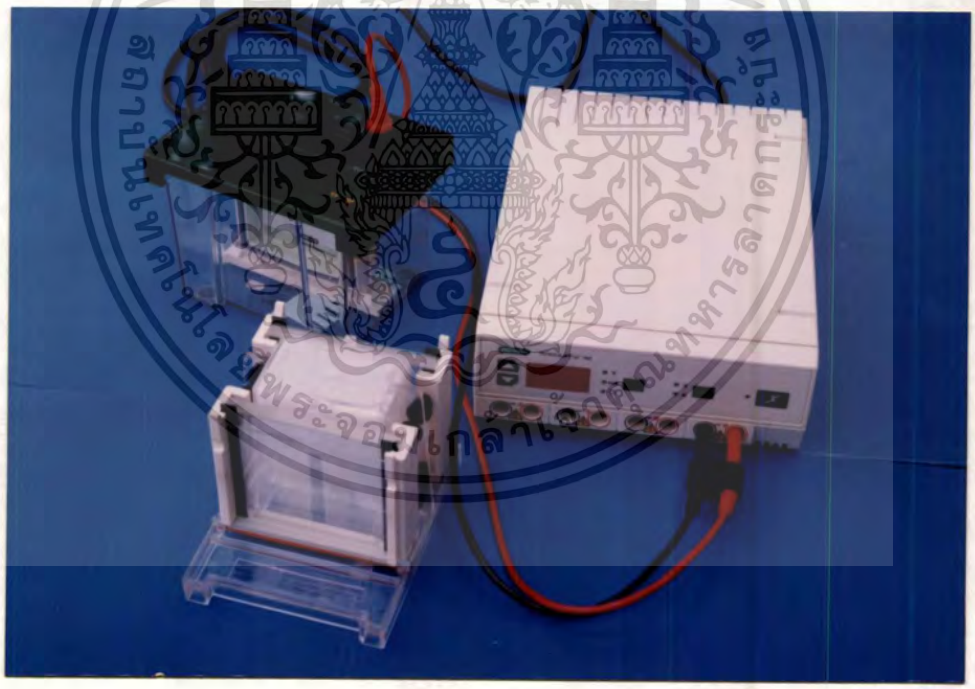
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

supernatant เก็บไว้ใน micro tube และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.1.2.2 การเตรียมเจลและการทำอิเลคโตรโฟรีซีส

1) การประกอบเครื่องมือ

นำแผ่นกระจกที่ผ่านการล้างด้วยเอทธานอลแล้วปล่อยให้แห้ง และวางแผ่นกระจกขนาดยาวบนพื้นที่ที่สะอาด จากนั้นวางแผ่นกระจกอีกแผ่นหนึ่งที่มีขนาดสั้นกว่าประกบเข้าไปโดยมี spacer คั่นระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองเพื่อเป็นตัวกำหนดความหนาของเจล และนำแผ่นกระจกคู่ดังกล่าวมายึดไว้ด้วย clamp โดยให้กระจกแผ่นยาวอยู่ข้างในและกระจกแผ่นสั้นอยู่ข้างนอก ปรับระดับฐานของกระจกให้เท่ากันด้วย stand และติดตั้งกระจกบน stand อีกครั้งเพื่อบรรจุเจลที่จะใช้ทดลองต่อไป (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 แสดงเครื่องมือการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) การเตรียมเจล

การเตรียม separating gel

ทำการเตรียม separating gel ที่มีความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีลำดับขั้นตอนของการเตรียมดังนี้คือ นำน้ำกลั่น ปริมาตร 2.63 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 30% acrylamide และสารละลาย 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 ปริมาตร 3 และ 1.88 มิลลิลิตร ตามลำดับ คนเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นหยดสารละลาย 10% ammonium persulfate 25 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันอีกครั้ง จึงหยด TEMMED ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตามลงไป และคนให้เข้ากันอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรดูดส่วนผสมดังกล่าวปล่อยลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกทั้งสองจนกระทั่งสารละลายอครีลาไมด์มีความสูงอยู่ในระดับห่างจากปลาย comb ซึ่งทำการวัดระยะทางไว้ก่อนหน้านี้ประมาณ 1 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นตามลงไปให้เต็มในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกที่เหลือเพื่อปรับระดับผิวหน้าเจลให้เรียบ ใช้พลาสติกคลุม stand ดังกล่าวประมาณ 30-45 นาทีเพื่อให้ separating gel เกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชัน (polymerization) อย่างสมบูรณ์ แล้วจึงเทน้ำกลั่นที่อยู่ในช่องว่างระหว่างกระจกเหนือเจลทิ้ง และซับด้วยกระดาษชำระให้แห้ง รอบรรจุ stacking gel ในขั้นตอนต่อไป

การเตรียม stacking gel

เตรียม stacking gel โดยมีลำดับขั้นตอนของการเตรียมเช่นเดียวกับ separating gel โดยผสมน้ำกลั่นกับ สารละลาย 30% acrylamide ปริมาตร 3.05 และ 0.65 มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เปลี่ยนจากสารละลาย 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 เป็นสารละลาย 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจึงเติมสารละลาย10% ammonium persulfate และ TEMMED ตามลำดับ จากนั้นเท stacking gel ลงไปบน separating gel ให้เต็มช่องว่าง จึงใช้ comb สอดลงไปในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกให้สารละลายดังกล่าวล้นออกมา ทิ้งไว้ประมาณ 30-45 นาทีจึงจะเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันที่สมบูรณ์ แล้วจึงถอด comb ออก เมื่อทั้ง separating gel และ stacking gel เกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันที่สมบูรณ์แล้ว จึงทำการถอดแผ่นกระจกที่มีเจลดังกล่าวออกจาก stand มาประกบลงใน inner cooling core ทั้งสองด้าน โดยให้แผ่นกระจกขนาดสั้นอยู่ข้างใน กระจกแผ่นยาวอยู่ข้างนอก แล้วจึงย้าย inner cooling core ดังกล่าวลงไปใน lower buffer chamber เติม running buffer (ภาคผนวก ข) ลงไปใน inner cooling core ให้ท่วมแผ่นกระจกที่อยู่ข้างในประมาณ 115 มิลลิลิตร ส่วน buffer ที่เหลือเทลงไปใน lower buffer chamber ต่อจากนั้นล้าง well ให้สะอาดโดยใช้ micro pipette ดูด buffer ขึ้นลงเพื่อไล่ฟองอากาศออก และ run เครื่องก่อนการทำจริง (pre-running) เป็นเวลา 2 นาที (150 Constant Voltage ; 60 milliampare)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

นำ supernatant ที่ได้มาผสมกับ sample buffer (loading buffer)(ภาคผนวก ข) ในอัตราส่วน 1:0.5 และนำมาอุ่นในน้ำร้อนประมาณ 1 นาที ใช้ micro pipette ดูดส่วนผสมดังกล่าวหยดลงในช่อง (well) ของ stacking gel ช่องละ 15 ไมโครลิตร จนครบทุกช่องโดยเหลือ 1 ช่องที่ขอบเจลไว้เพื่อหยด molecular weight standard เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นจึงเปิด power supply และเดินเครื่องเป็นเวลา 50 นาที (150 Const. V., 60 mA.) แล้วจึงแกะแผ่นเจลออกด้วยความระมัดระวัง และนำมาย้อมสีด้วย coomassie blue

4) การย้อมสีแผ่นเจลด้วย coomassie blue

เท fixing solution (ภาคผนวก ข) ลงในกล่องพลาสติคใสและวางแผ่นเจลลงไป เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นเท fixing solution ออกเก็บไว้ในขวดเดิม และย้อมสีด้วย coomassie blue (ภาคผนวก ข) เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงแล้วจึงเท coomassie blue ออก และล้างเจลด้วย fixing solution อีกครั้ง (ล้างผ่าน) จากนั้นจึงแช่ด้วย destaining solution (ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะปรากฏแถบโปรตีนชัดเจน จึงเก็บแผ่นเจลไว้ใน 7% acetic acid

5) การบันทึกผล

คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดยทำการวัดระยะทางของแถบโปรตีนที่ปรากฏเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งคำนวณได้จากค่า R_f (Relative mobilities) โดย

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางของสีย้อม}}$$

การตรวจดูตำแหน่งของการปรากฏและไม่ปรากฏแถบโปรตีนของเชื้อ *Colletotrichum* แต่ละ isolate ซึ่งการบันทึกผลจะใช้ระบบตัวเลข คือการปรากฏแถบโปรตีนให้สัญลักษณ์เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบโปรตีนให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยทำการบันทึกทุกตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ปรากฏ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Colletotrichum* แต่ละ isolate โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS (cluster analysis) และเสนอเป็น dendrogram แสดงความสัมพันธ์ดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การทดสอบหาสายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสอย่างรุนแรงบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

ในการทดลองครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษามะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ ซึ่งเป็นพันธุ์มะม่วงลูกผสมของมะม่วงสามฤดูและเป็นมะม่วงกินสุก โดยผลดิบมีสีเขียวอ่อนผิวเรียบ ผลสุกมีสีเหลืองส้ม เนื้อค่อนข้างแข็ง มีเส้นใยปานกลาง รสหวาน เปลือกหนาประมาณ 0.2 เซนติเมตร เนื่องจากมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์นี้กำลังได้รับความสนใจในการที่จะมาแทนตลาดของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ เพราะเป็นพันธุ์ที่ทนต่อการขนส่ง ตลอดจนผลมีอายุรอการจำหน่ายยาวนาน ซึ่งทำให้มีโอกาสจำหน่ายได้มากและเป็นที่ต้องการของผู้ขายปลีกทั่วไป

จากเชื้อ *Colletotrichum* ที่จำแนกได้จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาในข้อ 3.1 นำมาเฉพาะ specie ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคในพืชมากที่สุดมาทดสอบหาสายพันธุ์ที่จะทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนสรุนแรงที่สุดบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA และทำการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* ทุก isolates ลงบนใบมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ โดยใช้ปลายเข็มแทง 4-5 จุดเพื่อให้เกิดแผลบนใบมะม่วงก่อน แล้วจึงตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรวางลงบนรอยแผลนั้น โดยทำการทดลอง isolate ละ 4 ซ้ำๆ ละ 5 ใบ และใบละ 4 จุด นำใบมะม่วงที่ปลูกเชื้อเรียบร้อยแล้วมาบ่มไว้ในถุงพลาสติกชื้นที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) สังเกตความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นและบันทึกผลการเกิดโรคโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล จากนั้นทำการพิสูจน์โรคว่าอาการที่ปรากฏบนใบมะม่วงเป็นอาการเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Colletotrichum* จริงหรือไม่ โดยการแยกเชื้อราจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชบริเวณขอบแผลมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาอีกครั้งหนึ่ง

3.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุดบนพืชอาศัย (host range) ชนิดอื่นๆ

นำเชื้อรา *Colletotrichum* isolate ที่ทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุดบนใบมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์จากข้อ 3.2 ซึ่งทำการแยกเชื้อใหม่จากพืชดังกล่าวมาทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัยชนิดอื่นๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นพืชที่เกษตรกรนิยมปลูกร่วมกับมะม่วง ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ชมพู่ ฝรั่ง มะเขือเทศ และพริกไทย โดยดำเนินการทดลองและสังเกตการเกิดโรคเช่นเดียวกับข้อ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อรา *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุด

ในการที่จะนำจุลินทรีย์ต่อต้านมาควบคุมโรคพืชให้ได้ผลดีนั้น ประการหนึ่งซึ่งนอกเหนือจากความสามารถเฉพาะตัวของจุลินทรีย์ต่อต้านที่ถูกคัดเลือกมา การส่งเสริมเพื่อให้เชื้อเพิ่มศักยภาพในการควบคุมโรคพืชให้สูงขึ้นก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ เช่น การเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อต้านในสภาพอาหารที่เหมาะสม เป็นต้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบหาชนิดและความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความต้องการของจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อโรคพืชเพื่อให้เป็นประโยชน์ต่อการนำไปปรับใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชต่อไป

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD จำนวน 4 ซ้ำ ซึ่งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *T. harzianum* T88-2, transformant of *T. harianum* China และ *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุด โดยนำเชื้อราแต่ละชนิดมาเลี้ยงขยายปริมาณบนอาหาร PDA และใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะส่วนรอบนอกโคโลนี จากนั้นย้ายเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหาร 4 ชนิดที่ต้องการจะทดสอบในจานอาหารขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร โดยมีปัจจัยที่จะศึกษา 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัย A = ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมี 4 ชนิด คือ

A1 = potato dextrose agar (PDA)

A2 = potato sucrose agar (PSA)

A3 = mango fruit agar (MFA)

A4 = mango leaf agar (MLA)

ปัจจัย B = ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหาร ซึ่งมี 6 ระดับ คือ

B1 = pH 3

B2 = pH 4

B3 = pH 5

B4 = pH 6

B5 = pH 7

B6 = pH 8

ทำการบ่มเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 4 วัน บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและนับจำนวนการสร้างสปอร์ของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การทดสอบความต้านทานต่อสารเคมี carbendazim ของจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อรา *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุด

จากสาเหตุที่เกษตรกรในสวนมะม่วงมักนิยมใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราทั้งในสภาพแปลงปลูกและหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อลดความเสียหายเนื่องจากโรคแอนแทรคโนส โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำสารเคมี carbendazim เข้ามาใช้ (Saaiman, 1996) ซึ่งเป็นสารเคมีประเภทดูดซึมและมีฤทธิ์ตกค้างอยู่ในสภาพแวดล้อมค่อนข้างนาน ตลอดจนเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดิน รวมทั้งจุลินทรีย์ต่อต้านที่จะนำมาใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการคัดเลือกความสามารถทนทานได้ของจุลินทรีย์ต่อต้านต่อสารเคมี carbendazim ตลอดจนทดสอบความต้านทานของเชื้อโรคพืชต่อสารเคมีดังกล่าว เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำจุลินทรีย์ต่อต้านมาใช้ควบคุมเชื้อโรคพืชในสภาพที่มีการใช้สารเคมีมาก่อนหรือเพื่อให้จุลินทรีย์ต่อต้านสามารถตั้งตัวได้ก่อนในระยะแรก โดยมีขั้นตอนในการทดลองดังต่อไปนี้

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยเลี้ยงขยายปริมาณเชื้อรา 5 ชนิด คือ *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุด และจุลินทรีย์ต่อต้าน *Ch. globosum* Cg 8, *Ch. cupreum* Cc 9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *Trichoderma harzianum* China บนอาหาร PDA และเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีส่วนผสมของ carbendazim ให้ได้ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ppm ซึ่งในการเลือกใช้ระดับความเข้มข้นดังกล่าว Qian and Xiaoyan (1996) รายงานว่าเป็นระดับความเข้มข้นที่นิยมใช้กันในสภาพไร่ ซึ่งในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว Qian and Xiaoyan ได้ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบที่อุณหภูมิสูงกว่าเดิมคือ 28-30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติของ transformant ว่ายังมีคุณสมบัติเช่นเดิมหรือไม่ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรตัดส่วนรอบนอกโคโลนีของเชื้อและย้ายเชื้อรามาวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมีดังกล่าว ทำการทดลอง 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านในทุกระดับความเข้มข้นเปรียบเทียบกับ control ที่ไม่มีส่วนผสมของสารเคมี บันทึกผลการทดลองโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และนับจำนวนการสร้างสปอร์ของเชื้อ ตลอดจนหาเปอร์เซ็นต์ความต้านทานของเชื้อราต่อสารเคมี carbendazim (chemical resistance, CR) โดย

$$CR\ (\%) = \frac{A1-A2 \times 100}{A1}$$

A1 = ค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารที่ไม่มีสารเคมี (0 ppm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A2 = ผลต่างของค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารที่ไม่มีสารเคมี (0 ppm) กับอาหารที่มีสารเคมี

3.6 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุดบนอาหารผสมสารเคมี carbendazim (Bi-culture test with chemical)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราข้างต้นตามข้อ 3.4 และแบ่งอาหารออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกนำมาผสมกับสารเคมี carbendazim ให้ได้ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ppm และส่วนที่สองไม่มีการผสมสารเคมี ปล่อยให้อาหารแข็งตัวแล้วกลับจานอาหารและใช้ดินสอเขียนแก้วขีดแบ่งออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กันที่ก้นจานอาหารด้านนอก แต่ละส่วนให้เขียนชื่อเชื้อราแต่ละชนิดที่ต้องการจะทดสอบแล้วกลับจานอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าที่เดิม และย้ายเชื้อราแต่ละชนิดโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดส่วนรอบนอกโคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum* สายพันธุ์ที่รุนแรงที่สุด และจุลินทรีย์ต่อต้านทั้ง 4 ชนิด แล้วจึงใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วย้ายเชื้อราที่เจริญอยู่บนชิ้นส่วนอาหารลงไปตรงกลางส่วนแบ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยให้เชื้อราแต่ละชนิดห่างจากกัน ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) บันทึกผลการทดลองโดยหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (inhibition of growth, IG) ของเชื้อราสาเหตุโรคที่เกิดจากจุลินทรีย์ต่อต้านโดยเปรียบเทียบกับ control ซึ่งเลี้ยงเฉพาะจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อโรคพืชแยกจากกัน โดย

$$IG\ (\%) = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคพืชใน control

R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคพืชในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

4.1.1 การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology)

จากการแยกเชื้อ *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพืชอาศัยชนิดต่างๆ โดยวิธี tissue transplanting และทำการจำแนกเชื้อดังกล่าวโดยวิธีศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) อันประกอบด้วยศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต สีของโคโลนี รูปร่างและขนาดของสปอร์ ตลอดจนโครงสร้างต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งทำการศึกษาทั้งหมด 24 isolates พบว่าสามารถจำแนกเชื้อ *Colletotrichum* ออกได้เป็น 4 species ดังนี้คือ *C. dematium* จำนวน 2 isolates ได้แก่ isolate Sb001 และ Sb002 (จากโหระพา), *C. gloeosporioides* จำนวน 20 isolates ได้แก่ isolate A001 (จากวาสนา), A002 (จากหนวดปลาหมึก), A003 (จากอมรเบิกฟ้า), Bf001 (จากตาลแดง), C001 (จากส้มโชกุน ลำปาง), C002 (จากส้มโชกุน ลำปาง), C003 (จากส้มเขียวหวาน แพร่), C004 (จากส้มเขียวหวาน แพร่), C005 (จากส้มโอ), C006-1 (จากส้มเขียวหวาน ตาก), C007-1 (จากส้มโชกุน ตาก), C007-2 (จากส้มโชกุน ตาก), Ft001 (จากปาล์มหางหมาป่า), M001 (จากมะม่วงโชคอนันต์), M002-2 (จากมะม่วงเขียวเสวย), M003 (จากมะม่วงอกร่อง), Pay001 (จากมะละกอ), Pep001 (จากพริกไทย), Sap001 (จากชมพู่) และ St002 (จากสตรอเบอรี่), *C. lindemuthianum* จำนวน 1 isolate ได้แก่ Pea001 (จากถั่วลิสง) และ *C. musae* จำนวน 1 isolate ได้แก่ Ban001 (จากกล้วยน้ำว้า) (ตารางที่ 4.1) รวมทั้งได้แสดงรายละเอียดของเชื้อราในแต่ละ isolate ไว้ในภาพที่ 4.1 ถึงภาพที่ 4.24 ซึ่งจะพบว่า *Colletotrichum* ที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม species เดียวกัน ก็พบความแตกต่างกันหลายประการ ตัวอย่างเช่น ในกลุ่ม specie *gloeosporioides* โดยจะพบความแตกต่างทั้งในด้านการเจริญเติบโต สีของ culture ตลอดจนโครงสร้างต่างๆ ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสมาใช้เพื่อศึกษาถึงความแตกต่างและความเป็นไปได้ในการที่จะนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการจำแนกเชื้อราในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงเชื้อ *Colletotrichum* species ต่างๆ ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิดกัน

Isolate	พืชอาศัย	ส่วนของพืชที่เป็นโรค	Species
A001	วาสนา	ใบ	*C. gloeosporioides*
A002	หนวดปลาหมึก	ใบ	*C. gloeosporioides*
A003	อมรเปิกฟ้า	ใบ	*C. gloeosporioides*
Ban001	กล้วยน้ำว้า	ผล	*C. musae*
Bf001	ตาลแดง	ใบ	*C. gloeosporioides*
C001	ส้มโชกุน (ลำปาง)	ผล	*C. gloeosporioides*
C002	ส้มโชกุน (ลำปาง)	ผล	*C. gloeosporioides*
C003	ส้มเขียวหวาน (แพร่)	ผล	*C. gloeosporioides*
C004	ส้มเขียวหวาน (แพร่)	ผล	*C. gloeosporioides*
C005	ส้มโอ	ผล	*C. gloeosporioides*
C006-1	ส้มเขียวหวาน (ตาก)	ผล	*C. gloeosporioides*
C007-1	ส้มโชกุน (ตาก)	ใบ	*C. gloeosporioides*
C007-2	ส้มโชกุน (ตาก)	ใบ	*C. gloeosporioides*
Ft001	ปาล์มหางหมาป่า	ใบ	*C. gloeosporioides*
M001	มะม่วงโชคอนันต์	ใบ	*C. gloeosporioides*
M002-2	มะม่วงเขียวเสวย	ใบ	*C. gloeosporioides*
M003	มะม่วงอกร่อง	ใบ	*C. gloeosporioides*
Pay001	มะละกอ	ผล	*C. gloeosporioides*
Pea001	ถั่วลิสง	ใบ	*C. lindemuthianum*
Pep001	พริกไทย	ใบ	*C. gloeosporioides*
Sap001	ชมพู่	ผล	*C. gloeosporioides*
Sb001	โหระพา	ใบ	*C. dematium*
Sb002	โหระพา	ใบ	*C. dematium*
St002	สตรอเบอรี่	ใบ	*C. gloeosporioides*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคแอนแทรคโนสของวาสนา (*Dracaena* sp.)

Isolate A001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีขาวอมน้ำตาล สร้างเส้นใยฟูสีน้ำตาลอ่อน โดยเจริญเป็นวงบนผิวหน้าอาหาร เจริญเติบโตค่อนข้างช้าโดยเจริญมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 8 วัน ขอบโคโลนีค่อนข้างเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูไม่มากนัก conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว ขนาดประมาณ 11.25-16.25 x 2.5-3.75 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง sclerotia, chlamydospores และ setae (ภาพที่ 4.1)

ภาพที่ 4.1 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate A001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 8 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

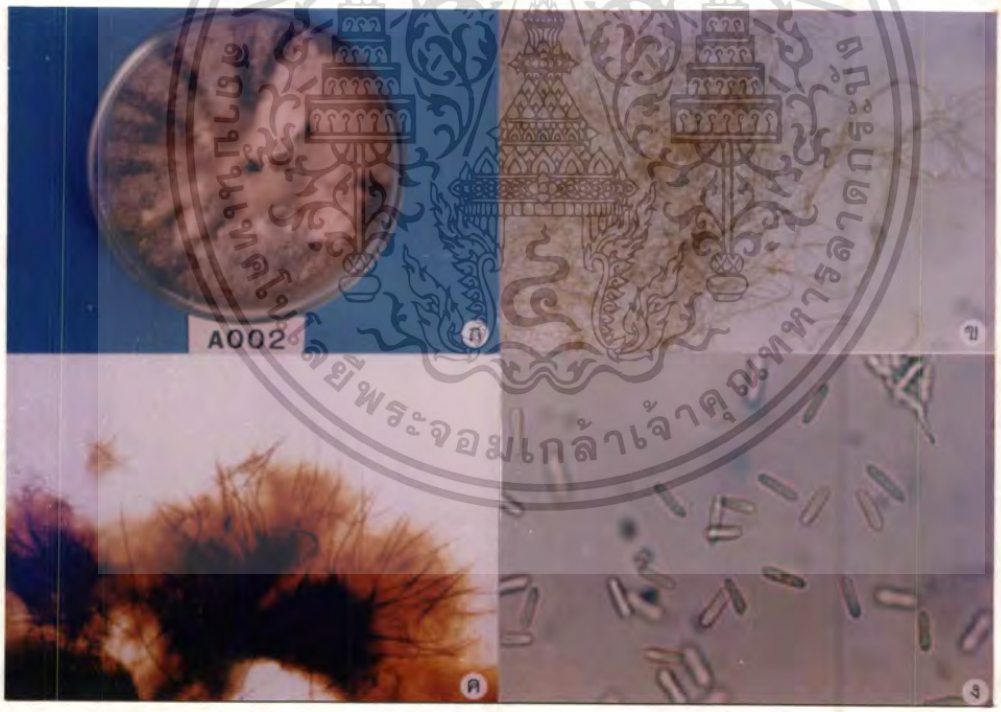
โรคแอนแทรคโนสของหนวดปลาหมึก (*Scheffera* sp.)

Isolate A002

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีน้ำตาล และพบการเจริญเป็นแถบสีน้ำตาลเข้มจากบริเวณกึ่งกลางโคโลนี สร้างเส้นใยฟูสีน้ำตาลอ่อน บางสภาวะอาจมีการเจริญของเส้นใยมากหรือน้อยแตกต่างกัน มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูกระจายบนผิวหน้าอาหาร conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว ขนาดประมาณ 12.5-15 x 3.5-5 ไมโครเมตร ไม่สร้าง sclerotia และ chlamydospores แต่พบการสร้าง setae สีน้ำตาลเข้มจำนวนมาก โดยมีขนาดประมาณ 87.5-162.5 x 2.5-3.75 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate A002

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. setae 100 เท่า

ง. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

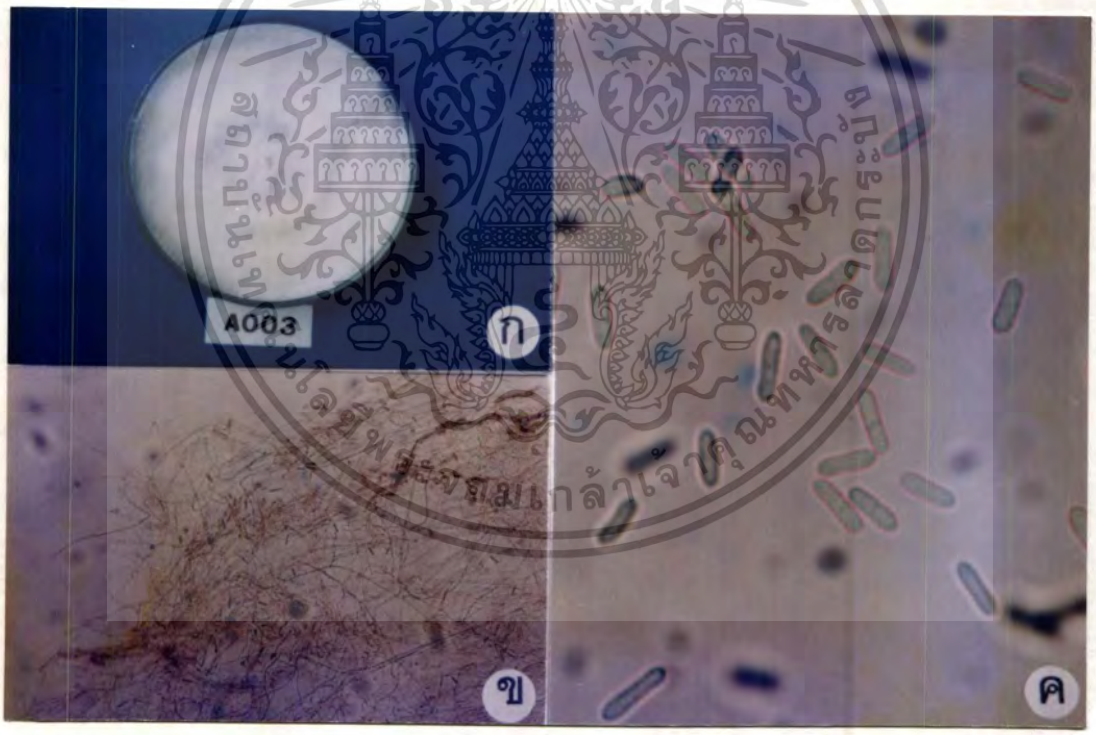
โรคแอนแทรคโนสของอมรเบิกฟ้า (*Mandivila sp.*)

Isolate A003

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีขาว สร้างเส้นใยฟูสีขาวถึงขาวอมน้ำตาลอ่อน เจริญเติบโตค่อนข้างเร็ว โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 6 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูไม่มากนัก conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใส ไม่มีสี เซลเดียว ขนาดประมาณ 12.5-15 x 2.5-5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae และ sclerotia แต่เริ่มมีการสร้าง chlamydospores สีน้ำตาลเข้มบ้างเล็กน้อย (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate A003

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 6 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคแอนแทรคโนสของกล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum* L.)

Isolate Ban001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีขาวอมน้ำตาลอ่อน สร้างเส้นใยฟูสีขาว และเมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีขาวอมเทา เจริญเติบโตเร็ว โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 5 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidia กระจัดกระจายทั่วทั้งโคโลนีจำนวนมาก โดยขนาดของ conidia มีความแปรปรวนมาก คือมีทั้งขนาดสั้นและยาว รูปร่างของ conidia มีลักษณะแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว ขนาดประมาณ 12.5-35 x 3-5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae, chlamydospores และ sclerotia (ภาพที่ 4.4)

ภาพที่ 4.4 แสดงเชื้อ *Colletotrichum musae* Isolate Ban001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 5 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคแอนแทรคโนสของตาลแดง (*Latania commersonii*)

Isolate Bf001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีขาวอมน้ำตาล สร้างเส้นใยฟูสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูไม่มากนัก ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว ขนาดประมาณ 5.75-15 x 3.75-5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae, chlamydospores และ sclerotia (ภาพที่ 4.5)

ภาพที่ 4.5 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate Bf001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคแอนแทรคโนสของส้มโชกุน จังหวัดลำปาง (*Citrus reticulata* Blanco)

Isolate C001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยขนาดเล็กสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้มค่อนข้างบาง และพบปริมาณการสร้าง terminal และ intercalary chlamydospores สีน้ำตาลเข้มจำนวนมาก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ พบการสร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปบนผิวหน้าอาหาร และมีการสร้างเมือกใสบนผิวหน้าโคโลนีค่อนข้างมาก ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.5-14 x 3.75-5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.6)

ภาพที่ 4.6 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate C001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใยและ chlamydospores 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

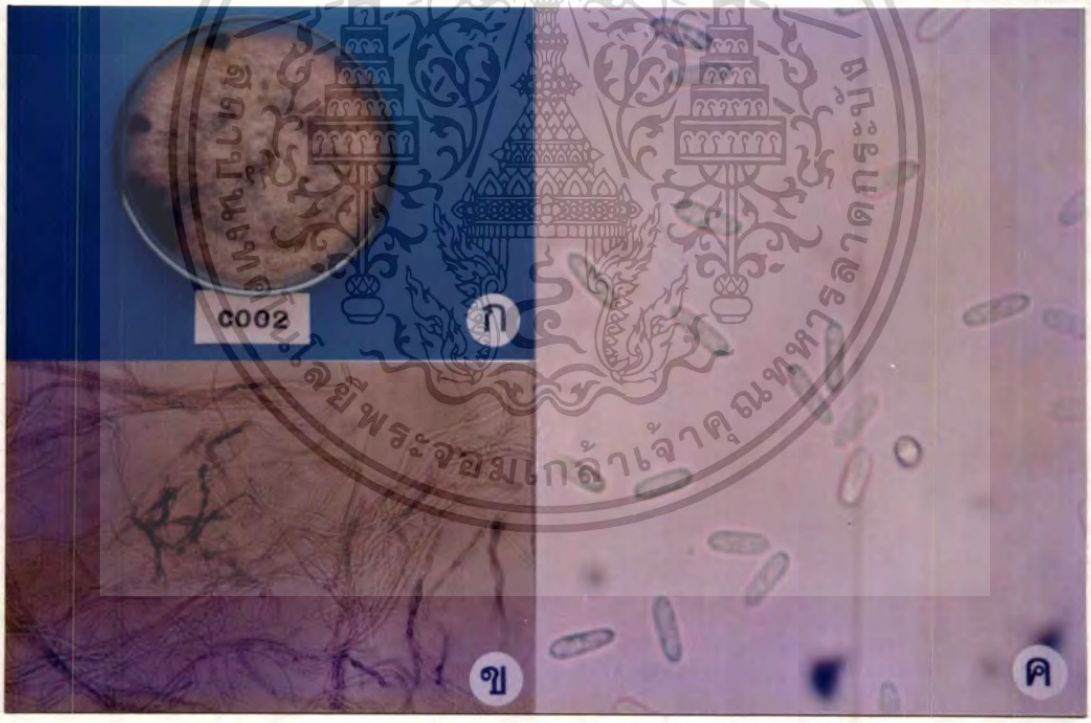
โรคแอนแทรคโนสของส้มโชกุน จังหวัดลำปาง (*Citrus reticulata* Blanco)

Isolate C002

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยขนาดใหญ่สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม พบปริมาณการสร้าง intercalary chlamydospore สีน้ำตาลเข้มค่อนข้างมาก เจริญเติบโตค่อนข้างช้า โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 8 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูกระจายบนผิวหน้าอาหารปริมาณน้อย แต่ไม่พบการสร้างเมือกใส ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.5-16.25 x 3.75-5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate C002

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 8 วัน

ข. เส้นใยและ chlamydospores 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคแอนแทรคโนสของส้มเขียวหวาน จังหวัดแพร่ (*Citrus nobilis* Lour.)

Isolate C003

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยสีน้ำตาลอ่อน เจริญเติบโตค่อนข้างช้า โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 8 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูกระจายบนผิวหน้าอาหารจำนวนมาก ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.5-18.75 x 2.75-5 ไมโครเมตร เริ่มมีการสร้าง chlamydospores สีน้ำตาลเข้มบ้างเล็กน้อย (ภาพที่ 4.8)

ภาพที่ 4.8 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate C003

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 8 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

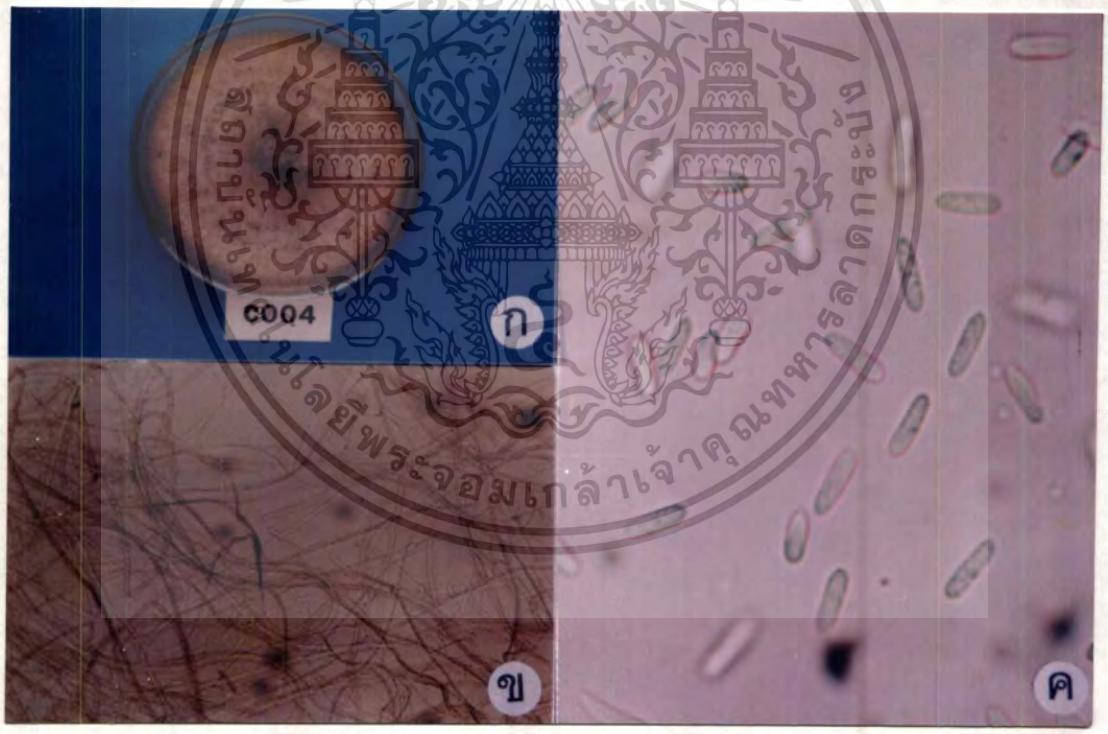
โรคแอนแทรคโนสของส้มเขียวหวาน จังหวัดแพร่ (*Citrus nobilis* Lour.)

Isolate C004

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีชมพูอ่อนและสีดำกระจายเป็นวง ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.75-18 x 3.75-5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง chlamydospores, setae และ sclerotia (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate C004

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคแอนแทรคโนสของส้มโอ (*Citrus grandis* (L.)Osb.)

Isolate C005

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยฟูขนาดเล็กสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidia ปริมาณน้อย และไม่พบการสร้าง conidial masses สีส้มอมชมพู ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.62-15.31 x 2.75-5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง chlamydospores, sclerotia และ setae (ภาพที่ 4.10)

ภาพที่ 4.10 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate C005

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

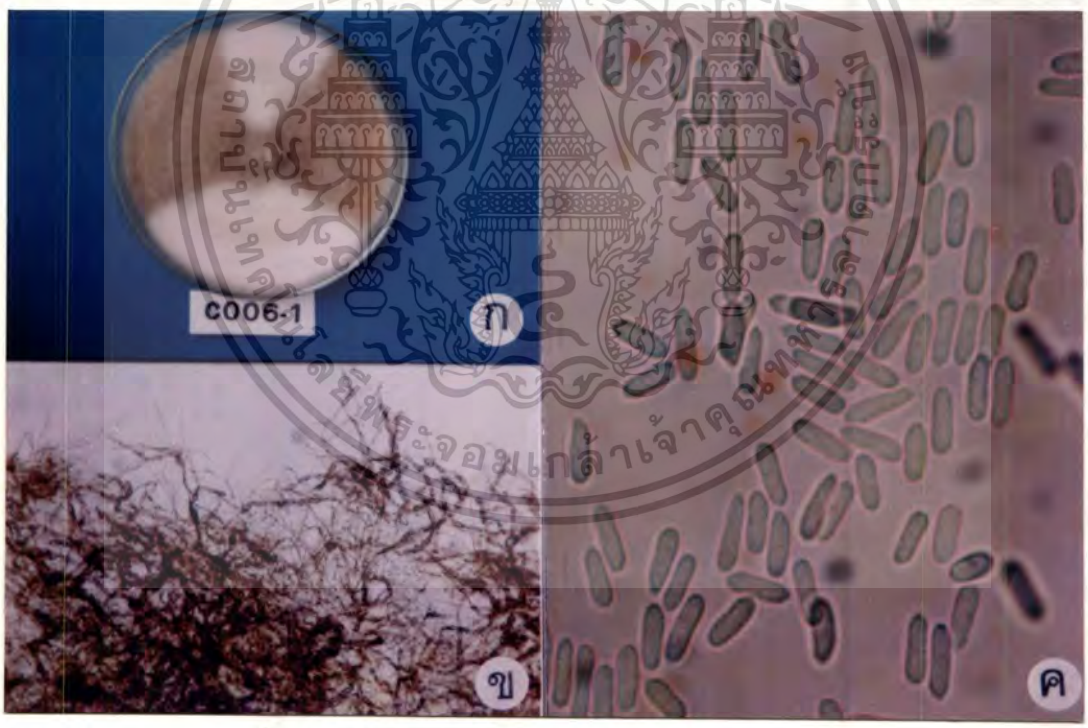
โรคแอนแทรคโนสของส้มเขียวหวาน จังหวัดตาก (*Citrus nobilis* Lour.)

Isolate C006-1

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยฟูสีขาวถึงขาวอมน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้ม การเจริญของเชื้อมีความแปรปรวนค่อนข้างมาก โดยบางครั้งพบการสร้าง conidial masses ซึ่งเจริญเป็นวง (concentric ring) จำนวนมาก แต่บางสภาวะกลับพบเส้นใยจำนวนมาก หรืออาจพบการเจริญเป็นแถบของเส้นใยบน conidial masses มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses ปริมาณน้อย ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว ขนาดประมาณ 12.5-15 x 4.25-5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง sclerotia และ setae แต่พบการสร้าง intercalary chlamydospores สีน้ำตาลเข้ม จำนวนมาก (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate C006-1

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใยและ chlamydospores 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคแอนแทรคโนสของส้มโชกุน จังหวัดตาก (*Citrus reticulata* Blanco)

Isolate C007-2

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีน้ำตาลอมเทาถึงเทาเข้ม สร้างเส้นใยฟูสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูเจริญเป็นวงจำนวนมาก conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว ขนาดประมาณ 12.5-17.5 x 4.5-5 ไมโครเมตร พบการสร้าง setae สีน้ำตาลเข้มปริมาณน้อย โดยมีขนาดประมาณ 75-100 x 2.5-4.5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.13)

ภาพที่ 4.13 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate C007-2

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. setae 100 เท่า

ง. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคแอนแทรคโนสของปาล์มหางหมาป่า (*Wodyetia bifurcata*)

Isolate Ft001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยฟูสีขาวหรือขาวอมน้ำตาลอ่อนจำนวนมาก ขอบโคโลนีเรียบ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูไม่มากนัก ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.5-17.5 x 3-4.75 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง chlamydospores และ setae (ภาพที่ 4.14)

ภาพที่ 4.14 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate Ft001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

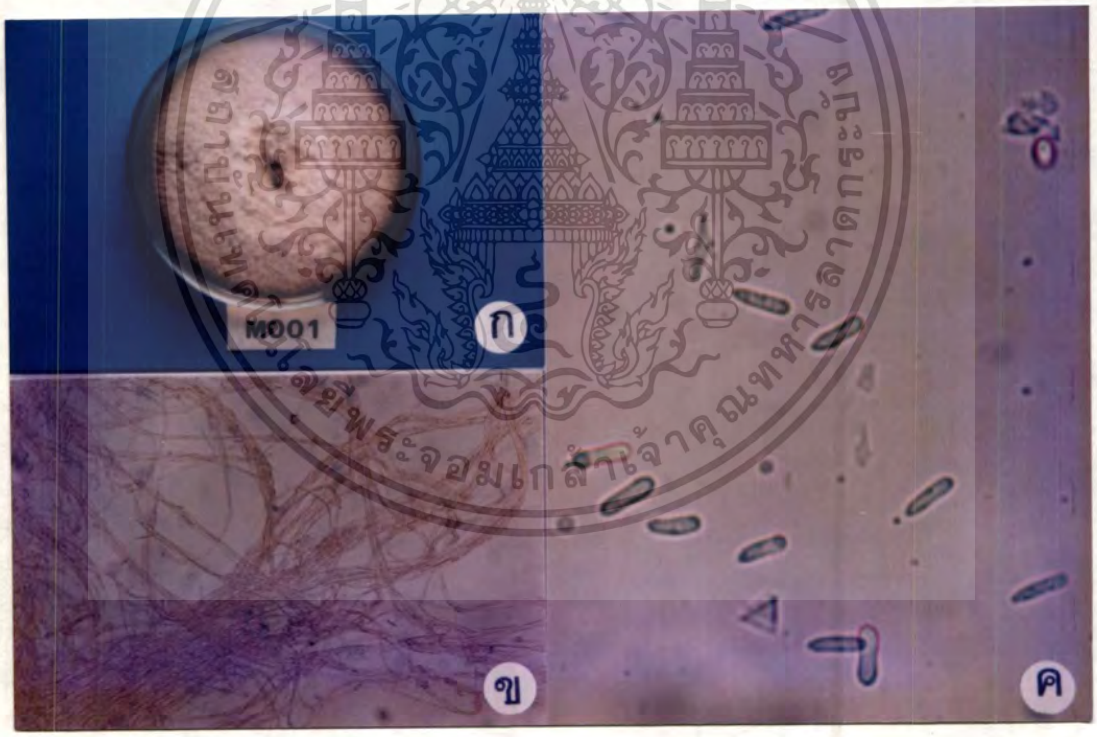
โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ (*Mangifera indica* L.)

Isolate M001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยฟูสีขาว เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีขาวอมน้ำตาล การเจริญมีความแปรปรวนมมาก บางสภาวะพบการสร้าง conidial masses มากแต่บางสภาวะกลับพบการเจริญของเส้นใยมาก เจริญเติบโตช้า โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 9 วัน ขอบโคโลนีเรียบ ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใส ไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.5-22.5 x 2.75-4.75 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae, chlamydospores และ sclerotia (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4.15 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate M001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 9 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

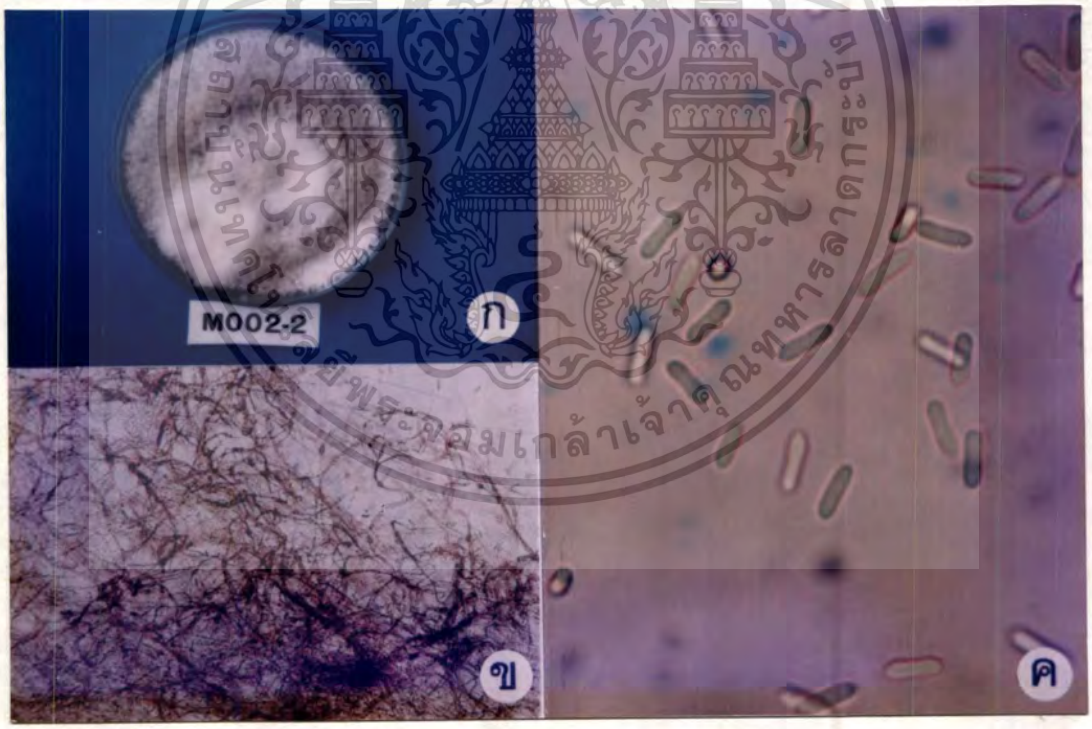
โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์เขียวเสวย (*Mangifera indica* L.)

Isolate M002-2

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีเส้นใยฟูสีขาวถึงขาวอมเทาหรือขาวอมน้ำตาล ขอบโคโลนีเรียบ พบการเจริญของเส้นใยจำนวนมาก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูไม่มากนักและไม่เจริญเป็นวงบนอาหาร ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 10.25-17.5 x 2.5-3.75 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae และ sclerotia แต่พบว่ามีการสร้าง intercalary chlamydospores สีน้ำตาลเข้มจำนวนมาก (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.16 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate M002-2

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใยและ chlamydospores 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

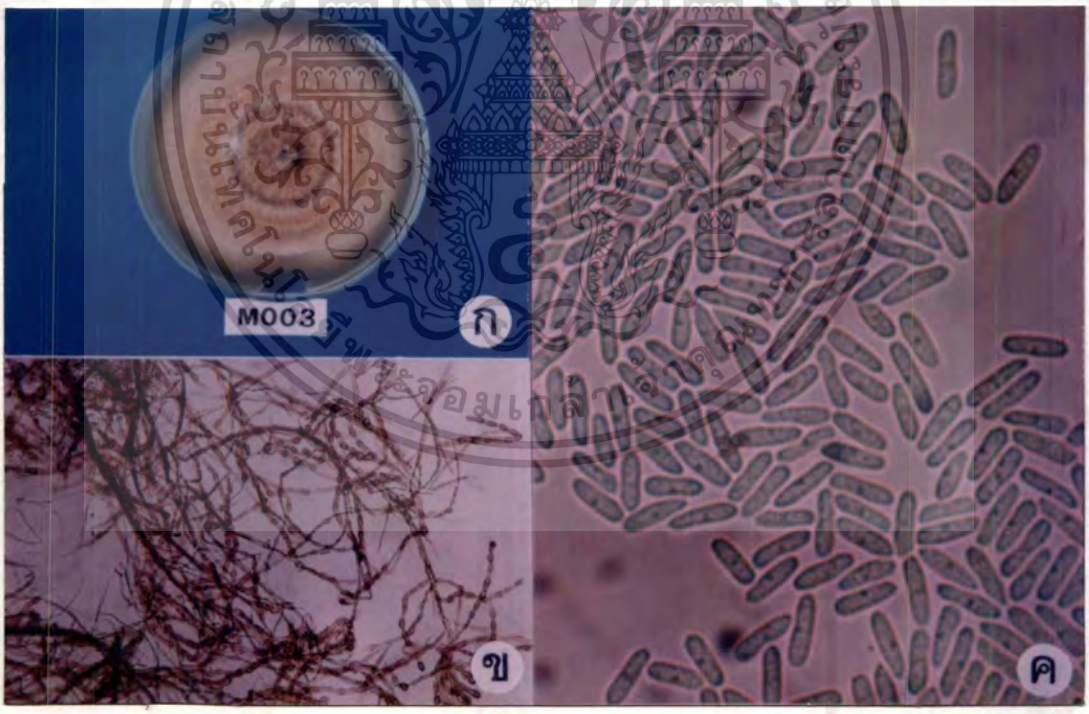
โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์อกร่อง (*Mangifera indica* L.)

Isolate M003

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA การเจริญมีความแปรปรวนมาก บางสภาวะพบการสร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูจำนวนมาก แต่บางสภาวะกลับพบการสร้างเส้นใยสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้มจำนวนมาก เจริญเติบโตค่อนข้างช้า โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 8 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูจำนวนมากและเจริญเป็นวงบนอาหาร ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 13.13-17 x 3.75-5 ไมโครเมตร พบการสร้าง terminal และ intercalary chlamydospores สีน้ำตาลเข้มจำนวนมาก แต่ไม่พบการสร้าง sclerotia และ setae (ภาพที่ 4.17)



ภาพที่ 4.17 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate M003

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 8 วัน

ข. เส้นใยและ chlamydospores 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

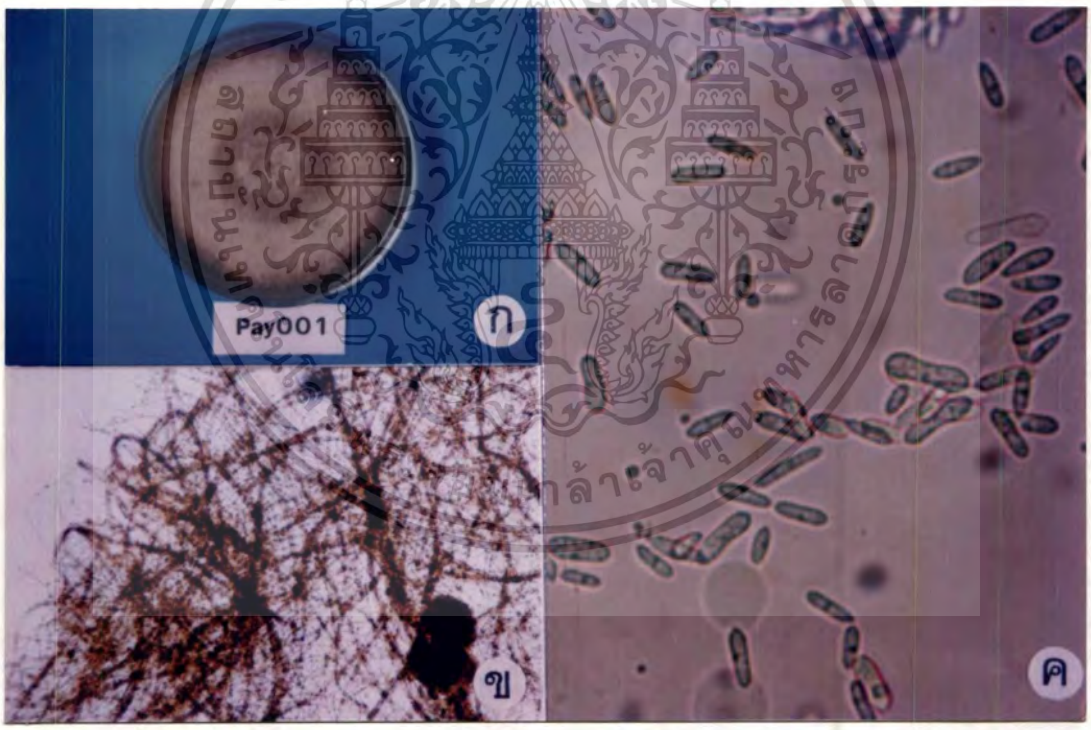
โรคแอนแทรคโนสของมะละกอ (*Carica papaya* L.)

Isolate Pay001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีเส้นใยฟูสีขาวอมเทาถึงเทาเข้ม เจริญเติบโตช้า โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อายุ 9 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูไม่มากนัก ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.5-20 x 3-5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae แต่พบการสร้าง sclerotia (ภาพที่ 4.18)



ภาพที่ 4.18 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporiodes* Isolate Pay001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 9 วัน

ข. เส้นใยและ sclerotia 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

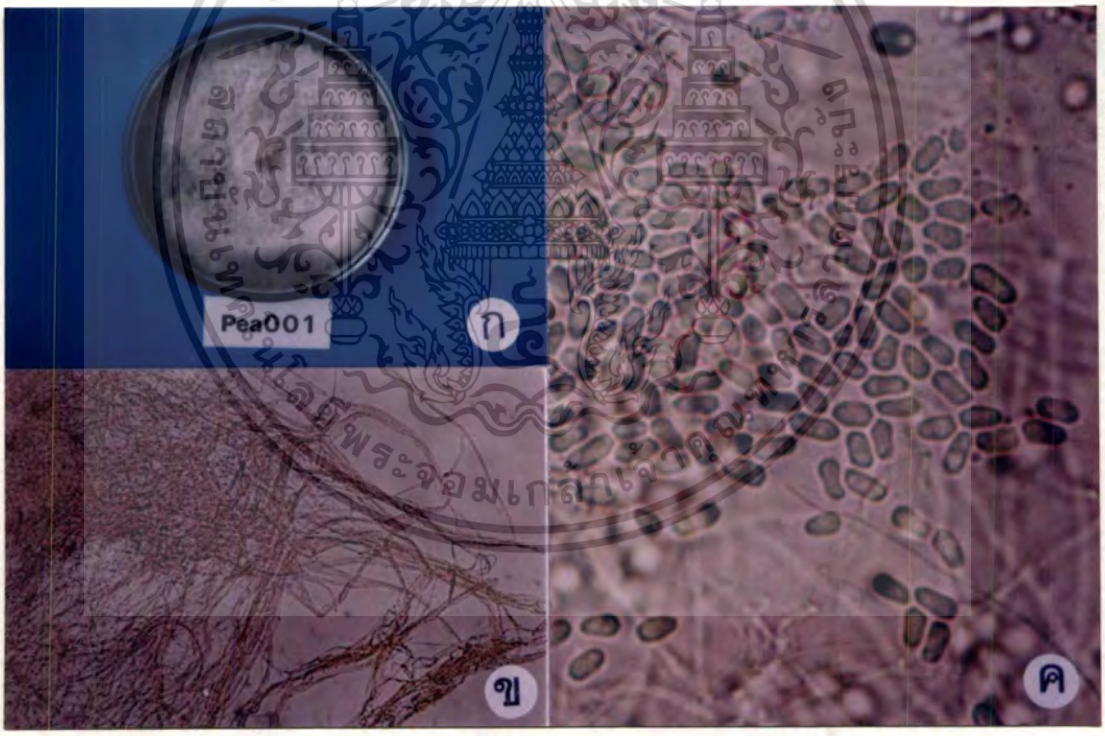
โรคแอนแทรคโนสของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.)

Isolate Pea001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br.& Cav.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีขาวอมเทา เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีเทาเข้มหรือเทาอมดำ สร้างเส้นใยสีน้ำตาลฟู เจริญเติบโตค่อนข้างช้า โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 8 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอ่อนไม่มากนัก conidia มีรูปร่างแบบ oblong หรือ dumbbell-shaped ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 8.75-11.25 x 5-5.5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae และ chlamydospores (ภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.19 แสดงเชื้อ *Colletotrichum lindemuthianum* Isolate Pea001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 8 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

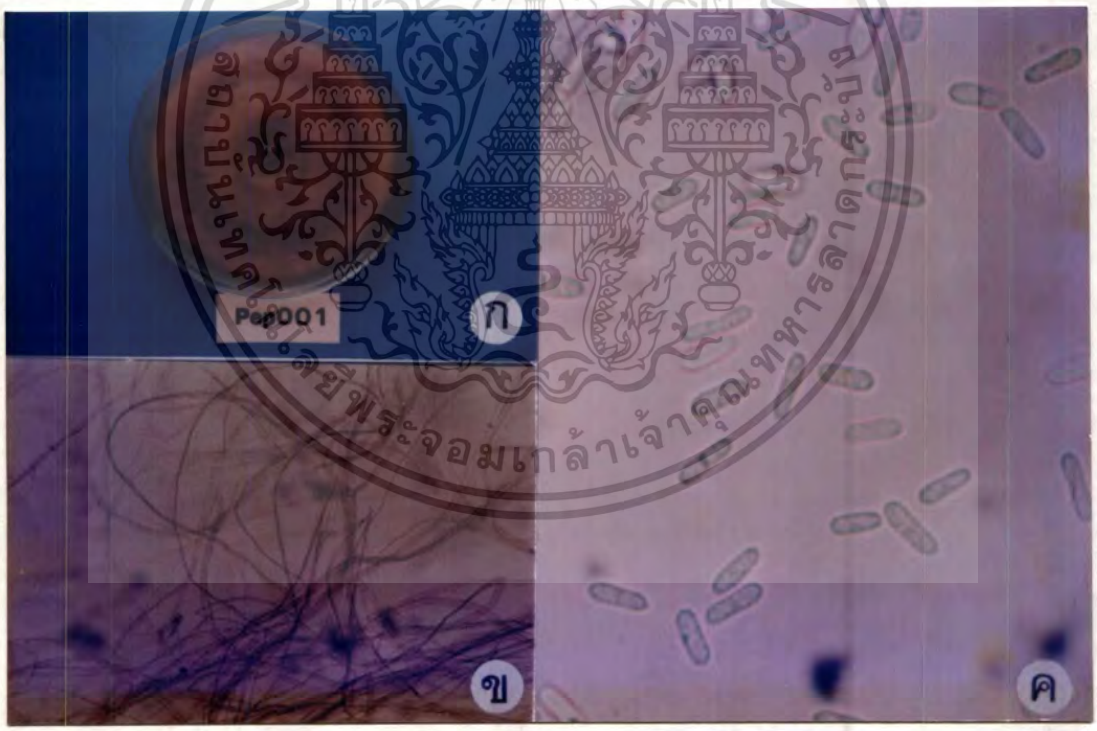
โรคแอนแทรคโนสของพริกไทย (*Piper nigrum* L.)

Isolate Pep001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยฟูสีขาวถึงขาวอมน้ำตาล และจะกลายเป็นสีเหลืองหม่นอมน้ำตาลเมื่ออายุมากขึ้น มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูเป็นวง (concentric ring) แต่บางครั้งพบการสร้าง conidial masses เป็นสีดำ ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.5-15 x 3.75-5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae, chlamydospores และ sclerotia (ภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.20 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate Pep001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

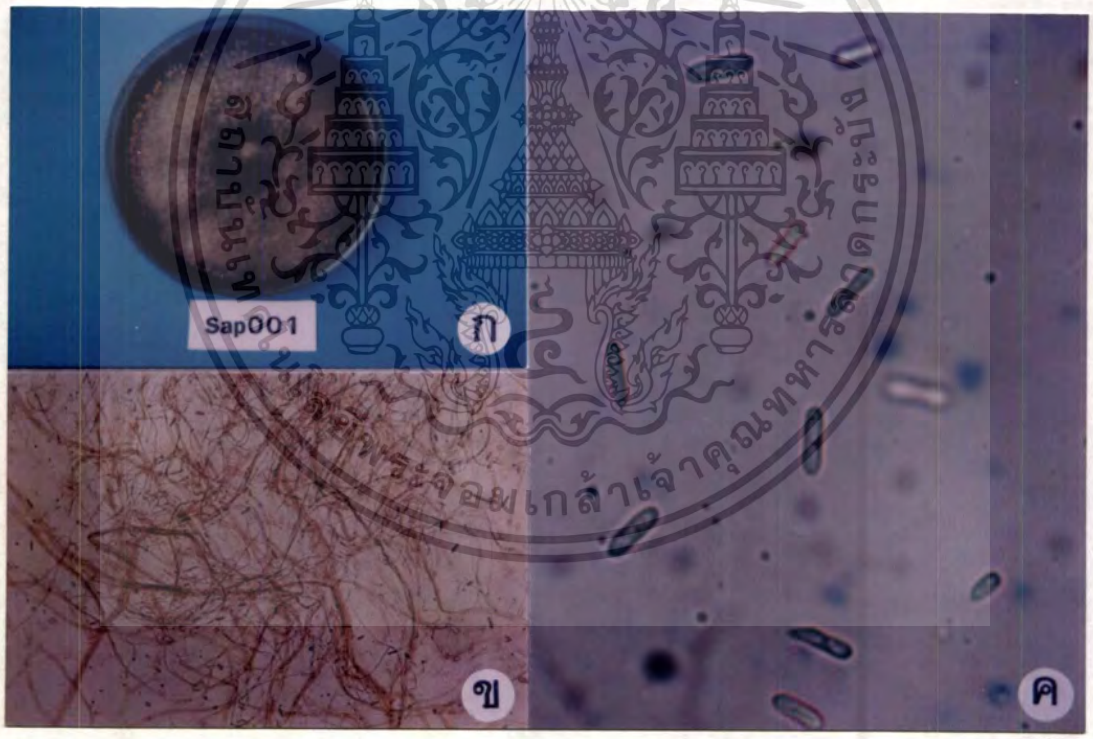
โรคแอนแทรคโนสของชมพู่ (*Eugenia* spp.)

Isolate Sap001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยฟูสีขาวอมเทาถึงเทาเข้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูเป็นวงบนผิวหน้าอาหาร ลักษณะ conidia มีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว มีขนาดประมาณ 12.5-20 x 2.75-5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae chlamydospores และ sclerotia (ภาพที่ 4.21)



ภาพที่ 4.21 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate Sap001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

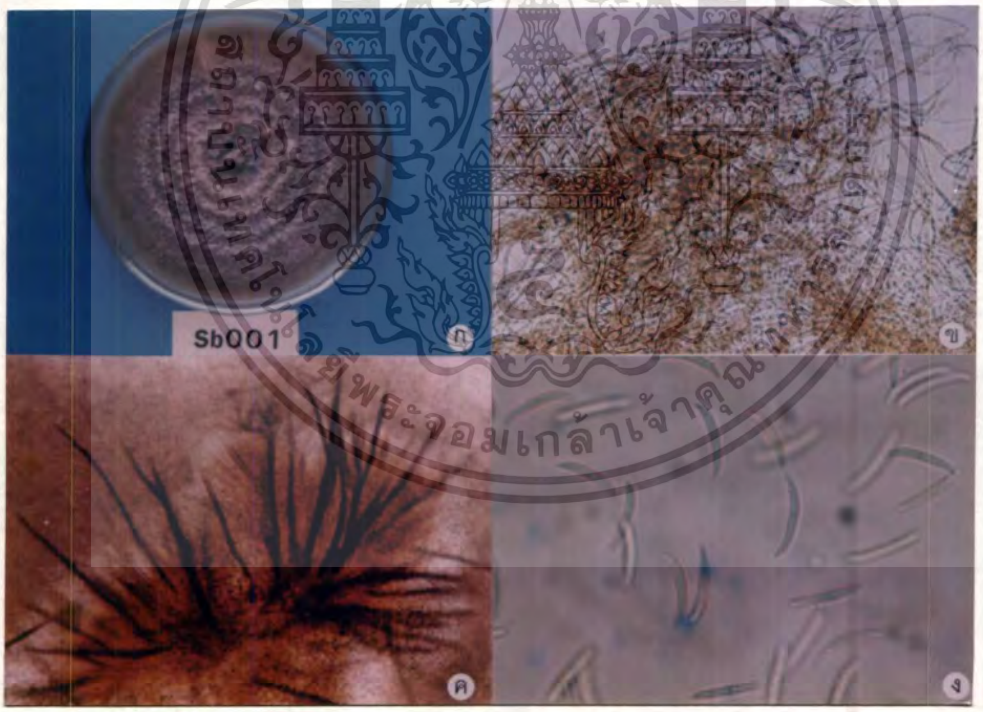
โรคแอนแทรคโนสของโหระพา (*Ocimum basilicum*)

Isolate Sb001

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum dematium* (Pers, & Fr.) Grove

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีน้ำตาลอมเทา พบการเจริญของเส้นใยสีน้ำตาลปริมาณน้อย มีการเจริญเป็นร่องสีน้ำตาลเข้มจากบริเวณกึ่งกลางโคโลนี เจริญเติบโตช้า โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 9 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอ่อน โดย conidia มีรูปร่างแบบ falcate หรือ fusiform มีขนาดประมาณ 15-25 x 2.5 ไมโครเมตร พบการสร้าง setae แบบหลวมๆ สีน้ำตาลเข้มถึงดำจำนวนมาก โดย setae มีขนาดประมาณ 175-250 x 5-7.5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.22)



ภาพที่ 4.22 แสดงเชื้อ *Colletotrichum dematium* Isolate Sb001

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 9 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. setae 400 เท่า

ง. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

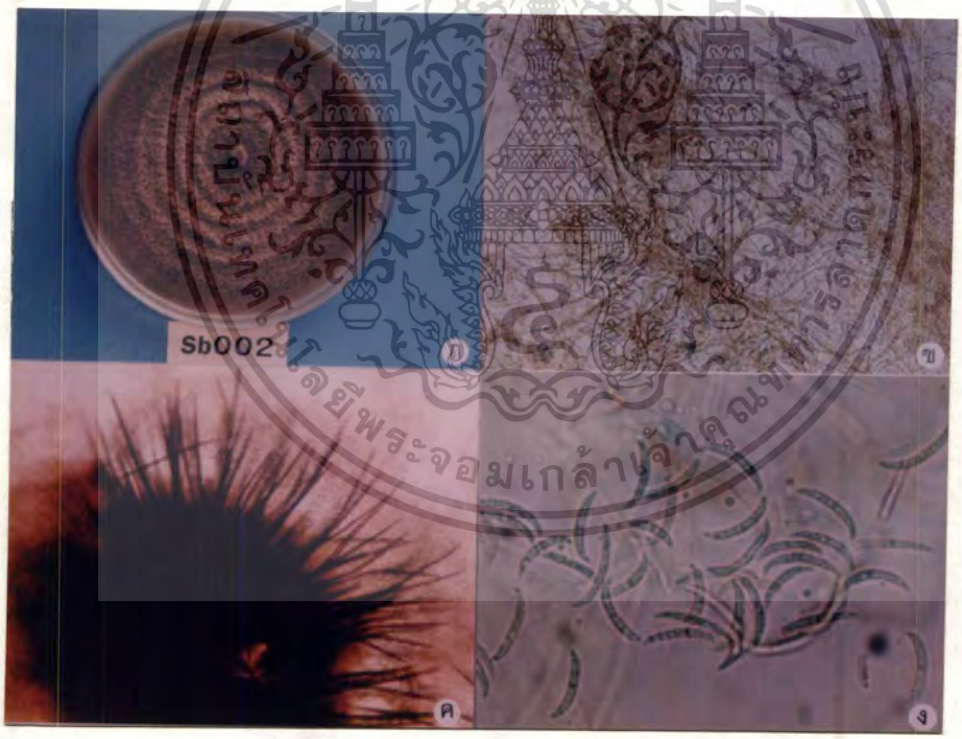
โรคแอนแทรคโนสของโหระพา (*Ocimum basilicum*)

Isolate Sb002

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum dematium* (Pers, & Fr.) Grove

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีน้ำตาลเข้มอมเทา พบการเจริญของเส้นใยสีน้ำตาลปริมาณน้อย ไม่พบเป็นร่องจากกึ่งกลางโคโลนี เจริญเติบโตช้า โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 9 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอ่อน โดย conidia มีรูปร่างแบบ falcate หรือ fusiform มีขนาดประมาณ 20-25 x 2.5-3.13 ไมโครเมตร พบการสร้าง setae แบบหนาแน่นสีน้ำตาลเข้มถึงดำจำนวนมาก โดย setae มีขนาดประมาณ 187.5-250 x 5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.23)



ภาพที่ 4.23 แสดงเชื้อ *Colletotrichum dematium* Isolate Sb002

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 9 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. setae 400 เท่า

ง. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

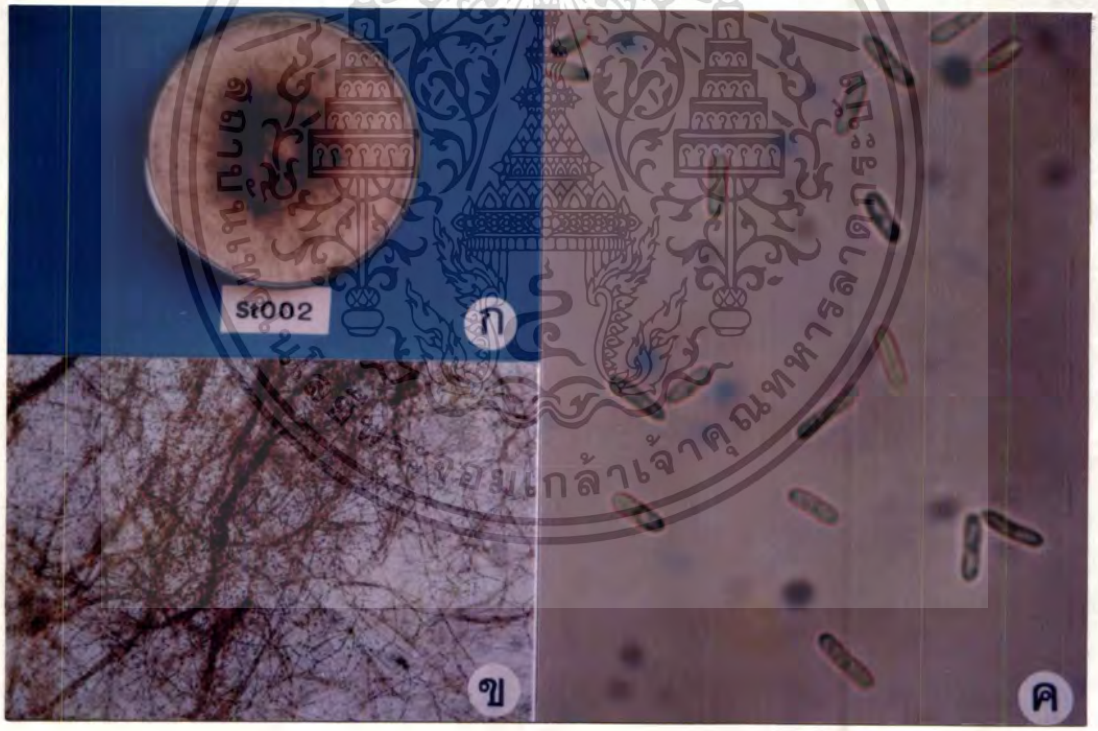
โรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอรี่ (*fragaria chiloensis*) Duchesne

Isolate St002

เชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยฟูสีน้ำตาลอ่อน เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เจริญมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อายุ 7 วัน ขอบโคโลนีเรียบ สร้าง conidial masses สีส้มอมชมพูไม่มากนัก conidia รูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ใสไม่มีสี เซลเดียว ขนาดประมาณ 10.5-17 x 3.5-4.5 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae, chlamydospores และ sclerotia (ภาพที่ 4.24)



ภาพที่ 4.24 แสดงเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* Isolate St002

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 7 วัน

ข. เส้นใย 100 เท่า

ค. conidia 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

จากการใช้เทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อ *Colletotrichum* จำนวน 24 isolates และ *Chaetomium cupreum* ซึ่งเป็น biological standard marker โดยบันทึกการปรากฏและไม่ปรากฏแถบโปรตีน พบว่าเชื้อ *Colletotrichum* ที่ทำการทดสอบมีการสร้างแถบโปรตีนทั้งหมด 10 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 24.5-100 kDa (ภาพที่ 4.25 และ 4.26) โดยเกิดแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 9 แถบ และที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่แตกต่างกัน 1 แถบในตำแหน่งที่ 3 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 91.5 kDa (ตารางที่ 4.2) เมื่อวิเคราะห์แถบโปรตีนที่เกิดขึ้นโดยพิจารณาจากการปรากฏและไม่ปรากฏแถบโปรตีนในแต่ละตำแหน่ง และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis ในโปรแกรม SPSS แล้วแสดงผลออกมาในรูป dendrogram (ภาพที่ 4.27) ทำให้จำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Colletotrichum* ได้ 4 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 มี 8 isolates ได้แก่ C007-1, St002, C004, Pea001, C003, Sb001, Sb002 และ C005

กลุ่มที่ 2 มี 13 isolates ได้แก่ A001, A003, M001, Pep001, M003, Pay001, C001, C007-2, C006-1, Bf001, Sap001, A002 และ M002-2

กลุ่มที่ 3 มี 2 isolates ได้แก่ Ban001 และ C002

กลุ่มที่ 4 มี 1 isolate ได้แก่ Ft001

ซึ่งการแบ่งกลุ่มเชื้อราดังกล่าวพิจารณาจากความถี่ของการเกิดและไม่เกิดแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันบางตำแหน่ง กล่าวคือในกลุ่มที่ 1 พบแถบโปรตีนในตำแหน่ง 3, 5 และ 6 น้ำหนักโมเลกุล 91.5, 83 และ 73 kDa ตามลำดับ ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 พบแถบโปรตีนในตำแหน่งที่ 1 และ 3 น้ำหนักโมเลกุล 100 และ 91.5 kDa ตามลำดับ ส่วนในกลุ่มที่ 3 พบแถบโปรตีนในตำแหน่งที่ 2, 3 และ 4 น้ำหนักโมเลกุล 98 91.5 และ 86 kDa ตามลำดับ ซึ่งต่างจากในกลุ่มที่ 4 ที่พบแถบโปรตีนในตำแหน่ง 6, 7, 9 และ 10 น้ำหนักโมเลกุล 73, 63, 44 และ 24.5 kDa ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราดังกล่าวออกเป็นกลุ่มย่อยได้ดังต่อไปนี้คือ

กลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

กลุ่มย่อยที่ 1.1 มี 5 isolates ได้แก่ C007-1, St002, C004, Pea001 และ C003

กลุ่มย่อยที่ 1.2 มี 3 isolates ได้แก่ Sb001, Sb002 และ C005

กลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อยคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มย่อยที่ 2.1 มี 2 isolates ได้แก่ A001 และ A003

กลุ่มย่อยที่ 2.2 มี 6 isolates ได้แก่ M001, Pep001, M003, Pay001, C001 และ C007-2

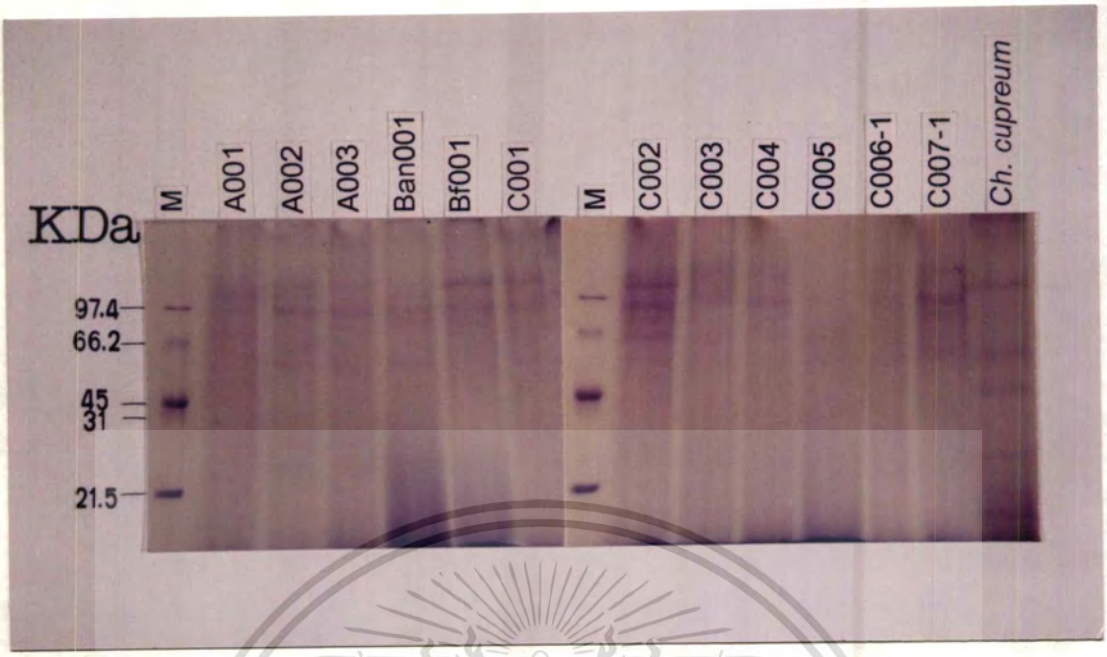
กลุ่มย่อยที่ 2.3 มี 1 isolate ได้แก่ C006-1

กลุ่มย่อยที่ 2.4 มี 4 isolates ได้แก่ Bf001, Sap001, A002 และ M002-2

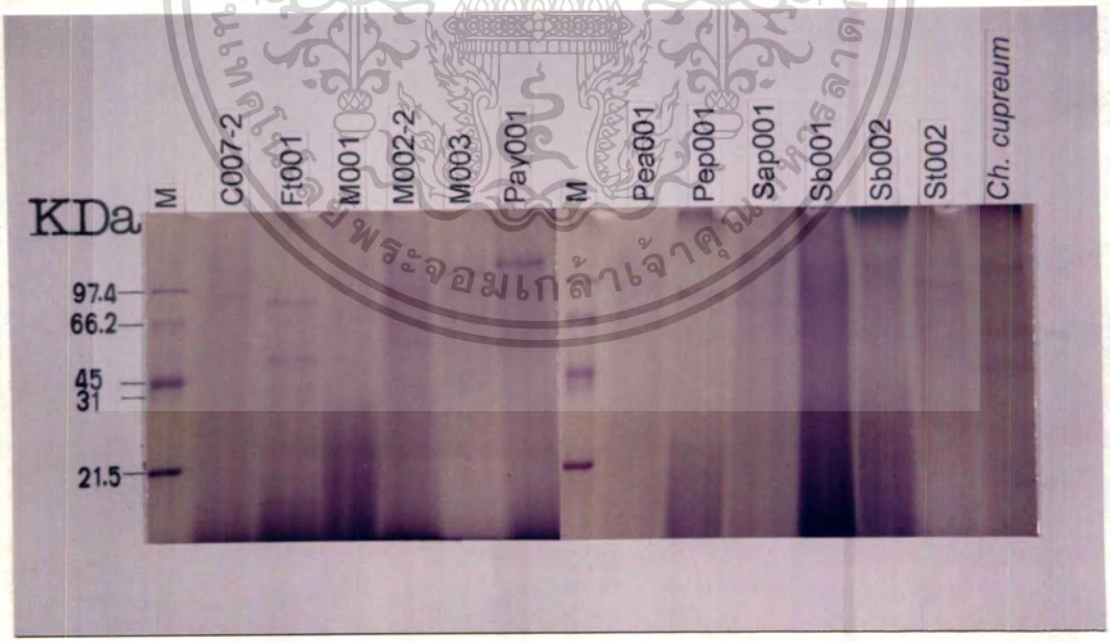
ซึ่งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราออกเป็นกลุ่มย่อยต่างๆ อาศัยความแตกต่างของแถบโปรตีนหลักในกลุ่มใหญ่ (major band) โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันจะเกิดแถบโปรตีนในตำแหน่งเดียวกัน (ภาพที่ 4.27)

จากผลการจัดกลุ่มเชื้อราข้างต้น มีข้อสังเกตที่ไม่สอดคล้องบางประการ กล่าวคือ เชื้อ *Chaetomium cupreum* ซึ่งเป็นเชื้อราที่นำมาเปรียบเทียบเพื่อให้เห็นความแตกต่างอย่างเด่นชัดจากเชื้อ *Colletotrichum* แต่กลับถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *C.gloeosporioides* isolate Ft001 (ภาพที่ 4.27) แต่เมื่อพิจารณาถึงแถบโปรตีนที่ปรากฏ ก็พบว่าสามารถแยก *Colletotrichum* isolate Ft001 ออกจาก *Ch. cupreum* ได้ โดยอาศัยการเกิดแถบโปรตีนในตำแหน่งที่ 3 ซึ่งถือว่าเป็นแถบโปรตีนหลักของ *Colletotrichum* ทั้งหมด แต่ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวใน *Ch. cupreum* (ตารางที่ 4.2) นอกจากนั้นในการจัดกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum* พบว่าไม่มีความสอดคล้องกับการจำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา กล่าวคือ *Colletotrichum* ที่ถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่ม species เดียวกันกลับไม่สามารถถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสได้ เช่น *C. gloeosporioides* ที่พบว่าถูกจัดให้อยู่ทั้ง 4 กลุ่ม หรืออีกในกรณีหนึ่งที่ *Colletotrichum* ต่าง species กันกลับถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน เหล่านี้เป็นต้น อย่างไรก็ตามเชื้อราที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวดังกล่าวก็ควรจะมีความสัมพันธ์กันในด้านใดด้านหนึ่ง เช่น มีการสร้างสารบางอย่างที่คล้ายกัน หรือมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคในระดับใกล้เคียงกัน เพราะฉะนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีสมาช่วยจำแนกกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่มีองค์ประกอบของโปรตีนที่เหมือนกัน นอกเหนือจากการจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาซึ่งอาศัยเพียงลักษณะภายนอกเท่านั้น โดยเทคนิคดังกล่าวจะช่วยลดขั้นตอนในการทดลองให้สั้นลงและให้ผลที่แน่นอนยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

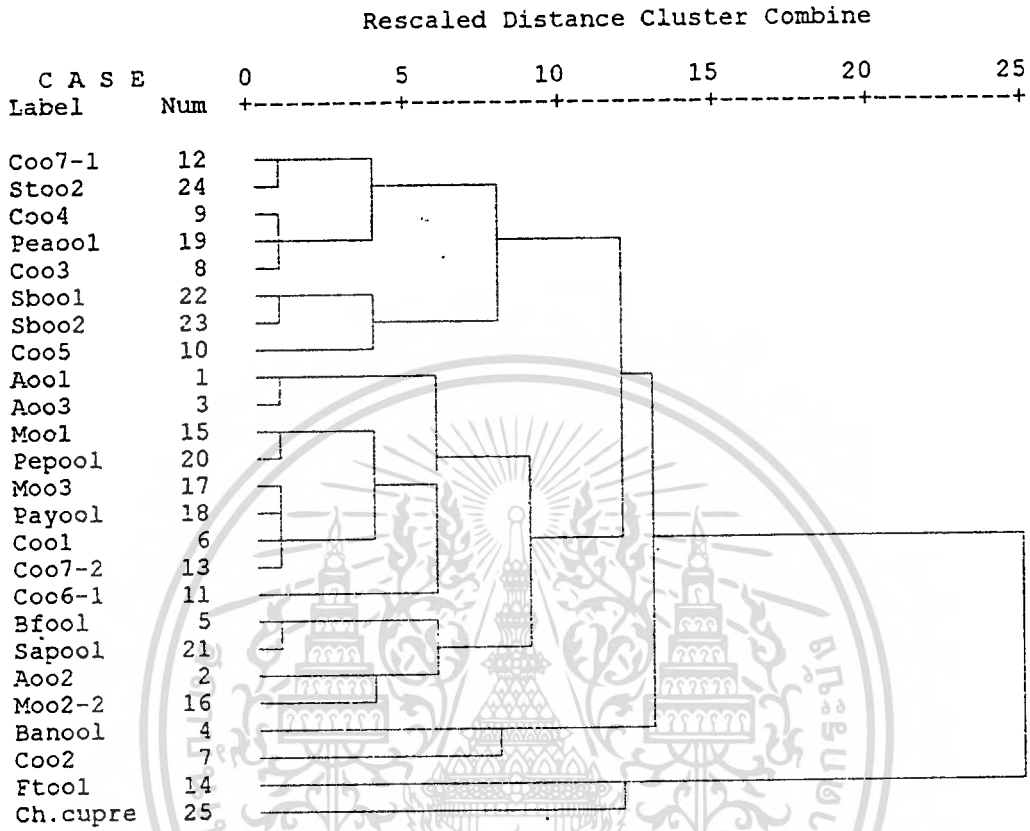


ภาพที่ 4.25 แสดงการเกิดแถบโปรตีนของเชื้อ *Colletotrichum* isolates ต่างๆ โดยเทคนิค SDS-PAGE
M คือ Molecular weight marker
ตัวเลขด้านซ้าย แสดงน้ำหนักโมเลกุล



ภาพที่ 4.26 แสดงการเกิดแถบโปรตีนของเชื้อ *Colletotrichum* isolates ต่างๆ โดยเทคนิค SDS-PAGE
M คือ Molecular weight marker
ตัวเลขด้านซ้าย แสดงน้ำหนักโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.27 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Colletotrichum* 24 isolates และ *Chaetomium cupreum* (biological standard marker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการปรากฏและไม่ปรากฏแถบโปรตีนของเชื้อรา *Colletotrichum* และ *Chaetomium cupreum* ซึ่งกำหนดค่าการปรากฏแถบโปรตีนเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบโปรตีนเป็น 0

Colletotrichum	ค่าแทนการปรากฏและไม่ปรากฏแถบโปรตีน									
	แถบ 1	แถบ 2	แถบ 3	แถบ 4	แถบ 5	แถบ 6	แถบ 7	แถบ 8	แถบ 9	แถบ 10
A001 (*C. gloeosporioides*)	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A002 (*C. gloeosporioides*)	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
A003 (*C. gloeosporioides*)	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Ban001 (*C. musae*)	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
Bf001 (*C. gloeosporioides*)	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
C001 (*C. gloeosporioides*)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
C002 (*C. gloeosporioides*)	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
C003 (*C.gloeosporioides*)	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
C004 (*C. gloeosporioides*)	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
C005 (*C. gloeosporioides*)	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
C006-1 (*C.gloeosporioides*)	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
C007-1 (*C.gloeosporioides*)	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
C007-2 (*C.gloeosporioides*)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Ft001 (*C. gloeosporioides*)	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1
M001 (*C. gloeosporioides*)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M002-2 (*C.gloeosporioides*)	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
M003 (*C. gloeosporioides*)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Pay001(*C.gloeosporioides*)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Pea001 (*C.lindemuthianum*)	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
Pep001 (*C.gloeosporioides*)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Sap001 (*C.gloeosporioides*)	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Sb001 (*C. dematium*)	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
Sb002 (*C. dematium*)	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
St002 (*C. gloeosporioides*)	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Ch. cupreum	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ความถี่ของการเกิดและไม่เกิดแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันบางตำแหน่งของเชื้อราทั้ง 4 กลุ่ม

ตำแหน่งแถบโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล (kDa)	ความถี่ของการเกิดแถบโปรตีน (เปอร์เซ็นต์)[1/]			
		กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 3	กลุ่ม 4
1	100	63	85	0	0
2	98	25	23	100	50
3	91.5	100	100	100	50
4	86	25	30	100	0
5	83	100	7	50	0
6	73	100	15	50	100
7	63	0	0	0	100
8	57.2	0	0	0	50
9	44	0	0	0	100
10	24.5	0	0	0	100

[1/] ความถี่ของการเกิดแถบโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) = (จำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏ / จำนวน isolate ของเชื้อราทั้งหมดที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน) x 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

4.2 การทดสอบหาสายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* isolates ต่าง ๆ ต่อการเกิดโรครุนแรงบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

จากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* จำนวน 20 isolates ซึ่งได้จากการจำแนกโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) จากข้อ 4.1.1 หลังจากทำการปลูกเชื้อบน detached leaves และบ่มภายใต้สภาพถุงพลาสติคชื้นในอุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* isolate M002-2 ซึ่งแยกได้จากมะม่วงเขียวเสวยทำให้เกิดอาการของโรคบนใบมะม่วงโชคอนันต์รุนแรงที่สุด โดยแผลจะมีสีน้ำตาลเข้มปนดำ และบางครั้งจะสังเกตเห็นลักษณะ concentric ring ซึ่งเป็นลักษณะอาการเฉพาะของโรคแอนแทรคโนส รองลงมาคือ *C. gloeosporioides* isolate M001 (แยกได้จากมะม่วงโชคอนันต์) และ isolate A001 (แยกได้จากใบวาสนา) โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผล 2.12, 1.86 และ 1.56 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.28) ส่วน *C. gloeosporioides* isolate Ft001 (แยกได้จากปาล์มหางหมาป่า) และ isolate Pep001 (แยกได้จากพริกไทย) ไม่สามารถทำให้เกิดโรคบนใบมะม่วงได้ (ตารางที่ 4.4)

จากผลการทดลองข้างต้นดังกล่าวอาจจะสังเกตเห็นความไม่สอดคล้องบางประการ กล่าวคืออาการของโรคที่รุนแรงที่สุดที่ปรากฏบนใบมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์น่าจะเกิดจากการปลูกเชื้อ ด้วย isolate M001 ซึ่งเป็น isolate ที่แยกได้จากมะม่วงโชคอนันต์เอง แต่กลับพบอาการรุนแรงเนื่องจากการปลูกเชื้อด้วย isolate M002-2 ซึ่งแยกได้จากมะม่วงเขียวเสวยแทน ดังนั้นจึงได้ทำการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* ทั้ง 2 isolates ดังกล่าวบนใบมะม่วงพันธุ์เขียวเสวยเพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่า *C. gloeosporioides* isolate M002-2 ก็ยังสามารถทำให้เกิดโรคได้ในระดับหนึ่ง (เส้นผ่าศูนย์กลางแผล 1.2 เซนติเมตร) ตรงกันข้ามกับการปลูกเชื้อด้วย isolate M001 ที่พบว่าไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ (ภาพที่ 4.29) นั่นแสดงว่า isolate M002-2 เป็นเชื้อที่สามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้อย่างกว้างขวาง (wide host range) นั่นเอง

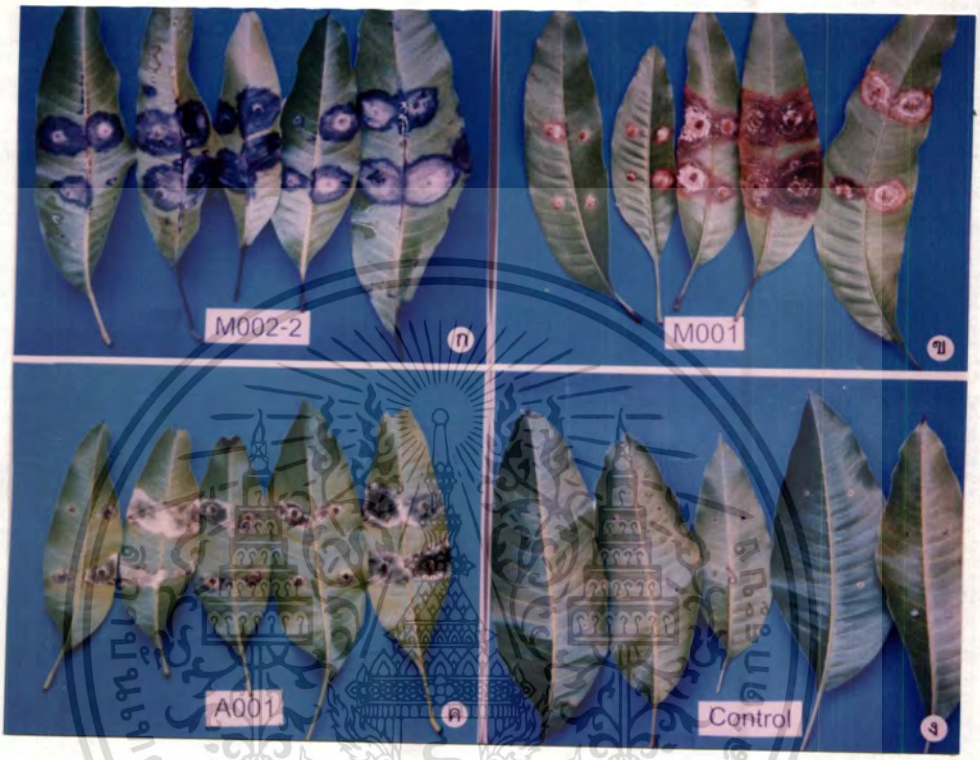
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนใบมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์หลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* isolates ต่างๆ โดยวิธี detached leaves เป็นเวลา 10 วัน

Isolates	เส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนใบมะม่วงโชคอนันต์ (ซม.)
A001 (ใบวาสนา)	1.56 [1/]c
A002 (ใบหนวดปลาหมึก)	0.8 def
A003 (ใบอมรเบิกฟ้า)	0.52 ef
Bf001 (ใบตาลแดง)	0.76 def
C001 (ผลส้มโชกุน ลำปาง)	0.56 ef
C002 (ผลส้มโชกุน ลำปาง)	0.65 def
C003 (ผลส้มเขียวหวาน แพร่)	0.5 f
C004 (ผลส้มเขียวหวาน แพร่)	0.53 ef
C005 (ผลส้มโอ นครปฐม)	0.72 def
C006-1 (ผลส้มเขียวหวาน ตาก)	0.54 ef
C007-1 (ใบส้มโชกุน ตาก)	0.63 def
C007-2 (ใบส้มโชกุน ตาก)	0.68 def
Ft001 (ใบปาล์มหางหมาป่า)	ไม่แสดงอาการ
M001 (มะม่วงโชคอนันต์)	1.86 b
M002-2 (มะม่วงเขียวเสวย)	2.12 a
M003 (มะม่วงอกร่อง)	0.89 d
Pay001 (มะละกอ)	0.61 def
Pep001 (พริกไทย)	ไม่แสดงอาการ
Sap001 (ชมพู่)	0.71 def
St002 (สตรอเบอรี่)	0.82 de

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 80 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.28 แสดงการเกิดโรคบนใบมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์หลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* isolates ต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน

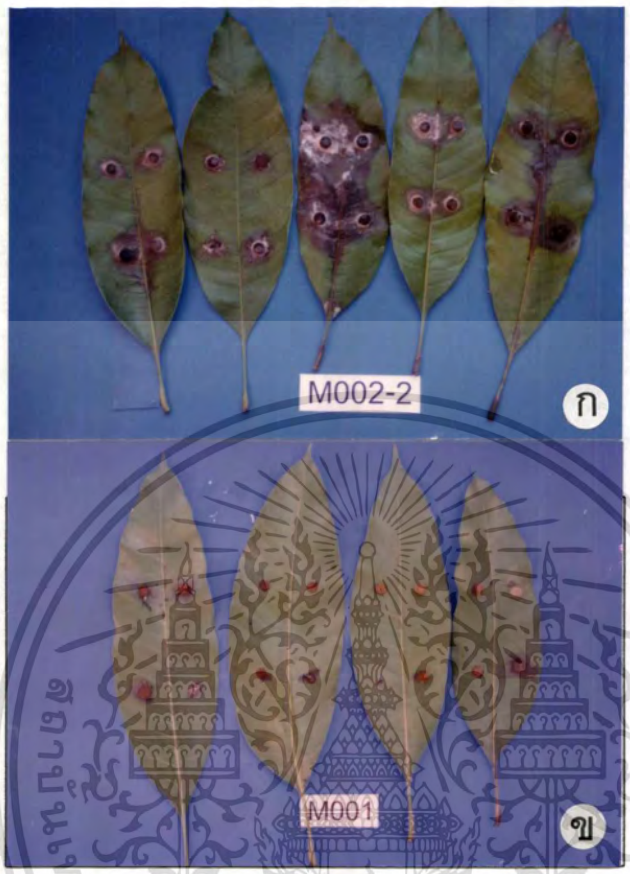
ก. isolate M002-2 (จากมะม่วงเขียวเสวย)

ข. isolate M001 (จากมะม่วงโชคอนันต์)

ค. isolate A001 (จากวาสนา)

ง. control (ใช้เฉพาะชิ้นวุ้นแทนเชื้อโรคพืช)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.29 แสดงการเกิดโรคบนใบมะม่วงพันธุ์เขียวเสวยหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นเวลา 10 วัน

ก. isolate M002-2 (จากมะม่วงเขียวเสวย)

ข. isolate M001 (จากมะม่วงโชคอนันต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* isolate M002-2 บนพืชอาศัย (host range) ชนิดอื่น ๆ

จากการนำเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 ซึ่งเป็น isolate ที่แยกได้จากมะม่วงเขียวเสวยและสามารถทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุดบนใบมะม่วงโชคอนันต์ตามผลการทดลองในข้อ 4.2 มาทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัยประเภทไม้ผลชนิดอื่นๆ ที่มีการปลูกร่วมกับมะม่วงในประเทศไทย บน detached leaves หรือ detached fruits จำนวน 5 ชนิดได้แก่ ส้มเขียวหวาน ละมุด ฝรั่ง มะกอกน้ำ และขนุน โดยบ่มเชื้อไว้ในถุงพลาสติคชื้นที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) พบว่า เชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 สามารถทำให้เกิดโครุนแรงที่สุดบนละมุด รองลงมาคือส้มเขียวหวาน โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผล 2.47 และ 1.25 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนบนฝรั่ง มะกอกน้ำ และขนุน ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ในระดับหนึ่งแต่ไม่รุนแรงมากนัก (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.30) นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *C. gloeosporiodes* M002-2 บนพืชอาศัยประเภทพืชผักและพืชไร่บางชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ พริกไทย พริกหยวก และถั่วลิสง เพื่อศึกษาความหลากหลายของพืชอาศัยต่อการเข้าทำลายของเชื้อดังกล่าว พบว่า *C. gloeosporioides* M002-2 ทำให้เกิดโรครุนแรงที่สุดบนมะเขือเทศ รองลงมาคือบนถั่วลิสง และพริกหยวก โดยมีเส้นผ่าเส้นผ่าศูนย์กลางแผล 3.14, 1.5 และ 1.17 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่สามารถทำให้เกิดโรคบนพริกไทยได้ (ภาพที่ 4.31)

จากผลการทดลองข้างต้นที่พบว่าหลังจากปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 มีพืชบางชนิดที่ไม่เป็นโรคหรือเป็นโรคในระดับที่ไม่รุนแรง เช่น ฝรั่ง มะกอกน้ำ ขนุน และพริกไทย จึงได้ศึกษาถึงกลไกบางอย่างของเหตุการณ์ดังกล่าว โดยใช้ผลฝรั่งซึ่งผ่านการปลูกเชื้อมาแล้วเป็นเวลา 8 วันเป็นตัวแทนในการศึกษา พบว่าหลังจากที่เชื้อมีการเจริญของเส้นใยเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชตามรอยแผลที่เจาะไว้ เชื้อก็สามารถใช้ประโยชน์จากสารอาหารภายในเซลพืชนั้นได้เพียงระยะหนึ่งก็เกิดการชะงักการเจริญเติบโตของเส้นใย และไม่สามารถเจริญครอบคลุมไปบนเนื้อเยื่อของผลฝรั่งได้อีก โดยเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อดังกล่าวสามารถแกะให้หลุดออกจากเนื้อเยื่อพืชปกติได้ (ภาพที่ 4.32)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนพืชอาศัยประเภทไม้ผลหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บน detached leaves หรือ detached fruits

พืชอาศัย	ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางแผลจากการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 (ซม.)[1/]
ส้มเขียวหวาน	10	1.25
ละมุด	12	2.47
ฝรั่ง	8	0.92
มะกอกน้ำ	8	0.79
ขนุน	6	0.81

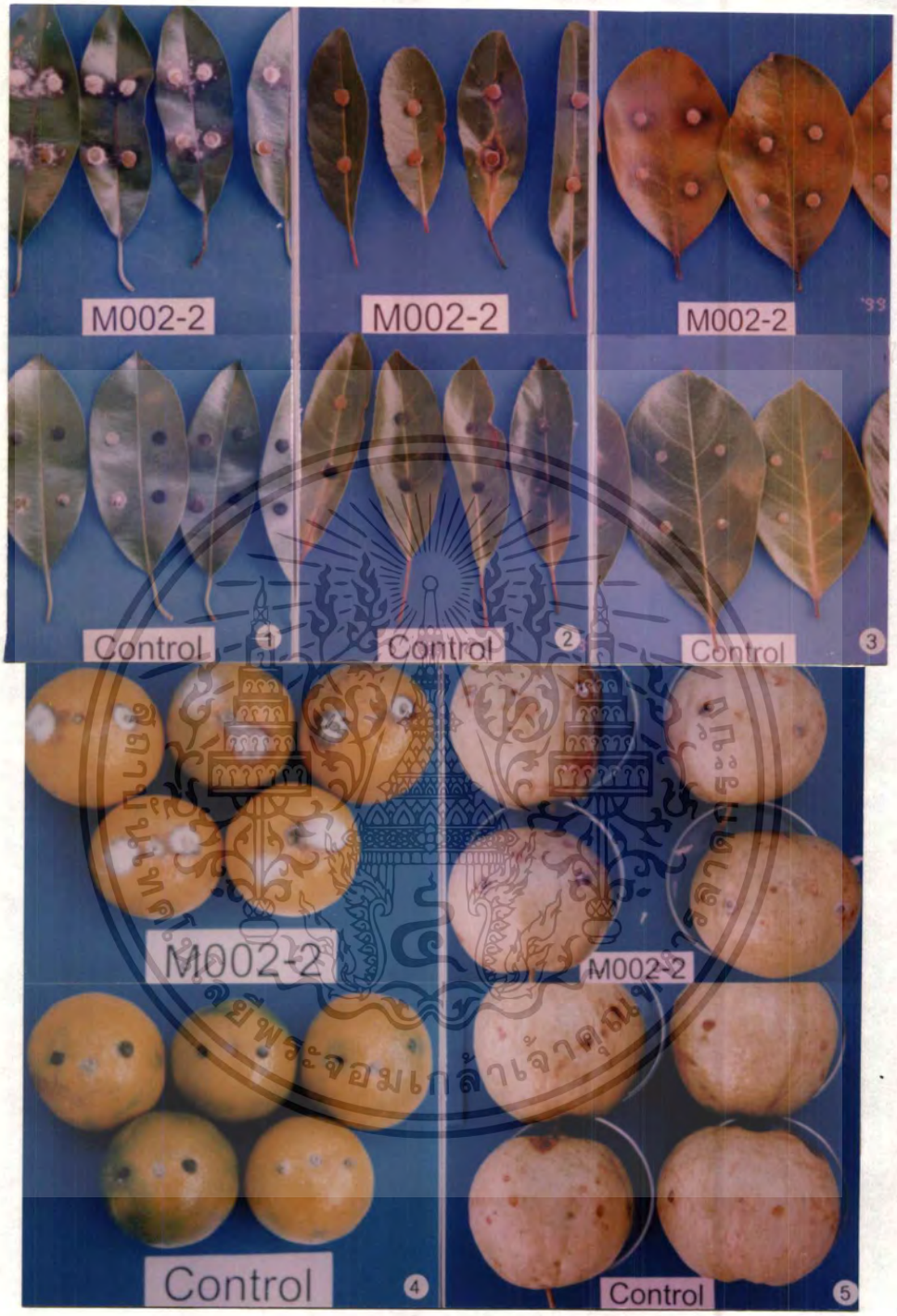
[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ

ตารางที่ 4.6 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนพืชอาศัยประเภทพืชผักและถั่วลิสงหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บน detached leaves หรือ detached fruits

พืชอาศัย	ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางแผลจากการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 (ซม.)[1/]
มะเขือเทศ	8	3.14
พริกไทย	5	0
พริกหยวก	6	1.17
ถั่วลิสง	4	1.5

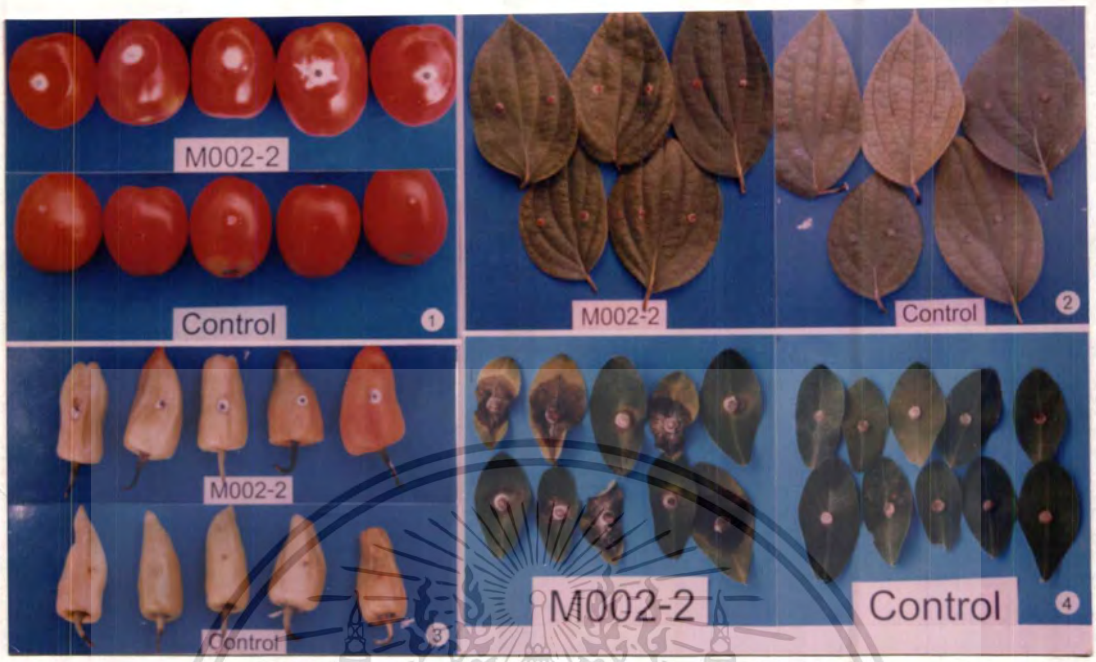
[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 20 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



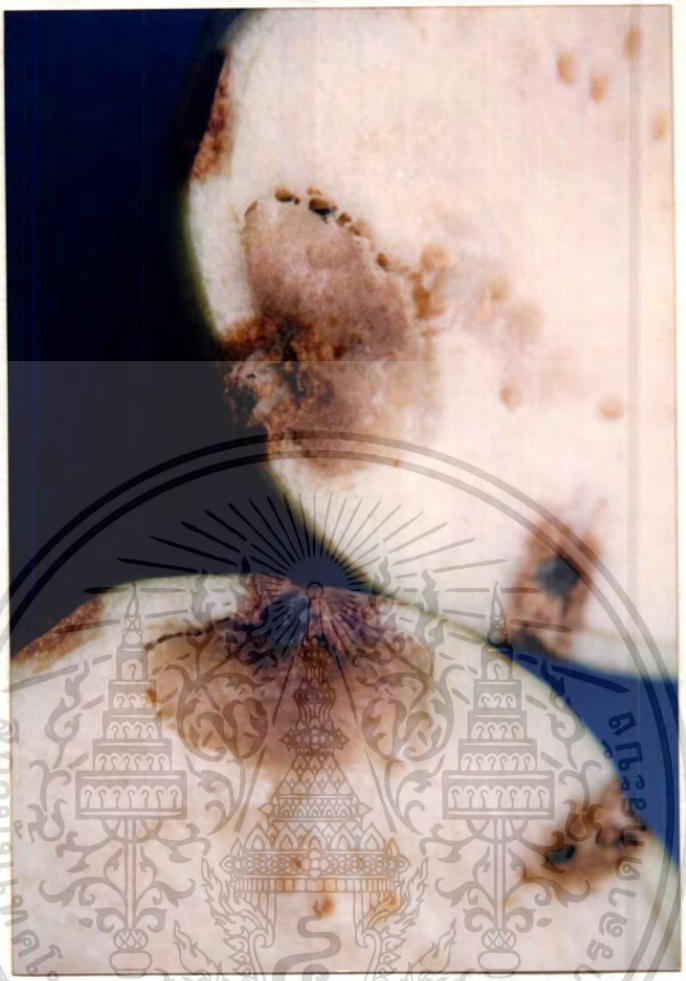
ภาพที่ 4.30 แสดงการเกิดโรคบนพืชอาศัยประเภทไม้ผลหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 1 = ละมุด 2 = มะกอกน้ำ 3 = ขนุน 4 = ส้มเขียวหวาน และ 5 = ฝรั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.31 แสดงการเกิดโรคบนพืชอาศัยประเภทพืชผักและถั่วลิสงหลังจากปลูกเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2
1 = มะเขือเทศ 2 = พริกไทย 3 = พริกหยวก และ 4 = ถั่วลิสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.32 แสดงการเข้าทำลายของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนผลฝรั่งที่อายุ 8 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2

ก่อนการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้ทำการศึกษาถึงลักษณะของจุลินทรีย์ต่อต้าน ได้แก่ *Ch. globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และเชื้อราที่มีคุณสมบัติ carry R-gene to carbendazim คือ transformant of *T. harzianum* China เพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างภายในต่างๆ ซึ่งได้แสดงรายละเอียดของเชื้อราไว้ในภาพที่ 4.33, 4.34, 4.35 และ 4.36

โดยทำการศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดคือ potato dextrose agar (PDA) potato sucrose agar (PSA) mango fruit agar (MFA) และ mango leaf agar (MLA) ที่มีระดับ pH แตกต่างกัน ตั้งแต่ pH 3-8 โดยทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อที่อายุ 4 วัน ยกเว้น transformant of *T. harzianum* ที่ทำการวัดผลที่อายุ 30 วันเนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก และทำการแปลงผลให้เป็นค่าประเมินการเจริญเติบโตเพื่อให้สอดคล้องกับความหนาแน่นของเส้นใย รวมทั้งบันทึกจำนวนสปอร์ที่อายุ 25 วัน ยกเว้น transformant of *T. harzianum* ที่ไม่มีการสร้างสปอร์ พบว่าชนิดของอาหารและระดับ pH มีปฏิกิริยาสัมพันธ์ (interaction) ต่อกันทั้งในด้านการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อราทุกชนิด ยกเว้นใน *T. harzianum* ดังจะเห็นได้จากผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ F-test ของปัจจัย A (ชนิดของอาหาร) x ปัจจัย B (ระดับ pH) ที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเจริญเติบโตและจำนวนสปอร์ที่แตกต่างกันในแต่ละทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น (treatment combination) มีผลมาจากความแตกต่างทั้งชนิดของอาหารและระดับ pH ซึ่งต่างจากการเจริญเติบโตและจำนวนสปอร์ของเชื้อ *T. harzianum* ที่พบว่า ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น ปัจจัย A x B ไม่มีปฏิกิริยาสัมพันธ์ต่อกัน รวมทั้งปัจจัยระดับ pH แสดงค่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (F-test แสดงค่า ns) นั่นแสดงว่าความแตกต่างของการเจริญเติบโตและจำนวนสปอร์ของเชื้อ *T. harzianum* ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่แตกต่างกันเท่านั้น

สำหรับข้อมูลการเจริญเติบโตและจำนวนสปอร์ของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดพบว่า ในเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar ระดับ pH 6 มีการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ดีที่สุดโดยมีค่าประเมินการเจริญเติบโตเท่ากับ 21.6 และจำนวนสปอร์เท่ากับ 7.59×10^7 (ภาพที่ 4.37) ส่วน *Ch. globosum* และ *Ch. cupreum* พบว่าการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ไม่ได้ถูกจำกัดอยู่ในทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นเดียวกัน กล่าวคือ *Ch. globosum* เจริญเติบโตดีบนอาหาร 2 ชนิดคือ potato sucrose agar ระดับ pH 7 และ mango fruit agar ระดับ pH 7 และ 8 (ค่าประเมินการเจริญเติบโตเท่ากับ 18.95, 18.6 และ 18.2 ตามลำดับ) แต่อย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก็ตามจำนวนสปอร์ที่มากที่สุดก็ถูกสร้างบนทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นที่ใกล้เคียงกันคือ mango fruit agar ระดับ pH 6 สำหรับ *Ch. cupreum* พบว่าเจริญเติบโตดีบนอาหาร potato sucrose agar ระดับ pH 5 แต่สร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar ที่ระดับ pH 6 (ภาพที่ 4.38) ในส่วนของเชื้อรา *T. harzianum* พบการเจริญเติบโตดีมากในเกือบทุกทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น ยกเว้นบนอาหาร potato sucrose agar pH 8 และ mango fruit agar pH 3 ตลอดจนอาหาร mango leaf agar ทุกระดับ pH ก็ให้ผลไม่ดีเช่นเดียวกัน นั่นแสดงว่า *T. harzianum* มีความทนทานต่อความเป็นกรด-ด่างได้สูงมากนั่นเอง สำหรับ transformant of *T. harzianum* พบว่าเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารทุกชนิดที่มี pH อยู่ระหว่าง 6-8 ยกเว้นบนอาหาร mango leaf agar (ภาพที่ 4.39) (ตารางที่ 4.7 และ 4.8)

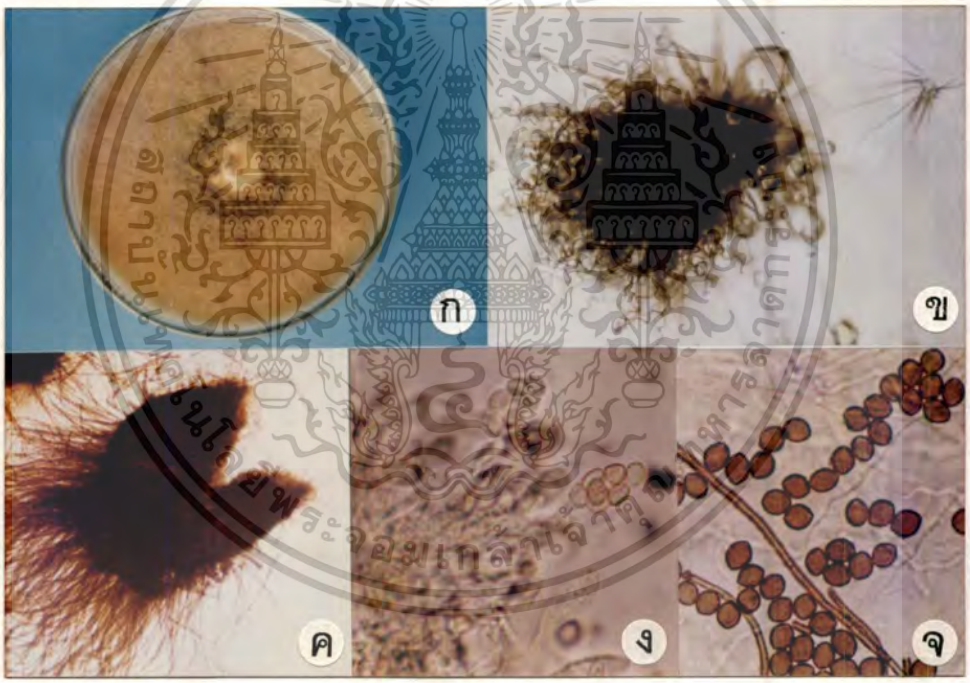
จากผลการทดลองข้างต้นอาจจะสังเกตเห็นความขัดแย้งหรือความไม่สอดคล้องบางประการในด้านการเจริญเติบโตและจำนวนสปอร์ของ *Ch. cupreum* กล่าวคือในสภาพอาหารที่มีการเจริญเติบโตสมบูรณ์ (potato sucrose agar ที่ระดับ pH 5) ไม่ได้มีผลให้สร้างสปอร์ได้ดี ทั้งนี้อาจจะสืบเนื่องมาจากสภาพอาหารดังกล่าวไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นหรือส่งเสริมในการสร้างสปอร์แต่อย่างใด โดยสรุปแล้วในการทดลองนี้พบว่าเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ในทุกอาหารและเกือบทุกระดับ pH แต่อย่างไรก็ตามพบว่าชนิดของอาหารที่ทำให้เชื้อราทั้ง 5 ชนิดมีการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ค่อนข้างดีถึงดีมาก คือ potato dextrose agar ที่ระดับ pH 6-7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chaetomium globosum Cg8

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยสีเขียวมะกอกหรือเขียวมะกอกเข้ม มีอัตราการเจริญเติบโต 8 มิลลิเมตรต่อวัน สร้าง perithecia มีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลมปก คลุมด้วย hair จำนวนมาก มีผนังทึบอยู่เป็นกลุ่มหรือกระจัดกระจาย มีขนาดประมาณ 300 x 250 ไมโครเมตร terminal hair มีรูปร่างโค้งงอเป็นคลื่นหรือเป็นขด ตรงปลายทู่ โดยปกติไม่มีการแตกกิ่งก้าน ผิวขรุขระเล็กน้อยและมีผนังกั้น ส่วน lateral hair มีลักษณะตรงหรือเป็นคลื่นเล็กน้อย asci มีรูปร่างแบบกระบอง (clavate) มีสภาพไม่คงทน ขนาดประมาณ 35 x 12 ไมโครเมตร ascospore มีรูปร่างคล้ายผลมะนาว (lemon-shaped) บรรจุอยู่ภายใน ascus จำนวน 8 อัน มีขนาดประมาณ 11.5 x 10.2 ไมโครเมตร เมื่อแก่เป็นสีน้ำตาล ผนังหนา และมี germ pore ที่ยอด (ภาพที่ 4.33)



ภาพที่ 4.33 แสดงเชื้อ *Chaetomium globosum* Cg8

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 10 วัน

ข. perithecium บนผิวหน้าอาหาร PDA 40 เท่า

ค. perithecium 40 เท่า

ง. young ascospores ใน asci 400 เท่า

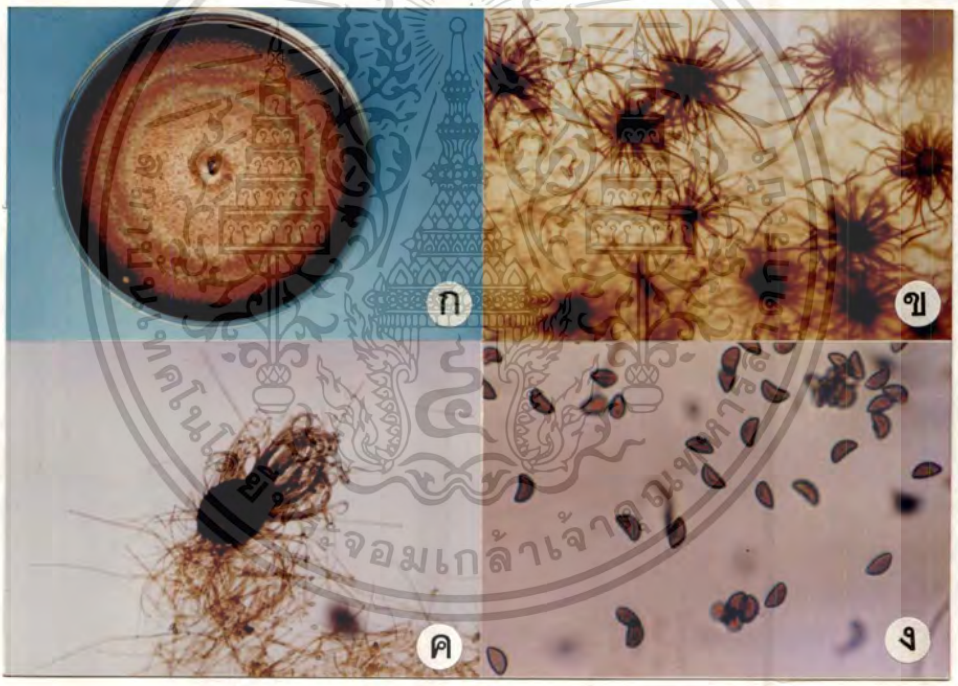
จ. ascospores 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chaetomium cupreum Cc9

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้าง pigment สีแดงบนอาหาร เส้นใยมีอัตราการเจริญเติบโต 5 มิลลิเมตรต่อวัน สร้าง perithecia รูปร่างไข่ถึงกลม โดยมีผนังบางในระยะแรกและทึบในเวลาต่อมา เจริญเติบโตเต็มที่ภายในระยะเวลา 14 วัน โดยมีขนาดประมาณ 120-140 x 102-130 ไมโครเมตร terminal hair มีสีคล้ายทองแดง ตรงปลายขดเป็นวง ผิวหยาบ กว้างประมาณ 4.5 ไมโครเมตร lateral hair มีลักษณะคล้าย terminal hair แต่มีขนาดแคบกว่า (3.8 ไมโครเมตร) และมีรูปร่างตรง asci มีรูปร่างแบบกระบอง และมีสภาพไม่คงทน มีขนาดประมาณ 25-30 x 10-12 ไมโครเมตร ascospore มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ใสไม่มีสีเมื่อยังอ่อน และจะกลายเป็นสีเขียวมะกอกเมื่อแก่แล้ว มีขนาดประมาณ 11 x 8 ไมโครเมตร และมี germ pore 1 อันที่ยอด (ภาพที่ 4.34)



ภาพที่ 4.34 แสดงเชื้อ *Chaetomium cupreum* Cc9

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 14 วัน

ข. perithecia บนผิวหน้าอาหาร PDA 40 เท่า

ค. perithecium 40 เท่า

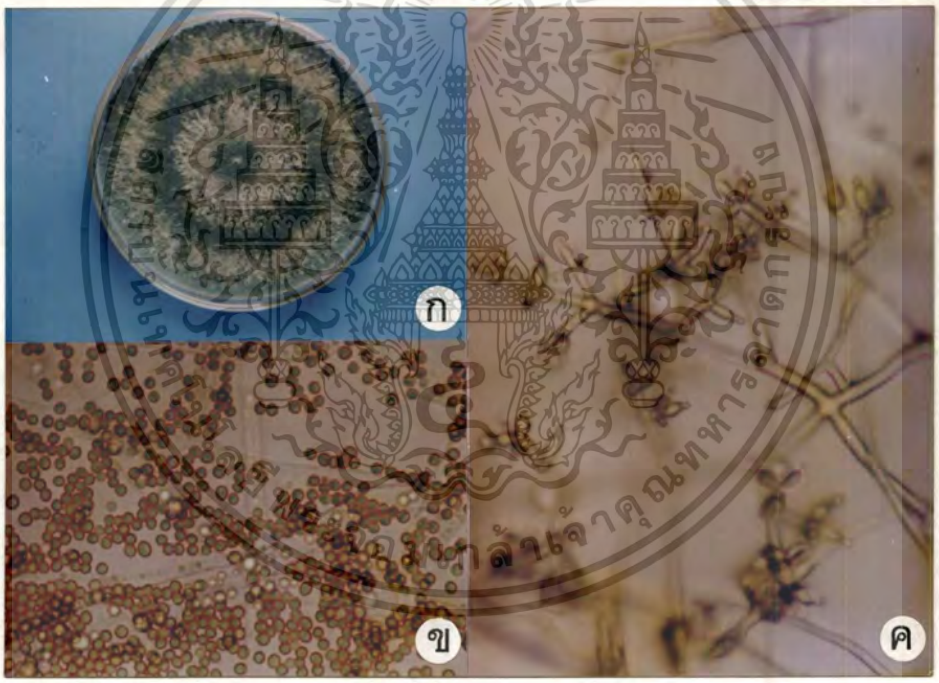
ง. ascospores 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Trichoderma harzianum T88-2

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเขียวและเจริญซ้อนกันเป็นวง (concentric ring) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่อายุ 5 วัน สร้างเส้นใยใสไม่มีสี phialophore มีลักษณะเหมือนกับเส้นใย มีผนังกั้น และมีการแตกแขนงได้ดี มีความยาวประมาณ 2.5-5 ไมโครเมตร ตอนปลายของ phialophore มีโครงสร้างที่เรียกว่า phialide ซึ่งมีรูปร่างเรียวยาวและมีจำนวน 3 แฉก มีความยาวประมาณ 7-8 ไมโครเมตร โดย phialide เป็นจุดกำเนิดของ phialospores (conidia) ซึ่งมีรูปร่างกลม ขนาดประมาณ 2.8-3.2 x 2.5-2.8 ไมโครเมตร ไม่มีการปลดปล่อย pigment บนอาหาร และพบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตดีที่สุดที่อุณหภูมิ 15-35 องศาเซลเซียส ที่ระดับ pH 3.7-4.7 (ภาพที่ 4.35)



ภาพที่ 4.35 แสดงเชื้อ *Trichoderma harzianum* T88-2

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 8 วัน

ข. conidia 400 เท่า

ค. phialides 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Transformant of *Trichoderma harzianum* China

รายละเอียดของเชื้อรา

ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีน้ำตาล สร้างเส้นใยใสไม่มีสีถึงสีน้ำตาลอ่อน เจริญราบและมีลักษณะเป็นร่องบนผิวหน้าอาหาร เจริญเติบโตช้ามากโดยมีอัตราการเจริญเติบโต 0.11 เซนติเมตรต่อวัน ไม่พบการสร้างสปอร์แต่กลับพบการสร้าง chlamydospores ทั้งที่ต่อกันเป็นลูกโซ่ตั้งแต่ 2-9 chlamydospores และ chlamydospore เดี่ยวๆ จำนวนมาก โดย chlamydospore เมื่อยังอ่อนจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน แต่เมื่อเชื้อรามีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและมีผนังหนา 2 ชั้น chlamydospore มีขนาดประมาณ 9.25-11.1 ไมโครเมตร และเชื้อราใน culture นี้ carry gene ซึ่งมีความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดเชื้อราประเภท carbendazim (ภาพที่ 4.36)

ภาพที่ 4.36 แสดงเชื้อ transformant of *Trichoderma harzianum* China

ก. โคโลนีบนอาหาร PDA ที่อายุ 30 วัน

ข. young chlamydospores 400 เท่า

ค. chlamydospores 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหารที่มีระดับ pH แตกต่างกัน ที่อายุ 4 วัน

ชนิดอาหาร	ระดับ pH	ค่าประเมินการเจริญเติบโต[1/]				
		M002-2	Cg8	Cc9	T88-2	Transformant[2/]
Potato dextrose agar	3	4.73 k[3/]	0.75 l	6.48 j	22 a	0 h
(PDA)	4	6.67 j	4.25 j	14.8 e	22 a	4.84e
	5	12.08 h	11.4 f	16.45 c	22 a	10.9 bc
	6	21.6 a	16.1 de	16.3 c	22 a	12.51 ab
	7	18.65 cd	16.3 cde	15.65 d	22 a	13.45 a
	8	11.7 h	15.45 e	15.5 d	22 a	12.35 ab
Potato sucrose agar	3	7.33 j	0.88 l	7.3 l	22 a	0 h
(PSA)	4	14.14 g	5.55 l	15.6 d	22 a	4.28 ef
	5	15.71 ef	6.85 h	17.7 a	22 a	10.25 c
	6	16.24 e	17.55 bc	16.95 b	22 a	12.59 ab
	7	15.68 ef	18.95 a	11.85 h	22 a	13.23 a
	8	14.63 fg	12.64 f	11. 36 h	16.5 b	13.09 a
Mango fruit agar	3	6.53 j	0.84 l	7.65 l	16.5 b	0 h
(MFA)	4	17.95 d	4.78 ij	11.85 h	22 a	1.2 gh
	5	19.5 bc	12.34 f	11.85 h	22 a	6.71 d
	6	20.35 b	16.85 cd	14.03 f	22 a	9.55 c
	7	19.65 bc	18.6 ab	12.98 g	22 a	13.25 a
	8	19.22 bcd	18.2 ab	12.75 g	22 a	13.3 a
Mango leaf agar	3	0.63 l	1.46 l	1.85 m	11 c	0 h
(MLA)	4	4.03 k	1.49 l	5.55 l	11 c	0 h
	5	9.25 l	2.96 k	6.1 jk	11 c	2.03 g
	6	9.68 l	8.35 g	6.6 j	11 c	5.05 de
	7	8.83 l	8.7 g	6.25 jk	11 c	5.93 de
	8	4.36 k	4.08 jk	5.8 kl	11 c	2.7 fg

M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch. cupreum*, T88-2 = *T. harzianum* และ transformant = transformant of *T. harzianum* China

[1/] ค่าประเมินการเจริญเติบโต = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) x ระดับความหนาแน่นของเส้นใย (ตารางผนวกที่ 1ก)

[2/] บันทึกผลที่อายุ 30 วันเนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้ามาก

[3/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

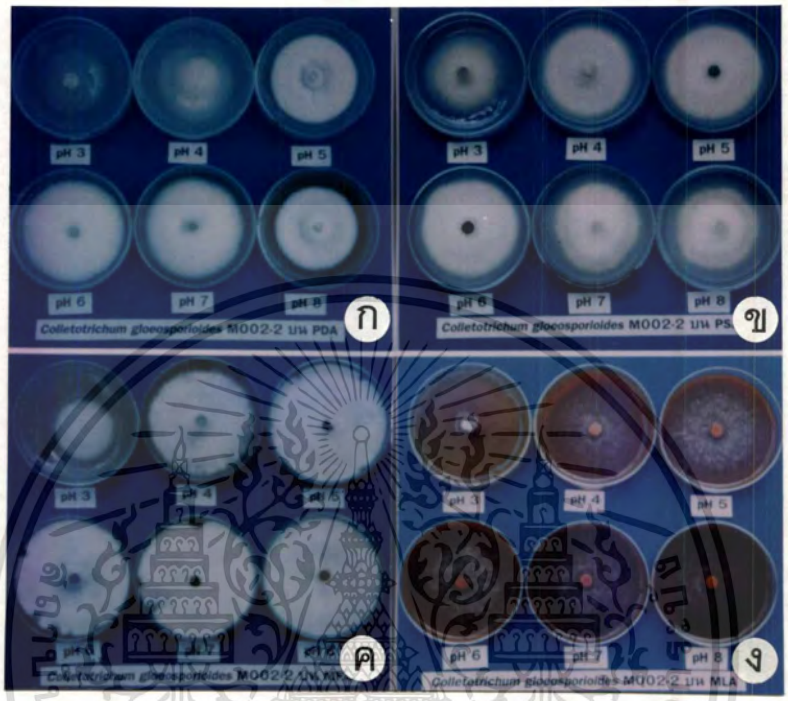
ตารางที่ 4.8 แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนอาหารที่มีระดับ pH แตกต่างกัน ที่อายุ 25 วัน

ชนิดอาหาร	ระดับ pH	จำนวนสปอร์ ($\times 10^7$)			
		M002-2	Cg8	Cc9	T88-2
Potato dextrose agar	3	0.68 jk[1/]	0 f	0.93 c	117.99 bc
(PDA)	4	1.93 g-j	0.5 ef	2.53 b	199.73 bc
	5	3.1 d-g	2.08 cd	3.17 b	756.18 ab
	6	7.59 a	2.73 bc	5.65 a	1146.23 a
	7	4.44 cd	1.65 d	2.27 b	766.14 ab
	8	0.02 k	0.84 e	2.22 b	142.78 bc
Potato sucrose agar	3	0.74 jk	0 f	0 c	51.84 c
(PSA)	4	1.22 ijk	0 f	0 c	55.96 c
	5	4.19 cde	0.01 f	0 c	58.13 c
	6	6.01 b	0.02 f	0 c	68.41 c
	7	4.62 c	0.02 f	0 c	50.05 c
	8	2.95 e-h	0.02 f	0 c	14.42 c
Mango fruit agar	3	0.71 jk	0 f	0 c	16.63 c
(MFA)	4	1.59 h-k	0.64 ef	0 c	112.94 bc
	5	3.71 c-f	3.38 b	0 c	159.39 bc
	6	6.05 b	4.05 a	0 c	212.62 bc
	7	2.39 f-l	2.25 cd	0 c	144.48 bc
	8	1.13 ijk	0.92 e	0 c	107.66 bc
Mango leaf agar	3	0.02 k	0 f	0 c	9.28 c
(MLA)	4	0.19 k	0 f	0 c	17.03 c
	5	0.18 k	0 f	0 c	31.28 c
	6	0.24 k	0 f	0 c	63.5 c
	7	0.16 k	0 f	0 c	37.43 c
	8	0.07 k	0 f	0 c	30.56 c

M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch. cupreum* และ T88-2 = *T. harzianum*

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.37 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 ที่อายุ 4 วัน

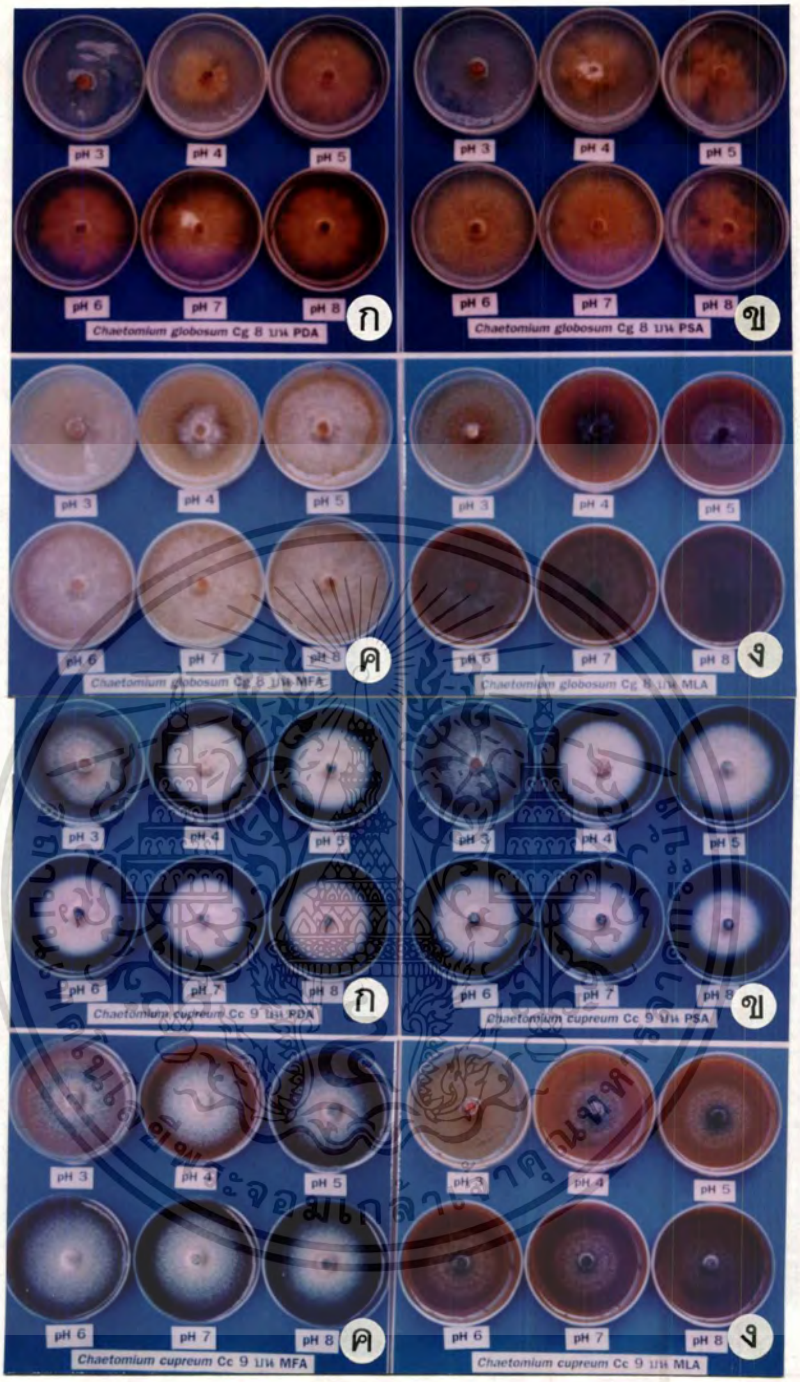
ก. บนอาหาร potato dextrose agar (PDA)

ข. บนอาหาร potato sucrose agar (PSA)

ค. บนอาหาร mango fruit agar (MFA)

ง. บนอาหาร mango leaf agar (MLA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.38 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Chaetomium globosum* Cg8 (บน) และ *Chaetomium cupreum* Cc9 (ล่าง) ที่อายุ 4 วัน

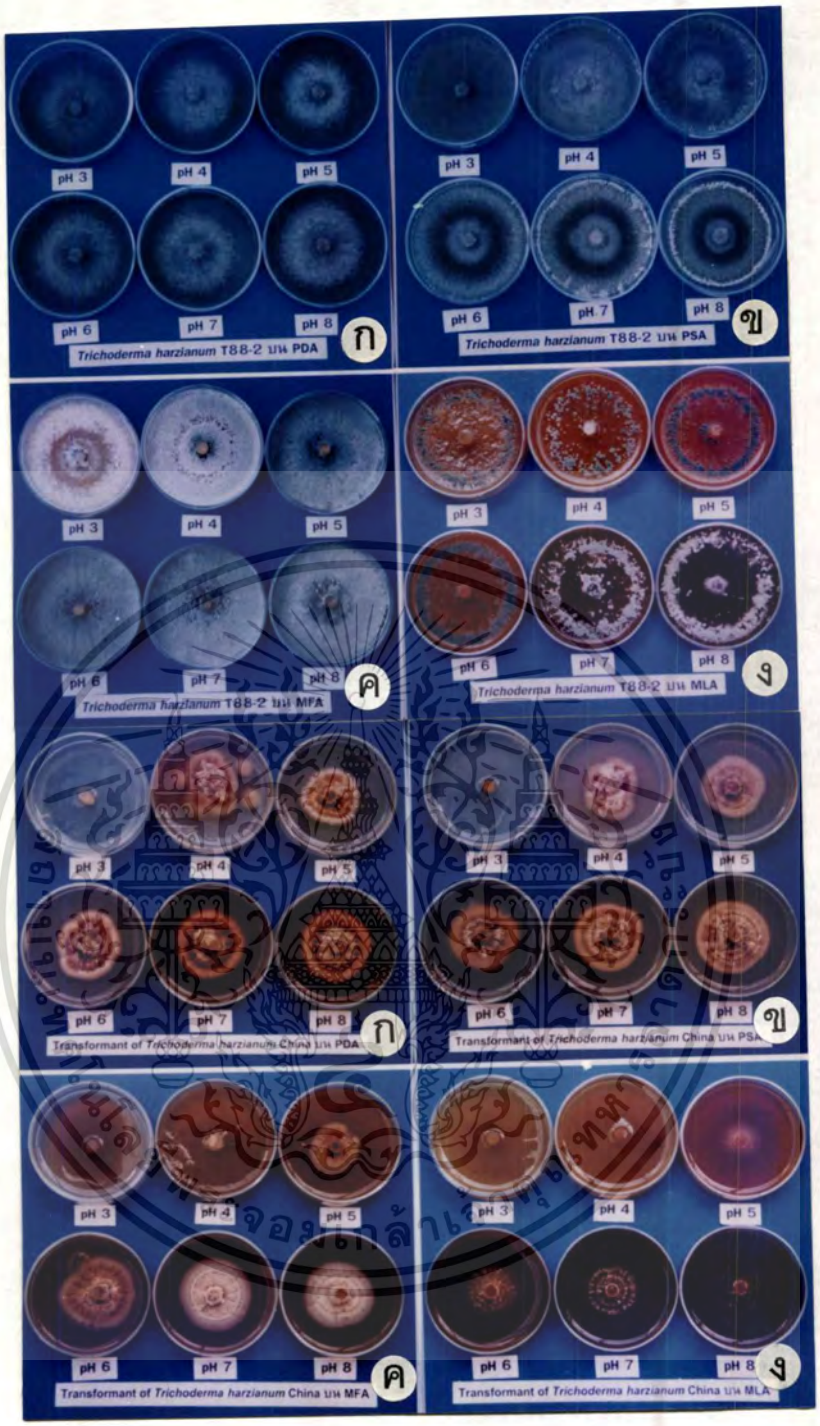
ก. บนอาหาร potato dextrose agar (PDA)

ข. บนอาหาร potato sucrose agar (PSA)

ค. บนอาหาร mango fruit agar (MFA)

ง. บนอาหาร mango leaf agar (MLA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.39 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Trichoderma harzianum* T88-2 ที่อายุ 4 วัน (บน) และ transformant of *Trichoderma harzianum* China ที่อายุ 30 วัน (ล่าง)

ก. บนอาหาร potato dextrose agar (PDA)

ข. บนอาหาร potato sucrose agar (PSA)

ค. บนอาหาร mango fruit agar (MFA)

ง. บนอาหาร mango leaf agar (MLA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทดสอบความต้านทานต่อสารเคมี carbendazim ของจุลินทรีย์ต่อต้านและเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2

จากการเลี้ยงเชื้อ *C. gloeosporioides* และจุลินทรีย์ต่อต้านทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ppm โดยทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีที่อายุ 6 วัน และแปลงผลให้เป็นค่าประเมินการเจริญเติบโต รวมทั้งนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราที่อายุ 25 วัน เปรียบเทียบกับ control (0 ppm) พบว่า *C. gloeosporioides* M002-2 *T. harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China มีความต้านทานต่อ carbendazim ได้ถึงระดับความเข้มข้น 0.8 ppm หรือมากกว่า โดยมีค่าประเมินการเจริญเติบโตเท่ากับ 4.46 7.4 และ 12.44 ตามลำดับ และพบว่า *C. gloeosporioides* เริ่มมีความต้านทานต่อ carbendazim ลดลงที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ppm (ค่าประเมินการเจริญเติบโตเท่ากับ 15.87) ในขณะที่ *T. harzianum* เริ่มมีความต้านทานลดลงที่ระดับความเข้มข้น 0.6 ppm (ค่าประเมินการเจริญเติบโตเท่ากับ 16.5) ตรงกันข้ามกับ transformant ซึ่งมีความต้านทานต่อ carbendazim ในระดับคงที่ ถึงแม้จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของ carbendazim ให้สูงขึ้นก็ตาม (ค่าประเมินการเจริญเติบโตเท่ากับ 12.44) ทั้งนี้เนื่องจาก transformant มีคุณสมบัติเป็น carried R-gene to carbendazim ซึ่งสามารถต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวได้นั่นเอง (ตารางที่ 4.9 และ 4.10; ภาพที่ 4.40 และ 4.41) สำหรับ *Ch. globosum* Cg8 และ *Ch. cupreum* Cc9 พบว่ามีความต้านทานต่อ carbendazim ได้ถึงระดับความเข้มข้น 0.4 ppm (ค่าประเมินการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.95 และ 0.76 ตามลำดับ) ซึ่งพบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดเริ่มมีความต้านทานลดลงที่ระดับความเข้มข้น 0.1 ppm (ค่าประเมินการเจริญเติบโตเท่ากับ 14.73 และ 19.64 ตามลำดับ) (ตารางที่ 4.9 และ 4.10; ภาพที่ 4.42)

จากผลการทดลองข้างต้นมีข้อสังเกตบางประการกล่าวคือ *Ch. globosum* และ *Ch. cupreum* ที่มีความต้านทานต่อ carbendazim ได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 0.4 ppm ซึ่งในความเข้มข้นดังกล่าวพบการเจริญของเส้นใยน้อยมาก นั่นแสดงว่าเชื้อรามีอัตราการเจริญเติบโตลดลง โดยมีอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 0.16 และ 0.13 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ ซึ่งต่างจากการเจริญเติบโตในสภาพที่ไม่มีสารเคมี (0.92 เซนติเมตรต่อวัน) หรือในสภาพที่มีสารเคมีแต่มีความเข้มข้นต่ำกว่า คือ 0.1 และ 0.2 ppm ในทำนองเดียวกันกับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *T. harzianum* ก็สามารถอธิบายในลักษณะเดียวกัน ยกเว้นใน transformant ที่พบว่าอัตราการเจริญเติบโตยังคงที่ (0.1 เซนติเมตรต่อวัน) ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของ carbendazim ให้สูงขึ้นก็ตาม (ตารางที่ 4.11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากความสามารถต้านทานต่อสารเคมี carbendazim ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดข้างต้น สามารถจัดกลุ่มความต้านทานได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีความต้านทานต่อสารเคมีน้อยถึงปานกลาง ซึ่งได้แก่ *C. gloeosporioides*, *Ch. globosum* และ *Ch. cupreum* โดยมีความต้านทานต่อสารเคมีได้เฉพาะที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ (0.1 ppm) และความต้านทานจะลดลงเรื่อยๆ ตามความเข้มข้นของ carbendazim ที่เพิ่มขึ้น กลุ่มที่สองเป็นเชื้อราที่มีความต้านทานต่อสารเคมีได้ในระดับหนึ่ง ได้แก่ *T. harzianum* ซึ่งคงความต้านทานต่อสารเคมีได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1-0.4 ppm แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีให้สูงขึ้นความต้านทานดังกล่าวก็จะลดลงอย่างรวดเร็ว สำหรับเชื้อราในกลุ่มสุดท้ายซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความต้านทานต่อ carbendazim มากที่สุดคือ transformant of *T. harzianum* ซึ่งพบว่าความต้านทานนั้นยังคงอยู่ในระดับสูงถึงแม้ความเข้มข้นของสารเคมีจะเพิ่มสูงขึ้นก็ตาม (ภาพที่ 4.43)

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *Trichoderma harzianum* China บนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 6 วัน

carbendazim	ค่าประเมินการเจริญเติบโต[1/]				
(ppm)	M002-2	Cg8	Cc9	T88-2	Transformant[2/]
0	22 a[3/]	22 a	22 a	22 a	12.88 a
0.1	22 a	14.73 b	19.64 b	22 a	12.72 a
0.2	15.87 b	5.82 c	12.75 c	22 a	12.56 a
0.4	5.66 c	0.95 d	0.76 d	22 a	12.52 a
0.6	4.48 c	0 d	0 d	16.5 b	12.44 a
0.8	4.46 c	0 d	0 d	7.4 c	12.44 a

M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch. cupreum*, T88-2 = *T. harzianum* และ transformant = transformant of *T. harzianum* China

[1/] ค่าประเมินการเจริญเติบโต = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) x ระดับความหนาแน่นของเส้นใย (ตารางผนวกที่ 5ก)

[2/] บันทึกผลที่อายุ 30 วัน

[3/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 25 วัน

carbendazim	จำนวนสปอร์ ($\times 10^7$)			
(ppm)	M002-2	Cg8	Cc9	T88-2
0	8.31 a [1/]	3.47 a	2.46 a	135.16 a
0.1	3.21 b	1.61 b	2.34 a	131.21 a
0.2	2.96 bc	0.06 c	2.28 a	129.43 a
0.4	2.58 bc	0 c	0.02 b	115.81 a
0.6	2.33 c	0 c	0 b	106.48 a
0.8	2.28 c	0 c	0 b	98.27 a

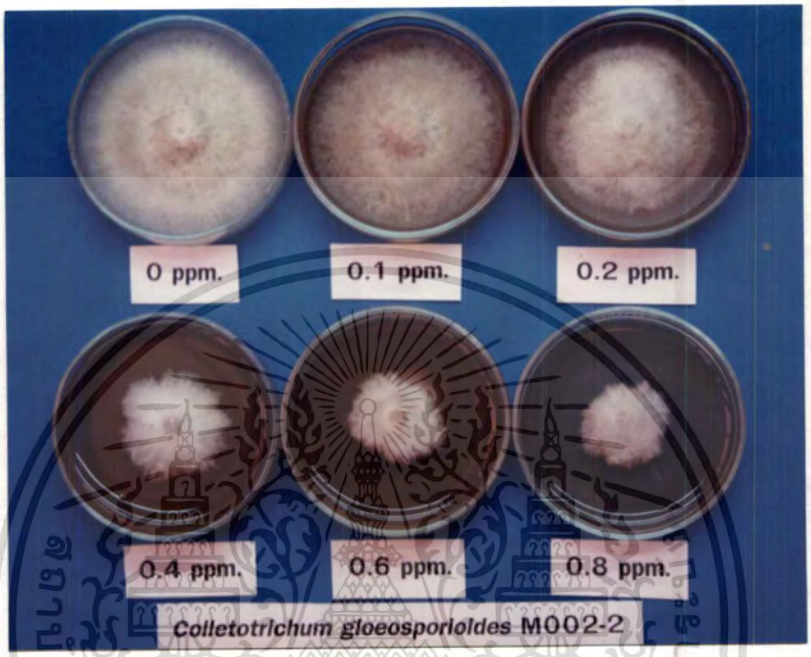
M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch. cupreum*, T88-2 = *T. harzianum* และ transformant = transformant of *T. harzianum* China

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.11 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ

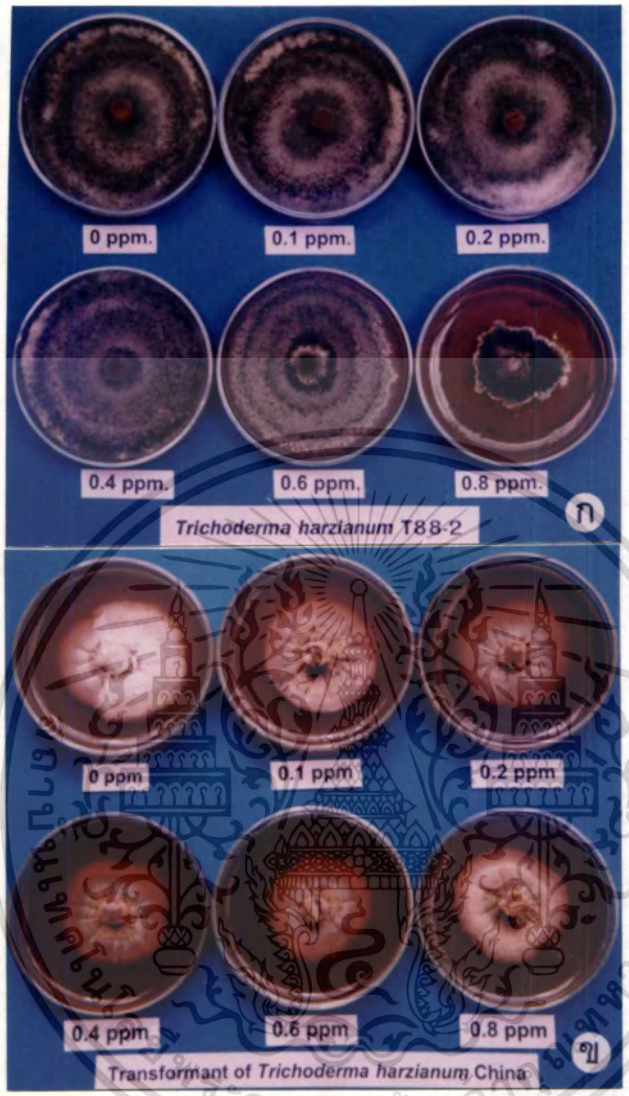
carbendazim	อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา (ซม. / วัน)				
(ppm)	*C.gloeosporioides*	*Ch.globosum*	*Ch. cupreum*	*T. harzianum*	Transformant
0	1.38	0.92	0.92	1.83	0.11
0.1	1.35	0.82	0.82	1.83	0.11
0.2	1.28	0.49	0.71	1.83	0.1
0.4	0.74	0.16	0.13	1.83	0.1
0.6	0.64	0	0	1.4	0.1
0.8	0.49	0	0	0.73	0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.40 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 6 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

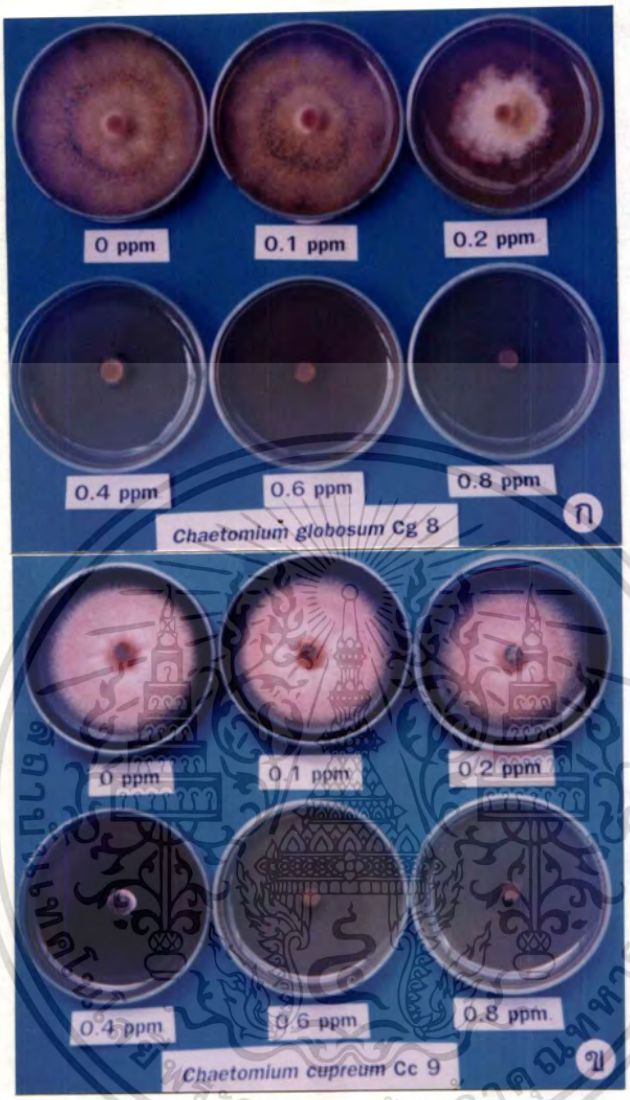


ภาพที่ 4.41 แสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านบนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ก. *Trichoderma harzianum* T88-2 ที่อายุ 6 วัน

ข. transformant of *T. harzianum* China ที่อายุ 30 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

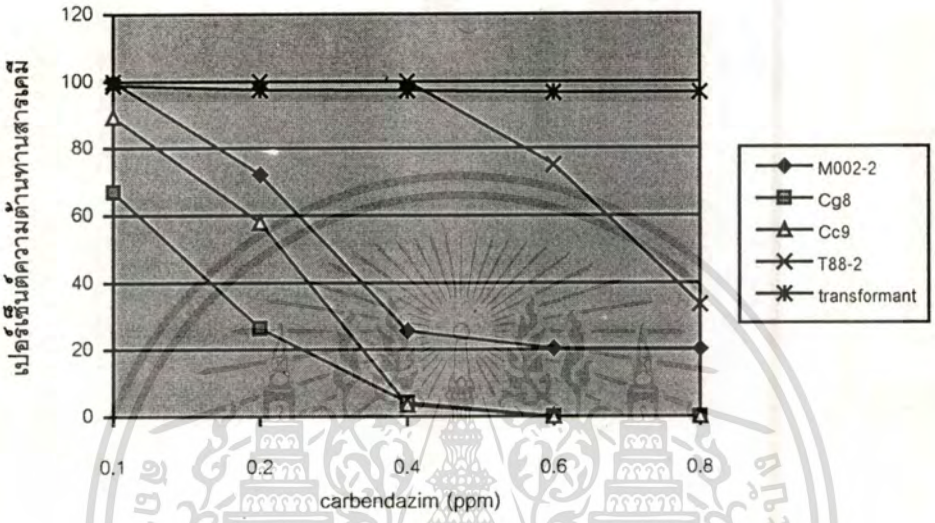


ภาพที่ 4.42 แสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้านบนสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 6 วัน

ก. *Chaetomium globosum* Cg8

ข. *Chaetomium cupreum* Cc9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.43 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความต้านทานต่อสารเคมี carbendazim ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *Trichoderma harzianum* China เปอร์เซ็นต์ความต้านทานต่อสารเคมี = (ค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารที่ไม่มีสารเคมี – ผลต่างของค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารที่ไม่มีสารเคมีกับมีสารเคมี) x 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหารผสมสารเคมี carbendazim (Bi-culture test with chemical)

จากการเลี้ยงเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง ร่วมกับจุลินทรีย์ต่อต้าน 4 ชนิด ได้แก่ *Ch. globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *T. harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ในความเข้มข้นต่างๆ ที่จุลินทรีย์ต่อต้านสามารถต้านทานได้ ตามผลการทดลองที่ 4.5 คือ *Ch. globosum* และ *Ch. cupreum* มีความต้านทานต่อ carbendzim ได้ถึงระดับความเข้มข้น 0.4 ppm แต่ที่ความเข้มข้นดังกล่าวเชื้อรามีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก (0.16 และ 0.13 เซนติเมตรต่อวัน ตามลำดับ) จึงคัดเลือกเอาถึงระดับความเข้มข้น 0.2 ppm มาใช้ในการทดลองนี้ ในขณะที่ *T. harzianum* และ transformant of *T. harzianum* ซึ่งมีความต้านทานต่อ carbendazim ได้ถึงระดับความเข้มข้น 0.8 ppm ก็สามารถทดสอบที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวได้เลย โดยทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 วัน ยกเว้นใน transformant of *T. harzianum* ที่ทำการเลี้ยงให้มีการเจริญเติบโตก่อนเชื้อโรคพืชเป็นเวลา 30 วัน เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้ามาก (0.11 เซนติเมตรต่อวัน) พบว่า ทั้ง *Ch. globosum* และ *Ch. cupreum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ในระดับที่ใกล้เคียงกันถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของ carbendazim ให้สูงขึ้นถึงระดับ 0.2 ppm ก็ตาม โดย *Ch. globosum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 60.83 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 87.73 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.12 และ 4.13; ภาพที่ 4.44) ในขณะที่ *Ch. cupreum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 58.34 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 83.96 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.14 และ 4.15; ภาพที่ 4.44) สำหรับใน *T. harzianum* และ transformant of *T. harzianum* ซึ่งสามารถต้านทานต่อ carbendazim ได้สูงถึง 0.8 ppm พบว่าที่ความเข้มข้นของ carbendazim ที่เปลี่ยนแปลงไป ก็มีผลทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* แตกต่างกันไปด้วย กล่าวคือ ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นก็มีผลทำให้ทั้งเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์มีแนวโน้มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าในทุกความเข้มข้นของ carbendazim เชื้อ *T. harzianum* มีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่า *Colletotrichum* (ตารางที่ 4.11) ดังนั้นจุลินทรีย์ต่อต้านจึงสามารถแข่งขันในการครอบครองพื้นที่อาหารได้มากกว่าเชื้อโรคพืช (ภาพที่ 4.45) นอกจากนั้น *Trichoderma* ยังได้พันรัดเส้นใยของเชื้อโรคพืชเพื่อจำกัดการเจริญเติบโตอีกด้วย (ภาพที่ 4.46) โดยพบว่า *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึง 90.54 และ 90.53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.16 และ 4.17) ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การควบคุมเชื้อโรคพืชอันเกิดจาก *Trichoderma* ได้ผลดีที่สุดนั้นน่าจะมาจากจุลินทรีย์ต่อต้านดังกล่าวมีความทนทานต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างได้สูงนั่นเอง ในกรณีของ transformant of *T. harzianum* พบว่า carbendazim ที่ความเข้มข้นต่ำๆ (0, 0.1 และ 0.2 ppm) จุลินทรีย์ต่อต้านไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคพืชได้ แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น (0.4, 0.6 และ 0.8 ppm) การเจริญของ *Colletotrichum* ถูกจำกัดลง ซึ่งน่าจะกล่าวได้ว่า transformant ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Colletotrichum* ได้ แต่เมื่อพิจารณาถึงเงื่อนไขของการทดลองนี้ที่ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ต่อต้านล่วงหน้าก่อนทำการเลี้ยงเชื้อโรคพืชเป็นเวลา 30 วัน เนื่องจากเชื้อรามีอัตราการเจริญเติบโตช้ามากดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ก็พบว่า *Colletotrichum* ถูกจำกัดบริเวณการครอบครองพื้นที่ เนื่องจาก transformant มีการครอบครองพื้นที่อยู่ก่อนแล้วนั่นเอง เพราะฉะนั้น transformant of *T. harzianum* จึงไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคพืชแต่อย่างใด (ตารางที่ 4.18 และ 4.19; ภาพที่ 4.47)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Chaetomium globosum* Cg8 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน

จุลินทรีย์ต่อต้าน	carbendazim (ppm)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* (ซม.)		เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (IG)[1/]
		control	bi-culture	
Ch. globosum Cg8	0	9	3.93	56.39 a[2/]
	0.1	9	3.53	60.83 a
	0.2	9	3.8	57.78 a

[1/] %IG = (R1-R2 / R1) x 100; R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ใน control, R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ใน bi-culture

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.13 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Chaetomium globosum* Cg8 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน

จุลินทรีย์ต่อต้าน	carbendazim (ppm)	จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* (x 10^7)		เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ (ISP)[1/]
		control	bi-culture	
Ch. globosum Cg8	0	7.56	1.40	81.48 a[2/]
	0.1	3.48	0.60	82.76 a
	0.2	2.69	0.33	87.73 a

[1/] %ISP = (S1-S2 / S1) x 100; S1 = จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ใน control, S2 = จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ใน bi-culture

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Chaetomium cupreum* Cc9 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน

จุลินทรีย์ต่อต้าน	carbendazim (ppm)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* (ซม.)		เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (IG)[1/]
		control	bi-culture	
Ch. cupreum Cc9	0	9	3.95	56.12 a[2/]
	0.1	9	4.03	55.28 a
	0.2	9	3.75	58.34 a

[1/] %IG = (R1-R2 / R1) x 100; R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ใน control, R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ใน bi-culture

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.15 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Chaetomium cupreum* Cc9 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน

จุลินทรีย์ต่อต้าน	carbendazim (ppm)	จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* (x 10^7)		เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ (ISP)[1/]
		control	bi-culture	
Ch. cupreum Cc9	0	7.56	1.21	83.96 a[2/]
	0.1	3.48	1.00	70.54 a
	0.2	2.69	0.44	83.58 a

[1/] %ISP = (S1-S2 / S1) x 100; S1 = จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ใน control, S2 = จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ใน bi-culture

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Trichoderma harzianum* T88-2 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน

จุลินทรีย์ต่อต้าน	carbendazim (ppm)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* (ซม.)		เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (IG)[1/]
		control	bi-culture	
T. harzianum T88-2	0	9	2.35	73.89 d[2/]
	0.1	9	1.91	78.75 c
	0.2	9	0.94	89.53 a
	0.4	7.08	0.81	88.51ab
	0.6	7.15	0.68	90.54 a
	0.8	4.53	0.65	85.58 b

[1/] %IG = (R1-R2 / R1) x 100; R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ใน control, R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ใน bi-culture

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.17 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *Trichoderma harzianum* T88-2 ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน

จุลินทรีย์ต่อต้าน	carbendazim (ppm)	จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ($\times 10^7$)		เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ (ISP)[1/]
		control	bi-culture	
T. harzianum T88-2	0	7.56	1.99	73.71 d[2/]
	0.1	3.48	0.74	78.76 c
	0.2	2.69	0.28	89.56 a
	0.4	2.55	0.3	88.41 ab
	0.6	2.21	0.21	90.53 a
	0.8	1.84	0.27	85.71 b

[1/] %ISP = (S1-S2 / S1) x 100; S1 = จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ใน control, S2 = จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ใน bi-culture

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ transformant of *Trichoderma harzianum* China ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 20 วัน

จุลินทรีย์ต่อต้าน	carbendazim (ppm)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* (ซม.)		เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (IG)[1/]
		control	bi-culture	
transformant of	0	9	5.3	41.11 b[2/]
T. harzianum China	0.1	9	5.18	42.44 b
	0.2	9	4.92	45.33 b
	0.4	8.8	2.9	67.05 a
	0.6	8.62	2.95	65.78 a
	0.8	7.9	2.5	68.35 a

[1/] %IG = (R1-R2 / R1) x 100; R1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ใน control, R2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *C. gloeosporioides* ใน bi-culture

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

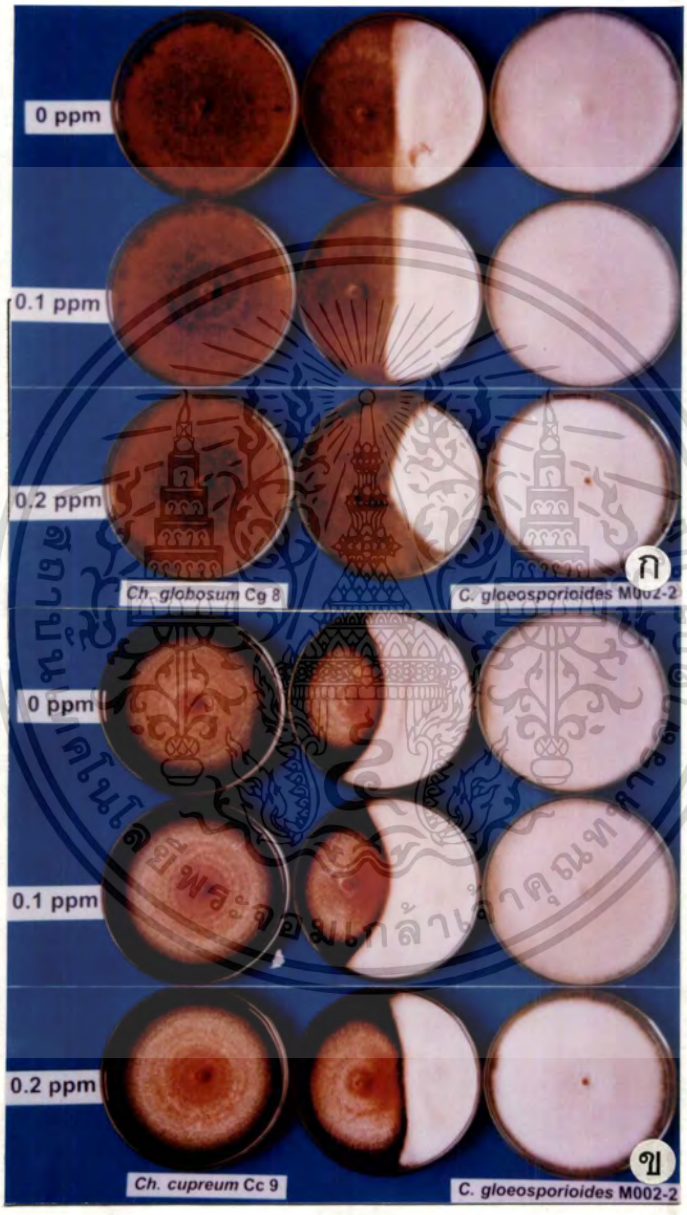
ตารางที่ 4.19 แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ของ transformant of *Trichoderma harzianum* China ที่มีผลต่อเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 20 วัน

จุลินทรีย์ต่อต้าน	carbendazim (ppm)	จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* (x 10^7)		เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์ (ISP)[1/]
		control	bi-culture	
transformant of	0	7.63	4.05	46.92 a[2/]
T. harzianum China	0.1	4.68	3.83	18.05 c
	0.2	2.98	2.79	6.64 c
	0.4	2.72	0.43	10.34 c
	0.6	2.26	2.05	9.45 c
	0.8	1.75	1.22	33.03 b

[1/] %ISP = (S1-S2 / S1) x 100; S1 = จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ใน control, S2 = จำนวนสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ใน bi-culture

[2/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

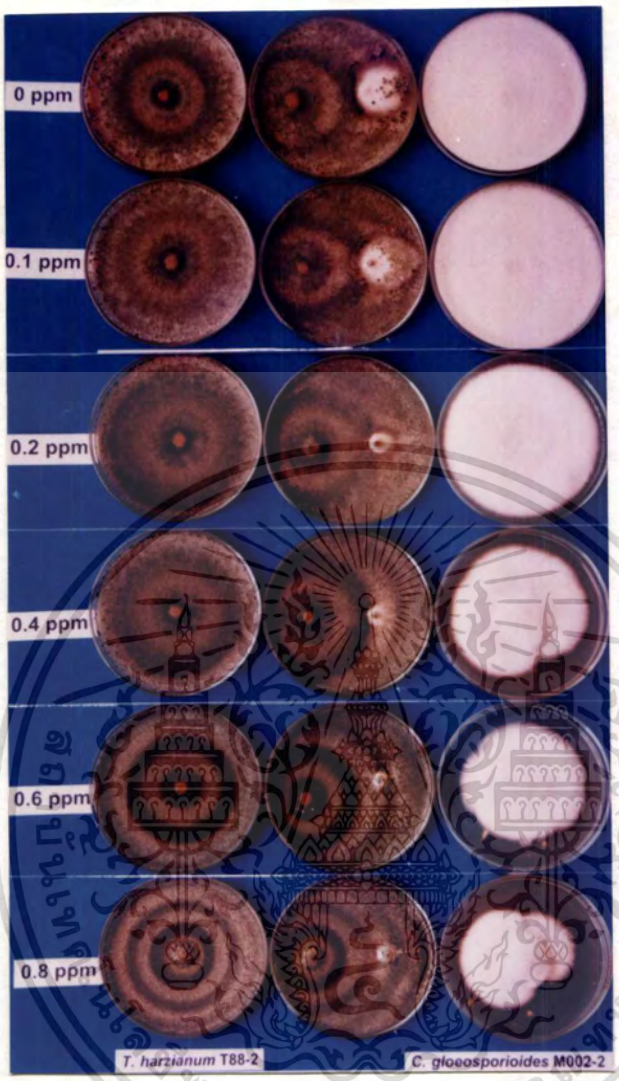


ภาพที่ 4.44 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Chaetomium* ร่วมกับ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน

ก. *Chaetomium globosum* Cg8

ข. *Chaetomium cupreum* Cc9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

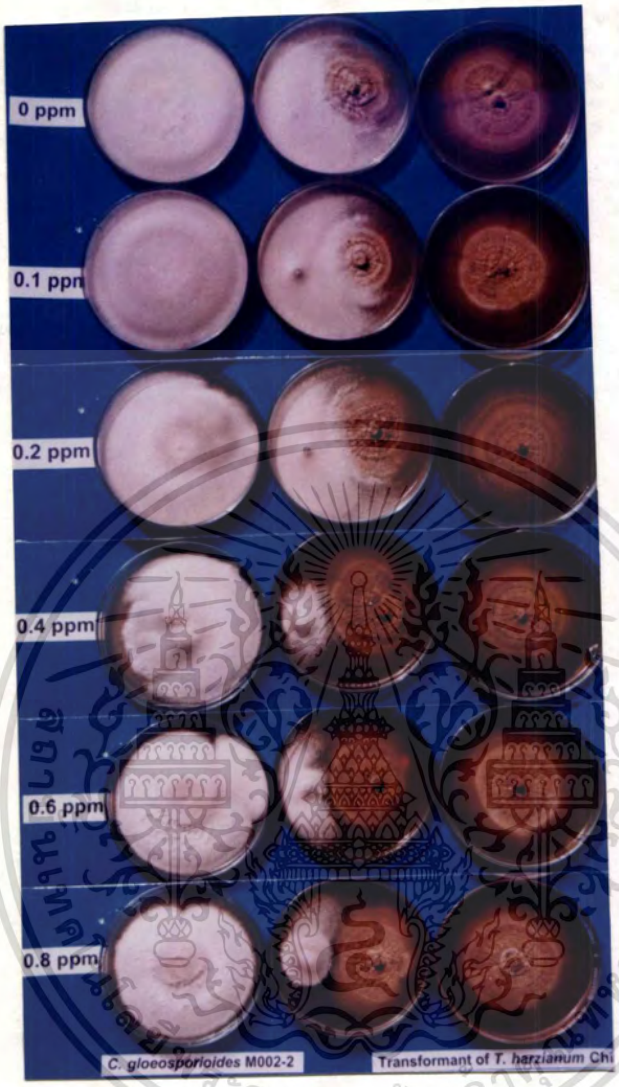


ภาพที่ 4.45 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Trichodrma harzianum* T88-2 ร่วมกับ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อายุ 15 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.46 แสดงเชื้อ *Trichoderma harzianum* T88-2 พันรัดเส้นใยของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 ที่อายุ 6 วัน : 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.47 แสดงการเจริญเติบโตของ transformant of *T. harzianum* China (อายุ 30 วัน) ร่วมกับ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2 (อายุ 20 วัน) บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) จำนวน 24 isolates ซึ่งทำการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต รูปร่างและขนาดของสปอร์ ตลอดจนโครงสร้างต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 4 species คือ *C. dematium* จำนวน 2 isolates *C. gloeosporioides* จำนวน 20 isolates *C. lindemuthianum* จำนวน 1 isolate และ *C. musae* จำนวน 1 isolate โดยเชื้อราในแต่ละ specie มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะขนาดและรูปร่างของสปอร์ กล่าวคือ *C. dematium* มีรูปร่างแบบ falcate หรือ fusiform ซึ่งมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว และมีความแตกต่างจาก *C. gloeosporioides* ซึ่งมีรูปร่างแบบ cylindrical หัวท้ายมน ในขณะที่ *C. lindemuthianum* กลับมีรูปร่างสปอร์แบบ dumbbell ซึ่งมีขนาดใหญ่และสั้นกว่า *C. gloeosporioides* สำหรับ *C. musae* มีรูปร่างแบบ cylindrical แต่แตกต่างจาก *C. gloeosporioides* ตรงที่สปอร์มีทั้งขนาดสั้นและยาวมาก และเมื่อพิจารณาถึงในแต่ละ species พบว่า ถึงแม้จะเป็น species เดียวกันก็สังเกตเห็นความแตกต่างกันหลายประการ กล่าวคือ ลักษณะการเจริญเติบโตและสีของโคโลนีแตกต่างกัน อัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ขนาดของสปอร์แตกต่างกัน ตลอดจนโครงสร้างต่างๆ อาจจะพบการสร้างหรือไม่สร้างแตกต่างกัน ดังจะเห็นได้จากเชื้อ *C. gloeosporioides* isolates ต่างๆ ซึ่งจากผลการทดลองสามารถจำแนกได้ 20 isolates และในแต่ละ isolate ก็มีความแตกต่างกันออกไป เช่น บาง isolate มีโคโลนีสีขาว บาง isolate มีโคโลนีสีเทาอมน้ำตาล หรือบาง isolate พบการสร้าง setae หรือ chlamydospore แต่บาง isolate กลับไม่สร้าง เหล่านี้เป็นต้น ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานของ Freeman *et al.* (1998) ที่รายงานว่า เชื้อ *C. gloeosporioides* ถึงแม้จะเป็น species เดียวกันแต่ถ้าแยกมาจากพืชอาศัยต่างชนิดกัน หรือแม้แต่พืชอาศัยชนิดเดียวกันแต่ต่างแหล่ง ก็ทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแตกต่างกันไปด้วย เนื่องจากเชื้อรา species ดังกล่าวมีความแปรปรวนมากนั่นเอง นอกจาก *Colletotrichum* แล้วความแปรปรวนดังกล่าวยังสามารถเกิดได้ในเชื้อราอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น *Phytophthora cryptogea* (Latorre *et al.*, 1995) เป็นต้น และจากการใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีสในการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของโปรตีนในสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปสู่ขั้วบวกผ่านตัวกลางคือ polyacrylamide gel ซึ่งพบว่าโปรตีนขนาดใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้ช้ากว่าโปรตีนขนาดเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย จึงปรากฏแถบโปรตีนอยู่ตอนบนของแผ่นเจล ส่วนโปรตีนขนาดเล็กจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรากฏอยู่ตอนล่างของเจล แต่ถ้าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันก็จะปรากฏแถบโปรตีนในตำแหน่งเดียวกัน (อาภัสรา, 2537; วาสนา, 2539) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของเชื้อ *Colletotrichum* จำนวน 24 isolates ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิดกันและจำแนกโดยวิธีสัณฐานวิทยาได้เป็น 4 species ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น พบการสร้างแถบโปรตีน 10 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 24.5-100 kDa ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการทดลองของ Weng and Chuang (1996) ได้รายงานว่า *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง สร้างแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 20-110 kDa และจากการสังเกตแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจล พบว่ามีเชื้อราบาง isolate ที่เกิดแถบโปรตีนไม่ค่อยชัดเจนนัก เช่น isolate C005 (*C. gloeosporioides*), Pea001 (*C. lindemuthianum*), Sb001 และ Sb002 (*C. dematium*) ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากขั้นตอนของการทำให้เซลเชื้อราแตก (บดด้วยไนโตรเจนเหลว) อาจจะไม่สมบูรณ์จึงทำให้โปรตีนไหลออกมาจากเซลได้น้อย หรือขึ้นอยู่กับความเฉพาะเจาะจงของอาหารเหลวที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลิตโปรตีนได้สูงขึ้น เช่นจากการทดลองของ Sicard *et al.* (1997) และ Balardin *et al.* (1997) ที่ทำการเลี้ยง *C. lindemuthianum* ในอาหารเหลว potato dextrose broth โดยมีส่วนผสมของ yeast extract และ ampicillin เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการสกัด DNA ของเชื้อดังกล่าว โดยส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อข้างต้นน่าจะมีสารอาหารบางชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อการนำไปสร้างสารประกอบบางอย่างของเชื้อ หรือสามารถกระตุ้นให้เชื้อสร้างสารประกอบเหล่านั้นได้ และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ *Colletotrichum* จำนวน 24 isolates ด้วยวิธี cluster analysis โดยมี *Ch. cupreum* เป็น biological standard marker พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อราออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ด้วยกันคือ

กลุ่มที่ 1 มี 8 isolates ได้แก่ C007-1, St002, C004, Pea001, C003, Sb001, Sb002 และ C005 โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยได้ดังต่อไปนี้คือ

กลุ่มย่อยที่ 1.1 มี 5 isolates ได้แก่ C007-1, St002, C004, Pea001 และ C003

กลุ่มย่อยที่ 1.2 มี 3 isolates ได้แก่ Sb001, Sb002 และ C005

กลุ่มที่ 2 มี 13 isolates ได้แก่ A001, A003, M001, Pep001, M003, Pay001, C001, C007-2, C006-1, Bf001, Sap001, A002 และ M002-2 โดยสามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยดังต่อไปนี้คือ

กลุ่มย่อยที่ 2.1 มี 2 isolates ได้แก่ A001 และ A003

กลุ่มย่อยที่ 2.2 มี 6 isolates ได้แก่ M001, Pep001, M003, Pay001, C001 และ C007-2

กลุ่มย่อยที่ 2.3 มี 1 isolate ได้แก่ C006-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มย่อยที่ 2.4 มี 4 isolates ได้แก่ Bf001, Sap001, A002 และ M002-2

กลุ่มที่ 3 มี 2 isolates ได้แก่ Ban001 และ C002

กลุ่มที่ 4 มี 1 isolate ได้แก่ Ft001 จากการแบ่งกลุ่มของเชื้อราข้างต้น พบว่าเชื้อราที่มีการจัดเป็นกลุ่มย่อยก็ยิ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากขึ้นหรือมีความเหมือนกันมากขึ้น กล่าวคือ เชื้อราที่มี species เดียวกันก็น่าจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังเช่นการทดลองของ Johnson *et al.* (1997) ที่ทำการเปรียบเทียบเชื้อ *C. nymphaea* ใน lily จำนวน 3 isolates จากยุโรปกับ *Colletotrichum* sp. จำนวน 9 isolates จากอเมริกาเหนือ ซึ่งได้ทำการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาควบคู่ไปด้วย โดยพบว่าทั้ง 9 isolates จากอเมริกาหนือสร้าง appressoria และ conidia ที่มีขนาดใหญ่กว่า *C. nymphaea* จากยุโรป และเมื่อใช้เทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีสเปรียบเทียบในระดับโมเลกุลและแบ่งกลุ่มโดย cluster analysis พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกมี 9 isolates จากอเมริกาเหนือ และกลุ่มที่สองมี 2 isolates จากยุโรป ดังนั้นจึงสรุปว่าทั้ง 9 isolates จากอเมริกาเหนือมีความแตกต่างจาก *C. nymphaea* และได้ตั้งเป็น species ใหม่คือ *C. nympharicola* แต่จากผลการศึกษาครั้งนี้มีข้อขัดแย้งบางประการกล่าวคือ ในกลุ่มของเชื้อราบางกลุ่มแทนที่จะประกอบด้วย *Colletotrichum* species เดียวกัน กลับมี *Colletotrichum* species อื่นๆ ร่วมอยู่ด้วย ดังเช่นในกลุ่มย่อยที่ 1.1 มี *C. lindemuthianum* (isolate Pea001) อยู่ร่วมกับ *C. gloeosporioides* หรือในกลุ่มย่อยที่ 1.2 มี *C. gloeosporioides* (isolate C005) อยู่ร่วมกับ *C. dematium* (isolate Sb001 และ Sb002) เป็นต้น จากความไม่สอดคล้องข้างต้นดังกล่าวอาจจะอธิบายได้ว่า ในแต่ละแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจลซึ่งน่าจะเป็นโปรตีนที่ยังไม่มีความบริสุทธิ์ นั่นคืออาจจะมีโปรตีนหลายๆ ชนิดอยู่ในแถบโปรตีนเดียว โดยโปรตีนชนิดหนึ่งๆ อาจมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับหรือใกล้เคียงกับโปรตีนอีกชนิดหนึ่ง ดังนั้นโมเลกุลของโปรตีนจึงเกิดการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าได้ระยะทางเท่ากันหรือใกล้เคียงกัน จึงสังเกตเห็นแถบโปรตีนมีลักษณะหนาและไม่มีความคมชัด และเมื่อทำการวัดระยะทางเคลื่อนที่ของโมเลกุลจึงไม่สามารถแยกแถบโปรตีนออกจากกันได้ จึงเป็นผลทำให้เกิดความเหมือนของตำแหน่งแถบโปรตีนขึ้น ซึ่งความเหมือนดังกล่าวจะเป็นผลทำให้การจัดกลุ่มเชื้อ *Colletotrichum* โดยวิธี cluster analysis ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรืออีกเหตุผลหนึ่งคือเชื้อ *Colletotrichum* ถึงแม้จะต่าง species กัน แต่สามารถสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดเดียวกันและมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันได้ ซึ่งพบจากรายงานของ Wattad *et al.* (1997) ที่ *C. gloeosporioides* และ *C. musae* สามารถผลิตเอนไซม์ pectate lyase ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 38-41 kDa สำหรับในกรณีของเชื้อ *Colletotrichum* species เดียวกันแต่ถูกจัดให้อยู่ต่างกลุ่มกัน เช่น จากการพบในเชื้อ *C. gloeosporioides* หลายๆ isolates ซึ่งแสดงว่าเชื้อราดังกล่าวมีการสร้างแถบโปรตีนที่มีตำแหน่งต่างกัน หรือมีองค์ประกอบของโปรตีนที่แตกต่างกันนั่นเอง อย่างไรก็ตามเหตุการณ์ดังกล่าวก็อาจจะเกิดขึ้นได้เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแปรปรวนของตัวเชื้อเอง ซึ่ง Freeman *et al.* (1998) กล่าวว่า *C. gloeosporioides* เป็นเชื้อราที่มีความแปรปรวนสูงมาก ดังจะเห็นได้จากเชื้อรามีความหลากหลายทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา (morphology) และในระดับโมเลกุล ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Weng and Chuang (1996) ว่า *C. gloeosporioides* สามารถสร้างแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ต่ำสุดคือ 20 kDa จนถึงสูงสุดคือ 110 kDa สำหรับเชื้อ *Ch. cupreum* ซึ่งเป็นเชื้อราต่าง genus ที่นำมาเปรียบเทียบเพื่อให้เห็นความแตกต่างจากกลุ่มของ *Colletotrichum* แต่จากผลการทดลองกลับถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อ *C. gloeosporioides* isolate Ft001 ซึ่งแยกเชื้อได้จากปาล์มหางหมาป่า ก็สามารถอธิบายเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นได้ในทำนองเดียวกันกับการสร้างโปรตีนที่เป็นชนิดเดียวกันของ *Colletotrichum* ที่มี species แตกต่างกัน นอกจากนี้อาจจะกล่าวอีกนัยหนึ่งได้ว่า *C. gloeosporioides* isolate Ft001 สามารถสร้างโปรตีนที่เป็นชนิดเดียวกันกับโปรตีนที่สร้างใน *Ch. cupreum* ซึ่งความสัมพันธ์ของเชื้อต่าง genus ดังกล่าวก็พบได้ในรายงานของ Hunt and Ekramoddoullah (1996) ที่รายงานว่า *Phellinus pini* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Inonotus tomentosus* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าในพืชตระกูลสน แต่อย่างไรก็ตามจากการสังเกตตำแหน่งของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นของ *Ch. cupreum* (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) พบว่าไม่เกิดการสร้างแถบโปรตีนในตำแหน่งที่ 3 และ 8 (น้ำหนักโมเลกุล 91.5 และ 57.2 kDa ตามลำดับ) แต่พบการสร้างใน *C. gloeosporioides* isolate Ft001 และการเกิดแถบโปรตีนในตำแหน่งที่ 3 นี้เองจึงสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *Colletotrichum* ทุก isolates ออกจาก *Ch. cupreum* ได้ และจากผลของการจัดกลุ่มเชื้อรา *Colletotrichum* ด้วยวิธี cluster analysis ข้างต้น ถึงแม้จะพบว่าไม่สามารถจัดเชื้อราที่มี species เดียวกันให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ทั้งหมดเนื่องจากสาเหตุที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น แต่เมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติอีกประการหนึ่งของเชื้อราซึ่งไม่สามารถใช้วิธีการจำแนกโดยอาศัยเพียงลักษณะภายนอก นั่นคือความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ กลับพบว่า *Colletotrichum* ที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 2 มีความสอดคล้องกับกลุ่มของเชื้อราที่นำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ โดยพบว่ากลุ่มเชื้อราดังกล่าวมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคมากที่สุด โดยเฉพาะใน isolate M002-2 (จากมะม่วงเขียวเสวย) M001 (จากมะม่วงโชคอนันต์) และ A001 (จากวาสนา) นั่นแสดงว่า *Colletotrichum* ในกลุ่มนี้มีการสร้างโปรตีนบางชนิดที่เหมือนกัน โดยโปรตีนดังกล่าวมีคุณสมบัติส่งเสริมในการเข้าทำลายพืชนั่นเอง ดังนั้นเทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีสจึงควรจะถูกนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติภายในของเชื้อรา ดังเช่นการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคดังกล่าวเพื่อช่วยลดขั้นตอนในการทดลองให้สั้นลง

จากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* จำนวน 20 isolates ซึ่งแยกได้จากพืชอาศัยต่างชนิดกัน และพบว่า *C.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

gloeosporioides isolate M002-2 ซึ่งแยกได้จากมะม่วงเขียวเสวยทำให้เกิดอาการของโรคบนใบมะม่วงโชคอนันต์มากที่สุด ส่วน *C. gloeosporioides* isolate M001 ซึ่งแยกได้จากมะม่วงโชคอนันต์กลับทำให้อาการของโรครุนแรงน้อยกว่า ซึ่งขัดแย้งกับการรายงานของ Alahakoon *et al.* (1994) ว่าโดยทั่วๆ ไปแล้วความสามารถของเชื้อโรคพืชในการทำให้เกิดโรครุนแรงบนพืชอาศัยมักจะเกิดกับพืชที่เป็นพืชอาศัยหลัก (original plant) มากกว่าบนพืชอาศัยรอง (alternate crops) แต่ก็ไม่ได้เป็นเช่นนี้เสมอไป ถ้าพืชอาศัยหลักมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อมากกว่าพืชอาศัยรอง เช่น จากการปลูกเชื้อข้าม (cross-inoculation) ของ *C. gloeosporioides* จำนวน 7 isolates ซึ่งแยกได้จากไม้ผลในเขตร้อนชื้นพบว่าเชื้อที่แยกได้จากมังคุดทำให้เกิดโครุนแรงกับพืชอาศัยรองชนิดอื่นๆ ได้แก่ มะม่วง ทุเรียน และเงาะ มากกว่าในมังคุดเอง ทั้งนี้เนื่องจากมังคุดมีความต้านทานต่อโรคมากกว่าพืชอื่นๆ นั่นเอง สำหรับความรุนแรงของโรคที่ปรากฏในการทดลองนี้อาจจะอธิบายได้ว่า น่าจะเกิดจากปัจจัยแวดล้อมหลายๆ อย่าง เช่น เชื้อก่อโรคตั้งต้น (inoculum) โดย Alahakoon *et al.* (1994) ได้อธิบายไว้ว่าความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของ inoculum และในการทดลองนี้ได้ใช้ inoculum ในลักษณะ agar disc ซึ่งไม่สามารถควบคุมปริมาณเชื้อก่อโรคตั้งต้นได้ หรือเกิดจากความอ่อนแอและความเครียดของพืชที่จะนำมาทดสอบเนื่องจากการใช้เทคนิค detached leave ตลอดจนความอ่อน หรือแก่ของใบที่แตกต่างกัน รวมทั้งอาจจะมีเชื้ออื่นเข้าทำลายทีหลังซึ่งจะทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงเพิ่มขึ้น ดังจากการรายงานของ Amusa (1997) ที่พบว่าอาการแอนแทรคโนสของ yam ที่เกิดจากการเข้าทำลายของ *C. gloeosporioides* จะมีขนาดแผลกว้างขึ้นเมื่อมีการเข้าทำลายจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* เข้ามาร่วมด้วย และประกอบกับ *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความแปรปรวนสูงอยู่แล้ว จึงมีผลทำให้ขนาดของแผลมีความแปรปรวนตามไปด้วย โดยอาจจะพบทั้งขนาดแผลใหญ่ แผลเล็ก หรือไม่เกิดแผลบนพืชอาศัยชนิดเดียวกัน (Freeman and Shabi, 1996) ด้วยปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จึงอาจจะทำให้ความสามารถในการติดเชื้อบนเนื้อเยื่อของพืชแตกต่างกันออกไป หรืออีกในกรณีหนึ่งคือ *C. gloeosporioides* isolate M002-2 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง (virulence) มากกว่า isolate M001 อยู่แล้วนั่นเอง ดังจะสังเกตได้จากการปลูกเชื้อข้ามโดยใช้ *C. gloeosporioides* ทั้ง isolate M001 และ M002-2 ปลูกบนใบมะม่วงเขียวเสวย ก็พบว่าเฉพาะ isolate M002-2 เท่านั้นที่สามารถทำให้เกิดโรคได้

จากการนำเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัยชนิดอื่นๆ ทั้งไม้ผล พืชผัก และพืชไร่ จำนวน 9 ชนิด ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ละมุด ฝรั่ง มะกอกน้ำ ขนุน มะเขือเทศ พริกไทย พริกหยวก และถั่วลิสง พบว่า *C. gloeosporioides* มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยในไม้ผลจะพบอาการรุนแรงบนละมุด และส้มเขียวหวานมากที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลางแผล 2.47 และ 1.25 เซนติเมตร ตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับ) ส่วนบนฝรั่ง มะกอกน้ำ และขนุน พบอาการของโรคเพียงเล็กน้อยเท่านั้น สำหรับความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชผักและถั่วลิสง พบว่า เชื้อราดังกล่าวมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนมะเขือเทศมากที่สุด รองลงมาคือบนถั่วลิสง และพริกหยวก (เส้นผ่าศูนย์กลางแผล 3.14, 1.5 และ 1.17 เซนติเมตร ตามลำดับ) แต่ไม่สามารถทำให้เกิดโรคบนพริกไทยได้ จากผลการทดลองข้างต้นมีข้อสังเกตบางประการกล่าวคือ ระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อบนพืชแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของพืชแต่ละชนิดว่ามีความแข็งแรงและทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อและทนทานต่อความเครียดเนื่องจากการใช้เทคนิค detached leave หรือ detached fruit เพียงใด ซึ่งปัจจัยดังกล่าวนี้เองอาจจะมีผลต่อการพัฒนาการเกิดโรคในพืชให้มีความรุนแรงมากหรือน้อยแตกต่างกัน ดังจะสังเกตได้จากการปลูกเชื้อบนละมุดซึ่งใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ 12 วัน และทำให้ขนาดของแผลมีความกว้างมากกว่าในส้มเขียวหวานซึ่งใช้ระยะเวลาในการบ่มเชื้อเพียง 10 วัน อย่างไรก็ตาม Park *et al.* (1989) กล่าวว่าความรุนแรงของโรคที่เกิดขึ้นมักเกิดกับผลไม้สุกมากกว่าในผลไม้ดิบ เนื่องจากผลไม้สุกมีองค์ประกอบของ glucose, fructose และ amino acid มากกว่า ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะกระตุ้นให้มีการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยที่ดีขึ้น และจะทำให้เกิดการติดเชื้อและความเสียหายของโรคเพิ่มขึ้น ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองที่ทำการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* บนผลมะเขือเทศสุก ซึ่งพบว่าทำให้เกิดอาการของโรครุนแรงมาก

จากกรณีที่เชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 ไม่สามารถทำให้เกิดโรครุนแรงบนฝรั่งตามผลการทดลองข้างต้น อาจจะอธิบายได้ว่าพืชได้สร้างกลไกบางอย่างเพื่อป้องกันการลุกลามของเชื้อ โดยเซลของพืชอาจจะได้รับการกระตุ้นจากสารที่เชื้อปลดปล่อยออกมาแล้วทำให้เป็นชั้นเนื้อเยื่อขึ้น โดยชั้นดังกล่าวจะช่วยยับยั้งไม่ให้เชื้อเจริญขยายวงกว้างออกไป และยังระงับการไหลเวียนของน้ำและอาหารจากเนื้อเยื่อพืชปกติไปยังเนื้อเยื่อที่เป็นโรค จึงทำให้เชื้อไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้และตายอยู่ในขอบเขตของแผลซึ่งสามารถแยกออกมาจากเนื้อเยื่อพืชปกติได้ (Agrios, 1978) หรือในกรณีหนึ่งคือพืชมีการสร้าง phenolic compound ซึ่งพืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อ โดย Pascholati *et al.* (1993) กล่าวว่าตัวเชื้อ *Colletotrichum* เองก็มีกลไกในการป้องกันตนเองจาก phenolic compound ได้เช่นกันนั่นคือการผลิตเมือก (mucilage) รอบๆ acervuli นั่นเอง

จากการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 และจุลินทรีย์ต่อต้าน 4 ชนิด ได้แก่ *Ch. globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *T. harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหารต่างกัน 4 ชนิดคือ potato dextrose agar (PDA) potato sucrose agar (PSA) mango fruit agar (MFA) และ mango leaf agar (MLA) ที่มีระดับ pH แตกต่างกันตั้งแต่ pH 3-8 และบ่มเชื้อดัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล่าวไว้ภายใต้อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) พบว่า *C. gloeosporioides* M002-2 เจริญเติบโตและสร้างสปอร์ดีที่สุดบนอาหาร PDA pH 6, *Ch. globosum* Cg8 เจริญเติบโตดีบนอาหาร 2 ชนิดคือ PSA และ MFA ที่ pH 7 และ 8 แต่สร้างสปอร์ได้ดีบน MFA pH 6 *Ch. cupreum* Cc9 เจริญเติบโตดีบนอาหาร PSA pH 5 แต่สร้างสปอร์ได้ดีบน PDA pH 6 *T. harzianum* T88-2 เจริญเติบโตดีบนอาหารทุกชนิดและทุกระดับ pH ยกเว้นบนอาหาร MLA และสร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร PDA pH 6 และ 7 สำหรับ transformant of *T. harzianum* China เจริญเติบโตดีบนอาหาร PDA pH 6 7 และ 8 จากผลการทดลองข้างต้นจะสังเกตเห็นว่าการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ที่ดีของเชื้อราแต่ละชนิดจะปรากฏอยู่บนชนิดของอาหารและระดับ pH ที่มีความหลากหลาย แต่เมื่อพิจารณาถึงสภาพความต้องการโดยทั่วๆ ไปของเชื้อราทั้ง 5 ชนิดกลับพบว่ามีความต้องการสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ใกล้เคียงกัน ถึงแม้ว่าในบางเชื้อราจะมีการเจริญเติบโตที่ไม่ได้จัดอยู่ในระดับที่ดีที่สุด แต่ก็พบว่าอยู่ในระดับที่ค่อนข้างดีพอสมควร นั่นคือบนอาหาร PDA ที่ระดับ pH 6-7 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการทดลองของ Hegde *et al.* (1993) ที่กล่าวว่า *C. gloeosporioides* มีการเจริญเติบโตดีที่สุดบนอาหาร potato dextrose broth ที่ระดับ pH 5-6.5 โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Kalaimani (1995) ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันคือ *C. falcatum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคไส้แดงของอ้อย ก็มีการเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ได้ดีบนระดับ pH 6-7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน

จากการทดสอบความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim ของเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 และจุลินทรีย์ต่อต้าน 4 ชนิด ได้แก่ *Ch. globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *T. harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ppm เปรียบเทียบกับ control (0 ppm) พบว่าเชื้อราแต่ละชนิดมีความต้านทานต่อสารเคมีได้ในระดับที่แตกต่างกัน โดย *Ch. globosum* และ *Ch. cupreum* มีความต้านทานต่อ carbendazim ได้ถึงระดับความเข้มข้นที่ 0.4 ppm เท่านั้น ส่วน *C. gloeosporioides, T. harzianum* และ transformant มีความต้านทานต่อสารเคมีได้ถึงระดับความเข้มข้น 0.8 ppm และพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารเคมีเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ก็ยิ่งทำให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราลดลงเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Andrivon *et al.* (1997) ที่กล่าวว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารเคมีกำจัดเชื้อรา tochlofos-methyl, thiabendazole, imazalil และ mancozeb ตั้งแต่ 0.1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้เชื้อ *C. coccodes* มีอัตราการเจริญเติบโตลดน้อยลงกว่าปกติ นั่นอาจจะแสดงว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดที่เห็นว่าเชื้อราสามารถต้านทานได้ แต่ความจริงแล้วเชื้ออาจมีความต้านทานต่อสารเคมีได้ในระดับที่สูงกว่านี้แต่เพียงต้องการระยะเวลาในการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเท่านั้นเอง แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราและชนิดของสารเคมีเช่นเดียวกัน ดังเช่นที่พบในเชื้อ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C. musae ที่สามารถต้านทานต่อ thiabendazole ได้สูงสุดเพียง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในขณะที่ *C. coccodes* มีความต้านทานต่อสารเคมีชนิดเดียวกันได้สูงกว่าถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Andrivon *et al.*, 1997; de Lapeyre de Bellaire and Dubois, 1997) แต่อย่างไรก็ตาม Holmstrom-Ruddick and Mortensen (1995a; 1995b) กล่าวว่าความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดเชื้อราของ *Colletotrichum* อาจจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างบางชนิดของเชื้อก็ได้ ดังเช่นที่พบใน *C. gloeosporioides* f.sp. *malvae* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีคุณสมบัติเป็น mycofungicide โดยพบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถต้านทานต่อ benomyl ได้สูงสุดถึง 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่า appressoria ของเชื้ออาจจะมีความต้านทานน้อยกว่าในเส้นใยหรือสปอร์ ซึ่งสังเกตได้จากเชื้อรามีการงอกของ appressoria ลดน้อยลงหลังจากถูก treated ด้วย benomyl

จากการทดสอบศักยภาพของจุลินทรีย์ต่อต้านทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Ch. globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China ต่อการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 โดยวิธี bi-culture บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ppm เปรียบเทียบกับ control (0 ppm) พบว่า *Ch. globosum* Cg8 และ *Ch. cupreum* Cc9 ต่างก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.1 และ 0.2 ppm ได้ในระดับหนึ่ง นั่นแสดงว่าจุลินทรีย์ต่อต้านดังกล่าวน่าจะสร้างกลไกบางอย่างในการควบคุมโรคพืชอย่างได้ผล เช่น อาจจะมีการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งจะสังเกตได้จากเชื้อรามีการสร้างสารสีน้ำตาลอ่อน (*Ch. globosum*) และสารสีแดง (*Ch. cupreum*) บนอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dio Pietro *et al.* (1992) และ Amemiya *et al.* (1994) ที่พบว่า chaetoglobosin C และ BHT ซึ่งเป็นสารสกัดจาก *Ch. globosum* สามารถยับยั้งเชื้อ *Verticillium dahliae* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ และ *Pythium ultimum* สาเหตุโรค damping-off ของ sugarbeet ได้ โดยสารปฏิชีวนะดังกล่าวรวมทั้งตัวจุลินทรีย์ต่อต้านเองอาจจะไปมีผลต่อการเข้าทำลายเซลของเชื้อโรคพืช ดังเช่นพบในรายงานของ Heller and Theiler (1994) ที่พบว่า *Ch. globosum* สามารถเจริญครอบคลุมไปบนโคโลนีของ *Phytophthora* และสามารถทำให้เซลของเชื้อโรคพืชแตกได้ สำหรับ *Chaetomium* ที่อยู่ในสภาพที่มีสารเคมี carbendazim ก็พบว่าสารเคมีมีส่วนทำให้จุลินทรีย์ต่อต้านมีศักยภาพในการควบคุมเชื้อโรคพืชลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Heller and Theiler (1994) ที่ทำการ treated ด้วยสารเคมี benlate ใน dual culture ระหว่าง *Ch. globosum* และ *Phytophthora* พบว่าจุลินทรีย์ต่อต้านลดความ active ลงอย่างเห็นได้ชัด ในกรณีที่นำ *T. harzianum* มาควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* พบว่าได้ผลดีมากที่สุดนั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติที่มีการแข่งขันสูงของจุลินทรีย์ต่อต้านนั่นเอง ประกอบกับ *Trichoderma* สามารถต้านทานต่อ carbendazim ได้สูงกว่า *Colletotrichum* อยู่แล้วจึงทำให้ศักยภาพในการควบคุมเชื้อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พืชเพิ่มสูงขึ้นไปอีก ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Elad *et al.* (1992) ที่ทำการควบคุมเชื้อ *Botrytis cinerea* สาเหตุโรค grey mould ของมะเขือเทศ แตงกวา และสตรอเบอรี่ โดยใช้ผงยาเชื้อ *Trichoderma harzianum* (T39) ผสมสารเคมีกำจัดเชื้อรา dicarboximide พบว่าให้ผลในการควบคุมโรคดีกว่าการใช้ผงยาเชื้อชนิดเดียว สำหรับ Transformant of *T. harzianum* China ที่พบว่าไม่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อโรคพืชเลย อาจจะเนื่องจากว่ายังไม่ได้รับการพัฒนา gene ให้มีคุณสมบัติดังกล่าว แต่พบว่าสามารถต้านทานต่อ carbendazim ได้สูงถึง 3,000 ppm ที่เดียว (ภาคผนวก ก) ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากหากมีการปรับปรุง gene เพื่อให้สามารถควบคุมเชื้อโรคพืชได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด จำนวน 24 isolates โดยวิธีศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 4 species ดังนี้คือ *C. dematium* จำนวน 2 isolates ได้แก่ isolate Sb001 และ Sb002 (จากโหระพา), *C. gloeosporioides* จำนวน 20 isolates ได้แก่ isolate A001 (จากวาสนา), A002 (จากหนวดปลาหมึก), A003 (จากอมรเบิกฟ้า), Bf001 (จากตาลแดง), C001 (จากส้มโชกุน ลำปาง), C002 (จากส้มโชกุน ลำปาง), C003 (จากส้มเขียวหวาน แพร่), C004 (จากส้มเขียวหวาน แพร่), C005 (จากส้มโอ), C006-1 (จากส้มเขียวหวาน ตาก), C007-1 (จากส้มโชกุน ตาก), C007-2 (จากส้มโชกุน ตาก), Ft001 (จากปาล์มหางหมาป่า), M001 (จากมะม่วงโชคอนันต์), M002-2 (จากมะม่วงเขียวเสวย), M003 (จากมะม่วงอกร่อง), Pay001 (จากมะละกอ), Pep001 (จากพริกไทย), Sap001 (จากชมพู่) และ St002 (จากสตรอเบอรี่), *C. lindemuthianum* จำนวน 1 isolate ได้แก่ Pea001 (จากถั่วลิสง) และ *C. musae* จำนวน 1 isolate ได้แก่ Ban001 (จากกล้วยน้ำว้า) และเมื่อนำเชื้อ *Colletotrichum* ทั้ง 24 isolates ข้างต้นมาจำแนกโดยเทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราด้วยวิธี cluster analysis เปรียบเทียบกับเชื้อ *Chaetomium cupreum* พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

กลุ่มที่ 1 มี 8 isolates ได้แก่ C007-1, St002, C004, Pea001, C003, Sb001, Sb002 และ C005 โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยได้ดังต่อไปนี้คือ

กลุ่มย่อยที่ 1.1 มี 5 isolates ได้แก่ C007-1, St002, C004, Pea001 และ C003

กลุ่มย่อยที่ 1.2 มี 3 isolates ได้แก่ Sb001, Sb002 และ C005

กลุ่มที่ 2 มี 13 isolates ได้แก่ A001, A003, M001, Pep001, M003, Pay001, C001, C007-2, C006-1, Bf001, Sap001, A002 และ M002-2 โดยสามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยดังต่อไปนี้คือ

กลุ่มย่อยที่ 2.1 มี 2 isolates ได้แก่ A001 และ A003

กลุ่มย่อยที่ 2.2 มี 6 isolates ได้แก่ M001, Pep001, M003, Pay001, C001 และ C007-2

กลุ่มย่อยที่ 2.3 มี 1 isolate ได้แก่ C006-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มย่อยที่ 2.4 มี 4 isolates ได้แก่ Bf001, Sap001, A002 และ M002-2

กลุ่มที่ 3 มี 2 isolates ได้แก่ Ban001 และ C002

กลุ่มที่ 4 มี 1 isolate ได้แก่ Ft001

โดยเชื้อรา 4 กลุ่มหลักข้างต้นสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *Colletotrichum* ออกจาก *Ch. cupreum* ซึ่งใช้เป็นเชื้อเปรียบเทียบ (control) ได้โดยอาศัยการเกิดแถบโปรตีนในตำแหน่งที่ 3 (น้ำหนักโมเลกุล 91.5 kDa) ซึ่งไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวใน *Ch. cupreum* และจาก 4 กลุ่มหลักดังกล่าว ถึงแม้จะไม่สามารถจัดให้อยู่ตามกลุ่ม species ซึ่งผ่านการจำแนกตามลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราได้ แต่ก็สามารถจัดให้อยู่ตามกลุ่มความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยพบว่าในกลุ่มที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย *C. gloeosporioides* ที่ทำให้เกิดอาการรุนแรงบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ นั่นคือ isolate M002-2 (จากมะม่วงเขียวเสวย) M001 (จากมะม่วงโชคอนันต์) และ A001 (จากวาสนา) ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำเทคนิคเจลอิเลคโตรโฟรีซีสมาใช้เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัย ซึ่งจะทำให้ระยะเวลาในการทดสอบให้สั้นลงได้ และจากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ *C. gloeosporioides* isolate M002-2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความรุนแรงที่สุดนั้น นอกจากจะทำให้เกิดอาการของโรคบนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์แล้ว ยังสามารถทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัยชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ละมุด ฝรั่ง มะกอกน้ำ ขนุน มะเขือเทศ พริกหยวก และถั่วลิสงได้ด้วย ซึ่งอาการของโรคที่เกิดขึ้นแสดงอาการรุนแรงมากหรือน้อยแตกต่างกัน โดยพบว่าบนมะเขือเทศเชื้อสามารถเข้าทำลายได้มากที่สุด รองลงมาคือละมุด

จากการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 และจุลินทรีย์ต่อต้าน 4 ชนิด ได้แก่ *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ เชื้อราที่มีคุณสมบัติ carried R-gene to carbendazim คือ transformant of *T. harzianum* China บนอาหาร 4 ชนิดที่มีระดับ pH แตกต่างกัน เพื่อศึกษาถึงความต้องการสภาพที่เหมาะสมของเชื้อรา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปปรับใช้เพื่อให้การควบคุมโรคพืชโดยใช้จุลินทรีย์ได้ผลดียิ่งขึ้น โดยพบว่าชนิดของอาหารและระดับ pH มีผลทำให้การเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อราทุกชนิดแตกต่างกัน ยกเว้นใน *T. harzianum* ที่พบว่าความแตกต่างดังกล่าวขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่แตกต่างกันเท่านั้น นั่นแสดงว่า *Trichoderma* มีความทนทานต่อระดับ pH ได้กว้าง ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองที่พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้บนระดับ Ph ตั้งแต่ 3-8 แต่อย่างไรก็ตามสภาพแวดล้อมที่เชื้อราทุกชนิดสามารถเจริญเติบโตและสร้างสปอร์ได้ดีคือบนอาหาร PDA ระดับ pH 6-7 และเมื่อทำการทดสอบความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim ของเชื้อราดังกล่าวข้างต้นบนสภาพอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าวที่มีส่วนผสมของสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 ppm เปรียบเทียบกับ control (0 ppm) พบว่า *Ch. globosum* และ *Ch. cupreum* มีความต้านทานต่อ carbendazim ได้ถึงระดับความเข้มข้น 0.4 ppm เท่านั้น ในขณะที่ *C. gloeosporioides*, *T. harzianum* และ transformant of *T. harzianum* สามารถต้านทานต่อสารเคมีได้ถึงระดับความเข้มข้น 0.8 ppm โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน transformant ที่พบว่าถึงแม้ความเข้มข้นจะเพิ่มสูงขึ้นแต่เปอร์เซ็นต์ความต้านทานต่อสารเคมีก็ยังคงอยู่ในระดับเดิม ซึ่งต่างจากเชื้อราชนิดอื่นๆ ที่เปอร์เซ็นต์ความต้านทานมีแนวโน้มลดลงบนความเข้มข้นของ carbendazim ที่เพิ่มขึ้น นั่นแสดงว่า transformant มีความต้านทานต่อ carbendazim ได้สูงที่สุด โดยในเบื้องต้นพบว่าสามารถต้านทานถึงระดับ 3,000 ppm ที่เดียว และเมื่อทำการทดสอบศักยภาพของจุลินทรีย์ต่อต้านทั้ง 4 ชนิดข้างต้นต่อการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* M002-2 โดยวิธี bi-culture ในสภาพที่มีสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ทั้ง *Ch. globosum* Cg8 และ *Ch. cupreum* Cc9 ซึ่งทดสอบบนความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.2 ppm ต่างก็มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อโรคพืชได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *T. harzianum* T88-2 มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อโรคพืชได้สูงกว่าคือสามารถควบคุมได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ carbendazim ให้สูงขึ้น ซึ่งต่างกับ transformant of *T. harzianum* ที่พบว่าไม่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อโรคพืชดังกล่าวเลย ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้จึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำจุลินทรีย์ต่อต้านดังกล่าวข้างต้นมาประยุกต์ใช้ร่วมกับสารเคมีกำจัดเชื้อรา carbenazim เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชในสภาพไร่ให้สูงขึ้น หรืออาจจะเป็นประโยชน์ต่อการนำจุลินทรีย์ต่อต้านดังกล่าวมาใช้ในสภาพพื้นที่ที่มีการตกค้างของสารเคมี carbenazim ได้ในระดับหนึ่ง

ข้อเสนอแนะ

ในการจำแนกเชื้อ *Colletotrichum* spp. โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ควรจะศึกษาลักษณะ appressoria ควบคู่ไปกับการศึกษาขนาดและรูปร่างของสปอร์ตลอดจนโครงสร้างอื่นๆ ของเชื้อ เนื่องจากรูปร่างและขนาดของ appressoria มีความเฉพาะเจาะจงต่อ species ของเชื้อ และน่าจะมีความแปรปรวนน้อยกว่าสปอร์ เพื่อเพิ่มความแม่นยำต่อการจำแนกเชื้อ (identification) ให้สูงขึ้น ดังพบในรายงานของ Kanapathipillai (1996) ที่รายงานว่า *Colletotrichum* สามารถสร้าง appressoria ที่มีขนาดและรูปร่างเดียวกันบนพืชอาศัยต่างชนิดกันและในการจำแนกเชื้อราโดยใช้เทคนิคทางเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ถึงแม้จะไม่สามารถจำแนกตามกลุ่ม specie ของเชื้อราได้ แต่ก็สามารถจำแนกตามชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเชื้อราเหล่านั้น ซึ่งพบว่าช่วยร่นระยะเวลาในการทดสอบให้สั้นลงได้ แต่ควรจะทำการศึกษาในระดับที่มีความบริสุทธ์ของโปรตีนสูงขึ้นเพื่อให้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น เช่น การศึกษาโดยใช้เทคนิค isozyme (Kollar, 1994; Surve-Iyer *et al.*, 1995; Harrington *et al.*, 1996) หรือการศึกษาในระดับ DNA โดยอาศัยเทคนิคอื่นๆ เช่น randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) หรือ restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Harrington and Wingfield, 1995; Trigiano *et al.*, 1995; Balardin *et al.*, 1997; Sicard *et al.*, 1997) เป็นต้น เพื่อให้งานวิเคราะห์พันธุกรรมของเชื้อรามีความกระจ่างมากขึ้น และสำหรับขั้นตอนการทดลองในเทคนิคดังกล่าวที่ทำการเลี้ยงเชื้อ *Colletotrichum* ในอาหารเหลวเพื่อสกัดโปรตีนควรจะทำการเลี้ยงใน selective media หรือในสูตรอาหารที่ได้รับการเติมสารบางอย่างเข้าไปเพื่อช่วยในการสร้างโปรตีนให้มากขึ้น หรือสารดังกล่าวอาจจะมีคุณสมบัติในการช่วยสกัดโปรตีนให้ดีขึ้น

จากการใช้จุลินทรีย์ต่อต้านในการควบคุมโรคพืช ซึ่งจะให้ประสบผลสำเร็จได้นั้นต้องขึ้นอยู่กับทั้งคุณสมบัติเฉพาะตัวของจุลินทรีย์ต่อต้านและปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ ดังเช่นจากการทดสอบหาชนิดของอาหาร และระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้าน ซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอย่างมีประสิทธิภาพในสภาพไร่ กล่าวคือควรมีการปรับปรุงสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ต่อต้าน เช่น การเพิ่มอินทรีย์วัตถุในดิน หรือปรับระดับความเป็นกรด-ด่างของดินให้อยู่ในระดับ pH 6-7 ด้วยปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะทำให้จุลินทรีย์ต่อต้านมีศักยภาพในการควบคุมโรคพืชเพิ่มสูงขึ้น ถึงแม้ว่าในสภาพพื้นที่ดังกล่าวจะมีการตกค้างของสารเคมีกำจัดเชื้อรา carbendazim อยู่ในปริมาณหนึ่งก็ตาม นอกจากนั้นการไม่ปลูกพืชหลักร่วมกับหรือปลูกในบริเวณใกล้เคียงกับพืชอาศัยอื่นของเชื้อโรค ดังเช่นในการทดลองข้างต้นที่พบว่านอกจากเชื้อ *C. gloeosporioides* จะเข้าทำลายมะม่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซคอนันต์แล้ว ยังสามารถเข้าทำลายพืชอื่นๆ อีก 8 ชนิด คือ ละมุด มะกอกน้ำ ขนุน ส้มเขียวหวาน ฝรั่ง มะเขือเทศ พริกหยวก และถั่วลิสง ซึ่งถ้าหากมีการปฏิบัติโดยไม่ปลูกพืชดังกล่าวข้างต้นร่วมกับมะม่วงโซคอนันต์ ก็จะเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมหรือป้องกันการระบาดของโรคได้ และวิธีการดังกล่าวก็จะเป็นการส่งเสริมให้การควบคุมโรคพืชได้ผลดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2535. การใช้ยาเชื้อที่ผลิตจาก *Chaetomium cupretum* .ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในสภาพดินที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดโรคพืช. วารสารศูนย์บางพระ. 29: 13-16.

พิณทิพ รื่นวงษา. 2536. การแยกโปรตีนโดยวิธีการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส. หน้า 4.1-4.34. *ใน*: วัฒนา ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์ , (ผู้รวบรวม), เทคนิคทางคณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย. สาธารณสุขมูลฐานอาเซี่ยน, มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.

วาสนา ศิริรังษี. 2539. Gel electrophoresis.*ใน*: วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน. ภาควิชาจุลชีววิทยาคลีนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อาภัสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อารมณ์ อุดมสิน. 2537. ข่าวเศรษฐกิจการเกษตร. 40(44): 30-31.

Adaskaveg, J.E. and R.J. Hartin. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. Phytopatholog. 87: 979-987.

Agrios, G.N. 1978. Plant Pathology. Academic Press., New York. 703 p.

Alahakoon, P.W., Brown, A.E. and S. Sreenivasaprasad. 1994. Cross-infection potential of genetic group of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropcal fruits. *Physiol.* Mol. Plant Pathol. 44: 93-103.

Amemiya, Y., Kondo, A., Hiano, K., Hirukawa, T. and T. Kato. 1994. Antifungal substances produced by *Chaetomium globosum*. Technical Bulletin of Faculty of Horticulture, Chiba University. 48: 13-18.

Amusa, N.A. 1997. Fungi associated with anthracnose symptoms of yam (*Dioscorea* spp.) in South-West Nigeria and their roles in disease severity. Crop Res. Hisar. 13: 177-183.

Andrivon, D., Ramage, K., Guerin,. C., Lucas, J.M. and B. Jouan. 1997. Distribution and fungicide sensitivity of *Colletotrichum coccodes* in French potato-producing areas. Plant Pathology. 46: 722-728.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bailey, J.A. and M.J. Jeger. 1992. *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. C.A.B. International, Wallingford Oxon. UK. 387 p.

Balardin, R.S., Jarosz,A.M. and J.D. Kelly. 1997. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. Phytopathology. 87: 1184-1191.

Bera, S. and R.P. Purkayastha. 1997. Identification and characterization of some PR-proteins induced by kitazin and *Rhizoctonia solani* causing sheath blight of rice. Indian of experimental biology. 35: 644-649.

Byrne, J.M., Hausbeck, M.K. and R. Hammerschmidt. 1997. Conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum coccodes* on tomato foliage. Plant Dis. 81: 715-718.

Chen, H., Hayn, M. and H. Esterbauer. 1992. Purification characterization of two extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei*. *Biochem.* Biophys. Acta. 1121: 54-60.

de Lapeyre de Bellaire, L. and C. Dubois. 1997. Distribution of thiabendazole-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadeloup banana plantations. Plant Dis. 81: 1378-1383.

Denoyes, B. and A. Baudry. 1995. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolate from strawberry using morphological and cultural characteristics. Phytopathology. 85: 53-57.

Dio Pietro, A., Gut-rella, M., Pachlatko, J.P. and F.S. Scwinn. 1992. Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum* , a causal agent of damping-off. Phytopathology. 82: 131-135.

Elad, Y., Zimand, G., Verhoeff, K., Malathrakis, N.E. and B. Williamson. 1992. Intergration of biological and chemical control for grey mould. Recent advances in *Botrytis* research. Proceedings of the 10th International *Botrytis* Symposium. Greece. 272-276.

Fox, R.T.V. 1993. Principles of diagnostic techniques in plant pathology. C.A.B. International. Wallingford, Oxon, UK. 205 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Freeman, S. and E. Shabi. 1996. Cross-infection of subtropical and temperature fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. Physiol. and Molecul. Plant Pathol. 49: 395-404.

Freeman, S. and T. Katan. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. Phytophatology. 87: 516-521.

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

Freitas, S. and M.A. Pizzinatto. 1997. Action of rhizobacteria on the *Colletotrichum gossypii* incidence and growth promotion in cotton seedlings (*Gossypium hirsutum*). Summa Phytopathologica. 23: 36-41.

Goes, A. and H. Kimati. 1997a. Pathogenic characterization of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus plants. Summa Phytopathologica. 23: 10-14.

Goes, A. and H. Kimati. 1997b. Morphological characterization of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* associated with postbloom fruit drop disease. Summa Phytopathologica. 23: 4-10.

Harrington, T.C and B.D. Wingfield. 1995. A PCR-based identification method for species of *Amillaria.* Mycologia. 87: 280-288.

Harrington, T.C., Steimel, J.P., Wingfield, M.J. and G.A. Kile. 1996. Isozyme variation and species delimitation in the *Ceratocystis coerulescens* complex. Mycologia. 88: 104-113.

Hegde, Y., Hegde, R.K. and S. Kulkarni. 1993. Physiological studies on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. causing anthracnose of arecanut. Karnataka J. of Agricultural Sci. 6: 411-412.

Heller, W.E. and H.R. Theiler. 1994. Antagonism of *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* and *Trichoderma viride* to four soil-borne *Phytophthora* species. Phytopathology. 141: 390-394.

Holmstrom-Ruddick, B. and K. Mortensen. 1995a. *In vitro* formation and survival of appressoria of a mycoherbicide agent, *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* and a benomyl-resistant strain, HP4.5RR. Mycol. 99: 1103-1107.

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Holmstrom-Ruddick, B. and K. Mortensen. 1995b. Factors affecting pathogenicity of a benomyl-resistant strain of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae*. Mycol. Res. 99: 1108-1112.

Hunt, R.S. and A.K. Ekramoddoullah. 1996. Proteins patterns distinguish among Canadian isolates of *Inonotus tomentosus, I. Circinatus* and *Phellinus pini*. Mycologia. 88: 395-402.

Hwang, B.K. and B.S. Kim. 1995. In vivo efficacy and in vitro activity of tubercidin, an antibiotic nucleoside, for control of *Phytophthora capsici* blight in *Capsicum annuum*. Pesticide Sci. 44: 255-260.

Ji, C. and J. Kuc. 1995. Purification and characterization of an acidic beta-1,3-glucanase from cucumber and its relationship to systemic disease resistance induced by *Colletotrichum laginarium* and tobacco necrosis virus. Mol. Plant microb. Interact. 8: 899-905.

Ji, C. and J. Kuc. 1997. Non-host resistance to *Colletotrichum lagenarium* in pumpkin and squash is not primary associated with β–1,3-glucanase and chitinase activities. Physiological and Molecular Plant Pathol. 50: 361-370.

Johnson, D.A., Carris, L.M. and J.D. Rogers. 1997. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum nymphaea* and *C. nupharicola* sp. Nov. on water-lilies (*Nymphaea* and *Nuphar*). Mycol. Res. 101: 641-649.

Kahl, J., Molhock, W.M.L., Van, der plus, C.H. and N.J. Fokkema,. 1995. Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. Phytopathology. 85: 393-401.

Kalaimani, T. 1995 Growth and sporulation of six isolates of sugarcane red rot (*Colletotrichum falcatum* Went.) at different temperature and hydrogen ion concentration. Cooperative Sugar. 27: 269-274.

Kanapathipillai, V.S. 1996. Comparative studies of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from eighteen malasian hosts. Pertanika J. of Tropical Agri Sci. 19: 7-15.

King, W.T., Madden, L.V., Ellis, M.A. and L.L. Wilson. 1997. Effects of temperature on sporulation and latent period of *Colletotrichum* spp. infecting strawberry fruit. Plant. Dis. 81: 77-84.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kollar, A. 1994. Characterization pf specific induction, activity, and isozyme polymorphism of extracellular cellulases from *Venturai inaqualis* detected *in vitro* and on the host plant. Molecular Plant-Microbe Interactions. 7: 603-611.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structures of protiens during assembly by head of bacteriophage-T4. Nature (London). 227: 680-688.

La-Grange, D.C., Pretorius, I.S. and W.H. Van-Zyl. 1996. Expression of a *Trichoderma reesei* beta-xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1036-1044.

Latorre, B., Perez, G.F., Wilcox, W.F. and R. Torres. 1995. Comparative protein electrophoretic and isoenzymic patterns of *Phytophthora cryptogea* isolates from Chile kiwifruit and North American deciduous fruits. Plant Dis. 79: 703-708.

Lo, C.T. Nelson, E.B. and G.E. Harman. 1997. Improved biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* 1295-22 for foliar phases of turf diseases by use of spray applications. Plant Dis. 81: 1132-1138.

Natural, M.P., Balmaceda, F. and M.J.C.M. Estrada. 1994. Anthracnose of *Anthurium andreanum* Andre. Pest Management Council of the Philippines, Inc., College, Laguna. PMCP. 86 pp.

Norman, D.J. and J.O. Strandberg. 1997. Suvival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leatherleaf fern. Plant Dis. 81: 117-1180.

Park, W.M., Kim, S.H. and Y.H. Ko. 1989. Susceptibilization of a red pepper (*Capsicum annuum* L.) to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. In relation to the ripenning of fruits. Korean J. of Plant Pathol. 5: 262-270.

Pascholati, S.F., Deising, H., Leite, B., Anderson, D. and R.L. Nicholson. 1993. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicla.* Physiol. mol. Plant pathol. 42: 37-51.

Qian, Y. And Z. Xiaoyan. 1996. Transformation of resistance gene to carbendazim into *Trichoderma harzianum* and its expression. p. 133-135. *in*: Wenhua, T., James Cook, R. and A. Rovira. Advances in biological control of plant disease. China Agricultural University Press Beijing China.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Qian, Y., Xiaoytan, Z., Yang, Q.A. and X.Y. Zhao. 1996. Transformation and expression of the residence gene to carbendazim into *Trichoderma harzianum.* Resistant pest mangement. 8: 31-32.

Saaiman, W.C. 1996. Evaluation of pre-harvest fungicides for the control of postharvest disease in mangoes. Yearbook South Africa Mango Growers' Association. 16: 65-69.

Sanogo, S. and S.P. Pennypacker. 1997. Factors affecting sporogenic and myceliogenic germination of sclerotia of *Colletotrichum coccodes.* Plant Dis. 81: 333-336.

Sanogo, S., Pennypacker, S.P., Stevenson, R.E. and A.A. MecNab. 1997. Weather variables associated with infection of tomato fruit by *Colletotrichum coccodes.* Plant Dis. 81: 753-756.

Sicard, D., Buchet, S., Michalakis, Y. and C. Neema. 1997. Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in wild populations of common bean. Plant Pathology. 46: 355-365.

Surve-Iyer, R.S., Adams, G.C., Iezzoni, A.F. and A.L. Jones. 1995. Isozyme detection and variation in *Leucostoma* species from *Prunus* and *Malus*. Mycologia. 87: 471-482.

Taisoo, L., Hoduck, K., Chull, B.K., Changkeun, Y. and M. Dusik. 1996. Electrophoretic profiles of protiens from the mycelia and fruiting-bodies of *Lentinus edodes* strains in Korea. FRI Journal of Forest Sci. Seoul. 54: 207-213.

Thomas, M.D. and R.A. Frederiksen. 1995. Dynamics of oval and falcate conidium production of *Colletotrichum graminicola* from sorghum. Mycologia. 87: 87-89.

Timmer, L.W., Brown. G.E. and Zitko, S.E. 1998. The role of *Colletotrichum* spp. In postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. Plant Dis. 82: 415-418.

Trigiano, R.N., Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and M.T. Windham. 1995. DNA amplification fingerprinting provides evidence that *Discula destructiva,* the cause of dogwood anthracnose in North America, is an introduced pathogen. Mycologia. 87: 490-500.

Tsigos, T. and V. Bouriotis. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum.* Biol. Chem. 270: 26286-26291.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vagvolgyi, C., Papp, T., Palagyi, Z. and T.J. Michailides. 1996. Isozyme variation among isolates of *Mucor piriformis*. Mycologia. 88: 602-607.

Wattad, C., Kobiler, D., Dinoor, A. and D. Prusky. 1997. Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. Physiological and Molecular Plant Pathology. 50: 197-212.

Weng, F.Y. and T.Y. Chuang. 1996. Analysis of enzyme composition in the spore matrix of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose. Plant Pathology Bulletin. 5: 181-187.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
ตารางข้อมูล

ตารางผนวกที่ 1ก แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหารชนิดต่างๆ

ชนิดอาหาร	pH	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และความหนาแน่นของเส้นใย									
		M002-2		Cg8		Cc9		T88-2		Transformant[1/]	
Potato	3	2.36 [2/]	2[3/]	0.75	1	3.24	2	5.5	4	0.63	0
Dextrose	4	3.34	2	2.13	2	3.7	4	5.5	4	1.61	3
Agar	5	4.03	3	4.05	3	4.06	4	5.5	4	2.73	4
(PDA)	6	5.4	4	4.03	4	4.08	4	5.5	4	3.13	4
	7	4.66	4	4.08	4	3.91	4	5.5	4	3.36	4
	8	3.9	3	3.86	4	3.88	4	5.5	4	3.09	4
Potato	3	3.66	2	0.89	1	3.65	2	5.5	4	0.59	0
Sucrose	4	4.71	3	2.78	2	3.9	4	5.5	4	1.43	3
Agar	5	5.24	3	3.43	2	4.43	4	5.5	4	2.56	4
(PSA)	6	5.43	3	4.39	4	4.24	4	5.5	4	3.15	4
	7	5.23	3	4.74	4	3.95	3	5.5	4	3.31	4
	8	4.89	3	4.21	3	3.79	3	5.5	3	3.27	4
Mango	3	3.26	2	0.84	1	3.83	2	5.5	3	0.54	0
Fruit	4	4.49	4	2.39	2	3.95	3	5.5	4	0.6	2
agar	5	4.88	4	4.11	3	3.95	3	5.5	4	2.24	3
	6	5.09	4	4.21	4	4.68	3	5.5	4	2.9	4
	7	4.91	4	4.65	4	4.33	3	5.5	4	3.31	4
	8	4.8	4	4.55	4	4.23	3	5.5	4	3.33	4
Mango	3	0.63	1	1.46	1	1.85	1	5.5	2	0.5	0
Leaf	4	4.03	1	1.49	1	2.78	2	5.5	2	0.5	0
Agar	5	4.63	2	2.96	1	3.05	2	5.5	2	2.03	1
	6	4.84	2	4.18	2	3.3	2	5.5	2	2.53	2
	7	4.41	2	4.35	2	3.23	2	5.5	2	2.96	2
	8	4.36	1	3.99	1	2.9	2	5.5	2	2.7	1

M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch. cupreum*, T88-2 = *T. harzianum* และ transformant = transformant of *T. harzianum*

[1/] บันทึกผลที่ 30 วัน

[2/] เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ที่อายุ 4 วัน ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[3/] ระดับความหนาแน่นของเส้นใย มี 5 ระดับ คือ ระดับ 0 หมายถึง ไม่มีการเจริญของเส้นใย ระดับ 1 หมายถึง โคโลนีมีเส้นใยบางมาก ระดับ 2 หมายถึง โคโลนีมีเส้นใยบาง ระดับ 3 หมายถึง โคโลนีมีเส้นใยหนาแน่นปานกลาง และระดับ 4 หมายถึง โคโลนีมีเส้นใยหนาแน่นมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2ก แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนอาหารชนิดต่างๆ

ชนิดอาหาร	pH	จำนวนสปอร์ (x 10^7)[u]			
		M002-2	Cg8	Cc9	T88-2
Potato dextrose agar (PDA)	3	0.68	0	0.93	117.99
	4	1.93	0.5	2.53	199.73
	5	3.1	2.08	3.17	765.18
	6	7.59	2.73	5.65	1146.23
	7	4.44	1.65	2.27	766.14
	8	0.02	0.84	2.22	142.78
Potato sucrose agar (PSA)	3	0.74	0	0	51.84
	4	1.22	0	0	55.96
	5	4.19	0	0	58.13
	6	6.01	0.02	0	68.41
	7	4.62	0.02	0	50.05
	8	2.95	0.02	0	14.4
Mango fruit agar (MFA)	3	0.71	0	0	16.63
	4	1.56	0.64	0	112.94
	5	3.71	3.38	0	159.39
	6	6.05	4.05	0	212.62
	7	2.39	2.25	0	144.48
	8	1.13	0.92	0	107.66
Mango leaf agar (MLA)	3	0.02	0	0	9.28
	4	0.19	0	0	17.03
	5	0.18	0	0	31.28
	6	0.24	0	0	63.5
	7	0.15	0	0	37.43
	8	0.07	0	0	30.56

M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch, cupreum* และ T88-2 = *T. harzianum*

[u] จำนวนสปอร์ (x 10^7) ที่อายุ 25 วัน ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3ก ANOVA แสดงค่าประเมินการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *T. harzianum* China บนอาหารชนิดต่างๆ ที่อายุ 4 วัน

Source of variance	F-test ค่าประเมินการเจริญเติบโต[1/]				
	M002-2	Cg8	Cc9	T88-2	Transformant[2/]
ทรีทเมนต์	**	**	**	**	**
ชนิดอาหาร (factor A)	**	**	**	**	**
ระดับ pH (factor B)	**	**	**	ns	**
A x B	**	**	**	ns	**

M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch. cupreum* , T88-2 = *Trichoderma harzianum* และ transformant = transformant of *T. harzianum*

[1/] ค่าประเมินการเจริญเติบโต = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) x ระดับความหนาแน่นของเส้นใย

[2/] บันทึกผลที่อายุ 30 วัน

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 4ก ANOVA แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chaetomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* CC9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนอาหารชนิดต่างๆ ที่อายุ 25 วัน

Source of variance	F-test จำนวนสปอร์ (x 10^7)			
	M002-2	Cg8	Cc9	T88-2
ทรีทเมนต์	**	**	**	*
ชนิดอาหาร (factor A)	**	**	**	**
ระดับ pH (factor B)	**	**	**	ns
A x B	**	**	**	ns

M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch. cupreum* และ T88-2 = *Trichoderma harzianum*

ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 5ก แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chatomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9, *Trichoderma harzianum* T88-2 และ transformant of *Trichoderma harzianum* China บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim

ชนิดของเชื้อรา	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และความหนาแน่นของเส้นใยบนสารเคมี carbendazim											
	0 ppm		0.1 ppm		0.2 ppm		0.4 ppm		0.6 ppm		0.8 ppm	
M002-2	5.5[1/]	4[2/]	5.5	4	5.29	3	2.83	2	2.24	2	2.23	2
Cg8	5.5	4	4.91	3	2.91	2	0.95	1	0.5	0	0.5	0
Cc9	5.5	4	4.91	4	4.25	3	0.76	1	0.5	0	0.5	0
T88-2	5.5	4	5.5	4	5.5	4	3.5	4	5.5	3	3.7	2
Transformant[3/]	3.22	4	3.18	4	3.14	4	3.13	4	3.11	4	3.11	4

M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch. cupreum*, T88-2 = *Trichoderma harzianum* และ transformant = transformant of *T. harzianum*

[1/] เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (ซม.) ที่อายุ 6 วัน ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2/] ระดับความหนาแน่นของเส้นใย มี 5 ระดับ คือ ระดับ 0 หมายถึง ไม่มีการเจริญของเส้นใย ระดับ 1 หมายถึง โคโลนีมีเส้นใยบางมาก ระดับ 2 หมายถึง โคโลนีมีเส้นใยบาง ระดับ 3 หมายถึง โคโลนีมีเส้นใยหนาแน่นปานกลาง และระดับ 4 หมายถึง โคโลนีมีเส้นใยหนาแน่นมาก

[3/] บันทึกผลที่อายุ 30 วัน

ตารางผนวกที่ 6ก แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* M002-2, *Chatomium globosum* Cg8, *Ch. cupreum* Cc9 และ *Trichoderma harzianum* T88-2 บนอาหาร PDA ผสมสารเคมี carbendazim

ชนิดของเชื้อรา	จำนวนสปอร์ (x 10^7) บนสารเคมี carbendazim[1/]					
	0 ppm	0.1 ppm	0.2 ppm	0.4 ppm	0.6 ppm	0.8 ppm
M002-2	8.31	3.21	2.69	2.58	2.33	2.28
Cg8	3.47	1.61	0.06	0	0	0
Cc9	2.46	2.34	2.28	0.02	0	0
T88-2	135.16	131.21	129.43	115.81	106.48	98.27

M002-2 = *C. gloeosporioides*, Cg8 = *Ch. globosum*, Cc9 = *Ch. cupreum* และ T88-2 = *Trichoderma harzianum*

[1/] จำนวนสปอร์ (x 10^7) ที่อายุ 25 วัน ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 7ก แสดงการเจริญเติบโต (ซม.) ของ transformant of *Trichoderma harzianum* China บน PDA ผสมสารเคมี carbendazim : 30 วัน

Carbendazim (ppm)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (ซม.)
0	3.22
500	3.09
1000	2.89
1500	2.7
2000	2.65
2500	2.5
3000	2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สูตรสารละลาย

1. **สารละลาย** 30% Acrylamide solution

Acrylamide	30	กรัม
Bis	0.8	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 **มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ** 4 **องศาเซลเซียส**

2. **สารละลาย** 4x Tris-Cl / SDS, pH 8.8 (1.5 M Tris-Cl / 0.4% SDS)

Tris-Cl	18.2	กรัม
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ปรับ pH 8.8 **ด้วย** 6 N HCl **และเติมน้ำให้ครบ** 100 **มิลลิลิตร**
เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 **องศาเซลเซียส**

3. **สารละลาย** 4x Tris-Cl / SDS, pH 6.8 (0.5 M Tris-Cl / 0.4% SDS)

Tris-Cl	6.05	กรัม
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

ปรับ pH 6.8 **ด้วย** 6 N HCl **และเติมน้ำให้ครบ** 100 **มิลลิลิตร**
เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 **องศาเซลเซียส**

4. 10% Ammonium persulfate

Ammonium persulfate	100	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

5. **องค์ประกอบของ** extraction buffer

Tris pH 7.5	4.482	กรัม
EDTA	0.037	กรัม
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	2	กรัม
2-Mercaptoethanol	1	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มิลลิลิตร

6. **องค์ประกอบของ** running buffer

Tris	30.2	กรัม
Glycine	144	กรัม
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	10	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. **องค์ประกอบของ** sample buffer

Tris	1.52	กรัม
Glyceral	20	มิลลิลิตร
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	2	กรัม
Bromophenol Blue	1	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	40	มิลลิลิตร
ปรับ pH 6.8 ด้วย HCl เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มิลลิลิตร

8. **องค์ประกอบของสารละลาย** coomassie blue

Methyl alcohol	100	มิลลิลิตร
Coomassie Blue R	0.1	กรัม
Acetic acid	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

9. **องค์ประกอบของสารละลาย** destaining

Methyl alcohol	25	มิลลิลิตร
Acetic acid	35	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	440	มิลลิลิตร

10. **องค์ประกอบของสารละลาย** fixing

Methyl alcohol	100	มิลลิลิตร
Acetic acid	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาววีระณีย์ ศรีพรมสุข เกิดเมื่อวันที่ 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2513 ที่จังหวัดสุรินทร์ สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืชวิทยา จากมหาวิทยาลัยขอนแก่นเมื่อปีการศึกษา 2535 ปี พ.ศ. 2536 เข้าทำงานในตำแหน่งผู้ช่วยวิจัยในโครงการ Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS) และปี พ.ศ. 2537 เข้ารับราชการในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 3 สังกัดภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และปี พ.ศ. 2541 ถึงปัจจุบันดำรงตำแหน่งนักวิชาการเกษตร 4 สังกัดที่ทำงานเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้