

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญ	ญ
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	56
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง	86
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	137
เอกสารอ้างอิง	146
ภาคผนวก	162
ภาคผนวก ก	163
ภาคผนวก ข	173
ภาคผนวก ค	176
ภาคผนวก ง	186
ภาคผนวก จ	189
ประวัติผู้เขียน	201

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

## สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	สูตรสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซล	11
2	รูปแบบขององค์ประกอบของน้ำตาลที่ผนังเซลล์	33
3	การจัดจำแนกและแบ่งกลุ่ม โดยใช้ลักษณะทางเคมี	33
4	ตัวอย่างเชื้อแอกติโนไมซีสที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช	42
5	ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนที่ตำแหน่ง ITS	59
6	หลักเกณฑ์ในการจัดระดับความต้านทานสารคาร์เบนดาซิม	64
7	เชื้อแอกติโนไมซีสจากดินที่นำมาจัดจำแนกชนิด	75
8	ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน 16S rDNA	78
9	ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนการทำ colony direct PCR	83
10	ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ T7	84
11	ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Sp6	84
12	เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้	88
13	เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนส มะม่วงที่ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค	91
14	เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม	97
15	เชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกได้จากดินป่าธรรมชาติจากแหล่งต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบ	101
16	รายชื่อเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกได้จากดิน และประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง	103

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
17	ประสิทธิภาพของเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 7 วัน	108
18	ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 - 15 วัน ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 7 วัน	110
19	ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ในการควบคุมการงอกของสปอร์เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ตรวจสอบผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ที่เวลา 6, 12 และ 18 ชั่วโมง	117
20	ความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง ที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส อายุ 5 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ตรวจสอบผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ที่เวลา 6 ชั่วโมง	118
21	ประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส บ่มเป็นเวลา 5 และ 7 วัน ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนผลมะม่วง ตรวจสอบผลหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน	122
22	เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกจากดินในเขตป่าในบริเวณต่างๆ ของจังหวัดเชียงใหม่	130

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
23	แสดงปริมาณสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมจาก stock 5000 ไมโครกรัมต่อลิตร ผสมใน PDA 150 มิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	172
24	เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนส มะม่วงที่แยกได้จากสวนและตลาดต่างๆ	176
25	ความทนทานของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	183
26	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%similarity) ของเชื้อแอกติโนไมซีส ไอโซเลทต่างๆ	188

## สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า	
1	ลักษณะอาการโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง	6
2	วงจรชีวิตของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i>	8
3	โครงสร้างเคมีสารเบนซิมิดาโซล	11
4	วงจรชีวิตของเชื้อ <i>Streptomyces</i>	22
5	การพัฒนาของเส้นใยในเชื้อ <i>Streptomyces</i>	26
6	ลักษณะของสปอร์แบบเดี่ยว (single spore) และสปอร์สายสั้น (short chains)	28
7	ลักษณะของสปอร์สายยาว (long chain)	29
8	ลักษณะการสร้างสปอร์ภายใน sporangia	31
9	ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแอกติโนไมซีต 90 จินัส โดยใช้เทคนิค 16S rRNA sequence	35
10	โครงสร้างทางเคมีของไคติน	44
11	การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนผลมะม่วง	57
12	แผนภาพแสดง ribosomal DNA ของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> spp. และตำแหน่งจับของไพรเมอร์ CgInt และ ITS4 บนตำแหน่ง ITS	60
13	การทดสอบความต้านทานเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ความเข้มข้นต่างๆ	62
14	การโรยตัวอย่างดินลงบนผิวหนังอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีต	66
15	วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีตในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> โดยวิธี dual culture	68
16	การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีตที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้วิธีแท่งวุ้น (agar plug method)	69
17	การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีตโดยวิธีการแพร่ (agar well diffusion method)	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
18 ตำแหน่งที่สุ่มตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ที่งอกบน cover slip	72
19 การหยคน้ำเลี้ยงเชื้อและน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีตบนผลมะม่วงเพื่อการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	74
20 การเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีตด้วยเทคนิค inclined coverslip เพื่อศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีต	75
21 ตำแหน่งจับของไพรเมอร์ 16Sf และ 16Sr บนยีน 16S ribosomal DNA ของเชื้อแอกติโนไมซีต <i>Streptomyces coelicolor</i>	79
22 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์	81
23 การเลี้ยง <i>Escherichia coli</i> บนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสาร 130 mM ampicillin	82
24 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง	87
25 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนอาหาร PDA	89
26 อักษรย่อแสดงการตั้งชื่อเชื้อรา	89
27 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังจากปลูกเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เป็นเวลา 4 วัน	92
28 ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เกิดบนใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังจากปลูกเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> เป็นเวลา 4 วัน	93
29 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนตรงตำแหน่ง ITS ที่เฉพาะเจาะจงต่อการจัดจำแนกเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงด้วยวิธี PCR โดยใช้ species-specific primer (CgInt และ ITS4)	94

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
30 การทดสอบความต้านทานของเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน	98
31 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	99
32 ลักษณะเชื้อแอคติโนไมซีสที่เจริญบนอาหาร CSA	100
33 อักษรย่อแสดงการตั้งชื่อเชื้อแอคติโนไมซีส	102
34 ลักษณะวงใส (inhibitio zone) บนอาหาร CCA (15% colloidal chitin agar) ที่ 15 วัน	105
35 ประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีส บ่มเป็นเวลา 3 วัน ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ด้วยวิธี agar well diffusion method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 7 วัน	111
36 แนวโน้มประสิทธิภาพของช่วงเวลาที่เหมาะสมของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีส เมื่อบ่มเป็นเวลา 3-13 วัน ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	112
37 ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีส เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 - 13 วัน ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar อายุ 7 วัน	113
38 ลักษณะของสปอร์เชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ภายหลังจากการทดสอบด้วยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนไมซีส ไอโซเลท NSP4 บ่มเป็นเวลา 5 วัน ที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ	119

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า	
39	ลักษณะอาการของโรคแอนแทรกโนสที่เกิดบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ หลังจากปลูกด้วยเชื้อรา <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ไอโซเลท NSP4 ที่บ่มเป็นระยะเวลา 5 วัน และตรวจสอบผลหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 วัน	123
40	ลักษณะรงควัตถุ (pigment) เชื้อแอกติโนไมซีส บ่มเป็นเวลา 15 วัน ที่สร้างขึ้น บนอาหาร yeast extract malt extract agar (ISP-2)	125
41	ลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีส บ่มเป็นเวลา 15 วัน ที่สร้างขึ้น บนอาหาร yeast extract malt extract agar (ISP-2)	125
42	ลักษณะของเชื้อแอกติโนไมซีส ไอโซเลทต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract malt extract agar (ISP-2) บ่มเป็นเวลา 15 วัน	126
43	การตรวจสอบ diaminopimelic acid (DAP) องค์ประกอบผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนไมซีส โดยวิธี thin layer chromatography (TLC)	131
44	การเพิ่มปริมาณบางส่วนของ 16S rDNA gene ที่เฉพาะเจาะจงต่อการจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีส ด้วยวิธี PCR โดยใช้ specific primer (16Sf และ 16Sr)	132
45	ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> ที่เจริญบนอาหาร Luria-Bertani (LB) ผสมสาร 130 mM ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	133
46	Phylogenetic tree ของเชื้อแอกติโนไมซีส 15 ไอโซเลท	136
47	การหยด spore suspension ลงใน heamacytometer เพื่อวัดปริมาณสปอร์	168
48	ตำแหน่งที่ใช้นับจำนวนสปอร์ โดยใช้ heamacytometer	169