

การควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ต่อ
เชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส
ในมะละกอ

BIOLOGICAL CONTROL OF *Neosartorya* ON
Colletotrichum CAUSE ANTHRACNOSE DISEASE OF
PAPAYA



นางสาวณิชนันต์ กลิ่นจรรยา
นางสาวปิยะวรรณ เปลียนวงษ์
นางสาวพิมพ์ภัทรา ธวันทา

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BIOLOGICAL CONTROL OF *Neosartorya* ON
Colletotrichum CAUSE ANTHRACNOSE DISEASE OF
PAPAYA



NIDCHAKAN KLINJAROON
PIYAWAN PLIANWONG
PIMPHATTRA THAWANTA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> ต่อเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะละกอ	
	Biological control of <i>Neosartorya</i> on <i>Colletotrichum</i> cause anthracnose disease of papaya	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณิกานต์ กลิ่นจรรยา	รหัสนักศึกษา 58050888
	นางสาวปิยะวรรณ เปลียนวงษ์	รหัสนักศึกษา 58050930
	นางสาวพิมพ์ภัทรา ธวันทา	รหัสนักศึกษา 58050946
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
ปีการศึกษา	2561	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์	

บทคัดย่อ

คัดแยกเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะละกอ โดยเก็บตัวอย่างมะละกอจากจังหวัดกรุงเทพฯ จังหวัดชลบุรี และจังหวัดสุพรรณบุรี ผลจากการจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถจำแนกได้จำนวน 2 สปีชีส์ คือ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. truncatum* เมื่อนำมาทดสอบการก่อโรค พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลต CBI1 สามารถก่อโรคได้รุนแรงที่สุด และศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* จำนวน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Neosartorya hiratsukae* EU06, *N. pseudofischeri* EU13 และ *N. fenneliae* CHA03-A11 ในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค Dual culture พบว่าเชื้อรา *N. pseudofischeri* EU13 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลต CBI1 ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 70.16 และเมื่อนำสารสกัดหยาบของเชื้อรา *N. pseudofischeri* EU13 ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี Poison plate พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อรา *C. gloeosporioides* ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการสร้างโคนิเดียของเชื้อก่อโรค *C. gloeosporioides* ด้วยค่า Effective dose ที่ 50% (ED₅₀) เท่ากับ 45.63 ppm

คำสำคัญ : โรคแอนแทรคโนส สกุล *Colletotrichum* สกุล *Neosartorya*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Biological control of <i>Neosartorya</i> on <i>Colletotrichum</i> cause anthracnose disease of papaya
Students	Miss Nidchakan Klinjaroon Student ID 58050888 Miss Piyawan Plianwong Student ID 58050930 Miss Pimphattra Thawanta Student ID 58050946
Degree	Bachelor of Science (Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2018
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Co-advisor	Dr. Narumon Tangthirasunun

Abstract

Isolation of *Colletotrichum* causes papaya anthracnose disease that were collected from Bangkok, Chonburi and Suphanburi provinces. The isolates were identified based on morphological characteristics and the sequencing. Two species of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* were identified. For fungal pathogenicity test, *C. gloeosporioides* CBI1 was most pathogenesis. *In vitro* test by dual culture technique, *C. gloeosporioides* CBI1 was co-cultured with three isolates of antagonist fungi (*Neosartorya hiratsukae* EU06, *N. pseudofischeri* EU13 and *N. fenneliae* CHA03-A11). The result showed the best antagonistic was *N. pseudofischeri* EU13 which inhibited *C. gloeosporioides* CBI1 as 70.16%. The hexane, ethyl acetate and methanol crude extracts of *N. pseudofischeri* EU13 were assessed for antifungal activity against *C. gloeosporioides* CBI1 by poison plate method. The ethyl acetate crude extracts of *N. pseudofischeri* EU13 showed the highest antagonistic activity. The growth and spore germination inhibition of *C. gloeosporioides* CBI1, the effective does at 50% (ED₅₀) for mycelium growth and spore germination inhibition was 45.63 ppm.

Keywords : Anthracnose, *Colletotrichum* sp., *Neosartorya* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดีด้วยความอนุเคราะห์ การช่วยเหลือคำปรึกษา คำแนะนำต่าง ๆ และกำลังใจจากบุคคลรอบข้าง คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมถึง ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินตามัย ประธานกรรมการ และ ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ข้อคิดเห็น ให้ความรู้เสนอ แนวทางในการศึกษาค้นคว้า ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ให้สำเร็จ ลุล่วง ทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้ มีความสมบูรณ์มากขึ้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณไว้เป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ รวมถึงบุคลากรทุกท่านที่กรุณาให้ คำปรึกษาแนะนำ ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้ด้วยดี มาตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา-มารดาที่ทำให้ได้รับการศึกษาตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรม สั่งสอน เป็นกำลังใจ และเป็นแรงผลักดันในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงพี่ น้อง และเพื่อน ๆ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมทุกคน ตลอดจนบุคคลอื่น ๆ ที่ให้ความ ช่วยเหลืออีกมากที่ไม่ได้กล่าวมา โดยคณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณา และความปรารถนาดีของ ทุกท่านเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ณิชนันต์ กลิ่นจรรยา

ปิยะวรรณ เปลียนวงษ์

พิมพ์ภัทรา รัตนทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i>	4
2.1.1 โรคแอนแทรคโนสในมะละกอ.....	7
2.1.2 การศึกษาระดับโมเลกุลของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i>	7
2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i>	8
2.3 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.....	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	11
3.1 แหล่งที่มาของพืช.....	11
3.2 สารเคมี.....	11
3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	11
3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และเทคนิค polymerase chain reaction (PCR).....	11
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	12
3.4 วิธีการทดลอง.....	13
3.4.1 การตัดแยกเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะละกอ.....	13
3.4.2 การบ่งชี้เชื้อในระดับโมเลกุล.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB.....	14
3.4.2.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis.....	14
3.4.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR.....	15
3.4.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุสปีชีส์ของเชื้อรา.....	16
3.4.3 การทดสอบการก่อโรคของเชื้อ <i>C. gloeosporioides</i> และ <i>C. truncatum</i>	16
3.4.4 การควบคุมเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> โดยเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> ด้วยเทคนิค Dual culture.....	16
3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบของเชื้อรา <i>N. pseudofischeri</i> EU13 ต่อการควบคุมเชื้อ <i>C. gloeosporioides</i> CBI1.....	17
3.4.5.1 การสกัดสาร.....	17
3.4.5.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบต่อการควบคุมเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> ด้วยวิธี Poison plate.....	17
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	19
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส ในมะละกอ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	19
4.2 ผลการบ่งชี้เชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	24
4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i>	24
4.2.2 ผลการบ่งชี้เชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> โดยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์.....	24
4.3 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> และ <i>C. truncatum</i>	26
4.4 การควบคุมเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> CBI1 โดยเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> ด้วยเทคนิค Dual culture.....	27
4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>N. pseudofischeri</i> EU13 ต่อการควบคุมเชื้อ <i>C. gloeosporioides</i> CBI1 ด้วยวิธี Poison plate.....	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	32
เอกสารอ้างอิง.....	34
ภาคผนวก.....	40
ภาคผนวก ก.....	41
ภาคผนวก ข.....	45
ภาคผนวก ค.....	49



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR.....	15
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในบริเวณ ITS	15
4.1 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i>	23
4.2 สายพันธุ์ของเชื้อราจากฐานข้อมูล NCBI เลข Accession และขนาดดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราก่อโรค <i>C. gloeosporioides</i> และ <i>C. truncatum</i>	25
4.3 ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> และ <i>C. truncatum</i>	27
4.4 การควบคุมเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> CBI1 โดยเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> ด้วยเทคนิค Dual culture.....	28
4.5 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>N. pseudofischeri</i> EU13 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> CBI1 ด้วยวิธี Poison plate.....	30



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 มะละกอฮอลแลนด์.....	4
2.2 ลักษณะโคนินเดียของเชื้อ <i>Colletotrichum</i> sp. รูปทรงโค้งงอคล้ายเคียว (ก-ค) และรูปทรงกระบอกหัวท้ายมน (ง-ฉ).....	5
2.3 การสีบพันธุ์ของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i>	8
2.4 <i>Neosartorya pseudofischeri</i> (ก-ข) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MEA (ค-จ) แอสโคคาร์ป (ฉ-ช) แอสคัส และแอสโคสปอร์ (ฅ) ภายใต้กล้อง SEM.....	9
3.1 แสดงการวางเชื้อต่อต้าน และเชื้อสาเหตุโรค บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม รวมทั้งจานอาหารชุดควบคุมของเชื้อต่อต้าน และเชื้อสาเหตุของโรค.....	17
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> ไอโซเลต CBI1 (ก) ลักษณะอาการของโรคบนผลมะละกอ (ข) ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้า และหลังเพลทที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ค) ลักษณะโคนินเดียที่กำลังขยาย 40 เท่า (ง) ลักษณะโคนินเดียที่กำลังขยาย 100 เท่า.....	20
4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> ไอโซเลต LKB1 (ก) ลักษณะอาการของโรคบนผลมะละกอ (ข) ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้า และหลังเพลทที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ค) ลักษณะโคนินเดียที่กำลังขยาย 40 เท่า (ง) ลักษณะโคนินเดียที่กำลังขยาย 100 เท่า.....	20
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> ไอโซเลต SPB2 (ก) ลักษณะอาการของโรคบนผลมะละกอ (ข) ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้า และหลังเพลทที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ค) ลักษณะโคนินเดียที่กำลังขยาย 40 เท่า (ง) ลักษณะโคนินเดียที่กำลังขยาย 100 เท่า.....	21
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> ไอโซเลต CBI2 (ก) ลักษณะอาการของโรคบนผลมะละกอ (ข) ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้า และหลังเพลทที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ค) ลักษณะโคนินเดียที่กำลังขยาย 40 เท่า (ง) ลักษณะโคนินเดียที่กำลังขยาย 100 เท่า.....	22
4.5 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อสกุล <i>Colletotrichum</i>	23
4.6 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS ของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i> แถบที่ 1 marker ขนาด 100 คู่เบส แถบที่ 2-5 คือ ไอโซเลต CBI1, CBI2, LKB1 และ SPB2 ตามลำดับ.....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> และ <i>C. truncatum</i> จากฐานข้อมูล NCBI กับเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> ไอโซเลต CBI1, LKB1 และ SPB2 ที่แยกได้จากมะละกอ และ <i>C. truncatum</i> CBI2 ที่แยกได้จากมะละกอ.....	26
4.8 แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลมะละกอที่เกิดจากการทดสอบการก่อโรคโดยเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> และ <i>C. truncatum</i> ทั้งหมด 4 ไอโซเลต.....	26
4.9 แสดงการทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture ระหว่างเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> CBI1 กับ <i>N. hiratsukae</i> EU06 (ก) <i>N. pseudofischeri</i> EU13 (ข) และ <i>N. fennelliae</i> CHA03-A11 (ค).....	28
4.10 สารสกัดยับยั้งเชื้อรา เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ <i>N. pseudofischeri</i> EU13 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>C. gloeosporioides</i> CBI1 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ.....	29
4.11 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อ <i>C. gloeosporioides</i> CBI1 จากสารสกัดยับยั้งของเชื้อราต่อต้าน <i>N. pseudofischeri</i> EU13.....	31
4.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคนิเดียของเชื้อ <i>C. gloeosporioides</i> CBI1 จากสารสกัดยับยั้งของเชื้อราต่อต้าน <i>N. pseudofischeri</i> EU13.....	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นผลผลิตการเกษตรส่งออกที่สำคัญของประเทศกำลังพัฒนาในแถบเอเชียและลาตินอเมริกา สร้างรายได้ให้ชาวสวนจำนวนมาก นอกจากนี้มะละกอยังเป็นผลไม้ที่กำลังได้รับความนิยมในตลาดอาหารสุขภาพระดับโลก ในช่วงปี ค.ศ. 2008-2010 องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations หรือ FAO) มีรายงานว่า การปลูกมะละกอในระดับโลกมีจำนวนเพิ่มขึ้น ประเทศอินเดียเป็นประเทศที่มีผลผลิตมะละกอเป็นอันดับที่ 1 คิดเป็น 38.61 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ บราซิล คิดเป็น 17.50 เปอร์เซ็นต์ และอินโดนีเซียคิดเป็น 6.89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับที่ 9 มีผลผลิตมะละกอกคิดเป็น 1.95 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตมะละกอทั่วโลก (FAOSTAT, 2013) แต่ในปี ค.ศ. 2015 Valenzuela และคณะ รายงานว่าโรคที่เกิดขึ้นหลังการเก็บเกี่ยวมะละกอส่งผลให้ปริมาณ และการส่งออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสาเหตุหลักมาจากโรคแอนแทรกโนส (Anthracnose) เกิดจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* โดยเชื้อราเข้าทำลายผลมะละกอตั้งแต่เป็นผลอ่อน แต่อาการของโรคแสดงเมื่อผลสุก ทำให้ผลมะละกอเน่าเสีย และคุณภาพลดลง

ประเทศไทยนิยมปลูกมะละกอหลากหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์แขก พันธุ์จำปาตะ พันธุ์ฮอลแลนด์ พันธุ์โซโล เป็นต้น แต่ในทึ้นี่สนใจศึกษาเฉพาะมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์เนื่องจากเป็นมะละกอที่นิยมทานผลสุก แต่ผลสุกมีอายุการเก็บรักษาสั้น ผลเน่าเสียง่าย โดยเฉพาะมะละกอที่ปลูกแบบอินทรีย์ (Organic) ซึ่งไม่ได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช สามารถเกิดโรคได้ง่ายกว่ามะละกอที่ปลูกแบบใช้สารเคมี โดยโรคที่พบบ่อยในมะละกอสามารถพบได้หลายโรค เช่น โรคแอนแทรกโนส โรคใบต่างวงแหวน (Ringspot virus) โรคเน่าคอดินของต้นกล้า (*Damping off*) โรครากเน่า (Root rot) โรคราแป้ง (Powdery mildew) โรคใบจุด (Leaf spot) และโรครากปม (Root knot) (โอเคเนชั่น, 2557) แต่โรคแอนแทรกโนสนั้นเป็นโรคที่สร้างความเสียหายมากที่สุดโรคหนึ่ง โดยมีการระบาดมากในประเทศเขตร้อน และกึ่งเขตร้อน สามารถเกิดได้ทุกฤดูกาล จึงสนใจที่จะศึกษาในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส ในปัจจุบันเกษตรกรใช้สารเคมีในการควบคุมโรคที่เกิดกับมะละกอ เช่น โพรคลอราซ (Prochloraz) และโพรพิโคนาโซล (Propiconazole) (Ong *et al.*, 2012) แม้ว่าการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชนั้นช่วยลดการเกิดโรค มีประโยชน์ต่อการควบคุมการระบาดของโรค และแมลงศัตรูพืชได้ในเวลาอันรวดเร็ว แต่มีผลเสีย คือ การตกค้างของสารเคมีในผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพทำให้มีโอกาเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ได้ ก่อให้เกิดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม รวมทั้งส่งผลต่อระบบนิเวศและผู้บริโภคอีกด้วย การใช้สารเคมีฆ่าเชื้อราเป็นเวลานานอาจทำให้เชื้อเกิดความต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ นอกจากนี้ประเทศไทยและต่างประเทศยังมีการออกกฎหมายเพื่อควบคุมการใช้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีทางการเกษตรที่มากเกินไปจนเกิดความจำเป็น และไม่เหมาะสม เพื่อลดความสูญเสียในหลายๆ ด้าน ทั้งในด้านปัญหาสุขภาพ ปัญหาสิ่งแวดล้อม และลดปริมาณสารพิษตกค้างในผักและผลไม้ (Ali *et al.*, 2010 ; Maqbool *et al.*, 2011 ; Edirisinghe *et al.*, 2012 ; Bautista-Rosales *et al.*, 2014 และ สาคร, 2556) ดังนั้นการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biocontrol) คือ การใช้สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค เพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช จึงเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2559) มีรายงานเกี่ยวกับการควบคุมโรคพืชโดยไม่ใช้สารเคมีด้วยการนำเชื้อต่อต้าน (Antagonistic) มาควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค (Pathogen) ซึ่งเชื้อต่อต้านจะใช้พื้นที่ และสารอาหารร่วมกับเชื้อก่อโรค กระตุ้นกลไกการป้องกันตัวเองของพืช หรือผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรค (Soytong และ Quimio, 1992) มีรายงานถึงการนำเชื้อต่อต้านเพื่อควบคุมโรคแอนแทรกโนสในผัก และผลไม้ต่าง ๆ โดย Jantasorn และคณะ (2016) รายงานว่าประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในพริกได้ รวมทั้ง Pattarasaiikul และคณะ (2018) โดยมีรายงานการใช้เชื้อรา *N. hiratsukae*, *N. pseudofischeri*, *N. aureola*, *N. spinosa*, และ *N. fenneliae* ควบคุมโรคแอนแทรกโนสในกล้วยที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *C. musae* ได้ และ Chalearmsrimuang และคณะ (2019) รายงานว่าเชื้อรา *N. pseudofischeri*, *N. fenneliae*, *N. quadricincta* และ *N. tsunodae* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในพืชได้ ดังนั้น คณะผู้จัดทำจึงสนใจที่จะศึกษาการควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ต่อเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในมะละกอ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) คัดแยกเชื้อรา และระบุสปีชีส์ (Species) ของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในมะละกอ
- 2) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* ที่มีผลต่อการควบคุมโรคแอนแทรกโนสในมะละกอ

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

- 1) คัดแยก และเพาะเลี้ยงเชื้อราสกุล *Colletotrichum* จากมะละกอที่ได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างจากตลาดใหม่ (อำเภอเมือง, ชลบุรี) ตลาดนำชัย (เขตลาดกระบัง, กรุงเทพฯ) และ KMITL Organic Farm (อำเภอด่านช้าง, สุพรรณบุรี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2) ปังซีเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *Internal transcribed spacer* (ITS)
- 3) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านในสกุล *Neosartorya* จำนวน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *N. feneliae* CHA03-A11, *N. hirasukae* EU06 และ *N. pseudofisherii* EU13 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
- 4) ศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกคโนสเฉพาะวิธี *Dual culture* และ *Poison plate*

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ต่อการควบคุมโรคแอนแทรกคโนสในมะละกอ เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มะละกอเป็นพืชที่ปลูกง่าย โตเร็ว ให้ผลผลิตตลอดทั้งปี สามารถบริโภคได้ทั้งผลดิบ และผลสุก ซึ่งผลดิบนิยมนำมาประกอบอาหารไทยหลายชนิด ส่วนผลสุกสามารถรับประทานสดได้เลย (ธวัชชัย, 2558) ในด้านคุณค่าทางโภชนาการของมะละกอนั้น จัดเป็นผลไม้ที่ประกอบไปด้วยสารอาหารนานาชนิด ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย มีแคลอรีต่ำ ไม่มีไขมันหรือคอเลสเตอรอล (สลิล และคณะ, 2559) สำหรับมะละกอฮอลแลนด์นั้นเป็นที่นิยมของผู้บริโภคมะละกอสุก โดยมีลำต้นลักษณะกลม ตรงใหญ่ และมีก้านใบสีเขียว ไม่มีแก่น มีตารอบลำต้น แตกกิ่งก้านน้อย ผลเป็นผลเดี่ยว มีลักษณะทรงกระบอก ปลายหุบ ไม่ยาวมาก มีเปลือกหนาผิวเรียบ (รูปที่ 2.1) ผลสุกมีสีเหลืองเข้ม เนื้อหนานุ่มฉ่ำน้ำ (Karazaa, 2012 และ พีระศักดิ์, 2555)



รูปที่ 2.1 มะละกอฮอลแลนด์

(http://papaya-trip.blogspot.com/2017/11/blog-post_20.html)

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

เชื้อ *Colletotrichum* พบรายงานครั้งแรกโดย Tode ในปี ค.ศ. 1790 (Sutton, 1992) เชื้อราสกุลนี้อยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) โดยมีฟรุติติง บอดี (Fruiting body) แบบฮาเชอร์วูลัส (Acervulus) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายจาน ภายในมีโคนิเดีย (Conidia) ลักษณะเป็นเชลล์เดี่ยว ใสไม่มีสี มีรูปทรงโค้งงอคล้ายเคียว (รูป 2.2 ก-ค) และทรงกระบอกหัวท้ายมน (รูป 2.2 ง-ฉ) (Weir *et al.*, 2012) บางสปีชีส์มีการสร้างแอฟเพรสเซอร์ียม (Appressorium) รูปทรงหลากหลาย ซึ่งใช้สำหรับเจาะเข้าไปในพืช (หทัยชนก, 2546) ปัจจุบันมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนสปีชีส์ที่บันทึกใน Index fungorum ทั้งหมด 889 สปีชีส์ (www.indexfungorum.org) และจากงานวิจัยของ Sutton (1992) ได้มีการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อ *Colletotrichum* ไว้ดังนี้

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Sordariomycetes

Order Glomerellales

Family Glomerellaceae

Genus *Colletotrichum*



รูปที่ 2.2 ลักษณะโคนินเดี่ยวของเชื้อ *Colletotrichum* sp.

รูปทรงโค้งงอคล้ายเคียว (ก-ค) และรูปทรงกระบอกหัวท้ายมน (ง-ฉ)

(<http://www.plantpathogen.org/homepage/colletotrichum>)

Abera และคณะ (2016) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* และ *C. asianum* มีลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน แตกต่างกัน จำแนกได้ 3 ลักษณะ คือ มีเส้นใยสีขาวเทา สีเทาเข้ม และสีส้มอมชมพู เส้นใยเจริญหนาแน่น โคนินเดี่ยวรวมกันเป็นกลุ่ม รูปทรงกระบอก หัวท้ายมน ใสไม่มีสี

Liu และคณะ (2016) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน จำแนกได้ 3 สปีชีส์ คือ *C. capsici* เส้นใยฟูเล็กน้อย ขณะที่เชื้ออื่นเส้นใยสีขาวเทาที่ต่อมาคือยาๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาและเป็นเทาแก่มีการคายไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่จะเห็นโคนิเดียรวมกลุ่มเป็นหยดน้ำขุ่น ๆ สีเหลืองอ่อน หรือสีชมพูอมส้ม มี Setae ลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ปลายเรียวแหลม โคนิเดียมีลักษณะโค้งคล้ายเคียว ปลายด้านหนึ่งแหลม ส่วนอีกด้านหนึ่งค่อนข้างมน ขนาดโคนิเดียที่วัดได้ 2.59-3.90×18.13-31.08 ไมโครเมตร มีอัตราการเจริญเติบโตบนอาหาร Water agar (WA) เฉลี่ย 3.9-5.4 มิลลิเมตรต่อวัน *C. gloeosporioides* เส้นใยฟูแต่ไม่หนาแน่น สีขาวเทาถึงสีเทา มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 4.7-6.7 มิลลิเมตรต่อวัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่จะเห็นโคนิเดียรวมกันเป็นกลุ่มมีลักษณะคล้ายหยดน้ำขุ่น ๆ สีส้มอมชมพูเจริญเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ โคนิเดียเดี่ยว ๆ รูปร่างทรงกระบอกตรง ปลายมนทั้งสองด้านเซลล์เดี่ยว ไม่มีสี วัดขนาดของโคนิเดียได้ 2.59-5.18×10.36-18.13 ไมโครเมตร และ *C. truncatum* เส้นใยมีสีขาวจนถึงเทาอ่อน ฟูเล็กน้อย เมื่อเจริญเต็มที่จะพบ setae สีดำกระจายอยู่รอบโคนิเดีย โคนิเดียเซลล์เดี่ยว รูปร่างโค้งงอ คล้ายเคียว ใสไม่มีสี โคนิเดียมีขนาดประมาณ 2.7-4.9×18.8-29.87 ไมโครเมตร อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเฉลี่ย 3.3-4.2 มิลลิเมตรต่อวัน บนอาหาร WA

Aktaruzzaman และคณะ (2017) ได้ศึกษาโรคแอนแทรคโนสในมะละกอกที่ประเทศเกาหลี ซึ่งแผลบนผิวมะละกอกเป็นจุดสีน้ำตาล ยุบลงในผล พบว่าเกิดจากเชื้อ *C. truncatum* ลักษณะโคโลนีบนอาหาร SNA มีเส้นใยสีน้ำตาลขาว เรียบไปกับผิวอาหาร โคนิเดียรูปเสี้ยว ไม่มีสี

Kimaru และคณะ (2018) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในผลอะโวคาโด โดยทำการคัดแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน พบโคโลนีสีขาว สีเทา และสีส้มอมชมพู ด้านหลังโคโลนีมีสีเทาครีม สีเทา และสีส้มอมเทา เส้นใยฟูแต่ไม่หนาแน่น เจริญซ้อนเป็นวงแหวน โคนิเดียรูปร่างกระบอก หัวท้ายมน เซลล์เดี่ยว ใสไม่มีสี

Stracieri และคณะ (2016) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และโมเลกุลของ *Colletotrichum* จากมะละกอกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส ในประเทศบราซิล พบว่า ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จะมีโคโลนีสีขาวอมเทา สีเทาเข้ม จนถึงสีส้มอมเทา

Calzada และคณะ (2017) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. truncatum* ที่แยกได้จากมะละกอก พริก และสับดูต้า สามารถจำแนกตามลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏได้ 6 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกมีโคโลนีสีส้ม จนถึงสีเทาอ่อน เส้นใยฟูเล็กน้อย กลุ่มโคนิเดียสีส้มอยู่บริเวณกลางโคโลนี กลุ่มที่สอง โคโลนีสีขาวอมส้ม เส้นใยเจริญซ้อนเป็นวงแหวน กลุ่มที่สาม โคโลนีสีเทาอ่อนเมื่อเจริญเต็มที่จะมีสีเทาเข้ม กลุ่มที่สี่ โคโลนีมีขาวอมเทา บริเวณกลางโคโลนีมีกลุ่มของโคนิเดียสีส้ม กลุ่มที่ห้า โคโลนีสีน้ำตาลอมเทา ไม่ปรากฏกลุ่มโคนิเดียชัดเจน และกลุ่มที่หก โคโลนีสีส้มอมขาว เส้นใยฟูเล็กน้อย เจริญซ้อนเป็นวง ตรงกลางมีกลุ่มโคนิเดียสีส้ม

Hailmi และคณะ (2017) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะละกอกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides* คือชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้อ *C. gloeosporioides* สามารถเจริญเติบโตได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาดูงาน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนอาหาร PDA ที่มีความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 7 และอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน มีขนาดรัศมีของโคโลนีเฉลี่ย 6.54 ± 1.30 เซนติเมตร

2.1.1 โรคแอนแทรคโนสในมะละกอ

โรคแอนแทรคโนสที่เกิดขึ้นในมะละกอส่วนใหญ่มักจะมีสาเหตุมาจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สามารถเข้าทำลายมะละกอโดยโคนิเดียของเชื้อจะปลิวไปตามลม เจริญได้ดีในที่มีความชื้นสูง สามารถเข้าทำลายใบ กิ่งก้าน และผล ทำให้ใบเป็นจุดดำหรือเป็นรู ผลเน่าเสียอย่างรวดเร็ว โดยลักษณะแผลบนผลมะละกอที่เกิดจากเชื้อรา มีลักษณะแผลกลมฉ่ำน้ำ และยุบลงไป ผลตรงกลางมีสปอร์ของเชื้อสีส้มหรือชมพู ขึ้นฟูเป็นวงชั้น ๆ บริเวณแผล ซึ่งแผลจะลุกลามขยายตัวทำให้ผลมะละกอเน่าเสียในเวลารวดเร็ว โดยเฉพาะในสภาพอากาศอบอ้าว และความชื้นสูง ส่งผลให้ผลผลิตน้อยลง และคุณภาพตกต่ำ (กรมวิชาการเกษตร, 2557 ; Parmeshwar *et al.*, 2016)

Rahman และคณะ (2008) ได้ศึกษาเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคที่พบบนผิวมะละกอสุก พบว่าโรคที่เกิดบนผลมะละกอมากที่สุด 90-98 เปอร์เซ็นต์ คือ โรคแอนแทรคโนส ซึ่งเกิดจาก *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* และ *C. truncatum* ซึ่ง *C. gloeosporioides* ก่อโรครุนแรงถึง 25-38 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 การศึกษาระดับโมเลกุลของเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

ในปัจจุบันพบว่าการศึกษาเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุลนี้ อาจไม่เพียงพอในการระบุสปีชีส์ของเชื้อ เนื่องจากบางสปีชีส์ เช่น *C. musae*, *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากจึงมีการศึกษาถึงระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) ของ Ribosomal DNA (rDNA) บริเวณ Internal Transcribed Spacers (ITS) คือ บริเวณลำดับเบสที่ไม่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน (Non-coding) ซึ่ง ITS เปรียบเสมือนเป็นบาร์โค้ดของเชื้อรา (Seifert, 2009 ; Schoch *et al.*, 2012) การศึกษาความแตกต่างของดีเอ็นเอบริเวณ ITS มักนิยมใช้กันโดยทั่วไปเนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่น ๆ ของ rDNA จึงนำมาใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อ ทำให้การจำแนกสปีชีส์ของรามีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น (Stracieri *et al.*, 2016)

Weir และคณะ (2012) พบว่าบริเวณ ITS สามารถบ่งชี้เชื้อรา *C. gloeosporioides* ออกจากเชื้อ *C. acutatum* และ *C. truncatum* เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะละกอได้

Chithra และคณะ (2014) วิเคราะห์บริเวณ ITS ของราเอนโดไฟท์ PF12 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพริกไทยที่มีอาการของโรคแอนแทรคโนสได้ 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

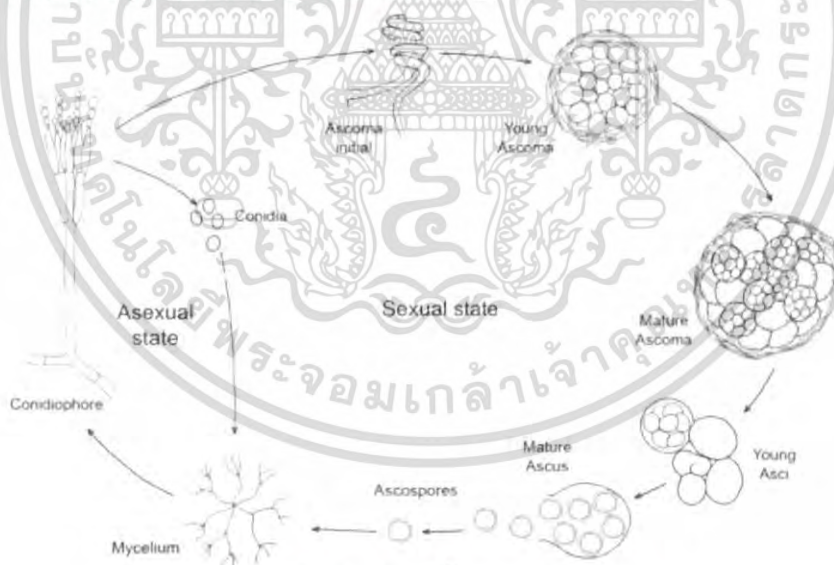
Sharma และคณะ (2014) ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* บริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส

Marin-Felix และคณะ (2017) ศึกษาระดับโมเลกุลของ *Colletotrichum* ที่บริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ในแต่ละสปีชีส์มีความแตกต่างกันออกไปจากการศึกษา พบว่าเชื้อราสกุล *Colletotrichum* มีความหลากหลายมากกว่า 200 สปีชีส์

Jinai และคณะ (2018) ศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่แยกได้จากฝรั่งที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส ที่บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อราที่คัดแยกได้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. orbiculare* และ *C. truncatum*

2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุล *Neosartorya*

เชื้อราสกุล *Neosartorya* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual state) ของเชื้อราสกุล *Aspergillus* (รูปที่ 2.3) มีการสร้างแอสโคสปอร์ (Ascospores) ในถุงหุ้มสปอร์ที่เรียกว่า แอสคัส (Ascus) และแอสคัสส่วนใหญ่มักจะถูกห่อหุ้มด้วยแอสโคคาร์ป (Ascocarp) มีรูปร่างแบบทรงกลมปิด (Cleistothecium) มีสีขาวยิ่งสีครีม (Samson *et al.*, 2007)

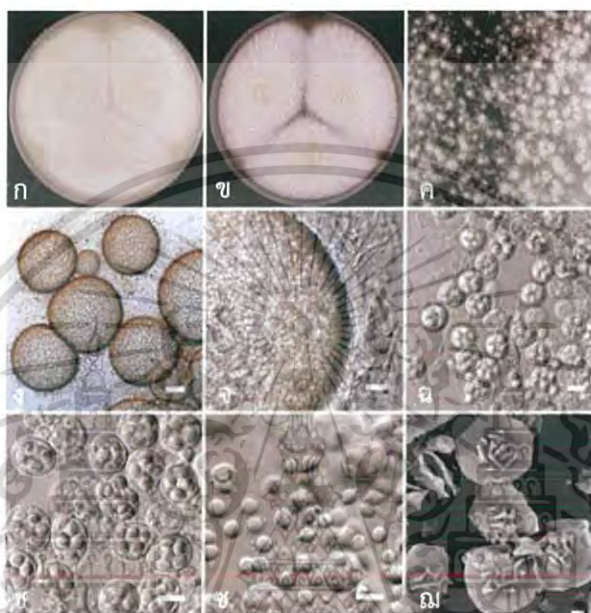


รูปที่ 2.3 การสืบพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya*
(Wyatt, 2014)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ซึ่งแต่ละสปีชีส์จะมีลักษณะแตกต่างกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น *N. fennelliae* โคลโคนีมีสีเทา แอสโคคาร์ปสีขาว ขนาด 150-450

ไมโครเมตร แอสโคสปอร์ประกอบด้วย 2 Equatorial crests พื้นผิวขรุขระ และนูนออกมา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

N. hiratsukae โคลนีมีสีเทาอ่อน แอสโคคาร์ปสีครีม ขนาด 130-220 ไมโครเมตร แอสโคสปอร์รูปร่างคล้ายเลนส์ ประกอบด้วย 2 Equatorial crests ติดกัน พื้นผิวคล้ายตาข่าย และ *N. pseudofischeri* โคลนีสีขาวถึงสีครีมอ่อน (รูป 2.4 ก-ข) มีแอสโคคาร์ปสีขาว รูปร่างกลม ขนาด 150-300 ไมโครเมตร (รูป 2.4 ค-จ) แอสโคสปอร์ค่อนข้างกลม (Subglobose) ประกอบด้วย 2 Equatorial crests พื้นผิวขรุขระ และผนังตั้งขึ้นเป็นสามเหลี่ยม (รูป 2.4 ฉ) (Samson *et al*, 2007)



รูปที่ 2.4 *Neosartorya pseudofischeri* (ก-ข) ลักษณะโคลนบนอาหาร MEA (ค-จ) แอสโคคาร์ป (จ-ข) แอสคัส และแอสโคสปอร์ (ฉ) ภายใต้กล้อง SEM (Samson *et al.*, 2007)

2.3 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี คือ การใช้สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคเพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช เชื้อเหล่านี้เรียกว่า เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้าน (Antagonistic microorganisms) มีกลไกการยับยั้งหรือควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืช 4 แบบ คือ การสร้างสารปฏิชีวนะ (Antibiosis) เป็นภาวะที่สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหลั่งสารเคมีออกมายับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ภาวะแก่งแย่งแข่งขัน (Competition) เป็นภาวะที่สิ่งมีชีวิตสองชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน และมีการแข่งขันกันเพื่อใช้ปัจจัยในการดำรงชีวิตทำให้สิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการแข่งขันมากกว่าเจริญเติบโตได้ดี ภาวะปรสิต (Parasitism) เป็นภาวะที่สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งแย่งหรือกินอาหารจากสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง และสุดท้ายการชักนำให้พืชต้านทานต่อโรค (Induction of resistance in plant) โดยจุลินทรีย์มีการสร้างสารที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (นิพนธ์, 2553 ; ศิริพรรณ, 2560)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ พ.ศ. 2539 ประเทศไทยประสบความสำเร็จด้านการควบคุมโรคด้วยชีววิธี โดย รศ.ดร. จิระเดช แจ่มสว่าง ประจำภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน นำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* มาใช้ควบคุมโรคพืชเป็นครั้งแรก โรคที่ใช้ได้ผลดี คือ โรคที่เกิดจากเชื้อราในดิน ได้แก่ โรครากเน่า โคนเน่าของทุเรียน ส้ม กล้วยไม้ และโรคต่าง ๆ ของ พืชผักหลายชนิด ในปัจจุบันนักวิจัย และนักวิชาการของไทยได้ศึกษาค้นคว้าหาเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านที่สามารถควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัสได้ เพื่อนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ต่อไป (นิพนธ์, 2553) สำหรับเชื้อราสกุล *Neosartorya* ได้มีรายงานการศึกษาในการควบคุมทางชีวภาพ ดังเช่น

กมลวรรณ และคณะ (2557) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* พบว่าสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชต่าง ๆ โดยมีการทดสอบฤทธิ์สารสกัด หยาบที่ความเข้มข้น 1,000 ppm พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

Boonsang และคณะ (2014) รายงานว่าประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทจาก เชื้อรา *N. pseudofischeri*, *N. quadricincta* และ *N. multiplicata* สามารถควบคุมการเจริญของ เชื้อรา *C. gloeosporioides* ในลูกแพร์ และ *C. capsici* ในพริกได้

Dethoup และคณะ (2015) ศึกษาสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทจาก *N. pseudofischeri* และ *N. fischeri* ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกคโนสในมะละกอได้ 92.59 เปอร์เซ็นต์

Cruz-Quiroza และคณะ (2018) ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพริกที่มีอาการของโรคแอนแทรกคโนส โดยใช้เชื้อราสกุล *Trichoderma* ด้วยวิธี Dual culture พบว่า เชื้อรา *T. asperellum* และ *T. longibranchiatum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 22.5 และ 21.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Pattarasaikul และคณะ (2018) ได้ศึกษาการควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ต่อเชื้อรา *C. musae* ไอโซเลต CMDC-01 และ CMNM-01 สาเหตุของโรคแอนแทรกคโนสใน กล้วยน้ำว่าด้วยวิธี dual culture พบว่า เชื้อรา *N. fenneliae* CHA03-A11 สามารถควบคุมการ เจริญเติบโตโคโลนีของเชื้อรา *C. musae* CMNM-01 ได้มากที่สุด 59.85 เปอร์เซ็นต์ และ *N. pseudofischeri* EU13 ควบคุมการเจริญเชื้อรา *C. musae* CMDC-01 ได้ 51.23 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 แหล่งที่มาของพืช

สุ่มเก็บตัวอย่างมะละกอลงจากตลาดใหม่ (อำเภอเมือง, ชลบุรี) ตลาดน้ำชัย (เขตลาดกระบัง, กรุงเทพฯ) และ KMITL Organic Farm (อำเภอด่านช้าง, สุพรรณบุรี) เพื่อใช้คัดแยกเชื้อราสกุล *Colletotrichum* รวมถึงเชื้อรา *N. hiratsukae* EU06, *N. pseudofischeri* EU13 และ *N. fennelliae* CHA03-A11 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา
 - 3.2.1.1 ยาปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย Amoxicillin
 - 3.2.1.2 สีย้อม Lactophenol cotton blue
 - 3.2.1.3 อาหาร Potato dextrose agar (PDA)
 - 3.2.1.4 อาหาร Water agar (WA)
 - 3.2.1.5 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Distilled water)
- 3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และปฏิกิริยา *Polymerase chain reaction* (PCR)
 - 3.2.2.1 Absolute ethanol 99.5%
 - 3.2.2.2 Agarose gel
 - 3.2.2.3 Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)
 - 3.2.2.4 Chloroform
 - 3.2.2.5 Deionized water (DI water)
 - 3.2.2.6 Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs)
 - 3.2.2.7 DNA ladder ขนาด 100 คู่เบส (บริษัท vivantis)
 - 3.2.2.8 DNA ladder ขนาด 1 กิโลเบส (บริษัท vivantis)
 - 3.2.2.9 Ethidium bromide
 - 3.2.2.10 Ethanol 70%
 - 3.2.2.11 Gel loading Dye
 - 3.2.2.12 Isoamyl alcohol
 - 3.2.2.13 Isopropanol
 - 3.2.2.14 Liquid nitrogen
 - 3.2.2.15 Magnesium chloride ($MgCl_2$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.2.16 β -mercaptoethanol
- 3.2.2.17 10X Standard *Taq* reaction buffer
- 3.2.2.18 Primer ตำแหน่ง ITS1 และ ITS4 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 3.1
- 3.2.2.19 Ribonuclease (RNase)
- 3.2.2.20 *Taq* DNA polymerase
- 3.2.2.21 TBE buffer
- 3.2.2.22 TE buffer
- 3.2.2.23 2XCTAB

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.3.1 Agarose gel electrophoresis
- 3.3.2 Alcohol lamp
- 3.3.3 Autoclave
- 3.3.4 Buchner funnel
- 3.3.5 Digital balance scale
- 3.3.6 Duran ขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.3.7 Erlenmeyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร
- 3.3.8 Food wrap
- 3.3.9 Forceps
- 3.3.10 Gel documentation system
- 3.3.11 Heat box
- 3.3.12 Hemacytometer
- 3.3.13 Hot air oven
- 3.3.14 Incubator
- 3.3.15 Laminar air flow
- 3.3.16 Light microscope
- 3.3.17 Microcentrifuge
- 3.3.18 Micropipette
- 3.3.19 Mortar และ Pestle
- 3.3.20 Needle
- 3.3.21 Parafilm

3.3.22 Petri dishes ขนาด 60 และ 90 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 3.3.23 Pipette Tips
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.24 Refrigerator
- 3.3.25 Rotary vacuum evaporator
- 3.3.26 Slide และ Cover glass
- 3.3.27 Spatula
- 3.3.28 Spin down
- 3.3.29 Stereo microscope
- 3.3.30 Suction flask
- 3.3.31 Syringe
- 3.3.32 Test tube ขนาด 20 มิลลิลิตร
- 3.3.33 Thermal cycler
- 3.3.34 Tissue culture bottle
- 3.3.35 Tube ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- 3.3.36 Vacuum pump
- 3.3.37 Vernier caliper
- 3.3.38 Vortex
- 3.3.39 Water bath
- 3.3.40 Whatman no.1

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การคัดแยกเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในมะละกอ คัดแยกเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนสในมะละกอ โดยวิธี Single spore isolation ดัดแปลงมาจาก Shivas และ Beasley (2004) โดยนำตัวอย่างมะละกอที่มีอาการของโรคมารบ่มใน Moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เชื้อเจริญได้เต็มที่ สังเกตการสร้างสปอร์ของเชื้อโดยส่อง ตัวอย่างมะละกอภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอทุก ๆ วัน เมื่อเห็นสปอร์ของเชื้อเกิดขึ้นจึงทำการแยกเชื้อ โดยใช้ปลายเข็มเขี่ยสปอร์มาวางลงในสไลด์หลุมที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออยู่ เขี่ยสปอร์ให้แตก เมื่อส่องดูใต้กล้องจะเห็นโคนเดี่ยวของเชื้อ จากนั้นดูดโคนเดี่ยวที่ผสมอยู่กับน้ำ มาหยดลงบนอาหาร WA ที่ผสมยาปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง เมื่อโคนเดี่ยวออกให้ใช้เข็มเขี่ยโคนเดี่ยว 1 โคนเดี่ยวนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเป็นเชื้อราสกุล *Colletotrichum* โดยสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ลักษณะโคโลนี สีโคโลนี และลักษณะของเส้นใย) จากนั้นเขี่ยกลุ่มเส้นใยของเชื้อที่คัดเลือกแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อ จากนั้นนำเชื้อราสกุล *Colletotrichum* มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะ และสีของโคโลนีด้วยตาเปล่า และดูลักษณะเส้นใยไมวากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมทั้งลักษณะโคโคนีเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ที่สะอาด ย้อมด้วย Lactophenol cotton blue ถ่ายภาพเส้นใย โคโคนีเดีย รวมถึงวัดขนาดโคโคนีเดีย บันทึกผล

3.4.2 การบ่งชี้เชื้อในระดับโมเลกุล

3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB (Doyle และ Doyle, 1990)

นำเส้นใยของเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 3.4.1 มาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ตักเส้นใยที่บดแล้วลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และ β -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม Chloroform : Isoamyl (24:1, V/V) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการสกัดอีกครั้งโดยเติม Chloroform : Isoamyl (24:1, V/V) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย Isopropanol ลงไปเท่ากับปริมาตรส่วนใสที่ดูดได้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติม 70% Ethanol ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม Absolute ethanol 99.5% ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนตะกอนด้านล่างแห้ง เมื่อแห้งแล้วนำมาเติม TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ต่อไป

3.4.2.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดโดยนำไปเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส ใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ที่อยู่ภายใต้เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) เปิดกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) เป็นเวลา 5 นาที ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น 5 นาที นำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสงยูวี ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพ เจล (Gel documentation system) จากนั้นเจือจางสารละลายดีเอ็นเออัตราส่วน ดังนี้

ดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 297 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า

280 นาโนเมตร

ไม่วางกรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler) จะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ดังตารางที่ 3.1 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีปริมาตรสารทั้งหมดในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร Standard *Taq* reaction buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร Forward primer ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร Reverse primer ความเข้มข้น 20 ไมโคร โมลาร์ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ปริมาตร 14.05 ไมโครลิตร ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณในตำแหน่ง ITS แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White <i>et al.</i> (1990)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในบริเวณ ITS (Calzada *et al.*, 2017)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturing	95	1	1 รอบ
Denaturation	94	1	
Annealing	58	1	30 รอบ
Extension	72	1	
Final extension	72	7	1 รอบ

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดยใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ทำตามวิธีการในข้อ 3.4.3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุสปีชีส์ของเชื้อรา

นำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำส่งบริษัท Bionics corporation จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ที่เว็บไซต์ National center for biotechnology information (NCBI) ด้วยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST) จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบแบบ ClustalW Multiple alignment หลังจากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank อีกครั้งเพื่อยืนยันผล และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (MEGA6) โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มจากระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี Maximum likelihood และมีค่า Bootstrap เท่ากับ 1000 ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI เป็นตัวเปรียบเทียบในการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

3.4.3 การทดสอบการก่อโรคของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* (Ismet *et al.*, 2012 และ Pattarasaikul, 2018)

นำมะละกามาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว พักให้แห้ง ใช้เข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะเป็นวงกลมบนผิวของมะละกอ ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร จากนั้นตัดชิ้นส่วนของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* (บ่มไว้ 5 วันบน PDA) โดยใช้หลอดค็อก (Cock) วางบนผิวของมะละกอที่เจาะไว้ นำมะละกอไปบ่มใน Moist chamber ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดสอบแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) จำนวน 3 ซ้ำ ต่อแต่ละไอโซเลต การทำแต่ละครั้งจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นตัวควบคุม

3.4.4 การควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยเชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยเทคนิค Dual culture (เมอมร, 2558 และ Waing *et al.*, 2015)

ตัดชิ้นส่วนของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และเชื้อราสกุล *Neosartorya* ที่บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้หลอดค็อกมาวางบนอาหาร PDA โดยให้ชิ้นส่วนของเชื้อราทั้งสองห่างกัน 4.5 เซนติเมตร ทำการเลี้ยงเชื้อราสกุล *Neosartorya* และเชื้อ *C. gloeosporioides* แยกจากกันบนอาหาร PDA เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงการวางเชื้อต่อต้าน และเชื้อสาเหตุโรค บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อม รวมทั้งจานอาหารชุดควบคุมของเชื้อต่อต้าน และเชื้อสาเหตุของโรค

หมายเหตุ: ● = เชื้อสาเหตุโรค *C. gloeosporioides* ● = เชื้อต่อต้านเชื้อราสกุล *Neosartorya*

บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อม (Dual culture plates) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วัน ทำการทดสอบแบบสุ่มสมบูรณ์จำนวน 4 ซ้ำ เมื่อครบ 25 วัน ให้นับจำนวนโคเนียของเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วย Hemacytometer แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth inhibition, GI) โดย

$$GI = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = ค่าเฉลี่ยของรัศมีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดเปรียบเทียบ

R2 = ค่าเฉลี่ยของรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อม

3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบของเชื้อรา *N. pseudofischeri* EU13 ต่อการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 (เมอมร, 2558 และ Dethoup *et al.*, 2015)

3.4.5.1 การสกัดสาร

เพิ่มปริมาณเส้นใยของเชื้อรา *N. pseudofischeri* EU13 โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำเส้นใยมาอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจนแห้ง บดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น ห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำไปแยกตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) ส่วนกากที่เหลือจะนำไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) และเมทานอล (Methanol) ตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เพื่อนำไปใช้ทำการทดลองขั้นต่อไป

3.4.5.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบต่อการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี Poison plate

นำสารสกัดหยาบจากข้อ 3.4.5.1 มาทดสอบการควบคุมเชื้อรา

C. gloeosporioides โดยนำสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล มาละลายใน

ไดเมทิลซัลโฟไซด์ (Dimethyl Sulfoxide) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นตัวควบคุมในแต่ละการทดลอง

ชนิดของสารสกัด มีดังนี้

สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน

สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตท

สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล

ระดับความเข้มข้นของสารสกัด มีดังนี้

ความเข้มข้น 0 ppm

ความเข้มข้น 10 ppm

ความเข้มข้น 50 ppm

ความเข้มข้น 100 ppm

ความเข้มข้น 500 ppm

ความเข้มข้น 1,000 ppm

จากนั้นนำสารสกัดหยาบแต่ละชั้นที่ละลายด้วยไดเมทิลซัลโฟไซด์ให้ได้ตามความเข้มข้นที่กำหนด นำไปผสมกับอาหาร PDA ที่เตรียมไว้ นำอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบแล้วไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเสร็จแล้วนำมาเทลงบนเพลท เพลทละ 5 มิลลิลิตร แล้วย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่คอกมาวางลงกลางเพลท บ่มเป็นเวลา 5 วัน พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และนับสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วย Hemacytometer นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโลนี และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ ดังนี้

$$GI = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อที่ 0 ppm (ตัวควบคุม)

R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อในแต่ละความเข้มข้น

คำนวณค่า Effective dose ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ED₅₀)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส ในมะละกอด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

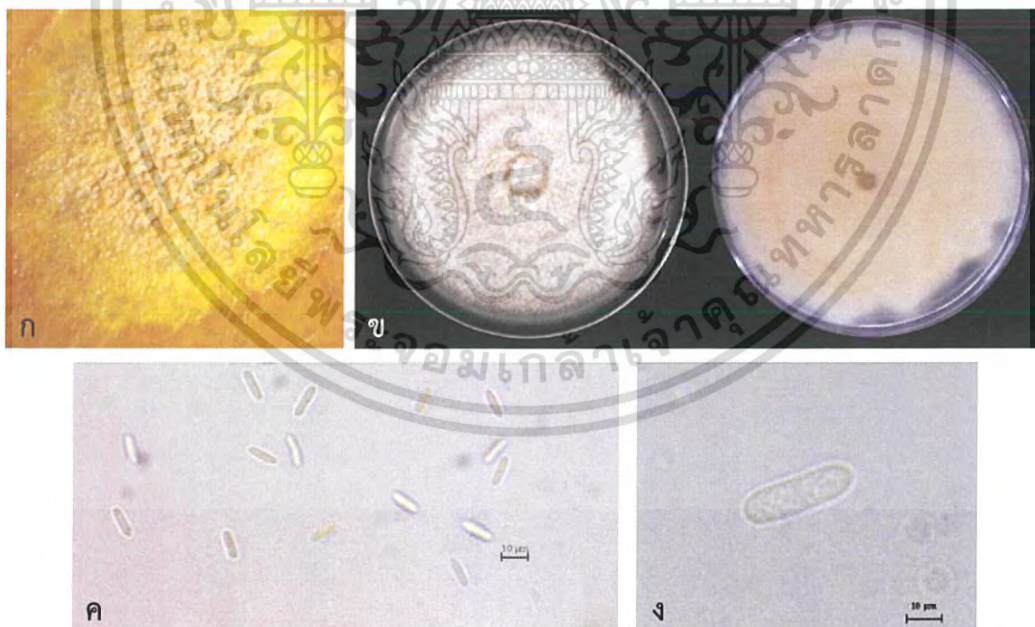
จากการคัดแยกเชื้อราก่อโรคจากผลมะละกอกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจาก ตลาดในจังหวัดชลบุรี 4 ตัวอย่าง กรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง และสุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง รวม 11 ตัวอย่าง นำมาคัดแยกด้วยวิธี Single spore isolation สามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 9 ไอโซเลต คือ CBI1, CBI2, CBI3, CBI4, LKB1, LKB2, LKB3, SPB1 และ SPB2 (การตั้งชื่อแต่ละไอโซเลต อักษร 3 ตัวแรก คือ ชื่อจังหวัด ตามด้วยตัวเลขแสดงลำดับการคัดแยก) แต่คัดเลือกให้เหลือเพียง 4 ไอโซเลต คือ CBI1, CBI2, LKB1 และ SPB2 เนื่องจากเชื้อราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างกัน เพราะมาจากสถานที่เดียวกัน และเมื่อนำทั้ง 4 ไอโซเลต มาจำแนกตามลักษณะโคโลนี รูปร่าง โคโรนเดีย และอัตราการเจริญเติบโตสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 มีทั้งหมด 3 ไอโซเลต (จาก 8 ไอโซเลต) ได้แก่ ไอโซเลต CBI1, LKB1 และ SPB2 มีลักษณะอาการของโรคบนผลมะละกอสุก ผลค่อนข้างกลมฉ่ำน้ำ สีน้ำตาลเข้ม ยุบตัวลงผลมะละกอบริเวณแผลมีการกลุ่มโคโรนเดียลักษณะเป็นหยดของเหลวข้นสีส้มเจริญอยู่ (รูป 4.1-4.3 ก) ลักษณะโคโรนเดียที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เส้นใยฟู มีสีขาว และขาวอมเทา ต่อมาค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเทา จนถึงเทาเข้ม เจริญขึ้นเป็นวงป็นชั้น ๆ ด้านตรงข้ามโคโรนเดียสีขาวอมเหลือง และขาวอมส้ม เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่จะพบกลุ่มโคโรนเดียลักษณะคล้ายหยดน้ำชั้น ๆ สีส้ม (รูป 4.1-4.3 ข) โคโรนเดียเซลล์เดี่ยว รูปทรงกระบอก หัวท้ายมน ใสไม่มีสี ขนาดประมาณ $2.59-5.18 \times 10.36-18.13$ ไมโครเมตร (รูป 4.1-4.3 ค-ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

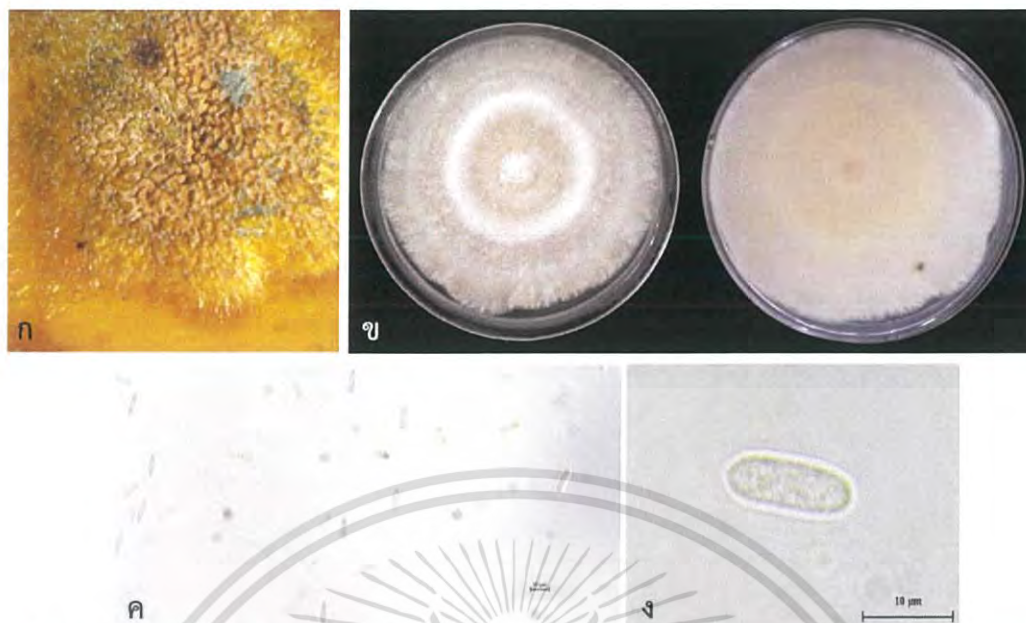


รูปที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ไอโซเลต CBI1 (ก) ลักษณะอาการของโรคบนผลมะละกอ (ข) ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้า และหลังเพลทที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ค) ลักษณะโคนินทรีย์ ที่กำลังขยาย 40 เท่า (ง) ลักษณะโคนินทรีย์ที่กำลังขยาย 100 เท่า



รูปที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ไอโซเลต LKB1 (ก) ลักษณะอาการของโรคบนผลมะละกอ (ข) ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้า และหลังเพลทที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ค) ลักษณะโคนินทรีย์ ที่กำลังขยาย 40 เท่า (ง) ลักษณะโคนินทรีย์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

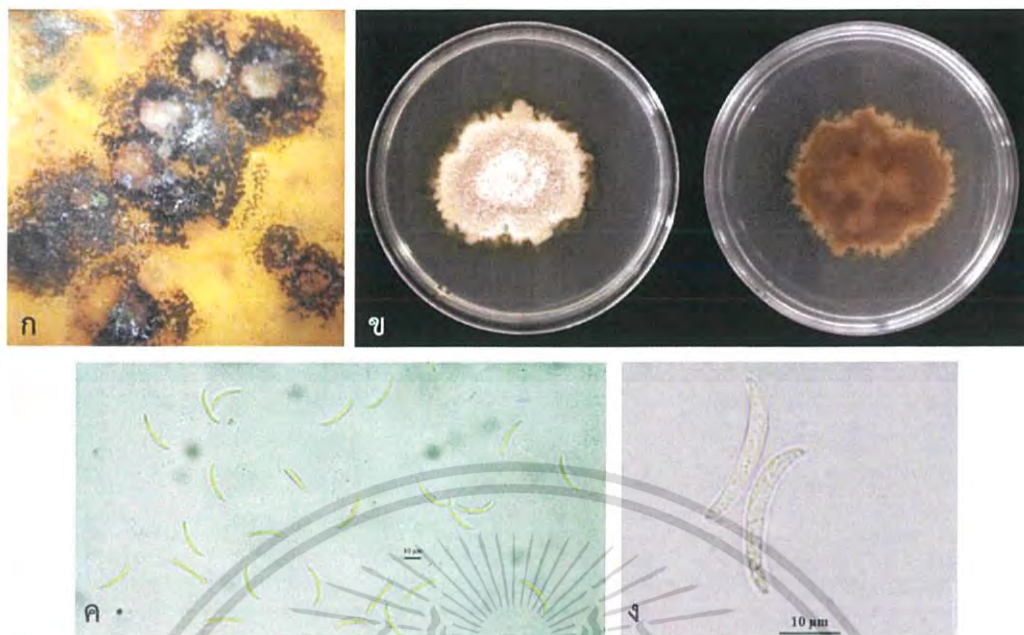
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ไอโซเลต SPB2 (ก) ลักษณะอาการของโรคบนผลมะละกอ (ข) ลักษณะโคโคนีทางด้านหน้า และหลังเพลทที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ค) ลักษณะโคโคนีเดี่ยว ที่กำลังขยาย 40 เท่า (ง) ลักษณะโคโคนีเดี่ยวที่กำลังขยาย 100 เท่า

กลุ่มที่ 2 มี 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต CBI2 ซึ่งได้มาจากมะละกอที่จังหวัดชลบุรี แสดงอาการของโรคเป็นแผลมีจุดสีดำเรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้นที่บริเวณแผล แผลยุบตัวลงเล็กน้อย ฉ่ำน้ำ ต่อมาแผลขยายใหญ่เป็นวงกลม ขอบแผลไม่ชัดเจน กลุ่มโคโคนีเดี่ยวเป็นหยดของเหลวชั้นสีส้ม (รูป 4.4ก) ลักษณะโคโคนีเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย เจริญเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ บริเวณขอบโคโคนีไม่สม่ำเสมอ ด้านตรงข้ามโคโคนีมีสีขาวอมเหลือง เจริญซ้อนกันเป็นวง เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่จะพบโคโคนีเดี่ยวรวมกลุ่มเป็นหยดชั้น ๆ สีส้ม หรือส้มอมชมพู มี setae ลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ ปลายเรียวแหลมเกิดปะปน (รูป 4.4ข) โคโคนีเดี่ยวมีลักษณะโค้งงอคล้ายเคียว ใสไม่มีสี ขนาดเฉลี่ยประมาณ $2.7-4.9 \times 18.8-29.87$ ไมโครเมตร (รูป 4.4ค)

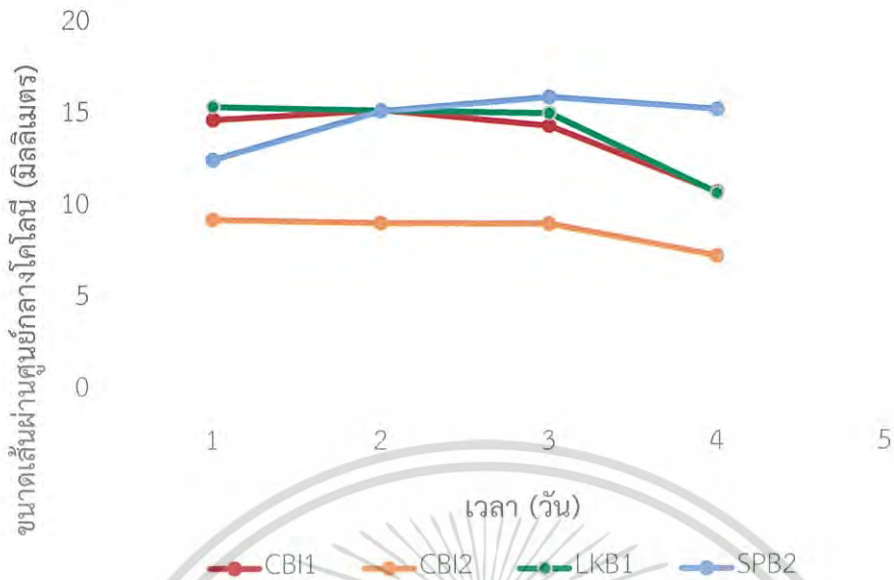
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ไอโซเลต CBI2 (ก) ลักษณะอาการของโรคบนผลมะละกอ (ข) ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้า และหลังเพลทที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน (ค) ลักษณะโคินเดี่ยว ที่กำลังขยาย 40 เท่า (ง) ลักษณะโคินเดี่ยวที่กำลังขยาย 100 เท่า

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลต โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน พบว่า เชื้อราที่จำแนกได้ทั้ง 2 กลุ่ม มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน เชื้อราในกลุ่มที่ 1 มีอัตราการเจริญเติบโตบนอาหาร PDA เฉลี่ย 14.303 ± 0.49 มิลลิเมตรต่อวัน และกลุ่มที่ 2 เชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 8.76 ± 0.93 มิลลิเมตรต่อวัน ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu และคณะ (2016) พบว่า เชื้อราสกุล *Colletotrichum* มีลักษณะโคโลนีสีขาว ถึงเทาอ่อน โคินเดี่ยวมีรูปร่างทรงกระบอก หรือโค้งงอคล้ายเคียว แต่ละสปีชีส์มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อสกุล *Colletotrichum*

ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตของโคโคนี (มิลลิเมตร)				ค่าเฉลี่ยรวม \pm SD (มิลลิเมตร)
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	
CBI1	14.81	15.34	14.48	10.85	13.87 \pm 2.04
CBI2	9.36	9.17	9.14	7.37	8.76 \pm 0.93
LKB1	15.52	15.33	15.17	10.8	14.21 \pm 2.27
SPB2	12.62	15.29	16.05	15.37	14.83 \pm 1.51

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่แบ่งเชื้อราออกเป็น 2 กลุ่ม จึงวิเคราะห์ในเบื้องต้นว่าไอโซเลต CBI1, LKB1 และ SPB2 อาจจะเป็น *C. gloeosporioides* เนื่องจากเจริญเติบโตเร็ว โคนินเดียวเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abera และคณะ (2016) และ Liu และคณะ (2016) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส *C. gloeosporioides* มีลักษณะของโคโคนีที่เจริญบนอาหาร PDA มีเส้นใยสีขาวเทา สีเทาเข้ม และสีส้มอมชมพู เส้นใยเจริญหนาแน่น โคนินเดี่ยวรวมกันเป็นกลุ่ม รูปทรงกระบอก หัวท้ายมน ใสไม่มีสี

ส่วน CBI2 ที่เจริญค่อนข้างช้า โคนินมีสีน้ำตาลขาว และมีโคนินเดี่ยวโค้งอคล้ายเคียวอาจจะเป็นการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคได้ทั้งหมด อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C. truncatum ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aktaruzzaman และคณะ (2017) ที่ศึกษาโรคแอนแทรกโนสในมะละกอบนพื้นที่ประเทศเกาหลี ซึ่งแผลบนผิวมะละกอบนเป็นจุดสีน้ำตาล ยุบลงในผล พบว่าเกิดจากเชื้อ *C. truncatum* ลักษณะโคโลนีบนอาหาร SNA มีเส้นใยสีน้ำตาลขาว เรียบไปกับผิวอาหาร โคนิเต็ยรูปเสี้ยว ไม่มีสี จากนั้นนำทั้ง 4 ไอโซเลตไประบุ และยืนยันสปีชีส์ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

4.2 ผลการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Colletotrichum* ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ของเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลต พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค PCR มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 ผลิตรณัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITS ของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* แถบที่ 1 marker ขนาด 100 คู่เบส แถบที่ 2-5 คือ ไอโซเลต CBI1, CBI2, LKB1 และ SPB2 ตามลำดับ

4.2.2 ผลการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Colletotrichum* โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR แล้ว นำผลิตรณัณฑ์ PCR ที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Bionic corporation จากนั้นทำการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยนำ

ลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบ และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ตรงกับฐานข้อมูล NCBI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า (ตารางที่ 4.2) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าไอโซเลต CBI1, LKB1 และ SPB2 เป็นเชื้อราไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

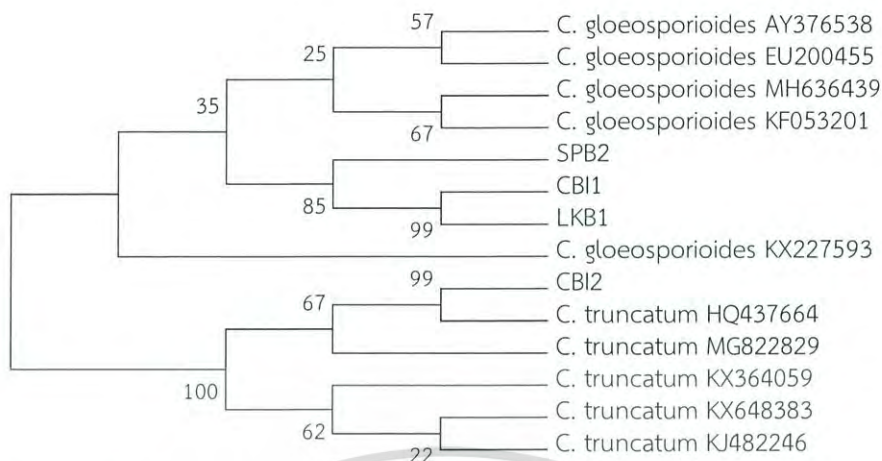
C. gloeosporioides มีขนาดดีเอ็นเอ เท่ากับ 575, 575 และ 575 คู่เบส (base pair, bp) ตามลำดับ และไอโซเลต CBI2 เป็นเชื้อรา *C. truncatum* มีขนาดดีเอ็นเอ 580 คู่เบส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sharma และคณะ (2014) ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* บริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส

ตารางที่ 4.2 สายพันธุ์ของเชื้อราจากฐานข้อมูล NCBI เลข Accession และขนาดดีเอ็นเอที่ใช้ สำหรับการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum*

สายพันธุ์	เลข Accession	ขนาดดีเอ็นเอ (bp)
<i>C. gloeosporioides</i>	AY376538	525
<i>C. gloeosporioides</i>	KX227593	574
<i>C. gloeosporioides</i>	MH636439	535
<i>C. gloeosporioides</i>	KF053201	538
<i>C. gloeosporioides</i>	EU200455	576
<i>C. truncatum</i>	HQ437664	589
<i>C. truncatum</i>	KX648383	583
<i>C. truncatum</i>	MG822829	539
<i>C. truncatum</i>	KX364059	581
<i>C. truncatum</i>	KJ482246	521

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 4 ไอโซเลต และลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI มาสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มจากระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากวิธี Maximum likelihood และมีค่า Bootstrap เท่ากับ 1000 พบว่าเชื้อราไอโซเลต CBI1, LKB1 และ SPB2 ที่แยกได้จากมะละกอ คือ เชื้อรา *C. gloeosporioides* และเชื้อราไอโซเลต CBI2 ที่แยกได้จากมะละกอ คือ *C. truncatum* ดังแสดงในรูปที่ 4.7 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Weir และคณะ (2012) พบว่าบริเวณ ITS สามารถคัดแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ออกจากเชื้อ *C. acutatum* และ *C. truncatum* เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในมะละกอได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* จากฐานข้อมูล NCBI กับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลต CBI1, LKB1 และ SPB2 และ *C. truncatum* CBI2 ที่แยกได้จากมะละกอ

4.3 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum*

จากการนำเชื้อรา *C. gloeosporioides* (CBI1, LKB1 และ SPB2) และ *C. truncatum* (CBI2) สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสที่แยกได้จากมะละกอ มาทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรค ด้วยวิธี Pathogenicity test โดยวางชิ้นส่วนของเชื้อราลงบนผลมะละกอ และบ่มใน Moist chamber ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบว่ามะละกอแสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส 2 ลักษณะ ลักษณะแรกที่พบ คือ แผลกลมฉ่ำน้ำ ยุบลงไปบนผล ตรงกลางมีเส้นใยสีขาว มีโคนเดี่ยวสีส้ม (รูปที่ 4.8ก, ค และ ง) ส่วนลักษณะที่สอง แผลสีน้ำตาล ยุบลงไปบนผล ตรงกลางมีกลุ่มโคนเดี่ยวสีดำ (รูปที่ 4.8ข) เมื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแผลของทั้ง 4 ไอโซเลต ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.8 แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสบนผลมะละกอที่เกิดจากการทดสอบการก่อโรค โดยเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* ทั้งหมด 4 ไอโซเลต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum*

ไอโซเลต	ขนาดบาดแผล
	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง \pm SD (มิลลิเมตร)
CBI1	28.39 ^a \pm 0.54
CBI2	21.19 ^{bc} \pm 2.33
LKB1	24.36 ^b \pm 2.43
SPB2	19.06 ^c \pm 3.46

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่า *C. gloeosporioides* CBI1 มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rahman และคณะ (2008) ศึกษาเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคที่พบบนผิวมะละกอสุก พบว่า โรคที่เกิดบนผลมะละกอมากที่สุด 90-98 เปอร์เซ็นต์ คือ โรคแอนแทรคโนส ซึ่ง *C. gloeosporioides* ก่อโรครุนแรงถึง 25-38 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเลือก *C. gloeosporioides* CBI1 ไปทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture ซึ่งเป็นการเลี้ยงเชื้อก่อโรค คือ *C. gloeosporioides* CBI1 ร่วมกับเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* จำนวน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *N. hirasukae* EU06, *N. pseudofisherii* EU13 และ *N. feneliae* CHA03-A11 ต่อไป

4.4 การควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* CBI1 โดยเชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยเทคนิค Dual culture

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะละกอ ที่ทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรคแล้ว พบว่า ก่อโรครุนแรงที่สุด จึงนำมาทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture บนอาหาร PDA ระหว่างเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* จำนวน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *N. hirasukae* EU06, *N. pseudofisherii* EU13 และ *N. feneliae* CHA03-A11 กับเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 เป็นเวลา 25 วัน (รูปที่ 4.9) พบว่า *N. pseudofisherii* EU13 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการสร้างโคนิเดียของเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 ได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนโคนิเดียของเชื้อรา *C. gloeosporioides* CBI1 บนอาหาร PDA เท่ากับ 1.50×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เมื่อนำคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคนิเดีย พบว่า สามารถยับยั้งได้ถึง 98.83 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเส้นใยอยู่ที่ 70.16 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *N. feneliae* CHA03-A11 และ *N. hirasukae* EU06 สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อราได้ 61.73 และ 61.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคนิเดีย 97.26 และ 95.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pattarasakul และคณะ (2018) ศึกษาการควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในกล้วย ด้วยวิธี Dual culture ระหว่างเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่ส่งมาเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการเท่านั้น เมื่อถูกเผยแพร่บนเว็บไซต์ของมหาวิทยาลัย การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Neosartorya ต่อเชื้อรา *C. musae* พบว่า *N. pseudofischeri* EU13 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างโคนิเดียของเชื้อรา *C. musae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงเลือก *N. pseudofischeri* EU13 มาศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขยายต่อไป



รูปที่ 4.9 แสดงการทดสอบด้วยเทคนิค Dual culture ระหว่างเชื้อรา *C. gloeosporioides* CBI1 กับ *N. hiratsukae* EU06 (ก) *N. pseudofischeri* EU13 (ข) และ *N. fennelliae* CHA03-A11 (ค)

ตารางที่ 4.4 การควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* CBI1 โดยเชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยเทคนิค Dual culture

<i>C. gloeosporioides</i> CBI1				
เชื้อต่อต้าน	รัศมีของโคโลนี (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเส้นใย	จำนวนโคนิเดีย ($\times 10^6$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคนิเดีย
Control	45.00	0.00	127.88	0.00
CHA03-A11	17.22	61.73 ^b	3.50	97.26 ^b
EU06	17.36	61.42 ^b	6.19	95.16 ^c
EU13	13.43	70.16 ^a	1.50	98.83 ^a

4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขยายจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* EU13 ต่อการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 ด้วยวิธี Poison plate

ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขยายจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* EU13 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 ด้วยวิธี Poison plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยนำเชื้อ *N. pseudofischeri* EU13 มาทำการสกัดสารสกัดขยายชั้นเฮกเซน (สีเหลือง) เอทิลอะซิเตท (สีเหลืองเข้ม) และเมทานอล (สีน้ำตาลเข้ม)

การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *N. pseudofischeri* EU13 โดยเลี้ยงเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 บนอาหาร PDA ผสมสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ *N. Pseudofischeri* EU13 ที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จะพบว่าสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรค *C. gloeosporioides* CBI1 โดยสังเกตได้จากขนาดโคโลนีของเชื้อทั้ง 4 ซ้ำ ที่เลี้ยงบนอาหารที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างกัน เชื้อที่เลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบมากกว่าจะมีขนาดโคโลนีเล็กกว่า ดังแสดงในรูปที่ 4.10 พบว่า สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 มากที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเส้นใยเท่ากับ 52.47 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 บนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดควบคุม และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างโคโคนีเดีย 72.97 เปอร์เซ็นต์ ค่า Effective dose ที่ 50% (ED_{50}) เท่ากับ 45.63 ppm ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของกมลวรรณ และคณะ (2557) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* พบว่าสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชต่าง ๆ โดยมีการทดสอบฤทธิ์สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1,000 ppm พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.10 สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ *N. pseudofischeri* EU13 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ

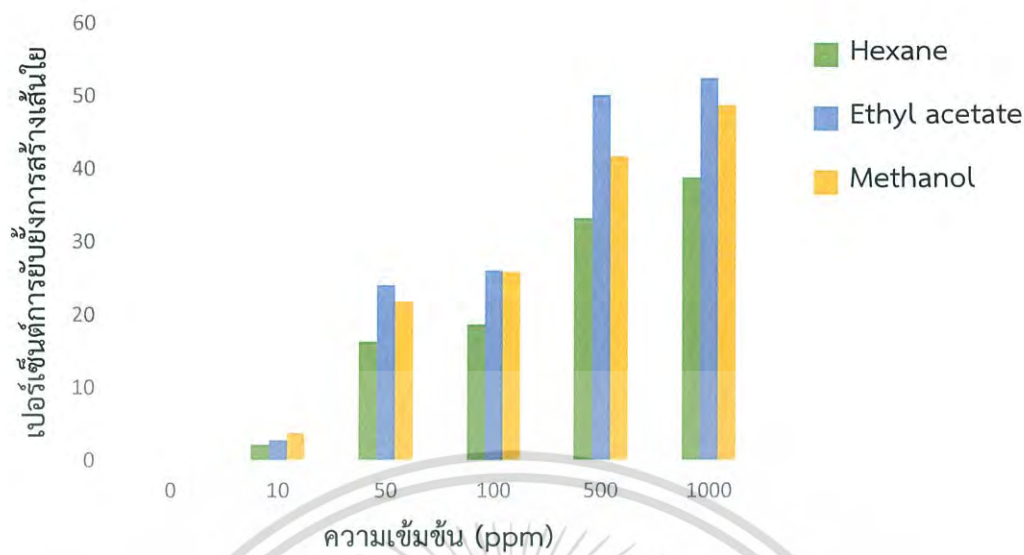
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *N. pseudofischeri* EU13 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* CBI1 ด้วยวิธี Poison plate

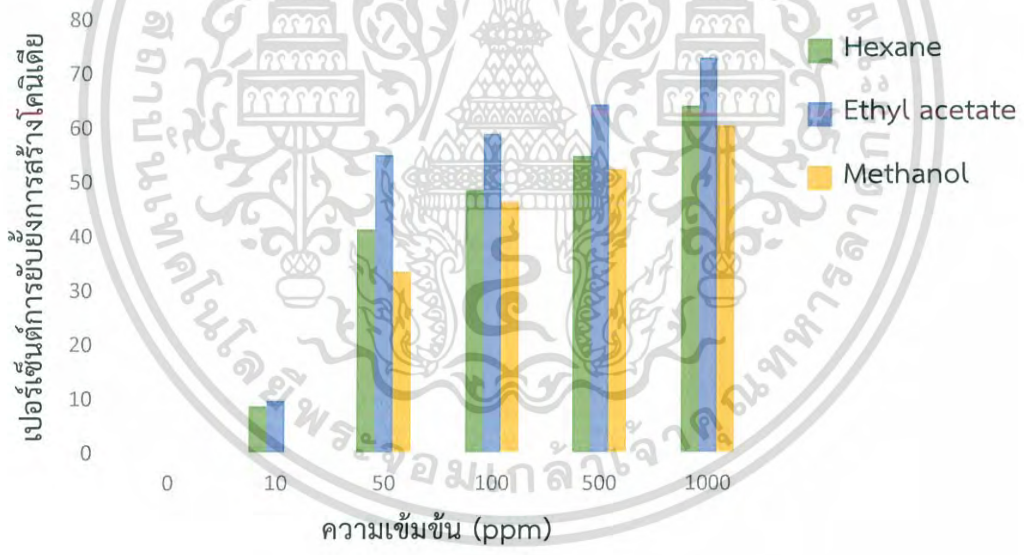
สารสกัด หยาบชั้น	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี ± SE (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์ การยับยั้ง การสร้าง เส้นใย	จำนวน โคโคนีเดีย ± SE ($\times 10^6$ โคโคนีเดียต่อ มิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ การยับยั้ง การสร้าง โคโคนีเดีย	ED ₅₀ (ppm)
เฮกเซน	0	47.82 ± 0.27	0.00	5.57 ± 0.91	0.00	106.17
	10	46.77 ± 1.28	2.20	5.25 ± 0.91	8.69	
	50	40.01 ± 2.39	16.33	3.38 ± 0.82	41.30	
	100	38.87 ± 1.70	18.71	3.00 ± 0.48	48.35	
	500	31.95 ± 1.20	33.19	2.60 ± 0.95	54.87	
	1,000	29.25 ± 1.26	38.83	2.06 ± 0.87	64.13	
เอทิล อะซิเตท	0	47.82 ± 0.27	0.00	5.78 ± 0.75	0.00	45.63
	10	46.48 ± 1.44	2.80	5.22 ± 0.48	9.73	
	50	36.31 ± 1.59	24.06	2.60 ± 0.85	55.12	
	100	35.35 ± 0.66	26.08	2.38 ± 1.15	58.93	
	500	23.84 ± 1.25	50.15	2.06 ± 0.87	64.33	
	1,000	22.73 ± 0.36	52.47	1.56 ± 0.65	72.97	
เมทานอล	0	47.82 ± 0.27	0.00	5.78 ± 0.75	0.00	110.21
	10	46.01 ± 0.96	3.79	5.78 ± 0.63	0.00	
	50	37.39 ± 0.40	21.81	3.85 ± 0.63	33.50	
	100	35.44 ± 0.54	25.88	3.10 ± 0.48	46.47	
	500	27.88 ± 2.71	41.69	2.75 ± 0.41	52.44	
	1,000	24.50 ± 0.68	48.76	2.28 ± 0.85	60.53	

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชั้น ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 มากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล และเฮกเซน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 สอดคล้องกับการยับยั้งการสังเคราะห์โคโคนีเดียของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด ดังรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 จากสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน *N. pseudofischeri* EU13



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคนิเดียของเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 จากสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน *N. pseudofischeri* EU13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในมะละกอ ที่มีการสุ่มเก็บตัวอย่างจากตลาดใหม่ (อำเภอเมือง, ชลบุรี) ตลาดน้ำชัย (เขตลาดกระบัง, กรุงเทพฯ) และ KMITL Organic Farm (อำเภอด่านช้าง, สุพรรณบุรี) สามารถคัดแยกเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต คือ CBI1, CBI2, CBI3, CBI4 LKB1, LKB2, LKB3, SPB1 และ SPB2 เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้ 2 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มที่ 1 มีทั้งหมด 8 ไอโซเลต คือ CBI1, CBI3, CBI4 LKB1, LKB2, LKB3, SPB1 และ SPB2 พบว่า โคลนนี้ของเชื้อรา *Colletotrichum* มีเส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเทา เจริญเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ โคนิเดียสั้น มีลักษณะรูปร่างทรงกระบอก หัวท้ายมน ใสไม่มีสี และกลุ่มที่ 2 มี 1 ไอโซเลต คือ CBI2 โคนิเดียมีลักษณะโค้งงอคล้ายเคียว ใสไม่มีสี ทำการสุ่มเลือกมาศึกษา 4 ไอโซเลต คือ CBI1, CBI2, LKB1, และ SPB2 เมื่อปองชี้เชื้อก่อโรคโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไอโซเลต CBI1, LKB1 และ SPB2 เป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีขนาดดีเอ็นเอ เท่ากับ 575, 575 และ 575 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต CBI2 เป็นเชื้อรา *C. truncatum* มีขนาดดีเอ็นเอ เท่ากับ 580 คู่เบส ซึ่งเมื่อนำไปทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่า ไอโซเลต CBI1 มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงมากที่สุด และเมื่อทดสอบการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* CBI1 โดยเชื้อราสกุล *Neosartorya* จำนวน 3 สปีชีส์ ได้แก่ *N. hirasukae* EU06, *N. pseudofischeri* EU13 และ *N. feneliae* CHA03-A11 ด้วยเทคนิค Dual culture พบว่า *N. pseudofischeri* EU13 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต *C. gloeosporioides* CBI1 ได้ดีที่สุดถึง 70.16 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* EU13 ต่อการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* CBI1 ด้วยวิธี Poison plate พบว่า สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตทมีฤทธิ์ในการต่อต้านดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการสร้างโคนิเดียของเชื้อราก่อโรค *C. gloeosporioides* มีค่า Effective dose ที่ 50% (ED₅₀) ของการยับยั้งการสร้างเส้นใย และการสร้างโคนิเดียเท่ากับ 45.63 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการนำเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* มาควบคุมโรคแอนแทรกคโนสที่เกิดขึ้นกับผลผลิตทางการเกษตร สามารถนำเชื้อราสกุล *Neosartorya* และสารสกัดที่ได้จากเชื้อราไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคอื่น ๆ แทนการใช้สารเคมีในควบคุมโรคพืช เพื่อลดการก่อให้เกิดอันตรายแก่ผลผลิตทางการเกษตร เกษตรกร ผู้บริโภค และลดมลพิษทางสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถนำไปศึกษาเพิ่มเติม เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ในอนาคตได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กมลวรรณ ศรีตะ อธิดา เดชชวบ ณรงค์ สงษ์บระอดุม และเอนก กิจเงา. 2557. “ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลน ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ.” บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิระเดช แจ่มสว่าง. 2539. “การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา : ตอนที่ 3 การควบคุมโรครากเน่าของทุเรียน.” *วารสารเคหการเกษตร*. 20(2) : 131-138.
- เทคโนโลยีชาวบ้าน. 2562. ครอบรู้สายพันธุ์มะละกอ 10 สายพันธุ์. [online]. เข้าถึงได้จาก : https://www.technologychaoban.com/news-slide/article_7772.
- ธวัชชัย นิมกิงรัตน์. 2558. วิจัยและพัฒนาพันธุ์มะละกอ Researching and development of papaya (*Carica papaya* L.) breeding. กรมวิชาการเกษตร.
- นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. “โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ”. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. เล่มที่ 35 : 129-159.
- พีระศักดิ์ ฉายประสาธ. 2555. คู่มือการปลูกมะละกอฮอลแลนด์. ภายใต้โครงการ “ฟื้นฟูและเยียวยาผู้ประสบอุทกภัยหลังน้ำลดด้วยงานวิจัยของ วช.” ภารกิจโครงการและประสานงานวิจัย, สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ.
- เมอมร สร้อยทอง. 2558. “การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากดิน และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในกาแฟ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง.
- สุวรรณ อินทร์คงแก้ว. 2539. มะละกอ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. 64 หน้า.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2546. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในสวนมะม่วง. [online]. เข้าถึงได้จาก : https://stri.cmu.ac.th/article_detail.php?id=11.
- สาคร ศรีมุข. 2556. ผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรของประเทศไทย (The Impact of the use of Agricultural Chemicals in Thailand). บทความวิชาการ. กลุ่มงานวิจัยและ ข้อมูล สำนักวิชาการ, สำนักงานเลขาธิการวุฒิสภา.
- สลิล ศิริอุดมภาส และคณะ. 2559. พบแพทย์, มะละกอ ผลไม้ขึ้นชื่อ กับประโยชน์ต่อสุขภาพ. [online]. เข้าถึงได้จาก : <https://www.pobpad.com/>.
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2559. การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพ. [online]. เข้าถึงได้จาก : <https://www.nstdaor.th/th/nstda-knowledge/3385-biocontrol>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว และแปรรูปผลิตผลเกษตร. 2557. โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว. กรุงเทพฯ. กรมวิชาการเกษตร.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. 198 หน้า.

ศิริพรรณ สุขขัง. 2560. การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี. [online]. เข้าถึงได้จาก : <http://biology.ipst.ac.th/?p=3341>.

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัต. 2536. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หทัยชนก คงแก้ว. 2546. การพัฒนาชุดไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจ *Colletotrichum* spp. บนเมล็ดพริก. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, วิทยาเขตกำแพงแสน.

โอเคนเนชั่น. 2557. การปลูกมะละกอ ตอนที่ 3. [online]. เข้าถึงได้จาก : <http://oknation.nationtv.tv/blog/print.php?id=844729>.

Abera, A., Lemessa, F. and Adunga, G. 2016. "Morphological characteristics of *Colletotrichum* species associated with mango (*Mangifera indica* L.) in southwest Ethiopia." *Food Science and Quality Management*. 48(1) : 2224-6088.

Aktaruzzaman, M.D., Afroz, T., Lee, Y.G. and Kim B.S. 2017. "Post-harvest anthracnose of papaya caused by *Colletotrichum truncatum* in Korea." *European Journal of Plant Pathology*. 150(1) : 259-265.

Ali, A., Muhammad, M.T.M., Sijam, K. and Siddiqui, Y. 2010. "Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya." *Journal of Food Science and Technology*. 45(1) : 2134-2140.

Bautista-Rosales, P.U., Calderon-Santoyo, M., Servin-Villegas, R., Ochoa-Alvarez, N.A., Vazquez-Juarez, R. and Ragazzo-Sanchez, J.A. 2014. "Biocontrol action mechanisms of *Cryptococcus laurentii* on *Colletotrichum gloeosporioides* of mango." *Crop Protection*. 65(1) : 194-201.

Boonsang, N., Dethoup, T., Singburadom, N., Gomes, N.G.M. and Kijjoa, A. 2014. "In vitro antifungal activity screening of crude extracts of soil fungi against plant pathogenic fungi." *Journal of Biopesticides*. 7(2) : 156-166.

Chithra, S., Jasima, B., Sachidanandanb, P.M., Jyothis, M. and Radhakrishnan, E.K. 2014. "Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*." *Phytomedicine*. 21(4) : 534-540.

Calzada, C.T., Tussell, R.T., Ciapara, I.H., Poot, E.H., Mex, R.M., Garcez, N. and Brito, D.P. 2017. "Characterization of *Colletotrichum truncatum* from papaya, pepper
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- and physic nut based on phylogeny, morphology and pathogenicity.” *Journal of Plant Pathology*. 67(4) : 821-830.
- Cruz-Quiroza, D.I., Roussosb, S., Rodriguez-Herreraa, R.R., Hernandez-Castillo, D. and Aguilara, C.N. 2018. “Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native mexican *Trichoderma* strains.” *Karbala International Journal of Modern Science*. 4(2) : 237-243.
- Chalearmsrimuang, T., Ismail, S.I., Mazlan, N., Suasaard, S. and Dethoup, T. 2019. “Marine-derived Fungi : a promising source of halo tolerant biological control agents against plant pathogenic fungi.” *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 13(1) : 209-223.
- Dethoup, T., Kumla, D. and Kijjoa, A. 2015. “Mycocidal activity of crude extracts of marine-derived beneficial fungi against plant pathogenic fungi.” *Journal of Biopesticides*. 8(2) : 107-115.
- Doyle, J.J. and Doyle J.L. 1990. “Isolation of plant DNA from fresh tissue.” *Focus*. 12(1) : 13-15.
- Edirisinghe, E.A.P.N., Ariyadasa, K.P. and Chandani, R.P.D.S. 2012. “Forest cover assessment of Sri Lanka, the Sri Lankan forester.” 34(1) : 1-12.
- Eamvijarn, A., Manoch, L., Visarathanonth, N. and Chamsawang, C. 2009. “Diversity of *Neosartorya* species from soil and *in vitro* antagonistic test against plant pathogenic fungi.” *Journal of Food Science and Technology*. 51(12) : 4078-4083.
- FAOSTAT. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT, FAO statistical Databases. [online]. Available : <http://www.fao.org/corp/statistic.html>.
- Gwa, V.I., and Nwankiti, A.O. 2017. “Efficacy of some plant extracts in *in vitro* control of *Colletotrichum* species causal agent of yam (*Dioscorea rotundata* Poir) tuber rot.” *Asian Journal of Plant Science and Research*. 7(2) : 8-16.
- Hailmi, M.S., Kadir, J., Nurfarah, W.W., Afiza, N.B., Khandake, M. and Mohammed, S. 2017. “Influence of culture media, temperature and pH on *Colletotrichum gloeosporioides*, isolated from *Carica papaya* in Besut, Terengganu, Malaysia.” *Journal of Agrobiotechnology*. 8(2) : 49-55.
- Index Fungorum. 2019. *Colletotrichum*. [online]. Available : <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ismet, A., Rizwana, H., Al-Othman, M.R. and Bakir, M.A. 2012. "Studies of actionmycetes for biological control of *Colletotrichum musae* pathogen during post-harvest." *Journal of Microbiology Research*. 6(17) : 3879-3886.
- Jantasorn, A., Mongon, J., Moungrimuangdee, B. and Ouphisittraiwat, T. 2016. "In vitro antifungal activity of soil fungi crude extracts isolated from riparian forest against plant pathogenic fungi." *Journal of Biopesticides*. 9(2) : 119-124.
- Jinai, Y., Lan, C., Huang, P. and Yu, D. 2018. "PCR detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in *Psidium guajava*." *Australasian Plant Pathology*. 47(1) : 95-100.
- Karazaa, K. 2012. **Holland papaya**. [online]. Availabel : <https://sites.google.com/site/hollandpapaya/phuch-swn-phaer>.
- Kimaru, S.K., Monda, E.R., Cheruiyot, C., Mbaka, J. and Alakonya, A. 2018. "Morphological and molecular identification of the causal agent of anthracnose disease of avocado in Kenya." *International Journal of Microbiology*. 1(1) : 1-10.
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., Chang, X., Zhang, S. and Gong, G. 2016 "Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan province, China." *Scientific Reports*. 6(1) : 1-17.
- Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P.G., Mohamed, M.T.M., Siddiqui, Y. and Zahid, N. 2011. "Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage." *Postharvest Biology and Technology*. 62(1) : 71-76.
- Marin-Felix, Y., Groenewald, J.Z. and Cai, L. 2017. "Genera of phytopathogenic fungi : GOPHY1." *Studies in Mycology*. 86(1) : 99-216.
- Mark F.W. 2018. **Pathogenicity vs. virulence**. [online]. Available : <https://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/Path.html>.
- McMaugh, T. 2008. "Guidelines for surveillance for plant in Asia and pacific." *Australian Center for Internationnal Agricultural Research*. 119(1) : 192-247.
- Ong, M.K., Kazi, F.K., Forney, C.F. and Ali, A. 2012. "Effect of gaseous ozone on papaya anthracnose." *Food Bioprocess Technology*. 6(11) : 1007-1013.
- Parmeshwar, L.S., Solanki, I.S. and Choudhary R. 2016. **Papaya : biology, cultivation, production and uses**. [online]. Available : <http://books.google.co.th/books?id>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า =anthracnose+disease+of+papaya.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Pattarasaikul, W., Soyong, K. and Poeaim, S. 2018. "Biological control of anthracnose disease on banana var 'Namwa Mali-Ong' by *Neosartorya* species." *International Journal of Agricultural Technology*. 14(7) : 1589-1598.
- Plapung, P. 2004. "Improvement of anthracnose resistant strawberry." Chiang Mai University of Thai. 122 p.
- Rahman, M.A., Mahmud, T.M.M., Kadir, J., Abdul Rahman, R. and Begum, M.M. 2008. "Major postharvest fungal diseases of papaya cv. 'Sekaki' in Selangor, Malaysia." *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 31(1) : 27-34.
- Ramos, A.A., Castro, C.B., Sena, M.P., Dethoup, T., Buttachon, S., Kijjoa, A. and Rocha, E. 2016. "Crude extracts of marine-derived and soil fungi of the genus *Neosartorya* exhibit selective anticancer activity by inducing cell death in colon, breast and skin cancer cell lines." *Pharmacognosy Research*. 8(1) : 8-15.
- Saini, T.J., Gupta, S.G. and Anandalakshmi, R. 2016. "First report of papaya anthracnose caused by *Colletotrichum fruticola* in India." *New Disease Reports*. 34(1) : 27 p.
- Samson, S., Hong, S.W., Peterson, J.C., Frisvad and Varga, J. 2007. "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*." *Studies in Mycology*. 59(1) : 147-203.
- Schocha, L.C., Seifertb, K.A., Huhndorf, S., Robertd, V., Spougea, J.L., Levesqueb, C.A., and Chenb, W. 2012. "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(16) : 6241-6246.
- Seifert, A. 2009. "Progress towards DNA barcoding of fungi." *Molecular Ecology Resources*. 9(1) : 83-89.
- Sharma, K., Merritt, L.J., Palmateer, A., Goss, E., Smith, M., Schubert, T., Johnson, S.R. and Bruggen, A.H. 2014. "Isolation, characterization and management of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose on lucky bamboo." *American Society for Horticultural Science*. 49(4) : 453-459.
- Shivas, R. and Beasley, D. 2004. คู่มือการจัดการ ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช. แปลจาก Management of plant pathogen collections. โดย พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุข พูนผลกุล และศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.

Soyong, K. and Quimio, T.H. 1992. "Antagonism of *Chaetomium cupreum* to *Pyricularia oryzae*." *Journal of Plant Protection in the Tropics*. 3(1) : 17-23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นองานใดที่นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Stracieri, J., Pereira, F.D., Silveira, A.L., Magalhães, H.M. and Goes, A.D. 2016. "Morphocultural and molecular characterization of papaya tree *Colletotrichum* spp." *African Journal of Agricultural Research*. 11(19) : 1755-1764.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute : Kew, Surrey.
- Sutton, B.C. 1992. "The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*." 1-26. In *Colletotrichum : biology, pathology and control*. Wallingford, UK : CAB International.
- Photita, W., Taylor, P.W.J., Ford, R., Hyde, K.D. and Lumyong, S. 2005. "Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand." *Fungal Diversity*. 18(1) : 117-133.
- Valenzuela, N.L., Angel, D.N., Ortiz, D.T., Rosas, R.A., Garcia, C.F.O. and Santos, M.O. 2015. "Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit." *Biological Control*. 91(1) : 88-93.
- Vijaya, I.S. and Zakaria, L. 2014. "Phenotypic and molecular characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana (*Musa* spp.) in Malaysia." *Genetics and Molecular Research*. 13(2) : 3627-3637.
- Waing, K.G.D., Abella, E.A., Kalaw, S.P., Waing, F.P. and Galvez, C.T. 2015. "Antagonistic interactions among different species of leaf litter fungi of Central Luzon State University." *Plant Pathology and Quarantine*. 5(1) : 122-130.
- Weir, B.S., Johnston, P.R. and Damm, U. 2012. "The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex." *Studies in Mycology*. 73(1) : 115-180.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 38(1) : 315-322.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) 1 ลิตร

แบบที่ 1 เตรียมจากอาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose Broth (PDB)

- ชั่งอาหารสำเร็จรูป PDB 24 กรัม
- เติมน้ำ (Agar) 15 กรัม
- ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
- นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

แบบที่ 2 เตรียมจากอาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose Agar (PDA)

- ชั่งอาหารสำเร็จรูป PDA 39 กรัม
- ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB) 1 ลิตร

- ชั่งอาหารสำเร็จรูป PDB 24 กรัม
- ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย 10X TBE Buffer 1 ลิตร

- ชั่ง Tris base 108 กรัม Boric acid 55 กรัม และ 0.5 โมลาร์ EDTA 40 มิลลิลิตร โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- ละลายให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน (Deionized water) ปริมาตร 500-700 มิลลิลิตร
- ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 8 แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย 1X TBE Buffer 500 มิลลิลิตร

- 10X TBE Buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออนปริมาตร 450 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- โดยคำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$10 \times V_1 = 1 \times 500$$

$$V_1 = 50 \text{ มิลลิลิตร}$$

$$\text{ดังนั้น ต้องเติมน้ำกลั่น } 500 - 50 = 450 \text{ มิลลิลิตร}$$

การเตรียมสารละลาย 1.25 มิลลิโมลาร์ (mM) dNTPs ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

- ดูดสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ dATPs, dCTPs, dGTPs และ dTTPs จาก stock ของแต่ละสารละลายปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร ซึ่งปริมาตรทั้งหมด เท่ากับ 5 ไมโครลิตร
- เติมน้ำ DI 95 ไมโครลิตร
- โดยคำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100 \times V_1 = 1.25 \times 100$$

$$V_1 = 1.25 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$\text{ดังนั้น ต้องเติมน้ำ DI } 100 - 5 = 95 \text{ ไมโครลิตร}$$

การเตรียมสารละลายไพรมอร์ความเข้มข้น 20 ไมโครโมล

- ดูดสารละลายไพรมอร์จาก Stock ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
- เติมน้ำ DI 16 ไมโครลิตร
- โดยคำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100 \times V_1 = 20 \times 20$$

$$V_1 = 4 \text{ ไมโครลิตร}$$

$$\text{ดังนั้น ต้องเติมน้ำ DI } 20 - 4 = 16 \text{ ไมโครลิตร}$$

การเตรียมสารละลาย 10% CTAB 500 มิลลิลิตร

- เตรียม CTAB 1 กรัม ใน โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.7 โมล จาก stock ความเข้มข้น 5 โมล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- โดยคำนวณจากสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$5 \times V_1 = 0.7 \times 500$$

$$V_1 = 70 \text{ ไมโครลิตร}$$

- ตวง NaCl 70 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน 430 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
- นำมาผสมกับ CTAB 50 กรัม คนให้เข้ากัน
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย 2X CTAB 100 มิลลิลิตร

- CTAB 2 กรัม
- 5 M NaCl 28 มิลลิลิตร
- 0.5 M EDTA pH 8 4 มิลลิลิตร
- 1 M Tris HCl pH 8 10 มิลลิลิตร
- PVP (Polyvinylpyrrolidone) 1 กรัม
- น้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน 68 มิลลิลิตร
- คนให้ละลาย แล้วปรับค่าความเป็นกรด-เบส จากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการกำจัดไอออน

การเตรียม stock สารสกัดหยาบสำหรับการทดสอบ Poison plate

- เตรียม stock สารสกัดหยาบโดยให้ความเข้มข้นเป็น 3,000 ppm
- ตูดสารสกัดหยาบจาก stock มา 0.10, 0.50, 1.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร PDA เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm
- นำอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- เทอาหาร PDA ลงบนเพลทขนาด 60 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- ในงานวิจัยทำทั้งหมด 6 ซ้ำ ต่อ 1 ความเข้มข้น

การเตรียม stock สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 3,000 ppm

ซึ่งสารสกัดหยาบ 54 มิลลิกรัม มาละลายด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ DMSO ปริมาตร 0.36 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมกับอาหาร PDA ปริมาตร 18 มิลลิลิตร จากนั้นตูด stock ที่เตรียมไว้ปริมาตรตามที่ต้องการ คือ 0.10, 0.50, 1.00, 5.00 และ 10.00 มิลลิลิตร มาผสมกับอาหาร PDA ให้รวมแล้วได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ในด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างเช่น ที่ความเข้มข้น 10 ppm ต้องดูดสารสกัดจาก stock มา 0.10 มิลลิลิตร แล้วเติมอาหาร PDA อีก 29.90 มิลลิลิตร

ตัวอย่างการคำนวณปริมาตรสารสกัดหยาบต่ออาหาร PDA ที่ใช้ทดสอบ poison plate ที่ความเข้มข้น 10 ppm

$$\begin{aligned} C_1V_1 &= C_2V_2 \\ 3000 \times V_1 &= 10 \times 30 \\ V_1 &= 0.1 \text{ มิลลิลิตร} \end{aligned}$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ตารางแสดงขนาดโคนิเตียของเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

โคนิเตียที่ (N)	ไอโซเลต							
	CBI1		CBI2		LKB1		SPB2	
	กว้าง (μm)	ยาว (μm)	กว้าง (μm)	ยาว (μm)	กว้าง (μm)	ยาว (μm)	กว้าง (μm)	ยาว (μm)
1	4.41	16.69	3.91	24.80	3.58	12.72	4.14	13.56
2	4.51	15.77	2.93	24.92	3.37	13.25	4.85	12.71
3	4.75	12.88	2.70	24.02	3.30	13.54	4.50	12.72
4	3.86	13.77	2.96	23.36	4.02	14.07	3.89	12.78
5	3.81	12.31	2.92	23.53	4.38	12.74	4.30	12.02
6	4.83	14.15	2.96	22.36	4.13	13.46	4.03	13.19
7	3.59	13.18	3.02	25.41	3.50	15.15	3.86	13.13
8	3.59	13.57	3.05	23.99	3.61	14.81	3.98	12.28
9	4.02	12.29	3.09	24.57	4.38	13.35	4.63	12.06
10	3.81	14.25	3.32	24.10	4.79	14.99	3.28	13.28
11	4.73	15.67	3.21	22.62	3.80	14.15	4.15	12.88
12	4.41	17.07	2.80	23.57	3.26	15.53	4.20	12.32
13	4.83	17.10	2.95	26.17	3.71	14.42	4.42	13.50
14	4.57	13.69	3.61	23.50	3.84	13.19	4.15	12.95
15	4.26	15.03	2.92	24.76	3.70	14.97	3.77	12.11
16	4.73	15.14	2.75	24.32	3.64	14.11	4.14	13.39
17	4.52	13.30	3.58	25.03	4.02	13.25	3.82	13.87
18	3.71	15.37	3.14	22.09	4.54	12.72	4.20	13.28
19	3.80	14.98	3.78	22.54	3.82	12.60	3.93	13.13
20	3.90	13.50	3.45	25.30	3.39	12.03	3.61	14.28
21	3.90	13.76	3.58	25.92	3.10	13.33	4.01	12.89
22	3.68	14.39	3.31	25.21	4.10	14.08	3.94	13.32
23	4.29	13.50	3.69	26.78	4.17	11.60	3.71	12.05
24	4.23	13.05	3.40	24.32	4.79	12.20	3.42	11.91
25	3.39	13.18	3.27	25.00	3.60	13.19	4.14	12.61
26	4.76	14.27	3.28	24.82	4.32	12.53	4.24	13.85
27	4.55	14.48	3.81	25.62	4.82	12.14	3.81	12.45
28	4.49	14.46	3.18	24.90	4.37	13.41	4.32	13.15
29	4.09	14.29	3.27	27.34	3.81	12.79	4.19	13.15
30	4.30	14.64	3.54	26.60	4.37	12.85	3.61	13.49
เฉลี่ย	4.21	14.32	3.25	24.58	3.94	13.44	4.04	12.94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-2 ตารางแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides*

วันที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ไอโซเลต CBI1 (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร/วัน)
	เพลทที่ 1	เพลทที่ 2	เพลทที่ 3	
1	15.07	15.27	14.11	14.81
2	30.22	30.75	29.48	30.15
3	45.17	44.83	43.91	44.63
4	56.85	55.20	54.41	55.48
5	67.65	62.53	59.58	61.52
6	77.03	67.59	65.58	70.06
7	82.65	71.83	71.21	75.23

ตารางภาคผนวกที่ ข-3 ตารางแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. truncatum*

วันที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ไอโซเลต CBI2 (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร/วัน)
	เพลทที่ 1	เพลทที่ 2	เพลทที่ 3	
1	9.55	9.19	9.36	9.36
2	20.62	17.80	17.08	18.50
3	29.49	25.95	27.57	27.67
4	36.41	33.53	35.19	35.04
5	41.61	39.76	41.65	41.06
6	48.14	46.27	50.57	48.32
7	53.37	51.79	57.65	54.27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข-4 ตารางแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides*

วันที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ไอโซเลต LKB1 (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร/วัน)
	เพลทที่ 1	เพลทที่ 2	เพลทที่ 3	
1	17.22	15.55	13.78	15.52
2	33.06	31.00	28.49	30.85
3	47.70	46.48	43.90	46.02
4	60.76	55.03	54.69	56.82
5	72.00	60.12	59.74	63.95
6	80.54	63.97	64.13	69.54
7	82.49	67.31	70.78	73.52

ตารางภาคผนวกที่ ข-5 ตารางแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides*

วันที่	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ไอโซเลต SPB2 (มิลลิเมตร)			ค่าเฉลี่ย (มิลลิเมตร/วัน)
	เพลทที่ 1	เพลทที่ 2	เพลทที่ 3	
1	11.59	11.94	14.33	12.62
2	26.60	27.00	30.13	27.91
3	42.67	43.37	45.86	43.96
4	56.21	59.96	61.84	59.33
5	65.32	73.74	73.53	70.86
6	70.77	81.65	75.70	76.04
7	75.09	82.89	82.38	80.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกข-1 แสดงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 ANOVA ของการทดสอบการก่อโรคของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. truncatum*

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1446.269	4	361.567	76.557	.000
Within Groups	47.229	10	4.723		
Total	1493.498	14			

Homogeneous Subsets

Duncan^a

replicate	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
4.00	3	.0000			
5.00	3		19.0633		
2.00	3		21.1983	21.1983	
3.00	3			24.3667	
1.00	3				28.3933
Sig.		1.000	.257	.104	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

	(I) replicate	(J) replicate	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1.00	2.00	7.19500*	1.77442	.015	1.3552	13.0348
		3.00	4.02667	1.77442	.231	-1.8131	9.8664
		4.00	28.39333*	1.77442	.000	22.5536	34.2331
		5.00	9.33000*	1.77442	.003	3.4902	15.1698
	2.00	1.00	-7.19500*	1.77442	.015	-13.0348	-1.3552
		3.00	-3.16833	1.77442	.431	-9.0081	2.6714
		4.00	21.19833*	1.77442	.000	15.3586	27.0381
		5.00	2.13500	1.77442	.750	-3.7048	7.9748
	3.00	1.00	-4.02667	1.77442	.231	-9.8664	1.8131
		2.00	3.16833	1.77442	.431	-2.6714	9.0081
		4.00	24.36667*	1.77442	.000	18.5269	30.2064
		5.00	5.30333	1.77442	.080	-.5364	11.1431
	4.00	1.00	-28.39333*	1.77442	.000	-34.2331	-22.5536
		2.00	-21.19833*	1.77442	.000	-27.0381	-15.3586
		3.00	-24.36667*	1.77442	.000	-30.2064	-18.5269
		5.00	-19.06333*	1.77442	.000	-24.9031	-13.2236
	5.00	1.00	-9.33000*	1.77442	.003	-15.1698	-3.4902
		2.00	-2.13500	1.77442	.750	-7.9748	3.7048
		3.00	-5.30333	1.77442	.080	-11.1431	.5364
		4.00	19.06333*	1.77442	.000	13.2236	24.9031

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-2 ANOVA ของการทดสอบด้วยวิธี Dual culture ระหว่างเชื้อรา *C. gloeosporioides* CBI กับ *N. hiratsukae* EU06 *N. pseudofischeri* EU13 และ *N. fenneliae* CHA03-A11

การยับยั้งการสร้างเส้นใย

ANOVA

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	129.637	2	64.819	35.756	.000
Within Groups	10.877	6	1.813		
Total	140.514	8			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Average			
Duncan ^a			
replicate	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3.00	3	62.2067	
1.00	3	63.0433	
2.00	3		70.6433
Sig.		.475	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การยับยั้งการสร้างโคนินเดีย

ANOVA

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.658	2	11.829	37.019	.000
Within Groups	1.917	6	.320		
Total	25.576	8			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และดัดแปลงข้อมูลของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Conidia					
	replicate	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan ^a	1.00	3	94.7200		
	3.00	3		97.1000	
	2.00	3			98.6633
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้