ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247357

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สำนักพระราชวัง

Plant Genetic Conservation Project as The Royal Initiation of
Her Royal highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG)
The Bureau of The Royal Househol

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากดินที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และการบ่งเอกลักษณ์

Screening of *Pseudomonas* spp in soil capable of bioactive production for controlling plant pathogen and identification.

ผู้วิจัย
วรรณดี บัญญัติรัชต
วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ISBN .....

600252339 247357

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247357

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สำนักพระราชวัง

Plant Genetic Conservation Project as The Royal Initiation of
Her Royal highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG)
The Bureau of The Royal Household

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากดินที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และการบ่งเอกลักษณ์

Screening of *Pseudomonas* spp in soil capable of bioactive production for controlling plant pathogen and identification.

ผู้วิจัย
วรรณดี บัญญัติรัชต
วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ISBN .....

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณทุนอุดหนุนทั่วไปจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ผ่านการบริหารจัดการงบประมาณสำนักบริหารการวิจัยและหน่วยประสานงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ: the Plant Genetic Conservation Project as the Royal Initiation of Her Royal highness Princess Maha Chakri Sirindhorn. ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ เครื่องมือ และวัสดุอุปกรณ์บางอย่าง ขอขอบคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการรวม์ทั้งบุคลากรสารบรรณทุกท่าน ที่ให้ความสะดวกในด้านต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณคณะทำงานและเจ้าหน้าที่ทุกท่านขององค์กรการไฟฟ้าฝ่ายผลิตทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาคโดยเฉพาะในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ที่ให้ความช่วยเหลือและจัดการในภาคสนาม

ชื่อเรื่อง: การคัดเลือกเชื้อ *Pseudomonas* spp. จากดินที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และการบ่งเอกลักษณ์

นักวิจัย: วรรณดี บัญญัติรัชต และคณะ

สถานที่ทำงาน: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โทร 043 – 202377 โทรสาร 043 – 202377

บทคัดย่อ

247357

จากการนำแบคทีเรียจำนวน 78 ไอโซเลตมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *S. rolfsii* โดยวิธี dual culture พบว่ามีจำนวน 11 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา ได้แก่ 4Z2B-4, 2Z2D-5, 4Z1D-2, 4Z2E-1, 4Z4C-2, Z1B-1, Z3B-2, Z4G-1, 2Z1A-5, 2Z2E-7 และ 2Z4E-2 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 50, 56, 50, 40, 60, 40, 48, 56, 40, 56 และ 60 ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อจำนวน 4 ไอโซเลตที่ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง มากกว่าหรือเท่ากับ 50 มาทดสอบการการควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *S. rolfsii* และนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตมาจำแนกชนิดด้วยวิธี Partial 16S rDNA sequencing นำข้อมูลเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า แบคทีเรีย 4Z2B-4 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Pseudomonas koreensis*PS9-14 ไอโซเลต 2Z2E-7, Z4G-1 จัดเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter cancerogenus* / *E. asburiae* ส่วน 2Z4E-2 จัดอยู่ในกลุ่ม *Enterobacter* sp.

คำสำคัญ: *Sclerotium rolfsii*, Partial 16S rDNA sequencing, *Pseudomonas*, dual culture

41 หน้า

Title: **Screening of *Pseudomonas* spp in soil capable of bioactive production for controlling plant pathogen and identification.**

Researchers: Wandee Bunyatratchata

Office: Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University

Tel: 043 – 202377, Fax: 043 – 202377

ABSTRACT

247357

The 78 isolates were analyzed for their abilities to inhibit the growths of *Sclerotium rolfsii* at laboratory level by using dual culture. The result showed that 11 isolates, 4Z2B-4, 2Z2D-5, 4Z1D-2, 4Z2E-1, 4Z4C-2, Z1B-1, Z3B-2, Z4G-1, 2Z1A-5, 2Z2E-7 and 2Z4E-2, of them were antagonistic bacteria that can inhibit the mycelial growths of *S. rolfsii* with the percents of inhibition 50, 56, 50, 40, 60, 40, 48, 56, 40, 56 and 60 respectively. In addition, the 4 isolates of antagonistic bacteria, 2Z2E-7, Z4G-1, 2Z4E-2, 4Z2B-4, were identified based on Partial 16S rDNA sequencing. The sequences were compared to sequences using GenBank database. The DNA sequences of 4Z2B-4 was similar to *Pseudomonas koreensis*PS9-14. Isolates of 2Z2E-7, Z4G-1 were *Enterobacter cancerogenus* / *E. asburiae* and 2Z4E-2 was *Enterobacter* sp.

Keywords: *Sclerotium rolfsii*, Partial 16S rDNA sequencing, *Pseudomonas*, dual culture

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
3. วิธีดำเนินงานวิจัย	
เชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (antagonistic bacteria)	8
การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดย วิธี Dual culture technique	8
ศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อ *Pseudomonas* spp ที่แยกได้และวิเคราะห์กลุ่ม	8
4. ผลการทดลอง	10
5. อภิปรายและวิจารณ์ผลการทดลอง	27
6. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32
ประวัติและผลงานนักวิจัย	39

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ ในกลุ่มที่ไม่หมักน้ำตาลกลูโคส 4

3.1 แบคทีเรียที่นำมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ และลักษณะทางชีวเคมี 9

4.1 แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา 10
Sclerotium rolfsii และเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar	5
4.1	ลักษณะของการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อแบคทีเรียเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดบนจานอาหาร Potato dextrose agar โดยวิธี dual culture บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	11
4.2	ลักษณะของการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ที่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อแบคทีเรียเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดบนจานอาหาร Potato dextrose agar โดยวิธี dual culture บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	12
4.3	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ที่ไม่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อแบคทีเรียเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดบนจานอาหาร Potato dextrose agar โดยวิธี dual culture บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน	13
4.4	ลักษณะการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ที่ไม่ถูกยับยั้งด้วยเชื้อแบคทีเรียเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar โดยวิธี dual culture	14
4.5	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' ของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย 4Z2B-4 กับเชื้อมาตรฐานของ *Pseudomonas fulva* IAM1529T (D84015) และ *Pseudomonas koreensis* Ps 9-14T (AF468452) บริเวณที่มีเครื่องหมาย * แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์	18
4.6	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5 ' ของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย 2Z2E-7, Z4G-1 กับเชื้อมาตรฐานของ *Enterobacter asburiae* JCM 6051T (AB004744) และ *E. cancerogenus* LMG 2693T (Z96078) บริเวณที่มีเครื่องหมาย * แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์	22
4.7	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย 5' ของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย 2Z4E-2 กับเชื้อมาตรฐาน ของ *Enterobacter amnigenus* JCM 1237T (AB004749) และ *E. nimipressuralis* LMG 10245T (Z96077) บริเวณที่มีเครื่องหมาย * แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์	25
4.8	ต้นไม้ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 4Z2B-4, 2Z2E-7, Z4G-1 และ 2Z4E-2 โดยวิธี Neighbor-joining method	26