หัวข้อดุษฎีนิพนธ์	การพัฒนาชีวภัณฑ์จากเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เพื่อควบคุมโรคเน่าคอดินในกล้าพืชสกุลผักกาด
ผู้เขียน	นางสาว ประไพพิศ สุวิทย์ชยานนท์
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (โรคพืช)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรวรรณ ฉัตรสีรุ้ง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์วัลย์ เมฆกมล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โรคเน่าคอดินเป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างรุนแรงของพืชผักในระยะกล้า ซึ่งเชื้อราสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิดรวมทั้งยังมีชีวิตรอดในดินได้เป็นระยะเวลานาน งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินจากต้นกล้าพืชสกุลผักกาดที่แสดงอาการของโรคและจากดินบริเวณรอบต้นกล้า ด้วยวิธีการให้ความชื้นในภาชนะปิด การใช้เหยื่อล่อและการแยกเชื้อโดยตรงจากชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรค พบเชื้อรา *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรคของเชื้อราดังกล่าวในต้นกล้าผักกาดขาวและมะเขือเทศ พบว่าเชื้อสามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดโรคได้ในต้นกล้าทั้ง 2 ชนิด

จากการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จากพืชสมุนไพรจำนวน 18 ชนิด ที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย พบเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จำนวน 66 ไอโซเลท ซึ่งมีความหลากหลายทางด้านสีของโคโลนี เช่น สีขาว เทา ครีม เหลืองอ่อนและสีเข้ม รวมทั้งยังมีการผลิตเม็ดสีในอาหารได้แตกต่างกัน การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อที่แยกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินด้วยวิธี dual culture พบเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จำนวน 12 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท GAR1, KAE1, HOU2, NEE1, COF1, COF4, COF6, ERY1, MET4, POL2, PRE5 และ SOL1 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum*,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

R. solani และ *S. rolfsii* ได้มากกว่า 60% โดยไอโซเลท MET4 และ COF4 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้มากที่สุด เท่ากับ 72.41% และ 67.58% ตามลำดับ ไอโซเลท ERY1 และ COF1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้มากที่สุด เท่ากับ 72.14% และ 70.21% ตามลำดับ ไอโซเลท COF6 และ PRE5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้มากที่สุด เท่ากับ 58.27% และ 54.97% ตามลำดับ และไอโซเลท PRE5 และ SOL1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้มากที่สุด เท่ากับ 77.46% และ 52.77% ตามลำดับ การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดังกล่าวอาจผลิตสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อราบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญและการพัฒนาของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินได้

เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย พบว่าไอโซเลท COF6, ERY1 และ POL2 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสและฟอสเฟตในอาหารจำเพาะได้ การวิเคราะห์ความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อรา พบว่าไอโซเลท GAR1, KAE1, NEE1, ERY1, POL2, PRE5 และ SOL1 สามารถผลิตสารต้านเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินได้ โดยสารต้านเชื้อราที่ผลิตโดยไอโซเลท ERY1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้มากที่สุด เท่ากับ 84.31% สารต้านเชื้อราที่ผลิตโดยไอโซเลท PRE5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้มากที่สุด เท่ากับ 60.14% ในขณะที่สารต้านเชื้อราที่ผลิตโดยไอโซเลท GAR1, KAE1, NEE1, COF1, POL2, PRE5 และ SOL1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ได้อย่างสมบูรณ์ (100%) นอกจากนี้ยังพบว่าสารต้านเชื้อรายังส่งผลให้เกิดการเจริญที่ผิดปกติ คือปลายเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราเจริญแทงลึกลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีรูปร่างผิดปกติ คือเส้นใยบวมพอง เกิดการอัดแน่นของโพรโทพลาสซึม เส้นใยอัดกันเป็นกลุ่มก้อน การหดสั้นของปลายเส้นใย และการรั่วของผนังเซลล์สืบพันธุ์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้คัดเลือกเชื้อไอโซเลท ERY1 และ PRE5 ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดิน เพื่อการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของไอโซเลท ERY1 พบว่าเชื้อสร้าง aerial mycelia สีเทา substrate mycelia สีน้ำตาลเหลือง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 และมีการเรียงตัวของสปอร์เป็นแบบ rectiflexibiles type ส่วนไอโซเลท PRE5 สร้าง aerial mycelia สีขาว substrate mycelia สีเหลืองอ่อน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ IMA-2 และมีการเรียงตัวของสปอร์แบบ spiral type การบ่งชี้สายพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับ GenBank, EMBL, DDBJ, PDB sequences พบว่าไอโซเลท ERY1 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces rochei* strain A-1 (99%) และไอโซเลท PRE5 มีความคล้ายคลึงกับ *Streptomyces albus* subsp. *albus* strain DSM 40313^{T} (99%)

การแยกสารต้านเชื้อราจากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ *S. rochei* ERY1 และ *S. albus* subsp. *albus* PRE5 และประเมินหาค่าความเข้มข้นของสารต้านเชื้อราที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินได้ 90% (MIC_{90}) พบว่าค่า MIC_{90} ของสารต้านเชื้อราที่ผลิตโดย *S. rochei* ERY1 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum* คือที่ความเข้มข้น 3.58 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่า MIC_{90} ของสารต้านเชื้อราที่ผลิตโดย *S. albus* subsp. *albus* PRE5 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* คือความเข้มข้น 5.19 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสารต้านเชื้อราที่ได้มาทดสอบความสามารถในการควบคุมการเกิดโรคเน่าคอดินของต้นกล้าผักกาดขาว พบว่าสารต้านเชื้อราที่ผลิตโดย *S. rochei* ERY1 ที่ความเข้มข้น 4, 5 และ 6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดการเกิดโรคเน่าคอดินจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* ได้เท่ากับ 40%, 40% และ 78% ตามลำดับ และสารต้านเชื้อราที่ผลิตโดย *S. albus* subsp. *albus* PRE5 ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถลดการเกิดโรคเน่าคอดินจากเชื้อรา *S. rolfsii* ได้เท่ากับ 20%, 70% และ 20% ตามลำดับ

การประเมินความสามารถในการเข้าครอบครองของ *S. rochei* ERY1 และ *S. albus* subsp. *albus* PRE5 ภายในต้นกล้าผักกาดขาวด้วยการเพาะเมล็ดผักกาดขาวที่คลุกด้วยผงสปอร์ของสายพันธุ์ข้างต้นในเวอร์มิคูไลท์ จากนั้นแยกเชื้อกลับจากต้นกล้าผักกาดขาวที่มีอายุ 7, 14 และ 21 วัน พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวไม่เพียงแต่เข้าครอบครองใบเลี้ยง ลำต้นอ่อน และรากของต้นผักกาดขาวได้ แต่ยังสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้อีกด้วย โดยพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าผักกาดขาวเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การตรวจสอบความสามารถในการผลิตฮอร์โมนพืช พบว่า *S. rochei* ERY1 สามารถผลิตออกซิน ได้เท่ากับ 4.490 มิลลิกรัม/ลิตร จิบเบอเรลลิน ได้เท่ากับ 0.179 มิลลิกรัม/ลิตร และไซโตไคนิน ได้เท่ากับ 0.067 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วน *S. albus* subsp. *albus* PRE5 สามารถผลิตออกซิน ได้เท่ากับ 32.49 ไมโครกรัม/ลิตร จิบเบอเรลลิน ได้เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัม/ลิตร และไซโตไคนิน ได้เท่ากับ 0.20 มิลลิกรัม/ลิตร จึงเป็นเหตุให้สรุปได้ว่าการเจริญที่เพิ่มขึ้นของต้นกล้าผักกาดขาวอาจเป็นผลมาจากกิจกรรมของทั้งสองสายพันธุ์ นอกจากนี้การตรวจสอบผ่านกล้อง scanning electron microscope ชี้ให้เห็นว่ามีการเข้าครอบครองของสายพันธุ์ทั้งสองบริเวณเซลล์ชั้นนอกของใบและการ์ดเซลล์ ตลอดจนบริเวณรากของต้นกล้าผักกาดขาว

จากการทดลองข้างต้นชี้ให้เห็นว่า *S. rochei* ERY1 และ *S. albus* subsp. *albus* PRE5 และสารต้านเชื้อราที่ผลิตโดยสายพันธุ์ข้างต้น มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคเน่าคอดินของพืชสกุลผักกาดในระยะกล้าได้ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ตั้งตำหรับชีวภัณฑ์จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ 1) รูปแบบผง ใช้สำหรับคลุกเมล็ด เพื่อให้สายพันธุ์ที่คัดเลือกข้างต้น สามารถเข้าครอบครองและส่งเสริมการเจริญของต้นกล้าผักได้ 2) รูปแบบเม็ด ใช้สำหรับรองก้นหลุมหรือการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หว่าน เพื่อให้สายพันธุ์ที่คัดเลือกข้างต้นและสารต้านเชื้อราที่ผลิตจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกข้างต้น ซึ่งอยู่ในเม็ดชีวภัณฑ์ช่วยป้องกันต้นกล้าผักจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคเน่าคอดิน 3) รูปแบบเม็ดฟองฟู่ ใช้สำหรับการฉีดพ่นบริเวณใบ เพื่อให้สายพันธุ์ที่คัดเลือกข้างต้นและสารต้านเชื้อราที่ผลิตจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกข้างต้น เมื่อละลายน้ำแล้วสามารถเข้าทำลายเชื้อราสาเหตุโรคเน่าคอดินได้ทันที เพื่อลดอัตราการเกิดโรคเน่าคอดิน นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนผสมต่าง ๆ ที่อยู่ในชีวภัณฑ์ทั้งสามรูปแบบไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของทั้งสองสายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ทั้งสองมีอัตราความมีชีวิตรอดในชีวภัณฑ์ทั้งสามรูปแบบ ที่อายุหลังการผลิตและหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 7 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง อยู่ในช่วง 10^5-10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Dissertation Title	Development of Bioproducts from Endophytic Actinomycetes for Controlling Damping-off in Brassica Seedling	
Author	Ms. Prapaipit Suwitchayanon	
Degree	Doctor of Philosophy (Plant Pathology)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Kaewalin Kunasakdakul	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Arawan Shutsrirung	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Sureewan Mekkamol	Co-advisor

ABSTRACT

Damping-off is the most destructive disease in seedling stage of crops and the causal pathogenic fungi have not only a wide-host-range but also long-term survive in the infested soil. In this study, damping-off pathogenic fungi were isolated from the infected brassica seedlings and the surrounded soil using moist chamber, baiting technique and tissue transplanting methods. The fungi were finally purified and identified as *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Pathogenicity test indicated that those fungi were pathogenic to Chinese cabbage and tomato seedlings.

Sixty-six isolates of endophytic actinomycetes were isolated from 18 medicinal plants that collected from the north of Thailand. Each isolate had difference in color of colony, such as white, gray, cream, light yellow and dark, and pigment that secreted into the culture medium. Those isolates were then evaluated for the ability to inhibit colony growth of the casual damping-off pathogenic fungi using dual culture method. The results showed that 12 isolates including GAR1, KAE1, HOU2, NEE1, COF1, COF4, COF6, ERY1, MET4, POL2, PRE5 and SOL1 strongly inhibited colony growth of *F. oxysporum*, *P. aphanidermatum*, *R. solani* and *S. rolfsii*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

with the inhibition percentage greater than 60%. MET4 and COF4 showed the strongest growth inhibition against *F. oxysporum* by 72.41% and 67.58%, respectively. ERY1 and COF1 showed the strongest growth inhibition against *P. aphanidermatum* by 72.14% and 70.21%, respectively. COF6 and PRE5 showed the strongest growth inhibition against *R. solani* by 58.27% and 54.97%, respectively. PRE5 and SOL1 showed the strongest growth inhibition against *S. rolfsii* by 77.46% and 52.77%, respectively. The results indicated that those isolates may produce bioactive compounds with antifungal activity that could inhibit the growth and development of damping-off pathogenic fungi.

Study of the capacity to produce hydrolytic enzymes showed that isolates COF6, ERY1 and POL2 had ability to degrade cellulose and phosphate in specific media. Moreover, isolates GAR1, KAE1, NEE1, ERY1, POL2, PRE5 and SOL1 also produced the effective antifungal metabolites against damping-off pathogenic fungi. ERY1 produced the most effective antifungal metabolites against *P. aphanidermatum* by 84.31%. PRE5 produced the most effective antifungal metabolites against *R. solani* by 60.14%. Besides, GAR1, KAE1, NEE1, COF1, POL2 PRE5 and SOL1 produced the most effective antifungal metabolites that completely inhibited the growth of *S. rolfsii* (100%). All inhibited fungi showed abnormal growth, penetration of mycelia into the medium; and malformation, mycelium swollen, protoplasm aggregation, colony cluster, shrinkage of hyphal tip and sporangial membrane lysis. In this study, however, only the effective isolates ERY1 and PRE5 were selected to study in the next steps.

Study of morphological characteristic showed that ERY1 had gray aerial mycelia and yellowish brown substrate mycelia on IMA-2 medium, and had a rectiflexibiles type of spore chain. PRE5 had white aerial mycelia and light yellow substrate mycelia on IMA-2 medium, and had a spiral type of spore chain. ERY1 and PRE5 were identified using 16S rRNA gene sequence analysis. Comparison of the sequencing with GenBank, EMBL, DDBJ and PDB sequences indicated that ERY1 was the most closely related to *Streptomyces rochei* strain A-1 with 99% similarity and PRE5 was the most closely related to *Streptomyces albus* subsp. *albus* strain DSM 40313^{T} with 99% similarity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Antifungal metabolites from the culture filtrates of *S. rochei* ERY1 and *S. albus* subsp. *albus* PRE5 were extracted and evaluated for the minimum inhibitory concentrations (MIC_{90}). The results showed that MIC_{90} value of antifungal metabolites produced by *S. rochei* ERY1 was 3.58 mg/ml on *P. aphanidermatum*. The MIC_{90} value of antifungal metabolites produced by *S. albus* subsp. *albus* PRE5 was 5.19 mg/ml on *S. rolfsii*. Concentrations greater than MIC_{90} values were then evaluated for the ability to control damping-off of Chinese cabbage seedlings. The results showed that antifungal metabolites produced by *S. rochei* ERY1 had potency to reduce the disease caused by *P. aphanidermatum* by 40%, 40% and 78% after treatment with 4, 5 and 6 mg/ml of the metabolites, respectively. Antifungal metabolites produced by *S. albus* subsp. *albus* PRE5 had potency to reduce the disease caused by *S. rolfsii* by 20%, 70% and 20% after treatment with 1, 2 and 3 mg/ml of the metabolites, respectively.

S. rochei ERY1 and *S. albus* subsp. *albus* PRE5 were further evaluated for their ability to colonize inside Chinese cabbage seedlings by planting the mixture of Chinese cabbage seeds and dry spore mass of the strains in the sterilized vermiculite. The inoculated seedlings were then re-isolation at 7-, 14- and 21-day-old seedlings. The results showed that the strains had not only ability to colonize cotyledon, hypocotyl and root parts of the seedlings but also promoted the growth of seedlings; root length, fresh and dry weight were increased in comparison with control seedlings. Study of the productions of plant growth hormones found that *S. rochei* ERY1 produced IAA 4.490 mg/l, GA3 0.179 mg/l and cytokinin 0.067 mg/l, and *S. albus* subsp. *albus* PRE5 produced IAA 32.49 µg/l, GA3 0.05 mg/l and cytokinin 0.20 mg/l, implying that those increases of seedling growth may attribute to the activities of *S. rochei* ERY1 and *S. albus* subsp. *albus* PRE5. Besides, scanning electron microscope also confirmed the establishment of both strains on epidermal-cell and guard-cell of Chinese cabbage seedling leaves and roots.

Overall results revealed that *S. rochei* ERY1 and *S. albus* subsp. *albus* PRE5, and their antifungal metabolites had potency to be developed as bioproducts for controlling damping-off disease of brassica seedlings. In this study, 3 formulations of bioproducts were formulated as follows: 1) Powder formulation, this formulation was developed with the purpose to use as seed coating which allows the effective strains to colonize and promote seedling growth; 2) Granular formulation, this formulation was developed

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

with the purpose to use as adding in the hole bottom of transplant seedlings and/or sowing for prevention seedlings from the infection of damping-off pathogenic fungi; and 3) Effervescent tablet, this formulation was developed with the purpose to use as foliar spray which the strains and its antifungal metabolites can directly inhibit the infection of damping-off pathogenic fungi. Besides, study of the effect of all excipients in the bioproducts on the growth of effective strains showed that there was no negative effect on the growth of strains. Moreover, the survival rates of effective strains in the developed bioproducts were approximately 10^5-10^8 cfu/ml, after production and storage at room temperature for 7 months.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved