

การควบคุมโรคโดยชีววิธีในกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง  
ด้วย *Neosartorya* และ *Talaromyces*

BIOLOGICAL CONTROL OF 'NAMWA MALI-ONG'  
BANANA DISEASES BY *Neosartorya* AND *Talaromyces*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-020-009

การควบคุมโรคโดยชีววิธีในกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน  
ด้วย *Neosartorya* และ *Talaromyces*

BIOLOGICAL CONTROL OF 'NAMWA MALI-ONG'  
BANANA DISEASES BY *Neosartorya* AND *Talaromyces*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2562

KMITL-2019-SC-M-020-009

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

BIOLOGICAL CONTROL OF 'NAMWA MALI-ONG'  
BANANA DISEASES BY *Neosartorya* AND *Talaromyces*



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  
2019

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ KMITL-2019-SC-M-020-009 ภายใต้งานวิจัยที่นำเสนอให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2019

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับงานที่อาจารย์ผู้สอนใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การควบคุมโรคโดยชีววิธีในกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อนด้วย <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i>
ชื่อนักศึกษา	นายวุฒิพงศ์ ภัทราศัยกุล
รหัสประจำตัว	59605052
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร. เกษม สร้อยทอง

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการควบคุมโรคก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวในกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อนโดยชีววิธี คือโรคตายพรายที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และโรคแอนแทรกโนสในกล้วยที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum musae* สามารถคัดแยกเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 8 ไอโซเลต จากต้นกล้วยที่แสดงอาการของโรคในจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี และเพชรบูรณ์ และเชื้อรา *C. musae* จำนวน 10 ไอโซเลต จากผลกล้วยที่เป็นโรคในจังหวัดสุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี และนนทบุรี สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรค พบว่าเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 สามารถก่อโรคได้รุนแรงมากที่สุดเมื่อทำการทดสอบการก่อโรคบนใบกล้วย ขณะที่เชื้อ *C. musae* BACM-09 สามารถก่อโรคแอนแทรกโนสบนผลกล้วยได้รุนแรงที่สุด คัดแยกเชื้อก่อโรคซ้ำและบ่งชี้ใหม่อีกครั้งด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และยืนยันสปีชีส์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคทั้งสองชนิดด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมของเชื้อราต่อต้านที่คัดแยกได้จากดินจำนวน 26 ไอโซเลต พบว่าเชื้อต่อต้าน *Talaromyces trachyspermus* AWP08-01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 ได้มากที่สุดที่ 62.25% และเชื้อต่อต้าน *Neosartorya fennelliae* CHA03-A11 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. musae* BACM-09 ได้มากที่สุดที่ 55.61% เมื่อคัดเลือกเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราก่อโรคทั้งสองชนิด จำนวน 3 ไอโซเลต (*T. trachyspermus* AWP08-01, *T. macrosporus* AWP11-01 และ *N. fennelliae* CHA03-A11) มาสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลาย คือ hexane, ethyl acetate และ methanol เมื่อนำสารสกัดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคทั้งสองชนิด พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อรา *N. fennelliae* CHA03-A11 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 ได้ดีที่สุดที่ 40.14 เปอร์เซ็นต์ และจากเชื้อรา *T. trachyspermus* AWP08-01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. musae* BACM-09 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 969.37 ppm

ดังนั้นจึงมีแนวโน้มในการนำเชื้อรา *N. fennelliae* CHA03-A11 และ *T. trachyspermus* AWP08-01 ไปใช้ในควบคุมเชื้อรา *F. oxyporum* ที่เป็นสาเหตุโรคตายพราย และเชื้อรา *C. musae* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสในกล้วย

**คำสำคัญ** : โรคตายพราย โรคแอนแทรกโนส กล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน การควบคุมโรคโดยชีววิธี *Neosartorya* และ *Talaromyces*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Biological Control of ‘Namwa Mali-Ong’ Banana Diseases by <i>Neosartorya</i> and <i>Talaromyces</i>
Student Name	Mr. Wutthipong Pattarasaikul
Student ID	59605052
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2019
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supattra Poeaim
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Kasem Soyong

### Abstract

The aim of this study was to control the pre-harvest and post-harvest of ‘Namwa Mali-Ong’ banana diseases by biological control agents; panama disease caused by *Fusarium oxysporum* and anthracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae*. Eight *F. oxysporum* isolates were collected from the symptomatic tissues of banana in Suphanburi, Nakhonpathom, Ratchaburi and Petchabun province. Ten *C. musae* isolates were obtained from the symptomatic fruits in Suphanburi, Nakhonpathom, Ratchaburi and Nonthaburi province. For the pathogenicity test, *F. oxysporum* BAFC-01 was the most virulent, causing the maximum diseases severity inoculated on banana leaves while the most virulent strain of anthracnose disease was *C. musae* BACM-09 induced on banana fruits. All pathogens were re-isolated and re-identified based on morphological characteristics and the internal transcribed spacer (ITS) sequences were also confirmed the species identification. For potent antagonistic activity, we were screened for 26 antagonists which isolated from soil against both fungal pathogens by dual culture method. The result showed the best isolates of antagonist to inhibit the spore production of *F. oxysporum* BAFC-01 was *Talaromyces trachyspermus* AWP08-01 with 62.25% and *Neosartorya fennelliae* CHA03-A11 was presented the highest inhibitory effects on the spore production of *C. musae* BACM-09 with 55.61%. The three selected antagonistic fungi (*T. trachyspermus* AWP08-01, *T. macrosporus* AWP11-01 and *N. fennelliae* CHA03-A11) which are effective against both pathogens were extracted using various solvents such as hexane, ethyl acetate and methanol. The crude extracts were evaluated against both pathogenic fungi. The result showed the most effective crude extract that can inhibit spore production of *F. oxysporum* BAFC-01 was crude ethyl acetate from *N. fennelliae* CHA03-A11 as 40.14%. Crude ethyl acetate from *T. trachyspermus* AWP08-01 was found to be the most effective inhibited the spore production of *C. musae* BACM-09 as 50% inhibition concentration at 969.37 ppm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Then, *N. fennelliae* CHA03-A11 and *T. trachyspermus* AWP08-01 will be used to control the pathogen *F. oxysporum* causing panama disease and *C. musae* causing anthracnose disease of banana.

**Keywords:** Biological control, Panama disease, Anthracnose disease, ‘Namwa Mali-Ong’ banana, *Neosartorya* and *Talaromyces*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. เกษม สร้อยทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้โอกาส ให้คำแนะนำ และให้คำปรึกษาแนวทางในการค้นคว้า การทำวิจัย ตลอดการดำเนินงาน รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขการเขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบคุณ รศ.ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ประธานกรรมการและผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก สถาบันและ รศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กรรมการและอาจารย์บัณฑิตประจำ ที่เสียสละเวลาตรวจทาน และพิจารณาวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณพื้นที่วิจัย พื้นที่วิทยาศาสตร์ เพื่อนนักศึกษาปริญญาโท ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือระหว่างการดำเนินงานวิจัย

นายวุฒิพงศ์ ภัทราศัยกุล



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 โรคที่สำคัญในกล้วย.....	3
2.1.1 โรคตายพราย.....	3
2.1.2 โรคแอนแทรคโนส.....	5
2.2 เชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> .....	6
2.3 เชื้อรา <i>Colletotrichum musae</i> .....	8
2.4 เชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> .....	10
2.5 เชื้อราสกุล <i>Talaromyces</i> .....	12
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>15</b>
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	15
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	15
3.3 สารเคมี.....	16
3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	16
3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและเทคนิค polymerase chain reaction (PCR).....	16
3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา.....	17
3.4 วิธีการทดลอง.....	17
3.4.1 การคัดแยกเชื้อราก่อโรคตายพรายและแอนแทรคโนสในกล้วย และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์.....	17
3.4.2 การคัดแยกเชื้อจากดินโดยวิธี soil plate และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์.....	17
3.4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา.....	18
3.4.4 การบ่งชี้เชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์.....	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	18
3.4.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR).....	19
3.4.4.3 การหาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์.....	19
3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคในกล้วย.....	20
3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านต่อการควบคุม เชื้อราสาเหตุโรคในกล้วย.....	22
3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดยับยั้งจากเชื้อต่อต้าน ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย.....	22
3.4.7.1 การสกัดสารสกัดยับยั้งจากเชื้อรา.....	22
3.4.7.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดยับยั้งต่อ การควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย.....	23
3.4.8 การวิเคราะห์สารสำคัญด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).....	24
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>25</b>
4.1 ผลการคัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	25
4.1.1 ผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุของโรคตายพราย.....	25
4.1.2 ผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส.....	29
4.1.3 ผลการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> จากดิน.....	33
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคในกล้วย.....	46
4.2.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการก่อโรคของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> .....	46
4.2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการก่อโรคของเชื้อรา <i>C. musae</i> .....	48
4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมในสภาพห้องปฏิบัติการ.....	49
4.3.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> BAF-01.....	49
4.3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านในการควบคุมเชื้อรา <i>C. musae</i> BACM-09.....	50
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดยับยั้งจากเชื้อราสกุล <i>Neosartorya</i> และ <i>Talaromyces</i> ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในกล้วย.....	54
4.5 ผลการวิเคราะห์สารสำคัญด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).....	64

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	65
เอกสารอ้างอิง.....	67
ภาคผนวก.....	72
ภาคผนวก ก .....	73
ภาคผนวก ข .....	74
ประวัติผู้เขียน.....	75



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1	17
3.2	20
3.3	20
4.1	26
4.2	27
4.3	30
4.4	31
4.5	33
4.6	36
4.7	37
4.8	47
4.9	49
4.10	50
4.11	51
4.12	57
4.13	58
4.14	59
4.15	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.16 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>T. macrosporus</i> AWP11-01 ต่อการควบคุมเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> BAFC-01.....	61
4.17 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ <i>T. macrosporus</i> AWP11-01 ต่อการควบคุมเชื้อรา <i>C. musae</i> BACM-09.....	62
4.18 แสดงสารสำคัญที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จาก <i>N. fennelliae</i> CHA03-A11 และ <i>T. trachyspermus</i> AWP08-01.....	64



## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะอาการของโรคตายพรายในกล้วยน้ำว้า จากตัวอย่างต้นที่เป็นโรครใน ประเทศอินโดนีเซีย; A, B และ C: อาการของโรคที่มีลักษณะใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เหี่ยว และก้านใบหักงอ; D และ E: เนื้อเยื่อภายในต้นกล้วยที่เป็นโรคเปลี่ยนเป็น สีม่วงถึงน้ำตาล.....	4
2.2 แสดงอาการและลักษณะแผลของโรคแอนแทรกโนสบนผลกล้วย; A: ลักษณะอาการ เริ่มต้นเป็นจุดวงสีดำ; B: จุดฉ่ำน้ำสีส้มเมื่อแผลได้รับความชื้น; C: แผลขยายขนาดจนผลเน่า.....	5
2.3 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ <i>F. oxysporum</i> ; A: microconidia. B: macroconidia และ C: chlamydospore.....	6
2.4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. musae</i> a: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; b: ลักษณะ โคโลนีด้านหลังจนเพาะเลี้ยง; c และ g: conidiophore; d-f: conidiomata; h และ i: conidia.....	9
2.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Neosartorya hiratsukae</i> ; A และ B: โคโลนีด้านหน้าและโคโลนีด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D: ascocarp; E และ F ascus. G, H และ I: ascospore.....	11
2.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Talaromyces flavus</i> ; A และ B: โคโลนี ด้านหน้าและโคโลนีด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C และ D: conidiophore; E และ F: conidia; G: ascus; H และ I: ascospore.....	13
3.1 แสดงวิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> บนใบกล้วย.....	21
3.2 แสดงวิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา <i>C. musae</i> บนผลกล้วย.....	21
3.3 แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน.....	23
4.1 แสดงตัวอย่างต้นกล้วยที่เป็นโรคตายพราย A: ตัวอย่างต้นกล้วยที่มีการใบเหี่ยว เปลี่ยนเป็นสีเหลือง, B และ C: เนื้อเยื่อภายในต้นกล้วย เปลี่ยนเป็นสีม่วงถึงน้ำตาล.....	25

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>F. oxysporum</i> BAFC-01 ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกล้วยที่เป็นโรคตายพรายบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน; A: โคลนிட้านหน้า; B: โคลนிட้านหลัง; C, D, E และ F: conidiophore; G และ H: microconidia; I: macroconidia; .....	28
4.3 แสดงตัวอย่างผลกล้วยที่เป็นโรคแอนแทรกโนส; A: ตัวอย่างผลกล้วยที่เป็นโรค; B: เม็ดน้ำสีส้ม (conidiomata) เกิดหลังจากบ่ม 3-5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....	29
4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>C. musae</i> BACM-06 ที่แยกได้จากผลกล้วยที่เป็นโรคแอนแทรกโนสบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน A: โคลนிட้านหน้า; โคลนிட้านหลัง; C และ D: conidiomata; E และ F: appressorium; G และ H: conidiophore; I และ J: conidia; .....	32
4.5 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>T. muroii</i> AWP01-02 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลัง บนอาหาร PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลนிட้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose; L: conidia; M: conidiophore.....	38
4.6 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>T. trachyspermus</i> AWP08-01 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลนிட้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose; L: conidia.....	39
4.7 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>T. macrosporus</i> AWP11-01 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G และ H: ascus; H, I และ J: ascospore; K และ L: โคลนிட้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose.....	40
4.8 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>T. muroii</i> AWP14-01 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลัง บนอาหาร PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore. J และ K: โคลนிட้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose, L: conidia.....	41

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.9 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>N. tatenoi</i> AWP04-03 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลโคนีด้านหน้าและโคลโคนีด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลโคนีด้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose; L: conidia; M: conidiophore.....	42
4.10 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>N. quadricinota</i> AWP13-03 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลโคนีด้านหน้าและโคลโคนีด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore ; J และ K: โคลโคนีด้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose L: conidia; M: conidiophore.....	43
4.11 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>N. spinosa</i> AWP07-01 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลโคนีด้านหน้าและโคลโคนีด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลโคนีด้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose L: conidia; M: conidiophore.....	44
4.12 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>N. tatenoi</i> AWP11-02 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลโคนีด้านหน้าและโคลโคนีด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลโคนีด้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose L: conidiophore.....	45
4.13 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>Fusarium oxysporum</i> จำนวน 8 ไอโซเลต บนใบกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน.....	47
4.14 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อรา <i>C. musae</i> จำนวน 10 ไอโซเลต บนผลกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน.....	48
4.15 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อราต่อต้าน AWP08-01, AWP11-01 และ CHA03-A11 ต่อการควบคุมเชื้อ <i>F. oxysporum</i> BAFC-01.....	53
4.16 แสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อราต่อต้าน AWP08-01, AWP11-01 และ CHA03-A11 ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค <i>C. musae</i> BACM-09.....	53
4.17 สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ <i>N. fennelliae</i> CHA03-A11 ต่อการควบคุมเชื้อ <i>F. oxysporum</i> BAFC-01.....	63
4.18 สารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ <i>T. trachyspermus</i> AWP08-01 ต่อการควบคุมเชื้อ <i>C. musae</i> BACM-09.....	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

ประชากรส่วนใหญ่ของประเทศไทยประกอบอาชีพเป็นเกษตรกร ส่งผลให้อุตสาหกรรมการด้านการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการเกษตรเกี่ยวกับผักและผลไม้ ถือเป็นธุรกิจที่สำคัญที่ส่งผลถึงเศรษฐกิจของประเทศ แต่ในแต่ละปีผลผลิตทางการเกษตรเกิดความเสียหายเป็นจำนวนมากเนื่องจากถูกทำลายโดยศัตรูพืช โดยเฉพาะโรคพืชที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชได้อย่างรวดเร็วและรุนแรง เกษตรกรจึงนิยมใช้สารเคมีในการควบคุม เพราะง่าย รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค โดยเกษตรกรมักใช้สารเคมีหลายชนิดควบคู่กัน และใช้ปริมาณมากเกินไปจนทำให้มีสารเคมีตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร ส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยทั้งในและต่างประเทศ รวมทั้งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคและเกษตรกร (สาคร, 2556; นัฐวุฒิ และคณะ, 2557)

กล้วย (*Musa spp.*) เป็นผลไม้เขตร้อน มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นอกจากจะรับประทานผลแล้วยังสามารถนำมาปรุงเป็นอาหารคาวหวาน และแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น กล้วยตาก กล้วยทอด ใช้เป็นส่วนผสมในขนม และยังสามารถนำส่วนต่าง ๆ ตั้งแต่ใบ ต้น มาใช้ประโยชน์ได้อีกด้วย กล้วยสามารถปลูกได้ทั่วประเทศจากการสำรวจในปี 2559 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกกล้วยกว่า 3 แสนไร่ และให้ผลผลิตมากถึง 1 ล้านตันต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) แต่ปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตทั้งก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวคือ โรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา เช่น โรคตายพราย และโรคแอนแทรคโนส เป็นต้น

โรคตายพราย (*Fusarium wilt* หรือ Panama disease) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* เป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตกล้วยเสียหายตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว เนื่องจากทำให้ต้นกล้วยยืนต้นตายอย่างรวดเร็ว (Deltoura และคณะ, 2017) มีรายงานการเกิดโรคตายพรายเกือบทุกจังหวัดในประเทศไทย และส่วนใหญ่เกิดโรคในกล้วยน้ำว้า (คณะทำงานพยากรณ์และเตือนภัยศัตรูพืช กรมวิชาการเกษตร, 2559) การควบคุมโรคยังเป็นไปได้ช้าเพราะเชื้อราเข้าทำลายทางราก และสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (ณรงค์, 2552; Ploetz, 2005; Thangavelu และคณะ, 2015) สำหรับโรคแอนแทรคโนสหรือโรคผลเน่า มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum musae* (Zhu และคณะ, 2015) เชื้อราจะเข้าทำลายแบบแฝงบนผลกล้วยที่ยังไม่สุกที่มีผลเป็นสีเขียว และจะแสดงอาการของโรคเมื่อกล้วยสุกหรือมีผลเป็นสีเหลืองทั้งผล อาการของโรคจะมีรุนแรงมากขึ้นตามความสุกของผลเพราะมีปริมาณน้ำตาลมากขึ้น (ทศพร, 2535; Khan และคณะ, 2001) ซึ่งเมื่อเกิดโรค เกษตรกรมักจะใช้สารเคมีในการควบคุมโรค เมื่อพบต้นกล้วยที่เป็นโรคตายพรายมักใช้ปูนขาว (calcium carbonate) ราดที่โคนต้น หรือตัดต้นทิ้งและเผาทำลายเพื่อกำจัดเชื้อราสาเหตุของโรค หรือใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม (cabendazim) ราดลงบนบริเวณดินที่จะเพาะปลูกกล้วย (อภิรัชต์, 2555) สำหรับการควบคุมโรคแอนแทรคโนส ใช้สารเคมีไทอะเบนดาโซน (thiabendazole) ฉีดพ่นหรือเคลือบที่ผิวของผลกล้วย เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรค (Mehdi, 2010) จะเห็นได้ว่าการควบคุมโรคในกล้วยยังนิยมใช้สารเคมี เพราะง่ายและมีประสิทธิภาพ

แต่ส่งผลกระทบต่อมากมายทั้งด้านสิ่งแวดล้อม การส่งออกผลผลิตกล้วยและด้านสุขภาพของผู้บริโภค เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเกษตรกรเอง งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะหาวิธีการควบคุมโรคในกล้วยโดยไม่ใช้สารเคมีเปลี่ยนมาใช้ การควบคุมโรคโดยชีววิธี คือการใช้สิ่งมีชีวิตควบคุมสิ่งมีชีวิตด้วยกันเอง โดยศึกษาจุลินทรีย์ที่คัดแยก ได้จากดิน และสนใจเชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ซึ่งมีรายงานการศึกษาเชื้อรา ในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ว่าสามารถควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum coffeanum* ที่เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในกาแฟ (เมอมร, 2558) เชื้อรา *Talaromyces flavus* สามารถควบคุมเชื้อ *Verticillium dahliae* ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวใน มะเขือเทศ (Tjamos และ Fravel, 1997) และเชื้อรา *T. flavus* ยังสามารถควบคุมเชื้อ *Verticillium albo-atrum* ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวในแตงกวาได้ (Naraghi และคณะ, 2010)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 คัดแยกและบ่งชี้เชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุของโรคตายพรายและเชื้อ *C. musae* สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในกล้วย ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์
- 1.2.2 คัดแยกและบ่งชี้เชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยลักษณะทาง สัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์
- 1.2.3 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ต่อการควบคุม เชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย
- 1.2.4 ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดแยกและบ่งชี้เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคตายพรายและโรคแอนแทรกโนสในกล้วย น้ำว้ามะลิอ่อน จากตัวอย่างกล้วยที่เกิดโรคในบริเวณจังหวัดสุพรรณบุรีและจังหวัดใกล้เคียง ด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง Internal Transcribed Spacers (ITS) และคัดแยกและบ่งชี้เชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากดินในบริเวณอำเภอทอง ผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี และอำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่ง  $\beta$ -tubulin รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* และสารสกัดจากเชื้อราทั้งสองสกุลต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุ ของโรคในกล้วย

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย คือ *F. oxysporum* สาเหตุ ของโรคตายพราย เชื้อรา *C. musae* สาเหตุของโรคแอนแทรกโนส และเชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากพื้นที่เพาะปลูกกล้วยในบริเวณจังหวัดสุพรรณบุรีและจังหวัดใกล้เคียง
- 1.4.2 ทราบถึงประสิทธิภาพของเชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ต่อการ ควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคในกล้วยต่อไป
- 1.4.3 ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย เพื่อนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้และพัฒนา เป็นสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วยต่อไป

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยเป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จากการสำรวจในปี 2559 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกกล้วยกว่า 3 แสนไร่ และให้ผลผลิตมากถึง 1 ล้านตันต่อปี สามารถสร้างรายได้ให้เกษตรกรที่สามารถขายได้ตั้งแต่กล้วยสด ไปจนถึงแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เพื่อส่งออก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) แต่ปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตทั้งก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวคือ โรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา เช่น โรคตายพราย และโรคแอนแทรกโนส

### 2.1 โรคที่สำคัญในกล้วย

#### 2.1.1 โรคตายพราย

โรคตายพราย (*Fusarium wilt*) เป็นโรคที่สำคัญที่มักเกิดในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิต ส่งผลต่อการลดลงของผลผลิตกล้วย ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* อาการของโรคตายพรายเริ่มจากเชื้อราสาเหตุเข้าสู่รากแล้วเจริญเข้าไปอยู่ในท่อลำเลียงน้ำและอาหาร ทำให้ท่อลำเลียงน้ำอาหารเกิดอุดตัน เมื่อเชื้อราเจริญอยู่ภายในท่อลำเลียงน้ำและอาหารเนื้อเยื่อจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ม่วง จนถึงน้ำตาล (รูปที่ 2.1A, B และ C) ระบบการส่งน้ำและธาตุอาหารผิดปกติ ใบจึงขาดน้ำ และแสดงอาการเหี่ยวเป็นสีเหลือง จนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล ก้านใบหักพับลงมาขนานกับลำต้น (รูปที่ 2.1D และ E) ส่วนใบยอดนั้นยังคงมีสีเขียวอ่อนและเจริญตั้งตรงอยู่ การเจริญเติบโตหยุดชะงัก ไม่สามารถสร้างดอกและผลเนื่องจากน้ำและอาหารไม่เพียงพอ โดยทั่วไปไม่พบอาการภายนอกของโรคในส่วนของหน่อ (อภีร์ชด์ และคณะ, 2554; Ploetz, 2005; Thangavelu และคณะ, 2015)

มีการรายงานถึงโรคตายพรายในกล้วยครั้งแรกในประเทศออสเตรเลียในปี 1876 แต่มีการสันนิษฐานว่าโรคนี้นี้มีแหล่งกำเนิดมาจากแถบทวีปเอเชียตะวันออก และมีรายงานว่าเกิดโรคนี้นี้มากในประเทศแถบอเมริกาใต้ที่มีพื้นที่การเพาะปลูกกล้วยจำนวนมาก เช่น ประเทศปานามาและประเทศบราซิล ซึ่งส่วนใหญ่นิยมเพาะปลูกกล้วยหอมจนทำให้โรคตายพรายมีชื่อเรียกอย่างแพร่หลายว่า *Fusarium wilt* หรือ Panama disease (Ploetz, 2005)

ในประเทศไทยเองมีรายงานถึงการสำรวจพืชที่เป็นโรคเหี่ยวและคัดแยกเชื้อราสาเหตุของโรค *Fusarium* sp. จากพืช 24 ชนิดที่ปลูกในพื้นที่ 20 จังหวัด พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อราได้ 6 ชนิด คือ *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum* และ *F. solani* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และในตัวอย่างกล้วยน้ำว้าที่เป็นโรคมียลักษณะอาการใบเหลืองเหี่ยว และก้านใบหัก เนื่องจากมีเชื้อราไปอุดตันอยู่ในท่อลำเลียงอาหารและน้ำ และสามารถคัดแยกได้เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* (อภีร์ชด์, 2544) และยังมีรายงานในประเทศอื่น ๆ ที่พบเจอลักษณะอาการใบเหลืองและเหี่ยว ไปจนถึงผลกล้วยมีลักษณะสีบเขียวและยืนต้นตาย เช่น ในประเทศจีน ตรวจพบกล้วยหอมที่มีอาการของโรคตายพราย (Wu และคณะ, 2013) ในประเทศอินโดนีเซียตรวจพบเชื้อราสาเหตุ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ในกล้วยน้ำว้า (Purwati และคณะ, 2007)

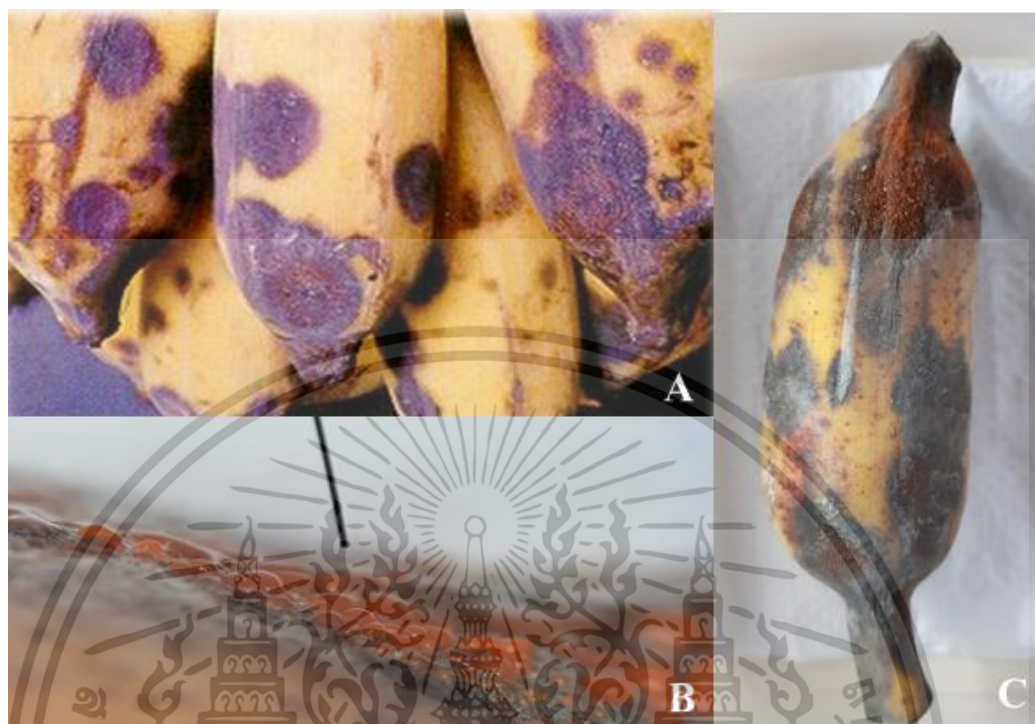


รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะอาการของโรคตายพรายในกล้วยน้ำว้า จากตัวอย่างต้นที่เป็นโรคในประเทศอินโดนีเซีย; A, B และ C: อาการของโรคที่มีลักษณะใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เหี่ยว และก้านใบหักงอ; D และ E: เนื้อเยื่อภายในต้นกล้วยที่เป็นโรคเปลี่ยนเป็นสีม่วงถึงน้ำตาล (Purwati และคณะ, 2007)

### 2.1.2 โรคแอนแทรคโนส

โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) หรือโรคผลเน่า เป็นโรคที่สำคัญที่พบบ่อยภายหลังการเก็บเกี่ยว สามารถเกิดได้ทั้งในกล้วยหอมและกล้วยน้ำว้า มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum musae* (Zhu และคณะ, 2015) ส่วนใหญ่จะพบในพื้นที่อากาศร้อน ความชื้นสูง ลักษณะอาการเริ่มจากสปอร์ของเชื้อราจะกระจายตัวปลิวไปกับลมและน้ำ จนไปติดอยู่กับส่วนปลายของผลกล้วย เมื่อได้รับความชื้นสปอร์จะงอกและเข้าทำลายเปลือกกล้วยจากด้านในปลายผลก่อน จนมองเห็นเป็นจุดสีดำ ฉ่ำน้ำ แล้วขยายวงกว้างไปเรื่อย ๆ (รูปที่ 2.2A) เปลือกกล้วยจะเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำหรือน้ำตาลดำ ขนาดและรูปร่างของแผลที่เกิดโรคนั้นไม่แน่นอน หากสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นผิวผลสีน้ำตาลดำที่เป็นโรคนั้นมีเม็ดสีส้มถึงน้ำตาลเข้มขนาดเล็กอยู่ทั่วไป (รูปที่ 2.2B) ทำให้เนื้อในผลเน่าในที่สุด (รูปที่ 2.2C) เชื้อราจะเข้าทำลายแบบแฝงบนผลกล้วยที่ยังไม่สุกไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลเป็นสีเขียว และจะแสดงอาการของโรคเมื่อกล้วยสุก มีผลเป็นสีเหลืองทั้งผล อาการของโรคจะรุนแรงขึ้นตามความสุกของผลเพราะมีปริมาณน้ำตาลมากขึ้น (ทศพร, 2535; Khan และคณะ, 2001)



รูปที่ 2.2 แสดงอาการและลักษณะแผลของโรคแอนแทรกโนสบนผลกล้วย; A: ลักษณะอาการเริ่มต้นเป็นจุดวงสีดำ; B: เม็ดฉ่ำน้ำสีส้มเมื่อแผลได้รับความชื้น; C: แผลสีดำขยายขนาดจนผลเน่า (ถ่ายภาพโดย: วุฒิพงศ์, 2561)

มีรายงานถึงการสำรวจถึงความหลากหลายของโรคแอนแทรกโนสในกล้วย มะม่วง ลำไย และถั่วเหลืองในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าโรคแอนแทรกโนสที่เกิดในมะม่วง ลำไย และถั่วเหลือง มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* และในตัวอย่างโรคแอนแทรกโนสที่เกิดในกล้วย มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *C. musae* (Photita และคณะ, 2005) และยังมีรายงานถึงการคัดแยกเชื้อรา endophyte ในใบกล้วย ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. musae* ได้ และคาดว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิด สามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืชได้ (endophytic fungi) แต่ไม่แสดงอาการของโรคจนกว่าจะอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ และความชื้น (Photita และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 เชื้อรา *Fusarium oxysporum*

เชื้อรา *F. oxysporum* จัดตามลำดับอนุกรมวิธานอยู่ใน

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Hypocreales

Family: Nectriaceae

Genus: *Fusarium*

Species: *F. oxysporum*

Subspecies: *F. oxysporum*

เมื่อเพาะเลี้ยง *F. oxysporum* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) มีลักษณะโคโลนีสีขาว เมื่อแก่จะเกิดสีม่วง เส้นใยฟูเล็กน้อย มีการสร้างสปอร์ 3 ลักษณะคือ microconidia (รูปที่ 2.3A), macroconidia (รูปที่ 2.3B) และ chlamydsopore (รูปที่ 2.3C) macroconidia และ microconidia สร้างจากปลาย sporodocium (conidiophore) macroconidia มีขนาด  $27.0-55.0 \times 3.3-5.5 \mu\text{m}$  มี 4-8 เซลล์ รูปร่างโค้ง ปลายทั้งสองด้านแหลมคล้ายเคียว (sickle-shaped) microconidia มีขนาด  $5.0-6-16.0 \times 2.4-3.5 \mu\text{m}$  มี 1-2 เซลล์ รูปร่างรี (oval -shaped) หรือรูปร่างคล้ายไต (kidney-shaped) chlamydsopore สร้างอยู่บริเวณปลายหรือระหว่างเส้นใย มีเส้นผ่านศูนย์กลาง  $7-11 \mu\text{m}$  (Ploetz, 2005)



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum*; A: microconidia. B: macroconidia และ C: chlamydsopore

(ที่มา: <http://www.promusa.org/Fusarium+oxysporum+f.+sp.+cubense>)

เชื้อ *F. oxysporum* รวมตัวกันอยู่ในดินหรือน้ำ ก่อโรคโดยเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชโดยการงอก germ tube ของสปอร์เข้าไปในพืชผ่านทางปลายรากหรือทางบาดแผล จากนั้นเชื้อราจะสร้างเอนไซม์ เช่น pectate lyase (PL) และ poly-galacturonase (PG) ที่สามารถสลายผนังเซลล์ของพืชได้ ทำให้เชื้อราเจริญเข้าไปอยู่ในท่อลำเลียงอาหารของพืชได้ (Nelson และคณะ, 1983; conidia ของเชื้อราจะแพร่กระจายโดยอาศัยการไหลของน้ำและสารอาหารในท่อลำเลียง เมื่อมี conidia จำนวนมากขึ้นส่งผลให้ท่อลำเลียงอุดตัน ทำให้ไม่สามารถลำเลียงน้ำและสารอาหารไปถึงด้านบนของต้นพืชได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่ภายนอกการดำเนินงาน  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสาเหตุทำให้ต้นพืชเกิดอาการเหี่ยว และทำให้เจริญเติบโตช้ากว่าปกติ แคระแกร็น และยืนต้นตาย เมื่อต้นตายและล้มลง conidia และเส้นใยบางส่วนจะกลับเข้าสู่สภาพแวดล้อมภายนอกและสามารถเจริญเติบโตได้ในดิน หรือเมื่อสร้าง chlamydospore ที่มีคุณสมบัติทนต่อสภาพแวดล้อม จะสามารถทำให้ต้นพืชกลับมาเป็นโรคเหี่ยวได้ (Kidane, 2008)

ในการควบคุมโรคตายพรายมักจะใช้ปูนขาว (แคลเซียมคาร์บอเนต) ราวที่โคนต้น หรือตัดต้นทิ้งและเผาทำลายเพื่อกำจัดเชื้อราสาเหตุของโรค หรือราสารเคมีคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ลงบนบริเวณดินที่จะปลูกกล้วย (อภิรัชต์, 2555) จะเห็นได้ว่าการควบคุมโรคยังไม่สามารถควบคุมโรคได้อย่างที่ควร และมีรายงานถึงการเลือกใช้ชนิดและปริมาณของสารเคมีกำจัดเชื้อราที่เหมาะสม จะสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุของโรคเหี่ยวในแคนตาลูป โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา copper hydroxide, etridiazole, quintozene, metalaxyl และ pyraclostrobin ที่ความเข้มข้น 0, 500, 1,000, 2,000 และ 3,000 ppm พบว่าสาร copper hydroxide ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ etridiazole และ metalaxyl ที่ระดับความเข้มข้น 3000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ 85.50 และ 52.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถึงการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคจะมีประสิทธิภาพดี แต่การใช้ในปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลเสียถึงสภาพแวดล้อมได้ (วิพรพรรณและวรวิฑู, 2560) เพราะเหตุนี้จึงมีหลายงานวิจัยที่พยายามหาวิธีในการควบคุมโรคตายพรายโดยไม่ใช้สารเคมีโดยตรงเปลี่ยนใช้สารทางชีวภาพทดแทน

มีหลายงานวิจัยที่คัดแยกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อร่วม เชื้อรา *Trichoderma* sp. จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 14 ไอโซเลต สามารถคัดแยกเชื้อราตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 5 ชนิด คือ *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. viride*, *T. koningii* และ *T. longibrachiatum* สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* DOAC 1258 ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสกัดเอาสารที่ได้จากเชื้อราทั้ง 5 ชนิด ยังสามารถยับยั้ง *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* DOAC 1258 ได้ โดยที่สารที่ได้จากไอโซเลต TMS07 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคได้ดีที่สุดที่ระดับ 71.67% ในขณะที่สารจากไอโซเลต TMS11, TMS14 และ TMS15 ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุของโรคได้ดีที่สุดใกล้เคียงกันที่ระดับ 70.90-71.44 เปอร์เซ็นต์ (รุ่งโรจน์ และคณะ, 2552) และยังมี การนำเชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ในสภาพแปลงปลูก โดยนำ *T. harzianum* คลุกในดินในกระถางคอนกรีต และเพาะปลูกกล้วยน้ำว้าโดยใช้ดินที่มีเชื้อราสาเหตุของโรคเพาะปลูกลงในกระถางเดียวกัน พบว่าหลังจาก 3 เดือนหลังการเพาะปลูก ต้นกล้วยที่ปลูกในกระถางที่มี *T. harzianum* สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่ากระถางควบคุม และไม่พบอาการเหลืองของใบ (อภิรัชต์ และคณะ, 2556) นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากเชื้อราในการควบคุมโรคตายพรายแล้ว ยังมีรายงานถึงประสิทธิภาพของสารสกัดในชั้นน้ำจากพืช 4 ชนิด คือ *Azardiachta indica*, *Artemessia annua*, *Eucalyptus globulus* และ *Ocimum sanctum* ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ของสารสกัดจาก *A. indica* สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรค

*F. oxysporum* f.sp. *cubense* ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจาก *E. globulus*, *A. annua* และ *O. sanctum* ตามลำดับ (Mengane และ Kamble, 2014)

## 2.3 เชื้อรา *Colletotrichum musae*

เชื้อรา *C. musae* จัดตามลำดับอนุกรมวิธานอยู่ใน

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Glomerellales

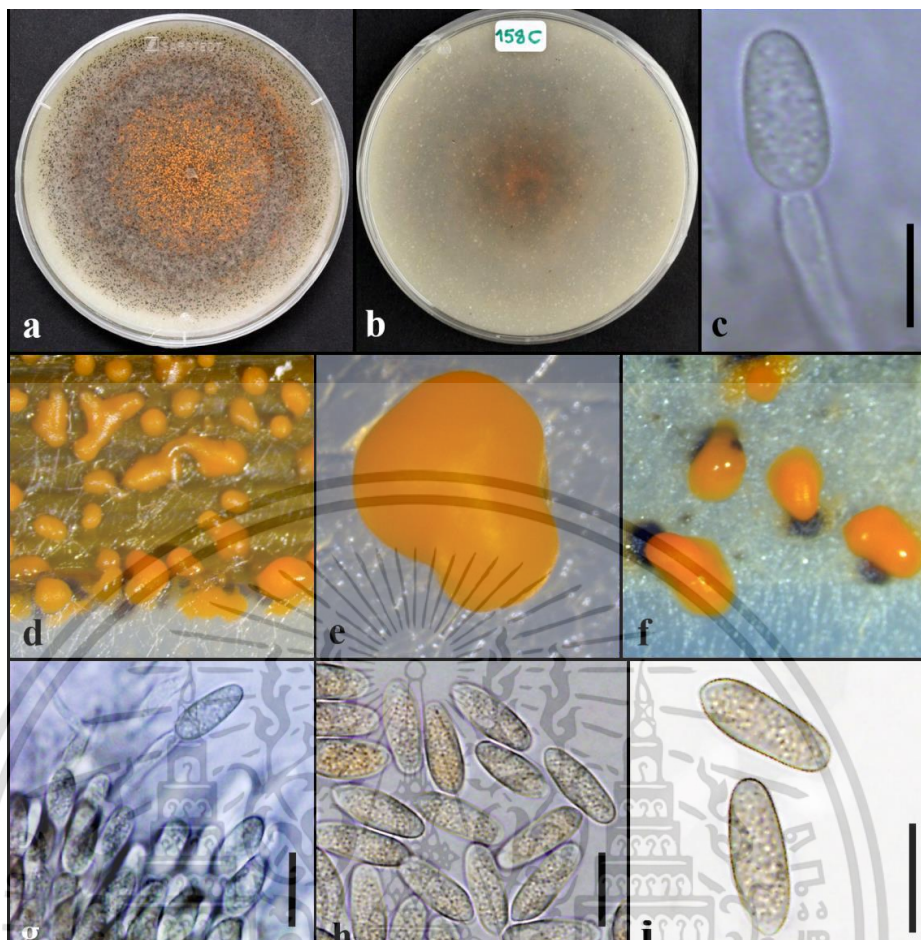
Family: Glomerellaceae

Genus: *Colletotrichum*

Species: *Colletotrichum musae*

เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA มีลักษณะโคโลนีสีขาว เทา น้ำตาล จนถึงดำ (รูปที่ 2.4a และ b) เมื่อแกะจะสร้าง conidiomata สีส้ม มีลักษณะเป็นเม็ดสร้างขึ้นอยู่บนเส้นใย (รูปที่ 2.4d, e และ f) พบ conidiophore (รูปที่ 2.4c และ g) และ conidia มีขนาดประมาณ  $9.5-15 \times 4.5-6 \mu\text{m}$  รูปปร่างรี (รูปที่ 2.4h และ i) (Alizadeh และคณะ, 2015) เชื้อรา *C. musae* สามารถก่อโรคได้เนื่องจากสปอร์ของเชื้อปลิวอยู่ตามลม และติดอยู่ที่ใบกล้วย ทำให้ใบมีรอยจุดสีดำ เกิดแผลกระจายตัวออกเป็นวงกว้าง เมื่อออกผลสปอร์จะไปติดที่ปลายผลและทำให้ผลเน่า (ทศพร, 2535) และยังสามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชได้ แต่จะไม่แสดงอาการของโรค (Photita และคณะ, 2001)

ในประเทศไทยมีการสำรวจถึงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรกโนสกล้วยน้ำว้าในพื้นที่จังหวัดนนทบุรี นครปฐม ราชบุรี และปทุมธานี พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจาก *C. musae* ภายหลังการเก็บเกี่ยวอยู่ที่ 87.2, 83.0, 78.0 และ 77.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ทศพร, 2535) และในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสมักใช้สารเคมีไทอะเบนดาโซล (thiabendazole) ฉีดพ่นหรือเคลือบที่ผิวของผลกล้วยเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรค (Mehdi, 2010) มีการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารเคมี thiabendazole, benomyl, thiophanate-methyl, prochloraz, imazalil ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส พบว่าการจุ่มกล้วยในสารเคมี imazalil ความเข้มข้น 250 ppm นาน 3 นาที สามารถควบคุมโรคแอนแทรกโนสได้ดี และเมื่อใช้ร่วมกับการเก็บรักษาในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส สามารถเก็บกล้วยหอมนาน 30 วัน โดยที่กล้วยหอมยังมีสภาพดีไม่เปลี่ยนสีปราศจากอาการโรค และเมื่อบ่มให้สุกที่อุณหภูมิห้อง ก็ไม่ปรากฏอาการของโรคแอนแทรกโนส แต่เมื่อทำการตรวจสอบสารตกค้างพบว่ามีสารเคมีตกค้างอยู่ที่ผิวกล้วย ซึ่งส่งผลเสียต่อการส่งออกผลผลิตกล้วยและยังส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อมในระยะยาว



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. musae* a: ลักษณะโคโลนีด้านหน้า; b: ลักษณะโคโลนีด้านหลังจางเพาะเลียง; c และ g: conidiophore; d-f: conidiomata; h และ i: conidia (Alizadeh และคณะ, 2015)

ในปัจจุบันมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารทางชีวภาพเพื่อนำมาควบคุมโรคแอนแทรกโนสในกล้วยโดยชีววิธี เพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค เช่น มีการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากใบขมิ้น (*Curcuma alismatifolia* Gagnep) และน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ มาทดสอบการควบคุมเชื้อรา *C. musae* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วม พบว่าเชื้อที่แยกได้ 3 ไอโซเลต คือ *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* และ *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคได้มากถึง 75 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตยังสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุของโรคได้มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Mahadtanapuk และคณะ (2007) นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียแล้วยังมีรายงานถึงการใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการทดสอบการควบคุมเชื้อรา *Thielaviopsis paradoxa*, *C. musae* และ *F. verticillioides* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วม และการทดสอบบนฝักกล้วยพบว่า *T. harzianum* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *T. paradoxa*, *C. musae*, และ *F. verticillioides* ได้มากถึง 100 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังมีการนำสารสกัดทางชีวภาพเพื่อใช้ควบคุมโรคแอนแทรกโนสในกล้วย โดยใช้สารสกัดขึ้นน้ำจากพืช *Solanum torvum*, *Jatropha curcas* และ *Emblica officinalis* ผสมกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อคุณผู้ใดเห็นใบเขียวหรือเห็นใบดำที่กล้วยของคุณไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยสารสกัดจาก *S. torvum* ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังช่วยยืดอายุของกล้วยให้ยังเขียวได้นานขึ้นกว่าเดิม 16-20 วัน (Thangavelu และคณะ, 2015)

## 2.4 เชื้อราสกุล *Neosartorya*

เชื้อราสกุล *Neosartorya* จำแนกตามลำดับอนุกรมวิธานอยู่ใน

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

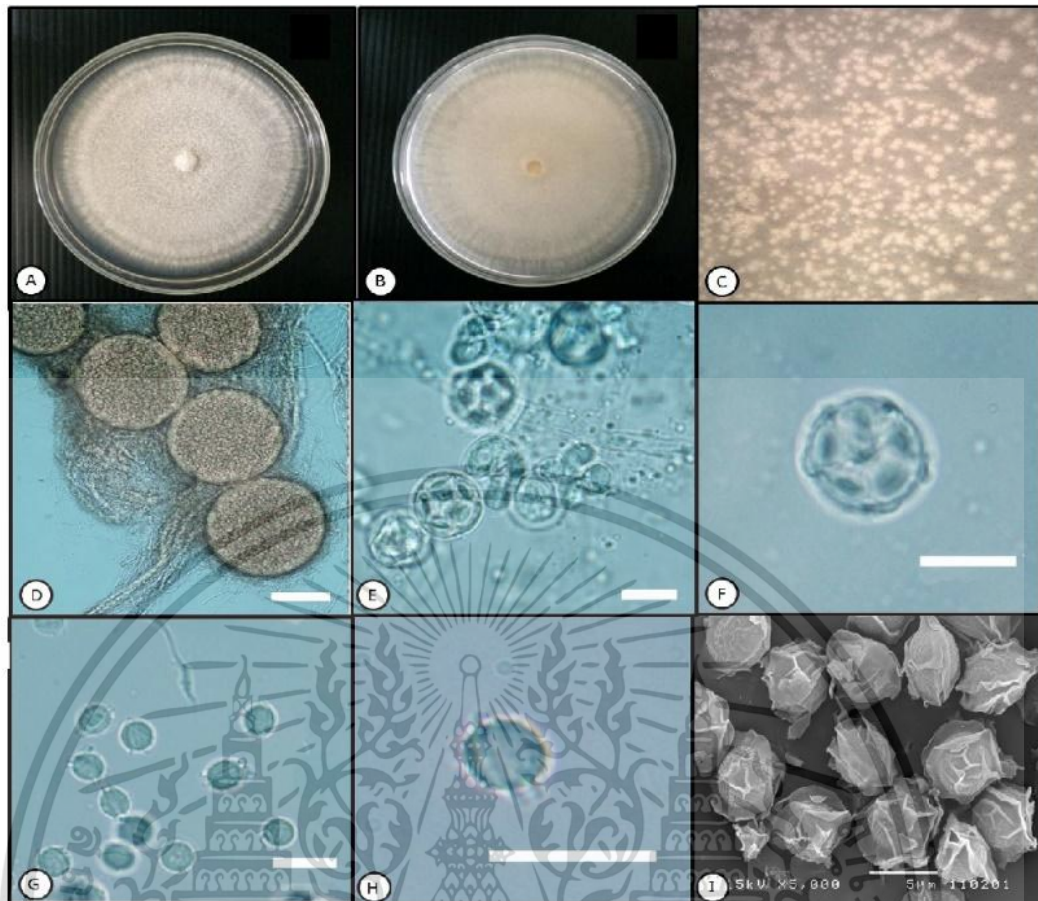
Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiomycetidae

Family: Trichocomaceae

Genus: *Neosartorya*

เชื้อราสกุล *Neosartorya* เป็นเชื้อราที่อยู่ในลักษณะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Aspergillus* เจริญอยู่บนซากสิ่งมีชีวิต พบทั่วไปในดิน เศษพืช ปุ๋ยหมัก มูลสัตว์ (Samson และคณะ 2007) โดยทั่วไปมีลักษณะโคโลนีตั้งแต่สีเทา ขาว ครีม จนถึงเหลืองอ่อน (รูปที่ 2.5A และ B) มีเมื่ออยู่ในลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศสามารถสร้าง ascocarp แบบ cleistothecium รูปร่างคล้ายถุงปิด ผนังหนา (รูปที่ 2.5C และ D) ascospore มี ridge แบบ 2 equatorial crests (รูปที่ 2.5H) และอยู่ในลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จะสามารถสร้าง conidiophore มีลักษณะเป็นแท่งตรงสั้น ๆ conidia มีรูปร่างรี (Yaguchi และคณะ, 2010; Poearim และคณะ, 2016) เชื้อราสกุล *Neosartorya* บางสปีชีส์สามารถเปลี่ยนรูปแบบเป็นลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสม (Samson และคณะ 2007)



รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Neosartorya hiratsukae*; A และ B: โคลนินด้านหน้าและโคลนินด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D: ascocarp; E และ F ascus; G, H และ I: ascospore (Soytong และ Poeaim, 2015)

เลขา และคณะ (2553) รายงานถึงการพบเชื้อราสกุล *Neosartorya* ในประเทศไทยจากดินบริเวณน้ำพุร้อน ดินทำการเกษตร และดินจากแหล่งต่าง ๆ จาก 13 จังหวัด จำนวน 7 สปีชีส์ คือ *N. delicate*, *N. fischeri*, *N. glabra*, *N. multiplicata*, *N. spinose*, *N. quadricincta* และ *N. takaii* ทำให้ทราบได้ว่าเชื้อราในสกุลนี้สามารถพบได้ทั่วไปในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีแนวโน้มที่จะสามารถทนความร้อนได้สูง และนำมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วม พบว่าเชื้อรา *Neosartorya* ทั้ง 7 สปีชีส์สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคพืช *Bipolaris maydis*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* และ *Pestalotiopsis* ได้ 30-40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Gomes และคณะ (2014) ยังมีการคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* จากน้ำทะเล สามารถคัดแยกเชื้อรา *N. paulistensis*, *N. lacinoso* และ *N. tsunoda* และจากดินสามารถคัดแยกเชื้อรา *N. fischeri* และ *N. siamensis* และพบว่าสารสกัดในชั้นน้ำจากเชื้อรา *N. paulistensis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion และยังมีรายงานการทดสอบการใช้สารสกัดยับยั้งจากเชื้อรา *N. pseudofischeri*, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*N. quadricincta*, *N. multiplicata*, *Eupenicillium parvum* และ *Gelasinospora brevispora* และสารสกัดหยาบในชั้น ethyl acetate สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรค *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora palmivora*, *Alternaria* sp., *F. oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *C. gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Helminthosporium maydis* และ *Rhizoctonia solani* และยังมีผลการรายงานถึงสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อรา *N. pseudofischeri* KUFA 0060 ที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรค *P. palmivora* และ *C. gloeosporioides* และสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อรา *N. quadricincta* KUFA 0064 ที่ความเข้มข้น 10 ppm สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *P. palmivora* และ *Alternaria* sp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Boonsang และคณะ, 2014)

## 2.5 เชื้อราสกุล *Talaromyces*

เชื้อราสกุล *Talaromyces* จำแนกตามลำดับอนุกรมวิธานอยู่ใน

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

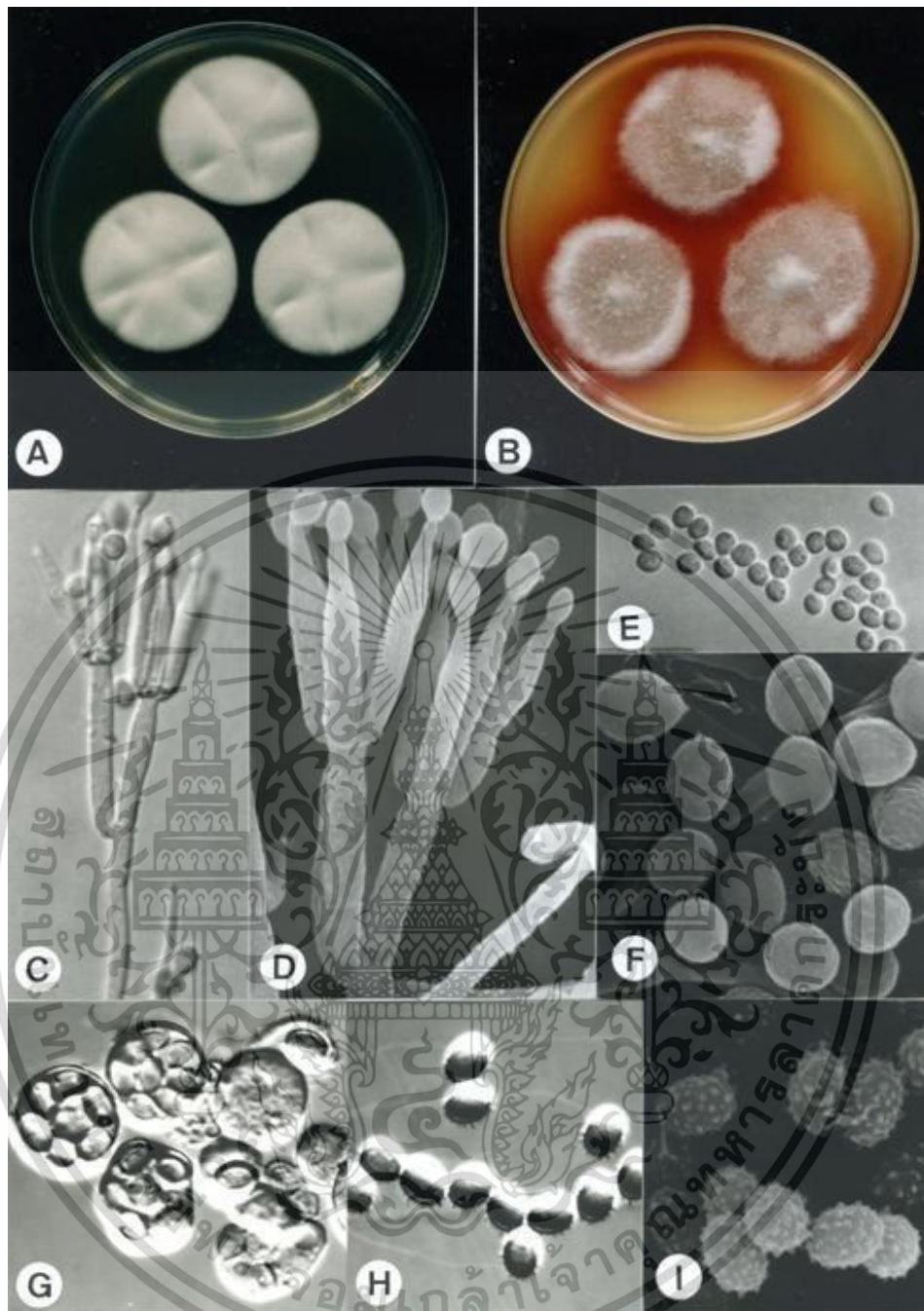
Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiomycetidae

Family: Trichocomaceae

Genus: *Talaromyces*

เชื้อราสกุล *Talaromyces* เป็นเชื้อราที่อยู่ในลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Penicillium* สามารถพบได้ในซากพืช ซากสัตว์ที่ทับถมกันอยู่บริเวณผิวดิน มีลักษณะโคโลนีสีขาวถึงเหลือง ครีม ชมพู เขียว และส้มแดง (รูปที่ 2.6A และ B) สามารถพบลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้โดยมี conidiophore มีทั้งเรียบและขรุขระ มี phialide 2 ชั้น ด้านปลายเล็ก บางชนิด phialide มีชั้นเดียว (รูปที่ 2.6C และ D) asexual spore (conidia) มีรูปร่างกลม ถึงรี (รูปที่ 2.6E และ F) ส่วนลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะพบ ascocarp มีลักษณะคล้ายถุงปิดไม่มีช่องเปิด รูปร่างกลม โดยมีผนังกัน ascomata เป็นเส้นใยบาง ๆ ascus รูปร่างคล้ายโซ่ (รูปที่ 2.6G) บรรจุ ascospore 8 อัน มีลักษณะกลมถึงรี ไม่มี ridge (รูปที่ 2.6H และ I) (Samson และคณะ 2007)



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Talaromyces flavus* A และ B: โคลนีด้านหน้าและโคลนีด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C และ D: conidiophore; E และ F: conidia; G: ascus; H และ I: ascospore (Yilmaz และคณะ, 2014)

มีรายงานการคัดแยกเชื้อรา *Talaromyces* ในประเทศไทย พบเชื้อราสกุลนี้ได้ 13 สปีชีส์คือ *T. austrocalifornicus*, *T. flavus*, *T. bacillisporus*, *T. helicus*, *T. macrosporus*, *T. trachyspermus*, *T. luteus*, *T. indigoticus*, *T. stipitatus*, *T. rotundus*, *T. wortmannii*, *T. tratensis* และ *T. thailandensis* ซึ่งสามารถคัดแยกได้ด้วยวิธี soil plate, dilution plate, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

alcohol และ heat treatment ด้วยอาหาร Gochenaur's glucose ammonium nitrate agar (GAN) และศึกษาสารทุติยภูมิจากรา *T. bacillisporus* สามารถสร้างสาร oxyphenalenone dimers ชนิดใหม่ ได้แก่ bacillisporin D และ E และศึกษาเชื้อรา *T. flavus* จำนวน 20 ไอโซเลต พบว่าส่วนใหญ่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรค *P. parasitica*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* ได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae*, *Rhizoctonia oryzae* และ *Sclerotium rolfsii* ได้ในสภาพห้องปฏิบัติการ (ธิดา และคณะ, 2550)

มีรายงานถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. flavus* ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคลำต้นเน่าของถั่ว *Sclerotium rolfsii* และโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ *Verticillium dahlia* พบว่าเชื้อรา *T. flavus* สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคทั้ง 2 ชนิดได้ดี (Madi และคณะ, 1997) และยังสามารถควบคุมเชื้อรา *Verticillium dahliae*, *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, *R. solani* และ *C. gossypii* ที่เป็นสาเหตุของโรคในฝ้ายในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมบนอาหาร Czapek agar (CZA) และ wheat grain media พบว่า *T. flavus* สามารถยับยั้งการเจริญของรา *V. dahliae* และ *F. oxysporum* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *R. solani* และ *C. gossypii* ได้ (Jun และคณะ, 1999) Huang และคณะ (2000) ยังพบว่ารา *T. flavus* สามารถควบคุม *Sclerotinia sclerotiorum* ที่เป็นสาเหตุของโรค white mould ของถั่ว dry bean (*Phaseolus vulgaris*) ในสภาพแปลงปลูกที่ประเทศแคนาดา

จะเห็นได้ว่าเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* มีความสามารถในการควบคุมโรคในพืชหลายชนิดได้ เพราะมีคุณสมบัติคือ มีผนังสปอร์หนา สามารถทนอุณหภูมิสูงและทนแอลกอฮอล์ในขั้นตอนการคัดแยกเชื้อด้วยวิธี alcohol และ heat treatment และยังสามารถสร้างสารทุติยภูมิออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคในพืชต่าง ๆ ได้ งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะคัดแยกและศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคตายพรายและโรคแอนแทรกโนสในถั่วลิสง

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกล้วยที่เกิดโรคตายพราย โดยสังเกตจากอาการใบเหี่ยว เปลี่ยนเป็นสีเหลือง เมื่อตัดขวางลำต้นพบเนื้อเยื่อภายในเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงถึงน้ำตาล ตัดเนื้อเยื่อภายในต้นที่เกิดโรค และตัดแยกเชื้อทันที และโรคแอนแทรกโนสโดยเก็บตัวอย่างผลกล้วยที่เป็นโรค สังเกตจุดสีดำที่เกิดบนผลกล้วย จากพื้นที่เพาะปลูกกล้วยในบริเวณจังหวัดสุพรรณบุรีและจังหวัดใกล้เคียง โดยเก็บตัวอย่างโรคตายพราย 10 ตัวอย่าง และตัวอย่างโรคแอนแทรกโนส 10 ตัวอย่าง รวมทั้งสุ่มเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาคัดแยกเชื้อราต่อต้านจากพื้นที่เพาะปลูกกล้วยที่ไม่เกิดโรคบริเวณจังหวัดสุพรรณบุรีและจังหวัดใกล้เคียง โดยเก็บตัวอย่างลึกจากผิวดินประมาณ 15 เซนติเมตร

และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราต่อต้านจำนวน 4 ไอโซเลต คือ *Neosartorya aureola* CHA01-A01, *N. spinosa* CHA09-A01, *N. fenneliae* CHA03-A11 และ *Talaromyces muroii* CHA03-A03 จาก รศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

#### 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.2.1 agarose gel electrophoresis
- 3.2.2 alcohol lamp
- 3.2.3 autoclave
- 3.2.4 balance
- 3.2.5 centrifuge
- 3.2.6 cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร
- 3.2.7 DNA thermal cycle
- 3.2.8 flask
- 3.2.9 hemacytometer
- 3.2.10 hot air oven
- 3.2.11 incubator
- 3.2.12 laminar flow cabinet
- 3.2.13 micropipette
- 3.2.14 needle
- 3.2.15 petri dish ขนาด 60 และ 90 มิลลิเมตร
- 3.2.16 rotary vacuum evaporator
- 3.2.17 separating funnel
- 3.2.18 slide และ cover slip
- 3.2.19 light microscope
- 3.2.20 stereo microscope
- 3.2.21 spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.22 vernier
- 3.2.23 vortex mixer
- 3.2.24 water bath
- 3.2.25 test tube ขนาด 0.2, 1.5 และ 50 มิลลิลิตร

### 3.3 สารเคมี

- 3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา
  - 3.3.1.1 สีย้อม lactophenol cotton blue
  - 3.3.1.2 อาหาร rose bengal agar
  - 3.3.1.3 อาหาร potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก)
  - 3.3.1.4 อาหาร malt extract agar (MEA) ที่เติม 40 เปอร์เซ็นต์ sucrose (ภาคผนวก ก)
- 3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)
  - 3.3.2.1 10X standard *Taq* reaction buffer
  - 3.3.2.2 10% CTAB (ภาคผนวก ข)
  - 3.3.2.3 2X CTAB (ภาคผนวก ข)
  - 3.3.2.4 3X gel loading dye
  - 3.3.2.5 agarose powder
  - 3.3.2.6 chloroform: Isoamyl alcohol (24:1 v/v)
  - 3.3.2.7 deionize water
  - 3.3.2.8 deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs)
  - 3.3.2.9 DNA ladder ขนาด 100 คู่เบส (VC 100 bp plus ladder)
  - 3.3.2.10 DNA ladder ขนาด 1 กิโลเบส (VC 1 kb DNA ladder)
  - 3.3.2.11 ethidium bromide
  - 3.3.2.12 ethyl alcohol 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
  - 3.3.2.13 ethylene diamine tetraacetate (EDTA)
  - 3.3.2.14 liquid nitrogen
  - 3.3.2.15 *Taq* DNA polymerase
  - 3.3.2.16 TBE buffer (ภาคผนวก ข)
  - 3.3.2.17 TE buffer (ภาคผนวก ข)
  - 3.3.2.18 ไพรเมอร์ในตำแหน่ง ITS และ  $\beta$ -*tubulin* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White และคณะ (1990)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'	
Bt2a	5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	Hubka และ Kolarik (2012)
Bt2b	5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC -3'	

#### 3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา

3.3.3.1 dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.3.3.2 ethyl acetate

3.3.3.3 hexane

3.3.3.4 methanol

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การคัดแยกเชื้อราก่อโรคตายพรายและแอนแทรกโนสในกล้วยและการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

การคัดแยกเชื้อราสาเหตุของโรคตายพราย *Fusarium oxysporum* ด้วยวิธี Tissue transplanting technique (Zheng และคณะ, 2018) โดยตัดชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดโรคที่ติดกับเนื้อเยื่อปกติวางลงบนอาหาร water agar (WA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง และสังเกตเส้นใยของเชื้อราที่เจริญจากเนื้อเยื่อพืชในตำแหน่งที่เกิดโรค ที่เวลาประมาณ 3 วัน เมื่อมีเส้นใยของเชื้อรางอกออกจากชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดโรค เขี่ยเส้นใยด้วยเข็มเย็บ (needle) ย้ายลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) สังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ ซึ่งลักษณะเด่นคือจะมีเส้นใยสีขาว และเปลี่ยนเป็นสีม่วงจากกลางโคโลนีที่เวลาประมาณ 3-5 วัน จนได้เชื้อบริสุทธิ์

การคัดแยกเชื้อราสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส *Colletotrichum musae* ด้วยวิธี Single spore isolation (Alizadeh และคณะ, 2015) โดยนำผลกล้วยที่เกิดโรคบ่มใน moist chamber ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน เมื่อสังเกตเห็นเม็ดน้ำใสล้อมรอบบริเวณแผลที่เกิดโรค เขี่ยลงน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และหยดหรือขีดสปอร์ลงบนอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นสังเกตการงอกของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เขี่ยสปอร์เดี่ยวลงบนอาหาร PDA และสังเกตลักษณะโคโลนีที่เป็นเส้นใยสีขาวถึงเทา และเปลี่ยนเป็นสีส้มจากกลางโคโลนี ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 3-5 วัน จนได้เชื้อบริสุทธิ์

#### 3.4.2 การคัดแยกเชื้อจากดินโดยวิธี soil plate และการทำให้เชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างดินมาแยกเชื้อโดยวิธี Heat treatment โดยนำตัวอย่างดินมาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ Alcohol treatment โดยนำตัวอย่างดินแช่ใน ethanol ความเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที และทำการแยกเชื้อด้วยอาหาร rose bengal agar โดยนำตัวอย่างตักใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 0.25 กรัม เทอาหารที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (pour plate) แล้วหมวนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ดินและอาหารกระจายตัวทั่วจานอาหาร บ่มไว้ในที่มืดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นใบนี้ไปใช้ประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิตั้ง (25 องศาเซลเซียส) (Hong และคณะ, 2010) สังเกตการเจริญของโคโลนีเชื้อราทุกวันเป็นเวลา 15 วัน เมื่อมีโคโลนีของเชื้อราตั้งแต่สีขาว คริม เหลืองอ่อน เหลือง และส้มปรากฏขึ้น ใช้เข็มเขี่ยตัดขอบโคโลนีย้ายลงบนอาหาร PDA สังเกตลักษณะโคโลนี สีโคโลนี การสร้าง ascocarp และลักษณะของ ascospore ซึ่งเชื้อราในกลุ่ม *Neosartorya* จะมีโคโลนีตั้งแต่สีขาว เทา คริม จนถึงเหลืองอ่อน สปอร์ลักษณะกลม มีผิวเรียบหรือขรุขระคล้ายมีหนาม มี ridge (Samson และคณะ, 2007) และเชื้อราในกลุ่ม *Talaromyces* จะมีโคโลนีตั้งแต่สีเหลืองอ่อน เหลือง ส้ม และแดง สปอร์มีรูปร่างรี มีผิวเรียบหรือขรุขระ (Yilmaz และคณะ, 2014)

### 3.4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *F. oxysporum* และ *C. musae* โดยนำเชื้อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อรา ลักษณะโคโลนี เส้นใย และสปอร์ โดยตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* โดยนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร PDA และ malt extract agar (MEA) ที่เติม sucrose 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 25 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อรา ลักษณะโคโลนี เส้นใย และสปอร์ โดยตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 3.4.4 การบ่งชี้เชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

#### 3.4.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (Doyle และ Doyle, 1987; Suksiri และคณะ, 2018)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ขูดเอาเส้นใยและบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา โดยใช้ไนโตรเจนเหลว และผสมกับ 2X CTAB buffer 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบดที่อ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1 v/v) 600 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใส เติม 10% CTAB buffer 50 ไมโครลิตร และ Rnase ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1 v/v) 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใสด้านบน ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ที่แช่เย็น เติม 1.5 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ได้ บดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย absolute ethanol 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เท absolute ethanol ที่ ตกตะกอนดีเอ็นเอจนแห้งที่อุณหภูมิตั้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใน agarose gel ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน 1X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1,000 คู่เบส ย้อมเจลด้วย ethidium bromide (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร จัดเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS สำหรับเชื้อราก่อโรค *F. oxysporum* (Zheng และคณะ, 2018) และ *C. musae* (Alizadeh และคณะ, 2015) และบริเวณ  $\beta$ -tubulin สำหรับเชื้อรา *Neosartorya* และ *Talaromyces* (Hong และคณะ, 2010; เมอมร, 2558) โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 3.1 ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารที่มีความเข้มข้นสุดท้ายคือ ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม, dNTPs 0.2 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.8 พิโคโมลาร์ เอ็มไซม์ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ standard *Taq* buffer 1X ต่อมิลลิลิตร และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS สภาวะดังตารางที่ 3.2 และตำแหน่ง  $\beta$ -tubulin สภาวะดังตารางที่ 3.3 จากนั้นตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ใน agarose gel ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน 1X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.4.4.3 การหาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Bioneer Corporation ประเทศเกาหลี ทำการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST

ตารางที่ 3.2 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS (White และคณะ, 1990)

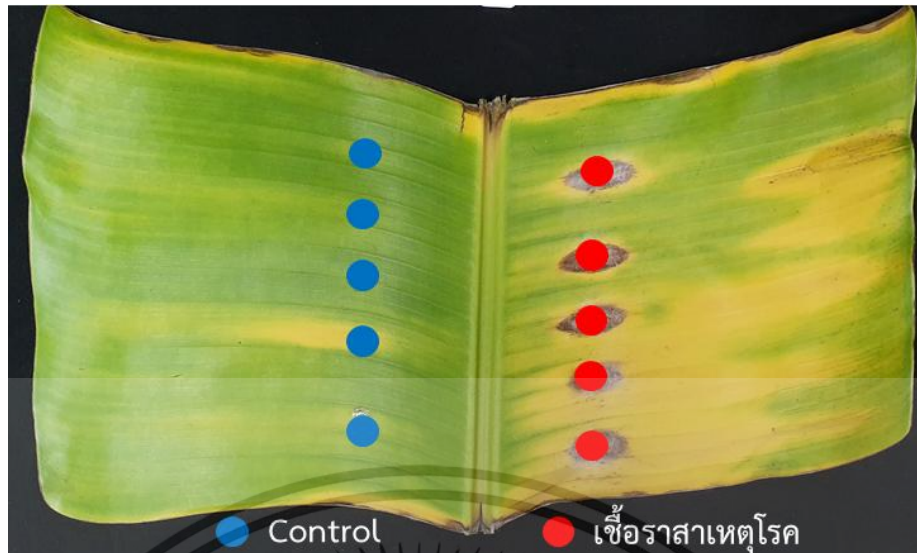
ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	1 รอบ
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing	50 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Final extension	75 องศาเซลเซียส	5 นาที	1 รอบ

ตารางที่ 3.3 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน  $\beta$ -tubulin (Hubka และ Kolarik, 2012)

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	3 นาที	
Annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	1 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35 รอบ
Extension	72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Annealing	55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	1 รอบ
Final extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	

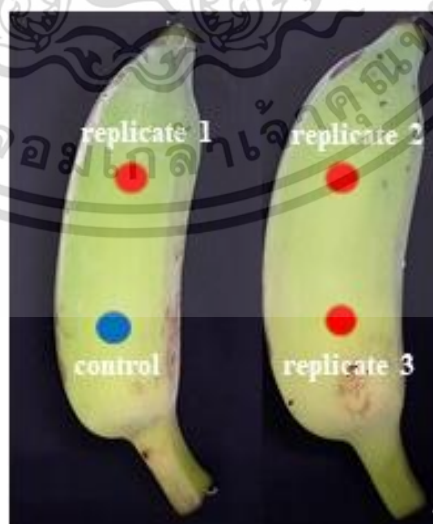
#### 3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคในกล้วย

ในการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* (ปรับปรุงจาก Purwati และคณะ, 2007) ทำการทดสอบโดยใช้ใบสดของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อนที่มีอายุและสีของใบใกล้เคียงกัน นำใบกล้วยตัดแบ่งให้มีขนาดประมาณ 20 เซนติเมตร ทำความสะอาดผิวใบด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้เข็มเย็บสร้างแผลบนใบกล้วยด้านละ 5 แผล ให้มีระยะห่างเท่า ๆ กัน (รูปที่ 3.1) ทำการวางเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ที่มีอายุ 5 วัน บนอาหาร PDA โดยตัดชิ้นวุ้นด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ลงบนแผล จำนวน 4 ซ้ำ และควบคุมโดยใช้ชิ้นวุ้นที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุของโรค ทำการบ่มใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดแผลทั้งด้านกว้างและด้านยาว และคัดเลือกเชื้อรา *F. oxysporum* ที่สามารถก่อโรครุนแรงที่สุด 1 ไอโซเลต



รูปที่ 3.1 แสดงวิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* บนใบกล้วย

ในการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา *C. musae* (ปรับปรุงจาก Purwati และคณะ, 2007) ทำการทดสอบโดยใช้ผลสดของกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อนที่มีอายุ ขนาด และสีของผลใกล้เคียงกัน นำผลกล้วยมาทำความสะอาดผิวด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้เข็มเย็บสร้างแผลบนผลกล้วยผลละ 2 แผล ให้มีระยะห่างเท่า ๆ กัน (รูปที่ 3.2) ทำการวางเชื้อรา *C. musae* ที่มีอายุ 5 วัน บนอาหาร PDA โดยตัดชิ้นวุ้นด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ลงบนแผล จำนวน 3 ซ้ำ และทำความสะอาดโดยใช้ชิ้นวุ้นที่ไม่มีเชื้อราสาเหตุของโรค ทำการบ่มใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดแผลทั้งด้านกว้างและด้านยาว และคัดเลือกเชื้อรา *C. musae* ที่สามารถก่อโรครุนแรงที่สุด 1 ไอโซเลต เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3.2 แสดงวิธีการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา *C. musae* บนผลกล้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในกล้วย

ทดสอบการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรค *Fusarium oxysporum* และ *Colletotrichum musae* โดยใช้เชื้อราต่อต้านคือ เชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วม (bi-culture) (Sakunyarak และ Satithorn, 2014) โดยนำเชื้อราสาเหตุของโรคและเชื้อราต่อต้านวางบนอาหาร PDA ที่มีอายุ 10 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราบริเวณขอบโคโลนี ย้ายชิ้นวุ้นของเชื้อราสาเหตุวางลงบนด้านหนึ่งของอาหาร PDA และวางชิ้นวุ้นของเชื้อราต่อต้านลงอีกด้านหนึ่งของอาหาร ให้มีระยะห่าง 4 เซนติเมตร ทำการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุและราต่อต้านแยกจากกันบนอาหาร PDA เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ทำการทดสอบแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วัน เนื่องจากเชื้อราในสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* เจริญเติบโตช้ากว่าเชื้อราสาเหตุของโรคทั้ง 2 ชนิด (เมอมร, 2558) เมื่อครบเวลานับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุของโรคเทียบกับจานเปรียบเทียบ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ จากสูตร

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

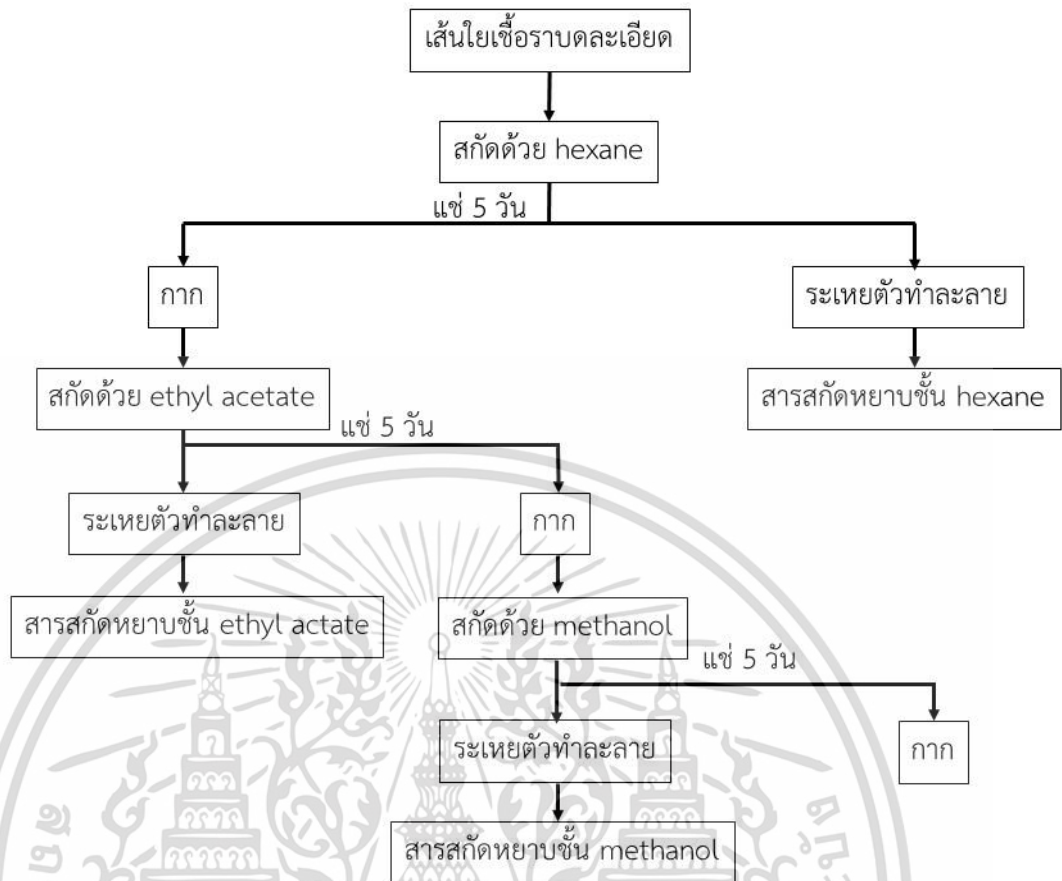
โดยที่ R1 คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุในจานอาหารเปรียบเทียบ และ R2 คือ จำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุในจานอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

ทำการคัดเลือกเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด จำนวน 3 ไอโซเลต เพื่อทำการสกัดสารและทดสอบในขั้นตอนต่อไป

### 3.4.7 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย

#### 3.4.7.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อรา (Soytong และ Poeaim, 2015)

คัดเลือกเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคทั้ง 2 ชนิด นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยเชื้อรา กรองเอาเส้นใยของเชื้อรา ออบให้แห้งในเครื่องอบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเส้นใยที่แห้งแล้วมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แช่ใน hexane ในปริมาณ 1:1 (w/v) เป็นเวลา 5 วัน กรองเอากากออกด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 นำสารละลายไปแยกตัวทำละลายด้วย rotary vacuum evaporator จะได้สารสกัดชั้น hexane จากนั้นนำกากที่ได้จากการกรองไปสกัดด้วยตัวทำละลายชั้นสูงขึ้น คือ ethyl acetate และ methanol จะได้สารสกัดชั้น ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบดังแผนผังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แผนผังแสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากเชื้อราต่อต้าน

### 3.4.7.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรค *Fusarium oxysporum* และ *Colletotrichum musae* (Soytong และ Poaim, 2015) โดยนำสารสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 3.4.7.1 มาทดสอบการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรค ในการเตรียมสารสกัดใช้ตัวทำละลาย DMSO (Dimethyl sulfoxide) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย โดยนำสารสกัดหยาบในชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol มาละลายให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ยกเว้นตัวควบคุมที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm ทำการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ เป็นแบบ 3 x 6 factorial experiment ดังนี้

ปัจจัย A คือ ชนิดของสารสกัด

A1 = สารสกัดหยาบชั้น hexane

A2 = สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate

A3 = สารสกัดหยาบชั้น methanol

ปัจจัย B คือ ระดับความเข้มข้นของสารสกัด

B1 = ความเข้มข้น 0 ppm

B2 = ความเข้มข้น 10 ppm

B3 = ความเข้มข้น 50 ppm

B4 = ความเข้มข้น 100 ppm

B5 = ความเข้มข้น 500 ppm

B6 = ความเข้มข้น 1,000 ppm

นำสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำอาหาร PDA ที่ผสมกับสารสกัดหยาบที่ฆ่าเชื้อแล้ว เทใส่จานอาหารเพาะเลี้ยง รोजनอาหารแข็ง ย้ายขึ้นวุ้นที่มีเชื้อราสาเหตุของโรค *F. oxysporum* และ *C. musae* โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดของโคโลนีและนับจำนวนสปอร์เชื้อรา *F. oxysporum* และ *C. musae* คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโลนี และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์ จากสูตร

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

โดยที่ R1 คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุบน PDA ที่ระดับความเข้มข้น 0 ppm (ควบคุม) และ R2 คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีหรือจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุบน PDA ในจานอาหารทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.05 และคำนวณค่า effective dose ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ED<sub>50</sub>) คือระดับความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (ถ้ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์) ด้วยโปรแกรม Graphpad Prism 8

### 3.4.8 การวิเคราะห์หาสารสำคัญด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry

นำสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วยทั้ง 2 ชนิด วิเคราะห์หาสารสำคัญด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการคัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

##### 4.1.1 ผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุของโรคตายพราย

จากการคัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างต้นกล้วยที่เป็นโรคตายพราย จากจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี และเพชรบูรณ์ ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ซึ่งสังเกตอาการของโรคจากลักษณะการเหี่ยวของใบ ที่มีใบเหี่ยวเป็นสีเหลือง (รูปที่ 4.1A) จากนั้นตัดต้นกล้วยที่สันนิษฐานว่าเป็นโรค เพื่อสังเกตเนื้อเยื่อภายในต้น พบว่าเนื้อเยื่อภายในต้นเปลี่ยนสีจากสีขาว เป็นสีม่วงถึงน้ำตาล (รูปที่ 4.1B และ C) เมื่อนำมาคัดแยกเชื้อราด้วยวิธี Tissue transplanting พบว่ามีตัวอย่างพืชที่เป็นโรคที่สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างพืชจากจังหวัดสุพรรณบุรี 3 ตัวอย่าง นครปฐม 1 ตัวอย่าง ราชบุรี 3 ตัวอย่าง และเพชรบูรณ์ 1 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต แสดงสถานที่และไอโซเลตที่คัดแยกได้ดังตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงตัวอย่างต้นกล้วยที่เป็นโรคตายพราย A: อาการใบเหี่ยวสีเหลือง, B และ C: เนื้อเยื่อภายในต้นกล้วยที่มีสีม่วงถึงน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงวัน เวลา สถานที่ในการเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคตายพราย และชื่อไอโซเลตเชื้อราที่คัดแยกได้

วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ตัวอย่างพืช	เชื้อราที่แยกได้
03/01/61	อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์	PB-01	BAFC-01
18/03/61	อ.โพธาราม จ.ราชบุรี	RM-01	BAFC-02
18/03/61	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	NP-01	BAFC-03
18/03/61	อ.เมือง จ.ราชบุรี	RM-02	BAFC-04
18/03/61	อ.เมือง จ.ราชบุรี	RM-03	BAFC-05
30/03/61	อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี	SP-01	BAFC-06
20/04/61	อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี	SP-02	BAFC-07
22/05/61	อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี	SP-03	BAFC-08

จากตัวอย่างต้นกล้วยที่เป็นโรคตายพราย 10 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อราได้ในลักษณะเดียวกันจำนวน 8 ไอโซเลต โดยในช่วง 3 วันแรกหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนอาหาร PDA โคโลนีจะมีเส้นใยสีขาว และเมื่อเวลา 5 วันจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วง (รูปที่ 4.2A และ B) โดย macroconidia และ microconidia สร้างได้จาก conidiophore มีลักษณะเป็นก้านยื่นออกมาจากเส้นใย (รูปที่ 4.2C, D, E และ F) microconidia มีลักษณะรูปร่างคล้ายไต (kidney-shaped) มี 1-2 เซลล์ ขนาดประมาณ  $3.46 \times 8.28 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.2G และ H) macroconidia มีลักษณะเรียวยาวปลายทั้งสองด้านโค้งงอคล้ายเคียว (sickle-shaped) มี 4-8 เซลล์ ขนาดประมาณ  $3.15 \times 17.25 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.2I) และ chlamydospore พบอยู่บริเวณปลายหรือระหว่างเส้นใย รูปร่างกลม ขนาดประมาณ  $7.25 \mu\text{m}$  บนอาหาร PDA สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว

ในแต่ละพื้นที่ที่สามารถคัดแยกเชื้อราได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างคล้ายกันทั้ง 8 ไอโซเลต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานถึงการพบโรคตายพรายในพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย ที่พบต้นกล้วยโดยเฉพะกล้วยน้ำว้าเกิดลักษณะอาการใบเหี่ยวเป็นสีเหลือง ยืนต้นตาย เนื้อเยื่อของพืชเปลี่ยนเป็นสีม่วงถึงน้ำตาล เมื่อทำการคัดแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting พบว่าสามารถคัดแยกได้เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (อภิรัชต์ และคณะ, 2556; Thangavelu และคณะ, 2015) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Maryani และคณะ (2019) ที่ศึกษาลักษณะและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ในประเทศอินโดนีเซีย พบว่าต้นกล้วยมีอาการใบเหี่ยว และเมื่อผ่าตัดขวางเนื้อเยื่อภายในเปลี่ยนเป็นสีม่วงถึงน้ำตาลเช่นกัน เมื่อคัดแยกเชื้อพบว่ามิโคโลนีสีม่วง สามารถสร้างสปอร์แบบ macroconidia มีขนาด  $3-4 \times 15-32 \mu\text{m}$  มี 3-8 เซลล์ microconidia ขนาด  $2-3 \times 4-13 \mu\text{m}$  มี 1-2 เซลล์ และ chlamydospore รูปร่างกลมขนาด  $4-12 \mu\text{m}$

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ของเชื้อราไอโซเลต BAFC-01 และ BAFC-05 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 2 ไอโซเลต และมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์เท่ากัน คือ เชื้อราไอโซเลต BAFC-01 และเชื้อราไอโซเลต BACM-05 มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 544 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลต มาเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าเชื้อราไอโซเลต BAFC-01 และ BAFC-05 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *F. oxysporum* accession number: MK074845, MK463988, MK432913 และ

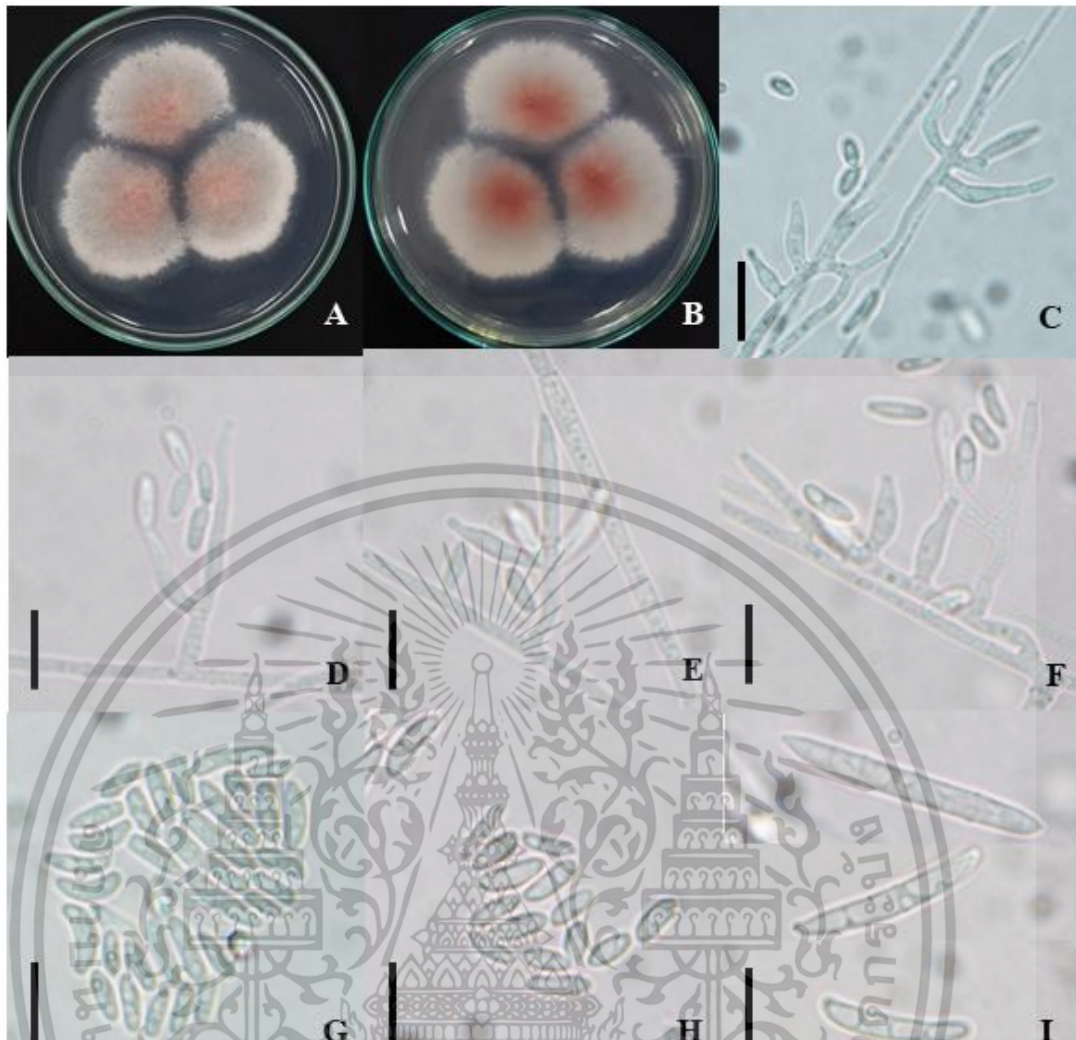
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MK849925 โดยมีค่า identity 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสามารถบ่งชี้เชื้อราไอโซเลต BAFC-01 และ BAFC-05 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราที่คัดแยกได้จำนวน 8 ไอโซเลต จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ว่าเป็นเชื้อรา *F. oxysporum*

ตารางที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่คัดแยกได้จำนวน 8 ไอโซเลต

ไอโซเลต	สีโคโลนี	macroconidia		microconidia		chlamydospore	
		รูปร่าง	ขนาด (µm)	รูปร่าง	ขนาด (µm)	รูปร่าง	ขนาด (µm)
BAFC-01	ขาว/ม่วง	kidney	3.15 × 17.25	sickle	3.46 × 8.28	globose	7.25
BAFC-02	ขาว/ม่วง	kidney	3.14 × 18.21	sickle	3.12 × 8.14	globose	6.13
BAFC-03	ขาว/ม่วง	kidney	3.13 × 16.92	sickle	3.19 × 8.26	globose	7.12
BAFC-04	ขาว/ม่วง	kidney	2.86 × 16.75	sickle	3.14 × 7.92	globose	6.48
BAFC-05	ขาว/ม่วง	kidney	2.78 × 16.25	sickle	3.09 × 7.87	globose	6.39
BAFC-06	ขาว/ม่วง	kidney	3.67 × 19.21	sickle	2.45 × 7.38	globose	7.49
BAFC-07	ขาว/ม่วง	kidney	3.02 × 17.55	sickle	2.78 × 8.01	globose	7.47
BAFC-08	ขาว/ม่วง	kidney	2.98 × 16.05	sickle	2.81 × 7.93	globose	7.58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01 ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อกล้วยที่เป็นโรคตายพรายบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน; A: โคลนด้านหน้า; B: โคลนด้านหลัง; C, D, E และ F: conidiophore; G และ H: microconidia; I: macroconidia; (scale bar; C-I = 10  $\mu$ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.2 ผลการคัดแยกเชื้อราสาเหตุของโรคแอนแทรกโนส

จากการคัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างผลกล้วยที่เป็นโรคแอนแทรกโนส จากจังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี และนนทบุรี ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ซึ่งสังเกตจากลักษณะผลที่มีแผลเป็นจุดสีดำ (รูปที่ 4.3A) จากนั้นนำมาบ่มในกล่องควบคุมความชื้นที่อุณหภูมิห้อง จุดแผลสีดำมีขนาดใหญ่ขึ้น และสร้างเม็ดฉ่ำน้ำสีส้ม (conidiomata) หลังจากบ่มประมาณ 3-5 วัน (รูปที่ 4.3B) และนำมาคัดแยกเชื้อราด้วยวิธี Single spore isolation พบว่ามีตัวอย่างผลกล้วยที่เป็นโรคที่สามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างผลกล้วยจากจังหวัดนครปฐม 6 ตัวอย่าง และจังหวัดสุพรรณบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี และนนทบุรี จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 4.3



รูปที่ 4.3 แสดงตัวอย่างผลกล้วยที่เป็นโรคแอนแทรกโนส; A: ตัวอย่างผลกล้วยที่เป็นโรค; B: เม็ดฉ่ำน้ำสีส้ม (conidiomata) เกิดหลังจากบ่ม 3-5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.3 แสดงวัน เวลา สถานที่ในการเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคแอนแทรกโนส และชื่อไอโซเลตของเชื้อราที่คัดแยกได้

วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ตัวอย่างพืช	เชื้อราที่แยกได้
06/10/60	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	KP-01	BACM-01
06/10/60	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	KP-02	BACM-02
06/10/60	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	KP-03	BACM-03
06/10/60	อ.เมืองนครปฐม จ.นครปฐม	NM-01	BACM-04
06/10/60	อ.เมือง จ.ราชบุรี	RM-01	BACM-05
23/12/60	อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี	DC-01	BACM-06
02/02/61	อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี	NS-02	BACM-07
05/04/61	อ.สามพราน จ.นครปฐม	SP-01	BACM-08
05/04/61	อ.สามพราน จ.นครปฐม	SP-02	BACM-09
25/12/61	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	KR-01	BACM-10

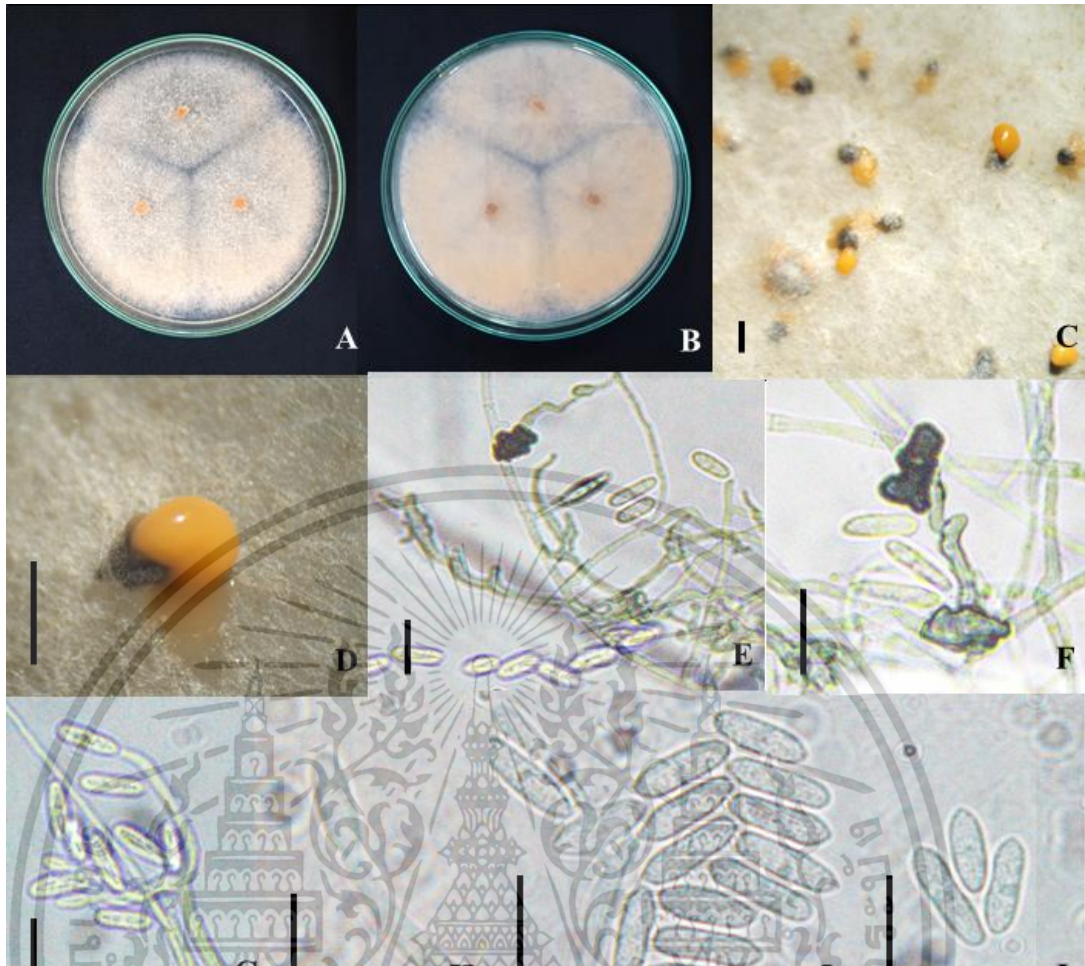
จากการคัดแยกเชื้อราพบว่าเชื้อทั้งหมด 10 ไอโซเลตที่แยกได้ แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังตารางที่ 4.4 และเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน โดยในรูปที่ 4.4A-I เป็นตัวอย่างของไอโซเลต BACM-06 ที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว ส้ม ถึงเทา (รูปที่ 4.4A และ B) เมื่อเพาะเลี้ยงต่ออีก 3-5 วัน จะเห็นเม็ดน้ำสีส้มเจริญขึ้นบนเส้นใย หรือเรียกว่า conidiomata (รูปที่ 4.4C และ D) มีการสร้าง appressorium (รูปที่ 4.4E และ F) conidia สร้างมาจาก conidiophore (รูปที่ 4.4G และ H) conidia มีลักษณะรี ขนาดประมาณ  $3.23 \times 12.57 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.4I และ J) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมดของเชื้อราที่แยกได้ มีความสอดคล้องกับรายงานที่คัดแยกเชื้อราจากกล้วยที่เป็นโรคแอนแทรกโนสในเมืองกวางโจว ประเทศจีน ซึ่งเก็บตัวอย่างผลกล้วยที่มีอาการเป็นจุดแผลสีดำ มีเม็ดน้ำสีส้ม และมีโคโลนีสีขาว เทา ถึงส้ม สร้างสปอร์ที่มีขนาดประมาณ  $2-3 \times 6-10 \mu\text{m}$  (Zhu และคณะ, 2015) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Alizadeh และคณะ (2015) ที่เก็บตัวอย่างกล้วยที่เป็นโรคที่มีอาการแผลเป็นเม็ดสีส้มฉ่ำน้ำมาคัดแยกเชื้อพบเชื้อราที่มีโคโลนีสีส้ม สร้างสปอร์ที่มีรูปร่างรี ขนาดประมาณ  $1-3 \times 5-14 \mu\text{m}$

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ของเชื้อราไอโซเลต BACM-09 และ BACM-10 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีขนาดผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 575 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลตมาเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าเชื้อราไอโซเลต BACM-09 และ BACM-10 มีความคล้ายกับเชื้อรา *Colletotrichum musae* accession number: JN121212, AY266396 และ AJ301904 โดยมีค่า identity 99.30 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสามารถบ่งชี้เชื้อราไอโซเลต BACM-09 และ BACM-10 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราที่คัดแยกได้ทั้ง 10 ไอโซเลต จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ว่าเป็นเชื้อรา *Colletotrichum musae*

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. musae* ที่คัดแยกได้จำนวน 10 ไอโซเลต

ไอโซเลต	สีโคโลนี	conidiomata	conidia		appressorium
			รูปร่าง	ขนาด ( $\mu\text{m}$ )	
BACM-01	เทา/ส้ม	มี	oval	3.17 × 13.22	มี
BACM-02	ขาว/ส้ม	มี	oval	3.63 × 12.78	มี
BACM-03	ขาว/ส้ม	มี	oval	3.72 × 12.74	มี
BACM-04	ขาว/ส้ม	มี	oval	3.74 × 12.77	มี
BACM-05	ขาว/ส้ม	มี	oval	3.61 × 12.27	มี
BACM-06	ขาว/ส้ม	มี	oval	3.23 × 12.57	มี
BACM-07	ขาว/ส้ม	มี	oval	3.45 × 12.42	มี
BACM-08	เทา/ส้ม	มี	oval	3.01 × 11.12	มี
BACM-09	ขาว/ส้ม	มี	oval	3.03 × 10.32	มี
BACM-10	เทา/ส้ม	มี	oval	3.56 × 12.79	มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. musae* BACM-06 ที่แยกได้จากผลกล้วยที่เป็นโรค แอนแทรกโนสบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน A: โคลนินด้านหน้า; B: โคลนินด้านหลัง; C และ D: conidiomata; E และ F: aspersorium; G และ H: conidiophore; I และ J: conidia; (scale bar: 10  $\mu$ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.1.3 ผลการคัดแยกเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* จากดิน

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี และอำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างดินที่สามารถแยกเชื้อราได้ 9 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างดินบริเวณอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี 6 ตัวอย่าง และอำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี 3 ตัวอย่าง โดยคัดแยกเชื้อราจากตัวอย่างดินด้วยวิธี Heat treatment และ Alcohol treatment โดยใช้อาหาร rose bengal agar base ซึ่งสามารถคัดแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงวันเวลา สถานที่ในการเก็บตัวอย่างดิน และชื่อไอโซเลตเชื้อราที่คัดแยกได้

วันที่เก็บตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ตัวอย่างดิน	เชื้อราที่แยกได้
16/01/62	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	KRI01	AWP01-01, AWP01-02, AWP01-03
16/01/62	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	KRI04	AWP04-01, AWP04-02, AWP04-03, AWP04-04
16/01/62	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	KRI05	AWP05-01, AWP05-02
16/01/62	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	KRI07	AWP07-01
16/01/62	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	KRI08	AWP08-01
16/01/62	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	KRI11	AWP11-01, AWP11-02
25/10/61	อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี	SPB01	AWP12-01
25/10/61	อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี	SPB02	AWP13-01, AWP13-02, AWP13-03
25/10/61	อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี	SPB03	AWP14-01, AWP14-02, AWP14-03, AWP14-04, AWP14-05

จากการคัดแยกเชื้อราทั้งหมด 22 ไอโซเลต เมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือลักษณะของโคโลนี การสร้าง ascocarp ขนาดของ ascus และลักษณะและขนาดของ ascospore พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อราในสกุล *Neosartorya* ที่มีโคโลนีสีขาว ถึงขาวครีม สามารถสร้าง ascocarp และมี ascospore รูปร่างกลม มี ridge สอดคล้องกับงานวิจัยของ Samson และคณะ (2007) ที่คัดแยกเชื้อรา *Neosartorya* จากดินพบว่า โคโลนีของเชื้อที่ได้มีสีขาวถึงเทาอ่อน มีการสร้าง ascocarp และมี ascospore ที่มีรูปร่างกลม มี ridge และกลุ่มเชื้อราในสกุล *Talaromyces* ที่มีโคโลนีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองแดง สามารถสร้าง ascocarp และมี ascospore รูปร่างรี ไม่มี ridge ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yilmaz และคณะ (2014) ที่รายงานว่าเชื้อรา *Talaromyces* จะมีโคโลนีสีเหลืองอ่อนถึงเหลืองแดง สามารถสร้าง ascocarp และมี ascospore รูปร่างกลม ไม่มี ridge และเมื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพิ่มขึ้น ทั้งขนาดและรูปร่างของ ascocarp และ ascospore แสดงดังตารางที่ 4.6 และสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินออกได้เป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

1) แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ดังตัวอย่างของไอโซเลต AWP01-02 มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองถึงเหลืองอ่อน (รูปที่ 4.5 A และ B) มีการสร้าง ascocarp แบบ cleistothecium รูปร่างกลม ขนาด  $227.67-782.23 \times 235.46-764.98 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.5C-F) ascus รูปร่างกลม ขนาด  $9.28-11.35 \times 9.41-12.01 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.5G) ascospore รูปร่างรี ขนาด  $4.12-5.16 \times 4.43-6.01 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.5H และ I) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีเป็นสีเหลืองอ่อน เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มบริเวณกลางโคโลนี (รูปที่ 4.5J และ K) สามารถสร้าง conidia ที่มีลักษณะกลม ขาว (รูปที่ 4.5L และ M) มีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ AWP01-02, AWP01-01, AWP04-01 และ AWP04-02

2) แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ดังตัวอย่างของไอโซเลต AWP08-01 มีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม (รูปที่ 4.6A และ B) เส้นใยเจริญช้า สามารถสร้างสารสีขาวออกมาในอาหารรอบโคโลนี สร้าง ascocarp แบบ cleistothecium รูปร่างกลม ขนาด  $212.87-728.43 \times 225.33-734.58 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.6C-F) ascospore ขนาด  $4.72-5.65 \times 5.13-6.73 \mu\text{m}$  รูปร่างรี ผิวเรียบ ไม่มี ridge (รูปที่ 4.6H และ I) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีได้ มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ AWP08-01

3) แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ดังตัวอย่างของไอโซเลต AWP11-01 มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง (รูปที่ 4.7A และ B) สามารถสร้างสารสีแดงใต้โคโลนี สร้าง ascocarp แบบ cleistothecium รูปร่างกลม ขนาด  $297.53-645.73 \times 312.87-649.75 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.7C-F) ascospore รูปร่างรี ผิวขรุขระคล้ายมีหนาม ขนาด  $4.64-7.15 \times 6.53-8.43 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.7I และ J) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีได้ มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ AWP11-01

4) แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ดังตัวอย่างของไอโซเลต AWP14-01 มีลักษณะโคโลนีสีขาว จะสังเกตเห็นจุดเล็กสีน้ำตาลอยู่บริเวณกลางโคโลนี เมื่อแก่โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (รูปที่ 4.8A และ B) สร้าง ascocarp แบบ cleistothecium รูปร่างกลม ขนาด  $173.57-765.23 \times 189.30-752.18 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.8C-F) ascospore รูปร่างรี ขนาด  $4.87-5.13 \times 5.89-6.71 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.8H และ I) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีขาวกลางโคโลนีสีเขียวอ่อน (รูปที่ 4.8J และ K) สร้าง conidia รูปร่างกลม (รูปที่ 4.8L และ M) มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ AWP14-01 และ AWP14-02

5) แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ดังตัวอย่างของไอโซเลต AWP04-03 มีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม (รูปที่ 4.9A และ B) เส้นใยเจริญช้า สร้าง ascocarp แบบ cleistothecium รูปร่างกลม ขนาด  $214.87-756.33 \times 225.43-759.87 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.9C-F) ascospore ขนาด  $4.72-5.33 \times 5.14-6.77 \mu\text{m}$  รูปร่างกลม ผิวขรุขระคล้ายมีหนาม มี ridge ที่มีลักษณะหุบเข้าด้านใน (รูปที่ 4.9H และ I) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว

กลางโคโลนีเป็นสีเขียวเข้ม สร้าง conidia รูปร่างกลม มีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ AWP01-03, AWP04-03, AWP04-04 และ AWP13-02

6) แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ดังตัวอย่างของไอโซเลต AWP13-03 มีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม (รูปที่ 4.10A และ B) เส้นใยเจริญเร็ว สร้าง ascocarp แบบ cleistothecium รูปร่างกลม ขนาด  $211.86-724.43 \times 225.23-739.71 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.10C-F) ascospore ขนาด  $4.44-5.77 \times 5.41-6.63 \mu\text{m}$  (รูปที่ 4.8H และ I) รูปร่างกลมผิวขรุขระคล้ายมีหนาม มี ridge ที่มีลักษณะหุบเข้าด้านใน เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวกลางโคโลนีสีเขียว (รูปที่ 4.10J และ K) สร้าง conidia รูปร่างกลม (รูปที่ 4.10L และ M) มีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ AWP05-01, AWP05-02, AWP13-03 และ AWP14-04

7) แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ดังตัวอย่างของไอโซเลต AWP07-01 มีลักษณะโคโลนีสีขาว (รูปที่ 4.11A และ B) สร้าง ascocarp แบบ cleistothecium รูปร่างกลม ขนาด  $222.37-734.53 \times 225.33-741.38 \mu\text{m}$  ขาว (รูปที่ 4.11C-F) ascospore ขนาด  $4.18-5.35 \times 5.23-6.34 \mu\text{m}$  รูปร่างกลม ผิวเรียบ มี ridge ที่มีลักษณะบานออกด้านนอก (รูปที่ 4.11H และ I) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว กลางโคโลนีสีเขียว ขาว (รูปที่ 4.11J และ K) สร้าง conidia รูปร่างกลม (รูปที่ 4.11L และ M) มีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ AWP07-01, AWP13-01, AWP14-03 และ AWP14-05

8) แสดงลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน ดังตัวอย่างของไอโซเลต AWP11-02 มีลักษณะโคโลนีสีขาว (รูปที่ 4.12A และ B) สร้าง ascocarp แบบ cleistothecium รูปร่างกลม ขนาด  $212.87-728.43 \times 235.33-759.78 \mu\text{m}$  ขาว (รูปที่ 4.12C-F) ascospore ขนาด  $4.32-5.44 \times 5.01-6.88 \mu\text{m}$  รูปร่างกลม ผิวเรียบ จะสังเกตเห็นดั่งเล็ก ๆ กระจุกออกมาจากพื้นผิว มี ridge ที่มีลักษณะอ้าออกด้านนอกขาว (รูปที่ 4.12H และ I) เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose ที่ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว กลางโคโลนีสีเขียว ขาว (รูปที่ 4.12J และ K) สร้าง conidia รูปร่างกลม ขาว (รูปที่ 4.12L) มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือ AWP11-02 และ AWP12-01

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง  $\beta\text{-tubulin}$  โดยใช้ไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b ของเชื้อราต่อต้านที่คัดเลือกเป็นตัวแทนของกลุ่มที่แบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวน 10 ไอโซเลต คือ AWP01-01, AWP04-01, AWP04-03, AWP05-01, AWP05-02, AWP07-01, AWP08-01, AWP11-01, AWP11-02 และ AWP13-02 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 6 กลุ่ม ตามขนาดของผลผลิตพีซีอาร์คือ ไอโซเลต AWP01-01 และ AWP04-01 มีขนาดเท่ากับ 461 คู่เบส ไอโซเลต AWP11-01 มีขนาดเท่ากับ 472 คู่เบส ไอโซเลต AWP08-01 มีขนาดเท่ากับ 478 คู่เบส ไอโซเลต AWP04-03, AWP11-02 และ AWP13-02 มีขนาดเท่ากับ 581 คู่เบส ไอโซเลต AWP05-01 และ AWP05-02 มีขนาดเท่ากับ 572 คู่เบส และไอโซเลต AWP07-01 มีขนาดเท่ากับ 553 คู่เบส

และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราได้เป็น 6 สปีชีส์ คือ *Talaromyces muroii* (AWP01-01 และ AWP04-01) *T. macrosporus* (AWP11-01) *T. trachyspermus* (AWP08-01) *Neosartorya tatenoi* (AWP04-03, AWP11-02 และ AWP13-02) *N. quadricincta* (AWP05-01 และ AWP05-02) และ *N. spinosa* (AWP07-01) มีค่าร้อยละความเหมือน (% identity) และสามารถสรุปสปีชีส์ของเชื้อราต่อต้านที่คัดแยกได้จากดิน ดังแสดงในตารางที่ 4.7

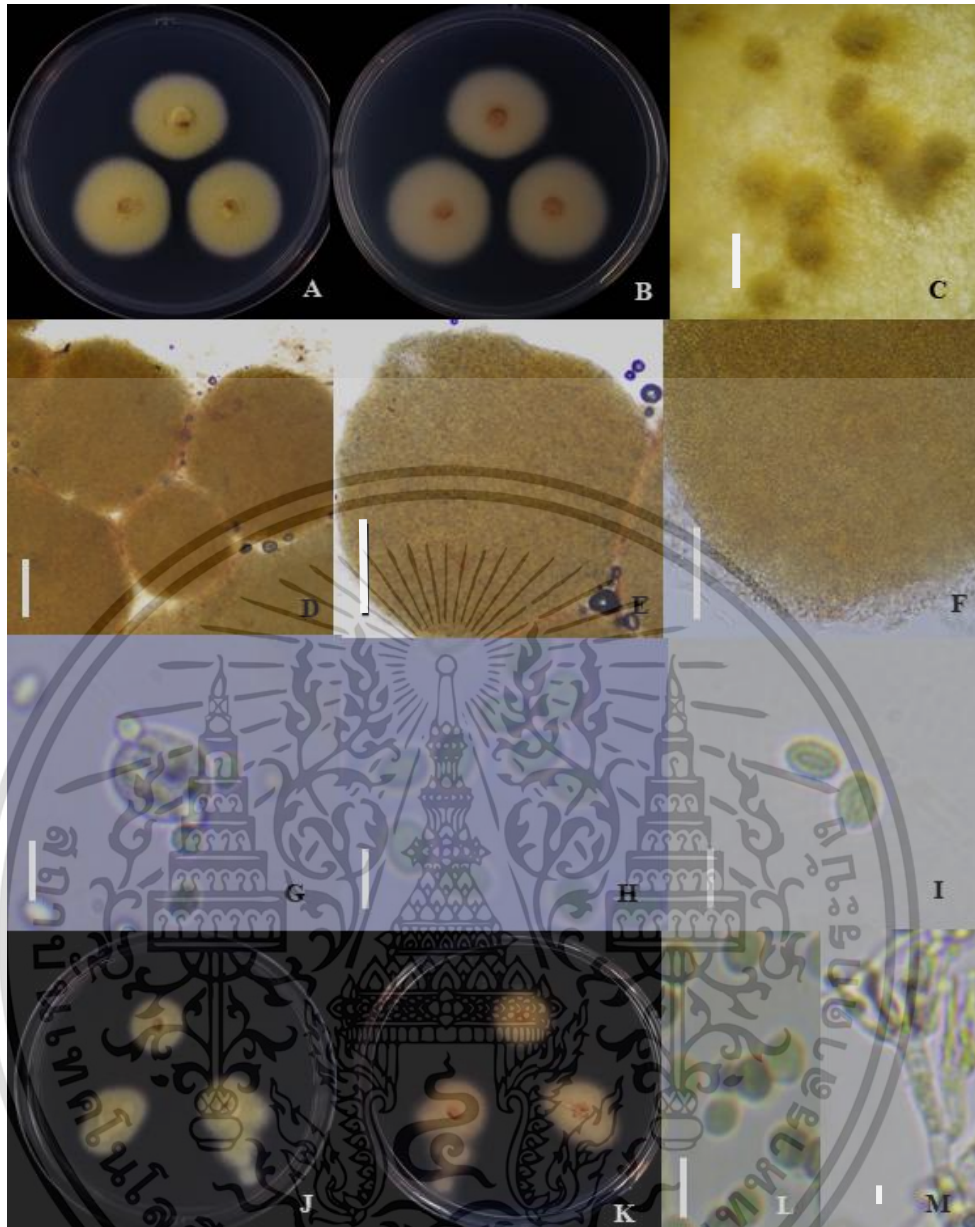
**ตารางที่ 4.6** แสดงชื่อสปีชีส์ของไอโซเลตของเชื้อราต่อต้านที่ได้จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ  $\beta$ -tubulin เทียบกับฐานข้อมูล Genbank

สปีชีส์	Accession number	% ความเหมือน	ไอโซเลตที่แยกได้	กลุ่มตาม สัณฐานวิทยา
<i>T. muroii</i>	KJ865727	99.54%	AWP01-01, AWP01-02, AWP04-01, AWP04-02, AWP14-01, AWP14-02	1, 4
<i>T. trachyspermus</i>	AY753371	99.25%	AWP08-01	2
<i>T. macrosporus</i>	AY753373	99.77%	AWP11-01	3
<i>N. tatenoi</i>	DQ114130	99.16%	AWP01-03, AWP04-03, AWP04-04, AWP11-02, AWP12-01, AWP13-02	5, 8
<i>N. quadricincta</i>	KM095498	99.08%	AWP05-01, AWP05-02, AWP13-03, AWP14-04	6
<i>N. spinosa</i>	AY870760	100%	AWP07-01, AWP13-01, AWP14-03, AWP14-05	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

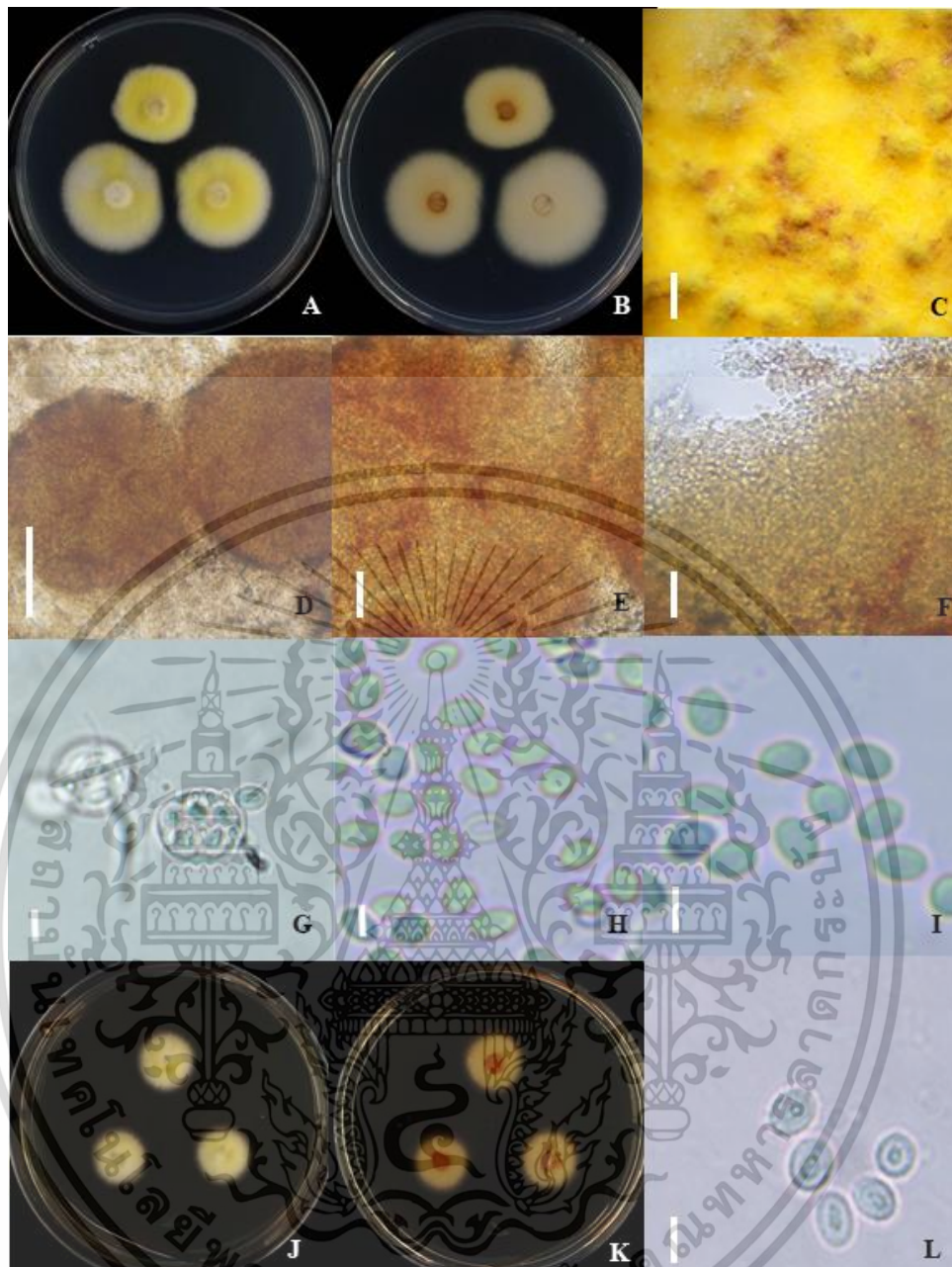
ตารางที่ 4.7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราต่อต้านที่คัดแยกได้จากดินทั้ง 22 ไอโซเลต

ไอโซเลต	สีโคโลนี	ascocarp			ascus		ascospore		ridge
		สี	รูปร่าง	ขนาด (µm)	รูปร่าง	รูปร่าง	ขนาด (µm)		
AWP01-01	เหลือง	เหลือง	subglobose	219.74-718.42 × 237.87-741.18	subglobose	ellipsoidal	4.71-5.45 × 5.13-6.73	ไม่มี	
AWP01-02	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	subglobose	227.76-782.23 × 235.46-764.98	subglobose	ellipsoidal	4.12-5.16 × 4.43-6.01	ไม่มี	
AWP01-03	ขาวครีม	ขาวครีม	subglobose	214.47-728.52 × 225.31-739.18	globose	subglobose	5.12-5.65 × 5.13-6.63	มี	
AWP04-01	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	subglobose	210.87-723.43 × 225.33-754.78	subglobose	ellipsoidal	4.42-5.61 × 5.22-6.43	ไม่มี	
AWP04-02	เหลือง	เหลือง	subglobose	237.43-771.13 × 257.37-784.38	subglobose	ellipsoidal	4.17-5.13 × 4.41-6.11	ไม่มี	
AWP04-03	ขาวครีม	ขาวครีม	subglobose	214.87-756.33 × 225.43-759.87	globose	globose	4.72-5.33 × 5.14-6.77	มี	
AWP04-04	ขาวครีม	ขาวครีม	subglobose	214.77-748.42 × 235.33-759.14	globose	globose	4.82-5.64 × 5.43-6.79	มี	
AWP05-01	ขาวครีม	ขาวครีม	subglobose	201.17-718.43 × 205.33-729.73	globose	globose	3.82-5.15 × 4.13-5.74	มี	
AWP05-02	ขาวครีม	ขาวครีม	globose	216.47-738.43 × 219.13-739.54	globose	globose	4.74-5.34 × 5.12-6.23	มี	
AWP07-01	ขาว	ขาว	globose	222.37-734.53 × 225.33-741.38	globose	globose	4.18-5.35 × 5.23-6.34	มี	
AWP08-01	เหลืองอ่อน	ครีม	globose	212.17-728.43 × 225.33-734.58	globose	globose	4.72-5.65 × 5.13-6.73	ไม่มี	
AWP11-01	เหลือง	เหลือง	subglobose	297.53-645.73 × 312.87-649.75	subglobose	ellipsoidal	4.64-7.15 × 6.53-8.43	ไม่มี	
AWP11-02	ขาว	ขาว	globose	212.87-728.43 × 235.33-759.78	globose	globose	4.32-5.44 × 5.01-6.88	มี	
AWP12-01	ขาว	ขาว	globose	214.17-778.47 × 225.43-789.18	globose	globose	4.21-5.75 × 5.16-6.44	มี	
AWP13-01	ขาว	ขาว	globose	221.87-708.33 × 235.65-714.68	globose	globose	4.57-5.82 × 5.28-6.33	มี	
AWP13-02	ขาวครีม	ขาวครีม	subglobose	214.27-748.43 × 215.23-759.55	globose	globose	4.78-5.77 × 5.29-6.84	มี	
AWP13-03	ขาวครีม	ขาวครีม	subglobose	211.86-724.43 × 225.23-739.71	globose	globose	4.44-5.77 × 5.41-6.63	มี	
AWP14-01	ขาว	ขาว	subglobose	173.57-765.23 × 189.30-752.18	globose	globose	4.87-5.13 × 5.89-6.71	ไม่มี	
AWP14-02	ขาว	ขาว	subglobose	187.37-708.42 × 188.53-711.48	globose	globose	4.12-5.35 × 5.16-5.98	ไม่มี	
AWP14-03	ขาว	ขาว	subglobose	191.82-698.73 × 198.55-701.78	globose	globose	4.92-5.61 × 5.11-6.23	มี	
AWP14-04	ขาวครีม	ขาวครีม	subglobose	202.84-768.51 × 207.33-779.49	globose	globose	4.32-5.65 × 4.57-6.18	มี	
AWP14-05	ขาว	ขาว	globose	179.47-705.78 × 183.37-712.48	globose	globose	3.78-4.63 × 4.17-5.71	มี	



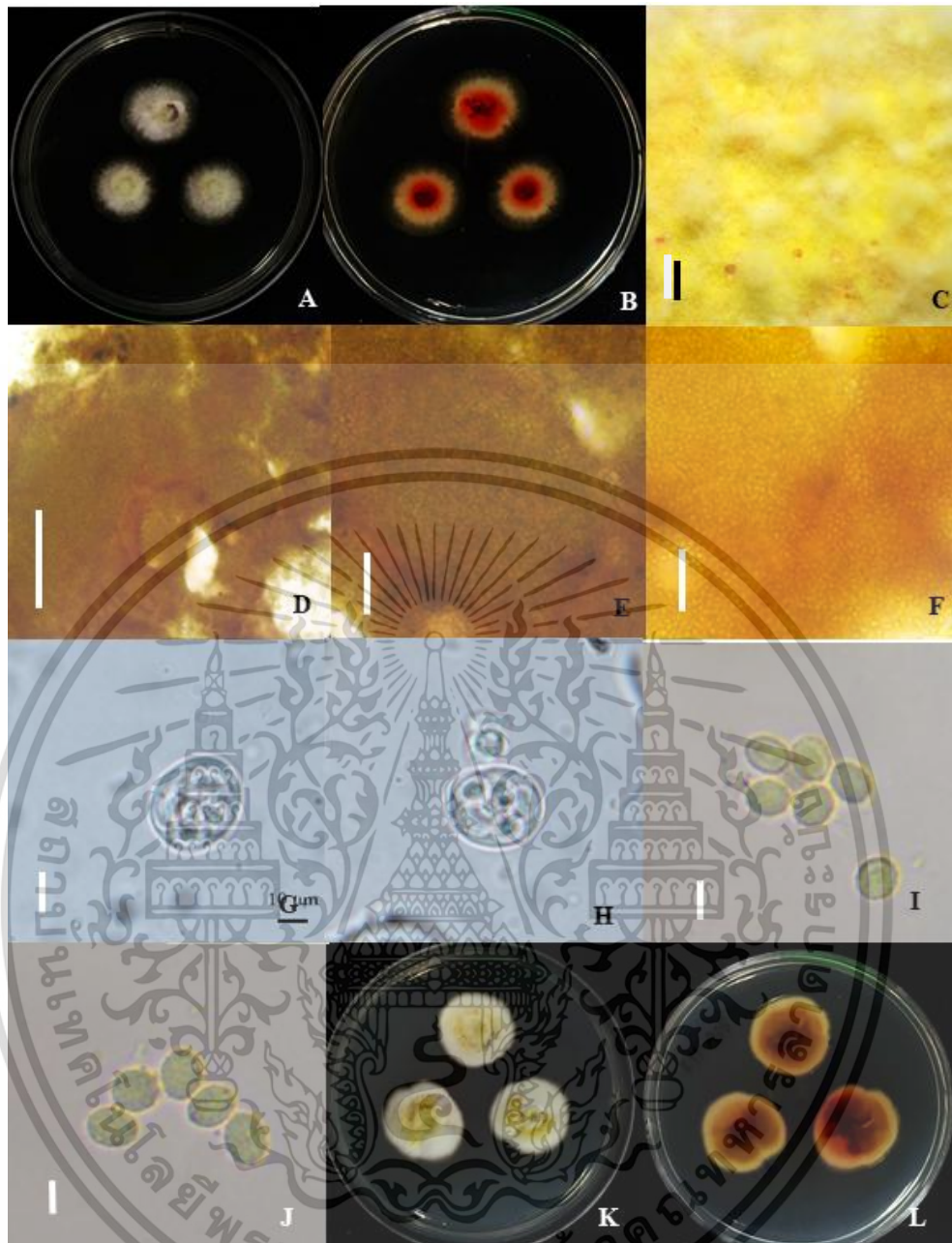
รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะของเชื้อรา *T. muroii* AWP01-02 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบน เส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลนிட้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose; L: conidia; M: conidiophore (scale bar: C, D, E และ F 100  $\mu\text{m}$ ; G, H, I, J, L และ M 5  $\mu\text{m}$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



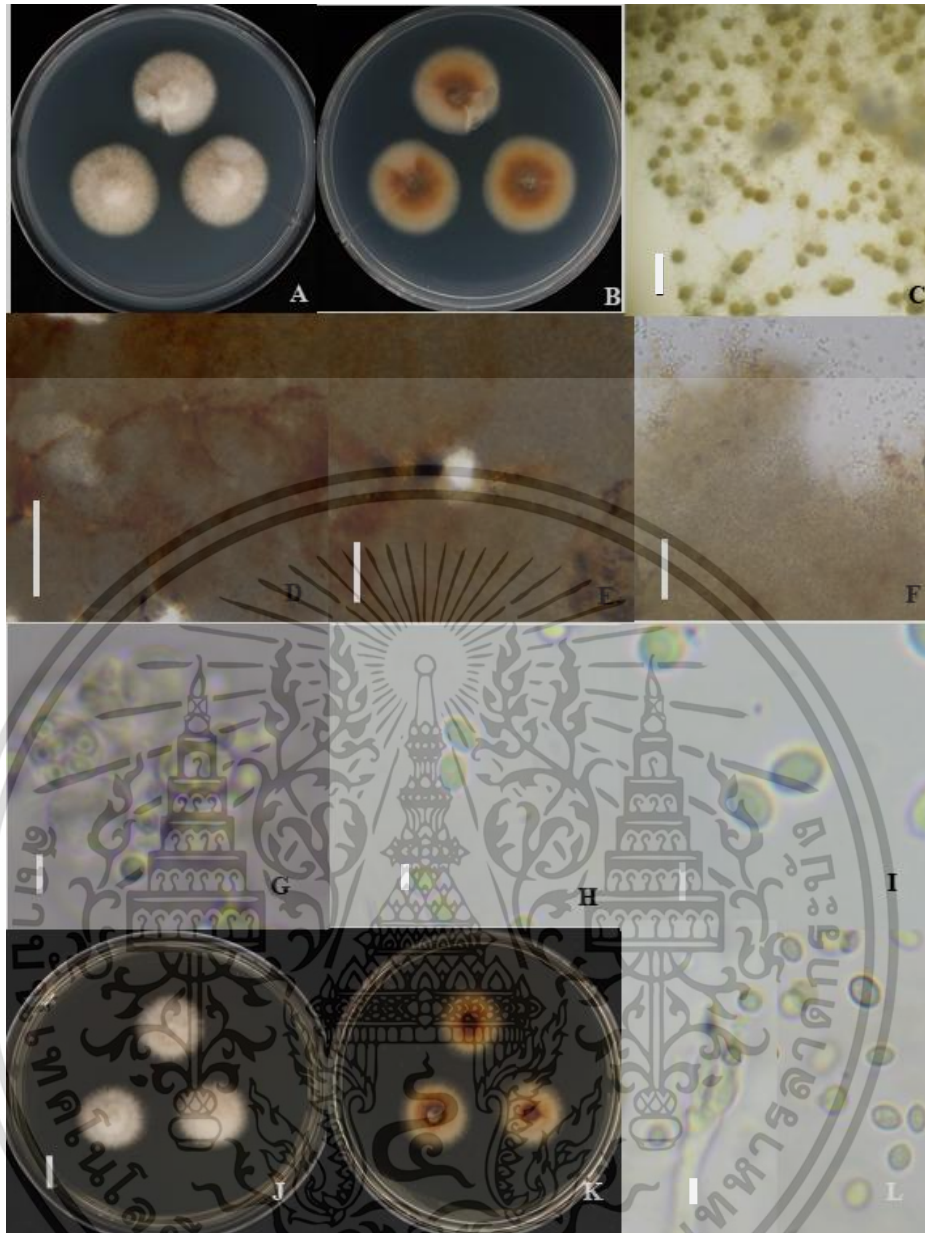
รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะของเชื้อรา *T. trachyspermus* AWP08-01 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลนிட้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose; L: conidia (scale bar: D, E และ F 100  $\mu$ m; G, H, I, และ L 5  $\mu$ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



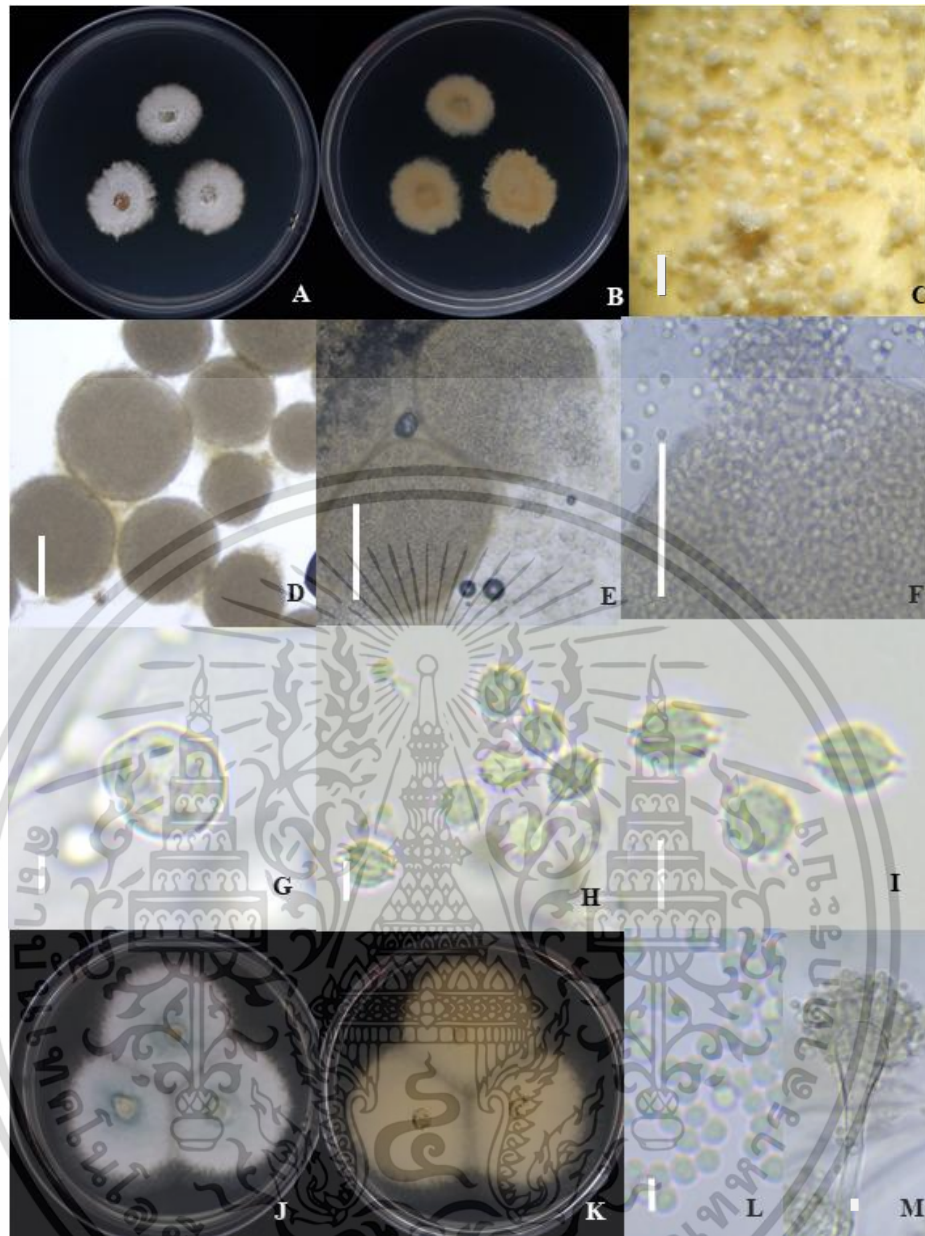
รูปที่ 4.7 แสดงลักษณะของเชื้อรา *T. macrosporus* AWP11-01 ที่ตัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G และ H: ascus; H และ I และ J: ascospore; K และ L: โคลนிட้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose; (scale bar: D, E และ F 100 µm; G, H, I และ J 5 µm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



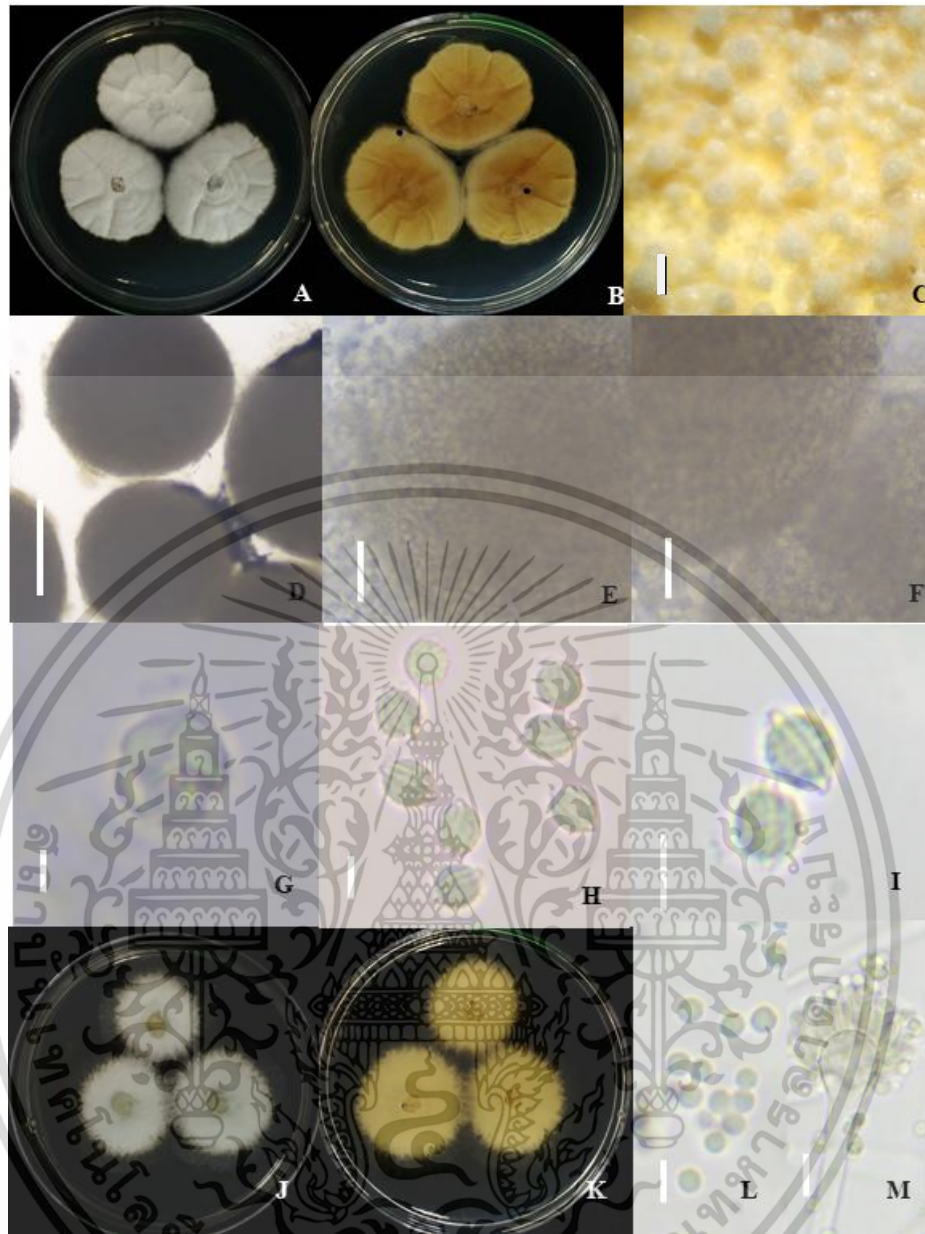
รูปที่ 4.8 แสดงลักษณะของเชื้อรา *T. muroii* AWP14-01 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนิน ด้านหน้าและโคลนินด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลนิน ด้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose, L: conidia (scale bar: D, E และ F 100  $\mu$ m; G, H, I และ L 5  $\mu$ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



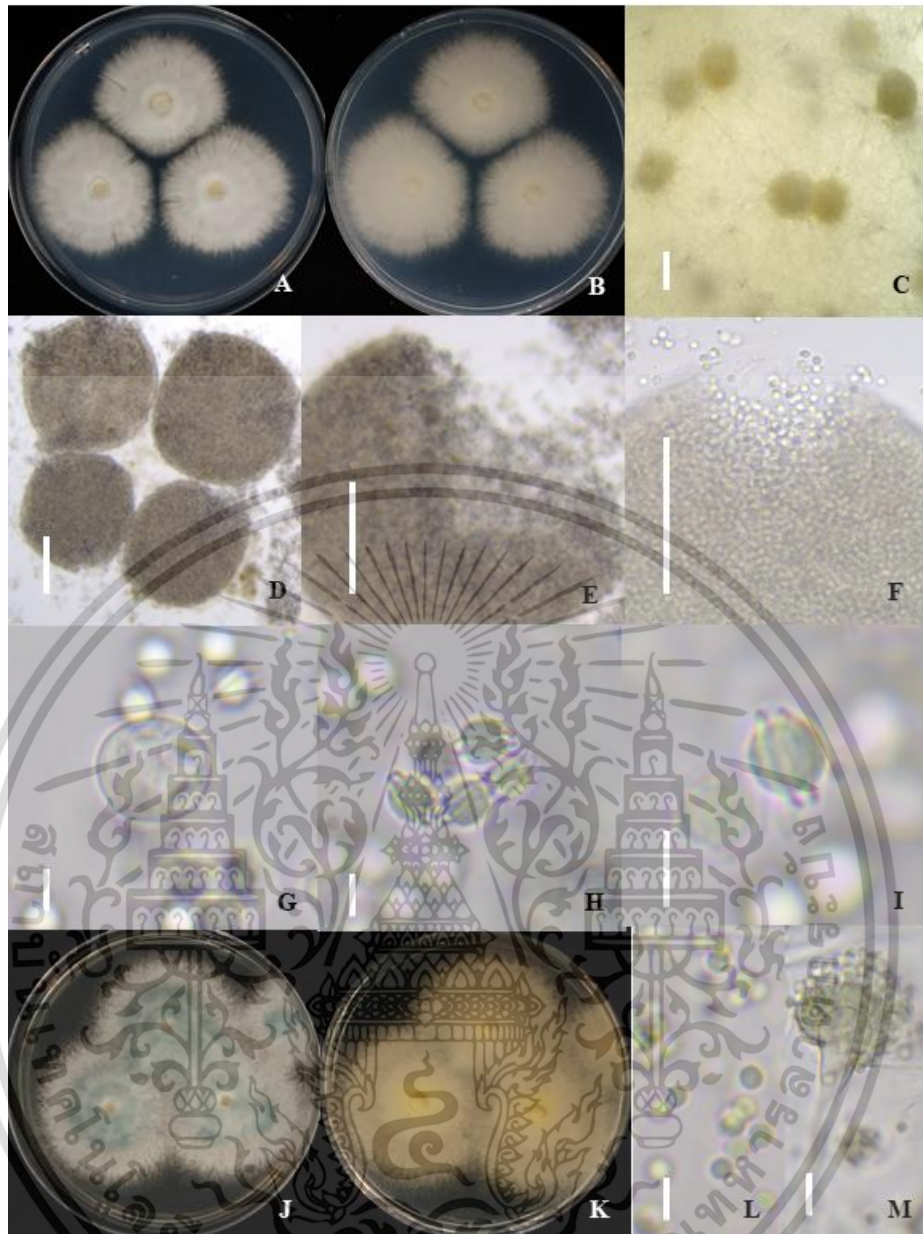
รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของเชื้อรา *N. tatenoi* AWP04-03 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนีย์ ด้านหน้าและโคลนีย์ด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลนีย์ ด้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose; L: conidia; M: conidiophore (scale bar: D, E และ F 100  $\mu$ m; G, H, I L และ M 5  $\mu$ m)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



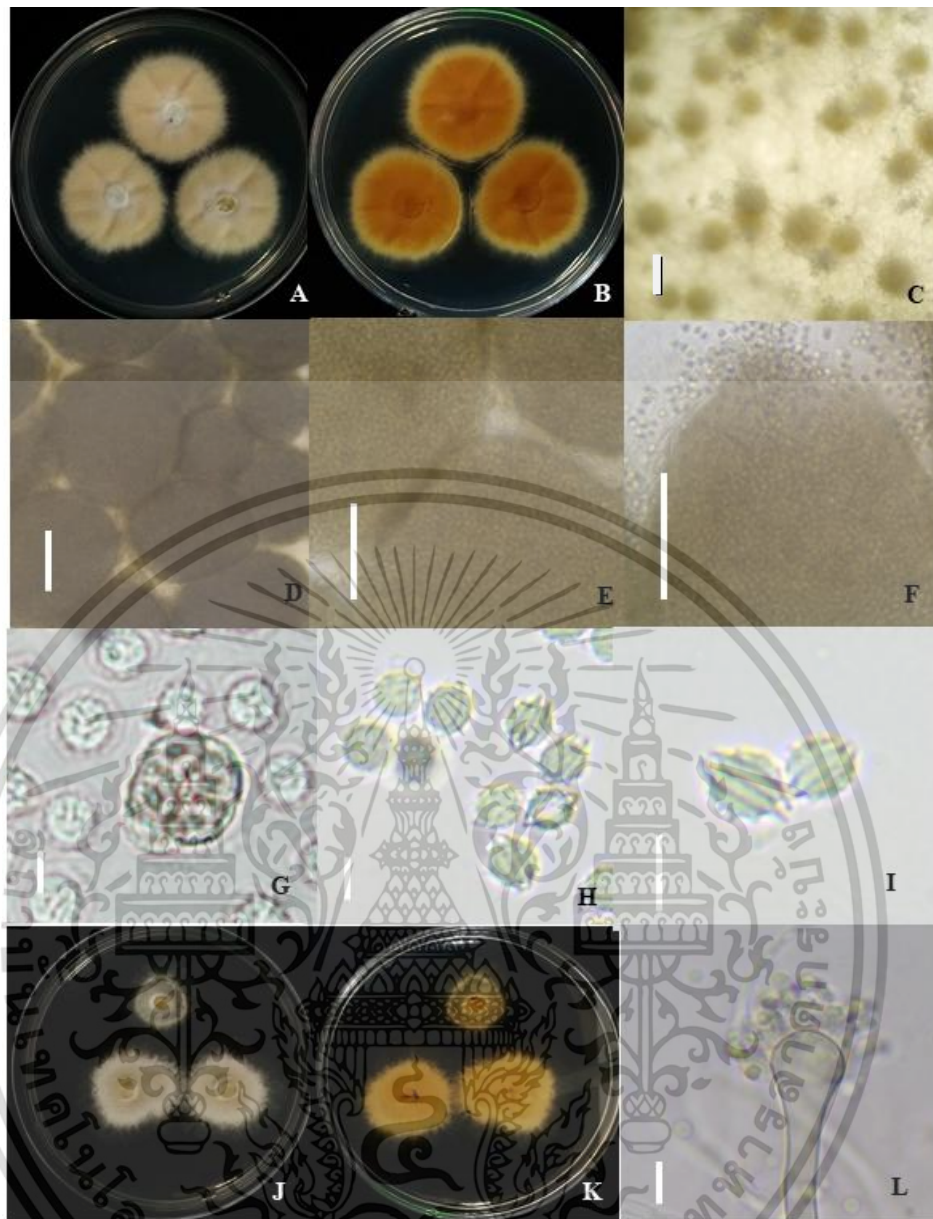
รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของเชื้อรา *N. quadriconta* AWP13-03 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนிட้านหน้าและโคลนிட้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลนிட้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose L: conidia; M: conidiophore (scale bar: D, E และ F 100  $\mu\text{m}$ ; G, H, I และ L 5  $\mu\text{m}$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของเชื้อรา *N. spinosa* AWP07-01 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนินี้ ด้านหน้าและโคลนินี้ด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I: ascospore; J และ K: โคลนินี้ด้านหน้าและด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose L: conidia; M: conidiophore. (scale bar: D, E และ F 100  $\mu\text{m}$ ; G, H, I, และ M 5  $\mu\text{m}$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงลักษณะของเชื้อรา *N. tatenoi* AWP11-02 ที่คัดแยกได้จากดิน; A และ B: โคลนีสี่ด้านหน้าและโคลนีสี่ด้านหลัง บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน; C: ascocarp ที่สร้างบนเส้นใย; D, E และ F: ascocarp; G: ascus; H และ I : ascospore ; J และ K: โคลนีสี่ด้านหน้าและสี่ด้านหลัง บนอาหาร MEA ที่เติม 40% sucrose L: conidiophore (scale bar: D, E และ F 100  $\mu\text{m}$ ; G, H, I และ L 5  $\mu\text{m}$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

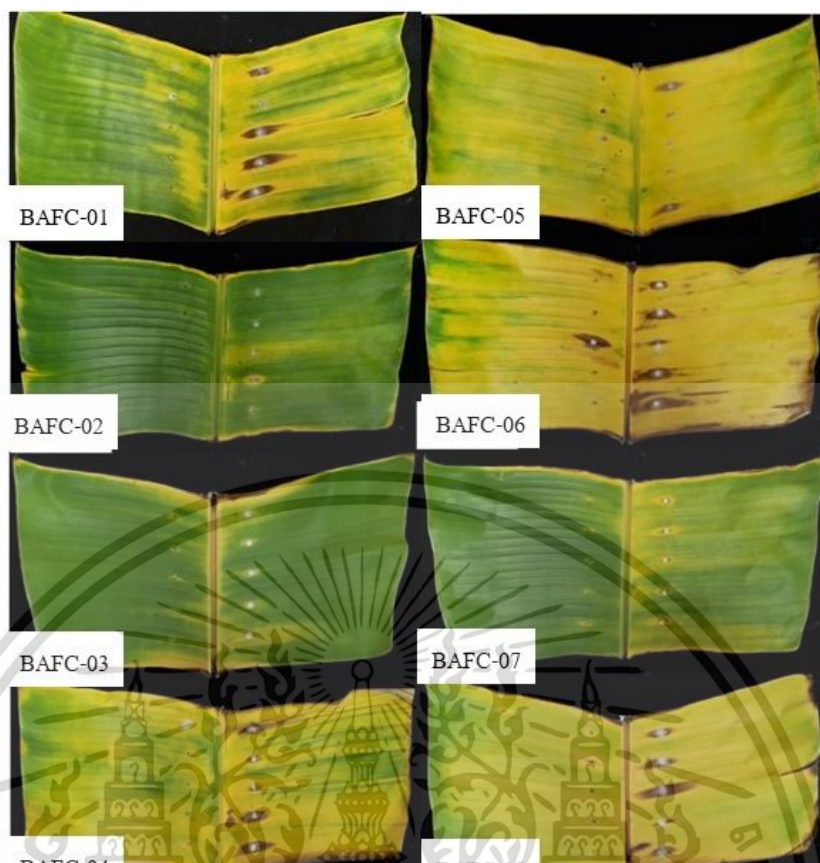
จากการคัดแยกเชื้อราต่อต้านทั้งหมด 22 ไอโซเลต จากตัวอย่างดินในจังหวัดสุพรรณบุรี และกาญจนบุรี พบว่าแบ่งได้ออกเป็น 6 สปีชีส์ คือ *T. muroii*, *T. macrosporus*, *T. trachyspermus*, *N. tatenoi*, *N. quadricinota* และ *N. spinosa* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเลขา และคณะ (2553) ที่รายงานถึงการพบเชื้อราสกุล *Neosartorya* ในประเทศไทยจากดินบริเวณน้ำพุร้อน ดินทำการเกษตร และดินจากแหล่งต่าง ๆ จาก 13 จังหวัด จำนวน 7 สปีชีส์ คือ *N. delicate*, *N. fischeri*, *N. glabra*, *N. multiplicata*, *N. spinosa*, *N. quadricinota* และ *N. takaii* แต่ไม่พบ *N. tatenoi* และงานวิจัยของ ธิตา และคณะ (2550) รายงานถึงการคัดแยกเชื้อรา *Talaromyces* ในประเทศไทยพบเชื้อราสกุลนี้ได้ 13 สปีชีส์ คือ *T. austrocalifornicus*, *T. flavus*, *T. bacillisporus*, *T. helicus*, *T. macrosporus*, *T. trachyspermus*, *T. luteus*, *T. indigoticus*, *T. stipitatus*, *T. rotundus*, *T. wortmannii*, *T. tratensis* และ *T. thailandensis* ซึ่งสามารถคัดแยกได้ด้วยวิธี soil plate, dilution plate, alcohol และ heat treatment ด้วยอาหาร Gochenaour's glucose ammonium nitrate agar (GAN) แต่ไม่พบ *T. muroii* ทำให้ทราบได้ว่าเชื้อราในสกุลนี้สามารถพบได้ทั่วไปในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีแนวโน้มที่จะสามารถทนความร้อนได้สูง

## 4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคในกล้วย

### 4.2.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการก่อโรคของเชื้อรา *F. oxysporum*

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 8 ไอโซเลต บนใบกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน โดยนำเชื้อราสาเหตุโรควางลงบนรอยแผลที่สร้างขึ้นบนใบกล้วยที่มีอายุขนาด และสีของใบใกล้เคียงกัน พบว่าเชื้อราในทุกไอโซเลตมีความสามารถในการก่อโรค แต่เชื้อราไอโซเลต BAFC-01 สามารถก่อโรคได้รุนแรงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ คือ มีขนาดแผล  $40.18 \pm 3.34 \times 10.21 \pm 1.19$  มิลลิเมตร มีพื้นที่แผล 410.29 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4.8) ลักษณะแผลมีรูปร่างรี สีน้ำตาลตรงกลางชั้นในมีเส้นใยสีขาวของเชื้อราสาเหตุของโรคเจริญขึ้น ดังรูปที่ 4.13 ไอโซเลตที่ก่อโรครุนแรงรองลงมาคือเชื้อราไอโซเลต BAFC-04, BACM-06 และ BAFC-08 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8) จึงคัดเลือกเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01 เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

จากการสังเกตพบว่า เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุของโรคตายพราย เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ใบกล้วยที่ใช้ในการทดสอบเกิดแผลรูปร่างรีสีน้ำตาลซึ่งแสดงถึงอาการของโรคตายพราย ที่เชื้อราสาเหตุเข้าทำลายบริเวณท่อน้ำเลี้ยงและอาหาร แต่บางตัวอย่างใบที่ใช้ในการทดสอบเกิดอาการใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (รูปที่ 4.13) คาดว่าเกิดจากขั้นตอนการเลือกใบกล้วยที่จะนำมาทดสอบ เพราะเป็นการเลือกใบกล้วยแบบสุ่มที่มีสีของใบใกล้เคียงกัน ในการทดสอบไม่สามารถใช้ใบกล้วยใบเดียวกัน ต้นเดียวกัน อายุของใบเท่ากันได้ทั้งหมด เพราะในการทดสอบต้องใช้ใบกล้วยขนาด 20 เซนติเมตร จึงไม่สามารถทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคตายพรายได้ในตัวอย่างใบเดียวกัน



รูปที่ 4.13 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จำนวน 8 ไอโซเลต บนใบกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง

ตารางที่ 4.8 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 8 ไอโซเลต บนใบกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อง

ไอโซเลต เชื้อราสาเหตุโรค	ขนาดแผล		
	ยาว (มม.)	กว้าง (มม.)	พื้นที่ (มม.)
BAFC-01	40.18±3.34	10.21±1.19	410.29 <sup>a</sup>
BAFC-02	7.78±3.50	4.22±0.60	32.83 <sup>c</sup>
BAFC-03	8.38±0.51	4.45±0.66	37.25 <sup>c</sup>
BAFC-04	29.90±3.39	10.28±2.29	307.89 <sup>b</sup>
BAFC-05	18.40±4.20	8.75±4.03	161.11 <sup>c</sup>
BAFC-06	31.01±3.27	9.50±2.46	294.64 <sup>b</sup>
BAFC-07	9.21±0.66	5.22±0.28	48.12 <sup>c</sup>
BAFC-08	34.33±4.03	8.96±2.49	307.55 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่  $P = 0.05$  โดยเปรียบเทียบค่าทางสถิติแบบ Duncan's Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการก่อโรคของเชื้อรา *C. musae*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *C. musae* ทั้ง 10 ไอโซเลต บนผลกล้วยน้ำว้า มะลิอ่อน พบว่าเชื้อราในทุกไอโซเลตสามารถก่อโรคได้ แต่เชื้อราไอโซเลต BACM-09 สามารถก่อโรคได้รุนแรงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญคือ มีขนาดแผล  $22.21 \pm 1.77 \times 32.66 \pm 1.33$  มิลลิเมตร มีลักษณะแผลเป็นสีดำ รูปร่างรี แผลยุบลงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.14 และไอโซเลตที่ก่อโรครุนแรงรองลงมาคือเชื้อราไอโซเลต BACM-10 และ BACM-04 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9) ทำการเลือกเชื้อรา *C. musae* BACM-09 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการก่อโรคมากที่สุด เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *C. musae* BACM-09 ในการก่อโรคแอนแทรกโนสบนผลกล้วย พบว่าผลกล้วยบางตัวอย่างเกิดแผลสีดำในบริเวณที่ไม่ได้วางชิ้นส่วนของเชื้อราสาเหตุ ซึ่งมีลักษณะแผลคล้ายคลึงกับอาการของโรคแอนแทรกโนส มีรายงานวิจัยของ Perfect และคณะ (1999) รายงานถึงการทดสอบเชื้อรา *Colletotrichum* 189 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ ว่ามีความสามารถในการเป็น endophytic fungi ที่สามารถอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชได้โดยไม่ก่อโรค จนกว่าจะได้รับสภาวะที่เหมาะสม สปอร์หรือเส้นใยจึงจะงอกและเจริญเติบโตได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Photita และคณะ (2005) ที่ทำการเก็บตัวอย่างใบกล้วยจากบริเวณดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อคัดแยกเชื้อรา endophyte เมื่อทำการคัดแยกสามารถพบเชื้อรา *Colletotrichum* 2 ชนิด คือ *C. gloiosporioides* และ *C. musae*



รูปที่ 4.14 แสดงประสิทธิภาพการก่อโรคของเชื้อรา *C. musae* จำนวน 10 ไอโซเลต บนผลกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน

ตารางที่ 4.9 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อรา *C. musae* จำนวน 10 ไอโซเลตบนผลกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน

ไอโซเลต เชื้อราสาเหตุโรค	ขนาดแผล		
	กว้าง (มม.)	ยาว (มม.)	พื้นที่ (มม.)
BACM-01	20.14±0.55	28.77±0.82	579.52 <sup>bc</sup>
BACM-02	19.40±0.85	27.53±2.19	533.93 <sup>bc</sup>
BACM-03	18.02±1.80	29.15±1.56	525.32 <sup>bc</sup>
BACM-04	20.36±2.50	29.80±1.44	606.76 <sup>b</sup>
BACM-05	20.39±1.66	26.61±3.03	542.58 <sup>bc</sup>
BACM-06	19.22±2.56	26.35±3.70	506.5 <sup>bc</sup>
BACM-07	19.80±1.96	25.85±5.86	511.68 <sup>bc</sup>
BACM-08	20.14±2.90	26.93±2.55	542.46 <sup>bc</sup>
BACM-09	22.21±1.77	32.66±1.33	725.30 <sup>a</sup>
BACM-10	21.33±0.72	29.76±2.70	634.60 <sup>b</sup>

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่  $P = 0.05$  โดยเปรียบเทียบค่าทางสถิติแบบ Duncan's Multiple Range Test

### 4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมในสภาพห้องปฏิบัติการ

#### 4.3.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum*

##### BAFC-01

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01 สาเหตุของโรคตายพรายในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยวิธีทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ระหว่างเชื้อราต่อต้าน *Neosartorya* และ *Talaromyces* จำนวน 22 ไอโซเลตที่คัดแยกได้ และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราต่อต้าน 4 ไอโซเลต คือ *N. aureola* CHA01-A01, *N. spinosa* CHA09-A01, *N. fenneliae* CHA03-A11 และ *T. muroii* CHA03-A03 รวมทั้งหมด 26 ไอโซเลต เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01 เป็นเวลา 25 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อรา *T. trachyspermus* AWP08-01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *F. oxysporum* BAFC-01 ได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุของโรค *F. oxysporum* BAFC-01 เท่ากับ  $1.15 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 ในจานอาหารควบคุมพบว่าสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 62.25 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อต่อต้าน *T. muroii* AWP04-02 และ *T. macrosporus* AWP11-01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 รองลงมา โดยมีจำนวนสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 เท่ากับ  $1.29 \times 10^7$  และ  $1.34 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 57.49 และ 55.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งประสิทธิภาพในการควบคุม *F. oxysporum* BAFC-01 ของเชื้อราต่อต้านทั้ง 26 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อร่วม

ไอโซเลต เชื้อต่อต้าน	<i>F. oxysporum</i>		ไอโซเลต เชื้อต่อต้าน	<i>F. oxysporum</i>	
	จำนวนสปอร์ (สปอร์/มล.)	การยับยั้งการ สร้างสปอร์ (%)		จำนวนสปอร์ (สปอร์/ มล.)	การยับยั้ง การสร้าง สปอร์ (%)
Control	$3.05 \times 10^7$	0.00 <sup>j</sup>	Control	$3.05 \times 10^7$	0.00 <sup>i</sup>
CHA01-A01	$2.06 \times 10^7$	21.70 <sup>g</sup>	AWP07-01	$1.90 \times 10^7$	37.46 <sup>d</sup>
CHA03-A03	$2.16 \times 10^7$	25.56 <sup>f</sup>	AWP08-01	$1.15 \times 10^7$	62.25 <sup>a</sup>
CHA03-A11	$1.92 \times 10^7$	37.62 <sup>d</sup>	AWP11-01	$1.34 \times 10^7$	55.93 <sup>b</sup>
CHA09-A01	$2.23 \times 10^7$	32.29 <sup>e</sup>	AWP11-02	$2.10 \times 10^7$	31.06 <sup>e</sup>
AWP01-01	$1.69 \times 10^7$	28.92 <sup>f</sup>	AWP12-01	$2.35 \times 10^7$	23.34 <sup>fg</sup>
AWP01-02	$1.97 \times 10^7$	36.88 <sup>d</sup>	AWP13-01	$2.18 \times 10^7$	28.51 <sup>f</sup>
AWP01-03	$1.89 \times 10^7$	26.63 <sup>f</sup>	AWP13-02	$2.86 \times 10^7$	6.11 <sup>i</sup>
AWP04-01	$1.55 \times 10^7$	44.52 <sup>c</sup>	AWP13-03	$2.36 \times 10^7$	22.44 <sup>g</sup>
AWP04-02	$1.29 \times 10^7$	57.49 <sup>b</sup>	AWP14-01	$1.60 \times 10^7$	47.39 <sup>c</sup>
AWP04-03	$1.58 \times 10^7$	48.13 <sup>c</sup>	AWP14-02	$2.86 \times 10^7$	6.19 <sup>i</sup>
AWP04-04	$2.21 \times 10^7$	27.28 <sup>f</sup>	AWP14-03	$2.25 \times 10^7$	26.13 <sup>f</sup>
AWP05-01	$2.32 \times 10^7$	23.67 <sup>fg</sup>	AWP14-04	$2.54 \times 10^7$	16.45 <sup>h</sup>
AWP05-02	$1.87 \times 10^7$	38.61 <sup>d</sup>	AWP14-05	$1.92 \times 10^7$	36.97 <sup>d</sup>

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

#### 4.3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อรา *C. musae* BACM-09

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านที่มีต่อการควบคุมเชื้อ *C. musae* BACM-09 สาเหตุของโรคแอนแทรกโนสในสภาพห้องปฏิบัติการ ทดสอบโดยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมบนอาหาร PDA ระหว่างเชื้อราต่อต้าน *Neosartorya* และ *Talaromyces* ทั้งหมด 26 ไอโซเลตเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *C. musae* BACM-09 เป็นเวลา 25 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.16) เชื้อรา CHA03-A11 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราก่อโรคได้ดีที่สุด โดยมีจำนวนสปอร์ของเชื้อ *C. musae* BACM-09  $1.23 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนสปอร์ของเชื้อในจานอาหารควบคุมพบว่าสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. musae* BACM-09 ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 55.64 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อต่อต้าน AWP05-01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. musae* BACM-09 ได้เป็นอันดับที่สอง โดยมีจำนวนสปอร์ของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*C. musae* BACM-09  $1.44 \times 10^7$  และ  $1.43 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 48.46 และ 48.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเชื้อต่อต้าน AWP08-01 และ AWP11-01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. musae* BACM-09 ได้เป็นอันดับที่สาม โดยมีจำนวนสปอร์ของเชื้อ *C. musae*  $1.61 \times 10^7$  และ  $1.63 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 41.99 และ 41.54 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.11

**ตารางที่ 4.11** แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อ *C. musae* และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสปอร์บนงานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรวม

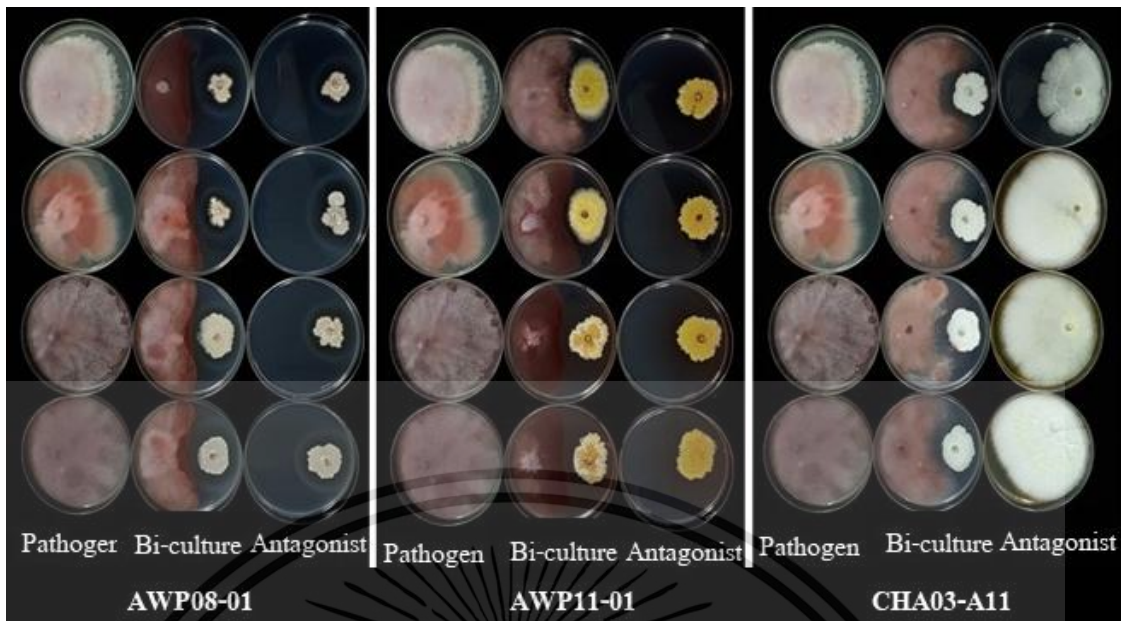
ไอโซเลต เชื้อต่อต้าน	<i>C. musae</i>		ไอโซเลต เชื้อต่อต้าน	<i>C. musae</i>	
	จำนวนสปอร์ (สปอร์/มล.)	การยับยั้งการ สร้างสปอร์ (%)		จำนวนสปอร์ (สปอร์/มล.)	การยับยั้ง การสร้าง สปอร์ (%)
Control	$2.78 \times 10^7$	0.00 <sup>j</sup>	Control	$2.78 \times 10^7$	0.00 <sup>j</sup>
CHA01-A01	$1.87 \times 10^7$	32.83 <sup>e</sup>	AWP07-01	$1.79 \times 10^7$	35.79 <sup>d</sup>
CHA03-A03	$2.32 \times 10^7$	16.67 <sup>h</sup>	AWP08-01	$1.61 \times 10^7$	41.99 <sup>c</sup>
CHA03-A11	$1.23 \times 10^7$	55.64 <sup>a</sup>	AWP11-01	$1.63 \times 10^7$	41.54 <sup>c</sup>
CHA09-A01	$1.81 \times 10^7$	34.99 <sup>de</sup>	AWP11-02	$2.11 \times 10^7$	24.21 <sup>f</sup>
AWP01-01	$2.13 \times 10^7$	23.49 <sup>f</sup>	AWP12-01	$2.03 \times 10^7$	27.17 <sup>f</sup>
AWP01-02	$1.97 \times 10^7$	29.06 <sup>e</sup>	AWP13-01	$2.05 \times 10^7$	26.19 <sup>f</sup>
AWP01-03	$1.61 \times 10^7$	42.26 <sup>c</sup>	AWP13-02	$2.23 \times 10^7$	19.81 <sup>g</sup>
AWP04-01	$1.76 \times 10^7$	36.69 <sup>d</sup>	AWP13-03	$2.38 \times 10^7$	14.60 <sup>h</sup>
AWP04-02	$1.82 \times 10^7$	34.45 <sup>de</sup>	AWP14-01	$2.43 \times 10^7$	12.81 <sup>h</sup>
AWP04-03	$2.08 \times 10^7$	25.20 <sup>f</sup>	AWP14-02	$2.62 \times 10^7$	5.80 <sup>i</sup>
AWP04-04	$1.79 \times 10^7$	35.61 <sup>d</sup>	AWP14-03	$2.60 \times 10^7$	6.52 <sup>i</sup>
AWP05-01	$1.44 \times 10^7$	48.10 <sup>b</sup>	AWP14-04	$2.58 \times 10^7$	7.42 <sup>i</sup>
AWP05-02	$1.75 \times 10^7$	37.23 <sup>d</sup>	AWP14-05	$2.22 \times 10^7$	20.08 <sup>g</sup>

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

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านต่อการควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* BAF01 และ *C. musae* BACM-09 จะเห็นได้ว่าเชื้อราต่อต้านที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* BAF01 ได้ดีที่สุดลำดับแรกตามข้อมูลทางสถิติ คือ AWP08-01 ลำดับที่สองคือ AWP04-02 และ AWP11-01 และลำดับที่สามคือ AWP04-01, AWP04-03 และ AWP14-01 และเชื้อราต่อต้านที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. musae* BACM-09 ลำดับแรกตามข้อมูลทางสถิติ คือ CHA03-A11 ลำดับที่สอง คือ AWP05-01 และลำดับที่สาม คือ AWP08-01 และ AWP11-01 และทำการคัดเลือกเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุของโรค 3 ไอโซเลตเพื่อนำมาสกัดสาร คือ เชื้อราต่อต้าน AWP08-01, AWP11-01 และ

CHA03-A11 จากประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้าน AWP08-01 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* ได้ดีที่สุด แต่สามารถยับยั้งเชื้อ *C. musae* BACM-09 เป็นลำดับที่สาม เชื้อราต่อต้าน AWP11-01 สามารถยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* BAF01 และ *C. musae* BACM-09 ได้ในลำดับที่ 2 และ 3 ตามลำดับ และเชื้อต่อต้าน CHA03-A11 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. musae* BACM-09 ได้ดีที่สุด จากผลการทดสอบจึงคัดเลือกเชื้อราต่อต้าน 3 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคนิวกกล้วยได้ทั้ง 2 ชนิดที่ คือ *Talaromyces trachyspermus* AWP08-01, *Talaromyces macrosporus* AWP11-01 และ *Neosartorya fennelliae* CHA03-A11 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 และ 4.16 เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อต่อต้านในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคนิวกกล้วยทั้ง 2 ชนิดพบว่า เชื้อรา *T. trachyspermus* AWP08-01, *T. macrosporus* AWP11-01 สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคนิวกกล้วย *F. oxysporum* BAF01 และ *C. musae* BACM-09 ได้ดี เช่นเดียวกับงานวิจัยของธิดา และคณะ (2550) ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในสกุล *Talaromyces* คือ *T. flavus* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคพืชด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมบนอาหาร PDA พบว่า *T. flavus* สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora parasitica*, *F. oxysporum*, *C. capsica* และ *C. gloiosporioides* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยของ Eamvijan และคณะ (2009) ที่รายงานถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา *N. fischeri*, *N. graba*, *N. spinosa*, *N. hiratsukae*, *N. takakii* และ *N. tatenoi* พบว่าสามารถควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum*, *C. capsica* และ *C. gloiosporioides* ได้เพียงแค่ 30-40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของ *N. fennelliae* CHA03-A11 พบว่าสามารถควบคุม *F. oxysporum* และ *C. musae* ได้มากถึง 37.62 และ 55.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 4.15 แสดงผลการเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อราต่อต้าน AWP08-01, AWP11-01 และ CHA03-A11 ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* BAFC-01



รูปที่ 4.16 แสดงผลการเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อราต่อต้าน AWP08-01, AWP11-01 และ CHA03-A11 ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค *C. musae* BACM-09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อราสกุล *Neosartorya* และ *Talaromyces* ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคในกล้วย

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อร่วมระหว่างเชื้อราต่อต้านทั้งหมด 26 ไอโซเลต และเชื้อราสาเหตุของโรค *F. oxysporum* BAFC-01 และ *C. musae* BACM-09 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วัน โดยสามารถคัดเลือกเชื้อราต่อต้านที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *Talaromyces trachyspermus* AWP08-01, *Talaromyces macrosporus* AWP11-01 และ *Neosartorya fennelliae* CHA03-A11 มาสกัดสารด้วยตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราต่อต้านบนอาหาร PDB เชื้อราต่อต้าน *T. trachyspermus* AWP08-01 ได้ปริมาณเส้นใยของเชื้อรา 20.42 กรัม สามารถนำมาสกัดสารได้ สารสกัดหยาบในชั้น hexane ได้น้ำหนัก 1.01 กรัม สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate 0.74 กรัม และสารสกัดหยาบชั้น methanol 1.22 กรัม เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราต่อต้าน *T. macrosporus* AWP11-01 ได้ปริมาณเส้นใยของเชื้อรา 19.08 กรัม สามารถนำมาสกัดสารได้สารสกัดหยาบในชั้น hexane ได้น้ำหนัก 0.97 กรัม สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate 0.62 กรัม และสารสกัดหยาบชั้น methanol 1.07 กรัม เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราต่อต้าน *N. fennelliae* CHA03-A11 ได้ปริมาณเส้นใยของเชื้อรา 27.82 กรัม สามารถนำมาสกัดสารได้สารสกัดหยาบในชั้น hexane ได้น้ำหนัก 1.48 กรัม สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate 1.06 กรัม และสารสกัดหยาบชั้น methanol 1.92 กรัม และนำสารสกัดในตัวทำละลายในชั้นต่าง ๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรค *F. oxysporum* BAFC-01 และ *C. musae* BACM-09 โดยผสมสารสกัดหยาบลงในอาหาร PDA ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm และเพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุของโรคทั้ง 2 ชนิดบนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดในชั้นต่าง ๆ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราสาเหตุของโรคทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่ผสมสารสกัด

จากการทดสอบโดยนำเชื้อราต่อต้าน *N. fennelliae* CHA03-A11 มาสกัดสารด้วยตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol และผสมสารสกัดหยาบในอาหาร PDA ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 และ *C. musae* BACM-09 ลงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งผลของสารสกัดหยาบชั้นของตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้นต่างกันต่อเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 พบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีผลต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *F. oxysporum* BAFC-01 โดยสังเกตได้จากขนาดของโคโลนีของเชื้อทั้ง 4 ซ้ำที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA โดยสารสกัดที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคจะทำให้โคโลนีของเชื้อราสาเหตุมีขนาดเล็กกว่าจานควบคุม สำหรับเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01 พบว่าสารสกัดหยาบในชั้น methanol สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01 ได้ดีที่สุดในระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 19.73 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01 สารสกัดชั้น ethyl acetate มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01 มากที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 40.14 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.12) สำหรับเชื้อรา *C. musae* BACM-09 พบว่าสารสกัดหยาบในชั้น methanol สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. musae* BACM-09 ได้ดีที่สุดในระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 20.24 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้ท่านไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. musae* BACM-09 ได้ 40.70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.13) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราต่อต้าน *N. fennelliae* CHA03-A11 ในชั้นของตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าสารสกัดหยาบในทุกชั้นของตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm ไม่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้เกิน 50 เปอร์เซ็นต์

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *T. trachyspermus* AWP08-01 สำหรับเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01 พบว่าสารสกัดหยาบในทุกชั้นของตัวทำละลาย ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01 ได้ แต่เมื่อทำการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01 สารสกัดชั้น ethyl acetate มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01 มากที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 22.11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.14) สำหรับเชื้อรา *C. musae* BACM-09 พบว่าสารสกัดหยาบในชั้น ethyl acetate สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. musae* BACM-09 ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 41.27 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. musae* BACM-09 ได้ 51.58 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.15)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *T. macrosporus* AWP11-01 ต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วย สำหรับเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01 พบว่าสารสกัดหยาบในชั้น methanol สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01 ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 19.73 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01 สารสกัดชั้น ethyl acetate มีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01 มากที่สุด ที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 40.44 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.16) สำหรับเชื้อรา *C. musae* BACM-09 พบว่าสารสกัดหยาบในชั้น ethyl acetate สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. musae* BACM-09 ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm เท่ากับ 6.85 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. musae* BACM-09 ได้ 12.01 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.17) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากเชื้อราต่อต้าน *T. macrosporus* AWP11-01 ในชั้นของตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าสารสกัดหยาบในทุกชั้นของตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm ไม่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดได้เกิน 50 เปอร์เซ็นต์

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในชั้นของตัวทำละลายจากเชื้อราต่อต้านจำนวน 3 ไอโซเลต คือ *T. trachyspermus* AWP08-01, *T. macrosporus* AWP11-01 และ *N. fennelliae* CHA03-A11 ในการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01 และ *C. musae* BACM-09 พบว่าในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *F. oxysporum* BAFc-01 สารสกัดหยาบในชั้น ethyl acetate จากเชื้อราต่อต้าน *T. macrosporus* AWP11-01 สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 40.44% (รูปที่ 4.17) รองลงมาคือสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อราต่อต้าน *N. fennelliae* CHA03-A11 ที่ 40.14% และในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. musae* BACM-09 พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อรา *T. trachyspermus* AWP08-01 สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 51.58% ED<sub>50</sub> เท่ากับ 969.37 ppm (รูปที่ 4.18) รองลงมาคือสารสกัดหยาบในชั้น methanol จากเชื้อรา *N. fennelliae* CHA03-A11 ที่ 40.70% ซึ่งคาดว่าสารสกัดในชั้น ethyl acetate จากเชื้อราต่อต้านทั้ง 3 ไอโซเลต น่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเอกซาร์นี้เป็นเอกซาร์ที่สว่นไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*F. oxysporum* BAFC-01 และ *C. musae* BACM-09 และให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ เมอมร (2558) ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *T. trachyspermus* EU09 และ *T. muroii* EU06 ในการควบคุมเชื้อรา *C. coffeanum* เชื้อราสาเหตุของโรคแอนแทรกคโนสในกาแฟ พบว่าสารสกัดหยาบในชั้น ethyl acetate จาก *T. trachyspermus* EU09 และ *T. muroii* EU06 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *C. coffeanum* ได้ดีที่ ED<sub>50</sub> เท่ากับ 0.65 และ 2.20 ppm ตามลำดับ และยังมีรายงานวิจัยของ Boonsang และคณะ (2014) ซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในชั้น ethyl acetate จากเชื้อราที่คัดแยกได้จากดินต่อการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคพืชต่าง ๆ พบว่าสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อรา *N. pseudofischeri* (KUFA-0060) มีฤทธิ์ในการควบคุมเชื้อรา *C. capsici* ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm และใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Dethoup และคณะ 2007 ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบในชั้น ethyl acetate จากเชื้อรา *N. pseudofischeri* (KUFA 0108) สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloiosporioides* และ *C. capsici* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ 1666.87 และ 1887.38 ppm ตามลำดับ และยังสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 9281.37 ppm



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *N. fennelliae* CHA03-A11 ต่อการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)	Growth inhibition (%)	จำนวนสปอร์ ( $\times 10^7$ สปอร์/มล.)	Spore inhibition (%)	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	50.00 ± 0.00	0	1.07 ± 0.35	0.00	-
	10	50.00 ± 0.00	0	1.06 ± 0.11	0.48	
	50	50.00 ± 0.00	0	1.05 ± 0.10	1.48	
	100	50.00 ± 0.00	0	1.05 ± 0.17	1.59	
	500	50.00 ± 0.00	0	0.98 ± 0.09	8.10	
	1000	48.78 ± 0.48	2.435	0.85 ± 0.09	20.57	
Ethyl acetate	0	50.00 ± 0.00	0.00	1.07 ± 0.35	0.00	-
	10	50.00 ± 0.00	0.00	0.96 ± 0.13	10.32	
	50	50.00 ± 0.00	0.00	0.89 ± 0.08	16.71	
	100	47.73 ± 0.29	4.54	0.80 ± 0.09	25.26	
	500	45.32 ± 0.38	9.36	0.71 ± 0.04	33.63	
	1000	42.64 ± 0.33	14.73	0.64 ± 0.09	40.14	
Methanol	0	50.00 ± 0.00	0.00	1.07 ± 0.35	0.00	-
	10	50.00 ± 0.00	0.00	1.07 ± 0.18	0.13	
	50	50.00 ± 0.00	0.00	1.05 ± 0.12	1.30	
	100	45.40 ± 0.23	9.19	0.93 ± 0.06	13.02	
	500	43.26 ± 0.16	13.49	0.90 ± 0.06	15.36	
	1000	40.14 ± 0.18	19.73	0.78 ± 0.04	26.49	

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

ตารางที่ 4.13 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *N. fennelliae* CHA03-A11 ต่อการควบคุมเชื้อรา *C. musae* BACM-09

สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)	Growth inhibition (%)	จำนวนสปอร์ ( $\times 10^7$ สปอร์/มล.)	Spore inhibition (%)	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.31 $\pm$ 0.09	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.28 $\pm$ 0.02	2.34	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.27 $\pm$ 0.03	2.69	
	100	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.27 $\pm$ 0.08	3.24	
	500	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.26 $\pm$ 0.03	4.04	
	1000	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.25 $\pm$ 0.02	4.54	
Ethyl acetate	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.31 $\pm$ 0.09	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.26 $\pm$ 0.02	4.13	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.24 $\pm$ 0.09	5.04	
	100	48.06 $\pm$ 0.13	3.88	1.12 $\pm$ 0.07	14.90	
	500	45.45 $\pm$ 0.45	9.10	1.05 $\pm$ 0.02	19.67	
	1000	44.58 $\pm$ 0.24	10.85	0.98 $\pm$ 0.06	25.25	
Methanol	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	1.31 $\pm$ 0.09	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	0.95 $\pm$ 0.05	27.34	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	0.93 $\pm$ 0.06	36.07	
	100	46.38 $\pm$ 0.25	7.24	0.84 $\pm$ 0.07	29.15	
	500	42.48 $\pm$ 0.64	15.04	0.81 $\pm$ 0.07	38.02	
	1000	39.88 $\pm$ 0.36	20.24	0.78 $\pm$ 0.06	40.70	

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

ตารางที่ 4.14 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. trachyspermus* AWP08-01 ต่อการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* BAFc-01

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น (ppm)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)	Growth inhibition (%)	จำนวนสปอร์ ( $\times 10^7$ สปอร์/มล.)	Spore inhibition (%)	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	50.00 ± 0.00	0.00	10.07 ± 0.04	0.00	-
	10	50.00 ± 0.00	0.00	10.06 ± 0.04	0.14	
	50	50.00 ± 0.00	0.00	9.96 ± 0.05	1.07	
	100	50.00 ± 0.00	0.00	9.84 ± 0.09	2.25	
	500	50.00 ± 0.00	0.00	9.81 ± 0.09	2.62	
	1000	50.00 ± 0.00	0.00	9.60 ± 0.06	4.67	
Ethyl acetate	0	50.00 ± 0.00	0.00	10.07 ± 0.04	0.00	-
	10	50.00 ± 0.00	0.00	10.03 ± 0.08	0.38	
	50	50.00 ± 0.00	0.00	9.91 ± 0.02	1.63	
	100	50.00 ± 0.00	0.00	9.28 ± 0.06	7.83	
	500	50.00 ± 0.00	0.00	9.03 ± 0.06	10.32	
	1000	50.00 ± 0.00	0.00	7.84 ± 0.04	22.11	
Methanol	0	50.00 ± 0.00	0.00	10.07 ± 0.04	0.00	-
	10	50.00 ± 0.00	0.00	9.57 ± 0.03	4.98	
	50	50.00 ± 0.00	0.00	9.58 ± 0.07	4.85	
	100	50.00 ± 0.00	0.00	9.35 ± 0.09	7.15	
	500	50.00 ± 0.00	0.00	9.34 ± 0.04	7.27	
	1000	50.00 ± 0.00	0.00	8.89 ± 0.09	11.74	

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

ตารางที่ 4.15 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. trachyspermus* AWP08-01 ต่อการควบคุมเชื้อรา *C. musae* BACM-09

สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)	Growth inhibition (%)	จำนวน สปอร์ ( $\times 10^7$ สปอร์/มล.)	Spore inhibition (%)	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.62	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.61	0.11	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.56	0.48	
	100	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.49	1.05	
	500	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.45	1.33	
	1000	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.38	1.90	
Ethyl acetate	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.62	0.00	969.37
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.34	2.24	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.38	1.92	
	100	49.01 $\pm$ 1.15	1.99	11.84	6.18	
	500	48.13 $\pm$ 0.22	3.74	10.52	16.61	
	1000	29.37 $\pm$ 0.22	41.27	6.11	51.58	
Methanol	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.62	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.48	1.15	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.53	0.73	
	100	46.38 $\pm$ 0.25	7.24	12.14	3.79	
	500	42.48 $\pm$ 0.64	15.04	11.90	5.72	
	1000	39.88 $\pm$ 0.36	20.24	11.82	6.37	

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

ตารางที่ 4.16 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. macrosporus* AWP11-01 ต่อการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01

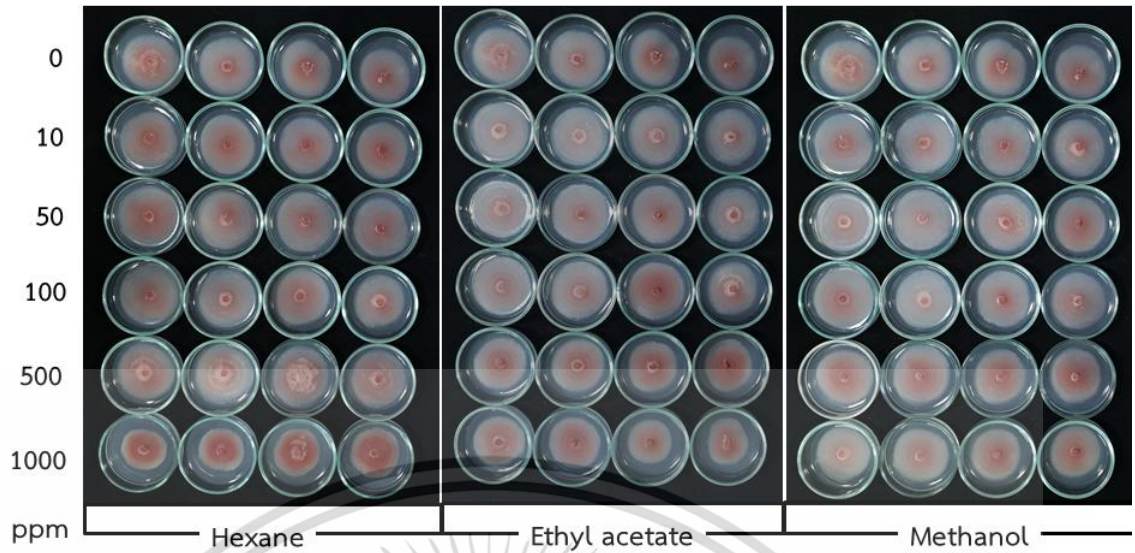
สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)	Growth inhibition (%)	จำนวนสปอร์ ( $\times 10^7$ สปอร์/มล.)	Spore inhibition (%)	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	10.67 $\pm$ 0.35	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	10.62 $\pm$ 0.11	0.48	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	10.51 $\pm$ 0.10	1.48	
	100	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	10.50 $\pm$ 0.17	1.59	
	500	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	9.81 $\pm$ 0.09	8.10	
	1000	48.78 $\pm$ 0.48	2.43	8.48 $\pm$ 0.09	20.57	
Ethyl acetate	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	10.67 $\pm$ 0.35	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	9.57 $\pm$ 0.03	10.32	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	8.89 $\pm$ 0.08	16.71	
	100	47.73 $\pm$ 0.29	4.54	7.98 $\pm$ 0.09	25.26	
	500	45.32 $\pm$ 0.38	9.36	7.08 $\pm$ 0.04	33.63	
	1000	42.64 $\pm$ 0.33	14.73	6.36 $\pm$ 0.09	40.44	
Methanol	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	10.67 $\pm$ 0.35	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	10.66 $\pm$ 0.18	0.13	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	10.53 $\pm$ 0.12	1.30	
	100	45.40 $\pm$ 0.23	9.19	9.28 $\pm$ 0.06	13.02	
	500	43.26 $\pm$ 0.16	13.49	9.03 $\pm$ 0.06	15.36	
	1000	40.14 $\pm$ 0.18	19.73	7.84 $\pm$ 0.04	26.49	

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

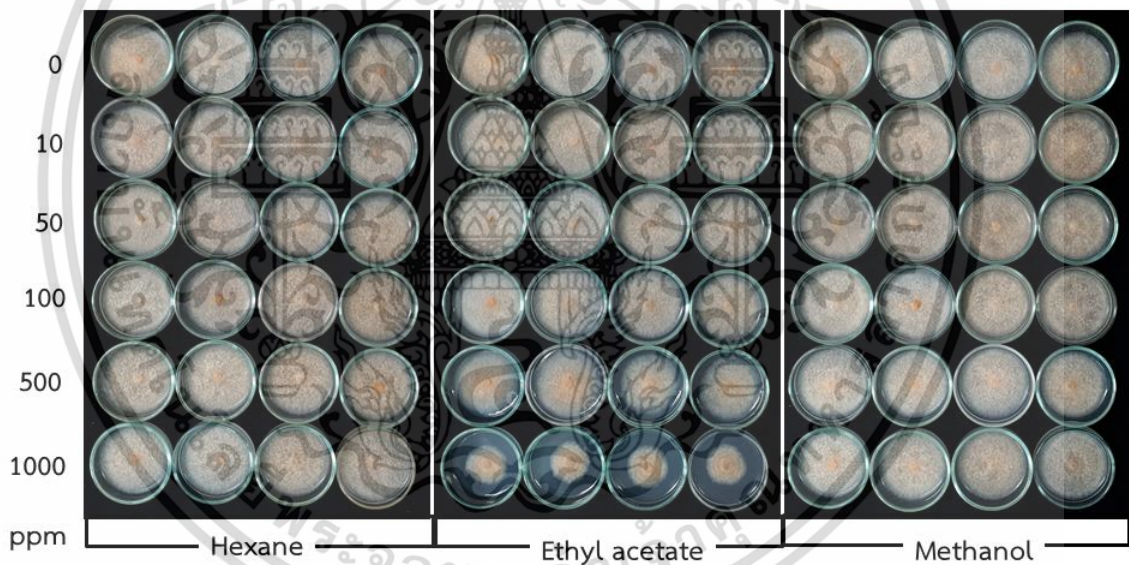
ตารางที่ 4.17 แสดงประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากเชื้อ *T. macrosporus* AWP11-01 ต่อการควบคุมเชื้อรา *C. musae* BACM-09

สารสกัด หยาบ	ความ เข้มข้น (ppm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง โคโลนี (มม.)	Growth inhibition (%)	จำนวนสปอร์ ( $\times 10^7$ สปอร์/มล.)	Spore inhibition (%)	ED <sub>50</sub> (ppm)
Hexane	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.60 $\pm$ 0.09	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.54 $\pm$ 0.03	0.50	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.48 $\pm$ 0.02	0.92	
	100	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.41 $\pm$ 0.05	1.55	
	500	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.07 $\pm$ 0.01	4.22	
	1000	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	11.86 $\pm$ 0.12	5.88	
Ethyl acetate	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.60 $\pm$ 0.09	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.56 $\pm$ 0.02	0.32	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.44 $\pm$ 0.09	1.27	
	100	48.11 $\pm$ 0.17	3.78	12.15 $\pm$ 0.07	3.59	
	500	47.20 $\pm$ 0.08	5.60	11.79 $\pm$ 0.04	6.41	
	1000	46.58 $\pm$ 0.24	6.85	11.09 $\pm$ 0.01	12.01	
Methanol	0	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.60 $\pm$ 0.09	0.00	-
	10	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.54 $\pm$ 0.02	0.45	
	50	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.50 $\pm$ 0.03	0.81	
	100	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.36 $\pm$ 0.05	1.88	
	500	50.00 $\pm$ 0.00	0.00	12.07 $\pm$ 0.03	4.20	
	1000	48.63 $\pm$ 0.30	2.74	11.51 $\pm$ 0.02	8.69	

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



รูปที่ 4.17 สารสกัดยับยั้ง hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *N. fennellae* CHA03-A11 ต่อการควบคุมเชื้อ *F. oxysporum* BAFC-01



รูปที่ 4.18 สารสกัดยับยั้ง hexane, ethyl acetate และ methanol จากเชื้อ *T. trachyspermus* AWP08-01 ต่อการควบคุมเชื้อ *C. musae* BACM-09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 ผลการวิเคราะห์สารสำคัญด้วย Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

เมื่อทำการวิเคราะห์สารสำคัญด้วยเครื่อง GC-MS จากสารสกัดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมเชื้อราก่อโรคทั้งสองชนิด คือ สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จาก *N. fennelliae* CHA03-A11 ที่สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคตายพรายได้ดีที่สุด และสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จาก *T. trachyspermus* AWP08-01 โรคแอนแทรกโนสได้ดีที่สุด พบสารสำคัญดังตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 แสดงสารสำคัญที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS ได้จากสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จาก *N. fennelliae* CHA03-A11 และ *T. trachyspermus* AWP08-01

สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จาก <i>N. fennelliae</i> CHA03-A11		สารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จาก <i>T. trachyspermus</i> AWP08-01	
ชนิดสารสำคัญ	ปริมาณ (%)	ชนิดสารสำคัญ	ปริมาณ (%)
Octadecanoic acid	34.46	Benzoic acid	28.51
Hexadecanoic acid	16.87	Hexadecanoic acid	11.69
9-Octadecanoic acid	16.62	Heptadecene	10.36
Benzoic acid	6.99	Linoleic acid	7.80

Benzoic acid เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารกันบูด หรือใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งมีรายงานวิจัยที่ใช้ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคต่าง ๆ ริชชารวรรณ (2550) รายงานถึงการ ใช้ Benzoic acid ที่นำมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae* และ *Phytophthora parasitica* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังมีรายงานถึงการ ใช้สาร Hexadecanoic acid หรือ Plamitic acid ในการควบคุมเชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคเน่าในมะนาวได้ (ธนัชชา และคณะ, 2547) นอกจากนี้ เดชฮวบ และคณะ (2550) รายงานว่าพบสาร Hexadecanoic acid ในสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ได้ มีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 5873.37 ppm และยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum* มีค่า ED<sub>50</sub> เท่ากับ 9281.37 ppm จึงคาดว่าสาร Benzoic acid และ Hexadecanoic acid ที่พบในสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จาก *N. fennelliae* CHA03-A11 และ *T. trachyspermus* AWP08-01 เป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* และ *C. musae* ได้

## บทที่ 5

### สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการคัดแยกเชื้อราก่อโรคในกล้วยน้ำว้ามะลิอ่อน โดยเฉพาะโรคที่เกิดในช่วงก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว คือ โรคตายพราย และโรคแอนแทรกโนส ในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรีและจังหวัดใกล้เคียง จากตัวอย่างโรคตายพรายทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยสังเกตอาการของโรคที่จะสังเกตเห็นลักษณะใบเหี่ยว เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง สามารถคัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต เชื้อราจะมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน จะเห็นบริเวณกลางโคโลนีเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีม่วงหรือม่วงแดง สามารถสร้างสปอร์ได้ 3 ลักษณะ คือ macroconidia มีรูปร่างรี ยาว ส่วนปลายทั้ง 2 ด้านโค้งงอคล้ายเคียว microconidia รูปร่างรี คล้ายไต และ chlamydo-spore รูปร่างกลม เกิดตรงกลางหรือปลายของเส้นใย ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และตัวอย่างโรคแอนแทรกโนส 10 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต เชื้อราจะมีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาวถึงเทา เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ตรงกลางโคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีส้ม เมื่อเพาะเลี้ยงต่อจนถึงวันที่ 5-7 จะสังเกตเห็นเม็ดน้ำส้ม ซึ่งเป็นกลุ่มของสปอร์ที่รวมตัวกันบนเส้นใย สปอร์มีรูปร่างรี ยาว ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum musae* และจากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่ามีขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อราสาเหตุโรคตายพรายเท่ากับ 544 คู่เบส และขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสเท่ากับ 575 คู่เบส และเมื่อทำการบ่งชี้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ เชื้อรา *Fusarium oxysporum* และเชื้อรา *Colletotrichum musae* ตามลำดับ จากนั้นทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด พบว่า เชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01 และเชื้อรา *C. musae* BACM-09 สามารถก่อโรคได้รุนแรงที่สุด

เมื่อคัดแยกเชื้อราต่อต้านจากดินบริเวณจังหวัดสุพรรณบุรี และจังหวัดกาญจนบุรี จากตัวอย่างดินทั้งหมด ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างดินที่สามารถแยกเชื้อราได้ 9 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างดินบริเวณอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี 6 ตัวอย่าง และอำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี 3 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกและบ่งชี้เชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลต แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มจากลักษณะของสปอร์ ได้แก่ เชื้อรา *Talaromyces* และเชื้อรา *Neosartorya* และจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ  $\beta$ -tubulin ด้วยไพรเมอร์ Bt2a และ Bt2b สามารถใช้ในการระบุสกุลของเชื้อราได้ 6 สปีชีส์ คือ *T. muroii*, *T. macrosporus*, *T. trachyspermus*, *N. tatenoi*, *N. quadricinota* และ *N. spinosa* และทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราต่อต้านที่มีต่อเชื้อราก่อโรคในกล้วยทั้ง 2 ชนิดในสภาพห้องปฏิบัติการด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลต *T. trachyspermus* AWP08-01 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* AFC-01 ได้ดีที่สุดที่ 62.25 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อราไอโซเลต *N. fenneliae* CHA03-A11 สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *C. musae* BACM-09 ได้ดีที่สุดที่ 55.64 เปอร์เซ็นต์ และจากการนำสารสกัดหยาบชั้นของตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol ของเชื้อราต่อต้าน *T. trachyspermus* AWP08-01,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*T. macrosporus* AWP11-01 และ *N. fenneliae* CHA03-A11 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคโรครทั้ง 2 ชนิด บนอาหาร PDA ที่ผสมสารสกัดหยาบชั้น hexane, ethyl acetate และ methanol ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 500 และ 1000 ppm พบว่าสารสกัดหยาบในทุกชั้นของตัวทำละลายที่ระดับความเข้มข้น 1000 ppm ของเชื้อราต่อต้านทั้ง 3 ไอโซเลต ไม่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* BAFC-01 ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่มีเพียงสารสกัดหยาบชั้น ethyl acetate จาก *T. trachyspermus* AWP08-01 ที่สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของ *C. musae* BACM-09 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 969.37 ppm เมื่อวิเคราะห์สารสำคัญของสารสกัดหยาบที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด 2 ชนิด พบสาร Octadecanoic acid, Hexadecanoic acid, 9-Octadecanoic acid และ Benzoic acid ที่คาดว่าสามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคได้ ซึ่งสามารถนำไปศึกษาและพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นสารในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคในกล้วยทั้ง 2 ชนิดได้ ทั้งการใช้เชื้อราต่อต้านโดยตรงและการใช้สารที่สกัดได้จากเชื้อราต่อต้านโดยนำไปทดสอบในสภาวะเพาะปลูกกล้วยในสภาพธรรมชาติต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- คณะทำงานพยากรณ์และเตือนภัยศัตรูพืช กรมวิชาการเกษตร. 2559. “ข้อมูลเตือนภัยการเกษตร”. กรมวิชาการการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 2552. “การควบคุมโรคตายพรายของกล้วย”. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นัฐวุฒิ ใฝ่ผาด สมจิตต์ สุพรรณทัศน์ 1, อีรพัฒน์ สุทธิประภา. 2557. “ผลจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชของเกษตรกรผู้ปลูกข้าวต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดกาฬสินธุ์”. *แก่นเกษตร*. 42 (3): 301-310.
- ทศพร ทองเที่ยง. 2535. “โรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของกล้วยหอมที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx และการควบคุมโรคเพื่อการส่งออก”. สาขาโรคพืชมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธิดา เดชฮวบ, เลขา มาโนช, นิพนธ์ วิสารทานนท์, จิระเดช แจ่มสว่าง, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, เสถียรพงศ์ โตอนันต์ และ อเนก กิจจา. 2550. “ความหลากหลายของรา *Talaromyces* จากดินและผลต่อราสาเหตุโรคพืชในห้องปฏิบัติการ.” หน้า 563-570. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาพืช**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เมอมร สร้อยทอง. 2558. “การคัดแยกและบ่งชี้ของเชื้อราสกุล *Talaromyces* และ *Neosartorya* จากดินและประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสในกาแฟ”. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- รุ่งโรจน์ และคณะ. 2552. “การควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* โดยชีววิธีด้วยเชื้อรา *Trichoderma* sp. ในระดับห้องปฏิบัติการ”. ใน **การสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2552**. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- เลขา มาโนช, อรุมา เพี้ยชัย, ธิดา เดชฮวบ, จิตรา เกาะแก้ว, อานาจ เอี่ยมวิจารณ์, มะโนรัตน์ สุดสงวน, วิรัตน์ ลิ้มธนาพานิชย์, เสียงแจ้ว พิริยพลนต์ และ สุวรรณภา กลิ่นภู. 2553. “ความหลากหลายของรา *Emericella*, *Eurotium* และ *Neosartorya* จากดิน.” หน้า 635-642. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: สาขาพืช**. กรุงเทพฯ :มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิพรพรรณ เนื่องเม็ก และ วรุณี อ้ายดวง. 2560. “การทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของแคนตาลูป”. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 68(6): 42-55.
- สาคร ศรีมุข. 2556. “ผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรของประเทศไทย (The impact of the use of agricultural chemicals in Thailand)”. บทความวิชาการการเกษตร สำนักวิชาการ สำนักงานเลขาธิการวุฒิสภา.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. “แนวยกเครื่องพัฒนาโลจิสติกส์ ดันกล้วยไทยบุกตลาดซี้ทิศทางออเดอร์ส่งออกยังสดใสในตลาดโลก”. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2555. “ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* สาเหตุของโรคตายพรายของกล้วยในประเทศไทย”. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อภิรัชต์ สมฤทธิ์พัฒนา สนธิรัตน์, นิยม ไช่มุกข์ และธารทิพย์ ภาสบุตร. 2556. “การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรคตายพรายของกล้วย น้ำว่าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* ในสภาพแปลงปลูก”. หน้า 1445-1557 ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปีกลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- Alizadeh, A., Javan-Nikkhah, M., Zare, R., Fotouhifar, K.B., Damm, U., and Stukenbrock, E.H. 2015. “New records of *Colletotrichum* species for the mycobiota of Iran.” *Mycologia Iranica*. 2(2): 94-108.
- Boonsang, N. Dethoup, T. Singburadom, N. Gomes, N.G.M. and Kijjo, A. 2014. “*In vitro* antifungal activity screening of crude extracts of soil fungi against plant pathogenic fungi.” *Journal of Biopesticides*. 7(2): 156-166.
- Deltoura, B., Franaa, S.C., Pereirab, O.L., Cardosoc, I., Debodee, J. and Hoftea, M. 2017. “Disease suppressiveness to *Fusarium* wilt of banana in an agroforestry system: Influence of soil characteristics and plant community.” *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 239: 173-181.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. “A rapid dna isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.” *Phytochemical Bulletin*. 19(1): 11-15.
- Eamvijarn, A., Manoch, L., Visarathanonth, N. and Chamsawarn, C. 2009. Diversity of *Neosartorya* species from soil and *In vitro* antagonistic test against plant pathogenic fungi. p. 54 in **Abstracts Book of Asian Mycological Congress 2009 & 11th International Marine and 8 Freshwater Mycology Symposium** National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan
- Gomes, N.M. Bessa, L.J. Buttachon, S. Costa, P.M. Buaruang, J. Dethoup, T. Silva A.M.S. and Kijjoa, A. 2014. “Antibacterial and antibiofilm activities of *Tryptoquivalines* and *Meroditerpenes* isolated from the marine-derived fungi *Neosartorya paulistensis*, *N. laciniosa*, *N. tsunodae*, and the soil fungi *N. fischeri* and *N. siamensis*.” *Marine Drugs*. 12: 822-839.
- Hong, S.B., Cho, H.S., Shin, H.D., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. 2006. “Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 477-486.
- Hubka, V. and Kolarik, M. 2012. “ $\beta$ -tubulin paralogue *tubC* is frequently misidentified as the *benA* gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences.” *Persoonia*. 29: 1-10.

- Khan, S.H., Aked, J. and Magan, N. 2001. "Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil." *Plant Pathology*. 50: 601-608.
- Kidane, E.G. 2008. "Management of fusarium wilt diseases using non-pathogenic *Fusarium oxysporum* and silicon." School of Agricultural Sciences and Agribusiness University of KwaZulu-Natal, South Africa
- Madi, L. Katan, T. Katan, J. and Henis, Y. 1997. "Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms." *Journal of Phytopathology*. 87: 1054-1060.
- Mehdi, M. 2010. "Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating." *Crop Protection*. 29 (10): 1136-1141
- Maryani, N., Lombard, L., Poerba, Y.S., Subandiyah, S., Crous, P.S. and Kema, G.H.J. 2019. "Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin". *Studies in Mycology*. 92: 155-194.
- Mengane, S.K. and Kamble, S.S. 2014. "Bioefficacy of plant extracts on *Fusarium oxysporum* f.sp.*cubense* causing panama wilt of banana." *IJPBS*. 4(3): 24-27.
- Naraghi, L., Heydari, A., Rezaee, S., Razavi, M. and Afshari-Azad, H. 2010. "Biological control of *Verticillium* wilt of greenhouse cucumber by *Talaromyces flavus*." *Phytopathol*. 49: 471-477.
- Naraghi, L., Heydari, A., Rezaee, S. and Razavi, M. 2012. "Biocontrol agent *Talaromyces flavus* stimulates the growth of cotton and potato." *Plant Growth Regul*. 31: 471-477.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. "*Fusarium* species." *An Illustrated Manual for Identification*. U.S.A.: The Pennsylvania State University
- Peterson, S.W. 2008. "Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci." *Mycologia*. 100: 205-226.
- Ploetz, R.C. 2005. "Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*". *Phytopathology*." 96 (6): 653-655.
- Photita, W., Taylor, P.W.J., Ford, R., Hyde, K.D. and Lumyong, S. (2005). "Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand." *Fungal Diversity*. 18: 117-133.
- Poemim, S., Tongkantom, K., Jabamrung, P., Bo-kaew, O. and Soyong, M. 2016. "Isolation, characterization and screening for anticancer and antimicrobial properties of the crude extract from genus *Neosartorya*." *Bioengineering and Bioscience*. 4(5): 71-75.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Purwati, R.D., Harran, S. and Sudarson, O. 2007. "In vitro selection of abaca for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*." *Journal of Biosciences*. 14(2): 65-70.
- Samson, R. A. Hong, S. Peterson, S. W. Frisvad, J. C. and Varga, J. 2007. "Polyphasictaxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Nosartorya*." *Studies in Mycology*. 59: 147-203.
- Soytong, M. and Poeaim, S. 2015. "Antifungal activity of *Talaromyces muroii* against coffee anthracnose." *Journal of Agricultural Technology*. 11(8): 1941-1948.
- Suksiri, S., Laipasu, P., Soyong, K. and Poeaim, S. 2018. "Isolation and identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from durian orchard in Chumphon province, Thailand." *International Journal of Agricultural Technology*. 14(3): 389-402.
- Thangavelu, R. Sundararaju, S. and Sathiamoorthy, S. 2004. "Management of anthracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae* using plant extracts." *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 79(4): 664-666.
- Thangavelu, R., Muthu Kumar, K., Ganga Devi, P. and Mustaffa, M. M. 2015. "Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* isolates (Foc) of India by inter simple sequence repeats (ISSR) analysis". *Molecular Biotechnology*. 51: 203-211.
- Tjamos, E.C. and Fravel, D.R. 1997. "Distribution and establishment of the biocontrol *Talaromyces flavus* in soil and on roots of solanaceous crops". *Crop Protection*. 16(2): 135-139.
- White, T.J. Bruns, T. Lee, S. and Taylor, J. 1990. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press.
- Wu, Y., Yi, G., Peng, X.X., Huang, B.Z., Liu, E. and Zhang, J.J. 2013. "Systemic acquired resistance in *Cavendish* banana induced by infection with an incompatible strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*." *Journal of Plant Physiology*. 170: 1039-1046.
- Yaguchi, T., Matsuzawa, T., Tanaka, R., Abliz, P., Hui, Y. and Horie, Y. 2010. "Two new species of *Neosartorya* isolated from soil in Xinjiang, China." *Mycoscience*. 51: 253-262.
- Yilmaz, N., Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C. and Samson, R.A. 2014. "Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*." *Studies in Mycology*. 78: 175-341.

- Zheng, S.J., Fernando, A., Bastidas, G., Li, X.D., Zeng, L., Bai, T.T., Xu, S.T., Yin, K.S., Li, H.X., Fu, G., Yu, Y. C. and Yang, L. 2018. "New geographical insights of the latest expansion of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 into the greater mekong subregion." *Front. Plant Sci.* 9: 1-9.
- Zhu, X., Lin, H., Si, Z., Xia, Y., Chen, W. and Li, X. 2015. "Benzothiadiazole-Mediated induced resistance to *Colletotrichum musae* and delayed ripening of harvested banana fruit." *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 64 (7): 1494-1502.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato dextrose broth สำเร็จรูป 24.0 กรัม

Agar 15.0 กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

หรือ

มันฝรั่งหั่นขนาด 1 x 1 เซนติเมตร 200.0 กรัม

Agar 15.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที กรองเอากากมันฝรั่งออก ปรับปริมาตรน้ำต้มมันฝรั่งให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### Water Agar (WA)

Agar 15.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### Malt Extract Agar + 40% sucrose

Malt Extract Agar สำเร็จรูป 50.0 กรัม

น้ำตาลทราย 400.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## ภาคผนวก ข

### 1. การเตรียมสารละลาย

#### 1.1 2X CTAB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ชั่ง CTAB 2 กรัม PVP 1 กรัม NaCl 0.4 กรัม จากนั้นเติม EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 4 มิลลิลิตร และ 1 โมลาร์ Tris-HCl จำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งหมดในบีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยอาจใช้ความร้อนเพื่อช่วยให้สารละลายได้ดีมากขึ้น และปรับปริมาตร ด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

#### 1.2 10% CTAB (ใน 0.7M NaCl) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เตรียม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ (จาก stock) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เติมน้ำ 43 มิลลิลิตร ชั่งสาร CTAB 5 กรัม ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้อง

#### 1.3 0.5M EDTA (pH8) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ชั่ง EDTA 93.06 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จนสารละลายเป็น เนื้อเดียวกัน ทำการปรับ pH ให้เท่ากับ 8 แล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 15 นาที

#### 1.4 10X Tris-borate EDTA buffer (TBE buffer) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 108 กรัม Boric acid 61.83 กรัม และ EDTA 9.305 กรัม นำสารที่ชั่งมา ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจน ครบ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และถ้าต้องการเตรียม 1X TBE buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เพื่อ ใช้งาน ให้ดูดสารละลาย 10X TBE มา 50 มิลลิลิตร แล้วใช้น้ำกลั่นปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

#### 1.5 1M Tris-HCl (pH8) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris 121 กรัม เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 8 ด้วย 1 โมลาร์ HCl จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### 1.6 10 mM TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

เตรียม 1 โมลาร์ Tris-HCl (pH8) มาปริมาตร 10 มิลลิลิตร และดูด 0.5 โมลาร์ EDTA (pH8) มาปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และถ้า ต้องการเตรียม 0.1 มิลลิโมลาร์ TE Buffer ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ต้องดูดสารจาก 10 มิลลิโมลาร์ TE Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรเป็น 40 มิลลิลิตร

---

## Biological control of anthracnose disease on banana var 'Namwa Mali-Ong' by *Neosartorya* species

---

Pattarasaikul, W.<sup>1</sup>, Soyong, 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, Ladkrabang, Bangkok, Thailand; <sup>2</sup>Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Pattarasaikul, W., Soyong, K. and Poeiam, 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.

**Abstract** The anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae* on banana was controlled by biological control agents. Seven isolates of *C. musae* were collected from banana growing area in Suphanburi, Nakhonpathom, Ratchaburi and Nonthaburi province, Thailand. Pathogenicity was tested on fresh banana, and proved that isolates CMDC-01 and CMNM-01 were most aggressive isolates. These isolates were molecular phylogeny confirmed species. *In vitro* test was done by dual culture technique, two isolates of pathogen were tested against ten isolates of antagonistic fungi (*Neosartorya hiratsukae*, *N. pseudofischeri*, *N. aureola*, *N. spinosa*, *N. fennelliae*, *Talaromyces muroii* and *T. trachyspermus*). The result showed the best antagonistic isolate was *N. pseudofischeri* EU13 which inhibited *C. musae* CMDC-01 of 51.23% and *N. fennelliae* CHA03-A11 inhibited *C. musae* CMNM-01 of 59.85%.

**Keywords:** Biological control, Anthracnose, 'Namwa Mali-Ong' banana, *Neosartorya* and *Talaromyces*

### Introduction

Most of the people in Thailand are farmers. So, the agricultural industry especially, the fruit and vegetable industry are important business that contributes to the economy. However, agricultural production is severely damaged by pests and plant diseases. In particular, plant diseases caused by fungi can quickly and severely damaged crops. Farmers are used chemicals for their control because chemicals are easier, faster and more effective to control the diseases (Mari *et al.*, 2009; Schirra *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2015).

Anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*, is one of disease that damages the banana. The pathogen is infested with unripe banana showing green and signs when the fruits is riped it become yellow. Symptoms of the disease are more severe as the fruit ripens because of the amount of sugar.

---

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

Lesions are small sunken black spots and extended wide. The size and shape of the lesion is uncertain. In optimum condition, orange spots are visible on the lesion. The farmers often use chemicals such as thiabendazole, carbendazim and prochloraz sprayed or coated at the surface of banana fruit to inhibit the growth of pathogen. But excessive use of chemicals negatively affects the environment, farmers and toxic residue in the product (Khan *et al.*, 2001; Mehdi, 2010; Alizadeh *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015).

The disease can be controlled without using chemical fungicides that has been reported as biological control. Recently, the successful measure has been achieved using antagonistic microorganism to control plant disease. There are many researches reported that in the biocontrol activity of antagonistic microorganism such as competition for space and nutrient, activation of host defenses, and production of substance to inhibit the pathogens (Soytong and Quimio, 1992). Many researches reported that using antagonistic fungus to control anthracnose disease in various fruits such as *Neosartorya fischeri*, *N. glabra*, *N. hiratsukae*, *N. takakii*, and *N. tatenoi* to control anthracnose disease in chilli caused by *Colletotrichum capsici* (Eamvijarn *et al.*, 2009). *Talaromyces trachyspermus* EU09 and *T. muroii* EU04 can inhibit growth of *C. coffeanum* cause of anthracnose disease in coffee (Soytong and Poaim, 2015). The objective was to isolate *Colletotrichum musae* from banana growing area in Suphanburi, Nakhonpathom, Ratchaburi and Nonthaburi province, Thailand. The pathogen was isolated, morphological and molecular phylogenetic confirmation. The potent antagonistic fungi *Neosartorya* and *Talaromyces* were tested to control the anthracnose pathogen.

## **Materials and methods**

### ***Isolation and identification of fungal pathogens***

*Colletotrichum musae* was isolated from anthracnose lesions of banana fruits by tissue transplanting technique. Banana fruits with disease symptoms were collected from growing banana area in Suphanburi, Nakhonpathom, Ratchaburi and Nonthaburi province, Thailand. Infected areas were washed with sterile distilled water, cut to 5 mm diameter and surface sterilized with 1% sodium hypochlorite for 30 second and washed three times with sterile distilled water. The washed tissue was transferred to Potato Dextrose Agar (PDA) and incubated at room temperature. After incubation, cut the fungal hyphal tip from infected tissue transferred to new PDA and purified by transferred single spore to new PDA. Identify species of pathogen isolates by morphological observation and molecular data (Sutton, 1992; Nuangmek *et al.*, 2008; Ismet *et al.*, 2012).

The pathogens were identified by morphological observation on character of lesion on fruits, colony, conidiomata, shape and size of conidia followed by Alizadeh *et al.* (2015). The pathogens were confirmed species by molecular data, dna extraction was modified the CTAB protocol from Doyle and Doyle (1990) and Suksiri (2018). The DNA templates were performed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region and amplified by polymerase chain reaction (PCR) which modify the condition followed by White *et al.* (1990). The PCR products were performed to sequencing analysis by Bioneer Company, Korea. The sequences were identified species by aligning the sequence from database of National Center for Biotechnology Information (NCBI) using Basic Local Alignment Search Tools (BLAST).

### ***Pathogenicity test***

Pathogenicity test modified from Ismet *et al.* (2012), was done on healthy green 'Namwa Mali-Ong var.' banana fruits. Fruits were surface sterilized with sterile distilled water and four wounds were made on fruits by needle. The mycelium plug was corked by 0.5 mm diameter of cork borer and placed on each wound, use pure PDA plug for control. Three replications were made in each treatment (Figure 2A). The inoculated fruits were incubated in moisture chamber at room temperature for 5 days. *C. musae* was reisolated to PDA for further experiment.

### ***Antagonist fungus***

*Neosartorya* and *Talaromyces* are soil-brone fungi, isolated by soil dilution technique, heat treatment and alcohol treatment from soil. Species of antagonistic isolates were identified by morphological and molecular data. Ten isolates of *Neosartorya* and *Talaromyces* were offered by Mayamor Soyong, Supanan Suksiri and Supattra Poearim which deposited in our laboratory. Antagonistic isolate *Neosartorya hiratsukae* EU06, *Talaromyces muroii* EU07, *N. pseudofischeri* EU13, *T. muroii* EU18, *T. trachyspermus* EU23 and *Neosartorya* sp. EU35, were isolated from Chiangmai province, Thailand. *N. aureola* CHA01-A01, *T. muroii* CHA03-A03, *N. fenneliae* CHA03-A11 and *N. spinosa* CHA09-A01, were isolated from Chumpon province, Thailand.

### ***Dual culture***

The isolates of antagonistic fungi were selected from *in vitro* test by dual culture technique (Nuangmek *et al.*, 2008; Sakunyarak and Satithorn, 2014). The mycelium plugs, 0.5 mm diameter of *C. musae* from colony incubated at

25°C for 10 days were dual culture with 0.5 mm diameter mycelium plug of antagonist isolates. The distance between pathogen and antagonist were approximately 4.5 cm. Four replications were made for each treatment. Dual culture plates were incubated at 25°C for 25 days. After incubation, colony of *C. musae* was measured and compared with control. The percentage of growth inhibition (GI) was calculated by using the equation (1). Data were statistical analysed and means were compared by Duncan Multiple Range Test (DMRT) at *p*-values less than 0.05 significantly level.

$$GI (\%) = [(A - B)/A] \times 100 \quad (1)$$

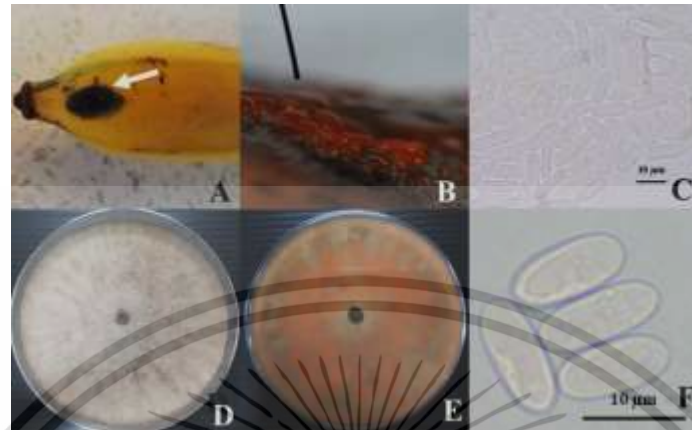
(A) *C. musae* colony in control plate, (B) *C. musae* colony in treatment plate

## Results

### *Isolation and identification of pathogen*

Seven 'Namwa Mali-Ong var.' banana samples were collected from Suphanburi, Nakhonpathom, Ratchaburi and Nonthaburi province, Thailand. The pathogen was isolated from anthracnose lesion (Figure 1A). Banana samples were isolated and yielded seven isolates of CMKP-01, CMKP-02, CMKP-03, CMNM-01, CMRM-01, CMNS-01 and CMDC-01. All isolates were identified by mycelium and colony morphology, conidia shape and size and development of conidiomata which observed after 10 days incubation at room temperature. The morphological characteristics of *C. musae* isolate CMDC-01 which is shown in Figure 1. All isolates were produced orange conidiomata on the lesions after 3 days incubation in moisture chamber (Figure 1B). The colony were white mycelium and turned to pinkish orange in color with age (Figure 1D and 1E). Conidia were hyaline cylindrical shape, size of conidia ranged from 3.45-5.32 × 10.12-14.60 μm (Figure 1C and 1F). All of seven isolates were morphologically identified as *Colletotrichum musae*.

The DNA sequences of each isolate was amplified with ITS regions. PCR product were sequenced and compared with *C. musae* sequences in NCBI databases. The nucleotide sequences were identified as *C. musae* based on molecular analysis and confirmed with morphological identification. BLAST analysis of all isolates complied with 99% identity with reference of *C. musae* accession number AJ301904, JN121212, NR120132 and JN943076 in Genbank database.



**Figure 1.** Morphological characters of *C. musae* isolate CMDC-01, (A) lesion on banana fruit, (B) conidiomata, (C and F) conidia and (D and E) colony on PDA after 10 days incubation

### **Pathogenicity test**

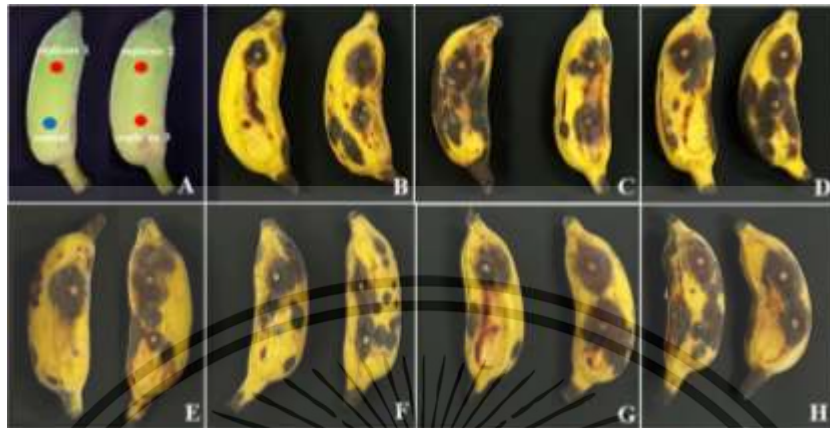
Pathogenicity test was confirmed the pathogenic isolates which tested on ‘Namwa Mali-Ong var.’ banana fruits. The fruits were inoculated by *C. musae* isolate CMKP-01, CMKP-02, CMKP-03, CMNM-01, CMRM-01 CMNS-01 and CMDC-01. The fruits were showed symptoms of anthracnose after 3-5 days incubation in moisture chamber. Lesions were black, oval and sunken. After that, the lesions showed white mycelium and produced orange color of conidial masses (Figure 2B-2H). *C. musae* isolates of CMNM-01 and CMDC-01 made a largest lesion on fruits which were  $24.18 \pm 0.98 \times 33.81 \pm 2.96$  mm and  $23.46 \pm 2.24 \times 30.66 \pm 3.32$  mm, respectively. However, there was no significantly different in lesions on fruits which inoculated CMNM-01 and CMDC-01 isolates, the lesions were 817.36 and 719.21 mm<sup>2</sup>, respectively (Table 1).

**Table 1.** Lesion areas on ‘Namwa Mali-Ong’ banana fruits inoculated with seven isolates of *C. musae* after 5 days of incubation

Isolates	Lesion		
	Width (mm)*	Length (mm)*	Area (mm <sup>2</sup> )
CMKP-01	16.57±3.34	24.35±4.09	403.45 <sup>c</sup>
CMKP-02	17.60±1.72	27.21±0.90	478.86 <sup>c</sup>
CMKP-03	18.02±1.99	26.19±2.59	471.97 <sup>c</sup>
CMNM-01	24.18±0.98	33.81±2.96	817.36 <sup>a</sup>
CMRM-01	15.41±2.48	28.81±2.25	443.81 <sup>c</sup>
CMNS-01	17.75±0.56	32.56±2.74	577.88 <sup>bc</sup>
CMDC-01	23.46±2.24	30.66±3.32	719.21 <sup>a</sup>

\*Values expressed are mean ± SE

a-c means with different letters in the same column were significantly by ANOVA at P<0.05



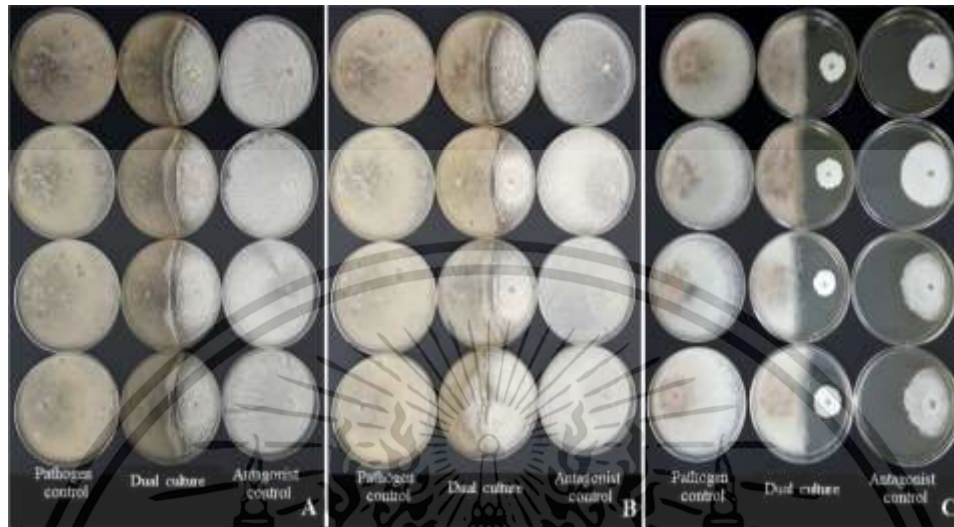
**Figure 2.** Lesion areas on banana fruits after pathogenicity test by isolates of *C. musae* (A) set of treatment in three replicates ● and control ●, (B) CMKP-01, (C) CMKP-02, (D) CMKP-03, (E) CMNS-01, (F) CMRM-01, (G) CMNM-01 and (H) CMDC-01

#### *Effect of antagonist to control C. musae by dual culture test*

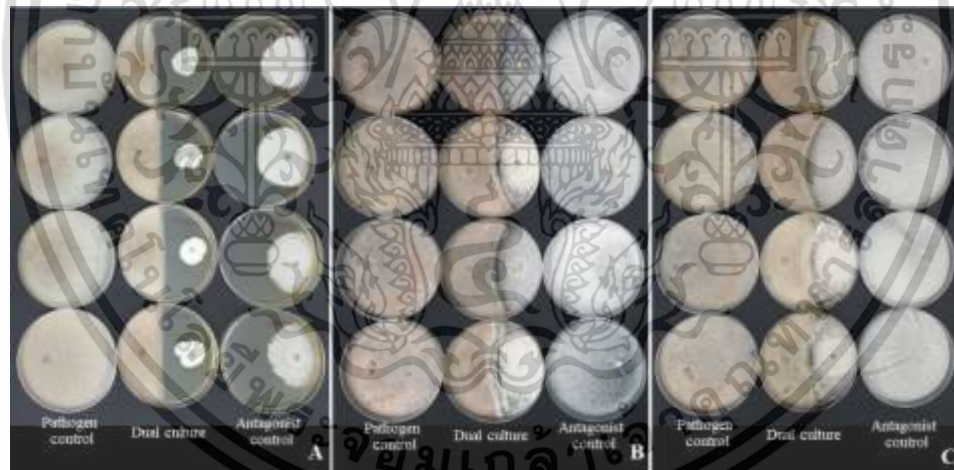
The isolates CMNM-01 and CMDC-01 proved to be aggressive pathogenic isolates to banana. Dual culture was tested with ten antagonistic isolates. The colony diameter was measured after 20 days incubation. Result showed that antagonistic isolates EU13, EU06 and CHA03-A11 were strongly inhibited *C. musae* CMDC-01 of 51.23, 47.32 and 46.62%, respectively (Figure 3). The antagonistic isolates of CHA03-A03, EU06 and EU13 showed the highest effective isolates to control *C. musae* CMNM-01 which were 59.85, 50.33 and 46.92%, respectively (Figure 4, Table 2).

**Table 2.** Dual culture test of antagonistic fungi and pathogen

Isolates of antagonist	<i>C. musae</i> CMDC-01		<i>C. musae</i> CMNM-01	
	Colony diameter (mm)	Growth inhibition (%)	Colony radius (mm)	Growth inhibition (%)
Control	45.00	0.00	45.00	0.00
EU06	23.71	47.32	22.35	50.33
EU07	28.88	35.82	30.33	32.59
EU13	21.94	51.23	23.89	46.92
EU18	30.63	31.94	29.71	33.98
EU23	37.01	17.76	35.53	21.05
EU35	27.00	40.01	29.60	34.21
CHA01-A01	25.36	43.65	27.91	37.97
CHA03-A03	29.06	35.42	29.38	34.71
CHA03-A11	24.02	46.62	18.07	59.85
CHA09-A01	28.71	36.20	29.19	35.14



**Figure 3.** Antagonistic activity in dual culture test on PDA after 20 days incubation of *C. musae* CMDC-01 dual culture with (A) EU13, (B) EU06 and (C) CHA03-A11



**Figure 4.** Antagonistic activity in dual culture test on PDA after 20 days incubation of *C. musae* CMNM-01 dual culture with (A) CHA03-A11, (B) th EU06 and (C) EU13

## Discussion

Anthrachnose of banana caused by *C. musae* that isolated from symptom showing black and sunken lesions and covered with orange conidiomata (Thangamani *et al.*, 2011). All the seven isolates showed hyaline cylindrical

conidia. The conidia size ranged in  $3.45\text{-}5.32 \times 10.12\text{-}14.60 \mu\text{m}$  and there were made a lesion was black and sunken on pathogenicity test. These characters agreed with Mehdi *et.al.* (2010) and Alizadeh *et.al.* (2015) also reported in the conidia size as  $4.5\text{-}6 \times 9.5\text{-}15 \mu\text{m}$ . The other species of *Colletotrichum* was a different shape and size of conidia. The average spore size of *C. capsici* causing anthracnose in chilli was  $3.50 \times 21.00 \mu\text{m}$  and sickle-shaped (Ghosh *et al.*, 2016). *C. gloeosporioides* were isolated from various host and conidia size was  $3.5\text{-}6.0 \times 12\text{-}17 \mu\text{m}$ , cylindrical shaped.

In this study, the antagonistic isolates EU13, EU06 and CHA03-A11 were strongly inhibited *C. musae* CMDC-01 as 51.23, 47.32 and 46.62%, respectively. The antagonistic isolates CHA03-A03, EU06 and EU13 showed highest antifungal activity against *C. musae* CMNM-01 which were 59.85, 50.33 and 46.92%, respectively. The result revealed that *N. hiratsukae* EU06, *N. pseudofischeri* EU13 and *N. fennelliae* CHA03-A11 gave the good control of both of tested isolates. Isolates EU06 and EU13 were actively against tested pathogenic isolates. Similar result from previous reports confirmed *N. hiratsukae* were inhibited *Bipolaris maydis*, *C. capsici*, *C. gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* (Eamvijarm *et al.*, 2009). Crude ethyl acetate extract from *N. pseudofischeri* KUFA 0060 at 100 ppm was strongly inhibited *Phytophthora palmivora* and *C. capsici* (Boonsang *et al.*, 2014). The research finding, it is obviously showed that *N. hiratsukae* EU06, *N. pseudofischeri* EU13 and *N. fennelliae* CHA03-A11 reported as the new antagonists to control banana anthracnose caused by *C. musae*. This study was similar to the report of *Chaetomium* spp. effectively against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, stated that the control mechanism as antibiosis which produced *Chaetomium* produced antibiotic substance eg. chaetoglobocin-c to kill the pathogen cells (Soytong *et al.*, 2001).

It is concluded that the biological control of banana anthracnose caused by *C. musae* using the effective antagonistic fungi. Isolates CMDC-01 and CMNM-01 were the highest pathogenic to infect the banana fruits. The antagonistic isolates *N. hiratsukae* EU06, *N. pseudofischeri* EU13 and *N. fennelliae* CHA03-A03 were strongly inhibited *C. musae* isolates CMDC-01 and CMNM-01.

## Acknowledgement

This work was financially supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL) (grant number A118-0261-010).

## References

- Alizadeh, A., JavanNikkhah, M., Zare, R., Fotouhifar, K. B., Damm, U. and Stukenbrock, E. H. (2015). New records of *Colletotrichum* species for the mycobiota of Iran. *Mycologia Iranica*. 2:94-108.
- Boonsang, N., Dethoup, T., Singburauodom, N., Gomes, N. G. M. and Kijjo, A. (2014). In vitro antifungal activity screening of crude extracts of soil fungi against plant pathogenic fungi. *Journal of Biopesticides*. 2:156-166.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.
- Eamvijarn, A., Manoch, L., Visarathanonth, N. and Chamsawarng, C. (2009). Diversity of *Neosartorya* species from soil and In vitro antagonistic test against plant pathogenic fungi. 11<sup>th</sup> International Marine and Freshwater Mycology Symposium. National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan, pp.54.
- Ghosh, R., Bhadra, S. and Bandyopadhyay, M. (2016) Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum capsici* causing leafspot of soybean. *Tropical Plant Research*. 3:481-490.
- Ismet, A., Rizwana, H., Al-Othman, M. R. and Bakir, M. A. (2012). Studies of actinomycetes for biological control of *Colletotrichum musae* pathogen during post harvest anthracnose of banana. *African Journal of Microbiology Research*. 17:3879-3886.
- Khan, S. H. (2001). Control of the anthracnose pathogen of banana (*Colletotrichum musae*) using antioxidants alone and in combination with thiabendazole or imazalil. *Plant Pathology*. 50:601-608.
- Mari, M.; Neri, F. and Bertolini, P. (2009). New approaches for postharvest disease control in Europe. *Postharvest Pathology*. 119-135.
- Mehdi, M. (2010). Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating. *Crop Protection*. 10:1136-1141.
- Nuangmek, W., McKenzie, E. H. C. and Lumyong, S. (2008). Endophytic fungi from wild banana (*Musa acuminata* Colla) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*. *Research Journal of Microbiology*. 5:368-2008.
- Sakunyarak, K. and Satithorn, W. (2014). Evaluation of antagonistic bacteria inhibitory to *Colletotrichum musae* on banana. *International Journal of Agricultural Technology*. 10:383-390.
- Schirra, M., D'Aquino, S., Cabras, P. and Angioni, A. (2011). Control of postharvest diseases of fruit by heat and fungicides: efficacy, residue levels, and residue persistence. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:8531-8542.
- Soytong, K. and Quimio, T. H. (1992). Antagonism of *Chaetomium cupreum* to *Pyricularia oryzae*. *Journal of Plant Protection in the Tropics*. 3:17-23.
- Soytong, K., Kanokmedhakul, S., Kukongviriyapa, V. and Isobe, M. (2001). Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article. *Fungal Diversity*. 7:1-15.
- Soytong, M. and Poaim, S. (2015). In vitro antagonism of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya pseudofischeri* against anthracnose disease in coffee. *Proceeding: the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology, Pattaya, Thailand*. 305-308 p.
- Suksiri, S., Laipasas, P., Soytong, K. and Poaim, 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.

- Sutton, B. C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum* control; Biology, Pathology and Control, Bailey, J. A. and M. J. (Eds.). CAB International, Wallingford, UK, pp.1-26.
- Thangamani, P.R., Kuppasamy, P., Peeran, M.F., Gandhi, K. and Raguchander, T. (2011). Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum musae* the causal organism of banana anthracnose. *World Journal of Agricultural Sciences*. 7:743-754.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press.
- Zhu, X., Lin, H., Si, Z., Xia, Y., Chen, W. and Li, X. (2015). Benzothiadiazole-Mediated induced resistance to *Colletotrichum musae* and delayed ripening of harvested banana fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 7:1494-1502.

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

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายวุฒิพงศ์ ภัทราศัยกุล  
วัน เดือน ปีเกิด 23 พฤศจิกายน พ.ศ. 2536  
ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 111 ซอนอ่อนนุช 76/1 แขวงประเวศ เขตประเวศ กรุงเทพฯ 10250  
ประวัติการศึกษา (2559) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกรตเฉลี่ย 2.85

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2562) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผลงานทางวิชาการ  
ปี 2561

Pattarasaiikul, W., Soyotong, K. and Poeiam, S. 2018. "Biological control of anthracnose disease on 'Namwa Mali-Ong' banana by *Neosartorya* species". *International Journal of Agricultural Technology*. 14(7): 1589-1598.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้