

การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของจุลินทรีย์กลุ่มราที่มีศักยภาพในการ
ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

CLASSIFICATION OF FUNGI WITH POTENTIAL
BIOACTIVE SUBSTANCE ACTIVITY



สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานปีการศึกษา 2565 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CLASSIFICATION OF FUNGI WITH POTENTIAL
BIOACTIVE SUBSTANCE ACTIVITY



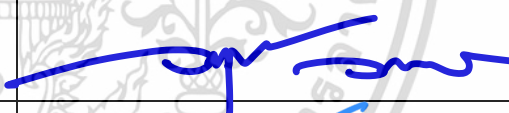
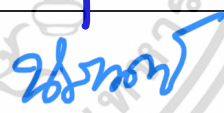

PORNPIMON WONGSAMAN

A COOPERATIVE EDUCATION SUBMITTED IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ACADEMIC YEAR 2022
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของจุลินทรีย์กลุ่มราที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ Classification of fungi with potential bioactive substance activity
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรพิมล วงษาม่าน รหัสนักศึกษา 62050517
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นิลเนตร อัครวะศิริจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นางสาวลิตา ปรีदानนท์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้สหกิจศึกษานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วรกฤต วรรณันทกิจ ประธานกรรมการ และอาจารย์นิเทศ	
ดร.นิลเนตร อัครวะศิริจินดา กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษา	
นางสาวลิตา ปรีदानนท์ กรรมการ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อสหกิจศึกษา	การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของจุลินทรีย์กลุ่มราที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
ชื่อนักศึกษา	นางสาว พรพิมล วงษาม่าน รหัสนักศึกษา 62050517
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นิลเนตร อัคระศิริจินดา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	นางสาวสิตา ปริदानนท์

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ไปประยุกต์ใช้ในหลากหลายด้านทั้งทางด้านอุตสาหกรรม ด้านการแพทย์ ด้านการเกษตรกรรม รวมถึงด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ขนาดใหญ่ในดินให้มีโมเลกุลเล็กลง เปลี่ยนเป็นธาตุอาหาร และทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มราพบที่มีความหลากหลายในระบบนิเวศเป็นอย่างมาก บางกลุ่มมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยร่วมกับพืช และดำรงชีวิตอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืช หรืออยู่รอบๆ รากพืช ซึ่งช่วยในการแลกเปลี่ยนธาตุอาหาร รวมถึงการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และมีอีกหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคทั้งในคน สัตว์ และพืช วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือการจัดจำแนกชนิดพันธุ์เชื้อราที่ทางทีมวิจัยได้คัดแยกจากตัวอย่างดินบริเวณรากพืชจำนวน 105 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากการสุ่มคัดเลือกจากลักษณะสัณฐานของเชื้อราที่แตกต่างกัน เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียต่อไป การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของเชื้อรา ในงานวิจัยนี้ใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลโดยใช้ บริเวณ internal transcribed spacer (ITS1–5.8S–ITS2) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และทำการวิเคราะห์สายพันธุ์เชิงวิวัฒนาการด้วย RAxML-HPC2 on XSEDE (8.2.8) ผ่านแพลตฟอร์ม CIPRES Science Gateway พบว่าจากเชื้อราทั้งหมด 105 สายพันธุ์ สามารถทำการวิเคราะห์ลำดับคลีโอไทด์ได้ทั้งหมด 98 ตัวอย่าง (93%) โดยสามารถจัดจำแนกอยู่ใน 3 ไฟลัม (Phylum) คือ Ascomycota (94%), Basidiomycota (3%) และ Mucoromycota (3%) พบความหลากหลายและกระจายอยู่ใน 13 อันดับ (Order) ได้แก่ Amphisphaeriales, Botryosphaeriales, Cantharellales, Capnodiales, Chaetosphaeriales, Cordanales, Eurotiales, Hypocreales, Mortierellales, Mucorales, Sordariales, Tubeufiales และ Xylariales จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางชีวภาพของราดินบริเวณรากพืช ซึ่งมีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์โดยกรมการส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อกรมการส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ โทร. 02-262-4000 หรือเว็บไซต์ www.doe.go.th ไม่ว่าการคัดลอกหรือการนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต

คำสำคัญ : การจัดจำแนก, ราดิน, วิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ, ลำดับอนุกรมวิธาน, ITS

Title	Classification of fungi with potential bioactive substance activity
Students	Miss Pornpimon Wongsaman Student 62050517
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
School	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2022
Advisor	Dr. Nilnate Assavasirijinda
Co-advisor	Miss Sita Preedanon

Abstract

Currently, microorganisms are used in various fields, including industry, medicine, agriculture, and the environment. Microorganisms have been found to play an important role in decomposing large organic matter into smaller molecules, converting them into nutrients, and soil fertility. Fungi have been discovered as being highly diverse in the natural environment. Some species are symbiotically associated with plants and dwelling inside their tissues, particularly, around plant roots. Additionally, they can also enhance the exchange of nutrients in the soil and promote plant growth. However, there are several species that cause diseases in humans, animals, and plants. The purpose of this study was to classify soil fungi that inhabit around plant roots. The research team had isolated and preliminarily characterized about 105 strains. These fungi were randomly selected according to differences in colony morphology to determine antibiofilm activity against bacterial strains. Based on molecular methods were compared with reported sequences in the GenBank database using the BLAST search engine in NCBI. The datasets containing the selected sequences that followed from the previous studies. Phylogenetic analysis was performed with RAxML-HPC2 on XSEDE (8.2.8) via the CIPRES Science Gateway platform. As a result, DNA barcode analysis revealed that 98 out of the selected fungal strains (93%) could be analyzed, and were classified into 3 phyla: Ascomycota (94%), Basidiomycota (3%), and Mucoromycota (3%). Among these, they belonged to 13 orders: Amphisphaeriales, Botryosphaeriales, Cantharellales,

Capnodiales, Chaetosphaeriales, Cordanales, Eurotiales, Hypocreales, Mortierellales, Mucorales, Sordariales, Tubeufiales, and Xylariales. Our findings demonstrated that soil fungi have considerable richness in the environment of plant roots and could be a potential source for bioactive compound research.

Keywords : Classification, Soil fungi, Phylogenetic analysis, Taxonomy, ITS



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การที่ข้าพเจ้าได้มาปฏิบัติสหกิจศึกษา ณ ธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) จังหวัดปทุมธานี ในระหว่างวันที่ 9 มกราคม พ.ศ. 2566 จนถึงวันที่ 28 เมษายน พ.ศ. 2566 นั้น ทำให้ข้าพเจ้าได้รับองค์ความรู้และประสบการณ์มากมาย ขอขอบพระคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ทีมวิจัยธนาคารจุลินทรีย์ ที่ช่วยให้ความอนุเคราะห์ให้ผู้ศึกษาได้เข้ามาทำการศึกษาสหกิจในครั้งนี้ สำหรับรายงานสหกิจศึกษานี้ ประสบความสำเร็จลงได้ด้วยดีโดยได้รับการสนับสนุนจากคุณสิดา ปรีดานนท์ ผู้ช่วยวิจัยอาวุโส กลุ่มงานวิจัยราทะเล ที่กรุณาให้คำชี้แนะและคำแนะนำแนวทางการศึกษาค้นคว้า และการปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่เกิดขึ้นในขณะปฏิบัติงานด้วยความเมตตาและความเอาใจใส่

ขอขอบพระคุณ ดร. นิลเนตร อัครวะศิริจินดา อาจารย์ที่ปรึกษาวิชา 05206523 CO-Operative Education สำหรับนักศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่คอยให้คำปรึกษาวิชา แนวคิด ดูแลอย่างใกล้ชิด และให้คำแนะนำช่วยเหลือที่ดีในการจัดการงานที่ถูกต้อง วิธีการสืบค้นข้อมูลที่รวดเร็วและแม่นยำ จึงทำให้ข้าพเจ้าสามารถสืบค้นข้อมูลได้ถูกต้องตรงประเด็นที่สำคัญ ๆ พร้อมทั้งตรวจทานระเบียบวิธีวิจัยให้ถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วรกฤต วรรณทกิจ ประธานกรรมการที่ให้เกียรติในการเป็นอาจารย์นิเทศ และคณะกรรมการการสอบวิชาสหกิจศึกษานี้ รวมถึงให้คำปรึกษา เพิ่มเติมความรู้ และชี้แนะแนวทางการเขียนงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วง ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูง

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ที่มีความช่วยเหลือทุกๆ ท่าน ที่มีส่วนเกี่ยวข้องให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ซึ่งข้าพเจ้าไม่สามารถกล่าวนามท่านได้ทั้งหมด ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่มีความสนใจ หากรายงานฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าก็ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

พรพิมล วงษาม่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขต.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา.....	3
2.2 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับบราดิน.....	6
2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราดิน.....	6
2.4 การจัดจำแนกชนิดพันธุ์เชื้อรา.....	7
2.4.1 การจัดจำแนกแบบโพลีฟาซิก.....	8
2.4.2 การจัดจำแนกด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม.....	8
2.4.3 การจัดจำแนกเชื้อราด้วยข้อมูลรหัสพันธุกรรม.....	8
2.5 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ.....	11
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	13
3.1 แหล่งของตัวอย่าง.....	13
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา.....	13
3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ และการทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์.....	14
3.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง.....	14
3.3.2 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการสงวนสิทธิ์ในเนื้อหาบางส่วน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นผู้ที่มีเหตุจำเป็นโดยแท้ และต้องขออนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การทำให้ผลผลิตฟิซีอาร์บริสุทธิ์	15
3.4 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	15
3.4.1 การเตรียมปฏิกิริยา sequencing และการทำให้ปฏิกิริยาบริสุทธิ์	15
3.4.2 การทำให้ปฏิกิริยาบริสุทธิ์.....	15
3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการทำแผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	16
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	17
4.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล.....	17
4.1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา	17
4.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง การตรวจสอบผลผลิตฟิซีอาร์	17
4.1.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Blast search	18
4.2 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	20
4.2.1 ไฟล์ม Ascomycota	20
4.2.2 ไฟล์ม Basidiomycota	46
4.2.3 ไฟล์ม Mucoromycota	48
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	53
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	53
4.1 ข้อเสนอแนะ.....	56
เอกสารอ้างอิง.....	58
ภาคผนวก	66
ภาคผนวก ก	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราดิน	7
2.2 ตัวอย่างไพรเมอร์เฉพาะของเชื้อราแต่ละกลุ่ม.....	10
5.1 การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ราดินด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลเปรียบเทียบระหว่างผล Blast search ของฐานข้อมูล NCBI และผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	53



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะทั่วไปของเส้นใยไมซีเลียม	3
2.2 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา.....	5
2.3 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ของ LSU-28s และ SSU-18s ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ	9
2.4 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ของบริเวณ internal transcribed spacer ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ	9
4.1 ผลการตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค gel electrophoresis.....	17
4.2 ร้อยละของเชื้อราที่จัดจำแนกในระดับไฟลัม (phylum) และชั้น (class) จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Blast search	19
4.3 ร้อยละของเชื้อราที่จัดจำแนกในระดับอันดับ (order), วงศ์ (family) และสกุล (genus) จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Blast search.....	19
4.4 ร้อยละการจัดจำแนกเชื้อราในระดับชนิดพันธุ์ (species) จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Blast search.....	20
4.5 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Amphisphaeriales บริเวณ ITS.....	22
4.6 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Botryosphaeriales บริเวณ ITS.....	24
4.7 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Capnodiales บริเวณ ITS	26
4.8 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Chaetosphaeriales บริเวณ ITS.....	28
4.9 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Cordanales บริเวณ ITS..	30
4.10 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราสกุล <i>Aspergillus</i> ที่อยู่ในอันดับ Eurotiales บริเวณ ITS.....	32
4.11 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสกุล <i>Penicillium</i> ที่อยู่ในอันดับ Eurotiales บริเวณ ITS.....	34
4.12 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสกุล <i>Talaromyces</i> อยู่ในลำดับ Eurotiales บริเวณ ITS.....	35
4.13 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Hypocreles บริเวณ ITS	38
4.14 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในวงศ์ Niesliaceae ซึ่งอยู่ในอันดับ Hypocreles บริเวณ ITS.....	39
4.15 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Sordariales บริเวณ ITS	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับงานวิจัยและไม่ควรนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.16 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Tubeufiales บริเวณ ITS 43

4.17 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Xylariales บริเวณ ITS... 45

4.18 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ
 Cantharellales บริเวณ ITS 47

4.19 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราในอันดับ Mortierellales บริเวณ ITS. 49

4.20 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Mucorales บริเวณ ITS. 50



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
ITS	Internal Transcribed Spacers
SSU	Small subunit
LSU	Large subunit
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ML	Maximum likelihood
DNA	Deoxyribonucleic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์กลุ่มยูคาริโอตเซลล์ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (de Hooh et al., 2000) และมีความหลากหลายเป็นอย่างมาก ปัจจุบันจัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (Monclavo, 2005) ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายที่สำคัญในระบบนิเวศ (Banos et al., 2018) และมีบทบาทมากขึ้นในการนำเชื้อรามาประยุกต์ใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งมีการนำเชื้อรามาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม และด้านเศรษฐกิจ นำไปสู่ผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ มากมาย (Kevin et al., 2019) ไม่ว่าจะเป็นการนำมาใช้รักษาโรคในคน เช่น ยาปฏิชีวนะ penicillin จาก *Penicillium chrysogenum* (Marco et al., 2008) สารยับยั้งไบโอฟิล์มจากสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Taufiq และ Darah, 2020) หรือยารักษาโรคต่างๆ เป็นต้น ด้านอาหาร เช่น ไวน์ และ สีส้มอาหาร เป็นต้น รวมถึงด้านการกำจัดโรคพืช เช่น การปรับปรุงความต้านทานโรคใบไหม้โดยใช้เชื้อรากลุ่ม Ectomycorrhizal คือ *Hymenochaete* sp. (Wang et al., 2022) เป็นต้น แต่ในทางกลับกันเชื้อราหลายชนิดสามารถก่อโรคร้ายแรงได้ทั้งในคน สัตว์ และพืชเช่นกัน (Hyde et al., 2018) ดังนั้นการระบุชนิดพันธุ์ และจำแนกเชื้อราให้ถูกต้องแม่นยำ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ทราบว่าเชื้อชนิดนั้นๆ ให้ประโยชน์ หรือก่อโรค หรือเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ หรือไม่

ในอดีตได้มีการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของเชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ด้วยการสังเกตจากลักษณะ สี รูปร่างของโคโลนี ขนาดของเส้นใย โครงสร้าง และขนาดของสปอร์ด้วยตาเปล่า หรือภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่การระบุชนิดพันธุ์ของเชื้อราแบบดั้งเดิมนั้นเป็นวิธีที่ทำได้ยาก ใช้เวลานาน ต้องอาศัยความรู้ทางด้านอนุกรมวิธานของผู้ที่มีความรู้ความเชี่ยวชาญสูง เพื่อระบุความแตกต่าง และจำแนกได้อย่างถูกต้อง เนื่องจากปัจจุบันมีการค้นพบเชื้อราชนิดใหม่จำนวนมาก และมีความคล้ายคลึงกันมากขึ้น อีกทั้งยังมีการวิวัฒนาการ เพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ในระบบนิเวศที่มีการเปลี่ยนแปลง จึงส่งผลให้การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ด้วยวิธีการข้างต้นมีความผิดพลาด

ดังนั้น จึงมีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล มาช่วยในการจัดจำแนก โดยเทคนิคนี้จะอาศัยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) ศึกษาความแตกต่างในบริเวณ internal transcribed spacers (ITS) ของ ribosomal DNA (rDNA) ซึ่งเป็นเครื่องหมายรหัสพันธุกรรมของเชื้อรา (Schoch et al., 2012) และเป็นบริเวณอนุรักษ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จึงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการจัดจำแนกระดับอนุกรมวิธาน และสายวิวัฒนาการของเชื้อรา เนื่องจากเป็นบริเวณที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่าย และมีความแตกต่างระหว่างชนิดสูง จึง

สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อราส่วนใหญ่ที่มีความใกล้เคียงกันได้ (Ganley and Kobayashi, 2007) และ (Li et al., 2013) รายงานฉบับนี้จึงมีการศึกษา และนำเทคนิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุเปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากมีการนำไปใช้

ทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular Genetic) เข้ามาช่วยให้การจัดจำแนก ระบุชนิดพันธุ์ของเชื้อรา และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมให้มีความถูกต้องมากขึ้น และนำข้อมูลที่ได้มาศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank เพื่อระบุตำแหน่งทางอนุกรมวิธาน และชนิดพันธุ์ของเชื้อรานั้นๆ ให้ถูกต้อง และนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของเชื้อราด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล (Molecular Biology)

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อรา จำนวน 105 สายพันธุ์
- 2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของบริษัท internal transcribed spacer ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)
- 3) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย gel electrophoresis
- 4) ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) บริสุทธิ์ ด้วยวิธี ExoSAP-IT
- 5) เตรียมปฏิกิริยา sequencing ด้วย Bigdye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit และทำให้ปฏิกิริยา sequencing บริสุทธิ์
- 6) วิเคราะห์รหัสพันธุกรรมด้วยเครื่อง Sanger Sequencer 3500 ABI
- 7) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม BioEdit
- 8) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Blast search
- 9) การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) จัดจำแนกเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
- 2) ทราบความสัมพันธ์ และลำดับวิวัฒนาการของเชื้อราที่คัดแยกได้

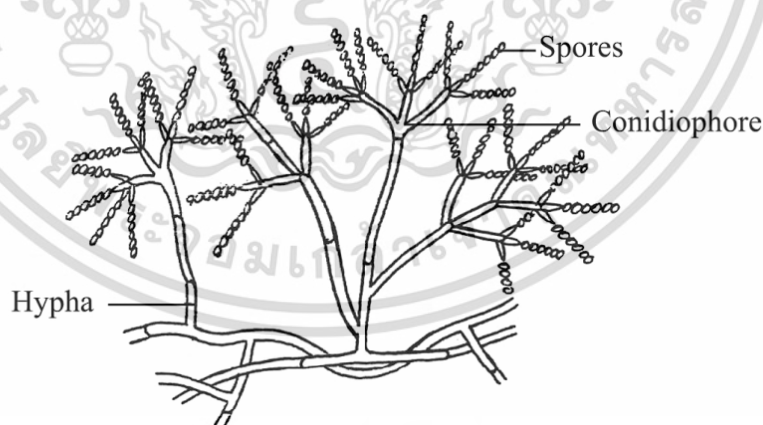
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับเชื้อรา

จุลินทรีย์กลุ่มราจัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (Kingdom Fungi) พบอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น ดิน แหล่งน้ำ ส่วนของพืช ใบ ราก และผล (Maheswari and Komalavalli, 2013) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีว่า จุลินทรีย์กลุ่มรา ประกอบด้วยสองกลุ่มใหญ่ๆ คือ เห็ด (mushrooms) และ รา (molds) บางชนิดก่อโรค บางชนิดทำหน้าที่ย่อยสลาย ช่วยให้พืชเจริญเติบโต และใช้ในการประกอบอาหาร ในส่วนของ การเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเชื้อรานั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น ปริมาณและชนิดของสารอาหาร เป็นต้น (Gaddeyya et al., 2012) เชื้อราเป็นตัวแทนของจุลินทรีย์กลุ่มเฮเทอโรโทรบ (heterotroph) ที่ไม่สามารถสร้างอาหารได้เอง เรียกรวมๆ ว่า “ราที่แท้จริง” หรือ Eumycota (Whittaker, 1969) โดยทั่วไปเชื้อราที่แท้จริงมี ลักษณะดังต่อไปนี้ ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกเบต้ากลูแคน (β -glucans) และไคติน (chitin) ที่มี เซลลูโลส (cellulose) หรือไคโตซาน (chitosan) เป็นองค์ประกอบหลัก เชื้อรามักมีลักษณะเป็นเซลล์ เดียวที่มีรูปร่างเป็นทรงกลมถึงรูปไข่ หรือเจริญเป็นกลุ่มของเส้นใยเรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) ประกอบด้วยโครงสร้างเส้นใยยาว (Hyphae) ดังรูปที่ 2.1 ทำหน้าที่รวบรวมสารอาหาร และสืบพันธุ์ มี amino adipidic pathway สำหรับสังเคราะห์กรดอะมิโนไลซีน (Adl et al., 2018)



รูปที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของเส้นใยไมซีเลียม

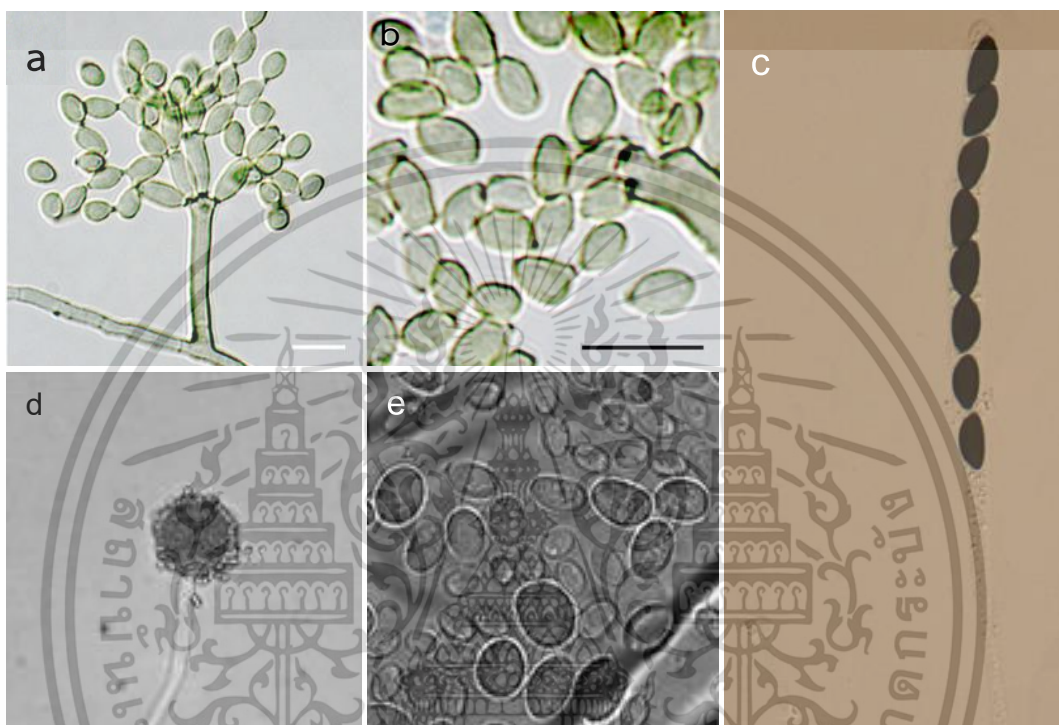
ที่มา : <https://nios.ac.in/media/documents/dmlt/microbiology/lesson-51.pdf>

เชื้อรามีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) นั้นสืบพันธุ์โดย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ การสร้างสปอร์ ระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่สูงมากนัก เนื่องจากการสร้างสปอร์เกิด

จากการแบ่งเซลล์ จึงทำให้มีความเหมือนกันมากทางพันธุกรรม ข้อดีของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือ มีการผลิตสปอร์ และสามารถเจริญเติบโตได้เป็นจำนวนมาก แต่เกิดการกลายพันธุ์ได้น้อย สปอร์ที่สามารถพบได้บ่อยเรียกว่า โคนิเดีย (conidia) เป็นสปอร์ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม มักจะอยู่ที่ปลายสุดของเส้นใยรวมกันเรียกว่า โคนิดิโอฟอร์ (conidiophore) ดังรูปที่ 2.2 a-c พบมากอยู่ในไฟลัมแอสโคไมโคตา (ascomycota) และ ไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (basidiomycota) และสปอร์บางชนิดเรียกว่า สปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospores) ดังรูปที่ 2.2 d เป็นสปอร์ที่เกิดจากปลายเส้นใยพองออกเป็นกระเปาะ แล้วต่อมามีผนังกันเกิดขึ้นภายใน กระเปาะจะมีผนังหนา และเจริญเป็นอับสปอร์ (sporangium) ดังรูปที่ 2.2 e (ภูพาใจ, 2020) ส่วนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) โดยมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส และสร้างสปอร์ที่เรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospore) อยู่ในถุงที่เรียกว่าแอสคัส (ascus) ดังรูปที่ 2.2 f สปอร์ที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะทนต่อสภาพแวดล้อมได้ไม่ดีเท่าสปอร์ที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่การสืบพันธุ์ดังกล่าวมีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า เนื่องจากเกิดการรวมตัวใหม่ และมักเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย เช่น อากาศหนาวจัด ร้อนจัด เป็นต้น

ในอดีตอาณาจักรฟังไจจำแนกเป็น 4 ไฟลัม โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และรูปแบบการสืบพันธุ์ สามารถจำแนกได้ดังนี้ Chytridiomycota Zygomycota Ascomycota และ Basidiomycota (Whittaker, 1969) ต่อมาได้มีการพิสูจน์ว่าไฟลัม Chytridiomycota และ Zygomycota จัดอยู่ในไฟลัมเดียวกัน เนื่องจากมีความเหมือนกันทางพันธุกรรม (Tanabe et al., 2005), (James et al., 2006) และ (White et al., 2006) ปัจจุบันมีการจัดจำแนกเชื้อราออกเป็น 9 ไฟลัม ได้แก่ Opisthosporidia Chytridomycota Neocallimastigomycota Blastocladiomycota Zoopagomycota Mucoromycota Glomeromycota Ascomycota และ Basidiomycota (Miguel et al., 2019) และมีรายงานการค้นพบเชื้อรามากกว่า 150,000 ชนิดพันธุ์ (species) ซึ่งเป็นที่รู้จัก และได้รับการตั้งชื่อ อย่างไรก็ตาม มีการคาดการณ์ว่าจำนวนสายพันธุ์ในอาณาจักรราคงมีอย่างน้อย 1.5 ล้านสายพันธุ์ ถึง 12 ล้านสายพันธุ์ ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดพันธุ์ได้ (Berbee, 2017) และ (Lücking et al., 2021) โดยเชื้อราในกลุ่มแอสโคไมโคตา (Ascomycota) เป็นไฟลัมที่มีสมาชิกอยู่มากที่สุดในอาณาจักรฟังไจ (Lutzoni et al., 2004), (Schoch et al., 2009) และ (McLaughlin and Spatafora, 2015) ซึ่งมีประมาณ 64,000 สายพันธุ์ (Kirk et al., 2008) เนื่องจากความหลากหลายของรากลุ่มดังกล่าวมีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง มีการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม และผลึกต้นให้เกิดนวัตกรรมใหม่ๆ ด้านชีววิทยา (Ortiz et al., 2019) เช่น *Saccharomyces cerevisiae* *Neurospora crassa* และ *Emericella nidulans* เป็นต้น ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในหลากหลายระบบนิเวศทั้งบนบก หรือในน้ำ และมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ เช่น ซากพืช ซากสัตว์ หรือ กิ่งไม้ เป็นต้น (Brodo et al., 2001) บางชนิดพบภายในหินบริเวณที่ราบน้ำแข็งในทวีปแอนตาร์กติกา (Selbmann et al., 2005) ไปจนถึงไม้ใต้ทะเลลึก (Kohlmeyer et al., 1977) ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้อต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ จึงเป็นที่

ทราบกันดีว่าเชื้อราในไฟลัมแอสโคไมโคตาส่วนใหญ่มีระบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มนี้มีตั้งแต่ยีสต์ทั่วไป ไปจนถึงราที่มีความซับซ้อน จากรายงานของ Hibbett et al. ปี 2007 ได้จัดจำแนกเชื้อราไฟลัมแอสโคไมโคตาออกเป็น 3 ไฟลัมย่อย (subphylum) ได้แก่ Taphrinomycotina Saccharomycotina และ Pezizomycotina และแบ่งเป็น 21 ชั้น (Class) 148 อันดับ (Order) 624 วงศ์ (Family) 4,511 สกุล (Genus) (Gautam et al., 2020)



รูปที่ 2.2 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา (a) แสดงรูปร่างของโคนิเดีย (conidia) ของเชื้อราสายพันธุ์ *Cladosporium cladosporioides* (b) แสดงรูปร่างของโคนิดีโอเฟอร์ (conidiophores) ของเชื้อราสายพันธุ์ *C. cladosporioides* (c) แสดงรูปร่างของแอสโคสปอร์ (ascospore) ที่อยู่ในถุงแอสคัส (ascus) ของเชื้อรา *Nemania camelliae* (d), (e) แสดงรูปร่างของอับสปอร์ (sporangium) และสปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospores) ของเชื้อราสายพันธุ์ *Mucor circinelloides*

ที่มา: รูป a-b Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Martin-Vicente, A., Cano-Lira, J. F., Wiederhold, N., Guarro, J. and Genéa, J. 2021. *Cladosporium* Species Recovered from Clinical Samples in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*.

ที่มา: รูป c Pi, Y.H., Long, S.H., Wu, Y.P., Liu, L.L., Lin, Y., Long, Q.D., Kang, J.C., Kang, Y.Q., Chang, C.R., Shen, X.C., Wijayawardene, N.N., Zhang, X. and Li, Q.R., 2021. A taxonomic study of *Nemania* from China, with six new species. *Myckeys*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา: รูป d-e Saito, S., Michailides, T. J., and Xiao, C. L. 2016. *Mucor* Rot-An Emerging Postharvest Disease of Mandarin Fruit Caused by *Mucor piriformis* and other *Mucor* spp. in California. Plant Disease.

2.2 ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับราดิน (soil fungi)

ราดินเป็นเชื้อราที่พบได้ในดิน และมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Mulani and Turukmane, 2014) อีกทั้งยังช่วยรักษาความอุดมสมบูรณ์ และแร่ธาตุในดิน ด้วยการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดิน ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมุนเวียนของคาร์บอนไดออกไซด์ และไนโตรเจน อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์หลายชนิดที่ยึดเกาะบนพื้นผิวของผลไม้ หรือใบไม้ ยังพบว่าเป็นสาเหตุให้เกิดการเน่าเสียของผลผลิตทางการเกษตร และก่อให้เกิดโรคได้อีกด้วย (Alsohaili et al., 2018) อีกทั้งราดินยังสามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดต่างของดินได้หลากหลายเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรีย (Rousk et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบราดินที่อยู่บริเวณรากของพืช และรากกลุ่มย่อยสลาย (Moro et al., 2015) ว่าเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจ

2.3 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราดิน

สารสกัดจากเชื้อราถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ รวมไปถึงใช้ในการทำงานวิจัยมากมาย ซึ่งบางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ไม่ว่าจะเป็น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อ และฤทธิ์ต้านมะเร็ง เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่นั้นได้จากการสกัดสารจากพืช จึงต้องใช้พืชในปริมาณมาก และได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาในปริมาณน้อย จุลินทรีย์จึงเป็นแหล่งค้นคว้าหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากมีความหลากหลาย และเพาะเลี้ยงได้ที่ละมากๆ จากการศึกษาของ Phainuphong et al. ปี 2018 พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราสกุล *Aspergillus unguis* PSU-RSPG204 ซึ่งแยกได้จากดิน ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ methicillin-resistant *S. aureus* (MIC 0.5 µg/mL) และพบสารที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้อีกด้วย Üstün et al. ปี 2019 ได้รายงานการพบเชื้อราในสกุล *Aspergillus sclerotiorum* ซึ่งแยกได้จากดิน ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากรา *A. sclerotiorum* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) และสามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ โดยกลุ่มของราบริเวณรากพืชยังมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (Plant Growth-Promoting Fungi, PGPF) และยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคพืช เช่น ราในสกุล *Trichoderma* spp. *Chaetomium* spp. *Metharhizium* spp. *Emericella* spp. (Teleomorph) (Hossain and Sultana 2020) (Lee et al., 2015) และ (Kumsorn et al., 2013) ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราดิน แสดงดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราดิน

ชื่อราดิน	สาร	คุณสมบัติ	อ้างอิง
<i>Talaromyces flavus</i> strain Bodhi001	สารกลุ่มอัลคาลอยด์ และ เปปทิเดส	ต้านเชื้อราก่อโรคพืช เช่น รา <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Phytophthora palmivora</i> , <i>Colletotrichum capsica</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> ฯลฯ	Jantasorn et al., 2016
<i>Aspergillus fumigatus</i>	N-formyl-4-hydroxyphenyl-acetamide and atraric acid	ต้านแบคทีเรียก่อโรค <i>Acinetobacter baumannii</i> , ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Pleurotus ostreatus</i>	Gill et al., 2023
<i>Aspergillus terreus</i>	Cyclooctasiloxane	ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น <i>S. aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> และ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rajalakshmi and Mahesh, 2014
<i>Trichoderma asperellum</i>	Blenolodes L-N	ยับยั้ง <i>Cryptococcus neoformans</i>	วัชรินทร์ และคณะ, 2562
<i>Chaetomium globosum</i>	Cytochalasin K Cochlodon A	ยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม	Afrah et al., 2021
<i>Drechslera halodes</i>	สารแทนนิน	ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น <i>S. aureus</i> และ <i>E. coli</i>	Tawfik et al., 2013

2.4 การจัดจำแนกชนิดพันธุ์เชื้อรา

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อราที่มีศักยภาพ ซึ่งจะนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ให้ถูกต้อง จึงเป็นหัวใจสำคัญ และเพื่อให้ง่ายต่อการจัดทำข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อรานั้นๆ เช่น คุณสมบัติทางชีวเคมี บทบาททางระบบนิเวศ โทษ และประโยชน์ เป็นต้น โดยวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ หรือ การจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน พบทั้งการศึกษาด้วยวิธีแบบดั้งเดิม (conventional method) เช่น สันฐานวิทยา สรีระวิทยา และการศึกษาทางชีวเคมี เป็นต้น ต่อมา มีการใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล (molecular method) เช่น การทำพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วย RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เป็นต้น รวมไปถึงการใช้เทคนิคการวิเคราะห์หลากหลายวิธีซึ่งเรียกว่า อนุกรมวิธาน โพลีฟาสิก (polyphasic taxonomy) เพื่อให้ทราบชนิดของเชื้อรานั้นๆ นอกจากนี้ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีการวิเคราะห์ลายพิมพ์น้ำหนักเปปไทด์ของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS) เข้ามาใช้ในการสนับสนุนข้อมูลสำหรับการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น (Anna et al., 2022)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 การจัดจำแนกแบบโพลีฟาซิก (polyphasic)

การนำข้อมูลทั้งจีโนมไทป์ และพีโนไทป์ของเชื้อรามาวิเคราะห์ร่วมกัน โดยใช้เทคนิควิธีการการวิเคราะห์หามาซึ่งเรียกได้ว่าเป็นอนุกรมวิธานโพลีฟาซิก (polyphasic taxonomy) ซึ่งสามารถใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราได้ถึงระดับ ชนิดพันธุ์ (species) และระดับสายพันธุ์ (strain) โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมของจุลินทรีย์

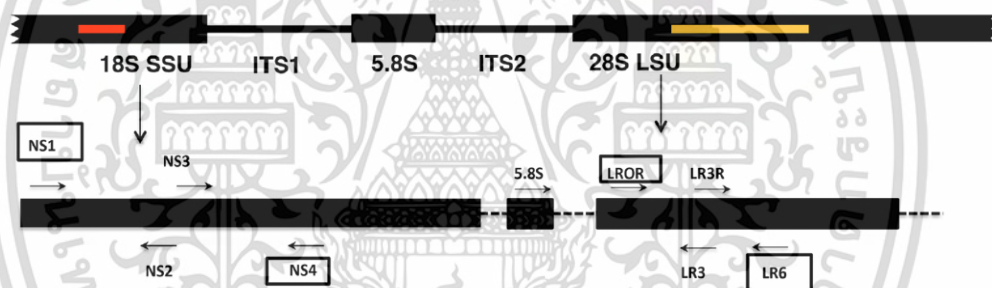
2.4.2 การจัดจำแนกด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม

ตัวอย่างวิธีการแบบดั้งเดิม ได้แก่ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics) สรีระวิทยา (Physiological) และการจัดกลุ่มเชื้อราจากสารที่เชื้อสร้างขึ้น (Chemo taxonomy) เป็นต้น ซึ่งการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกทำได้โดยสังเกตลักษณะของโคโลนีเชื้อราที่แตกต่างกัน เช่น สี ขนาด รูปร่าง จากมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Lima and Borba, 2001) ต่อมามีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยการศึกษาระดับโครงสร้าง และการเรียงตัวกันของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Gaddeyya et al., 2012) ซึ่งทำให้สามารถจัดลำดับอนุกรมวิธานของเชื้อราได้ถึงระดับ อันดับ (Order) หรือ วงศ์ (Family) แต่ยังไม่สามารถจัดจำแนกในระดับชนิดพันธุ์ (species) ได้ดีเท่าไรนัก เนื่องจากความหลากหลายของเชื้อรา รวมถึงสภาวะการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้บางสายพันธุ์มีความซับซ้อนเกินกว่าจะใช้วิธีนี้ในการจำแนก (Wang Z. et al., 2016) บางครั้งการจัดจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจเป็นที่ถกเถียง หรือเป็นปัญหาได้แม้กับผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ จากการจัดลำดับอนุกรมวิธานได้ไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะระบุสายพันธุ์ของเชื้อราตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้มีการใช้ข้อมูลทางสรีระวิทยาในการจัดจำแนก เช่น การศึกษาความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีแหล่งของสารอาหาร (substrate) ที่แตกต่างกัน เช่น การใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ (กลูโคส แลคโตส) การใช้ไนโตรเจน การสร้างก๊าซ การสร้างกรด คุณสมบัติการหมัก เป็นต้น แต่วิธีการทดสอบการใช้สารอาหารเหล่านี้ ค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากต้องมีสารอาหารหลากหลายชนิด และจากเอกสารงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานการมีใช้แหล่งที่อยู่อาศัยเฉพาะของจุลินทรีย์ในการศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อรา วิธีการนี้เป็นการศึกษาด้วยวิธีการจำลองสภาวะการเจริญของเชื้อราในห้องปฏิบัติการ การสุ่มเชื้อราจากตัวอย่างที่ขึ้นบนวัสดุโดยตรงด้วยเทคนิค moist chambers ผู้เชี่ยวชาญทางด้านเชื้อราวิทยาใช้เทคนิคนี้สำหรับเชื้อราที่เจริญบนใบไม้ หรือเศษไม้ขนาดเล็ก เช่น ascomycetes hyphomycetes และราเมือก เป็นต้น เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมและใช้กันอย่างแพร่หลาย

2.4.3 การจัดจำแนกเชื้อราด้วยข้อมูลรหัสพันธุกรรม

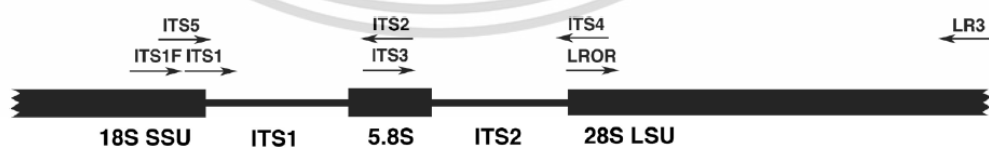
การจัดจำแนกเชื้อราด้วยข้อมูลเครื่องหมายรหัสทางพันธุกรรมที่ไม่ซ้ำกันในเชื้อราแต่ละชนิด สามารถใช้ในการวิเคราะห์ และระบุชนิดของเชื้อราที่แตกต่างกันในระดับสายพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง (Landeweert et al., 2546) การจัดจำแนกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายรหัส

ทางพันธุกรรมนี้กลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาลำดับอนุกรมวิธาน และใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา (Phylogenetic tree) (Alsohaili and Bayan, 2018) การศึกษาลำดับอนุกรมวิธานของเชื้อราโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล สามารถทำได้ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เริ่มขึ้นเมื่อสองทศวรรษก่อนด้วยกระดาษ Seminal โดย White et al. ปี 1990 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา ในส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ จำนวน 3 บริเวณ ได้แก่ LSU-28S (Large subunit) SSU-18S (small subunit) และ Internal transcribed-spacers (ITS) (Bruns et al., 1991) และ (Seifert et al., 1995) คู่ไพรเมอร์ของ LSU-28s เช่น LROR และ LR6 สามารถจัดจำแนกลำดับอนุกรมวิธานได้ในระดับ วงศ์ (family) และ สกุล (genus) และคู่ไพรเมอร์ของ SSU-18s เช่น NS1 และ NS4 สามารถจัดจำแนกได้ในระดับ ไฟลัม (phylum), ชั้น (class), อันดับ (order) ไปจนถึง วงศ์ (family) ดังรูปที่ 2.3 ส่วนบริเวณ ITS ซึ่งเป็นบริเวณที่สามารถใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราได้ถึงระดับ ชนิดพันธุ์ (species) และระดับสายพันธุ์ (strain) (Porras-Alfaro et al., 2014) และ (Schoch et al., 2012) เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันระหว่างชนิดสูงที่สุด ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.3 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ของ LSU-28s และ SSU-18s ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

ที่ ม ๑ : Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J. and Oberlies, N. H. 2023. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Product*. 80 (3): 756-770.



รูปที่ 2.4 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ของบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

ที่ ม ๑ : Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J. and Oberlies, N. H. 2023. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Product*. 80 (3): 756-770.

ดังนั้นในการจัดลำดับอนุกรมวิธาน โดยระบุสายพันธุ์ของเชื้อราสามารถใช้บริเวณ ITS เพียงอย่างเดียว หรือจะใช้ยีนอื่นๆ ร่วมกันก็ได้ (Kress and Erickson, 2012) ในปี พ.ศ. 2550 ผู้เชี่ยวชาญทางด้านเชื้อราวิทยา ได้จัดการประชุมในสหรัฐอเมริกา เพื่อประเมินตำแหน่งดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 6 บริเวณ ได้แก่ SSU, LSU, ITS, RPB1, RPB2 และ MCM7 โดยเสนอให้บริเวณ ITS เป็นบริเวณเครื่องหมายรหัสพันธุกรรมของเชื้อราอย่างเป็นทางการ (Rossmann, 2007) โดยเฉพาะเชื้อราไฟลัม แอสโคไมโคตา (Ascomycota) และไฟลัมเบสิดิโอไมโคตา (Basidiomycota) ซึ่งเป็นไฟลัมที่ใหญ่ที่สุดในอาณาจักรฟังไจ ในปี 2007 Schoch et al. กล่าวว่ามีการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อราประมาณ 172,000 รายการที่รวบรวมข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล GenBank บนเว็บไซต์ www.ncbi.nlm.nih.gov ซึ่งคิดเป็น 56% โดยมีประมาณ 2,500 สกุล และ 15,500 ชนิดพันธุ์ที่มีการระบุชื่อแล้ว เนื่องด้วยความหลากหลาย และความซับซ้อนทางพันธุกรรมของเชื้อราแต่ละชนิด ดังนั้นจึงมีการใช้ข้อมูลรหัสพันธุกรรมจากบริเวณ หรือยีนที่แตกต่างกันในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อรา เช่น *Penicillium*, *Aspergillus* และ *Fusarium* ส่วนใหญ่ใช้ TEF1- α , RPB1, RPB2, β -tubulin และ CaM เป็นเครื่องหมายรหัสพันธุกรรมในการพิสูจน์เอกลักษณ์ และแสดงตัวอย่างเพิ่มเติม ดังตารางที่ 2.2 (Tekpinar and Kalmer, 2019)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างไพรเมอร์เฉพาะของเชื้อราแต่ละกลุ่ม

ตำแหน่ง	กลุ่มเชื้อรา	ไพรเมอร์ 5'-3'
Internal Transcribed Spacer region of the rRNA (ITS)	All Fungi	ITS1 - TCCGTAGGTGAACCTGCGG
		ITS1F - CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
		ITS4 - TCCTCCGCTTATTGATATGC
Large Subunit of the rRNA (LSU, 28S)	All Fungi	LROR - ACCCGCTGAACCTAAGC
		LR6 - CGCCAGTTCTGCTTACC
Small Subunit of the rRNA (SSU, 18S)	All Fungi	NS1 - GTAGTCATATGCTTGCTCTC
		NS4 - CTCCGTC AATTCCTTTAAG
Cytochrome oxidase subunit I (COX1, COI)	Agaricomycota,	Ucox1 - TCTACTAATGCTAAAGATATTGG
	Pezizomycotina	Ucox2 - ATGATTTCTTTATGTTATGCC
	Penicillium	PenF1 - GACAAGAAAGGTGATTTTTATCTTC
		PenR - GGTAAGATAATAATAAACAACACTGCTG
RNA polymerase II subunit 1 (RPB1)	All Fungi	RPB1af - GARTGYCCDGGDCAYTTYGG
		RPB1cr - CCNGCDATNTCRTRTCCATRTA
Second largest subunit of RNA polymerase II (RPB2)	All Fungi	RPB2-5f - GAYGAYMGWGATCAYTTYGG
		RPB2-7cR - CCCATRGCTTYTTRCCCAT
Beta-tubulin (β -tub)	All Fungi	Bt2a - GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
		Bt2b - ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC
Mini chromosome main-tenance protein (MCM7)	All Fungi	Mcm7-709for - ACIMGITITCVGAYGTHAARCC
		Mcm7-1348rev - GAYTTDGCACICCGRTCCWCCCAT
		Mcm7-1447rev - CATIACIGCIGCTRAGRCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

Translation elongation factor 1-alpha (TEF1- α)	All Fungi	EF1-1018F - GAYTTCATCAAGAACATGAT EF1-1620R - GACGTTGAADCCCRACRTTGTC
γ -actin	Sordariomycetes, Dothideomycetes, Plant pathogenic fungi	act-512F - ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC act-783R - TACGAGTCCTTCTGGCCCAT
Sixth subunit of ATP synthase (ATP6)	All Fungi	ATP6-1 - ATTAATTSWCCWTTAGAWCAATT ATP6-2 - TAATTCTANWGCATCTTTAATRTA ATP6-3 - TCTCCTTTAGAACAAATTTGA ATP6-4 - AAGTACGAAWACWTGWGMMTTG
Calmodulin (CaM)	All Fungi	CMD5 - CCGAGTACAAGGAGGCCCTTC CMD6 - CCGATAGAGGTCATAACGTGG

ที่มา: Tekpinar and Kalmer, 2019

2.5 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) เป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ทำให้นักวิทยาศาสตร์มีความเข้าใจที่ดีขึ้นเกี่ยวกับสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตว่ามีการวิวัฒนาการอย่างไร ในขณะที่เดียวกันยังสามารถนำการวิเคราะห์นี้มาอธิบายความเหมือนและความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้อีกด้วย ในการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลรหัสพันธุกรรม เช่น ลำดับกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (DNA) ลำดับกรดไรโบนิวคลีอิก (RNA) หรือ ลำดับโปรตีน (Munja et al., 2019)

แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) มีองค์ประกอบคล้ายต้นไม้ ประกอบด้วย กิ่งก้าน (branch) อาจแตกเป็นกิ่งย่อยบนล่าง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อยเป็นจุดต่อ เรียกว่า โหนด (node) ที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือโปรตีน ที่แสดงตำแหน่งที่อยู่ของสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต เรียกว่า ใบ (leaf) หรือแทกซอน (taxon) หรือแทกซา (taxa) (Somchai, 2008) กลุ่มของแทกซาของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายกัน หรือมีบรรพบุรุษเดียวกัน เรียกว่า เคลด (clad) ส่วนข้อมูลของแทกซาที่ต้องการวิเคราะห์ เรียกว่า ingroup สายพันธุ์ที่นำมาใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ ingroup เรียกว่า outgroup

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุลินทรีย์กลุ่มราที่เกี่ยวข้องกับพืชที่เติบโตในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก Zhong et al. ปี 2023 ได้ทำการวิจัยความหลากหลายของเชื้อราดินที่ได้จากบริเวณรากพืชในประเทศจีน โดยบริเวณ ITS ในการจัดจำแนก ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 ด้วยวิธีการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ High-throughput sequencing หรือเรียกอีกอย่างว่าการวิเคราะห์ลำดับเบส Next-generation (NGS) ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์แบบใหม่ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ครั้งละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้วางไปประดับหรือจำหน่าย
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนมาก สามารถทำได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน มีความไวต่อการตรวจหาการกลายพันธุ์สูง ซึ่งแตกต่างจากวิธี sanger sequencing (ช่อทิพา, 2566) โดยพบเชื้อราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากรากพืช ได้แก่ *Alternaria*, *Fusarium*, *Monosporascus* และ *Podospora* นอกจากนี้ยังพบกลุ่ม *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Clonostachys*, *Mortierella*, *Penicilium* และ *Talaromyces* ด้วย

จากการจัดจำแนกเชื้อราด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยา และวิธีการทางชีวโมเลกุล ทำให้เกิดการนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งในคน สัตว์ และพืช งานวิจัยนี้ได้มีการนำเทคนิคในการจัดจำแนกนี้มาค้นหาเชื้อก่อโรคในมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่เกษตรกรนิยมปลูกกันในประเทศไทย เนื่องจากทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี และใช้ปัจจัยในการผลิตน้อย โดยทางผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างจากดิน และหัวมันสำปะหลัง มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราได้ทั้งหมด 3 สกุล (genus) จาก 16 สายพันธุ์ และผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1/ ITS4 สามารถจำแนกเชื้อรา *Pythium* spp. (*P. acanthicum* และ *P. graminicola*) เชื้อรา *Fusarium solani* และเชื้อรา *Neoscytalidium hyalinum* ได้ เมื่อนำเชื้อราทั้ง 3 สกุลนี้ ไปทดสอบการก่อโรคในต้นมันสำปะหลัง โดยการปลูกต้นมันสำปะหลังร่วมกับเชื้อราจำนวน 8 พันธุ์ พบว่าเชื้อรา *F. solani* และ *N. hyalinum* ก่อให้เกิดโรค และทำให้ต้นมันสำปะหลังตาย ในขณะที่เชื้อรา *Pythium* spp. ที่แยกจากดินไม่ก่อให้เกิดโรคนั้นเอง (พรปวีณ์ และคณะ, 2562)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 แหล่งของตัวอย่าง

ตัวอย่างเชื้อราที่ได้รับมอบหมาย จำนวนทั้งสิ้น 105 สายพันธุ์ ได้มาจากกระบวนการคัดแยกจากตัวอย่างดินบริเวณรากพืชของทิมวิจัย ซึ่งได้ทำการจัดจำแนกลักษณะสัณฐานเบื้องต้นด้วยวิธี morphotyping จากนั้นทางทิมวิจัยได้ทำการสุ่มคัดเลือกจากลักษณะสัณฐานที่แตกต่างกัน เพื่อนำมาทดสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรีย และจัดจำแนกชนิดพันธุ์ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา

นำเส้นใยรามาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method (Thanakitpipattana et al., 2020) เนื่องจากเป็นวิธีการที่ประหยัด ใช้เวลาน้อย ได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณมาก และมีความบริสุทธิ์สูง (Umesha et al., 2016) โดยเติมทรายปลอดเชื้อลงไป 1-2 ช้อน (spatula) ลงในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีเส้นใยรา และทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อราแตกด้วยไม้บดเซลล์ (pestle) จากนั้นเติมสารละลาย CTAB ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และสารละลาย RNase 10 ไมโครลิตร ผสมสารละลายด้วยเครื่องเขย่า (vortex) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่อง Heating Block ผสมสารละลายด้วยเครื่องเขย่า (vortex) อีกครั้ง จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (ในตู้ Fume hood) จากนั้นผสมสารให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา 20 ครั้ง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม isopropyl alcohol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วค่อยๆ เทส่วนใสที่ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) เทส่วนใสทิ้ง และทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการวางไว้ในตู้ fume hood เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับปริมาณของตะกอนดีเอ็นเอ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ และการทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์

3.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ internal transcribe spacer (ITS) ของ rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') - ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) เตรียม PCR master mix ปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดังต่อไปนี้: น้ำ nanopure ปลอดเชื้อ ปริมาตร 17.9 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 10X Taq buffer [(NH₄)SO₄ without MgCl₂] ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 10mM dNTP ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, ไพร์เมอร์ ITS1 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, ไพร์เมอร์ ITS4 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Tag DNA polymerase ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร (Taq DNA polymerase, recombinant, Thermo Scientific™) ปิเปต PCR master mix ปริมาตร 24.5 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 200 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตตัวอย่างดีเอ็นเอลงหลอดที่เตรียมไว้ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และใช้น้ำ nanopure เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (negative control) นำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (T100 Thermal Cycler, BIO-RAD) โดยตั้งอุณหภูมิ ดังต่อไปนี้ Preheat ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, Annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, Cycle 35 รอบ, Final อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที, End อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

3.3.2 การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

เตรียม 1% Agarose gel โดยใช้อัตราส่วนดังต่อไปนี้ Agarose powder 1 กรัม, 1XTAE 100 มิลลิลิตร, Redsafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยชั่ง agarose powder ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม 1X TAE ลงไป จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุณหภูมิเย็นลง จึงเติม Redsafe™ อัตราส่วน 1:20 ลงไปผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบาๆ จากนั้นค่อยๆ เทใส่ถาดเตรียมเจล โดยระวังไม่ให้เกิดฟอง แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที - 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าเจลจะแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ถอดหี (comb) ออก แล้วนำไปวางในเครื่อง electrophoresis

เตรียมผลผลิตพีซีอาร์บนแผ่นพาราฟิน ด้วยการนำมาผสมกับสีย้อม (loading dye) ในอัตราส่วน 5 : 2 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ลงในหลุมเจล ตั้งกระแสไฟที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที โดยสังเกตการเคลื่อนที่ของตัวอย่างจากแถบของสีย้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้วยวิธีการใดๆ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และระวังอย่าให้แถบสีย้อมตกเจล ตรวจสอบคุณภาพผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเครื่องส่องเจล (UV Transilluminator, MS major Science)

3.3.3 การทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์

ปิเปตผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ สาร ExoSAP-IT™ (ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent, Applied Biosystems™) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) จากนั้นนำไปบ่มด้วยเครื่อง Heating Block ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 การเตรียมปฏิกิริยา sequencing และการทำให้ปฏิกิริยาบริสุทธิ์

3.4.1 การเตรียมปฏิกิริยา sequencing

เตรียม sequencing reaction สำหรับบริเวณ ITS ปริมาตร 10 ไมโครลิตร อัตรา 1:8 ลงในหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 200 ไมโครลิตร เตรียมสารละลายดังนี้ น้ำ nanopure 5.75 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (3.2 μmol) 1 ไมโครลิตร, BigDye Sequencing Buffer (5X) 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction Premix (BigDye) 0.25 ไมโครลิตร (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) จากนั้นปิเปตผลผลิตพีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

เตรียม sequencing reaction สำหรับตัวควบคุมเชิงบวก ปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 200 ไมโครลิตร โดยเตรียมสารดังต่อไปนี้: น้ำ nanopure 5.5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (3.2 μmol) 1 ไมโครลิตร, pGEM-T 1 ไมโครลิตร, BigDye Sequencing Buffer (5X) 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction Premix (BigDye) 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (T100 Thermal Cycler, BIO-RAD) ตั้งค่าอุณหภูมิ ดังนี้ เริ่มต้นบ่มที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, Denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที, Extension อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที, Hold อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำให้ปฏิกิริยาบริสุทธิ์

3.4.2 การทำให้ปฏิกิริยาบริสุทธิ์

เติมน้ำ nanopure ปลอดเชื้อลงในหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 7.25 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ได้หลังจาก BigDye ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอด เติมน้ำ Absolute Ethanol ปริมาตร 31.25 ไมโครลิตร, 3M Sodium acetate (pH 4.6) ปริมาตร 1.5

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร ทำให้ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex) เป็นเวลา 5 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่เร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปิเปตสารละลายทิ้งอย่างระมัดระวัง เติม 70% Ethanol (molecular grade) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมสารละลายด้วยเครื่องเขย่า (vortex) เป็นเวลา 5 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่เร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายทิ้งอย่างระมัดระวัง นำไประเหยเอทานอล ด้วยด้วยเครื่อง Heating block ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ละลายตัวอย่างด้วย HiDi-formamide ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วย้ายตัวอย่างลงไมโครเพลท 96 หลุม หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์รหัสพันธุกรรม ด้วยเครื่อง Sanger Sequencer 3500 ABI (Thermo Scientific™)

3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการทำแผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรวจสอบด้วยโปรแกรม BioEdit v.7.7.1.0 จากนั้นนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) และบ่งชี้ชนิดพันธุ์ของเชื้อราเบื้องต้นด้วยร้อยละการบ่งชี้เอกลักษณ์ (% identity) สูงสุด จากนั้นทำการดาวน์โหลดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราแต่ละกลุ่มโดยอ้างอิงตามเอกสารงานวิจัยก่อนหน้านี้ และนำมาจัดเรียงด้วยโปรแกรม Muscle v.3.8 แล้วนำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วย RAxML-HPC2 on XSEDE (8.2.8) (Stamatakis 2014) ผ่านแพลตฟอร์ม CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010) จัดทำรูปแบบ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Figtree v.1.4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล

4.1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา

จากการนำตัวอย่างเชื้อราที่เก็บได้จากดิน และเศษซากใบไม้จำนวน 105 สายพันธุ์ มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method และนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอ และความบริสุทธิ์ของตัวอย่างด้วยเครื่อง nanodrop lite Spectrophotometer โดยได้สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 105 สายพันธุ์ ตามที่ได้รับมอบหมาย ส่วนการวัดปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าจากตัวอย่างทั้งหมดมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ในช่วง 122.6-2,760.2 นาโนกรัม ส่วนการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น A260/A280 พบว่ามีค่าความบริสุทธิ์อยู่ระหว่าง 1.57-2.23 โดยเกณฑ์ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอตามวิธีการมาตรฐาน คืออยู่ในช่วง 1.80-2.00 หากมีคุณภาพดีหากต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีน ปะปนอยู่ในสารละลาย ถ้ามากกว่า 2.00 แสดงว่ามี RNA ปนอยู่ในสารละลาย (กาญจน์ และคณะ, 2018)

4.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction พบว่าจากทั้งหมด 105 สายพันธุ์ ได้ผลผลิตพีซีอาร์เป็นจำนวน 98 สายพันธุ์ และผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดประมาณ 500-600 คู่เบส (base pair) ตัวอย่างผลการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis แสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ผลการตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยที่ (M) คือ 1 Kb DNA Ladder; หมายเลข 1-21 คือตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์; (N) คือ ตัวควบคุมเชิงลบ (negative control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

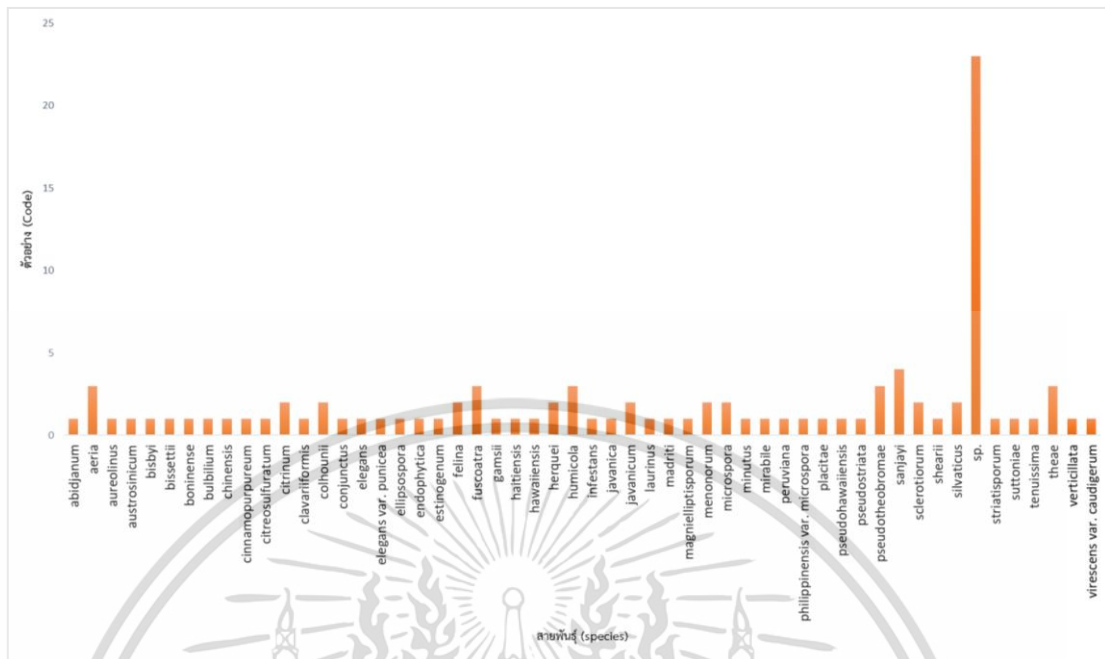
4.1.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Blast search

จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราจำนวน 98 สายพันธุ์ มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยวิธี Blast search พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 ไฟลัม (phylum) ได้แก่ ไฟลัม Ascomycota จำนวน 92 สายพันธุ์, ไฟลัม Basidiomycota จำนวน 3 สายพันธุ์ และไฟลัม Mucoromycota จำนวน 3 สายพันธุ์ พบการกระจายตัวโดยแบ่งเป็นระดับชั้น (class) ได้ทั้งหมด 6 ชั้น ประกอบด้วย Agaricomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Mortierellomycetes, Mucoromycetes และ Sordariomycetes ดังรูปที่ 4.2 และพบการกระจายตัวอยู่ใน 13 อันดับ (order) ได้แก่ Amphisphaeriales, Botryosphaeriales, Cantharellales, Capnodiales, Chaetosphaeriales, Cordanales, Eurotiales, Hypocreales, Mortierellales, Mucorales, Sordariales, Tubeufiales และ Xylariales แบ่งเป็นระดับวงศ์ (family) ได้ 22 วงศ์ ได้แก่ Aspergillaceae, Bionectriaceae, Botryosphaeriaceae, Capnodiaceae, Ceratobasidiaceae, Chaetomiaceae, Chaeto-phaeriaceae, Cordanaceae, Cordycipitaceae, Graphostromataceae, Hypocreaceae, Hypoxylaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Nectriaceae, Niessliaceae, Pestalotiopsisaceae, Sporocadaceae, Stachybotryaceae, Trichocomaceae, Endomelanconiopsisaceae และ Wiesneriomycetaceae ดังรูปที่ 4.3

กระจายตัวอยู่ในระดับสกุล (Genus) ทั้งหมด 35 สกุล ได้แก่ *Acremonium*, *Aquanectria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Biscogniauxia*, *Calonectria*, *Ceratobasidium*, *Chloridium*, *Chaetocapnodium*, *Clonostachys*, *Cordana*, *Cordyceps*, *Cylindrocladiella*, *Endomelanconiopsis*, *Neocosmospora*, *Gliocephalotrichum*, *Gliocladiopsis*, *Humicola*, *Hypoxylon*, *Lasiodiplodia*, *Linnemannia*, *Mariannaea*, *Mucor*, *Myrothecium*, *Neopestalotiopsis*, *Niesslia*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Podila*, *Pseudopestalotiopsis*, *Staphylotrichum*, *Talaromyces*, *Volutella* และ *Wiesneriomyces* ดังรูปที่ 4.3

พบว่าสามารถจัดจำแนกชนิดเชื้อราได้ถึงระดับชนิดพันธุ์ (Species) เป็นจำนวน 53 ชนิดพันธุ์ (75 สายพันธุ์) และมี 23 สายพันธุ์ ที่สามารถระบุได้ถึงระดับสกุลเท่านั้น ดังรูปที่ 4.4 จากผลการจัดจำแนกด้วยการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Blast search พบว่าเชื้อราชนิดส่วนใหญ่ที่พบจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ซึ่งสามารถจัดจำแนกตำแหน่งอนุกรมวิธานในระดับชั้น (class) ได้ทั้งหมด 3 ชั้น ได้แก่ Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Sordariomycetes และกระจายอยู่ใน 10 อันดับ (order), 19 วงศ์ (family) และ 31 สกุล (genus)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ร้อยละการจัดจำแนกเชื้อราในระดับชนิดพันธุ์ (species) จากการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI ด้วยวิธี Blast search

4.2 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้ง 98 สายพันธุ์ ออกเป็น 3 ไฟลัม (phylum) ดังนี้ Ascomycota, Basidiomycota และ Mucoromycota โดยได้แบ่งชุดข้อมูลตามตำแหน่งอนุกรมวิธานระดับอันดับ (order) ได้เป็น 13 ชุดข้อมูล (dataset) และทำการวิเคราะห์แบบ Maximum likelihood (ML) กำหนดค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 รายละเอียดผลการวิเคราะห์ ดังนี้

4.2.1 ไฟลัม Ascomycota

ประกอบด้วย 10 อันดับ (order) ดังนี้

1) อันดับ Amphisphaeriales

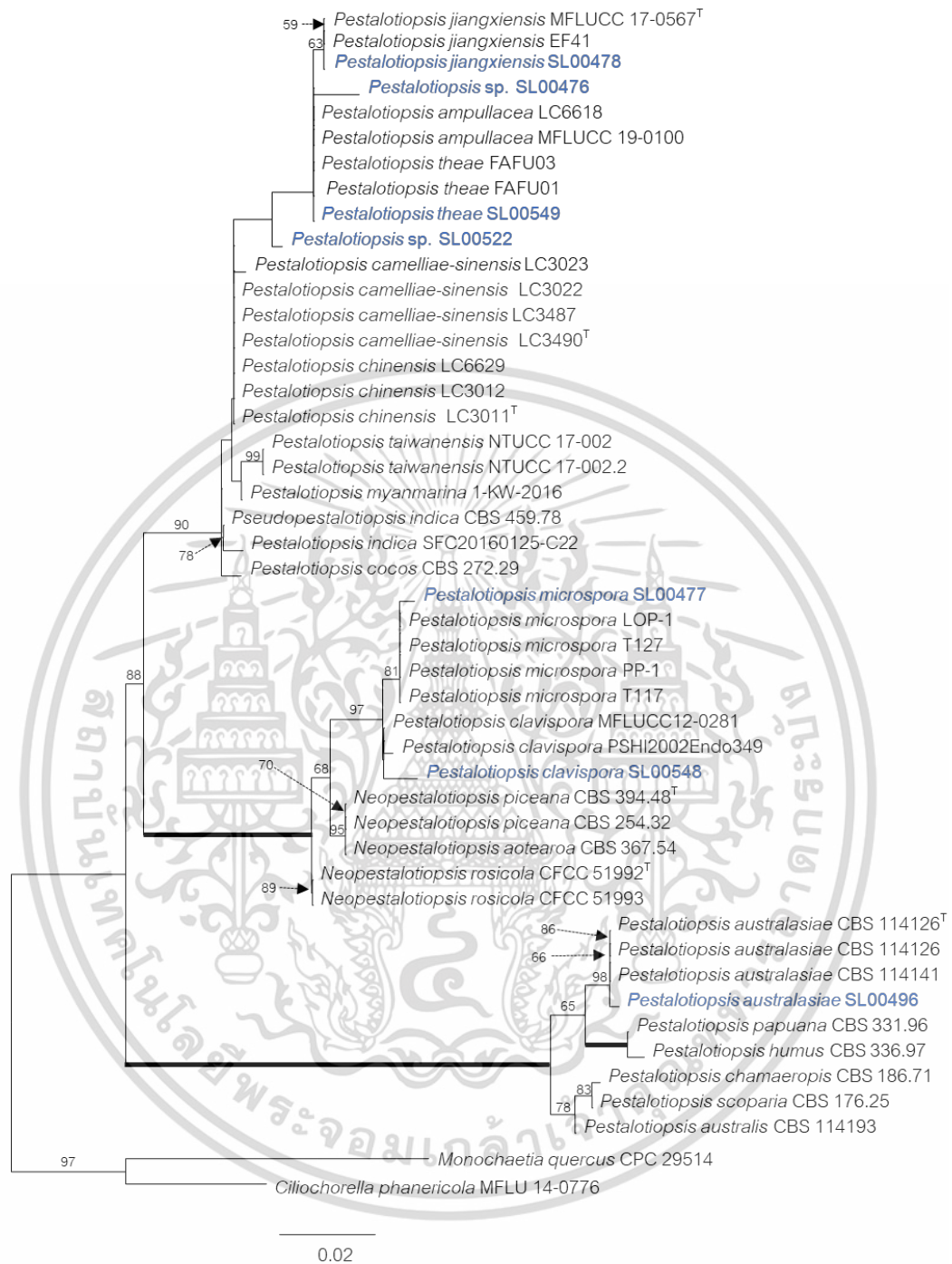
จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราในวงศ์ Pestalotiopsidaceae ซึ่งอยู่ในอันดับ Amphisphaeriales ชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราตินจำนวน 7 taxa (SL00476, SL00477, SL00478, SL00496, SL00522, SL00548 และ SL00549) และเชื้ออื่นๆ จำนวน 40 taxa โดยมี *Monochaetia quercus* และ *Ciliochorella phanericola* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดง

เอกสารนี้ให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00477 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Pestalotiopsis microspora* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 81 เชื้อรารหัส SL00478 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. jiangxiensis* ด้วยค่าความ

เชื้อมันร้อยละ 63 เชื้อรารหัส SL00496 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. australasiae* ด้วยค่าความเชื้อมันร้อยละ 98 เชื้อรารหัส SL00548 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. clavispora* (MFLUCC12-0281 และ PSHI2002Endo349) ด้วยค่าร้อยละการบ่งชี้เอกลักษณ์ (% identity) เท่ากับร้อยละ 100 และเชื้อรารหัส SL00549 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *P. theae* ในส่วนของเชื้อรารหัส SL00476 และ SL00522 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Pestalotiopsis* spp. ด้วยค่าความเชื้อมันต่ำกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นจึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ ดังรูปที่ 4.5



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



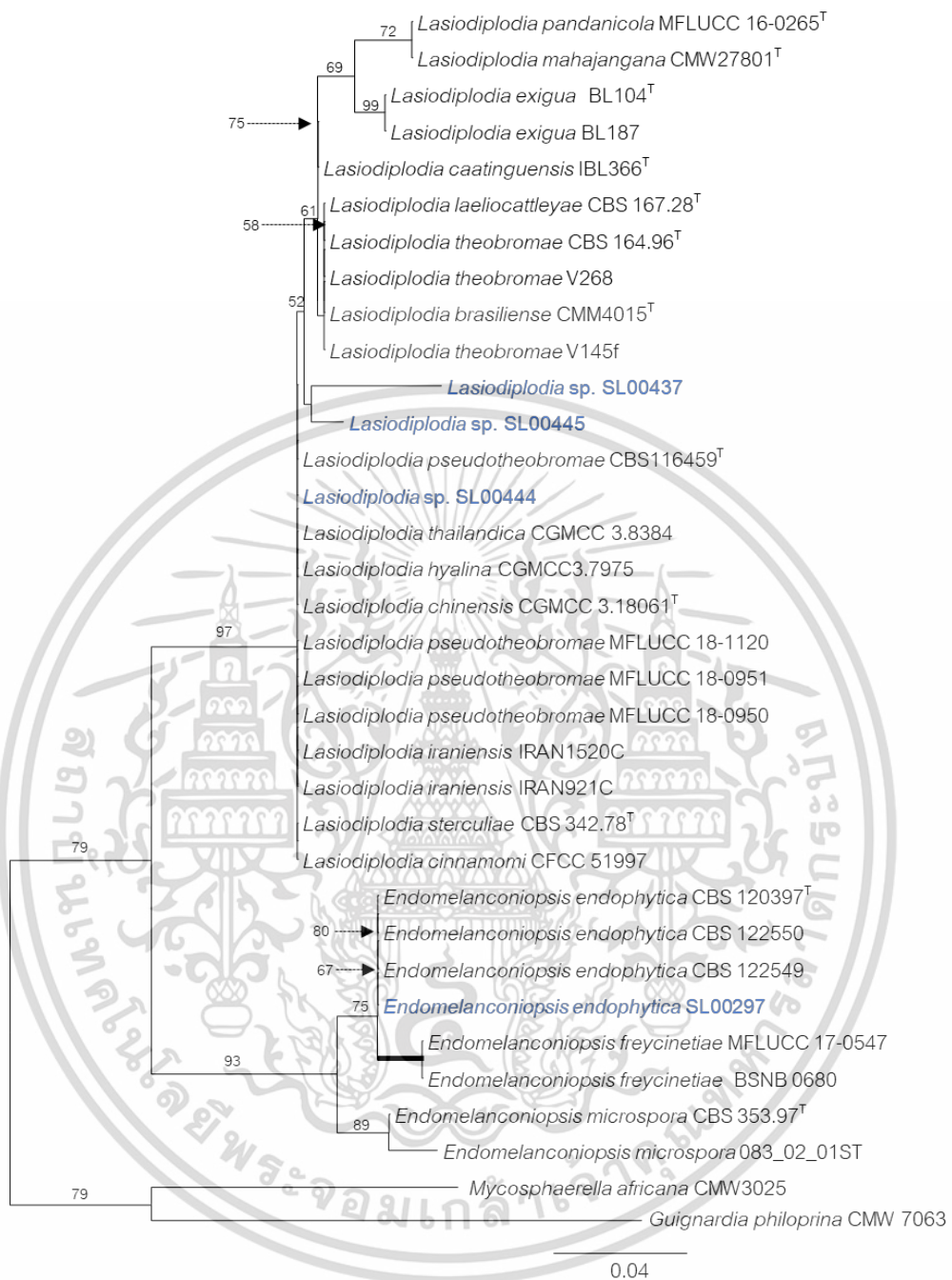
รูปที่ 4.5 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Amphisphaerales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00476, SL00477, SL00478, SL00496, SL00522, SL00548 และ SL00549 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยราทั้งหมด 47 taxa โดยมี *Monochaetia quercus* และ *Ciliochorella phanericola* เป็น outgroup (^T ย่อมาจาก Type)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) อันดับ Botryosphaerales

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราในอันดับ Botryosphaerales ชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราตินจำนวน 4 taxa (SL00297, SL00437, SL00444, และ SL00554) และเชื้อราอื่นๆ จำนวน 30 taxa โดยมี *Mycosphaerella africana* และ *Guignardia philoпрina* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00297 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Endomelanconiopsis endophytica* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 75 ซึ่งอยู่ในวงศ์ Endomelanconiopsidaceae และเชื้อรารหัส SL00437 SL00444 และ SL00445 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด *Lasiodiplodia spp. L. pseudotheobromae* (MFLUCC 18-1120, MFLUCC 18-0950, MFLUCC 18-0951, CBS 116459), *L. hyalina* (CGMCC 3.7975) และ *L. thailandica* (CGMCC 3.8384) ด้วยค่าร้อยละการบ่งชี้เอกลักษณ์ (% identity) เท่ากับร้อยละ 99.3-100 ซึ่งอยู่ในวงศ์ Botryosphaeriaceae ดังนั้นจึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอต่อรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Botryosphaeriales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00297, SL00437, SL00444 และ SL00445 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยเชื้อราทั้งหมด 34 taxa โดยมี *Mycosphaerella africana* และ *Guignardia philoprina* เป็น outgroup (Tย่อมาจาก Type)

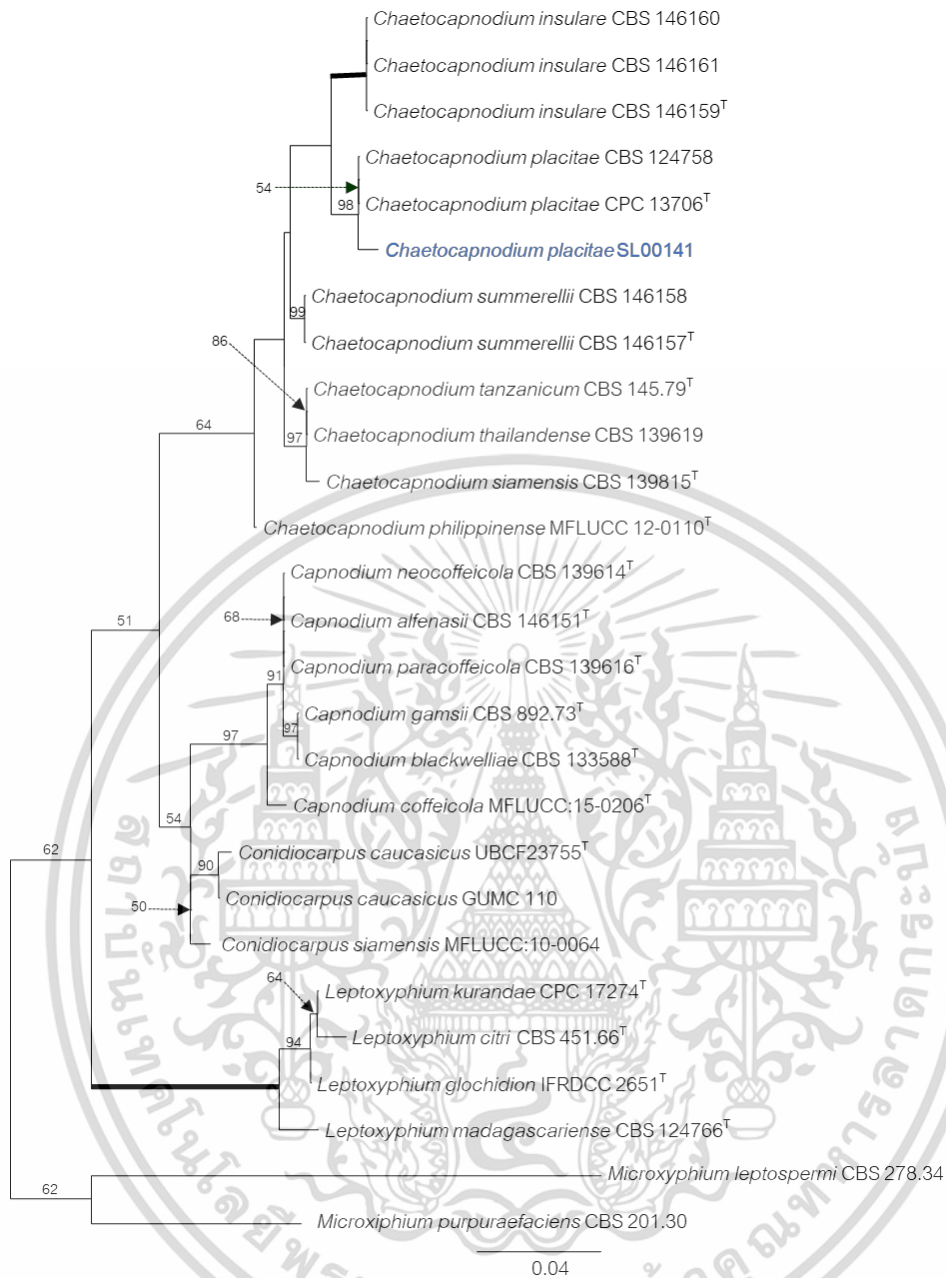
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) อันดับ Capnodiales

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราในวงศ์ Capnodiaceae ในอันดับ Capnodiales ชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราตินจำนวน 1 taxa (SL00141) และเชื้ออื่น ๆ จำนวน 26 taxa โดยมี *Microxyphium leptospermi* และ *M. purpuraefaciens* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00141 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อรา *Chaetocapnodium placita* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 98 ดังรูปที่ 4.7



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Capnodiales บริเวณ ITS ของเชื้อราห้ำส SL00141 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยเชื้อราทั้งหมด 27 taxa โดยมี *Microxyphium leptospermi* และ *M. purpuraefaciens* เป็น outgroup (^T ย่อมาจาก Type)

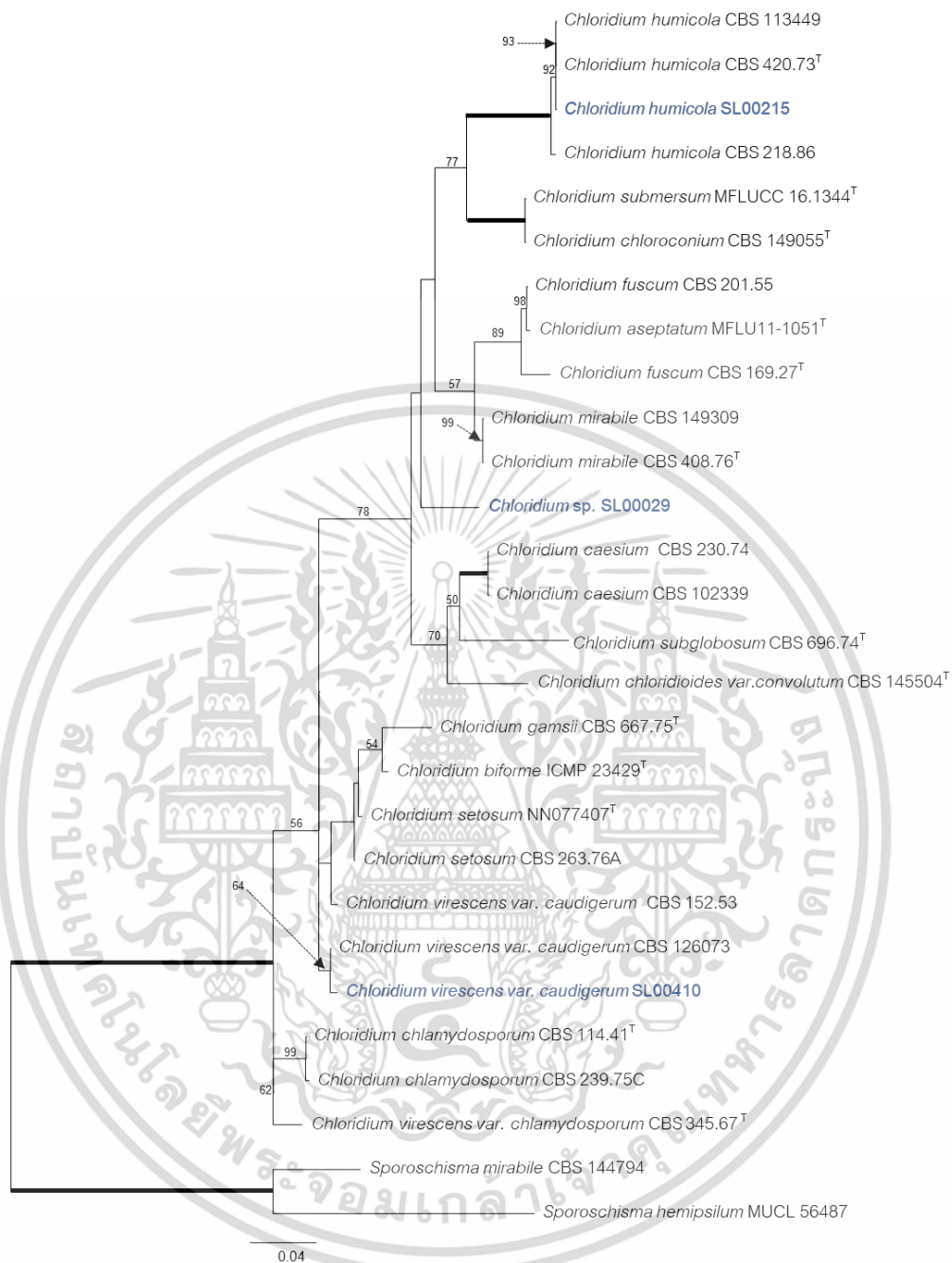
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) อันดับ Chaetosphaeriales

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราในวงศ์ Chaetosphaeriaceae ซึ่งอยู่ในอันดับ Chaetosphaeriales ชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราดินจำนวน 3 taxa (SL00029, SL00215 และ SL00410) และเชื้ออื่นๆ จำนวน 25 taxa โดยมี *Sporoschisma mirabile* และ *S. hemipsilum* เป็น outgroup เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00215 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Chloridium humicola* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 100 เชื้อรารหัส SL00410 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Ch. virescens var. caudigerum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 64 ส่วนเชื้อรารหัส SL00029 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราในกลุ่ม *Chloridium spp.* ด้วยค่าความเชื่อมั่นต่ำกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นจึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ ดังรูปที่ 4.8



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Chaetosphaeriales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00029, SL00215, และ SL00410 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยราทั้งหมด 28 taxa โดยมี *Sporoschisma mirabile* และ *S. hemipsilum* เป็น outgroup (T ย่อมาจาก Type)

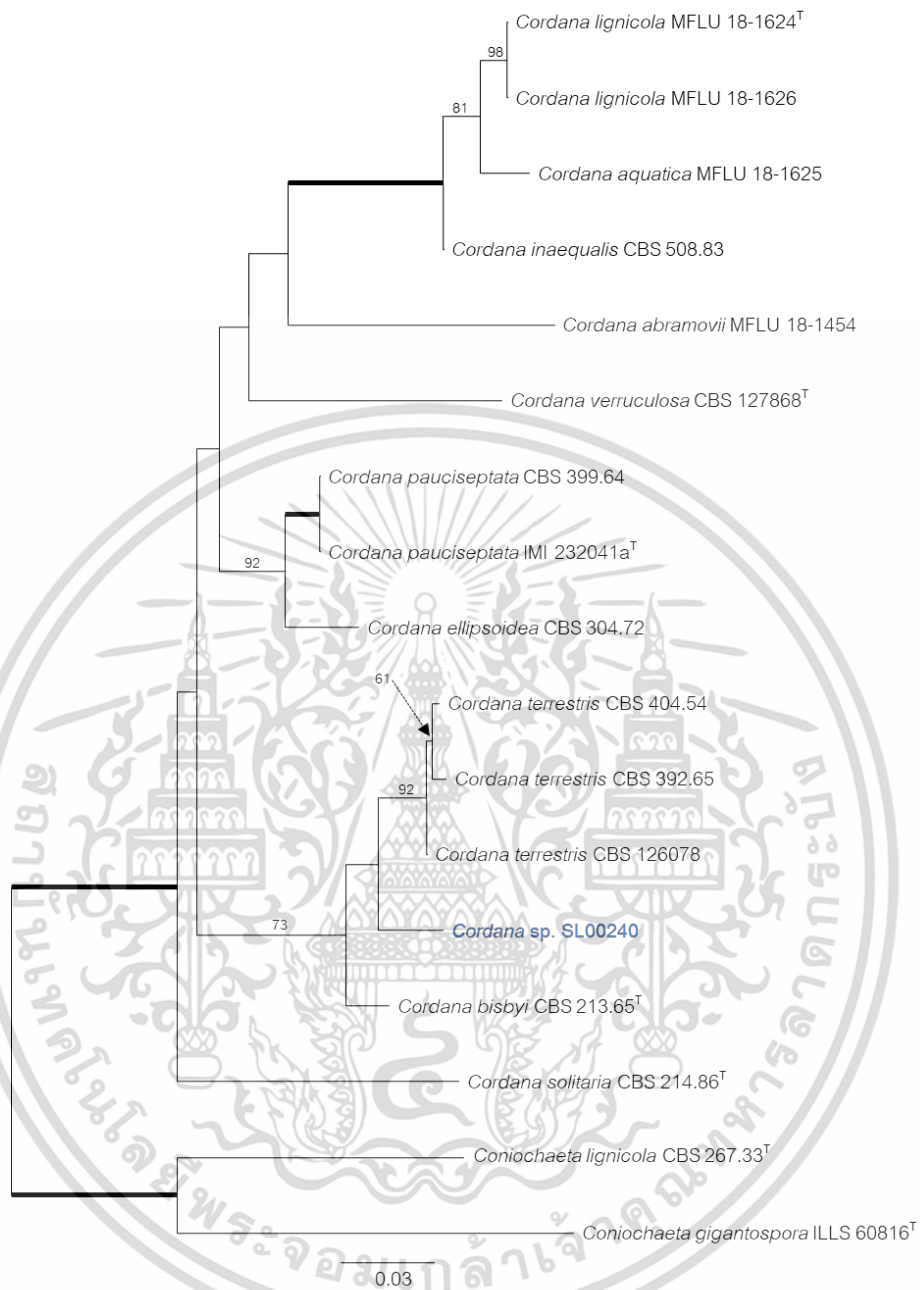
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) อันดับ Cordanales

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราในวงศ์ Cordanaceae ซึ่งอยู่ในอันดับ Cordanales ชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราตินจำนวน 1 taxa (SL00240) และเชื้ออื่น ๆ จำนวน 16 taxa โดยมี *Coniochaeta lignicola* และ *C. gigantospora* เป็น outgroup แสดงให้เห็นว่า SL00240 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Cordana* spp. [*C. bisbyi* CBS 213.65 และ *C. terrestris* (CBS 404.54, CBS 126078 และ CBS 392.65)] ด้วยค่าร้อยละการบ่งชี้เอกลักษณ์ (% identity) เท่ากับร้อยละ 94.3-96.2 และด้วยค่าความเชื่อมั่นต่ำกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นจึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ ดังรูปที่ 4.9



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Cordanales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00240 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยเชื้อราทั้งหมด 17 taxa โดยมี *Coniochaeta lignicola* และ *C. gigantospora* เป็น outgroup (T ย่อมาจาก Type)

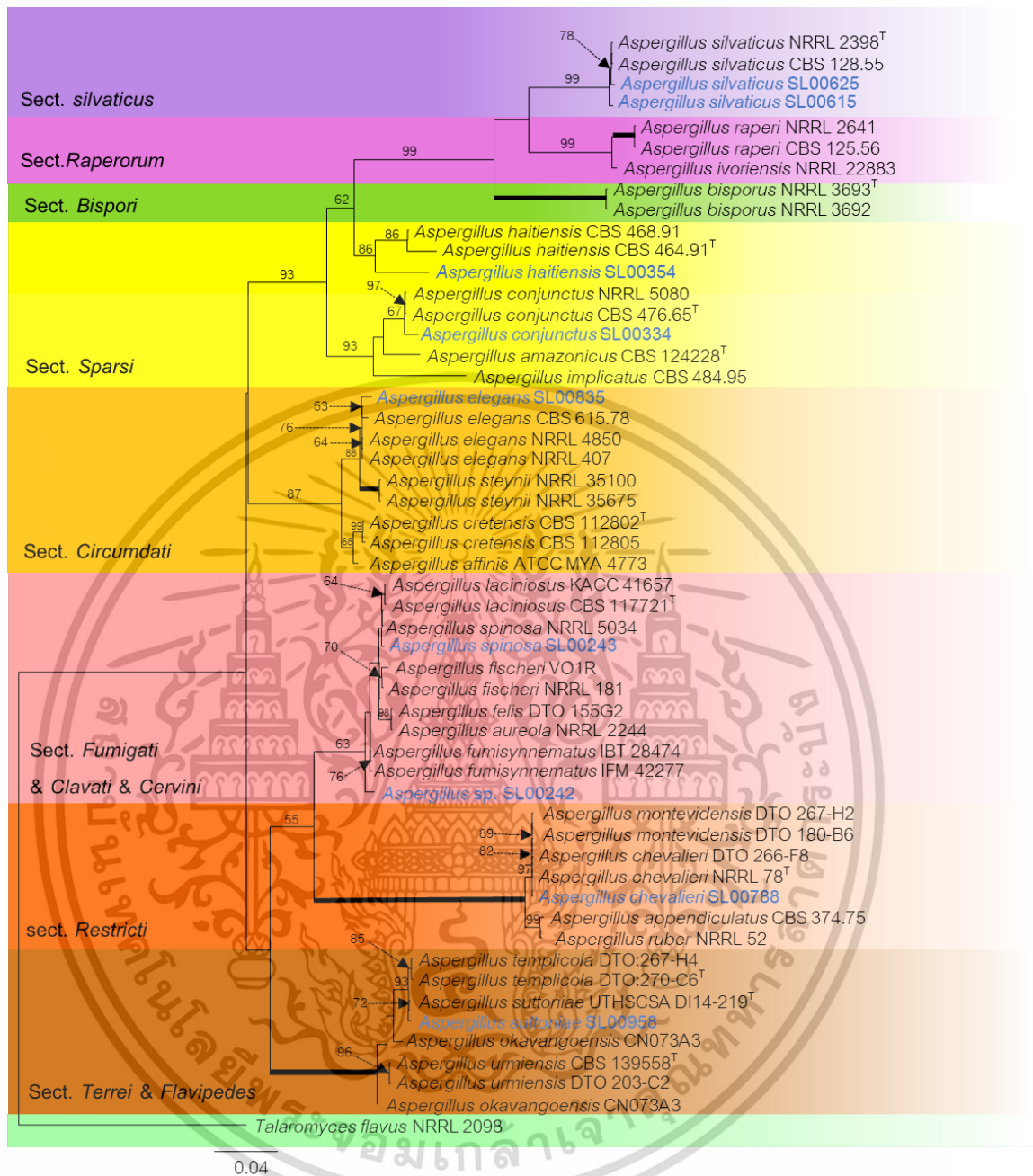
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) อันดับ Eurotiales

จากการเทียบเคียงเบื้องต้นของราตินจำนวน 38 taxa พบว่ามีความสัมพันธ์ของเชื้อราในอันดับ Eurotiales โดยแบ่งออกเป็น 3 สกุล ดังนี้ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Talaromyces*

6.1) สกุล *Aspergillus*

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราในวงศ์ Aspergillaceae ชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราตินจำนวน 9 taxa (SL00242, SL00243, SL00334, SL00354, SL00615, SL00625, SL00788, SL00835 และ SL00958) และเชื้ออื่น ๆ จำนวน 44 taxa โดยมี *Talaromyces flavus* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00243 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Aspergillus spinosa* (NRRL 5034) ด้วยค่าร้อยละการบ่งชี้เอกลักษณ์ (% identity) เท่ากับร้อยละ 99.8 เชื้อรารหัส SL00334 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรากลุ่ม *A. conjunctus* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 67 เชื้อรารหัส SL00354 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรากลุ่ม *A. haitiensis* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 86 เชื้อรารหัส SL00615 และ SL00625 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรากลุ่ม *A. silvaticus* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 99 เชื้อรารหัส SL00788 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรากลุ่ม *A. chevalieri* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 97 เชื้อรารหัส SL00835 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรากลุ่ม *A. elegans* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 76 เชื้อรารหัส SL00958 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรากลุ่ม *A. suttoniae* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 72 ส่วนเชื้อรารหัส SL00242 ด้วยค่าความเชื่อมั่นต่ำกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นจึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ ดังรูปที่ 4.10



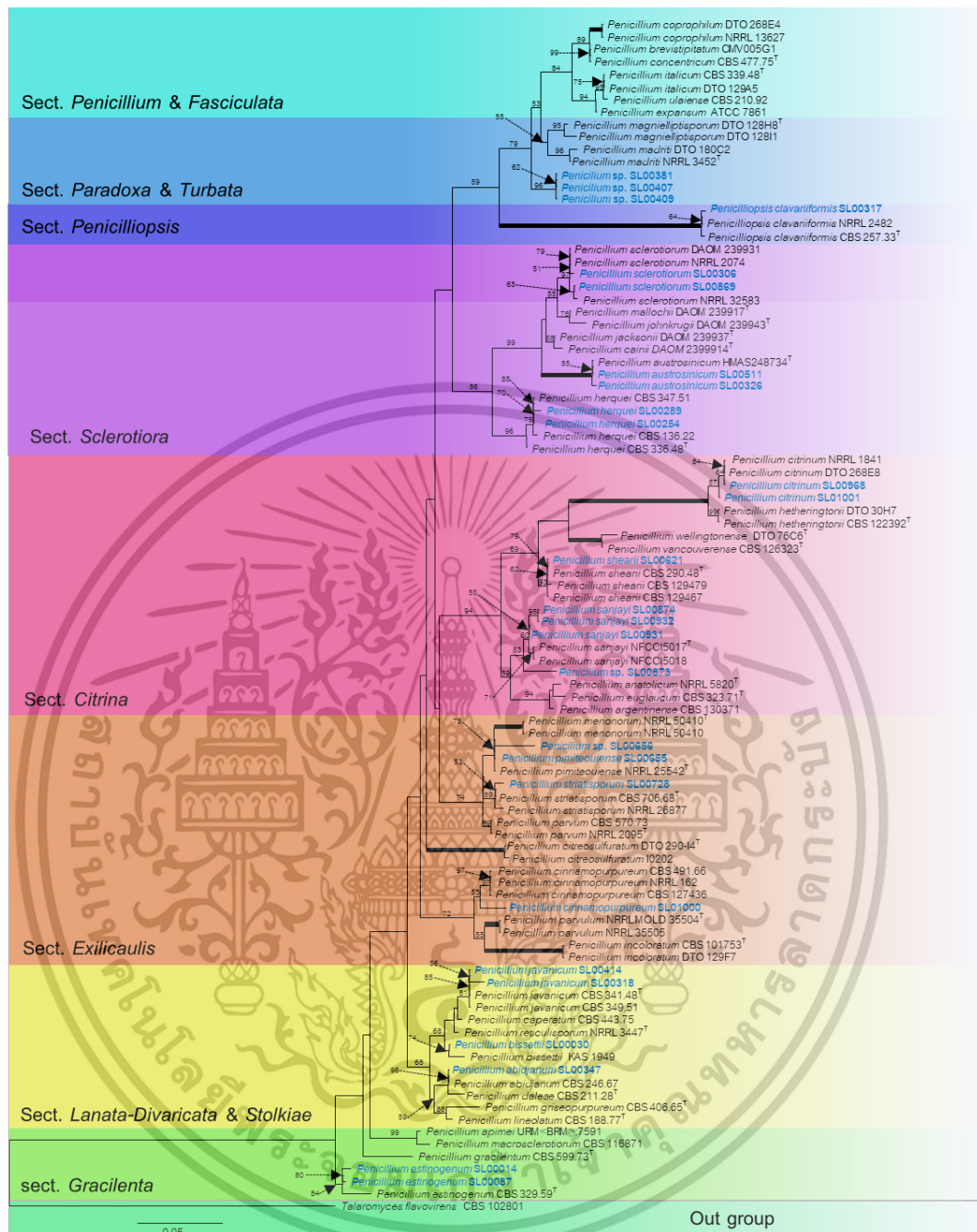
รูปที่ 4.10 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราสกุล *Aspergillus* ที่อยู่ในอันดับ Eurotiales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00242, SL00243, SL00334, SL00354, SL00615, SL00625, SL00788, SL00835 และ SL00958 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยราทั้งหมด 53 taxa โดยมี *Talaromyces flavus* เป็น outgroup (^T ย่อมาจาก Type)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2) สกุล *Penicillium*

ราดินในสกุล *Penicillium* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Aspergillaceae และมีจำนวนสายพันธุ์ (isolate) มากถึง 28 taxa ดังนี้ SL00014, SL00030, SL00087, SL00254, SL00284, SL00289, SL00306, SL00317, SL00318, SL00326, SL00347, SL00381, SL00407, SL00409, SL00414, SL00511, SL00621, SL00655, SL00656, SL00728, SL00869, SL00873, SL00874, SL00931, SL00932, SL00968, SL01000 และ SL01001 โดยชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราอื่นๆ 68 taxa โดยมี *Talaromyces flavus* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00014 และ SL00087 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium estinogenum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 84 เชื้อรารหัส SL00030 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *P. bissettii* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 74 เชื้อรารหัส SL00254 และ SL00289 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *P. herquei* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 96 เชื้อรารหัส SL00306 และ SL00869 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *P. sclerotiorum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 97 เชื้อรารหัส SL00317 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium clavariiformis* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 100 เชื้อรารหัส SL00318 และ SL00414 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *P. javanicum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 81 เชื้อรารหัส SL00326 และ SL00511 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *P. austrosinicum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 100 เชื้อรารหัส SL00347 ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *P. abidjanum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 96 เชื้อรารหัส SL00621 ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *P. shearii* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 93 เชื้อรารหัส SL00655 ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium pimiteouiense* (NRRL 25542) ด้วยค่าร้อยละการบ่งชี้เอกลักษณ์ (%identity) เท่ากับร้อยละ 100 เชื้อรารหัส SL00728 ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *P. striatisporum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 89 เชื้อรารหัส SL00874 SL00931 และ SL00932 ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *P. sanjayi* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 60 เชื้อรารหัส SL00968 และ SL01001 ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *P. citrinum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 87 เชื้อรารหัส SL01000 ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *P. cinnamopurpureum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 55 ในส่วนของเชื้อราจำนวน 6 taxa รหัส SL00284, SL00381, SL00407, SL00409, SL00656 และ SL00873 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Penicillium spp.* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 50 จึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ ดังรูปที่ 4.11

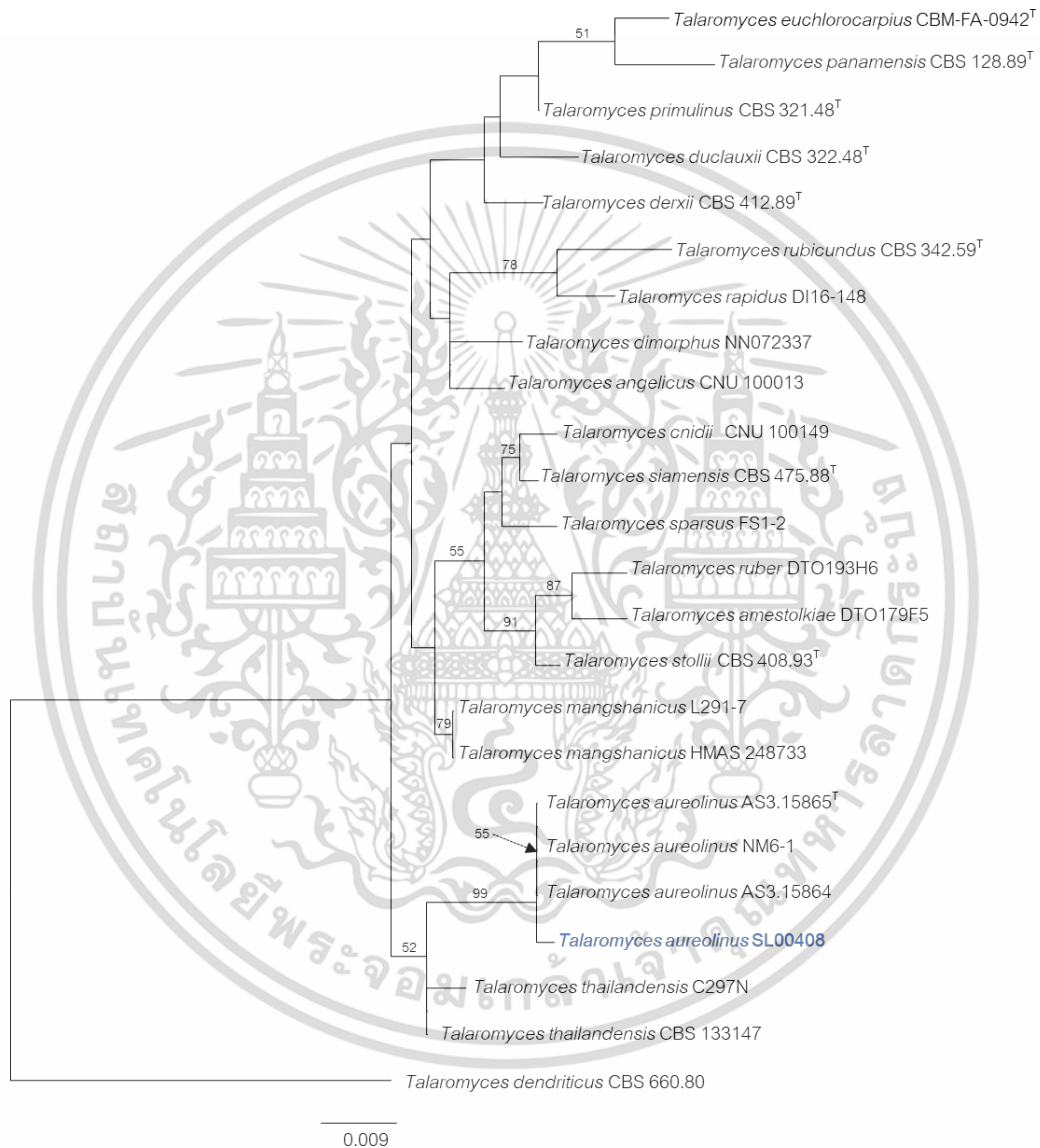
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสกุล *Penicillium* ที่อยู่ในอันดับ Eurotiales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00014, SL00030, SL00087, SL00254, SL00284, SL00289, SL00306, SL00317, SL00318, SL00326, SL00347, SL00381, SL00407, SL00409, SL00414, SL00511, SL00621, SL00655, SL00656, SL00728, SL00869, SL00873, SL00874, SL00931, SL00932, SL00968, SL01000 และ SL01001 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยราทั้งหมด 96 taxa โดยมี *Talaromyces flavovirens* เป็นเอกสารนี้ (T ย่อมาจาก Type) ใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.3) สกุล *Talaromyces*

ราดินในสกุล *Talaromyces* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Trichocomaceae ชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราดินจำนวน 1 taxa (SL00408) และเชื้ออื่นๆ จำนวน 23 taxa โดยมี *Talaromyces dendriticus* เป็น outgroup จากแผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่า SL00408 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรากลุ่ม *T. aureolinus* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสกุล *Talaromyces* อยู่ในลำดับ Eurotiales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00408 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยเชื้อราทั้งหมด 24 taxa โดยมี *Talaromyces dendriticus* เป็น outgroup (T ย่อมาจาก Type)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7) ลำดับ Hypocreles

ราดินในลำดับ Hypocreles เป็นกลุ่มที่มีจำนวนสายพันธุ์ (isolate) มากที่สุดคือ 31 taxa (SL00046, SL00047, SL00048, SL00050, SL00056, SL00065, SL00098, SL00166, SL00250, SL00271, SL00295, SL00364, SL00436, SL00438, SL00443, SL00482, SL00504, SL00505, SL00523, SL00524, SL00525, SL00526, SL00527, SL00539, SL00540, SL00547, SL00560, SL00664, SL00751, SL00848 และ SL00849) และกระจายตัวอยู่ใน 6 วงศ์ คือ Bionectriaceae, Cordycipitaceae, Nectriaceae และ Niessliaceae โดยแบ่งเป็น 2 ชุดข้อมูล คือ ชุดข้อมูลการวิเคราะห์ที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อราดินจำนวน 30 taxa และเชื้อราอื่นๆ จำนวน 121 taxa โดยมี *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. aenigma* เป็น outgroup ส่วนชุดข้อมูลการวิเคราะห์ที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อราดิน 1 taxa และเชื้อราอื่นๆ จำนวน 23 taxa โดยมี *Microascus trigonosporus* เป็น outgroup รายละเอียดดังนี้

7.1) วงศ์ Bionectriaceae (SL00664, SL00751, SL00848 และ SL00849)

จากวิเคราะห์พบว่าเชื้อรารหัส SL00664, SL00848 และ SL00849 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *Clonostachys psuedostiata* ด้วยค่าความเชื่อมน้อยละ 100 และเชื้อรารหัส SL00751 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *C. candelabrum* ด้วยค่าความเชื่อมน้อยละ 83 รูปที่ 4.13

7.2) วงศ์ Cordycipitaceae (SL00271, SL00295 และ SL00482)

ผลวิเคราะห์พบว่าเชื้อรารหัส SL00271 และ SL00295 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Amphichorda felina* ด้วยค่าความเชื่อมน้อยละ 100 และเชื้อรารหัส SL00482 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Cordyceps javanica* ด้วยค่าความเชื่อมน้อยละ 100 รูปที่ 4.13

7.3) วงศ์ Nectriaceae

จากผลการวิเคราะห์พบเชื้อราจำนวน 21 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์กับเชื้อราในวงศ์ Nectriaceae ได้แก่ SL00046, SL00047, SL00048, SL00050, SL00056, SL00166, SL00250, SL00436, SL00438, SL00443, SL00504, SL00505, SL00523, SL00524, SL00525, SL00526, SL00527, SL00539, SL00540, SL00547 และ SL00560 โดยเชื้อรารหัส SL00046 และ SL00047 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Gliocephalotrichum humicola* ด้วยค่าความเชื่อมน้อยละ 98 และเชื้อรารหัส SL00048 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *G. bulbilium* ด้วยค่าความเชื่อมน้อยละ 80 เชื้อรารหัส SL00050 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *Gliocladiopsis forbergii* (BRIP 60984) ด้วยค่าร้อยละการบ่งชี้เอกลักษณ์ (%identity) เท่ากับร้อยละ 100 ส่วนเชื้อรารหัส SL00540 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *G. guangdongensis* ด้วยค่าความเชื่อมน้อยละ 58 เชื้อรารหัส SL00065 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Neocosmospora solani* ด้วยค่าความเชื่อมน้อยละ 100 เชื้อรารหัส SL00166 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Mariannaea elegans* var. *punicea* ด้วยค่าความเชื่อมน้อยละ 100 เชื้อรารหัส

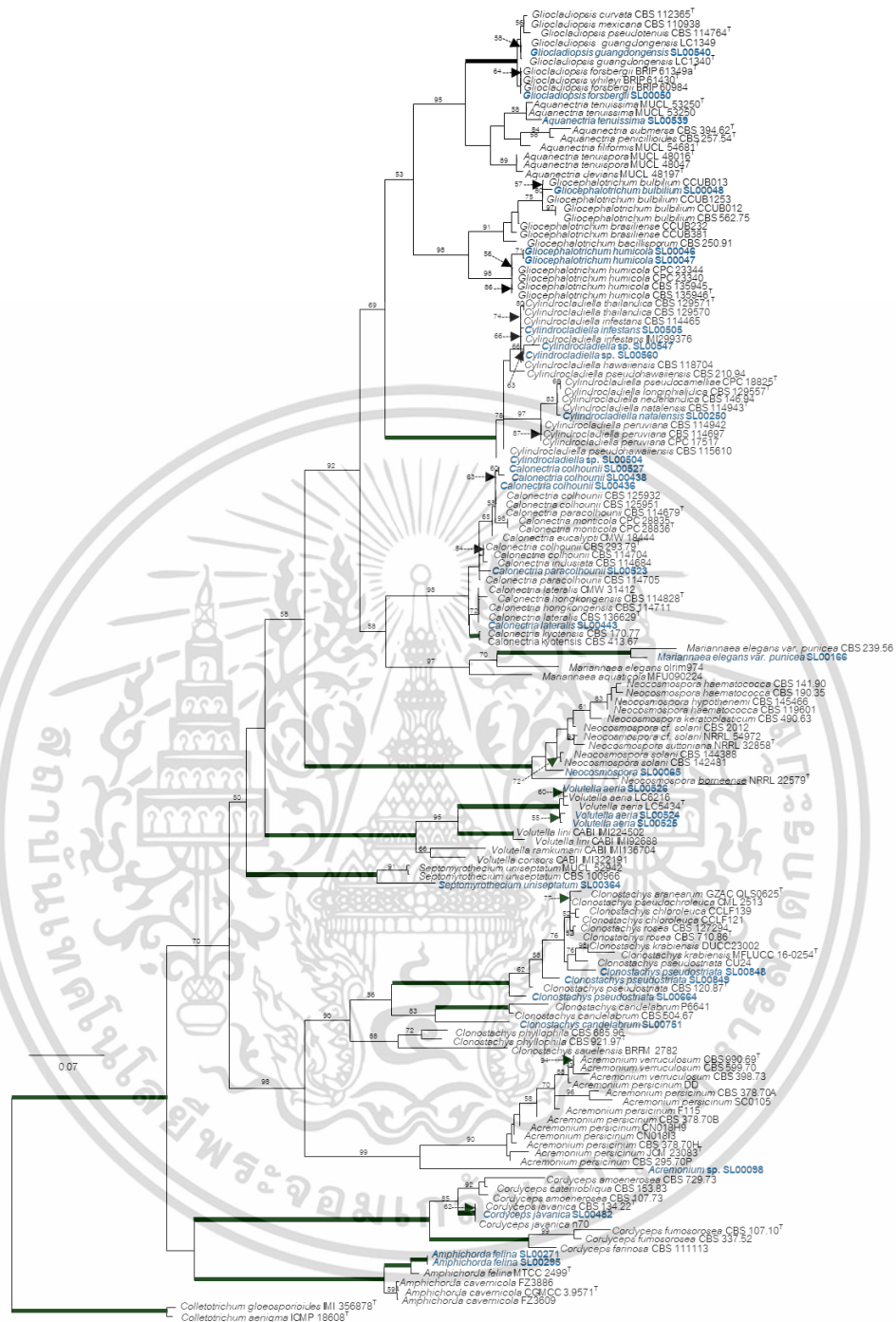
SL00505 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Cylindrocladiella infestans* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 66 เชื้อรารหัส SL00250 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. natalensis* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 83 ส่วนเชื้อรารหัส SL00504, SL00547 และ SL00560 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Cylindrocladiella spp.* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 100 เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ จึงสามารถจำแนกได้เพียงระดับสกุล นอกจากนี้เชื้อรารหัส SL00436 SL00438 และ SL00527 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Calonectria colhounii* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 63 เชื้อรารหัส SL00523 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. paracolhounii* (CBS 114679, CBS 114705) ด้วยค่าร้อยละการบ่งชี้เอกลักษณ์ (%identity) เท่ากับร้อยละ 99.5 และ SL00443 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *C. lateralis* (CBS 136629) ด้วยค่าร้อยละการบ่งชี้เอกลักษณ์ (%identity) เท่ากับร้อยละ 100 และเชื้อรารหัส SL00524, SL00525 และ SL00526 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Volutella aerea* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 100 และเชื้อรารหัส SL00539 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Aquanectria tenuissima* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 58 รูปที่ 4.13

7.4) วงศ์ *Hypocreles incertae sedis* (SL00098, SL00364)

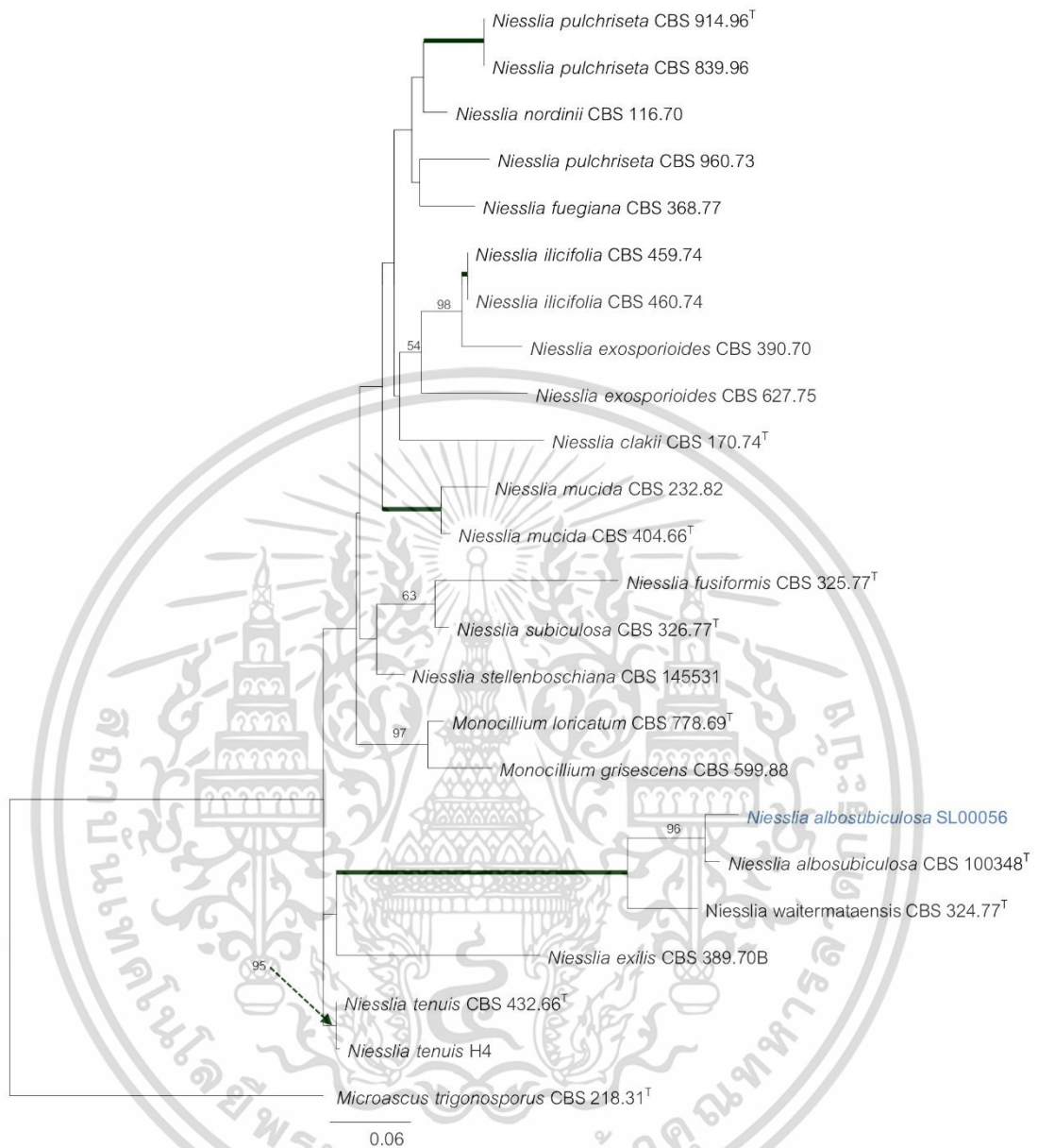
จากแผนภูมิสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าเชื้อรารหัส SL00364 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Septomyrothecium uniseptatum* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 100 ส่วนเชื้อรารหัส SL00098 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในสกุล *Acremonium spp.* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 98 เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล รูปที่ 4.13

7.5) วงศ์ *Niessliaceae* (SL00056)

จากการวิเคราะห์พบว่าเชื้อรารหัส SL00056 มีความสัมพันธ์กับเชื้อราในวงศ์ *Niessliaceae* และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Niesslia albosubiculosa* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 96 รูปที่ 4.14



รูปที่ 4.13 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Hypocreles บริเวณ ITS ของเชื้อราจำนวน 30 สายพันธุ์ ดังนี้ SL00046, SL00047, SL00048, SL00050, SL00056, SL00098, SL00166, SL00250, SL00271, SL00295, SL00364, SL00436, SL00438, SL00443, SL00482, SL00504, SL00505, SL00523, SL00524, SL00525, SL00526, SL00527, SL00539, SL00540, SL00547, SL00560, SL00664, SL00751, SL00848 และ SL00849 ด้วยวิธีการเอกสารนี้วิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยเชื้อราทั้งหมด 150 taxa โดยมี *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. aenigma* เป็น outgroup (ได้มาจาก Type)



รูปที่ 4.14 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในวงศ์ Niessliaceae ซึ่งอยู่ในอันดับ Hypocreles บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00056 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยเชื้อราทั้งหมด 24 taxa โดย *Microascus trigonosporus* เป็น outgroup (^T ย่อมาจาก Type)

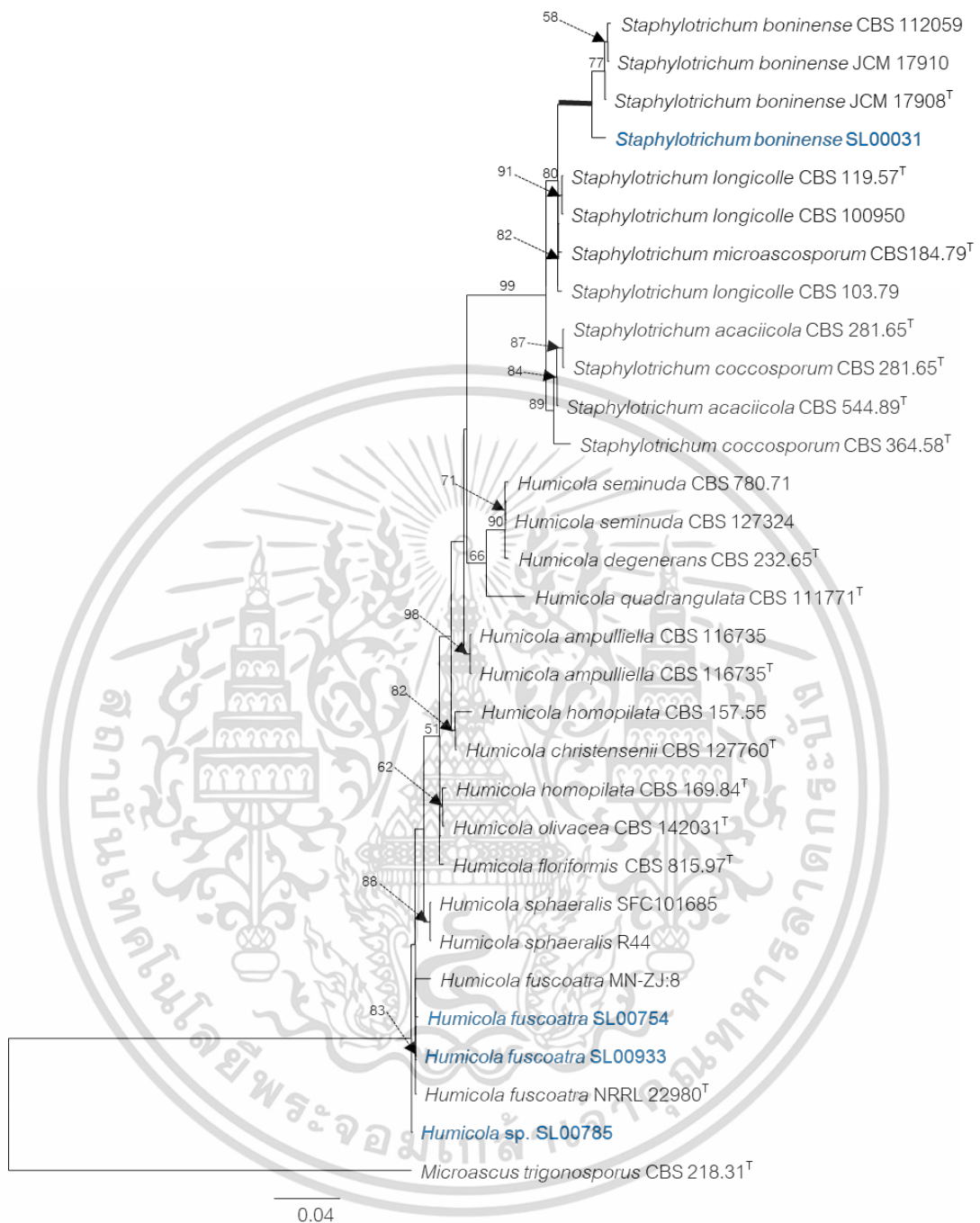
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8) อันดับ Sordariales

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราในวงศ์ Chaetomiaceae ซึ่งอยู่ในอันดับ Sordariales ชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราตินจำนวน 4 taxa (SL00031, SL00754, SL00785 และ SL00933) และเชื้ออื่นๆ จำนวน 27 taxa โดยมี *Microascus trigonosporus* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00031 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Staphylotrichum boninense* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 100 และเชื้อรารหัส SL00754 และ SL00933 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Humicola fuscoatra* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 83 ส่วนเชื้อรารหัส SL00785 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Humicola* spp. เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงจำแนกได้เพียงระดับสกุลดังรูปที่ 4.15



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4. 15 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Sordariales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00031, SL00754, SL00785 และ SL00933 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยยราทั้งหมด 31 taxa โดย *Microascus trigonosporus* เป็น outgroup (^T ย่อมาจาก Type)

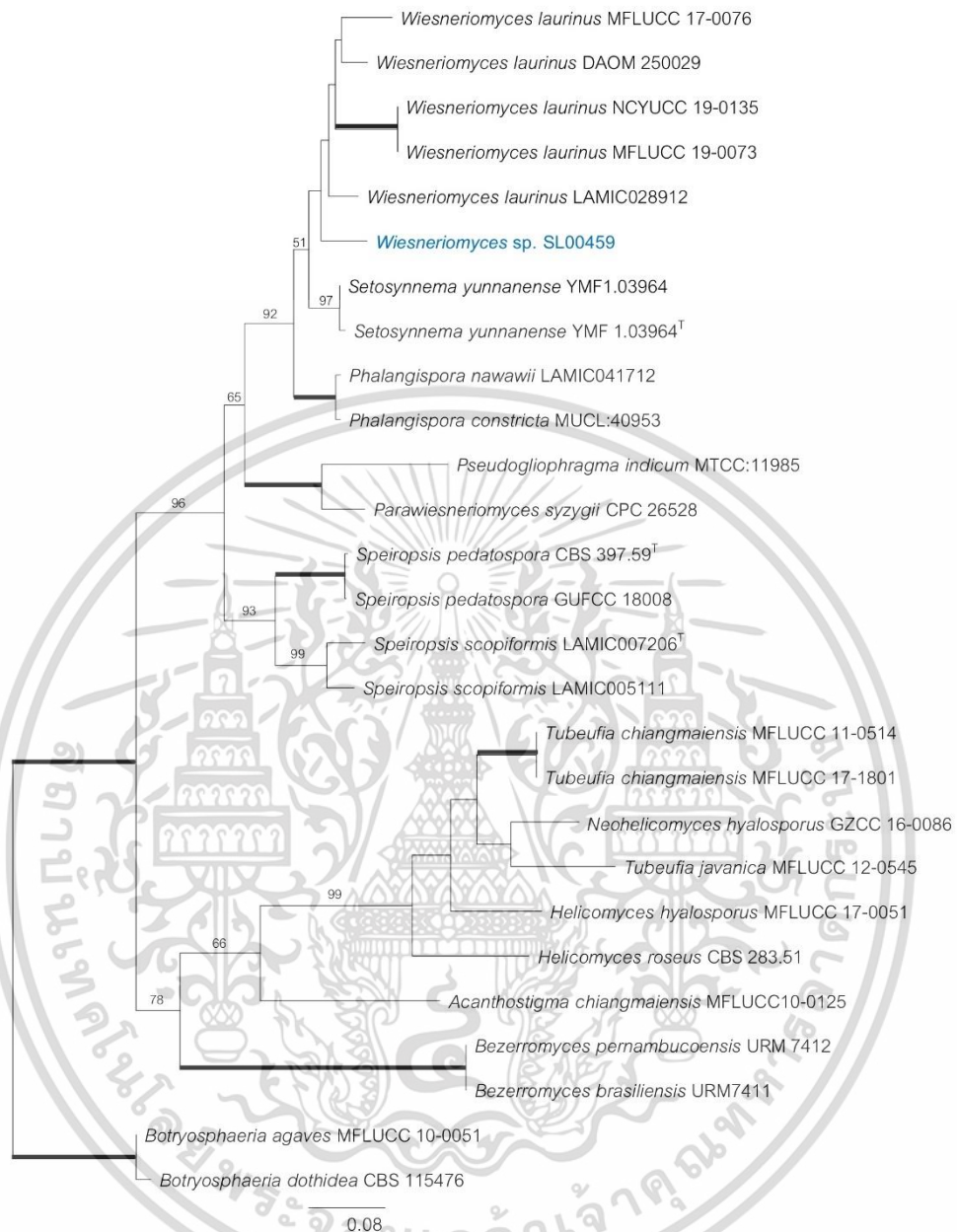
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9) อันดับ Tubeufiales

จากการวิเคราะห์พบว่าเชื้อราดินจำนวน 1 taxa (SL00459) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราในวงศ์ Wiesneriomycetaceae (อันดับ Tubeufiales) โดยชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้ออื่นๆ จำนวน 22 taxa โดยมี *Botryosphaeria agaves* และ *B. dothidea* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00459 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *Wiesneriomyces laurinus* (MFLUCC 17-0076, DAOM 250029, NCYUCC 19-0135, MFLUCC 19-0073, LAMIC028912) ด้วยค่าร้อยละการแบ่งชี้เอกลักษณ์ (% identity) เท่ากับร้อยละ 89.4-99.3 ดังนั้นจึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ยังไม่เพียงพอ คือ *Wiesneriomyces* sp. ดังรูปที่ 4.16



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Tubeufiales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00459 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยเชื้อราทั้งหมด 23 taxa โดย *Botryosphaeria agaves* และ *B. dothidea* เป็น outgroup (T ย่อมาจาก Type)

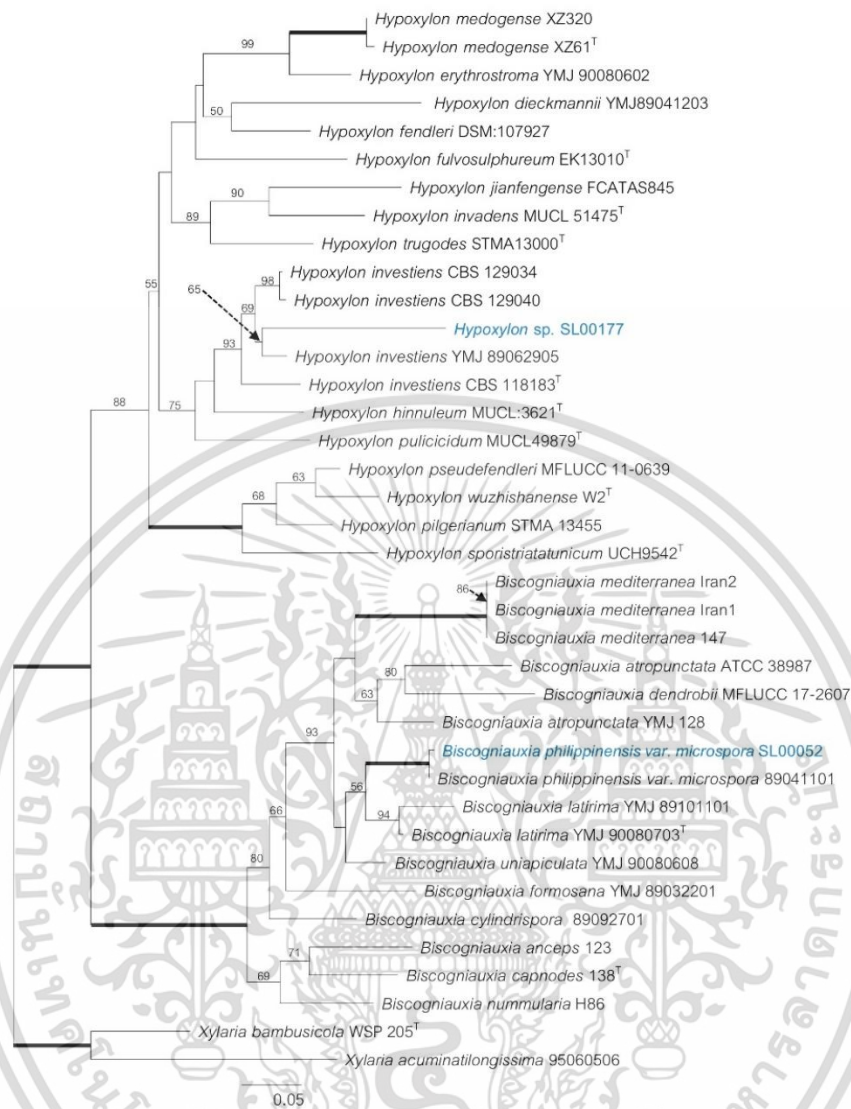
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10) อันดับ Xylariales

สำหรับราดิน 2 taxa ซึ่งประกอบด้วย SL00052 และ SL00177 เมื่อนำไปเทียบเคียงกับเชื้อราอื่นๆ 36 taxa ในอันดับ Xylariales โดยมี *Xylaria bambusicola* และ *X. acuminatilongissima* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00052 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรากลุ่ม *Biscogniauxia philippinensis* var. *microspore* ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่ในวงศ์ Graphostromataceae ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 100 และเชื้อรารหัส SL00177 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อรากลุ่ม *Hypoxyylon investiens* (YMJ 89062905, CBS 129034, CBS 129040, CBS 118183) อยู่ในวงศ์ Hypoxylaceae ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 93 ดังรูปที่ 4.17



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Xylariales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00052 และ SL00177 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยเชื้อราทั้งหมด 38 taxa โดย *Xylaria bambusicola* และ *X. acuminatlongissima* เป็น outgroup (^T ย่อมาจาก Type)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ไฟล์ม Basidiomycota

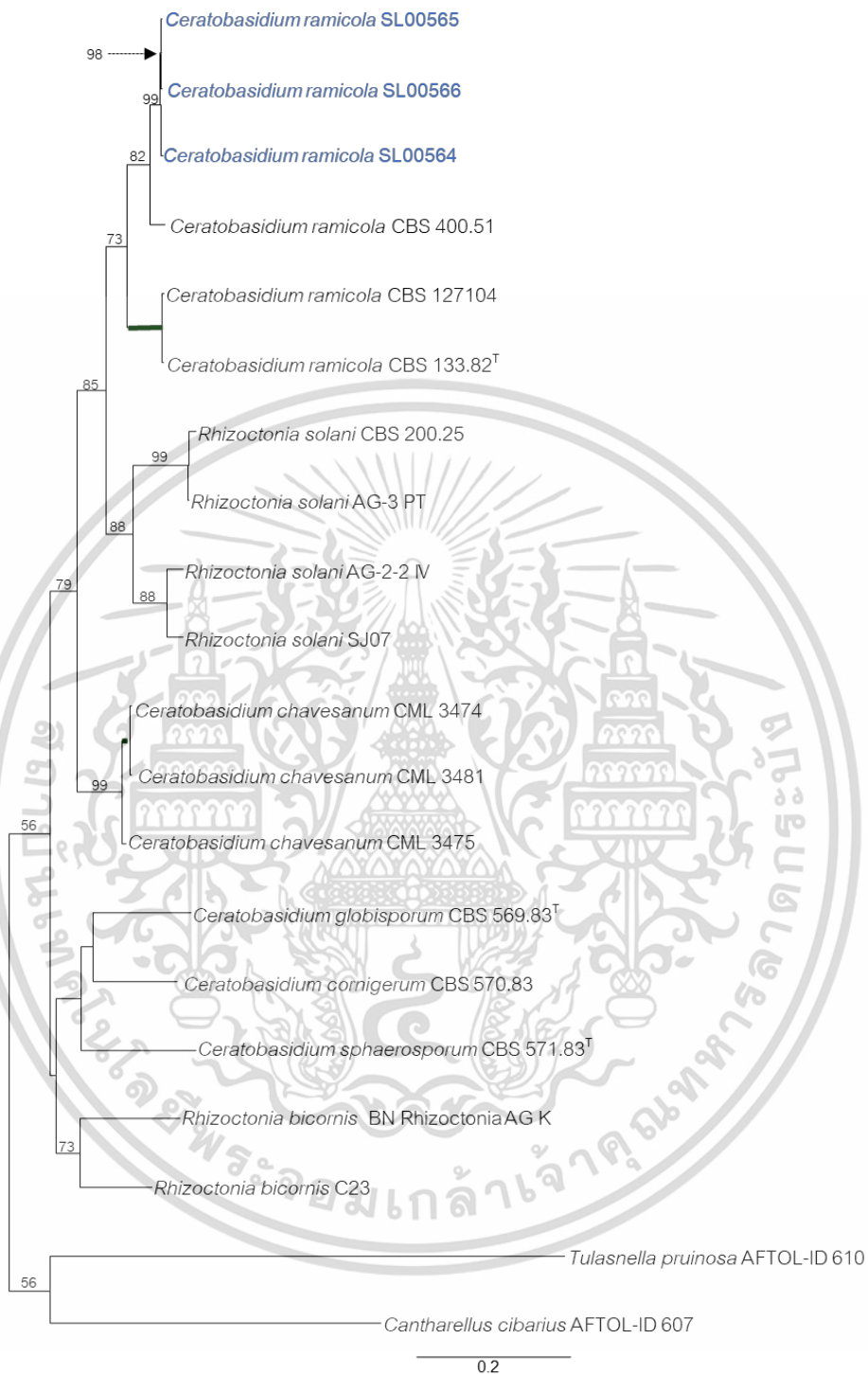
ประกอบด้วย 1 อันดับ (order) ดังนี้

1) อันดับ Cantharellales

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราในวงศ์ Ceratobasidiaceae ซึ่งอยู่ในอันดับ Cantharellales ชุดข้อมูลประกอบด้วยเชื้อราตินจำนวน 3 taxa (SL00564, SL00565, และ SL00566) และเชื้ออื่น ๆ จำนวน 17 taxa โดยมี *Tulasnella pruinosa* และ *Cantharellus cibarius* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อราทั้ง 3 taxa มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม *Ceratobasidium ramicola* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 82 ดังรูปที่ 4.18



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Cantharellales บริเวณ ITS ของเชื้อราหัทส SL00564, SL00565, และ SL00566 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยราทั้งหมด 20 taxa โดยมี *Tulasnella pruinosa* และ *Cantharellus cibarius* เป็น outgroup (^T ย่อมาจาก Type)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ไฟลัม Mucoromycota

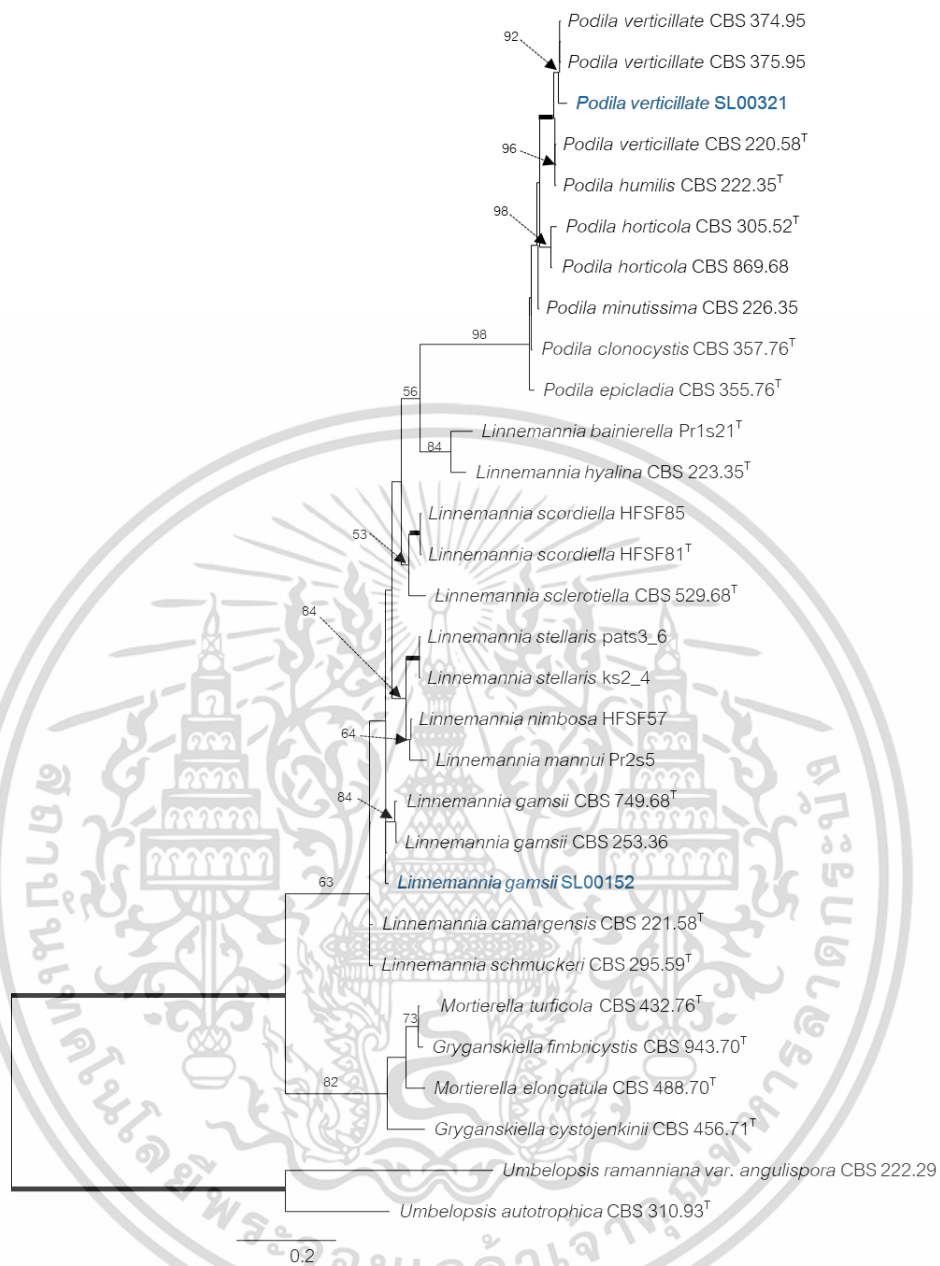
ประกอบด้วย 2 อันดับ (order) ดังนี้

1) อันดับ Mortierellales

ชุดข้อมูลในการวิเคราะห์ประกอบด้วย เชื้อราดินซึ่งมีความสัมพันธ์กับเชื้อราในวงศ์ Mortierellaceae จำนวน 2 taxa (SL00152 และ SL00321) และเชื้อราอื่นๆ จำนวน 28 taxa โดยมี *Umbelopsis ramanniana* var. *angulispora* และ *U. autotrophica* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00152 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Linnemannia gamsii* (CBS 749.68 และ CBS 253.36) ด้วยค่าร้อยละการแบ่งชี้เอกลักษณ์ (% identity) เท่ากับร้อยละ 97.0-97.7 และเชื้อรารหัส SL00321 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Podila verticillate* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 92 ดังรูปที่ 4.19



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

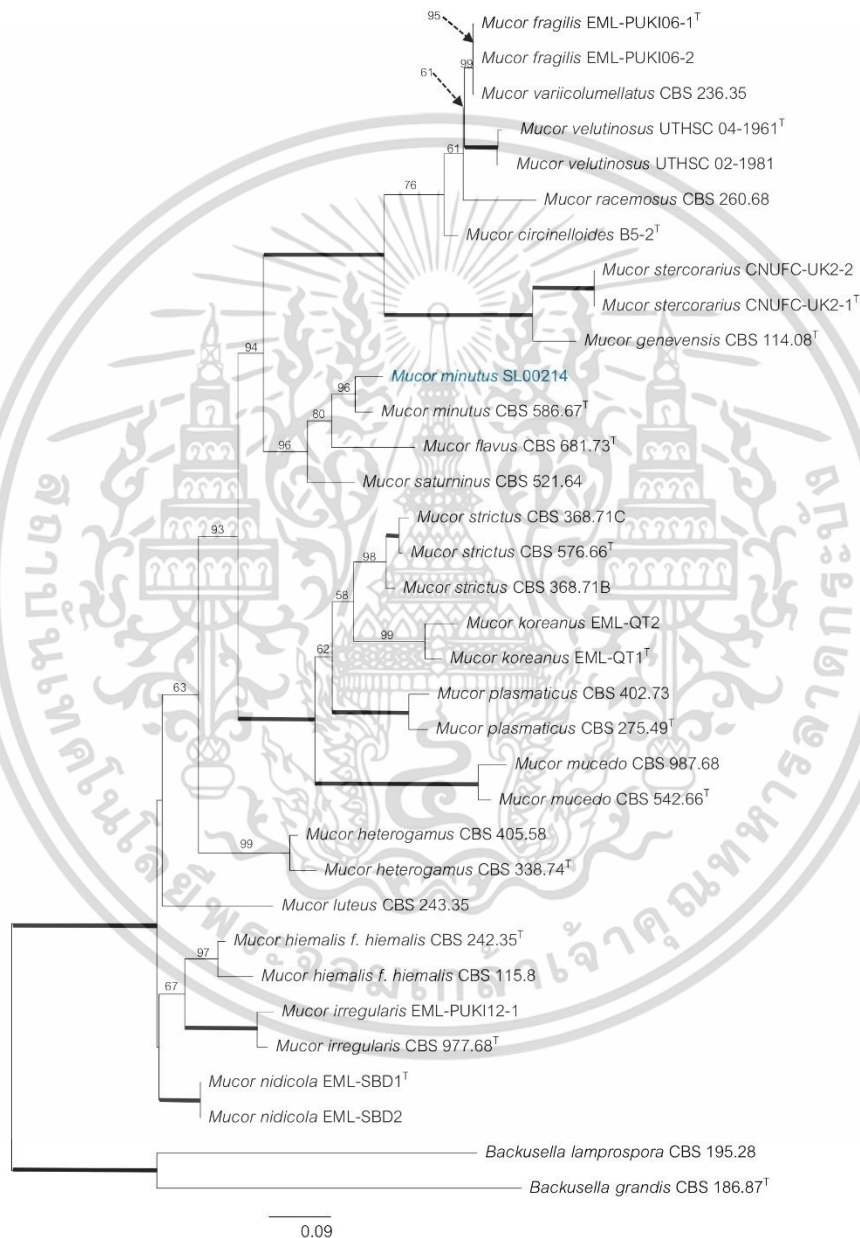


รูปที่ 4.19 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราในอันดับ Mortierellales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00152 และ SL00321 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยราทั้งหมด 30 taxa โดย *Umbelopsis ramanniana* var. *angulispora* และ *U. autotrophica* เป็น outgroup (^T ย่อมาจาก Type)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) อันดับ Mucorales

ชุดข้อมูลในการวิเคราะห์ประกอบด้วย เชื้อราที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อราในวงศ์ Mucoraceae จำนวน 1 taxa (SL00214) และเชื้อราอื่นๆ จำนวน 33 taxa โดยมี *Backusella lamprospora* และ *B. grandis* เป็น outgroup ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส SL00214 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Mucor minutus* ด้วยค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 96 ดังรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราในอันดับ Mucorales บริเวณ ITS ของเชื้อรารหัส SL00214 ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum Likelihood (ML) ประกอบด้วยราทั้งหมด 34 taxa โดย *Backusella lamprospora* และ *B. grandis* เป็น outgroup (^T ย่อมาจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า Type) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของเชื้อราจำนวน 98 สายพันธุ์ สามารถจัดจำแนกเชื้อราออกเป็น 3 ไฟลัม ได้แก่ ไฟลัม Ascomycota, ไฟลัม Basidiomycota และไฟลัม Mucoromycota จากการค้นคว้ามีรายงานการศึกษาศาสตร์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อรา โดยเฉพาะกลุ่มที่พบมากที่สุดในการจัดจำแนก คือกลุ่ม *Penicillium* sp. (ไฟลัม Ascomycota) ดังรายงานของ Hebra et al., 2021 พบว่าสารสกัดจาก *Penicillium sclerotiorum* SNB-CN111 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Trichophyton rubrum* และ *P. sclerotiorum* ยังผลิตเม็ดสีที่เรียกว่า azaphilones ซึ่งเป็นที่น่าสนใจในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตสีผสมอาหารจากธรรมชาติ และมีการนำเม็ดสีของเชื้อราชนิดนี้มาใช้ในการย้อมสีผ้าฝ้าย เป็นการเพิ่มมูลค่าในอุตสาหกรรม และมีมูลค่าทางเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมเป็นอย่างดี (Kallingal et al., 2023) สาร citreorosein และสาร emodin ที่ได้จาก *Penicillium herquei* มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุในการติดเชื้อรุนแรง (Marinho et al., 2013) ในรายงานของ Ashoka and Shivanna, 2023 พบว่า *Penicillium citrinum* มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพถึง 21 ชนิด สารประกอบหลัก ได้แก่ 8-hydroxyquinoline, trigonelline, spectinomycin, psoralidin, nicotinic acid, kanosamine, sulfamethazine, artemisinin ซึ่งเป็นกลุ่มสารต้านแบคทีเรีย สารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านมะเร็ง และยังมีสารประกอบอื่นๆที่ไม่รู้จักอีกหลายชนิดอีกด้วย ซึ่งอาจมีความสำคัญทางด้านเภสัชกรรมในอนาคต กลุ่มที่พบรองลงมา ได้แก่กลุ่ม *Aspergillus* sp. ซึ่ง *Aspergillus elegans* ที่พบในการจัดจำแนก ได้มีการแยกสารจาก *A. elegans* SweF9 โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 12 วัน ในอาหาร PMP พบว่าสาร (+)-epi-Epoformin เป็นสารประกอบที่แสดงการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* (Bulkan et al., 2022)

นอกจากนี้ เชื้อราในกลุ่ม *Pestalotiopsis* sp. ได้แก่ *Pestalotiopsis microspora* ที่พบในไฟลัมนี้ ยังมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเช่นกัน ซึ่งในปี 1996 ได้พบสาร taxol เป็นยารักษามะเร็งที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เป็นสารในกลุ่ม diterpenoid alkaloid และเชื้อรา *P. microspora* ยังพบ pestalotioprolide E ที่แสดงศักยภาพในการต่อต้านเซลล์มะเร็งรังไข่ของมนุษย์ สายพันธุ์ A2780 (Yang et al., 2012) และที่น่าสนใจคือการเพาะเลี้ยงร่วมกันของ *P. microspora* ร่วมกับ *Streptomyces lividans* ทำให้เกิดการสะสมของ pestalotioprolide E และ pestalotioprolide F เพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่า (Liu et al., 2016) ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ในอนาคต ต่อมาได้พบสาร sesquiterpenes ชนิดใหม่สามชนิด ได้แก่ (+)-dendocarbin L (75), (+)-sydonic acid (76), และ (+)-sydowic acid (77) ที่สกัดได้จาก *P. microspora* ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ P-388 และสารที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดก็คือ สาร (+)-sydowic acid (77) (Wu et al., 2022) เท่านั้น ไม่นับญาติให้หน้าไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้แล้วก็ตาม ยังมีเชื้อราอีกหลากหลายสายพันธุ์ที่ยังขาดการศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาศรออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ ตัวอย่างเช่น เชื้อรา *P. citrinum* ที่สามารถแยกได้จากดินในประเทศไทยนั้น ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลชีพของเชื้อราสายพันธุ์นี้ รวมไปถึงเชื้อรา *Ceratobasidium ramicola* ในไฟลัม Basidiomycota เชื้อรา *Linnemannia gamsii*, *Podila verticillate* ในไฟลัม Mucoromycota และอีกหลายสายพันธุ์ที่พบจากผลการจัดจำแนก ดังนั้นการศึกษาศรออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราเหล่านี้จึงเป็นที่น่าสนใจ เพื่อนำสรออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาปรับใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการนำตัวอย่างราดินทั้งหมด 105 สายพันธุ์ มาทำการสกัดดีเอ็นเอ และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่าได้ผลผลิตพีซีอาร์มาทั้งหมด 98 สายพันธุ์ จาก 105 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 93 จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ทั้ง 98 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS กับฐานข้อมูล NCBI รวมถึงการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าสามารถจัดจำแนกเชื้อราดินได้เป็น 3 ไฟลัม ได้แก่ ไฟลัม Ascomycota (92 สายพันธุ์; 94%), ไฟลัม Basidiomycota (3 สายพันธุ์; 3%) และไฟลัม Mucoromycota (3 สายพันธุ์; 3%) จากผลการวิเคราะห์พบว่าเชื้อราดินส่วนใหญ่ถูกจำแนกอยู่ในไฟลัม Ascomycota มากที่สุด (อ้างอิงจากรูปที่ 4.2) จำแนกตามตำแหน่งอนุกรมวิธานได้ดังนี้

1. จัดจำแนกได้ถึงระดับสกุล (genus) ทั้งหมด 98 สายพันธุ์ (100%) โดยแบ่งเป็น 33 สกุล ดังนี้ *Acremonium*, *Amphichorda*, *Aquanectria*, *Aspergillus*, *Biscogniauxia*, *Calonectria*, *Ceratobasidium*, *Chaetocapnodium*, *Chloridium*, *Clonostachys*, *Cordana*, *Cordyceps*, *Cylindrocladiella*, *Endomelanconiopsis*, *Gliocephalotrichum*, *Gliocladiopsis*, *Humicola*, *Hypoxylon*, *Lasiodiplodia*, *Linnemannia*, *Mariannaea*, *Mucor*, *Neocosmospora*, *Niesslia*, *Penicilliopsis*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Podila*, *Septomyrothecium*, *Staphylotrichum*, *Talaromyces*, *Volutella* และ *Wiesneriomyces* โดยพบราดินในสกุล *Penicillium* มากที่สุดถึง 27 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 28 (อ้างอิงจากรูป 4.3)
2. จัดจำแนกได้ถึงระดับชนิดพันธุ์ (species) เป็นจำนวน 78 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 80 ดังตารางที่ 5.1
3. จัดจำแนกในระดับวงศ์ (family) ได้ 22 วงศ์ ได้แก่ Aspergillaceae, Bionectriaceae, Botryosphaeriaceae, Capnodiaceae, Ceratobasidiaceae, Chaetomiaceae, Chaetosphaeriaceae, Cordanaceae, Cordycipitaceae, Endomelanconiopsidaceae, Graphostromataceae, Hypocreaceae, Hypoxylaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Nectriaceae, Niessliaceae, Pestalotiopsidaceae, Sporocadaceae, Stachybotryaceae, Trichocomaceae และ Wiesneriomycetaceae พบราดินเป็นสมาชิกอยู่ในวงศ์ Aspergillaceae มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 38 Nectriaceae ร้อยละ 21, Bionectriaceae ร้อยละ 4, Chaetomiaceae ร้อยละ 4 ไม่ปรากฏในวงศ์ใดทั้งสิ้น และไม่มี Sporocadaceae ร้อยละ 0 (อ้างอิงจากรูป 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ห้ามนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

4. พบการกระจายตัวอยู่ใน 13 อันดับ (order) ได้แก่ Amphisphaerales, Botryosphaerales, Cantharellales, Capnodiales, Chaetosphaerales, Cordanales, Eurotiales, Hypocreales, Mortierellales, Mucorales, Sordariales, Tubeufiales และ Xylariales โดยการกระจายอยู่ในอันดับ Eurotiales มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 39 อันดับ Hypocreales ร้อยละ 32 และอันดับ Amphisphaerales ร้อยละ 7 ตามลำดับ (อ้างอิงจากรูป 4.3)
5. พบการกระจายตัวอยู่ใน 6 ชั้น (class) ได้แก่ Agaricomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Mortierellomycetes, Mucoromycetes และ Sordariomycetes โดยพบกระจายตัวในชั้น Sordariomycetes มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 49 รองลงคือชั้น Eurotiomycetes ร้อยละ 39 และ ชั้น Dothideomycetes ร้อยละ 6 ตามลำดับ (อ้างอิงจากรูป 4.2)

ตารางที่ 5.1 การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ราดินด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลเปรียบเทียบระหว่างผล Blast search ของฐานข้อมูล NCBI และผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Code	NCBI Blast search		Phylogenetic analysis
	% Identity	Best hit	
SL00014	99.41-99.61%	<i>Penicillium estinogenum</i>	<i>Penicillium estinogenum</i>
SL00029	94.95	<i>Chloridium mirabile</i>	<i>Chloridium</i> sp.
SL00030	99.46-99.47%	<i>Penicillium bissettii</i>	<i>Penicillium bissettii</i>
SL00031	98.36%	<i>Staphylotrichum boninense</i>	<i>Staphylotrichum boninense</i>
SL00046	99.82-100%	<i>Gliocephalotrichum humicola</i>	<i>Gliocephalotrichum humicola</i>
SL00047	99.82-100%	<i>Gliocephalotrichum humicola</i>	<i>Gliocephalotrichum humicola</i>
SL00048	99.62-99.79%	<i>Gliocephalotrichum bulbilium</i>	<i>Gliocephalotrichum bulbilium</i>
SL00050	100%	<i>Gliocladiopsis</i> sp.	<i>Gliocladiopsis forbergii</i>
SL00052	99.67%	<i>Biscogniauxia philippinensis</i> var. <i>microspora</i>	<i>Biscogniauxia philippinensis</i> var. <i>microspora</i>
SL00056	96.56%	<i>Niesslia</i> sp.	<i>Niesslia albosubiculosa</i>
SL00065	99.60%	<i>Neocosmospora</i> sp.	<i>Neocosmospora solani</i>
SL00087	99.41-99.79%	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium estinogenum</i>
SL00098	88.80%	<i>Acremonium</i> sp.	<i>Acremonium</i> sp.
SL00141	98.46%	<i>Chaetocapnodium placitae</i>	<i>Chaetocapnodium placitae</i>
SL00152	98.86-99.63%	<i>Linnemannia gamsii</i>	<i>Linnemannia gamsii</i>
SL00166	98.68%	<i>Mariannaea elegans</i> var. <i>punicea</i>	<i>Mariannaea elegans</i> var. <i>punicea</i>
SL00177	98.83-99.48%	<i>Hypoxyton</i> sp.	<i>Hypoxyton</i> sp.
SL00214	99.49%	<i>Mucor minutus</i>	<i>Mucor minutus</i>
SL00215	100%	<i>Chloridium humicola</i>	<i>Chloridium humicola</i>
SL00240	94.85-95.48%	<i>Cordana</i> sp.	<i>Cordana</i> sp.

SL00242	100%	<i>Aspergillus spinosus, Aspergillus fischeri</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
SL00243	100%	<i>Aspergillus spinosus, Aspergillus fischeri</i>	<i>Aspergillus spinosa</i>
SL00250	100%	<i>Cylindrocladiella peruviana</i>	<i>Cylindrocladiella natalensis</i>
SL00254	100%	<i>Penicillium herquei</i>	<i>Penicillium herquei</i>
SL00271	99.05-99.11%	<i>Beauveria felina</i>	<i>Amphichorda felina</i>
SL00284	99.80%	<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	<i>Penicillium</i> sp.
SL00289	100%	<i>Penicillium herquei</i>	<i>Penicillium herquei</i>
SL00295	98.83-99.02%	<i>Beauveria felina</i>	<i>Amphichorda felina</i>
SL00297	100%	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>
SL00306	99.61%	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	<i>Penicillium sclerotiorum</i>
SL00317	99.46-99.82%	<i>Penicillioopsis clavariiformis</i>	<i>Penicillioopsis clavariiformis</i>
SL00318	100%	<i>Penicillium javanicum</i>	<i>Penicillium javanicum</i>
SL00321	100%	<i>Podila verticillata</i>	<i>Podila verticillate</i>
SL00326	99.81%	<i>Penicillium sclerotiorum.</i>	<i>Penicillium austrosinicum</i>
SL00334	98.93-99.27%	<i>Aspergillus conjunctus</i>	<i>Aspergillus conjunctus</i>
SL00347	100%	<i>Penicillium abidjanum</i>	<i>Penicillium abidjanum</i>
SL00354	95.70%	<i>Aspergillus haitiensis</i>	<i>Aspergillus haitiensis</i>
SL00364	96.49%	<i>Septomyrothecium uniseptatum</i>	<i>Septomyrothecium uniseptatum</i>
SL00381	98.08-99.04%	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
SL00407	98.11-98.68%	<i>Penicillium madriti</i>	<i>Penicillium</i> sp.
SL00408	99.61%	<i>Talaromyces aureolinus</i>	<i>Talaromyces aureolinus</i>
SL00409	98.22-99.03%	<i>Penicillium magnielliptisporum,</i>	<i>Penicillium</i> sp.
SL00410	100%	<i>Chloridium virescens var. caudigerum</i>	<i>Chloridium virescens var. caudigerum</i>
SL00414	99.80%	<i>Penicillium javanicum</i>	<i>Penicillium javanicum</i>
SL00436	99.80%	<i>Calonectria colhounii</i>	<i>Calonectria colhounii</i>
SL00437	99.45-99.63%	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
SL00438	99.42-100%	<i>Calonectria colhounii</i>	<i>Calonectria colhounii</i>
SL00443	99.00-100%	<i>Calonectria</i> sp.	<i>Calonectria lateralis</i>
SL00444	100%	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>
SL00445	99.58%	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
SL00459	92.19- 92.56%	<i>Wiesneriomyces laurinus</i>	<i>Wiesneriomyces</i> sp.
SL00476	99.80%	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
SL00477	100%	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
SL00478	99.80-100%	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	<i>Pestalotiopsis jiangxiensis</i>
SL00482	100%	<i>Cordyceps javanica</i>	<i>Cordyceps javanica</i>
SL00496	100%	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Pestalotiopsis australasiae</i>
SL00504	99.58-99.79%	<i>Cylindrocladiella hawaiiensis</i>	<i>Cylindrocladiella</i> sp.
SL00505	100%	<i>Cylindrocladiella infestans</i>	<i>Cylindrocladiella infestans</i>
SL00511	100%	<i>Penicillium austrosinicum</i>	<i>Penicillium austrosinicum</i>
SL00522	100%	<i>Pseudopestalotiopsis chinensis</i>	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
SL00523	99.20%	<i>Calonectria</i> sp.	<i>Calonectria paracolhounii</i>
SL00524	99.79-100%	<i>Volutella aeria</i>	<i>Volutella aeria</i>

SL00525	99.65-98.71%	<i>Volutella aeria</i>	<i>Volutella aeria</i>
SL00526	99.44-100%	<i>Volutella aeria</i>	<i>Volutella aeria</i>
SL00527	99.81%	<i>Calonectria</i> sp.	<i>Calonectria colhounii</i>
SL00539	99.81%	<i>Aquanectria tenuissima</i>	<i>Aquanectria tenuissima</i>
SL00540	100%	<i>Gliocladiopsis</i> sp.	<i>Gliocladiopsis guangdongensis</i>
SL00547	98.85%	<i>Cylindrocladiella pseudohawaiiensis</i>	<i>Cylindrocladiella</i> sp.
SL00548	100%	<i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i>	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>
SL00549	100%	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	<i>Pestalotiopsis theae</i>
SL00560	99.80%	<i>Cylindrocladiella</i> sp.	<i>Cylindrocladiella</i> sp.
SL00564	98.70-99.41%	<i>Ceratobasidium</i> sp.	<i>Ceratobasidium ramicola</i>
SL00565	99.62-98.85%	<i>Ceratobasidium</i> sp.	<i>Ceratobasidium ramicola</i>
SL00566	98.85-99.62%	<i>Ceratobasidium</i> sp.	<i>Ceratobasidium ramicola</i>
SL00615	99.63%	<i>Aspergillus silvaticus</i>	<i>Aspergillus silvaticus</i>
SL00621	100%	<i>Penicillium shearii</i>	<i>Penicillium shearii</i>
SL00625	100%	<i>Aspergillus silvaticus</i>	<i>Aspergillus silvaticus</i>
SL00655	100%	<i>Penicillium menonorum</i>	<i>Penicillium pimateouiense</i>
SL00656	99.82-100%	<i>Penicillium menonorum</i>	<i>Penicillium</i> sp.
SL00664	99.20-99.79%	<i>Clonostachys pseudostrata</i>	<i>Clonostachys pseudostrata</i>
SL00728	99.10-99.63%	<i>Penicillium striatisporum</i>	<i>Penicillium striatisporum</i>
SL00751	93.49-99.61%	<i>Clonostachys</i> sp.	<i>Clonostachys candelabrum</i>
SL00754	99.81%	<i>Humicola fuscoatra</i>	<i>Humicola fuscoatra</i>
SL00785	99.61%	<i>Humicola fuscoatra</i>	<i>Humicola</i> sp.
SL00788	100%	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus chevalieri</i>
SL00835	100%	<i>Aspergillus elegans</i>	<i>Aspergillus elegans</i>
SL00848	97.99-99.16%	<i>Clonostachys</i> sp.	<i>Clonostachys pseudostrata</i>
SL00849	98.75-99.81%	<i>Clonostachys</i> sp.	<i>Clonostachys pseudostrata</i>
SL00869	100%	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	<i>Penicillium sclerotiorum</i>
SL00873	97.41-97.60%	<i>Penicillium sanjayi</i>	<i>Penicillium</i> sp.
SL00874	99.05-99.07%	<i>Penicillium sanjayi</i>	<i>Penicillium sanjayi</i>
SL00931	99.24%	<i>Penicillium sanjayi</i>	<i>Penicillium sanjayi</i>
SL00932	99.24-99.25%	<i>Penicillium sanjayi</i>	<i>Penicillium sanjayi</i>
SL00933	100%	<i>Humicola fuscoatra</i>	<i>Humicola fuscoatra</i>
SL00958	99.08-99.81%	<i>Aspergillus suttoniae</i>	<i>Aspergillus suttoniae</i>
SL00968	100%	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
SL01000	98.38-100%	<i>Penicillium cinnamopurpureum</i>	<i>Penicillium cinnamopurpureum</i>
SL01001	100%	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ยังไม่เพียงพอสำหรับการจัดจำแนก
 เอกสารนี้ สำหรับเชื้อราบางกลุ่ม และบางสายพันธุ์อาจจะมีการศึกษาหรือพบค่อนข้างน้อยทำให้ไม่มีข้อมูลใน
 ฐานข้อมูล ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อจัดจำแนกและระบุชนิดพันธุ์ของเชื้อราด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล
 ไม่ว่ากันถึง

โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในสกุล *Aspergillum* และ *Penicilium* ซึ่งการศึกษาในปัจจุบันส่วนใหญ่มีการใช้ยีนมากกว่า 1 ตำแหน่งร่วมกัน (multiple gene) ในการบ่งชี้เอกลักษณ์ เช่น TEF1- α , RPB1, RPB2, β -tubulin และ CaM (Tekpinar and Kalmer., 2019, Chen et al., 2021) รวมถึงมีการใช้วิธีการทางเคมี (chemo taxonomy) หรือวิธีการอื่นๆ เข้ามาช่วยในการสนับสนุนข้อมูลสำหรับการจัดลำดับอนุกรมวิธาน ดังนั้นเพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ข้อมูลและการจำแนกได้ถึงระดับสายพันธุ์ จึงควรมีการเพิ่มตำแหน่งของยีนอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ขึ้นอยู่กับชนิดของกลุ่มเชื้อ นอกจากนี้ เชื้อราบางชนิดที่จัดจำแนกได้จากดินบริเวณรากพืช ยังมีการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกด้วย Tadpetch et al., 2014 พบสาร Solaninaphthoquione ที่ได้จากเชื้อราในดิน คือ *Fusarium solani* PSU-RSPG227 มีฤทธิ์ในการต้านมาลาเรีย Marinho et al., 2013 ทำการแยกสารจากเชื้อรา *Penicillium herquei* ด้วยเทคนิค chromatography และพบสาร citreorosein และสาร emodin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus subtilis* อีกทั้ง Arunpanichlert et al., 2020 พบสาร Botryosphaerilactones D-E จากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* NSTRU-PN1.4 เชื้อราที่จัดจำแนกได้นั้นมีความหลากหลายมาก บางชนิดพบสารสกัดที่ยังไม่ทราบประโยชน์ในการนำมาใช้ ซึ่งข้อมูลวิจัยเหล่านี้เป็นสิ่งที่จำเป็นต้องมีการนำไปศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์. 2566. “เทคโนโลยีการหาลำดับเบส Next Generation Sequencing.” [Online]. Available: 20 เมษายน 2566
- ณัฐวุฒิ รุ่งจินตมัย. 2548. “ราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารต้านจุลินทรีย์จากพืชสกุล *Garcinia*.” โครงการงานทางจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- พรปวีณ์ จิวัฒน์วานิกุล, ภาณุวัฒน์ มูลจันทร์, วรณวิไล อินทนู และจินตนา อันอาตม์งาม. 2562. “การจัดจำแนกชนิดและทดสอบการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคหัวและลำต้นเน่ามันสำปะหลัง.” วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 37 (2) : 239-249
- มาหามะชูปัน แดเบา, สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาจ, เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ และ กาญจน์ คุ่มทรัพย์. 2018. “การเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอในใบมะขามแห้งที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันโดยใช้กระดาษเซลลูโลสเมทริกซ์.” Journal of Science & Technology Phetchabun Rajabhat University. 3: 42-55.
- รัตนา เพ็งเพราะ, สุพัตรา นากอก, ปาริชาติ บัวแก้ว, สราวุธ แก้วศรี, ศรีณย์ จำรัสธนสาร และ สันธยา บุญรุ่ง. 2562. “การคัดแยกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในมันสำปะหลังจากเขตพื้นที่ บ้านโคกไม้แดง ตำบลหูทำนบ อำเภอปะคำ จังหวัดบุรีรัมย์. วารสารวิทยาศาสตร์คชสาส์น ปีที่ 41 ฉบับที่ 2
- ศ.ดร.วัชรินทร์ รุกขไชยศิริกุล. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2562. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราดิน *Trichoderma asperellum* PSU-PSF14 ที่แยกได้จากดินอินทรีย์ ในพื้นที่พรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส.
- สมชาย แสงอำนาจเดช. 2008. “ขั้นตอนง่ายๆในการสร้างไฟโรเจเนติกทรี.” Naresuan University Journal; 16(2): 181-188.
- สถาพร ภูผาใจ. 2563. เชื้อรา. [Online]. Available: <https://www.scimath.org/lesson-biology/item/9637-1-9637>. เข้าถึงเมื่อวันที่ 19 เมษายน 2566.
- อารมย์ จันทะสอน, เจนจิรา หม่องอัน1, บุญธิดา ม่วงศรีเมืองดี และธนประสงค์ อยู่พิศิษฐ์ไทรวัตติ. 2559. ผลของสารสกัดหยาบจากรา *Talaromyces flavus* Bodhi001 และ *Talaromyces trachyspermus* Bodhi002 แยกจากดินป่าขึ้นต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชทางเศรษฐกิจ. วารสารวิทย. กษ. 47(2): 121-131.
- Adl, S. M. Simpson, A. G. Lane, C. E. Luke’s, J. Bass, D. Bowser, S. S. Brown, M. Burki, F. Dunthorn, M. Hampl, V. Heiss, A. Hoppenrath, M. Lara, E. Le Gall, L. Lynn, D. H. McManus, H. Mitchell, E. A. D. Mozley-Stanridge, Sh. E. Parfrey, L. W. Pawlowski, J. Rueckert, S. Shadwick, L. Schoch, C. L. Smirnov, A. and Spiegel, F. W. 2012. The revised classification of eukaryotes. Journal of Eukaryotic Microbiology. 59(5): 429-93.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Adl, S. M. Simpson, A. G. Lane, C. E. Luke's, J. Bass, D. Bowser, S. S. Brown, M. Burki, F. Dunthorn, M. Hampl, V. Heiss, A. Hoppenrath, M. Lara, E. Le Gall L., Lynn D. H. McManus, H. Mitchell, E. A. D. Mozley-Stanridge, Sh. E. Parfrey, L. W. Pawlowski, J. Rueckert, S. Shadwick, L. Schoch, C. L. Smirnov, A. and Spiegel, F. W. 2018. Revision to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 66: 4–119.

Alsohaili, S.A. and Bani-Hasan, B.M. 2018. Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in the Northern Eastern Desert of Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 3: 329–337.

Banos, S. Lentendu, G. Kopf, A. Wubet, T. Glöckner, F.O. and Reich, M. 2018. A comprehensive fungi-specific 18S rRNA gene sequence primer toolkit suited for diverse research issues and sequencing platforms. *BMC Microbiology* 18:190.

Berbee, M. L. James, T. Y. and Strullu-Derrien, C. 2017. Early Diverging Fungi: Diversity and Impact at the Dawn of Terrestrial Life. *Annu. Rev. Microbiol.* 71: 41–60.

Brodo, I.M. Sharnoff, S.D. and Sharnoff S. 2001. *Lichens of North America*. New Haven (CT): Yale University Press.

Bruns, T.D. White, T.J. and Taylor, J.W. 1991. Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 22: 525-564.

de Hoog, G.S. Guarro, J. Gené, J. and Figueras, M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2 nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Universitat Rovira I Virgili. 507-511.

D. Thanakitpipattana, K. Tasanathai, S. Mongkolsamrit, A. Khonsanit, S. Lamlerthton, J.J. Luangsa-ard. 2020. Fungal pathogens occurring on Orthopterida in Thailand. *Persoonia*. 44: 140–160.

Gautam, A.K., Verma, R.K., Avasthi, S., Sushma Bohra, Y., Devadatha, B., Niranjana, M., and Suwannarach, N. 2022. Current Insight into Traditional and Modern Methods in Fungal Diversity Estimates. *J. Fungi*. 8: 226.

Gaddeyya, G., Shiny Niharika, P., Bharathi P., and Ratna Kumar, P.K. 2012. Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. *AdvAppl Sci Res*. 3 (4): 2020-2026.

Ganley, AR. and Kobayashi, T. 2007. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res.* 17(2): 184–191.
- Gaddeyya, G. Niharika, PS. Bharathi, P. and Kumar, PKR. 2012. Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at Salur Mandal. *AdvAppl Sci Res.* 3: 2020-2026.
- Gill, H. Sykes, E.M.E. Kumar, A. Sorensen, J.L. 2023. Isolation of Bioactive Metabolites from Soil Derived Fungus-*Aspergillus fumigatus*. *Microorganisms*, 11: 590.
- Hossain, Md. M. and Sultana, F. 2020. Application and Mechanisms of Plant Growth Promoting Fungi (PGPF) for Phytostimulation. *Organic Agriculture.* 1-30.
- Hibbett, D.S. Binder, M. Bischoff, J.F. Blackwell, M. Cannon, P.F. Eriksson, O.E. Huhndorf, S. James, T. Kirk, P.M. Lucking, R. Lumbsch, T. Lutzoni, F. Matheny, P.B. Mclaughlin, D.J. Powell, M.J. Redhead, S. Schoch, C.L. Spatafora, J.W. Stalpers, J.A. Vilgalys, R. Aime, M.C. Aptroot, A. Bauer, R. Begerow, D. Benny, G.L. Castlebury, L.A. Crous, P.W. Dai, Y.C. Gams, W. Geiser, D.M. Griffith, G.W. Gueidan, C. Hawksworth, D.L. Hestmark, G. Hosaka, K. Humber, R.A. Hyde, K. Ironside, J.E. Koljalg, U. Kurtzman, C.P. Larsson, K.H. Lichtwardt, R. Longcore, J. Miadlikowska, J. Miller, A. Moncalvo, J.M. Mozley-Standridge, S. Oberwinkler, F. Parmasto, E. Reeb, V. Rogers, J.D. Roux, C. Ryvarden, L. Sampaio, J.P. Schußler, A. Sugiyama, J. Thorn, R.G. Tibell, L. Untereiner, W.A. Walker, C. Wang, Z. Weir, A. Wei, M. White, M.M. Winka, K. Yao, Y.J. and Zhang, N. 2007. A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111: 509–547.
- Raja, H. A. Miller, A.N. Pearce, C.J. and Oberlies, N.H. 2023. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. 80(3): 756-770.
- Hyde, K.D. Al-Hatmi, A.M. Andersen, B. Boekhout, T. Buzina, W. Dawson, T.L. Eastwood, D.C. Jones, E.G. de Hoog, S. Kang, Y. and Longcore, J.E. 2018. The world's ten most feared fungi. *Fungal Divers.* 93: 161–194.
- James, T. Y. Letcher, P. M. Longcore, J. E. Mozley-Standridge, S. E. Porter, D. Powell, M. J. Griffith, G. W. and Vilgalys, R. 2006. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia* 98: 860–871.
- Janowski, D. and Leski, T. 2022. Factors in the Distribution of Mycorrhizal and Soil Fungi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Diversity, 14, 1122.
- Hyde, K.D. and Xu, J. 2019. Fungal Diversity The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97: 1–136.
- Kirk, P.M. Cannon, P.F. Minter, D.W. and Stalpers, J.A. 2008. *Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi*. 10th ed. Wallingford (UK): CAB International.
- Kohlmeyer, J. 1977. New genera and species of higher fungi from the deep sea (1615–5315 m). *Rev. Mycol.* 41: 189–206.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L. 2012. DNA Barcodes: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 858: 3-8.
- Kumsorn, W. Piasai, O. Manoch, L. and Chamswarn, Ch. 2013. Diversity of *Emericella spp.* and Biological Efficacy Against Fungi of *Phytophthora palmivora* and *Colletotrichum capsici* in vitro. *Proceedings of 51st Kasetsart University Annual Conference: Plants*. 51: 266-273.
- Landeweert, R. Leeflang, P. Kuyper, T.W. Hoffland, E. Rosling, A. Wernars, K. and Smit, E. 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Appl Environ Microbiol.* 69: 327-333.
- Lau, A. F. 2021. MALDI-TOF for Fungal Identification. *Clin Lab Med.* 41(2): 267–283.
- Lee, H.W. Nguyen, T.T.T. Mun, H.Y. Lee, H. Kim, Ch. and Lee, H.B. 2015. Confirmation of Two Undescribed Fungal Species from Dokdo of Korea Based on Current Classification System Using MultiLoci. *Mycobiology.* 43(4): 392-401.
- Li, Y. Jiao, L. and Yao, Y.J. 2013. Non-concerted ITS evolution in fungi, as revealed from the important medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis*. *Mol Phylogenet Evol.* 68(2): 373–379.
- Lima, R.F and Borba, C.M. 2001. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Mycol.*, 18: 191-196.
- Lücking, R. Aime, M.C. Robbertse, B. Miller, A.N. Aoki, T. Ariyawansa, H.A. Cardinali, G. Crous, P.W. Druzhinina, I.S. Geiser, D.M. 2021. Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. *Nat. Microbiol.* 6: 540–548.
- Maheswari, N.U and Komalavalli, R. 2013. Diversity of soil fungi from Thiruvarur District, Tamil Nadu, India. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2: 135-141.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Marco, A. Albang, R. Albermann, K. Badger, J. H. Daran, J-M. Driessen, A. J. M. and Bovenberg, R. A. L. 2008. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature Biotechnology*. 26(10): 1161-1168.
- Miller, M.A. Pfeiffer, W. and Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8.
- Mohammed, A. E. Sonbol, H. Alwakeel, S. S. Alotaibi, M. O. Alotaibi, S. Alothman, N. Suliman, R. S. Ahmedah, H. T. and Ali, R. 2021. Investigation of biological activity of soil fungal extracts and LC/ MS-QTOF based metabolite profiling. *Scientific Reports*. 11: 4760.
- Moncalvo, J.M. 2005. Molecular systematics: Major fungal phylogenetic groups and fungal species concepts. *Evolutionary Genetics of Fungi*. 1–33.
- Moro, L.B. Delgado, G. and Schoenlein-Crusius, I.H. 2015. *Clathrosporium retortum*, a novel aeroaquatic fungus in the Sordariomycetidae (Ascomycota) from Brazil. *Phytotaxa*. 239(1): 017–029.
- Mulani, R.M and Turkmane, K.L. 2014. Diversity of hizospheric fungi of *Ceropegia bulbosa* *Var. bulbosa* Roxb. *J Global Biosci*. 3(4): 1089–1093
- Muhsin, T.M. and Mohammad, H.M. 2013. Antibacterial bioactive Compound from the fungus *Drechslera halodes* (drechsler) subram. & jain isolated from soil of basrah, iraq. *Journal of University of Zakho*. 2: 508-514.
- Munjal, G. Hanmandlu, M. and Srivastava, S. 2019. *Phylogenetics Algorithms and Applications. Ambient Communications and Computer Systems. Advances in Intelligent Systems and Computing*. 904: 187-194.
- Ortiz M.A.N. and Gabaldon, T. 2019. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biol. Rev.* 94: 2101–2137.
- Phainuphong, P. Rukachaisirikul, V. Phongpaichit, S. Sakayaroj, J. Kanjanasirirat, P. Borwornpinyo, S. Akrimajirachoote, N. Yimnual, Ch. and Muanprasa, Ch. 2018. Depsides and depsidones from the soil-derived fungus *Aspergillus unguis* PSU-RSPG204. *74(39): 5691-5699*.
- Porras-Alfaro, A. Liu, K. L. Kuske, C. R. and Xiec, G. 2014. From Genus to Phylum: Large-Subunit and Internal Transcribed Spacer rRNA Operon Regions Show Similar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Classification Accuracies Influenced by Database Composition. *Appl Environ Microbiol.* 80: 829–840.
- Rousk, J. Bååth, E. Brookes, P.C. Lauber, C.L. Lozupone, C. Caporaso, J.G. Knight, R. and Fierer, N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISM J.* 4: 1340–1351.
- Schoch, C.L. Seifert, K.A. Huhndorf, S. Robert, V. Spouge, J.L. Levesque, C.A. and et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(16): 6241–6.
- Schoch, C. L. Seifert, K. A. Huhndorf, S. Robert, V. Spouge, J. L. Levesque, C. A. and Chen, W. 2012. DNA barcoding in fungi. In *Access Science. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 6241–6246.
- Selbmann, L. de Hoog, G.S. Mazzaglia, A. Friedmann, E.I. and Onofri, S. 2005. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Stud. Mycol.* 51: 1–12.
- Seifert, K. A. Wingfield, B. D. Wingfield, M. J. 1995. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Canadian Journal of Botany* 73: 760–767.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 30(9): 1312–1313.
- Rajalakshmi, S. and Mahesh, N. 2014. Production and Characterization of Bioactive Metabolites Isolated from *Aspergillus terreus* in Rhizosphere Soil of Medicinal Plants. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 3(6): 784-798.
- Taufiq, M. M. J. and Darah, I. 2020. Antibacterial and Antibiofilm Activities of Crude Extract of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* IBRL OS-64 against Foodborne Bacterium, *Yersinia enterocolitica*. *British Journal of Pharmaceutical Research.* 32(14): 87-102.
- Tekpinar, A. D. and Kalmer, A. 2019. Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia,* 109(1-2): 187-224.
- ÜSTÜN, A. YAZICI, A. İSKENDER, N. A. and ÖRTÜCÜ, S. 2019. The Evaluation of Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Bioactive Compounds Obtained from *Aspergillus Sclerotiorum*. *Journal of the Institute of Science and Technology,* 9(3): 1666-1673.
- Umesha, S. Manukumar, H.M. and Raghava, S. 2016. A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens, *Biotech,* 6:123.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wang, Y.H. Kong, W.L. Zhu, M.L. Dai, Y. and Wu, X.Q. 2022. Colonization by the Mycorrhizal Helper *Bacillus pumilus* HR10 Is Enhanced During the Establishment of Ectomycorrhizal Symbiosis Between *Hymenochaete* sp. RL and *Pinus thunbergia*. *Front. Microbiol.* 13: 818912.
- Wang, Z. Nilsson, R.H. James, T.Y. and Townsend, J.P. 2016. *Biology of Microfungi*; Springer, 25–46
- White. T.J. Bruns, T. Lee, S. and et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press San Diego. 315–322.
- Whittaker, R.H. 1969. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science.* 163: 150–160.
- White, M.M. James, T.Y. O'Donnell, K. Cafaro, M.J. Tanabe, Y. and Sugiyama, J. 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* 98: 872–884.
- Wijayawardene, N.N. Hyde, K.D. Tedersoo, L. Haelewaters, D. Rajeshkumar, K.C. Zhao, R.L. Saxena, R.K. and et al. 2020. Outline of fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere.* 11(1): 1060–1456.
- Zhong, F. Fan, X. Ji, W. Hai, Z. Hu, N. Li, X. Liu, G. Yu, C. Chen, Y. Lian, B. and et al. 2022. Soil Fungal Community Composition and Diversity of Culturable Endophytic Fungi from Plant Roots in the Reclaimed Area of the Eastern Coast of China. *Journal of Fungi.* 8(2):124.
- Arunpanichlert J. Rukachaisirikul V. Chaiwarin T. and et al. 2020. Dimeric g-lactone derivatives from the soil-derived fungus *Lasiodiplodia theobromae* NSTRU-PN1.4. *Nat Prod Res.* 6:1–11.
- Tadpetch K. Chukong C. Jeanmard L. and et al. 2014. Cytotoxic naphthoquinone and a new succinate ester from the soil fungus *Fusarium solani* PSU-RSPG227. *Phytochem Lett.* 11:106–110.
- Marinho A.M.R. Marinho P.S.B. Santos L.S. Filho E.R. and Ferreira I.C.P. 2013. Active polyketides isolated from *Penicillium herquei*. *A nais da Academia Brasileira de Ciências* 85(3):909-912

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wu, C. Wang, Y. and Yang, Y. 2022. *Pestalotiopsis* Diversity: Species, Dispositions, Secondary Metabolites and Bioactivities. *Molecules*. 27, 8088.
- Yang, X.L. Zhang, J.Z. Luo, D.Q. 2012. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. *Nat. Prod.* 29, 622–641.
- Liu, S. Dai, H. Makhloufi, G. Heering, C. Janiak, C. Hartmann, R. Mándi, A. Kurtán, T. Müller, W.E.G. Kassack, M.U. and et al. 2016. Cytotoxic 14-membered macrolides from a mangrove-derived endophytic fungus, *Pestalotiopsis microspora*. *J. Nat. Prod.* 79,2332–2340.
- Hebra, T. Elie, N. Poyer, S. Van Elstande, E. Touboul, D. and Eparvier, V. 2021. Dereplication, Annotation, and Characterization of 74 Potential Antimicrobial Metabolites from *Penicillium Sclerotiorum* Using t-SNE Molecular Networks. *Metabolites*. 11, 444.
- Ashoka, G.B. Shivanna, M.B. 2023. Antibacterial, antioxidant, and anticancer activities of *Penicillium citrinum* Thom. endophytic in *Jatropha heynei*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 13(03), 196-207.
- Kallingal, A. Ayyolath, A. Kundil, V.T. Joseph, T.M. Chandra, N.D. Haponiuk, J.T. Thomas, S. Variyar, J.E. 2023. Extraction and optimization of *Penicillium sclerotiorum* strain AK-1 pigment for fabric dyeing. *J Basic Microbiol.* 1–10.



ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

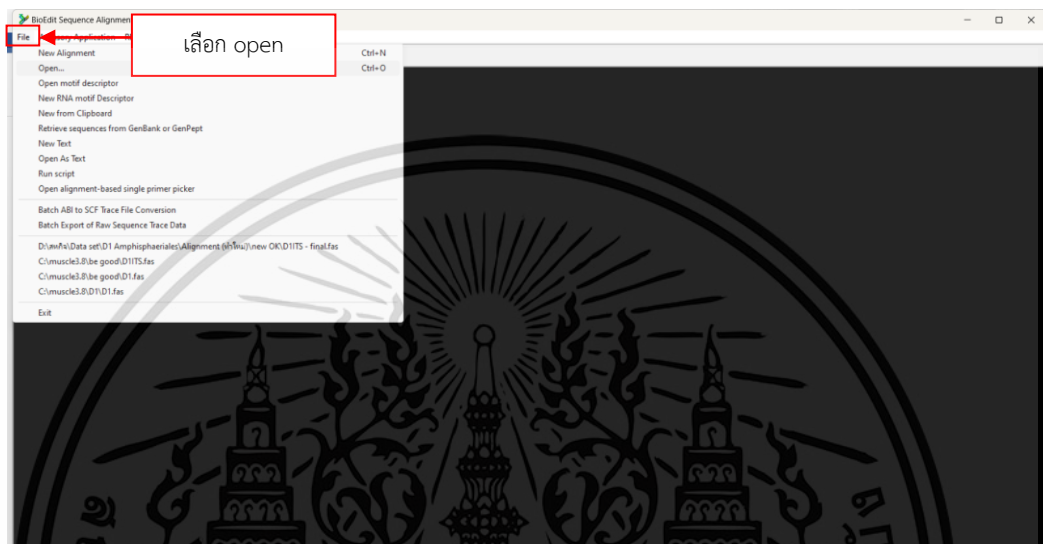


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

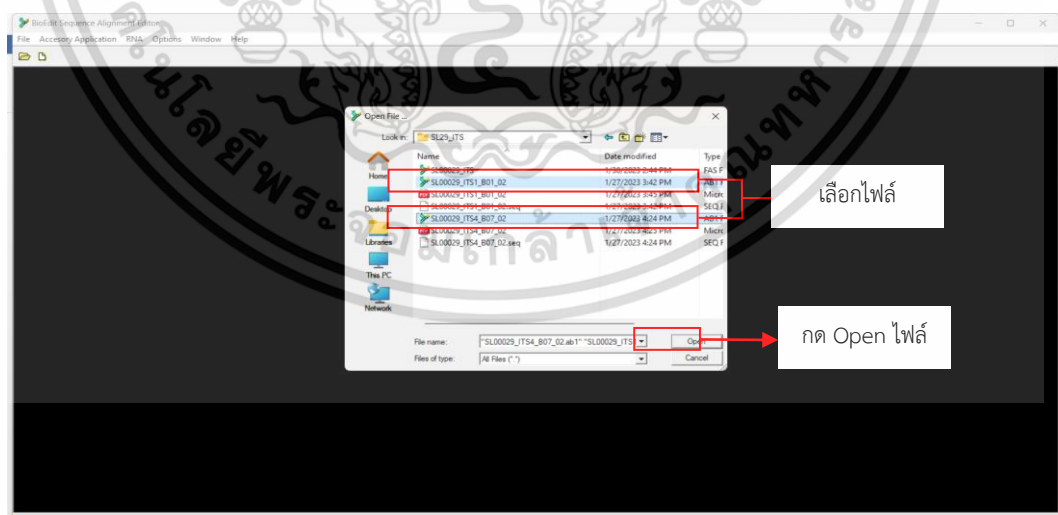
1. ขั้นตอนการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ Concensus

1.1 เมื่อโหลดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากเครื่อง Sanger Sequencer 3500 ABI (Thermo Scientific™) แล้ว ให้เปิดโปรแกรม BioEdit ขึ้นมา

1.2 เลือก file เพื่อเปิดข้อมูล

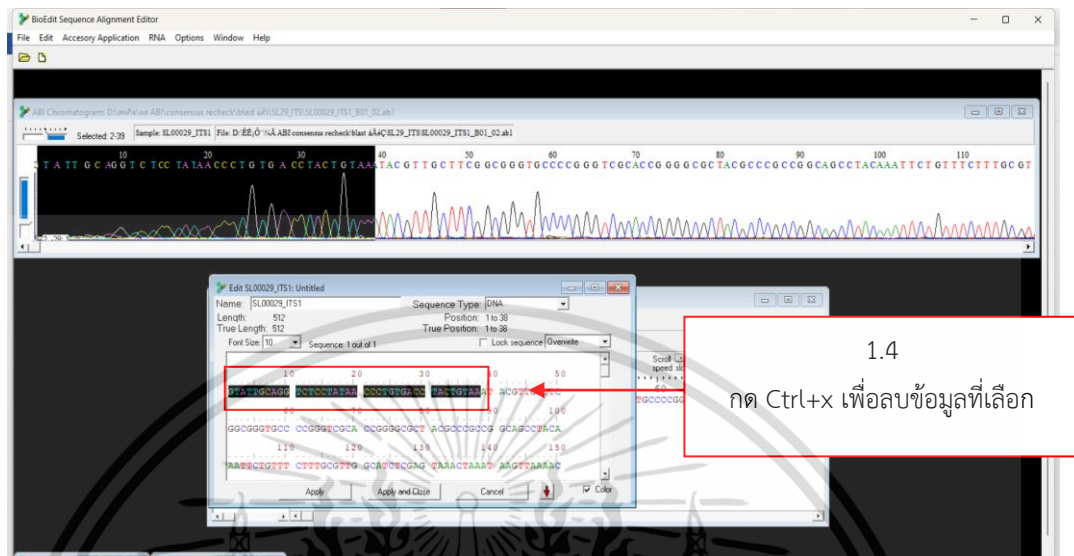


1.3 เลือกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการเปรียบเทียบทั้ง Forward primer sequence และ Reverse Primer sequence

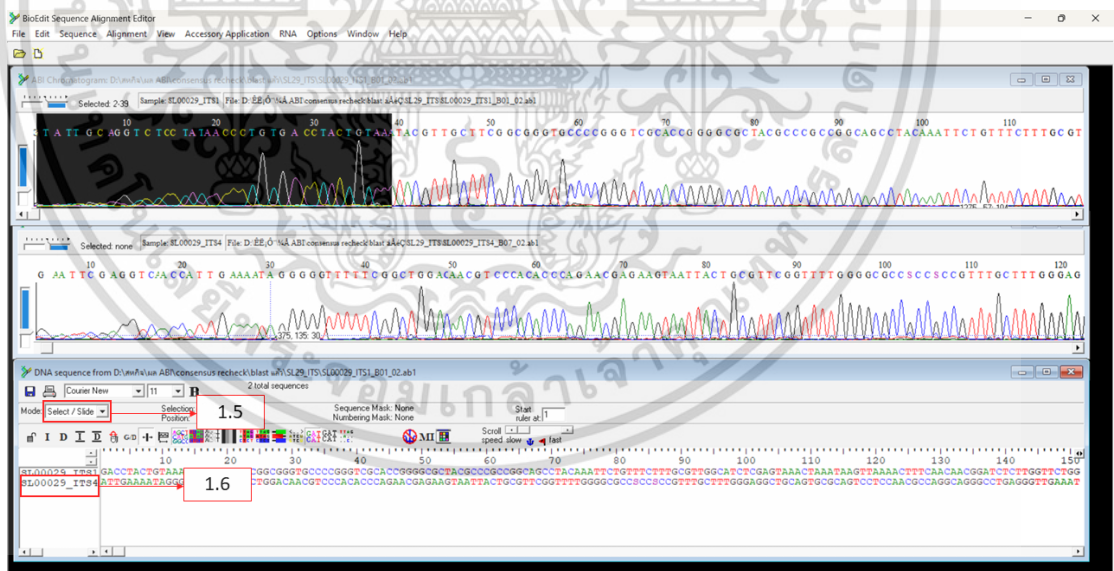


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ตัด sequence ทั้งหมด และย้ายด้วยการสังเกตจากกราฟ ทั้งสองสาย



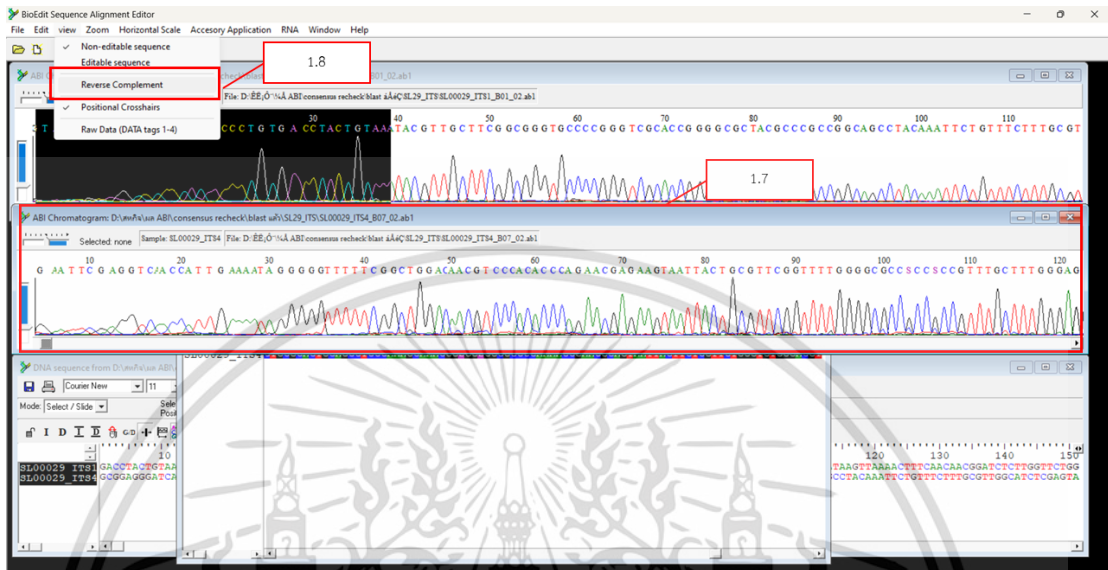
- 1.5 รวม sequence ทั้งสองสายไว้ในหน้าต่างเดียวกัน โดยก่อนรวมให้กดเลือก select/Slide ก่อน
1.6 Reverse สาย ITS4 ด้วยการกด ctrl+shift+R พร้อมกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.7 เลือกที่กราฟ ITS4 sequence

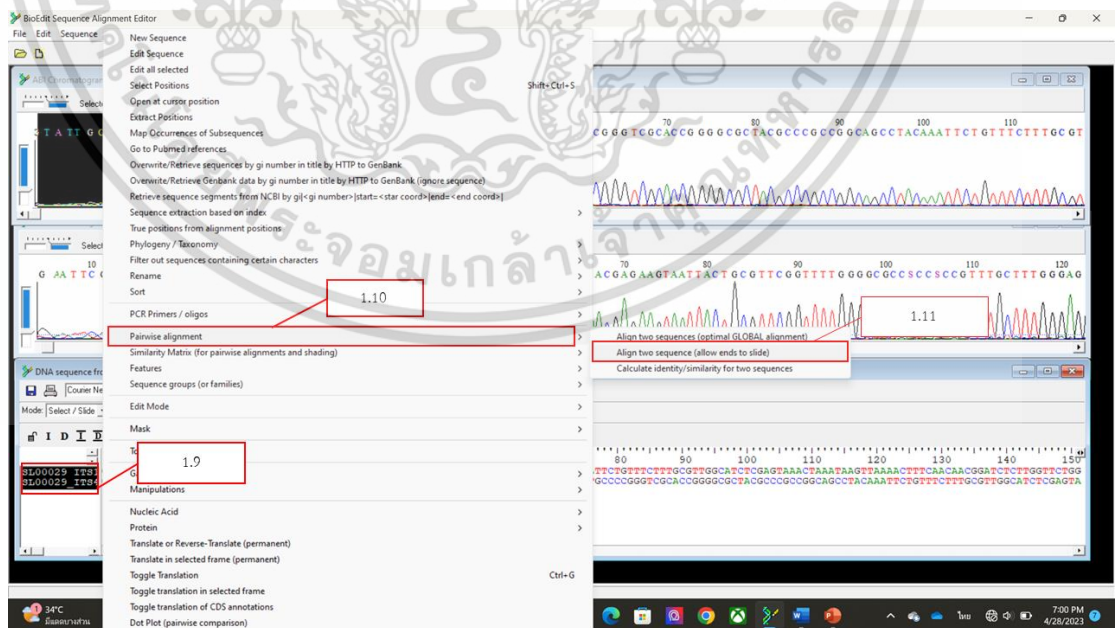
1.8 กด reverse complement



1.9 คลุมดำทั้งสองไฟล์ตามภาพ

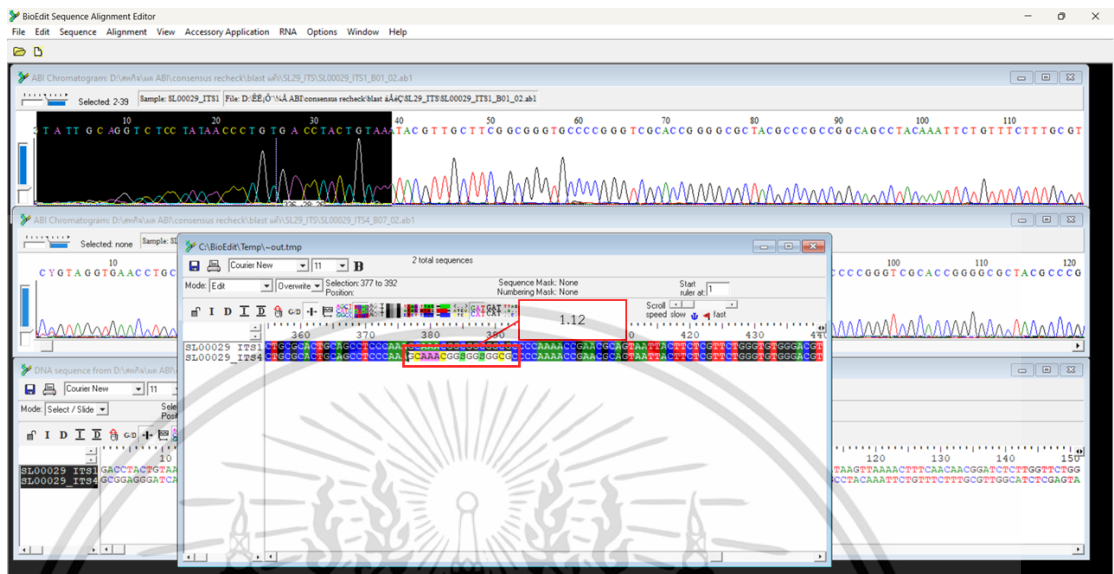
1.10 เข้าไปที่แถบเครื่องมือ sequence แล้วเลือก Pairwise alignment

1.11 เลือก Alignment two sequence (allow ends to slide)

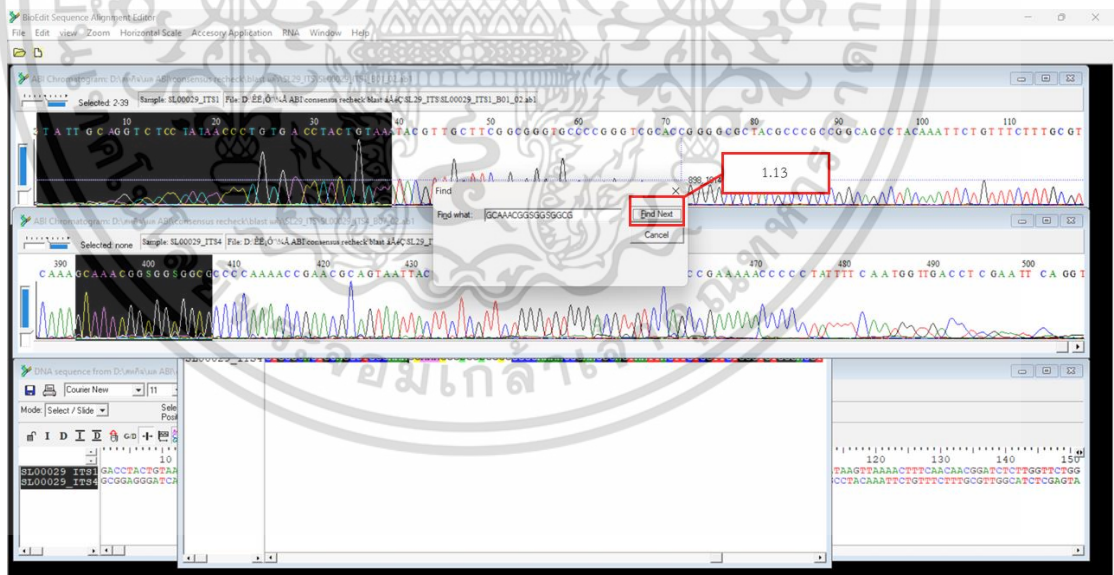


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.12 คลุมดำช่วงที่เบสไม่ใช่ A T C G เพื่อแก้ไขให้ถูกต้อง



1.13 กด ctrl+f จะขึ้นหน้าต่างดังภาพ copy ส่วนที่คลุมดำก่อนหน้าวางลงในช่อง แล้วกด find next

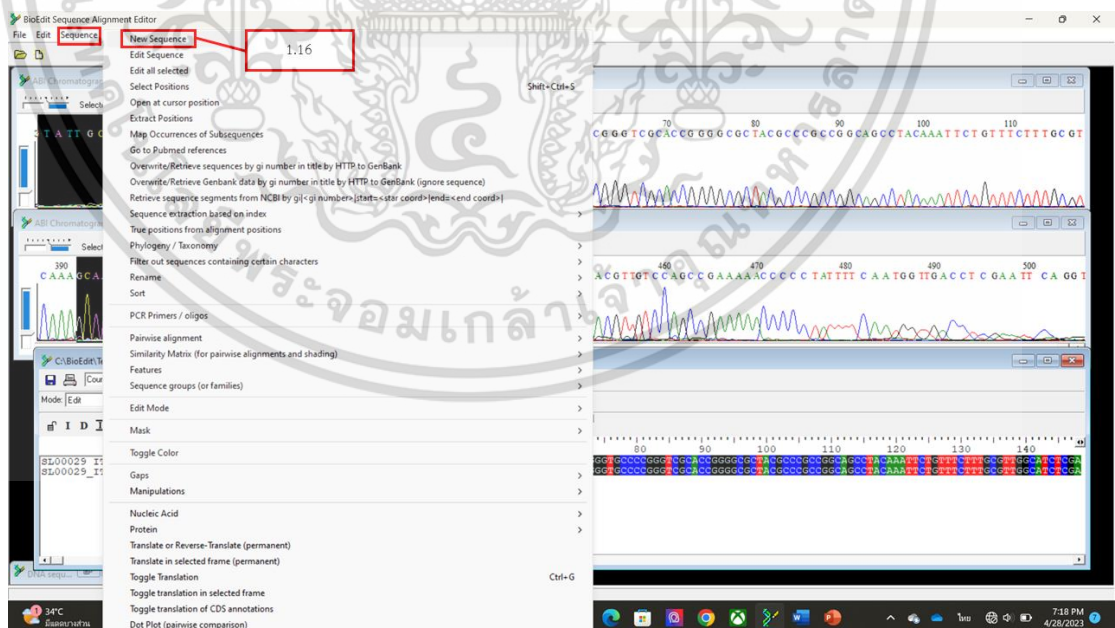


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.14 สังเกตพีคที่สูงที่สุดในเบสที่มีปัญหา: ในตัวอย่างคือตัว S ซึ่งพีคที่สูงที่สุดจากกราฟตรงตัว S คือ สีเหลือง หรือตัว C
- 1.15 แก้เบสให้ถูกต้องโดยการกด shift+เบสที่ต้องการจะแก้: shift+C

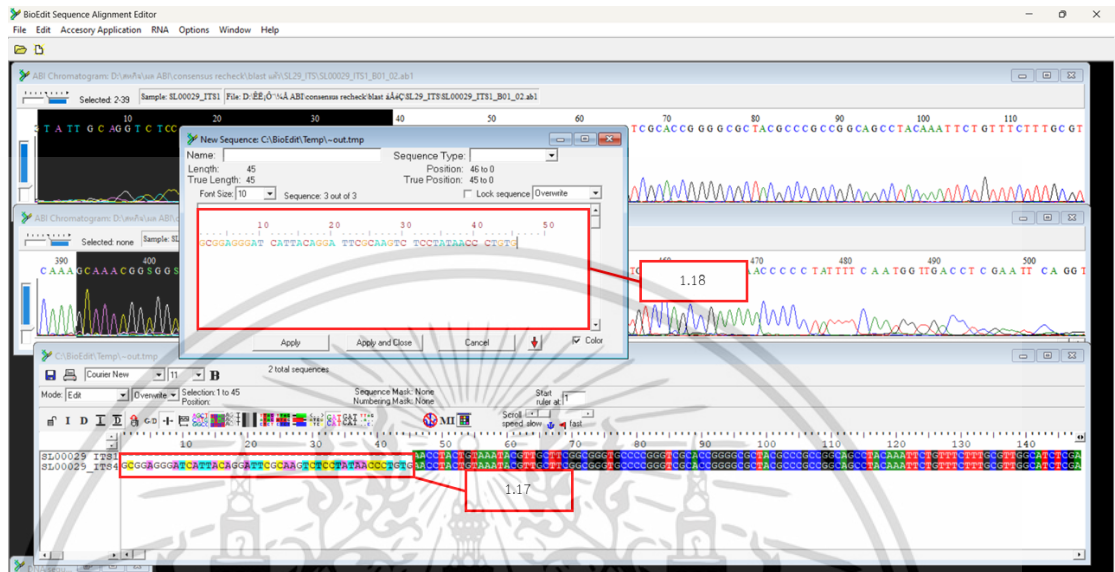


- 1.16 เมื่อแก้ไขเรียบร้อยแล้วให้เลือกแถบเครื่องมือ Sequence และเลือก New Sequence

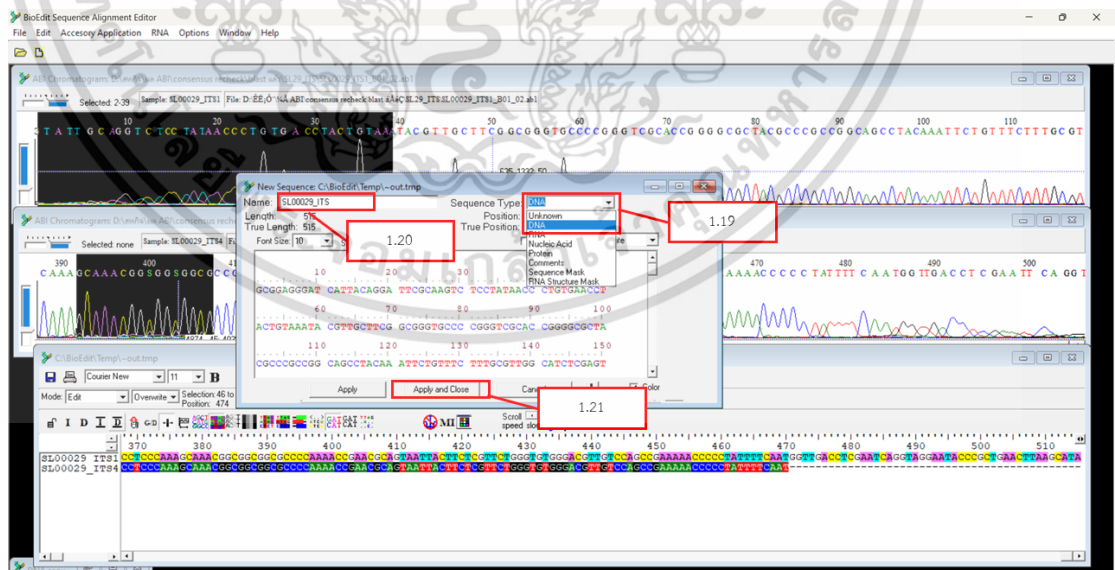


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.17 คลุมดำ Sequence ที่ทำการตรวจสอบแล้วทั้งหมด
- 1.18 จากนั้นนำมาวางในกรอบดังภาพ

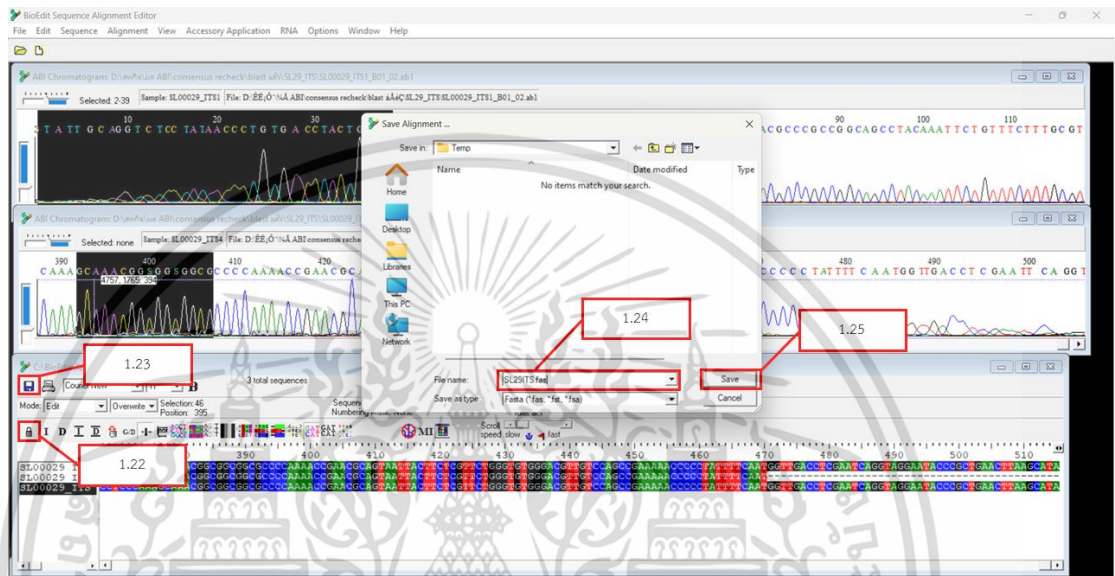


- 1.19 เมื่อคัดลอก sequence ทั้งหมดแล้วให้เลือกคำว่า DNA
- 1.20 ใส่ชื่อในชื่อ Name
- 1.21 กด Apply and close



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.22 กดเครื่องหมายล๊อคเพื่อไม่ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขยับ
- 1.23 กด save ที่ไอคอน
- 1.24 บันทึกชื่อโดยใช้ XXX.fas
- 1.25 กด save

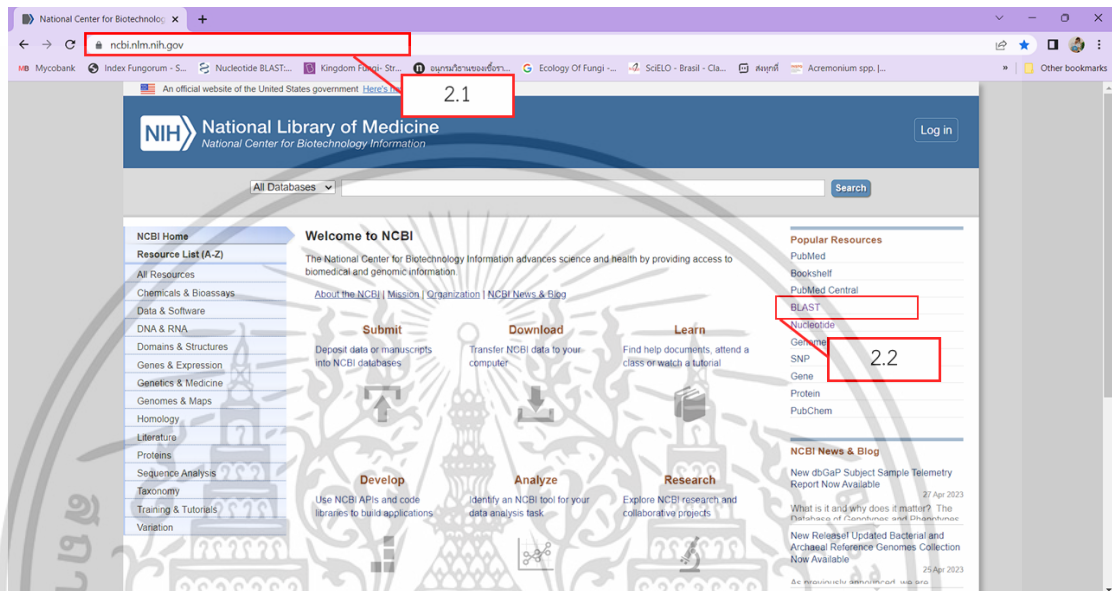


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

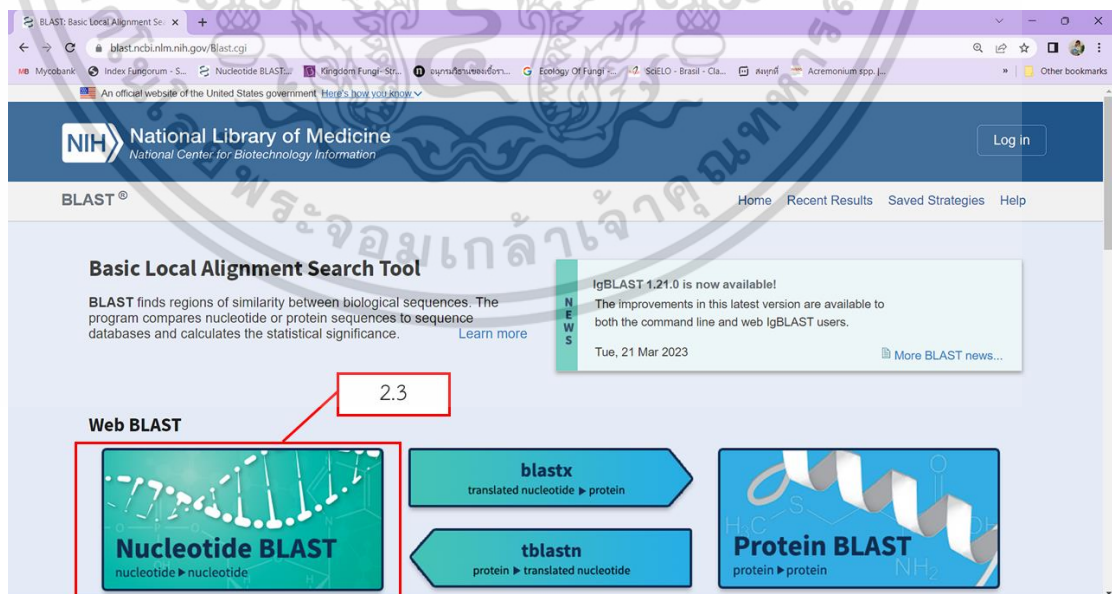
2. ขั้นตอนเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของฐานข้อมูล ncbi และการดาวน์โหลดข้อมูลตัวอย่างเชื้อ

2.1 เข้า (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

2.2 เข้าไปที่เมนู Blast



2.3 เลือกเมนู nucleotide BLAST



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 Copy sequence จากขั้นตอนที่ 1 มาวางในช่องดังรูป

2.5 คลิกที่ช่อง Show results in a new window

2.6 กดปุ่ม BLAST

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 คลิกที่ Per. Ident

2.8 เลือกผล 5 อันดับแรก

Sequences producing significant alignments

Check	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Penicillium sp. strain SYPE 7691 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	Penicillium sp.	928	928	100%	0.0	99.61%	610	MF568059.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Penicillium estinogenum CBS 329.59 ITS region, from TYPE material	Penicillium estinogenum	928	928	100%	0.0	99.61%	739	NR_169981
<input checked="" type="checkbox"/>	Penicillium estinogenum strain CBS_329.59 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	Penicillium estinogenum	928	928	100%	0.0	99.61%	877	MN431388.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Penicillium sp. isolate EF12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	Penicillium sp.	846	846	91%	0.0	99.57%	476	MK907924.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Penicillium sp. strain SYPE 8092 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	Penicillium sp.	922	922	100%	0.0	99.41%	610	MF588876.1

2.7 กดที่ Send to

2.8 เลือก Complete RecordFileFasta

Nucleotide

Species: Fungi (2)

Molecule types: genomic DNA/RNA (2)

Source databases: INSDC (GenBank) (2)

Sequence Type: Nucleotide (2)

Sequence length: Custom range...

Release date: Custom range...

Revision date: Custom range...

Items: 2

- Chordium vicosens var. caudigerum culture CBS:152.53 strain CBS:152.53 ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
- Chordium tropicale isolate NN076009 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Send to: Filters: Manage Filters

- Complete Record
- Coding Sequences
- Gene Features

Choose Destination

- File
- Clipboard
- Collections
- Analysis Tool

Download 2 items

Format

- Summary
- Summary
- GenBank
- GenBank (full)
- FASTA**
- ASN 1
- XML
- INSDC XML
- TinySeq XML
- Feature Table
- Accession List
- GI List
- GFF3

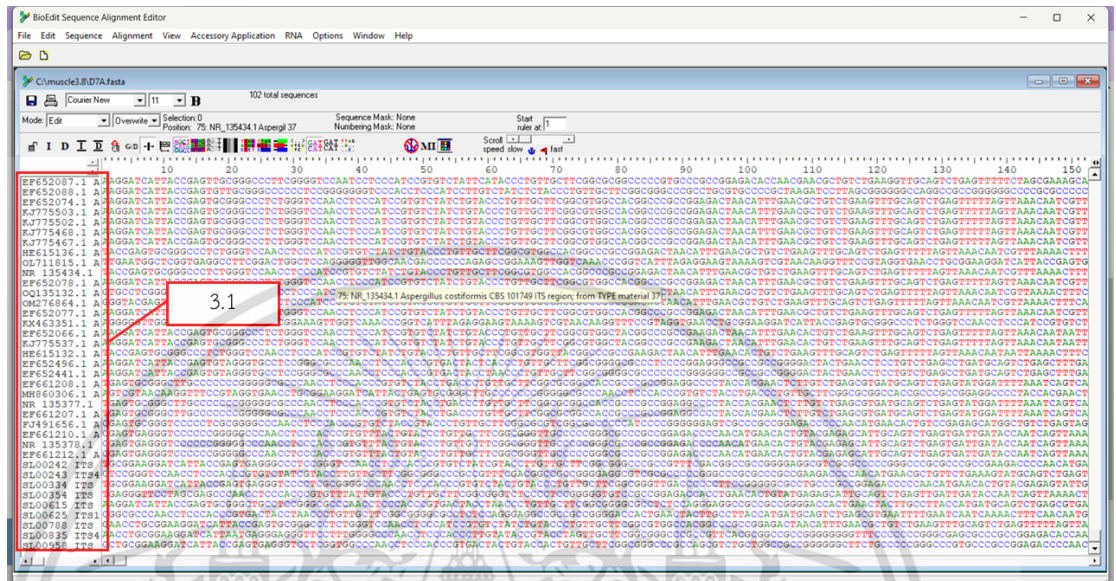
Recent activity

- Per 18S rDNA strain F46
- Per 18S rDNA strain F46
- Pestalotiopsis clavipora strain MFLUCC12-0281 internal transcribed spacer 1, p...

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำมาจัดเรียงด้วยโปรแกรม Muscle v.3.8

3.1 รวม sequence ที่ต้องการวิเคราะห์ และ sequence ตัวอย่างไว้ในไฟล์เดียวกัน



3.2 เปิดโปรแกรม command prompt ใส่คำสั่ง cd\

3.3 Muscle3.8

3.4 Dir

3.5 ให้สังเกตนามสกุลไฟล์ว่าเป็น .fasta หรือ .fas



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 พิมพ์คำว่า muscle

3.7 เว้นวรรค muscle -in (ไฟล์ที่เราตั้งชื่อ .fasta/.fas) -out (ชื่อไฟล์ที่เราอยากให้บันทึกใหม่.
fasta/.fas)

```

C:\muscle3.8>muscle
MUSCLE v3.8.31 by Robert C. Edgar
http://www.drive5.com/muscle
This software is donated to the public domain.
Please cite: Edgar, R.C. Nucleic Acids Res 32(5), 1792-97.

Basic usage
muscle -in <inputfile> -out <outputfile>

Common options (for a complete list please see the User Guide):
-in <inputfile>      Input file in FASTA format (default stdin)
-out <outputfile>    Output alignment in FASTA format (default stdout)
-diags              Find diagonals (faster for similar sequences)
-maxiters <n>       Maximum number of iterations (integer, default 16)
-maxhours <h>      Maximum time to iterate in hours (default no limit)
-html              Write output in HTML format (default FASTA)
-msf               Write output in GCG MSF format (default FASTA)
-clw               Write output in CLUSTALW format (default FASTA)
-clustric          As -clw, with "CLUSTAL W (1.81)" header
-log[al] <logfile> Log to file (append if -loga, overwrite if -log)
-quiet             Do not write progress messages to stderr
-version           Display version information and exit

Without refinement (very fast, avg accuracy similar to T-Coffee): -maxiters 2
Fastest possible (amino acids): -maxiters 1 -diags -sv -distance1 kbit20_3
Fastest possible (nucleotides): -maxiters 1 -diags

C:\muscle3.8> muscle -in D7A.fasta -out D7AITS.fasta
  
```

3.8 เมื่อเสร็จแล้วจะขึ้นดังภาพ

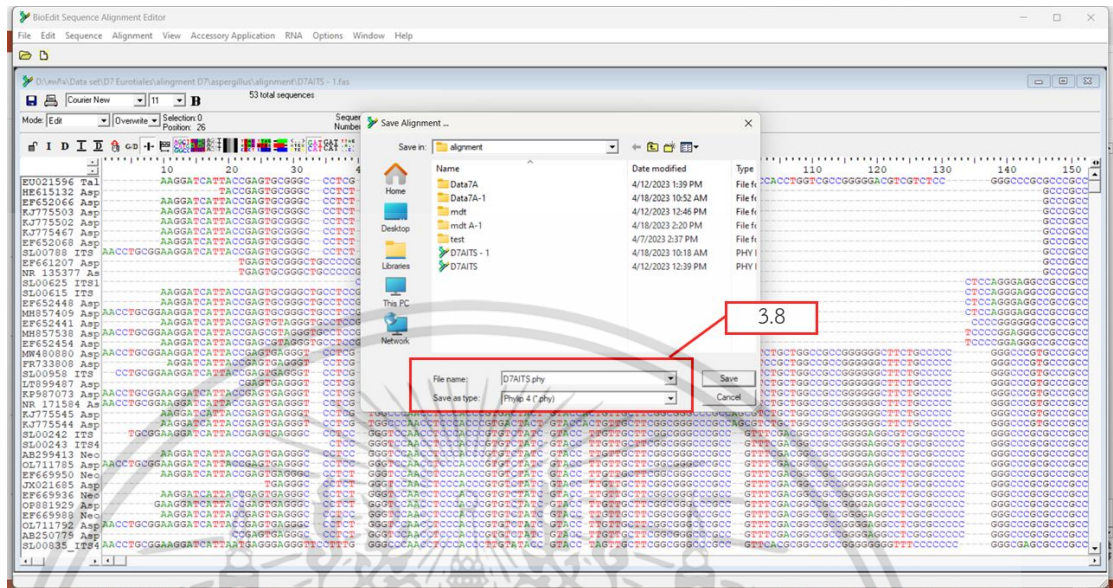
```

D7A 102 seqs, max length 2347, avg length 837
00:00:01 7 MB(0%) Iter 1 100.00% W-mer dist pass 1
00:00:01 7 MB(0%) Iter 1 100.00% W-mer dist pass 2
00:00:03 86 MB(4%) Iter 1 100.00% Align node
00:00:03 86 MB(4%) Iter 1 100.00% Root alignment
00:00:05 87 MB(4%) Iter 2 100.00% Refine tree
00:00:05 87 MB(4%) Iter 2 100.00% Root alignment
00:00:05 87 MB(4%) Iter 2 100.00% Root alignment
00:00:21 87 MB(4%) Iter 3 100.00% Refine biparts
00:00:37 87 MB(4%) Iter 4 100.00% Refine biparts
00:00:46 87 MB(4%) Iter 5 100.00% Refine biparts
00:00:46 87 MB(4%) Iter 5 100.00% Refine biparts

C:\muscle3.8>
  
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

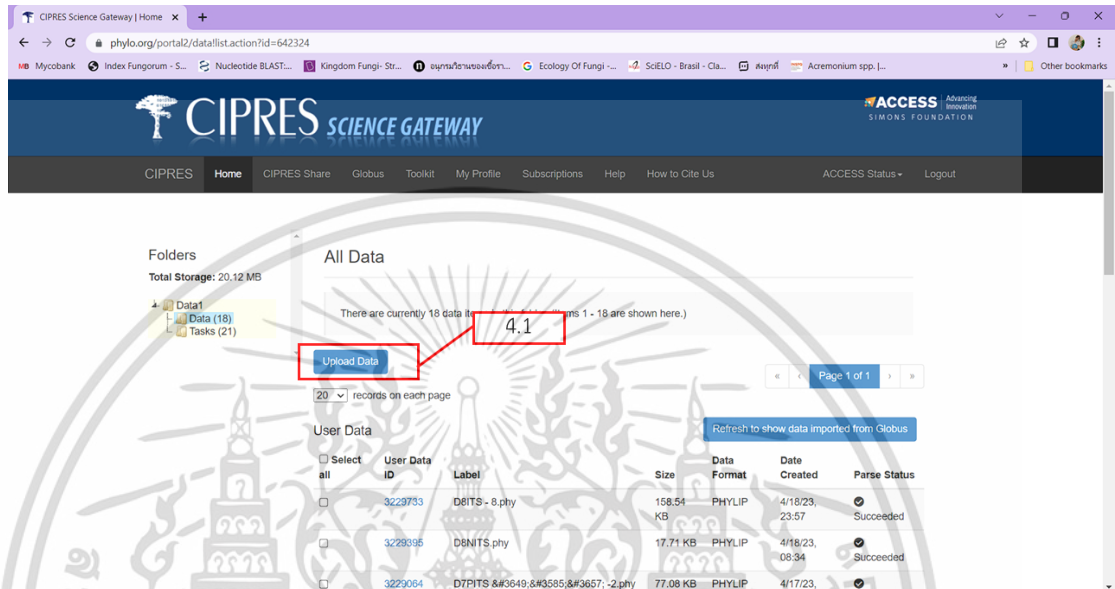
3.9 ตัด Gaps ที่สามารถตัดได้ออก แล้ว save ไฟล์เป็น .phy



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วย RAxML-HPC2 on XSEDE (8.2.8) (Stamatakis 2014) ผ่านแพลตฟอร์ม CIPRES Science Gateway

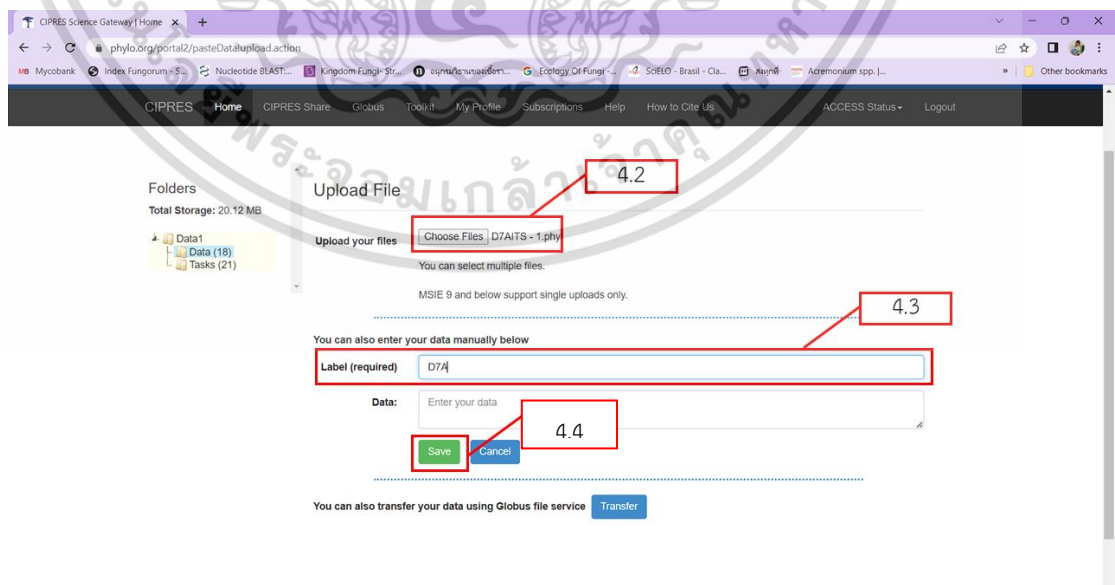
4.1 ทำการ upload Data



4.2 Choose file

4.3 ตั้งชื่อไฟล์ข้อมูล

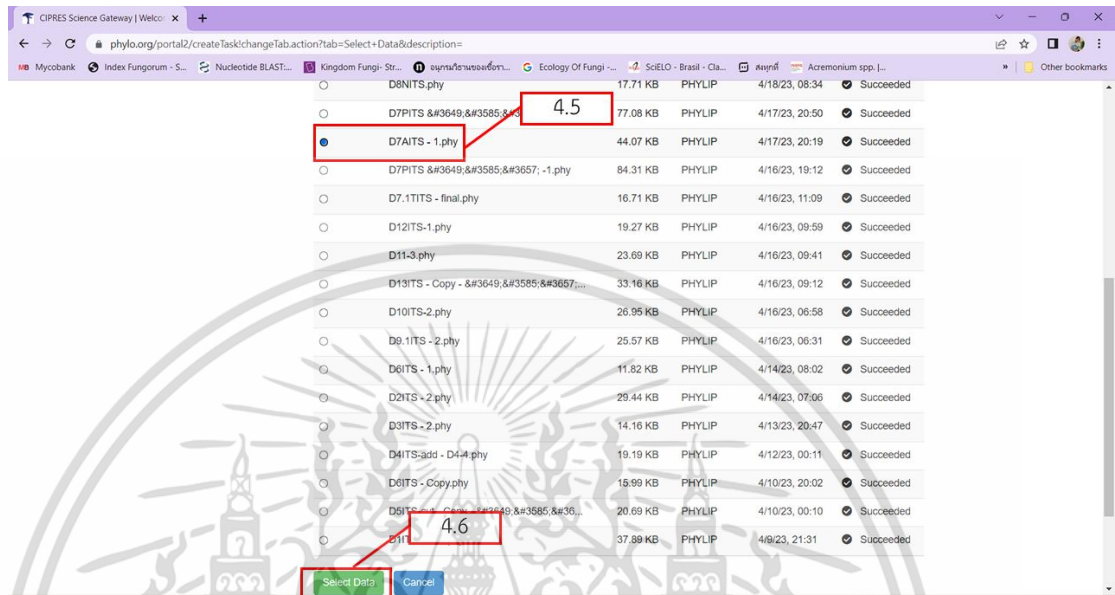
4.4 กด save



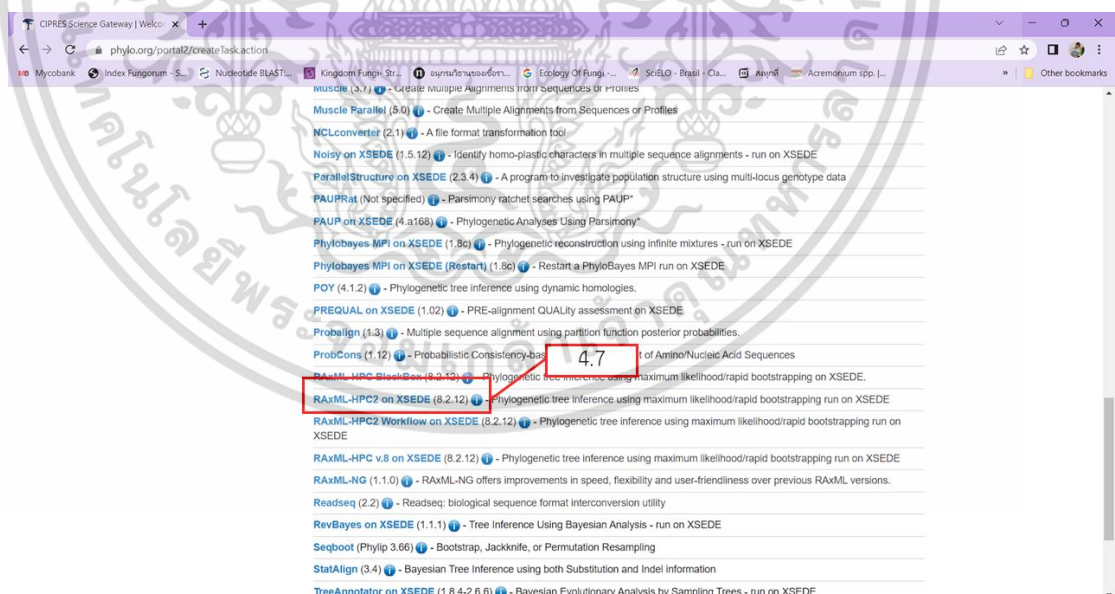
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 จากนั้นกดเลือก Data ที่ upload ลงไป

4.6 กด select data



4.7 เลือก Tool เป็น RAXML-HPC2 on XSEDE (8.2.12)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 เลือก 50 Parameters set

4.8 เลือก 50 Parameters set

4.9 เปลี่ยนเป็น Nucleotide

4.10 เลือก out group ในข้อมูลของเรา

4.9 เปลี่ยนเป็น Nucleotide

4.10 เลือก out group ในข้อมูลของเรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.11 เลือก GTRGAMMA

Advanced Parameters

Nucleic Acid Options

Choose model for bootstrapping phase [Not Mandatory] GTRCAT **GTRGAMMA**

Protein Analysis Options

Choose GAMMA or CAT model: + Protein GAMMA Protein CAT

Protein Substitution Matrix + DAYHOFF

Upload a Custom Protein Substitution Matrix

Use a Partition file that specifies AA Matrices

Select the First Protein Substitution Matrix Called in Your Partition File

Select the Second Protein Substitution Matrix Called in Your Partition File

Select the Third Protein Substitution Matrix Called in Your Partition File

Select the Fourth Protein Substitution Matrix Called in Your Partition File

Select the Fifth Protein Substitution Matrix Called in Your Partition File

Use empirical frequencies? No Yes

RNA Secondary Structure Options

Upload a Secondary Structure File (-S)

Use an RNA Secondary Structure Substitution Model (-A) + Sixteen State Model A

4.12 ตั้งค่า bootstrap เป็น 1000

4.13 กด save parameter

Configure Bootstrapping

Conduct Multiparametric Bootstrapping? (-b) +

Enter a random seed value for multi-parametric bootstrapping + 12345

Conduct rapid bootstrapping? (-x)

Enter a random seed value for rapid bootstrapping + 12345

Conduct a rapid Bootstrap analysis and search for the best-scoring program run. (-fs)

Print branch lengths (-k)

Specify an Explicit Number of Bootstraps

Bootstrap iterations (-i/-N) + 1000

Let RAxML halt bootstrapping automatically

Stop Bootstrapping Automatically with Frequency Criterion +

Stop Bootstrapping Automatically with Majority Rule Criterion (recommended)

Select Majority Rule Criterion: (autoMRE is recommended) + autoMR autoMRE autoMRE_IGN

Use a posteriori bootstrapping

Select the criterion for a posteriori bootstrapping analysis + autoFC

File with topologies for a posteriori bootstrapping (-z)

4.13

Save Parameters Reset Cancel

Advanced Help

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.14 กด save and run task

The screenshot shows the CIPRES Science Gateway interface. The browser address bar displays 'phylo.org/portal2/raxmlhpc2_tjob.action'. The page title is 'Task Summary'. Below the title, there are tabs for 'Select Data', 'Select Tool', and 'Set Parameters'. A message states: 'You may edit your task using the tabs above. Current CPU Hr Usage: 41 Explain this?'. The 'Description' field contains 'Data7A'. The 'Input' section shows '1 Inputs Set'. The 'Tool' section shows 'RAxML-HPC2 on XSEDE' with a 'Click for more info' link. The 'Input Parameters' section shows '23 Parameters Set'. At the bottom of this section, three buttons are visible: 'Save Task' (green), 'Save and Run Task' (red, highlighted with a red box and labeled '4.14'), and 'Cancel Task' (red). Below the buttons, a note states: 'Saved tasks can be run later from the task list. XSEDE tasks are limited to 168 hours. Non-XSEDE tasks are limited to 72 hours.'

4.15 เมื่อเสร็จและจะขึ้นคำว่า View Output ให้ดาวน์โหลดข้อมูลมา

The screenshot shows the CIPRES Science Gateway task list. The browser address bar displays 'phylo.org/portal2/tasklist.action?id=642324'. The page title is 'Task List'. The table below lists tasks with columns for 'Clone', 'Data', 'Tool', 'View (1)', 'View (22)', 'Time', and 'View Output'. The 'Data7A-1' task is highlighted with a red box, and its 'View Output' button is also highlighted with a red box and labeled '4.15'. The table contains the following data:

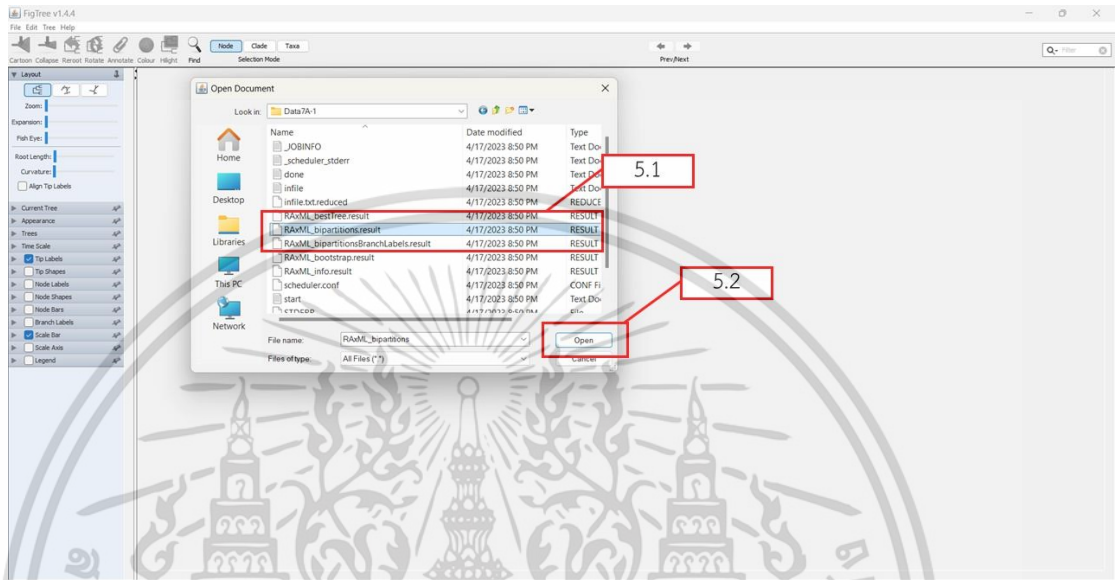
Clone	Data	Tool	View (1)	View (22)	Time	View Output
<input type="checkbox"/>	Data5Test	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/19/23, 01:31	View Output
<input type="checkbox"/>	Data6-8	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/18/23, 23:59	View Output
<input type="checkbox"/>	Data8N	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/18/23, 08:45	View Output
<input type="checkbox"/>	Data7P-2	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/17/23, 20:51	View Output
<input type="checkbox"/>	Data7A-1	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/17/23, 20:20	View Output
<input type="checkbox"/>	Data7T1	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/16/23, 11:11	View Output
<input type="checkbox"/>	Data12-1	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/16/23, 09:59	View Output
<input type="checkbox"/>	Data11-3	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/16/23, 09:42	View Output
<input type="checkbox"/>	Data13	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/16/23, 09:13	View Output
<input type="checkbox"/>	Data12	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/16/23, 07:51	View Output
<input type="checkbox"/>	Data10_1	RAxML-HPC2 on XSEDE	View (1)	View (22)	4/16/23, 06:59	View Output

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

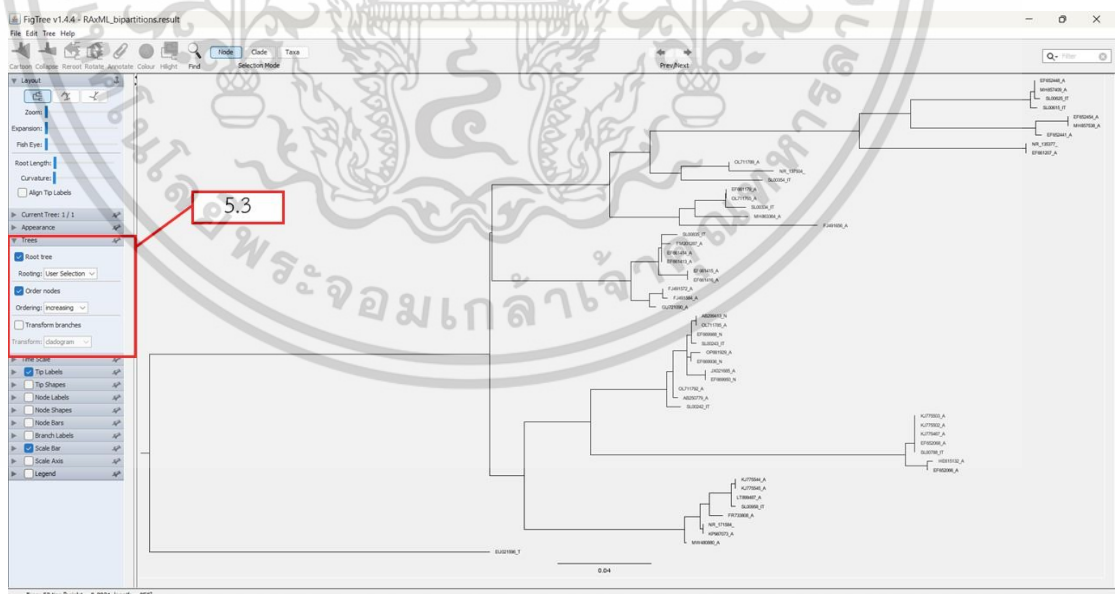
5. จัดทำรูปแบบ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Figtree v.1.4.4

5.1 เปิดโปรแกรม Figtree แล้วเลือกไฟล์ดังกล่าว

5.2 กด open

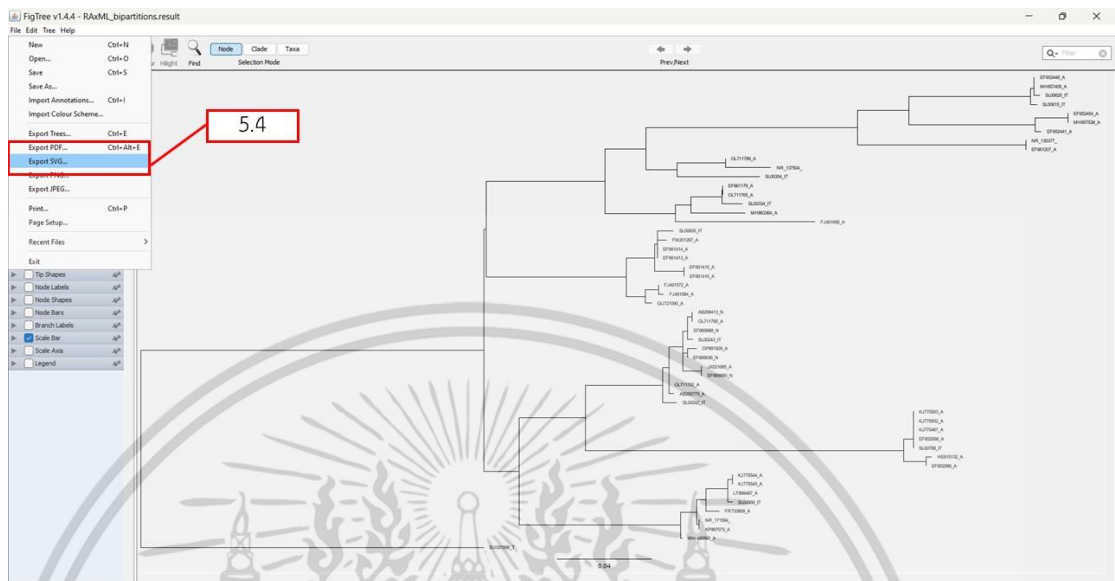


5.3 เลือกเมนู treesคลิกที่ช่อง Root tree และ Order nodes

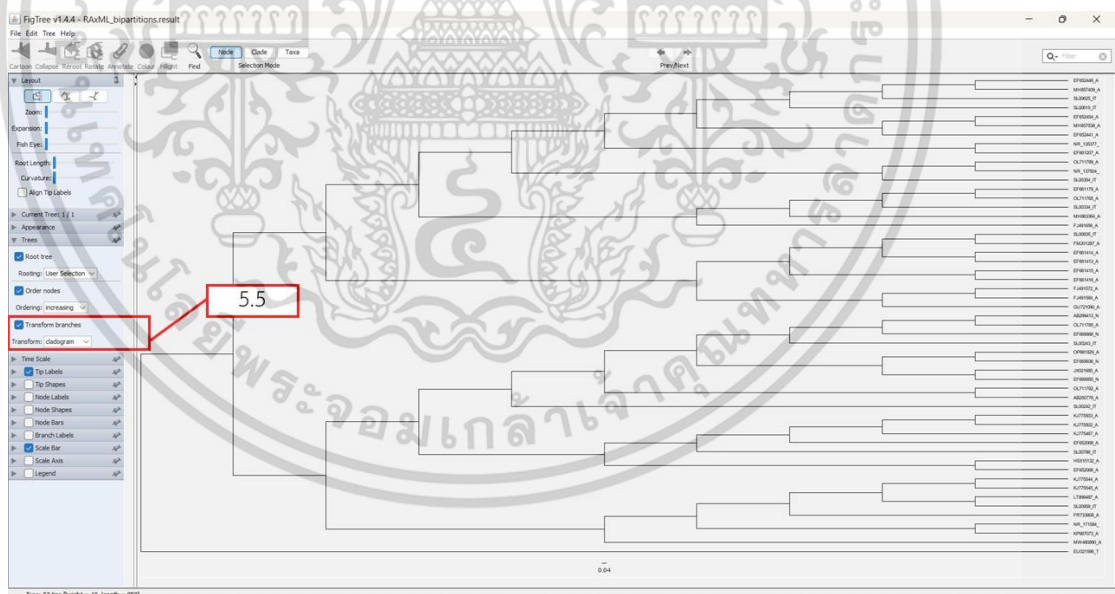


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 Save ไฟล์เป็น .svg

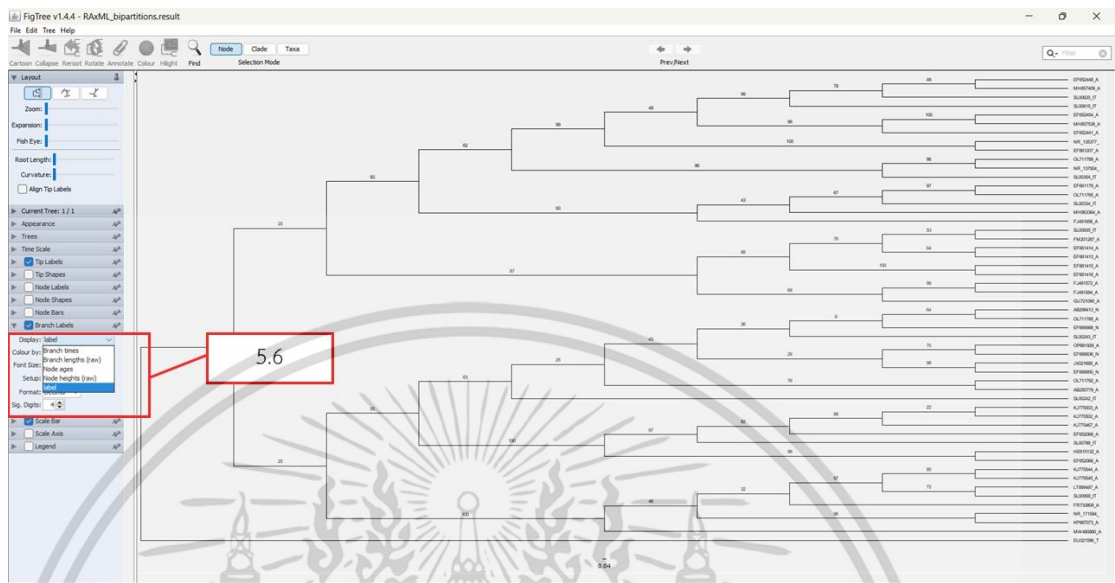


5.5 กลับมาที่เมนู trees อีกครั้ง แล้วคลิก Transform branches



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.6 ไปที่เมนู Branch labels> เลือกหัวข้อ Display เป็น label



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา

วันที่ 20 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาว

พรพิมล

วงษามาน

รหัสประจำตัว 62050517

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา ชีววิทยา ขอรับรองว่า สหกิจศึกษา เรื่อง ชื่อภาษาไทย การจัดจำแนกชนิดพันธุ์ของจุลินทรีย์กลุ่มราที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ชื่อภาษาอังกฤษ Classification of fungi with potential bioactive substance activity ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อนเรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่มโครงการพิเศษ/ปัญหาพิเศษ/สหกิจศึกษา ฉบับสมบูรณ์แล้ว

โปรแกรมอักขราวิสุทธิ์ 1.48 %

ลงชื่อ พรพิมล วงษามาน

(นางสาวพรพิมล วงษามาน)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร. นิลเนตร อัครวะศิริจินดา อาจารย์ที่ปรึกษาสหกิจศึกษา ได้ตรวจสอบสหกิจศึกษาของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัยของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ นิลเนตร อัครวะศิริจินดา

(ดร. นิลเนตร อัครวะศิริจินดา)

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้