

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Neosortorya* และ *Talaromyces*
ในการควบคุมโรคลำต้นไหม้และแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่ง

EFFICACY OF *Neosortorya* AND *Talaromyces* TO CONTROL
STEM BLIGHT AND ANTHRACNOSE IN ASPARAGUS

ธัญพร มังคลาด

THANATCHAPORN MANGKALAD

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-041

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Neosortorya* และ *Talaromyces*
ในการควบคุมโรคลำต้นไหม้และแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่ง

EFFICACY OF *Neosortorya* AND *Talaromyces* TO CONTROL
STEM BLIGHT AND ANTHRACNOSE IN ASPARAGUS

ธัญชพร มังคลาด

THANATCHAPORN MANGKALAD

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-041

EFFICACY OF *Neosartorya* AND *Talaromyces* TO CONTROL
STEM BLIGHT AND ANTHRACNOSE IN ASPARAGUS

THANATCHAPORN MANGKALAD

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

2020

KMITL-2020-SC-M-020-041

COPYRIGHT 2020

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> ในการควบคุมโรคลำต้นไหม้และแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่ง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวธนัชพร มังคลาด
รหัสประจำตัว	60605047
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2563
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อราสาเหตุโรค *Phomopsis asparagi* และ *Colletotrichum gloeosporioides* จากต้นหน่อไม้ฝรั่งจำนวน 29 ตัวอย่าง เป็นเชื้อรา *P. asparagi* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ 10 ไอโซเลต และ เชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส จำนวน 8 ไอโซเลต โดยบ่งชี้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยคูไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคพบว่า *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 สามารถก่อโรคในหน่อไม้ฝรั่งรุนแรงมากที่สุด การแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากตัวอย่างดินจำนวน 18 ตัวอย่าง เป็นเชื้อราสกุล *Neosartorya* จำนวน 15 ไอโซเลต และเชื้อราสกุล *Talaromyces* จำนวน 10 ไอโซเลต บ่งชี้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง β -tubulin ด้วยคูไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อราต่อต้าน ได้แก่ เชื้อรา *N. spinosa*, *N. pseudofischeri*, *T. liani*, *T. macrosporus*, *T. muroii* และ เชื้อราสกุล *Talaromyces* ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์จำนวน 2 ไอโซเลต การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 และ *Talaromyces* ATM07-01 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สปีชีส์ ได้ดี และการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้านในการยับยั้งการสร้างสปอร์ พบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ของเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 ได้ดีที่สุดใน โดยมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 11.67 และ 95.09 ppm ตามลำดับ สำหรับสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 จากตัวทำละลายเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. asparagi* ASPA03 ดีที่สุด และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท สามารถยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ASCG06 ได้ดีที่สุดใน เมื่อวิเคราะห์สารสำคัญในสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ของเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 พบสาร Hecogenin และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล ของเชื้อรา *Talaromyces*. ATM07-01 พบสาร Bis (2-ethylhexyl) phthalate และ Phenol, bis(1,1-dimethylethyl)

คำสำคัญ: โรคลำต้นไหม้ โรคแอนแทรคโนส *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis asparagi*, *Neosartorya* sp. และ *Talaromyces* sp.

Thesis Title	Efficacy of <i>Neosartorya</i> and <i>Talaromyces</i> to control stem blight and anthracnose in asparagus
Student Name	Thanatchaporn Mangkalad
Student ID	60605047
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2020
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Kasem Soyong

Abstract

Phomopsis asparagi and *Colletotrichum gloeosporioides* were isolated from 29 samples of diseased asparagus found 10 isolates of *P. asparagi* causing stem blight and 8 isolates of *C. gloeosporioides* causing anthracnose. The pathogens were identified by morphology and nucleotide sequences of the ITS regions with ITS1/ITS4 primers. The pathogenicity test revealed that *P. asparagi* ASPA03 and *C. gloeosporioides* ASCG06 had the highest virulence pathogenic isolates. The fifteen isolates of *Neosartorya* and ten isolates of *Talaromyces* were isolated from 18 soil samples using morphological and molecular characterization. DNA sequencing on β -*tubulin* with Bt2a/Bt2b primers used for molecular identification. *N. spinosa*, *N. pseudofischeri*, *T. liani*, *T. macrosporus*, *T. muroii* and two unidentified species of *Talaromyces* were confirmed by phylogenetic analysis. Obtained results from the dual culture method, *N. pseudofischeri* ATM17-03 and *Talaromyces* ATM07-01 demonstrated good inhibitory of spore germination on both of the tested pathogens. The crude ethyl acetate extract of *N. pseudofischeri* ATM17-03 showed the most effective to inhibit spore germination of *P. asparagi* ASPA03 and *C. gloeosporioides* ASCG06 which the ED₅₀ values of 11.67 and 95.09 ppm, respectively. In crude extracts of *Talaromyces* ATM07-01 test, it was found that crude methanol extract showed the highest inhibitory effect on spore germination of *P. asparagi* ASPA03. The remaining ethyl acetate crude extract showed also the highest degrees of inhibition of *C. gloeosporioides* ASCG06 spore germination. In crude ethyl acetate extract of *N. pseudofischeri* ATM17-03, the antagonist compound found Hecogenin. The ethyl acetate and methanol extract of *Talaromyces* ATM07-01, the identified compounds were Bis (2-ethylhexyl) phthalate and Phenol, bis(1,1-dimethylethyl).

Keywords: stem blight, anthracnose, *Phomopsis asparagi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Neosartorya* sp. and *Talaromyces* sp.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 ในโครงการต้นแบบการทำเกษตรอินทรีย์ KMITL และประสบความสำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากบุคคลดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.โองการ วณิชชีวะ ผู้ทรงคุณวุฒิจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สรัญญา พันธุ์ฤกษ์ กรรมการบัณฑิตประจำภาควิชาชีววิทยา ที่ช่วยให้คำแนะนำ แก้ไขปัญหาต่าง ๆ จนการทำเล่มวิทยานิพนธ์สำเร็จไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. เกษม สร้อยทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ รวมทั้งช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เกิดความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ขอขอบคุณ ดร. นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ ที่ให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางในการปฏิบัติงานในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ และ ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ที่สนับสนุนให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้ผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากนักน้อย หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ธนัชพร มังคลาด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 โรคในหน่อไม้ฝรั่ง	4
2.1.1 โรคลำต้นไหม้.....	4
2.1.2 โรคแอนแทรคโนส.....	5
2.1.3 โรคอื่น ๆ	6
2.2 เชื้อราสาเหตุโรค.....	8
2.2.1 เชื้อรา <i>Phomopsis asparagi</i>	8
2.2.2 เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	9
2.2.3 การบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรค.....	11
2.3 เชื้อราต่อต้าน	12
2.3.1 เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	12
2.3.2 การบ่งชี้เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	13
2.3.3 ประโยชน์ของเชื้อราต่อต้าน	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	16
3.1 การเก็บตัวอย่าง	16
3.1.1 ตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการโรคลำต้นไหม้และแอนแทรคโนส.....	16
3.1.2 ตัวอย่างดิน	16
3.2 สารเคมี	16
3.2.1 อาหารเพาะเลี้ยงและคัดแยกเชื้อรา.....	16
3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ	16
3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน	17
3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	17
3.2.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน	17
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	18
3.4 วิธีการทดลอง.....	19
3.4.1 การคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากหน่อไม้ฝรั่ง.....	19
3.4.2 การคัดแยกเชื้อราต่อต้านจากดิน.....	19
3.4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา.....	19
3.4.4 การศึกษาเชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์.....	20
3.4.5 การทดสอบความสามารถการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรค	22
3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อรา สาเหตุโรค.....	23
3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค.....	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	26
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรค	26
4.1.1 ผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้และแอนแทรคโนส.....	26
4.1.2 ผลการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและ ลำดับนิวคลีโอไทด์	27
4.2 ผลการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	31
4.2.1 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์.....	31
4.2.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	50
4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรค.....	52
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค ด้วยวิธี dual culture	53
4.5 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน	58
4.5.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>Neosartorya</i> <i>pseudofischeri</i> ATM17-03 ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค.....	59

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากเชื้อรา <i>Talaromyces</i> . ATM07-01 ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค	64
4.5.3 ผลการวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วยเทคนิค Gas Chromatography- Mass Spectrometry	69
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	74
5.1 สรุปผลการวิจัย	74
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	75
เอกสารอ้างอิง	76
ภาคผนวก	82
ประวัติผู้เขียน.....	86
ผลงานทางวิชาการ	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	17
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS.....	21
3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง β -tubulin	21
3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS และ <i>Calmodulin</i>	22
4.1 แสดงแหล่งที่มา รหัสตัวอย่างของหน่อไม้ฝรั่ง และรหัสของเชื้อราที่คัดแยกได้	26
4.2 ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Phomopsis asparagi</i>	28
4.3 ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	30
4.4 แสดงแหล่งที่มาของตัวอย่างดินสำหรับคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>	32
4.5 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และ ลักษณะโคโลนีของเชื้อราต่อต้าน.....	44
4.6 ตารางแสดงข้อมูลสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> จำนวน 25 ไอโซเลต.....	45
4.7 ผลการบ่งชี้เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง β -tubulin	49
4.8 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค..	57
4.9 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>Neosartorya pseudofischeri</i> ATM17-03 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>Phomopsis asparagi</i> ASPA03.....	61
4.10 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>Neosartorya pseudofischeri</i> ATM17-03 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ASCG06.....	63
4.11 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>Talaromyces</i> ATM07-01 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>Phomopsis asparagi</i> ASPA03	66
4.12 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>Talaromyces</i> ATM07-01 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ASCG06	68
4.13 สารสำคัญที่พบในสารสกัดหยาบจากตัวทำลายเหกเซน ตัวทำลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อรา <i>Neosartorya pseudofischeri</i> ATM17-03.....	71
4.14 สารสำคัญที่พบในสารสกัดหยาบจากตัวทำลายเหกเซน ตัวทำลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อรา <i>Talaromyces</i> ATM07-01.....	73

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 อาการของโรคลำต้นใหม่ (ก) อาการของโรคในระยะเริ่มต้น (ข) ผลขยายตามแนวลำต้น (ค) อาการระยะรุนแรง	5
2.2 อาการขอโรคแอนแทรคโนส (ก) อาการของโรคในระยะเริ่มต้น (ข) ผลมีการขยายตามแนวลำต้น และ กลุ่มสปอร์น้ำตาลเรียงซ้อนกันเป็นวง (ค) ระยะรุนแรงมีแผลเกิดทั่วลำต้น.....	6
2.3 อาการของโรคในหน่อไม้ฝรั่ง (ก) โรคใบเทียมร่วง (ข-ค) โรคเน่าเปียก (ง-จ) โรคราสนิม (ฉ-ช) โรคไหม้แห้งและเหี่ยวของต้นกล้า	7
2.4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Phomopsis asparagi</i> (ก) ลักษณะของโคโคนิบบนอาหารเพาะเลี้ยง PDA (ข) pycnidium (ค) conidiophores (ง) α -conidia (จ) β -conidia	9
2.5 แสดงรูปแบบของ α -conidia (ก) biguttulate (ข) multiguttulate (ค) eguttulate....	9
2.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (ก) ลักษณะของโคโคนิบบนอาหาร PDA (ข) spore mass (ค) conidiophore (ง-จ) conidia	10
2.7 แสดงวัฏจักรชีวิตของเชื้อราสกุล <i>Talaromyces</i>	12
2.8 ลักษณะของ ascospore (ก) มี ridge (ข) ไม่มี ridge.....	14
3.1 การทดสอบการก่อโรคบนต้นหน่อไม้ฝรั่ง (ก) การทำแผลบนลำต้นหน่อไม้ฝรั่ง (ข) การวางชิ้นวัุ้นที่มีเชื้อราสาเหตุโรคและชิ้นวัุ้นที่ปราศจากเชื้อสาเหตุโรคบนลำต้นหน่อไม้ฝรั่งสำหรับชุดควบคุม	23
3.2 การวางชิ้นวัุ้นเชื้อราบนจานอาหาร (ก) จานอาหารควบคุมของเชื้อราต่อต้าน (ข) จานอาหารเพาะเลี้ยงร่วม (ค) จานอาหารควบคุมของเชื้อราสาเหตุโรค	24
4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Phomopsis asparagi</i> ASPA03 (ก) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน (ข-ค) pycnidium (ง) conidiophore (จ-ฉ) α -conidia...	29
4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ASCG06 (ก) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน (ข-ค) spore mass (ง-ฉ) conidia	31
4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Neosartorya spinosa</i> ATM03-02 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ช) ลักษณะ ascospore (ฉ) conidiophore (ญ) conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	34

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Neosartorya pseudofischeri</i> ATM17-03 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ลักษณะ ascocarp (จ-ฉ) ascus (ช-ซ) ลักษณะ ascospore (ณ) conidiophore (ญ) conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	35
4.5 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces macrosporus</i> ATM07-07 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ซ-ณ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	37
4.6 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces muroii</i> ATM16-01 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ซ-ญ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	38
4.7 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces liani</i> ATM07-06 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ซ-ญ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	40
4.8 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces</i> ATM07-01 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ซ-ญ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	41
4.9 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces</i> ATM11-01 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ซ-ญ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง.....	43

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.10 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง β - <i>tubulin</i> ของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> จำนวน 10 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Likelihood	51
4.11 แสดงบาดแผลจากการทดสอบความสามารถการก่อโรคของเชื้อรา <i>Phomopsis asparagi</i> (ก) ชุดควบคุม (ข) ASPA03 (ค) ASPA08 และ (ง) ASPA10	50
4.12 แสดงบาดแผลจากการทดสอบความสามารถการก่อโรคของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (ก) ชุดควบคุม (ข) ASCG06 (ค) ASCG08 (ง) ASCG 03 (จ) ASCG01 (ฉ) ASCG04 และ (ช) ASCG05.....	53
4.13 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา <i>Phomopsis asparagi</i> ASPA03 ด้วย (ก) เชื้อรา <i>Talaromyces</i> ATM03-01 (ข) <i>Talaromyces</i> ATM07-01 (ค) <i>Neosartorya pseudofischeri</i> ATM17-03.....	55
4.14 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ASCG06 ด้วย (ก) เชื้อรา <i>Talaromyces</i> ATM07-08 (ข) <i>Neosartorya spinosa</i> ATM03-02 (ค) <i>Neosartorya pseudofischeri</i> ATM17-03	56
4.15 แสดงสีของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Neosartorya pseudofischeri</i> ATM17-03 ในตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และตัวทำละลายเมทานอล.....	58
4.16 แสดงสีของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Talaromyces</i> ATM07-01 ในตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และตัวทำละลายเมทานอล.....	58
4.17 แสดงการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค <i>Phomopsis asparagi</i> ASPA03 บนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Neosartorya pseudofischeri</i> ATM17-03	60
4.18 แสดงการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ASCG06 บนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา <i>Neosartorya pseudofischeri</i> ATM17-03.....	62
4.19 แสดงการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค <i>Phomopsis asparagi</i> ASPA03 บนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Talaromyces</i> ATM07-01	65
4.20 แสดงการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ASCG 06 บนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดจากเชื้อรา <i>Talaromyces</i> ATM07-01.....	67

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis* L.) จัดเป็นพืชผักอีกหนึ่งชนิดที่สำคัญในการส่งออก และสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรของประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยนั้นมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสามารถผลิตหน่อไม้ฝรั่งได้ตลอดทั้งปี อีกทั้งหน่อไม้ฝรั่งที่ผลิตได้ยังมีคุณภาพตรงตามความต้องการของตลาดต่างประเทศ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562) จึงนิยมปลูกมากในภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี เพชรบูรณ์ และราชบุรี แต่อย่างไรก็ตามพื้นที่ในการเพาะปลูกหน่อไม้ฝรั่งมีจำนวนลดลงจากเดิม เนื่องจากปัญหาการระบาดของโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ได้แก่ โรคลำต้นไหม้ (stem blight) โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) โรคใบเหี่ยวร่วง (cercospora blight) โรคราสนิม (asparagus rust) และโรครากเน่า (root rot) (Cheah และคณะ, 2006; Elena, 2007) โดยเฉพาะโรคลำต้นไหม้ และโรคแอนแทรคโนส ที่สร้างปัญหาให้กับเกษตรกรผู้ผลิตหน่อไม้ฝรั่งเป็นอย่างมาก โรคลำต้นไหม้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Phomopsis asparagi* (Cheah และคณะ, 2006; Elena, 2007; ทศนาพร และคณะ, 2553) มักระบาดอย่างรุนแรงในช่วงฤดูฝนจนถึงต้นฤดูหนาว เชื้อราสามารถแพร่กระจายได้ด้วยลม และน้ำ สปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนเหนือพื้นดินของต้นหน่อไม้ฝรั่ง โดยมีลักษณะอาการที่ชัดเจนในหน่อไม้ฝรั่งที่มีลำต้นขนาดใหญ่ หรือมีอายุตั้งแต่ 1 เดือนขึ้นไป จะปรากฏให้เห็นเป็นจุดดำเล็ก ๆ รูปกระสวย สีของลำต้นที่เกิดการติดเชื้อจะเข้มขึ้นจากเดิม ในระยะต่อมาแผลดังกล่าวจะพัฒนาขยายใหญ่มากขึ้นเป็นแผลรูปรีขยายยาวไปตามแนวลำต้น บริเวณกลางแผลมีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาล บริเวณขอบแผลมีสีน้ำตาลอมแดงถึงสีน้ำตาลเข้ม เมื่อมีการระบาดของโรคลำต้นไหม้ในแปลงเพาะปลูกโรคจะลุกลามอย่างรวดเร็ว ส่งผลต่อการแตกหน่อ และขนาดของหน่อไม้ฝรั่งที่ลดลง สุดท้ายต้นหน่อไม้ฝรั่งที่มีการติดเชื้อจะชะงักการเจริญเติบโต และแห้งตายในที่สุด (Cheah และคณะ, 2006; Elena, 2006; กรมวิชาการเกษตร, 2562) สำหรับโรคแอนแทรคโนส ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Cheah และคณะ, 2006; Elena, 2007; เยาวพา, 2554) ลักษณะอาการของโรคในช่วงแรกคล้ายคลึงกับโรคลำต้นไหม้ คือ จะเป็นแผลรูปรีขนาดเล็ก ๆ สีน้ำตาล บริเวณกลางแผลจะมีสีอ่อนกว่าบริเวณขอบแผล และยุบต่ำลงจากระดับเดิม อาการของโรคแอนแทรคโนสที่แตกต่างกับโรคลำต้นไหม้ คือ เมื่ออาการของแผลขยายใหญ่บริเวณกลางแผลจะพบจุดสีส้ม หรือสีน้ำตาลเรียงเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ (concentric ring) และอาจมีของเหลวสีส้ม (slime mass) อยู่ที่บริเวณแผลเช่นกัน ระยะสุดท้ายของต้นหน่อไม้ฝรั่งที่ติดเชื้อ ลำต้นจะสับแห้ง ใบเหลืองเหี่ยว และตายในที่สุด โรคแอนแทรคโนสมีการระบาดในช่วงเวลาเดียวกับโรคลำต้นไหม้ เมื่อโรคทั้งสอง เกิดการระบาดร่วมกันจะทำให้แปลงเพาะปลูกหน่อไม้ฝรั่งนั้นทรุดโทรมอย่างรวดเร็ว (Cheah และคณะ, 2006; Elena, 2006; บุญญวดี, 2557; กรมวิชาการเกษตร, 2562)

การควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค (pathogen) ในหน่อไม้ฝรั่ง ไม่ว่าจะเป็นโรคลำต้นไหม้ และโรคแอนแทรคโนส เกษตรกรจะใช้วิธีการฉีดพ่นสารเคมีในการควบคุม ป้องกัน และกำจัดโรค ได้แก่ สาร carbendazim และ สาร benzimidazole ที่นิยมใช้ในการกำจัดเชื้อรา (ทศนาพร และคณะ, 2552)

สารเคมีในกลุ่มของ benomyl เช่น benlate OD thiabendazole ใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรก โนส ส่วนโรคลำต้นไหม้จะฉีดพ่นสาร chlorothalonil และ difenoconazole (Davis, 2002; Beasley และคณะ, 2004) ซึ่งสารเคมีเหล่านี้ทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง มีระดับความรุนแรงตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงแก่ชีวิต ทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค รวมถึงปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะทางดิน และน้ำ ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศห่วงโซ่อาหาร (สุธาสินี, 2015) ดังนั้นการควบคุมโรคในหน่อไม้ฝรั่งด้วยชีววิธี (biocontrol) จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจ เป็นการลดผลเสีย และอันตรายจากการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค และลดผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งการควบคุมด้วยชีววิธี คือ การนำสิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์ โดยเรียกเชื้อจุลินทรีย์นี้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้านหรือเชื้อต่อต้าน (antagonist) มายับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรค โดยไม่สร้างความเสียหายหรือส่งผลเสียต่อพืช (เกษม, 2532)

การควบคุมโรคในหน่อไม้ฝรั่งด้วยชีววิธีจะอาศัยการเลียนแบบความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ นำสิ่งมีชีวิตหรือเชื้อต่อต้าน ที่เป็นศัตรูทางธรรมชาติมาควบคุม (ศิริพรรณ, 2017) ในการศึกษาควบคุมโรคในหน่อไม้ฝรั่งด้วยสารชีวภัณฑ์นั้นยังไม่สามารถควบคุมโรคจากเชื้อราที่เกิดขึ้นได้ และยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการคัดเลือกจุลินทรีย์ต่อต้านหรือเชื้อราต่อต้านมาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในหน่อไม้ฝรั่งค่อนข้างน้อย จากข้อมูลของ Nonaka และคณะ (2015) ที่รายงานการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Talaromyces siamensis* ร่วมกับเชื้อราสกุล *Phomopsis* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสกุล *Phomopsis* ได้ เช่นเดียวกับสารสกัดยับยั้งจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* มีรายงานประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสในกาแฟที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *C. coffeanum* (เมอมร, 2558) สารสกัดยับยั้งของ *T. flavus* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในพืชได้หลายสปีชีส์ได้ดี ได้แก่ เชื้อรา *Alternaria* sp., *C. capsica*, *C. gloeosporioides*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora palmivora*, *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium* sp., *Rhizoctonia solani* และ *fusarium oxysporum* และสารสกัดยับยั้งที่ได้จากเชื้อรา *T. trachyspermus* สามารถควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*, *S. rolfsii*, *C. gloeosporioides* และ *Lasiodiplodia theobromae* (อารมณ และคณะ, 2559) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชอื่น ๆ เช่น การควบคุมโรครากและโคนเน่าในทุเรียนที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *P. palmivora* (สุภานัน, 2560) เชื้อรา *S. rolfsii* และ *Verticillium dahliae* สาเหตุโรคลำต้นเน่าในถั่ว และโรคเหี่ยวในมะเขือเทศได้ดี (Dethoup, 2017)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 คัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้และแอนแทรกโนสในหน่อไม้ฝรั่ง ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์

1.2.2 คัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์

1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อรา *Phomopsis asparagi* และ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่คัดแยกจากต้นหน่อไม้ฝรั่ง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides* โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างจากพื้นที่เพาะปลูกหน่อไม้ฝรั่งที่มีการระบาดของโรค ในเขตพื้นที่ของจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี และนนทบุรี ด้วยวิธี tissue transplanting และบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยศึกษาที่ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) และทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคบนต้นหน่อไม้ฝรั่ง แล้วเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการก่อโรคบนต้นหน่อไม้ฝรั่งที่รุนแรงมากที่สุดในแต่ละสปีชีส์ เพื่อใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยวิธี dual culture และใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดยับยั้งจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยวิธี poison food

การคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากดินในป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ในเขตพื้นที่ของจังหวัดนครนายก ปราจีนบุรี ระยอง และจันทบุรี ด้วยวิธี heat treatment บ่งชี้เชื้อราต่อต้านด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยศึกษาที่ตำแหน่ง ITS, β -tubulin และ Calmodulin จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture แล้วคัดเลือกเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมที่ดี และครอบคลุมการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สปีชีส์ แล้วนำไอโซเลตนั้นไปสกัดสารเป็นสารสกัดยับยั้งใช้ในการทดสอบในวิธี poison food

1.4 ประโยชน์คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อให้ทราบถึงปัญหาและสาเหตุของการเกิดโรคลำต้นไหม้และโรคแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่งที่จะส่งผลต่อการควบคุมโรคในอนาคต

1.4.2 สามารถหาแนวทางในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้และโรคแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่ง

1.4.3 เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพในการควบคุมโรคลำต้นไหม้และโรคแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่งโดยเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หน่อไม้ฝรั่งจัดเป็นพืชผักอีกหนึ่งชนิดที่มีสำคัญในการส่งออกของประเทศไทย ถึงแม้ว่าค่าตอบแทนที่ได้จากการผลิตจะสูงแต่อุปสรรคในการเพาะปลูก และการผลิตหน่อไม้ฝรั่ง คือ การถูกรุกรานจากโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคลำต้นไหม้ (stem blight) และโรคแอนแทรกโนส (anthracnose) ทำให้พื้นที่ในการเพาะปลูกหน่อไม้ฝรั่งลดถึงร้อยละ 50 เพราะเกษตรกรหันไปเพาะปลูกพืชอื่นแทน และปัจจุบันก็ยังไม่มีการวิจัยที่มีประสิทธิภาพสามารถควบคุมโรคดังกล่าวที่เกิดขึ้นได้ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2561; ปदारณี, 2561)

2.1 โรคในหน่อไม้ฝรั่ง

2.1.1 โรคลำต้นไหม้ (Stem blight)

โรคลำต้นไหม้ หรือ โรคไหม้แห้ง มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phomopsis asparagi* (Davis, 2001; Cheah และคณะ, 2006; Elena, 2007; Yang, 2014; ทศนาพร และคณะ, 2552; ปदारณี, 2561) เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) (Punithalingam, 1990) มักสร้างความเสียหายแก่แปลงเพาะปลูกในช่วงฤดูฝนถึงฤดูหนาวที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น โดยจะเข้าทำลายได้ทุกส่วนของลำต้นที่อยู่เหนือพื้นดิน ลักษณะอาการจะปรากฏชัดเจนเมื่อลำต้นมีขนาดใหญ่ หรือมีอายุตั้งแต่ 1 เดือนขึ้นไป อาการของโรคจะรุนแรงมากที่สุดคือบริเวณโคนต้นเพราะเป็นบริเวณที่อยู่ใกล้ผิวดิน ซึ่งสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคนี้อาศัยอยู่ในดิน และซากเศษพืชได้มานานอย่างน้อย 6 เดือน และสามารถอยู่ข้ามฤดูได้บนเศษซากพืช (Cheah และคณะ, 2006; กรมวิชาการเกษตร, 2559) ในช่วงแรกพื้นผิวของลำต้นจะปรากฏให้เห็นเป็นจุดช้ำขนาดเล็กรูปกระสวย (รูปที่ 2.1ก) และมีสีที่เข้มขึ้นแตกต่างไปจากพื้นผิวเดิม ต่อมาแผลจะพัฒนาขยายใหญ่มากขึ้น เป็นรูปรียาวขยายไปตามลำต้น บริเวณตรงกลางแผลมีสีน้ำตาล ส่วนขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีน้ำตาลแดง (รูปที่ 2.1ข) เมื่อแผลมีความรุนแรง และขยายใหญ่ไปทั่วพื้นผิวของต้นหน่อไม้ฝรั่ง บริเวณกลางของแผลจะพบจุดสีดำ ที่เรียกว่า พิคนินเดียม (pycnidium) จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วแผล (รูปที่ 2.1ค) ต้นแม่หน่อไม้ฝรั่งจะเหลืองซีด ใบเหลืองและร่วง หรือลำต้นอาจหักพับลง และแห้งตายไปในที่สุด ปัญหาดังกล่าวจะมีผลทำให้ผลผลิตและคุณภาพของหน่อลดลง (Punithalingam, 1990; Davis, 2001; Cheah และคณะ, 2006; Elena, 2007; กรรณิการ์, 2533; กรมส่งเสริมการเกษตร, 2560)



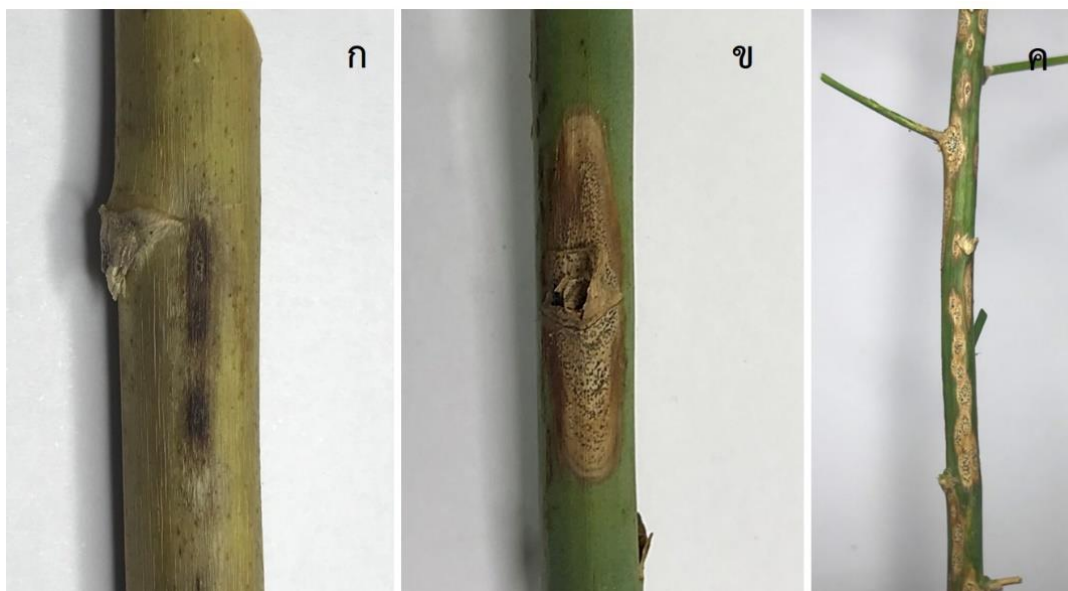
รูปที่ 2.1 อาการของโรคลำต้นไหม้ (ก) อาการของโรคในระยะเริ่มต้น (ข) แผลขยายตามแนวลำต้น (ค) อาการระยะรุนแรง

(ภาพถ่ายโดย ธนัชพร มังคลาด, 2561)

2.1.2 โรคแอนแทรคโนส

โรคแอนแทรคโนส หรือที่เกษตรกรเรียกว่าโรคตาเสือ มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Davis, 2001; Cheah และคณะ, 2006; Elena, 2007; Weir และคณะ, 2012; อัมพร และคณะ, 2558) จัดว่าเป็นอีกโรคหนึ่งที่ระบาดรุนแรง และสร้างความเสียหายแก่หน่อไม้ฝรั่งเป็นอย่างมาก โดยโรคนี้มักจะเกิดกับต้นแม่หน่อไม้ฝรั่งที่แก่ และระบาดในแปลงที่มีการปลูกหน่อไม้ฝรั่งติดต่อกันหลายปี มักระบาดในช่วงเวลาเดียวกันกับโรคลำต้นไหม้ คือ ช่วงฤดูฝนที่มีความชื้นสูง หรือกรณีที่มีหมอกลงจัดเชื้อราจะแพร่ระบาดได้ดี และมีลักษณะของอาการที่คล้ายคลึงกันอีกด้วย เชื้อรานี้สามารถดำรงชีวิตโดยอาศัยอยู่กับเศษซากพืชที่ตายแล้วได้ (สมชาย, 2544; กรมวิชาการเกษตร, 2560) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม สปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคได้สัมผัสกับผิวเนื้อเยื่อพืช และสร้าง appressorium หลังจากนั้นจะสร้างเข็มแทง (penetration peg) เข้าไปในเนื้อเยื่อพืช และสร้างเส้นใยเจริญลงไปในชั้นเนื้อเยื่อพืช อาการของโรคแอนแทรคโนสในระยะแรกนั้นบาดแผลของโรคจะมีขนาดเล็ก รูปรี ฉ่ำน้ำ บริเวณกลางแผลจะยุบต่ำลง และมีสีอ่อนมากกว่าบริเวณขอบแผล (รูปที่ 2.2ก) เมื่อแผลขยายขนาดใหญ่ขึ้นบริเวณกลางแผลจะพบจุดสีส้ม หรือสีน้ำตาลเรียงเป็นวงซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น เรียกวงลักษณะนี้ว่า concentric ring (รูปที่ 2.2ข) หรือพบของเหลวข้นสีส้มอยู่บริเวณกลางแผลเช่นกัน ระยะสุดท้ายของต้นหน่อไม้ฝรั่งที่ติดเชื้อจะมีอาการเหี่ยวเฉาเป็นสีเหลือง ใบเหี่ยว ให้ผลผลิตลดลง ลำต้นหยุดการเจริญ และตายไปในที่สุด (รูปที่ 2.2ค)

(Cheah และคณะ, 2003; สมชาย, 2544; กรมวิชาการเกษตร, 2019) นอกจากนี้เชื้อรา *C. gloeosporioides* ยังเป็นเชื้อราสาเหตุของพืชอีกหลายชนิด ได้แก่ สาเหตุโรคแอนแทรกโนสใน มะม่วง ฝรั่ง หอมใหญ่ หอมแดง พริกไทย พริก กล้วยไม้ และกุหลาบ เป็นต้น (Cheah และคณะ, 2006; Weir และคณะ, 2012; Lopez, และคณะ, 2015; บุญญวดี และคณะ, 2553; เยาวพา, 2554)



รูปที่ 2.2 อาการขอโรคแอนแทรกโนส (ก) อาการของโรคในระยะเริ่มต้น (ข) ผลมีการขยายตามแนว ลำต้น และกลุ่มสปอร์สีน้ำตาลเรียงซ้อนกันเป็นวง (ค) ระยะรุนแรงมีแผลเกิดทั่วลำต้น (ภาพถ่ายโดย ธนัชพร มังคลาด, 2560)

2.1.3 โรคอื่น ๆ ที่พบในหน่อไม้ฝรั่ง

นอกจากโรคลำต้นไหม้และโรคแอนแทรกโนสที่สร้างความเสียหายแก่การเพาะปลูก และการผลิตหน่อไม้ฝรั่ง ยังมีการระบาดของโรคอื่นถึงแม้จะไม่รุนแรงเทียบเท่าโรคทั้ง 2 ได้แก่ โรคใบ เทียมร่วง (*cercospora blight*) ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Cercospora asparagi* เป็นโรคที่สามารถเข้า ทำลายต้นหน่อไม้ฝรั่งได้ทุกระยะ เมื่อพืชมีอาการของโรคจะสร้างความเสียหายแก่กิ่งแขนง และใบ เทียมของหน่อไม้ฝรั่งจะแห้งเหลือง และร่วงลงในที่สุด ถ้าหากเกิดกับต้นหน่อไม้ฝรั่งที่อายุน้อย หรือยัง เป็นต้นกล้า จะทำให้ต้นตายได้ ลักษณะของอาการบริเวณก้าน กิ่งแขนงจะเกิดแผลลักษณะกลม สี ม่วงอมน้ำตาลจนถึงสีม่วงแดง บริเวณกลางผลมีสีขาวถึงสีเทา (รูปที่ 2.3ก) (กรมวิชาการเกษตร, 2019) โรคเน่าเปียก (wat rot) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Choanephora cucurbitarum* ซึ่งสามารถก่อ โรคในผลอ่อนของพืชตระกูลแตงได้อีกด้วย โดยอาการของโรคที่พบในหน่อไม้ฝรั่งคือ จะเกิดที่บริเวณ ปลายหน่อของหน่อไม้ฝรั่ง ทำให้บริเวณปลายหน่อเน่า ฉ่ำน้ำ และอาการจะลุกลามอย่างรวดเร็ว หน่อที่มีการติดเชื้อจะยุบ และตายไป โรคนี้ระบาดในช่วงที่มีฝนตกชุก และจะระบาดน้อย หรือไม่พบ เลยในสภาพอากาศแห้งแล้ง (รูปที่ 2.3ข-ค) (กรมวิชาการเกษตร, 2560) โรคราสนิม (*asparagus rust*) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Puccinia asparagi* อาการของโรคจะปรากฏบริเวณก้าน และกิ่งแขนงของ

ต้นหน่อไม้ฝรั่ง มักไม่พบอาการบนหน่ออ่อนของหน่อไม้ฝรั่ง ลักษณะเป็นตุ่มนูนยาวขนาดเล็ก สีน้ำตาล หรือสีแดง เมื่ออาการรุนแรงขึ้นจะกลายเป็นแผลสีน้ำตาล กระจายทั่วผิวของลำต้น กิ่ง หรือ ลำต้นที่แสดงอาการจะแห้ง และแก่เร็วกว่ากำหนด โรคนี้จะระบาดไม่นานเนื่องจากสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคค่อนข้างอายุสั้นไม่สามารถอยู่ข้ามฤดูได้ และจะแพร่กระจายได้ก็ต่อเมื่อสปอร์ตกลงพืชหรือ ในที่ที่มีความชื้น เกษตรกรมักจะทำลายต้นพืช และดูแลแปลงเพาะปลูกอย่างสม่ำเสมอเพื่อเป็นการ ตัดวงจรของการเกิดโรค (รูปที่ 2.3ง-จ) (สมชาย, 2544; Elena, 2007) โรคไหม้แห้งและเหี่ยวของต้น กล้า (seedling blight และ wilt) มีสาเหตุจากเชื้อราสกุล *Fusarium* หลายสปีชีส์ ที่ก่อให้เกิดอาการ และลักษณะเดียวกัน เช่น *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* f.sp. *asparagi* และ *F. moniliforme* อาการของโรคคือ ระบบรากของต้นหน่อไม้ฝรั่งจะถูกทำลาย หากขุดรากของต้นที่ แสดงอาการ และส่วนของโคนต้นใต้ดินขึ้นมาดูจะพบว่ามีสีดำคล้ำจนถึงสีน้ำตาลแดง เมื่อรากถูก ทำลายจึงส่งผลให้ต้นหน่อไม้ฝรั่งขาดน้ำ และสารอาหาร ลำต้นจะเหี่ยวเฉา หรือมีอาการแห้งไหม้ เกิดขึ้น หากโรคนี้ออกขึ้นกับต้นหน่อไม้ฝรั่งที่ยังเป็นต้นอ่อน หรือต้นกล้าจะทำให้ต้นหยุดการเจริญไม่ สามารถฟื้นกลับมาได้ (รูปที่ 2.3ฉ-ช) (สมชาย, 2544; Elena, 2007)



รูปที่ 2.3 อาการของโรคในหน่อไม้ฝรั่ง (ก) โรคใบเหี่ยวมร่วง (ข-ค) โรคเน่าเปื่อย (ง-จ) โรคราสนิม (ฉ-ช) โรคไหม้แห้งและเหี่ยวของต้นกล้า

(ที่มา: Cheah และคณะ, 2006; Elena, 2007)

2.2 เชื้อราสาเหตุโรค

2.2.1 เชื้อรา *Phomopsis asparagi*

ข้อมูลอนุกรมวิธานของเชื้อรา *P. asparagi* (Sacc.) (Grove, 1935)

Class Sordariomycetes

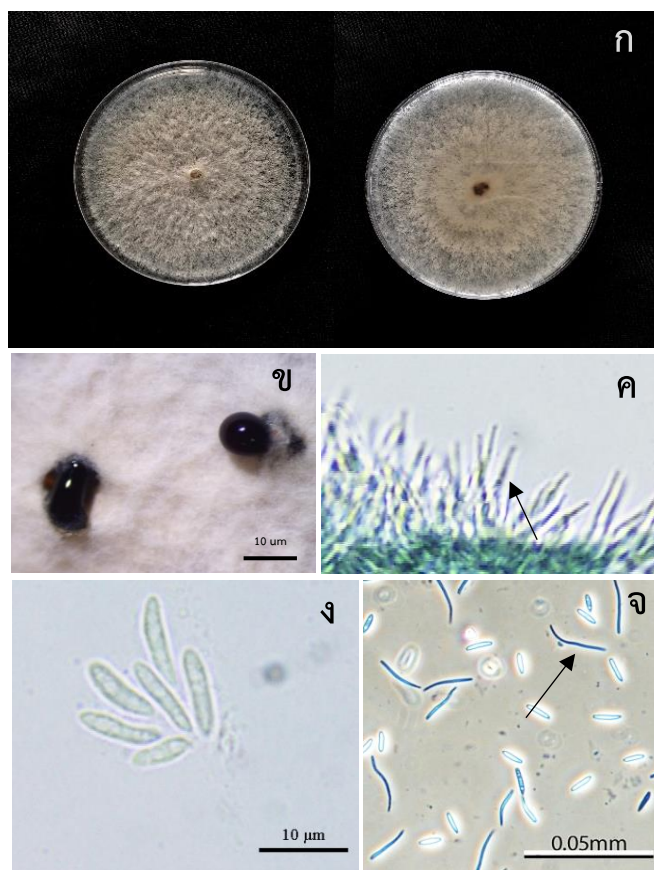
Family Diaporthaceae

Genus *Phomopsis*

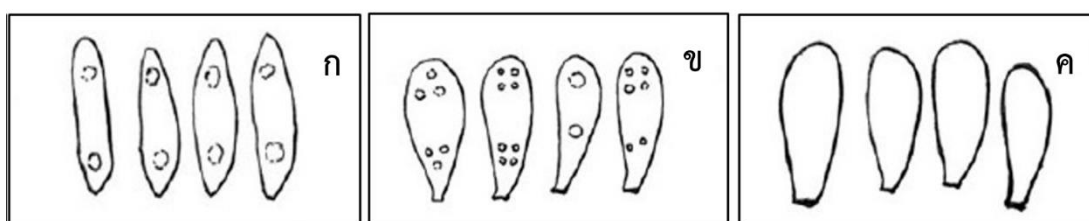
Species *P. asparagi*

เชื้อราสกุล *Phomopsis* เป็นเชื้อราในกลุ่มใหญ่กลุ่มหนึ่งที่มีชื่อสปีชีส์ (species name) มากกว่า 1,000 สายพันธุ์ ดำรงอยู่ได้โดยการอาศัยอยู่ในพืช (host) เป็นกลุ่มเชื้อราที่มีระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphs) (Uecker, 1988) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *P. asparagi* มีลักษณะของโคโลนีบนอาหารเพาะ PDA คือ มีการสร้างเส้นใยสีขาวจนถึงเทา เส้นใยค่อนข้างเรียบ (Flat) ไปกับผิวของอาหาร (รูปที่ 2.4ก) เชื้อราจะมีการสร้างส่วนขยายพันธุ์สำหรับห่อหุ้มสปอร์ เรียกว่า pycnidium ที่มีสีน้ำตาลจนถึงสีดำ ทรงกลม (รูปที่ 2.4ข) (Uecker และ Johnson, 1991; Dinh และคณะ, 2018) ภายใน pycnidium จะมีการสร้าง conidiophores ที่สามารถแตกแขนงได้ มีผนังกัน (รูปที่ 2.4ค) และบรรจุ conidia ไว้จำนวนมาก โดยมี conidia อยู่ 2 รูปแบบ คือ α -conidia ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สีไม่มีสี (hyaline) รูปไข่ (oblong) หรือทรงกระสวย (fusiform) (รูปที่ 2.4ง) ขนาด 2.9–3.5x8.7–9.9 ไมโครเมตร (Dinh และคณะ, 2018; Udayanga และคณะ, 2011) โดยสามารถจำแนกรูปแบบของ α -conidia ออกเป็น 3 แบบ คือ Biguttulate (รูปที่ 2.5ก) Multiguttulate (รูปที่ 2.5ข) Eguttulate (รูปที่ 2.5ง) (Udayanga และคณะ, 2012) และ β -conidia มีลักษณะสีไม่มีสี เซลล์เดี่ยว รูปร่างเป็นเส้นยาว ส่วนปลายโค้งงอ คล้ายตะขอ (filiform) ขนาด 1.5–1.9x16.9–23.9 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.4จ) (Shishido และคณะ, 2013)

การแพร่กระจายของ conidia เกิดได้ง่ายโดย ลม ฝน และการปนเปื้อนจากมนุษย์ conidia มีความทนทานสูงสามารถอาศัยอยู่ในดินและซากเศษพืชได้นานอย่างน้อย 6 เดือน (Cheah และคณะ, 2006; กรมวิชาการเกษตร, 2019) เมื่อ pycnidium สัมผัสกับความชื้น conidia จะถูกปลดปล่อย หรือแพร่กระจายออกมา จากการศึกษากลไกการเกิดโรคของเชื้อรา *P. asparagi* บนผิวต้นหน่อไม้ฝรั่ง พบว่าในช่วง 0-24 ชั่วโมง conidia จะสร้างท่ออก (germ tube) ออกมา โดยมีหน้าที่ยึดเกาะและทำลายพื้นผิวของพืช ช่วงเวลา 24-48 ชั่วโมง จะมีการงอกของเส้นใยรา หลังจากนั้น ภายใน 4 วัน เส้นใยจะเจริญอย่างต่อเนื่อง และบุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืช วันที่ 8-12 จะมีการสร้าง pycnidium ขึ้น (Yang และคณะ, 2014)



รูปที่ 2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Phomopsis asparagi* (ก) ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเพาะ PDA (ข) pycnidium (ค) conidiophores (ง) α -conidia (จ) β -conidia (ที่มา: ดัดแปลงจาก Shishido และคณะ, 2013)



รูปที่ 2.5 แสดงรูปแบบของ α -conidia (ก) แบบ biguttulate (ข) multiguttulate (ค) eguttulate (ที่มา: ดัดแปลงจาก Udayanga และคณะ, 2012)

2.2.2 เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ข้อมูลอนุกรมวิธานของเชื้อ *C. gloeosporioides* (Corda, 1831)

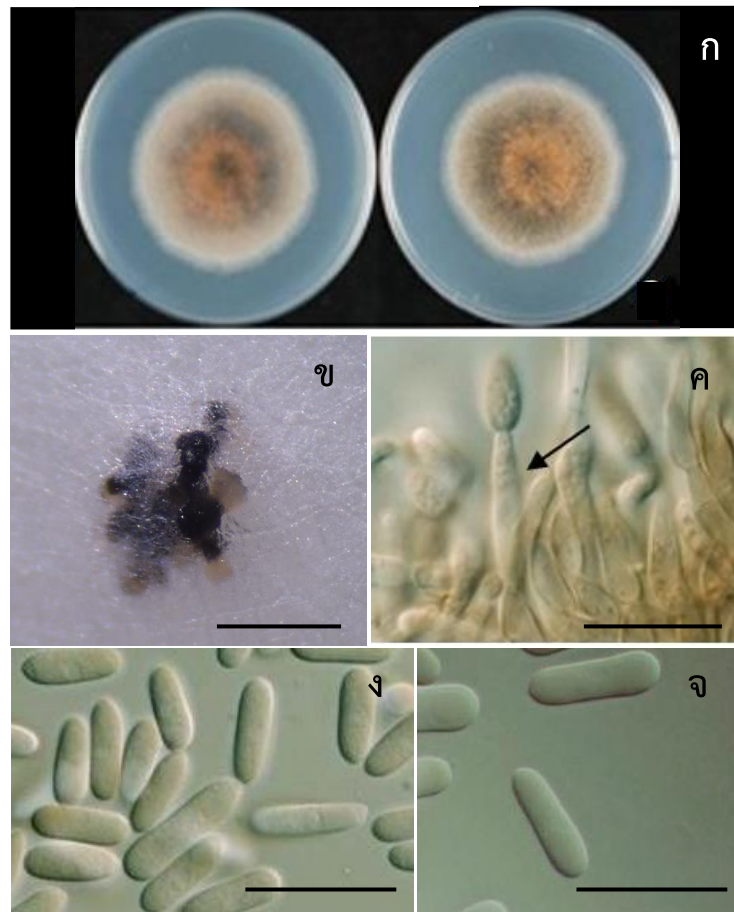
Class Sordariomycetes

Family Glomerellaceae

Genus *Colletotrichum*

Species *C. gloeosporioides*

เชื้อรา *C. gloeosporioides* เป็นเชื้อราที่มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยอาศัยเพศ มีการรายงานไว้ว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* มีเชื้อราที่ใกล้เคียงกัน (synonym) อยู่ถึง 600 สปีชีส์ (Bailey และคณะ, 1992; Weir และคณะ, 2012) ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA โคโลนีมีขอบเรียบ มีการเจริญเป็นวงแหวนซ้อนกัน (concentric ring) ลักษณะเส้นใยมีผนังกัน สีขาวจนถึงเทา และฟูเล็กน้อย (รูปที่ 2.6ก) เชื้อราจะมีการสร้างส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า fruiting body แบบ acervulus รูปถ้วย ซึ่งภายในของ acervulus จะมี conidiophores ที่บริเวณส่วนปลายของ conidiophores จะเป็นจุดกำเนิด conidia การสร้างกลุ่มของสปอร์ (spore mass) จะมีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีส้ม (slime mass) อยู่บนเส้นใยรา (รูปที่ 2.6ข) ลักษณะของ conidiophores ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ก้านตรงไม่แตกกิ่ง ใสไม่มีสี (hyaline) (รูปที่ 2.6ค) และ conidia ที่มีลักษณะเป็นรูปไข่ (ovoid) ถึงทรงกระบอกที่ส่วนหัวและท้ายมน (oblong) มีขนาด 3.5-6 x 12-17 ไมโครเมตร (Lopez และคณะ, 2015) ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีผนังกัน ใสไม่มีสี (รูปที่ 2.6ง-จ) (บุญญาวดี และคณะ, 2553; เยาวพา, 2554; Elena, 2007)



รูปที่ 2.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ก) ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA (ข) spore mass (ค) conidiophore (ง-จ) conidia (ที่มา: ดัดแปลงจาก Weir และคณะ, 2012)

การแพร่กระจายของ conidia สามารถเกิดได้ง่ายโดยอาศัยน้ำ ลม แมลง และสิ่ง que เข้าไปสัมผัสกับ conidia หลังจากที่เชื้อราสร้าง conidia จำนวนมากไว้ภายใน acervulus เมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่ conidia จะถูกดันหรือถูกปลดปล่อยออกมาสู่ภายนอก จากการศึกษาการเกิดโรค พบว่าเมื่อ conidia ตกสู่ผิวพืชจะมีการสร้างท่ออก และ appressoria ออกมา โดยมีลักษณะเป็นรูปไข่หรือรูปปรียาว หรือรูปทรงกระบอก สำหรับยึดเกาะและเจาะพื้นผิวพืช (บุญญาวดี, 2014) หลังการปลูกถ่ายเชื้อแล้ว 6 ชั่วโมง จากนั้นเส้นใยราจะเจริญสู่เนื้อเยื่อพืช และปรากฏแผลบนพื้นผิวพืชใน ชั่วโมงที่ 96 หลังการปลูกถ่ายเชื้อ (รัตติรส และคณะ, 2559)

2.2.3 การบ่งชี้เชื้อสาเหตุโรค

การบ่งชี้เชื้อรา *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides* จะบ่งชี้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราและลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย Rehner และ Uecker (1991) ได้ศึกษาเชื้อราสกุล *Phomopsis* จำนวน 18 ไอโซเลต ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของพืชหลายชนิด การบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) คู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 พบว่าชนิดของพืชกับสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคมีความสัมพันธ์กันเพียงเล็กน้อย Shishido และคณะ (2005) บ่งชี้เชื้อราสกุล *Phomopsis* ที่เป็นเชื้อราสาเหตุโรคในพืชตระกูลแตงในประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ตำแหน่ง ITS คู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 ในการบ่งชี้เชื้อรา สามารถระบุได้ว่าเชื้อรา *P. sclertioides* เป็นเชื้อราสาเหตุของโรค เช่นเดียวกับกับ Kacergius และ Jovaisiene (2010) ศึกษาเชื้อราสกุล *Diaporthe* ที่เป็นระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Phomopsis* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคในบลูเบอร์รี่ ได้บ่งชี้เชื้อราที่ตำแหน่ง ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 สามารถระบุสปีชีส์เป็นเชื้อ *P. vacciniae* ขณะที่ Udayanga และคณะ (2012) ได้ประเมินวิวัฒนาการ (phylogenetic evaluation) ของเชื้อราสกุล *Diaporthe* และ *Phomopsis* ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ตำแหน่ง translation elongation factor 1-alpha (EF1-alpha) ด้วยคู่ไพรเมอร์ EF1-728F และ EF1-986R ตำแหน่ง *Calmodulin* คู่ไพรเมอร์ CAL228F และ CAL737R และตำแหน่ง β -*tubulin* ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b ได้รายงานว่ ตำแหน่ง ITS สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Phomopsis* ได้ แต่ถ้าให้จะมีประสิทธิภาพมากขึ้นควรวิเคราะห์ตำแหน่ง EF1-alpha ร่วมด้วย และ Dinh และคณะ (2018) ได้ศึกษาเชื้อราสกุล *Diaporthe* ที่ก่อโรคในหน่อไม้ฝรั่งสายพันธุ์ *Asparagus kiusianus* จำนวน 14 ไอโซเลต พบว่าเมื่อบ่งชี้เชื้อราที่ตำแหน่ง ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 สามารถระบุสปีชีส์เชื้อ *P. asparagi* จำนวน 8 ไอโซเลต และ เชื้อราอีก 6 ไอโซเลต ถูกบ่งชี้ที่ตำแหน่ง β -*tubulin* และ EF1-alpha เพิ่มเติม จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นเชื้อ *D. unshiuensis*

เช่นเดียวกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่บ่งชี้สายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จากการทำงานของ Weir และคณะ (2012) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในตำแหน่ง *Actin* ด้วยคู่ไพรเมอร์ ACT-512F และ ACT-783R ตำแหน่ง *Calmodulin* ไพรเมอร์ CL1, CL2A, CL1C และ CL2C ตำแหน่ง ITS คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ตำแหน่ง β -*tubulin* ไพรเมอร์ T1, T2 และ Bt2b ตำแหน่ง glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ด้วยคู่ไพรเมอร์ GDF และ GDR และ ตำแหน่ง

glutamine synthetase ไพรเมอร์ GSF1, GSF3, GSR1, และ GSR2 รายงานว่าในการบ่งชี้เชื้อราสกุล *C. gloeosporioides* ที่ตำแหน่ง ITS สามารถบ่งชี้สปีชีส์ของเชื้อได้และจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นหากทำการบ่งชี้ในตำแหน่งอื่นร่วมด้วยในกรณีที่ทำกรบ่งชี้เชื้อราในระดับสปีชีส์ย่อย (subspecies) (Lopez และคณะ, 2015)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดแยกและบ่งชี้เชื้อรา *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้น โดยสังเกตจากลักษณะโคโลนี เส้นใย รูปร่าง และ ขนาดของ conidia และยืนยันสายพันธุ์ด้วยการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS

2.3 เชื้อราต่อต้าน

2.3.1 เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

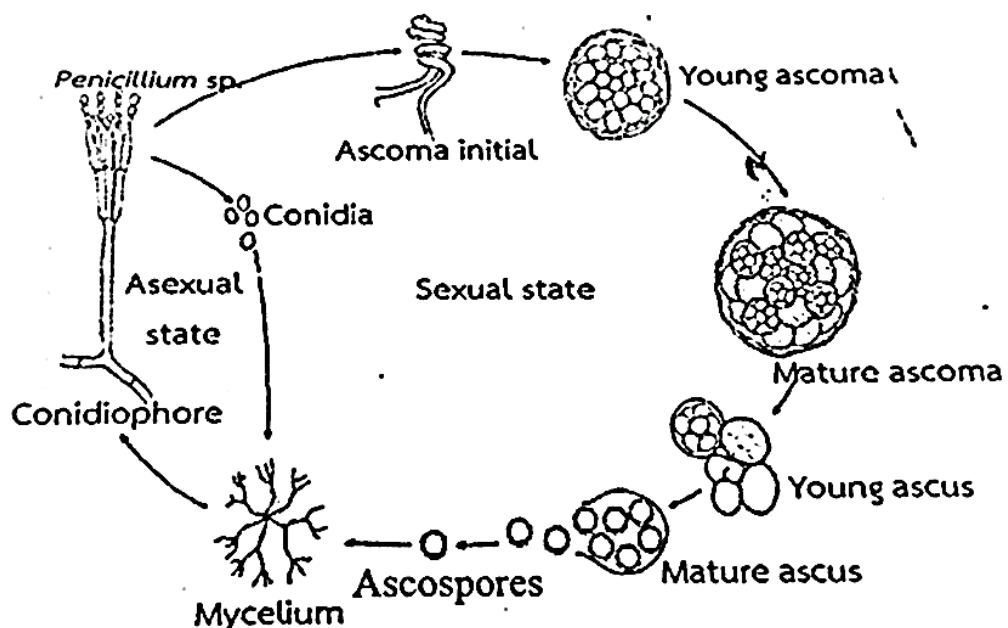
เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ถูกจัดลำดับอนุกรมวิธานตาม Samson และคณะ (2007)

Class Ascomycetes

Order Eurotiales

Genus *Neosartorya* และ *Talaromyces*

เป็นเชื้อราที่ดำรงชีวิตอยู่บนซากพืชและสิ่งมีชีวิตในดิน มักพบในพื้นดินในป่าที่อุดมสมบูรณ์ ดินเกษตรกรรม และดินป่าชายเลน (ธิดา และคณะ, 2550) มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่มีการสร้าง ascocarp ที่บรรจุ ascus มีลักษณะเป็นถุงหุ้ม ภายในบรรจุ ascospore จึงทำให้เชื้อราสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ (Kikoku และคณะ, 2009) ในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเชื้อราจะสร้าง conidiophore และ conidia หรือ asexual spore (เมอมร, 2558; สุภานัน, 2560) โดยแสดงวัฏจักรชีวิตของเชื้อราสกุล *Talaromyces* ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงวัฏจักรชีวิตของเชื้อราสกุล *Talaromyces*

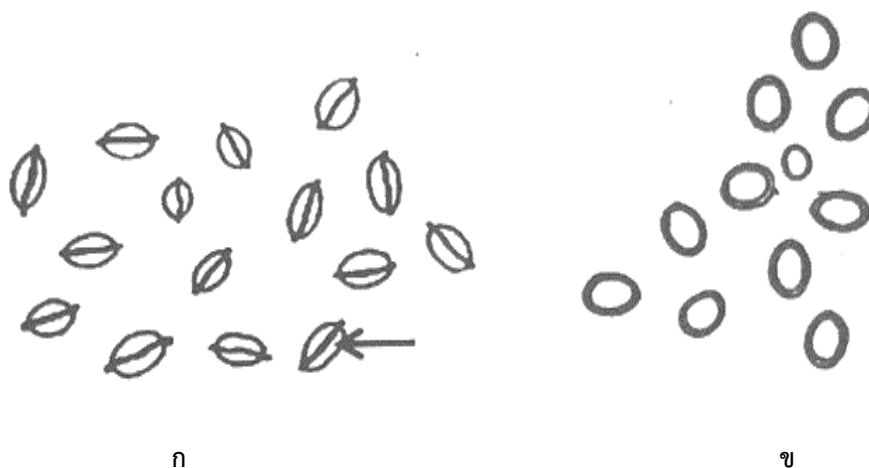
(ที่มา: Wyatt และคณะ, 2013)

2.3.2 การบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

การบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* สามารถแยกออกจากกันได้โดยสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือ เชื้อราสกุล *Neosartorya* จะมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว สีเทา จนถึงสีครีม และลักษณะของ ascospore จะพบเป็นสันนูน (ridge) ที่มีลักษณะคล้ายวงแหวนล้อมรอบ (รูปที่ 2.8ก) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อราสกุล *Neosartorya* (Samson และคณะ, 2007; สุภานัน, 2560) ส่วนเชื้อราสกุล *Talaromyces* จะมีลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลือง เขียว แดง และชมพู และ ascospore จะไม่พบ ridge (รูปที่ 2.8ข) (Yilmaz และคณะ, 2014 ; สุภานัน, 2560) อย่างไรก็ตามการบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราทั้งสองสกุล ยังเป็นเรื่องยากที่สามารถบ่งชี้ถึงสปีชีส์ เนื่องจากเชื้อราทั้งสองสกุลจัดอยู่ในวงศ์ที่มีสปีชีส์ภายในสกุลเดียวกันจำนวนมาก และมีลักษณะของ ascocarp, ascus และ ascospore ที่คล้ายคลึงกัน เช่น เชื้อรา *N. hiratsukae*, *N. pseudofischeri* มีขนาดของ ascospore ระหว่าง 4.5-5.0 ไมโครเมตร (Samson และคณะ, 2007) และเชื้อรา *T. muroii* และ *T. pseudofischeri* มีขนาดของ ascospore ระหว่าง 4.0-5.5×3.0-3.5 และ 3.0-4.0×3.5-6.0 ไมโครเมตร (Yilmaz และคณะ, 2014) ดังนั้นการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จึงเป็นวิธีที่จะสามารถจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราออกจากกันได้

การบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* มีหลายตำแหน่งที่ใช้ในการบ่งชี้ เช่น ตำแหน่ง ITS ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ตำแหน่ง β -tubulin ใช้คู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b และ ตำแหน่ง Calmodulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ CF1L กับ CF4 และ CF1M กับ CF4 (เมอมร, 2558) และงานวิจัยของ Samson และคณะ (2007) ที่ทำการบ่งชี้ในตำแหน่ง ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และตำแหน่ง β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b พบว่าทั้งสองตำแหน่งสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราได้ นอกจากนี้ยังมีตำแหน่ง RNA polymerase I (RPB1) ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ RPB1 และ RPB2 ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ (Manoch และคณะ, 2013)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตจากลักษณะของโคโลนี รูปร่าง ขนาดของ ascospore และบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง β -tubulin



รูปที่ 2.8 ลักษณะของ ascospore (ก) มี ridge (ข) ไม่มี ridge
(ที่มา: (Yilmaz และคณะ, 2014))

2.3.3 ประโยชน์ของเชื้อราต่อต้าน

ในการป้องกันและการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค (Pathogen) ในหน่อไม้ฝรั่ง เกษตรกรนิยมฉีดพ่นสารเคมีในการควบคุมป้องกันและกำจัดโรค ได้แก่ สาร carbendazim, azoxystrobin และสารเคมีในกลุ่ม benzimidazoles (ทัศนพร และคณะ, 2552; สมชาย, 2554) ทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพแบบเฉียบพลัน และเรื้อรัง ที่มีระดับความรุนแรงตั้งแต่เล็กน้อยจนถึงแก่ชีวิต ทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค การปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะทางดิน และทางน้ำ รวมถึงส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศห่วงโซ่อาหาร (สุธาสินี, 2015) ซึ่งแตกต่างจากการควบคุมโรคพืชด้วยชีววิธี ที่หมายถึงการควบคุมหรือกำจัดเชื้อสาเหตุโรคด้วยการนำสิ่งมีชีวิตมายับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรค โดยไม่สร้างความเสียหายต่อต้นพืช มักเรียกจุลินทรีย์ หรือสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นว่า เชื้อต่อต้าน (Antagonist) (เกษม, 2532) ทัศนพร และคณะ (2552) ศึกษาประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดโรคลำต้นไหม้ในหน่อไม้ฝรั่งที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *P. asparagi* ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ด้วยวิธี dual culture พบว่า *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อสาเหตุโรคถึง 76.98 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับ azoxystrobin พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคลำต้นไหม้ในโรงเรือนพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. asparagi* ได้ดี โดยวิธีการราดลงดินร่วมกับการฉีดพ่นสปอร์ และอำพร และคณะ (2558) ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Penicillium* และเชื้อราสกุล *Trichoderma* ที่ได้จากการแยกตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี นำมาควบคุมโรคแอนแทรกโนส สาเหตุจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* และโรคลำต้นไหม้ในหน่อไม้ฝรั่ง สาเหตุจากเชื้อรา *P. asparagi* ด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อราสกุล *Penicillium* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อราสกุล *Trichoderma* สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *P. asparagi* มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ เพ็ญจันทร์ และคณะ (2553) พบว่าเชื้อราสกุล *Trichoderma* สามารถยับยั้งการเจริญ

ของเชื้อราสกุล *Phomopsis* ที่เป็นเชื้อราสาเหตุโรคในลิ้นจี่ และลำไยมากถึง 74 เปอร์เซ็นต์ และ Nonaka และคณะ (2015) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. siamensis* สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสกุล *Phomopsis* ได้สูง ในการทดสอบด้วยวิธี dual culture และ เมอมร (2558) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อรา *C. coffeanum* พบว่าเชื้อรา *T. muroii* และเชื้อรา *N. hiratsukae* สามารถควบคุมจำนวนสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคได้ถึง 85 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในพืช โดยกมลวรรณ และคณะ (2557) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบของเชื้อรา *T. trachyspermus* และเชื้อราสกุล *Neosartorya* ที่หมักในตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ที่ความเข้มข้น 1000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ อารมณ และคณะ (2559) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *T. flavus* และ *T. trachyspermus* สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae*, *Sclerotium rolfsii*, *P. palmivora*, *C. capsica*, *Alternaria* sp., *Pyricularia grisea*, *Helminthosporium* sp, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* โดยสารสกัดหยาบของ *T. flavus* สามารถควบคุมเชื้อก่อโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm

จึงกล่าวได้ว่าได้ว่าเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชด้วยการใช้เชื้อโดยตรง และในรูปแบบของสารสกัด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากดิน เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides*

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

3.1.1 ตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการโรคลำต้นไหม้และแอนแทรคโนส

เก็บรวบรวมตัวอย่างต้นหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการของโรคลำต้นไหม้และโรคแอนแทรคโนส โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างจากพื้นที่เพาะปลูกหน่อไม้ฝรั่งที่มีการระบาดของโรคจากจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี และนนทบุรี เพื่อนำมาคัดแยกเชื้อสาเหตุโรค *Phomopsis asparagi* และ *Colletotrichum gloeosporioides*

3.1.2 การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มจากพื้นที่ป่าอุดมสมบูรณ์ ในเขตพื้นที่จังหวัดนครนายก ปราจีนบุรี ระยอง และจันทบุรี โดยขุดดินบริเวณผิวหน้าลึกประมาณ 10 เซนติเมตร (เมอมร, 2558; สุภานัน, 2560) มาประมาณ 200-300 กรัม โดยให้มีเศษของใบไม้หรือรากไม้ติดมาด้วย จากนั้นนำตัวอย่างดินมาคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

3.2 สารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและคัดแยกเชื้อรา

3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA)

3.2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal Agar Base (RBAB)

3.2.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Water Agar (WA)

อาหารทั้ง 5 ชนิด จากบริษัท HiMedia Laboratory (ประเทศอินเดีย)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

3.2.2.1 Clorox 10 เปอร์เซนต์

3.2.2.2 Glycerol

3.2.2.3 Immersion oil

3.2.2.4 Lactophenol

3.2.2.5 Lactophenol cotton blue

3.2.2.6 Sterile distillation water

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3.2.3.1 β -mercaptoethanol

3.2.3.2 Chloroform

3.2.3.3 CTAB

3.2.3.4 Ethanol 70 และ 99.5 เปอร์เซนต์

3.2.3.5 Isoamyl alcohol

3.2.3.6 Isopropanol

3.2.3.7 Liquid nitrogen

3.2.3.8 RNase A

3.2.3.9 TE buffer

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase chain reaction: PCR)

3.2.4.1 10X standard *Taq* reaction buffer

3.2.4.2 Deionize H₂O

3.2.4.3 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

3.2.4.4 MgCl₂

3.2.4.5 Primer

1) สำหรับบ่งชี้เชื้อสาเหตุโรค *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides*
ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) (ตารางที่ 3.1)

2) สำหรับบ่งชี้เชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่
ตำแหน่ง ITS, β -*tubulin* และ *Calmodulin* โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 3.1

3.2.4.6 *Taq* DNA polymerase

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
ITS1	5' TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3'	White และคณะ (1990)
ITS4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	
Bt2a	5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3'	Glass และ Donaldson (1995)
Bt2b	5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'	
CF1L	5' GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR 3'	Peterson (2008)
CF4	5' TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC 3'	

3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.2.5.1 6X Gel loading dye

3.2.5.2 Agarose

3.2.5.3 EDTA

3.2.5.4 Ethidium bromide

3.2.5.5 Marker VC 100 bp plus บริษัท Vivantis

3.2.5.6 Marker 1 kb บริษัท Biolabs

3.2.5.7 TBE buffer

3.2.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน

3.2.6.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.2.6.2 Ethyl acetate

3.2.6.3 Hexane

3.2.6.4 Methanol

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.3.1 Agarose gel electrophoresis system
- 3.3.2 Alcohol burner
- 3.3.3 Autoclave
- 3.3.4 Balance
- 3.3.5 Cellophane
- 3.3.6 Centrifuge
- 3.3.7 Cork borer
- 3.3.8 Duran bottle
- 3.3.9 Gel documentation
- 3.3.10 Forceps
- 3.3.11 Heat box
- 3.3.12 Hemacytometer
- 3.3.13 Hot air oven
- 3.3.14 Incubator
- 3.3.15 Laminar air flow
- 3.3.16 Light microscope
- 3.3.17 Loop
- 3.3.18 Micropipette set
- 3.3.19 Microwave
- 3.3.20 Mortar และ pestle
- 3.3.21 Petri dish diameter 5.0 และ 10.0 เซนติเมตร
- 3.3.22 Rotary evaporator
- 3.3.23 Slide และ cover slip
- 3.3.24 Spatula
- 3.3.25 spectrophotometer
- 3.3.26 Spin down
- 3.3.27 Stereo microscope
- 3.3.28 Syringes and needle ขนาด 26Gx1 นิ้ว
- 3.3.29 Test tube size 0.2, 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร
- 3.3.30 Tip
- 3.3.31 Tissue bottle
- 3.3.32 Thermal cycler
- 3.3.33 Vernier
- 3.3.34 Volumetric flask
- 3.3.35 Vortex mixer
- 3.3.36 Water bath
- 3.3.37 Whatman เบอร์ 1

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การคัดแยกเชื้อสาเหตุโรค *Phomopsis asparagi* และ *Colletotrichum gloeosporioides* จากหน่อไม้ฝรั่ง

แยกเชื้อสาเหตุโรค *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides* จากหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการของโรคจากแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งของเกษตรกรในจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี นนทบุรี และราชบุรีด้วยวิธี tissue transplanting (ตัดแปลงจาก Dhingra และ Sinclair, 1986; เยาวพา, 2554; สุภานัน, 2560) โดยตัดชิ้นส่วนบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อพืชที่ติดกับเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค ซึ่งสังเกตได้จากขอบของแผลที่มีสีที่แตกต่างกัน ตัดชิ้นเนื้อเยื่อเป็นชิ้นขนาดเล็กใส่ถุงล่องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ขนาดประมาณ 5x5 มิลลิเมตร นำชิ้นส่วนที่ตัดได้มาฆ่าเชื้อภายนอกด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 5 นาที ซับน้ำออกจากชิ้นส่วนด้วยกระดาษชำระที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนแห้งสนิท จากนั้นวางชิ้นส่วนพืชราบไปกับอาหาร Water agar (WA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เมื่อมีเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค จึงใช้ปลายเข็มที่ปราศจากเชื้อขนาด 26Gx1 นิ้ว ตัดบริเวณปลายเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอแล้วนำเชื้อรานั้นเพาะเลี้ยงต่อบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่อุณหภูมิห้องเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.4.2 การคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากดิน

แยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากตัวอย่างดินที่ทำการเก็บจากเขตพื้นที่จังหวัดนครนายก ปราจีนบุรี ระยอง และจันทบุรี ด้วยวิธี heat treatment (ตัดแปลงจากสุภานัน, 2560) โดยชั่งดิน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยไม่มีการเขย่าหลอดทดลองให้ตัวอย่างดินแยกชั้นกับน้ำ เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้เทน้ำทิ้ง จากนั้นตักตัวอย่างดินจากหลอดทดลองใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ แล้ว pour plate ด้วยอาหาร Rose Bengal Agar Base (RBAB) นำไปบ่มแบบคว่ำจานอาหารเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเชื้อราทุก ๆ 24 ชั่วโมง เมื่อปรากฏโคโลนีของเชื้อราให้ใช้เข็มเขี่ยแต่ละโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรค *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides* เชื้อราจะถูกเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง เชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ถูกเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA และ อาหาร Malt Extract Agar (MEA) ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยที่เชื้อราทั้งหมดจะถูกบันทึกภาพและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราในวันที่ 5 ของการบ่ม จากนั้นศึกษาลักษณะและขนาดของโคโลนี รวมถึงขนาดของ ascocarp, ascus, ascospores และ conidia ที่ย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue และ lactophenol ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Uecker, 1991; Udayanga และคณะ, 2012; Weir และคณะ, 2012; เมอมร, 2558; สุภานัน, 2560)

3.4.4 การศึกษาเชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมเชื้อราด้วยเทคนิค single spore isolation (ดัดแปลงจาก Choi และคณะ, 1999) จากนั้นเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA โดยผิวหน้าของอาหารจะถูกวางแผ่นเซลโลเฟนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารทำการขีดเส้นใยราลงโกร่ง โดยเติมไนโตรเจนเหลวลงไป แล้วบดจนเป็นผงละเอียดคล้ายผงแป้ง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle, 1987; สุภานัน, 2560) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ นำเส้นใยราที่บดแล้วประมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยพลิกหลอดทดลองทุก ๆ 10-15 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว เติม Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันอย่างเบามือ โดยพลิกหลอดทดลองไปมาทันทีหลังจากเติมสาร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังการปั่นเหวี่ยงสารละลายจะเกิดการแยกชั้น ประกอบด้วย ชั้นบน คือ สารละลายดีเอ็นเอ ชั้นกลาง คือ โปรตีน และ ชั้นล่าง คือ Chloroform : isoamyl alcohol ให้ดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Rnase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนด จึงทำการสกัดตัวอย่างซ้ำอีก 1 ครั้ง ด้วย Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร โดยทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาที่ได้อธิบายไว้แล้วข้างต้น จากนั้นดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม isopropanol ที่เย็นจัด ให้ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของส่วนใสที่ดูดมา พลิกหลอดทดลองไปมาทันทีหลังจากเติมสาร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเออีก 1 ครั้ง ด้วย เอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยนำหลอดที่มีตะกอนดีเอ็นเอไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้ที่ดูดส่วนใสทิ้ง ก้อนนำไปตากให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อตะกอนแห้งดีแล้วจึงทำการละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิส โดยนำสารละลายดีเอ็นเอ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 3X gel loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในหลุมเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส ในการเปรียบเทียบ จากนั้นทำการตั้งค่าเครื่องเจลอเล็กโทรโฟรีซิส ที่ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25-30 นาที เมื่อครบเวลา นำแผ่นเจลอะกาโรสย้อมด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที บันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง gel documentation และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

3.4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ของเชื้อสาเหตุโรค *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides* ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (White และคณะ, 1990; Udayanga และคณะ, 2012) โดยมีปริมาตรสารในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5,000 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร standard *Taq* reaction buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร Forward และ Reverse primer ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTP ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และน้ำ ปริมาตร 15.1 ไมโครลิตร (สุภานัน, 2560) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 สำหรับเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* เพิ่มปริมาณที่ตำแหน่ง β -*tubulin* ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b ตำแหน่ง ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และ ตำแหน่ง *Calmodulin* ด้วยคู่ไพรเมอร์ CF1L และ CF4 (Peterson, 2008; เมอมร, 2558) สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 3.3 และ 3.4

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS (Udayanga และคณะ, 2012)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	180	1
Denaturation	95	30	
Annealing	55	50	40
Extension	72	60	
Final extension	72	600	1

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง β -*tubulin* (เมอมร, 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	30	
Denaturation	95	30	
Annealing	55	30	1
Final extension	72	600	

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS และ *Calmodulin* (ดัดแปลงจาก Peterson, 2008; เมอมร, 2558)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (วินาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	180	
Annealing	53	30	1
Extension	72	60	
Denaturation	95	30	
Annealing	53	30	35
Extension	72	30	
Denaturation	95	30	
Annealing	53	30	1
Final extension	72	600	

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เรสนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส โดยใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผลกับ 3X gel loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของแผ่นเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลาในการตรวจสอบ 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ทำการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาที แล้วบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง gel documentation จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Bioneer Corporation ประเทศเกาหลีใต้ แล้วนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยโปรแกรม Bioedit แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) บนฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุชนิดของเชื้อรา

3.4.5 การทดสอบความสามารถการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรค (Pathogenicity test)

การทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนต้นหน่อไม้ฝรั่งในห้องปฏิบัติการ (ดัดแปลงจาก Yang และคณะ, 2016) โดยนำต้นหน่อไม้ฝรั่งยาว 15 เซนติเมตร มาล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 5 นาที ซึบน้ำออกด้วยกระดาษชำระที่ปราศจากเชื้อให้ต้นหน่อไม้ฝรั่งแห้งสนิท ทำการสร้างบาดแผลบนผิวของต้นหน่อไม้ฝรั่งด้วยเข็มที่ปราศจากเชื้อเบอร์ 26Gx1 นิ้ว จำนวน 4 แผล ให้อยู่ภายใต้เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.1ก) จากนั้นจะขึ้นวันที่มีเชื้อสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน ด้วย cork borer ขนานเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำขึ้นวันที่ได้วางลงบนผิวของต้นหน่อไม้ฝรั่ง (รูปที่ 3.1ข) บ่มในกล่องบ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง วัดความกว้าง และความยาวของรอยแผลที่เกิดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ขึ้นวันที่ไม่มีเชื้อสาเหตุโรค) และคัดแยกเชื้อกลับมาอีกครั้ง (re-isolate) ด้วยวิธี tissue transplanting เพื่อยืนยันว่าแผลที่เกิดขึ้นมาจากเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ วิเคราะห์ความรุนแรงในการก่อโรคในแต่ละไอโซเลตในทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 23 โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.05$

จากนั้นนำเชื้อสาเหตุโรคที่มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงที่สุดไปใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค ด้วยวิธี dual culture และ poison food ต่อไป



รูปที่ 3.1 การทดสอบการก่อโรคบนต้นหน่อไม้ฝรั่ง (ก) การทำแผลบนต้นหน่อไม้ฝรั่ง (ข) การวางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราสาเหตุโรคและชิ้นวุ้นที่ปราศจากเชื้อราสาเหตุโรคบนลำต้นหน่อไม้ฝรั่งสำหรับชุดควบคุม

3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรค

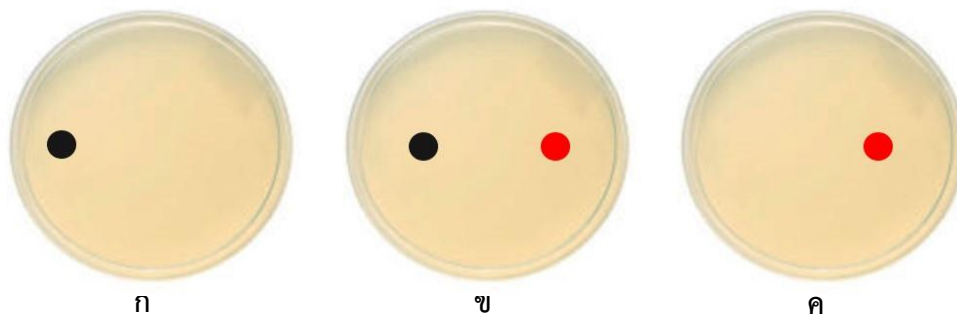
การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ต่อเชื้อสาเหตุโรค *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ และโรคแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่ง ด้วยวิธี dual culture (สุภานัน, 2560) จำนวน 4 ซ้ำ ด้วยการทดสอบแบบ Complete Randomized Design (CRD) เตรียมเชื้อสาเหตุโรค และเชื้อราต่อต้าน โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบของเส้นใยรา ด้วย cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร ทำการวางชิ้นวุ้นของเชื้อสาเหตุโรค และเชื้อราต่อต้านลงบนจานอาหาร PDA ในด้านที่ตรงข้ามกันให้มีระยะห่าง 4 เซนติเมตร สำหรับจานอาหารควบคุมของเชื้อสาเหตุโรค และเชื้อราต่อต้านจะวางชิ้นวุ้นไว้ฝั่งใดฝั่งหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3.2) บ่มจานอาหารทั้งหมดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นทำการนับจำนวน conidia ของเชื้อสาเหตุโรคบนจานอาหารที่มีการเลี้ยงร่วมเปรียบเทียบกับจานอาหารควบคุมของเชื้อสาเหตุโรค โดยนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ (% Spore inhibition) ด้วยสมการ

$$\% \text{ Spore inhibition (SI)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 คือ จำนวน conidia ของเชื้อสาเหตุโรคในจานอาหารชุดควบคุม

R2 คือ จำนวน conidia ของเชื้อสาเหตุโรคในจานอาหารเพาะเลี้ยงร่วม

คัดเลือกเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจากการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค โดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น $p=0.05$



รูปที่ 3.2 การวางชิ้นวุ้นเชื้อราบนจานอาหาร (ก) จานอาหารควบคุมของเชื้อราต่อต้าน (ข) จานอาหารเพาะเลี้ยงร่วม และ (ค) จานอาหารควบคุมของเชื้อสาเหตุโรค
 หมายถึง: ● แสดงถึงเชื้อราต่อต้าน และ ● แสดงถึงเชื้อสาเหตุโรค

3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อรา *Phomopsis asparagi* และ *Colletotrichum gloeosporioides*

3.4.7.1 การสกัดสาร

คัดเลือกเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ดี จากการทดสอบด้วยวิธี dual culture จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณเชื้อราต่อต้าน โดยตัดแปลงจากวิธีการของ สุภานัน (2560) ด้วยอาหาร PDB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใส่ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา 2 ชิ้น เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำเส้นใยราที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยแห้งสนิทนำไปบดเส้นใยให้เป็นผง และนำมาแช่กับตัวทำละลายเฮกเซน ปริมาตร 1:10 (W/V) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลา กรองแยกเส้นใยราออกจากตัวทำละลายเฮกเซน ด้วยกระดาษกรองกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อนำเส้นใยราไปแช่ต่อในตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ในปริมาตร 1:10 (W/V) เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำการกรองแยกเส้นใยราออกจากตัวทำละลาย แล้วนำแช่ต่อด้วยตัวทำละลายเมทานอล ในปริมาตร 1:10 (W/V) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล ที่ได้จากการกรองไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดหยาบไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี poison food และส่งวิเคราะห์สารสกัดหยาบเพื่อหาสารสำคัญด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry ต่อไป

3.4.7.2 การทดสอบการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี poison food

เตรียมสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอลที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm โดยเตรียมสารสกัดด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย นำสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งไอน้ำ (autoclave) นำอาหารมาเทลงจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค ที่มีอายุ 7 วัน ด้วย cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร วางชิ้นวุ้นลงบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสารสกัดหยาบผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ตัดแปลงจาก สุภานัน, 2560) และนับจำนวน conidia ของเชื้อราสาเหตุโรค ด้วย hemocytometer

เปรียบเทียบกับงานอาหารควบคุม (ความเข้มข้น 0 ppm) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ แล้ววิเคราะห์หาค่าคำนวณหา Effective dose ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ED₅₀) คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ควบคุมการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism เวอร์ชัน 7

$$\% \text{ Spore inhibition (SI)} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 คือ ความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคในงานอาหารควบคุม (0 ppm)

R2 คือ ความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคในงานอาหารที่ผสมสารสกัด

การทดสอบการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดยับยั้งในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี Poison food เป็นการทดสอบแบบ 3X6 factorial experiment ใน CRD จำนวน 4 ซ้ำ ซึ่งมี 2 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของสารสกัดยับยั้ง และระดับความเข้มข้นของสารสกัดยับยั้ง การวิเคราะห์ข้อมูลในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดยับยั้ง ได้จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น p=0.05

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรค

4.1.1 ผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้และแอนแทรคโนส

การคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้ ที่มีลักษณะของอาการของแผลเป็นวงรีคล้ายรอยไหม้ สีน้ำตาลเข้ม และบริเวณกลางแผลพบ pycnidium กระจายทั่วแผล และเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส มีลักษณะของแผลเป็นวงรีโดยที่ขอบแผลจะยุบลงเล็กน้อย บริเวณกลางแผลจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน และพบกลุ่มของสปอร์ที่เป็นสีดำซ้อนกันเป็นวง จากต้นหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการ จากพื้นที่เพาะปลูกหน่อไม้ฝรั่งที่มีการระบาดของโรคในจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี และนนทบุรี จำนวน 29 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต เป็นเชื้อรา *Phomopsis asparagi* จำนวน 10 ไอโซเลต และเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 8 ไอโซเลต โดยมีการกำหนดรหัสของเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้เป็น ASPA สำหรับเชื้อรา *P. asparagi* และ ASCG สำหรับ *C. gloeosporioides* (ตารางที่ 4.1) หากพิจารณาจากช่วงระยะเวลาของการเก็บตัวอย่างของต้นหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการของโรคจะพบว่า ช่วงเดือนกันยายน จะพบการระบาดของโรคแอนแทรคโนส และช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงพฤษภาคม จะพบการระบาดของโรคลำต้นไหม้

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มา รหัสตัวอย่างของหน่อไม้ฝรั่ง และรหัสของเชื้อราที่คัดแยกได้

วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อรา
20 กันยายน 2560	อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม	NP-01	ASCG01
		NP-02	ASCG02
		NP-03	-
		NP-04	-
		NP-05	ASCG03
		NP-06	-
		NP-07	ASCG04
		NP-08	ASCG05
		NP-09	ASPA01
		NP-10	-
21 พฤศจิกายน 2560	อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี	SP-01	ASCG06
		SP-02	ASCG07
		SP-03	-
		SP-04	ASCG08
		SP-05	-
		SP-06	-

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งที่มา รหัสตัวอย่างของหน่อไม้ฝรั่ง และรหัสของเชื้อราที่คัดแยกได้ (ต่อ)

วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อรา
1 เมษายน 2561	อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี	RB-05	-
		RB-10	ASPA02
		RB-13	-
		RB-15	-
		RB-19	ASPA03
		RB-23	ASPA04
6 พฤษภาคม 2561	อำเภออุททอง สุพรรณบุรี	SP-01	ASPA05
		SP-02	ASPA06
		SP-03	ASPA07
28 พฤษภาคม 2561	อำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี	NB-02	ASPA08
		NB-07	-
		NB-12	ASPA09
		NB-14	ASPA10

หมายเหตุ - คือไม่พบเชื้อราที่จะสนใจ

4.1.2 ผลการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์

4.1.2.1 เชื้อรา *Phomopsis asparagi*

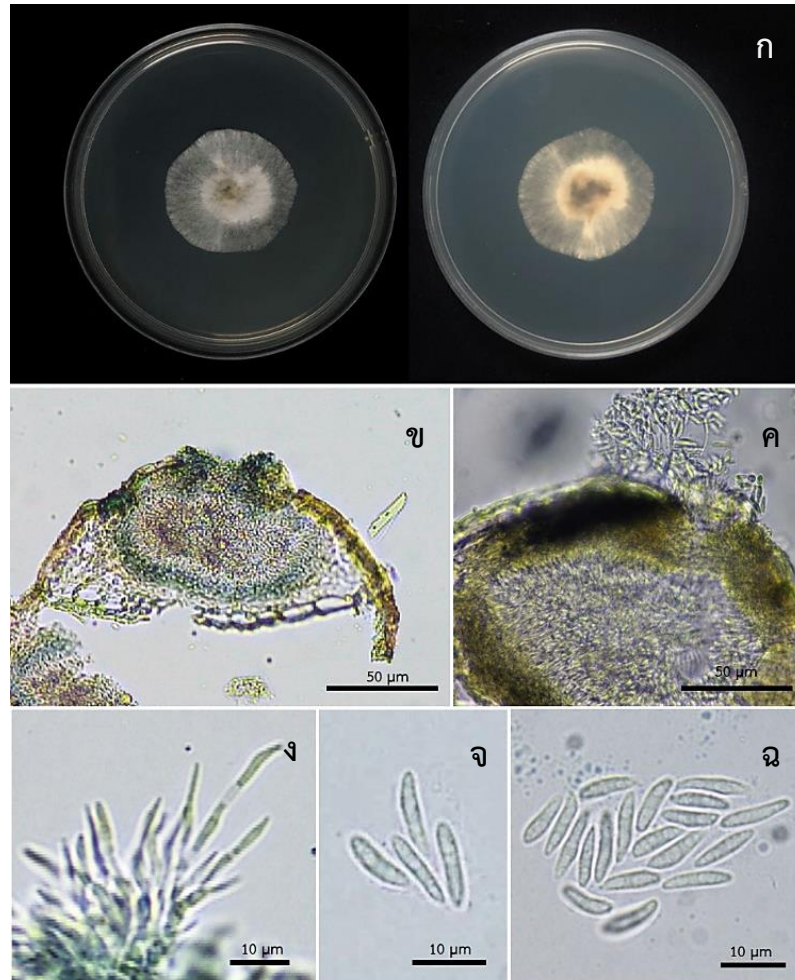
การคัดแยกเชื้อรา *P. asparagi* จากตัวอย่างต้นหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการโรค ลำต้นไหม้ จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ ASPA01 ถึง ASPA10 โดยเฉพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (28-33 องศาเซลเซียส) และมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของทุก ๆ ไอโซเลต ในวันที่ 5 ของการบ่ม อยู่ในช่วง 35.34-35.80 มิลลิเมตร โดยมีลักษณะโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาว และด้านหลังจานอาหารเพาะเลี้ยงเป็นสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีเทา หรือสีเทาปนเขียว เส้นใยเรียบ (Flat) ไปกับผิวของอาหาร และพบการสร้าง pycnidium สีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำบนเส้นใย หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งภายในของ pycnidium จะบรรจุ conidia เอาไว้จำนวนมาก ลักษณะของ conidia เชื้อรา *P. asparagi* ทั้ง 10 ไอโซเลต พบ conidia ชนิด α -conidia เท่านั้น โดยมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีผนังกัน รูปทรงกระสวย (fusiform) แบบ biguttulate และใสไม่มีสี (hyaline) มีขนาดอยู่ในช่วง 2.02-3.84×6.52-13.50 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4.2) และไม่พบ conidia ชนิด β -conidia ในทุก ๆ ไอโซเลต จากการรายงานของ Udayanga และคณะ (2011) ได้อธิบายถึงลักษณะของ α -conidia ที่เป็นรูปทรงกระสวย และจำแนกลักษณะของ α -conidia ออกเป็น 3 รูปแบบ คือ แบบ biguttulate, multiguttulate และ eguttulate ซึ่งจากการรายงานก็ยังพบอีกว่าลักษณะของ α -conidia ของเชื้อ *P. asparagi* จะพบในรูปแบบ biguttulate มากกว่าแบบ multiguttulate หรือ eguttulate และ Kanematsu และคณะ (2000) ได้จำแนกเชื้อราสกุล *Phomopsis* ออกเป็น 2 ชนิด คือ W type และ G type ตามลักษณะของโคโลนี ความรุนแรงในการก่อโรค รวมถึงการสร้าง conidia โดยชนิด W type มีลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร PDA จะเป็นสีขาวและด้านหลังจานอาหารจะเป็นสีค่อนข้างขาวหรือปนไปด้วยสีชมพูอ่อน ๆ และสีน้ำตาล พบ conidia ทั้งชนิด α และ β -conidia สำหรับความรุนแรงในการก่อโรคนั้นต่ำกว่าชนิด G type สำหรับ

ชนิด G type มีลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร PDA เป็นสีขาวจนถึงสีเทา ด้านหลังจานอาหารเป็นสีเทาหรือสีน้ำตาลอมเทา pycnidium มีขนาดเล็กกว่า W type และพบ conidia ชนิด α -conidia เท่านั้น ส่วนความรุนแรงในการก่อโรคสูง และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับเชื้อรา *P. asparagi* ทั้ง 10 ไอโซเลต ไม่ว่าจะเป็นลักษณะของสีโคโลนี และการพบ α -conidia เพียงชนิดเดียว จึงมีความใกล้เคียงกับเชื้อราสกุล *Phomopsis* ชนิด G type โดยแสดงตัวอย่างลักษณะของเชื้อรา *P. asparagi* รหัส ASPA03 (รูปที่ 4.1) มีลักษณะโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวและด้านหลังจานอาหารเพาะเลี้ยง PDA เป็นสีขาวปนเทา (รูปที่ 4.1ก) มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ในวันที่ 5 ของการบ่ม เท่ากับ 35.72 มิลลิเมตร และในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงมีการสร้าง pycnidium และสร้าง conidia ชนิด α -conidia ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีผนังกัน รูปทรงกระสวย แบบ biguttulate ใสไม่มีสี (รูปที่ 4.1จ-ฉ) มีขนาด 2.04-3.84×6.52-13.50 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4.2) และได้เลือกเชื้อรา *P. asparagi* ASPA03 เป็นตัวแทนในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

การบ่งชี้เชื้อสาเหตุโรครา *P. asparagi* ASPA03 ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction) พบว่า เชื้อรา *P. asparagi* มีขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ประมาณ 550 คู่เบส และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วมีขนาด เท่ากับ 579 คู่เบส และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *P. asparagi* Accession MT459266 โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 99.83 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.2 ข้อมูลลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *Phomopsis asparagi*

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี วันที่ 5 (มิลลิเมตร)	ลักษณะโคโลนี	α -conidia		
			ลักษณะ	ความกว้าง (ไมโครเมตร)	ความยาว (ไมโครเมตร)
ASPA01	35.35			2.42-3.21	7.07-11.16
ASPA02	35.34			2.37-3.54	6.74-12.38
ASPA03	35.72	โคโลนีเป็นสีขาวถึงขาวปนเทา เจริญ		2.04-3.84	8.94-12.84
ASPA04	35.45	เรียบไปกับผิว	รูปทรงกระสวย	2.17-3.83	6.52-11.11
ASPA05	35.80	อาหาร และ	ใสไม่มีสี และ	2.23-3.78	6.85-10.64
ASPA06	35.80	pycnidium มีสี	ไม่มีผนังกัน	2.02-3.22	6.93-10.30
ASPA07	35.70	น้ำตาลเข้มจนถึงสี		2.18-3.55	7.11-13.50
ASPA08	35.61	ดำ		2.21-3.51	6.83-12.43
ASPA09	35.60			2.43-3.23	6.69-11.32
ASPA10	35.35			2.17-3.55	7.04-12.92



รูปที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Phomopsis asparagi* ASPA03 (ก) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน (ข-ค) pycnidium (ง) conidiophore (จ-ฉ) α -conidia

4.1.2.2 เชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*

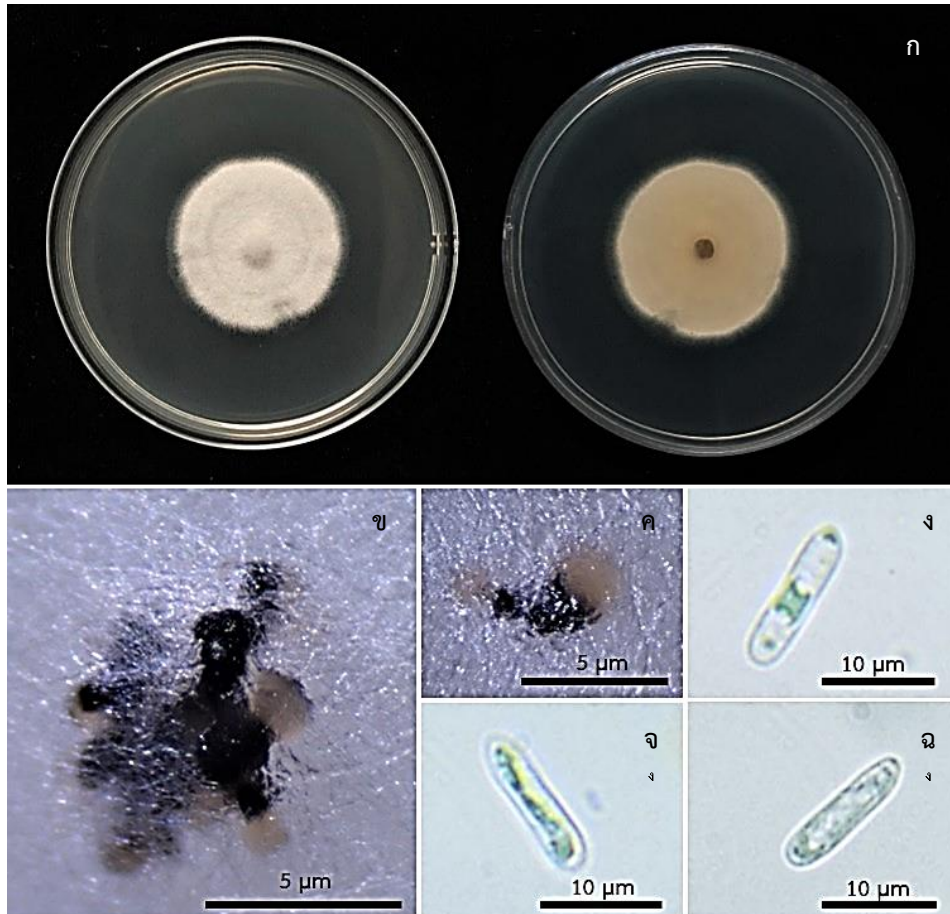
การคัดแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากตัวอย่างต้นหน่อไม้ฝรั่ง จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ ASCG01 ถึง ASCG08 โดยเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง (28-33 องศาเซลเซียส) มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของทุก ๆ ไอโซเลต ในวันที่ 5 ของการบ่ม อยู่ในช่วง 47.31-47.50 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.3) มีลักษณะโคโลนีด้านหน้าและด้านหลังจานอาหารเพาะเลี้ยง เป็นสีขาวยนเทา เส้นใยฟูเล็กน้อย (raised) หลังวันที่ 7 ของการบ่มจะเห็นการสร้างกลุ่มของสปอร์ (spore mass) ที่เป็นของเหลวสีส้มเกิดขึ้นบนเส้นใย ซึ่งภายในจะบรรจุ conidia ไว้มากมาย ลักษณะของ conidia ทั้ง 8 ไอโซเลต เป็นเซลล์เดี่ยว รูปทรงกระบอกที่ส่วนหัวและท้ายมน (oblong) ใสไม่มีสี และไม่มีผนังกัน มีขนาดอยู่ในช่วง 2.90-5.80×5.40-13.90 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4.3) สอดคล้องกับการรายงานของ Weir และคณะ (2012) อธิบายถึงลักษณะของโคโลนีหน้าจานอาหารที่มีสีขาวยนเทา และด้านหลังจานอาหารจะเป็นสีเทา หรือน้ำตาลเทา และสร้าง fruiting body เป็นสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ มีลักษณะของ conidia เป็นรูปทรงกระบอก ขนาดอยู่ในช่วง 4.40-5.30×9.90-15.4 ไมโครเมตร และ รูปที่ 4.2 แสดงตัวอย่างลักษณะเชื้อ *C. gloeosporioides* รหัส ASCG06 มีลักษณะโคโลนีด้านหน้าและหลังจานอาหารเพาะเลี้ยง PDA เป็นสีขาวยนเทา (รูปที่ 4.2ก) เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในวันที่ 5 ของการบ่ม เท่ากับ 47.38 มิลลิเมตร และ เชื้อราจะสร้างกลุ่มสปอร์ที่มี

ลักษณะเป็นเหลวสีส้ม (รูปที่ 4.2ข-ค) ที่บรรจุ conidia เอาไว้ ลักษณะของ conidia เป็นเซลล์เดี่ยว ไม่มีผนังกัน รูปทรงกระบอกหัวท้ายมน ขนาด 3.11-5.80×6.21-13.63 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.2ง-ฉ)

การบ่งชี้เชื้อรา *C. gloeosporioides* คัดเลือกเชื้อรา รหัส ASCG06 นำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง ITS คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอร์ส พบว่า มีขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ประมาณ 550 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วมีขนาดเท่ากับ 581 คู่เบส และเปรียบเทียบข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI มีค่าความเหมือนเท่ากับ 99.48 เปอร์เซ็นต์ ตรงกับหมายเลข Accession JX669445

ตารางที่ 4.3 ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ไอโซเลต	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี วันที่ 5 (มิลลิเมตร)	ลักษณะโคโลนี	โคนินเดีย		
			ลักษณะ	ความกว้าง (ไมโครเมตร)	ความยาว (ไมโครเมตร)
ASCG01	47.44			2.90-5.56	5.40-13.00
ASCG02	47.40			3.46-5.53	5.44-13.33
ASCG03	47.43	โคโลนีเป็นสีขาวถึงขาว	ทรงกระบอก หัวท้ายมน ใสไม่มีสี	3.04-5.17	5.72-12.73
ASCG04	47.50	ปนเทา พูเล็กน้อย,		3.20-4.89	6.07-13.02
ASCG05	47.40	spore mass เป็นสีดำ		3.20-5.11	5.80-13.90
ASCG06	47.38	และมีของเหลวสีส้ม		3.11-5.80	6.21-13.63
ASCG07	47.45			3.01-5.06	6.21-13.90
ASCG08	47.31			3.02-5.14	6.80-12.70



รูปที่ 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ASCG06 (ก) เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน (ข-ค) spore mass (ง-ฉ) conidia

4.2 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

4.2.1 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์

การคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากตัวอย่างดินในพื้นที่ป่าอุดมสมบูรณ์ ในเขตจังหวัดนครนายก ปราจีนบุรี ระยอง และจันทบุรี จำนวน 18 ตัวอย่าง โดยกำหนดรหัสของตัวอย่างดินตั้งแต่ ATM01 ถึง ATM18 สามารถแยกเชื้อราต่อต้านทั้งหมด 25 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.4) ได้บ่งชี้และจำแนกตามลักษณะของโคโลนี ขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospore ด้วยวิธีของ Yilmaz และคณะ (2014) และ Samson และคณะ (2007) สามารถบ่งชี้เชื้อราได้อย่างน้อย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *N. spinosa*, *N. pseudofischeri*, *T. macrosporus*, *T. liani* และ *T. muroii* และเชื้อราสกุล *Talaromyces* อีกจำนวน 2 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้

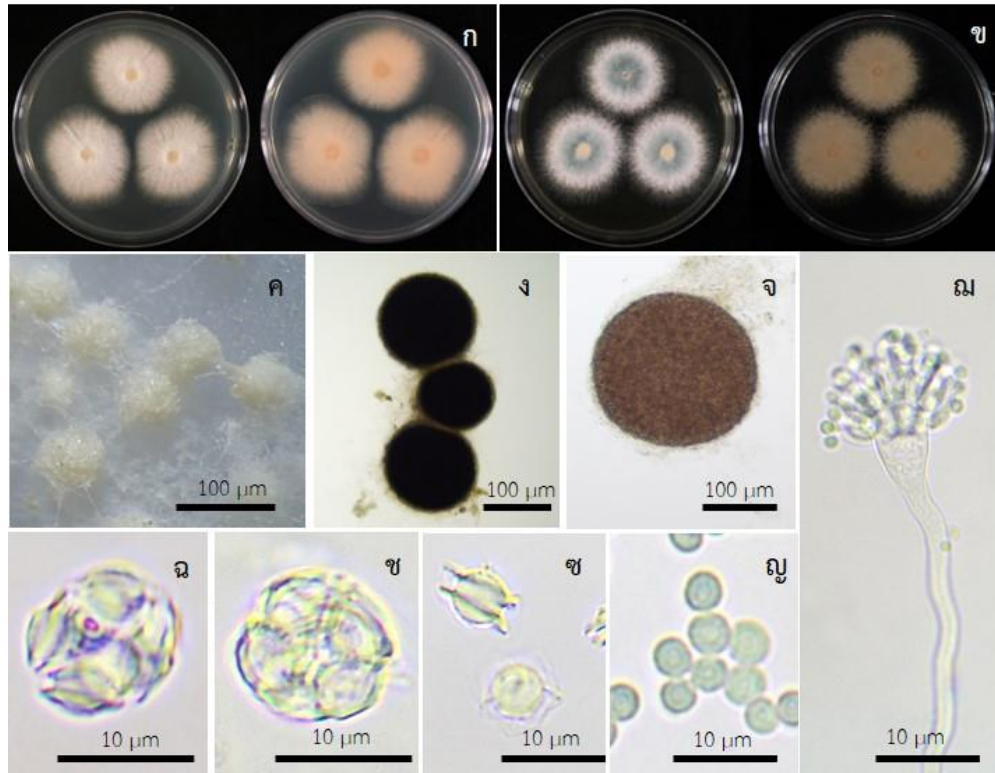
ตารางที่ 4.4 แสดงแหล่งที่มาของตัวอย่างดินสำหรับคัดแยกเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่	รหัสตัวอย่าง	รหัสเชื้อรา
13 มกราคม 2562	นครนายก	ATM01	ATM01-03, ATM01-05, ATM01-07
		ATM02	-
		ATM03	ATM03-01, ATM03-02
		ATM04	-
		ATM05	ATM05-01
	ปราจีนบุรี	ATM06	ATM06-01, ATM06-03
		ATM07	ATM07-01, ATM07-06, ATM07-07, ATM07-08
		ATM08	-
		ATM09	ATM09-01, ATM09-04
		ATM010	-
14 มกราคม 2562	ระยอง	ATM011	ATM011-01
		ATM012	-
		ATM013	-
		ATM014	ATM014-01, ATM014-02
	จันทบุรี	ATM015	ATM015-01
		ATM016	ATM016-01
		ATM017	ATM017-01, ATM017-02, ATM017-03
		ATM018	ATM018-01, ATM018-02, ATM018-03

หมายเหตุ - คือไม่พบเชื้อราที่สนใจ

การบ่งชี้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosartorya* รหัส ATM01-03, ATM03-02, ATM05-01, ATM06-01, ATM09-01, ATM09-04, ATM14-01, ATM14-02, ATM15-01, ATM17-01, ATM17-02, ATM18-01 และ ATM18-03 จำนวน 13 ไอโซเลต เมื่อเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวถึงขาวนวล เจริญเรียบไปกับผิวของอาหาร มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในวันที่ 5 ของการบ่มอยู่ในช่วง 37.27-63.34 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.5) เชื้อรามีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาดอยู่ในช่วง 63.32-289.47×71.34-294.93 ไมโครเมตร ฐาน ascus แบบ globose ถึง subglobose ขนาดอยู่ในช่วง 7.30-13.74×7.95-13.41 ไมโครเมตร และรูปร่าง ascospore แบบ globose ถึง subglobose ขนาด 4.04-5.91×4.07-5.68 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4.6) และ พบ ridge ล้อมรอบลักษณะเป็นวงแหวน สำหรับการเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 35.93-46.44 มิลลิเมตร ลักษณะของโคโลนีเป็นสีขาวปนเขียว (ตารางที่ 4.5) รวมถึงพบการสร้างก้านชูสปอร์ และ conidia ที่มีลักษณะค่อนข้างกลมของเชื้อราสกุล *Aspergillus* ที่เป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Neosartorya* โดยรูปที่ 4.3 ได้แสดงตัวอย่างลักษณะของเชื้อรารหัส ATM03-02 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในวันที่ 5 ของการบ่มบนอาหาร PDA เท่ากับ 39.59 มิลลิเมตร โคโลนีเป็นสีขาวและเรียบไปกับผิวหน้าของอาหาร (รูปที่ 4.3ก) และบนอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 43.76 มิลลิเมตร โคโลนีเป็นสีขาวปนเขียว (รูปที่ 4.3ข) การเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เชื้อราจะสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง broadly ellipsoida ขนาด 79.47-276.41×81.79-286.11 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.3ค-จ) รูปร่างของ ascus แบบ globose ถึง subglobose ขนาด 8.44-11.27×8.76-10.55 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.3ฉ-ช) และรูปร่างของ ascospore แบบ globose ถึง subglobose ขนาด 4.17-5.50×4.19-5.64 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.3ฉ-ช) และในการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรามีการสร้างก้านชูสปอร์ (รูปที่ 4.3ฉ) conidia (รูปที่ 4.3ญ)

เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของรหัส ATM03-02, ATM05-01, ATM06-01, ATM09-01, ATM14-02, ATM15-01 และ ATM17-02 ที่ตำแหน่ง β -tubulin ด้วยคู่มือไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b ได้ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ประมาณ 600 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดเท่ากับ 560 คู่เบส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI สามารถระบุเป็นเชื้อรา *N. spinosa* มีค่าความเหมือนเท่ากับ 99.80 เปอร์เซ็นต์ และตรงกับหมายเลข Accession AY870760 สอดคล้องกับ สุภานัน (2560) ที่รายงานขนาดนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *N. spinosa* ที่มีขนาด 560 คู่เบส เช่นกัน

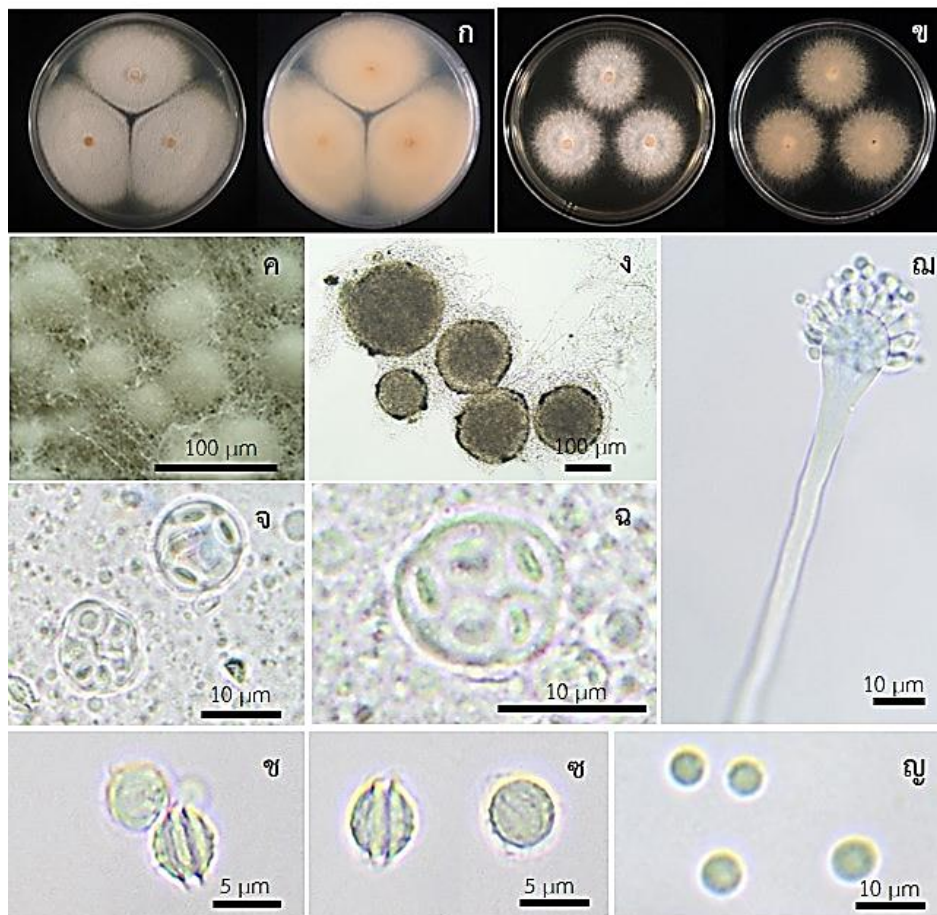


รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neosartorya spinosa* ATM03-02 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ฌ) ลักษณะ ascospore (ฎ) conidiophore (ญ) conidia ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

เชื้อรารหัส ATM17-03 และ ATM18-02 มีลักษณะของโคโลนีบนจานอาหารเพาะเลี้ยง PDA เป็นสีขาวครีม โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีในวันที่ 5 ของการบ่ม เท่ากับ 62.15-65.50 มิลลิเมตร ลักษณะของ ascocarp แบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาดอยู่ในช่วง 68.88-184.57×88.69-117.76 ไมโครเมตร สำหรับถุง ascus ที่ห่อหุ้ม ascospore ไว้ มีรูปร่างแบบ globose ถึง subglobose ขนาดอยู่ในช่วง 7.77-13.84×8.01-12.75 ไมโครเมตร และรูปร่าง ascospore แบบ globose ถึง subglobose ขนาดอยู่ในช่วง 4.19-5.41×4.47-5.33 ไมโครเมตร (ตารางที่ 4.6) และพบลักษณะเฉพาะของ ascospore คือมี ridge ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 38.13-46.09 มิลลิเมตร โคโลนีเป็นสีขาวปนเขียวอ่อน พบก้านชูสปอร์ และ conidia ของเชื้อราสกุล *Aspergillus* เป็นเชื้อราในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Neosartorya* จากรูปที่ 4.4 แสดงตัวอย่างลักษณะของเชื้อรารหัส ATM17-03 เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA และอาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 65.50 และ 46.09 มิลลิเมตร ตามลำดับ ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA เส้นใยสีขาวครีมและเรียบไปกับผิวหน้าอาหาร (รูปที่ 4.4ก) ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นสีขาวปนเขียวอ่อน (รูปที่ 4.4ข) ลักษณะของ ascocarp บนอาหาร PDA เป็นแบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 68.88-

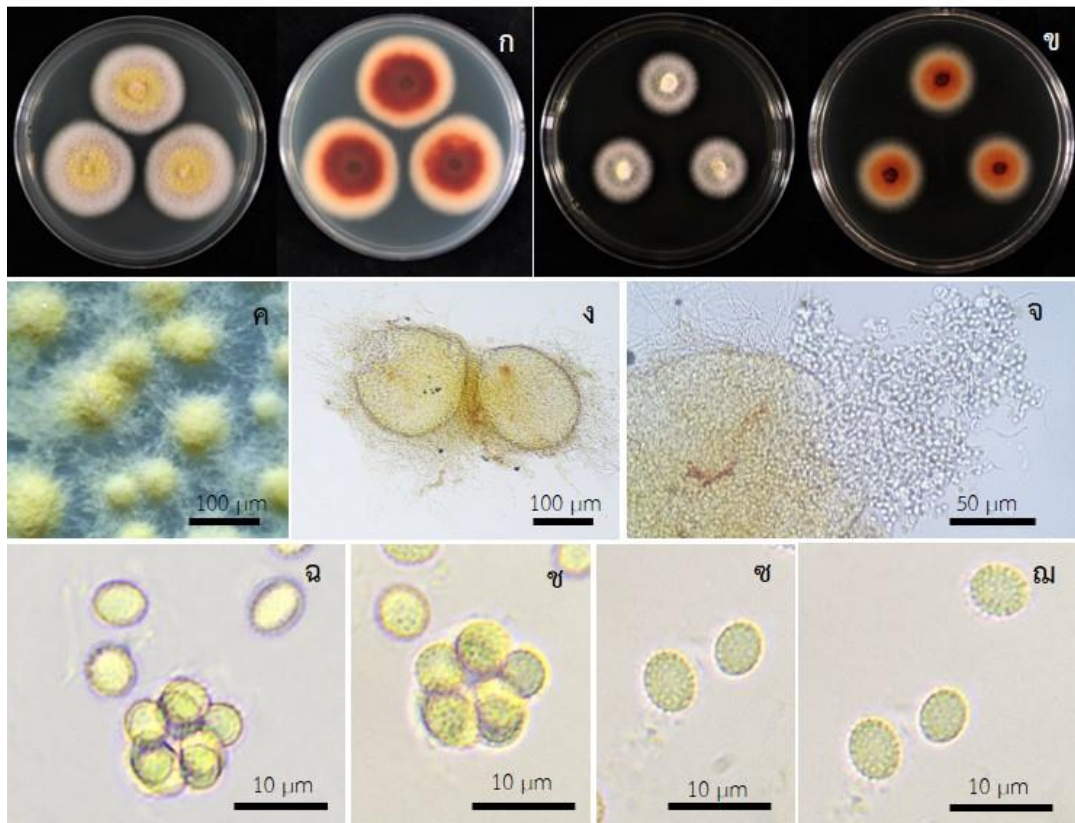
137.03×82.46-145.99 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.4ค-ง) รูปร่างของ ascus แบบ globose ถึง subglobose ขนาด 7.77-10.32×8.01-11.35 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.4จ-ฉ) และ ascospore มี ridge ล้อมรอบ ลักษณะของ ascospore แบบ globose ถึง subglobose ขนาด 4.19-5.22×4.47-5.41 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.4ซ-ซ) และในการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อรามีการสร้างก้านชูสปอร์ (รูปที่ 4.3ฉ) conidia ลักษณะค่อนข้างกลม (รูปที่ 4.3ญ) บ่งชี้เป็นเชื้อราสกุล *Aspergillus*

นำเชื้อรารหัส ATM17-03 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b มีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ประมาณ 600 คู่เบส และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 553 คู่เบส นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI ระบุเป็นเชื้อ *N. pseudofischeri* มีค่าความเหมือนเท่ากับ 97.83 เปอร์เซ็นต์ และตรงกับหมายเลข Accession KM095495 สอดคล้องกับเมอเมอร์ (2558) ได้รายงานขนาดของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *N. pseudofischeri* เท่ากับ 553 คู่เบสเช่นกัน



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neosartorya pseudofischeri* ATM17-03 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง) ลักษณะ ascocarp (จ-ฉ) ascus (ซ-ซ) ลักษณะ ascospore (ฉ) conidiophore (ญ) conidia ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

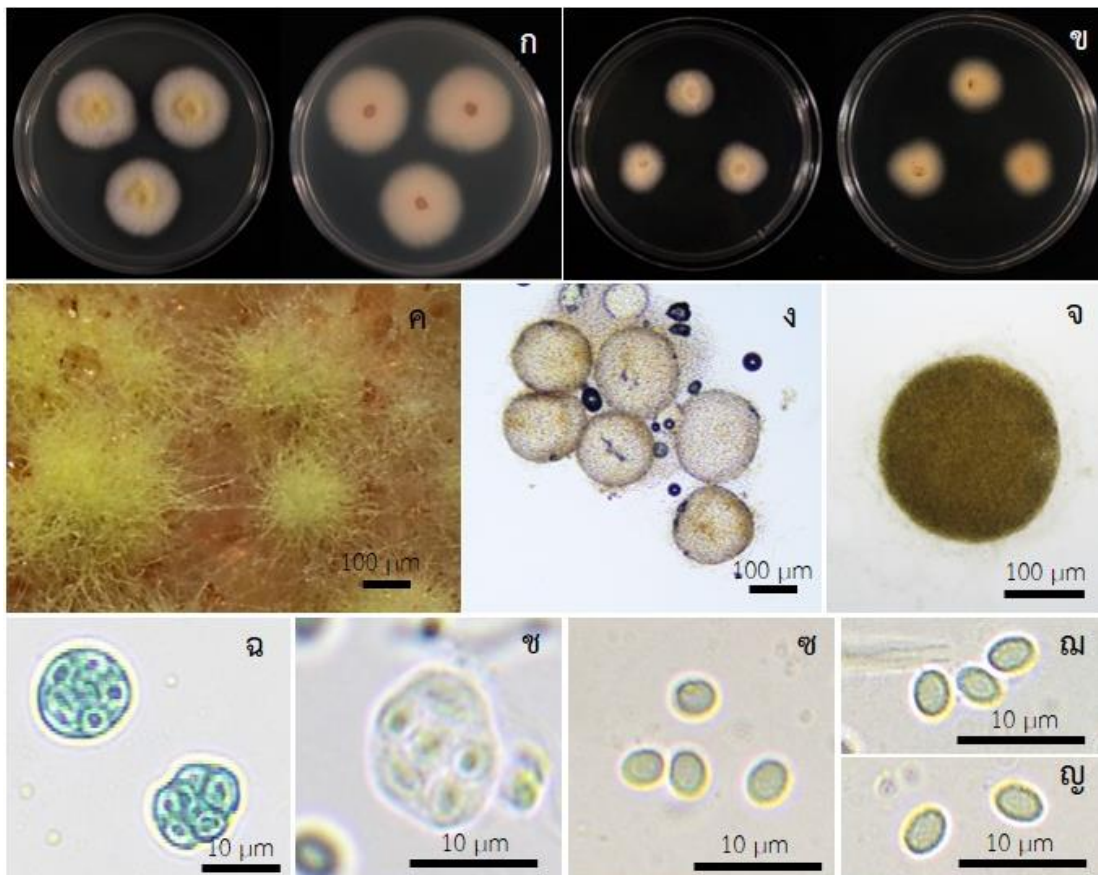
เชื้อราห้ำส ATM06-03 และ ATM07-07 เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โคลนินบนจานอาหารเป็นสีเหลืองปนส้มและเรียบไปกับผิวหน้าของอาหาร ส่วนด้านหลังจานอาหารเป็นสีแดงอมส้ม โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีวันที่ 5 ของการบ่มเท่ากับ 35.46-36.59 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.5) เชื้อราจะสร้าง ascocarp เป็นแบบ cleistothecia สีเหลือง รูปร่างแบบ subglobose ถึง broadly ellipsoidal ช่วง $96.52-374.06 \times 109.47-324.19$ ไมโครเมตร ผนัง ascus มีรูปร่างแบบ globose ถึง subglobose ขนาดอยู่ในช่วง $8.81-10.76 \times 9.87-12.64$ ไมโครเมตร และ ascospore แบบ ellipsoidal ขนาด $4.01-5.17 \times 5.05-6.34$ ไมโครเมตร (ตารางที่ 4.6) ลักษณะของ ascospore ทั้ง 2 ไอโซเลตนี้ไม่มี ridge ล้อมรอบ แต่มีขนาดของ ascospore ใหญ่ที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิเดียวกัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 25.98-25.24 มิลลิเมตร ลักษณะของโคโลนีด้านหน้าจานอาหารเป็นสีเทา และด้านหลังเป็นสีส้ม (ตารางที่ 4.5) ดังรูปที่ 4.5 ที่แสดงตัวอย่างเชื้อราห้ำส ATM07-07 เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA และ MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีวันที่ 5 ของการบ่มเท่ากับ 36.59 และ 25.24 มิลลิเมตร ตามลำดับ ลักษณะของโคโลนินบนอาหาร PDA เส้นใยมีสีเหลืองปนส้มและเรียบไปกับผิวหน้าของอาหาร และด้านหลังจานอาหารเพาะเลี้ยงมีสีแดงอมส้ม (รูปที่ 4.5ก) และโคโลนินบนอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ ด้านหน้าเป็นสีเทา และด้านหลังเป็นสีส้ม (รูปที่ 4.5ข) การสร้าง ascocarp บนอาหาร PDA เป็นแบบ cleistothecia สีเหลือง รูปร่างแบบ subglobose ถึง broadly ellipsoidal ขนาด $96.52-374.06 \times 109.47-342.11$ ไมโครเมตร (รูปที่ 4.5ค-จ) ผนัง ascus ที่ทำหน้าที่ห่อหุ้ม ascospore มีผนังบาง มีรูปร่างแบบ globose ถึง subglobose ขนาด $8.81-10.76 \times 9.43-12.14$ ไมโครเมตร (รูปที่ 4.5ฉ-ช) รูปร่าง ascospore แบบ ellipsoidal ขนาด $4.28-5.17 \times 5.05-6.34$ ไมโครเมตร ไม่พบ ridge บน ascospore และพื้นผิวของ ascospore ไม่เรียบมีลักษณะเป็นหนาม (รูปที่ 4.5ซ-ณ) เมื่อนำเชื้อรามาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b มีขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ประมาณ 500 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความยาวเท่ากับ 462 คู่เบส นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI ถูกระบุเป็นเชื้อรา *T. macrosporus* ที่มีค่าความเหมือนเท่ากับ 99.25 เปอร์เซ็นต์ ตรงกับหมายเลข Accession JX091382



รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces macrosporus* ATM07-07 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ช-ฉ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

สำหรับเชื้อรารหัส ATM01-05 และ ATM16-01 ถูกเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร PDA มีสีของเส้นใยเป็นสีเหลืองเจริญเรียบไปกับผิวหน้าของอาหาร และด้านหลังจานอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเส้นใยเป็นสีเหลืองอ่อน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีวันที่ 5 ของการบ่มเท่ากับ 32.01-34.13 มิลลิเมตร มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia สีเหลือง รูปร่างแบบ subglobose ถึง broadly ellipsoidal ขนาด 92.44-284.94×93.09-305.05 ไมโครเมตร มี ascus แบบ globose ถึง subglobose ขนาด 9.00-13.02×9.16-12.47 ไมโครเมตร และ ascospore แบบ ellipsoidal ขนาด 2.54-3.40×3.04-4.32 ไมโครเมตร และไม่พบ ridge ล้อมรอบ ascospore ลักษณะของพื้นผิวค่อนข้างเรียบ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรารหัส ATM06-03 และ ATM07-07 และลักษณะของ โคโลนีบนจานอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ ด้านหน้าเป็นสีขาว และด้านหลังเป็นสีเหลืองอ่อน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 19.32-22.31 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.5.) โดยมีลักษณะพื้นฐานวิทยาของรหัส ATM16-01 (รูปที่ 4.6) มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 34.13 มิลลิเมตร และ อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 22.31 มิลลิเมตร ลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA เป็นสีเหลือง และเรียบไปกับผิวหน้าของอาหารและด้านหลังเป็นสีเหลืองอ่อน (รูปที่ 4.6ก) ascocarp เป็นสีเหลืองแบบ subglobose ถึง broadly ellipsoidal ขนาด 92.44-261.01×93.09-305.05 ไมโครเมตร (รูป

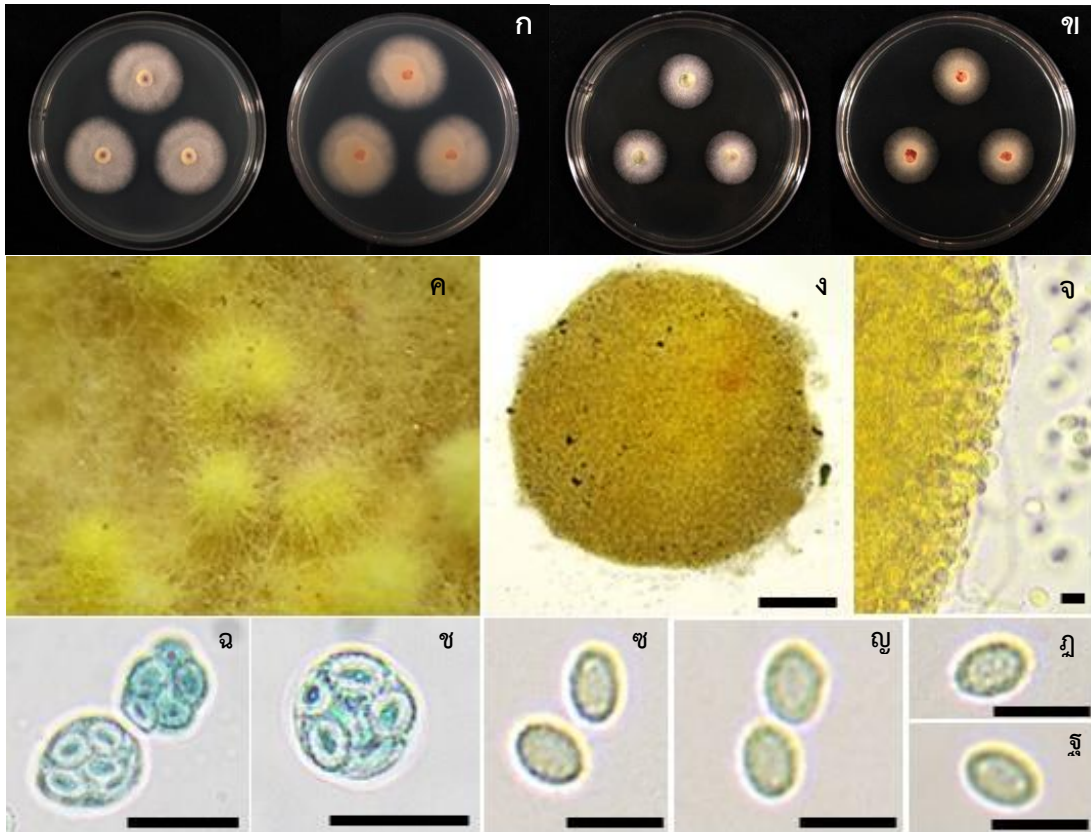
ที่ 4.6ค-จ) ลักษณะของ ascus เป็นแบบ globose ถึง subglobose ขนาด 9.44-12.47 × 9.95-13.02 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.6ฉ-ช) และลักษณะของ ascospore แบบ ellipsoidal ขนาด 2.56-3.40×3.62-4.32 ไมโครเมตร และไม่พบ ridge ล้อมรอบ ascospore (รูปที่ 4.6ซ-ญ) เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่ตำแหน่ง β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b มีขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ประมาณ 500 คู่เบส และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ 461 คู่เบส นำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเชื้อรารหัส ATM01-05 และ ATM16-01 ระบุเป็นเชื้อรา *T. muroii* มีค่าความเหมือนเท่ากับ 98.88 เปอร์เซ็นต์ ตรงกับหมายเลข Accession LT898321 สอดคล้องกับ เมอมร (2558) ได้รายงานขนาดของนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *T. muroii* เท่ากับ 461 คู่เบส



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces muroii* ATM16-01 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ซ-ญ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

นอกจากนี้ยังพบเชื้อรารหัส ATM01-07, ATM03-01, ATM07-06, ATM07-08 จำนวน 4 ไอโซเลต ที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายกับเชื้อรารหัส ATM01-05 และ ATM16-01 ไม่ว่าจะเป็นลักษณะของโคโลนีบนจานอาหาร PDA ที่มีเส้นใยสีเหลืองและเรียบไปกับผิวหน้าของอาหาร และด้านหลังเป็นสีเหลืองอ่อน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 30.65-33.52 มิลลิเมตร รวมถึงลักษณะของ ascocarp, ascus และ ascospore แต่จะแตกต่างกันที่ขนาด โดยขนาดของ ascocarp อยู่ในช่วง 109.99-330.05×126.29-341.20 ไมโครเมตร ascus มีขนาด 7.60-12.55×7.90-12.66 ไมโครเมตร และ ascospore มีขนาด 2.30-3.33×3.16-4.43 ไมโครเมตร สำหรับการเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวและด้านหลังเป็นสีเหลืองอ่อน มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 18.10-22.13 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.5) โดยรูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของเชื้อรารหัส ATM07-06 เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 31.92 มิลลิเมตร โคโลนีบนอาหาร PDA เป็นสีเหลือง ส่วนด้านหลังจานอาหารเป็นสีเหลืองอ่อน (รูปที่ 4.7ก) และอาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 21.01 มิลลิเมตร มีโคโลนีด้านหน้าและด้านหลังจานเพาะเลี้ยงเป็นสีขาว (รูปที่ 4.7ข) สำหรับลักษณะของ ascocarp แบบ cleistothecia สีเหลือง รูปร่างแบบ subglobose ถึง broadly ellipsoidal ขนาด 167.67-287.74×187.23-341.20 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.7ค-จ) ascus เป็นแบบ globose ถึง subglobose ขนาด 9.00-11.97×9.17-11.65 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.7ฉ-ช) และลักษณะของ ascospore แบบ ellipsoidal ขนาด 2.34-3.08×3.60-3.94 ไมโครเมตร และไม่พบ ridge ล้อมรอบ ascospore (รูปที่ 4.7ซ-ฐ)

เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรารหัส ATM07-06 ที่ตำแหน่ง β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b มีขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ประมาณ 500 คู่เบส และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความยาวเท่ากับ 462 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI ระบุเป็นชื่อ *T. liani* ที่มีค่าความเหมือนเท่ากับ 98.78 เปอร์เซ็นต์ ตรงกับหมายเลข Accession MH792920 อย่างไรก็ตามเชื้อรารหัส ATM01-07, ATM03-01 และ ATM07-08 จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายกับเชื้อรา *T. muroii* และ *T. liani* แต่ยากที่จะระบุว่าเป็นเชื้อราสปีชีส์ใดจึงต้องบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

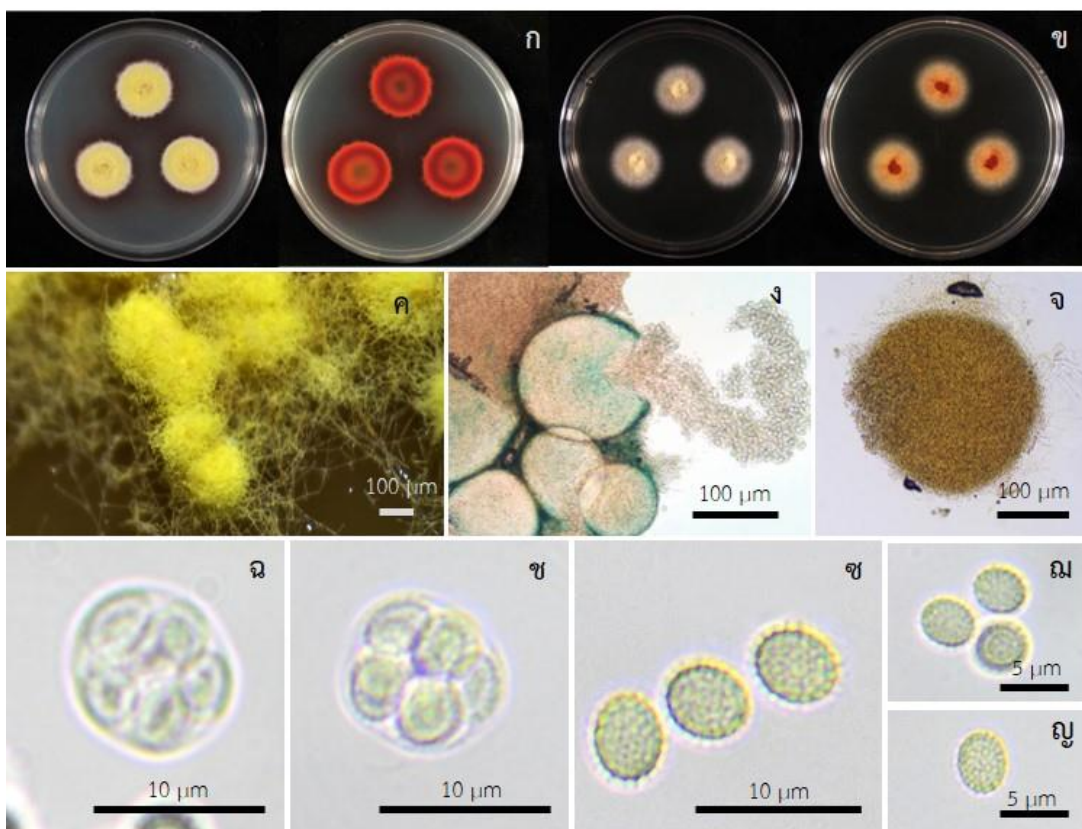


รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces liani* ATM07-06 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ช-ฐ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรารหัส ATM07-01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร PDA และอาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีวันที่ 5 ของการบ่ม เท่ากับ 24.11 และ 25.05 มิลลิเมตร ตามลำดับ ลักษณะของโคโลนีบนหน้าอาหาร PDA เป็นสีเหลืองและเรียบไปกับผิวหน้าของอาหาร และด้านหลังจานอาหารเพาะเลี้ยงเป็นสีแดงส้ม และสามารถสร้างสารสีแล้วเปลี่ยนสีของอาหาร PDA เป็นสีส้มถึงสีแดง (รูปที่ 4.8ก) และเส้นใยเป็นสีเทาเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.8ข) พบการสร้าง ascocarp เป็นแบบ cleistothecia สีเหลือง รูปร่างแบบ globose ถึง broadly ellipsoidal ขนาด 92.77-267.04×100.47-242.11 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.8ค-จ) ลักษณะของ ascus มีรูปร่างแบบ subglobose ขนาด 8.71-11.11×9.85-13.29 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.8ฉ-ช) มี ascospore แบบ ellipsoidal ขนาด 4.68-5.32×6.02-7.00 ไมโครเมตร และไม่พบ ridge ล้อมรอบและพื้นผิวไม่เรียบ (รูปที่ 4.8ช-ญ) (ตารางที่ 4.6)

การบ่งชี้เชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b ได้ผลิตลำดับที่ซีอาร์ประมาณ 500 คู่เบส และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า มีขนาดของนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 451 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI ระบุเป็นเชื้อรา *T. siamensis* มีค่าความเหมือนเพียง 93.68 เปอร์เซ็นต์ หมายเลข Accession KJ767036 จึงบ่งชี้เพิ่มเติมด้วยตำแหน่ง Calmodulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ CF1L และ CF4 ได้ผลิตลำดับที่ซีอาร์

ประมาณ 700 คู่เบส และมีขนาดของนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 702 คู่เบส เมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI ถูกระบุเป็นเชื้อรา *T. aculeatus* ค่าความเหมือนเพียง 91.39 เปอร์เซ็นต์ หมายเลข Accession MH792972 และตำแหน่ง ITS คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ได้ผลิตภัณฑ์ฟิชอาร์ประมาณ 600 คู่เบส และมีขนาดของนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 579 คู่เบส นำไป วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI ระบุเป็นเชื้อ *T. pinophilus* (MH059546), *T. flavus* (MH860587), *T. liani* (MH858781) และ *T. macrosporus*, (MH860463) ค่าความเหมือน 99.48 เปอร์เซ็นต์ แต่ก็ไม่สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อราหัตส ATM07-01 ได้ จึงต้องบ่งชี้ที่ตำแหน่งอื่นเพิ่มเติม จากการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Talaromyces* ของ Yilmaz และ คณะ (2014) นอกจากตำแหน่ง β -tubulin, Calmodulin และ ITS ยังมีการบ่งชี้ที่ตำแหน่ง *RPB2* ด้วยคู่ไพรเมอร์ RPB2-5F และ RPB2-7Cr สามารถบ่งชี้สปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* ได้

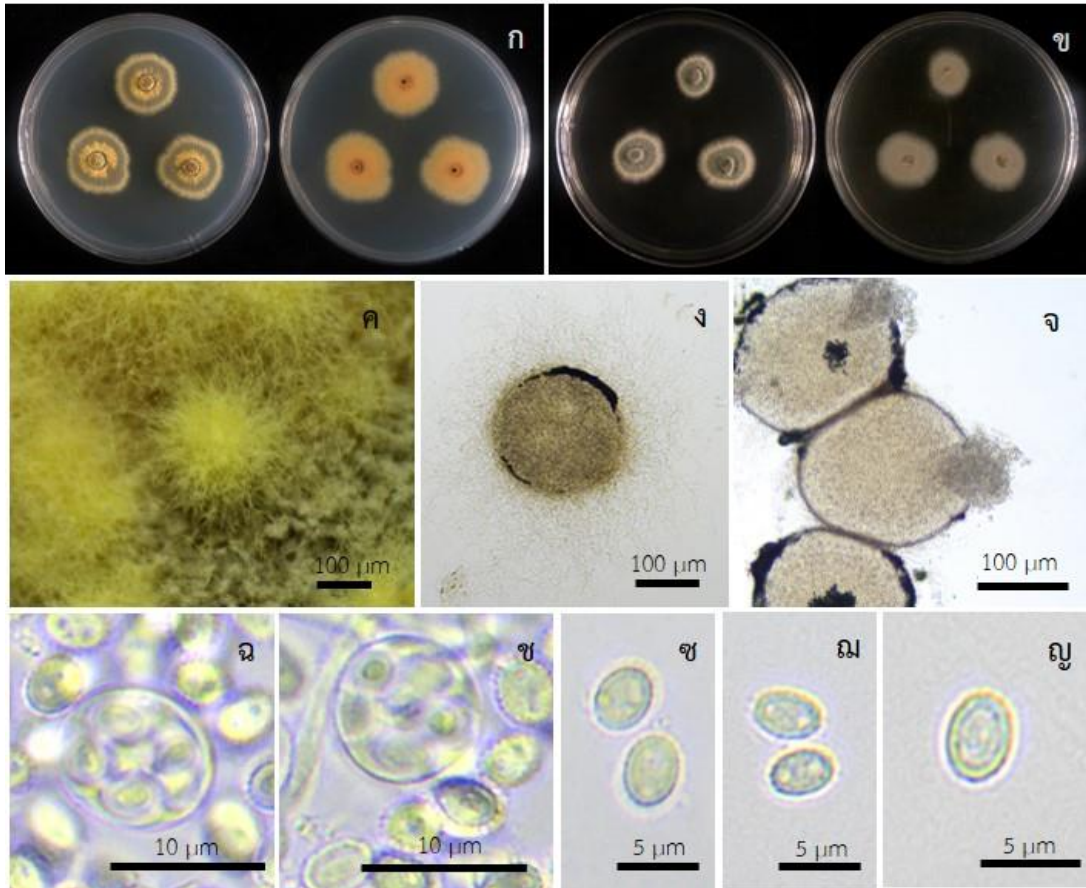


รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 เพาะเลี้ยงบน (ก)อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ลักษณะ ascus (ฅ-ญ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

สำหรับเชื้อรารหัส ATM11-01 มีลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร PDA และอาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีวันที่ 5 ของการบ่ม เท่ากับ 27.38 และ 19.17 มิลลิเมตร ตามลำดับ ลักษณะของโคโลนีบนหน้าอาหาร PDA เป็นสีเหลืองมีขอบโคโลนีเป็นสีเขียวปนเหลืองเรียบไปกับผิวหน้าของอาหาร และด้านหลังจานอาหารเพาะเลี้ยงสัณเฑาะเป็นสีเหลืองปนส้ม (รูปที่ 4.9ก) ลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร MEA ที่เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นสีเขียว ด้านหลังเป็นสีเทา (รูปที่ 4.9ข) บนจานอาหาร PDA เชื้อราสามารถสร้าง ascocarp ที่มีลักษณะแบบ cleistothecia สีเหลือง รูปร่างแบบ globose ถึง subglobose ขนาด 86.79-159.67×91.46-162.05 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.9ค-จ) ลักษณะของ ascus มีรูปร่างแบบ subglobose ขนาด 6.97-11.07×7.47-12.96 ไมโครเมตร (รูปที่ 4.9ฉ-ช) ลักษณะของ ascospore แบบ ellipsoidal ขนาด 3.19-3.83×3.95-4.99 ไมโครเมตร และไม่พบ ridge ล้อมรอบ (รูปที่ 4.9ซ-ญ) (ตารางที่ 4.5)

เมื่อบ่งชี้ด้วยตำแหน่ง β -tubulin, Calmodulin และ ITS โดยมีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ประมาณ 500, 700 และ 600 คู่เบส ตามลำดับ และมีขนาดของนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 465, 710 และ 609 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST และเปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI ที่ตำแหน่ง β -tubulin และ Calmodulin เชื้อรารหัส ATM11-01 ถูกระบุเป็นเชื้อ *T. qii* (KP765380 และ KP765382) มีค่าความเหมือน 96.83 และ 96.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ตำแหน่ง ITS ระบุเป็นเชื้อ *T. thailandensis* (NR147428), *T. aculeatus* (MH509420) และ *T. flavus* (MH857785) โดยมีค่าความเหมือน 98-99 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อรา รหัส ATM11-01 ได้ จากการรายงานของ Wang และคณะ (2015) ศึกษาเชื้อราสกุล *Talaromyces* ที่แยกได้จากใบพืชในประเทศจีนและทิเบต โดยใช้ตำแหน่ง β -tubulin, Calmodulin และ ITS ในบ่งชี้เชื้อรา *T. qii* เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *T. qii* และเชื้อรา *Talaromyces* ATM11-01 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 47 คู่เบส จากทั้งหมด 1,640 คู่เบส

การบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จำนวน 25 ไอโซเลต สามารถบ่งชี้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกเป็นเชื้อราสกุล *Neosartorya* จำนวน 15 ไอโซเลต และ *Talaromyces* จำนวน 10 ไอโซเลต และการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราต่อต้านจำนวน 15 ไอโซเลต สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อราต่อต้านที่ตำแหน่ง β -tubulin ได้อย่างน้อย 5 สปีชีส์ ได้แก่ เชื้อรา *N. spinosa*, *N. pseudofischeri*, *T. macrosporus*, *T. liani* และ *T. muroii* และ เชื้อราสกุล *Talaromyces* จำนวน 2 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ และอีก 3 ไอโซเลตที่ยังไม่ได้ระบุสปีชีส์ (ตารางที่ 4.7)



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces* ATM11-01 เพาะเลี้ยงบน (ก) อาหาร PDA (ข) อาหาร MEA เสริมด้วย sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 5 วัน (ค) ลักษณะ ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (ง-จ) ลักษณะ ascocarp (ฉ-ช) ascus (ช-ญ) ลักษณะ ascospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ตารางที่ 4.5 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และสีโคโลนีของเชื้อราต่อต้าน

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี วันที่ 5 (มิลลิเมตร)		สีโคโลนี	
	อาหาร PDA	อาหาร MEA เสริม ด้วย sucrose 40%	อาหาร PDA	อาหาร MEA เสริม ด้วย sucrose 40%
ATM01-03	37.27	52.69	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM01-05	32.01	19.32	เหลือง	ขาว
ATM01-07	33.52	18.10	เหลือง	ขาว
ATM03-01	30.65	19.45	เหลือง	ขาว
ATM03-02	39.59	43.76	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM05-01	40.44	44.24	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM06-01	42.02	45.76	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM06-03	35.46	25.98	เหลืองปนส้ม	เทา
ATM07-01	24.11	25.05	เหลือง	เทา
ATM07-06	31.92	21.01	เหลือง	ขาว
ATM07-07	36.59	25.24	เหลืองปนส้ม	เทา
ATM07-08	31.45	22.13	เหลือง	ขาว
ATM09-01	51.14	46.82	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM09-04	43.59	45.14	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM11-01	27.38	19.17	เหลืองปนเขียว	เขียว
ATM14-01	63.34	38.95	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM14-02	47.98	44.70	ขาวนวล	ขาวปนเขียว
ATM15-01	41.83	46.44	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM16-01	34.13	22.31	เหลือง	ขาว
ATM17-01	42.36	41.78	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM17-02	38.56	45.89	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM17-03	65.50	46.09	ขาวครีม	ขาวปนเขียวอ่อน
ATM18-01	45.50	35.93	ขาว	ขาวปนเขียว
ATM18-02	62.15	38.13	ขาวครีม	ขาวปนเขียวอ่อน
ATM18-03	49.08	51.18	ขาว	ขาวปนเขียว

ตารางที่ 4.6 ตารางแสดงข้อมูลสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosortarya* และ *Talaromyces* จำนวน 25 ไอโซเลต

ไอโซเลต	Ascocarp		Ascus		Ascospore		ridge
	รูปร่าง	ขนาด	รูปร่าง	ขนาด	รูปร่าง	ขนาด	
ATM14-02	globose - subglobose	63.32-110.39× 71.34-125.74	globose - ellipsoidal	8.90-12.11× 9.62-10.97	globose- broadly ellipsoidal	4.76-5.91× 4.73-5.77	พบ
ATM17-03	globose-subglobose	68.88-137.03× 82.46-145.99	globose - subglobose	7.77-10.32× 8.01-11.35	globose- subglobose	4.19-5.22× 4.47-5.41	พบ
ATM18-02	globose-subglobose	88.69-184.57× 92.76-177.76	globose - subglobose	9.22-13.84× 9.33-12.75	globose- subglobose	4.70-5.33× 4.78-5.41	พบ
ATM01-03	globose- broadly ellipsoidal	90.21-210.71× 101.00-230.31	globose - subglobose	8.85-8.92× 9.20-9.93	Globose- subglobose	4.35-5.19× 4.41-5.17	พบ
ATM03-02	globose- broadly ellipsoidal	79.47-276.41× 81.79-286.11	globose - subglobose	8.76-10.55× 8.44-11.27	globose- subglobose	4.17-5.5× 4.19-5.64	พบ
ATM06-01	globose- broadly ellipsoidal	96.67-289.47× 109.00-294.93	globose - subglobose	7.30-11.11× 8.64-11.78	globose- subglobose	4.04-4.83× 4.27-4.89	พบ
ATM05-01	globose- broadly ellipsoidal	90.17-246.91× 110.00-280.06	globose - subglobose	8.11-10.97× 8.53-12.12	globose - subglobose	4.07-5.38× 4.07-5.34	พบ

ตารางที่ 4.6 ตารางแสดงข้อมูลสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosortarya* และ *Talaromyces* จำนวน 25 ไอโซเลต (ต่อ)

ไอโซเลต	Ascocarp		Ascus		Ascospore		ridge
	รูปร่าง	ขนาด	รูปร่าง	ขนาด	รูปร่าง	ขนาด	
ATM09-01	globose-	99.75-274.43x	globose-	7.81-11.78x	globose-	4.17-5.45x	พบ
	broadly ellipsoidal	110.92-267.67	subglobose	7.41-12.00	subglobose	4.24-5.52	
ATM09-04	globose-	103.24-274.43x	globose -	8.96-13.74x	globose-	4.19-5.60x	พบ
	broadly ellipsoidal	114.92-284.67	subglobose	9.2-14.01	subglobose	4.37-5.68	
ATM14-01	globose-	88.95-167.00x	globose -	8.88-13.26x	globose-	4.69-5.55x	พบ
	broadly ellipsoidal	90.00-190.47	subglobose	9.04-12.67	subglobose	5.015.48	
ATM15-01	globose-	100.07-249.18x	globose -	9.59-13.04x	globose-	4.49-5.16x	พบ
	broadly ellipsoidal	109.80-214.33	subglobose	10.02-12.85	subglobose	4.45-5.35	
ATM17-01	globose-subglobose	86.91-176.84x	globose -	8.75-12.99x	globose-	4.37-5.23x	พบ
		97.51-176.43	subglobose	8.61-13.41	subglobose	4.61-5.17	
ATM17-02	globose-subglobose	92.99-204.31x	globose -	7.95-13.11x	globose-	4.88-5.36x	พบ
		97.65-169.00	subglobose	8.55-12.99	subglobose	4.87-5.39	
ATM18-01	globose-subglobose	94.55-156.36x	globose -	8.5-13.04x	globose -	4.24-5.37x	พบ
		101.47-197.11	subglobose	9.16-12.16	subglobose	4.48-5.29	
ATM18-03	globose - subglobose	90.89-176.99x	globose -	8.40-10.87x	globose -	4.48-5.09x	พบ
		75.43-195.00	subglobose	8.41-11.00	subglobose	4.38-5.03	

ตารางที่ 4.6 ตารางแสดงข้อมูลสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosortarya* และ *Talaromyces* จำนวน 25 ไอโซเลต (ต่อ)

ไอโซเลต	Ascocarp		Ascus		Ascospore		
	รูปร่าง	ขนาด	รูปร่าง	ขนาด	รูปร่าง	ขนาด	ridge
ATM06-03	subglobose –	109.79-267.33x	globose -	8.98-11.56x	ellipsoidal	4.01-5.04x	ไม่พบ
	broadly ellipsoidal	124.11-324.19	subglobose.	9.87-12.64		5.25-6.08	
ATM07-07	subglobose –	96.52-374.06x	globose -	8.81-10.76x	ellipsoidal	4.28-5.17x	ไม่พบ
	broadly ellipsoidal	109.47-342.11	subglobose.	9.43-12.14		5.05-6.34	
ATM01-05	subglobose –	107.61-284.94x	globose -	9.00-12.85x	ellipsoidal	2.54-3.05x	ไม่พบ
	broadly ellipsoidal	110.34-301.51	subglobose.	9.16-13.15		3.04-4.09	
ATM01-07	subglobose –	130.61-245.94x	globose -	8.00-12.12x	ellipsoidal	2.77-3.33x	ไม่พบ
	broadly ellipsoidal	140.34-265.18	subglobose.	8.10-12.71		3.31-4.43	
ATM03-01	subglobose –	137.68-299.99x	globose -	7.6-11.06x	ellipsoidal	2.37-3.17x	ไม่พบ
	broadly ellipsoidal	149.24-295.33	subglobose.	7.9-11.24		2.48-3.21	
ATM07-06	subglobose –	167.67-287.64x	globose -	9.00-11.97x	ellipsoidal	2.34-3.08 x	ไม่พบ
	broadly ellipsoidal	187.23-298.65	subglobose.	9.17-11.65		3.60-3.94	
ATM07-08	subglobose –	109.99-330.05x	globose -	8.79-12.55x	ellipsoidal	2.3-3.01 x	ไม่พบ
	broadly ellipsoidal	126.29-341.20	subglobose.	9.13-12.66		3.16-4.05	

ตารางที่ 4.6 ตารางแสดงข้อมูลลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Neosortarya* และ *Talaromyces* จำนวน 25 ไอโซเลต (ต่อ)

ไอโซเลต	Ascocarp		Ascus		Ascospore		ridge
	รูปร่าง	ขนาด	รูปร่าง	ขนาด	รูปร่าง	ขนาด	
ATM16-01	globose-	92.44-261.01×	globose -	9.44-13.02×	ellipsoidal	2.56-3.40×	ไม่พบ
	broadly ellipsoidal	93.09-305.05	subglobose	9.95-12.47		3.62-4.32	
ATM07-01	globose -	92.77-267.04×	subglobose	8.71-11.11×	ellipsoidal	4.68-5.32×	ไม่พบ
	broadly ellipsoidal	100.47-242.11×		9.85-13.29		6.02-7.00	
ATM11-01	globose - subglobose	86.79-159.67×	subglobose	6.97-11.07×	ellipsoidal	3.19-3.83×	ไม่พบ
		91.46-162.05		7.47-12.96		3.95-4.99	

ตารางที่ 4.7 ผลการบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง β -tubulin

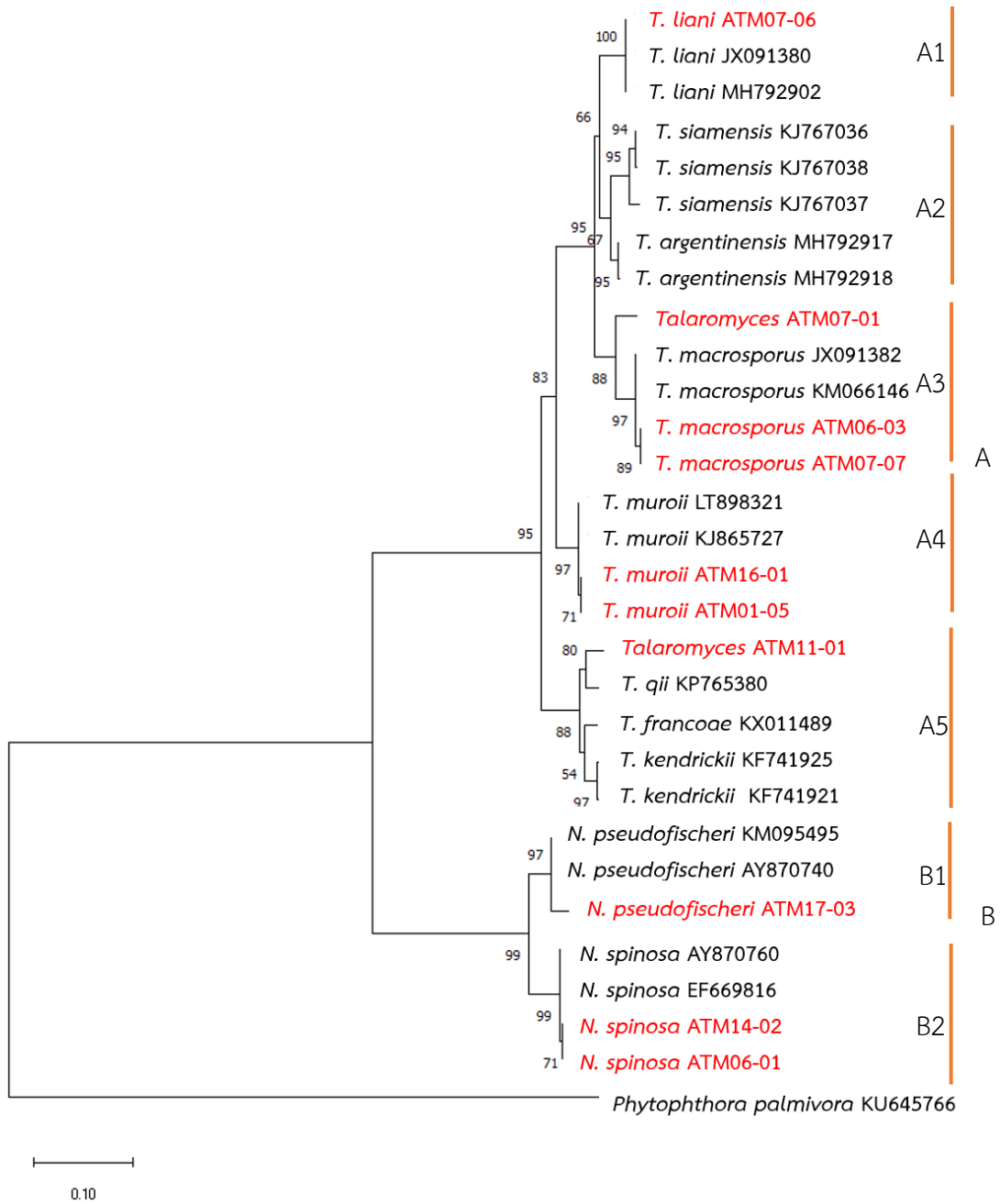
ไอโซเลต	การบ่งชี้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา	การบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์			
		สปีชีส์	ขนาดนิวคลีโอไทด์	%identity	Accession
ATM14-02	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>N. spinosa</i>	560	99.80	AY870760
ATM17-02	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>N. spinosa</i>	560	99.80	AY870760
ATM15-01	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>N. spinosa</i>	560	99.80	AY870760
ATM03-02	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>N. spinosa</i>	560	99.80	AY870760
ATM09-01	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>N. spinosa</i>	560	99.80	AY870760
ATM06-01	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>N. spinosa</i>	560	99.80	AY870760
ATM05-01	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>N. spinosa</i>	560	99.80	AY870760
ATM17-03	<i>Neosartorya</i> sp.	<i>N. pseudofischeri</i>	553	97.83	KM095495
ATM06-03	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>T. macrosporus</i>	462	99.25	JX091382
ATM07-07	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>T. macrosporus</i>	462	99.25	JX091382
ATM07-06	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>T. liani</i>	462	99.78	MH792920
ATM01-05	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>T. muroii</i>	461	98.88	LT898321
ATM16-01	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>T. muroii</i>	461	98.88	LT898321
ATM07-01	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>Talaromyces</i> sp.	451	-	-
ATM11-01	<i>Talaromyces</i> sp.	<i>Talaromyces</i> sp.	465	-	-

หมายเหตุ: - คือ ไม่สามารถระบุได้

4.2.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces*

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จำนวน 15 ไอโซเลต ที่ตำแหน่ง β -*tubulin* ด้วยคู่ Bt2a และ Bt2b (ตารางที่ 4.7) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 10 ไอโซเลต มาศึกษาความสัมพันธ์ด้วยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum Likelihood ที่มีค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 พบว่าเชื้อราต่อต้านทั้ง 10 ไอโซเลต ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.10) โดยกลุ่ม A จะแสดงความสัมพันธ์กับเชื้อราสกุล *Talaromyces* ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มย่อย กลุ่ม A1 เชื้อรารหัส ATM07-06 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *T. liani* กลุ่ม A2 เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรารหัส ATM07-01 พบว่าเชื้อรารหัส ATM07-01 ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มย่อย A2 แต่มีความใกล้ชิดกับเชื้อราในกลุ่ม A3 โดยที่กลุ่ม A3 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อรา *T. macrosporus* กับเชื้อราต่อต้านรหัส ATM06-03 และ ATM07-07 แต่อย่างไรก็ตามด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรารหัส ATM07-01 และ รหัส ATM06-03 และ ATM07-07 มีความแตกต่าง จึงทำให้เชื้อรา ATM07-01 ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่ม A3 ความสัมพันธ์ของกลุ่ม A4 แสดงให้เห็นว่าเชื้อรารหัส ATM01-05 และ ATM16-01 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *T. muroii* และกลุ่ม A5 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อราต่อต้านรหัส ATM11-01 พบว่าเชื้อราต่อต้านมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อรา *T. qii*

กลุ่ม B แสดงความสัมพันธ์กับเชื้อราสกุล *Neosartorya* สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่ม B1 มีเชื้อรา ATM06-01 และ ATM14-02 ที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *N. spinosa* และ B2 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อรา ATM17-03 ที่จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา *N. pseudofischeri*



รูปที่ 4.10 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง β -tubulin ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จำนวน 10 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Maximum Likelihood

4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรค

ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคในระดับห้องปฏิบัติการของเชื้อราที่คัดแยกได้จากต้นหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการโรคลำต้นไหม้จากเชื้อรา *P. asparagi* จำนวน 10 ไอโซเลต รหัส ASPA01 ถึง ASPA10 โดยทดสอบในสภาวะปิดในกล่องควบคุมความชื้น เป็นเวลา 5 วัน โดยพิจารณาความรุนแรงของการก่อโรคจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบาดแผลที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณหาค่าพื้นที่ของบาดแผลเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางด้วยชิ้นวุ้นปราศจากเชื้อรา (รูปที่ 4.11ก) พบว่ามีเชื้อรา *P. asparagi* จำนวน 3 ไอโซเลต เท่านั้น ที่แสดงอาการของโรคบนผิวของต้นหน่อไม้ฝรั่ง (รูปที่ 4.11ข-ง) ได้แก่ รหัส ASPA03, ASPA08 และ ASPA10 โดยรหัส ASPA03 มีพื้นที่ของบาดแผลมากที่สุด เท่ากับ 108.63 ± 7.6 ตารางมิลลิเมตร (รูปที่ 4.11ข) ตามด้วย ASPA08 และ ASPA10 มีพื้นที่ของบาดแผลเท่ากับ 55.62 ± 7.7 และ 44.28 ± 2.66 ตารางมิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.11ค-ง) และผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส จำนวน 8 ไอโซเลต รหัส ASCG01 ถึง ASCG08 โดยทดสอบในสภาวะปิดในกล่องควบคุมความชื้น เป็นเวลา 7 วัน โดยพิจารณาความรุนแรงของการก่อโรคจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบาดแผลที่เกิดขึ้น พบว่าเมื่อเปรียบเทียบขนาดพื้นที่ของบาดแผลกับชุดควบคุม (รูปที่ 4.12ก) เชื้อราสาเหตุโรค รหัส ASCG06 มีพื้นที่ของบาดแผลกว้างมากที่สุด (รูปที่ 4.12ข) เท่ากับ 43.72 ± 1.6 ตามด้วย ASCG08, ASCG03, ASCG01, ASCG04 และ ASCG05 เท่ากับ 16.59 ± 4.4 , 15.32 ± 1.6 , 15.27 ± 1.5 , 12.71 ± 1.5 และ 10.43 ± 1.05 ตามลำดับ (รูปที่ 4.12ค-ข) ในการบันทึกภาพการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *C. gloeosporioides* จะต้องนำชิ้นวุ้นออกก่อนการบันทึกภาพเพื่อแสดงบาดแผลให้เห็นได้อย่างชัดเจน เนื่องจากขนาดของบาดแผลมีขนาดเล็กกว่าชิ้นวุ้น

หลังการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* รหัส ASPA03 และ *C. gloeosporioides* รหัส ASCG06 จะถูกนำไปแยกด้วยวิธี tissue transplanting อีกครั้ง (re-isolate) และศึกษาลักษณะของเชื้อราเพื่อยืนยันว่าอาการที่แสดงบนผิวต้นหน่อไม้ฝรั่งนั้นมาจากเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides* และใช้เชื้อราที่แยกได้ดังกล่าวไปศึกษาการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture ต่อไป



รูปที่ 4.11 แสดงบาดแผลจากการทดสอบความสามารถการก่อโรคของเชื้อรา *Phomopsis asparagi* (ก) ชุดควบคุม (ข) ASPA03 (ค) ASPA08 และ (ง) ASPA10



รูปที่ 4.12 แสดงบาดแผลจากการทดสอบความสามารถการก่อโรคของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (ก) ชุดควบคุม (ข) ASCG06 (ค) ASCG08 (ง) ASCG03 (จ) ASCG01 (ฉ) ASCG04 และ (ช) ASCG05

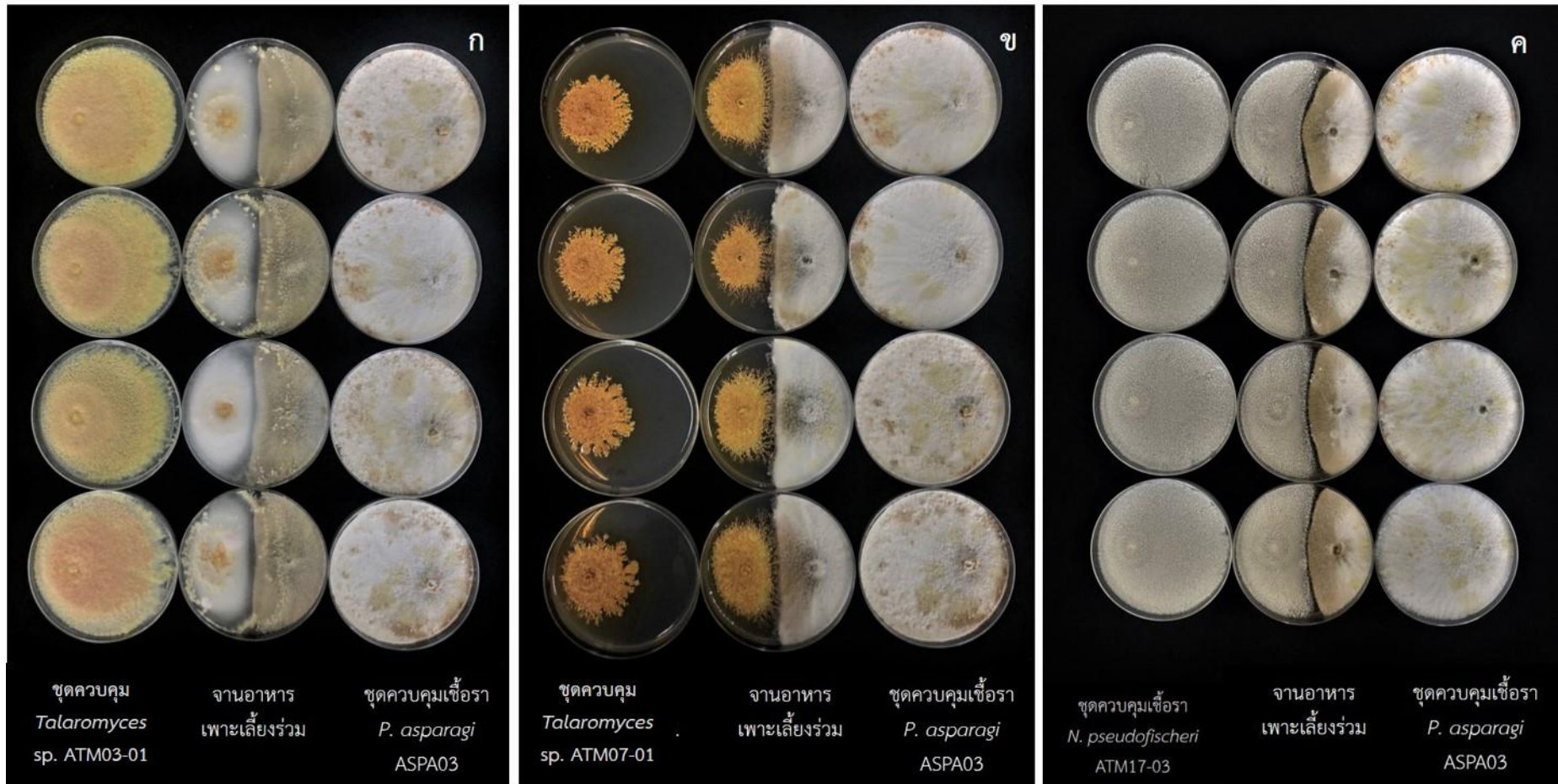
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านจำนวน 25 ไอโซเลต ประกอบด้วยเชื้อราสกุล *Neosartorya* จำนวน 15 ไอโซเลต และเชื้อราสกุล *Talaromyces* จำนวน 10 ไอโซเลต ในการควบคุมเชื้อ *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 เป็นเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้ และแอนแทรคโนสในหน่อไม้ฝรั่ง ที่ทดสอบระดับห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบบนจานอาหารเพาะเลี้ยงร่วม PDA เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ต่อเชื้อรา *P. asparagi* ASPA03 เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคโดยเชื้อรา *Talaromyces* ATM03-01 มีประสิทธิภาพในการควบคุมดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ (% spore inhibition) เท่ากับ 85.33 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.12ก) รองลงมาเป็นเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ เท่ากับ 79.83 เปอร์เซ็นต์ โดยจะสังเกตได้ว่าเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 (รูปที่ 4.12ข) นั้นมีการสร้างวงใส (Clear zone) รอบโคโลนี (รูปที่ 4.12ข) และในเชื้อราสกุล *Neosartorya* พบว่า เชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์สูงที่สุด เท่ากับ 72.13 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.12ค) นอกจากนี้ หากพิจารณาถึงประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านทั้ง 25 ไอโซเลต พบว่ามีเชื้อราต่อต้านทั้งหมด 16 ไอโซเลต ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* ASPA03 มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8)

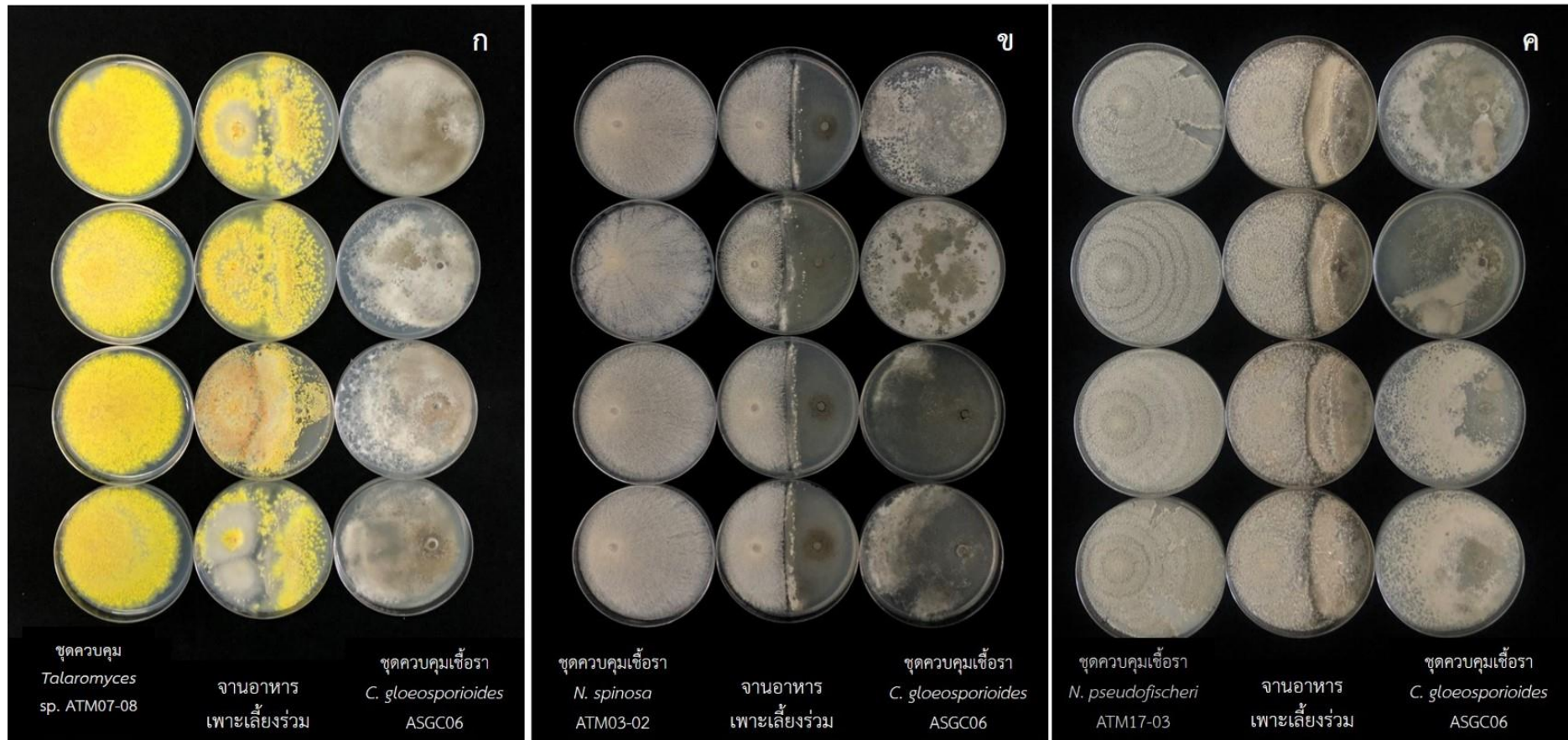
การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านทั้ง 25 ไอโซเลต ในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ASCG06 พบว่า เชื้อรา *Talaromyces* ATM07-08 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ถึง 89.65 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.13ก) ตามด้วยเชื้อรา *N. spinosa* ATM03-02 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 85.01 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.13ข) ซึ่งไม่แตกต่างจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ เท่ากับ 84.17 เปอร์เซ็นต์ จากเชื้อราต่อต้านทั้ง 25 ไอโซเลต มีเชื้อราต่อต้านจำนวน 22 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

การสร้างสปอร์ มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.8) สอดคล้องกับรายงานประสิทธิภาพของเชื้อ *T. muroii* และ *N. pseudofischeri* ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค *C. coffeanum* ได้ถึง 84.95 และ 68.45 เปอร์เซ็นต์ (เมอมร, 2558) และ Eamvijan และคณะ (2009) ได้คัดเลือกเชื้อราสกุล *Neosartorya* หลายสปีชีส์ และทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าเชื้อ *N. spinosa* สามารถควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ 30-40 เปอร์เซ็นต์ บนจานอาหารเพาะเลี้ยงร่วม นอกจากนี้ยังมีรายงานประสิทธิภาพของเชื้อ *T. muroii*, *N. pseudofischeri* และ *N. spinosa* ในยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* เชื้อราสาเหตุโรครากและโคนเน่าในทุเรียน ได้ 67.50, 48.32 และ 49.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (สุภานัน, 2560) และยังสามารถควบคุมเชื้อ *Alternaria brassicicola* เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในคะน้า ได้ถึง 50.55, 71.99 และ 79.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Punyanobpharat และคณะ, 2018)

จากข้อมูลดังกล่าวการคัดเลือกเชื้อต่อต้านทั้ง 25 ไอโซเลต ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 ได้เลือกเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 และ *Talaromyces* ATM07-01 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สปีชีส์ได้ดี จึงนำไปทดสอบในขั้นตอน poison food technique ต่อไป



รูปที่ 4.12 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Phomopsis asparagi* ASPA03 ด้วย (ก) เชื้อรา *Talaromyces* sp ATM03-01 (ข) *Talaromyces* ATM07-01 (ค) *Neosaryorya Pseudofischeri* ATM17-03



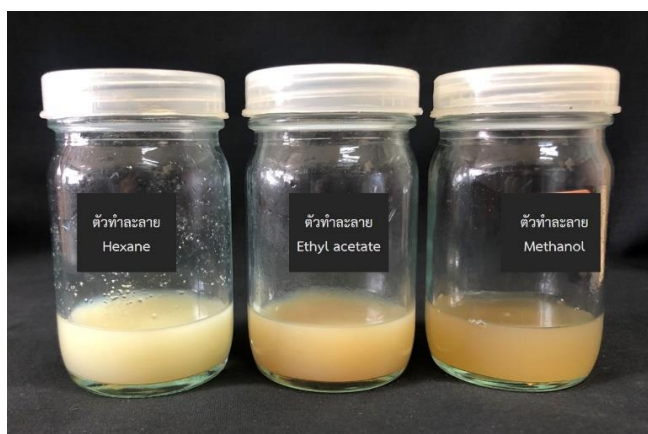
รูปที่ 4.13 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*. ASGC06 ด้วย (ก) เชื้อรา *Talaromyces* ATM07-08 (ข) *Neosartorya spinosa* ATM03-02 (ค) *Neosartorya pseudofischeri* ATM17-03

ตารางที่ 4.8 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

เชื้อราต่อต้าน	% spore inhibition	
	<i>P. asparagi</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
	ASPA03	ASCG06
<i>N. spinosa</i> ATM01-03	37.45 ^k	33.78 ^m
<i>T. muroii</i> ATM01-05	66.26 ^{cdef}	79.85 ^{bc}
<i>Talaromyces</i> ATM01-07	45.57 ^j	84.54 ^{ab}
<i>Talaromyces</i> ATM03-01	85.33 ^a	83.70 ^b
<i>N. spinosa</i> ATM03-02	70.45 ^{cd}	85.01 ^{ab}
<i>N. spinosa</i> ATM05-01	47.09 ^{ij}	62.27 ^{hij}
<i>N. spinosa</i> ATM06-01	66.53 ^{cdef}	64.72 ^{fg}
<i>T. macrosporus</i> ATM06-03	30.80 ^l	80.68 ^{bc}
<i>Talaromyces</i> ATM07-01	79.83 ^b	75.44 ^{cd}
<i>T. liani</i> ATM07-06	38.13 ^k	75.47 ^{cd}
<i>T. macrosporus</i> . ATM07-07	55.68 ^{gh}	83.92 ^b
<i>Talaromyces</i> ATM07-08	53.53 ^h	89.65 ^a
<i>N. spinosa</i> ATM09-01	25.19 ^m	46.50 ^l
<i>N. spinosa</i> ATM09-04	38.13 ^k	58.66 ^{ijk}
<i>Talaromyces</i> ATM11-01	52.64 ^{hi}	57.90 ^{jk}
<i>N. spinosa</i> ATM14-01	65.00 ^{def}	44.86 ^l
<i>N. spinosa</i> ATM14-02	53.79 ^h	56.47 ^{kl}
<i>N. spinosa</i> ATM15-01	46.62 ^j	63.43 ^{ghi}
<i>T. muroii</i> ATM16-01	65.06 ^{def}	84.86 ^{ab}
<i>N. spinosa</i> ATM17-01	63.12 ^{ef}	72.49 ^{de}
<i>N. spinosa</i> ATM17-02	46.46 ^j	69.10 ^{ef}
<i>N. pseudofischeri</i> ATM17-03	72.13 ^c	84.17 ^b
<i>N. spinosa</i> ATM18-01	50.23 ^{hij}	58.21 ^{ijk}
<i>N. pseudofischeri</i> ATM18-02	68.99 ^{cde}	68.49 ^{efg}
<i>N. spinosa</i> ATM18-03	60.87 ^{fg}	67.62 ^{efg}

4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านทั้ง 25 ไอโซเลต ต่อการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture สามารถคัดเลือกเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 และเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 สำหรับการสกัดสารจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 และ *Talaromyces* ATM07-01 ด้วยวิธีการหมักเส้นใยราที่ผ่านการอบแห้งแล้วกับตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติมีขั้วที่แตกต่างกัน เริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ ตัวทำละลายเฮกเซน ขั้วกลาง คือ ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และสุดท้ายตัวทำละลายเมทานอลที่มีขั้วสูง ลักษณะสีของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 ในตัวทำละลายเฮกเซนจะมีสีขาวนวลปนเหลือง และตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล จะมีสีเหลืองส้มแตกต่างกันเล็กน้อย (รูปที่ 4.14) และ สีของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 ทำละลายเฮกเซนจะมีสีขาวนวลปนเหลือง ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท มีสีน้ำตาลอิฐ และตัวทำละลายเมทานอลจะมีสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 4.15) สารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลายจะถูกผสมกับอาหารเพาะเลี้ยง PDA เพื่อทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 4.14 แสดงสีของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 ในตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และตัวทำละลายเมทานอล



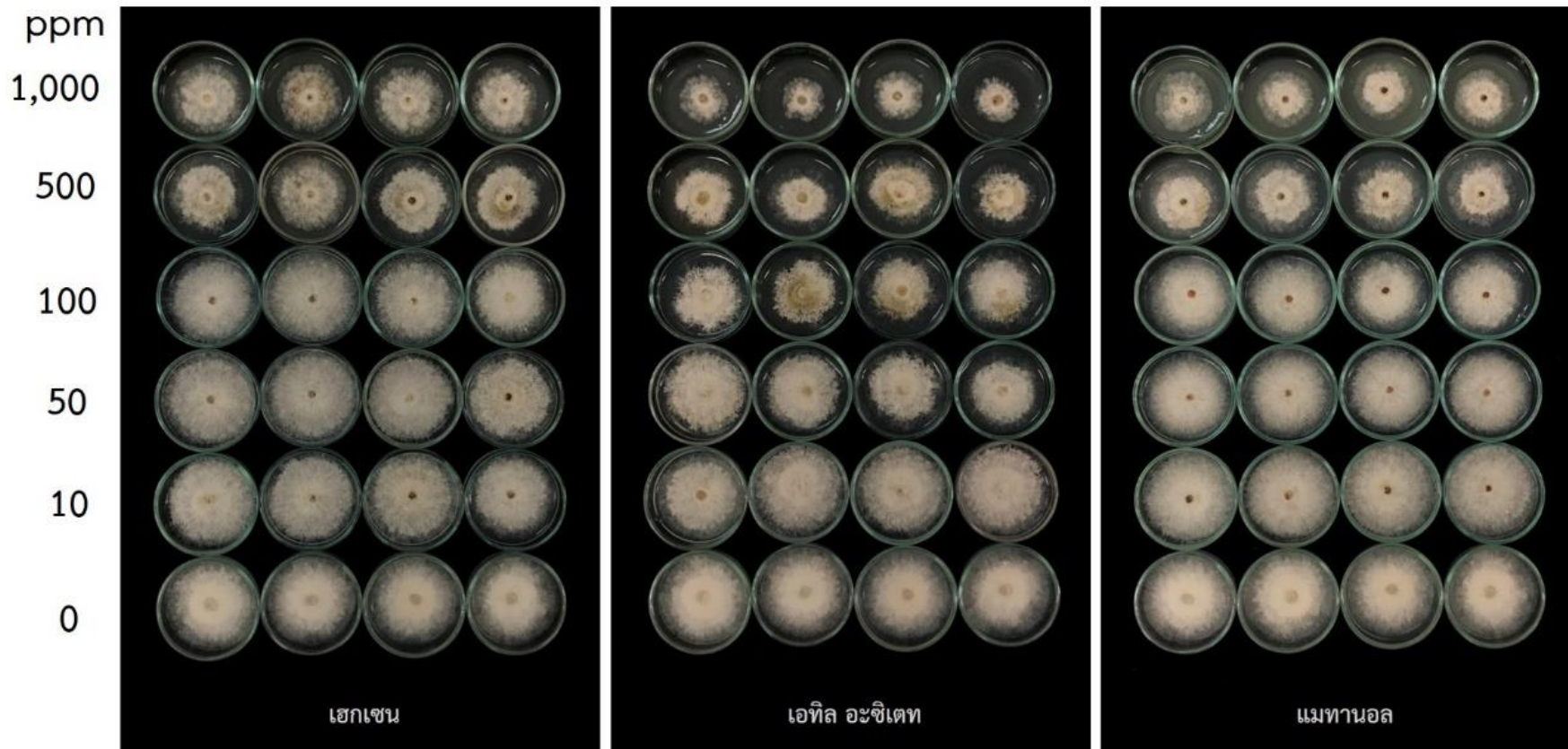
รูปที่ 4.15 แสดงสีของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 ในตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และตัวทำละลายเมทานอล

4.5.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบของเชื้อรา *Neosartorya pseudofischeri* ATM17-03 ในการควบคุมเชื้อรา *Phomopsis asparagi* และ *Colletotrichum gloeosporioides*

ผลการทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. asparagi* ASPA03 บนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล ของเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 ที่ความเข้มข้น 0 (control), 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีขนาดโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคเล็กกว่าโคโลนีบนจานอาหารที่มีความเข้มข้นต่ำ เช่นเดียวกับกับบนจานอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล แต่ขนาดโคโลนีบนจานอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนนั้นในแต่ละความเข้มข้นมีขนาดของโคโลนีที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.16) เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยในทุก ๆ ระดับความเข้มข้น พบว่าจานอาหารที่มีความเข้มข้น 1,000 ppm ของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุด เท่ากับ 48.73 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล และเฮกเซน ที่ 38.66 และ 29.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์มากที่สุดถึง 82.47 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีประสิทธิภาพเท่ากับ 70.88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคำนวณค่า ED₅₀ (Effective Dose) ของสารสกัดในแต่ละตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท มีค่าเท่ากับ 11.67 ppm ตามมาด้วยสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอลเท่ากับ 118.12 ppm และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนมีค่ามากกว่า 1,000 ppm (ตารางที่ 4.9)

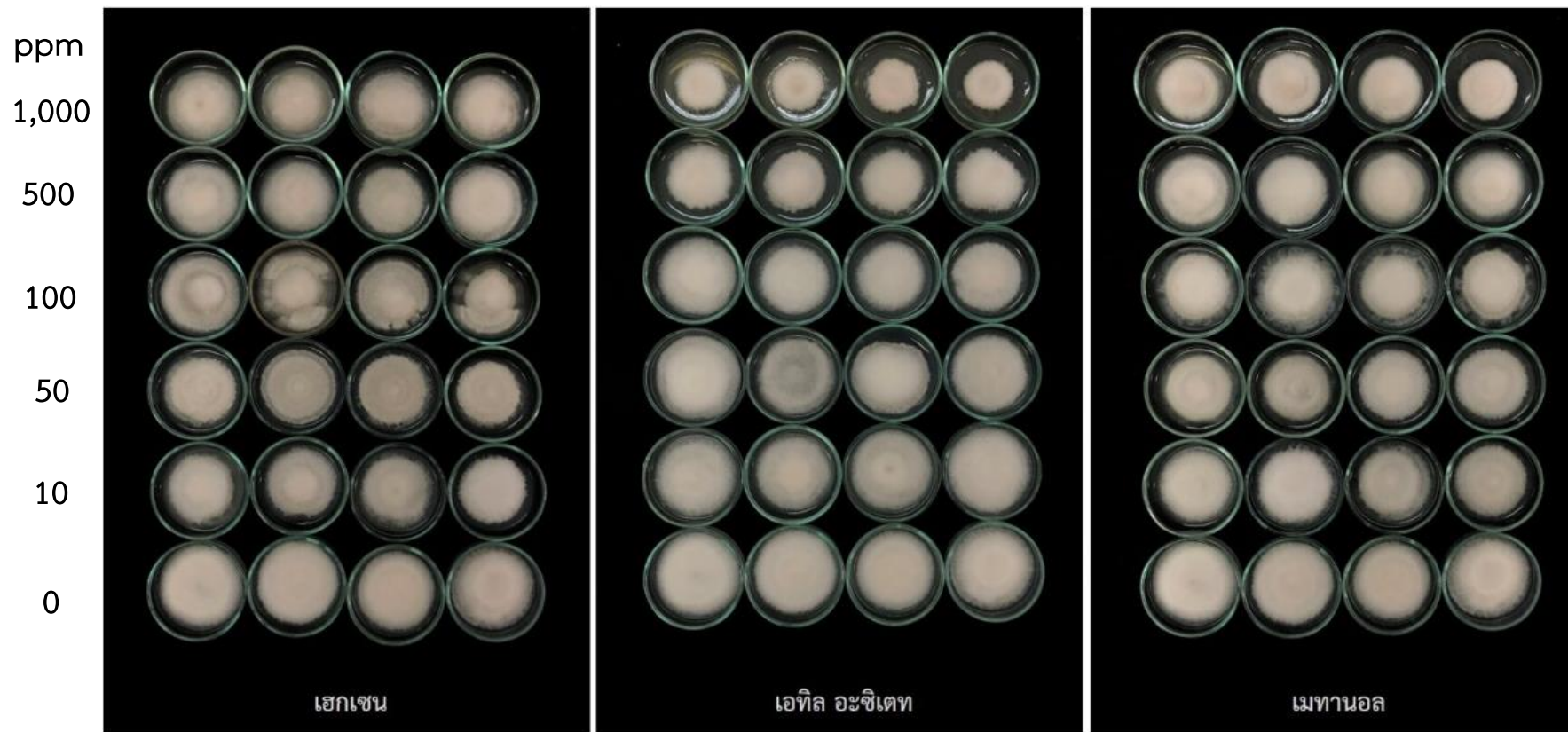
สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบของเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 ต่อเชื้อ *C. gloeosporioides* ASCG06 ที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยง PDA พบว่าขนาดของโคโลนีบนอาหารที่ผสมด้วยสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล ที่ความเข้มข้นสูงมีขนาดของโคโลนีเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนสารสกัดหยาบตัวจากทำละลายเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีขนาดของโคโลนีที่ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.17) และนำขนาดโคโลนีคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยพบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญที่ 44.54 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารสกัดหยาบจากเมทานอลและเฮกเซนเท่ากับ 29.05 และ 28.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุดที่ 70.17 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารสกัดจากตัวทำละลายเมทานอล และเฮกเซน มีค่าเท่ากับ 66.10 และ 51.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อคำนวณค่า ED₅₀ ของสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท มีค่าเท่ากับ 95.09 ppm สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล เท่ากับ 119.12 ppm และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน เท่ากับ 969.97 ppm (ตารางที่ 4.10)



รูปที่ 4.16 แสดงการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Phomopsis asparagi* ASPA03 บนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดยับยั้งจากเชื้อ *Neosartorya pseudofischeri* ATM17-03

ตารางที่ 4.9 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Neosartorya pseudofischeri* ATM17-03 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Phomopsis asparagi* ASPA03

สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลางโลนี (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งกาเจอร์มิ	ปริมาณสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการ สร้างสปอร์	ED ₅₀ (ppm)
เฮกเซน	0	50	0.0	8.50	0	>1,000
	10	48.55	2.90	7.20	12.91	
	50	48.47	3.06	6.45	23.04	
	100	47.43	5.14	5.71	32.84	
	500	37.29	25.42	5.06	40.52	
	1000	35.45	29.10	4.30	49.02	
เอทิล อะซิเตท	0	50	0.0	8.32	0	11.67
	10	48.22	3.57	4.68	43.74	
	50	43.25	13.51	3.31	60.27	
	100	40.69	18.62	2.58	68.95	
	500	34.54	30.92	2.00	75.96	
	1000	25.64	48.73	1.46	82.47	
เมทานอล	0	50	0.0	8.35	0	118.12
	10	48.28	3.46	6.55	21.46	
	50	46.58	6.84	5.68	31.95	
	100	45.66	8.69	4.72	43.43	
	500	36.05	27.91	3.19	61.73	
	1000	30.67	38.66	2.43	70.88	



รูปที่ 4.17 แสดงการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Colletotrichum gloeosporioides* ASCG06 บนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดจากเชื้อ *Neosartorya pseudofischeri* ATM17-03

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Neosartorya pseudofischeri* ATM17-03 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ASCG06

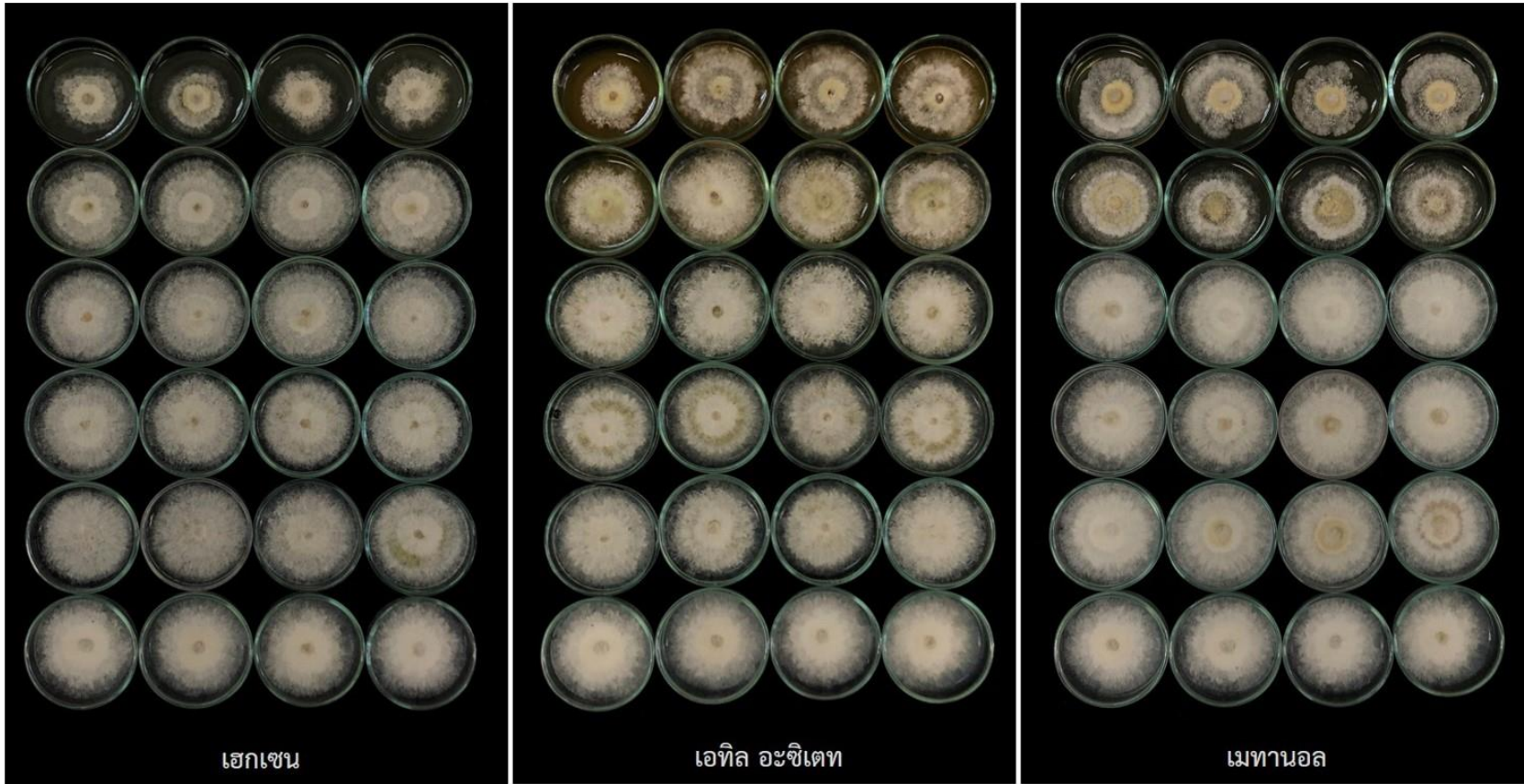
สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลางเส้น (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การ ยับยั้งกาเจอร์เรีย	ปริมาณสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการ สร้างสปอร์	ED ₅₀ (ppm)
เฮกเซน	0	50	0.0	14.42	0	969.97
	10	47.14	5.72	13.03	9.63	
	50	44.99	10.01	12.53	13.05	
	100	39.89	20.21	11.46	20.52	
	500	37.48	25.034	8.33	42.20	
	1000	35.72	28.55	7.05	51.11	
เอทิล อะซีเตท	0	50	0.0	14.38	0.0	95.09
	10	45.68	8.65	10.21	29.05	
	50	39.75	20.50	9.71	32.53	
	100	37.95	24.10	7.08	50.77	
	500	35.43	29.14	5.15	64.24	
	1000	27.73	44.54	4.29	70.17	
เมทานอล	0	50	0.0	14.19	0.0	119.12
	10	46.6	6.80	10.63	25.15	
	50	44.1	11.80	9.812	30.87	
	100	39.26	21.49	8.29	41.59	
	500	38.23	23.54	6.25	55.97	
	1000	35.48	29.05	4.81	66.10	

4.5.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบ *Talaromyces* ATM07-01 ในการควบคุมเชื้อรา *Phomopsis asparagi* และ *Colletotrichum gloeosporioides*

ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 ต่อเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* ASPA03 บนจานอาหารเพาะเลี้ยง PDA ที่ความเข้มข้น 0 (control), 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm เมื่อสังเกตการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค พบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีขนาดโคโลนีเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล มีขนาดของโคโลนีในแต่ละความเข้มข้นไม่แตกต่างกับชุดควบคุม เมื่อนำขนาดโคโลนีมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน มีประสิทธิภาพมากที่สุด เท่ากับ 28.98 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารสกัดหยาบจากเอทิล อะซิเตท และเมทานอล ที่มีประสิทธิภาพเท่ากับ 23.30 และ 23.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.18) สำหรับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีประสิทธิภาพมากที่สุด เท่ากับ 75.54 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเฮกเซน เท่ากับ 73.32 และ 62.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า ED₅₀ สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล มีค่าเท่ากับ 82.08 ppm สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเฮกเซน มีค่า 106.10 และ 503.50 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 ต่อเชื้อ *C. gloeosporioides* ASCG06 ในแต่ละตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ส่งผลต่อขนาดโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคเพียง 24.20 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล และเฮกเซน ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 21.84 และ 18.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.19) ถึงแม้ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจะมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยต่ำ แต่จากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์มากที่สุดถึง 66.86 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล และเฮกเซน มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง เท่ากับ 66.40 และ 53.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อคำนวณหาค่า ED₅₀ ของสารสกัดหยาบในแต่ละตัวทำละลาย สารสกัดจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท มีค่าเท่ากับ 103.10 ppm สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล เท่ากับ 166.16 ppm และสารสกัดหยาบจากเฮกเซน เท่ากับ 949.94 ppm (ตารางที่ 4.12)

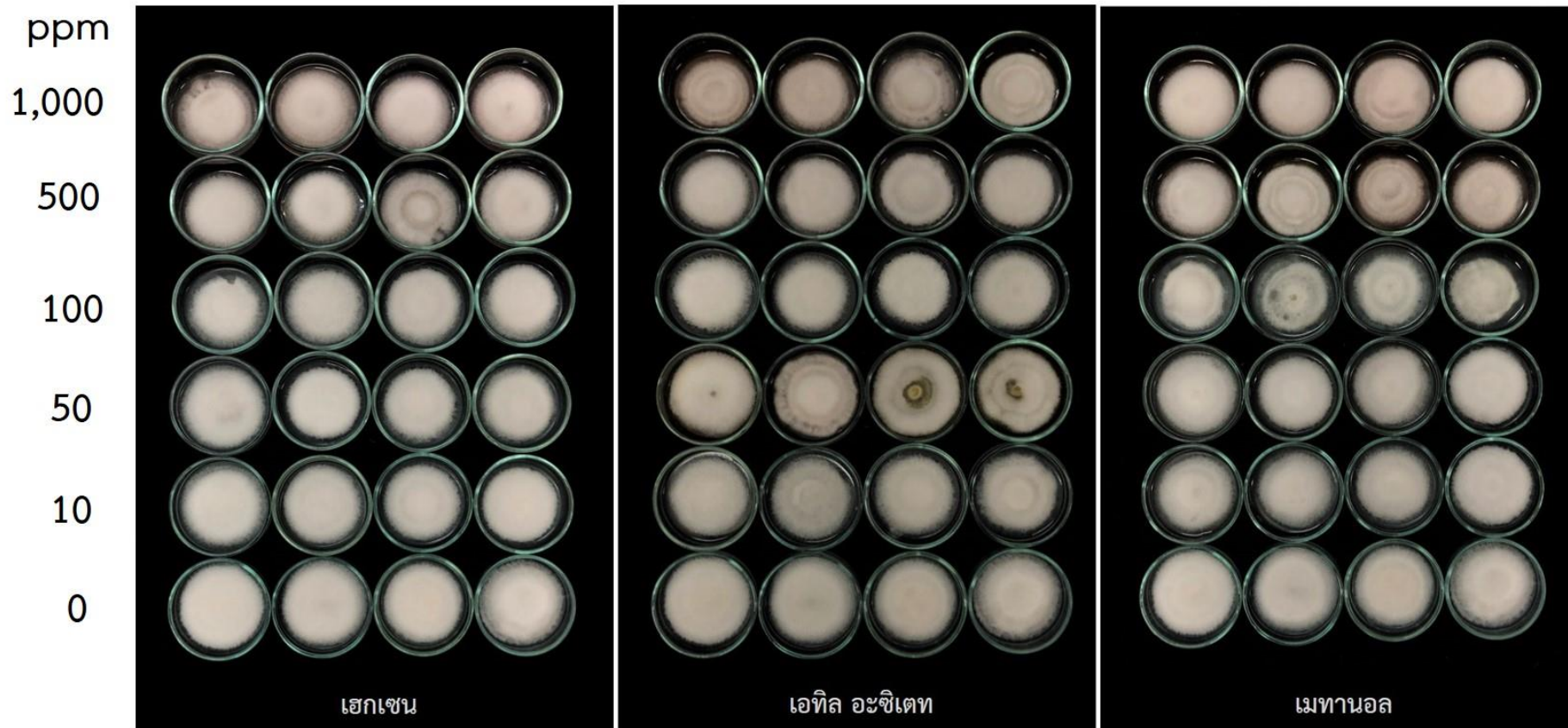
ppm
1,000
500
100
50
10
0



รูปที่ 4.18 แสดงการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Phomopsis asparagi* ASPA03 บนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดจากเชื้อ *Talaromyces* ATM07-01

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Talaromyces* ATM07-01 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Phomopsis asparagi* ASPA03

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางโลนี (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ	ปริมาณสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์	ED ₅₀ (ppm)
เฮกเซน	0	50	0.0	8.25	0.0	503.50
	10	48.65	2.71	6.95	15.76	
	50	48.55	2.90	6.25	24.24	
	100	48.32	3.36	5.375	38.85	
	500	48.34	3.36	4.19	49.24	
	1000	35.51	28.98	3.13	62.12	
เอทิลอะซิเตท	0	50	0.0	8.2	0.0	106.10
	10	48.61	2.79	6.13	25.30	
	50	48.56	2.85	5.19	36.74	
	100	48.12	3.77	4.31	47.41	
	500	45.14	9.72	2.81	65.70	
	1000	38.35	23.3	2.19	73.32	
เมทานอล	0	50	0	8.18	0.0	82.08
	10	48.61	2.76	5.44	33.48	
	50	48.63	2.74	4.31	47.24	
	100	48.23	3.54	3.31	59.48	
	500	43.51	12.98	2.63	67.89	
	1000	38.46	23.11	2.00	75.54	



รูปที่ 4.19 แสดงการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ASCG06 บนจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดจากเชื้อ *Talaromyces* ATM07-01

ตารางที่ 4.12 ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Talaromyces* ATM07-01 ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ASCG06

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางโลนี (มิลลิเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ	ปริมาณสปอร์ ($\times 10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์	ED ₅₀ (ppm)
เฮกเซน	0	50	0.0	14.25	0.0	949.94
	10	48.65	2.70	11.93	16.32	
	50	46.64	6.73	10.16	28.68	
	100	44.62	10.76	8.75	38.60	
	500	41.68	16.65	8.25	42.11	
	1000	40.98	18.04	6.63	53.51	
เอทิลอะซิเตท	0	50	0.0	14.1	0.0	103.10
	10	47.99	4.03	11.55	18.09	
	50	44.56	10.89	10.8	23.40	
	100	42.06	15.89	7.38	47.70	
	500	39.22	21.56	5.00	64.54	
	1000	37.90	24.20	4.25	69.86	
เมทานอล	0	50	0.0	14.14	0.0	166.16
	10	48.47	3.07	11.55	18.30	
	50	45.64	8.72	9.34	33.95	
	100	43.16	13.69	8.50	39.87	
	500	40.33	19.34	6.38	54.91	
	1000	39.08	21.84	4.75	66.40	

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *N. pseudofischeri* ATM17-03 ต่อเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 มากที่สุด โดยมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 11.67 และ 95.09 ppm ตามลำดับ และประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *Talaromyces* ATM07-01 พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. asparagi* ASPA03 มากที่สุด มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 82.08 ppm และสารสกัดจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ASCG06 มากที่สุด มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 103.10 ppm หากเปรียบเทียบ

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 และ *Talaromyces* ATM07-01 พบว่า สารสกัดจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ของเชื้อ *N. pseudofischeri* ATM17-03 มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด จากการรายงานของ Boonsang และคณะ (2014) สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท *N. pseudofischeri* ที่ความเข้มข้น 100 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการรุกรานสปอร์ของเชื้อรา *C. capspsici* และ *P. palmivora* ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และ เมอมร (2558) รายงานผลของ สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท จากเชื้อ *T. muroii* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการรุกรานสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 2.20 ppm และ สารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย methanol จากเชื้อ *T. trachyspermus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการรุกรานสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของสารสกัด 0.65 ppm

4.5.3 ผลการวิเคราะห์สารสำคัญจากสารสกัดหยาบ

การวิเคราะห์หาสารสำคัญจากสารสกัดหยาบในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล ของเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 และ *Talaromyces* ATM07-01 จำนวน 6 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 ในตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล พบสารจำนวน 12, 14 และ 9 ชนิด (ตารางที่ 4.13) สารที่ถูกวิเคราะห์ทั้งหมดจะสนใจสารที่มีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพหรือที่ส่งผลต่อการควบคุมจุลินทรีย์ สารสำคัญในตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 พบ Dispiro [5.2.5.2] hexadecane-1-one ถึง 61.99 เปอร์เซ็นต์ แต่สารสำคัญนี้ยังไม่มีข้อมูลการถูกนำไปใช้ในการทดสอบ ประสิทธิภาพในด้านต่าง ๆ และ สารErgosta-5,7,22- trien-3-ol ปริมาณที่พบ 13.47 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม Phytosterols เป็นสารที่สังเคราะห์มาจากเชื้อรา มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเชื้อรา (antifungal) รวมถึงด้านเภสัชกรรม มีการทดสอบประสิทธิภาพของสารสำคัญนี้โดย ทดสอบ ประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Candida albicans* เปรียบเทียบกับสารต้านเชื้อราชนิดอื่น ๆ พบว่าสาร Ergosta-5,7,22- trien-3-ol สามารถยับยั้งเชื้อราได้ถึง 73–75 เปอร์เซ็นต์ (Sardari และ คณะ, 2003) และ สาร9-Octadecenoic acid (z)-, Methyl ester ปริมาณที่พบ 2.269 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นสารจำพวก fatty acid มีรายงานการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.333, 1, 3.333 และ 10 มิลลิกรัมต่อเพลท พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดของการทดลอง ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเพาะเลี้ยง (Mortelmans และคณะ, 1986) จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากตัวทำละลายเฮกเซนของเชื้อ *N. pseudofischeri* ATM17-03 ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สปีชีส์ จากค่า ED₅₀ พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเฮกเซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการรุกรานสปอร์ต่ำ ต้องใช้ความเข้มข้นในการยับยั้งมากกว่า 1,000 ppm สารสำคัญดังกล่าวอาจไม่มีผลต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สปีชีส์ สารสำคัญจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ คือ Octadecanoic acid, ethyl ester จัดอยู่ในกลุ่มของ amino acid ปริมาณที่พบ 2.29 เปอร์เซ็นต์ จากการรายงานของ Sayed และ Asghar (2014) ที่มีการใช้ Octadecanoic acid, ethyl ester เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์

stearoyl hydrazide ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* ให้ผลลัพธ์เป็นบวก โดยใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุด เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Milbemycins ปริมาณที่พบ 2.47 เปอร์เซ็นต์ เป็นกลุ่มของ macrolides มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา และใช้ในด้านเภสัชกรรม โดย Silva และคณะ (2012) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ Milbemycin ในการควบคุมเชื้อรา *C. glabrata* ที่ผ่านการตัดแต่งพันธุกรรมการทำงานของยีน *CgPDR1* ที่มีการดื้อยา พบว่า Milbemycin มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราดังกล่าวที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสำคัญ Hecogenin มีปริมาณที่พบ 13.47 เปอร์เซ็นต์ โดย Hecogenin เป็นสารที่อยู่ในกลุ่ม steroid saponins ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและต้านแบคทีเรีย จากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2005) ที่พบว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของ Hecogenin กับเชื้อ *C. albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมเชื้อ *C. albicans* และที่ความเข้มข้น 1.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุม *C. neoformans* ได้ และจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ สารสำคัญ Octadecanoic acid, ethyl ester, Milbemycins และ Hecogenin อาจมีผลต่อการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สปีชีส์ ที่ใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพียง 11.67 ppm ในการควบคุมเชื้อ *P. asparagi* และ 95.09 ppm ในการควบคุมเชื้อ *C. gloeosporioides* สำหรับสารสำคัญที่ได้จากสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล พบ Fukinanolid ปริมาณที่พบ 47.55 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารจำพวก amino acid โดยมีรายงานกล่าวถึงประสิทธิภาพของสารดังกล่าวว่า มีฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อ *S. aureus*, *S. sobrinu*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* โดยที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดในการควบคุมเชื้อ *S. aureus* และ *S. sobrinu* ที่ 3.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อ *E. coli* เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *P. aeruginosa* เท่ากับ 15.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Mohadjerani และคณะ, 2016) 9-Octadecadienoic acid (z)-, Methyl ester และ 9,12-Octadecadienoic acid (z, z)-, Methyl ester ปริมาณที่พบ 14.19 และ 3.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นสารในกลุ่ม fatty acid ที่มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราและแบคทีเรีย และยังมีฤทธิ์เป็นยาฆ่าไส้เดือนฝอย (nematicide) (Ali และคณะ, 2007) และการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา Marimuthu และคณะ (2014) พบว่า สาร 9-Octadecadienoic acid (z)-, Methyl ester สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger*, *A. flavus* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม เกิดวงใส เท่ากับ 11 และ 14 มิลลิเมตร จากประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 ของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเมทานอล มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 118.12 และ 119.12 ppm อาจเกิดจากประสิทธิภาพของสารสำคัญดังกล่าว

ตารางที่ 4.13 สารสำคัญที่พบในสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อรา *Neosartorya pseudofischeri* ATM17-03

สารสกัด หยาบ	ชื่อสารสำคัญ	ปริมาณที่พบ (เปอร์เซ็นต์)
	Phenol, bis(1,1-dimethylethyla)-	1.19
	Benz [a] anthracene-4-ol, 7,12- dimethyl	4.61
	Octadecenoic acid, Methyl ester	1.79
	alpha-Cyperone	1.9
	Hexadecenoic acid, ethyl ester	1.95
	Isopropyl palmitate	4.16
เฮกเซน	Dispiro [5.2.5.2] hexadecane-1-one	61.99
	9-Octadecenoic acid (z)-, Methyl ester	2.269
	Phenol, 2,2'- [(1-methyl-1,2- estanediyl) bis (nitrilomethylidyne)] bis-	1.98
	Octadecenoic acid, ethyl ester	1.37
	9-Octadecenoic acid (z)-	3.28
	Ergosta-5,7,22- trien-3-ol,	13.47
	1,2,3- Propanetriol, monoacetate	5.38
	1,2,3- Propanetriol, diacetate	3.74
	Triacetin	3.09
	Hexadecenoic acid, ethyl ester	4.02
	Milbemycin b,13-chloro-5-demethoxy-28- deoxy-6,28-epoxy-5-(hydroxyimino)-25-(1- methylethyl	2.47
เอทิล อะซิเตท	n- Hexadecenoic acid	0.94
	dispiro [5.2.5.2] hexadecane-1-one	32.34
	Linoleic acid ethyl ester	1.91
	Ethyl oleate	6.70
	Octadecanoic acid, ethyl ester	2.29
	6H-purine-6-thione, 1, 7-dihydro-7-methyl-	1.24
	Di-n-octyl phthalate	7.81
	Hecogenin	16.74

ตาราง 4.13 สารสำคัญที่พบในสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อรา *Neosartorya pseudofischeri* ATM17-03 (ต่อ)

สารสกัด หยาบ	ชื่อสารสำคัญ	ปริมาณที่พบ (เปอร์เซ็นต์)
	Hexadecenoic acid, methyl ester	7.33
	Hexadecenoic acid, ethyl ester	5.25
	Fukinanolid	47.55
	9,12-Octadecadienoic acid (z, z)-, Methyl ester	3.91
เมทานอล	9-Octadecadienoic acid (z)-, Methyl ester	14.19
	Octadecadienoic acid, Methyl ester	2.52
	Linoleic acid ethyl ester	2.85
	Ethyl oleate	13.34
	Octadecadienoic acid, ethyl ester	2.92

สำหรับสารสำคัญของเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 ที่ได้จากสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน พบจำนวน 8 ชนิด และในตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล พบอย่างละ 1 ชนิด (ตารางที่ 4.14) โดยสารสำคัญส่วนใหญ่ที่พบจะจัดอยู่ในกลุ่มของ amino acid โดยมีสารสำคัญที่น่าสนใจ คือสาร Bis (2-ethylhexyl) phthalate สารสำคัญที่พบในสารสกัดจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท พบว่า เชื้อ *Streptomyces thermoviolaceus*, *S. thermodiastaticus* และ *S. longisporus* สามารถผลิตสารสำคัญดังกล่าวได้ และสารมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Al-Bari และคณะ, 2005) และมีการสกัดสาร Bis (2-ethylhexyl) phthalate ได้จากเชื้อรา *Penicillium janthinellum* ด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท พบว่าสารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม(MCF-7) โดยมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 243 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (Sayed และคณะ, 2015) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราอีกหลายสายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา *A. niger*, *A. flavus* และ *A. fumigatus* โดยมีความเข้มข้นต่ำที่สุดของ di-(2-ethylhexyl) phthalate เท่ากับ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ที่ความเข้มข้น 1.2 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และในแบคทีเรียอีกหลายสปีชีส์ ได้แก่ *B. subtilis*, *S. aureus*, *Streptococcus equosemens*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้น 1.4-6.2 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (Sayed, 2014) สอดคล้องกับผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบขึ้นตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *P. asparag* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 ที่มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 106.10 และ 103.10 ppm ตามลำดับ

ตาราง 4.14 สารสำคัญที่พบในสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน ตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอล จากเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01

สารสกัด หยาบ	ชื่อสารสำคัญ	ปริมาณที่พบ (เปอร์เซ็นต์)
เฮกเซน	Hexadecenoic acid, methyl ester	19.35
	Hexadecenoic acid, ethyl ester	22.48
	9,12-Octadecadienoic acid (z, z)-, Methyl ester	9.76
	9-Octadecenoic acid (z)-, Methyl ester	12.82
	Octadecenoic acid, Methyl ester	4.22
	Linoleic acid ethyl ester	11.18
	Ethyl oleate	15.44
	Octadecenoic acid	4.72
เอทิล อะซิเตท	Bis (2-ethylhexyl) phthalate	100
เมทานอล	Phenol, bis(1,1-dimethylethyl)	100

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้ และแอนแทรคโนส จากตัวอย่างหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการของโรค จำนวน 29 ตัวอย่าง จากพื้นที่เพาะปลูกหน่อไม้ฝรั่งในจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี และนนทบุรี สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต แบ่งออกเป็นเชื้อรา *P. asparagi* ที่เป็นสาเหตุของโรคลำต้นไหม้จำนวน 10 ไอโซเลต (ASPA01-ASPA10) และ เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนส จำนวน 8 ไอโซเลต (ASCG01- ASCG08) และเลือกตัวแทนของเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* และ *C. gloeosporioides* โดยยืนยันสปีชีส์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS

การแยกเชื้อราต่อต้านจากตัวอย่างดินจำนวน 18 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครนายก ปราจีนบุรี ระยอง และจันทบุรี สามารถแยกเชื้อราต่อต้านได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต จำแนกเชื้อราด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาออกเป็นเชื้อสกุล *Neosartorya* จำนวน 15 ไอโซเลต และสกุล *Talaromyces* จำนวน 10 ไอโซเลต เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อบ่งชี้สปีชีส์จากเชื้อราต่อต้าน จำนวน 15 ไอโซเลต ที่ตำแหน่ง β -tubulin ด้วยคูไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b สามารถระบุสปีชีส์ของเชื้อราต่อต้านได้อย่างน้อย 5 สปีชีส์ ได้แก่ เชื้อรา *N. spinosa*, *N. pseudofischeri*, *T. macrosporus*, *T. liani* และ *T. muroii* และเชื้อราสกุล *Talaromyces* ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ จำนวน 2 ไอโซเลต

เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคบนต้นหน่อไม้ฝรั่ง เชื้อรา *P. asparagi* จำนวน 10 ไอโซเลต สามารถสร้างบาดแผลบนผิวต้นหน่อไม้ฝรั่งเพียง 3 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส ASPA03, ASPA08 และ ASPA10 โดยรหัส ASPA03 มีพื้นที่ของบาดแผลมากที่สุด เท่ากับ 108.63 ± 7.6 ตารางมิลลิเมตร และเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 8 ไอโซเลต สามารถสร้างบาดแผล จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส ASCG06, ASCG08, ASCG03, ASCG01, ASCG04 และ ASCG05 โดยที่รหัส ASCG06 มีพื้นที่ของบาดแผลกว้างมากที่สุด เท่ากับ 43.72 ± 1.6 ตารางมิลลิเมตร

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จำนวน 25 ไอโซเลต ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 ด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 และ *Talaromyces* ATM07-01 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 สปีชีส์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ 72-84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 และ *Talaromyces* ATM07-01 ต่อเชื้อราสาเหตุโรค *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 ด้วยวิธี poison food พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ของเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *P. asparagi* ASPA03 และ *C. gloeosporioides* ASCG06 มากที่สุด โดยมีค่า ED₅₀ เท่ากับ 11.67 และ 95.09 ppm ส่วนสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Talaromyces* ATM07-01 จากตัวทำละลายเมทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. asparagi* ASPA03 มากที่สุด มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 82.08 ppm และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ASCG06 มากที่สุด มีค่า

ED₅₀ เท่ากับ 103.10 ppm เมื่อนำสารสกัดในแต่ละตัวทำละลายวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตทของเชื้อรา *N. pseudofischeri* ATM17-03 พบสาร Octadecanoic acid, ethyl ester, Milbemycins และ Hecogenin และ สารสำคัญ Bis (2-ethylhexyl) phthalate จากตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และ Phenol, bis(1,1-dimethylethyl) จากตัวทำละลายเมทานอล ของเชื้อรา *Talaromyces*. ATM07-01 สารสำคัญดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้และแอนแทรคโนส

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้และแอนแทรคโนส ด้วยสารสกัดหยาบ พบว่ามีสารสำคัญที่เชื้อราต่อต้านผลิออกมา มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ควรมีพัฒนาสารสกัดให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อที่จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2560. **หน่อไม้ฝรั่ง**. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมวิชาการเกษตร. 2561. **หน่อไม้ฝรั่ง**. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมวิชาการเกษตร. 2019. **โรคในหน่อไม้ฝรั่ง**. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2560. **หน่อไม้ฝรั่ง**. กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2562. **หน่อไม้ฝรั่ง**. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรณีการ์ ชมภูแก้ว. 2533. “โรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง ; สาเหตุโรค, การเข้าทำลายและการป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมี.” วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกษม สร้อยทอง. 2532. **การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี**. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ทัศนพร ทัศนกร., ณีฐฐิมา โฆษิตเจริญกุล., ธารทิพย์ ภาสบุตร และเยาวภา ตันติวานิช. 2552. “การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัด โรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง.” หน้า 187-196. **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552 เล่มที่ 1**. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ทัศนพร ทัศนกร., ธารทิพย์ ภาสบุตร และพีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2552. “ศึกษาผลของสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดที่มีต่อเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการป้องกันกำจัดโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง.” หน้า 197-210. **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552 เล่มที่ 1**. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวง เกษตรและสหกรณ์.
- ทัศนพร ทัศนกร., ธารทิพย์ ภาสบุตร และพีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2553. “การพัฒนารูปแบบการป้องกันกำจัดโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่งแบบผสมผสาน.” หน้า 460-49. **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่มที่ 1**. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวง เกษตรและสหกรณ์.
- บุญญวดี จิระวุฒิ. 2014. “โรคผลเน่าของเงาะหลังการเก็บเกี่ยวและการควบคุม.” *Thai Agricultural Research Journal*. 32(1) : 89-109.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- ปราณี. 2561. **ข้อมูลพื้นฐานสินค้าการ ปี2560-2561**. กรุงเทพฯ : สำนักงานส่งเสริมและจัดการสินค้า การเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- พรพิมล อธิปัญญาคม,. สุนีรัตน์ สิมะเต็อ และชนินทร์ ดวงสอาด. 2554. **การจำแนกชนิดของราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทาง พันธุกรรม**. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์.
- เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง, แสงชัย เอกประทุมชัย, กนกวรรณ พุ่มพุทรา, ไวรุจน์ เดชมหิตกุล, อนวัช สุวรรณกุล และอนันต์ ทองทา. 2553. **การผลิตเชื้อรา *Trichoderma spp.* เพื่อใช้เป็นสาร ชีวอินทรีย์สำหรับเกษตรอินทรีย์**. กรุงเทพฯ:สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ มหา วิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- เมอมร สร้อยทอง. 2558. “การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartory* จากดิน และประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกคโนสในกาแฟ.” วิทยานิพนธ์วิทยา ศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เยาวพา อารีรัตน์. 2554. “การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนส (anthracnose) ของ หน่อไม้ฝรั่ง.” มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมชาย สุขะกุล. 2544. “การบริหารโรคของหน่อไม้ฝรั่งในภาคกลาง.” หน้า 306-334. **Proceedings of the 2nd symposium on vegetable and legume research**. ก รุ เ ท พ ฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนา ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุธาสิณี อั้งสูงเนิน. 2558. “ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช.” *EAU HERITAGE JOURNAL Science and technology*. 9(1) : 50-63.
- สุภานัน สุขศิริ. 2560. “การคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* เพื่อ การควบคุมโรครากและโคนเน่าในทุเรียน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหารลาดกระบัง.
- อำพร สิริวิทย์, กาญจนา เชียงทอง และสมภาพ เรืองสังข์. (2558). “การคัดแยกเชื้อราปฏิปักษ์จากดิน ในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum sp.* และ *Phomopsis asparagi* ในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี.” **การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5**.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Al-Bari, M.A., Bhuiyan, M.S., Flores, M.E., Petrosyan P, Garcia-Varela, M., Islam, M.A., 2005. “*Streptomyces bangladeshensis* sp. nov., isolated from soil, which produces bis-(2-ethylhexyl)phthalate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55 : 1973–1977
- Ali, A., Javaid, A. and Shoail, A. 2007. “GC-MS analysis and antifungal activity of methanolic root extract of *Chenopodium album* against *Sclerotium rolfsii*.” *Planta Daninha*. 35.
- Bailey, J. A. , Connell, R. J. , Pring, R. J. and Nash, C. 1992. “Infection strategies of *Colletotrichum* species.” *Biology, Pathology and Control*. 1(1): 88-120
- Beasley, D., Horlock, C.M. and Cheah, L. H. 2004. “*Phomopsis* stem blight of asparagus : field survey and fungicide screening.” *Plant Protection*. 57 : 30-46.
- 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.
- Cheah, L.H., Horlock, C.M and Beasley, D. 2006. **Integrated management of new asparagus diseases**. New Zealand : New Zealand Institute for Crop and Food Research.
- Davis R. D. 2002. “Management of three newly recorded asparagus diseases in Queensland will require adoption of new production strategies. ” *acta horticulturae*. 589 : 365-371.
- Dethoup, T. , Kaewsalong, N. , Songkumorn, P. and Jantasorn, A. 2017. “Potential application of a marine-derived fungus, *Talaromyces tratensis* KUFA 0091 against rice diseases.” *Biological Control*. 1(19) : 1-6.
- Dinh, T. L., Zaw, M. and Matsumoto, M. 2018. “*Diaporthe* species complex occurring on *Asparagus kiusianus* in Japan.” *Journal of Plant Pathology*. 101 : 161-167.
- Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B. 1986. “Basic Plant Pathology Method.” *CRS Press Inc.* : 355.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. “Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12 : 13-15.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- 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.
- Elena, K. 2006. “First report of *Phomopsis asparagi* causing stem blight of asparagus in Greece.” *The European Journal of Plant Science and biotechnology*. 55 : 300.
- Elena, K. 2007. “Asparagus diseases.” *The European Journal of Plant Science*. 1 : 76-78.
- 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.
- Hawksworth, D. 2001. “The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revisited.” *Mycological Research*. 105 : 1422-1432.
- Kacergius, A and Jovaisiene, Z. 2010. “Molecular characterization of quarantine fungus *Diaporthe/Phomopsis vaccinii* and related isolates of *Phomopsis* from Vaccinium plants in Lithuania.” *Botanica Lithuanica*, 16(4) : 177–182.
- Kikoku, Y. Tagashira, N. Gabriel, A. A. and Nakano, H. 2009. “Heat activation of *Neosartorya* and *Talaromyces* ascospore and enhancement by organic acid.” *Biocontrol Science*. 14(3) : 87-95.
- Kumar, S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura, K. 2018. “MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms.” *Molecular Biology and Evolution*. 35 : 1547-1549.
- Kanematsu, S., Minaka, N., Kobayashi, T., Kudo, A. and Ohtsu, Y. 2000. “Molecular phylogenetic analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer regions and comparison of fertility in *Phomopsis* isolates from fruit trees.” *Journal of General Plant Pathology*. 66 : 191–201.
- Lopez, B., Lopez, J.A.R., Molar, A. and Santoy, M.C. 2015. “*Colletotrichum gloeosporioides* from mango : morphological, physiological, genetic and pathogenic aspects.” *Journal of Research in Biology*. 5(2) : 1641-1647.
- Manoch, L., Dethoup, T., Yilmaz, N., Houbraken, J. and Samson, R.A. 2013. “Two new *Talaromyces* species from soil Thailand.” *Mycoscience*. 54 : 335-342.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Marimuthu, K., Nagaraj, N. and Ravi, D. 2014. "GC-MS Analysis of phytochemicals, Fatty acids and Antimicrobial potency of Dry christmas Lima Beans." *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 27(2) : 63-66
- Mortelmans, M., Haworth, S., Lawlo, P. and Speck, W. 1886. "Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals." *Journal of the Environmental Society*. 8 : 56-119
- Nonaka, K., Iwatsuki, M., Horiuchi, S., Shiomi, K., Omura, S. and Masuma, R. 2015. "Induced production of BE-31405 by co-culturing of *Talaromyces siamensis* FKA-61 with a variety of fungal strains." *The Journal of Antibiotics*. 68 : 573-578.
- Punithalingam, E. 1990. "CMI descriptions of fungi and bacteria." *My copathologia*. 112 : 39-40.
- Punyanobpharat, A., Soyong, K. and Poeaim. 2018. "Effective of *Neosartorya* and *Talaromyces* to control *Alternaria brassicicola* causing leaf spot of kale." *International Journal of Agricultural Technology*. 14(7) : 1709-1718
- Sardari, S., Mori, Y., Kurosawa, T., and Danesh . 2003. "Modulatory effect of cAMP on fungal ergosterol level and inhibitory activity of azole drugs." *Journal of Microbiology*. 49 : 344-349.
- Sayed, E and Asghar, H. 2014. "Synthesis of various nitrogen heterocycles as antimicrobial surface agents." *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 51 : 12-51.
- Sayed, E., Asghar, H., Shash, M. and Shima, R. 2015. "Isolation, structure elucidation and biological activity of Di-(2-ethylhexyl) phthalate Produced by *Penicillium janthinellum* 62." *International Journal of ChemTech Research*. 8 : 58-66.
- Silva, L.v., Sanguinetti, M., Vandeputte, P., Torelli, R., Rochat, B. and Sanglard, D. 2012. "Milbemycin: More than efflux inhibitors for fungal pathogens." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57(2) : 873-886
- Shishido, M., Kubota, I., Ohashi, T. and Usami, T. 2013. "Comparison of PCR assays for detection and quantification of *Phomopsis sclerotioides* in plant and soil." *Journal of General Plant Pathology*. 79(1) : 18-27.
- Shishido, M., Shinozak, T. and Takeuchi, T. 2018. "Black root rot of cucurbits caused by *Phomopsis sclerotioides* in Japan and phylogenetic grouping of the pathogen." *The Phytopathological Society of Japan*. 72 : 220-22.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Tamura K. and Nei M. 1993. "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees." *Molecular Biology and Evolution*. 10 : 512-526.
- Uecker F. A. 1988. "A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology." *Mycological Research*. 13 : 1-231
- Uecker, F. A. and Johnson, D. 1991. "Morphology and taxonomy of species of *Phomopsis* on asparagus." *Mycologia*. 83(2) : 192-199.
- Udayanga, D., Liu, X., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. A. and Hyde, K. D. 2011. "The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens." *Fungal Diversity*. 50 (1) : 189-225.
- Udayanga, D., Liu, X., Crous, P. W., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E. and Hyde, K. D. 2012. "A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe (Phomopsis)*." *Fungal Diversity*. 56(1) : 157-171.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." **Academic Press**.
- Weir, B.S., Johnsto, P.R. and Dam, U. 2012. "The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex." *Studies in Mycology*. 73 : 115-180.
- Yang, Y. Q., Lan, B., Jian, Y. L., Chang, D. D., Zhang, S. L. and Li, X. M. 2014. "Infection process and pathogenic mechanism of *Phomopsis asparagi*, the asparagus stem blight pathogen." *Phytoparasitica*. 44 : 11-18.
- Zhang, J.D., ZXu, X., Cao, Y.W. 2005. "Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L." *Journal of Ethnopharmacology* 103 : 76-84.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Water Agar (WA)

ประกอบด้วย

วุ้น 18 กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายสารละลายทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้น
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

ประกอบด้วย

Potato Dextrose Broth สำเร็จรูป 24 กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายสารละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่า
เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หรือ

มันฝรั่งหั่นขนาด 1×1×1 เซนติเมตร 200 กรัม

Dextrose 20 กรัม

วิธีการเตรียม

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรองเอามันฝรั่ง
ออกปรับปริมาตรน้ำต้มมันฝรั่งให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ dextrose ลงไปคนให้เข้ากัน จากนั้นนำไป
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

ประกอบด้วย

Potato Dextrose Broth สำเร็จรูป 24 กรัม

Agar 15 กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายสารละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นนำไปนึ่ง
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หรือ

มันฝรั่งหั่นขนาด 1×1×1 เซนติเมตร 200 กรัม

Dextrose 20 กรัม

Agar 15 กรัม

วิธีการเตรียม

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรองเอามันฝรั่งออกปรับปริมาตรน้ำต้มมันฝรั่งให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ dextrose ลงไปคนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) + 40% Sucrose

ประกอบด้วย

Malt extract agar สำเร็จรูป	50	กรัม
น้ำตาลทราย	400	กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายสารละลายทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. 2X CTAB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

CTAB	2	กรัม
PVP	1	กรัม
NaCl	0.4	กรัม

เติม EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 4 มิลลิลิตร และ 1 โมลาร์ Tris-HCl จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนช่วยให้สารละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

6. 10% CTAB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

CTAB	5	กรัม
------	---	------

เติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เติมน้ำ 43 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. 0.5 M EDTA (pH8) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

EDTA	93.06	กรัม
------	-------	------

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8 แล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. 10X Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

Tris base 108 กรัม

Boric acid 61.83 กรัม

EDTA 9.305 กรัม

ละลายสารด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับ 1X TBE buffer ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า

9. 1 M Tris-HCl (pH8) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

Tris 121 กรัม

ละลายสารด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. 10 mM TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

1 โมลาร์ Tris-HCl (pH8) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 โมลาร์ EDTA (pH8) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับ 0.1 มิลลิโมลาร์ TE buffer ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า

ผลงานทางวิชาการ

Effective of *Neosartorya* to control *Phomopsis asparagi* causing stem blight of asparagus

Mangkalad, T.¹, Soytong, K.², Tangthirasunun, N.³ and Poeaim, S.^{1*}

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

Mangkalad, T., Soytong, K., Tangthirasunun, N. and Poeaim, S. (2018). Effective of *Neosartorya* to control *Phomopsis asparagi* causing stem blight of asparagus. International Journal of Agricultural Technology 14(7): 1423-1432.

Abstract The biocontrol of stem blight of asparagus *Phomopsis asparagi* was proved by *Neosartorya* and *Talaromyces*. The symptoms are appearance as oval-shaped lesions with light brown centres and slightly darker margins. Ten isolates of pathogen were isolated by tissue transplanting technique and confirmed by morphology and molecular identification based on internal transcribed spacer (ITS)-nrDNA sequence as *P. asparagi*. Fungal mycelia showed undulate margins and colonies white to gray and reached a diameter of 9 cm petri dish after 10 days. Alpha conidia were oblong or spindle-shaped, with a size of 2–3.5 × 6.5–8.8 μm. The fungal pathogenicity test showed the asparagus was infected by *P. asparagi* within 2 days on moisture chamber at room temperature. *Neosartorya* and *Talaromyces* were proved antifungal activity against *P. asparagi* causing of stem blight of asparagus in dual culture. It revealed that *N. hiratsuka* EU06 was the highest inhibition *P. asparagi* causing the stem blight of asparagus at 59.50%.

Keywords: Stem blight, *Phomopsis asparagi*, *Neosartorya* and *Talaromyces*

Introduction

The asparagus (*Asparagus officinalis* L.) became popular for many years and has been used as a vegetable and medicine (Bunning, 2010). In Thailand, asparagus cultivation areas are in western and north east eg. Kanchanaburi, Nakorn Pathom, Suphanburi, Phetchabun and Ratchaburi (Tumtorn, 2018). Including, environment of Thailand able to cultivated asparagus all the year. However, cultivate areas are decrease because it was offended by crown stem and root rot (caused by *Fusarium* sp.), soft rot (caused by *Phytophthora* sp.), rust (caused by *Puccinia asparagi*), purple spot (caused by *Stemphylium* sp.), stem blight (caused by *Phomopsis asparagi*) and anthracnose disease (caused

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

by *Colletotrichum gloeosporioides*) (Cheah *et al.*, 2006; Elena, 2007; Tumtorn, 2018).

The phomopsis stem blight caused by *P. asparagi* is one of the most important plant diseases to loss cultivation crop (Tumtorn, 2018). This disease able spread through trade of contaminated asparagus seeds, crowns and spears (Cheah *et al.*, 2006). The stem blight lesion character has light-dark brown oval shape and darker margins and wither in the final stage (Cheah *et al.*, 2006; Elena, 2007). For morphology character are greyish white or white colonies, dark brown to black pycnidia, fusiform to ellipsoid conidia (Cheah *et al.*, 2006; Elena, 2007; Dinh *et al.*, 2018). The conidai has been reported were β -conidia and α -conidia and Uecker and Johnson (1991) show only α -conidia.

In 2015, Nonaka *et al.* were co-culture and evaluated efficacy of *Talaromyces siamensis* FKA-61 with *Phomopsis* sp. FKA62. They founded *T. siamensis* FKA-61 inhibited the growth of *Phomopsis* sp strain FKA-62. Soyong (2015) was reported about *Talaromyces* and *Neosartorya* species could be control *C. coffeanum* causing antracnose on coffee. Dethoup *et al.* (2017) studied antagonistic activity of *T. tratensis* KUFA 0091 against with *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata* and *F. moniliforme* in rice.

However, information in field of symptoms and biological control have a few. So, in this studied was to efficacy antagonistic activity of the *Talaromyces* and *Neosartorya* to control Phomopsis stem blight disease in asparagus.

Materials and methods

Isolation and identification of fungi

Pathogen

Asparagus stem blight are symptomatic of oval shaped brown and slightly darker margins were collected from different cultivated fields in Nakhon Pathom, Suphanburi, Ratchaburi and Nonthaburi provinces, Thailand (Table 1). The pathogen was isolated and cultured on Potato dextrose agar (PDA) at room temperature. All isolates were separately proved for pathogenicity tes. The morphology was observe under compound microscope (Nikon, Japan). All isolates were kept in PDA slants at 4°C and 40% glycerol suspension at -80°C.

The isolates was confirmed which based on DNA sequencing of internal transcribed spacer region (ITS) by using ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') and ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') primers (White *et al.*, 1990) following PCR protocols of Udayanga *et al.* (2012). PCR products were performed for sequencing analysis by Bioneer company, Korea. Finally, Basic Local Alignment Search Tools (BLAST), National Center for

Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was confirmed *Phomopsis* species.

Antagonist

Pure cultures of antagonistic isolates *N. hiratsuka* EU06, *N. pseudofischeri* EU13, *Neosartorya* sp. EU35, *T. muroii* EU07, *T. muroii* EU18, *T. trachyspermus* EU23, *N. aureola* CHA01-A01, *N. fennelliae* CHA03-A11, *N. spinosa* CHA09-A01 and *T. muroii* CHA03-A03) were obtained from Soyong (2015) and Suksiri and Poeaim. All isolates were cultured on PDA at room temperature and used in this study.

Pathogenicity of Phomopsis sp.

Pathogenicity test was modified the protocol from Yang *et al.* (2015). Each isolate of *Phomopsis* sp. was cultured on PDA at room temperature for 7 days. The asparagus stem length at 15 cm was cleaned with sterilized water and air dried. The surface of asparagus stem was punctured 5 times by sterile needle. The mycelial plugs (5 mm diameter) of pathogen was transferred onto the wounded stem and kept in moisture chamber box for 5 days at room temperature. The PDA plugs without pathogen was used as control. The symptom was observed and the lesions measure diameter and photographed. Finally, the statistical analysis of pathogenicity was done with ANOVA analysis ($p < 0.05$).

Dual culture test

P. asparagi RB-19 was grown on PDA for 7 days and incubated at room temperature. The agar plug of *P. asparagi* RB-19 was placed on one side of PDA plate and the agar plug of pathogen was placed in opposite site, and incubated for 20 days at 25°C in dark room. Colony diameters were measured. This was performed with four replications. The statistical analysis was done with ANOVA analysis ($p < 0.05$).

Results

Morphology of P. asparagi

Characteristics of *P. asparagi* were studied (Figure 1 and Table 1) by visually observed under microscope. Lesions were formed on the asparagus stems as oval-shaped, longitudinal scars on stem. Lesions area was light brown

to dark brown and slightly darker margins. The center of lesions was light gray with pycnidia (Figure 1A and 1B). Pycnidia are immersed and dark brown to black and submersed in the stems (Figure 1C and 1D). The pycnidia were formed after 3 weeks and found only α -conidia and not seen β -conidia. The α -conidia was lucent, fusiform to eliipsoid, aseptate and biguttulate α -conidia (Figure 1F). Size of α -conidia showed in Table 1. The mycelia consisted of thin and thick hyphae with various sizes, ranch, smooth and lucent (Figure 1G). The colony character on PDA were raised undulate margins with white to gray (Figure 1H).

The three isolates of NB-02, SP-02 and SP-03 were selected and used to confirm species by sequencing. The isolates proved to be *P. asparagi* (KJ801804, LC203584 and JQ614011) in GenBank which 99% identity.

Pathogenicity

Pathogenicity test of each isolate was evaluatede on asparagus stem after 5 days inoculation. The results were divided into two groups including seven sample asparagus stems without lesion. Three asparagus stems had lesion from inoculated. *P. asparagi* RB-19 showed the large area of lesions of 110.25 mm, and followed by NB-02 and NB-14 which the lesions were 55.63 mm and 44.03 mm, respectively. The inoculated stems was infected and appeared symptom like a burn oval-shaped brown. The center of lesions on stem was light brown. The lesions from pathogenicity test was similar to the symptoms of stem blight collected in the fields. The pathogenicity test is shown in Figure 2.

Table 1. Size of α -conidia of ten *Phomopsis* sp. isolates

Fungal isolates	Location	Size of α -conidia	
		Width (μm)	Length (μm)
NB-02	Nonthaburi	2.2–3.1	6.7–8.4
NB-12	Nonthaburi	2.1–3.2	6.6–8.4
NB-14	Nonthaburi	2.1–3.5	6.9–8.8
NP-01	Nakhon Pathom	2.0–3.2	7.0–8.5
RB-10	Ratchaburi	2.0–3.5	6.7–8.9
RB-19	Ratchaburi	2.0–3.3	7.0–8.3
RB-23	Ratchaburi	2.1–3.4	7.2–9.1
SP-01	Suphan Buri	2.2–3.1	6.8–8.4
SP-02	Suphan Buri	2.0–3.2	6.9–8.3
SP-03	Suphan Buri	2.1–3.2	7.0–8.8

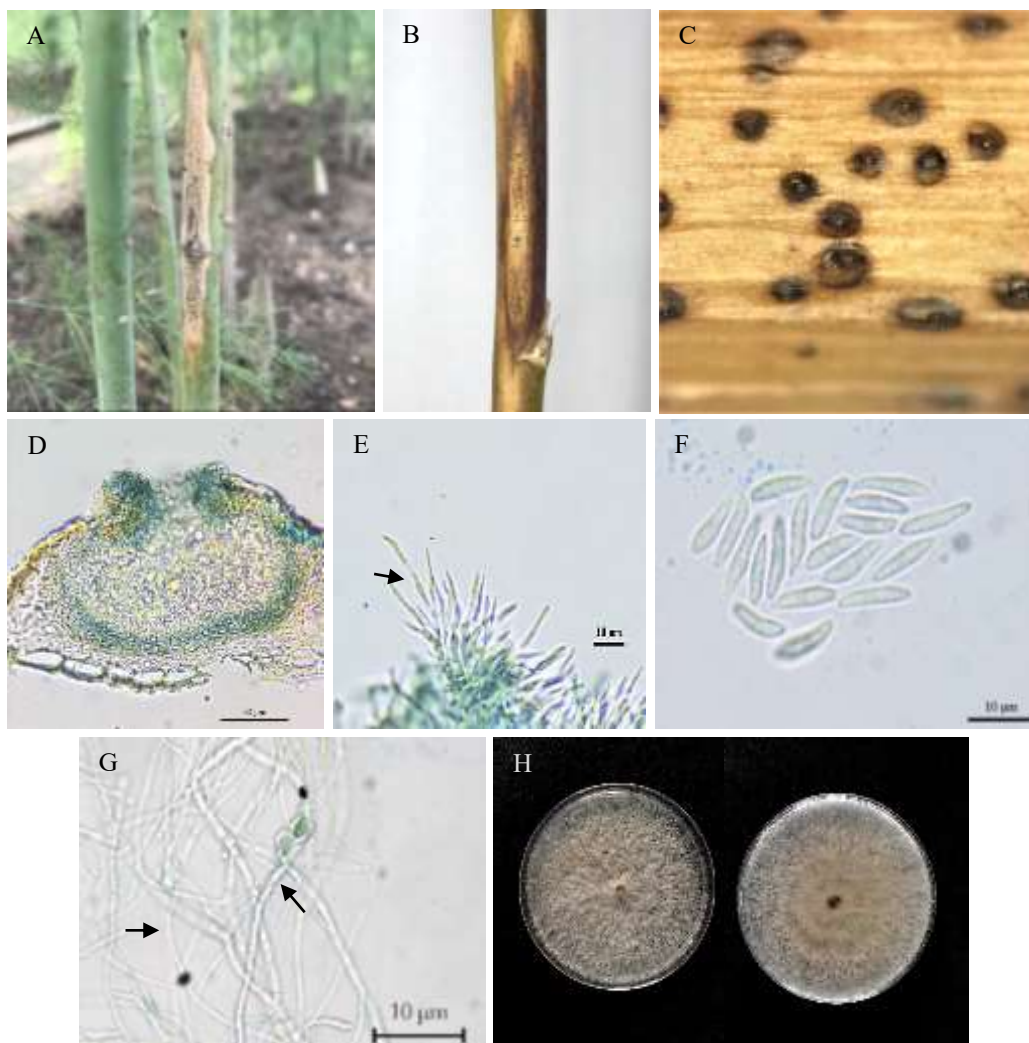


Figure 1. *Phomopsis asparagi* isolate RB-19. (A and B) lesion of stem blight disease on asparagus stem in field. (C and D) Pycnidium of *P. asparagi*. (E) conidiophore (F) α -conidia (G) thin and thick hyphae. (H) *P. asparagi* was cultured on PDA for 10 days at room temperature



Figure 2. Lesion of diseased from asparagus stems during the pathogenicity test that were infected with *P. asparagi* isolates RB-19, NB-02 and NB-14



Figure 3. Dual culture of two fungal strains, *N. hiratsuka* EU06 and *P. asparagi* RB-19

Dual culture test

Dual culture test was done between *P. asparagi* RB-19 and antagonists (*N. hiratsuka* EU06, *N. pseudofischeri* EU13, *N. aureola* CHA01-A01, *N. fennelliae* CHA03-A11, *N. spinosa* CHA09-A01, *Neosartorya* sp. EU35, *T. muroii* EU07, *T. muroii* EU18, *T. trachyspermus* EU23 and *T. muroii* CHA03-A03) which incubated at 25 °C for 20 days in dark room. The growth inhibition showed *N. hiratsuka* EU06 was the highest inhibition of 59.50%, followed by *N. pseudofischeri* EU13, *N. aureola* CHA01-A01, *N. spinosa* CHA09-A01, *N. fennelliae* CHA03-A11 and *Neosartorya* sp. EU35 which were 57.55, 57.24, 56.76, 55.96 and 55.26 %, respectively (Figure 3 and Table 2).

Table 2. Colony diameter (mm) of *P. asparagi* RB-19 and antagonists in dual culture test on PDA at 25 °C for 20 days

Antagonists	Colony diameter of <i>P. asparagi</i> RB-19 (mm)		Growth inhibition (%)
	Control	Average	
<i>N. aureola</i> CHA01-A01	90.00	38.48	57.24 ^b
<i>N. fennelliae</i> CHA03-A11	90.00	39.64	55.96 ^{abc}
<i>N. hiratsuka</i> EU06	90.00	36.45	59.50 ^a
<i>N. pseudofischeri</i> EU13	90.00	38.21	57.55 ^b
<i>N. spinosa</i> CHA09-A01	90.00	38.92	56.76 ^{bc}
<i>Neosartorya</i> sp. EU35	90.00	40.27	55.26 ^{cde}
<i>T. muroii</i> CHA03-A03	90.00	40.37	55.14 ^{de}
<i>T. muroii</i> EU07	90.00	41.35	54.06 ^e
<i>T. muroii</i> EU18	90.00	41.58	53.84 ^e
<i>T. trachyspermus</i> EU23	90.00	48.46	46.16 ^f

^{a-f} mean are the different letter in the same column were significant by Duncan Multiple Range Test (DMRT) at $p < 0.05$

Discussion

The morphology of *P. asparagi* showed the α -conidia size similar to Dinh *et al.* (2018) that found the size of α -conidia as $8.7-9.9 \times 2.9-3.5 \mu\text{m}$ which cultured on PDA medium and Uecker and Johnson (1991) reported the size of α -conidia was $7-8 \times 3 \mu\text{m}$ and not seen β -conidia. Davis (2001) reported not revealed the presence of β -conidia in inoculated stem. However, in this research was not seen beta conidia that may involve temperature. Vidic *et al.* (2013) reported β -conidia formed quickly on medium made of soybean seeds

and mature stems after exposure to low temperature. The species of *P. asparagi* was confirmed by compared with DNA sequences in BLAST. Comparison with reference sequences in the database was revealed *P. asparagi* accession number include KJ801804, LC203584 and JQ614011 that showed 99% identity. The same characteristic of symptoms was found in infection of *P. asparagi* as reported by Yang *et al.* (2015) who described that the mycelia can spread into host tissues in 4 days (Elena, 2007).

In the study of dual culture between *P. asparagi* RB-19 and ten antagonists observed that *N. hiratsuka* EU06 inhibited the growth of RB-19 as the highest inhibition of 59.50%. On the other hand, Soyong (2015) studied efficacy of *Neosartorya* and *Talaromyces* against coffee anthracnose who stated that dual culture test on PDA found *T. muroii* EU04 and EU18 can be controlled *C. coffeanum* to 85-90 % but *N. hiratsuka* EU06 can be against the least coffee anthracnose. Efficacy of *Neosartorya* sp. EU35 and *N. pseudofischeri* EU13 can be controlled pathogen more than 50% as same as in this research finding. In addition, other research were reported *N. fisheri* can be controlled the growth of other microorganisms (Waing *et al.*, 2015). Nonaka *et al.* (2015) reported *Talaromyces* sp. can be inhibited *Phomopsis* sp. FKA-62 and *T. tratensis* KUFA 0091 against *A. padwickii*, *B. oryzae*, *C. lunata* and *F. moniliforme* (Dethoup *et al.*, 2017).

It concluded that asparagus stem blight caused by *P. asparagi* which isolated from diseased samples from Nakhon Pathom, Suphanburi Ratchaburi and Nonthaburi province. Ten isolates of *P. asparagi* were morphological and molecular identified. *P. asparagi* RB-19 was proved to be highest pathogenic to cause disease in asparagus. *N. hiratsuka* EU06 proved to be antagonized *P. asparagi* RB-19 causing the stem blight of asparagus.

Acknowledgements

This work was financially supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (grant number: A 118-0261-010). Special thanks are directly expressed to Supattra Poem, Mayamor Soyong and Supanan Suksiri for supporting the antagonists.

References

- Brunning, P. (2010). Asparagus Liliaceae Asparagaceae. The International Wine and Food Society Europe and Africa Committee 103.
- Cheah, L. H. (2006). Integrated management of new asparagus diseases. New Zealand Institute for Crop and Food Research.
- Davis, R. (2001). Asparagus stem blight recorded in Australia. Australasian Plant Pathology. 30:181-182.

- Dethoup, T., Kaewsalong, N., Songkumorn, P. and Jantasorn, A. (2017). Potential application of a marine-derived fungus, *Talaromyces tratensis* KUFA 0091 against rice diseases. *Biological Control*. 119:1-6.
- Dethoup, T. and Manosh, L. (2013). Studies of the efficacy of fungi in Family Trichocomaceae for controlling plant pathogenic fungi. Kasetsart University.
- Dinh, T. L., Zaw, M. and Matsumoto, M. (2018). *Diaporthe* species complex occurring on *Asparagus kiusianus* in Japan. *Journal of Plant Pathology*. 1-7.
- Diogo, E. L. F., Santos, J. M. and Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity*. 44:107-115.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.
- Elena, K. (2006). First report of *Phomopsis asparagi* causing stem blight of asparagus in Greece. 55:300.
- Elena, K. (2007). Asparagus Diseases. *The European Journal of Plant Science*. 1:76-78.
- Johnson, G., Weinberger, K. and Wu, M. H. (2008). *The Vegetable Industry in Tropical Asia: Thailand*.
- Lu, G., Jian, W., Zhang, J., Zhou, Y. and Cao, J. (2008). Suppressive effect of silicon nutrient on *Phomopsis* stem blight development in asparagus. *HortScience*. 43:811-817.
- Nonaka, K., Iwatsuki, M., Horiuchi, S., Shiomi, K., Omura, S. and Masuma, R. (2015). Induced production of BE-31405 by co-culturing of *Talaromyces siamensis* FKA-61 with a variety of fungal strains. *The Journal of Antibiotics*. 68:573-578.
- Punithalingam, E. (1975) Some new species and combinations in *Phomopsis*. *Trans Brit Mycol Soc*. 64:427-435.
- Sonoda, T., Uragami, A. and Kaji, K. (1997). Evaluation of *Asparagus officinalis* cultivars for resistance to stem blight by using a novel inoculation method. 32:1085-1086.
- Soytong, M. (2015). Isolation and identification of genus *Talaromyces* and *Neosartorya* from soil and their efficacy against coffee anthracnose. (Master Thesis). King Mongkut's Institute of Technology 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*. 14:389-402.
- Tumtorn, P. (2018). Asparagus. Retrieved from <http://www.agriman.doae.go.th/home/news/of%20newsyear%202560.html>.
- Udayanga, D., Liu, X., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. A. and Hyde, K. D. (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*. 50:189-225.
- Udayanga, D., Liu, X., Crous, P. W., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E. and Hyde, K. D. (2012). A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity*. 56:157-171.
- Uecker, F. A. and Johnson, D. (1991). Morphology and Taxonomy of Species of *Phomopsis* on Asparagus. *Mycologia*. 83:192-199.

- Waing, K. G. D., Abella, E. A., Kalaw, S. P., Waing, F. P. and Galvez, C. T. (2015). Antagonistic interactions among different species of leaf litter fungi of Central Luzon State University. *Plant Pathology and Quarantine*. 5:122-130.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.
- Yang, Y. Q., Lan, B., Jian, Y. L., Chang, D. D., Zhang, S. L. and Li, X. M. (2015). Infection Process and Pathogenic Mechanism of *Phomopsis asparagi*, the Asparagus Stem Blight Pathogen. *Phytoparasitica*. 44:11-18.

(Received: 13 September 2018, accepted: 31 October 2018)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวธนัชพร มังคลาด
วัน เดือน ปีเกิด	วันที่18 เมษายน พ.ศ. 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	95/93 พัฒนาศิริ เดอะ ไรต์ ตำบลตุคุด อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12180
ประวัติการศึกษา	2559 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2562 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.46 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Mangkalad, T., Soyong, K., Tangthirasunun, N. and Poeaim, S. 2018. "Effective of <i>Neosatorya</i> to control <i>Phomopsis asparagi</i> causing stem blight of asparagus". <i>International Journal of Agricultural Technology</i> . 14(7) : 1423-1432.