บทคัดย่อ

T 155879

การจำแนกจุลินทรีย์โดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน (polyphasic taxonomy) จากทั้งข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้นำมาใช้ในการทดสอบจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างปุ๋ยหมักและเศษซากพืช จำนวน 97 ตัวอย่าง จากจังหวัดขอนแก่น ชัยภูมิ อุดรธานี มหาสารคาม ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ และเพชรบูรณ์ แล้วนำมาแยกเชื้อ *Streptomyces* ด้วยวิธี serial dilution plating พบว่า แยกเชื้อได้ 386 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในพืชตระกูลแตง ตระกูลพริกและมะเขือ 4 ชนิดโดยวิธี bioassay สามารถคัดเลือกเชื้อ *Streptomyces* spp. ที่เป็นปฏิปักษ์ ได้ 13 ไอโซเลต แบ่งเป็นกลุ่มตามชนิดแบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง โดยกลุ่มที่ 1 ยับยั้งเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* มี 5 ไอโซเลต ได้แก่ PR1, PR7, PR9, PR10 และ PR11, กลุ่มที่ 2 ยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* มี 4 ไอโซเลต ได้แก่ PR1, PR10, PR11 และ PR12, กลุ่มที่ 3 ยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* มี 8 ไอโซเลต ได้แก่ PR2, PR4, PR5, PR6, PR8, PR10, PR11 และ PR13, และกลุ่มที่ 4 ยับยั้งเชื้อ *Ralstonia solanacearum* มี 7 ไอโซเลต ได้แก่ PR1, PR2, PR3, PR7, PR10, PR11 และ PR12 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทั้ง 4 ชนิดคือ PR10 และ PR11 ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบเบื้องต้นถึงประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ และโรคผลเน่าแบคทีเรียของแตงโมในเรือนทดลองพบว่า ไอโซเลต PR10 และ PR11 สามารถลดอัตราการเกิดโรคพืชทั้งสองชนิดได้

ผลการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 13 ไอโซเลต พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนของเส้นใยที่เจริญเข้าไปในอาหารไม่มีการแตกหักเป็นท่อน แต่ขนาดและลักษณะโคโลนี สีของเส้นใยชูอากาศ รูปแบบของสายสปอร์ มีลักษณะที่แตกต่างกัน และมีความแตกต่างในความสามารถเจริญได้บนอาหาร Arginine-glycerol mineral salt agar, Czapek's soiution agar และ Yeast extract-malt extract agar, ความสามารถในการสร้าง melanoid pigment, การรีดิวส์ไนเตรท, การทนทานต่อเกลือ, การใช้แหล่งคาร์บอน, การสร้างเอนไซม์ย่อยไคตินและเซลลูโลส และการสร้างสารยับยั้งเชื้อรา ส่วนลักษณะที่เหมือนกันทุกไอโซเลตคือสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ได้ และถูกยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เติม streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้ง 13 ไอโซเลต โดยเทคนิค pulse field gel electrophoresis ยังไม่ประสบความสำเร็จ อย่างไรก็ตามพบว่า การย่อยผนังเซลล์ของเชื้อ *Streptomyces* spp ที่ฝังอยู่ในชิ้นอะกาโรสเจลที่เหมาะสมคือ การใช้บัฟเฟอร์ SucTE ที่มี lysozyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนแล้วตามด้วยบัฟเฟอร์สกัด B (0.5 M EDTA pH9.5, 0.5% SDS และ 1% lauroyl sarcosine) ที่มี proteinase K 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การตัดจีโนมิคดีเอ็นเอของ *Streptomyces* spp. ด้วยเอนไซม์ *BamHI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวนมาก การใช้เทคนิค repetitive sequence-PCR (rep-PCR) ด้วยไพรเมอร์ BOXA1R พบว่า *Streptomyces* spp. ทั้ง 13 ไอโซเลต มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน ยกเว้นไอโซเลต PR8 และ PR 9 ที่มีรูปแบบคล้ายกันมากโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.90

การจำแนกชนิดเชื้อ *Streptomyces* ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช โดยใช้คุณลักษณะผสมผสาน ที่ใช้ทั้งข้อมูลทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค rep-PCR ร่วมกัน สามารถระบุชนิดได้ 8 ไอโซเลต คือ PR1 เป็น *S. baarnensis*, PR6 เป็น *S. neyagawaensis*, PR7 เป็น *S. nojiriensis*, PR10 เป็น *S. chrysomallus* subsp. *fumigatus*, PR12 เป็น *S. noboritoensis* และ PR13 เป็น *S. nigrescens*, ไอโซเลต PR8 และ PR 9 ระบุชนิดเหมือนกันเป็น *S. sioyaensis* ส่วนไอโซเลต PR2, PR3, PR4, PR5 และ PR 11 ระบุได้ว่าเป็นชนิดที่แตกต่างกัน แต่ยังไม่สามารถกำหนดชื่อชนิดได้ในขณะนี้

ABSTRACT

TE 155879

Polyphasic taxonomy approach (base on properties of morphology, physiology and DNA fingerprint) was investigated for identification of *Streptomyces* spp., antagonistic to phytopathogenic bacteria. Total 97 samples of composts and plant residues were collected from Khon Kaen, Chaiyaphum, Udon Thani, Maha Sarakham, Roi Et, Kalasin and Petchabum provinces. The *Streptomyces* spp. was isolated from these samples by serial dilution plating technique. Total 386 isolates of *Streptomyces* spp. were obtained. The antibiosis activity against important phytopathogenic bacteria for solanaceae and cucurbitaceae was carried out by bioassay. Only 13 isolates of antagonistic *Streptomyces* spp. were selected and divided into 4 groups according to the species of tested phytopathogenic bacteria as follows. Group 1 consisted of 5 isolates (PR1, PR7, PR9, PR10 and PR11) inhibited the growth of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Group 2 consisted of 4 isolates (PR1, PR10, PR11 and PR12) inhibited the growth of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Group 3 consisted of 8 isolates (PR2, PR4, PR5, PR6, PR8, PR10, PR11 and PR13) inhibited the growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Group 4 consisted of 7 isolates (PR1, PR2, PR3, PR7, PR10, PR11 and PR12) inhibited the growth of *Ralstonia solanacearum*. Therefore, the isolate PR 10 and PR11 showed high potential broad-spectrum antagonists against 4 species of economic important phytopathogenic bacteria. Preliminary test for biological control efficacy in green house condition was investigated with *Streptomyces*-PR10 and PR11. Result showed that the PR10 and PR11 reduced the bacterial wilt and bacterial fruit blotch diseases.

Investigation of morphological and chemical properties revealed that all selected *Streptomyces* spp. isolates were Gram-positive bacteria, which have no fragmentation of substrate mycelium. Colony characteristic and spore chain type were diversified. The growth characteristics on three media namely Arginine-glycerol mineral salt agar, Czapek's solution agar and Yeast extract-malt extract agar of selected 13 of *Streptomyces* spp. were different. They showed distinctively in ability to produce melanin pigment, nitrate reduction, growth on medium containing sodium chloride, utilization of carbon sources, production of chitinases and cellulases and antifungal. However, all 13 *Streptomyces* spp. isolates produced catalase and no resistance to streptomycin (100 µg/ml).

Study on genotypic information of antagonistic *Streptomyces* spp. by pulse field gel electrophoresis technique was not successfully. However, the suitable condition for lyses cells of *Streptomyces* embedded in agarose gel (plug) could be pointed out as follows; treating plugs with sucTE buffer containing lysozyme (2 mg/ml) and follow by buffer B (0.5 M EDTA pH 9.5, 0.5% SDS and 1% lauroyl sarcosine) containing proteinase K (1mg/ml). The restriction enzymes *Bam*HI produced many pieces of DNA fragments from genomic DNA of selected *Streptomyces* spp. Using repetitive sequence-PCR (rep-PCR) technique with BOXA1R primer, the DNA fingerprint of 13 selected *Streptomyces* spp. showed clearly distinctively at level of *Streptomyces* species. The *Streptomyces*-PR8 and PR9 are highly closed relationship with similarity coefficient of 0.90.

Classification of antagonistic *Streptomyces* spp. by polyphasic taxonomy approach (based upon their morphology, physiology and gonomic DNA fingerprint) resulted that the 6 isolates consisted of PR1, PR6, PR7, PR10, PR12 and PR13 were identified as *S. baarnensis, S. neyagawaensis, S. nojiriensis, S. chrysomallus* subsp. *fumigatus, S. noboritoensis* and *S. nigrescens*, respectively. The PR8 and PR9 were identified as the same species as *S. sioyaensis*. The isolate PR2, PR3, PR4, PR5 and PR 11 were identified as distinct species but could not designated their species names so far.