ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การป้องกันโรคใบจุดอัลเทอนาเรีย และโรคเหี่ยวฟิวซาเรี่ยมของพริกและมะเขือเทศโดยการใช้เชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ และเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

ผู้เขียน นางสาวณัฐสุดา บรรเลงสวรรค์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชวนพิศ บุญชิตสิริกุล	ประธานกรรมการ
ดร. สรัญยา วัลยะเสวี	กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการเก็บรวบรวมและแยกเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์จากบริเวณราก ใบและลำต้นของพริกและมะเขือเทศที่ปลูกบริเวณพื้นที่ราบและที่สูงในอำเภอแม่แจ่ม สันทราย และแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 95 ไอโซเลท โดยแยกเชื้อได้จากพริกจำนวน 55 ไอโซเลท และมะเขือเทศจำนวน 40 ไอโซเลท จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยอาศัยลักษณะของเส้นใย สีของโคโลนี รงควัตถุ ก้านชูสปอร์ และการเรียงตัวของสปอร์ พบว่าสามารถแบ่งเชื้อทั้งหมดได้เป็น 2 สกุล ได้แก่ *Streptomyces* และ *Nocardia* เมื่อนำเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ที่แยกได้และเชื้อรา *Trichoderma harzianum* มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคใบจุดและโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเทศ โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. อยู่ระหว่าง 0 - 80.52 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา *F. oxysporum* อยู่ระหว่าง 0-81.50 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลท SSC2-R1 และพบว่าเชื้อรา *T. harzianum*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *F. oxysporum* ได้ 75.66 เปอร์เซ็นต์ และ 86.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าสปอร์มีลักษณะกลม สปอร์เรียงต่อกันเป็นสายแบบ spirales type ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจัดอยู่ใน สกุล *Streptomyces* จากการนำเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ทั้งหมด 95 ไอโซเลท มาวิเคราะห์หาความใกล้เคียงของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ร่วมกับไพรเมอร์ F1 และ ไพรเมอร์ R5 ได้ผลผลิตของ PCR ที่มีขนาด 1,500 คู่เบส เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Sph*I, *Kpn*I, *Pst*I, *Sca*I และ *Kzo* 91 พบว่าพบว่ามีเอนไซม์เพียง 3 ชนิดเท่านั้นที่ให้ความแตกต่างกันในการจัดจำแนกเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ คือ เอนไซม์ *Sph*I, *Pst*I และ *Kzo* 91 จากการวิเคราะห์ข้อมูลที่ค่า similarity เท่ากับ 0.52 สามารถแบ่งกลุ่มได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม A จำนวน 64 ไอโซเลท กลุ่ม B จำนวน 16 ไอโซเลท กลุ่ม C จำนวน 3 ไอโซเลท และกลุ่ม D จำนวน 12 ไอโซเลท โดยเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ที่จัดจำแนกอยู่ในแต่ละกลุ่มเป็นเชื้อที่แยกได้จากสภาพพื้นที่และชนิดพืชที่แตกต่างกันไปและเชื้อที่จัดอยู่ภายในแต่ละกลุ่มก็มีความใกล้เคียงของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเฉพาะในกลุ่ม A ประกอบด้วยกลุ่มเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลท SSC2-R1, SSC2-R2 และ SSC2-R3 เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ พบว่าเชื้อทั้งหมดอยู่ในกลุ่ม A, B และ C จัดอยู่ใน สกุล *Streptomyces* ขณะที่เชื้อเอนโดไฟท์ติก แอกติโนไมซีสต์ ที่อยู่ในกลุ่ม D จัดอยู่ใน สกุล *Nocardia* จากการทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *T. harzianum* และเชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 ต่อการควบคุมโรคใบจุดและโรคเหี่ยวของต้นกล้าพริกและมะเขือเทศในสภาพโรงเรือน การทดสอบการเกิดโรคใบจุดกับต้นพริกและมะเขือเทศพบว่าเกิดโรคในระดับเดียวกันโดยเกิดโรคที่ระดับความรุนแรง 1 คือ ต้นพืชมีอาการใบจุด 1-25 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบสุ่มและทุกกรรมวิธีให้ผลแตกต่างจากชุดควบคุม การควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวพบว่าการทดสอบกับต้นพริกทุกกรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของต้นพริกได้ โดยเกิดโรคที่ระดับความรุนแรง 2 คือ เกิดอาการเหี่ยวของใบพืชทั้งต้น 26-50 เปอร์เซ็นต์ และทุกกรรมวิธีให้ผลใกล้เคียงกันโดยไม่แตกต่างจากชุดควบคุม การทดสอบกับต้นมะเขือเทศพบว่าการใช้เชื้อรา *T. harzianum* และการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ร่วมกับการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์ ไอโซเลท SSC2-R1 ทั้ง 2 กรรมวิธีสามารถยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวของต้นมะเขือเทศได้ดีที่สุด เกิดโรคที่ระดับความรุนแรง 2 คือ เกิดอาการเหี่ยวของใบพืชทั้งต้น 26-50 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ผลแตกต่างจากชุดควบคุม

Thesis Title Prevention of Alternaria Leaf Spot and Fusarium Wilt Diseases in Chili and Tomato Using Endophytic Actinomycetes and *Trichoderma harzianum*

Author Miss Nutsuda Bunlangswan

Degree Master of Science (Plant Pathology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Chuanpit Boonchitsirikul Chairperson

Dr. Sarunya Valyasevi Member

Abstract

Ninety-five endophytic actinomycetes were isolated from roots, leaves and stems of healthy chili and tomato plants. They were collected from both the high and lowland areas in the districts Mae Jam, San Sai and Mae Wang in Chiang Mai they could be divided into fifty-five isolates from chili and forty isolates from tomato. According to the isolate microscopic and morphological examinations regarding the presence of aerial mycelium, colony color, diffusible pigment, sporophore and spore chain morphology they could be grouped into two genera *Streptomyces* and *Nocardia*. Both endophytic actinomycetes and *Trichoderma harzianum* were tested for antagonistic activities by using the dual culture method against *Alternaria* sp. and *Fusarium oxysporium* which caused Alternaria leaf spot and Fusarium wilt diseases in chili and tomato. Endophytic actinomycetes inhibited the growth of *Alternaria* sp. and *F. oxysporium* which varied from 0 to 80.52% and 0 to 81.50%. SSC2-R1 actinomycetes isolate was the best antagonistic isolate while *T. harzianum* inhibited the growth of *Alternaria* sp. and *F. oxysporium*

at the inhibition rate 75.66 and 86.75%. An examination of the selected isolate SSC2-R1 by a scanning electron microscope revealed that the individual spores were round in shape and connected like a spiral chain. The morphology characteristic could be classified into genus *Streptomyces*. Ninety-five endophytic actinomycetes were analysed for phylogenetic relationships by using Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). DNA of actinomycetes were amplified by polymerase chain reaction (PCR), using primers F1 and R5. The amplified products (1,500 bp) were digested with 5 restriction enzymes, *Sph*I, *Kpn*I, *Pst*I, *Sca*I and *Kzo* 91. However there were only 3 restriction enzymes, *Sph*I, *Pst*I and *Kzo* 91 could be classify endophytic actinomycetes at 0.52 similarity into four group group A 64 isolates, group B 16 isolates, group C 3 isolates and group D 12 isolates. The endophytic actinomycetes isolates from different location and plant in each group showed phylogenetic relationships in their group specially group A which had the best antagonistic isolate SSC2-R1, SSC2-R2 and SSC2-R3. From morphology observation, all of endophytic actinomycetes isolates in group A, B and C were identified in genus *Streptomyces* while endophytic actinomycetes isolates in group D were identified in genus *Nocardia*. Actinomycetes SSC2-R1 isolate and *T. harzianum* were applied to control Alternaria leaf spot and Fusarium wilt diseases in chili and tomato under the greenhouse conditions. The results showed that seedlings of chili and tomato had the same disease rating score which had a severity scale of 1 and the symptoms for the leaf varied from 1 to 25%. Which were significantly different from the control treatment. To control Fusarium wilt diseases in chili, all treatments had the same disease rating score which had severity in scale of 2 and the leaf symptoms varied from 26 to 50% which were non-significantly different from the control treatment. The seedlings treated with *T. harzianum* and seedlings treated with both *T. harzianum* and SSC2-R1 isolate showed the best control of the Fusarium wilt disease in tomato which rating score had severity in scale of 2 and the leaves symptoms varied from 26 to 50%. They were significantly different from the control treatment.