บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรบนพื้นที่สูงทั้งหมด 14 ชนิด จากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงทั้งหมด 4 แห่ง เพื่อใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี tissue transplanting สามารถแยกเชื้อจุลินทรย์ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อแอคติโนมัยซีส จำนวน 113, 135 และ 27 ไอโซเลท ตามลำดับ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราสนิมขาวของเบญจมาศที่เกิดจากเชื้อรา *Puccinia horiana* ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี detached leaf เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า 75% โดยการพ่นเซลล์แขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์ลงบนใบเบญจมาศที่เป็นโรค ผลการทดสอบพบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ AK-MCL5 และ KW-CAR17 สามารถควบคุมโรคราสนิมขาวได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 82.66% และ 88.33% ตามลำดับ และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ LEPE04 และ LEPE18 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 83.33% และ 88.89% ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราที่แยกได้ไม่สามารถควบคุมโรคราสนิมขาวได้ ในส่วนของการใช้สารทดแทนสารเคมีในการควบคุมโรคราสนิมขาวของเบญจมาศ ได้ทดสอบโดยใช้สาร 5 ชนิด ได้แก่ กรดซาลิไซลิก กรดจัสโมนิก ไคโตซาน เอทิลีน และ petroleum oil ในความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า petroleum oil ที่ความเข้มข้น 2% และ 5% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 100% ในขณะที่สารอีก 4 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งน้อยกว่า 75% จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลท เชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์ 2 ไอโซเลท และ petroleum oil ความเข้มข้น 2% และ 5% ไปทดสอบเพื่อยืนยันประสิทธิภาพต่อไป การทดสอบเพื่อยืนยันประสิทธิภาพ ในกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ใช้ความเข้มข้น 5 ระดับ ได้แก่ 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อใบ ผลการทดสอบพบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท AK-MCL5 และ KW-CAR17 ที่ความเข้มข้น 10^7 – 10^8 cfu/ml สามารถยับยั้งเชื้อได้ 100% ในวันที่ 5 หลังการทดสอบ และเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์ไอโซเลท LEPE04 และ LEPE18 ที่ความเข้มข้น 10^8 cfu/ml มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 89% และ 91.66% ตามลำดับ ในวันที่ 7 หลังการทดสอบ ในส่วนของ petroleum oil ที่ความเข้มข้น 2% และ 5% สามารถยับยั้งเชื้อได้สูงสุดในวันที่ 3 หลังการทดสอบ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 100% เมื่อตรวจสอบลักษณะของสปอร์เชื้อรา *P. horiana* ภายใต้ compound microscope พบว่าชุดที่ได้รับการทดสอบมีลักษณะของสปอร์ที่ผิดปกติไป คือ ผนังของสปอร์บางลง และไม่มีไซโตพลาสซึมภายในสปอร์ จากผลการทดสอบสามารถสรุปได้ว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท AK-MCL5 และ KW-CAR17 เชื้อแอคติไมซีสปฏิปักษ์ไอโซเลท LEPE04 และ LEPE18 และ petroleum oil ความเข้มข้น 2% และ 5% สามารถควบคุมโรคราสนิมขาวของเบญจมาศที่เกิดจากเชื้อรา *P. horiana* ในห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาการเพิ่มปริมาณเชื้อปฏิปักษ์ในอาหารสูตรต่าง ๆ กับสภาพการเลี้ยง สำหรับแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า ปัจจัยที่ 1 (สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) อาหารสูตรที่ 3 (สูตรกากถั่วเหลือง) สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลท คือ AK-MCL5 และ KW-CAR17 โดยได้ปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 4.5×10^5 และ 1.6×10^{10} cfu/ml ตามลำดับ ปัจจัยที่ 2 (ระยะเวลาในการเลี้ยง) พบว่า วันที่ 7 หลังการทดสอบเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยไอโซเลท AK-MCL5 ได้ปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 1.2×10^9 cfu/ml และไอโซเลท KW-CAR17 ได้ปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 1.1×10^{10} cfu/ml และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ 1 (สูตรอาหาร) ร่วมกับปัจจัยที่ 2 (ระยะเวลาในการเลี้ยง) พบว่า

อาหารสูตรที่ 3 (สูตรกากถั่วเหลือง) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลท ได้แก่ AK-MCL5 และ KW0CAR17 ได้มากที่สุด โดยมีจำนวนเท่ากับ 1.0 X 10^{10} และ 1.2 x 10^{11} cfu/ml ตามลำดับ และอาหารสูตรที่ 3 (สูตรกากถั่วเหลือง) มีต้นทุนการผลิตเป็นจำนวน 2.25 บาทต่อลิตร สำหรับการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์ พบว่า ปัจจัยที่ 1 (สูตรอาหาร) อาหารสูตรที่ 6 (ISP-2) สามารถให้ปริมาณเชื้อแอคติมัยซีสปฏิปักษ์ไอโซเลท LEPE04 ได้จำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 1.0 x 10^{9} cfu/ml และอาหารสูตรที่ 2 (สูตรเมล็ดถั่วเหลือง) สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์ไอโซเลท LEPE18 ได้จำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 7.4 x 10^{8} cfu/ml ปัจจัยที่ 2 (ระยะเวลาในการเลี้ยง) พบว่า การเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เหมาะสมสำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์ LEPE04 มากที่สุด โดยมีจำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 2.9 x 10^{8} cfu/ml และสำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์ไอโซเลท LEPE18 การเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วันสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อได้มากที่สุด เท่ากับ 3.4 x 10^{8} cfu/ml เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ 1 (สูตรอาหาร) ร่วมกับปัจจัยที่ 2 (ระยะเวลาในการเลี้ยง) พบว่า อาหารสูตรที่ 6 (ISP-2) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์ไอโซเลท LEPE04 ได้ดีที่สุด โดยได้จำนวนเท่ากับ 2.3 x 10^{9} cfu/ml และมีต้นทุนในการผลิตเป็นจำนวน 68 บาทต่อลิตร สำหรับเชื้อแอคติโนมัยซีสปฏิปักษ์ไอโซเลท LEPE18 พบว่า การเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ในอาหารสูตรที่ 2 (สูตรเมล็ดถั่วเหลือง) สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อได้ดีที่สุด โดยได้จำนวนเท่ากับ 1.2 x 10^{9} cfu/ml และมีต้นทุนการผลิต เป็นจำนวน 38.6 บาทต่อลิตร

Highland Research and Development Institute (Public Organization)

Abstract

Fourteen highland herbs species were collected from 4 locations of Royal Project station for isolation of antagonistic microorganisms by tissue transplanting technique. From this technique, 113, 135 and 27 isolates of fungi, bacteria and actinomycetes were isolated, respectively. The isolated microorganisms were used for screening of antagonistic activity in control of chrysanthemum white rust disease (CWRD) caused by *Puccinia horiana* with detached leaf method. The results showed that 2 isolates of antagonistic bacteria, AK-MCL5 and KW-CAR17, could control CWRD with 82.66 and 88.33% of inhibition, respectively and 2 isolates of antagonistic actinomycetes, LEPE04 and LEPE18, had 83.33% and 88.89%, respectively. While all of isolated fungi could not control CWRD. Moreover, five chemicals including salicylic acid, jasmonic acid, chitosan, ethylene and petroleum oil were used for control CWRD and the results showed only 2% and 5% of petroleum oil could control CWRD with 100% of inhibition. Results of the screening test indicated that 2 isolates of antagonistic bacteria, 2 isolates of antagonistic actinomycetes and 2 concentrations of petroleum oil were selected to use in the final test. In the final test, 5 concentrations consist of 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 and 10^8 cfu/ml of antagonistic bacteria and actinomycetes in ratio 1 ml/leaf were carried out. The results showed that antagonistic bacteria isolates AK-MCL5 and KW-CAR17 at concentration of 10^7 – 10^8 cfu/ml could control CWRD with 100% of inhibition at 5 days post-treatment (dpt) while antagonistic bacteria isolates LEPE04 and LEPE18 at the concentration of 10^8 cfu/ml had 89.00% and 91.66% of inhibition at 7 dpt, respectively. The highest inhibition results were given from 2% and 5% of petroleum oil which had 100% of inhibition from 3 dpt. The morphology of *P. horiana* spores were observed under compound microscope after treatments and the results showed that the tested spores showing wilt-shaped and lack of cytoplasm in the spores. In summary, the use of antagonistic bacteria, isolates AK-MCL5 and KW-CAR17, antagonistic actinomycetes, isolates LEPE04 and LEPE18, and petroleum oil at concentration of 2% and 5% had an *in vitro* efficiency for control chrysanthemum white rust disease caused by *P. horiana.* The study on the method for mass production of antagonistic microorganisms is figured out. There are 2 factors used for determination of mass production including factor 1 (media), factor 2 (time for cultivation) and finally, the relationship between factor 1 and factor 2 was determined as well. For cultivation of antagonistic bacteria, factor 1 was medium number 3 (soybean meal residue) pH 7.2 with the conditions 150 rpm, light for 12 h and dark for 12 h at 25-28°C could give the highest bacterial concentration at 4.5×10^9 and 1.6×10^{10} cfu/ml for isolate AK-MCL5 and KW-CAR17, respectively. The factor 2 (time for cultivation) showed

that the optimum days for cultivation is 7 days with the highest bacterial concentration at 1.2×10^{9} and 1.1×10^{10} cfu/ml for isolate AK-MCL5 and KW-CAR17, respectively. The results of relationship between factor 1 (media) and factor 2 (time for cultivation) found that for isolate AK-MCL5 the medium number 3 (soybean meal residue) had the highest bacterial concentration at 1.0×10^{10} cfu/ml and at 1.2×10^{11} cfu/ml for isolate KW-CAR17 when cultured for 7 days. The cost for medium number 3 was 2.25 Baht per litter. Moreover, antagonistic actinomycetes with the conditions 200 rpm, light for 12 h and dark for 12 h at 25-28°C were used for cultivation. The factor 1 (media) was medium number 6 (ISP-2) showed the highest actinomycetes concentration for isolate LEPE04 with 1.0×10^{9} cfu/ml and for isolate LEPE18 found that medium number 2 (soybean seed) had the highest of actinomycetes concentration at 7.4×10^{8} cfu/ml. The factor 2 (time for cultivation) showed that 5 days after cultivation was suitable for isolate LEPE04 with antinomycetes concentration at 2.9×10^{8} cfu/ml, but for isolate LEPE18 after 7 days of cultivation gave the highest of actinomycetes concentration at 3.4×10^{8} cfu/ml. The results of relationship between factor 1 (media) and factor 2 (time for cultivation) found that the medium number 6 (ISP-2) was suitable for isolate LEPE04 when cultured for 5 days with actinomycetes concentration at 2.3×10^{9} cfu/ml, while the medium number 2 (soybean seed) was suitable for isolate LEPE18 with the concentration of 1.2×10^{9} cfu/ml after 5 days of cultivation. The cost for medium number 2 and 6 were 38.6 and 68 Baht per litter, respectively.