

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU4980037

ชื่อโครงการ: การใช้ล้าเชื้อแอสโคไมซีตปฏิบัติกับที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสาเหตุโรคเพื่อการผลิตพริกและ
แตงกวาอินทรีย์

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน: ผศ. ดร. ปราณี พัฒนพิพัชไพศาล คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

การคัดแยกเชื้อแอสโคไมซีตจากตัวอย่างดินรอบรากพืชจากแปลงเกษตรกรในเขตจังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ water-yeast extract-cellulose agar (WYEC agar) และ enrichment media for isolation of chitinase-producing actinomycetes (EMCA agar) สามารถคัดแยกเชื้อแอสโคไมซีตได้ จำนวน 173 ไอโซเลต และ 283 ไอโซเลต ตามลำดับ ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WYEC agar สามารถคัดเลือกเชื้อที่สร้างรัศมีของบริเวณใสเท่ากับ 10 มม. ขึ้นไป จำนวน 201 ไอโซเลต และทำการทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ไคไนเนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMCA agar สามารถคัดเลือกเชื้อที่สร้างรัศมีของบริเวณใสเท่ากับ 5 มม. ขึ้นไป จำนวน 68 ไอโซเลต นำไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Rhizoctonia solani* และ *Pythium* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ cornmeal agar (CMA agar) (*In vitro*) พบว่าเชื้อแอสโคไมซีตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ดีมีจำนวน 7 ไอโซเลต คือ PACCH 129, PACCH 182, PACCH 201, PACCH 225, PACCH 232, PACCH 246 และ PACCH 277 และเมื่อนำไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์ไคไนเนสได้ดีมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA agar พบว่าเชื้อแอสโคไมซีตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ดีมีจำนวน 13 ไอโซเลต คือ PACCH 24, PACCH 42, PACCH 91, PACCH 101, PACCH 129, PACCH 133, PACCH 137, PACCH 140, PACCH 224, PACCH 225, PACCH 246, PACCH 247 และ PACCH 277 เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคกล้าเน่าตายในดินแตงกวาและต้นพริก (*In vivo*) พบว่าไอโซเลตที่สามารถควบคุมการเกิดโรคกล้าเน่าตายในดินแตงกวาได้ดี คือ PACCH129, PACCH182, และ PACCH246 ไอโซเลตที่สามารถควบคุมการเกิดโรครากเน่าโคนเน่าในดินพริกได้ดี คือ PACCH24 และ PACCH225 จากการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกล้าเชื้อแอสโคไมซีตปฏิบัติทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกล้าเชื้อ PACCH24, PACCH129, PACCH182 และ PACCH246 คือ ยีสต์สกัด (0.8, 0.8, 1.0 และ 0.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกล้าเชื้อ PACCH 225 คือ กากถั่วเหลืองบดแห้ง (2.0 กรัมต่อลิตร) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกล้าเชื้อ PACCH24 PACCH129 และ PACCH246 คือ ซูโครส (1.0, 1.0 และ 4.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกล้าเชื้อ PACCH 182 และ PACCH 225 คือ ฟรุคโตส (4.0 กรัมต่อลิตร) และ

กากน้ำตาล (8.0 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ การควบคุมโรคกล้าเน่าตายของแตงกวาในระดับเรือนเพาะชำ พบว่า เชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ PACCH 129 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจาก *R. solani* R2 ได้ดีที่สุด โดยช่วยลดอัตราการเน่าของเมล็ดและให้อัตราการงอกของเมล็ดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการควบคุมโรคที่เกิดจาก *Phytium* sp. P4, *R. solani* R1 และ *Phytium* sp. P2 โดยให้อัตราการงอกของเมล็ดเท่ากับ 64.00, 62.67 และ 56.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าในชุดการทดลองที่ควบคุมโรคดังกล่าว มีต้นกล้าที่สามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้เท่ากับ 68.25-100 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเมล็ดที่งอก แสดงให้เห็นว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ PACCH 129 ช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเพาะเชื้อและพบว่าเมล็ดที่งอกมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์สูงขึ้นด้วยเช่นกัน การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของต้นพริกที่เกิดจากเชื้อรา *S. rolfii* ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ PACCH 24 ในระดับเรือนเพาะชำ พบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในศึกษาในแปลงภาคสนาม พบว่าการเพาะปลูกด้วยต้นพริกหรือแตงกวาที่เพาะด้วยเมล็ดเคลือบสารพวงและเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ PACCH 24 หรือ PACCH 129 สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ต้นพืชแข็งแรง ไม่มีอาการของโรค ใบหนา ผลไม่มีแผล เมื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดของ DAP และน้ำตาลภายในเซลล์ รวมทั้งการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล สามารถจัดจำแนกเชื้อ แอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์ทั้งสองชนิดได้คือ *Streptomyces fimbriatus* PACCH 129 และ *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ผลการวิจัยชี้ให้เห็นถึงการนำเชื้อแอคติโนมัยซีทปฏิปักษ์และวิธีการเคลือบเมล็ดมาใช้ในการควบคุมโรคกล้าเน่าตายของแตงกวาและโรครากเน่าโคนเน่าของพริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

Project Code: RMU4980037

Project Title: Application of antagonistic actinomycetes inoculums against phytopathogenic fungi for organic-chilli and organic-cucumber cultivation

Investigator: Asist. Prof. Dr. Pranee Pattanapitpaisal

E-mail address: praneesci@gmail.com

Project Period: 3 years

Rhizosphere-associated soils from Ubon Ratchathani and Srisaket province were collected for isolation of actinomycetes by using selective media. One hundred and seventy three isolates were derived by using water-yeast extract-cellulose agar (WYEC agar) and two hundred and eighty three isolates were obtained by using enrichment media for isolation of chitinase-producing actinomycetes agar (EMCA agar). All isolates were screened for cellulolytic and chitinolytic activity. Two hundred and one isolates show significant clear zone on WYEC agar plates while sixty eight isolates gave significant clear zone on EMCA agar plates. The selected cellulase-producing isolates were assayed for *in vitro* antagonism towards *R. solani* and *Phytium* sp. by use of a Difco cornmeal agar (CMA agar) assay procedure and seven isolates were very strong antagonists of both fungus. These isolates were also tested for their effects on the germination and short-term biological control of damping-off disease of cucumber. None of the actinomycetes prevented seed germination and three isolates provided the most effective suppression. They were PACCH129, PACCH182 and PACCH246. While the selected chitinase-producing isolates were assayed for *in vitro* antagonism towards *Sclerotium* sp. by the same procedure and the result showed that thirteen isolates have remarkable inhibiting the growth of the fungus. These isolates were tested for *in vivo* biocontrol assay of chili root and stem rot disease and two isolates showed the most effective suppression. They were PACCH24 and PACCH225. Maximum biomass production of antagonistic actinomycetes PACCH24, PACCH129, and PACCH246 can be produced by using a combination of yeast extract (0.8 g/l) with sucrose (1.0, 1.0 and 4.0 g/l, respectively) while strain PACCH182 and PACCH225 biomass can be produced by using yeast extract (1.0 g/l) plus fructose (4.0 g/l) and dry soy bean residue (2.0 g/l) complement with molasses (8.0 g/l), respectively. Antagonistic actinomycetes PACCH129 was evaluated in greenhouse for biocontrol of preemergence damping-off of cucumber caused by *R. solani* and *Phytium* sp. Antagonistic actinomycetes PACCH129 was most effective in reducing root and stem rot caused by *R. solani* R2 (100% germination) and was more effective for against *Phytium* sp. P4 (64.00% germination), *R. solani* R1 (62.67% germination) and *Phytium* sp. P2 (56.00 % germination), respectively. During 42-

days growth experiments, almost actinomycetes-inoculated seedlings appeared healthy and well rooted. The percentages of seedling growth which survived from root and stem rot disease was 68.25-100% of germinated seed. Nevertheless, this actinomycete has no effect on seed germination and plant growth. Whereas the biocontrol of *S. rolfsii* root and stem rot of chili with antagonistic actinomycete PACCH24 in greenhouse also provided a good level (50% protection). Biological control by seed coating with antagonistic actinomycetes PACCH 129 and PACCH24 was further carried out in field soil inoculated with phytopathogenic fungi. The results showed that the antagonist significantly reduced symptoms. Morphology characteristic, diaminopimelic acid and sugar analysis, and 16S rDNA sequencing analysis showed that they are *Streptomyces fimbriatus* PACCH 129 and *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24. The study indicate that these novel antagonistic actinomycetes and particularly, a seed coating method could be used as a biological agent in order to control damping-off and root and stem rot of cucumber and chili, respectively.

คำสำคัญ: แอคติโนไมซีตปฏิบัติ การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โรครากเน่าโคนเน่า โรคกล้าเน่าตาย การเคลือบเมล็ดพันธุ์ antagonistic actinomycetes, biocontrol, root and stem rot, damping-off, coated-seeding, *R. solani*, *Phytium* sp.