ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ สูตรชีวภัณฑ์ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคทางดินของมะเขือเทศ

ผู้เขียน นางสาวณิชกานต์ นเรวุฒิกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.อังสนา อัครพิศาล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

อ.ดร.เยาวลักษณ์ จันทร์บาง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จากการศึกษาและแยกเชื้อ พบโรคทางดินที่สำคัญของมะเขือเทศ คือเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรครากและโคนเน่า เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง และเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียว จากนั้นทำการแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากมะเขือเทศและพริก จำนวน 33 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธี dual culture และวิธี disc diffusion สำหรับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลท คือ CMM11 และ CMM7 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* ได้ดี โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง คือ 28.00 และ 25.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพที่ดีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC2 และCMM5 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งคือ 38.00, 36.40 และ 36.40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพียงไอโซเลทเดียว คือ TKC1 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ดีที่สุด โดยขนาดความกว้างของบริเวณใส คือ 2.70 มิลลิเมตร

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์ 9 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ คือ TKC1, TKC2, TKC3, TKC4, TKC10, TKC11, CMM7, CMM13 และCMM14 และสามารถผลิตเอนไซม์ฟอสฟาเตสมีเพียงไอโซเลท CMM13 ที่สามารถผลิตได้ และในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส มีแบคทีเรียปฏิปักษ์ 25 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตได้ คือ TKC1, TKC3, TKC4, TKC5, TKC6, TKC7, TKC8, TKC9, TKC10, TKC11, TKC12, CMM1, CMM2, CMM3, CMM4, CMM5, CMM7, CMM8, CMM11,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

CMM13, CMM15, CMM16, CMM17, CMM19 และCMM20 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ยูรีเอส และแคตาเลสได้

จากผลการทดลองขั้นต้นได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 5 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC7, TKC10, CMM11 และCMM13 ที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคทางดินในสภาพห้องปฏิบัติการ และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ดี มาพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผง สารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมัน แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบผงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ดีกว่าสารชีวภัณฑ์ในรูปแบบสารละลายเข้มข้น และสารละลายน้ำมัน โดยสูตรสารชีวภัณฑ์ T01R มีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคทางดิน และมีต้นทุนในการผลิตที่ไม่สูงเมื่อเทียบกับสูตรอื่นๆ จึงได้คัดเลือกสารชีวภัณฑ์ในสูตร T01R มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคในสภาพเรือนทดลอง โดยเมื่อทดสอบการควบคุมเชื้อรา *S. rolfsii* เชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* และเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าในกรรมวิธีที่ใช้สูตรสารชีวภัณฑ์ก่อนและหลังการปลูกเชื้อสาเหตุ ช่วยลดระดับการเกิดโรคได้ดี โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุมที่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคอย่างเดียว และสำหรับการใช้สูตรสารชีวภัณฑ์ C13R ทดสอบกับต้นมะเขือเทศ พบว่าไม่ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติ และช่วยส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศได้ดี โดยสังเกตจากความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท TKC1 ด้วยชุดทดสอบระบบ API 50 CH พบว่าคือเชื้อ *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* และตรวจพบตำแหน่งของยีนที่สร้างสาร subtilosin ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 bp ในเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท คือ TKC1, TKC10 และCMM11

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Bioproduct Formulations of Bacterial Antagonists for Control of Tomato Soil Borne Diseases

Author Miss Nitchakarn Nareawuttikun

Degree Master of Science (Plant Pathology)

Thesis Advisory Committee Asst. Prof. Dr. Angsana Akarapisan Advisor

Lect. Dr. Yaowaluk Chanbang Co-advisor

Abstract

Isolation of the tomato soil borne pathogen were found Sclerotium root and stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii,* Fusarium wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and Bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. Thirty-three antagonistic bacterial isolates were obtained from aerial parts and rhizoshere of tomatos and chillis. The bacterial isolates were purified and assay *in vitro* against of *S. rolfsii* and *F.oxysporum* f. sp. *lycopersici* by dual culture and *R. solanacearum* by disc diffusion technique**.** Among the 33 bacterial isolates tested, 2 isolates; CMM11 and CMM7 showed the highest percentages of growth inhibition of *S. rolfsii* with 28.00 and 25.6 respectively, 3 isolates; TKC1, TKC2 and CMM5 showed the highest percentages of growth inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* with 38.00, 36.40 and 36.40 respectively, and only one isolated; TKC1 showed the highest of growth inhibition of *R. solanacearum* of the clear zone around the colonies with 2.7 mm.

A total of 33 bacterial isolates were tested for their enzyme production. The results showed 9 isolates; TKC1, TKC2, TKC3, TKC4, TKC10, TKC11, CMM7, CMM13 and CMM14 for their ability to produce cellulase enzyme and only one isolate; CMM13 for their ability to produce phosphatase enzyme that showed positive results with clear zone around the colonies, and detected for 25 isolates; TKC1, TKC3, TKC4, TKC5, TKC6, TKC7, TKC8, TKC9, TKC10, TKC11, TKC12, CMM1, CMM2, CMM3, CMM4, CMM5, CMM7, CMM8, CMM11, CMM13, CMM15, CMM16, CMM17, CMM19 and CMM20 for their ability to produce amylase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

enzyme. However, all bacteria isolates showed positive results for their ability to produce urease and catalase enzyme.

Selection of effective antagonistic bacteria 5 isolates for controlling of all pathogen and the ability to produce enzymes in vitro to generate the wettable powder, soluble concentrate and emulsifiable concentrate formulation. The various bioproduct formulation assay in vitro against of *S. rolfsii, F.oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *R. solanacearum*. The results showed that the wettable powder formulation were effective than the soluble concentrate and emulsifiable concentrate formulation for controlling pathogens. The T01R formulation showing the effective for control of all pathogen was selected and assessed in a greenhouse experiment. The result in the significant reduction of symptom development when T01R was applied before and after pathogen infection on tomato plant compared with the pathogen alone. And C13R formulation also had growth promotion activity, which show the increased heigth and weight of tomato compared with distilled water control. The API 50 CH system identification kits identified isolate TKC1 as Bacillus subtilis/ amyloliquefaciens. The detection of subtilosin gene of 5 antagonistic bacteria isolates by using specific primer extension analysis. The results show that TKC1, TKC10 and CMM11 isolate had 1500 bp DNA fragment of subtilosin gene (sbo).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved