ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสต่อเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริก

ผู้เขียน นางสาวพรนภา โทตรี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. สรัญยา วัลยะเสวี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
อาจารย์ ดร. ชาติชาย โขนงนุช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก พบว่าเมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินบนดอยสุเทพ-ปุยจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ SEA120-4, SEA120-28, SEA120-38, OMA60-1, OMA60-7 และ OMA60-34 มาเลี้ยงในอาหาร enzyme production medium (EPM) ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทดสอบยับยั้งการเจริญเส้นใยและการงอกสปอร์ของเชื้อราด้วยวิธี agar well method โดยแบ่งน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเป็น 2 ส่วน ได้แก่ น้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้กรองสปอร์ของเชื้อแอคติโนมัยซีทออก (non-culture filtrate; NF) และน้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่กรองสปอร์ออก (culture filtrate; F) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คืออาหาร EPM พบว่า น้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิด NF ของทุกไอโซเลทให้ผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกสปอร์ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้สูงกว่าน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด F โดยน้ำกรองเลี้ยงเชื้อชนิด NF และ F ของเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท OMA60-1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเขย่าเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วันเป็นต้นไป และพบว่า เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* เมื่อเขย่าเป็นเวลา 3 วัน มีค่าเท่ากับ 56.39 และ 51.78% ตามลำดับ ในขณะที่สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* ได้เท่ากับ 64.40 และ 54.07% ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท พบว่าแอคติโนมัยซีททุกไอโซเลทผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยไอโซเลท OMA60-1 มีปริมาณเอนไซม์ไคติเนสในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อสูงสุดเท่ากับ 0.15 U/ml หลังจากนั้นเริ่มมีค่าลดลงเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิด F ของไอโซเลท OMA60-1 ที่เขย่าเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3, 5 และ 6 วันมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 10 kDa MW cut-off พบว่าส่วนของสารละลายที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง (MW >10 kDa) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูง ในขณะที่สารละลายที่ผ่านแผ่นกรอง (MW <10 kDa) พบเพียงเล็กน้อย เมื่อนำมาทดสอบยับยั้งการเจริญเส้นใยและการงอกสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* พบว่าสารละลายที่ไม่ผ่านแผ่นกรองให้ผลการยับยั้งการเจริญเส้นใยและการงอกสปอร์ของเชื้อราได้สูงกว่าสารละลายที่ผ่านแผ่นกรอง

เมื่อนำน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทของไอโซเลท OMA60-1 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนผลพริกชี้ฟ้า พบว่าพริกที่แช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทก่อนปลูกเชื้อสาเหตุทั้ง 2 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าพริกที่แช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทภายหลังการปลูกเชื้อ ซึ่งพริกที่แช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิด F เป็นเวลา 5 นาที ให้ผลการยับยั้งได้ดีเทียบเท่ากับการใช้แบคทีเรีย *Baciilus subtilis* ซึ่งเป็นสารชีวภัณฑ์ทางการค้า และการแช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิด NF รองลงมาคือการแช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิด F เป็นเวลา 3 และ 1 นาที ตามลำดับ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทไอโซเลท OMA60-1 ต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในระยะต้นกล้าพบว่า การแช่เมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิด NF และ F ให้ผลการยับยั้งการเกิดโรคได้ดีและมีเปอร์เซ็นต์ความงอกไม่แตกต่างจากการใช้ captan และ *B. subtilis* ทั้งการเพาะบนจานอาหาร PDA และการเพาะลงดินที่ฆ่าเชื้อแล้ว

การทดสอบคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของผลพริกที่แช่ในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทชนิด F ในเวลาต่างๆ กันพบว่า การแช่ผลพริกเป็นเวลา 5 นาที มีอายุการเก็บรักษาสั้นกว่าการแช่ผลพริกเป็นเวลา 1 และ 3 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเริ่มแสดงอาการผิดปกติอยู่ในเกณฑ์ที่ผู้บริโภคยอมรับไม่ได้คือ มีกลิ่นผิดปกติ และผลพริกเริ่มนิ่มเละ เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 10 วันเป็นต้นไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title The Effect of Chitinase Producing Actinomycete Culture Filtrate on *Colletotrichum* spp. Causing Chilli Anthracnose

Author Miss Pornnapa Thotree

Degree Master of Science (Postharvest Technology)

Thesis Advisory Committee Lect. Dr. Sarunya Valyasevi Advisor

Lect. Dr. Chartchai Knongnuch Co-advisor

ABSTARCT

This study was conducted to evaluate the efficiency of culture medium from soil actinomyces against *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. capsici* causing chilli anthracnose disease. Six actinomycete isolated from Doi Suthep-Pui soil: SEA120-4, SEA120-28, SEA120-38, OMA60-1, OMA60-7 and OMA60-34, were cultivated on enzyme production medium (EMP) at 28 °C for 7 days. After that, culture medium of each isolate was separated in 2 parts: non-culture filtrate (NF) and culture filtrate (F), were tested against *Colletotrichum* spp. using agar well method and EMP as a control. The results showed a significant difference in the inhibitory activity between non-culture filtrate (NF) and culture filtrate (F) from all tested actinomycete. The inhibitory activity of both NF and F were increased after 3-day actinomycete culture. Non-culture filtrate and culture filtrate of isolate OMA60-1 had the highest inhibitory efficacy of both fungi. After 3-day actinomycete culture, they could inhibit mycelial growth of *C. gloeosporioides* at 56.39 and 51.78%, respectively, while *C. capsici* was inhibited at 64.40% and 54.07%, respectively.

Chitinase activity of culture filtrate was measured. The results showed chitinase was produced in all actinomycete isolates in verying degree and isolate OMA60-1 produced the highest level of chitinase activity (0.15 U/ml) at 3-day culture after that it was decreased until 7-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

day culture. After ultrafiltration (10 kDa MW cut-off) of culture filtrate (F) at 3, 5 and 6-day actinomycete culture, the fraction 1 (MW >10 kDa) showed the highest chitinase activity while the fraction 2 (MW <10 kDa) was detected a few amount. When fraction 1 and 2 were tested for the inhibitory effect on mycelial growth and spore germination of *C. gloeosporioides*. The results showed the fraction 1 was more effective inhibiting the mycelial growth and spore germination than the fraction 2.

Non-culture filtrate (NF) and culture filtrate (F) of isolate OMA60-1 were tested for controlling of anthracnose disease on chilli. The results showed the chilli fruits were dipped in non-culture filtrate (NF) and culture filtrate (F) before inoculation with spore suspension of both pathogenic fungi had the percentage of disease incidence less than the chilli dipped in non-culture filtrate (NF) and culture filtrate (F) after inoculation. The biocontrol efficacy of dipping in culture filtrate (F) for 5 mins was not different from using commercial *Bacillus subtilis* and non-culture filtrate (NF). While dipping in culture filtrate (F) for 3 and 1 min were less effective, respectively. The prevention of pathogenic fungi on seed was observed. After inoculation with *C. gloeosporioides* and *C. capsici*, seeds were treated with captan, *B. subtilis*, non-culture filtrate (NF) and culture filtrate (F). The biocontrol efficacy of all treatment were not different when cultivated on PDA and sterile soil.

When evaluated the postharvest quality of chilli fruits after dipping in culture filtrate (F) and kept at 25 $^{\circ}$C. It was found that the chilli fruits dipped in culture filtrate (F) for 5 mins had a shelf-life less than dipping in culture filtrate (F) for 3 and 1 min, respectively. They showed the abnormal symptom such as off-flavour and soft texture after kept for 10 days.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved