สารบาญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบาญตาราง	ฌ
สารบาญภาพ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	56
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	112
เอกสารอ้างอิง	117
ภาคผนวก	124
ภาคผนวก ก	125
ภาคผนวก ข	135
ภาคผนวก ค	138
ภาคผนวก ง	177
ประวัติผู้เขียน	180

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ส่วนประกอบของเซลล์เชื้อราที่ถูกทำลายโดยสารพิษของสารดูดซึม	12
2	ระดับความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ	30
3	เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ	32
4	ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ขั้นตอน 1st PCR ในการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน beta-tubulin	35
5	ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ขั้นตอนที่ 2 (2nd PCR) ในการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน beta-tubulin	36
6	ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ในขั้นตอนการทำ colony direct PCR	40
7	ส่วนผสมของปฏิกิริย Polymerase Chain Reactionในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ primerT7	40
8	ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ primerSP6	41
9	ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ในการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน 16S rDNA	50
10	จำนวนเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากแหล่งต่าง	57
11	จำนวนเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับต่างๆ	61
12	การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	72
13	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร 4 ชนิด	75

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
14	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C และ 120^{O}C เป็นเวลา 24 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Colletotrichum* sp.สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	76
15	ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp.สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	77
16	ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินที่อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120^{O}C ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum.* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	80
17	เชื้อแอคติโนมัยซีสที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง 15% colloidal chitin agar เป็นเวลา 15 วัน	82
18	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกไอโซเลทต่างๆ	86
19	ลักษณะเชื้อแอคติโนมัยซีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 (inhibitory mold agar-2)	89
20	เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพริก ที่ผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง บันทึกผลภายหลังจากเพาะบนกระดาษชื้นเป็นเวลา 14 วัน	98
21	เปอร์เซนต์การเกิดโรคบนต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่เมล็ดผ่านการแช่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) บันทึกผลการทดลองภายหลังการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Cg60 (HR) เป็นเวลา 10 วัน	103

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
22	เปรียบเทียบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg60 (HR) ด้วยวิธีการฉีดพ่น NF และ F เชื้อแอคติโนมัยซีสก่อน และหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุ (บันทึกผลหลังปลูกเชื้อสาเหตุ 10 วัน)	108
23	แสดงปริมาณสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมจาก stock 5000 µg/l ผสมใน PDA 150 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	134
24	เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของพริกที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ	138
25	อัตราการเจริญ และระดับความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA	145
26	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร oatmeal agar (OMA)	150
27	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร caseine starch agar (CSA)	151
28	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร soil extract agar (SEA)	152
29	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร chitin agar (CA)	153
30	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร caseine starch agar (CSA)	153
31	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร oatmeal agar (OMA)	153
32	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร soil extract agar (SEA)	154
33	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%similarity) ของเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลทต่างๆ	176

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
34	ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติแบบ Factorial in RCBD ของเปอร์เซนต์การยับยั้งของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนทรคโนสพริก	177
35	ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดพริกที่ผ่านการแช่ใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากเพาะบนกระดาษชื้นเป็นเวลา 14 วัน	178
36	ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และ อาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท CF60 (HR) ในต้นกล้าพริกที่มีอายุ 45 วัน ที่ผ่านการแช่เมล็ดพันธุ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F ก่อนปลูก	178
37	ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท CF 60 (HR) ด้วยวิธีการฉีดพ่นอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F ก่อนและหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุ (หลังปลูกเชื้อรา เป็นเวลา 7 วัน)	179

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ

ภาพ		หน้า
1.	วงจรของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. หรือเชื้อรา Gloeosporium ในพืชต่างๆ	9
2	การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ด้วยวิธี streak plate	28
3	การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ภายใต้กล้องสเตอริโอ	28
4	ลักษณะการวางเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม	29
5	ลำดับนิวคลิโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน beta-tubulin *(TBU2)*	34
6	แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ (T-vector pGEM®Easy)	38
7	การเลี้ยง *Escherichia coli* บนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสาร ampicilin	39
8	การเกลี่ยตัวอย่างดินลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิดต่างๆ	43
9	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีส ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยวิธี dual culture	44
10	การทดสอบประสิทธิภาพอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช	47
11	การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสด้วยเทคนิค inclined coverslip เพื่อศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส	47
12	อาการโรคแอนแทรคโนสพริก และลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*	58
13	อาการโรคแอนแทรคโนสพริก และลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum capsici*	59
14	การทดสอบระดับความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม	62
15	เจลอิเล็กโทรโฟริซีส บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณบริเวณบางส่วนของยีน beta-tubulin (*TUB2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.	64
16	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Escherichia coli* ที่เจริญบนอาหาร Luria-Bertani ผสมสาร ampicilin บ่มที่อุณหภูมิ 37^{O}C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	65

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
17	เจลอิเล็กโทรโฟริซีสบนบน 1% agarose gel ของเชื้อ *Escherichia coli* ที่มีส่วน insert gene ของยีน beta-tubulin (*TUB2*) ยีน ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.	66
18	เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณบางส่วนของยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.	71
19	ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินอบฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	78
20	ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินอบฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใน การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp.สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	81
21	ลักษณะวงใส (clear zone) บนอาหาร 15% colloidal chitin agar (CCA) ที่ 15 วัน ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส จากเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120^{O}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	83
22	ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) การควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg49, Cc11, Cc53 และ Cg60	87
23	ลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีส ไอโซเลทต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ inhibitory mold agar-2 (IMA-2) อายุ 7 วัน	90
24	องค์ประกอบของผนังเซลล์ diaminopimelic acid (DAP) ของเชื้อแอคติโนมัยซีส โดยวิธีการแยกสีของสารละลายมาตราฐานจากเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)	93

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
25	เจลอิเล็กโทรโฟริซีสบน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ 27f/1492r ตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน 16S rDNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลทต่างๆ	94
26	Phylogenetic tree ของเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลท OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-28 และ SEA120-38	96
27	การงอกของเมล็ดพริกหนุ่มพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้า ภายหลังการเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น 14 วัน โดยแช่เมล็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และ อาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	99
28	ลักษณะต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่เมล็ดผ่านการแช่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F)	102
29	อาการบนใบของต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่ผ่านการแช่เมล็ดพริกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 3 ไอโซเลท	104
30	อาการบนใบของต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 3 ไอโซเลท	109
31	อาการบนใบของต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ไอโซเลท Cg60 (highly resistant) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเอาเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 3 ไอโซเลท	110
32	อาการบนใบของต้นกล้าพริกอายุ 45 วัน ภายหลังฉีดพ่นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) เป็นเวลา 10 วัน	111

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
33	การหยด spore suspension ลงใน heamacytometer เพื่อวัดปริมาณสปอร์	130
34	ตำแหน่งที่ใช้นับจำนวนสปอร์ โดยใช้ heamacytometer	130
35-55	เปรียบเทียบความเหมือน 95 % ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนบางส่วนของยีน beta-tubulin (*TBU2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลทต่างๆ	155-175

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved