

Thesis Title Role of Rhizobacteria in Promoting Plant Growth
and Their Antifungal Activities

Author Miss Mathurot Chaiharn

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
Prof. Dr. Christian V. Stevens	Co-advisor
Assoc. Prof. Somporn Choonluchanon	Co-Advisor

Abstract

Phosphate Solubilization Potential and Stress Tolerance of Rhizobacteria from Rice Soil in Northern Thailand

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are known to influence plant growth by various direct or indirect mechanisms. A total of 216 phosphate-solubilizing bacterial isolates were isolated from different rice rhizospheric soil in Northern Thailand. These isolate were screened *in vitro* for their plant growth promoting activities such as solubilization of inorganic phosphate, ammonia (NH₃), catalase and cell wall degrading enzyme activity. It was found that 100 % solubilized inorganic phosphate, 77.77% produced NH₃ and most of the isolates were positive for catalase. In addition, some strains also produced cell wall degrading enzymes such as protease (7%), chitinase (1%), cellulase (3%) and β-glucanase (3%),

as evidenced by phenotypic characters, biochemical tests and quantitative assays using spectrophotometer. The isolates could exhibit more than two or three plant growth promoting (PGP) traits, which may promote plant growth directly, indirectly or synergistically. Part of this study focused on the effect of NaCl, temperature, and pH on a specific the bacterial isolate *Acinetobacter* CR 1.8. Strain CR 1.8 that was able to grow on up to 25 % NaCl, between 25 and 55°C, and at pH 5 to 9. Maximum solubilization of tricalcium phosphate and aluminium phosphate was obtained at neutral pH, and 37°C. Strain CR 1.8 had protease activity but no cellulase, β -glucanase and chitinase activities.

Screening Siderophore Producing Bacteria as Potential Biological Control Agents for Fungal Rice Pathogens in Thailand

Rice (*Oryza sativa*) is a staple food in Thailand and, in addition, feeds around a half of the world's population. Therefore, diseases of rice are of special concern. Rice is destroyed by 2 main pathogens, *Fusarium oxysporum* and *Pyricularia oryzae* the causative agents of root rot and blast in rice respectively. These pathogens result in low grain yield in Thailand and other Southeast Asian countries. Soil samples were taken from paddy fields in Northern Thailand and bacteria were isolated using the soil dilution plate method on Nutrient agar. Some 216 bacterial isolates which were subsequently tested for their siderophore production and effectiveness in inhibiting mycelial growth, *in vitro*, of the rice pathogenic fungi; *Alternaria*, *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae* and *Sclerotium* sp, the causal agent of spot, root rot and blight in rice. It was found that 23 % of the bacteria isolated produced siderophore on both solid and liquid media using dual culture technique, the

siderophore producing rhizobacteria showed a strong antagonistic effect against the *Alternaria* (35.4 %), *Fusarium oxysporum* (37.5 %), *Pyricularia oryzae* (31.2 %) and *Sclerotium* sp (10.4%) strains tested. *Streptomyces* A 130 and *Pseudomonas* MW 2.6 in particular showed a significant higher antagonistic effect against *Alternaria* sp while *Ochrobactrum anthropi* D5.2 exhibited a good antagonistic effect against *F. oxysporum*. *Bacillus firmus* D 4.1 inhibited *P. oryzae* and *Kocuria rhizophila* 4(2.1.1) strongly inhibited *Scelortium* sp. *Pseudomonas aureofaciens* AR1 was the best siderophore producer overall and secreted hydroxamate type siderophore. This strain exhibits an *in vitro* antagonistic effect against *Alternaria* sp., *F. oxysporum* and *P. oryzae*. Siderophore production in this isolate was maximal after 15 days and at an optimal temperature of 30°C, yielding $108.73 \pm 1.39 \mu\text{g ml}^{-1}$ of siderophore. The most effective isolates were identified by biochemical tests and molecular techniques as members of the Genus *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Kocuria* including *B. firmus* D 4.1, *P. aureofaciens* AR1 and *Kocuria rhizophila* 4(2.1.1). The study demonstrated antagonistic activity towards the target pathogens discussed and are thus potential agents for biocontrol of soil borne diseases of rice in Thailand and other countries.

Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production and Plant Growth Promoting Activities

A total of 216 bacterial strains were isolated from rice rhizospheric soils in northern Thailand. The bacterial strains were initially tested for indole acetic acid (IAA) production; selected strains were then tested for optimized conditions for IAA production and whether these caused stimulatory effects on bean and maize seedling growth. It was found that 18.05 % produced IAA. The best IAA producer was identified by biochemical testing and 16S rDNA sequence analysis as *Klebsiella* SN 1.1. In addition to being the best IAA producer, this strain was a high P-solubilizer and produced the highest amount of IAA (291.97 ± 0.19 ppm) in culture media supplemented with L-tryptophan. The maximum production of IAA was achieved after 9 days of incubation. The culture requirements were optimized for maximum IAA production. The tested of IAA production by selected isolates was studied in a medium with 0, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 and 0.9 % (v/v) L-tryptophan. Low levels (12.6 ppm) of IAA production was recorded without tryptophan addition. Production of IAA in *Klebsiella* SN 1.1 increased with an increase to 0.2% (v/v) tryptophan concentration. The production of IAA was further confirmed by extraction of crude IAA from this isolate and subsequent Thin Layer Chromatography (TLC) analysis. A specific spot from the extracted IAA production was found to correspond with a standard spot of IAA with the same R_f value. The *Klebsiella* strain SN 1.1 also demonstrated stimulatory effects on bean seedlings *in vivo*.

Antifungal Activity of a Rhizobacteria Against Plant Pathogenic Fungi

Strain SN 4.1 was isolated from rice rhizospheric soil and identified as *Burkholderia gladioli* on the basis of biochemical tests. This bacterium exhibits a broad-spectrum antifungal activity towards phytopathogenic fungi. The antifungal metabolite produced by SN 4.1 was extracted, purified and characterized using nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectroscopy (MS). Production of indole-3-acetic acid (IAA), catalase, phosphatase, phosphate solubilization activity and protease in SN 4.1 was determined. Strain SN 4.1 did not produce β -glucanase, cellulase and chitinase. The antifungal metabolite produced by SN 4.1 has been identified as pyridine compound on the basis of NMR and MS data. Strain SN 4.1 showed a broad-spectrum antifungal activity towards a range of phytopathogenic fungi. This bacterium also showed several plant growth-promoting traits but did not show the traits attributed to deleterious rhizobacteria. This strain can be used as biofertilizer and antagonist against a range of phytopathogenic fungi that infect rice.

Biocontrol of *Pythium* damping-off in Rice by Rhizobacteria

The *Pythium* biocontrol rhizobacteria strains were examined using a rice seedling emergence bioassay. All strains significantly increased the percentage of seedling emergence following inoculation with approximately 1250 propagal g^{-1} soil of *Pythium*. There was no significant difference between the fresh root weight of three selected bacteria-inoculated and -uninoculated plants in the absence of *Pythium*; however, the plant height, root length and reduction in fungal disease of bacteria-inoculated plants was significantly higher than that of the uninoculated control plants

with bacteria in the presence of *Pythium* spp. This study indicates that selected rhizobacteria strains have potential for control of seedling disease of rice and for plant growth promotion.

Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in Bean by Using Antagonistic Rhizobacteria

Pseudomonas and *Burkholderia* are ubiquitous bacteria that are common inhabitants of the rhizosphere. Six bacterial isolates from the rhizosphere of cocoyam and rice were assessed as potential biocontrol agents in this study. Two different anastomosis groups (AGs) of *Rhizoctonia solani*, the intermediate aggressive AG 2-2 and the highly aggressive AG 4 HGI, were included in experiments with bean plants. Fungal inhibition tests were performed by a plate assay. Biocontrol activity was evaluated in greenhouse trials. All bacterial isolates with antifungal activity against *Rhizoctonia solani* were found as *in vitro* antagonism which was shown as inhibition zones in the dual-culture assay. The wild type strain CMR 12a reduced disease severity caused by both *R. solani* AGs. A biosurfactant-deficient, a phenazine-deficient mutant of CMR 12a and *Pseudomonas* D5.4 still protected bean plants, however, lesser extent compared to wild type. Two mutants deficient in production of both phenazines and biosurfactants and *Burkholderia* SN 4.1 loss their biocontrol activity. Microscopic observations revealed pronounced more branching and denser mycelium of both *R. solani* AGs in all tested bacteria except a mutant deficient in production of phenazines and biosurfactants.

Key words: *Antifungal Activities, Pathogenic fungi, Plant Growth Promoting Activities, Rhizobacteria, Rice*

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

บทบาทของแบคทีเรียบริเวณรากพืชในการส่งเสริมการเจริญของพืชและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา

ผู้เขียน

นางสาวมธุรส ชัยหาญ

ปริญญา

วิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ.ดร.สายสมร ถ้ายอง

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

Prof. Dr. Christian V. Stevens

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รศ. สมพร ชุนท์ลือขานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ศักยภาพในการละลายฟอสเฟตและความทนทานของแบคทีเรียบริเวณรากข้าวในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย

แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญของพืช จะแสดงอิทธิพลต่อการเจริญของพืชโดยวิธีทางตรงและทางอ้อม แบคทีเรียจำนวน 216 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินบริเวณรากข้าวในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย นำมาทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช ได้แก่ ความสามารถในการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟต การผลิตแอมโมเนีย การผลิตเอนไซม์แคตาเลสและเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ จากการทดลอง พบว่า 100 % แสดงความสามารถในการละลายอนินทรีย์ฟอสเฟต 77% ผลิตแอมโมเนีย และ แบคทีเรียทดสอบทั้งหมดแสดงผลบวกต่อการผลิตเอนไซม์แคตาเลส และ บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ในการย่อยผนังเซลล์ ได้แก่ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จำนวน 7% ไคติเนส จำนวน 1% เซลลูเลส จำนวน 3% และ เบต้ากลูคาเนส จำนวน 3% เมื่อทดสอบโดยวิธีชีวเคมีและการวัดค่าการดูดกลืนแสง แบคทีเรียทดสอบแสดงความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืชมากกว่าสองหรือสาม วิธี ทั้งแบบทางตรง ทางอ้อม และ ผลผสมผสาน ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ศึกษาผลของไซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิ และ พีเอช ต่อ *Acinetobacter* ไอโซเลท CR 1.8 สายพันธุ์ CR 1.8 สามารถเจริญในเกลือที่มีความเข้มข้นเกิน 2.5 % ช่วงอุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 25 ถึง 55°C และ ช่วงพีเอชระหว่าง 5 ถึง 9 แบคทีเรียดังกล่าวสามารถละลายไตรแคลเซียมฟอสเฟตและอลูมิเนียมฟอสเฟตได้

สูงที่สุดที่พืชเป็นกลาง ที่อุณหภูมิ 30°C และ สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ เซลลูเลส เบต้ากลูคาเนส และไลติเนส

การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไซเดอโรฟอรัที่มีศักยภาพในการควบคุมราโรคข้าวในประเทศไทย

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญในประเทศไทยและมีการเพาะปลูกในปริมาณครึ่งหนึ่งของโลก เชื้อราที่สำคัญ 2 ชนิด ที่เข้าทำลายข้าวได้แก่ *Fusarium oxysporum* และ *Pyricularia oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุการเกิดโรครากเน่าและโรคใบไหม้ในข้าว เชื้อราก่อโรคทั้งสองชนิดส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลงทั้งในประเทศไทยและกลุ่มประเทศทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จากการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เก็บจากนาบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด จำนวน 216 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตไซเดอโรฟอรัและประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคข้าว ได้แก่ *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae* และ *Sclerotium* sp. ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคใบจุด โรครากเน่า และ โรคใบไหม้ในข้าว พบว่า 23 % ของแบคทีเรียที่แยกได้สามารถผลิตไซเดอโรฟอรับนอาหารแข็งและในอาหารเหลว การทดสอบโดยวิธี dual culture ของจุลินทรีย์ที่ผลิตไซเดอโรฟอรั พบว่า จุลินทรีย์ดังกล่าวแสดงการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ ต่อ *Alternaria* sp. จำนวน 25.4 % *Fusarium oxysporum* จำนวน 37.5 % *Pyricularia oryzae* 31.2 % และ *Sclerotium* sp. จำนวน 10.4 % ของแบคทีเรียที่ทดสอบทั้งหมด *Streptomyces* A 130 และ *Pseudomonas* MW 2.6 แสดงผลการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *Alternaria* sp. อย่างมีนัยสำคัญ และ *Ochrobactrum anthropi* D 5.2 แสดงผลการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *F. oxysporum* *Bacillus firmus* D 4.1 สามารถยับยั้ง *P. oryzae* และ *Kocuria rhizophila* 4(2.1.1) แสดงผลการยับยั้ง *Sclerotium* sp. *Pseudomonas aureofaciens* AR 1 เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตไซเดอโรฟอรัได้ดีที่สุดและผลิตไซเดอโรฟอรัชนิด hydroxamate และ แสดงความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ *Alternaria* sp., *F. oxysporum* และ *P. oryzae* แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิต ไซเดอโรฟอรัได้สูงสุด ปริมาณ $108 \pm 1.39 \mu\text{g ml}^{-1}$ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 15 วัน เมื่อจำแนกชนิดโดยวิธีการทดสอบทางชีวเคมีและเทคนิคทางโมเลกุล พบว่าจัดอยู่ในจีส *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Kocuria* ได้แก่ *B. firmus* D 4.1, *Pseudomonas aureofaciens* AR 1 และ *Kocuria rhizophila* 4(2.1.1) การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อก่อโรค

และ ความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียดังกล่าวในการควบคุมราก่อโรคข้าวในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ

การคัดแยกและการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไอเอเอ และ ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของพืช

แบคทีเรียจำนวน 216 สายพันธุ์ที่แยกได้จากบริเวณรากข้าวในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอินโด การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอเอเอ และ ผลการกระตุ้นการงอกของถั่วและข้าวโพด จากการวิจัยพบว่า 100 % ของแบคทีเรียทดสอบสามารถละลายอนินทรีย์ฟอสเฟต และ 18.05 % ผลิตไอเอเอ จุลินทรีย์ที่ผลิตไอเอเอได้สูงที่สุดนำไปจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่า จัดอยู่ในจีนัส *Klebsiella* SN 4.1 โดยสามารถผลิตไอเอเอได้ในปริมาณ 291.97 ± 0.19 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี L-tryptophan เป็นส่วนประกอบ ไอเอเอผลิตได้สูงที่สุด ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อได้ 9 วัน และ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไอเอเอ คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณของ L-tryptophan 0, 0.1, 0.2, 0.5, 0.7 และ 0.9 % (v/v) และเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มี L-tryptophan เป็นองค์ประกอบแบคทีเรียสามารถผลิตไอเอเอได้ในปริมาณ 12.6 ppm ความสามารถในการผลิตไอเอเอเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ L-tryptophan เท่ากับ 0.2 % (v/v) การผลิตไอเอเอยืนยันผลโดยการสกัดน้ำกรองเลี้ยงเชื้อจากแบคทีเรียและทดสอบโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่าจุดที่ได้จากน้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่สกัดแล้วและจุดที่ได้จากสารมาตรฐาน ไอเอเอ มีความเกี่ยวพันกัน *Klebsiella* SN 1.1 แสดงผลการกระตุ้นการงอกของถั่วและข้าวโพด

สารยับยั้งเชื้อราจากแบคทีเรียบริเวณรากพืชต่อการควบคุมราโรคพืช

สายพันธุ์ SN 4.1 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณรากข้าวและจัดจำแนกโดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมี คือ *Burkholderia gladioli* ซึ่งแสดงคุณสมบัติยับยั้งราโรคพืช สารยับยั้งราก่อโรคพืชจากสายพันธุ์ SN 4.1 ได้นำมาสกัด ทำให้บริสุทธิ์ และ จัดจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิค nuclear magnetic resonance (NMR) และ mass spectroscopy (MS) จากนั้นนำมาทดสอบคุณสมบัติในการผลิตไอเอเอ คาทาเลส ฟอสฟาเตส และการย่อยสลายอนินทรีย์ฟอสเฟต พบว่าสายพันธุ์ SN 4.1 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ เบตาไกลูคาเนส เซลลูเลส และไคติเนส สารยับยั้งเชื้อราจากสายพันธุ์ SN 4.1 คือ สารประกอบไพรีดีน โดยอาศัยข้อมูลการจัดจำแนกของ NMR และ MS สาย

พันธุ์ SN 4.1 แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้หลายชนิดและ สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชแต่ไม่แสดงคุณสมบัติโดยรวมของแบคทีเรียบริเวณรากพืช แบคทีเรียชนิดนี้สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพและจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราก่อโรคข้าว

การควบคุมโรครากเน่าจาก *Pythium* ในข้าวโดยแบคทีเรียบริเวณรากพืช

การควบคุม *Pythium* โดยจุลินทรีย์บริเวณรากข้าว ทดสอบโดยใช้การงอกของเมล็ดข้าวทุกสายพันธุ์เพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดหลังจากการเพาะด้วย 1250 propagules g⁻¹ *Pythium* ชุดทดลองที่เพาะและไม่เพาะแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้งสามชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของน้ำหนักรากสด อย่างไรก็ตาม ความสูงของพืช ความยาวของราก และการลดรากออโรคของ ชุดทดลองที่มีการเพาะแบคทีเรียมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าพืชที่เพาะด้วย *Pythium* แต่ไม่มีการเพาะด้วยแบคทีเรีย การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียบริเวณรากพืชสายพันธุ์ที่ คัดเลือกมีความสามารถในการควบคุม โรคข้าวในระยะการงอก และ ส่งเสริมการเจริญของพืช

การควบคุม *Rhizoctonia solani* ในถั่วงาชีวภาพโดยใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่บริเวณรากพืช

Pseudomonas และ *Burkholderia* เป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในบริเวณรากพืชแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากรากของ cocoyam และ ข้าว ที่แสดงคุณสมบัติควบคุมทางชีวภาพ และ *Rhizoctonia solani* AG 2-2 และ AG 4 HGI ใช้ในการทดสอบในถั่วงา การทดสอบการควบคุมราก่อโรค ใช้วิธี plate assay การควบคุมทางชีววิธีทดสอบในโรงเรือน แบคทีเรียทุกไอโซเลท แสดงขอบเขตการยับยั้ง *Rhizoctonia solani* เมื่อทดสอบแบบ dual-culture CMR 12a สายพันธุ์ต้นแบบลดความสามารถในการเกิดโรคของ *R. solani* AGs ได้ทั้ง 2 ชนิด biosurfactant-deficient CMR 12 a mutant phenazine-deficient CMR 12a mutant และ *Pseudomonas* D 5.4 ยังคงป้องกันถั่วงาแต่มีประสิทธิภาบน้อยกว่าเชื้อต้นแบบ phenazine and biosurfactant-deficient CMR 12a mutant และ *Burkholderia* SN 4.1 สูญเสียความสามารถในการควบคุมโรคพืช การตรวจสอบได้กล้องจุลทรรศน์ แสดงให้เห็นการแตกกิ่งและความหนาที่บวมของเส้นใย *R. solani* AGs ในแบคทีเรียทดสอบทุกชนิด ยกเว้น phenazine and biosurfactant-deficient CMR 12a mutant

คำสำคัญ: การยับยั้งเชื้อรา, เชื้อราก่อโรค, จุลินทรีย์บริเวณรากพืช, การส่งเสริมการเจริญของพืช, ข้าว