ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมและการควบคุมเชื้อรา *Cercospora* spp. ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมโดยใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์

ผู้เขียน นายณัฐพงษ์ นวลดี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ. ดร. สรัญยา วัลยะเสวี ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์ กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดจากพืชต่างๆ ได้จำนวน 60 ไอโซเลท และเมื่อตรวจสอบความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมผสมบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ 6 ระดับความเข้มข้น คือ 1, 10, 50, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเชื้อรา *Cercospora* spp. ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR $\geq$ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มี จำนวน 48 ไอโซเลท และ เชื้อราที่ไม่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมหรือสายพันธุ์ปกติ (S $\leq$ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีจำนวน 12 ไอโซเลท เมื่อนำตัวแทนเชื้อราจำนวน 22 ไอโซเลท ประกอบด้วยเชื้อราที่ต้านทาน (HR) และไม่ต้านทาน (S) สารคาร์เบนดาซิมจำนวน 19 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ มาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่บริเวณบางส่วนของยีน beta-tubulin (*TUB1*) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบว่าเชื้อราที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 198 โดย glutamic acid (G**A**G) ถูกแทนที่ด้วย alanine (G**C**G) และนอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง codon 139 จาก leucine (C**T**C) ถูกแทนที่ด้วย histidine (C**A**C) และ codon 189 จาก valine (G**T**C, G**T**T) ถูกแทนที่ด้วย alanine (G**C**C) ของเชื้อราไอโซเลท CL06 และ CL43 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราในกลุ่มไม่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม (S)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับการใช้เชื้อแอกติโนไมซีสต์ในควบคุมเชื้อรา *Cercospora* spp. ไอโซเลท CCR07 (S) และ CCR10 (HR) นั้น ได้แยกและคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสต์จากดินจำนวน 7 แห่ง ในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งแยกเชื้อแอกติโนไมซีสต์ได้ทั้งหมด 191 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโดยวิธี dual culture บนอาหาร glucose yeast extract-malt extract agar (GYM) พบ 23 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Cercospora* spp. (S, HR) ได้ตั้งแต่ 75% ซึ่งในจำนวนนี้มีเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่ยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราได้ 100% อีกทั้งสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส และเซลลูเลสได้ จำนวน 6 ไอโซเลทได้แก่ OMA60-01, OMA60-07, SEA60-34, SEA120-04, SEA120-28 และ SEA120-38

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อ (enzyme production medium; EPM) ที่ไม่กรองเชื้อแอกติโนไมซีสต์ออก (NF) และน้ำกรองเชื้อที่กรองเชื้อแอกติโนไมซีสต์ออก (F) ทั้ง 6 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Cercospora* spp. ไอโซเลท CCR01 (S) และ CCR10 (HR) พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ (NF) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุอยู่ในช่วง 53.33-69.23% ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้น้ำกรองเชื้อแอกติโนไมซีสต์ (F) (16.67-33.33%) ยกเว้นในไอโซเลท SEA60-34 และ SEA120-28 นี้มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 53.33-58.97% และ 43.33-58.97 % ตามลำดับ และน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ (NF) ทั้ง 6 ไอโซเลท มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าการใช้สารชีวภัณฑ์ ของเชื้อ *Bacillus subtilis* (50.00-53.85%) ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบ เมื่อทดสอบความเป็นพิษของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสต์ชนิด NF และ F ทั้ง 6 ไอโซเลท โดยฉีดพ่นลงบนใบต้นกล้าพริก และผักกาดหอม พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้งสองชนิดในทุกไอโซเลทไม่ทำให้ต้นกล้าพริก และผักกาดหอมแสดงอาการผิดปกติ จากนั้นทำการจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนไมซีสต์ที่มีประสิทธิภาพทั้ง 6 ไอโซเลท โดยการศึกษาลักษณะการสร้างสปอร์ พบสปอร์ต่อกันเป็นสายลักษณะขดม้วนเป็นวงคล้ายสปริง เมื่อวิเคราะห์หา diaminopimelic acid (DAP) องค์ประกอบผนังเซลล์ โดยวิธี thin layer chromatography (TLC) พบว่าเป็นชนิด *LL*-isomer ทั้ง 6 ไอโซเลท จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ในเบื้องต้นว่าเชื้อแอกติโนไมซีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลท จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Genetic Characterization and Control of Carbendazim-resistant *Cercospora* spp. Using Actinomycetes

Author Mr. Nattapong Nuandee

Degree Master of Science (Plant Pathology)

Thesis Advisory Committee Lect. Dr. Sarunya Valyasevi Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Chaiwat To-anun Member

Abstract

A total of 60 *Cercospora* spp. isolates causing leaf spot disease from various plants were collected 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 (recommended concentration) and 1,000 µg/ml concentration. The result showed that 48 isolates were highly resistant (HR $\geq$ 500 µg/ml) and 12 isolates were sensitive (S $\leq$ 1 µg/ml) to the carbendazim. The partial beta-tubulin gene (*TUB1*) sequences of 22 representative *Cercospora* isolates showed a point mutation with substitution of the amino acid from glutamic acid (G**A**G) to alanine (G**C**G) at codon 198 for the HR phenotypes. Furthermore, the respective amino acid substitutions from leucine (C**T**C) to histidine (C**A**C) and valine (G**T**C, G**T**T) to alanine (G**C**C) at codons 139 and 189 of isolates CL06 and CL43 (HR) were also detected.

For the antagonistic assay, 191 isolates of soil actinomycetes isolated from seven locations in Chiang Mai Province were tested against *Cercospora* species, isolates CCR07 (S) and CCR10 (HR) using dual culture method on glucose yeast extract-malt extract agar (GYM) medium. Twenty-three actinomycetes isolates showed 75% of percent inhibition to the two *Cercospora* isolates. All the 23 isolates also produced chinolytic and cellulolytic activity. Among

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

them, isolates OMA60-01, OMA60-07, SEA60-34, SEA120-04, SEA120-28 and SEA120-38, however, showed 100% of percent inhibition activity.

In the efficiency assay of liquid culture medium (enzyme production medium; EPM) (NF) and culture filtrate medium (F) of the actinomycetes isolates OMA60-01, OMA60-07, SEA60-34, SEA120-04, SEA120-28 and SEA120-38 against *Cercospora* species isolates CCR01 (S) and CCR10 (HR), the growth inhibition activity of these actinomycetes using liquid culture medium (NF) (53.33-69.23%) were consistently higher than using culture filtrate medium (F) (16.67-33.33%), except for the isolates SEA60-34 and SEA120-28 showed the percentages of growth inhibition of the pathogens range 53.33-58.97% and 43.33-58.97% respectively. The growth inhibition activity of the six actinomycetes isolates on the culture medium (NF) was also higher than the bioproduct of *Bacillus subtilis* inhibition activity (50.00-53.85%). The phytotoxicity assay of these actinomycetes on *Capsicum annuum* and *Lactuca sativa* showed that all isolates were non-phytotoxic to the tested plants. The identification of the actinomycetes isolates based on morphology and thin layer chromatography (TLC) methods confirmed that the isolates of OMA60-01, OMA60-07, SEA60-34, SEA120-04, SEA120-28 and SEA120-38 belonged to genus *Streptomyces.*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved