

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การเคลือบเมล็ดข้าวโพดด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และการตรวจสอบการเจริญของเชื้อราในต้นกล้าโดยเทคนิคพีซีอาร์

**ผู้เขียน** นางสาวพัชราภรณ์ พุทธรัง

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชวนพิศ บุญจิตสิริกุล ประธานกรรมการ  
รองศาสตราจารย์ ดร. สมบัติ ศรีชวงส์ กรรมการ

อาจารย์วราภรณ์ ประกอบ กรรมการ

### บทคัดย่อ

จากการทดสอบ การเจริญของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารเคลือบเมล็ด 4 ชนิด ได้แก่ สาร arabic gum 10% 20% และ 40% สาร pectin 1% สาร hydroxyethyl cellulose 1% และ 3.5% และสาร polyvinyl alcohol 1% พบว่า สาร arabic gum 10% สาร pectin 1% สาร hydroxyethyl cellulose 1% และสาร polyvinyl alcohol 1% ไม่มีผลยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อรา *T. harzianum* เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นอาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารเคลือบเมล็ด เมื่อนำสารดังกล่าวผสมกับเชื้อรา *T. harzianum* แล้วเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด เพื่อ ทดสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อรา บนอาหาร PDA พบว่า เมล็ดที่เคลือบด้วยสาร hydroxyethyl cellulose 1% มีจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *T. harzianum* มากที่สุดถึง 97.5 % ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับเมล็ดที่เคลือบด้วยสาร arabic gum 10% และสาร pectin 1% ที่มีจำนวนโคโลนีเกิดขึ้นเท่ากับที่ 95.5 % จากการตรวจสอบ ปริมาณ สปอร์ของ เชื้อรา *T. harzianum* บนผิวเมล็ดที่เคลือบ พบว่าการเคลือบเมล็ดด้วยสาร pectin 1% มีปริมาณสปอร์ของเชื้อราบนเมล็ดมากที่สุด  $2.5 \times 10^4$  CFU/เมล็ด 1 กรัม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับปริมาณสปอร์ของเชื้อราบนเมล็ดที่เคลือบด้วยสาร arabic gum 10%

และสาร hydroxyethyl cellulose 1% ที่มี ปริมาณสปอร์ของเชื้อราบนเมล็ดเท่ากับที่  $1.75 \times 10^4$  CFU / เมล็ด 1 กรัม เมื่อทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดข้าวโพดหลังการเคลือบเมล็ดพบว่า การเคลือบเมล็ดด้วยสาร pectin 1% ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุดเป็น 97.75% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดที่เคลือบด้วยสาร arabic gum 10% สาร hydroxyethyl cellulose 1% สาร polyvinyl alcohol 1% และกรรมวิธีที่ไม่เคลือบเมล็ด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเป็น 96%, 96.25%, 97.25% และ 96.50% ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาต้นทุนและคุณภาพในการเคลือบเมล็ดพบว่าสาร arabic gum 10% ให้ผลดีที่สุด จึงคัดเลือกและนำมาเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคต้นเน่าในสภาพเรือนทดลอง โดยปลูกในดินที่มีสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium* sp. เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เคลือบเมล็ด พบว่าเมล็ดที่เคลือบด้วยสาร arabic gum 10% ร่วมกับเชื้อรา *T. harzianum* ให้เปอร์เซ็นต์ ความงอกเพิ่มขึ้นเป็น 54.76% โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความงอกของต้นกล้าเพียง 36.90% เชื้อรา *T. harzianum* เป็นเชื้อราที่เป็นเชื้อเอ็นโดไฟท์ภายในต้นพืช ซึ่งสามารถกระตุ้นความต้านทานในต้นพืชได้ จากการตรวจสอบเชื้อรา *T. harzianum* ภายในส่วนต่างๆ ของต้นกล้าที่มาจากการเคลือบเมล็ดโดยเทคนิค พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณ 18S ribosomal RNA gene (rDNA) ของเชื้อรา *T. harzianum* พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 300 คู่เบส จากเนื้อเยื่อส่วนราก ลำต้น และใบของต้นกล้าข้าวโพดที่มาจากการเคลือบเมล็ด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ต้นกล้ามาจากเมล็ดที่ไม่ได้เคลือบเชื้อรา *T. harzianum* พบแถบดีเอ็นเอเฉพาะเนื้อเยื่อส่วนราก

<b>Thesis Title</b>	Corn Seeds Coating with <i>Trichoderma harzianum</i> and Detection of Fungi Growth in Seedlings by the PCR-based Technique	
<b>Author</b>	Miss Phatcharaphorn Phutthang	
<b>Degree</b>	Master of Science (Plant Pathology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Asst. Prof. Dr. Chuanpit Boonchitsirikul	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Sombat Srichuwong	Member
	Lect. Waraporn Prakob	Member

### Abstract

*Trichoderma harzianum* growth was tested in potato dextrose agar (PDA) supplemented medium containing the following four kinds of coating materials: 10%, 20% and 40% arabic gum, 1% pectin, 1% and 3.5% hydroxyethyl cellulose and 1% polyvinyl alcohol. The results showed that 10% arabic gum, 1% pectin, 1% hydroxyethyl cellulose and 1% polyvinyl alcohol had no effect on the *T. harzianum* growth compared with the control which was PDA without the coating material. These materials were mixed with *T. harzianum* and coated on corn seed for testing of the fungi viability in the PDA medium. The performance of 1% hydroxyethyl cellulose in combination with *T. harzianum* resulted in the highest percentage of colony at 97.5%. However there were no significant results for the coating materials of 10% arabic gum and 1% pectin which had a colony of fungus at 95.5%. From the determination of the spore of *T. harzianum* for viability on seed coating, the results showed that 1% pectin coating gave the highest amount of spores  $2.5 \times 10^4$  CFU/ 1g. of seed. No significant results were detected for seeds with coated with 10% arabic gum and 1% hydroxyethyl cellulose with spores  $1.75 \times 10^4$  CFU/ 1g. of seed. The effect of seed coating on germination for the 1% pectin coating gave the

highest percentage germination at 97.75%. Similarly, there were no significant results for the 10% arabic gum, 1% hydroxyethyl cellulose, 1% polyvinyl alcohol and non seed corn coating with percentage germinations at 96%, 96.25% 97.25% and 96.50%, respectively. In consideration of cost and quality of coating material, 10% arabic gum was the best material for the corn seeds so was selected to use for coating corn seed. The corn seed coated with 10% arabic gum combined with *T. harzianum* was tested for the efficacy of *T. harzianum* against Fusarium stalk rot and the bioassays were also conducted in greenhouse conditions. The corn seed coated with 10% arabic gum combined with *T. harzianum* was grown in infested soil with *Fusarium* sp. as compared to non-coated seeds. The percentage of germination of coated corn seed was increased to 54.76 % which was significant when compared to non-coated seed with percentage of germination at 36.90%. *T. harzianum* has been proved to be an endophytic fungi that could induce resistance in plants. A PCR-based method for detection of *T. harzianum* endophytes in plant tissue was developed. The DNA primers were designed to amplify products based on a nucleotide sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2), specifically including the 18S ribosomal RNA region (rDNA) of *T. harzianum*. The PCR assays detected and amplified a 300 bp DNA fragment from roots, shoots and leaves of corn seedlings coated with *T. harzianum*. However the seedling from the non-coating only amplified the DNA fragment from the root.