

ประสิทธิภาพของเชื้อ *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium*  
ในการควบคุมเชื้อ *Alternaria brassicicola*  
ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า

EFFICACY OF *Neosartorya*, *Talaromyces* AND *Eupenicillium*  
TO CONTROL *Alternaria brassicicola*  
CAUSING LEAF SPOT OF KALE

อดิศร ปุญญนพรัตน์

ADISORN PUNYANOBPHARAT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-043

ประสิทธิภาพของเชื้อ *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium*  
ในการควบคุมเชื้อ *Alternaria brassicicola*  
ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า

EFFICACY OF *Neosartorya*, *Talaromyces* AND *Eupenicillium*  
TO CONTROL *Alternaria brassicicola*  
CAUSING LEAF SPOT OF KALE

อดิศร ปุญญนพรัตน์

ADISORN PUNYANOBPHARAT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2563

KMITL-2020-SC-M-020-043

EFFICACY OF *Neosartorya*, *Talaromyces* AND *Eupenicillium*  
TO CONTROL *Alternaria brassicicola*  
CAUSING LEAF SPOT OF KALE

ADISORN PUNYANOBPHARAT

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-020-043

COPYRIGHT 2020

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> ในการควบคุมเชื้อ <i>Alternaria brassicicola</i> ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า
นักศึกษา	นายอดิศร ปุญญนพรัตน์
รหัสประจำตัว	60605052
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2563
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร. เกษม สร้อยทอง

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* จากดิน เพื่อนำมาควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า ในการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้าสามารถคัดแยกเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ได้จำนวนทั้งหมด 10 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการก่อโรคด้วยวิธี Koch's postulate พบว่า เชื้อรา *A. brassicicola* KAAB01 มีความสามารถในการก่อโรคมากที่สุด สำหรับการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อรา *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* จำนวนทั้งหมด 20 ไอโซเลต สามารถบ่งชี้เชื้อราได้ทั้งหมด 9 สปีชีส์ ได้แก่ *Neosartorya tatenoi*, *Neosartorya fennelliae*, *Neosartorya spinosa*, *Talaromyces diversus*, *Talaromyces rugulosus*, *Talaromyces muroii*, *Talaromyces macrosporus*, *Eupenicillium brefledianum* และ *Eupenicillium erubescens* จากนั้นนำเชื้อรามาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม (dual culture) ผลจากการทดสอบพบว่าเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802, *E. brefledianum* AAP0204 และ *E. brefledianum* AAP0313 มีประสิทธิภาพดีที่สุด สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยวิธี poisoned food พบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อรา *E. brefledianum* AAP0204 จากตัวทำละลาย ethyl acetate มีประสิทธิภาพดีที่สุด และการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. brassicicola* KAAB01 พบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อรา *E. brefledianum* AAP0204 จากตัวทำละลาย methanol มีประสิทธิภาพดีที่สุด เมื่อหาสารสำคัญด้วยวิธี GC-MS พบว่าสารสำคัญที่มีมากที่สุดคือ benzoic acid

**คำสำคัญ :** *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Eupenicillium*, *Alternaria brassicicola* และ โรคใบจุดในผักคะน้า

<b>Thesis Title</b>	Efficacy of <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> and <i>Eupenicillium</i> to control <i>Alternaria brassicicola</i> causing leaf spot of kale
<b>Student Name</b>	Adisorn Punyanobpharat
<b>Student ID</b>	60605052
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)
<b>Department</b>	Biology
<b>Year</b>	2020
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim
<b>Thesis Co-advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Kasem Soyong

### Abstract

The purpose of this research was isolation and identification of fungal species *Neosartorya*, *Talaromyces* and *Eupenicillium* from soil to control pathogen of leaf spot disease on kale caused by *Alternaria brassicicola*. Ten isolates of *Alternaria brassicicola* were isolated from leaf spot symptom on kale. Pathogenicity test was done using Koch's postulate method. These result demonstrate that *A. brassicicola* KAAB01 had the strongest pathogenicity. Twenty isolates of *Neosartorya*, *Talaromyces* and *Eupenicillium* were classified into 9 species thus *Neosartorya tatenoi*, *Neosartorya fennelliae*, *Neosartorya spinosa*, *Talaromyces diversus*, *Talaromyces rugulosus*, *Talaromyces muroii*, *Talaromyces macrosporus*, *Eupenicillium brefledianum* and *Eupenicillium erubescens*. The efficacy of those isolates was evaluated using dual culture with *A. brassicicola*. Results revealed that *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802, *E. brefledianum* AAP0204 and *E. brefledianum* AAP0313 exhibited significant inhibition in the number of spore on the pathogen tested. Crude extracts were tested using poisoned food technique, it was found that crude ethyl acetate extract of *E. brefledianum* AAP0204 showed the highest inhibitory effect on number of spore. Including, the crude methanolic extract of *E. brefledianum* AAP0204 shown the most effective against spore germination of *A. brassicicola*. Benzoic acid which the major antagonistic compound was identified by GC-MS.

**Keywords :** *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Eupenicillium*, *Alternaria brassicicola* and Leaf spot disease

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2561 ในโครงการต้นแบบการทำเกษตรอินทรีย์ KMITL และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณดังต่อไปนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร. เกษม สร้อยทอง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และแนวทางในการค้นคว้าข้อมูลการทำวิจัย พร้อมทั้งตรวจทานและแก้ไขความผิดพลาดของการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. โองการ วณิชชาชีวะ ประธานกรรมการสอบ และ รศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พุกษ์ อาจารย์บัณฑิตประจำภาควิชาชีววิทยา ผู้ที่ให้ข้อเสนอแนะ ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในเรื่อง อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี พร้อมทั้งเจ้าหน้าที่ธุรการที่อำนวยความสะดวกในการประสานงาน และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนผู้จัดทำ จนกระทั่งการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปตามที่คาดหวัง ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยอยู่เคียงข้างและให้ความช่วยเหลือ พร้อมทั้งเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา

หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ มีความผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นายอดิศร ปุณฺณพรัตน์

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฅ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 โรคใบจุดในผักคะน้า.....	4
2.2 เชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> .....	5
2.3 เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> .....	7
2.4 เชื้อราสกุล <i>Talaromyces</i> .....	9
2.5 เชื้อราสกุล <i>Eupenicillium</i> .....	11
2.6 การใช้ประโยชน์ของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> ในการควบคุมโรคพืช.....	13
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>15</b>
3.1 การเก็บตัวอย่างโรคใบจุดในผักคะน้า และตัวอย่างเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> .....	15
3.1.1 การเก็บตัวอย่างโรคใบจุดในผักคะน้า.....	15
3.1.2 การเก็บตัวอย่างเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> .....	15
3.2 สารเคมี.....	15
3.2.1 อาหารที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อรา.....	15
3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา.....	15
3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ.....	16

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR).....	16
3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	16
3.2.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา.....	17
3.3 อุปกรณ์.....	17
3.4 วิธีการทดลอง.....	18
3.4.1 การคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า <i>Alternaria brassicicola</i> .....	18
3.4.2 การคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> .....	18
3.4.3 การบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	19
3.4.4 การศึกษาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์.....	20
3.4.5 การทดสอบความสามารถการก่อโรคใบจุดในผักคะน้าของเชื้อราสาเหตุโรค <i>Alternaria brassicicola</i> .....	22
3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า <i>Alternaria brassicicola</i> .....	24
3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า <i>Alternaria brassicicola</i> .....	25
3.4.8 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า <i>Alternaria brassicicola</i> .....	27
3.4.9 การวิเคราะห์สารสำคัญด้วย Gas chromatography - mass spectrometry.....	29
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....</b>	<b>30</b>
4.1 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า.....	30
4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> .....	33
4.3 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> .....	36

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากดินในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01 ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม.....	58
4.5 ผลของการสกัดสารและทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยวิธี poison food.....	61
4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01.....	69
4.7 ผลการหาสารสำคัญด้วย Gas chromatography–mass spectrometry.....	74
<b>บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ.....</b>	<b>78</b>
เอกสารอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	84
ภาคผนวก ก.....	85
ประวัติผู้เขียน.....	88

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	แสดงข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่างและเชื้อราที่แยกได้จากโรคใบจุดในผักคะน้าในแต่ละสถานที่.....	30
4.2	แสดงขนาด conidia และ อัตราการเจริญ ของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า.....	32
4.3	แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลและดัชนีความรุนแรงของโรคที่ทดสอบโดยเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> จำนวน 10 ไอโซเลต.....	34
4.4	แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลตของเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> ที่แยกได้จากดิน.....	36
4.5	แสดงอัตราการเจริญของโคโลนี ascocarp, ascus และ ascospore ของเชื้อราที่แยกได้จากดิน.....	53
4.6	แสดงประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากดินในการยับยั้งจำนวนสปอร์ของเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม.....	60
4.7	แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา <i>Talaromyces macrosporus</i> AAP0817 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01.....	64
4.8	แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา <i>Neosartorya spinosa</i> AAP0802 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01.....	66
4.9	แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา <i>Eupenicillium brefeldianum</i> AAP0204 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01.....	68
4.10	แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา <i>Eupenicillium brefeldianum</i> AAP0204 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01.....	71
4.11	แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา <i>Neosartorya spinosa</i> AAP0802 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01.....	72

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.12	แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา <i>Talaromyces macrosporus</i> AAP0817 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01.....	73
4.13	แสดงรายชื่อสารสำคัญที่ได้จากสารสกัดหยาบของเชื้อรา <i>Talaromyces macrosporus</i> AAP0817, <i>Neosartorya spinosa</i> AAP0802 และ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> AAP0204.....	76

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	อาการโรคใบจุดในผักคะน้า A: อาการใบจุดในผักคะน้า; B: ลักษณะ concentric ring.....	4
2.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> A และ B: ลักษณะโคโลนีด้านหน้าและหลัง; C: ลักษณะเส้นใยและ conidiophore; D: conidia ต่อเป็นสาย; E-F: conidia.....	6
2.3	วงจรชีวิตของเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> .....	7
2.4	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Neosartorya asulata</i> บ่มเชื้อราเป็นระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส A: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Oat meal agar (OA); B: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Malt extract agar (MEA); C: ลักษณะ ascocarp; D: ลักษณะ ascus; E: ลักษณะ ascospore.....	8
2.5	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces stipitatus</i> บ่มเชื้อราเป็นระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส A: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Czapek yeast extract agar (CYA); B: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Malt extract agar (MEA); C: ลักษณะ ascocarp; D: ลักษณะ ascus; E: ลักษณะ ascospore.....	10
2.6	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ลักษณะโคโลนีที่ระยะเวลา 25 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส A และ B: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ด้านหน้าและหลังจานอาหาร; C: ลักษณะ ascocarp; D: ลักษณะ ascus; E: ลักษณะ ascospore.....	12
3.1	การทดสอบความสามารถในการก่อโรคใบจุดในผักคะน้า A: การทำแผลบนใบคะน้า; B: การวางชิ้นวัุ้นบนใบคะน้า; C: การวัดขนาดแผล.....	23
3.2	การวางชิ้นวัุ้นในการทดสอบ dual-culture A: ลักษณะการวางเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> บนจานอาหารชุดควบคุม; B: ลักษณะการวางเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> และเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม; C: ลักษณะการวางเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> บนจานอาหารชุดควบคุม.....	25
3.3	แผนผังแสดงลำดับในการสกัดสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน.....	26

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.1	แสดงลักษณะอาการโรคใบจุดในผักคะน้าและแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01 ที่แยกได้จากโรคใบจุดในผักคะน้า A: ลักษณะอาการโรคใบจุดในผักคะน้า; B: ลักษณะแผลโรคใบจุดในผักคะน้า; C: ลักษณะโคโลนีด้านหน้างานอาหารเลี้ยงเชื้อ; D: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานอาหารเลี้ยงเชื้อ; E: ลักษณะ conidiophore ภายใต้กล้อง stereo microscope; F: ลักษณะ conidiophore; G: ลักษณะเส้นใย; H: ลักษณะ conidia ที่ต่อกันเป็นสาย; I-J: ลักษณะ conidia.....	32
4.2	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อราสกุล <i>Alternaria</i> ในบริเวณ ITS โดยใช้ maximum likelihood ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000.....	33
4.3	แสดงลักษณะความรุนแรงของโรคในใบผักคะน้าที่ปลูกเชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> ทั้ง 10 ไอโซเลต บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 วัน.....	35
4.4	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Neosartorya tatenoi</i> AAP0704 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคโลนีด้านหน้าและโคโลนีด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคโลนีด้านหน้าและโคโลนีด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมชูโครส 40 เปอร์เซ็นต์; L: conidiophore; M: conidia.....	44
4.5	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Neosartorya fennelliae</i> AAP0940 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคโลนีด้านหน้าและโคโลนีด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคโลนีด้านหน้าและโคโลนีด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมชูโครส 40 เปอร์เซ็นต์.....	45
4.6	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Neosartorya spinosa</i> AAP0820 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคโลนีด้านหน้าและโคโลนีด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคโลนีด้านหน้าและโคโลนีด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมชูโครส 40 เปอร์เซ็นต์; L: conidiophore; M: conidia.....	46

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.7	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces diversus</i> AAP0123 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์; L: conidiophore; M: conidia.....	47
4.8	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces rugulosus</i> AAP0806 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ascus; G-H: ascospore; I และ J: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์.....	48
4.9	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces muroii</i> AAP0825 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์.....	49
4.10	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces macrosporus</i> AAP0208 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์; L: conidiophore; M: conidia .....	50

## สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า	
4.11	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Eupenicillium brefeldianum</i> AAP0305 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ascus; G-H: ascospore; I และ J: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์; K: conidiophore และ conidia.....	51
4.12	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Eupenicillium erubescens</i> AAP0808 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ascus; G-H: ascospore; I และ J: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์.....	52
4.13	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อรา <i>Neosartorya</i> , <i>Talaromyces</i> และ <i>Eupenicillium</i> ในบริเวณ $\beta$ -tubulin โดยใช้ maximum likelihood ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000.....	57
4.14	แสดงลักษณะโคโลนีของการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดใน 4 อันดับแรก ในการยับยั้งจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค <i>Alternaria brassicicola</i> .....	59
4.15	แสดงลักษณะของโคโลนี <i>Alternaria brassicicola</i> ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Talaromyces macrosporus</i> AAP0817.....	63
4.16	แสดงลักษณะของโคโลนีของ <i>Alternaria brassicicola</i> ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Neosartorya spinosa</i> AAP0802.....	65
4.17	แสดงลักษณะของโคโลนีของ <i>Alternaria brassicicola</i> ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบจากเชื้อรา <i>Eupenicillium brefeldianum</i> AAP0204.....	67
4.18	แสดงลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Alternaria brassicicola</i> KAAB01 ที่ 12 ชั่วโมง A-B: ลักษณะของสปอร์ที่งอกได้ปกติ; C: ลักษณะของสปอร์ที่ยังไม่งอก; D: ลักษณะสปอร์ที่แตกหัก; E-F: ลักษณะของสปอร์ที่แคระแกร็น.....	70

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ผักคะน้าเป็นผักที่มีการเพาะปลูกในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก โดยมีพื้นที่เพาะปลูกอยู่ที่ 47,833 ไร่ มีผลผลิตรวมอยู่ที่ 53,004 ตัน และมีพื้นที่ปลูกทั้งหมด 72 จังหวัด (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าผักคะน้าเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แต่ปัญหาที่สำคัญในการเพาะปลูกผักคะน้าคือ โรคพืช อาทิเช่น โรคราน้ำค้าง (Downy mildew) เชื้อสาเหตุโรคคือ *Pseudoperonospora* sp. และ *Peronospora parasitica* โรคเน่าคอดิน (Damping-off) เชื้อสาเหตุโรคคือ *Pythium* sp. และ โรคใบจุด (Leaf spot) เชื้อสาเหตุโรคคือ *Alternaria brassicicola* (Robert และคณะ, 2008) โดยโรคใบจุดในผักคะน้า เมื่อมีการระบาดของรุนแรงจะส่งผลให้ผลผลิตเสียหายถึง 40 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะในฤดูฝนหรือฤดูที่มีความชื้นสูง และเชื้อสาเหตุโรคนี้สามารถอยู่ข้ามฤดูในเศษซากพืชในรูปของเส้นใย (Jenny และคณะ, 2014) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาโรคใบจุดในผักคะน้า

ในปัจจุบันเกษตรกรมีการนำสารเคมีมาใช้ในการควบคุมโรคพืชเป็นจำนวนมาก จากรายงานของกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พบว่าระหว่างปี พ.ศ. 2540-2553 มีการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชมากถึง 120,000 ตัน โดยสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีการใช้มากที่สุด ได้แก่ สารกำจัดวัชพืช 74 เปอร์เซ็นต์ สารกำจัดแมลง 14 เปอร์เซ็นต์ สารป้องกันกำจัดโรคพืช 9 เปอร์เซ็นต์ และสารอื่นๆ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น จากการประเมินของ World bank และ Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) พบว่ามีมูลค่าการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในประเทศมากถึงปีละ 18,000 ล้านบาท ส่วนการศึกษาสารพิษตกค้างในผักสดและผลไม้สดที่นำเข้าจากต่างประเทศจำนวน 9 ชนิด พบว่าในปี พ.ศ. 2551-2552 ผักสดที่ตรวจพบสารเคมีมากที่สุดคือผักคะน้า ที่มาจากสาธารณรัฐประชาชนจีน (นันทวิทยากรณ์, 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานของเครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช รายงานผลการเฝ้าระวังสารเคมีกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักผลไม้ประจำปี พ.ศ. 2559 พบผักผลไม้ที่วางจำหน่ายในท้องตลาดมีสารพิษตกค้างอยู่ที่ 46.38 เปอร์เซ็นต์ (เครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช, 2559) สำหรับรายงานข้อมูลผู้ป่วยที่เกิดจากการได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชนั้น พบผู้ป่วยที่ได้รับพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปี พ.ศ. 2561 มีผู้ป่วยจำนวนทั้งหมด 10,312 ราย (กรมควบคุมโรค, 2561) และข้อมูลจากสำนักกระบาดวิทยาพบว่าในระหว่างปี พ.ศ. 2546-2555 มีรายงานผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทั้งสิ้น 17,340 ราย คิดเป็นค่าเฉลี่ยปีละ 1,734 ราย (แสงโสม, 2556) นอกจากนี้สารเคมียังส่งผลต่อสภาพแวดล้อมอีกด้วยโดยเฉพาะทางดินและทางน้ำ ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและห่วงโซ่อาหารสำหรับสาเหตุของมลพิษทางดินคือ สารเคมีที่สลายตัวได้จะตกค้างในดิน เมื่อโครงสร้างของดิน

เสื่อมโทรม เช่น ขาดธาตุอาหาร มีสารพิษเจือปน ดินเค็ม ดินเปรี้ยว และอาจเกิดผลกระทบต่อแหล่งน้ำ จากการที่น้ำพัดหน้าดินจนทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในน้ำที่อุปโภคบริโภค ทำให้ปลาและสิ่งมีชีวิตในน้ำตายลง (สุธาสิณี, 2558) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นได้ว่าสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชมีการนำมาใช้กันเป็นจำนวนมาก ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

งานวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาการควบคุมโรคพืชด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biocontrol) คือการนำสิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อราสาเหตุโรค และไม่สร้างความเสียหายต่อต้นพืช เรียกเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ว่าเชื้อราต่อต้าน (Antagonist) ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการคัดแยกเชื้อราที่อาศัยอยู่ในดิน เนื่องจากจุลินทรีย์ในดินมีเสถียรภาพมากกว่าจุลินทรีย์ในอากาศ (เกษม, 2532) โดยมีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Talaromyces muroii* EU18 ในตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Colletotrichum coffeanum* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในกาแฟ (เมอมร, 2558) และสุภานัน (2561) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสกุล *Pythium* และ เชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าในต้นทุเรียนได้ Boonsang และคณะ (2014) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Neosartorya pseudofischeri*, *N. quadricincta* และ *N. multiplicata* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Alternaria* sp. และงานวิจัยของ Dethoup และคณะ (2018) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Talaromyces tratensis* KUFA 0091 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค stackburn ในข้าวจากเชื้อรา *Alternaria padwickii* นอกจากนั้นยังมีรายงานของเชื้อราอีกหนึ่งสกุลที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์แต่ยังไม่มีการศึกษาในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชนั้นคือเชื้อราสกุล *Eupenicillium* (Ambarish และคณะ, 2017) ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้สนใจที่จะคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* จากดิน เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 คัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์

1.2.2 คัดแยกและบ่งชี้เชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดในผักคะน้า ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์

1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่คัดแยกได้จากโรคใบจุดในผักคะน้า

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* จากดินในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เลย และสุพรรณบุรี ด้วยวิธี Heat treatment บ่งชี้เชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยศึกษาบริเวณ  $\beta$ -tubulin เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อราต่อต้าน คัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *A. brassicicola* จากสวนของเกษตรกรพื้นที่จังหวัดในภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี และราชบุรี ด้วยวิธี Tissue transplanting บ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยศึกษาบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนใบคะน้าด้วยวิธี Detached leaf และเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถก่อโรคได้มากที่สุด ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค ดำเนินการศึกษาด้วยวิธี dual-culture จากนั้นคัดเลือกเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพ นำมาศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราต่อต้านด้วยวิธี poison food techniques ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการงอกของสปอร์และหาสารสำคัญด้วย Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ที่แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เลย และสุพรรณบุรี

1.4.2 ทราบความหลากหลายเชื้อรา *A. brassicicola* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้าที่เก็บมาจากพื้นที่จังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี นนทบุรี และราชบุรี

1.4.3 ทราบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *A. brassicicola* ซึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ต่อไปในอนาคต

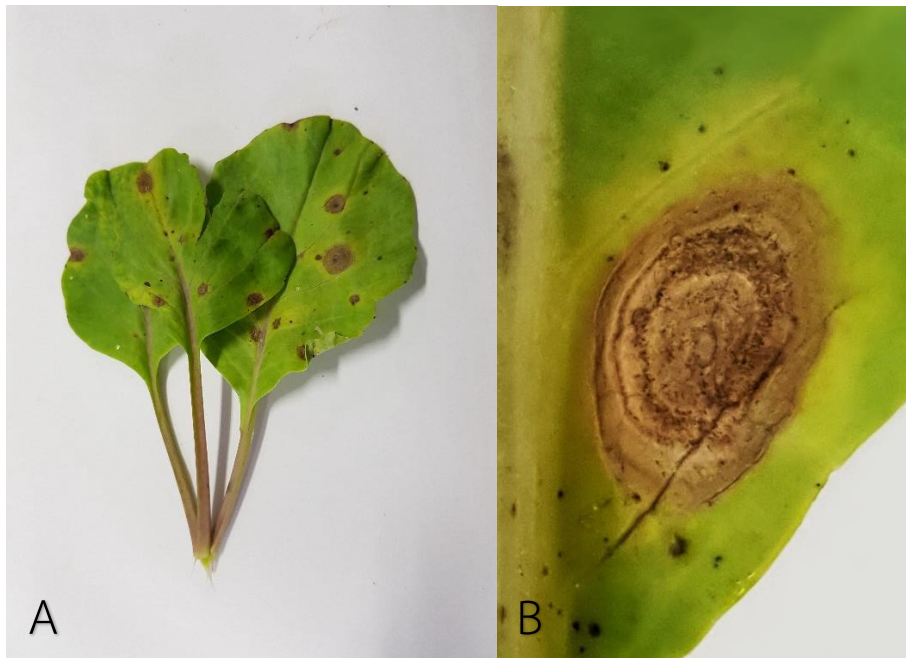
## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 โรคใบจุดในผักคะน้า

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกผักคะน้าทั้งหมด 47,833 ไร่ มีผลผลิตรวม 53,004 ตัน ในปี พ.ศ. 2561 (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562) จึงส่งผลให้ผักคะน้ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แต่อุปสรรคในการเพาะปลูกผักคะน้า คือ โรคใบจุด เชื้อสาเหตุของโรคนี้คือ *Alternaria brassicicola* โดยมีรายงานพบเชื้อ *A. brassicicola* ในผักคะน้าที่มีอาการใบจุดโดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดสุพรรณบุรี กาญจนบุรี เชียงราย เชียงใหม่ และลำพูน (สุณิรัตน์ และคณะ, 2556) ซึ่งเชื้อสาเหตุโรคนี้สามารถอาศัยข้ามฤดูในเศษซากพืช (Jenny และคณะ 2014) เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม เช่น มีอากาศชื้น ลม ฝน สปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคก็จะปลิวไปได้ง่าย นี่จึงเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการปลูกผักคะน้า

อาการของโรคใบจุดในผักคะน้าเริ่มแรกใบจะมีจุดสีเหลือง เมื่อระยะเวลาผ่านไปจุดสีเหลืองจะพัฒนากลายเป็นจุดวงกลมสีน้ำตาลดังรูปที่ 1A เมื่ออาการของโรครุนแรงขึ้น แผลจุดวงกลมสีน้ำตาลจะเกิดวงแหวนซ้อนกัน (concentric ring) รูปที่ 1B จากนั้นใบจะเปลี่ยนจากสีเขียวกลายเป็นสีเหลืองเมื่อเวลาผ่านไปใบจะเหี่ยวและแห้งตาย (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2556)



รูปที่ 2.1 อาการโรคใบจุดในผักคะน้า A: อาการใบจุดในผักคะน้า; B: ลักษณะ concentric ring (ถ่ายภาพโดย: อติสร ปุญญนพรัตน์, 2561)

## 2.2 เชื้อรา *Alternaria brassicicola*

คลาส Dothideomycetes

อันดับ Pleosporales

วงศ์ Pleosporaceae

สกุล *Alternaria*

สปีชีส์ *A. brassicicola*

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเขียวถึงดำดังรูปที่ 2.2A และ B conidiophore มีสีน้ำตาลเกิดขึ้นเดี่ยวๆ มีลักษณะคล้ายเส้นใยแต่จะต่างกันตรงที่ส่วนของ conidiophore จะกว้างกว่าเส้นใยดังรูปที่ 2.2C conidia มีสีน้ำตาล มี transverse septa (รูปที่ 2.2F) โดยส่วนใหญ่จะมีผนังกันตามขวางมากกว่าตามยาว รูปทรงเป็นแบบ obpyriform ต่อกันเป็นสาย (รูปที่ 2.2D) เส้นใยเชื้อรามีสีน้ำตาลและมีผนังกันดังรูปที่ 2.2E เชื้อนี้พบได้ทั่วไปในดิน (พรหมมาศ, 2555)

Pattanamahakul และ Strange (1999) คัดแยกเชื้อสาเหตุโรคจากใบกะหล่ำปลี กะหล่ำดอก และผักคะน้าด้วยวิธี Tissue transplanting ได้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต จากนั้นศึกษาลักษณะทาง สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทั้ง 30 ไอโซเลต มีลักษณะ conidia เป็นแบบ obpyriform มีสีน้ำตาลขนาด 8-21×13-44 ไมโครเมตร ต่อกันเป็นสาย โคโลนีบนอาหาร PDA มีสี เทาถึงดำเหมือนกัน และบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ที่อยู่บน ribosomal DNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการ ทำ PCR มีขนาด 600 คู่เบส นอกจากนั้นยังได้มีการศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *A. brassicicola* จากพื้นที่ต่างๆ และได้ทดสอบความสามารถในการก่อโรคด้วยวิธี detached leaf พบว่าเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ได้จากพื้นที่ต่างกัน มีความสามารถในการก่อโรคต่างกัน

Hye และคณะ (2001) กับ Woudenberg และคณะ (2013) ศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราใน สกุล *Alternaria* โดยบ่งชี้ลักษณะของเชื้อรา *A. brassicicola* ด้วยสัณฐานวิทยา พบว่าโคโลนีของ เชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA มีสีเขียวเข้มถึงดำ เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเส้นใยมี ผนังกัน ลักษณะ conidiophore แตกเป็นกิ่งออกมาจากเส้นใย conidia เป็นแบบ obpyriform มี การต่อกันเป็นสายยาว นอกจากนี้ Woudenberg และคณะ (2013) ยังได้บ่งชี้เชื้อราด้วยลำดับ นิวคลีโอไทด์ โดยอาศัยบริเวณ ITS ที่อยู่บน ribosomal DNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาดเท่ากับ 560 คู่เบส

Swati และคณะ (2014) บ่งชี้เชื้อรา 32 ไอโซเลต ที่แยกได้จากกะหล่ำดอก (cauliflower) ด้วยวิธี Tissue transplanting โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เชื้อราทั้ง 32 ไอโซเลต มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันดังนี้ โคลนีสีเขียวเข้มถึงดำ เส้นใยมีสีน้ำตาลและมีผนังกัน conidia มีลักษณะเป็นแบบ obpyriform มีสีน้ำตาล มีผนังเซลล์เรียบ มี septa เหมือนกันทั้ง 32 ไอโซเลตมีขนาด 6-10×32-40 ไมโครเมตร และบ่งชี้เชื้อราด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 32 ไอโซเลต โดยอาศัยบริเวณ ITS ที่อยู่บน ribosomal DNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าทั้ง 32 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *A. brassicicola* ที่นำข้อมูลลำดับเบสมาจากฐานข้อมูล GenBank และมีขนาดลำดับเบสอยู่ที่ 600 คู่เบส

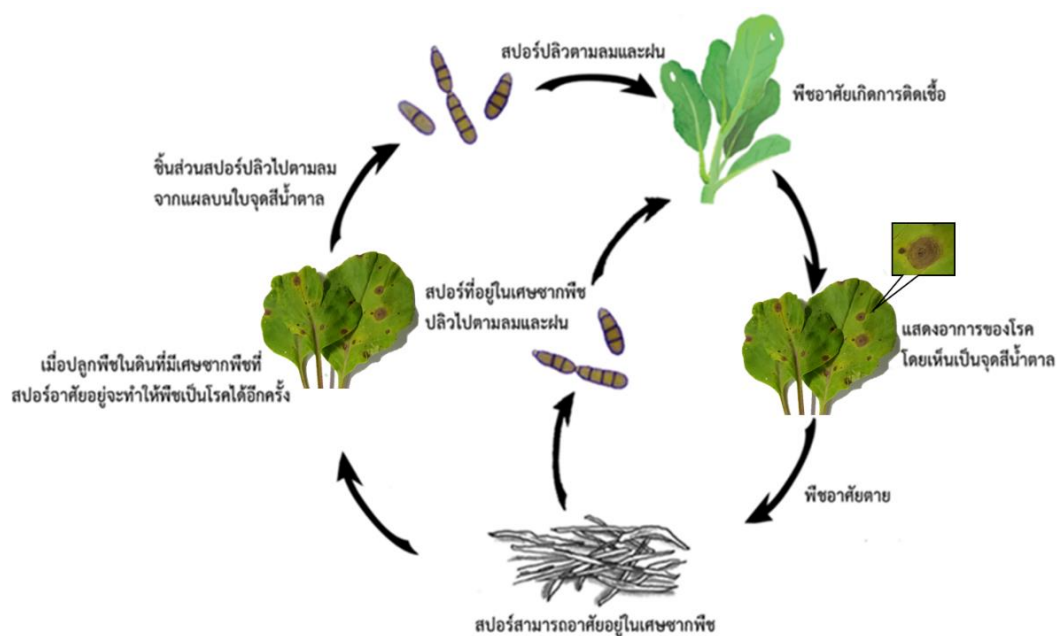
นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยของ Mukesh และคณะ (2017) พบว่า *A. brassicicola* มีการผลิต mycotoxin TeA, AOH และ AME ออกมาซึ่งมีผลทำให้ใบพืชมีอาการเหี่ยว และเหลืองทำให้ใบพืชเกิดอาการเซลล์ตายอย่างรวดเร็ว



รูปที่ 2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* A และ B: ลักษณะโคโลนี ด้านหน้าและหลัง; C: ลักษณะเส้นใยและ conidiophore; D: conidia ต่อเป็นสาย; E-F: conidia

(ถ่ายภาพโดย: อติศร ปุญญนพรัตน์, 2561)

โดยวัฏจักรของเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถอยู่ข้ามฤดูในรูปของเส้นใยหรือสปอร์อยู่ในเศษซากพืช หรือเมล็ดพันธุ์ที่ติดเชื้อ เชื้อสาเหตุที่ติดอยู่กับเมล็ดพันธุ์อาจทำให้ต้นกล้าเน่าหลังจากที่เมล็ดงอกเชื้อที่อยู่ในเศษซากพืชจะสร้าง conidia เพิ่มขึ้นจำนวนมากในกรณีที่มีความชื้นสูง เช่น หมอกหรือน้ำค้างมาก หรือฝนตกทำให้ conidia แพร่กระจายไปทางอากาศ เมื่อ conidia สัมผัสผิวพืชจะงอกแล้วแทงผ่านเข้าสู่พืชอาศัยโดยตรงหรือเข้าทางบาดแผล จากนั้นเชื้อจะเจริญในพืชอาศัยสร้าง conidia มากมายในส่วนของพืชที่ติดเชื้อ และแพร่กระจายไปยังส่วนอื่นๆ ทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำต่อไปเมื่อหมดฤดูปลูกเชื้อสาเหตุก็จะอยู่ในเศษซากพืช หรือส่วนของพืชที่เป็นโรค เช่น ใบ กิ่ง เพื่อรอเข้าทำลายพืชต่อไป (พรหมมาศ, 2555) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

## 2.3 เชื้อราสกุล *Neosartorya*

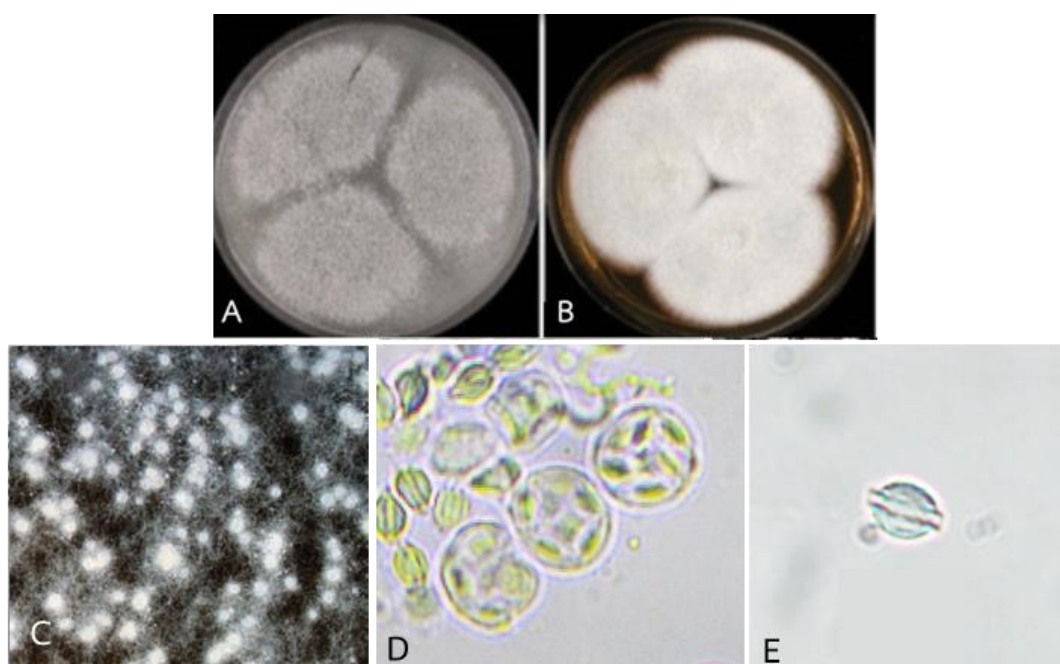
คลาส Ascomycetes

อันดับ Eurotiales

วงศ์ Trichocomaceae

สกุล *Neosartorya*

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อราในสกุล *Neosartorya* โคลนีสีเทา ขาว ครีม (รูปที่ 2.4A และ B) เป็นเชื้อราที่มีการสร้าง ascocarp หรือถุงหุ้มสปอร์รูปทรง globose ถึง subglobose (รูปที่ 2.4C) ภายใน ascocarp ประกอบไปด้วยหลาย ascus รูปทรง globose ถึง subglobose (รูปที่ 2.4D) ภายใน ascus จะบรรจุ ascospore หลายอัน มีรูปทรง globose ถึง broadly ellipsoid และพบ ridge หรือสันนูนเป็นวงล้อมรอบ ascospore (รูปที่ 2.4E) เชื้อราสกุล *Neosartorya* เป็น teleomorph ของเชื้อราสกุล *Aspergillus* สามารถพบได้ทั่วไปในดิน (Pitt และ Hocking, 1997)



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neosartorya asulata* บ่มเชื้อราเป็นระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส A: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Oat meal agar (OA); B: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Malt extract agar (MEA); C: ลักษณะ ascocarp; D: ลักษณะ ascus; E: ลักษณะ ascospore

(ที่มา: Samson และคณะ, 2007)

ในรายงานวิจัยของ Samson และคณะ (2007) ศึกษาการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อรา *Aspergillus* section *Fumigati* และศึกษาระยะ teleomorph ของเชื้อรา *Aspergillus* ในสกุล *Neosartorya* ได้บ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* โดยเลี้ยงบนอาหาร Oat meal Agar (OA) และเลี้ยงบนอาหาร Malt extract agar (MEA) พบว่ามีลักษณะโคโลนีส่วนใหญ่เป็นสีขาว โดยในแต่ละสปีชีส์มี

ลักษณะและขนาด ascocarp, ascus และ ascospore ที่แตกต่างกันดังนี้ *N. asulata* มี ascocarp สีขาวรูปทรง globose ขนาด 200-300 ไมโครเมตร และ ascospore มีรูปทรง globose ถึง subglobose ขนาด 4.5 ไมโครเมตร มี ridge ล้อมรอบ *N. fennelliae* มีขนาด ascocarp อยู่ที่ 150-450 ไมโครเมตร สีขาว ascospore มีขนาด 3.20-5.00×5.50-7.70 ไมโครเมตร และมี ridge *N. spinosa* มีขนาด ascocarp อยู่ที่ 200-300 ไมโครเมตร สีขาว ascospore มีขนาด 4.50 ไมโครเมตร และ *N. tatenoi* มีขนาด ascocarp อยู่ที่ 140-310×140-360 ไมโครเมตร สีขาว ascospore มีขนาด 5.00-5.50 ไมโครเมตร และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 2 บริเวณ ได้แก่ บริเวณ ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 และบริเวณ  $\beta$ -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a กับ Bt2b พบว่าบริเวณ ITS ไม่สามารถแยกความหลากหลายในระดับสปีชีส์ได้ แต่ในตำแหน่ง  $\beta$ -tubulin สามารถแยกความหลากหลายในระดับสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ได้

เมอมร (2558) คัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* ที่แยกได้จากดินโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA อาทิเช่น *N. hiratsukae* EU06 มีโคโลนีสีขาว ascocarp มีรูปทรง globose สีขาว ขนาด 90.70-263.05× 91.98-276.76 ไมโครเมตร ascus รูปทรง globose มีขนาด 9.86-13.63×8.63-13.97 ไมโครเมตร ascospore มีหลายรูปทรงได้แก่ broadly ellipsoidal ขนาด 3.86-6.81× 3.70-6.48 ไมโครเมตร และพบว่า ascospore มี ridge *N. pseudofischeri* EU13 พบว่ามีโคโลนีสีขาว ascocarp มีรูปทรง globose สีขาว ขนาด 151.70-458.70×148.06-526.58 ไมโครเมตร ascus รูปทรง subglobose มีขนาด 10.33-14.19×10.63-15.87 ไมโครเมตร ascospore มีหลายรูปทรงได้แก่ subglobose ขนาด 4.22-6.07×4.49-7.41 ไมโครเมตร ascospore มี ridge และบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS,  $\beta$ -tubulin และ calmodulin ผลที่ได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 550-650, 500-600 และ 700-800 คู่เบส ตามลำดับ ผลการบ่งชี้พบว่า บริเวณ ITS ไม่สามารถบ่งชี้ในระดับสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ได้ แต่ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin และ calmodulin สามารถบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya* ได้

## 2.4 เชื้อราสกุล *Talaromyces*

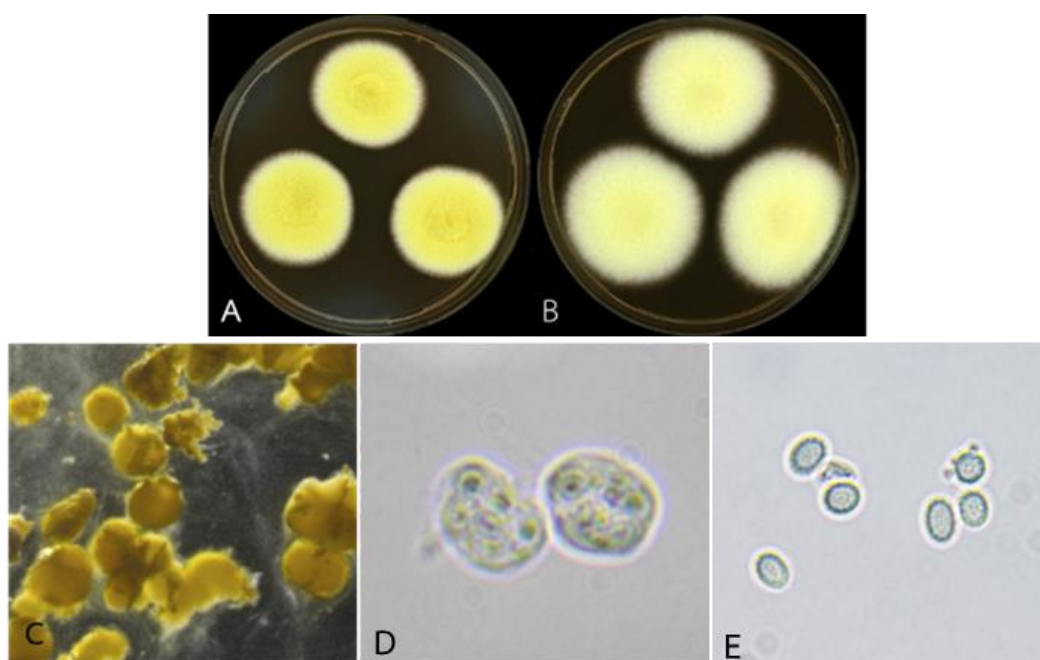
คลาส Ascomycetes

อันดับ Eurotiales

วงศ์ Trichocomaceae

สกุล *Talaromyces*

เชื้อราในสกุล *Talaromyces* โคลนีสีเหลือง (รูปที่ 2.5A และ B) ขมพู ส้มแดง เป็นเชื้อราที่มีการสร้าง ascocarp รูปทรง globose ถึง subglobose (รูปที่ 2.5C) ภายใน ascocarp มี ascus หลายอัน รูปทรง globose ถึง subglobose (รูปที่ 2.5D) ภายใน ascus บรรจุ ascospore หลายอัน มีรูปทรง subglobose ถึง ellipsoid ไม่มี ridge โดยส่วนใหญ่จะพบ spiny ที่ผิวของ ascospore (รูปที่ 2.5E) เชื้อราสกุล *Talaromyces* เป็น teleomorph ของเชื้อราสกุล *Penicillium* สามารถพบได้ทั่วไปในดิน (Benjamin, 1955)



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces stipitatus* บ่มเชื้อราเป็นระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส A: ลักษณะโคโลนียบนอาหาร Czapek yeast extract agar (CYA); B: ลักษณะโคโลนียบนอาหาร Malt extract agar (MEA); C: ลักษณะ ascocarp; D: ลักษณะ ascus; E: ลักษณะ ascospore (ที่มา: Yilmaz และคณะ, 2014)

Yilmaz และคณะ (2014) ได้จัดอนุกรมวิธานของเชื้อราในสกุล *Talaromyces* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น เชื้อรา *T. macrosporus* เติบโตบนอาหาร Czapek yeast extract agar (CYA) สีโคโลนีสีเหลือง การยกตัวของโคโลนีย์เป็นแบบ raise ขอบโคโลนีย์เป็นแบบ entire ascocarp สีเหลืองรูปทรง globose ขนาด 100-350×100-400 ไมโครเมตร ascus มีขนาด 11.50-13.50×13-15 ไมโครเมตร ascospore รูปทรง subglobose ถึง broadly ellipsoid

มีขนาดอยู่ที่ 5.00-6.50×4.50-5.50 ไมโครเมตร พบ spiny ที่บริเวณผิวของสปอร์ สำหรับเชื้อรา *T. muroii* ที่เลี้ยงบนอาหาร CYA สีโคโลนีมีสีเหลือง การยกตัวของโคโลนีเป็นแบบ raise ขอบโคโลนีเป็นแบบ entire ascocarp สีเหลืองรูปทรง subglobose ขนาด 140-290×160-330 ไมโครเมตร ascus มีขนาด 7.50-9.50×9.50-13 ไมโครเมตร ascospore รูปทรง ellipsoid มีขนาดอยู่ที่ 3-4×3.50-6 ไมโครเมตร ไม่มี ridge แต่มี spiny การบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS และ  $\beta$ -tubulin พบว่าในบริเวณ ITS ไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ของแต่ละสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่บริเวณ  $\beta$ -tubulin สามารถแยกกลุ่มความสัมพันธ์ในระดับสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน

สุภานัน (2561) คัดแยกและบ่งชี้เชื้อรา *T. muroii* ที่แยกได้จากดินมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้ โคโลนีมีสีเหลืองถึงส้ม ascocarp รูปร่าง globose ถึง subglobose ขนาด 230.61-240.34 × 245.94-265.18 ไมโครเมตร ภายใน ascus ประกอบด้วย ascospore มีรูปร่าง subglobose และ ellipsoidal ขนาด 8.85-8.92 × 9.20-9.93 ไมโครเมตร และบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ตำแหน่ง  $\beta$ -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a กับ Bt2b มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 500 คู่เบส

Manoach และคณะ (2013) บ่งชี้เชื้อรา *Talaromyces* สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากดินในจังหวัดตราดของประเทศไทย คือ *T. thailandensis* และ *T. tratensis* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 เพื่อหาความสัมพันธ์ภายในสกุล *Talaromyces* พบว่าตำแหน่ง ITS ไม่สามารถบ่งชี้ในระดับสปีชีส์ได้ ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง  $\beta$ -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ Bt2a กับ Bt2b พบว่ามีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ที่ 269 และ 493 คู่เบส ตามลำดับ และตำแหน่ง RPB1 ด้วยคู่ไพรเมอร์ RPB1 กับ RPB2 พบว่ามีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเออยู่ที่ 469 และ 493 คู่เบส ตามลำดับ โดยพบว่าดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง  $\beta$ -tubulin และ RPB1 สามารถบ่งชี้ระดับสปีชีส์ได้

## 2.5 เชื้อราสกุล *Eupenicillium*

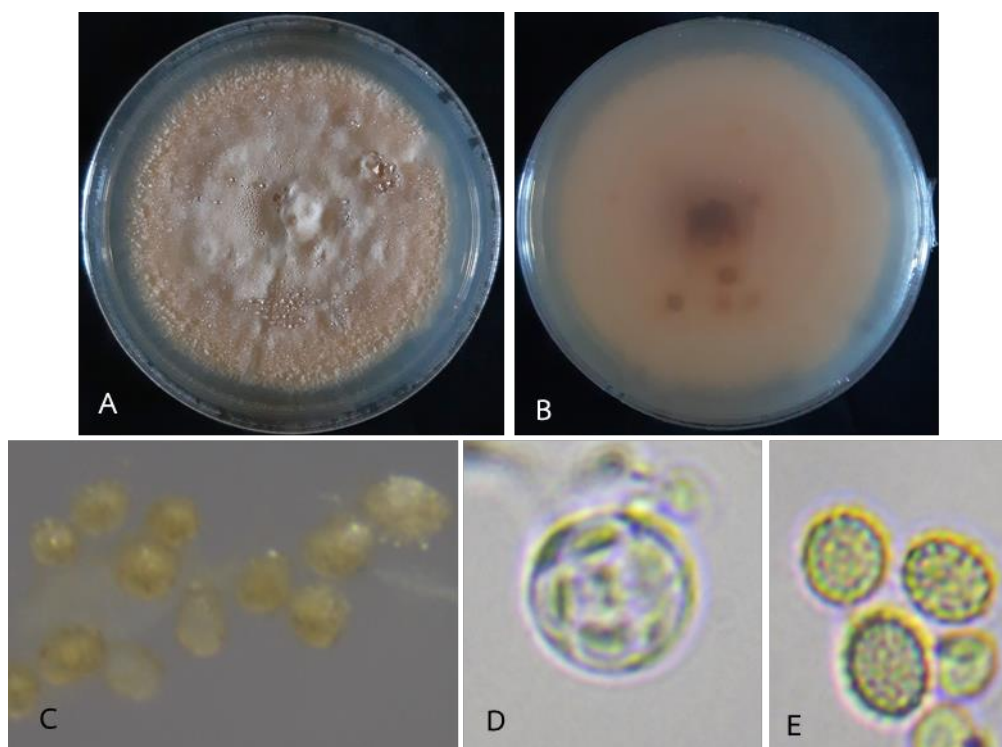
คลาส Ascomycetes

อันดับ Eurotiales

วงศ์ Trichocomaceae

สกุล *Eupenicillium*

Amelia และ De (1967) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุล *Eupenicillium* โดยเชื้อราในสกุล *Eupenicillium* มีโคโลนีสีเหลือง ครีมน (รูปที่ 2.6A และ B) เป็นเชื้อราที่มีการสร้าง ascocarp รูปทรง globose ถึง subglobose (รูปที่ 2.6C) ภายใน ascocarp มี ascus หลายอัน รูปทรง globose ถึง subglobose (รูปที่ 2.6D) ภายใน ascus บรรจุ ascospore หลายอัน มีรูปทรง subglobose ถึง ellipsoid ไม่มี ridge โดยส่วนใหญ่จะพบ spiny ที่ผิวของ ascospore (รูปที่ 2.6E) เชื้อราสกุล *Eupenicillium* เป็น teleomorph ของเชื้อราสกุล *Penicillium* สามารถพบได้ทั่วไปในดิน นอกจากนั้นยังได้บ่งชี้ในระดับสปีชีส์ของเชื้อรา *E. brefeldianum* ไว้ดังนี้ โคโลนีมีสีเหลือง ascocarp รูปทรง globose ถึง subglobose ขนาด 100-200 ไมโครเมตร ascus มีขนาดอยู่ที่ 7.50-9 ไมโครเมตร ประกอบด้วย ascospore มีรูปทรง broadly ellipsoidal ขนาด 2.50-3 × 3-4 ไมโครเมตร



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Eupenicillium brefeldianum* ลักษณะโคโลนีที่ระยะเวลา 25 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส A และ B: ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ด้านหน้าและหลังจานอาหาร; C: ลักษณะ ascocarp; D: ลักษณะ ascus; E: ลักษณะ ascospore

(ถ่ายภาพโดย: อติศร ปุญญนพรัตน์, 2561)

## 2.6 การใช้ประโยชน์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ในการควบคุมโรคพืช

ในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมโรคพืช อาทิเช่น กมลวรรณ (2558) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา เอนโดไฟท์สกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่แยกได้จากพืชป่าชายเลนจำนวน 40 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืชจำนวน 10 ชนิด ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วม ผลที่ได้คือ เชื้อรา *Neosartorya* sp. KUFA47 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งโรคพืชทั้ง 10 ชนิด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากที่สุดอยู่ที่ 67.22 เปอร์เซ็นต์ ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในพริก *Alternaria solani* ในส่วนของประสิทธิภาพสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *T. trachyspermus* KUFA35, *Neosartorya* KUFA41 และ *Neosartorya* KUFA47 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate ทดสอบด้วยวิธี poison food ผลการทดสอบที่ได้คือ สารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Neosartorya* sp. KUFA41 มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคได้ทั้ง 10 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคือ 100 เปอร์เซ็นต์

เมอมร (2558) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ที่แยกได้จากดินในการยับยั้งการสร้างสปอร์ *Colletotrichum coffeanum* บนอาหาร PDA ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม ผลการทดลองที่ได้เชื้อรา *T. trachyspermus* EU09 และ *T. muroii* EU04 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมากที่สุดอยู่ที่ 91.22 และ 90.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *T. muroii* EU04, *T. trachyspermus* EU09 และ *T. muroii* EU18 ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol ด้วยวิธี poison food ผลที่ได้คือ สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate ของเชื้อรา *T. muroii* EU04 มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยมีค่า ED<sub>50</sub> อยู่ที่ 0.41 ppm

Jantasorn และคณะ (2016) ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *T. flavus* Bodhi003 และ *N. fischeri* Bodhi004 สกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate นำไปทดสอบด้วยวิธี poison food กับเชื้อราสาเหตุโรค 10 ชนิด ผลที่ได้คือ สารสกัดหยาบที่ได้จาก *N. fischeri* Bodhi004 ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคได้มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคือ 100 เปอร์เซ็นต์ กับเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 4 ชนิด ในขณะที่สารสกัดหยาบที่ได้จาก *T. flavus* Bodhi003 ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตมากที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ กับเชื้อสาเหตุโรคจำนวน 3 ชนิด

Dethoup และคณะ (2018) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *T. tratensis* KUFA0091 ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในข้าว *Bipolaris oryzae* ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม บนอาหาร PDA จากผลการทดสอบที่ได้คือเชื้อราต่อต้าน *T. tratensis* KUFA0091 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งขนาดโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคในข้าว *B. oryzae* มากที่สุดอยู่ที่ 46 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate ของเชื้อรา *T. tratensis* KUFA0091 นำมาทดสอบด้วยวิธี poison food พบว่าสามารถยับยั้งโคโลนีเชื้อรา *B. oryzae* ได้มากที่สุด 53 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร

Mangkalad และคณะ (2018) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้ในหน่อไม้ฝรั่ง *Phomopsis asparagi* ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม ผลจากการทดสอบพบว่า *N. aureola* CHA01-A1 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 57.24 เปอร์เซ็นต์

Pattarasaikul และคณะ (2018) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน *Colletotrichum musae* CMDC-01 และ CMNM-01 ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม ผลจากการทดสอบพบว่า *N. hiratsukae* EU06 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 47.32 และ 50.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับเชื้อราในสกุล *Eupenicillium* ยังไม่พบรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Eupenicillium* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช แต่พบรายงานวิจัยของ Lian และคณะ (2009) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Eupenicillium* sp. ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* และ เชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* ด้วยวิธี paper disc diffusion ผลที่ได้พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate ของเชื้อรา *Eupenicillium* sp. มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone คือ 1-10, 21-30, 0, 0, 11-20 และ 1-10 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากรายงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเก็บตัวอย่างโรคใบจุดในผักคะน้า และตัวอย่างเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium*

##### 3.1.1 การเก็บตัวอย่างโรคใบจุดในผักคะน้า

เก็บตัวอย่างใบคะน้าที่เป็นโรคใบจุดจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี นนทบุรี และราชบุรี โดยใบคะน้ามีลักษณะใบเหี่ยว เหลือง มีแผลเป็นจุดสีน้ำตาล และภายในมีลักษณะเป็น concentric rings เพื่อนำไปคัดแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคต่อไป

##### 3.1.2 การเก็บตัวอย่างเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium*

เก็บตัวอย่างดินที่มีความอุดมสมบูรณ์จากดินในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เลย และสุพรรณบุรี โดยขุดดินบริเวณผิวหน้าออกลึกประมาณ 10 เซนติเมตร (เมอมร, 2558) ตักดินใส่ถุงเก็บตัวอย่างประมาณครึ่งหนึ่งของถุงเก็บตัวอย่างขนาด 7×11 นิ้ว นำไปคัดแยกและบ่งชี้เชื้อรา เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและใช้เป็นเชื้อต่อต้านในการศึกษาต่อไป

รวมทั้งได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จาก รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *N. aureola* CHA01-A01, *N. fennelliae* CHA03-A11, *N. spinosa* CHA09-A01 และ *T. muroii* CHA03-A03

#### 3.2 สารเคมี

##### 3.2.1 อาหารที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อรา (ภาคผนวก ก)

3.2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Potato dextrose broth (PDB)

3.2.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Rose bengal agar base (RBAB)

3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Malt extract agar (MEA)

โดยอาหารทั้ง 3 ชนิด จากบริษัท HiMedia Laboratory (ประเทศอินเดีย)

3.2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Water Agar (WA)

3.2.1.5 น้ำตาลซูโครส

3.2.1.6 Sodium hypochlorite (NaClO)

##### 3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

3.2.2.1 Immersion oil

3.2.2.2 Lactophenol cotton blue บริษัท HiMedia Laboratoty (ประเทศอินเดีย)

3.2.2.3 Sterile distillation water

### 3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (ภาคผนวก ก)

3.2.3.1 Chloroform

3.2.3.2 CTAB

3.3.3.3  $\beta$ -mercaptoethanol

3.3.3.4 Ethanol 70 และ 99.5 เปอร์เซ็นต์

3.3.3.5 Isoamyl alcohol

3.3.3.6 Isopropanol

3.3.3.7 Liquid nitrogen

3.3.3.8 Polyvinylpyrrolidone

3.3.3.9 RNase

3.3.3.10 TE buffer

### 3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

3.2.4.1 Deionize H<sub>2</sub>O

3.2.4.2 Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

3.2.4.3 Magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>)

3.2.4.4 Primer สำหรับบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคสกุล *A. brassicicola* ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ได้แก่ forward primer: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG C-3') และ reverse primer: ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White และคณะ, 1990)

3.2.4.5 Primer สำหรับบ่งชี้เชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ตำแหน่ง  $\beta$ -tubulin ได้แก่ forward primer: Bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') และ reverse primer: Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACCC TTG GC-3') (Glass และ Donaldson, 1995)

3.2.4.6 *Taq* DNA polymerase

3.2.4.7 10X standard *Taq* reaction buffer

### 3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาคผนวก ก)

3.2.5.1 Agarose

3.2.5.2 Boric acid

3.2.5.3 EDTA

3.2.5.4 Ethidium bromide

3.2.5.5 Marker VC 100 bp Plus บริษัท Vivantis (ประเทศมาเลเซีย)

3.2.5.6 Marker 1 Kb บริษัท Biolabs (ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2.5.7 Tris base

3.2.5.8 6X Gel loading dye

### 3.2.6 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา

3.2.6.1 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.2.6.2 Ethyl acetate

3.2.6.3 Methanol

3.2.6.4 Hexane

## 3.3 อุปกรณ์

3.3.1 Agarose gel electrophoresis

3.3.2 Alcohol burner

3.3.3 Autoclave

3.3.4 Balance

3.3.5 Buchner funnel

3.3.6 Cellophane paper

3.3.7 Cork borer

3.3.8 Duran bottle

3.3.9 Forceps

3.3.10 Gel documentation รุ่น IGenius

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 Microcentrifuge

3.3.18 Micropipette set

3.3.19 Microwave

3.3.20 Mortar และ pestle

3.3.21 Needle

3.3.22 Petri dish diameter 60 and 90 mm

- 3.3.23 Rotary evaporator
- 3.3.24 Slide และ cover slit
- 3.3.25 Spatula
- 3.3.26 Spectrophotometer
- 3.3.27 Spin down
- 3.3.28 Stereo microscope
- 3.3.29 Syringes และ needle size 25Gx1”
- 3.3.30 Test tube size 0.2, 1.5 and 2.0 mm.
- 3.3.31 Thermal cycle
- 3.3.32 Tip
- 3.3.33 Tissue bottle
- 3.3.34 UV transilluminator
- 3.3.35 Vortex mixer
- 3.3.36 Vernier
- 3.3.37 Whatman No.1
- 3.3.38 Water bath

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การตัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *Alternaria brassicicola*

นำตัวอย่างใบคะน้าที่มีผลมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี Tissue transplanting (กรมวิชาการเกษตร, 2558) ชั้นแรกนำตัวอย่างใบพีชมาตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.25 ตารางเซนติเมตร ระหว่างส่วนของเนื้อเยื่อที่เป็นผลกับส่วนเนื้อเยื่อปกติ นำชิ้นเนื้อเยื่อไปฆ่าเชื้อพื้นผิวโดยแช่ในสารละลาย NaClO ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 5 นาที นำไปวางบนอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน ใช้เข็มขนาด 25Gx1” ตัดบริเวณปลายเส้นใยที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อฝั่่งที่เป็นผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ วางลงบนจานอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 3.4.2 การตัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium*

การตัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* จากตัวอย่างดินที่เก็บได้จากพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย เลย และ สุพรรณบุรี ดำเนินการตัดแยกเชื้อราด้วยวิธี Heat treatment (ดัดแปลงจาก Elettra และคณะ, 2017) ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม เติม

น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาให้เทน้ำทิ้ง โดยห้ามเขย่าหลอดทดลอง จากนั้นใช้ชั้นตักสารตกดินใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อแล้วเทอาหาร RBAB ด้วยวิธีการ pour plate รอจนกระทั่งอาหารแข็ง นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง สังเกตทุกๆ 24 ชั่วโมง เมื่อปรากฏโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราให้ใช้เข็มเขี่ยแต่ละโคโลนีวางลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อนำไปบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคระดับโมเลกุลต่อไป

### 3.4.3 การบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

#### 3.4.3.1 การบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้าบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10-15 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตสีของโคโลนีจะเป็นสีเขียวถึงดำ ลักษณะนุ่มเหมือนกำมะหยี่ ในส่วนของลักษณะเส้นใยจะคัดเลือกเส้นใยที่มีสีน้ำตาล มีผนังกัน และลักษณะ conidia จะมีลักษณะเป็นรูปทรง obpyriform มีผนังกันตามขวาง ต่อกันเป็นสาย (Hye และคณะ, 2001 ; Woudenberg และคณะ, 2013 ; Pattanamahakul และ Strange, 1999) โดยใช้เทคนิค Slide culture วิธีการคือ ตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ปราศจากเชื้อให้เป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมขนาด 0.25 ตารางเซนติเมตร จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อราให้ติดที่ปลายเข็มแทงเข้าไปที่ด้านข้างชิ้นวุ้นอาหาร PDA จากนั้นนำ cover glass วางลงบนชิ้นวุ้นอาหาร PDA โดยให้ชิ้นวุ้นอยู่ตรงกลาง cover glass จากนั้นนำไปสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope และหาอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกๆ 2 วัน เริ่มวัดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อรา จนครบ 9 วัน

#### 3.4.3.2 การบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium*

เลี้ยงเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 15 วัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสีโคโลนีของราในสกุล *Neosartorya* จะเป็นสีขาวถึงขาวครีม ลักษณะของ ascocarp ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* แบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose และ ascospores มีรูปร่าง subglobose ถึง ellipsoidal และมี ridge ที่มีลักษณะเป็นวงแหวน โดยคัดแยกตามหลักของ Samson และคณะ (2007) ในส่วนของเชื้อราในสกุล *Talaromyces* สีโคโลนีมีสีเหลืองถึงส้มแดง ascocarp สีเหลืองถึงส้ม มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecia รูปร่าง globose ถึง subglobose ภายใน ascus ประกอบด้วย ascospore มีรูปร่าง subglobose และ broadly ellipsoidal แยกตามหลักของ Yilmaz และคณะ (2014) และเชื้อราในสกุล *Eupenicillium* สีโคโลนีมีสีเหลืองครีม ascocarp สีเหลือง รูปร่าง globose ถึง subglobose ascospore มีรูปร่าง subglobose และ broadly ellipsoidal แยกตามหลักของ Amelia และ De (1967) สำหรับ

ascocarp, ascus และ ascospore ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope โดยเขียนเชื้อลงบนสไลด์แล้วย้อมด้วย lactophenol cotton blue นอกจากนั้น ascocarp ที่อยู่บนอาหาร PDA นำมาศึกษาภายใต้กล้อง stereo microscope ด้วย สำหรับอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ สังเกตลักษณะและสีของโคโลนี สังเกตการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope ในส่วนของการศึกษาอัตราการเจริญ โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA และ MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุก 2 วัน เริ่มวัดในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อวัดจนครบ 11 วัน

### 3.4.4 การศึกษาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 3.4.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อราบนแผ่นเซลโลเฟนที่ปราศจากเชื้อ โดยคืบแผ่นเซลโลเฟนวางลงบนผิวหน้าอาหาร PDA จากนั้นใช้ cork borer ตัดขอบโคโลนีของเชื้อราที่ต้องการศึกษาจากการทำ single spore โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน นำไปวางบนแผ่นเซลโลเฟนและบ่มที่อุณหภูมิห้องเมื่อโคโลนีเจริญโตเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ช้อนตักสารที่ปราศจากเชื้อชุดเส้นใยออกจากแผ่นเซลโลเฟน นำไปบดด้วยโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวบดให้ละเอียดจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle, 1987) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ นำเส้นใยที่บดแล้วประมาณ 0.5 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 2.0 มิลลิลิตร เติม  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เพื่อแตกเซลล์และแยกสารประกอบฟีนอลิก ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง โดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 15 นาที จนผงเส้นใยแตกเป็นเนื้อเดียวกับสาร เมื่อครบเวลานำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยพลิกหลอดไปมาทันที หลังจากใส่สาร นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จะได้สารละลายที่แบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นล่างคือ chloroform : isoamyl alcohol ชั้นกลางคือโปรตีน และชั้นบนคือสารละลายที่มีดีเอ็นเอ ดูดส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อย่อย RNA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตรอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที จะได้สารละลายแบ่งออกเป็น 3 ชั้น เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันของสารละลายดีเอ็นเอ โปรตีน และสาร chloroform : isoamyl alcohol ดูดส่วนใสชั้นบนใสในหลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม isopropanol ที่เย็น ปริมาตรเท่ากับ 1 : 1 กับส่วนใสที่ดูดมา ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมาทันที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เมื่อครบ

เวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเออยู่บริเวณก้นหลอด จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเออยู่บริเวณก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย absolute ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จะได้ตะกอนดีเอ็นเออยู่บริเวณก้นหลอดเทส่วนใสทิ้ง และปั่นเหวี่ยงรอบสุดท้ายที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ใช้ไมโครปิปปेटดูดน้ำที่เหลือออก จากนั้นทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อตะกอนแห้งแล้ว ขั้นตอนสุดท้าย คือละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นย้ายสารละลายดีเอ็นเอมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป การตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอเล็กโทรโฟรีซิส โดยนำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 3X gel loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในหลุม gel agarose ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยตั้งกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอ Marker 1 Kb เมื่อครบ 30 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้าง ethidium bromide ด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที ถ่ายรูปเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

#### 3.4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR มีปริมาตรสารในปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Taq DNA Polymerase ความเข้มข้น 5,000 ยูนิต ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร standard Taq reaction buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร forward primer ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร reverse primer ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTP ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ Nuclease free water ปริมาตร 10.6 ไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สำหรับเชื้อรา *A. brassicicola* ใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ดังนี้ เริ่มจาก initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 120 วินาที จำนวน 1 รอบ denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 120 วินาที จำนวน 35 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 600 วินาที จำนวน 1 รอบ (ดัดแปลงจาก Pattanamahakul และ Strange, 1999)

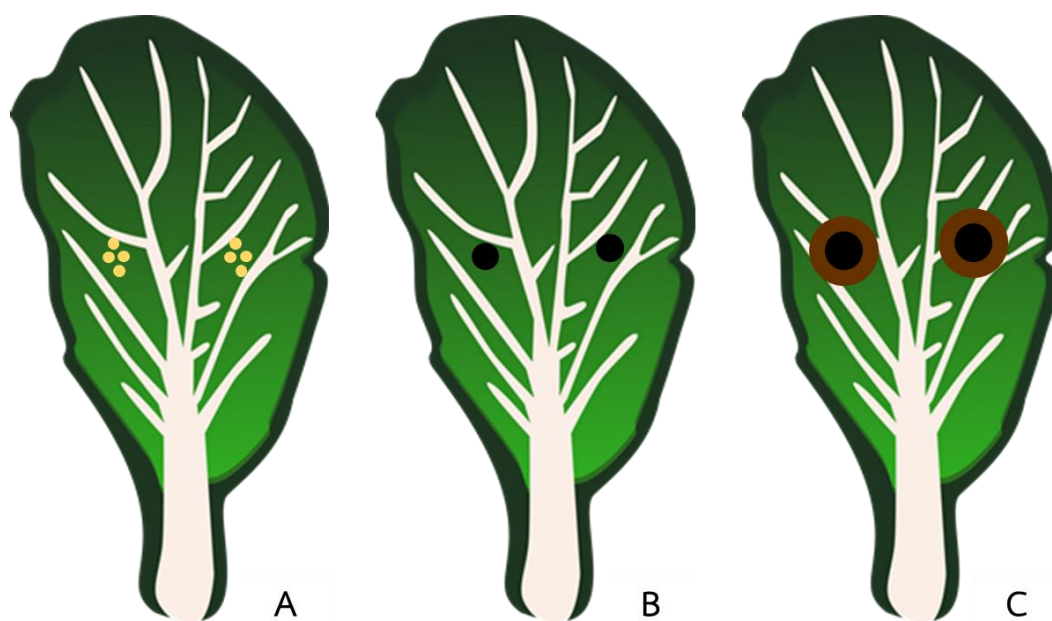
ส่วนเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ  $\beta$ -tubulin ใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ เริ่มจาก initial denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 180 วินาที annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 1 รอบ denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 35 รอบ และ denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 600 วินาที จำนวน 1 รอบ (เมอมร, 2558)

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 3X gel loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในหลุม gel agarose ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยตั้งกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างกับดีเอ็นเอ Marker VC 100 bp Plus เมื่อครบ 30 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้าง ethidium bromide ด้วยน้ำเป็นเวลา 10 นาที ถ่ายรูปเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Bioneer Corporation ประเทศเกาหลีใต้ หลังจากได้รับลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และหาตำแหน่งจับไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Bioedit หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไป Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อรา จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อราโดยสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Tamura-Nei และ Maximum-likelihood

### 3.4.5 การทดสอบความสามารถการก่อโรคใบจุดในผักคะน้าของเชื้อราสาเหตุโรค *Alternaria brassicicola*

การทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test) บนใบคะน้าใช้วิธี Detached leaf โดยนำใบคะน้าที่มีขนาดความยาว 20 เซนติเมตร มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นฆ่าเชื้อพื้นผิวด้วยด้วยการพ่น ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 นาที และล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นทำให้ใบเกิดแผลจำนวน 2 แผลต่อ 1 ใบ โดยเชื้อรา *A. brassicicola* 1 ไอโซเลต ใช้ใบคะน้า 2 ใบ ในการทำแผลใช้เข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 25Gx1” จิ้มแผลละ 5 ครั้ง ให้อยู่ภายในเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.1A) เตรียมเชื้อที่จะนำมาทดสอบโดยทำการเลี้ยงเชื้อบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้

cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีของเชื้อรา วางลงบนแผลของใบคະນ້າ โดยวางขึ้นวุ้นด้านที่มีเส้นใยลงบนแผล (รูปที่ 3.1B) บ่มใบคະນ້าที่มีเชื้อราในสภาวะ moisture โดยนำใบคະน້าที่มีเชื้อราใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 23×32 เซนติเมตร ภายในบรรจุสำลีที่ชุบน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลสีน้ำตาลที่เกิดขึ้น (รูปที่ 3.1C) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดควบคุมจะเป็นเพียงขึ้นวุ้นปราศจากเชื้อก่อโรค บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรอยแผลสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นบนใบคະน້าด้วย vernier caliper และหาดัชนีความรุนแรงของโรค โดยใบไม่เกิดโรค ใบมีสีเหลืองปนเขียว ใบมีสีเหลือง และ ใบมีสีเหลืองปนน้ำตาล ให้คะแนนคือ 0, 1, 2 และ 3 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคคือ 0, 1-30, 31-60 และ 61-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Mukesh และคณะ, 2017) ไอโซเลตใดที่แสดงอาการรอยแผลวงกลมสีน้ำตาลให้ทำการคัดแยกเชื้อกลับมาอีกครั้ง (re-isolate) ด้วยวิธี Tissue transplanting (กรมวิชาการเกษตร, 2558) เพื่อเป็นการยืนยันว่าเชื้อราไอโซเลตที่ทดสอบเป็นเชื้อราสาเหตุโรค โดยหลังจากที่ re-isolate เรียบร้อยแล้วให้นำเชื้อราไปบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาอีกครั้ง และนำเชื้อราที่ re-isolate กลับมาได้ใหม่ ไปใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคใบจุดในคະນ້า *A. brassicicola* ต่อไป โดยคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคที่มีความสามารถในการทำให้เกิดแผลบนใบคະน້ากว้างที่สุด และมีดัชนีความรุนแรงของโรคมามากที่สุด โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ วิเคราะห์ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อราก่อโรคแต่ละไอโซเลตทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น P=0.05



รูปที่ 3.1 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคใบจุดในผักคະน້า A: การทำแผลบนใบคະน້า; B: การวางขึ้นวุ้นบนใบคະน້า; C: การวัดขนาดแผล

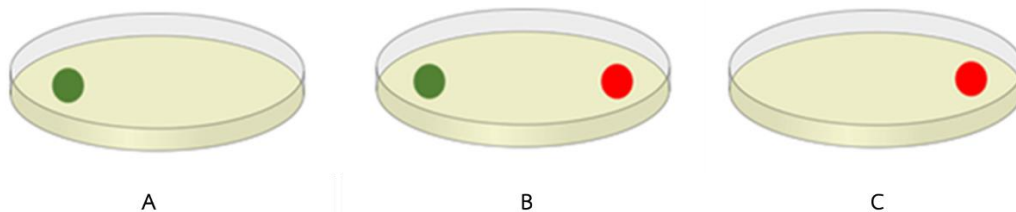
### 3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *Alternaria brassicicola*

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ที่คัดแยกได้จากดินและที่ได้รับความอนุเคราะห์จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *N. aureola* CHA01-A01, *N. fennelliae* CHA03-A11, *N. spinosa* CHA09-A01 และ *T. muroii* CHA03-A03 ใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *A. brassicicola* ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม (dual-culture) วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ เตรียมเชื้อรา *A. brassicicola* เชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* โดยเลี้ยงเชื้อบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีของเชื้อ วางลงบนจานอาหาร PDA โดยวางเชื้อราสาเหตุโรคและเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ด้านตรงข้ามกัน ให้มีระยะห่างประมาณ 4.5 เซนติเมตร ดังรูปที่ 3.2B จานอาหารควบคุมมีทั้งหมด 2 ชุด คือ ชุดของเชื้อรา *A. brassicicola* จะวางขึ้นวันที่ด้านใดด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังรูปที่ 3.2A และชุดของเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* จะวางขึ้นวันที่ด้านตรงข้ามเชื้อรา *A. brassicicola* ดังรูปที่ 3.2C ป่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน เมื่อครบ 30 วัน นับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมโดยใช้น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใส่ลงไปบนจานอาหารจากนั้นชุดสปอร์ของเชื้อราด้วยด้วยกระจกสไลด์ใช้ไมโครปิเปตดูด spore suspension ใส่ลงไปบน hemacytometer chamber ละ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ที่ได้จากจานอาหารชุดควบคุมของเชื้อรา *A. brassicicola* นำจำนวนสปอร์ที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ (Spore Inhibition; SI) ด้วยสมการ

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

เมื่อ R1 คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ในจานอาหารควบคุม

R2 คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม



รูปที่ 3.2 การวางชิ้นวุ้นในการทดสอบ dual-culture A: ลักษณะการวางเชื้อรา *Alternaria brassicicola* บนจานอาหารชุดควบคุม; B: ลักษณะการวางเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม; C: ลักษณะการวางเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* บนจานอาหารชุดควบคุม

หมายเหตุ: ● แสดงถึงเชื้อรา *A. brassicicola* และ ● แสดงถึงเชื้อรา *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium*

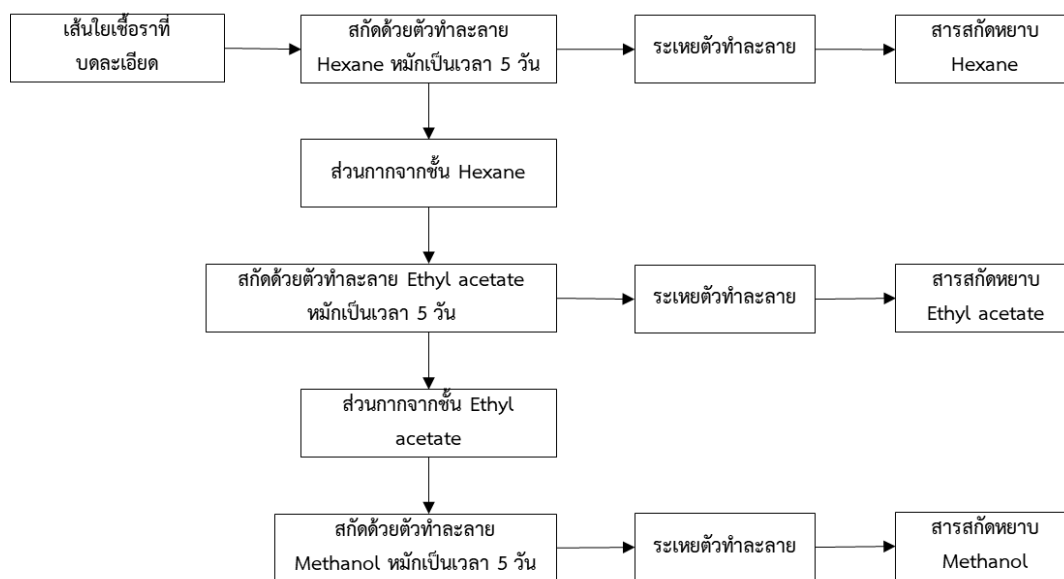
คัดเลือกเชื้อราในสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดใน 3 อันดับแรก ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค *A. brassicicola* โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น  $P=0.05$

### 3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *Alternaria brassicicola*

#### 3.4.7.1 การสกัดสาร (เมอมร, 2558)

คัดเลือกเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *A. brassicicola* โดยคัดเลือกเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดใน 3 อันดับแรก นำมาเลี้ยงด้วยอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดขอบโคโลนีของเชื้อรา โดยชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา 1 ชิ้น ต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มเป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบ 30 วันนำเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จนกว่าเส้นใยจะแห้ง จากนั้นนำเส้นใยที่แห้งมาบดด้วยเครื่องปั่น และนำผงเส้นใยที่ได้ไปห่อด้วยผ้าขาวบาง โดยห่อให้เหมือนลูกประคบ แล้วนำไปสกัดสารด้วยวิธี maceration โดยนำผงเส้นใยที่ห่อด้วยผ้าขาว

บางเป็นลูกประคบไปแช่ด้วยตัวทำละลาย hexane ในปริมาณ 1 : 10 (W/V) เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบเวลานำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัดหยาบชั้น hexane แล้วจากนั้นนำผงเส้นใยที่ผ่านการแช่ในตัวทำละลาย hexane ไปสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate และ methanol ตามลำดับโดยใช้หลักการสกัดสารเหมือนกันกับตัวทำละลาย hexane ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แผนผังแสดงลำดับในการสกัดสารสกัดหยาบของเชื้อราต่อต้าน

3.4.7.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *A.brassicicola*

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol ไปทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยวิธี poison food (สุภานัน, 2561) ละลายสารสกัดหยาบด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ นำสารสกัดหยาบที่ได้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีความเข้มข้น 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ppm แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบมาเทในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งจึงใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *A. brassicicola* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 วัน วางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อลงตรงกลางงานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 15 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีด้วย Vernier caliper และนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา

*A. brassicicola* ในจานอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบที่เลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* โดยใช้ น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ใส่ลงไปบนจานอาหารจากนั้นจุดสปอร์ของเชื้อราด้วยด้วยกระจกสไลด์ใช้ ไมโครปิเปตดูด spore suspension ใส่ลงไปบน hemacytometer chamber ละปริมาตร 10 ไมโครลิตร นับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ด้วย hemacytometer เปรียบเทียบกับชุด ควบคุม โดยชุดควบคุมคืออาหาร PDA ที่เลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* โดยไม่ผสมสารสกัดหยาบ จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ (Spore inhibition; SI) จากสมการ

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

เมื่อ R1 คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ในจานอาหารชุดควบคุม

R2 คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* ในจานอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบ ทำการทดลองแบบ 3x5 factorial experiment ใน CRD จำนวน 4 ซ้ำ ซึ่งมี 2 ปัจจัยดังนี้

ปัจจัย A คือ ชนิดของสารสกัดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่

A1 = สารสกัดตัวทำละลาย hexane

A2 = สารสกัดตัวทำละลาย ethyl acetate

A3 = สารสกัดตัวทำละลาย methanol

ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm (ตัวควบคุม)

B2 = ความเข้มข้น 10 ppm

B3 = ความเข้มข้น 100 ppm

B4 = ความเข้มข้น 1,000 ppm

B5 = ความเข้มข้น 10,000 ppm

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น  $P=0.05$  และคำนวณหาค่า Effective Dose ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ED<sub>50</sub>) คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเชื้อรา 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

### 3.4.8 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *Alternaria brassicicola*

เริ่มจากการหาอัตราการงอกที่เหมาะสม โดยนำจานเลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* ที่มี อายุครบ 10 วัน โดยเทอาหาร PDB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* แล้วจุดสปอร์ด้วยกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นจุด spore suspension ใส่ใน hemacytometer chamber ละปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยเตรียมความเข้มข้นสปอร์ให้มี

จำนวนสปอร์อยู่ที่  $1 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อได้ความเข้มข้นสปอร์ที่ต้องการแล้วจึงเริ่มนับจำนวนสปอร์ที่งอกอย่างสมบูรณ์ทุกชั่วโมง ให้ครบจำนวน 40 สปอร์ เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสม การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด เริ่มจากนำสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol ไปทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยละลายสารสกัดหยาบด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับอาหาร PDB ทำเป็น stock สาร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และผสมกับ spore suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* ที่มีความเข้มข้นของสปอร์อยู่ที่  $1 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มข้นของสารสกัดหยาบอยู่ที่ 0, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ได้จากการหาช่วงเวลาการงอกที่เหมาะสม) ในส่วนของชุดควบคุมจะไม่มีส่วนผสมสารสกัดหยาบลงไป จากนั้นดูด spore suspension ที่ผสมกับสารสกัดหยาบมานับจำนวนสปอร์ที่งอกอย่างสมบูรณ์และสปอร์ที่ไม่เกิดการงอกจำนวน 40 สปอร์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ spore suspension ที่ไม่ผสมสารสกัดหยาบ ในการนับจำนวนสปอร์ใช้ไมโครปิเปตดูด spore suspension ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน heamacytometer และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนสปอร์ที่งอกอย่างสมบูรณ์ ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์ (% Germination Inhibition) คำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ Germination Inhibition} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

เมื่อ R1 คือ จำนวนสปอร์ที่งอกอย่างสมบูรณ์ของชุดควบคุม

R2 คือ จำนวนสปอร์ที่งอกอย่างสมบูรณ์ของ spore suspension ที่ผสมสารสกัดหยาบทำการทดลองแบบ 3x5 factorial experiment ใน CRD จำนวน 4 ซ้ำ ซึ่งมี 2 ปัจจัยดังนี้

ปัจจัย A คือชนิดของสารสกัดจากตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่

A1 = สารสกัดชั้น hexane

A2 = สารสกัดชั้น ethyl acetate

A3 = สารสกัดชั้น methanol

ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 50 ppm

B3 = ความเข้มข้น 100 ppm

B4 = ความเข้มข้น 500 ppm

B5 = ความเข้มข้น 1,000 ppm

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบข้อมูลแบบ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น  $P=0.05$

#### 3.4.9 การวิเคราะห์สารสำคัญด้วย Gas chromatography-mass spectrometry

นำสารสกัดหยาบที่ได้ส่งวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า

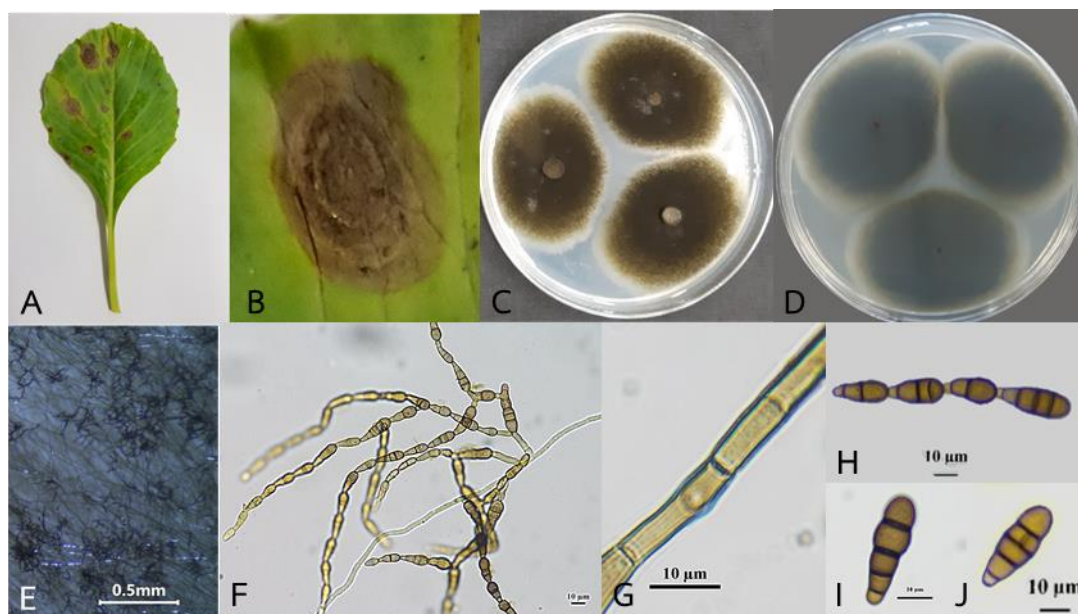
จากการลงพื้นที่เก็บตัวอย่างผักคะน้าที่มีอาการโรคใบจุด โดยเลือกจากใบที่มีแผลจุดวงกลมสีน้ำตาลและเกิดวงแหวนซ้อนกัน ดังรูปที่ 4.1A และ B นำตัวอย่างที่ได้มาทำการคัดแยกเชื้อราด้วยวิธี Tissue transplanting ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต จาก 6 สถานที่ ดังนี้ อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม ได้ทั้งหมด 1 ไอโซเลต อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลต อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี ได้ทั้งหมด 2 ไอโซเลต KMITL Organic Farm จังหวัดสุพรรณบุรี ได้ทั้งหมด 1 ไอโซเลต อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ได้ทั้งหมด 1 ไอโซเลต และ อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี ได้ทั้งหมด 1 ไอโซเลต ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่างและเชื้อราที่แยกได้จากโรคใบจุดในผักคะน้าในแต่ละสถานที่

สถานที่เก็บตัวอย่าง	ไอโซเลตที่คัดแยกได้
อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม	KAAB01
อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม	KAAB02, KAAB03, KAAB04, KAAB05
อำเภอบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี	KAAB06, KAAB07
KMITL Organic Farm จังหวัดสุพรรณบุรี	KAAB08
อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี	KAAB09
อำเภอเมือง จังหวัดราชบุรี	KAAB10

การบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้าด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยดูจากลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี ลักษณะและขนาดของ conidia โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง จากการศึกษาพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 10 ไอโซเลต มีอัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 7.84 มิลลิเมตรต่อวัน โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังนี้ ลักษณะโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มีสีเขียวเข้มถึงสีดำ โคโลนีเจริญเป็นวงกลม circular ผิวหน้าเรียบเนียน (smooth) ไม่มีการยกตัวของ

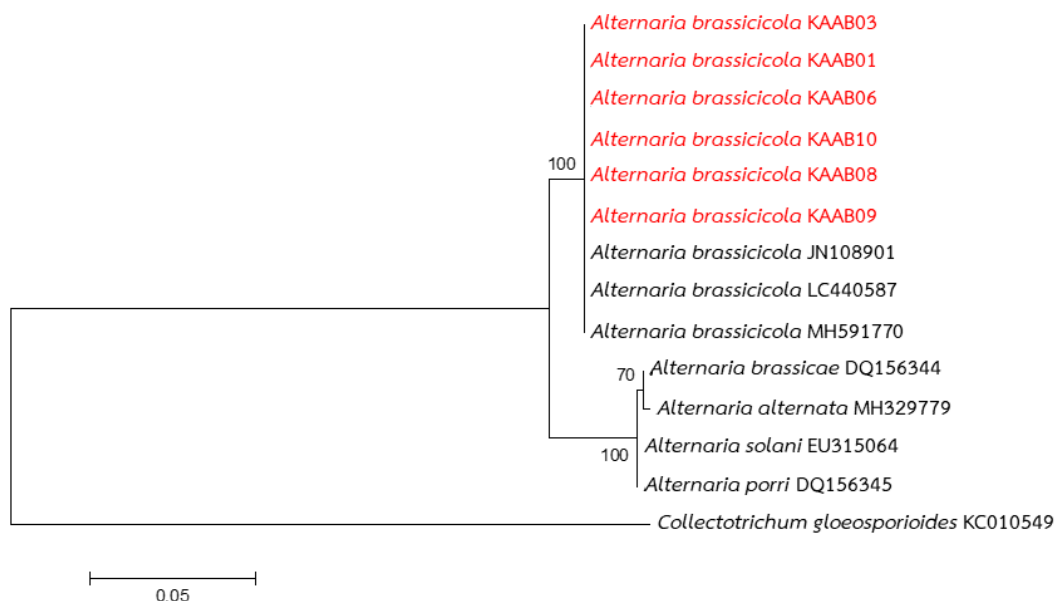
โคโลนี (flat) ดังรูปที่ 4.1C และ D เส้นใยมีผนังกันสื่อน้ำตาล conidiophore แตกเป็นกิ่งออกมาจากเส้นใย โดยที่ปลายสุดของ conidiophore จะกว้างกว่าเส้นใยปกติ conidiophore 1 กิ่ง จะประกอบไปด้วย conidia 1 อัน มาต่อที่ปลายสุดของ conidiophore และสามารถมี conidia หลายอันมาต่อเป็นสายยาวดังรูปที่ 4.1F และ G ในส่วนของ conidia มีรูปทรงแบบ obpyriform สีสน้ำตาลมีผนังกันตามยาว และมีผนังกันตามขวาง แต่จะพบสปอร์ที่มีผนังกันตามขวางได้จำนวนน้อย (รูปที่ 4.1I และ J) โดย conidia ทั้ง 10 ไอโซเลต มีขนาดอยู่ในช่วง 4.71-10.68×21.74-49.21 ไมโครเมตร ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พรหมมาศ (2555) ; Pattanamahakul และ Strange (1999) ; Hye และคณะ (2001) ; Woudenberg และคณะ (2013) ; Swati และคณะ (2014) ที่ได้บ่งชี้เชื้อรา *A. brassicicola* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สำหรับการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้าในบริเวณ ITS โดยสุ่มเลือกตัวแทนจำนวน 6 ไอโซเลต KAAB01, KAAB03, KAAB06, KBBA08, KAAB09 และ KAAB10 มาจากแต่ละพื้นที่ ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากนั้นส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์รวมไพรเมอร์ และนำไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank ผลของการตรวจสอบขนาดของ PCR ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่ามีความยาวอยู่ที่ 550 คู่เบส และผลจากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์รวมกับไพรเมอร์มีความยาว 566 คู่เบส ทั้ง 6 ไอโซเลต ซึ่งมีความแตกต่างกับงานวิจัยของ Hye และคณะ (2001) ที่มีความยาวลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 560 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Alternaria brassicicola* ตรงกับ accession MH591770, LC440587 และ JX499030 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 6 ไอโซเลต ในการหาความสัมพันธ์ของเชื้อราสกุล *Alternaria* ในบริเวณ ITS โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วย maximum likelihood ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria porri*, *Alternaria brassicae* และ *Colletotrichum gloeosporioides* จากฐานข้อมูล GenBank มาศึกษาร่วมกับไอโซเลตตัวแทนทั้งหมด 6 ไอโซเลต ผลที่ได้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยไอโซเลต KAAB01, KAAB03, KAAB06, KAAB08, KAAB09 และ KAAB10 มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *A. brassicicola* accession LC440587, MH591770 และ JN108901 กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วย *A. alternata* accession MH329779, *A. solani* accession EU315064, *A. porri* accession DQ156345 และ *A. brassicae* DQ156344 จากรูปที่ 4.2 สังเกตได้ว่าเชื้อรา *A. brassicae* DQ156344 และ *A. alternata* accession MH329779 มีความใกล้เคียงกันมากที่สุดในกลุ่มที่ 2 โดยเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มมี out group คือ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* KC010549 ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะอาการโรคใบจุดในผักคะน้าและแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01 ที่แยกได้จากโรคใบจุดในผักคะน้า A: ลักษณะอาการโรคใบจุดในผักคะน้า; B: ลักษณะแผลโรคใบจุดในผักคะน้า; C: ลักษณะโคโลนีด้านหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ; D: ลักษณะโคโลนีด้านหลังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ; E: ลักษณะ conidiophore ภายใต้วัดกล้อง stereo microscope; F: ลักษณะ conidiophore; G: ลักษณะเส้นใย; H: ลักษณะ conidia ที่ต่อกันเป็นสาย; I-J: ลักษณะ conidia

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาด conidia และ อัตราการเจริญ ของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า

ไอโซเลต	ขนาด conidia ( $\mu\text{m}$ )	อัตราการเจริญ (mm/day)
KAAB01	5.86-8.23×31.18-49.21	7.82
KAAB02	4.90-9.23×21.74-32.22	7.82
KAAB03	5.48-8.67×31.18-49.21	7.89
KAAB04	6.72-9.38×24.33-35.08	7.72
KAAB05	5.44-8.38×24.22-42.15	7.87
KAAB06	4.71-9.78×23.07-34.01	7.79
KAAB07	5.37-8.86×24.01-34.62	7.97
KAAB08	6.07-8.81×23.54-45.69	7.84
KAAB09	6.35-10.26×24.51-42.72	7.78
KAAB10	8.04-10.68×25.91-41.02	7.90



รูปที่ 4.2 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อราสกุล *Alternaria* ในบริเวณ ITS โดยใช้ maximum likelihood ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000

#### 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

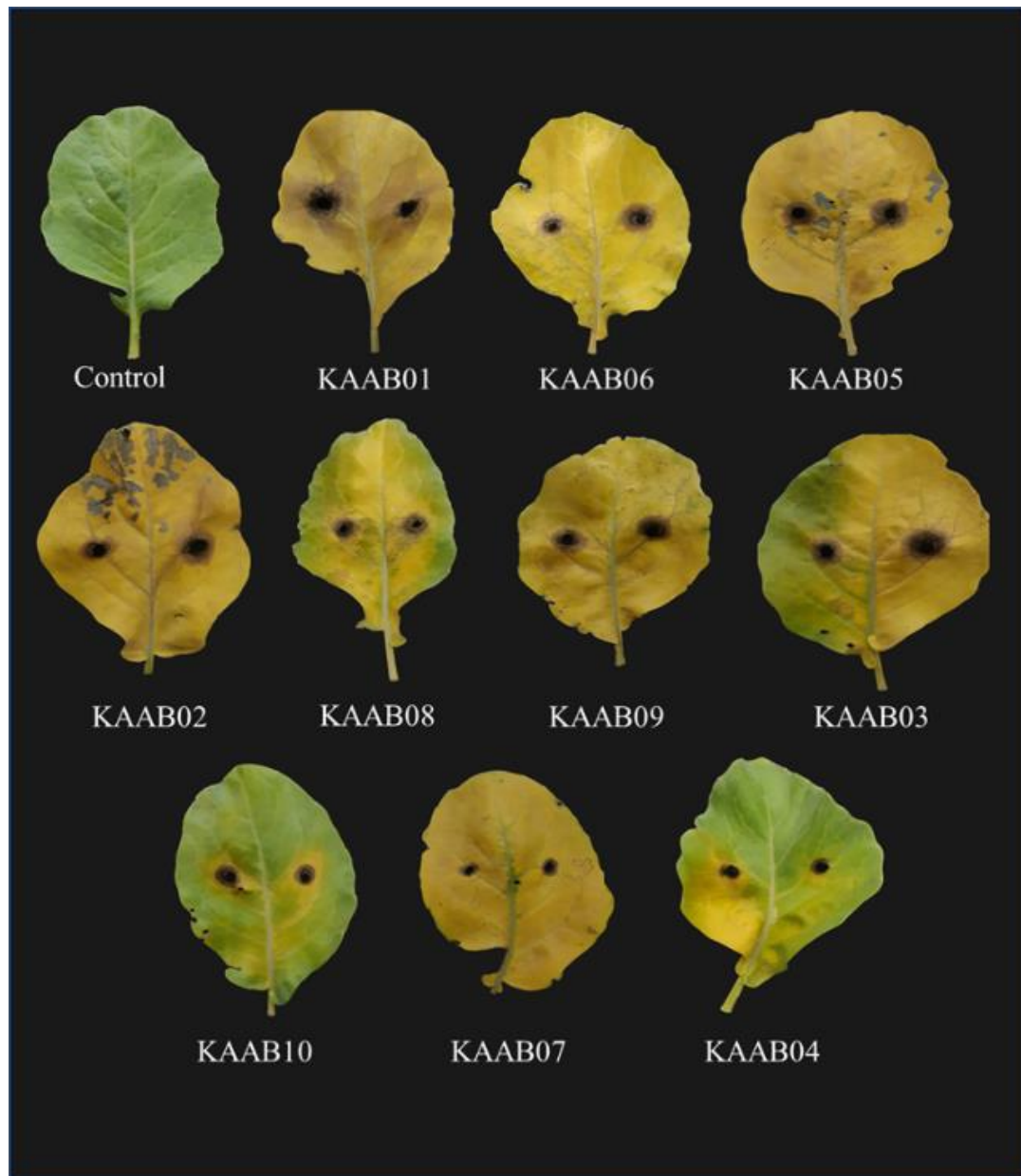
ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคใบจุดในผักคะน้า โดยใช้เชื้อรา *A. brassicicola* ที่แยกได้จากโรคใบจุดในผักคะน้าทั้งหมด 10 ไอโซเลต ทดสอบโดยใช้ใบคะน้าที่มีความยาวขนาด 20 เซนติเมตร วางเชื้อรา *A. brassicicola* จำนวน 2 จุด ต่อใบ โดย 1 ไอโซเลต ใช้ใบผักคะน้าจำนวน 2 ใบ เท่ากับ 4 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน เก็บผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลที่เกิดขึ้น และหาดัชนีความรุนแรงของโรค โดยใบไม่เกิดโรค ใบมีสีเหลืองปนเขียว ใบมีสีเหลือง และ ใบมีสีเหลืองปนน้ำตาล ให้คะแนนคือ 0, 1, 2 และ 3 มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคคือ 0, 1-30, 31-60 และ 61-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดสอบที่ได้พบว่าไอโซเลต KAAB01, KAAB02 และ KAAB05 มีคะแนนความเหลืองของใบที่ไม่แตกต่างกันคือ 3 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคอยู่ที่ 61-100 เปอร์เซ็นต์ ดังรูปที่ 4.3 สำหรับผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางแผลพบว่าเชื้อราไอโซเลตที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุดคือ ไอโซเลต KAAB01 มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางแผลอยู่ที่ 20.75 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต KAAB06, KAAB05, KAAB02, KAAB08, KAAB09, KAAB03 และ KAAB10 มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางแผลที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติคือ 17.50, 16.56, 16.49, 16.12, 14.88, 14.27 และ 14.07 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.3 จากการทดสอบพบว่าเชื้อรา *A. brassicicola* แต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pattanamahakul และ Strange (1999) ที่

คัดแยกเชื้อรา *A. brassicicola* จากพื้นที่ต่างๆ และทดสอบความสามารถในการก่อโรคในผักคะน้า พบว่าเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ได้จากพื้นที่ต่างกัน มีความสามารถในการก่อโรคต่างกัน นอกจากนี้ จากการทดลองยังสังเกตได้อีกว่าการเหลืองของใบคะน้าที่ทดสอบในแต่ละไอโซเลตไม่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผล แต่อาจจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการผลิต mycotoxin ของแต่ละไอโซเลต ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Mukesh และคณะ (2017) พบว่า *A. brassicicola* มีการผลิต mycotoxin TeA, AOH และ AME ออกมา มีผลทำให้ใบพืชมีอาการเหี่ยว และเหลืองเร็วกว่าปกติ ส่งผลให้ใบพืชเกิดอาการเซลล์ตายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการทดลองครั้งต่อไป จะใช้เชื้อรา *A. brassicicola* KAAB01 ไปใช้ในการทดสอบ เนื่องจากเชื้อราในไอโซเลตนี้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากที่สุด และยังมีดัชนีความรุนแรงของโรคมากที่สุดอีกด้วย

**ตารางที่ 4.3** แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลและดัชนีความรุนแรงของโรคที่ทดสอบโดยเชื้อรา *Alternaria brassicicola* จำนวน 10 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผล (mm)	คะแนนความรุนแรงของ โรค	ดัชนีความรุนแรงของ โรค (%)
KAAB01	20.75 <sup>a</sup> ±0.56	3	61-100
KAAB02	16.49 <sup>b</sup> ±0.54	3	61-100
KAAB03	14.27 <sup>bc</sup> ±1.70	1	1-30
KAAB04	10.19 <sup>d</sup> ±1.80	1	1-30
KAAB05	16.56 <sup>b</sup> ±2.07	3	61-100
KAAB06	17.50 <sup>b</sup> ±1.22	2	31-60
KAAB07	11.57 <sup>cd</sup> ±0.94	2	31-60
KAAB08	16.12 <sup>b</sup> ±1.16	1	1-30
KAAB09	14.88 <sup>bc</sup> ±0.32	2	31-60
KAAB10	14.07 <sup>bc</sup> ±0.97	1	1-30
control	0 <sup>e</sup>	0	0

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ , ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่  $P = 0.05$  โดยเปรียบเทียบค่าทางสถิติแบบ Duncan's Multiple Range Test



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะความรุนแรงของโรคในใบผักคะน้าที่ปลูกเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ทั้ง 10 ไอโซเลต ปุ่มที่อุณหภูมิต้อง เป็นระยะเวลา 3 วัน

### 4.3 ผลการคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium*

ผลของการเก็บตัวอย่างดินโดยขุดดินบริเวณผิวหน้าออกลึกประมาณ 10 เซนติเมตร ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 4 จังหวัด คือ ตัวอย่างดินจาก จังหวัดเชียงราย จังหวัดสุพรรณบุรี จังหวัดเลย และ จังหวัดเชียงใหม่ ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (01, 02, 03, 06, 07, 08 และ 09) โดยคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* จากตัวอย่างดินด้วยวิธี heat treatment โดยเลี้ยงบนอาหาร RBAB บ่มที่อุณหภูมิห้อง ได้จำนวน 2, 2, 2, 1, 1, 9 และ 3 ไอโซเลต ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลตของเชื้อรา *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ที่แยกได้จากดิน

สถานที่เก็บตัวอย่างดิน	รหัสดิน	ไอโซเลต
จ.เชียงราย	01	AAP0107, AAP0123
	02	AAP0204, AAP0208
	03	AAP0305, AAP0313
	06	AAP0620
จ.สุพรรณบุรี	07	AAP0704
จ.เลย	08	AAP0802, AAP0805, AAP0806, AAP0808, AAP0816, AAP0817, AAP0820, AAP0824, AAP0825
		AAP0931, AAP0940, AAP0941
จ.เชียงใหม่	09	

การบ่งชี้เชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ที่แยกได้จากดินทั้งหมด 20 ไอโซเลต ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี ลักษณะและขนาดของ ascocarp, ascus, ascospore และหาอัตราการเจริญ โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA สำหรับ MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ สังเกตลักษณะของโคโลนี ศึกษาการเปลี่ยน stage และหาอัตราการเจริญ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นคัดเลือกตัวแทนนำไปบ่งชี้ด้วยลำดับ

นิวคลีโอไทด์ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ  $\beta$ -tubulin จากนั้นส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์รวมไพรเมอร์ และนำไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank ผลการบ่งชี้ที่ได้มีดังนี้

*Neosartorya tatenoi* ไอโซเลต AAP0704 มีลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนียบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 7.32 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นวงกลม (circular) ผิวหน้าโคโลนีมีการแบ่งระดับสี (contour) โคโลนีมีการยกตัวขึ้นมาเล็กน้อย (raise) สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวครีมดังรูปที่ 4.4A ด้านหลังโคโลนีมีสีขาวดังรูปที่ 4.4B ascocarp มีสีขาวดังรูปที่ 4.4C-E ascus รูปร่าง globose ถึง subglobose ดังรูปที่ 4.4F และ G ascospore มีรูปทรงเป็นแบบ subglobose และมี ridge แสดงในรูปที่ 4.4H และ I โดยมีขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospore อยู่ที่ 204.47-208.62×325.81-336.71, 10.19-10.56×11.79-12.05 และ 4.79-4.83×5.26-5.42 ไมโครเมตร ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.5 สำหรับการเจริญเติบโตของโคโลนียบนอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 6.97 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน (smooth) โคโลนีไม่มีการยกตัว (flat) สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.4J และสีของโคโลนีด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.4K นอกจากนี้ยังสังเกตเห็น conidiophore และ conidia ของเชื้อรา *Aspergillus* ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* แสดงในรูปที่ 4.4L และ M ตามลำดับ เมื่อนำไปบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin ผลจากการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขนาดอยู่ที่ 550 คู่เบส และผลของการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมกับไพรเมอร์มีขนาด 558 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Neosartorya tatenoi* ตรงกับ accession EF669838 และ DQ114130 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 97.65 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 2 accession

*Neosartorya fennelliae* ไอโซเลต AAP0931, AAP0940 และ AAP0941 มีลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนียบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 4.12 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.5A และด้านหลังโคโลนีมีสีขาวดังรูปที่ 4.5B ascocarp มีสีขาวดังรูปที่ 4.5C-E ascus มีรูปทรง globose ถึง subglobose ดังรูปที่ 4.5F และ G ascospore มีรูปทรงเป็นแบบ subglobose และมี ridge แสดงในรูปที่ 4.5H และ I โดยมีขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospore อยู่ในช่วง 120.75-147.70×182.83-221.43, 10.49-12.02×12.54-13.91 และ 4-4.52×4.45-4.96 ไมโครเมตร ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.5 สำหรับการเจริญเติบโตของโคโลนียบนอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญ

ของโคโลนีอยู่ที่ 3.52 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.5J และสีของโคโลนีด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.5K ไม่พบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จากนั้นคัดเลือกเชื้อราจำนวน 1 ไอโซเลต เพื่อไปบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin คือไอโซเลต AAP0931 ผลจากการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขนาดอยู่ที่ 550 คู่เบส ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ร่วมกับไพรเมอร์มีขนาด 557 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Neosartorya fennelliae* ตรงกับ accession KY808607, DQ534086 และ DQ534093 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 98.31, 98.24 และ 98.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

*Neosartorya spinosa* ไอโซเลต AAP0802, AAP0820 และ AAP0824 มีลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 6.30 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.6A และโคโลนีด้านหลังมีสีขาวดังรูปที่ 4.6B ascocarp มีสีขาวแสดงในรูปที่ 4.6C-E ascus มีรูปทรง globose ถึง subglobose ดังรูปที่ 4.6F และ G ascospore มีรูปทรง subglobose ถึง ellipsoid มี ridge ดังรูปที่ 4.6H และ I มีขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospore อยู่ในช่วง 321.45-364.68×412.51-459.18, 12.16-13.59×13.29-15.82 และ 4.04-4.29×5.11-5.71 ไมโครเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 สำหรับการเจริญเติบโตของโคโลนีบนอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 5.39 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.6J และสีของโคโลนีด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.6K เมื่อเขี่ยเส้นใยเชื้อราไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตพบ conidiophore และ conidia ของเชื้อรา *Aspergillus* ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* ดังรูปที่ 4.6L และ M ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกเชื้อราจำนวน 1 ไอโซเลต เพื่อไปบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin คือไอโซเลต AAP0802 ผลจากการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขนาดอยู่ที่ 550 คู่เบส ในขณะที่ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ร่วมกับไพรเมอร์มีขนาด 560 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Neosartorya spinosa* ตรงกับ accession AY870760, AY870761 และ EF669816 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 99.80, 99.80 และ 99.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

*Talaromyces diversus* ไอโซเลต AAP0107 และ AAP0123 มีลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 3.73 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของ

โคโลนีสั้นด้านหน้าเป็นสีเหลืองดังรูปที่ 4.7A และสีโคโลนีสั้นด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.7B ascocarp มีสีเหลืองแสดงในรูปที่ 4.7C-E ascus มีรูปทรง globose ถึง subglobose ดังรูปที่ 4.7F และ G ascospore มีรูปทรงเป็นแบบ broadly ellipsoid ถึง ellipsoid ไม่มี ridge แต่พบหนามที่ผิวของสปอร์ ดังรูปที่ 4.7H และ I ในส่วนของขนาด ascocarp, ascus และ ascospore อยู่ในช่วง 173.35-222.32×414.36-553.30, 8.44-10×10.77-11.59 และ 2.16-2.93×3.04-4.32 ไมโครเมตร ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.5 สำหรับการเจริญเติบโตของโคโลนีสั้นอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีสั้นอยู่ที่ 2.88 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีสั้นเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีสั้นเรียบเนียน โคโลนีสั้นไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีสั้นเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.7J และสีของโคโลนีสั้นด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.7K เมื่อสังเกตลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีโครงสร้าง conidiophore และ conidia ของเชื้อรา *Penicillium* ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* ดังรูปที่ 4.7L และ M ตามลำดับ ในการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin คัดเลือกเชื้อราจำนวน 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต AAP0123 ผลจากการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขนาดอยู่ที่ 450 คู่เบส ผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ออกมาพร้อมกับไพรเมอร์มีขนาด 466 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Talaromyces diversus* ตรงกับ accession MG906572, MG906571 และ LT559060 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 90.23, 90.23 และ 89.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

*Talaromyces rugulosus* ไอโซเลต AAP0806 มีลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีสั้นอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีสั้นอยู่ที่ 2.37 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีสั้นเป็นแบบวงกลมที่ไม่เสมอกัน (irregular) ผิวหน้าโคโลนีสั้นเรียบเนียน โคโลนีสั้นมีการยกตัวขึ้นเล็กน้อย สีของโคโลนีสั้นด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.8A และสีของโคโลนีสั้นด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.8B สำหรับ ascocarp มีสีเหลืองดังรูปที่ 4.8C-E ascus รูปทรง globose ถึง subglobose แสดงในรูปที่ 4.8F ascospore มีรูปทรงเป็นแบบ broadly ellipsoid ถึง ellipsoid มีหนามที่ผิวของสปอร์ ไม่พบ ridge ดังรูปที่ 4.8G และ H โดยมีขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospore คือ 625.70-683.11×701.15-724.36, 7.82-7.89×8.20-8.76 และ 2.46-2.50×2.90-3.00 ไมโครเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 สำหรับการเจริญเติบโตของโคโลนีสั้นอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีสั้นอยู่ที่ 3.20 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีสั้นเป็นแบบวงกลมที่ไม่เสมอกัน ผิวหน้าโคโลนีสั้นเรียบเนียน โคโลนีสั้นมีการยกตัวขึ้นเล็กน้อย สีของโคโลนีสั้นด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.8I และสีของโคโลนีสั้นด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.8J ไม่พบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีเพียงไอโซเลต AAP0806 จากนั้นนำไอโซเลตที่ได้

ไปบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin ผลจากการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขนาดอยู่ที่ 450 คู่เบส ผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับไพรเมอร์มีขนาด 473 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Talaromyces rugulosus* ตรงกับ accession KF196859, KF196860 และ KF196858 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 99.37, 99.15 และ 99.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

*Talaromyces muroii* ไอโซเลต AAP0825 มีลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนียบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 3.54 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาว เหลืองดังรูปที่ 4.9A และสีของโคโลนีด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.9B ascocarp มีสีเหลืองแสดงในรูปที่ 4.9C-E ascus รูปทรง subglobose ถึง broadly ellipsoid ดังรูปที่ 4.9F และ G ascospore มีรูปทรงเป็นแบบ ellipsoid แสดงในรูปที่ 4.9H และ I พบหนามที่ผิวของสปอร์ ไม่มี ridge มีขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospore อยู่ในช่วง 473.85-489.50×659.48-665.78, 8.64-8.86×9.20-9.73 และ 3.11-3.18×4.18-4.21 ไมโครเมตร ตามลำดับ สำหรับการเจริญเติบโตของโคโลนียบนอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 3.81 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีเหลืองดังรูปที่ 4.9J และสีโคโลนีด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.9K ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จากนั้นนำไอโซเลตที่ได้ไปบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin ผลจากการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขนาดอยู่ที่ 450 คู่เบส ผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับไพรเมอร์มีขนาด 461 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Talaromyces muroii* ตรงกับ accession KJ865727, MG452846 และ LT898321 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 99.77, 99.49 และ 99.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

*Talaromyces macrosporus* ไอโซเลต AAP0208, AAP0816 และ AAP0817 มีลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนียบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 5.61 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีเหลืองดังรูปที่ 4.10A และโคโลนีด้านหลังเป็นสีเหลืองดังรูปที่ 4.10B ascocarp มีสีเหลืองดังรูปที่ 4.10C-E ascus มีรูปทรง globose ถึง subglobose ดังรูปที่ 4.10F และ G ascospore มีรูปทรงเป็นแบบ broadly ellipsoid ดังรูปที่ 4.10H และ I ที่ผิวของสปอร์มีหนาม ไม่มี ridge มีขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospore อยู่ที่ 326.86-373.04×453.02-667.47, 11.66-13.95×13.23-14.79 และ 4.06-4.99×5.19-6.18 ไมโครเมตร

ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 สำหรับการเจริญเติบโตของโคโลนีบนอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 4.78 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.10J และสีของโคโลนีด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.10K เมื่อสังเกตลักษณะของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีโครงสร้าง conidiophore และ conidia ของเชื้อรา *Penicillium* ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* ดังรูปที่ 4.10L และ M ในการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin คัดเลือกเชื้อราจำนวน 1 ไอโซเลต คือไอโซเลต AAP0817 ผลจากการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขนาดอยู่ที่ 450 คู่เบส ผลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ออกมาพร้อมกับไพรเมอร์มีขนาด 464 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Talaromyces macrosporus* ตรงกับ accession JX091382, KX011486 และ AY753373 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 100, 98.36 และ 94.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

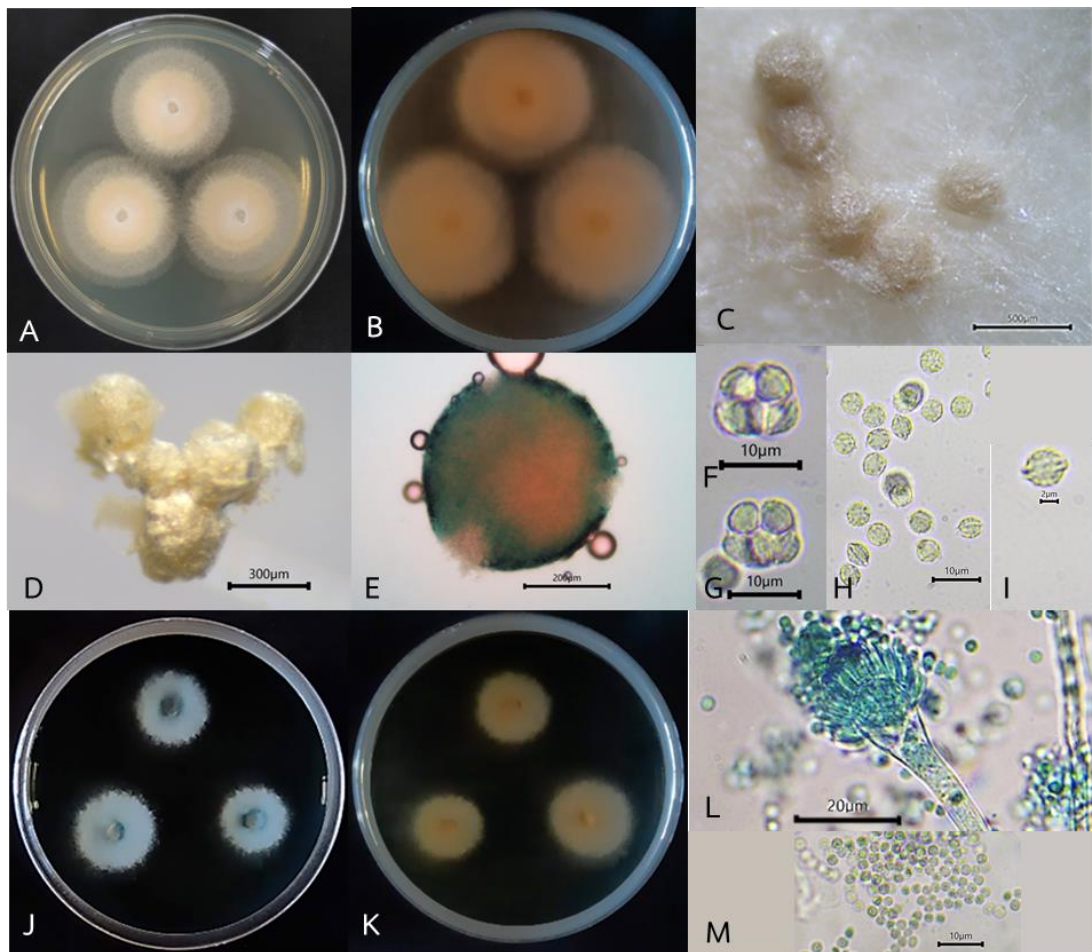
*Eupenicillium brefeldianum* ไอโซเลต AAP0204, AAP0305, AAP0313 และ AAP0620 มีลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 6.64 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.11A และสีของโคโลนีด้านหลังเป็นสีเหลืองดังรูปที่ 4.11B ascocarp มีสีเหลืองแสดงในรูปที่ 4.11C-E ascus มีรูปทรง globose ถึง subglobose ดังรูปที่ 4.11F ascospore มีรูปทรงเป็นแบบ broadly ellipsoid ดังรูปที่ 4.11G และ H มีหนามที่ผิวของสปอร์ ไม่พบ ridge มีขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospore อยู่ที่ 107.95-132.83×173.66-191.75, 8.09-9.93×10.19-11.85 และ 3.07-3.53×3.55-4.74 ไมโครเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 สำหรับการเจริญเติบโตของโคโลนีบนอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 5.75 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.11I และสีของโคโลนีด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.11J เมื่อสังเกตลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีโครงสร้าง conidiophore และ conidia ของเชื้อรา *Penicillium* ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ของเชื้อราสกุล *Eupenicillium* ดังรูปที่ 4.11K จากนั้นคัดเลือกเชื้อราจำนวน 1 ไอโซเลตเพื่อไปบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin คือไอโซเลต AAP0204 ผลจากการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขนาดอยู่ที่ 500 คู่เบส ในขณะที่ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ออกมาพร้อมกับไพรเมอร์มีขนาด 516 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Eupenicillium*

*brefeldianum* ตรงกับ accession EU021669 และ AY766259 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 98.31 และ 97.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

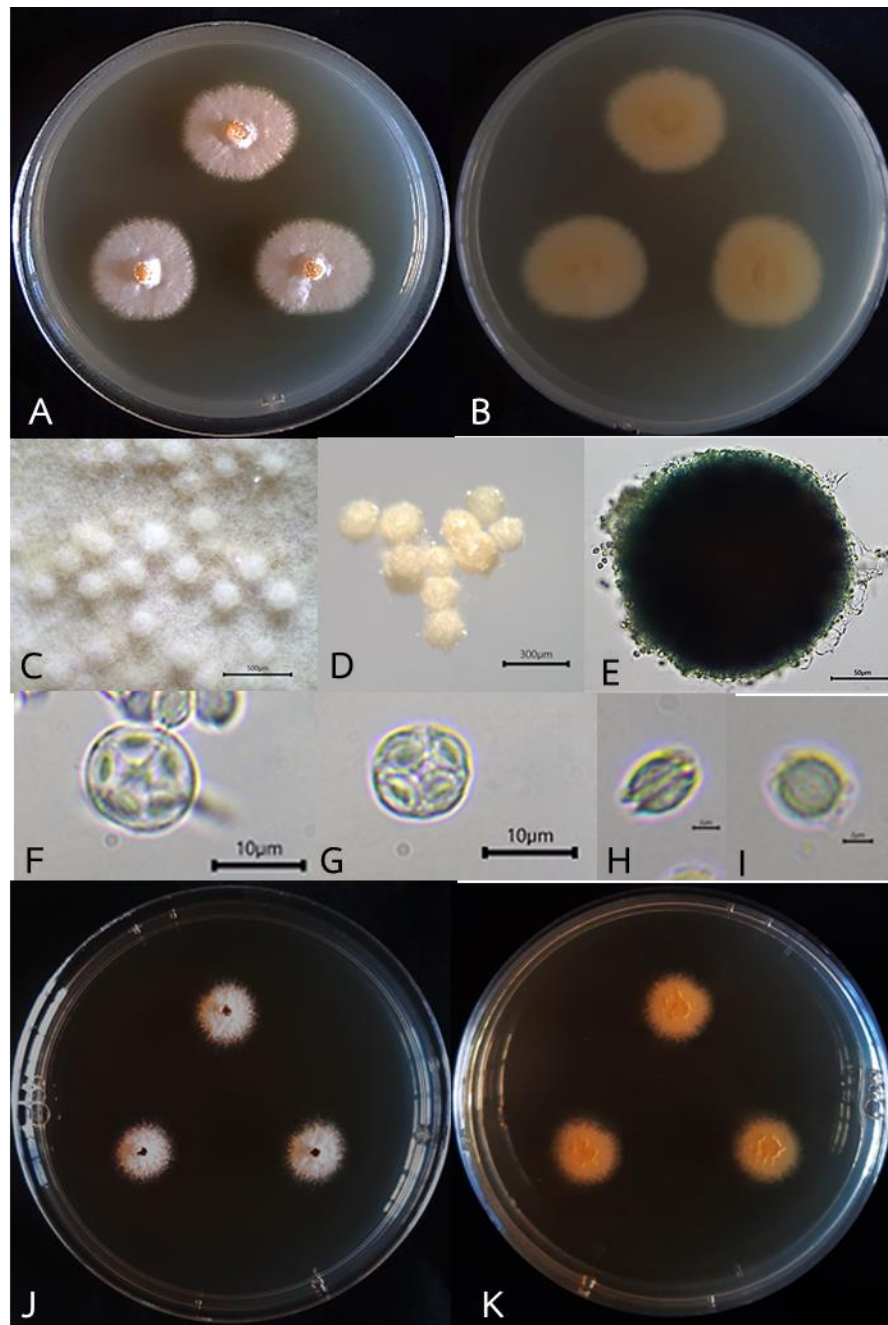
*Eupenicillium erubescens* ไอโซเลต AAP0805 และ AAP0808 มีลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 3.40 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีมีรอยแตก (wrinkle) โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.12A และ สีของโคโลนีด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.12B ascocarp มีสีเหลืองแสดงในรูปที่ 4.11C-E ascocarp มีสีเหลืองดังรูปที่ 4.12C-E ascus รูปทรง globose ถึง subglobose ดังรูปที่ 4.12F ascospore มีรูปทรงเป็นแบบ subglobose ถึง broadly ellipsoid ดังรูปที่ 4.12G และ H ไม่พบ ridge มีขนาดของ ascocarp, ascus และ ascospore อยู่ที่ 62.67-69.22×104.44-127.05, 9.21-9.83×10.58-10.83 และ 3.16-3.44×3.82-4.03 ไมโครเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5 สำหรับการเจริญเติบโตของโคโลนีบนอาหาร MEA ที่ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่อายุ 5 วัน อัตราการเจริญของโคโลนีอยู่ที่ 3.10 มิลลิเมตรต่อวัน โคโลนีเจริญเป็นแบบวงกลม ผิวหน้าโคโลนีเรียบเนียน โคโลนีไม่มีการยกตัว สีของโคโลนีด้านหน้าเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.11I และโคโลนีด้านหลังเป็นสีขาวดังรูปที่ 4.12J ไม่พบการสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ จากนั้นคัดเลือกเชื้อราจำนวน 1 ไอโซเลต เพื่อไปบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin คือไอโซเลต AAP0808 ผลจากการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขนาดอยู่ที่ 550 คู่เบส ในขณะที่ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ร่วมกับไพรเมอร์มีขนาด 576 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น *Eupenicillium erubescens* ตรงกับ accession KF900169 และ HQ646566 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนอยู่ที่ 98.74 และ 99.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลจากการบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถบ่งชี้ได้ทั้งหมด 9 สปีชีส์ คือ *N. tatenoi*, *N. finnelliae*, *N. spinosa*, *T. diversus*, *T. rugulosus*, *T. muroii*, *T. macrosporus*, *E. brefeldianum* และ *E. erubescens* จำนวนไอโซเลตที่ได้ 1, 3, 3, 2, 1, 1, 3, 4, และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ ผลจากการบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อรา *N. tatenoi*, *N. finnelliae* และ *N. spinosa* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Samson และคณะ (2007) ในส่วนของเชื้อรา *T. muroii* และ *T. macrosporus* พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yilmaz และคณะ (2014) นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Yilmaz และคณะ (2014) ยังได้มีการรายงานว่าเชื้อรา *T. diversus* และ *T. rugulosus* พบแค่ช่วง asexual stage คือพบเพียง conidiophore และ conidia ของเชื้อรา *Penicillium* เท่านั้น สำหรับผลของการบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Eupenicillium brefeldianum* พบว่ามี

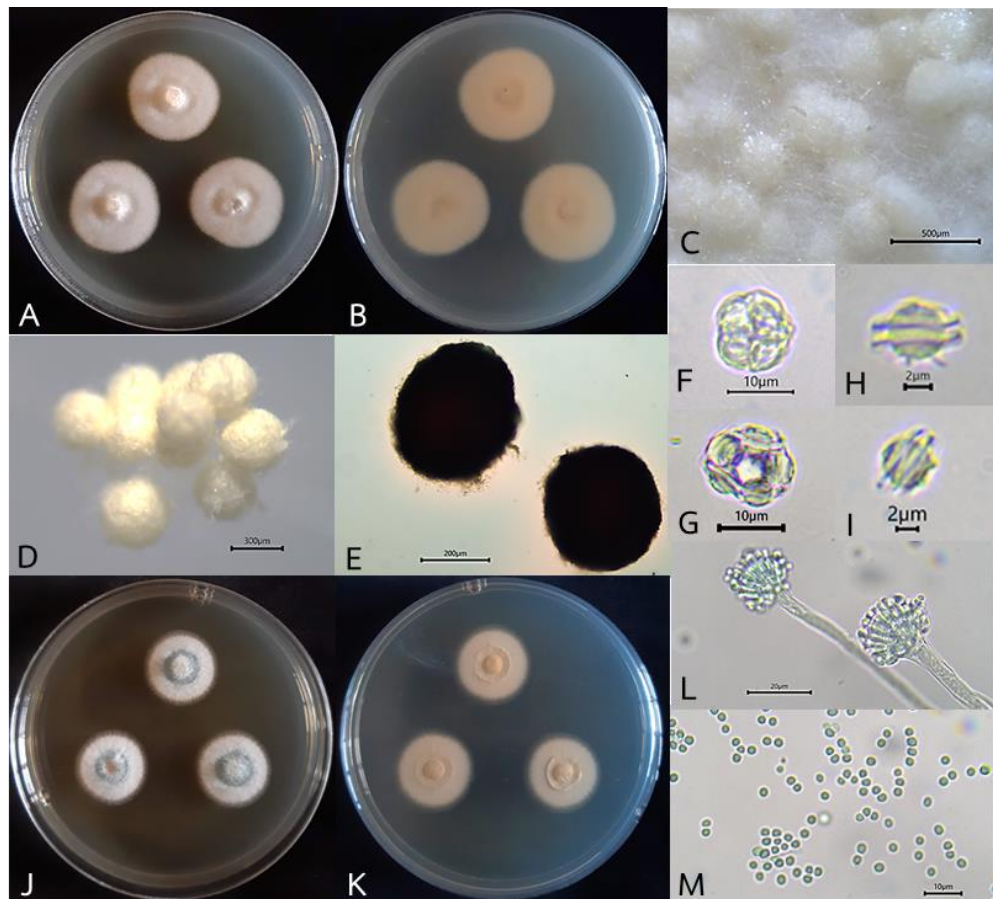
ความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Amelia และ De (1967) จากผลการบ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะสังเกตได้ลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี ลักษณะ ascocarp ascus และ ascospore ของเชื้อราสกุล *Eupenicillium* และ *Talaromyces* มีความคล้ายคลึงกัน แต่มีลักษณะที่แตกต่างกันตรงที่ผิวของ ascocarp ซึ่งเชื้อราสกุล *Talaromyces* จะมีเส้นใยมาพันล้อมรอบมากกว่า (รูปที่ 4.8D) เชื้อรา *Eupenicillium* (รูปที่ 4.11D) และมีขนาด ascocarp ที่ใหญ่กว่า มีสีเหลืองของ ascocarp ที่ชัดเจนกว่า และผลจากการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* มีขนาดอยู่ที่ 450-500 คู่เบส ซึ่งมีขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Manoach และคณะ (2013) และ วิทยานิพนธ์ของสุภานัน (2561) สำหรับขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Neosartorya* อยู่ในช่วง 550-600 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิทยานิพนธ์ของเมอมร (2558) ที่ได้รายงานขนาดลำดับเบสของ *Neosartorya* จะอยู่ในช่วง 500-600 คู่เบส



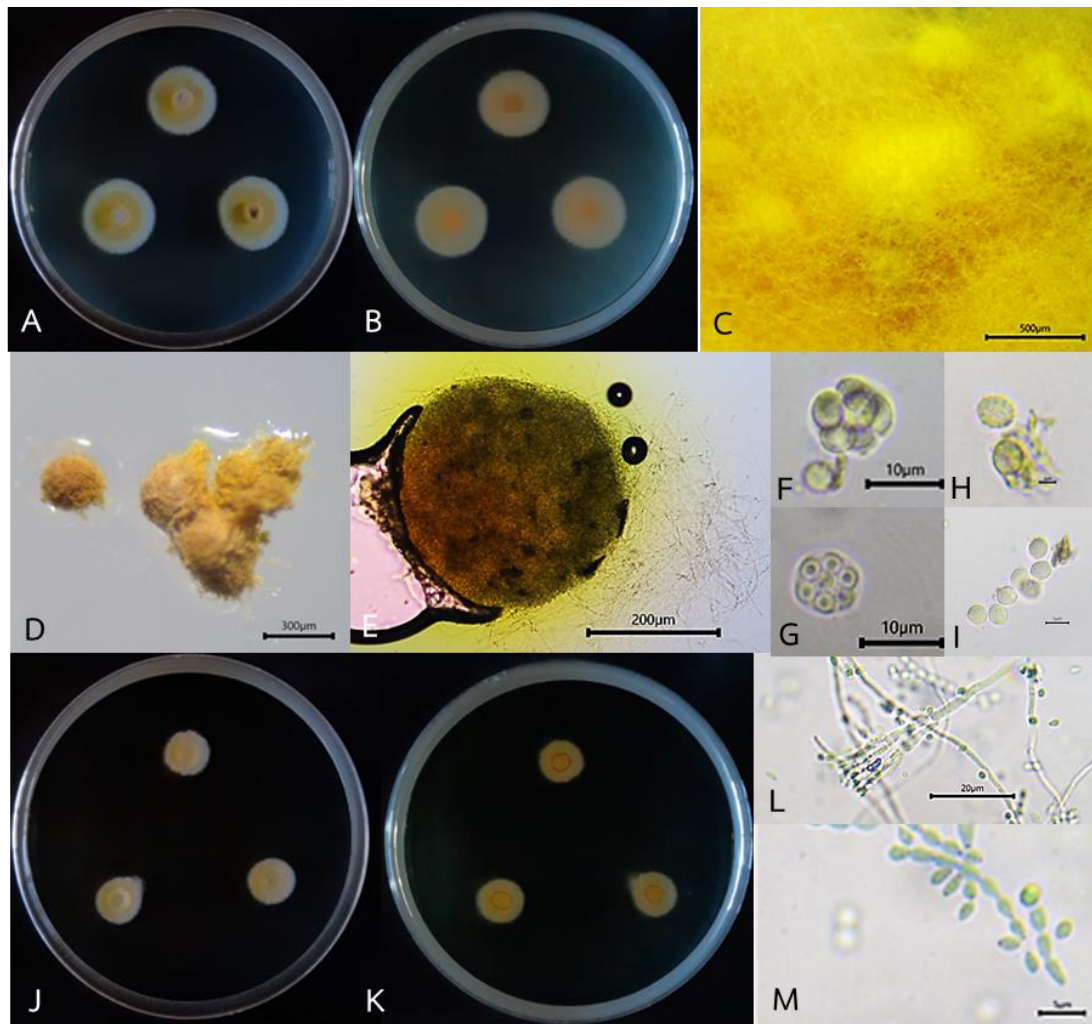
รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neosartorya tatenoi* AAP0704 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนินี้ด้านหน้าและโคลนินี้ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์ stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคลนินี้ด้านหน้าและโคลนินี้ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์; L: conidiophore; M: conidia



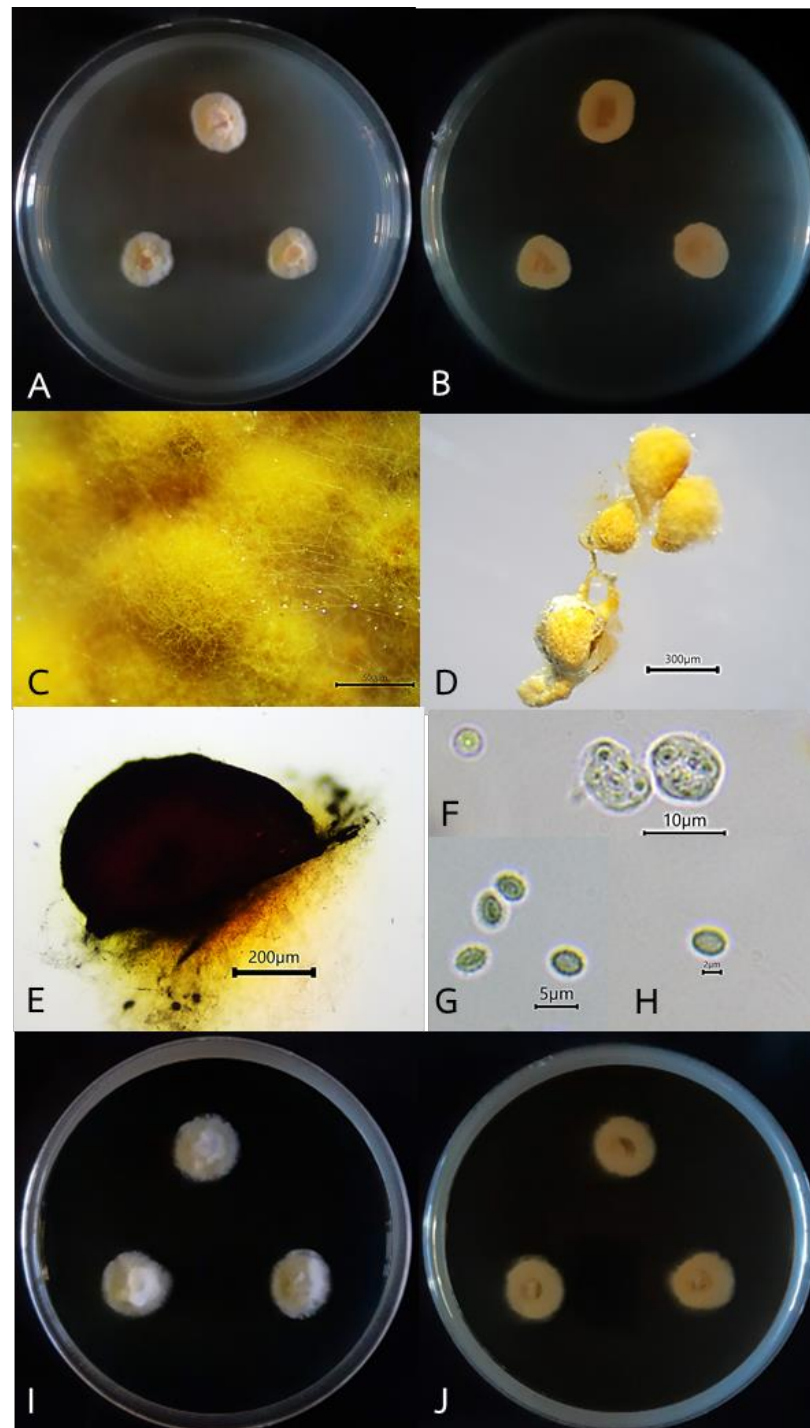
รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neosartorya fennelliae* AAP0940 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์ stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์



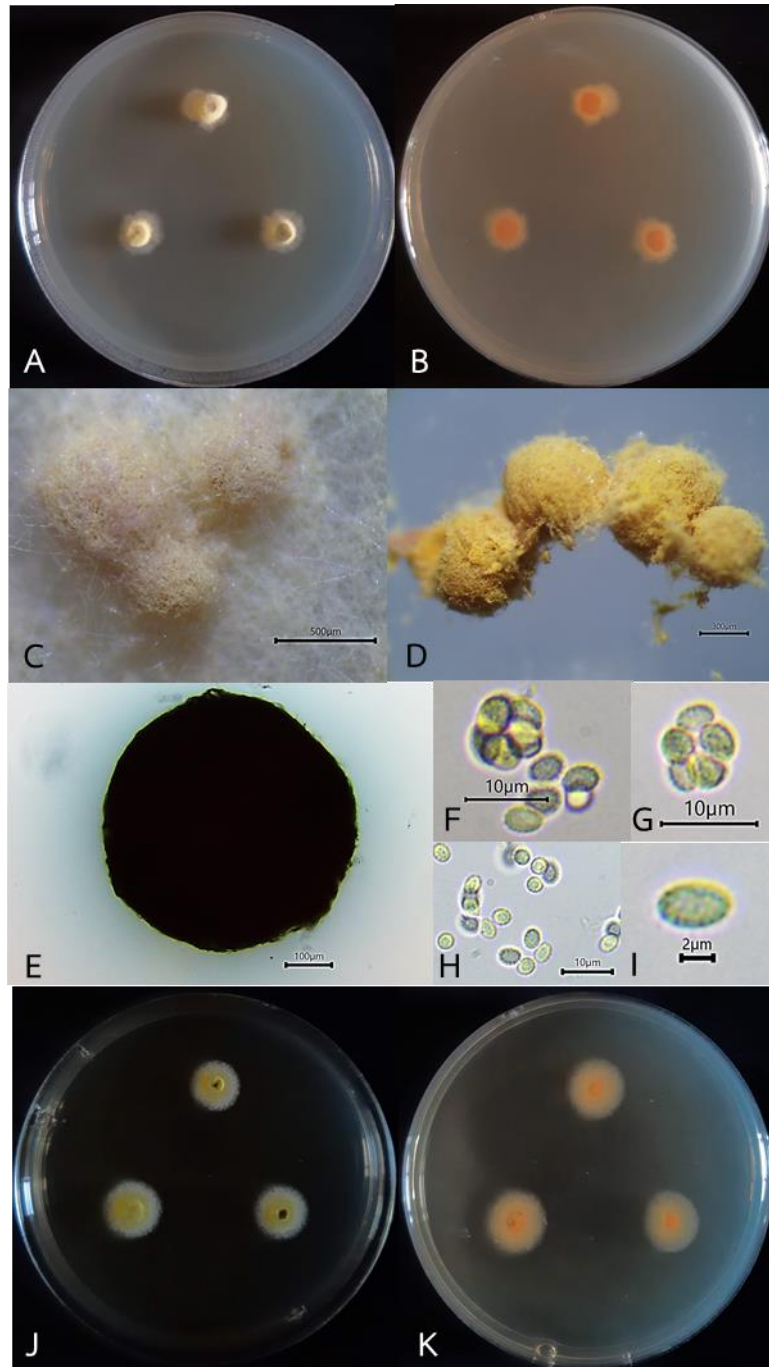
รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neosartorya spinosa* AAP0820 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนีย์ด้านหน้าและโคลนีย์ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้กล้อง stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคลนีย์ด้านหน้าและโคลนีย์ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์; L: conidiophore; M: conidia



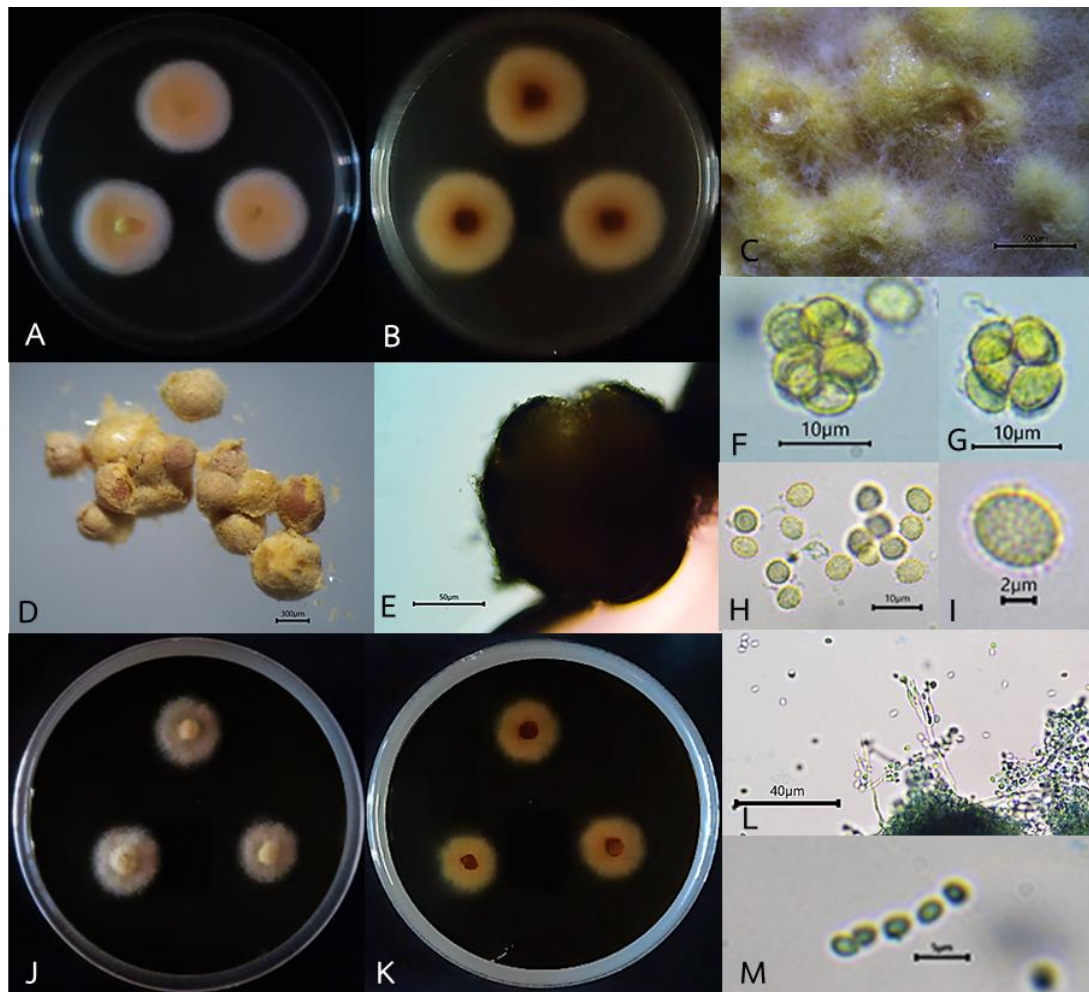
รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces diversus* AAP0123 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนินี้ด้านหน้าและโคลนินี้ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์ stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคลนินี้ด้านหน้าและโคลนินี้ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์; L: conidiophore; M: conidia



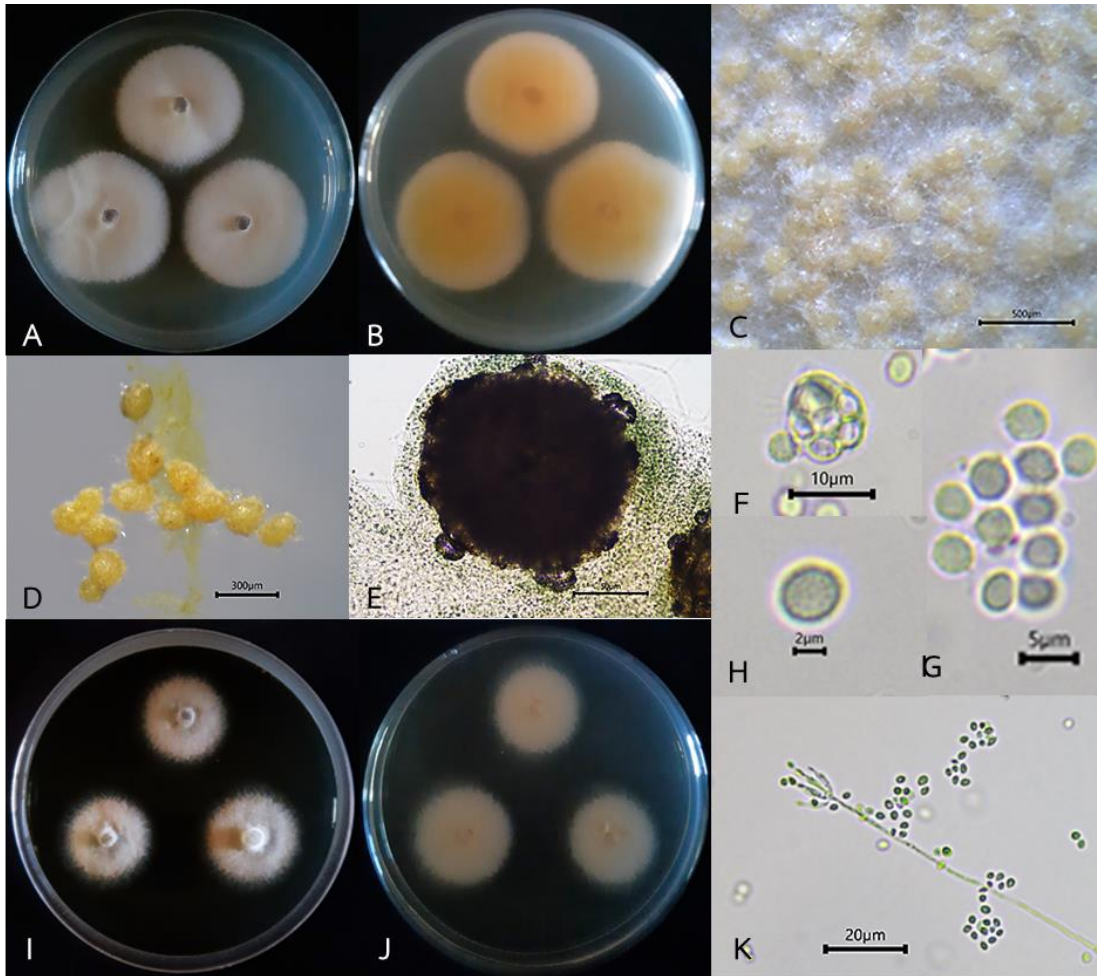
รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces rugulosus* AAP0806 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนีย์ด้านหน้าและโคลนีย์ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์ stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ascus; G-H: ascospore; I และ J: โคลนีย์ด้านหน้าและโคลนีย์ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์



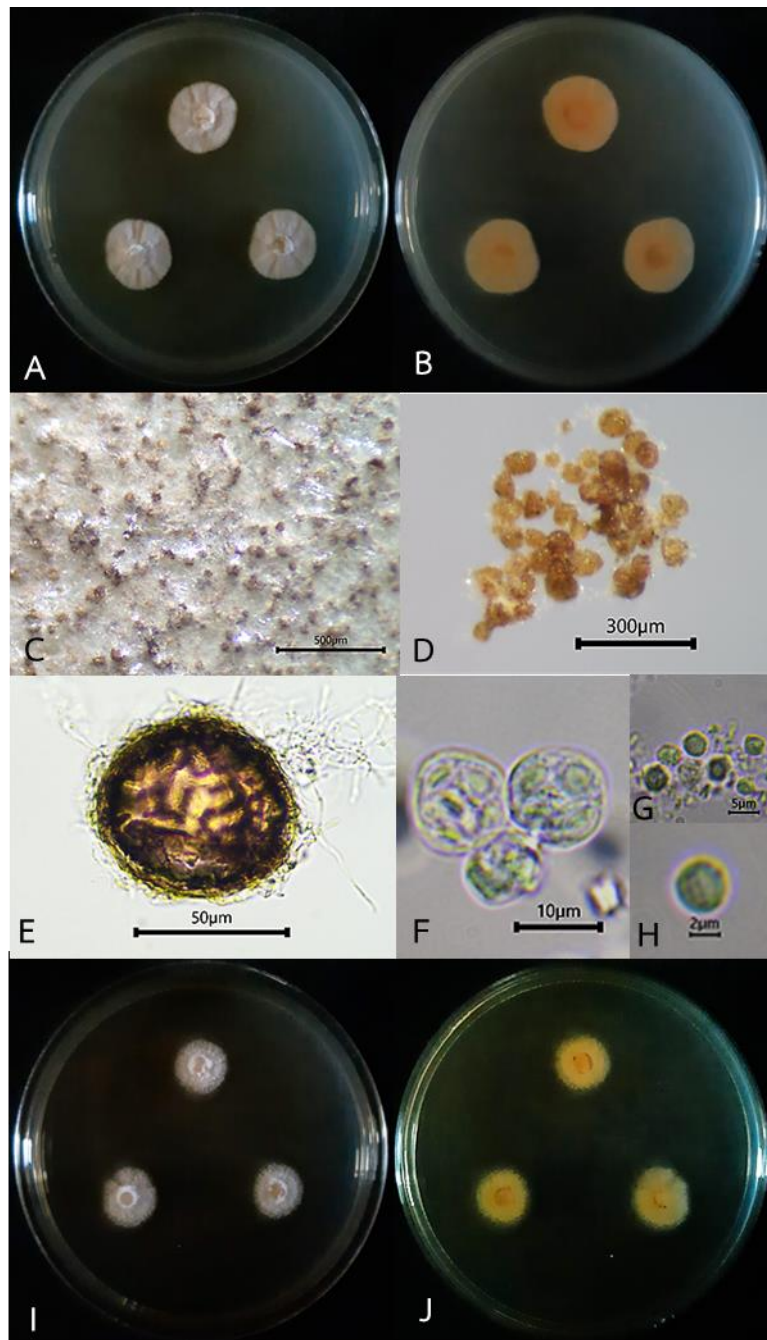
รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces muroii* AAP0825 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนีย์ด้านหน้าและโคลนีย์ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์ stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K: โคลนีย์ด้านหน้าและโคลนีย์ด้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces macrosporus* AAP0208 ที่  
 คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C:  
 ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์ stereo microscope; E:  
 ascocarp ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบใช้แสง; F-G: ascus; H-I: ascospore; J และ K:  
 โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์;  
 L: conidiophore; M: conidia



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Eupenicillium brefeldianum* AAP0305 ที่ คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์ stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ascus; G-H: ascospore; I และ J: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์; K: conidiophore และ conidia



รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Eupenicillium erubescens* AAP0808 ที่คัดแยกได้จากดิน A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร PDA; C: ascocarp ที่เจริญบนอาหาร PDA; D: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์ stereo microscope; E: ascocarp ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์แบบใช้แสง; F: ascus; G-H: ascospore; I และ J: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลังที่เลี้ยงบนอาหาร MEA ผสมซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.5 แสดงอัตราการเจริญของโคโคนี ขนาด ascocarp, ascus และ ascospore ของเชื้อราที่แยกได้จากดิน

Species	ไอโซเลต	อัตราการเจริญ (mm/day)		Ascocarp	Ascus	Ascospore		Ridge
		PDA	MEA+40% sucrose	ขนาด (µm)	ขนาด (µm)	รูปทรง	ขนาด (µm)	
<i>Neosartorya tatenoi</i>	AAP0704	7.32	6.97	204.47-208.62×	10.19-10.56×	sub globose	4.79-4.83×	พบ
				325.81-336.71	11.79-12.05		5.26-5.42	
	AAP0931	5.26	3.53	136.53-145.39×	10.49-12.02×	sub globose	4.15-4.43×	พบ
				216.21-221.43	13.43-13.91		4.63-4.96	
<i>Neosartorya fennelliae</i>	AAP0940	3.55	3.65	120.75-128.37×	10.54-10.89×	sub globose	4-4.18×	พบ
				182.83-190.60	12.58-12.88		4.45-4.72	
	AAP0941	3.56	3.38	140.37-147.70×	10.65-11.59×	sub globose	4.34-4.52×	พบ
				200.23-207.79	12.54-13.01		4.71-4.90	
	AAP0802	6.81	6.57	343.18-364.68×	12.16-12.34×	ellipsoid	4.04-4.13×	พบ
				432.51-436.82	14.29-14.70		5.31-5.58	
<i>Neosartorya spinosa</i>	AAP0820	5.56	4.47	321.45-329.05×	13.25-13.59×	ellipsoid	4.20-4.29×	พบ
				450.94-459.18	15.08-15.82		5.25-5.71	
	AAP0824	6.53	5.13	333.18-364.68×	12.22-12.24×	ellipsoid	4.14-4.23×	พบ
				412.51-446.82	13.29-13.70		5.11-5.18	

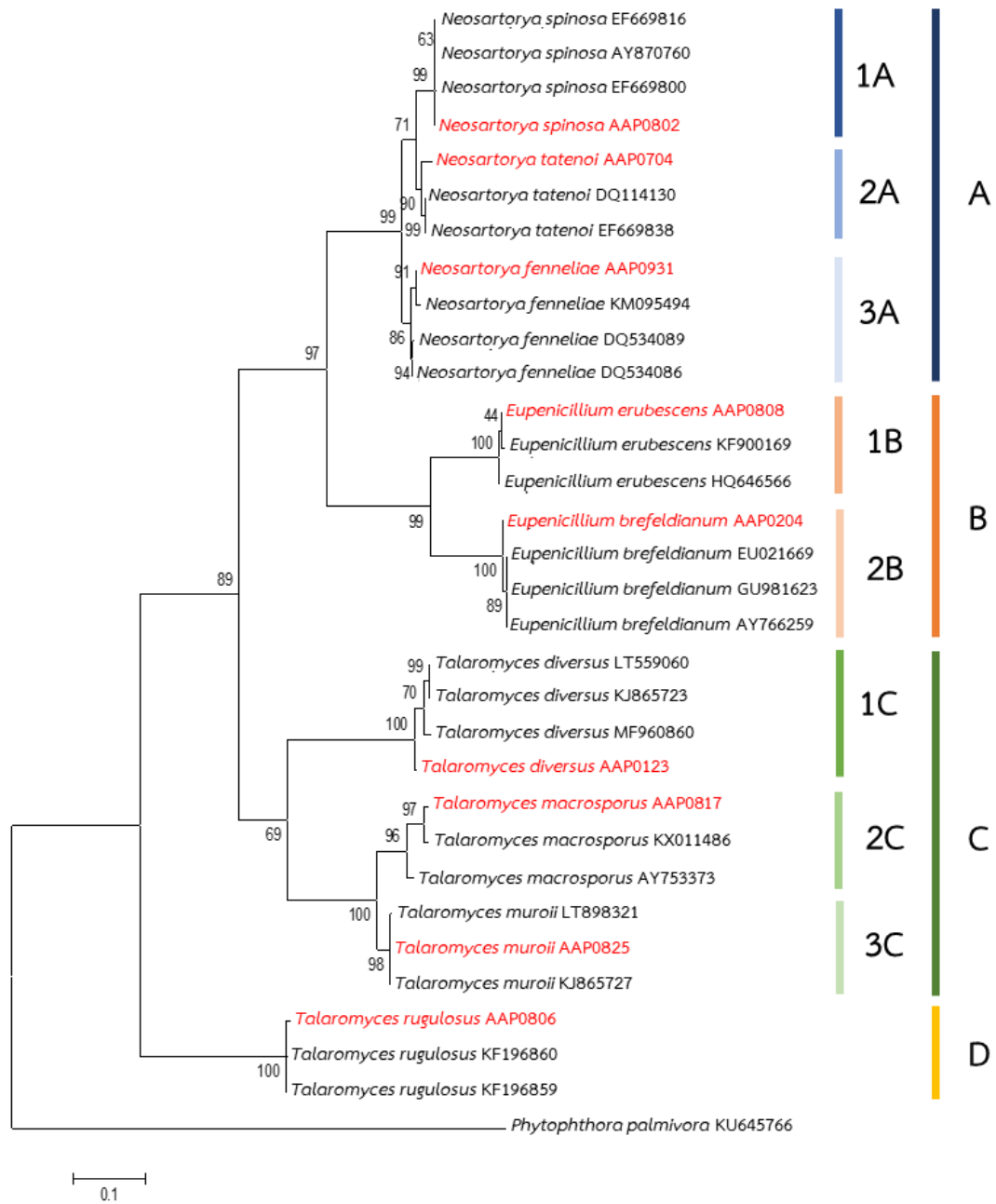
ตารางที่ 4.5 แสดงอัตราการเจริญของโคโลนี ขนาด ascocarp, ascus และ ascospore ของเชื้อราที่แยกได้จากดิน (ต่อ)

Species	ไอโซเลต	อัตราการเจริญ (mm/day)		Ascocarp	Ascus	Ascospore		Ridge
		PDA	MEA+40% sucrose	ขนาด (µm)	ขนาด (µm)	รูปร่าง	ขนาด (µm)	
<i>Talaromyces diversus</i>	AAP0107	2.73	3.00	182.85-222.32x 414.36-541.65	8.44-9.66x 10.77-11.17	ellipsoid	2.89-2.93x 3.87-4.22	ไม่พบ
	AAP0123	4.74	2.76	173.35-176.71x 449.40-553.30	8.74-10x 11.23-11.59	ellipsoid	2.16-2.24x 3.04-4.32	ไม่พบ
<i>Talaromyces rugulosus</i>	AAP0806	2.37	3.20	625.70-683.11x 701.15-724.36	7.82-7.89x 8.20-8.76	broadly ellipsoid	2.46-2.50x 2.90-3	ไม่พบ
<i>Talaromyces muroii</i>	AAP0825	3.54	3.81	473.85-489.50x 659.48-665.78	8.64-8.86x 9.20-9.73	ellipsoid	3.11-3.18x 4.18-4.21	ไม่พบ
<i>Talaromyces macrosporus</i>	AAP0816	7.32	5.43	326.86-329.88x 453.02-465.35	13.46-13.95x 14.65-14.79	broadly ellipsoid	4.93-4.99x 5.95-5.97	ไม่พบ
	AAP0817	5.36	4.75	371.10-373.04x 658.33-667.47	11.66-11.98x 13.23-13.63	broadly ellipsoid	4.81-4.90x 6.11-6.18	ไม่พบ

ตารางที่ 4.5 แสดงอัตราการเจริญของโคโลนี ขนาด ascocarp, ascus และ ascospore ของเชื้อราที่แยกได้จากดิน (ต่อ)

Species	ไอโซเลต	อัตราการเจริญ (mm/day)		Ascocarp	Ascus	Ascospore		Ridge
		PDA	MEA+40% sucrose	ขนาด (µm)	ขนาด (µm)	รูปร่าง	ขนาด (µm)	
<i>Talaromyces macrosporus</i>	AAP0208	4.16	4.16	350.12-361.82× 551.95-572.27	11.74-12.67× 13.55-14.39	broadly ellipsoid	4.06-4.15× 5.19-5.35	ไม่พบ
	AAP0204	6.71	4.66	129.77-132.83× 173.66-178.31	8.34-9.52× 10.19-10.71	broadly ellipsoid	3.16-3.28× 3.55-4.11	ไม่พบ
<i>Eupenicillium brefeldianum</i>	AAP0305	7.32	6.14	122.70-124.91× 182.17-189.64	8.85-9.48× 11.38-11.85	broadly ellipsoid	3.42-3.53× 4.71-4.74	ไม่พบ
	AAP0313	7.32	6.98	111.73-115.81× 189.32-191.75	9.73-9.93× 10.24-11.43	broadly ellipsoid	3.45-3.51× 4.07-4.29	ไม่พบ
	AAP0620	5.22	5.24	107.95-115.93× 175.95-177.55	8.09-8.32× 10.28-11.42	broadly ellipsoid	3.07-3.16× 3.57-3.75	ไม่พบ
<i>Eupenicillium erubescens</i>	AAP0808	2.93	3.27	62-67.78× 117.70-127.05	9.56-9.78× 10.58-10.77	broadly ellipsoid	3.16-3.28× 3.82-3.84	ไม่พบ
	AAP0805	3.87	2.94	62.95-69.22× 104.44-118.91	9.21-9.83× 10.62-10.83	broadly ellipsoid	3.39-3.44× 3.92-4.03	ไม่พบ

สำหรับการหาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ในบริเวณ  $\beta$ -*tubulin* โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วย maximum likelihood ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ผลที่ได้สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราที่เป็นตัวแทนจำนวน 9 ไอโซเลต ได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม A จัดเป็นกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อราสกุล *Neosartorya* โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ดังนี้ กลุ่ม 1A มีตัวแทนเชื้อราไอโซเลต AAP0802 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Neosartorya spinosa* EF669816, EF669800 และ AY870760 กลุ่ม 2A มีตัวแทนเชื้อราไอโซเลต AAP0704 มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Neosartorya tatenoi* DQ114130 และ EF669838 และ กลุ่ม 3A มีตัวแทนเชื้อราไอโซเลต AAP0931 มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Neosartorya fennelliae* KM095494, DQ534089 และ DQ534086 ในกลุ่ม A จะเห็นได้ว่ากลุ่ม 1A และ 2A มีความใกล้เคียงกันซิดมากกว่ากลุ่ม 3A แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *N. spinosa* และ *N. tatenoi* มีความใกล้เคียงกันมากกว่าเชื้อรา *N. fennelliae* ดังรูปที่ 4.13 ในกลุ่ม B เป็นกลุ่มที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อราสกุล *Eupenicillium* เมื่อสังเกตดูจากแผนภาพความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.13 แล้วพบว่าเชื้อราในกลุ่ม B คือเชื้อราสกุล *Eupenicillium* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อรากลุ่ม A คือเชื้อราสกุล *Neosartorya* โดยเชื้อราเชื้อราในกลุ่ม B มีกลุ่มย่อยดังนี้ กลุ่ม 1B มีตัวแทนเชื้อราคือไอโซเลต AAP0808 มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Eupenicillium erubescens* KF900169 และ HQ646566 กลุ่ม 2B มีตัวแทนเชื้อราคือไอโซเลต AAP0204 มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Eupenicillium brefeldianum* EU021669, GU981623 และ AY766259 สำหรับกลุ่ม C มีความใกล้ชิดกับเชื้อราสกุล *Talaromyces* สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยคือ กลุ่ม 1C มีตัวแทนเชื้อราไอโซเลต AAP0123 มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Talaromyces diversus* LT559060, KJ865723 และ MF960860 กลุ่ม 2C มีตัวแทนเชื้อราไอโซเลต AAP0817 มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Talaromyces macrosporus* KX011486 และ AY753373 โดยเชื้อราในกลุ่ม 2C ที่เป็นเชื้อรา *T. macrosporus* มีความใกล้ชิดกับเชื้อราในกลุ่ม 3C ที่เป็นเชื้อรา *Talaromyces muroii* LT898321 และ KJ865727 ดังรูปที่ 4.13 โดยตัวแทนเชื้อราไอโซเลตที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อราในกลุ่ม 3C คือเชื้อราไอโซเลต AAP0825 และ กลุ่ม D ไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่ม A, B และ C ดังรูปที่ 4.13 โดยในกลุ่ม D มีตัวแทนเชื้อราคือไอโซเลต AAP0806 มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Talaromyces rugulosus* KF196860 และ KF196859 โดยมีเชื้อราที่เป็น out group ของกลุ่ม A, B, C และ D คือเชื้อรา *Phytophthora palmivora* KU645766

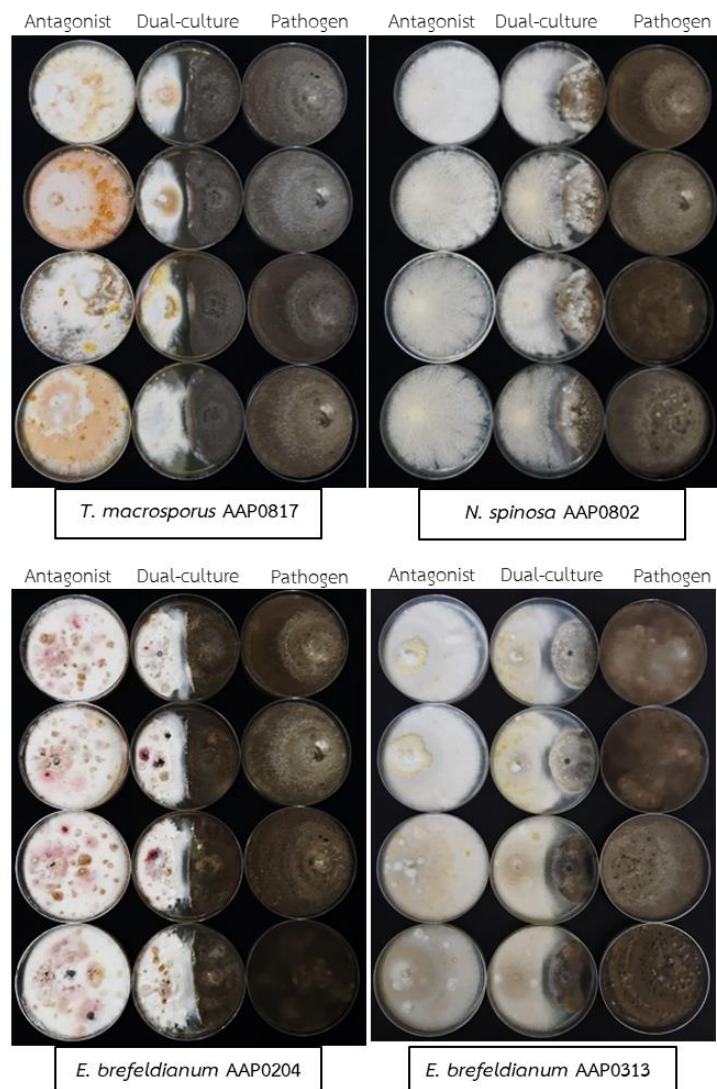


รูปที่ 4.13 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์เชื้อรา *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin โดยใช้ maximum likelihood ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000

#### 4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากดินในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01 ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่คัดแยกได้จากดิน จำนวน 20 ไอโซเลต และที่ได้รับ ความอนุเคราะห์ จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *N. aureola* CHA01-A01, *N. fennelliae* CHA03-A11, *N. spinosa* CHA09-A01 และ *T. muroii* CHA03-A03 รวมทั้งหมดจำนวน 24 ไอโซเลต ใช้ในการ ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *A. brassicicola* KAAB01 ที่ได้จากการทดสอบ ความสามารถในการก่อโรค นำมาทดสอบด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม (dual-culture) โดยเลี้ยงเชื้อร่วมบน อาหาร PDA ระยะเวลา 30 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บผลโดยการนับจำนวนสปอร์ของ เชื้อสาเหตุโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ในจานอาหารชุดควบคุมของ เชื้อสาเหตุโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจำนวนสปอร์ spore inhibition (%SI) และวัดขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม ผลจากการทดสอบพบว่าเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802, *E. brefeldianum* AAP0204 และ *E. brefeldianum* AAP0313 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งจำนวนสปอร์มากที่สุดคือ 97.35, 96.93, 96.14 และ 94.30 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคในจานเลี้ยงเชื้อร่วมอยู่ที่ 44.22, 37.12, 40.20 และ 36.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.16 เมื่อดูจากโคโลนีในจาน เลี้ยงเชื้อร่วมแล้วพบว่าโคโลนีของเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817 มีการสร้าง clear zone เกิด ขึ้นกับโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคอาจจะเป็นไปได้ว่ามีการสร้างสารเกิดขึ้น ในขณะที่โคโลนีของเชื้อรา *N. spinosa* AAP0802 เจริญโตทับโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค และโคโลนีของเชื้อรา *E. brefeldianum* AAP0204 กับ *E. brefeldianum* AAP0313 เจริญโตชนกับขอบโคโลนีของเชื้อรา สาเหตุโรค แสดงดังรูปที่ 4.14 จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อร่วมพบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ โคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อราไอโซเลตต่างๆที่แยกได้จากดินมีความแตกต่างเพียง เล็กน้อย โดยจะมีขนาดอยู่ในช่วง 36-44 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.6) แต่มีเพียงเชื้อรา 2 ไอโซเลต ที่มี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีไม่ได้อยู่ในช่วงคือ *E. erubescens* AAP0805 และ AAP0808 ที่มี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อสาเหตุโรคใหญ่ที่สุดคือ 50.02 และ 49.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจำนวนสปอร์กับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา สาเหตุโรคในจานเลี้ยงเชื้อร่วม พบว่าไม่มีความสอดคล้องกันจึงเป็นไปได้ว่าเชื้อราที่นำมาทดสอบ ประสิทธิภาพมีผลกระทบต่อจำนวนสปอร์มากกว่าการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งผล จากประสิทธิภาพการยับยั้งจำนวนสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคสูงสุดที่ได้ พบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อเทียบ กับงานวิจัยของ Dethoup และคณะ (2018) ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *T. tratensis* KUFA0091 ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในข้าว *Bipolaris oryzae* กมลวรรณ (2558) ที่ได้ศึกษา

ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์สกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชจำนวน 10 ชนิด Mangkalad และคณะ (2018) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคลำต้นใหม่ในหน่อไม้ฝรั่ง *Phomopsis asparagi* และงานวิจัยของ Pattarasaikul และคณะ (2018) ศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในกล้วยน้ำหว้ามะลิองค์ด้วยชีววิธี โดยใช้เชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงคัดเลือกเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802 และ *E. brefeldianum* AAP0204 ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด 3 อันดับแรกไปสกัดสารเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขยายต่อไป



รูปที่ 4.14 แสดงลักษณะโคโลนีของการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด  
ใน 4 อันดับแรก ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *Alternaria brassicicola*

ตารางที่ 4.6 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากดินในการยับยั้งจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm)	จำนวนโคนิตี ( $\times 10^4$ spore/ml)	Spore inhibition (%)
AAP0107	39.91 $\pm$ 0.45	59.20 $\pm$ 1.30	44.95 <sup>h</sup>
AAP0123	44.61 $\pm$ 0.55	49.75 $\pm$ 3.70	53.74 <sup>g</sup>
AAP0204	40.20 $\pm$ 0.44	4.15 $\pm$ 2.29	96.14 <sup>a</sup>
AAP0208	42.15 $\pm$ 0.30	85.85 $\pm$ 1.28	20.17 <sup>k</sup>
AAP0305	37.26 $\pm$ 0.77	48.98 $\pm$ 0.97	54.46 <sup>g</sup>
AAP0313	36.20 $\pm$ 0.90	6.13 $\pm$ 1.35	94.30 <sup>a</sup>
AAP0620	37.66 $\pm$ 0.64	70.70 $\pm$ 0.90	34.26 <sup>j</sup>
AAP0704	36.03 $\pm$ 0.68	15.50 $\pm$ 1.62	85.58 <sup>b</sup>
AAP0802	37.12 $\pm$ 0.94	3.30 $\pm$ 1.29	96.93 <sup>a</sup>
AAP0805	50.02 $\pm$ 1.15	50.28 $\pm$ 0.79	53.25 <sup>g</sup>
AAP0806	39.21 $\pm$ 1.45	59.00 $\pm$ 0.88	45.14 <sup>h</sup>
AAP0808	49.42 $\pm$ 0.58	103.28 $\pm$ 1.17	3.97 <sup>l</sup>
AAP0816	41.45 $\pm$ 0.41	86.63 $\pm$ 0.93	19.45 <sup>k</sup>
AAP0817	44.22 $\pm$ 0.16	2.85 $\pm$ 0.68	97.35 <sup>a</sup>
AAP0820	37.12 $\pm$ 0.94	3.30 $\pm$ 1.29	58.62 <sup>f</sup>
AAP0824	39.00 $\pm$ 0.44	45.75 $\pm$ 2.63	57.45 <sup>f</sup>
AAP0825	36.43 $\pm$ 0.18	49.98 $\pm$ 0.91	53.53 <sup>g</sup>
AAP0931	40.37 $\pm$ 1.58	86.20 $\pm$ 3.04	19.85 <sup>k</sup>
AAP0940	37.67 $\pm$ 0.42	70.75 $\pm$ 4.99	34.21 <sup>j</sup>
AAP0941	43.81 $\pm$ 0.88	66.13 $\pm$ 1.72	38.51 <sup>i</sup>
CHA01-A01	39.32 $\pm$ 0.98	30.98 $\pm$ 2.13	69.67 <sup>d</sup>
CHA03-A03	39.09 $\pm$ 0.51	21.50 $\pm$ 0.48	80.01 <sup>c</sup>
CHA03-A11	40.91 $\pm$ 2.08	36.05 $\pm$ 1.64	66.48 <sup>e</sup>
CHA09-A01	37.14 $\pm$ 0.87	22.70 $\pm$ 0.82	78.89 <sup>c</sup>
Control	90.00 $\pm$ 0.00	107.55 $\pm$ 1.00	0.00 <sup>m</sup>

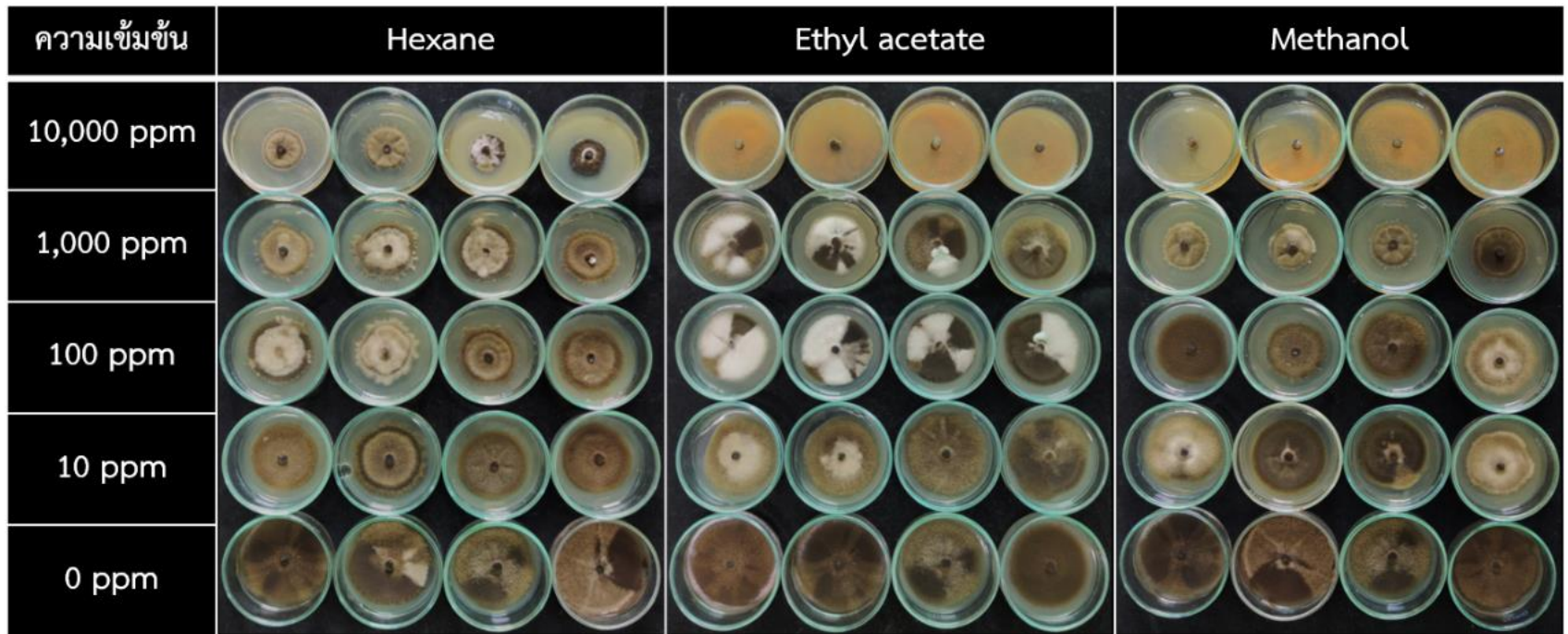
หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ , ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่  $P = 0.05$  โดยเปรียบเทียบค่าทางสถิติแบบ Duncan's Multiple Range Test

#### 4.5 ผลของการสกัดสารและทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยวิธี poison food

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากดินด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วม ได้คัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดมา 3 ไอโซเลต คือ *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802 และ *E. brefeldianum* AAP0204 เพิ่มจำนวนเชื้อโดยเลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเส้นใยที่ได้ไปอบให้แห้งและบดเส้นใย นำไปแช่ในตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายด้วย evaporator และทำให้สารแห้งด้วย vacuum dry เมื่อสารแห้งนำมาชั่งน้ำหนัก พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817 ในตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol คือ 1.32, 3.52 และ 5.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *N. spinosa* AAP0802 ในตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol คือ 1.78, 3.97 และ 6.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดที่ได้จากเชื้อรา *E. brefeldianum* AAP0204 ในตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol คือ 1.22, 1.68 และ 3.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลของสกัดสารทำให้ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 9 สาร เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ผลได้พบว่าเชื้อรา *N. spinosa* AAP0802 ให้เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดมากที่สุด

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยวิธี poison food โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol ของเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802 และ *E. brefeldianum* AAP0204 ไปละลายสารสกัดหยาบด้วย DMSO ไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีความเข้มข้น 0, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ppm นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อรา *A. brassicicola* KAAB01 เก็บผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรค สำหรับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจำนวนสปอร์ ดำเนินการโดยนับจำนวนสปอร์ในงานอาหารชุดทดสอบเปรียบเทียบกับงานอาหารชุดควบคุมที่ไม่ผสมสารสกัดหยาบ ผลการทดสอบที่ได้คือ สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate และ methanol ของเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งจำนวนสปอร์มากที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm ทั้ง 2 ตัวทำละลาย เมื่อดูจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคแล้วพบว่าไม่มีการเจริญเติบโตดังรูปที่ 4.15 สำหรับสารสกัดหยาบที่มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งรองลงมาคือ สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย hexane ของเชื้อรา *N. spinosa* AAP0802 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งจำนวน

สปอร์อยู่ที่ 92.44 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ที่ 20.05 มิลลิเมตร เมื่อพิจารณาค่า ED<sub>50</sub> พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย methanol มีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate แสดงในตารางที่ 4.7 ในส่วนของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *N. spinosa* AAP0802 ที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งมากที่สุดคือสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate และ methanol โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจำนวนสปอร์อยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm ทั้ง 2 ตัวทำละลาย เมื่อดูจากการเจริญเติบโตของโคโลนีพบว่าไม่มีการเจริญเติบโตเกิดขึ้นแสดงในรูปที่ 4.16 และสารสกัดหยาบที่มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งจำนวนสปอร์รองลงมาคือ สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจำนวนสปอร์อยู่ที่ 78.09 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อสาเหตุโรคอยู่ที่ 29.61 มิลลิเมตร สำหรับค่า ED<sub>50</sub> เมื่อนำมาพิจารณาแล้วพบว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากชั้น methanol มีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate แสดงในตารางที่ 4.8 สำหรับสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *E. brefeldianum* AAP0204 พบว่าสารสกัดหยาบจากตัวทำละลาย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจำนวนสปอร์มากที่สุดคือ 93.58 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ที่ 16.27 มิลลิเมตร รองลงมาคือ สกัดหยาบจากตัวทำละลาย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจำนวนสปอร์มากที่สุดคือ 90.18 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ที่ 15.28 มิลลิเมตร เมื่อดูลักษณะโคโลนีจะเห็นได้ว่ามีขนาดที่ใกล้เคียงกัน แต่ต่างกันตรงที่สีของโคโลนีของสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate จะมีโคโลนีสีขาว ส่วนโคโลนีในสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย methanol จะได้สีน้ำตาล ซึ่งแตกต่างจากโคโลนีในชุดควบคุมที่เป็นสีเขียวเข้มดังรูปที่ 4.17 เมื่อพิจารณาจากค่า ED<sub>50</sub> พบว่าที่สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate มีประสิทธิภาพมากที่สุดแสดงในตารางที่ 4.9 จากผลการทดลองทั้งหมดของสาร 9 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *E. brefeldianum* AAP0204 ในตัวทำละลาย ethyl acetate มีค่า ED<sub>50</sub> น้อยที่สุดคือ 34.75 ppm และเมื่อดูค่าของจำนวนสปอร์เปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแล้วพบว่าจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคลด ขนาดของโคโลนีก็จะลดตามเช่นเดียวกัน ถ้าดูจากสีของโคโลนีจะพบว่าสารสกัดที่มีประสิทธิภาพจะสามารถเปลี่ยนสีโคโลนีให้เป็นสีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Dethoup และคณะ (2018) พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802 และ *E. brefeldianum* AAP0204 มีประสิทธิภาพที่มากกว่า แต่เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบกับงานวิจัยของ Jantasorn และคณะ (2016), กมลวรรณ (2558) และ เมอมร (2558) พบว่ามีประสิทธิภาพที่ไม่แตกต่างกัน

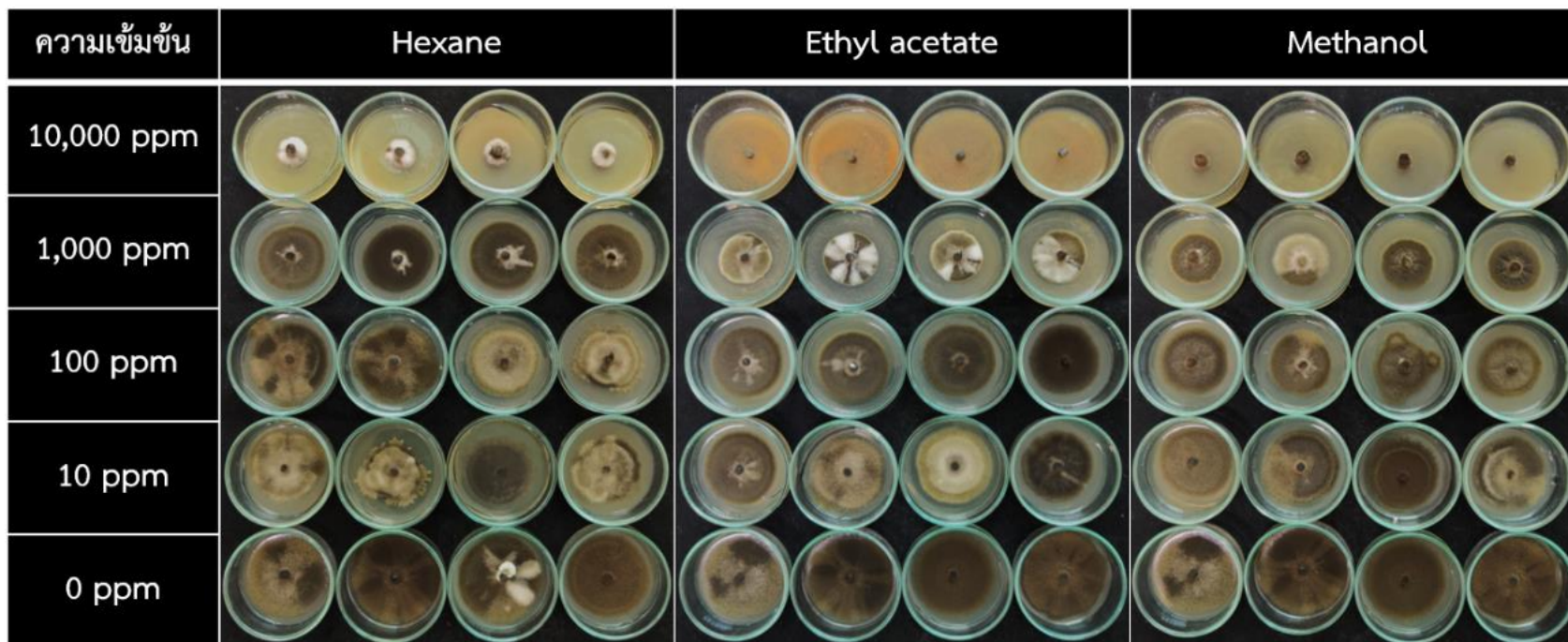


รูปที่ 4.15 แสดงลักษณะของโคโลนี *Alternaria brassicicola* ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Talaromyces macrosporus* AAP0817

ตารางที่ 4.7 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดเหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Talaromyces macrosporus* AAP0817 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01

ชนิดของ ตัว ทำละลาย	ความ เข้มข้น (ppm)	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางโคโลนี (mm)	จำนวน สปอร์×10 <sup>5</sup> (spore/ml)	% spore inhibition	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	50.00±0.00	13.24±0.00	0.00	184.50
	10	37.05±0.73	10.30±0.48	22.20	
	100	33.51±2.43	7.00±0.43	47.12	
	1,000	31.42±1.58	3.25±0.34	75.45	
	10,000	20.05±1.05	1.00±0.16	92.44	
Ethyl acetate	0	50.00±0.00	13.24±0.00	0.00	494.40
	10	41.38±0.65	10.45±0.19	21.07	
	100	38.34±0.53	8.85±0.34	33.15	
	1,000	33.56±1.13	3.15±0.19	76.20	
	10,000	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00	
Methanol	0	50.00±0.00	13.24±0.00	0.00	178.90
	10	39.94±0.94	11.15±0.44	15.78	
	100	39.06±1.96	7.55±0.34	42.97	
	1,000	27.12±2.29	1.40±0.37	89.42	
	10,000	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00	

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ, ED<sub>50</sub> คือระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

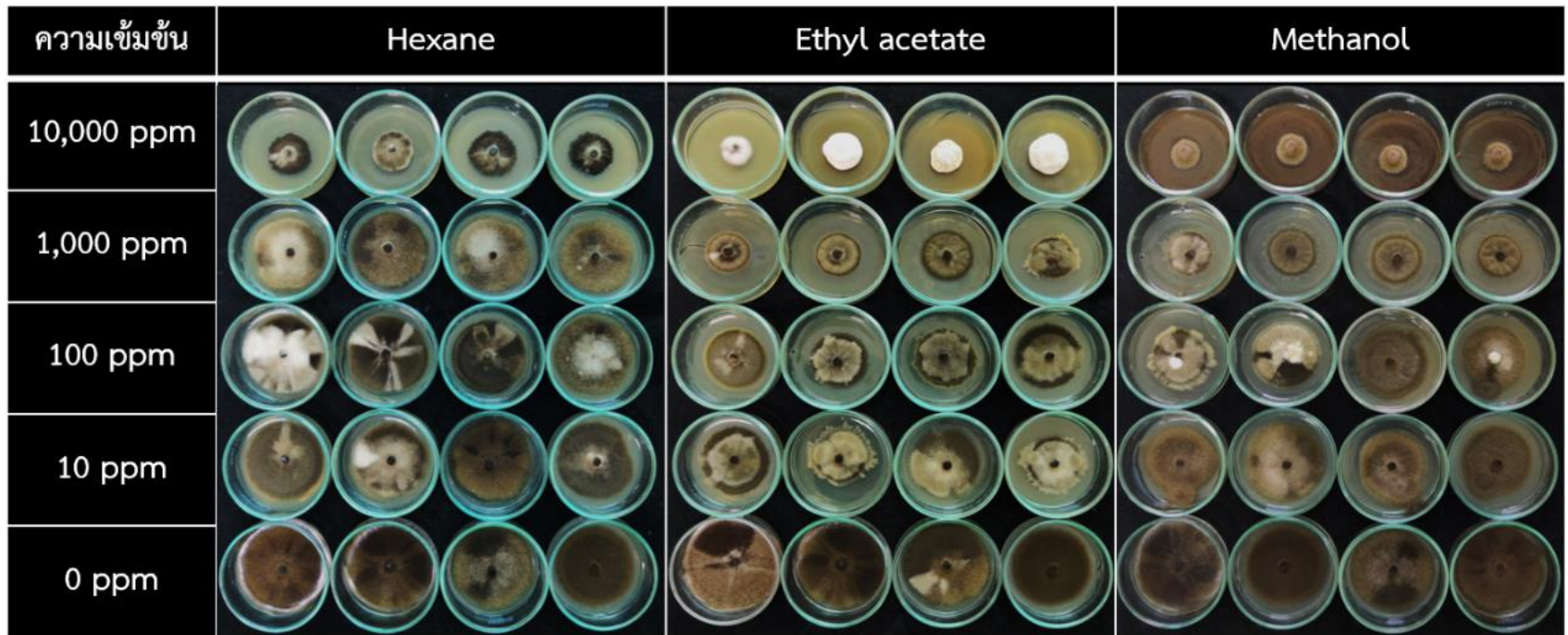


รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะของโคโลนีของ *Alternaria brassicicola* ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *Neosartorya spinosa* AAP0802

ตารางที่ 4.8 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Neosartorya spinosa* AAP0802 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01

ชนิดของ ตัวทำ ละลาย	ความ เข้มข้น (ppm)	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางโคโลนี (mm)	จำนวน สปอร์×10 <sup>5</sup> (spore/ml)	%spore inhibition	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	50.00±0.00	13.24±0.00	0.00	1,285
	10	37.29±1.73	11.75±0.19	11.25	
	100	36.26±0.51	10.75±0.19	18.80	
	1,000	35.25±0.53	8.15±0.75	38.44	
	10,000	16.16±1.19	4.45±0.44	66.38	
Ethyl acetate	0	50.00±0.00	13.24±0.00	0.00	182.30
	10	43.10±0.25	11.40±0.16	13.89	
	100	37.60±0.42	7.15±0.19	45.99	
	1,000	27.93±0.48	3.30±0.35	75.07	
	10,000	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00	
Methanol	0	50.00±0.00	13.24±0.00	0.00	87.30
	10	43.04±0.62	11.95±0.34	9.74	
	100	37.04±0.74	6.20±1.10	53.17	
	1,000	29.61±0.18	2.90±0.35	78.09	
	10,000	0.00±0.00	0.00±0.00	100.00	

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ, ED<sub>50</sub> คือระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.17 แสดงลักษณะของโคโลนีของ *Alternaria brassicicola* ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดยับยั้งจากเชื้อรา *Eupenicillium brefeldianum* AAP0204

ตารางที่ 4.9 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Eupenicillium brefeldianum* AAP0204 ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01

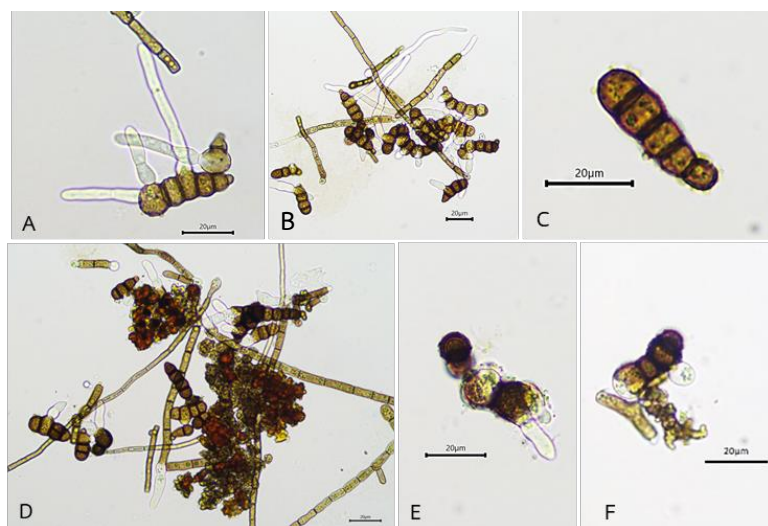
ชนิดของ ตัวทำ ละลาย	ความ เข้มข้น (ppm)	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลางโคโลนี (mm)	จำนวน สปอร์×10 <sup>5</sup> (spore/ml)	%spore inhibition	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	50.00±0.00	13.24±0.00	0.00	>10,000
	10	42.01±0.98	12.30±0.26	7.09	
	100	40.62±0.26	11.65±0.34	12.00	
	1,000	38.36±0.41	11.10±0.48	16.16	
	10,000	25.54±0.22	6.75±0.44	49.01	
Ethyl acetate	0	50.00±0.00	13.24±0.00	0.00	34.75
	10	37.62±0.47	10.00±0.43	24.47	
	100	34.84±0.81	4.00±0.16	69.78	
	1,000	25.48±0.64	1.85±0.19	86.02	
	10,000	16.27±0.84	0.85±0.19	93.58	
Methanol	0	50.00±0.00	13.24±0.00	0.00	155.40
	10	40.79±1.35	10.95±0.44	17.29	
	100	34.60±2.09	7.30±1.24	44.86	
	1,000	26.41±0.77	3.40±0.33	74.32	
	10,000	15.28±1.13	1.30±0.35	90.18	

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ, ED<sub>50</sub> คือระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

#### 4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการงอกของสปอร์ นำสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802 และ *E. brefeldianum* AAP0204 โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 9 สาร โดยสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ โดยละลายสารสกัดหยาบด้วย Dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นผสมกับ spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า *A. brassicicola* KAAB01 ความเข้มข้นสปอร์  $1 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยให้มีระดับความเข้มข้นที่ 0, 50, 100, 500 และ 1,000 ppm สำหรับชุดควบคุมคือ spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้าที่ไม่ผสมสารสกัดหยาบ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 12 ชั่วโมง โดยระยะเวลาที่ 12 ชั่วโมง (ได้จากการหาช่วงเวลาการงอกที่เหมาะสม) เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกได้จากการนับจำนวนสปอร์ที่งอกอย่างสมบูรณ์จำนวน 40 สปอร์ ของชุดทดสอบ เปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ที่งอกอย่างสมบูรณ์จำนวน 40 สปอร์ ของชุดควบคุม และวัดขนาดของ germ tube ผลการทดสอบสารสกัดหยาบของเชื้อรา *E. brefeldianum* AAP0204 ที่ได้จากตัวทำละลาย methanol มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการงอกมากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 1,000 และ 500 ppm มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกคือ 100 และ 85.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อดูสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคที่ความเข้มข้น 1,000 ppm พบว่าสปอร์มีการแตกหักทุกสปอร์ไม่สามารถงอกต่อไปได้รูปที่ 4.18D ในขณะที่ตัวทำละลาย ethyl acetate มีผลทำให้สปอร์เชื้อราสาเหตุโรคเกิดการแตกหักและสปอร์มีขนาด germ tube ที่สั้นลงโดยมีความยาวเฉลี่ยอยู่ที่ 14.73 ไมโครเมตร ดังรูปที่ 4.18E เมื่อพิจารณาว่า  $ED_{50}$  พบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย methanol มีประสิทธิภาพดีที่สุดโดยมีค่า  $ED_{50}$  อยู่ที่ 71.96 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลาย hexane และ ethyl acetate ดังตารางที่ 4.10 ในส่วนของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *N. spinosa* AAP0802 พบว่าสารสกัดหยาบตัวทำละลายที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์มากที่สุดคือ ตัวทำละลาย ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 และ 500 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 57.50 และ 36.67 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความยาวของ germ tube เฉลี่ยอยู่ที่ 21.09 และ 32.55 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อดูลักษณะสปอร์พบว่าสปอร์มีการแตกหักและสปอร์เกิดการแคระแกร็นดังรูปที่ 4.18F สำหรับค่า  $ED_{50}$  พบว่าตัวทำละลาย ethyl acetate มีประสิทธิภาพดีที่สุดโดยมีค่า  $ED_{50}$  อยู่ที่ 727.1 ppm เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย hexane และ methanol ที่มีค่า  $ED_{50}$  มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดลองดังตารางที่ 4.11 สำหรับสารสกัดของเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817 ที่ได้จากตัวทำละลาย methanol และ ethyl acetate ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm

มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์มากที่สุดอยู่ที่ 53.34 และ 27.50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีความยาวเฉลี่ยของ germ tube อยู่ที่ 27.37 และ 29.91 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อสังเกตลักษณะของสปอร์พบว่าสปอร์แตกหัก (รูปที่ 4.18D) และมีความยาวของ germ tube ลดลง (รูปที่ 4.18E) เมื่อพิจารณาค่า ED<sub>50</sub> พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย methanol เพียงสารเดียวที่มีค่า ED<sub>50</sub> ไม่เกินความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบโดยมีค่า ED<sub>50</sub> อยู่ที่ 982.40 ppm ดังตารางที่ 4.12 จากผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดพบว่าสารสกัดหยาบของเชื้อรา *E. brefeldianum* มีประสิทธิภาพที่ดีเมื่อเทียบกับสารตัวอย่างทั้งหมด จากผลลักษณะสปอร์ที่มีความผิดปกติเมื่อผสมด้วยสารสกัดพบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยของเมอมร (2558) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol ที่ได้จากเชื้อ *T. muroii* EU18 ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในกาแฟที่มีเชื้อสาเหตุโรคคือ *C. coffeanum* โดยพบว่าสารสกัดหยาบมีผลทำให้สปอร์ของเชื้อสาเหตุโรครูปร่างผิดปกติ และเมื่อมาดูเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการงอกของสปอร์พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย methanol ของเชื้อรา *E. brefeldianum* AAP0204 ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mohamed (2015) ได้ศึกษาโรคใบจุดในกะหล่ำปลีที่มีเชื้อสาเหตุโรคคือ *A. brassicicola* ผลที่ได้คือสารเคมี Diathane M-45 ที่ ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. brassicicola* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.18 แสดงลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01 ที่ 12 ชั่วโมง  
A-B: ลักษณะของสปอร์ที่งอกได้ปกติ; C: ลักษณะของสปอร์ที่ยังไม่งอก; D: ลักษณะสปอร์ที่แตกหัก; E-F: ลักษณะของสปอร์ที่แคระแกร็น

ตารางที่ 4.10 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Eupenicillium brefeldianum* AAP0204 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01

ชนิดของ ตัวทำ ละลาย	ความ เข้มข้น (ppm)	ความยาว เฉลี่ย germ tube ( $\mu\text{m}$ )	จำนวนสปอร์ ที่งอกอย่าง สมบูรณ์	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการ งอก	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	56.04	40	0.00	>1,000
	50	54.46	40	0.00	
	100	47.67	40	0.00	
	500	46.57	40	0.00	
	1,000	34.02	38.33	4.17	
Ethyl acetate	0	56.04	40	0.00	671.90
	50	46.57	40	0.00	
	100	28.01	34	15.00	
	500	23.00	23.33	41.67	
	1,000	14.73	10.66	73.34	
Methanol	0	56.04	40	0.00	71.96
	50	53.14	30.33	24.17	
	100	28.07	14	65.00	
	500	16.65	5.67	85.84	
	1,000	0.00	0	100.00	

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ, ED<sub>50</sub> คือระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.11 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Neosartorya spinosa* AAP0802 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01

ชนิดของตัว ทำละลาย	ความ เข้มข้น (ppm)	ขนาดของ germ tube ( $\mu\text{m}$ )	จำนวนสปอร์ ที่งอกอย่าง สมบูรณ์	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการ งอก	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	56.04	40	0.00	>1,000
	50	43.13	40	0.00	
	100	52.26	40	0.00	
	500	52.96	40	0.00	
	1,000	49.47	40	0.00	
Ethyl acetate	0	56.04	40	0.00	727.10
	50	44.68	40	0.00	
	100	43.33	34	15.00	
	500	32.55	25.33	36.67	
	1,000	21.09	17	57.50	
Methanol	0	56.04	40	0.00	>1,000
	50	46.79	40	0.00	
	100	42.82	40	0.00	
	500	40.21	36	10.00	
	1,000	27.56	29	27.50	

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ, ED<sub>50</sub> คือระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.12 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา *Talaromyces macrosporus* AAP0817 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Alternaria brassicicola* KAAB01

ชนิดของตัว ทำละลาย	ความ เข้มข้น (ppm)	ขนาดของ germ tube ( $\mu\text{m}$ )	จำนวนสปอร์ ที่งอกอย่าง สมบูรณ์	เปอร์เซ็นต์ ยับยั้ง การงอก	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	56.04	40	0.00	>1,000
	50	48.35	40	0.00	
	100	51.88	40	0.00	
	500	55.20	40	0.00	
	1,000	50.32	40	0.00	
Ethyl acetate	0	56.04	40	0.00	>1,000
	50	47.91	40	0.00	
	100	52.70	40	0.00	
	500	36.80	37.33	6.67	
	1,000	29.91	29	27.50	
Methanol	0	56.04	40	0.00	982.40
	50	55.64	40	0.00	
	100	53.92	40	0.00	
	500	39.53	30.66	23.34	
	1,000	27.37	18.66	53.34	

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ, ED<sub>50</sub> คือระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

#### 4.7 ผลการหาสารสำคัญด้วย Gas chromatography–mass spectrometry

นำสารสกัดหยาบที่ได้จากจากเชื้อราเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802 และ *E. brefeldianum* AAP0204 โดยสกัดด้วยตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol ส่งวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วย GC-MS ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยคัดเลือกรายงานสารที่มีเปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบตั้งแต่ 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ผลจากการส่งวิเคราะห์พบสารสำคัญของสารสกัดหยาบที่มีเปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบมากที่สุดของเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817 ที่ได้จากตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol คือ 9, 12-Octadecadienoic acid (z,z)-, Benzoic acid และ Sorbitol มีเปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบอยู่ที่ 14.96, 47.94 และ 26.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสำคัญของสารสกัดหยาบที่มีเปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบมากที่สุดของเชื้อรา *N. spinosa* AAP0802 ที่ได้จากตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol มีดังนี้ 9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester, Benzoic acid และ Spirostan-12-one, 3-hydroxy-, (3.beta.,5.alpha.,25R)- มีเปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบอยู่ที่ 16.28, 51.11 และ 36.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับสารสำคัญของสารสกัดหยาบที่มีเปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบมากที่สุดของเชื้อรา *E. brefledianum* AAP0204 ที่ได้ จากตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol คือ Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol, (3.beta.,22E)-, Benzoic acid และ 9, 12-Octadecadienoic acid (z,z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester มีเปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบอยู่ที่ 46.05, 48.28 และ 12.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของสารที่มีเปอร์เซ็นต์รองลงมา แสดงในตารางที่ 4.13 จากผลสารสำคัญที่ได้พบว่าปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อรา 3 ไอโซเลต พบมากที่สุดในตัวทำละลาย ethyl acetate มีเปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบอยู่ในช่วง 47-51 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลายชนิดอื่น และที่มากไปกว่านั้นปริมาณสารที่พบมากที่สุดของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต คือ Benzoic acid ซึ่งมีรายงานงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาร Benzoic acid ไว้ดังนี้ Eun และคณะ (2001) ได้ศึกษากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของ Phenol และ Benzoic acid ด้วยวิธี Disc diffusion พบว่า Benzoic acid มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ที่ความเข้มข้นของสาร 40 เปอร์เซ็นต์ ใน DMSO โดยมี clear zone อยู่ที่ 23, 23 และ 12 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้งานวิจัยของ Duraipandiyar และ Ignacimuthu (2007) ศึกษาสารสกัดที่ได้จากต้นราชพฤกษ์ในการต้านจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* และ *Enterococcus faecalis* ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ 5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ มี

clear zone ใกล้เคียงกับชุดควบคุมมีขนาดอยู่ที่ 15, 19, 23 และ 13 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปหาสารสำคัญด้วย X-ray crystallography พบว่าสารสำคัญที่พบคือ Benzoic acid จากงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่า Benzoic acid ที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate ของเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802 และ *E. brefeldianum* AAP0204 อาจจะเป็นสารสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรค *A. brassicicola* โดยดูได้จากผลของการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบด้วยวิธี poison food และการยับยั้งการงอกของสปอร์ พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย ethyl acetate ของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งจำนวนสปอร์และยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* นอกจากนี้ยังพบว่าสาร Benzoic acid เป็นสารวัตถุกันเสียใช้ในการถนอมอาหาร จึงอาจจะมีความเป็นไปได้ที่สามารถใช้เชื้อราทั้ง 3 ชนิดนี้ ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคซึ่งปลอดภัยกับมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ แต่ก็ยังต้องศึกษาสารสำคัญตัวอื่นๆด้วยว่าเป็นมิตรกับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมด้วยหรือไม่

ตารางที่ 4.13 แสดงรายชื่อสารสำคัญที่ได้จากสารสกัดเหยาบของเชื้อรา *Talaromyces macrosporus* AAP0817, *Neosartorya spinosa* AAP0802 และ *Eupenicillium brefeldianum* AAP0204

เชื้อรา	ชื่อสาร	เปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบ		
		Hexane	Ethyl acetate	Methanol
<i>T. macrosporus</i> AAP0817	9, 12-Octadecadienoic acid (z,z)-	14.96		
	9-Octadecenoic acid (Z)-	13.30		
	Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol, (3.beta.,22E)-	10.39		
	Acetic acid, butyl ester		11.61	
	1,2,3-Propanetriol,monoacetate		10.76	
	Benzoic acid		47.94	
	Sorbitol			26.03
	D-Mannitol			20.18
	2,4,7-Trioxabicyclo[4.4.0]9-decene, 8-[4-(4-pentylcyclohexyl)cyclohexyloxy]-3-phenyl-			16.47
<i>N. spinosa</i> AAP0802	Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol, (3.beta.,22E)-	12.55		
	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester	16.28		
	(22E)-Ergosta-5, 7, 9(11), 22-tetraene-3.beta.-ol	10.47		
	Benzoic acid		51.11	
	Hexestrol		11.52	
	(1S,5S,6S,9R)-3,5,9-Trimethyl-3-azabicyclo[4.3.0]nonane		12.38	
	Ethyl Oleate			14.64
	Spirostan-12-one, 3-hydroxy-, (3.beta.,5.alpha.,25R)-			36.87

ตารางที่ 4.13 แสดงรายชื่อสารสำคัญที่ได้จากสารสกัดหยาบของเชื้อรา *Talaromyces macrosporus* AAP0817, *Neosartorya spinosa* AAP0802 และ *Eupenicillium brefeldianum* AAP0204 (ต่อ)

เชื้อรา	ชื่อสาร	เปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่พบ		
		Hexane	Ethyl acetate	Methanol
<i>E. Brefeldianum</i> AAP0204	Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol, (3.beta.,22E)-	46.05		
	Hexadecanoic acid	11.63		
	9-Octadecenoic acid (Z)-, 2,3-dihydroxypropyl ester	10.30		
	10,13-Dimethyl-17-(1,4,5-trimethyl-hex2-enyl)-1,2,9,10,11,12,13,15,16,17decahydrocyclopenta [a] phenanthrene-3-one	28.13		
	Benzoic acid		48.80	
	Di-n-octyl phthalate		24.85	
	9, 12-Octadecadienoic acid (z,z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester			12.63

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ผลจากการเก็บตัวอย่างโรคใบจุดในผักคะน้าทั้ง 6 สถานที่ สามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้าได้จำนวน 10 ไอโซเลต บ่งชี้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีสัณฐานวิทยาเหมือนกันรวมทั้งบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ มีขนาดลำดับเบสอยู่ที่ 566 คู่เบส เมื่อนำไป BLAST ในฐานข้อมูล GenBank มีเปอร์เซ็นต์ identity 100 เปอร์เซ็นต์ กับ *A. brassicicola* และเชื้อที่นำมาศึกษาไม่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม จากนั้นจึงนำเชื้อรา *A. brassicicola* มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคเพื่อหาไอโซเลตที่ก่อโรครุนแรงที่สุดใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาต่อไป พบว่าทั้ง 10 ไอโซเลต มีความสามารถในการก่อโรคแตกต่างกัน โดยเชื้อรา *A. brassicicola* KAAB01 มีความสามารถในการก่อโรคมากที่สุด ดังนั้นจะนำ *A. brassicicola* KAAB01 ไปทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านที่แยกได้จากดินต่อไป สำหรับการคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อราต่อต้าน นำตัวอย่างดินจาก 4 สถานที่ จำนวน 7 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อที่ต้องการได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต แบ่งเป็นเชื้อในสกุล *Neosartorya* จำนวน 7 ไอโซเลต เชื้อในสกุล *Talaromyces* จำนวน 7 ไอโซเลต และ เชื้อราในสกุล *Eupenicillium* จำนวน 6 ไอโซเลต บ่งชี้เชื้อราด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถบ่งชี้เชื้อราได้ทั้งหมด 9 สปีชีส์ คือ *N. tatenoi*, *N. finnelliiae*, *N. spinosa*, *T. diversus*, *T. rugulosus*, *T. muroii*, *T. macrosporus*, *E. brefeldianum* และ *E. erubescens* การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่แยกได้จากดิน 24 ไอโซเลต โดยได้รับความอนุเคราะห์มาเพิ่มเติมจำนวน 4 ไอโซเลต ในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อรา *A. brassicicola* KAAB01 ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมผลที่ได้พบว่าเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802, *E. brefeldianum* AAP0204 และ *E. brefeldianum* AAP0313 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* KAAB01 มากที่สุด จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817, *N. spinosa* AAP0802 และ *E. brefeldianum* AAP0204 ไปสกัดสารด้วยวิธี marceration ด้วยตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับของการมีขั้ว เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *A. brassicicola* KAAB01 ด้วยวิธี poison food พบว่าสารสกัดหยาบในทุกตัวทำละลายที่ได้จากเชื้อรา *T. macrosporus* AAP0817 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคดีที่สุดสำหรับเชื้อรา *N. spinosa* AAP0802 และเชื้อรา *E. brefeldianum* AAP0204 มีประสิทธิภาพดีทั้งในตัวทำละลาย ethyl acetate และ methanol นอกจากนี้สารสกัดหยาบที่ได้จากตัวทำละลาย methanol ของเชื้อรา *E. brefeldianum*

AAP0204 ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* KAAB01 ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นวิเคราะห์สารสำคัญของสารสกัดหยาบด้วยวิธี GC-MS พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต มีปริมาณสาร Benzoic acid มากที่สุดซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ จะเห็นได้ว่าเชื้อราสกุล *Neosartorya*, *Talaromyces* และ *Eupenicillium* มีประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมเชื้อรา *A. brassicicola* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า

### ข้อเสนอแนะ

ผลจากการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Talaromyces macrosporus* AAP0817, *Neosartorya spinosa* AAP0802 และ *Eupenicillium brefeldianum* AAP0204 มีประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในผักคะน้า ในอนาคตจึงอยากให้มีการทดสอบหาประสิทธิภาพของเชื้อราในด้านอื่นเพิ่มเติม เช่น การทดสอบเอนไซม์ในการย่อยเศษซากพืช การศึกษาประสิทธิภาพการอยู่รอดของเชื้อราในสภาพแปลงปลูก การหาประสิทธิภาพของเชื้อราที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชสภาพแปลงปลูก และการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคอื่นๆ เพื่อที่จะสามารถพัฒนาไปเป็นชีวภัณฑ์ได้ในอนาคต

## เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมโรค. 2561. รายงานสถานการณ์โรคและภัยสุขภาพจากการประกอบอาชีพและ  
สิ่งแวดล้อม ปี 2561. [Online] Available : <http://envocc.ddc.moph.go.th>
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2562. สถานการณ์ปลูกค่น้ำรายจังหวัด ปี 2561. [Online] Available :  
<https://production.doae.go.th>.
- กรมวิชาการเกษตร. 2558. อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรู  
ธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว.
- กมลวรรณ ศรีดี. 2558. “ประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ของสารสกัดจากรา  
เอนโดไฟท์ที่แยกจากพืชป่าชายเลนบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน จังหวัดจันทบุรี.” วิทยานิพนธ์  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี. กรุงเทพมหานคร : คณะเทคโนโลยี  
การเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- เครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Thai-Pan). 2559. ผลการเฝ้าระวังสารเคมีกำจัดศัตรูพืช  
ตกค้างในผักและผลไม้ประจำปี 2559. ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ.
- นันทิทยาภรณ์ อมรินทร์. 2012. “การศึกษาสถานการณ์ กฎหมาย และการควบคุม สารพิษตกค้าง  
ในผักสดและผลไม้สดนำเข้าจากต่างประเทศ.” *FDA Journal*. : 36-45.
- พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2555. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา. กรุงเทพมหานคร : คณะเทคโนโลยี  
การเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เมอมร สร้อยทอง. 2558. “การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya*  
จากดินและประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกคโนสในกาแฟ.” วิทยานิพนธ์วิทยา  
ศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ  
ทหารลาดกระบัง.
- สุนิรัตน์ สีมะเต็อ พรพิมล อธิปัญญาคม ชนินทร ดวงสอาด และ อภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2556.  
“อนุกรมวิธานและชีววิทยาของรา *Alternaria* และ *Stemphylium* สาเหตุโรคพืช  
*Taxonomy and Biology of Plant Pathogenic Fungi : Genus Alternaria and  
Stemphylium.*” *วิชาการเกษตร*. : 2737-2745.
- สุธาสิณี อึ้งสูงเนิน. 2015. “ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช.” *EAU HERI  
-TAGE JOURNAL*. 9 : 50-63.
- สุภานัน สุขศิริ. 2561. “การคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* เพื่อ  
การควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าในทุเรียน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา  
วิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- แสงโถม ศิริพานิช. 2556. **สถานการณ์และปัญหาสุขภาพจากการสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช.**  
กรุงเทพมหานคร.
- Ambarish, C. Santhosh, G. Laveena, D. Flavia, D. and Viana, D. 2017. "Antibacterial and antioxidant potential of organic solvents extract of mangrove endophytic fungus *Eupenicillium senticosum* Scott." *Nova Science Publishers*. 9(1) : 65-73.
- Amelia, C. and De, E. 1967. "Studies on the genus *Eupenicillium* taxonomy and nomenclature of *Penicillia* in relation to their sclerotoid ascocarpic states." *Persoonia*. 4 : 391-405.
- Benjamin, C. 1955. "Ascocarp of *Aspergillus* and *Penicillium*." *Mycologia*. 47 : 669-687.
- Boonsang, N. Dethoup, T. Singburadom, N. Gomes, N. and Kijjoa, A. 2014. "in vitro antifungal activity screening of crude extracts of soil fungi against plant pathogenic fungi." *Journal of Biopesticides*. 7 : 156-166.
- Dethoup, T. Kaewsalong, N. Songkumorn, P. and Jantasorn, A. 2018. "Potential application of a marine-derived fungus, *Talaromyces tratensis* KUFA 0091 against rice diseases." *Biological Control*. 119 : 1-6.
- Doyle, J. Doyle, J. and Brown, A. 1990. "A chloroplast-DNA phylogeny of the wild perennial relatives of soybean (*Glycine* Subgenus *glycine*) : congruence with morphological and crossing groups." *Evolution*. 44 : 371-389.
- Duraipandiyar, V. and Ignacimuthu, S. 2007. "Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant." *Journal of Ethnopharmacology*. 112 : 590-594.
- Elettra, B. Roberta, T. Scaramuzzaa, N. Bruttia, A. and Berninib, V. 2017. "*Aspergillus* with *Neosartorya*-type ascospores: heat resistance and effect of sugar concentration on growth and spoilage incidence in berry products." *International Journal of Food Microbiology*. 258 : 81-88.
- Eun, S. Woong, S. Min, J. Mal, N. Kyoo, H. and Jin, S. 2001. "Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives." *International Biodeterioration and Biodegradation*. 47 : 209-214.
- 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.
- Hye, C.S. Kim, B. R. and Yu, S. H. 2001. "Taxonomic studies on *Alternaria* in Korea." *Mycobiology*. (1) : 27-42.

- Jantasorn, A. Mongon, J. Moungrimuangdee, B. and Oiuiphisttraiwat, T. 2016. “*In vitro* antifungal activity of soil fungi crude extracts isolated from riparian forest against plant pathogenic fungi.” *Journal of Biopesticides*. 9(2) : 119-124.
- Jenny, E. Len, T. and Stuart, G. 2014. “ Pests, diseases and disorders of *brassica* vegetables a field identification guide.” *Horticulture Australia*. 10 : 1 - 124.
- Lian, W. Yong, C. Kun, Z. Guang, H. Min, J. Hui, M. Shi, K. and Xiang, L. 2009. “Isolation and difference in anti- *Staphylococcus aureus* bioactivity of Curvularin derivates from fungus *Eupenicillium* sp.” *Applied Biochemistry Biotechnology*. 159 : 284-293.
- Mangkalad, T. Soyong, 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.
- Manoach, L. Dethoup, T. Yilmaz, N. Houbraken, J. and Samson, R.A. 2013. “ Two new *Talaromyces* species from soil in Thailand.” *Mycoscience*. 54 : 335-342.
- Mohamed, S. 2015. “Studies on cabbage *Alternaria* leaf spot disease.” Thesis Master of science Plant Pathology Zagazig University.
- Mukesh, M. Prashant, S. and Upadhyay, R. S. 2017. “Isolation, characterization and toxicological potential of *Alternaria*-mycotoxins (TeA, AOH and AME) in different *Alternaria* species from various regions of India.” *Scientific Reports*. 7 : 1-19.
- Pattanamahakul, P. and Strange, R. N. 1999. “Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of Brassica species grown in Thailand.” *Plant Pathology*. 48 : 749-755.
- Pattarasaikul, W. Soyong, K. and Poeaim, S. 2018. “Biological control of anthracnose disease on banana var ‘Namwa Mali-Ong’ by *Neosartorya* species.” *International Journal of Agricultural Technology*. 14(7) : 1589-1598.
- Pitt, J. and Hocking, D. 1997. “*Aspergillus* and related teleomorphs” *Fungi and Food Spoilage*. 8 : 339-416.
- Robert, H.G. Suzanne, I.W. and Gordon, T. 2008. “The biology of Canadian weeds. 137. *Brassica napus* L. and *B. rapa* L.” *Canadian Journal of Plant Science*. 88 : 951-996.

- Samson, R.A. Hong, S. Peterson, S.W. Frisvad, J.C. and Varga, J. 2007. "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya*." *Studies in Mycology*. 59 : 147-203.
- Swati, D. Sharma, P. Behera, N. and Chowdappa, P. 2014. "Diversity in Indian isolates of *Alternaria brassicicola* (Schwein) Wiltshire causing black leaf spot disease in cauliflower." *Plant Pathology Journal* 13 : 232-245.
- White, T. J. Bruns, T.D. Lee, S.B. and Taylor, J.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In PCR Protocols." *A guide to methods and applications*. 64 : 315-322.
- Woudenberg, J.H.C. Groenewald, J.Z. Binder, M. and Crous, P.W. 2013. "*Alternaria* redefined." *Studies in Mycology*. 75 : 171-212.
- Yilmaz, N. Visagie, C.M. Houbarkem, J. Frisvad, J.C. and Samson, R.A. 2014. "Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*." *Studies in Mycology*. 78 : 175-341.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

#### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

ประกอบด้วย

Potato dextrose broth สำเร็จรูป	24	กรัม
---------------------------------	----	------

วิธีการเตรียม

ละลายสารละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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 กรองเอามันฝรั่งออกปรับปริมาตรน้ำต้มมันฝรั่งให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ dextrose ลงไปคนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหาร PDA เติม agar ลงไปในอาหาร PDB 15 กรัม

#### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) ผสม 40% Sucrose

ประกอบด้วย

Malt extract agar สำเร็จรูป	50	กรัม
-----------------------------	----	------

น้ำตาลซูโครส	400	กรัม
--------------	-----	------

วิธีการเตรียม

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

#### 3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Water Agar (WA)

ประกอบด้วย

วุ้น	18	กรัม
------	----	------

วิธีการเตรียม

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

#### 4. 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 ใช้ความร้อนช่วยให้สารละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

#### 5. 10% CTAB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

CTAB 5 กรัม

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

#### 6. 0.5 M EDTA (pH8) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย

EDTA 93.06 กรัม

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

#### 7. 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 นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับ 1X TBE buffer ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า

**8. 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

**9. 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

**10. Lactophenol ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร**

ประกอบด้วย

Phenol Crystals 200 กรัม

ละลายใน glycerol ปริมาตร 400 มิลลิลิตร lactic acid 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร สำหรับ lactophenol cotton blue ให้ใส่ cotton blue ปริมาตร 0.5 กรัม ลงไปละลาย

ผลงานทางวิชาการ

---

## Effective of *Neosartorya* and *Talaromyces* to control *Alternaria brassicicola* causing leaf spot of kale

---

Punyanobpharat, A.<sup>1</sup>, Soytong, K.<sup>2</sup> and Poeaim, S.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok, Thailand; <sup>2</sup>Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Punyanobpharat, A., Soytong, K. and Poeaim, S. (2018). Effective of *Neosartorya* and *Talaromyces* to control *Alternaria brassicicola* causing leaf spot of kale. International Journal of Agricultural Technology 14(7): 1709-1718.

**Abstract** The antagonistic potential of *Neosartorya* and *Talaromyces* proved to control leaf spot of kale caused by *Alternaria brassicicola*. Leaf spot symptoms were collected from Nakornpathom, Suphanburi, Ratchaburi and Nonthaburi provinces, isolated and identified the pathogen by morphological and molecular characterization. Four isolates were confirmed as *A. brassicicola*. The pathogenicity test was done by detached leaf bioassay and found that AbK-NP01 was the highest virulence pathogenic isolate. Dual culture technique was used to assay with eight species of antagonistic fungi (*N. hiratsukae*, *N. pseudofischeri*, *N. aureola*, *N. spinosa*, *N. fennelliae*, *Neosartorya* sp., *T. trachyspermus* and *T. muroii*) against *A. brassicicola*. The best effective of antagonist to control the tested pathogen was *N. spinosa* CHA09-A01.

**Keywords:** Leaf spot disease, *Alternaria brassicicola*, *Neosartorya*, *Talaromyces*

### Introduction

Kale (*Brassica oleracea*) belongs to *Brassicaceae*. The native growth of kale is Asia. In Thailand, kale is cultivation around 122 million square meter and total productivity at 102,405 tons/year (Department of Agriculture Extension of Thailand, 2015). From this result make kale be important economic crop but large problems are plant disease which able to damage, loss and cost effect for agriculture. Disease of plant in genus kale such as damping-off cause by *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* (Pscheidt and OCamb, 2018) and leaf spot cause by *Alternaria brassicicola* (Rimmer *et al.*, 2007, Iacomini *et al.*, 2004).

This study interesting in leaf spot disease caused by *A. brassicicola* because of can loss productivity at 40% especially in rainy season (Anan and

---

\* **Corresponding Author:** Poeaim, S.; **Email:** [poeaim@hotmail.com](mailto:poeaim@hotmail.com)

Athinuwat, 2016). The data record from Bureau of Epidemiology of Thailand (Siripanich, 2013) found that the most farmers are use chemical to control disease and had been affect to farmer, consumer and environment. Including record from 2003-2012 of patient 17,340 persons which average about 1,734 persons/ year and patient rate 2.35/hundred-thousand persons. So, we would like to develop biological control to control plant disease alternative synthetic chemicals. By choosing to study effective of *Neosartorya* and *Talaromyces* species as antagonists to control leaf spot disease from *A. brassicicola*. Which Boonsang *et al.* (2014) have been presented ethyl acetate extracts of *Neosartorya* sp. against ten plant pathogenic fungi and Dethoup *et al.* (2018) have been used *T. tratenensis* to against rice brown spot and dirty panicle.

The objective of this study was to evaluate *Neosartorya* and *Talaromyces* species to control leaf spot of kale caused by *A. brassicicola*.

## **Material and methods**

### ***Isolation of pathogen***

The pathogen were isolated from leaf spot symptoms as brown spot with concentric rings on leaf (Figure 1: A-B). Diseased samples were collected from four provinces of Thailand (Nonthaburi-2, Ratchaburi-1, Suphanburi-2 and Nakhonpathom-5). Leaf spot symptoms were cut into pieces of 5 mm, washed with sterilized 6% sodium hypochlorite (NaClO) for 1 min., soaked in sterilized water for 5 min and placed on Water Agar (WA) media plate (Deep *et al.*, 2014) and incubated at room temperature for 2-3 days. After incubation mycelial growth out of leaf piece. Hyphal tip was cut and placed on Potato Dextrose Agar (PDA) media plate until get pure culture.

### ***Identification of pathogen***

All isolates were identified by morphological characteristics of the colony appearance on PDA media plate and conidia. The conidia were determined by size (length and width) and characteristic of conidia (Deep *et al.*, 2014) using Nikon NIS-Element software and characteristic of conidia was observed under microscope.

Molecular identification was used to identify into species. The mycelia were placed on sterilized cellophane sheet, covered on PDA media for 12 days at room temperature. The colony was scraped off and crushed with liquid nitrogen by motar and pestle. The total powder of mycelia of 1-2 gram was put

into 2 ml tube. DNA was isolated according to Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) method by Doyle and Doyle (1990) and Suksiri *et al.* (2018).

Polymerase chain reaction (PCR) was used primers ITS1 (3' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 5') and ITS4 (3' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 5'). Amplification reactions were performed in a 25 µl mixture containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of deoxynucleotide triphosphates, 0.8 µM of each primer, 300 ng/µl of DNA template, 1 U of *Taq* polymerase and 1X standard *taq* reaction buffer. PCR cycling conditions consisted of initial denaturation at 94 °C for 2 min. Thirty-five cycles of denaturation at 94 °C for 30 sec, annealing at 58 °C for 30 sec and extension at 72 °C for 2 min. Final extension at 72 °C for 10 min. Method modified according to White *et al.* (1990). PCR products were performed to sequence analysis by Bioneer company, Korea and identified species from database of National Center for Biotechnology Information (NCBI) using Basic Local Alignment Search Tools (BLAST).

### ***Antagonist***

Pure culture of *Neosartorya hiratsukae* EU06, *N. pseudofischeri* EU13, *Neosartorya* sp. EU35, *Talaromyces muroii* EU07, *T. muroii* EU18 and *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), Suksiri and Poeaim, Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

### ***Pathogenicity test***

All isolates were tested pathogenicity by detached leaf bioassay. Kale was cultivated for 25 days and selected leaf with length of 15-20 cm, leaf was gently washed under running tap water, and wounded by sterilized needle (5 times). The agar plug (5 mm diameter) of *A. brassicicola* were placed on wound while control was used pure agar. The leaves were placed in moist chamber boxes. It was recorded diameter of lesion on 4 days. The experiments were conducted in completely randomized design (CRD). Each treatment consisted of three replicates.

### ***Dual culture***

The most virulent isolate from pathogenicity test was used for dual culture test, *Neosartorya* and *Talaromyces* against *A. brassicicola*. An agar plug (5 mm diameter.) of each antagonist and an agar plug of pathogen

obtained from the edge of 15 days old colony were placed 4 cm apart on opposite sides of a PDA plate (9 cm diameter). An agar plug of each antagonist and pathogen were placed on a separate PDA plate to control. The plates were incubated at room temperature for 20 days. The inhibition percent were calculated by using this formula:  $[(x - y)/x] \times 100$ , where  $x$  = amount of conidia of the plant pathogenic fungus in the control plate, and  $y$  = amount of conidia of plant pathogenic fungus in the dual culture plate. Experiment was conducted in completely randomized design (CRD). Each treatment consisted of four replicates.

## Results

### *Isolation and identification of pathogen*

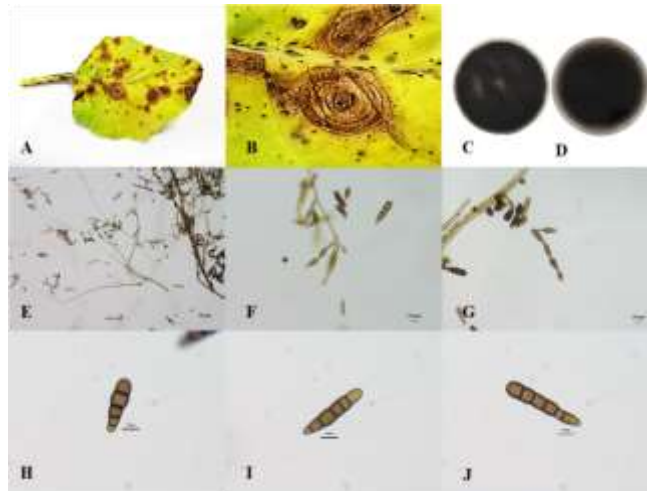
Ten isolates were isolated from 30 leaf spot samples of kale. The color of colony and the conidia grown on PDA media showed little variation of colony color. The colony color of *A. brassicicola* isolates varied from light olive green to olivaceous black (Figure 1: C-D). The conidia of all isolates were same characteristics, conidia color was brown, obpyriform shape, chain and mostly had 4-6 transverse septa (Figure 1: E-J). The conidia size of *A. brassicicola* averaged length and width variation to each isolate include AbLK-NP01(Nakornpathom) 38.72 with 7.05  $\mu\text{m}$ , AbLK-NP02 (Nakornpathom) 31.78 with 7.13  $\mu\text{m}$ , AbLK-NP03 (Nakornpathom) 32.07 with 7.41  $\mu\text{m}$ , AbLK-NP04 (Nakornpathom) 27.8 with 6.65  $\mu\text{m}$ , AbLK-NP05 (Nakornpathom) 28.92 with 7.51  $\mu\text{m}$ , AbLK-NB01 (Nonthaburi) 27.46 with 7.48  $\mu\text{m}$ , AbLK-NB02 (Nonthaburi) 28.79 with 7.21  $\mu\text{m}$ , AbLK-SP01 (Suphanburi) 30.77 with 7.25  $\mu\text{m}$ , AbLK-SP02 (Suphanburi) 33.36 with 7.84  $\mu\text{m}$  and AbLK-RB01 (Ratchaburi) 32.91 with 9.16  $\mu\text{m}$  (Table 1).

Four isolates of AbLK-NP02 from Nakornpathom, AbLK-SP01 from Suphanburi, AbLK-RB01 from Ratchaburi and AbLK-NB01 from Nonthaburi were chosen to represent species identification. The result of molecular identification showed all isolates identity 99% of *A. brassicicola*, corresponding to accession number MF462311 and U05198 obtained to compare with data base in NCBI. That confirmed all isolates are *A. brassicicola*.

### *Pathogenicity test*

Ten isolates of *A. brassicicola* were found to be virulence isolates by detach leaf bioassay. The result showed that isolated AbLK-NP01 was the

longest diameter of lesion at 20.75 mm, and followed by AbLK-NB01, AbLK-NP05, AbLK-NP02, AbLK-SP01, AbLK-SP02, AbLK-NP03, AbLK-RB01, AbLK-NB02 and AbLK-NP04 which diameter of lesion were 17.5, 16.56, 16.49, 16.12, 14.88, 14.27, 14.07, 11.57 and 10.19 mm., respectively (Figure 3). Characteristic of lesion was brown circle, and the scale of lesions changed the leaf color in virulence isolate which leaf changed to yellow, conversely the none virulence isolates showed a few change to yellow (Figure 2).



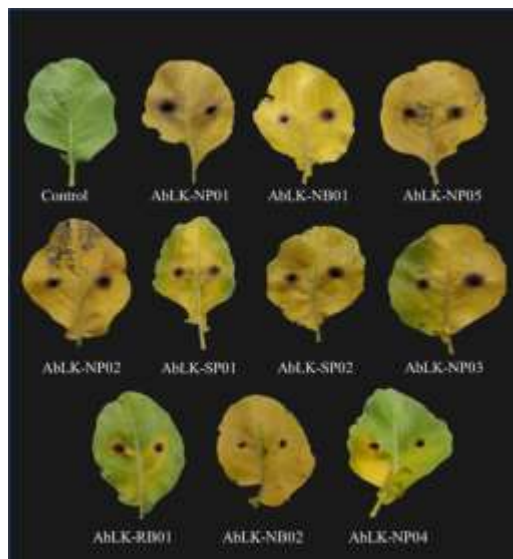
**Figure 1.** Leaf spot disease symptom and morphology of *A. brassicicola* (A) Leaf spot symptoms, (B) Characteristic of lesion, (C) Front of colony plate, (D) Back of colony plate, (E) Hypha and conidia of pathogen 10x magnification, (F) Conidiophore, (G) Hypha and conidia of pathogen 40x magnification, (H) Four transverse septa, (I) Five transverse septa and (J) Six transverse septa

### Dual culture

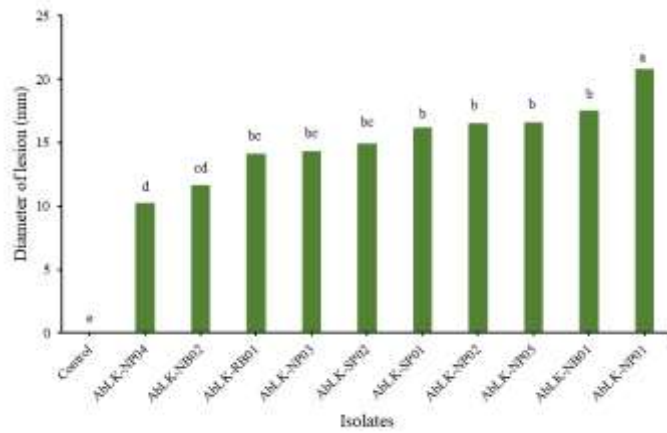
Ten isolates of *Neosartorya* and *Talaromyces* showed actively against *A. brassicicola* AbLK-NP01. The result showed that *N. spinosa* CHA09-A01 (Figure 4) had the highest inhibited than other tested antagonists which the growth inhibition of 79.31% and number of conidia of  $2.95 \times 10^5$  conidia/ml, and followed by *N. aureola* CHA01-A01, *Neosartorya* sp. EU35, *N. hiratsuka* EU06, *N. pseuifischeri* EU13, *N. fennelliae* CHA03-A11, *T. muroii* CHA03-A03, *T. muroii* EU18, *T. muroii* EU07 and *T. trachyspermus* EU23 which the growth inhibition of 78.60, 75.10, 72.99, 71.94, 60.02, 57.56, 50.55, 42.49 and 42.14%, respectively. The number of conidia were  $3.05 \times 10^5$ ,  $3.55 \times 10^5$ ,  $3.85 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $5.7 \times 10^5$ ,  $6.05 \times 10^5$ ,  $7.05 \times 10^5$ ,  $8.2 \times 10^5$  and  $8.25 \times 10^5$  conidia, respectively (Table 2).

**Table 1.** Morphology and province collection of *Alternaria brassicicola* isolated from leaf spot on kale

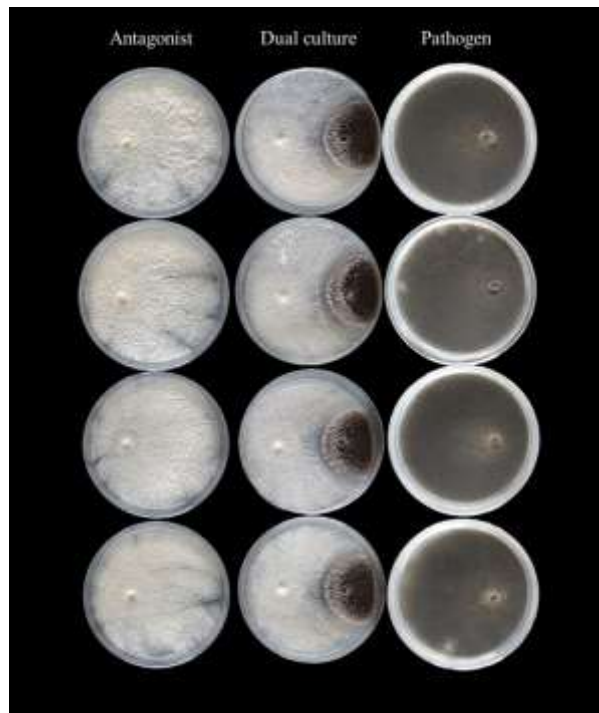
Isolates	Province of collection	Colony color on PDA	Conidial characteristics			
			Colour	Shape	Size of conidial ( $\mu\text{m}$ )	
					Length	Width
AbLK-NP01	Nakornpathom	Olive Gray	Brown	Obpyriform	38.72	7.05
AbLK-NP02	Nakornpathom	Dark Olive Green	Brown	Obpyriform	31.78	7.13
AbLK-NP03	Nakornpathom	Dark Olive Green	Brown	Obpyriform	32.07	7.41
AbLK-NP04	Nakornpathom	Dark Olive Green	Brown	Obpyriform	27.8	6.65
AbLK-NP05	Nakornpathom	Olive Gray	Brown	Obpyriform	28.92	7.51
AbLK-NB01	Nonthaburi	Light Olive Green	Brown	Obpyriform	27.46	7.48
AbLK-NB02	Nonthaburi	Light Olive Green	Brown	Obpyriform	28.79	7.21
AbLK-SP01	Suphanburi	Olivaceous Black	Brown	Obpyriform	30.77	7.25
AbLK-SP02	Suphanburi	Olivaceous Black	Brown	Obpyriform	33.36	7.84
AbLK-RB01	Ratchaburi	Light Olive Green	Brown	Obpyriform	32.91	9.16



**Figure 2.** Characteristic lesion on kale leaf after 4 days inoculation with agar plug of *A. brassicicola* isolates



**Figure 3.** Pathogenicity test of *A. brassicicola* isolate by detach leaf bioassay. Different letter indicates significant differences ( $p = 0.05$ ) between different treatments according to Duncan's Multiple Range Test



**Figure 4.** Characteristic colony dual culture of *N. spinosa* CHA09-A01 with *A. brassicicola* AblK-NP01.

**Table 2.** Dual culture of *Neosartorya* and *Talaromyces* for growth inhibition of *A. brassicicola* AbLK-NP01

Treatment	<i>Alternaria brassicicola</i>	
	Number of conidia/ml ( $\times 10^5$ )	Growth inhibition (%)
CHA09-A01	2.95	79.31 <sup>a</sup>
CHA01-A01	3.05	78.60 <sup>a</sup>
EU35	3.55	75.10 <sup>a</sup>
EU06	3.85	72.99 <sup>ab</sup>
EU13	4	71.94 <sup>ab</sup>
CHA03-A11	5.7	60.02 <sup>bc</sup>
CHA03-A03	6.05	57.56 <sup>c</sup>
EU18	7.05	50.55 <sup>cd</sup>
EU07	8.2	42.49 <sup>d</sup>
EU23	8.25	42.14 <sup>d</sup>
control	14.26	0 <sup>e</sup>

Different letter indicates significant differences ( $p = 0.05$ ) between different treatments according to Duncan's Multiple Range Test

## Discussion

The result of the present study showed ten isolates of *Alternaria brassicicola* isolated from leaf spot on kale in growing areas. The morphological of ten isolates showed no differed in colony color on PDA. The conidia color and conidia characteristic were not different in ten isolates. In part of conidia size was differed due to conidia of *A. brassicicola* are possible variation of length and width that was reported from Cho *et al.* (2001). It identified as *A. brassicicola* that similar to Deep *et al.* (2014). The molecular identification confirmed as *A. brassicicola*. The sequence from PCR product of four isolates were BLAST with database on NCBI. The result showed identity percentage not different and similarity sequence from report of Mahmoudi *et al.* (2017) and Claudia *et al.* (1995). This reason is confirmed other isolates are *A. brassicicola*. The pathogenicity test confirmed ten isolates were pathogenic isolates to cause leaf spot of kale. The pathogenic test was confirmed all isolates were pathogenic and caused leaf spot of kale (Figure 2). Each isolate was differed in virulence to disease (Figure 3) with a significant ( $p = 0.05$ ). The

color on infested leaves with high virulent isolate turned yellow, conversely none virulence isolate made few yellow (Figure 2). The reason was possible *A. brassicicola* may produce toxin attack leaf according to report of Atsushi *et al.* (2009). The effective antagonist *Neosartorya* and *Talaromyces* against *A. brassicicola* was proved by dual culture technique. The result was observed a rank of effective antagonist *Neosartorya* (Table 2). In dual culture, the antagonist grew over colony of pathogen. The result showed *N. spinosa* CHA09-A01 (Figure 4) was highly effective as similar *Trichoderma* spp. against *A. brassicicola* reported Intana *et al.* (2005). Moreover, percentage inhibition of *N. spinosa* CHA09-A01 was high effective than those effective of volatile metabolites on *Trichoderma* spp. from literature searched (Amin *et al.*, 2010).

It concluded that the morphology was identified as *A. brassicicola* AbLK-NP01. *Neosartorya* and *Talaromyces* were proved to inhibit *A. brassicicola* by dual culture method. The result showed that *N. spinosa* CHA09-A01, *N. aureola* CHA01-A01, *Neosartorya* sp. EU35, *N. hiratsuka* EU06 and *N. pseudisclerotii* EU13 had high effective to inhibit the tested pathogen of 79.31, 78.60, 75.1, 72.99 and 71.94%, respectively.

### Acknowledgement

This work was supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (grant number A118-0261-010). The antagonists were supported by Supattra Poeaim, Mayamor Soyong and Supanan Suksiri. The samples were supported by farmers in Nonthaburi, Ratchaburi, Suphanburi and Nakornpathom province.

### References

- Amin, F., Razdan, V. K., Mohiddin, F. A., Bhat, K. A. and Sheikh, P. A. (2010). Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in vitro*. *Journal of Phytology*. 2:34-37.
- Anan, K. and Athinuwat, D. (2016). Bio-formulation development from *Bacillus subtilis* TU-Orgal for controlling the important diseases of chinese kale. *Journal of Science and Technology*. 5:794-812.
- Atsushi, M., Tajima, N., Higuchi, Y., Toyomasu, T., Sassa, T., Kato, N. and Dairi, T. (2009). Identification and functional analysis of brassicene C biosynthetic gene cluster in *Alternaria brassicicola*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 19:870-874.
- Boonsang, N., Dethoup, T., Singburaudom, N., Gomes, N. and Kijjoa, A. (2014). *in vitro* antifungal activity screening of crude extracts of soil fungi against plant pathogenic fungi. *Biopesticides*. 7:156-166.
- Cho, H. S., Kim, B. R. and Yu, S. H. (2001). Taxonomic studies on *Alternaria* in Korea (1). *Mycobiology*. 29:27-42.

- Claudia, A., Victor, M., Lawrence, E. and Ginette, S. (1995). Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycology Research*. 99:604-614.
- Deep, S., Sharma, P., Behera, N. and Chowdappa, P. (2014). Diversity in Indian isolates of *Alternaria brassicicola* (Schwein) Wiltshire causing black leaf spot disease in cauliflower. *Plant Pathology Journal*. 13:232-245.
- Dethoup, T., Kaewsalong, N., Songkumorn, P. and Jantasorn, A. (2018). Potential application of a marine-derived fungus, *Talaromyces tratensis* KUFA 0091 against rice diseases. *Biological Control*. 119:1-6.
- Doyle, J., Doyle, J. and Brown, A. (1990). A chloroplast-DNA phylogeny of the wild perennial relatives of soybean (*Glycine Subgenus glycine*): congruence with morphological and crossing groups. *Evolution*. 44:371-389.
- Iacomini, B., Avenot, H., Bataille, N., Laurent, E., Guenard, M. and Simoneau, P. (2004). In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection*. 23:481-488.
- Intana, W., Suwanno, T. and Chamswang, C. (2005). Use of antifungal metabolite from *Trichoderma virens* for controlling chinese kale leaf spots caused by *Alternaria brassicicola*. *Walailak Journal of Science and Technology*. 2:1-9.
- Mahmoudi, R., Shams-Bakhsh, M. and Safaie, N. (2017). Phylogenetic analysis of *Alternaria raphani*, *A. arborescens* and *A. brassicicola* from canola in Iran. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 2:105-111.
- Pscheidt, J.W. and Ocamb, C. M. (2018). Cabbage and Cauliflower (*Brassica* sp.)-Damping-off (Wirestem). *Pacific Northwest Pest Management Handbooks*. pp. 1-2.
- Rimmer, R., Shattuck, V. and Buchwaldt, L. (2007). Compendium of *Brassica* diseases. *Hort Science*. 44:1509-1510.
- Siripanich, S. (2005). Situation and health problems from pesticide chemicals. Bureau of Epidemiology of Thailand. pp. 1-5.
- Suksiri, S., Laipasu, P., Soyong, K. and Poemim, 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.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. and Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, New York. pp. 315-322.

(Received: 27 August 2018, accepted: 24 October 2018)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายอดิศร ปุญญนพรัตน์
วัน เดือน ปีเกิด	27 มกราคม 2537
ที่อยู่ปัจจุบัน	83 หมู่ 5 ต.ลำคองหงษ์ อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา 30160
ประวัติการศึกษา	(2559) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ เกรดเฉลี่ย 2.25 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2563) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Phunyanobpharat, A. Soytong, K. and Poeaim, S. 2018. “Effective of <i>Neosartorya</i> and <i>Talaromyces</i> to control <i>Alternaria brassicicola</i> causing leaf spot of kale ” <i>International Journal of Agricultural Technology</i> 14(7) : 1709-1718.