ปริฉัตร นำประดิษฐ์ทรัพย์ : การประเมินประสิทธิภาพสูตรสำเร็จ *Bacillus* sp. ผสมไคโตซานเพื่อชักนำความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ (EVALUATION OF *Bacillus* sp. BASED CHITOSAN FORMULATION TO INDUCE RESISTANCE AGAINST FUSARIUM WILT DISEASE ON TOMATO) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ, 104 หน้า.

คำสำคัญ: ฟูซาเรียม อ๊อกซีสปอรัม/เหี่ยวเหลือง/บาซิลลัส/มะเขือเทศ/ชักนำความต้านทาน

โรคเหี่ยวเหลืองในมะเขือเทศ เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*FOL*) เป็นโรคสำคัญในประเทศไทย ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตมะเขือเทศมากกว่า 50-80% เกษตรกรจำเป็นต้องใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคในปริมาณมาก การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการชักนำความต้านทานในมะเขือเทศต่อโรคเหี่ยวเหลืองของสูตรสำเร็จ *Bacillus*-based chitosan (BBC) ซึ่งเป็นสูตรสำเร็จของแบคทีเรียบาซิลลัสและไคโตซาน โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จ BBC จำนวน 3 สูตร ได้แก่ BBC1, BBC2 และ BBC3 ที่ความเข้มข้นของไคโตซานที่แตกต่างกัน ได้แก่ 800, 1000, 1200 และ 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา พบว่า BBC1 ที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *FOL* ได้ดีที่สุดที่ 45.14% ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีการใช้สารเคมี อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกสูตรดังกล่าวมาทำการศึกษากลไกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (environmental scanning electron microscope : ESEM) แสดงให้เห็นโหมดการทำงานของ BBC1 ที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *FOL* ได้โดยตรงโดยการหลั่งสารต้านเชื้อรา จากนั้นทดสอบอัตราการรอดชีวิต พบว่าหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน ปริมาณเชื้อลดลงเหลือและคงที่ในเดือนที่ 3 มีปริมาณเท่ากับ 10^8–10^6 CFU/g (Log_{10} of 8.51-6.20) หลังจากนั้นมีปริมาณเชื้อมีแนวโน้มลดลง และเมื่อเวลาผ่านไปเป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณการอยู่รอดของเชื้อเหลืออยู่เพียง 10^4 CFU/g (Log_{10} of 4.71) เมื่อนำไปใช้ด้วยวิธีการฉีดพ่นทางใบร่วมกับการราดดิน เปรียบเทียบกับสารเคมีเทอร์ราคลอร์ ซุปเปอร์-เอ็กซ์, บาซิลลัสการค้า และไคโตซานการค้า COS® ในสภาพโรงเรือนทดลอง และภายหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย 7 วันทำการปลูกเชื้อรา *FOL* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลือง พบว่า สูตรสำเร็จ BBC1 สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวเหลืองได้ 78.95% ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารเคมี ซึ่งลดการเกิดโรคได้ 73.69% นอกจากนี้ BBC1 ที่ความเข้มข้น 800 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถส่งเสริมให้มะเขือเทศมีผลผลิตเพิ่มขึ้น 75.0% และมีน้ำหนักต่อผลเพิ่มขึ้น 32.5% เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างใบมะเขือเทศที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ภายหลังการปลูกเชื้อ สาเหตุโรค มาทำการตรวจสอบกลไกการปกป้องตนเอง ได้แก่ ปริมาณกรดซาลิไซลิก (SA), ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ chitinase, ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ β-1,3-glucanase และปริมาณ

กิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) พบว่า 24 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรคมะเขือเทศมีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมี, สูตรสำเร็จ BBC1, บาซิลลัสการค้า และไคโตซานการค้า COS® มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นของปริมาณ SA สูงสุดที่ 9.38, 9.23, 9.15 และ 9.09 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด เช่นเดียวกับมะเขือเทศที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จ BBC1, สารเคมี, ไคโตซานการค้า COS® และ บาซิลลัสการค้า มีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อสาเหตุโรค 1.00, 0.98, 0.98 และ 0.96 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ขณะเดียวกันปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ β-1,3-glucanase มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 30.34, 28.42, 27.07 และ 24.63 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อฉีดพ่นด้วยสารเคมี, สูตรสำเร็จ BBC1, ไคโตซานการค้า COS® และ บาซิลลัสการค้า เช่นเดียวกับปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 92.65, 87.18, 84.83 และ 79.97 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อฉีดพ่นด้วยสารเคมี, ไคโตซานการค้า COS®, สูตรสำเร็จ BBC1 และ บาซิลลัสการค้า นอกจากนี้ เมื่อนำใบมะเขือเทศที่ฉีดพ่นด้วยสิ่งกระตุ้นสูตรสำเร็จ BBC1 และปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy พบว่า สูตรสำเร็จ BBC1 ส่งเสริมให้มะเขือเทศมีการสังเคราะห์สารในกลุ่มไขมัน C=O ester, โปรตีน (Amide I, II) และ C-H bending ในเนื้อเยื่อสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสูตรสำเร็จ BBC1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคโดยตรงและสามารถชักนำให้มะเขือเทศเกิดกระบวนการปกป้องตนเองให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค ดังนั้น การชักนำความต้านทานพืชโดยใช้สูตรสำเร็จ BBC1 จึงเป็นแนวทางที่ดีในการนำไปใช้ในระบบการผลิตมะเขือเทศปลอดภัยและลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา .....

ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

PARICHAT NUMPARDITSUB : EVALUATION OF *Bacillus* sp. BASED CHITOSAN FORMULATION TO INDUCE RESISTANCE AGAINST FUSARIUM WILT DISEASE ON TOMATO. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. NATTHIYA BUENSANTEAI, 104 PP.

Keyword: *Fusarium oxysporum*/Fusarium wilt/Bacillus/Tomato/Induced resistance

Fusarium wilt disease on tomatoes is caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*FOL*). It is a serious disease of tomatoes in Thailand, which can cause tomato yield loss up to 50-80%. Farmers need to use a lot of chemical fungicides to control the disease. The objective of this study was to investigate the resistance induction mechanisms against Fusarium wilt disease in tomato plants after being treated with *Bacillus*-based chitosan (BBC) formulation, which is a formulation of *Bacillus* sp. and chitosan. The efficacy of 3 BBC formulations including BBC1, BBC2, and BBC3 at different concentrations of 800, 1000, 1200, and 2000 µg/ml was tested for inhibiting the growth of Fusarium colonies. The result showed that BBC1 at a concentration of 800 µg/ml was the most effective for inhibiting *FOL* mycelial growth by 45.14%, which was not significantly different from the positive control (terraclor super-x®). Therefore, this formulation was selected for a further study of the mode of action by environmental scanning electron microscope (ESEM). The result pointed out that the BBC1 at a concentration of 800 µg/ml demonstrated the direct mode of action that inhibited *FOL* growth by secretion of antifungal agents. Then, the *Bacillus* viability was evaluated after storage at room temperature until 6 months. The *Bacillus* sp. strain CaSUT008 in the encapsulated form was decreased by 10^8–10^6 CFU/g (Log_{10} of 8.51-6.20) at 1-3 months after storage. After that, the bacteria's survival was decreased to 10^4 CFU/g (Log_{10} of 4.71) at the 6th month. Moreover, the BBC1 at a concentration of 800 µg/ml was applied by foliar spraying and soil drenching to control Fusarium wilt disease and compared with terraclor super-x®, *B. subtillis* commercial, and COS® under greenhouse conditions. The tomato plants were inoculated with *FOL* at 7 days after the last application. It was found that the encapsulated BBC1 was able to reduce the Fusarium wilt disease severity by 78.95%, which was not significantly different from the terraclor super-x® at 73.69%. In addition, the tomato fruit weight and yield of the BBC1 application was significantly increased by 34.5 and 75.0%, respectively when compared with the control treatment. Moreover, the defense mechanisms were investigated in

tomato leaves, including salicylic acid (SA) content, chitinase, β-1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity at 0, 24, and 48 hours after fungal challenge inoculation (HAI). In addition, the accumulation of SA was significantly increased at 24 HAI in the terraclor super-x®, encapsulated BBC1, *B. subtillis* commercial and COS® application at 9.38, 9.23, 9.15, and 9.09 µg g^{-1} fresh weight, respectively. Besides, the tomatoes treated with the encapsulated BBC1, the terraclor super-x®, COS®, and *B. subtillis* commercial showed the highest increase of chitinase activity at 24 HAI as 1.00, 0.98, 0.98, and 0.96 µmol mg^{-1} protein, respectively. The amount of β-1,3-glucanase increased to the highest at 30.34, 28.42, 27.07, and 24.63 µmol mg^{-1} protein treated with terraclor super-x®, encapsulated BBC1, COS®, and *B. subtillis* commercial, respectively. Similarly, PAL activity significantly increased at 24 HAI to levels of 92.65, 87.18, 84.83, and 79.97 µmol mg^{-1} protein when treated with terraclor super-x®, COS®, encapsulated BBC1, and *B. subtillis* commercial, respectively. In addition, the leaf samples treated with BBC1 at 24 HAI were investigated for biochemical changes by Synchrotron FT-IR microspectroscopy. It was found that the encapsulated BBC1 promoted the synthesis of C=O ester lipids, proteins (Amide I, II), and C-H bending in the epidermis, which were significantly higher than those of the control treatment. These results suggested that the encapsulated BBC1 had the efficiency in direct and indirect control of Fusarium wilt on tomatoes by inhibiting fungal pathogen and inducing the plant defense mechanism during host-pathogen interactions. Therefore, the encapsulated BBC1 is a good approach for tomato production systems to reduce the chemical fungicides used for disease control and also their harmful effects on humans and the environment.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Crop Production Technology Student's Signature Parichat Numparditsub

Academic Year 2021 Advisor's Signature