

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



242205

การจําแนกชนิดของพืช *Psychotria sp.* ในอนุวงศ์โรสวูดนํ้าทะเลที่โคกกร
ไข่เทคนิค PCR และการควบคุมโรคจําแนกที่เป็นปฏิปักษ์

ปณิศา อินธิรักษ์

วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัย
สาขาวิชาโรคพืช

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตุลาคม 2553



การจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยการ
ใช้เทคนิค PCR และการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์



ปณิดดา อินพิทักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืช

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตุลาคม 2553

การจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยการ
ใช้เทคนิค PCR และการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์

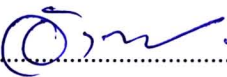
ปณิดดา อินพิทักษ์

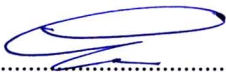
วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืช

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์


.....กรรมการ
ผศ. ดร. อังสนา อัครพิศาล


.....กรรมการ
อ. ดร. เยาวลักษณ์ จันทร่าง


.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. อังสนา อัครพิศาล


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ. ดร. เยาวลักษณ์ จันทร่าง

21 ตุลาคม 2553

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. อังสนา อัครพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำปรึกษา ข้อเสนอแนะในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ อ. ดร. เขวาลักษณ์ จันทร่บาง ที่ให้ความรู้ คำแนะนำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาโรคพืชทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ และขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาโรคพืช เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคณาจารย์คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่านที่ได้ให้ความรู้เพื่อน ๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้ำ ที่ให้ทั้งชีวิต และการสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน ตลอดจนญาติพี่น้องที่เป็นกำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้หวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้คงเป็นประโยชน์แก่ผู้สนใจ ความดีและประโยชน์ที่พึงมีขอบอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ และผู้มีพระคุณแก่ข้าพเจ้าทุกท่าน

ปนัดดา อินพิทักษ์

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยใช้เทคนิค PCR และการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์

ผู้เขียน

นางสาวปณิดา อินพิทักษ์

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. อังสนา อัครพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
อ. ดร. เขียวลักษณ์ จันทร์บาง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

242205

ส้มสายน้ำผึ้งเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปลูกมากในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ปัญหาสำคัญที่พบในการในการผลิตส้ม คือโรครากเน่าของส้มที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญก่อให้เกิดความเสียหายกับส้มสายน้ำผึ้งจากการแยกและศึกษาพบเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ OR01, OR02, OR03 และ OR04 ที่มีลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA เป็นแบบ arachnoid ในทุกไอโซเลท ส่วนลักษณะของ sporangium มี 2 แบบคือ ellipsoid และ ovoid มองเห็น papilla ชัดเจน ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้เทคนิค PCR ด้วย specific primer Par1s (forward primer) (5'-ACGTTTGGGCTTCGGCCTGATT-3') และ Par2a (reverse primer) (5'-GATGCATACCGAAGTACACATTA-3') ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *Phytophthora parasitica* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 680 bp ในทุกไอโซเลท ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อ *P. parasitica* ที่แยกจากดินบริเวณต้นที่แสดงอาการของโรค

ทำการแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบ ๆ รากส้ม พริกกะเหรี่ยง และมะเขือเทศ จำนวน 88 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. parasitica* ทั้ง 4 ไอโซเลทด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ (dual culture technique) พบแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงสุดได้แก่ T14, TKM61 และ TKM65 โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญอยู่ในระหว่าง 24.25-58.00 จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าเมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรียทั้ง 88 ไอโซเลท บนอาหารทดสอบคือ carboxymethyl cellulose agar (CMC), czapek solution agar (CZA) และ colloidal chitin agar (CCA) โดยคัดเลือกจากการปรากฏ

บริเวณใสรอบรอยเจริญของเชื้อ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท มีการสร้างเอนไซม์ cellulase โดยที่ไอโซเลท D11 และ T15 มีการสร้างเอนไซม์มากที่สุดซึ่งให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเท่ากับ 25.5 และ 21.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ แบคทีเรียเพียง 1 ไอโซเลท คือ CMM103 มีการสร้างเอนไซม์ phosphatase โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเท่ากับ 16 มิลลิเมตร แบคทีเรียทั้ง 88 ไอโซเลท ไม่มีการสร้างเอนไซม์ chitinase

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการเจริญของต้นส้ม ในสภาพเรือนทดลอง พบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของต้นส้ม และการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นส้มโดยเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยแบคทีเรียไอโซเลท TKM61 และ TKM65 ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นส้มสูงที่สุด เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง โดยการใช้สารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13, T14, TKM61 และ TKM65 ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ พบว่าหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 75 วัน กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13 และ TKM61 ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T14 และ TKM65 ในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ โดยมีระดับการเกิดอาการเหี่ยวเป็น 1.00 และ 1.08 ตามลำดับ เกิดความเสียหายต่อระบบราก เป็น 1.50 และ 1.08 ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ โดยมีระดับการเกิดอาการเหี่ยว และเกิดความเสียหายต่อระบบรากเป็น 1.00

Thesis Title	Identification of <i>Phytophthora</i> spp. Causing Citrus Root Rot Disease by PCR Technique and Controlling the Disease with Bacterial Antagonists	
Author	Miss Panadda Inpitak	
Degree	Master of Science (Plant Pathology)	
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Angsana Akarapisan	Advisor
	Lect. Dr. Yaowaluk Chanbang	Co-advisor

Abstract

242205

Tangerines cv. Sai Nam Pung has an economic important crop in Fang District, Chiang Mai Province. Citrus root rot disease caused by *Phytophthora* spp. is one of the most destructive soilborne disease results in devastating yield loss in Tangerines cv. Sai Nam Pung. Four isolates of pathogen: OR01, OR02, OR03 and OR04 were found. All Isolates tested growth patterns on PDA had arachnoid patterns. All isolates produced ellipsoid and ovoid sporangia and prominently papillate. Identification of the pathogen by PCR amplification with specific primers Par1s (forward primer) (5'-ACGTTTGGGCTTCGGCCTGATT-3') and Par2a (reverse primer) (5'-GATGCATACCGAAGTACACATTA-3') were specific for *Phytophthora parasitica* and the specific fragment of 680 bp was amplified from all isolates which isolated from soil in citrus infected fields.

Eighty-eight isolates of bacteria were isolated from the rhizosphere of tangerines, chillis and tomatos. The isolates were purified and assayed *in vitro* against four isolates of *P. parasitica* by dual culture technique. Among the 88 isolates tested, 3 isolates; T14, TKM61 and TKM65, showed antagonistic activity against the mycelium growth of *Phytophthora parasitica*, with inhibition percentage 24.25-58.00. A total of eighty-eight bacteria isolates were screened for enzyme activities using carboxymethyl cellulose agar (CMC), czapec solution agar (CZA) and colloidal chitin agar (CCA), was conducted using clear zone technique to screen the bacteria. The cellulase activity was detected for 14 isolates, the isolates D11 and T15 expressed high activity of enzyme cellulase represented clear zone of diameters, 25.5 and 21.5 mm.

respectively. The phosphatase activity was detected from isolate CMM103 showed clear zone of diameters, 16 mm. The chitinase activity was not detected from the 88 isolates.

Greenhouse trials were evaluated for their ability of these three antagonistic isolates. The results showed that using of antagonistic bacterias were not effective in suppressing the growth of tangerines. The antagonistic bacteria promoted plant growth by increasing fresh and dry weights. The results showed the highest efficiency that treatment of tangerines with the isolate TKM61 and TKM65. The control efficacy antagonistic isolates; T13, T14, TKM61 and TKM65 were investigated in controlling citrus root rot disease. Efficacy tests were performed in greenhouse by root drenched prior to inoculation of the pathogens. After 75 days, treatment with isolate T13 and TKM61 showed the best results controlling capabilities were more effective than isolate T14 and TKM65 ($p<0.01$). The isolates T13 and TKM61 had the level of wilt of 1.00 and 1.08 respectively and the level of root rot of 1.50 and 1.08 respectively, which was not significantly different from the uninoculated control had the level of wilt and root rot of 1.00.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	๗
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	24
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	35
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	67
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	78
ภาคผนวก ข	80
ภาคผนวก ค	85
ภาคผนวก ง	87
ภาคผนวก จ	89
ประวัติผู้เขียน	93

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	จำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท	40
2	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่างๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp.สาเหตุโรครากเน่าของส้มทั้ง 4 ไอโซเลท โดยวิธีเลี้ยงเชื้อ สาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหารPDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ในห้องปฏิบัติการ	42
3	ขนาดรัศมีของโคโลนีของเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหาร PDA ที่เลี้ยงในอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 8 วัน	48
4	อัตราการเจริญของเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท บนอาหารชนิดต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส	49
5	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. จำนวน 4 ไอโซเลท บนอาหาร PDA	50
6	ความสูงของต้นส้ม อายุ 8 เดือน หลังการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์บริเวณโคนต้นส้ม 28 วัน และ 75 วัน	59
7	น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ของส้มอายุ 8 เดือน หลังการใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์ บริเวณโคนต้นส้ม 75 วัน	60
8	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทในการควบคุมเชื้อ <i>Phytophthora parasitica</i> . สาเหตุโรครากเน่าของส้ม	64

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยูแคริโอตโดยอาศัยลำดับของยีน 16S rRNA	10
2	วงจรชีวิตของเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp.	12
3	วงจรการเกิดโรคของเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp.	13
4	ลักษณะการวัดผลในการเป็นปฏิปักษ์ ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์	28
5	โครมาโตแกรมของ IAA วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบ สมรรถนะสูง (HPLC)	32
6	ลักษณะอาการของโรครากเน่าของส้มที่ปลูกในสวนส้ม อำเภอฟาง จังหวัด เชียงใหม่	35
7	ลักษณะ โคลนีและสปอร์ของเชื้อ <i>Phytophthora</i> sp. ไอโซเลท OR01	36
8	วิธีการแยกเชื้อสาเหตุโรครากเน่าของส้ม และลักษณะของเชื้อ <i>Phytophthora</i> sp.	37
9	ลักษณะต้นกล้าส้มอายุ 5 เดือน ที่แสดงอาการน้ำส้มสีน้ำตาลที่บริเวณใบ มีเส้นใยสี ขาวเจริญคลุมทั่วทั้งต้น ระยะเวลา 20 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับต้นกล้าส้มปกติในชุด ควบคุม	38
10	การเจริญลูกกลมของเส้นใยสู่บริเวณรากต้นส้มที่ทำการปลูกเชื้อ <i>Phytophthora</i> sp. ไอโซเลท OR03 หลังปลูกเชื่อนาน 20 วัน บนต้นส้มอายุ 5 เดือน	38
11	ลักษณะอาการของต้นส้มอายุ 6 เดือน หลังการปลูกเชื้อ <i>Phytophthora</i> sp. นาน 45 วัน	39
12	ลักษณะอาการแผลถ้ำน้ำส้มสีน้ำตาลที่บริเวณยอดต้นส้ม หลังทำการปลูกเชื้อ <i>Phytophthora</i> sp. ไอโซเลท OR03 นาน 45 วัน	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
13	การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท (OR01, OR02, OR03 และ OR04) โดยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์	43
14	ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทต่าง ๆ บนอาหาร NA ที่อายุ 48 ชั่วโมง และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	45
15	การทดสอบการสร้างเอนไซม์ cellulase และ phosphatase ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ	46
16	ลักษณะ โคลโลนีและ sporangium ของเชื้อ บนอาหาร PDA อายุ 8 วัน	51
17	Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของ total DNA จากเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท	52
18	Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primer Par1s/Par2a จากเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรค	54
19	Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primer Pal1s และ Pal2a จากเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรค	55
20	Gel electrophoresis บน 1% agarose gel ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วย specific primer CAPFW และ CAPRV2 จากเชื้อ <i>Phytophthora</i> spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรค	56
21	เปรียบเทียบต้นส้มอายุ 8 เดือน แต่ละกรรมวิธีหลังจากใส่แบคทีเรียปฏิปักษ์นาน 75 วัน	61
22	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรครากเน่าของส้มอายุ 8 เดือน ที่เกิดจากเชื้อ <i>Phytophthora parasitica</i> ของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท	65
23	การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมโรครากเน่าของส้มอายุ 8 เดือน ที่เกิดจากเชื้อ <i>Phytophthora parasitica</i> ของแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท	66