ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47367

BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL WILT IN PATHUMMA (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

SARAN PROMSAI

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN APPLIED MICROBIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
SEPTEMBER 2011

b00254939

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E47367

BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL WILT IN PATHUMMA (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

SARAN PROMSAI

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN APPLIED MICROBIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
SEPTEMBER 2011

BIOLOGICAL CONTROL OF BACTERIAL WILT
IN PATHUMMA (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)

SARAN PROMSAI

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN APPLIED MICROBIOLOGY

EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON
Asst. Prof. Dr. Prasart Phonimdang

.....MEMBER
Asst. Prof. Dr. Narumol Thongwai

.....MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Arayar Jatisatienr

.....MEMBER
Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua

.....MEMBER
Assoc. Prof. Wanchai Sonthichai

THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....ADVISOR
Asst. Prof. Dr. Narumol Thongwai

.....CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Arayar Jatisatienr

.....CO-ADVISOR
Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua

12 September 2011

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express heart-felt gratitude to my advisor Asst. Prof. Dr. Narumol Thongwai for her guidance, motivation, patience and supervision throughout my Ph.D. study. I am deeply grateful to my co-advisor, Assoc. Prof. Dr. Arayar Jatisatienr and Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua for their kindness, advice guidance and valuable suggestions on my thesis work. I am grateful to the examining committee members, Asst. Prof. Dr. Prasart Phonimdang and Assoc. Prof. Wanchai Sonthichai for their comments and suggestions.

I sincerely thank Asst. Prof. Dr. Sumalee Pruksakorn for her valuable comment on molecular studies.

I sincerely thank the Bua Lai Pathumma Garden in Amphur San Sai, Chiang Mai, for pathumma rhizomes.

I would like to thank the office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand under the program of Strategic Scholarship for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral Degree for financial support.

I would like to thank the Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University and the Graduate School of Chiang Mai University for all supports.

I would like to thank Dr. Panitnart Auputinan, Ruangwoot Chutima, Pawalee Srisuksomwong, Raenu Yucharoen, Jiraporn Palee, Nongluck Jaito and Sutatip Treepolauksorn for their help and friendship.

I would like to thank all the members of ScB2711, other friends and the staff in the Department of Biology for their friendship, help, guidance, enjoyable and memorable time during my research work.

Most of all, I would like to express my gratefulness to my family; father, mother and sister for their love, encouragement and emotion support.

Saran Promsai

Thesis Title	Biological Control of Bacterial Wilt in Pathumma (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.)
Author	Mr. Saran Promsai
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Narumol Thongwai — Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Arayar Jatisatienr — Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Yingmanee Tragoolpua — Co-advisor

ABTRACT

E 47367

Forty-five isolates of wilt causing bacteria were isolated from infected Pathumma rhizomes using TZC medium. Ten bacterial isolates, namely PRZ, PT1B, PT1J, PT2X, D1, RRD, RT1S, Rh1-1 were identified as *Enterobacter* spp., Tu1-1 was identified as *Klebsiella* sp. and Tu1-2 was identified as *Pseudomonas* sp. by conventional and molecular methods. These bacteria were determined for their abilities to cause high disease severity in Pathumma plant both *in vivo* and laboratory bioassays. Fifteen bacterial isolates, namely PRZ, PT1B, PT1J, PT2X, RRD, RT1K, RT1S, RT2R, C4, D1, Rh1-1, Rh3-1, Tu1-1, Tu2-1 and R1512 were evaluated the persistence in natural soil without Pathumma plants. It was found that these bacteria had 42-70% survival rate after incubation for 1 year.

E47367

For the study of the adhesion of wilt causing bacteria in Pathumma tissue, *E. asburiae* PT1J was selected to investigate due to its high level of disease incidence. The infected pseudostems were observed changes under light compound and scanning electron microscope. The electron microscopic studies clearly showed the bacteria adhesion and structural changes of plant tissues. This bacterium could adhere to the vascular bundle walls and caused plant tissue shrunken.

One hundred and two bacterial isolates were isolated from soil samples collected from different sites in Thailand using TSA medium. After testing their ability to inhibit growth of the pathogenic bacteria using paper disc diffusion method, it was found that four isolates namely SP15, SP38, SP46 and SP58 had the highest ability to inhibit growth of wilt causing bacteria. From biochemical and molecular identification, the isolates SP15, SP38, SP46 and SP58 were *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas mosselii* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. The optimal conditions of inhibiting substances from the isolate SP15 was 30°C at pH 8 in modified TSB medium containing 0.5% (w/v) glucose and 2% (w/v) peptone, SP38 was 25°C at pH 7 in modified TSB medium containing 0.5% (w/v) sucrose and 2% (w/v) peptone, SP46 was 25°C at pH 7 in modified TSB medium containing 0.5% (w/v) glucose and 1.5% (w/v) peptone, and SP58 was 25°C at pH 7 in modified TSB medium containing 0.5% (w/v) sucrose and 1.5% (w/v) peptone.

Characterization of inhibiting substances produced by antagonistic bacteria was found that all antagonists could produce both hydroxamate-type and catecholate-type siderophore. Among four antagonists, only three strains *Ps. mosselii* SP38, *Ps.*

E47367

mosselii SP46 and *Ps. aeruginosa* SP58 showed the ability to produce phenazine derivatives.

The three experimental designs were used to evaluate the ability to control bacterial wilt in pots of pathumma. Experiment 1, both antagonistic and pathogenic bacteria were co-applied to pathumma rhizomes and to soil in pots before cultivation. Experiment 2, both antagonistic and pathogenic bacteria were co-applied to shooting pathumma. Experiment 3, pathogenic bacteria were applied to rhizomes and to soil before pathumma cultivation while the mixed culture of antagonistic bacteria were added to the plant pots after shooting. All experiments were conducted three times consecutively in 2008, 2009 and 2010. The results revealed that experiment 1 and 2 had the disease incidence of 0-33% while experiment 3 had the disease incidence of 33-67%. In all experiments, the bacterial cell numbers of antagonistic mixture were declined by 5-15% on average while pathogenic bacteria PT1J, PT2X, D2, RRD, RT1S and R227 were declined by 30, 35, 25, 40, 30 and 30% on average, respectively. However, all experiments could reduce wilt disease compared with the disease plant controls which were not treated with antagonistic bacteria.

Molasses and soil were found to be most suitable carrier materials for the optimal formulation for all antagonistic bacteria. The cell numbers of each antagonistic bacterial isolate were $1x10^4$-$1x10^5$ cfu/g in molasses or soils after 2 months of incubation.

Keywords: biological control, *Curcuma alismatifolia*, Pathumma, wilt disease, antagonistic bacteria, *Enterobacter* spp.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การควบคุมโรคเหี่ยวในปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) ที่เกิดจากแบคทีเรียโดยวิธีทางชีวภาพ

ผู้เขียน นายศรัณย์ พรหมสาย

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. นฤมล ทองไว	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. อารยา จาติเสถียร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. ยิ่งมณี ตระกูลพัว	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

E 47367

แบคทีเรียก่อโรคเหี่ยวในปทุมมาถูกคัดแยกได้จากหัวพันธุ์ที่เป็นโรคเหี่ยว โดยใช้อาหาร TZC พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 45 ไอโซเลท ในจำนวนนี้มี 10 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการก่อโรคได้รุนแรงที่สุด โดยการทดสอบการก่อโรคในแปลงปลูกปทุมมาและในห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้แก่ *Enterobacter* sp. PRZ, PT1B, PT1J, PT2X, D1, RRD, RT1S และ Rh1-1, *Klebsiella sp.* Tu1-1 และ *Pseudomonas* sp. Tu1-2 เมื่อศึกษาการคงอยู่ในดินที่ปราศจากพืชอาศัยของแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยวจำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ PRZ, PT1B, PT1J, PT2X, RRD, RT1K, RT1S, RT2R, C4, D1, Rh1-1, Rh3-1, Tu1-1, Tu2-1 และ R1512 พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 42-70% เมื่อเวลาผ่านไป 1 ปี

ในการศึกษาการเกาะติดเนื้อเยื่อพืชของ *E. asburiae* PT1J ซึ่งสามารถก่อโรคได้รุนแรง โดยการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่าแบคทีเรียสามารถเกาะติดเนื้อเยื่อพืชได้ดี เนื้อเยื่อพืชมีการหดตัวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีเชื้อ

ในการแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณต่างๆของประเทศไทยด้วยอาหาร TSA พบว่าสามารถแยกได้ 102 ไอโซเลท แบคทีเรียทั้งหมดถูกนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยวด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่ามี 4 ไอโซเลท ได้แก่ *Bacillus subtilis* SP15, *Pseudomonas mosselii* SP38, *Pseudomonas mosselii* SP46 และ *Pseudomonas aeruginosa* SP58 มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยว โดยมีสภาวะที่เหมาะสมคือ *B. subtilis*

E47367

SP15 สร้างสารยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 8 ที่มีส่วนประกอบของ 0.5% (w/v) glucose และ 2% (w/v) peptone สำหรับ *Ps. mosselii* SP38 คือ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 7 ที่มีส่วนประกอบของ 0.5% (w/v) sucrose และ 2% (w/v) peptone สำหรับ *Ps. mosselii* SP46 คือ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 7 ที่มีส่วนประกอบของ 0.5% (w/v) glucose และ 1.5% (w/v) peptone และสำหรับ *Ps. aeruginosa* SP58 คือ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 7 ที่มีส่วนประกอบของ 0.5% (w/v) sucrose และ 1.5% (w/v) peptone

ในการศึกษาสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP15, SP38, SP46 และ SP58 พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถสร้างสาร siderophore ชนิด hydroxamate และ catecholate นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ SP38, SP46 และ SP58 สามารถผลิตสารในกลุ่ม phenazine ได้

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยวในแปลงปลูก โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พร้อมกับแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยวตอนเริ่มปลูกปทุมมา กลุ่มที่ 2 ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์พร้อมกับแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยวตอนต้นปทุมมางอก และกลุ่มที่ 3 ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยวตอนเริ่มปลูกปทุมมา และตามด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ภายหลังจากต้นปทุมมางอก ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำในปี 2008, 2009 และ 2010 ในการวิจัยพบว่า กลุ่มที่ 1 และ 2 มีอัตราการเกิดโรค 0-33% ในขณะที่กลุ่มที่ 3 มีอัตราการเกิดโรค 33-67% ในการตรวจสอบหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยวในทั้งสามกลุ่มการทดลอง พบว่าปริมาณเชื้อผสมของแบคทีเรียปฏิปักษ์ลดลง 5-15% ส่วนแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยว PT1J, PT2X, D1, RRD, RT1S และ R227 ลดลง 30, 35, 25, 40, 30 และ 30% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามทั้ง 3 กลุ่มการทดลองสามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีการเพาะเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหี่ยวเพียงอย่างเดียว

ในการศึกษาหาส่วนผสมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่า กากน้ำตาลและดินมีความเหมาะสมที่สุด โดยพบปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทอยู่ระหว่าง $1x10^4$ - $1x10^5$ cfu/g เมื่อเวลาผ่านไป 2 เดือน

คำสำคัญ: การควบคุมทางชีวภาพ, ปทุมมา, โรคเหี่ยว, แบคทีเรียปฏิปักษ์, *Enterobacter* spp.

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

LIST OF TABLES

LIST OF TABLES (CONTINUED)

LIST OF TABLES (CONTINUED)

LIST OF TABLES (CONTINUED)

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

LIST OF FIGURES (CONTINUED)

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

%	=	percent
°C	=	degree Celsius
bp	=	base pair
cm	=	centrimeter
cfu/g	=	colony forming unit per gram
cfu/ml	=	colony forming unit per milliliter
cv	=	cultivar
g	=	gram
g/l	=	gram per liter
kg/ha	=	kilogram per hectare
l	=	liter
m	=	meter
mg	=	milligram
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
µl	=	microliter
µm	=	micrometer
µM	=	micromolar
M	=	molar
OD	=	optical density
pH	=	power of hydrogen ion

v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume