ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาต้นตอส้มต้านทานโรคแคงเกอร์โดยใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผู้เขียน นางสาวศิรินภา ไชยพล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. เกวลิน คุณาศักดากุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ.ดร. ดรุณี นาพรหม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาประกอบด้วย 6 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณยอดของต้นตอส้มทรอยเยอร์โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากลำต้นและรากบนอาหารแข็งสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) ที่แตกต่างกันจำนวน 5 สูตร ดังนี้ 1) สูตร MS ชุดควบคุมไม่เติม สารควบคุมการเจริญเติบโต 2) สูตรMS1 เติม BAP 1.5 มก./ลิตร kinetin 1.5 มก./ลิตร และ NAA 0.1 มก./ลิตร 3) สูตร MS2 เติม BAP 1.0 มก./ลิตร kinetin 1.0 mg/l และ NAA 0.1 มก./ลิตร 4) สูตร MS3 เติม BAP 2.0 มก./ลิตร และ NAA 0.1 มก./ลิตร และ 5) สูตร MS4 เติม kinetin 2.0 มก./ลิตร และ NAA 0.1 มก./ลิตร ในขั้นตอนที่ 2 เป็นการศึกษาอาการโรคแคงเกอร์ของมะกรูดและแยกเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้อาหาร Yeast Extract Dextrose $CaCO_3$ (YDC) ในขั้นตอนที่ 3 เป็นการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้ โดยใช้ต้นกล้าส้มทรอยเยอร์อายุ 3 เดือน ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและต้นกล้าส้มทรอยเยอร์และคลีโอพัตราอายุ 6 เดือน ที่เพาะเลี้ยงในสภาพโรงเรือน แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่มีความเข้มข้น 10^8 cfu/มล. ด้วยการฉีดพ่นบนใบหรือการแช่ต้นกล้าลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อ เปรียบเทียบการเกิดโรคกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นต้นกล้าส้มด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในขั้นตอนที่ 4 เป็นการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์แอนโดไฟต์จากเนื้อเยื่อส่วนใบและกิ่งของมะขวิด (*Limonia acidizssima* L.) และมะสัง (*Feroniella lucida* Scheff.) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2) และการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่แยกได้ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์โดยวิธี well diffusion

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในขั้นตอนที่ 5 เป็นการชักนำให้ต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์ โดยหยดเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้ของแต่ละไอโซเลทที่มีเข้มข้น 10^4 cfu/มล. ปริมาตร 1 มล. บนผิวหน้าอาหารที่เพาะเลี้ยงกล้าส้มในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 30 วัน ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุโรค โดยการจุ่มลำต้นและใบของต้นกล้าลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อสาเหตุ แล้วย้ายปลูกต้นกล้าลงในขวดแก้วที่มี vermiculite และอาหารเหลว MS ซึ่งนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมทั้งประเมินระดับความรุนแรงของโรค หลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 7 วัน ในขั้นตอนที่ 6 เป็นการศึกษาความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการเข้าอาศัยในต้นกล้าส้มที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและในสภาพโรงเรือน โดยในสภาพปลอดเชื้อปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ที่คัดเลือกได้เข้มข้น 10^4 cfu/มล. ปริมาตร 1 มล. บนผิวหน้าอาหารที่เพาะเลี้ยงกล้าส้มแต่ละต้น แล้วแยกเชื้อกลับจากส่วนใบ ลำต้น และรากของต้นกล้าส้ม หลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 และ 30 วัน สำหรับการทดสอบในสภาพโรงเรือน ปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ให้กับต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 30 วัน ก่อนย้ายต้นกล้าลงปลูกในถาดหลุมที่ใช้แกลบดำนึ่งฆ่าเชื้อเป็นวัสดุปลูกแล้วแยกเชื้อกลับที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 30 วัน หลังออกปลูก จากผลการทดลองในแต่ละขั้นตอน พบว่า จากการเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร ในการเพิ่มปริมาณยอดของต้นตอส้มหลังการเพาะเลี้ยง 30 วัน อาหารสูตร MS3 สามารถชักนำเนื้อเยื่อส่วนรากและลำต้นให้เกิดยอดมากที่สุดเท่ากับ 11.7 และ 7.5 ยอดต่อชิ้นพืช ตามลำดับ ในการศึกษาอาการของโรคแคงเกอร์ของใบมะกรูด พบว่า ใบที่แสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงใบมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง ฉ่ำน้ำ ทั้งบนใบและใต้ใบ จากการแยกเชื้อสาเหตุจากแผลพบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ซึ่งสามารถทำให้ต้นกล้าส้มแสดงอาการของโรคหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ในสภาพปลอดเชื้อและสภาพโรงเรือน เป็นเวลา 7 และ 14 วัน ตามลำดับ จากการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ พบว่า สามารถแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ จากมะขวิดได้ 3 ไอโซเลท และจากมะสัง 1 ไอโซเลท เชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ ไอโซเลท LIM1 และ LIM2 ที่ได้จากมะขวิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ โดยมีบริเวณยับยั้ง (clear zone) เท่ากับ 2.4 และ 1.6 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลทที่เหลืออีก 2 ไอโซเลทอย่างมีนัยสำคัญ ผลจากการชักนำให้ต้นกล้าส้มทรอยเยอร์ต้านทานต่อโรคแคงเกอร์โดยการปลูกเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ พบว่า ไอโซเลท LIM1 และ LIM2 สามารถลดความรุนแรงและจำนวนต้นกล้าที่เกิดโรคได้ โดยพบต้นกล้าแสดงอาการโรคแคงเกอร์ที่ระดับ 1 เท่ากับ 50 และ 38.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุมซึ่งปลูกเชื้อสาเหตุโรคเพียงอย่างเดียวมีระดับความรุนแรงของโรคมากถึงระดับ 4 เท่ากับ 66.7 เปอร์เซ็นต์ ผลจากการศึกษาความสามารถของเชื้อแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ไอโซเลท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

LIM1 ในการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อของต้นกล้าส้มในสภาพปลอดเชื้อ หลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 14 และ 30 วัน พบว่า สามารถแยกเชื้อกลับได้จากเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นรวมเท่ากับ 17.5 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อย้ายต้นกล้าออกปลูกในแกลบดำในสภาพโรงเรือนและแยกเชื้อกลับที่ระยะเวลา 7, 14, 21 และ 30 วัน หลังออกปลูก พบว่า สามารถแยกเชื้อกลับจากเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นได้เท่ากับ 27.5, 45, 50 และ 52.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ไม่สามารถแยกเชื้อกลับได้จากเนื้อเยื่อส่วนรากของต้นกล้าส้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Development of Canker Disease Resistance in Citrus Root Stock Using Endophytic Actinomycetes with Tissue Culture Technique
Author	Miss Sirinapa Chaipon
Degree	Master of Science (Plant Pathology)
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Kaewalin Kunasakdakul — Advisor Asst. Prof. Dr. Daruni Naphrom — Co-advisor

Abstract

The study consisted of six working steps. The first step was the development of proper media for mass propagation of Citrange Troyer citrus seedlings. The stem and root segments of citrus seedlings were cultured on the modified Murashige and Skoog (MS) solid media with five different formations as follows; 1.) MS medium without plant hormone as the control, 2.) MS1 with 6-benzylaminopurine (BAP) 1.5 mg/l, kinetin 1.5 mg/l and α-naphthalene acetic acid (NAA) 0.1 mg/l, 3.) MS2 with BAP 1.0 mg/l, kinetin 1.0 mg/l and NAA 0.1 mg/l, 4.) MS3 with BAP 2.0 mg/l and NAA 0.1 mg/l, 5.) MS4 with kinetin 2.0 mg/l and NAA 0.1 mg/l. In the second step, the symptom of canker disease in rough lemon was investigated and the pathogenic microorganism was isolated using Yeast Extract Dextrose $CaCO_3$ (YDC) medium. In the third step, the pathogenicity of isolated pathogenic microorganism was tested under aseptic condition by using three months old plantlets of Citrange Troyer citrus and under greenhouse by using six months old seedlings of Citrange Troyer and Clreopatra citrus. For both conditions, the cell suspension of the isolated pathogenic microbe at the concentration of 10^8 cfu/ml was inoculated by either spraying onto the leaves or dipping the plantlets or seedling into the cell suspension. The control treatments in which autoclaved distilled water was used for spraying or dipping were included for comparison. In the forth step, endophytic actinomycetes were isolated from the leaf

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and twig tissues of Wood apple (*Limonia acidizssima* L.) and Java feroniella (*Feroniella lucida* Scheff.) using Inhibitory Mold Agar 2 (IMA-2). Then, their antimicrobial activities against canker pathogen were tested using well diffusion method. In the fifth step the selected effective endophytic actinomycetes isolated were tested to induce canker disease resistance in Citrange Troyer plantlets. One ml of cell suspension of each endophytic actinomycetes at the concentration of 10^4 cfu/ml was inoculated onto the surface of the culturing medium of each plantlet and incubated for 30 days before inoculation of canker pathogen by dipping the stem and leaves of plantlets into the cell suspension of canker pathogen. The plantlets were grown in the glass bottles containing vermiculite and MS liquid medium under aseptic condition and the canker disease symptom of the plantlets were evaluated at 7 days after disease inoculation. In the sixth step, citrus host colonization ability of the most effective endophytic actinomycetes was tested *in vitro* and *in vivo*. One ml of cell suspension of the selected endophytic actinomycetes at the concentration of 10^4cfu/ml was used for inoculation onto the surface of culturing medium of each Citrange Troyer plantlet and then inoculation for 14 and 30 days before re-isolated of the endophytic actinomycetes in the leave, stem and roots of the treated plants. For *in vivo* testing, the inoculated plantlets were transplanted into charcoal rice husk in plastic tray at 30 days after inoculation. Re-isolation of the inoculated endophytic actinomycetes were done at 7, 14, 21 and 30 days after transplanting. It was found that at 30 days after culturing, MS3 induced statistically the highest numbers of regenerated shoots compared to the offer four formulations. From this media there were 11.7 and 7.5 shoots derived from each root and stem segments respectively. In rough lemon which had severe canker disease symptom, there were the pustule lesion with brownish yellow color surrounded by water soaking yellow halos on the upper and lower surfaces of the leaves. The isolated canker disease pathogen was the bacterium which was identified as *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Its pathogenicity was showed after inoculation the cell suspension to the tissue cultured Citrange Troyer plantlets grown under aseptic condition and glass house for 7 and 15 days respectively. Three isolates of endophytic actinomycetes were obtained from the tissue of *Limonia acidizssima* (L.) and one from *Feroniella lucida* (Scheff.). Considering from the clear zone of pathogen inhibiting of LIM1 and LIM2 endophytic actinomycetes isolates at 2.4 and 1.6 cm respectively, there two isolates were significantly better than the remaining two isolates for their antimicrobial activities against canker pathogen. The

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

results from induction of canker disease resistance in Citrange Troyer plantlets by endophytic actinomycetes inoculation showed LIM1 and LIM2 clearly reduced disease severity and the plantlets which showed canker disease symptom at the level 1 were 50 and 38.9 % of the total numbers of the tested plantlets respectively while those from the control treatment which were inoculated with only canker pathogen were severity infected at the level 4 about 66.7 %. The result from host colonization testing of LIM1 *in vitro* showed that at 14 and 30 days after incubation there were 17.5 and 40 % of the total segments of the leaves and stems of the inoculated plantlets which LIM1 could be re-isolated respectively, while that from the roots was only 10 %. In the case of *in vivo* testing, it was found that at 7, 14, 21 and 30 days after transplanting the leave and stem segments which LIM1 could be re-isolated were 27.5, 45.5, 50 and 52 % respectively while none were obtained from the root segments.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved