ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การจำแนกชนิดของเชื้อ *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครากเน่าของส้มโดยการใช้เทคนิค PCR และการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์

ผู้เขียน นางสาวปนัดดา อินพิทักษ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. อังสนา อัครพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

อ. ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ส้มสายน้ำผึ้งเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปลูกมากในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ปัญหาสำคัญที่พบในการในการผลิตส้ม คือโรครากเน่าของส้มที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora* spp. ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญก่อให้เกิดความเสียหายกับส้มสายน้ำผึ้ง จากการแยกและศึกษาพบเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ OR01, OR02, OR03 และ OR04 ที่มีลักษณะการเจริญบนอาหาร PDA เป็นแบบ arachnoid ในทุกไอโซเลท ส่วนลักษณะของ sporangium มี 2 แบบคือ ellipsoid และ ovoid มองเห็น papilla ชัดเจน ทำการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้เทคนิค PCR ด้วย specific primer Par1s (forward primer) (5'-ACGTTTGGGCTTCGGCCTGATT-3') และ Par2a (reverse primer) (5'-GATGCATACCGAAGTACACATTA-3') ซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ *Phytophthora parasitica* พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 680 bp ในทุกไอโซเลท ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อ *P. parasitica* ที่แยกจากดินบริเวณต้นที่แสดงอาการของโรค

ทำการแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดินบริเวณรอบ ๆ รากส้ม พริกกะเหรี่ยง และมะเขือเทศ จำนวน 88 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P parasitica* ทั้ง 4 ไอโซเลทด้วยวิธีเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ (dual culture technique) พบแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยสูงสุดได้แก่ T14, TKM61 และ TKM65 โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญอยู่ในระหว่าง 24.25-58.00 จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าเมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรียทั้ง 88 ไอโซเลท บนอาหารทดสอบคือ carboxymethyl cellulose agar (CMC), czapec solution agar (CZA) และ colloidal chitin agar (CCA) โดยคัดเลือกจากการปรากฏ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

บริเวณใสรอบรอยเจริญของเชื้อ พบว่าแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท มีการสร้างเอนไซม์ cellulase โดยที่ไอโซเลท D11 และ T15 มีการสร้างเอนไซม์มากที่สุดซึ่งให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเท่ากับ 25.5 และ 21.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ แบคทีเรียเพียง 1 ไอโซเลท คือ CMM103 มีการสร้างเอนไซม์ phosphatase โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเท่ากับ 16 มิลลิเมตร แบคทีเรียทั้ง 88 ไอโซเลท ไม่มีการสร้างเอนไซม์ chitinase

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการเจริญของต้นส้ม ในสภาพเรือนทดลอง พบว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของต้นส้ม และการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นส้มโดยเพิ่มน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง โดยแบคทีเรียไอโซเลท TKM61 และ TKM65 ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นส้มสูงที่สุด เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรครากเน่าของส้มในสภาพเรือนทดลอง โดยการใช้สารแขวนลอยของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13, T14, TKM61 และ TKM65 ก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุ พบว่าหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 75 วัน กรรมวิธีที่ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T13 และ TKM61 ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่าการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท T14 และ TKM65 ในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีระดับการเกิดอาการเหี่ยวเป็น 1.00 และ 1.08 ตามลำดับ เกิดความเสียหายต่อระบบราก เป็น 1.50 และ 1.08 ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อโดยมีระดับการเกิดอาการเหี่ยว และเกิดความเสียหายต่อระบบรากเป็น 1.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Identification of *Phytophthora* spp. Causing Citrus Root Rot Disease by PCR Technique and Controlling the Disease with Bacterial Antagonists	
Author	Miss Panadda Inpitak	
Degree	Master of Science (Plant Pathology)	
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Angsana Akarapisan	Advisor
	Lect. Dr. Yaowaluk Chanbang	Co-advisor

Abstract

Tangerines cv. Sai Nam Pung has an economic important crop in Fang District, Chiang Mai Province. Citrus root rot disease caused by *Phytophthora* spp. is one of the most destructive soilborne disease results in devastating yield loss in Tangerines cv. Sai Nam Pung. Four isolates of pathogen: OR01, OR02, OR03 and OR04 were found. All Isolates tested growth patterns on PDA had arachnoid patterns. All isolates produced ellipsoid and ovoid sporangia and prominently papillate. Identification of the pathogen by PCR amplification with specific primers Par1s (forward primer) (5'-ACGTTTGGGCTTCGGCCTGATT-3') and Par2a (reverse primer) (5'-GATGCATACCGAAGTACACATTA-3') were specific for *Phytophthora parasitica* and the specific fragment of 680 bp was amplified from all isolates which isolated from soil in citrus infected fields.

Eighty-eight isolates of bacteria were isolated from the rhizosphere of tangerines, chillis and tomatos. The isolates were purified and assayed *in vitro* against four isolates of *P. parasitica* by dual culture technique. Among the 88 isolates tested, 3 isolates; T14, TKM61 and TKM65, showed antagonistic activity against the mycelium growth of *Phytophthora parasitica*, with inhibition percentage 24.25-58.00. A total of eighty-eight bacteria isolates were screened for enzyme activities using carboxymethyl cellulose agar (CMC), czapec solution agar (CZA) and colloidal chitin agar (CCA), was conducted using clear zone technique to screen the bacteria. The cellulase activity was detected for 14 isolates, the isolates D11 and T15 expressed high activity of enzyme cellulase represented clear zone of diameters, 25.5 and 21.5 mm.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

respectively. The phosphatase activity was detected from isolate CMM103 showed clear zone of diameters, 16 mm. The chitinase activity was not detected from the 88 isolates.

Greenhouse trials were evaluated for their ability of these three antagonistic isolates. The results showed that using of antagonistic bacterias were not effective in suppressing the growth of tangerines. The antagonistic bacteria promoted plant growth by increasing fresh and dry weights. The results showed the highest efficiency that treatment of tangerines with the isolate TKM61 and TKM65. The control efficacy antagonistic isolates; T13, T14, TKM61 and TKM65 were investigated in controlling citrus root rot disease. Efficacy tests were performed in greenhouse by root drenched prior to inoculation of the pathogens. After 75 days, treatment with isolate T13 and TKM61 showed the best results controlling capabilities were more effective than isolate T14 and TKM65 ($p<0.01$). The isolates T13 and TKM61 had the level of wilt of 1.00 and 1.08 respectively and the level of root rot of 1.50 and 1.08 respectively, which was not significantly different from the uninoculated control had the level of wilt and root rot of 1.00.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved