พรพรรณ อู่สุวรรณ : การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp.ในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่น (BIOCONTROL OF GRAPE FUNGAL DISEASES BY *BACILLUS* SPP. AND *STREPTOMYCES* SPP.) อ. ที่ปรึกษา : ดร.โสภณ วงศ์แก้ว, 149 หน้า.

โรคที่เกิดจากเชื้อราเป็นโรคที่ทำความเสียหายอย่างมากในองุ่น การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี มักทำให้เชื้อดื้อต่อสารเคมี เกิดการปนเปื้อนสารเคมีกับผลผลิตและสิ่งแวดล้อม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดหาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมาใช้ควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราในองุ่น โดยทำการแยกเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. จากตัวอย่างดินปลูกองุ่นในจังหวัดนครราชสีมาและอุบลราชธานี จากนั้นคัดเลือกเชื้อแต่ละสกุล 5 ไอโซเลตแรกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อรา *Pythium aphanidermatum, Colletotrichum ampelinum* และ *Sclerotium rolfsii* ด้วยวิธี dual culture method จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมในองุ่น ในสภาพใบตัด (detached leaf) และทดสอบการสร้างเอนไซม์ β-1, 3-1, 4-glucanase, protease และ chitinase ทำการระบุชนิดของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเกิดโรคในองุ่น โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และลำดับของนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ผลการศึกษาพบเชื้อ *Bacillus* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ จำนวน 61 ไอโซเลต และเชื้อ *Streptomyces* spp. จำนวน 73 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aphanidermatum*, *C. ampelinum* และเชื้อ *S. rolfsii* ได้ เมื่อนำเชื้อแต่ละสกุล 5 ไอโซเลตแรก มาทดสอบการยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิม พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับไอโซเลต ระยะการเจริญเติบโต และรูปแบบของเชื้อ โดยเชื้อ *Bacillus* spp. ในรูปของ cell suspensions ทั้งระยะ log phase และ stationary phase สามารถยับยั้งการเกิดโรคราสนิมได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งโรคสแคบ และราน้ำค้างได้ ขณะที่ culture filtrate ของเชื้อทั้งสองระยะสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ทั้ง 3 ชนิด ส่วนเชื้อ *Streptomyces* spp. ทั้งรูปแบบ cell suspensions และ culture filtrate ทั้งสองระยะการเจริญเติบโตสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีทั้ง 3 ชนิด สำหรับความสามารถของแต่ละไอโซเลต ในการยับยั้งโรคแต่ละชนิดได้สูงสุด สรุปได้ คือเชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSN502 log phase รูป cell suspensions, BSD603 ทั้ง 2 ระยะ รูป culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SHH202 log phase, SHR103 stationary phase รูป cell suspensions, SYR107 log phase และ SSR107 stationary phase ในรูป culture filtrate ยับยั้งโรคราน้ำค้างได้สูงสุด เชื้อ *Bacillus* ไอโซเลต BSD502 log phase, BSN603 stationary phase ในรูป cell suspensions, BSD101 ทั้ง 2 ระยะ รูป culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* ไอโซเลต SHH202 ทั้ง 2 ระยะ รูป cell suspensions, log phase รูป culture filtrate และ SYR107

ระยะ stationary phase รูป culture filtrate ยับยั้งโรคสแคบได้ดีที่สุด เชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSN301 ทั้ง 2 ระยะ รูป cell suspensions, BSN201 ทั้ง 2 ระยะ รูป culture filtrate เชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSH216 log phase และ SSH211 stationary phase ทั้ง 2 รูปแบบ ยับยั้งโรคราสนิมได้ดีที่สุด เมื่อนำเชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. มาใช้ร่วมกันในการยับยั้งการเกิดโรค พบว่าการใช้ culture filtrate ของเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกันสามารถยับยั้งการเกิดโรคทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าการใช้ cell suspensions ร่วมกัน การทดสอบการสร้างเอนไซม์ พบว่า culture filtrate ของเชื้อ *Bacillus* spp. ในระยะ stationary phase แต่ละไอโซเลต มีกิจกรรมของเอนไซม์ β-1, 3-1, 4-glucanase และ protease แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เมื่อเทียบกับเชื้อในระยะ log phase แต่ไม่พบการสร้างเอนไซม์ chitinase สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. ในสภาพ cell culture แต่ละไอโซเลต สร้างเอนไซม์ β-1, 3-1, 4-glucanase และ chitinase ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่ไม่พบการสร้างเอนไซม์ protease ผลของการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคเชื้อราในองุ่นเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของเชื้ออ้างอิง พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต BSD101, BSD203 และ BSD604 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *B. subtilis* ไอโซเลต BSD406, BSD502, BSD405, BSN301 และ BSN304 ใกล้เคียงกับ *B. firmus* ไอโซเลต BSD603 และ BSN201 ใกล้เคียงกับ *B. pantothenticus* ไอโซเลต BSN501, BSN502 และ BSN603 ใกล้เคียงกับ *B. megaterium* สำหรับเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต SSR203 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *S. cellulosae* ไอโซเลต SSR107 ใกล้เคียงกับ *S. globisporus* ไอโซเลต SSH209 ใกล้เคียงกับ *S. aureoverticillatus* ไอโซเลต SSH211 ใกล้เคียงกับ *S. gancidicus* ไอโซเลต SSH213 ใกล้เคียงกับ *S. ghanaensis* ไอโซเลต SSH216 ใกล้เคียงกับ *S. chattanoogensis* ไอโซเลต SYR205 ใกล้เคียงกับ *S. noboritoensis* ไอโซเลต SYR107 ใกล้เคียงกับ *S. rameus* ไอโซเลต SHH202 ใกล้เคียงกับ *S. malaysiensis* และไอโซเลต SHR103 และ SHR106 ใกล้เคียงกับ *S. cyaneus*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

PORNPAN USUWAN : BIOCONTROL OF GRAPE FUNGAL DISEASES BY *BACILLUS* SPP. AND *STREPTOMYCES* SPP. THESIS ADVISOR : SOPONE WONGKAEW, Ph.D., 149 PP.

DOWNY MILDEW/SCAB/RUST/*BACILLUS* SPP./*STREPTOMYCES* SPP./GRAPE

Fungal diseases cause great losses in grapes. Chemical control can make the causal fungi become resistant and always leave residues on the products and environment. The objective of this study was to select effective antagonists to be used as biocontrol agents for grape fungal disease control. *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. were isolated from soils collected from grape growing areas in Nakhon Ratchasima and Ubonratchathanee provinces. Subsequently, the top 5 isolates from each genus which were most effective in reducing the growth of *Pythium aphanidermatum, Colletotrichum ampelinum* and *Sclerotium rolfsii* in dual culture, were selected for further test with downy mildew, scab (anthracnose), and rust on the detached grape leaves. The most effective isolates were subsequently studied for β-1, 3-1, 4-glucanase, protease and chitinase production and identified to a species level. Identification of the isolates was based on their morphology, biochemical tests and the nucleotide sequence of 16S rDNA. From the soils, 61 isolates of *Bacillus* spp and 73 isolates of *Streptomyces* spp. antagonistic to *P. aphanidermatum, C. ampelinum* and *S. rolfsii* were obtained. These isolates had different capacity in subduing downy mildew, scab, and rust depending on the isolate, growth phase and the form tested. Cell suspensions of *Bacillus* spp. in both log and stationary phases could inhibit rust well but were not effective with downy mildews and scab while the culture filtrates of

both phases were effective to all 3 diseases. In contrast, *Streptomyces* spp. of both phases and forms could reduce all 3 diseases. The isolates that were most effective in reducing the diseases were *Bacillus* isolate BSN502 log phase as a cell suspension; BSD603 in both phases as culture filtrate; *Streptomyces* isolate SHH202 log phase; SHR103 stationary phase as cell suspension; SYR107 log phase and SSR107 as culture filtrate against downy mildews, *Bacillus* isolate BSD502 log phase, BSN603 stationary phase as cell suspension; BSD101 in both phases as culture filtrate; *Streptomyces* isolate SHH202 in both phases as cell suspension; in log phase as culture filtrate and SYR107 stationary phase as culture filtrate against scab, *Bacillus* isolate BSN301 in both phases as cell suspension; BSN201 in both phases as culture filtrate; *Streptomyces* isolate SSH216 log phase and SSH211 stationary phase as both phases against rust. By mixing the culture filtrates of *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. together, the effectiveness could be increased but not that of the cell suspension. As a culture filtrate, activities of β-1, 3-1, 4-glucanase and protease of *Bacillus* spp. could be detected at a highly significant different level among the isolates in the stationary phase but not in the log phase. Chitinase was not detected, however. For *Streptomyces* spp. in cell culture form, activities of β-1, 3-1, 4-glucanase and chitinase could be detected at a highly significant level among the isolates but protease could not be detected. The isolates that were most effective in controlling the 3 diseases were identified as *B. subtilis* (BSD101, BSD203 and BSD604), *B. firmus* (BSD406, BSD502, BSD405, BSN301 and BSN304), *B. pantothenticus* (BSD603 and BSN201), *B. megaterium* (BSN501, BSN502, and BSN603) and *S. cellulosae* (SSR203), *S. globisporus* (SSR107), *S. aureoverticillatus* (SSH209), *S. gancidicus* (SSH211), *S.*

ghanaensis (SSH213), *S. chattanoogensis* (SSH216), *S. noboritoensis* (SYR205), *S. rameus* (SYR107), *S. malaysiensis* (SHH202) and *S. cyaneus* (SHR103 and SHR106).

School of Crop Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2007 Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____