

อาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศไทย

นายบุญฤทธิ จันทวิมล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2554  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

DOUBLE-STRANDED RNA IN AN ISOLATE OF *Trichoderma* sp. IN THAILAND

Mr. Boonyarit Chandavimol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Botany

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

อาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้ใน  
ประเทศไทย

โดย

นายบุญยฤทธิ จันทวิมล

สาขาวิชา

พฤกษศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธราริน ไฉ่หัตถะกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธราริน ไฉ่หัตถะกุล)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต)

บุญยฤทธิ์ จันทวิมล : อาร์เอ็นเอสายคู่ใน *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ที่คัดแยกในประเทศไทย. (DOUBLE-STRANDED RNA IN AN ISOLATE OF *Trichoderma* sp. IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. พงศ์ธาริน ไฉ่หัตถะกุล, 132 หน้า.

ผลการตรวจสอบ double-stranded RNA (dsRNA) ในรา *Trichoderma* จำนวน 96 ไอโซเลต ที่คัดแยกจาก 13 จังหวัดในประเทศไทย พบ dsRNA ใน 7 ไอโซเลต (7%) ได้แก่ *Trichoderma* sp. Cbi3.1.1 *T. harzianum* Cbi3.2.2 *T. reesei* Cbi3.3.1 *Trichoderma* sp. Cpn1.1.1 *Trichoderma* sp. Pbn1.1.5 *T. virens* Plk1.1.9 และ *Trichoderma* sp. Ubn1.1.3 ลักษณะ dsRNA ที่พบในราแต่ละไอโซเลตมีจำนวนตั้งแต่ 1 - 10 แถบ และมีขนาดโดยประมาณ 1.25 - 21.9 kb จากนั้นได้เลือก dsRNA จาก *T. reesei* Cbi3.3.1 ซึ่งมีจำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 2.06 - 2.26 kb ไปสังเคราะห์ cDNA โคลน และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA จาก cDNA โคลน c88 c101 และ c171 สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ putative RNA dependent RNA polymerases และ putative capsid proteins ของไวรัสในสกุล *Partitivirus* ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการยืนยันว่า dsRNA จาก *T. reesei* Cbi3.3.1 มีความใกล้เคียงกับไวรัสสกุล *Partitivirus* การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA ของ *T. reesei* Cbi3.3.1 พบว่า dsRNA มีผลต่อการเติบโตที่แตกต่างกันเมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร Corn meal dextrose agar ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °C และพบการสร้างสปอร์ที่ต่างกันภายหลังการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ในขณะที่การเลี้ยงในอาหาร Synthetic low nutrient agar พบความแตกต่างที่อุณหภูมิ 15 °C เท่านั้น สำหรับการผลิตเอนไซม์ endoglucanase ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในโคโลนีทั้งสองกลุ่ม แต่พบว่ากลุ่มของโคโลนีที่ไม่มี dsRNA มีค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนใน crude enzyme ที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อ.....  
 สาขาวิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....  
 ปีการศึกษา.....2554.....

# # 5072637023 : MAJOR BOTANY

KEYWORDS : Mycovirus / Double-stranded RNA / *Trichoderma*

BOONYARIT CHANDAVIMOL : DOUBLE-STRANDED RNA IN AN ISOLATE  
OF *Trichoderma* sp. IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.  
PONGTHARIN LOTRAKUL , Ph. D. , 132 pp.

Double-stranded RNAs (dsRNAs) were detected in 7 of 96 isolates (7%) of *Trichoderma* spp. isolated from 13 provinces of Thailand. The dsRNA-containing isolates included *Trichoderma* sp. Cbi3.1.1 *T. harzianum* Cbi3.2.2 *T. reesii* Cbi3.3.1 *Trichoderma* sp. Cpn1.1.1 *Trichoderma* sp. Pbn1.1.5 *T. virens* Plk1.1.9 and *Trichoderma* sp. Ubn1.1.3. The number of dsRNA fragments in each fungal isolate ranged from 1 to 10 and their size ranged from approximately 1.25 to 21.9 kb. Complementary DNAs synthesized from 3 dsRNA fragments of *T. reesii* Cbi3.3.1 were cloned and sequenced. Partial amino acid sequences translated from the cDNA clones, c88, c101 and c171, were similar to putative RNA dependent RNA polymerases and putative capsid proteins of viruses in the genus *Partitivirus*. Results of phylogenetic analyses supported the close relationship between dsRNA from *T. reesii* Cbi3.3.1 and partitiviruses. When growth and endoglucanase production were compared between the single-cell colonies with and without dsRNA, the difference in growth rate was detected on Corn meal dextrose agar medium at 30 and 40 °C and higher sporulation in dsRNA-free colonies was observed in 14 day-old cultures. Higher protein content was also detected in the crude enzyme produced by dsRNA-free colonies. However, no significant difference was found in endoglucanase production.

Department : ..Botany..... Student's Signature .....

Field of Study : ..Botany..... Advisor's Signature .....

Academic Year : ..2011.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. พงศ์ธาริน โฉมดีตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ความแนะนำ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ชุมพล คุณวาสี หัวหน้าภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. ศิริพงษ์ เปรมจิต ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ (ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก) และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนและเชื้อเพื่อสถานที่ในการวิจัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช และในภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัยฉบับนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	12
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	13
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	14
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	17
4. ผลการวิจัย.....	24
5. การอภิปรายผลการวิจัย.....	77
6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	88
รายการอ้างอิง.....	90
ภาคผนวก.....	100
ภาคผนวก ก.....	101
ภาคผนวก ข.....	104
ภาคผนวก ค.....	111
ภาคผนวก ง.....	118
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	132

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจัดจำแนกไมโคไวรัส.....	4
2	สายพันธุ์ของรา <i>Trichoderma</i> ที่ตรวจพบ dsRNA จากรายงานการศึกษาก่อนหน้า.....	10
3	ไอโซเลตของรา <i>Trichoderma</i> ทั้งหมดที่คัดแยกได้.....	25
4	จำนวนและขนาดโดยประมาณของ dsRNA ที่พบในรา <i>Trichoderma</i> แต่ละไอโซเลต.....	30
5	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.1.1 โดยการทำให้ pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2 .....	31
6	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.2.2 โดยการทำให้ pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2 .....	33
7	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.3.1 โดยการทำให้ pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2 .....	35
8	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cpn1.1.1 โดยการทำให้ pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2 .....	37
9	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต PIK1.1.9 โดยการทำให้ pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2.....	39
10	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Ubn1.1.3 โดยการทำให้ pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2 .....	41
11	ข้อมูลของไอโซเลตที่ใช้ในการจำแนกด้วย Interactive key.....	53
12	รหัสสายพันธุ์และข้อมูลโดยสรุปของ <i>Trichoderma</i> ไอโซเลตที่พบ dsRNA ในการศึกษา.....	54
13	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โคลน c88 โดยการทำให้ pairwise alignment .....	56
14	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA โคลน c88 โดยการทำให้ pairwise alignment.....	57



ตารางที่		หน้า
15	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โคลน c101 โดยการทำให้ pairwise alignment.....	58
16	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA โคลน c101 โดยการทำให้ pairwise alignment.....	59
17	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โคลน c171 โดยการทำให้ pairwise alignment.....	60
18	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA โคลน c171 โดยการทำให้ pairwise alignment.....	60
19	ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของไวรัสในฐานข้อมูล GenBank.....	62
20	ค่าเฉลี่ย (±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของรัศมีการเติบโต (mm) ของโคโลนีเซลล์เดี่ยวเมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMD และ SNA เป็นเวลา 3 วัน.....	72
21	ค่าเฉลี่ย (±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของรัศมีการเติบโต (mm) ของกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA เมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMD และ SNA เป็นเวลา 3 วัน.....	73
22	ค่าเฉลี่ย (±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของแอกติวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase จาก crude enzyme ที่ได้จากโคโลนีเซลล์เดี่ยว.....	75
23	ค่าเฉลี่ย (±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของแอกติวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase จาก crude enzyme ที่ได้จากกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA.....	76
24	ขนาดและระยะการเคลื่อนที่ของ DNA marker เมื่อแยกบน 1.6% agarose....	119
25	การหาขนาดโดยประมาณของ dsRNA ของแต่ละไอโซเลต.....	121
26	รัศมีการเติบโต (mm) ของเส้นใยโคโลนีเดี่ยวที่มี และไม่มี dsRNA เมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMD เป็นเวลา 3 วัน .....	122
27	การเติบโต (mm) ของเส้นใยโคโลนีเดี่ยวที่มี และไม่มี dsRNA เมื่อเลี้ยงบนอาหาร SNA เป็นเวลา 3 วัน.....	123
28	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ของน้ำตาล glucose .....	124
29	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ของ crude enzyme จากโคโลนีเดี่ยว.....	125
30	ปริมาณน้ำตาลของ crude enzyme จากโคโลนีเดี่ยว.....	126

ตารางที่	หน้า
31	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ของโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆที่วัดด้วยวิธี Bradford ..... 127
32	ปริมาณโปรตีนของ crude enzyme จากการผลิตเอนไซม์ endoglucanase..... 128
33	ANOVA ของรัศมีการเติบโตของโคโลนีเซลล์เดี่ยวทั้งหมดบนอาหาร CMD ที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C..... 129
34	ANOVA ของรัศมีการเติบโตระหว่างกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA บนอาหาร CMD ที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C..... 129
35	ANOVA ของรัศมีการเติบโตของโคโลนีเซลล์เดี่ยวทั้งหมดบนอาหาร SNA ที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C..... 130
36	ANOVA ของรัศมีการเติบโตระหว่างกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA บนอาหาร SNA ที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C..... 130
37	ANOVA ของแอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase และปริมาณโปรตีนจาก crude enzyme ของโคโลนีเซลล์เดี่ยวทั้งหมด..... 131
38	ANOVA ของแอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase และปริมาณโปรตีนจาก crude enzyme ของกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA..... 131

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนที่แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกรา <i>Trichoderma</i> .....	25
2	ผลการย่อย dsRNA ด้วย nuclease .....	27
3	แถบ dsRNA เมื่อแยกบน 8% SDS-PAGE .....	29
4	แถบ dsRNA เมื่อแยกบน 1.6% agarose .....	29
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ <i>Trichoderma</i> ไอโซเลต Cbi3.1.1.....	31
6	Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.1.1 กับ <i>Trichoderma koningiopsis</i> strain DAOM 229982 (EU280141).....	32
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ <i>Trichoderma</i> ไอโซเลต Cbi3.2.2.....	33
8	Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.2.2 กับ <i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 229907 (HQ607942).....	34
9	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ <i>Trichoderma</i> ไอโซเลต Cbi3.3.1.....	35
10	Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.3.1 กับ <i>Hypocrea jecorina</i> strain DAOM 220784 (EU280101).....	36
11	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ <i>Trichoderma</i> ไอโซเลต Cpn1.1.1.....	37
12	Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cpn1.1.1 กับ <i>Trichoderma erinaceum</i> strain CIB T72 (EU280106).....	38
13	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ <i>Trichoderma</i> ไอโซเลต PIk1.1.9.....	39
14	Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต PIk1.1.9 กับ <i>Hypocrea virens</i> strain CIB T06 (EU280076).....	40
15	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ <i>Trichoderma</i> ไอโซเลต Ubn1.1.3.....	41
16	Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Ubn1.1.3 กับ <i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 233353 (EF392759).....	42
17	รัศมีของโคโลนี (mm) ของ <i>Trichoderma</i> ที่พบ dsRNA แต่ละไอโซเลตที่ อุณหภูมิ 15 20 25 30 และ 35 °C เมื่อเลี้ยงบนจานอาหาร PDA และ SNA ใน ที่มีดเป็นเวลา 3 วัน.....	45
18	ลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> ไอโซเลต Cbi 3.1.1 .....	46

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> ไฮโซเลต Cbi 3.2.2 .....	47
20	ลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> ไฮโซเลต Cbi 3.3.1 .....	48
21	ลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> ไฮโซเลต Cpn1.1.1 .....	49
22	ลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> ไฮโซเลต Pbn1.1.5 .....	50
23	ลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> ไฮโซเลต Plk1.1.9 .....	51
24	ลักษณะโคโลนีของ <i>Trichoderma</i> ไฮโซเลต Ubn1.1.3 .....	52
25	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA clone c88.....	55
26	ลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA clone c88.....	55
27	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA clone c101.....	58
28	ลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA clone c101.....	58
29	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA clone c171.....	59
30	ลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA clone c171.....	60
31	Multiple amino acid sequence alignment ของ putative RdRp จากโคลน c88 กับ <i>Partitivirus</i> ชนิดต่าง ๆ.....	65
32	Multiple amino acid sequence alignment ของ putative RdRp จากโคลน c101 กับ <i>Partitivirus</i> ชนิดต่าง ๆ.....	66
33	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่วิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของ putative RdRp จากโคลน c88 และ c101 กับไวรัสในวงศ์ <i>Partitiviridae</i> .....	67
34	Multiple amino acid sequence alignment ของ putative CP จากโคลน c171 กับ <i>Partitivirus</i> ชนิดต่าง ๆ.....	68
35	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่วิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของ putative CP จากโคลน c171 กับไวรัสในวงศ์ <i>Partitiviridae</i> .....	69
36	การตรวจสอบ dsRNA ในโคโลนีเดี่ยว.....	70
37	โคโลนีเซลล์เดี่ยวบนจานอาหาร CMD ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน.....	74
38	การเคลื่อนที่ของ DNA marker บน 8% SDS-PAGE.....	107
39	Counting chamber ชนิด Improved Neubauer.....	111
40	ตำแหน่งของแถบที่ใช้ในการหาขนาด dsRNA เมื่อแยกบน 1.6% agarose.....	118
41	กราฟ log ของขนาดของ DNA marker กับระยะการเคลื่อนที่บน 1.6 % agarose.....	120

ภาพที่		หน้า
42	กราฟมาตรฐานของน้ำตาล glucose.....	124
43	กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA.....	127

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไมโคไวรัส (mycovirus) หรือไวรัสของเห็ดราสามารถพบได้ในเห็ดราเกือบทุกกลุ่ม ทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือยีสต์จนถึงราเส้นใย (Lemke and Nash, 1974) โดยอาจตรวจพบในรูปของอนุภาคคล้ายไวรัส (virus-like particles) ที่มีโปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรม (capsid) หรือพบเพียงสารพันธุกรรมอย่างเดียว ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA, dsRNA) อยู่ในไซโตพลาสซึมหรือไมโทคอนเดรีย ไมโคไวรัสส่วนใหญ่ไม่พบว่ามี การติดต่อภายนอกเซลล์ แต่จะถ่ายทอดผ่านสปอร์หรือผ่านการรวมเส้นใย ซึ่งทำให้มีการแพร่ระบาดที่จำกัด (van Diepeningen et al., 1997) ทำให้ไมโคไวรัสมีลักษณะและวิวัฒนาการที่แตกต่างไปจากไวรัสของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เห็ดราที่มีไวรัสส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการผิดปกติที่เห็นได้อย่างชัดเจนด้วยตาเปล่า (symptomless) จึงไม่มีผู้ทำการศึกษา แต่ไวรัสบางสายพันธุ์สามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะของเห็ดราให้อาศัยได้ ดังที่มีรายงานในเห็ดที่มีการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์บางชนิด เช่น เห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) และในกลุ่มของเห็ดนางรม (*Pleurotus* spp.) พบการระบาดของไวรัสซึ่งทำให้เส้นใยเห็ดเจริญเติบโตช้าและมีรูปร่างดอกเห็ดที่ผิดปกติ (Kim et al., 2008) สำหรับในยีสต์และราสนิม พบว่าไวรัสเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเป็น killer yeast ที่สามารถสร้างสารพิษที่มีผลฆ่าราสายพันธุ์อื่นที่ไม่มีไวรัสได้ (Schmidt and Breinig, 2006) ในกลุ่มของราก่อโรคพืช พบว่าไวรัสมีผลต่อความสามารถในการก่อโรค (virulence) ของราหลายชนิด เช่น ในรา *Cryphonectria parasitica* ซึ่งก่อโรคไหม้ในเกาลัด การติดเชื้อไวรัสบางสายพันธุ์ในสกุล *Hypovirus* จะทำให้มีความสามารถในการก่อโรคลดลง แต่ในรา *Nectria radicola* การติดเชื้อไวรัสอาจทำให้ความสามารถในการก่อโรคสูงขึ้น (Ahn and Lee, 2001) นอกจากนี้จากการศึกษาไวรัสในราเอนโดไฟต์ (endophytic fungi) *Curvularia protuberata* พบว่าไวรัสมีผลให้ราและพืชอาศัยสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ (Marquez et al., 2007)

จากรายงานการประชุมของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ครั้งที่ 8 ในปีค.ศ. 2005 ได้จัดหมวดหมู่ของไมโคไวรัสไว้ใน 12 สกุล เป็นกลุ่มที่มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ 1 สกุล คือ *Rhizidiovirus* กลุ่มที่มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว 6 สกุล ได้แก่ *Barnavirus* *Narnavirus* *Hemivirus* *Pseudovirus* และ *Metavirus* และกลุ่มที่มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายคู่ 5 สกุล ได้แก่ *Chrysovirus* *Hypovirus* *Partivirus* *Mycovirus* และ *Totivirus* (Pearson et al.,

2009) อย่างไรก็ตามการศึกษาไมโคไวรัสยังมีน้อยเมื่อเทียบกับการศึกษาไวรัสของพืชและสัตว์ ทำให้ยังขาดความรู้ความเข้าใจในด้านต่างๆ เช่น จำนวนชนิด ความหลากหลายทางพันธุกรรม ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ อนุกรมวิธานตลอดจนกลไกการเพิ่มจำนวนและการก่อโรค

รา *Trichoderma* (*Hypocrea*) เป็นราดิน (soil fungi) ที่สามารถพบได้ทั่วไป มีการนำรากลุ่มนี้มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การผลิตเอนไซม์และสารทุติยภูมิ เนื่องจากเป็นราที่เติบโตเร็วและสามารถผลิตเอนไซม์สำคัญหลายชนิดในปริมาณมาก สำหรับราชนิด *T. harzianum* ยังเป็นปรสิตของราชนิดอื่น (mycoparasite) จึงมีผู้นำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมราก่อโรคพืชได้ อย่างไรก็ตามก็มีรายงานว่าราชนิดนี้ก็เป็นสาเหตุของโรคราเขียวของเห็ดอุตสาหกรรมด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *T. longibrachiatum* / *H. oreintalis* สามารถเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ก่อโรคในมนุษย์ได้อีกด้วย (Jaklitsch, 2009; Schuster and Schmoll, 2010)

จากความสำคัญของ *Trichoderma* และไมโคไวรัสดังที่กล่าวข้างต้น งานวิจัยนี้ จึงมุ่งที่จะศึกษา dsRNA ที่อาจเป็นไมโคไวรัสใน *Trichoderma* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย โดยเริ่มจากการคัดแยก *Trichoderma* จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณต่างๆ ในประเทศไทย จากนั้นทำการตรวจสอบ dsRNA ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ dsRNA ศึกษาอัตราการถ่ายทอด dsRNA ผ่าน conidia และศึกษาผลของ dsRNA ที่มีต่อลักษณะทางสรีรวิทยาของราบางประการ เช่น การเติบโตของเส้นใยราบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิต่างๆ และการผลิตเอนไซม์ endoglucanase

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษา dsRNA ใน *Trichoderma* sp. สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้สายพันธุ์ของ *Trichoderma* ที่มี dsRNA และความรู้พื้นฐานเพื่อการศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับไวรัสของราต่อไป

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ไมโคไวรัส

ไวรัสที่พบในเห็ดราหรือไมโคไวรัส มีรายงานการพบในเห็ดราเกือบทุกชนิด โดยอนุภาคของไมโคไวรัสส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA ที่เป็น single-stranded RNA (ssRNA) หรือ double-stranded RNA (dsRNA) อาจมีหรือไม่มีโปรตีนเปลือกหุ้ม (capsid protein) (Lemke and Nash, 1974; Ghabrial, 1998) จากการศึกษพบว่าอนุภาคของไมโคไวรัสไม่สามารถติดต่อกับภายนอกเข้าสู่ในเซลล์ราได้เอง ดังนั้นการถ่ายทอดของไมโคไวรัสตามธรรมชาติจึงจำกัดอยู่ 2 วิธี คือ การถ่ายทอดผ่านการรวมของเซลล์เส้นใย และการถ่ายทอดผ่านสปอร์ของราสายพันธุ์ที่มีไวรัส (Hollings, 1978; Ghabrial, 1998) ทำให้การถ่ายทอดไวรัสจำกัดในราสายพันธุ์เดียวกัน หรือ สายพันธุ์ใกล้เคียงที่มีความเข้ากันได้ของเส้นใย (vegetative compatibility) (van Diepeningen et al., 1997; McCabe et al., 1999)

จากรายงานการประชุมของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ครั้งที่ 8 ในปีค.ศ. 2005 ได้จัดจำแนกไมโคไวรัสไว้ใน 12 สกุล โดยอาศัยข้อมูลของสารพันธุกรรม และลักษณะอนุภาคของไวรัส โดยเป็นกลุ่มที่มีจีโนมเป็น dsDNA 1 สกุล คือ *Rhizidiovirus* กลุ่มที่มีจีโนมเป็น ssRNA 6 สกุล ได้แก่ *Barnavirus* *Narnavirus* *Hemivirus* *Pseudovirus* และ *Metavirus* และกลุ่มที่มีจีโนมเป็น dsRNA 5 สกุล ได้แก่ *Chrysovirus* *Hypovirus* *Partitivirus* *Mycoreovirus* และ *Totivirus* (Pearson, 2009) ต่อมาภายหลังได้จำแนกไมโคไวรัสเพิ่มเติมในสกุล *Endornavirus* และได้เพิ่มสกุลใหม่อีก 4 สกุล ไว้ใน Virus Taxonomy list 2009 ของ ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2011: Online) ได้แก่ *Victorivirus* *Botrexvirus* *Sclerodarnavirus* และ *Mycoflexivirus* (ตารางที่ 1) รวมเป็น 17 สกุลในปัจจุบัน



ตารางที่ 1 การจัดจำแนกไมโคไวรัสที่เสนอโดย International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2011: Online; Adam and Antoniw, 2006; Hulo et al., 2011)

Order	Family	Genera	Genome		Morphology	Species
			Segments	Size (kb)		
Double-stranded RNA						
Unassigned	<i>Chrysoviridae</i>	<i>Chysovirus</i>	4.	2.7 - 3.5	Isometric, 30 - 35 nm, not enveloped, multiple components	<i>Penicillium chrysogenum virus</i>
	<i>Endomaviridae</i>	<i>Endomavirus</i>	1	14 - 17.6	No true particles, nucleoprotein complex, not enveloped	<i>Helicobasidium mompa endomavirus 1</i>
	<i>Hypoviridae</i>	<i>Hypovirus</i>	1	9 - 13	Pleomorphic vesicles, 50 - 80 nm	<i>Cryphonectria hypovirus 1</i>
	<i>Partitiviridae</i>	<i>Partivirus</i>	2	2.1	Isometric, 30 - 40 nm, not enveloped	<i>Atkinsonella Hypoxylon virus</i>
	<i>Reoviridae</i>	<i>Mycoreovirus</i>	11 - 12	0.7 - 4.1	Isometric, ~80 nm, not enveloped	<i>Cryphonectria parasitica mycoreovirus-1</i>
	<i>Totiviridae</i>	<i>Totivirus</i>	1	4.6 - 6.7	Isometric, 60 nm, not enveloped	<i>Saccharomyces cerevisiae virus L-A</i>
		<i>Victorivirus</i>	1	4.6 - 6.7	Isometric, 40 nm, not enveloped	<i>Helminthosporium victoriae virus-190S</i>
Double-stranded DNA						
Unassigned	Unassigned	<i>Rhizidiovirus</i>	1	25.5	Isometric, 60 nm, not enveloped	<i>Rhizidiomyces virus</i>

ตารางที่ 1 (ต่อ) การจัดจำแนกไมโคไวรัสที่เสนอโดย International Committee on Taxonomy of Viruses

Order	Family	Genera	Genome		Morphology	Species
			Segments	Size (kb)		
Single-stranded (+) RNA						
<i>Tymovirales</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Botrexvirus</i>	1	7	Flexuous, filamentous, 720 nm long and 12 - 13 nm in diameter, not enveloped	<i>Botrytis virus X</i>
		<i>Sclerodarnavirus</i>	1	5.5	No true particles, nucleoprotein complex, not enveloped	<i>Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus</i>
	<i>Gammaplexiviridae</i>	<i>Mycoflexivirus</i>	1	6.8	Flexuous, filamentous, 720 nm long and 12-13 nm in diameter	<i>Botrytis virus F</i>
Unassigned	<i>Barnaviridae</i>	<i>Barnavirus</i>	1	4	Bacilliform, 20 x 50 nm, not enveloped	<i>Mushroom bacilliform virus</i>
	<i>Namaviridae</i>	<i>Mitovirus</i>	1	2.5 – 2.9	No true particles, nucleoprotein complex, not enveloped	<i>Cryphonectria parasitica mitovirus 1</i>
		<i>Namavirus</i>	1	2.5 – 2.9	No true particles, nucleoprotein complex, not enveloped	<i>Saccharomyces 20S RNA namavirus</i>
Single-stranded (+) RNA (Reversed transcribing)						
Retrotransposons	<i>Pseudoviridae</i>	<i>Hemivirus</i>	1	-	Isometric to quasi-isometric, 30-40 nm, not enveloped	<i>Saccharomyces cerevisiae Ty5 virus</i>
		<i>Pseudovirus</i>	1	4.2-9.7	Isometric to quasi-isometric, 30-40 nm, not enveloped	<i>Saccharomyces cerevisiae Ty1 virus</i>
	<i>Metaviridae</i>	<i>Metavirus</i>	1	-	Ovoid, 50 nm, irregular, enveloped nucleoprotein complex	<i>Saccharomyces cerevisiae Ty3 virus</i>

## ผลของไมโคไวรัสต่อราให้อาศัย

แม้ว่าราให้อาศัยที่มีไวรัสส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการผิดปกติ (latent; cryptic infection) แต่ในไวรัสบางสายพันธุ์พบว่าการติดเชื้อไวรัสมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของราให้อาศัยในด้านต่าง ๆ เช่น

### (1) โรคไวรัสในเห็ด

การระบาดของโรคไวรัสในเห็ดมีรายงานครั้งแรกในช่วงปี ค.ศ. 1950 โดยพบการระบาดของ *La france isometric virus* (LIV) ในฟาร์มเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) ซึ่งทำให้เกิดโรค La france หรือโรค Die back มีอาการคือเส้นใยเติบโตช้า การสร้างดอกเห็ดไม่สม่ำเสมอ และรูปร่างดอกเห็ดผิดปกติ สร้างความเสียหายอย่างมากกับอุตสาหกรรมเพาะเห็ด (Buck, 1998; Goodin et al., 1992) จากนั้นจึงมีรายงานการศึกษาโรคไวรัสในเห็ดหลายชนิดต่อมา เช่น โรค *Mushroom virus X* (MVX) ที่พบในฟาร์มเห็ดกระดุมในประเทศอังกฤษ มีผลทำให้การสร้างดอกเห็ดไม่สม่ำเสมอ มีขนาดไม่เท่ากัน และอาจมีสีน้ำตาลเกิดขึ้น (Grogan, et al. 2003) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาไวรัสหลายชนิดในฟาร์มเห็ดนางรม (*Pleurotus* spp.) ของประเทศเกาหลีใต้ ซึ่งพบลักษณะอาการของโรคไวรัสที่แตกต่างกัน เช่น *Oyster mushroom speherical virus* (OMSV-1) พบในดอกเห็ดนางรมที่แสดงอาการของโรค Dieback (Yu et al., 2003) *Pleurotus ostreatus virus 1* (PoV-1) ซึ่งตรวจพบในดอกเห็ดนางรมปกติ (Lim et al., 2005) และ *Pleurotus eryngii spherical virus* (PeSV) พบในดอกเห็ดนางรมหลวงที่มีรูปร่างผิดปกติ (Ro et al., 2007)

### (2) การสร้างสารพิษในยีสต์

จากการศึกษาในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และในราเขม่า (smut) *Ustilago maydis* พบว่ามีสายพันธุ์ที่มีคิลเลอร์ ฟีนอไทป์ (Killer phenotype) ที่สามารถผลิตสารพิษออกมาทำลายเซลล์อื่นอย่างจำเพาะได้ สารพิษเหล่านี้เป็นโปรตีนของไวรัสในสกุล *Totiviridae* ซึ่งจะกระตุ้นให้ยีสต์เซลล์อื่นที่ไม่มีไวรัสเกิดกระบวนการ Apoptosis ที่นำไปสู่การตายของเซลล์ (Schmidt and Breinig, 2006)

### (3) การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการก่อโรคของราโรคพืช

จากการค้นพบผลของไวรัสที่ทำให้ราให้อาศัยมีการเติบโตลดลงและมีลักษณะผิดปกติ จึงได้มีผู้สนใจศึกษาไวรัสที่มีผลในการควบคุมเห็ดราก่อโรคพืชชนิดต่าง ๆ อย่างเช่นในรา *Cryphonectria parasitica* สาเหตุของโรคไหม้ในต้นเกาลัด (Chestnut blight) ทำให้ค้นพบ *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV-1) :ซึ่งส่งผลต่อการเติบโต การสร้างสปอร์ที่ลดลง และสามารถลดการก่อโรคของราชนิดนี้ (hypovirulence) และมีการนำมาใช้ควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิด hypovirulence โดยไวรัสในราก่อโรคพืชชนิดอื่น ๆ อีก ได้แก่ *Botrytis cinerea* (Howitt et al., 2005; Wu et al., 2007) และ *Sclerotinia sclerotiorum* (Xie et al., 2006) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า *Nectria radicumicola virus L1* ในรา *Nectria radicumicola* สาเหตุของโรครากเน่าในโสม มีผลทำให้ความสามารถในการก่อโรค (hypervirulence) การสร้างสปอร์ การผลิตเอนไซม์และการสร้างเม็ดสีของราสูงขึ้น (Ahn and Lee, 2001)

### (4) การทนต่อสภาพแวดล้อมของราแอนโดไฟต์

Marquez และคณะ (2007) ได้ศึกษาไวรัสในราแอนโดไฟต์ของหญ้า ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง ของอุทยานแห่งชาติ Yellow Stone ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า *Curvularia thermal tolerance virus* (CThTV) ซึ่งมีจีโนมเป็น dsRNA ขนาด 2.2 และ 1.8 kb ในราแอนโดไฟต์ชนิด *Curvularia protuberata* ที่พบในหญ้าพานิคเขตร้อน (*Dichanthelium lanuginosum*) มีความเกี่ยวข้องกับการทนต่ออุณหภูมิสูง (heat tolerance) ของราแอนโดไฟต์และพืชให้อาศัยของรา และได้ทำการทดลองนำราแอนโดไฟต์ที่มีไวรัสมาใช้กับต้นมะเขือเทศ ซึ่งสามารถเพิ่มการทนต่ออุณหภูมิสูงของต้นมะเขือเทศได้

## ราสกุล *Trichoderma*

ราสกุล *Trichoderma* Pers. เป็นราในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หรือ anamorph ของราสกุล *Hypocrea* Fr. (*Hypocreales*, *Hypocreaceae*) มีการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน ดังนี้ (Hibbett et al., 2007)

Kingdom: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Class: *Sordariomycetes*

Subclass: *Hypocreomycetidae*

Order: *Hypocreales*

Family: *Hypocreaceae*

Genus: *Hypocrea*

Genus: *Trichoderma*

รา *Trichoderma* สามารถพบได้ทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่น สามารถพบได้ในดิน บนเศษซากพืช ลักษณะโดยทั่วไปเส้นใยเติบโตได้รวดเร็ว ลักษณะใสไม่มีสี หรือมีสีขาวขึ้นกับอาหารที่ใช้เลี้ยง มีการสร้างสปอร์ conidia ส่วนใหญ่เป็นสีเขียวยหรือไม่มีสี บางชนิดมีสีเหลือง รูปร่างส่วนใหญ่เป็นทรงรี (ellipsoidal) หรือขอบขนาน (oblong) บางชนิดเป็นทรงกลม (globose) ผิวสปอร์เรียบ อยู่รวมกลุ่มบนปลายของเซลล์ phalide conidiophores เป็นกิ่งก้านแตกแขนง และส่วนใหญ่พบการสร้าง chlamydospore ระยะ teleomorph หรือ *Hypocrea* สามารถพบได้บนเปลือกไม้ รวมถึงบนเห็ดชนิดอื่น โดยจะสร้างกลุ่มเส้นใยหรือ stroma มีสีเหลือง แดง จนถึงน้ำตาล ภายในจะมีโครงสร้าง perithecium ซึ่งจะมี ascus จำนวนมากที่บรรจุสปอร์แบบอาศัยเพศหรือ ascospore ไว้ (Samuel, 2006; Samuel 2004; Jaklitsch, 2009)

### ความสำคัญของ *Trichoderma*

รา *Trichoderma* หลายชนิดมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะชนิดที่มีการเติบโตรวดเร็วและมีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก และทนต่ออุณหภูมิสูง เช่น *T. reesei* (*H. jecorina*) สามารถนำมาใช้ผลิตเอนไซม์ cellulase ในระดับอุตสาหกรรมมาเป็นเวลานาน และได้มีการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่สร้างเอนไซม์ กลไกการทำงาน และลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางชีววิทยาของเห็ดรา (Penttilä and Limón, 2004) มีรายงานการนำรา *T. koningii* *T. virens* และ *T. harzianum* มาใช้ในการควบคุมโรคพืชแบบชีววิธี (biological control) เนื่องจากสามารถผลิตสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ไคติเนสได้ จึงสามารถควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยหรือราสาเหตุของโรคพืชชนิดอื่น ๆ ได้ (Samuel, 2006) ในทางตรงข้าม รา *Trichoderma* บางชนิดสามารถก่อโรคราเขียวในเห็ดเศรษฐกิจได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *T. longibachiatum* สามารถเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสในสัตว์และผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องได้ ((Kuhls et al., 1999; Kredics et al., 2003)

## การศึกษาไวรัสของ *Trichoderma*

การศึกษาไมโคไวรัสใน *Trichoderma* ในปัจจุบัน มีเพียงรายงานการตรวจพบ dsRNA ใน *Trichoderma* ที่คัดแยกจากพื้นที่ต่าง ๆ เช่น ในยุโรป อเมริกาเหนือ และในประเทศไทย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ภา *Trichoderma* ที่ตรวจพบ dsRNA จากรายงานการศึกษาก่อนหน้า

	สายพันธุ์	แหล่งที่คัดแยก	จำนวน dsRNA	ขนาดโดยประมาณ (kb)	เอกสารอ้างอิง
1	<i>T. harzianum</i>	อเมริกา	1	2.7	Castle et al. (1998)
2	<i>T. koningii</i>	อเมริกา	1	2.7	
3	<i>T. harzianum</i> C8, C22	ฮังการี	2	9.4, 6.5	Antal et al. (2005)
4	<i>T. aggressivum</i> B1, B2, B7, B8	ฮังการี	2	9.4, 6.5	
5	<i>Trichoderma</i> sp. DAOM 175924	ฮังการี	1	2.4	
6	<i>T. aggressivum</i> f. sp. <i>aggressivum</i> CBS 450.95	แคนาดา	3	10.0, 4.3, 3.4	
7	<i>T. aggressivum</i> f. sp. <i>aggressivum</i> CBS 100527	อเมริกา	3	10.0, 4.3, 3.4	
8	<i>T. aggressivum</i> f. sp. <i>aggressivum</i> CBS 100528	อเมริกา	3	4.3, 3.4, 2.4	
9	<i>T. aggressivum</i> f. sp. <i>europaeum</i> CBS 433.95	ไอร์แลนด์	4	10.0, 9.4, 6.5, 3.0	
10	<i>T. aggressivum</i> f. sp. <i>europaeum</i> CBS 100526	ไอร์แลนด์	2	9.4, 6.5	
11	<i>Trichoderma</i> sp. T10	เชียงใหม่	1	1.0	Jom-in and Akarapisan (2009)
12	<i>Trichoderma</i> sp. T20	เชียงใหม่	2	1.0, 0.7	

Castle และคณะ (1998) ศึกษาพลาสมิดใน *Trichoderma* ที่แยกได้จากฟาร์มเห็ดในประเทศไทยพบพลาสมิดที่เป็น dsRNA จำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 2.7 kb ในรา *T. harzianum* 32 ไอโซเลต และ *T. koningii* 1 ไอโซเลต

Antal และคณะ (2005) ตรวจสอบ dsRNA ใน *Trichoderma* ที่คัดแยกจากบริเวณฟาร์มเห็ดในประเทศฮังการี จำนวน 7 ไอโซเลต และสายพันธุ์จากศูนย์เก็บรักษาพันธุ์เห็ดรา Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, The Netherlands) ซึ่งมีที่มาจากทั้งทวีปอเมริกาเหนือและยุโรป 5 สายพันธุ์ พบแถบ dsRNA จำนวน 1 – 4 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 2.4 จนถึง 10 กิโลเบส

สำหรับในประเทศไทย Jom-in และ Akarapisan (2009) ตรวจสอบ dsRNA ใน *Trichoderma* ที่คัดแยกจากวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ด ดินจากพื้นที่เกษตร และสารชีวภัณฑ์จากพื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 156 ไอโซเลต พบ dsRNA ใน *Trichoderma* spp. 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต T10 พบ dsRNA จำนวน 1 แถบ ขนาด 1.0 กิโลเบส และไอโซเลต T20 พบ dsRNA จำนวน 2 แถบ ขนาด 0.7 และ 1.0 กิโลเบส โดยว่าไอโซเลตที่พบ dsRNA มีอัตราการเจริญ การสร้างสปอร์ และความสามารถในการทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืช *Sclerotium rolfsii* น้อยกว่าไอโซเลตที่ไม่มี dsRNA

อย่างไรก็ดี จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา ยังไม่มีถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ ตลอดจนความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างไวรัสใน *Trichoderma* เหล่านี้กับไมโคไวรัสอื่น ๆ ที่มีรายงานไว้ อีกทั้งการแพร่กระจาย และอัตราการถ่ายทอดของไวรัสก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท / ประเทศ
1. กล้องจุลทรรศน์รุ่น BX-51	Olympus / Japan
2. กล้องจุลทรรศน์รุ่น CH30RF200	Olympus / Japan
3. เครื่องเขย่ารุ่น SPL15-UPF55	Labcon / South Africa
4. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิรุ่น VS-8480 SFN	Vision Scientific / Korea
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งรุ่น BL610	Sartorius/ Germany
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น TC-205	Denver Instrument Company / USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็กรุ่น Spectrafuge 16M	Labnet International / USA
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนขนาดเล็ก รุ่น Denville™ 260D	Denville Scientific / USA
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนรุ่น Rotofix32	Hettich / Germany
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R	Hettich / Germany
11. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น PP-50	Sartorius / Germany
12. เครื่อง Dry Box รุ่น DB-101	HL instruments
13. เครื่อง Gel Documentation	Bio-Rad / USA
14. เครื่อง MicroplateReader รุ่น Opsy MR™	Dynex Technologies /USA
15. เครื่อง Power Supply รุ่น PAC1000	Bio-Rad / USA
16. เครื่อง Programmable Thermal Controller รุ่น PTC-100®	MJ Research / USA
17. เครื่อง Speed vacuum รุ่น DNA 110 SpeedVac	ThermoSavant / USA
18. เครื่อง Vortex รุ่น Genie 2	Scientific Industries / USA
19. ชุด Electrophoresis รุ่น Mini-protein® 3 cell	Bio-Rad / USA
20. ตู้เขี่ยเชื้อ Laminar flow รุ่น BV123	ISSOC / Thailand
21. ตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิ	Binder / Germany
22. ตู้อบลมร้อน	Memmert / Germany
23. ปีมัสสุญญากาศรุ่น 0523-101Q-G588DX	GAST Manufacturing / USA

<b>อุปกรณ์</b>	<b>บริษัท / ประเทศ</b>
24. หม้อนิ่งแรงดันไอน้ำ	Ta Chang Medical Instrument Factory / Taiwan
25. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าร่วน Clifton	Bennett Scientific / UK
26. อุปกรณ์นับเซลล์ Counting Chamber	Brand / Germany

### 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

#### 3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

<b>1. Agar</b>	<b>บริษัท / ประเทศ</b>
2. $\alpha$ -Cellulose	พัฒนสินเอนเตอร์ไพรส์/ ไทย
3. Ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sigma / USA
4. Calcium hydrogen phosphate dihydrate $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Scharlau / Spain
5. Carboxymethyl Cellulose (CMC)	Scharlau / Spain
6. Chloramphenicol	Sigma / USA
7. Cobalt chloride heptahydrate $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Olan-kemed / Thailand
8. Corn meal agar (CMA)	M&B / England
9. Corn steep liquor	HiMedia/ India
10. Dextrose (Glucose)	Sigma / USA
11. Ferrous sulfate heptahydrate $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma / USA
12. Manganese sulfate heptahydrate $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	M&B / England
13. Magnesium sulphateheptahydrate $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck / Germany
14. Potassium chloride KCl	Ajax Finechem / AUS
15. Potassium dihydrogen phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Ajax Finechem / AUS
16. Potassium nitrate $\text{KNO}_3$	Merck / Germany
17. Potato dextrose broth (PDB)	Merck / Germany
18. Rose Bengal	HiMedia/ India
	Fisher Scientific / USA

**อาหารเลี้ยงเชื้อ**

19. Sucrose		บริษัท / ประเทศ
20. Tryptone		Ajax Finechem / AUS
21. Tween 80		HiMedia/ India
22. Yeast extract		Ajax Finechem / AUS
23. Zinc sulfate	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	HiMedia/ India
		M&B / England

**3.2.2 เอนไซม์**

1. <i>Taq</i> DNA Polymerase		บริษัท / ประเทศ
2. DNA polymerase I, <i>E. coli</i>		RBC Bioscience / Taiwan
3. Reverse transcriptase (SuperScript™ III)		Vivantis / Malaysia
4. <i>Eco</i> RI		Invitrogen / USA
5. <i>Hind</i> III		Invitrogen / USA
6. DNase I (RNase-free)		Fermentas / USA
7. RNase A		NEB / USA
8. RNase H (Cloned)		US Biologicals / USA
9. RNase inhibitor (RNaseOUT)		Takara Bio / Japan
10. S1 Nuclease		Invitrogen / USA
		Fermentas / USA

**3.2.3 DNA marker และไพรเมอร์**

1. 1 kb DNA Ladder		บริษัท / ประเทศ
2. ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')		Vivantis / Malaysia
3. ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')		Vivantis / Malaysia
4. Lambda DNA		Vivantis / Malaysia
5. Random hexamer		Fermentas / USA
		Fermentas / USA

**3.2.4 สารเคมี**

1. N-acetyl-D-glucosamine (NAG)		บริษัท / ประเทศ
2. Acrylamide		Fluka / Switzerland
3. Agarose		Merck / Germany
4. Ammonium persulfate (APS)		Vivantis / Malaysia
		Serva / Germany

สารเคมี		บริษัท / ประเทศ
5. Ammonium molybdate	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	Ajax finechem / AUS
6. Ampicillin sodium salt		โมเดิร์นแมนยู / ไทย
7. Bentonite		Riedel-de Haën / Germany
8. $\beta$ -mercaptoethanol		Merck / Germany
9. bis-Acrylamide		Merck / Germany
10. Boric acid		Fisher Scientific / USA
11. Bovine serum albumin (BSA)		Sigma / USA
12. Bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside (X-gal)		BioBasic / USA
13. Bromophenol Blue (BPB)		Ajax finechem / AUS
14. Calcium chloride dihydrate	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Scharlau / Spain
15. Calcium carbonate	$\text{CaCO}_3$	APS / AUS
16. Chloroform		Fisher scientific / USA
17. Coomessie Brilliant Blue G-250		Bio-rad / USA
18. Copper sulfate	$\text{CuSO}_4$	Carlo Erba Reagent / Italy
19. N.N-Dimethylformamide (DMF)		Fluka / Switzerland
20. Dimethyl sulfoxide (DMSO)		Riedel-de Haën / Germany
21. DNA purification Kit (Ultraclean® 15 DNA)		Mo Bio / USA
22. dNTPs		Fermentas / USA
23. Dithiothreitol (DTT)		Invitrogen / USA
24. Ethanol (95%)		องค์การสุรา กรมสรรพสามิต / ไทย
25. Ethanol (absolute)		Merck / Germany
26. Ethidium bromide		Fisher Scientific / USA
27. Fibrous cellulose powder (CF11)		Whatman / USA
28. Glacial acetic acid		Merck / Germany
29. Glycerol		Ajax Chemical / AUS
30. Glycine		Ajax Finechem / AUS
31. Hydrochloric acid (37%)	HCl	Scharlau / Spain
32. Isoamyl alcohol		Ajax Finechem / AUS
33. Isopropanol		Merck / Germany

สารเคมี		บริษัท / ประเทศ
34.	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	BioBasic / USA
35.	Lactophenol Blue	Fluka / Switzerland
36.	pGEM-T Easy Vector System	Promega / USA
37.	Phenol	Merck / Germany
38.	Phosphoric acid (85%)	Carlo Erba Reagent / Italy
39.	Potassium sodium tartrate tetrahydrate	$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Ajax Finechem / AUS
40.	Sodium acetate	Scharlau / Spain
41.	Sodium hydrogen arsenate heptahydrate	$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Fluka / Switzerland
42.	Sodium carbonate	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ Ajax Finechem / AUS
43.	Sodium chloride	$\text{NaCl}$ Merck / Germany
44.	Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Vivantis / Malaysia
45.	Sodium hydrogen carbonate	$\text{NaHCO}_3$ Fisher scientific / USA
46.	Sodium hydroxide	$\text{NaOH}$ Ajax Finechem / AUS
47.	Sodium sulfate	$\text{Na}_2\text{SO}_4$ Merck / Germany
48.	Sulfuric acid	$\text{H}_2\text{SO}_4$ Merck / Germany
49.	Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Fluka / Switzerland
50.	Tris Base	Vivantis / Malaysia

### 3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 1. การคัดแยกรา *Trichoderma*

##### 1.1 การคัดแยกรา *Trichoderma*

เก็บตัวอย่างดิน กิ่งไม้และเห็ดหึ่งจากจังหวัดในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย นำตัวอย่างดิน 1 g ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 mL เจือจางในอัตรา  $10^{-3}$  และ  $10^{-4}$  เท่า จากนั้นเกลี่ยตัวอย่าง 100  $\mu$ L ลงบนจานอาหารกึ่งแข็ง potato dextrose agar (PDA) ที่มีน้ำตาล dextrose 0.5 % (w/v) และ chloramphenicol 10 mg/mL (P0.5DA+c) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างกิ่งไม้และเห็ดหึ่งจะถูกตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก นำมาวางบนจานอาหาร P0.5DA+c บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยของราเติบโต ทำการถ่ายเส้นใยบนจานอาหาร P0.5DA จนได้เส้นใยบริสุทธิ์

##### 1.2 การคัดเลือกรา *Trichoderma*

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราแต่ละไอโซเลตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกรามีลักษณะคล้ายรา *Trichoderma* เก็บรักษาเส้นใยบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 4 °C และเก็บ spore suspension ใน 1 % (v/v) Tween 80, 20 % (v/v) glycerol ที่อุณหภูมิ -20 °C (ภาคผนวก ค 1)

#### 2. การตรวจสอบ dsRNA

2.1 การสกัด dsRNA (ดัดแปลงจากวิธีของ B. I. Hillman, Rutgers University, Personal communication)

##### 2.1.1 การสกัดกรดนิวคลีอิก

เลี้ยงเส้นใยหรือ spore suspension ในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 25 ml บ่มในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน แยกเส้นใยราด้วยการกรองสุญญากาศ จากนั้นบดเส้นใยน้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 g ร่วมกับไนโตรเจนเหลวในโถงเติม Extraction buffer (2x STE buffer, 0.02 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mg/mL bentonite, 2 % (w/v) SDS) 2 mL ผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายที่ได้ 750  $\mu$ L ลงในหลอด centrifuge ขนาด 1.5 mL ทำการสกัดด้วย phenol-chloroform โดยเติม phenol 375  $\mu$ L นำไป

เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 375  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ 6,000 rpm 10 นาที เก็บส่วนใสในหลอดใหม่

### 2.1.2 การแยก dsRNA

แยก dsRNA จากสารสกัดจากข้อ 2.1.1 ด้วยวิธี cellulose column chromatography โดยผสม 95 % ethanol ลงในสารสกัดให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 17 % (v/v) ทำการเตรียมคอลัมน์โดยใช้กระบอกฉีดยาปลอดเชื้อขนาด 3 mL รองปากกระบอกด้วยชั้นผ้าวีรานะปลอดเชื้อ ชั่งผง cellulose (CF11) 0.2 mg ในหลอด vial ปลอดเชื้อ เติม Wash buffer (17% (v/v) ethanol ใน 1x STE buffer) ปริมาตรประมาณ 2 เท่า ผสมให้เข้ากัน ปิเปตลงในคอลัมน์ สารละลายจะค่อย ๆ ไหลออกและ cellulose จะนอนตัวที่ก้นคอลัมน์ จากนั้นปิเปต Wash buffer 2 mL ลงในคอลัมน์ก่อนจะปิเปตสารสกัดที่เตรียมไว้ตามลงไป เมื่อสารละลายหยุดไหล ค่อย ๆ เติม Wash buffer 2 mL ลงในคอลัมน์ ระวังอย่าให้ผิวหน้าของ cellulose ฟุ้ง ทำซ้ำ 5-6 รอบ ปล่อยให้ Wash buffer ไหลออกเกือบหมด เติม Elution buffer (1x STE buffer) 1 mL เพื่อชะ dsRNA ออกจาก cellulose เก็บ Elution buffer ที่ไหลออกมาหลังจาก 5 หยดแรกจนได้ปริมาตรประมาณ 750  $\mu$ L ลงในหลอด 1.5 mL เติม 3M sodium acetate (NaOAc, pH 5.2) 100  $\mu$ L และ isopropanol 750  $\mu$ L เก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$  อย่างน้อย 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 14,000 rpm 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและทิ้งตะกอนให้แห้งจากนั้นละลายตะกอนด้วย 1xSTE buffer 50  $\mu$ L ทำการตรวจสอบแถบ dsRNA บน 1 % agarose gel

### 2.1.3 การทดสอบการย่อยของ dsRNA

ตรวจสอบ dsRNA โดยการย่อยด้วย nucleases (DNase I RNase A และ S1 nuclease) โดยแบ่งตัวอย่างที่สกัดได้ใสในหลอดขนาด 1.5 mL จำนวน 2 หลอด ตกตะกอนด้วย ethanol จากนั้นละลายตะกอน dsRNA ด้วย 0.1x SSC buffer (15 mM NaCl, 1.5 mM sodium citrate) และ 2x SSC buffer (300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate) ปริมาตร 30  $\mu$ L ในแต่ละหลอด แบ่งตัวอย่างจากแต่ละหลอด 5  $\mu$ L ลงในหลอดใหม่ 3 หลอด ทำปฏิกิริยาการย่อยในแต่ละหลอดตามวิธีของผู้ผลิตเอนไซม์ ได้แก่ หลอดที่ 1 ย่อยด้วย DNase I (NEB, New England Biolabs) 0.1 U (0.014U/ $\mu$ L) ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  30 นาที หลอดที่ 2 ย่อยด้วย RNase A (US Biologicals) 0.03 U (0.005U/ $\mu$ L) ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และหลอดที่ 3 ย่อยด้วย S1 nuclease (Fermentas) 0.1 U (0.014U/ $\mu$ L) ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  30 นาที ตรวจสอบผลบน 8 % SDS-PAGE

## 2.1.4 การตรวจสอบจำนวนและขนาดของ dsRNA

ทำการตรวจสอบจำนวนของ dsRNA บน 8 % SDS-PAGE ใน 1x Tris-glycine buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 3.30 ชั่วโมง และคำนวณขนาดโดยประมาณของ dsRNA จากการเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของ DNA marker บน 1.6 % agarose gel (Livshits et al., 1990) ใน 0.5x TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 40 นาที

## 2.2 การจำแนกชนิดของรา *Trichoderma* ที่พบ dsRNA

### 2.2.1 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

#### 2.2.1.1 การสกัด DNA

ใช้วิธีการสกัดเดียวกับในข้อ 2.1.1 ย่อยสารสกัดที่ได้ 50  $\mu$ L ด้วย RNase A (10 mg/ml) 2  $\mu$ L จากนั้นสกัดซ้ำด้วย phenol-chloroform ก่อนตกตะกอนด้วย ethanol คำนวณความเข้มข้นโดยประมาณจากความเข้มของแถบบน agarose gel และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 5-10 ng/ $\mu$ L เพื่อใช้เป็น DNA template ต่อไป

#### 2.3.1.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

ทำปฏิกิริยา PCR เพิ่มจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White, et al., 1990) เตรียมปฏิกิริยา 50  $\mu$ L โดยใช้ 10x PCR buffer 5  $\mu$ L dNTPs (2.5 mM) 4  $\mu$ L ITS5 (5  $\mu$ M) 2.5  $\mu$ L ITS4 (5  $\mu$ M) 2.5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 3  $\mu$ L Taq DNA polymerase 1  $\mu$ L DNA Template 5  $\mu$ L และ deionized water 26  $\mu$ L กำหนดสภาวะของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Programmable Thermal Controller โดยใช้อุณหภูมิ (1) 94 °C 3 นาที (2) 94 °C 1 นาที 55°C 1 นาที 72 °C 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) 72 °C 10 นาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ultraclean® 15 DNA Purification Kit (MO Bio) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI's 3730XL DNA Analyzers (AITbiotech, Singapore)



### 2.3.2 การศึกษาการเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงเส้นใยของราบนานอาหาร PDA และ synthetic low-nutrient agar (SNA) ที่อุณหภูมิ 15 20 25 30 และ 35 °C วัดการเติบโตจากรัศมีของโคโลนีในวันที่ 3 จากนั้นทำการบันทึกลักษณะของโคโลนีหลังวันที่ 7 และบันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

## 3. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA

### 3.1 การทำ cDNA cloning

#### 3.1.1 การแยก dsRNA สายเดี่ยว (ดัดแปลงจาก Hillman et al. (1992))

คัดเลือก dsRNA จากรา *Trichoderma* ที่ได้ในข้อ 2 มา 1 ไอโซเลต แล้วแยก dsRNA ขึ้นด้วย cellulose column chromatography 2 รอบ ตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ dsRNA บน 1.5 % agarose gel แบ่งตัวอย่าง dsRNA ประมาณ 4 µg นำไปตกตะกอนด้วย NaOAc ปริมาตร 0.1 เท่าและ ethanol ปริมาตร 2 เท่า ละลายตะกอนด้วย DMSO 9 µL บีบสารละลายลงในหลอดขนาด 0.2 mL และเติม RNaseOUT™ 1 µL (ความเข้มข้นตัวอย่าง ~0.4 µg/µL ใน 90% (v/v) DMSO) และบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที บีบแบ่งตัวอย่าง 5 µL ลงในหลอดใหม่เติม random hexamer (0.2 mg/µL) 2 µL และ deionized water ปลอดเชื้อ 5 µL แช่ในน้ำแข็ง 2 นาที ก่อนนำไปสังเคราะห์ first strand cDNA

#### 3.1.2 การสร้าง first strand cDNA (วิธีของ reverse transcriptase (Superscript III Invitrogen))

เตรียมสารเคมีในหลอดขนาด 0.2 mL โดยใช้ 5x First Strand buffer 4µL, 0.1M DTT 1 µL, dNTPs (2.5mM) 7 µL และตัวอย่าง RNA จากข้อ 3.1.1 12 µL จากนั้นเติม reverse transcriptase (Superscript III, Invitrogen) 1 µL บ่มที่อุณหภูมิ (1) 25 °C 5 นาที (2) 50 °C 60 นาที และ (3) 70 °C 15 นาที ตามลำดับ

### 3.1.3 การสร้าง second strand cDNA (วิธีของ DNA polymerase I (Fermentus))

เตรียมสารเคมีในหลอดขนาด 0.2 mL โดยใช้ 10x Reaction buffer for DNA pol I 8  $\mu$ L, RNase H (2 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, DNA pol I 3  $\mu$ L และ deionized water 88.5  $\mu$ L จากนั้นเติมตัวอย่างจากข้อ 3.1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 15 °C 120 นาทีแล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย DNA Purification kit เก็บ cDNA ใน TE buffer 10  $\mu$ L

### 3.1.4 การเติมปลาย A-tail (วิธีของ pGem T-Easy Vector (Promega))

เตรียมสารเคมีในหลอดขนาด 0.2 mL โดยใช้ 10x *Taq* pol buffer + MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mM) 5  $\mu$ L, *Taq* DNA pol 2  $\mu$ L จากนั้นเติม purified cDNA จากข้อ 3.1.3 บ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 30 นาทีและทำให้บริสุทธิ์ด้วย DNA Purification kit เก็บ cDNA ใน TE buffer 10  $\mu$ L

### 3.1.5 การต่อ cDNA กับพลาสมิด (วิธีของ pGem T-Easy vector (Promega))

เตรียมสารเคมีในหลอดขนาด 0.2 mL โดยใช้ 2x ligation buffer 5  $\mu$ L, pGem T-Easy Vector 1  $\mu$ L cDNA จากข้อ 3.1.4 5  $\mu$ L จากนั้นเติม T4 Ligase 1  $\mu$ L บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

### 3.1.6 การทำ transformation (ดัดแปลงจาก Sambrook et al. (1989))

เตรียม competent cell ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  (ภาคผนวก ค 3) โดยละลาย competent cell suspension 100  $\mu$ L บนน้ำแข็ง แล้วเติมพลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.1.5 5  $\mu$ L แช่ในน้ำแข็งต่อไปเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °C 90 วินาที นำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาทีเติมอาหารเหลว Lysogeny broth (LB) 400  $\mu$ L กลับหลอดเบา ๆ บ่มหลอดในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ระหว่างนั้นเตรียมจานอาหาร LA ที่มี ampicillin 100  $\mu$ g/mL เกลี้ย Xgal (20 mg/mL) 40  $\mu$ L และ IPTG (200 mg/mL) 4  $\mu$ L ให้ทั่วผิวหน้าแล้วทิ้งไว้จนแห้ง นำหลอด competent cell suspension ที่บ่มไว้มาปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 6,000 rpm 3 นาที ปิเปิดส่วนใส่ทิ้ง และเติม LB 450  $\mu$ L ปิเปิดเซลล์ 100  $\mu$ L ลงบนจานอาหาร LA ที่เตรียมไว้ เกลี้ยเซลล์ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง ตรวจสอบผลของ blue-white colony

### 3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA

ทำการสกัด recombinant plasmid โดยวิธี Miniprep Alkali Lysis method (Sambrook et al., 1989) (ภาคผนวก ค 4) นำพลาสมิดที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย DNA Purification Kit แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI's 3730XL DNA Analyzers (AITbiotech, Singapore)

## 4. การศึกษาผลของ dsRNA ที่มีต่อราให้อาศัย

### 4.1 การขจัด dsRNA

เตรียม spore suspension จาก *Trichoderma* ที่ตรวจพบ dsRNA ในข้อ 3.1 จำนวน 1 ไชเล็ต (ภาคผนวก ค 1) โดยเก็บสปอร์จากโคโลนีที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนสปอร์ที่ได้ด้วย counting chamber (ภาคผนวก ค 2) จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 เซลล์ต่อ 1 mL ปิเปตสปอร์ปริมาตร 50  $\mu$ L ลงบนจานอาหาร P0.5DA เกลี่ยให้ทั่ว เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน คัดแยกโคโลนีที่เติบโตจากเซลล์เดี่ยว (single cell colony) จำนวน 20 โคโลนีเพื่อตรวจสอบ dsRNA ในแต่ละโคโลนีตามวิธีในข้อ 2.1

### 4.2 การเปรียบเทียบการเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

คัดเลือกโคโลนีที่มีและไม่มี dsRNA จากข้อ 4.1 กลุ่มละ 3 โคโลนี เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอัตราการเติบโตที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเลี้ยงเส้นใยบนจานอาหาร CMD และ SNA บ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 15 30 และ 40 °C และเก็บผลเป็นเวลา 7 วัน โดยวัดการเติบโตจากรัศมีของโคโลนีในวันที่ 3 และเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีในวันที่ 7

### 4.3 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ endoglucanase

เลี้ยงเส้นใยของโคโลนีจากข้อ 4.2 ในอาหารสูตร Production Medium ที่มี 3% (w/v)  $\alpha$ -cellulose (Punnapayak and Emert, 1986) สำหรับการผลิต endoglucanase โดยเติมอาหารปริมาตร 100 mL ในฟลาสก์ขนาด 150 mL บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 5 วัน กรองส่วนใสนำมาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ endoglucanase ตามวิธีของ Ghose (1985) โดยวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952; Nelson,

1944) (ภาคผนวก ค 5) และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) (ภาคผนวก ค 6)  
วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 1. การคัดแยกรา *Trichoderma*

จากราทั้งหมดที่เติบโตบนอาหาร P0.5DA+c คัดเลือกไอโซเลตของรา *Trichoderma* จากลักษณะของโครงสร้าง conidiophore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสามารถคัดแยกรา *Trichoderma* จากตัวอย่างดิน กิ่งไม้ และเห็ดหึ่งที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ ใน 13 จังหวัด ได้จำนวนทั้งสิ้น 96 ไอโซเลต (ตารางที่ 3) ได้แก่ กรุงเทพฯ (3 ไอโซเลต) ชลบุรี (25 ไอโซเลต) เชียงใหม่ (4 ไอโซเลต) ชุมพร (1 ไอโซเลต) จันทบุรี (2 ไอโซเลต) กาญจนบุรี (1 ไอโซเลต) น่าน (11 ไอโซเลต) เพชรบูรณ์ (5 ไอโซเลต) พิษณุโลก (11 ไอโซเลต) ปัตตานี (12 ไอโซเลต) ร้อยเอ็ด (3 ไอโซเลต) ระยอง (6 ไอโซเลต) และอุบลราชธานี (12 ไอโซเลต) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงบริเวณที่เก็บตัวอย่างเพื่อคัดแยกรา *Trichoderma* (จุดแสดงจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง)

ตารางที่ 3 ไอโซเลตของรา *Trichoderma* ทั้งหมดที่คัดแยกได้

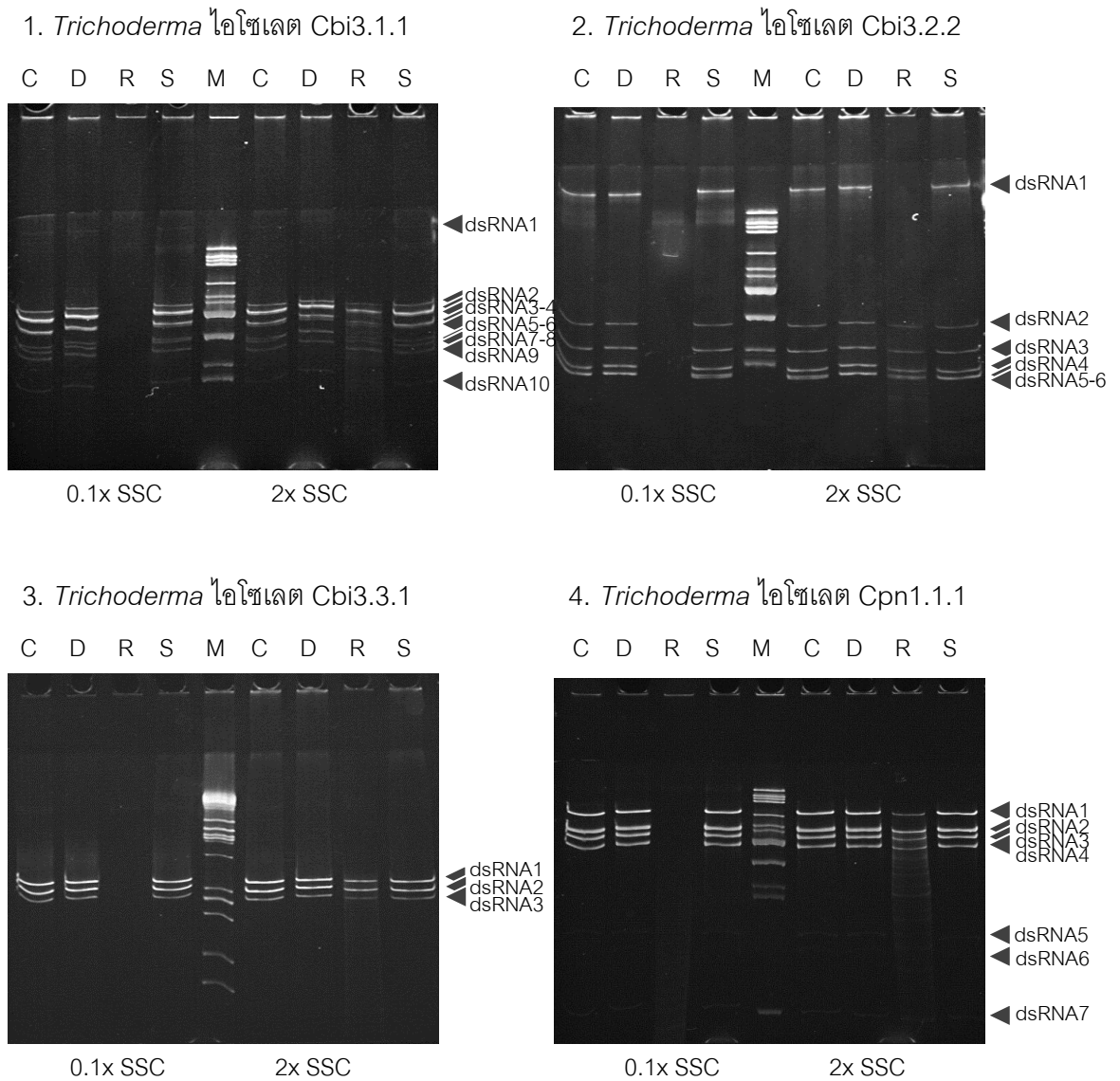
ไอโซเลต	ตัวอย่างและแหล่งที่มา	ไอโซเลต	ตัวอย่างและแหล่งที่มา
1. Bkk1.1.1	ดิน บางรัก จ.กรุงเทพฯ	32. Cmi2.1.3	ดิน บ้านโป่ง จ.เชียงใหม่
2. Bkk1.1.2	ดิน บางรัก จ.กรุงเทพฯ	33. Cmi2.1.4	ดิน บ้านโป่ง จ.เชียงใหม่
3. Bkk2.1.1	ดิน อ่อนนุช จ.กรุงเทพฯ	34. Cpn1.1.1	ดิน จ.ชุมพร
4. Cbi2.1.1	ดิน เขาเขียว จ. ชลบุรี	35. Cti1.1.1	ดิน จ.จันทบุรี
5. Cbi2.1.2	ดิน เขาเขียว จ. ชลบุรี	36. Cti1.1.2	ดิน จ.จันทบุรี
6. Cbi2.1.3	ดิน เขาเขียว จ. ชลบุรี	37. Kri3.1.1	กิ่งไม้ จ.กาญจนบุรี
7. Cbi2.1.4	ดิน เขาเขียว จ. ชลบุรี	38. Nan1.2.1	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
8. Cbi2.2.1	กิ่งไม้ เขาเขียว จ. ชลบุรี	39. Nan1.2.2	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
9. Cbi2.2.2	กิ่งไม้ เขาเขียว จ. ชลบุรี	40. Nan1.2.3	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
10. Cbi2.2.3	กิ่งไม้ เขาเขียว จ. ชลบุรี	41. Nan1.2.4	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
11. Cbi2.2.4	กิ่งไม้ เขาเขียว จ. ชลบุรี	42. Nan1.2.5	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
12. Cbi2.3.1	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	43. Nan1.2.6	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
13. Cbi2.3.2	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	44. Nan1.2.7	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
14. Cbi2.3.3	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	45. Nan1.2.8	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
15. Cbi2.3.4	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	46. Nan1.2.9	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
16. Cbi2.3.5	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	47. Nan1.2.10	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
17. Cbi2.3.6	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	48. Nan1.2.11	ดิน ดอยภูคา จ.น่าน
18. Cbi2.3.7	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	49. Pbn1.1.3	ดิน หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
19. Cbi2.3.8	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	50. Pbn1.1.4	ดิน หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
20. Cbi2.3.9	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	51. Pbn1.1.5	ดิน หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
21. Cbi3.1.1	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	52. Pbn1.1.6	ดิน หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
22. Cbi3.1.2	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	53. Pbn1.1.7	ดิน หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
23. Cbi3.2.1	กิ่งไม้ เขาเขียว จ. ชลบุรี	54. Plk1.1.2	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก
24. Cbi3.2.2	กิ่งไม้ เขาเขียว จ. ชลบุรี	55. Plk1.1.3	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก
25. Cbi3.3.1	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	56. Plk1.1.4	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก
26. Cbi3.3.2	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	57. Plk1.1.5	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก
27. Cbi3.3.3	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	58. Plk1.1.6	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก
28. Cbi3.3.4	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	59. Plk1.1.7	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก
29. Cbi3.3.5	เห็ดหิ่ง เขาเขียว จ. ชลบุรี	60. Plk1.1.8	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก
30. Cmi2.1.1	ดิน บ้านโป่ง จ.เชียงใหม่	61. Plk1.1.9	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก
31. Cmi2.1.2	ดิน บ้านโป่ง จ.เชียงใหม่	62. Plk1.1.10	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก

ตารางที่ 3 (ต่อ) ไอโซเลตของรา *Trichoderma* ทั้งหมดที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ตัวอย่างและแหล่งที่มา	ไอโซเลต	ตัวอย่างและแหล่งที่มา
63. Plk1.1.12	ดิน วังทอง จ.พิษณุโลก	80. Ryg1.1.2	ดิน จ.ระยอง
64. Ptn1.1.1	ดิน จ.ปัตตานี	81. Ryg1.1.3	ดิน จ.ระยอง
65. Ptn1.1.2	ดิน จ.ปัตตานี	82. Ryg1.1.4	ดิน จ.ระยอง
66. Ptn1.1.3	ดิน จ.ปัตตานี	83. Ryg1.1.5	ดิน จ.ระยอง
67. Ptn1.1.4	ดิน จ.ปัตตานี	84. Ryg1.1.6	ดิน จ.ระยอง
68. Ptn1.1.5	ดิน จ.ปัตตานี	85. Ubn1.1.1	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
69. Ptn1.1.6	ดิน จ.ปัตตานี	86. Ubn1.1.2	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
70. Ptn1.2.1	ดิน จ.ปัตตานี	87. Ubn1.1.3	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
71. Ptn1.2.2	ดิน จ.ปัตตานี	88. Ubn1.1.4	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
72. Ptn1.2.3	ดิน จ.ปัตตานี	89. Ubn1.1.5	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
73. Ptn1.2.4	ดิน จ.ปัตตานี	90. Ubn1.1.6	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
74. Ptn1.2.5	ดิน จ.ปัตตานี	91. Ubn1.1.7	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
75. Ptn1.2.6	ดิน จ.ปัตตานี	92. Ubn1.1.8	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
76. Ret1.1.1	เห็ดหึ่ง จ. ร้อยเอ็ด	93. Ubn1.1.9	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
77. Ret1.1.2	เห็ดหึ่ง จ. ร้อยเอ็ด	94. Ubn1.1.10	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
78. Ret1.1.3	เห็ดหึ่ง จ. ร้อยเอ็ด	95. Ubn1.1.11	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี
79. Ryg1.1.1	ดิน จ.ระยอง	96. Ubn1.1.12	ดิน เมือง จ.อุบลราชธานี

## 2. การตรวจสอบ dsRNA

จากการตรวจสอบ dsRNA ในทุกไอโซเลตของรา *Trichoderma* ที่คัดแยกได้ พบแถบ dsRNA ใน 7 ไอโซเลต จาก 5 จังหวัด ได้แก่ ไอโซเลต Cbi3.1.1 Cbi3.2.2 Cbi3.3.1 Cpn1.1.1 Pbn1.1.5 Plk1.1.9 และ Ubn1.1.3 จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาทดสอบการย่อยด้วย nuclease พบว่าแถบ dsRNA ที่พบจากตัวอย่างทั้ง 7 ไอโซเลต ไม่ถูกย่อยโดย DNase I และ S1 nuclease ในขณะที่ RNase A สามารถย่อยแถบ dsRNA ได้ใน 0.1x SSC buffer แต่ย่อยไม่ได้หรือย่อยได้น้อยใน 2x SSC buffer ซึ่งเป็นการยืนยันว่าแถบที่ตรวจพบทั้งหมดเป็น dsRNA (ภาพที่ 2)

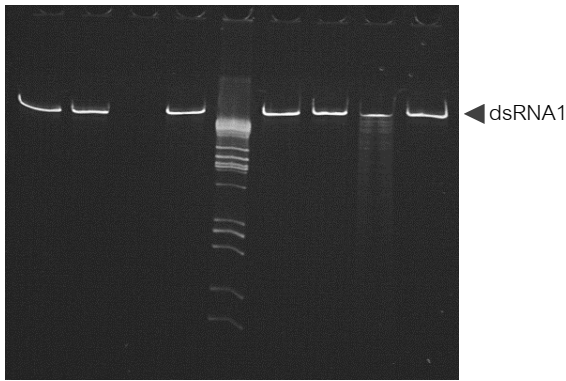


ภาพที่ 2 ผลการย่อย dsRNA ด้วย nuclease ใน 0.1x SSC buffer และ 2x SSC buffer เลน M: DNA marker เลน C: ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อย เลน D: ตัวอย่างที่ย่อยด้วย DNase I เลน R: ตัวอย่างที่ย่อยด้วย RNase A และเลน S: ตัวอย่างที่ย่อยด้วย S1 nuclease ของ (1) *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi3.1.1 (2) *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi3.2.2 (3) *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi3.3.1 และ (4) *Trichoderma* ไฮโซเลต Cpn1.1.1 โดย dsRNA ถูกแยกบน 8% SDS-PAGE ใน 1x Tris-glycine buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 3.30 ชั่วโมง



5. *Trichoderma* ไอโซเลต Pbn1.1.5

C D R S M C D R S

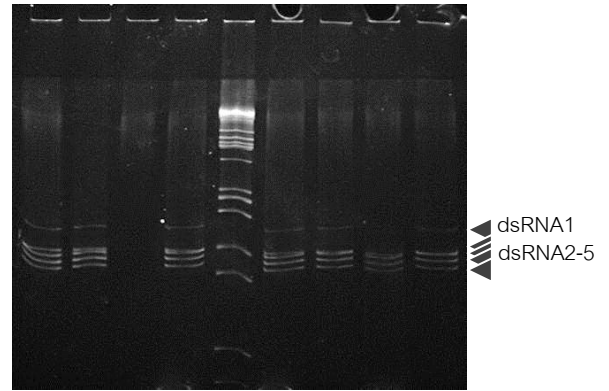


0.1x SSC

2x SSC

6. *Trichoderma* ไอโซเลต PIk1.1.9

C D R S M C D R S

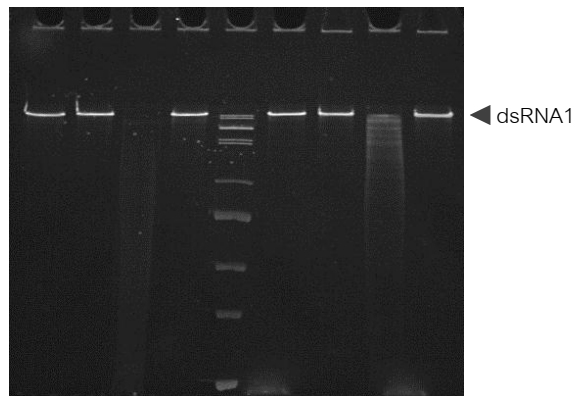


0.1x SSC

2x SSC

7. *Trichoderma* ไอโซเลต Ubn1.1.3

C D R S M C D R S

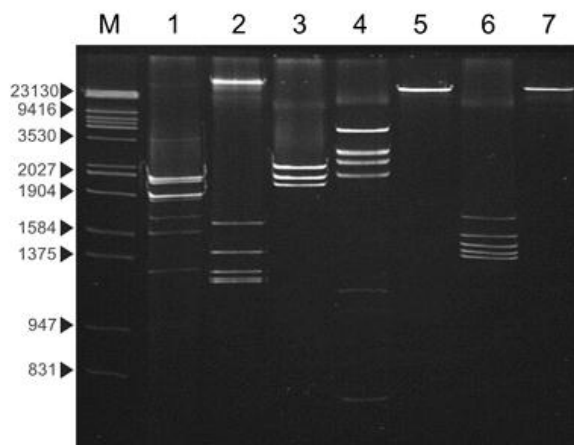


0.1x SSC

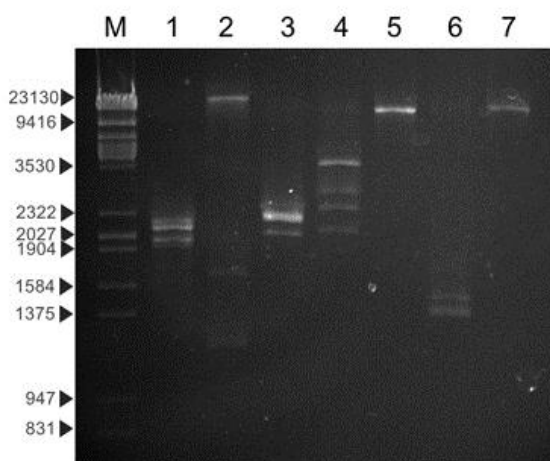
2x SSC

ภาพที่ 2 (ต่อ) ผลการย่อย dsRNA ด้วย nuclease ใน 0.1x SSC buffer และ 2x SSC buffer เลน M: DNA marker เลน C: ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อย เลน D: ตัวอย่างที่ย่อยด้วย DNase I เลน R: ตัวอย่างที่ย่อยด้วย RNase A และเลน S: ตัวอย่างที่ย่อยด้วย S1 nuclease ของ (5) *Trichoderma* ไอโซเลต Pbn1.1.5 (6) *Trichoderma* ไอโซเลต PIk1.1.9 และ (7) *Trichoderma* ไอโซเลต Ubn1.1.3 โดย dsRNA ถูกแยกบน 8% SDS-PAGE ใน 1x Tris-glycine buffer ใช้ กระแสไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลา 3.30 ชั่วโมง

เมื่อตรวจสอบจำนวนแถบ dsRNA ทั้งหมดด้วยการแยกบน 8% SDS-PAGE (ภาพที่ 3; ตารางที่ 4) พบจำนวนของ dsRNA ตั้งแต่ 1 – 10 แถบ ขณะที่การตรวจสอบขนาดโดยประมาณของแถบ dsRNA ที่พบด้วยการแยกตัวอย่าง dsRNA บน 1.6% agarose gel (ภาพที่ 4; ตารางที่ 4) พบจำนวนแถบของ dsRNA ตั้งแต่ 1 – 4 แถบ โดยมีขนาดโดยประมาณตั้งแต่ 1.24 kb จนถึง 22.9 kb



ภาพที่ 3 แถบ dsRNA เมื่อแยกบน 8% SDS-PAGE ที่ 100 V เป็นเวลา 3.30 ชั่วโมง เลน M :  $\lambda$  DNA marker เลนที่ 1-7: dsRNA จากไอโซเลต (1) Cbi3.1.1 (2) Cbi3.2.2 (3) Cbi3.3.1 (4) Cpn1.1.1 (5) Pbn1.1.5 (6) PIK1.1.9 และ (7) Ubn1.1.3



ภาพที่ 4 แถบ dsRNA เมื่อแยกบน 1.6% agarose ที่ 100 V เป็นเวลา 60 นาที เลน M :  $\lambda$  DNA marker เลนที่ 1-7: dsRNA จากไอโซเลต (1) Cbi3.1.1 (2) Cbi3.2.2 (3) Cbi3.3.1 (4) Cpn1.1.1 (5) Pbn1.1.5 (6) PIK1.1.9 และ (7) Ubn1.1.3

ตารางที่ 4 จำนวนและขนาดโดยประมาณของ dsRNA ที่พบในรา *Trichoderma* แต่ละไอโซเลต

	ไอโซเลต	ตัวอย่างและ แหล่งที่คัดแยก	จำนวนแถบ dsRNA บน 8 % SDS-PAGE	จำนวนแถบและขนาด โดยประมาณ (kb) ของ dsRNA บน 1.6% Agarose gel
1	Cbi3.1.1	เห็ดหึ่ง จ.ชลบุรี	10	4 (2.15, 2.10, 1.98, 1.94 )
2	Cbi3.2.2	กิ่งไม้ จ.ชลบุรี	6	3 (21.96, 1.70, 1.25)
3	Cbi3.3.1	เห็ดหึ่ง จ.ชลบุรี	3	2 (2.19, 2.04)
4	Cpn1.1.1	ดิน จ.ชุมพร	7	4 (3.25, 2.75, 2.40, 2.05)
5	Pbn1.1.5	ดิน จ.เพชรบูรณ์	1	1 (15.25)
6	Plk1.1.9	ดิน จ.พิษณุโลก	5	2 (1.50, 1.42)
7	Ubn1.1.3	ดิน จ.อุบลราชธานี	1	1 (15.25)

จากนั้นนำรา *Trichoderma* ที่พบ dsRNA ทั้ง 7 ไอโซเลต มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Nucleotide BLAST (blastn; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides>) และใช้โปรแกรม *TrichOKEY* 2.0 (<http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>) ในการจำแนกชนิดจากข้อมูลของ oligonucleotide DNA barcode

1. ไอโซเลต Cbi3.1.1 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS1 ITS2 และ 5.8s ribosomal DNA (rDNA) gene ความยาว 603 เบส จากปลายที่ใช้ไพรมอร์ ITS4 (ภาพที่ 5) ผลการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม blastn และ Clustalw2 (ตารางที่ 5) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับของ *Trichoderma koningiopsis* strain DAOM 229982 (EU280141) ที่ 600 ลำดับ (97.2 %) (ภาพที่ 6) ผลการวิเคราะห์บริเวณ ITS1 และ ITS2 ด้วยโปรแกรม *TrichOKEY* v2.0 พบบริเวณจำเพาะกับสกุลจำนวน 5 บริเวณ จำแนกเป็นรา *Trichoderma koningiopsis* หรือ *Trichoderma ovalisporum* (Section *Trichoderma*; XII Rufa Clade; *Trichoderma koningii* morphological species)

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTACAACCTCCCAAACC
CAATGTGAACCATAACCAAACTTGTTGCCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCC
CGCCGGAGGGACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCA
AAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC
TGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCTCCGGGGGGTGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATC
CCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCTTGCAGTAGTTTGACAACTCGCACCCGGGAGCGC
GGCGCGTCCACGTCCGTA AAAACACCCA AACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATGGATAACCA
```

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi3.1.1

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.1.1 โดยการทำให้ Pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2

	Description	GenBank Accession #	Length (bp)	Nucleotide Identity (%)
	<i>Trichoderma</i> isolate Cbi3.1.1		603	
1	<i>Trichoderma koningiopsis</i> strain DAOM 229982	EU280141	617	600/617 (97.2%)
2	<i>Trichoderma koningiopsis</i> strain DAOM 233971	EU280131	622	599/622 (96.3%)
3	<i>Trichoderma koningiopsis</i> strain CIB T01	EU280108	629	599/629 (95.2%)
4	<i>Trichoderma ovalisporum</i> strain DAOM 229859	EU280118	629	599/629 (95.2%)
5	<i>Trichoderma koningiopsis</i> strain DMC 786b	EU718082	636	599/636 (94.2%)

isolateCbi3.1.1 EU280141.1	-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG 59 TGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG 60 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	TTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACCATACCAAATTTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGC 119 TTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACCATACCAAAT-GTTGCCTCGGCGGGGTCACGC 119 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	CCCGGTTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCGGAGGGACCAACCAAATCTTTC 179 CCCGGTTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCGGAGGGACCAACCAAATCTTTC 179 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	TGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAA 239 TGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAA 239 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 299 AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA 299 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	AGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC 359 AGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC 359 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGG 419 CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGG 419 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	GTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGG 479 GTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGG 479 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	TCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTGCACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGT 539 TCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTGCACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGCGT 539 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	CCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT----- 594 CCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG 599 *****
isolateCbi3.1.1 EU280141.1	--GGA--TACCCA----- 603 CTGGACTTAAGCATATCA 617 *** ** *

ภาพที่ 6 Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.1.1 กับ *Trichoderma koningiopsis* strain DAOM 229982 (EU280141)

2. ไอโซเลต Cbi3.2.2 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS1 ITS2 และ 5.8s rDNA gene ขนาด 617 เบส จากการใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 (ภาพที่ 7) ผลการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม blastn และ Clustalw2 (ตารางที่ 6) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับของ *Hypocrea lixii* strain DAOM 229907 (HQ607942) ที่ 616 ลำดับ (95.9 %) (ภาพที่ 8) ผลการวิเคราะห์บริเวณ ITS1 และ ITS2 ด้วยโปรแกรม TrichoKEY v2.0 พบบริเวณจำเพาะกับสกุลจำนวน 5 บริเวณ จำแนกเป็นรา *Hypocrea lixii* (*Trichoderma harzianum*) (I Lixii-Catoptron Clade)

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACC
CAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCCTGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGGTTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCC
CGCCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTC
TCGTAGGCGTTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGACAGTAT
TCTGGCGGGCATGCCGTGCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCT
CCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTC
GCATCGGGAGCGCGGCGCTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATA
CCAAGGTC
```

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi3.2.2

ตารางที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.2.2 โดยการทำให้ Pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2 กับลำดับที่ได้จากโปรแกรม blastn

	Description	GenBank Accession #	Length (bp)	Nucleotide Identity (%)
	<i>Trichoderma</i> isolate Cbi3.2.2		617	
1	<i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 229907	HQ607942	642	616/642 (95.9 %)
2	<i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 230766	EU280141	642	616/642 (95.9 %)
3	<i>Hypocrea lixii</i> strain CIB T44	EU718082	643	616/643 (95.8 %)
4	<i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 234005	EU280131	644	616/642 (95.6 %)
5	<i>Hypocrea lixii</i> strain JB PER62	EU280108	644	616/642 (95.6 %)

IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGATCATTACCGAGT GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGATCATTACCGAGT *****	60 60
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	TTACAAC TCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAAC TGTGCCTCGGCGGGATCTCTGCC TTACAAC TCCCAAACCAATGTGAACCATACCAAAC TGTGCCTCGGCGGGGTAC -GCC *****	120 119
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	CCGGGTGCGTTCGACGCCCCGACCAAGGCGCCCCCGGAGG -ACCAACCAAACTCTTTT CCGGGTGCGTTCGACGCCCCGGAACAGGCGCCCCCGGAGGACCAACCAAA -CTCTTTC *****	179 178
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	TGTATACCCCTCGCGGGTTTTTATAAATCTGAGCCTTCTCGGCGCTCTCGTAGGCGTT TGTA -GTCCCTCGCGGACGTTAT - - - - - TTCTTACAGCTCTGAGCAAAAAT ****	239 225
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	TCGAAAATGAATCAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG C - - AAAATGAATCAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG *****	299 283
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC *****	359 343
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTC GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTC *****	419 403
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	GAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGGCCCTCCCTTAG -CGGGTGGCCGTCTCC GAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCC *****	478 463
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	GAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTGCACA -CTCGCATC GAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTGCACAAC TCGCACC *****	537 523
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	GGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAAC TCTGAAATGTTGACCTCGGATC GGGAGCGCGGCGGTCCACAGTCCGTAACACCCAAC TCTGAAATGTTGACCTCGGATC *****	597 583
IsolateCbi3.2.2 HQ607942.1	AGGTAGGAATACC - - - - - AAG -GT -TC - - - - - AGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG *****	617 627

ภาพที่ 8 Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.2.2 กับ *Hypocrea lixii* strain DAOM 229907 (HQ607942)

3. ไอโซเลต Cbi3.3.1 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS1 ITS2 และ 5.8s rDNA gene ขนาด 628 เบส จากการใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 (ภาพที่ 9) ผลการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม blastn และ Clustalw2 (ตารางที่ 7) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับของ *Hypocrea jecorina* strain DAOM 220784 (EU280101) ที่ 626 ลำดับ (99.3 %) (ภาพที่ 10) ผลการวิเคราะห์บริเวณ ITS1 และ ITS2 ด้วยโปรแกรม TrichOKEY v2.0 พบบริเวณจำเพาะกับสกุลจำนวน 5 บริเวณ จำแนกเป็นรา *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACC
CCAATGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTGCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGATCCCATGG
CGCCCGCGGAGGACCAACTCAAACCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGGCTCCGTCGCGGCTCTGTTTTACCTTTGCT
CTGAGCCTTTCTCGGCGACCTAGCGGGGCTCTCGAAAATGAATCAAAACTTTCACAACCGATCTCTTGGTTCTG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGG
TCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCGGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCA
GTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGCGGCCACAGCCGTA AACACCCCAAACCTCTGAAATGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGAATCCAGT
```

ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi3.3.1

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.3.1 โดยการทำ Pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2 กับลำดับที่ได้จากโปรแกรม blastn

	Description	GenBank Accession #	Length (bp)	Nucleotide Identity (%)
	<i>Trichoderma</i> isolate Cbi3.3.1		628	
1	<i>Hypocrea jecorina</i> strain DAOM 220784	EU280101	630	626/630 (99.3%)
2	<i>Hypocrea jecorina</i> strain GJS 97-178	AJ004964	648	620/648 (95.7%)
3	<i>Hypocrea jecorina</i> strain GJS 97-177	AJ004963	648	620/648 (95.7%)
4	<i>Hypocrea jecorina</i> strain GJS 97-38	AJ004962	648	620/648 (95.7%)
5	<i>Trichoderma reesei</i> strain ATCC 56765 (RutC30)	X93938	648	620/648 (95.7%)



IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG 59 TGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG 60 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	TTTACAAC TCCCAAACCCCAATGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCT 119 TTTACAAC TCCCAAACCCCAATGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCT 120 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	GCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGATCCCATGGCGCCCGCGGAGGACCAACTCAAATC 179 GCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGATCCCATGGCGCCCGCGGAGGACCAACTCAAATC 180 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	TTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTTCCGTCGCGGCTCTGTTTTACCTTTGCTCTGAGCCTTTC 239 TTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTTCCGTCGCGGCTCTGTTTTACCTTTGCTCTGAGCCTTTC 240 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	TCGCGACCCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGG 299 TCGCGACCCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGG 300 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG 359 TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG 360 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT 419 TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT 420 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	CCGAGCGTCATTTCAACCTCGAACCCCTCCGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTC 479 CCGAGCGTCATTTCAACCTCGAACCCCTCCGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTC 480 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	ACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTT 539 ACCGGGCCGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTT 540 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	GCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGGCCACAGCCGTA AACACCCCAACTCTGAAAT 599 GCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGGCCACAGCCGTA AACACCCCAACTCTGAAAT 600 *****
IsolateCbi3.3.1 EU280101.1	GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT-CCAGT 628 GTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGC 630 ***** ** *

ภาพที่ 10 Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cbi3.3.1 กับ *Hypocrea jecorina* strain DAOM 220784 (EU280101)

4. ไอโซเลต Cpn1.1.1 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS1 ITS2 และ 5.8s rDNA gene ขนาด 629 เบส จากการใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 (ภาพที่ 11) ผลการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม blastn และ Clustalw2 (ตารางที่ 8) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับของ *Trichoderma erinaceum* strain CIB T72 (EU280106) 98.9 % identity) (ภาพที่ 12) ผลการวิเคราะห์บริเวณ ITS1 และ ITS2 ด้วยโปรแกรม *TrichoKEY* v2.0 พบบริเวณจำเพาะกับสกุลจำนวน 5 บริเวณ จำแนกเป็นรา *Trichoderma erinaceum* (Section *Trichoderma*)

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGAAGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTAGCGAGTTTACAAGTCCCAAACC
CAATGTGAAGAATACCAAACCTGTTGCCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCC
GCCGGAGGGACCAACCAAACCTTTTACTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCA
AAATGAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCC
TGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTGGCGTTGGGGATCGGGAACCCTCAGACGGGATC
CCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACTCGCACCCGGGAGCGC
GGCGCGTCCACGTCCGTAACCAACCAACTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTA
AGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Trichoderma* ไอโซเลต Cpn1.1.1

ตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cpn1.1.1 โดยการทำให้ Pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2

	Description	GenBank Accession #	Length (bp)	Nucleotide Identity (%)
	<i>Trichoderma</i> isolate Cpn1.1.1		629	
1	<i>Trichoderma erinaceum</i> strain CIB T72	EU280106	630	623/630 (98.9%)
2	<i>Trichoderma erinaceum</i> strain DAOM 237546	EU280134	629	622/629 (98.9%)
3	<i>Trichoderma koningiopsis</i> strain CIB T01	EU280108	629	621/629 (98.7%)
4	<i>Trichoderma ovalisporum</i> strain DAOM 229859	EU280118	629	621/629 (98.7%)
5	<i>Trichoderma gamsii</i> strain DAOM 231637	EU280129	630	621/630 (98.6%)

IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGAAGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTAGCGAG TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG *****	59 60
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	TTTACAAGTCCCAAACCCAATGTGAAGAATACCAAAGTGTGCCTCGGGGGGTACAGCC TTTACAAGTCCCAAACCCAATGTGAACCATACCAAAGTGTGCCTCGGGGGGTACAGCC *****	119 120
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	CCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGGACCAACCAAAGTCTTTAC CCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGGACCAACCAAAGTCTTTAC *****	179 180
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	TGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAA TGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAA *****	239 240
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA *****	299 300
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	AGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC AGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC *****	359 360
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGG CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGG *****	419 420
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	GTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTCAGACGGGATCCCGGCCCGAAAATACAGTGGCGG GTCGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTCAGACGGGATCCCGGCCCGAAAATACAGTGGCGG *****	479 480
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	TCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGCGCGT TCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGACAACCTCGCACCGGGAGCGCGCGCGT *****	539 540
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	CCACGTCCGTAACAACCCAAGTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG CCACGTCCGTAACAACCCAAGTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG *****	599 600
IsolateCpn1.1.1 EU280106.1	CTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA CTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA *****	629 630

ภาพที่ 12 Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Cpn1.1.1 กับ *Trichoderma erinaceum* strain CIB T72 (EU280106)

5. ไอโซเลต Pbn1.1.5 ข้อมูลการตรวจจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถจำแนกได้

6. ไอโซเลต PIK1.1.9 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS1 ITS2 และ 5.8s rDNA gene ขนาด 637 เบส จากการใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 (ภาพที่ 13) ผลการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม blastn และ Clustalw2 (ตารางที่ 9) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับของ *Hypocrea virens* strain CIB T06 (EU280076) ที่ 637 ลำดับ (99.7 %) (ภาพที่ 14) ผลการวิเคราะห์บริเวณ ITS1 และ ITS2 ด้วยโปรแกรม TrichOKEY v2.0 พบบริเวณจำเพาะกับสกุล จำนวน 5 บริเวณ จำแนกเป็นรา *Hypocrea virens* (*Trichoderma virens*)

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACC
CAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCC
CGCCGGAGGACCAACCAAACCTCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCC
TCGTGGCGCTTTCGAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTAT
TCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCT
TTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCG
GGAGCGCGGCGCTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG
CTGAACTTAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Trichoderma* ไอโซเลต PIK1.1.9

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต PIK1.1.9 โดยการทำ Pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2

	Description	GenBank Accession #	Length (bp)	Nucleotide Identity (%)
	<i>Trichoderma</i> isolate PIK1.1.9		637	
1	<i>Hypocrea virens</i> strain CIB T06	EU280076	639	637/639 (99.7%)
2	<i>Hypocrea virens</i> strain DAOM 167651	EU280073	639	637/639 (99.7%)
3	<i>Hypocrea virens</i> strain DAOM 233974	EU280090	638	636/638 (99.7%)
4	<i>Hypocrea crassa</i> strain DAOM 164916	EU280067	639	636/639 (99.5%)
5	<i>Hypocrea virens</i> strain GL-13	GU046491	654	636/654 (97.2%)

IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG TGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG *****	59 60
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	TTTACAAC TCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAAC TGTGCCTCGGCGGGATCTCTGC TTTACAAC TCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAAC TGTGCCTCGGCGGGATCTCTGC *****	119 120
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	CCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGCGCCCCCGGAGGACCAACCAAAC TCTTAT CCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGCGCCCCCGGAGGACCAACCAAAC TCTTAT *****	179 180
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	TGTATACCCCTCGCGGGTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCTCGTGGGCGTT TGTATACCCCTCGCGGGTTTTTACTATCTGAGCCATCTCGGCGCCCTCGTGGGCGTT *****	239 240
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	TCGAAAATGAATCAAAC TTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG TCGAAAATGAATCAAAC TTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG *****	299 300
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC *****	359 360
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTC GCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCCTC *****	419 420
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	GAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAATAC GAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAATAC *****	479 480
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	AGTGGCGGTCTCGCCG CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGC AGTGGCGGTCTCGCCG CAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCGC *****	539 540
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	GGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAAC TTTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAG GGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCCAAAC TTTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAG *****	599 600
IsolatePlk1.1.9 EU280076.1	GAATACCCGCTGAACTTA-GCATATCAATAAGCGGAGGA GAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA *****	637 639

ภาพที่ 14 Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Plk1.1.9 กับ *Hypocrea virens* strain CIB T06 (EU280076)

7. ไอโซเลต Ubn1.1.3 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS1 ITS2 และ 5.8s rDNA gene ขนาด 640 เบส จากการใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 (ภาพที่ 15) ผลการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม blastn และ Clustalw2 (ตารางที่ 10) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับของ *Hypocrea lixii* strain DAOM 233353 (EF392759) ที่ 635 ลำดับ (98.3 %) (ภาพที่ 16) ผลการวิเคราะห์บริเวณ ITS1 และ ITS2 ด้วยโปรแกรม TrichoKEY v2.0 พบบริเวณจำเพาะกับสกุลจำนวน 5 บริเวณ จำแนกเป็นรา unidentified species ใน I Lixii-Catoptron Clade

```
GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACC
CAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTTCTGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGC
CCGCCGAGGACCAACCTAAAACCTTATGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCG
CCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACCGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGG
CCCTCCCTCTGCGGGGGCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACA
CTCGCATCGGGAGCGCGCGCTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTACGGAAATGTGACCTCGGATCAGGTAGGAA
TACCCAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *Trichoderma* ไอโซเลต Ubn1.1.3

ตารางที่ 10 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไอโซเลต Ubn1.1.3 โดยการ  
ทำ Pairwise alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2

	Description	GenBank Accession #	Length (bp)	Nucleotide Identity (%)
	<i>Trichoderma</i> isolate Ubn1.1.3		640	
1	<i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 233353	EF392759	646	635/646 (98.3%)
2	<i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 231408	AY605730	646	635/646 (98.3%)
3	<i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 233963	EU280092	646	635/646 (98.3%)
4	<i>Hypocrea lixii</i> strain JB PER42	EF191307	646	635/646 (98.3%)
5	<i>Hypocrea lixii</i> strain DAOM 231646	AY605723	647	635/647 (98.1%)

IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG 59 TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAG 60 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	TTTACAAC TCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAAC TGTTCGCTCGGCGGGATCTTCTG 119 TTTACAAC TCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAAC TGTTCGCTCGGCGGGATCT-CTG 119 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	CCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCTAAAAC TTT 179 CCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCTAAAAC TTT 179 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	ATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGG 239 ATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGG 239 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	CGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG 299 CGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG 299 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT 359 AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT 359 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	GAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAAC 419 GAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAAC 419 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	CCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTCTGCGGG-GGCCGTC 478 CCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTC 479 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	TCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCA 538 TCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCA 539 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	TCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAAC TACGGAATGT-GACCTCGGA 597 TCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAAC TCTGAAATGTGACCTCGGA 599 *****
IsolateUbn1.1.3 EF392759.1	TCAGGTAGGAATACCC---AACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 640 TCAGGTAGGAATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 646 *****

ภาพที่ 16 Pairwise alignment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไอโซเลต Ubn1.1.3 กับ *Hypocrea lixii* strain DAOM 233353 (EF392759)

เมื่อศึกษาการเติบโตของ *Trichoderma* ที่พบ dsRNA แต่ละไอโซเลตบนอาหาร PDA และ SNA จำนวน 2 ซ้ำ และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ที่เลี้ยงบนอาหาร CMD (เนื่องจากบางไอโซเลตไม่สร้างสปอร์บนอาหาร PDA และ SNA) (ภาพที่ 17) ผลพบว่า

1. *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi 3.1.1 สามารถเติบโต บนอาหาร PDA ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 25 °C (37.5 - 45.5 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 °C บนอาหาร SNA เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 25 °C เช่นกัน (11 - 12 mm) บนอาหาร CMD พบการสร้างสปอร์สีเขียวถึงเขียวเข้มหลังวันที่ 7 มีการสร้างสารสีส้มในอาหารหลังวันที่ 14 ลักษณะ conidiophore อยู่รวมเป็นกลุ่ม ลักษณะแตกแขนง มี philaide แยกจากกันที่ปลายเส้นใย conidia มีรูปร่างทรงรีหรือรูปทรงไข่ ผิวเรียบ หลัง 14 วันไปแล้วพบ chlamyospore จำนวนมาก บริเวณกึ่งกลางหรือปลายเส้นใย รูปร่างกลม (ภาพที่ 18)

2. *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi 3.2.2 สามารถเติบโต บนอาหาร PDA ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 30 °C (39 - 67 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 °C บนอาหาร SNA เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 30 °C (43 - 54.5 mm) เช่นกัน และเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C บนอาหาร CMD พบการสร้างสปอร์สีเขียวหรือขาวหลังวันที่ 3 ลักษณะ conidiophore แตกแขนง มี philaide แยกจากกันที่ปลายเส้นใย conidia มีรูปร่างกลม กลมรีหรือรูปไข่ ผิวเรียบ อยู่รวมเป็นกลุ่ม หลัง 14 วันพบ chlamyospore บริเวณกึ่งกลางหรือปลายเส้นใย รูปร่างทรงรี (ภาพที่ 19)

3. *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi 3.3.1 สามารถเติบโต บนอาหาร PDA ได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 20 - 35 °C (80 mm เต็มจานอาหาร) บนอาหาร SNA เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 - 35 °C (63 - 80 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C บนอาหาร CMD พบการสร้างสารสีเหลืองในอาหาร และมีการสร้างสปอร์สีเขียวหลังวันที่ 3 ลักษณะ conidiophore แตกแขนง มี philaide แยกจากกันที่ปลายเส้นใย conidia มีรูปร่างรี ผิวเรียบ อยู่รวมเป็นกลุ่ม หลัง 14 วันพบ chlamyospore บริเวณกึ่งกลางเส้นใย รูปร่างกลม พบการสร้างโครงสร้างคล้าย stromata หลัง 7 วัน หรือเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแผล ไม่พบสปอร์แบบอาศัยเพศภายใน (ภาพที่ 20)

4. *Trichoderma* ไอโซเลต Cpn 1.1.1 สามารถเติบโต บนอาหาร PDA ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 30 °C (55 - 72 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 °C บนอาหาร SNA เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 25 °C (22.5 - 35.5 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 °C บนอาหาร CMD พบการสร้างสปอร์สีเขียวย่อนหรือเหลืองหลังวันที่ 14 หรือเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแผล ลักษณะ conidiophore แตกแขนง มี philaide แยกจากกันที่ปลายเส้นใย conidia มีรูปร่างทรงรี



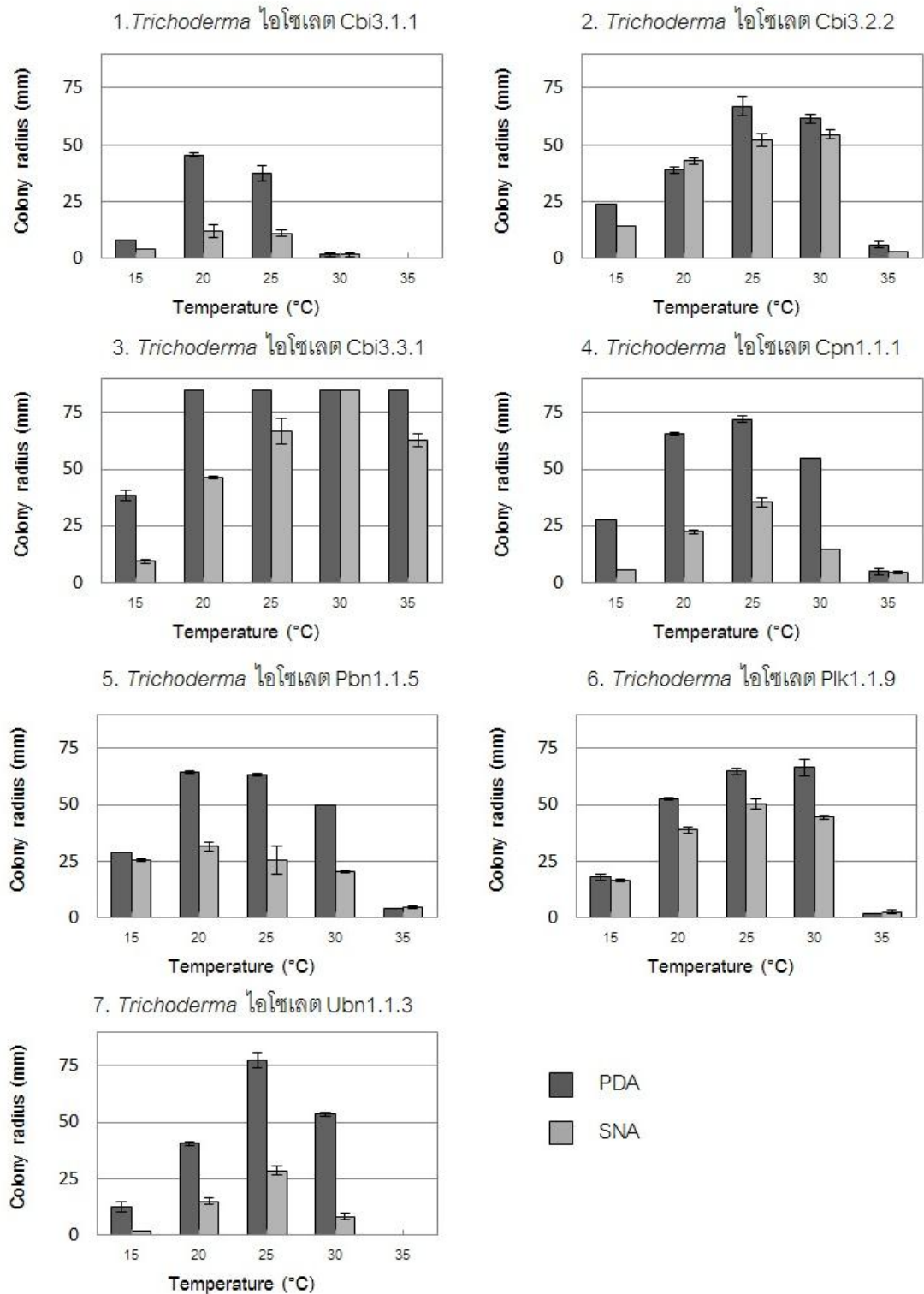
ผิวเรียบ หลัง 14 วันพบ chlamydospore บริเวณกึ่งกลางหรือปลายเส้นใย รูปร่างทรงกลม และพบ blastospore จำนวนมาก (ภาพที่ 21)

5. *Trichoderma* ไอโซเลต Pbn 1.1.5 สามารถเติบโต บนอาหาร PDA ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 30 °C (50 - 64.5 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 °C บนอาหาร SNA เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15 - 30 °C (20.5 - 31.5 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 °C บนอาหาร CMD พบการสร้างสปอร์สีเขียวหลังวันที่ 14 ลักษณะ conidiophore แดกแขนง มี philaide แยกจากกันที่ปลายเส้นใย conidia มีรูปร่างกลมรีหรือรูปไข่ อยู่รวมเป็นกลุ่ม หลัง 14 วันพบ chlamydospore บริเวณกึ่งกลางหรือปลายเส้นใย รูปร่างทรงรี ผิวเรียบ (ภาพที่ 22)

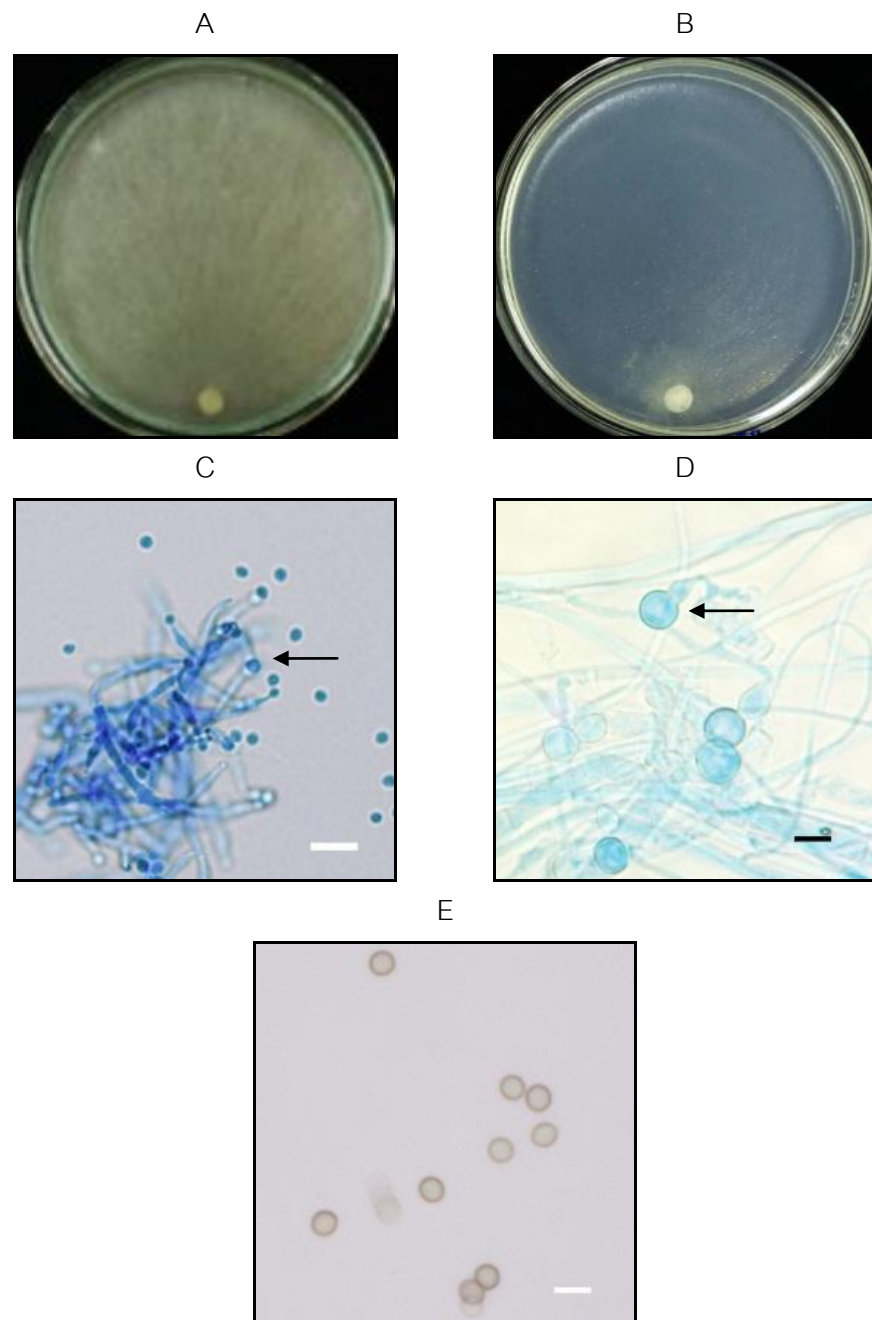
6. *Trichoderma* ไอโซเลต Plk 1.1.9 สามารถเติบโต บนอาหาร PDA ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 30 °C (52.5 - 66.5 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C บนอาหาร SNA เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 30 °C (39 - 50.5 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 °C บนอาหาร CMD พบการสร้างสปอร์สีเขียวหลังวันที่ 2 ลักษณะ conidiophore มี philaide อยู่รวมกัน conidia มีรูปร่างทรงรี อยู่รวมเป็นกลุ่ม หลัง 14 วันพบ chlamydospore บริเวณกึ่งกลางเส้นใย รูปร่างทรงรี ผิวเรียบ (ภาพที่ 23)

7. *Trichoderma* ไอโซเลต Ubn 1.1.3 สามารถเติบโต บนอาหาร PDA ได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 - 30 °C (53.5 - 77.5 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 °C บนอาหาร SNA เติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20 - 25 °C (15 - 28.5 mm) โดยเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 °C บนอาหาร CMD พบการสร้างสปอร์สีเขียวหลังวันที่ 3 ลักษณะ conidiophore แดกแขนง มี philaide แยกจากกัน conidia สปอร์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ หลัง 14 วันพบ chlamydospore จำนวนมาก บริเวณกึ่งกลางเส้นใย รูปร่างทรงกลม ผิวเรียบ (ภาพที่ 24)

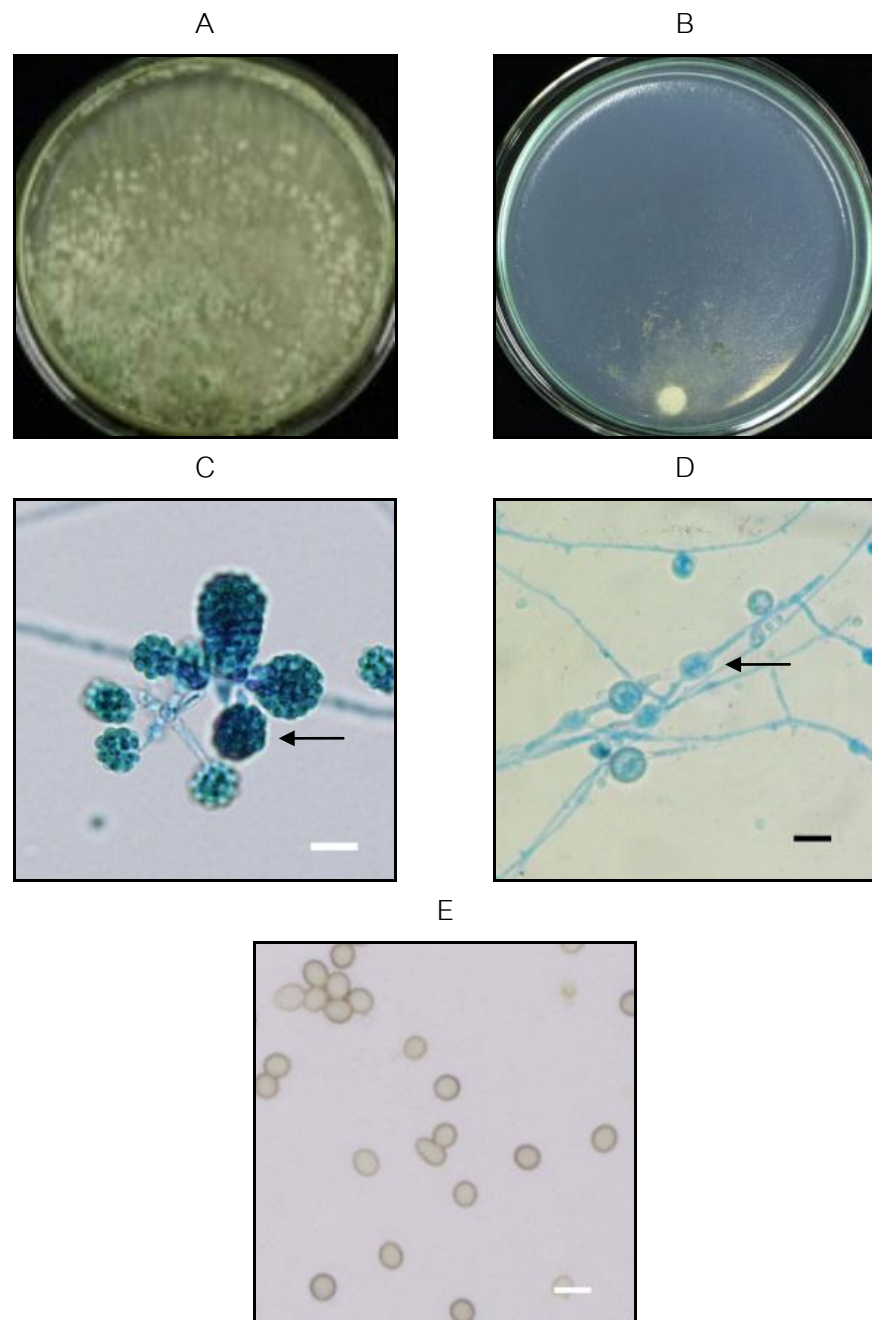
เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตของ *Trichoderma* ทั้ง 7 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต Cbi3.3.1 มีการเติบโตที่ดีที่สุด และเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 ถึง 35 °C ขณะที่ ไอโซเลต Cbi1.1.1 มีการเติบโตน้อยที่สุด และเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20 - 25 °C



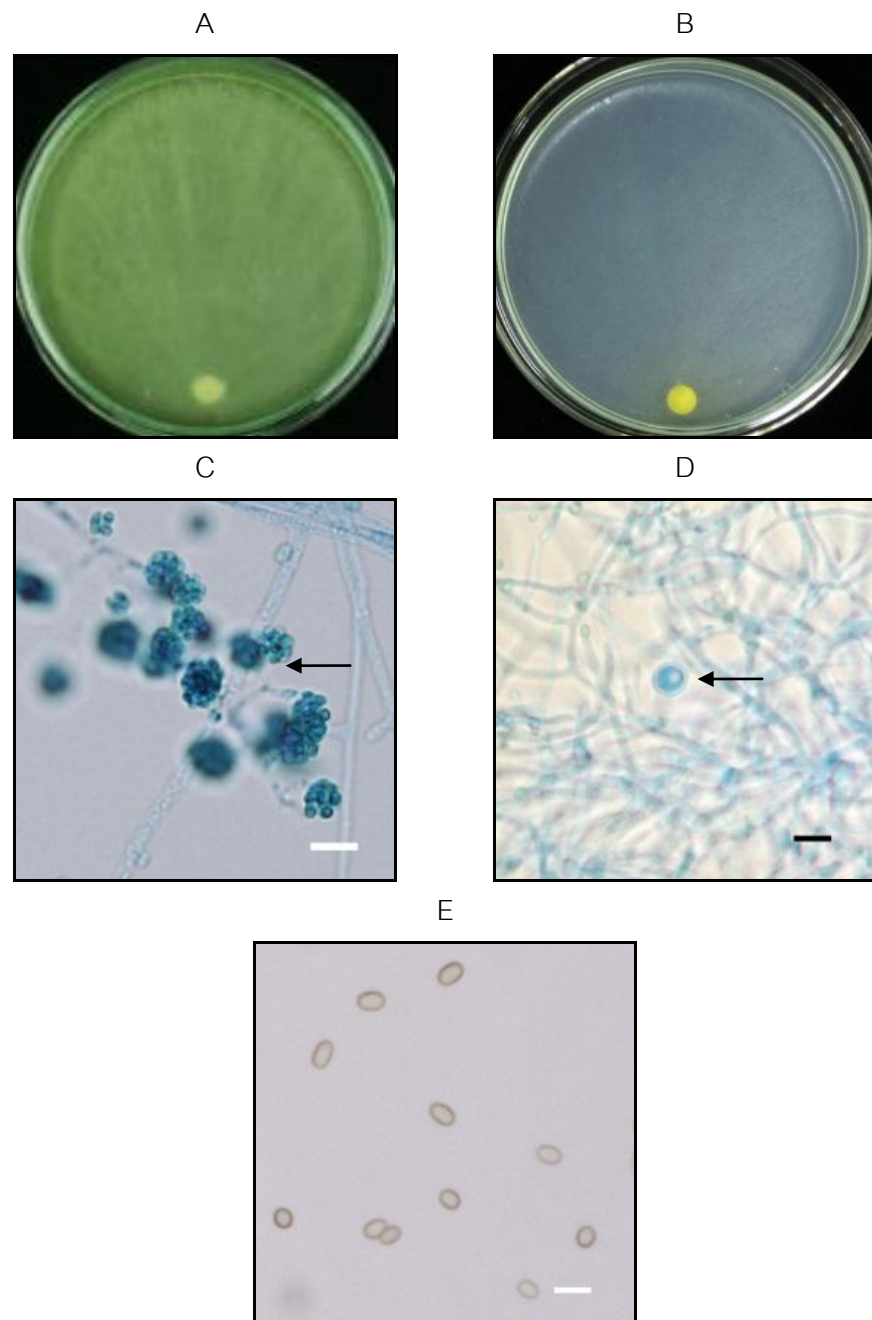
ภาพที่ 17 รัศมีของโคโลนี (mm) ของ *Trichoderma* ที่พบ dsRNA แต่ละไอโซเลตที่อุณหภูมิ 15 20 25 30 และ 35 °C เมื่อเลี้ยงบนจานอาหาร PDA และ SNA ในที่มีดเป็นเวลา 3 วัน



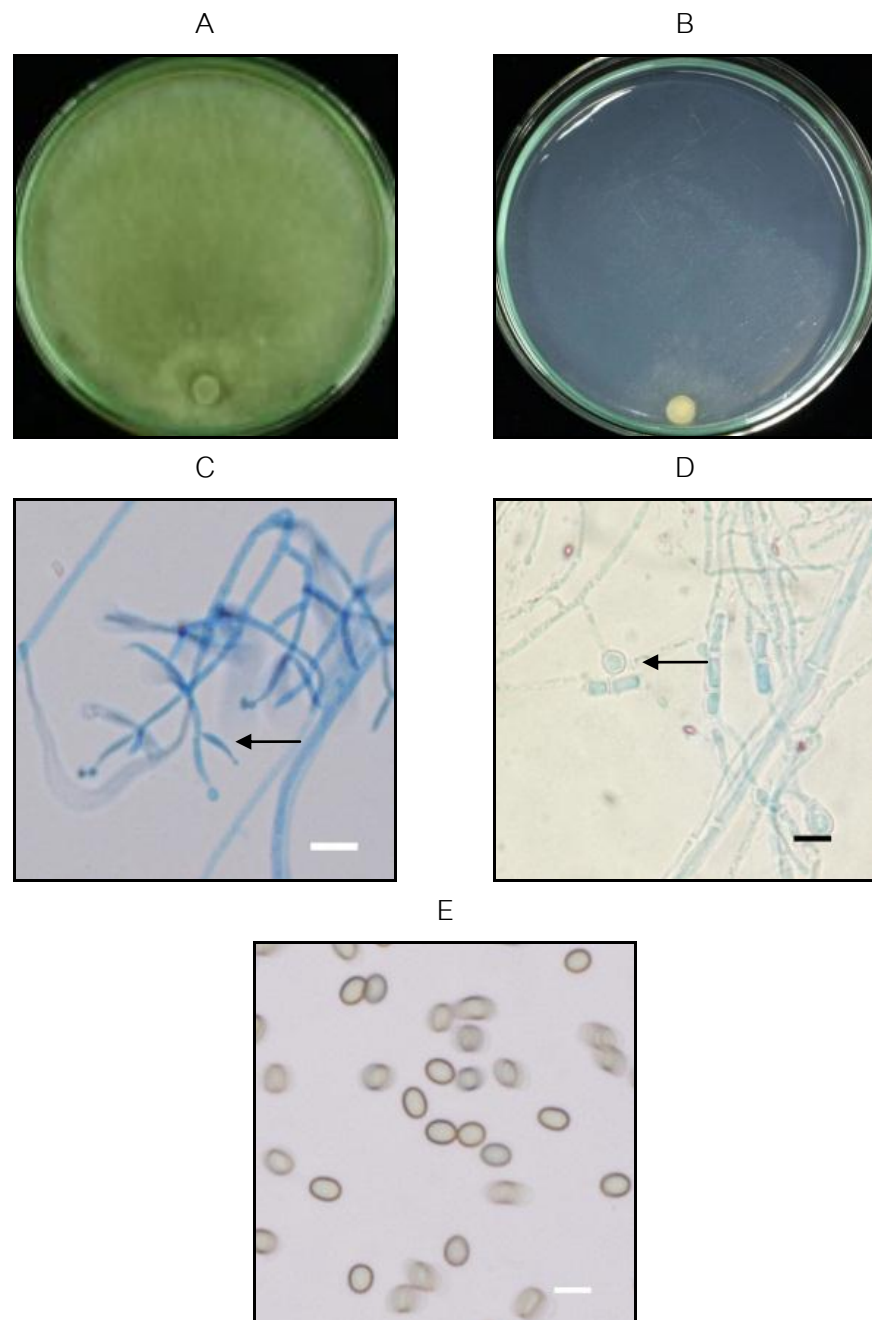
ภาพที่ 18 ลักษณะโคโลนีของ *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi 3.1.1 ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA (A) และ SNA (B) ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน และลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ conidiophores (C) จากโคโลนีอายุ 7 วัน chlamydospores (D) จากโคโลนีอายุ 14 วัน (ขนาดของบาร์ = 10  $\mu$ m) และ conidia (E) (ขนาดของบาร์ = 5  $\mu$ m)



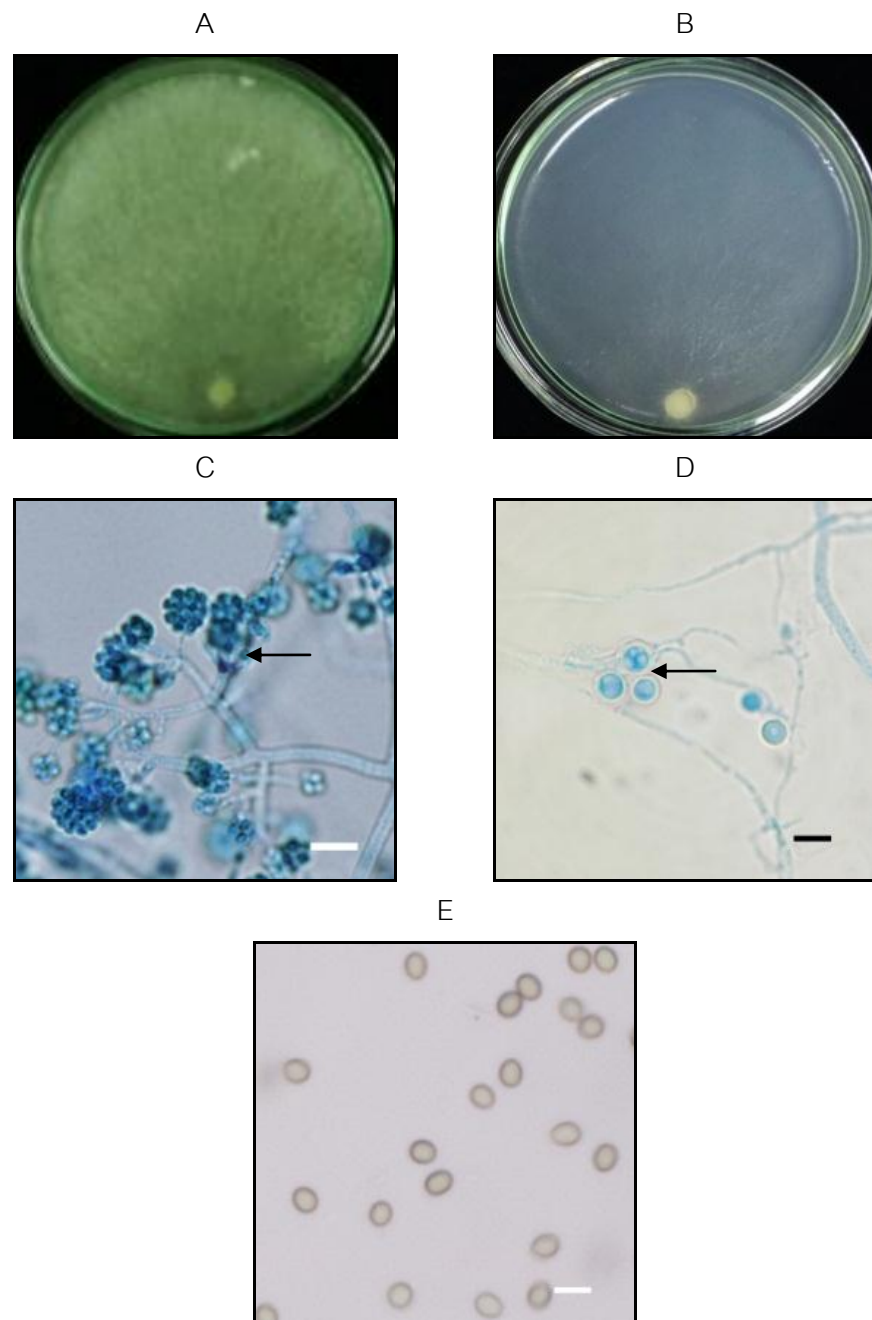
ภาพที่ 19 ลักษณะโคโลนีของ *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi 3.2.2 ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA (A) และ SNA (B) ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน และลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ conidiophores (C) จากโคโลนีอายุ 7 วัน chlamydospores (D) จากโคโลนีอายุ 14 วัน (ขนาดของบาร์ = 10  $\mu$ m) และ conidia (E) (ขนาดของบาร์ = 5  $\mu$ m)



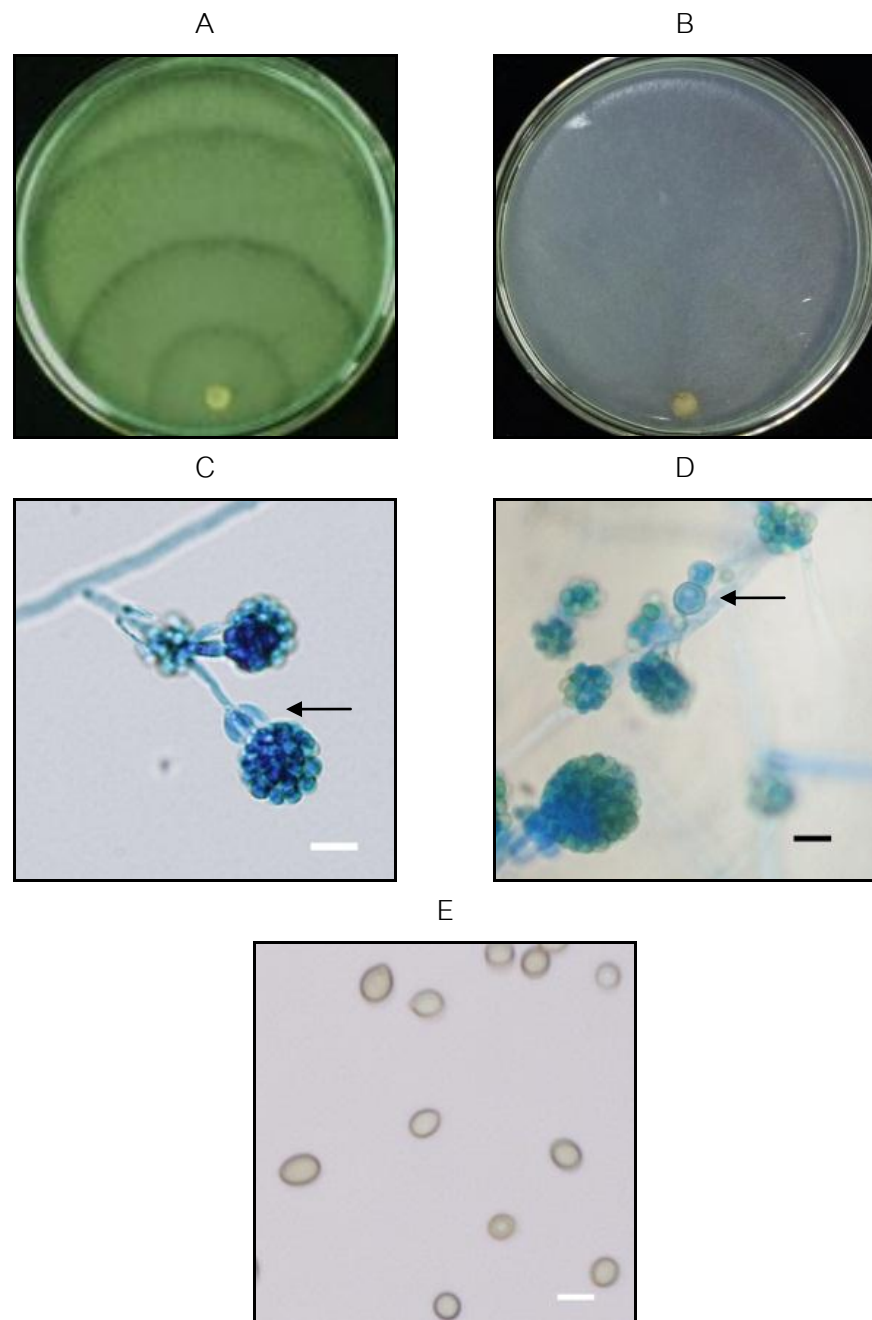
ภาพที่ 20 ลักษณะโคโลนีของ *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi 3.3.1 ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA (A) และ SNA (B) ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน และลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ conidiophores (C) จากโคโลนีอายุ 7 วัน chlamydospores (D) จากโคโลนีอายุ 14 วัน (ขนาดของบาร์ = 10  $\mu$ m) และ conidia (E) (ขนาดของบาร์ = 5  $\mu$ m)



ภาพที่ 21 ลักษณะโคโลนีของ *Trichoderma* ไฮโซเลต Cpn1.1.1 ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA (A) และ SNA (B) ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน และลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ conidiophores (C) จากโคโลนีอายุ 7 วัน chlamydospores (D) จากโคโลนีอายุ 14 วัน (ขนาดของบาร์ = 10  $\mu$ m) และ conidia (E) (ขนาดของบาร์ = 5  $\mu$ m)

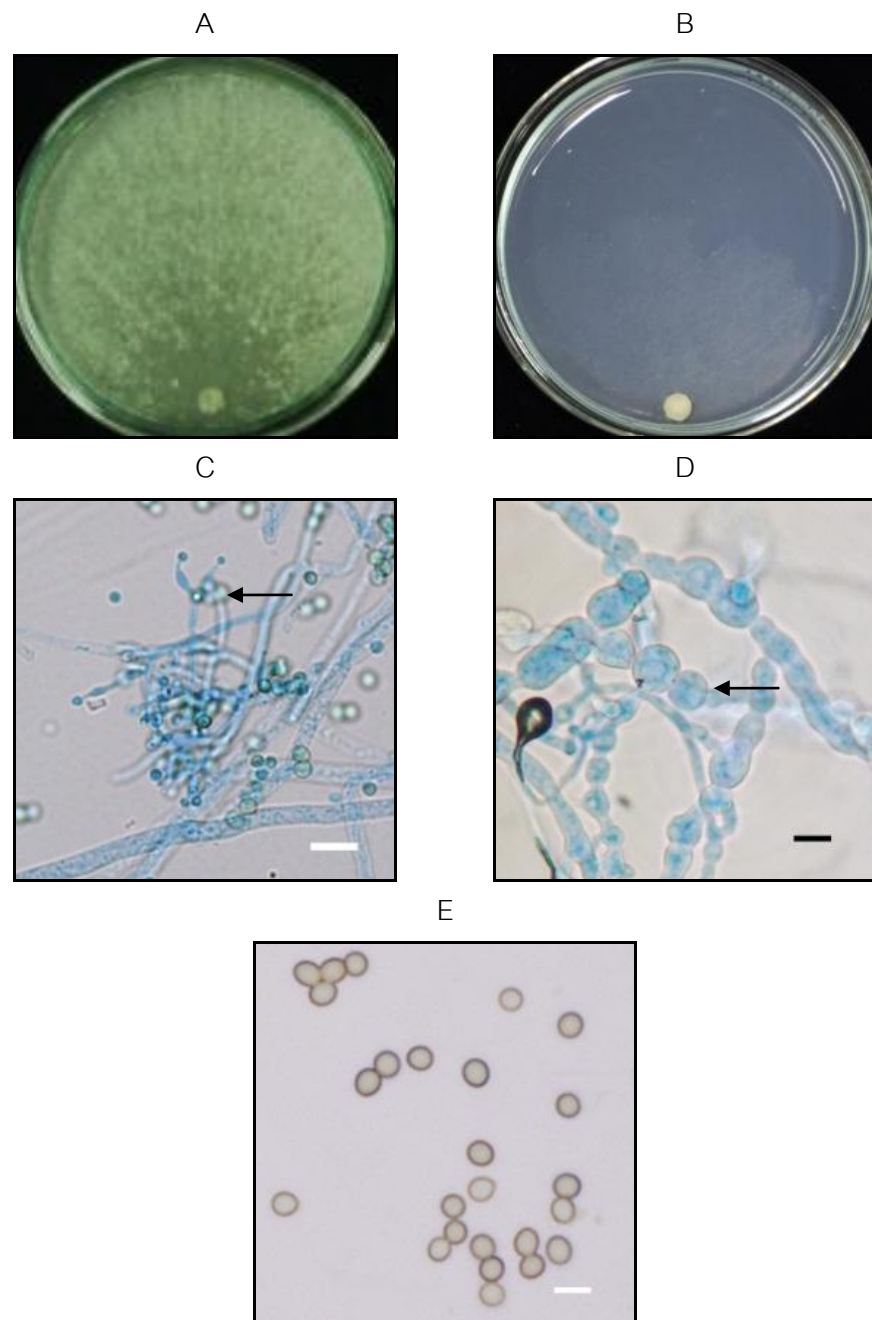


ภาพที่ 22 ลักษณะโคโลนีของ *Trichoderma* ไอโซเลต Pbn1.1.5 ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA (A) และ SNA (B) ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน และลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ conidiophores (C) จากโคโลนีอายุ 7 วัน chlamydospores (D) จากโคโลนีอายุ 14 วัน (ขนาดของบาร์ = 10  $\mu$ m) และ conidia (E) (ขนาดของบาร์ = 5  $\mu$ m)



ภาพที่ 23 ลักษณะโคโคเนียของ *Trichoderma* ไอโซเลต PIk1.1.9 ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA (A) และ SNA (B) ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน และลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ conidiophores (C) จากโคโคเนียอายุ 7 วัน chlamydospores (D) จากโคโคเนียอายุ 14 วัน (ขนาดของบาร์ = 10  $\mu$ m) และ conidia (E) (ขนาดของบาร์ = 5  $\mu$ m)





ภาพที่ 24 ลักษณะโคโลนีของ *Trichoderma* ไฮโซเลต Ubn1.1.3 ที่เลี้ยงบนจานอาหาร PDA (A) และ SNA (B) ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน และลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ conidiophores (C) จากโคโลนีอายุ 7 วัน chlamydospores (D) จากโคโลนีอายุ 14 วัน (ขนาดของบาร์ = 10  $\mu$ m) และ conidia (E) (ขนาดของบาร์ = 5  $\mu$ m)

ตารางที่ 11 ข้อมูลของไอโซเลตที่ใช้ในการจำแนกด้วย Interactive key

	Isolate	Conidia			Conidiophore	Chlamydo­spores	Culture, radius (mm) after 72 h in darkness				
		Shape	Ornament	Pigment			PDA			SNA	
							30 °C	35 °C	40 °C	35 °C	
1	Cbi3.1.1	globose – subglobose*	smooth	green*	with a more or less distinct, long central axis; lateral branches typically paired; phialides held in cruciate whorls	dry	unicellular, terminal and intercalary, solitary	<14*	<2	No	<2
2	Cbi3.2.2	subglobose - ovoidal	smooth	green	with a more or less distinct, long central axis; lateral branches typically paired; phialides held in cruciate whorls	dry	unicellular, terminal and intercalary, solitary*	55-67	2-19*	No	2-17*
3	Cbi3.3.1	ellipsoidal - oblong	smooth	green	with a more or less long central axis; phialides arising singly over a long distance	dry	unicellular, most terminal, solitary	>67*	>56*	> 5	44-63
4	Cpn1.1.1	ellipsoidal	smooth	yellow* yellow-green	with a more or less distinct, long central axis; lateral branches typically paired; phialides held in cruciate whorls	dry	unicellular, most terminal, solitary	55-67	2-19*	No	2-17*
5	Pbn1.1.5	subglobose - ovoidal	smooth	green	with a more or less distinct, long central axis; lateral branches typically paired; phialides held in cruciate whorls	dry	unicellular, most terminal, solitary	42-54	2-19	No	2-17
6	PIk1.1.9	ellipsoidal	smooth	green	gliocladium-like with; phialides held in Gliocladium-like head	held in liquid	unicellular, terminal and intercalary, solitary	55-67*	2-19	No	2-17*
7	Ubn1.1.3	subglobose - ovoidal	smooth	grey green	with a more or less distinct, long central axis; lateral branches typically paired; phialides held in cruciate whorls	dry	unicellular, terminal and intercalary in hyphae, in chains*	42-54	<2*	No	<2*

\* ลักษณะของไอโซเลตต่างจากข้อมูลลักษณะของชนิดที่ได้จากการจำแนกด้วยข้อมูล ITS

จากการเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Trichoderma* ทั้ง 7 ไอโซเลต (ตารางที่ 11) ทำการจำแนกด้วย Interactive key และเปรียบเทียบลักษณะของรา *Trichoderma* จากเว็บไซต์ *Trichoderma* Online (Samuel et al., 2011: Online) โดยพบว่าไอโซเลต Cbi3.2.2 Cbi3.3.1 Plk1.1.9 และ Ubn1.1.3 มีลักษณะโคโลนีและสปอร์ตรงกับ *T. harzianum* *T. reesei* *T. virens* และ *T. harzianum* ตามลำดับ สำหรับไอโซเลต Cbi3.1.1 และ Cpn1.1.1 มีลักษณะโคโลนีและสปอร์แตกต่างจาก *T. koningiopsis* และ *T. erinaceum*

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS การเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกไอโซเลต Cbi3.2.2 Cbi3.3.1 และ Plk1.1.9 เป็น *T. harzianum* *T. reesei* และ *T. virens* ซึ่งมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS การเติบโต และลักษณะทางสัณฐานวิทยา สอดคล้องกัน สำหรับไอโซเลต Cbi3.1.1 Cpn1.1.1 Pbn1.1.5 และ Ubn1.1.3 ยังไม่สามารถ จำแนกชนิดได้ ราทั้ง 7 ไอโซเลตถูกกำหนดรหัสสายพันธุ์ และเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชของ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Professor Kasin Suvatabhandhu Herbarium, Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 รหัสสายพันธุ์และข้อมูลโดยสรุปของ *Trichoderma* ไอโซเลตที่พบ dsRNA ในการศึกษานี้

รหัสสายพันธุ์	รหัสไอโซเลต	ชนิด	แหล่งที่คัดแยก
BCU-CB-T01*	Cbi3.1.1	<i>Trichoderma</i> sp.	เห็ดหึ่ง จ.ชลบุรี
BCU-CB-T02	Cbi3.2.2	<i>Trichoderma harzianum</i>	กิ่งไม้ จ.ชลบุรี
BCU-CB-T03	Cbi3.3.1	<i>Trichoderma reesei</i>	เห็ดหึ่ง จ.ชลบุรี
BCU-CB-T04	Cpn1.1.1	<i>Trichoderma</i> sp.	ดิน จ.ชุมพร
BCU-CB-T05	Pbn1.1.5	<i>Trichoderma</i> sp.	ดิน จ.เพชรบูรณ์
BCU-CB-T06	Plk1.1.9	<i>Trichoderma virens</i>	ดิน จ.พิษณุโลก
BCU-CB-T07	Ubn1.1.3	<i>Trichoderma</i> sp.	ดิน จ.อุบลราชธานี

\*BCU: Bangkok, Department of Botany Herbarium, Faculty of Science, Chulalongkorn University, CB: Chandavimol Boonyarit, T: *Trichoderma*

### 3. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA

#### 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA จาก *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi3.3.1

ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA จาก *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi3.3.1 โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA มาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม blastx และวิเคราะห์ Putative protein ด้วยโปรแกรม Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) จากนั้นตรวจสอบ percent identity ของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับยีนและโปรตีนของไวรัสไฮโซเลตที่คล้ายคลึงกันมากที่สุดที่ได้จากการใช้ blastx โดยการทำให้ pairwise sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustalw2

#### 3.1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ Replicase

##### 3.1.1.1 โคลน c88

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก cDNA clone c88 มีความยาว 480 เบส (ภาพที่ 25) เมื่อวิเคราะห์ putative protein ด้วยโปรแกรม Translate Tool ได้โปรตีนยาว 160 กรดอะมิโน จากด้าน 3'5' Frame 1 (ภาพที่ 26) ผลการเปรียบเทียบ pairwise alignment กับยีนและโปรตีนของไวรัสที่คล้ายคลึงกันมากที่สุดที่ได้จากการทำ blastx (ตารางที่ 13 - 14) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับ replicase gene ของ *Raphanus sativus cryptic virus 2* (NC\_010343) ที่ 238 ลำดับ (44.8 %) และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับของ putative RNA dependent RNA polymerase (RdRp) ของ *Primula malacoides virus* China/Mar2007 (YP\_003104768) ที่ 88 ลำดับ (54.3 %)

```
GGCGCGTTGGTCAAATTTGGGACCAATCGATCGTGAAGAATGAGCTGTATTGCTTTGCAATGTGATCTATGTAGGAC
ATTGCTCCTCGGATAGTTTTTCGAGACCATACATAATGCATGAGTCAGGGTGCCTTGCGGAAACAAGGAGAGGAAAAG
TCAGCATAGCTTCTATCAGGATGAACATTTTCATCAACGGCGTATACGGGTCTCTGTTTTGAGATTGCCATCGCGTTC
AGAAATATGATTCCTTGTGAAGAGCATTGTTGCGTGGTTATCTATATAAATAGATAATGACTTAGCTAGTTTCATTG
AATCTTTCTTCATCAGAAAAGTTCGGGATCTGGATCGTAATCAAACGGGACAGGTAAGGGATAGTTAGATTGCTTAA
TCTTGTGGAGTTGCGTGGTGTACTTCCAAAAAGCGTTATAGAAGTATCCTTTTGAAGTTGGCCTGTGTTTGTA
TTCGACGGGGTGTGAGAATTTTGC
```

ภาพที่ 25 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA clone c88

```
AKFSHPVEYKHRPTSKGYFYNAFWEVARTQLHKIKQSNYPLFPVDFDYDPELSDEERFNELAKSLSIYIDNHATM
LFTRNHISERDGNLQRPVYAVDEMFILIEAMLTFFLLVSARHPDSCIMYGLETIRGAMSYIDHIAKQYSSFFTTID
WSQFDQRA
```

ภาพที่ 26 ลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA clone c88

ตารางที่ 13 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โคลน c88 โดยการทำ pairwise alignment

	Description	GenBank accession #	Length (bp)	Nucleotide Identity (%)
	c88	-	480	
1	Raphanus sativus cryptic virus 2 segment 1	NC_010343	1717	238/531 (44.8 %)
2	Vicia cryptic virus RNA1	NC_007241	2012	241/542 (44.5 %)
3	Primula malacoides virus China/Mar2007 RNA 1	NC_013109	2390	231/522 (44.3 %)
4	Atkinsonella hypoxylon partitivirus RNA 1	NC_003470	2180	235/534 (44.0 %)
5	Ceratocystis polonica partitivirus segment 1	NC_010705	2315	217/517 (43.9 %)
6	Sclerotinia sclerotiorum partitivirus S segment 1	NC_013014	1874	234/539 (43.4 %)
7	Rhizoctonia solani virus 717 RNA1	NC_003801	2363	221/512 (43.2 %)
8	Raphanus sativus cryptic virus 1 dsRNA 1	NC_008191	1866	219/508 (43.1 %)
9	Ceratocystis resinifera partitivirus RNA 1	NC_010755	2207	223/522 (42.7 %)
10	Beet cryptic virus 1 RNA 1	NC_011556	2008	224/530 (42.3 %)
11	Fusarium poae virus 1 RNA 2	NC_003884	2203	215/508 (42.3 %)
12	Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8 segment 1	NC_007537	2299	209/499 (41.9 %)
13	Raphanus sativus cryptic virus 3 segment 1	NC_011705	1609	209/500 (41.8 %)
14	Amasya cherry disease-associated mycovirus	NC_006441	2002	212/510 (41.6 %)
15	White clover cryptic virus 1 RNA1	NC_006275	1955	204/502 (40.6 %)
16	Pleurotus ostreatus virus 1 RNA-1	NC_006961	2296	196/496 (39.5 %)

ตารางที่ 14 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA โคลน c88 โดยการทำ pairwise alignment

	Description	GenBank accession #	Length (aa)	Amino acid Identity (%)
	c88	-	160	
1	putative RdRp [Primula malacoides virus China/Mar2007]	YP_003104768	723	88/162 (54.3 %)
2	putative RdRp [Fusarium poae virus 1]	NP_624349	673	90/174 (51.7 %)
3	putative RdRp [Pleurotus ostreatus virus 1]	YP_227355	706	86/173 (49.7 %)
4	putative RdRp [Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8]	YP_392480	709	85/176 (48.3 %)
5	putative RdRp [Rhizoctonia solani virus 717]	NP_620659	730	83/173 (48.0 %)
6	putative RdRp [Atkinsonella hypoxylon partitivirus]	NP_604475	665	73/306 (23.9 %)
7	putative RdRp [Vicia cryptic virus]	YP_272124	616	43/231 (18.6 %)
8	putative RdRp [Ceratomyces polonica partitivirus]	YP_001911122	663	62/344 (18.0 %)
9	putative RdRp [Beet cryptic virus 1]	YP_002308574	616	41/237 (17.3 %)
10	putative RdRp [Ceratomyces resinifera partitivirus]	YP_001936016	663	54/315 (17.1 %)
11	putative RdRp [Raphanus sativus cryptic virus 1]	YP_656506	573	34/205 (16.6 %)
12	putative RdRp [Amasya cherry disease-associated mycovirus]	YP_138537	621	33/204 (16.2 %)
13	putative RdRp [Sclerotinia sclerotiorum partitivirus S]	YP_003082248	580	40/251 (15.9 %)
14	putative RdRp [Raphanus sativus cryptic virus 2]	YP_001686783	477	27/177 (15.3 %)
15	putative RdRp [White clover cryptic virus 1]	YP_086754	616	43/298 (14.4 %)
16	putative RdRp [Raphanus sativus cryptic virus 3]	YP_002364401	481	27/188 (14.4 %)

### 3.1.1.2 โคลน c101

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก cDNA clone c101 มีความยาว 270 เบส (ภาพที่ 27) เมื่อวิเคราะห์ putative protein ด้วยโปรแกรม Translate Tool ได้โปรตีนยาว 89 กรดอะมิโน จากด้าน 5'3' Frame 3 (ภาพที่ 28) ผลการเปรียบเทียบ pairwise alignment กับยีนและโปรตีนของไวรัสที่คล้ายคลึงกันมากที่สุดที่ได้จากการทำ blastx (ตารางที่ 15 - 16) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับ replicase gene ของ *Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8* (NC\_007537) ที่ 140 ลำดับ (51.3 %) และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับของ putative RdRp ของ *Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8* (YP\_392480) ที่ 40 ลำดับ (38.1 %)

```
GAAAGCCGTCAAATGGAATTCTCAACGTTCCGCGCCAATCCACAATGGAAACATTGTCCGCGCCGACAACCCTGT
GATACTCGATCCGACTACTGAAGATCCAGTTCGCCGAAACAGGTTACGTGGTACACCCAATGATTCAATACTTGATT
ACACACAAGTATCAAGAATACAAATGGATCCCCGACTTCTACGTCCGCTCCGCTTGGCACAACCGATGCAACATTCA
GTGATTTCAATCGCGAACAGCGTCCATCCGACCCAGTCCCCG
```

ภาพที่ 27 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA จาก clone c101

```
KPSNGILNVPRQFHNGNIVRADNPVILDPTTEDVPVETGYVVHPMIQYLI THKYQEYKWI PDFYVRPLGTTDATFS
DFNREQRPSDPVP
```

ภาพที่ 28 ลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก clone c101

ตารางที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โคลน c101 โดยการทำ pairwise alignment

	Description	GenBank accession #	Length (bp)	Nucleotide Identity (%)
	c101	-	270	
1	<i>Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8 segment 1</i>	NC_007537	2299	140/273 (51.3 %)
2	<i>Primula malacoides virus China/Mar2007 RNA 1</i>	NC_013109	2390	139/275 (50.5 %)
3	<i>Pleurotus ostreatus virus 1 RNA-1</i>	NC_006961	2296	137/274 (50.0 %)
4	<i>Pleurotus ostreatus virus 1</i>	GQ505291	1558	140/283 (49.5 %)
5	<i>Grapevine associated partitivirus-1 isolate Ctg474</i>	GU108584	2231	140/284 (49.3 %)
6	<i>Helicobasidium mompa partitivirus V1-1</i>	AB110979	2247	136/279 (48.7 %)
7	<i>Heterobasidion RNA virus 2 isolate HetRV2-pa1</i>	HM565953	2290	137/294 (46.6 %)
8	<i>Rhizoctonia solani virus 717 RNA1</i>	NC_003801	2363	140/301 (46.5 %)
9	<i>Fusarium poae virus 1 RNA 1</i>	NC_003883	2185	121/278 (43.5 %)

ตารางที่ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA โคลน c101 โดยการทำ pairwise alignment

	Description	GenBank accession #	Length (aa)	Amino acid Identity (%)
	c101	-	89	
1	putative RdRp [Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8]	YP_392480	709	40/105 (38.1 %)
2	putative RdRp [Primula malacoides virus China/Mar2007]	YP_003104768	723	32/110 (29.1 %)
3	putative RdRp [Pleurotus ostreatus virus 1]	YP_227355	706	38/135 (28.1 %)
4	putative RdRp [Helicobasidium mompa partitivirus V1-1]	BAD32677	706	47/171 (27.5 %)
5	putative RdRp [Pleurotus ostreatus virus 1]	ACX43952	502	37/135 (27.4 %)
6	putative RdRp [Fusarium poae virus 1]	NP_624349	673	38/143 (26/6 %)
7	putative RdRp [Grapevine associated partitivirus-1]	ADO60922	701	35/141 (24.8 %)
8	putative RdRp [Rhizoctonia solani virus 717]	NP_620659	730	37/180 (20.6 %)
9	putative RdRp [Heterobasidion RNA virus 2]	ADL66905	722	31/152 (20.4 %)

### 3.1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ Capsid protein gene

#### โคลน c171

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก cDNA clone c171 มีความยาว 475 เบส (ภาพที่ 29) เมื่อวิเคราะห์ putative protein ด้วยโปรแกรม Translate Tool ได้โปรตีนยาว 158 กรดอะมิโน จากด้าน 5'3' Frame 3 (ภาพที่ 30) ผลการเปรียบเทียบ pairwise alignment กับยีนและโปรตีนของไวรัสที่คล้ายคลึงกันมากที่สุดที่ได้จากการทำ blastx (ตารางที่ 17 – 18) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับ hypothetical protein ของ *Tetrahymena thermophila* (XM\_001030027) ที่ 225 ลำดับ (43.7 %) และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงมากที่สุดกับลำดับของ putative capsid protein ของ *Primula malacoides virus* China/Mar2007 (YP\_003104769) ที่ 50 ลำดับ (29.1 %)

```
AAAAGCTAACGTAGTATGGAATAGAGGAGTCGGCAAACCATGAGTTCTCAATTCCCAGAGAAAGGGAAGGGTTGGG
AACGGGGATGACCGTACCATCTAAGTCGAATGACTCGATGACCATACCGAAAGCAGTCGCATCCCAAGCATCAACA
GTTGAGCCTTCAAGATCAAGGACGTAACCTCGTGGGTACAAGTGCAAGCTTTCGCTGAACTGTACGAATTCATCAT
TTCGTGGAAATGGGAGAGCATCGTCGTCCTGGAGACTGTAGGTTGAGGGGGGAGTCGAATGACGCTTTGACCTGATG
TTCCTTGTCTGATTGGCAGGTGCCAGTGGGTTGAGGCATTTCCCTCGAGCTTTGGCTTGTCTGGGCACTCGCAAAAAG
CGAACGGCGGGCGAAAAGTCAGCGGGGGGAACGCGAACCTGGGCGCTTAAAATTAGAATCAGGGAAGGTGATGGCAG
AGTGGTGCCATGTGGGGAG
```

ภาพที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก clone c171



LPTWHHSAITFPDSNFKRPVRVPPADFSAAVRFLRVPDKPKLEEMPQPTGTCQSDKEHQVKASFDSPLNLQSPDDD  
ALPFPNRNDEFVQFSESLHLYPRVYVLDLEGSTVDAWDATAFGMVIESFDLDTGTVIPVNPNSLSLGIENSWFADSSI  
PYYVSF

ภาพที่ 30 ลำดับกรดอะมิโนของ putative protein ของ c171

ตารางที่ 17 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA โคลน c171 โดยการทำให้ pairwise alignment

	Description	GenBank accession #	Length (bp)	Nucleotide Identity (%)
	c171	-	475	
1	Tetrahymena thermophila hypothetical protein, mRNA	XM_001030027	2508	225/515 (43.7 %)
2	Haloarcula marismortui ATCC 43049 chromosome I	NC_006396	3131724	223/521 (42.8 %)
3	Primula malacoides virus China/Mar2007 RNA 2	NC_013110	2344	204/505 (40.4 %)
4	Rhizoctonia solani virus RNA2	NC_003802	2206	202/502 (40.2 %)
5	Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8 segment 2	NC_007538	2279	200/507 (39.4 %)

ตารางที่ 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ putative protein จาก cDNA โคลน c171 โดยการทำให้ pairwise alignment

	Description	GenBank accession #	Length (aa)	Amino acid Identity (%)
	c171	-	158	
1	putative capsid protein [Primula malacoides virus China/Mar2007]	YP_003104769	673	50/172 (29.1 %)
2	putative capsid protein [Rhizoctonia solani virus 717]	NP_620660	683	56/194 (28.9 %)
3	putative coat protein [Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8]	YP_392481	686	53/200 (26.5 %)
4	metallo-beta-lactamase [Haloarcula marismortui ATCC 43049]	YP_137463	286	40/216 (18.5 %)
5	hypothetical protein THERM_01179950 [Tetrahymena thermophila]	XP_001030027	835	36/443 (8.1 %)

## 2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ cDNA โคลนที่ได้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์กับไวรัสในสกุล *Partitivirus* จึงทำการรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของไวรัสในสกุล *Partitivirus* จากรายการ Virus Taxonomy 2009 list version 9 ของ ICTV (ICTV, 2011 : Online) และข้อมูลของไวรัสที่ยังไม่ถูกจำแนกในฐานข้อมูลของ GenBank (ตารางที่ 19) นำข้อมูลของ putative protein มาวิเคราะห์ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (ภาพที่ 31 – 33) จากนั้นนำผลที่ได้มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA5 (ภาพที่ 34 – 35) ด้วยวิธี Neighbor-Joining ผลพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ putative RdRp จากโคลน c88 และ c101 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัส *Rhizoctonia solani virus 717* (RhsV-717) *Rosellinia necatrix virus 1-W8* (RnRP1-W8) *Pleurotus ostreatus virus 1* (PoV-1) *Fusarium poae virus 1* (FpV-1) *Primula malacoides virus* (PmV) *Helicobasidium mompa partitivirus V1-1* (HmV-V1-1) และ Grapevine associated partitivirus-1 (GaPV-1) และลำดับกรดอะมิโนของ putative CP จากโคลน c171 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัส *Rhizoctonia solani virus 717* (RhsV-717) *Rosellinia necatrix virus 1-W8* (RnRP1-W8) และ *Primula malacoides virus* China/Mar2007 (PmV) เช่นกัน

ตารางที่ 19 ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของไวรัสในฐานข้อมูล GenBank

	Species	Abbreviation	GenBank accession #					
			RNA 1: putative RdRp	RNA 2: putative capsid protein	RNA 3	RNA 4		
<i>Partitivirus</i>								
1	<i>Agaricus bisporus virus 4 (Mushroom virus 4)</i>	AbV-4 (MV4)	-	-	-	-	-	-
2	<i>Aspergillus ochraceus virus (dsRNA complex)</i>	AoV	-	-	-	-	-	-
3	<i>Atkinsonella hypoxylon virus (Type species)</i>	AhV	NC_003470	NP_604475	NC_003471	NP_604476	NC_003472	-
4	<i>Ceratocystis resinifera virus 1</i>	CrV-1	NC_010755	YP_001936016	NC_010754	YP_001936015	-	-
5	<i>Discula destructiva virus 1</i>	DdV-1	NC_002797	NP_116716	NC_002800	NP_116742	NC_002801	NC_002802
6	<i>Discula destructiva virus 2</i>	DdV-2	NC_003710	NP_620301	NC_003711	NP_620302	-	-
7	<i>Fusarium poae virus 1</i>	FpV-1 (FUPO-1)	NC_003883	NP_624349	NC_003884	NP_624348	-	-
8	<i>Fusarium solani virus 1</i>	FusoV-1	NC_003885	NP_624350	NC_003886	NP_624351	-	-
9	<i>Gaeumannomyces graminis virus 019/6-A</i>	GgV-019/6-A	-	-	-	-	-	-
10	<i>Gaeumannomyces graminis virus T1-A</i>	GgV-T1-A	-	-	-	-	-	-
11	<i>Gremmeniella abietina RNA virus MS1</i>	GaV-MS1	NC_004018	NP_659027	NC_004019	NP_659028	NC_004020	-
12	<i>Helicobasidium mompa virus</i>	HmV	AB025903	BAC23065	-	-	-	-
13	<i>Heterobasidion annosum virus</i>	HaV	AF348136	AAK52739	-	-	-	-
14	<i>Ophiostoma himal-ulmi partitivirus 1</i>	OPV-1	AM087202	CAJ31886	AM087203	CAJ31887	-	-
15	<i>Penicillium stoloniferum virus F</i>	PsV-F	NC_007221	YP_271922	NC_007222	YP_271923	NC_007223	-
16	<i>Penicillium stoloniferum virus S</i>	PsV-S	NC_005976	YP_052856	NC_005977	YP_052857	NC_005976	-
17	<i>Pleurotus ostreatus virus 1</i>	PoV-1	NC_006961	YP_227355	NC_006960	YP_227354	-	-
18	<i>Rhizoctonia solani virus 717</i>	RhsV-717	NC_003801	NP_620659	NC_003802	NP_620660	-	-
19	<i>Rosellinia necatrix virus 1-W8</i>	RnPV1-W8	NC_007537	YP_392480	NC_007538	YP_392481	-	-

ตารางที่ 19 (ต่อ) ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของไวรัสในฐานข้อมูล GenBank

	Species	Abbreviation	GenBank accession #					
			RNA 1: putative RdRp	RNA 2: putative capsid protein	RNA 3	RNA 4		
<b>Tentative partitivirus species</b>								
1	Diplocarpon rosae virus	DrV	-	-	-	-	-	-
2	Phialophora radiculicola virus 2-2-A	PrV-2-2-A	-	-	-	-	-	-
<b>Unassigned partitivirus</b>								
1	Amasya cherry disease-associated partitivirus	ACD-PV	NC_006441	YP_138537	NC_006440	YP_138536	-	-
2	Aspergillus fumigatus partitivirus 1	AfPV-1	FN376847	CAY25801	FN398100	CAZ61323	FN376847	-
3	Aspegillus ochraceus virus F	AoV-F	EU118277	ABV30675	EU118278	ABV30676	EU118279	-
4	Botryotinia fuckeliana partitivirus 1	BfPV-1	NC_010349	YP_001686789	NC_010350	YP_001686790	NC_01035	-
5	Ceratocystis polonica partitivirus	CpPV-2008	NC_010705	YP_001911122	NC_010706	YP_001911123	-	-
6	Ceratocystis polonica partitivirus	CpPV-2004	AY260756	AAP86639	AY260757	AAP86640	-	-
7	Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus	CCRS-PV	AJ781401	CAH03668	AJ781402	CAH03669	-	-
8	Flammulina velutipes browning virus	FvBV	AB465308	BAH56481	AB465309	BAH56482	-	-
9	Flammulina velutipes isometric virus	FvIV	AB428575	BAH08700	-	-	-	-
10	Fusarium graminearum dsRNA mycovirus-2	FgV	AY372188	AAR17790	-	-	-	-
11	Gremmeniella abietina RNA virus MS2	GaV-MS2	NC_006444	YP_138540	NC_006445	YP_138541	NC_006446	-
12	Grapevine associated partitivirus-1	GaPV-1	GU108584	ADO60922	-	-	-	-
13	Grapevine associated partitivirus-2	GaPV-2	HM852916	ADU86896	-	-	-	-
14	Helicobasidium mompa partitivirus V1-1	HmV-V1-1	AB110979	BAD32677	-	-	-	-
15	Helicobasidium mompa partitivirus V1-2	HmV-V1-2	AB110980	BAD32678	-	-	-	-
16	Helicobasidium mompa partitivirus V13	HmV-V13	AB110978	BAF94205	-	-	-	-

ตารางที่ 19 (ต่อ) ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของไวรัสในฐานข้อมูล GenBank

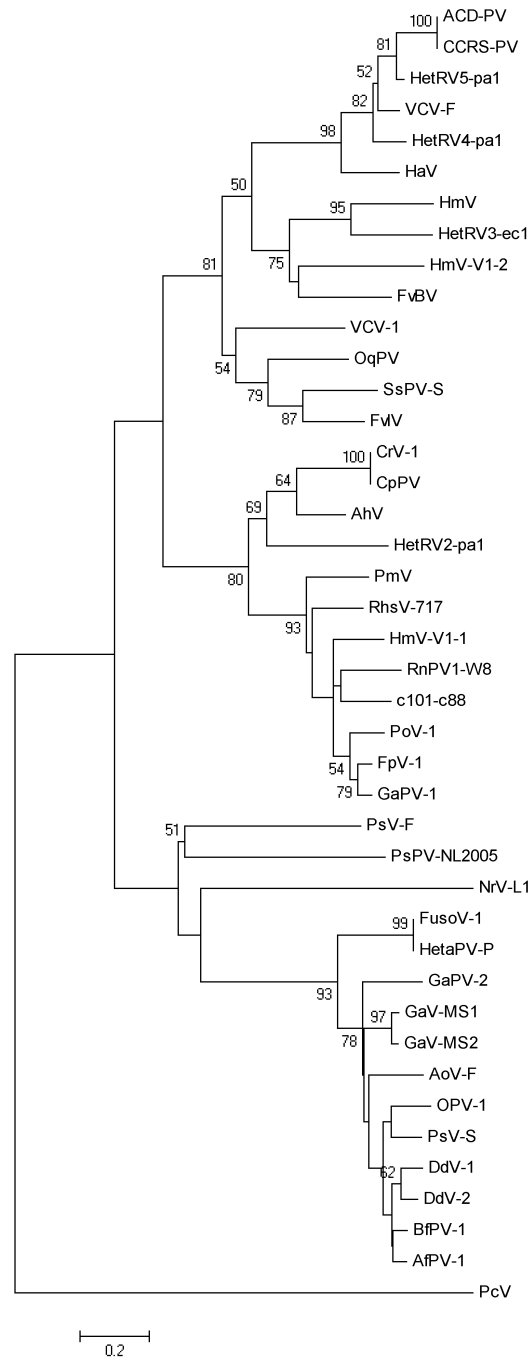
	Species	Abbreviation	GenBank accession #					
			RNA 1: putative RdRp		RNA 2: putative capsid protein		RNA 3	RNA 4
17	<i>Helicobasidium purpureum partitivirus</i>	HpPV	AY949837	AAX53614	-	-	-	-
18	<i>Heterobasidion annosum P-type partitivirus</i>	HetaPV-P	AF473549	AAL79540	-	-	-	-
19	<i>Heterobasidion parviorum partitivirus Fr110B</i>	HetpPV	FN665662	CBJ23785	-	-	-	-
20	<i>Heterobasidion RNA virus 2</i>	HetRV2-pa1	HM565953	ADL66905	HM565954	ADL66906	-	-
21	<i>Heterobasidion RNA virus 3</i>	HetRV3-ec1	FJ816271	ACO37245	FJ816272	ACO37246	-	-
22	<i>Heterobasidion RNA virus 4</i>	HetRV4-pa1	HQ541325	ADV15443	-	-	-	-
23	<i>Heterobasidion RNA virus 5</i>	HetRV5-pa1	HQ541326	ADV15444	-	-	-	-
24	<i>Metarhizium anisopliae virus-RJ</i>	MaV-RJ	-	-	-	-	-	-
25	<i>Nectria radicola virus L1</i>	NrV-L1	AF251278	AAK12855	-	-	-	-
26	<i>Ophiostoma quercus partitivirus</i>	OqPV	AM111099	CAJ34337	-	-	-	-
27	<i>Pinus sylvestris partitivirus NL-2005</i>	PsPV-NL2005	AY973825	AAJ51483	-	-	-	-
28	<i>Pleurotus ostreatus virus-SN</i>	PoV-SN	-	-	-	-	-	-
29	<i>Pleurotus ostreatus virus 1-TD300</i>	PoV-1-TD300	GQ505291	ACX43952	GQ505292	ACX43953	-	-
30	<i>Primula malacoides virus China/Mar2007</i>	PmV	NC_013109	YP_003104768	NC_013110	YP_003104769	-	-
31	<i>Rosellinia necatrix partitivirus 2-W57</i>	RnPV2-W57	-	-	AB569998	BAK53192	-	-
32	<i>Sclerotinia sclerotiorum partitivirus S</i>	SsPV-S	NC_013014	YP_003082248	NC_013015	YP_003082249	-	-
33	<i>Vicia cryptic virus isolate FA061102</i>	VCV-F	EU605883	ACC69172	-	-	-	-
34	<i>Vicia cryptic virus 1</i>	VCV-1	DQ910762	ABJ99996	-	-	-	-
<b><i>Chrysovirus</i></b>								
1	<i>Penicillium chrysogenum virus</i>	PcV	NC_007539	YP_392482	NC_007540	YP_392483	NC_007541	NC_007542

c88	-AKFSHPVEYKHRPTSKGYFYNAFWEVARTQLHKIKQSNYPVFPFDYDPPPELSDEERF	59
RnPv1-W8	HAYYARNKLYALRPTSKGYFFNTVYEFSTRWMMHHEHGYPFVPS-----HDA	48
PoV-1	HAMFSAPRLYERRTTSKGYFINYFLETARSTIHNKLGHPFDPS-----KV	47
FpV1	HALFSHPKEYESKRTSKGYVNAFLESARSLIHWIKLYGNPFRHC-----PS	47
HmV-V1-1	HASFAPPEQYHDRHTSKGYINTMQYARTIVHRLKQFALPFNPK-----DFDS	49
RhsV-717	FAHFCHPELYAEKPTSKGYFFNATKHENRFLVHKIKHSGYPFDFT-----SDSDR	50
PmV	HAKYSHPEEYALKSTSKGYFYNATYENARTLVHLIKTYGLPFNMQFACPKSD--LTDEQI	58
	* :. * : *****: * . * :* :* *:	
<b>Motif-III</b>		
c88	NELAKSLSIYIDNHATMLFTRNHISERDGNLQRPVYAVDEMFIIEAMLTFFLLVSARH	119
RnPv1-W8	LDNARQYRIFMQKHVTMLFTRNHISDRDGLKQRPVYAVDDFFILCELMISFPLHVMARY	108
PoV-1	PDLGSALRSFILKRPTMLFTRNHISDRDGNLQRPVYAMDDLFIRLESMTFFPLHVMARK	107
FpV1	-DLAQSLREFFLQRPMTMLFTRNHISDRDGLKQRPVYAVDDLFLLTIESMLTFPAHVIARK	106
HmV-V1-1	SSIFSRMRFFFLTRPTMLFTRNHISDRDGNLQRPVYAVDDLFLILEVMLTFPLLVMARL	109
RhsV-717	N---SKMADFLKSEPTMMFTRNHISKRDTLKVREPVYAVDELFLDLECMIAFPATVQARK	107
PmV	NLYISKANQFFNDYPTLLFTRNHISKRSGLTKVRPVYAVDDIFIIELMLTFPLTIQARK	118
	:: *:*:*****.* * ** *****:*:*: * *:*:* : **	
<b>Motif-IV</b>		
c88	PD---SCIMYGLETIRGAMSVIDHIAKQYSSFFTIDWSQFDQRA-	160
RnPv1-W8	PINGIKSCIMYSFETIRGSNRYLDSIARDFISFFTIDWSQFDQRP	154
PoV-1	IE---CCIMYGETIRGSNRQIDKIASFRSFFTIDWSGFDQRLP	149
FpV1	PE---CCIMYGLETIRGSNQILDKIASDYKSFFTIDWSGFDQRLP	148
HmV-V1-1	PE---CCIMYGLETIRGSNHWDSTAKRFRSYFTIDWSQYDQRLP	151
RhsV-717	PE---CCIMYGLETIRGSNIKLDLSAQGFISFATIDWSGYDQRLP	149
PmV	PS---CCIMYGLETIRGSNHYIDRLARPYSTFFSLDWSYDQRLP	160
	.****. *****: :* * : :: :*** :***	

ภาพที่ 31 Multiple amino acid sequence alignment ของ putative RdRp จากโคลน c88 กับ *Partitivirus* ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Rosellinia necatrix partitivirus 1 - W8* (RnPv1-W8; YP\_392480) *Pleurotus ostreatus virus 1* (PoV-1; YP\_227355) *Fusarium poae virus 1* (FpV1; NP\_624349) *Helicobasidium mompa partitivirus V1-1* (HmV-V1-1; BAD32677) *Rhizoctonia solani virus 717* (RhsV-717; NP\_620659) และ *Primula malacoides virus* (PmV; YP\_003104768) โดยแสดงบริเวณที่เป็น conserved motif ของ RdRp ที่ 3 และ 4 ของไวรัส dsRNA (Bruenn, 1993; Huang and Ghabrial, 1996; Chiba et al., 2009)

c101	KPSNGILNVPRQFHN-----GNIVRADNPVILDP-----TTEDPVP-----	36
RnPv1-W8	TQMNADRNEPFDEFYRPLE--DNELPDIRFPAPGITVLPFRYHTGQIVETTDELP-----	52
PoV-1	HDKARQDGFDFEFYRSRS--IDDLPDNRIPPSGI IPLPYEYHRSQVVI STEEVP-----	52
FpV-1	EDKQSQQGFPHEYYR-LH--ESPI PDDRIPPSGIKLLPFEYKSMNVVTATPEVP-----	51
HmV-V1-1	DQKNALKDQHFEFFSPSD--PTSFPADRLPAPGIQILPLRYHSTNPVIATNLVP-----	52
RhsV-717	IHRNAIKNRPFQFYTDLFT-DTDLPTDRIPKPGIELVNAYFHPGNVIRPNPEFSKQLTPD	59
PmV	RTDNQQKHQPYELHQPI PADAAP I IDKRQFAPGLKLVPLMYHYGHV IHDPPDPQP-----	55
	: . . . :	
c101	-----ETGYVVHPMIQYLITHKYQEYKWI PDFYVRPLGTTDATFSDFNREQ	82
RnPv1-W8	-----DSGFSLHPLIDYLTGTKWLHYRPYIDKYCRPLGTTNATFSDFNREQ	98
PoV-1	-----ETGFQIDPRIVRILRNKYPQYLPHVTKYVRPLGTTDATVKDFFKPQ	98
FpV-1	-----ESGFKIHPRIERLLRSKYPQYLQYVRKYTRPLGTTNATVSDFFKPQ	97
HmV-V1-1	-----ETGFPLHPLIHLYLVYRKYPRYIPYVEKYVRPLGTTDATFSDFNREQ	98
RhsV-717	MELDQFESYIPGDIDYGPPI DNELLTLIYRKYPQYLDPI TKYCRPAGTTDATFRDFNKEQ	119
PmV	-----DQTKVYPLDSRIYNLIMSTYPSYLSVLHDYCRPIGTVEATFNDFNTEQ	103
	:. : : .: * * * * .: **. ** *	
c101	RPSPVP- 89	
RnPv1-W8	IPSAPIDE 106	
PoV-1	IPSDPIPE 106	
FpV-1	TPSQPVEP 105	
HmV-V1-1	VKIAPLDP 106	
RhsV-717	IKTEDSDA 127	
PmV	IPSAPIDE 111	

ภาพที่ 32 Multiple amino acid sequence alignment ของ putative RdRp จากโคลน c101 กับ *Partitivirus* ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Rosellinia necatrix partitivirus 1 - W8* (RnPv1-W8; YP\_392480) *Pleurotus ostreatus virus 1* (PoV-1; YP\_227355) *Fusarium poae virus 1* (FpV1; NP\_624349) *Helicobasidium mompa partitivirus V1-1* (HmV-V1-1; BAD32677) *Rhizoctonia solani virus 717* (RhsV-717; NP\_620659) และ *Primula malacoides virus China/Mar2007* (PmV; YP\_003104768)

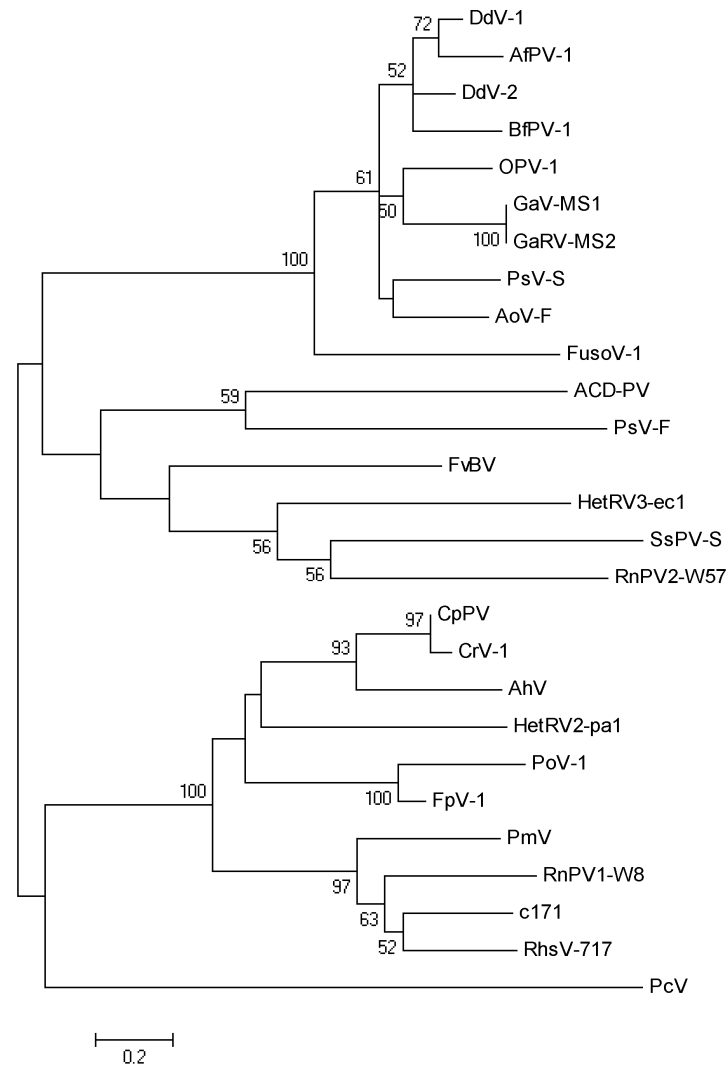


ภาพที่ 33 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่วิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของ putative RdRp จากโคลน c88 และ c101 กับไวรัสในวงศ์ *Partitiviridae* จำนวน 40 ชนิด ด้วยวิธี Neighbor-Joining จากกลุ่มข้อมูลทั้งหมด 77 ตำแหน่ง โดยมี *Penicillium chrysogenum virus* (PcV; YP\_392482) จากสกุล *Chrysovirus* เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม ตัวเลขที่ node แสดงเปอร์เซ็นต์ bootstrap (1000 ซ้ำ) เฉพาะค่าที่สูงกว่า 50% ความยาวของกิ่งในแนวนอนแสดงจำนวนของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน



c171	LPTWHHSAITFPD-----SNFKRPVRVPPADFSAAVRFLRVDPKPK-----LEEM	45
RnPv1-W8	QPLHHCADNMPTD----EFDVFESTVTVTRHPEQAAADHKYLVLPNKPN-----TGTT	50
RhsV-717	LPTAHGKNLIDANGDLISSAKLSATDRQISRSARDIAIEIGFLPPIDATP-----SHKQ	54
PmV	LPTWSYNTNATKS-----AVYSAITTLTTLTSEDRDRAQDICFLQRPAAAFNATTEVTDVT	54
	* . . . . . : : : *	
c171	PQPTGTCQSDK----EHQVKASFDSPLNLQSPD-----DDALFFPR--NDEFVQFSES	92
RnPv1-W8	HHLASAVCDTDPVHPVTVTQPSADFLVLRDVT-----TFPIADQHILIPRDTEFLLYDED	105
RhsV-717	PQPQALDNKDQPIPD SHVSNASWPWNLLHSTLNPPTAPKLSDVIQVPSP-ETEFEIFDSD	113
PmV	YAATATPNQAVQLPTGHQLTRHFFSLLQVPNG-----AEPFPRHDNDLQVFSDF	105
	. . . * . . . : : : . . .	
c171	LHLYPRVYVLDLEG-STVDAWDATAFGMVIESFDLDGTVIPVNPSSLGLIENSWFADSS	151
RnPv1-W8	RDFAPTVLVLDPTTNSTVSAYMATLTGMVIYSHEIDASAI SFPNTEDINGLHNCQFADSA	165
RhsV-717	RHHYPPVRVLNFPDDSTVDAH LATLTGMVIESFEIDGSVVAHPDAHLSNGVDNTWFAVSA	173
PmV	VHTAPSVLVLDTDGELTISAH LPLLAKGKIESFEIDGSTIEMPVNDKSLGLQNC L FADSA	165
	. * * ** : * : . * . * : * * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
c171	IPYYVSF-	158
RnPv1-W8	TPYTMVYR	173
RhsV-717	ISLRYVYQ	181
PmV	VSRYLVRP	173

ภาพที่ 34 Multiple amino acid sequence alignment ของ putative CP จากโคลน c171 กับ *Partitivus* ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Rosellinia necatrix partitivus 1 - W8* (RnPv1-W8; YP\_392480) *Rhizoctonia solani virus 717* (RhsV-717; NP\_620659) และ *Primula malacoides virus China/Mar2007* (PmV; YP\_003104768)

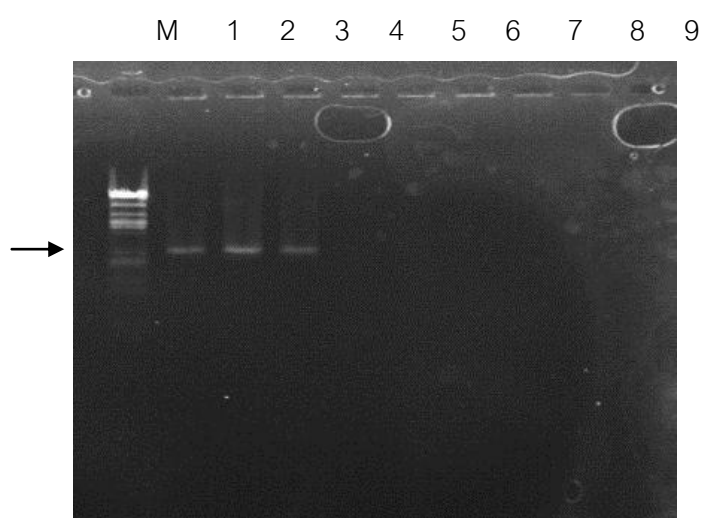


ภาพที่ 35 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่วิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของ putative CP จากโคลน c171 กับไวรัสในวงศ์ *Partitiviridae* จำนวน 26 ชนิด ด้วยวิธี Neighbor-Joining จากกลุ่มข้อมูลทั้งหมด 101 ตำแหน่ง โดยมี *Penicillium chrysogenum virus* (PcV; YP\_392482) จากสกุล *Chrysovirus* เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม ตัวเลขที่ node แสดงเปอร์เซ็นต์ bootstrap (1000 ซ้ำ) เฉพาะค่าที่สูงกว่า 50% ความยาวของกิ่งในแนวนอนแสดงจำนวนของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน

#### 4. การศึกษาผลของ dsRNA ที่มีต่อรา

##### 4.1 การขจัด dsRNA

การแยกโคโลนีจากเซลล์เดี่ยวจากสปอร์ของ *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi3.3.1 ได้โคโลนีเซลล์เดี่ยวที่ไม่มี dsRNA จำนวน 6 โคโลนี ได้แก่ โคโลนี c1 c4 c5 c6 c8 และ c9 จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มี dsRNA จำนวน 2 โคโลนี กำหนดเป็นโคโลนี v2 และ v3 แล้วตรวจสอบ dsRNA ในโคโลนีซ้ำอีกครั้ง (ภาพที่ 36) ก่อนทำการเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ



ภาพที่ 36 การตรวจสอบ dsRNA ในโคโลนีเซลล์เดี่ยว บน 1 % agarose ที่ 120 V เป็นเวลา 30 นาที เลน M :  $\lambda$  DNA marker เลนที่ 1: dsRNA จาก *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi3.3.1 เลนที่ 2 – 9: dsRNA จากโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีไวรัส v2 (2) และ v3 (3) และ dsRNA จากโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่ไม่มีไวรัส c1 (4) c4 (5) c5 (6) c6 (7) c8 (8) และ c9 (9)

#### 4.2 การเปรียบเทียบการเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากโคโลนีในข้อ 4.1 วัดรัศมีการเติบโตบนอาหาร CMD และ SNA ที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C เป็นเวลา 3 วัน (72 ชั่วโมง) เปรียบเทียบระหว่าง *Trichoderma* ไฮโซเลต Cbi3.3.1 กับกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มี dsRNA (v2 - v3) และกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่ไม่มี dsRNA (c1 c4 c5 c6 c8 และ c9) (ตารางที่ 20 – 21)

ผลทดลองพบว่าการเติบโตบนอาหาร CMD ที่อุณหภูมิ 15 °C โคโลนีเดี่ยวกลุ่มที่ไม่มี dsRNA มีการเติบโตไม่แตกต่างกับกลุ่มที่มี แต่มีค่าสูงกว่าไฮโซเลต Cbi3.3.1 อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีโคโลนี c9 ที่เติบโตได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 30 °C กลุ่มที่ไม่มี dsRNA มีการเติบโตเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่มี dsRNA และไฮโซเลต Cbi3.3.1 อย่างมีนัยสำคัญ และที่อุณหภูมิ 40 °C กลุ่มที่ไม่มี dsRNA มีการเติบโตเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มที่มี dsRNA อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีโคโลนี c5 ที่เติบโตได้ดีที่สุด เมื่อทำการเลี้ยงโคโลนีต่อไปในสภาวะห้องปกติ ลักษณะโคโลนีเซลล์เดี่ยวบน CMD หลัง 7 วันมีลักษณะไม่แตกต่างกัน แต่ภายหลัง 14 วัน กลุ่มของโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่ไม่มี dsRNA มีการสร้างสปอร์มากกว่ากลุ่มที่ไม่มี dsRNA อย่างชัดเจน ที่ทุกอุณหภูมิ (ภาพที่ 37)

การเติบโตของโคโลนีบนอาหาร SNA ที่อุณหภูมิ 15 °C โคโลนีเดี่ยวกลุ่มที่ไม่มี dsRNA มีการเติบโตสูงกว่ากลุ่มที่มีไวรัสและไฮโซเลต Cbi3.3.1 อย่างมีนัยสำคัญ มีโคโลนี c9 ที่เติบโตดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 30 °C และ 40 °C ไฮโซเลต Cbi3.3.1 มีการเติบโตน้อยกว่าโคโลนีเดี่ยวกลุ่มที่มี และไม่มี dsRNA อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีโคโลนี c8 ที่เติบโตดีที่สุดทั้งสองอุณหภูมิ ทั้งนี้ ลักษณะของโคโลนีทั้งหมดที่สังเกตระหว่างการเติบโตบน SNA เป็นเวลา 7 วันมีลักษณะไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ย ( $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของรัศมีการเติบโต (mm) ของโคโลนีเซลล์เดี่ยวเมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMD และ SNA เป็นเวลา 3 วัน

	โคโลนีเซลล์เดี่ยว (n=3)	CMD			SNA		
		15 °C	30 °C	40 °C	15 °C	30 °C	40 °C
1	ไฮโซเลต Cbi3.3.1	3.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	73.4 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>	17.6 $\pm$ 1.2 <sup>bcd</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	30.6 $\pm$ 2.3 <sup>ab</sup>	4.5 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup>
2	โคโลนี v2	8.9 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	73.7 $\pm$ 7.8 <sup>a</sup>	20.0 $\pm$ 1.0 <sup>cde</sup>	0.3 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup>	37.7 $\pm$ 2.3 <sup>bcd</sup>	9.2 $\pm$ 1.3 <sup>bcdef</sup>
3	โคโลนี v3	8.1 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	78.7 $\pm$ 2.3 <sup>ab</sup>	15.0 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.7 <sup>ab</sup>	41.0 $\pm$ 4.0 <sup>bcde</sup>	8.5 $\pm$ 1.8 <sup>bcde</sup>
4	โคโลนี c1	9.6 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	80.0 $\pm$ 0.0 <sup>bc</sup>	19.8 $\pm$ 0.8 <sup>bcde</sup>	1.7 $\pm$ 0.4 <sup>bcd</sup>	36.0 $\pm$ 2.3 <sup>abcd</sup>	10.5 $\pm$ 0.5 <sup>cdefg</sup>
5	โคโลนี c4	8.2 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>	80.0 $\pm$ 0.0 <sup>bc</sup>	17.7 $\pm$ 0.6 <sup>bcde</sup>	2.7 $\pm$ 1.0 <sup>cde</sup>	37.8 $\pm$ 4.3 <sup>bcd</sup>	7.7 $\pm$ 2.1 <sup>bcde</sup>
6	โคโลนี c5	9.0 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	80.0 $\pm$ 0.0 <sup>bc</sup>	21.7 $\pm$ 0.8 <sup>de</sup>	0.7 $\pm$ 1.3 <sup>abc</sup>	29.5 $\pm$ 3.1 <sup>ab</sup>	7.3 $\pm$ 2.0 <sup>abcd</sup>
7	โคโลนี c6	8.7 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	80.0 $\pm$ 0.0 <sup>bc</sup>	19.8 $\pm$ 2.0 <sup>bcde</sup>	0.7 $\pm$ 1.9 <sup>abc</sup>	42.5 $\pm$ 1.8 <sup>bcde</sup>	11.7 $\pm$ 2.8 <sup>defgh</sup>
8	โคโลนี c8	16.2 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>	80.0 $\pm$ 0.0 <sup>bc</sup>	19.7 $\pm$ 2.3 <sup>bcde</sup>	2.3 $\pm$ 1.2 <sup>cd</sup>	44.6 $\pm$ 4.9 <sup>de</sup>	14.0 $\pm$ 1.0 <sup>fgh</sup>
9	โคโลนี c9	17.7 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>	80.0 $\pm$ 0.0 <sup>bc</sup>	19.7 $\pm$ 2.1 <sup>bcde</sup>	3.3 $\pm$ 0.8 <sup>de</sup>	42.1 $\pm$ 6.7 <sup>bcde</sup>	13.5 $\pm$ 2.8 <sup>efgh</sup>

\* ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

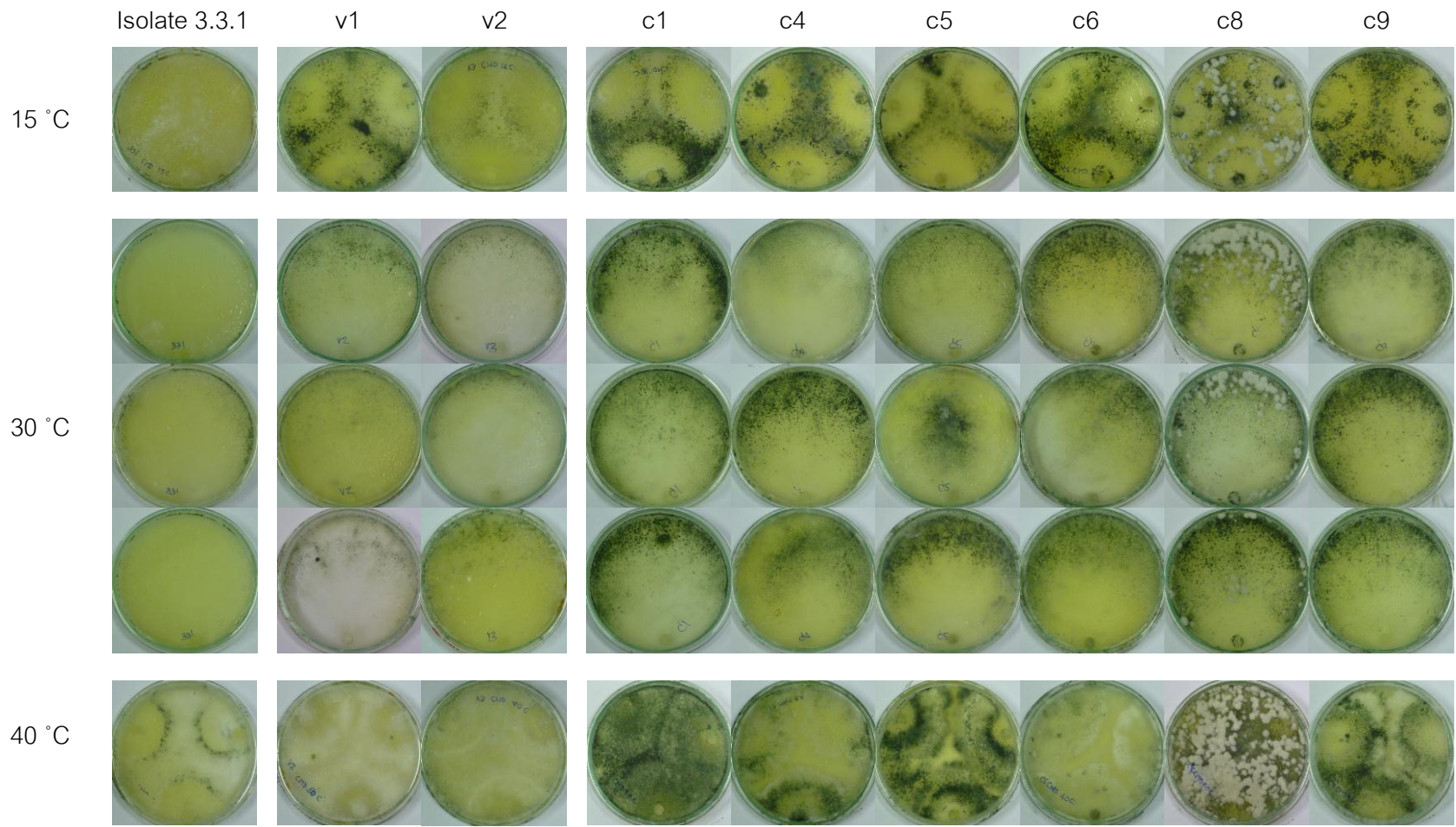
\*\* ค่าที่ขีดเส้นใต้แสดงว่าค่าที่นำมาเฉลี่ยมีค่าสูงสุดที่วัดได้เมื่อเลี้ยงใยเติบโตเต็มจานอาหารเลี้ยง โดยมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 80 mm

ตารางที่ 21 ค่าเฉลี่ย ( $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของรัศมีการเติบโต (mm) ของกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA เมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMD และ SNA เป็นเวลา 3 วัน

		CMD			SNA		
		15 °C	30 °C	40 °C	15 °C	30 °C	40 °C
1	ไอโซเลต Cbi3.3.1 (n=3)	3.9 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	73.4 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>	17.6 $\pm$ 1.2 <sup>ab</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	30.6 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>	4.5 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
2	โคโลนีเดี่ยวที่มี dsRNA (n=6)	8.5 $\pm$ 1.1 <sup>ab</sup>	76.2 $\pm$ 5.8 <sup>a</sup>	17.5 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	39.3 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	8.8 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>
3	โคโลนีเดี่ยวที่ไม่มี dsRNA (n=18)	11.6 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	80.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	19.7 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	1.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	38.8 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup>	10.8 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>

\* ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

\*\* ค่าที่ขีดเส้นใต้แสดงว่าค่าที่นำมาเฉลี่ยมีค่าสูงสุดที่วัดได้เมื่อเลี้ยงใยเติบโตเต็มจานอาหารเลี้ยง โดยมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 80 mm



ภาพที่ 37 โคโลนีเชลล์เดี่ยวบนจานอาหาร CMD ที่เลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน

#### 4.3 การเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ endoglucanase

การผลิตเอนไซม์ endoglucanase ของโคโลนีเดี่ยวจากการเลี้ยงในอาหาร production ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน (120 ชั่วโมง) คำนวณค่าแอกติวิตีจาก crude enzyme ที่ได้ จากปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อย 2% (w/v) carboxy methyl cellulose (CMC) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที วัดปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Somogyi-Nelson และวัดปริมาณโปรตีนใน crude enzyme ด้วยวิธี Bradford จากนั้นคำนวณค่าแอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase (ตารางที่ 22 - 23) ค่าแอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะของแต่ละโคโลนีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ปริมาณโปรตีนของกลุ่มโคโลนีเดี่ยวที่มี dsRNA มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่มีอย่างมีนัยสำคัญ โดยโคโลนีเดี่ยว c5 ที่ไม่มี dsRNA มีค่าแอกติวิตีและแอกติวิตีจำเพาะสูงสุด และโคโลนีเดี่ยว c4 ที่ไม่มี dsRNA มีปริมาณโปรตีนสูงสุด

ตารางที่ 22 ค่าเฉลี่ย ( $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของแอกติวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase จาก crude enzyme ที่ได้จากโคโลนีเซลล์เดี่ยว

	โคโลนี (n=3)	แอกติวิตี (mU/mL)	ปริมาณโปรตีน ( $\mu$ g/mL)	แอกติวิตีจำเพาะ (U/mg protein)
1	ไฮโซเลต Cbi3.3.1	3.4 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	72.6 $\pm$ 6.0 <sup>abcd</sup>	0.05 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
2	โคโลนี v2	4.5 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	65.4 $\pm$ 3.1 <sup>abc</sup>	0.07 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
3	โคโลนี v3	2.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	60.9 $\pm$ 11.8 <sup>ab</sup>	0.04 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
4	โคโลนี c1	3.6 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	76.7 $\pm$ 5.3 <sup>bcd</sup>	0.05 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
5	โคโลนี c4	1.9 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	81.9 $\pm$ 9.8 <sup>cd</sup>	0.02 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
6	โคโลนี c5	4.5 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	74.5 $\pm$ 3.3 <sup>bcd</sup>	0.06 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
7	โคโลนี c6	4.0 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	72.4 $\pm$ 7.8 <sup>abcd</sup>	0.06 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
8	โคโลนี c8	1.5 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	66.9 $\pm$ 10.5 <sup>abc</sup>	0.02 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
9	โคโลนี c9	3.6 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	74.1 $\pm$ 1.5 <sup>bcd</sup>	0.05 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>

\* ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )



ตารางที่ 23 ค่าเฉลี่ย ( $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของแอกติวิตี ปริมาณโปรตีน และแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase จาก crude enzyme ที่ได้จากกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA

		แอกติวิตี (mU/mL)	ปริมาณโปรตีน ( $\mu$ g/mL)	แอกติวิตีจำเพาะ (U/mg protein)
1	ไอโซเลต Cbi3.3.1 (n=3)	3.3 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	72.6 $\pm$ 6.0 <sup>ab</sup>	0.05 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
2	โคโลนีเดี่ยวที่มี dsRNA (n=6)	3.5 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	63.2 $\pm$ 8.1 <sup>b</sup>	0.06 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
3	โคโลนีเดี่ยวที่ไม่มี dsRNA (n=18)	3.2 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	74.4 $\pm$ 7.6 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>

\* ตัวอักษรยกภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ )

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย

#### 1. การคัดแยกรา *Trichoderma*

จากตัวอย่างดิน กิ่งไม้ และเห็ดหึ่งที่เก็บจากบริเวณต่างๆใน 13 จังหวัดของประเทศไทย ตั้งแต่ช่วงเดือน สิงหาคม พ.ศ. 2551 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2553 คัดแยกราบนอาหาร P0.5DA+c ที่มีน้ำตาล glucose เพียง 0.5% (w/v) เพื่อชะลอการเติบโตของราชนิดต่างๆ และเติม chloramphenicol 10 mg/mL เพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย การคัดเลือกไอโซเลตที่มีลักษณะโคโลนีคล้าย *Trichoderma* พิจารณาจากลักษณะเส้นใยสีไม่มีสีหรือมีสีขาว เติบโตได้เร็ว และอาจเติบโตบนโคโลนีของราอื่นได้ มีการสร้างสปอร์สีเขียว สีเขียวเหลือง และสีขาว จากนั้นตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาของแต่ละไอโซเลตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะของ conidiophore phialide และ conidia กับลักษณะของ *Trichoderma* ที่รายงานไว้โดย Chaverri และ Samuel (2003) คัดแยกราที่มีลักษณะคล้าย *Trichoderma* และมีลักษณะของโคโลนีหรือการเติบโตที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ได้จำนวนทั้งสิ้น 96 ไอโซเลต โดยเป็นไอโซเลตที่แยกจากตัวอย่างดิน 13 ตัวอย่างที่เก็บใน 11 จังหวัดจากทุกภาคของประเทศไทยเป็นจำนวน 76 ไอโซเลต แยกจากตัวอย่างกิ่งไม้ 3 ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรีและกาญจนบุรีเป็นจำนวน 7 ไอโซเลต และแยกจากตัวอย่างเห็ดหึ่ง 4 ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรีและร้อยเอ็ดเป็นจำนวน 19 ไอโซเลต จากการวิจัยนี้ได้เน้นการเก็บตัวอย่างดินซึ่งเป็นแหล่งอาศัยของรา *Trichoderma* ซึ่งสามารถคัดแยกได้จำนวนมาก โดยพบไอโซเลตที่มีลักษณะคล้าย *Trichoderma* ที่แตกต่างกันจำนวนถึง 12 ไอโซเลตภายในตัวอย่างเดียว สำหรับตัวอย่างกิ่งไม้และเห็ดหึ่งก็เป็นอีกแหล่งอาศัยของรา *Trichoderma* โดยตัวอย่างกิ่งไม้และเห็ดหึ่งนี้ในการศึกษานี้เป็นตัวอย่างที่นำมาคัดแยกราในกลุ่มเน่าขาว (white rot) และพบการปนเปื้อนของราหลายชนิดบนตัวอย่าง ซึ่งเป็นราที่มีลักษณะคล้าย *Trichoderma* และนำมาใช้ในงานวิจัยนี้ โดยพบจำนวนตั้งแต่ 2 ถึง 8 ไอโซเลตจากตัวอย่างเดียวกัน ถึงแม้ว่าตัวอย่างกิ่งไม้และเห็ดหึ่งจะมีจำนวนไอโซเลตน้อยกว่า แต่ลักษณะของไอโซเลตกลุ่มที่ได้จากตัวอย่างกิ่งไม้และเห็ดหึ่งมีลักษณะโคโลนีแตกต่างจากกลุ่มไอโซเลตที่ได้จากตัวอย่างดิน ซึ่งจากรายงานการศึกษารรา *Trichoderma* แต่ละชนิดก็คัดแยกได้จากแหล่งอาศัยที่ต่างกันได้ (Chaverri and Samuel, 2003; Jaklitsch, 2009; Kubicek et al., 2003; Kullnig-Gradinger et al., 2002; Samuel et al., 2002)

## 2. การตรวจสอบ dsRNA

### 2.1 การสกัด dsRNA

สำหรับวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบไวรัสที่ใช้ในการศึกษา ได้ใช้วิธีการตรวจสอบ dsRNA โดยการแยก dsRNA ด้วย cellulose column chromatography ซึ่งอาศัยคุณสมบัติในการจับระหว่างโมเลกุลของ dsRNA กับ cellulose ในสารละลายที่มี ethanol ความเข้มข้นประมาณ 15 % เพื่อแยก dsRNA จากสารพันธุกรรมอื่นๆ (Morris and Dodds, 1979) วิธีการแยก dsRNA นี้สามารถตรวจสอบ dsRNA ของไวรัสที่มีจีโนมเป็น ssRNA และ dsRNA ซึ่งเป็นโมโคไวรัสส่วนใหญ่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากนั้นทำการยืนยันโครงสร้างของ dsRNA ที่ได้นี้ด้วยการย่อยด้วย nuclease ชนิดต่างๆ ได้แก่ DNase I จะย่อย DNA ทั้งสายคู่และสายเดี่ยว S1 nuclease จะย่อย ssRNA และ ssDNA และ RNase A จะย่อย RNA ทั้งหมดในสภาวะของสารละลายที่มีความเข้มข้นเกลือต่ำ (0.1x SSC buffer) แต่ย่อย dsRNA ไม่ได้ในสภาวะของสารละลายที่มีความเข้มข้นเกลือสูง (2x SSC buffer) (Billeter et al., 1966) ซึ่งจากผลที่ได้ยืนยันแถบที่สกัดได้มีโครงสร้างเป็น dsRNA จริง

การตรวจสอบ dsRNA ใน 96 ไอโซเลตของรา *Trichoderma* ที่คัดแยกได้ พบแถบ dsRNA ใน 7 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต Cbi3.1.1 Cbi3.2.2 และ Cbi3.3.1 แยกจากตัวอย่างกิ่งไม้หรือเห็ดแห้งจากพื้นที่ป่าของอุทยานแห่งชาติเขาเขียว จังหวัดชลบุรี ไอโซเลต Cpn1.1.1 Pbn1.1.5 PIK1.1.9 และ Ubn1.1.3 แยกจากตัวอย่างดินจากจังหวัดชุมพร เพชรบูรณ์ พิษณุโลก และ อุบลราชธานี ตามลำดับ จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสามารถพบ dsRNA ที่อาจเป็นไวรัสในรา *Trichoderma* ที่แยกจากตัวอย่างดินที่เก็บจากธรรมชาติจากทุกภาคของประเทศไทย และสามารถพบได้มากถึง 3 ไอโซเลตที่แตกต่างกันจากตัวอย่างกิ่งไม้และเห็ดแห้งที่เก็บจากสถานที่เดียว

อัตราการพบ dsRNA ในรา *Trichoderma* จากการศึกษานี้คิดเป็น 7 % จาก 96 ไอโซเลตที่แยกจากตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติจากจังหวัดในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ซึ่งสูงกว่าอัตราการพบใน *Trichoderma* ที่แยกจากฟาร์มเห็ดและพื้นที่เกษตรเฉพาะในจังหวัดเชียงใหม่ โดย Jom-in และ Akarapisan (2009) ซึ่งพบในอัตรา 1.3 % จาก 156 ไอโซเลต โดยทั่วไปอัตราการพบ dsRNA ในเห็ดรากลุ่มต่าง ๆ มีตั้งแต่ 10 % จนถึง 100 % ในตัวอย่างที่ทำการศึกษา (Pearson et al., 2009) อย่างเช่นราที่คัดแยกจากดินในกลุ่ม *Aspergillus* section *Nigri* มีอัตราการพบ dsRNA ประมาณ 7 % ของราจำนวนประมาณ 300 ไอโซเลตที่คัดแยกจากตัวอย่างจากธรรมชาติในประเทศต่างๆ ในขณะที่ราสายพันธุ์ที่ถูกเก็บรักษาไว้ในศูนย์เก็บรักษาพันธุ์จุลินทรีย์มี

อัตราพบถึง 25.5 % จาก 51 สายพันธุ์ (Varga et al., 1994) ทั้งนี้ในอีกรายงานการศึกษาหนึ่งพบว่าอัตราพบ dsRNA ใน black *Aspergillus* อยู่ที่ประมาณ 10 % ใน 668 ไอโซเลตจากทั่วโลก (van Diepeningen et al., 2006) สำหรับใน *Aspergillus* section *Flavi* มีรายงานว่าพบ dsRNA ประมาณ 19.2 % ใน 26 สายพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้ และ 7.6 % ใน 66 ไอโซเลตที่คัดแยกใหม่ (Elias and Cotty, 1996) นอกจากนี้จากการศึกษา *Aspergillus* section *Fumigati* และ section *Circumdati* พบ dsRNA ในอัตรา 3.5 % จาก 113 สายพันธุ์ของ และ 8.2 % จาก 60 สายพันธุ์ ซึ่งมีสกุล *Neosartorya* และ *Petromyces* ที่เป็นระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยเช่นกัน (Varga et al., 1998) อย่างไรก็ตามการศึกษา *Aspergillus nidulans* กลับไม่พบ dsRNA (0%) ใน 112 ไอโซเลตที่ทำการตรวจสอบ และจากการทดลองถ่ายเชื้อไวรัส พบว่าไวรัสไม่สามารถถ่ายทอดผ่านการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราชนิดนี้ได้ (Coenen et al., 1997) ดังนั้นจะเห็นว่าอัตราพบ dsRNA ในรานั้นแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ดรา และวิธีที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างที่ศึกษา

แถบของ dsRNA ที่พบในรา *Trichoderma* แต่ละไอโซเลตมีรูปแบบที่แตกต่างกัน โดยจำนวนแถบ dsRNA ที่พบบน 1.6 % agarose มีจำนวนตั้งแต่ 1 จนถึง 4 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่างประมาณ 1.25 จนถึง 22 กิโลเบส แต่เมื่อทำการตรวจสอบแถบ dsRNA บน 8% SDS-PAGE พบแถบ dsRNA จำนวนตั้งแต่ 1 จนถึง 10 แถบ ซึ่งมีหลายแถบที่ไม่พบบน agarose gel เนื่องจากมีอยู่ในปริมาณที่ต่ำกว่าความสามารถของ agarose gel ที่จะตรวจสอบได้ และเนื่องจาก dsRNA มีการเคลื่อนที่บน 8% SDS-PAGE แตกต่างจากบน agarose gel จึงไม่สามารถคำนวณขนาดโดยการเปรียบเทียบกับ DNA marker ได้ สำหรับรูปแบบของ dsRNA ที่พบในการศึกษานี้แตกต่างจากรูปแบบของ dsRNA ที่พบในรา *Trichoderma* ที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Castle et al., 1998; Antal et al., 2005; Jom-in and Akarapisan, 2009) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า dsRNA ในรา *Trichoderma* ที่พบได้ในประเทศไทยนี้มีความหลากหลายมาก โดยรูปแบบ dsRNA ของ *Trichoderma* ไอโซเลตที่พบนี้ ไอโซเลต Cbi3.1.1 มี dsRNA จำนวน 10 แถบ มองเห็นบน agarose gel เพียง 4 แถบขนาดประมาณ 1.94 – 2.15 kb ซึ่งใกล้เคียงกับจีโนมของไวรัสในสกุล *Mycroevirus* แต่จากจำนวนแถบที่มีมาก จึงอาจเป็นไปได้ว่าเป็นการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสหลายชนิด ไอโซเลต Cbi3.2.2 มี dsRNA จำนวน 6 แถบ มองเห็นบน agarose gel เพียง 3 แถบขนาดประมาณ 1.25 – 22 kb ขนาดของ dsRNA ที่พบไม่ใกล้เคียงกับจีโนมของไวรัสในสกุลใด และอาจเป็นการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสหลายชนิด ไอโซเลต Cbi3.3.1 มี dsRNA จำนวน 3 แถบ โดย 2 แถบที่มีขนาดใกล้เคียงกันมาก มีขนาดโดยประมาณ 2.19 kb ซึ่งที่ใกล้เคียงกับจีโนมของ

ไวรัสในสกุล *Partitivirus* ไอโซเลต Cpn1.1.1 มี dsRNA จำนวน 7 แถบ มองเห็นบน agarose gel เพียง 4 แถบขนาดประมาณ 2.05 – 3.25 kb ขนาดของ dsRNA ที่พบใกล้เคียงกับจีโนมของไวรัสในสกุล *Chrysovirus* และอาจเกิดจากการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสหลายชนิด ไอโซเลต Pbn1.1.5 และ Ubn1.1.3 พบ dsRNA เพียงแถบเดียว ขนาดประมาณ 15.25 kb ใกล้เคียงกับจีโนมของไวรัสในสกุล *Endornavirus* และรูปแบบของ dsRNA ของไอโซเลต Plk1.1.9 มีจำนวน 5 แถบ มองเห็นบน agarose gel เพียง 2 แถบขนาดประมาณ 1.42 – 1.5 kb ซึ่งไม่ใกล้เคียงกับจีโนมของไวรัสในสกุลใด

## 2.2 การจำแนกชนิดของรา *Trichoderma* ที่พบ dsRNA

ในการจำแนกรรา *Trichoderma* ทั้ง 7 ไอโซเลตที่พบ dsRNA ได้ใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง Internal transcribed spacer (ITS) ร่วมกับลักษณะการเติบโตและสัณฐานวิทยา โดยสามารถจำแนกรไอโซเลต Cbi3.2.2 Cbi3.3.1 และ Plk1.1.9 เป็น *T. harzianum* *T. reesei* และ *T. virens* ตามลำดับ ขณะที่ไอโซเลต Cbi3.1.1 Cpn1.1.1 Pbn1.1.5 และ Ubn1.1.3 ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากยังขาดข้อมูลบางส่วน หรือผลการจัดจำแนกชนิดจากข้อมูลของ ITS กับลักษณะสัณฐานวิทยาที่ได้ไม่สอดคล้องกัน

สำหรับการจำแนกรรา *Trichoderma* มีหน่วยงานที่ดูแลคือ International Subcommision on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy (ISTH) โดยในปัจจุบันจัดจำแนกรรา *Trichoderma* หรือ *Hypocrea* จำนวนทั้งสิ้น 104 ชนิด จากข้อมูลการเติบโต สัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ITS2 และ *tef1* (translation-elongation factor 1-alpha encoding gene) ร่วมกับข้อมูลของยีน *rpb2* (RNA polymerase 2 gene) *cal1* (calmodulin gene) *chi18-5* (endochitinase 18 – 5 gene) (International Subcommision on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy, 2011 : Online) สำหรับการใส่ข้อมูลบริเวณ ITS ของ rRNA gene เป็นบริเวณที่มีการศึกษากันมากในการจำแนกรรา ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและรวดเร็ว แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank มักพบข้อมูลมีการระบุชนิดไม่ถูกต้อง (Kubicek et al., 2003) ต่อมาได้มีการสร้างฐานข้อมูลเฉพาะสำหรับสายพันธุ์ Type species ของรา *Trichoderma* หรือ *Hypocrea* ในเว็บไซต์ของ ISTH โดยใช้โปรแกรม *TrichoBLAST* ในการเปรียบเทียบ และได้พัฒนาการจำแนกด้วยวิธี DNA barcoding ด้วยโปรแกรม *TrichoKEY* 2.0 (Druzhinina et al., 2005; 2006) แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถจำแนกชนิดของรา *Trichoderma* กลุ่ม *Koningii* complex และ *Rufa* complex และในกลุ่มของ *T. longibrachiatum* กับ *H.*

*orientalis* และ *T. tomentosum* กับ *T. cerinum* ที่มีลำดับคล้ายกันได้ ในการยืนยันชนิดที่ถูกต้อง จึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลอื่นๆมาพิจารณาร่วมด้วย เช่น ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *tef1* (Kullnig-Gradinger et al., 2002; Jaklitsch et al., 2005) *rpb2* (Liu et al., 1999) *cal1* (Chaverri et al., 2003) *chi18-5* (Komon-Zelazowska et al., 2007) และ *las1* (essential nuclear protein gene) (Druzhinina et al., 2010) นอกจากนี้อาจศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอน การตอบสนองต่อแสง การสร้างสปอร์ รวมถึงการศึกษาข้อมูลของ *MAT* (mating gene) และการทดลอง mating ระหว่างสายพันธุ์ที่ใกล้เคียง (Seidl et al., 2009; Druzhinina et al., 2010) เพื่อระบุว่าเป็นชนิดเดียวกันหรือชนิดใหม่

การจำแนกชนิดลักษณะสัณฐานวิทยาจากระยะ anamorph ของรา *Trichoderma* นั้นทำได้ยาก เนื่องจากชนิดที่ใกล้ชิดกันมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันมาก (Chaverri and Samuel, 2003) ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้ข้อมูลทางโมเลกุลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ในการจำแนกก่อน จากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบลักษณะของไอโซเลตกับรา *Trichoderma* ชนิดที่ได้ โดยได้ทำการบันทึกลักษณะที่ใช้กับ Interactive key จากเว็บไซต์ *Trichoderma* Online (Samuel et al., 2011 : Online) ได้แก่ลักษณะของ conidia conidiophore phialide chlamydospore และการเติบโตในที่มีดเป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 °C โดย *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi3.2.2 Cbi3.3.1 และ Plk1.1.9 มีลักษณะตรงกับชนิดที่จำแนกด้วย ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ขณะที่ไอโซเลต Cbi3.1.1 มีลักษณะโคโลนี และ conidia ต่างจาก *T. koningiopsis* ไอโซเลต Cpn1.1.1 มีลักษณะโคโลนี และ conidia ต่างจาก *T. erinaceum* ไอโซเลต Pbn1.1.5 ไม่มีผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แต่มีลักษณะสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *T. ovalisporum* และไอโซเลต Ubn1.1.3 มีลักษณะใกล้เคียง *T. harzianum* แต่มีการสร้าง chlamydospore ในลักษณะเป็นโซ่ต่อเนื่องต่างจากลักษณะตามปกติ โดยไอโซเลตที่มีลักษณะแตกต่างกันนี้อาจเป็นรา *Trichoderma* ชนิดใหม่ หรืออาจเป็นผลจากการมี dsRNA ที่พบ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม อย่างเช่น ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นๆ หรือการขจัดไวรัสในไอโซเลตนั้น จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ไอโซเลต Cbi3.1.1 Cpn1.1.1 และ Pbn1.1.5 มีการสร้างสปอร์ที่น้อยกว่าไอโซเลตอื่นๆที่ทำการศึกษาอย่างชัดเจน นอกจากนี้ทั้ง 7 ไอโซเลตที่พบ dsRNA จะมีการสร้าง chlamydospore ซึ่งเป็น resting spore ที่สร้างจากเส้นใยจำนวนมาก ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการมี dsRNA ในไอโซเลตเหล่านี้

สำหรับการเก็บรักษา *Trichoderma* ไอโซเลตที่มี dsRNA ได้ใช้การเก็บ 2 วิธี คือ การเก็บเส้นใยในขวด vial ที่มีอาหารเลี้ยง CMD 10 mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C และวิธีการเก็บสปอร์แบบ spore suspension ใน 1% (v/v) Tween ใน 20% (v/v) glycerol เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C พบว่าวิธีการเก็บบนอาหารเลี้ยงสามารถเก็บรักษาเส้นใยได้เป็นเวลา 5 – 6 เดือน สามารถนำออกมาถ่ายเส้นใยได้ตลอดเวลา ลักษณะของโคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง และสามารถตรวจสอบพบ dsRNA ได้ในทุกไอโซเลต นอกจากนี้ยังได้ทดลองเก็บเส้นใยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ พบว่าเส้นใยของ *Trichoderma* บางไอโซเลตเกิดการย่อยสลาย และพบการปนเปื้อน ไม่สามารถเก็บรักษาเส้นใยได้ สำหรับการเก็บ spore suspension สามารถเก็บรักษาสปอร์ได้เป็นเวลามากกว่า 1 ปี แต่ไม่สามารถใช้เก็บรักษาสปอร์ของไอโซเลต Cpn1.1.1 ได้ และหลังจากการละลายและแช่แข็งซ้ำพบว่าหลายไอโซเลตไม่สามารถนำมาใช้ได้อีก จึงไม่เหมาะในการใช้งานอย่างต่อเนื่อง และยังพบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะของโคโลนีในบางไอโซเลต และยังคงตรวจสอบไม่พบ dsRNA ในไอโซเลต Pbn1.1.5 และ Ubn1.1.3 เมื่อนำสปอร์มาเลี้ยงอีกครั้งด้วย ดังนั้นวิธีการเก็บเส้นใยในอาหารเลี้ยงจึงเหมาะสมที่สุดในการเก็บไอโซเลตที่มี dsRNA ในงานวิจัยนี้

### 3. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA ที่พบ ได้เลือกศึกษา dsRNA จาก *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi3.3.1 เนื่องจากความสำคัญของราชชนิดนี้ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรม ประกอบกับเป็นชนิดของรา *Trichoderma* ที่มีข้อมูลการศึกษาทางชีววิทยาด้านต่างๆจำนวนมาก และยังไม่มียารายงานการศึกษาไวรัสในราชชนิดนี้มาก่อน การศึกษาไวรัสที่อาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติต่างๆของรา *T.* จึงมีความน่าสนใจและอาจนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไปได้

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA จาก *T.* ไอโซเลต Cbi3.3.1 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA จาก cDNA ของโคลน c88 และ c101 ความยาว 480 และ 270 เบส ถอดรหัสเป็นโปรตีนความยาว 160 และ 89 กรดอะมิโน ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ replicase ของ *Primula malacoides virus* China/Mar2007 ที่ 54.3 % และ *Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8* ที่ 38.1 % ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA จากโคลน c171 ถอดรหัสเป็นโปรตีนความยาว 475 เบส ถอดรหัสเป็นโปรตีนความยาว 158 กรดอะมิโน ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ capsid protein ของ *Primula malacoides virus* China/Mar2007 ที่ 29.1 % และการเปรียบเทียบ multiple alignment แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จาก cDNA ของโคลน c88 มีบริเวณของ conserved motif III และ IV ของ RdRp ของไวรัสในกลุ่ม *Partitivirus*

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ putative protein จากลำดับนิวคลีโอไทด์ บางส่วนของ dsRNA กับ putative RdRp และ CP ของ *Partitivirus* ชนิดต่างๆพบว่า dsRNA จาก *T. reesei* ไอโซเลต Cbi3.3.1 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Primula malacoides virus* (PmV) ที่ แยกจากใบที่เป็นโรคขอบใบเหลือง (yellow-edge) ของ *Primula malacoides* พืชล้มลุกซึ่งใช้เป็น ไม้ประดับจากมณฑล Hangzhou ประเทศจีน (Li et al., 2009) *Rosellinia necatrix partitivirus* 1 - W8 (RnPV-W8) ที่พบในไอโซเลต W8 ของรา *Rosellinia necatrix* ซึ่งเป็นราดินก่อโรครากเน่า ขาว (white root rot) ของพืชหลายชนิด โดยไอโซเลต W8 นี้เป็นไอโซเลตที่มีลักษณะ hypovirulent ที่แยกได้จากต้นงุ่นในจังหวัด Okayama ประเทศญี่ปุ่น โดยพบ RNA ของ *Partitivirus* ร่วมกับ dsRNA ขนาดใหญ่อีก 2 แถบ (Sasaki et al., 2005) ไวรัส *Rhizoctonia solani virus* 717 (RhsV-717) จากไอโซเลต 717 ที่มีลักษณะ hypovirulent ของ *Rhizoctonia solani* ราก่อโรคพืช ในดิน (Strauss et al., 2000; Tavantzis and Bandy, 1988) และเมื่อศึกษาเฉพาะ putative RdRp พบว่า dsRNA จาก *T. reesei* ไอโซเลต Cbi3.3.1 ยังมีความสัมพันธ์กับ *Helicobasidium mompa partitivirus* V1-1 (HmV-V1-1) ใน *Helicobasidium mompa* ไอโซเลต V1 ที่ก่อโรคราก เน่าม่วง (Violet root rot) ในต้นแอปเปิลในจังหวัด Fukushima ของประเทศญี่ปุ่น (Osaki et al., 2002) *Fusarium poae virus* 1 (FpV-1; FUPO-1) ใน *Fusarium poae* ไอโซเลต A-11 ที่แยก จากเมล็ดข้าวสาลีในประเทศฮังการี (Compel et al., 1998) *Pleurotus ostreatus virus* 1 (PoV-1) ในเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) สายพันธุ์ ASI2596 (Lim et al., 2005) และ *Grapevine associated partitivirus* 1 (GaPV-1) จากต้นงุ่น (Al Rwahni et al., 2009; Al Rwahni et al., 2011)

โดยทั่วไปไวรัสในวงศ์ *Partitiviridae* มีจีโนมเป็น dsRNA 2 โมเลกุล (bipartite genome) ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน มีขนาดประมาณ 1.4 – 3.0 kb แต่ละโมเลกุลมี 1 open reading frame ซึ่ง ถอดรหัสเป็น RNA dependent RNA polymerase (RdRp) และ capsid protein (CP) ที่ประกอบ กับเป็นอนุภาคสมมาตรแบบ isometric ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 – 35 nm ภายในจะ บรรจุจีโนมแต่ละส่วนแยกจากกัน และอาจพบ dsRNA โมเลกุลที่ 3 และ 4 ซึ่งเป็น defective RNA หรือ satellite virus (Ghabrial, 1998) วงศ์ *Partitiviridae* แบ่งออกเป็น 4 สกุล ได้แก่ สกุล *Alphacryptovirus* และ *Betacryptovirus* สำหรับ cryptic virus ที่พบในพืช สกุล *Partitivirus* สำหรับไวรัสพบในเห็ดรา และสกุล *Cryspovirus* สำหรับที่ไวรัสพบในโปรโตซัว (Nibert et al., 2009) โดยไวรัสในสกุล *Partitivirus* ส่วนใหญ่พบจากการศึกษาไวรัสในราโรคพืช ได้แก่ *Atkinsonella hypoxylon* (Oh and Hillman, 1995) *Discula destructiva* (Rong et al., 2002)



*Fusarium poae* (Compel et al., 1999) *Fusarium solani* (Nogawa et al., 1996) *Gaeumannomyces graminis* (Buck, 1984) *Gremmeniella abietina* (Tuomivirta and Hantula, 2003) *Helicobasidium mompa* (Osaki et al., 2002) *Heterobasidion annosum* (Ihrmark et al., 2001) *Ophiostoma himal-ulmi* (Crawford et al., 2006) *Penicillium stoloniferum* (Kim et al., 2005; Kim et al., 2003) *Pleurotus ostreatus* (Lim et al., 2005) *Rhizoctonia solani* (Strauss et al., 2000) และ *Rosellinia necatrix* (Sasaki et al., 2005) ทั้งนี้ยังพบไวรัสในพืชบางชนิด เช่น *Vicia cryptic virus* (VCV) (Blawid et al., 2007) *Cherry chlorotic rusty spot-associated partitivirus* (CCRS-PV) *Amasya cherry disease-associated partitivirus* (ACD-PV) (Coutts et al., 2004) *Grapevine associated partitivirus 1* (GaPV-1) (Al Rwahni et al., 2009; Al Rwahni et al., 2011) รวมทั้ง *Primula malacoides virus* (PmV) (Li et al., 2009) ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับไวรัสในสกุล *Partitivirus* แต่ยังไม่มีการจัดหมวดหมู่ไว้

จากการศึกษาที่ได้นี้อาจเป็นไปได้ว่า dsRNA ที่พบใน *Trichoderma Cbi3.3.1* เป็นไวรัสในสกุล *Partitivirus* ซึ่งเป็นครั้งแรกที่รายงานการพบในรา *T.* โดย dsRNA ที่พบมีจำนวน 3 แถบ บน 8 % SDS-PAGE และจากการเคลื่อนที่บน 1.6 % agarose พบจำนวน 2 แถบ แถบเข้มมีขนาดโดยประมาณ 2.19 kb และแถบที่จางกว่ามีขนาดโดยประมาณ 2.04 kb ซึ่งใกล้เคียงกับลักษณะทั่วไปของไวรัสในวงศ์ *Partitiviridae* ที่มีจำนวน dsRNA 2 – 4 แถบ โดย dsRNA1 และ dsRNA2 ที่มีขนาดใกล้เคียงกันถอดรหัสเป็น RdRp และ CP และ dsRNA3 อาจเป็น defective RNA หรือ satellite virus และจากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการยืนยันความใกล้ชิดกับไวรัสในสกุล *Partitivirus* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง RdRp gene และ CP gene มีความแตกต่างจากไวรัสที่มีรายงานมาก่อน ซึ่งเป็นไปได้ว่า dsRNA ใน *T.* นี้เป็นไวรัสชนิดใหม่ในสกุล *Partitivirus* แต่อย่างไรก็ดีจำเป็นต้องมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้งจีโนม การศึกษาการเพิ่มจำนวนอนุภาค และการถ่ายทอดตามวิธี Koch's postulates เพื่อเป็นการสรุปได้แน่ชัด

#### 4. การศึกษาผลของ dsRNA ที่มีต่อราให้อาศัย

การตัดแยกสปอร์เดี่ยวจาก *T. ไชโซเลต Cbi3.3.1* ได้ตัดแยกจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 10 โคโลนี จากนั้นทำการตรวจสอบ dsRNA ภายหลังจากการถ่ายเส้นใย 2 – 3 รอบ โดยครั้งแรกสามารถตัดแยกโคโลนีที่ไม่มี dsRNA จำนวน 5 โคโลนี คิดเป็นอัตราการถ่ายทอด 50 % และครั้งที่ 2 จำนวน 10 โคโลนี คิดเป็นอัตรา 0 % แต่เมื่อทำการถ่ายเส้นใยต่อเนื่องไปอีกกระยะหนึ่งตรวจพบ dsRNA ในบางโคโลนี ซึ่งอาจเกิดจากการที่ dsRNA ที่ถ่ายทอดในสปอร์มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในครั้งแรก และเพิ่มจำนวนขึ้นในปริมาณที่ตรวจสอบได้เมื่อทำการถ่ายเส้นใยไประยะหนึ่ง หรืออาจเกิดจากการปนเปื้อนจากโคโลนีที่มี dsRNA ระหว่างการเลี้ยงเส้นใย ในการขจัด dsRNA จึงควรพันพาราฟิล์มรอบขอบจานอาหารและแยกจานอาหารของโคโลนีที่มีและไม่มี dsRNA จากกัน และตรวจสอบ dsRNA ก่อนนำมาใช้ทดลองทุกครั้ง โดยอาจทำการตัดแยกสปอร์เดี่ยวของโคโลนีที่ไม่มี dsRNA ซ้ำอีกครั้งเพื่อขจัด dsRNA โดยสมบูรณ์

เพื่อยืนยันว่าโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่ได้ไม่มี dsRNA จึงทำการตรวจสอบซ้ำอีกครั้งก่อนนำมาทำการทดลองเปรียบเทียบ โดยได้โคโลนีเดี่ยวที่ไม่มี dsRNA จำนวน 6 โคโลนี (c1 c4 c5 c6 c8 และ c9) และได้เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มี dsRNA จำนวน 2 โคโลนี (v2 และ v3) ทำการทดลองเปรียบเทียบการเติบโตและลักษณะทางสัณฐานของโคโลนี โดยมี *T. reesei* ไชโซเลต Cbi3.3.1 เป็นชุดการทดลองควบคุม

ในการศึกษาความแตกต่างจากการมีและไม่มี dsRNA ของ *T. reesei* ไชโซเลต Cbi3.3.1 ได้ทำการทดลองศึกษาผลของปริมาณธาตุอาหารและอุณหภูมิที่อาจส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของราให้อาศัยที่เกิดจาก dsRNA ในโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่ได้ โดยการวัดระดัมีการเติบโตด้วยอาหาร CMD ที่มีธาตุอาหารสูง และ SNA ที่มีธาตุอาหารต่ำ และเลือกบ่มที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C ซึ่งการศึกษการเติบโตก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า *T. reesei* ไชโซเลต Cbi3.3.1 สามารถเติบโตได้น้อยที่อุณหภูมิต่ำสุดคือ 15 °C และสูงสุดคือ 40 °C และเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C ในการทดลองได้ทำการวัดระดัมีการเติบโตที่ 3 วัน จากนั้นได้เลี้ยงต่อไปที่สภาวะห้องปกติเพื่อสังเกตลักษณะของโคโลนีหลัง 7 และ 14 วัน

ผลการเติบโตบนอาหาร CMD พบว่ากลุ่มโคโลนีเดี่ยวที่มี dsRNA (v2 และ v3) มีการเติบโตเฉลี่ยที่อุณหภูมิ 30 °C น้อยกว่ากลุ่มโคโลนีเดี่ยวที่ไม่มี dsRNA (c1 – c9) แต่มีการเติบโตเฉลี่ยสูงกว่าที่อุณหภูมิ 40 °C และจากการสังเกตลักษณะของโคโลนีหลัง 7 วัน ไม่พบความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเส้นใยบน CMD มีลักษณะค่อนข้างหนา สีขาว ขอบโคโลนีสีน้ำตาล มีการสร้างสีเหลืองในอาหารเลี้ยง และมีลักษณะการสร้างสปอร์คล้ายกันทุกโคโลนี แต่เมื่อทำการสังเกตภายหลัง 14 วัน พบว่า กลุ่มโคโลนีที่ไม่มี dsRNA และ *T. reesei* ไอโซเลต Cbi3.3.1 มีการสร้างสปอร์น้อยกว่ากลุ่มโคโลนีที่ไม่มี dsRNA อย่างชัดเจน ที่ทุกอุณหภูมิ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า dsRNA จาก *T. reesei* ไอโซเลต Cbi3.3.1 มีผลต่อการสร้างสปอร์ของราให้อาศัย

สำหรับการเติบโตบนอาหาร SNA กลุ่มโคโลนีเดี่ยวที่ไม่มี dsRNA มีการเติบโตสูงกว่าที่อุณหภูมิ 15 °C เท่านั้น แต่ไม่แตกต่างที่อุณหภูมิ 30 °C และ 40 °C โดยที่การเติบโตทั้งสองกลุ่มสูงกว่า *T. reesei* ไอโซเลต Cbi3.3.1 ที่ทุกอุณหภูมิ อย่างไรก็ตามจากการสังเกตลักษณะของโคโลนีหลัง 7 และ 14 วัน ไม่พบความแตกต่างกัน โดยเส้นใยบน SNA มีลักษณะใสไม่มีสี ขอบโคโลนีสีน้ำตาล และมีการสร้างสปอร์เหมือนกันทุกโคโลนี

จากการคัดแยกโคโลนีเซลล์เดี่ยวพบว่า dsRNA ของ *T. reesei* ไอโซเลต Cbi3.3.1 มีการถ่ายทอดผ่านสปอร์ในช่วงตั้งแต่ 0 จนถึง 50 % โดยมีความแตกต่างกันที่ระยะเวลาเติบโตของเส้นใยและบริเวณที่เก็บสปอร์แขวนลอยที่นำมาใช้ และจากการทดลองนี้สามารถจัด dsRNA ด้วยการแยกโคโลนีเซลล์เดี่ยวได้สำเร็จ สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างโคโลนีที่มีและไม่มี dsRNA ตามแผนการทดลองนั้นจะคัดเลือก 2 โคโลนีจากแต่ละกลุ่ม แต่เนื่องจากลักษณะของโคโลนีที่ไม่มี dsRNA แต่ละโคโลนีมีความแตกต่างกัน จึงนำมาใช้เปรียบเทียบทั้ง 6 โคโลนี โดยผลการเปรียบเทียบวัดมีการเติบโตแสดงให้เห็นว่าการมี dsRNA ส่งผลต่อการเติบโตเฉลี่ยของโคโลนีเซลล์เดี่ยว ทั้งในสภาวะที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเติบโต (30 °C) และไม่เหมาะสมต่อการเติบโต (15 °C และ 40 °C) ผลจากการเลี้ยงบนอาหาร CMD ที่มีธาตุอาหารสูง มีการเติบโตของโคโลนีที่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °C และพบความแตกต่างของการสร้างสปอร์เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ขณะที่การเลี้ยงบนอาหาร SNA ที่มีธาตุอาหารต่ำไม่พบความแตกต่างของลักษณะโคโลนี และมีการเติบโตของโคโลนีที่ต่างกันเฉพาะที่อุณหภูมิ 15 °C เท่านั้น สำหรับการผลิตเอนไซม์ endoglucanase ที่ 30 °C ของโคโลนีเซลล์เดี่ยว พบว่าการมี dsRNA ไม่มีผลต่อค่าแอกติวิตีที่วัดได้ แต่ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme ของกลุ่มโคโลนีที่ไม่มี dsRNA มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่มี dsRNA อย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลองเปรียบเทียบนี้แสดงให้เห็นว่า dsRNA ใน *T. reesei* ไอโซเลต Cbi3.3.1 ที่พบส่งผลกับการเติบโต การสร้างสปอร์ และการผลิตโปรตีน ซึ่งสังเกตได้ยากเมื่อทำการเลี้ยงเส้นใยตามปกติ อย่างไรก็ตามยังจำเป็นต้องมีการทดลองถ่ายทอด dsRNA เข้าสู่สายพันธุ์ที่ไม่มี dsRNA เพื่อยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะเกิดจากการมี dsRNA ทั้งนี้จากการศึกษาทำให้อาศัยของ *Partitivirus* ชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่มักไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของราให้อาศัย รวมถึงราสายพันธุ์ที่แสดงอาการ hypovirulent ก็พบการติดเชื้อร่วมกับไวรัสชนิดอื่น จึงไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นผลจาก *Partitivirus* หรือไม่ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาไวรัสชนิดอื่นๆ พบว่านอกจากการที่โปรตีนของไวรัสส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของราให้อาศัยโดยตรงแล้ว การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการตอบสนองของราให้อาศัยต่อ dsRNA ของไวรัสด้วยเช่นกัน โดยอาจส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีนบางกลุ่ม อย่างเช่นใน *Nectria radicularis* ที่ไวรัสส่งผลต่อ signal transduction pathway มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการก่อโรค การสร้างสปอร์ การสร้างเม็ดสี และการผลิตเอนไซม์ laccase ที่สูงขึ้น (Ahn and Lee, 2001) หรือในราเอนโดไฟต์ *Curvularia protuberata* ที่มีไวรัสพบระดับการแสดงออกของยีนกลุ่มที่สร้าง heat shock protein ที่สูงขึ้น (Morsy et al., 2010) นอกจากนี้ยังอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA silencing ของราได้ทำลาย dsRNA ของไวรัสจนไม่ส่งผลต่อราให้อาศัย เมื่อทำการยับยั้งกระบวนการ RNA silencing จึงทำให้ราให้อาศัยแสดงอาการผิดปกติขึ้น (Hammond et al. 2008; Sun et al., 2009)

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 1. การคัดแยกกรา *Trichoderma*

##### 1.1 การคัดแยกกรา *Trichoderma*

การคัดแยกกราจากตัวอย่างดิน กิ่งไม้ และเห็ดแห้งที่เก็บจากพื้นที่ 13 จังหวัด ในประเทศไทย ได้รัลักษณะคล้ายรา *Trichoderma* จำนวนทั้งหมด 96 ไอโซเลต

#### 2. การตรวจสอบ dsRNA

การตรวจสอบพบ dsRNA ในรา 7 ไอโซเลต จาก 96 (7%) ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต Cbi3.1.1 Cbi3.2.2 Cbi3.3.1 Cpn1.1.1 Pbn1.1.5 Plk.1.1.9 และ Ubn 1.1.3 โดย dsRNA ที่พบ มีจำนวน 1 - 10 แถบ และขนาดโดยประมาณตั้งแต่ 1.2 – 22 kb

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS การเติบโตและลักษณะสัณฐานวิทยา จำแนก ไอโซเลต Cbi3.2.2 Cbi3.3.1 และ Plk.1.1.9 เป็น *T. harzianum* *T. reesei* และ *T. virens* สำหรับ ไอโซเลต Cbi3.1.1 Cpn1.1.1 Pbn1.1.5 และ Ubn 1.1.3 จำเป็นต้องหาข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อการ จำแนกต่อไป

#### 3. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA จาก *Trichoderma* ไอโซเลต Cbi3.3.1 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA จาก cDNA ของโคลน c88 และ c101 ความยาว 480 และ 270 เบส ถอดรหัสเป็นโปรตีนความยาว 160 และ 89 กรดอะมิโน ซึ่งมีความคล้ายคลึง กับ replicase ของ *Primula malacoides virus* China/Mar2007 (YP\_003104768) ที่ 54.3 % และ *Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8* (YP\_392480) ที่ 38.1 % ตามลำดับ และ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA จากโคลน c171 ความยาว 475 เบส ถอดรหัสเป็นโปรตีนความยาว 158 กรดอะมิโน ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับ capsid protein ของ *Primula malacoides virus* China/Mar2007 (YP\_003104769) ที่ 29.1 % ซึ่งทั้งหมดเป็นไวรัสที่อยู่ในวงศ์ *Partitiviridae*

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโปรตีนที่ถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA ที่ได้ กับโปรตีนจากไวรัสในวงศ์ *Partitiviridae* ด้วยวิธี Neighbor-Joining พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของ putative RdRp จากโคลน c88 และ c101 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัส *Rhizoctonia solani virus 717* (RhsV-717) *Rosellinia necatrix virus 1-W8* (RnRP1-W8) *Pleurotus ostreatus virus 1* (PoV-1) *Fusarium poae virus 1* (FpV-1) และ *Primula malacoides virus China/Mar2007* (PmV) *Helicobasidium mompa partitivirus V1-1* (HmV-V1-1) Grapevine associated partitivirus-1 (GaPV-1) และลำดับกรดอะมิโนของ putative CP จากโคลน c171 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัส *Rhizoctonia solani virus 717* (RhsV-717) *Rosellinia necatrix virus 1-W8* (RnRP1-W8) และ *Primula malacoides virus China/Mar2007* (PmV)

#### 4. การศึกษาผลของ dsRNA ที่มีต่อราให้อาศัย

การคัดแยกโคโลนีจากสปอร์เดี่ยวของ *Trichoderma reesei* ไอโซเลต Cbi3.3.1 สามารถคัดแยกโคโลนีที่ไม่มี dsRNA ได้ และการทดลองเปรียบเทียบการเติบโต สันฐานวิทยา ของโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มี และไม่มี dsRNA มีความแตกต่างกัน โดยการมี dsRNA มีผลการเติบโตมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญบนอาหาร CMD ที่มีธาตุอาหารสูงที่อุณหภูมิ 30 และ 40 °C และเมื่อสังเกตลักษณะโคโลนีหลัง 7 วันไม่พบความแตกต่างกัน แต่หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน โคโลนีมีการสร้างสปอร์ที่แตกต่างกัน ขณะที่การเติบโตบนอาหาร SNA ที่มีธาตุอาหารต่ำมีการเติบโตแตกต่างกันที่อุณหภูมิ 15 °C เท่านั้น และสังเกตไม่พบความแตกต่างของโคโลนีหลัง 7 และ 14 วัน

การผลิตเอนไซม์ endoglucanase ในอาหารสูตร production พบว่าโคโลนีที่ไม่มี dsRNA จะมีค่าแอกติวิตีเฉลี่ยและค่าแอกติวิตีจำเพาะเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ยสูงกว่าโคโลนีที่มี dsRNA

## รายการอ้างอิง

- Adams, M. J. and Antoniw, J. F. 2006. DPVweb: a comprehensive database of plant and fungal virus genes and genomes. Nucleic Acids Research 34 : D382 – D385.
- Ahn, I. P. and Lee, Y. H. 2001. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicola*. Molecular Plant-Microbe Interactions 14 : 496 – 507.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Rowhani, A. 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. Virology 387 : 395 – 401.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., U´rbez-Torres, J. R., Cordero, F., Rowhani, A. 2011. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. Archives of Virology 156 : 397 – 403.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215 : 403 – 410.
- Antal Z., Hatvani, L., Varga, J., Kredics, L., Szekeres, A., Manczinger, L., Vágvölgyi, C. and Nagy, E. 2005. Double-stranded RNA elements in *Trichoderma* strains obtained from mushroom farms. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 52 : S5.
- Bertani, G. 2004. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. Journal of Bacteriology 186 : 595 – 600.
- Billeter, M. A., Weissmann, C., and Warner, R. C. 1966. Replication of viral ribonucleic acid. IX. Properties of double-stranded RNA from *Escherichia coli* infected with bacteriophage MS2. Journal of Molecular Biology 17 : 145 – 173.
- Blawid, R., Stephan, D., and Maiss, E. 2007. Molecular characterization and detection of Vicia cryptic virus in different *Vicia faba* cultivars. Archives of Virology 152 : 1477 – 1488.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 : 248 – 254.

- Bruenn, J. A. 1993. A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. Nucleic Acids Research 21 : 5667 – 5669.
- Buck, K. W. 1984. A new double-stranded RNA virus from *Gaeumannomyces graminis*. Journal of General Virology 65 : 987 – 990.
- Buck, K. W. 1998. Molecular variability of viruses of fungi. In Bridge, P. D., Couteaudier, Y., and Clarkson, J. M. (eds.), Molecular Variability of Fungal Pathogens. pp. 53 – 72. Wallingford, UK: CAB International,
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D. and Bissett, J. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. Applied and Environmental Microbiology 64 : 133 – 137.
- Chaverri, P. and Samuel, G. J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. Studies in Mycology 48 : 1 – 116.
- Chiba, S., Salaipeth, L., Lin, Y.-H., Sasaki, A., Kanematsu, S., and Suzuki, N. 2009. A novel bipartite double-stranded RNA mycovirus from the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: Molecular and biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biological control. Journal of Virology 83 : 12801 – 12812.
- Coenen, A., Kevei, F., Hoekstra, R. F. 1997. Factors affecting the spread of double stranded RNA mycoviruses in *Aspergillus nidulans*. Genetics Research 69 : 1 – 10.
- Compel, P., Papp, I., Bibo, M., Fekete, C., and Hornok, L. 1998. Genetic interrelationships and genome organization of double-stranded RNA elements of *Fusarium poae*. Virus Genes 18 : 49 – 56.
- Coutts, R. H. A., Covelli, L., Di Serio, F., Citir, A., Acıkgöz, S., Hernández, C., Ragozzino, A., and Flores, R. 2004. Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. II. Characterization of a new species in the genus *Partitivirus*. Journal of General Virology 85 : 3399 – 3403.



- Crawford, L. J., Osman, T. A., Booy, F. P., Coutts, R. H., Brasier, C. M., and Buck, K. W. 2006. Molecular characterization of a partitivirus from *Ophiostoma himal-ulmi*. Virus Genes 33 : 33 – 9.
- Druzhinina, I. S., Komon-Zelazowska, M., Atanasova, L., Seidl, V., and Kubicek, C. P. 2010. Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamospecies related to it. PLoS One 5 : e9191.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., and Kubicek, C. P. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience 47 : 55 – 64.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G., and Kubicek, C. P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology 42 : 813 – 828.
- Elias, K. S. and Cotty, P. J. 1996. Incidence and stability of infection by double-stranded RNA genetic elements in *Aspergillus* section *Flavi* and effects on aflatoxigenicity. Canadian Journal of Botany 74: 716–725.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39 : 783-791.
- Ghabrial, S. A. 1998. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. Virus Genes 16 : 119 – 131.
- Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulose activities. International Union of Pure and Applied Chemistry 59 : 257-268.
- Goodin, M. M., Schlaghaufer, B., and Romaine, C. P. 1992. Encapsidation of La France disease specific dsRNAs in 36 nm isometric articles. Phytopathology 82 : 285 – 290.
- Grogan, H. M., Adie, B. A. T., Gaze, R. H., Challen, M. P., and Mills, P. R. 2003. Double stranded RNA elements associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus*. Mycological Research 107 : 147–154.
- Hammond, T. M., Andrews, M. D., Roossinck, M. J., and Keller, N. P. 2008. *Aspergillus* mycoviruses are targets and suppressors of RNA silencing. Eukaryotic Cell 7 : 350 – 357.

- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten, Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüssler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., and Zhang, N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111 : 509 – 547.
- Hillman, B. I., Tian, Y., Bedker, P. J., and Brown, M. P. 1992. A North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. *Journal of General Virology* 73 : 681 – 686.
- Hollings, M. 1978. Mycoviruses: viruses that infect fungi. *Advance Virus Research* 22 : 1 – 53.
- Howitt, R. L. J., Beever, R. E., Pearson, M. N., and Forster, R. L. S. 2006. Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, *Botrytis virus X*, reveals high amino acid identity to genes from plant 'potex-like' viruses. *Archives of Virology* 151 : 563 – 579.
- Huang, S. and Ghabrial, S. A. 1996. Organization and expression of the double-stranded RNA genome of *Helminthosporium victoriae* 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93 : 12541- 12546.
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I. and Le Mercier, P. 2011. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research* 39 : D576 – 582.

- Ihrmark, K., Stenstrom, E., and Stenlid, J. 2001. Double-stranded RNA transmission through basidiospores of *Heterobasidion annosum*. Mycological Research 108 : 149 – 153.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. 2011. Virus Taxonomy List 2009 [Online]. Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009> [2011, August].
- International Subcommision on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy, 2011. ISTH.info - a website of Trichoderma DNA BarCode [Online]. Available from: <http://www.isth.info/> [2011, August].
- Jaklitsch, W. M. 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. Studies in Mycology 63 : 1-91.
- Jaklitsch, W.M., Komon, M., Kubicek, C.P., and Druzhinina, I. S. 2005. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocreal/Trichoderma*. Mycologia 97 : 1365 – 1378.
- Jom-in, S. and Akarapisan, A. 2009. Characterization of double-stranded RNA in *Trichoderma* spp. isolates in Chiang Mai province. Journal of Agricultural Technology 5 : 261 – 270.
- Kredics, L., Antal, Z., Dóczy, I., Manczinger, L., Kevei, F., and Nagy, E. 2003. Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. Acta Microbiol Immunol Hung 50 : 105–117.
- Kim, J. W., Choi, E. Y., and Lee, J. I. 2005. Genome organization and expression of the *Penicillium stoloniferum* virus F. Virus Genes 31 : 175 – 183.
- Kim, J. W., Kim, S. Y., and Kim, K. M. 2003. Genome organization and expression of the *Penicillium stoloniferum* virus S. Virus Genes 27 : 249 – 256.
- Kim, Y. J., Kim, J. Y., Kim, J. H., Yoon, S. M., Yoo, Y. B., and Yie, S. W. 2008. The identification of a novel *Pleurotus ostreatus* dsRNA virus and determination of the distribution of viruses in mushroom spores. The Journal of Microbiology 46 : 95 – 99.

- Komon-Zelazowska, M., Bissett, J., Zafari, D., Hatvani, L., Manczinger, L., Woo, S., Lorito, M., Kredics, L., Kubicek, C. P., and Druzhinina, I. S. 2007. Genetically closely related but phenotypically divergent *Trichoderma* species cause world-wide green mould disease in oyster mushroom farms. The American Society for Microbiology 73 : 7415 – 7426.
- Kubicek C. P., Bissett, J., Kullnig-Gradinger, C. M., Druzhinina, I. S., and Szakacs, G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. Fungal Genetic and Biology 38 : 310 – 317.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Börner, T., and Guého, E. 1999. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride*. Medical Mycology 37 : 25 – 33.
- Kullnig-Gradinger, C. M., Szakács, G., and Kubicek, C. P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. Mycological Research 106 : 757– 767.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R, Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 23 : 2947 – 2948.
- Lemke, P. A. and Nash, C. H. 1974. Fungal viruses. Bacteriological Reviews 38 : 29 – 56.
- Li, L., Tian, Q., Du, Z., Duns, G. J., and Chen, J. 2009. A novel double-stranded RNA virus detected in *Primula malacoides* is a plant-isolated partitivirus closely related to partitivirus infecting fungal species. Achieve of Virology 154 : 565 – 572.
- Lim, W.-S., Jeong, J. H., Jeong, R.-D., Yoo, Y. B., Yie, S. W., Kim, K.-H. 2005. Complete nucleotide sequence and genome organization of a dsRNA partitivirus infecting *Pleurotus ostreatus*. Virus Research 108 : 111–119.
- Liu, Y. J., Whelen, S., and Hall, B. D. 1999. Phylogenetic relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. Molecular Biology and Evolution 16 : 1799 – 1808.

- Livshits, M. A., Amosora, O. A. and Lynbchenko, Y. L. 1990. Flexibility difference between double-stranded RNA and DNA as revealed by gel electrophoresis. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics 7 : 1237-1249.
- Marquez, L. M., Redman, R. S., Rodriguez, R. J., and Roossinck, M. J. 2007. A virus in a fungus in a plant: three way symbiosis required for thermal tolerance. Science 315 : 513 – 515.
- McCabe, P. M., Pfeiffer, P., and van Alfen, N. K. 1999. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. Trends in Microbiology 7 : 377 – 381.
- Morris, T. J. and Dodds, J. A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. Phytopathology 69 : 854 – 858.
- Morsy, M. R., Oswald, J., He, J., Tang, Y., and Roossinck, M. J. 2010. Teasing apart a three-way symbiosis: transcriptome analyses of *Curvularia protuberata* in response to viral infection and heat stress. Biochemical and Biophysical Research Communications 15 : 225 – 230.
- Nei, M. and Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York : Oxford University Press,
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. The Journal of Biological Chemistry 153 : 375-389.
- Nibert, M. L., Woods, K. M., Upton, S. J., Ghabrial, S. A. 2009. *Cryspovirus*: a new genus of protozoan viruses in the family *Partitiviridae*. Archives of Virology 154 : 1959 – 1965.
- Nirenberg, H. I. 1976. Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Section *Liseola*. Mitteilungen aus der Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 169 : 1 – 117.
- Nogawa, M., Kageyama, T., Nakatani, A., Taguchi, G., Shimosaka, M., and Okazaki, M. 1996. Cloning and characterization of mycovirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *Robiniae*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 60 : 784 – 788.
- Nuss, D. L. 2005. Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. Nature Review. Microbiology 3 : 632 – 642.

- Oh, C.-S. and Hillman, B. I. 1995. Genome organization of a partitivirus from the filamentous ascomycete *Atkinsonella hypoxylon*. Journal of General Virology 76 : 1461 – 1470.
- Osaki, H., Nomura, K., Iwanami, T., Kanematsu, S., Okabe, I., Matsumoto, N., Sasaki, A., and Ohtsu, Y. 2002. Detection of a double-stranded RNA virus from a strain of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa* Tanaka. Virus Genes 25 : 139 – 145.
- Pearson, M. N., Beever, R. E., Bione, B., and Arthur, K. 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. Molecular Plant Pathology 10 : 115-129.
- Penttilä, M., Limón, C., and Nevalainen, H. 2004. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. In Arora, D. K. (ed.), Handbook of Fungal Biotechnology, pp. 413 – 427. Marcel Dekker, Inc.,
- Punnapayak, H. and Emert, G. H. 1986. Use of *Pachysolen tannophilus* in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocelulose. Biological Letters 8 : 63-66.
- Ro, H.-S., Kang, E.-J., Yu, J.-S., Lee, T.-S., Lee, C.-W., and Lee, H.-S. 2007. Isolation and characterization of a novel mycovirus, PeSV, in *Pleurotus eryngii* and the development of a diagnostic system for it. Biotechnology Letters 29 : 129 – 135.
- Rong, R., Rao, S., Scott, S. W., Carner, G. R., and Tainter, F. H. 2002. Complete sequence of the genome of two dsRNA viruses from *Discula destructiva*. Virus Research 90 : 217 – 224.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold New York : Spring Harbor Laboratory Press,
- Samuel, G. J. 2004. Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* spp. Phytopathology 94 : S138–S13
- Samuel, G. J. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state and ecology. Phytopathology 96 : 195 – 206.
- Samuel, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A., and Pertini, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 94 : 146 – 170.

- Samuel, G. J., Chaverri, P., Farr, D.F., and McCray, E. B. 2011. *Trichoderma* [Online]. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Available from : <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> [2011, August].
- Sasaki, A., Miyanishi, M., Ozaki, K., Onoue, M., and Yoshida, K. 2005. Molecular characterization of a partitivirus from the plant pathogenic ascomycete *Rosellinia necatrix*. *Archives of Virology* 150 : 1069 – 1083.
- Schmitt, M. J. and Breinig, F. 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews: Microbiology* 32 : 56 – 60.
- Schuster, A. and Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 : 787-799.
- Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C. P., and Schmoll, M. 2009. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 : 13909 – 13914.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *The Journal of Biological Chemistry* 195 : 19 – 23.
- Strauss, E. E., Lakshman, D. K., and Tavantzis, S. M. 2000. Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. *Journal of General Virology* 81 : 549 – 555.
- Sun, Q., Choi, G. H., and Nuss, D. L. 2009. A single Argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 : 17927 – 17932.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).
- Tavantzis, S. M. and Bandy, B. P. 1988. Properties of a mycovirus from *Rhizoctonia solani* and its virion-associated RNA polymerase. *Journal of General Virology* 69 : 1465 – 1477.

- Tuomivirta, T. T. and Hantula, J. 2003. Two unrelated double-stranded RNA patterns in *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A code for putative viruses of the families *Totiviridae* and *Partitiviridae*. Archives of Virology 148 : 2293 – 2305.
- van Diepeningen, A. D., Debets, A. J. M., and Hoekstra, R. F. 1997. Heterokaryon incompatibility blocks virus transfer among natural isolates of black *Aspergilli*. Current Genetics 32 : 209 – 217.
- van Diepeningen, A. D., Debets, A. J. M., and Hoekstra, R. F. 2006. Dynamics of dsRNA Mycoviruses in black *Aspergillus* populations. Fungal Genetics and Biology 43 : 446 – 452.
- Varga, J., Kevei, F., Vagvolgyi, C., Vriesema, A., and Croft, J. H. 1994. Double-stranded RNA mycoviruses in section *Nigri* of the *Aspergillus* genus. Canadian Journal of Microbiology 39 : 325 – 329.
- Varga, J., Rinyu, E., Kevei, E., Toth, B., and Kozakiewicz, Z. 1998. Double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* sections *Circumdati* and *Fumigati*. Canadian Journal of Microbiology 44 : 569 – 574.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds.), PCR protocols: a guide to methods and applications, pp. 315 – 322. New York : Academic Press,
- Wu, M. D., Zhang, L., Li, G. Q., Jiang, D. H., Hou, M. S., and Huang, H.-C. 2007. Hypovirulence and Double-Stranded RNA in *Botrytis cinerea*. Phytopathology 97 : 1590 – 1599.
- Xie, J., Wei, D. M., Jiang, D. H., Fu, Y. P., Li, G. Q., Ghabrial, S. A., and Peng, Y. L. 2006. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of General Virology 87 : 241 – 249.
- Yu, H. J., Lim, D., and Lee, H.-S. 2003. Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*. Virology 314 : 9 – 15.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

#### 1. Corn meal dextrose agar (CMD)

CMA powder	17	g
Glucose	20	g

ละลายผง CMA (Himedia) และ glucose ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

#### 2. Lysogeny broth (LB) / agar (Bertani, 1951)

Tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
NaCl	10	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรเป็น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หากต้องการเตรียม Lysogeny agar ให้ละลาย agar น้ำหนัก 15 g ก่อนทำการปรับปริมาตรเป็น 1 L

#### 3. Potato dextrose broth / agar (PDB/PDA)

มันฝรั่ง	200	g
Glucose	20	g

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นขนาดเล็ก นำไปต้มกับน้ำกลั่นจนสุก กรองน้ำมันฝรั่งผ่านผ้าขาวบาง เติม glucose แล้วปรับ pH จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หากต้องการเตรียม potato dextrose agar ให้ละลาย agar น้ำหนัก 15 g ก่อนทำการปรับปริมาตรเป็น 1 L

#### 4. Potato dextrose broth / agar (PDB/PDA) (Commercial grade)

PDB powder	24	g
------------	----	---

ละลายผง PDB (Himedia) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หากต้องการเตรียม potato dextrose agar ให้ละลาย agar น้ำหนัก 15 g ก่อนทำการปรับปริมาตรเป็น 1 L

#### 5. Synthetic low nutrient agar (SNA) (Nirenberg, 1976)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1	g
$\text{KNO}_3$	1	g
KCl	0.5	g
Glucose	0.2	g
Sucrose	0.2	g
Agar	20	g

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น agar ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 5.5 ละลาย agar ปรับปริมาตรเป็น 1 L นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## 6. Production medium (ดัดแปลงจาก Punnapayak and Emert (1986))

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4	g
CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5	g
Corn steep liquor	7	g
Tween 80	2	mL
<b>ธาตุอาหารรอง</b>		
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.4	mg
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.6	mg
CoCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.6	mg
<b>แหล่งคาร์บอน</b>		
α-cellulose	30	g

1. เตรียม Stock ของธาตุอาหารรอง โดยละลาย FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.14 g MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.16 g และ CoCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.36 g ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 20 mL เก็บในหลอดที่บดแสงที่อุณหภูมิ 4 °C

2. ละลาย MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O และ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ในน้ำกลั่น 800 mL เติม corn steep liquor (50 %) 14 mL Tween 80 2 mL และ Stock ของธาตุอาหารรอง 200 µL ปรับ pH เป็น 5.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L จากนั้นเทสารละลาย 100 mL ใส่ขวดพลาสติกขนาด 250 mL จำนวน 10 ขวด

3. ชั่ง CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.5 g และ α-Cellulose 3 g ใส่ในแต่ละขวด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. สารเคมีสำหรับการตรวจสอบ dsRNA

##### 1.1 Phenol (1x STE saturated)

ชั่ง phenol (crystalline) 250 g ใส่ในขวดสีชา นำไปละลายที่อุณหภูมิ 65 °C เติม 8-hydroxyquinoline 0.25 g (0.1% w/v) และ 2x STE buffer 250 mL ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นแยกชั้น phenol ด้วยกรวยแยก แล้วเติม 1x STE buffer นำไปปั่นต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำซ้ำจน phenol มี pH ~8.0 จึงเติม 1x STE buffer 30 mL ปิดฝิวน้ำชั้น phenol เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

##### 1.2 Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)

ตวง chloroform 120 mL จากนั้นเติม isoamyl alcohol 5 mL เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

##### 1.3. STE buffer

4x STE buffer (200 mM Tris, 400 mM NaCl, 4mM EDTA, pH 8.0)

ละลาย Tris 24.23 g NaCl 23.38 g ในน้ำกลั่น 800 mL ปรับ pH เป็น 8.0 ละลาย EDTA 1.49 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 1 L หนึ่งฆ่าเชื้อ

1.4 Extraction buffer (2x STE buffer, 0.02%  $\beta$ -mercaptoethanol (v/v), 1 mg/mL bentonite, 2% SDS (w/v))

ตวง 4x STE buffer 500 mL เติม Bentonite 1 g SDS 20 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 1 L หนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่อเย็นลงจึงเติม  $\beta$ -mercaptoethanol 200  $\mu$ L

##### 1.5 Wash buffer (17% (v/v) EtOH ใน 1x STE buffer)

ตวง 95% EtOH 179 mL เติม 2x STE buffer ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 500 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จนเป็น 1 L

### 1.6 Elution buffer (1x STE buffer)

ตวง 4x STE buffer 250 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 1 L หนึ่งฆ่าเชื้อ

### 1.7 TE buffer

10x TE buffer (100 mM Tris, 10mM EDTA, pH 8.0)

ละลาย Tris 6.06 g ในน้ำกลั่น 80 mL ปรับ pH เป็น 8.0 ละลาย EDTA 0.37 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 100 mL หนึ่งฆ่าเชื้อ

### 1.8 TBE buffer

5X TBE buffer

ละลาย Tris 54 g boric acid 27.5 g ในน้ำกลั่น แล้วเติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 mL

### 1.9 Saline-Sodium Citrate (SSC) buffer

2x SSC buffer (300 mM NaCl, 30 mM sodium citrate)

ละลาย NaCl 1.753 กรัม และ sodium citrate 0.882 กรัม ในน้ำกลั่น 80 mL ปรับ pH ด้วย NaOH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 100 mL หนึ่งฆ่าเชื้อ

0.1x SSC buffer (15 mM NaCl, 1.5 mM sodium citrate)

เจือจาง 2x SSC buffer 50  $\mu$ L ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 950  $\mu$ L

### 1.10 30% Acrylamide mix (29% (w/v) acrylamide, 1% (w/v) bis-acrylamide)

ละลาย acrylamide 29 g ในน้ำกลั่น 50 mL bis-acrylamide 1 g ในน้ำกลั่น 50 mL เก็บในภาชนะที่บดแสงที่อุณหภูมิ 4 °C นำมาผสมในอัตรา 1:1 ก่อนใช้

### 1.11 10% (w/v) APS

ละลาย ammonium persulfate (APS) 0.1 g ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 mL เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C ในหลอดขนาด 1.5 mL ที่ห่อด้วยฟอลส์

### 1.12 Resolving buffer

ละลาย Tris 7.2684 g และ SDS 0.154 g ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนเป็น 100 mL นิ่งฆ่าเชื้อ

### 1.13 Stacking buffer

ละลาย Tris 0.96 g และ SDS 0.061 g ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับปริมาตรจนเป็น 50 mL นิ่งฆ่าเชื้อ

### 1.14 Tris-glycine buffer

ละลาย Tris 3.02 g Glycine 18.8 g และ SDS 1 g ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับปริมาตรจนเป็น 1 L เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

### 1.15 8% Resolving gel

Resolving buffer	3,275	μL
Distilled water	334	μL
30% Acrylamide	1,336	μL
TEMED	5	μL
10% APS	50	μL
	<hr/>	
	5,000	μL

### 1.16 5% Stacking gel

Stacking buffer	1,644	μL
30% Acrylamide	344	μL
TEMED	2	μL
10% APS	20	μL
	<hr/>	
	2,000	μL

### 1.17 6X loading dye (30% (v/v) glycerol, 0.25% (w/v) BPB ใน TE buffer)

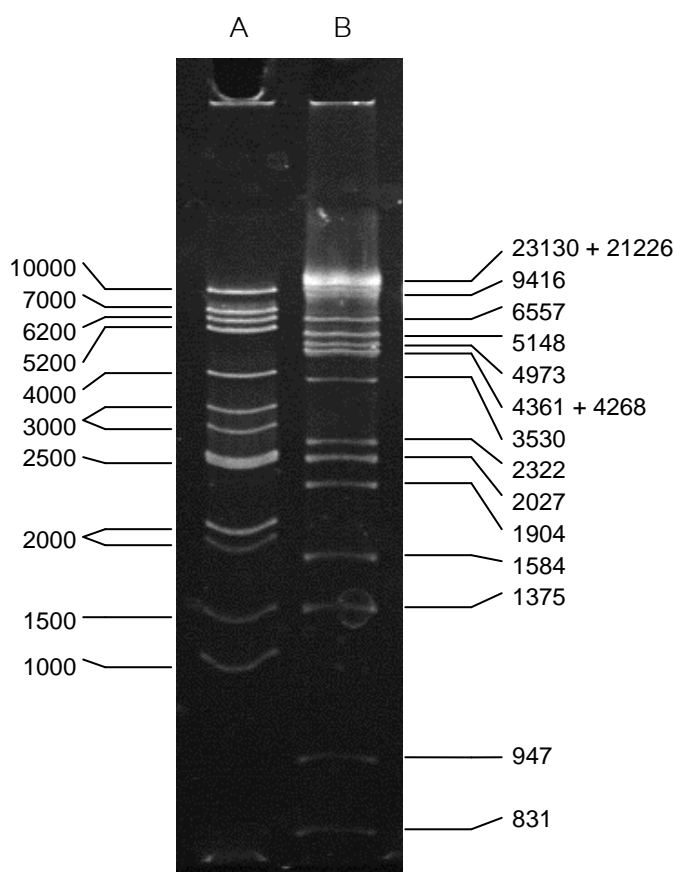
ผสม 10x TE buffer 50  $\mu$ L กับ glycerol ฆ่าเชื้อ 300  $\mu$ L จากนั้นละลาย bromophenol blue (BPB) 2.5 mg ปรับปริมาตรเป็น 1 mL

### 1.18 $\lambda$ DNA marker

1. เตรียม Lambda ( $\lambda$ ) DNA (Fermentas) 50  $\mu$ g (0.3  $\mu$ g/ $\mu$ l ใน TE buffer) ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ Lambda DNA 50  $\mu$ g ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Eco*RI

2. นำ DNA ที่ตัดแล้วมาสกัดด้วย phenol-chloroform และตกตะกอนด้วย Ethanol

3. ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE buffer



ภาพที่ 38 การเคลื่อนที่ของ DNA marker บน 8% SDS-PAGE ใน Tris-glycine buffer กระแสไฟฟ้า 100 volt เวลา 4.00 ชั่วโมง เลน A: 1 kb DNA ladder (Vivantis) เลน B:  $\lambda$  DNA ที่ตัดด้วย *Hind*III ผสมกับ  $\lambda$  DNA ที่ตัดด้วย *Hind*III และ *Eco*RI (1:1)



## 2. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ dsRNA

### 2.1 0.1 M Calcium chloride ใน 15% (v/v) glycerol

ละลาย calcium chloride 2.22 g ในน้ำกลั่น เติม glycerol (100 %) 30 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 200 mL หนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บในขวดที่บแสงที่อุณหภูมิ 4 °C

### 2.2 X-gal (20 mg/mL)

ชั่ง X-gal 20 mg ละลายด้วย dimethyl formamide (DMF) 1 mL เก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิ -20 °C ในหลอดขนาด 1.5 mL ห่อฟอลด์

### 2.3 IPTG (200 mg/mL)

ชั่ง IPTG 0.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 500  $\mu$ L กรองผ่านฟิลเตอร์ขนาด 0.2  $\mu$ m เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C ในหลอดขนาด 1.5 mL

### 2.4 Sol I (50 mM glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0)

ละลาย glucose 0.45 g Tris 0.15 g ในน้ำกลั่น 40 mL ปรับ pH เป็น 8.0 ละลาย EDTA 0.19 g ปรับปริมาตรเป็น 50 mL กรองผ่านฟิวเตอร์ปลอดเชื้อขนาด 0.2  $\mu$ m เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

### 2.5 Sol II (Alkali-SDS solution; 0.2N NaOH, 1% (w/v) SDS)

เตรียม 2N NaOH โดยละลาย NaOH 0.16 g ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 20 mL

เตรียม 2% SDS โดยละลาย SDS 0.4 g ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 20 mL

ผสม 2N NaOH 2% SDS และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ในอัตรา 1:5:4 ก่อนใช้งาน

### 2.6 Sol III (High salt solution)

ละลาย potassium acetate 29.4 g ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 80 mL เติม glacial acetic acid 11.5 mL ปรับปริมาตรเป็น 100 mL

### 3. สารเคมีสำหรับการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Somogyi, 1952; Nelson, 1944)

#### 3.1 Copper Reagent

3.1.1 Reagent I (potassium sodium tartrate:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ :  $\text{NaHCO}_3$  (1: 2:12:1.3))

ละลาย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  144 g ในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มให้เดือด ปริมาตร 800 mL เติม potassium sodium tartrate 12 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  24 g และ  $\text{NaHCO}_3$  16 g ลงไป ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มแล้ว ปรับปริมาตรให้เป็น 800 mL เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 °C

3.1.2 Reagent II ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1:9))

ละลาย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  36 g ในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มให้เดือด ปริมาตร 300 mL เติม  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4.0 g ปรับปริมาตรให้เป็น 200 mL เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 °C

3.1.3 Copper Reagent

ผสม Reagent I และ Reagent II ในอัตรา 4:1 ก่อนใช้งาน

#### 3.2 Arsenomolybdate Reagent

ละลาย ammonium molybdate 25 g ในน้ำกลั่น 450 mL เติม Conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  21 mL หลังจากนั้นเติมสารละลาย  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  3 g ที่ละลายในน้ำ 25 mL เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 3.3 0.05 M citrate buffer, pH 5.0

ละลาย sodium citrate ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0.867 g และ citric acid ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0.431 g ในน้ำกลั่น 100 mL หนึ่งฝาเชื้อ

#### 4. สารเคมีสำหรับการวัดปริมาณโปรตีน

##### 4.1 Bradford's reagent

Coomassie Brilliant Blue G-250	10	mg
95% Ethanol	5	mL
85% Phosphoric acid	10	mL
น้ำกลั่น	100	mL

ซึ่ง Coomassie Brilliant Blue G-250 10 mg ละลายด้วย 95% Ethanol 5 mL จากนั้นเติม 85% Phosphoric acid 10 mL และปรับปริมาตรให้ครบ 100 mL ด้วยน้ำกลั่น

## ภาคผนวก ค

### วิธีการทดลอง

#### 1. การเตรียม cell (spore) suspension

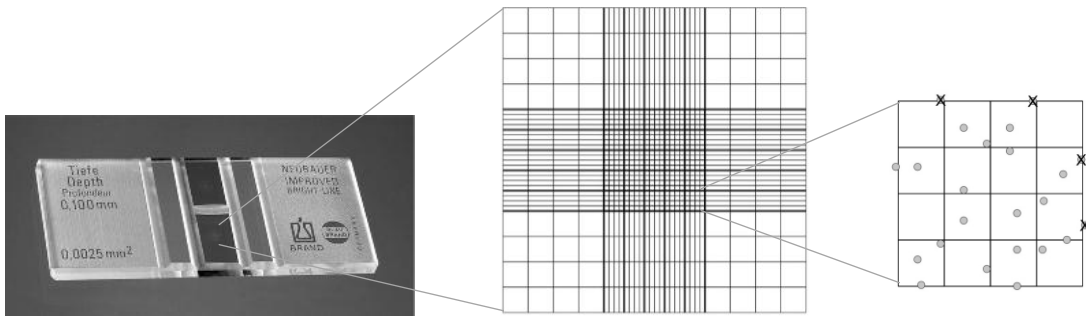
1. ปิเปต 1% (v/v) Tween ใน 20% (v/v) glycerol 5 ml ลงบนขอบจานอาหารเลี้ยง เชื้อยง จานอาหารให้สารละลายไหลทั่วผิวหน้าโคโลนี

2. ปิเปตสารแขวนลอยที่ได้ 100  $\mu\text{L}$  ลงในหลอด 1.5 mL เก็บที่อุณหภูมิ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### 2. การนับจำนวนเซลล์โดยวิธี direct microscopic count ด้วย counting chamber

1. เจือจาง cell suspension อย่างน้อย 1:100 เท่า ก่อนทำการนับจำนวนเซลล์

2. ปิดกึ่งกลางของ counting chamber (หรือ Haemocytometer) ด้วย cover glass เฉพาะ ปิเปต cell suspension ที่ผสมเข้ากันแล้ว 5  $\mu\text{L}$  แล้วลงบริเวณร่องกึ่งกลาง



ภาพที่ 39 Counting chamber ชนิด Improved Neubauer

3. นับจำนวนเซลล์ภายในช่องกึ่งกลางของ chamber (ช่องใหญ่  $5 \times 5 = 25$  ช่อง มีพื้นที่ช่องละ  $0.04\text{ mm}^2$ , ช่องเล็ก  $4 \times 4 = 16$  ช่อง มีพื้นที่ช่องละ  $0.0025\text{ mm}^2$ ) โดยจะไม่นับเซลล์ที่ทับเส้นขอบด้านบนและด้านขวา และนับอย่างน้อย 5 ช่อง

## วิธีการคำนวณ

$$\text{Cells per } \mu\text{l Volume} = \frac{\text{Counted particles}}{\text{Counted surface (mm}^2\text{) x Chamber depth (mm) x Dilution}}$$

โดยที่	Cells per $\mu\text{l}$ Volume	= จำนวนเซลล์ต่อปริมาตร 1 $\mu\text{l}$
	Counted particles	= จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่นับได้
	Counted surface	= พื้นที่ที่นับ
	Chamber depth	= 0.1 mm (ขึ้นอยู่กับชนิดของ cover glass ที่ใช้)
	Dilution	= การเจือจาง

### 3. การเตรียม *E. coli* competent cell (ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook et al. (1989))

1. เลี้ยง *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  บนจานอาหาร LA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 1 คืน
2. เชื้อโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB 10 mL ในขวดขนาด 50 ml เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 14 ชั่วโมง
3. ถ่าย 1 mL ลงในขวด LB 10 mL ใหม่ เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm อุณหภูมิ 37 °C 90 นาที (วัดค่า OD<sub>600</sub> = ~0.6-0.8)
4. ปิเปต 10 mL ลงในขวด LB 90 mL เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm อุณหภูมิ 37 °C 110 นาที
5. ถ่าย 20 mL ลงในขวด Centrifuge ขนาด 30 mL แช่ในน้ำแข็ง 20 นาที
6. ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C 7 นาที ปิเปตอาหารเหลวออกจนหมด
7. เติมสารละลาย calcium chloride แช่เย็น 10 mL ผสมให้เซลล์แขวนลอย แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที
8. ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C 7 นาที ทิ้งส่วนใส
9. เติมสารละลาย calcium chloride แช่เย็น 10 mL ผสมให้เซลล์แขวนลอย แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที
10. ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C 7 นาที ทิ้งส่วนใส
11. เติมสารละลาย calcium chloride แช่เย็น 1 mL ผสมให้เซลล์แขวนลอย
12. ปิเปต 100  $\mu$ L ลงในหลอดขนาด 1.5 mL
13. แช่หลอดในไนโตรเจนเหลว เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C

#### 4. การสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Alkaline lysis (ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook et al. (1989))

1. เลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* ในอาหารเหลว LB ที่มี ampicillin 100 µg/mL ปริมาตร 5 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 rpm เป็นเวลาประมาณ 14-16 ชั่วโมง
2. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ 1.5 mL ใส่ในหลอด 1.5 mL ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 g เป็นเวลา 30 วินาที เทอาหารเหลวทิ้ง
3. เติมสารละลาย Sol I 100 µL และ RNase A 2 µL ทำให้เซลล์แขวนลอย
4. เติมสารละลาย Sol II ที่เตรียมใหม่ 200 µL ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดเบา ๆ 4-5 ครั้ง ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที
5. เติมสารละลาย Sol III ที่เตรียมใหม่ 200 µL ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอด 4-5 ครั้ง แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที
6. ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสในหลอดใหม่
7. ตกตะกอนด้วยการเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า บ่มที่ -20 °C 10 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง
8. ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol 1 mL บ่มที่ -20 °C 10 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง
9. ระเหยตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE buffer 30 µL

## 5. การวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ endoglucanase (Somogyi, 1952; Nelson, 1944)

### 5.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลด้วยวิธี Somogyi-Nelson

1. เตรียมสารละลาย glucose 10 mg/mL จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 - 100  $\mu\text{g/mL}$
2. ปิเปตสารละลายแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 100  $\mu\text{L}$  เติม citrate buffer 100  $\mu\text{L}$
3. เติม Copper reagent 400  $\mu\text{L}$  เขย่าในเข้ก้าน นำไปไว้บน Hot plate ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 15 นาที
4. ทิ้งให้หลอดทดลองเย็นลง ค่อยๆเติม arsenomolybdate reagent 400  $\mu\text{L}$
5. ปิเปตสารละลายน้ำตาล glucose 50  $\mu\text{L}$  ผสมกับน้ำกลั่น 100  $\mu\text{L}$  ลงในช่องของ microplate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader
6. นำค่าที่วัดได้นำมาสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาล

### 5.2 การวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ endoglucanase

1. เติมเอนไซม์ 100  $\mu\text{L}$  ลงในหลอดทดลอง 2 หลอด
2. เติม 1% CMC ใน citrate buffer 100  $\mu\text{L}$  และอีกหลอดเติม citrate buffer 100  $\mu\text{L}$  (blank)
3. บ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที
4. เติม Copper reagent 400  $\mu\text{L}$  เขย่าในเข้ก้าน นำไปไว้บน hot plate ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 15 นาที
5. ทิ้งให้หลอดทดลองเย็นลง ค่อยๆเติม arsenomolybdate reagent 400  $\mu\text{L}$
6. นำสารละลายไปปั่นตกตะกอนที่ 6000 rpm 5 นาที ปิเปตสารละลาย 50  $\mu\text{L}$  ผสมกับน้ำกลั่น 100  $\mu\text{L}$  ลงในช่องของ microplate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 540 nm ด้วยเครื่อง microplate reader



7. นำค่าที่วัดได้นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

## 6. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (ดัดแปลงจากวิธีของ Bradford (1976))

### 6.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีน Bovine serum albumin (BSA)

1. เตรียมสารละลาย BSA ความเข้มข้น 10 mg/mL จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10 - 100  $\mu\text{g/mL}$  ในหลอดทดลอง
2. ปิเปตสารละลาย BSA 100  $\mu\text{L}$  ลงในหลอดทดลอง
3. เติม Bradford reagent 1 mL เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 3 นาที
4. ปิเปตสารละลาย 200  $\mu\text{L}$  ลงในช่องของ microplate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 620 nm ด้วยเครื่อง microplate reader
5. นำค่าที่วัดได้นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน

### 6.2 การวัดปริมาณโปรตีน

1. เติมเอนไซม์ 100  $\mu\text{L}$  ลงในหลอดทดลอง
2. เติม Bradford reagent 1 mL ปิเปตให้เข้ากันทิ้งไว้ 3 นาที
3. ปิเปตสารละลาย 200  $\mu\text{L}$  ลงในช่องของ microplate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 620 nm ด้วยเครื่อง microplate reader
4. นำค่าที่วัดได้นำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณปริมาณโปรตีน

## 7. การคำนวณค่าแอกติวิตีของเอนไซม์

การคำนวณค่า Unit of enzyme ตามวิธีของ The International Union of Biochemistry (IUB)

1 หน่วย (ยูนิต) ของเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย 1  $\mu\text{mol}$  ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะทดสอบ

1 หน่วยของเอนไซม์ = 1  $\mu\text{mol}$  ของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกปล่อยออกมาในเวลา 1 นาที

### วิธีการคำนวณ

$$\text{Units/mL enzyme} = \frac{\text{Sugar}}{(\text{Time} \times \text{Volume} \times \text{Dilution})}$$

โดยที่ Sugar = ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการเทียบ O.D. กับกราฟมาตรฐาน ( $\mu\text{mol}$ )

Time = ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์ (min)

Volume = ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ (mL)

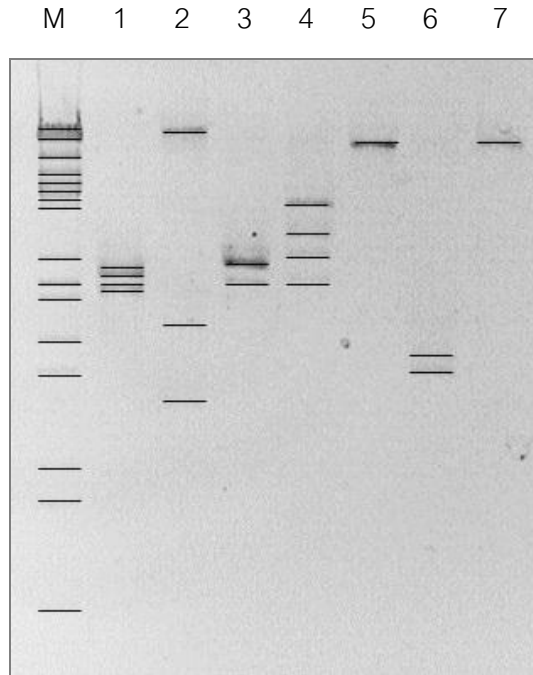
Dilution = การเจือจาง

1 หน่วยของเอนไซม์ endoglucanase = 0.180 mg ของน้ำตาล Glucose ที่ถูกปล่อยออกมาจาก CMC ในเวลา 1 นาที

## ภาคผนวก ง

### ข้อมูลการทดลองเพิ่มเติม

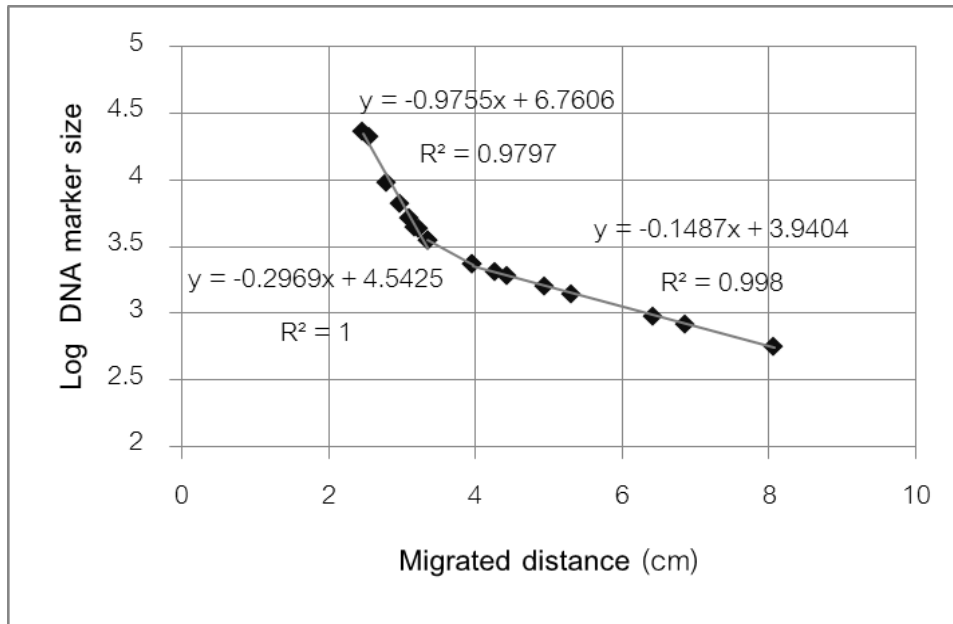
#### 1. การหาขนาดโดยประมาณของ dsRNA



ภาพที่ 40 ตำแหน่งของแถบที่ใช้ในการหาขนาด dsRNA เมื่อแยกบน 1.6% agarose ที่ 100 V เป็นเวลา 60 นาที เลน M :  $\lambda$  DNA marker เลนที่ 1-7: dsRNA จากไอโซเลต (1) Cbi3.1.1 (2) Cbi3.2.2 (3) Cbi3.3.1 (4) Cpn1.1.1 (5) Pbn1.1.5 (6) PIk1.1.9 และ (7) Ubn1.1.3

ตารางที่ 24 ขนาดและระยะการเคลื่อนที่ของ DNA marker เมื่อแยกบน 1.6% agarose

	ขนาดของ DNA marker (bp)	Log 10	ระยะการเคลื่อนที่ (cm)
1	23130	4.4	2.5
2	21226	4.3	2.6
3	9416	4.0	2.8
4	6557	3.8	3.0
5	5148	3.7	3.1
6	4361	3.6	3.2
7	4268	3.6	3.2
8	3530	3.5	3.3
9	2322	3.4	4.0
10	2027	3.3	4.3
11	1904	3.3	4.4
12	1584	3.2	4.9
13	1375	3.1	5.3
14	947	3.0	6.4
15	831	2.9	6.9
16	564	2.8	8.1



ภาพที่ 41 กราฟ log ของขนาดของ DNA marker กับระยะการเคลื่อนที่บน 1.6 % agarose

ตารางที่ 25 การหาขนาดโดยประมาณของ dsRNA ของแต่ละไอโซเลต

	ไอโซเลต	dsRNA	ระยะการเคลื่อนที่ (cm)	Log 10	ขนาดโดยประมาณ (bp)
1	Cbi3.1.1	1	4.09	3.33	2150
		2	4.15	3.32	2102
		3	4.33	3.30	1982
		4	4.39	3.29	1937
2	Cbi3.2.2	1	2.48	4.34	21962
		2	4.78	3.23	1699
		3	5.67	3.10	1252
3	Cbi3.3.1	1	4.03	3.34	2194
		2	4.24	3.31	2041
4	Cpn1.1.1	1	3.33	3.51	3246
		2	3.71	3.44	2753
		3	3.92	3.38	2399
		4	4.23	3.31	2047
5	Pbn1.1.5	1	2.64	4.18	15249
6	PIk1.1.9	1	5.13	3.18	1505
		2	5.29	3.15	1423
7	Ubn1.1.3	1	2.64	4.18	15249

## 2. การเติบโตของโคโลนีเซลล์เดี่ยว

ตารางที่ 26 รัศมีการเติบโต (mm) ของเส้นใยโคโลนีเดี่ยวที่มี และไม่มี dsRNA เมื่อเลี้ยงบนอาหาร CMD เป็นเวลา 3 วัน

CMD	15 °C					30 °C					40 °C				
	1	2	3	Mean	SD	1	2	3	Mean	SD	1	2	3	Mean	SD
โคโลนี															
Cbi3.3.1	3.0	3.5	5.2	3.9	1.2	68.5	77.8	74.0	73.4	4.7	18.5	16.2	18.0	17.6	1.2
v2	8.2	10.5	8.0	8.9	1.4	80.0*	76.2	65.0	73.7	7.8	21.0	20.0	19.0	20.0	1.0
v3	8.0	8.8	7.5	8.1	0.7	76.0	80.0*	80.0*	78.7	2.3	14.5	15.0	15.5	15.0	0.5
c1	10.0	9.5	9.2	9.6	0.4	80.0*	80.0*	80.0*	80.0	0.0	20.0	20.5	19.0	19.8	0.8
c4	8.5	7.0	9.0	8.2	1.0	80.0*	80.0*	80.0*	80.0	0.0	18.0	17.0	18.0	17.7	0.6
c5	10.0	9.5	7.5	9.0	1.3	80.0*	80.0*	80.0*	80.0	0.0	21.5	22.5	21.0	21.7	0.8
c6	10.5	6.7	9.0	8.7	1.9	80.0*	80.0*	80.0*	80.0	0.0	22.0	19.5	18.0	19.8	2.0
c8	17.5	15.2	16.0	16.2	1.2	80.0*	80.0*	80.0*	80.0	0.0	17.0	21.0	21.0	19.7	2.3
c9	17.0	18.5	17.5	17.7	0.8	80.0*	80.0*	80.0*	80.0	0.0	18.0	22.0	19.0	19.7	2.1

\* รัศมีสูงสุดที่วัดได้เมื่อเส้นใยเติบโตเต็มจานอาหารเลี้ยง

ตารางที่ 27 การเติบโต (mm) ของเส้นใยโคโลนีเดี่ยวที่มี และไม่มี dsRNA เมื่อเลี้ยงบนอาหาร SNA เป็นเวลา 3 วัน

SNA	15 °C					30 °C					40 °C				
โคโลนี	1	2	3	Mean	SD	1	2	3	Mean	SD	1	2	3	Mean	SD
Cbi3.3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	28.0	32.5	31.4	30.6	2.3	4.0	5.0	4.5	4.5	0.5
v2	1.0	0.0	0.0	0.3	0.6	39.0	39.0	35.0	37.7	2.3	8.0	10.5	9.0	9.2	1.3
v3	0.0	1.2	0.0	0.4	0.7	45.5	38.0	39.5	41.0	4.0	6.5	9.0	10.0	8.5	1.8
c1	1.0	2.0	2.0	1.7	0.4	38.6	34.0	35.5	36.0	2.3	11.0	10.5	10.0	10.5	0.5
c4	2.0	4.0	2.0	2.7	1.0	37.0	42.5	34.0	37.8	4.3	7.0	10.0	6.0	7.7	2.1
c5	1.0	0.0	1.0	0.7	1.3	33.0	27.0	28.5	29.5	3.1	5.0	8.5	8.5	7.3	2.0
c6	1.0	1.0	0.0	0.7	1.9	43.0	44.0	40.5	42.5	1.8	8.5	14.0	12.5	11.7	2.8
c8	2.0	3.0	2.0	2.3	1.2	40.5	43.2	50.0	44.6	4.9	14.0	15.0	13.0	14.0	1.0
c9	4.0	3.0	3.0	3.3	0.8	34.5	47.0	44.8	42.1	6.7	16.0	14.0	10.5	13.5	2.8

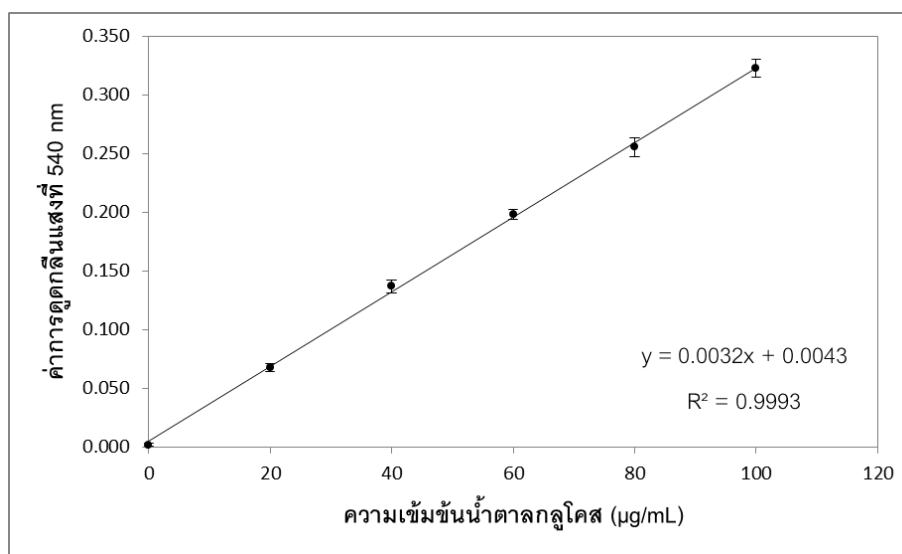


### 3. การวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ของโคโลนีเซลล์เดี่ยว

#### 3.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาล

ตารางที่ 28 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ของน้ำตาล glucose ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่วัดด้วยวิธี Somogyi-Nelson

ความเข้มข้นของ Glucose ( $\mu\text{g/mL}$ )		0	20	40	60	80	100
ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 540 nm	1	0.002	0.067	0.142	0.199	0.261	0.320
	2	0.003	0.071	0.131	0.201	0.259	0.317
	3	0.000	0.064	0.137	0.193	0.246	0.331
	ค่าเฉลี่ย	0.002	0.067	0.137	0.198	0.255	0.323
	SD	0.002	0.004	0.006	0.004	0.008	0.007



ภาพที่ 42 กราฟมาตรฐานของน้ำตาล glucose

### 3.2 การวัดค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ endoglucanase

ตารางที่ 29 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ของ crude enzyme จากโคโลนีเดี่ยว

		ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm					
		ก่อนทำปฏิกิริยา			หลังทำปฏิกิริยา		
โคโลนี		1	2	3	1	2	3
Cbi3.3.1	1	0.025	0.027	0.025	0.065	0.066	0.066
	2	0.022	0.021	0.020	0.094	0.086	0.085
	3	0.051	0.052	0.053	0.124	0.121	0.121
v2	1	0.017	0.017	0.016	0.143	0.144	0.149
	2	0.028	0.028	0.029	0.068	0.066	0.067
	3	0.047	0.046	0.046	0.116	0.113	0.114
v3	1	0.046	0.044	0.044	0.099	0.099	0.099
	2	0.035	0.036	0.036	0.073	0.068	0.066
	3	0.048	0.047	0.047	0.095	0.094	0.098
c1	1	0.036	0.034	0.035	0.071	0.071	0.074
	2	0.040	0.040	0.041	0.120	0.121	0.124
	3	0.047	0.049	0.054	0.122	0.123	0.123
c4	1	0.028	0.027	0.029	0.036	0.045	0.046
	2	0.039	0.039	0.037	0.064	0.061	0.059
	3	0.046	0.044	0.048	0.114	0.111	0.111
c5	1	0.039	0.035	0.035	0.132	0.139	0.141
	2	0.046	0.047	0.048	0.067	0.069	0.072
	3	0.039	0.040	0.041	0.154	0.151	0.157
c6	1	0.034	0.034	0.039	0.066	0.079	0.080
	2	0.047	0.046	0.045	0.133	0.137	0.137
	3	0.043	0.042	0.045	0.130	0.126	0.127
c8	1	0.031	0.029	0.030	0.086	0.080	0.080
	2	0.043	0.042	0.044	0.042	0.038	0.041
	3	0.043	0.042	0.043	0.076	0.070	0.076
c9	1	0.029	0.027	0.021	0.118	0.118	0.117
	2	0.028	0.027	0.026	0.101	0.103	0.104
	3	0.053	0.052	0.055	0.077	0.077	0.075

ตารางที่ 30 ปริมาณน้ำตาลของ crude enzyme จากโคโลนีเดี่ยว

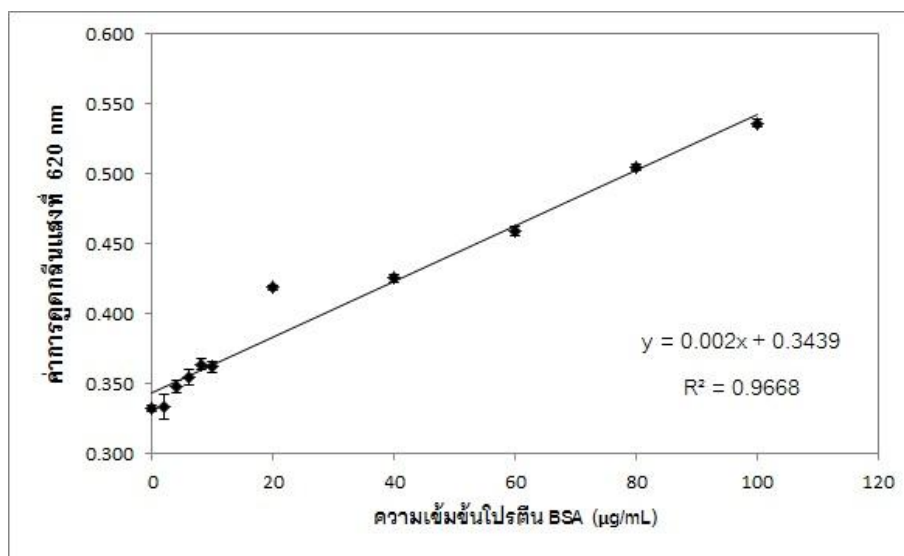
โคโลนี	ปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น ( $\mu\text{g/mL}$ )	ค่าแอกทิวิตี (mU/mL)
Cbi3.3.1	18.09 $\pm$ 5.19	3.35 $\pm$ 0.961
v2	24.13 $\pm$ 14.34	4.47 $\pm$ 2.66
v3	13.78 $\pm$ 3.38	2.55 $\pm$ 0.63
c1	19.51 $\pm$ 7.34	3.61 $\pm$ 1.36
c4	10.38 $\pm$ 8.65	1.92 $\pm$ 1.60
c5	24.34 $\pm$ 15.50	4.51 $\pm$ 2.87
c6	21.84 $\pm$ 8.64	4.04 $\pm$ 1.60
c8	8.02 $\pm$ 8.63	1.48 $\pm$ 1.60
c9	19.48 $\pm$ 11.27	3.61 $\pm$ 2.09

### 3.3 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

ตารางที่ 31 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm ของโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆที่วัดด้วยวิธี Bradford

ความเข้มข้นของ BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	2	4	6	8	10	
ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 620 nm	1	0.334	0.323	0.352	0.356	0.361	0.362
	2	0.330	0.337	0.344	0.349	0.363	0.358
	3	0.333	0.340	0.348	0.360	0.368	0.366
	ค่าเฉลี่ย	0.332	0.333	0.348	0.355	0.364	0.362

ความเข้มข้นของ BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )	20	40	60	80	100	
ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 620 nm	1	0.419	0.429	0.457	0.505	0.537
	2	0.420	0.423	0.463	0.503	0.539
	3	0.417	0.424	0.457	0.507	0.533
	ค่าเฉลี่ย	0.419	0.425	0.459	0.505	0.536



ภาพที่ 43 กราฟมาตรฐานของโปรตีน BSA

ตารางที่ 32 ปริมาณโปรตีนของ crude enzyme จากการผลิตเอนไซม์ endoglucanase

Cellulase	โคโลนี	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm				ปริมาณโปรตีน ( $\mu\text{g/mL}$ )
		1	2	3	ค่าเฉลี่ย	
Cbi3.3.1	1	0.500	0.505	0.495	0.500	78.050
	2	0.477	0.474	0.478	0.476	66.217
	3	0.493	0.492	0.488	0.491	73.550
v2	1	0.471	0.477	0.476	0.475	65.383
	2	0.474	0.480	0.489	0.481	68.550
	3	0.457	0.479	0.470	0.469	62.383
v3	1	0.436	0.442	0.442	0.44	48.050
	2	0.468	0.473	0.472	0.471	63.550
	3	0.484	0.488	0.487	0.486	71.217
c1	1	0.511	0.509	0.507	0.509	82.550
	2	0.491	0.482	0.493	0.489	72.383
	3	0.498	0.492	0.492	0.494	75.050
c4	1	0.531	0.525	0.525	0.527	91.550
	2	0.491	0.487	0.485	0.488	71.883
	3	0.505	0.511	0.510	0.509	82.383
c5	1	0.502	0.498	0.494	0.498	77.050
	2	0.481	0.484	0.491	0.485	70.717
	3	0.492	0.497	0.497	0.495	75.717
c6	1	0.504	0.509	0.502	0.505	80.550
	2	0.493	0.483	0.485	0.487	71.550
	3	0.476	0.470	0.476	0.474	65.050
c8	1	0.450	0.455	0.455	0.453	54.717
	2	0.488	0.489	0.490	0.489	72.550
	3	0.489	0.492	0.491	0.491	73.383
c9	1	0.494	0.491	0.495	0.493	74.717
	2	0.493	0.490	0.500	0.494	75.217
	3	0.487	0.490	0.489	0.489	72.383

#### 4. ตารางสถิติ

ตารางที่ 33 ANOVA ของรัศมีการเติบโตของโคโลนีเซลล์เดี่ยวทั้งหมดบนอาหาร CMD ที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C

CMD		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
15 °C	Between Groups	437.423	8	54.678	40.019	0.000*
	Within Groups	24.593	18	1.366		
	Total	462.016	26			
30 °C	Between Groups	185.612	8	23.201	2.373	0.061
	Within Groups	176.020	18	9.779		
	Total	361.632	26			
40 °C	Between Groups	90.660	8	11.333	5.678	0.001*
	Within Groups	35.927	18	1.996		
	Total	126.587	26			

\*ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

ตารางที่ 34 ANOVA ของรัศมีการเติบโตระหว่างกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA บนอาหาร CMD ที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C

CMD		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
15 °C	Between Groups	168.974	2	84.487	6.919	0.004*
	Within Groups	293.043	24	12.210		
	Total	462.016	26			
30 °C	Between Groups	149.105	2	74.553	8.419	0.002*
	Within Groups	212.527	24	8.855		
	Total	361.632	26			
40 °C	Between Groups	29.049	2	14.524	3.574	0.044*
	Within Groups	97.538	24	4.064		
	Total	126.587	26			

\*ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

ตารางที่ 35 ANOVA ของวัคซีการเติบโตของโคโลนีเซลล์เดี่ยวทั้งหมดบนอาหาร SNA ที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C

SNA		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
15 °C	Between Groups	34.279	8	4.285	10.113	0.000*
	Within Groups	7.627	18	0.424		
	Total	41.905	26			
30 °C	Between Groups	659.107	8	82.388	5.610	0.001*
	Within Groups	264.333	18	14.685		
	Total	923.441	26			
40 °C	Between Groups	227.741	8	28.468	8.377	0.000*
	Within Groups	61.167	18	3.398		
	Total	288.907	26			

\*ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

ตารางที่ 36 ANOVA ของวัคซีการเติบโตระหว่างกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA บนอาหาร SNA ที่อุณหภูมิ 15 °C 30 °C และ 40 °C

SNA		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
15 °C	Between Groups	16.494	2	8.247	7.789	0.002*
	Within Groups	25.411	24	1.059		
	Total	41.905	26			
30 °C	Between Groups	183.736	2	91.868	2.981	0.070
	Within Groups	739.704	24	30.821		
	Total	923.441	26			
40 °C	Between Groups	106.463	2	53.231	7.002	0.004*
	Within Groups	182.444	24	7.602		
	Total	288.907	26			

\*ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %

ตารางที่ 37 ANOVA ของแอกติวิตี้และแอกติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase และ ปริมาณโปรตีนจาก crude enzyme ของโคโลนีเซลล์เดี่ยวทั้งหมด

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	27.954	8	3.494	1.032	0.449
	Within Groups	60.975	18	3.388		
	Total	88.929	26			
Protein	Between Groups	967.583	8	120.924	2.202	0.078
	Within Groups	988.632	18	54.924		
	Total	1956.214	26			
Specific activity	Between Groups	0.005	8	0.001	0.892	0.542
	Within Groups	0.013	18	0.001		
	Total	0.019	26			

ตารางที่ 38 ANOVA ของแอกติวิตี้และแอกติวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase และ ปริมาณโปรตีนจาก crude enzyme ของกลุ่มโคโลนีเซลล์เดี่ยวที่มีและไม่มี dsRNA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Activity	Between Groups	0.458	2	0.229	0.062	0.940
	Within Groups	88.471	24	3.686		
	Total	88.929	26			
Protein	Between Groups	569.395	2	284.689	4.927	0.016*
	Within Groups	1386.819	24	57.784		
	Total	1956.214	26			
Specific activity	Between Groups	0.001	2	0.000	0.480	0.624
	Within Groups	0.018	24	0.001		
	Total	0.019	26			

\*ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายบุญยฤทธิ์ จันทิมนล เกิดเมื่อวันที่ 10 เมษายน พ.ศ. 2528 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ จากภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2550 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ในกลุ่มศักยภาพทางชีวภาพของพืชในอนาคต (Plant Bioprospecting) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2554