

การคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*
เพื่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าในทุเรียน

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI
IN GENUS *Neosartorya* AND *Talaromyces*
FOR ROOT AND STEM ROT DISEASE CONTROL IN DURIAN



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2561

KMITL-2018-SC-M-020-043

การคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*
เพื่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าในทุเรียน

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI
IN GENUS *Neosartorya* AND *Talaromyces*
FOR ROOT AND STEM ROT DISEASE CONTROL IN DURIAN



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2561

KMITL-2018-SC-M-020-043

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกสิ่งนี้ออกไป และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI
IN GENUS *Neosartorya* AND *Talaromyces*
FOR ROOT AND STEM ROT DISEASE CONTROL IN DURIAN



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY,

FACULTY OF SCIENCE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุผลแบบลงเนื้อที่ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

YEAR 2018

KMITL-2018-SC-M-020-043



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

COPYRIGHT 2018

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราในสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> เพื่อการควบคุมโรครากและโคนเน่าในทุเรียน
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสุภานัน สุขศิริ
รหัสประจำตัว	59605047
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
พ.ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง

บทคัดย่อ

การคัดแยกเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* จากตัวอย่างดินและเปลือกไม้ของต้นทุเรียนที่เป็นโรครากและโคนเน่าในสวนทุเรียน จังหวัดห้วยซุมพร จำนวน 47 ต้น พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 33 ไอโซเลต ได้แก่ สกุล *Phytophthora* และ *Pythium* รวมทั้งสกุล *Mortierella* ที่มีจำนวนมาก จึงคาดว่าอาจเป็นสาเหตุของโรครากและโคนเน่า เมื่อบ่งชี้เชื้อราด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล สามารถจำแนกเชื้อได้ 8 สปีชีส์ ได้แก่ *Phytophthora palmivora*, *Pythium cucurbitacearum*, *P. splendens*, *P. deliense*, *P. acanthicum*, *Mortierella capitata*, *M. chlamydospora* และ *M. hyalina* เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรคพบว่า *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum* และ *P. splendens* มีความสามารถทำให้ใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองเกิดรอยแผลเน่าสีน้ำตาล รวมทั้งคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ได้จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Neosartorya aureola*, *N. fennelliae*, *N. spinosa* และ *Talaromyces muroii* และในการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่มีต่อการควบคุมเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี bi-culture พบว่าเชื้อรา *N. hiratsukae* EU06 และ *T. muroii* EU18 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum* และ *P. splendens* ได้ดีที่สุด รวมทั้งสารสกัดจากเชื้อรา *N. hiratsukae* EU06 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ด้วยค่า ED₅₀ ของสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลเท่ากับ 0.4199, 0.0736 และ 4.4023 ppm ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาด้านนี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : โรครากและโคนเน่า สกุล *Neosartorya* สกุล *Phytophthora* สกุล *Pythium* สกุล *Talaromyces*

Thesis Title	Isolation and identification of fungi in genus <i>Neosartorya</i> and <i>Talaromyces</i> for root and stem rot disease control in durian
Student Name	Supanan Suksiri
Student ID	59605047
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Year	2018
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Kasem Soyong

Abstract

Isolation of genus *Phytophthora* and *Pythium* from 47 soil and bark planted to durian which root and stem rot disease in Chomphon province, found that 33 isolates of genus *Phytophthora* and *Pythium*. In addition, can isolates a lot of genus *Mortierella* which it is expected cause of the disease. Identification of fungi by molecular techniques correspond to 8 species, *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum*, *P. splendens*, *P. deliense*, *P. acanthicum*, *M. capitata*, *M. chlamydospora*, and *M. hyalina*. The pathogenicity test found that *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum* and *P. splendens* have the ability to brown rot wound on Monthong durian leaf. Isolation and identification of genus *Neosartorya* and *Talaromyces* correspond to 4 species, *N. aureola*, *N. fenneliae*, *N. spinosa* and *Talaromyces muroii*. The efficacy of *N. hiratsukae* EU06 and *T. muroii* EU18 are the highest inhibit the formation spore of *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum* and *P. splendens* by bi-culture. Including, the extract of *N. hiratsukae* EU06 have the most effective on controlling of *P. palmivora* by poison plate method. The ED₅₀ value of the hexane, ethyl acetate and methanol extract were 0.4199, 0.0736 and 4.4023 ppm, respectively.

Keywords : Root and stem rot disease, Genus *Neosartorya*, Genus *Phytophthora*, Genus *Pythium*, Genus *Talaromyces*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประสบความสำเร็จด้วยความกรุณาจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ผู้ทรงคุณวุฒิจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำ แก้ไขปัญหาต่างๆ จนการทำเล่มโครงการพิเศษสำเร็จไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ โปธิ์เอี่ยม กรรมการบัณฑิตประจำภาควิชาชีววิทยา ที่กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สร้อยญา พันธุ์ฤกษ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำ แก้ไขปัญหาต่างๆ จนการทำเล่มโครงการพิเศษสำเร็จไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โปธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. เกษม สร้อยทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (ร่วม) ที่คอยให้ความรู้ คำแนะนำ ชี้แนะแนวทาง ช่วยแก้ไขปัญหารวมทั้งช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เกิดความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี นอกจากนี้ขอขอบคุณนางสาวเมอมร สร้อยทอง ในการอนุเคราะห์เชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่ใช้สำหรับการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นในการทำโครงการพิเศษครั้งนี้

นอกจากนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ที่สนับสนุนและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ รวมถึงเพื่อน พี่และน้องทุกท่าน ที่ช่วยเป็นกำลังใจ ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางที่เหมาะสม

สุดท้ายนี้ คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากนักน้อย หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

สุภานัน สุขศิริ
กรกฎาคม 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 โรครากและโคนเน่าในทุเรียน.....	5
2.2 เชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i>	6
2.2.1 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i>	6
2.2.2 การบ่งชี้ของเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i>	8
2.3 เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	11
2.3.1 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	11
2.3.2 การบ่งชี้ของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	12
2.3.3 การใช้ประโยชน์จากเชื้อราต่อต้าน.....	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	18
3.1 ตัวอย่างดิน.....	18
3.2 ตัวอย่างเชื้อ.....	18
3.3 สารเคมี.....	18
3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อรา.....	18
3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา.....	18
3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ.....	19
3.3.4 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่.....	19
3.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส.....	19
3.3.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา.....	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4	อุปกรณ์.....	20
3.5	วิธีการทดลอง	21
3.5.1	การคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i>	21
3.5.1.1	วิธี Baiting	21
3.5.1.2	วิธี Soil plate	22
3.5.1.3	วิธี Tissue transplanting.....	22
3.5.2	การคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	22
3.5.2.1	วิธี Soil dilution plate	22
3.5.2.2	วิธี Alcohol treatment.....	23
3.5.2.3	วิธี Heat treatment.....	23
3.5.3	การบ่งชี้เชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา	23
3.5.4	การศึกษาด้วยเทคนิคระดับไมเลกุล.....	24
3.5.4.1	การสกัดดีเอ็นเอ.....	24
3.5.4.2	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่	25
3.5.4.3	การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา	26
3.5.5	การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราก่อโรค	26
3.5.6	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรค สกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i> สาเหตุโรครากและโคนเน่า ในทุเรียน.....	28
3.5.7	การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้านในการควบคุม เชื้อราก่อโรคสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i> สาเหตุโรครากและโคน เน่าทุเรียน.....	29
บทที่ 4	ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	31
4.1	ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i>	31
4.1.1	ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i>	33
4.1.1.1	สกุล <i>Phytophthora</i>	33
4.1.1.2	สกุล <i>Pythium</i>	35
4.1.1.3	สกุล <i>Mortierella</i>	38
4.1.2	ผลการศึกษาเทคนิคระดับไมเลกุลของเชื้อราก่อโรค.....	45

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	49
4.2.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	49
4.2.2 ผลการศึกษาเทคนิคระดับโมเลกุลของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	52
4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อราก่อโรค	53
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i>	58
4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i>	68
4.5.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดของเชื้อรา <i>Neosartorya hiratsukae</i> EU06.....	68
4.5.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดของเชื้อรา <i>Talaromyces muroii</i> EU18.....	74
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	79
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก.....	90
ภาคผนวก ก.....	91
ภาคผนวก ข.....	94
ภาคผนวก ค.....	98
ประวัติผู้เขียน.....	102
ผลงานทางวิชาการ.....	103

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS.....	25
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ β -tubulin.....	26
4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินหรือเปลือกไม้สำหรับคัดแยกเชื้อราก่อโรคสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i> และชื่อไอโซเลตเชื้อที่คัดแยกได้.....	31
4.2 ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> และ <i>Mortierella</i>	42
4.3 ผลการบ่งชี้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> และ <i>Mortierella</i>	46
4.4 แสดงวันที่เก็บตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง แหล่งที่มาของตัวอย่างดินสำหรับคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> และชื่อไอโซเลตเชื้อที่คัดแยกได้.....	49
4.5 ผลการบ่งชี้เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา	53
4.6 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง (จำนวน 4 ซ้ำ) หลังจากปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน.....	56
4.7 จำนวนสปอร์ของเชื้อ <i>P. palmivora</i> ไอโซเลต CHP34-S14 และ CHP38-S22 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม.....	60
4.8 จำนวนสปอร์ของเชื้อ <i>P. cucurbitacearum</i> ไอโซเลต CHP22-S05 และ CHP45-S02 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม.....	63
4.9 จำนวนสปอร์ของเชื้อ <i>P. splendens</i> ไอโซเลต CHP17-N05 และ CHP18-N03 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม.....	66
4.10 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>N. hiratsukae</i> EU06 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>P. palmivora</i> CHP34-S14	71
4.11 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>N. hiratsukae</i> EU06 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>P. palmivora</i> CHP38-S22	73
4.12 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>T. muroii</i> EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>P. palmivora</i> CHP34-S14	76
4.13 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>T. muroii</i> EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>P. palmivora</i> CHP38-S22	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 อาการโรครากและโคนเน่าในทุเรียน (ก) บริเวณฉ่ำน้ำ และหยดน้ำจากเปลือกไม้ และ (ข) รอยเน่าในเนื้อเยื่อเปลือกไม้.....	5
2.2 วัฏจักรชีวิตของเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> และ <i>Pythium</i>	7
2.3 การปล่อย zoospores ออกจาก sporangia ของ (ก) เชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> และ (ข) เชื้อราสกุล <i>Pythium</i>	8
2.4 รูปร่างของ sporangia (ก) globose (ข) obovoid (ค) obpyriform (ง) ovoid (จ) limoniform (ฉ) obturbinate (ช) ellipsoid (ซ) pyriform (ฅ) intercalary และ (ญ) basal plug conspicuous	9
2.5 ลักษณะการสร้าง papillate (ก) non-papillate (ข) semi-papillate และ (ค) papillate	9
2.6 วัฏจักรชีวิตของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	11
2.7 ลักษณะ ascospores (ก) มี ridge และ (ข) ไม่มี ridge.....	12
2.8 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Neosartorya spinosa</i> ลักษณะโคโลนีที่ระยะเวลา 14 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) บนจานอาหาร Oatmeal agar (OA) (ข) บนจานอาหาร Malt extract agar (MEA) (ค) ascocarp (ง) ลักษณะ ascus จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) (จ) ลักษณะ ascospores จาก SEM.....	14
2.9 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces radicus</i> ลักษณะโคโลนีที่ระยะเวลา 14 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) บนจานอาหาร Oatmeal agar (OA) (ข) บนจานอาหาร Malt extract agar (MEA) (ค) ลักษณะ ascus จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) (จ) ลักษณะ ascospores จาก SEM.....	15
3.1 การวางชิ้นส่วนใบทุเรียนบนจานอาหาร WA (ก) วางใบแนบราบกับอาหาร และ (ข) วางใบแนวตั้งฉากกับอาหาร.....	22
3.2 แสดงการทดสอบการก่อโรคบนใบทุเรียน (ก) การทำแผลบนใบทุเรียน (ข) การวางชิ้นส่วนบนใบทุเรียนเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนใบทุเรียน	27
3.3 การวางชิ้นส่วนบนจานอาหาร (ก) เชื้อราก่อโรคบนจานอาหารควบคุม (ข) เชื้อราก่อโรค และเชื้อราต่อต้านบนจานอาหาร bi-culture และ (ค) เชื้อราต่อต้านบนจานอาหารควบคุม.....	29
4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> ไอโซเลต CHP38-S22 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 10 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) เส้นใยไม่มีผนังกัน และ (ง) sporangia ที่มี papilla.....	34

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.2 การปล่อย zoospores ออกจาก sporangia (ก) ปลาย papilla แตกออก (ข) ปล่อย zoospores ออกจาก sporangia และ (ค) หลังจากปล่อย zoospores	35
4.3 การปล่อย zoospores ออกจาก sporangia (ก) sporangia ก่อนปล่อย zoospores (ข) ขณะ sporangia สร้างท่อ และ (ค) ขณะกำลังเคลื่อนย้าย zoospores ไปยัง vesicle.	35
4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล <i>Pythium</i> ของไอโซเลต CHP45-S02 ที่มีลักษณะการเจริญแบบ petaloid ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) sporangia.....	36
4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล <i>Pythium</i> ของไอโซเลต CHP17-N05 ที่มีลักษณะการเจริญแบบ cotton candy ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) sporangia.....	37
4.6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล <i>Pythium</i> มีลักษณะการเจริญแบบ stellate stiated ได้แก่ ไอโซเลต CHP36-S12 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) sporangia..	38
4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล <i>Mortierella</i> ของไอโซเลต CHP25-S01 ที่มีลักษณะการเจริญแบบ rose ที่มีเส้นใยสีขาว พู แต่ขอบโคโลนียังคงมีลักษณะเป็นกลีบดอกไม้ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) เส้นใยไม่มีผนังกัน และ (ง) spore.....	39
4.8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล <i>Mortierella</i> ของไอโซเลต CHP06-S03 ที่มีลักษณะการเจริญของโคโลนีและเส้นใยคล้ายรูปดอกกุหลาบ ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) spore.....	40
4.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล <i>Mortierella</i> ของไอโซเลต CHP33-S06 ที่มีลักษณะการเจริญของโคโลนีและเส้นใยซ้อนกันคล้ายดอกกุหลาบที่มีกลีบติดกัน ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) spore.....	41
4.10 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ของเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> และ <i>Mortierella</i> จำนวน 18 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI.....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

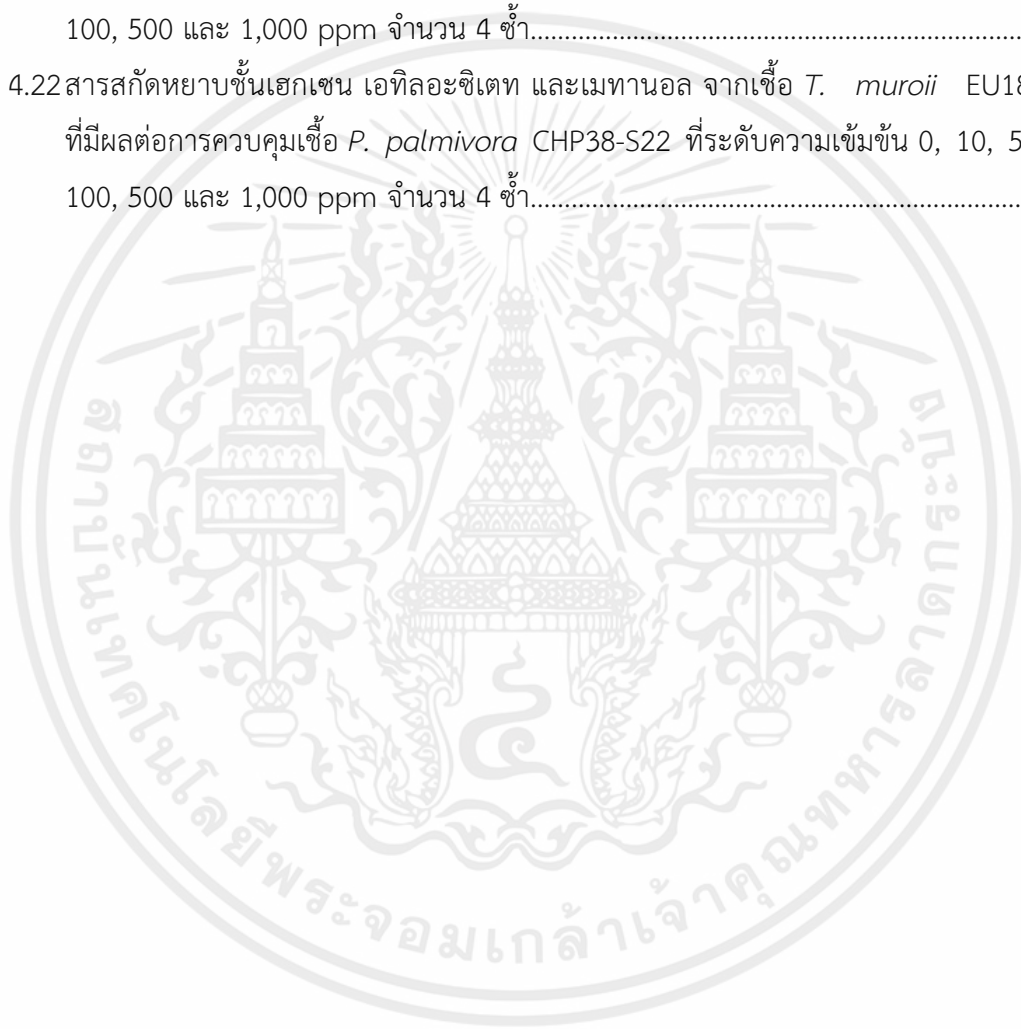
สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Neosartorya</i> ไอโซเลต CHA01-A01 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 20 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะ ascocarp (ง) ascocarp ที่แตก (จ) ลักษณะ ascus และ (ง) ลักษณะ ascospores.....	50
4.12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Neosartorya</i> ไอโซเลต CHA03-A011 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 20 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะ ascocarp (ง) ascocarp ที่แตก (จ) ลักษณะ ascus และ (ง) ลักษณะ ascospores.....	51
4.13 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Talaromyces</i> ไอโซเลต CHA03-A03 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 20 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะ ascocarp (ง) ascocarp ที่แตก (จ) ลักษณะ ascus และ (ง) ลักษณะ ascospores.....	51
4.14 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ β -tubulin ของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> ทั้ง 4 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI	53
4.15 ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสกุล <i>Phytophthora</i> , <i>Pythium</i> และ <i>Mortierella</i> บนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ที่ทดสอบด้วยวิธี detached leaf เป็นระยะเวลา 4 วัน หลังจากทำการปลูกเชื้อลงบนทุเรียน.....	57
4.16 ผลจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่าง (ก) เชื้อก่อโรค <i>P. palmivora</i> CHP34-S14 กับเชื้อ <i>N. hiratsukae</i> EU06 และ (ข) เชื้อก่อโรค <i>P. palmivora</i> CHP38-S22 กับเชื้อ <i>T. muroii</i> EU18.....	61
4.17 ผลจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อก่อโรค <i>P. cucurbitacearum</i> (ก) CHP22-S05 และ (ข) CHP45-S02 กับเชื้อ <i>N. hiratsukae</i> EU06.....	64
4.18 ผลจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่าง (ก) เชื้อก่อโรค <i>P. splendens</i> CHP17-N05 กับเชื้อ CHP18-N03 และ (ข) กับเชื้อ <i>T. muroii</i> EU18.....	67
4.19 สารสกัดยับยั้งชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ <i>N. hiratsukae</i> EU06 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>P. palmivora</i> CHP34-S14 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ.....	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการอ้างอิงเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.20 สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ <i>N. hiratsukae</i> EU06 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>P. palmivora</i> CHP38-S22 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ.....	72
4.21 สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ <i>T. muroii</i> EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>P. palmivora</i> CHP34-S14 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ.....	75
4.22 สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ <i>T. muroii</i> EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>P. palmivora</i> CHP38-S22 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ.....	77



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ประเทศไทยเป็นแหล่งเพาะปลูกทุเรียนรายใหญ่ที่สุดของโลก (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547) แต่อย่างไรก็ตามในการเพาะปลูกทุเรียน โรครากและโคนเน่า (Root and stem rot) เป็นสาเหตุที่ทำให้ต้นทุเรียนเสียหายและก่อให้เกิดปัญหาแก่เกษตรกรมากที่สุด (นลินี และคณะ, 2555; Cooke *et al.*, 2009; Abad and Cruz, 2012) โรคนี้อาจเข้าทำลายต้นทุเรียนจากบริเวณปลายรากเข้าสู่ระบบท่อลำเลียง อาการของโรคเกิดจากโคนต้นลุกลามไปสู่กิ่ง ทำให้ต้นทุเรียนทรุดโทรมและตายลงอย่างรวดเร็ว (สุจินต์ และคณะ, 2558) โดยโรครากและโคนเน่ามีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (อมรรัตน์ และคณะ, 2555; Lim and Chan, 1986) และยังมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* สปีชีส์อื่นๆ เช่น *P. cinnamomi* (Santoso *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงเชื้อราสกุล *Pythium* เป็นสาเหตุของโรครากและโคนเน่าในทุเรียนด้วย เช่น *P. cucurbitacearum*, *P. vexans* และ *P. deliense* (Lin and Sangchote, 2003; Vawdrey, 2005; Santoso *et al.*, 2015) โดยเชื้อทั้ง 2 สกุลจัดอยู่ในวงศ์ Pythiaceae และเป็นสาเหตุสำคัญของโรคพืชหลายชนิด (Link *et al.*, 2002) เช่น โรครากและโคนเน่าในมะละกอ (ธนะพล และสิทธิพงษ์, 2547) โรครากและลำต้นเน่าในคะน้า (สมชาย และอรรถกร, 2553) โรครากเน่าในถั่วแขก (Nzungize *et al.*, 2011) และโรครากเน่าในพริก (Saadoun and Allagui, 2013) เป็นต้น เชื้อราเหล่านี้อาศัยอยู่ในดิน บนเศษซากพืช เศษอินทรีย์วัตถุ โดยสปอร์ของเชื้อราสามารถแพร่กระจายได้ด้วยลม และน้ำ เมื่อสปอร์ไปตกตามส่วนต่างๆ ของต้นทุเรียนสามารถก่อให้เกิดโรครากและโคนเน่าได้ (ปัญจมา และสมศิริ, 2545) หากสปอร์ตกลงบนผลทุเรียน จะส่งผลให้ทุเรียนมีอาการเน่าโดยสามารถเข้าทำลายตั้งแต่ระยะผลอ่อนจนกระทั่งผลแก่ (ทรงกลด, 2561) ด้วยเหตุนี้ในฤดูฝนจึงเกิดการแพร่กระจายของโรครากและโคนเน่าของทุเรียนอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะภาคใต้เป็นพื้นที่ที่มีปริมาณฝนมากที่สุดของประเทศไทย (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2555) จังหวัดชุมพรเป็นแหล่งที่มีพื้นที่การเพาะปลูกทุเรียนมากที่สุดในภาคใต้ (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ดังนั้นจึงสนใจศึกษาเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากและโคนเน่าในทุเรียนในจังหวัดชุมพร

เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* มีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก การบ่งชี้เชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญสูง มีเช่นนั้นอาจนำไปสู่การบ่งชี้ที่ผิดพลาดได้ (ทวี, 2549; Santoso *et al.*, 2015) ทำให้การวางแผนสำหรับการจัดการโรคพืชเป็นไปอย่างล่าช้า (Mounde *et al.*, 2012) ดังนั้นนอกจากการบ่งชี้เชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว จึงสนใจนำเทคนิคระดับโมเลกุลมาใช้ในการบ่งชี้และศึกษาความ

หลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ด้วย โดยทั่วไปนิยมศึกษาในตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) (Kroon *et al.*, 2004)

การควบคุมเชื้อราก่อโรค (Pathogen) ในพืช เกษตรกรนิยมใช้วิธีฉีดพ่นสารเคมี โดยสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการควบคุมเชื้อราในคลาส Oomycete คือ สารเคมี hymexazol และ metalaxyl (อมรรัตน์ และคณะ, 2555; Shighiro *et al.*, 1990) เนื่องจากสามารถแก้ปัญหาได้อย่างเฉียบพลัน แต่การใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้เชื้อก่อโรคเกิดการต้านทานสารเคมี และมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น (อมรรัตน์ และคณะ, 2555; ปรียาพร และคณะ, 2558) นอกจากนี้สารเคมียังมีฤทธิ์ตกค้างในธรรมชาติก่อให้เกิดมลพิษและเป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค รวมถึงทำลายแมลงและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ (นิพนธ์, 2553) ดังนั้นจึงสนใจศึกษาการควบคุมโรคด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biocontrol) คือการนำสิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรค และไม่สร้างความเสียหายต่อต้นพืช เรียกเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า เชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านหรือเชื้อต่อต้าน (Antagonist) และเนื่องจากเชื้อราก่อโรคเข้าทำลายต้นทุเรียนจากบริเวณปลายรากดั่งที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นในการคัดเลือกเชื้อราต่อต้าน จึงทำการคัดแยกจากเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน อีกทั้งจุลินทรีย์ในดินยังมีเสถียรภาพมากกว่าจุลินทรีย์ในอากาศ (เกษม, 2532) โดยมีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดยับยั้งเชื้อราต่อต้านที่สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคทั้งสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ได้ เช่น สารสกัดยับยั้งเชื้อรา *Neosartorya pseudofischeri*, *N. quadricincta*, *N. multiplicata* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค *Phytophthora palmivora* และ *Pythium aphanidermatum* (Boonsang *et al.*, 2014) เช่นเดียวกับสารสกัดจากเชื้อรา *Talaromyces trachyspermus* และเชื้อราสกุล *Neosartorya* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* ได้เช่นกัน (กมลวรรณ และคณะ, 2557) นอกจากนี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จะสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราในสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ได้แล้ว ยังมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชหลายชนิด เช่น โรคแอนแทรคโนสในกาแฟที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum coffeanum* (เมอมร, 2558) โรคเหี่ยวในมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (Naraghi *et al.*, 2010) และโรคเหี่ยวในแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *Verticillium dahlia* (Bahramian *et al.*, 2016) เป็นต้น ซึ่งเชื้อราสามารถใช้ควบคุมโรคพืชได้ทั้งในรูปของเชื้อโดยตรง หรือในรูปของสารสกัด (กมลวรรณ, 2558) ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากดิน เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราและสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* และเนื่องจากเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก (เมอมร, 2558) ดังนั้นนอกจากการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว จะยืนยันและศึกษาความหลากหลายทาง

พันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลด้วย โดยศึกษาในตำแหน่ง β -tubulin (Glass and Donaldson, 1995) ซึ่งเป็นหนึ่งในตำแหน่งที่มีประสิทธิภาพในการบ่งชี้เชื้อราต่อต้านทั้ง 2 สกุล (เมอมร, 2558)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 คัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุล

1.2.2 คัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุล

1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากดินบริเวณรอบต้นทุเรียนที่ไม่เป็นโรค ด้วยวิธี Alcohol treatment วิธี Heat treatment และวิธี Soil dilution plate บ่งชี้เชื้อราต่อต้านด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคระดับโมเลกุล โดยศึกษาบริเวณ β -tubulin และคัดแยกเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* จากดินบริเวณรอบต้นทุเรียนที่เป็นโรครากและโคนเน่าด้วย วิธี Baiting และวิธี Soil plate นอกจากนี้ยังคัดแยกเชื้อราก่อโรคจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคด้วยวิธี Tissue transplanting บ่งชี้เชื้อราก่อโรคด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุล โดยศึกษาบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) โดยเก็บตัวอย่างดินจากสวนทุเรียนในจังหวัดชุมพร ช่วงเดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ.2559 และช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ.2560 ทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อราก่อโรคบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองด้วยวิธี Detached leaf และเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการเกิดโรคบนใบทุเรียนมากที่สุด 2 อันดับของแต่ละสปีชีส์ เพื่อใช้สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรค ดำเนินการศึกษาด้วยวิธี bi-culture และคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุด 2 อันดับ เพื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อราต่อต้านด้วยวิธี poison plate

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบสถานการณ์ของเชื้อราก่อโรครากและโคนเน่าในทุเรียน

1.4.2 ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* และของเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3 ทราบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าที่มีสาเหตุจากเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้เชื้อรา และสารสกัดในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยมีพื้นที่ในการเพาะปลูกทุเรียนเป็นอันดับหนึ่งของโลก (จิรวรรณ, 2561; Santoso *et al.*, 2015) จึงส่งผลให้ประเทศไทยกลายเป็นผู้นำการส่งออกทุเรียน (Bais, 2016; Parichatnon *et al.*, 2017) แต่อุปสรรคในการเพาะปลูกทุเรียนที่เป็นปัญหาแก่เกษตรกรมากที่สุดตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน คือโรครากและโคนเน่า (Root and stem rot) (อมรรัตน์ และคณะ, 2546; นลินี และคณะ, 2555) ซึ่งปัญหานี้ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของทุเรียน ทำให้ผลผลิตของทุเรียนลดจำนวนลง (Lim and Chan, 1986)

2.1 โรครากและโคนเน่าในทุเรียน

โรครากและโคนเน่าจะเข้าทำลายต้นทุเรียนจากบริเวณปลายรากของต้นทุเรียน เข้าสู่ระบบท่อลำเลียงน้ำ เกิดอาการของโรคจากโคนต้นลุกลามไปสู่กิ่ง สู่ต้น (สุจินต์ และคณะ, 2558) อาการเริ่มต้นจะสังเกตเห็นจุดฉ่ำน้ำ มีน้ำยางไหลออกมาจากเปลือกไม้บริเวณลำต้นหรือกิ่งโดยเฉพาะในเวลาเช้า ดังแสดงในรูปที่ 2.1ก เมื่อแดดออกจะแห้งหายไป หากเปิดเปลือกออกจะพบเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายเป็นรอยเน่าสีน้ำตาล ฉ่ำน้ำ (นลินี และคณะ, 2555) ดังแสดงในรูปที่ 2.1ข



รูปที่ 2.1 อาการโรครากและโคนเน่าในทุเรียน (ก) บริเวณฉ่ำน้ำ และหยดน้ำจากเปลือกไม้

(ข) รอยเน่าในเนื้อเยื่อเปลือกไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
(ถ่ายภาพโดย: สุภานัน สุขศิริ, 2559)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และตั้งชื่อเรื่องสิ่งของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาการต่อมาของโรครากและโคนเน่า คือ ใบจะเริ่มซีด ไม่เป็นมัน จากนั้นใบจะหลุดร่วงหรืออาจแห้งเหี่ยวติดที่กิ่ง หากขุดดินบริเวณรากจะพบรากมีอาการเน่า เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทำให้ไม่สามารถลำเลียงสารอาหารไปเลี้ยงลำต้นได้ (Lin and Sangchote, 2003; Vawdrey *et al.*, 2005) ส่งผลให้ต้นทุเรียนทรุดโทรมและยืนต้นตายในที่สุด (สนชัย, 2540) โรคนี้นักพบบ่อยกับทุเรียนพันธุ์ที่มีความอ่อนแอในการต้านทานโรค คือ ทุเรียนพันธุ์หมอนทอง โดยโรครากและโคนเน่าในทุเรียน มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* (ปัญจมา และสมศิริ, 2545; Lim and Chan, 1986; Cooke *et al.*, 2009; Abad and Cruz, 2012) นอกจากนี้เชื้อ *P. palmivora* ยังมีรายงานถึงเชื้อ *Phytophthora* สปีชีส์อื่นๆ ที่มีความสามารถในการทำให้ทุเรียนเป็นโรครากและโคนเน่าได้เช่นกัน ได้แก่ *P. nicotianae* (Panabieres *et al.*, 2016) *P. cinnamomi* var. *parvispora* (Santoso *et al.*, 2015)

โรครากและโคนเน่าในทุเรียนนอกจากจะมีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. palmivora* แล้ว Lin and Sangchote (2003), Vawdrey *et al.* (2005) และ Janick and Paull (2008) ยังรายงานว่า มีสาเหตุจากเชื้อสกุล *Pythium* อีกด้วย ได้แก่ *Pythium vexans* (*P. complectens*) และ Santoso *et al.* (2015) ยังรายงานว่า โรครากและโคนเน่ามีสาเหตุจากเชื้อ *P. cucurbitacearum* และ *P. deliense*

2.2 เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

2.2.1 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

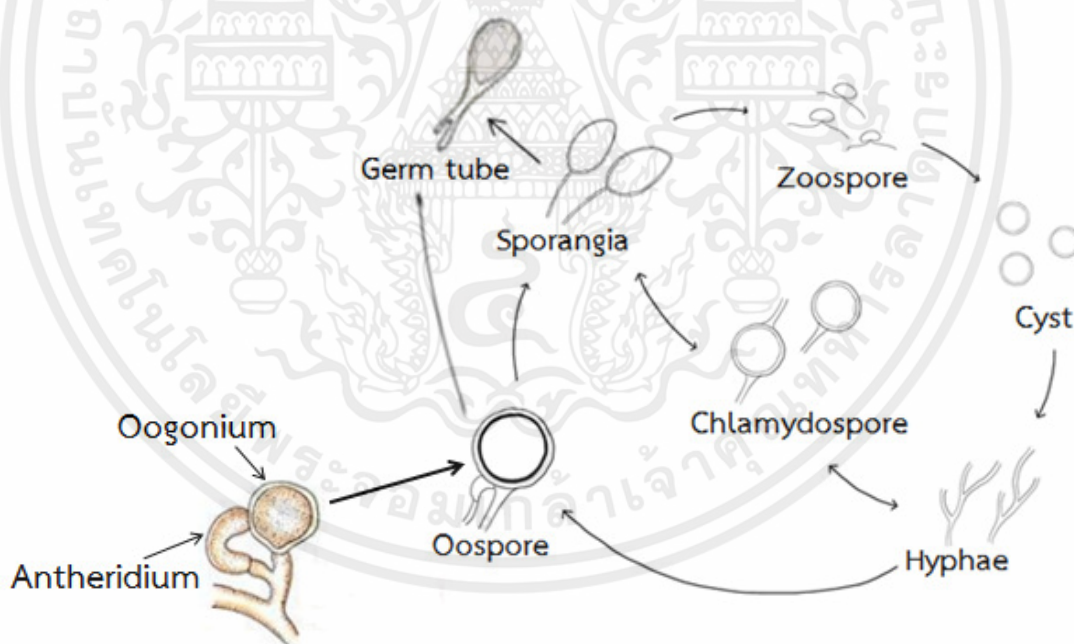
Singh *et al.* (2008) ได้ทำการจัดอนุกรมวิธานเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ดังนี้

- คลาส Oomycetes
- อันดับ Peronosporales
- วงศ์ Pythiaceae
- สกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

โดยวงศ์ Pythiaceae ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 10 สกุล (Trigiano *et al.*, 2016) และก่อโรคในพืชหลายชนิด (Link *et al.*, 2002) ปัจจุบันมีการบันทึกว่าเชื้อราสกุล *Phytophthora* ประกอบด้วย 287 สปีชีส์ และสกุล *Pythium* ประกอบด้วย 317 สปีชีส์ (<http://www.indexfungorum.org>)

เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สามารถขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้าง oospore ซึ่งเป็นการผสมระหว่างอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (oogonium) กับอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (antheridium) และการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะสร้าง sporangia ที่บริเวณปลายเส้นใย สามารถมีรูปร่างได้หลายแบบ เชื้อราจะสร้างตัวเองให้อยู่ในรูป oospore ในดินหรือเนื้อเยื่อพืชเพื่อใช้ในการอาศัยข้ามฤดู การเข้าทำลายพืชเบื้องต้นจะเกิดขึ้นขณะที่สภาพอากาศมีความชื้น และอุณหภูมิที่เหมาะสม oospore จะสามารถพัฒนาเป็น germ

tube หรือ sporangia ที่สามารถเข้าทำลายพืชได้โดยตรง (direct penetration) หลังจากนั้นจะเข้าสู่การทำลายพืชขั้นต่อไป โดยหากอุณหภูมิอยู่ในช่วง 10 ถึง 18 องศาเซลเซียส sporangia จะงอกเป็น germ tube แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 18 องศาเซลเซียส sporangia จะสร้าง zoospores อยู่ใน sporangia และปล่อย zoospores ออกไปในน้ำ ดิน เพื่อทำลายพืชต่อไป (สมศิริ, 2529; Schumann and Arcy, 2000; Kritartha, 2013) โดย zoospores มี flagella ใช้สำหรับว่ายน้ำ เมื่อ zoospores ตกลงในแหล่งที่มีน้ำจะเริ่มสลับ flagella ที่ตั้งและจะอยู่ในระยะพัก คือ สร้างผนังเซลล์เป็นถุงกลมๆ เป็นโครงสร้างที่ใช้พัก เรียกว่า cysts แต่จะอยู่ในระยะนี้ไม่นาน แล้วจะเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นเส้นใย ที่เรียกว่า hyphae ซึ่ง hyphae ที่ติดกับเนื้อเยื่อพืชจะได้รับสารอาหารจากพืช เมื่อเชื้อรา *Phytophthora* หรือ *Pythium* เข้าทำลายพืชจะสร้าง chlamydospore, oospore และหรือ sporangia มากขึ้นซึ่งจะทำให้วงจรชีวิตของเชื้อราสมบูรณ์ขึ้น โดย chlamydospore เป็นโครงสร้างที่มีผนังหนา ทรงกลมสร้างบริเวณปลายเส้นใย หรือชั้นระหว่างเส้นใย ซึ่งเป็นรูปแบบของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพื่อความอยู่รอดในระยะยาว ในกรณีที่สภาพอากาศมีความชื้นปริมาณสูง chlamydospores จะพัฒนาไปเป็น sporangia หรือ hyphae ใหม่ได้ (Singh *et al.*, 2008; Parke, 2017) ดังแสดงวัฏจักรชีวิตของเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ได้ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วัฏจักรชีวิตของเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

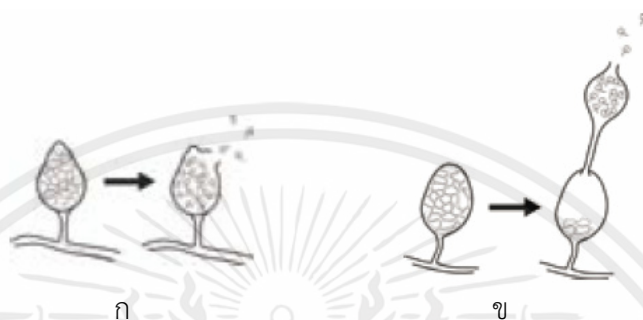
(ที่มา: ดัดแปลงจาก <http://forestphytophthoras.org/phytophthora-basics>; Schumann

and Arcy, 2000; Kritartha, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อแตกต่างในการปล่อย zoospores ออกจาก sporangia ของเชื้อราทั้ง 2 สกุล คือ เชื้อราสกุล *Phytophthora* จะปล่อย zoospores ออกมาโดยตรงจาก sporangia (รูปที่ 2.3ก) แต่เชื้อราสกุล *Pythium* จะสร้าง vesicle ลักษณะผนังบาง และมีท่อเชื่อมต่อกับ sporangia ทำให้ของเหลวภายใน sporangia ดัน zoospores ให้ไหลออกมาที่ vesicle และเมื่อภายใน vesicle เกิดแรงดันมากขึ้นจะทำให้ vesicle แตกออก (รูปที่ 2.3ข) (Burgess *et al.*, 2008)



รูปที่ 2.3 การปล่อย zoospores ออกจาก sporangia ของ (ก) เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ (ข) เชื้อราสกุล *Pythium*
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Burgess *et al.*, 2008)

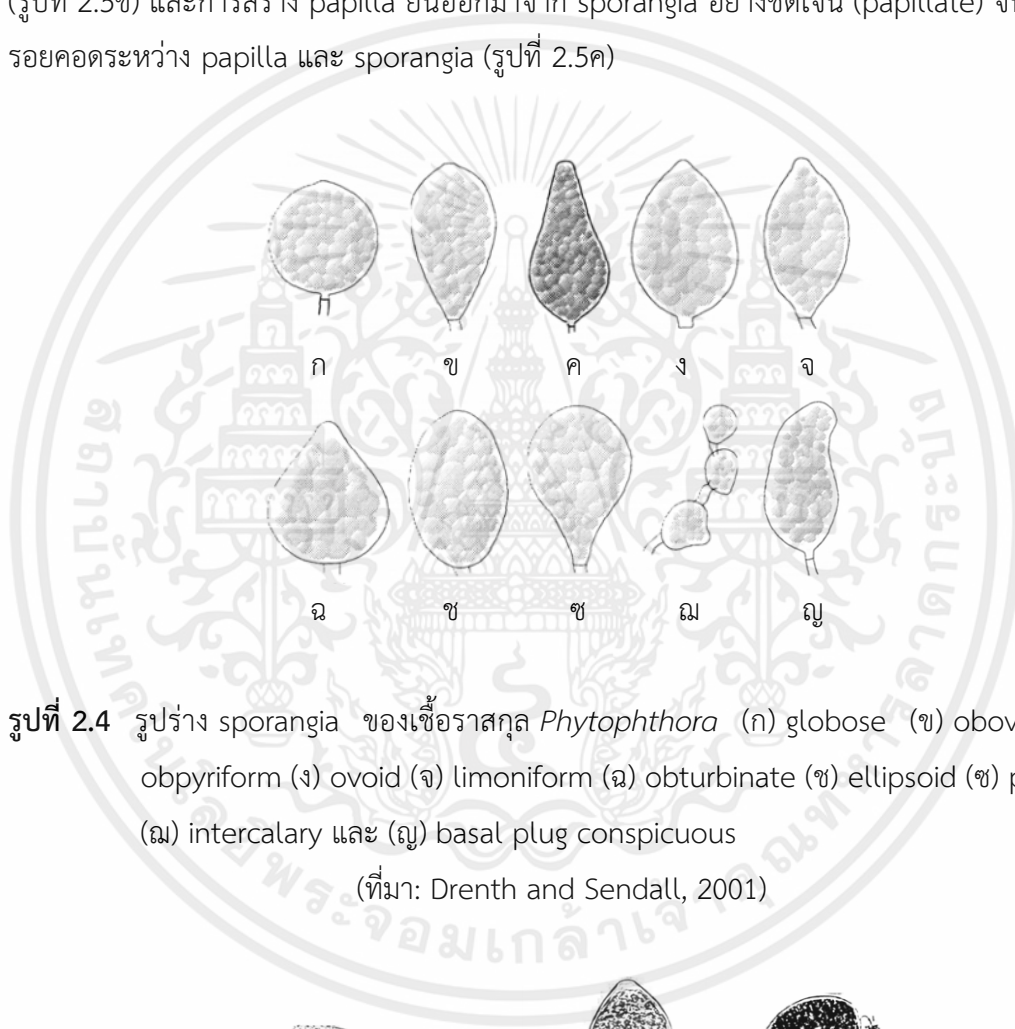
นอกจากเชื้อราทั้ง 2 สกุลนี้จะก่อโรครากและโคนเน่าในทุเรียนแล้ว ยังก่อโรครากและโคนเน่าในพืชชนิดอื่น เช่น *P. palmivora* เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในมะละกอ ส้มโอ (ธนะพล และสิทธิพงษ์, 2547; Hung *et al.*, 2015) *P. nicotianae* โรครากเน่าในพริก (Saadoun and Allagui, 2013) *P. aphanidermatum* โรครากและลำต้นเน่าในคะน้า (สมชาย และอรุณกร, 2553) และ *Pythium* อีกหลายสปีชีส์ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในถั่วแขก (Nzungize *et al.*, 2011) เป็นต้น

2.2.2 การบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* มีรูปร่าง ลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก การบ่งชี้เชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญสูง มิเช่นนั้นอาจนำไปสู่การบ่งชี้ที่ผิดพลาดได้ (ทวี, 2549; Santoso *et al.*, 2015) ส่งผลให้การวางแผนสำหรับการจัดการโรคพืชเป็นไปอย่างล่าช้า (Mounde *et al.*, 2012) ดังนั้นเพื่อให้ผลการบ่งชี้ที่ถูกต้องในการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* จึงบ่งชี้เบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและยืนยันการบ่งชี้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

สนชัย (2540) บ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora palmivora* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยรายงานลักษณะโคโลนีของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) มีสีขาวเรียบไปบนผิวหน้าอาหาร ลักษณะการเจริญเป็นแฉกคล้ายดาว (star pattern) เมื่อศึกษาภายใต้

กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยไม่มีสี ไม่มีผนังกัน (non septate) พบรูปร่างของ sporangia 2 ลักษณะ คือ รูปไข่ (oval หรือ ovoid) และผลส้มโอ (Lemon หรือ limoniform) แต่อย่างไรก็ตาม Drenth and Sendall (2001) แบ่งรูปร่างของ sporangia ของเชื้อราสกุล *Phytophthora* ออกเป็น 10 ลักษณะ ได้แก่ globose, obovoid, obpyriform, ovoid, limoniform, obturbinate, ellipsoid, pyriform, intercalary และ basal plug conspicuous (รูปที่ 2.4ก-ญ) นอกจากนี้ยังกล่าวถึงลักษณะการสร้าง papilla ออกเป็น 3 ลักษณะ คือ ไม่มีการสร้าง papilla (non-papillate) (รูปที่ 2.5ก) มีการสร้าง papilla แต่ยื่นออกมาจาก sporangia เพียงเล็กน้อย (semi-papillate) (รูปที่ 2.5ข) และการสร้าง papilla ยื่นออกมาจาก sporangia อย่างชัดเจน (papillate) จนเกิดเป็นรอยคอดระหว่าง papilla และ sporangia (รูปที่ 2.5ค)



รูปที่ 2.4 รูปร่าง sporangia ของเชื้อราสกุล *Phytophthora* (ก) globose (ข) obovoid (ค) obpyriform (ง) ovoid (จ) limoniform (ฉ) obturbinate (ช) ellipsoid (ซ) pyriform (ฌ) intercalary และ (ญ) basal plug conspicuous (ที่มา: Drenth and Sendall, 2001)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
รูปที่ 2.5 ลักษณะการสร้าง papillate (ก) non-papillate (ข) semi-papillate และ (ค) papillate (ที่มา: Drenth and Sendall, 2001)

Santoso *et al.* (2015) คัดแยกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรครากและโคนเน่าของทุเรียนในประเทศไทยอินโดนีเซีย และบ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora* ได้แก่ *P. palmivora*, *P. cinnamomi* var. *parvispora* และเชื้อราสกุล *Pythium* ได้แก่ *P. cucurbitacearum*, *P. vexans* และ *P. deliense* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถแบ่งลักษณะโคโลนีของเชื้อทั้ง 2 สกุล บนจานอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ออกเป็น 3 ลักษณะ คือ petallate, stellate และ stoloniferous และแบ่งรูปร่างหลักๆ ของ sporangia ออกได้เป็น 3 ลักษณะ คือ globose, ovoid และ ellipsoid โดยพบว่าเชื้อราแต่ละสปีชีส์อาจพบ sporangia ได้หลายรูปแบบ และขนาด (ด้านกว้าง x ด้านยาว) ของ sporangia แต่ละสปีชีส์จะแตกต่างกัน โดย *P. palmivora* มีขนาด sporangia อยู่ในช่วง 19-39 x 28-51 ไมโครเมตร *P. cinnamomi* มีขนาด sporangia 7-8 ไมโครเมตร *P. cucurbitacearum* มีขนาด sporangia อยู่ในช่วง 5-7 x 22-25 ไมโครเมตร และ *P. vexans* มีขนาด sporangia อยู่ในช่วง 5-7 x 24-28 ไมโครเมตร และยืนยันการบ่งชี้เชื้อราด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลอีกด้วย ในการบ่งชี้สปีชีส์ของเชื้อราทั้งสองสกุลอาศัยบริเวณ Internal transcribed spacers ที่อยู่บน ribosomal DNA (ITS-nrDNA) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS6 สอดคล้องกับรายงานของ Grunwald *et al.* (2011) และ Grunwald *et al.* (2013) ที่ศึกษาการบ่งชี้เชื้อราในสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลจาก 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ ITS โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS6 และบริเวณ cytochrome oxidase subunit 1 และ 2 (*cox spacer*) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ FMPhy-8b และ FMPhy-10b แต่พบว่าบริเวณ *cox spacer* ไม่สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล *Pythium* ได้ และยังกล่าวถึงฐานข้อมูลสำหรับการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora* ที่รวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Phytophthora* มากกว่า 120 สปีชีส์ จาก 700 ไอโซเลต ที่คัดแยกระหว่างปีพ.ศ. 2549-2552 สามารถเข้าถึงได้ที่ <http://www.phytophthoradb.org> นอกจากนี้ Oszako *et al.* (2016) ยังรายงานบ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* จำนวน 17 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำในประเทศโปแลนด์ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล 2 วิธี ได้แก่ วิธี TaqMan probes และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS6 และ ITS4 พบว่าวิธี TaqMan probes สามารถบ่งชี้ได้เพียง 8 ไอโซเลต แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถบ่งชี้ได้ทั้ง 17 ไอโซเลต

ดังนั้นจึงสนใจคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตจากลักษณะโคโลนี เส้นใย รูปร่างและขนาดของ sporangia และยืนยันการบ่งชี้และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 2 สกุล ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลจากบริเวณ ITS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

2.3.1 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จัดลำดับอนุกรมวิธานตาม Hurst (2006) และ Samson *et al.* (2007) ดังนี้

คลาส Ascomycetes

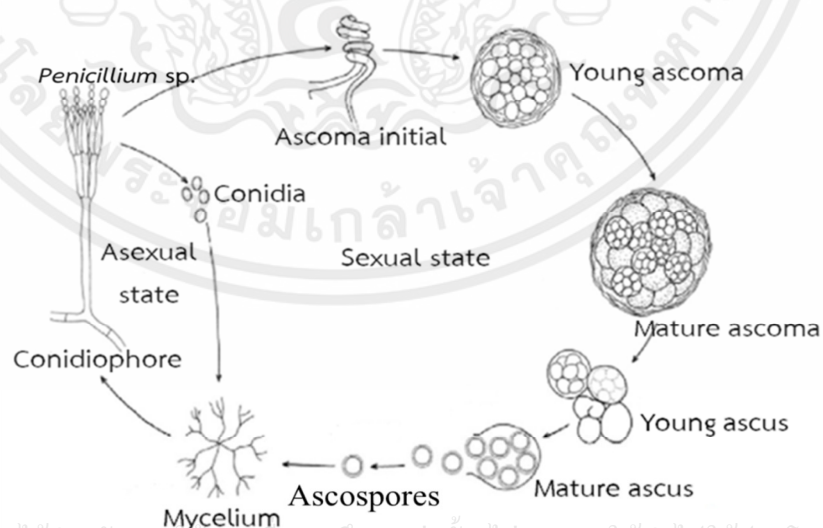
อันดับ Eurotiales

วงศ์ Trichocomaceae

สกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* อาศัยอยู่บนเศษซากพืช ซากสัตว์ในดิน พบทั้งในที่ดินป่า ดินเกษตรกรรมและดินป่าชายเลน (จิตา และคณะ, 2550; เมอมร, 2558) เชื้อราสกุล *Neosartorya* ใช้เรียกระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Aspergillus* ส่วนเชื้อราสกุล *Talaromyces* เป็นระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Penicillium* (Frisvad, 2015)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* เริ่มต้นจากเตรียมสร้าง ascoma หรือ ascocarp โดยจะสร้าง ascoma แบบ cleistothecial มีลักษณะกลมถึงค่อนข้างกลม ที่ปิดตัวเองและไม่มีช่องเปิด (Cousin, 2014; Yilmaz *et al.*, 2014) เมื่อสร้าง ascoma แล้ว จะพัฒนาไปเป็น ascus ซึ่งภายใน ascus ประกอบไปด้วย ascospores จากนั้น ascospores จะพัฒนาไปเป็นเส้นใย ซึ่ง ascospore ของเชื้อราทั้ง 2 สกุล มีคุณสมบัติในการทนความร้อนอุณหภูมิสูงได้ (Kikoku *et al.*, 2009) ส่วนระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะสร้าง conidiophore และ conidia จากนั้น conidia จะพัฒนาต่อไปเป็นเส้นใย โดยแสดงวัฏจักรชีวิตของเชื้อราสกุล *Talaromyces* ดังรูปที่ 2.6



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

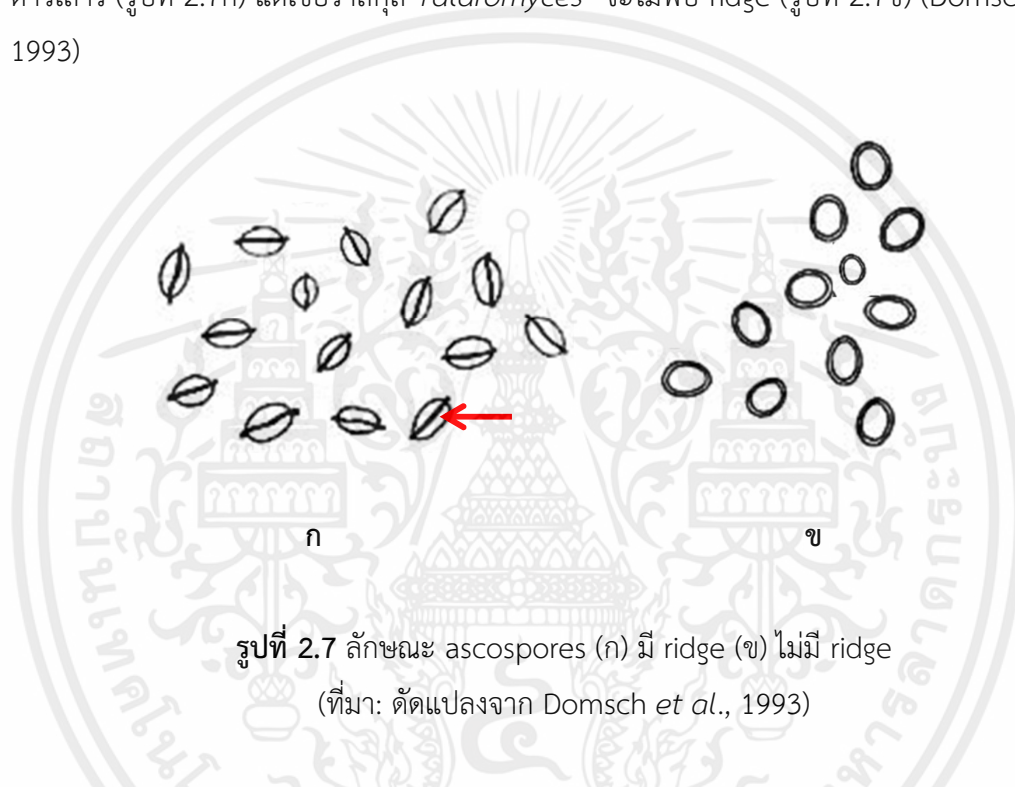
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.6 วัฏจักรชีวิตของเชื้อราสกุล *Talaromyces*

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Wyatt *et al.*, 2013)

2.3.2 การบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

ข้อแตกต่างของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน คือ เชื้อราสกุล *Neosartorya* มักพบโคโลนีสีเทา ขาว คริมถึงเนื้อ (Samson *et al.*, 2007) ส่วนเชื้อราสกุล *Talaromyces* มักพบโคโลนีสีเหลือง ชมพู เขียว ส้มแดง (Yilmaz *et al.*, 2014) ในการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* นอกจากสีของโคโลนีแล้วพบว่าลักษณะ ascospores ของเชื้อราทั้ง 2 สกุลยังมีความแตกต่างกันอีกด้วย โดยเชื้อราสกุล *Neosartorya* จะพบ ridge หรือสัน หนูนเป็นวงล้อมรอบ ascospore คล้ายวงแหวนที่ล้อมดาวเสาร์ (รูปที่ 2.7ก) แต่เชื้อราสกุล *Talaromyces* จะไม่พบ ridge (รูปที่ 2.7ข) (Domsch *et al.*, 1993)



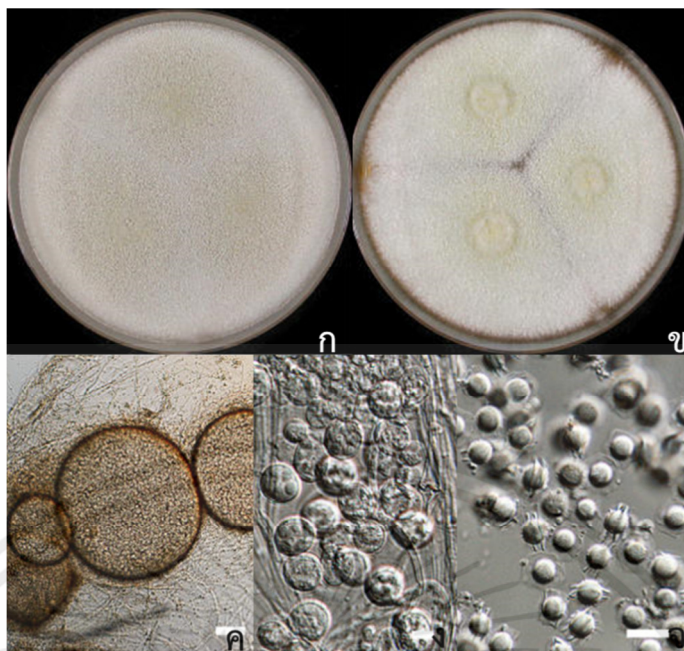
รูปที่ 2.7 ลักษณะ ascospores (ก) มี ridge (ข) ไม่มี ridge
(ที่มา: ดัดแปลงจาก Domsch *et al.*, 1993)

แต่อย่างไรก็ตามเชื้อราภายในสกุลเดียวกันมีลักษณะและขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospores คล้ายคลึงกัน จึงยากสำหรับการบ่งชี้สปีชีส์ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นนอกจากบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว ยังจำเป็นต้องบ่งชี้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลอีกด้วย

การบ่งชี้เชื้อราทั้ง 2 สกุลนี้ นิยมบ่งชี้ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา ควบคู่ไปกับการบ่งชี้ระดับโมเลกุล เช่น เมอมร (2558) บ่งชี้เชื้อรา *N. hiratsukae*, *N. pseudofischeri*, *T. muroii* และ *T. trachyspermus* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยบ่งชี้จากสีของโคโลนี รูปร่างและขนาดของ cleistothecial, ascus และ ascospores พบว่า เชื้อราสกุล *Neosartorya* เมื่อเลี้ยงบนจานอาหาร PDA โคโลนีจะมีสีเหลืองถึงเหลืองอ่อน cleistothecial มีรูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 145.24-769.80 x 147.60-892.28 ไมโครเมตร ascospore หลายรูปร่าง ได้แก่ ellipsoidal ถึง broadly ellipsoidal ขนาด 1.13-4.88 x 1.92-5.46 ไมโครเมตร และพบว่า ascospores มี ridge

ส่วนเชื้อราสกุล *Talaromyces* โคลนีบนจานอาหาร PDA มีสีขาว cleistothecial มีรูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 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 ascospores มีหลายรูปร่าง ได้แก่ ellipsoidal ถึง broadly ellipsoidal ขนาด 3.86-6.81 x 3.70-7.77 ไมโครเมตร นอกจากบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วยังยืนยันด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล โดยศึกษาจาก 3 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 605 คู่เบส บริเวณ β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a กับ Bt2b พบว่าให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยเชื้อราสกุล *Neosartorya* มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และเชื้อราสกุล *Talaromyces* มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส และบริเวณ calmodulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ CF1L กับ CF4 และ CF1M กับ CF4 พบว่าเชื้อราสกุล *Neosartorya* มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส เชื้อราสกุล *Talaromyces* มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส แต่จากการบ่งชี้ทั้ง 3 บริเวณ พบว่าบริเวณ ITS ไม่สามารถจำแนกเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* ได้ แต่บริเวณ β -tubulin และ calmodulin สามารถบ่งชี้เชื้อราทั้งสองสกุลได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Samson *et al.* (2007) ที่บ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยบ่งชี้จากสีของโคลนี รูปร่างและขนาดของ cleistothecial, ascus และ ascospore เช่น *Neosartorya spinosa* เมื่อเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร Oat meal agar (OA) มีลักษณะโคลนีด้านหน้าสีขาวถึงครีม (รูปที่ 2.8 ก) และบนจานอาหาร Malt extract agar (MEA) (รูปที่ 2.8ข) มี ascocarp แบบ cleistothecial สีครีมขนาด 200-300 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.8ค) และ ascospores มีรูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 4.5 ไมโครเมตร มี ridge ล้อมรอบ (รูปที่ 2.8ง) โดย ascospores จะถูกบรรจุอยู่ภายใน ascus (รูปที่ 2.8จ) และยังบ่งชี้และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล จาก 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 และ บริเวณ β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a กับ Bt2b พบว่าทั้งสองบริเวณสามารถใช้จัดจำแนกเชื้อราสปีชีส์ของเชื้อราและจัดกลุ่มของเชื้อราได้

Peterson (2008) บ่งชี้และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Aspergillus* ซึ่งเป็นระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5 บริเวณ ได้แก่ ITS และ Lsu rDNA (ID) เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 บริเวณ β -tubulin (BT) ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a และ BT2b บริเวณ calmodulin (CF) ด้วยคู่ไพรเมอร์ CF1L, CF1M และ CF4 บริเวณ และ RNA polymerase II (RPB2) ด้วยคู่ไพรเมอร์ 5F และ 7CR พบว่าบริเวณ BT และ ITS ไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราสกุล *Aspergillus* ได้ แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ CF, RPB2 และ ID ทั้ง 3 บริเวณมาสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ พบว่า สามารถแยกแต่ละสปีชีส์ในสกุล *Aspergillus* ออกจากกันได้อย่างชัดเจน



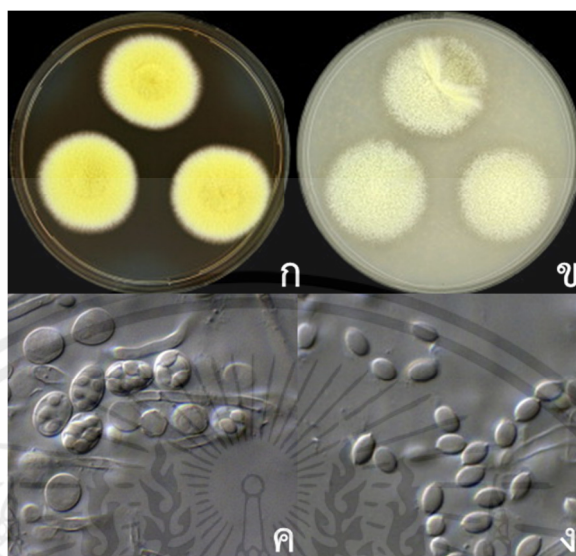
รูปที่ 2.8 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neosartorya spinosa* ลักษณะโคโลนีที่ระยะเวลา 14 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) บนจานอาหาร Oatmeal agar (OA) (ข) บนจานอาหาร Malt extract agar (MEA) (ค) ascocarp (ง) ลักษณะ ascus จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) (จ) ลักษณะ ascospores จาก SEM (ที่มา: Samson *et al.*, 2007)

Yilmaz *et al.* (2014) บ่งชี้เชื้อราสกุล *Talaromyces* จากสีของโคโลนี รูปร่างและขนาดของ cleistothecial, ascus และ ascospore พบว่าโดยส่วนใหญ่สีของโคโลนีบนจานอาหาร OA (รูปที่ 2.9ก) และ MEA (รูปที่ 2.9ข) มีสีเหลือง ส้ม น้ำตาล เช่น *Talaromyces radicus* บนจานอาหาร CYA มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ascocarp สีเหลือง รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 150–400 ไมโครเมตร ascus มีขนาด 9.5-13.5 × 8-11.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.9ค) ascospores รูปร่าง broadly ellipsoidal ขนาด 4-5.5 × 3-3.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.9ง) และบ่งชี้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลจากบริเวณ β -tubulin ด้วยคูไพรเมอร์ Bt2a กับ Bt2b

Manoach *et al.* (2013) ทำการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Talaromyces* สปีชีส์ใหม่ที่พบจากดินในจังหวัดตราด ประเทศไทย คือ *T. thailandensis* และ *T. tratensis* ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 3 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ ITS ด้วยคูไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 บริเวณ β -tubulin ด้วยคูไพรเมอร์ Bt2a กับ Bt2b และบริเวณ RPB1 ด้วยคูไพรเมอร์ RPB1 และ RPB2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ ดัชนีงานวิจัยนี้จึงสนใจบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยลักษณะที่ไม่ว่ากรณีใดทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตจากลักษณะสีโคโลนี รูปร่าง และขนาดของ cleistothecial, ascus และ ascospore ยืนยันการบ่งชี้และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลจาก

บริเวณ β -tubulin แม้ว่าบริเวณ calmodulin จะมีประสิทธิภาพการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* แต่ใช้ไพรเมอร์จำนวนหลายคู่ มากกว่าบริเวณ β -tubulin



รูปที่ 2.9 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces radicus* ลักษณะโคโลนีที่ระยะเวลา 14 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก) บนจานอาหาร Oatmeal agar (OA) (ข) บนจานอาหาร Malt extract agar (MEA) (ค) ลักษณะ ascus จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) (จ) ลักษณะ ascospores จาก SEM

(ที่มา: Yilmaz *et al.*, 2014)

2.3.3 การใช้ประโยชน์จากเชื้อราต่อต้าน

ในอดีตการกำจัดเชื้อราก่อโรคในพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อราในคลาส Oomycetes นิยมใช้วิธีการฉีดพ่นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพจำเพาะต่อเชื้อรานั้น โดยนิยมใช้สารเคมีที่มีชื่อทางการค้า คือ metalaxyl แต่พบว่าเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานเชื้อราก่อโรคจะเกิดการดื้อหรือความต้านทานต่อสารเคมี ต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีมากขึ้นจึงจะสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคนั้นได้ (อมรรรัตน์ และคณะ, 2555) แม้ว่าการใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อราก่อโรคในพืชจะสามารถแก้ปัญหาได้อย่างเฉียบพลัน แต่ข้อเสีย คือการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้เชื้อก่อโรคเกิดการต้านทานสารเคมี และมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้สารเคมียังมีฤทธิ์ตกค้างในธรรมชาติก่อให้เกิดมลพิษและเป็นอันตรายต่อเกษตรกรและผู้บริโภค รวมถึงทำลายแมลงและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ ตรงข้ามกับวิธีการควบคุมทางชีวภาพที่สามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคได้ในระยะยาว และไม่ตกค้างในธรรมชาติ (นิพนธ์, 2553; ปรียาพร และคณะ, 2558)

การควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธีหรือชีวภาพ หมายถึง การกำจัดเชื้อก่อโรค (Pathogen) ด้วยการนำสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่า มายับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรค และไม่สร้างความเสียหายต่อ

ต้นพืช เรียกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถเหล่านี้ว่า เชื้อต่อต้าน (Antagonist) ดังนั้นจึงสนใจศึกษา การควบคุมโรคด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยทำการคัดเลือกเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน เนื่องจากเชื้อราก่อโรค เข้าทำลายต้นทุเรียนจากบริเวณปลายรากดั่งที่กล่าวข้างต้น อีกทั้งเชื้อราในดินยังมีเสถียรภาพมากกว่า เชื้อราในอากาศ (เกษม, 2532)

วาริน และคณะ (2550) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *Pytophthora palmivora* โดยใช้ *Trichoderma harzianum* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ที่ใช้ทางการค้าจำนวน 2 สายพันธุ์ (T-35-wt และ T-CB-Pin-01) และที่เป็น สายพันธุ์กลายจำนวน 2 สายพันธุ์ (T-35-co4 และ T-35-co5) ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. palmivora* ด้วยวิธี Dual culture พบว่า *T. harzianum* ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการ เจริญของเส้นใยเชื้อก่อโรคได้ โดยสายพันธุ์กลายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่าการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อ ราก่อโรคที่ดีกว่า โดยสายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถยับยั้งได้เพียง 50-70 เปอร์เซ็นต์ และ Muthukumar *et al.* (2011) ยังศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Trichoderma* จำนวน 8 ไอโซเลต ในการ ควบคุมเชื้อราก่อโรค *P. aphanidermatum* พบว่า ไอโซเลต TVC₃ มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. aphanidermatum* มากที่สุดถึง 88 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือไอโซเลต THC₁, TVC₅, TVC₁, TVC₄ มีประสิทธิภาพการยับยั้งประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต THC₃, TVC₂, THC₂ ให้ ประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่า 50 แต่ไม่ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เชื้อราสกุล *Trichoderma* ยังมีรายงานถึงเชื้อราสกุลอื่นที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* ได้ดีเช่นกัน อีกด้วย เช่น จากรายงานของ Hung *et al.* (2015) ใช้เชื้อรา *Chaetomium globosum* CG05, *C. locknowense* CL01 และ *C. cupreum* CC03 ในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าในส้มโอ ด้วยวิธี bi-culture พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งการเจริญของเส้นใย เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 49.7-61.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ เมื่อนับปริมาณสปอร์พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และยังศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลจากเชื้อรา *C. globosum* CG05 มีประสิทธิภาพในยับยั้งการสร้างสปอร์ ของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้สารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลที่ระดับความเข้มข้นเพียง 5.1, 3.0 และ 2.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรคได้ 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *C. locknowense* CL01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรคได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 16.7, 3.5 และ 4.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ

และนอกจากนี้ยังมีรายงานที่กล่าวถึงประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการกำจัดเชื้อราก่อโรคทั้งสกุล *Phytophthora* หรือ *Pythium* แต่เป็นเพียง

การศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น โดยกมลวรรณ และคณะ (2557) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยวิธี dilution plate พบว่าสารสกัดหยาบที่หมักด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ของเชื้อรา *Talaromyces trachyspermus* (KUFA35) และ *Neosartorya* sp. (KUFA41) ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Boonsang et al. (2014) ที่พบว่าสารสกัดหยาบที่หมักด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ของเชื้อรา *N. pseudofischeri* KUFA 0060, *N. quadricincta* KUFA 0064, *N. multiplicata* KUFA 0071 ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลแตกต่างจาก Taboonpong et al. (2014) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces flavus* ที่คัดแยกจากอ่าวในจังหวัดตราด และทะเลอันดามันจังหวัดกระบี่ ประเทศไทย เมื่อทดสอบด้วยวิธี Dual culture พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *P. palmivora* ได้เพียง 80 เปอร์เซ็นต์

จะเห็นได้ว่าเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจาก *P. palmivora* และ *P. aphanidermatum* นอกจากนั้นแล้วยังมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชอีกหลายชนิด เช่น โรคแอนแทรคโนสในกาแฟที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum coffeanum* (เมอมร, 2558) โรคเหี่ยวในมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* โรคเหี่ยวในแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *Verticillium dahlia* (Bahramian et al., 2016) เชื้อราสามารถใช้ควบคุมโรคพืชได้ทั้งในรูปของเชื้อโดยตรง หรือในรูปของสารสกัด (กมลวรรณ, 2558) ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงสนใจคัดแยกเชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากดิน เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคในสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากสวนทุเรียนในจังหวัดชุมพร โดยขุดดินบริเวณรอบรากใหญ่ที่ห่างจากโคนต้นทุเรียนประมาณ 15 เซนติเมตร ขุดดินบริเวณผิวหน้าออกลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ทำการตักดินใส่ถุงตัวอย่าง โดยตัวอย่างดินสำหรับคัดแยกเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สาเหตุโรครากและเน่าโคนเน่าในทุเรียน เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณโคนต้นทุเรียนที่เป็นโรครากและโคนเน่า และเก็บเปลือกไม้ที่เป็นโรคโดยขุดผิวหน้าของเปลือกไม้ก่อน แล้วจึงเก็บเนื้อไม้ด้านใน ทำการเก็บตัวอย่างดิน 2 ช่วงเวลา คือ ช่วงเดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาคม พ.ศ.2559 และช่วงเดือนกรกฎาคม ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ.2560 ตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณโคนต้นทุเรียนสุขภาพดี ไม่เคยปรากฏอาการของโรครากและโคนเน่า

3.2 ตัวอย่างเชื้อ

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และนางสาวเมอมร สร้อยทอง จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ *N. hiratsukae* EU06, *N. pseudofischeri* EU16 และ *T. muroii* EU18

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อรา

- 3.3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
- 3.3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)
- 3.3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal Agar Base (RBAB)

โดยอาหารทั้ง 3 ชนิดจากบริษัท HiMedia Laboratory (ประเทศอินเดีย)

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

- 3.3.2.1 Glycerol
- 3.3.2.2 Immersion oil
- 3.3.2.3 Lactic acid
- 3.3.2.4 Lactophenol cotton blue บริษัท HiMedia Laboratory (ประเทศอินเดีย)
- 3.3.2.5 Phenol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีเมล: office@himedia.com

3.3.2.6 Sterile distillation water

3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3.3.3.1 Chloroform

3.3.3.2 β -mercaptoethanol

3.3.3.3 CTAB

3.3.3.4 Ethanol

3.3.3.5 Isoamyl alcohol

3.3.3.6 Isopropanol

3.3.3.7 Liquid nitrogen

3.3.3.8 Polyvinylpyrrolidone

3.3.3.9 RNase

3.3.4 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่

3.3.4.1 Deionize H₂O

3.3.4.2 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

3.3.4.3 MgCl₂

3.3.4.4 Primer

1) สำหรับบ่งชี้เชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ได้แก่ forward primer: ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') และ reverse primer: ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA-TGC-3') (Grunwald *et al.*, 2013)

2) สำหรับบ่งชี้เชื้อราต่อต้านสกุล *Neosatrorya* และ *Talaromyces* ตำแหน่ง β -tubulin ได้แก่ forward primer: Bt2a (5'-GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC-3') และ reverse primer: Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass and Donaldson, 1995)

3.3.4.5 10X standard *Taq* reaction buffer

3.3.4.6 *Taq* DNA polymerase

3.3.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.3.5.1 Agarose

3.3.5.2 Boric acid

3.3.5.3 EDTA

3.3.5.4 Ethidium bromide

3.3.5.5 6x Gel loading dye

3.3.5.6 Marker VC 100 bp Plus บริษัท Vivantis (ประเทศไทย)

3.3.5.7 Marker 1 kb บริษัท Biolabs (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.3.5.8 Tris base

3.3.5.9 Tris-HCl

3.3.5.10 Gel documentation รุ่น IGenius

3.3.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา

3.3.6.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.3.6.2 Ethyl acetate

3.3.6.3 Hexane

3.3.6.4 Methanol

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 garose gel electrophoresis system

3.4.2 Alcohol burner

3.4.3 Autoclave

3.4.4 Balance

3.4.5 Centrifuge

3.4.6 Cellophane

3.4.7 Cork borer

3.4.8 Duran bottle

3.4.9 Forceps

3.4.10 Heat box

3.4.11 Hemacytometer

3.4.12 Hot air oven

3.4.13 Incubator

3.4.14 Laminar air flow

3.4.15 Light microscope

3.4.16 Loop

3.4.17 Micropipette set

3.4.18 Microwave

3.4.19 Mortar และ pestle

3.4.20 Needle

3.4.21 Petri dish diameter 5.0 และ 10.0 centimeters

3.4.22 Rotary evaporator

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.23 Separating funnel
- 3.4.24 Slide และ cover slit
- 3.4.25 Spatula
- 3.4.26 Spectrophotometer
- 3.4.27 Spin down
- 3.4.28 Stereo microscope
- 3.4.29 Syringes and needle size 26Gx1”
- 3.4.30 Test tube size 0.2, 1.5 and 2.0 millimeters
- 3.4.31 Tip
- 3.4.32 Tissue bottle
- 3.4.33 Thermal cycler
- 3.4.34 UV transilluminator
- 3.4.35 Vernier
- 3.4.36 Vortex mixer
- 3.4.37 Water bath
- 3.4.38 Whatman No.1

3.5 วิธีการทดลอง

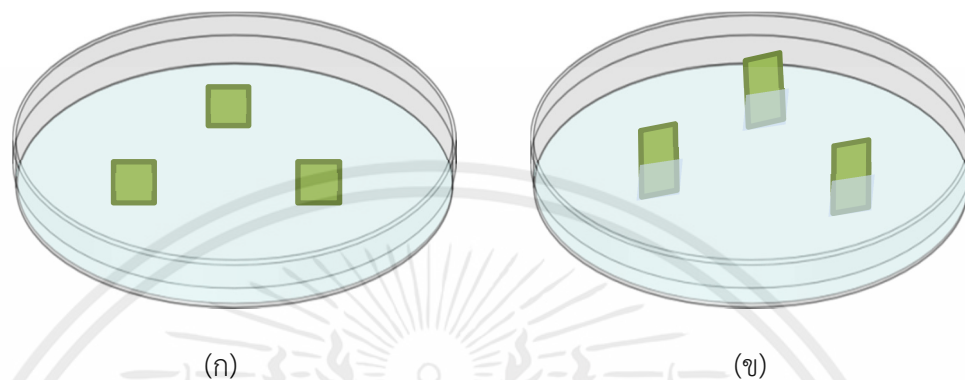
3.5.1 การคัดแยกเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

คัดแยกเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณโคนต้นทุเรียนที่เป็นโรครากและโคนเน่า คัดแยกเชื้อก่อโรคด้วย วิธี Baiting วิธี Soil plate และวิธี Tissue transplanting

3.5.1.1 วิธี Baiting (ดัดแปลงจาก Jeffer and Aldwinckle, 1987; Drenth and Sendall, 2001; Martin *et al.*, 2012)

นำตัวอย่างดินใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 กรัม เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้สารละลายดิน จากนั้นเตรียมใบทุเรียนเพื่อใช้เป็นเหยื่อล่อเชื้อ โดยนำใบทุเรียนที่ไม่แก่หรืออ่อนเกินไปจากต้นทุเรียนที่ไม่เป็นโรค (ไม่ควรเด็ดใบทุเรียนจากต้นมาทิ้งไว้เกิน 24 ชั่วโมง) นำใบมาทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตัดขอบของใบทุเรียนออก พร้อมตัดใบทุเรียนเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1X1 เซนติเมตร นำใบทุเรียนมาลอยบนสารละลายดินจำนวน 6-8 ชิ้นต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง ขนาด 10 เซนติเมตร วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อในกล่องที่มีความชื้น บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาตัดใบทุเรียนจากสารละลายดินมาล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ล้างซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นวางใบบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับน้ำให้แห้ง จากนั้นวางใบทุเรียนบนจานอาหาร Water

agar (WA) โดยวางราบไปกับอาหาร และวางตั้งฉากกับอาหาร จำนวน 3 ชิ้นต่อจานอาหาร (รูปที่ 3.1 ก-ข) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปลายเข็มขนาด 25Gx1” ตัดบริเวณปลายเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ วางลงบนจานอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุลต่อไป



รูปที่ 3.1 การวางชิ้นส่วนไบทุเรียนบนจานอาหาร WA (ก) วางใบแนวนราบกับอาหาร และ (ข) วางใบแนวตั้งฉากกับอาหาร

3.5.1.2 วิธี Soil plate (ดัดแปลงจาก Ivors, 2008)

นำเข็มเขี่ยเชื้อเผาไฟให้ร้อนแดง รอให้เย็นสักครู่แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักตัวอย่างดินวางลงบนจานอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ปลายเข็มขนาด 25Gx1” ตัดบริเวณปลายเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ วางลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุลต่อไป

3.5.1.3 วิธี Tissue transplanting (ดัดแปลงจาก สนชัย, 2540)

นำเนื้อเยื่อเปลือกไม้ที่เป็นโรควางลงบนอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ปลายเข็มขนาด 25Gx1” ตัดบริเวณปลายเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ วางลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุลต่อไป

3.5.2 การคัดแยกเชื้อสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

คัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณโคนต้นทุเรียนที่ไม่เป็นโรค ดำเนินการคัดแยกเชื้อราต่อต้านด้วย 3 วิธี ได้แก่ วิธี Soil dilution plate วิธี Heat treatment และวิธี Alcohol treatment

3.5.2.1 วิธี Soil dilution plate (ดัดแปลงจากเมอมร, 2558)

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร (ระดับความเจือจาง 10 เท่า) จากนั้นเจือจางสารละลายดินกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ระดับความเจือจาง 100, 500

และ 1,000 เท่า ปิเปตสารละลายดินที่ระดับความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหาร Rose bengal agar base (RBA) ปราศจากเชื้อ ที่เติม streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วยวิธีการ pour plate รอจนกระทั่งอาหารแข็ง นำไปบ่มแบบคว่ำจานอาหารเพาะเลี้ยง ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตทุกๆ 24 ชั่วโมง เมื่อปรากฏโคโลนีของเชื้อราให้ใช้เข็มเขี่ยแต่ละโคโลนีวางลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุลต่อไป

3.5.2.2 วิธี Heat treatment (ดัดแปลงจากธิดา และคณะ, 2550; ดัดแปลงจากเลขา และคณะ, 2553)

ชั่งตัวอย่างดิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เมื่อครบเวลาให้เทน้ำทิ้ง โดยห้ามเขย่าหลอดทดลอง จากนั้นใช้ช้อนตักสารตักดินใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหาร RBA ปราศจากเชื้อ ที่เติม streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1

3.5.2.3 วิธี Alcohol treatment (ดัดแปลงจากธิดา และคณะ, 2550; ดัดแปลงจากเลขา และคณะ, 2553)

ชั่งตัวอย่างดิน 0.3 กรัม ใส่ในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ เติม 65 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-15 นาที เมื่อครบเวลาเท Ethanol ทิ้ง โดยห้ามเขย่าหลอดทดลอง จากนั้นใช้ช้อนตักสารตักดินใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหาร RBA ปราศจากเชื้อ ที่เติม streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1

3.5.3 การบ่งชี้เชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สำหรับเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะโคโลนี โดยบันทึกรูปแบบการเรียงตัวของเส้นใย พร้อมศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตัดชิ้นวุ้นวางลงบนสไลด์ที่มีหยดน้ำ หากนำสไลด์ไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วไม่พบสปอร์ของเชื้อ ให้ใช้ cork borer ตัดชิ้นวุ้นจากจานอาหาร PDA ไปวางลอยในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อประมาณ 30 มิลลิลิตร สังเกตทุกๆ 6 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ หากพบบริเวณที่คาดว่าเป็นสปอร์ ให้ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยบริเวณเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ วางลงบนสไลด์ที่มีหยดน้ำ แล้วตรวจสอบสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อีกครั้ง บันทึกรูปร่าง วัดความยาวและความกว้างของ sporangia และการมีหรือไม่มี papilla ของ sporangia โดยคัดแยกตามหลักของ Domsch *et al.*, 1993, Drenth and Sendall, 2001 และ Burgess, 2008

สำหรับเชื้อต่อต้นสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* เลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกสีของโคโลนี พร้อมศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้

เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื่อมาวางบนสไลด์ที่มีหยดสี Lactophenol cotton blue จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการบันทึกลักษณะ และขนาดของ cleistothecia, ascus และ ascospores โดยคัดแยกตามหลักของ Domsch *et al.* (1993)

3.5.4 การศึกษาด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

3.5.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อราบนแผ่นเซลโลเฟน โดยคืบแผ่นเซลโลเฟนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ววางลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดขอบของโคโลนีของเชื้อจากจานอาหาร PDA วางลงบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อโคโลนีเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ข้อตักสารชุดเส้นใยออกจากแผ่นเซลโลเฟน แล้วนำไปใส่โกร่ง บดเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle, 1987) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ นำเส้นใยที่บดแล้วประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2.0 มิลลิลิตร เติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เพื่อแตกเซลล์และแยกสารประกอบฟีนอลิก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง โดยพลิกหลอดไปมาทุกๆ 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยพลิกหลอดไปมาทันทีหลังจากใส่สาร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จะได้สารละลายที่แบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นล่าง คือ Chloroform : isoamyl alcohol ชั้นกลางคือโปรตีน และชั้นบน คือสารละลายที่มีดีเอ็นเอ ดูดส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติม Rnase ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อย่อย RNA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำไปสกัดซ้ำด้วย Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตรอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จะได้สารละลายแบ่งออกเป็น 3 ชั้น เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันของสารละลายดีเอ็นเอ โปรตีน และสาร Chloroform : isoamyl alcohol ดูดส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม isopropanol ที่เย็น ปริมาตรเท่ากับ 1 : 1 กับส่วนใสที่ดูมา ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาทันที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเออยู่บริเวณก้นหลอด จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเออยู่บริเวณก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 99.5 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเออยู่บริเวณก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยนำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อตะกอนแห้งแล้ว ขั้นตอนสุดท้าย คือละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นย้ายสารละลายดีเอ็นเอมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยนำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 3X gel loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในหลุมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเปิดเครื่อง gel electrophoresis โดยตั้งกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส เมื่อครบ 30 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออกด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที ถ่ายรูปเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

3.5.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction: PCR) มีปริมาตรสารในปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 5,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร standard Taq reaction buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 2 ไมโครลิตร forward primer ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร reverse primer ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTP ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ Nuclease free water ปริมาตร 10.6 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สำหรับเชื้อสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ดังตารางที่ 3.1 ส่วนเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แต่ละคู่ไพรเมอร์จะใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS (Grunwald et al., 2013)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
initial denaturation	94	180	1
Denaturation	94	60	
Annealing	55	60	35
Extension	72	60	
final extension	72	600	1

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ β -tubulin (เมอเมอร์, 2558)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
initial denaturation	95	180	
annealing	55	30	1
extension	72	60	
Denaturation	95	30	
Annealing	55	30	35
Extension	72	60	
Denaturation	95	30	
annealing	55	30	1
final extension	72	10	

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาถูกโซ่ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 3X gel loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในหลุมเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เมื่อครบ 30 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างเอธิเดียมออกด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที ถ่ายรูปเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Bioneer Corporation ประเทศเกาหลี หลังจากได้รับลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไป Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุสปีชีส์ของเชื้อรา และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อต่อไป

3.5.4.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้างต้นมาจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Bioedit จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อโดยสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Tamura-Nei และ Maximum-likelihood

3.5.5 การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อราก่อโรค

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรค (Pathogenicity test) บนใบทุเรียน ใช้วิธี Detached leaf (อิติยา และคณะ, 2556) โดยนำใบทุเรียนจากต้นทุเรียนพันธุ์หมอนทอง มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นฆ่าเชื้อด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol และล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นทำให้ใบเกิดแผลจำนวน 4 แผล โดยใช้เข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 26Gx1”

จุ่มแผล 9 ครั้ง ให้อยู่ภายในขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร ดังรูปที่ 3.2ก เตรียมเชื้อที่จะนำมาทดสอบโดยทำการเลี้ยงเชื้อบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน เมื่อเวลาใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร ตัดเชื้อราพร้อมชิ้นวุ้น วางลงบนแผลของใบทุเรียน วางชิ้นวุ้นด้านที่มีเส้นใยเชื้อลงบนแผล ดังรูปที่ 3.2ข บ่มใบทุเรียนในสภาพ moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง บ่มเป็นเวลา 3 วัน วัดความกว้างของรอยแผลเน่าสีน้ำตาลที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดควบคุมเตรียมเหมือนชุดทดสอบ แต่ใช้ชิ้นวุ้นที่ปราศจากเชื้อวางลงบนแผลบนใบทุเรียน บันทึกขนาดความกว้างของรอยแผลเน่าสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นบริเวณแผลบนใบทุเรียนด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ ไอโซเลตใดที่แสดงอาการเน่าบริเวณแผล ให้ทำการคัดแยกเชื้อกลับมาอีกครั้ง (re-isolate) ด้วยวิธี Tissue transplanting (ชลิตา, 2554) เพื่อเป็นการยืนยันว่าแผลเน่าเกิดจากเชื้อรา ไอโซเลตที่ทดสอบ โดยตัดชิ้นส่วนใบพืชบริเวณที่เกิดแผลและให้ติดส่วนของใบที่ไม่เน่าด้วยขนาดประมาณ 4x4 มิลลิเมตร แล้วนำชิ้นส่วนใบไปวางบนจานอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการตัดบริเวณปลายเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ วางลงบนจานอาหาร PDA เพื่อนำเชื้อราไปบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และนำเชื้อที่ re-isolate กลับมาได้ใหม่ไปใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ด้วยวิธี bi-culture และ poison plate ต่อไป



รูปที่ 3.2 การทดสอบการเกิดโรคบนใบทุเรียน (ก) การทำแผลบนใบทุเรียน (ข) การวางชิ้นวุ้นบนใบทุเรียนเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนใบทุเรียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการทำให้เกิดแผลบนใบทุเรียนรุนแรงมากที่สุดจำนวน 2 อันดับแรกของแต่ละสปีชีส์ เพื่อนำไปศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สาเหตุโรครากและโคนเน่าในทุเรียนต่อไป โดยวิเคราะห์ ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อก่อโรคแต่ละไอโซเลตทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

3.5.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สาเหตุโรครากและโคนเน่าในทุเรียน

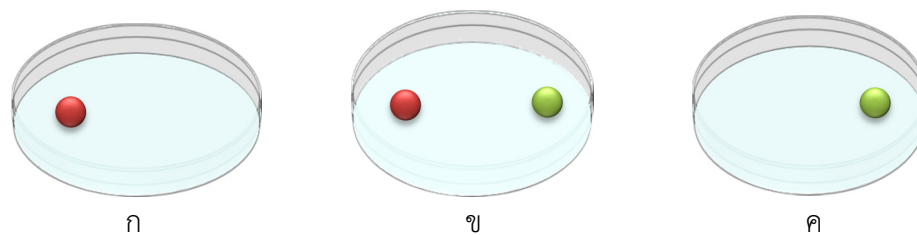
ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่แยกได้จากดินในการควบคุมเชื้อก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สาเหตุโรครากและโคนเน่าใน ทุเรียน ด้วยวิธี bi-culture ทำการทดสอบแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ เตรียมเชื้อก่อโรค และเชื้อต่อต้านก่อนทดสอบ โดยเลี้ยงเชื้อก่อโรคนบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาใช้ cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 มิลลิเมตร ตัด เชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อมชิ้นวุ้น วางลงบนจานอาหาร PDA วางชิ้นวุ้นด้านที่มีเส้นใยเชื้อลง โดยวางเชื้อก่อโรคและเชื้อต่อต้านด้านตรงข้ามกัน ให้มีระยะห่างประมาณ 4.5 เซนติเมตร ดังรูปที่ 3.3ข บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน เมื่อครบเวลา นับ จำนวนสปอร์ของเชื้อก่อโรคด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับจานอาหารควบคุม โดยจานอาหาร ควบคุมของเชื้อก่อโรคจะวางชิ้นวุ้นของเชื้อก่อโรคไว้ที่ฝั่งใดฝั่งหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังรูปที่ 3.3ก และจานอาหารควบคุมของเชื้อต่อต้านจะวางชิ้นวุ้นของเชื้อต่อต้านไว้ที่ฝั่งตรงข้ามของเชื้อก่อ โรค ดังรูปที่ 3.3ค บ่มจานอาหารควบคุมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน เมื่อ ครบ 30 วัน นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต (Growth Inhibition; GI) ด้วยสมการ

$$\text{Growth Inhibition (GI)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อราก่อโรคในจานอาหารควบคุม

R2 คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อราก่อโรคในจานอาหาร bi-culture

คัดเลือกเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของตัวแทนเชื้อราในแต่ละสปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรค 2 อันดับแรก โดยวิเคราะห์ ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ ระดับความเชื่อมั่น $P = 0.05$



รูปที่ 3.3 การวางชิ้นวุ้นบนจานอาหาร (ก) เชื้อราก่อโรคบนจานอาหารควบคุม (ข) เชื้อราก่อโรคและเชื้อราต่อต้านบนจานอาหาร bi-culture และ (ค) เชื้อราต่อต้านบนจานอาหารควบคุม
 หมายเหตุ: ● แสดงถึงเชื้อราก่อโรค และ ● แสดงถึงเชื้อราต่อต้าน

3.5.7 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สาเหตุโรครากและโคนเน่าในทุเรียน

คัดเลือกเชื้อราต่อต้านจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สาเหตุโรครากและโคนเน่าในทุเรียน ด้วยวิธี bi-culture ที่ให้ประสิทธิภาพดีที่น้อยอย่างน้อย 2 อันดับ มาเพิ่มปริมาณเส้นใยเชื้อราต่อต้านโดยเพาะเลี้ยงเชื้อราต่อต้านด้วยอาหาร PDB ในขวดเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นนำเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยแห้ง นำมาบดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำไปแช่กับตัวทำละลาย hexane ในปริมาณ 1 : 1 (W/V) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลานำไปกรองด้วยกระดาษ whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัดชั้น hexane นำกากที่ได้จากชั้น hexane ไปทำการแช่ในตัวทำละลาย ethyl acetate เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลานำไปกรองด้วยกระดาษ whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัดชั้น ethyl acetate นำกากที่ได้จากชั้น ethyl acetate ไปทำการแช่ด้วยตัวทำละลาย methanol เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลานำไปกรองด้วยกระดาษ whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัดชั้น methanol นำสารสกัดที่ได้จากแต่ละชั้นไปทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยวิธี poison plate โดยทำการเตรียมสารสกัดของ hexane, ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm โดยเตรียมสารสกัดด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ Dimethylsulfoxide (DMSO) นำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหารมาเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร รอให้อาหารแข็ง จึงใช้ cork borer ตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราก่อโรคร่วมชิ้นวุ้นจากจานอาหาร PDA ที่มีอายุ 10 วัน วางชิ้นวุ้นด้านที่มีเส้นใยเชื้อราลงบนจานอาหารที่มีสารสกัด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 วัน วัดขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลางโคโลนีด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ และบ่มต่ออีก 25 วัน เพื่อบันทึกจำนวนสปอร์ของเชื้อก่อโรคด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับจานอาหารควบคุม (ความเข้มข้น 0 ppm) โดยจานอาหารควบคุม คือ จานอาหาร PDA ไม่ผสมสารสกัด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ (Growth Inhibition; GI) จากสมการ

$$\text{Growth Inhibition (GI)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 คือ ความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อราก่อโรคในจานอาหารควบคุม (0 ppm)

R2 คือ ความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อราก่อโรคในจานอาหารสารสกัด

ทำการทดลองแบบ 3X6 factorial experiment ใน CRD จำนวน 4 ซ้ำ ซึ่งมี 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัย A คือ ชนิดของสารสกัด ได้แก่

A1 = สารสกัดชั้น hexane

A2 = สารสกัดชั้น ethyl acetate

A3 = สารสกัดชั้น methanol

ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด

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

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05 และค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรของข้อมูล (Coefficient of variation: C.V.) ด้วยโปรแกรม SPSS และคำนวณหาค่า Effective Dose ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ED₅₀) คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

ตัวอย่างดินและเปลือกไม้สำหรับคัดแยกเชื้อราก่อโรครวบรวมได้จาก 7 ตำบล ใน 3 อำเภอ ของ จังหวัดชุมพร ได้แก่ ตำบลชุมโคและตำบลทะเลทรัพย์ ในอำเภอปะทิว ตำบลท่าแซะและตำบลรับร่อ อำเภอท่าแซะ และตำบลขุนกระหิงและตำบลบ้านนา อำเภอเมืองชุมพร จำนวน 47 ตัวอย่าง ซึ่ง กำหนดรหัสตัวอย่างตั้งแต่ CHP01 ถึง CHP47 พบว่าจากตัวอย่างดินหรือเปลือกไม้ที่สามารถคัดแยก เชื้อราก่อโรคได้มีจำนวน 22 ตัวอย่าง โดยสามารถคัดแยกเชื้อราก่อโรคได้จำนวน 33 ไอโซเลต โดย แสดงวันที่เก็บ รหัสตัวอย่าง แหล่งที่มาของตัวอย่างและเชื้อที่สามารถคัดแยกได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินหรือเปลือกไม้สำหรับคัดแยกเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* และชื่อไอโซเลตเชื้อที่คัดแยกได้

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	รหัส ตัวอย่าง	แหล่งที่มาตัวอย่าง		พิกัด		เชื้อที่แยกได้
		ตำบล	อำเภอ	ละติจูด	ลองจิจูด	
16 มิ.ย. 59	CHP01	รับร่อ	ท่าแซะ	NA	NA	-
	CHP02	รับร่อ	ท่าแซะ	NA	NA	-
17 มิ.ย. 59	CHP03	รับร่อ	ท่าแซะ	NA	NA	-
31 ส.ค. 59	CHP04	หินแก้ว	ท่าแซะ	10.70665	98.94702	-
	CHP05	ท่าแซะ	ท่าแซะ	10.65793	99.16938	-
12 ต.ค. 59	CHP06	ขุนกระหิง	เมืองชุมพร	10.46492	99.10064	CHP06-S03 CHP06-S04
	CHP07	ขุนกระหิง	เมืองชุมพร	10.46479	99.10112	-
	CHP08	ขุนกระหิง	เมืองชุมพร	10.46461	99.10139	-
	CHP09	บ้านนา	เมืองชุมพร	10.47165	99.02063	-
	CHP10	บ้านนา	เมืองชุมพร	10.47179	99.02060	CHP10-S07
	CHP11	บ้านนา	เมืองชุมพร	10.47113	99.01970	-
	CHP12	บ้านนา	เมืองชุมพร	10.47076	99.02004	-
	CHP13	บ้านนา	เมืองชุมพร	10.47079	99.02027	-
	CHP14	บ้านนา	เมืองชุมพร	NA	NA	CHP14-S11 CHP14-N11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแบบสงวนเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	รหัส ตัวอย่าง	แหล่งที่มาตัวอย่าง		พิกัด		เชื้อที่แยกได้	
		ตำบล	อำเภอ	ละติจูด	ลองจิจูด		
13 ต.ค. 59	CHP15	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	NA	NA	-	
	CHP16	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.73049	99.26450	CHP16-N01 CHP16-N06	
	CHP17	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.73024	99.26467	CHP17-N05 CHP17-N11	
	CHP18	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.73565	99.26298	CHP18-N03	
	CHP19	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.71847	99.23324	CHP19-S12	
	CHP20	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.69232	99.23673	-	
	CHP21	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.69209	99.23673	-	
	CHP22	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.69141	99.23689	CHP22-S05 CHP22-S10 CHP22-S12	
	CHP23	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.69125	99.23696	CHP23-S13	
	8 ก.ค. 60	CHP24	ชุมโค	ปะทิว	10.78955	99.27869	-
		CHP25	ชุมโค	ปะทิว	10.78955	99.27878	CHP25-S01 CHP25-S08 CHP25-S10
		CHP26	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.73095	99.26456	CHP26-S11 CHP26-S17
		CHP27	ทะเลทรัพย์	ปะทิว	10.73028	99.26466	-
CHP28		หินแก้ว	ท่าแซะ	10.35270	99.13410	CHP28-S03 CHP28-S05	
CHP29		หินแก้ว	ท่าแซะ	NA	NA	-	
CHP30		หินแก้ว	ท่าแซะ	10.35294	99.15110	-	
CHP31		หินแก้ว	ท่าแซะ	10.35295	99.14730	-	
CHP32		หินแก้ว	ท่าแซะ	10.60275	99.06797	-	
CHP33		หินแก้ว	ท่าแซะ	10.60287	99.06753	-	
14 ธ.ค. 60	CHP34	หินแก้ว	ท่าแซะ	10.35270	99.13410	CHP34-S09 CHP34-S14	

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของกรมวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

วันที่เก็บ ตัวอย่าง	รหัส ตัวอย่าง	แหล่งที่มาตัวอย่าง		พิกัด		เชื้อที่แยกได้
		ตำบล	อำเภอ	ละติจูด	ลองจิจูด	
14 ธ.ค. 60	CHP35	หินแก้ว	ท่าแซะ	NA	NA	-
	CHP36	หินแก้ว	ท่าแซะ	NA	NA	CHP36-S12
	CHP37	หินแก้ว	ท่าแซะ	NA	NA	CHP37-S19
	CHP38	หินแก้ว	ท่าแซะ	NA	NA	CHP38-S22
	CHP39	หินแก้ว	ท่าแซะ	NA	NA	CHP39-S01
	CHP40	หินแก้ว	ท่าแซะ	NA	NA	CHP40-S14
	CHP41	หินแก้ว	ท่าแซะ	NA	NA	CHP41-S01
	CHP42	บ้านนา	เมืองชุมพร	NA	NA	-
	CHP43	บ้านนา	เมืองชุมพร	NA	NA	-
	CHP44	บ้านนา	เมืองชุมพร	NA	NA	-
	CHP45	หินแก้ว	ท่าแซะ	10.60202	99.09410	CHP45-S02
	CHP46	หินแก้ว	ท่าแซะ	10.60197	99.09418	CHP46-S13
	CHP47	หินแก้ว	ท่าแซะ	10.60192	99.09411	CHP47-S01

หมายเหตุ: NA = no available = ไม่มีการเก็บข้อมูล

- = ไม่พบเชื้อที่สนใจศึกษา

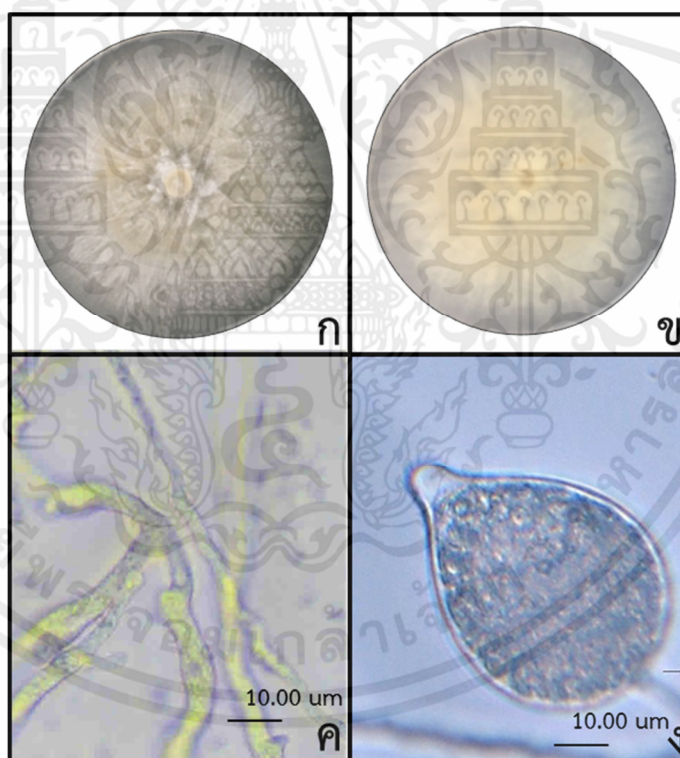
4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Phytophthora*, *Pythium* และ *Mortierella*

เชื้อราก่อโรคจำนวน 33 ไอโซเลต สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามลักษณะการเจริญของโคโลนี ระยะเวลาที่โคโลนีเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปร่างของ sporangia การปล่อย zoospores ออกจาก sporangia ได้แก่ สกุล *Phytophthora* จำนวน 8 ไอโซเลต สกุล *Pythium* จำนวน 12 ไอโซเลต และนอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella* ได้จำนวน 13 ไอโซเลต ซึ่งมีจำนวนมากใกล้เคียงกับการคัดแยกเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* จึงคาดว่าอาจเป็นสาเหตุของโรครากและโคนเน่าในทุเรียน จึงสนใจในการศึกษาครั้งนี้ด้วย โดยมีรายละเอียดของเชื้อราแต่ละสกุลดังนี้

4.1.1.1 สกุล *Phytophthora*

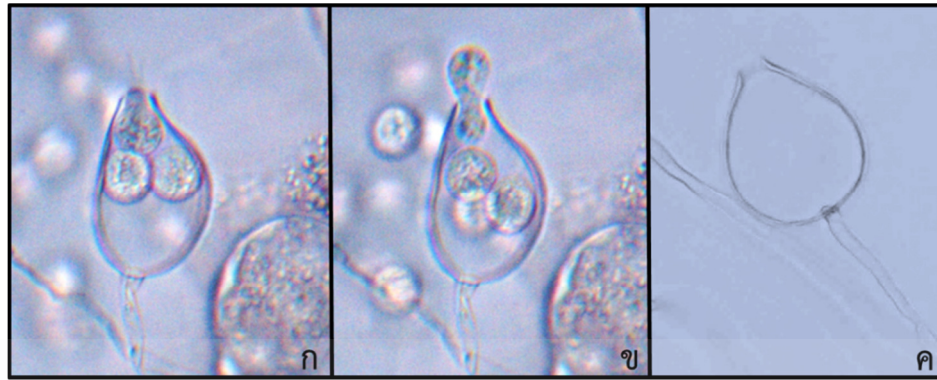
บ่งชี้เป็นเชื้อราสกุล *Phytophthora* จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ CHP25-S08, CHP34S14, CHP37-S19, CHP38-S22, CHP39-S01, CHP40-S14, CHP41-S07 และ CHP47-S01 โดยเมื่อเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 10 วัน โคโลนีมีสีขาว เส้นใยเรียงไปกับผิวหน้าอาหาร ลักษณะการเจริญเป็นแฉกคล้ายดาว หรือที่เรียกว่า stellate แสดงลักษณะโคโลนีด้านหน้า

และด้านหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต CHP38-S22 ดังรูปที่ 4.1ก-ข เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีผนังกัน (รูปที่ 4.1ค) sporangia มีหลากหลายรูปร่าง ได้แก่ ovoid, limoniform, obpyriform, obturbinate และ basal plug conspicuous แต่รูปร่างโดยส่วนใหญ่คือ ovoid มีขนาดความกว้างตั้งแต่ 19.23-53.44 ไมโครเมตร และความยาว 25.62-78.15 ไมโครเมตร ซึ่ง sporangia มีการสร้าง papilla ยื่นออกมาอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.1ง) เพื่อใช้ในการปล่อย zoospores ออกสู่สิ่งแวดล้อม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Phytophthora* sp. จำนวน 8 ไอโซเลต พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของสนชัย (2540); Santoso *et al.* (2015) และ Das *et al.* (2016) โดย sporangia การปล่อย zoospores จะปล่อยทีละ 1 zoospores ผ่านช่อง papilla ของ sporangia โดยตรง (รูปที่ 4.2ก-ข) เมื่อการปล่อย zoospores เสร็จสมบูรณ์จะเหลือไว้เพียง sporangia ที่ไม่มี zoospores อยู่ภายใน (รูปที่ 4.2ค) ซึ่งลักษณะการปล่อย zoospores สอดคล้องกับงานวิจัยของ Burgess *et al.* (2008) ที่พบว่าสกุล *Phytophthora* มีการปล่อย zoospores จาก sporangia โดยตรง



รูปที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล *Phytophthora* ไอโซเลต CHP38-S22 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 10 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสาร (ค) เส้นใยไม่มีผนังกัน และ (ง) sporangia ที่มี papilla กรุณาให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 การปล่อย zoospores ออกจาก sporangia (ก) ปลาย papilla แตกออก (ข) ปล่อย zoospores ออกจาก sporangia และ (ค) หลังจากการปล่อย zoospores

4.1.1.2 สกุล *Pythium*

บ่งชี้เป็นเชื้อราสกุล *Pythium* จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ CHP10-S07, CHP14-S11, CHP14-N11, CHP16-N01, CHP17-N05, CHP18-N03, CHP22-S05, CHP25-S10, CHP34-S09, CHP36-S12, CHP45-S02 และ CHP46-S13 กลุ่มนี้มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วเมื่อเทียบกับสกุล *Phytophthora* รวมทั้ง sporangia ไม่มีการสร้าง papilla (รูปที่ 4.3ก) พบการปล่อย zoospores ออกจาก sporangia โดยการสร้างท่อยื่นออกมาจาก sporangia และปลายท่อจะมีลักษณะเป็นถุง หรือที่เรียกว่า vesicle (รูปที่ 4.3ข-ค) เมื่อการปล่อย zoospores เสร็จสมบูรณ์จะไม่พบผนังของ sporangia เหลืออยู่ เนื่องจากแรงดันที่ทำให้ vesicle แตกออก ลักษณะการปล่อย zoospores สอดคล้องกับรายงานของ Burgess *et al.* (2008) แต่ไม่พบการปล่อย zoospore ของทุกไอโซเลต ดังนั้นจึงอาศัยลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร PDA รูปร่างและขนาดของ sporangia ในการบ่งชี้

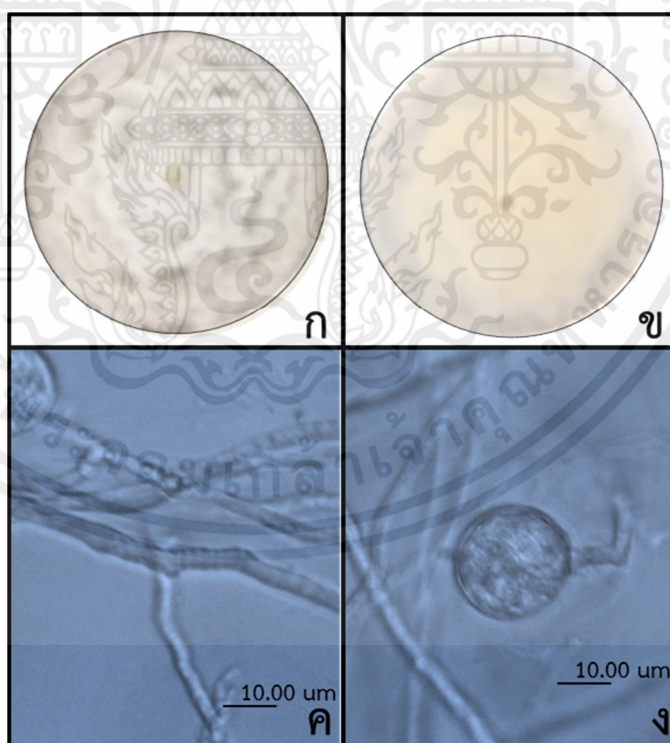


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดรูปที่ 4.3 การปล่อย zoospores ออกจาก sporangia (ก) sporangia ก่อนปล่อย zoospores (ข) ขณะ sporangia สร้างท่อ (ค) ขณะกำลังเคลื่อนย้าย zoospores ไปยัง vesicle

เส้นใยของเชื้อราในสกุล *Pythium* มีสีขาว และมีความเหนียว เมื่อวัตถุสัมผัส โคนเส้นใย เส้นใยจะยุบตัวลง เรียบไปกับผิวหน้าอาหาร สามารถแบ่งเชื้อราทั้ง 12 ไอโซเลต ออกได้ เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร PDA ได้แก่ petaloid, cotton candy และ stellate stiated

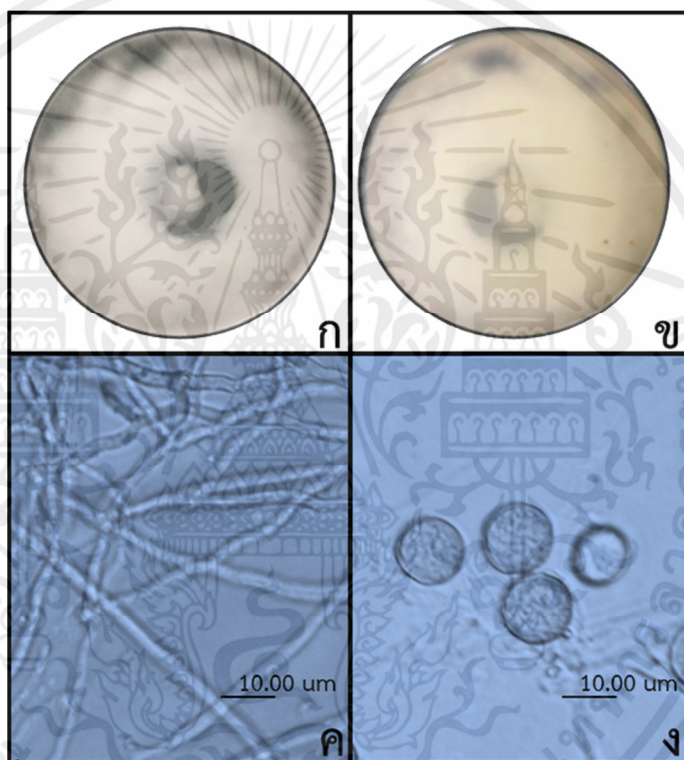
1) petaloid หรือ petellate คือ ลักษณะคล้ายกลีบดอกไม้เล็กๆ ซ้อนกันเป็น วงกลม ไอโซเลตที่มีลักษณะการเจริญแบบ petaloid มีจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ CHP10-S07, CHP14-S11, CHP14-N11, CHP16-N01, CHP22-S05, CHP34-S09, CHP45-S02 และ CHP46-S13 โดยแสดงตัวอย่างของโคโลนีด้านหน้า (รูปที่ 4.4ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.4ข) เมื่อศึกษาภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยไม่มีสีและไม่มีผนังกัน (รูปที่ 4.4ค) นอกจากนี้พบรูปร่างของ sporangia ส่วนใหญ่เป็นแบบ globose ดังรูปที่ 4.4ง และอาจพบรูปร่าง ellipsoid ได้แต่มีจำนวนน้อย sporangia ไม่มีการสร้าง papilla และสามารถแบ่งขนาดของ sporangia ออกเป็นขนาดเล็ก (CHP10-S07, CHP14-S11, CHP14-N11 และ CHP16-N01) มีขนาดความกว้าง x ความยาวอยู่ใน ช่วง 8.25-17.04 x 8.50-19.96 ไมโครเมตร และ sporangia ที่มีขนาดใหญ่ (CHP22-S05, CHP34-S09, CHP45-S02 และ CHP46-S13) ซึ่งมีความกว้าง x ความยาวอยู่ในช่วง 14.14-20.81 x 15.06-21.48 ไมโครเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

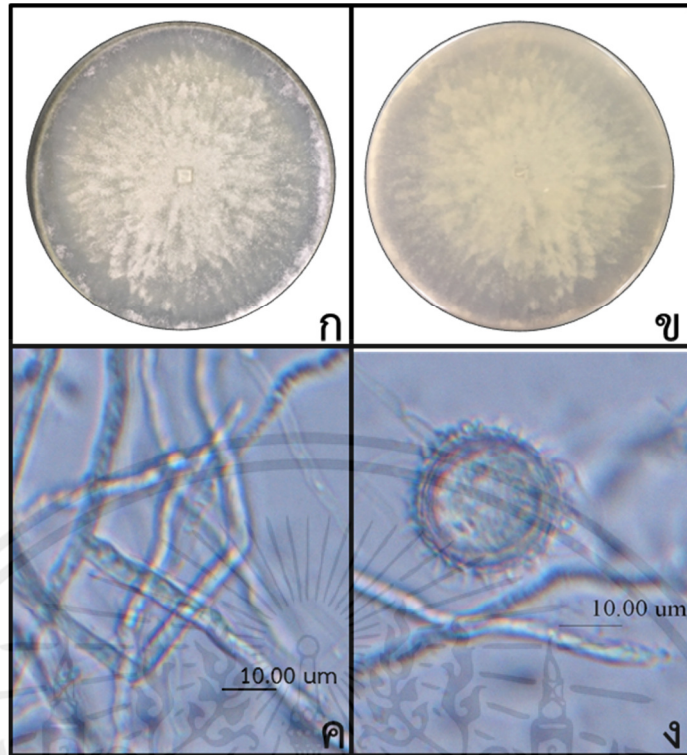
รูปที่ 4.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล *Pythium* ของไอโซเลต CHP45-S02 ที่มีลักษณะการเจริญแบบ petaloid ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) sporangia

2) cotton candy คือ เส้นใยสีขาว มีลักษณะฟูบนอาหาร คล้ายขนมสายไหม ซึ่งมีจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ CHP17-N05, CHP18-N03 และ CHP25-S10 โดยแสดงตัวอย่างของ โคลนிட้านหน้า (รูปที่ 4.5ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.5ข) ของไอโซเลต CHP17-N05 เมื่อศึกษาภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยไม่มีสี ไม่มีผนังกัน (รูปที่ 4.5ค) โดยพบรูปร่าง sporangia ของทั้ง 3 ไอโซเลต เพียงรูปร่างเดียว คือ globose และไม่มีการสร้าง papilla (รูปที่ 4.5ง) โดยมีขนาดของ sporangia หลากหลาย แตกต่างกัน โดยไอโซเลต CHP17-N05 มีขนาด 11.51-20.18 × 11.56-22.53 ไมโครเมตร CHP18-N03 มีขนาด 27.72-42.62 × 27.77-42.70 ไมโครเมตร และ CHP25-S10 มีขนาด 9.89-18.21 × 10.44-19.02 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล *Pythium* ของไอโซเลต CHP17-N05 ที่มีลักษณะการเจริญแบบ cotton candy โดยเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคลนிட้านหน้า (ข) โคลนிட้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) sporangia

3) stellate stiated คือ เส้นใยเรียบไปบนผิวหน้าอาหาร ลักษณะเรียงตัวกันเป็นริ้ว ขอบแต่ละริ้วมีความมน ไม่แหลม พบเพียง 1 ไอโซเลต คือ CHP36-S12 (รูปที่ 4.6ก-ข) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีสี ไม่มีผนังกัน (รูปที่ 4.6ค) พบ sporangia รูปร่างกลมไม่ว่ากรณี globose เพียงรูปร่างเดียว และมีลักษณะคล้ายหนามแหลม สั้น ล้อมรอบ sporangia ดังรูปที่ 4.6ง โดยมีขนาดความกว้าง × ความยาว คือ 20.52-24.19 × 21.11-24.35 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล *Pythium* มีลักษณะการเจริญแบบ stellate stiated ได้แก่ ไอโซเลต CHP36-S12 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) sporangia

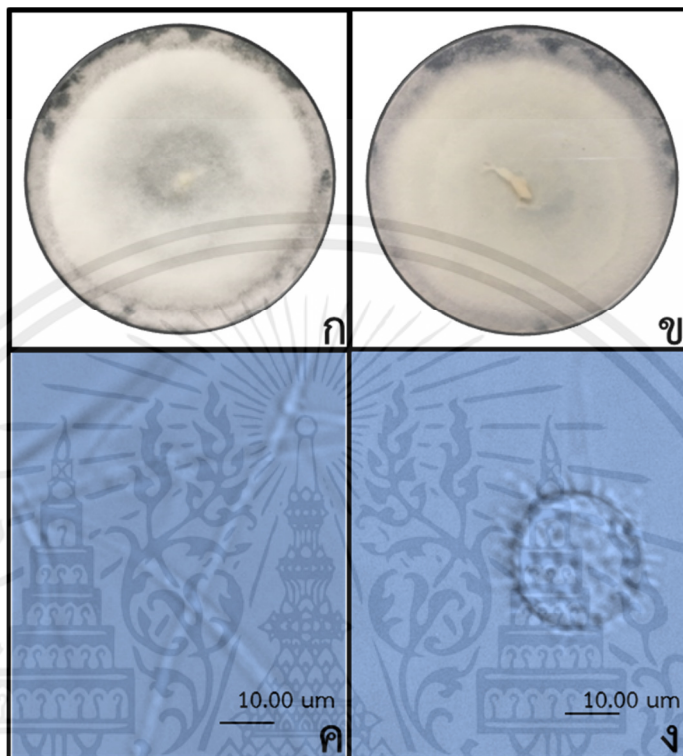
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Pythium* ทั้ง 3 กลุ่ม มีลักษณะโคโลนี รูปร่างของ sporangia สอดคล้องกับงานวิจัยของ Santoso *et al.* (2015) และ Kageyama (2014) พบว่า โคโลนีของเชื้อราสกุล *Pythium* มีลักษณะโคโลนีได้หลายแบบทั้ง petaloid และ cottony พบ sporangia หลายรูปร่าง ได้แก่ globose, ovoid, ellipsoid และ obpyriform มีขนาดตั้งแต่ขนาดเล็ก จนกระทั่งขนาดใหญ่ โดยมีความกว้าง x ความยาวตั้งแต่ 5-22 x 7-26 ไมโครเมตร

4.1.1.3 สกุล *Mortierella*

สามารถคัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella* ที่มีแนวโน้มบ่งชี้เป็นเชื้อราสกุล *Mortierella* ประกอบด้วย 13 ไอโซเลต โดยมีการเจริญเติบโตของโคโลนีแบบดอกกุหลาบ (rose) คือ โคโลนีมีลักษณะคล้ายดอกกุหลาบ จากลักษณะของโคโลนีสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะการจัดเรียงของเส้นใยที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับเส้นใยสีขาว ฟู แต่ขอบของโคโลนียังแสดงลักษณะเป็นแฉกคล้ายดอกไม้
ไม่ว่ากรณีใดๆ จำนวน 9 ไอโซเลต ได้แก่ CHP06-S04, CHP17-N11, CHP25-S01, CHP26-S17, CHP28-S03, CHP28-S05, CHP16-N06, CHP26-S04 และ CHP26-S11 โดยแสดงตัวอย่างโคโลนีด้านหน้า (รูปที่

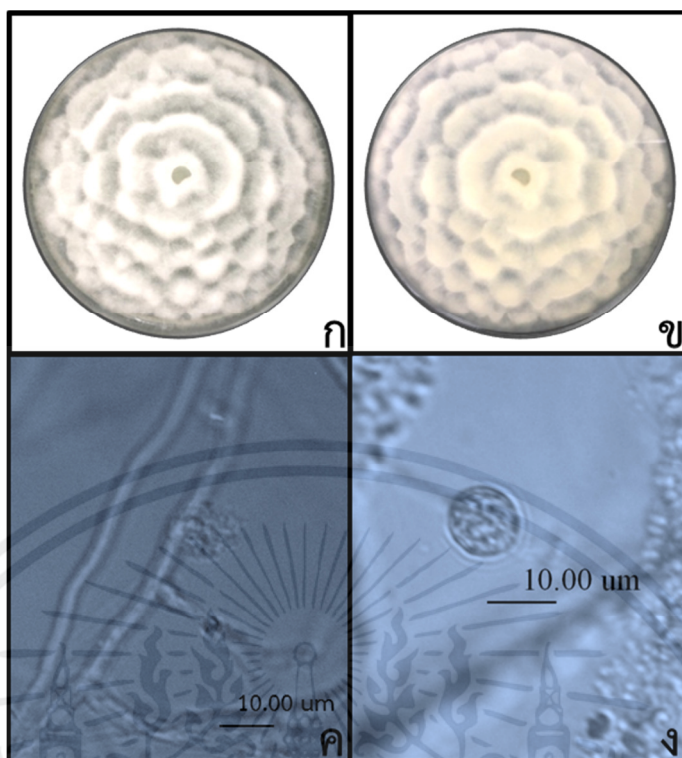
4.7ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.7ข) ของไอโซเลต CHP25-S01 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใยไม่มีสี ไม่มีผนังกัน (รูปที่ 4.7ค) และ spore มีรูปร่าง globose เพียงรูปร่างเดียว (รูปที่ 4.7ง) มีขนาดความกว้าง x ความยาว 12.19-20.85 x 13.19-21.63 ไมโครเมตร



รูปที่ 4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล *Mortierella* ของไอโซเลต CHP25-S01 ที่มีลักษณะการเจริญของโคโลนีแบบ rose ที่มีเส้นใยสีขาว พู แต่ขอบโคโลนียังคงมีลักษณะเป็นกลีบดอกไม้ ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) spore

2) เส้นใยสีขาว เส้นใยมีการเรียงตัวกันลักษณะคล้ายรูปดอกกุหลาบชัดเจน โดยเส้นใยมีการเจริญซ้อนกันทำให้มองเห็นคล้ายกลีบกุหลาบซ้อนกัน จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ CHP06-S03, CHP22-S10 และ CHP23-S13 โดยแสดงตัวอย่างโคโลนีด้านหน้า (รูปที่ 4.8ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.8ข) ของไอโซเลต CHP06-S03 เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีผนังกัน (รูปที่ 4.8ค) ในกลุ่มนี้มี spore ขนาดเล็ก โดยมีความกว้าง x ความยาว คือ 5.30-11.17 x 7.24-13.01 ไมโครเมตร และรูปร่างของ spore เป็นแบบ limoniform (รูปที่ 4.8ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



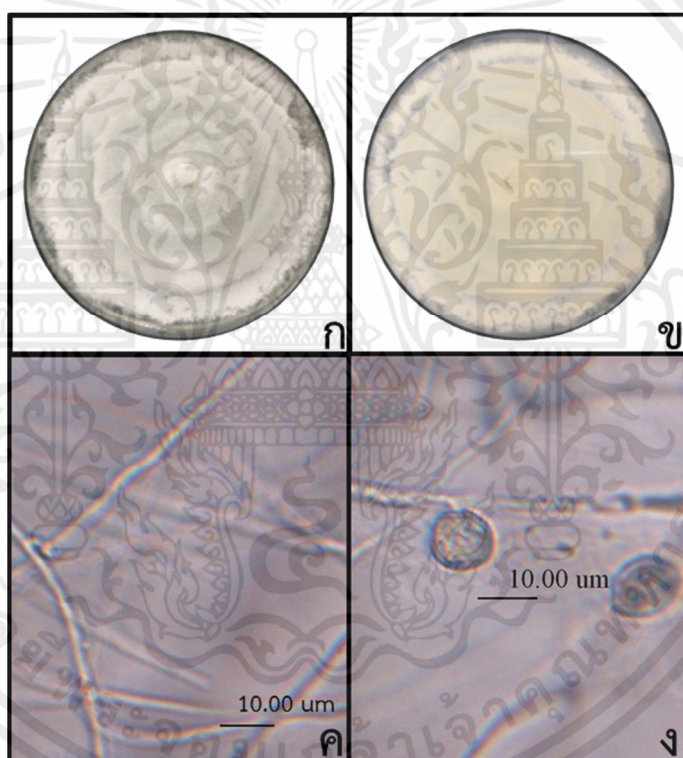
รูปที่ 4.8 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล *Mortierella* ไอโซเลต CHP06-S03 ที่มีลักษณะการเจริญของโคโลนีและเส้นใยคล้ายรูปดอกกุหลาบ ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) spore

3) เส้นใยสีขาวและมีการเจริญของเส้นใยเรียงตัวกันเป็นรูปดอกกุหลาบ ที่มีเส้นใยต่อกันคล้ายลักษณะกลีบติดกัน โดยพบเพียงไอโซเลตเดียว คือ CHP33-S06 โดยมีลักษณะโคโลนีด้านหน้า (รูปที่ 4.9ก) และด้านหลัง (รูปที่ 4.9ข) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยไม่มีผนังกัน (รูปที่ 4.9ค) รูปร่างของ spore เป็นแบบ limoniform (รูปที่ 4.8ง) โดยมีขนาดสปอร์ใกล้เคียงกับไอโซเลตเชื้อราสกุล *Mortierella* ในข้อ 2 คือ ความกว้าง x ความยาวเท่ากับ 7.55-10.10 x 10.00-12.82 ไมโครเมตร

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราทุกไอโซเลตอันประกอบด้วย รูปแบบการเจริญของโคโลนีบนจานอาหาร PDA รูปร่าง ขนาดความกว้างและความยาวของ sporangia การสร้างและไม่สร้าง papilla ของ sporangia และการจำแนกเชื้อตามสกุล ดังตารางที่ 4.2

ทำการคัดเลือกตัวแทนในแต่ละกลุ่มเพื่อบ่งชี้สปีชีส์ของเชื้อราด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล และเอกสารนี้เป็นยืนยันการบ่งชี้ลักษณะสัณฐานวิทยาดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยจาก 33 ไอโซเลต ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่ไม่ว่ากรณีไอโซเลตที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มจำนวน 18 ไอโซเลต ได้แก่ สกุล *Phytophthora* จำนวน 3 ไอโซเลต สกุล *Pythium* คัดเลือกจากลักษณะโคโลนี และขนาดของ sporangia โดยไอโซเลตที่มีการเจริญของ

โคโลนีแบบ petaloid และมี sporangia ขนาดใหญ่ จำนวน 2 ไอโซเลต และที่มี sporangia ขนาดเล็ก จำนวน 2 ไอโซเลต กลุ่มที่มีการเจริญของโคโลนีแบบ cotton candy จำนวน 3 ไอโซเลต และ *Pythium* กลุ่มที่มีการเจริญของโคโลนีแบบ stellate stiated จำนวน 1 ไอโซเลต และสกุล *Mortierella* คัดเลือกจากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน โดยกลุ่มที่มีรูปแบบการเจริญเป็นเส้นใยฟู แต่ขอบโคโลนียังคงมีลักษณะซ้อนคล้ายกลีบดอกไม้ จำนวน 3 ไอโซเลต กลุ่มที่มีลักษณะการเจริญของเส้นใยซ้อนทับกัน ทำให้โคโลนีมีลักษณะเป็นรูปดอกไม้ชัดเจน จำนวน 3 ไอโซเลต และลักษณะที่เส้นใยซ้อนกันทำให้มีลักษณะโคโลนีคล้ายดอกไม้ แต่กลีบต่อกัน จำนวน 1 ไอโซเลต รวมจำนวนทั้งหมด 18 ไอโซเลต ได้แก่ CHP25-S08, CHP38-S22, CHP34-S14, CHP22-S05, CHP45-S02, CHP14-S11, CHP14-N11, CHP17-N05, CHP18-N03, CHP25-S10, CHP36-S12, CHP06-S03, CHP22-S10, CHP23-S13, CHP16-N06, CHP25-S01, CHP26-S11 และ CHP33-S06



รูปที่ 4.9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสกุล *Mortierella* ของไอโซเลต CHP33-S06 ที่มีลักษณะการเจริญของเส้นใยซ้อนกันคล้ายดอกกุหลาบที่มีกลีบติดกัน ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะเส้นใย และ (ง) spore

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Phytophthora*, *Pythium* และ *Mortierella*

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	Sporangia			Papilla	สกุล
		รูปร่าง	ความกว้าง (ไมโครเมตร)	ความยาว (ไมโครเมตร)		
CHP25-S08	stellate	ovoid, limoniform และ obpyriform	25.33-45.34	26.29-56.74	+	<i>Phytophthora</i>
CHP34-S14	stellate	ovoid, limoniform, obpyriform, obturbinate และ basal plug conspicuous	24.23-40.35	35.15-65.30	+	<i>Phytophthora.</i>
CHP37-S19	stellate	ovoid, limoniform และ obturbinate	19.23-37.59	33.48-58.94	+	<i>Phytophthora</i>
CHP38-S22	stellate	ovoid, limoniform และ obturbinate	21.90-34.21	28.24-69.58	+	<i>Phytophthora</i>
CHP39-S01	stellate	ovoid, limoniform และ obturbinate	20.85-46.12	33.25-59.35	+	<i>Phytophthora</i>
CHP40-S14	stellate	ovoid, limoniform และ obturbinate	22.79-53.44	25.62-70.38	+	<i>Phytophthora</i>
CHP41-S07	stellate	ovoid, limoniform, obpyriform และ obturbinate	24.72-40.11	37.08-64.68	+	<i>Phytophthora</i>
CHP47-S01	stellate	ovoid, limoniform และ obturbinate	21.80-47.65	30.65-78.15	+	<i>Phytophthora</i>
CHP10-S07	petaloid	globose และ ellipsoid	8.34-17.29	8.67-19.94	-	<i>Pythium</i>
CHP14-S11	petaloid	globose และ ellipsoid	9.91-17.87	10.14-19.96	-	<i>Pythium</i>
CHP14-N11	petaloid	globose และ ellipsoid	8.25-17.04	8.50-19.83	-	<i>Pythium</i>
CHP16-N01	petaloid	globose และ ellipsoid	14.97-18.86	15.36-20.31	-	<i>Pythium</i>
CHP22-S05	petaloid	globose และ ellipsoid	15.63-20.29	16.91-20.77	-	<i>Pythium</i>

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	Sporangia			Papilla	สกุล
		รูปร่าง	ความกว้าง (ไมโครเมตร)	ความยาว (ไมโครเมตร)		
CHP34-S09	petaloid	globose และ ellipsoid	14.14-19.35	15.06-21.32	-	<i>Pythium</i>
CHP45-S02	petaloid	globose และ ellipsoid	17.05-20.73	17.91-21.48	-	<i>Pythium</i>
CHP46-S13	petaloid	globose และ ellipsoid	16.39-20.81	16.88-21.01	-	<i>Pythium</i>
CHP17-N05	cotton candy	globose	11.51-20.18	11.56-22.53	-	<i>Pythium</i>
CHP18-N03	cotton candy	globose	22.72-42.62	27.77-42.70	-	<i>Pythium</i>
CHP25-S10	cotton candy	globose	9.89-18.21	10.44-19.02	-	<i>Pythium</i>
CHP36-S12	stellate stiated	globose	20.52-24.19	21.11-24.35	-	<i>Pythium</i>
CHP06-S04	rose (เส้นใยฟู)	globose	13.75-19.33	13.91-19.46	-	<i>Mortierella</i>
CHP17-N11	rose (เส้นใยฟู)	globose	14.50-20.38	14.62-21.17	-	<i>Mortierella</i>
CHP25-S01	rose (เส้นใยฟู)	globose	12.19-20.06	13.94-21.63	-	<i>Mortierella</i>
CHP26-S17	rose (เส้นใยฟู)	globose	14.39-20.16	14.55-20.54	-	<i>Mortierella</i>
CHP28-S03	rose (เส้นใยฟู)	globose	14.74-19.98	14.96-20.14	-	<i>Mortierella</i>
CHP28-S05	rose (เส้นใยฟู)	globose	12.52-19.73	13.19-19.81	-	<i>Mortierella</i>
CHP16-N06	rose (เส้นใยฟู)	globose	14.21-20.85	14.50-20.62	-	<i>Mortierella</i>

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี	Sporangia			Papilla	สกุล
		รูปร่าง	ความกว้าง (ไมโครเมตร)	ความยาว (ไมโครเมตร)		
CHP26-S04	rose (เส้นใยฟู)	globose	13.60-17.27	13.84-17.93	-	<i>Mortierella</i>
CHP26-S11	rose (เส้นใยฟู)	globose	14.69-19.21	14.88-20.03	-	<i>Mortierella</i>
CHP06-S04	rose (กลีบซ้อน)	limoniform	5.43-11.74	7.92-15.38	-	<i>Mortierella</i>
CHP17-N11	rose (กลีบซ้อน)	limoniform	5.81-11.57	7.95-13.79	-	<i>Mortierella</i>
CHP25-S01	rose (กลีบซ้อน)	limoniform	5.71-11.39	8.08-15.27	-	<i>Mortierella</i>
CHP26-S17	rose (กลีบซ้อน)	limoniform	5.31-11.52	7.24 -14.33	-	<i>Mortierella</i>
CHP28-S03	rose (กลีบซ้อน)	limoniform	5.86-11.17	8.24-14.48	-	<i>Mortierella</i>
CHP28-S05	rose (กลีบซ้อน)	limoniform	5.90-11.63	7.51-13.89	-	<i>Mortierella</i>
CHP16-N06	rose (กลีบซ้อน)	limoniform	6.07-11.26	8.91-14.28	-	<i>Mortierella</i>
CHP26-S04	rose (กลีบซ้อน)	limoniform	5.30-11.85	8.37-13.01	-	<i>Mortierella</i>
CHP26-S11	rose (กลีบซ้อน)	limoniform	5.85-11.43	8.11-14.99	-	<i>Mortierella</i>
CHP33-S06	rose (กลีบติด)	limoniform	7.55-10.10	10.00-12.82	-	<i>Mortierella</i>

หมายเหตุ: + คือ มีการสร้าง papilla และ - คือ ไม่มีการสร้าง papilla

4.1.2 ผลการศึกษาเทคนิคระดับโมเลกุลของเชื้อราก่อโรค

สำหรับการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora*, *Pythium* และ *Mortierella* ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่หรือพีซีอาร์ พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* มีขนาดใกล้เคียงกัน ที่ขนาดขึ้นดีเอ็นเอประมาณ 900 คู่เบส แต่เชื้อราสกุล *Mortierella* ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดเล็กกว่าคือประมาณ 700 คู่เบส ยกเว้นไอโซเลตที่ CHP06-S04, CHP16-N06, CHP17-N11, CHP25-S01, CHP26-S04, CHP26-S11, CHP26-S17, CHP28-S03 และ CHP28-S05 หรือเชื้อราสกุล *Mortierella* ในกลุ่มที่มีลักษณะการเจริญของเส้นใยเรียงตัวเป็นกลีบซ้อนกัน เห็นลักษณะโคโลนีเป็นรูปดอกกุหลาบชัดเจน ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส เช่นเดียวกับเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่าสามารถบ่งชี้เชื้อราสกุล *Phytophthora* เป็น *P. palmivora* ที่มีค่าความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และตรงกับหมายเลข Accession KP183963 ของฐานข้อมูล ซึ่งการบ่งชี้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อในสกุลนี้ (ตารางที่ 4.3)

สำหรับเชื้อราสกุล *Pythium* ที่มีลักษณะโคโลนีแบบ petaloid ทั้งที่มีขนาดของ sporangia แตกต่างกันแต่พบว่าบ่งชี้เป็นเชื้อ *P. cucurbitacearum* ไม่แตกต่างกันจากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูลให้เปอร์เซ็นต์การบ่งชี้ตั้งแต่ 96 ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่มีโคโลนีแบบ cotton candy พบว่าสามารถบ่งชี้ได้เป็น *P. splendens* และ *P. deliense* ซึ่งมีค่าความเหมือนในการบ่งชี้ 99 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า *P. splendens* มีขนาด sporangia ที่ไม่แน่นอนสามารถมีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ และในสกุล *Pythium* ที่มีลักษณะการเจริญของเส้นใยแบบ stellate stiated สามารถบ่งชี้ได้เป็น *P. acanthicum* ให้ค่าความเหมือนเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.3)

ในสกุล *Mortierella* ที่มีลักษณะการเจริญของเส้นใยฟู ขอบโคโลนีเป็นกลีบทำให้โคโลนีมีลักษณะแบบ rose บ่งชี้ได้เป็น *M. capitata* โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97-98 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่เส้นใยโคโลนีมีลักษณะกลีบดอกกุหลาบซ้อนกันเห็นเป็นรูปดอกกุหลาบชัดเจน บ่งชี้ได้เป็น *M. chlamydospora* และกลุ่มที่เส้นใยเจริญซ้อนกันทำให้โคโลนีที่มีลักษณะกลีบดอกกุหลาบติดกัน บ่งชี้เป็น *M. hyalina* ซึ่งมีค่าการบ่งชี้เท่ากับ 99 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามไอโซเลต CHP33-S06 ที่บ่งชี้ได้เป็น *M. hyalina* มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับฐานข้อมูลที่น้อยกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงทำการยืนยันการบ่งชี้ด้วยแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แต่ละสปีชีส์มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.3 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Phytophthora palmivora*, *Pythium cucurbitacearum*,

P. splendens, *P. deliense*, *P. acanthicum*, *Mortierella capitata*, *M. chlamydospora* และ *M. hyaline* มีความยาว 895, 924, 920, 885, 845, 674, 723 และ 634 คู่เบส ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 ผลการบ่งชี้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุลเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Phytophthora*, *Pythium* และ *Mortierella*

ไอโซเลต	การบ่งชี้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา	การบ่งชี้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล			
		ความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)	สปีชีส์	Accession Number	Identity (%)
CHP25-S08	<i>Phytophthora</i> sp.	895	<i>P. palmivora</i>	KP183963	99
CHP34-S14	<i>Phytophthora</i> sp.	895	<i>P. palmivora</i>	KP183963	99
CHP38-S22	<i>Phytophthora</i> sp.	895	<i>P. palmivora</i>	KP183963	99
CHP14-S11	<i>Pythium</i> sp.	924	<i>P. cucurbitacearum</i>	KP183959	99
CHP14-N11	<i>Pythium</i> sp.	924	<i>P. cucurbitacearum</i>	KP183959	96
CHP22-S05	<i>Pythium</i> sp.	924	<i>P. cucurbitacearum</i>	KP183959	99
CHP45-S02	<i>Pythium</i> sp.	924	<i>P. cucurbitacearum</i>	HQ237483	99
CHP17-N05	<i>Pythium</i> sp.	920	<i>P. splendens</i>	HQ237486	99
CHP18-N03	<i>Pythium</i> sp.	920	<i>P. splendens</i>	HQ237486	99
CHP25-S10	<i>Pythium</i> sp.	885	<i>P. deliense</i>	AY598622	99
CHP36-S12	<i>Pythium</i> sp.	845	<i>P. acanthicum</i>	KU210470	97
CHP06-S03	<i>Mortierella</i> sp.	674	<i>M. capitata</i>	MF115611	98
CHP22-S10	<i>Mortierella</i> sp.	674	<i>M. capitata</i>	MF115611	98
CHP23-S13	<i>Mortierella</i> sp.	674	<i>M. capitata</i>	KT804161	97
CHP16-N06	<i>Mortierella</i> sp.	723	<i>M. chlamydospora</i>	AB476422	99
CHP25-S01	<i>Mortierella</i> sp.	723	<i>M. chlamydospora</i>	AB476422	99
CHP26-S11	<i>Mortierella</i> sp.	723	<i>M. chlamydospora</i>	AB476422	99
CHP33-S06	<i>Mortierella</i> sp.	634	<i>M. hyalina</i>	KC009040	85

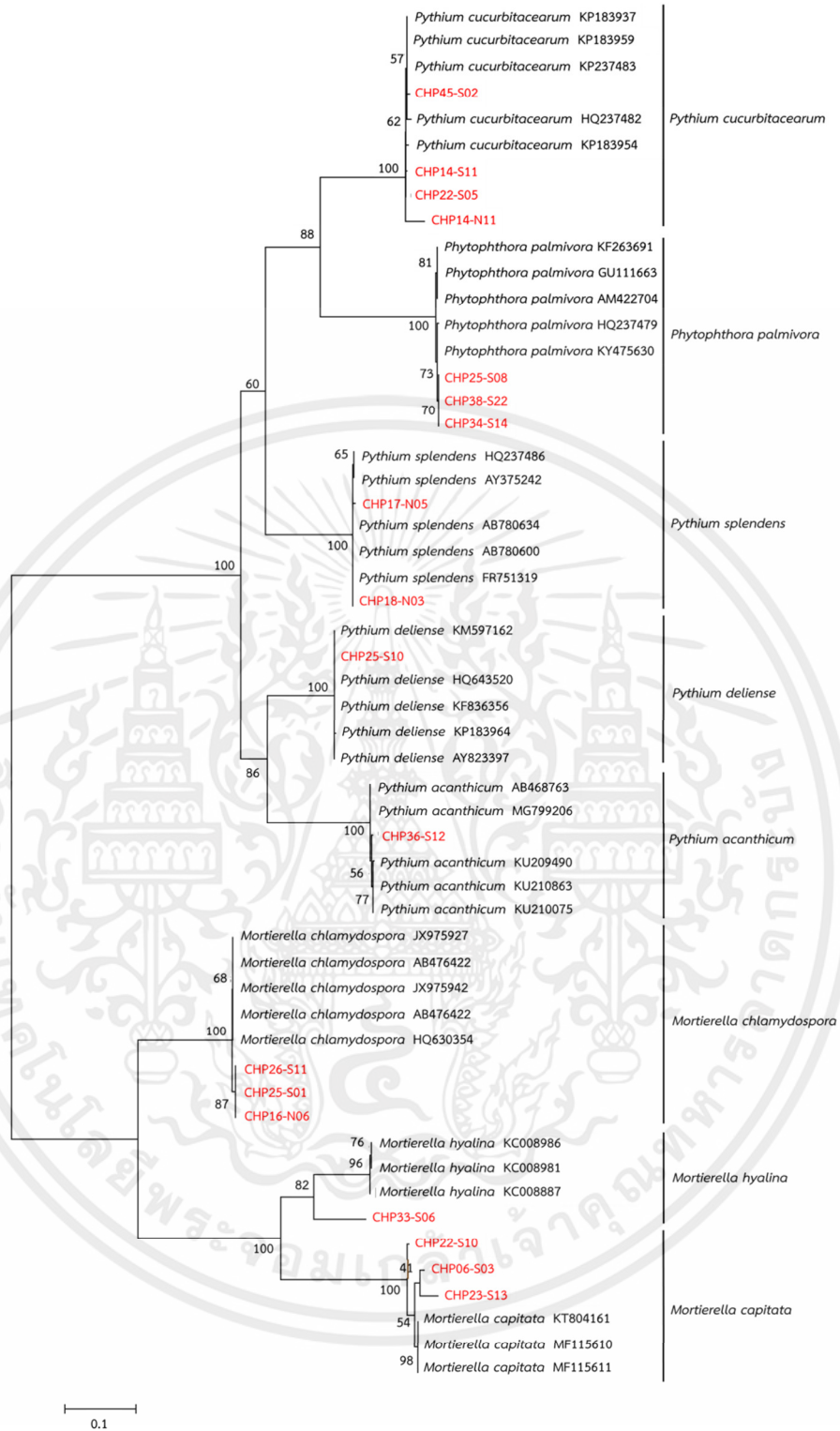
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ได้จากการทดลองและลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank มาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGA6 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราทั้ง 18 ไอโซเลต ออกเป็น 8 สปีชีส์ คือ *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum*, *P. splendens*, *P. deliense*, *P. acanthicum*, *M. capitata*, *M. chlamydospora* และ *M. hyalina* สอดคล้องตามผลการ BLAST ในฐานข้อมูล NCBI ข้างต้น แม้ว่า *M. hyalina* จะจัดอยู่ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในกลุ่มฐานข้อมูล แต่ไม่ใกล้ชิดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของฐานข้อมูล อาจเนื่องมาจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. hyalina* บริเวณ ITS ในฐานข้อมูลมีจำนวนน้อย

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม และแยกออกจากสกุล *Mortierella* อย่างชัดเจน ดังแสดงในแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ในรูปที่ 4.10

ผลการคัดแยกเชื้อรา *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum*, *P. deliense* และ *P. splendens* จากตัวอย่างดินและเปลือกไม้ที่เป็นโรครากและโคนเน่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Santoso *et al.* (2015) ที่คัดแยกเชื้อราเหล่านี้ได้จากตัวอย่างดินของต้นทุเรียนที่เป็นโรครากและโคนเน่าในประเทศอินโดนีเซีย นอกจากนี้การคัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella* ได้จากตัวอย่างดิน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Watanabe (2018) ที่สามารถคัดแยกเชื้อราสกุล *Mortierella* ได้จากตัวอย่างดินของต้นแตงกวาที่เป็นโรครากเน่าในประเทศญี่ปุ่น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS ของเชื้อสกุล *Phytophthora*, *Pythium* และ *Mortierella* จำนวน 18 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Likelihood และใช้รูปแบบ Tamura-Nei

4.2 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

ตัวอย่างดินสำหรับคัดแยกเชื้อราต่อต้านรบกวนได้จาก ตำบลรับร้อและตำบลท่าแซะ อำเภوتاแซะ จังหวัดชุมพร จำนวนตัวอย่าง 9 ตัวอย่าง ซึ่งกำหนดรหัสตัวอย่างดินตั้งแต่ CHA01 ถึง CHA09 พบว่าตัวอย่างดินที่สามารถคัดแยกเชื้อราต่อต้านได้มีจำนวน 3 ตัวอย่าง โดยสามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 4 ไอโซเลต แสดงวันที่เก็บตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง แหล่งที่มาของตัวอย่างดินและชื่อไอโซเลตเชื้อที่สามารถคัดแยกได้ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงวันที่เก็บตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง แหล่งที่มาของตัวอย่างดินสำหรับคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* และชื่อไอโซเลตเชื้อที่คัดแยกได้

วันที่เก็บ ตัวอย่างดิน	รหัส ตัวอย่างดิน	แหล่งที่มาตัวอย่างดิน		พิกัด		เชื้อที่แยกได้
		ตำบล	อำเภอ	ละติจูด	ลองจิจูด	
04 ก.พ. 60	CHA01	รับร้อ	ท่าแซะ	10.42330	99.0028	CHA01-A01
	CHA02	รับร้อ	ท่าแซะ	10.42331	99.0112	-
	CHA03	รับร้อ	ท่าแซะ	NA	NA	CHA03-A03 CHA03-A11
	CHA04	รับร้อ	ท่าแซะ	10.42332	99.0108	-
	CHA05	รับร้อ	ท่าแซะ	10.42341	99.0122	-
	CHA06	รับร้อ	ท่าแซะ	10.42089	99.0714	-
	CHA07	รับร้อ	ท่าแซะ	10.42097	99.0682	-
	CHA08	รับร้อ	ท่าแซะ	10.43185	98.59716	-
	CHA09	ท่าแซะ	ท่าแซะ	10.39817	99.13233	CHA09-A01

หมายเหตุ: NA = no available = ไม่มีการเก็บข้อมูล

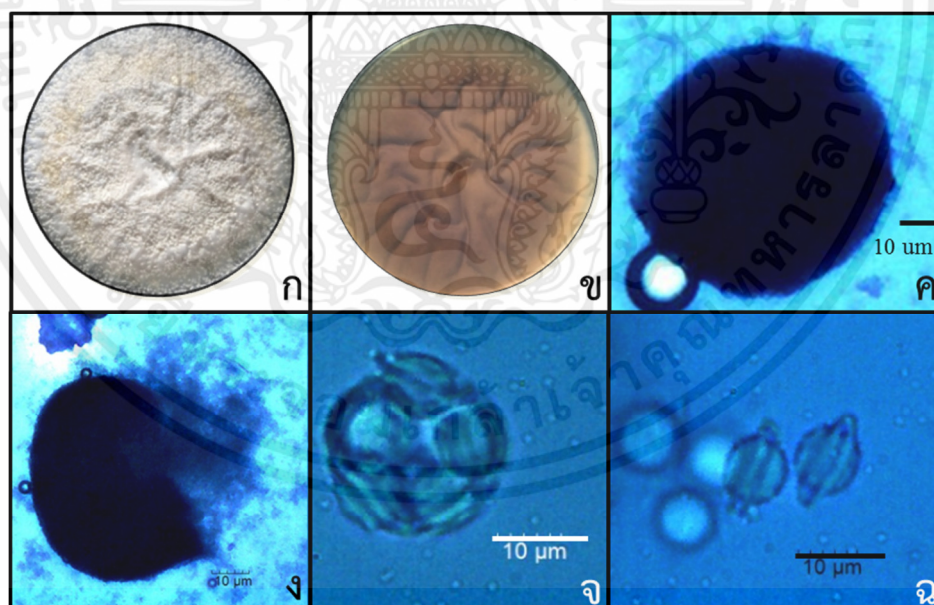
- = ไม่พบเชื้อที่สนใจศึกษา

4.2.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

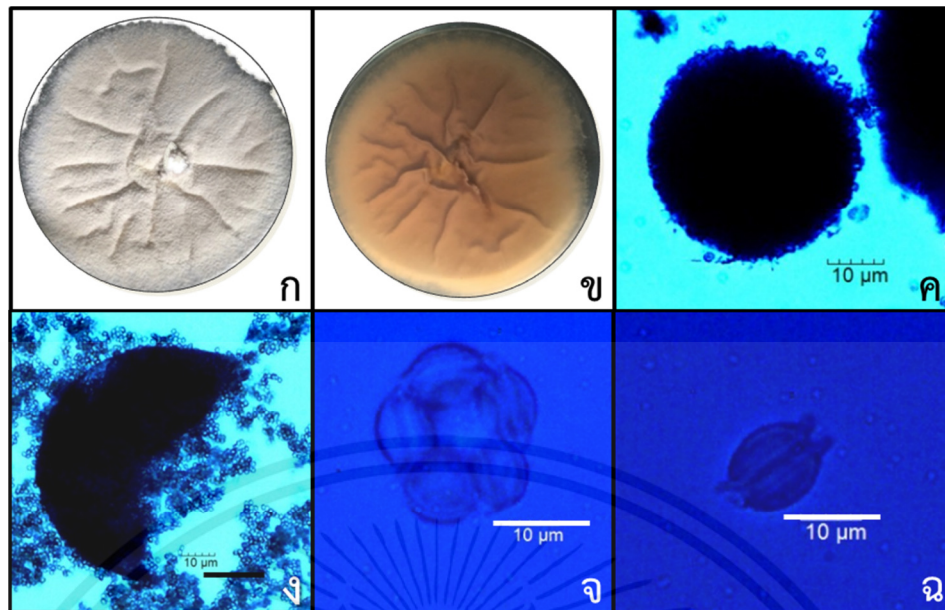
เชื้อราต่อต้านที่คัดแยกได้ เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาตาม Yilmaz *et al.* (2014) และ Samson *et al.* (2007) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม จากสีของโคโลนีและขนาดของ ascus และ ascospore โดยกลุ่มที่ 1 มีลักษณะโคโลนีมีสีขาว ถึงครีม (รูปที่ 4.11ก-ข) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 89.34-148.92 × 91.50-168.24 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.11ค-ง) แสดงลักษณะถุงของ ascus ดังรูปที่ 4.11จ ภายในประกอบด้วย ascospores มีรูปร่าง subglobose และ ellipsoidal ขนาด 7.62-8.04 × 9.90-12.38 ไมโครเมตร และมี ridge ที่มีลักษณะเป็นวงแหวน (รูปที่ 4.11ฉ) สอดคล้องกับงานวิจัย

ของ Samson *et al.* (2007) พบว่าเชื้อราสกุล *Neosartorya* มีโคโลนีสีขาวถึงเทาอ่อน สร้าง ascocarp แบบ cleistothecia และ ascospores มี ridge ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ CHA01-A01, CHA03-A11 และ CHA09-A01 จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต CHA01-A01 และ CHA03-A11 มีโคโลนีสีขาว แต่ลักษณะโคโลนีของ CHA03-A11 มีการสร้าง ascocarp บนจานอาหาร PDA ขนาดเล็กกว่าไอโซเลต CHA01-A01 อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.12ก-ข) แต่เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ารูปร่างและขนาดของ ascocarp (รูปที่ 4.12ค-ง) ascus (รูปที่ 4.12จ) และ ascospores (รูปที่ 4.12ฉ) มีรูปร่างเช่นเดียวกันและมีขนาดใกล้เคียงกัน และ CHA09-A01 มีโคโลนีสีครีม แต่รูปร่างและขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospores คล้ายคลึงกับ 2 ไอโซเลตที่กล่าวมาข้างต้น

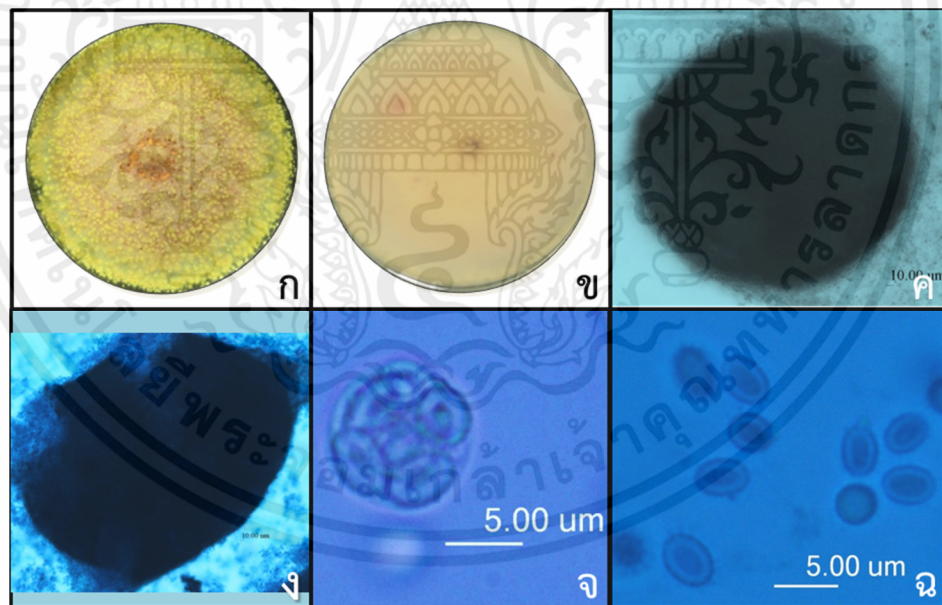
กลุ่มที่ 2 ลักษณะโคโลนีมีการสร้าง ascocarp สีเหลืองถึงส้ม (รูปที่ 4.13ก-ข) มีเพียงไอโซเลตเดียว คือ CHA03-A03 มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 230.61-245.94 x 240.34-265.18 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.13ค-ง) กุญ ascus ที่บรรจุ ascospores ภายในแสดงดังรูป 4.13จ โดย ascospores มีรูปร่าง subglobose และ ellipsoidal ขนาด 8.85-8.92 x 9.20-9.93 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.13ฉ) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yilmaz *et al.* (2014) พบว่าเชื้อราสกุล *Talaromyces* มีโคโลนีสีเหลืองถึงแดง สร้าง ascocarp แบบ cleistothecia และ ascospores ไม่มี ridge



รูปที่ 4.11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya* ไอโซเลต CHA01-A01 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 20 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ลักษณะ ascocarp (ง) ascocarp ที่แตก (จ) ascus และ (ฉ) ลักษณะ ascospores



รูปที่ 4.12 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Neosartorya* ไอโซเลต CHA03-A11 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 20 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง (ค) ascocarp (ง) ascocarp ที่แตก (จ) ascus และ (ฉ) ascospores



รูปที่ 4.13 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Talaromyces* ไอโซเลต CHA03-A03 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 20 วัน (ก) ลักษณะโคโลนีด้านหน้า (ข) โคโลนีด้านหลัง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ (ค) ascocarp (ง) ascocarp ที่แตก (จ) ascus และ (ฉ) ascospores ซึ่งประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการศึกษาเทคนิคระดับโมเลกุลของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

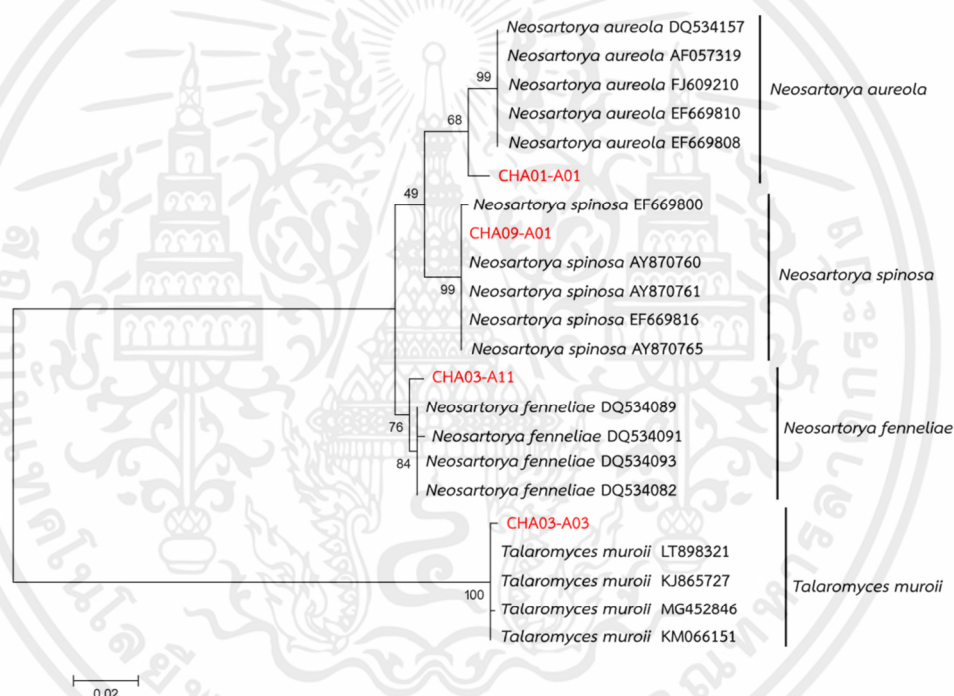
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ β -tubulin ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่หรือพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 600 คู่เบส และเชื้อราสกุล *Talaromyces* ที่ขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 คู่เบส สอดคล้องกับงานวิจัยของเมอมร (2558) ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่บริเวณ β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าบ่งชี้ไอโซเลต CHA01-A01 ได้เป็น *N. aureola* ซึ่งเหมือนกับหมายเลข Accession FJ609210 ในฐานข้อมูลถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต CHA03-A11 บ่งชี้เป็น *N. fennelliae* ค่าเปอร์เซ็นต์การบ่งชี้ 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต CHA09-A01 บ่งชี้ตรงกับ *N. spinosa* (AY870760) ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การบ่งชี้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต CHA03-A03 เหมือนกับ *T. muroii*

เพื่อทราบขนาดที่แท้จริงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ดำเนินการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ β -tubulin ของ *N. aureola*, *N. fennelliae* และ *N. spinosa* มีความยาวเท่ากับ 557, 555 และ 560 คู่เบสตามลำดับ และ *T. muroii* มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเล็กกว่า คือ 461 คู่เบส แสดงผลการบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการบ่งชี้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล ดังตารางที่ 4.5

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ โดยสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGA6 ดังรูปที่ 4.14 พบว่าแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม คือ *Neosartorya* และ *Talaromyces* และสามารถแยกเชื้อทั้งสองสกุลออกจากกันอย่างชัดเจน ภายในกลุ่มของ *Neosartorya* พบว่าไอโซเลต CHA01-A01 มีความใกล้ชิดกับ CHA09-A01 มากกว่า CHA03-A11 สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอันได้แก่ สีของโคโลนี รูปร่างและขนาด ascocarp, ascus และ ascospores ซึ่ง ไอโซเลต CHA03-A11 มีความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับอีก 2 ไอโซเลต ในการบ่งชี้เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลต บ่งชี้ได้เป็นเชื้อ 4 สปีชีส์ ได้แก่ CHA01-A01 บ่งชี้เป็น *N. aureola*, CHA03-A03 บ่งชี้เป็น *T. muroii*, CHA03-A11 บ่งชี้เป็น *N. fennelliae* และ CHA09-A01 บ่งชี้เป็น *N. spinosa*

ตารางที่ 4.5 ผลการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ไอโซเลต	การบ่งชี้ด้วย ลักษณะสัณฐาน- วิทยา	การบ่งชี้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล			
		ความยาวลำดับ นิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)	สปีชีส์	Accession	Identity (%)
CHA01-A01	<i>Neosartorya</i> sp.	557	<i>N. aureola</i>	FJ609210	98
CHA03-A03	<i>Talaromyces</i> sp.	461	<i>T. muroii</i>	LT898321	99
CHA03-A11	<i>Neosartorya</i> sp.	555	<i>N. fennelliae</i>	DQ534093	99
CHA09-A01	<i>Neosartorya</i> sp.	560	<i>N. spinosa</i>	AY870760	100



รูปที่ 4.14 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ β -tubulin ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ทั้ง 4 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Likelihood และใช้รูปแบบ Tamura-Nei

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อราก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคในระดับห้องปฏิบัติการของเชื้อราที่คัดแยกได้จากดิน
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุผลเบื้องต้นที่แสดงถึงความเสี่ยงของเชื้อราที่คัดแยกได้
ของต้นทุเรียนที่แสดงอาการโรครากและโคนเน่า จำนวน 33 ไอโซเลต ได้แก่ *Phytophthora palmivora* จำนวน 8 ไอโซเลต *Pythium cucurbitacearum* จำนวน 8 ไอโซเลต *P. splendens*

จำนวน 3 ไอโซเลต *P. deliense* จำนวน 1 ไอโซเลต *P. acanthicum* จำนวน 1 ไอโซเลต *Mortierella capitata* จำนวน 3 ไอโซเลต *M. chlamydospora* จำนวน 9 ไอโซเลต และ *M. hyalina* จำนวน 1 ไอโซเลต หลังจากทำการปลูกเชื้อลงบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองด้วยวิธี Detached leaf เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการทำให้ใบทุเรียนเกิดรอยแผลเน่ารุนแรงที่สุดไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี bi-culture ต่อไป และเปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าเชื้อ *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum* และ *P. splendens* มีความสามารถทำให้ใบทุเรียนแสดงอาการรอยแผลเน่าสีน้ำตาลดำถึงสีดำ แต่ให้ขนาดความกว้างและความยาวของรอยแผลแตกต่างกัน แผลจะลุกลามไปตามเส้นใบ และหากปล่อยทิ้งไว้นานกว่า 4 วันขึ้นไป แผลจะขยายลุกลาม จนเกิดอาการเน่าทั้งใบ ส่วนเชื้อ *P. deliense*, *P. acanthicum*, *M. capitata*, *M. chlamydospora* และ *M. hyaline* ไม่พบความสามารถในการทำให้ใบทุเรียนเกิดรอยแผลเน่า จากการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อก่อโรคจำนวน 33 ไอโซเลต แสดงค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 4 ซ้ำของขนาดรอยแผลเน่าบนใบทุเรียน ดังตารางที่ 4.6 และแสดงลักษณะรอยแผลเน่าบนใบทุเรียน ดังรูปที่ 4.15

เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของแต่ละไอโซเลตด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าแบ่งค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ a-i โดย a คือกลุ่มที่มีความรุนแรงในการสร้างขนาดรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนได้มากที่สุด ไปจนถึง f ซึ่งไม่มีความสามารถในการสร้างรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนเทียบเท่ากับตัวควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อลงบนใบทุเรียน ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติจากตารางที่ 4.6 พบว่า *P. palmivora* จำนวน 8 ไอโซเลต สร้างระดับความรุนแรงในการเกิดโรคมามากที่สุดเมื่อเทียบกับสปีชีส์อื่นๆ โดยมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ตั้งแต่กลุ่ม a ถึง f โดยไอโซเลตที่มีความรุนแรงมากที่สุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ CHP34-S14 และ CHP38-S22 ซึ่งสร้างขนาดรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนเท่ากับ 25.38 ± 0.81 และ 25.99 ± 0.81 มิลลิเมตร ตามลำดับ สอดคล้องกับค่ากล่าวของ Lim and Chan, 1986; Cooke *et al.*, 2009 และ Abad and Cruz, 2012 ที่กล่าวว่าโรครากและโคนเน่าในทุเรียนเกือบจะทั้งหมดมีสาเหตุจากเชื้อรา *P. palmivora* เป็นตัวก่อโรค และนอกจากนี้ยังมีเชื้อรา *P. cucurbitacearum* บางไอโซเลตที่สามารถทำให้ใบทุเรียนเกิดรอยแผลขนาดใหญ่เทียบเท่ากับ *P. palmivora* ได้แก่ ไอโซเลต CHP22-S05 และ CHP45-S02 สามารถสร้างขนาดรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนได้กว้างเท่ากับ 21.76 ± 0.12 และ 20.21 ± 1.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยภาพรวมของเชื้อรา *P. cucurbitacearum* จำนวน 8 ไอโซเลต พบว่ามีการแบ่งค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ c-h มีทั้งไอโซเลตที่สามารถในการสร้างรอยแผลขนาดใหญ่บนใบทุเรียนไปจนถึงมีสร้างรอยแผลขนาดเล็กเพียงแค่ 13.40 ± 0.46 มิลลิเมตร ได้แก่ ไอโซเลต CHP46-S13 อาจกล่าวได้ว่า *P. cucurbitacearum* มีความรุนแรงในการสร้างรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนรองลงมาจาก *P. palmivora* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Santoso *et al.* (2015) ที่ศึกษาเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการทำให้ต้นทุเรียนลดจำนวนลงในประเทศอินโดนีเซียพบว่า

เกี่ยวข้องกับเชื้อ *P. cucurbitacearum* และสามารถพบเชื้อนี้ในตัวอย่างดินของโรครากและโคนเน่าในทุเรียนได้จำนวนมากเทียบเท่ากับการพบ *P. palmivora*

ความสามารถในการเกิดโรคลำดับถัดมา ได้แก่ *P. splendens* ไอโซเลต CHP17-N05 และ CHP18-N03 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกลุ่ม h เป็นกลุ่มที่มีการสร้างรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนรองจาก *P. cucurbitacearum* สามารถสร้างขนาดรอยแผลบนใบทุเรียนได้เพียง 13.26 ± 0.36 และ 13.20 ± 0.28 มิลลิเมตร ตามลำดับ และนอกจากนี้ยังมีเชื้อราสกุล *Pythium* บางสปีชีส์ที่ไม่มีความสามารถในการทำให้ใบทุเรียนเกิดแผลเน่า ได้แก่ *P. deliense* และ *P. acanticum* เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อลงบนใบทุเรียนพบว่าไม่มีการสร้างรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการวิจัยใดที่รายงานถึงเชื้อ *P. splendens*, *P. deliense* และ *P. acanticum* ที่เกี่ยวข้องกับโรครากและโคนเน่าในทุเรียน มีเพียงงานวิจัยของ Santoso *et al.* (2015) ที่สามารถคัดแยกเชื้อ *P. deliense* ได้จำนวน 1 ไอโซเลตจากเชื้อทั้งหมดจำนวน 36 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินของโรครากและโคนเน่าในทุเรียนในประเทศอินโดนีเซีย แต่ในรายงานการศึกษาไม่มีการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อ *P. deliense* ส่วนเชื้อราสกุล *Mortierella* ได้แก่ *M. capitata*, *M. chlamydospora* และ *M. hyalina* จัดอยู่ในกลุ่มที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม i โดยมีค่าทางสถิติไม่แตกต่างจากตัวควบคุม (control) โดยมีรายงานถึงเชื้อ *Mortierella* ที่คัดแยกได้จากดินของต้นแตงกวาในประเทศญี่ปุ่นพบว่าไม่เป็นสาเหตุของโรคพืชในแตงกวา (Watanabe, 2018) นอกจากนี้ *Mortierella* มีจำนวนมากกว่า 90 สายพันธุ์ แต่ยังไม่มีการรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคพืช (Kidd, 2016) โดยทั่วไปแม้ว่าเชื้อราสกุล *Mortierella* สปีชีส์ที่คัดแยกได้จะไม่ใช่สาเหตุของโรคพืช แต่สามารถพบได้ในดินเนื่องจากเป็นเชื้อราที่มีจำนวนประชากรมากในดิน (Tsao and Guy, 1977)

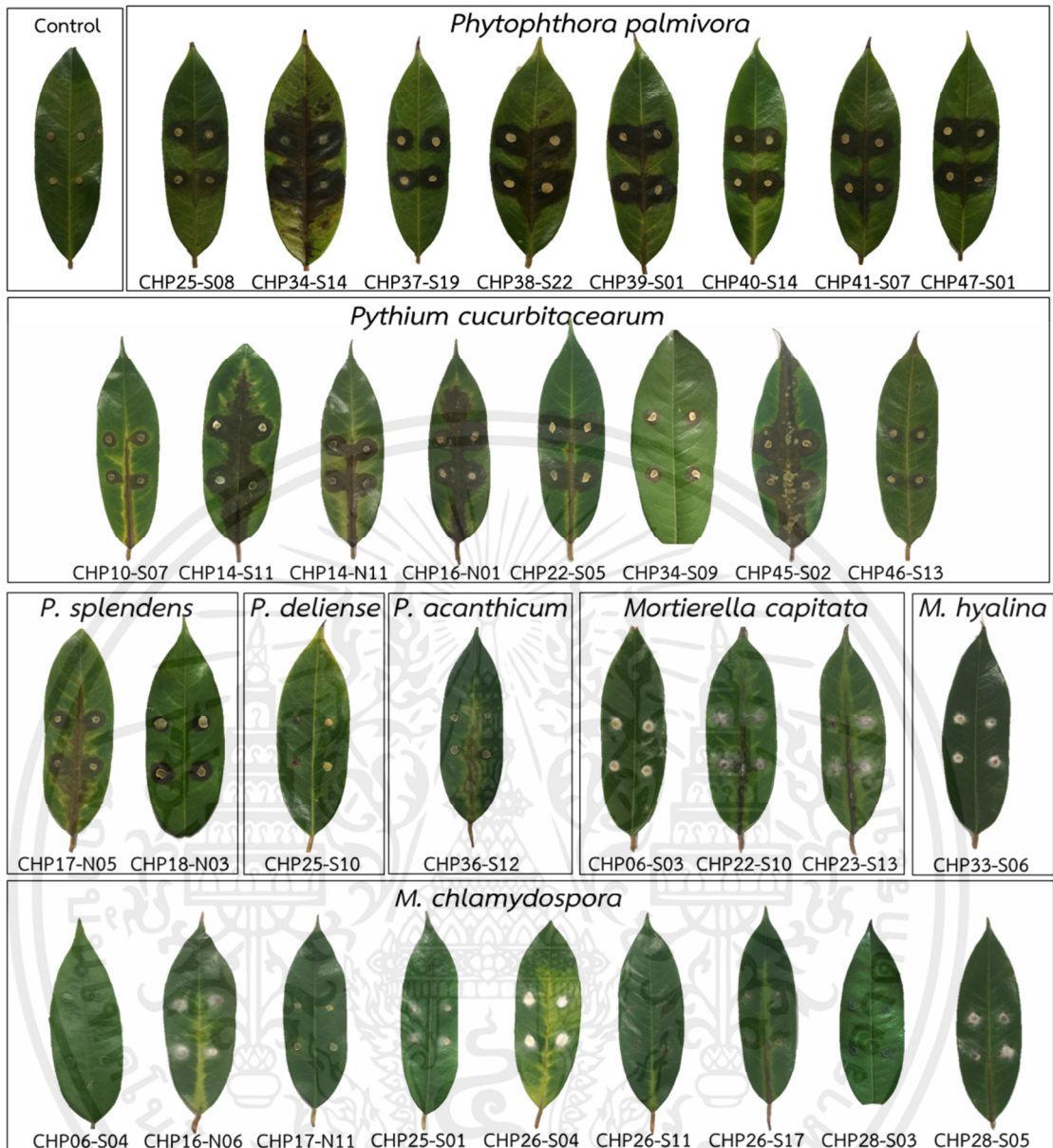
จากนั้นนำใบทุเรียนที่เกิดรอยแผลเน่ามาคัดแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue transplanting อีกครั้ง (re-isolate) เพื่อเป็นการยืนยันถึงเชื้อสาเหตุของรอยแผลเน่าแต่ละไอโซเลต และนำเชื้อที่ได้จากการ re-isolate ไปใช้ในการทดลองต่อไป ผลการ re-isolate พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้จากรอยแผลเน่าบนใบทุเรียนมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกับเชื้อที่ทำการทดสอบลงบนใบทุเรียน ดังนั้นจึงเลือกตัวแทนของแต่ละสปีชีส์ที่เพื่อนำไปใช้ในการศึกษา การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* ต่อไป โดยคัดเลือกจากไอโซเลตที่มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงมากที่สุด 2 อันดับแรกของแต่ละสปีชีส์ จากการทดลองข้างต้นพบว่า มีเพียง 3 สปีชีส์ ที่มีความสามารถในการทำให้ใบทุเรียนเกิดรอยแผลเน่า ได้แก่ *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum* และ *P. splendens* โดยไอโซเลตที่มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงมากที่สุด 2 อันดับแรกของทั้ง 3 สปีชีส์ ได้แก่ *P. palmivora* ไอโซเลต CHP34-S14 และ CHP38-S22 *P. cucurbitacearum* ไอโซเลต CHP22-S05 และ CHP45-S02 และ *P. splendens* ไอโซเลต CHP17-N05 และ CHP18-N03 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเน่าบนทุเรียนพันธุ์หมอนทอง (จำนวน 4 ซ้ำ) หลังจากปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 4 วัน

ไอโซเลต	สปีชีส์	เส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลเน่า (มิลลิเมตร)
Control	-	4.45 ⁱ
CHP25-S08	<i>Phytophthora palmivora</i>	19.04 ^f
CHP34-S14	<i>Phytophthora palmivora</i>	25.38 ^a
CHP37-S19	<i>Phytophthora palmivora</i>	19.15 ^{ef}
CHP38-S22	<i>Phytophthora palmivora</i>	25.99 ^a
CHP39-S01	<i>Phytophthora palmivora</i>	23.27 ^b
CHP40-S14	<i>Phytophthora palmivora</i>	22.25 ^{bc}
CHP41-S07	<i>Phytophthora palmivora</i>	20.72 ^{cd}
CHP47-S01	<i>Phytophthora palmivora</i>	22.98 ^b
CHP10-S07	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	13.26 ^g
CHP14-S11	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	18.24 ^f
CHP14-N11	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	18.08 ^f
CHP16-N01	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	16.04 ^g
CHP22-S05	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	21.76 ^c
CHP34-S09	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	13.20 ^g
CHP45-S02	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	20.21 ^{de}
CHP46-S13	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	13.40 ^h
CHP17-N05	<i>Pythium splendens</i>	15.61 ^h
CHP18-N03	<i>Pythium splendens</i>	16.60 ^h
CHP25-S10	<i>Pythium deliense</i>	4.76 ⁱ
CHP36-S12	<i>Pythium acanthicum</i>	5.20 ⁱ
CHP06-S03	<i>Mortierella capitata</i>	4.68 ⁱ
CHP22-S10	<i>Mortierella capitata</i>	4.47 ⁱ
CHP23-S13	<i>Mortierella capitata</i>	4.78 ⁱ
CHP06-S04	<i>Mortierella chlamydospora</i>	4.98 ⁱ
CHP16-N06	<i>Mortierella chlamydospora</i>	5.03 ⁱ
CHP17-N11	<i>Mortierella chlamydospora</i>	4.88 ⁱ
CHP25-S01	<i>Mortierella chlamydospora</i>	4.90 ⁱ
CHP26-S04	<i>Mortierella chlamydospora</i>	5.07 ⁱ
CHP26-S11	<i>Mortierella chlamydospora</i>	4.93 ⁱ
CHP26-S17	<i>Mortierella chlamydospora</i>	4.76 ⁱ
CHP28-S03	<i>Mortierella chlamydospora</i>	4.86 ⁱ
CHP28-S05	<i>Mortierella chlamydospora</i>	4.88 ⁱ
CHP33-S06	<i>Mortierella hyalina</i>	4.86 ⁱ

หมายเหตุ: a-i แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน โดย ANOVA ที่ P=0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อราสกุล *Phytophthora*, *Pythium* และ *Mortierella* บนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ที่ทดสอบด้วยวิธี Detached leaf เป็นระยะเวลา 4 วัน หลังจากทำการปลูกเชื้อลงบนใบทุเรียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ *N. aureala* CHA01-A01, *N. fennelliae* CHA03-A11, *N. spinosa* CHA09-A01 *N. hiratsukae* EU06, และ *N. pseudofisheri* EU13 และ *Talaromyces* จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ และ *Talaromyces muroii* CHA03-A03 และ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สาเหตุโรครากและโคนเน่าในทุเรียน โดยการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าผลการทดสอบประสิทธิภาพของรา *Neosartorya* จำนวน 5 ไอโซเลต และ *Talaromyces* จำนวน 2 ไอโซเลต ในการควบคุมเชื้อรา *P. palmivora* จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ CHP34-S14 และ CHP38-S22, *P. cucurbitacearum* จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ CHP22-S05 และ CHP45-S02 และ *P. splendens* จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ CHP17-N05 และ CHP18-N03 เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* พบว่าเชื้อรา *N. hiratsukae* EU06 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ไอโซเลต CHP34-S14 และ CHP38-S22 ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยมีจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* CHP34-S14 บนจานอาหารเพาะเลี้ยงร่วมเท่ากับ $1.38 \pm 0.22 \times 10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ของเชื้อราก่อโรคกับจานอาหารควบคุมของเชื้อราก่อโรคที่มีจำนวนสปอร์ 7.70×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสปอร์เท่ากับ 82.14 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ *T. muroii* EU18 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* CHP34-S14 บนจานอาหารเพาะเลี้ยงร่วมได้ 71.98 เปอร์เซ็นต์ โดยมีจำนวนสปอร์บนจานอาหารเพาะเลี้ยงร่วมเท่ากับ $2.20 \pm 0.29 \times 10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่จานอาหารควบคุมของเชื้อรา *P. palmivora* CHP34-S14 มีสปอร์เท่ากับ 7.85×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับลักษณะการเจริญของโคโลนี ยกตัวอย่างการเจริญของเชื้อรา CHP34-S14 กับ *N. hiratsukae* EU06 ขนาดโคโลนีของเชื้อราต่อต้านมีขนาดมากกว่าขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* และสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรคได้ (รูปที่ 4.16 ก) เช่นเดียวกับการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* CHP38-S22 พบว่าเชื้อรา *N. hiratsukae* EU06 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* CHP38-S22 ได้มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยมีจำนวนสปอร์ของเชื้อราก่อโรคบนจานอาหารเพาะเลี้ยงร่วมที่เลี้ยงร่วมกับ *N. hiratsukae* EU06 เท่ากับ $2.20 \pm 0.29 \times 10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* CHP38-S22 กับจานอาหารควบคุมของเชื้อราก่อโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 68.12 เปอร์เซ็นต์ เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *P. palmivora* อันดับรองลงมาได้แก่ *T. muroii* EU18 สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของ *P. palmivora* CHP38-S22 ได้ 67.50 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับลักษณะการเจริญของโคโลนี ยกตัวอย่างการเจริญของเชื้อรา CHP38-S22 บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับ *T. muroii* EU18 ขนาด

โคโลนีของเชื้อราต่อต้านมีขนาดมากกว่าขนาดโคโลนีของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* และสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรคได้ (รูปที่ 4.16ข)

นอกจากนี้เชื้อ *N. spinosa* CHA09-A01 ยังสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* CHP34-S14 และ CHP38-S22 ได้ 55.52 และ 49.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Eamvijarn (2013) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *N. spinosa* สามารถควบคุม *P. palmivora* ได้ 56.1 เปอร์เซ็นต์

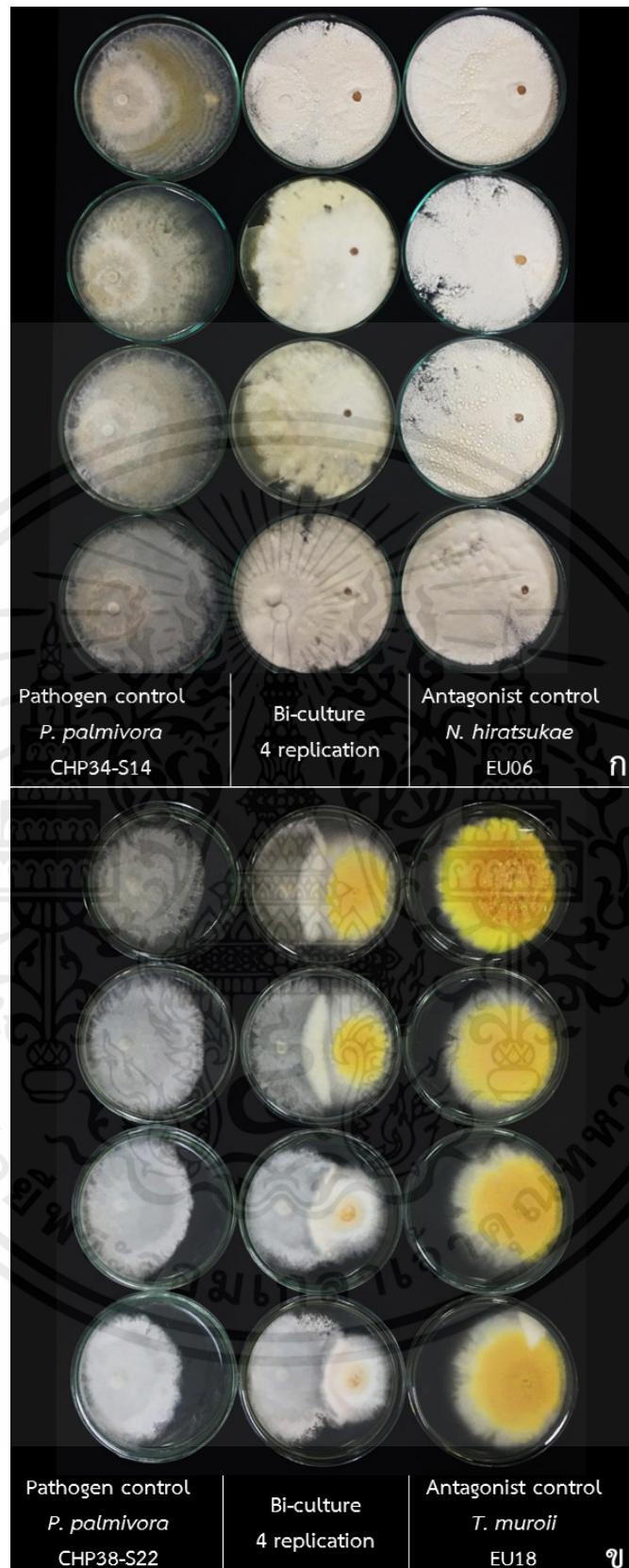


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 จำนวนสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ไอโซเลต CHP34-S14 และ CHP38-S22 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

เชื้อราต่อต้าน	เชื้อราก่อโรค <i>Phytophthora palmivora</i>					
	ไอโซเลต CHP34-S14			ไอโซเลต CHP38-S22		
	จำนวนสปอร์ (10 ⁵ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์	จำนวนสปอร์ (10 ⁵ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์
	ชุดควบคุม	จำนวนสปอร์		ชุดควบคุม	จำนวนสปอร์	
<i>N. aureola</i> CHA01-A01	8.05	2.85	64.60	7.40	2.60	64.86
<i>N. fennelliae</i> CHA03-A11	7.40	4.40	40.54	7.40	4.28	42.23
<i>N. spinosa</i> CHA09-A01	7.70	3.43	55.52	6.95	3.53	49.28
<i>N. hiratsukae</i> EU06	7.70	1.38	82.14	6.90	2.20	68.12
<i>N. pseudofischeri</i> EU13	9.25	3.88	58.11	7.45	3.85	48.32
<i>T. muroii</i> CHA03-A03	7.55	4.90	35.10	7.05	4.43	37.24
<i>T. muroii</i> EU18	7.85	2.20	71.98	8.0	2.60	67.50

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์= $((R1-R2)/R1) \times 100$; R1=จำนวนสปอร์ของเชื้อ *P. palmivora* ในงานอาหารควบคุม (control), R2=จำนวนสปอร์ของเชื้อในงานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 รูปที่ 4.16 ผลจําานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อก่อโรค *P. palmivora* CHP34-S14 กับเชื้อ

(ก) *N. hiratsukae* EU06 และ (ข) *T. muroii* EU18

สำหรับเชื้อราก่อโรค *P. cucurbitacearum* CHP22-S05 และ CHP45-S02 มีแนวโน้มในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรคไปในทางเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบจำนวนสปอร์ของเชื้อก่อโรคกับงานอาหารควบคุมพบว่า เชื้อต่อต้านสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรคได้เพียงเล็กน้อย โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.8 เมื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ พบว่า *N. hiratsukae* EU06 ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์เชื้อก่อโรค *P. cucurbitacearum* CHP22-S05 และ CHP45-S02 ได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจำนวนสปอร์ของเชื้อก่อโรคกับงานอาหารควบคุมของเชื้อราก่อโรค *P. cucurbitacearum* CHP22-S05 ที่มีจำนวนสปอร์ 4.55×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าในงานอาหารเพาะเลี้ยงร่วมกับ *N. hiratsukae* EU06 ยังคงมีจำนวนสปอร์เท่ากับ $3.48 \pm 0.17 \times 10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 23.63 เปอร์เซ็นต์ และงานอาหารควบคุมของเชื้อราก่อโรค *P. cucurbitacearum* CHP45-S02 มีจำนวนสปอร์ 4.70×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แต่ในงานอาหารที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *N. hiratsukae* EU06 มีจำนวนสปอร์ลดลงเหลือ $3.60 \pm 0.00 \times 10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แม้ว่าจากลักษณะการเจริญของโคโลนีนบนงานอาหารเพาะเลี้ยงร่วมพบว่า โคโลนีของเชื้อราต่อต้าน *N. hiratsukae* EU06 จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *P. cucurbitacearum* CHP22-S05 (รูปที่ 4.17ก) และ CHP45-S02 (รูปที่ 4.17ข) ได้อาจเนื่องมาจากเชื้อราก่อโรคมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วกว่าเชื้อราต่อต้าน แต่เมื่อนับปริมาณสปอร์พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์เชื้อราก่อโรค *P. cucurbitacearum* CHP22-S05 และ CHP45-S02 แต่สามารถยับยั้งได้เพียงเล็กน้อย ไม่สามารถยับยั้งได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 23.40 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ *N. spinosa* CHA09-A01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *P. cucurbitacearum* CHP22-S05 และ CHP45-S02 ได้เท่ากับ 19.23 และ 18.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 จำนวนสปอร์ของเชื้อ *P. cucurbitacearum* ไอโซเลต CHP22-S05 และ CHP45-S02 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

เชื้อราต่อต้าน	เชื้อราก่อโรค <i>Pythium cucurbitacearum</i>					
	ไอโซเลต CHP22-S05			ไอโซเลต CHP45-S02		
	จำนวนสปอร์ (10 ⁵ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์	จำนวนสปอร์ (10 ⁵ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์
	ชุดควบคุม	จำนวนสปอร์		ชุดควบคุม	จำนวนสปอร์	
<i>N. aureola</i> CHA01-A01	4.60	3.9	15.22	4.75	4.60	3.16
<i>N. fennelliae</i> CHA03-A11	4.20	3.60	14.29	4.80	4.00	16.67
<i>N. spinosa</i> CHA09-A01	4.60	3.68	19.23	4.60	3.75	18.48
<i>N. hiratsukae</i> EU06	4.55	3.48	23.63	4.70	3.60	23.40
<i>N. pseudofischeri</i> EU13	4.35	3.90	10.34	4.25	3.85	9.42
<i>T. muroii</i> CHA03-A03	4.20	3.78	10.12	4.80	4.50	6.25
<i>T. muroii</i> EU18	4.80	4.17	14.07	4.15	3.63	12.65

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ยับยั้งการสร้างสปอร์ = $((R1-R2)/R1) \times 100$; R1=จำนวนสปอร์ของเชื้อ *P. cucurbitacearum* ในจานอาหารควบคุม (control), R2=จำนวนสปอร์ของเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม



เอกสารนี้เป็นรูปที่ 4.17 แสดงผลจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อก่อโรค *P. cucurbitacearum* (ก) CHP22-S05 กับเชื้อ *N. pseudofisheri* EU06 และ (ข) CHP45-S02 กับเชื้อ *N. spinosa* CHA09-A01

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *P. splendens* จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ CHP17-N05 และ CHP18-N03 พบว่า *T. muroii* EU18 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรค *P. splendens* CHP17-N05 และ CHP18-N03 ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจำนวนสปอร์ของเชื้อก่อโรคกับจานอาหารควบคุมพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ 32.00 และ 48.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แม้ว่าโคโลนีบนจานอาหารเพาะเลี้ยงร่วมของเชื้อราต่อต้าน *T. muroii* EU18 จะสามารถเจริญคลุมโคโลนีเชื้อราก่อโรค CHP17-N05 (รูปที่ 4.18ก) และ CHP18-N03 (รูปที่ 4.18ข) ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนับจำนวนสปอร์พบว่าไม่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าเชื้อต่อต้านไอโซเลตอื่นๆ ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์เพียง 5.61-14-29 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น *N. hiratsukae* EU06 ที่มีประสิทธิภาพรองลงมาในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *P. splendens* CHP18-N03 โดยมีค่าการยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *P. splendens* เท่ากับ 33.24 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.9

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านด้วยวิธี bi-culture พบว่า *N. hiratsukae* EU06 และ *T. muroii* EU18 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดสองอันดับแรกในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* นอกจากนี้ *N. hiratsukae* EU06 ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *P. cucurbitacearum* สูงที่สุดอีกด้วย และสำหรับเชื้อก่อโรค *P. splendens* พบว่า *T. muroii* EU18 มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรค ดังนั้นเชื้อราต่อต้าน *N. hiratsukae* EU06 และ *T. muroii* EU18 จึงมีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum* และ *P. splendens* ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราต่อต้านไอโซเลตอื่นๆ จึงนำเชื้อราต่อต้าน *N. hiratsukae* EU06 และ *T. muroii* EU18 ไปทำการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 3 ตัว ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชั้นในการควบคุมเชื้อราก่อโรคด้วยวิธี poison plate ต่อไป

ตารางที่ 4.9 จำนวนสปอร์ของเชื้อ *P. splendens* ไอโซเลต CHP17-N05 และ CHP18-N03 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

เชื้อราต่อต้าน	เชื้อราก่อโรค <i>Pythium splendens</i>					
	ไอโซเลต CHP17-N05			ไอโซเลต CHP18-N03		
	จำนวนสปอร์ (10 ⁵ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์	จำนวนสปอร์ (10 ⁵ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์
	ชุดควบคุม	จำนวนสปอร์		ชุดควบคุม	จำนวนสปอร์	
<i>N. aureola</i> CHA01-A01	5.60	4.80	14.29	8.60	8.03	6.69
<i>N. fennelliae</i> CHA03-A11	5.10	4.30	15.69	8.20	7.63	7.02
<i>N. spinosa</i> CHA09-A01	4.80	4.23	12.77	8.45	7.80	7.70
<i>N. hiratsukae</i> EU06	5.95	5.28	11.34	9.10	6.08	33.24
<i>N. pseudofischeri</i> EU13	5.25	4.58	12.86	8.80	8.20	6.82
<i>T. muroii</i> CHA03-A03	5.80	5.48	5.61	7.95	7.73	2.83
<i>T. muroii</i> EU18	6.25	4.25	32.00	9.40	4.83	48.67

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ (%) ยับยั้งการสร้างสปอร์ = $((R1-R2)/R1) \times 100$; R1=จำนวนสปอร์ของเชื้อ *P. splendens* ในจานอาหารควบคุม (control), R2=จำนวนสปอร์ของเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม



รูปที่ 4.18 ผลจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อก่อโรค *P. splendens* (ก) ไอโซเลต CHP17-N05 และ (ข) CHP18-N03 กับเชื้อ *T. muroii* EU18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุผลบางเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium*

ผลการสกัดสารจากเชื้อรา *Neosartorya hiratsukae* EU06 และ *Talaromyces muroii* EU18 ด้วยวิธีการหมักกับตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ระเหยง่าย ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารจะใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ ขั้วปานกลาง และขั้วสูง ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ ลักษณะสารสกัดของ *N. hiratsukae* EU06 ชั้นเฮกเซนมีลักษณะหนืดสีส้มใส ชั้นเอทิลอะซิเตท มีลักษณะเป็นของแข็งมีสีน้ำตาลดำเข้มกว่าสารสกัดชั้นเมทานอลที่เป็นของแข็งมีสีน้ำตาล เช่นเดียวกับลักษณะของสารสกัดของ *T. muroii* EU18 แต่สารสกัดชั้นเฮกเซนมีสีที่แตกต่าง คือ หนืดสีเหลืองใส ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการควบคุมเชื้อราก่อโรคเฉพาะ *Phytophthora palmivora* จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ CHP34-S14 และ CHP38-S22

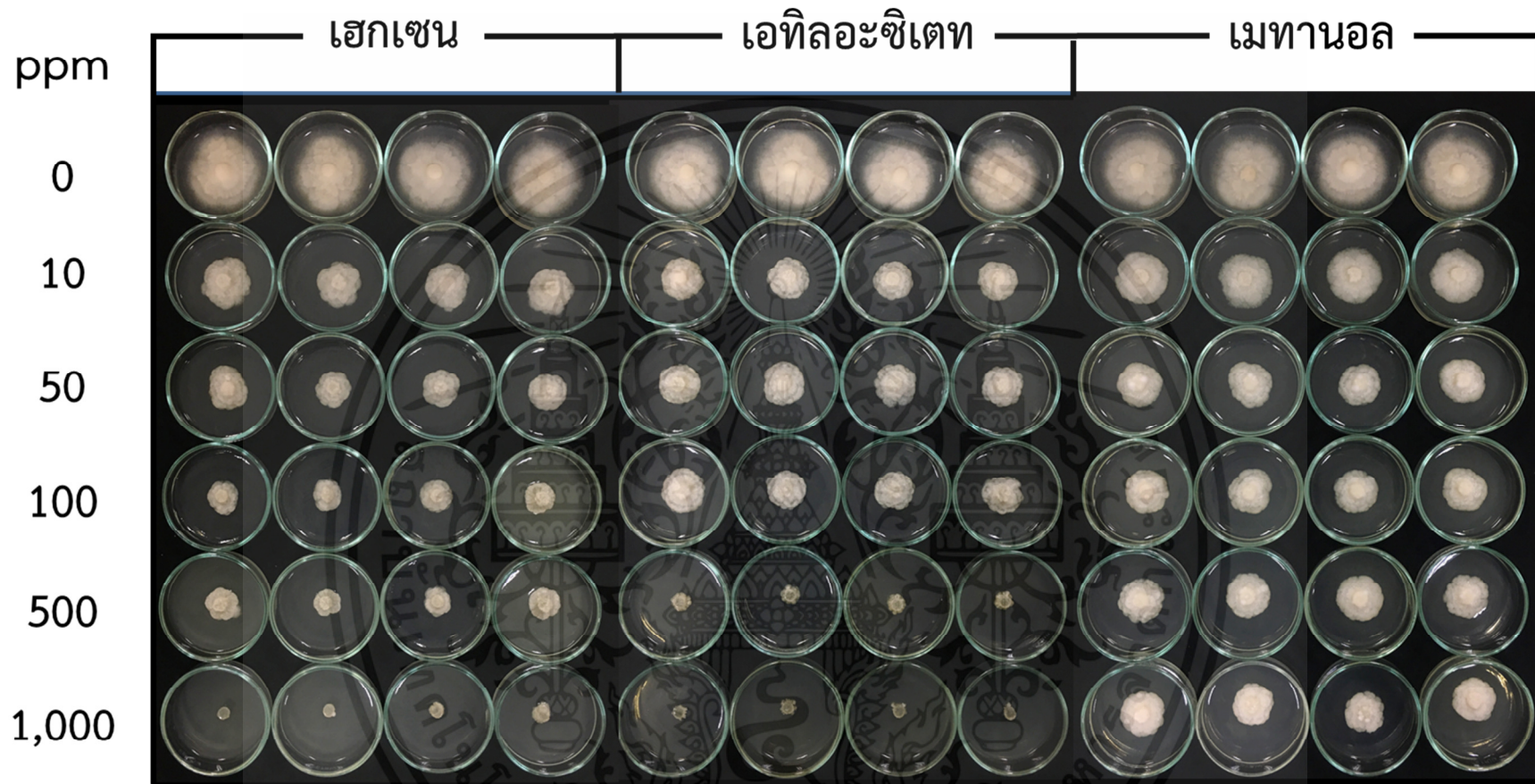
4.5.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดของเชื้อรา *N. hiratsukae* ไอโซเลต EU06

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรค *Phytophthora pamivora* บนจานอาหารเพาะเลี้ยง PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ของเชื้อ *N. hiratsukae* EU06 ที่ความเข้มข้น 0 (control), 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm พบว่าโคโลนีของเชื้อรา *P. pamivora* CHP34-S14 และ CHP38-S22 ที่เพาะเลี้ยงบนจานอาหารที่มีสารสกัดแต่ละความเข้มข้น มีการเจริญของโคโลนีน้อยกว่าจานอาหารควบคุม (0 ppm) (รูปที่ 4.19 และรูปที่ 4.20) อย่างชัดเจน เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยจากการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราก่อโรค *P. pamivora* CHP34-S14 ที่เพาะเลี้ยงบนสารสกัดแต่ละความเข้มข้นกับจานอาหารควบคุมพบว่า สารสกัดชั้นเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราก่อโรคได้มากที่สุดถึง 88.48 เปอร์เซ็นต์ และมีประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างกับสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1,000 ppm ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 85.35 และ 88.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการนับจำนวนสปอร์พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้นเพียง 0.4199, 0.0736 และ 4.4023 ppm ตามลำดับ สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *P. pamivora* CHP34-S14 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (ED₅₀) โดยแสดงขนาดของโคโลนี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ ปริมาณสปอร์ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ และ ED₅₀ ของเชื้อรา *P. pamivora* CHP34-S14 เมื่อเพาะเลี้ยงบนจานอาหารที่ผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ดังตารางที่ 4.10 นอกจากนี้ยังให้ผลเช่นเดียวกับการยับยั้งการเจริญของโคโลนีของเชื้อ *P. pamivora* CHP38-S22 (รูปที่ 4.20) โดยสารสกัดชั้นเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *P. pamivora* CHP38-S22 ได้ดีที่สุดไม่แตกต่างกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 87.13 และ 88.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนับปริมาณสปอร์

พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.0420, 0.0009 และ 12.4561 ppm ตามลำดับ สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *P. pamivora* CHP38-S22 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงขนาดของโคโลนี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ ปริมาณสปอร์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. pamivora* CHP38-S22 เมื่อเพาะเลี้ยงบนจานอาหารที่ผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ดังตารางที่ 4.11



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

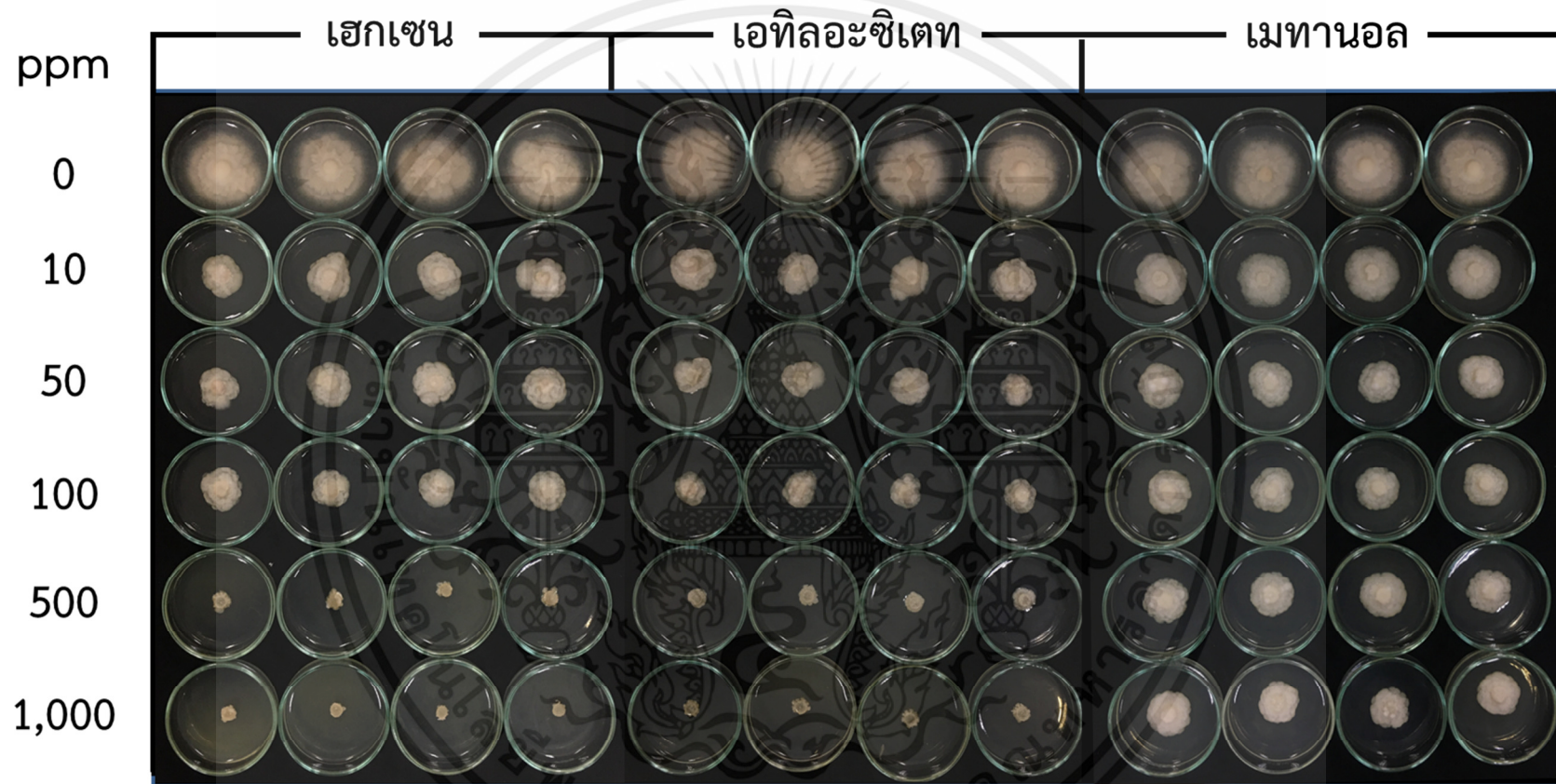


รูปที่ 4.19 สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ *N. hiratsukae* EU06 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* CHP34-S14 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *N.hiratsukae* EU06 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* CHP34-S14

สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้ง การเจริญ	ED ₅₀ (ppm)	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์ ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการ สร้าง สปอร์	ED ₅₀ (ppm)
เฮกเซน	0	45.57 ^a	0.00 ^j	15.7783	3.37 ^a	0.00 ^h	0.4199
	10	23.51 ^c	48.43 ^h		1.19 ^d	64.44 ^f	
	50	19.57 ^s	57.07 ^d		0.35 ^{fgh}	89.63 ^{bc}	
	100	16.07 ^h	64.73 ^c		0.20 ^{hi}	94.07 ^b	
	500	6.95 ^h	66.63 ^c		0.20 ^{hi}	94.07 ^b	
	1,000	5.25 ^j	88.48 ^a		0.00 ⁱ	100.00 ^a	
เอทิล- อะซิเตท	0	45.47 ^a	0.00 ^j	17.5052	3.10 ^b	0.00 ^h	0.0736
	10	21.52 ^{ef}	52.65 ^{ef}		0.79 ^e	74.39 ^e	
	50	21.03 ^{def}	53.73 ^{efg}		0.35 ^{fgh}	88.51 ^c	
	100	20.58 ^{fg}	54.74 ^{de}		0.23 ^{ghi}	92.69 ^{bc}	
	500	6.66 ⁱ	85.35 ^b		0.00 ⁱ	100.00 ^a	
	1,000	5.44 ^{ij}	88.04 ^{ab}		0.00 ⁱ	100.00 ^a	
เมทานอล	0	45.29 ^a	0.00 ^j	190.5016	2.92 ^b	0.00 ^h	4.4023
	10	28.36 ^b	37.36 ^h		1.50 ^c	48.40 ^s	
	50	22.81 ^{cd}	49.65 ^{gh}		0.82 ^e	71.74 ^e	
	100	22.06 ^e	51.27 ^{fgh}		0.52 ^f	82.02 ^d	
	500	22.48 ^{cd}	50.36 ^{gh}		0.47 ^{fgh}	83.64 ^d	
	1,000	20.67 ^{efg}	54.33 ^{def}		0.50 ^{fg}	83.08 ^d	
C.V.		4.12	3.98		20.32	4.97	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ *N. hiratsukae* EU06 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* CHP38-S22 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *N.hiratsukae* EU06 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* CHP38-S22

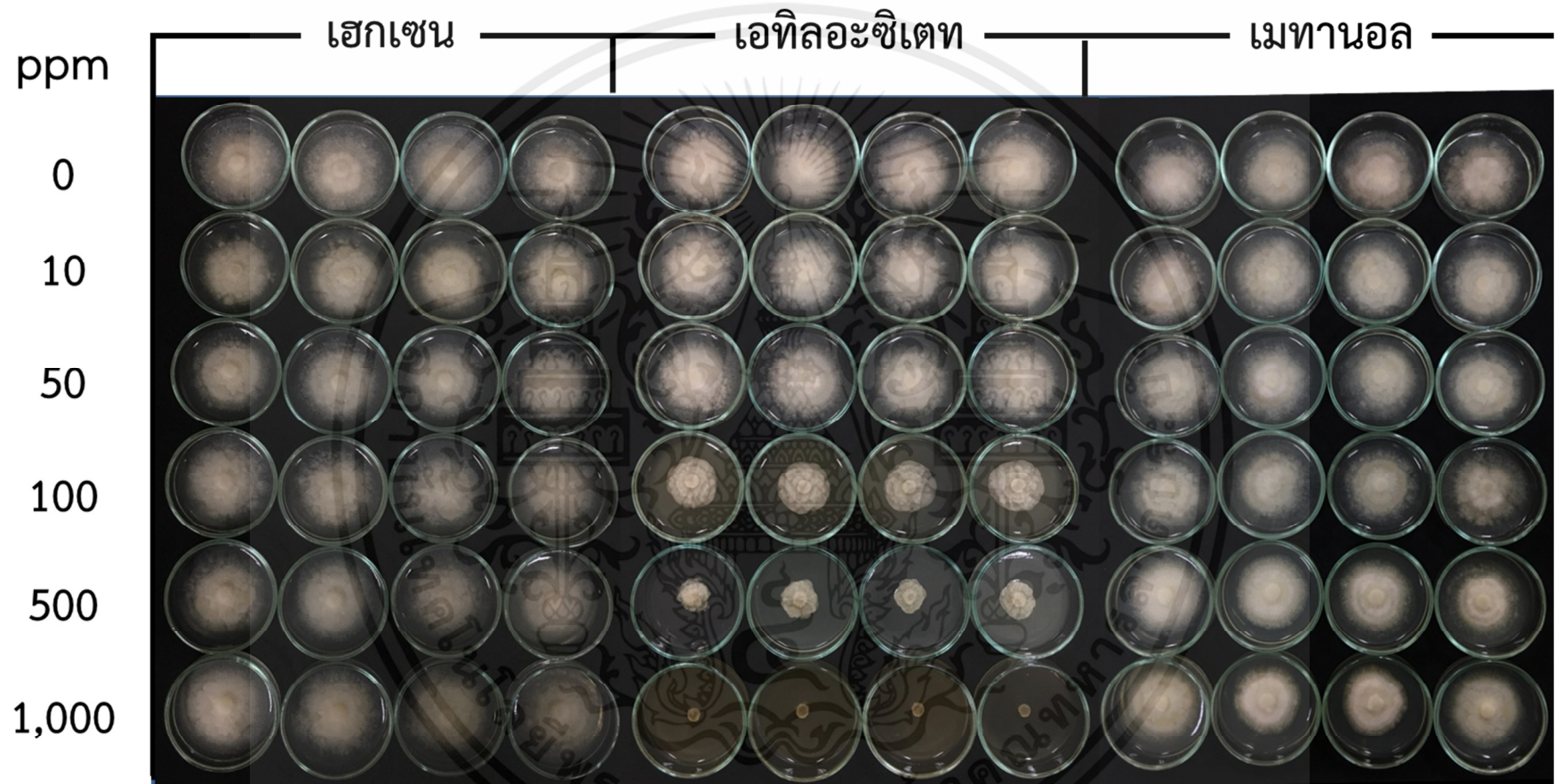
สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้ง การเจริญ	ED ₅₀ (ppm)	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์ ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการ สร้าง สปอร์	ED ₅₀ (ppm)
เฮกเซน	0	45.98 ^a	0.00 ^j	10.6363	2.83 ^b	0.00 ^g	0.0420
	10	21.66 ^e	52.89 ^{ef}		0.70 ^{de}	73.21 ^e	
	50	18.96 ^g	58.76 ^d		0.30 ^{efgh}	89.29 ^{abcd}	
	100	16.60 ^h	63.88 ^c		0.10 ^{fgh}	95.36 ^{abc}	
	500	10.42 ⁱ	77.34 ^b		0.08 ^{gh}	98.21 ^{ab}	
	1,000	5.91 ^j	87.13 ^a		0.00 ^h	100.00 ^a	
เอทิล- อะซิเตท	0	45.94 ^a	0.00 ^j	0.0009	3.25 ^a	0.00 ^g	0.0009
	10	22.62 ^{de}	50.76 ^{fg}		0.53 ^{def}	83.66 ^{de}	
	50	21.29 ^e	53.65 ^{ef}		0.38 ^{defgh}	88.20 ^{bcd}	
	100	19.32 ^{fg}	57.94 ^d		0.22 ^{fgh}	92.88 ^{abcd}	
	500	9.09 ⁱ	80.22 ^b		0.08 ^{gh}	97.57 ^{ab}	
	1,000	5.36 ^j	88.33 ^a		0.00 ^h	100.00 ^a	
เมทานอล	0	46.01 ^a	0.00 ^j	12.4561	3.12 ^{ab}	0.00 ^g	12.4561
	10	28.51 ^b	38.03 ⁱ		1.87 ^c	35.71 ^f	
	50	26.10 ^c	43.24 ^h		0.75 ^d	75.36 ^e	
	100	23.62 ^d	48.65 ^g		0.45 ^{defg}	85.00 ^{cde}	
	500	20.83 ^d	48.84 ^g		0.28 ^{efgh}	91.07 ^{abcd}	
	1,000	23.54 ^{ef}	54.73 ^e		0.30 ^{efgh}	91.43 ^{abcd}	
C.V.		5.39	4.63		31.27	9.79	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดของเชื้อรา *T. muroii* ไอโซเลต EU18

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราก่อโรค *Phytophthora palmivora* บนจานอาหารเพาะเลี้ยง PDA ผสมสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อรา *T. muroii* EU18 ที่ความเข้มข้น 0 (control), 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm พบว่าโคโลนีของเชื้อรา *P. palmivora* CHP34-S14 และ CHP38-S22 ในสารสกัดชั้นเฮกเซนและเมทานอล มีการเจริญของโคโลนีใกล้เคียงกับจานอาหาร control แต่สารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีได้ (รูปที่ 4.22 และรูปที่ 4.23) โดยสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* CHP34-S14 ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุดถึง 87.05 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการนับปริมาณสปอร์พบว่าสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ระดับความเข้มข้น 24.4203 ppm สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* CHP34-S14 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงขนาดของโคโลนี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ ปริมาณสปอร์ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ และ ED₅₀ ของเชื้อรา *P. palmivora* CHP34-S14 เมื่อเพาะเลี้ยงบนจานอาหารที่ผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ดังตารางที่ 4.12 และสารสกัดจากเชื้อรา *T. muroii* EU18 จากชั้นเอทิลอะซิเตทที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* CHP38-S22 ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเท่ากับ 87.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนับปริมาณสปอร์พบว่าสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตทที่ระดับความเข้มข้น 25.3446 ppm สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* CHP38-S22 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงขนาดของโคโลนี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ ปริมาณสปอร์ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์และ ED₅₀ ของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora* CHP38-S22 เมื่อเพาะเลี้ยงบนจานอาหารที่ผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ดังตารางที่ 4.13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

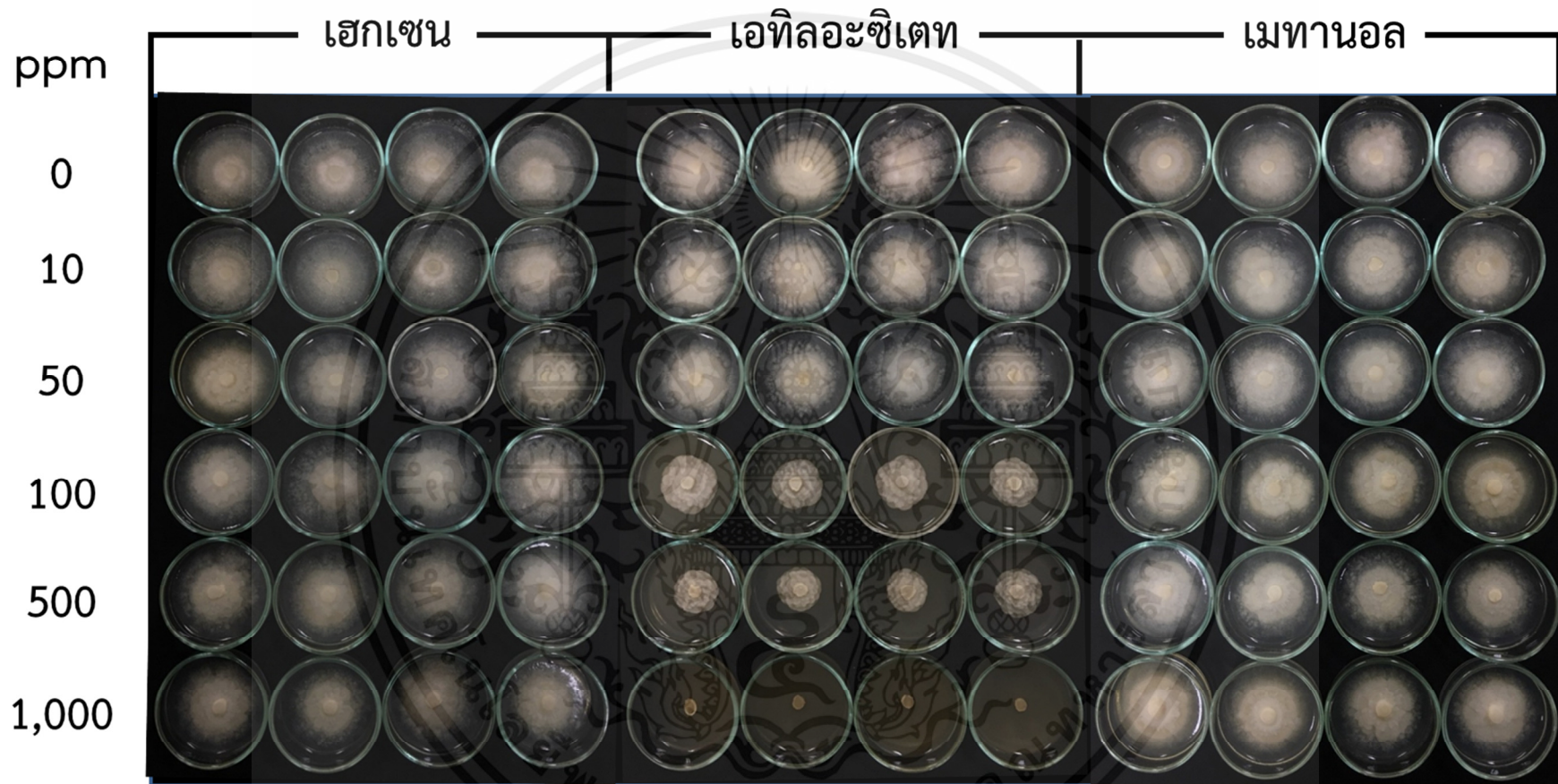


รูปที่ 4.21 สารสกัดหายาชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* CHP34-S14 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ

ตารางที่ 4.12 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* CHP34-S14

สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้ง การเจริญ	ED ₅₀ (ppm)	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์ ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการ สร้าง สปอร์	ED ₅₀ (ppm)
เฮกเซน	0	47.60 ^a	0.00 ^h	-	2.30 ^b	0.00 ^f	-
	10	43.99 ^b	7.54 ^{fg}	-	1.58 ^{de}	28.05 ^{de}	-
	50	39.02 ^{def}	18.05 ^e	-	1.35 ^{efg}	38.38 ^c	-
	100	38.71 ^{ef}	18.61 ^e	-	1.35 ^{efg}	38.57 ^c	-
	500	37.78 ^f	20.55 ^{de}	-	1.20 ^g	45.52 ^c	-
	1,000	35.63 ^g	25.09 ^d	-	1.20 ^g	45.52 ^c	-
เอทิล- อะซิเตท	0	41.13 ^{cd}	0.00 ^h	232.1040	2.53 ^a	0.00 ^f	24.4203
	10	39.25 ^{def}	4.21 ^{fgh}	232.1040	1.58 ^{de}	37.62 ^c	24.4203
	50	39.02 ^{def}	4.71 ^{fgh}	232.1040	1.40 ^{efg}	44.84 ^c	24.4203
	100	26.18 ^h	36.02 ^c	232.1040	0.28 ^h	89.01 ^b	24.4203
	500	17.15 ⁱ	58.00 ^b	232.1040	0.05 ^{hi}	97.92 ^{ab}	24.4203
	1,000	5.30 ^j	87.05 ^a	232.1040	0.00 ⁱ	100.0 ^a	24.4203
เมทานอล	0	41.67 ^c	0.00 ^h	-	2.30 ^{ab}	0.00 ^f	-
	10	40.84 ^{cdf}	2.02 ^{gh}	-	1.82 ^c	28.56 ^e	-
	50	38.65 ^{ef}	7.20 ^{fg}	-	1.75 ^{cd}	23.53 ^e	-
	100	38.76 ^{ef}	6.95 ^{fg}	-	1.47 ^{ef}	35.72 ^{cd}	-
	500	37.83 ^f	9.17 ^f	-	1.27 ^{fg}	43.66 ^c	-
	1,000	34.16 ^g	18.04 ^e	-	1.25 ^{fg}	45.16 ^c	-
C.V.		3.98	21.71		12.22	15.63	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน, เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* CHP38-S22 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm จำนวน 4 ซ้ำ

ตารางที่ 4.13 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. muroii* EU18 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *P. palmivora* CHP38-S22

สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้ง การเจริญ	ED ₅₀ (ppm)	ปริมาณสปอร์ (10 ⁴ สปอร์ ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการ สร้าง สปอร์	ED ₅₀ (ppm)
เฮกเซน	0	45.14 ^a	0.00 ^h	-	2.75 ^a	0.00 ^f	-
	10	44.79 ^{ab}	0.57 ^{gh}	-	2.03 ^c	26.23 ^{de}	-
	50	43.29 ^{abc}	4.06 ^{fg}	-	2.00 ^c	27.37 ^{de}	-
	100	41.82 ^{cde}	7.21 ^{defg}	-	1.83 ^{cde}	33.72 ^d	-
	500	40.12 ^{efg}	10.94 ^{de}	-	1.50 ^{fg}	45.21 ^c	-
	1,000	39.35 ^{efg}	12.70 ^d	-	1.50 ^{fg}	45.59 ^c	-
เอทิล- อะซิเตท	0	42.15 ^{cde}	0.00 ^h	264.0288	2.57 ^{ab}	0.00 ^f	25.3446
	10	40.49 ^{efg}	3.77 ^{fgh}	264.0288	1.63 ^{defg}	36.87 ^{cd}	25.3446
	50	38.97 ^{fgh}	7.44 ^{defg}	264.0288	1.38 ^g	46.38 ^c	25.3446
	100	26.53 ⁱ	37.05 ^c	264.0288	0.35 ^h	86.34 ^b	25.3446
	500	22.09 ^j	47.55 ^b	264.0288	0.10 ^{hi}	96.04 ^a	25.3446
	1,000	5.40 ^k	87.17 ^a	264.0288	0.00 ⁱ	100.0 ^a	25.3446
เมทานอล	0	42.84 ^{bcd}	0.00 ^h	-	2.40 ^b	0.00 ^f	-
	10	42.33 ^{cde}	1.11 ^h	-	1.90 ^{cd}	20.72 ^e	-
	50	40.91 ^{def}	4.46 ^{efgh}	-	1.70 ^{def}	29.07 ^{de}	-
	100	38.26 ^{gh}	10.65 ^{de}	-	1.65 ^{defg}	31.19 ^d	-
	500	36.89 ^h	13.77 ^d	-	1.63 ^{defg}	32.19 ^d	-
	1,000	38.88 ^{fgh}	9.18 ^{def}	-	1.60 ^{efg}	33.32 ^d	-
C.V.		3.75	28.52		11.39	17.35	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การตัดแยกเชื้อราก่อโรคสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สาเหตุโรครากและโคนเน่าในทุเรียน จังหวัดชุมพร จากตัวอย่างดินและเปลือกไม้ จำนวน 47 ต้นตัวอย่าง สามารถตัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลต จากตัวอย่างดิน 22 ตัวอย่าง โดยแบ่งได้เป็น 3 สกุล คือ สกุล *Phytophthora* จำนวน 8 ไอโซเลต สกุล *Pythium* จำนวน 12 ไอโซเลต ซึ่งสกุล *Pythium* นี้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยตามลักษณะการเจริญของโคโลนี และยังรวมถึงสกุล *Mortierella* จำนวน 13 ไอโซเลต ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใย ซึ่งตัดแยกสกุล *Mortierella* ได้จากดินของต้นทุเรียนที่เป็นโรครากและโคนเน่าและสามารถตัดแยกได้จำนวนมากเทียบเท่ากับสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS6/ITS4 พบว่า สามารถบ่งชี้เชื้อราข้างต้นได้จำนวน 8 สปีชีส์ ได้แก่ *Phytophthora palmivora*, *Pythium cucurbitacearum*, *P. splendens*, *P. deliense*, *P. acanthicum*, *Mortierella capitata*, *M. hyaline* และ *M. chlamydospora*

การตัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากตัวอย่างดินจำนวน 9 ตัวอย่าง ในสวนทุเรียน จังหวัดชุมพร สามารถตัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลต จากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง โดยแบ่งได้เป็น 2 สกุล ตามสีของ ascocarp บนโคโลนี คือ สกุล *Neosartorya* จำนวน 3 ไอโซเลต มีโคโลนีสีขาวถึงครีม และสกุล *Talaromyces* จำนวน 1 ไอโซเลต มีโคโลนีสีเหลืองถึงส้ม เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณบริเวณ β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b พบว่า เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตข้างต้น สามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อราได้เป็นจำนวน 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Neosartorya aureola*, *N. fennelliae*, *N. spinosa* และ *T. muroii*

เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อราสกุล *Phytophthora*, *Pythium* และ *Mortierella* บนใบทุเรียนพบว่า *P. palmivora* มีความสามารถในการสร้างรอยแผลบนใบทุเรียนมากที่สุด รองลงมา คือ *P. cucurbitacearum* ซึ่งบางสปีชีส์ที่มีความสามารถเทียบเท่ากับ *P. palmivora* นอกจากนี้ *P. splendens* ยังสร้างรอยแผลบนใบทุเรียนแต่มีขนาดเล็ก ส่วนเชื้อรา *P. deliense*, *P. acanthicum*, *M. chlamydospora*, *Mortierella capitata*, และ *M. hyaline* ไม่สามารถทำให้ใบทุเรียนเกิดรอยแผลเน่า แต่อย่างไรก็ตามในการทดสอบความสามารถในการก่อโรคควรทำการทดสอบกับต้นกล้าทุเรียน (*in vivo*) เพื่อยืนยันความสามารถของเชื้ออีกครั้ง

และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราสกุล *Phytophthora* และ *Pythium* สาเหตุโรครากและโคนเน่าในทุเรียนในสภาพห้องปฏิบัติการ บนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า *N. hiratsukae* EU06 และ *T. muroii* EU18 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรค *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum* และ *P. splendens* เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อรา *N. hiratsukae* EU06 และ *T. muroii* EU18 ต่อเชื้อรา *P. palmivora* พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อรา *N. hiratsukae* EU06 ที่ความเข้มข้น 0.4199, 0.0736 และ 4.4023 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดจากเชื้อรา *T. muroii* EU18 ชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 24.4203 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. palmivora* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเชื้อรา *N. hiratsukae* EU06 และ *T. muroii* EU18 สามารถควบคุมเชื้อรา *P. palmivora* ซึ่งอาจประยุกต์ใช้เชื้อราและสารสกัดของเชื้อรา *N. hiratsukae* EU06 และ *T. muroii* EU18 ในการควบคุมโรครากและโคนเน่าในสวนทุเรียน และควรทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อและสารสกัดกับเชื้อราก่อโรครากและโคนเน่าในทุเรียนที่แยกได้จากต้นทุเรียนจังหวัดอื่นๆ เพื่อพัฒนาสารสกัดร่วมกับสารสกัดจากเชื้อราต่างๆที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากและโคนเน่าต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กมลวรรณ ศรีดี๊ะ ธิดา เดชชวบ, ณรงค์ สิงห์บุระอุดม และเอนก กิจเจา. 2557. “ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของราเอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลนในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ.” หน้า 372-379. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กมลวรรณ ศรีดี๊ะ. 2558. “ประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ของสารสกัดจากราเอนโดไฟท์ที่แยกจากป่าชายเลนบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. **ทุเรียน : เอกสารวิชาการลำดับที่ 13/2547.** กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2555. **ปริมาณฝน.** [Online]. Available : <https://www.tmd.go.th/info/info.php?FileID=55>.

เกษม สร้อยทอง. 2532. **การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ขจรศักดิ์ ภาวกุล. 2514. “โรครากเน่าของทุเรียน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิรวรรณ โรจนพรทิพย์. 2561. **600 สายพันธุ์ทุเรียน “สมบัติล้ำค่า” ของชาติ ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี.** [Online]. Available : https://www.technologychaoban.com/agricultural-technology/article_53214

ชลิดา เล็กสมบูรณ์. 2554. **โรคพืชและการวินิจฉัย.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชษฐา กวางทอง. 2541. “การใช้เทคโนโลยีการผลิตทุเรียนของเกษตรกรในจังหวัดจันทบุรี : ศึกษาเฉพาะกรณีอำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาส่งเสริมการเกษตร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทวี เก้าศิริ. 2549. **Phytophthora ราศัตรูพืชที่สำคัญ.** [Online]. Available : <http://www.thaigreenagro.com/aticle.aspx?id=1694>.

ทรงกลด ซื่อสัตย์บงกช. 2561. **โรคผลเน่า.** [Online]. Available : <http://www.agriqua.doae.go.th/plantclinic/Clinic>.

ธิดา เดชชวบ, เลขา มาโนช, นิพนธ์ วิสารทานนท์, จิระเดช แจ่มสว่าง, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, เสถียร พงศ์ โตอนันต์ และเอนก กิจเจา. 2550. “ความหลากหลายของรา *Talaromyces* จากดิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารและผลต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ.” หน้า 563-570. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ธิตยา สารพัฒน์ ศิริพร วรกุลดำรงชัย และมาลัยพร เชื้อบัณฑิต. 2556. “การคัดเลือกต้นตอทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองที่ทนทานหรือต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน.” หน้า 250-258. ใน รายงานผลการวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ชนะพล ใจหวัง และสิทธิพงษ์ จอนที่สม. 2547. “การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* และ *Phytophthora palmivora* ในมะละกอ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม.

นลินี ศิวากรณ์ พงณา ตระกูลสุวรรณ์ และศิริพร วรกุลดำรงชัย. 2555. “การควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนโดยใช้ชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis*.” หน้า 221-225. ใน รายงานผลการวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. “โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ.” หน้า 128-159. ใน **สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว**. เล่มที่ 35. กรุงเทพฯ : โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว.

ปัญญา กวางดี๊ด และสมศิริ แสงโชติ. 2545. “การจัดการโรคผลเน่าของทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl.” *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 33(6) : 45-48.

ปรียาพร นันแสน, นันทวดี คุณาพันธ์ และรัชฎาพร สุพรหม. 2558. การแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากดินเพื่อควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคใบร่วงในยางพารา และเชื้อรา *Collectotrichum* sp. ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดในยางพาราและก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง. [โปสเตอร์]. อุบลราชธานี : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

เมอมร สร้อยทอง. 2558. “การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากดิน และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสในกาแฟ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เลขา มาโนช อรุมา เพี้ยชัย ธิดา เดชชวบ จิตรา เกตุแก้ว อำนาง เอี่ยมวิจารณ์ มะโนรัตน์ สุดสงวน

วรรัตน์ ลิ้มธนาวานิชย์ เสียงแจ้ว พิริยพณต์ และสุวรรณ กลิ่นภู. 2553. **ความหลากหลายของรา *Emericella*, *Eurotium* และ *Neosartorya* จากดิน** กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

วาริน อินทนา, มนตรี อิศรไกรศีล, ศุภลักษณ์ เศรษฐสุกุลชัย, ประคอง เย็นจิตต์, และทักษิณ สุวรรณโน. 2550. “ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาซิเอนัม สายพันธุ์กลายในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการลดปริมาณเชื้อราไฟทอปทอรา พาล์มมิโวราในสวนทุเรียน.” *วิทยาศาสตร์ก้าวหน้า*. 5(3) : 1-9.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. **ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร**. [Online]. Available : http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=13577

สนชัย เพ็ชรพรหม. 2540. “การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) butler โดยชีววิธีแบบผสมผสาน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมชาย ชดตระกูล และอรุณกร พรหมวี. 2553. “ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากใบไม้ในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของค่น้ำที่เกิดจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*.” *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 18(1) : 1-13.

สมศิริ แสงโชติ, บรรณาธิการ. 2529. **โรคพืชเบื้องต้น บทปฏิบัติการ**. 3. กรุงเทพฯ : โอ.เอส. ปรินต์ติ้ง เฮาส์.

สุจินต์ จันทร์สอาด, สุภมาส วัฒนทัฬ, จันทร์กานต์ กรรณสุต, ชลธิชา ถวิลไพร, ปาริฉัตร วรรณสุข, ฐาปนี ถาวรอยู่, จุลมาศ คำเมือง และจิราวรรณ ไชโย. 2558. “โรครากเน่า-โคนเน่าในทุเรียน แก้อย่างไร จึงจะ “เอาอยู่”.” *ลัดดาเกษตรสาร*. 15(55) : 1-8.

อมรรัตน์ ภูไพบูลย์, พจนา ตระกูลสุขรัตน์ และทวิ เก่าศิริ. 2546. “ความผันแปรใน *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. ทุเรียน : ลักษณะรูปร่างและแบบคู่ผสม.” *วารสารวิชาการเกษตร*. 21(1) : 72-89.

อมรรัตน์ ภูไพบูลย์, พีระวรรณ พัฒนวิภาส และยุศศักดิ์ เจียมไชยศรี. 2555. “ผลของสารป้องกันกำจัดโรคพืช metalaxyl ต่อการเจริญของ รา *Phytophthora palmivora*.” หน้า 1163-1174. ใน รายงานผลการวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Abad, R.G. and Cruz, K.J.T. 2012. **Incidence of *Phytophthora* fruit rot on four durian cultivars in Davao city, Philippines**. *Banwa* 9(1&2): 1-9.

Bahramian, D. Naraghi, L. and Heydari, A. 2016. “Effectiveness of the chemical stabilizers of *Talaromyces flavus* in biological control of tomato and cucumber vascular wilt disease.” *Journal of Plant Protection Research*. 56(3) : 291-297.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Bais, K. 2016. "Why Thailand is the leading exporter of durian, mangosteen and other tropical fruits." *Utar Agriculture Science Journal*. 2(3) : 5-15.
- Boonsang, N. Dethoup, T. Singburadom, N. Gomes, N.G.M. and Kijjoa, A. 2014. "In vitro antifungal activity screening of crude extracts of soil fungi against plant pathogenic fungal." *Journal of Biopesticides*. 7(2) : 156-166.
- Burgess, L.W. Knight, T.E. Tesoriero, L. and Phan, H.T. 2008. **Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam**. Vietnam : Goanna Print Pty Ltd.
- Chomchalow, N., Somsri, S. and Songkhla, P.N. 2008. "Marketing and export of major tropical fruits from Thailand." *Assumption University Journal of Technology*. 11(3) : 133-143.
- Cooke, T., Persley, D. and House, S. editors. 2009. **Diseases of fruit crops in Australia**. Australia: CSIRO Publishing.
- Cousin, M.A. 2014. "Classification of the Eukaryotic Ascomyces." in 35-40 in Batt, C.A. **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2nd Ed. London : Academic Press.
- Das, A.K., Nerkar, S., Kumar, A. and Bawage, S. 2016. "Detection, identification and characterization of *Phytophthora* spp. Infecting citrus in INDIA." *Journal of Plant Pathology*. 98(1) : 55-69.
- Drenth, A. and Sendall, B. 2001. **Practical guide to detection and identification of *Phytophthora***. [Online]. Available : <https://www.researchgate.net/file-PostFile-Loader.html>
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H. 1993. **Compendium of soil fungi**. Berchtesgaden : IHW-Verlag.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. "Isolation of plant DNA from fresh tissue." *Focus* 12 : 13-15.
- Eamvijarn, A. 2013. "*Neosartorya* species: diversity, morphology, phylogeny, antagonist tests against plant pathogenic fungi and secondary metabolites of *N. pseudofischeri*." Ph.D. Thesis of Kasetsart university.
- Fridvas, J.C. 2015. **Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of**

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ***Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species**. [Online]. Available : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4290622/> ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Glass, N.L. and Donaldson, G.C. 1995. "Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes." *Applied and environmental microbiology*. 61(4) : 1323-1330.
- Grunwald, N. J., Martin, F. N., Larsen, M. M., Sullivan, C. M., Press, C. M., Coffey, M. D., Hansen, E. M., and Parke, J. L. 2011. "PhytophthoraID.org: A sequence-based Phytophthora identification tool." *Plant Disease*. 95:337-342.
- Grunwald, N.J. Martin, F.N. and Larsen, M.M. 2013. **Protocols Internal transcribed spacer region (ITS) region.** [Online]. Available : <http://phytophthora-id.org/files/Phytophthora-ID%20sequencing%20protocols.pdf>
- Hung, P.M., Wattanachai, P., Kasem, S. and Poaim, S. 2015 "Biological control of *Phytophthora palmivora* causing root rot of pomelo using *Chaetomium* spp." *Mycobiology*. 43(1) : 63-70.
- Hurst, C.J. 2006. Opportunistic algae, fungi and Ichthyosporea associated with mammalian livestock disease. in 261-301 in **The Rasputin Effect: When Commensals and Symbionts Become Parasitic.** Switzerland : Springer Nature.
- Ivors, K. 2008. **Methods for isolating *Phytophthora* from different substrates.** [Slide]. United state : North Carolina State University Fletcher.
- Janick, J. and Paull, R.E., editor. 2008. **The encyclopedia of fruit and nuts.** United Kingdom : Cambridge University Press .
- Jeffers, S.N. and Aldwinckle, H.S. 1987. "Enhancing detection of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil." *Phytopathology*. 77(10) : 1475-1482.
- Kidd, S., Halliday, C., Alexiou, H. and Ellis, D. 2016. "**Descriptions of medical fungi.**" South Australia : Newstyle printing.
- Kikoku, Y. Tagashira, N. Gabriel, A.A. and Nakano, H. 2009. "Heat activation of *Neosartorya* and *Talaromyces* ascospores and enhancement by oranic acid." *Biocontrol Science*. 14(3) : 87-95.
- Kritartha, S. 2013. **Life Cycle of *Pythium* (With Diagram) Oomycetes.** [Online].

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
 Available : <http://www.biologydiscussion.com/fungi/life-cycle-of-pythium-with-diagram-oomycetes/63352> หากและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kroon, L.P.N.M. Bakker, F.T. Bosch, G.B.M.V.D. Bonants P.J.M. and Flier, W.G. 2004. "Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences." *Fungal Genetics and Biology*. 41 : 766-782.
- Lim, T.K. and Chan, L.G. 1986. "Fruit rot of durian caused by *Phytophthora palmivora*." *Pertanika* 9(3) : 269-276.
- Lin, T.K. and Sangchote, S. 2003. "Diseases of durian." in 241-252 in Ploetz, R.C. **Diseases of tropical fruit crops**. Florida : Tropical Research and Education Center Homestead, United Kingdom.
- Link, V.H. Powelson, M.L. and Johnson, K.B. 2002. **Oomycetes**. [Online]. Available : <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/LabExercises/Pages/Oomycetes.aspx>
- Martin, F.N., Abad, Z.G., Balci, Y. and Ivos, K. 2012. "Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs." *Plant disease*. 96(8) : 1080-1103.
- Martin, F.N., Abad, Z.G., Balci, Y. and Ivos, K. 2012. "Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs." *Plant disease*. 96(8) : 1080-1103.
- Manoch, L., Dethoup, T., Yilmaz, N., Houbraken, J. and Samson, R.A. 2013. "Two new *Talaromyces* species from soil Thailand." *Mycoscience*. 54 : 335-342.
- Mounde, L.G., Ateka, E.M., Kihurani, A.W., Wasilwa, L. 2012. "Morphological characterization and identification of *Phytophthora* specie causing citrus gummosis in Kenya." *African journal of food, Agriculture, Nutrition and Development*. 12(7) : 7072-7087.
- Muthukumar, A. Eswaran, A. and Sanjeevkumas, K. 2011. "Exploitation of *Trichoderma* species on the growth of *Pythium aphanidermatum* in Chilli." *Brazilian Journal of Microbiology*. 42(1) : 1598-1607.
- Naraghi, L., Heydari, A., Rezaee, S., Razavi, M., Jahanifar, H. and Khaledi, E.M. 2010. "Biological control of tomato verticillium wilt disease by *Talaromyces flavus*." 50(3) : 360-365.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Nzungize, J. Gepts P. Buruchara, R. Buah, S. Ragama, P. Busogoro, J.P. and Baudoin, J.P. 2011. "Pathogenic and molecular characterization of *Pythium* species inducing root rot symptoms of common bean in Rwanda." *African Journal of Microbiology Research*. 5(10) : 1169-1181.
- Oszako, T., Sikora, K., Belbahri, L. and Nowakowska, J.A. 2016. "Molecular detection of Oomycetes species in water courses." *Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry*. 58(4) : 246-251.
- Panabieres, F., Ali, G.S., Allagul, M.B., Dalio, R.J.D., Gudmestad, N.C., Kuhn, M.L., Guha Roy, S., Schena, L. and Zamponis, A. 2016. "*Phytophthora nicotianae* diseases worldwide: new knowledge of a long-recognised pathogen." *Phytopathologia Mediterranea*. 55(1) : 20-40.
- Parichatnon, S., Maichum, K. and Peng, K.C. 2017. "Application of the malmquist productivity index on measurement of productivity trend of durian production in Thailand." *International Journal of Business Marketing and Management*. 2(4) : 1-9.
- Parke, J. 2017. ***Phytophthora basics***. [Online]. Available : <http://www.forestphytophthoras.org/phytophthora-basics>
- Peterson, S.W. 2008. "Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci." *Mycologia*. 100 : 205-226.
- Saadoun, M. and Allgui, M.B. 2013. "Management of chili pepper root rot and wilt (caused by *Phytophthora nicotianae*) by grafting onto resistant rootstock." *Phytopathologia Mediterranea*. 52(1) : 141-147.
- Samson, R.A. Hong, S. Peterson S.W. Frisvad, J.C. Varga, J. 2007. "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*." *Studies in Mycology*. 59(1) : 147-203.
- Santoso, P.S. Aryantha, I.N.P. Pancoro, A. and Suhandono, S. 2015. "Identification of *Pythium* and *Phytophthora* associated with durian (*Durio* sp.) in Indonesia: their molecular and morphological characteristics and distribution." *Asian Journal of Plant Pathology*. 9(2) : 59-71.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Schumann, G.L. and Arcy C. J. D. 2000. “Late blight of potato and tomato.” [Online]. Available :<https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Oomycetes/Pages/Lateblight-Chinese.aspx>
- Shighiro, K., Richardco, E., LAURAN, E.W. and Michael, W.D. 1990. “Sensitivities of various Oomycetes to hymexazol and metalaxyl.” *Journal of General Microbiology* . 136 : 2127-2134.
- Singh, V. Pande, P.C. Jain D.K. 2008. **Text Book of Botany Diversity Of Microbes And Cryptogams.** 4th Ed. New Delhi : Rastogi Publications.
- Taboonpong, K. Manoch, L. Chamswang, C. and Piasai, O. 2014. “Diversity of microfungi in marine sediments from the gulf of Thailand and Andaman sea and the *In Vitro* antagonistic activity against plant pathogenic fungi.” *Thai Journal of Agricultural Science* 2014. 47(2) : 99-108.
- Trigiano, R.B. Spring, O. Windham, A.S. Baird, R.E. Jeffers, S.N. and Lamour K.H. 2016. “Oomycota: The Fungus-Like Organisms.” in 241-252. In Ownley, B.H. and Trigiano, R.B. **Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises.** 3rd Ed. New York : CRC Press.
- Tsao, P.H. and Guy, S.O. 1977. “Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora*-isolation medium containing hymexazol.” *Phytopathology*. 67 : 796-801.
- Vawdrey, L.L. Langdon, P. and Martin T. 2005. “Incidence and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* and *Pythium vexans* associated with durian decline in far northern Queensland.” *Australasian Plant Pathology*. 34(1) : 127-128.
- Watanabe, T. 2018. “**Pictorial atlas of soilborne fungal plant pathogens and diseases.**” United state : CRC Press.
- White, T.J. Bruns, T. Lee, S. and Taylor, J. 1990. **PCR Protocols : a guide to methods and applications.** San Diego : Academic Press.
- 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.
- เอกสารนี้เป็นเอกสาร 175-341. ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด [online].available : www.indexfungorum.org ว่างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
[online].available : www.forestphytophthoras.org/phytophthora-basics

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

[online].available : www.phytophthoradb.org



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) จากมันฝรั่งสด

สำหรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- ชั่งมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้ว 200.00 กรัม
- ชั่งน้ำตาล Dextrose 20.00 กรัม
- ชั่งผงวุ้น 15.00 กรัม
- น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ต้มน้ำกลั่นให้เดือด จากนั้นนำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วและห่อด้วยผ้าขาวบางใส่ลงในน้ำเดือด ต้มจนเนื้อมันฝรั่งนิ่ม เมื่อเนื้อมันฝรั่งนิ่มแล้วให้นำหอมมันฝรั่งออก แล้วเติมน้ำตาล Dextrose และเติมผงวุ้นที่ละลายด้วยน้ำลงไป รอจนกระทั่งน้ำเดือด แล้วแบ่งใส่ขวดตูแวนขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

สำหรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- ชั่งอาหาร PDA สำเร็จรูป 24.00 กรัม
- น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ละลายอาหาร PDA สำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal Agar Base (RBAB) จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป

สำหรับปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- ชั่งอาหาร RBAB สำเร็จรูป 31.55 กรัม
- น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ละลายอาหาร RBAB สำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากผ่านการฆ่าเชื้อ ก่อนการเทอาหารลงจานเพาะเลี้ยงเชื้อจะต้องเติมยาปฏิชีวนะ Streptomycin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลาย

2.1 0.5M EDTA ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

- ชั่ง EDTA (MW=372.24) 93.06 กรัม
- น้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ละลาย EDTA ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับ pH เท่ากับ 8.0 ด้วยกรด HCl จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 10X TBE Buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- ชั่ง Tris base 108 กรัม
- ชั่ง Boric acid 61.83 กรัม
- ชั่ง EDTA 9.305 กรัม
- น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

นำสารที่ชั่งมาละลายน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อนำมาใช้งานต้องเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1X TBE Buffer โดยดูด 10X TBE Buffer ปริมาตร 50 ml ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 450 ml

2.3 1M Tris-HCl ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร (pH=8.0)

- ชั่ง Tris-HCl 121 กรัม
- น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

นำสารที่ชั่งมาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer ปรับ pH ให้ได้ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.4 10 mM TE Buffer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

- 1M Tris -HCl (pH 8.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- 0.5 M EDTA (pH = 8.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.5 1.25 mM Deoxynucleotides triphosphate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

- 100 mM dATP ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร
- 100 mM dTTP ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร
- 100 mM dCTP ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษายานาน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และข้อมูลอ้างอิงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 100 mM dGTP ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร
- น้ำ DI ปริมาตร 95 ไมโครลิตร

เติม dATP, dTTP, dCTP และ dGTP ลงในน้ำ DI ผสมให้เข้ากัน

2.6 20 pM Primer

- 100 pM Forward primer หรือ Reverse primer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
- น้ำ DI ปริมาตร 16 ไมโครลิตร

2.7 การเตรียมอะกาโรสเจล (W/V)

- ผงอะกาโรสเจล
- 1X TBE Buffer

หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้ชั่งผงอะกาโรสเจล 0.2 กรัม ผสมกับ 1X TBE Buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แต่หากต้องการเตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ให้ชั่งผงอะกาโรสเจล 0.4 กรัม ผสมกับ 1X TBE Buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนจนผงวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทใส่ลงในถาดเตรียมเจลที่มีหัว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลเกิดการแข็งตัว

2.8 3X Loading dye ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

- 6X Loading dye ปริมาตร 50 ไมโครลิตร
- น้ำ DI ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ผสม 6X Loading dye และน้ำ DI ในอัตราส่วน 1:1 (V/V)

2.9 Ethidium bromide (EtBr)

- Ethidium bromide ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
- 1X TBE Buffer หรือน้ำกลั่น

ใส่ Ethidium bromide ลงในภาชนะที่มี 1X TBE Buffer หรือน้ำกลั่นปริมาตร 499.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. การเตรียมสไลด์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Phytophthora*, *Pythium* และ *Mortierella*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนจานอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 10 วัน จากนั้น cork ขึ้นวุ้นพร้อมเส้นใยของเชื้อราบริเวณขอบของโคโลนีและบริเวณตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่ไม่มีอาหารและปราศจากเชื้อ จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อประมาณ 30 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตได้กล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อค้นหา sporangia เมื่อพบ sporangia ให้ทำการเขี่ยขึ้นวุ้นขึ้นมาจากน้ำ จากนั้นวางลงบนสไลด์พร้อมปิดกระจกปิดสไลด์ และทำการศึกษารายใต้กล้องจุลทรรศน์อีกครั้งเพื่อศึกษารูปร่างและวัดขนาด

ภาคผนวก ข

KY475630	GAAGGTGAAGTCGTAACCAAGTCCGTAGGTGAATCGTCGGGAACTCATTCACACCTTAAAACTTCCACGTGAACCGATCAAAACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCG
HQ237479	GAAGGTGAAGTCGTAACCAAGTCCGTAGGTGAATCGTCGGGAACTCATTCACACCTTAAAACTTCCACGTGAACCGATCAAAACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCG
AM422704	GAAGGTGAAGTCGTAACCAAGTCCGTAGGTGAATCGTCGGGAACTCATTCACACCTTAAAACTTCCACGTGAACCGATCAAAACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCG
KF263691	GAAGGTGAAGTCGTAACCAAGTCCGTAGGTGAATCGTCGGGAACTCATTCACACCTTAAAACTTCCACGTGAACCGATCAAAACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCG
GU111663	GAAGGTGAAGTCGTAACCAAGTCCGTAGGTGAATCGTCGGGAACTCATTCACACCTTAAAACTTCCACGTGAACCGATCAAAACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCG
CHP25-808	GAAGGTGAAGTCGTAACCAAGTCCGTAGGTGAATCGTCGGGAACTCATTCACACCTTAAAACTTCCACGTGAACCGATCAAAACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCG
CHP38822	GAAGGTGAAGTCGTAACCAAGTCCGTAGGTGAATCGTCGGGAACTCATTCACACCTTAAAACTTCCACGTGAACCGATCAAAACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCG
CHP34814	GAAGGTGAAGTCGTAACCAAGTCCGTAGGTGAATCGTCGGGAACTCATTCACACCTTAAAACTTCCACGTGAACCGATCAAAACTTAGTTGGGGTCTCTTTCCG

KY475630	CGCGGGCTGCTGGCTTCAATGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACATAGCTTTTAAAAACCAI
HQ237479	CGCGGGCTGCTGGCTTCAATGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACATAGCTTTTAAAAACCAI
AM422704	CGCGGGCTGCTGGCTTCAATGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACATAGCTTTTAAAAACCAI
KF263691	CGCGGGCTGCTGGCTTCAATGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACATAGCTTTTAAAAACCAI
GU111663	CGCGGGCTGCTGGCTTCAATGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACATAGCTTTTAAAAACCAI
CHP25-808	CGCGGGCTGCTGGCTTCAATGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACATAGCTTTTAAAAACCAI
CHP38822	CGCGGGCTGCTGGCTTCAATGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACATAGCTTTTAAAAACCAI
CHP34814	CGCGGGCTGCTGGCTTCAATGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACATAGCTTTTAAAAACCAI

KY475630	TCTTTATAACTGATTATACCTGTAGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAGCAACTTTCCAGTGGATGCTAGGCTCCGACATCGATGAAGAACG
HQ237479	TCTTTATAACTGATTATACCTGTAGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAGCAACTTTCCAGTGGATGCTAGGCTCCGACATCGATGAAGAACG
AM422704	TCTTTATAACTGATTATACCTGTAGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAGCAACTTTCCAGTGGATGCTAGGCTCCGACATCGATGAAGAACG
KF263691	TCTTTATAACTGATTATACCTGTAGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAGCAACTTTCCAGTGGATGCTAGGCTCCGACATCGATGAAGAACG
GU111663	TCTTTATAACTGATTATACCTGTAGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAGCAACTTTCCAGTGGATGCTAGGCTCCGACATCGATGAAGAACG
CHP25-808	TCTTTATAACTGATTATACCTGTAGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAGCAACTTTCCAGTGGATGCTAGGCTCCGACATCGATGAAGAACG
CHP38822	TCTTTATAACTGATTATACCTGTAGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAGCAACTTTCCAGTGGATGCTAGGCTCCGACATCGATGAAGAACG
CHP34814	TCTTTATAACTGATTATACCTGTAGGACGAAAGTCTCTGCTTTAACTAGATAGCAACTTTCCAGTGGATGCTAGGCTCCGACATCGATGAAGAACG

KY475630	CTCCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTCAGGATTCAGTGAATCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGCTCCGGGATATGCTGCT
HQ237479	CTCCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTCAGGATTCAGTGAATCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGCTCCGGGATATGCTGCT
AM422704	CTCCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTCAGGATTCAGTGAATCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGCTCCGGGATATGCTGCT
KF263691	CTCCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTCAGGATTCAGTGAATCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGCTCCGGGATATGCTGCT
GU111663	CTCCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTCAGGATTCAGTGAATCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGCTCCGGGATATGCTGCT
CHP25-808	CTCCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTCAGGATTCAGTGAATCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGCTCCGGGATATGCTGCT
CHP38822	CTCCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTCAGGATTCAGTGAATCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGCTCCGGGATATGCTGCT
CHP34814	CTCCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTCAGGATTCAGTGAATCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGCTCCGGGATATGCTGCT

KY475630	ATCAGTGCCTGATACATAAACTTGGTTTCTTCCCTTCCCTGAGTCCGTTGGGATGTCGCGCAGATGGAAGTCTCTCCGCTGGCTCCGATCCGGCTG
HQ237479	ATCAGTGCCTGATACATAAACTTGGTTTCTTCCCTTCCCTGAGTCCGTTGGGATGTCGCGCAGATGGAAGTCTCTCCGCTGGCTCCGATCCGGCTG
AM422704	ATCAGTGCCTGATACATAAACTTGGTTTCTTCCCTTCCCTGAGTCCGTTGGGATGTCGCGCAGATGGAAGTCTCTCCGCTGGCTCCGATCCGGCTG
KF263691	ATCAGTGCCTGATACATAAACTTGGTTTCTTCCCTTCCCTGAGTCCGTTGGGATGTCGCGCAGATGGAAGTCTCTCCGCTGGCTCCGATCCGGCTG
GU111663	ATCAGTGCCTGATACATAAACTTGGTTTCTTCCCTTCCCTGAGTCCGTTGGGATGTCGCGCAGATGGAAGTCTCTCCGCTGGCTCCGATCCGGCTG
CHP25-808	ATCAGTGCCTGATACATAAACTTGGTTTCTTCCCTTCCCTGAGTCCGTTGGGATGTCGCGCAGATGGAAGTCTCTCCGCTGGCTCCGATCCGGCTG
CHP38822	ATCAGTGCCTGATACATAAACTTGGTTTCTTCCCTTCCCTGAGTCCGTTGGGATGTCGCGCAGATGGAAGTCTCTCCGCTGGCTCCGATCCGGCTG
CHP34814	ATCAGTGCCTGATACATAAACTTGGTTTCTTCCCTTCCCTGAGTCCGTTGGGATGTCGCGCAGATGGAAGTCTCTCCGCTGGCTCCGATCCGGCTG

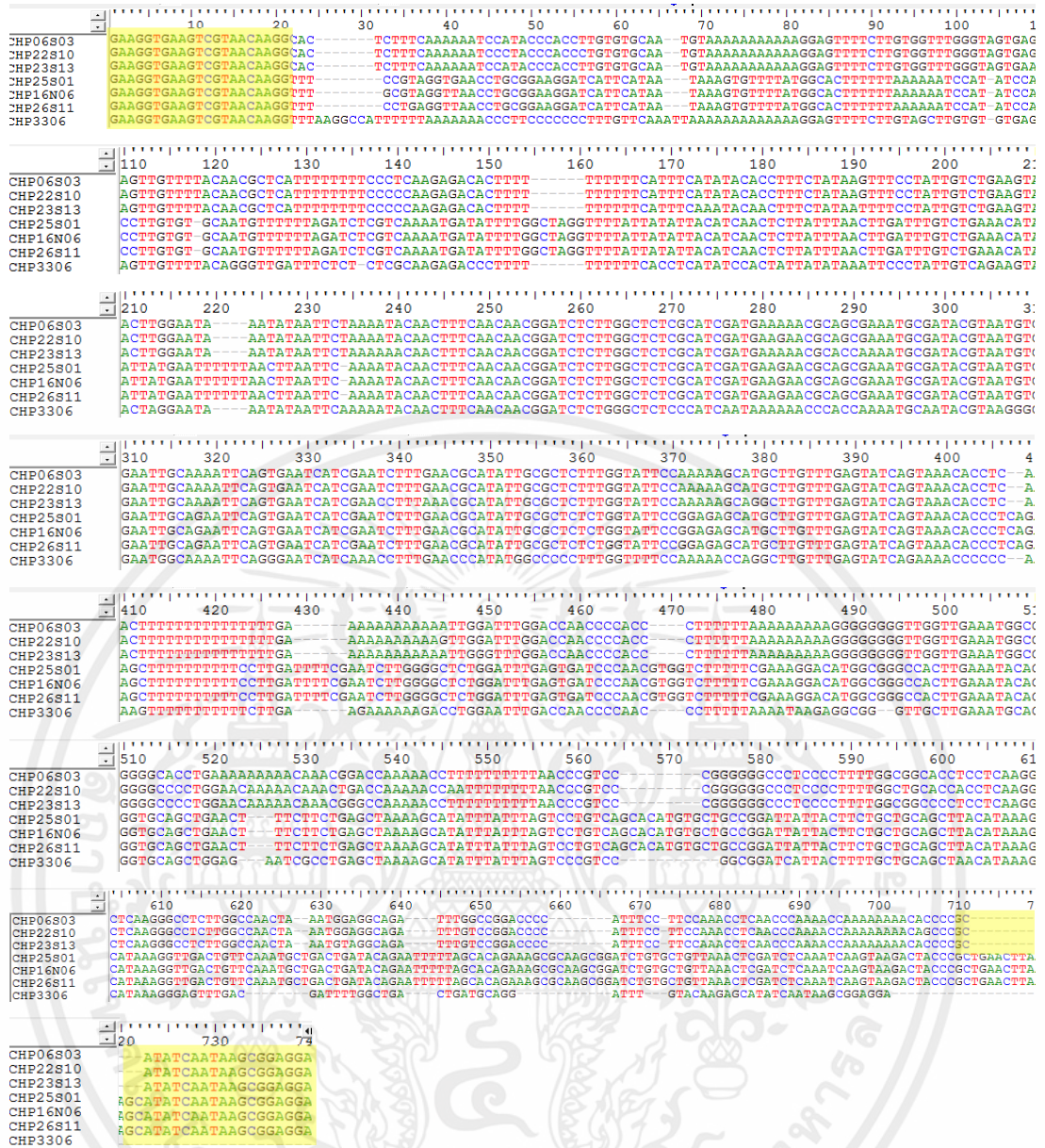
KY475630	GGATCGGCTGTGAGTCCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTCTGACTTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTTGGAGGCTGCTGGCTGAGCCAGT
HQ237479	GGATCGGCTGTGAGTCCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTCTGACTTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTTGGAGGCTGCTGGCTGAGCCAGT
AM422704	GGATCGGCTGTGAGTCCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTCTGACTTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTTGGAGGCTGCTGGCTGAGCCAGT
KF263691	GGATCGGCTGTGAGTCCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTCTGACTTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTTGGAGGCTGCTGGCTGAGCCAGT
GU111663	GGATCGGCTGTGAGTCCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTCTGACTTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTTGGAGGCTGCTGGCTGAGCCAGT
CHP25-808	GGATCGGCTGTGAGTCCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTCTGACTTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTTGGAGGCTGCTGGCTGAGCCAGT
CHP38822	GGATCGGCTGTGAGTCCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTCTGACTTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTTGGAGGCTGCTGGCTGAGCCAGT
CHP34814	GGATCGGCTGTGAGTCCCTTTGAAATGTAAGTGAAGTCTGACTTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTTGGAGGCTGCTGGCTGAGCCAGT

KY475630	GCGACAGTTTGTCTGCTGCGCATTAATGGAAGAGTTCGATCCGCGGATGATGATGGCTTCCGGTGAACAGACGCTTATTAATAATTTCTCAGCTGTGGGTATGA
HQ237479	GCGACAGTTTGTCTGCTGCGCATTAATGGAAGAGTTCGATCCGCGGATGATGATGGCTTCCGGTGAACAGACGCTTATTAATAATTTCTCAGCTGTGGGTATGA
AM422704	GCGACAGTTTGTCTGCTGCGCATTAATGGAAGAGTTCGATCCGCGGATGATGATGGCTTCCGGTGAACAGACGCTTATTAATAATTTCTCAGCTGTGGGTATGA
KF263691	GCGACAGTTTGTCTGCTGCGCATTAATGGAAGAGTTCGATCCGCGGATGATGATGGCTTCCGGTGAACAGACGCTTATTAATAATTTCTCAGCTGTGGGTATGA
GU111663	GCGACAGTTTGTCTGCTGCGCATTAATGGAAGAGTTCGATCCGCGGATGATGATGGCTTCCGGTGAACAGACGCTTATTAATAATTTCTCAGCTGTGGGTATGA
CHP25-808	GCGACAGTTTGTCTGCTGCGCATTAATGGAAGAGTTCGATCCGCGGATGATGATGGCTTCCGGTGAACAGACGCTTATTAATAATTTCTCAGCTGTGGGTATGA
CHP38822	GCGACAGTTTGTCTGCTGCGCATTAATGGAAGAGTTCGATCCGCGGATGATGATGGCTTCCGGTGAACAGACGCTTATTAATAATTTCTCAGCTGTGGGTATGA
CHP34814	GCGACAGTTTGTCTGCTGCGCATTAATGGAAGAGTTCGATCCGCGGATGATGATGGCTTCCGGTGAACAGACGCTTATTAATAATTTCTCAGCTGTGGGTATGA

KY475630	GGTGGATGATTTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATGGCTTTGCTGTTCCGAAATAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTCTGATCCATTTGGGAAC
HQ237479	GGTGGATGATTTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATGGCTTTGCTGTTCCGAAATAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTCTGATCCATTTGGGAAC
AM422704	GGTGGATGATTTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATGGCTTTGCTGTTCCGAAATAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTCTGATCCATTTGGGAAC
KF263691	GGTGGATGATTTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATGGCTTTGCTGTTCCGAAATAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTCTGATCCATTTGGGAAC
GU111663	GGTGGATGATTTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATGGCTTTGCTGTTCCGAAATAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTCTGATCCATTTGGGAAC
CHP25-808	GGTGGATGATTTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATGGCTTTGCTGTTCCGAAATAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTCTGATCCATTTGGGAAC
CHP38822	GGTGGATGATTTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATGGCTTTGCTGTTCCGAAATAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTCTGATCCATTTGGGAAC
CHP34814	GGTGGATGATTTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATGGCTTTGCTGTTCCGAAATAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTCTGATCCATTTGGGAAC

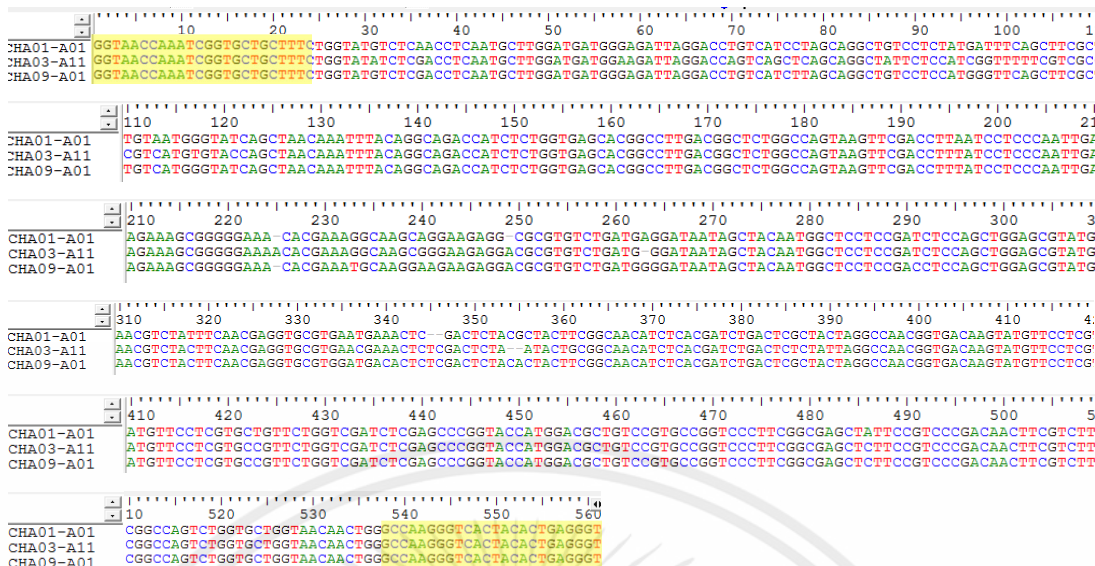
KY475630	ATTTGGGAACCTTGTGATGCTTGGCATGCACTCAATTGGAACCTGATATCAGGCAAGATTAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
HQ237479	ATTTGGGAACCTTGTGATGCTTGGCATGCACTCAATTGGAACCTGATATCAGGCAAGATTAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
AM422704	ATTTGGGAACCTTGTGATGCTTGGCATGCACTCAATTGGAACCTGATATCAGGCAAGATTAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
KF263691	ATTTGGGAACCTTGTGATGCTTGGCATGCACTCAATTGGAACCTGATATCAGGCAAGATTAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
GU111663	ATTTGGGAACCTTGTGATGCTTGGCATGCACTCAATTGGAACCTGATATCAGGCAAGATTAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
CHP25-808	ATTTGGGAACCTTGTGATGCTTGGCATGCACTCAATTGGAACCTGATATCAGGCAAGATTAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
CHP38822	ATTTGGGAACCTTGTGATGCTTGGCATGCACTCAATTGGAACCTGATATCAGGCAAGATTAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
CHP34814	ATTTGGGAACCTTGTGATGCTTGGCATGCACTCAATTGGAACCTGATATCAGGCAAGATTAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
 ปรากฏภาพที่ ข-1 ตำแหน่งจับไพรเมอร์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ด้วยคู่
 ไพรเมอร์ ITS6/ITS4 ของเชื้อราสกุล *Phytophthora*

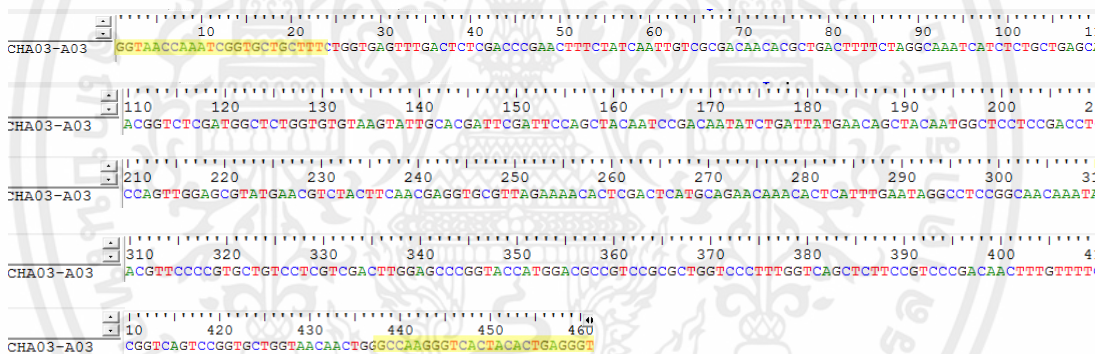


รูปภาคผนวกที่ ข-3 ตำแหน่งจับไพรเมอร์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS6/ITS4 ของเชื้อราสกุล *Mortierella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ ข-4 ตำแหน่งจับไพรเมอร์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณบริเวณ *β-tubulin* ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b ของเชื้อราสกุล *Neosartorya*



รูปภาคผนวกที่ ข-5 ตำแหน่งจับไพรเมอร์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณบริเวณ *β-tubulin* ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a/Bt2b ของเชื้อราสกุล *Talaromyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวก ค-1 ANOVA ของการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อราสกุล
Phytophthora, *Pythium* และ *Mortierella* บนใบทุเรียนในสภาพ
ห้องปฏิบัติการ

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower	Upper		
					Bound	Bound		
Control	4	4.4450	.21190	.10595	4.1078	4.7822	4.22	4.68
CHP25-S08	4	19.0425	2.07823	1.03911	15.7356	22.3494	16.56	21.17
CHP34-S14	4	25.3825	1.62069	.81034	22.8036	27.9614	23.45	27.11
CHP37-S19	4	19.1525	1.01125	.50562	17.5434	20.7616	18.10	20.26
CHP38-S22	4	25.9900	.98044	.49022	24.4299	27.5501	25.12	27.07
CHP39-S01	4	23.2675	1.03268	.51634	21.6243	24.9107	21.97	24.29
CHP40-S14	4	22.2475	.80946	.40473	20.9595	23.5355	21.04	22.71
CHP41-S07	4	20.7150	.84627	.42313	19.3684	22.0616	19.90	21.48
CHP47-S01	4	22.9750	.40419	.20209	22.3318	23.6182	22.48	23.46
CHP10-S07	4	15.6125	.80425	.40213	14.3328	16.8922	14.81	16.60
CHP14-S11	4	18.2400	.22494	.11247	17.8821	18.5979	17.99	18.51
CHP14-N11	4	18.0775	.57703	.28851	17.1593	18.9957	17.46	18.65
CHP16-N01	4	16.0425	.86164	.43082	14.6714	17.4136	14.76	16.56
CHP22-S05	4	21.7600	.24262	.12131	21.3739	22.1461	21.53	22.09
CHP34-S09	4	16.5975	.36719	.18359	16.0132	17.1818	16.17	16.96
CHP45-S02	4	20.2075	2.00503	1.00252	17.0170	23.3980	18.47	22.71
CHP46-S13	4	13.4000	.91408	.45704	11.9455	14.8545	12.25	14.16
CHP17-N05	4	13.2600	.71680	.35840	12.1194	14.4006	12.28	13.93
CHP18-N03	4	13.2025	.56317	.28158	12.3064	14.0986	12.83	14.04
CHP36-S12	4	5.1950	.54933	.27467	4.3209	6.0691	4.49	5.82

ภาคผนวก ค-1 (ต่อ)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					CHP06-S03	4		
CHP22-S10	4	4.4675	.28359	.14180	4.0162	4.9188	4.12	4.79
CHP23-S13	4	4.7800	.36258	.18129	4.2030	5.3570	4.42	5.14
CHP06-S04	4	4.9825	.10178	.05089	4.8206	5.1444	4.83	5.04
CHP17-N11	4	4.8800	.14445	.07223	4.6501	5.1099	4.73	5.07
CHP25-S01	4	4.8975	.13276	.06638	4.6863	5.1087	4.77	5.08
CHP26-S17	4	4.7575	.28453	.14227	4.3047	5.2103	4.50	5.06
CHP28-S03	4	4.8550	.11958	.05979	4.6647	5.0453	4.76	5.03
CHP28-S05	4	4.8775	.02986	.01493	4.8300	4.9250	4.84	4.91
CHP16-N06	4	5.0275	.15327	.07663	4.7836	5.2714	4.86	5.23
CHP26-S04	4	5.0725	.37277	.18639	4.4793	5.6657	4.85	5.63
CHP26-S11	4	4.9275	.20565	.10282	4.6003	5.2547	4.70	5.13
CHP33-S06	4	4.8575	.11529	.05764	4.6740	5.0410	4.69	4.95
Total	136	12.4301	7.75067	.66461	11.1157	13.7446	4.12	27.11

Test of Homogeneity of Variances

wound

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
8.205	33	102	.000

ANOVA

wound

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8049.289	33	243.918	410.850	.000
Within Groups	60.556	102	.594		
Total	8109.846	135			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม จีเอ็มเอ็มไอซ์ ดิจิทัล กรุ๊ป จำกัด ขอสงวนสิทธิ์ในข้อมูลและเนื้อหาเอกสารชุดนี้ไว้ก่อนนำไปใช้

Post Hoc Tests

Duncan^a

isolate	N	Subset for alpha = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	4	4.4450									
CHP22-S10	4	4.4675									
CHP06-S03	4	4.6750									
CHP25-S10	4	4.7550									
CHP26-S17	4	4.7575									
CHP23-S13	4	4.7800									
CHP28-S03	4	4.8550									
CHP33-S06	4	4.8575									
CHP28-S05	4	4.8775									
CHP17-N11	4	4.8800									
CHP25-S01	4	4.8975									
CHP26-S11	4	4.9275									
CHP06-S04	4	4.9825									
CHP16-N06	4	5.0275									
CHP26-S04	4	5.0725									
CHP36-S12	4	5.1950									

isolate	N	Subset for alpha = 0.05												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
CHP18-N03	4		13.2025											
CHP17-N05	4		13.2600											
CHP46-S13	4		13.4000											
CHP10-S07	4			15.6125										
CHP16-N01	4			16.0425										
CHP34-S09	4			16.5975										
CHP14-N11	4				18.0775									
CHP14-S11	4				18.2400									
CHP25-S08	4				19.0425									
CHP37-S19	4				19.1525	19.1525								
CHP45-S02	4					20.2075	20.2075							
CHP41-S07	4						20.7150	20.7150						
CHP22-S05	4							20.7150	21.7600					
CHP40-S14	4								21.7600	22.2475				
CHP47-S01	4									22.2475	22.2475			
CHP39-S01	4										22.9750			
CHP34-S14	4											23.2675		
CHP38-S22	4												25.3825	
CHP38-S22	4													25.9900
Sig.		.271	.736	.090	.074	.056	.354	.058	.373	.079	.267			



ผลงานทางวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation and Identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from Durian Orchard in Chumphon Province, Thailand

Suksiri, S.¹, Laipasu, P.², Soytong, K.³ and Poeaim, S.^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok, Thailand. ²Department of Statistics, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok, Thailand. ³Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Suksiri, S., Laipasu, P., Soytong, K. and Poeaim, S. (2018). Isolation and identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from durian orchard in Chumphon province, Thailand. International Journal of Agricultural Technology 14(3):389-402.

Abstract The major problem of durian cultivation are root and stem rot disease caused by *Phytophthora* and *Pythium* species. Therefore, the pathogens were isolated, identified, and found the virulent pathogenic fungi that isolated from soil planted to durian in Chumphon province. The pathogens were studied on morphological and molecular analysis based on internal transcribed spacer (ITS)-nrDNA sequence. Ten isolates were confirmed as *Phytophthora palmivora*, *Pythium cucurbitacearum*, *Pythium deliense*, *Pythium splendens*, *Mortierella chlamydospora*, *Mortierella capitata* and *Mortierella* sp. The pathogenicity test was done by detached leaf method in Monthong durian variety. It found that *P. palmivora* and *P. cucurbitacearum* were high pathogenic isolates. Moreover, *P. splendens* was infected and produced symptoms on leaves. It is the first report of *P. splendens* as pathogenic to durian.

Keywords: internal transcribed spacer, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., root and stem rot disease

Introduction

Durian is an economic fruit and famous fruit in Southeast Asia, that known as “the king of fruit”. Thailand is the largest durian production in the world (Chomchalow *et al.*, 2008). Moreover, Thailand is also a leading exporter for the international market (Bais, 2016; Parichatnon *et al.*, 2017). However, the major problem is root and stem rot disease which affected yield loss of durian plantation (Lim and Chan, 1986).

Symptoms of root and stem rot disease start attacks at the root system that roots will change to brown color. Then, trunk of durian tree has a juicy spot. When open the bark for observe this wound, the inner has brown juicy that will be change to be a dark brown color. This symptom rapidly spreads which the

* Corresponding author: Poeaim, S.; Email: poeaim@hotmail.com

leaves will fall down and the tree will die (Lin and Sangchote, 2003; Burgess *et al.*, 2008; Janick and Paull, 2008).

Many researchers reported that *Phytophthora palmivora* cause root and stem rot disease in durian (Lim and Chan, 1986; Cooke *et al.*, 2009; Abad and Cruz, 2012). Furthermore, a few information reported that root and stem rot disease caused by *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium cucurbitacearum*, *Pythium vexans* and *Pythium deliense* (Lin and Sangchote, 2003; Vawdrey *et al.*, 2005; Santoso *et al.*, 2015). *Phytophthora* and *Pythium* belong to the Pythiaceae, Oomycetes (Singh *et al.*, 2008) that both genera are plant pathogens and widely host range (Robideau *et al.*, 2011). The pathogen inoculum are spreaded rapidly by wind and rain, this feature resulted plague in all area of durian orchards (Erwin *et al.*, 1983).

Phytophthora and *Pythium* are considered a very difficult group for species identification because these morphology are very similar (Uzuhashi *et al.*, 2010; Schroeder *et al.*, 2013). Molecular techniques for identification of *Phytophthora* and *Pythium* species have higher precision and resolution (Spies *et al.*, 2011). The universal primers ITS6 and ITS4 for internal transcribed spacer (ITS) of nucleus ribosomal DNA (nrDNA) were widely used for pathogen identification (Grunwald *et al.*, 2011; Santoso *et al.*, 2015; Olson *et al.*, 2016; Oszako *et al.*, 2016). Therefore, the objectives to isolate and identify *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from soil planted to durian in Chumphon province.

Materials and methods

Sampling and Isolation

Soil samples were collected from durian trees showing root and stem rot disease in Khunkrating, Banna, Talesub, Chumco and Hinkaew district orchards in Chumphon province. The district and geographic location of soil samples were shown in Table 1. Soil samples were collected infected trees, at 10-15 cm depth and kept in plastic bags.

Direct soil plating and soil baiting techniques were used to isolate. For soil plate technique, the soil sample was placed on water agar (WA) and incubated at room temperature (RT) for 1-2 days. After that, cut hyphal tip under stereo microscope put on potato dextrose agar (PDA). Another method is baiting method which was modified from Jeffers and Aldwinckle (1987), Drenth and Sendall (2001) and Martin *et al.* (2012). The mature and healthy leaves of Monthong durian were used as a bait. The leaf was washed with tap water, soaked in 70% ethanol, rinsed in sterile water and cut with scissors about 1×1 cm. The pieces of leaves were floated on soil solution and incubated in the

dark for 1-2 days at 25°C. After that, the pieces of leaves were placed on WA then incubated at RT for 1-2 days. After incubation, hyphal tip were cut and placed on PDA. The morphology was photographed, observed sporangium shape, papilla and measured sporangium size (Drenth and Sendall, 2001).

Table 1. The district and geographic location of 7 soil samples from Chumphon province

District	Geographic location	
	Latitude	Longitude
Khunkrating	10.46492	99.10064
Banna	10.47082	99.02060
Talesub	10.73024	99.26467
Talesub	10.73565	99.26298
Talesub	10.69141	99.23689
Chumco	10.78955	99.27878
Hinkaew	10.60287	99.06753

DNA extraction

DNA extraction are modify the CTAB protocol followed Doyle and Doyle (1990). Mycelium was scraped off from the cellophane sheet and ground with liquid nitrogen by a pestle. The powder about 1-2 g. was put into 2 ml tube and add 2 μ l of β -mercaptoethanol for separate phenolic compound and 700 μ l of 2X CTAB buffer was added for cell extraction. The tube was incubated at 65°C in water bath for 1 hour. After incubation, add 700 μ l of chloroform: isoamyl alcohol (24:1, v/v) and mixed by immediately inversion. After centrifugation, the upper aqueous layer was transferred and treated with RNase for 30 minutes at 37°C. After that, the solution was added with 50 μ l of 10% CTAB in 0.7M NaCl, precipitated with cold isopropanol and washed with 70% ethanol and absolute ethanol. DNA pellet was dried in incubator 37°C before dissolved with TE buffer and stored at -20°C, for further use as templates for PCR amplification.

Amplification and sequence analysis

Molecular identification was performed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS)-nrDNA region, using universal primers ITS6 (5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTG-ATATGC-3') (White *et al.*, 1990; Cooke *et al.*, 2000). DNA templates were amplified by polymerase chain reaction (PCR) which modify the condition followed Grunwald *et al.* (2011). The PCR products were performed to sequencing analysis by Bioneer Company, Korea. The sequences were

identified species by aligning the sequence from database of National Center for Biotechnology Information (NCBI) using Basic Local Alignment Search Tools (BLAST). The phylogenetic tree was established using MEGA6 program by Tamura-Nei model, Maximum-likelihood method and bootstrap was generated using 1000 replications.

Pathogenicity test

Pathogenicity test of each isolate was tested by detached leaf method (Vawdrey *et al.*, 2005). Monthong durian leaf was rinsed with sterilized water and surface sterilized with 70% ethanol. Each wound was punctured nine times with a sterile needle. Each durian leaf was made for four wounds as four repeating and immediately inoculated. Before inoculation, all isolates were cultured on PDA medium at 25°C for 7 days. Then, mycelia were cut to discs of 0.5 mm diameter with a sterilized cork borer and were transferred to the durian leaf. The discs of PDA medium were maintained as control. After that, each leaf was incubated in moist chamber box at room temperature for 4 days. The brown rot around wound was measured diameter and photographed. Statistical analysis of pathogenicity was done with ANOVA analysis ($p < 0.05$).

Results

Isolation and morphological identification

All isolates were identified according to their mycelium and colony morphology, sporangium shape and size, growth rate, development of zoosporangia and the process of the zoospore release which were observed on PDA medium.

The first group, the colony morphology of isolate CHP25-S08 is stellate pattern after 10 days on PDA. Sporangia are ovoid to limoniform shape and occasionally found obpyriform shape that are often papillate. The sporangia width rang from 25.33 to 45.34 μm and length rang from 26.29 to 56.74 μm . This isolate was identified as *Phytophthora palmivora* (Figure 1-4A). The colony morphology of isolate CHP14-S11, CHP14-N11 and CHP22-S05 is petaloid pattern after 7 days on PDA that the colony grow faster than the first group. Sporangia are globose to ellipsoid shape without papilla. The sporangia of isolate CHP14-S11 and CHP14-N11 which isolated from the same soil area are difference from CHP22-S05. The sporangia of isolate CHP14-S11 ranged in width from 9.91 to 17.87 μm and length from 10.14 to 19.96 μm and isolate CHP14-N11 ranged in width from 8.25 to 17.04 μm and length from 8.50 to

19.83 μm . The sporangia of isolate CHP22-S05 ranged in width from 15.63 to 20.29 μm and length from 16.91 to 20.77 μm . Three isolates were identified as *Pythium cucurbitacearum* which the morphology of isolate CHP14-S11 shown in Figure 1-4B. CHP25-S01, the colony morphology of this isolate is rose pattern on PDA after 7 days. The sporangia are round and globose shape with spine that width rang from 12.19 to 20.06 μm and length rang from 13.94 to 21.63 μm . This isolate was identified as *Pythium spinosum* (Figure 1-4C). The final group was divided into 2 subgroups based on their shape and growth pattern of colonies on PDA after 7 days and morphology of sporangia. The first subgroup (CHP17-N05, CHP18-N03 and CHP25-S10), colonies are fast-growing and white cotton candy pattern and sporangia are globose shape without papilla. The other group (CHP06-S03 and CHP33-S06), colonies are concentric pattern like a rose and sporangia are only limoniform shape without papilla. This group was identified as *Pythium* sp. which the colony and sporangia of CHP18-N03 shown in Figure 1-4D. The morphological characteristics of ten isolates as shown in Table 2.

A total of ten isolates were phenotypically identified as *Phytophthora palmivora* and *Pythium* sp. (*Pythium cucurbitacearum*, *Pythium spinosum* and *Pythium* sp.). However, some isolates can not be identified to species with traditional morphological observations. So, it is necessary to confirm by the molecular technique for complete identification.

Table 2. The morphological characteristics of ten isolates

Isolate	Colony pattern	Sporangia			
		Shape	Width (μm)	Length (μm)	Papilla
CHP25-S08	stellate	Obpyriform ovoid limoniform	25.33-45.34	26.29-56.74	+
CHP14-S11	petaloid	globose ellipsoid	9.91-17.87	10.14-19.96	-
CHP14-N11	cottony with slightly petaloid	globose ellipsoid	8.25-17.04	8.50-19.83	-
CHP22-S05	petaloid	globose ellipsoid	15.63-20.29	16.91-20.77	-
CHP25-S01	rose	globose	12.19-20.06	13.94-21.63	-
CHP17-N05	cotton candy	Globose	11.51-20.18	11.56-22.53	-
CHP18-N03	cotton candy	Globose	27.72-42.62	27.77-42.70	-
CHP25-S10	cotton candy	globose	9.89-18.21	10.44-19.02	-
CHP06-S03	rose	Limoniform	5.85-11.43	8.11-14.99	-
CHP33-S06	rose	Limoniform	7.55-10.10	10.00-12.82	-

+: papillated sporangium, -: non papillate sporangium

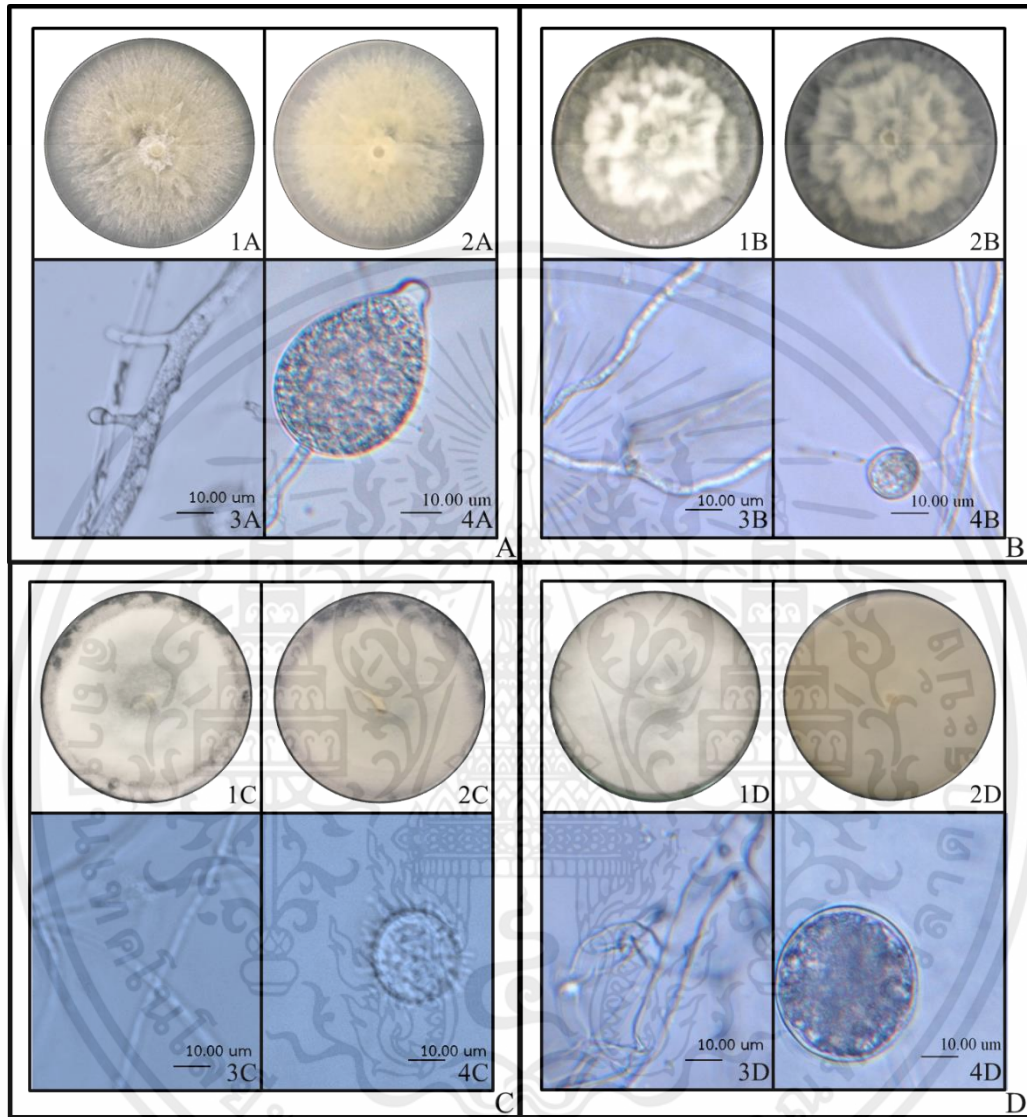


Figure 1. Colonies and sporangia morphology of *Phytophthora* and *Pythium* on PDA: colony on the top of the Petri dish (1), colony on the bottom of the Petri dish (2), hypha (3) and sporangium (4) of the CHP25-S08 (A), CHP14-S11 (B), CHP25-S01 (C) and CHP18-N03 (D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Molecular identification and sequence analysis

The nrDNA-ITS sequences of each sample which amplified with ITS6 and ITS4 primers were sequenced and compared with known DNA sequences in the NCBI databases. The nucleotide sequences in all isolates are ranged in size from 634 to 924 (Table 3). The isolate CHP25-S08 was identified as *Phytophthora palmivora* based on molecular analysis, corroborating the above morphological identification. BLAST analysis of this isolate revealed 99% identity with reference sequences of *P. palmivora* in GenBank. CHP14-S11, CHP14-N11 and CHP22-S05 were identified as *Pythium cucurbitacearum* which showed 94-99% identity. The isolate CHP25-S01 was assumed to belong to *P. spinosum* based on the morphological identification of its sporangia and its gross colony appearance. However, nucleotide sequence analysis of this isolate was most closely related to *Mortierella chlamydospora* (JX975927) showed 98% identity. Five isolates were identified as *Pythium* sp. CHP17-N05 and CHP18-N03 were identified to *Pythium splendens* which a sequence identity higher than 85%. CHP25-S10 sequence was more closely related to *Pythium deliense*, showed 99% identity. Moreover, in CHP06-S03 and CHP33-S06 showed 92% and 82% identity with the *Mortierella capitata* (MF115611) *Mortierella hyalina* (KC009040), respectively. Sequence comparing between morphology and molecular identification showed result in Table 3.

Table 3. Identification comparing between morphology and molecular

Isolate	Morphology	Sequence length (bp)	Identification		
			Molecular	Accession number	% Identity
CHP25-S08	<i>Phytophthora palmivora</i>	895	<i>P. palmivora</i>	KP183963	99
CHP14-S11	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	924	<i>P. cucurbitacearum</i>	KP183959	98
CHP14-N11	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	924	<i>P. cucurbitacearum</i>	KP183959	94
CHP22-S05	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	924	<i>P. cucurbitacearum</i>	KP183959	99
CHP17-N05	<i>Pythium</i> sp.	920	<i>P. splendens</i>	AB780581	87
CHP18-N03	<i>Pythium</i> sp.	920	<i>P. splendens</i>	AB780605	86
CHP25-S10	<i>Pythium</i> sp.	885	<i>P. deliense</i>	KP183964	99
CHP25-S01	<i>Pythium spinosum</i>	723	<i>M. chlamydospora</i>	JX975927	98
CHP06-S03	<i>Pythium</i> sp.	674	<i>M. capitata</i>	MF115611	92
CHP33-S06	<i>Pythium</i> sp.	634	<i>M. hyalina</i>	KC009040	82

The DNA sequences were analyzed for phylogenetic relationships using MEGA 6 software. All sequences were compared with the sequences in GenBank. Bootstrap analysis was performed with 1,000 replications to determine the support for each group. The phylogenetic tree shows in Figure 2 clearly separate to two major groups consist of genus *Phytophthora*, *Pythium* and *Mortierella*. The tree shows that the three isolates of *P. cucurbitacearum* (CHP22-S05, CHP14-N11 and CHP14-S11) was well embedded within *P.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้ ห้ามเผยแพร่หรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีโอกาสไปใช้ 395

palmivora with strong support (92%) and demonstrated the close relationships between *P. splendens* (CHP17-N05 and CHP18-N03) and *P. deliense* (CHP25-S10). Including, phylogenetic analysis confirmed the relationships in genus *Mortierella*. However, the CHP33-S06 shown to be less closely related to *M. hyalina*.

Pathogenicity test

Pathogenicity test of each isolate which the detached leaf bioassay was used to evaluate on Monthong durian leaf after 4 days inoculation. *P. palmivora* isolate CHP25-S08 showed the significantly largest diameter of brown lesions (mean of 26.94 mm) on durian leaf. In this study, the *P. cucurbitacearum* isolate CHP22-S05, CHP14-N11 and CHP14-S11 gave large diameters ranged from 18.24 to 22.15 mm. In addition, both isolates of *P. splendens* (CHP17-N05 and CHP18-N03) also made brown lesions ranged from 16.04 to 17.40 mm in diameter. However, there were no significant differences in diameter of lesions in the groups of control, *P. deliense* (CHP25-S10) and *Mortierella* (CHP25-S01, CHP06-S03 and CHP33-S06). The pathogenicity are shown in Figure 3 and Table 4.

Table 4. Lesion diameters on detached leaves of Montong durian cultivar inoculated with ten isolates after 4 days of inoculation

Isolates	Species	Lesion diameters (mm)*
Control	-	4.56±0.08 ^c
CHP25-S08	<i>Phytophthora palmivora</i>	26.94±2.16 ^a
CHP22-S05	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	22.15±0.22 ^b
CHP14-N11	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	20.21±1.00 ^{bc}
CHP14-S11	<i>Pythium cucurbitacearum</i>	18.24±0.11 ^{cd}
CHP17-N05	<i>Pythium splendens</i>	17.40±0.49 ^d
CHP18-N03	<i>Pythium splendens</i>	16.04±0.32 ^d
CHP25-S10	<i>Pythium deliense</i>	4.86±0.29 ^c
CHP25-S01	<i>Mortierella chlamydospora</i>	4.76±0.04 ^c
CHP06-S03	<i>Mortierella capitata</i>	4.95±0.24 ^c
CHP33-S06	<i>Mortierella</i> sp.	4.63±0.17 ^c

*Values expressed are mean ± SE

a-c means with the different letters in the same column were significant by ANOVA at $p < 0.05$

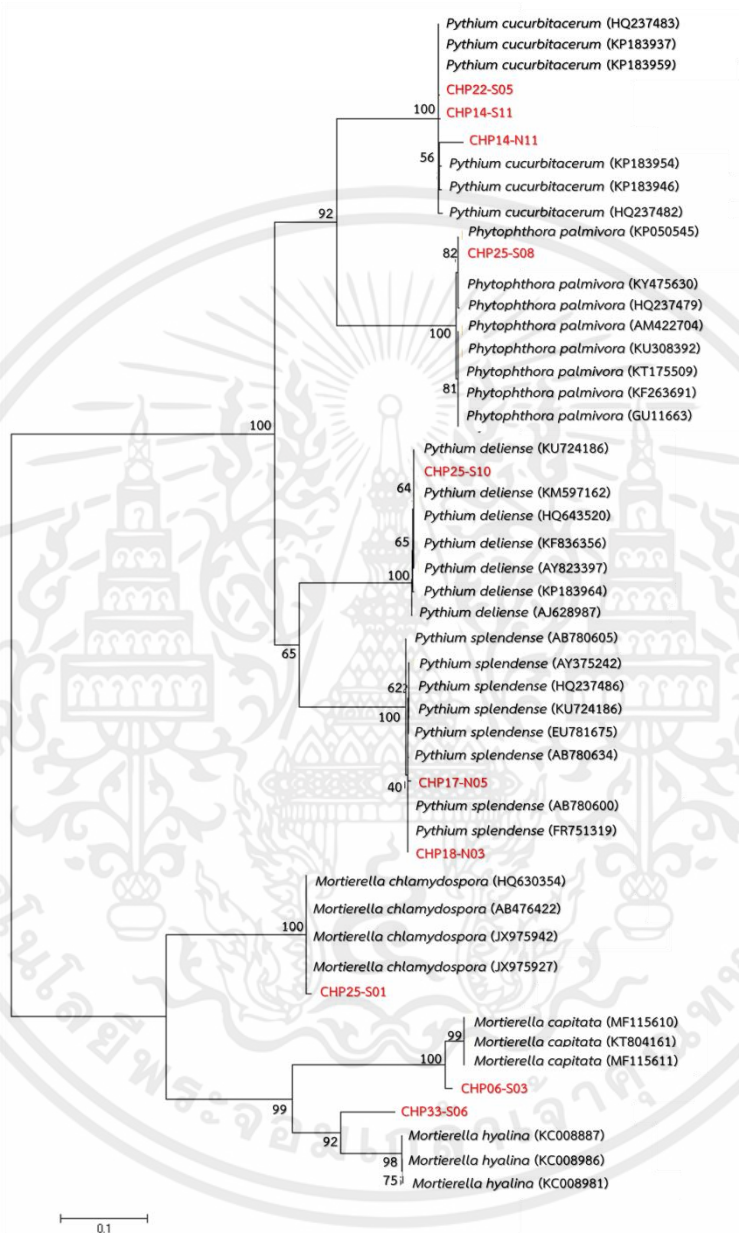


Figure 2. Phylogenetic tree obtained from the analyses of ITS-nrDNA sequence data, representing the identification of *Pythium*, *Phytophthora* and *Mortierella* and the numbers above the nodes are the percentage of the trees from bootstrap analysis

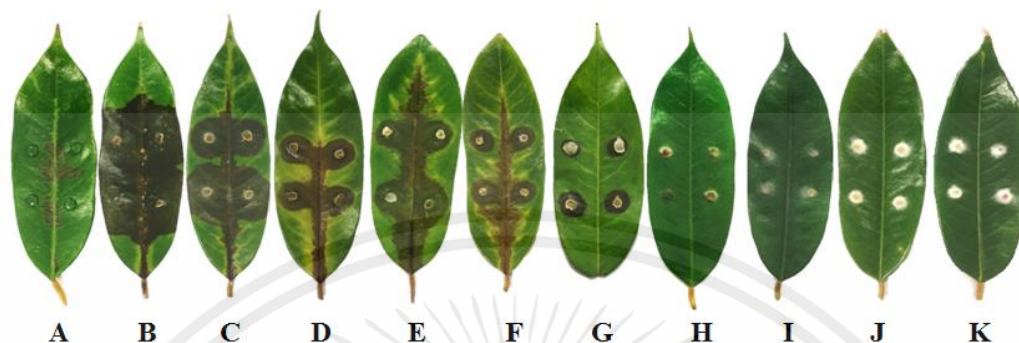


Figure 3. Pathogenic and non-pathogenic results of detached leaf assays in leaves of Monthong durian inoculated with isolates of control (A), CHP25-S08 (B), CHP22-S05 (C), CHP14-N11 (D), CHP14-S11 (E), CHP17-N05 (F), CHP18-N03 (G), CHP25-S10 (H), CHP25-S01 (I), CHP06-S03 (J) and CHP33-S06 (K) after 4 days of inoculation

Discussion

The genus *Phytophthora* and *Pythium* were classified in Pythiaceae and Peronosporales. Both genera are very similar in morphology (Uzuhashi *et al.*, 2010; Schroeder *et al.*, 2013). For *Phytophthora palmivora* the sporangium is thin-walled, limoniform shaped with an apical papilla, zoospores which packed in the sporangium are released directly through an opening at apical papilla. For genus *Pythium*, the sporangium have globose shaped without papilla and sporangium produce zoospores in a vesicle. Zoospores in the sporangium are released when the vesicle break (Burgess *et al.*, 2008). However, some isolates are not found stage of zoospores release. *Phytophthora palmivora* and *Pythium* sp. have various shape and size of sporangium (Santoso *et al.*, 2015). Including, the colony morphology of some *Pythium* sp. isolates are similar appearance to *Mortierella* sp. in culture that some *Mortierella* sp. produce zygospores that look like *Pythium* oospores (Domsch *et al.*, 2007). However, colonies of *Mortierella* are fast growing, producing a concentric pattern and having smaller spore than *Pythium* sp. An accurate morphological identification is essential but difficult to identify or impossible to do. So, molecular identification provides a rapid and reliable. Based on morphological and ITS-nrDNA sequences, ten isolates were identified as *P. palmivora*, *P. cucurbitacearum*, *P. splendens*, *P. deliense*, *M. chlamydospora*, *M. capitata* and *Mortierella* sp. Because of CHP33-S06 shown to be less closely related to *M. hyalina* that it is not enough to identify as this species only based on ITS sequences of nrDNA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Root and stem rot disease in durian are almost related to *Phytophthora palmivora* as the responsible pathogen (Lim and Chan, 1986; Cooke *et al.*, 2009; Abad and Cruz, 2012). Nowadays, *P. cinnamomi*, *P. cucurbitacearum*, *P. vexans* and *P. deliense* are also found associated with durian tree-decline (Lin and Sangchote, 2003; Vawdrey *et al.*, 2005; Santoso *et al.*, 2015). *P. splendens* were successful in produced lesions on leaves of durian. So, this present study demonstrated the first publication for the association of *P. splendens* pathogen in durian. However, *P. deliense* and genus *Mortierella* are not associated with leaf rot disease in durian which genus *Mortierella* has not been reported for plant pathogen. So, those isolates should be testing on the another commercial durian cultivars in future.

Conclusion

Direct soil plating and soil baiting techniques were isolated and identified for pathogenic fungi from soil that were collected from durian orchards in Chumphon province. Due to insufficient morphological identification, it is easy to misidentify and difficult to key to the species level of *Phytophthora* and *Pythium*. The molecular identification are essential to verify the species level identification which can provide rapid and reliable. Based on morphological and ITS-nrDNA sequences, the ten isolates were identified as *Phytophthora palmivora*, *Pythium cucurbitacearum*, *P. deliense*, *P. splendens*, *Mortierella chlamydospora*, *M. capitata* and *Mortierella* sp. Pathogenicity test by detached leaf method, the high virulence of leaf rot disease of durian are caused by *P. palmivora* and *P. cucurbitacearum*. In this study, *P. splendens* was successful in produced lesions on leaves of Monthong durian. So, this is the first publication of *P. splendens* as pathogen of durian. However, *P. deliense* and genus *Mortierella* are not associated with leaf rot disease of durian.

Acknowledgement

This work was supported by Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL); fiscal year 2016. We thank anonymous reviewers for their helpful comments on the manuscript.

References

- Abad, R. G. and Cruz, K. J. T. (2012). Incidence of *Phytophthora* fruit rot on four durian cultivars in Davao city, Philippines. *Banwa* 9:1-9.
- Bais, K. (2016). Why Thailand is the leading exporter of durian, mangosteen and other tropical fruits. *Utar Agriculture Science Journal* 2:5-15.

- Burgess, L. W., Knight, T. E., Tesoriero, L. and Phan, H. T. (2008). Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam. Vietnam: Goanna Print Pty Ltd.
- Chomchalow, N., Somsri, S., and Songkhla, P. N. (2008). Marketing and export of major tropical fruits from Thailand. *Assumption University Journal of Technology* 11:133-143.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. and Brasier, C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30:17-32.
- Cooke, T., Persley, D. and House, S. (2009). Diseases of fruit crops in Australia. Australia: CSIRO Publishing.
- Drenth, A. and Sendall, B. (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. Brisbane: CRC for Tropical Plant Protection.
- Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. (2007). Compendium of soil fungi. Berchtesgaden, IHW-Verlag.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Erwin, D. C., Garcia, S. E. and Tsao, P. H. (1983). *Phytophthora: Its biology, taxonomy, and pathology*. United States: The American Phytopathological Society.
- Grunwald, N. J., Martin, F. N., Larsen, M. M., Sullivan, C. M., Press, C. M., Coffey, M. D., Hansen, E. M. and Parke, J. L. (2011). Phytophthora-ID.org: A sequence-based *Phytophthora* identification tool. *Plant Disease* 95:337-342.
- Janick, J. and Paull, R. E. (2008). The encyclopedia of fruit and nuts. United Kingdom: Cambridge University Press.
- Jeffers, S. N. and Aldwinckle, H. S. (1987). Enhancing detection of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil. *Phytopathology* 77:1475-1482.
- Lim, T. K. and Chan, L. G. (1986). Fruit rot of durian caused by *Phytophthora palmivora*. *Pertanika* 9:269-276.
- Lin, T. K. and Sangchote, S. (2003). Diseases of tropical fruit crops. Florida: Tropical Research and Education Center Homestead.
- Martin, F. N., Abad, Z. G., Balci, Y. and Ivos, K. (2012). Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant disease* 96:1080-1103.
- Oszako, T., Sikora, K., Belbahri, L. and Nowakowska, J. A. (2016). Molecular detection of oomycetes species in water courses. *Folia Forestalia Polonica, Series A-Forestry* 58:246-251.
- Olson, J. D., Damicone, J. P. and Kahn, B. A. (2016). Identification and characterization of isolate of *Pythium* and *Phytophthora* spp. from snap beans with cottony leak. *Plant Disease* 100:1446-1453.
- Parichatnon, S., Maichum, K. and Peng, K. C. (2017). Application of the malmquist productivity index on measurement of productivity trend of durian production in Thailand. *International Journal of Business Marketing and Management* 2:1-9.
- Robideau, G. P., De Cock, A. W., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Desaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C. H., Kupper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B. and Levesque, C. A. (2011). DNA barcoding of Oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11:1002-1011.
- Santoso, P. S., Aryantha, I. N. P., Pancoro, A. and Suhandono, S. (2015). Identification of *Pythium* and *Phytophthora* associated with durian (*Durio* sp.) in Indonesia: their molecular and morphological characteristics and distribution. *Asian Journal of Plant Pathology* 9:59-71.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของสำนักงานเพื่อการศึกษานานาชาติ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ 400 ห้ามสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Schroeder, K. L., Martin, F. N., De Cock, A.W. A. M., Levesque, C. A., Spies, C. F. J., Okubara, P. A. and Paulitz, T. C. (2013). Molecular detection and quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease* 97:4-20.
- Singh, V., Pande, P. C. and Jain D. K. (2008). Text book of botany diversity of microbes and cryptogams. 4. New Delhi: Rastogi Publications.
- Spies, C. F. J., Mazzola, M. and McLeod, A. (2011). Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 131:103-119.
- Uzuhashi, S., Tojo, M. and Kakishima, M. (2010). Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51:337-365.
- Vawdrey, L. L., Langdon, P. and Martin T. (2005). Incidence and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* and *Pythium vexans* associated with durian decline in far northern Queensland. *Australasian Plant Pathology* 34:127-128.
- Vawdrey, L. L., Martin, T. M. and De Faveri, J. (2005). A detached leaf bioassay to screen durian cultivars for susceptibility to *Phytophthora palmivora*. *Australasian Plant Pathology* 34:251-253.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press.

(Received: 25 August 2017, accepted: 25 November 2017)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวสุภานัน สุขศิริ
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่ 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	12/10 ถนนบ้านปรก ตำบลหน้าเมือง อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี 70000
ประวัติการศึกษา	2559 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.03 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2561 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. Suksiri, S., Laipasu, P., Soytong, K. and Poeaim, S. 2018 “Isolation and Identification of <i>Phytophthora</i> sp. and <i>Pythium</i> sp. from Durian Orchard in Chumphon Province, Thailand” <i>International Journal of Agricultural Technology</i> . 14(3) : 389- 402

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้