การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากดิน และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในกาแฟ

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF GENUS *Talaromyces* AND *Neosartorya* FROM SOIL AND THEIR EFFICACY AGAINST COFFEE ANTHRACNOSE

เมอมร สร้อยทอง
MAYAMOR SOYTONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2558
KMITL-2015-SC-M-020-073

การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากดิน และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในกาแฟ

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF GENUS *Talaromyces* AND *Neosartorya* FROM SOIL AND THEIR EFFICACY AGAINST COFFEE ANTHRACNOSE

เมอมร สร้อยทอง

MAYAMOR SOYTONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2558

KMITL-2015-SC-M-020-073

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF GENUS *Talaromyces* AND *Neosartorya* FROM SOIL AND THEIR EFFICACY AGAINST COFFEE ANTHRACNOSE

MAYAMOR SOYTONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2015

KMITL-2015-SC-M-020-073

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2015
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ "การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากดินและประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในกาแฟ"
"ISOLATION AND IDENTIFICATION OF GENUS *Talaromyces* AND *Neosartorya* FROM SOIL AND THEIR EFFICACY AGAINST COFFEE ANTHRACNOSE"

ชื่อนักศึกษา นางสาวเมอมร สร้อยทอง
รหัสประจำตัว 55651604
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี) -----

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง)	
ผศ.ดร.โองการ วณิชาชีวะ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ 9 ธันวาคม พ.ศ. 2558 เวลา 09.00 - 12.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 ตึกจุฬาภรณ์ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษณี ธนะบรีพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่.....๒๑.....**เดือน**.....ธ.ค.....**พ.ศ.**.....๕๘.....

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากดิน และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในกาแฟ
ชื่อนักศึกษา	เมอมร สร้อยทอง
รหัสประจำตัว	55651604
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2558
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

คัดแยกและบ่งชี้เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากดินบริเวณดอยสุเทพ และดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS), *β-tubulin* และ *calmodulin* พบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต เป็นเชื้อในสกุล *Talaromyces* จำนวน 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Talaromyces muroii* และ *T. trachyspermus* และเชื้อในสกุล *Neosartorya* จำนวน 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Neosartorya hiratsukae, N. pseudofischeri, Neosartorya* sp.1 และ *Neosartorya* sp.2 และศึกษาประสิทธิภาพที่มีต่อการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum coffeanum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกาแฟ ด้วยวิธีอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 และ *T. muroii* EU04 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมได้ดีที่สุดที่ 91.22 และ 90.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหยาบของเชื้อ *T. trachyspermus* EU09, *T. muroii* EU04 และ EU18 มาทดสอบประสิทธิภาพต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ด้วยวิธี poison plate พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *T. muroii* EU04 มีฤทธิ์ในการต่อต้านดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* ด้วยค่า effective dose ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ED_{50}) เท่ากับ 0.41 ppm

คำสำคัญ : สกุล *Talaromyces*, สกุล *Neosartorya*, *Colletotrichum coffeanum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Isolation and identification of genus *Talaromyces* and *Neosartorya* from soil and their efficacy against coffee anthracnose
Student Name	Mayamor Soytong
Student ID	55651604
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2015
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim

Abstract

Isolation and identification of genus *Talaromyces* and *Neosartorya* from soil collected from Doi Suthep and Doi Inthanon, Chiang Mai. Eighteen isolates were identified base on morphology and DNA sequencing: Internal transcribed spacer (ITS), *ß-tubulin* and *calmodulin*. These isolates were identified into 2 species for genus *Talaromyces*: *Talaromyces muroii* and *T. trachyspermus* and 4 species for genus *Neosartorya*: *Neosartorya hiratsukae, N. pseudofischeri, Neosartorya* sp.1, *Neosartorya* sp.2. For their efficacy against coffee anthracnose *Colletotrichum coffeanum* were proved by bi-culture test *in vitro*. *T. trachyspermus* EU09 and *T. muroii* EU04 showed the highest significant difference inhibition of spore pathogen at 91.22 and 90.65%. The crude extracts of *T. trachyspermus* EU09, *T. muroii* EU04 and EU18 were assessed for antifungal activity against *C. coffeanum* by poison plate method. The ethyl acetate crude extract of *T. muroii* EU04 expressed the highest antagonistic activity which inhibited spore pathogen at effective dose at 50% (ED_{50}) 0.41 ppm.

Keywords : *Talaromyces* sp., *Neosartorya* sp., *Colletotrichum coffeanum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี ได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลเหล่านี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ซึ่งกรุณาชี้แนะแนวทางในการดำเนินงานวิจัยและข้อคิดเห็นในการแก้ปัญหาต่างๆ ในการทดลอง อบรมสั่งสอนและดูแลอย่างใกล้ชิด พร้อมทั้งยังคอยให้คำปรึกษาและตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของเล่มวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบรูณ์มากยิ่งขึ้น ขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการสอบ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำ และ ผศ.ดร.โองการ วณิชาชีวะ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง อาจารย์ประจำภาควิชาการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับการอนุเคราะห์ตัวอย่างดินในการทำงานวิจัย มอบความรู้เกี่ยวกับเชื้อรา และให้คำชี้แนะด้วยความเมตตาเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดลชาติ ตันติวานิช อาจารย์ประจำภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการคำนวณข้อมูลทางสถิติ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำภาควิชาที่คอยอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือและเสนอข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยให้คำชี้แนะต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และยังเป็นกำลังใจที่สำคัญที่คอยสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

นางสาวเมอมร สร้อยทอง

ธันวาคม 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญรูป ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อสกุล *Talaromyces* 4
2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อสกุล *Neosartorya* 6
2.3 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด 8
2.4 เทคนิคระดับโมเลกุลที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* 9
2.5 การใช้ประโยชน์จากเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* 11
2.6 เชื้อ *Colletotrichum coffeanum* 12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 14
3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน 14
3.2 สารเคมี 14
3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 14
3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) 14
3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา 15
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ 15
3.4 วิธีการทดลอง 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.4.1 การคัดแยกเชื้อจากดินโดยวิธี soil plate และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ 16
3.4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ 17
3.4.3 การบ่งชี้เชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 17
3.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *Colletotrichum coffeanum* 20
3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *Colletotrichum coffeanum* 21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 24
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 24
4.2 ผลการบ่งชี้เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 28
4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS, *β-tubulin* และ *calmodulin* 28
4.2.2 ผลการบ่งชี้เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 29
4.2.3 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* 32
4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค *Colletotrichum coffecinarum* ในสภาพห้องปฏิบัติการ 49
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อสกุล *Talaromyces* ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum* 52
4.4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU04 52
4.4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 56
4.4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU18 60
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ 65
เอกสารอ้างอิง 67
ภาคผนวก 71
ภาคผนวก ก 72
ภาคผนวก ข 76
ภาคผนวก ค 82
ประวัติผู้เขียน 93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR	15
3.2	แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* (Hubka และ Kolarik, 2012)	18
3.3	แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS (White และคณะ, 1990)	19
4.1	แสดงวันเวลา สถานที่ในการเก็บตัวอย่างดิน และชื่อไอโซเลตเชื้อที่แยกได้	24
4.2	แสดงข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทั้ง 18 ไอโซเลต	27
4.3	แสดงชื่อสปีชีส์ของไอโซเลตที่ได้จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 บริเวณเทียบกับฐานข้อมูล GenBank	31
4.4	สรุปชื่อสกุล และสปีชีส์ของตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากดิน	38
4.5	แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม	51
4.6	ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU04 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum*	55
4.7	ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum*	59
4.8	ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum*	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Talaromyces flavus* A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า ; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-D: ลักษณะ conidiophore; E: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM); G: ลักษณะของ ascus; H: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ I: ลักษณะ ascospores กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM).....	5
2.2	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya fischeri* A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า ; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C: ลักษณะ coniophore; D: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; E: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM); F: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ G: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM).....	7
3.1	แสดงการวางเชื้อต่อต้าน (antagonist) และเชื้อสาเหตุโรค (pathogen) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม รวมทั้งจานอาหารตัวควบคุมของเชื้อ antagonist และ pathogen	20
3.2	แผนผังแสดงลำดับในการสกัดสารสกัดหยาบ.....	21
4.1	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อกลุ่มที่ 1 เชื้อสกุล *Talaromyces* โดยมีไอโซเลต EU07 เป็นตัวแทนของสกุลที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 25 วัน A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง ; C-D: ลักษณะ clestothecia และ E: ลักษณะ ascospores	26
4.2	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อกลุ่มที่ 2 เชื้อสกุล *Neosartorya* โดยมีไอโซเลต EU06 เป็นตัวแทนของสกุลที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 25 วัน A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-D: ลักษณะ clestothecia และ E: ลักษณะ ascospores.....	26
4.3	แสดงผลแถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS, *β-tubulin* และ *calmodulin* ของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* โดยใช้ EU10 และ EU12 เป็นตัวอย่างของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ EU06 และ EU13 เป็นตัวอย่างของเชื้อสกุล *Neosartorya*..	29
4.4	แผนภูมิการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ในบริเวณ *β-tubulin* โดยใช้ Neighbor-joining ค่า bootstrap เท่ากับ 1000.....	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.5	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b ของบริเวณ *ß-tubulin* ของเชื้อ *T. trachyspermus* เปรียบเทียบกันระหว่างไอโซเลต EU01, EU09, EU10 และ EU23	34
4.6	แผนภูมิการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ในบริเวณ *calmodulin* โดยใช้ Neighbor-joining ค่า bootstap เท่ากับ 1000	36
4.7	แผนภูมิการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ในบริเวณ *ß-tubulin* และ *calmodulin* โดยใช้ Neighbor-joining ค่า bootstrap เท่ากับ 1000	37
4.8	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Talaromyces muroii* EU12 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-D: ลักษณะ ascocarp; E: ลักษณะ ascus และ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ลักษณะ conidiophore และ G-I: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	39
4.9	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Talaromyces trachyspermus* EU23 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-E: ลักษณะ ascocarp; F: ลักษณะ ascus และ ascospore และ G-I: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	41
4.10	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Neosartorya hiratsukae* EU06 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-F: ลักษณะ ascocarp; G: ลักษณะ ascus; H-K: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ I-K: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	42
4.11	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya pseudofischeri* EU13 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-F: ลักษณะ ascocarp; G: ลักษณะ ascus; H: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ I-L: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	44
4.12	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya* sp.1 EU35 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-E: ลักษณะ ascocarp; F: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; G: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; H-I: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด และ J-K: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.13	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya* sp.2 EU36 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-E: ลักษณะ ascocarp; F: ลักษณะ ascus; G: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ H-J: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด	48
4.14	แสดงผลจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *T. muroii* EU04 (A), *T. trachyspermus* EU09 (B) และ *T. muroii* EU18 (C) ต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum*	50
4.15	สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. muroii* EU04 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ	53
4.16	กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. muroii* EU04	54
4.17	กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. muroii* EU04	54
4.18	สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ	57
4.19	กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. trachyspermus* EU09	58
4.20	กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. trachyspermus* EU09	58
4.21	สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ	61
4.22	กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. muroii* EU18	62
4.23	กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. muroii* EU18	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* เป็นเชื้อราจำพวกเชื้อที่ดำรงชีวิตอยู่บนซากสิ่งมีชีวิต พบแพร่กระจายทั่วไปในดิน ฝุ่นละออง เศษพืช ปุ๋ยหมัก มูลสัตว์ รวมถึงอาหาร (ธิดา และคณะ, 2550) จัดอยู่ในชั้น Ascomycetes อันดับ Eurotiales วงศ์ Trichocomaceae และเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ตามลำดับ (Samson และคณะ, 2007; Houbraken และ Samson, 2011; Yilmaz และคณะ, 2014) โดยลักษณะทางสัณฐานของเชื้อสกุล *Talaromyces* จะมีโคโลนีมีสีเหลืองถึงส้มแดง ส่วนของ ascomata wall ประกอบด้วยเส้นใยหลวมๆ มีสีขาวถึงเหลือง ascus สร้างในลักษณะโซ่ (Domsch และคณะ, 1993) เชื้อสกุล *Neosartorya* จะมีโคโลนีสีขาวถึงเหลืองจาง สร้าง ascocarp แบบ cleistothecia สีขาวถึงสีเหลืองจาง ascospore ประกอบด้วย 2 equatorial crests หรือ ridge ส่วนของ conidiophore จะเป็นแท่งตรงสั้นๆ มีสีเขียวอมเทา (Yaguchi และคณะ, 2010)

ในปัจจุบันทั่วโลกมีรายงานว่าพบเชื้อสกุล *Talaromyces* จำนวน 99 สปีชีส์ (species) และเชื้อสกุล *Neosartorya* จำนวน 38 สปีชีส์ (http://www.speciesfungorum.org) ในประเทศไทยมีรายงานพบเชื้อสกุล *Talaromyces* จำนวน 13 สปีชีส์ และเชื้อสกุล *Neosartorya* จำนวน 7 สปีชีส์ (ธิดา และคณะ, 2550; เลขา และคณะ, 2553; Manoch และคณะ, 2013) โดยเชื้อสกุล *Talaromyces* จำนวน 2 สปีชีส์ที่ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2556 จากดินบริเวณป่าในจังหวัดตรัง ได้แก่ *T. thailandensis* และ *T. tratensis* (Manoch และคณะ, 2013) และมีการพบเชื้อสกุล *Neosartorya* ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย ซึ่งแยกจากดินบริเวณที่มีการทำการเกษตรและดินริมทาง ได้แก่ *N. multiplicata* และ *N. quadricincta* (เลขา และคณะ, 2548) ซึ่งเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* บางสายพันธุ์ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด เช่น โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *Verticillium albo-atrum* ในมะเขือเทศ (Naraghi และคณะ, 2010) โรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ในยอดถั่ว (Madi และคณะ, 1997) ในการศึกษาเชื้อทั้งสองสกุลในครั้งนี้จึงทำการศึกษาโดยแยกเชื้อจากดิน และใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกเชื้อทั้งสองสกุล แต่เนื่องจากเชื้อทั้งสองสกุลนี้เป็นสกุลที่มีลักษณะทางสัณฐานหลากหลายและมีจำนวน สปีชีส์ภายในสกุลปริมาณมาก (Guarro และคณะ, 1999) ทำให้การใช้การจำแนกสปีชีส์จากลักษณะทางสัณฐานเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอ จึงต้องมีการใช้เทคนิคอื่นช่วยในการจัดจำแนก ได้แก่ การศึกษาสารทุติยภูมิ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง *β-tubulin*, *calmodulin*, internal transcribed spacer (ITS) และ *actin* (Samson และคณะ, 2007; Peterson, 2008) ดังเช่นการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin*, *calmodulin*, ITS และ *actin* และข้อมูลสัณฐานจากกล้อง-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM) มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายและบ่งชี้เชื้อสกุล *Neosartorya* ชนิดใหม่ ซึ่งแยกได้จากดินในประเทศเกาหลี (Hong และคณะ, 2006; Samson และคณะ, 2007) โดยการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS, *β-tubulin* และ *calmodulin* และลักษณะทางสัณฐานมาใช้ในการคัดแยก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ที่คัดแยกจากดิน

ในด้านการประยุกต์ใช้เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* มีการรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *T. flavus* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธีเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ร่วมกับเชื้อสาเหตุโรคพืช พบว่าเชื้อ *T. flavus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum capsici* และ *C. gloeosporioides* (ธิดา และคณะ, 2550) และ Eamvijan และคณะ (2009) ทดสอบความสามารถของเชื้อ *N. fischeri*, *N. graba*, *N. spinosa*, *N. hiratsukae*, *N. takakii*, *N. tatenoi* และ *Neosartorya* sp. 3 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยเลี้ยงเชื้อราร่วมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในห้องปฏิบัติการ พบว่า *Neosartorya* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bipolaris maydis*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ได้ 30-40 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อดังเช่น Boonsang และคณะ (2014) ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *Eupenicillium parvum*, *Gelasinospora brevispora*, *N. pseudofischeri*, *N. quadricincta* และ *N. multiplicata* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช ด้วยวิธี dilution plate พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *N. pseudofischeri* KUFA 0060 ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อสาเหตุโรค *P. palmivora* และ *C. capsici* และสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *N. quadricincta* KUFA 0064 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ppm มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อสาเหตุโรค *P. palmivora* และ *Alternaria* sp. และเนื่องจากในปัจจุบันกาแฟเป็นพืชส่งออกที่สำคัญมีการบริโภคในปริมาณมาก และโรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่พบได้มากในพื้นที่เพาะปลูกกาแฟในประเทศไทย (ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร, 2553) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงนำเชื้อราทั้งสองสกุลที่ได้จากการคัดแยกมาศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกาแฟ พร้อมทั้งศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อสกุล *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ด้วยวิธี poison plate อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 คัดแยกและบ่งชี้เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ที่มีต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum coffeanum*

1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อสกุล *Talaromyces* ที่มีต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum coffeanum*

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

คัดแยกและบ่งชี้เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากตัวอย่างดินที่เก็บบริเวณดอยอินทนนท์และดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ ในปีพุทธศักราช 2553-2554 ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง Internal Transcribed Spacers (ITS) ยีน *β-tubulin* และยีน *calmodulin* รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อทั้งสองสกุล และสารสกัดหยาบเชื้อสกุล *Talaromyces* ที่มีต่อการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum coffeanum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกาแฟในสภาพห้องปฏิบัติการ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบความหลากหลายของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ที่แยกได้จากดินบริเวณดอยอินทนนท์และดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่

1.4.2 ทราบประสิทธิภาพของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ที่มีต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum coffeanum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกาแฟ ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในการเกษตรต่อไป

1.4.3 ทราบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบเชื้อสกุล *Talaromyces* ที่มีต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum coffeanum* เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สารสกัดหยาบเชื้อสกุล *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* เป็นเชื้อราที่อยู่ในจำพวกเชื้อที่ดำรงชีวิตอยู่บนซากสิ่งมีชีวิต โดยอยู่ในวงศ์ Trichocomaceae อันดับ Eurotiales และเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ตามลำดับ (Samson และคณะ, 2007; Houbraken และ Samson, 2011; Yilmaz และคณะ, 2014) โดยระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีการสร้าง ascocarp ซึ่งภายในบรรจุ ascus ซึ่งเป็นถุงหุ้ม ascospore และในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีการสร้าง conidiophore และ conidia หรือ asexual spore

2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อสกุล *Talaromyces*

เชื้อสกุล *Talaromyces* มีโคโลนีมีสีขาวถึงเหลือง ค่อนข้างครีม ชมพู เขียว และส้มแดง มี fruiting body หรือ ascocarp แบบ cleistothecium หรือ gymnothecium มีลักษณะคล้ายถุงปิด ไม่มีช่องเปิด รูปร่าง globose (กลม) ถึง subglobose (ค่อนข้างกลม) ตื้น แยกออกจากกันหรืออยู่ติดกัน โดย ascomata wall ประกอบด้วยเส้นใยหลวมๆ มีสีขาวถึงเหลือง ค่อนข้างครีม ค่อนข้างชมพู ส้ม ค่อนข้างแดงหรือเขียว ascus (พหูพจน์: asci) สร้างในลักษณะโซ่ และภายในบรรจุ 8 ascospores หรือบางครั้งบรรจุเพียง 2 ascospores ซึ่งมีลักษณะกลมถึงวงรี conidiopore มีพื้นผิวเรียบหรือขรุขระ และมีกิ่งก้าน phialide สองชั้น โดยสัดส่วนเล็กที่ด้านปลาย บางชนิดมีกิ่งก้าน phialide ชั้นเดียว conidia หรือ asexual spore ค่อนข้างกลม (Domsch และคณะ, 1993; Stolk และ Samson, 1972)

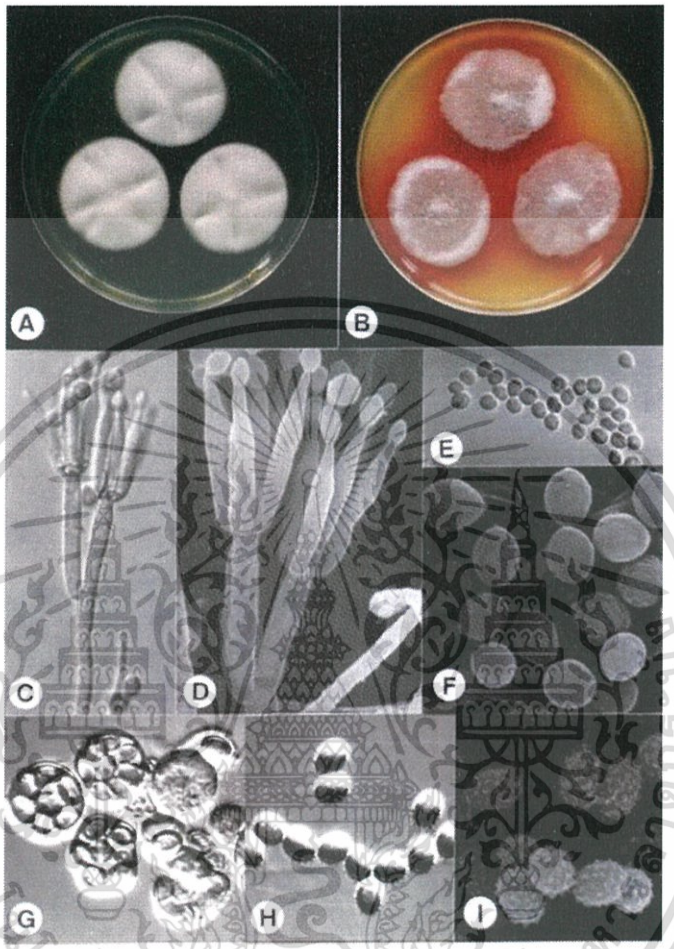
เชื้อราในสกุลนี้มีหลากหลายสปีชีส์ แต่สปีชีส์ที่พบได้บ่อยในสกุล *Talaromyces* มีดังนี้

Talaromyces flavus ลักษณะโคโลนีสีเหลืองจางจนถึงสีเหลือง ดังแสดงโคโลนีด้านหน้าจานเพาะเลี้ยงเชื้อใน (รูปที่ 2.1A) และด้านหลังจานเพาะเลี้ยง (รูปที่ 2.1B) พบ ascocarp สีเหลืองเข้ม ขนาด 200-700 ไมโครเมตร รูปร่าง subglobose (ค่อนข้างกลม) ascus มีลักษณะ globose (กลม) (รูปที่ 2.1 G) ascospore รูปร่าง broadly ellipsoidal (วงรีกว้าง) ขนาด 4-5.5 x 3-3.5 ไมโครเมตร ผนังหนา พื้นผิวเป็นแบบ spiny (หนามเล็ก) ไม่มี ridge (สัน) ดังรูปที่ 2.1 H-I และ conidiophore สร้างกิ่งแบบ biverticillate (รูปที่ 2.1 C-D) และ conidia มีลักษณะค่อนข้างกลม ดังแสดงในรูปที่ 2.1 E-F (Domsch และคณะ, 1993; Yilmaz และคณะ, 2014)

Talaromyces muroii พบว่ามี ascocarp สีเหลืองอ่อนถึงเหลือง รูปร่างค่อนข้างกลม ascospore รูปร่าง ellipsoidal (วงรี) ขนาด 3.5-6 x 3-4 ไมโครเมตร มีผนังค่อนข้างหนา ไม่มี ridge และ conidiophore สร้างกิ่งแบบ monoverticillate ถึง biverticillate ซึ่งส่วนย่อยมีกิ่งอยู่ด้านปลาย (Yilmaz และคณะ, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Talaromyces trachyspermus พบว่ามี ascocarp สีขาวครีม ascospore รูปร่าง broadly ellipsoidal (วงรีกว้าง) ขนาด 3.5-5 x 2-3 ไมโครเมตร พื้นผิวเป็นแบบ spiny (หนามเล็ก) ไม่มี ridge และ conidiophore สร้างกิ่งแบบ monoverticillate ถึง biverticillate (Yilmaz และคณะ, 2014)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Talaromyces flavus* A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-D: ลักษณะ conidiophore; E: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM); G: ลักษณะ ascus; H: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ I: ลักษณะ ascospores กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)

ที่มา: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802030015

ปัจจุบันทั่วโลกมีรายงานว่าพบเชื้อสกุล *Talaromyces* จำนวน 99 สปีชีส์ (CABI, 2015) โดยพบแพร่กระจายทั่วไปในดิน ฝุ่นละออง เศษพืช ปุ๋ยหมัก มูลสัตว์ รวมถึงอาหาร ในประเทศไทยมีรายงานพบเชื้อสกุล *Talaromyces* จำนวน 13 สปีชีส์ ได้แก่ *T. austrocalifornicus*, *T. flavus*, *T. bacillisporus*, *T. helicus*, *T. macrosporus*, *T. trachyspermus*, *T. luteus*, *T. indigoticus*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T. stipitatus, T. rotundus, T. wortmannii, T. tratensis และ *T. thailandensis* (ธิดา และคณะ, 2550) ซึ่ง *T. tratensis* และ *T. thailandensis* เป็นเชื้อสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Talaromyces* ที่แยกได้จากดินบริเวณป่าในจังหวัดตรัง (Manoch และคณะ, 2013) โดยธิดา และคณะ (2550) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อสกุล *Talaromyces* จากดินด้วยวิธี soil plate, dilution plate, alcohol และ heat treatment ด้วยอาหาร Gochenaur's glucose ammonium nitrate agar (GAN) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสปีชีส์ใหม่ในประเทศไต้หวัน ได้แก่ *T. unicus* โดยแยกได้จากดินเช่นกัน (Tzean และคณะ, 1992)

2.2 ลักษณะทั่วไปของเชื้อสกุล *Neosartorya*

เชื้อสกุล *Neosartorya* เป็นระยะสืบพันธุ์ของเชื้อสกุล *Aspergillus* โดยจะมี fruiting body หรือ ascocarp แบบ cleistothecium มีลักษณะคล้ายถุงปิด ไม่มีช่องเปิด ซึ่ง ascocarp มีสีขาวถึงสีเหลืองจาง ถูกล้อมรอบด้วยผนังหนา ascospore มี 2 equatorial crests หรือ ridge มี conidiopore จะเป็นแท่งตรงสั้นๆ มีสีเขียวอมเทา aspergilla มีแถวเดียวและ vesicle ที่เจริญเต็มที่จะมีลักษณะเป็นรูปช้อนที่ด้านบน conidia มีลักษณะเรียบและเป็นวงรีกว้าง (Yaguchi และคณะ, 2010)

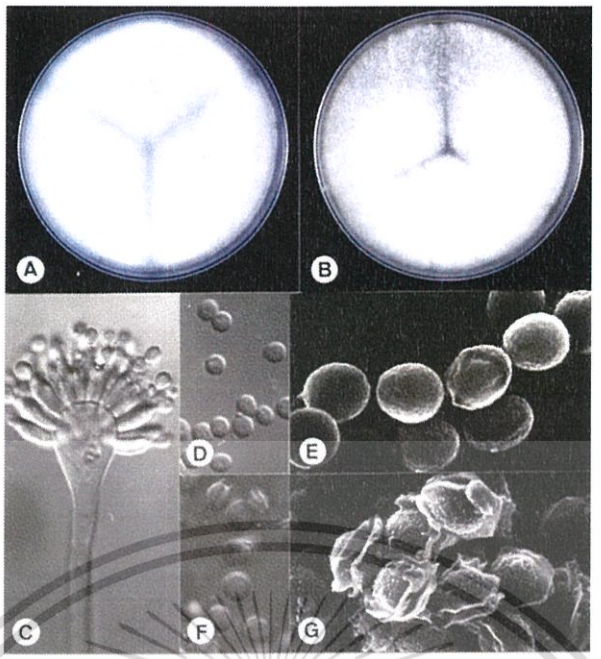
โดยลักษณะเชื้อสกุล *Neosartorya* ที่พบบ่อย ได้แก่ *Neosartorya aureola* โคโลนีมีสีส้มอ่อนถึงเหลือง มี ascocarp สีเหลืองถึงเหลืองมะนาว ขนาด 175-500 ไมโครเมตร มีเส้นใยสีเหลืองทองเข้มสานอยู่หลวมๆ โดยรอบ ascospore รูปร่าง lenticular (คล้ายเลนส์) ขนาด 6-7 x 4.4-5 ไมโครเมตร ประกอบด้วย 2 equatorial crests หรือ ridge ที่ชัดเจนและมีพื้นผิวนูนและมีหนามขนาดเล็ก (Samson และคณะ, 2007)

Neosartorya hiratsukae โคโลนีมีสีเทาอ่อน มี ascocarp สีครีม ขนาด 130-220 ไมโครเมตร ascospore รูปร่าง lenticular (คล้ายเลนส์) ประกอบด้วย 2 equatorial crests หรือ ridge ที่ติดกัน พื้นผิวคล้ายตาข่าย ขนาด 4.5-5 ไมโครเมตร (Samson และคณะ, 2007)

Neosartorya pseudofischeri โคโลนีมีสีขาวถึงค่อนข้างครีมอ่อน มี ascocarp สีขาว รูปร่างกลมถึงค่อนข้างกลม ขนาด 150-300 ไมโครเมตร ascospore รูปร่าง subglobose (ค่อนข้างกลม) ขนาด 4.5-6 ไมโครเมตร ประกอบด้วย 2 equatorial crests หรือ ridge ซึ่งกว้าง 1 ไมโครเมตร พื้นผิวขรุขระ และผนังตั้งขึ้นเป็นสามเหลี่ยม (Samson และคณะ, 2007)

Neosartorya fischeri โคโลนีมีสีขาวถึงเหลืองอ่อนถึงสีเนื้อ (รูปที่ 2.2 A-B) มี ascocarp สีครีมอ่อน รูปร่าง globose กลม มีเส้นใยล้อมรอบอย่างหลวมๆ ขนาด 400 ไมโครเมตร ascospore รูปร่าง lenticular (คล้ายเลนส์) ขนาด 7-8 x 3-4 ไมโครเมตร พื้นผิวคล้ายร่างแห (รูป 2.2 F-G) conidiophore มีรูปร่าง columnar (เป็นเสาตรง) ดังรูปที่ 2.2 C และมี conidia รูปร่าง globose (กลม) ถึง subglobose (ค่อนข้างกลม) ขนาด 2-2.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.2 D-E)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya fischeri* A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C: ลักษณะ coniophore; D: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; E: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM); F: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ G: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM)

ที่มา: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802030010

ปัจจุบันทั่วโลกมีรายงานว่าพบเชื้อสกุล *Neosartorya* จำนวน 38 สปีชีส์ (CABI, 2015) โดยพบแพร่กระจายทั่วไปในดินบริเวณต่างๆ รวมถึงอาหาร ในประเทศไทยมีรายงานพบเชื้อสกุล *Neosartorya* จำนวน 7 สปีชีส์ ได้แก่ *N. delicate*, *N. fischeri*, *N. glabra*, *N. multiplicata*, *N. spinosa*, *N. quadricincta* และ *N. takakii* (เลขา และคณะ, 2553; Manoch และคณะ, 2013) โดยการพบเชื้อที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในประเทศไทย ซึ่งแยกจากดินบริเวณดินทำเกษตร ดินริมทาง ดินในที่รกร้าง และดินในสวนบริเวณบ้านที่อยู่อาศัย ได้แก่ *N. multiplicata* และ *N. quadricincta* โดยวิธีแช่ดินในแอลกอฮอล์ และความร้อน ด้วยอาหาร Gochenaur's glucose ammonium nitrate agar (GAN) บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3-5 วัน (เลขา และคณะ, 2548) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสปีชีส์ใหม่จากดินในประเทศเกาหลี ถึง 3 สปีชีส์ ได้แก่ *N. assulata*, *N. denticulate* และ *N. galapagensis* (Hong และคณะ, 2006) นอกจากนั้นมีการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) และสารทุติยภูมิร่วมกันในการจำแนกเชื้อในสกุลนี้ (Guarro และคณะ, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Samson และคณะ (2007) จัดจำแนกเชื้อสกุล *Aspergillus* section *Fumigati* ซึ่งมีเชื้อสกุล *Neosartorya* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สารทุติยภูมิ และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* พบว่ามีจำนวนชนิดของเชื้อสกุล *Aspergillus* section *Fumigati* จำนวน 10 สปีชีส์ และเชื้อสกุล *Neosartorya* จำนวน 23 สปีชีส์ เช่น *N. udagawae*, *N. quadricincta* และ *N. australensis* เป็นต้น

2.3 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ปัจจุบันมีการใช้บาร์โค้ด (barcode) ในการตรวจสอบสินค้าต่างๆ รวมทั้งใบบัตรประชาชน บัตรอนุญาตต่างๆ ทำให้เราสามารถระบุเอกลักษณ์ของตัวบุคคล และชนิดของสิ่งต่างๆ ได้รวดเร็วและแม่นยำ เช่นเดียวกับแนวความคิดของบาร์โค้ดดีเอ็นเอที่สามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป็นบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตขึ้น โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการระบุความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียงตัวอยู่บนสายดีเอ็นเอมาตรฐานหรือในยีนบางชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดสั้นๆ ไม่เกิน 1,000 คู่เบส มาใช้เป็นแถบป้าย (tag) บอกข้อมูลแสดงถึงเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่แตกต่างกันได้ ทำให้การระบุชนิดของตัวอย่างสิ่งมีชีวิตทำได้รวดเร็วขึ้น รวมทั้งสามารถเข้ามาช่วยสนับสนุนการค้นพบสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ และช่วยในการจำแนกสิ่งมีชีวิตประเภทสปีชีส์ซ่อนเร้นและสิ่งมีชีวิตที่ลักษณะภายนอกไม่สามารถบอกความแตกต่างออกจากกันได้ (โองการ, 2555)

เนื่องจากความก้าวหน้าของเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) สามารถวิเคราะห์ได้ง่ายและเร็วมากขึ้น จึงทำให้มีข้อมูลของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เพิ่มมากขึ้น โดยในกลุ่มของราและยีสต์ เริ่มมีการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเข้ามาช่วยในการจำแนกสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้ โดยเริ่มมีการจัดตั้งเป็นโครงการ all fungal barcoding (http://www.fungalbarcoding.org) พบว่าดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณ internal transcribed spacers (ITS) ของ ribosomal DNA (rDNA) สามารถใช้เป็นบริเวณที่เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในกลุ่มของราและยีสต์ได้ เนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่นๆ ของ rDNA ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์หรือภายในสปีชีส์เดียวกันได้ (Seifert, 2009; โองการ, 2555) บริเวณยีน *calmodulin* เป็นบริเวณที่มีการสร้างโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียมซึ่งมีความสามารถในการกระตุ้นปฏิกิริยาของบริเวณจับโปรตีนได้หลายบริเวณ โดยบริเวณนี้เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และพบได้ทั่วไปในเซลล์ยูคาริโอต รวมถึงในพืช จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้ (Buaboocha และคณะ, 2001; Wang และ Zhuang, 2006) รวมถึงบริเวณ *β-tubulin* ซึ่งมีรายงานการใช้บริเวณดังกล่าวในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราในกลุ่มได้ (Msiska, 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เทคนิคระดับโมเลกุลที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya*

เนื่องจากเชื้อจากทั้งสองสกุลนี้ถูกจัดอยู่ในวงศ์ที่มีสปีชีส์ของเชื้อปริมาณมากและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ความซับซ้อน จึงทำให้ต้องมีการนำเทคนิคอื่นๆ นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยามาใช้ในการจัดจำแนก ยังมีการใช้เทคนิคระดับโมเลกุลต่างๆ ร่วมด้วย (Guarro และคณะ, 1999) และเชื้อสกุล *Aspergillus* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อสกุล *Neosartorya*

Peterson (2008) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อสกุล *Aspergillus* ซึ่งเป็นสกุลที่มีขนาดใหญ่และเป็นเชื้อที่มีระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อสกุล *Neosartorya* โดยทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา 4 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) และ LSU rDNA (ID), *β-tubulin* (BT), *calmodulin* (CF) และ *RNA polymerase II* (RPB2) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 สำหรับบริเวณ ITS และ LSU rDNA (ID) ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b สำหรับบริเวณ *β-tubulin* ไพรเมอร์ CF1L หรือ CF1M และ CF4 สำหรับบริเวณ *calmodulin* ไพรเมอร์ 5F และ 7CR สำหรับบริเวณ RPB2 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* ของเชื้อใน section *Nidulans*, *Usti* และ *Nigri* มีแนวโน้มที่เป็น paralogous คือมีลำดับนิวคลีโอไทด์มีการจำลองตัวซ้ำๆ กันใน genome ทำให้ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* มาใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในเชื้อ section ดังกล่าว สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ CF มีขนาด 872 นิวคลีโอไทด์ บริเวณ RPB2 มีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ 1017 นิวคลีโอไทด์ บริเวณ ID มีขนาด 1275 นิวคลีโอไทด์ โดย ITS1 มีขนาด 246 นิวคลีโอไทด์ ITS2 มีขนาด 223 นิวคลีโอไทด์ โดยบริเวณ ITS ไม่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ เนื่องจากมีปัญหาในการ alignment

Schmidt และคณะ (2004) ใช้เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) และเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase chain reaction; PCR) ในการระบุเชื้อ *Aspergillus carbonarius* พบว่าเทคนิค AFLP สามารถจำแนกเชื้อ *A. niger* และ *A. carbonarius* ออกจากกันได้อย่างอย่างชัดเจน และจากเทคนิค PCR สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะและมีความแม่นยำในการจำแนกเชื้อ *A. carbonarius*

Chakraborty และคณะ (2011) ใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และลำดับนิวคลีโอด์บริเวณ ITS ในการใช้ในการบ่งชี้เชื้อสกุล *T. flavus* และ *Trichoderma* spp. พบว่าการคัดแยกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทำได้ง่ายกว่าการใช้เทคนิค RAPD เนื่องจากเทคนิค RAPD นั้นมีความสามารถในการแบ่งกลุ่มของเชื้อ แต่ยังต้องการเทคนิคอื่นมาใช้ในการจำแนกและระบุเชื้อทั้งสองสกุล ซึ่งในครั้งนี้ได้เลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

Manoch และคณะ (2013) จัดจำแนกและระบุเชื้อในสกุล *Talaromyces* สองชนิดใหม่จากดินในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ในการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อชนิดใหม่กับเชื้ออื่นๆ ในสกุล *Talaromyces* โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

513 คู่เบส และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* และ *RPB1* ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของเชื้อชนิดใหม่กับเชื้ออื่นๆ ที่ใกล้เคียงกันในสกุลนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b สำหรับตำแหน่ง *β*-tubulin และไพรเมอร์ RPB1 และ RPB2 สำหรับตำแหน่ง *RPB1* พบว่า *T. tratensis* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 269 และ 493 คู่เบส ตามลำดับ และ *T. thailandensis* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 469 และ 493 คู่เบส ตามลำดับ

Visagie และคณะ (2014) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อที่แยกจากฝุ่นบริเวณบ้านจากทั่วโลก ศึกษาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS, *β-tubulin* และ *calmodulin* พบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 568, 391 และ 507 คู่เบส ตามลำดับ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 สำหรับบริเวณ ITS, Bt2a และ Bt2b สำหรับ *β-tubulin* และไพรเมอร์ cmd5 และ cmd6 สำหรับบริเวณ *calmodulin* ซึ่งข้อมูลจากบริเวณ ITS นั้นยังไม่เพียงพอต่อการใช้ในการจำแนกเชื้อในสกุล *Penicillium* รวมถึงเชื้ออื่นๆ ในชั้น ascomycetes เนื่องจากเชื้อสกุล *Penicillium* และสกุลใกล้เคียง มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank ในปริมาณมากและยังมีบางส่วนที่บ่งชี้ชนิดผิดไป จึงต้องใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* มาใช้ในการคัดแยกเชื้อ *Aspergillus, Penicillium* และ *Talaromyces*

Yilmaz และคณะ (2014) คัดแยกเชื้อในสกุล *Talaromyces* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนก เพื่อใช้ในการยืนยันข้อมูลที่ได้จากบริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ V9G และ LS266 สำหรับบริเวณ ITS, ไพรเมอร์ RPB2-5F และ RPB2-7Cr สำหรับบริเวณ *RPB2* และไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b หรือ T10 และ Bt2b สำหรับบริเวณ *β-tubulin* พบว่าขนาดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS มีขนาด 494 คู่เบส *β-tubulin* มีขนาด 336 คู่เบส และ *RPB2* มีขนาด 538 คู่เบส และพบว่าเชื้อสกุล *Penicillium* subgenus *Biverticillium* และเชื้อสกุล *Talaromyces* เป็น monophyletic clade ซึ่งแยกออกจากเชื้ออื่นๆ ในสกุล *Penicillium*

นอกจากนี้ได้มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตำแหน่ง *β-tubulin* และ *calmodulin* ในการจำแนกชนิดของเชื้อสกุล *Neosartoya* (Samson และคณะ, 2007) โดย Hong และคณะ (2006) ศึกษาเชื้อสกุล *Neosartoya* และค้นพบสปีชีส์ใหม่จากดินในประเทศเกาหลี 2 สปีชีส์ ได้แก่ *N. laciniosa* และ *N. coreana* พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อชนิดใหม่ทั้ง 2 สปีชีส์ มีความคล้ายคลึงกันทั้งลักษณะโคโลนีไปจนถึงลักษณะของ ascospore จึงต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาในบริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* แยกความแตกต่างของสปีชีส์ใหม่ สำหรับบริเวณ *β-tubulin* ใช้ไพร์เมอร์ Bt2a และ Bt2b ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 466 คู่เบสและสำหรับบริเวณ *calmodulin* ใช้ไพรเมอร์ cmd5 และ cmd6 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 522 คู่เบส

Yaguchi และคณะ (2010) มีการพบสปีชีส์ใหม่ของเชื้อสกุล *Neosartorya* ที่แยกได้จากดินในประเทศจีน โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* และ *actin* ในการจำแนกเชื้อสปีชีส์ใหม่ทั้ง 2 สปีชีส์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การใช้ประโยชน์จากเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya*

จากการรายงานมีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคชนิดต่างๆ จากเชื้อสกุล *Talaromyces* โดยมีการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเชื้อ *T. flavus* พบว่าสามารถยับยั้งโรคเหี่ยวจากเชื้อรา *Verticillium dahlia* (Stosz และคณะ, 1996) ยับยั้งโรคลำต้นเน่าจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* โดยลดการเน่าเปื่อยของยอดถั่ว (Madi และคณะ,1997) และโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ จากเชื้อ *V. albo-atrum* (Naraghi และคณะ, 2010) และยังมีการนำเอนไซม์ที่ได้จาก *Trichoderma harzianum* และ *T. flavus* มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Botrytis fabae* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่ว โดยพบว่าเอนไซม์จาก *T. flavus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. fabae* ได้อย่างสมบรูณ์ที่ความเข้มข้น 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และยังส่งผลให้การสร้างสปอร์ของเชื้อ *B. fabae* ลดลง (Haggag และคณะ, 2006)

ธิดา และคณะ (2550) ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *T. flavus* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-14 วัน พบว่าเชื้อ *T. flavus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum capsici* และ *C. gloeosporioides* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่สามารถควบคุมเชื้อ *Lasiodiplodia theobromae*, *Rhizoctonia oryzae* และ *Sclerotium rolfsii* ได้

Miao และคณะ (2012) รายงานว่าพบสารทุติยภูมิชนิดใหม่ จากสารสกัดชั้น ethyl acetate ของเชื้อรา *T. verruculosus* โดยสาร (–)-8-hydroxy-3-(4-hydroxypentyl)-3,4- dihydroiso-coumarin ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Alternaria solani*, *Valsa mali*, *Curvularia lunata* และ *Botryosphaeria berengeriana*

สำหรับเชื้อสกุล *Neosartorya* มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคชนิดต่างๆ ดังเช่น Yim และคณะ (2014) ได้ทำการแยกส่วนสารสกัดหยาบชั้น ehthyl acetate จากเชื้อ *N. tatenoi* ได้สาร meroterpenoids จำนวน 2 ชนิด ซึ่งได้นำมาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเยื่อบุช่องปากของมนุษย์ (KB) และ เซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ (NCI-H187) พบแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 48.18 และ 4.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Eamvijan และคณะ (2009) ทดสอบความสามารถของเชื้อรา *N. fischeri*, *N. graba*, *N. spinosa*, *N. hiratsukae*, *N. takakii*, *N. tatenoi* และ *Neosartorya* sp. ไอโซเลต 1, 2 และ 3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเลี้ยงเชื้อราร่วมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในห้องปฏิบัติการ พบว่า *Neosartorya* ทั้ง 9 สปีชีส์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bipolaris maydis*, *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pestalotiopsis sp. ได้ประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* ได้

Gomes และคณะ (2014) ค้นพบสารประกอบชนิดใหม่ 11 ชนิดจากเชื้อ *N. paulistensis*, *N. laciniosa* และ *N. tsunodae* ที่ได้มาจากน้ำทะเล และเชื้อในดิน *N. fischeri* และ *N. siamensis* เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa*

Boonsang และคณะ (2014) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *N. pseudofischeri*, *N. quadricincta*, *N. multiplicata*, *Eupenicillium parvum* และ *Gelasinospora brevispora* ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora palmivora*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Helminthosporium maydis* และ *Rhizoctonia solani* ด้วยวิธี dilution plate พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *N. pseudofischeri* KUFA 0060 ที่ความเข้มข้น 100 ppm มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อราสาเหตุโรค *P. palmivora* และ *C. capsici* และสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *N. quadricincta* KUFA 0064 ที่ความเข้มข้น 10 ppm มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อราสาเหตุโรค *P. palmivora* และ *Alternaria* sp.

2.6 เชื้อ *Colletotrichum coffeanum*

ปัจจุบันกาแฟเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยมีการผลิตและส่งออกไปต่างประเทศถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และยังเป็นที่นิยมในการบริโภคทั่วโลก จึงทำให้ต้องการเมล็ดกาแฟของโรงงานแปรรูปทั้งในประเทศและต่างประเทศเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีอัตราการเพาะปลูกพืชชนิดนี้ในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกๆ ปี ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยนิยมปลูกกาแฟโรบัสต้า และพื้นที่ภาคเหนือมีการขยายพื้นที่ในการเพาะปลูกกาแฟอาราบิก้าเพิ่มมากขึ้น โดยทั่วไปกาแฟโรบัสต้ามีลักษณะของความต้านทานต่อโรคมากกว่ากาแฟอาราบิก้า แต่เมื่อสภาพแวดล้อมในช่วงเวลานั้นเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการแพร่ระบาดของโรคแล้วนั้น โรคในกาแฟก็อาจจะทำความเสียหายในทางเศรษฐกิจให้กับเกษตรกรและของประเทศได้ ซึ่งโรคที่พบว่ามีการระบาดมากที่สุดในกาแฟที่ปลูกอยู่ในเขตประเทศไทย ได้แก่ โรคแอนแทรคโนสในกาแฟที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum coffeanum* Noack ซึ่งลักษณะการทำลายของโรคนั้น สามารถทำอันตรายกับกาแฟได้ทั้งในส่วนของใบ กิ่ง และผล ถ้าเข้าทำลายผลกาแฟจะเข้าทำลายได้ทั้งในผลอ่อนและผลแก่ เริ่มแรกเป็นจุดสีน้ำตาลเข้ม ต่อมาแต่ละจุดขยายรวมกันเป็นแผลมีรูปร่างไม่แน่นอน เนื้อเยื่อยุบ ผลกาแฟหยุดการเจริญและเปลี่ยนเป็นสีดำ ผลยังคงติดอยู่บนกิ่ง หากโรคนี้เกิดที่ใบ จะทำให้เป็นจุดสีน้ำตาลแล้วขยายใหญ่ขึ้น เนื้อเยื่อกลางแผลตาย มีสีน้ำตาลไหม้ จุดแผลแต่ละจุดขยายเชื่อมต่อกันเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผลขนาดใหญ่ ทำให้ใบไหม้ โดยเฉพาะใบกาแฟของกิ่งที่อ่อน จากนั้นข้อและปล้องจะแห้งตายจากยอดเข้ามา และลุกลามจนกิ่งแห้งและใบร่วง หากอาการรุนแรงต้นกาแฟจะแห้งจากยอดและยืนต้นตาย (ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร, 2553) โดยมีรายงานการนำเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ มาใช้ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนส

Buaruang และคณะ (2009) ได้ทำการทดสอบเชื้อ *Eurotium cristatum* ซึ่งแยกได้จากฟองน้ำ *Clathria reinwardti* และ *Xestospongia testudinaria* เก็บจากบริเวณหมู่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี และนำสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate ของเชื้อดังกล่าวมาทดสอบการยังยั้งการเจริญของรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง จากผลการทดลองที่ความเข้มข้น 1,000 ppm เชื้อรา *E. cristatum* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *C. gloeosporioides*

Oziengbe และ Osazee (2012) ทำการนำ copper sulphate มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่า copper sulphate ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยังยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคได้ที่ 78.2 และ 66.3 เปอร์เซ็นต์

Ademe และคณะ (2013) นำสารสกัดหยาบจากพืชมาหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะละกอ *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากพืช *Lantan camara* มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค 88.7 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคได้ที่ 85.8 เปอร์เซ็นต์

Vilavong และ Soytong (2013) ได้นำเชื้อ *Cheatomium cupreum* มาทดสอบการต้านการเจริญของเชื้อรา *C. coffeanum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสกาแฟ ด้วยวิธีเลี้ยงในอาหารร่วม (bi-culture) เมื่อครบเวลา 30 วัน พบว่าเชื้อรา *C. cupreum* สามารถยับยั้งการเกิดสปอร์ของ *C. coffeanum* ได้ 97.05 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน

ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างดินทั้งหมด 25 ตัวอย่าง จากรศ.ดร.เกษม สร้อยทอง โดยรวบรวมตัวอย่างดินบริเวณพื้นที่ดอยสุเทพและดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ เก็บระหว่างปี พ.ศ. 2553 ถึง 2554 โดยการตีแปลงขนาด 1,600 ตารางเมตร แล้วทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดิน 5 จุด ลึกประมาณ 20 เซนติเมตร โดยแบ่งเป็นตัวอย่างดินจากพื้นที่ดอยสุเทพ จำนวน 12 ตัวอย่าง และดอยอินทนนท์ จำนวน 13 ตัวอย่าง

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.2.3.1 สีย้อม lactophenol cotton blue

3.2.3.2 อาหาร glucose ammonium nitrate agar (GAN)

3.2.3.3 อาหาร potato dextrose agar (PDA)

3.2.3.4 อาหาร potato dextrose broth (PDB)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ และเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

3.2.3.1 10X standard *Taq* reaction buffer

3.2.3.2 6X gel loading dye

3.2.3.3 agarose gel

3.2.3.4 deionize H_2O

3.2.3.5 Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs)

3.2.3.6 DNA ladder ขนาด 100 คู่เบส (VC 100bp plus ladder)

3.2.3.7 DNA ladder ขนาด 1 กิโลเบส (VC 1kb DNA ladder)

3.2.3.8 ethidium bromide

3.2.3.9 ethyl alcohol 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.2.3.10 ethylene diamine tetraacetate (EDTA)

3.2.3.11 liquid nitrogen

3.2.3.12 *Taq* DNA polymerase

3.2.3.13 TBE buffer

3.2.3.14 ชุดสกัดดีเอ็นเอ GF-1 plant DNA extraction; Vivantis

3.2.3.15 ชุด GF-1 ambiclean kit (PCR & Gel); Vivantis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.16 primer ในตำแหน่ง ITS, *β-tubulin* และ *calmodulin* โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White และคณะ (1990)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
Bt2a	5'- GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC -3'	Hubka และ Kolarik (2012)
Bt2b	5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC -3'	
CF1L	5'- GCCGACTCTTTGACYGARGAR -3'	Peterson (2008)
CF1M	5'- AGGCCGAYTCTYTGACYGA -3'	
CF4	5'- TTTYTGCATCATRAGYTGGAC -3'	

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา

3.2.3.1 dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.2.3.2 ethyl acetate

3.2.3.3 hexane

3.2.3.4 methanol

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 agarose gel electrophoresis

3.3.2 alcohol lamp

3.3.3 autoclave

3.3.4 balance

3.3.5 centrifuge

3.3.6 cock borer

3.3.7 DNA thermal cycle

3.3.8 Erlenmeyer flask

3.3.9 hemacytometer

3.3.10 hot air oven

3.3.11 incubator

3.3.12 larminar air flow

3.3.13 micropipette set

3.3.14 mortar และ pestle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.15 needle

3.3.16 petri dish ขนาด 5.0 และ 10.0 เซนติเมตร

3.3.17 rotary evaporator

3.3.18 separating funnel

3.3.19 slide และ cover glass

3.3.20 light microscope

3.3.21 stereo microscopes

3.3.22 spectrophotometer

3.3.23 vernier

3.3.24 vortex mixer

3.3.25 water bath

3.3.26 test tube 0.2, 1.5 และ 50 มิลลิลิตร

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การคัดแยกเชื้อจากดินโดยวิธี soil plate และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างดินมาแยกเชื้อโดยวิธี soil plate ด้วยอาหาร GAN (glucose ammonium nitrate agar) (ธิดา และคณะ, 2550; เลขา และคณะ, 2553) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ glucose 20 กรัม, NH_4NO_3 1 กรัม, difco bacto yeast extract 1 กรัม, K_2HPO_4 0.5 กรัม, rose Bengal 0.06 กรัม, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.05 กรัม, agar 20 กรัม, น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร (Gochenaur, 1964) โดยนำตัวอย่างดินแต่ละตัวอย่างมาบดให้ละเอียดและตักใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 0.0025 กรัม หรือเท่ากับปลายเข็มเขี่ย เทอาหาร GAN ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วไปอุ่นให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วหมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยรอบ เพื่อให้ดินกระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่เกาะกันเป็นก้อน จากนั้นนำไปบ่มไว้ในที่มืด สังเกตดูการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อราทุกวัน โดยสังเกตเป็นระยะเวลา 15 วัน เมื่อมีโคโลนีของเชื้อราปรากฏขึ้นให้เห็นให้ใช้เข็มเขี่ยตัดขอบของโคโลนีไปใส่ไว้บนจานอาหาร PDA (potato dextrose agar) พร้อมทั้งตั้งชื่อรหัสตัวอย่างเชื้อจากดินที่แยกได้โดยใช้รหัส S01 และเรียงลำดับตามจำนวนตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่แยกได้ พร้อมทั้งระบุวันที่เก็บตัวอย่างดิน เช่น แยกเชื้อจากตัวอย่างดิน DS-T1 ได้ 3 ไอโซเลต จะตั้งชื่อเชื้อที่แยกได้เป็น DS-T1-S01, DS-T1-S02 และ DS-T1-S03 ตามลำดับ โดย DS หมายถึงตัวอย่างที่เก็บมาจากดอยสุเทพ, DI หมายถึงตัวอย่างที่เก็บมาจากดอยอินทนนท์, T หมายถึง ลำดับ treatment ของตัวอย่างดิน และ S หมายถึงลำดับของตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้ และเมื่อเชื้อที่แยกได้ในแต่ละเพลทมีโคโลนีที่มีสีโคโลนีสีขาวถึงเหลือง ค่อนข้างครีม ชมพู เขียว และส้มแดง และพบว่ามีลักษณะถุงกลมของ ascocarp แบบ cleistothecia จะทำการใช้เข็มเขี่ยตัดโคโลนีบนอาหารไปเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหาร PDA อีกครั้ง โดยจะทำการเขี่ยตัดโคโลนีของเชื้อบนอาหารไปเลี้ยงในอาหาร PDA ใหม่ จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ และเมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วให้นำไปใส่ในหลอดอาหาร PDA พร้อมระบุชื่อไอโซเลต โดยเปลี่ยนรหัสเชื้อเป็น EU และตามด้วยตัวเลขลำดับเชื้อ 2 หลัก เพื่อใช้ในศึกษาต่อไป และในการศึกษาครั้งนี้จะนำเฉพาะเชื้อที่มีโคโลนีสีขาวถึงเหลือง ค่อนข้างครีม และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาอยู่ในสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* มาใช้ต่อไป

3.4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

นำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 วัน เพื่อสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อและลักษณะสัณฐาน โดยทำการบันทึกสีและขนาดของโคโลนี และศึกษาลักษณะขนาดและสีของ cleistothecia, asci และ ascospores ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยเขี่ยเชื้อลงบนสไลด์ แล้วย้อมด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue และทำการคัดแยกตามหลักการของ Domsch และคณะ (1993), Samson และคณะ (2007) และ Yilmaz และคณะ (2014) พร้อมทั้งทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกเชื้อตัวแทนของแต่ละสปีชีส์ที่จำแนกได้ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) โดยทำการส่งตัวอย่างเชื้อที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.3 การบ่งชี้เชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจะเตรียมจากคู่มือการสกัดของ GF-1 plant DNA extraction user's guide (Vivantis, มาเลเซีย) โดยเริ่มจากทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร potato dextrose broth (PDB) เป็นเวลา 10-15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหาร PDB มาทำการล้างเส้นใยด้วย 25 มิลลิโมลาร์ EDTA จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทำซ้ำอีก 3 รอบหรือจนกว่าน้ำที่ล้างเส้นใยจะใส จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำส่วนของเส้นใยที่ได้มาบดละเอียดด้วยโกร่งบดยา โดยใช้ไนโตรเจนเหลว และผสมกับ lysis buffer (buffer PL) 280 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้สารละลายเนื้อเดียว เติม proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายน้ำและไม่ถูกย่อยสลาย แยกส่วนตะกอนทิ้ง และนำส่วนใสมาเติม RNase A (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม PB buffer ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรตัวอย่าง และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ต่ออีก 10 นาที ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 200 ไมโครลิตร และดูดตัวอย่างใส่ลงในคอลัมน์และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย wash buffer 750 ไมโครลิตร และล้างซ้ำอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม elution buffer 50 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน 1X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส ย้อมเจลด้วย ethidium bromide (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ถ่ายรูปใต้แสง UV และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นทำการเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reation

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยเพิ่มจำนวนบริเวณของ ITS และส่วนของ *β-tubulin* และ *calmodulin* ด้วย โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 3.1 ในปฏิกริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม, dNTPs 0.5 ไมโครลิตร (200 ไมโครโมลาร์) ไพรเมอร์แต่ละไพรเมอร์ 1 ไมโครลิตร (0.8 พิโคโมลาร์) เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร (1 ยูนิต) (Vivantis, มาเลเซีย) และ 10X standard *Taq* reaction buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร (1X) และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งสามตำแหน่งด้วยสภาวะที่ใช้ดังตารางที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* (Hubka และ Kolarik, 2012)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	1 รอบ
annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
denaturation	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35 รอบ
annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
denaturation	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	1 รอบ
annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
final extension	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS (White และคณะ, 1990)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	1 รอบ
denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
annealing	50 องศาเซลเซียส	1 นาที	
extension	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ

จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปศึกษาต่อในเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.3.3 การหาของความสัมพันธ์เชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุดสำเร็จรูป GF-1 ambiclean kit (PCR & Gel) (Vivantis, มาเลเซีย) โดยนำผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์ที่ได้ ไปตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เช่นเดียวกับการตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอนที่ 3.4.3.2 นำส่วนผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์ที่เหลือทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ first base laboratories ประเทศมาเลเซีย และ Bioneer Corporation ประเทศเกาหลี จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้ Kimura 2-parameter distance และ Neighbor-joining

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

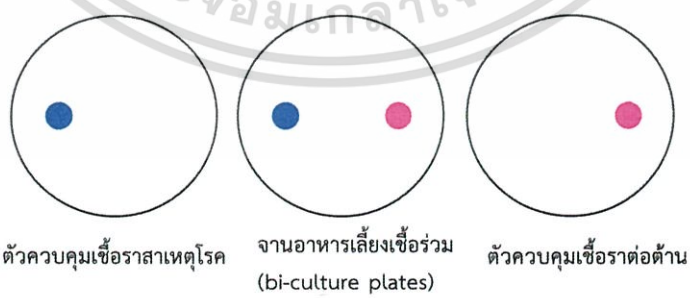
3.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *Colletotrichum coffeanum*

ทดสอบเชื้อราต่อต้าน (antagonist) ได้แก่ เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ที่แยกได้จากดินที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรค *C. coffeanum* (pathogen) ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์มาจากรศ.ดร.เกษม สร้อยทอง ด้วยวิธี bi-culture หรืออาหารเลี้ยงเชื้อร่วม โดยนำเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อราต่อต้านบนอาหาร PDA ที่มีอายุ 10 วัน มาใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ฆ่าเชื้อเจาะเป็นชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราบริเวณขอบโคโลนี แล้วย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อราต่อต้านแต่ละชนิดจำนวน 1 ชิ้น วางบนอาหาร PDA และย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุโรควางด้านตรงข้ามกับชิ้นวุ้นเชื้อราต่อต้าน ให้มีระยะห่าง 4.5 เซนติเมตร ดังรูปที่ 3.1 โดยแยกทดสอบเชื้อราต่อต้านแต่ละชนิดแยกจากกัน ทำการเลี้ยงเชื้อราต่อต้านและเชื้อราสาเหตุโรคแยกจากกันบนอาหาร PDA เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม (bi-culture plates) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 25 วัน ทำการทดสอบแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ เนื่องจากเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* เจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อรา *C. coffeanum* เชื้อสาเหตุโรคที่ใช้ทดสอบ และเชื้อ *C. coffeanum* มีการสร้างสปอร์ที่ระยะเวลา 25 วัน เมื่อครบเวลานับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค ด้วย hemacytometer แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibiton, GI) โดย

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

R1 = จำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารเปรียบเทียบ (control)

R2 = จำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม



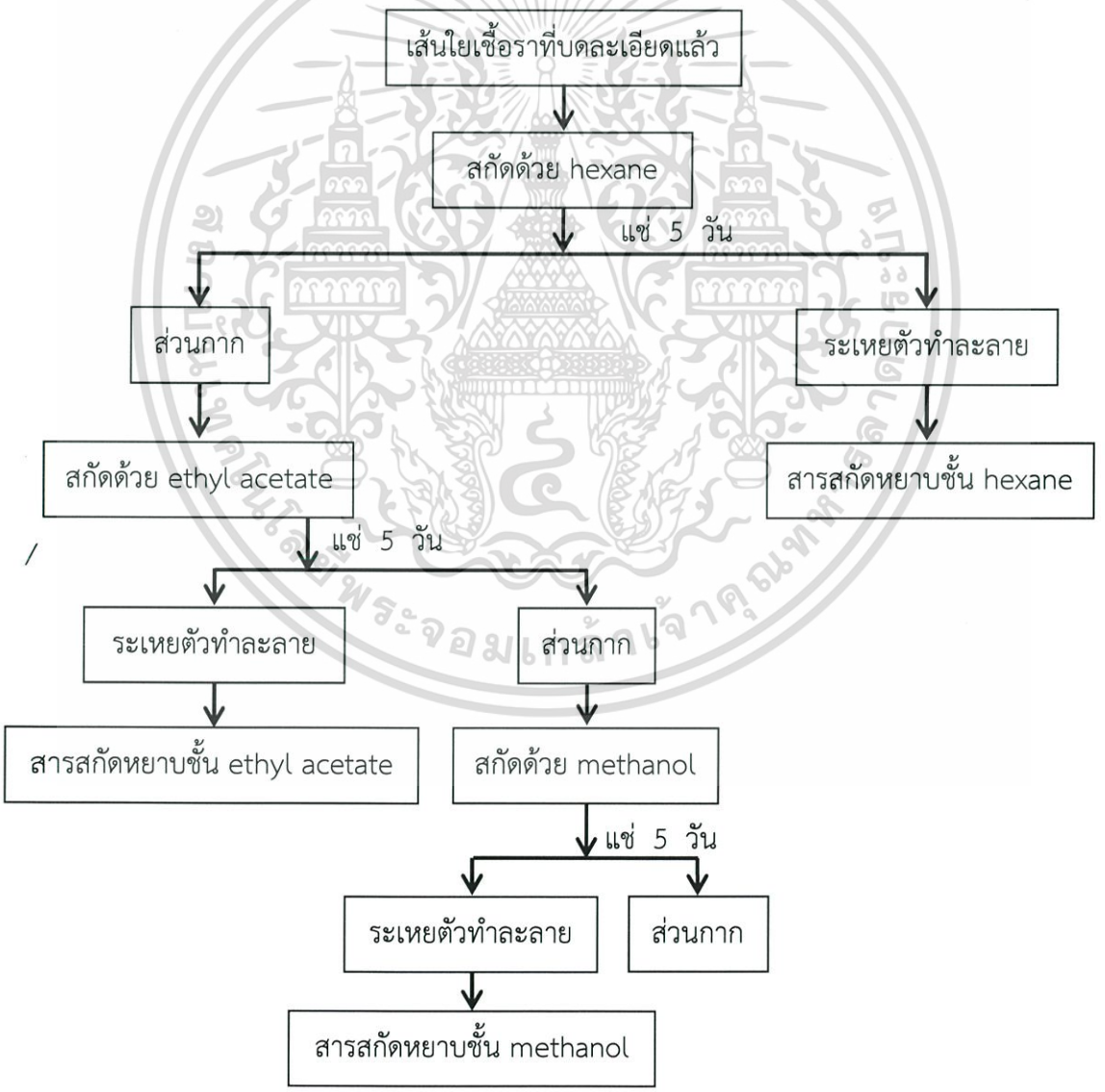
รูปที่ 3.1 แสดงการวางเชื้อต่อต้าน (antagonist) และเชื้อสาเหตุโรค (pathogen) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม รวมทั้งจานอาหารตัวควบคุมของเชื้อ antagonist และ pathogen
หมายเหตุ: ● = เชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum*, ● = เชื้อต่อต้าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *Colletotrichum coffeanum*

3.4.5.1 การสกัดสาร

เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยเชื้อรา เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นนำส่วนของเส้นใยที่เพาะเลี้ยงไว้มากรอง และตากแห้งที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะแห้ง แล้วนำส่วนของเส้นใยมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น นำไปแช่ hexane ในปริมาณ 1:1 (w/v) เป็นเวลา 5 วัน นำไปกรองด้วยกระดาษ whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปแยกตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัดหยาบส่วน hexane แล้วจากนั้นนำส่วนกากที่ได้จากการกรองไปสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้นสูงขึ้น ได้แก่ ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate และ methanol เก็บไว้เพื่อทดลองต่อไป ดังแผนผังรูปที่ 3.2 โดยเลือกทำการสกัด 3 ไอโซเลต จากผลการทดสอบในขั้นตอน 3.4.4



รูปที่ 3.2 แผนผังแสดงลำดับในการสกัดสารสกัดหยาบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.5.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบต่อการควบคุมของเชื้อราสาเหตุโรค *C. coffeanum* ด้วยวิธี poison plate

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* นำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 มาทดสอบการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค โดยในการเตรียมสารสกัดใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ DMSO (Dimethylsulfoxide) เป็นตัวทำละลาย โดยนำสารสกัดหยาบ hexane, ethyl acetate และ methanol มาละลายให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นตัวควบคุมในแต่ละการทดลอง ทำการทดลองแบบ 3x6 factorial experiment ใน CRD จำนวน 3 ซ้ำ

ปัจจัย A คือ ชนิดของสารสกัด ดังนี้

A1 = สารสกัดหยาบชั้น hexane

A2 = สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate

A3 = สารสกัดหยาบชั้น methanol

ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด ดังนี้

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 10 ppm

B3 = ความเข้มข้น 50 ppm

B4 = ความเข้มข้น 100 ppm

B5 = ความเข้มข้น 500 ppm

B6 = ความเข้มข้น 1,000 ppm

จากนั้นนำสารสกัดหยาบแต่ละชั้นที่ละลายด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ DMSO ที่ชั่งให้น้ำหนักได้ตามความเข้มข้นที่กำหนด แล้วนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เตรียมไว้ จากนั้นให้นำขวดอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบแล้ว ไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมกับสารสกัดแต่ละชั้นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มาเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอจนกว่าอาหารจะแข็งแล้วจึงย้ายชิ้นวุ้นโคโลนี เชื้อ *C. coffeanum* สาเหตุโรคที่ใช้ cock borer ที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะไว้ มาวางลงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 25 วัน พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่อายุ 4 วัน และทำการนับสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคด้วย hemacytometer ที่อายุ 25 วัน แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโลนี และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

กำหนด R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อที่ 0 ppm (ตัวควบคุม)

R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อในแต่ละความเข้มข้น

ทำการวิเคราะห์ข้อมูล โดยเปรียบเทียบ treatment mean แบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05 และคำนวณค่า effective dose ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ED_{50}) ด้วยวิธี profit analysis (ถ้าหากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) ด้วยโปรแกรม StatPlus version5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการคัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินบริเวณดอยสุเทพ และดอยอินทนนท์ ทั้งหมด จำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างดินที่สามารถแยกเชื้อได้มี จำนวน 14 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างดินบริเวณดอยสุเทพ จำนวน 8 ตัวอย่างและตัวอย่างดินบริเวณดอยอินทนนท์ จำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อจากดินได้ทั้งหมด จำนวน 36 ไอโซเลต โดยเชื้อในไอโซเลตอื่นๆ ที่ไม่ได้นำมาศึกษา เนื่องจากมีการตายและปนเปื้อนระหว่างการทำการทดลอง จำนวน 10 ไอโซเลต รวมทั้งไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่สนใจได้ จำวนวน 5 ไอโซเลต และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าเป็นเชื้อสกุลอื่นๆ อีก จำนวน 3 ไอโซเลต ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้ จึงรายงานการศึกษาเชื้อทั้งหมด 18 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงวันเวลา สถานที่ในการเก็บตัวอย่างดิน และชื่อไอโซเลตเชื้อที่แยกได้

วันที่เก็บตัวอย่างดิน	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ตัวอย่างดิน	เชื้อที่แยกได้
07-09-53	ดอยสุเทพ	DS-T3	EU14, EU23
07-09-53	ดอยสุเทพ	DS-T4	EU02
17-10-53	ดอยอินทนนท์	DI-T2	EU25
17-10-53	ดอยอินทนนท์	DI-T3	EU26, EU35, EU36
17-10-53	ดอยสุเทพ	DS-T1	EU10
17-10-53	ดอยสุเทพ	DS-T3	EU09
05-06-54	ดอยอินทนนท์	DI-T2	EU01
05-06-54	ดอยอินทนนท์	DI-T4	EU13
05-06-54	ดอยสุเทพ	DS-T3	EU18
05-06-54	ดอยสุเทพ	DS-T5	EU03
09-07-54	ดอยอินทนนท์	DI-T2	EU16
09-07-54	ดอยอินทนนท์	DI-T3	EU07, EU12
09-07-54	ดอยสุเทพ	DS-T1	EU06
09-07-54	ดอยสุเทพ	DS-T3	EU04

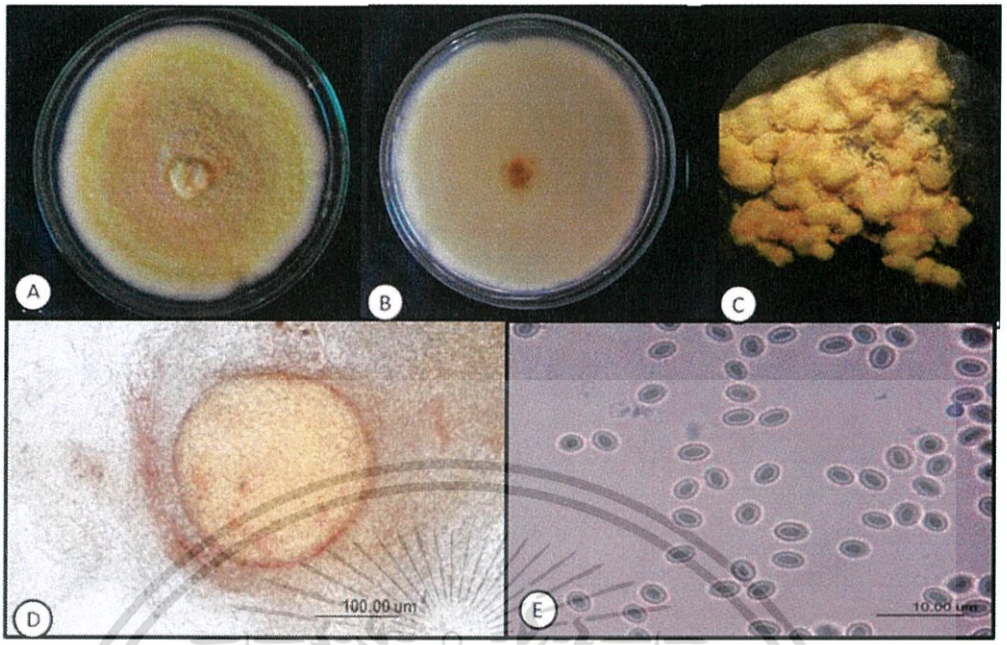
หมายเหตุ: DS = ดอยสุเทพ; DI = ดอยอินทนนท์; T = ลำดับ treatment ของตัวอย่างดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

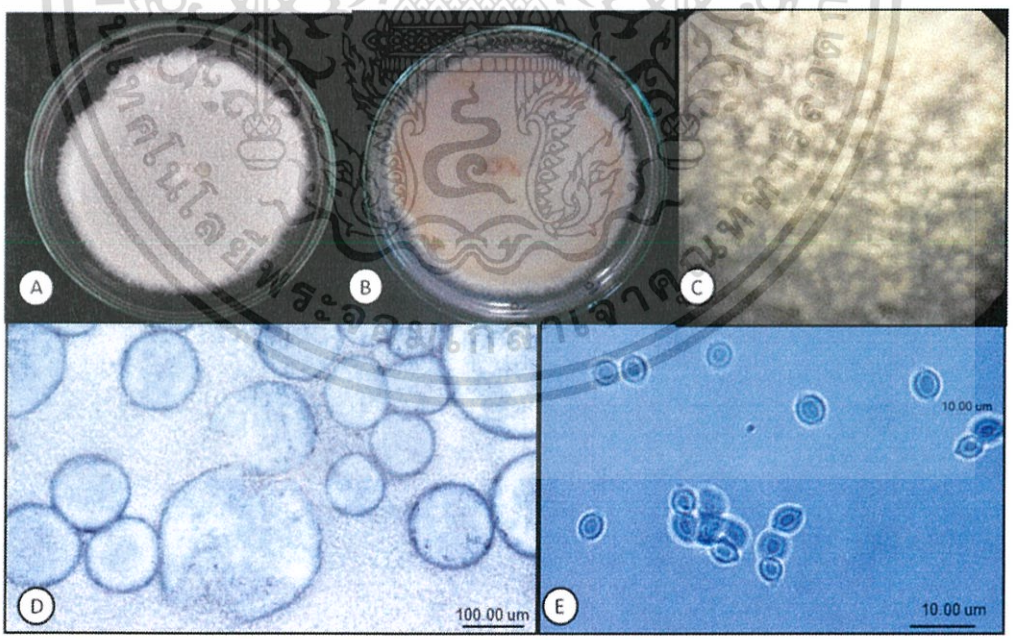
โดยแต่ละพื้นที่จะได้เชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มจากลักษณะสีของโคโลนี ขนาดของ ascus และขนาดของ ascospore ดังตารางที่ 4.2 กลุ่มที่ 1 แสดงลักษณะโคโลนีมีสีเหลืองถึงเหลืองอ่อน โดยรูปที่ 4.1 A แสดงโคโลนีด้านหน้าจานเพาะเลี้ยง และรูปที่ 4.1 B แสดงด้านหลังจานเพาะเลี้ยง มีการสร้าง ascocarp แบบ clestothecia ขนาด 145.24-769.80 x 147.60 -892.28 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเส้นใยหลวมๆ ที่ผนัง รูปร่าง globose ถึง subglobose ดังแสดงในรูปที่ 4.1 C-D ขนาด 5.22-12.11 x 5.85-12.71 ไมโครเมตร และ ascospores รูปร่าง ellipsoidal ถึง broadly ellipsoidal และไม่มี rigde ดังแสดงในรูปที่ 4.1 E ขนาด 1.13-4.88 x 1.92-5.46 ไมโครเมตร ซึ่งแสดงลักษณะของเชื้อสกุล *Talaromyces* จำนวน 14 ไอโซเลต ได้แก่ EU01, EU02, EU03, EU04, EU07, EU09, EU10, EU12, EU14, EU16, EU18, EU23, EU25 และ EU26 พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yilmaz และคณะ (2014) พบว่าเชื้อสกุล *Talaromyces* มีโคโลนีสีเหลือง ถึงเหลืองแดง และพบว่ามีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose และ ascospore ไม่มี rigde

กลุ่มที่ 2 ลักษณะโคโลนีมีสีขาว โดยโคโลนีด้านหน้าแสดงดังรูปที่ 4.2 A และโคโลนีด้านหลังมีสีขาวขุ่น ดังรูปที่ 4.2 B มีการสร้าง ascocarp แบบ clestothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose ดังรูปที่ 4.2 C-D มีขนาด 90.70- 458.70 x 91.98-526.58 ไมโครเมตร ascus รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 9.17-14.79 x 8.63-15.87 ไมโครเมตร และ ascospores รูปร่าง subglobose, ellipsoidal และ broadly ellipsoidal และมี rigde ขนาด 3.86-6.81 x 3.70-7.77 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.2 E) ซึ่งแสดงลักษณะของเชื้อสกุล *Neosartorya* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ EU06, EU13, EU35 และ EU36 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Samson และคณะ (2007) พบว่าเชื้อสกุล *Neosartorya* มีโคโลนีสีขาว ถึงเทาอ่อน มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose และ ascospore มี rigde

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อกลุ่มที่ 1 เชื้อสกุล *Talaromyces* โดยมีไอโซเลต EU07 เป็นตัวแทนของสกุลที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 25 วัน A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง ; C-D: ลักษณะ clestothecia และ E: ลักษณะ ascospores



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อกลุ่มที่ 2 เชื้อสกุล *Neosartorya* โดยมีไอโซเลต EU06 เป็นตัวแทนของสกุลที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 25 วัน A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-D: ลักษณะ clestothecia และ E: ลักษณะ ascospores

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทั้ง 18 ไอโซเลต

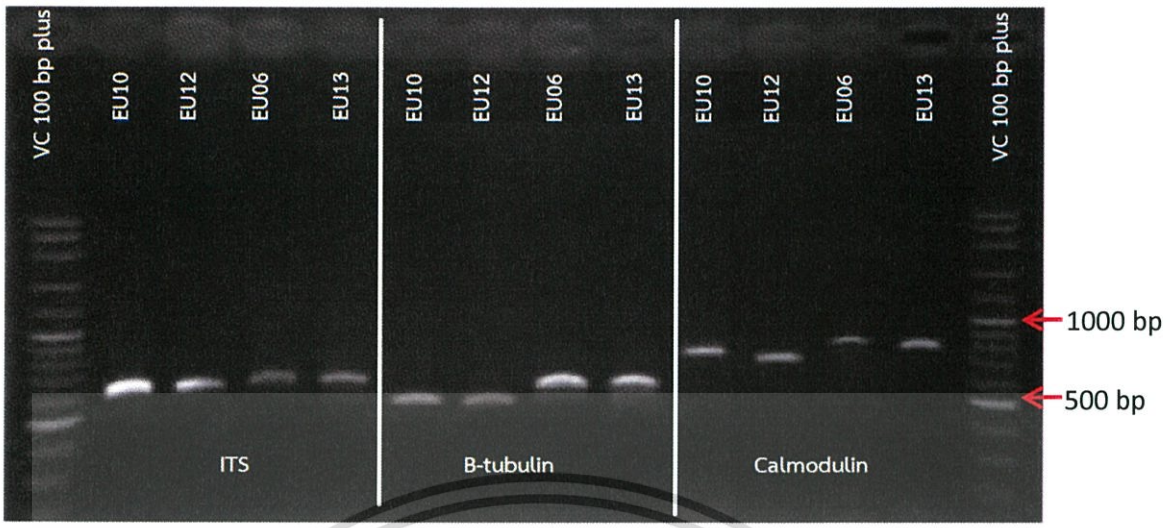
code	Colony	Cleistothecia			Ascus		Ascospore		ridge
	color	color	shape	size (µm)	shape	size (µm)	shape	size (µm)	
EU01	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	subglobose	213.34-447.29 X 265.82-499.78	subglobose	5 22-7.19 x 6.04-8.56	ellipsoidal	2.11-3.73 x 2.45-4.39	ไม่มี
EU02	เหลือง	เหลือง	subglobose	200.66-332.05 x 260.75-406.83	subglobose	7.32-11.44 x 7.95-11.93	broadly ellipsoidal	1.13-2.91 x 1.92-3.35	ไม่มี
EU03	เหลือง	เหลือง	globose	154.79-261.76 x 160.81-231.39	subglobose	7.61-8.89 x 8.12-9.16	ellipsoidal	2.14-3.44 x 2.14-4.56	ไม่มี
EU04	เหลือง	เหลือง	subglobose	145.24-233.94 x 147.60-254.12	subglobose	6.92-8.97 x 8.47-10.18	broadly ellipsoidal	2.90-3.82 x 3.35-4.85	ไม่มี
EU06	ขาวครีม	ขาวครีม	globose	90.7-263.05 x 91.98-276.76	globose	9.86-13.63 x 8.63-13.97	broadly ellipsoidal	3.86-6.81 x 3.70-6.48	มี
EU07	เหลือง	เหลือง	subglobose	220.78-420.59 x 244.4-482.06	globose	8.51-9.95 x 8.69-11.69	ellipsoidal	2.91-4.42 x 4.27-5.46	ไม่มี
EU09	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	subglobose	223.14-437.72 X 245.81-501.48	subglobose	5.24-7.29 x 6.13-8.91	ellipsoidal	2.08-3.87 x 2.21-4.28	ไม่มี
EU10	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	subglobose	266.63-429.15 x 221.18-404.67	subglobose	5.36-8.00 x 7.11-9.01	broadly ellipsoidal	2.04-3.92 x 2.05-4.11	ไม่มี
EU12	เหลือง	เหลือง	subglobose	219.28-769.80 x 219.95-867.84	subglobose	8.19-11.18 x 9.32-12.17	broadly ellipsoidal	2.60-4.84 x 2.95-5.30	ไม่มี
EU13	ขาว	ขาวครีม	globose	151.7-458.70 x 148.06-526.58	subglobose	10.33-14.19 x 10.63-15.87	subglobose	4.22-6.07 x 4.49-7.41	มี
EU14	เหลือง	เหลือง	subglobose	161.15-377.71 x 172.48-408.21	globose	6.31-10.45 x 8.38-11.46	broadly ellipsoidal	2.79-3.93 x 3.27-5.27	ไม่มี
EU16	เหลือง	เหลือง	subglobose	209.71-777.06 x 218.95-859.65	subglobose	7.98-12.11x 8.31-12.71	broadly ellipsoidal	2.54-4.88 x 2.89-5.36	ไม่มี
EU18	เหลือง	เหลือง	subglobose	220.78-420.59 x 244.4-482.06	globose	8.51-9.95 x 8.69-11.69	ellipsoidal	2.91-4.42 x 4.27-5.46	ไม่มี
EU23	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	globose	401.62-763.75 x 401.91-892.28	subglobose	5.63-7.76 x 5.85-9.54	broadly ellipsoidal	2.09-3.92 x 2.40-4.37	ไม่มี
EU25	เหลือง	เหลือง	subglobose	148.34-235.04 x 151.45-261.38	subglobose	6.64-9.12 x 8.41-11.48	broadly ellipsoidal	2.64-3.77 x 3.62-4.39	ไม่มี
EU26	เหลือง	เหลือง	subglobose	155.61-284.17 x 161.90-296.08	subglobose	6.42-8.27 x 7.24-10.53	broadly ellipsoidal	2.47-4.02 x 3.67-4.89	ไม่มี
EU35	ขาว-เทาอ่อน	ขาวซีด	subglobose	144.44-448.02 x 169.26-492.38	subglobose	10.48-14.79 x 11.13-15.58	subglobose	4.73-6.23 x 5.16-7.77	มี
EU36	ขาวครีม	ขาวครีม	subglobose	108.34-453.47 x 109.69-455.40	subglobose	9.17-12.95 x 9.43-13.56	ellipsoidal	3.98-5.03 x 4.77- 5.63	มี

4.2 ผลการบ่งชี้เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS, *β-tubulin* และ *calmodulin*

จากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS, *β-tubulin* และ *calmodulin* ซึ่งตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเลคโตโฟรีซิส จะแสดงในรูปที่ 4.3 โดยบริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* มีขนาดเท่ากัน ที่ขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 650 คู่เบส ซึ่งมีขนาดมากกว่างานวิจัยของ Visagie และคณะ (2014) ที่ศึกษาเชื้อสกุล *Talaromyces* พบว่ามีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 605 คู่เบส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1/ ITS4 เช่นเดียวกัน และผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* พบว่าแถบเอ็นดีเอ็นเอของ *Talaromyces* และ *Neosartorya* มีความแตกต่างกัน โดยแถบดีเอ็นเอบริเวณ *β-tubulin* ของเชื้อสกุล *Talaromyces* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 คู่เบส และเชื้อสกุล *Neosartorya* มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 600 คู่เบส แถบดีเอ็นเอบริเวณ *calmodulin* ของเชื้อสกุล *Talaromyces* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 700 คู่เบส โดยที่เชื้อตัวอย่าง จำนวน 2 ไอโซเลตที่นำมาใช้ศึกษามีขนาดแตกต่างกันประมาณ 100 คู่เบส และเชื้อสกุล *Neosartorya* มีขนาด 800 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบขนาดผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ *β-tubulin* จากงานวิจัยของ Visagie และคณะ (2014) ซึ่งศึกษาเชื้อสกุล *Talaromyces* มีผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 391 โดยใช้ไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b สำหรับ *β-tubulin* ซึ่งมีขนาดผลผลิตมากกว่า และผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ *calmodulin* ขนาด 507 คู่เบส โดยใช้ไพรเมอร์ cmd5/cmd6 ซึ่งแตกต่างกัน และจากงานวิจัยของโดย Hong และคณะ (2006) ศึกษาเชื้อสกุล *Neosartoya* และค้นพบสปีชีส์ใหม่พบว่าชิ้นดีเอ็นเอของบริเวณ *β-tubulin* ที่ใช้ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b มีขนาดชิ้น ดีเอ็นเอ เท่ากับ 466 คู่-เบส ซึ่งมีความใกล้เคียงกับขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของบริเวณ *β-tubulin* ใน การทดลองครั้งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงผลแถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS, *β-tubulin* และ *calmodulin* ของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* โดยใช้ EU10 และ EU12 เป็นตัวอย่างของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ EU06 และ EU13 เป็นตัวอย่างของเชื้อสกุล *Neosartorya*

4.2.2 ผลการบ่งชี้เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 3 บริเวณ แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการจัดเรียงด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อหาตำแหน่งจับไพรเมอร์ ดังแสดงในภาคผนวก ข ทำให้ทราบขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่แน่นอน พบว่าการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียง 16 ไอโซเลต แบ่งตามขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ได้จำนวน 6 กลุ่ม โดยขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของไอโซเลต EU02, EU03, EU04, EU07, EU12, EU14, EU16, EU18, EU25 และ EU26 มีขนาดเท่ากับ 577 คู่เบส ไอโซเลต EU09 และ EU10 มีขนาดเท่ากับ 591 คู่เบส ไอโซเลต EU23 มีขนาดเท่ากับ 593 คู่เบส ไอโซเลต EU06 มีขนาดเท่ากับ 606 คู่เบส ไอโซเลต EU13 มีขนาดเท่ากับ 588 คู่เบส และ ไอโซเลต EU35 มีขนาดเท่ากับ 556 คู่เบส

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* ด้วยไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต แต่เนื่องจากไอโซเลต EU35 พบว่ามีผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ จึงไม่สามารถทำการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับไอโซเลตดังกล่าวได้ ดังนั้นจึงศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* เพียง 17 ไอโซเลต เมื่อแบ่งตามขนาดผลผลิตพีซีอาร์ได้จำนวน 6 กลุ่ม โดยพบว่าขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของไอโซเลต EU02, EU03, EU04, EU07, EU12, EU14, EU16, EU18, EU25 และ EU26 มีขนาดเท่ากับ 461 คู่เบส ไอโซเลต EU01 และ EU23 มีขนาดเท่ากับ 497 คู่เบส ไอโซเลต EU09 และ EU10 มีขนาดเท่ากับ 478 คู่เบส ไอโซเลต EU06 มีขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 545 คู่เบส ไอโซเลต EU13 มีขนาดเท่ากับ 553 คู่เบส และ ไอโซเลต EU36 มีขนาดเท่ากับ 556 คู่เบส

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *calmodulin* ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ได้แก่ CF1L/CF4 และ CF1M/CF4 โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียง 15 ไอโซเลต โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยไพรเมอร์ CF1L/CF4 จำนวน 10 ไอโซเลต พบว่าขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของไอโซเลต EU02, EU03, EU07, EU12 และ EU14 มีขนาดเท่ากับ 701 คู่เบส ไอโซเลต EU09 และ EU10 มีขนาดเท่ากับ 749 คู่เบส ไอโซเลต EU23 มีขนาดเท่ากับ 754 คู่เบส ไอโซเลต EU06 มีขนาดเท่ากับ 733 คู่เบส และไอโซเลต EU13 มีขนาดเท่ากับ 764 คู่เบส และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยไพร-เมอร์ CF1M/CF4 จำนวน 5 ไอโซเลต พบว่าขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของไอโซเลต EU01 มีขนาดเท่ากับ 756 คู่เบส ไอโซเลต EU04 และ EU18 มีขนาดเท่ากับ 703 คู่เบส ไอโซเลต EU35 มีขนาดเท่ากับ 766 คู่เบส และไอโซเลต EU36 มีขนาดเท่ากับ 744 คู่เบส

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS โดยใช้โปรแกรม BLAST เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าไม่สามารถจำแนกเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ได้ โดยพบว่าเป็นเชื้อ *Penicillium verruculosum* ซึ่งเป็น asexual stage ของเชื้อสกุล *Talaromyces* และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* สามารถจำแนกและบ่งชี้เชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยทั้งหมด 18 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็น 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Talaromyces muroii* (EU02, EU03, EU04, EU07, EU12, EU14, EU16, EU18, EU25 และ EU26) *T. trachyspermus* (EU01, EU09, EU10 และ EU23) และ *Neosartorya aureola* (EU36), *N. hiratsukae* (EU06) และ *N. pseudofischeri* (EU13 และ EU35) มีค่าร้อยละความเหมือน (% identity) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงชื่อสปีชีส์ของไอโซเลตที่ได้จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 บริเวณเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

ไอโซเลต	ตำแหน่งที่ใช้ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์								
	ITS			*β-tubulin*			*calmodulin*		
	Species	Accession	Identity	Species	Accession	Identity	Species	Accession	Identity
EU01	NA[1]	-	-	*Talaromyces trachyspermus*	AY753371	91%	*Talaromyces trachyspermus*	KJ885281	95%
EU02	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	*Talaromyces muroii*	KJ885274	99%
EU03	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	*Talaromyces muroii*	KJ885274	99%
EU04	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	*Talaromyces muroii*	KJ885274	99%
EU06	*Neosartorya hiratsukae*	GQ461906	99%	*Neosartorya hiratsukae*	FJ433874	99%	*Neosartorya hiratsukae*	FR751434	98%
EU07	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	*Talaromyces muroii*	KJ885274	99%
EU09	*Talaromyces assiutensis*	KM458833	99%	*Talaromyces trachyspermus*	AY753371	99%	*Talaromyces trachyspermus*	KJ885281	99%
EU10	*Talaromyces assiutensis*	KM458833	99%	*Talaromyces trachyspermus*	AY753371	97%	*Talaromyces trachyspermus*	KJ885281	99%
EU12	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	*Talaromyces muroii*	KJ885274	99%
EU13	*Neosartorya pseudofischeri*	EF669935	99%	*Neosartorya pseudofischeri*	KM095495	99%	*Neosartorya pseudofischeri*	EU014121	99%
EU14	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	*Talaromyces muroii*	KJ885274	99%
EU16	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	NA[1]	-	-
EU18	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	*Talaromyces muroii*	KJ885274	99%
EU23	*Talaromyces trachyspermus*	KJ510654	99%	*Talaromyces trachyspermus*	AY753371	90%	*Talaromyces trachyspermus*	KJ885281	95%
EU25	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	NA[1]	-	-
EU26	*Penicillium verruculosum*	JQ796881	99%	*Talaromyces muroii*	KJ865727	99%	NA[1]	-	-
EU35	*Bionectria sp.*	AB734444	99%	NA[2]	-	-	*Neosartorya pseudofischeri*	EF669864	99%
EU36	NA[1]	-	-	*Neosartorya aureola*	FJ609210	96%	*Neosartorya aureola*	EU014121	98%

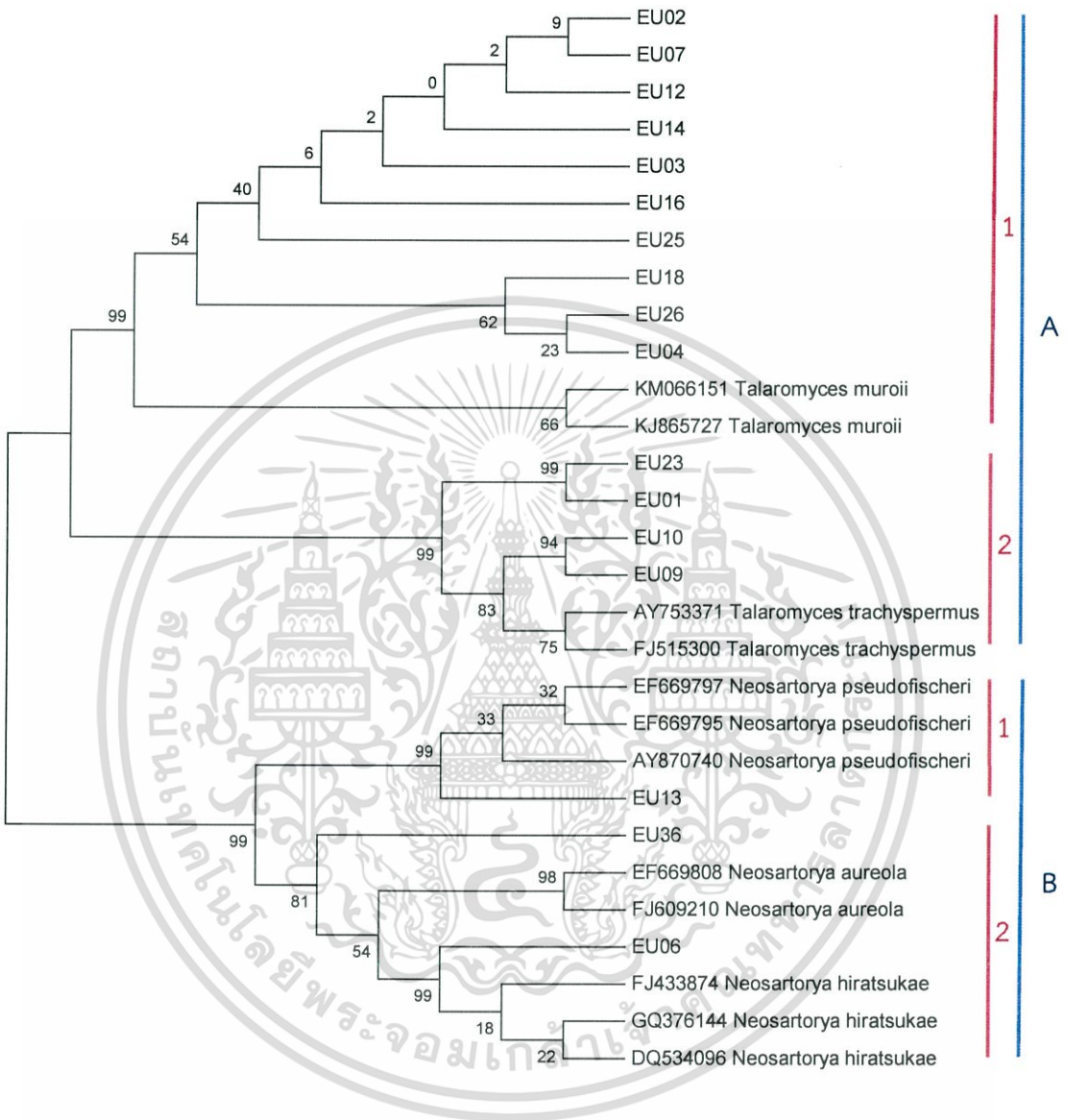
หมายเหตุ: NA[1] = No Availble[1] = amplified ไม่ขึ้น; NA[2] = No Availble[2] = มี band ผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ

4.2.3 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya*

ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของเชื้อที่คัดแยกได้จากดินทั้ง 2 สกุล คือ *Talaromyces* และ *Neosartorya* จำนวน 18 ไอโซเลต เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI จำนวน 12 ตัวอย่าง (ดังตารางที่ 4.3) โดยจะทำการศึกษาเฉพาะบริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* โดยไม่นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มาศึกษาหาความสัมพันธ์ จากการหาความสัมพันธ์ของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ด้วยการสร้าง phylogenetic tree บริเวณ *β-tubulin* โดยใช้ Neighbor-joining และค่า bootstrap เท่ากับ 1000 พบว่าสามารถแบ่งเชื้อจำนวน 17 ไอโซเลต โดยไม่ได้มีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EU35 จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม และสามารถแยกเชื้อทั้งสองสกุลออกจากกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.4 โดยกลุ่ม A สัมพันธ์กับเชื้อสกุล *Talaromyces* ซึ่งยังสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย ในกลุ่ม 1A ประกอบด้วย ไอโซเลต EU02, EU03, EU04, EU07, EU12, EU14, EU16, EU18, EU25 และ EU26 ที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อ *Talaromyces muroii* และในกลุ่ม 2A ประกอบด้วยไอโซเลต EU01, EU09, EU10 และ EU23 ที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อ *Talaromyces trachyspermus* นอกจากนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EU01 และ EU23 มีความแตกต่างจาก EU09 และ EU10 อย่างชัดเจน สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเลคโตโฟรีซิส และจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไอโซเลต EU01 และ EU23 มีขนาด 497 คู่เบส ตรวจสอบพบว่ามีขนาดใหญ่กว่าไอโซเลต EU09 และ EU10 ที่มีขนาด 478 คู่เบส เนื่องจากมี indel (การเพิ่มหรือลดของนิวคลีโอไทด์) จำนวน 21 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบว่ามี transversion และ transition ดังแสดงในรูปที่ 4.5

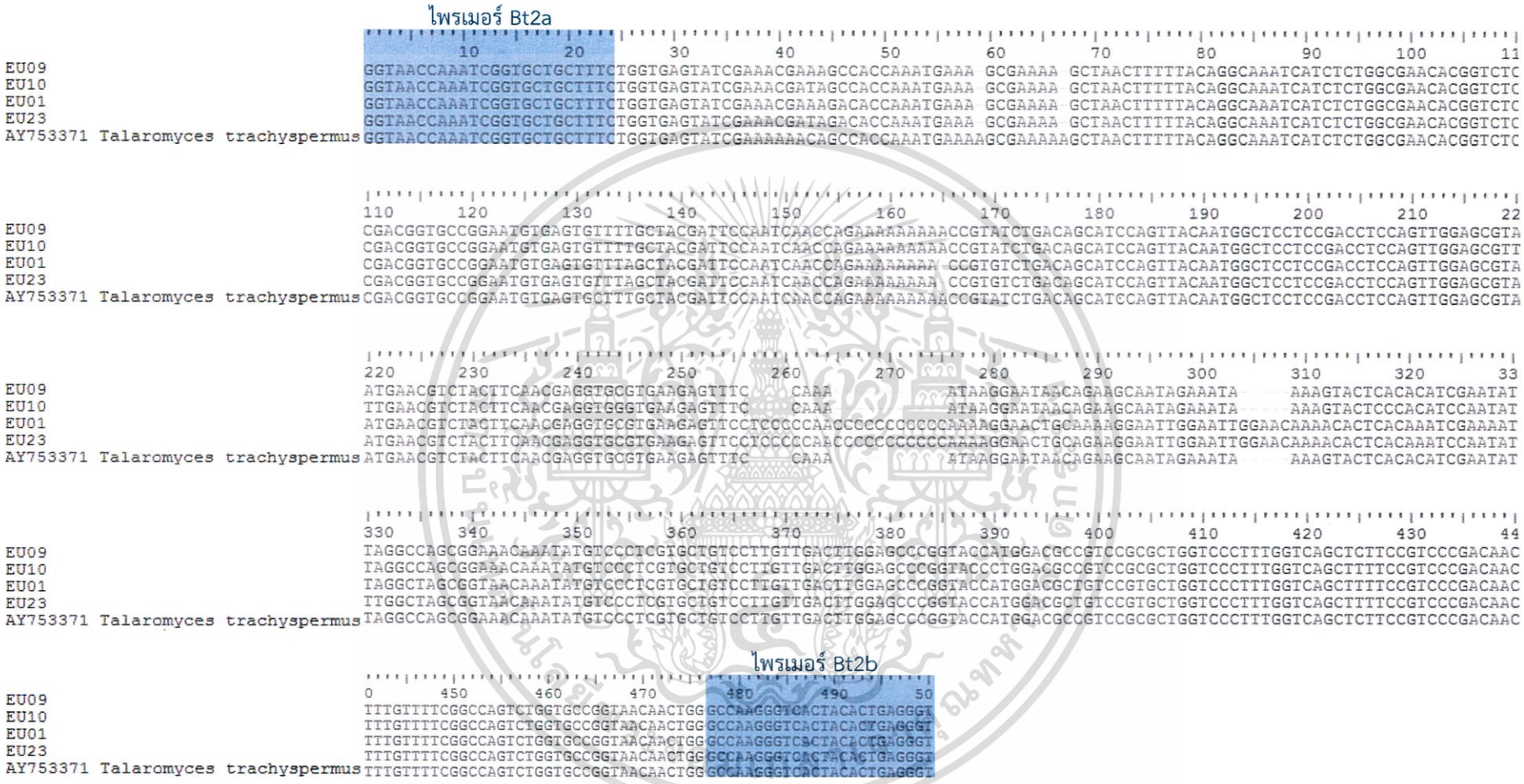
กลุ่ม B แสดงความสัมพันธ์กับเชื้อสกุล *Neosartorya* และสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่ม 1B มีเพียงไอโซเลต EU13 ที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Neosartorya pseudofischeri* แต่ไม่สามารถแยกไอโซเลต EU36 ซึ่งจำแนกได้เป็น *N. aureola* และไอโซเลต EU06 จำแนกได้เป็น *N. hiratsukae* ออกจากกันได้ ดังแสดงในรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แผนภูมิการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ในบริเวณ *ß-tubulin* โดยใช้ Neighbor-joining ค่า bootstrap เท่ากับ 1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

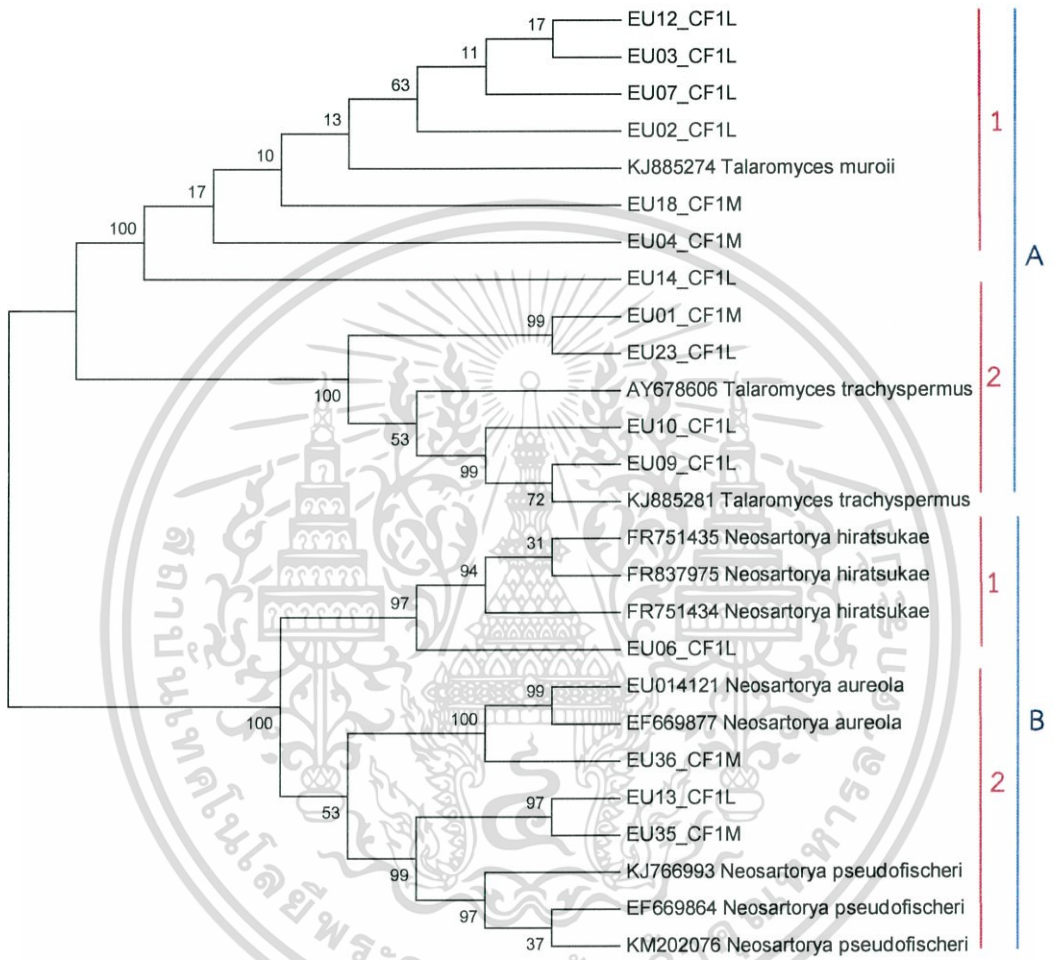


รูปที่ 4.5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งการจับของไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b ของบริเวณ *β-tubulin* ของเชื้อ *T. trachyspermus* เปรียบเทียบกันระหว่างไอโซเลต EU01, EU09, EU10 และ EU23

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ในบริเวณ *calmodulin* โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วย Neighbor-joining และค่า bootstrap เท่ากับ 1000 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อจำนวน 15 ไอโซเลต ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A มีความใกล้ชิดกับเชื้อสกุล *Talaromyces* และยังสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มที่ 1A ประกอบด้วยไอโซเลต EU02, EU03, EU04, EU07, EU12, EU16 และ EU18 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Talaromyces muroii* (KJ885274) และกลุ่มที่ 2A ประกอบด้วยไอโซเลต EU01, EU09, EU10 และ EU23 แสดงความใกล้ชิดกับ *Talaromyces trachyspermus* (AY678608, KJ885281) ดังแสดงในรูปที่ 4.6

กลุ่มที่ B มีความใกล้ชิดกับเชื้อสกุล *Neosartorya* โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยเช่นเดียวกัน คือ กลุ่มที่ 1B มีเพียงไอโซเลต EU06 ที่แสดงความใกล้ชิดกับเชื้อ *Neosartorya hitratsukae* (FR751435, FR837975 และ FR751434) สำหรับในกลุ่มที่ 2B สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่ม โดยไอโซเลต EU36 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Neosartorya aureola* (EU014121, EF669877) และเชื้อไอโซเลต EU13 และ EU35 ที่แสดงความใกล้ชิดกับเชื้อ *Neosartorya pseudafischeri* (KJ766993, EF669864, KM202076) ดังแสดงในรูปที่ 4.6

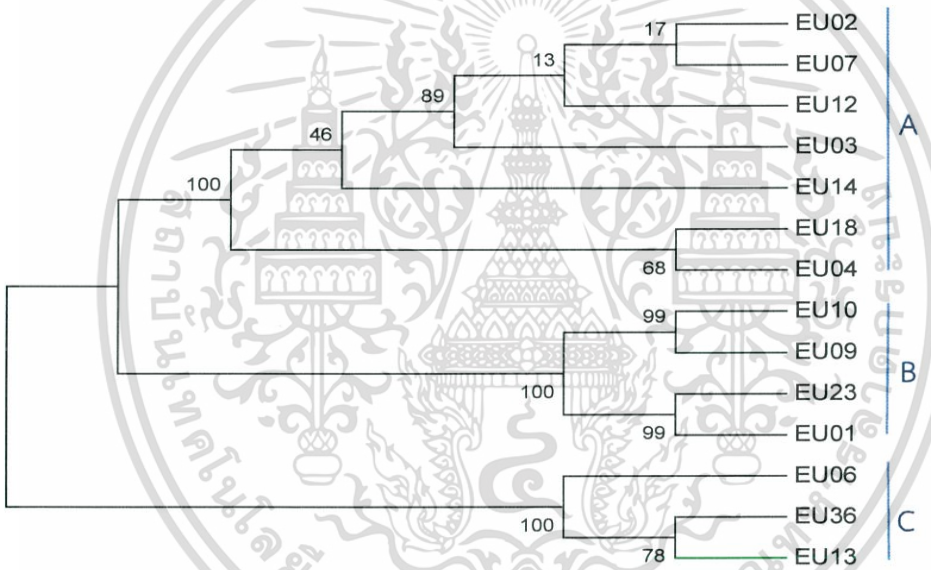
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แผนภูมิการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ในบริเวณ *calmodulin* โดยใช้ Neighbor-joining ค่า bootstrap เท่ากับ 1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ คือ *β-tubulin* และ *calmodulin* มาหาความสัมพันธ์เฉพาะในกลุ่มตัวอย่างที่คัดแยกได้จากดิน จำนวน 14 ไอโซเลต นำมาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ Neighbor-joining และค่า bootstrap เท่ากับ 1000 สามารถแบ่งเชื้อทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม และมีความสัมพันธ์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ากลุ่ม A ที่ประกอบด้วยไอโซเลต EU02, EU03, EU04, EU07, EU12, EU14 และ EU18 บ่งชี้ว่าเป็น *Talaromyces muroii* และกลุ่ม B ที่ประกอบด้วยไอโซเลต EU01, EU09, EU10 และ EU23 บ่งชี้ว่าเป็น *Talaromyces trachyspermus* ซึ่งอาจต้องทำการศึกษาต่อไป เนื่องจากยังแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยอย่างชัดเจน และกลุ่ม C เป็นเชื้อไอโซเลตที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อสกุล *Neosartorya* ที่ประกอบด้วยไอโซเลต EU06, EU13 และ EU36 โดยสามารถแบ่งไอโซเลต EU06 ซึ่งบ่งชี้ว่าเป็น *Neosartorya hiratsukae* ออกจากไอโซเลต EU36 และ EU13 ได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 4.7 แผนภูมิการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ในบริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* โดยใช้ Neighbor-joining ค่า bootstrap เท่ากับ 1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 สรุปชื่อสกุล และสปีชีส์ของตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากดิน

สกุล	สปีชีส์	ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต
Talaromyces	*Talaromyces muroii*	EU02 EU03 EU04 EU07 EU12 EU14 EU16 EU18 EU25 EU26	10
	Talaromyces trachspermus	EU01 EU09 EU10 EU23	4
Neosartorya	*Neosartorya hiratsukae*	EU06	1
	Neosartorya pseudofischeri	EU13	1
	Neosartorya sp.1	EU35	1
	Neosartorya sp.2	EU36	1

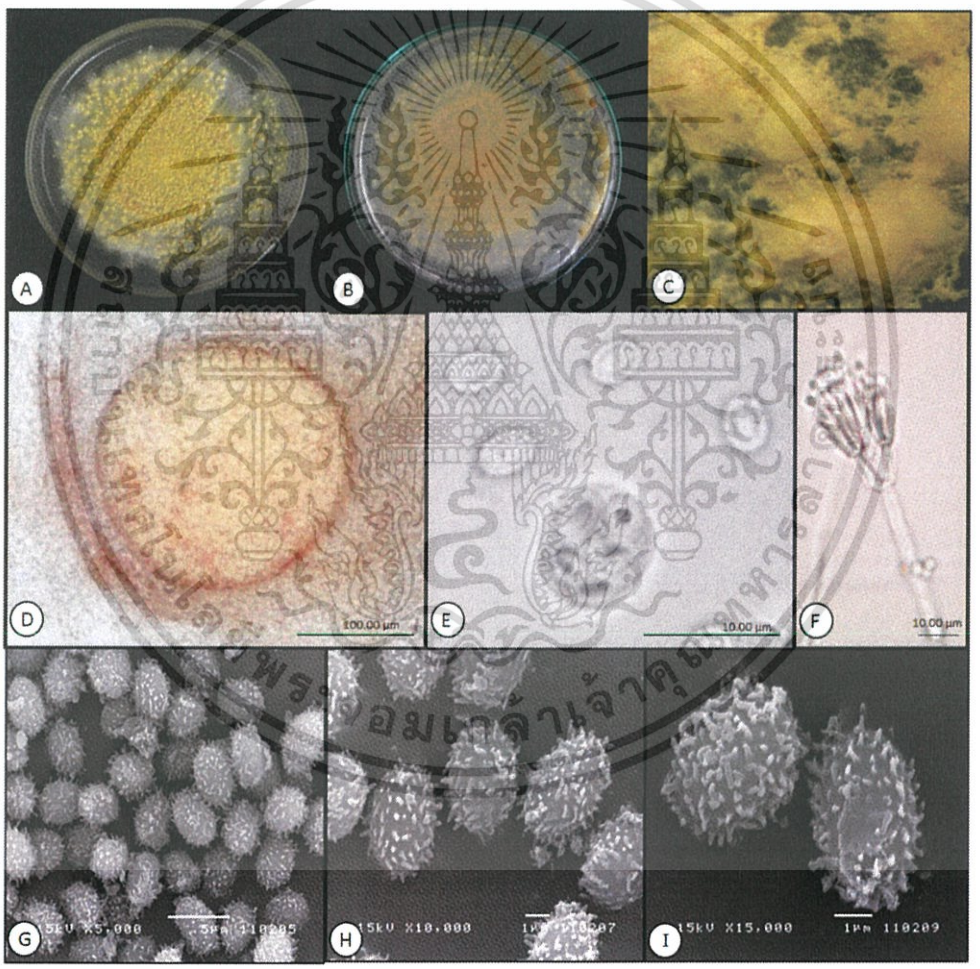
4.2.3.1 *Talaromyces muroii*

พบทั้งหมดจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ EU02, EU03, EU04, EU07, EU12, EU14, EU16, EU18, EU25 และ EU26 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีขนาดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เท่ากับ 23.51-59.32 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 7 วัน โคโลนีมีสีเหลือง ผิวหน้าโคโลนีเป็นปุย (flocose) มี ascocarp แบบ cleistothecia สีเหลืองถึงเหลืองอ่อน รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 145.24-769.80 x 147.60-867.84 ไมโครเมตร ascus รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 6.31-12.11 x 7.24-12.71 ไมโครเมตร ascospore รูปร่าง broadly ellipsoidal ถึง ellipsoidal ขนาด 1.13-4.88 x 1.92-5.46 ไมโครเมตร ผนังหนา ไม่มี ridge โดยแสดงลักษณะทางสัณฐานของไอโซเลต EU12 เป็นตัวแทนของสปีชีส์นี้ พบว่ามีขนาดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เท่ากับ 37.54-59.32 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 7 วัน โคโลนีสีเหลือง ดังแสดงในรูปโคโลนีหน้าจานเพาะเลี้ยงรูปที่ 4.8 A และรูปโคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง รูปที่ 4.9 B มี ascocarp แบบ cleistothecia สีเหลือง รูปร่าง subglobose ขนาด 219.28-769.80 x 219.95-867.84 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.8 C-D ascus รูปร่าง subglobose ขนาด 8.19-11.18 x 9.32-12.17 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.8 E ascospore รูปร่าง broadly ellipsoidal มีขนาด 2.60-4.84 x 2.95-5.30 ไมโครเมตร ผนังหนา พื้นผิวเป็นหนามเล็กๆ (spiny) ไม่มี ridge ดังแสดงในรูปที่ 4.8 E, 4.8 G-I และยังพบระยะ conidiophore มีลักษณะแบบ biverticillate และไม่สมมาตร ซึ่งลักษณะดังกล่าวใกล้เคียงกับการศึกษาของ Yilmaz และคณะ (2014) ที่รายงานว่าเชื้อสปีชีส์นี้ มี ascocarp สีเหลืองอ่อนถึงเหลือง รูปร่างค่อนข้างกลม ascospore รูปร่าง ellipsoidal (วงรี) ขนาด 3-4 x 3.50-6 ไมโครเมตร มีผนังหนาเล็กน้อย เป็นหนามเล็กๆ (spiny) ไม่มี ridge และมี conidiophore สร้างกิ่งแบบ monoverticillate ถึง biverticillate ซึ่งส่วนย่อยมีกิ่งอยู่ด้านปลาย โดยในการศึกษาครั้งนี้มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาด ascospore ใกล้เคียง และไม่พบ ridge เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรูปร่างของ conidiophore สร้างกิ่งแบบ biverticillate เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อกลุ่มนี้ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 พบว่ามีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 577 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *β-tubulin* ด้วยไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 461 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *calmodulin* ด้วยไพรเมอร์ CF1L/CF4 มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 701 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ CF1M/CF4 มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 703 คู่เบส ดังที่กล่าวไปในข้อ 4.2.2 จึงสรุปได้ว่าเชื้อในไอโซเลตนี้เป็น *Talaromyces muroii* และจะพบว่า phylogenetic tree ทั้งบริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* สามารถจำแนกสปีชีส์นี้ได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Talaromyces muroii* EU12 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-D: ลักษณะ ascocarp; E: ลักษณะ ascus และ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ลักษณะ conidiophore และ G-I: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

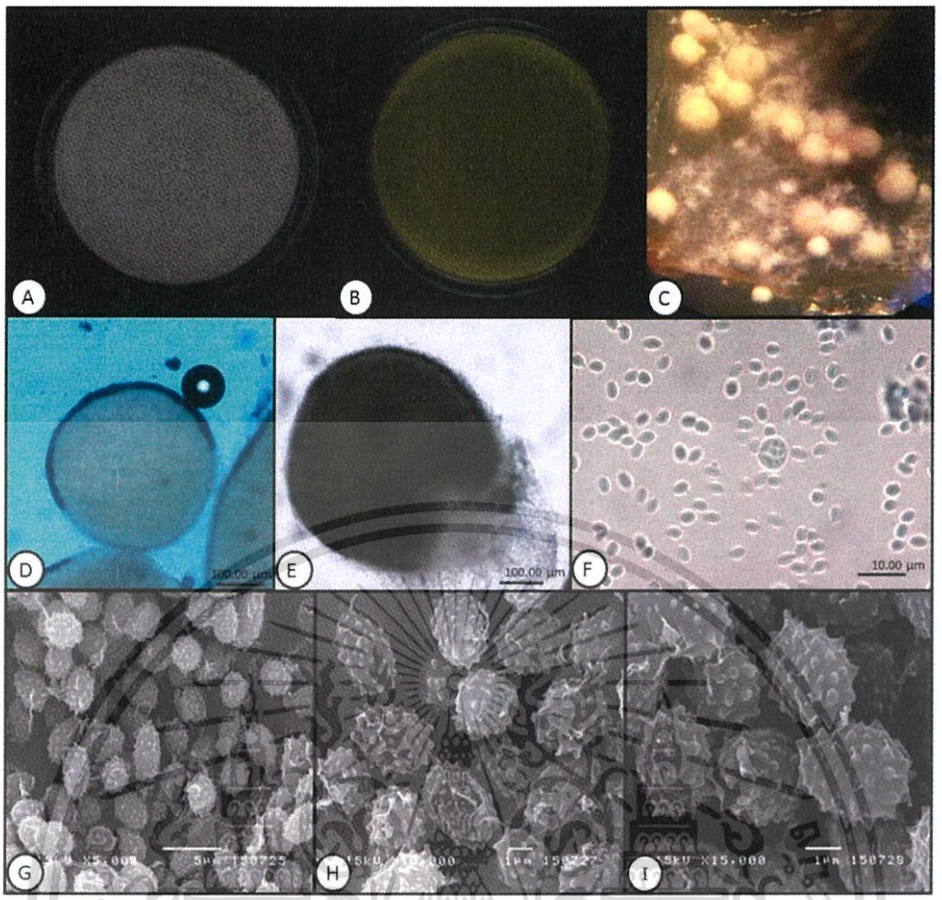
4.2.3.2 *Talaromyces trachyspermus*

พบทั้งหมดจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ EU01, EU09, EU10 และ EU23 โดยจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีขนาดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เท่ากับ 18.12-53.59 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 7 วัน โคโลนีมีสีเหลืองอ่อน ผิวโคโลนีเป็นปุย (flocose) มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia มีสีเหลืองอ่อน รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 213.34-763.75 x 221.18-892.28 ไมโครเมตร ascus รูปร่าง subglobose ขนาด 5.22-8.00 x 5.85-9.54 ไมโครเมตร ascospore รูปร่าง broadly ellipsoidal ถึง ellipsoidal ขนาด 2.04-3.92 x 2.05-4.39 ไมโครเมตร และไม่มี ridge

สำหรับเชื้อกลุ่มนี้ในบริเวณ *calmodulin* บางไอโซเลตจะเพิ่มปริมาณได้ด้วยไพรเมอร์ชนิด CF1L/CF4 และบางส่วนเพิ่มปริมาณได้ด้วยไพรเมอร์ชนิด CF1M/CF4 โดยกลุ่มแรกมีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 เท่ากับ 591 คู่เบส บริเวณ *β-tubulin* ด้วยไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b เท่ากับ 478 คู่เบส และบริเวณ *calmodulin* ด้วยไพรเมอร์ CF1L/CF4 เท่ากับ 749 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต EU09 และ EU10 และอีกกลุ่มหนึ่งจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS และ *β-tubulin* ผลผลิตพีซีอาร์ เท่ากับ 593 และ 497 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต EU01 และ EU23 และลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *calmodulin* ด้วยไพรเมอร์ CF1L/CF4 เท่ากับ 754 คู่เบส สำหรับไอโซเลต EU23 และเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ CF1M/CF4 เท่ากับ 756 คู่เบส สำหรับไอโซเลต EU01 ดังที่กล่าวในข้อ 4.2.2

โดยเชื้อ *T. trachyspermus* นี้จะยกตัวอย่างในไอโซเลต EU23 เป็นตัวแทน โดยมีขนาดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เท่ากับ 19.52-25.35 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 7 วัน โคโลนีสีเหลืองอ่อน ผิวโคโลนีเป็นปุย (flocose) ดังแสดงในรูปโคโลนีด้านหน้ารูปที่ 4.9 A และโคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยงรูปที่ 4.9 B มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia มีสีเหลืองอ่อน รูปร่าง globose ขนาด 401.62-763.75 x 401.91-892.28 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.9 C-E ascus รูปร่าง subglobose ขนาด 5.63-7.76 x 5.85-9.54 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.9 F และ ascospores รูปร่าง broadly ellipsoidal ขนาด 2.09-3.92 x 2.40-4.37 ไมโครเมตร พื้นผิวเป็นหนาม (spiny) ไม่มี ridge ดังแสดงในรูปที่ 4.9 F-I ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับ Yilmaz และคณะ (2014) ที่รายงานว่าสปีชีส์นี้มี ascospore รูปร่าง broadly ellipsoidal (วงรีกว้าง) ขนาด 3.5-5 x 2-3 ไมโครเมตร พื้นผิวเป็นแบบ spiny (หนามเล็ก) ไม่มี ridge แต่แตกต่างกันที่พบว่ามี ascocarp สีขาวครีม และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 บริเวณ จึงสรุปได้ว่าเชื้อในกลุ่มนี้เป็น *Talaromyces trachyspermus* และจะพบว่า phylogenetic tree ทั้งบริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* สามารถจำแนกสปีชีส์นี้ได้ แต่ทั้งนี้ยังคงต้องทำการศึกษาบริเวณอื่นๆ เพิ่มเติมสำหรับเชื้อในกลุ่มนี้เนื่องจากพบว่ามี Indel หลายตำแหน่งในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* ดังแสดงในรูปที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



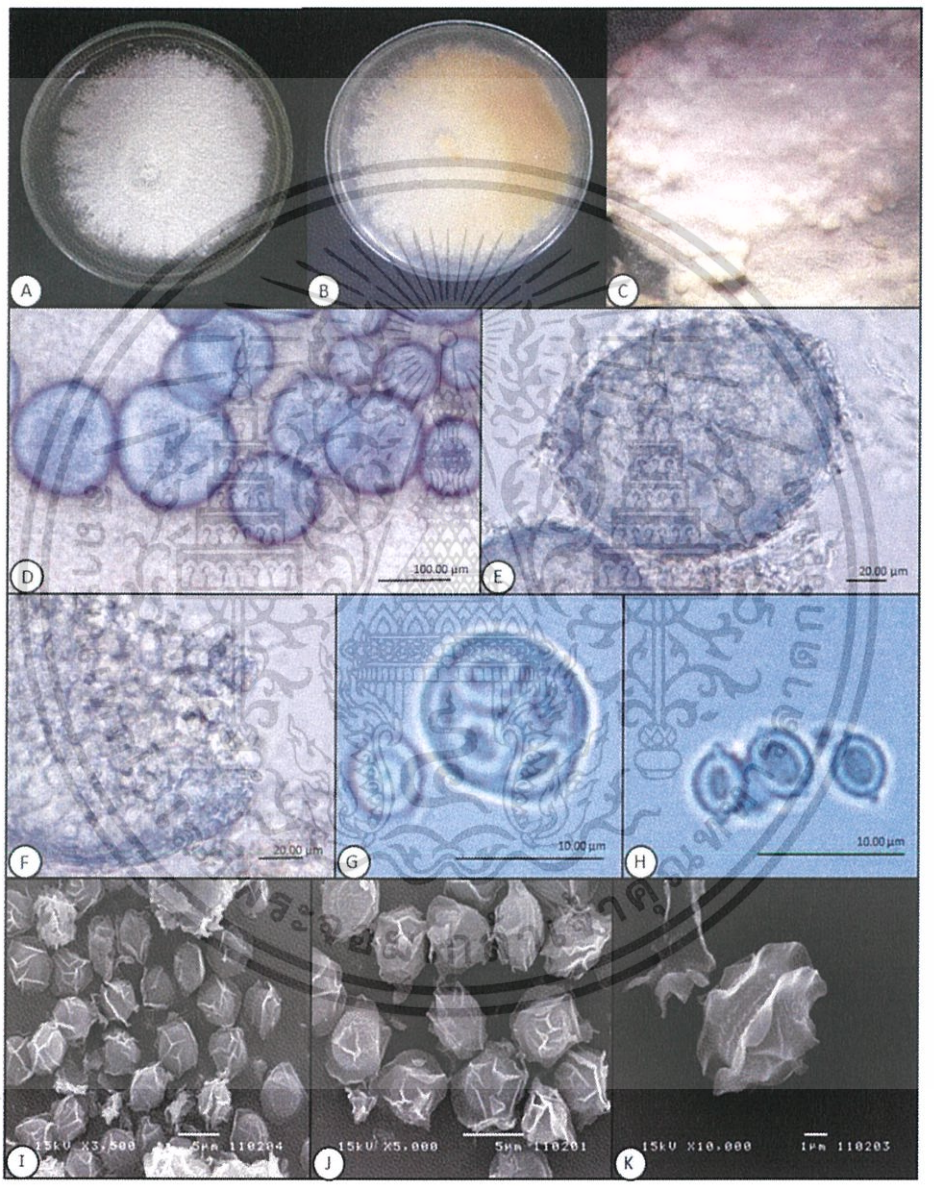
รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Talaromyces trachyspermus* EU23 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-E: ลักษณะ ascocarp; F: ลักษณะ ascus และ ascospore และ G-I: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

4.2.3.3 *Neosartorya hiratsukae*

พบเพียง 1 ไอโซเลต ได้แก่ EU06 โดยมีขนาดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เท่ากับ 57.65-58.36 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 7 วัน โคโลนีมีสีขาวครีม ดังแสดงในรูปที่ 4.10 A-B มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia สีขาวครีม รูปร่าง globose ขนาด 90.7-263.05 x 91.98-276.76 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.10 C-F) ascus รูปร่าง globose ขนาด 9.86-13.63 x 8.63-13.9 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.10 G) ascospore รูปร่าง broadly ellipsoidal ประกอบด้วย 2 equatorial crests หรือ ridge ที่ติดกัน พื้นผิวคล้ายตาข่าย ขนาด 3.86-6.81 x 3.70-6.48 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.10 H จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และรูปที่ 4.10 I-K จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ทั้งนี้พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความสอดคล้องกับ Samson และคณะ (2007) โดยมีลักษณะภายนอกของ ascospore แตกต่างกับอยู่เล็กน้อย โดยที่มี ridge ที่เปิดกว้างมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ ITS เท่ากับ 606 คู่เบส ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของบริเวณ *β-tubulin* เท่ากับ 545 คู่เบส และขนาดผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ *calmodulin* เท่ากับ 733 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ CF1L/CF4 ดังกล่าวไปในข้อ 4.2.2 จึงสรุปได้ว่าเชื้อในไอโซเลตนี้เป็น *Neosartorya hiratsukae* และจะพบว่า phylogenetic tree บริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* สามารถจำแนกสปีชีส์นี้ออกจากเชื้อสกุล *Neosartorya* อีก 2 สปีชีส์ได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Neosartorya hiratsukae* EU06 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-F: ลักษณะ ascocarp; G: ลักษณะ ascus; H-K: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ I-K: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

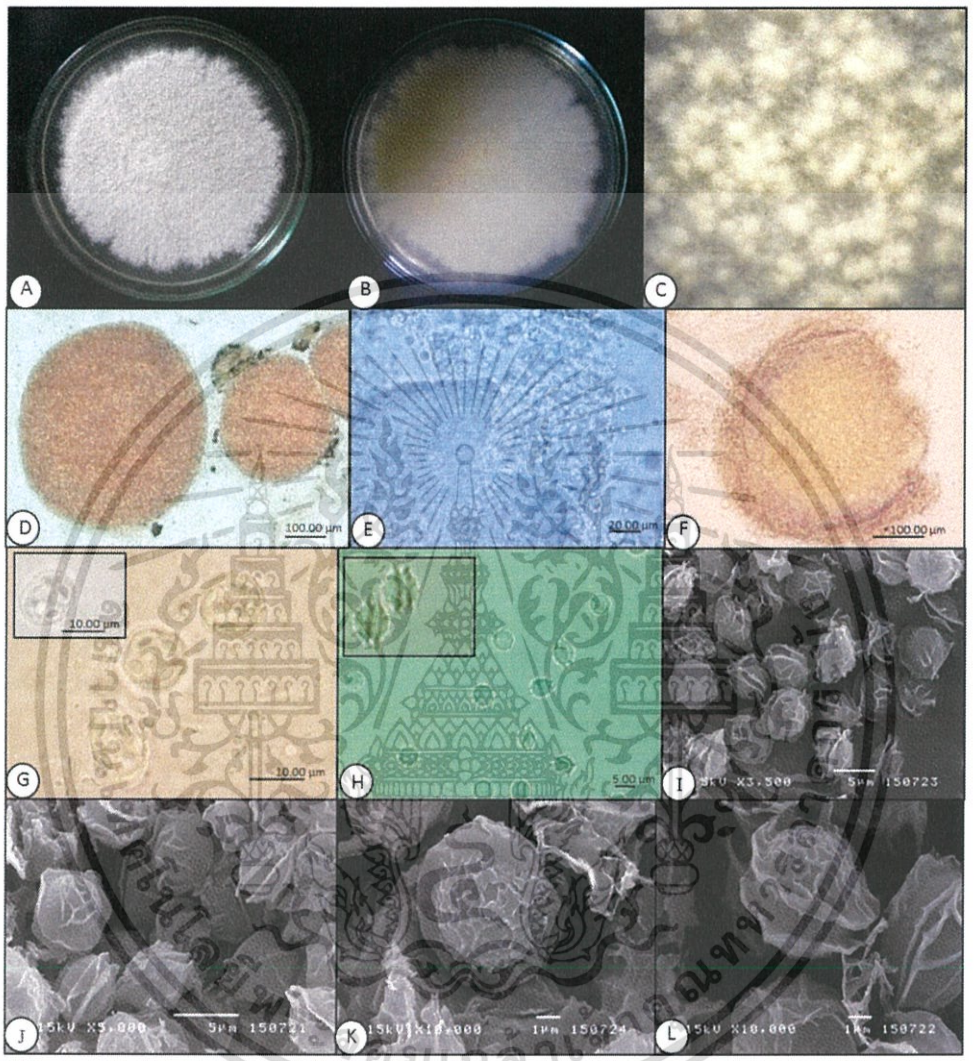
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.4 *Neosartorya pseudofischeri*

พบเพียง 1 ไอโซเลต ได้แก่ EU13 โดยพบว่ามีขนาดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เท่ากับ 42.94-47.94 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 7 วัน โคโลนีมีสีขาว (รูปที่ 4.11 A-B) มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia สีขาวครีม รูปร่าง globose ขนาด 151.7-458.70 x 148.06-526.58 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.11 C-F) ascus รูปร่าง subglobose ขนาด 10.33-14.19 x 10.63-15.87 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.11 G) ascospore รูปร่าง subglobose ขนาด 4.22-6.07 x 4.49-7.41 ไมโครเมตร ประกอบด้วย 2 equatorial crests หรือ ridge ซึ่งกว้าง 1 ไมโครเมตร พื้นผิวขรุขระ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 H จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และรูปที่ 4.11 I-L จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด โดยจะมีลักษณางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับ Samson และคณะ (2007) และพบว่ามีขนาดระหว่าง ridge กว้าง 1 ไมโครเมตรเช่นเดียวกัน

โดยขนาดของผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ ITS เท่ากับ 588 คู่เบส ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของบริเวณ *β-tubulin* เท่ากับ 553 คู่เบส และขนาดผลผลิตพีซีอาร์ *calmodulin* เท่ากับ 764 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ CF1L/CF4 ดังกล่าวในข้อ 4.2.2 จากข้อมูลการหาความสัมพันธ์ของเชื้อในข้อ 4.2.3 และจากภาพ 4.4, 4.6 และ 4.7 จึงสรุปได้ว่าเชื้อในไอโซเลตนี้เป็น *Neosartorya pseudofischeri*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya pseudofischeri* EU13 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-F: ลักษณะ ascocarp; G: ลักษณะ ascus; H: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ I-L: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

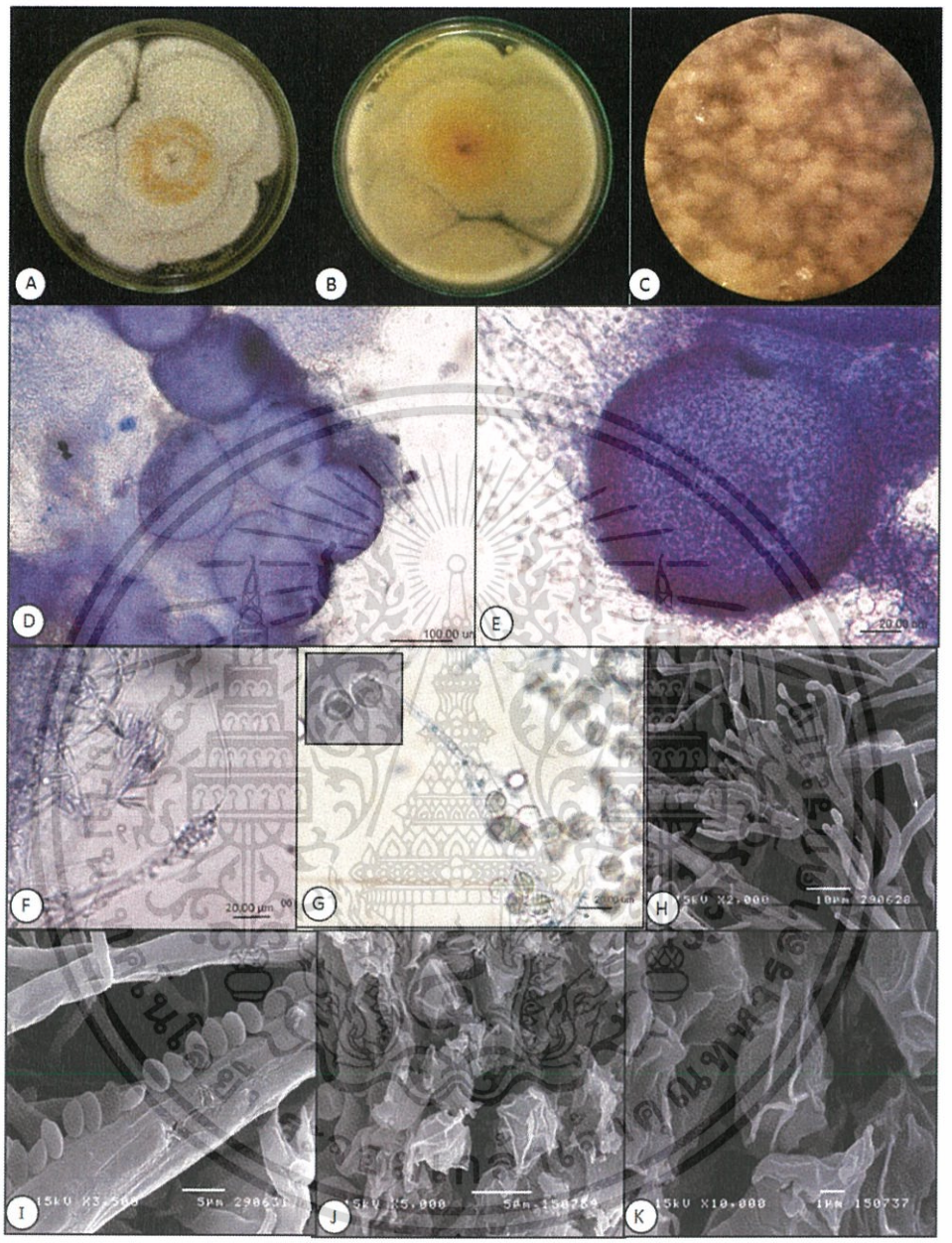
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.5 *Neosartorya* sp.1

เชื้อในสปีชีส์นี้พบเพียงไอโซเลตเดียว ได้แก่ EU35 โดยจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่ามีขนาดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เท่ากับ 87.59-88.59 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 7 วัน โคโลนีมีสีขาวถึงเทาอ่อน ดังแสดงในรูปโคโลนีหน้าจานเพาะเลี้ยงรูปที่ 4.12 A และหลังโคโลนีในรูปที่ 4.12 B มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia สีขาวซีด รูปร่าง subglobose ขนาด 144.44-448.02 x 169.26-492.38 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.12 C-E มี ascus รูปร่าง subglobose ขนาด 10.48-14.79 x 11.13-15.58 ไมโครเมตร และ ascospore รูปร่าง subglobose ขนาด 4.73-6.23 x 5.16-7.77 ไมโครเมตร ประกอบด้วย 2 equatorial crests หรือ ridge ซึ่งกว้าง 1 ไมโครเมตร พื้นผิวขรุขระ ดังแสดงในรูปที่ 4.12 G จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และรูปที่ 4.12 J-K จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

โดยขนาดของผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ ITS เท่ากับ 556 คู่เบส และไม่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* ได้เนื่องจากเพิ่มปริมาณได้ 2 แถบ และขนาดผลผลิตพีซีอาร์ *calmodulin* เท่ากับ 766 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ CF1L/CF4 ดังกล่าวในข้อ 4.2.2 จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเชื้อไอโซเลตนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อสปีชีส์ *N. pseudofischeri* และพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แตกต่างจากไอโซเลต EU13 แต่เนื่องจากลักษณะ conidia ซึ่งเป็นสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ มีลักษณะของเชื้อในสกุล *Penicillium* ดังรูปที่ 4.12 F และ 4.12 H-I ซึ่งแตกต่างจากเชื้อสกุล *Neosartorya* ทั่วไปที่จะมีลักษณะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็น *Aspergillus* (Houbraken และ Samson, 2011; Yilmaz และคณะ, 2014) จึงยังไม่สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อในไอโซเลตนี้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya* sp.1 EU35 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-E: ลักษณะ ascocarp; F: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; G: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; H-I: ลักษณะ conidia จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด และ J-K: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

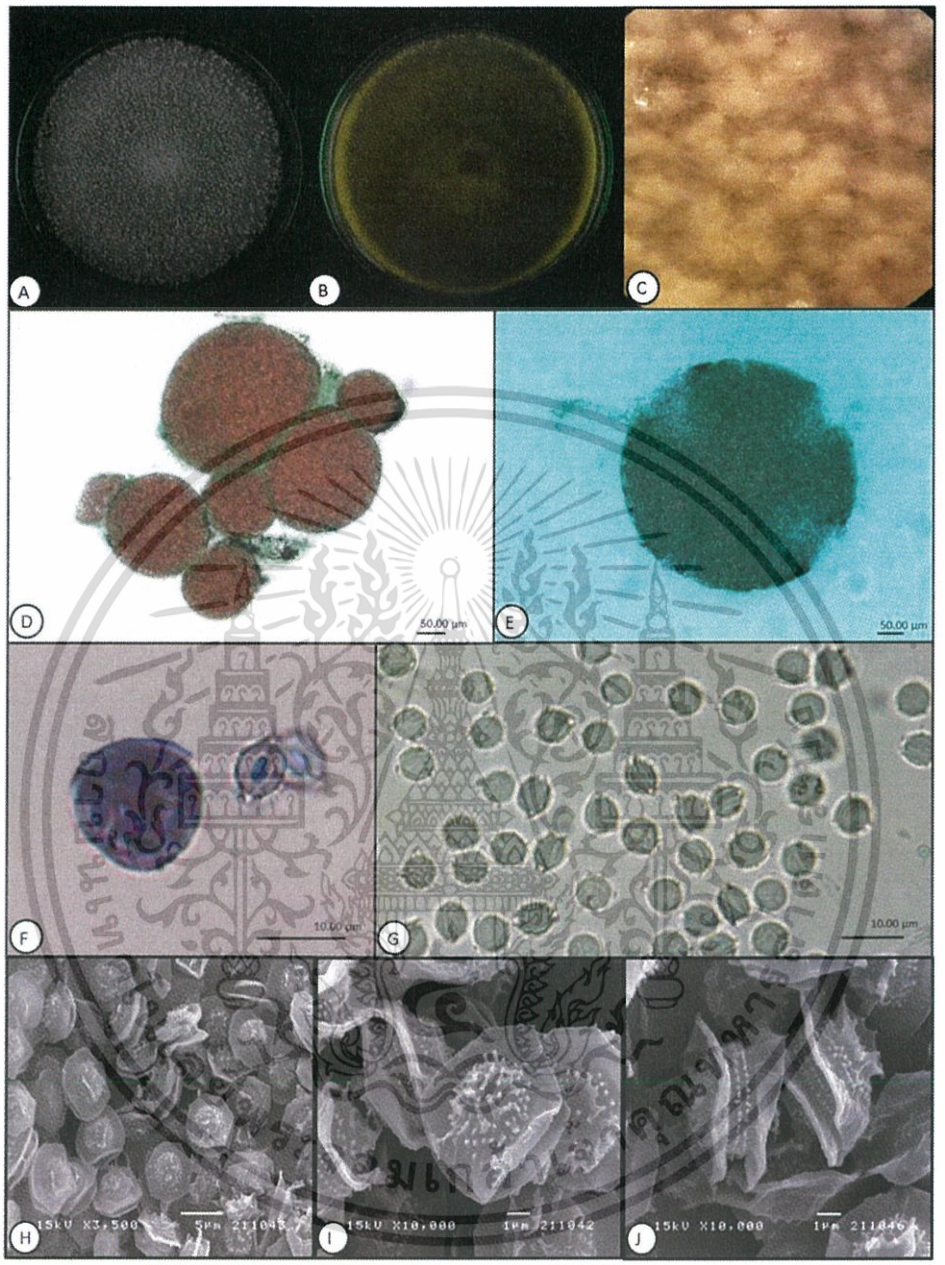
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.6 *Neosartorya* sp.2

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าไอโซเลต EU36 มีขนาดโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เท่ากับ 37.97-40.37 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 7 วัน โคโลนีมีขาวครีม ดังแสดงในรูปโคโลนีหน้าจานเพาะเลี้ยงรูปที่ 4.13 A และหลังโคโลนีในรูปที่ 4.13 B มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia สีขาวครีม รูปร่าง subglobose ขนาด 108.34-453.47 x 109.69-455.40 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.13 C-E มี ascus รูปร่าง subglobose ขนาด 9.17-12.95 x 9.43-13.56 ไมโครเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.13 F และ ascospore รูปร่าง ellipsoldal ขนาด 3.98-5.03 x 4.77-5.63 ไมโครเมตร ประกอบด้วย 2 equatorial crests หรือ rigde ที่ชัดเจนและมีพื้นผิวนูนและมีหนามเล็กๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.13 G จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และรูปที่ 4.13 H-J จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ และมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ *β-tubulin* เท่ากับ 556 คู่เบส และขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ *calmodulin* เท่ากับ 744 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ CF1M/CF4 ดังแสดงในข้อ 4.2.2 และจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อในฐานข้อมูล GenBank ดังแสดงในข้อ 4.2.3 พบว่าเชื้อในไอโซเลตนี้มีความสัมพันธุ์ใกล้เคียงกันกับเชื้อ *Neosartorya aureola* ทั้งจาก phylogenetic tree และ BLAST แต่เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลตนี้ มีลักษณะของ asacospore มีความกว้างของ ridge ที่กว้างกว่าเชื้อ *Neosartorya aureola* ทั่วไป และมีลักษณะเปิดออกอย่างเห็นได้ชัด จึงทำให้ไม่สามารถระบุเชื้อไอโซเลตนี้เป็นเชื้อ *Neosartorya aureola* ได้ ซึ่งต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นๆ ในการระบุสปีชีส์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya* sp.2 EU36 A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; B: โคโลนีหลังจานเพาะเลี้ยง; C-E: ลักษณะ ascocarp; F: ลักษณะ ascus; G: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และ H-J: ลักษณะ ascospores จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค *Colletotrichum coffeanum* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่มีต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกาแฟ ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมบนอาหาร PDA ระหว่างเชื้อราต่อต้าน (antagonist) สกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* กับเชื้อ *C. coffeanum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกาแฟ เป็นระยะเวลา 25 วัน พบว่า *T. trachyspermus* EU09 และ *T. muroii* EU04 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมเท่ากับ 1.43×10^5 และ 1.53×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* บนจานเพาะเลี้ยงที่เป็น control โดยคิดเป็นการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* เท่ากับ 91.22 และ 90.65 เปอร์เซ็นต์ และ *T. muroii* EU16 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ โดยจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมเท่ากับ 8.00×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* ที่ 84.95 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *T. muroii* EU26, *T. muroii* EU18, *T. muroii* EU03, *T. muroii* EU25, *T. muroii* EU07, *Neosartorya* sp.1 EU35, *N. pseudofischeri* EU13, *Neosartorya* sp.2 EU36, *T. trachyspermus* EU23 และ *T. trachyspermus* EU10 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* สาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมที่ 81.89, 80.28, 76.21, 75.80, 74.39, 71.59, 68.45, 67.64, 51.88, และ 49.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* สาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมได้น้อยที่สุด คือ *N. hiratsukae* EU06 ที่ 15.37 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

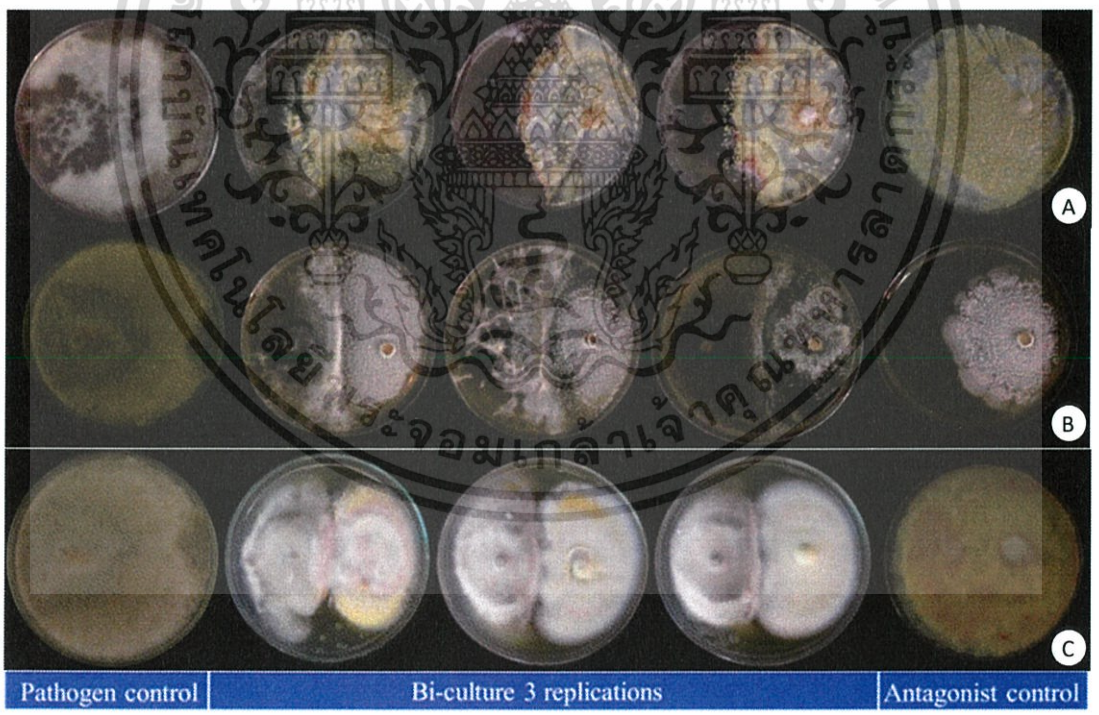
จากการทดลองพบว่า *T. muroii* EU26, EU18, EU03, EU16 และ EU07 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้เช่นเดียวกับงานวิจัยของธิดา และคณะ (2550) ซึ่งทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *T. flavus* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ร่วมกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7-14 วัน พบว่าเชื้อ *T. flavus* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Phytophthora parasitica*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum capsici* และ *C. gloeosporioides* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าเชื้อ *N. pseudofischeri* EU13, *Neosartorya* sp.1 EU35, *Neosartorya* sp.2 EU36 มีฤทธิ์ในการยับยั้งสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ดีที่ 68.45, 71.59 และ 67.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีกว่าเชื้อสกุล *Neosartorya* จากงานวิจัยของ Eamvijan และคณะ (2009) ซึ่งทำการทดสอบเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

N. fischeri, *N. graba*, *N. spinosa*, *N. hiratsukae*, *N. takakii*, *N. tatenoi* และ *Neosartorya* sp. ไอโซเลต 1, 2 และ 3 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม ในห้องปฏิบัติการ ซึ่ง *Neosartorya* ทั้ง 9 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Bipolaris maydis*, *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* และ *Pestalotiopsis* sp. ได้เพียง 30-40 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii*

เชื้อ *T. trachyspermus* EU09, *T. muroii* EU04, EU16, EU26 และ EU18 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* สาเหตุโรคได้ดีที่สุด 4 อันดับแรก และขนาดโคโลนีของเชื้อ *T. muroii* EU16 และ EU26 ที่เวลา 7 วันมีขนาดเล็กกว่าเชื้อ *T. muroii* EU18 ดังนั้นจึงนำเชื้อ *T. trachyspermus* EU09, *T. muroii* EU04 และ *T. muroii* EU18 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่มีต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ด้วยวิธี poison plate ต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.14 จะเห็นว่ามีขนาดโคโลนีของเชื้อต่อต้านมีการเจริญได้มากกว่าขนาดโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* ซึ่งจะมีความสอดคล้องกับผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค



รูปที่ 4.14 แสดงผลจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อ *T. muroii* EU04 (A), *T. trachyspermus* EU09 (B) และ *T. muroii* EU18 (C) ต่อการควบคุมเชื้อ *C. Coffeanum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

Antagonists	*C. coffeanum*		
	จำนวนสปอร์ของ control ($\times 10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนสปอร์±SE ($\times 10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	% การยับยั้งการสร้างสปอร์
T muroii EU03	6.66	1.58 ± 0.18	76.21[d]
T. muroii EU04	16.33	1.53 ± 0.41	90.65[a]
N. hiratsukae EU06	6.66	5.63 ± 0.23	15.37[h]
T. muroii EU07	61.70	15.80 ± 0.65	74.39[d]
T. trachyspermus EU09	16.33	1.43 ± 0.08	91.22[a]
T. trachyspermus EU10	16.33	8.18 ± 0.30	49.90[g]
N. pseudofischeri EU13	6.66	2.10 ± 0.25	68.45[f]
T. muroii EU16	53.13	8.00 ± 1.31	84.95[b]
T. muroii EU18	4.77	0.94 ± 0.26	80.28[c]
T. trachyspermus EU23	6.66	3.20 ± 0.55	51.88[g]
T. muroii EU25	4.77	1.15 ± 0.17	75.80[d]
T. muroii EU26	4.77	0.86 ± 0.62	81.89[c]
Neosartorya sp.1 EU35	67.57	19.20 ± 0.47	71.59[e]
Neosartorya sp.2 EU36	67.57	21.87 ± 0.61	67.64[f]

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ P=0.05 โดยเปรียบเทียบแบบ Duncan's Multiple Range Test % ยับยั้งการสร้างสปอร์ = ((R1-R2)/R1) x 100; R1 = จำนวนสปอร์ของ *C. coffeanum* ในจานอาหารเปรียบเทียบ(control), R2 = จำนวนสปอร์ของของเชื้อ *C. coffeanum* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ต่อการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค ด้วยเชื้อต่อต้านแต่ละสปีชีส์ที่นำมาทดสอบมีความแตกต่างกัน โดยจะพบว่าสำหรับเชื้อ *T. trachyspermus* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* แตกต่างกันระหว่างไอโซเลต EU09 และ EU23 พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกัน แต่ EU09 และ EU10 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันก็มีประสิทธิภาพแตกต่างกันได้เช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อสกุล *Talaromyces* ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อสกุล *Talaromyces* ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยการทดสอบด้วยวิธี poison plate บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA ระหว่างสารสกัดหยาบชั้นต่างๆ ของเชื้อราต่อต้านสกุล *Talaromyces* กับเชื้อ *C. coffeanum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในกาแฟ โดยนำ*เชื้อ T. muroii* EU04, *T. trachyspermus* EU09 และ *T. muroii* EU18 มาทำการสกัดสารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol โดยสารสกัดหยาบในแต่ละชั้นที่ได้มีสีน้ำตาล น้ำตาลแดง และน้ำตาลเข้ม ตามลำดับ

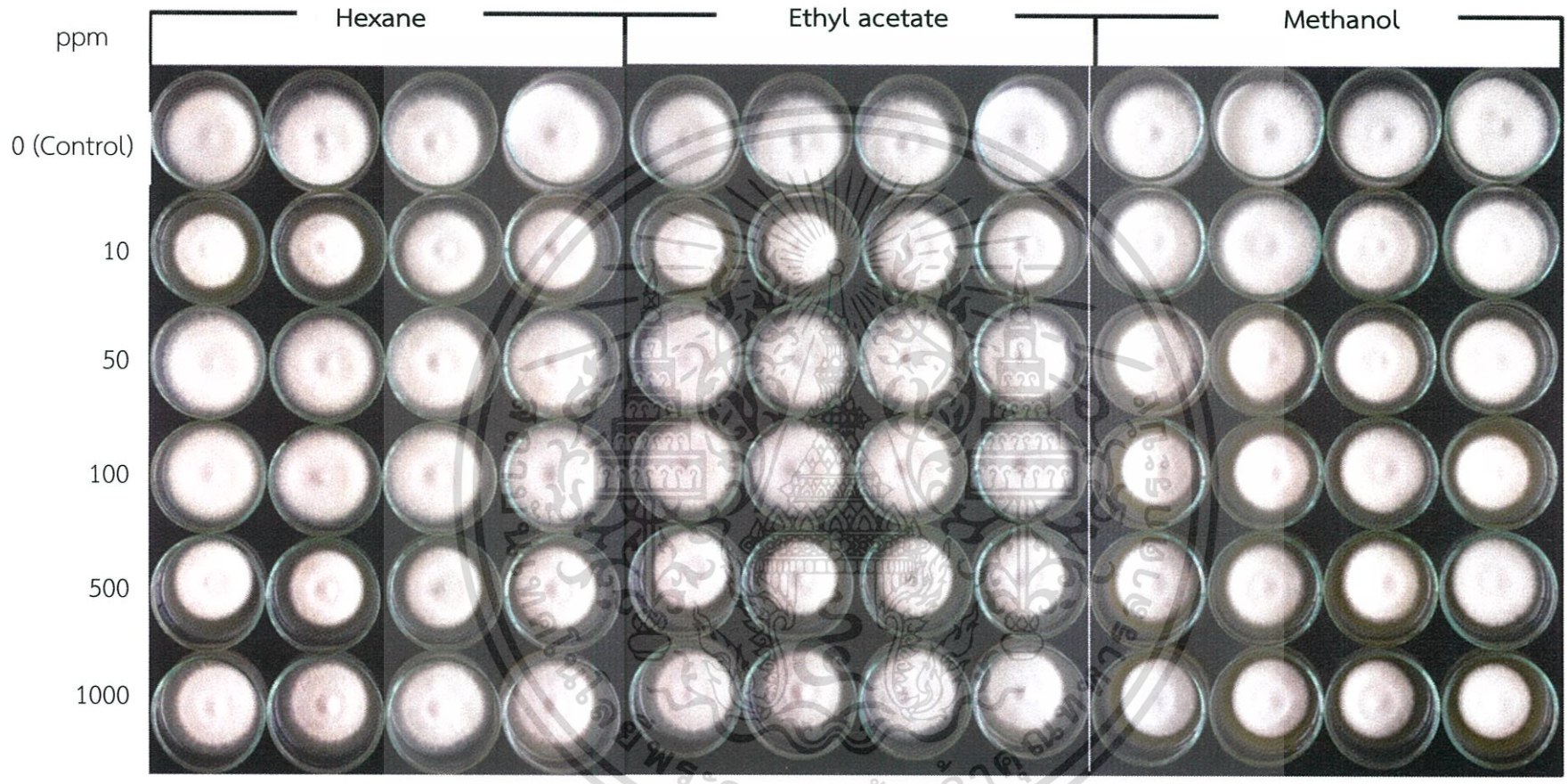
4.4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU04

ผลประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU04 โดยการจากเลี้ยงเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. muroii* EU04 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.15 จะพบว่าสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมีผลการการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* โดยสังเกตได้จากขนาดโคโลนีของเชื้อทั้ง 4 ซ้ำที่เลี้ยงบนอาหารที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างกัน โดยเชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นมากกว่าจะมีขนาดโคโลนีเล็กกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัด และจากกราฟที่ 4.16 พบว่าสารสกัดหยาบชั้น methanol มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. coffeanum* มากที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 27.25 เปอร์เซ็นต์ โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm จะแสดงในตารางที่ 4.6

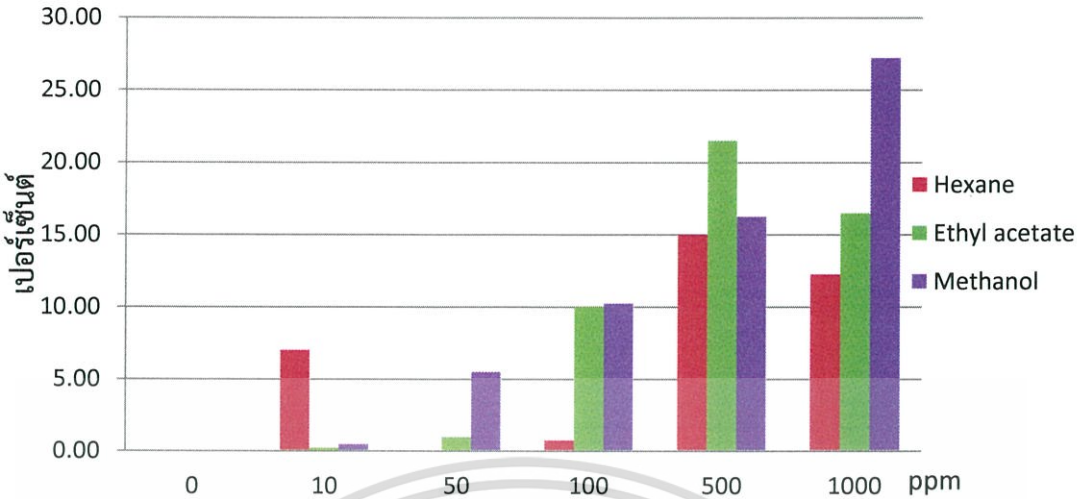
จากรูปที่ 4.17 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของสารสกัดหยาบชั้นต่างๆ พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* มากที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 78.95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจำนวนสปอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบ ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (control) จะแสดงในตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.17

เมื่อเปรียบเทียบทั้งสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชั้น พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate มีฤทธิ์มากที่สุดในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 0.41 ppm สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ สารสกัดชั้น methanol และ hexane สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความ-เข้มข้น 0.52 และ 3.30 ppm

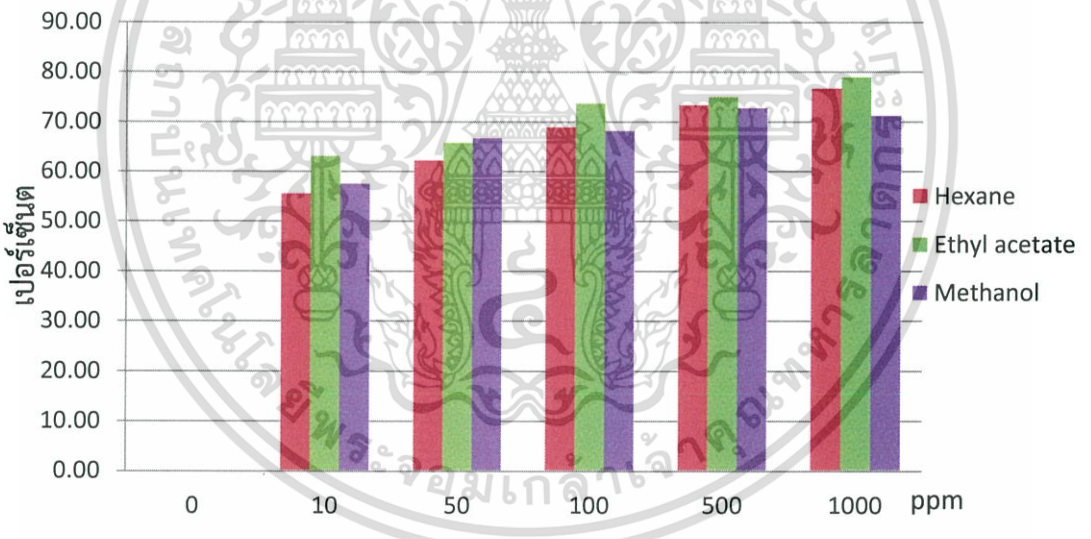
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. muroii* EU04 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ



รูปที่ 4.16 กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. muroii* EU04



รูปที่ 4.17 กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. muroii* EU04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU04 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum*

สารสกัดหยาบชั้น	ความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ±SE (ซม.) (4 วัน)	% การยับยั้งการเจริญเติบโต	ปริมาณสปอร์± SE ($\times 10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) (25 วัน)	% การยับยั้งการสร้างสปอร์	ED_{50} (ppm)
Hexane	0	5.00 ± 0.00	0.00	28.13 ± 0.49	0.00	3.30
	10	4.65 ± 0.04	7.00	12.50 ± 0.24	55.56	
	50	5.00 ± 0.00	0.00	10.63 ± 0.49	62.22	
	100	4.96 ± 0.04	0.75	8.75 ± 0.37	68.89	
	500	4.25 ± 0.00	15.00	7.50 ± 0.24	73.33	
	1000	4.39 ± 0.16	12.25	6.56 ± 0.14	76.67	
Ethyl acetate	0	5.00 ± 0.00	0.00	23.75 ± 0.37	0.00	0.41
	10	4.99 ± 0.01	0.25	8.75 ± 0.37	63.16	
	50	4.95 ± 0.04	1.00	8.13 ± 0.36	65.79	
	100	4.50 ± 0.11	10.00	6.25 ± 0.17	73.68	
	500	3.93 ± 0.11	21.50	5.94 ± 0.07	75.00	
	1000	4.18 ± 0.07	16.50	5.00 ± 0.24	78.95	
Methanol	0	5.00 ± 0.00	0.00	20.63 ± 0.43	0.00	0.52
	10	4.98 ± 0.02	0.50	8.75 ± 0.37	57.58	
	50	4.73 ± 0.14	5.50	6.88 ± 0.14	66.67	
	100	4.49 ± 0.05	10.25	6.56 ± 0.22	68.18	
	500	4.19 ± 0.09	16.25	5.63 ± 0.14	72.73	
	1000	3.64 ± 0.08	27.25	5.94 ± 0.14	71.21	

หมายเหตุ: % ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือสร้างสปอร์ = ((R1-R2)/R1) x 100; R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อที่ 0 ppm (ตัวควบคุม), R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อในแต่ละความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09

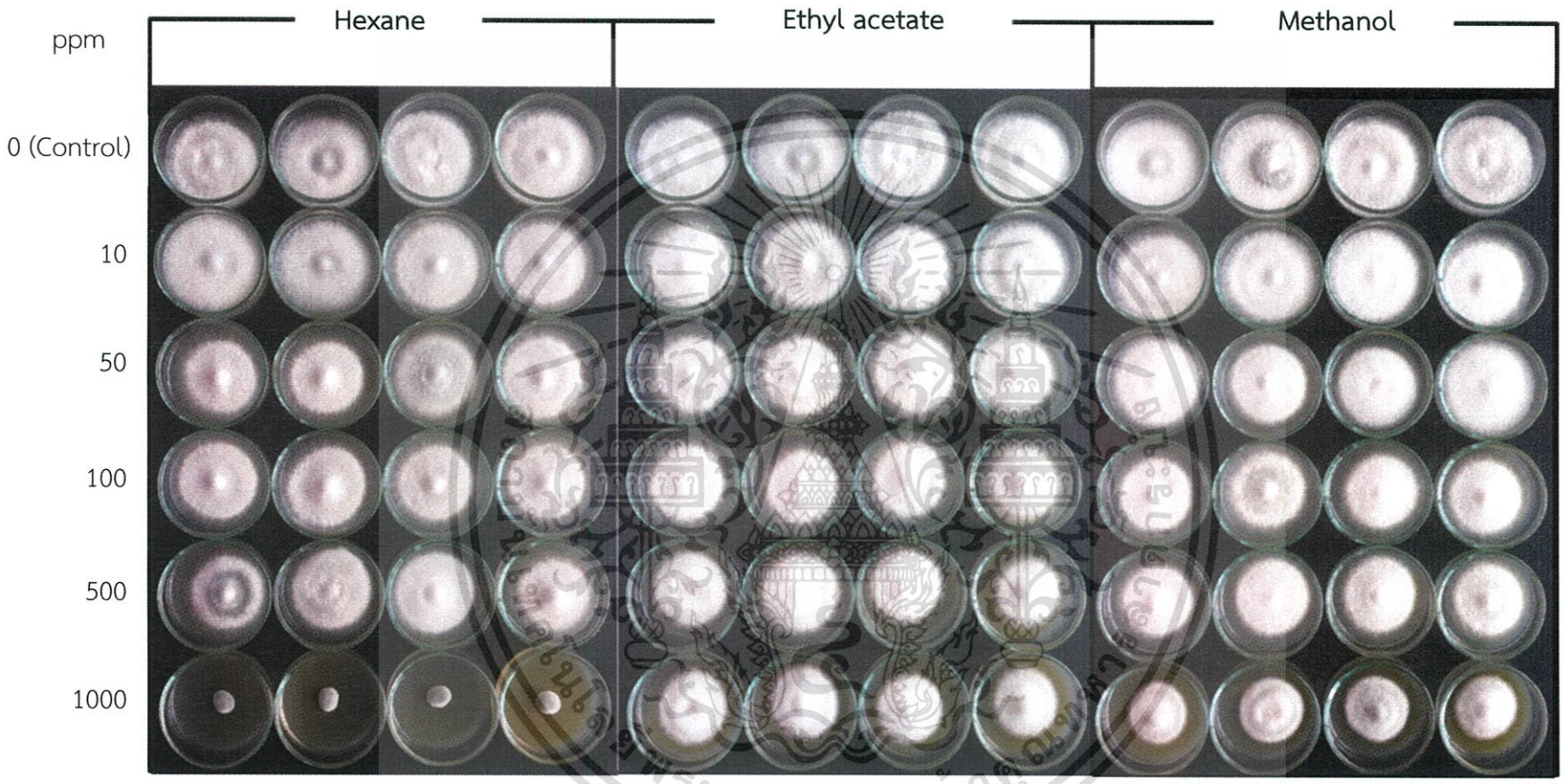
จากเลี้ยงเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4.18 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดในแต่ละชั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งจะพบว่ามีในทุกชั้นของสารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1000 ppm จะมีขนาดโคโลนีเล็กกว่าความเข้มข้นระดับอื่นๆ และสอดคล้องกับผลการยับยั้งการเจริญเติบโตจากรูปที่ 4.19 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบชั้น hexane มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. coffeanum* มากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 78.75 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.19) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (control) จะแสดงในตารางที่ 4.7

จากรูปที่ 4.20 แสดงผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์มากที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 80.7 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.20) ซึ่งจำนวนสปอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบชั้น hexane ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm จะแสดงในตารางที่ 4.7 ซึ่งจะพบว่าจำนวนสปอร์ในสารสกัดแต่ละชั้นมีปริมาณแตกต่างกัน โดยที่จำนวนสปอร์ของสารสกัดจากชั้น ethyl acetate มีค่าน้อยที่สุด

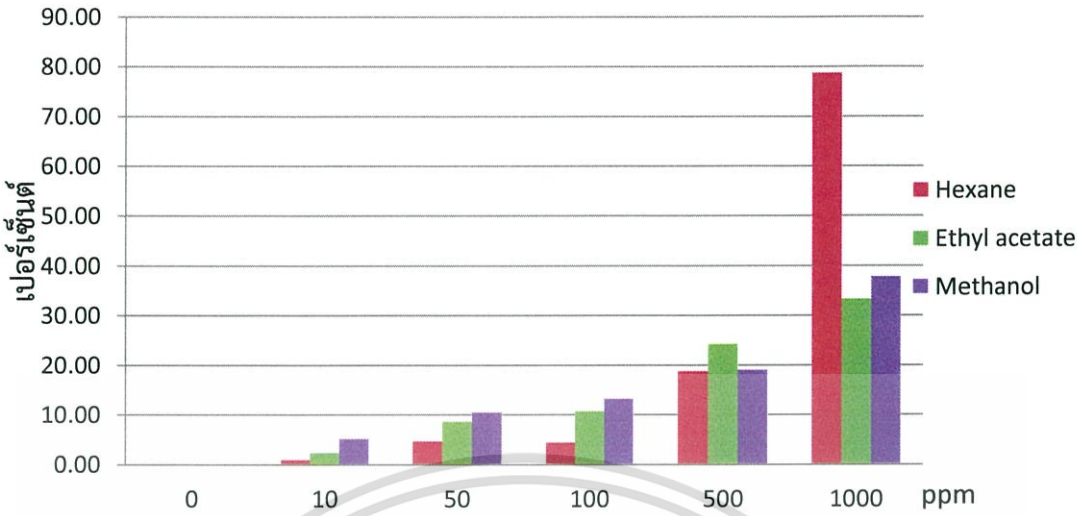
เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบทั้งสามชั้น พบว่าสารสกัดหยาบชั้น methanol มีฤทธิ์มากที่สุดในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 0.65 ppm สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ สารสกัดชั้น ethyl acetate และ hexane สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 12.54 และ 18.90 ppm ตามลำดับ

โดยเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate ที่ได้จาก *T. muroii* EU04 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบชั้น methanol ของเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 โดยสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเข้มข้น 0.41 และ 0.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

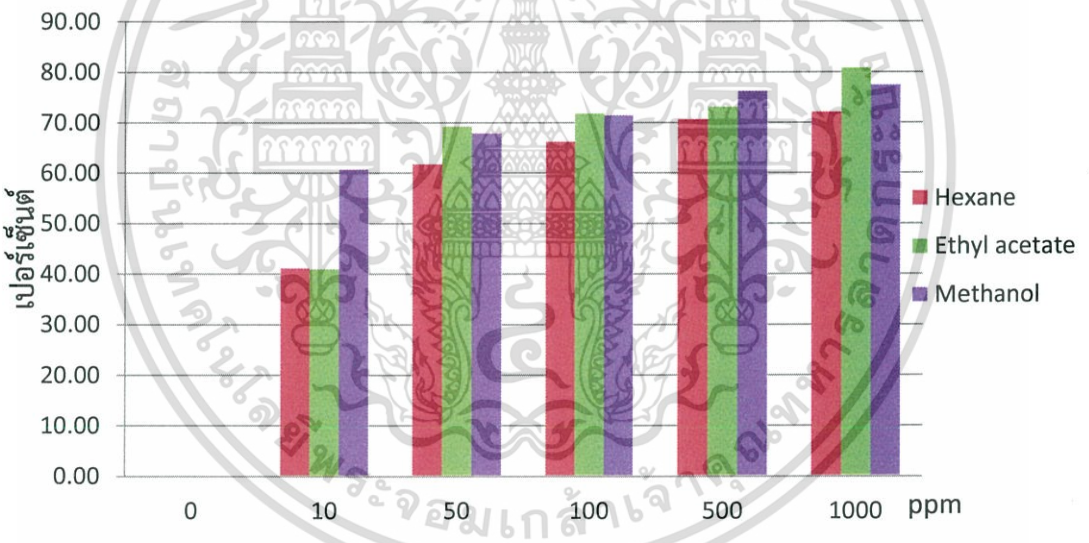
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ



รูปที่ 4.19 กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. trachyspermus* EU09



รูปที่ 4.20 กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. trachyspermus* EU09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum*

สารสกัดหยาบชั้น	ความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ±SE (ซม.) (4 วัน)	% การยับยั้งการเจริญเติบโต	ปริมาณสปอร์ ± SE ($\times 10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) (25 วัน)	% การยับยั้งการสร้างสปอร์	ED_{50} (ppm)
Hexane	0	5.00 ± 0.00	0.00	21.25 ± 0.37	0.00	18.90
	10	4.95 ± 0.04	1.00	12.50 ± 0.41	41.18	
	50	4.76 ± 0.09	4.75	8.13 ± 0.36	61.76	
	100	4.78 ± 0.08	4.50	7.19 ± 0.18	66.18	
	500	4.06 ± 0.05	18.75	6.25 ± 0.17	70.59	
	1000	1.06 ± 0.03	78.75	5.94 ± 0.27	72.06	
Ethyl acetate	0	5.00 ± 0.00	0.00	24.38 ± 0.28	0.00	12.54
	10	4.88 ± 0.10	2.50	14.38 ± 0.28	41.06	
	50	4.56 ± 0.09	8.75	7.50 ± 0.24	69.23	
	100	4.46 ± 0.13	10.75	6.88 ± 0.28	71.79	
	500	3.79 ± 0.07	24.25	6.56 ± 0.22	73.08	
	1000	3.34 ± 0.09	33.25	4.69 ± 0.18	80.77	
Methanol	0	5.00 ± 0.00	0.00	26.25 ± 0.50	0.00	0.65
	10	4.74 ± 0.14	5.25	10.31 ± 0.25	60.71	
	50	4.48 ± 0.21	10.50	8.44 ± 0.32	67.86	
	100	4.34 ± 0.03	13.25	7.50 ± 0.24	71.43	
	500	4.05 ± 0.06	19.00	6.25 ± 0.17	76.19	
	1000	3.11 ± 0.04	37.75	5.94 ± 0.27	77.38	

หมายเหตุ: % ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือสร้างสปอร์ = ((R1-R2)/R1) x 100; R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อที่ 0 ppm (ตัวควบคุม), R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อในแต่ละความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

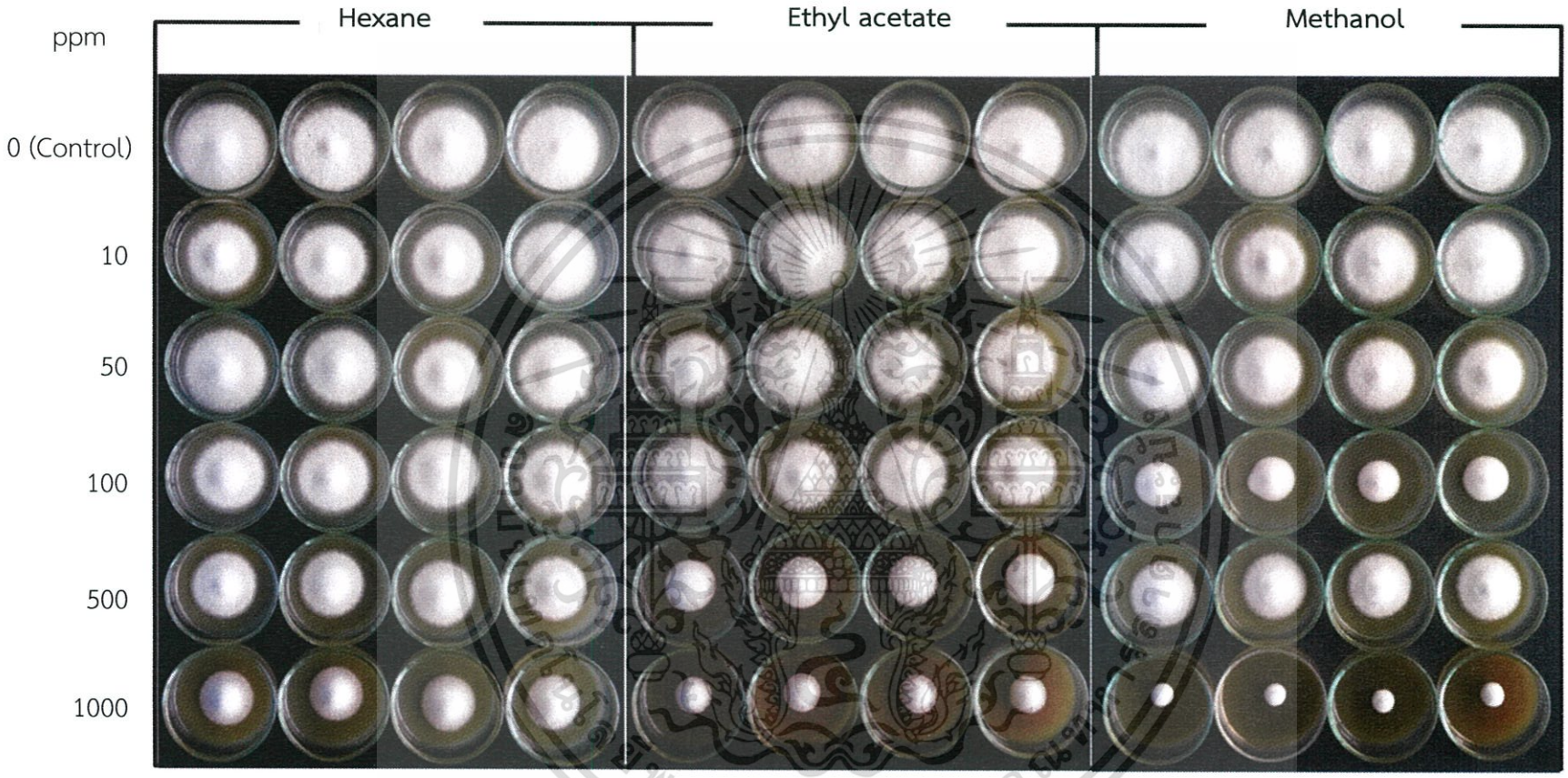
4.4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU18

จากเลี้ยงเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากรูปที่ 4.21 แสดงให้เห็นถึงขนาดโคโลนีของเชื้อในแต่ละสารสกัดซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบชั้น methanol มีขนาดโคโลนีเล็กที่สุด โดยสอดคล้องกับกราฟที่ 4.22 ที่แสดงให้เห็นถึงการที่สารสกัดหยาบชั้น methanol มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. coffeanum* มากที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 76.25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm โดยขนาดของโคโลนีและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตจะแสดงดังตารางที่ 4.8

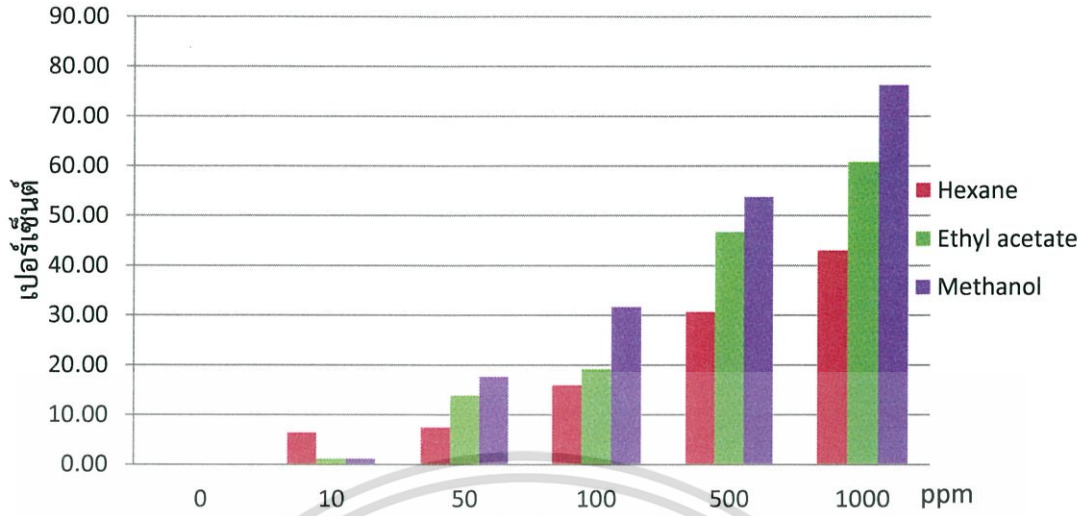
จากกราฟที่ 4.23 แสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของสารสกัดหยาบชั้น methanol มีค่าสูงที่สุด โดยที่มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 80.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจำนวนสปอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบชั้น methanol ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm จะแสดงดังตารางที่ 4.8 ทั้งจำนวนสปอร์และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์

เมื่อเปรียบเทียบทั้งสารสกัดหยาบทั้ง 3 สาร พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate มีฤทธิ์มากที่สุดในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 2.20 ppm สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ สารสกัดชั้น methanol และ hexane สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 21.71 และ 111.74 ppm ตามลำดับ

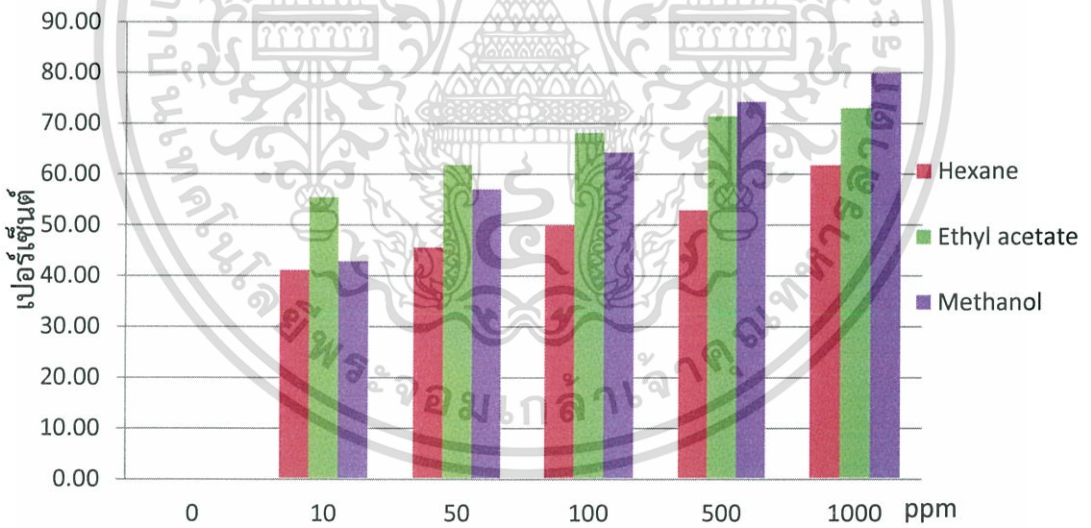
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum* ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ



รูปที่ 4.22 กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. muroii* EU18



รูปที่ 4.23 กราฟเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* จากสารสกัดหยาบของ *T. muroii* EU18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *C. coffeanum*

สารสกัดหยาบชั้น	ความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ±SE (ซม.) (4 วัน)	% การยับยั้งการเจริญเติบโต	ปริมาณสปอร์± SE ($\times 10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) (25 วัน)	% การยับยั้งการสร้างสปอร์	ED_{50} (ppm)
Hexane	0	5.00 ± 0.00	0.00	21.25 ± 0.49	0.00	111.74
	10	4.68 ± 0.12	6.50	12.50 ± 0.24	41.18	
	50	4.63 ± 0.14	7.50	11.56 ± 0.49	45.59	
	100	4.20 ± 0.02	16.00	10.63 ± 0.37	50.00	
	500	3.46 ± 0.05	30.75	10.00 ± 0.24	52.94	
	1000	2.85 ± 0.02	43.00	8.13 ± 0.14	61.76	
Ethyl acetate	0	5.00 ± 0.00	0.00	19.69 ± 0.37	0.00	2.20
	10	4.94 ± 0.03	1.25	8.75 ± 0.37	55.56	
	50	4.30 ± 0.08	14.00	7.50 ± 0.36	61.90	
	100	4.04 ± 0.11	19.25	6.25 ± 0.17	68.25	
	500	2.66 ± 0.01	46.75	5.63 ± 0.07	71.43	
	1000	1.96 ± 0.01	60.75	5.31 ± 0.24	73.02	
Methanol	0	5.00 ± 0.00	0.00	21.88 ± 0.43	0.00	21.71
	10	4.94 ± 0.04	1.25	12.50 ± 0.37	42.86	
	50	4.11 ± 0.04	17.75	9.38 ± 0.14	57.14	
	100	3.41 ± 0.01	31.75	7.81 ± 0.22	64.29	
	500	2.31 ± 0.04	53.75	5.63 ± 0.14	74.29	
	1000	1.19 ± 0.03	76.25	4.38 ± 0.14	80.00	

หมายเหตุ: % ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือสร้างสปอร์ = ((R1-R2)/R1) x 100; R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อที่ 0 ppm (ตัวควบคุม), R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อในแต่ละความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตจะพบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ EU04 มีความสามารถในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค *C. coffeanum* ได้มากที่สุด โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.41 ppm และรองลงมา ได้แก่ สารสกัดหยาบชั้น methanol จากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 ซึ่งมีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.65 ppm และสารสกัดหยาบจากชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *T. muroii* EU18 มีค่า ED_{50} เท่ากับ 2.20 ppm และพบว่าสารสกัดที่ได้จากชั้น ethyl acetate น่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์และการเจริญเติบโตของโคโลนีของ *C. coffeanum* ได้เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Boonsang และคณะ (2014) ซึ่งทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อที่แยกได้จากดิน ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *Neosartorya pseudofischeri* KUFA 0060 ฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *Colletotrichum capsici* ที่ความเข้มข้น 100 ppm และสารสกัดหยาบ ethyl acetate จากเชื้อ *Neosartorya quadricinta* KUFA 0064 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง เชื้อราสาเหตุโรค *Phytophthora palmivara* และ *Alternaria* sp. ที่ความเข้มข้น 10 ppm

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *T. muroii* ทั้ง 2 ไอโซเลต พบว่าเชื้อสปีชีส์เดียวกันแต่แตกต่างไอโซเลตกันก็มีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *T. flavus* 20 ไอโซเลต ของธิดา และคณะ (2550) พบว่าเชื้อ *T. flavus* แตกต่างไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค *Phytophthora palmivora* และเชื้ออื่นๆ ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการแยกเชื้อจากดินบริเวณดอยสุเทพ และดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ จากตัวอย่างดินทั้งหมด 25 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต จากตัวอย่างดิน 14 ตัวอย่าง โดยแบ่งได้เป็น 2 สกุล ได้แก่ เชื้อสกุล *Talaromyces* จำนวน 14 ไอโซเลต และเชื้อสกุล *Neosartorya* จำนวน 4 ไอโซเลต และจากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS), *β-tubulin* และ *calmodulin* พบว่าขนาดผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ของเชื้อ *Talaromyces muroii, T. trachyspermus, Neosartorya hiratsukae, N. pseudofischeri* และ *Neosartorya* sp.1 มีขนาดเท่ากับ 577, 591, 606, 588 และ 556 คู่เบส ตามลำดับ และขนาดผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ *β-tubulin* และ *calmodulin* ของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* สามารถใช้ในการระบุสกุลของเชื้อทั้งสองได้ เนื่องจากมีขนาดที่แตกต่างกัน โดยขนาดผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ *β-tubulin* ด้วยไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b ของเชื้อ *Talaromyces muroii, T. trachyspermus, Neosartorya hiratsukae, N. pseudofischeri* และ *Neosartorya* sp.2 มีขนาดเท่ากับ 461, 478, 545, 553 และ 556 คู่เบส ตามลำดับ และขนาดผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ *calmodulin* ด้วยไพรเมอร์ CF1L/CF4 ของเชื้อ *Talaromyces muroii, T. trachyspermus, Neosartorya hiratsukae* และ *N. pseudofischeri* มีขนาดเท่ากับ 701, 749, 733 และ 764 คู่เบส ตามลำดับ และขนาดผลผลิตพีซีอาร์บริเวณ *calmodulin* ด้วยไพรเมอร์ CF1M/CF4 ของเชื้อ *Talaromyces muroii, T. trachyspermus, Neosartorya* sp.1 และ *Neosartorya* sp.2 มีขนาด 703, 756, 766 และ 744 คู่เบส และเมื่อทำการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* รวมทั้งหมด 18 ไอโซเลต สามารถแบ่งได้เป็น จำนวน 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Talaromyces muroii* จำนวน 10 ไอโซเลต (EU02, EU03, EU04, EU07, EU12, EU14, EU16, EU18, EU25 และ EU26) *T. trachyspermus* จำนวน 4 ไอโซเลต (EU01, EU09, EU10 และ EU23) *N. hiratsukae* จำนวน 1 ไอโซเลต (EU06) และ *N. pseudofischeri* จำนวน 1 ไอโซเลต (EU13) *Neosartorya* sp.1 จำนวน 1 ไอโซเลต (EU35) และ *Neosartorya* sp. 2 จำนวน 1 ไอโซเลต (EU36)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่มีต่อการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค *Colletotrichum coffeanum* ในสภาพห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม เป็นระยะเวลา 25 วัน พบว่าเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 และ *T. muroii* EU04 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ที่ดีที่สุดที่ 91.22 และ 90.65 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *N. hiratsukae* EU06 สามารถยับยั้งการสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้น้อยที่สุดที่ 15.37 เปอร์เซ็นต์ และจากการนำสารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol ของเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

T. muroii EU04 และ EU18 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบ ด้วยวิธี poison plate โดยการเลี้ยงเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 0 (ควบคุม), 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm พบว่าสารสกัดหยาบสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *T. muroii* EU04 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารสกัดหยาบ ได้ดีที่สุดที่ ED_{50} เท่ากับ 0.41 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ธิดา เดชฮวบ, เลขา มาโนช, นิพนธ์ วิสารทานนท์, จิระเดช แจ่มสว่าง, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, เสถียร พงศ์ โตอนันต์ และ เอนก กิจเจา. 2550. "ความหลากหลายของรา *Talaromyces* จากดินและผลต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ." หน้า 563-570. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาพืช**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เลขา มาโนช, อรอุมา เจียมจิตต์, ธิดา เดชฮวบ, ผจงจิต ภูจิญญาณ์, ยุพดี เผ่าพันธุ์. 2548. "ชนิดและการแพร่กระจายของเชื้อราจากดินบริเวณน้ำพุร้อน ดินทำการเกษตร และดินจากแหล่งอื่นๆ." หน้า. 737-746 ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: สาขาพืช** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เลขา มาโนช, อรอุมา เพียซ้าย, ธิดา เดชฮวบ, จิตรา เกาะแก้ว, อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์, มะโนรัตน์ สุดสงวน, วิรัตน์ ลิ้มธนาวานิชย์, เสียงแจ่ว พิริยพฤนต์ และ สุวรรณา กลิ่นภู่. 2553. "ความหลากหลายของรา *Emericella*, *Eurotium* และ *Neosartorya* จากดิน." หน้า 635-642. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาพืช**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โองการ วณิชาชีวะ. 2555. "ดีเอ็นเอบาร์โค้ด: เครื่องมือใหม่สำหรับการระบุชนิดทางชีวภาพ" *วารสารวิทยาศาสตร์ มข*. 40(2) : 396-407.

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

Buaboocha, T. Liao, B. and Zielinski, R.E. 2001. "Isolation of cDNA and genomic DNA clones encoding calmodulin-binding protein related to a family of ATPases involved in cell division and vesicle fusion" *Planta*. 212 : 774-781.

Buaruang, J. Manoch, L. Dethoup, T. and Kijjoa, A. 2009. "*In Vitro* efficacy of marine sponge-associated fungal extracts from Ko Samaesan against plant pathogenic fungi." in **The 35th Congress on Science and Technology of Thailand**. Chonburi : Burapha university.

Chakraborty, B.N. Chakraborty, U. Sunar, K. and Dey, P.L. 2011. "RAPD profile and rDNA sequence analysis of *Talaromyces flavas* and *Trichoderma* species." *Indian Journal of Biotechnology*. 10 : 487-495.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Domsch, K.H. Gams, W. and Anderson, T.H. 1993. **Compendium of soil fungi vol.I** London : Academic Press.

Eamvijarn, A. Manoch, L. Visarathanonth, N. and Chamsawarng, C. 2009. "Diversity of *Neosartorya* species from soil and *in vitro* antagonistic test against plant pathogenic fungi" in **Abstracts Book of Asian Mycological Congress 2009 & 11th International Marine and Freshwater Mycology Symposium. National Museum of Natural Science**. Taiwan : Taichung.

Gochenaur, S. 1964. "A modification of the immersion tube method for isolating soil fungi." *Mycologia.* 56 : 921-923.

Gomes, N.M. Bessa, L.J. Buttachon, S. Costa, P.M. Buaruang, J. Dethoup, T. Silva A.M.S. and Kijjoa, A. 2014. "Antibacterial and antibiofilm activities of Tryptoquivalines and Meroditerpenes isolated from the marine-derived fungi *Neosartorya paulistensis*, *N. laciniosa*, *N. tsunodae*, and the soil fungi *N. fischeri* and *N. siamensis*." *Marine Drugs.* 12 : 822-839.

Guarro, J. Gené, J. and Stchigel, A.M. 1999. "Developments in Fungal Taxonomy." *Clinical Microbiology Reviews.* 12(3) : 454–500.

Haggag, W.M. Kansoh, A.L. and Aly, A.M. 2006. "Proteases From *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum* : Purification, Characterization and antifungal activity against brown spot disease on Faba bean." *Plant Pathology Bulletin.* 15 : 231-239.

Hong, S.B. Cho, H-S. Shin, H-D. Frisvad, J.C. and Samson, R.A. 2006. "Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56 : 477-486.

Hong, S.B. Shin, H.D. Hong, J. Frisvad, J.C. Nielsen, P.V. Varga, J. and Samson, R.A. 2008. "New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section Fumigati." *International Journal of General and Molecular Microbiology.* 93(1-2) : 87-98.

Houbraken, J. and Samson, R.A. 2011. "Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families." *Studies in Mycology*. 70 : 1-51.

Hubka, V. and Kolarik, M. 2012. "*β-tubulin* paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences." *Persoonia*. 29 : 1-10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Madi, L. Katan, T. Katan, J. and Henis, Y. 1997. "Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different macchanisms." *Journal of Phytopathology*. 87 : 1054-1060.

Manoch, L. Dethoup, T. Yilmaz, N. Houbraken, J. and Samson, R.A. 2013. "Two new *Talaromyces* species from soil in Thailand." *Mycoscience*. 54 : 335-342.

Miao, F. Yang, R. Chen, D.D. Wang, Y. Qin, B.F Yang, X.J. and Zhou, L. 2012. "Isolation, Identification and antimicrobial activities of two secondary metabolites of *Talaromyces verruculosus*." *Molecules*. 17 : 14091-14098.

Msiska, Z. 2008. "The *ß-tubulin* gene as a mean to discriminate species and verify evolutionary patterns of Arbuscular mycorrhizal fungi." Ph.D. in Agricultural Sciences Thesis of West Virginia University.

Naraghi, L. Heydari, A. Rezaee, S. Razavi, M. and Jahanifar, H. 2010. "Study on antagonistic effects of *Talaromyces flavus* on *Verticillium albo-atrum*, the causal agent of potato wilt disease." *Crop Protection*. 29 : 658-662.

Peterson, S.W. 2008. "Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci." *Mycologia*. 100 : 205-226.

Samson, R. A. Hong, S. Peterson, S. W. Frisvad, J. C. and Varga, J. 2007. "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Nosartorya*." *Studies in Mycology*. 59 : 147-203.

Schmidt, H. Taniwaki, M.H. Vogel R.F. and Niessen L. 2004. "Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples." *Journal of Applied Microbiology*. 97 : 899–909.

Seifert, K.A. 2009. "Progress towards DNA barcoding of fungi." *Molecular Ecology Resources*. 9 : 83-89.

Stolk, A.C. and Samson, R.A. 1972. "Studies on *Talaromyces* and related genera II. The genus *Talaromyces*." *Studies in Mycology*. 2 : 1-65.

Stosz, S.K. Fravel, D.R. and Roberts, D.P. 1996. "*In vitro* analysis of the role of glucose oxidase from *Talaromyces flavus* in biocontrol of the plant pathogen *Verticillium dahlia*." *Applied and Environmental microbiology*. 62(9) : 3183-3186.

Tzean, S.S. Chen, J.L. and Shiu, S.H. 1992. "*Talaromyces unicus* sp. nov. from Taiwan." *Mycologia*. 84 : 739-749.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vilavong, S. and Soytong, K. 2013. "Plant pathogenic fungi and pathogenicity test on Arabica Coffee plantation at Paksong in Lao PDR and preliminary biocontrol test in vitro." 444-452. in Lin, F.C. and Soytong, K. **the 3rd International conference on Integration of science and technology.** Bangkok : faculty of Agricultural technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

Visagie, C.M. Hirooka, Y. Tanney, J.B. Whitfield, E. Mwange, K. Meijer, M. Amend, A.S. Seifert, K.A. and Samson, R.A. 2014. "*Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* isolated from house dust samples collected around the world." *Studies in Mycology*. 78 : 63–139.

Wang, L and Zhuang, W.Y. 2007. "Phylogenetic analyses of *penicillium* based on partial *calmodulin* gene sequences." *Biosystems* 88 : 113-126.

White, T.J. Bruns, T. Lee, S. and Taylor, J. 1990. **PCR Protocols : a guide to methods and applications.** San Diego : Academic Press.

Yaguchi, T. Matsuzawa, T. Tanaka, R. Abliz, P. Hui, Y. and Horie, Y. 2010. "Two new species of *Neosartorya* isolated from soil in Xinjiang, China." *Mycoscience*. 51 : 253–262.

Yilmaz, N. Visagie, C.M. Houbraken, J. Frisvad, J.C. and Samson, R.A. 2014. "Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*." *Studies in Mycology*. 78 : 175-341.

Yim, T. Kanokmedhakul, K. Kanokmedhakul, S. Boonlue, S. and Sanmanoch, W. 2014. "Aszonapyrones from the fungus *Neosartorya tatenoi*." 324-329. in **graduate research conference.** Khon Kaen : Khon Kaen University.

CABI. 2015. CABI databases. [online].available : www.speciesfungorum.org

ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร. 2553. โรคของกาแฟโรบัสต้าในประเทศไทย. [online].available : www.bloggang.com/mainblog.php?id=coffeeis&month=02-11-2010&group=7&gblog=4

[online].available : www.fungalbarcoding.org/

[online].available : www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802030015

[online].available : www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802030010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Potato Dextrose Agar (PDA) 39.0 กรัม
- ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

- ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Potato Dextrose Broth (PDB) 24.0 กรัม
- ละลายอาหารด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมสารละลาย

0.5 M EDTA ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง EDTA 93.06 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิตร ลงในบีกเกอร์ แล้วผสมให้เข้ากันด้วย magnetic bar
- ปรับ pH เท่ากับ 8 โดยใช้กรด-ด่าง แล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

25 mM EDTA ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ตวง 0.5M EDTA ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 475 มิลลิลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10X TBE Buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลตร

- ชั่ง Tris base 108 กรัม Boric acid 55 กรัม ตวง 0.5M EDTA 40 มิลลิลิตร
- ผสมให้ละลายเข้ากัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1X TBE Buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1M Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

- ชั่ง Tris 121 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลตร
- ปรับ pH เท่ากับ 8 ด้วย 1M HCl แล้วปรับปริมาตราสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

TE Buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

- ดูด 0.5 M EDTA 2 มิลลิลิตร และ 1 M Tris-HCl 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร
- นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Ethidium bromide 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ดูด Ethidium bromide ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม 1X TBE Buffer 499.5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

1.25 mM Deoxynucleotides triphosphate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

- ดูด 100 mM Deoxynucleotides triphosphate (dNTPs) จาก stock โดยปิเปต dNTPs จาก stock dATP, dCTP, dGTP และ dTTP 0.625 ไมโครลิตร จะได้ Mix dNTPs จำนวน 2.5 ไมโครลิตร
- เติม Deionized water 47.5 ไมโครลิตร จะทำให้ได้ Mix dNTPs เข้มข้น 1.25 mM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

- สารละลายไพรเมอร์เริ่มต้นมีความเข้มข้น A นาโนโมลต่อไมโครลิตร (A พิโคโมลต่อไมโครลิตร) เตรียมไพรเมอร์ ความเข้มข้น 20 พิโคโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากสูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$
$$(A)V_1 = (20)(50)$$
$$V_1 = (20)(50)/A \text{ ไมโครลิตร}$$

- ดูดสารละลายไพรเมอร์เริ่มต้น ปริมาตร (20)(50)/A ไมโครลิตร และเติม Deionized water 50 - (20)(50)/A ไมโครลิตร
- เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสไลด์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- ใช้ needle ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดชิ้นวุ้นของเชื้อขนาดประมาณ 0.5 x 1 เซนติเมตร
- วางชิ้นวุ้นลงบนสไลด์ ตากชิ้นวุ้นให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- ตัดชิ้นวุ้นที่แห้งแล้วเป็นแว่นๆ ด้วยมีดโกน แล้ววางบนสไลด์
- หยดสีย้อม lactophenol cotton blue ลงบนสไลด์ของชิ้นวุ้นที่ตัดไว้
- ปิดด้วย cover slide แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศ์เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน-วิทยาต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเชื้อส่งวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศ์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

- ใช้ needle ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดชิ้นวุ้นของเชื้อขนาดประมาณ 0.5 x 1 เซนติเมตร
- วางชิ้นวุ้นลงบนสไลด์ ตากชิ้นวุ้นให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
- ตัดชิ้นวุ้นที่แห้งแล้วด้วยมีดโกน จากนั้นวางลงบนสไลด์ที่ตัดให้ได้ขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ที่ติดเทปกาวสองหน้าไว้
- ติดตัวอย่างบนแท่นวาง (stub) ด้วยเทปกาวสองหน้าแล้วนำไปฉาบทอง (sputter coater, Balzers model SCD 040, Liechtenstein)
- ส่องดูด้วยกล้อง SEM (JEOL, model JSM-5410LV, Japan)

การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคด้วย hemacytometer

- ใช้ needle ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ขูดผิวหน้าโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคทั้งหมด และจะขูดเฉพาะบริเวณที่เป็นโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค สำหรับการทดสอบแบบ bi-culture
- บดด้วยแท่งแก้ว แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- ดูดสปอร์มาหยอดลงในแอ่งของ hemacytometer ทั้ง 2 ด้าน ด้านละ 10 ไมโครลิตร
- นับสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับสปอร์ที่อยู่ใน 5 ช่องใหญ่ของ hemacytometer ของแต่ละด้าน แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยของสปอร์ที่นับได้
- คำนวณจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร ดังสูตรต่อไปนี้

  จำนวนสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)

  = ค่าเฉลี่ยของสปอร์ x 10^4 x ค่าความเจือจาง (dilution factor)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดหยาบเพื่อทำการทดสอบแบบ poison plate

- ชั่งสารสกัดหยาบ 0.3, 1.5, 3, 15 และ 30 มิลลิกรัม ละลายด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ DMSO
- ผสมสารสกัดหยาบที่ละลายแล้วกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm
- นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อ autoclave ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลงบนจานเพาะเลี้ยงขนาด 5 เซนติเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 6 ซ้ำ โดยนำมาใช้ในการบันทึกถ่ายภาพเพียง 4 ซ้ำ
- รอจนกว่าอาหารจะแข็งและนำไปใช้เลี้ยงเชื้อสาเหตุโรค เพื่อทำการทดสอบแบบ poison plate ต่อไป

ตัวอย่างการคำนวณน้ำหนักสารสกัดหยาบต่ออาหาร PDA ที่ใช้ทดสอบแบบ poison plate

- 1 ppm เท่ากับ 1 mg/l

เช่น ถ้าต้องการความเข้มข้น 10 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 30 ml คำนวณดังนี้

10 ppm = 10 mg/l =10 mg/1000 ml

ถ้าอาหาร PDA 1,000 ml ใช้สารสกัด 10 mg

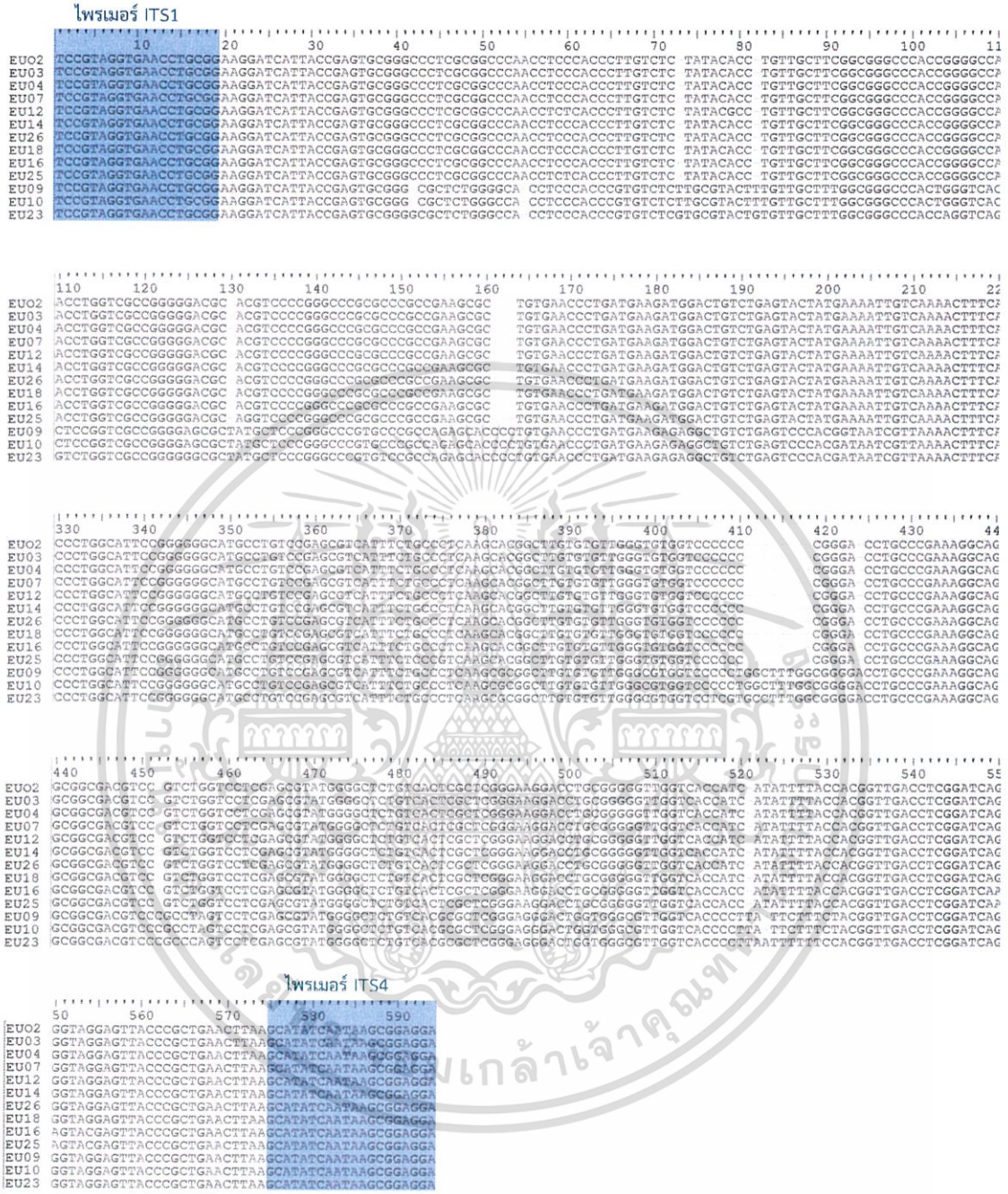
ดังนั้นอาหาร PDA 30 ml ใช้สารสกัด = (10 x 30)/1,000 = 0.3 mg

การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

- ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีด้วย Vernier
- วัด 2 แกนที่ตัดฉากกัน แล้วทำการหาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี

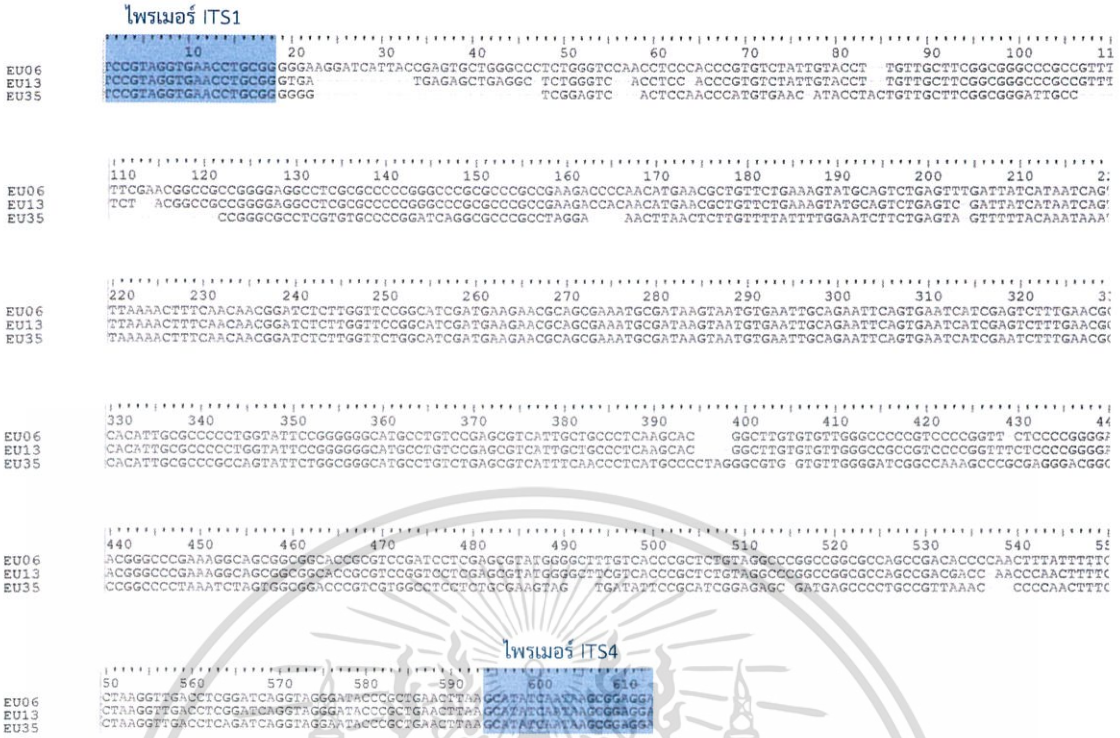
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข



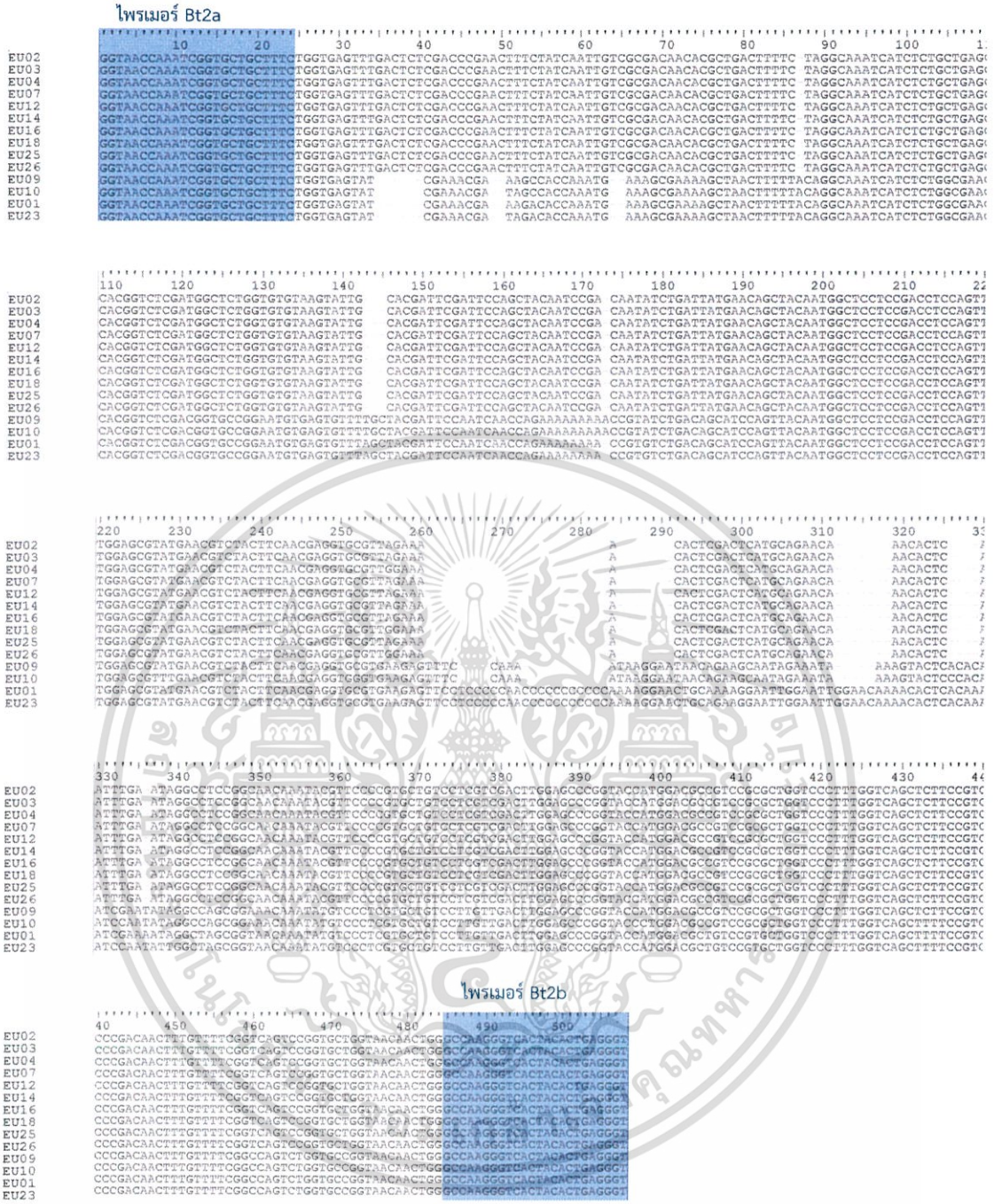
รูปภาคผนวกที่ข-1 แสดงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งจับไพรเมอร์ ITS1/ITS4 จากบริเวณ ITS ของเชื้อสกุล *Talaromyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



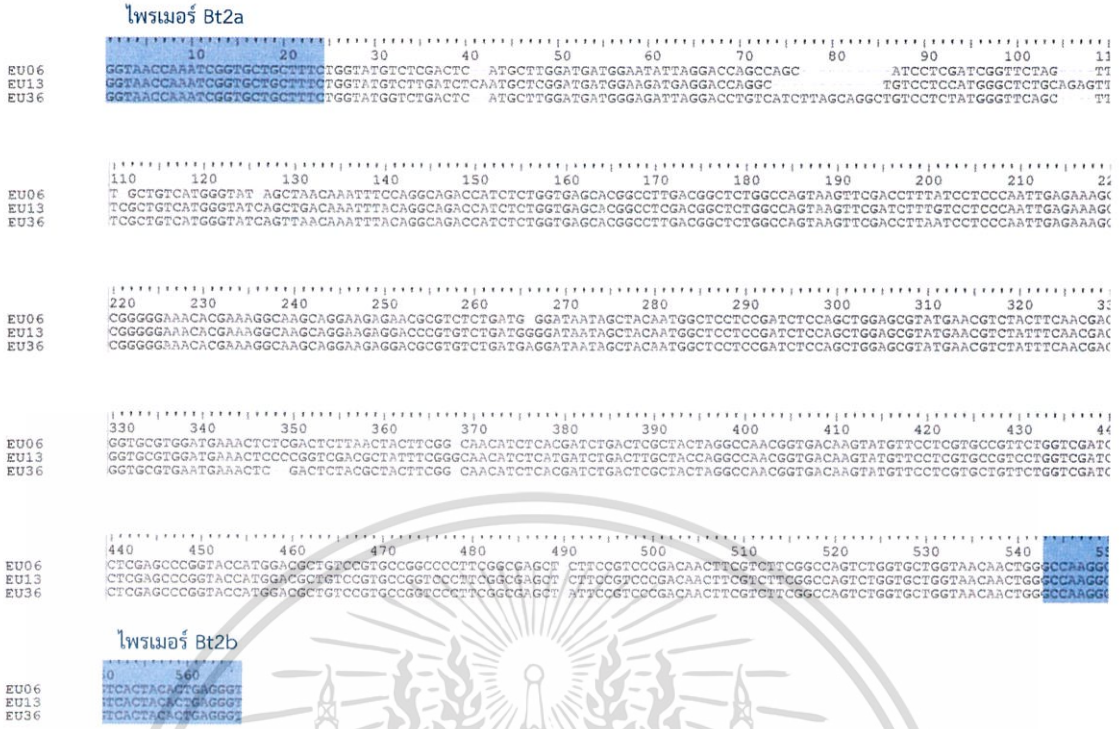
รูปภาคผนวกที่ข-2 แสดงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งจับไพรเมอร์ ITS1/ITS4 จากบริเวณ ITS ของเชื้อสกุล *Neosartorya*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



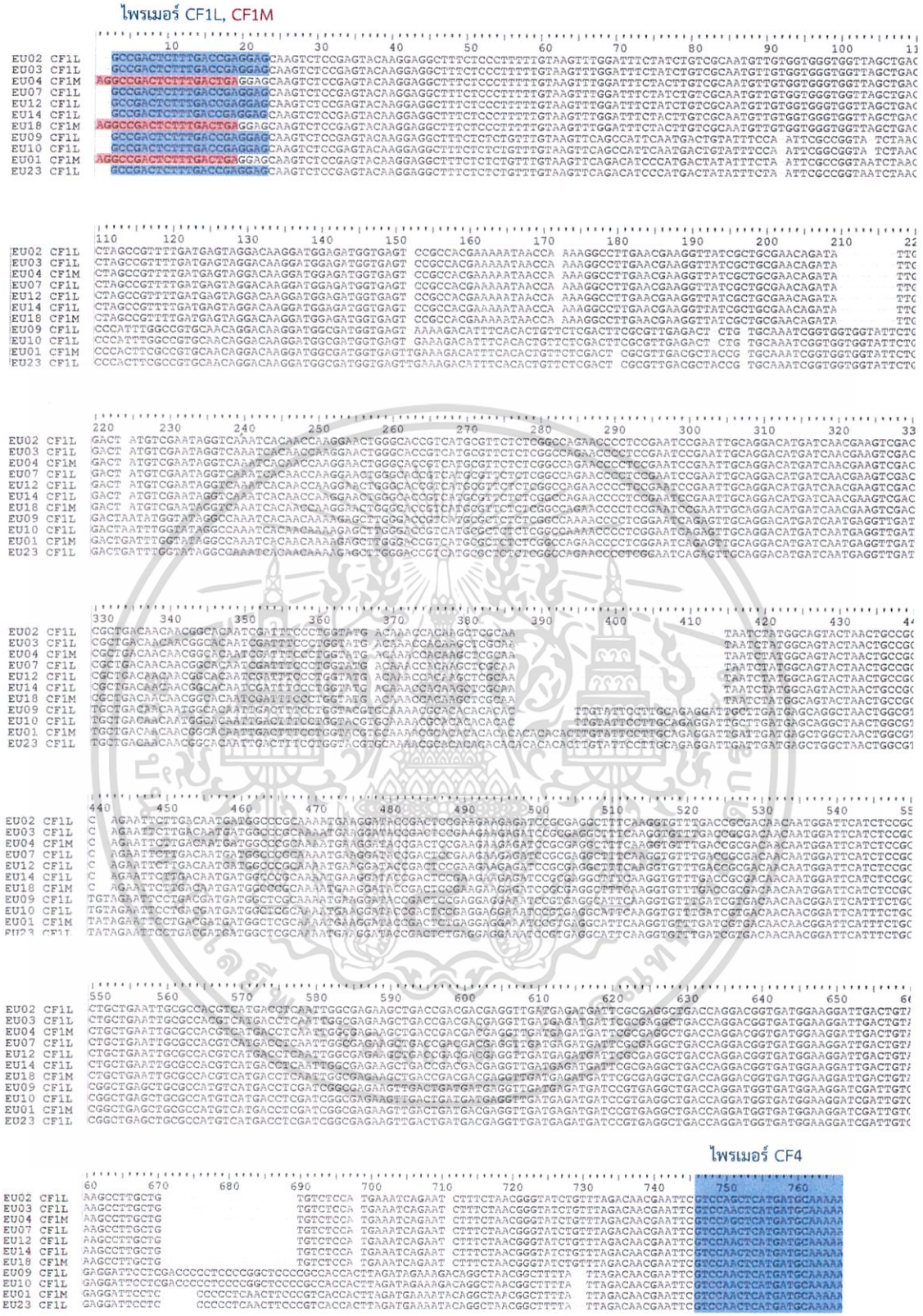
รูปภาคผนวกที่ข-3 แสดงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งจับไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b จากบริเวณ *β-tubulin* ของเชื้อสกุล *Talaromyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



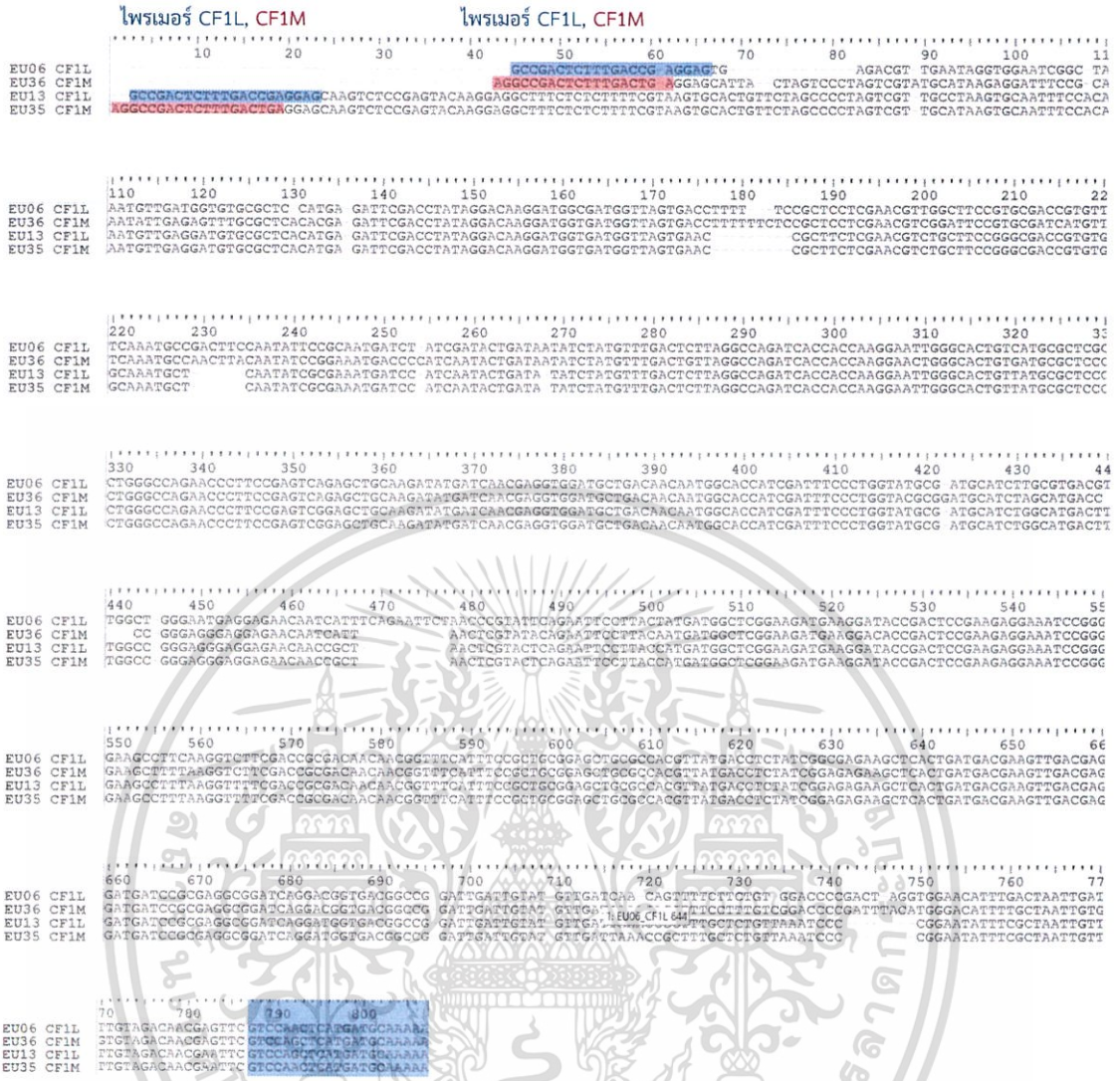
รูปภาคผนวกที่ข-4 แสดงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งจับไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b จากบริเวณ *β-tubulin* ของเชื้อสกุล *Neosartorya*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ข-5 แสดงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งจับไพรเมอร์ CF1L/CF4 และ CF1M/CF4 จากบริเวณ *Calmodulin* ของเชื้อสกุล *Talaromyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ข-6 แสดงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งจับไพรเมอร์ CF1L/CF4 และ CF1M/CF4 จากบริเวณ *Calmodulin* ของเชื้อสกุล *Neosartorya*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวกที่ ค-1 ANOVA ของการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ต่อการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค *Colletotrichum coffeanum* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

Descriptives

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสปอร์

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
EU06	3	15.3700	.52678	.30414	14.0614	16.6786	14.82	15.87
EU13	3	68.4500	.65383	.37749	66.8258	70.0742	67.70	68.90
EU03	3	76.2133	.46372	.26773	75.0614	77.3653	75.81	76.72
EU23	3	51.8800	1.42566	.82310	48.3385	55.4215	50.43	53.28
EU10	3	49.8967	1.57001	.90645	45.9965	53.7968	48.57	51.63
EU09	3	91.2233	.09609	.05548	90.9846	91.4620	91.12	91.31
EU04	3	90.6533	.43108	.24889	89.5825	91.7242	90.27	91.12
EU05	3	92.4900	.92504	.53407	90.1921	94.7879	91.73	93.52
EU07	3	74.3933	1.82352	1.05281	69.8635	78.9232	72.29	75.53
EU25	3	75.8000	.60622	.35000	74.2941	77.3059	75.45	76.50
EU26	3	81.8900	2.26502	1.30771	76.2634	87.5166	80.28	84.48
EU18	3	80.2800	.96234	.55561	77.8894	82.6706	79.44	81.33
EU16	3	84.9467	4.26301	2.46125	74.3568	95.5366	80.43	88.90
EU35	3	71.5867	1.21253	.70006	68.5746	74.5988	70.55	72.92
EU36	3	67.6400	1.55560	.89813	63.7757	71.5043	66.11	69.22
Total	45	71.5142	19.65033	2.92930	65.6106	77.4178	14.82	93.52

Test of Homogeneity of Variances

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสปอร์

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.913	14	30	.007

ANOVA

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสปอร์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16913.407	14	1208.100	473.385	.000
Within Groups	76.561	30	2.552		
Total	16989.968	44			

Homogeneous Subsets

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Post Hoc Tests

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสปอร์

Duncan[a]

เชื้อ	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
EU06	3	15.3700							
EU10	3		49.8967						
EU23	3		51.8800						
EU36	3			67.6400					
EU13	3			68.4500					
EU35	3				71.5867				
EU07	3					74.3933			
EU25	3					75.8000			
EU03	3					76.2133			
EU18	3						80.2800		
EU26	3						81.8900		
EU16	3							84.9467	
EU04	3								90.6533
EU09	3								91.2233
EU05	3								92.4900
Sig.		1.000	.139	.539	1.000	.198	.227	1.000	.194

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-2 probit analysis ของผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น hexane จากเชื้อ *T. muroii* EU04 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

Probit Analysis - Finney Method [Lognormal Distribution]

Log10[Dose (Stimulus)]	Actual Percent (%)	Probit Percent(%)	N	R	E(R)	Difference	Chi-square
1	0.5556	0.5562	281250	156,250	156,444.8144	-194.8144	0.2426
1.699	0.6222	0.6357	281250	175,000	178,784.4581	-3,784.4581	80.1083
2	0.6889	0.6684	281250	193,750	187,979.3759	5,770.6241	177.1476
2.699	0.7333	0.7392	281250	206,250	207,900.5046	-1,650.5046	13.1032
3	0.7667	0.7671	281250	215,625	215,750.8696	-125.8696	0.0734

Chi-square

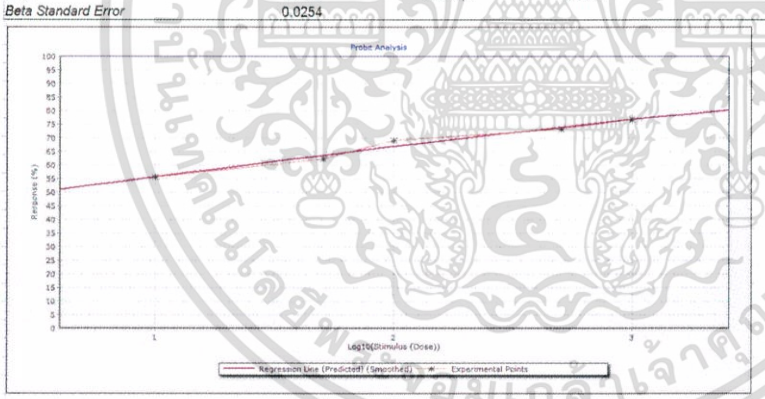
Chi-square	270.6752
Degrees Of Freedom	3
p-level	0

Dose (Stimulus) Percentile

Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error	LCL	UCL
1	2.6732	-7.3967	0.8849	0	0	0	0
5	3.3548	-5.078	0.6686	0	0.0000	0	0.0003
10	3.7183	-3.8415	0.5535	0.0001	0.0002	0	0.0027
16	4.0056	-2.8641	0.4628	0.0014	0.0017	0.0000	0.0161
20	4.1585	-2.3438	0.4146	0.0045	0.005	0.0001	0.0414
25	4.3258	-1.7747	0.362	0.0168	0.0157	0.0006	0.1162
30	4.476	-1.2638	0.3151	0.0545	0.0431	0.0029	0.2941
40	4.7471	-0.3417	0.2312	0.4553	0.254	0.0535	1.5828
50	5	0.5188	0.1554	3.3019	1.2071	0.7946	7.7501
60	5.2529	1.3792	0.0885	23.9444	4.9147	11.0673	40.4975
70	5.524	2.3013	0.0689	200.1449	31.9002	127.1058	349.0112
75	5.6742	2.8123	0.0973	649.0256	146.5614	368.8518	1,533.8814
80	5.8415	3.3813	0.1417	2,405.9364	799.1759	1,099.0759	8,769.9204
84	5.9944	3.9017	0.1865	7,973.5426	3,529.9389	2,895.1554	44,508.2034
90	6.2817	4.879	0.2742	75,688.8316	51,029.1599	17,379.9277	966,366.2765
95	6.6452	6.1156	0.3877	1,304,824.652	1,325,876.9481	164,752.4783	48,330,494.0571
99	7.3268	8.4342	0.6029	271,754,673.5599	510,599,071.3	10,990,636.1119	75,439,228,459.4614

Regression Statistics

LD50	**3.3019**	**LD50 Standard Error**	**1.2071**
LD50 LCL	0.7946	*LD50 UCL*	7.7501
Log10[LD50]	0.5188	*Standard Error*	0.1554
Beta	0.294	*Intercept*	4.8475
Beta Standard Error	0.0254		



Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]

Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)
10	0.5556	281,250	5.1394	4.8606
50	0.6222	281,250	5.3109	4.6891
100	0.6889	281,250	5.4923	4.5077
500	0.7333	281,250	5.6226	4.2548
1,000	0.7667	281,250	5.7277	4.0447

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-3 probit analysis ของผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *T. muroii* EU04 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

Alpha value (for confidence interval)	0.001

Probit Analysis - Finney Method [Lognormal Distribution]

Log10[Dose (Stimulus)]	Actual Percent (%)	Probit Percent(%)	N	R	E(R)	Difference	Chi-square
1	0.6316	0.6257	237500	150,000	148,592.1043	1,407.8957	13.3397
1.699	0.6579	0.6851	237500	156,250	162,723.0767	-6,473.0767	257.4971
2	0.7368	0.7095	237500	175,000	168,498.4411	6,501.5589	250.8644
2.699	0.75	0.7623	237500	178,125	181,038.914	-2,913.914	46.9009
3	0.7895	0.7833	237500	187,500	186,027.7415	1,472.2585	11.6517

Chi-square

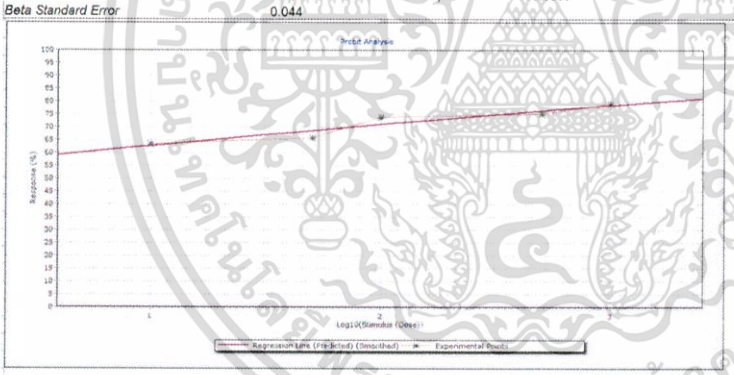
Chi-square	580.2539
Degrees Of Freedom	3
p-level	0

Dose (Stimulus) Percentile

Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error	LCL	UCL
1	2.6732	-10.4361	3.7345	0	0	0	0
5	3.3548	-7.4916	2.8546	0	0.0000	0	0.0001
10	3.7183	-5.9213	2.3857	0	0.0001	0	0.0012
16	4.0056	-4.6801	2.0154	0.0000	0.0011	0	0.0074
20	4.1585	-4.0192	1.8185	0.0001	0.0031	0	0.0193
25	4.3258	-3.2966	1.6033	0.0005	0.0101	0	0.0549
30	4.476	-2.6478	1.4104	0.0023	0.0289	0	0.1405
40	4.7471	-1.4767	1.0634	0.0334	0.1916	0	0.7733
50	5	-0.384	0.7425	0.413	1.104	0.0001	3.879
60	5.2529	0.7087	0.4308	5.1135	5.9456	0.0378	20.8179
70	5.524	1.8798	0.1761	75.82	31.6022	17.0684	225.5236
75	5.6742	2.5286	0.2261	337.769	183.9336	124.5483	3,423.6104
80	5.8415	3.2512	0.4028	1,783.3878	1,901.8376	469.4126	171,874.8187
84	5.9944	3.9121	0.588	8,167.3758	14,760.9865	1,328.6248	7,338,643.5313
90	6.2817	5.1533	0.9496	142,331.2354	825,760.1424	8,476.6137	9,371,028,979.8194
95	6.6452	6.7236	1.4144	5,291,890.0131	68,608,526.9761	83,795.638	84,087,010,055,946.7188
99	7.3268	9.6681	2.2916	4,657,283,246.3763	455,712,438,160.786	5,903,345.8512	2.26379900131937E21

Regression Statistics

LD50	**0.413**	**LD50 Standard Error**	**1.104**
LD50 LCL	0.0001	*LD50 UCL*	3.879
Log10[LD50]	-0.384	*Standard Error*	0.7425
Beta	0.2315	*Intercept*	5.0889
Beta Standard Error	0.044		



Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]

Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)
10	0.6316	237,500	5.3356	4.6844
50	0.6579	237,500	5.4063	4.5937
100	0.7368	237,500	5.6333	4.2334
500	0.75	237,500	5.6742	4.1516
1,000	0.7895	237,500	5.8044	3.8912

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-4 probit analysis ของผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น methanol จากเชื้อ *T. muroii* EU04 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

Alpha value (for confidence interval) 0.001

Probit Analysis - Finney Method [Lognormal Distribution]

Log10[Dose (Stimulus)]	Actual Percent (%)	Probit Percent(%)	N	R	E(R)	Difference	Chi-square
1	0.5758	0.5968	206250	118.750	123,096.4198	-4,346.4198	153.468
1.699	0.6667	0.6476	206250	137.500	133,558.9886	3,941.0114	116.29
2	0.6818	0.6687	206250	140.625	137,915.139	2,709.861	53.2454
2.699	0.7273	0.7156	206250	150.000	147,594.9331	2,405.0669	39.1907
3	0.7121	0.7348	206250	146.875	151,551.876	-4,676.876	144.3279

Chi-square

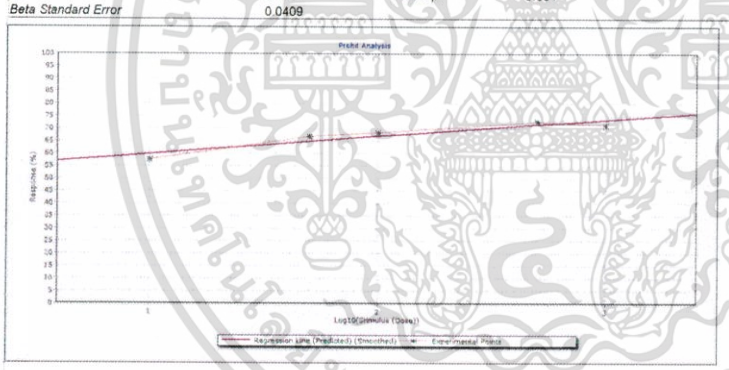
Chi-square	506.522
Degrees Of Freedom	3
p-level	0

Dose (Stimulus) Percentile

Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error	LCL	UCL
1	2.6732	-12.4575	5.8072	0	0	0	0
5	3.3548	-8.8912	4.3816	0	0.0000	0	0.0000
10	3.7183	-6.9893	3.6218	0	0.0002	0	0.0005
16	4.0056	-5.486	3.0215	0	0.0017	0	0.0039
20	4.1585	-4.6856	2.7022	0.0000	0.0052	0	0.0117
25	4.3258	-3.8104	2.3532	0.0002	0.0174	0	0.0393
30	4.476	-3.0245	2.0402	0.0009	0.0518	0	0.1163
40	4.7471	-1.6062	1.4769	0.0248	0.3708	0	0.8362
50	5	-0.2827	0.9557	0.5215	2.3257	0	5.441
60	5.2529	1.0407	0.454	10.9827	13.6911	0.0527	40.861
70	5.524	2.4591	0.266	287.7735	187.4605	93.1816	4,591.3937
75	5.6742	3.2449	0.5225	1,757.4901	2,662.4913	417.7333	882,817.0762
80	5.8415	4.1201	0.8549	13,185.7927	46,286.1956	1,576.4065	434,951,785.5586
84	5.9944	4.9205	1.1681	83,268.9484	610,238.6954	4,968.2186	134,802,534,754.2159
90	6.2817	6.4238	1.7631	2,653,335.5342	76,862,733.1961	40,795.0802	6,774,352,955,946,252
95	6.6452	8.3257	2.5202	211,682,201.2493	35,067,042,272.1003	566,948.6468	6.20021488571713E21
99	7.3268	11.892	3.9439	779,761,265,935.1117	3,426,521,239,011,884.5	76,610,795.2496	9.62516366186526E32

Regression Statistics

LD50	0.5215	**LD50 Standard Error**	2.3257
LD50 LCL	0	*LD50 UCL*	5.441
Log10[LD50]	-0.2827	*Standard Error*	0.9557
Beta	0.1911	*Intercept*	5.054
Beta Standard Error	0.0409		



Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]

Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)
10	0.5758	206,250	5.1907	4.8093
50	0.6667	206,250	5.4303	4.5697
100	0.6818	206,250	5.4724	4.5276
500	0.7273	206,250	5.6042	4.2915
1,000	0.7121	206,250	5.5592	4.3816

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-5 probit analysis ของผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น hexane จากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

Alpha value (for confidence interval) 0.001

Probit Analysis - Finney Method [Lognormal Distribution]

Log10[Dose (Stimulus)]	Actual Percent (%)	Probit Percent(%)	N	R	E(R)	Difference	Chi-square
1	0.4118	0.4501	212500	87,500	95,639.0883	-8,139.0883	692.6536
1.699	0.6176	0.5761	212500	131,250	122,414.3781	8,835.6219	637.7373
2	0.6618	0.6287	212500	140,625	133,606.87	7,018.13	368.6498
2.699	0.7059	0.7408	212500	150,000	157,422.5742	-7,422.5742	349.9791

Chi-square

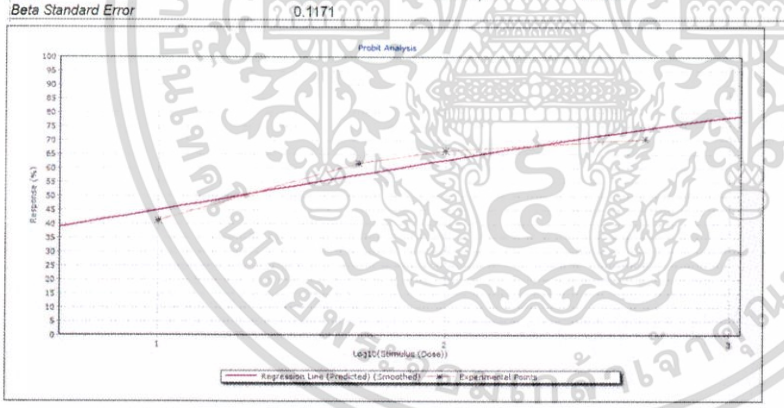
Chi-square	2,049.0198
Degrees Of Freedom	2
p-level	0

Dose (Stimulus) Percentile

Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error	LCL	UCL
1	2.6732	-3.8486	1.4695	0.0001	0.0021	0	298.4489
5	3.3548	-2.3473	1.0853	0.0045	0.0272	0	210.309
10	3.7183	-1.5467	0.8815	0.0284	0.1062	0	176.325
16	4.0056	-0.9139	0.7214	0.1219	0.3094	0.0001	155.0055
20	4.1585	-0.577	0.6368	0.2649	0.5433	0.0005	145.6579
25	4.3258	-0.2086	0.5452	0.6186	0.9973	0.0028	137.2069
30	4.476	0.1222	0.464	1.3251	1.7011	0.0133	131.5306
40	4.7471	0.7193	0.3231	5.2396	4.2674	0.2134	128.6749
50	5	1.2764	0.2088	18.8979	9.4406	2.3872	149.605
60	5.2529	1.8335	0.1553	68.1595	24.893	14.6335	317.4716
70	5.524	2.4306	0.2215	269.5158	143.4804	30.0309	2,418.8006
75	5.6742	2.7614	0.2886	577.282	412.4627	33.0823	10,073.5029
80	5.8415	3.1298	0.3722	1,348.3819	1,302.3762	33.7444	53,879.584
84	5.9944	3.4667	0.4526	2,929.1059	3,636.2462	33.0419	259,660.2263
90	6.2817	4.0996	0.6085	12,576.4961	23,980.3455	30.2795	5,223,606.3077
95	6.6452	4.9002	0.8099	79,463.8422	250,290.1479	26.023	242,650,391.4659
99	7.3268	6.4014	1.1921	2,520,053.3062	19,530,745.9291	18.6918	339,757,398,389.9122

Regression Statistics

LD50	**18.8979**	**LD50 Standard Error**	**9.4406**
LD50 LCL	2.3872	*LD50 UCL*	149.605
Log10[LD50]	1.2764	*Standard Error*	0.2088
Beta	0.454	*Intercept*	4.4205
Beta Standard Error	0.1171		



Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]

Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)
10	0.4118	212,500	4.7774	4.7774
50	0.6176	212,500	5.2989	4.7011
100	0.6618	212,500	5.4168	4.5832
500	0.7059	212,500	5.541	4.418

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-6 probit analysis ของผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

Alpha value (for confidence interval) 0.001

Probit Analysis - Finney Method [Lognormal Distribution]

Log10[Dose (Stimulus)]	Actual Percent (%)	Probit Percent(%)	N	R	E(R)	Difference	Chi-square
1	0.4103	0.4813	243750	100.000	117,305.8897	-17,305.8897	2,553.1013
1.699	0.6923	0.6128	243750	168.750	149,376.9997	19,373.0003	2,512.5229
2	0.7179	0.6666	243750	175.000	162,472.5569	12,527.4431	965.9282
2.699	0.7308	0.7776	243750	178.125	189,540.6303	-11,415.6303	687.5392
3	0.8077	0.818	243750	196.875	199,392.0181	-2,517.0181	31.7735

Chi-square

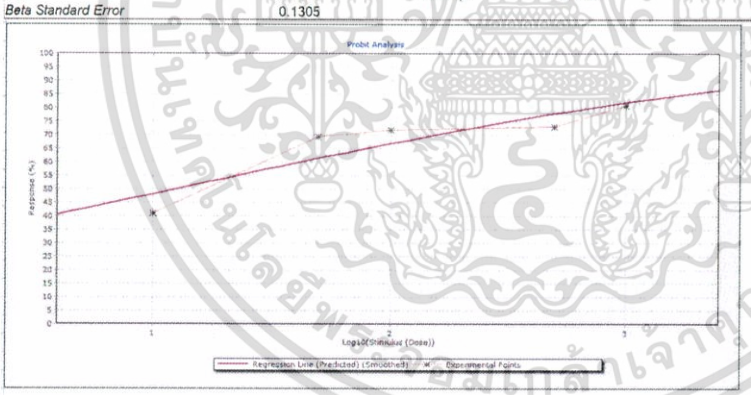
Chi-square	6,750.8652
Degrees Of Freedom	3
p-level	0

Dose (Stimulus) Percentile

Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error	LCL	UCL
1	2.6732	-3.7752	6.4876	0.0002	257.8768	0	0.089
5	3.3548	-2.3476	4.8912	0.0045	174.8296	0	0.5312
10	3.7183	-1.5862	4.0411	0.0259	142.5092	0	1.39
16	4.0056	-0.9844	3.3703	0.1036	121.5786	0	2.9989
20	4.1585	-0.664	3.0139	0.2167	111.8971	0	4.5391
25	4.3258	-0.3137	2.625	0.4856	102.3895	0	7.186
30	4.476	0.0009	2.2769	1.002	94.7844	0	10.9442
40	4.7471	0.5687	1.6535	3.7039	83.3544	0	24.2342
50	5	1.0985	1.0856	12.5445	75.8708	0	56.2791
60	5.2529	1.6282	0.5729	42.4858	73.7817	0.0443	195.9461
70	5.524	2.196	0.4473	157.0434	191.8939	23.6924	16,640.9004
75	5.6742	2.5106	0.6912	324.0407	762.829	77.3878	1,939,721.4575
80	5.8415	2.861	1.0392	726.0317	3,939.5978	165.4361	879,037,253.0128
84	5.9944	3.1814	1.3786	1,518.2867	18,119.2943	283.6648	168,296,386,242.5072
90	6.2817	3.7831	2.0345	6,069.3509	328,512.4408	682.4846	6,046,472,357,505,374
95	6.6452	4.5445	2.8767	35,033.796	13,186,630.814	1,892.4329	3.8388053627575E21
99	7.3268	5.9721	4.4674	937,779.7428	13,755,333,464.788	11,775.707	3.17338177769757E32

Regression Statistics

LD50	**12.5445**	**LD50 Standard Error**	**75.8708**
LD50 LCL	0	*LD50 UCL*	56.2791
Log10[LD50]	1.0985	*Standard Error*	1.0856
Beta	0.4774	*Intercept*	4.4756
Beta Standard Error	0.1305		



Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]

Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)
10	0.4103	243,750	4.7735	4.7735
50	0.6923	243,750	5.502	4.496
100	0.7179	243,750	5.5764	4.3472
500	0.7308	243,750	5.6148	4.2704
1,000	0.8077	243,750	5.8693	3.7614

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-7 probit analysis ของผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น methanol จากเชื้อ *T. trachyspermus* EU09 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

Alpha value (for confidence interval)	0.001

Probit Analysis - Finney Method [Lognormal Distribution]

Log10[Dose (Stimulus)]	Actual Percent (%)	Probit Percent(%)	N	R	E(R)	Difference	Chi-square
1	0.6071	0.614	262500	159,375	161,179.5468	-1,804.5468	20.2035
1.699	0.6786	0.6774	262500	178,125	177,806.4967	318.5033	0.5705
2	0.7143	0.7032	262500	187,500	184,602.3325	2,897.6675	45.4841
2.699	0.7619	0.7594	262500	200,000	199,334.9131	665.0869	2.2191
3	0.7738	0.7816	262500	203.125	205,178.598	-2,053.598	20.5541

Chi-square

Chi-square	89.0314
Degrees Of Freedom	3
p-level	0

Dose (Stimulus) Percentile

Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error	LCL	UCL
1	2.6732	-9.7256	0.8392	0	0	0	0
5	3.3548	-6.9318	0.6406	0	0	0	0
10	3.7183	-5.4419	0.5348	0	0	0	0.0001
16	4.0056	-4.2642	0.4513	0.0001	0.0001	0	0.0007
20	4.1585	-3.6371	0.4069	0.0002	0.0002	0	0.0024
25	4.3258	-2.9515	0.3585	0.0011	0.001	0.0000	0.0088
30	4.476	-2.3359	0.3151	0.0046	0.0036	0.0003	0.0284
40	4.7471	-1.2247	0.2372	0.0596	0.0342	0.0073	0.2347
50	5	-0.1879	0.1657	0.6487	0.2535	0.15	1.7004
60	5.2529	0.8489	0.0977	7.0609	1.6026	3.0195	12.6465
70	5.524	1.96	0.0499	91.1993	10.5048	62.7657	130.4298
75	5.6742	2.5756	0.0631	376.376	54.8458	252.1661	635.3671
80	5.8415	3.2613	0.1008	1,825.0126	427.4403	1,001.9169	4,389.1707
84	5.9944	3.8883	0.1414	7,731.8371	2,562.4121	3,383.5122	26,874.9557
90	6.2817	5.066	0.222	116,406.725	62,118.2006	32,247.327	833,804.5732
95	6.6452	6.5559	0.3263	3,596,865.7744	2,964,122.902	548,815.0114	65,476,674.6679
99	7.3268	9.3498	0.524	2,237,448,618.3904	3,403,649,277.3156	109,968,395.1806	237,567,369,862.9444

Regression Statistics

LD50	0.6487	**LD50 Standard Error**	0.2535
LD50 LCL	0.15	*LD50 UCL*	1.7004
Log10[LD50]	-0.1879	*Standard Error*	0.1657
Beta	0.244	*Intercept*	5.0458
Beta Standard Error	0.0166		

Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]

Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)
10	0.6071	262,500	5.2715	4.7285
50	0.6786	262,500	5.4633	4.5367
100	0.7143	262,500	5.5656	4.3689
500	0.7619	262,500	5.7122	4.0757
1,000	0.7738	262,500	5.7512	3.9976

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-8 probit analysis ของผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น hexane จากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

Alpha value (for confidence interval)	0.001

Probit Analysis - Finney Method [Lognormal Distribution]

Log10[Dose (Stimulus)]	Actual Percent (%)	Probit Percent(%)	N	R	E(R)	Difference	Chi-square
1	0.4118	0.402	212500	87.500	85,433.2838	2,066.7162	49.9959
1.699	0.4559	0.4671	212500	96.875	99,251.4196	-2,376.4196	56.8996
2	0.5	0.4955	212500	106.250	105,283.254	966.746	8.877
2.699	0.5294	0.5612	212500	112.500	119,255.7196	-6,755.7196	382.7049
3	0.6176	0.5891	212500	131.250	125,186.6337	6,063.3663	293.6768

Chi-square

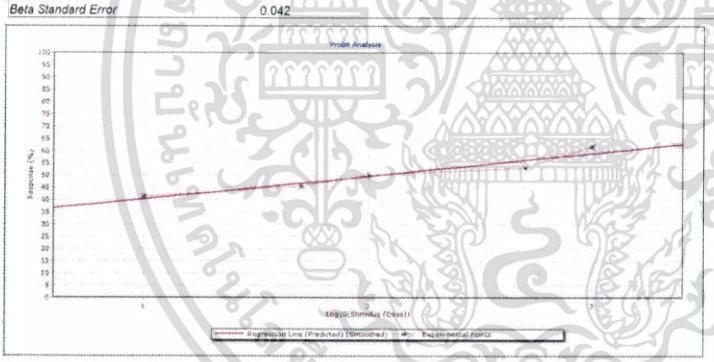
Chi-square	792.1542
Degrees Of Freedom	3
p-level	0

Dose (Stimulus) Percentile

Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error	LCL	UCL
1	2.6732	-7.7832	2.5789	0	0	0	0.0001
5	3.3548	-4.9033	1.8291	0.0000	0.0004	0	0.0044
10	3.7183	-3.3675	1.4301	0.0004	0.0058	0	0.0422
16	4.0056	-2.1536	1.1156	0.007	0.0455	0	0.2564
20	4.1585	-1.5072	0.9488	0.0311	0.1364	0	0.6726
25	4.3258	-0.8005	0.7673	0.1583	0.4497	0.0000	1.9447
30	4.476	-0.1659	0.6059	0.6825	1.2926	0.0007	5.1021
40	4.7471	0.9795	0.3255	9.5382	7.8362	0.2673	31.5256
50	5	2.0482	0.1533	111.7338	40.2776	35.0942	332.0005
60	5.2529	3.1169	0.3109	1,308.8957	1,019.1913	411.3664	39,167.7812
70	5.524	4.2623	0.5898	18,291.6451	33,210.3322	2,569.9474	14,561,679.8779
75	5.6742	4.8968	0.751	78,856.9377	215,212.8781	6,753.2062	406,038,294.2608
80	5.8415	5.6036	0.9323	401,417.7507	1,693,934.6237	19,541.9981	16,754,945,098.2494
84	5.9944	6.2499	1.0991	1,777,955.4946	11,096,479.4237	51,295.5404	506,369,058,601.5101
90	6.2817	7.4639	1.4135	29,099,168.26	376,450,455.6941	311,393.9652	308,214,499,353,213.812
95	6.6452	8.9997	1.8125	999,323,427.5687	32,441,249,369.3438	3,022,670.2887	1.03584937156416E18
99	7.3268	11.8796	2.5623	757,816,737,205.5469	138,297,295,940,274.719	212,012,352.0283	4.29268078178366E24

Regression Statistics

LD50	**111.7338**	**LD50 Standard Error**	**40.2776**
LD50 LCL	35.0942	*LD50 UCL*	332.0005
Log10[LD50]	2.0482	*Standard Error*	0.1533
Beta	0.2367	*Intercept*	4.5153
Beta Standard Error	0.042		



Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]

Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)
10	0.4118	212,500	4.7774	4.7774
50	0.4559	212,500	4.8894	4.8894
100	0.5	212,500	5	5
500	0.5294	212,500	5.0736	4.9264
1,000	0.6176	212,500	5.2989	4.7011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-9 probit analysis ของผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

Alpha value (for confidence interval) 0.001

Probit Analysis - Finney Method [Lognormal Distribution]

Log10[Dose (Stimulus)]	Actual Percent (%)	Probit Percent(%)	N	R	E(R)	Difference	Chi-square
1	0.5556	0.5631	196875	109,375	110,858.4537	-1,483.4537	19.8509
1.699	0.619	0.6283	196875	121,875	123,703.7647	-1,828.7647	27.0354
2	0.6825	0.6555	196875	134,375	129,042.0253	5,332.9747	220.3981
2.699	0.7143	0.7152	196875	140,625	140,810.4825	-185.4825	0.2443
3	0.7302	0.7394	196875	143,750	145,560.1717	-1,810.1717	22.5111

Chi-square

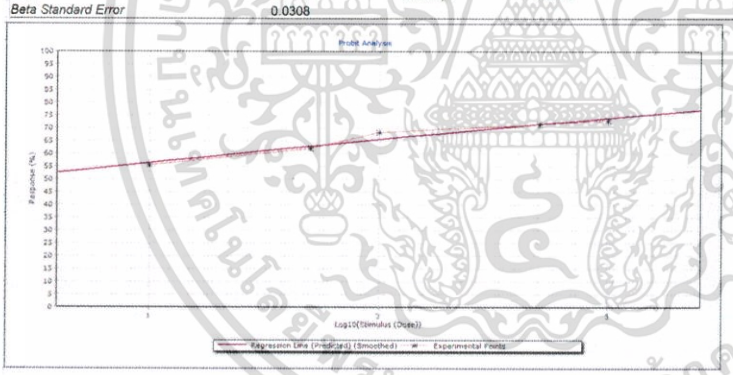
Chi-square	290.0398
Degrees Of Freedom	3
p-level	0

Dose (Stimulus) Percentile

Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error	LCL	UCL
1	2.6732	-9.3021	1.7405	0	0	0	0
5	3.3548	-6.4771	1.3087	0	0	0	0.0001
10	3.7183	-4.9706	1.0788	0.0000	0.0001	0	0.0012
16	4.0056	-3.7798	0.8974	0.0002	0.0006	0	0.0083
20	4.1585	-3.1458	0.801	0.0007	0.0022	0	0.0237
25	4.3258	-2.4525	0.6957	0.0035	0.0084	0	0.0742
30	4.476	-1.8301	0.6015	0.0148	0.0277	0.0000	0.2072
40	4.7471	-0.7066	0.4328	0.1965	0.2299	0.0024	1.3353
50	5	0.3418	0.279	2.1968	1.5105	0.1308	7.8061
60	5.2529	1.3901	0.1413	24.5536	8.1301	6.4725	51.3196
70	5.524	2.5136	0.1231	326.2988	93.7348	164.119	996.7538
75	5.6742	3.1361	0.1949	1,368.0372	634.7315	540.246	9,394.8786
80	5.8415	3.8294	0.2912	6,751.0789	4,873.8474	1,806.3088	128,847.8048
84	5.9944	4.4634	0.3839	29,064.9025	29,169.3816	5,267.3991	1,460,829.7603
90	6.2817	5.6542	0.562	450,995.5874	760,669.4147	38,166.7727	143,942,302.6451
95	6.6452	7.1607	0.7901	14,477,778.6367	43,473,297.4985	458,059.1597	48,892,968,270.3289
99	7.3268	9.9856	1.2205	9,674,461,378.1198	80,085,838,341.0072	47,447,245.4765	2,777,755,637,588,899.5

Regression Statistics

LD50	**2.1968**	**LD50 Standard Error**	**1.5105**
LD50 LCL	0.1308	*LD50 UCL*	7.8061
Log10[LD50]	0.3418	*Standard Error*	0.279
Beta	0.2413	*Intercept*	4.9175
Beta Standard Error	0.0308		



Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]

Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)
10	0.5556	196,875	5.1394	4.8606
50	0.619	196,875	5.3025	4.6975
100	0.6825	196,875	5.4744	4.5256
500	0.7143	196,875	5.5656	4.3689
1,000	0.7302	196,875	5.6129	4.2741

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ค-10 probit analysis ของผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบชั้น methanol จากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Collectotrichum coffeanum*

Alpha value (for confidence interval) 0.001

Probit Analysis - Finney Method [Lognormal Distribution]

Log10[Dose (Stimulus)]	Actual Percent (%)	Probit Percent(%)	N	R	E(R)	Difference	Chi-square
1	0.4286	0.433	218750	93.750	94,727.2416	-977.2416	10.0816
1.699	0.5714	0.572	218750	125.000	125,131.2961	-131.2961	0.1378
2	0.6429	0.6302	218750	140.625	137,854.156	2,770.844	55.6935
2.699	0.7429	0.7526	218750	162.500	164,620.7577	-2,120.7577	27.3211
3	0.8	0.7977	218750	175.000	174,492.2357	507.7643	1.4776

Chi-square

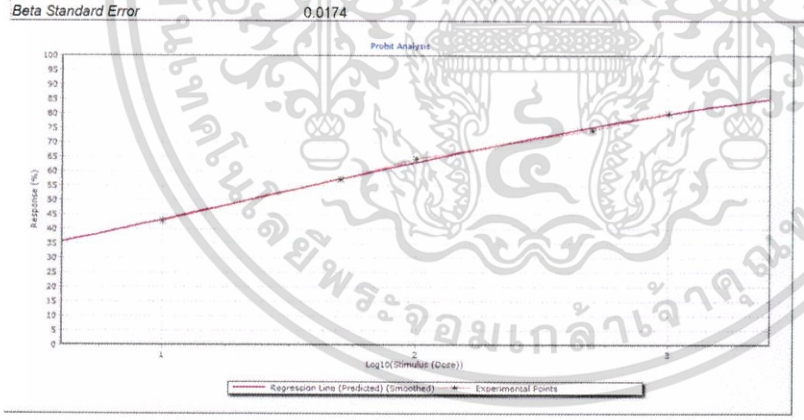
Chi-square	94.7115
Degrees Of Freedom	3
p-level	0

Dose (Stimulus) Percentile

Percentile	Probit (Y)	Log10[Dose (Stimulus)]	Standard Error	Dose (Stimulus)	Standard Error	LCL	UCL
1	2.6732	-3.3077	0.1889	0.0005	0.0002	0.0001	0.0017
5	3.3548	-1.9472	0.1416	0.0113	0.0037	0.0036	0.0285
10	3.7183	-1.2217	0.1165	0.06	0.0163	0.0233	0.1285
16	4.0056	-0.6483	0.0969	0.2248	0.0506	0.1024	0.4238
20	4.1585	-0.3429	0.0866	0.454	0.0911	0.2251	0.8004
25	4.3258	-0.0091	0.0754	0.9793	0.1708	0.5321	1.6059
30	4.476	0.2907	0.0655	1.953	0.2957	1.1505	3.0047
40	4.7471	0.8318	0.0484	6.7882	0.7582	4.6032	9.357
50	5	1.3366	0.0343	21.7076	1.718	16.5556	27.3815
60	5.2529	1.8415	0.0254	69.4173	4.0619	57.3439	83.1989
70	5.524	2.3825	0.0278	241.2806	15.4552	198.8801	298.8882
75	5.6742	2.6823	0.034	481.1682	37.6984	382.2726	629.0617
80	5.8415	3.0162	0.0429	1,037.9201	102.7705	779.6875	1,462.6496
84	5.9944	3.3215	0.0521	2,096.4431	252.0608	1,485.4977	3,186.9947
90	6.2817	3.8949	0.0705	7,851.4391	1,280.3208	4,941.1264	13,885.0801
95	6.6452	4.6205	0.0948	41,731.3695	9,185.5006	22,433.866	90,042.5051
99	7.3268	5.9809	0.1416	956,946.7094	317,535.6489	379,665.7572	3,023,152.3219

Regression Statistics

LD50	**21.7076**	**LD50 Standard Error**	**1.718**
LD50 LCL	16.5556	*LD50 UCL*	27.3815
Log10[LD50]	1.3366	*Standard Error*	0.0343
Beta	0.501	*Intercept*	4.3304
Beta Standard Error	0.0174		



Probit Analysis - Least squares [Normal Distribution]

Dose (Stimulus)	Actual Percent (%)	N	Probit (Y)	Weight (Z)
10	0.4286	218,750	4.8203	4.8203
50	0.5714	218,750	5.1797	4.8203
100	0.6429	218,750	5.3657	4.6343
500	0.7429	218,750	5.6519	4.1963
1,000	0.8	218,750	5.8415	3.8171

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวเมอมร สร้อยทอง
วัน เดือน ปีเกิด	11 เมษายน 2533
ที่อยู่ปัจจุบัน	2064 ถนนลาดกระบัง แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	2554 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา เกรดเฉลี่ย 2.88 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2558 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. เรื่อง Morphological and molecular phylogeny studies on Eurotiales isolated from soil ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ the 2nd International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (ICIST 2013) ระหว่างวันที่ 28-29 พฤศจิกายน 2013 ณ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง 2. เรื่อง *In vitro* antagonism of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya pseudoficheri* against anthracnose disease in coffee ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ the 2nd International Symposium on Agricultural Technology (ISAT2015) ระหว่างวันที่ 1-3 กรกฎาคม 2015 ณ โรงแรมเอวัน พัทยา จังหวัดชลบุรี 3. เรื่อง Antifungal activity of *Talaromyces muroii* against coffee anthracnose ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ the 4nd International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (ICIST 2015) ระหว่างวันที่ 28-29 พฤศจิกายน 2015 ณ Center for Women and Development hotel, Hanoi, Vietnam

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้