ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาลักษณะของอาร์เอ็นเอเส้นคู่ในเชื้อไตรโคเดอร์มาที่แยกได้ในจังหวัดเชียงใหม่

ผู้เขียน นางสาวโสภา จอมอิ่น

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. อังสนา อัครพิศาล	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. ชาตรี สิทธิกุล	กรรมการ
ผศ. ดร. วิชชา สอาดสุด	กรรมการ

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากวัสดุเพาะในฟาร์มเห็ด ตัวอย่างดินในแปลงเกษตรกร และสารชีวภัณฑ์ โดยวิธี dilution plate ได้จำนวนทั้งหมด 156 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาการเจริญของเส้นใยเชื้อรา บนอาหาร PDA สามารถแบ่งอัตราการเจริญออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1. เจริญเร็ว จำนวน 71 ไอโซเลท 2. เจริญปานกลาง จำนวน 78 ไอโซเลท และ 3. เจริญช้า จำนวน 7 ไอโซเลท พบว่ามีอัตราการเจริญเฉลี่ย ± SD เท่ากับ 32.30 ± 1.62, 27.17± 2.32 และ 19.48 ± 0.56 มิลลิเมตรต่อวันตามลำดับ และศึกษาการสร้างสปอร์ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 วัน สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1. สร้างสปอร์มากกว่า 10×10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร จำนวน 35 ไอโซเลท 2. สร้างสปอร์อยู่ระหว่าง 5-10 $\times 10^{10}$ สปอร์ /มิลลิลิตร จำนวน 81 ไอโซเลท และ 3. สร้างสปอร์น้อยกว่า 5×10^{10} สปอร์ /มิลลิลิตร จำนวน 40 ไอโซเลท พบว่าทั้ง 3 กลุ่ม มีปริมาณการสร้างสปอร์เฉลี่ย ± SD เท่ากับ $13.04 \pm 2.52 \times 10^{10}$, $7.37 \pm 1.28 \times 10^{10}$ และ $3.22 \pm 1.22 \times 10^{10}$ สปอร์ /มิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้งหมด 156 ไอโซเลท มาสกัดหา double-stranded RNA (dsRNA) พบ dsRNA จากเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท คือ TM10 โดยพบแถบของ dsRNA มีขนาดประมาณ 1000 bp และ TM20 พบ dsRNA 2 แถบคือขนาดประมาณ 700 bp และ 1100 bp เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma* spp. ไอโซเลท TM10 และ TM20 ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง สลับกับการเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว subculture ทำเช่นนี้เป็นจำนวน 10 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อเป็นการขจัด dsRNA โดยการใช้ความร้อน ผลปรากฏว่าเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท มีอัตราการเจริญและการสร้างสปอร์เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามยังคงพบ dsRNA อยู่ภายในเส้นใย เมื่อตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ exo-chitinase พบว่าทุกไอโซเลทที่นำมาศึกษาคือ T15, T42, T75, TM10, TM20 TM10h และ TM20h ไม่มีความแตกต่างกัน และเมื่อนำเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทั้ง 7 ไอโซเลทดังกล่าว มาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยเทคนิค dual culture พบว่าไอโซเลท T15, T42 และ T75 ซึ่งไม่ปรากฏ dsRNA มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคเท่ากับ 71.67, 54.93 และ 60.79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท TM10, TM20, TM10h และ TM20h ที่พบ dsRNA มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเท่ากับ 25.42, 24.62, 28.52 และ 26.74 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในสภาพเรือนทดลอง พบว่าไอโซเลท T15 และ T75 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุได้ดี โดยพบการเกิดโรคกับต้นพืชเพียง 25.00 เปอร์เซ็นต์ทั้ง 2 ไอโซเลท และ T42 ก็พบการเกิดโรคเท่ากับ 48.75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลท TM10, TM20, TM10h และ TM20h มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต่ำเท่ากัน คือพืชแสดงอาการการเกิดโรคเท่ากับ 72.50, 66.25, 62.25 และ 63.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการปรากฏของ dsRNA ใน *Trichoderma* ทั้งไอโซเลท TM10 และ TM20 มีผลต่ออัตราการเจริญ การสร้างสปอร์ และความรุนแรงในการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Characterization of Double-stranded RNA in *Trichoderma* spp. Isolates in Chiang Mai Province

Author Miss Sopa Jom-in

Degree Master of Science (Plant Pathology)

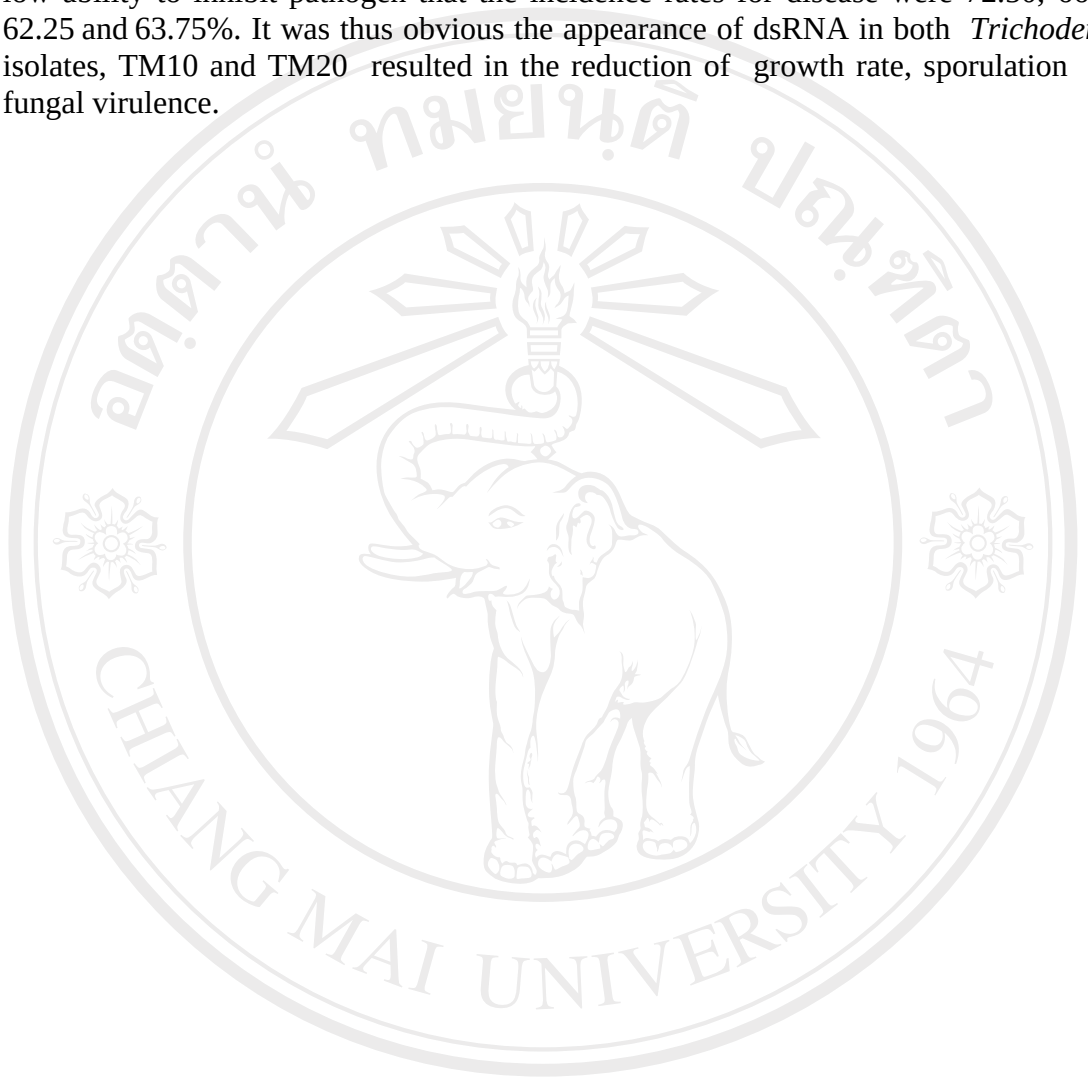
Thesis Advisory Committee
Asst. Prof. Dr. Angsana Akarapisan Chairperson
Asst. Prof. Dr. Chatree Sittigul Member
Asst. Prof. Dr. Vicha Sardsud Member

Abstract

One hundred and fifty-six isolates of *Trichoderma* spp. were collected from mushroom growth media, farm lands and commercial biological product by dilution plate method. Based on growth rate property on PDA medium, the fungal isolates could be separated into 3 groups which are high 32.30 ± 1.62 mm per day (71 isolates), moderate 27.17± 2.32 mm per day (78 isolates) and low 19.48 ± 0.56 mm per day (7 isolates). Afterwards, the sporulation attributes of all 156 isolates was studied. The fungi were cultivated under room temperature for 10 days. It was found that the fungi were classified base on sporulation into 3 groups. The first group sporulated more than 10×10^{10} spores/ml (35 isolates), the second group sporulated around $5\text{-}10 \times 10^{10}$ spores/ml (81 isolates) and the last group sporulated less than 5×10^{10} spores/ml (40 isolates). The result indicated the average sporulation value of all this 3 groups which are $13.04 \pm 2.52 \times 10^{10}$, $7.37 \pm 1.28 \times 10^{10}$ and $3.22 \pm 1.22 \times 10^{10}$ spores/ml respectively. One hundred and fifty-six isolates of *Trichoderma* spp. were examined for the presence of dsRNA. Two of the isolates contained dsRNA elements. One dsRNA segment of 1000 bp was evident from isolate TM10. Two dsRNA segments of 700 and 1100 bp were found in isolate TM20. The isolates TM10 and TM20 were incubated at 37 ^{o}C for heat therapy to eliminate dsRNA (3 hours) then incubated in the room temperature for 24 hours, alternately and subcultured for 10 times. It was found that both fungal isolates gained the higher growth rate and sporulation, however dsRNA could be found. Production of exo-chitinase enzyme from T15, T42, T75, TM10, TM20, TM10h and TM20h isolates was evaluated, there was no significant in enzyme production. The 7 isolates of fungi were evaluated for antagonistic activity to *Sclerotium rolfsii* by dual culture technique. Percentage of growth inhibition of *S. rolfsii* by *Trichoderma* spp. isolates T15, T42 and T75 free from dsRNA were 71.67, 54.93 and 60.79% respectively. Meanwhile, the dsRNA-containing isolates TM10, TM20, TM10h and TM20h showed low inhibition percentages which were 25.42, 24.62, 28.52 and 26.74. The results of greenhouse experiment indicated that *Trichoderma* spp. T15 and T75 showed a high ability of inhibitory effects

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

on plant pathogen that percentages of disease incidences were 25.00% for both of the isolates and 48.75% for the T42 isolate. TM10, TM20, TM10h and TM20h isolates had low ability to inhibit pathogen that the incidence rates for disease were 72.50, 66.25, 62.25 and 63.75%. It was thus obvious the appearance of dsRNA in both *Trichoderma* isolates, TM10 and TM20 resulted in the reduction of growth rate, sporulation and fungal virulence.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved