ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสจากดินในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง

ผู้เขียน นางสาววิลาสินี แสงนาค

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ. ดร. สรัญยา วัลยะเสวี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รศ. ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จากการศึกษาและแยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ สวน และตลาด ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน นครนายก และพิษณุโลก ทั้งหมด 17 พันธุ์ จำนวน 150 ไอโซเลท เมื่อประเมินระดับความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) จำนวน 112 ไอโซเลท (74.7 เปอร์เซนต์) ซึ่งได้จากการแยกเชื้อจากใบ 18 ไอโซเลท (12 เปอร์เซนต์) และผล 94 ไอโซเลท (62.7 เปอร์เซนต์) และระดับอ่อนแอ (S) 37 ไอโซเลท (24.7 เปอร์เซนต์) ซึ่งได้จากการแยกเชื้อจากใบ 28 ไอโซเลท (18.7 เปอร์เซนต์) และผล 9 ไอโซเลท (6 เปอร์เซนต์) ส่วนเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับปานกลาง (MR) มี 1 ไอโซเลท (0.6 เปอร์เซนต์) ซึ่งแยกได้จากผล

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF; non-filtrate culture) และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F; filtrate culture) จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 บ่มเป็นเวลา 3 - 15 วัน โดยทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท NDM_F012 (HR) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ในทุกไอโซเลท โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF ให้เปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราอยู่ในช่วง 28.89 - 77.50 เปอร์เซนต์ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F ให้เปอร์เซนต์การยับยั้งในช่วง 20.74 - 67.59 เปอร์เซนต์ เชื้อแอกติโนไมซีสที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด คือไอโซเลท NSP4 และ NSP1ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเฉลี่ย 59.56 และ 58.89 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ส่วนช่วงเวลาที่เหมาะสมที่อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย คือ 3 - 7 วัน และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ เมื่อเก็บรักษาในระยะเวลาที่นานขึ้น

จากการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการงอกของสปอร์ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 5 วัน โดยจากการตรวจการงอกของสปอร์เชื้อราที่ 6 ชั่วโมง อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 70.73 - 88.98 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4, NSP1 และ NSP2 โดยมีประสิทธิภาพ 88.98, 88.01 และ 86.25 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ในช่วง 30.25 – 43.30 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP2, NSP3, NSP1, NSP4 และ NSP5 โดยมีประสิทธิภาพ 43.30, 42.26, 41.24, 40.38 และ 39.54 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่อตรวจวัดการงอกของ germ tube พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง สปอร์เชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีขนาดสปอร์และ germ tube รวมกันเฉลี่ยอยู่ในช่วง 24.49-27.76 × 3.89-4.39 ไมโครเมตร ซึ่งงอกยาวกว่าสปอร์เชื้อราปกติที่ 0 ชั่วโมง ประมาณ 1.5 เท่า ส่วนสปอร์เชื้อราที่ทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F มีขนาดสปอร์และ germ tube รวมกันเฉลี่ยอยู่ในช่วง 32.64-37.25 × 3.99-4.58 ไมโครเมตร ซึ่งงอกยาวกว่าสปอร์เชื้อราปกติที่ 0 ชั่วโมง ประมาณ 2 เท่า ในขณะที่สปอร์ของเชื้อราในชุดควบคุม มีขนาดสปอร์และ germ tube รวมกันเฉลี่ยอยู่ในช่วง 48.92-56.24 × 3.86-4.62 ไมโครเมตร ซึ่งงอกยาวกว่าสปอร์เชื้อราปกติที่ 0 ชั่วโมง ประมาณ 3 เท่า โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ NSP4 และ NSP1 ตามลำดับ และจากการตรวจสอบลักษณะของความผิดปกติของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสมีผลเพียงชะลอการเจริญของเชื้อราเท่านั้น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัญฐานวิทยาของเชื้อราแต่อย่างใด

จากการการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ในการยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้ในช่วง 22.55 - 37.80 เปอร์เซนต์ และไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4, NSP3 และ NSP5 โดยมีประสิทธิภาพ 37.80, 34.69 และ 34.69 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F บ่มเป็นเวลา 5 วัน สามารถลดการเกิดโรคในช่วง 16.56 - 28.62 เปอร์เซนต์ ซึ่งไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ได้แก่ NSP4 และ NSP3 โดยมีประสิทธิภาพ 28.62 และ 27.24 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพลดลงเมื่ออายุของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีส จำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK8, NOK9, NOK10, NHK11, NHK12, NOK13, CHK14 และ NHK15 โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบการสร้างสปอร์ 2 ลักษณะ คือ แบบขดม้วนต่อกันเป็นวง (coil) คล้ายขดลวดสปริง และสปอร์แบบต่อกันเป็นสายโซ่ยาว (fragmenting branched aerial hypha) จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบผนังเซลล์ diaminopimelic acid (DAP) โดยวิธี thin layer chromatography (TLC) พบว่ามีองค์ประกอบของผนังเซลล์ DAP ชนิด *LL* และเมื่อจัดจำแนกด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยอาศัยยีน 16S rDNA สามารถจัดจำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม (clade) กลุ่มแรก ได้แก่ ไอโซเลท NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 กลุ่มที่สอง ได้แก่ NOK7 กลุ่มที่สาม ได้แก่ NOK8, NOK10 และ NHK15 ส่วนกลุ่มที่สี่ ได้แก่ NOK9, NHK11, NHK12, NOK13 และ CHK14 โดยจากตัวอย่างเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท มีเพียง 3 ไอโซเลท เท่านั้น ที่สามารถจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ ได้แก่ ไอโซเลท NOK8 และ NOK10 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *S. parvisporogenes* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง (% similarity) ที่ 97.98 เปอร์เซนต์ ส่วนไอโซเลท NHK15 มีระดับความคล้ายคลึงกับเชื้อ *S. lilacinus* มากที่สุด ด้วยระดับความคล้ายคลึง 97.63 เปอร์เซนต์ โดยจากการจัดจำแนกทั้ง 3 วิธี พบว่าเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 15 ไอโซเลท จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Phylogeny and Efficacy of Soil Actinomycetes in Controlling Fungi Causing Mango Anthracnose
Author	Miss Vilasinee Saengnak
Degree	Master of Science (Plant Pathology)
Thesis Advisory Committee	Lect. Dr. Sarunya Valyasevi Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Chaiwat Toanun Co-advisor

Abstract

A total of 150 *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing anthracnose disease from 17 mango cultivars were collected from orchards and markets; Chiang Mai, Lumphun, , Nakhon-nayok and Phitsanulok, and examined for their sensitivity to carbendazim. The carbendazim-sensitivity assays were conducted by growing all isolates on potato dextrose agar (PDA) amended with the carbendazim at 1, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml concentrations. The isolates consisted of 112 isolate (74.7 percents) with the highly resistant (HR) 18 isolates (12 percents) obtained from leaves and 94 isolates (62.7 percents) from fruits, respectively. There were 37 isolates (24.7 percents) of the sensitive (S) phenotype consisting of 28 isolates (18.7 percents) from leaves and 9 isolates (6 percents) from fruits. And the another 1 isolate (0.6 percents) of the moderately resistant obtained from fruit.

The efficiency of non-filtrate culture (NF) and filtrated culture (F) of actinomycetes from 6 isolates as follow NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 and NSP6, incubated 3 - 15 days, were tested for inhibitiory growth of *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease of mango strain NDM_F012 (HR). The actinomycetes culture medium NF type showed higher efficacy in than F type. The culture medium NF type showed the percentages of growth inhibition of pathogen range 28.89 - 77.50 percents and F type showed the percentages of growth inhibition of pathogen range 20.74 - 67.59 percents. The actinomycetes isolate NSP4 and NSP1 showed the highest percentage in the average of 59.56 and 58.89 percents, respectively. And the range of 3 – 7 days culture medium both NF and F type had the highest efficacy. Thereafter, the efficacy of the culture decreased every day.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

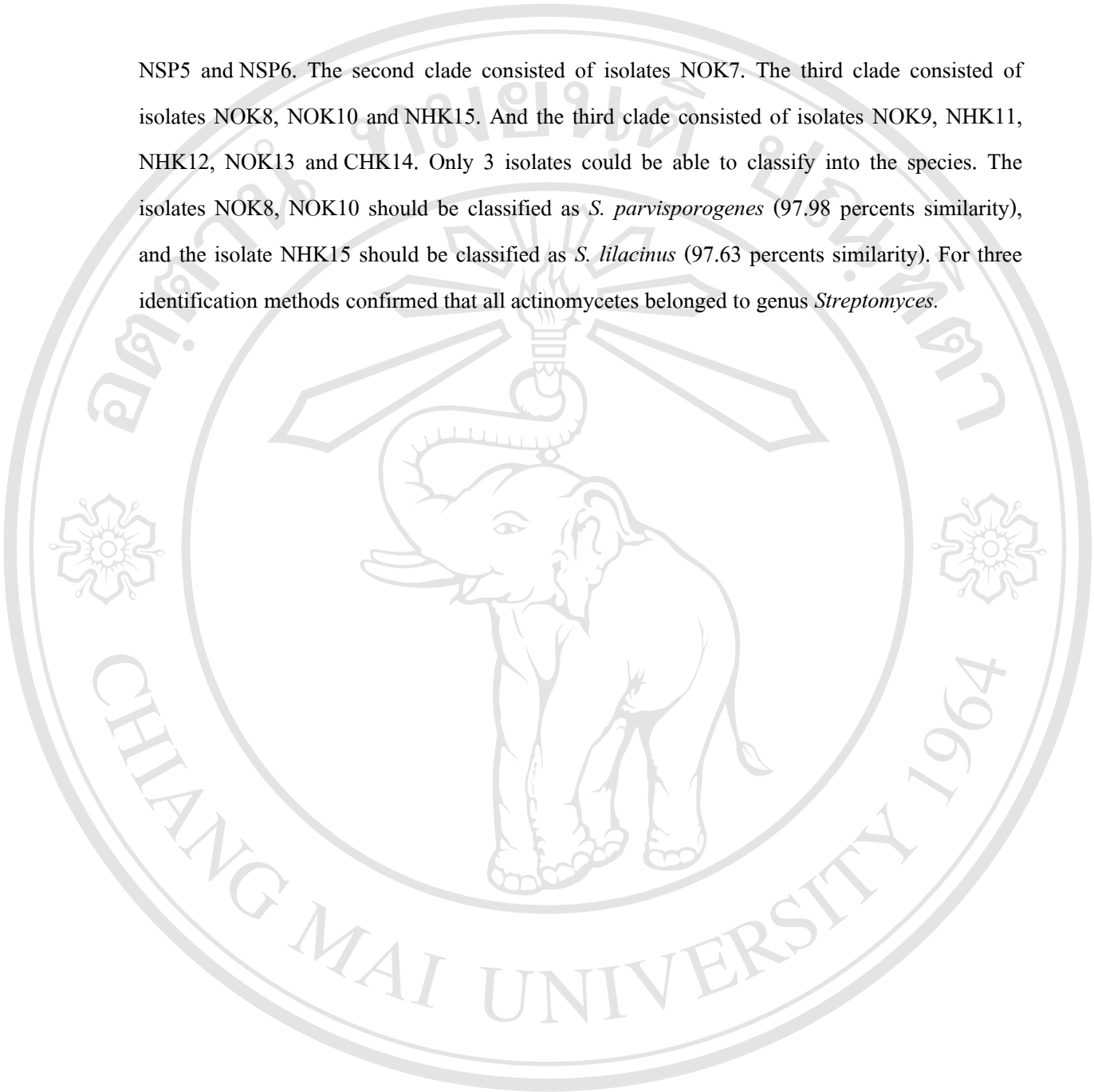
The actinomycetes culture medium both NF and F type were tested for the inhibition of spore germination. The results showed that the fifth day culture medium had the highest efficacy. After treated spore with cuture medium for 6 hours, the actinomycetes culture medium NF type showed the percentages of spore germinate inhibition of pathogen range 70.73 - 88.98 percents. The best isolates were NSP4, NSP1 and NSP2 which showed the inhibition at 88.98, 88.01 and 86.25 percents, respectively. The culture medium F type showed the percentages of growth inhibition of pathogen range 30.25 – 43.30 percents. The best isolates were NSP2, NSP3, NSP1, NSP4 and NSP5 which showed the inhibition at 43.30, 42.26, 41.24, 40.38 and 39.54 percents, respectively. About the conidia germination at 6 hours, the germ tube of conidia that treated by the culture medium NF type were sized in range 15.08 – 19.69 micrometers (1.5 fold from normal conidia). The germ tube of conidia that treated by the culture medium F type were sized in range 15.08 – 19.69 micrometers (2 fold from normal conidia) while the control were sized in range 31.36 – 38.68 micrometers (3 fold from normal conidia). The actinomycetes isolate NSP4 and NSP1 showed the highest inhibition percentage. For the morphology, the treated conidia were same as the normal conidia which means the culture medium just slow down the conidial germination but had no any effect to the morphological.

For testing the actinomycetes culture medium in controlling anthracnose disease on mango fruits, the fifth day culture medium almost had highest efficacy. The culture medium NF type showed the percentages of growth inhibition of pathogen range 22.55 - 37.80 percents which the best isolate were NSP4, NSP3 and NSP5 that showed 37.80, 34.69 and 34.69 percents, respectively. The culture medium F type showed the percentages of growth inhibition of pathogen range 16.56 - 28.62 percents which the best isolate were NSP4 and NSP3 that showed 28.62 and 27.24 percents, respectively.

The identification of the actinomycetes 15 isolates; NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NOK7, NOK8, NOK9, NOK10, NHK11, NHK12, NOK13, CHK14 and NHK15, based on morphology, the result showed two spore forming type; coil and fragmenting branched aerial hypha. For the diaminopimelic acid (DAP) of cell wall component analysis by thin layer chromatography (TLC) technique, all 15 actinomycetes isolates showed the *LL* type of DAP. And for the identification by molecular technique, 16S rDNA sequencing were grouped the actinomycetes into 4 clades. The first clade consisted of isolates NSP1, NSP2, NSP3, NSP4,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NSP5 and NSP6. The second clade consisted of isolates NOK7. The third clade consisted of isolates NOK8, NOK10 and NHK15. And the third clade consisted of isolates NOK9, NHK11, NHK12, NOK13 and CHK14. Only 3 isolates could be able to classify into the species. The isolates NOK8, NOK10 should be classified as *S. parvisporogenes* (97.98 percents similarity), and the isolate NHK15 should be classified as *S. lilacinus* (97.63 percents similarity). For three identification methods confirmed that all actinomycetes belonged to genus *Streptomyces*.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved