ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เหมาะสมเพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดิน

ผู้เขียน นางสาวศุภลักษณ์ ยาเจริญ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ประสาทพร สมิตะมาน

บทคัดย่อ

เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์แยกได้จากดินในพื้นบริเวณสถานีวิจัยและพัฒนาของมูลนิธิโครงการหลวงขุนห้วยแห้ง ดอยอินทนนท์ จ. เชียงใหม่ โดยนำมาอบที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเชื้อด้วยวิธี dilution plate technique บนอาหาร soil extract agar 7 วัน นำเชื้อที่มีลักษณะของ Actinomycete ไปเลี้ยงต่อบนอาหาร starch soluble ได้เชื้อทั้งสิ้น 77 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชคือ *Fusarium oxysporum* *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotium rolfsii* ด้วยวิธี dual culture พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดิน 3 ไอโซเลตซึ่งให้ประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ชนิด คือ Actinomycete ไอโซเลต KII623 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *F. oxysporum* ที่ 67.13 ไอโซเลต KIII623 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *R. solani* ที่ 52.55 และ KIII0021 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง *S. rolfsii* สูงถึง 70.15 เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก stock cultures ทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลตขอนแก่น2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum* *R. solani* และ *S. rolfsii* ที่ 20.69

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์ 55.56 เปอร์เซ็นต์ และ 70.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทดสอบเชื้อ *Trichoderma viride* ร่วมกับ *F. oxysporum, Trichoderma* sp. ไอโซเลตT6 ร่วมกับ *R. solani* และ *Trichoderma* sp. ไอโซเลต T5 ร่วมกับ *S. rolfsii* พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงถึง 68.80 เปอร์เซ็นต์ 75.36 เปอร์เซ็นต์ และ 71.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *PBRC1* พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *F. oxysporum, R. solani* และ *S. rolfsii* ได้ที่ 44.45 เปอร์เซ็นต์ 67.11 เปอร์เซ็นต์ และ 32.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและเมื่อนำไปตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและ BIOLOG® SYSTEM จำแนกได้เป็นเชื้อ *Serratia plymuthica*

เมื่อศึกษาการเจริญภายในเส้นใยของเชื้อราด้วยวิธี slide culture พบว่าเชื้อในกลุ่ม *Trichoderma* spp. เข้าทำลายโดยการพัน รัด และแทงเข้าไปเจริญภายในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทุกชนิด สำหรับการทดสอบด้วยการเลี้ยงร่วมกันกับเชื้อ *PBRC1* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยเกิด clear zone ระหว่างเชื้อ *PBRC1* กับเชื้อก่อโรคทุกชนิดรวมทั้ง Trichoderma spp.ทุกไอโซเลต

เมื่อนำเชื้อ *PBRC1* มาเลี้ยงร่วมกับ *Ralstonia solanacearum* ในอาหาร NB จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดจำนวนประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* หลังจากการเลี้ยง 8 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบเชื้อทั้งสองในต้นกล้ามะเขือเทศที่ช่วงเวลาต่างกัน พบว่าดินที่ผสมด้วยเชื้อ *PBRC1* ก่อนการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* 5 วันช่วยลดดัชนีการเกิดโรคเหี่ยวในต้นมะเขือเทศได้ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดสอบประสิทธิภาพในระดับโรงเรือนเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคด้วยเชื้อชีวินทรีย์ในต้นกล้ามะเขือเทศที่จัดไว้ในภาชนะปลูกทรงหกเหลี่ยมที่สร้างจากกระจกสไลด์ เมื่อผสมดินด้วยเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลต T5 T6 *T. harzianum T. viride* และ *F. oxysporum* ที่ความเข้มข้น $4x10^6$ $7x10^6$ $5x10^6$ $5x10^6$ $6x10^6$ spore/ml ร่วมกับ *B. subtilis* และ *PBRC1* ที่ความเข้มข้น $6x10^8$ และ $8x10^8$ cfu/ml ตามลำดับ พบว่าดินที่ผสมด้วย T5 ร่วมกับ *B. subtilis* ให้ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของรากต้นมะเขือเทศมากที่สุด ส่วนดินที่ผสมด้วย T6 ให้ค่าเฉลี่ยความยาวรากสูงที่สุดและสามารถยับยั้งเชื้อ *R. solani* ได้ดีที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Screening of Suitable Antagonist Microbes for Biological Control of Soilborne Pathogens

Author Miss Supalak Yacharone

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Assoc. Prof. Dr. Prasartporn Smitamana

Abstract

Antimicrobial agents were screening from soil collected from The Royal Project Foundation station, Khun Huay Hang, Chiang Mai province. The soil was incubated 30 minute at 50ºC and 60 ºC 30 minute , screening for target Actinomycestes by dilution plating on soil extract agar. After 7 days, they were transfer to starch agar, 77 isolates were found. All of them were tested for antagonistic effects on *Fusarium oxysporum, Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* by dual culture method. Three isolates were selected from their highest activities on 3 fungi pathogens as following : actinomycete KII623 isolate for *F. oxysporum*, KIII0021 isolate for *R. solani* and KIII623 isolate for *S. rolfsii* at 67.13%, 52.55% and 70.15%, respectively.

Biocontrol agents from stock cultures were screening for the target pathogens which revealed that *Bacillus subtilis* Khon Khaen 2 isolate inhibited *F. oxysporum, R. solani* and *S. rolfsii* at 20.69%, 55.56 and 70.15% respectively. *Trichoderma viride* inhibited *F. oxysporum*, *Trichoderma* sp. T6 isolate inhibited *R. solani* and *Trichoderma* sp. T5 isolate inhibited *S. rolfsii* at 68.80%, 75.36% and 71.64%, respectively. *PBRC1*, a bacterial agent, was found out that it could inhibit *F. oxysporum, R. solani* and *S. rolfsii* at 44.45%, 67.11% and 32.00% respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

From the morphology and results from the BIOLOG® SYSTEM this bacteria was identified as *Serratia plymuthica*

Slide culture was used to observe the infection of the *Trichoderma* spp. on the pathogens which clearly shown the coiling and penetration of all tested *Trichoderma* spp. in the pathogens. For the *PBRC1*, clear zones formations around the colonies were found when co-cultured with the pathogens as well as the *Trichoderma* spp. Moreover, the abnormal growth of the mycelium of *Trichoderma harzianum, T. viride*, T5 and T6 were also found.

PBRC1 was selected for the antagonist test with *Ralstonia solanacearum* by co-cultured in NB media and the samples were taken every hour. *R. solanacearum* was inhibited by *PBRC1* started on the 8th hour after cultured. Young tomato were inoculated with *R. solanacearum* and *PBRC1* at different periods. Five days prior amended soil with *PBRC1* showed best statistically different in tomato wilt reduction.

Nursery trials for the effectiveness of selected microbes on controlling of soil- borne pathogens were conducted by planting tomato plantlets in the divided hexagonal vessels making from glass slides then inoculated with the *T. harzianum, T. viride,* T6 and T5 combined with *B. subtilis* and *PBRC1* using the spore or cell suspension of *Trichoderma* spp. T5, T6 *T. harzianum, T. viride,* and *F. oxysporum* as $4x10^6$, $7x10^6$, $5x10^6$, $5x10^6$, and $6x10^6$ spores/ml, $6x10^8$ and $8x10^8$ cfu/ml respectively, results revealed that soil mixed with T5 together with *B. subtilis* gave average of highest tomato plant fresh weight, T6 gave the highest root length as well as highest inhibition of *R. solani* infection.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved