Thesis Title Anti-phytopathogenic Fungal Activity in Tomatoes of Endophytic *Streptomyces* Strain P4

Author Miss Julaluck Tang-um

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup

ABSTRACT

Streptomyces sp., an endophytic actinomycete, is a gram positive filamentous bacterium. Previously, the endophytic *Streptomyces* sp. P4 was isolated from sweet pea root. The study on growth of the P4 strain found that it grew exponentially during the first 4 to 7 days of incubation. The maximum yield of cell growth was 0.44±0.0082 g dry weight in 100 ml medium on the seventh day of incubation. In terms of physiological characteristics of P4 strain on agar media, it formed a flat colony. In addition, substrate and aerial mycelia were yellowish to grayish, but their color varied a little depending on the media. Aerial mycelia of the isolate were powdery. In liquid media, a cell feature of P4 was in a form of yellowish mycelia pellets. Based on 16S rRNA gene sequence analysis, the P4 strain was identified as *Streptomyces* sp. with the most closely relatedness (99.7%) to *S. griseoflavus*.

The ability of *Streptomyces* P4 to produce hydrolytic enzyme was determined by a plate agar method. The result indicated that the P4 isolate could produce amylase and chitinase while cellulase, lipase, and protease were not obviously produced.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Amylase production was growth-associated and started in log phase while it reached the maximum enzyme production during stationary phase. The maximum amylase activity was 1.66±0.073 U/ml at 7th day growth while total biomass was 0.085±0.001 g dry pellet per 100 ml medium. Amylase specific activity in cell secretion was 118.4±4.61 U/mg protein. Chitinase production was also closely associated with cell growth and started in log phase but dropped off when approaching stationary phase. The maximum chitinase activity was 0.00093±0.00 U/ml at 5th day growth and biomass as 0.088±0.0008 g dry weight per 100 ml medium. The specific activity of chitinase in cell supernatant was 0.050±0.0003 U/mg protein.

The antagonistic activities of P4 against three phytopathogenic fungi (*Corynespora casiicola*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*, and *Rhizotonia solani*) were tested by dual culture method. P4 isolate could inhibit the growth of *F. oxysporum* causing fusarium wilt in tomatoes. The maximal inhibition zone diameter was observed on ninth day with the percentage inhibition of mycelial growth as 12.50 and 9.39 on PDA and IMA-2 media, respectively. But it did not inhibit the growth of *C. casiicola* causing leaf spot in tomato and *R. solani* causing root rot in rice during 14 days of observation. Shown by scanning electronic microscopic analysis, cell wall of *F. oxysporum* degraded when growing towards the P4 strain compared to control region. However, biocontrol effect of P4 isolate *in planta* culture of tomato found that it could not reduce the disease severity of fusarium wilt. The P4 strain only showed statistically significant decrease in disease severity on 3rd day of fungal infection compared to control tomato plants.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคพืชในมะเขือเทศของเชื้อเอนโดไฟติกสเตรปโทไมซิสสายพันธุ์ P4

ผู้เขียน นางสาว จุฬาลักษณ์ แตงอ่ำ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์

บทคัดย่อ

สเตรปโทไมซิสเป็นเชื้อเอนโดไฟติกแอคติโนมัยซิสซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถเกิดโครงสร้างคล้ายเส้นด้าย ก่อนหน้านี้มีการแยกเชื้อเอนโดไฟติกสเตรปโทไมซิสจากรากถั่วลันเตา ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ P4 พบว่ามีการเจริญเติบโตแบบเพิ่มจำนวนทวีคูณ (exponential) ระหว่าง 4 ถึง 7 วันแรกของการบ่ม โดยผลผลิตของเซลล์สูงสุดอยู่ในวันที่ 7 ของ การบ่มคือ 0.44±0.0082 กรัมน้ำหนักแห้งในอาหาร 100 มิลลิลิตร การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อ P4 บนอาหารวุ้นแข็ง พบว่าเชื้อสร้างโคโลนีแบนราบ นอกจากนี้ substrate และ aerial mycelia มีสีเหลืองถึงสีเทา โดยสีจะแตกต่างกันเล็กน้อยขึ้นอยู่กับอาหาร aerial mycelia ของเชื้อมีลักษณะเป็นผง ส่วนในอาหารเหลวเซลล์ของ P4 เกาะกันเป็น pellet สีเหลือง จากการอาศัย การวิเคราะห์ลำดับของยีน 16S rRNA พบว่าเชื้อ P4 ได้รับการจำแนกให้เป็น *Streptomyces* ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *S. griseoflavus* มากที่สุด (ร้อยละ 99.7)

การประเมินความสามารถของ P4 ในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายโดยวิธี plate agar แสดงให้เห็นว่าเชื้อ P4 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและไคติเนสได้ แต่ไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไลเปส และโปรติเอส ทั้งนี้การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและเริ่มต้นขึ้นในระยะ log phase ในขณะที่การผลิตเอนไซม์สูงสุดจะสิ้นสุดลงระหว่าง stationary phase โดยการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1.66±0.073 U/ml ณ วันที่ 7 ของการเจริญเติบโต ซึ่งมีชีวมวลทั้งหมดเท่ากับ 0.085±0.001 กรัมน้ำหนักแห้งในอาหาร 100 มิลลิลิตร และมี specific activity ของอะไมเลสที่หลั่งออกมานอกเซลล์เท่ากับ 118.4±4.61 U/mg protein สำหรับการผลิตเอนไซม์ไคติเนสนั้นมีความสัมพันธ์กับการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เจริญเติบโตของเซลล์ด้วยเช่นเดียวกันและเริ่มต้นขึ้นในระยะ log phase แต่จะสิ้นสุดลงเมื่อใกล้เข้าสู่ stationary phase โดยการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดเท่ากับ 0.00093±0.00 U/ml ณ วันที่ 5 ของการเจริญเติบโตและมีชีวมวลเท่ากับ 0.088±0.0008 กรัมน้ำหนักแห้งในอาหาร 100 มิลลิลิตร มี specific activity ของไคติเนสที่หลั่งออกมานอกเซลล์เท่ากับ 0.050±0.0003 U/mg protein

Dual culture เป็นวิธีที่นำมาทดสอบความสามารถของเชื้อ P4 ในการเป็นศัตรูปฏิปักษ์ต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Corynespora casiicola*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi* และ *Rhizoctonia solani* ผลการทดลอง พบว่า เชื้อ P4 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *F. oxysporum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว fusarium ในมะเขือเทศได้ โดยที่เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งสูงสุดสังเกตเห็นได้ในวันที่ 9 และมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหาร PDA และ IMA-2 เท่ากับ 12.50 และ 9.39 ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. casiicola* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบจุดในมะเขือเทศและ *R. solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค root rot ในต้นข้าวในช่วง 14 วันที่สังเกตผล การวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่า ผนังเซลล์ของ *F. oxysporum* ถูกทำลายเมื่อเจริญเติบโตร่วมกับเชื้อ P4 โดยเทียบกับบริเวณควบคุม อย่างไรก็ตาม ผลการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อ P4 ในต้นมะเขือเทศที่เลี้ยงในห้องทดลอง พบว่ามันไม่สามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยว fusarium ได้ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับต้นมะเขือเทศชุดควบคุมเฉพาะในวันที่ 3 ของการบ่มเท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved