



การระบุชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyton* ในพื้นที่ภาคใต้
ของประเทศไทย และการนำไปใช้ควบคุมโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน
Identification of Genus *Annulohyphoxylon* and *Hypoxyton* in Southern
Thailand and Utilization for Controlling Leaf Spot Disease of
Oil Palm Seedlings

นีรชา หลิมนุกูล
Neeracha Limnukul

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การระบุชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon* ในพื้นที่ภาคใต้
ของประเทศไทย และการนำไปใช้ควบคุมโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน
Identification of Genus *Annulohyphoxylon* and *Hyphoxylon* in Southern
Thailand and Utilization for Controlling Leaf Spot Disease of
Oil Palm Seedlings

นীরชา หลิมนุกูล
Neeracha Limnukul

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนินันท์ พรสุริยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาว นีรชา หลิมนุกูล)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวนیرชา หลิมนุกุล)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การระบุชนิดของเชื้อราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> และ <i>Hypoxylon</i> ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย และการนำไปใช้ควบคุมโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน
ผู้เขียน	นางสาวนිරชา หลิมนุกูล
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

Annulohyphoxylon และ *Hypoxylon* ปัจจุบันเป็นเชื้อราในวงศ์ *Hypoxylaceae* ซึ่งแยกออกมาจากวงศ์ *Xylariaceae* ไฟลัม *Ascomycota* เป็นเชื้อราในกลุ่มผู้ย่อยสลายที่มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ รวมถึงการสร้างสารทุติยภูมิและเอนไซม์ที่มีประโยชน์ได้หลายชนิดในประเทศไทยโดยเฉพาะพื้นที่ภาคใต้มีการศึกษาเชื้อรากลุ่มนี้น้อย เนื่องจากเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความหลากหลายสูงและยากแก่การระบุชนิดโดยใช้ฐานฐานวิทยา ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เก็บรวบรวมเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon* ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ยกเว้น 3 จังหวัด ชายแดนภาคใต้ (ปัตตานี ยะลา และนราธิวาส) โดยเก็บตัวอย่างบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติสวนป่าปลุก รวมถึงพื้นที่สวนยาพารา ได้ทั้งสิ้น 146 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุล จำแนกเชื้อราได้ 15 ชนิด (เชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* 4 ชนิด เชื้อราสกุล *Hypoxylon* 11 ชนิด) ได้แก่ *A. moriforme*, *A. nitens*, *A. stygium*, *A. thailandicum*, *H. duranii*, *H. fendleri*, *H. griseobrunneum*, *H. haematostroma*, *H. hypomiltum*, *H. jaklitschii*, *H. lenormandii*, *H. macrocarpum*, *H. monticulosum*, *H. pilgerianum* และ *H. sublenormandii* และอีก 12 ตัวอย่าง ไม่สามารถจำแนกชนิดที่ชัดเจนได้ ในการศึกษาครั้งนี้มีเชื้อราที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 45 ไอโซเลท เมื่อทดสอบความสามารถในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยเทคนิค *dual culture* ได้ตัวอย่างเชื้อราที่มีประสิทธิภาพ 3 กลุ่ม กลุ่มแรกได้แก่ *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia oryzae* มากกว่า 70% กลุ่มที่สองมีการเจริญของเส้นใยคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *C. oryzae* ได้แก่ *A. nitens* (SKW11) และ *Hypoxylon* species C (STW04) กลุ่มที่สามเป็นเชื้อราที่ทำให้โคโลนีของเชื้อรา *C. oryzae* เกิดความผิดปกติที่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่าในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ *H. fendleri* (PJB04), *H. lenormandii* (CHPW03), *H. polyporoideum* (SKWPM02) และ *H. sublenormandii* (SKW30) นำเชื้อราทั้ง 3 กลุ่มมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและเซลลูเลส รวมถึงความสามารถในการสร้างสารระเหยยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค

พบว่าเชื้อรา *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) สามารถสร้างเอนไซม์โคติเนส เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อรา *C. oryzae* ได้นอกจากนี้ยังสร้างสารระเหยที่มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* ได้เช่นกัน จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตดังกล่าวต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* ได้ จึงทดสอบใช้เส้นใยแขวนลอยเชื้อราในการควบคุมโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพห้องทดลอง เนื่องจากเชื้อรา *A. moriforme* (SKW12) สร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่อาจมีผลต่อใบพืช จึงเลือกเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) ทดสอบด้วยวิธี detached leaf พบว่าเส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) ที่ความเข้มข้น 15% (w/v) มีระดับการเกิดโรคต่ำ (0.66) และให้ผลไม่แตกต่างกับระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ที่สูงกว่า ในขณะที่เส้นใยแขวนลอยเชื้อรา *A. stygium* (PTW09) มีการเจริญของเส้นใยปกคลุมทับใบปาล์มน้ำมันอย่างหนาแน่น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อพื้นที่การสังเคราะห์แสงของพืช จึงได้ใช้เส้นใยแขวนลอยเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) ที่ความเข้มข้น 15% (w/v) ทดสอบควบคุมโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพโรงเรือนเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ พบว่าเส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *C. oryzae* ในสภาพเรือนทดลองอยู่ในระดับต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ

Thesis Title	Identification of Genus <i>Annulohypoxylon</i> and <i>Hypoxylon</i> in Southern Thailand and Utilization for Controlling Leaf Spot Disease of Oil Palm Seedlings
Author	Miss Neeracha Limnukul
Major Program	Plant pathology
Academic Year	2019

ABSTRACT

Annulohypoxylon and *Hypoxylon* are fungal species currently belonging to the family *Hypoxylaceae* that separated from family *Xylariaceae* (Phylum *Ascomycota*). These fungal genera are the decomposers that play an important role in the ecosystem. They can produce many beneficial secondary metabolites and enzymes. In Southern Thailand, the study of these fungal genera are limited because they are high diversity and difficult to identify by morphological characteristics. Thus, in this study one hundred forty-six samples of *Annulohypoxylon* and *Hypoxylon* were collected from the nature trail, planted forest and rubber plantation in Southern Thailand except for three border provinces (Pattani, Yala and Narathiwat). All collected samples were identified based on morphological and molecular characterization. They were classified into 15 species (4 species of genus *Annulohypoxylon* and 11 species of genus *Hypoxylon*) namely *A. moriforme*, *A. nitens*, *A. stygium*, *A. thailandicum*, *H. duranii*, *H. fendleri*, *H. griseobrunneum*, *H. haematostroma*, *H. hypomiltum*, *H. jaklitschii*, *H. lenormandii*, *H. macrocarpum*, *H. monticulosum*, *H. pilgerianum* and *H. sublenormandii*. Besides, twelve species were undescribed. Forty-five culturable isolates were grown on PDA and tested for their antagonistic properties by dual culture technique. The results showed three efficacy groups of the fungi; the first group presented the percentage inhibition of *Curvularia oryzae* over 70% i.e. *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) and *A. stygium* (PTW09). The second group, mycelium grew rapidly and covered colony of *C. oryzae* i.e. *A. nitens* (SKW11) and *Hypoxylon* species C (STW04). The final group presented the colony abnormalities of *C. oryzae* i.e. *H. lenormandii* (CHPW03),

H. polyporoideum (SKWPM02), *H. sublenormandii* (SKW30) and *H. fendelri* (PJB04). After that, three groups of fungi were screened for the production of chitinase, cellulase, and volatile compound for inhibition the mycelial growth of *C. oryzae*. It was found that *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) and *A. stygium* (PTW09) could produce chitinase to degrade fungal cell wall and produced volatile organic compound to inhibit mycelial growth of *C. oryzae*. The culture filtrates of 3 selected isolates were tested for the inhibition ability against *C. oryzae*. The result showed that all culture filtrates were not inhibited the hyphal growth of *C. oryzae* in laboratory condition. Therefore, the mycelial suspension of *A. nitens* (PNGPW04) and *A. stygium* (PTW09) were tested for disease control on oil palm leaf by detached leaf technique. Fifteen percentage (w/v) of mycelial suspension of *A. nitens* (PNGPW04) showed a lower level of disease incidence (0.66) and not significantly different from the other high concentrations while the mycelial suspension of *A. stygium* (PTW09) covered oil palm leaf that may effected to photosynthesis. Therefore, the used of mycelial suspension to control leaf spot on oil palm seedlings was investigated. The mycelial suspension of *A. nitens* (PNGPW04) was low efficiency to control leaf spot disease when compared with mancozeb.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนินันท์ พรสุริยา อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สายทอง แก้วฉาย ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.อนุรักษ์ สันป่าเป้า และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญชนก ไชยรินทร์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความกรุณาแนะแนวทาง คำปรึกษาอันเป็นประโยชน์ต่อการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ทุนโครงการเรียนดี คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นริศ ท้าวจันทร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสุทธิ์ สิทธิฉายา และดร.ณัฐพัชร์ ศรีหะนัล ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแนะนำแนวทางอันเกิด ประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ พีตกร.กนกอร วุฒิวงศ์ และพีตกร.จิตรา กิตติโมรากุล ที่กรุณาให้คำปรึกษา ตลอดจนช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ขอขอบคุณบุคลากร ภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทั้งเรื่องวัสดุ อุปกรณ์ ในการทำ วิทยานิพนธ์ และอำนวยความสะดวกในด้านงานธุรการ

ขอขอบคุณ ป้าแอน แม่สาว น้องเบนซ์ และครอบครัวหลิมนุกูล ผู้เป็นแรงผลักดัน และ กำลังใจสำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึง พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็น กำลังใจส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

นীরชา หลิมนุกูล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(12)
รายการภาพภาคผนวก	(15)
บทที่ 1	1
บทนำต้นเรื่อง	2
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	28
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	28
บทที่ 2	29
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	29
บทที่ 3	42
ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง	42
บทที่ 4	122
สรุปผลการทดลอง	122
เอกสารอ้างอิง	124
ภาคผนวก	135
ภาคผนวก ก	136
ภาคผนวก ข	140
ภาคผนวก ค	141
ประวัติผู้เขียน	145

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะที่ใช้จำแนกเชื้อรา <i>Hypoxylon</i> กลุ่มย่อย <i>Hypoxylon</i> และกลุ่มย่อย <i>Annulata</i>	5
2	เชื้อรา <i>Curvularia</i> spp. บางชนิดที่ก่อโรคในพืชชนิดต่าง ๆ	21
3	เชื้อราที่นำมาวิเคราะห์และเทียบเคียงสำหรับการสร้างแผนภูมิต้นไม้ในการศึกษานี้	33
4	ชนิดและจำนวนเชื้อราสกุล <i>Annulohypoxylon</i> และ <i>Hypoxylon</i> ที่ได้จากการศึกษานี้	42
5	การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS ของเชื้อราสกุล <i>Annulohypoxylon</i> และ <i>Hypoxylon</i> ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank	100
6	การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง <i>beta-tubulin</i> ยีนของเชื้อราสกุล <i>Annulohypoxylon</i> และ <i>Hypoxylon</i> ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank	101
7	การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i> สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน เมื่อทดสอบ ด้วยวิธี dual culture กับเชื้อรา <i>Annulohypoxylon</i> spp. และ <i>Hypoxylon</i> spp. เป็นระยะเวลา 14 วัน	109
8	การสร้างเอนไซม์โคติเนส และเซลลูเลส ของเชื้อรา <i>Annulohypoxylon</i> spp. และ <i>Hypoxylon</i> spp.	113
9	การสร้างสารระเหยของเชื้อรา <i>Annulohypoxylon</i> spp. และ <i>Hypoxylon</i> spp. ที่มีผลยับยั้งการเจริญของโคโคนีเชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i>	115
10	ระดับการเกิดโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละความเข้มข้นที่ทดสอบ	118
11	ระดับความรุนแรงของโรคใบจุดต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง ภายใต้สภาพแปลงทดลอง	121

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การย่อยสลายซึบสเตรทของเชื้อราในระยะต่าง ๆ	3
2	ลักษณะที่แตกต่างกันของเชื้อรา <i>Annulohyphoxylon</i> และ <i>Hypoxylon</i>	5
3	ภาพตัดตามยาวของไฮสเตรมาเชื้อรา <i>Annulohyphoxylon</i> และ <i>Hypoxylon</i>	7
4	ลักษณะออสติโอลแบบต่าง ๆ	7
5	แอสคัส และแอสโคสปอร์	8
6	ลักษณะเจอร์มสลิท	9
7	ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา	10
8	การแตกกิ่งของโคนิดีโอฟอร์ที่พบในเชื้อราสกุล <i>Annulohyphoxylon</i> และ <i>Hypoxylon</i>	11
9	แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงการจัดกลุ่มเชื้อราวงศ์ Hypoxylaceae	14
10	อาการโรคแคงเกอร์บริเวณลำต้นของต้นไผ่ที่เกิดจากเชื้อ <i>Hypoxylon atropunctatum</i>	17
11	ลักษณะอาการใบจุดที่เกิดจากเชื้อ <i>Curvularia oryzae</i>	22
12	เชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i>	22
13	ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ ที่พบในเชื้อรา <i>Curvularia</i> spp.	23
14	สีที่ปรากฏจากการทำปฏิกิริยาของไฮสเตรมากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อรา <i>Annulohyphoxylon</i> และเชื้อรา <i>Hypoxylon</i>	30
15	การเตรียมสไลด์กึ่งถาวรเพื่อศึกษาโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์	31
16	การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i> ของเชื้อรา <i>Annulohyphoxylon</i> spp. และ <i>Hypoxylon</i> spp. ด้วยวิธี dual culture	36
17	การประกบจานอาหารเพาะเชื้อในวิธีการทดสอบสารระเหย	38
18	ตำแหน่งการวางเชื้อราสาเหตุโรค (pathogen) และตำแหน่งที่มีการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลท	39

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	<i>Annulohypoxyton moriforme</i> ไอโซเลท SKW12	45
20	<i>Annulohypoxyton nitens</i> ไอโซเลท PNGPW04	47
21	<i>Annulohypoxyton stygium</i> ไอโซเลท PTW09	49
22	<i>Annulohypoxyton thailandicum</i> ไอโซเลท CHPW07	51
23	<i>Annulohypoxyton species A</i> ไอโซเลท KBB02	53
24	<i>Annulohypoxyton species B</i> ไอโซเลท PNGW01	55
25	<i>Annulohypoxyton species C</i> ไอโซเลท PNGPW03	57
26	<i>Annulohypoxyton species E</i> ไอโซเลท TRW07	59
27	<i>Hypoxyton duranii</i> ไอโซเลท SKW32	61
28	<i>Hypoxyton fendleri</i> ไอโซเลท PSUW17	63
29	<i>Hypoxyton griseobrunneum</i> ไอโซเลท PTW09	65
30	<i>Hypoxyton haematostroma</i> ไอโซเลท KBPB01	67
31	<i>Hypoxyton polyporoideum</i> (syn. <i>Hypoxyton haematostroma</i>) ไอโซเลท SKWPM02	68
32	<i>Hypoxyton hypomiltum</i> ไอโซเลท PSUW01	70
33	<i>Hypoxyton jaklitschii</i> ไอโซเลท CHPW03	72
34	<i>Hypoxyton lenormandii</i> ไอโซเลท SKW(T)19	74
35	<i>Hypoxyton macrocarpum</i> ไอโซเลท PSUW07	76
36	<i>Hypoxyton monticulosum</i> ไอโซเลท CHPW01	78
37	<i>Hypoxyton pilgerianum</i> ไอโซเลท SRBAM01	80
38	<i>Hypoxyton sublenormandii</i> ไอโซเลท SKW30	82
39	<i>Hypoxyton species A</i> ไอโซเลท PTBAM04	84
40	<i>Hypoxyton species B</i> ไอโซเลท SKW09	86
41	<i>Hypoxyton species C</i> ไอโซเลท STPW01	88
42	<i>Hypoxyton species D</i> ไอโซเลท PTW02	90
43	<i>Hypoxyton species D</i> ไอโซเลท PTPB01	92
44	<i>Hypoxyton species F</i> ไอโซเลท TRW04	94

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
45	<i>Hypoxylon</i> species G ไอโซเลท KBPB02	96
46	<i>Hypoxylon</i> species H ไอโซเลท TRW05	98
47	แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเชื้อราสกุล <i>Annulohypoxylon</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS	103
48	แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเชื้อราสกุล <i>Annulohypoxylon</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน <i>beta-tubulin</i>	103
49	แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเชื้อราสกุล <i>Hypoxylon</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS	105
50	แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเชื้อราสกุล <i>Hypoxylon</i> ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน <i>beta-tubulin</i>	106
51	ลักษณะโคโลนีเชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i> และ <i>Annulohypoxylon</i> spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	108
52	โคโลนีเชื้อรา <i>Annulohypoxylon</i> spp. และ <i>Hypoxylon</i> spp. เจริญคลุมทับโคโลนีเชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i>	108
53	ลักษณะโคโลนีเชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i> ที่เกิดความผิดปกติเมื่อเจริญร่วมกับเชื้อ <i>Annulohypoxylon</i> spp. และ <i>Hypoxylon</i> spp.	110
54	วงสีม่วง (purple zone) บริเวณรอบโคโลนีเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเอสได้บนอาหาร CCA เป็นระยะเวลา 14 วัน	112
55	วงใสที่เกิดจากการย่อยเซลลูโลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar	113
56	ขนาดโคโลนีเชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i> ที่ถูกยับยั้ง	116
57	การทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อรา <i>Annulohypoxylon</i> spp.	117
58	การทดสอบใช้เส้นใยเชื้อราแขวนลอยควบคุมเชื้อ <i>Curvularia oryzae</i>	120

รายการภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่	หน้า
1 การสร้างเอนไซม์แลคเคสของเชื้อรา <i>Hypoxylon lenormandii</i> (CHPW03) บนอาหาร BBA	139
2 กิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อรา <i>Annulohypoxylon</i> spp. และ <i>Hypoxylon</i> spp. ในแต่ละไอโซเลท	139
3 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i> ของเชื้อราสกุล <i>Annulohypoxylon</i> และ <i>Hypoxylon</i>	140

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon* จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota วงศ์ *Hyphoxylaceae* มักพบเชื้อราในวงศ์นี้เจริญบนเศษซากไม้ หรือกิ่งไม้ที่ร่วงหล่นลงสู่พื้นดิน บางชนิดสามารถดำรงชีวิตเป็นเอนโดไฟท์ (endophyte) อาศัยภายในใบพืช และบางชนิดก่อให้เกิดโรคในพืชได้ เช่น โรคแคงเกอร์ (Williamson, 2010) เชื้อราทั้งสองสกุลนี้ มีเขตการกระจายตัวอยู่ทั้งในทวีปยุโรป อเมริกา และเอเชีย ทั่วโลกมีรายงานเชื้อราในสกุล *Annulohyphoxylon* 69 ชนิด และสกุล *Hyphoxylon* 979 ชนิด (<http://www.mycobank.org>) ในประเทศไทยเริ่มมีการศึกษาเชื้อราทั้งสองสกุลนี้ตั้งแต่ปี 1997 (Thienhiran, 1997) และมีการรายงานเชื้อราชนิดใหม่อย่างต่อเนื่องในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย เช่น บริเวณจังหวัดกาญจนบุรี และนครราชสีมา ได้แก่ *H. kanchanapisekii*, *H. sublenormandii* และ *H. suranareei* (Suwannasai et al., 2005) บริเวณจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ *A. bahnphadengense* และ *A. maeteangense* (Fournier et al., 2010) และบริเวณจังหวัดเชียงราย ได้แก่ *H. fulvo-sulphureum* (Sir et al., 2015) โดยทั่วไปสามารถพบเชื้อราทั้งสองสกุลนี้ได้ในสภาพป่าดิบแล้ง ป่าเบญจพรรณ ป่าชายเลน ป่าพรุ ตลอดจนป่าปลูก และสวนผลไม้ (สุรางค์ เจริญทรัพย์, 2542) เนื่องจากในประเทศไทย มีความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราสูง โดยเฉพาะในสกุล *Annulohyphoxylon* จึงพบว่าบางชนิดยากต่อการจัดจำแนกให้ถูกต้อง อีกทั้งยังมีฐานข้อมูลในการศึกษาอยู่น้อยมาก (มัลลิกา มะกรวัฒน์, 2557) และในบริเวณพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยยังมีการศึกษาเชื้อราทั้งสองสกุลนี้ไม่มากนัก (สุรางค์ เจริญทรัพย์, 2542; Suwannasai, 2005) ในเชื้อรากลุ่มนี้มีรายงานว่าบางชนิดสร้างสารที่มีประโยชน์ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ เช่น สาร fragiformin A-B ที่สกัดจากสโตรมาตาของเชื้อรา *H. fragiforme* สามารถต่อต้านเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Yarrowia lipolytica* และกลุ่มราสาย (filamentous fungi) (Stadler et al., 2006) สาร cohaerin G-K จากสโตรมาตาของเชื้อรา *A. cohaerens* มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) (Quang et al., 2006) นอกจากนี้ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราทั้งสองสกุล สามารถสร้างสารระเหยในการต่อต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เช่น *Botrytis cinerea*, *Cercospora bacticola*, *Phytophthora cinnamomi* และ *Sclerotinia sclerotium* (Thomseck et al., 2010) ดังนั้นการศึกษาดังนี้ จึงสนใจเก็บรวบรวมตัวอย่างและจำแนกชนิดเชื้อราในสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon* ตลอดจนการใช้ประโยชน์จากเชื้อราทั้งสองสกุลในแง่ของการเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตรโดยนำมาทดสอบควบคุมโรคใบจุดในต้นกล้า

ปาล์มน้ำมัน ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia oryzae* ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับกล้าปาล์มน้ำมัน ได้ตลอดทั้งปี หากมีการระบาดอย่างรุนแรงอาจทำให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันตายได้ (Sunpapao *et al.*, 2014) เกษตรกรมักใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อราชนิดนี้ แต่พบว่าเมื่อหยุดใช้สารเคมีกลับเกิดการระบาดของโรคซ้ำ ดังนั้นการใช้เชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon* ที่ได้จากการเก็บรวบรวมมาทดสอบควบคุมโรคดังกล่าว จึงไม่เพียงแต่สร้างฐานข้อมูลทางชนิดของเชื้อราทั้งสองสกุล ในพื้นที่ภาคใต้เท่านั้น หากแต่เป็นการคัดกรองจุลินทรีย์ชนิดใหม่ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *C. oryzae* ที่อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปัญหาเชื้อราต้อยา และความเสี่ยงที่เกิดจากการใช้สารเคมีต่อเกษตรกรและสภาพแวดล้อมได้

ตรวจเอกสาร

เชื้อราผู้ย่อยสลาย

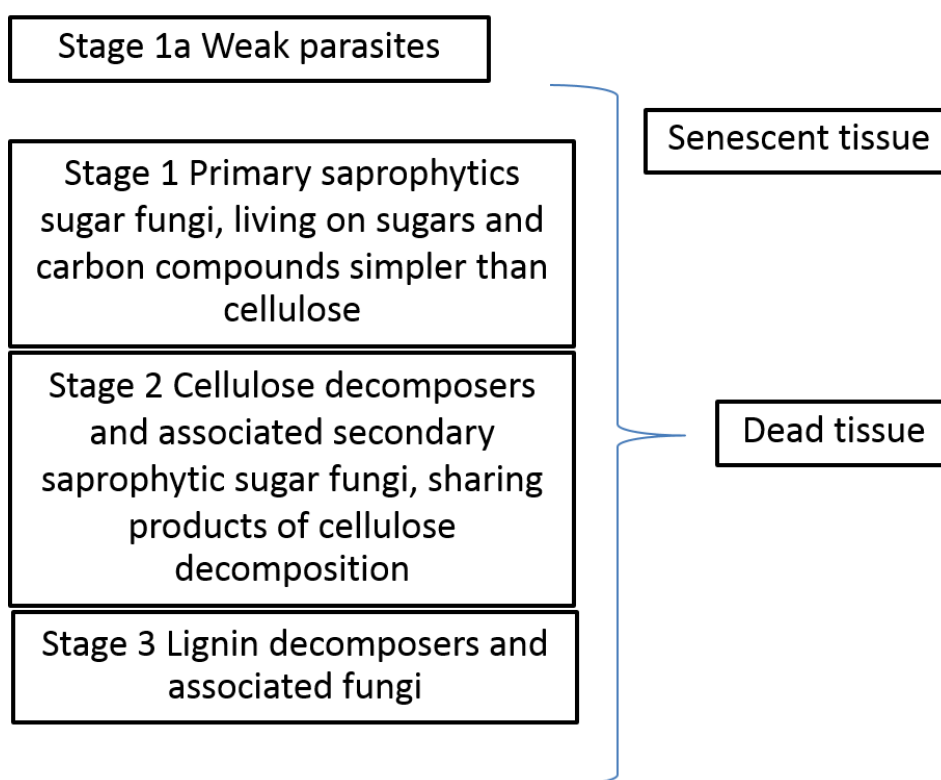
จุลินทรีย์คือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีความสำคัญในระบบนิเวศ ซึ่งระบบนิเวศจะสมบูรณ์ได้ ภายใต้การแลกเปลี่ยนพลังงาน และสสารซึ่งกันและกัน ระหว่างสิ่งมีชีวิตด้วยกันต้องมีการถ่ายทอดพลังงานไปตามห่วงโซ่อาหารที่มีองค์ประกอบภายในระบบที่ทำหน้าที่เป็นผู้ผลิต ผู้บริโภค และผู้ย่อยสลาย (นงพงา สุวานิช, 2536) ผู้ย่อยสลายเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญในระบบนิเวศ จุลินทรีย์ที่ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลาย (saprophyte) ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา แอคติโนมัยซิส และสาหร่าย เป็นต้น จุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากและสามารถพบเห็นได้ทั่วไปคือเชื้อราย่อยสลาย (saprophytic fungi) โดยหน้าที่หลักของเชื้อรากลุ่มนี้ คือ การสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน โปรตีน ไขมัน และสารประกอบอื่น ๆ มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย อินทรีย์วัตถุให้กลายเป็นธาตุอาหารกลับลงสู่พื้นดิน และพืชสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้ เชื้อราจัดเป็นผู้ย่อยสลายเศษซากพืชที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากเส้นใยของเชื้อราสามารถแทรกผ่านผนังเซลล์ ทำให้องค์ประกอบของเซลล์พืชแยกออกจากกันได้ง่ายขึ้น เกิดการย่อยสลายอย่างทั่วถึง แตกต่างจากแบคทีเรียที่มักเกิดการย่อยสลายจำกัดเฉพาะบริเวณพื้นผิวก่อนเท่านั้น กระบวนการย่อยสลายของเชื้อราเกิดขึ้นเมื่อเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ออกมา เพื่อย่อยผนังเซลล์ และเข้าไปเจริญสร้างเส้นใยภายในเนื้อไม้ เชื้อราจะใช้แป้ง น้ำตาล เซลลูโลส และลิกนิน ในเซลล์เนื้อไม้เป็นแหล่งอาหาร ทำให้เนื้อไม้ผุ มีสีซีดเกิดเป็นเส้นลวดลายสีดำแทรกอยู่ในเนื้อไม้ เรียกลักษณะนี้ว่า ราผุขาว (white rot) (สุรางค์ เจริญศิริ, 2542) นอกจากนี้เชื้อรายังเป็นสิ่งมีชีวิตเดียวที่สามารถย่อยลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ซับซ้อนของเซลล์พืชได้ (Garrett, 1963; Harley, 1971; Dix and Webster, 1995) โดย Garrett (1963–1966) แบ่งเชื้อราผู้ย่อยสลายออกเป็น 3 ระยะ ตามลำดับในการย่อยสับสเตรทดังนี้ (ภาพที่ 1)

ระยะที่ 1 sugar fungi เชื้อราย่อยสลายน้ำตาล และใช้แหล่งคาร์บอน

ระยะที่ 2 cellulose decomposers and associate เป็นการย่อยสลายในระยะที่ 2 เชื้อราย่อยสลายน้ำตาลร่วมกับเซลลูโลส

ระยะที่ 3 lignin decomposers and associate เป็นการย่อยในลำดับสุดท้ายเชื้อรา ย่อยสลายลิกนิน

จากการศึกษาบริเวณรากพืชที่เกิดการย่อยสลายโดยธรรมชาติ พบว่าเชื้อราประเภทแรกที่ เข้าครอบคลุมพื้นที่ คือเชื้อราประเภท weak parasite หรือ obligate saprophyte ซึ่งอยู่ในระยะ sugar fungi เชื้อราสามารถใช้น้ำตาลเพนโตส เฮมิเซลลูโลส แต่ไม่สามารถใช้เซลลูโลสและลิกนิน เป็นแหล่งอาหารได้ ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่มนี้ ได้แก่ เชื้อราในอันดับ (order) Mucorales สำหรับเชื้อราที่สามารถใช้แหล่งอาหารจากเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่ดำรงชีวิตอยู่ในรูปแบบ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) ในไฟลัม Ascomycota ในขณะที่กลุ่มเชื้อราที่ใช้แหล่ง อาหารจากการย่อยสลายลิกนิน คือเชื้อราในไฟลัม Basidiomycota



ภาพที่ 1 การย่อยสลายซบสเตรทของเชื้อราในระยะต่าง ๆ

ที่มา: Garrett (1963–1966)

เชื้อรา *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon*

เชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon* จัดเป็นเชื้อราในกลุ่มผู้ย่อยสลายอีกชนิดหนึ่งที่เจริญและย่อยสลายเนื้อไม้ที่ตายแล้วหลังจากร่วงหล่นลงสู่พื้นดิน ทำให้ระบบนิเวศสมบูรณ์ (Whalley, 1996) รากลุ่มนี้มีเขตการแพร่กระจายอยู่ทั่วไป ทั้งทวีปอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย แอฟริกา และเอเชีย (สุรางค์ เจริญศิริ, 2542) ซึ่งเชื้อราในสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon* จัดอยู่ในกลุ่มย่อย (section) ของเชื้อรา *Hypoxylon* Bull. (Ju and Roger, 1996) โดยมีการแบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย *Hypoxylon* (*Hypoxylon* section *Hypoxylon*) และ กลุ่มย่อย *Annulata* (*Hypoxylon* section *Annulata*) โดยใช้ลักษณะต่าง ๆ ในการจำแนกดังตารางที่ 1

ต่อมา Hsieh และคณะ (2005) ได้ทำการจำแนกเชื้อราสกุล *Hypoxylon* และสกุลใกล้เคียงโดยใช้ลักษณะทางชีวโมเลกุล (molecular biology) บริเวณยีน *alpha-actin* และ *beta-tubulin* ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในการจำแนกเชื้อรากลุ่มย่อย *Annulata* ออกจากสกุล *Hypoxylon* เกิดเป็นเชื้อราสกุลใหม่คือ เชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* โดยเชื้อรา *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon* มีการจัดลำดับอนุกรมวิธานดังนี้ (Wijayawardene et al., 2018)

Kingdom Fungi

Subkingdom Dikarya

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Class Sordariomycetes

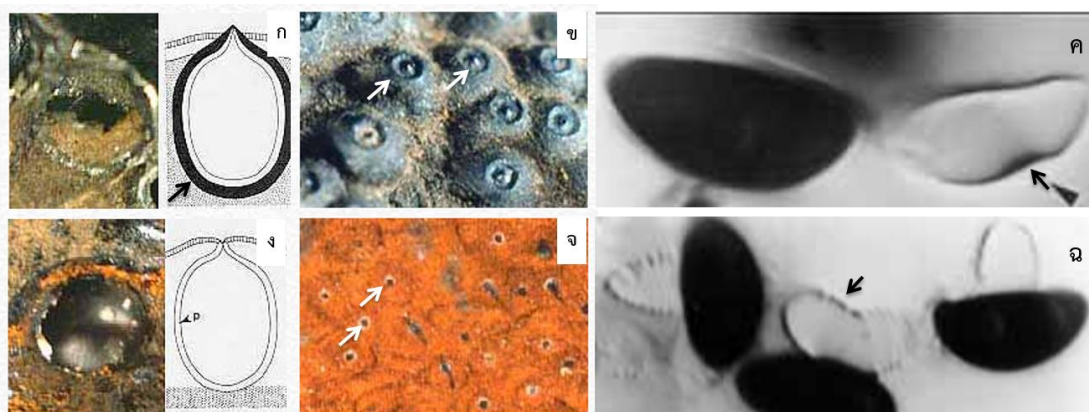
Subclass Xylariomycetes

Order Xylariales

Family Hypoxylaceae

Genus *Hypoxylon* and *Annulohyphoxylon*

การจำแนกเชื้อราทั้งสองสกุลในเบื้องต้นใช้ลักษณะเนื้อเยื่อ carbonaceous ซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มเพอริทีเซีย ในเชื้อราสกุล *Hypoxylon* มีเนื้อเยื่อ carbonaceous ลักษณะบาง แตกต่างจากในเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่มีเนื้อเยื่อ carbonaceous เป็นผนังหนาและมีสีเข้ม รูปแบบออสติโอลซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นปิดอยู่ส่วนบนสุดของเพอริทีเซีย บนผิวหน้าสโตรมาตา และลักษณะเพอริสปอร์ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2, ตารางที่ 1)



ภาพที่ 2 ลักษณะที่แตกต่างกันของเชื้อรา *Anulohypoxyton* (ก.-ค.) และ *Hypoxyton* (ง.-จ.)
 ก. เนื้อเยื่อ carbonaceous หนาเป็นชั้นชัดเจน (ลูกศร) ข. ลักษณะออสติโอลมีแผ่นจานล้อมรอบ (ostiole disc) (ลูกศร) ค. เพอริสปอร์มีผนังหนา (ลูกศร) ง. เนื้อเยื่อ carbonaceous บาง
 จ. ออสติโอลแบบ umbilicate ฉ. เพอริสปอร์มีลวดลายเป็นชั้น ๆ (coil-like ornamentation)
 ที่มา: <http://mycology.sinica.edu.tw/Xylariaceae/GenusHypoxyton.asp>

ตารางที่ 1 ลักษณะที่ใช้จำแนกเชื้อรา *Hypoxyton* กลุ่มย่อย *Hypoxyton* และกลุ่มย่อย *Annulata*

ลักษณะ	เชื้อรา <i>Hypoxyton</i>	
	กลุ่มย่อย <i>Hypoxyton</i>	กลุ่มย่อย <i>Annulata</i>
1. ลักษณะผิวหน้าของสโตรมาตา	ผิวสโตรมาตามักมีสีส้มเมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่ เช่น แสด ส้ม ม่วง ม่วงดำ เหลือง น้ำตาล	ผิวหน้าสโตรมาตามักมีสีดำเมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่
2. ผนังเพอริทีเทียม	ผนังเพอริทีเทียมบาง	ผนังเพอริทีเทียมหนาและมีสีดำ
3. ออสติโอล	ส่วนใหญ่เป็นแบบ umbilicate บางชนิดเป็น papillate ไม่มีจาน (disk) ล้อมรอบออสติโอล	ออสติโอลเป็นแบบ papillate หรือ conical papillate มีแผ่นจานล้อมรอบออสติโอล
4. เพอริสปอร์	เพอริสปอร์ผนังบางมักมีลวดลาย	เพอริสปอร์ผนังหนาไม่พบลวดลาย

การจำแนกเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph stage)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นระยะที่สำคัญในการใช้จำแนกเชื้อราทั้งสองสกุลนี้ โดยการศึกษาทั้งโครงสร้างที่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามลักษณะดังต่อไปนี้

สโตรมา (stroma)

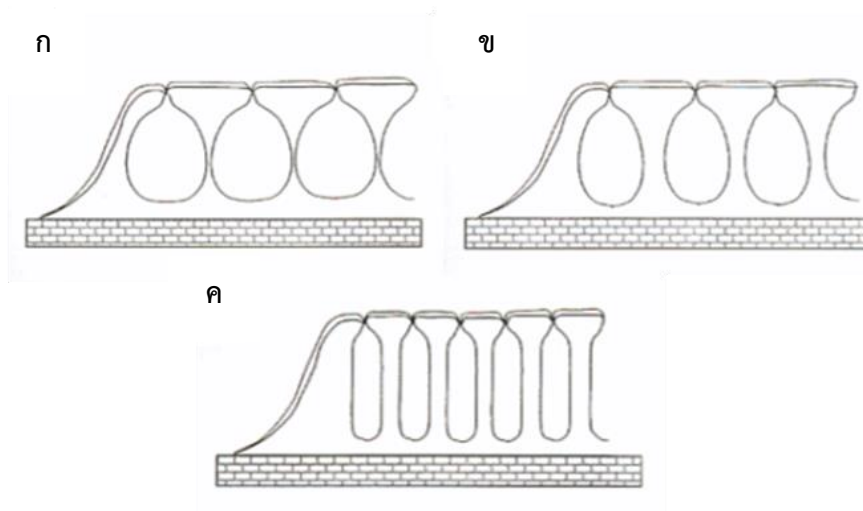
เชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon* สร้างสโตรมาลักษณะคล้ายป็นหนาขึ้นบนเนื้อไม้ (wood) หรือ เปลือกไม้ (bark) มีลักษณะเป็นก้อนนูน (glomerate) เรียบกึ่งนูนหนา (effuse-pulvinate) หรือ เป็น แผ่น แบน เรียบ (pulvinate) ในเชื้อราสกุล *Hyphoxylon* โครงสร้างสโตรมามักมีสีสดใส เช่น แสด ส้ม ม่วง ม่วงดำ เหลือง น้ำตาล ไปจนถึงสีดำ (สุรางค์ เจริญศิริ, 2542) ซึ่งแตกต่างจากสีสโตรมาของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* ที่ผิวสโตรมาส่วนใหญ่มีสีดำอำมม่วง หรือดำอมเขียว บางชนิดอาจมีลักษณะเป็นมันเงา (shiny) หรือด้าน (dull) สีที่ปรากฏจากการทำปฏิกิริยาของสโตรมากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 10 % เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเชื้อราทั้งสองสกุลเช่นกัน ในเชื้อรา *Annulohyphoxylon* ส่วนมากให้สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous) สีเขียวหม่น (dull green) สีเขียวเข้ม (dark green) สีม่วงแดง (vinaceous purple) สีน้ำผึ้ง (honey) เป็นต้น ส่วนเชื้อรา *Hyphoxylon* ให้สีโทน ส้ม (orange) เหลืองอำพัน (amber) น้ำตาลอ่อน (hazel) เหลืองอมเทา (isabelline) แดง (reddish) ม่วง (purple) หรือไม่มีสี (colorless)

เพอริทีเซียม (perithecium)

เพอริทีเซียมเป็นโครงสร้างให้กำเนิดสปอร์ หรือส่วนห่อหุ้มถุง asci และ paraphyses มักพบส่วนเนื้อเยื่อ carbonaceous ล้อมรอบอยู่ ซึ่งส่วนเพอริทีเซียมในเชื้อราทั้งสองสกุลนี้มีรูปร่าง 3 แบบ ได้แก่ รูปร่างกลม (spherical) รูปร่างรีคล้ายไข่ (obovoid) และรูปร่างยาวเป็นแท่ง (tubular) หรือทรงกระบอกเรียวยาวคล้ายหอก (lanceolate) (ภาพที่ 3)

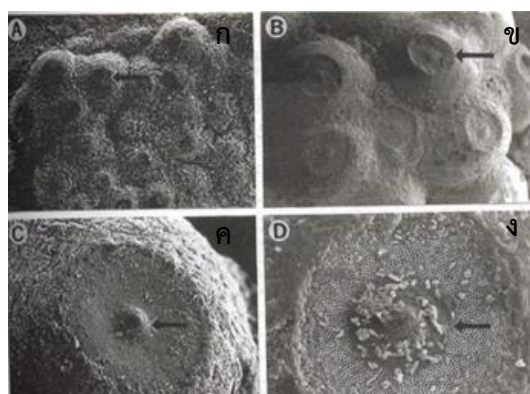
ออสติโอล (ostiole)

ออสติโอลเป็นส่วนปลายสุดของเพอริทีเซียม มักมีช่องเปิดนูนลักษณะคล้ายจะงอย (beak) หรือคอ (neck) เพื่อปลดปล่อยสปอร์ (Webster and Weber, 2007) ส่วนใหญ่เชื้อราสกุล *Hyphoxylon* มักพบออสติโอลเป็นแบบ umbilicate บางชนิดเป็น papillate ไม่มีจาน (disk) ล้อมรอบออสติโอล แตกต่างจากออสติโอลของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* ซึ่งเป็นชนิด papillate มีแผ่นจานขนาดเล็กล้อมรอบ (ostiole discs) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ภาพตัดตามยาวของไฮตรมาเชื้อรา *Annulohypoxylon* และ *Hypoxylon* ก. เพอริทีเซียรูปร่างกลม (spherical) ข. เพอริทีเซียรูปร่างรีคล้ายไข่ (obovoid) และ ค. เพอริทีเซียรูปร่างเป็นแท่งยาว (tubular)

ที่มา: สุรางค์ เขียรหิรัญ (2542)



ภาพที่ 4 ลักษณะออสติโอดแบบต่าง ๆ ก. ลักษณะออสติโอดแบบ umbilicate ข. ลักษณะแผ่นจาน (disk) ค. ลักษณะออสติโอดแบบ papillate และ ง. ลักษณะของออสติโอดแบบ conical papillate

ที่มา: สุรางค์ เขียรหิรัญ (2542)

แอสคัส (ascus) แอสโคสปอร์ (ascospore) และเพอริสปอร์ (perispore)

ถุงแอสคัสสร้างภายในเพอริทีเซีย มีลักษณะคล้ายกระบอง (ภาพที่ 5 ก, ง) บริเวณปลายแอสคัสพบเอพิคอลลอปพาราทัส หรือ เอพิคอลลริงส์ (apical apparatus/apical rings) (ภาพที่ 5 ข) ทำหน้าที่ดันแอสโคสปอร์ (ascospore) ให้ออกจากแอสคัส บางชนิดติดสีน้ำเงิน

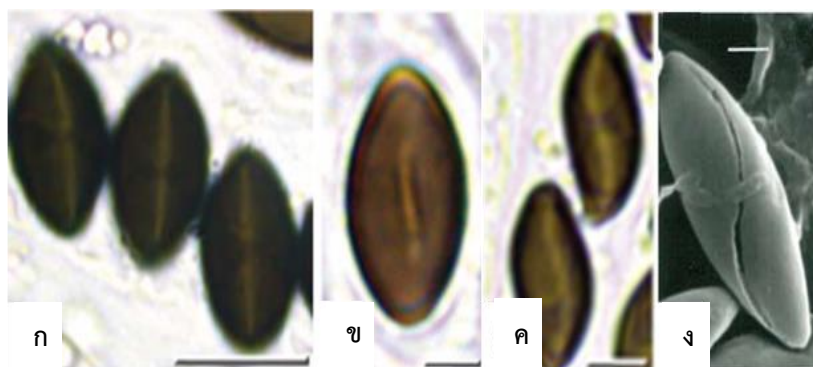
เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Melzer's reagent ซึ่งใน 1 แอสคัส บรรจุไปด้วย 8 แอสโคสปอร์ แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม โดยแอสโคสปอร์ถูกดันออกมาบริเวณส่วนปลายของเพอริทีเซียมกับผิวหน้าสโตรมาที่เรียกว่า ออสติโอล เพอริสปอร์หรือเปลือกหุ้มแอสโคสปอร์ เป็นลักษณะที่ใช้จำแนกเชื้อราทั้งสองสกุล โดยเมื่อหยดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 10% ลงบนแอสโคสปอร์ เกิดการหลุดออกของเพอริสปอร์ เรียกลักษณะดังกล่าวว่า perispore dehiscent (ภาพที่ 5 ค) ในทางตรงกันข้าม หากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เรียกลักษณะนั้นว่า perispore indehiscent



ภาพที่ 5 แอสคัส และแอสโคสปอร์ ก. แอสคัสภายในเพอริทีเซียม (ลูกศร) ข. เอพิคอลแอฟพาราทัส ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำยา Melzer's reagent (ลูกศร) ค. แอสโคสปอร์ทำปฏิกิริยากับ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10% ทำให้เพอริสปอร์หลุดออกมา (perispore dehiscent) (ลูกศร) และ ง. แอสคัสลักษณะคล้ายกระบอง บรรจุแอสโคสปอร์ 8 แอสโคสปอร์
ที่มา: ภาพ ก: <https://mycologysite.files.wordpress.com/2016/09/biol-319lecture8ascomycota.pdf>
ภาพ ข, ค และ ง ถ่ายโดย นีรชา หลิมนุกูล

เจอร์มสลิต (germ slit)

เจอร์มสลิตปรากฏบนแอสโคสปอร์ เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกเชื้อราทั้งสองสกุลนี้ โดยเชื่อว่าเจอร์มสลิตเกี่ยวข้องกับกระบวนการงอกของสปอร์เชื้อราทั้งสองสกุล ในรากลุ่มนี้มีลักษณะเจอร์มสลิตหลายรูปแบบ (ภาพที่ 6) ได้แก่ ลักษณะเป็นเส้นตรง มีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ (straight full length) หรือน้อยกว่าความยาวแอสโคสปอร์ (straight nearly full length) และในเชื้อราสกุล *Hypoxylon* มักพบลักษณะเจอร์มสลิตแบบเป็นเส้นโค้งคล้ายตัวเอส (sigmoid germ slit) ลักษณะเป็นเส้นโค้งเล็กน้อย (slightly sigmoid germ slit) หรือเส้นโค้งคล้ายเกลียว (spiral germ slit) ซึ่งพบในเชื้อรา *H. monticulosum* ร่วมด้วย (Suwannasia *et al.*, 2012)



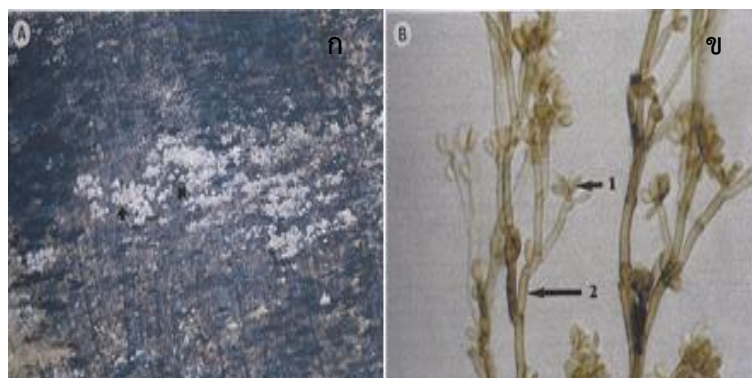
ภาพที่ 6 ลักษณะเจอร์มสลิต ก. เจิร์มสลิตเป็นเส้นตรง ความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ (straight full length) ข. เจิร์มสลิตเส้นตรง ความยาวน้อยกว่าความยาวแอสโคสปอร์ (straight nearly full length) ค. เจิร์มสลิตแบบเป็นเส้นโค้งคล้ายตัวเอส (sigmoid germ slit) และ ง. เจิร์มสลิตเป็นเส้นโค้งคล้ายเกลียว (spiral germ slit)

ที่มา: Fournier และคณะ (2015) และ Suwannasia และคณะ (2012)

ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph stage)

เชื้อราสร้างโคนิเดีย (conidia) บนโคนิดีโอฟอร์ (conidiophore) มีลักษณะรูปร่างคล้ายฝุ่นชอล์กสีขาวอยู่บนท่อนไม้ หรือเศษกิ่งไม้ที่หักโค่นลงสู่พื้นดิน (ภาพที่ 7) ในการสืบพันธุ์ระยะนี้ เชื้อราสามารถสร้างโคนิเดียได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งในเชื้อราสกุล *Hypoxylon* มีลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 4 รูปแบบ คือ *Nodulisporium*-like, *Periconiella*-like, *Sporothrix*-like และ *Virgariella*-like ส่วนเชื้อราสกุล *Annulohypoxylon* มีลักษณะการสืบพันธุ์

แบบไม่อาศัยเพศ 3 รูปแบบ คือ *Nodulisporium*-like, *Periconiella*-like และ *Virgariella*-like (Ju and Roger, 1996)



ภาพที่ 7 ระยะเวลาการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา ก. ลักษณะเชื้อราสีขาวคล้ายฝุ่นบนผิวเนื้อไม้ ข. ลักษณะโคนเดี่ยว (ลูกศร1) และโคนติโอพอร์ (ลูกศร2) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ที่มา: สุรางค์ เขียรศิริ (2542)

ลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon*

Sporothrix-like

รูปแบบการเกิดโคนติโอพอร์เป็นโครงสร้างแบบง่าย ซึ่งมีการสิ้นสุดการแตกกิ่งก้านที่ conidiogenous region หรือในบางชนิดอาจมีการแตกกิ่งและสร้าง conidiogenous region บนบริเวณ additional brunch (es) ได้ และในแต่ละกิ่งบริเวณปลายมีเซลล์โคนติโอจีนัสแค่ 1 เซลล์เท่านั้น (ภาพที่ 8 A และ B) สามารถพบลักษณะนี้ได้ในเชื้อราบางชนิด เช่น *H. dieckmannii* และ *H. lividicolor*

Virgariella-like

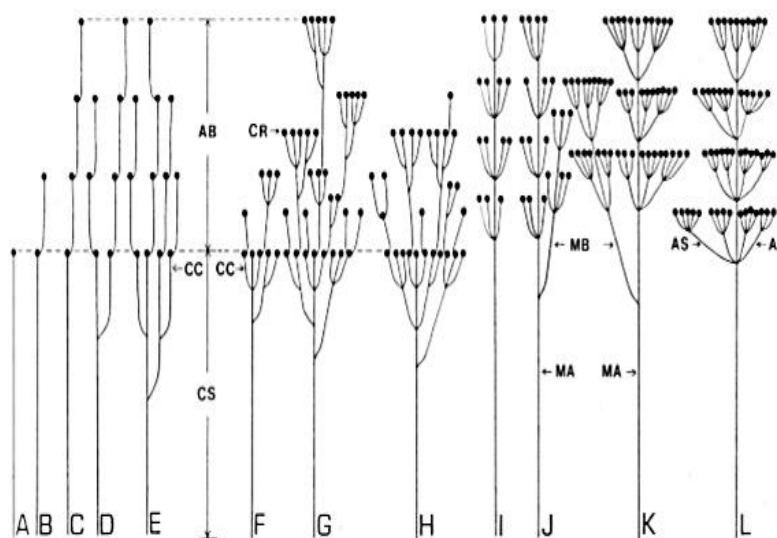
รูปแบบการแตกกิ่งก้านของโคนติโอพอร์ เป็นแบบไม่มีก้าน หรือมีการแตกออกทีละ 2 กิ่ง (dichotomously branched) บางครั้งอาจแตกได้มากกว่า เนื่องจากการแตกกิ่งแบบ *Virgariella*-like ไม่จำเป็นต้องแตกออกมาจากส่วนของ main axis แต่มีการแตกเพิ่มมาจากส่วนของ main brunch ทำให้มีการต่อจากบริเวณปลาย conidiogeneous region(s) เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งในแต่ละปลายมีเซลล์โคนติโอจีนัส 1-2 เซลล์ หรือมากกว่านั้น (ภาพที่ 8 C, D และ E) ลักษณะนี้พบได้ในเชื้อรา *A. cohaerens*, *A. minutellum*, *A. multiforme*, *H. fuscum*, *H. macrocapum*, *H. monticulosum*, *H. notatum*, *H. perforatum*, *H. rutilum*, *H. submonticulosum* และ *H. rugodes*

Nodulisporium-like

รูปแบบการแตกกิ่งก้านของโคนิดีโอฟอร์คล้ายแบบ *Virgariella*-like แต่มีความซับซ้อนมากกว่า โดยมีการแตกกิ่งก้านคล้ายพุ่มไม้ (bushy structure) ซึ่งในแต่ละปลายมีเซลล์โคนิดีโอจีนีสจำนวน 2–3 เซลล์ หรือมากกว่านั้น (ภาพที่ 8 F, G และ H) สามารถพบลักษณะนี้ได้ในเชื้อรา *A. annulatum*, *A. atroroseum*, *A. bahnphadengense*, *A. bovei* var. *microspore*, *A. truncatum*, *H. fendleri*, *H. fragiforme*, *H. rickii*, *H. rubiginosum* และ *H. sublutilum*

Periconiella-like

โคนิดีโอฟอร์มีการแตกกิ่งจาก main axis และ major branch อย่างน้อยหนึ่งกิ่ง ซึ่งในแต่ละกิ่งบริเวณปลายมีเซลล์โคนิดีโอจีนีสจำนวน 3–4 เซลล์ นอกจากนี้ยังมีการแตกกิ่งย่อย (additional subordinate branches) เพิ่มขึ้นจากบริเวณ major branch ทำให้เกิดกิ่งก้าน และมี conidiogenous region(s) มากกว่าแบบอื่น ๆ (ภาพที่ 8 I, J, K และ L) สามารถพบลักษณะนี้ได้ในเชื้อรา *A. leptascum*, *A. stygium*, *A. stygium* var. *stygium*, *H. investiens*, *H. jecorinum* และ *H. haematostroma*



ภาพที่ 8 การแตกกิ่งของโคนิดีโอฟอร์ที่พบในเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon* รูปแบบ *Sporothrix*-like (A และ B) รูปแบบ *Virgariella*-like (C, D และ E) รูปแบบ *Nodulisporium*-like (F, G และ H) และรูปแบบ *Periconiella*-like (I, J, K และ L) (AB = additional branch(es)); AS = additional subordinate(es); CC = conidiogenous cell(s); CR = conidiogenous region(s); CS = conidiogenous structure(s); MA = main axis; MB = major branch(es))

ที่มา: Ju และ Rogers (1996) อ้างโดย มัลลิกา มะกรวัฒน์ (2557)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon*

การจำแนกเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น เชื้อราต้องอยู่ในระยะที่เหมาะสมสำหรับการศึกษา กล่าวคือตัวอย่างเชื้อราต้องเป็นระยะที่เจริญเต็มที่ และเป็นตัวอย่างที่สมบูรณ์ จึงสามารถนำมาจัดจำแนกลักษณะต่าง ๆ ได้อย่างครบถ้วน นอกจากนี้ตัวอย่างที่นำมาศึกษาควรเป็นตัวอย่างที่สามารถเจริญและเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งมีความสำคัญในการจำแนกชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันสูงออกจากกันได้ ในราทั้งสองสกุลนี้และสกุลอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงมีความหลากหลายสูง จึงยากแก่การจำแนกถึงระดับสปีชีส์ (มัลลิกา มะกรวัฒน์นะ, 2557) เทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการช่วยจำแนกเชื้อราในกลุ่มนี้ และพบว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สามารถช่วยระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันสูง และยากต่อการระบุชนิดหรือชนิดที่มีความซับซ้อนได้ดี

บริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) เป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา เนื่องจากสามารถพบตำแหน่งนี้ได้ในเชื้อราทุกชนิด นอกจากนี้ในตำแหน่ง ITS มีจำนวนซ้ำของชุด ribosomal DNA สูง ซึ่งง่ายต่อการวิเคราะห์โดยใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (Polymerase Chain Reaction, PCR) จากตัวอย่างดีเอ็นเอเพียงแค่น้อย (Carbone and Kohn, 1999)

ในปี 2005 Hsieh และคณะ ศึกษาขึ้นที่ตำแหน่ง *alpha-actin* และ *beta-tubulin* ของเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae จากนั้นสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แยกกลุ่มเชื้อราออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ กลุ่มเชื้อรา *Hyphoxylon* section *Annulata* กลุ่มเชื้อราในสกุล *Bischofiauxia* กลุ่มเชื้อรา *Hyphoxylon* section *Hyphoxylon* และ *Dadina* ผลการวิจัยครั้งนี้ทำให้เกิดเชื้อราสกุลใหม่คือ เชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ที่แยกออกมาจากเชื้อรา *Hyphoxylon* section *Annulata* ในปีเดียวกัน Suwannasia (2005) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อรา *Hyphoxylon* และสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงในประเทศไทย โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS พบว่า สามารถจำแนกเชื้อราสกุล *Hyphoxylon* ได้ชนิดใหม่ 3 ชนิด คือ *H. kanchanapisakii*, *H. suranarii* และ *H. sublenormandii*

มัลลิกา มะกรวัฒน์นะ (2557) จำแนกเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทั้งรูปแบบการเจริญของเชื้อราในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS, *alpha-actin*, *beta-tubulin* และ *elongation factor 1-alpha* สามารถจำแนกเชื้อรา *Annulohyphoxylon* ได้ 6 ชนิด และมีอีก 7 ชนิด

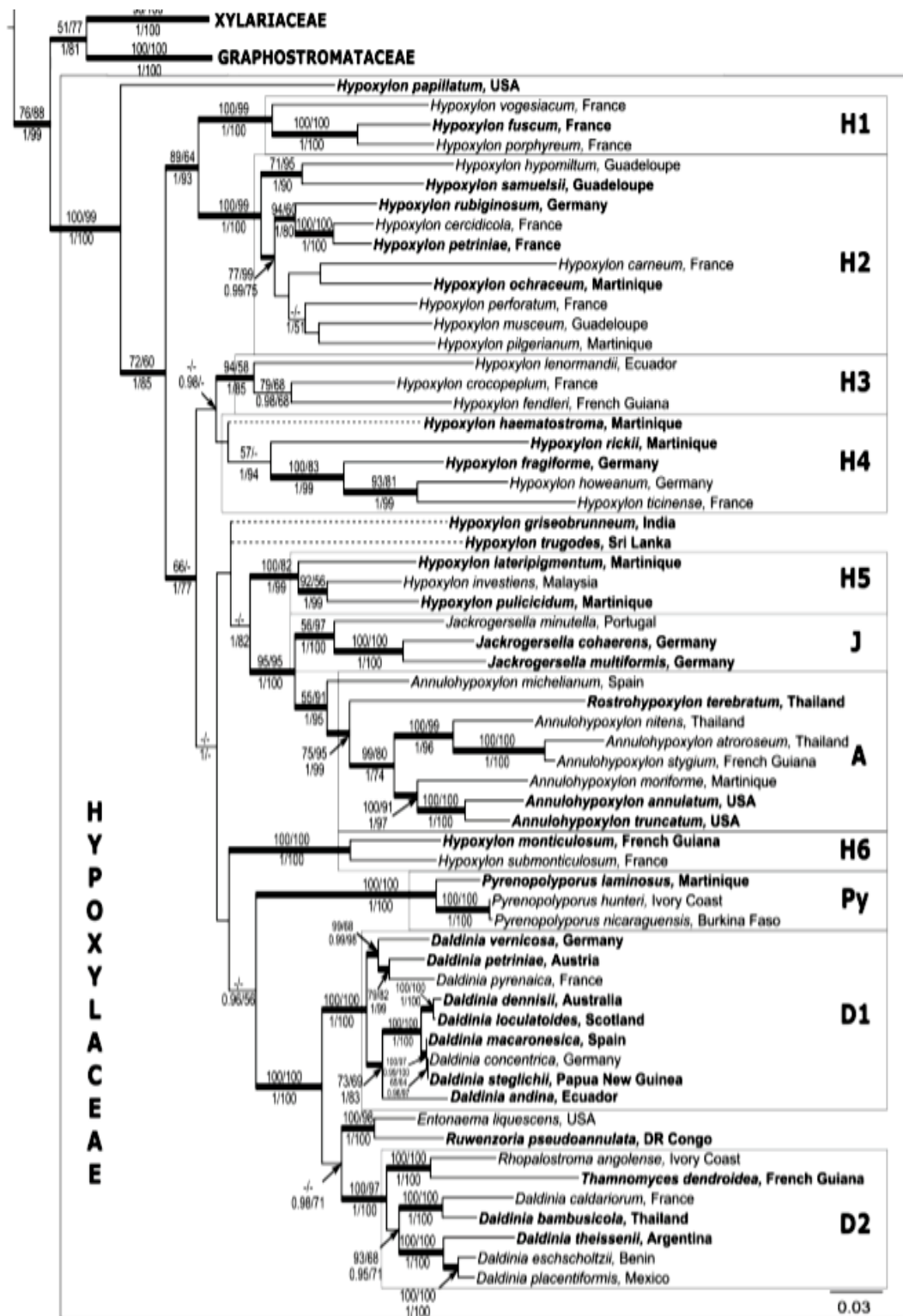
ที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ จึงนำข้อมูลที่ได้สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ แยกเชื้อรา *Annulohyphoxylon* 7 ชนิดที่มีความซับซ้อนและใกล้เคียงกันได้สำเร็จ จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า ในเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ไม่เพียงแต่มีความแปรผันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาสูง แต่มีความแปรผันของลักษณะทางพันธุกรรมสูงเช่นกัน

Kuhnert และคณะ (2014) พบเชื้อราสกุล *Hypoxylon* ชนิดใหม่ 3 ชนิด ได้แก่ *H. isbellinum*, *H. lamilosum* และ *H. lateripigmentum* จากการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอที่บริเวณ ITS และ ยีน *beta-tubulin* ซึ่งงานวิจัยนี้ทำให้เกิดการแนะนำวิธีการจัดลำดับหมวดหมู่ในเชิงเปรียบเทียบแบบ polyphasic taxonomic เพื่อใช้จำแนกเชื้อรา *Hypoxylon*

Kuhnert และคณะ (2015) พบเชื้อรา *Hypoxylon* ชนิดใหม่ ได้แก่ *H. jaklitschii* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *H. lenormandii* จากการจำแนกโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS และ ยีน *beta-tubulin* ร่วมกับการใช้คุณสมบัติทางเคมี (chemotaxonomy) ทำให้พบสารในกลุ่ม Azaphilone ชนิดใหม่ 7 ชนิด (lenormandinsA-G) ที่ได้จากสโตรมาของเชื้อราทั้งสองชนิดดังกล่าว

Wendt และคณะ (2017) จำแนกเชื้อราวงศ์ Xylariaceae โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับวิธีการทางชีวโมเลกุล บริเวณ 4 ตำแหน่งยีน คือ ITS และยีน *large subunit (LSU)*, *RNA polymerase II (RPB2)* และ *beta-tubulin (TUB2)* ประกอบกับการจำแนกโดยใช้คุณสมบัติทางเคมี สามารถจัดกลุ่มเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon*, *Hypoxylon* และสกุลที่ใกล้เคียงอยู่ในวงศ์ *Hypoxylaceae* (ภาพที่ 9) และเกิดเชื้อราสกุลใหม่ 2 สกุล ได้แก่ *Jackrogersella* (แยกมาจากเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* เดิม) และ *Pyrenopolyporus* (แยกมาจากเชื้อราสกุล *Hypoxylon* เดิม)

Lambert และคณะ (2019) จำแนกเชื้อรา 2 ชนิดที่มีความใกล้เคียงกันสูง คือ *H. monticulosum* และ *H. submonticulosum* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางชีวโมเลกุล บริเวณ 4 ตำแหน่ง คือ ITS, LSU, RPB2 และ TUB2 จากนั้นสร้างแผนภูมิด้านไม้ พบว่าเชื้อราทั้ง 2 ชนิด แยก clade ออกจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ จึงแยกเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ออกเป็นสกุลใหม่ คือ *Hypomontagnella* เกิดเชื้อราชนิดใหม่ขึ้น 2 ชนิด ได้แก่ *Hypomontagnella monticulosa* และ *H. barbarendis*



ภาพที่ 9 แผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) แสดงการจัดกลุ่มเชื้อราวงศ์ Hypoxylaceae
ที่มา: Wendt *et al.* (2017)

บทบาทของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon*

นอกเหนือจากบทบาทในการเป็นผู้ย่อยสลายไม้ในธรรมชาติที่กล่าวไว้ข้างต้นของเชื้อราทั้งสองสกุลนี้ บางชนิดดำรงชีวิตเป็นเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช ในขณะที่บางชนิดก่อโรคกับพืชและอีกหลาย ๆ ชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ราย่อยสลายไม้ในธรรมชาติ (wood decay fungi)

การที่เชื้อราสามารถย่อยสลายเนื้อไม้ได้ เนื่องจากเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายประกอบของเนื้อไม้ โดยพบว่าเชื้อราทั้งสองสกุลนี้ ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลาย สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส (cellulose) และลิกนิน (lignin) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเนื้อไม้ได้ (Roger, 1979; สุรางค์ เจริญทรัพย์, 2542)

มีการรายงานว่าเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae มีบทบาทสำคัญในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลาย ได้แก่ เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และลิกนินเนส (ligninase) (Wei *et al.*, 1992)

Shigo (1964) รายงานว่า เชื้อราสกุล *Hypoxylon* หลายชนิดมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายไม้เนื้อแข็ง และเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae กว่า 581 ไอโซเลท สามารถสร้างลิกนินโกลติกเอนไซม์ (ligninolytic enzyme) ได้ (Urairuj *et al.*, 2003)

Seephueak และคณะ (2011) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่ย่อยสลายกิ่งก้านของไม้ยางพารา โดยทำการเก็บตัวอย่างบริเวณจังหวัดนครศรีธรรมราชและสงขลา วางแผนการเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง แบ่งเป็น เดือนมกราคม (ปลายฤดูฝน: late rainy season) เดือนเมษายน (ฤดูร้อน: dry season) เดือนกรกฎาคม (ก่อนฤดูฝน: early rainy season) และเดือนตุลาคม (ฤดูฝน: rainy season) พบกิ่งก้านไม้ยางพารา 3 ระยะ ได้แก่ กิ่งก้านที่เพิ่งร่วงหล่น (newly fallen branches) กิ่งก้านที่อยู่ในระหว่างการย่อยสลาย (middle stage decaying branches) และกิ่งก้านเก่า (old decaying fallen branches) พบเชื้อราทั้งหมด 497 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบ เชื้อรา *Hypoxylon* spp. ในทุกฤดูกาล รวมไปถึงในทุกระยะการย่อยกิ่งก้านไม้ยางพารา จึงจัดเชื้อรา *Hypoxylon* spp. อยู่ในเชื้อราชนิดเด่นที่พบอีกด้วย

Pointing และคณะ (2003) พบว่าเชื้อราสกุล *Biscogniauxia*, *Hypoxylon* และ *Xylaria* แสดงศักยภาพในการสร้างเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) เซลลูเลส (cellulase) และไซแลนเนส (xylanase) ย่อยสลายเนื้อไม้ได้ ซึ่งทำให้น้ำหนักของไม้ลดลงเฉลี่ยประมาณร้อยละ 20 ของน้ำหนักทั้งหมด

ราสาเหตุโรคพืช (Pathogen)

เชื้อราในอันดับ Xylariales บางชนิดสามารถก่อโรคในพืชได้ โดยเฉพาะไม้ยืนต้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อและสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ รวมไปถึงทรัพยากรป่าไม้ มีรายงานการเข้าทำลายของเชื้อ *H. mammanum* บริเวณเขตพื้นที่ป่าไม้ในทวีปยุโรปแพร่กระจายเข้าสู่ทวีปอเมริกาเหนือ (Bier, 1940; Pinon, 1979)

Conway และ Olson (n.d.) รายงานการเข้าทำลายต้นโอ๊กของเชื้อรา *H. atropunctatum* ในรัฐ Oklahoma ทำให้เกิดโรคแคงเกอร์ในต้นโอ๊ก โดยเฉพาะในต้นโอ๊กที่มีอาการขาดน้ำ หรืออยู่ในสภาวะแห้งแล้ง (drought) และต้นโอ๊กที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบราก พืชมักแสดงอาการอย่างรุนแรงจนตายในที่สุด นอกจากนี้ในรัฐฟลอริดาประเทศอเมริกา เชื้อราดังกล่าว สามารถเข้าทำลายต้นฮิคเคอรี (hickory) และ ต้นพีแคน (pecan) ได้อีกด้วย

Mcpherson และคณะ (2005) รายงานการเข้าทำลายของเชื้อรา *H. thouarsianum* ในต้นโอ๊ก (*Quercus agrifolia*) ส่งผลให้อัตราการตายของต้นโอ๊กสูงขึ้น 5.8–17.4 เปอร์เซ็นต์ นับตั้งแต่ปี 2000–2003

McBird และ Apple (2009) รายงานว่า เชื้อรา *H. atropunctatum* สามารถปรับตัวและเข้าทำลายต้นพืชได้แทบทุกระบบนิเวศ ทั้งบริเวณพื้นที่ป่า บริเวณทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ (pasture) สวนสาธารณะ หรือแม้แต่เขตชุมชนและที่อยู่อาศัยของมนุษย์ (urban development area) โดยเฉพาะเขตชุมชน เนื่องจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ เช่น การก่อสร้าง หรือต่อเติมสถานที่ต่าง ๆ ส่งผลให้ต้นไม้ที่เจริญบริเวณใกล้เคียงเกิดความเครียด จากความเสียหายของระบบรากบางส่วน หรืออาการขาดน้ำ ทำให้ต้นไม้อ่อนแอลง ซึ่งเป็นสาเหตุให้เชื้อก่อโรครดังกล่าวเข้าทำลายต้นไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมทั้งแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 10)

Allen และคณะ (2010) รายงานการเข้าทำลายของเชื้อ *H. mammanum* ในพืชสกุล Aspen บริเวณ 5 พื้นที่ป่าแถบเทือกเขาร็อกกี โดยเชื้อราชนิดนี้เข้าทำลายต้นไม้ที่มีอายุ 40–50 ปีขึ้นไป เมื่อต้นไม้ถูกเชื้อราเข้าทำลาย อาการเริ่มแรกมีลักษณะคล้ายรอยบวมเล็กน้อยบริเวณผิวเนื้อไม้ จากนั้นเชื้อราสร้างโครงสร้างที่ใช้ขยายพันธุ์ (stromata) เจริญขึ้นบนผิวหน้าเนื้อไม้ลักษณะปื้นสีส้มเหลือง ต่อมาโครงสร้างที่เจริญเต็มที่เปลี่ยนเป็นสีดำปรีอกมาภายนอกลำต้น เชื้อราแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว ไปยังเซลล์ต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อพืช ยกเว้นเนื้อเยื่อสเคอเรนคิมา (sclerenchyma) ซึ่งเมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่ที่มีการเจริญของปุ่มนูน (canker) มีขนาดมากกว่า 2.5 มิลลิเมตร ใบพืชเกิดอาการเหี่ยว เนื่องจากเซลล์ที่ใช้ลำเลียงน้ำถูกทำลาย เชื้อราจะขยายลุกลามไปเรื่อย ๆ จนต้นไม้ตายลง (Bier, 1940; Anderson, 1956)



ภาพที่ 10 อาการโรคแคงเกอร์บนลำต้นของต้นโอ๊คที่เกิดจากเชื้อรา *Hypoxylon atropunctatum*
ที่มา: McBird และ Apple (2009)

ราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi)

ราเอนโดไฟท์ จัดเป็นกลุ่มเชื้อราที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อพืช มีวงจรชีวิตบางช่วง หรือตลอดชีวิต ภายในพืชนั้น และดำรงชีวิตแบบพึ่งพาอาศัยกัน (mutualistic symbiosis) โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียใด ๆ กับพืชอาศัย (Azevedo *et al.*, 2000) นอกจากนี้เชื้อราเอนโดไฟท์มีบทบาทสำคัญในการปกป้องพืชอาศัยจากปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจก่อให้เกิดผลเสียกับพืชนั้น มีการสำรวจเชื้อราเอนโดไฟท์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่เขตร้อน พบเชื้อราในวงศ์ Xylariaceae เป็นชนิดเด่น มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ในวงจรชีวิตดังกล่าว (Rodrigus, 1994; Lodge *et al.*, 1996) เชื้อราเอนโดไฟท์ในลำดับ Xylariales สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive metabolite) ที่มีประโยชน์ได้ แต่ยังมีบทบาทไม่มากนักในระบบนิเวศ (Petrini *et al.*, 1995; Whalley 1993; Rogers 2000)

Huang และ คณะ (2009) ศึกษาความหลากหลาย และจำแนกเชื้อราเอนโดไฟท์จากพืชตระกูลกุหลาบจันทน์พลา (*Artemisia* species) โดยนำเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ 34 ไอโซเลทมาจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา ร่วมกับวิธีทางชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ สามารถจำแนกรายได้ในระดับสกุลคือ *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phomopsis* และเชื้อราเอนโดไฟท์ชนิดเด่น (dominant fungal endophytes) ที่พบมากในพืชชนิดนี้ ได้แก่ เชื้อราในสกุล *Xylaria*

Ho และคณะ (2012) แยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากบริเวณกิ่งก้านของพืชสมุนไพรในวงศ์ Lauraceae และ Rutaceae ที่เก็บจากบริเวณตอนกลางและตอนเหนือของประเทศไต้หวัน จำนวน 156 ไอโซเลท จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับวิธีทางชีวโมเลกุลโดยศึกษาดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ ยีน *LSU* รวมทั้งสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ จำแนกเชื้อราได้

35 สายพันธุ์ ใน 19 วงศ์ ซึ่งเชื้อราที่พบมากที่สุด ได้แก่ *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Hypoxyton*, *Nigrospora*, *Phomopsis* และ *Xylaria*

Benitez และคณะ (2016) แยกเชื้อรา *H. anthochroum* ที่ดำรงชีวิตเป็นเชื้อราเอนโดไฟท์อาศัยอยู่ในพืชจำพวกเงาะ (*Burseraceae*) พบว่าสามารถสร้างสารระเหย ที่มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ และสร้างสารที่เป็นพิษต่อพืช (phytotoxin)

การสร้างเอนไซม์และสารทุติยภูมิที่มีประโยชน์ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี

ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจำเป็นต้องคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ ในการทำลายเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อย่างหนึ่ง คือการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (cell wall degrading enzyme) ที่ส่งผลให้เชื้อสาเหตุโรคชะงักการเจริญหรือไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อสาเหตุโรคที่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สร้างขึ้น เช่น เซลลูเลส กลูแคนเนส และไคตินเนส (Wijesundera *et al.*, 1991) และเอนไซม์ดังกล่าว อาจเกี่ยวข้องในการทำลายศัตรูพืชชนิดอื่น เช่น แมลง หรือไส้เดือนฝอย นอกเหนือจากการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายซับซ้อนต่าง ๆ คือการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีผลในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

Wei และคณะ (1992) ทดสอบการสร้าง cellulolytic enzyme จากเชื้อราสกุล *Xylaria* และ *Hypoxyton* พบว่าเชื้อราในสกุล *Xylaria* (*X. anisopleura*, *X. regalis* และ *X. grammica*) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงขึ้นหลังจากการบ่มไว้เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ และในเชื้อรา *H. stygium* สายพันธุ์ 76100905 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ beta-glucosidase ปริมาณ 51×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการบ่มไว้เป็นเวลา 3 วัน และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน (165×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

Angawi และคณะ (2003) พบสาร Malettinin A ที่ได้จากสโตรมาตาตาของเชื้อรา *Hypoxyton* sp. ซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา (antifungal agent) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides* และ *Candida albicans* เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี standard disk assay ใช้สารปริมาณ 250 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ผลการทดสอบแสดงบริเวณยับยั้งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 31–33 มิลลิเมตร และแสดงคุณสมบัติในการเป็นสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial agent) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus subtilis* เมื่อใช้สารปริมาณ 200 ไมโครกรัมต่อดิสก์ โดยแสดงบริเวณยับยั้งในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 21–30 มิลลิเมตร

Quang และคณะ (2006) สกัดสารจากสโตรมาตาของเชื้อรา *H. multiforme* พบสารในกลุ่ม azaphilone 4 ชนิด (Multiformin A–D) ที่มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์แบบไม่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มต่าง ๆ

Bills และคณะ (2012) แยกเชื้อรา *H. pulicidum* sp. nov. จากส่วนเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของพืชหลายชนิด พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถสร้างสาร Nudulisporic acid ที่มีคุณสมบัติในการขับไล่แมลงปากดูดที่เป็นพาหะนำโรคสู่มนุษย์และสัตว์ได้ เช่น ตัวเรือด (bedbug) หมัด (fleas) และเห็บ (ticks)

Kuhnert และคณะ (2014) ศึกษาองค์ประกอบของสารที่อยู่ภายในบริเวณสโตรมาตาด้วยวิธี HPLC ในเชื้อรา *H. lechatii* sp. nov. พบสารประกอบที่มีความเป็นพิษ และมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ คือ hypoxyvermelhotins (A–C), vermelhotin, BNT; daldinin E, daldinin F และ macrocarpone A

Rolb และคณะ (2015) ทดสอบการสร้างเอนไซม์ เบต้ากลูคาเนส (beta-glucanase) และแพคตินเนส (pectinase) ที่ได้จากเชื้อรา *A. stygium* พบว่าเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้โดยการทดลองใช้เปลือกส้ม (citrus bagasse) และกากถั่วเหลือง (soybean bran) เป็นซับสเตรท และเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ beta-glucanase ได้มากที่สุดที่ 10.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (pH 5.0) และเอนไซม์ pectinase ได้มากที่สุดที่ 6.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (pH 4.0)

Cheng และคณะ (2015) รายงานการพบสารทุติยภูมิในกลุ่ม Furanoid จากเชื้อรา *A. elevatidiscus* สายพันธุ์ BCRC 34014 ได้แก่ 7-O-methylnaringenin, pinocembrin, epicatechin และสารในกลุ่ม aliphatics 3 ชนิด ได้แก่ sitosterol, methyl linoleate และ 2,3-dihydroxypropyl palmitate ซึ่งเป็นรายงานการพบสารนี้ครั้งแรกที่สร้างจากเชื้อราชนิดนี้

Sudarman และคณะ (2016) ศึกษาองค์ประกอบของสารจากสโตรมาตาของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* 3 ชนิด คือ *A. leptascum*, *A. cf. truncatum* และ *Annulohyphoxylon* sp. พบสาร truncatones A–D และสารในกลุ่ม benzenofluoranthenes มีผลต่อการแบ่งเซลล์เนื้อเยื่อต่าง ๆ ในสัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นผลดีในด้านการศึกษาอัตรารเจริญของเซลล์มะเร็ง

Wu และคณะ (2017) ทดสอบสาร Nodupeptide ที่สร้างจากเชื้อรา *Nodulisporium* sp. สายพันธุ์ IFB-A163 พบว่ามีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ และฆ่าแมลง (insecticide) โดยสารดังกล่าวสามารถต่อต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ และมีคุณสมบัติในการฆ่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown plant hopper) แมลงศัตรูสำคัญในข้าว

ปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมัน เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในภาคใต้ของประเทศไทย และของโลก ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) จัดอยู่ในวงศ์ Arecaceae (Palmae) สามารถเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น ระหว่างเส้นละติจูดที่ 10 องศาเหนือถึง 10 องศาใต้ (Hartley, 2000)

การได้มาซึ่งผลผลิตปาล์มน้ำมันที่ดี เกษตรกรต้องจัดการความเสี่ยงต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ ในทุกระยะของการเจริญเติบโตของปาล์มน้ำมัน เช่น แมลงศัตรูปาล์มน้ำมัน อากาศขาดธาตุของปาล์มน้ำมัน และโรคที่เกิดในระยะต่าง ๆ ของปาล์มน้ำมัน โดยเฉพาะโรคที่เกิดในระยะต้นกล้าปาล์มน้ำมัน การเกิดโรคบางชนิดอาจไม่ได้ทำให้ต้นกล้าปาล์มน้ำมันตาย แต่ทำให้ต้นกล้าที่เป็นโรคอ่อนแอ หรือเจริญเติบโตช้า ส่งผลกระทบเป็นลูกโซ่ต่อเนื่องไปจนถึงผลผลิตของปาล์มในระยะยาว ซึ่งโรคสำคัญ ๆ ที่มักพบมีการระบาดตั้งแต่ระยะเมล็ดจนถึงระยะกล้าปาล์มน้ำมัน ได้แก่ โรคบราวเจอร์ม (brown germ disease) โรคเมล็ดเน่า (seed rot) โรคใบไหม้ (leaf blight) โรคบลาส (blast) และโรคใบจุด (leaf spot) มีสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิด เช่น *Cercospora elaeidis*, *Curvularia eragrostidis*, *Drechslera* sp., *Pestalotiopsis palmarum* (ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช, 2548; Labarca *et al.*, 2006 และ Pornsuriya *et al.*, 2013) โดยเชื้อราแต่ละชนิดทำให้เกิดแผลจุดบนใบปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแต่อาการที่คล้ายกันคือ หากมีการระบาดรุนแรง แผลเชื่อมต่อกันเป็นรอยไหม้ตลอดทั้งใบ ทำให้ต้นปาล์มน้ำมันเติบโตช้า แคระแกร็น ซึ่งโรคสำคัญที่พบในภาคใต้คือ โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Curvularia* spp.

โรคใบจุด *Curvularia* (*Curvularia* leaf spot)

เชื้อราในสกุล *Curvularia* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด และใบไหม้ที่สำคัญชนิดหนึ่ง โดยเชื้อราสกุลนี้สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด เช่น ไม้ผล พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ ตลอดจนพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ปาล์มน้ำมัน ยางพารา หรือพืชอาศัยรองที่เป็นวัชพืชต่าง ๆ (ตารางที่ 2) โดยเชื้อรา *Curvularia* มีการจัดหมวดหมู่ดังนี้ (<http://www.mycobank.or>)

Kingdom Fungi

Subkingdom Dikarya

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Class Dothideomycetes

Subclass Pleosporomycetidae

Order Pleosporales

Family Pleosporaceae

Genus *Curvularia*

เชื้อรา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

เชื้อรา *C. oryzae* เป็นสาเหตุโรคใบจุดที่มีความสำคัญในระยะต้นกล้าของปาล์มน้ำมัน โดยเฉพาะพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ที่เป็นพื้นที่สำคัญในการผลิตและเพาะปลูกปาล์มน้ำมัน ซึ่งมักพบการระบาดของเชื้อราชนิดนี้ในแปลงเกษตรกรที่มีการจัดการดูแลแปลงปลูกกล้าปาล์มที่ไม่ดี ตลอดจนระบบการให้น้ำกล้าปาล์มน้ำมันที่มากเกินไป อาการโรคในระยะแรก แสดงอาการที่ใบอ่อน โดยมีลักษณะเป็นจุดมีสีเหลือง เมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้นแผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำขนาดใหญ่ (Sunpapao *et al.*, 2014) (ภาพที่ 11 และ 12) ในประเทศไทย มีรายงานการระบาดของเชื้อรา *C. oryzae* และ *C. eragrostidis* บริเวณแหล่งเพาะปลูกกล้าปาล์มน้ำมันที่สำคัญทางภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดกระบี่ และสุราษฎร์ธานี ตามลำดับ (พิพัฒน์ เชียงหลิว และ เกริกชัย ธนารักษ์, 2554)

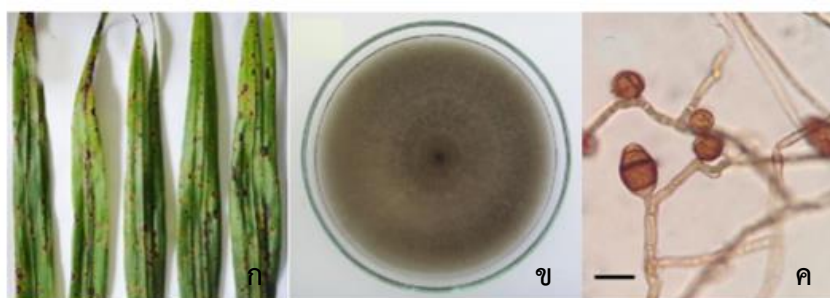
ตารางที่ 2 เชื้อรา *Curvularia* spp. บางชนิดที่ก่อโรคในพืชชนิดต่าง ๆ

ชนิดของเชื้อรา	ชื่อโรค	พืชอาศัย	อ้างอิง
<i>Curvularia aerea</i>	ใบจุด	ข้าว	Kusai และคณะ (2015)
<i>C. alcorrii</i>	ใบจุด	ข้าวโพด	Manamgoda และคณะ (2012)
<i>C. akaii</i>	ใบจุด	<i>Themeda triandra</i>	Manamgoda และคณะ (2012)
<i>C. eragrostidis</i>	ใบไหม้ จุดสนิม ใบจุด	กล้วยไม้สกุลหวาย ปาล์มน้ำมัน และข้าว	พีระวรรณ และคณะ (2553) Kusai และคณะ (2015)
<i>C. geniculata</i>	ใบจุด	ข้าว	Kusia และคณะ (2015)
<i>C. hawaiiensis</i>	ใบจุด	ข้าว	Kusia และคณะ (2015)
<i>C. hominis</i>	ใบจุด	<i>Echinoculata</i> sp.	Manamgoda และคณะ (2012)
<i>C. lunata</i>	ใบจุด เมล็ดต่าง ใบไหม้ เมล็ดเน่าดำ	ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง สับปุดา เยอบีร่า และ หญ้ายาง	พีระวรรณ และคณะ (2553) Akram และคณะ (2014) Kusai และคณะ (2015)
<i>C. oryzae</i>	ใบจุด	ปาล์มน้ำมัน	Sunpapao และคณะ (2014)
<i>C. pallescens</i>	ใบไหม้	ลิ้นมังกร	พีระวรรณ และคณะ (2553)
<i>C. presadii</i>	ใบจุด	แกลดดิโอส	พีระวรรณ และคณะ (2553)
<i>C. vermiculata</i>	ใบจุด	ข้าวฟ่าง	Manamgoda และคณะ (2012)
<i>C. tuberculata</i>	ใบจุด	กล้วยไม้สกุลออกซิเดียม ข้าวโพด	พีระวรรณ และคณะ (2553) Manamgoda และคณะ (2012)
<i>Curvularia</i> sp.	ใบจุด ฝักจุด	ดอกบานชื่น กระเจี๊ยบเขียว	พีระวรรณ และคณะ (2553)



ภาพที่ 11 ลักษณะอาการใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Curvularia oryzae* ก. อาการใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ข. ลักษณะจุดแผลที่เกิดจากเชื้อ *Curvularia oryzae*

ที่มา: [www. http://ippc.acfs.go.th/pest/G001/T008/FUNGI172](http://ippc.acfs.go.th/pest/G001/T008/FUNGI172)



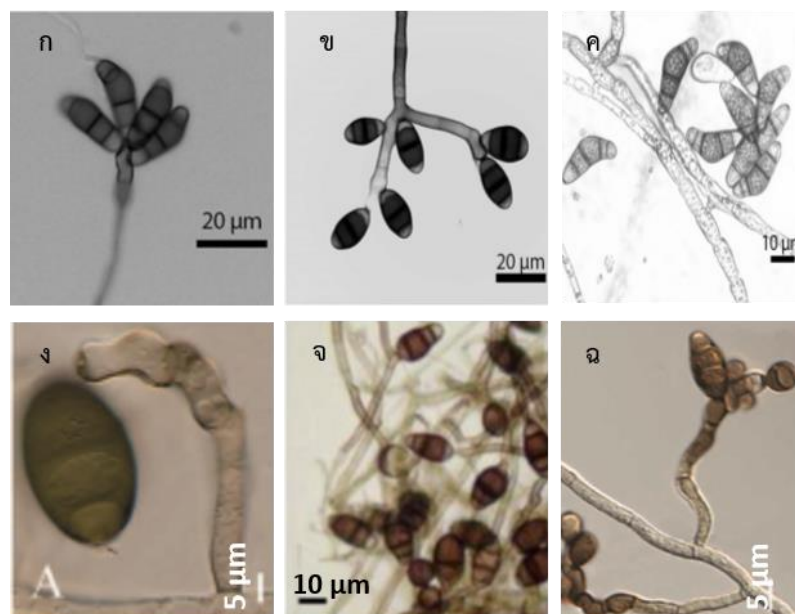
ภาพที่ 12 เชื้อรา *Curvularia oryzae* ก. ลักษณะใบจุดบนใบกล้าปาล์มน้ำมัน ข. ลักษณะโคโคนีของเชื้อรา *Curvularia oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA (Corn Meal Agar) อายุ 9 วัน ค. ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia oryzae*

ที่มา: จิตรา กิตติโมรากุล (2557)

การสืบพันธุ์ของเชื้อรา *Curvularia oryzae*

เชื้อรา *C. oryzae* เป็นรูปแบบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราในสกุล *Cochliobolus* spp. เชื้อราในสกุลนี้สามารถก่อโรคกับพืชได้ ตัวอย่างเช่น โรคใบจุดในข้าวบาร์เลย์ (barley spot blotch) (Agostinetto *et al.*, 2015) โรคใบจุดในธัญพืช (spot blotch on cereal leaves) โรครากเน่า (common root rot) (Deacon and Lewis, 1982) ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุล *Curvularia* spp. มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า โคโคนีเดียม (conidium) รูปร่างโค้ง มีจำนวนเซลล์ 3–5 เซลล์ โดยเซลล์ตรงกลางมีสีเข้มกว่าเซลล์ตรงส่วนหัว และส่วนท้าย โคโคนีเดียมสร้างบนก้านชูสปอร์ที่เรียกว่าโคโคนิโอฟอร์ (conidiophore) ที่มีลักษณะแบบข้อหัก (geniculate) และไม่มีก้านแตกกิ่งก้าน (ภาพที่ 13) แต่อาจมีการงอก (proliferation) ออกทางส่วนด้านข้างใกล้ส่วน

ปลาย (วิจัย รักรักษาศาสตร์, 2551) ในเชื้อรา *C. oryzae* พบว่า มีลักษณะของโคนิเดียที่แตกต่างออกไปจากเชื้อราในสกุล *Curvularia* spp. ชนิดอื่น ๆ โดยมีลักษณะโคนิเดียที่เจริญอยู่บนปลายโคนิดิโอฟอร์เพียง 1 สปอร์เท่านั้น ภายในโคนิเดียมีการสร้างผนังกัน (septate hypha) แบ่งโคนิเดียออกเป็น 3-4 เซลล์ บริเวณกึ่งกลางของสปอร์ มักโป่งพองใหญ่ขึ้น และมีสีเข้มมากกว่าเซลล์ข้างเคียง (Sunpapao *et al.*, 2014)



ภาพที่ 13 ลักษณะสปอร์แบบต่าง ๆ ที่พบในเชื้อรา *Curvularia* spp. ก. *Curvularia aeria* ข. *Curvularia eragrostidis* ค. *Curvularia geniculata* ง. *Curvularia neoindica* จ. *Curvularia oryzae* และ ฉ. *Curvularia subpendfii*

ที่มา: Kusai และคณะ (2015); Monamgoda และคณะ (2015) และ Sunpapao และคณะ (2014)

การควบคุมโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี

ปัจจุบัน การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเริ่มเข้ามามีบทบาทสำคัญในการเพาะปลูกพืชของเกษตรกร เนื่องจากปัญหาสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชส่งผลเสียต่อตัวเกษตรกรเอง และผู้บริโภค ตลอดจนตกค้างในดิน และแหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อ การสร้างความต้านทานของเชื้อก่อโรคต่อสารป้องกันกำจัดโรคพืชนั้น หรือก่อให้เกิดการดื้อยา พิพัตน์ เชียงหลิว และเกริกชัย ธนารักษ์ (2554) รายงานการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน 3 ชนิด ได้แก่ แคปแทน (captan) ไทแรม (thiram) และแมนโคเซบ (mancozeb) สำหรับป้องกันโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน พบว่าเชื้อรา *C. oryzae* สามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าว

และเกิดการดื้อยา ดังนั้นจึงใช้สารเคมีทั้ง 3 ชนิด ผสมกันในอัตราส่วน เท่า ๆ กัน ฉีดพ่นเพื่อยับยั้งการระบาดของโรคในแปลง แต่พบว่าเมื่อหยุดใช้สารเคมีดังกล่าว เกิดการระบาดของโรคซ้ำอีกครั้ง ดังนั้นการควบคุมโดยชีววิธีจึงเป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งของเกษตรกร เนื่องจากเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์ สภาพแวดล้อม และสามารถแก้ไขปัญหาการสร้างความต้านทานของเชื้อก่อโรคได้ ปัจจุบันจึงมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการควบคุมโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยชีววิธีเกิดขึ้น

จิตรรา กิตติโมรากุล (2557) ทำการสำรวจและแยกเชื้อรา *C. oryzae* ที่เกิดการระบาดบริเวณแปลงปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมันในพื้นที่ต่าง ๆ จาก 11 จังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย และทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อรา *C. oryzae* ในแต่ละไอโซเลท พบว่าเชื้อรา *C. oryzae* ไอโซเลท NK1 สามารถก่อโรคได้รุนแรงที่สุด จึงได้ทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. ในการควบคุมเชื้อรา *C. oryzae* NK1 โดยใช้วิธี dual culture พบว่าทั้งเชื้อรา *Trichoderma* spp. และเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *C. oryzae* ไอโซเลท NK1 ได้ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ 90.22 และ 81.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Pithakkit และคณะ (2015) รายงานความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Actinomycetes ได้แก่ *Streptomyces abikoensis* ChM3 -1 , *Kitasatospora nipponensis* KM6 -4 และ *S. angustmyceticus* NR8 -2 ในการควบคุมเชื้อ *C. oryzae*, *Ganoderma boninense* และ *Schizophyllum commune* สาเหตุโรคใบจุด (leaf spot) โรคลำต้นเน่า (stem rot) และโรคบราวเฮอร์ม (brown germ disease) ในปาล์มน้ำมัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Actinomycetes สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิดได้ โดยทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคมักมีลักษณะผิดปกติเมื่อเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว

Sunpapao และคณะ (2018) ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 3 ชนิด ได้แก่ *S. hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* NR8-2, *T. harzianum* TM2/1 และ endophytic *Trichoderma* V76-12 เพื่อควบคุมเชื้อ *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยการทดสอบด้วยวิธีการ dual culture test การสร้างสารระเหย (volatile organics compound) การสกัดสารสกัดหยาบ (crude metabolite) ด้วยวิธีการ agar diffusion test และทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพเรือนทดลอง พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* V76-12 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *C. oryzae* เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลทอื่น ๆ

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ประกอบด้วย เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ไล้เดือนฝอย โปรโตซัว ไวรัส และไวรอยด์ เป็นส่วนหนึ่งของการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ในการลดปริมาณของเชื้อโรคพืชหรือลดกิจกรรมของเชื้อสาเหตุโรคพืช ให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยใช้สิ่งมีชีวิต (organism) (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2546)

กลไกการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อสาเหตุโรคพืช

เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มีกลไก และรูปแบบในการดำรงชีวิตที่สามารถต่อสู้กับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ในธรรมชาติได้ เพื่อแย่งพื้นที่หาอาหาร ย่อยสลายสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเพื่อดูดซึมเป็นอาหาร หรือสามารถผลิตสารต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ ช่วยย่อยสลายธาตุอาหารในดินให้อยู่ในรูปแบบที่พืชนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น หรือสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคของพืชโดยไม่ส่งผลเสียกับพืชนั้น (อรุณ และคณะ, 2559) โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคดังนี้ (Kawicha and Sangdee, 2012)

การแก่งแย่งแข่งขัน (competition)

เป็นกลไกที่เกิดขึ้นระหว่างสิ่งมีชีวิตสองชนิด ผลกระทบจากกลไกดังกล่าวทำให้สิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งด้อยความสามารถลง กล่าวคือ ในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และเชื้อสาเหตุโรคพืช หากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกการแข่งขัน จะสามารถเจริญครอบคลุมพื้นที่ได้รวดเร็ว รวมไปถึงการแก่งแย่งพื้นที่ในการหาอาหารของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Begon *et al.*, 1996 อ้างโดย Kawicha and Sangdee, 2012) เชื้อสาเหตุโรคพืชส่วนใหญ่ ต้องการสารอาหาร เพื่อช่วยในการงอกของสปอร์ หรือการแทงเส้นใยเข้าสู่ผิวพืช ดังนั้นหากไม่มีพื้นที่สำหรับดูดซึมธาตุอาหาร กระบวนการดังกล่าวจะชะงักลงจึงไม่สามารถก่อโรค และสร้างอันตรายให้กับพืชได้

การทำลายชีวิต (antibiosis)

กลไกการทำลายชีวิต เป็นปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์สองชนิด หรือมากกว่าในการสร้างสารบางอย่าง เช่น สารปฏิชีวนะ หรือสารพิษ ที่มีผลกระทบเป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ หรือที่รู้จักกันดีว่าเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่มีคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ (metabolic compounds) ที่สามารถต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทั้งในด้านการยับยั้งการเจริญ หรือมีฤทธิ์เป็นพิษสามารถฆ่าจุลินทรีย์สาเหตุโรคอื่น ๆ ได้ กลไกการทำลายชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถสังเกตได้จากบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) รอบ ๆ โคลนินของเชื้อเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้น

การเป็นปรสิต (parasitism)

สภาวะที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ได้รับผลประโยชน์จากจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ทำให้จุลินทรีย์ที่มีสภาวะเป็นผู้ให้อาศัย (host) อ่อนแอหรือตายลง ในเชื้อราบางชนิดที่ดำรงชีวิตแบบปรสิต

สามารถใช้เส้นใยพันรัด หรือใช้ฮัสตอเรีย (haustoria) แทะทะลุผ่านผนังเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรค เพื่อดูดซับสารอาหารจากเชื้อราสาเหตุโรคนั้น

การชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (induced systemic resistance)

เป็นกลไกที่ชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคด้วยตัวเอง กลไกการตอบสนองต่อความต้านทานของพืชกับโรคพืช มี 2 ระดับ ได้แก่ การตอบสนองต่อความต้านทานในระยะสั้น (short term response) และการตอบสนองต่อความต้านทานในระยะยาว (long term response) โดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่อ่อนแอลงในต้นพืช หรือการใช้สารเคมีบางชนิดชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน ซึ่งพืชสามารถพัฒนาความต้านทานได้เองจากการรับเชื้อ หรือสารเคมีสังเคราะห์ (synthetic chemical compound) หรือสารธรรมชาติ (natural compound) บางชนิด (เกษม สร้อยทอง, 2551) หรือการที่พืชถูกกระตุ้นด้วยเชื้อที่อ่อนแอ (hypovirulence) จึงสร้างความต้านทานต่อโรคได้ เช่น การติดเชื้อไวรัส *Cryphonectria hypovirus1* ของเชื้อรา *Cryphonectria parasitica* สาเหตุโรคไหม้ในเกาลัด (chestnut blight) ทำให้การเกิดโรคไหม้ในเกาลัดทุเลาลง นอกจากนี้ตัวเชื้อที่เป็น Hypovirulence สามารถแพร่กระจายและถ่ายทอดไปยังต้นพืชที่เป็นโรคข้างเคียงได้

การส่งเสริมการเจริญของพืช (induce growth response)

ในกลไกนี้ จุลินทรีย์ที่มีความโดดเด่นมากที่สุด คือจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณรอบ ๆ รากพืช (rhizosphere microorganism) (Kliefied and Chet, 1992 อ้างโดย Kawicha and Sangdee, 2012) ในเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์บางชนิด นอกจากต่อต้าน และควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ ยังส่งเสริมการเจริญของพืชได้อีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา *T. harzianum* ที่นอกจากจะใช้ในกระบวนการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีของพืชในตระกูลแตงได้ ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญของแตงได้ 25-40% เมื่อชั่งน้ำหนักแห้ง (EL-Mehalawy, 2004)

เชื้อรา *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon* กับการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ และ เชื้อสาเหตุโรคพืช

เชื้อราทั้งสองสกุลสามารถสร้างสารที่มีประโยชน์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่มักปนเปื้อนมาในอาหารที่ไม่สะอาด และทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ (Marcellano et al., 2017)

Yuyama และคณะ (2017) พบว่าเชื้อ *H. fragiforme* ที่พบบนเหือกเขาแห่งหนึ่งในประเทศเยอรมนี เมื่อเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เชื้อราสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ที่มีผลในการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilms) ของเชื้อแบคทีเรีย

S. aureus ทำให้การดื้อยาปฏิชีวนะและการสร้างความต้านทานต่อระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ในเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ลดลง

เชื้อรา *Annulohyphoxylon* และ *Hyphoxylon* นอกจากสามารถต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์แล้ว ยังสามารถต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชได้เช่นกัน

Angawi และคณะ (2003) สกัดสาร Malettin A จากบริเวณสโตรมาตาตาของเชื้อรา *Hyphoxylon* spp. ทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่ามีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อรา *Aspergillus flavus* สาเหตุโรคฝักเน่า และโรคที่เกิดภายหลังการเก็บเกี่ยวของพืชผักหลายชนิด

Tomscheck และคณะ (2010) แยกเชื้อรา *Nodulosporium* sp. (ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *Hyphoxylon*) จากใบพืชชนิดหนึ่ง (*Persea indica*) พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถสร้างสารระเหยที่ต่อต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Botrytis cinerea*, *Phytophthora cinnamomi*, *Cercospora beticola* และ *Sclerotinia sclerotiorum*

Hassan และคณะ (2013) แยกเชื้อรา *Hyphoxylon* sp. จากใบเฟิร์นชนิดหนึ่ง (*Thelypteris angustifolia*) ทางตอนกลางของประเทศอเมริกา ทดสอบความสามารถในการสร้างสารระเหยในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถสร้างสารระเหยที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพให้กับน้ำมันดิบ อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืช อาทิ *P. palmivora*, *Rhizoctonia solani* และ *S. sclerotiorum* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่อเชื้อราสาเหตุโรคสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์

Fernandez และคณะ (2016) รายงานการสร้างสารระเหยจากเชื้อรา *Nodulisporium* sp. GS4d2 II1 a พบว่าสารระเหยที่เชื้อราสร้างมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคน้ำระดับคอดินของต้นกล้าผักหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของการสร้างสารระเหยต่อต้านนี้ทั้งในเชื้อราชนิดเดียวกัน และต่างชนิดกันด้วย (traspecific and interspecific interactions)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทราบชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyton* ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย
2. เพื่อให้ได้เชื้อรา *Annulohyphoxylon* หรือ *Hypoxyton* ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ตัวอย่างแห้ง (herbarium) และตัวอย่างดองของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyton* ที่พบในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย
2. มีฐานข้อมูลให้กับผู้ที่สนใจศึกษาชนิด และคุณสมบัติบางประการของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyton* ที่พบในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย
3. เป็นแนวทางเลือกหนึ่งสำหรับการลดใช้สารเคมีในการป้องกันและควบคุมโรคพืช

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. การระบุชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

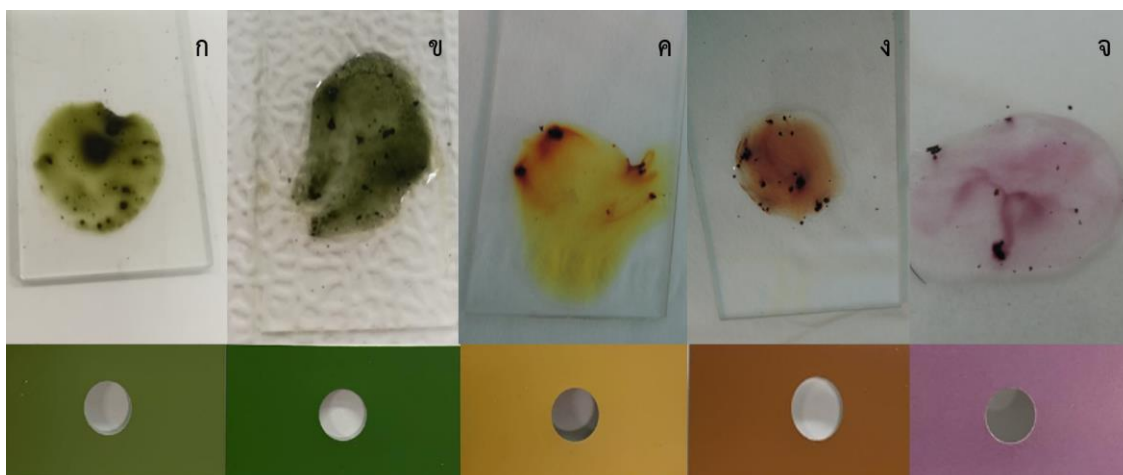
เก็บตัวอย่างเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxydon* ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ บริเวณเส้นทางศึกษารวมชาติ น้ำตก และสวนยางพาราในพื้นที่ภาคใต้ ยกเว้นจังหวัดยะลา ปัตตานี และนราธิวาส ระหว่างเดือนธันวาคม 2558–มีนาคม 2559 และ เดือนกรกฎาคม 2559–ธันวาคม 2559 เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่มีสภาพภูมิอากาศชื้นเหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อรา โดยเก็บตัวอย่างกิ่งไม้ หรือขอนไม้ที่เชื้อราเจริญอยู่ ในกรณีที่เชื้อราเจริญอยู่บนขอนไม้ขนาดใหญ่ ใช้เลื่อยตัด หรือใช้สิ่วแงะขึ้นส่วนที่เชื้อราเจริญออก ถ่ายรูปตัวอย่าง วัดขนาดของเชื้อราด้วยไม้บรรทัด หรือตลับเมตร จดบันทึกวันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง สภาพพื้นที่ ชนิดพืชที่เชื้อราเจริญ และบันทึกรหัสหมายเลขตัวอย่าง เก็บตัวอย่างลงถุงพลาสติก (zip lock) ปิดปากถุงให้สนิทนำไปห้องปฏิบัติการ ผึ่งลมให้แห้ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นที่อาจเจริญขึ้นในขณะที่ตัวอย่างขึ้น

แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) โดยทำความสะอาดบริเวณผิวหน้าสโตรมาตา หรือโครงสร้าง fruiting body ของเชื้อราด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้ใบมีดเฉือนบริเวณผิวหน้าสโตรมาตาออกบาง ๆ เพื่อให้เห็นเพอริทีเซียมที่ภายในบรรจุแอสคัส ใช้เข็มเขี่ยตัดแอสคัส (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์) ออกมาวางบนจานอาหารรูน ทำให้ถุงแอสคัสแตกออก และเก็บแอสโคสปอร์เดี่ยว (single ascospore) นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA (potato dextrose agar, ภาคผนวก ค) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28–30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 12–24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา ตัดปลายเส้นใย (hyphal tips) ที่เจริญจากแอสโคสปอร์เดี่ยวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope; Leica PM750, Germany) ย้ายลงในหลอดอาหารเอียง (PDA slant) เพื่อเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้จำแนกชนิดต่อไป

1.2 การศึกษาโครงสร้างภายนอก

นำตัวอย่างมาตรวจดูลักษณะภายนอก และโครงสร้างภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป บันทึกสีของสโตรมาตา ลักษณะออสติโอล เพอริทีเซีย และลักษณะอื่น ๆ บันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอซึ่งประกอบด้วยกล้องถ่ายภาพ (Leica S8APO, Germany) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกชนิด จากนั้นหยดโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH; Himedia) ความเข้มข้น

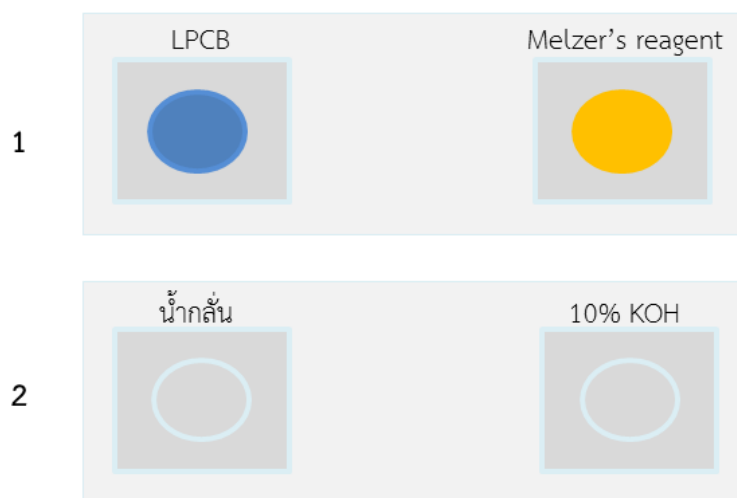
10 เปอร์เซ็นต์ บนผิวหน้าสโตรมาตาทิ้งไว้ 1 นาที ดูปฏิกิริยาสีที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับแผ่นสีมาตรฐาน (RHS: The Royal Horticultural Society) (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 สีที่ปรากฏจากการทำปฏิกิริยาของสโตรมาทากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* (ก.-ข.) และเชื้อรา *Hypoxylon* (ค.-จ.) ก. สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous) ข. สีเขียวหม่น (dull green) ค. สีส้ม (orange) ง. สีส้มอมน้ำตาลหม่น (dull orange brown) จ. สีม่วง (purple)

1.3 การศึกษาลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำตัวอย่างเชื้อราส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (Leica DM 750, Germany) ที่กำลังขยายต่าง ๆ ใช้ใบมีด (gillette superthin) เฉือนบริเวณผิวหน้าสโตรมาตาออก จนเห็นเพอริทีเซียม ใช้เข็มเขี่ยตักแอสคัสวางบนแผ่นสไลด์ เพื่อทำสไลด์กึ่งถาวร (ภาพที่ 15) โดยใช้สไลด์ 2 แผ่น สไลด์แรกหยดแลกโตฟีนอลคอตตอลบลู (lactophenol cotton blue : LPCB) สังกะสีขนาด และ รูปร่างของแอสคัส หยดสารละลายเมลเซอร์ (melzer's reagent) เพื่อบันทึกการติดสีของ เอพิคอลแอพาราตัส (apical apparatus) สไลด์ที่ 2 หยดน้ำกลั่น บันทึกลักษณะรูปร่าง และสีสันของ แอสโคสปอร์ และหยดสารละลายโพแตสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (10% KOH) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที สังเกตลักษณะเปลือกหุ้มสปอร์ (เพอริสปอร์) บันทึกภาพใต้กล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ ซึ่งประกอบด้วยกล้องถ่ายภาพ วัดขนาดแอสโคสปอร์ 30 สปอร์ต่อตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม Leica applications (LAS software) และจัดบันทึกลักษณะต่าง ๆ จากภาพถ่าย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนก เปรียบเทียบลักษณะกับหนังสือของ Webster และ Weber (2007) Thienhirun (1997) สุรางค์ เขียวศิริ (2542) Suwannasai (2005) มัลลิกา มะกรวิวัฒนะ (2557) และงานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง



ภาพที่ 15 การเตรียมสไลด์กึ่งถาวรเพื่อศึกษาโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

2.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา ดัดแปลงจาก Saitoh และคณะ (2006)

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดปลายเส้นใยเชื้อรา 2 ชั้น ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติมนสารละลาย lysis buffer (200 mM Tris-HCl, 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 200 mM NaCl, 1% n-lauroylsarcosine sodium salt, pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ จากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใส (supernatant) 300 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนสารละลายเอทานอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เติมนสารละลายเอทานอลออก และเติมนสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออก เปิดฝาคั่วหลอดไมโครทิวบ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย nuclease-free water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทำลองต่อไป

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราส่วน *ribosomal DNA (rDNA)* และ *beta-tubulin* ทุกไอโซเลทด้วยเทคนิค PCR ตำแหน่ง Internal transcribed spencer (ITS) ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4 (White *et al.*, 1990) และตำแหน่ง *beta-tubulin* ใช้คู่ไพรเมอร์ *beta-tubulin_F* กับ *beta-tubulin_R* (Park *et al.*, 2012) โดยมีขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยาในหลอด PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ดังนี้

จีโนมดีเอ็นเอ 2.0 ไมโครลิตร 2X Dream Taq Green PCR master mix (Thermo fisher scientific, USA) 25 ไมโครลิตร 100 พิโคโมลาร์ forward primer 1.0 ไมโครลิตร 100 พิโคโมลาร์ reverse primer 1.0 ไมโครลิตร RNase-free water 21 ไมโครลิตร

นำหลอด PCR เข้าเครื่อง Thermal cycler (Bio-RAD T100™) ตั้งสภาวะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5x TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้บนเครื่อง UV transilluminator นำตัวอย่างที่ได้ส่งบริษัท MACROGEN (ประเทศเกาหลีใต้) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) เพื่อใช้ในการยืนยันชนิดต่อไป

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ (phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon* จากการทดลองและลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 3) นำมาจัดเรียง (multiple sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) นำผลที่ได้มาตรวจสอบอีกครั้งด้วยโปรแกรม BioEdit (North Carolina state university, USA. 1999) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor joining โดยโปรแกรม MEGA version 6 (Tamura *et al.*, 2011) ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ นำข้อมูลแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้ไปวิเคราะห์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิด

ตารางที่ 3 เชื้อราที่นำมาวิเคราะห์และเทียบเคียงสำหรับการสร้างแผนภูมิต้นไม้ในการศึกษานี้

ชนิด	สายพันธุ์	สถานที่พบ	Accession No.	
			ITS	<i>beta-tubulin</i>
<i>Annulohypoxylon sp.</i>	H181	ประเทศไทย	FN252420	-
<i>Annulohypoxylon bahnphadengense</i>	STMA13115	ประเทศเยอรมันนี	KX376338	KX376347
<i>A. moriforme</i>	SUT220	ประเทศไทย	DQ322129	-
<i>A. nitens</i>	91022108	ประเทศไต้หวัน	EF026138	AY951664
<i>A. nitens</i>	HY11	ประเทศจีน	KX722230	-
<i>A. squamulosum</i>	YMJ 90081905	ประเทศไต้หวัน	-	AY951665
<i>A. stygium</i>	105F	ประเทศจีน	FJ008986	AY951667
<i>A. stygium</i>	P10535EM1CC601	ประเทศปานามา	KP322774	KX271263
<i>A. stygium</i>	FL0470	ประเทศสหรัฐอเมริกา	-	KU684142
<i>A. subnitens</i>	MUCL54594	ประเทศเยอรมันนี	KX376333	-
<i>A. thailandicum</i>	MFLUCC 13-0118	ประเทศไทย	NR_153529	-
<i>Hypoxylon cf. archeri</i>	SUT103	ประเทศไทย	DQ201121	-
<i>H. anthochroum</i>	GS4D2II1a	ประเทศเม็กซิโก	KM516709	-
<i>H. cercidicola</i>	CBS:119009	ประเทศเยอรมันนี	KC968908	-
<i>H. cinnabarinum</i>	YMJ 8	ประเทศเม็กซิโก	AY951709	-
<i>H. durandii</i>	dmp032cm	ประเทศเยอรมันนี	FN209460	-
<i>H. erythrostroma</i>	MUCL:53759	ประเทศฝรั่งเศส	KC968910	-
<i>H. fendleri</i>	STMA12152	ประเทศฝรั่งเศส	KF234421	-
<i>H. fendleri</i>	BCC32408	ประเทศไทย	KY173350	-
<i>H. fragiforme</i>	MUCL 51264	-	KC477229	-
<i>H. griseobrunneum</i>	MUCL 51264	-	KY610402	-
<i>H. haematostroma</i>	MUCL:53301	-	KC968911	KC977291
<i>H. haematostroma</i>	STMA 14043	ประเทศอาร์เจนตินา	KU159527	-
<i>H. haematostroma</i>	YMJ 14 (JDR)	ประเทศไต้หวัน	JQ009322	-
<i>H. haematostroma</i>	YMJ 14	ประเทศไต้หวัน	-	AY951727
<i>H. howeanum</i>	MUCL 47599	-	AM749928	-
<i>H. hypomiltum</i>	MUCL:51845	-	KY610403	-
<i>H. hypomiltum</i>	-	ประเทศไต้หวัน	JN979427	-
<i>H. jecorinum</i>	YMJ 39	ประเทศเม็กซิโก	AY951731	-
<i>H. jaklitschii</i>	CBS 138916	ประเทศศรีลังกา	NR_158468	-
<i>H. lenomandii</i>	BCC<THA>:71961	ประเทศไทย	KM610289	KC977273
<i>H. lenomandii</i>	BCC<THA>:31564	ประเทศไทย	KM610292	-
<i>H. lenomandii</i>	YMJ 92092009	ประเทศไต้หวัน	-	AY951733
<i>H. macrocarpum</i>	IUB:B.Whitaker:OTU43	-	MH178712	-
<i>H. macrocarpum</i>	12H0101	ประเทศไทย	KT385774	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิด	สายพันธุ์	สถานที่พบ	Accession No.	
			ITS	beta-tubulin
<i>H. macrocarpum</i>	JR5	ประเทศจีน	KM513588	-
<i>H. monticulosum</i>	EK13014	ประเทศไทย	KP401578	-
<i>H. monticulosum</i>	JR5	ประเทศจีน	KM513588	-
<i>H. munkii</i>	-	ประเทศไต้หวัน	JN979436	-
<i>H. notatum</i>	YMJ 250 (JDR)	ประเทศสหรัฐอเมริกา	JQ009305	-
<i>H. ochraceum</i>	MUCL54625	-	KC968937	-
<i>H. papillatum</i>	ATCC58729	-	KC968919	-
<i>H. polyporoideum</i>	YMJ 15 (JDR)	ประเทศไต้หวัน	JQ009311	MH790277
<i>H. polyporoideum</i>	YMJ 56	-	-	AY951748
<i>H. rickii</i>	MUCL53309	-	KC968932	KC977288
<i>H. rubiginosum</i>	YMJ 25	ประเทศเม็กซิโก		AY951750
<i>H. rubiginosum</i>	MUCL 52887	-	KC477232	-
<i>H. samuelsii</i>	KC968916	-	KC968916	
<i>H. shearii</i> var. <i>minor</i>	Isolate29	ประเทศเม็กซิโก	EF026142	-
<i>H. subgilvum</i>	YMJ 88113007 (HAST)	ประเทศไต้หวัน	JQ009315	-
<i>H. sublenormandii</i>	640F18F-AC	ประเทศบราซิล	MG751215	-
<i>H. submonticulosum</i>	CBS 115280	-	KC968923	-
<i>H. ulmophilum</i>	TM-1	-	JQ009329	-
<i>H. ticinense</i>	YMJ 313 (HAST)	ประเทศฝรั่งเศส	JQ009317	-
<i>H. trugodes</i>	STMA13000	-	KF234422	-
<i>H. vogesiacum</i>	CBS 115273	ประเทศฝรั่งเศส	KC968920	KX271275
<i>Xylaria venosula</i>	isolate 94080508	ประเทศสหรัฐอเมริกา	EF026149	EF025617
<i>A. moriforme</i> *	SKW12	สงขลา ประเทศไทย	-	-
<i>A. nitens</i> *	PNGW04, SKW11	พังงา และสงขลา ประเทศไทย	-	-
<i>A. stygium</i> *	PTW09, SRW04	พัทลุง และสุราษฎร์ธานี ประเทศไทย	-	-
<i>A. thailandicum</i> *	CHPW07	ชุมพร ประเทศไทย	-	-
<i>H. duranii</i> *	PNGW02, SKW32	พังงา และสงขลา ประเทศไทย	-	-
<i>H. fendleri</i> *	PTW08, PJB04	พัทลุง และชุมพร ประเทศไทย	-	-
<i>H. griseobrunneum</i> *	PTW09(N)	พัทลุง ประเทศไทย	-	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิด	สายพันธุ์	สถานที่พบ	Accession No.	
			ITS	<i>beta-tubulin</i>
<i>H. haematostroma</i> *	KBPB01, SKWPM03	กระบี่ และสงขลา ประเทศไทย	-	-
<i>H. hypomiltum</i> *	PSUW1, PSUB09, PJB03	สงขลา และชุมพร ประเทศไทย	-	-
<i>H. jaklitschii</i> *	CHPW02, CHPW03, NKB02	ชุมพร และนครศรีธรรมราช ประเทศไทย	-	-
<i>H. lenormandii</i> *	RNW03, SRBAM02	ระนอง และสุราษฎร์ธานี ประเทศไทย	-	-
<i>H. macrocarpum</i> *	PSUW07	สงขลา ประเทศไทย	-	-
<i>H. monticulosum</i> *	CHPW01, KB4, NKB03, PNGB02, SKWPM03	ชุมพร กระบี่ นครศรีธรรมราช พังงา และ สงขลา ประเทศไทย	-	-
<i>H. pilgerianum</i> *	SRBAM01	สุราษฎร์ธานี ประเทศไทย	-	-
<i>H. sublenormandii</i> *	SKW30	สงขลา ประเทศไทย	-	-
<i>Annulohypoxyton</i> species A*	KBPB02	กระบี่ ประเทศไทย	-	-
<i>Annulohypoxyton</i> species C*	PNGPW03	พังงา ประเทศไทย	-	-
<i>Annulohypoxyton</i> species E*	TRW07	ตรัง ประเทศไทย	-	-
<i>Hypoxyton</i> species B*	SKW09	สงขลา ประเทศไทย	-	-
<i>Hypoxyton</i> species C*	STPW01	สตูล ประเทศไทย	-	-
<i>Hypoxyton</i> species D*	PTW02	พัทลุง ประเทศไทย	-	-
<i>Hypoxyton</i> species F*	TRW04	ตรัง ประเทศไทย	-	-
<i>Hypoxyton</i> species G*	KBPB02	สงขลา ประเทศไทย	-	-
<i>Hypoxyton</i> species H*	TRW05, SRW05	ตรัง และสุราษฎร์ธานี ประเทศไทย	-	-

หมายเหตุ: * เป็นชนิดที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในการศึกษานี้

3. การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

3.1 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรค

เชื้อรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในปาล์มน้ำมัน ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำเส้นใยมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

นำเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา

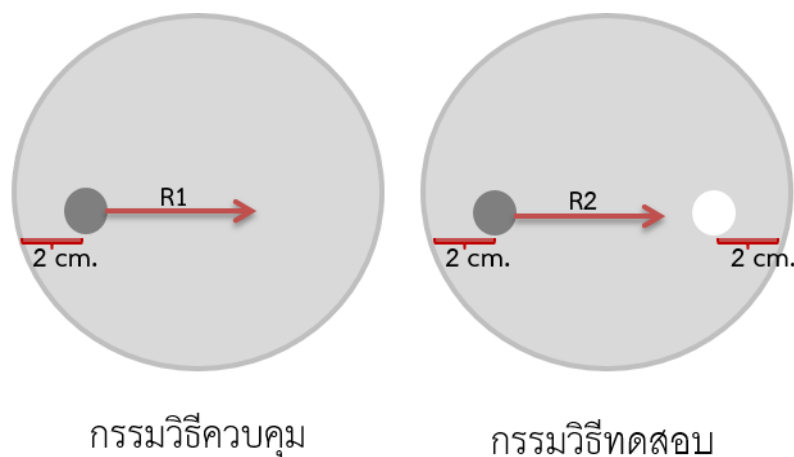
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia oryzae*

ทำการทดสอบด้วยวิธี dual culture โดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ที่ต้องการทดสอบ นำไปวางบนอาหาร PDA โดยวางในแนวเส้นผ่านศูนย์กลางให้เชื้อห่างจากขอบจาน 2 เซนติเมตร และด้านตรงข้ามวางเชื้อรา *C. oryzae* ส่วนกรรมวิธีควบคุม วางเชื้อรา *C. oryzae* เพียงชนิดเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 16) ในแต่ละไอโซเลท ทดสอบ 5 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเส้นใยเชื้อราในกรรมวิธีควบคุมเจริญเต็มจาน วัดรัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth – PIRG) (Vincent, 1927)

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (PIRG) = $(R_1 - R_2)/R_1 \times 100$

R_1 = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีควบคุม

R_2 = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อในกรรมวิธีทดสอบ



ภาพที่ 16 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Curvularia oryzae* ของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ด้วยวิธี dual culture

4. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia oryzae*

4.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีของเชื้อราทดสอบที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 3-5 วัน (ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา) นำมาวางบนอาหาร colloidal chitin agar (CCA, ภาคผนวก ค) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ สังเกตเปลี่ยนสีของอาหาร CCA ทุกวัน หากเชื้อราสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเกิดการย่อยไคตินในอาหารเลี้ยงเชื้อสีอาหาร CCA เปลี่ยนเป็นสีม่วง บันทึกผลเป็นบวก บันทึกผลเป็นลบหากเชื้อราไม่สร้างเอนไซม์ และบันทึกวันที่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร CCA ในแต่ละไอโซเลทของเชื้อราที่ทดสอบ

4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (Pointing, 2003)

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 3-5 วัน ย้ายเลี้ยงบนอาหาร carboxymethyl cellulose agar (CMC, ภาคผนวก ค) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยการทดสอบการละลายของโกเรด (congo red) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จนท่วมโคโลนีของเชื้อรา เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทดสอบการละลายของโกเรดออกล้างผิวหน้าโคโลนีเชื้อราด้วย 1 M NaCl สังเกตบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อรา บันทึกผลการสร้างบริเวณใสของเชื้อราแต่ละไอโซเลท

4.3 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารระเหย

นำเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3 มาทดสอบการสร้างสารระเหย ด้วยวิธี volatile extracellular metabolite test (Dennis and Webster, 1971) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา *C. oryzae*, *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. อายุ 3 วัน จากนั้นนำมาวางบริเวณกึ่งกลางอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเปิดฝาและนำจานเพาะเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ประกบกับจานเพาะเชื้อ *C. oryzae* ยึดรอยต่อระหว่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม (ภาพที่ 17) ในกรรมวิธีควบคุมใช้จานอาหาร PDA ประกบกับจานอาหารที่มีการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. oryzae* บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อรา *C. oryzae* ในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *C. oryzae* ในชุดทดสอบ และนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Turkey's HSD test



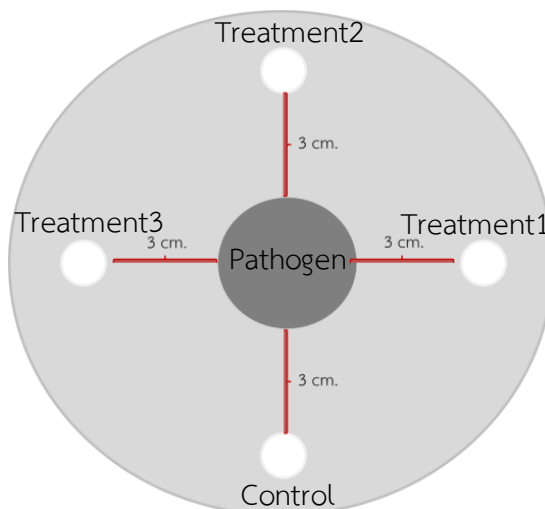
ภาพที่ 17 การประกบจานอาหารเพาะเชื้อในวิธีการทดสอบสารระเหย

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate)

เตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. อายุ 5 วัน (ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดจากการทดลองที่ 3) ย้ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุอาหารเหลว PDB (potato dextrose broth; ภาคผนวก ค) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (ขวดละ 3 ชั้น) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าสารแนวราบ (horizontal shaker) ปรับความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน นำน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร เพื่อเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อไว้ทดสอบ

ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* ด้วยวิธี agar diffusion method โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD: completely randomized design) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคปาล์มน้ำมัน ที่อายุ 3-5 วัน วางตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อสาเหตุโรคไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงบนวุ้นอาหาร โดยให้มีระยะห่างจากจุดที่วางเชื้อราสาเหตุโรค 3 เซนติเมตร (ภาพที่ 18) หยดน้ำเลี้ยงเชื้อราลงหลุม หลุมละ 30 ไมโครลิตร ในกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตลักษณะของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค และการเกิดบริเวณโซนใส บันทึกค่ารัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยตามกรรมวิธีของ Mastapa (2004) ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \left\{ 1 - \left(\frac{\text{fungal growth}}{\text{control growth}} \right) \right\} \times 100$$



ภาพที่ 18 ตำแหน่งการวางเชื้อราสาเหตุโรค (pathogen) และตำแหน่งที่มีการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลท (treatment 1–3) โดยมีชุดควบคุม (control) เป็นน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

5. การทดสอบการใช้เส้นใยแฉวนลอยเชื้อรา (mycelial suspension) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการควบคุมโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพห้องทดลอง

5.1 การเตรียมตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน

เตรียมตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน โดยเลือกใบปาล์มน้ำมันในระยะเพสลาด นำมาตัดให้มีความยาวประมาณ 20 เซนติเมตร จากนั้นใช้สำลี จุ่มแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ดทำความสะอาดให้ทั่วผิวหน้าใบปาล์มน้ำมัน และผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5.2 การเตรียมเส้นใยแฉวนลอยเชื้อรา

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hyphoxylon* spp. ที่เจริญบนอาหาร PDA ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวนขวดละ 3 ขัน จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน กรองเส้นใยเชื้อราด้วยผ้าขาวบางฆ่าเชื้อ ชักเส้นใยให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู ปั่นเส้นใยด้วยเครื่องปั่นอเนกประสงค์ให้ละเอียด เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองที่ 5.4

5.3 การเตรียมสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

เลี้ยงเชื้อรา *C. oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 14 วัน เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อลงบนโคโลนีของเชื้อรา ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แผ่นสไลด์ชุดผิวหน้าโคโลนีเชื้อรา เพื่อให้สปอร์เชื้อราหลุดออกมา เทสปอร์แขวนลอยลงในปิเกตอร์ผ่านผ้าขาวบางที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

5.4 การทดสอบเส้นใยแขวนลอยเชื้อราในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคบนใบปาล์มน้ำมัน ด้วยวิธี detached leaf

นำใบปาล์มน้ำมันที่เตรียมไว้ตามข้อ 5.1 ใส่ในกล่องพลาสติกเก็บความชื้น 3 ใบต่อ 1 กล่อง นำเส้นใยเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hyphoxylon* spp. ปั่นละเอียดที่เตรียมไว้ในการทดลองที่ 5.2 มาเตรียมเส้นใยแขวนลอยที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจีไนส์เซอร์ (homogenizer) นำเส้นใยแขวนลอยที่ได้พ่นลงบนใบปาล์มน้ำมัน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อใบ ความเข้มข้นละ 3 ใบ ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง กรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อพ่นลงบนใบปาล์มน้ำมัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง นำสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. oryzae* ที่เตรียมไว้ตามข้อ 5.3 พ่นลงบนใบปาล์มน้ำมัน ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อลงในกล่องเพื่อรักษาความชื้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง 14 วัน บันทึกผลการเกิดโรคและประเมินความรุนแรงของโรค 6 ระดับ (ปริศนา วงศ์ล้อม, 2548)

ระดับ 0 ไม่มีอาการใบจุด

ระดับ 1 พบจุดเนื้อเยื่อสีน้ำตาลขนาดเล็กกว่าปลายเข็มหมุด

ระดับ 2 พบจุดเนื้อเยื่อตายแผลค่อนข้างกลมขนาด 1-2 มิลลิเมตร ขอบแผลสีน้ำตาล เกิดอาการ 1-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

ระดับ 3 พบจุดเนื้อเยื่อตายขนาด 5 มิลลิเมตร เกิดอาการ 25-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

ระดับ 4 พบจุดเนื้อเยื่อตายเชื่อมต่อกันขนาดใหญ่ 1-2 เซนติเมตร เกิดอาการ 51-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

ระดับ 5 พบใบมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นโรคในระยะสุดท้ายทำให้เนื้อเยื่อบนใบบางส่วนตาย

6. การทดสอบใช้เส้นใยแขวนลอยในการควบคุมเชื้อรา *Curvularia oryzae* บนใบกล้าปาล์ม น้ำมันในสภาพแปลงทดลอง

นำต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุประมาณ 6 เดือน ทดสอบประสิทธิภาพเส้นใยแขวนลอยของ เชื้อราปฏิปักษ์ในระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. oryzae* ได้ดีที่สุด จากการทดลองที่ 5 มาทดสอบในสภาพโรงเรือน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จำนวน 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 6 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น โดยในแต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม พ่นน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม พ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. oryzae* ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเส้นใยแขวนลอยเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากการทดลองที่ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. oryzae*

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารเคมีฆ่าเชื้อราแมนโคเซป ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ 24 ชั่วโมง และพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *C. oryzae*

บ่มไว้ในสภาพโรงเรือนเป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลการเกิดโรคที่เกิดขึ้นบนใบ โดยการเปรียบเทียบจากเกณฑ์การประเมินการเกิดโรค 6 ระดับ ตามการทดลองที่ 5.4

บทที่ 3

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างและการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyton* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyton* ในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ยกเว้น 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ เนื่องจากเหตุการณ์ไม่สงบในพื้นที่ ได้ตัวอย่างเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyton* ทั้งหมด 146 ตัวอย่าง พบว่าเป็นตัวอย่างที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ สามารถนำมาจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 76 ตัวอย่าง โดย 45 ตัวอย่าง สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และจำแนกชนิดได้ 15 ชนิด (ตารางที่ 4) ทั้งนี้พบว่ามีเชื้อราจำนวน 12 ตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้อย่างชัดเจน คิดเป็นร้อยละ 15.78 ของตัวอย่างเชื้อราในสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyton* ทั้งหมด ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

ตารางที่ 4 ชนิดและจำนวนเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyton* ที่ได้จากการศึกษา

ชนิด	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ไอโซเลท	ภาพที่
<i>Annulohyphoxylon majforme</i>	ม. สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา	3	19
	บ.คีรีวงค์ อ.ลานสกา จ.นครศรีธรรมราช	1	
<i>Annulohyphoxylon nitens</i>	สวนยางพารา อ.ทับปุด จ.พังงา	2	20
	เขาคอหงส์ จ. สงขลา	1	
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	อ. เขาชัยสน จ. พัทลุง	1	21
	เขาคอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา	2	
	วัดสมณเฑาะ อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	1	
<i>Annulohyphoxylon thailandicum</i>	สวนยางพารา อ.พะโต๊ะ จ. ชุมพร	1	22
<i>Hypoxyton duranii</i>	น้ำตกลำรู่ อ.กะปง จ.พังงา	1	27
	สวนหสม ร.9 อ.เมือง จ.ภูเก็ต	1	
	น้ำตกโตนงาช้าง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	1	
<i>Hypoxyton fendleri</i>	อ.เขาชัยสน จ.พัทลุง	2	28
	ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ม. สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	2	
	อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์	1	
<i>Hypoxyton griseobrunneum</i>	อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง	1	29
<i>Hypoxyton haematostroma</i>	อ.คลองท่อม จ.กระบี่	1	30
	อ.ควนกาหลง จ.สตูล	1	
	สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้(ทุ่งค่าย) อ.ย่านตาขาว จ.ตรัง	2	
	ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ม. สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	3	

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิด	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ไอโซเลท	ภาพที่
<i>Hypoxylon hypomiltum</i>	อ.กะเปอร์ จ.ระนอง	1	32
	อ่างเก็บน้ำ ม.สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	2	
	อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์	1	
<i>Hypoxylon jaklitschii</i>	สวนยางพารา อ.ละแม จ.ชุมพร	2	33
<i>Hypoxylon lenormandii</i>	อ.คลองท่อม จ.กระบี่	1	34
	สวนหลวง ร.9 อ.เมือง จ.ภูเก็ต	1	
	บ่อน้ำพุร้อน อ.เมือง จ.ระนอง	1	
	บ.คีรีวงค์ อ.ลานสกา จ.นครศรีธรรมราช	1	
	ต้นน้ำพะโต๊ะและสวนยางพารา อ.พะโต๊ะ จ.ชุมพร	2	
	ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ม. สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	2	
	น้ำตกวิภาวดี อ.วิภาวดี จ.สุราษฎร์ธานี	1	
<i>Hypoxylon macrocarpum</i>	อ่างเก็บน้ำ ม.สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	1	35
<i>Hypoxylon monticulosum</i>	วัดพระนางสร้าง อ. ถลาง จ.ภูเก็ต	1	36
	อ.พะโต๊ะ จ.ชุมพร	1	
	อ.สิชล จ.นครศรีธรรมราช	1	
	น้ำตกโตนงาช้าง อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	2	
	สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้(ทุ่งค่าย) อ.ย่านตาขาว จ.ตรัง	1	
	อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	1	
	อ.เมือง จ.พังงา	1	
<i>Hypoxylon cf. pilgerianum</i>	น้ำตกวิภาวดี อ.วิภาวดี จ.สุราษฎร์ธานี	3	37
<i>Hypoxylon sublenormandii</i>	เขาคอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	1	38
	น้ำตกวิภาวดี อ.วิภาวดี จ.สุราษฎร์ธานี	1	
<i>Annulohypoxylon species A</i>	อ.คลองท่อม จ.กระบี่	2	23
<i>Annulohypoxylon species B</i>	สวนยางพารา อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	3	24
<i>Annulohypoxylon species C</i>	สวนยางพารา อ.ท้ายเหมือง จ.พังงา	2	25
<i>Annulohypoxylon species D</i>	สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้(ทุ่งค่าย) อ.ย่านตาขาว จ.ตรัง	1	26
<i>Hypoxylon species A</i>	อ.เขาชัยสน จ.พัทลุง	1	39
<i>Hypoxylon species B</i>	เขาคอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	1	40
<i>Hypoxylon species C</i>	สวนยางพารา อ.ควนกาหลง จ.สตูล	2	41
<i>Hypoxylon species D</i>	สวนยางพารา อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง	2	42
<i>Hypoxylon species E</i>	สวนยางพารา อ.ป่าพะยอม จ.พัทลุง	1	43
<i>Hypoxylon species F</i>	สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้(ทุ่งค่าย) อ.ย่านตาขาว จ.ตรัง	1	44
<i>Hypoxylon species G</i>	สวนยางพารา อ.คลองท่อม จ.กระบี่	1	45
<i>Hypoxylon species H</i>	สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้(ทุ่งค่าย) อ.ย่านตาขาว จ.ตรัง	1	46
รวม		76	

การจำแนกเชื้อราสกุล *Annulohypoxyton* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. *Annulohypoxyton moriforme* (Henn.)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

ลักษณะสโตรมาสีดํา (blackish) หรือน้ำตาล (brown) สโตรมามีลักษณะ นูนเป็นก้อน (glomerate) เรียบ กิ่งนูน (effused-pulvinate) และเป็นแผ่นแบนเรียบ (pulvinate) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีน้ำตาล (brown) สีดํา (black) สีเขียวมะกอก (greenish olivaceous) หรือสีเขียวหม่น (dull green) เพอริทีเซีย (perithecia) ทรงกลม (spherical) ขนาด 0.4–0.8 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอล (ostioles) มีลักษณะปลายแหลม (papillate) แผ่นรองจาน (ostiole disc) เป็นแบบ *trucatum*-type แอสโคสปอร์ (ascospore) มีสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลเข้ม ลักษณะแอสโคสปอร์รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร (ellipsoid-inequilateral) ปลายสปอร์แคบ (narrowly rounded ends) แอสโคสปอร์มีขนาด $7.0-9.0 \times 2.3-4$ ไมโครเมตร ลักษณะเจอร์มสลิต (germ slit) เป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ (straight full length) ลักษณะเพอริสปอร์ (perispore) เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

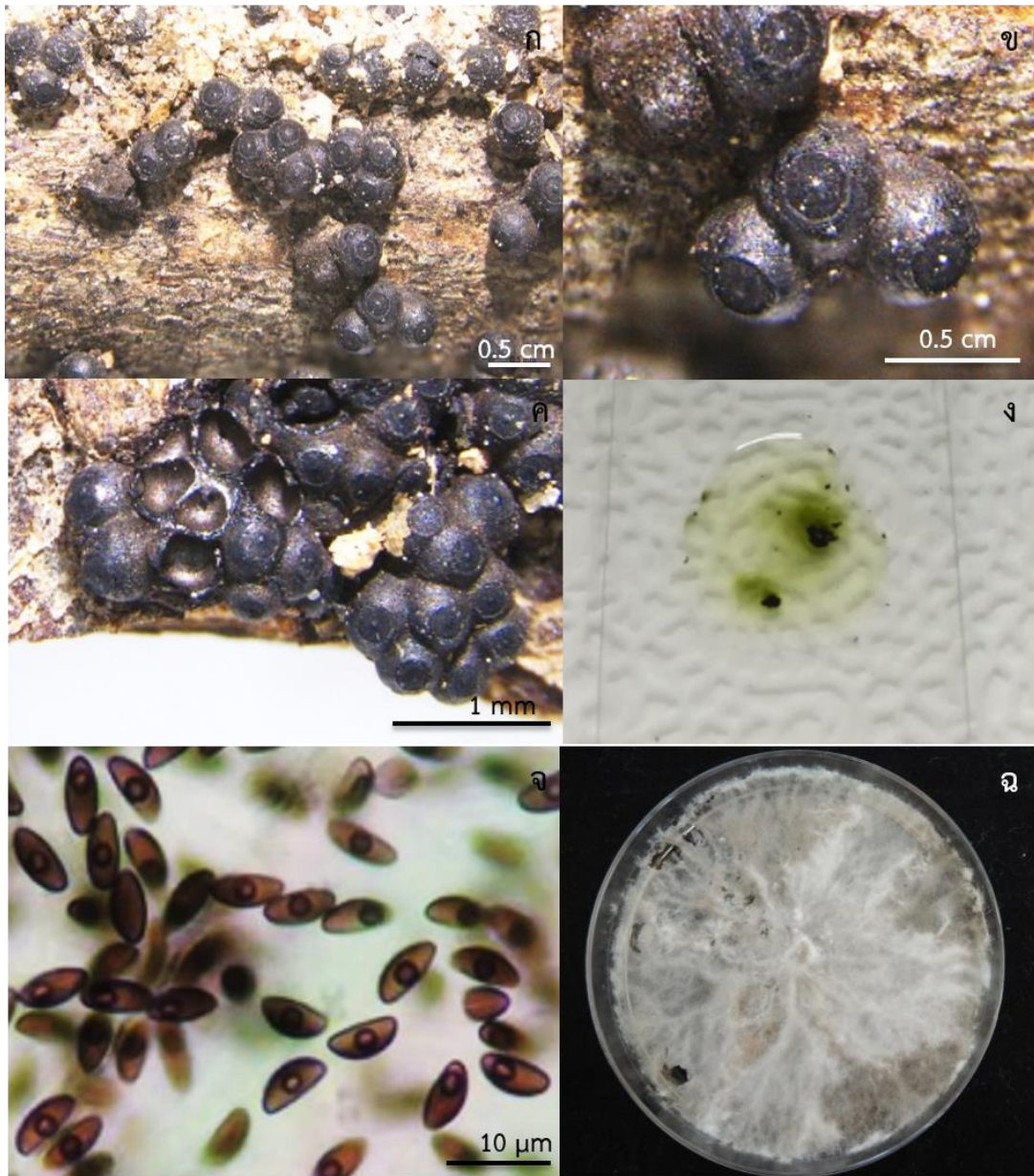
บริเวณที่พบ (habitat): กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษานี้ (province): สงขลา และ นครศรีธรรมราช

ตัวอย่างที่ศึกษา: SKW06, SKW12, SKW18 และ NKW08

เอกสารอ้างอิง: Ju และ Roger (1996)

(ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 *Annulohypoxylon moriforme* ไอโซเลท SKW12 ก. สโตรมานูนเป็นก้อน (glomerate) ข. ออสติโอลปลายแหลม (papillate) ค. เพอริทีเซียรูปร่างทรงกลม (spherical) ง. ปฏิกิริยาของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีเขียวมะกอก (greenish olivaceous) จ. แอสโคสปอร์ ฉ. โคลนินของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

2. *Annulohyphoxylon nitens* (Ces.)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาเมื่อยังอ่อนมีสีน้ำตาลเข้ม (dark brown vinaceous) ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีดำ และเมื่อโตเต็มที่มีสีดำเงา (shiny black) สโตรมาเป็นแบบครึ่งทรงกลม (hemispherical) มีทั้งแบบ หนูนเป็นก้อน และเรียบกึ่งหนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีเขียวมะกอก เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกลม ขนาด 0.4–0.8 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะปลายแหลม แผ่นรองจานเป็นแบบ *bovei*-type ขนาด 0.2–0.5 มิลลิเมตร แอสโคสปอร์ มีสีน้ำตาลอ่อน (light brown) จนถึงน้ำตาล ลักษณะแอสโคสปอร์รีดคล้ายรูปไข่ ด้าน ทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 6.2–10.5 × 3.5–4.8 ไมโครเมตร ลักษณะเจอร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาว แอสโคสปอร์ ลักษณะเพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

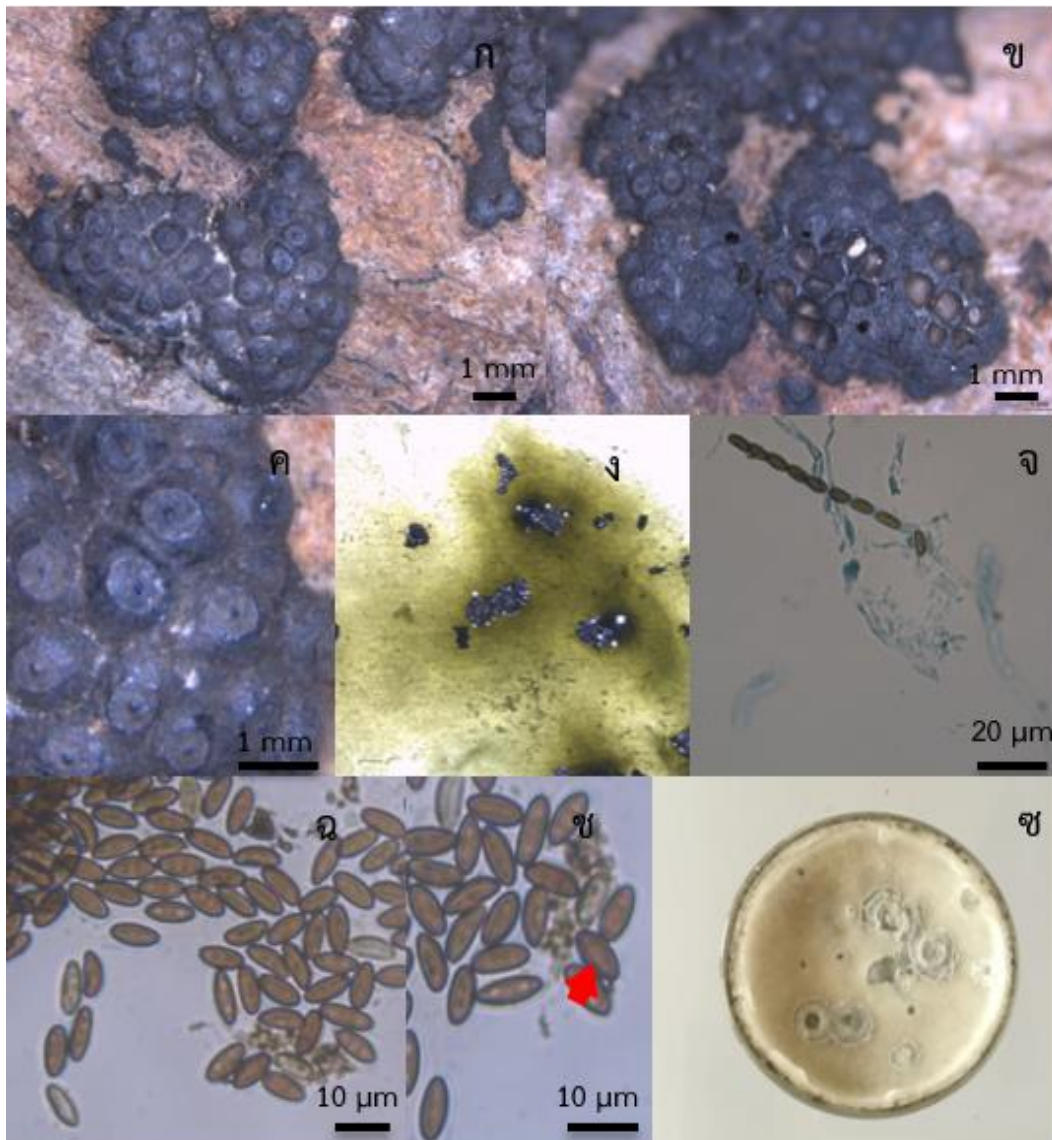
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้: สงขลา และพังงา

ตัวอย่างที่ศึกษา: SKW11, PNGPW04* และ PNGPW08*

หมายเหตุ: *ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา

เอกสารอ้างอิง: Ju และ Rogers (1996)

(ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 *Annulohypoxyton nitens* ไอโซเลท PNGPW04 ก. สโตรมาทอนเป็นก้อน (glomerate) ข. เพอริทีเชียรูปร่างทรงกลม ค. ออสติโอลปลายแหลม และแผ่นรองจานแบบ *bovei*-type ง. ปฏิกิริยาของสโตรมาทากับสารละลาย KOH เกิดสีเขียวมะกอก จ. แอสค์สภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ ฉ. แอสโคสปอร์ ช. เจริ่มสลิทแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (straight full length) ซ. โคลนีสของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

3. *Annulohyphoxylon stygium* (Lév.)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาที่มีสีดำ หรือดำอมน้ำตาล (blackish with reddish brown tone) แบบเรียบกึ่งนูน และเป็นแผ่นแบนเรียบ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีเขียวมะกอกหรือสีเขียวหม่น เพอริทีเซียมีรูปร่างแบบรี (obovoid) จนถึงทรงกระบอก (tubular) ขนาด 0.2–0.3 × 0.3–0.5 มิลลิเมตร ออสติโอล มีลักษณะปลายแหลม แผ่นรองจานเป็นแบบ *truncatum*-type ขนาด 0.1–0.2 มิลลิเมตร แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อน รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 5.6–7.5 × 2.4–3.3 ไมโครเมตร ลักษณะเจอร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาว แอสโคสปอร์ ลักษณะเพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทุรุดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

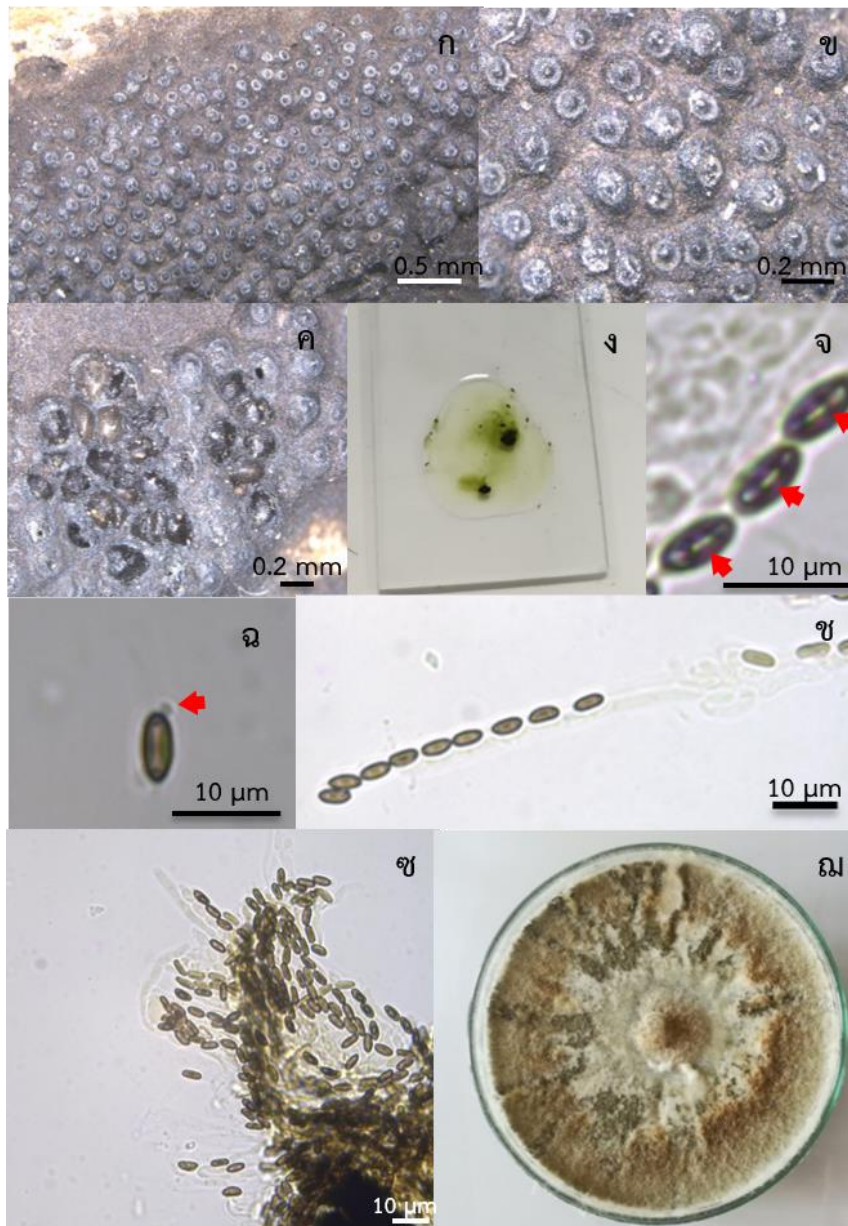
บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: สงขลา พัทลุง และสุราษฎร์ธานี

ตัวอย่างที่ศึกษา: SKW03, PSUSKW01, PTW09 และ SRW04

เอกสารอ้างอิง: Ju และ Rogers (1996)

(ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 *Annulohypoxyton stygium* ไอโซเลท PTW09 ก. สโตรมาแบบเรียบกึ่งนูน
 ข. แผ่นออสติโอลปลายแหลม ค. เพอริทีเซียแบบรี (obovoid) ง. ปฏิภานของสโตรมาตากับ
 สารละลาย KOH เกิดสีเขียวมะกอก จ. เจริ่มสลิทแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์
 ฉ. ทูรูดถุงหุ้มสปอร์เมื่อทำปฏิภานกับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ช. แอสค์สภายในบรรจุ
 8 แอสโคสปอร์ ซ. แอสโคสปอร์ ฅ. โคลนิจของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

4. *Annulohypoxyton thailandicum* (Daranagama & K.D. Hyde, sp. nov.)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สีโตรมาสีดำ หรือสีผงถ่าน (carbonaceous) แบบเรียบกึ่งนูน หรือเป็นแบบครึ่งทรงกลม เนื้อเยื่อระหว่างเพอริทีเซียมีสีดำ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีเขียวมะกอก เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกลมขนาด 0.35–0.5 × 0.3–0.7 มิลลิเมตร ออสติโอล มีลักษณะปลายแหลม แผ่นรองจานเป็นแบบ *trucatum*-type ขนาด 0.3–0.45 มิลลิเมตร แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาล รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 9.3–11.7 × 4.6–5.3 ไมโครเมตร ลักษณะเจอร์มสลิท เป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ ลักษณะเพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หูรดกุ่มสปอร์ดิสสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

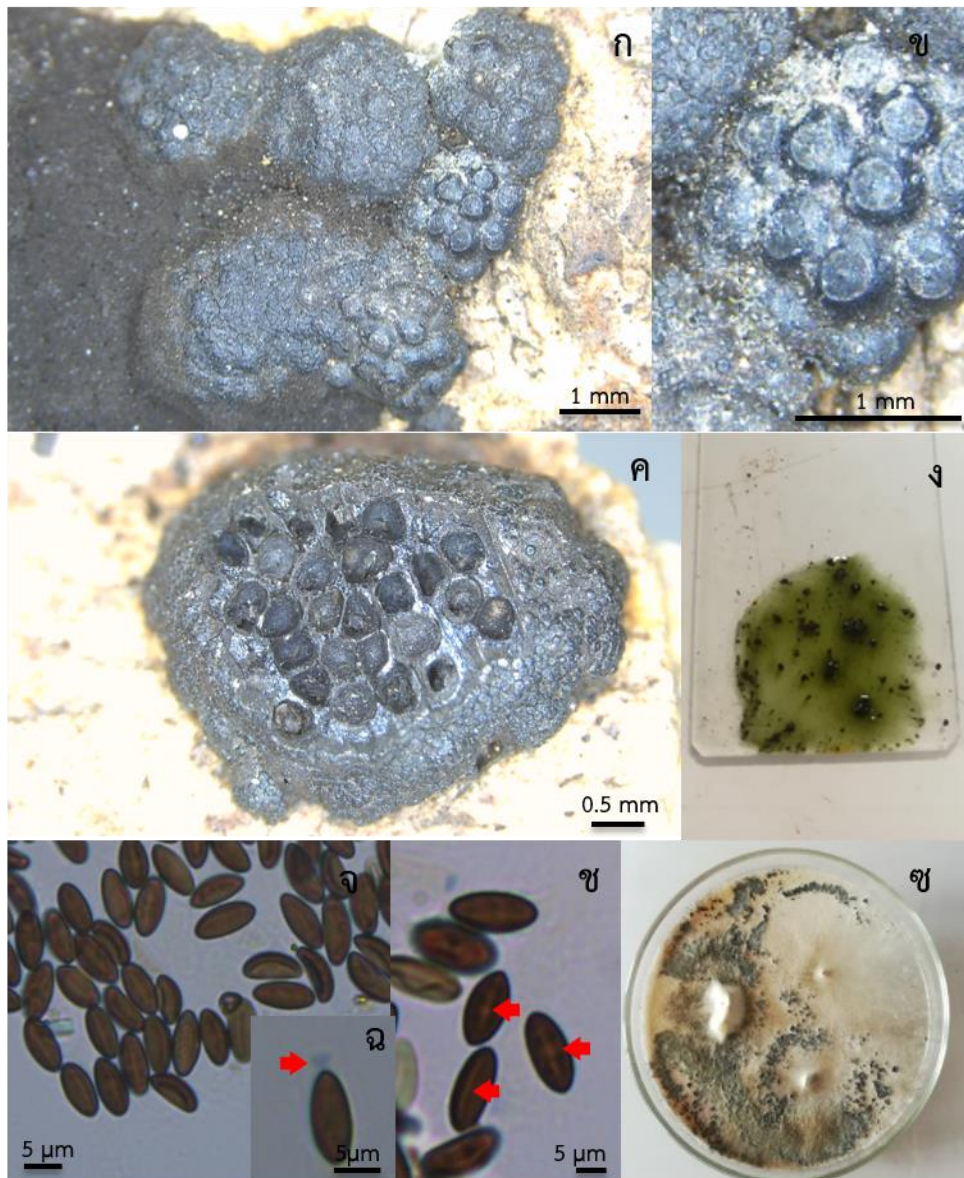
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้: ชุมพร

ตัวอย่างที่ศึกษา: CHPW07

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา

เอกสารอ้างอิง: Lui และคณะ (2015)

(ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 *Annulohypoxyton thailandicum* ไอโซเลท CHPW07 ก. สโตรมาแบบครึ่งทรงกลม
 ข. ออสติโอลแบบปลายแหลม ค. เพอริทีเซียทรงกลม ง. ปฏิภานของสโตรมาตากับสารละลาย KOH
 เกิดสีเขียวมะกอก จ. แอสโคสปอร์ ฉ. หนวดถุงหุ้มสปอร์เมื่อทำปฏิภานกับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร)
 ช. ลักษณะเจิร์มสลิทแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ซ. โคลนีย์ของเชื้อราเมื่อ
 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

5. *Annulohypoxyton* species A ไอโซเลท KBB02

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

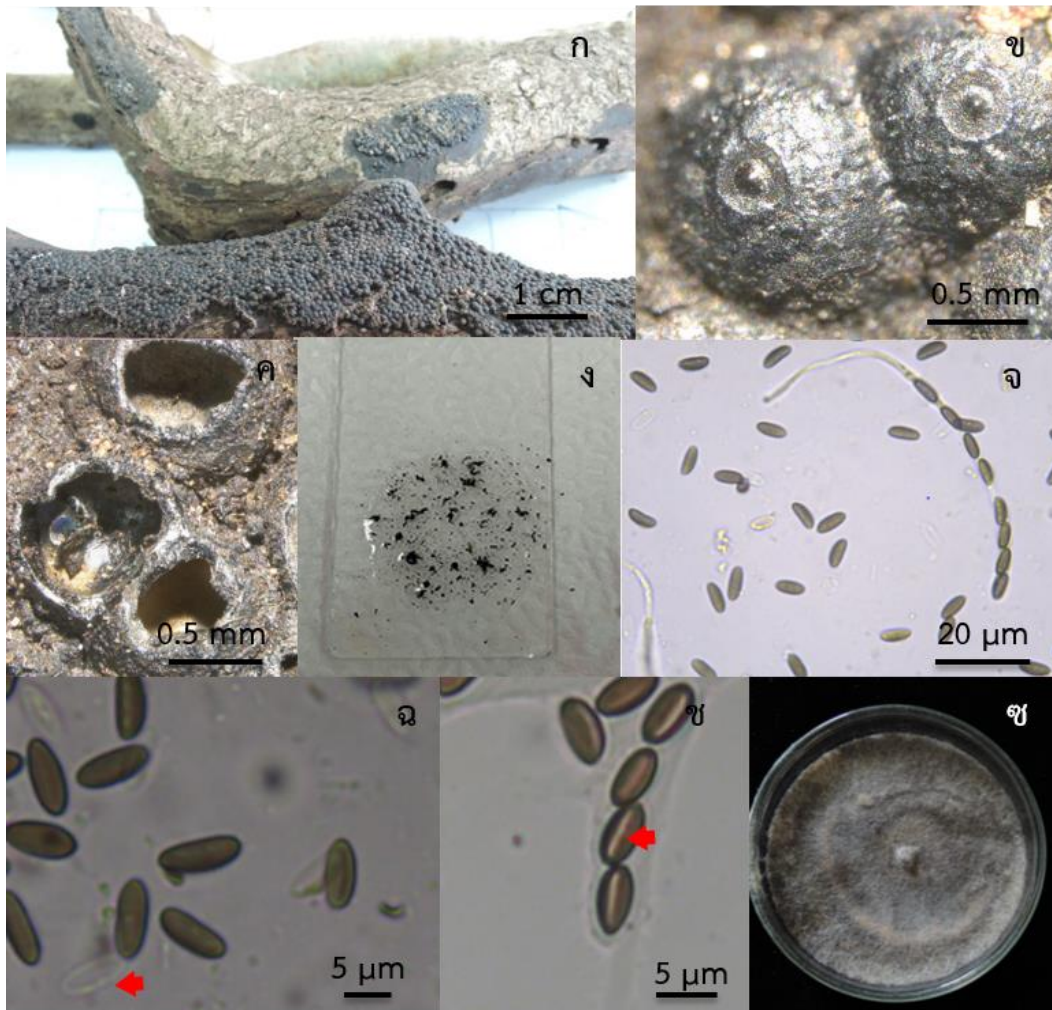
สโตรมาไม่มีสีดำด้าน หรือดำเป็นมันวาว รูปร่างสโตรมาเป็นแบบนูนเป็นก้อน มีทั้งครึ่งทรงกลม และเรียบกึ่งนูน สโตรมาเมื่อทำปฏิกิริยากับ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ไม่เกิดสี (colorless) เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5–0.6 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะปลายแหลม แผ่นรองจานเป็นแบบ *bovei*-type ขนาด 0.1–0.3 มิลลิเมตร แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลน้ำตาลอ่อน รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์ กว้างมน (broadly rounded ends) แอสโคสปอร์มีขนาด 6.9–8.4 × 3.1–4.1 ไมโครเมตร เจริญสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ ลักษณะเพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หูดงุ้มสปอร์ไม่ติดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: กระบี่

ตัวอย่างที่ศึกษา: KBB02 และ KBW03

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Annulohypoxyton* species A มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *A. subnitens* J. Fourn. & Lechat, sp. nov. ต่างกันที่ *A. subnitens* มีขนาดแอสโคสปอร์ 6.7–7.7 × 2.3–3.2 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าแอสโคสปอร์ของเชื้อรา *Annulohypoxyton* species A ที่มีขนาดแอสโคสปอร์ 6.9–8.4 × 3.1–4.1 ไมโครเมตร รวมถึงสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ในเชื้อรา *Annulohypoxyton* species A ไม่เกิดสี แต่ในเชื้อรา *A. subnitens* ให้สีน้ำตาลปนเทา (greyish sepia) (Fournier and lechat, 2015) (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 *Annulohypoxylon* species A ไอโซเลท KBB02 ก. สโตรมาแบบนูนเป็นก้อน และครึ่งทรงกลม ข. ออสติโอลปลายแหลม ค. เพอริที่เซียทรงกลม ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH ไม่เกิดสี (color less) จ. แอสคัส ภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ ฉ. เพอริสปอร์ dehiscent (ลูกศร) ช. เจริญสลิทแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ซ. โคลนีสของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

6. *Annulohyphoxylon* species B ไอโซเลท PNGW01

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีผงถ่าน เป็นแบบครึ่งทรงกลม และเรียบกึ่งนูน สโตรมาตาเมื่อทำปฏิกิริยากับ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เกิดสีเขียวมะกอก เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกลมจนถึงรูปร่างรี เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.28–0.5 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลปลายแหลม แผ่นรองจานเป็นแบบ *bovei*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.15–0.35 มิลลิเมตร แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลน้ำตาลอ่อน รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่เท่ากัน ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด $7.8-9.3 \times 3.5-5.5$ ไมโครเมตร ลักษณะเจิร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาว แอสโคสปอร์ ลักษณะเพอริสปอร์เป็นแบบ indehiscent เปลือกแอสโคสปอร์ไม่หลุดออก เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทูรูดงูหุ้มสปอร์เกิดสีน้ำตาลเงิน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

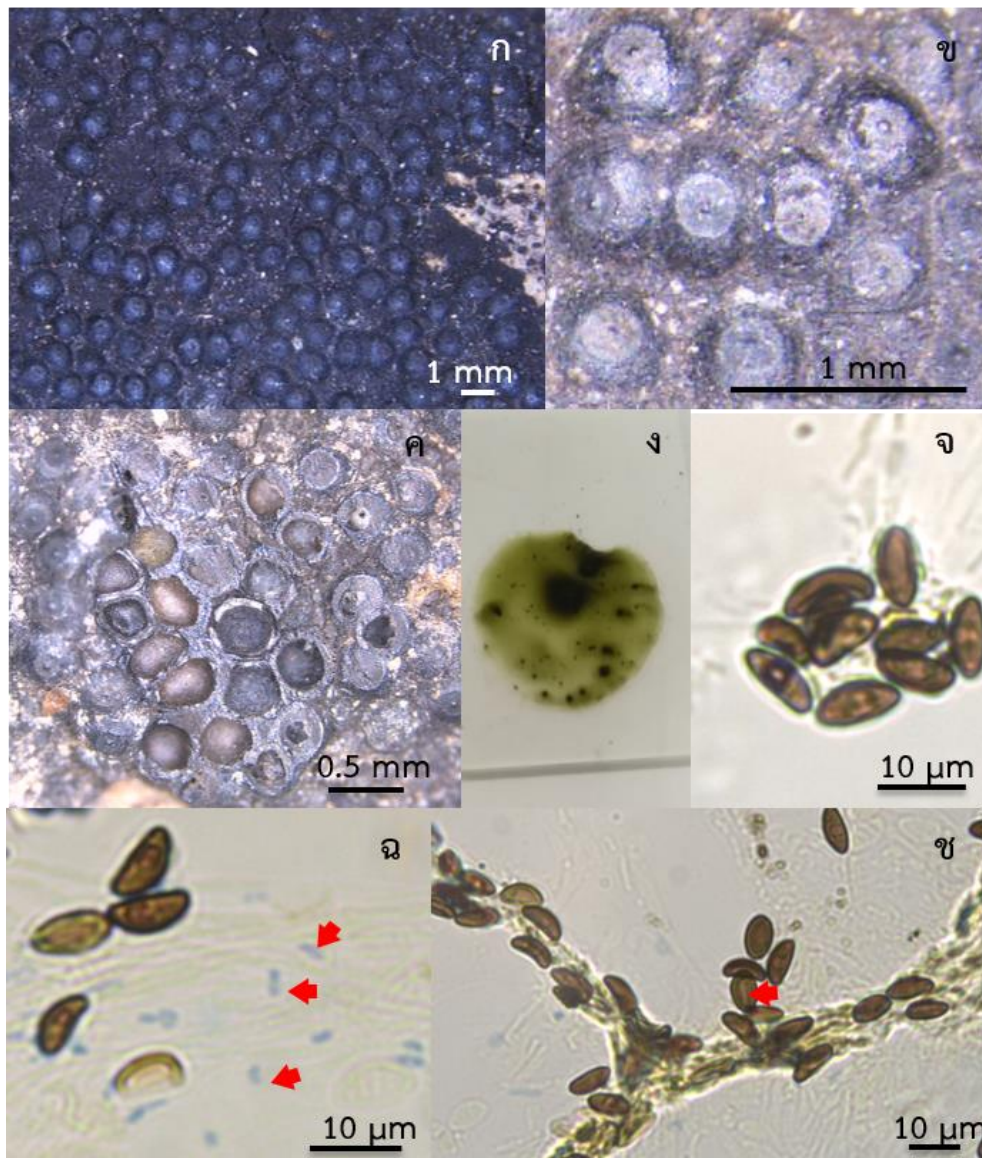
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้: พังงา

ตัวอย่างที่ศึกษา: PNGW01*, PNGPW05**, PNGPW06**

หมายเหตุ: *ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้เนียง,**ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา และเป็นตัวอย่างที่ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* species B มีความคล้ายคลึงกับ เชื้อรา *A. stygium* (Lév.) ทั้งขนาดของเพอริทีเซีย แอสโคสปอร์ รวมไปถึงสีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH กับสโตรมาให้สีเขียวมะกอกเช่นกัน แตกต่างกันที่ชนิดของแผ่นรองจาน ซึ่งเชื้อรา *Annulohyphoxylon* species B มีแผ่นรองจานเป็นแบบ *bovei*-type ในขณะที่ *A. stygium* มีแผ่นรองจานแบบ *trucatum*-type

(ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 *Annulohypoxyton* species B ไอโซเลท PNGW01 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงู น ข. แผ่นออสติโอลปลายแหลม ค. เพอริทีเซียทรงกลมจนถึงรี ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีเขียวมะกอก จ. แอสโคสปอร์ ฉ. หน่อตุ่มสปอร์เมื่อทำปฏิภานกับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ช. ลักษณะเจอร์มสลิทแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร)

7. *Annulohypoxyton* species C ไอโซเลท PNGPW03

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาตีดา แบบนูนเป็นก้อน มีทั้งครึ่งทรงกลม และเรียบกึ่งนูน สโตรมาตาเมื่อทำปฏิกิริยากับ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เกิดสีเขียวมะกอก เพอริทีเซียทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25–0.5 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลปลายแหลม แผ่นรองจานแบบ *bovei*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25–0.4 มิลลิเมตร แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อนรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตรปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด $8.5\text{--}10.5 \times 3.5\text{--}5.2$ ไมโครเมตร ลักษณะเจิร์มสลิทเป็นเส้นตรง มีความยาวเท่ากับความยาวแอสโคสปอร์ ลักษณะเพอริสปอร์ เป็นแบบ *dehiscent* เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หูดงุ้มสปอร์เกิดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

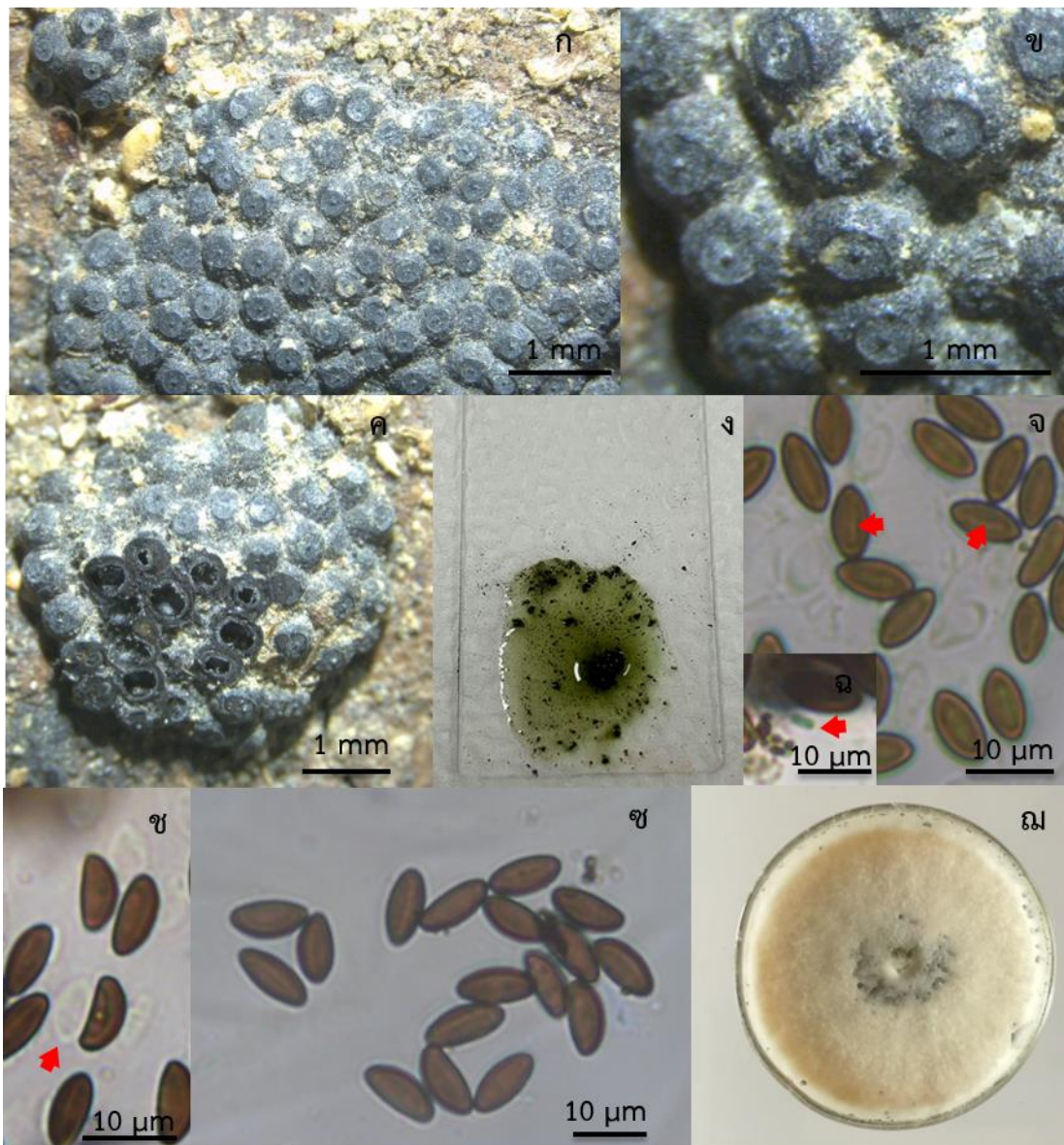
บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้: พังงา

ตัวอย่างที่ศึกษา: PNGPW03 และ PNGPW07

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Annulohypoxyton* species C พบว่าคล้ายคลึงกับเชื้อรา *A. annulatum* (Schwein.: Fr.) Mont. และ *A. cf. moriforme* (Henn.) แตกต่างกันที่เชื้อรา *A. annulatum* มีแผ่นรองจานแบบ *truncatum*-type และเพอริทีเซียมีขนาดเท่ากับ 0.3–0.5 มิลลิเมตร (มัลลิกา มะกรวัฒน์, 2557) ส่วนเชื้อรา *A. cf. moriforme* มีขนาดเพอริทีเซียเท่ากับ 0.5–0.6 มิลลิเมตร และมีแผ่นรองจานแบบ *truncatum*-type (Fournier and lechat, 2016) ซึ่งใหญ่กว่า *Annulohypoxyton* species C ในขณะที่เชื้อรา *Annulohypoxyton* species C มีแผ่นรองจานแบบ *bovei*-type (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 *Annulohypoxyton* species C ไอโซเลท PNGPW03 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งนูน
 ข. ออสติโอลแบบปลายแหลม ค. เพอริทีเรียตรงกลม ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH
 เกิดสีเขียวแก่ (dark green) จ. เจริญสลิทแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร)
 ฉ. หูรดถุงหุ้มสปอร์เมื่อทำปฏิภานกับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ช. เพอริสปอร์ dehiscent
 (ลูกศร) ซ. แอสโคสปอร์ ฉ. โคลนินของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

8. *Annulohypoxyton* species E ไอโซเลท TRW07

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาตีสดำ แบบเรียบกิ่งนูน สโตรมาตาเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เกิดสีม่วงแดง (purple olivaceous) เพอริทีเซียมีทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2–0.25 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลปลายแหลม แผ่นรองจานเป็นแบบ *truncatum*-type มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.2 มิลลิเมตร แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร สปอร์มีขนาด 10–12 × 4.4–5.4 ไมโครเมตร เจริญสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ indehiscent เปลือกแอสโคสปอร์ไม่หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หูดงุ้มสปอร์ไม่เกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

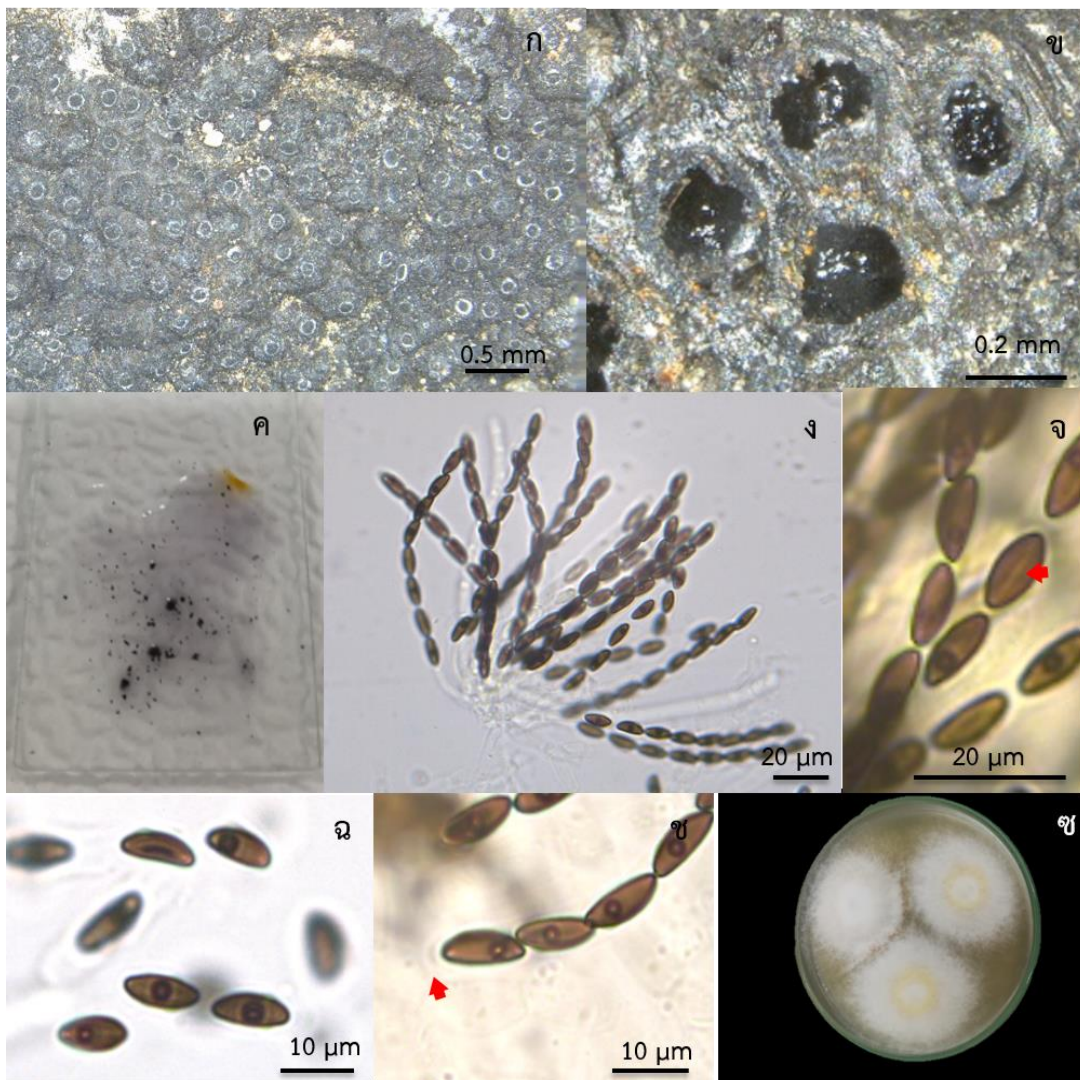
บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: ตรัง

ตัวอย่างที่ศึกษา: TRW07

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Annulohypoxyton* species E มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *A. archeri* Berk. และ *A. purpureonitens* (Y.M. Ju & J.D. Rogers) ต่างที่สีของสโตรมาตาเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ โดยเชื้อรา *A. archeri* เกิดสีเขียวหม่น ในขณะที่เชื้อรา *Annulohypoxyton* species E เกิดสีม่วงแดง และเพอริทีเซียของ *A. purpureonitens* มีขนาด 0.4–0.8 มิลลิเมตร ซึ่งใหญ่กว่าเชื้อรา *Annulohypoxyton* species E ที่มีขนาดเพอริทีเซียเท่ากับ 0.2–0.25 มิลลิเมตร โดยเชื้อรา *Annulohypoxyton* species E มีลักษณะหลายประการที่แตกต่าง รวมทั้งก้ำกึ่งกับชนิดของเชื้อราในสกุลเดียวกันมากกว่าสองชนิด จึงทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราที่ชัดเจนได้

(ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 *Annulohypoxylon* species E ไอโซเลท TRW07 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงู
 ข. เพอริทีเซียทรงกลม ค. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีม่วงแดง (purple
 olivaceous) ง. แอสคัสภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ จ. ลักษณะเจอร์มสลิทแบบเส้นตรงมีความยาว
 เท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ฉ. แอสโคสปอร์ ช. หูรดถุงหุ้มสปอร์เมื่อทำปฏิภานกับสารละลาย
 เมลเซอร์ (ลูกศร) ซ. โคลนินของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

การจำแนกเชื้อราสกุล *Hypoxylon* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. *Hypoxylon duranii* J.D. Rogers

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีเทาอมน้ำตาลเข้ม (sepia) จนถึงสีน้ำตาลอมม่วง (brown vinaceous) แบบเรียบกึ่งนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เกิดสีเหลืองปนเทา (isabelline) หรือสีน้ำตาลอมเหลือง (yellowish brown) บริเวณตำแหน่งบนสุดของเพอริทีเซียมีสีดำเป็นมันเงา เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกระบอก จนถึงทรงกระบอกยาว (long-tubular) บางชนิดเป็นวงรี ขนาด $0.5-0.75 \times 0.2-0.25$ มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะเว้าลง (umbilicate) แอสโคสปอร์สีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด $8-11.5 \times 3.5-5.5$ ไมโครเมตร เจริมสลิตเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ ลักษณะเพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทุรูตงุ้มสปอร์มีขนาด $0.5-0.7 \times 2.2-2.5$ ไมโครเมตร ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

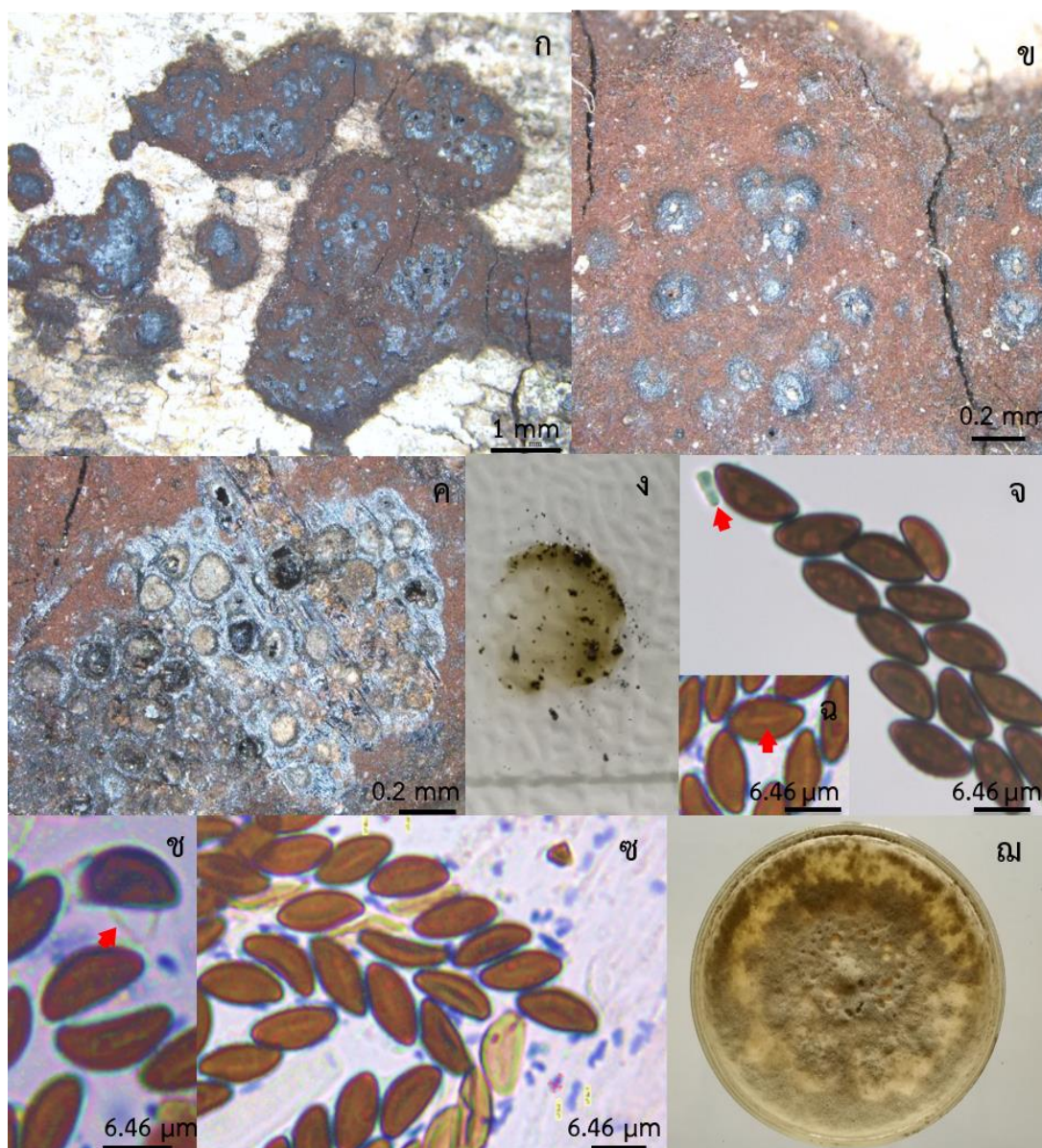
บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: สงขลา พังงา และภูเก็ต

ตัวอย่างที่ศึกษา: SKW32, PNGW02 และ PKW04

เอกสารอ้างอิง: Fournier และคณะ (2015)

(ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 *Hypoxylon duranii* ไอโซเลท SKW32 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงู ข. ออสติโอล ค. เพอริทีเซียทรงรี ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาลอมเหลือง (yellowish brown) จ. หน่อตุ่มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ฉ. เจริญสลิทแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (straight full length) (ลูกศร) ช. เพอริสปอร์ dehiscent (ลูกศร) ซ. แอสโคสปอร์ ฉ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน

2. *Hypoxylon fendleri* Berk. ex Cooke

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีม่วงแก่ (dark vinaceous) หรือสีน้ำตาลส้ม (dark brick) ยึดออกรูปทรงรี (elongate-ellipsoid) แบบเรียบกึ่งนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาล (sienna) หรือสีส้ม (orange) เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกลมรี ขนาด $0.5-0.6 \times 0.3-0.4$ มิลลิเมตร บริเวณรอบนอกเพอริทีเซียมีลักษณะค่อนข้างกลม (subglobose) แผ่นออสติโอลมีลักษณะเว้าลง แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด $8-11.5 \times 3.5-5.5$ ไมโครเมตร เจริญสลิทเป็นเส้นโค้งเล็กน้อย มีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ (faintly sigmoid germ slit spore-length) เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทุรุดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงิน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์ มีลักษณะปลายแหลมคล้ายรูปลิ้นเล็กน้อย (slightly cuneate)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph stage): เชื้อราชนิดนี้มีรูปแบบโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือ *nodulisporium*-like เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ OMA (oat meal agar) เป็นเวลา 12 วัน

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

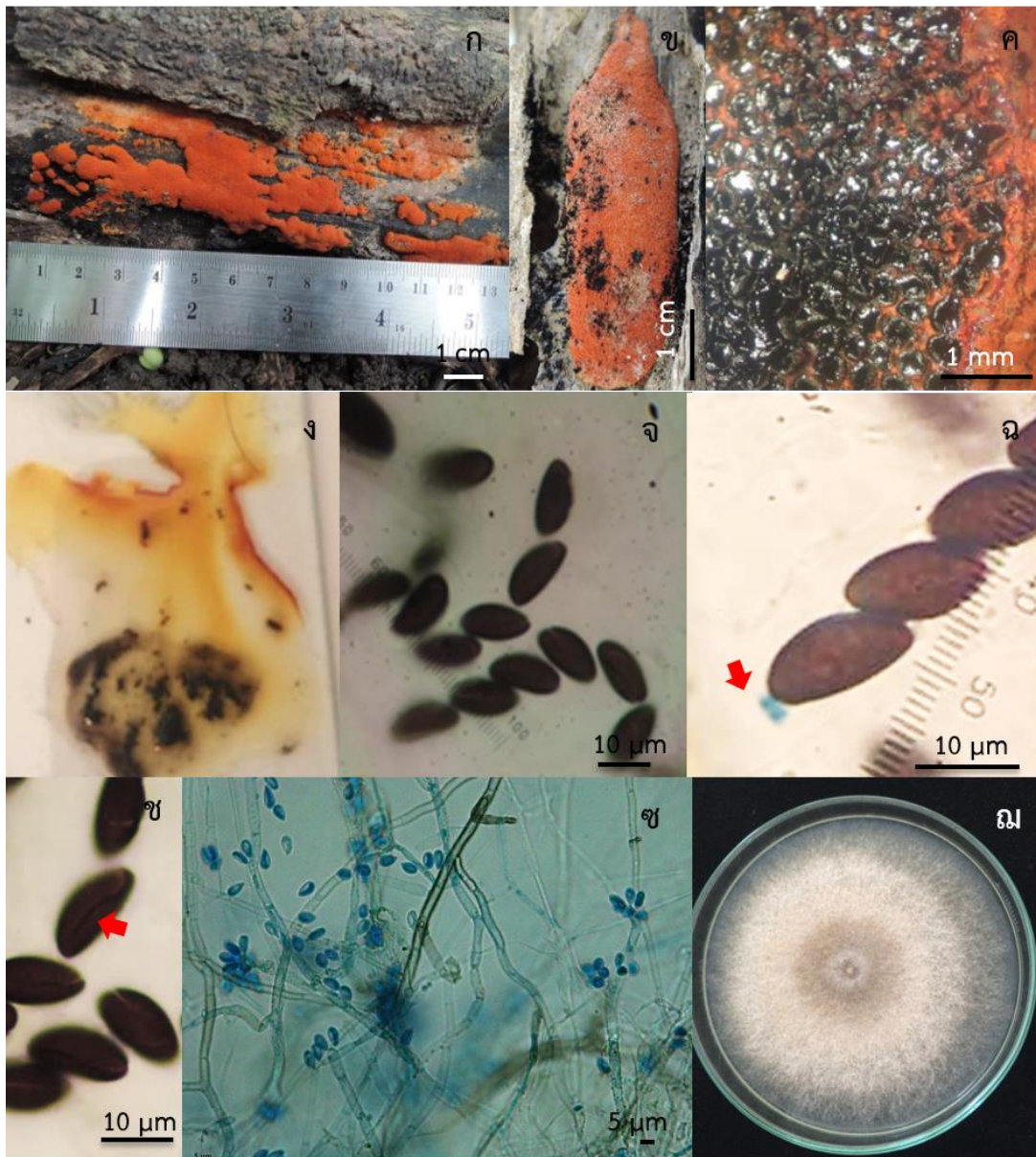
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้: พัทลุง สงขลา และประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่างที่ศึกษา: PTW04, PTPW08*, PSUW17, PSUSKW22 และ PJB04

หมายเหตุ: *ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา

เอกสารอ้างอิง: Fournier และคณะ (2015)

(ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 *Hypoxylon fendleri* ไอโซเลท PSUW17 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงูน ข. สโตรมา ค. เพอริทีเซียทรงกลมรี ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีส้ม จ. แอสโคสปอร์ ฉ. หน่อตุ่มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ช. เจริ่มสลิทแบบโค้งเล็กน้อยมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ซ. โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (*nodulisporium* like) ฅ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน

3. *Hypoxylon griseobrunneum* (B.S. Mehrotra)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีม่วงแก่ หรือสีม่วงปนเทา (livid vinaceous) ผิวหน้าสโตรมาปกคลุมด้วยเม็ดสีสีม่วงปนเหลือง (dull olivaceous yellow granules) สโตรมาเป็นแบบเรียบกึ่งนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับ สารละลาย KOH เกิดสีเหลืองอ่อน (fawn) เพอริทีเซีย รูป ร่า ง รี ข น าด $0.5-0.65 \times 0.18-0.25$ มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะเว้าลง แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลเข้มรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด $9.5-13 \times 3.5-5.5$ ไมโครเมตร เจริมสลิตเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออก เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หูรดงหุ้มสปอร์มีขนาด $2.60-3.10 \times 0.90-1.87$ ไมโครเมตร ติดสีน้ำเงิน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

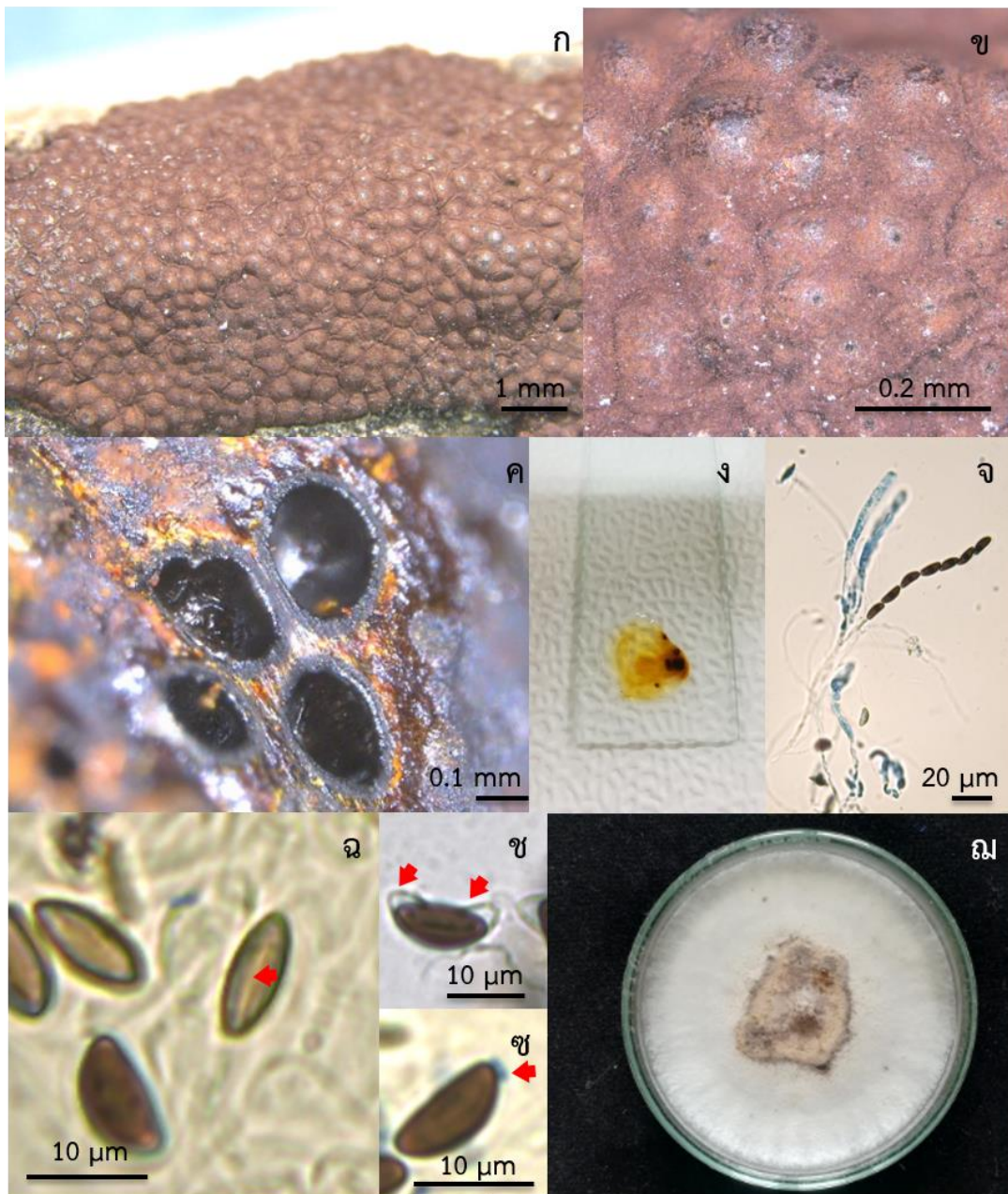
บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: พัทลุง

ตัวอย่างที่ศึกษา: PTW09(N)

เอกสารอ้างอิง: Kuhnert และ Stadler (2014)

(ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 *Hypoxylon griseobrunneum* ไอโซเลท PTW09(N) ก. ลักษณะสโตรมาเรียบกิ่งขุน
 ข. ออสติโอล ค. เพอริทีเซียทรงกลมรี ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีเหลืองอ่อน
 จ. แอสคัสภายในบรจุ 8 แอสโคสปอร์ ฉ. เจริ่มสลิทแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์
 (ลูกศร) ช. เพอริสปอร์ dehiscent (ลูกศร) ซ. หูรดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับ
 สารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ฅ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
 เป็นเวลา 10 วัน

4. *Hypoxylon haematostroma* Mont.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีเหลืองส้ม (fulvous) สีส้มแดง (scarlet) แบบเรียบกิ่งงู ปกคลุมด้วยเม็ดสีส้มแดง (reddish orange) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เกิดสีแดงอมส้ม (dense orange) เพอริทีเซียมีลักษณะเรียวยาวแหลมคล้ายหอก (lanceolate) ขนาด $1.2-1.8 \times 0.25-0.35$ มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะเว้าลง แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์กว้าง แอสโคสปอร์มีขนาด $11.5-18.4 \times 5.5-8.5$ ไมโครเมตร เจริญสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หูดงูหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ: เชื้อราชนิดนี้มีรูปแบบโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ *periconiella*-like เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร OMA เป็นเวลา 12 วัน

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

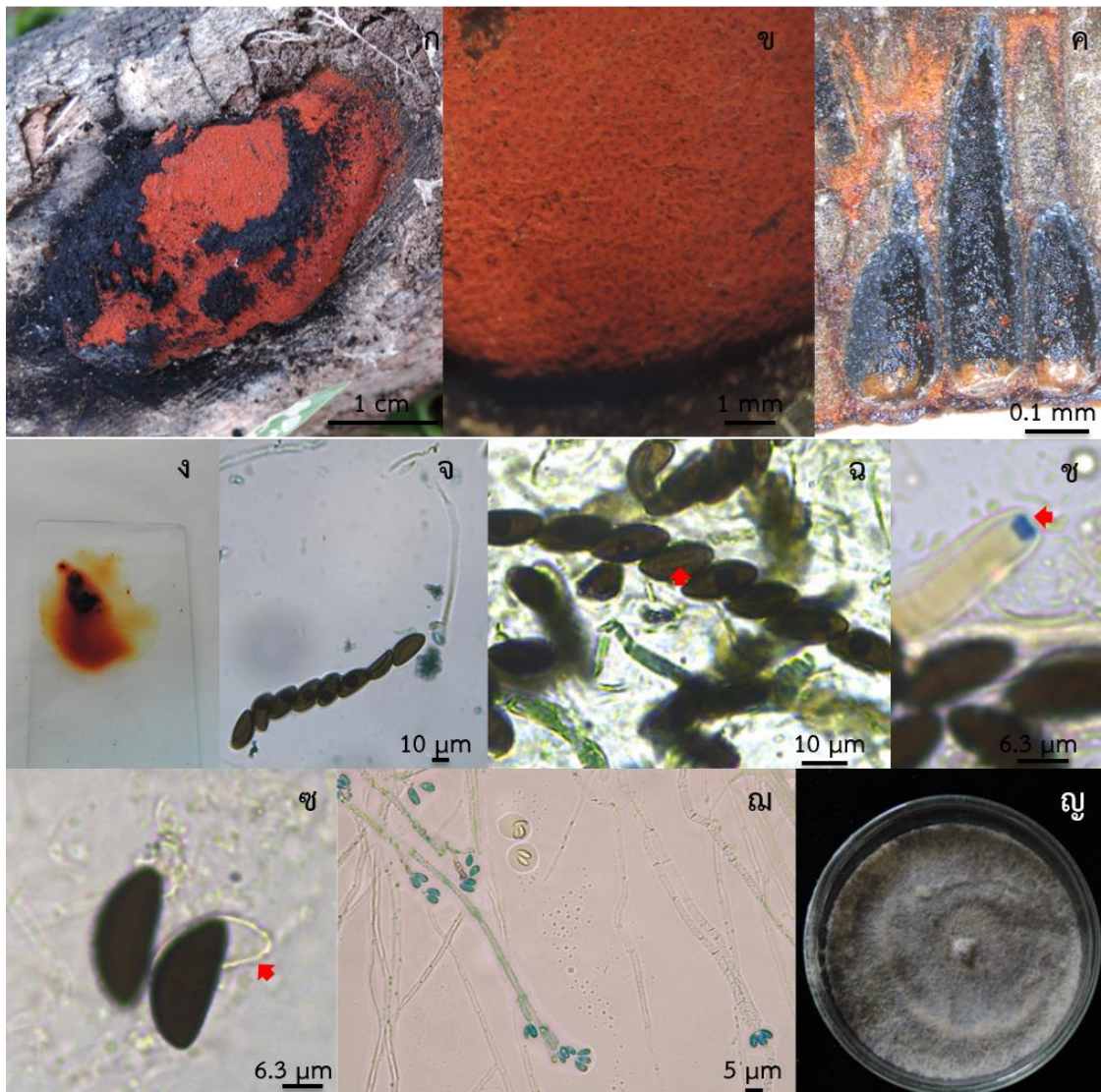
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: กระบี่ ตรัง สตูล และสงขลา

ตัวอย่างที่ศึกษา: KBPB01*, TRW02, TRB06, STW03, PSUB03, SKWPM02 และSKWPM03

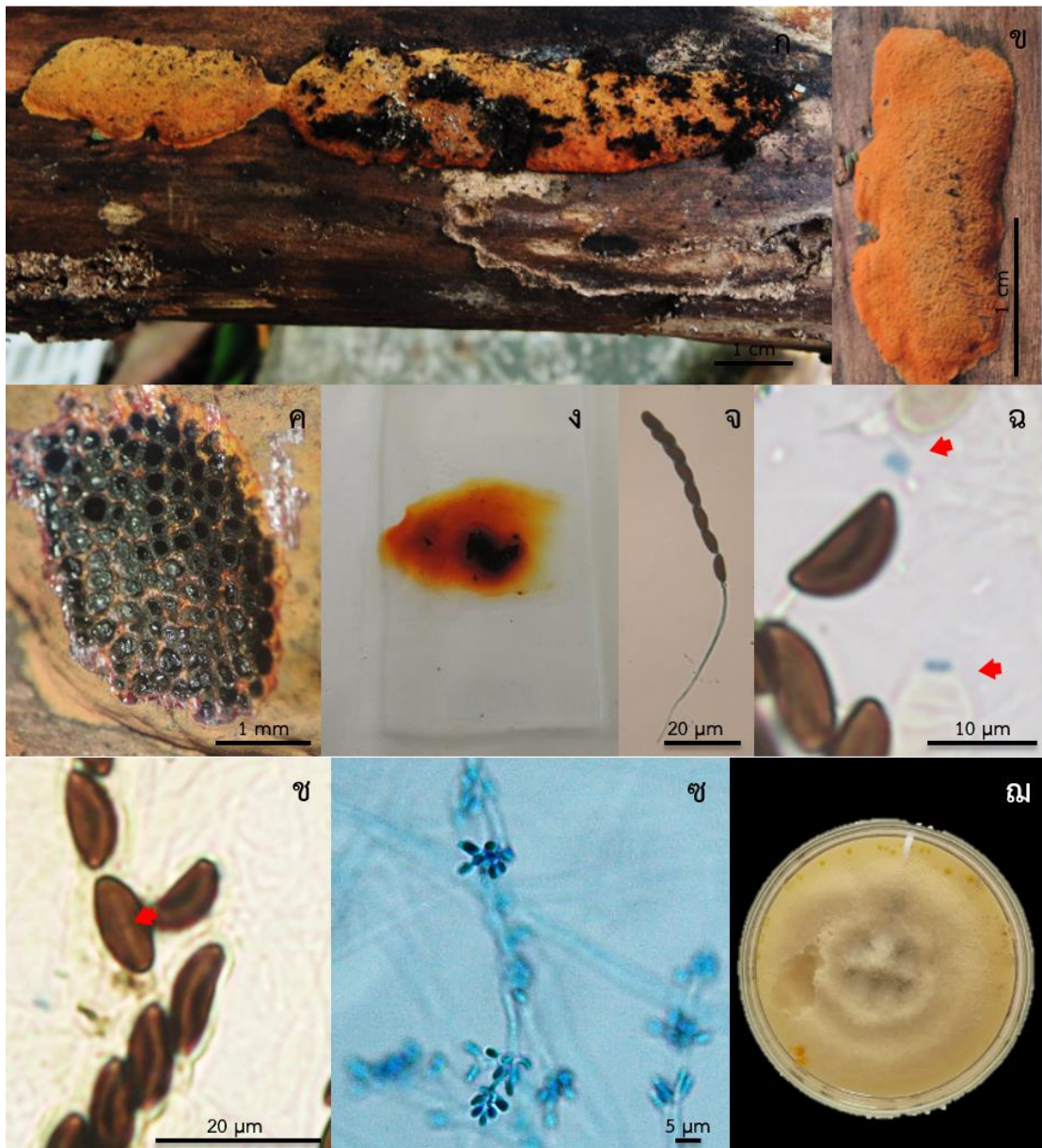
หมายเหตุ: *ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา

เอกสารอ้างอิง: Fournier และคณะ (2015)

(ภาพที่ 30 และ 31)



ภาพที่ 30 *Hypoxylon haematostroma* ไอโซเลท KBPB01 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งนูน ข. สโตรมา ค. เพอริทีเซียเรียวแหลมคล้ายหงอก ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีแดงอมส้ม จ. แอสคัสภายในบรจุ 8 แอสโคสปอร์ ฉ. เจริ่มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ แอสโคสปอร์ (ลูกศร) ช. ทุรุดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิภานกับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ซ. เพอริสปอร์ dehiscent (ลูกศร) ฌ. โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (*periconiella*-like) ญ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน



ภาพที่ 31 *Hypoxylon polyporoideum* (syn. *Hypoxylon haematostroma*) ไอโซเลท SKWPM02 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งนูน ข. สโตรมา ค. เพอริทีเซีย ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีแดงอมส้ม จ. แอสคัสภายในบรจุ 8 แอสโคสปอร์ ฉ. ทุรตถุข่มสปอร์ ช. เจริ่มสลิตเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ซ. โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (*periconiella*-like) ฅ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน

5. *Hypoxyton hypomiltum* Mont.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีเซียวอมเทา (pruinose) แบบเรียบกิ่งงอน ปกคลุมด้วยเม็ดสีเหลืองปนเขียวหม่น (dull olivaceous yellow granule) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาลอบเชย (cinnamon) เพอริทีเซีย มีรูปร่างคล้ายครึ่งวงกลม หรือลักษณะรูปวงรีขนาด $0.7-0.85 \times 0.25-0.45$ มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะเว้าลึก (deeply umbilicate) แอสไซ (asci) ลักษณะคล้ายทรงกระบอก (cylindrical) ภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ ขนาด $120-200 \times 5-6.5$ ไมโครเมตร spore-bearing parts ขนาด $48-56 \times 5-6.5$ ไมโครเมตร ก้านแอสคัส (stipes) มีความยาว $65-155$ ไมโครเมตร แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาล ไรคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด $8.5-9.5 \times 3-4.5$ ไมโครเมตร เจริญสลิทคล้ายตัวเอส (sigmoid) มีความยาวเท่ากับ ความยาว แอสโคสปอร์ (full length) ลักษณะเพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออก เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทุรูตถูกหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

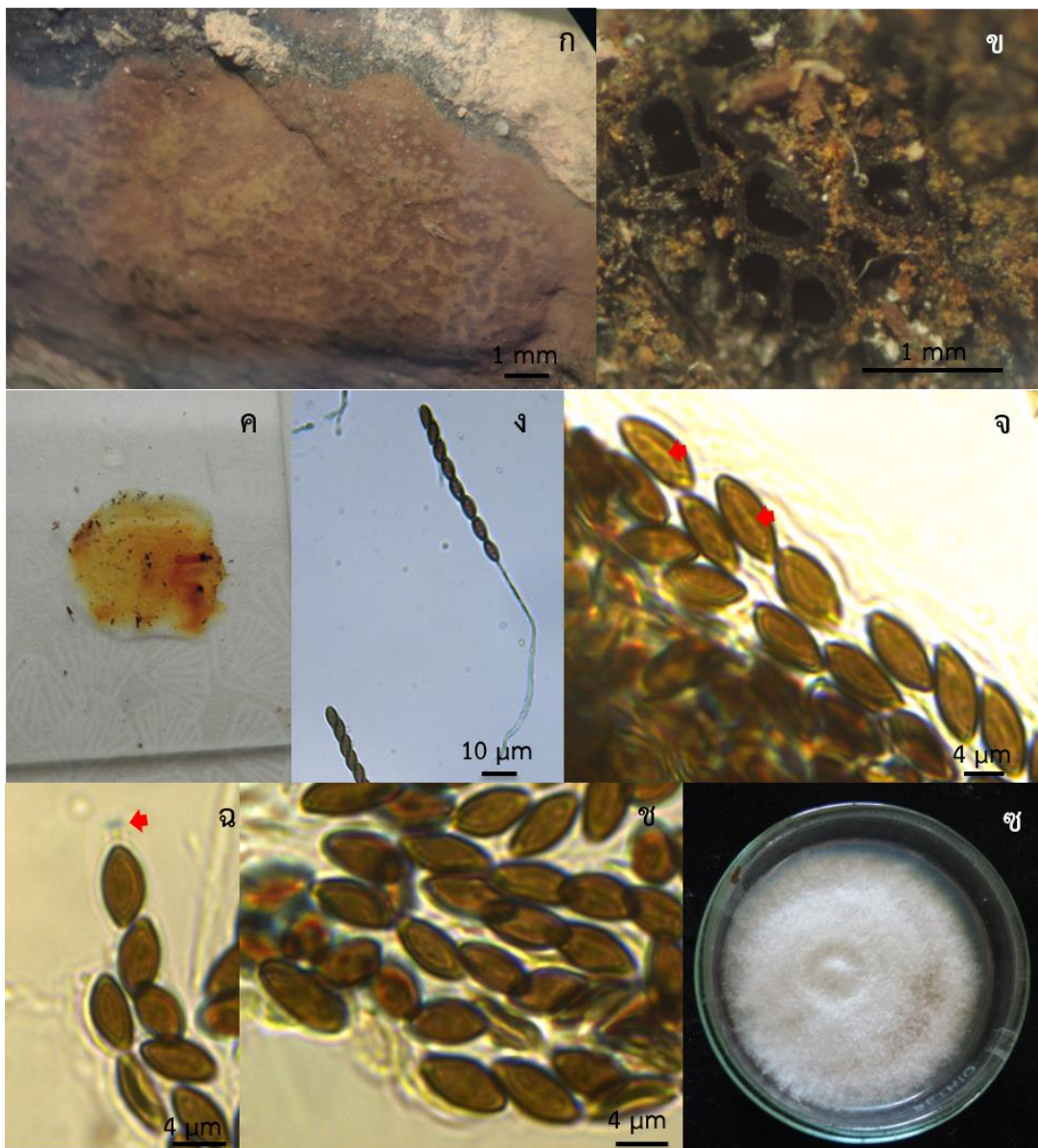
บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: ระนอง สงขลา และประจวบคีรีขันธ์

ตัวอย่างที่ศึกษา: RNB05, PSUW01, PSUB09, และ PJB03

เอกสารอ้างอิง: Fournier และคณะ (2015)

(ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 *Hypoxylon hypomiltum* ไอโซเลท PSUW01 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งนูน
 ข. เพอร์ทีเซียแบบกลมรี ค. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาลอบเชย
 (cinnamon) ง. แอสคัสภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ จ. เจริญสลิทคล้ายตัวเอสมีความยาวเท่ากับความ
 ยาวแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ฉ. หนวดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิภานกับสารละลายเมลเซอร์
 (ลูกศร) ช. แอสโคสปอร์ ซ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
 เป็นเวลา 12 วัน

6. *Hypoxyton jaklitschii* Sir & Kuhnert.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีน้ำตาลดำ (sepia) สีอิฐเข้ม (dark brick) ลักษณะกลมขีดกันเป็นแผ่นเรียบกึ่งนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เกิดสีอิฐเข้ม เพอริที่เขี่ยมีรูปร่างกลม ขนาด 0.3–0.4 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะเว้า แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์ มีขนาด 9–12 × 4.0–5.5 ไมโครเมตร เจริมสลิตโค้งเล็กน้อย (slightly sigmoid) ด้านข้างนูนออก (convex side) มีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์ หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มชั้น 10 เปอร์เซ็นต์

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ: เชื้อราชนิดนี้มีรูปแบบโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ *nodulisporium-like* เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ OMA เป็นเวลา 15 วัน

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

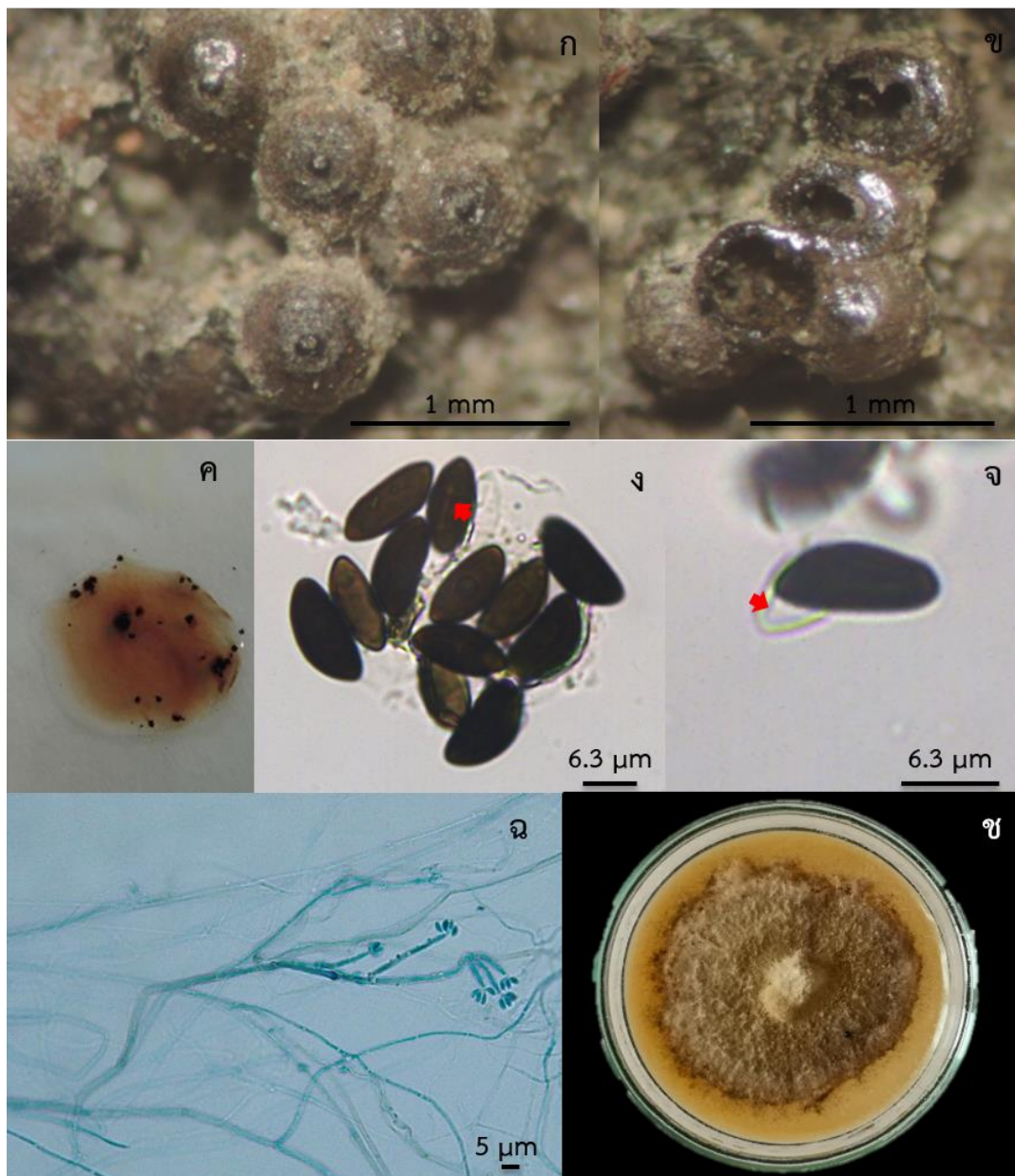
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้: ชุมพร

ตัวอย่างที่ศึกษา: CHPW02 และ CHPW03

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา

เอกสารอ้างอิง: Kuhnert และคณะ (2014)

(ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 *Hypoxylon jaklitschii* ไอโซเลต CHPW03 ก. สโตรมาแบบเป็นเม็ดกลม (glomerate) ข. เพอริทีเซียทรงกลม ค. ปฏิกิริยาของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีอิฐเข้ม ง. เจริญสลิท เป็นเส้นโค้งเล็กน้อยมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) จ. เพอริสปอร์ dehiscent (ลูกศร) ฉ. โครงสร้างสีบัพนธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (*nodulisporium*-like) ช. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน

7. *Hypoxylon lenormandii* Berk. & M.A. Curtis,

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาที่มีสีน้ำตาลม่วง เป็นแบบกลมเรียงติดกันนูนขึ้น ผิวหน้าไม่เรียบ เมื่อทำปฏิกิริยากับ สารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาลแดง (hazel) เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกลม ขนาด 0.4–0.6 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะเว้าลง ตำแหน่งสูงกว่าผิวหน้าของสโตรมา บางชนิดมีลักษณะปลายแหลม เล็กน้อย (slightly papillate) แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาล รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 11–13 × 3.5–4.8 ไมโครเมตร เจริญสลิต โคนเล็กน้อย มีความยาวเท่ากันความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

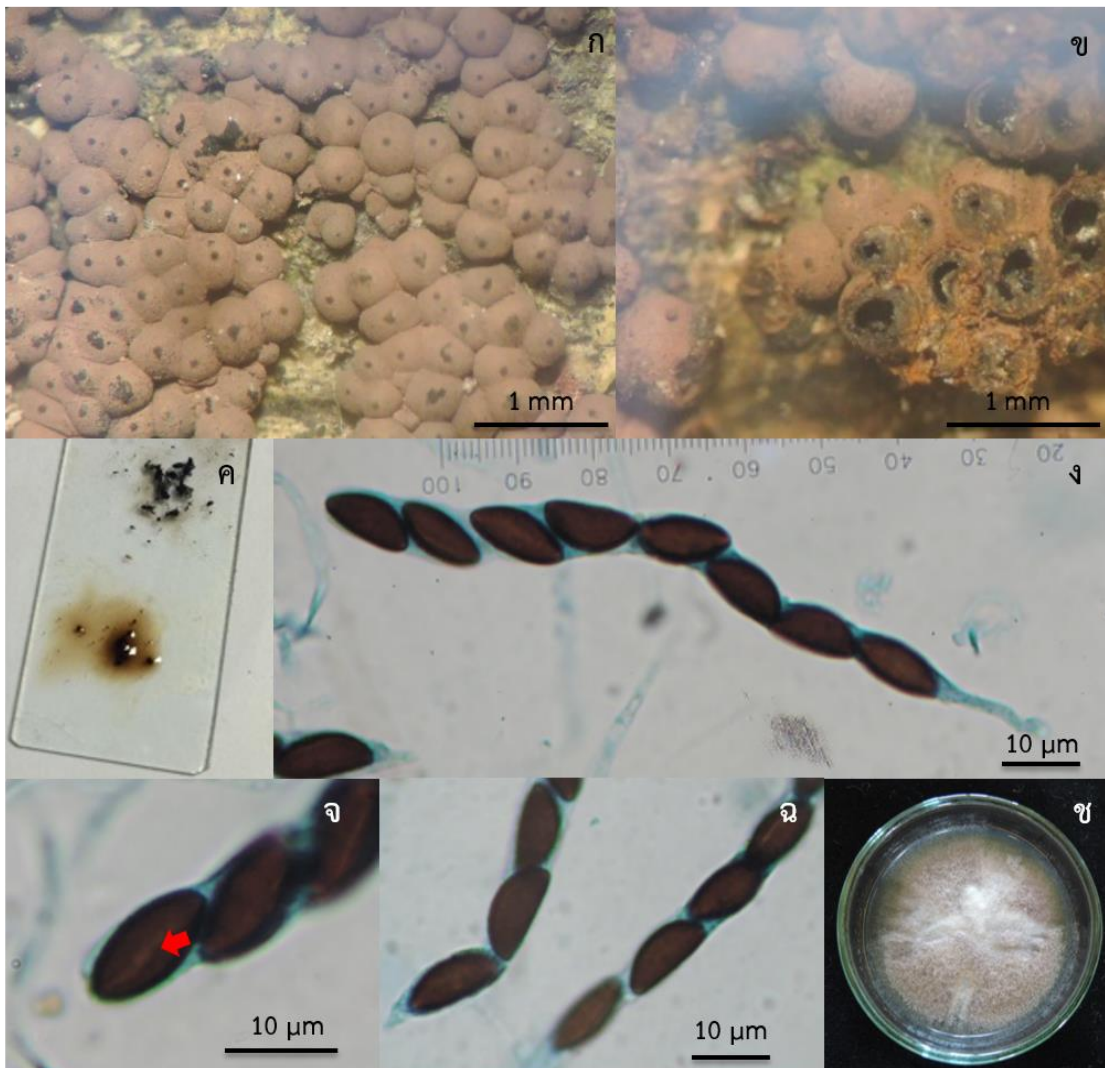
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: กระบี่ ชุมพร ภูเก็ต ระนอง นครศรีธรรมราช สงขลา และ สุราษฎร์ธานี

ตัวอย่างที่ศึกษา: KBB01, CHPW06*, CHPW08*, PKB01, RNPW03*, NKB02, SKW04, SKW(T)19 และ SRBAM02**

หมายเหตุ: *ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา **ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ไผ่

เอกสารอ้างอิง: Ju และ Rogers (1996)

(ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 *Hypoxylon lenormandii* ไอโซเลท SKW(T)19 ก. สโตรมาแบบเป็นเม็ดกลม ข. เพอร์ทีเซียทรงกลม ค. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาลแดง (hatzel) ง. แอสคัสภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ จ. เจริญสลับเป็นเส้นโค้งเล็กน้อยมีความยาวเท่ากับ แอสโคสปอร์ (ลูกศร) ฉ. แอสโคสปอร์ ช. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

8. *Hypoxylon macrocarpum* Pouzar.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีแดงซีด (livid red) เมื่อสโตรมาอายุมากขึ้นสีค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม (dark vinaceous) ผิวสโตรมาปกคลุมด้วยเม็ดสีสีม่วงเหลือง (yellowish orange granules) สโตรมาเป็นแบบเรียบกึ่งนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH สีน้ำตาลปนเทา (sepia) เพอริทีเซียสามารถพบได้ทั้งรูปร่างทรงกลมรีและทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3–0.6 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะเว้าลง อยู่ในตำแหน่งที่ต่ำกว่าผิวหน้าสโตรมา แอสไซ มีลักษณะคล้ายทรงกระบอกภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ ขนาด 140–182 × 6–8 ไมโครเมตร spore-bearing parts ยาว 65–80 ไมโครเมตร ก้านแอสคัสยาว 70–112 ไมโครเมตร แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตรปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 9–13 × 3.5–5.5 ไมโครเมตร เจริญสลิตเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาว แอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับ สารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หนวดถุงหุ้มสปอร์มีขนาด 1 × 2–2.5 ไมโครเมตรติดสีน้ำเงิน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

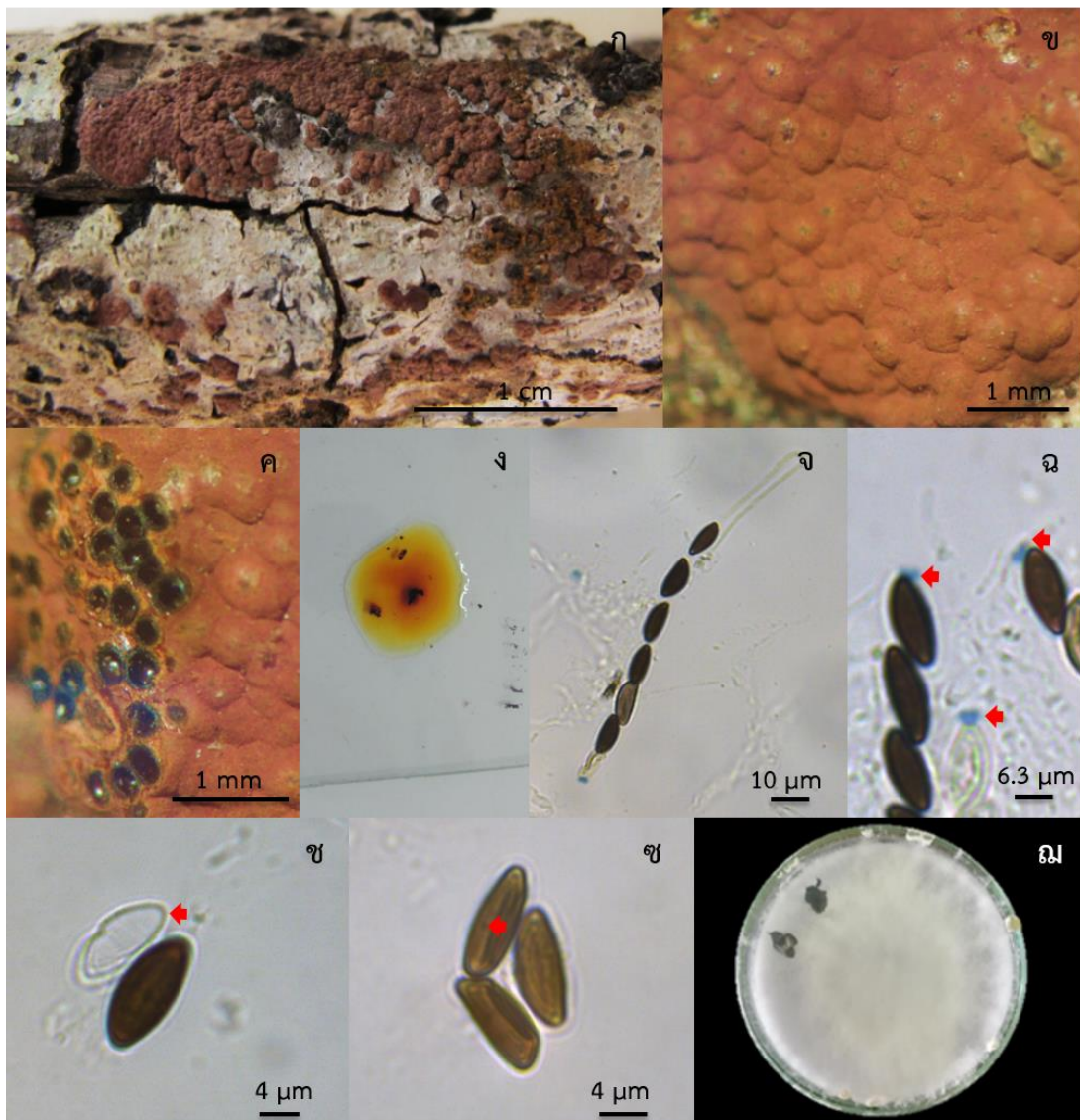
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: สงขลา

ตัวอย่างที่ศึกษา: PSUW07*

หมายเหตุ: *ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้กระถินณรงค์

เอกสารอ้างอิง: Ju และ Rogers (1996)

(ภาพที่ 35)



ภาพที่ 35 *Hypoxylon macrocarpum* ไอโซเลท PSUW07 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงู น ข. สโตรมา ค. เพอริทีเซียทรงรี ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาล จ. ถุงแอสคัสภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ ฉ. หูรดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิภานกับสารละลาย เมลเซอร์ (ลูกศร) ช. เพอริสปอร์แบบ dehiscent ซ. ลักษณะเจอร์มสลิทเป็นเส้นโค้งเล็กน้อยมีความ ยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ฅ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

9. *Hypoxylon monticulosum* Mont.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีสนิม (rust) เมื่อมีอายุน้อย ๆ และสีเริ่มจางลง (pruina gradually fading) เมื่ออายุมากขึ้น จนเปลี่ยนเป็นสีโทนน้ำตาลเข้ม (dull brownish black) สโตรมาตาเป็นแบบเรียบกึ่งนูน (effused-pulvinate) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เกิดสีม่วงจาง ๆ (livid vinaceous) เพอริทีเซียมีรูปร่างครึ่งวงกลม ขนาด $0.35-0.45 \times 0.2-0.35$ มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะปลายแหลมเล็กน้อย (conic-papillate) สีดำเป็นเงา แอสโคสปอร์สีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด $6.5-8.7 \times 3-4$ ไมโครเมตร เจริญสลิทเป็นเส้นโค้งคล้ายตัวเอส มีความยาวเท่ากับความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หนวดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

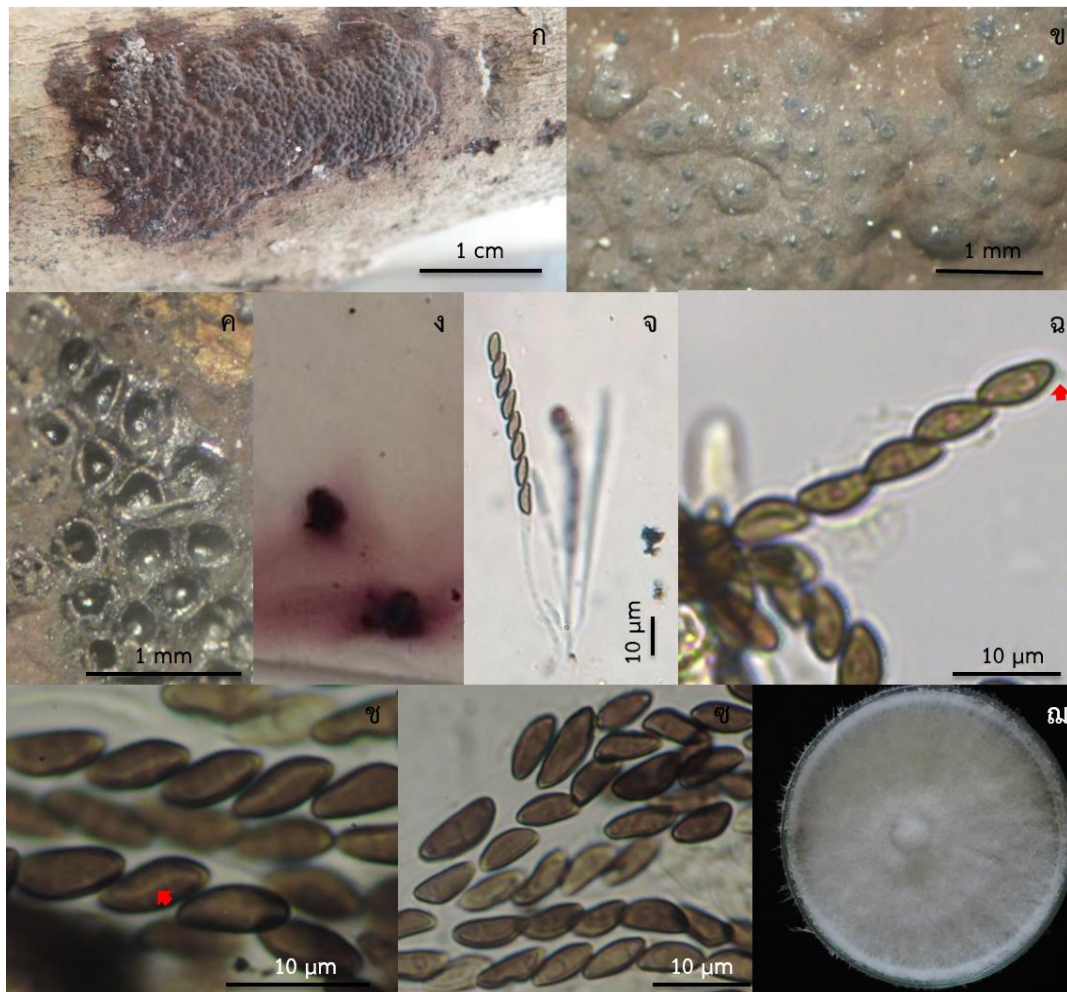
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้: กระบี่ ชุมพร ตรัง พังงา ภูเก็ต ระนอง นครศรีธรรมราช และ สงขลา

ตัวอย่างที่ศึกษา: KBW04, CHPW01*, TRB09, PNGB02, PKW05, RNPW02*, NKB03, SKW25 และ SKW26

หมายเหตุ: *ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา

เอกสารอ้างอิง: Fournier และคณะ (2015)

(ภาพที่ 36)



ภาพที่ 36 *Hypoxylon monticulosum* ไอโซเลท CHPW01 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงูน
 ข. ออสติโอลปลายแหลมเล็กน้อย ค. เพอริทีเชียทรงรี ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH
 เกิดสีม่วง จ. แอสคัสภายในบรจ 8 แอสโคสปอร์ ฉ. หน่อตุ่มหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิภานกับ
 สารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ช. เจริ่มสลิทเป็นเส้นโค้งคล้ายตัวเอสมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์
 (ลูกศร) ซ. แอสโคสปอร์ ฅ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 12 วัน

10. *Hypoxylon pilgerianum* Henn.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีม่วงแดงเข้ม เจริญราบแนบติดไปกับเนื้อไม้ (effused-applanate) ผิวสโตรมาปกคลุมด้วยเม็ดสีที่มีสีน้ำตาล เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เกิดสีส้มน้ำตาล เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกลมหรือรี ขนาด 0.13–0.17 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลแบบเว้าลง แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาล รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด $7.5\text{--}10.5 \times 3.3\text{--}5.7$ ไมโครเมตร เจริญสลักเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาว แอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ฟูรูดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์ ขนาด $0.8\text{--}1 \times 2.5$ ไมโครเมตร

บริเวณที่พบ: ท่อนไม้

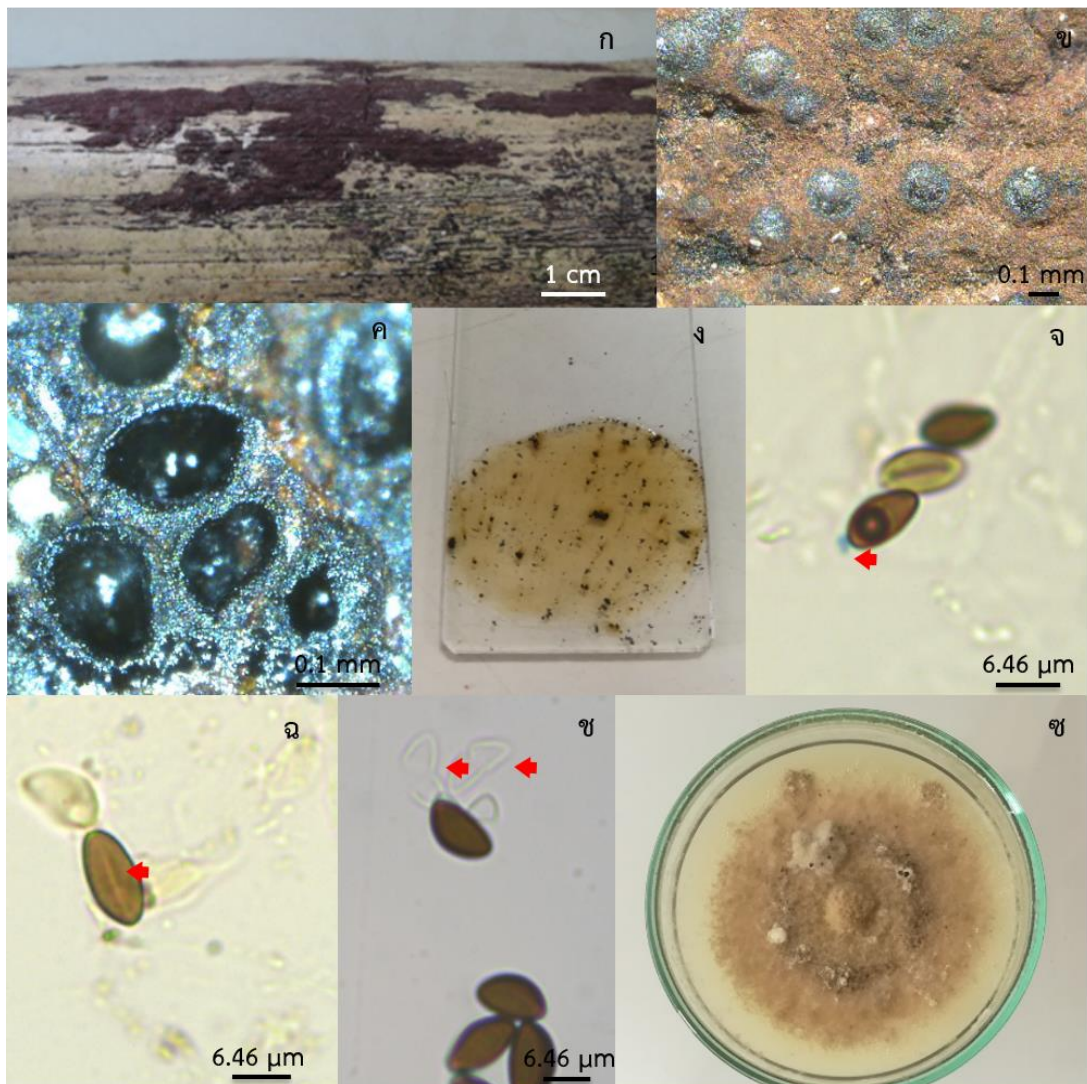
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: สุราษฎร์ธานี

ตัวอย่างที่ศึกษา: SRBAM01*, SRBAM03* และ SRBAM04*

หมายเหตุ: *ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ไผ่

เอกสารอ้างอิง: Fournier และคณะ (2015)

(ภาพที่ 37)



ภาพที่ 37 *Hypoxylon pilgerianum* ไอโซเลท SRBAM01 ก. สโตรมาบนราบ ข. ออสติโอล ค. เพอริทีเซียทรงกลมและทรงรี ง. ปฏิกริยาของสโตรมาทับสารละลาย KOH เกิดสีส้มอมน้ำตาล (sienna) จ. หูรดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกริยากับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ฉ. ลักษณะเจอร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ช. เพอริสปอร์แบบ dehiscent (ลูกศร) ซ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 10 วัน

11. *Hypoxylon sublenormandii* N. Suwannasai, S. Rodtong, S.

Thienhirun & A.J.S. Whalley

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีน้ำตาลแดง (reddish brown) ลักษณะกลมจนถึงเรียบกึ่งนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาลแดง เพอริทีเซียมีรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.2×0.4 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลอยู่ตำแหน่งสูงกว่าผิวหน้าสโตรมาเล็กน้อย แอสโคสปอร์สีน้ำตาลรีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 9–12 × 4–5 ไมโครเมตร เจริญสลับเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หน่อตุ่มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

บริเวณที่พบ: ท่อนไม้

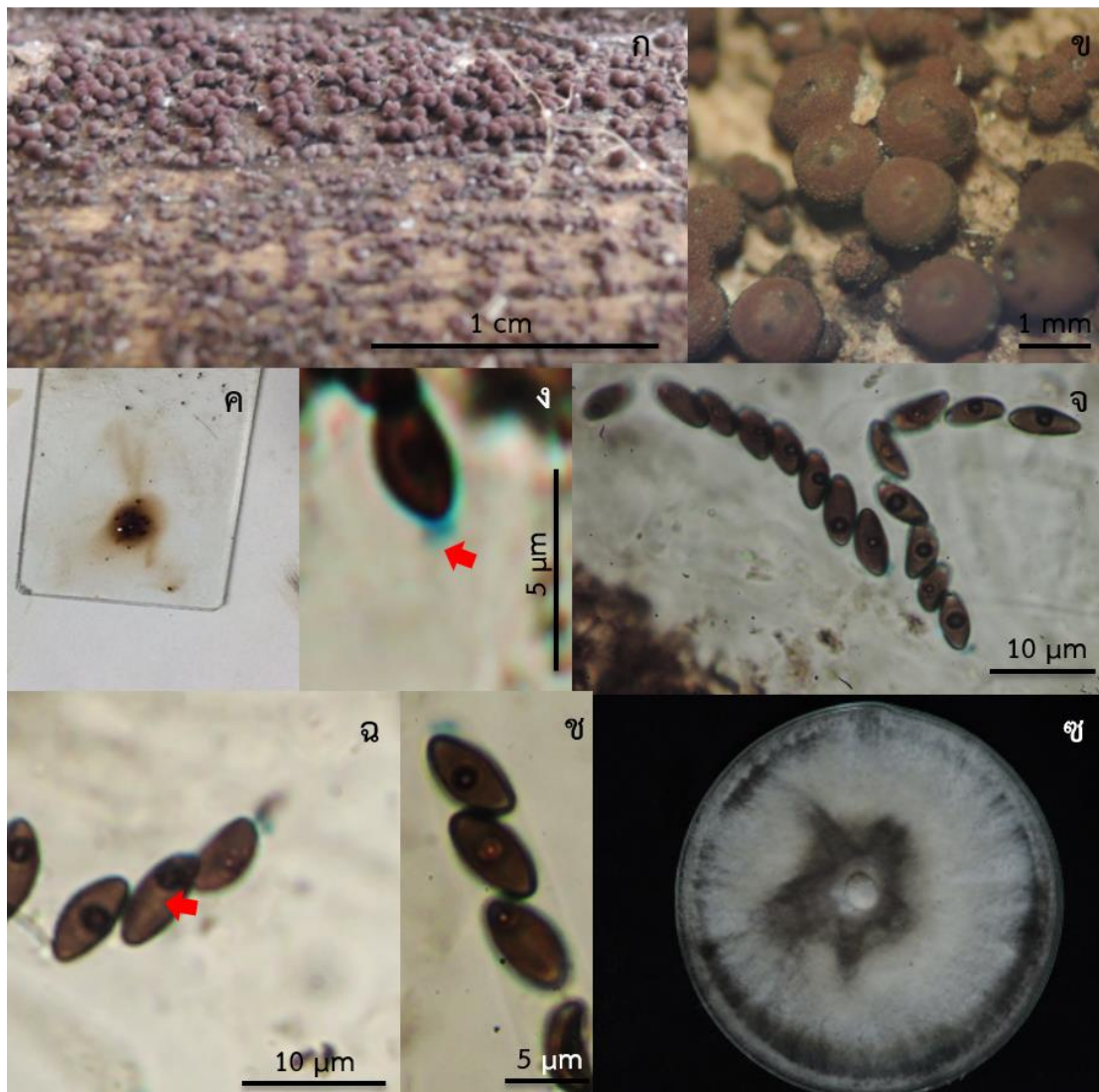
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: สงขลา และ สุราษฎร์ธานี

ตัวอย่างที่ศึกษา: SKW30 และ SRBAM07

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ไผ่

เอกสารอ้างอิง: Suwannasai (2005)

(ภาพที่ 38)



ภาพที่ 38 *Hypoxylon sublenormandii* ไอโซเลท SKW30 ก. สโตรมาตรงกลม ข. เพอริทีเซียตรงกลม ค. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาลแดง ง. หูรดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) จ. แอสคัส ฉ. เจริ่มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ช. แอสโคสปอร์ ซ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 15 วัน

12. *Hypoxylon* species A ไอโซเลท PTBAM04

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาที่มีสีน้ำตาลแดง แบบทรงกลมเรียงติดกันเป็นกระจุก เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีน้ำตาลแดง เพอริที่เชื่อมทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25×0.45 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอลมีลักษณะเว้าลง แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาล หรือสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตรปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์ มีขนาด $11.7-16 \times 4.9-6.0$ ไมโครเมตร เจริมสลิตเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาว แอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ indehiscent เปลือกแอสโคสปอร์ไม่หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับ สารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หนวดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับ สารละลายเมลเซอร์

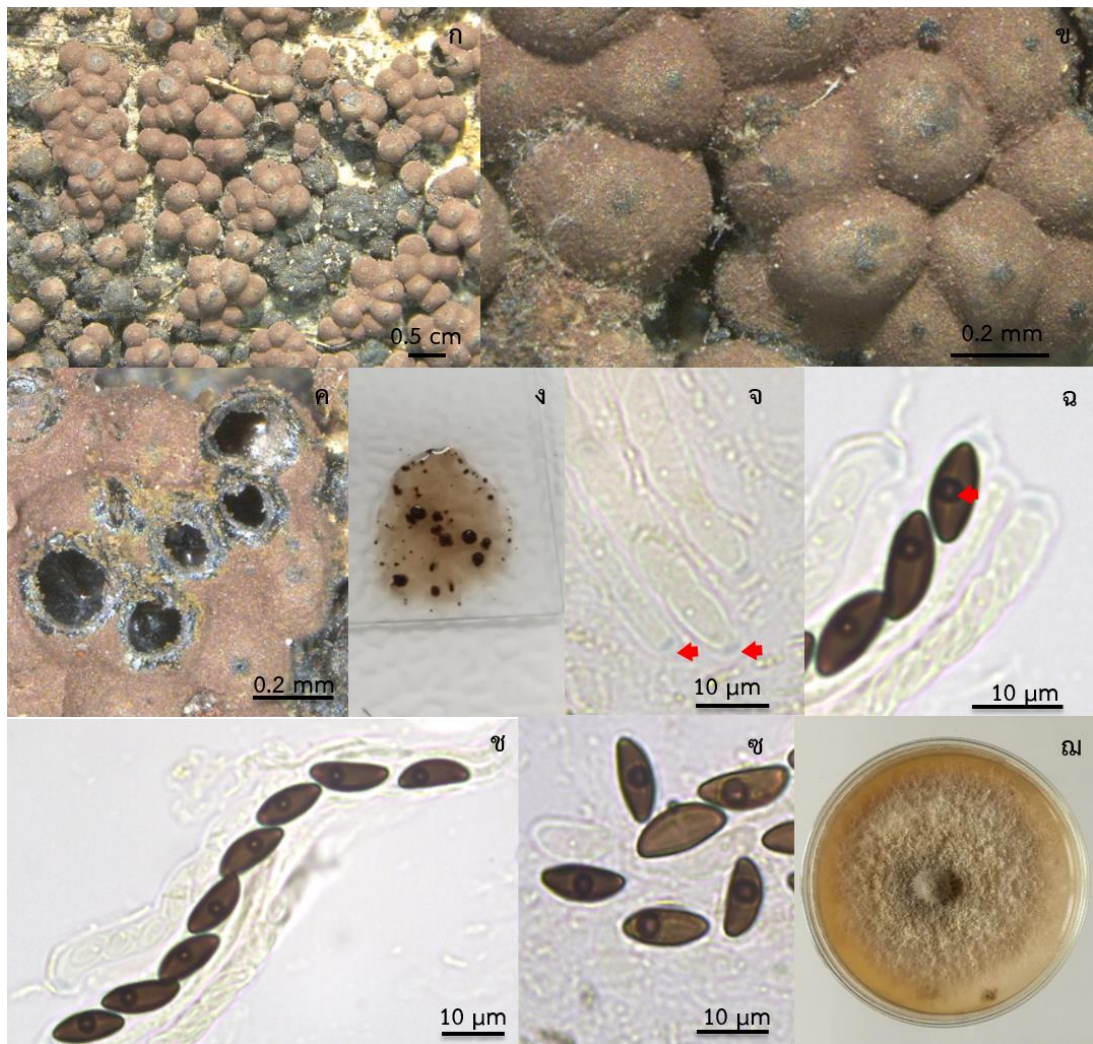
บริเวณที่พบ: ท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: พัทลุง

ตัวอย่างที่ศึกษา: PTBAM04 และ PTBAM07

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ไผ่

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราชนิดนี้ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อรา *H. rubellum* Penzig & Sacc แตกต่างที่เชื้อรา *H. rubellum* มีรูปทรงของแอสโคสปอร์คล้ายกระสวย (fusiform) และมีขนาดแอสโคสปอร์เท่ากับ $18.1-21.1 \times 7.5-8.9$ ไมโครเมตร ซึ่งใหญ่กว่า *Hypoxylon* species A ที่มีขนาดแอสโคสปอร์เพียง $11.7-16 \times 4.9-6.0$ ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังมีความ คล้ายคลึงกับเชื้อรา *H. venezuelense* Y.-M. Ju & J. D. Rogers แตกต่างกันที่เชื้อราชนิดนี้มี เพอริที่เขี่ยขนาดเล็ก คือ 0.1 มิลลิเมตร (Ju and Roger, 1996) ในขณะที่รา *Hypoxylon* species A มีขนาดเพอริที่เขี่ย 0.25×0.45 มิลลิเมตร ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราที่ชัดเจนได้ (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 39 *Hypoxylon* species A ไอโซเลท PTBAM04 ก. สโตรมาแบบทรงกลม ข. สโตรมาและออสติโอล ค. เพอริทรีเซียทรงกลม ง. ปฏิภิกิริยาของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีน้ำตาลแดง จ. หูรดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิภิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ฉ. ลักษณะเจอร์มสลิทเป็นเส้นตรง มีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ช. แอสคัสภายในบรรจุ 8 แอสโคปอร์ ซ. แอสโคสปอร์ ฅ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 15 วัน

13. *Hypoxyton species B* ไอโซเลท SKW09

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

ผิวสโตรมาปกคลุมด้วยสีขาว เมื่อฉีกผิวหน้าสโตรมาออกพบเพอริทีเซีย และพื้นผิวรอบ ๆ เป็นสีส้ม แบบเรียบ กิ่งงู สโตรมาเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีส้ม เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.2–0.3 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะเว้าลง แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตรปลายสปอร์กว้าง แอสโคสปอร์มีขนาด 10.5–12.6 × 4.7–5.5 ไมโครเมตร เจริญสลับเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวแอสโคสปอร์

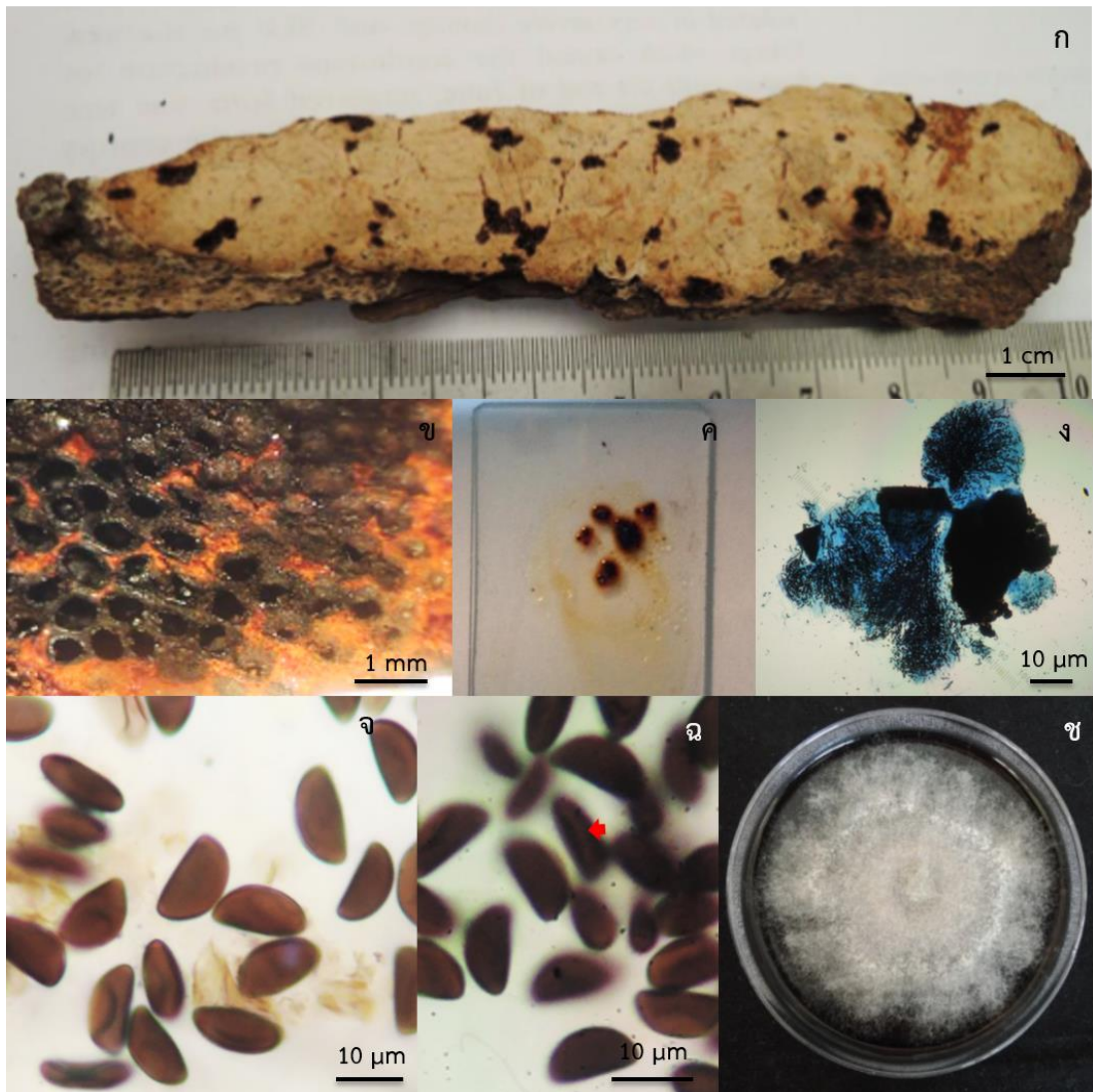
บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: สงขลา

ตัวอย่างที่ศึกษา: SKW09

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราชนิดนี้ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *H. cinnabarinum* (Henn.) แตกต่างที่แอสโคสปอร์ของเชื้อรา *H. cinnabarinum* มีขนาดใหญ่กว่า แอสโคสปอร์ของเชื้อรา *Hypoxyton species B* คือ 10.5–14.7 × 4.7–7.4 ไมโครเมตร (Fournier *et al.*, 2015) นอกจากนี้เชื้อรา *Hypoxyton species B* มีข้อมูลลักษณะที่ใช้จำแนกบางประการขาดไป ได้แก่ ลักษณะเพอริสปอร์ และการทำปฏิกิริยาของหูดสปอร์กับสารละลาย เมลเซอร์เป็นต้น จึงทำให้ยากแก่การจัดจำแนกชนิดที่ชัดเจน

(ภาพที่ 40)



ภาพที่ 40 *Hypoxylon* species B ไอโซเลท SKW09 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงูน ข. เพอริทีเซีย ล้อมรอบด้วยฝุ่นเม็ดสีส้มค. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีส้ม ง. แอสไซและแอสโคสปอร์ในสารละลายแลคโตฟีนอลคอตตอลบลู จ. แอสโคสปอร์ ฉ. ลักษณะเจอร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ช. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 15 วัน

14. *Hypoxyylon species C* ไอโซเลท (STPW01)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาตามีเนื้อหยาบสีแดงส้ม เรียบกึ่งนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีส้ม เพอร์ที่เซียมีรูปร่างทรงกระบอก หรือรูปทรงรี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.1–0.2 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะเว้าลง แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาล หรือสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตรปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 11.6–18 × 5–9 ไมโครเมตร เจริญสลับเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากันความยาวแอสโคสปอร์เพอร์สปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หน่อตุ่มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ: เชื้อราชนิดนี้มีรูปแบบสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ *periconiella*-like เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ OMA เป็นเวลา 10 วัน

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

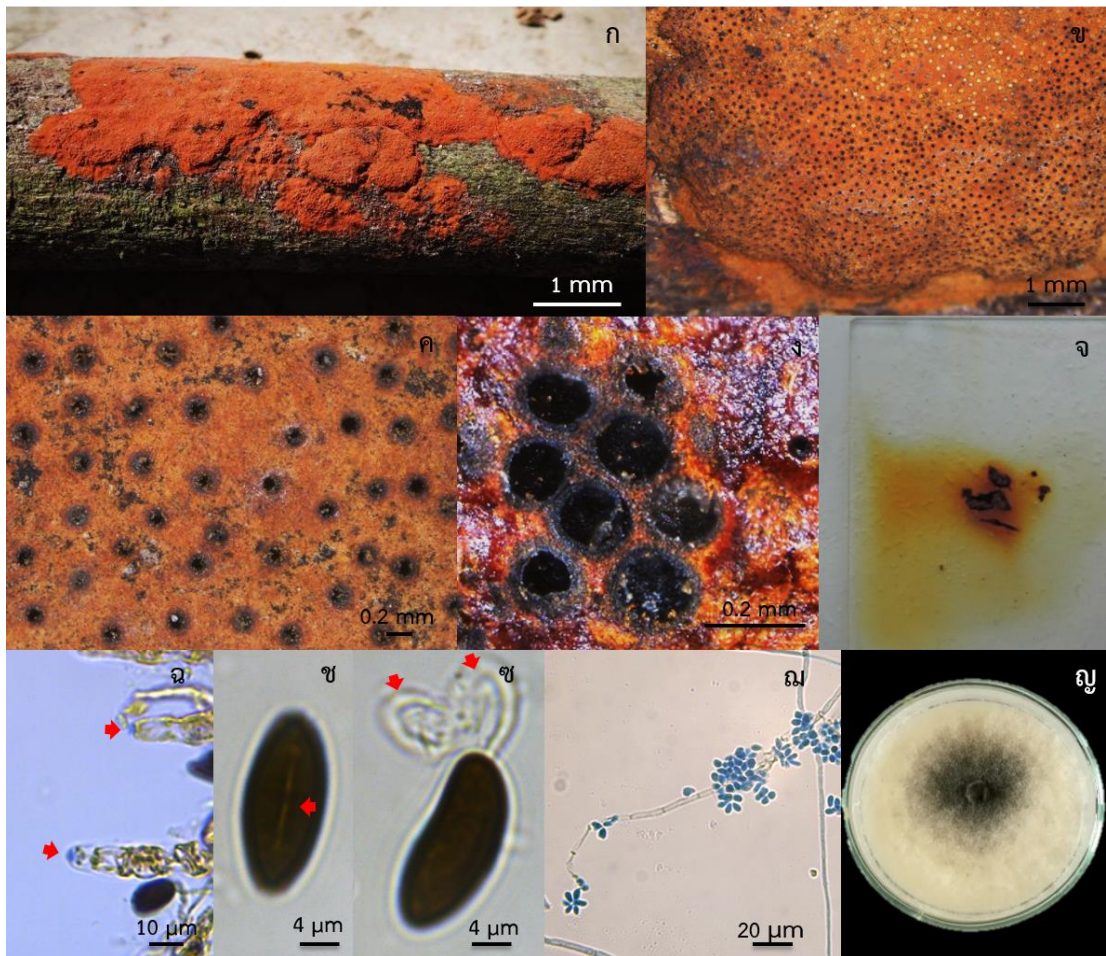
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาคั้งนี้: สตูล

ตัวอย่างที่ศึกษา: STPW01* และ STPW04*

หมายเหตุ: *ตัวอย่างที่ศึกษาเจริญบนไม้ยางพารา

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราชนิดนี้ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *H. rickii* Y.M. Ju & J.D. Rogers แตกต่างที่ แอสโคสปอร์ของเชื้อรา *H. rickii* มีแอสโคสปอร์ขนาด 5.5–8.5 × 3–4 ไมโครเมตร (Cruz and Cortez, 2015) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าแอสโคสปอร์ของเชื้อรา *Hypoxyylon species C* นอกจากนี้ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *H. rickii* เป็นแบบ *nodulisporium*-like (Founier et al., 2015) ในขณะที่รา *Hypoxyylon species C* มีการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบ *periconiella*-like

(ภาพที่ 41)



ภาพที่ 41 *Hypoxylon* species C ไอโซเลท STPW01 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงู ข. สโตรมา ค. ออสติโอลเว้าลง ง. เพอริทีเซีย จ. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีส้ม ฉ. หูรดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ช. เจริ่มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ช. เพอริสปอร์แบบ dehiscent ฉ. โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (*periconiella*-like) ฉ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 15 วัน

15. *Hypoxyylon* species D ไอโซเลท PTW02

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีส้ม แบบเรียบกึ่งนูนไปจนถึงนูนขึ้นเป็นกลุ่มก้อนมีลักษณะคล้ายครึ่งวงกลม เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีส้ม เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงรี เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.15–0.25 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะเว้าลง แอสคัสมีลักษณะคล้ายทรงกระบอก ภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ มีขนาด $115.8\text{--}143 \times 5.5\text{--}7.8$ ไมโครเมตร (spore-bearing parts) ขนาด 58.8×76 ไมโครเมตร ก้านแอสคัส (stipes) มีความยาว $52.8\text{--}72.5$ ไมโครเมตร แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อน รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบขนาด $10.5\text{--}12.3 \times 4\text{--}6.3$ ไมโครเมตร เจริ่มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หูดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย เมลเซอร์ ขนาด $2.6\text{--}3.7 \times 1.1\text{--}1.7$ ไมโครเมตร

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

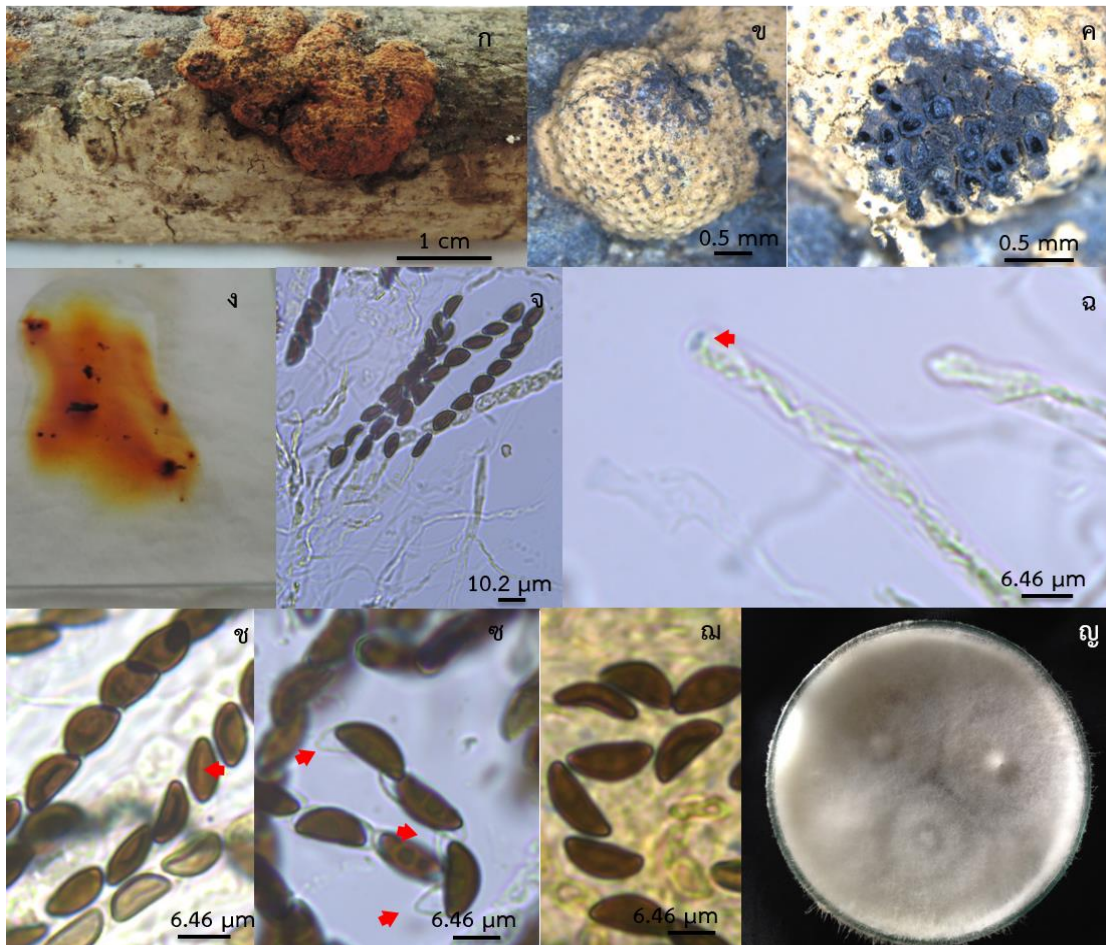
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: พัทลุง

ตัวอย่างที่ศึกษา: PTW02 และ PTW05

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษาเจริญบนไม้ยางพารา

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราชนิดนี้ มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อรา *H. rickii* Y.M. Ju & J.D. Rogers แตกต่างที่แอสโคสปอร์ของเชื้อรา *H. rickii* มีขนาด $6.2\text{--}7.9 \times 3\text{--}4$ ไมโครเมตร (Fournier *et al.*, 2015) ซึ่งเล็กกว่าแอสโคสปอร์ของเชื้อรา *Hypoxyylon* species D ที่มีขนาดแอสโคสปอร์เท่ากับ $10.5\text{--}12.3 \times 4\text{--}6.3$ ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา *H. fendleri* แตกต่างกันที่ลักษณะเจริญสลิทของเชื้อราชนิดนี้ เป็นแบบโค้ง และมีความยาวเท่ากับ ความยาวของแอสโคสปอร์ (Ju and Rogers, 1996) ในขณะที่ *Hypoxyylon* species D มีเจริญสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากันความยาวแอสโคสปอร์

(ภาพที่ 42)



ภาพที่ 42 *Hypoxylon* species D ไอโซเลท PTW02 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งนู น
 ข. สโตรมาเป็นกลุ่มก้อนคล้ายครึ่งวงกลม ค. เพอริทีเซียทรงรี ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย
 KOH เกิดสีส้ม จ. แอสคัสภายในบรรจุ 8 แอสโคสปอร์ ฉ. ทูรูดงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยา
 กับสารละลายเมลเซอร์ (ลูคสร) ช. ลักษณะเจอร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์
 (ลูคสร) ซ. เพอริสปอร์แบบ dehiscent ฌ. แอสโคสปอร์ ญ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบน
 อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

16. *Hypoxyylon* species E ไอโซเลท PTPB01

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีน้ำตาลม่วงแบบเรียบกึ่งนูน หรือแบนราบ (plane) ไปกับผิวเนื้อไม้ เมื่อทำปฏิกิริยากับ KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีน้ำตาล (honey) เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงรี ไปจนถึงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.6–0.8 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะเว้าลง แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อน จนถึงสีน้ำตาลเข้ม รียาว ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตรปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด $10.2\text{--}13.7 \times 3.5\text{--}5$ ไมโครเมตร เจริญสลับเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวแอสโคสปอร์

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ: เชื้อราชนิดนี้มีรูปแบบโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ *nodulisporium*-like เมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยบนอาหาร OMA เป็นเวลา 15 วัน

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

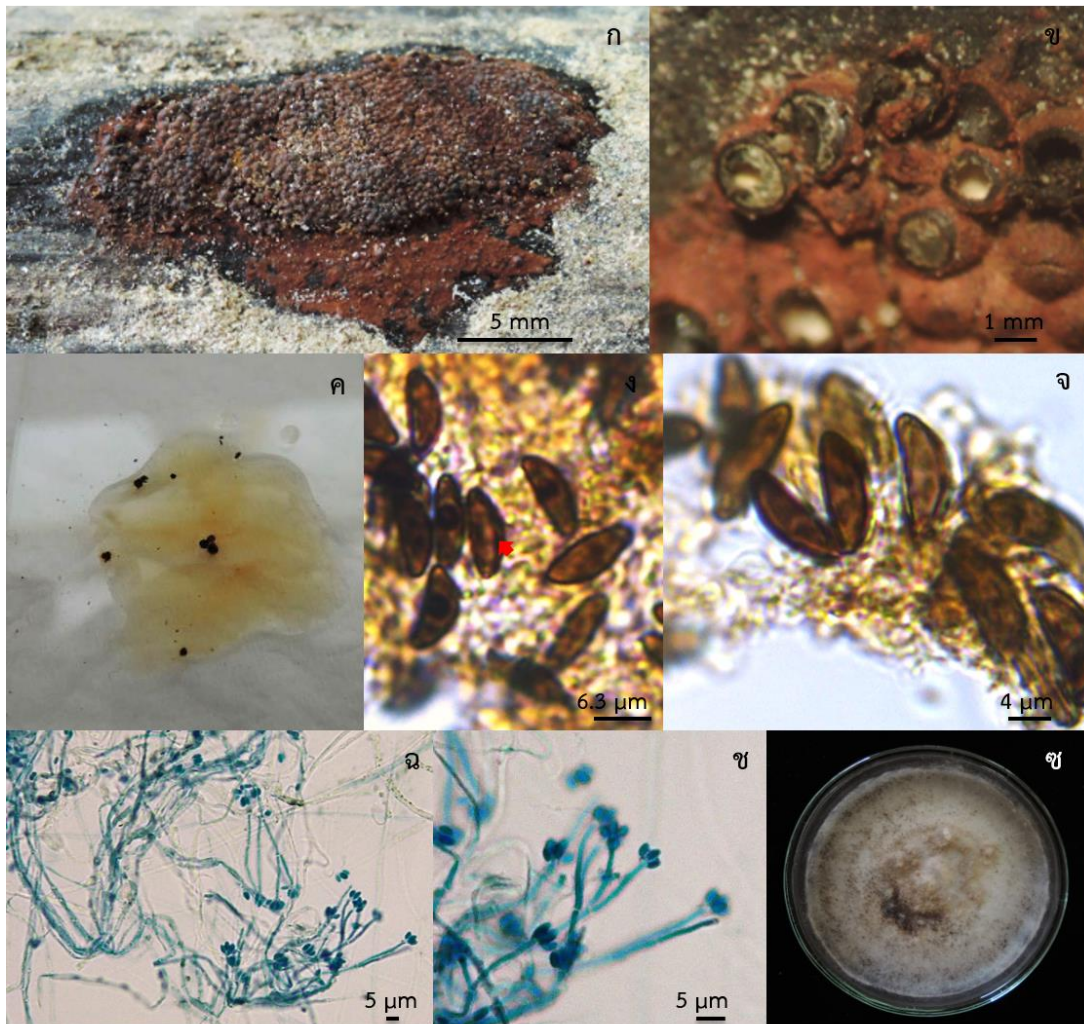
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: พัทลุง

ตัวอย่างที่ศึกษา: PTPB01

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษาเจริญบนไม้ยางพารา

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Hypoxyylon* species E มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *H. aucklandiae* Y.-M. Ju & J. D. Rogers แตกต่างที่ขนาดของเพอริทีเซีย โดยในเชื้อรา *H. aucklandiae* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2–0.6 ไมโครเมตร (สุรางค์ เขียรศิริ, 2543) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเชื้อรา *Hypoxyylon* species E นอกจากนี้ยังมีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *H. pilgerianum* แต่เชื้อรา *H. pilgerianum* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพอริทีเซีย 0.1–0.3 ไมโครเมตร (Ju and Roger, 1996) ในขณะที่ *Hypoxyylon* species E มีเส้นผ่านศูนย์กลางเพอริทีเซียขนาด 0.6–0.8 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า

(ภาพที่ 43)



ภาพที่ 43 *Hypoxylon* species D ไอโซเลท PTPB01 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงู น ข. เพอริทีเซียทรงกลม ค. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดน้ำตาล ง. ลักษณะเจอร์มสลิท เป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) จ. แอสโคสปอร์ ฉ.-ช. โครงสร้างสืบพันธุ์แบบ ไม่อาศัยเพศ (*nodulisporium*-like) ซ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 15 วัน

17. *Hypoxylon* species F ไอโซเลท TRW04

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

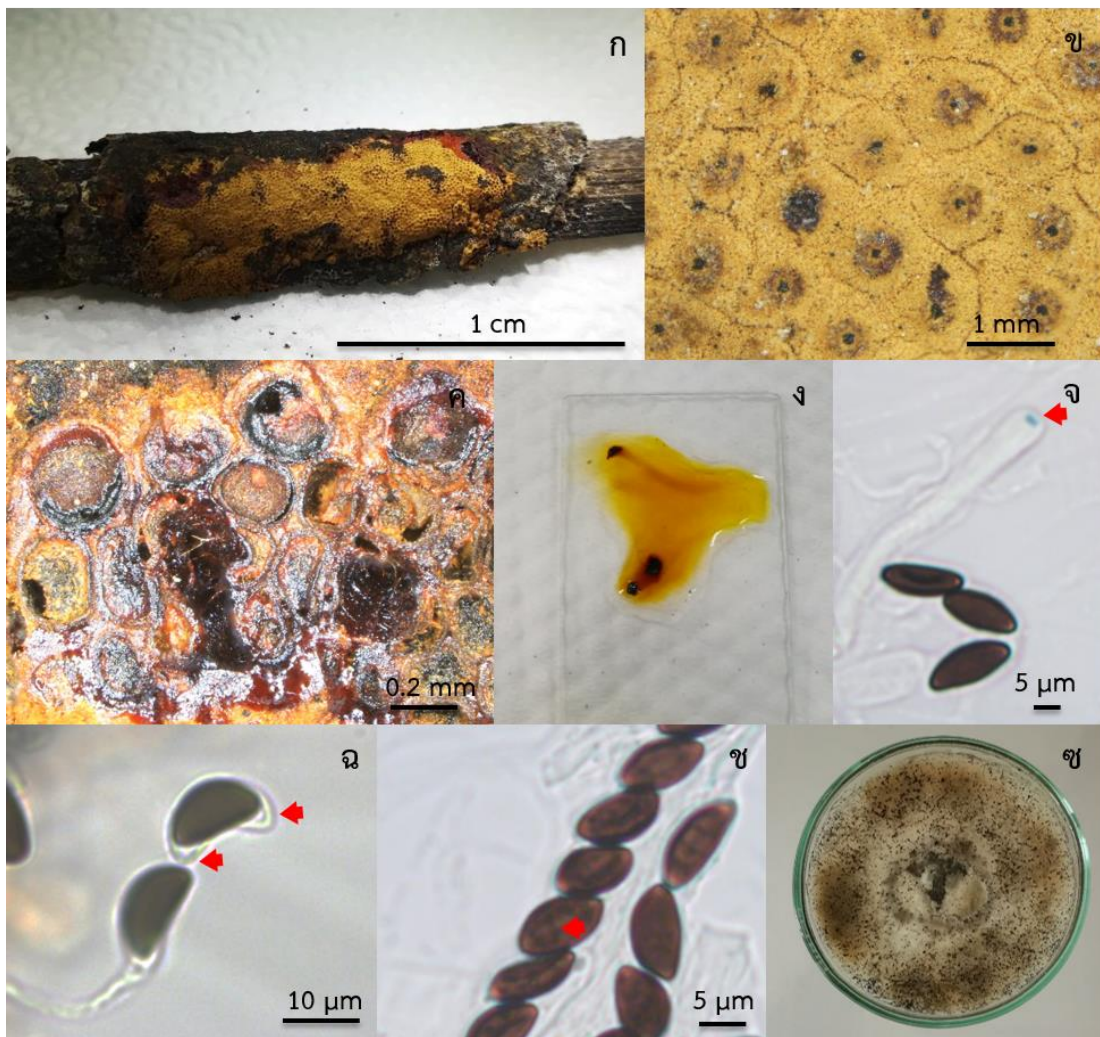
สโตรมาตีสม์ แบบเรียบกึ่งนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีส้ม เพอริทีเซียทรงรี เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.2–0.3 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะเว้าลง แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อน รีคล้ายรูปไข่ ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 10.6–14.2 × 5.4–7.6 ไมโครเมตร เจริญสลิทเป็นเส้นตรง มีความยาวเท่ากับความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หนวดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงิน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: ตรัง

ตัวอย่างที่ศึกษา: TRW04

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Hypoxylon* species F มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *H. fendleri* แตกต่างที่ขนาดของเพอริทีเซีย โดยเชื้อรา *H. fendleri* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเพอริทีเซีย คือ 0.5–0.6 × 0.3–0.4 ไมโครเมตร (Fournier *et al.*, 2015) ซึ่งใหญ่กว่าขนาดเพอริทีเซียของเชื้อรา *Hypoxylon* species F ที่มีขนาดเพียง 0.2–0.3 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังมีลักษณะบางประการคล้ายกับเชื้อรา *H. subcrocopeplum* Y.-M. Ju & J. D. Rogers ยกเว้นลักษณะเพอริสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้เป็นแบบ indehiscent (Ju and Roger, 1996) ซึ่งแตกต่างจาก *Hypoxylon* species F ที่มีเพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent (ภาพที่ 44)



ภาพที่ 44 *Hypoxylon* species F ไอโซเลท TRW04 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงู น
 ข. ออสติโอลแบบเว้าลง ค. เพอร์ทีเซีย ง. ปฏิกริยาของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีส้ม
 จ. หูรดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกริยากับสารละลายแมลเซอร์ (ลูกศร) ฉ. เพอร์สปอร์แบบ
 dehiscent (ลูกศร) ช. ลักษณะเจอร์มสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร)
 ซ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

18. *Hypoxylon* species G ไอโซเลท KBPB02

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาสีส้มปนม่วง (orange vinaceous) ลักษณะเรียบกึ่งนูน ไปจนถึงแบนราบไปกับผิวเนื้อไม้ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีส้มเพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกลม ไปจนถึงทรงรี เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.09–0.15 × 0.05–0.1 มิลลิเมตร ออสติโอลมีลักษณะสูงกว่าผิวหน้าสโตรมาเล็กน้อย แอสโคสปอร์มีสีน้ำตาลจนถึงสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตรปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 10–13 × 3.8–6 ไมโครเมตร เจริ่มสลิตเป็นเส้นโค้งเล็กน้อยมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ dehiscent เปลือกแอสโคสปอร์หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หนวดถุงหุ้มสปอร์ติดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

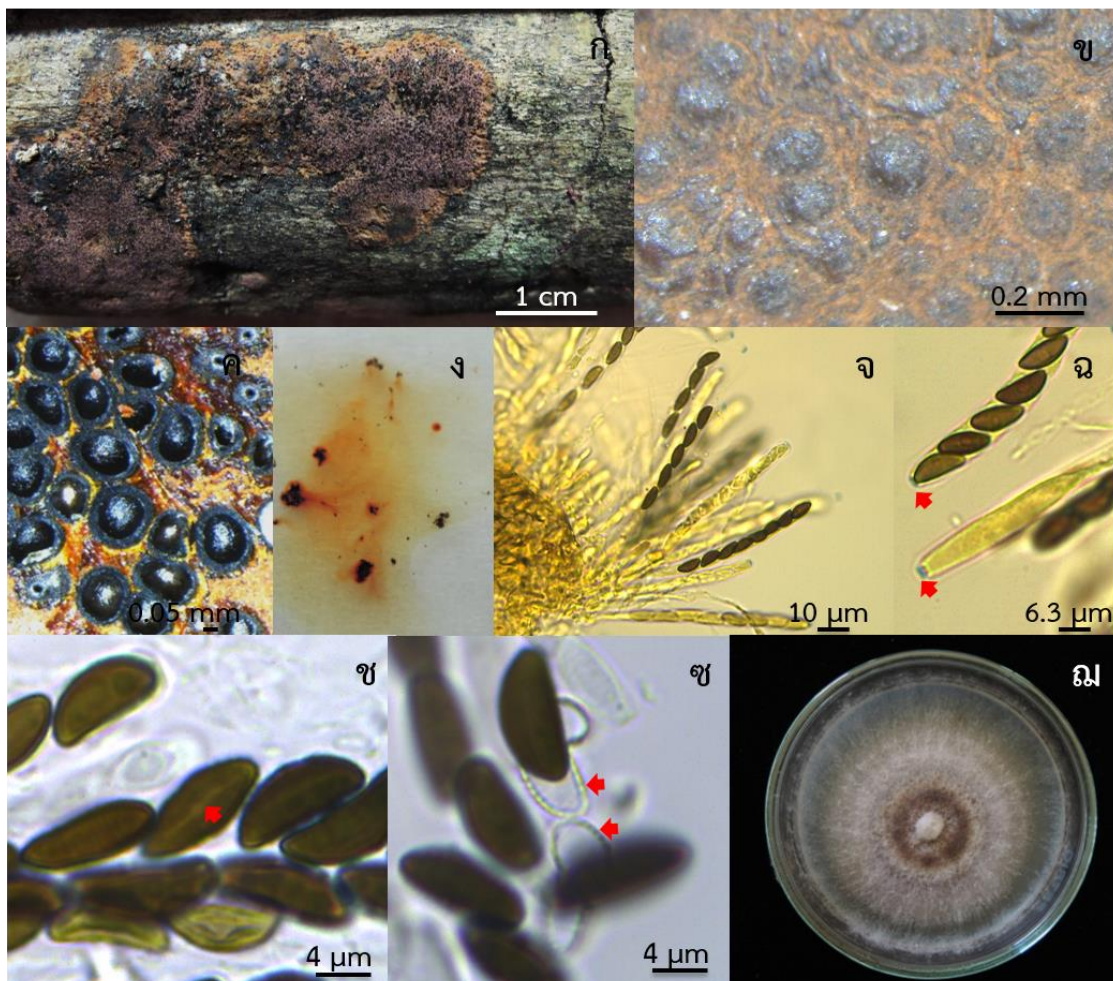
จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: กระบี่

ตัวอย่างที่ศึกษา: KBPB02

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่พบเจริญบนไม้ยางพารา

ข้อสังเกต: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Hypoxylon* species G มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *H. macrocarpum* Pouzar แตกต่างที่ขนาดเพอริทีเซีย โดยเชื้อรา *H. macrocarpum* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเพอริทีเซียเท่ากับ 0.3–0.6 มิลลิเมตร ซึ่งใหญ่กว่าขนาดเพอริทีเซียของเชื้อรา *Hypoxylon* species G (0.09–0.15 × 0.05–0.1 มิลลิเมตร) และลักษณะของเจริญสลิตของเชื้อรา *H. macrocarpum* เป็นแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับขนาดแอสโคสปอร์ (Ju and Roger, 1996) ในขณะที่ *Hypoxylon* species G มีเจริญสลิตแบบเป็นเส้นโค้งเล็กน้อยมีความยาวเท่ากับ ความยาวแอสโคสปอร์

(ภาพที่ 45)



ภาพที่ 45 *Hypoxylon* species G ไอโซเลท KBPB02 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งงู น ข. ออสติโอลสูงกว่าผิวหน้าสโตรมาเล็กน้อย ค. เพอริทีเซีย ง. ปฏิภานของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีส้ม จ. แอสคัสภายในบรจุ 8 แอสโคสปอร์ ฉ. หูรดงุ้มสปอร์ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิภานกับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ช. ลักษณะเจอร์มสลิทโค้งเล็กน้อยมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ซ. เพอริสปอร์แบบ dehiscent (ลูกศร) ฉ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

19. *Hypoxylon* species H ไอโซเลท TRW05

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา:

สโตรมาปกคลุมด้วยฝุ่นเม็ดสีสีน้ำตาลอ่อน รูปร่างสโตรมาเป็นแบบเรียบกึ่งนูน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เกิดสีส้ม เพอริทีเซียมีรูปร่างทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.20–0.30 มิลลิเมตร แผ่นออสติโอล มีลักษณะปลายแหลม แผ่นรองจานเป็นแบบ *bovei*-type ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.15–0.2 มิลลิเมตร แอสโคสปอร์ มีสีน้ำตาลเข้ม รีคล้ายรูปไข่ด้านทั้งสองของสปอร์ไม่สมมาตร ปลายสปอร์แคบ แอสโคสปอร์มีขนาด 11.5–16 × 5.7–7.8 ไมโครเมตร เจริญสลิทเป็นเส้นตรงมีความยาวเท่ากับความยาวแอสโคสปอร์ เพอริสปอร์เป็นแบบ indehiscent เปลือกแอสโคสปอร์ไม่หลุดออกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ หูรดกุ่มหุ้มสปอร์มีขนาด 1.6–1.8 × 2.7–3.6 ไมโครเมตร และเกิดสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายเมลเซอร์

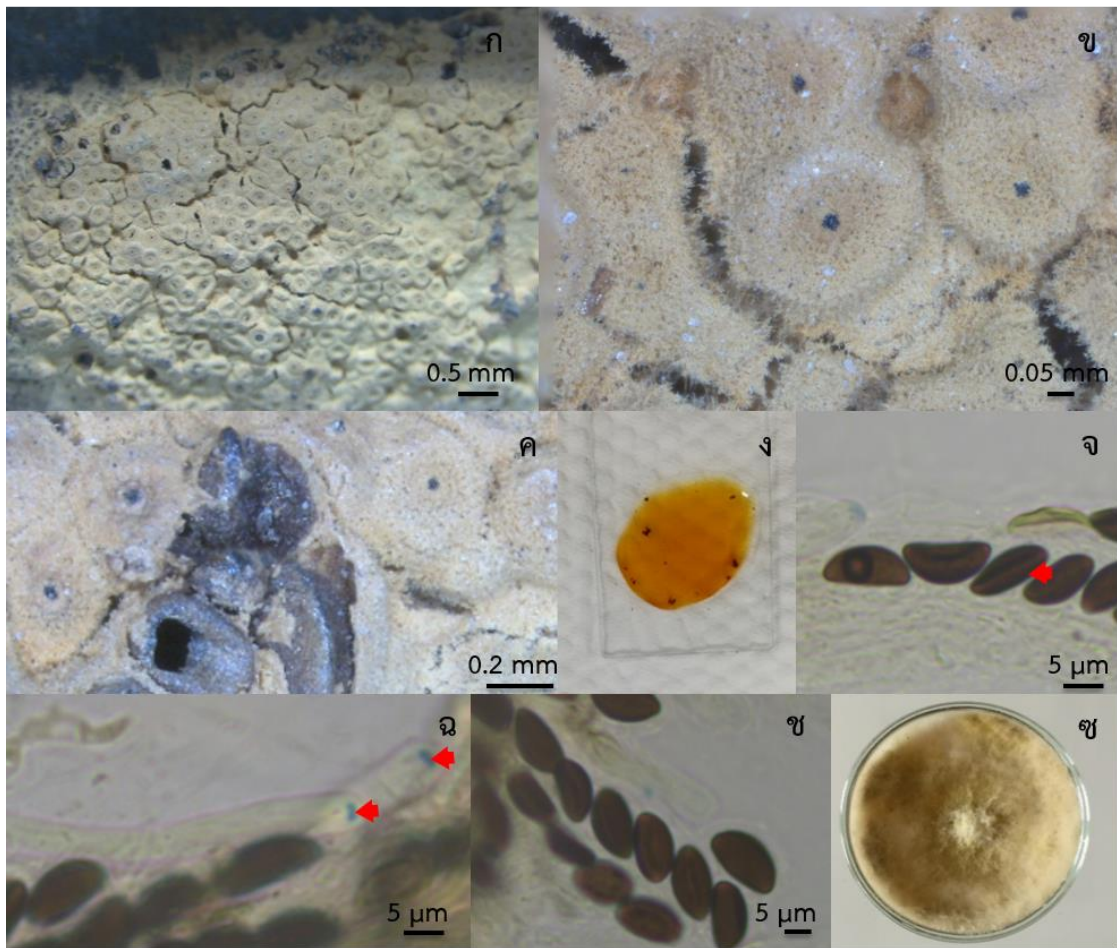
บริเวณที่พบ: กิ่งไม้ และท่อนไม้

จังหวัดที่พบตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้: ตรัง และ สุราษฎร์ธานี

ตัวอย่างที่ศึกษา: TRW05 และ SRW05

ข้อสังเกต: เชื่อว่า *Hypoxylon* species H เมื่อสังเกตลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่ามีสโตรมาคล้ายคลึงกับเชื้อราสกุล *Hypoxylon* เนื่องจากมีฝุ่นผงสีน้ำตาลปกคลุมอยู่บนสโตรมา แต่เมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบแผ่นออสติโอล อีกทั้งในโครงสร้างเพอริทีเซีย พบเนื้อเยื่อ carbonaceous มีผนังหนา ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของเชื้อราสกุล *Annulohypoxylon* นอกจากนี้ การทำปฏิกิริยาของสโตรมากับสารละลาย KOH ของเชื้อรานี้เกิดสีส้ม ซึ่งมีเชื้อราในสกุล *Annulohypoxylon* เพียงแค่ 2 ชนิดเท่านั้น ที่เมื่อสโตรมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH แล้วให้สีส้ม คือ *A. gombakense* และ *A. ilanense* (มัลลิกา มะกรวัฒน์, 2557) แต่เชื้อราทั้งสองชนิดดังกล่าวมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่น ๆ ที่ไม่ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Hypoxylon* species H แต่ลักษณะสโตรมาของเชื้อรา *Hypoxylon* species H มีความใกล้เคียงกับรา *H. pulicidum* J. Fourn (Fournier et al., 2015) จึงทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดที่ชัดเจนได้

(ภาพที่ 46)



ภาพที่ 46 *Hypoxylon* species H ไอโซเลท TRW05 ก. สโตรมาแบบเรียบกิ่งนู น
 ข. แผ่นออสติโอล ค. รูปร่างเพอริทีเซียทรงกลม ง. ปฏิกริยาของสโตรมากับสารละลาย KOH เกิดสีส้ม
 จ. ลักษณะเจอร์มสลิทแบบเส้นตรงมีความยาวเท่ากับแอสโคสปอร์ (ลูกศร) ฉ. ทูรูดถุงหุ้มสปอร์
 ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกริยากับสารละลายเมลเซอร์ (ลูกศร) ช. การเรียงตัวของแอสโคสปอร์ในแอสคัส
 ซ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 12 วัน

2. การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

จากตัวแทนเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyylon* ที่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์ได้จำนวน 46 ไอโซเลท เป็นเชื้อราที่สามารถระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 15 ชนิด ได้แก่ เชื้อราสกุล *Hypoxyylon* 11 ชนิด (28 ไอโซเลท) และเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* 4 ชนิด (6 ไอโซเลท) และเชื้อราที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 12 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อราสกุล *Hypoxyylon* 8 ชนิด (8 ไอโซเลท) และเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* 4 ชนิด (4 ไอโซเลท) เมื่อนำมาระบุชนิดด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyylon* บริเวณตำแหน่ง ITS แสดงร้อยละความเหมือน (%identity) 97–99 เปอร์เซ็นต์ กับเชื้อราชนิดนั้น ๆ (ตารางที่ 5) สอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ที่สามารถระบุชนิดของเชื้อราทั้ง 2 สกุล ได้ 14 ชนิด ได้แก่ *A. moriforme*, *A. nitens*, *A. stygium*, *A. thailandicum*, *H. duranii*, *H. fendleri*, *H. grieobrunneum*, *H. haemotostroma*, *H. hypomiltum*, *H. lenormandi*, *H. macrocarpum*, *H. monticulosum*, *H. pilgerianum* และ *H. sublenormandii* ซึ่งใน ตัวอย่าง PTW09(N) นอกจากมีเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงที่ 99 เปอร์เซ็นต์กับเชื้อรา *H. anthochroum* strain GS4D2II1 ยังมีความใกล้เคียงกับ *H. grieobrunneum* strain CBS 129347 เช่นกัน แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเชื้อรา *H. grieobrunneum* มากกว่า เนื่องจากตัวอย่างที่ศึกษามีขนาดแอสโคสปอร์ใกล้เคียงกับเชื้อราทั้ง 2 ชนิด แต่มีเม็ดสียภายในเนื้อเยื่อสโตรมาเป็นสีส้ม และเมื่อสโตรมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้สีเหลืองอ่อน เช่นเดียวกับเชื้อรา *H. grieobrunneum* ในขณะที่เชื้อรา *H. anthochroum* มีเม็ดสียภายในเนื้อเยื่อสโตรมาเป็นสีดำ และเมื่อสโตรมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย KOH ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้สีเทาอมเขียวมะกอก (gray olivaceous) (Cruz and Cortez, 2015) ส่วนตำแหน่ง *beta-tubulin* (ตารางที่ 6) พบว่ามีร้อยละความเหมือนสูงสุดของเชื้อราเพียงชนิดเดียว คือ *A. stygium* แสดงร้อยละความเหมือนสูงสุด 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อราบางชนิดไม่มีข้อมูลตำแหน่งยีนนี้ และเชื้อราส่วนใหญ่มีร้อยละความเหมือนอยู่ในระดับต่ำ คือ 89–96 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ มัลลิกา มะกรวัฒน์ (2557) ที่ได้จำแนกชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* บริเวณเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการจำแนกโดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุลทำการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณ 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS, ยีน *beta-tubulin*, *alpha-actin* และ *elongation factor 1-alpha* ทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *alpha actin* และ *beta-tubulin* เหมาะสำหรับการใช้จัดกลุ่มเชื้อราในระดับสกุล (genus) มากกว่าระดับสปีชีส์ (species) และวาไรตี้ (variety) ในขณะที่

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS สามารถช่วยระบุความแตกต่างของเชื้อราชนิดที่มีใกล้เคียงกันสูงได้ทั้งในระดับสปีชีส์และวาไรตี้ ส่วนผลการเทียบเคียงของตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ พบว่าทั้งตำแหน่ง ITS และ *beta-tubulin* มีร้อยละความเหมือน คือ 88–96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในระดับที่ต่ำเกินความน่าเชื่อถือว่าเป็นเชื้อราชนิดนั้น ๆ จึงต้องนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาจัดกลุ่มและหาชนิดที่ใกล้เคียงมากที่สุดโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree)

ตารางที่ 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS ยีน ของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon* ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank

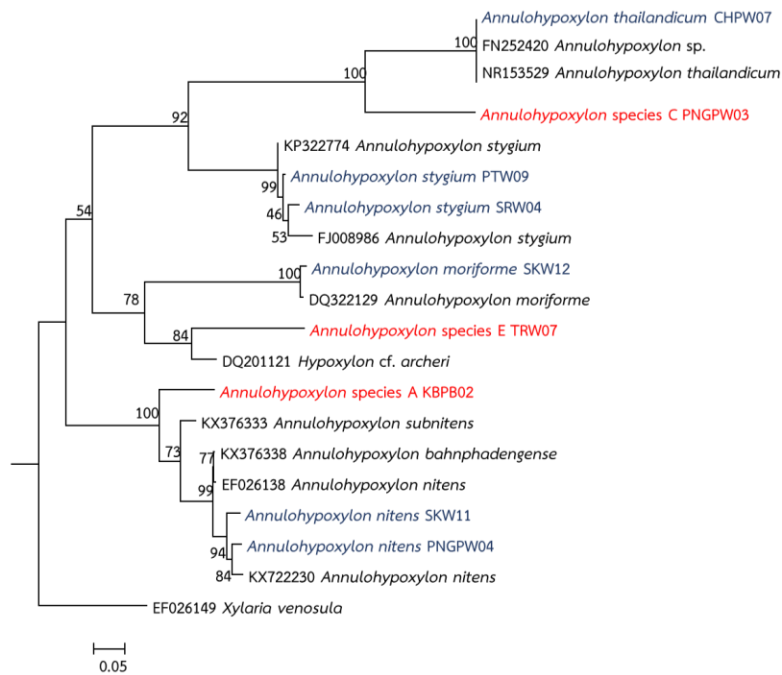
ชนิด	ไอโซเลท	ITS		% identity
		ชนิด	Accession No.	
<i>A. moriforme</i>	SKW12	<i>A. moriforme</i> isolate SUT220	DQ322129	97
<i>A. nitens</i>	PNGPW04	<i>A. nitens</i> isolate HY11	KX722230	99
<i>A. stygium</i>	PTW09	<i>A. stygium</i> strain P10535EM1CC601	KP322774	99
<i>A. thailandicum</i>	CHPW07	<i>A. thailandicum</i> MFLUCC 13-0118	NR_153529	99
<i>Annulohyphoxylon</i> speciesA	KBB02	<i>A. subnitens</i> strain MUCL54594	KX376333	94
<i>Annulohyphoxylon</i> speciesC	PNGPW03	<i>Annulohyphoxylon</i> sp. H181	FN252420	95
<i>Annulohyphoxylon</i> speciesD	TRW07	<i>Xylariaceae</i> sp. 4Y-Df6-2	AB741596	90
<i>H. duranii</i>	PNGW02	<i>H. duranii</i> isolate H204	FM209460	99
<i>H. fendleri</i>	PJB04	<i>H. fendleri</i> strain BCC32408	KY173350	99
<i>H. griseobrunneum</i>	PTW09(N)	<i>H. griseobrunneum</i> MFLUCC17-0027	MG545065	99
<i>H. haematostroma</i>	KBPB01	<i>H. haematostroma</i> YMJ 14 (JDR)	JQ009322	99
<i>H. hypomiltum</i>	PSUW01	<i>H. hypomiltum</i>	JN979427	99
<i>H. jacklitschii</i>	CHPW03	<i>H. jacklitschii</i> CBS 138916	NR1584684	98
<i>H. lenormandii</i>	RNW03	<i>H. lenormandii</i>	KM610289	99
<i>H. macrocarpum</i>	PSUW07	<i>H. macrocarpum</i> strain 12H0101	KT385774	99
<i>H. monticulosum</i>	PNGB02	<i>H. monticulosum</i> strain JR5	KM513588	99
<i>H. pilgerianum</i>	SRBAM01	<i>H. pilgerianum</i>	KY610412	97
<i>H. sublenormandii</i>	SKW30	<i>H. sublenormandii</i> JF13026	KM610291	97
<i>Hypoxylon</i> specieseB	SKW09	<i>Xylariales</i> sp. Iso468	LT604858	86
<i>Hypoxylon</i> specieseC	STPW01	<i>Hypoxylon</i> sp. BAB-4969	KR155059	93
<i>Hypoxylon</i> specieseD	PTW02	<i>Hypoxylon</i> sp. BAB-4957	KR155047	93
<i>Hypoxylon</i> specieseF	TRW04	<i>Hypoxylon haematostroma</i> YMJ 14	JQ009322	82

ตารางที่ 6 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง *beta-tubulin* ยีน ของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxylon* ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank

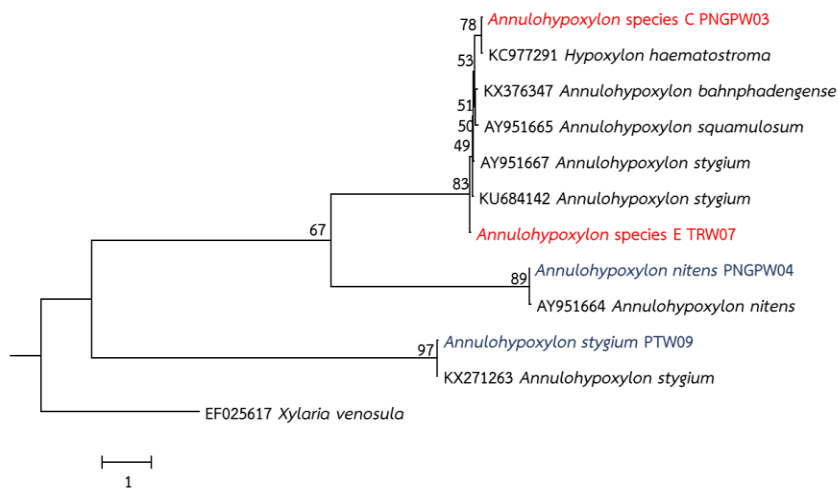
ชนิด	ไอโซเลท	<i>beta-tubulin</i>		% identity
		ชนิด	Accession No.	
<i>Hypoxylon specieseG</i>	KBPB02	<i>H. sp isolate</i> H128	FN252453	96
<i>Hypoxylon specieseH</i>	TRW05	<i>H. haematostroma</i> strain STMA14043	KU159527	88
<i>A. moriforme</i>	SKW12	-	-	-
<i>A. nitens</i>	PNGPW04	<i>H. haematostroma</i> YMJ 14	AY951727	89
<i>A. stygium</i>	PTW09	<i>A. stygium</i> isolate FL0470	KU684142	99
<i>A. thailandicum</i>	CHPW07	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon specieseA</i>	KBB02	-	-	-
<i>Annulohyphoxylon specieseC</i>	PNGPW03	<i>H. haematostroma</i> strain STMA 14043	KU159527	95
<i>Annulohyphoxylon specieseD</i>	TRW07	<i>A. stygium</i> strain MUCL 54601	KX271263	92
<i>H. duranii</i>	PNGW02	<i>H. rickii</i>	AY951750	95
<i>H. fendleri</i>	PJB04	<i>H. rickii</i> YMJ 25	KC977288	95
<i>H. grieobrunneum</i>	PTW09(N)	<i>H. haematostroma</i> strain STMA 14043	KU159527	95
<i>H. haematostroma</i>	KBPB01	<i>H. haematostromar</i> YMJ 14	AY951727	94
<i>H. hypomiltum</i>	PSUW01	-	-	-
<i>H. jaklitschii</i>	CHPW03	-	-	-
<i>H. lenormandii</i>	RNW03	-	-	-
<i>H. macrocarpum</i>	PSUW07	-	-	-
<i>H. monticulosum</i>	PNGB02	<i>H. haematostroma</i> strain STMA 14043	KU159527	94
<i>H. pilgerianum</i>	SRBAM01	-	-	-
<i>H. sublenormandii</i>	SKW30	<i>H. sublenormandii</i> JF13026	KM610303	92
<i>Hypoxylon specieseB</i>	SKW09	<i>H. polyporoideum</i> YMJ 56	AY951748	92
<i>Hypoxylon specieseC</i>	STW01	<i>H. rickii</i>	KC977288	96
<i>Hypoxylon specieseD</i>	PTW02	<i>H. rickii</i>	KC977288	96
<i>Hypoxylon specieseF</i>	TRW04	-	-	-
<i>Hypoxylon specieseG</i>	KBPB02	-	-	-
<i>Hypoxylon specieseH</i>	TRW05	<i>H. haematostroma</i> strain STMA 14043	KU159527	94

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS และ ยีน *beta-tubulin* ร่วมกับการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ทั้ง 9 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ได้ 4 ชนิด โดยแผนภูมิต้นไม้ที่ตำแหน่ง ITS จัดกลุ่มเชื้อรา *Annulohyphoxylon* sp. (SKW12), *Annulohyphoxylon* sp. (PNGPW04) และ *Annulohyphoxylon* sp. (CHPW07) อยู่ในชนิดเดียวกับเชื้อรา *A. moriforme*, *A. nitens* และ *A. thailandicum* ตามลำดับ และเชื้อรา *Annulohyphoxylon* sp. (PTW09) และ *Annulohyphoxylon* sp. (SRW04) จัดอยู่ในชนิดเดียวกันกับเชื้อรา *A. stygium* ด้วยค่า bootstrap 99–100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 47) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราดังกล่าว ในขณะที่ผลการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ในตำแหน่ง *beta-tubulin* จากตัวแทนเชื้อรา 4 ตัวอย่าง พบว่าสามารถระบุชนิดเชื้อราได้ 2 ชนิด คือ *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 48) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ที่ตำแหน่งยีน ITS และการระบุชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* ทั้ง 2 ตำแหน่ง และการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมด้วย ยังไม่สามารถจำแนกชนิดเชื้อราอีก 3 ชนิด คือ *Annulohyphoxylon* species A (KBPB02), *Annulohyphoxylon* species C (PNGPW03) และ *Annulohyphoxylon* species E (TRW07) ได้อย่างแน่ชัด

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS และ ยีน *beta-tubulin* ร่วมกับการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเชื้อราสกุล *Hypoxyton* ทั้ง 31 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราสกุล *Hypoxyton* ได้ 12 ชนิด โดยแผนภูมิต้นไม้ที่ตำแหน่ง ITS จัดกลุ่มชนิดเชื้อราได้ 11 ชนิด ได้แก่ *H. duranii* (SKW32 และ PNGW02), *H. fendleri* (PJB04 และ PTW08), *H. griseobrunneum* (PTW09(N)), *H. haematostroma* (KBPB01 และ SKWPM03), *H. hypomiltum* (PSUW01, PSUB09 และ PJB03), *H. jaklitschii* (CHPW02 และ (CHPW03), *H. lenormandii* (SRBAM02 และ RNW03), *H. macrocarpum* (PSUW07), *H. monticulosum* (KBPW04, CHPW01, PNGB02, RNPW02 และ NKB03), *H. pilgerianum* (SRBAM01) และ *H. sublenormandii* (SKW30) ซึ่งจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันด้วยค่า bootstrap ตั้งแต่ 63–100 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการระบุชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในขณะที่แผนภูมิต้นไม้ในตำแหน่งยีน *beta-tubulin* จากตัวแทนเชื้อราจำนวน 14 ตัวอย่าง สามารถจัดกลุ่มเชื้อราสกุล *Hypoxyton* ได้ 2 ชนิด คือ *H. haematostroma* (KBPB01, SKWPM02, SKWPM03 และ SKWPM04) และ *H. sublenormandii* (SKW30) ซึ่งสอดคล้องกับการระบุชนิดโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและแผนภูมิต้นไม้ในตำแหน่ง ITS นอกจากนี้ยังพบว่า การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ที่ตำแหน่ง ITS ช่วยยืนยันการจัดกลุ่มเชื้อราที่ไม่ทราบชนิดให้อยู่ในกลุ่มชนิดเดียวกันได้ 1 ชนิด คือ *Hypoxyton* species C (STPW01) เป็นชนิดเดียวกันกับ *Hypoxyton* species D (PTW02)



ภาพที่ 47 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเชื้อราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS

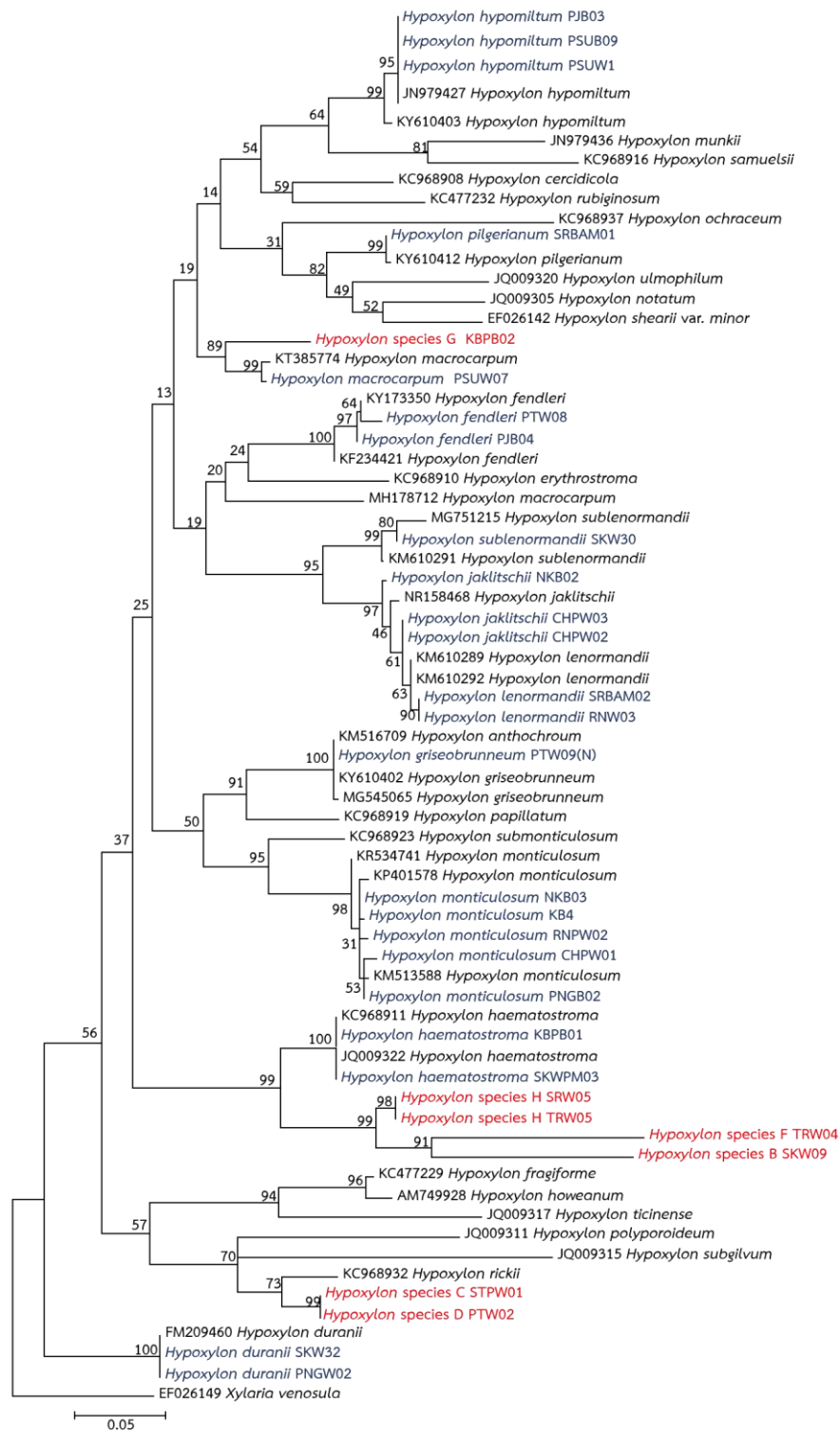


ภาพที่ 48 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเชื้อราสกุล *Annulohypoxyton* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน *beta-tubulin*

หมายเหตุ: ตัวอักษรสีน้ำเงินคือ เชื้อราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และตัวอักษรสีแดงคือ เชื้อราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

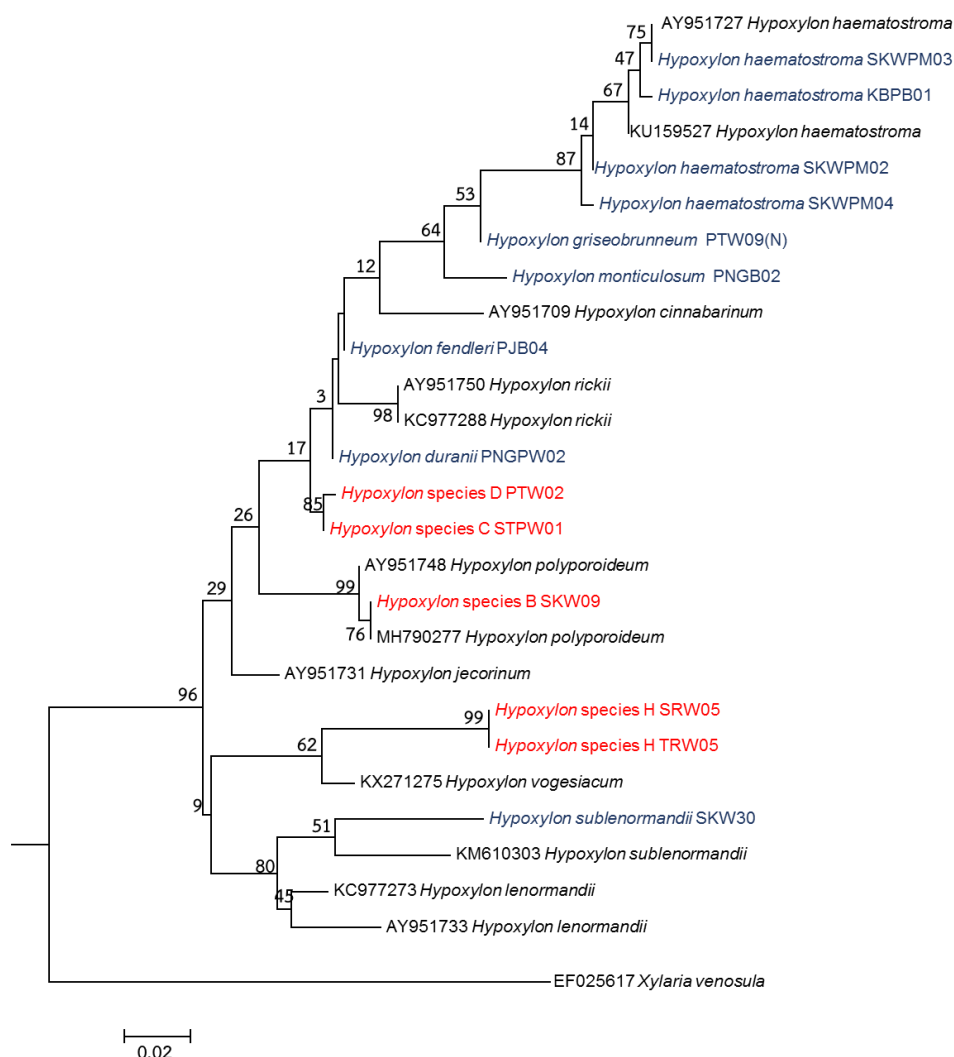
(ภาพที่ 49) และในตำแหน่ง *beta-tubulin* สามารถจัดกลุ่มให้เชื้อราที่ไม่ทราบชนิดคือ *Hypoxyylon* species B (SKW09) เป็นชนิดเดียวกับเชื้อรา *H. polyporoideum* ด้วยค่า bootstrap สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 50) ซึ่งทั้งการจัดกลุ่มในตำแหน่ง ITS ของเชื้อราสกุล *Hypoxyylon* พบว่าเชื้อรา *Hypoxyylon* species C (STPW01) และเชื้อรา *Hypoxyylon* species D (PTW02) ถูกจัดให้เป็นเชื้อราชนิดเดียวกัน แต่ไม่ทราบชนิด และการจัดกลุ่มในตำแหน่ง ITS และ *beta-tubulin* ไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อราอีก 3 ชนิด คือ *Hypoxyylon* species F (TRW04), *Hypoxyylon* species G (KBPB02) และ *Hypoxyylon* species H (TRW05, SRW05) ซึ่งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดนี้ ถูกแยกกิ่งออกมาจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ

การวิเคราะห์ยีนที่ตำแหน่ง *beta-tubulin* และการศึกษาแผนภูมิต้นไม้ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราสกุล *Annulohypoxyylon* พบว่าสามารถช่วยจัดกลุ่มเชื้อราในสกุลนี้ได้เพียงบางชนิดเท่านั้น เนื่องจากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างยาก ประกอบกับยีนเป็นยีนเดี่ยว (single copy gene) มีขนาดใหญ่ และจำนวนซ้ำน้อย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับยีนในบริเวณตำแหน่งอื่นจึงได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร (มัลลิกา มะกรวัฒน์, 2557) ทั้งนี้เชื้อราบางชนิดจากการศึกษาข้อมูลในตำแหน่งยีน *beta-tubulin* เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ มีคุณภาพไม่ดีทำให้ไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ในการศึกษาครั้งนี้ได้



ภาพที่ 49 แผนภูมิต้นไม้ของการต้นไม้อของเชื้อราสกุล *Hypoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่ง ITS

หมายเหตุ: ตัวอักษรสีน้ำเงินคือ เชื้อราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และตัวอักษรสีแดงคือเชื้อราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้



ภาพที่ 50 แผนภูมิวิวัฒนาการต้นไม้ของเชื้อราสกุล *Hypoxylon* ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน *beta-tubulin*

หมายเหตุ: ตัวอักษรสีน้ำเงินคือ เชื้อราตัวอย่างที่สามารถระบุชนิดได้ และตัวอักษรสีแดงคือเชื้อราตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุชนิดได้

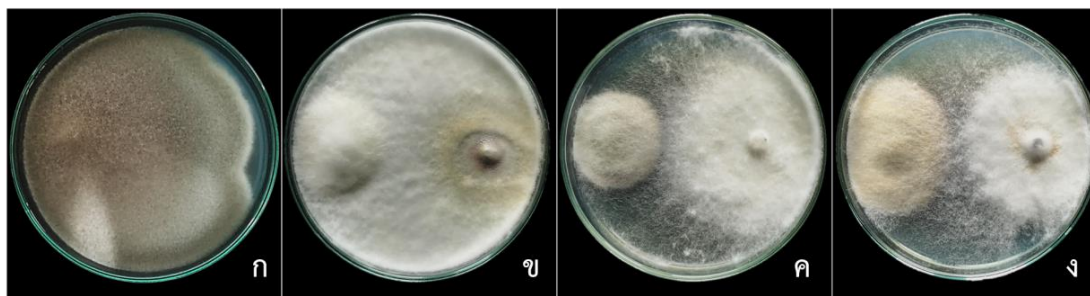
3. การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

จากวิธี dual culture พบว่าเชื้อรา *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) มีการเจริญของโคโลนีครอบคลุมพื้นที่ผิวหน้าอาหาร (ภาพที่ 51) และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* ได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Annulohypoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ไอโซเลทอื่นๆ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคือ

76.07, 76.07 และ 71.42 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) จึงคัดเลือกเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท ทำการทดลองต่อไป นอกจากนี้พบว่ามีเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp และ *Hypoxyylon* spp. บางไอโซเลทแสดงคุณสมบัติที่น่าสนใจ ได้แก่ เชื้อรา *A. nitens* (SKW11) และ *Hypoxyylon* sp. (STPW01) สร้างเส้นใยคลุมทับโคโลนีเชื้อรา *C. oryzae* ยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรค (ภาพที่ 52) อีกกลุ่มหนึ่งคือเชื้อรา *H. lenormandii* (CHPW03), *H. polyporoideum* (SKWPM02), *H. sublenormandii* (SKW30) และ *H. fendleri* (PJB04) ทำให้โคโลนีเชื้อรา *C. oryzae* เกิดความผิดปกติขึ้น ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 53) ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวถูกคัดเลือกเพื่อทำการทดสอบต่อไปเช่นกัน

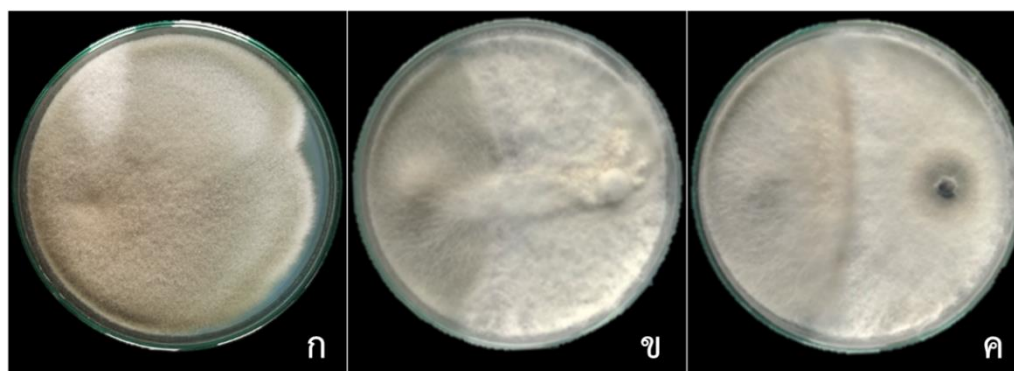
ในธรรมชาติเชื้อราสาเหตุโรคพืชต้องการสารอาหารในการเจริญ เพื่อช่วยขยายโคโลนีสำหรับการหาพื้นที่ในการหาอาหาร และการงอกของเส้นใย (germination) ในเชื้อราปฏิปักษ์หลายชนิดสามารถเจริญแข่งขัน แย่งสารอาหาร น้ำ รวมทั้งพื้นที่สำหรับการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ ส่งผลให้การเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชลดลง หรือไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากขาดปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการเจริญของเส้นใย (Begon *et al.*, 1996) มีรายงานว่าเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxyylon* spp. บางชนิดแสดงคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์ได้ เช่น เชื้อรา *H. fragiforme* สามารถสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ในกลุ่ม azaphilones ที่มีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อโปรโตซัว ที่เป็นสาเหตุโรคมาลาเรียได้ (da Sivilar, 2012) รวมถึงการทดลองของ Rehman และคณะ (2011) ทดสอบแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากใบพืชสมุนไพรมะเขือเทศ *Nothapodytes foetida* พบเชื้อรา *Nodulisporium* sp. (ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *Hypoxyylon*) เมื่อนำเชื้อราดังกล่าว มาทดสอบความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิด ได้แก่ *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*, *Drechlera tetramera*, *Alternaria alternata* และ *Colletotrichum gleosporoides* ด้วยวิธี dual culture พบว่าเชื้อรา *Nodulisporium* sp. สามารถเจริญเข้าครอบคลุมพื้นที่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคไม่สามารถเจริญได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเชื้อราสาเหตุโรคมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดที่ 81.66 และ 77.66 เมื่อทดสอบกับเชื้อ *A. alternata* และ *C. gleosporoides* ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า ในเชื้อ *Annulohyphoxylon multiforme* ที่ดำรงชีวิตเป็นเอนโดไฟท์ สามารถควบคุมเชื้อรา *Armillaria* spp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของไม้ยืนต้นหลายชนิด และแสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Küngas and Kullman, 2013) ต่อมา Sreeja และคณะ (2016) แยกเชื้อราปฏิปักษ์จากใบพริกไทยดำ (black pepper) และทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Phytophthora capsici* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าในพริกไทย พบว่าเชื้อรา *A. nitens* 2 ไอโซเลทแสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเชื้อราโรคพืชได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ โดยอาศัยกลไกการเจริญแก่งแย่งพื้นที่

สารอาหาร (competition) และการทำลายชีวิต (antibiosis) โดยการสร้างสารระเหย เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้



ภาพที่ 51 ลักษณะโคโลนีเชื้อรา *Curvularia oryzae* และ *Annulohyphoxylon* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture หลังจากการบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

- ก. โคโลนีของเชื้อรา *C. oryzae* (ชุดควบคุม)
- ข. เชื้อรา *C. oryzae* (ซ้าย) และเชื้อรา *A. moriforme* (SKW12) (ขวา)
- ค. เชื้อรา *C. oryzae* (ซ้าย) และเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) (ขวา)
- ง. เชื้อรา *C. oryzae* (ซ้าย) และเชื้อรา *A. stygium* (PTW09) (ขวา)



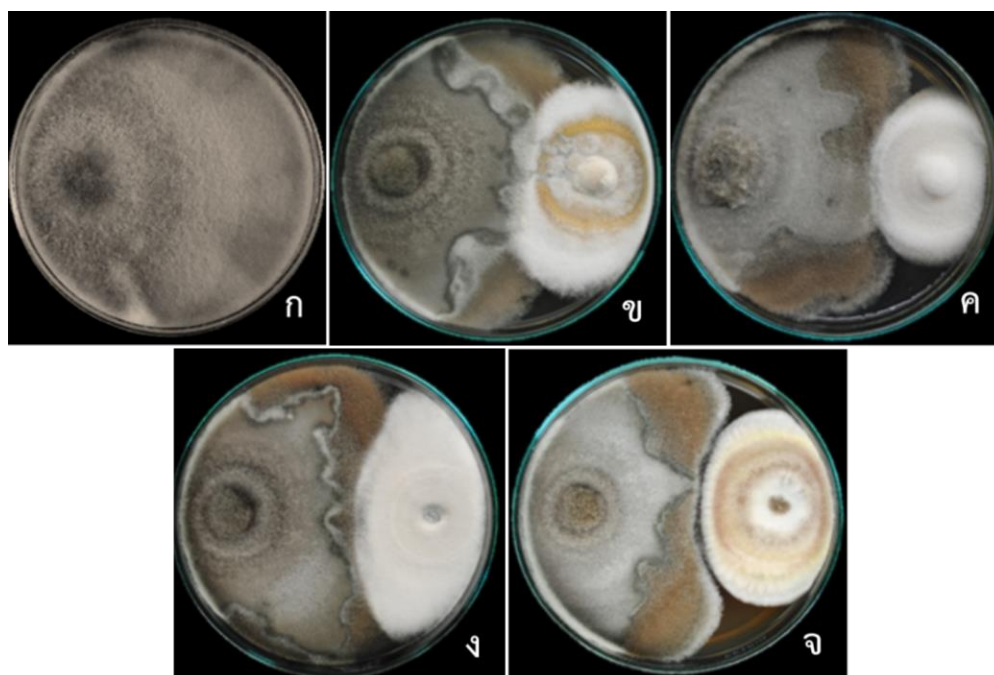
ภาพที่ 52 โคโลนีเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. เจริญคลุมทับโคโลนีเชื้อรา *Curvularia oryzae* เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture หลังจากการบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

- ก. โคโลนีของเชื้อรา *C. oryzae* (ชุดควบคุม)
- ข. เชื้อรา *C. oryzae* (ซ้าย) และเชื้อรา *A. nitens* (SKW11) (ขวา)
- ค. เชื้อรา *C. oryzae* (ซ้าย) และเชื้อรา *Hypoxylon* spp. (STW04) (ขวา)

ตารางที่ 7 การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture กับเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxyylon* spp. เป็นระยะเวลา 14 วัน

ชนิดของเชื้อรา	รัศมีโคโลนี (ซ.ม.)		%inhibition ^{1/}
	control	dual-culture	
<i>A. moriforme</i> (SKW12)	7	1.67	76.07±0.94a
<i>A. nitens</i> (PNGPW04)	7	1.67	76.07±0.74a
<i>A. stygium</i> (PTW09)	7	2.00	71.42±1.05ab
<i>A. stygium</i> (SRW04)	7	2.44	65.08±0.68bcdef
<i>A. thailandicum</i> (CHPW07)	7	2.29	67.21±0.68bcde
<i>A. nitens</i> (SKW11)	7	2.20	68.57±0.29bc
<i>Annulohyphoxylon</i> sp. (PNGW03)	7	2.32	66.85±1.54bcde
<i>Annulohyphoxylon</i> sp. (TRW07)	7	2.27	67.50±1.47bcd
<i>H. anthochoum</i> (PTW09)(N)	7	2.25	67.85±1.95bcd
<i>H. durandii</i> (PNGW02)	7	2.44	65.07±0.44bcdef
<i>H. durandii</i> (SKW32)	7	3.00	57.14±1.54hijk
<i>H. fendleri</i> (PJB04)	7	3.09	55.78±1.27hijk
<i>H. fendleri</i> (PTW08)	7	2.91	58.32±1.48ghijk
<i>H. haematostroma</i> (KBPB01)	7	2.22	68.21±0.68bc
<i>H. hypomiltium</i> (PSUB09)	7	2.31	66.96±0.60bcde
<i>H. jaklitschii</i> (CHPW02)	7	3.05	56.42±1.23hijk
<i>H. lenormandii</i> (CHPW03)	7	3.25	53.57±0.41jkl
<i>H. lenormandii</i> (NKB02)	7	3.71	46.96±3.21lm
<i>H. lenormandii</i> (RNW03)	7	2.62	62.46±1.18cdefgh
<i>H. lenormandii</i> (SRBAM02)	7	2.80	60.00±1.16fghi
<i>H. macrocapum</i> (PSUW07)	7	2.41	65.57±1.01bcdef
<i>H. monticulosum</i> (CHPW01)	7	2.25	67.85±1.23bcd
<i>H. monticulosum</i> (NKB03)	7	2.48	64.50±0.61cdefg
<i>H. monticulosum</i> (PNGB02)	7	2.29	67.20±0.58bcde
<i>H. monticulosum</i> (RNPW02)	7	2.44	65.00±0.77bcdefg
<i>H. monticulosum</i> (SKW25)	7	2.75	60.71±1.95efghij
<i>H. monticulosum</i> (TRB09)	7	2.70	61.42±0.25defghi
<i>H. pilgerianum</i> (SRBAM01)	7	3.26	53.39±0.77jkl
<i>H. polyporoideum</i> (SKWPM02)	7	3.74	46.53±0.47m
<i>H. rubellum</i> (PTBAM04)	7	3.05	56.32±0.84hijk
<i>H. sublenormandii</i> (SKW30)	7	3.29	52.92±0.58klm
<i>Hypoxyylon</i> sp. (KBPW02)	7	2.37	66.07±0.68bcdef
<i>Hypoxyylon</i> sp. (PTPB01)	7	3.15	54.96±0.77ijk
<i>Hypoxyylon</i> sp. (PTW02)	7	3.12	55.42±0.40ijk
<i>Hypoxyylon</i> sp. (SKW09)	7	6.09	30.71±2.56n
<i>Hypoxyylon</i> sp. (STPW01)	7	2.26	67.67±0.79bcd
<i>Hypoxyylon</i> sp. (TRW05)	7	2.98	57.39±0.73hijk

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ยตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P=0.05$ ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test



ภาพที่ 53 ลักษณะโคโลนีเชื้อ *Curvularia oryzae* ที่เกิดความผิดปกติเมื่อเจริญร่วมกับเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน

- ก. โคโลนีของเชื้อรา *C. oryzae* (ชุดควบคุม)
- ข. เชื้อรา *C. oryzae* (ซ้าย) และเชื้อรา *H. lenormandii* (CHPW03) (ขวา)
- ค. เชื้อรา *C. oryzae* (ซ้าย) และเชื้อรา *H. polyporoideum* (SKWPM02) (ขวา)
- ง. เชื้อรา *C. oryzae* (ซ้าย) และเชื้อรา *H. sublenormandii* (SKW30) (ขวา)
- จ. เชื้อรา *C. oryzae* (ซ้าย) และเชื้อรา *H. fendleri* (PJB04) (ขวา)

4. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Curvularia oryzae*

4.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนส

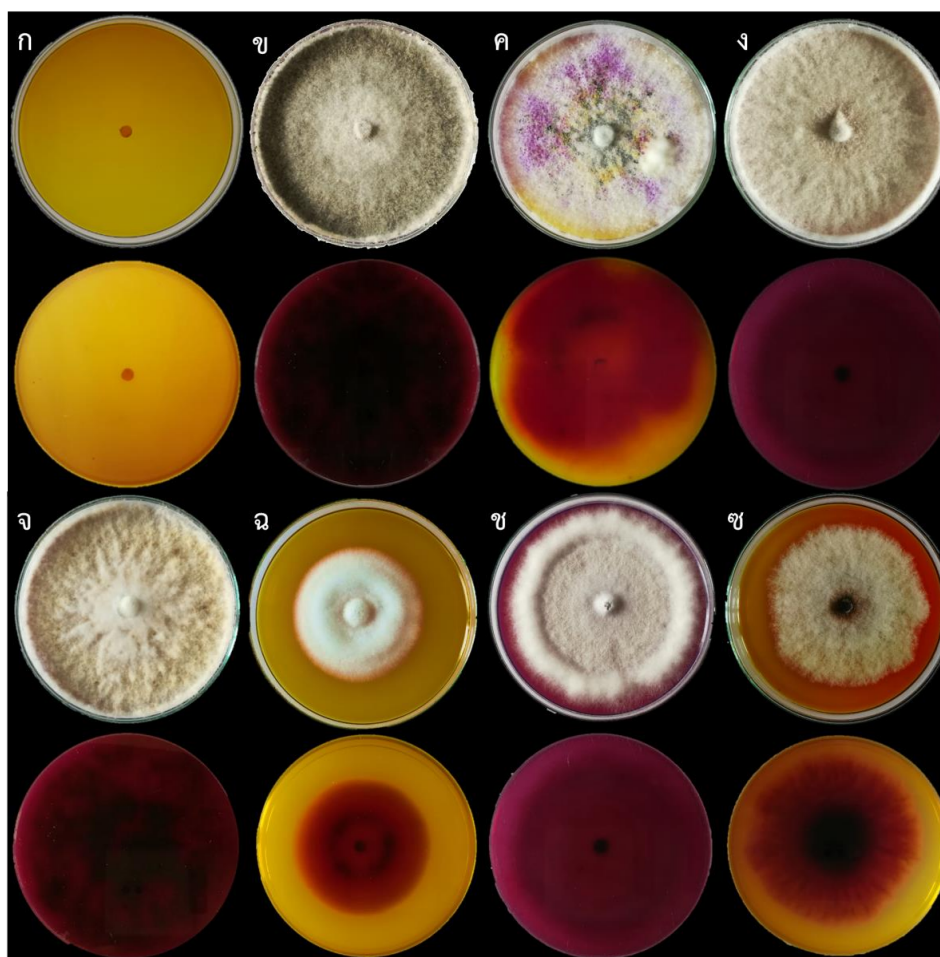
จากเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. 9 ไอโซเลท ที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองที่ 3 สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ 7 ไอโซเลท คือ *A. moriforme* (SKW12), *A. stygium* (PTW09), *A. nitens* (PNGPW04), *A. nitens* (SKW11), *H. polyporoideum* (SKWPM02), *H. sublenormandii* (SKW30) และ *Hypoxylon* sp. (STPW01) โดยเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท สามารถสร้างวงสีม่วงรอบโคโลนีบนอาหาร

colloidal chitin agar (ภาพที่ 54) และสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 8) คุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราบางชนิด ถูกจัดให้เป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประโยชน์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช เนื่องจากเอนไซม์ไคติเนสสามารถย่อยสลายไคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์เชื้อราหลายชนิด (Webster and weber, 2007) สอดคล้องกับการทดลองของ Janifer และคณะ (2014) ได้แยกเชื้อรา *Trichoderma viride* N9 จากดิน และนำเอนไซม์ไคติเนสสกัดหยาบ (crude enzyme) ที่สกัดได้จากเชื้อราชนิดนี้มาทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่าสามารถต่อต้านเชื้อราได้หลายชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Macrophomina phaseolina* และ *Fusarium moniliforme* ในขณะที่ สุวิตา แสไพศาล และคณะ (2011) ใช้ประโยชน์จากการสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อ *Trichoderma* sp. ในการชักนำให้ต้นมะเขือเทศ สร้างความต้านทานต่อโรคใบจุดเป้ากระสุน (target spot) ที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* โดยพบว่า เมื่อปลูกมะเขือเทศร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ไอโซเลท T24, T17 และ 88 ส่งผลให้ต้นมะเขือเทศมีจำนวนแผลจุดเฉื่อยต่อต้นต่ำลง และเมื่อตรวจสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส พบใบมะเขือเทศมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสสูงเมื่อปลูกร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. ซึ่งเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถแทงเส้นใยถึงชั้นเซลล์ epidermis ชั้นที่ 1 หรือ 2 ของผนังเซลล์พืช ทำให้พืชเกิดการตอบสนองต่อเส้นใย โดยการกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวเอง และสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเชื้อราสาเหตุโรคได้ (Bigirimana et al., 1997)

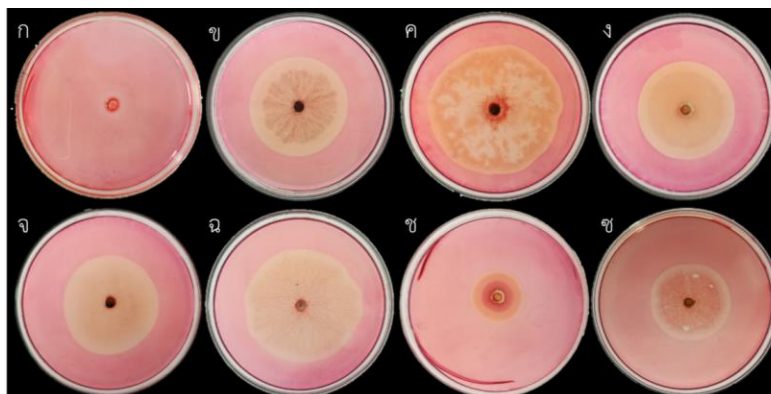
4.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

เชื้อรา *Hypoxylon* spp. และ *Annulohypoxylon* spp. ทั้ง 9 ไอโซเลท ที่ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC (carboxymethyl cellulose agar) สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสได้ 7 ไอโซเลท คือ *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (SKW11), *H. lenormandii* (CHPW03), *H. polyporoideum* (SKWPM02), *H. sublenormandii* (SKW30), *H. fendleri*. (PJB04) และ *Hypoxylon* sp. (STPW01) โดยสังเกตได้จากการสร้างวงใสรอบ ๆ โคลนเชื้อรา เมื่อมีการย่อยเซลลูโลสบนอาหารทดสอบ (ภาพที่ 55, ตารางที่ 8) มีเพียงเชื้อรา *A. stygium* (PTW09) และ *A. nitens* (PNGPW04) เท่านั้นที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลส สามารถย่อยสลายเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์พืชได้ ดังนั้นหากนำเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสไปใช้ในการควบคุมโรคทางใบของพืช อาจส่งผลเสียต่อพืชได้ ซึ่งเซลลูโลสไม่เพียงแต่เป็นองค์ประกอบสำคัญในเซลล์พืชเท่านั้น ในเชื้อราสาเหตุโรคบางชนิดที่จัดอยู่ในกลุ่ม (class) oomycetes เช่น *Pythium* spp. และ *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพืช

หลายชนิด มีองค์ประกอบของผนังเซลล์เป็นเซลลูโลสด้วยเช่นกัน (Webster and Webster, 2007) ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จึงต้องอาศัยกลไกในการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ร่วมกัน



ภาพที่ 54 วงสีม่วง (purple zone) บริเวณรอบโคโลนีเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์โคติเนสบนอาหาร CCA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 14 วัน ก.-ง. (บน) โคโลนีเชื้อราบนจานอาหารชุดควบคุม: *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) ตามลำดับ ก.-ง.(ล่าง) วงสีม่วงที่เกิดจากการย่อยโคตินของเชื้อรา *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) ตามลำดับ จ.-ช. (บน) โคโลนีเชื้อราบนจานอาหาร *Annulohyphoxylon* spp. (SKW11), *H. polyporoideum* (SKWPM02), *H. sublenormandii* (SKW30) และ *Hypoxylon* sp. (STPW01) ตามลำดับจ.-ช. (ล่าง) วงสีม่วงหลังจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากการย่อยสลายโคตินของเชื้อรา *A. nitens*. (SKW11), *H. polyporoideum* (SKWPM02), *H. sublenormandii* (SKW30) และ *Hypoxylon* spp. (STPW01) ตามลำดับ



ภาพที่ 55 วงใสที่เกิดจากการย่อยเซลลูโลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar ก. ชุดควบคุม ข. *A. moriforme* (SKW12) ค. *Annulohyphoxylon* sp. (SKW11) ง. *H. lenormandii* (CHPW03) จ. *polyporoideum* (SKWPM02) ฉ. *H. sublenormandii* (SKW30) ช. *Hypoxylon fendleri* (PJB04) และ ซ. *Hypoxylon* sp. (STPW01)

ตารางที่ 8 การสร้างเอนไซม์ไคติเนส และเซลลูเลส ของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp.

ชนิดของเชื้อรา	การสร้างเอนไซม์		จำนวนวันที่เชื้อราสร้างเอนไซม์ (วัน)
	ไคติเนส ^{1/}	เซลลูเลส ^{2/}	ไคติเนส/เซลลูเลส
<i>A. moriforme</i> (SKW12)	+	+	7/7
<i>A. nitens</i> (PNGPW04)	+	-	7/-
<i>A. stygium</i> (PTW09)	+	-	9/-
<i>A. nitens</i> (SKW11)	+	+	12/7
<i>H. lenormandii</i> (CHPW03)	-	+	9/7
<i>H. polyporoideum</i> (SKWPM02)	+	+	12/7
<i>H. sublenormandii</i> (SKW30)	+	+	12/7
<i>H. fendleri</i> (PJB04)	-	+	12/7
<i>Hypoxylon</i> sp. (STPW01)	+	+	9/7
Control	-	-	-/-

^{1/}บันทึกผลเป็นบวก (+) เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีม่วงรอบโคโลนีเชื้อรา

บันทึกผลเป็นลบ (-) หากไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น

^{2/}บันทึกผลเป็นบวก (+) เมื่อเกิดวงใสรอบโคโลนีเชื้อรา

บันทึกผลเป็นลบ (-) หากไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น

4.3 การทดสอบการสร้างสารระเหย

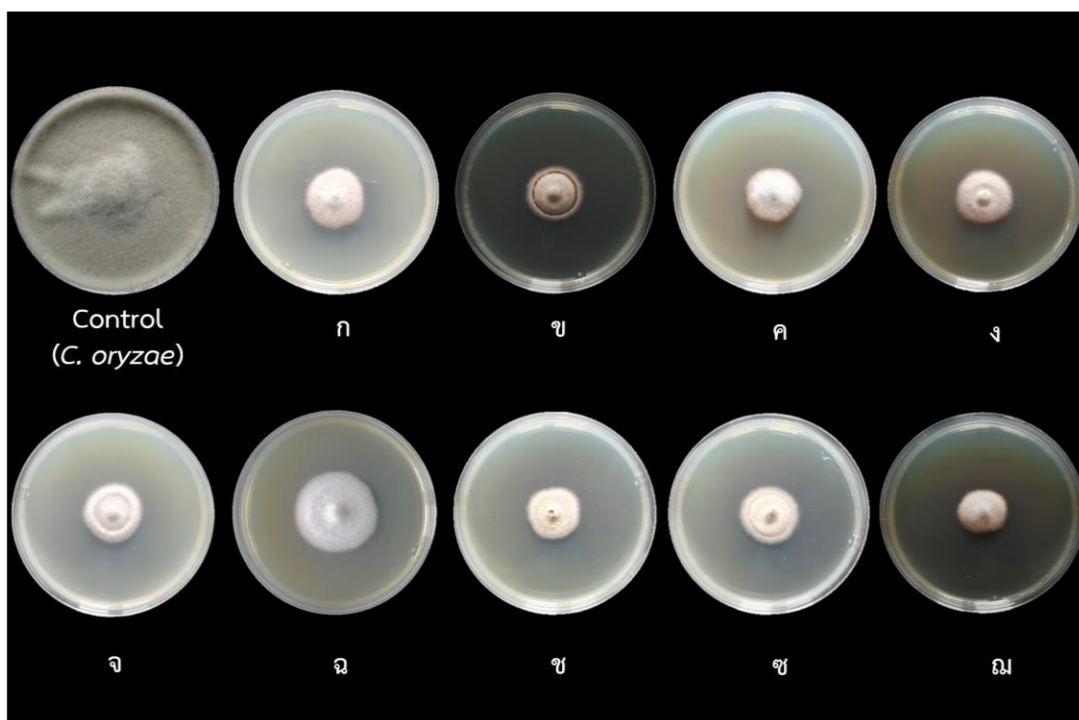
ทดสอบความสามารถในการสร้างสารระเหยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยวิธี volatile extracellular metabolite test (Dennis and Webster, 1971) พบว่าเชื้อราทั้ง 9 ชนิด สามารถสร้างสารระเหยยับยั้งการเจริญของโคโคโคนีเชื้อรา *C. oryzae* ได้ในระดับที่ไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* เต็มหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อภายในระยะเวลา 7 วัน ยกเว้นเชื้อรา *H. polyporoideum* (SKWPM02) เพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้นที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโคโคนีเชื้อรา *C. oryzae* มากที่สุด (3.21 เซนติเมตร) แสดงให้เห็นว่ามีการสร้างสารระเหยอยู่ในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราในไอโซเลทอื่น ๆ (ตารางที่ 9, ภาพที่ 56) สอดคล้องกับการทดลองของ Park และคณะ (2010) ที่ทำการทดสอบการสร้างสารระเหยของเชื้อรา *Nodulisporium* sp. (ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *Hypoxylon* sp.) ไอโซเลท CF016 พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถสร้างสารระเหยหลายชนิด ได้แก่ beta-elemene, 1-methyl-1,4-cyclohexadiene, beta-selinene และ alpha-selinene. มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวของแอปเปิ้ลได้ อาทิ *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum coccodes*, *Magnaporthe oryzae*, *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* ต่อมา มีการทดสอบสารระเหยที่สร้างจากเชื้อรา *H. anthochroum* ในการควบคุมโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยวของมะเขือเทศเชอร์รี่ที่เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* พบว่าสารระเหยที่เชื้อราสร้างขึ้นมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีผลยับยั้งกระบวนการหายใจ และการแทงทะลุผ่านผนังเซลล์พืชของเชื้อราสาเหตุโรคได้อีกด้วย (Macias-Rubalcava *et al.*, 2018)

เมื่อนำผลที่ได้จากการทดลองนี้ เปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทดลองอื่น ๆ ข้างต้น ทำให้สามารถคัดเลือกตัวแทนเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เบื้องต้น 3 ไอโซเลท ได้แก่ *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) เนื่องจากเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ นอกจากสามารถสร้างสารระเหยที่มีประสิทธิภาพเพื่อยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ ยังมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคอยู่ในระดับที่สูง จากการทดสอบด้วยวิธี dual culture ด้วยเช่นกัน ยิ่งไปกว่านั้นเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสที่มีผลในการย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อราสาเหตุโรคได้ จึงได้คัดเลือกเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทนี้ ทดสอบคุณสมบัติในการควบคุมโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันสำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 9 การสร้างสารระเหยของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ที่มีผลยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Curvularia oryzae*

ชนิดของเชื้อรา	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา <i>Curvularia oryzae</i> (ซ.ม.)±SE ^{1/}
<i>A. moriforme</i> (SKW12)	2.47±0.15a
<i>A. nitens</i> (PNGPW04)	2.45±0.28a
<i>A. stygium</i> (PTW09)	2.35±0.15a
<i>A. nitens</i> (SKW11)	2.77±0.15a
<i>H. lenormandii</i> (CHPW03)	2.76±0.15a
<i>H. polyporoideum</i> (SKWPM02)	3.21±0.03b
<i>H. sublenormandii</i> (SKW30)	2.46±0.02a
<i>H. fendleri</i> (PJB04)	2.11±0.04a
<i>Hypoxylon</i> sp. (STPW01)	2.58±0.05a
Control	8.50±0.00c

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ที่ได้จากการวัดการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Curvularia oryzae* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของการสร้างสารระเหยที่มีผลต่อการเจริญของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ที่ได้รับการคัดเลือก ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ยตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ($P>0.05$)

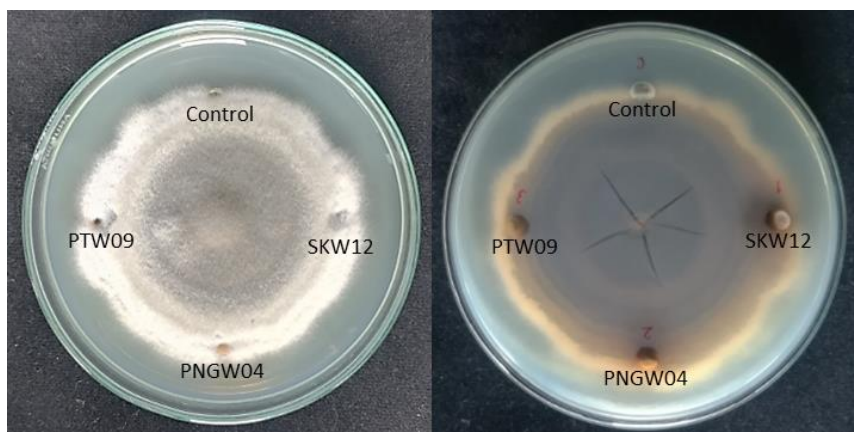


ภาพที่ 56 ขนาดโคโลนีเชื้อรา *Curvularia oryzae* ถูกยับยั้งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมภายหลังจากการทดสอบการสร้างสารระเหยกับเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. เป็นระยะเวลา 9 วัน ก. เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *A. moriforme* (SKW12) ข. เมื่อทดสอบเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) ค. เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *A. stygium* (PTW09) ง. เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Annulohyphoxylon* sp. (SKW11) จ. เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *H. lenormandii* (CHPW03) ฉ. เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *H. polyporoideum* (SKWPM02) ช. เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *H. sublenormandii* (SKW30) ซ. เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Hypoxylon fendleri* (PJB04) ฅ. เมื่อทดสอบกับเชื้อรา *Hypoxylon* sp. (STPW01)

4.4 ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture filtrate)

ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อรา *A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) ซึ่งได้จากการคัดกรองคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์เบื้องต้นพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* ได้ โดยในวันที่ 7 ของการทดลองเส้นใยเชื้อรา *C. oryzae* เจริญเข้าครอบคลุมบริเวณหลุมที่ทำการหยดน้ำเลี้ยงเชื้อได้ทั้งหมด (ภาพที่ 57) จากผลการทดลองเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไม่ถูกผลิตขึ้น หากไม่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อสาเหตุโรค (Cha *et al.*, 1998) หรือในการทดลองนี้มีการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่ไม่เอื้อให้เชื้อราสามารถผลิต

เอนไซม์ไคตินเนสได้ เนื่องจากไม่ได้ใส่ซับสเตรด (colloidal chitin) เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเพื่อย่อยสลายไคติน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้เส้นใยแขวนลอยของเชื้อราไปทดสอบการควบคุมโรคใบจุดบนใบกล้าปาล์มน้ำมัน เนื่องจากเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่สร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 57 การทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. (*A. moriforme* (SKW12), *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09)) ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Curvularia oryzae*

5. การทดสอบการใช้เส้นใยแขวนลอยเชื้อรา (mycelial suspension) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการควบคุมโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ในสภาพห้องทดลอง

คัดเลือกเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. 2 ไอโซเลท ที่มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์เบื้องต้น ได้แก่ *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) เนื่องจากเชื้อรา *A. moriforme* (SKW12) สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ จึงไม่ถูกคัดเลือกมาทดสอบในการทดลองนี้ จากการทดสอบใช้เส้นใยแขวนลอยเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) ในการควบคุมโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธี detached leaves พบว่าความเข้มข้นของเส้นใยแขวนลอยเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) ที่ 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีอัตราการเกิดโรคอยู่ในระดับต่ำคือเท่ากับ 0.66 ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับระดับการเกิดโรคในกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่ผลของเส้นใยแขวนลอยเชื้อรา *A. stygium* (PTW09) มีอัตราการเกิดโรคอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุก ๆ ระดับความเข้มข้นของเส้นใยแขวนลอย (ตารางที่ 10) ดังนั้นจึงคัดเลือกความเข้มข้นของเส้นใยแขวนลอยเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04)

ที่ 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ไปใช้ทดสอบการควบคุมเชื้อรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพโรงเรือนในการทดลองต่อไป

เนื่องจากผลการทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อรา *Annulohyphoxylon* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลทในการทดลองที่ 8 ไม่สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ แต่เชื้อราที่ได้รับการคัดเลือก มีความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรค โดยอาศัยกลไกของตัวเชื้อราเอง เช่น การเจริญแข่งขัน และการสร้างเอนไซม์ทำลายผนังเซลล์เชื้อร่าก่อโรค แต่เชื้อรา *Annulohyphoxylon* ทั้ง 2 ไอโซเลท ไม่สร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองใช้เส้นใยแวนลอยของเชื้อรา *Annulohyphoxylon* ทั้ง 2 ไอโซเลท ในการทดสอบการควบคุมโรคบนใบต้นกล้าปาล์มน้ำมัน เนื่องจากเป็นส่วนที่เชื้อรายังสามารถเจริญได้ และอาจมีผลต่อเชื้อราสาเหตุโรคได้เช่นกัน สอดคล้องกับการทดลองของ Omar และคณะ (2009) รายงานการใช้สปอร์แวนลอยร่วมกับเส้นใยแวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ Actinomycetes ในการควบคุมโรครากเน่าของต้นมะเขือเทศในเรือนทดลองร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. และสารเคมีกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (carbendazim) พบว่าสามารถลดอัตราการเกิดโรคในต้นมะเขือเทศได้ โดยการทดสอบในห้องทดลองเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดสามารถทนต่อสารเคมีกำจัดเชื้อราได้อีกด้วย

ตารางที่ 10 ระดับการเกิดโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละความเข้มข้นที่ทดสอบ

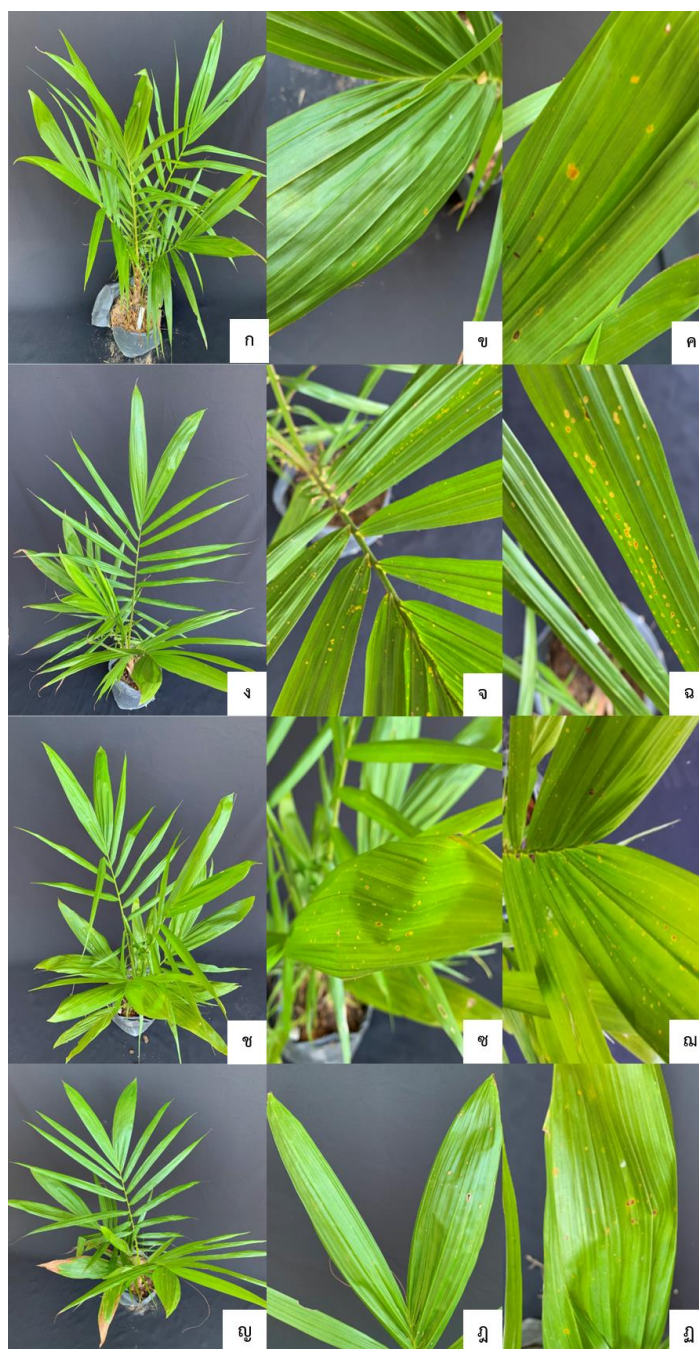
ชนิดของเชื้อรา	ความเข้มข้นของเส้นใยแวนลอย (% w/v)/ระดับการเกิดโรค±SE ^{1/}				
	0	5	10	15	20
<i>A. nitens</i> (PNGPW04)	1.83±0.30b	1.66±0.33b	1.16±0.30ab	0.66±0.21a	0.66±0.33a
<i>A. stygium</i> (PTW09)	1.83±0.30a	1.66±0.33a	1.16±0.40a	1.16±0.47a	1.16±0.16a

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ย ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ($P>0.05$)

6. การทดสอบใช้เส้นใยเชื้อราแวนลอยในการควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* บนใบกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพโรงเรือน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเส้นใยแวนลอยเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) ในการควบคุมโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพโรงเรือน เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ ที่ความเข้มข้น 40 ppm. พบว่าในกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารเคมีแมนโคเซบ มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุดต่ำสุด ที่ระดับ 1 ใบต้นกล้าปาล์มน้ำมันแสดงอาการใบจุดเล็กน้อย (ภาพที่ 58, ญ-ฎ) ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมพ่นด้วยสปอร์แวนลอยเชื้อ *C. oryzae* เพียงอย่างเดียว และกรรมวิธีพ่นด้วยสปอร์แวนลอยเชื้อ *C. oryzae* และเส้นใยแวนลอยเชื้อ *A. nitens* (PNGPW04)

มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุด ที่ระดับ 2.25 และ 2 ตามลำดับ โดยใบของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน แสดงอาการใบจุด เนื้อเยื่อตาย ลักษณะกลมเท่าหัวเข็มหมุด กระจายอยู่บริเวณผิวใบ (ภาพที่ 58, ง-ฉ และ ช-ฉ) อาการดังกล่าวสามารถพบได้ในแปลงเพาะปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่มีการระบาดของอย่าง รุนแรง และกรรมวิธีควบคุมโดยการฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น มีระดับความรุนแรงของโรคที่ระดับ 0.25 ต้นกล้าปาล์มน้ำมันแสดงอาการใบจุดค่อนข้างน้อย (ภาพที่ 58, ก-ค) เมื่อนำผลที่ได้วิเคราะห์ของมูล ทางสถิติ พบว่าในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีแมนโคเซบมีระดับการเกิดโรคต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเส้นใยแฉวนลอยเชื้อ *A. nitens* (PNGPW04) และกรรมวิธีควบคุมที่พ่นด้วย สปอร์แฉวนลอยเชื้อ *C. oryzae* ที่มีระดับความรุนแรงของโรคใบจุดไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 11) ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เส้นใยแฉวนลอยของเชื้อ *A. nitens* (PNGPW04) ไม่สามารถควบคุมเชื้อ *C. oryzae* ในสภาพเรือนทดลองได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยสภาพแวดล้อม ที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา กล่าวคือความชื้นและอุณหภูมิเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญมีผลต่อ การเจริญของเส้นใยเชื้อราในธรรมชาติ โดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญได้ดีในที่สูง ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Ashrae, 2000) และเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25–35 องศาเซลเซียส หากความชื้นต่ำเกินไปเชื้อราสามารถมีชีวิตอยู่ได้ แต่เจริญได้น้อย เช่นเดียวกับ อุณหภูมิที่สูงเกินไป อาจทำให้เชื้อราตายได้ (ยศนนท์ พรหมโชติกุล และอรุณี วิฉิน, 2549) ซึ่งสภาพ เรือนทดลองเป็นพื้นที่โล่ง ประกอบกับช่วงทำการทดลองเป็นช่วงฤดูร้อน (เดือนกุมภาพันธ์– เดือนพฤษภาคม) อากาศค่อนข้างแห้ง และมีอุณหภูมิสูง จึงอาจส่งผลกระทบต่อ การเจริญของเส้นใย เชื้อราที่ทดสอบ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการใช้เส้นใยแฉวนลอยของเชื้อรา มักใช้ ทดสอบในการควบคุมโรคที่เกิดในระบบรากของพืช เช่น โรครากเน่าโคนเน่าของมะเขือเทศที่มีสาเหตุ จากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *lycopercici* ที่มีการใช้เส้นใยแฉวนลอยของเชื้อรา *T. viridae* และ *T. hazianum* เทราดบริเวณโคนต้นพืชเพื่อป้องกันโรค (Wani et al., 2009) โดยพื้นดินใต้ต้นพืช ที่มีการทับถมของเศษอินทรีย์วัตถุ เป็นสภาพที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ตรงกันข้ามกับ การใช้เส้นใยแฉวนลอยควบคุมโรคทางใบที่การควบคุมปัจจัยภายนอกเป็นไปได้ยาก วิธีที่เป็นที่นิยมใน การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์สำหรับควบคุมโรคทางใบคือการใช้สปอร์แฉวนลอยในการฉีดพ่น เนื่องด้วย สปอร์ของเชื้อราสามารถทนต่อรังสี UV และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ อีกทั้งสามารถเจริญได้ ทันทีเมื่อมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (Webster and Weber, 2007)



ภาพที่ 58 การทดสอบใช้เส้นใยเชื้อราแฉวนลอยควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* ก. ต้นกล้าปาล์มน้ำมันในกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น) ข.-ค. อาการใบจุดที่เกิดบนต้นปาล์มในกรรมวิธีควบคุม ง. ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปนด้วยสปอร์แฉวนลอยเชื้อรา *Curvularia oryzae* จ.-ฉ. อาการใบจุดที่เกิดขึ้นภายหลังปนด้วยสปอร์แฉวนลอยเชื้อรา *Curvularia oryzae* 14 วัน ช. ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปนด้วยสปอร์แฉวนลอยเชื้อรา *Curvularia oryzae* และเส้นใยแฉวนลอยเชื้อรา *Annulohyphoxylon nitens* (PNGPW04) ช.-ฉ. อาการใบจุดที่เกิดขึ้นภายหลังปนด้วยสปอร์แฉวนลอยเชื้อรา *Curvularia oryzae* และเส้นใยแฉวนลอยเชื้อรา *Annulohyphoxylon nitens* (PNGPW04) 14 วัน ฉ. ต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ปนด้วยสารเคมีแมนโคเซบ ฉ.-ฉ. อาการใบจุดที่เกิดขึ้นภายหลังปนด้วยสารเคมีแมนโคเซบ 14 วัน

ตารางที่ 11 ระดับความรุนแรงของโรคใบจุดต้นกล้าปาล์มน้ำมันในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง ภายใต้สภาพแปลงทดลอง

กรรมวิธี	ดัชนีความรุนแรงของโรค \pm SE ^{1/}
กรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่น)	0.25 \pm 0.25a
กรรมวิธีควบคุม (สปอร์แขวนลอยเชื้อสาเหตุโรค <i>C. oryzae</i>)	2.25 \pm 0.25b
เส้นใยแขวนลอยเชื้อรา <i>A. nitens</i> (PNGPW04) + <i>C. oryzae</i>	2.00 \pm 0.41b
สารเคมีกำจัดเชื้อราแมนโคเซบ + <i>C. oryzae</i>	1.00 \pm 0.41ab

^{1/}ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ ตัวอักษรที่ตามหลังค่าเฉลี่ย ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ($P>0.05$)

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากตัวอย่างเชื้อราสกุล *Annulohyphoxylon* และ *Hypoxyylon* จำนวน 146 ตัวอย่าง บริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติ และสวนยางพารา ในภาคใต้ของประเทศไทย สามารถจำแนกชนิด โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้ 15 ชนิด ได้แก่ *A. moriforme* (4 ตัวอย่าง), *A. nitens* (3 ตัวอย่าง), *A. stygium* (4 ตัวอย่าง), *A. thailandicum* (1 ตัวอย่าง), *Hypoxyylon duranii* (3 ตัวอย่าง), *H. fendleri* (5 ตัวอย่าง), *H. griseobrunneum* (1 ตัวอย่าง), *H. haematostroma* (8 ตัวอย่าง), *H. hypomiltum* (4 ตัวอย่าง), *H. jaklitschii* (2 ตัวอย่าง), *H. lenormandii* (8 ตัวอย่าง), *H. macrocarpum* (1 ตัวอย่าง), *H. monticulosum* (9 ตัวอย่าง), *H. cf. pilgerianum* (3 ตัวอย่าง) และ *H. sublenormandii* (2 ตัวอย่าง) และมี 12 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกชนิดที่ชัดเจนได้ ส่วนที่เหลืออีก 76 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเก่าที่อยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์ หรือเชื้อรายังอ่อนอยู่ในระยะที่ยังไม่มีการสร้างสปอร์ทำให้ไม่สามารถระบุชนิดที่ถูกต้องได้จากตัวอย่างเชื้อราจำนวน 70 ตัวอย่างที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ มีเชื้อราเพียง 45 ไอโซเลทที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คิดเป็นร้อยละ 30.82 ของจำนวนเชื้อราทั้งหมด และมีเชื้อรา 5 ชนิด ที่มีการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศบนอาหาร OMA ได้แก่ *H. fendleri* (*Nodulisporium*-like), *H. haematostroma* (*Periconiella*-like), *H. jaklitschii* (*Nodulisporium*-like), *Hypoxyylon* species C (STPW01) (*Periconiella*-like) และ *Hypoxyylon* species D (PTPB01) (*Nodulisporium*-like) ในจำนวนเชื้อราที่สามารถระบุชนิดได้ พบว่าเชื้อราที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดได้แก่ *H. monticulosum* รองลงมาคือ *H. haematostroma* และ *H. lenormandii* ตามลำดับ

คัดเลือกเชื้อราที่มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ได้ 2 ไอโซเลท คือ *A. nitens* (PNGPW04) และ *A. stygium* (PTW09) ทดสอบการใช้เส้นใยแฉวนลอยของเชื้อราทั้งสองชนิด ในการควบคุมโรคใบจุดบนต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยวิธี detached leaf พบว่าเชื้อรา *A. stygium* (PTW09) มีการเจริญของเส้นใยปกคลุมใบปาล์มน้ำมันอย่างหนาแน่น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการสังเคราะห์แสงของพืช ดังนั้น จึงคัดเลือกเส้นใยแฉวนลอยของเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ไปทดสอบในสภาพแปลงปลูกบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน

แต่พบว่าเส้นใยแขวนลอยของเชื้อ *A. nitens* (PNGPW04) ไม่สามารถควบคุมโรคใบจุดในต้นกล้าปาล์มน้ำมันในสภาพแปลงปลูกได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีแมนโคเซบ

ทั้งนี้ในการควบคุมโดยชีววิธีจำเป็นต้องหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ควบคุมโรคพืชในตำแหน่งต่าง ๆ ของพืช การใช้เส้นใยแขวนลอยของเชื้อราที่โรยทางใบของพืชยังมีข้อจำกัด ทั้งปัจจัยของแสง ความชื้น สภาพแวดล้อม ที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา หากมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับประโยชน์ของเชื้อราทั้งสองสกุลนี้ ในการสกัดสารที่เชื้อราสร้าง หรือการหาสูตรอาหารที่กระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์ได้มากจะเป็นประโยชน์ทั้งต่อการควบคุมโดยชีววิธี และการจำแนกชนิดของเชื้อราที่ชัดเจนขึ้น นอกเหนือไปจากคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของเชื้อราทั้ง 2 สกุลนี้ อีกหนึ่งคุณสมบัติที่โดดเด่น คือการสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายเนื้อไม้ เช่น เซลลูเลส แล็กเคส และไซแลนเนส (ภาคผนวก ก) ซึ่งอาจใช้ประโยชน์จากการสร้างเอนไซม์เหล่านี้ ในการกำจัดหรือย่อยสลายเศษซากไม้ที่เกิดจากการทำสวนหรือการทำเกษตรกรรม รวมไปถึงการย่อยสลายก้อนเชื้อเห็ดที่หมดอายุจากโรงเรือนเพาะเห็ด ให้กลายเป็นธาตุอาหารกลับลงสู่พื้นดิน เพื่อให้พืชสามารถใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง. 2551. เทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- จิตรรา กิตติโมรากุล. 2557. การควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมัน โดยสารเคมี และชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จิระเดช แจ่มสว่าง 2546. การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี: โครงการเกษตรผู้ชาติ โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพและชีวภัณฑ์ในการจัดการศัตรูพืชเพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์. นครปฐม : ภาควิชาโรคพืชคณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- ปริศนา วงศ์ล้อม. 2548. การใช้พืชสมุนไพร และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B012-022 ควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma harzianum* Rifai.) ในเห็ดหูหนู และผลของกานพลู (*Eugenia aromatica* ktze.) ต่อการควบคุมโรคทางใบของถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Fruw.). วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นงพงา สุขวนิช. 2536. ระบบนิเวศและความสัมพันธ์ระหว่างธรรมชาติกับสิ่งมีชีวิต. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก : <http://kanchanapisek.or.th>. (15/06/61)
- พิพัฒน์ เชี่ยวหลิว และเกริกชัย ธนรักษ์. 2554. การปลูกปาล์มน้ำมันตามหลักการปฏิบัติทางเกษตรที่ดี. สุราษฎร์ธานี : สำนักวิจัยและพัฒนาเกษตร เขต 7 กรมวิชาการเกษตรสุราษฎร์ธานี.
- พีระวรรณ พัฒนวิภาส, ทศนากร ทศคร และ ธารทิพย์ ภาสบุตร. 2554. การป้องกันกำจัดโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia* sp. โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารเคมี. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร.
- มัลลิกา มะกรวัฒน์. 2557. การระบุชนิดของเชื้อรา *Annulohypoxyon* ที่ซับซ้อนในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียวโดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์. ปรินญาณิพนธ์ วท. ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ยศนันท์ พรหมโชติกุล และ อรุณี วิณิน. 2549. เห็ดราทำลายไม้. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยการจัดการไม้และผลิตผลป่าไม้ กรมป่าไม้.
- วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยาเบื้องต้น ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

- ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2548. คู่มือการป้องกันกำจัดโรคปาล์มน้ำมันโดยวิธีการผสมผสาน. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- สุรางค์ เขียวหิรัญ. 2542. อนุกรมวิธานเชื้อราสกุล *Hypoxylon* ที่พบในประเทศไทย Taxonomy of the Genus *Hypoxylon* in Thailand. กรุงเทพมหานคร. กลุ่มป้องกันรักษาเนื้อไม้ส่วนวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. สุราษฎร์ธานี. สำนักวิจัยและพัฒนาเกษตร เขต7 กรมวิชาการเกษตรสุราษฎร์ธานี.
- สุวิตา แสไพศาล, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์. 2011. การชักนำให้มะเขือเทศสร้างความต้านทานโรคใบจุดเป่ากระสุนโดยเชื้อ *Trichoderma* spp. และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลาย. วารสารวิจัย มช. 16: 261–270.
- อนุรักษ์ สันป่าเป้า. 2558. การจำแนกชนิดของเชื้อ *Curvularia* sp. สาเหตุของโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลและการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคโดยชีวภัณฑ์โคโตซาน. รายงานวิจัย. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 63 หน้า.
- อรุณ ชาญชัยเขาวีวัฒน์, สุวินัย เกิดทับทิม และสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. 2559. การนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในระบบเกษตรกรรมแบบยั่งยืน. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้. 7: 1–16.
- Agostinetto, L., Casaa, R.T., Bogoa, A., Sachs, C., Souza, C.A., Reis, E.M. and da Cunhac, I.C. 2015. Barley spot blotch intensity, damage, and control response to foliar fungicide application in southern Brazil. Crop protection 67: 7–12.
- Akram, W., Anjum, T., Ahmad, A. and Moeen, R. 2014. First report of *Curvularia lunata* causing leaf spots on Sourghum bicolor from Pakistan. American Phytopathological society 98: 1007.
- Allen, K.K., Blodgett, J.T., Bruns, K.S., Cain, R.J., Costello, S.L., Eager, T.J., Harris, J.L., Howell, B.E., Mask, R.A., Schaupp, W.C., Witcusky, J.J. and Worrall, J.J. 2010. Field guide to disease and insect of the Rocky mountain region. Colorado : Rocky mountain research station.
- Alexopoulos, C.J., C.W. Mims and M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. New York : John wiley and Sons, Inc.
- Anderson, R.L. 1956. Hypoxylon canker of aspen. Forest Pest Leaflet. United states of America : Department of Agriculture No. 6.

- Angawi, R.F., Swenson, D.C., Gloer, J.B. and Wicklow, D.T. 2003. Malettin A: a new antifungal tropolone form an unidentifind fungal colonist of *Hypoxylon stromata* (NRRL 29110). *Tetrahedon letters* 44: 7593–7596.
- Ashrae. 2000. ASHRAE Handbook-HVAC Systems and equipment. Atlanta: American Society of Heating, Refrigerating and Air-conditioning Engineers.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, J.R.W., Pereira, J.O. and Araujo, W.L. 2000. Endophytic microorganism: a review on insect control and recent on tropical plants. *Electric Journal of Biotechnology* 3: 40–65.
- Begon, M., Harper, J.L. and Townsend, C.R. 1996 .Ecology: Individuals, populations and communities. London : Blackwell Scientifi Publications.
- Benítez, U.Á., Romero, M.Y.M., Fernández, S.R.E., Oliveras, L.P., Flores, R.G., Lisci, D.G., Suárez, H.T. and Rubalcava, M.M.L. 2016. Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxylon anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia* (Burseraceae). *Journal of Applied Microbiology* 121: 380–400.
- Bier, J.L. 1940. Studies in forest pathology. III. *Hypoxylon* canker on poplar. pp. 40. Canada. : Technical Bulletin.
- Bills, G.F., Gonzalez-Menendez, V., Martín, J., Platas, G., Fournier, J., Persoh, D. and Stadler, M. 2012. *Hypoxylon pulicicidum* sp. nov. (Ascomycota, Xylariales), a pantropical insecticide-producing endophyte. *PLoS ONE* 7: 1–17.
- Carbone, L. and Kohn, I.M. 1999. A method designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaaw, P.D. and Farrand, S.K. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant associated bacteria. *Molecular of Plant Microbe Interaction* 11: 1119–1129.
- Cheng, M.J., Wu, M.D., Cheng, Y.C., chen, J.J., Hsieh, S.Y., Yuan, G.W. and Su, Y.S. 2015. Metabolites isolated from an endophytic fungus of *Annulohypoxylon elevatidiscus*. *Chemistry of natural compound* 51: 67–80.
- Conway, K.E. and Olson, B. n.d. *Hypoxylon* canker of oaks. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. United state of America : Oklahoma State University.

- Cruz, K. and Cotex, V.G. 2015. *Hypoxylon* (Xylariaceae, Ascomycota) from western Parana Brazil. *Brazil Journal of Botany* 38: 889–901.
- Deacon, J.W. and Lewis, S.J. 1982. Natural senescence of the root cortex of spring wheat in relation to susceptibility to common root rot (*Cochlioholus sativas*) and growth of a free-living nitrogen-fixing bacterium. *Plant and Soil*. 66: 13–20.
- Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society* 57: 25–39.
- Dix, N. J. and Webster, J. 1995. *Fungal Ecology*. pp. 332–333. London : Chapman and Hall.
- EL-Mehalawy, A.A. 2004. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agents for wilt disease of kidney bean caused by *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 6: 310–316.
- Fernández, S.R.E., Diaz, D., Duarte, G., Oliveras, L.P., Sánchez, S. and Rubalcava, M. M.L. 2016. Antifungal Volatile Organic Compounds from the Endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2II1a: a Qualitative Change in the Intraspecific and Interspecific Interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microbial Ecology* 71: 347–364.
- Fournier, J. and Lechat, C. 2015. Three distinctive neotropical species of *Hypoxylon* (Xylariaceae) with purple KOH-extractable pigments, including two new taxa *H. cypraeisporum* sp. nov. and *H. sclerophaeum* var. *parvisporum* var. nov. *Ascomycete.org*. 7: 9–21.
- Fournier, J., Lechat, C. and Courtecuisse, R. 2015. The genus *Hypoxylon* Xylariaceae in Guadeloupe and Martinique (French West Indies). *Ascomycete.org* 7: 145–212.
- Garrett, S.D. 1963. *Soil fungi and soil fertility*. pp. 165. Oxford: Pergamon Press.
- Garrett, S.D. 1966. Cellulose-decomposing ability of some cereal foot-root fungi in relation to their saprophytic survival. *Transactions of the British Mycological Society* 49: 57–68.

- Hansan, K., Perry, B.A., Dranginis, A.W. and Ptister, D.H. 2013. A Phylogeny of the highly diverse Cup-Fungus family pyrenomataceae (Pezizomycetes, Ascomycota) clarifies relationship and evolution of selected life history traits. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 311–335.
- Harley, J.L. 1971. Fungi in ecosystem. *Journal of Ecology-Wiley Online Library* 59: 653–668.
- Hartley, C.W.S. 2000. The oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). London and New York : Scientific and Technical.
- Ho, M.Y., Chung, W.C., Huang, H.C. and Chung, W.H. 2012. Identification of endophytic fungi of medicinal herbs of Lauraceae and Rutaceae with antimicrobial property. *Taiwania* 57: 229–241.
- Hsieh, H.M. and Roger, J.D. 2005. Molecular phylogeny of *Hypoxylon* and closely related genera. *Mycologia* 97: 844–865.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Surveswaran, S., Hyde, K.D., Corke, H. and Sun, M. 2009. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity* 36: 69–88.
- Jenifer, S., Jeyasree, J., Laveena, D.K. and Manikandan, K. 2014. Purification and characterization of chitinase from *Trichoderma viride* N9 and antifungal activity against phytopathogenic fungi. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3: 1604–1611.
- Ju, Y.M. and Rogers, J.D. 1996. A Revision of the Genus *Hypoxylon*. Minnesota : APS Press.
- Kawicha, P. and Sangdee, A. 2012. Plant disease control using antagonistic microorganisms. *Journal of Science and Technology Mahasarakham University* 32: 220–229.
- Kleinfied, O. and Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum*. Interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil*. 144: 267–72.
- Kuhnert, E., Heitkämper, S., Fournier J., Surup, F. and Stadler, M. 2014. Hypoxyvermelhotins A–C, new pigments from *Hypoxylon lechatii* sp. nov. *Fungal Biology* 118: 242–252.

- Kuhnert, E., Surup, F., B. Sir, E., Lambert, C., D. Hyde, K., Hladki, A.I., Romero, A.I. and Stadler, M. 2015. Lenormandins A–G, new azaphilones from *Hypoxylon lenormandii* and *Hypoxylon jaklitschii* sp. nov., recognized by chemotaxonomic data. *Fungal Diversity* 71: 165–184.
- Küngas, K. and Kullman, B. 2013. Antagonistic effect of selected endophytic fungi against *Armillaria* spp. in vitro. Proceedings of the Exo and endogenous signalling. Poland, 14th - 18th September 2014, pp. 135–136.
- Kusai, N.A., Azmi, M.M.Z., Zulkifly S., Yusof, M.T. and Zainudin, N.A.I.M. 2015. Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. *Rend. Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali* 27: 205–214.
- Labarca, M., Sanabria, N. and Arcia, A. 2006. Pestalotiopsis palmarum Cooke pathogenicity on nursery oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plants. *Journal of University of Zulia (Venezuela)*. 23: 414–421.
- Lambert, C., Wendt, L., Hladki, A.I., Stadler, M. and Sir, E.B. 2019. *Hypomontagnella* (Hypoxylaceae): a new genus segregated from *Hypoxylon* by a polyphasic taxonomic approach. *Mycological Progress*. 18: 187–201.
- Lodge, D.J., Fittler, P.J., and Sutton, B.C. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*. 88: 733–738.
- Liu, J.K., Hyde, K.D., Jones, E.B.G., Ariyawansa, H.A., Bhat, D.J., Boonmee, S. *et al.* 2015. Fungal diversity notes 1–110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species. *Fungal Diversity* 72: 1–197.
- Macías-Rubalcava, M.L., Sánchez-Fernández, R.E., Roque-Flores, G., Lappe-Oliveras, P. and Medina-Romero, Y.M. 2018. Volatile organic compounds from *Hypoxylon anthochroum* endophytic strains as postharvest mycofumigation alternative for cherry tomatoes. *Food Microbiology* 76: 363–373.
- Manamgoda, D.S., Cai, L., Bahkali, E.H.C., Chukeatirote, E. and Hyde, K.D. 2012. Two new *Curvularia* species from north Thailand. *Sydowia* 64: 221–288.
- Marcellano, J.P., Collanto, A.S., Rolly, G. and Fuentes, R.G. 2017. Antibacterial Activity of Endophytic Fungi Isolated from the Bark of *Cinnamomum mercadoi*. *Pharmacognosy Journal* 9: 405–409.

- Mostapha, N.K. 2004. Biological control of *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight by antagonistic bacteria in greenhouse and field conditions. *Plant Pathology Journal* 3: 88–96.
- McBride, S. and Apple, D. 2009. Diagnostician: Texas plant disease diagnostic laboratory and professor department plant pathology and microbiology Texas agrilife extension service. United state of America : the Texas A and M University.
- Mcpherson, B.A., Mori, S.R., Wood, D.L., Storer, A.J., Svihra, P., Kelly, M.N. and Standiford, R.B. 2005. Sudden oak death in California: disease progression in oaks and tanoaks. *Forest Ecology and Management* 213: 71–89.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426–428.
- Omar, I., O'Neill, T.M. and Rossal, I.S. 2009. Biological control of fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. *Plant Pathology* 55: 92–99.
- Park, Y.J., Kwon, O.C., Son, E.S., Yoon, D.E., Han, W., N, J.Y., Yoo, Y.B. and Lee, C.S. 2012. Genetic diversity analysis of *Ganoderma* species and development of specific marker for identification of medical mushroom *Ganoderma lucidum*. *African journal of microbiology research*. 6: 5410–5425.
- Petrini, O., Petrini, L.E. and Rodrigues, K.F. 1995. Xylariaceous endophytes: an exercise in biodiversity. *Fitopatologia Brasileira* 20: 531–539.
- Pinon, J. 1979. Origine et principaux caractères des souches françaises d'*Hypoxylon mammatum*. *European Journal of Forest Pathology* 9: 129–142.
- Pithakkit, S., Petcharat, V., Chuenchit, S., Pornsuriya, C. and Sunpapao, A. 2015. Isolation of antagonistic Actinomycetes species from rhizosphere as effective biocontrol against oil palm fungal diseases. *Walailak Journal of Science and Technology* 5: 481–490.
- Pointing, S.B., Parungao, M.M. and Hyde, K.D. 2003. Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical xylariaceae. *Mycological Research*. 107: 231–235.

- Pornsuriya, C., Sunpapao, A., Srihanant, N., Worapattamasri, K., Kittimorakul, J., Phithakkit, S. and Petcharat, V. 2013. A survey of diseases and disorders in oil palms of southern Thailand. *Plant Pathology Journal* 12: 169–175.
- Quang, D.N., Stadler, M., Fournier, J., Tomitaa, A. and Hashimoto, T. 2006. Cohaerins C–F, four azaphilones from the xylariaceous fungus *Annulohyphoxylon cohaerens*. *Tetrahedron* 62: 6349–6354.
- Rehman, S., Mir, T., Kour, A., Qazi, P.H. Sultan, P. and Shawl, A.S. 2011. *In vitro* antimicrobial studies of *Nodulisporium* specie: an endophytic fungus. *Journal of Yeast and Fungal Research* 2: 53–58.
- Rodrigues, K.F. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea* Mart. *Mycologia* 86: 376–385.
- Roger, J.D. 1979 The Xylariaceae: Systematic, biological and evolutionary aspects. *Mycologia* 71: 1–42.
- Rogers, J.D. 2000. Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. *Mycological Research* 104: 1412–1420.
- Robl, D., Delabona, P.D.S., Mergel, C.M., Rojas, J.D., Costa, P.D.S., Pimentel, I.C., Vicente, V.A., da Cruz, P.J.G. and Padilla, G. 2013. The capability of endophytic fungi for reproduction of hemicellulases and related enzymes. *BMC Biotechnology* 13: 94.
- Robl, D., Costa, P.D.S., Büchli, F., Juliana, D., Lima, D.S., Delabona P.S., Squina, F.M., Pimentel, I.C., Padilla, G. and Pradella, J.G.C. 2015. Enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by *Annulohyphoxylon stygium* glycohydrolases. *Bioresource Technology* 177: 247–254.
- Robl, D., Costa, P.D.S., Rabelo, S.C, Delabona P.S.D., Lima, D.J.S., Padilla, G. and Padilla, J.G.C. 2016. Use of Ascomycete extracts in enzymatic cocktail formulations increases sugar cane bagasse hydrolysis. *BioEnergy Research* 9: 559–565.
- Seephueak, P., Phongpaichit, S., Hyde, K.D. and Petcharat, V. 2011. Diversity of saprobic fungi on decaying branch litter of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Mycosphere* 2: 307–330.

- Saitoh, K.I., Togashi, K. and Teraoka, T.A. 2006. A simple method for amini-preparation of fungal DNA. *International Journal of Gynecological Pathology* 72: 348–350.
- Shigo, A.L. 1964 Organism interactions in the beech bark disease. *Phytopathology* 54: 263–269.
- Sreeja, K., Anandaraj, M. and Bhai, R.S. 2016. In vitro evaluation of fungal endophytes of black pepper against *Phytophthora capsici* and *Radopholus similis*. *Journal of Spices and Aromatic Crops* 25: 113–122.
- Stadler, M. and Fournier, J. 2006. Pigment chemistry, taxonomy and phylogeny of the Hypoxyloideae (Xylariaceae). *Revista Iberoamericana de Micología* 23: 160–170.
- Sunpapao, A., Kittimorakul, J. and Pornsuriya, C. 2014. Disease Note: Identification of *Curvularia oryzae* as cause of leaf spot disease on oil palm seedlings in nurseries of Thailand. *Phytoparasitica* 42: 529–533.
- Sunpapao, A., Chairin, T. and Ito, S. 2018. The biocontrol by *Streptomyces* and *Trichoderma* of leaf spot disease caused by *Curvularia oryzae* in oil palm seedlings. *Biological Control* 123: 36–42.
- Suwannasai, N. 2005. Molecular taxonomic studies of selected members of the *Xylariaceae* (fungi). Ph.D. Philosophy in Microbiology. Suranaree University of Technology.
- Svilar, L. 2012. Structural elucidation of secondary metabolites from *Hypoxylon fragiforme*, using high resolution mass spectrometry and gas-phase ion-molecule reactions. Ph.D. Philosophy. Sorbornne University.
- Tamura, K., Daniel, P., Peterson, N., Glen, S., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2431–2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.

- Thienhirun, S. 1997. A preliminary account of the xylariaceae of Thailand. Ph.D. Philosophy. Liverpool John Moores University.
- Tomscheck, A.R., Strobel, G.A., Booth, E., Geary, B., Spakowicz, D., Kingh, B., Floerchinger, C., Sears, J., Liarzi, O. and Ezra, D. 2010. *Hypoxyton* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1.8-Cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. *Microbial Ecology* 60: 903–914.
- Urairuj, C., Khanongnuch, C. and Lumyong, S. 2003. Ligninolytic enzymes from tropical endophytic Xylariaceae. *Fungal Diversity* 13: 209–219.
- Vincent, J.M. 1927. Distortion of fungal hyphae in presence of certain inhibitors. *Nature*. 159–850.
- Wani, A.H., Taskeen, U.N. and Mir, R.A. 2009. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on tomato with fungal antagonists. *Journal of Biological Control* 23: 169–173.
- Webster, J. and Weber, R.W.S. 2007. Ascomycota (ascomycetes). *In* Introduction to fungi. pp. 226–247. New York : Cambridge University Press.
- Wei, D.L., Chang, Y.H., Lin, Y.W., Chuang, C.L. and Jong, S.C. 1992. Production of cellulolytic enzymes from the Xylaria and Hypoxyton species of Xylariaceae. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8: 141–146
- Wendt, L., Sir, B.E., Kuhnert, E., Heitkämper, S., Lambert, C., Hladki, A.I., Romero, A.I., Luangsa-ard, J.J., Srikitikulchai, P., Peršoh, D. and M, Stadler. 2017. Resurrection and emendation of the Hypoxylaceae, recognized from a multigene phylogeny of the Xylariales. *Mycological Progress* 17: 115–154.
- Whalley, A.J.S. 1993. Tropical Xylariaceae: their distribution and ecological characteristics. *The British Mycological Society* 39: 103–119.
- White, T.J., Bruns, T. and Taylor. J. 1990. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York. : Academic press.
- Wijayawardene, N., Hyde, K.D., Lumbsch, T. and Liu, J.K.J. 2017. Outline of Ascomycota: 2017. *Fungal Diversity* 88: 167–263.
- Wijesundera, R.L., Jeganathan, S. and liyanage, N.S. 1991. Some effects of isolates of *Trichoderma* on *Rigidoporus lignosus*. *Rubber Research Institute of Sri Lanka* 2: 42–47.

- Williamson, M. 2010. *Hypoxylon* canker. Available form: <http://www.Clemson.edu/extension/hgic>. [accessed on October 6, 2015]
- Wu, H.M., Lin, L.P., Xu, Q.L., Han, W.B., Zhang, S., Mei, Y.N., Yao, Z.Y. and Tan, R.X. 2017. Nudupetide, a potent insecticide and antimicrobial from *Nodulisporium* sp. associated with *Riptortus pedestris*. *Tetrahedron Letters* 58: 663–665.
- Yuyama, K.T., Chepkirui, C., Wendt, L., Fortkamp, D., Stadler, M., and Abraham, W.R. 2017. Bioactive compounds produced by *Hypoxylon fragiforme* against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microorganisms* 5: 1–9.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเนื้อไม้

1. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคเคส

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 3-5 วัน ย้ายเลี้ยงบนอาหาร bromophenol blue agar (BBA, ภาคผนวก ค.) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อราทุกวัน (เมื่อเกิดโซนใสเชื้อราสร้างเอนไซม์แลคเคส) บันทึกวันที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น

2. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส

เตรียมอาหารแข็ง (solid state) ที่มีส่วนประกอบดังนี้ ซีลี้อย 2 ส่วน เปลือกถั่วบดหยาบ 2 ส่วน และ ปั่นหยาบ และ mineral solution (ภาคผนวก ค) นำซีลี้อย 2 ส่วน เปลือกถั่วบดหยาบ 2 ส่วน และ หย้าแห้งปั่น 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน ตักส่วนผสมปริมาตร 10 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 200 มิลลิลิตร เติม mineral solution ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดมาเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 20 นาที วางอาหารแข็งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น จากนั้น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะขอบโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 3-5 วัน ย้ายเลี้ยงบนอาหาร solid state (3 ชั้นต่อ 1 ขวดรูปชมพู่) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอจนเชื้อราเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร เมื่อเชื้อราเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร (ประมาณ 14 วัน) เติม KPB (potassium phosphate buffer) pH 7.5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เพื่อสกัดเอนไซม์ที่เชื้อราสร้างออกมาให้อยู่ในรูปแบบสารละลาย ผสมทุกอย่างให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้กระบอกฉีดยา (syringe) ดูดส่วนใสในสารละลายนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์

วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) ด้วย DNS (Dinitrosaniclyc acid) method (Miller, 1959) โดยเติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 125 ไมโครลิตร ลงในหลอด micro centrifuge tube ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ xylan ใน KPB 125 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมด (250 ไมโครลิตร) ใส่ในหลอดแก้ว ที่มีสารละลาย DNS อยู่ 250 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน ปิดหลอดแก้วด้วยลูกแก้ว นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาแล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 2 ไมโครลิตร สังเกตการทำปฏิกิริยาของ DNS กับน้ำตาล ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ultraviolet-visible spectrophotometer (UV 5300, metash, China) จดบันทึก

ค่าการดูดกลืนแสงและเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นำไปคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) โดย $\Delta A = A - A_2 - A_3$ และ

Enzyme activity (Unit/ml) = $\frac{(\Delta A/m) \times 1000}{MW / \text{incubation time}} / 0.125 \times (0.250/0.125)$

ค่า slope (m) จากกราฟความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลไซโลส = 0.9528 และมวลโมเลกุล (MW) ไซโลส = 150.13

ผลการทดลอง

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเนื้อไม้

1. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แลคเคส

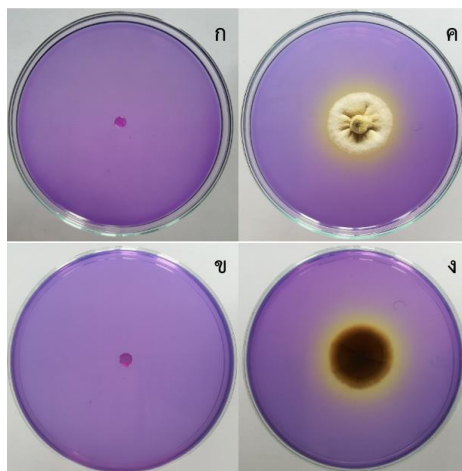
ทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Hypoxylon* spp. และ *Annulohypoxylon* spp. ทั้ง 9 ไอโซเลท ในการสร้างเอนไซม์แลคเคส บนอาหาร BBA (bromophenol blue agar) จากผลการทดลองพบว่า มีเพียงเชื้อรา *H. lenormandii* (CHPW03) เพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้นที่สามารถสร้างเอนไซม์แลคเคสได้ โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีอาหารของอาหาร BBA จากสีม่วงเข้ม เป็นสีฟ้าอ่อนๆ จนถึงใส เกิดจากการย่อยลิคินินของเอนไซม์แลคเคส (ภาพที่ 1)

2. การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส

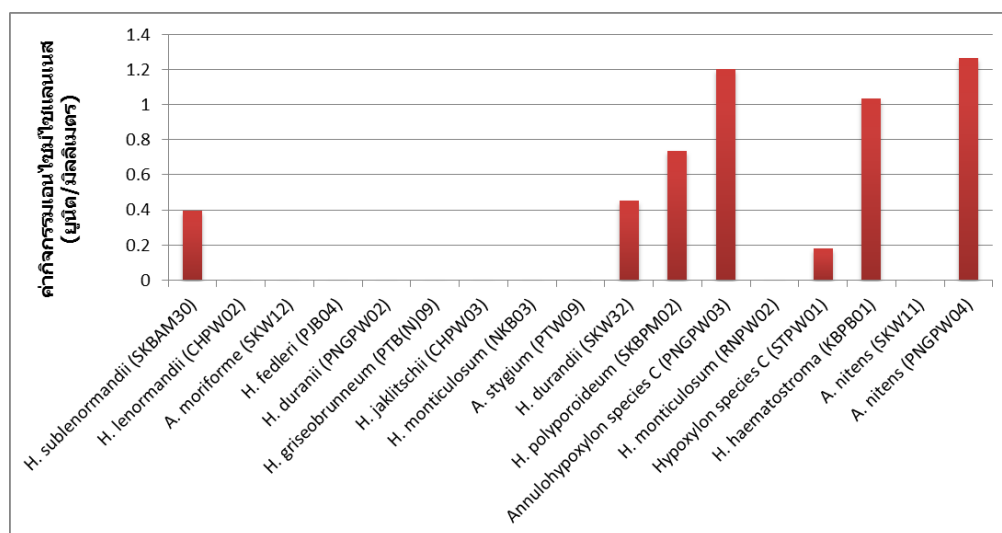
วัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนส ด้วยวิธี DNS method (dinitrosanicylic acid) พบว่าเชื้อรา *Annulohypoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. 5 ไอโซเลท มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสเกิดขึ้น เมื่อทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์พบว่าเชื้อรา *A. nitens* (PNGPW04) แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุดคือ 1.26 ยูนิท/มิลลิลิตร รองลงมาคือเชื้อรา *H. polyporoideum* SKWPM02, *H. sublenormandii* (SKW30) และ *Hypoxylon* sp. (STPW01) แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสคือ 0.738, 0.396 และ 0.180 ยูนิท/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

เชื้อราในสกุล *Annulohypoxylon* และ *Hypoxylon* เป็นเชื้อราที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเนื้อไม้ในระบบนิเวศ ดังนั้นในการทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส แลคเคส และไซแลนเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายองค์ประกอบของเนื้อไม้ ได้แก่ เซลลูโลส ลิคินิน และไซแลน (องค์ประกอบย่อยในเฮมิเซลลูโลส) จึงได้ถูกศึกษาเพิ่มเติมในแง่คุณสมบัติในการย่อยสลายของเชื้อราทั้งสองสกุลดังกล่าว โดยเริ่มมีการรายงานครั้งแรกว่า เชื้อราสกุล *Xylaria* และ *Hypoxylon* บางชนิด ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในพืชจำพวก แองจิโอสเปิร์ม (angiosperm) มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส และลิคินินได้ (Roger, 1979) ต่อมาได้มีการนำความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายของเชื้อรามานำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น

การใช้ประโยชน์จากการสร้างเอนไซม์ เซลลูเลส และไซแลนเนส ที่ได้จากการคัดเลือกเชื้อราบนซากใบปาล์มน้ำมัน เพื่อนำมาเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายซากพืชได้ดียิ่งขึ้น (พิมพ์ชนา และคณะ, 2559) การเพิ่มค่ากิจกรรม ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) จากการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายในกลุ่ม hemicellulase และ Beta glucosidase ของเชื้อรา *A. stygium* DR47 และ *Aspergillus niger* DR02 ในกระบวนการย่อยสลายขานอ้อย ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น และเพิ่มปริมาณของผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายมากขึ้น นอกจากนี้เชื้อรา *A. stygium* ยังสามารถสร้างเอนไซม์แพคตินเนส และไซแลนเนสได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนขานอ้อยที่มีส่วนผสมของ ไซแลน และแพคติน (Robl et al., 2013; Robl et al., 2016) ในขณะที่ Memic และคณะ 2017 รายงานการใช้ประโยชน์จากการสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม Ligninolytic enzyme ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *H. fragiforme* และ *Coniophora puteana* สำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ของสารในกลุ่ม PAHs (Polycyclic aromatic hydrocarbons) ที่เกิดจากการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ของอินทรีย์วัตถุ และสารในกลุ่มนี้บางชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง ภายหลังจากเลี้ยงเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ในอาหารเหลวเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และตรวจสอบการย่อยสลายองค์ประกอบของสารดังกล่าว ด้วยเทคนิค GC/MS พบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายองค์ประกอบสารกลุ่มนี้ได้หลายชนิด เช่น 1- methyl-naphthalene, 2- methyl-naphthalene, 1- methylfluorene, acenaphthene, acenaphthylene, anthracene, 1,2- benzanthracene, benzo(k)fluoranthene, byphenil, fluorine, phenanthrene และ phyrene

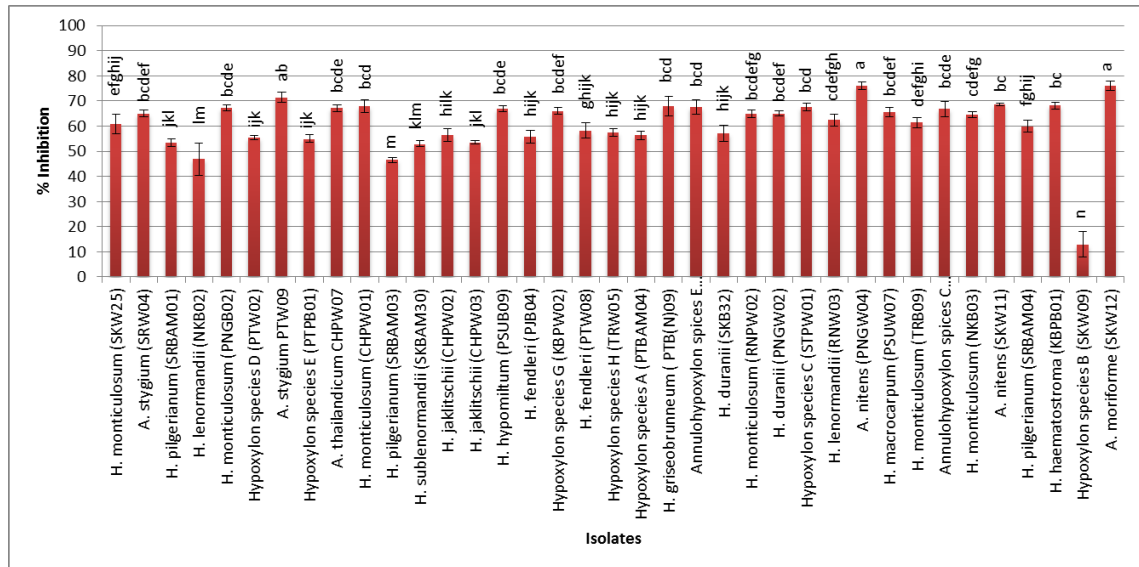


ภาพภาคผนวกที่ 1 การสร้างเอนไซม์แลคเคสของเชื้อรา *Hypoxylon lenormandii* (CHPW03) บนอาหาร BBA ก. กรรมวิธีควบคุม (หน้าจานอาหาร) ข. กรรมวิธีควบคุม (หลังจานอาหาร) (ค. หน้าจานอาหาร, ง. หลังจานอาหาร) โชนใส่รอบโคโลนีเชื้อรา *H. lenormandii* (CHPW03) จากการสร้างเอนไซม์แลคเคส เมื่อเชื้อราเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน



ภาพภาคผนวกที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์ไซแลนเนสของเชื้อรา *Annulohypoxylon* spp. และ *Hypoxylon* spp. ในแต่ละไอโซเลท

ภาคผนวก ข



ภาพภาคผนวกที่ 3 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Curvularia oryzae* ของเชื้อราสกุล *Annulohypoxylon* และ *Hypoxylon*

ภาคผนวก ค

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Bromophenol blue agar (BBA)

PDA	39 กรัม
Bromophenol blue	0.002 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

นำ PDA สำเร็จรูปผสมน้ำกลั่น ตั้งไฟ และคนให้ส่วนผสมทุกอย่างเข้ากัน เติม bromophenol blue คนส่วนผสมให้เข้ากันอีกครั้ง จากนั้นนำอาหาร BBA ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น แล้วเทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

2. Carboxyl methyl cellulose (CMC)

$C_4H_{12}N_2O_6$	5 กรัม
KH_2PO_4	1 กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.001 กรัม
Yeast extracts	0.1 กรัม
CMC	20 กรัม
Agar	16 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่นอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปตั้งไฟ เพื่อให้ส่วนผสมทั้งหมดรวมเป็นเนื้อเดียวกัน นำอาหาร CMC ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น แล้วเทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

3. Corn meal agar (CMA)

Corn meal	17.00 กรัม
Agar	2.00 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

นำผงวุ้นผสมกับอาหารสำเร็จรูป corn meal ที่เตรียมไว้ เติมน้ำกลั่นลงไปในส่วนผสม จากนั้นนำไปตั้งไฟเพื่อให้ผงวุ้นและส่วนผสมทุกอย่างเข้ากัน นำอาหาร CMA ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น แล้วเทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

4. Colloidal chitin agar

Colloidal chitin	1% (w/v)
PDA	39 กรัม
Bromocresol purple	0.015% (w/v)
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

นำอาหาร PDA สำเร็จรูปผสมกับ colloidal chitin เติมน้ำกลั่นลงไปในส่วนผสม จากนั้นนำไปตั้งไฟ เพื่อให้ส่วนผสมทุกอย่างเข้ากัน เติมน้ำ bromocresol purple และวางอาหารพักไว้ให้เย็น นำไปปรับค่าพีเอช ด้วย NaCl และ NHCl ให้ได้พีเอชประมาณ 4.7 นำอาหาร CCA ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น แล้วเทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

5. Oat meal agar (OMA)

Oat meal	20 กรัม
Trace salt solution	1 มิลลิลิตร
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

Trace salt solution ประกอบด้วย

FeSO ₄	0.1 กรัม
MnCl ₂	0.1 กรัม
ZnSO ₄	0.1 กรัม
Distilled water	100 มิลลิลิตร

วิธีการ

นำ oat meal ที่ซังไว้ต้มในน้ำเดือดจนสุก ใช้ผ้าขาวบางกรองแยกส่วนน้ำต้มออก เติมผงวุ้น และ นำไปตั้งไฟอีกครั้ง คนส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำอาหาร OMA ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนอุ่น เติม trace salt solution แล้วเทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

6. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200 กรัม
Dextrose	20 กรัม
Agar	15 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

นำมันฝรั่งสดปอกเปลือก และล้างน้ำให้สะอาด หั่นมันฝรั่งเป็นลูกเต๋าขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์ เซนติเมตร นำไปต้มให้สุก กรองแยกส่วนน้ำต้มมันฝรั่งออกผ่านผ้าขาวบาง นำส่วนผสมที่เตรียมไว้ใส่ในน้ำต้มมันฝรั่งและตั้งไฟอีกครั้ง เพื่อให้ส่วนผสมทุกอย่างเข้ากันดี นำอาหาร PDA ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุ่น แล้วเทอาหารลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

7. Potato dextrose broth (PDB)

Potato	200 กรัม
Dextrose	20 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

นำมันฝรั่งสดปอกเปลือก และล้างน้ำให้สะอาด หั่นมันฝรั่งเป็นลูกเต๋าขนาด 1×1×1 ลูกบาศก์ เซนติเมตร ต้มให้สุก กรองแยกส่วนน้ำต้มมันฝรั่งออกผ่านผ้าขาวบาง นำส่วนผสมที่เตรียมไว้ใส่น้ำต้มมันฝรั่งและตั้งไฟอีกครั้ง เพื่อให้ส่วนผสมทุกอย่างเข้ากันดี นำอาหาร PDB ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที

8. Solid state

Nut shell	1 กรัม
Saw dust	1 กรัม
Dry glass	0.5 กรัม
Peptone	1% (w/v)
Mineral solution	(mineral solution 10 มิลลิลิตรต่อ

วัตถุดิบ 2.5 กรัม)

Mineral solution ประกอบด้วย

Nacl	0.1 กรัม
MgSO ₄	0.1 กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2 กรัม
Yeast extract	1% (w/v)
Distilled water	100 มิลลิลิตร

วิธีการ

นำวัตถุดิบ (เปลือกถั่ว ชี้อ้อย และหญ้าแห้ง) บดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นอเนกประสงค์ และคลุกเคล้าให้เข้ากัน ละลาย 1% เพป्टอน ผสมลงใน mineral solution เติมน้ำละลายลงในวัตถุดิบในข้อที่ 1 คลุกเคล้าส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันภายในขวดรูปชมพู่ขนาด 200 มิลลิลิตร นำอาหาร solid state ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง ก่อนใช้เลี้ยงเชื้อราต่อไป

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวนیرชา หลิมนุกูล	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5810620045	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2557

ทุนการศึกษา

- ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนโครงการเรียนดี คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสถานวิจัยพืชกรรมปาล์มน้ำมัน ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์และเผยแพร่ผลงาน

- นیرชา หลิมนุกูล ณิชพัชร์ ศรีหนัล และ ชนินันท์ พรสุริยา. 2560. การสำรวจและจำแนกชนิดของเชื้อราสกุล *Hypoxyton* Bull. โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในบริเวณพื้นที่อ่างเก็บน้ำมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. วารสารแก่นเกษตร (ฉบับพิเศษ) 45(1): 1404–1408.
- นیرชา หลิมนุกูล ณิชพัชร์ ศรีหนัล และ ชนินันท์ พรสุริยา. (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์). การคัดเลือกเชื้อรา *Annulohypoxyton* spp. เพื่อใช้ควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์.