

การควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ต่อเชื้อรา
Colletotrichum capsici ในพริก

BIOCONTROL OF *Neosartorya* ON
Colletotrichum capsici OF CHILLI



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีการศึกษา 2560

BIOCONTROL OF *Neosartorya* ON
Colletotrichum capsici OF CHILLI



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

เอกสารนี้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงหรือทำซ้ำของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

หัวข้อโครงการพิเศษ การควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ต่อเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ในพริก
 Biocontrol of *Neosartorya* on *Colletotrichum capsici* of chilli

ชื่อนักศึกษา นางสาวณิศาภาดา เจือจาน รหัสนักศึกษา 57050686
 นางสาวดวงพร เหลืองสำราญ รหัสนักศึกษา 57050687

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
 ภาควิชา ชีววิทยา
 ปีการศึกษา 2560
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
 (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	การควบคุมโดยชีววิธีของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> ต่อเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> ในพริก	
	Biocontrol of <i>Neosartorya</i> on <i>Colletotrichum capsici</i> of chilli	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวณิศาภาดา เจือจาน	รหัสนักศึกษา 57050686
	นางสาวดวงพร เหลืองสำราญ	รหัสนักศึกษา 57050687
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2560	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

บทคัดย่อ

คัดแยกและบ่งชี้สายพันธุ์เชื้อรา *Colletotrichum capsici* ที่เป็นสาเหตุของโรค แอนแทรคโนสในพริก ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) รวมทั้งการคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* จากดิน ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ β -tubulin เพื่อยืนยันการบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อรา *Neosartorya spinosa* และ *Neosartorya udagawae* และในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* ในการยับยั้งเชื้อรา *C. capsici* ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Poison plate พบว่าสารสกัดหยาบชั้น Ethyl acetate จาก เชื้อราต่อต้าน *N. spinosa* CHA23H11 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างโคนิเดียมากที่สุด (97.24%) และมีค่า Effective dose ที่ 50% (ED₅₀) เท่ากับ 7.37 ppm

คำสำคัญ : *Colletotrichum capsici*, *Neosartorya spinosa*, *Neosartorya udagawae*, โรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า แอนแทรคโนส, การควบคุมโรคโดยชีววิธี

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Biocontrol of <i>Neosartorya</i> on <i>Colletotrichum capsici</i> of chilli	
Students	Miss Nitpada Jurejan	Student ID 57050686
	Miss Duangporn Luangsamran	Student ID 57050687
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)	
Department	Biology	
Faculty	Science	
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
Academic Year	2017	
Advisor	Asst. Prof Dr. Supattra Poeaim	

Abstract

Isolation and identification of the *Colletotrichum capsici* causing anthracnose of chilli based on morphology and nucleotide sequence data of internal transcribed spacer (ITS). Including, isolated antagonist fungus *Neosartorya* sp. from soil based on morphology. To confirm identification of *Neosartorya spinosa* and *Neosartorya udagawae* isolates with DNA sequencing of the β -tubulin. In vitro efficacy of crude extract of *Neosartorya* sp. against *C. capsici* by poison plate method, the ethyl acetate crude extract of *N. spinosa* CHA23H11 was the most effective antagonist the conidial germination (97.24%) and with an effective dose for 50% (ED₅₀) at 7.37 ppm.

Keyword : *Colletotrichum capsici*, *Neosartorya spinosa*, *Neosartorya udagawae*,

Anthracnose, Biocontrol

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดีด้วยความอนุเคราะห์ การช่วยเหลือคำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ และกำลังใจจากบุคคลรอบข้าง คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัทธา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รวมถึง ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ ดร.ณัฐวดี รุ่งจินตามัย คณะกรรมการ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็น ให้ความรู้เสนอแนวทางในการศึกษาค้นคว้าด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่งตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ให้สำเร็จลุล่วง ทำให้โครงการพิเศษฉบับนี้ มีความสมบูรณ์มากขึ้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณไว้เป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ รวมถึงบุคลากรทุกท่านที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำโครงการพิเศษในครั้งนี้ด้วยดี มาตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา - มารดาที่ทำให้ได้รับการศึกษาตลอดจนคอยเลี้ยงดูและอบรมสั่งสอน เป็นกำลังใจ และเป็นแรงผลักดันในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงพี่ น้อง และเพื่อนๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน ตลอดจนบุคคลอื่นๆ ที่ให้ความช่วยเหลืออีกมากที่ไม่ได้กล่าวมา โดยคณะผู้จัดทำรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและความปรารถนาดีของท่านเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

นิตภาดา เจือจาน
ดวงพร เหลืองสำราญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนส (Antracnose).....	3
2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i>	5
2.3 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i>	7
2.4 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biological Control).....	10
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	11
3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง	11
3.2 สารเคมี.....	11
3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	11
3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA และ	
เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)	11
3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสาร	12
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	12
3.4 วิธีการทดลอง.....	14
3.4.1 การคัดแยกเชื้อราก่อโรค <i>Colletotrichum capsici</i>	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.2 การคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล <i>Neosartorya</i> จากดิน.....	14
3.4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	15
3.4.4 การระบุสายพันธุ์ของเชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์	15
3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของเชื้อต่อต้านต่อการควบคุม เชื้อราก่อโรค <i>Colletotrichum capsici</i>	18
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	21
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	21
4.1.1 การคัดแยกเชื้อราก่อโรค <i>Colletotrichum capsici</i>	21
4.1.2 การคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล <i>Neosartorya</i> จากดิน.....	25
4.2 ผลการบ่งชี้เชื้อราก่อโรค <i>Colletotrichum capsici</i> และ เชื้อราต่อต้านสกุล <i>Neosartorya</i> ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์	28
4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS ของเชื้อราก่อโรค <i>Colletotrichum capsici</i> และบริเวณ β -tubulin ของเชื้อราต่อต้านสกุล <i>Neosartorya</i>	28
4.2.2 ผลการบ่งชี้เชื้อราก่อโรค <i>C. capsici</i> และ เชื้อราต่อต้านสกุล <i>Neosartorya</i> จากลำดับนิวคลีโอไทด์.....	29
4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้านสกุล <i>Neosartorya</i> ต่อการควบคุมเชื้อราก่อโรค <i>C. capsici</i> ด้วยวิธี Poison plate	33
4.3.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก เชื้อราต่อต้าน <i>N. spinosa</i> CHA23H11	33
4.3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก เชื้อราต่อต้าน <i>N. udagawae</i> CHA23H21.....	38
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง.....	45
ภาคผนวก	49
ภาคผนวก ก	50
ภาคผนวก ข	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 Primer ที่ใช้ในเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR).....	12
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ในบริเวณ ITS.....	17
3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ในบริเวณ β -tubulin.....	17
4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>C. capsici</i>	25
4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i>	28
4.3 แสดงเลข Accession และสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้สำหรับการสร้าง Phylogenetic tree ของเชื้อ <i>Collectotrichum capsici</i>	30
4.4 แสดงเลข Accession และสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้สำหรับการสร้าง Phylogenetic tree ของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i>	32
4.5 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>N. spinosa</i> CHA23H11 ที่มีผลต่อการ ควบคุมเชื้อราก่อโรค <i>C. capsici</i>	37
4.6 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>N. udagawae</i> CHA23H21 ที่มีผลต่อการ ควบคุมเชื้อราก่อโรค <i>C. capsici</i>	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะของโรคแอนแทรกโนสที่เกิดขึ้นบนผลพริก.....	4
2.2 แสดงลักษณะกลุ่มของโคนิเดียและโคนิเดียเดี่ยวของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> และ <i>C. capsici</i>	5
2.3 แสดงการสืบพันธุ์ของเชื้อราสกุล <i>Aspergillus</i>	8
2.4 แสดงลักษณะ Ascocarp และ Ascospore ของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i>	8
3.1 แผนผังแสดงลำดับในการสกัดสารสกัดหยาบ.....	19
4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> ไอโซเลต CC1.....	22
4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> ไอโซเลต BK4.....	23
4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> ไอโซเลต BK14.....	24
4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> ไอโซเลต CHA23H11.....	26
4.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> ไอโซเลต CHA23H21.....	27
4.6 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS และ บริเวณ β -tubulin.....	29
4.7 แผนภูมิการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา <i>Collectotrichum capsici</i> , <i>C. gloeosporioides</i> และ <i>C. acutatum</i>	31
4.8 แผนภูมิการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา <i>Neosartorya spinosa</i> , <i>N. udagawae</i> และ <i>N. fennelliae</i>	32
4.9 แสดงสีของสารสกัดหยาบแต่ละชั้นของเชื้อรา <i>N. spinosa</i> CHA23H11 และ <i>N. udagawae</i> CHA23H21.....	33
4.10 สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ <i>N. spinosa</i> CHA23H11 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>C. capsici</i>	35
4.11 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อราก่อโรค <i>C. capsici</i> จากสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน <i>N. spinosa</i> CHA23H11.....	36
4.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคนิเดียของเชื้อราก่อโรค <i>C. capsici</i> จากสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน <i>N. spinosa</i> CHA23H11.....	36
4.13 สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ <i>N. udagawae</i> CHA23H21 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>C. capsici</i>	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปภาพที่	หน้า
4.14 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยของเชื้อราก่อโรค <i>C. capsici</i> จากสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน <i>N. udagawae</i> CHA23H21.....	40
4.15 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคนิเดียของเชื้อราก่อโรค <i>C. capsici</i> จากสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน <i>N. udagawae</i> CHA23H21.....	40



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญมีอยู่หลากหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือพริก เนื่องจากคนไทยนิยมรับประทานอาหารที่มีรสชาติเผ็ดร้อน พริกจึงเป็นพืชผักที่มีความสำคัญในการประกอบอาหารประจำวันสำหรับคนไทย คนส่วนใหญ่จึงนิยมปลูกพริกเพื่อบริโภคในครัวเรือนและปลูกเพื่อการค้าภายในประเทศและเพื่อการส่งออก อีกทั้งยังนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น เครื่องปรุงรส (ปัญญา, 2550) แต่เกษตรกรผู้ปลูกพริกมักประสบปัญหาจากโรคพืชที่เกิดขึ้นในพริก ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา เช่น โรคแอนแทรคโนส โรคใบจุด โรครากรากและโคนเน่า เป็นต้น โดยโรคที่พบบ่อยและทำความเสียหายร้ายแรงแก่ผลพริกทั้งในขณะที่พริกเจริญเติบโตและภายหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้ได้ผลผลิตพริกที่ลดน้อยลง ส่งผลให้เกษตรกรสูญเสียรายได้ คือโรคแอนแทรคโนส ซึ่งโรคนี้อาจแพร่ระบาดในช่วงฤดูฝนที่มีความชื้นสูง เนื่องจากมีสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา โดยสปอร์ของเชื้อราจะสามารถแพร่กระจายไปได้อย่างรวดเร็ว (ไทยเกษตรศาสตร์, 2555)

โรคแอนแทรคโนสก่อให้เกิดความสูญเสียกับพืชเศรษฐกิจมากมาย ทั้งพืชตระกูลถั่ว หนุ่ย ผักไม้ผล และไม้ประดับ ทำให้ผลผลิตที่ได้เน่าเสีย อายุการเก็บเกี่ยวสั้น ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ โรคแอนแทรคโนสมีสาเหตุมาจากเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* จำนวน 3 สปีชีส์หลัก ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporiosides*, *Colletotrichum capsici* และ *Colletotrichum pipeatum* (ธารทิพย์ และคณะ, 2547) ลักษณะของพริกที่ติดโรคจะมีการเริ่มเป็นแผลหรือจุดดำเป็นแอ่งยุบลง แผลมีรูปร่างกลมหรือวงรี มีตั้งแต่แผลขนาดเล็กไปจนถึงเต็มทั่วทั้งผลพริก ต่อมาแผลเหล่านี้จะแห้งเป็นสีน้ำตาลหรือดำพร้อมกับสร้าง Fruiting body ซึ่งเป็นที่เกิดของสปอร์หรือโคนิเดีย ที่เป็นจุดสีเหลืองส้มหรือน้ำตาลดำเป็นวงเรียงซ้อนกันอยู่ที่แผล เชื้อราสามารถเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ผลขนาดเล็กไปจนถึงโตเต็มที่และสุกแดง อย่างไรก็ตามหากผลพริกอยู่ในระยะผลอ่อน เซลล์บริเวณแผลที่ถูกทำลายจะหยุดการแบ่งเซลล์ ขณะเดียวกันแผลจะขยายไปเรื่อยๆ ทำให้ผลพริกเกิดการคดโค้งงอหรือบิดเบี้ยวขึ้น โดยมีแผลหรือเซลล์ที่ตายอยู่ด้านใน ลักษณะคล้ายกุ่มแห้ง (Sornyoo, 2560)

การควบคุมโรคด้วยชีววิธี คือ การจัดการศัตรูพืชให้อยู่ในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหาย โดยใช้สิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูของศัตรูพืชที่เรียกว่า ศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ ตัวห้ำ ตัวเบียน และเชื้อจุลินทรีย์ (อารีพันธ์, 2560) กมลวรรณ และคณะ (2557) ได้รายงานว่าเชื้อราสกุล *Neosartorya* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ได้ ดังนั้นคณะผู้จัดทำจึงสนใจที่จะทำการคัดเลือก

เชื้อราสกุล *Neosartorya* จากดินเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *C. capsici* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริก

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 คัดแยกเชื้อราและระบุสายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุล

1.2.2 แยกเชื้อราและระบุสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุล

1.2.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ที่ก่อโรคในพริก โดยใช้วิธี Poison plate

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อรา *Colletotrichum capsici* จากตัวอย่างพริกที่สุ่มเก็บในตลาดจังหวัดกรุงเทพมหานคร ปรารจันบุรี ระยอง และชุมพร และคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* จากตัวอย่างดินในจังหวัดชุมพรแล้วจึงทำการระบุสายพันธุ์ของเชื้อรา *C. capsici* และเชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุล จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก โดยใช้วิธี Poison plate

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถประยุกต์ใช้เชื้อราและสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกได้ในอนาคต

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พริก เป็นพืชผักที่คนไทยรู้จักเป็นอย่างดี เพราะใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารไทยแทบทุกชนิด ถือได้ว่าเป็นพืชหนึ่งที่มีความสำคัญทางวัฒนธรรมคู่กันกับข้าวตลอดมาและมีการบริโภคพริกกันอย่างแพร่หลาย นอกจากพริกจะนิยมใช้เป็นอาหารสำหรับบริโภคแล้ว ยังพบงานวิจัยที่รายงานว่าผลพริกนั้นสามารถนำมาสกัดสารแล้วนำมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคได้อย่างมากมาย (มโนวิช และจันทรรัตน์, 2547) เช่น สารแคปไซซินในพริก สามารถช่วยลดน้ำหนัก บรรเทาอาการไข้หวัด บรรเทาอาการไอเนื่องจากไข้หวัด ช่วยในการเผาผลาญไขมัน ช่วยลดการสะสมของไขมัน ช่วยเร่งเมตาบอลิซึม ช่วยลดปริมาณสารโคเลสเตอรอล ช่วยบรรเทาอาการเจ็บปวด ช่วยลดอาการอักเสบ ช่วยในการสร้างสารเอนดอร์ฟิน (Endorphin) สารเบต้าแคโรทีน ยังสามารถช่วยป้องกันเนื้อเยื่อบุผนังช่องปาก จมูก ลำคอ และปอด ช่วยลดการอุดตันของเส้นเลือด ช่วยให้การไหลเวียนของเลือดดีขึ้น วิตามินซี สามารถช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็งได้ ช่วยเสริมสร้างคอลลาเจน และความเผ็ดของพริกนั้นยังช่วยกระตุ้นการทำงานของลิ้นและกระเพาะอาหาร ทำให้มีความอยากอาหารมากขึ้น

ถึงแม้ว่าพริกจะมีประโยชน์ต่างๆ มากมาย แต่ก็ยังมีปัญหาในด้านผลผลิตที่เกษตรกรผู้ปลูกพริกต้องพบเจอก็คือโรคต่างๆ ที่มักจะเกิดขึ้นในพริก เช่น โรคแอนแทรคโนส โรคราดและโคนเน่า โรคเหี่ยว โรคใบจุด โรคยอดและกิ่งแห้ง โรคใบหงิกและโรคใบด่าง แต่ในที่นี้จะศึกษาเพียงโรคแอนแทรคโนส เพราะนับว่าเป็นโรคที่ทำให้ความเสียหายมากที่สุดโรคหนึ่ง โดยจะระบาดมากในเขตที่มีความชื้นสูงหรือฝนตกชุก ในกรณีที่โรคระบาดรุนแรงหรือมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคเชื้อจะเข้าไปทำลายใบ กิ่งก้าน ลำต้นและผล ทำให้ใบร่วงเป็นจำนวนมาก ผลพริกที่เป็นโรคจะเป็นแผลใหญ่ ผลร่วงก่อนสุกหรือก่อนแก่เต็มที่หรือผลพริกอาจจะเน่าหมดทั้งผล ทำให้ผลผลิตน้อยและคุณภาพต่ำ ต้นอาจยืนแห้งตาย ในประเทศไทยจะพบโรคนี้อันตรายทั่วไปในแหล่งปลูกพริก โดยเฉพาะเขตภาคกลางซึ่งมีการปลูกพริกมาก โดยโรคนี้อาจเข้าทำลายพริกได้ทุกชนิด (ศุภลักษณ์, 2536)

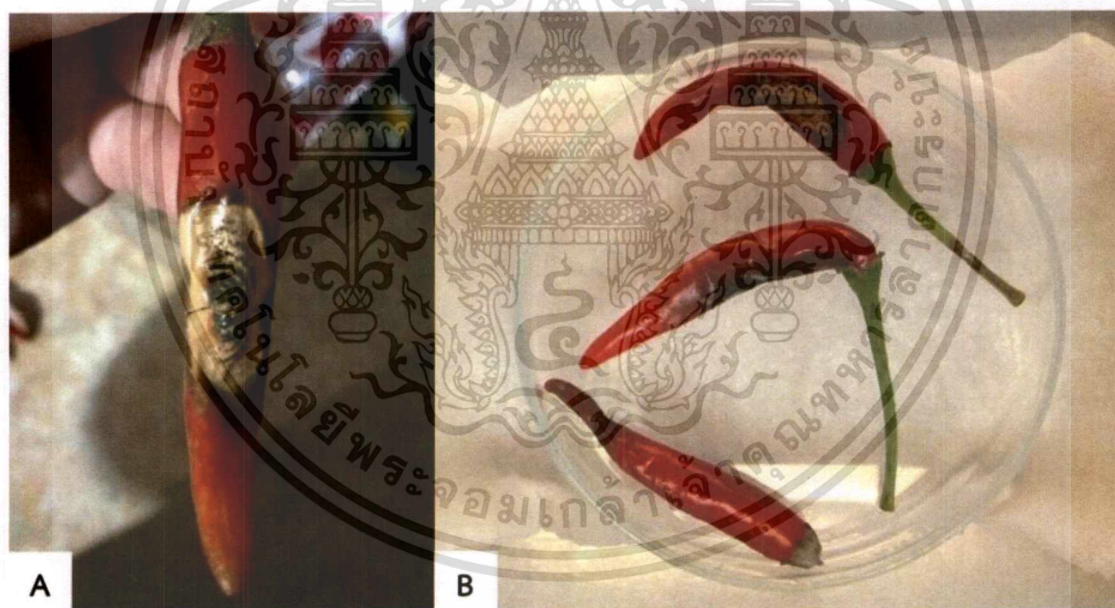
2.1 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนส (Antracnose)

โรคแอนแทรคโนส (Antracnose disease) สามารถทำลายพริกได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต หากมีเชื้อติดมากับเมล็ดพันธุ์ เชื้อจะเข้าทำลายต้นกล้าทำให้ต้นกล้าแห้งตาย ในระยะต้นโตจะทำให้เกิดแผลที่ใบและกิ่งก้าน ทำให้ใบร่วงและเกิดอาการแห้งตายจากปลายยอด (Die back) อาการของโรคจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อผลพริกเริ่มสุก โดยจะเกิดรอยแผลช้ำยุบลงไปจากนั้นกลายเป็นแผลสีน้ำตาลรูปวงกลมรีขนาดใหญ่ มีจุดเล็กๆ สีดำเรียงซ้อนกันเป็นวง (Concentric ring) อยู่ในบริเวณแผล

เอกส...
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

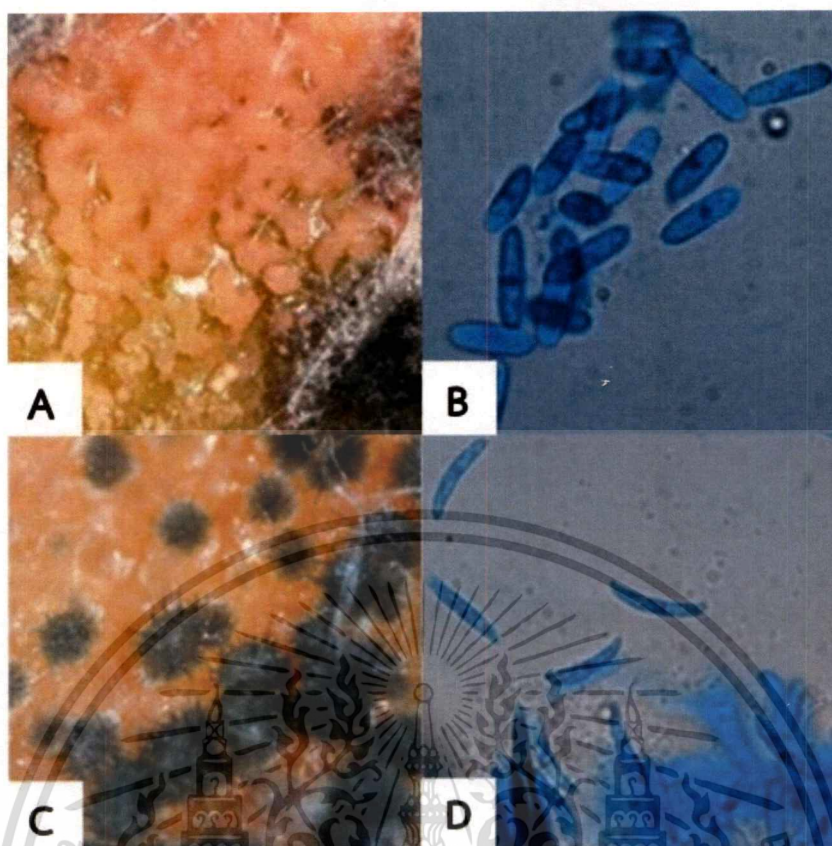
(รูปที่ 2.1A) ส่งผลให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นไม่มีการแบ่งเซลล์ ทำให้ผลพริกที่เป็นโรคมักมีลักษณะโค้งงอหรือหดย่นมีลักษณะคล้ายกุ่มแห้งชาวบ้านจึงมักเรียกว่า โรคกุ่มแห้ง (รูปที่ 2.1B) (ศุภลักษณ์, 2536)

โรคแอนแทรคโนสที่เกิดขึ้นในพริกส่วนใหญ่มักจะมีสาเหตุสำคัญที่เกิดขึ้นโดยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และเชื้อรา *Colletotrichum capsici* โดยที่ *C. gloeosporioides* ก่อให้เกิดแผลกลมรีขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 1-2 เซนติเมตร เนื้อเยื่อบริเวณแผลจะยุบตัวลงเป็นแอ่ง เมื่อเริ่มเกิดแผลใหม่ๆ แผลจะมีสีเหลืองส้ม และมี Fruiting body ที่เรียกว่า Acervulus มีลักษณะเป็นถ้วยคว่ำสีเหลืองส้มเรียงซ้อนกันเป็นวง ๆ อยู่ในบริเวณแผล (รูปที่ 2.2A) ไม่มี Setae และเมื่อนานขึ้น แผลจะกลายเป็นสีน้ำตาลดำ โคนินเดียเป็นเซลล์เดี่ยว สีรูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน ขนาดเฉลี่ย 9-24 x 3-4.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.2B) ส่วน *C. capsici* ก่อให้เกิดแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ขนาดและรูปร่างของแผลไม่แน่นอน มักมีจุดสีน้ำตาลเข้มถึงดำเรียงซ้อนกันเป็นวงอยู่ในบริเวณแผล มี Setae ซึ่งลักษณะจะคล้ายกับหนามอยู่บนจุดสีดำเล็กๆ บริเวณแผล (รูปที่ 2.2C) โคนินเดียเซลล์เดี่ยว สีใส รูปร่างโค้งงอคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว ขนาดเฉลี่ย 9-14 x 6.5-11.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.2D) (ศุภลักษณ์, 2536)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดขึ้นบนผลพริก (A) รอยบาดแผลที่มีลักษณะเป็นจุดสีดำขึ้นซ้อนกันเป็นวง (B) ลักษณะของผลพริกที่โค้งงอคล้ายกุ่มแห้ง (ที่มา : ณีตภาดาและดวงพร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะกลุ่มของโคนิเดียและโคนิเดียเดี่ยวของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* (A) กลุ่มของโคนิเดียของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (B) โคนิเดียเดี่ยวของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (C) กลุ่มของโคนิเดียของเชื้อรา *C. capsici* ที่มี Setae และ (D) โคนิเดียเดี่ยวของเชื้อรา *C. capsici*

(ที่มา : Calzada, 2012)

เชื้อราสกุล *Colletotrichum* สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วโดยอาศัย แมลง เครื่องมือ กลีกรรรมและสิ่งเคลื่อนไหวทุกชนิดที่ไปถูกต้องสัมผัสเข้า เมื่อเชื้อตกลงบนผลพริกก็จะงอกและเข้าทำลายผลพริก สามารถสังเกตอาการของโรคได้ภายใน 3-5 วัน หากในระยะการเก็บเกี่ยวผลพริกมีการระบาดของโรคนี้อาจมีเชื้อราสาเหตุโรคติดไปกับเมล็ดพันธุ์พริก ทำให้โรคสามารถระบาดไปยังแหล่งอื่นๆ ได้อีกด้วย เมื่อนำเมล็ดพันธุ์ที่มีเชื้อติดอยู่ไป สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคอยู่ที่ อุณหภูมิ 27-32 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่าร้อยละ 95 (ศักดิ์, 2537)

2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

เชื้อราในสกุล *Colletotrichum* พบรายงานครั้งแรกโดย Tode ในปี ค.ศ. 1790 มีชื่อเดิมว่า *Vermicularia* ต่อมาในปี ค.ศ. 1837 Corda ได้เปลี่ยนจากสกุล *Vermicularia* เป็นชื่อสกุล *Colletotrichum* และเป็นที่ยอมรับมาจนถึงปัจจุบัน (Sutton, 1992) โดยทั่วไปเชื้อราชนิดนี้มีการใช้

ขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศโดยการสร้างโคนิเดียบนก้านสั้นๆ ภายใน Fruiting body บนแผลซึ่งมองเห็นเป็นจุดดำๆ เรียงซ้อนเป็นวง เมื่อโคนิเดียแก่จะดันเปลือกด้านบน Fruiting body ให้แตกออก (ศักดิ์, 2537) จากงานวิจัยของ Sutton (1992) ได้จัดอนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ไว้ดังนี้

Sub-division	Deuteromycotina
Class	Coelomycetes
Order	Melanconiales
Family	Melanconialesae
Genus	<i>Colletotrichum</i>

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ที่สำคัญคือสร้าง Fruiting body แบบ Acervulus พบกระจายทั่วไปบนพืชอาศัยที่เป็นแผล มีการสร้าง Setae สีน้ำตาลดำ สปอร์เมื่ออยู่รวมกันมีสีเหลืองอ่อนถึงสีชมพูอมส้ม (Salmon pink) โคนิเดียมี 2 ลักษณะคือ เป็นเซลล์เดี่ยว รูปโค้งงอคล้ายเคียว และรูปทรงกระบอกปลายมน หลังจากงอก Germ tube แล้ว พบว่ามีการสร้างโครงสร้างที่ใช้สำหรับแทงเข้าไปในพืช (Appressorium) รูปทรงหลายลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา บางชนิดมีรูปทรงไม่แน่นอน มีขอบเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวไม่สม่ำเสมอและตรงกลางของ Appressorium มีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล บางครั้งพบการสร้างกลุ่มก้อนที่เรียกว่า Sclerotia บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีน้ำตาลถึงสีดำ โดยสามารถแบ่งเชื้อรา *Colletotrichum* ออกเป็น 2 ลักษณะตามรูปร่างของโคนิเดียคือ โคนิเดียทรงกระบอกปลายมน (Straight-spored) และโคนิเดียรูปโค้งงอคล้ายเคียว (Falcate-spored) (Sutton, 1992; หทัยชนก คงแก้ว, 2546)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) จะมีเส้นใยเหนืออาหารเจริญฟูหนาแน่น เมื่อเชื้อยังอ่อนอยู่จะมีเส้นใยสีขาวเทา ต่อมาค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาและเป็นเทาแกมดำ ด้านใต้จานเพาะเลี้ยงโคโลนีจะมีสีเทาแก่ถึงดำ เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ประมาณ 1 สัปดาห์ จะเห็นโคนิเดียรวมกลุ่มเป็นหยดน้ำขุ่นๆ สีเหลืองอ่อน หรือสีชมพูอมส้ม เจริญเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้นๆ มี Setae ลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำปลายเรียวแหลมเกิดปะปน โคนิเดียเดี่ยวๆ มีลักษณะโค้ง คล้ายเคียว ปลายด้านหนึ่งแหลม ส่วนอีกด้านหนึ่งค่อนข้างมน ขนาดที่วัดได้ 2.59-3.9 x 18.13-31.08 ไมครอน (ธารทิพย์ และคณะ, 2547)

ชิตชนก (2557) ได้ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* 2 สปีชีส์ คือ *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในผลแก้วมังกร โดยศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. capsici* จะแสดงอาการของโรครุนแรงมากกว่าโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ลักษณะแผลจะแห้ง

เนื้อเยื่อยุบตัวลง เชื้อราสร้าง Acervulus บนแผล ภายใน Acervulus มีการสร้างโคนิเดียรูปร่างแบบ รัดดำ
ไม่เสี้ยว (Falcate) ส่วนปลายแหลม ไม่มีสี ไม่มีผนังกัน เชื้อรามีการสร้าง Setae สีดำชัดเจน ส่วนโรคใช้

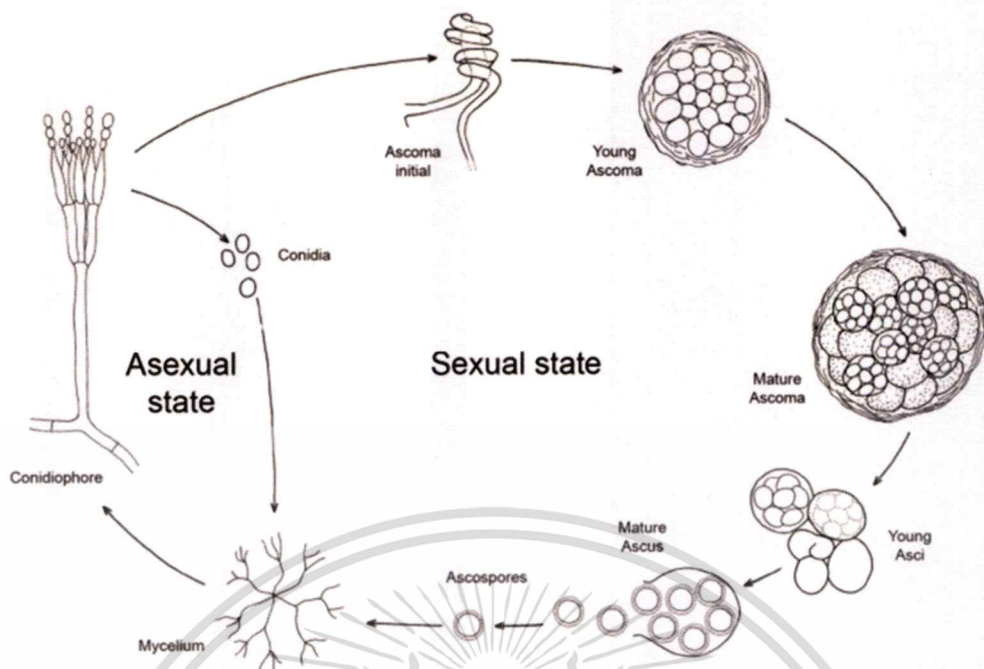
แอนแทรกโนสที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ลักษณะแผลจะฉ่ำน้ำ เชื้อราสร้างโคนิเดียมีรูปร่างแบบทรงกระบอกปลายมน (Rod shape) ไม่มีสี ไม่มีผนังกัน และศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ของแก้วมังกรตั้งแต่เริ่มเห็นตุ่มดอกจนถึงระยะก่อนการเก็บเกี่ยว พบเชื้อรา *C. gloeosporioides* เข้าทำลายที่ในระยะก่อนการเก็บเกี่ยวสูงสุดในผลอายุ 8 สัปดาห์ และพบเชื้อรา *C. capsici* เข้าทำลายสูงที่สุดในผลที่อายุ 7 สัปดาห์

สุตารัตน์ และเพชรรัตน์ (2552) ได้เก็บรวบรวมและคัดแยกเชื้อราสกุล *Colletotrichum* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. capsici* จะมีลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเส้นใยสีขาวถึงดำเข้ม ด้านหลังของโคโลนีเป็นสีน้ำตาลแก่ถึงดำ เส้นใยเจริญฟูหนา ตอนแรกจะมีสีขาวแล้วค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเทาหรือเทาดำ โคโลนีเจริญเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้นๆ สร้าง Aervulus มี Setae สีน้ำตาลเข้ม ปลายเรียวแหลม โคนิเดียรูปร่างเสี้ยวพระจันทร์ปลายแหลม (Falcate) ขนาด 19.4-24 x 2.73.5 ไมโครเมตร

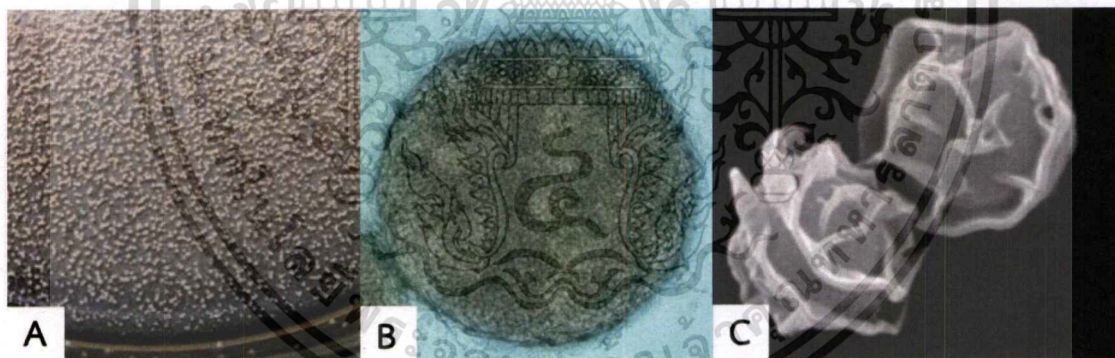
Calzada (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* คือ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในมะละกอ พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. capsici* คือ โคนิเดียมีรูปร่างเป็นวงกลม ขอบมีลักษณะเป็นคลื่น และมีสีเทาอ่อนไปจนถึงดำ มีกลุ่มก้อนของโคนิเดีย (Conidial masses) เป็นวงแบบ Concentric ring และมีโคนิเดียรูปร่างโค้งงอคล้ายเคียวปลายแหลม (Falcate)

2.3 ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุล *Neosartorya*

เชื้อราสกุล *Neosartorya* เป็นระยะสืบพันธุ์ของเชื้อสกุล *Aspergillus* ซึ่งจะมีการสร้างถุงทรงกลมขึ้นบนผิวหน้าอาหารเรียกว่า Ascocarp (รูปที่ 2.3) โดย Ascocarp เป็นแบบ Cleistothecium มีลักษณะคล้ายถุงปิดไม่มีช่องเปิด (รูปที่ 2.4A และ 2.4B) มีสีขาวถึงสีเหลืองจาง ถูกล้อมรอบด้วยผนังหนา ส่วน Ascospore มีรอยแยกแบ่งทำให้เห็นเป็นรอยนูนขึ้นมา (รูปที่ 2.4C) (Yaguchi และคณะ, 2010)



รูปที่ 2.3 แสดงการสืบพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Aspergillus*
(ที่มา : Wyatt, 2014)



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะ Ascocarp และ Ascospore ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* (A) ลักษณะ Ascocarp บนผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยง PDA (B) ลักษณะ Ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 40 เท่า (C) ลักษณะ Ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 40 เท่า

(ที่มา : นิติภาดาและดวงพร; Dyer & O' Gorman, 2011)

ปัจจุบันทั่วโลกมีรายงานว่าพบเชื้อสกุล *Neosartorya* จำนวน 42 สปีชีส์ (CABI, 2018) โดยพบแพร่กระจายทั่วไปในดินบริเวณต่างๆ รวมถึงอาหาร โดยสามารถคัดแยกเชื้อราชนิดนี้ด้วยการแช่ดินในเอกซแทรกต์และเอ็กสแทรกต์ที่เตรียมไว้เพื่อวิเคราะห์หาเชื้อราชนิดนี้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้การคัดแยกเชื้อราชนิดนี้ด้วยการแช่ดินในเอกซแทรกต์และเอ็กสแทรกต์ที่เตรียมไว้เพื่อวิเคราะห์หาเชื้อราชนิดนี้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้การคัดแยกเชื้อราชนิดนี้ด้วยการแช่ดินในเอกซแทรกต์และเอ็กสแทรกต์ที่เตรียมไว้เพื่อวิเคราะห์หาเชื้อราชนิดนี้

แอลกอฮอล์ ความร้อน หรืออาจใช้วิธีการเจือจางดิน แล้วเลี้ยงบนอาหารที่มีส่วนผสมของ Rose bengal

Eamvijan และคณะ (2009) แยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* จากดินแหล่งต่างๆ โดยใช้วิธีแช่ดิน ในแอลกอฮอล์และความร้อน เลี้ยงบนอาหาร Gochenaour's glucose ammonium nitrate agar (GAN) พบเชื้อราสกุล *Neosartorya* 9 สปีชีส์ ได้แก่ *N. fischeri* *N. graba* *N. spinosa* *N. hiratsukae* *N. takakii* *N. tatenoi* และเชื้อราสกุล *Neosartorya* เชื้อราที่พบมากได้แก่ *N. spinosa* (75 isolates) รองลงมาได้แก่ *N. fischeri* เมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* จำนวน 9 สปีชีส์ดังกล่าวกับราสาเหตุโรคพืชบนอาหารเพาะเลี้ยง PDA ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อราสกุล *Neosartorya* ทุกสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ได้

เลขา และคณะ (2553) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Emericella*, *Eurotium* และ *Neosartorya* จากดิน โดยเก็บตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆแล้วนำมาแยกด้วยวิธี Alcohol treatment และ Heat treatment บนอาหาร Glucose ammonium nitrate agar (GAN) แล้วจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

กมลวรรณ และคณะ (2557) ได้ทำการสกัดสารทุติยภูมิจากเอนโดไฟท์ จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Talaromyces trachyspermus* (KUFA 35) *Eurotium chevarii* (KUFA 39) เชื้อราสกุล *Neosartorya* (KUFA 41 และ 47) และเชื้อราสกุล *Nigrospora* (KUFA 51) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดที่ความเข้มข้น 10,000 1,000 100 10 และ 1 ppm ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่าสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* (KUFA 47) ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. capsici* ได้ 38.89% และที่ 10,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 60.37% ส่วนสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* (KUFA 41) ที่ 10,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. capsici* ได้ถึง 100%

Dethoup และคณะ (2015) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย Ethyl acetate จากเชื้อรา 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Emericella nidulans* (KUFA 0104) *Hamigera avellanea* (KUFA 0106) *Neosartorya fischeri* (KUFA 0107) *N. pseudofischeri* (KUFA 0108) และ *Talaromyces trachyspermus* (KUFA 0021) ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชที่สำคัญ 10 ชนิด พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. fischeri* (KUFA 0107) และ *N. pseudofischeri* (KUFA 0108) ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. capsici* 100% และ 73.7% ตามลำดับ

Jantasorn และคณะ (2016) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก Ethyl acetate ของเชื้อรา *Talaromyces flavus* Bodhi003, *Neosartorya fischeri* Bodhi004 และ *Eurotium* sp. Bodhi005 ที่แยกได้จากดินในป่าโกงกาง เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค 10 ชนิดภายใต้สภาวะ *in vitro* โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. fischeri* Bodhi004 ที่ความ

เข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* ได้มากกว่า 50%

2.4 การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Biological Control)

การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี คือ การใช้สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค เพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เรียกว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกการยับยั้งหรือควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชอยู่ 4 รูปแบบคือ 1.การทำลายชีวิต (Antibiosis) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถทำลายเชื้อโรค 2.การแข่งขัน (Competition) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการเจริญเติบโตแข่งขันกับเชื้อโรคพืช ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตทำลายพืช 3.การเป็นปรสิต (Parasitism) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถในการเข้าไปเจริญอาศัยในเชื้อโรคพืชแล้วคอยดูดกินอาหาร ทำให้เชื้อโรคพืชอ่อนแอและตายในที่สุด 4.การชักนำให้ต้านทานต่อโรค (Induced host resistance) เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีความสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค

ปัจจุบันมีนักวิจัยและนักวิชาการของไทยได้ศึกษาค้นคว้าหาเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมโรคพืชกับพืชหลายชนิดได้ ทั้งที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส และยังพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมโรคเหล่านี้ โดยสามารถนำไปพัฒนาผลิตเผยแพร่ หรือผลิตเป็นชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ได้ สิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้ควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ 1.เชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย เป็นเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีประสิทธิภาพในด้านการควบคุมโรคได้ดี ปัจจุบันมีการผลิตใช้หรือจำหน่ายมาก 2.เชื้อไวรัสและไส้เดือนฝอย เป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้ได้ดีกับการกำจัดแมลงศัตรูพืชมากกว่าเชื้อโรคพืช โดยจะทำลายหนอนหรือตัวอ่อนของแมลงศัตรูพืช 3.พืช มีการนำพืชหลายชนิดมาใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยปลูกเพื่อขับไล่หรือทำลายศัตรูพืชทั้งโรคและแมลง

การควบคุมโรคพืชมีอยู่หลายวิธี แต่วิธีที่เกษตรกรชอบใช้คือ การใช้สารเคมี ซึ่งเป็นวิธีที่มีข้อเสียหลายอย่างคือ สารเคมีที่ใช้ อาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค รวมถึงยังอาจเป็นอันตรายต่อแมลงและจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ นอกจากนี้สารเคมียังสามารถสะสมก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในปัจจุบันจึงหันมาใช้การควบคุมโรคพืชด้วยวิธีชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม (นิพนธ์, 2553)

จากการสำรวจของเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Thailand Pesticide Alert Network: Thai-PAN) ในการประชุมการประชุมวิชาการเพื่อเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ประจำปี 2559 มีรายงานว่าในพริกแดงพบสารตกค้างจากตัวอย่างที่สุ่มเก็บมาทั้งหมดรวม 35 ชนิด และมีค่าเกินมาตรฐาน MRLs (Maximum Residue Limits) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่สามารถมีได้ในผัก-ผลไม้ รวมไปถึงสินค้าเกษตรอื่นๆ ที่อาจมีการตกค้างจากสารเคมีเกษตร ถึง 100% (Thai-PAN, 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพริกจากตลาดในกรุงเทพมหานคร จังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดระยอง จังหวัดชุมพร เพื่อใช้คัดแยกเชื้อรา *Colletotrichum capsici* โดยมีตัวอย่างจากตลาดในกรุงเทพฯ 8 ตัวอย่าง ตลาดในจังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดระยอง และจังหวัดชุมพร จังหวัดละ 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดเป็น 14 ตัวอย่าง และตัวอย่างเชื้อรา *C. capsici* บริสุทธิ์ที่ได้รับ ความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม 1 ตัวอย่าง และได้รับตัวอย่างดินจากจังหวัดชุมพร เพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* จำนวน 3 ตัวอย่างจาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.2.1.1 ยาปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย Streptomycin

3.2.1.2 สีย้อม Lactophenol cotton blue

3.2.1.3 อาหาร Potato dextrose agar (PDA)

3.2.1.4 อาหาร Potato dextrose broth (PDB)

3.2.1.5 อาหาร Rose bengal agar base

3.2.1.6 อาหาร Water agar (WA)

3.2.1.7 Distiled water

3.2.1.8 Ethyl alcohol 60%

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด DNA และเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

3.2.2.1 Absolute ethanol

3.2.2.2 Agarose gel

3.2.2.3 10X Standard *Taq* reaction buffer

3.2.2.4 6X Gel loading Dye

3.2.2.5 β -mercaptoethanol

3.2.2.6 Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)

3.2.2.7 Chloroform

3.2.2.8 Deionized water (DI water)

3.2.2.9 Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs)

3.2.2.10 DNA ladder ขนาด 100 คู่เบส (Vivantis, Malaysia)

- 3.2.2.11 DNA ladder ขนาด 1 กิโลเบส (Vivantis, Malaysia)
- 3.2.2.12 Ethidium bromide
- 3.2.2.13 Ethyl alcohol 70%
- 3.2.2.14 Isoamyl alcohol
- 3.2.2.15 Isopropanol
- 3.2.2.16 Liquid nitrogen
- 3.2.2.17 Magnesium chloride ($MgCl_2$)
- 3.2.2.18 Primer ในตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้กับเชื้อรา *C. capsici* และ β -tubulin ใช้กับเชื้อราสกุล *Neosartorya* โดยมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 Primer ที่ใช้ในเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White และคณะ (1990)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
Bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	เมอมร (2558)
Bt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'	

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

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสาร

3.2.3.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.2.3.2 Ethyl acetate

3.2.3.3 Hexane

3.2.3.4 Methanol

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 Agarose gel electrophoresis

3.3.2 Alcohol lamp

3.3.3 Autoclave

3.3.4 Buchner funnel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่าการพิมพ์หรือการเผยแพร่ในรูปแบบใดก็ตาม ให้ติดต่อแจ้งเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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 Fume Hood
- 3.3.11 Gel documentation system
- 3.3.12 Golves
- 3.3.13 Heat box
- 3.3.14 Hemacytometer
- 3.3.15 Hot air oven
- 3.3.16 Incubator
- 3.3.17 Laminar air flow
- 3.3.18 Light microscope
- 3.3.19 Microcentrifuge
- 3.3.20 Micropipette
- 3.3.21 Mini run gel electrophoresis system
- 3.3.22 Mortar และ Pestle
- 3.3.23 Needle
- 3.3.24 Parafilm
- 3.3.25 Petri dishes ขนาด 90 60 และ 50 มิลลิเมตร
- 3.3.26 Pipette Tips
- 3.3.27 Plastic Box Heat Resistant
- 3.3.28 Refrigerator
- 3.3.29 Rotary vacuum evaporator
- 3.3.30 Shaker
- 3.3.31 Slide และ Cover glass
- 3.3.32 Spatula
- 3.3.33 Spin down
- 3.3.34 Stereo microscope
- 3.3.35 Suction flask
- 3.3.36 Syringe
- 3.3.37 Test tube ขนาด 20 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะในรูปแบบใดก็ตาม อีกทั้งห้ามมิให้ใช้เอกสารนี้เพื่อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.38 Thermal cycler
- 3.3.39 Tissue culture bottle
- 3.3.40 Tube ขนาด 2, 1.5 และ 0.5 มิลลิลิตร
- 3.3.41 Vacuum pump
- 3.3.42 Vernier
- 3.3.43 Vortex
- 3.3.44 Water bath
- 3.3.45 Whatman no.1

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การคัดแยกเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum capsici*

คัดแยกเชื้อราก่อโรค *C. capsici* ดัดแปลงวิธีการจาก Shivas and Beasley (2547) โดยนำตัวอย่างพริกที่มีอาการของโรคมาทำการบ่มใน Moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เชื้อเจริญได้เต็มที่ ส่องตัวอย่างพริกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอทุกวัน เพื่อสังเกตสปอร์ของเชื้อ เมื่อสังเกตเห็นสปอร์ของเชื้อเกิดขึ้นจึงใช้ปลายเข็มเขี่ยสปอร์ของเชื้อขึ้นมาวางลงในอาหาร Water agar (WA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วันจากนั้นทำการตัดบริเวณปลายเส้นใยแล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกเชื้อโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ลักษณะโคโลนี ลักษณะของ Setae และโคนิเดีย) และเขี่ยกลุ่มเส้นใยของเชื้อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้งโดยใช้วิธี single spore isolation เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในขวด slant PDA เพื่อนำไประบุสายพันธุ์ของเชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.4.2 การคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* จากดิน

คัดแยกแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วย 3 วิธี ได้แก่ Alcohol treatment method, Heat treatment method และ Dilution pour plate ดังต่อไปนี้

3.4.2.1 Alcohol treatment method (ดัดแปลงวิธีการจาก เลขา และคณะ, 2553)

ชั่งดิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดทดลองแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร เติม Ethyl alcohol 60% ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที รินเอทิลแอลกอฮอล์ทิ้ง ใช้ช้อนตักสาร (spatula) ตักดินใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เทอาหาร Rose bengal agar base ที่ผสมยาปฏิชีวนะต้านแบคทีเรีย Streptomycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยง หมุนเบาๆ ให้เม็ดดินกระจายทั่ว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด และคว่ำจานเพาะเลี้ยง สังเกตจานเพาะเลี้ยงทุกวัน เมื่อโคโลนีของเชื้อเจริญขึ้นบนผิวหน้าอาหาร ใช้เข็มเขี่ยโคโลนีมาเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกเชื้อโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ลักษณะและสีของโคโลนี ลักษณะและขนาดของ Cleistothecium Ascus และ Ascospore) เขี่ยกลุ่มเส้นใยของเชื้อ

นำเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 30 วัน และเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นใช้ซ็อนตักสาร ตักเส้นใยที่บดแล้วลงในหลอดทดลองขนาด 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 หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม 10% CTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำการสกัดอีกครั้งโดยเติม Chloroform : Isoamyl (24:1, v/v) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Isopropanol ที่เย็นลงไปเท่ากับปริมาตรส่วนใสที่ดูด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติม Ethyl alcohol 70% ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม Absolute ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนด้านล่างหลุดแห้ง เมื่อแห้งแล้วนำมาเติม TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน แล้วจึงนำมาเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ในขั้นตอนต่อไป

3.4.4.2 การตรวจสอบคุณภาพ DNA ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA ที่สกัดได้โดยวิธี Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน ขนาด 1 กิโลเบส (Vivantis) ทำโดยผสม DNA ที่สกัดได้จากข้อ 3.4.4.1 ปริมาตร 3 ไมโครลิตรกับ 3X Dye ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงหลุมบน 1% Agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่อยู่ภายใต้เครื่อง Mini run gel electrophoresis system เปิดกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที ล้างแผ่นเจลด้วยแช่ในน้ำกลั่น 5 นาที หลังจากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel documentation system)

3.4.4.3 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำ DNA เชื้อราที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่อง Thermal cycler (Biometra T1 thermocycler) โดยเชื้อราก่อโรค *C. capsici* จะทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้คู่ Primer ITS1 และ ITS4 ส่วนเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* จะเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ β -tubulin โดยใช้คู่ Primer Bt2a และ Bt2b ดัง

ตารางที่ 3.1 ในการเพิ่มปริมาณ DNA มีปริมาตรสารทั้งหมดในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5000 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 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Magnesium chloride (MgCl₂) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ Deionized water (DI water) ปริมาตร 14.05 ไมโครลิตร ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณในตำแหน่ง ITS แสดงดังตารางที่ 3.2 และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณในตำแหน่ง β -tubulin แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) (Calzada และคณะ, 2014)

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

ตารางที่ 3.3 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ในบริเวณ β -tubulin (เมอมร, 2558)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	3 นาที	} 1 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Denaturation	95	30 วินาที	} 35 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Denaturation	95	30 วินาที	} 1 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Final extension	72	1 นาที	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (Vivantis) โดยใช้ 1% Agarose gel ใน 1X TBE buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำตามวิธีการในข้อ 3.4.4.2

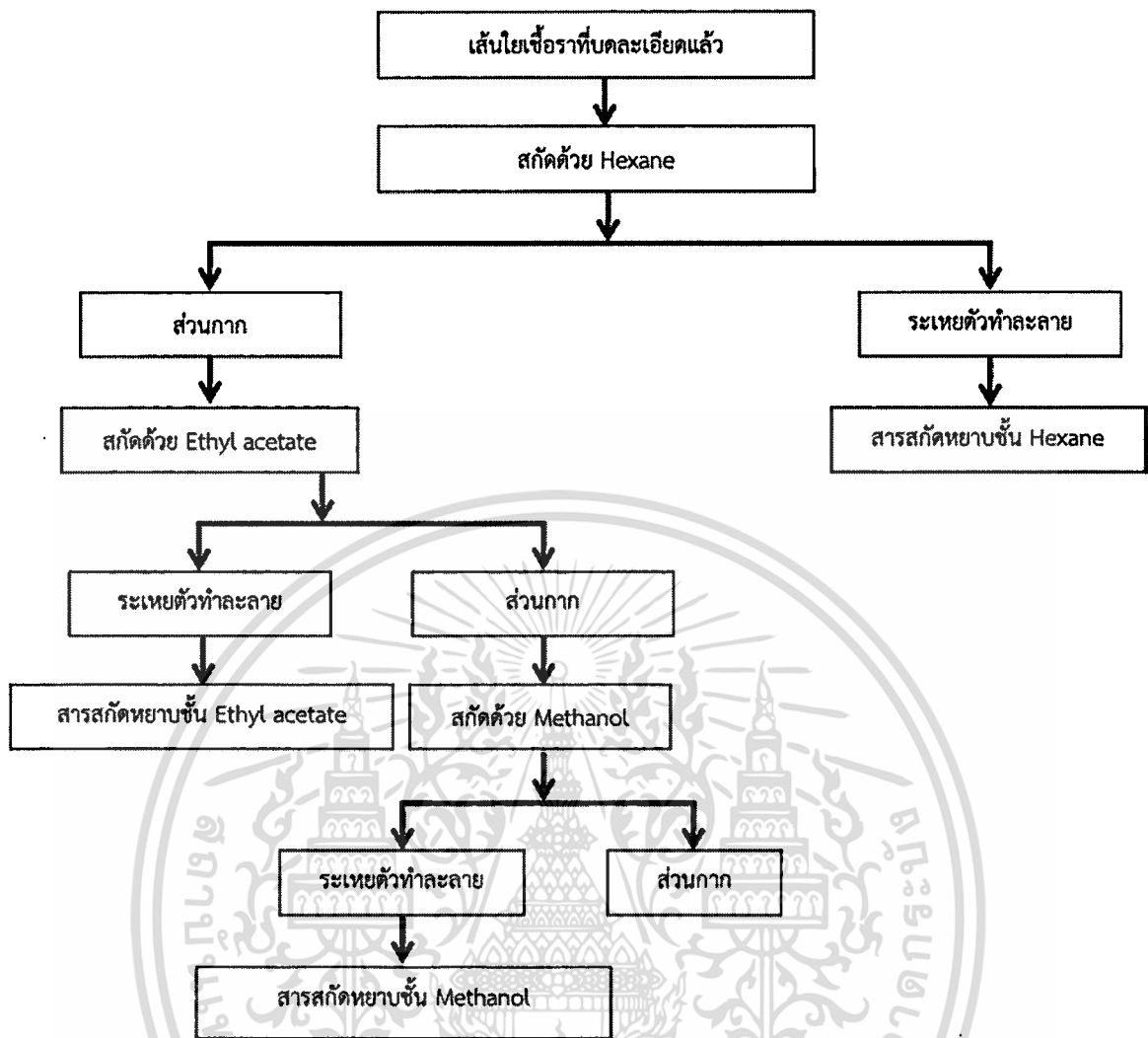
3.4.4.4 การหาความสัมพันธ์ของเชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

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

3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของเชื้อต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum capsici*

3.4.5.1 การสกัดสาร

เพิ่มปริมาณเส้นใยของเชื้อราสกุล *Neosartorya* เพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยของเชื้อ โดยการใช้ปลายทิวป Cork เชื้อราจากอาหาร PDA ที่อายุ 10 วันลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีอาหารเพาะเลี้ยง Potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำเส้นใยและอาหารมาอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจนแห้ง แล้วนำมาบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่น จากนั้นห่อผงที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปแช่ในตัวทำละลาย Hexane บนเครื่องเขย่า Rotary shaker เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำออกไปแช่ด้วยตัวทำละลายที่ขั้วสูงขึ้นไปได้แก่ Ethyl acetate และ Methanol ตามลำดับ โดยแช่เป็นเวลา 4 วันบนเครื่องเขย่า Rotary shaker เช่นเดียวกับตัวทำละลาย Hexane (รูปที่ 3.1) หลังจากที่ได้สารละลายแต่ละชั้นแล้วจะนำไปกรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary vacuum evaporator จนได้สารสกัดหยาบออกมา ทำให้สารสกัดหยาบแห้งด้วยโถดูดความชื้น (Desiccator) เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อไป



รูปที่ 3.1 แผนผังแสดงลำดับในการสกัดสารสกัดหยาดของเชื้อราสกุล *Neosartorya*

3.4.5.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาดต่อการควบคุมเชื้อราก่อโรค

C. capsici ด้วยวิธี Poison plate

ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาดเชื้อราสกุล *Neosartorya* ในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *C. capsici* โดยนำสารสกัดหยาดชั้น Hexane Ethyl acetate และ Methanol ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 มาละลายด้วยตัวทำละลาย 2% DMSO (Dimethyl sulfoxide) โดยละลายให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งเป็นการควบคุมในแต่ละการทดลอง โดยทำการทดลองแบบ 3x6 Factorial experiment ใน CRD จำนวน 3 ซ้ำ

ปัจจัย A คือ ชนิดของสารสกัด ดังนี้

A1 = สารสกัดหยาดชั้น Hexane

A2 = สารสกัดหยาดชั้น Ethyl acetate

A3 = สารสกัดหยาดชั้น Methanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด ดังนี้

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 10 ppm

B3 = ความเข้มข้น 50 ppm

B4 = ความเข้มข้น 100 ppm

B5 = ความเข้มข้น 500 ppm

B6 = ความเข้มข้น 1000 ppm

จากนั้นนำสารสกัดหยาบแต่ละชั้นที่ละลายด้วย 2% DMSO ที่ได้คำนวณปริมาตรตามความเข้มข้นที่กำหนดแล้วนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้ จากนั้นให้นำขวดอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบแล้ว ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากที่ได้แล้วนำมาเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อขนาด 60 มิลลิเมตร ย้ายชิ้นส่วนของเชื้อ *C. capsici* จากจานเพาะเลี้ยงอาหาร PDA ที่มีอายุ 30 วัน โดยที่ใช้ปลายทิว Cork มาวางลงกลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและทำการนับสปอร์ของเชื้อราสาเหตุของโรคด้วย Hemacytometer แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโลนีและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ ดังสมการ

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

GI = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition)

R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อที่ 0 ppm (ตัวควบคุม)

R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อในแต่ละความเข้มข้น

ทำการวิเคราะห์ข้อมูล โดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 24 และคำนวณค่า effective dose ที่ 50% (ED₅₀) ด้วยโปรแกรม GraphPad prism

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

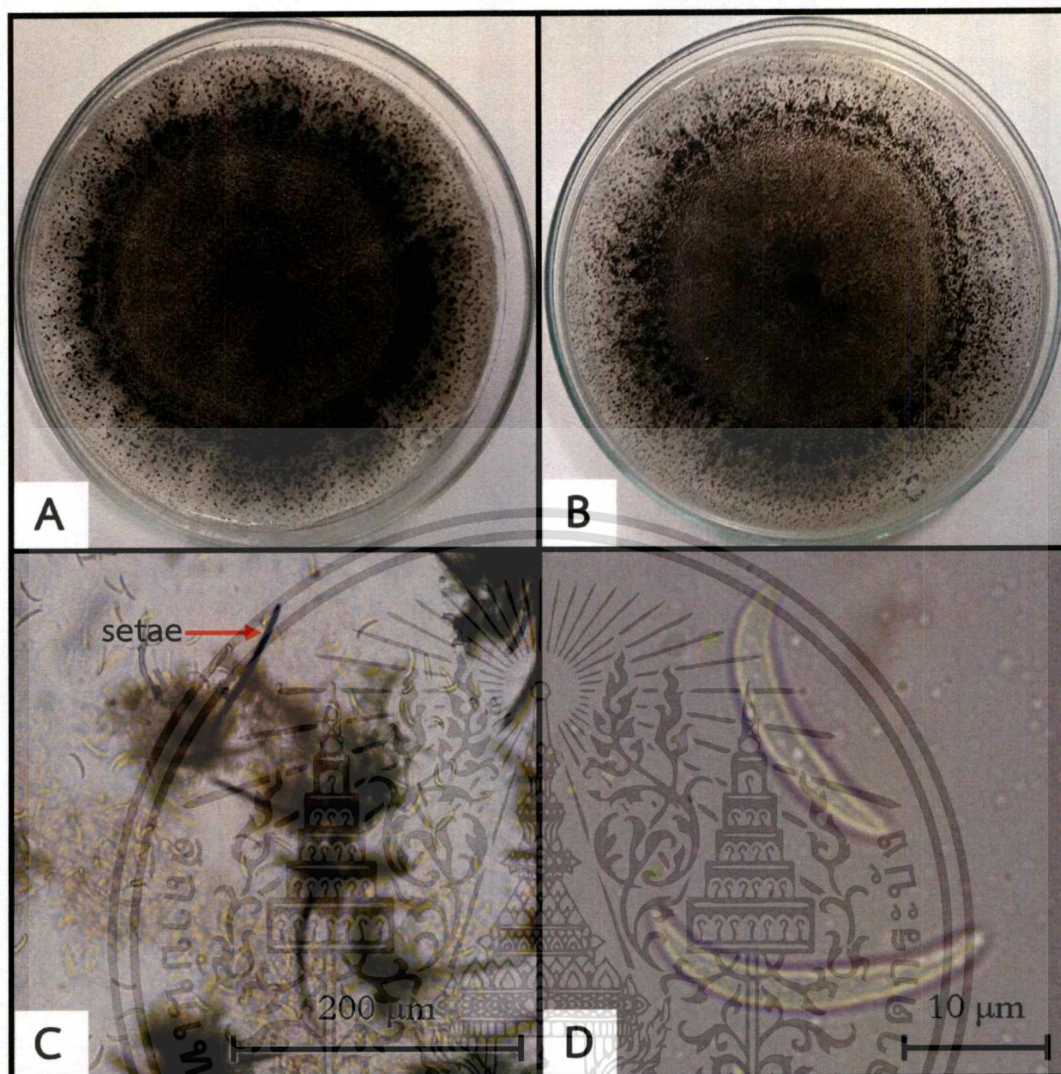
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.1.1 การคัดแยกเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum capsici*

จากการคัดแยกเชื้อราก่อโรค *C. capsici* เบื้องต้นได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราก่อโรค *C. capsici* บริสุทธิ์จาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม มา 1 ตัวอย่างคือ ไอโซเลต CC1 และทำการคัดแยกเพิ่มจากตัวอย่างพริกที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากตลาดในจังหวัดกรุงเทพมหานคร 8 ตัวอย่าง ปราชินบุรี 2 ตัวอย่าง ระยอง 2 ตัวอย่าง และชุมพร 2 ตัวอย่าง รวม 14 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 2 ไอโซเลต คือ BK4 และ BK14 (BK = ตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากกรุงเทพมหานคร, 4 และ 14 = ลำดับการคัดแยก) หลังจากทำให้เชื้อบริสุทธิ์และทำการเพิ่มปริมาณเชื้อแล้ว นำเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 30 วันมาศึกษาลักษณะของโคโลนี ลักษณะ Setae และโคนินเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยการย้อมสี Lactophenol cotton blue

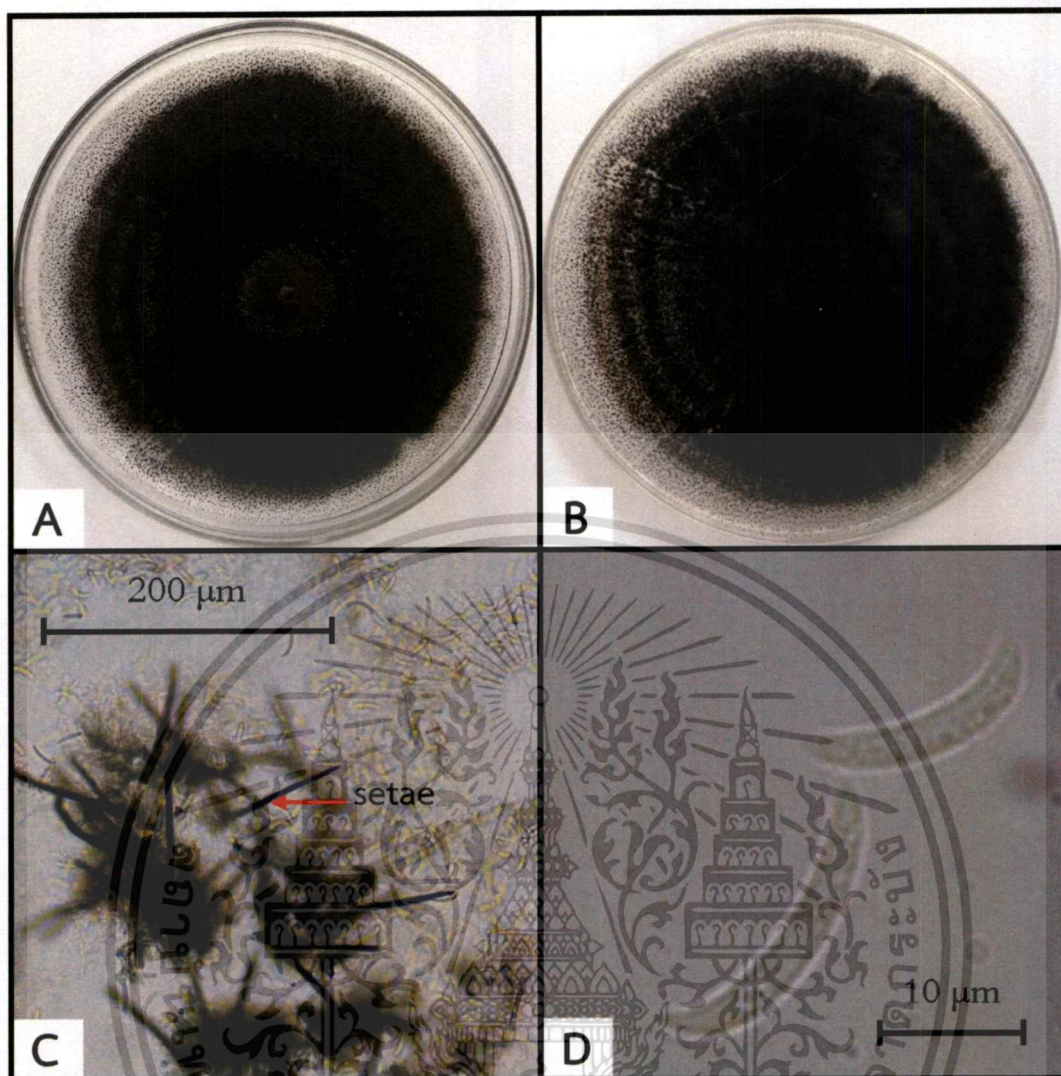
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต CC1 แสดงให้เห็นถึงลักษณะของโคโลนีทางด้านหน้าเพลท (รูป 4.1A) และด้านหลังเพลท (รูป 4.1B) โดยลักษณะโคโลนีจะมีสีเทา ดำเรียงซ้อนกันเป็นวง มีหยดน้ำสีส้มอยู่ตรงกลางของโคโลนี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 89.52 มิลลิเมตร Setae มีลักษณะเป็นเส้นสีดำปลายแหลมงอกออกมาจากกลุ่มก้อนของโคนินเดีย (รูปที่ 4.1C) และโคนินเดียเดี่ยวมีลักษณะโค้งงอคล้ายเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว (รูปที่ 4.1D) มีขนาดโคนินเดียเท่ากับ $1.92-4.1 \times 14.12-24.42$ ไมโครเมตร



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ไอโซเลต CC1
 A: ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้าเพลท; B: ลักษณะโคโลนีทางด้านหลังเพลท; C: ลักษณะ
 Setae ที่กำลังขยาย 40 เท่า; D: ลักษณะโคนิเดีย ที่กำลังขยาย 100 เท่า

สำหรับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต BK4 ที่ได้ทำการคัดแยกลักษณะของโคโลนีทางด้านหน้าเพลท (รูปที่ 4.2A) และด้านหลังเพลท (รูปที่ 4.2B) โคโลนีจะมีสีเทาดำซ้อนกันเป็นวง มีหยดน้ำสีส้มอยู่ตรงกลางโคโลนี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 87.03 มิลลิเมตร Setae มีลักษณะเป็นเส้นสีดำปลายแหลม (รูปที่ 4.2C) และโคนิเดียเดี่ยวมีลักษณะโค้งงอคล้ายเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว (รูปที่ 4.2D) มีขนาดเท่ากับ $1.92-4.31 \times 10.35-29.47$ ไมโครเมตร

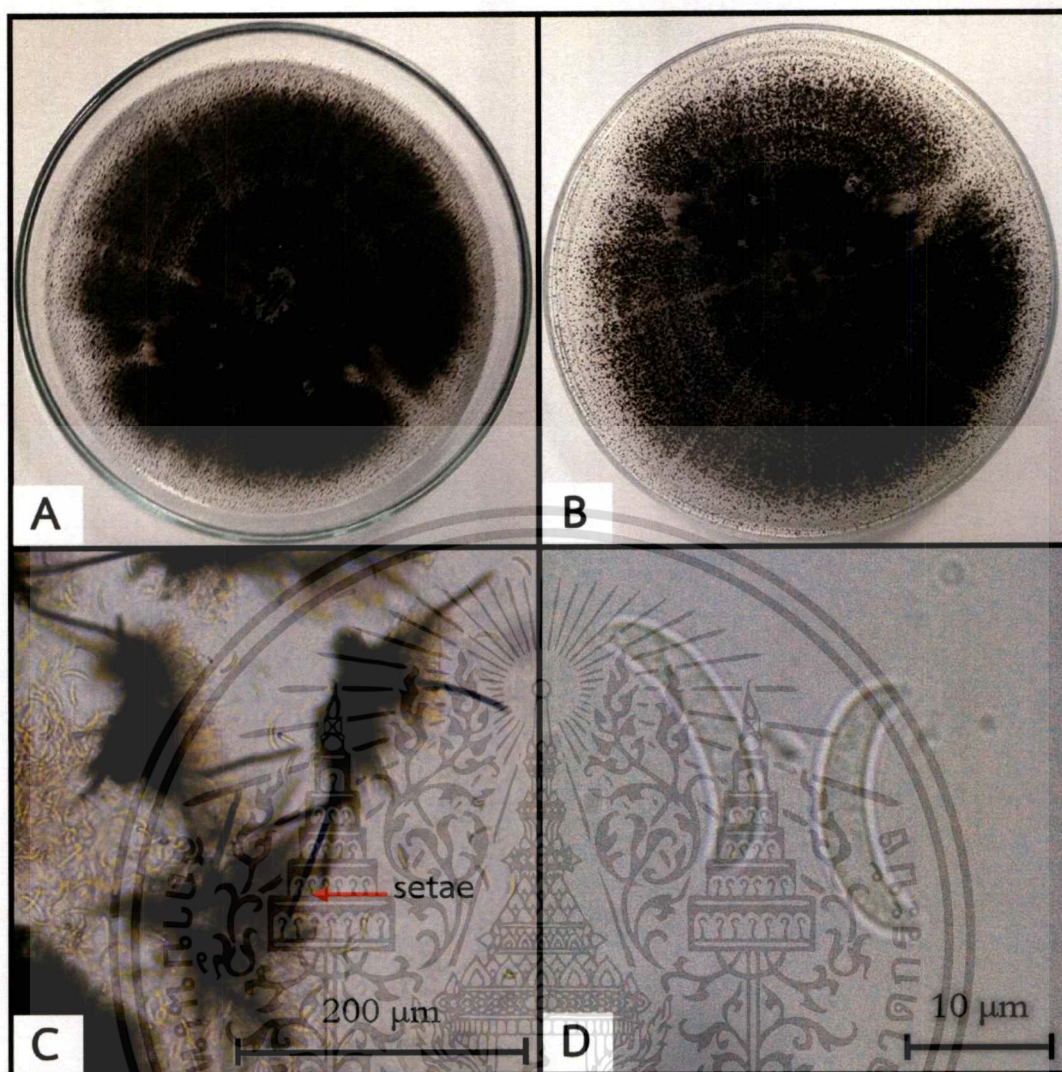
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ไอโซเลต BK4
 A: ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้าเพลท; B: ลักษณะโคโลนีทางด้านหลังเพลท; C: ลักษณะ Setae ที่กำลังขยาย 40 เท่า; D: ลักษณะโคนินเดี่ยว ที่กำลังขยาย 100 เท่า

และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต BK14 ลักษณะของโคโลนีทางด้านหน้าเพลท (รูปที่ 4.3A) และด้านหลังเพลท (รูปที่ 4.3B) โคโลนีจะมีสีเทาดำเรียงซ้อนกันเป็นวง มีหยดน้ำสีส้มอยู่ตรงกลางของโคโลนี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 83.61 มิลลิเมตร Setae มีลักษณะเป็นเส้นสีดำปลายแหลม (รูปที่ 4.3C) และโคนินเดี่ยวมีลักษณะโค้งงอคล้ายเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว (รูปที่ 4.3D) มีขนาดเท่ากับ $1.89-3.84 \times 10.35-26.38$ ไมโครเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ไอโซเลต BK14 A: ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้าเพลท; B: ลักษณะโคโลนีทางด้านหลังเพลท; C: ลักษณะ Setae ที่กำลังขยาย 40 เท่า; D: ลักษณะโคนินเดีย ที่กำลังขยาย 100 เท่า

จะเห็นได้ว่าเชื้อราก่อโรค *C. capsici* ที่แยกได้จำนวน 2 ไอโซเลตคือ BK4 และ BK14 มีลักษณะที่เหมือนกันกับไอโซเลต CC1 ที่เป็นเชื้อรา *C. capsici* บริสุทธิ์ มีลักษณะคือ โคโลนีมีสีเทาไปจนถึงดำ มี Setae ที่มีลักษณะเป็นเส้นสีดำปลายแหลมงอกออกมาจากกลุ่มก้อนของโคนินเดีย (Conidiamass) มีลักษณะและขนาดของโคนินเดียที่ใกล้เคียงกัน (ดังแสดงในตารางที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Calzada (2012) ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* โดยระบุไว้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. capsici* คือโคโลนีมีรูปร่างเป็นวงกลม สีเทาอ่อนไปจนถึงดำ มีกลุ่มก้อนของโคนินเดีย (Conidia masses) เป็นวงแบบ Concentric ring และโคนินเดียรูปร่างโค้งงอคล้ายเคียวปลายแหลม (Falcate) และงานวิจัยของเพชรรัตน์ (2552) ก็ยังได้ระบุไว้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. capsici* จะมีลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนใช้

อาหาร PDA เป็นเส้นใยสีขาวถึงดำเข้ม ด้านหลังของโคโลนีเป็นสีน้ำตาลแก่ถึงดำ เส้นใยเจริญฟูหนา เมื่อยังอ่อนมีสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีเทาหรือเทาดำ เจริญเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้นๆ สร้างหยดน้ำสีส้ม (Acervulus) มี Setae สีน้ำตาลเข้มปลายเรียวแหลม และมีโคนเดี่ยวรูปเสี้ยวพระจันทร์ปลายแหลม (Falcate) ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Calzada (2012)

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรค *C. capsici*

ไอโซเลต	สีโคโลนี	รูปร่าง โคโลนี	ขนาดโคโลนี ± SE (มิลลิเมตร)	รูปร่าง โคนเดี่ยว	ขนาด โคนเดี่ยว ± SE (ไมโครเมตร)
CC1	เทาดำ	ซ้อนกันเป็นวง	89.52 ± 0.31	โค้งงอคล้ายเคียวหรือ พระจันทร์เสี้ยว	1.92-4.1 × 14.12-24.42 ± 0.84
BK4	เทาดำ	ซ้อนกันเป็นวง	87.03 ± 0.70	โค้งงอคล้ายเคียวหรือ พระจันทร์เสี้ยว	1.92-4.31 × 10.35-29.47 ± 0.80
BK14	เทาดำ	ซ้อนกันเป็นวง	83.61 ± 0.48	โค้งงอคล้ายเคียวหรือ พระจันทร์เสี้ยว	1.89-3.84 × 10.35-26.38 ± 0.81

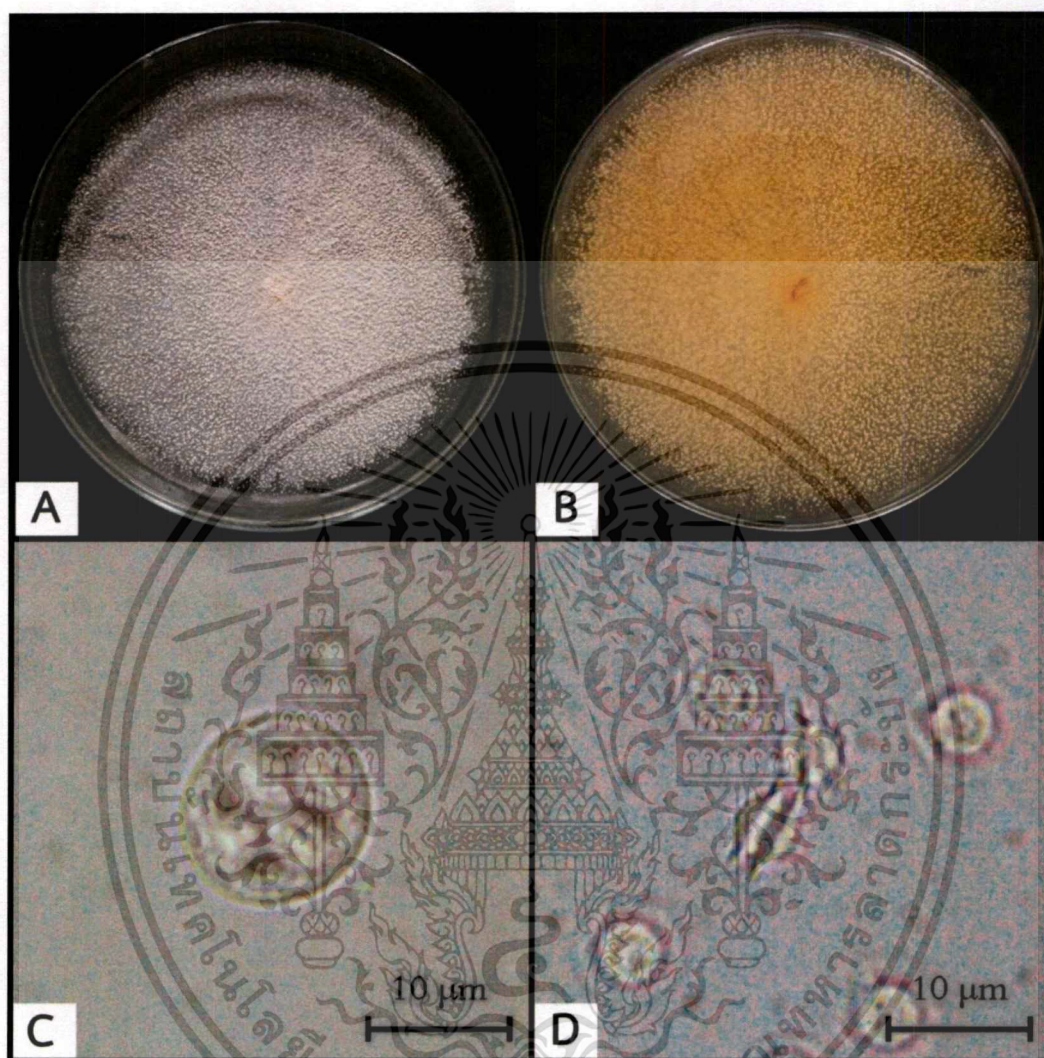
4.1.2 การคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* จากดิน

จากการคัดแยกเชื้อราต่อต้าน *Neosartorya* จากดินจำนวน 3 ตัวอย่างที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม สามารถคัดแยกเชื้อราได้จำนวน 2 ไอโซเลต คือ CHA23H11 และ CHA23H21 หลังจากทำให้เชื้อบริสุทธิ์และทำการเพิ่มปริมาณเชื้อแล้ว นำเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 7 วันมาทำการสังเกตลักษณะของโคโลนีและลักษณะ Cleistothecium Ascus และ Ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยการย้อมสี Lactophenol cotton blue

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H11 โดยลักษณะโคโลนีด้านหน้าเพลท (รูปที่ 4.4A) และหลังเพลท (รูปที่ 4.4B) มีขนาดโคโลนีเท่ากับ 83.34 มิลลิเมตร และจะสังเกตว่าบนผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยง PDA มี Ascocarp ที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมขนาดเล็ก สีเหลืองอ่อนเจริญอยู่บนผิวหน้า และเมื่อนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะเป็นทรงกลมปิด ภายในจะมี Ascus ที่มีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดเท่ากับ 9.39-14.4 × 9.12-14.53 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.4C) และภายในบรรจุ Ascospore ที่มีลักษณะเป็นทรงกลม มีเส้น 2 เส้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่มอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

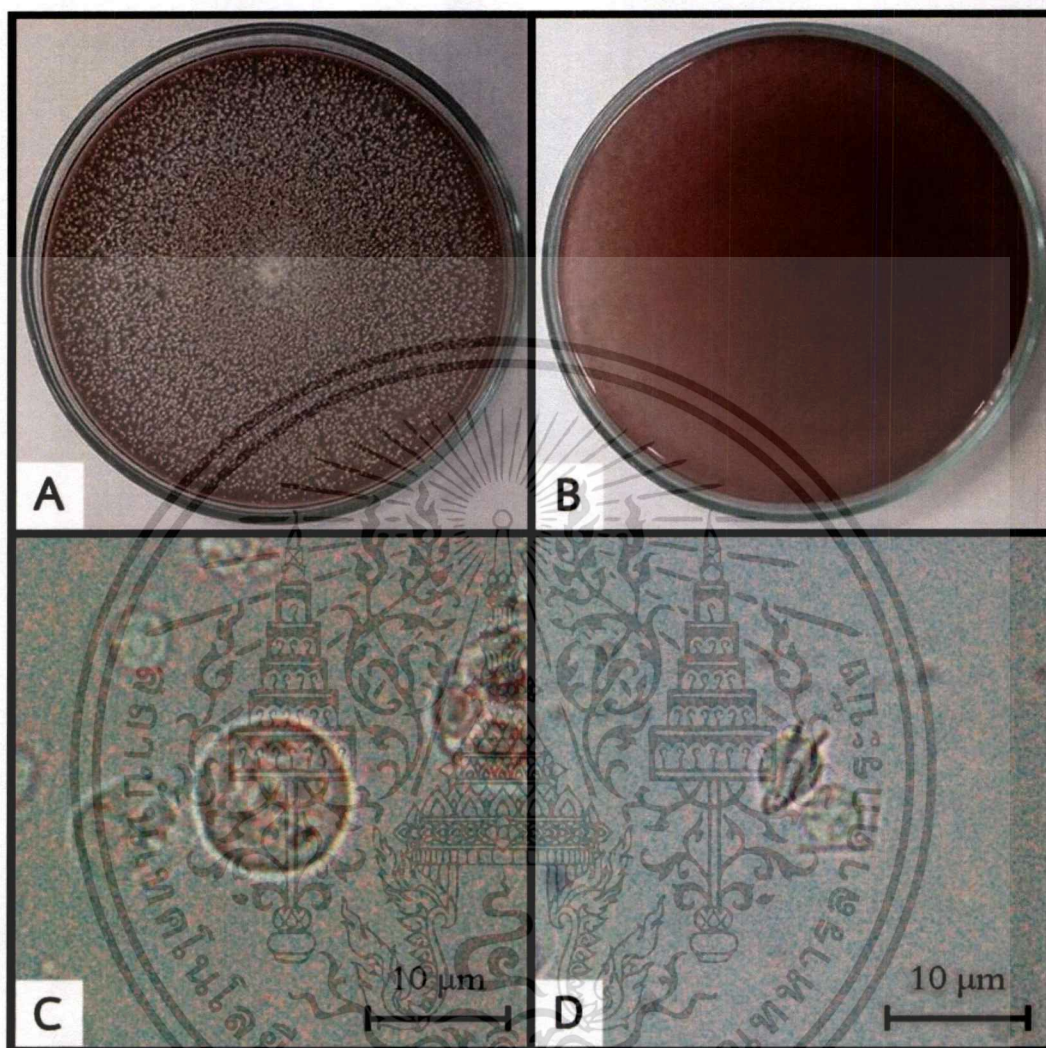
ขึ้นมาจากพื้นผิวทำให้เห็นเป็นร่องตรงกลางของ Ascospore คล้ายกับมีวงแหวนล้อมรอบและขนาดของ Ascospore เท่ากับ $3.5\text{-}5.32 \times 3.48\text{-}5.76$ ไมโครเมตร (รูปที่ 4.4D)



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H11
A: ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้าเพลท; B: ลักษณะโคโลนีทางด้านหลังเพลท; C: ลักษณะ Ascus ที่กำลังขยาย 100 เท่า; D: ลักษณะ Ascospore ที่กำลังขยาย 100 เท่า

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H21 ลักษณะโคโลนีด้านหน้าเพลท (รูปที่ 4.5A) และหลังเพลท (รูปที่ 4.5B) โดยมีขนาดโคโลนี 78.33 มิลลิเมตร และสีของอาหารเพาะเลี้ยง PDA มีสีเปลี่ยนไปจากสีเหลืองไปเป็นสีม่วงแดง และสังเกตเห็น Ascocarp ที่ลักษณะเป็นเม็ดกลมสีขาวขนาดเล็ก เจริญอยู่บนผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยง และเมื่อนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะเป็นถุงทรงกลมปิด ที่ภายในจะมี Ascus ที่มีลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดเท่ากับ $7.69\text{-}11.98 \times 8.77\text{-}11.84$ ไมโครเมตร (รูปที่ 4.5C) และภายในบรรจุ Ascospore ที่มีลักษณะเป็นทรงกลมมีเส้น 2 เส้นพุ่งขึ้นมาจากผิว ทำให้เห็นเป็นร่องตรงกลางของ

Ascospore คล้ายกับมีวงแหวนล้อมรอบ และขนาดของ Ascospore เท่ากับ $3-4.82 \times 3.46-5.02$ ไมโครเมตร (รูป 4.5D)



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H21
 A: ลักษณะโคโลนีทางด้านหน้าเพลท; B: ลักษณะโคโลนีทางด้านหลังเพลท; C: ลักษณะ Ascus ที่กำลังขยาย 100 เท่า; D: ลักษณะ Ascospore ที่กำลังขยาย 100 เท่า

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* ทั้ง 2 ไอโซเลต มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน คือมีการสร้าง Ascocarp ขึ้นบนผิวหน้าอาหาร มี Ascus ที่เป็นทรงกลม และมี Ascospore ที่มีลักษณะเป็นทรงกลมมีเส้น 2 เส้นนูนขึ้นมาจากผิว ทำให้เห็นเป็นร่องตรงกลางของ Ascospore คล้ายกับมีวงแหวนล้อมรอบ แต่ไอโซเลต CHA23H21 สีของอาหารเพาะเลี้ยง PDA จะเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีม่วงแดง (ดังแสดงในตารางที่ 4.2) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้ง 2 ไอโซเลตนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dyer และ O'Gorman (2011) ที่กล่าวถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosartorya* นั้นจะมีการสร้าง Ascocarp สีขาวไม่วาวกรณใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงสี่เหลี่ยมจางขึ้นบนผิวหน้าอาหาร ลักษณะเป็นทรงกลมปิด (Cleistothecium) มี Ascus และ Ascospore เป็นเส้น 2 เส้นนูนขึ้นมาทำให้เห็นเป็นร่องลงไปคล้ายกับมีวงแหวนล้อมรอบ และงานวิจัยของ Samson และคณะ (2007) ยังได้กล่าวคล้ายคลึงกันว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosartorya* นั้นจะมี Ascocarp เป็นสี่เหลี่ยมอ่อน และ Ascospore จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เส้นที่นูนขึ้นมาจากพื้นผิวของ Ascospore ทำให้เห็นว่าตรงกลางนั้นเป็นร่องลึกลงไป

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya*

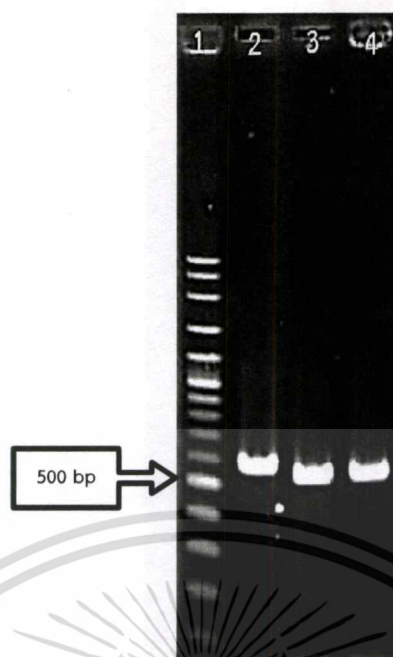
ไอโซเลต	สีโคโลนี	สื่ออาหารเพาะเลี้ยง PDA	ขนาด		ขนาด		ขนาด Ascospore ± SE (ไมโครเมตร)
			โคโลนี ± SE (มิลลิเมตร)	รูปร่าง Ascus	Ascus ± SE (ไมโครเมตร)	รูปร่าง Ascospore	
CHA23 H11	เหลือง นวล	เหลืองอ่อน	83.34 ± 0.35	ทรงกลม	9.39-14.4 ×	มีสันนูน	3-5.32 ×
					9.12-14.53 ± 0.12	ขึ้นมาทำให้เห็นเป็นร่อง	3.48-5.76 ± 0.05
CHA23 H21	ขาว	ม่วงแดง	78.33 ± 0.86	ทรงกลม	7.69-11.98 ×	มีสันนูน	3-4.82 ×
					8.77-11.84 ± 0.08	ขึ้นมาทำให้เห็นเป็นร่อง	3.46-5.02 ± 0.04

4.2 ผลการบ่งชี้เชื้อราก่อโรค *Colletotrichum capsici* และเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS ของเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum capsici* และบริเวณ β -tubulin ของเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya*

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* แต่ละไอโซเลตมีลักษณะที่เหมือนกัน จึงได้ทำการคัดเลือกมา 1 ไอโซเลต คือ BK4 เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณ DNA ต่อไป ซึ่งจากผลการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS ของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* ไอโซเลต BK4 และผลการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ β -tubulin ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H11 และ CHA23H21 นั้น พบว่ามีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS และบริเวณ β -tubulin ประมาณ 550 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ ITS ของเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต BK4 (แถบที่ 2) ผลิตภัณฑ์ PCR บริเวณ β -tubulin ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H11 (แถบที่ 3) และไอโซเลต CHA23H21 (แถบที่ 4) โดยเทียบกับ Marker ขนาด 100 คู่เบส (แถบที่ 1)

4.2.2 ผลการบ่งชี้เชื้อราก่อโรค *C. capsici* และเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* จากลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการเพิ่มปริมาณ DNA ทั้ง 2 ตำแหน่ง แล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์โดยใช้โปรแกรม BioEdit โดยพบว่าเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต BK4 มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เท่ากับ 541 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Kumar และ Shukla (2004) ที่ศึกษาความหลากหลายของยีนของเชื้อรา โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ที่พบว่ามีขนาดชิ้น DNA เท่ากับ 550 คู่เบส ในส่วนของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H11 และ CHA23H21 มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เท่ากับ 512 คู่เบส และ 510 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งขนาดที่ได้นี้มีขนาดที่ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ He และคณะ (2008) ที่ศึกษาการแยกและระบุสายพันธุ์ของ *Aspergillus* โดยใช้ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b พบว่ามีขนาดของชิ้น DNA เท่ากับ 511 คู่เบส เมื่อทำการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าโปรแกรม BLAST เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อราโดยเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต BK4 ตรงกับเชื้อรา *C. capsici* โดยมีร้อยละความเหมือนอยู่ที่ 100% และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ β -tubulin ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H11 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

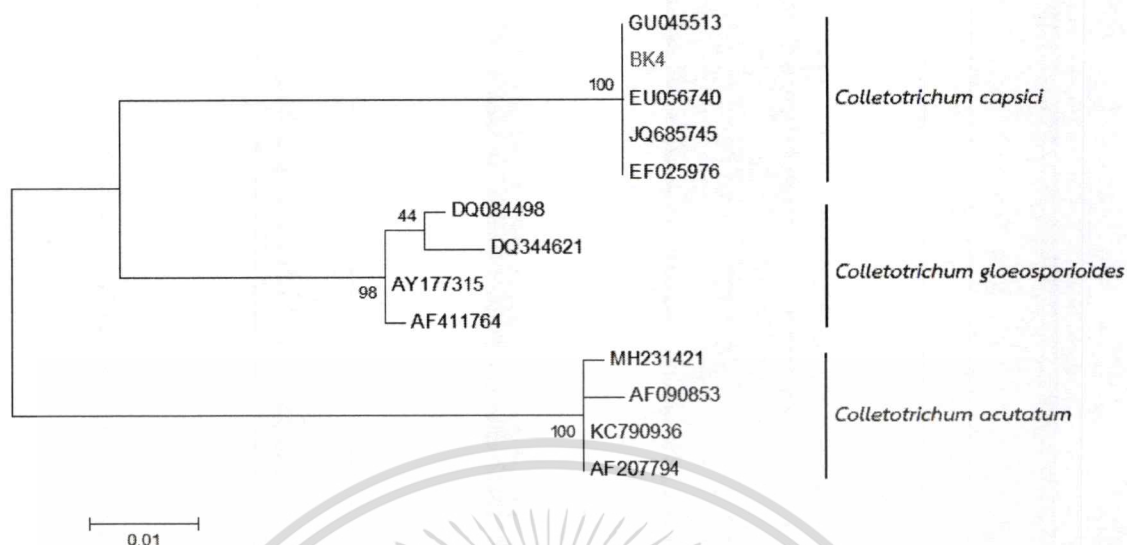
CHA23H21 ตรงกับเชื้อรา *Neosartorya spinosa* และ *Neosartorya udagawae* มีร้อยละความเหมือนอยู่ที่ 99% และ 98% ตามลำดับ

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราบริเวณ ITS มาทำ Phylogenetic tree ระหว่างเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต BK4 ที่ได้จากการทดลองเทียบกับในฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ *C. capsici* และใช้ Out group เป็นเชื้อราสายพันธุ์ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* ด้วย Maximum Likelihood และค่า Bootstrap เท่ากับ 1000 พบว่าเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต BK4 มีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *C. capsici* ในฐานข้อมูล ดังแสดงในรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.3 แสดงเลข Accession และสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้สำหรับการสร้าง Phylogenetic tree ของเชื้อราก่อโรค *Collectotrichum capsici*

สายพันธุ์	เลข Accession
<i>C. capsici</i>	GU045513
<i>C. capsici</i>	EU056740
<i>C. capsici</i>	EF025976
<i>C. capsici</i>	JQ685745
<i>C. gloeosporioides</i>	DQ084498
<i>C. gloeosporioides</i>	DQ344621
<i>C. gloeosporioides</i>	AY177315
<i>C. gloeosporioides</i>	AF411764
<i>C. acutatum</i>	AF090853
<i>C. acutatum</i>	MH23421
<i>C. acutatum</i>	KC790936
<i>C. acutatum</i>	AF207794

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

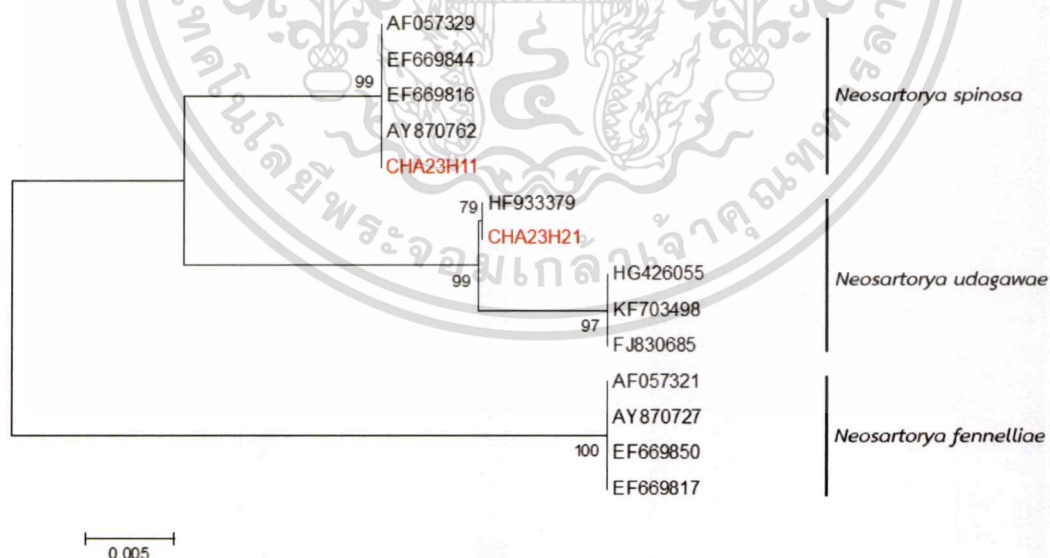


รูปที่ 4.7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราสกุล *C. capsici*, *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* ที่ได้จากการทดลองและฐานข้อมูล ในบริเวณ ITS โดยใช้ Maximum Likelihood ค่า Bootstrap เท่ากับ 1000

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราบริเวณ β -tubulin เมื่อนำมาทำ Phylogenetic tree ระหว่างเชื้อรา *Neosartorya spinosa* ไอโซเลต CHA23H11 และ *Neosartorya udagawae* ไอโซเลต CHA23H21 ที่ได้จากการทดลองเทียบกับในฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI (ตารางที่ 4.4) โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์ *N. spinosa* และ *N. udagawae* ใช้เชื้อราสายพันธุ์ *N. fennelliae* เป็น Out group ด้วย Maximum Likelihood และค่า Bootstrap เท่ากับ 1000 พบว่าเชื้อรา *N. spinosa* ไอโซเลต CHA23H11 และ *N. udagawae* ไอโซเลต CHA23H21 มีความใกล้ชิดกับ *N. spinosa* และ *N. udagawae* ในฐานข้อมูล และทั้ง 2 สปีชีส์นี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.4 แสดงเลข Accession และสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้สำหรับการสร้าง Phylogenetic tree ของเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya*

สายพันธุ์	เลข Accession
<i>N. spinosa</i>	AF057329
<i>N. spinosa</i>	EF669844
<i>N. spinosa</i>	EF669816
<i>N. spinosa</i>	AY870762
<i>N. udagawae</i>	HG426055
<i>N. udagawae</i>	HF933379
<i>N. udagawae</i>	KF703498
<i>N. udagawae</i>	FJ830685
<i>N. fennelliae</i>	AF057321
<i>N. fennelliae</i>	AY870727
<i>N. fennelliae</i>	EF669850
<i>N. fennelliae</i>	EF669817



รูปที่ 4.8 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราสกุล *N. Spinosa*, *N. udagawae* และ *N. fennelliae* ที่ได้จากการทดลองและฐานข้อมูล ในบริเวณ β -tubulin โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เฉพาะเพื่อการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
Maximum Likelihood ค่า bootstrap เท่ากับ 1000
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* ต่อการควบคุมเชื้อราก่อโรค *C. capsici* ด้วยวิธี Poison plate

ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อราก่อโรค *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริก ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยการทดสอบด้วยวิธี Poison plate บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA ระหว่างสารสกัดหยาบชั้นต่างๆ ของเชื้อรา *Neosartorya spinosa* และ *Neosartorya udagawae* ต่อเชื้อรา *C. capsici* โดยนำเชื้อรา *N. spinosa* CHA23H11 และ *N. udagawae* CHA23H21 มาทำการสกัดสารสกัดหยาบชั้น Hexane, Ethyl acetate และ Methanol โดยสารสกัดหยาบแต่ละชั้นที่ได้มีสีเหลือง น้ำตาลแดง และน้ำตาลเข้ม ตามลำดับ (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.9 แสดงสีของสารสกัดหยาบแต่ละชั้นของเชื้อรา *Neosartorya spinosa* CHA23H11 และ *Neosartorya udagawae* CHA23H21 โดยทำเป็น Stock ที่ความเข้มข้น 4000 ppm

4.3.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน *N. spinosa* CHA23H11

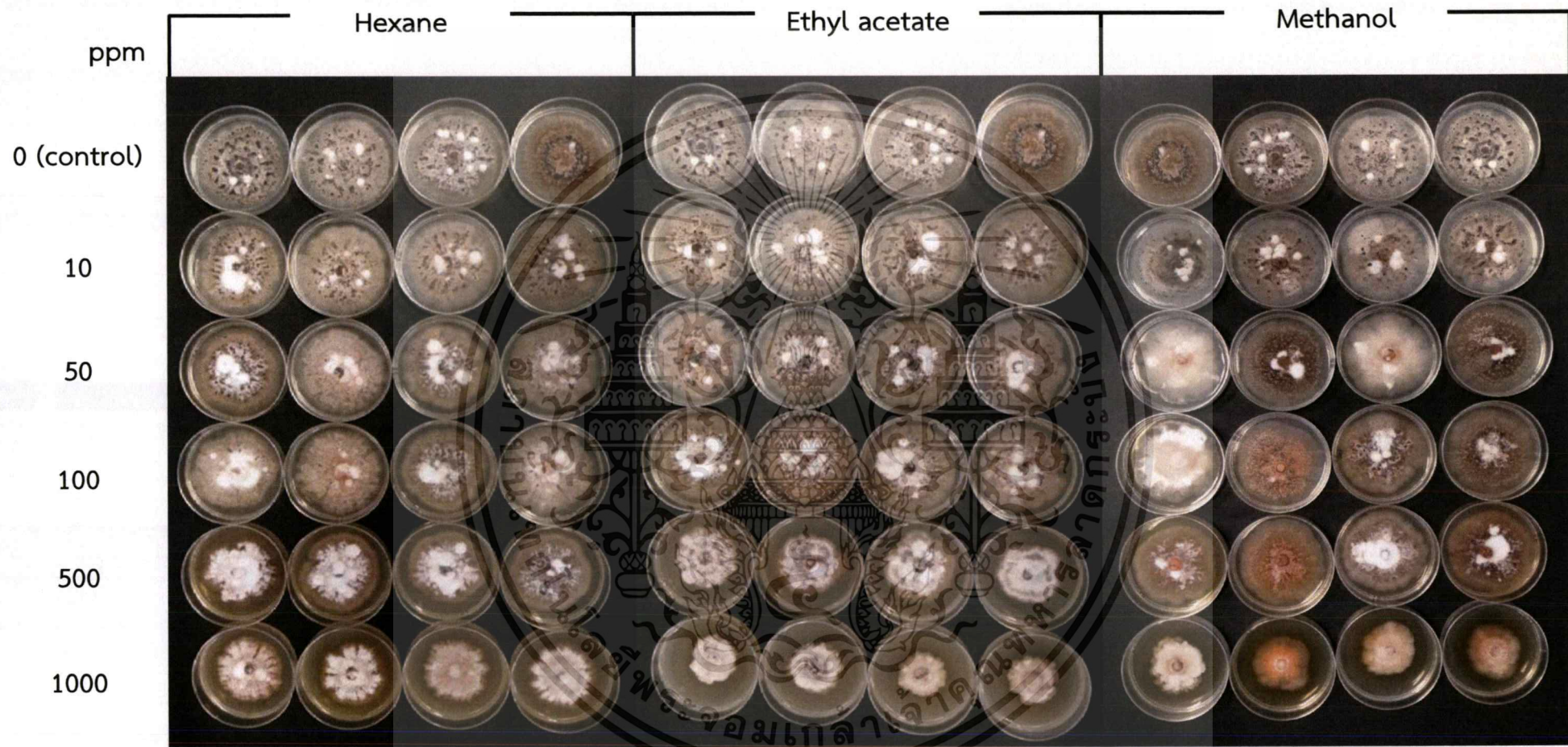
ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน *N. spinosa* CHA23H11 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรค *C. capsici* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA ที่ผสมกับสารสกัดหยาบชั้น Hexane, Ethyl acetate และ Methanol จากเชื้อ *N. spinosa* CHA23H11 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังรูปที่ 4.10 แสดงถึงสารสกัดหยาบของเชื้อรา *N. spinosa* CHA23H11 ที่มีผลในการควบคุมเชื้อรา *C. capsici* พบว่าสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมีผลต่อการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *C. capsici* โดยสังเกตได้จากขนาดของโคโลนีของเชื้อรา *C. capsici* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง โดยเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารสกัดหยาบความเข้มข้นมากจะมีขนาดโคโลนีที่เล็กกว่าโคโลนีของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารสกัดหยาบความเข้มข้นน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ และกราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* พบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชั้น ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm ชั้น Hexane, Ethyl acetate และ Methanol ไม่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* อยู่ที่ 28.86%, 44.02% และมี 33.90% ใช้

ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.11 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโคโคนินของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* พบว่าสารสกัดหยาบชั้น Hexane, Ethyl acetate และ Methanol ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโคโคนินอยู่ที่ 94.88%, 97.24% และ 93.96% ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.12

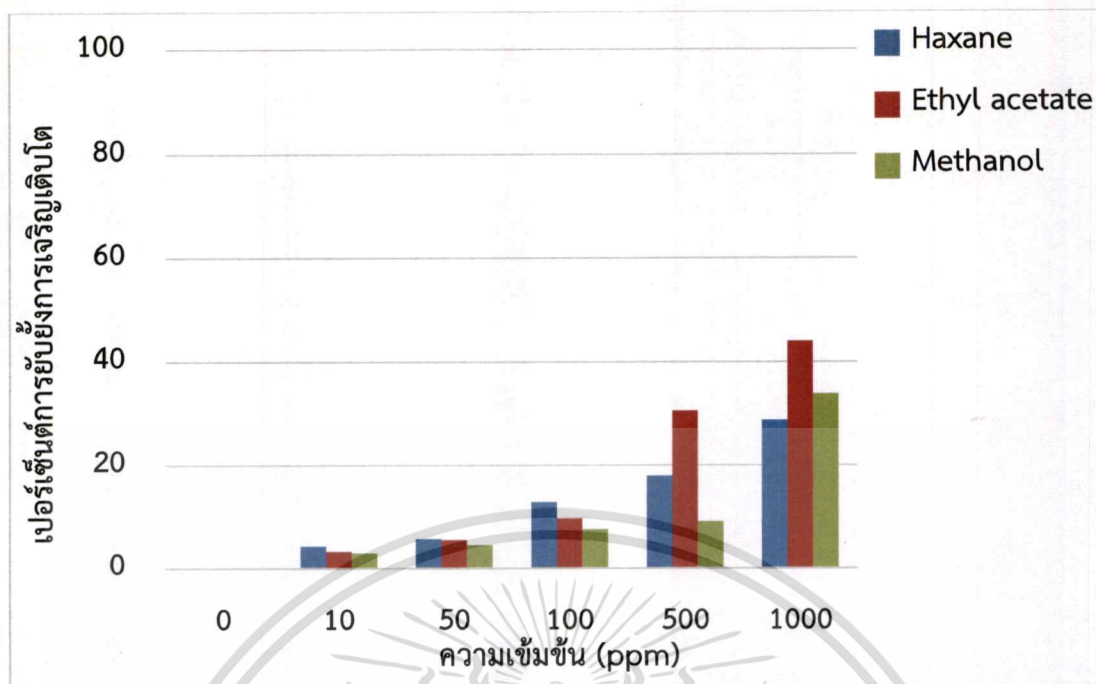
เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชั้น (ดังแสดงในตารางที่ 4.5) พบว่าสารสกัดหยาบชั้น Ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อ *C. capsici* มากที่สุด คือ 44.02% รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากชั้น Methanol และ Hexane มีเปอร์เซ็นต์ 33.90% และ 28.86% ตามลำดับ และสารสกัดหยาบชั้น Ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างโคโคโคนินของเชื้อ *C. capsici* มากที่สุด คือ 97.24% รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากชั้น Hexane และ Methanol มีเปอร์เซ็นต์ 94.88% และ 93.96% ตามลำดับ



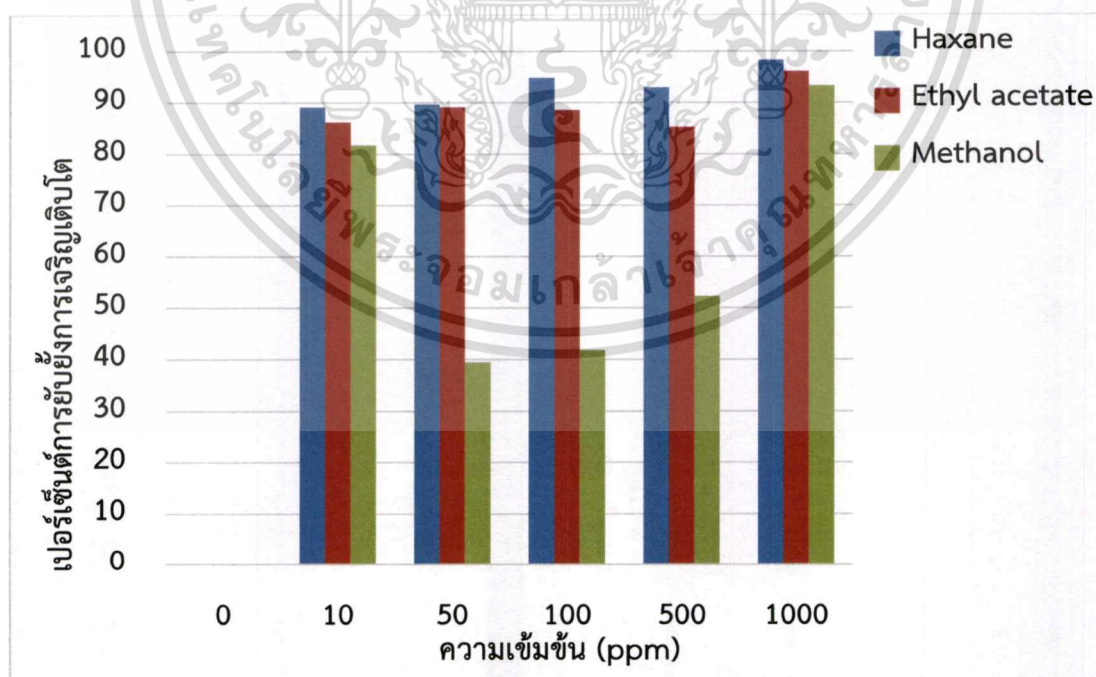
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *N. spinosa* CHA23H11 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. capsici* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* จากสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน *N. spinosa* CHA23H11



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคนิเดียของเชื้อราก่อโรค *C. capsici*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่โดยไม่หวังกำไรเพื่อประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. spinosa* CHA23H11 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อราก่อโรค *C. capsici*

สารสกัด หยาบชั้น	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลางโคโลนี ± SE (มิลลิเมตร)	% การ ยับยั้ง การสร้าง เส้นใย	ปริมาณสปอร์ ± SE (× 10 ⁶ สปอร์ต่อ มิลลิลิตร)	% การ ยับยั้งการ สร้าง โคนิเดีย	ED ₅₀ (ppm)
Hexane	0	47.23 ^h ± 0.29	0.00	9.54 ^f ± 0.86	0.00	5.96
	10	45.17 ^{fgh} ± 0.49	4.37	2.05 ^{bcd} ± 0.42	78.48	
	50	44.49 ^{fg} ± 0.53	5.80	1.39 ^{abc} ± 0.21	85.43	
	100	41.14 ^e ± 0.77	12.90	1.06 ^{ab} ± 0.22	88.85	
	500	38.72 ^d ± 0.95	18.01	0.95 ^{ab} ± 0.21	90.03	
	1000	33.60 ^c ± 0.90	28.86	0.49 ^a ± 0.17	94.88	
Ethyl acetate	0	45.64 ^h ± 0.52	0.00	9.54 ^f ± 0.86	0.00	7.37
	10	44.58 ^{gh} ± 0.24	3.35	3.36 ^d ± 0.64	64.70 ^a	
	50	42.59 ^{fg} ± 0.02	5.60	2.66 ^{cd} ± 0.21	72.05	
	100	44.43 ^{ef} ± 0.80	9.82	1.40 ^{abc} ± 0.41	85.30	
	500	32.76 ^{bc} ± 1.07	30.63	0.93 ^{ab} ± 0.13	90.29	
	1000	26.44 ^a ± 0.98	44.02	0.26 ^a ± 0.09	97.24	
Methanol	0	47.23 ^h ± 0.29	0.00	9.54 ^f ± 0.86	0.00	10.75
	10	45.80 ^{gh} ± 0.64	3.02	5.03 ^e ± 0.40	47.24	
	50	45.04 ^{fgh} ± 0.86	4.62	3.36 ^d ± 0.70	64.70 ^a	
	100	43.59 ^{fg} ± 0.43	7.70	2.93 ^d ± 0.53	69.29	
	500	42.89 ^{ef} ± 0.51	9.19	1.48 ^{abc} ± 0.27	84.51	
	1000	31.22 ^b ± 1.78	33.90	0.58 ^a ± 0.20	93.96	

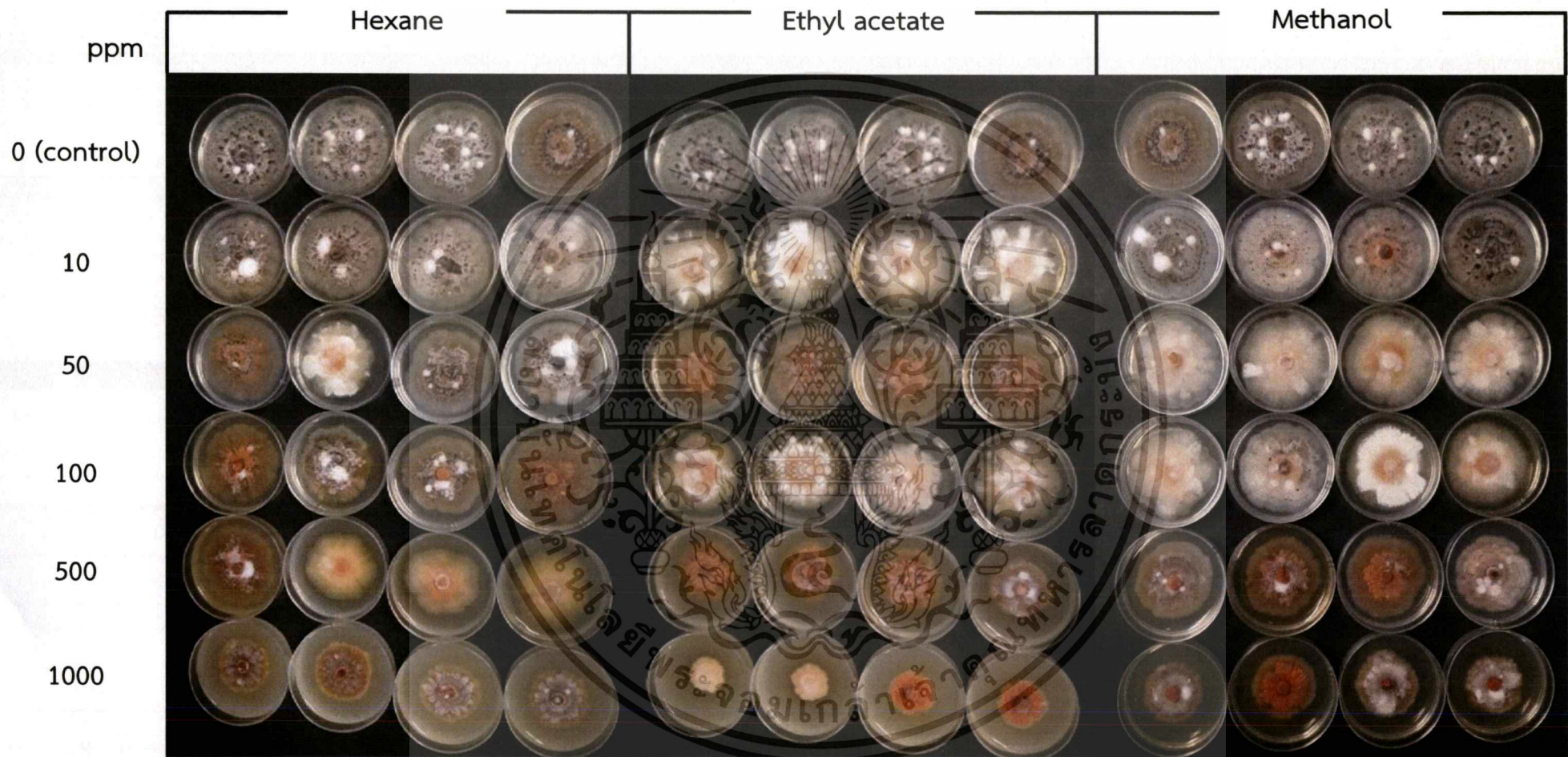
หมายเหตุ : ในคอลัมน์เดียวกันค่าที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Duncan's Multiple Range test, DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

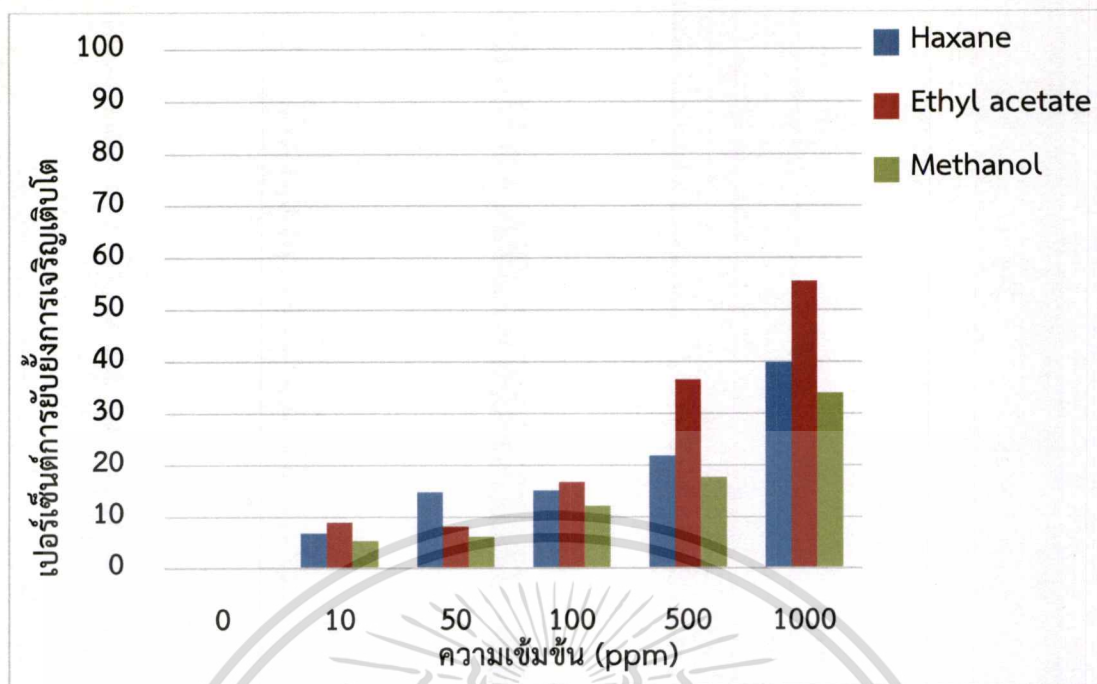
4.3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน *N. udagawae* CHA23H21

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน *N. udagawae* CHA23H21 โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรค *C. capsici* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA ที่ผสมกับสารสกัดหยาบชั้น Hexane, Ethyl acetate และ Methanol จากเชื้อ *N. udagawae* CHA23H21 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังรูปที่ 4.13 แสดงถึงสารสกัดหยาบของเชื้อรา *N. udagawae* CHA23H21 ที่มีผลในการควบคุมเชื้อรา *C. capsici* พบว่าสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมีผลต่อการเจริญของโคโลนีของเชื้อรา *C. capsici* โดยสังเกตได้จากขนาดโคโลนีของเชื้อรา *C. capsici* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยง PDA ที่มีส่วนผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารที่มีสารสกัดหยาบความเข้มข้น จะมีขนาดโคโลนีที่เล็กกว่าโคโลนีของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารสกัดหยาบความเข้มข้นน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบทั้ง 3 ชั้น ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm ชั้น Hexane, Ethyl acetate และ Methanol มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* อยู่ที่ 39.84%, 55.50% และ 34.06% ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.14 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโคนีเดียของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* พบว่าสารสกัดหยาบชั้น Hexane, Ethyl acetate และ Methanol ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโคนีเดียอยู่ที่ 72.31%, 71.78% และ 69.42% ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.15

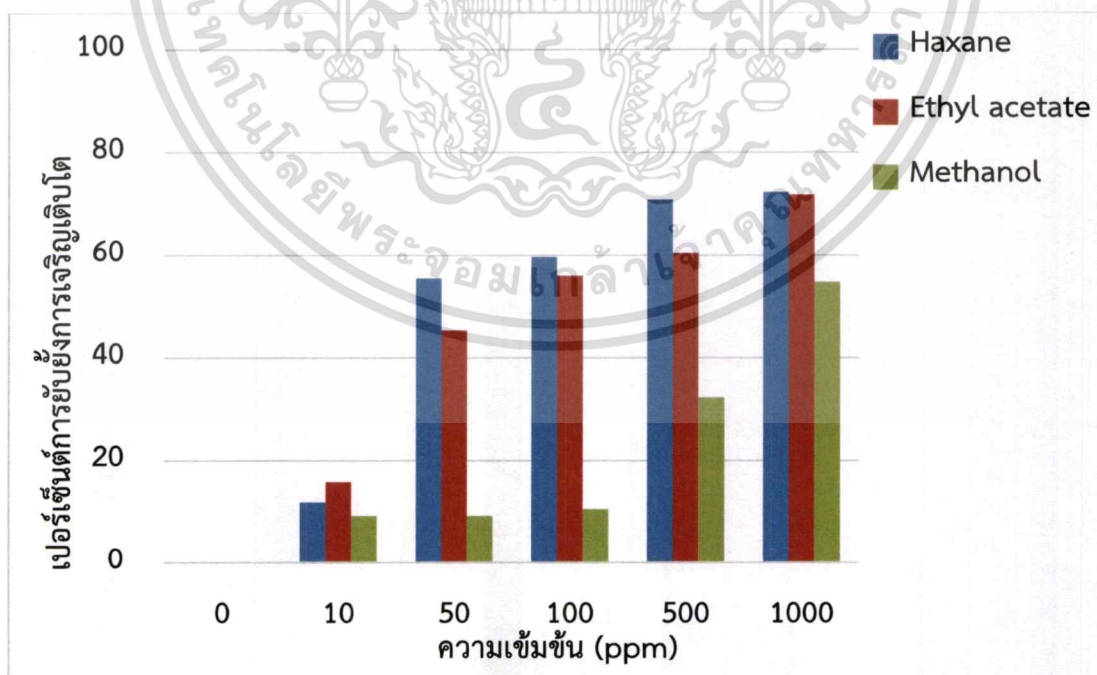
เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชั้น (ดังแสดงในตารางที่ 4.6) พบว่าสารสกัดหยาบชั้น Ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเส้นใยของเชื้อ *C. capsici* มากที่สุด คือ 55.5% รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากชั้น Hexane และ Methanol คือ 39.84% และ 34.06% ตามลำดับ และสารสกัดหยาบชั้น Hexane ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างโคโคนีเดียของเชื้อ *C. capsici* มากที่สุด คือ 72.31% รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากชั้น Ethyl acetate และ Methanol คือ 71.78% และ 69.42% ตามลำดับ



รูปที่ 4.13 สารสกัดหายาชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *N. udagawae* CHA23H21 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. capsici* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* จากสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน *N. udagawae* CHA23H21



รูปที่ 4.15 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคนิเดียของเชื้อราก่อโรค *C. capsici*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเชิงการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

จากสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน *N. udagawae* CHA23H21

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. udagawae* CHA23H21 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. capsici*

สารสกัด หยาบชั้น	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี \pm SE (มิลลิเมตร)	% การ ยับยั้ง การสร้าง เส้นใย	ปริมาณสปอร์ \pm SE ($\times 10^6$ สปอร์ต่อ มิลลิลิตร)	% การ ยับยั้ง การสร้าง โคโคนิเดีย	ED ₅₀ (ppm)
Hexane	0	47.23 ⁱ \pm 0.29	0.00	9.54 ^e \pm 0.86	0.00	42.96
	10	44.00 ^h \pm 0.53	6.83	8.39 ^e \pm 0.24	11.94	
	50	40.24 ^{ef} \pm 0.93	14.79	4.24 ^a \pm 0.62	55.51	
	100	40.10 ^{ef} \pm 1.26	15.10	3.84 ^a \pm 0.60	59.71	
	500	36.89 ^d \pm 1.14	21.88	2.78 ^a \pm 0.64	70.87	
	1000	28.41 ^b \pm 0.66	39.84	2.64 ^a \pm 0.75	72.31	
Ethyl acetate	0	47.23 ⁱ \pm 0.29	0.00	9.54 ^e \pm 0.86	0.00	66.32
	10	42.99 ^{sh} \pm 0.43	8.97	8.01 ^{de} \pm 0.56	15.88	
	50	43.36 ^{sh} \pm 0.38	8.18	5.20 ^{ac} \pm 0.88	45.41	
	100	39.32 ^{ef} \pm 0.42	16.75	3.94 ^a \pm 0.24	56.04	
	500	29.96 ^{bc} \pm 1.33	36.57	3.76 ^a \pm 0.32	60.50	
	1000	21.02 ^a \pm 0.66	55.50	2.69 ^a \pm 0.71	71.78	
Methanol	0	47.23 ⁱ \pm 0.29	0.00	9.54 ^e \pm 0.86	0.00	133.63
	10	44.66 ^h \pm 0.50	5.44	8.64 ^e \pm 0.46	9.32	
	50	44.28 ^h \pm 0.51	6.24	8.51 ^e \pm 0.29	10.63	
	100	41.46 ^{fg} \pm 0.62	12.21	6.45 ^{cd} \pm 0.74	32.28	
	500	38.86 ^{de} \pm 0.54	17.72	4.30 ^a \pm 0.28	54.86	
	1000	31.14 ^c \pm 0.42	34.06	2.91 ^a \pm 0.13	69.42	

หมายเหตุ : ในคอลัมน์เดียวกันค่าที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (Duncan's Multiple Range test, DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *N. spinosa* CHA23H11 และ *N. udagawae* CHA23H21 จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากชั้นต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1000 ppm มีร้อยละของการยับยั้งการสร้างเส้นใยและร้อยละของการยับยั้งการสร้างโคนเดี่ยวของเชื้อ *C. capsici* สูงที่สุด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ กมลวรรณ และคณะ (2558) ที่ได้ทำการสกัดสารทุติยภูมิ จากราเอนโดไฟท์ พบว่าสารสกัดจากเชื้อรา *Neosartorya* sp. (KUFA 47) ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. capsici* ได้ 38.89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนงานวิจัยของ Dethoup และคณะ (2015) ที่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย Ethyl acetate พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. fischeri* (KUFA 0107) และ *N. pseudofischeri* (KUFA 0108) ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *C. capsici* 100% และ 73.7% ตามลำดับ และในงานวิจัยของ Jantasorn และคณะ (2016) ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจาก Ethyl acetate ของเชื้อราพบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. fischeri* Bodhi004 ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *C. capsici* ได้มากกว่า 50% จะเห็นได้ว่างานวิจัยของเรามีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่าของงานวิจัยอื่นๆ ที่กล่าวมาข้างต้น โดยมีร้อยละการยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน แต่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการคัดแยกเชื้อราก่อโรค *Colletotrichum capsici* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส ในพริก จากตัวอย่างพริกที่สุ่มเก็บจากกรุงเทพมหานคร จังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดระยอง และจังหวัด ชุมพร รวม 14 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อรา *C. capsici* ได้ทั้งหมด 2 ไอโซเลต คือ BK4 และ BK14 และยังได้รับความอนุเคราะห์เชื้อรา *C. capsici* บริสุทธิ์จาก ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม จำนวน 1 ไอโซเลต เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เชื้อรา *C. capsici* มีโคโลนีสีเทาไปจนถึงดำ มี Setae และมีโคนินเดียเป็นรูปโค้งงอคล้ายเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว (Falcate) และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าเชื้อรา *C. capsici* มีขนาดผลผลิต PCR เท่ากับ 541 คู่เบส และในส่วนของ การคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* จากตัวอย่างดินทั้งหมด 3 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 2 ไอโซเลตคือ CHA23H11 และ CHA23H21 และเมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลตมีลักษณะที่ คล้ายคลึงกัน คือมีการสร้าง Ascocarp ขึ้นเต็มผิวหน้าของอาหาร มี Ascus เป็นทรงกลม และมี Ascospore ที่มีลักษณะเป็นทรงกลมมีเส้น 2 เส้นนูนขึ้นมาจากผิว ทำให้เห็นเป็นร่องตรงกลางของ Ascospore คล้ายกับมีวงแหวนล้อมรอบ แต่ไอโซเลต CHA23H21 นั้นสีของอาหารเพาะเลี้ยง PDA จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงแดง และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ในบริเวณ β -tubulin ด้วยไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b และทำการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว เชื้อราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H11 ตรงกับเชื้อรา *Neosartorya spinosa* ซึ่งผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดเท่ากับ 512 คู่เบส และเชื้อราสกุล *Neosartorya* ไอโซเลต CHA23H21 ตรงกับเชื้อรา *Neosartorya udagawae* ซึ่งผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาดเท่ากับ 510 คู่เบส

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น Hexane, Ethyl acetate และ Methanol จากเชื้อราต่อต้าน *N. spinosa* และ *N. udagawae* ที่มีผลในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *C. capsici* ในสภาพห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Poison plate พบว่าสารสกัดหยาบชั้น Ethyl acetate จากเชื้อราต่อต้าน *N. spinosa* ที่ความเข้มข้น 1000 ppm สามารถยับยั้งการสร้างเส้นใยและยับยั้ง การสร้างโคนินเดียได้ดีที่สุดที่ 44.02% และ 97.24% ($ED_{50} = 7.37$ ppm) ตามลำดับ และสารสกัด หยาบชั้น Ethyl acetate จากเชื้อราต่อต้าน *N. udagawae* ที่ความเข้มข้น 1000 ppm สามารถ ยับยั้งการสร้างเส้นใยได้ดีที่สุดที่ 55.50% และสารสกัดชั้น Hexane ที่ความเข้มข้น 1000 ppm สามารถยับยั้งการสร้างโคนินเดียได้ดีที่สุดที่ 72.31% ($ED_{50} = 42.96$ ppm)

จากการศึกษานี้สามารถนำเชื้อราต่อต้าน *N. spinosa* และ *N. udagawae* ที่คัดแยกได้ไป อกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ประยุกต์ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งกับเชื้อก่อโรคอื่นๆ ซึ่งเป็นแนวทางที่ดีในการใช้ ไม่ว่ากรรมใดๆ ฟงสน อักทงหามมืเหตุดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์จากธรรมชาติมาควบคุมโรคพืชแทนการใช้สารเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายกับเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมได้ และอาจนำไปศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารสกัดหยาบ หรือนำไปประยุกต์ใช้กับงานอื่นๆ เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อไปในอนาคตได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลวรรณ ศรีดี, ธิดา เดชชวบ, ณรงค์ สิงค์บุระอุดม และอเนก กิจเงา. 2557. “ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลนในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ.” 537 หน้า. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 สาขาพืช. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชิดชนก เกษี. 2557. “กระบวนการของการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (Syd.) E.J.Butler & Bisby สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus*(Haw.) Brit. & Rose.) และการควบคุม.” ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไทยเกษตรศาสตร์. 2555. ศัตรูพริกและการป้องกันกำจัด. [online.] เข้าถึงได้จาก : <http://www.thaikasetsart.com/ศัตรูพริกและการป้องกัน/>.

ธารทิพย์ ภาสบุตร, ธนิตย์ ปล่องบรรจง และกรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์. 2548. “การรวบรวมและจำแนกชนิดเชื้อสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของไม้ผล และพืชเศรษฐกิจ. 894-909. ใน รายงานผลการวิจัย พ.ศ. 2548 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. “โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ.” สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนโดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. เล่มที่ 35 : 129-159.

เนียรวรรณ มีเจริญ. 2560. การแยกเชื้อบริสุทธิ์. [online.] เข้าถึงได้จาก : <http://www.sci.math.org/lesson-biology/item/7448-2017-08-11-07-30-49>.

ปรกชล อุทรัพย์. 2559. “สถานการณ์การนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช การใช้ และการตกค้างในผลผลิต.” 23 หน้า. ใน การประชุมวิชาการเพื่อเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ประจำปี 2559. กรุงเทพฯ.

ประวิตร โสภณดร, วิจิตร วรรณชิต, อภินันท์ กำเนิดรัตน์, วัชรินทร์ ชื่นสุวรรณ, อีระ เอกสมทราเมษฐ ,รังสรรค์ อาภาคัพพะกุล, จำเริญ ยืนยงสวัสดิ์, วิษณุ สมทรัพย์, 2543. หลักการกลไกกรรม. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ปัญญา โพธิ์ธิรัตน์, ประภัสสร ขุนพิสิข และมนูญ สุขสมบุรณ์. 2550. “เกษตรอินทรีย์ : กรณีศึกษา การป้องกันการกำจัดโรค และแมลงศัตรูพืชในแปลงปลูกข้าวโพดหวานโดยชีววิธี.” บัณฑิต วิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มนวิช เรืองดิษฐ์ และ จันทรรัตน์ จินดารัศมี. 2547. “พริกใครว่าดีแต่เผ็ด.” *กรมวิทยาศาสตร์บริการ*. 52(164) : 33-39.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมอมร สร้อยทอง. 2558. “การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Taralomyces* และ *Neosartorya* จากดินและประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสในกาแฟ.” วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์, บุรณี พัววงศ์แพทย์, สุรีย์พร บัวอาจ, วิลาวัลย์ ไคร์ครวญ และธวัชชัย นิมกิงรัตน์. 2561. การควบคุมโรคเหี่ยวแบคทีเรียของพริกโดยชีววิธี. [online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=1809>.

เลขา มาโนช, อรุมา เพี้ยซ้าย, ธิดา เดชฮวบ, จิตรา เกาะแก้ว, อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์, มะโนรัตน์ สุดสงวน, วิรัตน์ ลิ้มธนาวานิชย์, เสียงแจ้ว พิริยพจน์ต์ และ สุวรรณ กลินภู. 2553. “ความหลากหลายของรา *Emericella*, *Eurotium* และ *Neosartorya* จากดิน.” 635-642. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 สาขาพืช. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุดารัตน์ สุดพันธ์ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2552. “การเก็บรวบรวมและจำแนกเชื้อราคอลเลตโตตริคัม สาเหตุโรคแอนแทรกโนสในพริก.” 268-277. ใน การประชุมวิชาการอรัทษาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9. อุบลราชธานี.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 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.

อารีพันธ์ อุปนิสากร. 2560. การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี. [online]. เข้าถึงได้จาก : <http://www.rdpb-journal.in.th/2017/05/26/research-2-2548/>.

CABI. 2018. CABI databases. [online.] เข้าถึงได้จาก : <http://www.speciesfungorum.org>

Calzada, C.T. Tussel, R.T. Ciapara, I.H. and Brito, D.P. 2012. Morphological, Pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology*. 135(1)

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. Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19 : 11-15.

- Dyer, P.S. and O’Gorman, C.M. 2011. “Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species.” *FEMS Microbiol.* 36 : 165–192.
- Eamvijarn, A. Manoch, L. Visarathanonth, N. and Chamsawarng, C. 2009. “Diversity of *Neosartorya* species from soil and *in vitro* antagonistic test against plant pathogenic fungi” in **Abstract Book of Asain Mycological Congress 2009 & 11th International Marine and Freshwater Mycology Symposium.** National Museum of Natural Science. Taiwan : Taichung.
- He C., Fan Y., Liu G. and Zhang H.. 2008. “Isolation and Identification of a Strain of *Aspergillus Tubingensis* With Deoxynivalenol Biotransformation Capability. ” *International Journal of Molecular Sciences.* 9 : 2366-2375.
- Hong, S.B Cho, H-S. Shin, H-D. Frisvad, J.C. and Samson, R.A. 2006. “Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. ” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56 : 477-486.
- Hubka, V. and Kolarik, M. 2012. “ β -tubulin paralogue of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three family. ” *Studies in Mycology.* 70 : 1-51.
- Jantasorn, A. Mongon, J. Moungrsrimuangdee, B. and Oiuphisittraiwat, 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.
- Kumar M. and Shukla K. P.. 2004. “Use of PCR Targeting of Internal Transcribed Spacer Regions and Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis of Sequence Variation in Different Regions of rRNA Genes in Fungi for Rapid Diagnosis of Mycotic Keratitis.” *Journal of Clinical Microbiology.* 43 : 662-668.
- Samson, R.A. Hong, S. Peterson, S. W. Frisvad, J. C. and varga, J. 2007. “Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. ” *Studies in Mycology.* 59 : 147-203.
- Shivas, R. and Beasley, D. 2547. **คู่มือการจัดการ ศูนย์เก็บรักษาตัวอย่างโรคพืช.** แปลโดย พรพิมล อธิปัญญาคม, ศรีสุข พูนผลกุล และศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.
- Sornyoo, B. 2560. **มารู้จักแอนแทรกคโนสในพริก.** [online]. เข้าถึงได้จาก : <https://www.svgroup.co.th/โรคแอนแทรกคโนสพริก>.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sutton, B.C. 1992. "The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*." 1-26. In *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Wallingford, UK : CAB International.
- Wyatt, T.T. 2014. "Fungal spores for dispersion in space and time." *Advances in Applied Microbiology*. 85 : 43-91.
- Yaguchi, T. Matsuzawa, T. Tanaka, R. Abliz, P. Hui, Y. and Horie, Y. 2010 "Two new species of *Neosartorya* isolated from soil in Xinjiang, China." *Mycoscience*. 51 : 253.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. 38 : 315-322.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

สำหรับการเลี้ยงแบบปกติ

- เตรียมมันฝรั่งสด 200 กรัม
- ต้มมันฝรั่งในน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที
- เติมน้ำ 15 กรัม คนจนมันละลาย
- เติมน้ำตาลเด็กซ์โตรส 20 กรัม คนจนละลาย
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับการทำ poison plate

- ชั่งอาหารสำเร็จรูป Potato Dextrose Agar (PDA) 39 กรัม
- ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

- เตรียมมันฝรั่งสด 200 กรัม
- ต้มมันฝรั่งในน้ำ 1 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที
- เติมน้ำตาลเด็กซ์โตรส 20 กรัม คนจนละลาย
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเจือจางดินแบบ 10-fold dilution

- ชั่งดิน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง
- ใส่น้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่มีดินอยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน จะได้ความเข้มข้นเป็น 10^{-1}
- ถ้าต้องการความเข้มข้นเป็น 10^{-2} ให้นำสารละลายดินความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
- ถ้าต้องการความเข้มข้นเป็น 10^{-3} ให้นำสารละลายดินความเข้มข้น 10^{-2} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
- ถ้าต้องการความเข้มข้นเป็น 10^{-4} ให้นำสารละลายดินความเข้มข้น 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ถ้าต้องการความเข้มข้นเป็น 10^{-5} ให้นำสารละลายดินความเข้มข้น 10^{-4} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

การเตรียมสารละลาย

10X TBE Buffer 1 ลิตร

- ชั่ง Tris base 108 กรัม Boric acid 55 กรัม ตวง 0.5 โมลาร์ EDTA 40 มิลลิลิตร
- ผสมให้ละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1X TBE Buffer 500 มิลลิลิตร

- ตวง 10X TBE Buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

1.25 มิลลิโมลาร์ dNTPs ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

- ตูด 100 มิลลิโมลาร์ dATPs, dCTPs, dGTPs และ dTTPs จาก stock มา 1.25 ไมโครลิตร จะได้เป็น Mix dNTPs ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำ Deionized อีก 95 ไมโครลิตร จะได้ Mix dNTPs ที่มีความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์

ไพร์เมอร์ ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

- สารละลายไพร์เมอร์มีความเข้มข้น A ไมโครโมลาร์ เตรียมไพร์เมอร์ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จาก

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(A)V_1 = (20)(20)$$

$$V_1 = \frac{(20)(20)}{A} = B \text{ ไมโครลิตร}$$

- ตูดสารละลายไพร์เมอร์เริ่มต้น B ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำ Deionized ให้มีปริมาตรสุดท้ายครบ 20 ไมโครลิตร

การเตรียมสไลด์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- หยดสีย้อม Lactophenol cotton blue ลงบนสไลด์
- ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยบนโคโลนีของเชื้อที่ต้องการ
- จากนั้นนำเข็มเขี่ยแก้วบนสีย้อม เกลี่ยให้กระจายเล็กน้อย
- ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
- นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดหยาบเพื่อทำการทดสอบแบบ poison plate

- เตรียม stock สารสกัดหยาบโดยให้ความเข้มข้นเป็น 4000 ppm
- ดูดสารสกัดหยาบจาก stock มา 0.125, 0.625, 1.25, 6.25 และ 12.5 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm ในอาหาร PDA 50 มิลลิลิตร
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลงบนจานเพาะเลี้ยงขนาด 5 เซนติเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 6 จาน โดยนำมาใช้ในการบันทึกผล 4 จาน
- รอจนอาหารแข็งแล้วจึงนำไปใช้เลี้ยงเชื้อสาเหตุของโรค เพื่อทำการทดสอบ poison plate

ตัวอย่างการทำ stock สารสกัดหยาบความเข้มข้น 4000 ppm

- 1 ppm = 1 มิลลิกรัม/ลิตร
- ดังนั้น 4000 ppm = 4000 มิลลิกรัม/1000 มิลลิลิตร
- เตรียม stock ให้มีปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร จะต้องชั่งสารสกัดหยาบมา 100 มิลลิกรัม จากนั้นละลายด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ DMSO

ตัวอย่างการคำนวณปริมาตรสารสกัดหยาบต่ออาหาร PDA ที่ใช้ทดสอบ poison plate

- Stock มีความเข้มข้น 4000 ppm
- ถ้าต้องการความเข้มข้น 10 ppm ในอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะคำนวณได้ ดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(4000)V_1 = (10)(50)$$

$$V_1 = \frac{(10)(50)}{4000} = 0.125 \text{ มิลลิลิตร}$$

การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

- ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางด้วย Vernier
- วัด 2 แขนที่ตั้งฉากกัน แล้วทำการหาค่าเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข-1 ANOVA ของการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหายาจากเชื้อ

N. spinosa CHA23H11 และ *N. udagawae* CHA23H21 ที่มีผลต่อการ
ควบคุมเชื้อ *C. capsici*

Descriptives							
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		
					Lower Bound	Upper Bound	
CHA23H11 ขนาดโคโลนี	Control	4	47.23	0.579252392	0.289626196	46.30828018	48.15171982
	Hexane 10	4	45.16875	0.983652844	0.491826422	43.60353882	46.73396118
	Hexane 50	4	44.49	1.064643915	0.532321958	42.79591395	46.18408605
	Hexane 100	4	41.1375	1.542322383	0.771161192	38.68332092	43.59167908
	Hexane 500	4	38.725	1.892062367	0.946031183	35.71430656	41.73569344
	Hexane 1000	4	33.6	1.795178728	0.897589364	30.74347004	36.45652996
	Ethyl acetate 10	4	45.6425	1.047890739	0.523945369	43.975072	47.309928
	Ethyl acetate 50	4	44.5825	0.470540469	0.235270235	43.83376511	45.33123489
	Ethyl acetate 100	4	42.5875	0.049074773	0.024537386	42.50941109	42.66558891
	Ethyl acetate 500	4	32.76125	2.149962693	1.074981347	29.34017958	36.18232042
	Ethyl acetate 1000	4	26.44	1.960765157	0.980382578	23.31998509	29.56001491
	Methanol 10	4	45.8	1.2826535	0.64132675	43.75901205	47.84098795
	Methanol 50	4	45.045	1.713602443	0.856801222	42.31827612	47.77172388
	Methanol 100	4	43.5925	0.861563501	0.430781751	42.22156021	44.96343979
	Methanol 500	4	42.89	1.019509686	0.509754843	41.26773258	44.51226742
	Methanol 1000	4	31.2225	3.559048328	1.779524164	25.5592599	36.8857401
Total	64	40.6821875	6.269655561	0.783706945	39.11607414	42.24830086	

CHA23H11 จำนวนสปอร์	Control	4	9.5375	1.720162299	0.860081149	6.800337924	12.27466208
	Hexane 10	4	2.05	0.842614977	0.421307489	0.709211539	3.390788461
	Hexane 50	4	1.3875	0.425	0.2125	0.71123016	2.06376984
	Hexane 100	4	1.0625	0.447911822	0.223955911	0.349772339	1.775227661
	Hexane 500	4	0.95	0.414326763	0.207163382	0.290713662	1.609286338
	Hexane 1000	4	0.4875	0.3473111	0.17365555	-0.06514946	1.040149463
	Ethyl acetate 10	4	3.3625	1.275	0.6375	1.33369048	5.39130952
	Ethyl acetate 50	4	2.6625	0.415080314	0.207540157	2.002014595	3.322985405
	Ethyl acetate 100	4	1.4	0.81240384	0.40620192	0.1072842	2.6927158
	Ethyl acetate 500	4	0.925	0.259807621	0.129903811	0.511588098	1.338411902
	Ethyl acetate 1000	4	0.2625	0.179698822	0.089849411	-0.02344093	0.548440926
	Methanol 10	4	5.025	0.798435971	0.399217986	3.754510197	6.295489803
	Methanol 50	4	3.3625	1.393063172	0.696531586	1.145825628	5.579174372
	Methanol 100	4	2.925	1.068877916	0.534438958	1.224176712	4.625823288
	Methanol 500	4	1.475	0.542371337	0.271185668	0.611966172	2.338033828
	Methanol 1000	4	0.575	0.396862697	0.198431348	-0.05649711	1.206497111
	Total	64	2.340625	2.375902084	0.296987761	1.747142317	2.934107683

CHA23H21 ขนาดโคลีนี	Control	4	47.22625	0.578768448	0.289384224	46.30530025	48.14719975
	Hexane 10	4	43.99875	1.053623707	0.526811854	42.32219956	45.67530044
	Hexane 50	4	40.24125	1.864364838	0.932182419	37.2746295	43.2078705
	Hexane 100	4	40.095	2.512750817	1.256375408	36.09665272	44.09334728
	Hexane 500	4	36.89375	2.277386569	1.138693284	33.26991976	40.51758024
	Hexane 1000	4	28.41125	1.323211844	0.661605922	26.30572468	30.51677532
	Ethyl acetate 10	4	42.98875	0.868469679	0.434234839	41.60682094	44.37067906
	Ethyl acetate 50	4	43.36125	0.766783053	0.383391526	42.14112705	44.58137295
	Ethyl acetate 100	4	39.3175	0.840481013	0.420240507	37.98010715	40.65489285
	Ethyl acetate 500	4	29.955	2.660303867	1.330151934	25.72186289	34.18813711
	Ethyl acetate 1000	4	21.0175	1.326766119	0.663383059	18.90631903	23.12868097
	Methanol 10	4	44.65625	1.001235695	0.500617847	43.06306058	46.24943942
	Methanol 50	4	44.2775	1.023739062	0.511869531	42.6485027	45.9064973
	Methanol 100	4	41.46125	1.240640795	0.620320398	39.48711364	43.43538636
	Methanol 500	4	38.85875	1.088641164	0.544320582	37.12647898	40.59102102
	Methanol 1000	4	31.14125	0.849356374	0.424678187	29.78973447	32.49276553
	Total	64	38.36882813	7.124270374	0.890533797	36.58923833	40.14841792

CHA23H21 จำนวนสปอร์	Control	4	9.5375	1.720162299	0.860081149	6.800337924	12.27466208
	Hexane 10	4	8.3875	0.487125925	0.243562962	7.61237395	9.16262605
	Hexane 50	4	4.2375	1.239203373	0.619601687	2.265650902	6.209349098
	Hexane 100	4	3.8375	1.193297253	0.596648626	1.938697783	5.736302217
	Hexane 500	4	2.775	1.27377392	0.63688696	0.748141447	4.801858553
	Hexane 1000	4	2.6375	1.505752857	0.752876429	0.241511192	5.033488808
	Ethyl acetate 10	4	8.0125	1.110836772	0.555418386	6.24491081	9.78008919
	Ethyl acetate 50	4	5.2	1.757365452	0.878682726	2.403639404	7.996360596
	Ethyl acetate 100	4	3.9375	0.476751158	0.238375579	3.178882519	4.696117481
	Ethyl acetate 500	4	3.7625	0.642099421	0.321049711	2.740776535	4.784223465
	Ethyl acetate 1000	4	2.6875	1.410304341	0.70515217	0.443391081	4.931608919
	Methanol 10	4	8.6375	0.92319644	0.46159822	7.16848845	10.10651155
	Methanol 50	4	8.5125	0.580768169	0.290384085	7.588368242	9.436631758
	Methanol 100	4	6.45	1.471960144	0.735980072	4.107782938	8.792217062
	Methanol 500	4	4.3	0.559761854	0.279880927	3.409293978	5.190706022
	Methanol 1000	4	2.9125	0.259406374	0.129703187	2.499726572	3.325273428
	Total	64	5.3640625	2.613768015	0.326721002	4.711162676	6.016962324

Test of Homogeneity of Variances				
	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
CHA23H11 ขนาดโคโลนี	2.266	15	48	0.016
CHA23H11 จำนวนสปอร์	2.239	15	48	0.018
CHA23H21 ขนาดโคโลนี	2.333	15	48	0.013
CHA23H21 จำนวนสปอร์	1.403	15	48	0.185

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
CHA23H11 ขนาดโคโลนี	Between Groups	2355.130	15	157.009	62.125	0.000
	Within Groups	121.311	48	2.527		
	Total	2476.441	63			
CHA23H11 จำนวนสปอร์	Between Groups	322.412	15	21.494	31.059	0.000
	Within Groups	33.218	48	0.692		
	Total	355.629	63			
CHA23H21 ขนาดโคโลนี	Between Groups	3093.916	15	206.261	95.506	0.000
	Within Groups	103.664	48	2.160		
	Total	3197.579	63			
CHA23H21 จำนวนสปอร์	Between Groups	368.202	15	24.547	18.943	0.000
	Within Groups	62.200	48	1.296		
	Total	430.402	63			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

CHA23H11 ขนาดโคโคโลนี									
Duncan ^a									
สารสกัดทชชาน	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Ethyl acetate 1000	4	26.4400							
Methanol 1000	4		31.2225						
Ethyl acetate 500	4		32.7613	32.7613					
Hexane 1000	4			33.6000					
Hexane 500	4				38.7250				
Hexane 100	4					41.1375			
Ethyl acetate 100	4					42.5875	42.5875		
Methanol 500	4					42.8900	42.8900		
Methanol 100	4						43.5925	43.5925	
Hexane 50	4						44.4900	44.4900	
Ethyl acetate 50	4						44.5825	44.5825	
Methanol 50	4						45.0450	45.0450	45.0450
Hexane 10	4						45.1688	45.1688	45.1688
Ethyl acetate 10	4							45.6425	45.6425
Methanol 10	4							45.8000	45.8000
Control	4								47.2300
Sig.		1.000	0.177	0.459	1.000	0.147	0.050	0.095	0.088
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.									
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.									

CHA23H11 จำนวนสปอร์

Duncan^a

สารสกัดขยาย	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Ethyl acetate 1000	4	0.2625					
Hexane 1000	4	0.4875					
Methanol 1000	4	0.575					
Ethyl acetate 500	4	0.925	0.925				
Hexane 500	4	0.95	0.95				
Hexane 100	4	1.0625	1.0625				
Hexane 50	4	1.3875	1.3875	1.3875			
Ethyl acetate 100	4	1.4	1.4	1.4			
Methanol 500	4	1.475	1.475	1.475			
Hexane 10	4		2.05	2.05	2.05		
Ethyl acetate 50	4			2.6625	2.6625		
Methanol 100	4				2.925		
Ethyl acetate 10	4				3.3625		
Methanol 50	4				3.3625		
Methanol 10	4					5.025	
Control	4						9.5375
Sig.		0.085	0.104	0.057	0.050	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

CHA23H21 ขนาดโคลน

Duncan^a

สารสกัดหยาบ	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ethyl acetate 1000	4	21.0175								
Hexane 1000	4		28.4113							
Ethyl acetate 500	4		29.9550	29.9550						
Methanol 1000	4			31.1413						
Hexane 500	4				36.8938					
Methanol 500	4				38.8588	38.8588				
Ethyl acetate 100	4					39.3175	39.3175			
Hexane 100	4					40.0950	40.0950			
Hexane 50	4					40.2413	40.2413			
Methanol 100	4						41.4613	41.4613		
Ethyl acetate 10	4							42.9888	42.9888	
Ethyl acetate 50	4							43.3613	43.3613	
Hexane 10	4								43.9988	
Methanol 50	4								44.2775	
Methanol 10	4								44.6563	
Control	4									47.2263
Sig.		1.000	0.144	0.259	0.065	0.233	0.064	0.090	0.160	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

CHA23H21 จำนวนสปอร์						
Duncan ^a						
สารสกัดหยาบ	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Hexane 1000	4	2.6375				
Ethyl acetate 1000	4	2.6875				
Hexane 500	4	2.7750				
Methanol 1000	4	2.9125				
Ethyl acetate 500	4	3.7625	3.7625			
Hexane 100	4	3.8375	3.8375			
Ethyl acetate 100	4	3.9375	3.9375			
Hexane 50	4	4.2375	4.2375			
Methanol 500	4	4.3000	4.3000			
Ethyl acetate 50	4		5.2000	5.2000		
Methanol 100	4			6.4500	6.4500	
Ethyl acetate 10	4				8.0125	8.0125
Hexane 10	4					8.3875
Methanol 50	4					8.5125
Methanol 10	4					8.6375
Control	4					9.5375
Sig.		0.085	0.124	0.127	0.058	0.097
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.						