

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความผันแปรของลักษณะฟีโนไทป์จีโนไทป์ และการเป็นปฏิปักษ์ของเชื้อเอนโดไฟท์ดึก แอคติโนมัยซีส ของพืชตระกูลกะหล่ำเพื่อควบคุมโรคใบจุด

ผู้เขียน นางสาวไพลิน ถาใจ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชวนพิศ บุญชิตสิริกุล ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อเอนโดไฟท์ดึก แอคติโนมัยซีสทั้งหมด 75 ไอโซเลท จากบริเวณราก ใบ และลำต้นของพืชที่ปลูกได้แก่ ผักกาดฮ่องเต้ (PAI-D) ผักคะน้า (KAL) ผักกาดเขียวปลี (IN-MUS) ผักกวางตุ้ง (CH-MUS) และกะหล่ำดอก (CAU) โดยใช้อาหาร inhibitory mold agar (IMA-2) ซึ่งเป็นตัวอย่างพืชเก็บมาจากพื้นที่ 2 แหล่งคือ บริเวณที่ราบ และที่สูง โดยสามารถแยกเชื้อได้จาก ผักกาดฮ่องเต้จำนวน 36 ไอโซเลท ผักคะน้าจำนวน 12 ไอโซเลท ผักกาดเขียวปลีจำนวน 5 ไอโซเลท ผักกวางตุ้งจำนวน 7 ไอโซเลท และกะหล่ำดอกจำนวน 15 ไอโซเลท จากการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเอนโดไฟท์ดึก แอคติโนมัยซีส โดยอาศัยลักษณะเส้นใย สีของโคโลนี รังควัตถุ ก้านชูสปอร์ และการเรียงตัวของสปอร์ พบว่าสามารถแบ่งเชื้อทั้ง 75 ไอโซเลทได้ 4 สกุล ได้แก่ *Streptomyces*, *Nocardiosis*, *Nocardioide* และ *Nocardia* เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อรา *Alternaria brassicicola* และ *Cercospora* sp. สาเหตุโรคใบจุดของพืชตระกูลกะหล่ำ ด้วยวิธีการ dual culture พบว่า เชื้อเอนโดไฟท์ดึก แอคติโนมัยซีส สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* อยู่ระหว่าง 24.78 - 72.77% และเชื้อรา *Cercospora* sp. อยู่ระหว่าง 16.02 - 54.05% โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสที่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดทั้ง 2 ชนิดได้ดี ได้แก่ ไอโซเลท PAI-D1, IN-MUS1, CAU1 และ KAL8 เมื่อนำเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทมาศึกษาการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ และความเป็นกรดเป็นด่างที่แตกต่างกัน พบว่า

ไอโซเลท PAI-D1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 °C แต่ไอโซเลท CAU1 และ KAL8 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิระหว่าง 20-25 °C ส่วนไอโซเลท IN-MUS1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 °C เช่นเดียวกับอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแอกติโนมัยซีสในสภาพแวดล้อม จากการทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง พบว่าเชื้อส่วนใหญ่คือ ไอโซเลท PAI-D1, CAU1 และ KAL8 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5-9 ยกเว้นไอโซเลท IN-MUS1 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 9 เมื่อนำเชื้อที่ได้คัดเลือกไอโซเลท CAU1, KAL8 และ PAI-D1 มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าสปอร์มีลักษณะเป็นท่อนกลม เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ จากลักษณะรายละเอียดของโครงสร้างสปอร์ของเชื้อจะจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อ *Streptomyces* sp. ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทอยู่ในสกุล *Streptomyces* และเมื่อนำเชื้อเอนโดไฟต์ติก แอกติโนมัยซีสทั้งหมดมาวิเคราะห์หาความใกล้เคียงของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อเอนโดไฟต์ติก แอกติโนมัยซีสทั้ง 60 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่าผลผลิตของ PCR ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ลำดับเบส 16S rDNA มีขนาด 1,500 คู่เบส เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *EcoRV*, *KpnI* และ *PstI* พบว่ารูปแบบการตัดของเอนไซม์ *PstI* สามารถจัดกลุ่มของ *Streptomyces* ทั้งหมดออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A 34 ไอโซเลท กลุ่ม B 7 ไอโซเลท กลุ่ม C 3 ไอโซเลท และกลุ่ม D 2 ไอโซเลท ตามลำดับโดยเชื้อ *Streptomyces* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคแผลสะเก็ดของมันฝรั่ง 2 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม B ในขณะที่กลุ่มที่ให้ผลการยับยั้งสูงที่สุดคือ PAI-D1 อยู่ในกลุ่ม A อย่างไรก็ตามพบว่าไม่สามารถกลุ่มที่ไม่ใช่ *Streptomyces* ได้แก่ *Nocardiosis*, *Nocardioidea* และ *Nocardia* ออกจากกลุ่ม *Streptomyces* ได้ ซึ่งพบว่าวิธี PCR-RFLP ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ในระดับสกุล แต่วิธีการนี้มีความสำคัญในการจำแนกระดับสายพันธุ์ และระดับไบโอไทป์

Thesis Title Phenotypic, Genotypic and Antagonistic Variation Among Endophytic Actinomycetes Implicated in Crucifer to Control Leaf Spot

Author Miss Phailin Thachai

Degree Master of Science (Plant Pathology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Chuanpit Boonchitsirikul Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Sombat Srichuwong Member

Abstract

Seventy five endophytic actinomycete strains were isolated from root, leaf and stem of healthy Pai-tsai (PAI-D), Chinese kale (KAL), Indian mustard (IN-MUS), Chinese mustard (CH-MUS) and cauliflower (CAU) on inhibitory mold agar (IMA-2) medium. The samples were collected from both high and lowland areas. The isolates could be divided into 36 isolates from Pai-tsai, 12 isolates from Chinese kale, 5 isolates from Indian mustard, 7 isolates from Chinese mustard and 15 isolates from cauliflower. According to their microscopic and morphological examination of the presence of aerial mycelium, colony color, diffusible pigment, sporophore and spore chain morphology. Seventy five isolates could be grouped into 4 genera; *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Nocardioide* and *Nocardia*. Screening of the isolates for antimicrobial activity to *Alternaria brassicicola* and *Cercospora* sp. causing leaf spot disease by dual culture method found that the inhibition to *A. brassicicola* varied from 24.78-72.77% and *Cercospora* sp. varied from 16.02 - 54.05%. Four isolates; PAI-D1, IN-MUS1, CAU1 and KAL8 were good inhibitors for both pathogens. These four isolates were examined with regard to their growth in different temperature and pH condition. The optimum growth temperature varied from one isolate to another. PAI-D1 isolate grew well at 40 °C, but CAU1 and KAL8 isolate registered optimum growth between 20-25 °C, whereas the other isolate IN-MUS1 grew the best at 20 °C. Like temperature, pH also played a role in determining the ability of actinomycete to grow in particular

environments. Most isolates PAI-D1, CAU1 and KAL8 grew optimally within a range of pH between 5-9, except IN-MUS1 which grew well at pH 9. An examination of selected isolates CAU1, KAL8 and PAI-D1 by scanning electron microscope revealed that the individual spores were of round shape and presented a chain of spores. The details of spore structure placed them in the genus *Streptomyces*. The results confirmed that these three isolates were *Streptomyces*. The approximate phylogenetic relationships among 60 endophytic actinomycetes was demonstrated by using Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) analysis. PCR amplification using primers base on nucleotide of 16S rDNA sequencing produced a fragment of 1,500 bp. To distinguish between actinomycetes isolates, PCR product was digestion with three restriction enzymes *EcoRV*, *KpnI* and *PstI*. In the restriction patterns of *PstI* enzymes, *Streptomyces* could be divided into 4 groups; group A 34 isolates, group B 7 isolates, group C 3 isolates and group D 2 isolates, respectively. The 2 potato scab-inducing strains belong to group B, while the best antagonistic isolate PAI-D1 belonged to group I. However, non-streptomyces, *Nocardiosis*, *Nocardioidea* and *Nocardia* did not split out from genus *Streptomyces*. PCR-RFLP were not found relationship at genus level, but there were important differences at species and biotype level.