ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246492

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การควบคุมเชื้อรา *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่าคอดินด้วยแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ที่สร้างไคติเนสร่วมกับการใช้ไคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้ง

Controlling of *Pythium* sp., a Causative Agent of Seedling Damping Off Disease, by Chitinolytic Antagonistic Actinomycetes Cooperated with Shrimp Chitosan

คณะผู้วิจัย: รศ. ดร. สายพิณ ไชยนันทน์
Assoc. Prof. Dr. Saipin Chaiyanan

ผศ. ดร. วิมลศิริ พรทวีวัฒน์
Asst. Prof. Wimolsiri Porntaveevat

รายงานนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณ ประจำปี 2553

b00254550

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246492

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การควบคุมเชื้อรา *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่าคอดินด้วยแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ที่สร้างไคติเนสร่วมกับการใช้ไคโตซานสกัดจากเปลือกกุ้ง

Controlling of *Pythium* sp., a Causative Agent of Seedling Damping Off Disease, by Chitinolytic Antagonistic Actinomycetes Cooperated with Shrimp Chitosan

คณะผู้วิจัย: รศ. ดร. สายพิณ ไชยนันทน์
Assoc. Prof. Dr. Saipin Chaiyanan

ผศ. ดร. วิมลศิริ พรทวีวัฒน์
Asst. Prof. Wimolsiri Porntaveevat

รายงานนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณ ประจำปี 2553

246492

บทคัดย่อ

แอคติโนมัยซิทส์ที่ย่อยสลายไคตินได้จำนวน 51 ไอโซเลทคัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่มีไคตินสะสม 30 ตัวอย่าง มีเพียง 15 ไอโซเลทที่แสดงกิจกรรมเป็นปฏิปักษ์ต่อต้านการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ที่ก่อให้เกิดโรคเน่าคอดินของต้นกล้าพืช (plant seedling damping off disease) เนื่องจากโครงสร้างของเชื้อราประกอบด้วยกลูแคน เซลลูโลสและไคตินจึงศึกษาความสามารถของเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ในการสร้างเอนไซม์ ไคติเนส ไคโตซานเนส และเซลลูเลส ไอโซเลท S22 แสดงความเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อราและการผลิตเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดย slide culture technique สามารถจำแนกชนิดของไอโซเลท S22 เบื้องต้นเป็นสปีชีย์ส์หนึ่งในจีนัส *Streptomyces* ดังนั้นจึงเลือก Streptomyces isolate S22 เป็นวัสดุชีวภาพ (biocontrol agent) สำหรับใช้ควบคุมถั่วเหลืองจากโรคเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* สภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตชีวมวลของเซลล์ของ *Streptomyces* isolate S22 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ colloidal chitin medium คือ การใช้ shrimp colloidal chitin 1%w/v โดยมี pH ของอาหารเป็น 7.0 และบ่มเพาะที่ 30 องศาเซลเซียส ในงานวิจัยนี้ศึกษาความสามารถในการปกป้องถั่วเหลืองจากโรคเน่าคอดินโดยกิจกรรมของแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์หรือไคโตซานอย่างเดียวหรือกิจกรรมร่วมกันของแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์กับไคโตซาน การทดลองได้ออกแบบเป็น completely randomized design โดยทำ 3 ซ้ำ ซึ่งมีการเตรียมดินทั้งหมด 6 แบบ คือ 1. ดินปกติเป็นชุดควบคุม 2. ดินที่มีแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ 3. ดินที่ใส่เชื้อราก่อโรค *P. aphanidermatum* 4. ดินที่ใช้แอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์เตรียมดินก่อนที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา 5. ดินที่ใช้ไคโตซานเตรียมดินก่อนที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา และ 6. ดินที่ใช้แอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์และไคโตซานเตรียมดินก่อนที่ทำให้ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา ดินแต่ละแบบเตรียมอย่างละ 6 กระถาง แบ่ง 3 กระถางใช้ทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด อีก 3 กระถางทดสอบเปอร์เซ็นต์การรอดจาการเป็นโรคของต้นกล้า ในแต่ละกระถางเพาะเมล็ดหรือต้นกล้าของถั่วเหลืองจำนวน 10 เมล็ดหรือ 10 ต้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้วัสดุชีวภาพทุกแบบ: แอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์หรือไคโตซานอย่างเดียวหรือใช้แอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ร่วมกับไคโตซานสามารถเพิ่มเปอร์เซนต์การงอกและเปอร์เซ็นต์การรอดจากการเป็นโรคของต้นกล้าเมื่อเทียบกับชุดที่ไม่มีการควบคุมโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น (400 มก/ล) มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้แอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ S22 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การใช้ไคโตซานร่วมกับแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ S22 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการป้องกันโรคให้กับทั้งเมล็ดและต้นกล้าของถั่วเหลือง เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดและเปอร์เซ็นต์การรอดจากการเป็นโรคของต้นกล้าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินที่ใช้ทั้งแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ S22 และไคโตซานไม่แตกต่างจากที่ปลูกในดินที่ไม่มีเชื้อราก่อโรค ($p \geq 0.05$)

Abstract

246492

51 isolates of chitinolytic actinomycetes were isolated from 30 chitin-rich samples. Only 15 chitinolytic isolates showed antagonistic activity against *Pythium aphanidermatum*, a causative agent of plant seedling damping off disease. For structure of *P. aphanidermatum* cell wall is composed of glucan, cellulose, and chitin, the ability of the antagonistic actinomycetes to produce chitinase, chitosanase, and cellulase enzymes were studied. The isolate S22 gave the best performance in antagonistic activity as well as production of the three hydrolytic enzymes. From morphological study using slide culture technique, the isolate S22 was preliminary determined to be a species of genus *Streptomyces*. Therefore, the isolate S22 was selected to be a biocontrol agent in protecting of soy bean from seedling damping off disease, caused by *P. aphanidermatum*. The optimal conditions for producing cell biomass of the antagonistic *Streptomyces* isolate S22 in colloidal chitin medium were using shrimp colloidal chitin at 1%w/v, pH of the medium at 7.0, and culturing at 30°C for three days. In this research, soy bean seedling damping off disease protection efficiency of antagonistic actinomycetes or shrimp chitosan alone or combined activity of antagonistic actinomycetes and chitosan were investigated. Experimental design for protection against seedling damping off fungi was a completely randomized design with 3 replicates. There were 6 types of soil preparation: 1. normal soil (control), 2. soil amended with antagonistic actinomycetes S22, 3. soil artificially infested with *P. aphanidermatum*, 4. soil amended with isolate S22 before fungal infestation, 5. soil amended with chitosan before fungal infestation, and 6. soil amended with isolate S22 and chitosan before fungal infestation. There were six pots for each types of soil. Three pots for seed germination test and another three pots for survival of seedling test. 10 seeds or seedling of soy bean were planted in each pot, percentages of seed germination and survival of the seedling without getting disease in soil artificially infested with *P. aphanidermatum* were analyzed. Application of the antagonistic *Streptomyces* isolate S22 or chitosan alone or the antagonist S22 together with chitosan in soil artificially contaminated with *P. aphanidermatum*, resulted in the significant increase of percentages of seed germination and survival of the seedling without getting disease when compared to the unprotected treatment ($p \leq 0.05$). The treatment with chitosan (400 mg/l) alone was less effective in the suppression of the pathogen development than the treatment with the antagonistic isolate S22 ($p \leq 0.05$). The mixture of chitosan with the antagonistic isolate S22 was the most effective in inhibition of disease in both seed and seedling of soy bean caused by *P. aphanidermatum*. The percentages of seed

germination and survival of the seedling without getting disease were not significantly different from the un-infested soil treatment ($p \geq 0.05$).

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
บทนำ (Introduction)	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ผลสำเร็จของงานวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ	3
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	3
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	11
วิธีการดำเนินการวิจัย (Material and methods)	13
ผลการวิจัย (Results)	19
1. การเก็บตัวอย่าง	19
2. การคัดแยกแอคติโนมัยซิทส์ที่ย่อยสลายไคตินจากตัวอย่างดิน	20
3. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของแอคติโนมัยซิทส์ที่คัดแยกได้	22
4. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคโตซาเนสของแอคติโนมัยซิทส์ที่คัดแยกได้	23
5. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยซิทส์ที่คัดแยกได้	24
6. ความสามารถของแอคติโนมัยซิทส์ที่คัดเลือกได้ในการยับยั้งการเจริญของ *Pythium aphanidermatum*	26
7. การจำแนกชนิดเชื้อแอคติโนมัยซิทส์ที่คัดเลือกเป็นเชื้อปฏิปักษ์ที่ใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดจาก *P. aphanidermatum*	28
8. ผลของไคโตซานที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *P. aphanidermatum*	29
9. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อปฏิปักษ์ที่คัดแยกไดh ในอาหารที่มี Colloidal chitin ที่เตรียมจากเปลือกกุ้งเป็นองค์ประกอบหลัก	30
10. ทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซาน เชื้อปฏิปักษ์ และผลิตภัณฑ์ไคโตซานกับเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรค Seedling damping off ในถั่วเหลือง	32
11. สรุปผลงานวิจัย	37
12. เอกสารอ้างอิง (References)	39
13. ผลงานตีพิมพ์ จากโครงการนี้	41

สารบัญตาราง (List of Tables)

หน้า

ตารางที่ 1. ตำแหน่งและลักษณะของตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ 23

ตารางที่ 2. จุลินทรีย์ย่อยสลายไคตินจากตัวอย่างดินจากแหล่งดินที่มีไคตินสะสม 25

ตารางที่ 3. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของแอคติโนมัยซิทส์ 26

ตารางที่ 4. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคโตซาเนสของแอคติโนมัยซิทส์ 27

ตารางที่ 5. ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยซิทส์ 28

ตารางที่ 6. ความสามารถในการย่อยสลายไคติน ไคโตซาน และ CMC ของแอคติโนมัยซิทส์ที่แสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* 32

ตารางที่ 7. ผลของไคโตซานความเข้มข้นต่างๆในอาหารแข็ง PDA ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* 34

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองและการรอดของต้นกล้าถั่วเหลืองที่ปลูกในดินที่ปนเปื้อนด้วย *P. aphanidermatum* ที่ใช้ไคโตซาน เชื้อปฏิปักษ์และไคโตซานกับเชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรค 38

สารบัญภาพ (List of Illustrations)

หน้า

รูปที่ 1. โครงสร้างของ ไคติน ไคโตซาน และเซลลูโลส 7

รูปที่ 2. การทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ของจุลินทรีย์ (Antagonistic test) 14

รูปที่ 3. ตัวอย่างการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของแอคติโนมัยซิทส์บน Colloidal chitin agar 25

รูปที่ 4. ตัวอย่างการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคโตซาเนสของแอคติโนมัยซิทส์บน Colloidal chitosan agar 25

รูปที่ 5. ตัวอย่างการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแอคติโนมัยซิทส์บน CMC agar 25

รูปที่ 6. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซิทส์ไอโซเลท S22, CS20.1, และ CS 20.2 26

รูปที่ 7. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซิทส์ไอโซเลท CS22.1 26

รูปที่ 8. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซิทส์ไอโซเลท CS34.1, CS35.1 26

รูปที่ 9. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซิทส์ไอโซเลท CS37.1, CS40.1 27

รูปที่ 10. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซิทส์ไอโซเลท CS41.1, C2.2 และ C8.2 27

รูปที่ 11. การยับยั้ง *P. aphanidermatum* โดยแอคติโนมัยซิทส์ไอโซเลท S22, P9.3 27

รูปที่ 12. ลักษณะเส้นใยของแอคติโนมัยซิทส์ปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 29

รูปที่ 13. การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 ในอาหาร colloidal chitin medium 30

รูปที่ 14. ผลของปริมาณของคอลลอยดอลไคตินที่มีต่อการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 ในอาหารเหลว Colloidal chitin medium 31

รูปที่ 15. ผลของ pH ที่มีต่อการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 ใน Colloidal chitin medium 31

รูปที่ 16. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อปฏิปักษ์ไอโซเลท S22 ใน Colloidal chitin medium 32

รูปที่ 17. การเตรียมเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 เพื่อใช้ในการทดลอง 34

รูปที่ 18. ลักษณะการเจริญของถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 ระยะเวลา 0 – 14 วัน 35

หน้า

รูปที่ 19. แสดงเปรียบเทียบระหว่างเมล็ดถั่วเหลืองที่ไม่ติดเชื้อและเมล็ดที่มีการติดเชื้อ 35
รูปที่ 20. ต้นกล้าถั่วเหลืองที่มีการเกิดโรคเน่าคอดินจากเชื้อ *P. aphanidermatum* 36
รูปที่ 21. ลักษณะการเกิดโรคเน่าคอดินในระยะต้นกล้าของต้นถั่วเหลือง 36