วัชรินทร์ ยุทธวานิชกุล : การปรับปรุงหัวเชื้อไรโซเบียมโดยเพิ่มคุณสมบัติการควบคุมเชื้อโรคที่ติดมากับเมล็ดถั่วลิสง *ASPERGILLUS FLAVUS* และ *A. NIGER* (IMPROVEMENT OF PEANUT RHIZOBIAL INOCULANT BY INCORPORATION OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR) AS BIOCONTROL AGAINST SEED BORNE FUNGI, *ASPERGILLUS FLAVUS* AND *A. NIGER*) อาจารย์ที่ปรึกษา : อ. ดร.พรรณลดา ติตตะบุตร, 75 หน้า

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช นับเป็นปัญหาสำคัญต่อการเพาะปลูก และการเจริญเติบโตของพืช มีผลทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลงและส่งผลต่ออุตสาหกรรมอาหาร ดังนั้นจึงมีการใช้สารเคมีในปริมาณมากเพื่อควบคุมโรคในพืช ทำให้เป็นอันตรายต่อผู้ใช้และผู้บริโภค นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการควบคุมในทางชีวภาพหรือชีววิธีจึงถูกนำมาใช้ในการเกษตร ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อไรโซเบียมและเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม PGPR ที่มีความสามารถในการควบคุมการเจริญของเชื้อราก่อโรครากเน่าในถั่วลิสง ซึ่งมีสาเหตุมากจากเชื้อ *Aspergillus niger* และ *A. flavus* จากการศึกษาพบว่า เชื้อในกลุ่มไรโซเบียมจำนวน 265 ไอโซเลต ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร และ 500 ไอโซเลต จากการคัดแยกจากปมรากถั่วลิสง ไม่มีเชื้อใดที่สามารถควบคุมเชื้อราก่อโรครากเน่าในถั่วลิสง แต่เมื่อนำเชื้อ PGPR จำนวน 350 ไอโซเลต ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มาทดสอบ พบเชื้อ PGPR จำนวน 11 ไอโซเลต สามารถควบคุมเชื้อรา *A. niger* ได้ และจากการทดสอบพบเชื้อที่มีความสามารถสูงสุด 4 ไอโซเลต คือ A20, A45, A62, และ A106 โดยพบว่า ไอโซเลต A20 และ A62 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้อีกด้วย จากผลการระบุเชื้อด้วยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลต A20, A45, A62, และ A106 มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus megaterium* strain AM1C7 (99%), *B. subtilis* strain Setapak 8 (99%), *B. subtilis* subsp. *subtilis* strain SB 3130 (99%) และ *Pseudomonas* sp. NJ-61 (95%) ตามลำดับ จากนั้นได้นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. niger* พบว่า ไอโซเลต A20, A45, A62, และ A106 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อ *A. niger* ได้ 42.5%, 51.42%, 67.81%, และ 44.53% ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อ PGPR ไปทดสอบการผลิต lytic enzyme พบว่าไอโซเลต A20, A45, และ A62 สามารถผลิต เอนไซม์โปรติเอสได้ และเพื่อทำการทดสอบสารที่จุลินทรีย์หลั่งออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้นำอาหารเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ PGPR ในแต่ละไอโซเลตที่ทำการแยกเซลล์ออกแล้วมาทดสอบ พบว่าอาหารเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อไอโซเลต A20 และ A62 สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อนำอาหารเหลวดังกล่าวไปบ่มกับเอนไซม์ proteinase k ก่อนนำไปทดสอบกับเชื้อรา พบว่าอาหารจากไอโซเลต A45 และ A62 ไม่สูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* แสดงว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ของเชื้อดังกล่าวไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่เชื้อผลิตได้ เชื้อ PGPR ทุกไอโซเลต สามารถผลิตฮอร์โมนพืชออกซิน (Indole-3-acetic acid, IAA) โดยเชื้อ PGPR ไอโซเลต A62 ผลิตฮอร์โมน IAA สูงสุดที่ 65.50 ppm ต่อ $10^8$ เซลล์ ฮอร์โมน IAA ที่เชื้อผลิตได้มีผลสนับสนุนต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของรากถั่วลิสง และเมื่อทดสอบการป้องกันการเกิดโรครากเน่าในถั่วลิสงโดยใช้ไอโซเลต A20 หรือ A45

ที่ความเข้มข้น $10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ร่วมกับการใช้เชื้อ *Bradyrhizobium* sp. TAL 173 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าเชื้อไอโซเลต A20 หรือ A45 สามารถควบคุมการเกิดโรครากเน่าจากเชื้อ *A. niger* ได้ ดังนั้น การพัฒนาหัวเชื้อไรโซเบียมให้มีความสามารถทั้งในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืชโดยการตรึงไนโตรเจน จากอากาศและสามารถควบคุมเชื้อราก่อโรค *A. niger* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดรากเน่าในถั่วลิสงสามารถทำได้โดยการใช้เชื้อไรโซเบียมร่วมกับเชื้อในกลุ่ม PGPR

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

WATCHARIN YUTTAVANICHAKUL : IMPROVEMENT OF PEANUT RHIZOBIAL INOCULANT BY INCORPORATION OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR) AS BIOCONTROL AGAINST SEED BORNE FUNGI, *ASPERGILLUS FLAVUS* AND *A. NIGER*. THESIS ADVISOR : PANLADA TITTABUTR, Ph.D., 75PP.

BRADYRHIZOBIA/PEANUT/PGPR/RHIZOBIAL INOCULANTS/BIOCONTROL/ *ASPERGILLUS NIGER*

Pathogenic microorganisms are one of the most important problems for plant growth, which eventually affect the food production system whenever the chronic threat of pathogens has occurred. Biological control is considered as an alternative or supplemental way for reducing the use of chemical agents in agricultural system. In this study, the inhibition of seed borne pathogenic fungus *Aspergillus niger* that causes root rot diseases in peanut (*Arachis hypogaea* L.) was investigated by using root nodulating *Bradyrhizobium* and soil-isolated Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as biological controllers. A total of 265 peanut bradyrhizobial strains were obtained from the Department of Agriculture (DOA), Thailand, and 500 isolates were isolated from peanut nodules, and then their antagonistic activities to *A. niger* were determined. However, none of them could inhibit *A. niger* growth. Thus, 350 PGPR isolates obtained from School of Biotechnology, Suranaree University of Technology were further screened to achieve this purpose. The total of 11 isolates were found to be able to inhibit *A. niger* growth. Based on their ability to inhibit *A. niger* growth and root colonization, the best 4 PGPR isolates were selected which were A20, A45, A62, and A106. Among these isolates, it was found that isolates A20 and A62 could also inhibit *A. flavus*. The sequence of 16S rDNA genes of these selected strains indicated that A20, A45, A62, and A106 were highly homology to *Bacillus megaterium* strain

AM1C7 (99%), *B. subtilis* strain Setapak 8 (99%), *B. subtilis* subsp. *subtilis* strain SB 3130 (99%), and *Pseudomonas* sp. NJ-61 (95%), respectively. These 4 PGPR, A20, A45, A62, and A106, were able to inhibit *A. niger* growth at 42.5%, 51.42%, 67.81%, and 44.53%, respectively. The production of lytic enzyme protease was detected in A20, A45, and A62, but not found in A106. Some antifungal activities were found clearly in cell-free supernatants of A20 and A62. Interestingly, the antifungal activity of isolates A45 and A62 was proteinase k resistant. This implied that the mode of action against fungus from these isolates was not from protease enzyme. All of PGPR isolates could produce an auxin (Indole-3-acetic acid, IAA) hormone. Isolate A62 produced a significantly high amount of IAA hormone at 65.5 ppm per $10^8$ cells. IAA hormone produced from PGPR isolates could promote peanut root growth. When either isolate A20 or A45 ($10^8$ cells per ml) was co-inoculated with *Bradyrhizobium* sp. TAL 173 ($10^8$ cells per ml), the peanut root rot disease caused by *A. niger* ($10^5$ and $10^6$ spores per seed) could be inhibited. Therefore, improvement of rhizobial inoculant for peanut to increase nitrogen fixation and reduce fungicide usage by incorporating of rhizobia with selected PGPR might be an appropriate approach.

School of Biotechnology

Academic Year 2010

Student s Signature_____

Advisor s Signature_____

Co-advisor s Signature_____

Co-advisor s Signature_____