ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249693

การวิเคราะห์ลักษณะ และควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในพริก

วรรษมน บุญยิ่ง

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืช

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มกราคม 2553

b00254291

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
249693

การวิเคราะห์ลักษณะ และควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในพริก

วรรษมน บุญยิ่ง

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืช

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มกราคม 2553

การวิเคราะห์ลักษณะ และควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในพริก

วรรษมน บุญยิ่ง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาโรคพืช

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
ผศ.ดร. วรวรรณ ชาลีพรหม

.....กรรมการ
อ.ดร. สรัญยา วัลยะเสวี

.....กรรมการ
อ.ดร. วสุ ปฐมอารีย์

.....กรรมการ
อ.ดร. ศุภวัตน์ สินสุวงศ์วัฒน์

13 มกราคม 2553

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. สรัญยา วัลยะเสวี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งให้ความรู้ คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางต่างๆ สนับสนุนและเอาใจใส่ตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย รวมทั้งการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรวรรณ ชาลีพรหม กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ศุภวัฒน์ สินสุวงศ์วัฒน์ และ อาจารย์ ดร. วสุ ปฐมอารีย์ กรรมการที่ปรึกษาวิยานิพนธ์ และ เอื้อเฟื้อข้อมูลการสกัดดีเอ็นเอ การจัดจำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีส และการทำ phylogenetic tree ของเชื้อแอคติโนมัยซีสให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังสนา อัครพิศาล กรรมการที่ปรึกษา และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Kazuya Akimitsu ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำงานวิจัย และให้คำแนะนำปรึกษาการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาโรคพืช และ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยและโอกาสในการศึกษาหาความรู้

ขอขอบพระคุณ คุณพรประพา คงตระกูล คุณณัฐพงษ์ นวลดี คุณยุพา จอมแก้ว Miss. Yoko Miyamoto, Miss. Chikako Miyake และ Miss. Yuriko Izum ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเพื่อน พี่ และน้อง ภาควิชาโรคพืช และ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่ให้กำลังใจ คำปรึกษา และแง่คิดในการทำงานวิจัย

ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อบุญเลิศ บุญยิ่ง และ คุณแม่อำพร บุญยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนการศึกษา และเป็นกำลังใจที่สำคัญเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

วรรษมน บุญยิ่ง

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ลักษณะและควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในพริก
ผู้เขียน	นางสาววรรษมน บุญยิ่ง
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ. ดร. สรัญยา วัลยะเสวี ประธานกรรมการ รศ. ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์ กรรมการ ผศ. ดร. อังสนา อัครพิศาล กรรมการ

บทคัดย่อ

249693

จากการศึกษาและแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในเขต อ.สันทราย อ.แม่ริม และจากตลาดในเขต จ.เชียงใหม่ ได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท ได้แก่ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* จำนวน 73 และ 27 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อทดสอบความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/ml ตามลำดับ พบเชื้อราที่ต้านทานสารกำจัดเชื้อราระดับสูง (HR) ระดับปานกลาง (MR) ระดับเล็กน้อย (WR) และเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อรา (S) จำนวน 43, 5, 3 และ 49 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยเปรียบเทียบกับยีน beta-tubulin (*TUB2*) ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U14138) พบเชื้อรา HR มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่ง codon 198 จาก glutamic acid (G**A**G) เป็น alanine (G**C**G) ส่วนเชื้อรา MR มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 162 โดยเปลี่ยนจาก methionine (GC**A**) เป็น valine (GC**G**) ส่วนกรณีของเชื้อรา WR และ S ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (NF) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองเชื้อแอคติโนมัยซีสออก (F) จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 และ SEA120-38 โดยทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Cg24 (S), Cg49 (WR), Cc11 (MR),

Cc53 (HR) และ Cg60 (HR) พบเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ SEA60-34, OMA60-7 และ SEA120-28 มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสาเหตุได้โดย SEA60-34 (NF) มีเปอร์เซนต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 53.3-75.0% รองลงมาคือ OMA60-7 (NF) และ SEA120-28 (NF) มีเปอร์เซนต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 60.0-66.7% และ 43.3-58.3% ตามลำดับ ส่วนน้ำกรองชนิด F มีเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อราต่ำกว่าชนิด NF ในทุกไอโซเลท เมื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยอาศัยยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท จัดอยู่ในจีนัส *Streptromyces* sp.

249693

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-7, SEA60-34 และ SEA120-28 ต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์พริก โดยนำมาทดสอบเปอร์เซนต์การงอกกับเมล็ดพริกหนุ่มพันธุ์การค้า และพันธุ์พื้นเมือง พบว่าเมล็ดพริกทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการแช่อาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F ทั้ง 3 ไอโซเลท มีเปอร์เซนต์การงอกอยู่ในช่วง 91.0-99.0% จากนั้นนำเมล็ดพริกที่ผ่านการแช่อาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F มาเพาะกล้า เมื่อเพาะเลี้ยงต้นกล้าเป็นระยะเวลา 45 วัน จึงปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Cg60 (HR) พบว่าภายหลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุเป็นเวลา 10 วัน เมล็ดพริกพันธุ์การค้าที่แช่ใน NF และ F มีเปอร์เซนต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 63.9-75.0% และ 82.7-87.5% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่แช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อมีเปอร์เซนต์การเกิดโรคเท่ากับ 86.1% ส่วนเมล็ดพริกพันธุ์พื้นเมืองที่แช่ใน NF และ F มีเปอร์เซนต์การเกิดโรคสูงกว่าเมล็ดพริกพันธุ์การค้า ซึ่งอยู่ในช่วง 76.7-83.6% และ 86.9-88.1% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่แช่ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อมีเปอร์เซนต์การเกิดโรคเท่ากับ 90.6%

การทดสอบการฉีดพ่นอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสกับต้นกล้าพริกหนุ่มพันธุ์การค้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F จำนวน 3 ไอโซเลท โดยฉีดพ่น 2 วิธีได้แก่ ฉีดพ่นก่อน และหลังการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไอโซเลท Cg60 (HR) พบว่าการฉีดพ่นด้วย NF และ F ก่อนปลูกเชื้อราสาเหตุมีเปอร์เซนต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 38.3-46.7% และ 55.0-58.3% ตามลำดับ สำหรับการฉีดพ่นด้วย NF และ F หลังการปลูกเชื้อราสาเหตุมีเปอร์เซนต์การเกิดโรคอยู่ในช่วง 41.0-46.0% และ 58.3-61.3% ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยอาหาร EPM ก่อน และหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุ มีเปอร์เซนต์การเกิดโรคเท่ากับ 91.0 และ 89.7% ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรคบนต้นกล้าพริก โดยฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสชนิด NF และ F จำนวน 3 ไอโซเลท พบว่าต้นกล้าพริกไม่ปรากฏอาการผิดปกติใดๆ

Thesis Title	Characterization and Control of Carbendazim-resistant *Colletotrichum* spp. in Chili	
Author	Miss Wassamon Boonying	
Degree	Master of Science (Plant Pathology)	
Thesis Advisory Committee	Lect. Dr. Sarunya Valyasevi	Chairperson
	Assoc. Prof. Chaiwat Toanun	Member
	Asst. Prof. Dr. Angsana Akarapisan	Member

Abstract

219693

One hundred isolates of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose on chili were collected from Sansai and Mae Rim district and from markets in Chiag Mai. The isolates consisted of 73 isolates of *C. gloeosporioides* and 27 isolates of *C. capsici,* respectively. The preliminary test on the potato dextrose agar (PDA) medium amended with carbendazim at 0.1, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml concentrations showed highly resistant (HR), moderately resistant (MR), weakly resistant (WR) and sensitive (S) of 43, 5, 3 and 49 isolates respectively. Nucleotide sequence analysis of beta-tubulin gene of HR, MR, WR and S compared with partial *TUB2* gene from *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U14138). All HR phenotype showed a mutation point with substitution of glutamic acid (G**A**G) to alanine (G**C**G) at codon 198, MR phenotype showed a mutation point with substitution of methionine (GC**A**) to valine (GC**G**) at codon 162 but no mutation point of amino acid was found in the WR and S phenotype.

The efficiency of culture medium (NF) and culture filtrate medium (F) of actinomyces from 6 isolates such as OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 and SEA120-38, were tested for inhibitory growth of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose on chili strains Cg24 (S), Cg49 (WR), Cc11 (MR), Cc53 (HR) and Cg60 (HS). Results showed three isolates of actinomyces including SEA60-34, OMA60-7 and SEA120-28 respectively inhibited of *Colletotrichum* spp.. The SEA60-34 (NF) showed the percentages of growth inhibition of the pathogen range 53.3-75.0%, OMA60-7 (NF) and SEA120-28 (NF) showed the percentages of

249693

growth inhibition of the pathogen range 60.0-66.7% and 43.3-58.3% respectively. While, the culture filtrate medium of actinomyces resulted to be lower officiate in inhibit of pathogen compared with culture medium of actinomyces all isolates. The actinomyces isolates OMA60-1, OMA60-7, SEA60-34, SEA120-4, SEA120-28 and SEA120-38 were identified by 16S rDNA. The results revealed that all actinomyces were *Streptomyces* sp.

The culture medium of actinomyces type NF and F from 3 isolates of actinomyces including OMA60-7, SEA60-34 and SEA120-28 were tested for seed germination. The green chili including native seed and commercial seed were treated by NF and F. The resulted showed seed both were treated with NF and F had percentage of germination rang 91-99%. Then, the seed both were cultivated. When, forty-five day-old of seedling were inoculation with sporsuspension of *Colletotrichum* sp. Cg60 (HR). The resulted showed commercial seedling treated with NF and F had disease of rang 63.9-75.0% and 82.7-87.5% respectively, whereas commercial seedling treated with distill water had disease range 86.1%. While, native seed treated with NF and F had disease range 76.7-83.6% and 86.9-88.1% respectively, whereas native seedling treated with distill water had disease range 90.6%, were high disease than commercial seed treated with NF and F.

When sprayed with NF and F from three isolates of actinomyces on chili seedling of commercial green chili before and after inoculated with spore suspension of Cg60 (HR). It was found that the seedling were sprayed with NF and F before inoculated with Cg60 (HR) showed disease of range 38.64-46.00% and 55-61.33% respectively. Chili seedling were inoculated with spore suspension of Cg60 (HR) before sprayed with NF and F showed disease of range 41.0-46.0% and 58.3-61.3% respectively. While, the control were sprayed with EPM before inoculated with spore suspension of Cg60 (HR) showed disease of range 91.0 and 89.7% respectively. Three actinomyces isolates with high efficiency, NF and F were treated on seedling. The result showed actinomyces non-pathogenicity in chili.

สารบาญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
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

สารบาญตาราง

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

สารบาญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
14	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60°C และ 120°C เป็นเวลา 24 และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Colletotrichum* sp.สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	76
15	ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp.สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	77
16	ประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินที่อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120°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

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°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร oatmeal agar (OMA)	150
27	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร caseine starch agar (CSA)	151
28	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร soil extract agar (SEA)	152
29	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนอาหาร chitin agar (CA)	153
30	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร caseine starch agar (CSA)	153
31	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร oatmeal agar (OMA)	153
32	จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสที่แยกจากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนอาหาร soil extract agar (SEA)	154
33	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน (%similarity) ของเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลทต่างๆ	176

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

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

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°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก	78
20	ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีสซึ่งแยกจากดินอบฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 120°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°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 120°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

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

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