Thesis Title Diversity of Actinomycetes and Fungi from Plant-parasitic Nematode Infested Rhizosphere Soils and Their Biocontrol Potential on *Meloidogyne incognita*

Author Miss Pornthip Ruanpanun

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
	Prof. Dr. Harmut Laatsch	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Kevin D. Hyde	Co-advisor
	Dr. Nuchanart Tangchitsomkid	Co-advisor

Abstract

Root-knot nematodes (RKNs) are serious pathogens that may severely damage the plant root system of major crops resulting in significant yield losses. Nematode-infected plants may then suffer from secondary infection by fungal pathogens that also effect plant growth. The aim of this research was 1) to find microbial antagonists that can be used to control nematodes, 2) to investigate their antifungal activity, and indole-3-acetic acid (IAA) and siderophore production, 3) test nematicidal microorganisms pathogenicity on tomatoes, 4) to determine and characterize bioactive compounds from the most nematicidal isolates and 5) to apply their products to control RKNs in the greenhouse. Thirty-eight samples of plant-parasitic nematode

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

infested rhizosphere soils were collected in provinces in the northern and centre of Thailand and returned to the laboratory for treatment. Treatment involved three methods: 1) a pretreatment with serial dilution, 2) a heat pretreatment and the third was phenol treatment. Glycerol-arginine agar, humic acid vitamin (HV) agar and starch casein (SC) agar were used as selective media for the isolation of actinomycetes. Serial dilution method and potato dextrose agar (PDB) were used for the isolation of fungi. A total of 202 isolates of actinomycetes and fungi were obtained. The morphology, chemotaxonomy and 16S rDNA sequence data of 135 actinomycete isolates were determined. *Streptomyces* (98.5%) was the dominant genus of in parasitic nematode infested rhizosphere soils. More actinomycete species were isolated from pretreated soils by using simple serial dilution than using heat and phenol treatments. SC agar was the best medium for actinomycete isolation. Sixty-seven fungal isolates were obtained and identified based on morphology, dominant with *Penicillium* (37.3%) and *Fusarium* (32.8%) bearing the 8 genera.

All actinomycete and fungal isolates were subjected to primary screening *in vitro* for their effects on *Meloidogyne incognita* egg hatching and juvenile mortality by using spore and culture filtrates. Eight actinomycete and 10 fungal isolates showed high activity in decreasing egg hatch rate and increasing infective second-stage juveniles (J2) mortality rate of *M. incognita.*

All isolates with high nematicidal activity were evaluated for their ability to produce antifungal metabolites using a dual culture method. Five actinomycete isolates (27.0%) including *Streptomyces* sp. strain CMU-JT005, CMU-MH021, CMU-LPS002, CMU-LPS024 and non-*Streptomyces* sp. CMU-LPS010 showed strong activity against the plant pathogenic fungi *Alternaria porri*, *Colletotrichum*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

capsici, *Curvularia sp.*, *Drechslera sp.*, *Exserohilum sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Nigrospora* sp. and *Sclerotium rolfsii*. *Streptomyces* sp. CMU-JT005 and *Streptomyces* sp. CMU-MH021 had strong activity in inhibiting both plant pathogenic fungi and nematodes. But all nematicidal fungal isolates had no activity in inhibiting plant pathogenic fungi. Furthermore, strain CMU-JT005 produced IAA at 30.3 µg/ml and strain CMU-MH021 produced IAA and siderophore as 28.5 and 26.0 µg/ml, respectively. Moreover, both strains showed no pathogenicity on tomatoes and they were selected as a working strain to test against root-knot nematode.

Morphology and chemotaxonomy confirmed that strains CMU-JT005 and CMU-MH021 were *Streptomyces* species. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence showed strain CMU-JT005 to form a distinct clade within the *Streptomyces* tree and it was closely (99.60% similarity) related to *S. morookaensis.* Strain CMU-MH021 forms a distinct clade within the *Streptomyces* tree and is closely (99.36%) related to *S. hiroshimensis*.

Potential strains, *Streptomyces* sp. CMU-JT005 and *Streptomyces* sp. CMU-MH021, were investigated for bioactive compound production after culture in different media. Structure elucidation was analyzed by spectroscopy techniques. Carbazomycin D (**1**), 3-methoxy-2-methyl-carbazole-1,4-quinone (**2**) and carbazomycin F (**3**) were isolated from *Streptomyces* sp. CMU-JT005. Compound **2** is a new natural product. An extract of *Streptomyces* sp. CMU-MH021 was purified, two compounds were identified as fevenulin (**4**) and isocoumarin (**5**). Compound **4** showed activity to decrease egg hatch rate and increase J2 mortality rate of *M. incognita* at minimum inhibitory concentration of 120 µg/ml. This is first report concerning nematicidal activity of fervenulin (**4**).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A biocontrol agent prepared from a culture filtrate of *Streptomyces* sp. CMU-MH021 showed the highest activity to control root-knot disease on chili in the greenhouse, control efficacy was 33.4%. Products or pure compounds from this isolate may provide a new alternative biological agent to control root-knot nematodes in agricultural systems.

Keywords: *actinomycetes, fungi, root-knot nematode, biocontrol, 3-methoxy-2-methyl-carbazole-1,4-quinone, fervenulin*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายของแอคติโนมัยซีสและเชื้อราจากดินรอบรากพืชที่ถูกบุกรุกด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชและความสามารถในการควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita*	
ผู้เขียน	นางสาวพรทิพย์ เรือนปานันท์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร.สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	Prof. Dr. Hartmut Laatsch	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	Assoc. Prof. Dr. Kevin D. Hyde	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยรากปมเป็นศัตรูชนิดหนึ่งที่เข้าทำลายพืชและทำให้สูญเสียผลิตผลทางการเกษตรซึ่งศัตรูพืชดังกล่าวจะเข้าทำลายระบบรากของพืชและมากไปกว่านั้นการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยเป็นการเปิดทางให้เชื้อก่อโรคชนิดอื่นเข้าทำลายพืชได้ง่ายขึ้นโดยเฉพาะเชื้อรา ซึ่งทำให้ผลผลิตลดลงมากยิ่งขึ้น จุดมุ่งหมายของการทำวิจัยเพื่อหาจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปมเพื่อใช้ในควบคุมศัตรูพืชชนิดนี้ ศึกษาคุณสมบัติอื่นๆของเชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวในการยั้บยั้งเชื้อราโรคพืช ความสามารถในการผลิตสาร indole-3-acetic acid (IAA) และ สาร siderophore ศึกษาการก่อโรคของเชื้อต่อต้นมะเขือเทศ รวมไปถึงการแยกสารอื่นและศึกษาคุณสมบัติของสารที่แยกได้จากเชื้อปฏิปักษ์นั้นและใช้ผลิตภัณฑ์จากเชื้อปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปมในการควบคุมโรครากปมของพืชในเรือนทดลอง จากการเก็บตัวอย่างดินรอบรากพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลายทั้งสิ้น 38 ตัวอย่างจากพื้นที่ในภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทยมาทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสโดยวิธี serial dilution pretreatment โดยการใช้ heat method pretreatment และ โดยการใช้ 1.4 % phenol method pretreatment ซึ่งทำการแยกเชื้อบนอาหาร glycerol-arginine agar humic acid vitamin (HV) agar และ starch casein (SC) agar ส่วนการแยกเชื้อราใช้ serial dilution pretreatment แยกบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสิ้น 202 ไอโซเลต โดยเป็นเชื้อแอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คติโนมัยซีสจำนวน 135 ไอโซเลต จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์และยีนส่วน 16S rDNA ของเชื้อแอคติโนมัยซีททั้งหมดพบว่าร้อยละ 98.5 อยู่ในจีนัส *Streptomyces* และจำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีสแยกได้จากดินที่ผ่านวิธีการ serial dilution method พบมากกว่าวิธี heat method และ 1.4% phenol treatment อาหาร SC agar เป็นอาหารที่แยกจำนวนชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีสจากดินที่ผ่านการ pretreatment ทั้งสามวิธีได้หลากหลายและมากที่สุด จำนวนเชื้อที่เหลือทั้งหมด 67 ไอโซเลตเป็นเชื้อราและจากการศึกษาทางสัญฐานวิทยาพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ร้อยละ 37.3 อยู่ในจีนัส *Penicillium* รองลงมาคือจีนัส *Fusarium* ซึ่งมีอยู่ร้อยละ 32.8

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยซีสและเชื้อราทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งอัตราการฟักของไข่และเพิ่มอัตราการตายของตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยใช้สปอร์และน้ำเลี้ยงเชื้อจากเชื้อเหล่านั้น พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 8 ไอโซเลตและเชื้อรา 10 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการฟักของไข่และเพิ่มอัตราการตายของไส้เดือนฝอย *M. incognita* ได้ในระดับสูงหรือระดับ A

จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดในระดับ A มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชโดย dual culture พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีส 5 ไอโซเลท (27.0%) ได้แก่ *Streptomyces* sp. ไอโซเลต CMU-JT005 CMU-MH021 CMU-LPS002 CMU-LPS024 และ non-*Streptomyces* sp. ไอโซเลต CMU-LPS010 มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ: *Alternaria porri Colletotrichum capsici Curvularia sp. Drechslera sp. Exserohilum sp. Fusarium oxysporum Nigrospora* sp. และ *Sclerotium rolfsii*. เชื้อ *Streptomyces* sp. CMU-JT005 และ *Streptomyces* sp. CMU-MH021 สามารถยับยั้งได้ในระดับสูงทั้งไส้เดือนฝอยรากปมและเชื้อราโรคพืชแต่เชื้อราที่ควบคุมไส้เดือนฝอยได้ในระดับ A ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชได้ ไอโซเลต CMU-JT005 สามารถผลิตสาร IAA ได้ที่ความเข้มข้น 30.3 μg/ml ส่วน ไอโซเลต CMU-MH021 สามารถผลิตสาร IAA ได้ที่ความเข้มข้น 28.5 μg/ml และผลิตสาร siderophore ได้ที่ความเข้มข้น 26 μg/ml ฉะนั้นจึงได้คัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้งสองไอโซเลตนี้ในการศึกษาข้อมูลเพื่อใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในงานวิจัยนี้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยืนยันว่า เชื้อไอโซเลต CMU-JT005 และ CMU-MH021 อยู่ในจีนัส *Streptomyces* และจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree จากยีนส่วน 16S rDNA พบว่า *Streptomyces* sp. CMU-JT005 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *S. morookaensis* (99.60%) และเชื้อ *Streptomyces* sp. CMU-MH021 มีความใกล้เคียงกับเชื้อ *S. hiroshimensis* (99.36%).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากเชื้อ *Streptomyces* sp. CMU-JT005 และ *Streptomyces* sp. CMU-MH021ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ได้รับการพิสูจน์โครงสร้างวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโทรสโคปีหลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารชนิดต่างๆ พบว่า carbazomycin D (**1**) 3-methoxy-2-methyl-carbazole-1,4-quinone (**2**) และ carbazomycin F (**3**) แยกได้จาก *Streptomyces* sp. CMU-JT005 ซึ่งงานวิจัยนี้พบเป็นครั้งแรกว่า compound **2** เป็นสารใหม่ที่แยกได้จากธรรมชาติ ในขณะที่ fevenulin (**4**) และ isocoumarin (**5**) แยกได้จากสารสกัดจากเชื้อ *Streptomyces* sp. CMU-MH021โดยพบคุณสมบัติในการลดอัตราการฟักของไข่และเพิ่มอัตราการตายของไส้เดือนฝอยรากปมได้ในระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ 120 μg/ml ของ compound **4** เป็นครั้งแรกในงานวิจัยนี้

จากการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมของเชื้อ *Streptomyces* sp. CMU-JT005 และ *Streptomyces* sp. CMU-MH021 พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. CMU-MH021 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากปมในต้นพริกได้ในระดับสูง ซึ่งให้ค่าประสิทธิภาพในการควบคุมที่ 33.4% ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวรวมถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้น่าจะเป็นแนวทางใหม่ในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในอนาคตต่อไป

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีส เชื้อรา ไส้เดือนฝอยรากปม การควบคุมด้วยชีววิธี 3-methoxy-2-methyl-carbazole-1,4-quinone fervenulin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved