

เหยีบน ฮู่ย ฮวง: การผลิตและการเตรียมอนุภาคนาโนอีลิซิเตอร์และความสามารถในการควบคุมโรคใบจุดมันสำปะหลัง (PREPARATION OF NANOPARTICLE-BASED ELICITORS AND THEIR ABILITY TO CONTROL CASSAVA LEAF SPOT DISEASE) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิญา เป็อนสันเทียะ, 258 หน้า

อัลเทอร์นาเรีย/มันสำปะหลัง/ใบจุด/อนุภาคนาโน/ตัวกระตุ้น


วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ (1) เพื่อตรวจหาเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดมันสำปะหลังในประเทศไทย (2) เพื่อสังเคราะห์อีลิซิเตอร์อนุภาคนาโนที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านโรคใบจุดมันสำปะหลัง และ (3) เพื่อประเมินวิธีการใช้อีลิซิเตอร์อนุภาคนาโนในการลดโรคใบจุดมันสำปะหลังในสภาพโรงเรือนตาข่าย เริ่มจากเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดมันสำปะหลังถูกตรวจสอบและจำแนกตามตามวิธีการของ Koch's postulates ผลการศึกษาพบว่า สามารถแยกเชื้อราบริสุทธิ์และจำแนกเชื้อราได้ทั้งหมดจำนวน 36 ไอโซเลต จากใบพืชสาเหตุโรคใบจุดจำนวน 16 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้มีเชื้อราที่แยกได้ 23 ไอโซเลต ที่แสดงความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค โดยทำให้เกิดจุดแผลเน่าในใบพืชด้วยวิธีการ detached leaves ไอโซเลตที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมกที่สุดนั้น ทำให้เกิดแผลเน่าขนาด  $28.35-32.72 \times 25.70-29.70$  มม. และ  $26.86-30.57 \times 19.20-24.05$  มม. โดยคิดเป็น 30.4 และ 34.8% ของพื้นที่ใบทั้งหมด ตามลำดับ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดลำดับของโมเลกุลบริเวณ ITS region สามารถจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อรา *Alternaria alternata* จำนวน 14 ไอโซเลต และ *Alternaria solani* จำนวน 9 ไอโซเลต ซึ่ง *A. alternata* นั้น มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคใบจุดมันสำปะหลังสูงกว่า *A. solani* จากการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค พบว่า *A. alternata* ก่อให้เกิดอาการแผลตายและแผลไหม้บนใบมันสำปะหลัง เทคนิค Synchrotron (SR) Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อใบบริเวณชั้น epidermis และชั้น mesophyll เมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. alternata* ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณของ pectins, polysaccharides, celluloses, hemicelluloses เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของ lipids, proteins, phenolics, lignins, carbohydrate ลดลงสำหรับการทดลองการสังเคราะห์อีลิซิเตอร์อนุภาคนาโนโดยใช้ Chitosan (CS) (0.4% หรือ 0.5%) และ pentasodium triphosphate (0.2% หรือ 0.5%) กับ salicylic acid (SA) 0.05, 0.1 and 0.2% หรือ silver nitrate 1, 2, 3 mM ถูกนำมาเตรียม CS-NP-loaded SA จำนวน 3 สูตร ได้แก่ N1, N2, N3 และ CS-NP-loaded silver จำนวน 3 สูตร ได้แก่ N4, N5, N6 ตามลำดับ NPs ทั้งหมด 6 สูตร ได้ผ่านการพิสูจน์แล้วว่าไม่เป็นพิษต่อใบมันสำปะหลัง โดยสูตร CS-NP-loaded

SA (N3) และ CS-NP-loaded silver (N6) มีประสิทธิภาพสูงกว่าสูตรอื่นๆ (N1, N2, และ N4, N5) ในการลดความรุนแรงและดัชนีการเกิดโรคใบจุด นอกจากนี้ สูตร N3 ที่ความเข้มข้น 400 ppm และ N6 ที่ความเข้มข้น 200, 400, 800 ppm สามารถลดความรุนแรงของโรคได้เท่ากับ 68.9-73.6% หรือ 37.0-37.7% โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการทดสอบและความหนาแน่นของเชื้อราสาเหตุโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้สูงกว่าหรือเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชเชิงพาณิชย์ (pyraclostrobin และ flutriafol) หรือ อนุภาคนาโน zinc oxide ภายใต้สภาพโรงเรือนตาข่าย ในการอธิบายลักษณะเฉพาะของอนุภาค พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคแบบไฮโดรไดนามิกของ N3 และ N6 เท่ากับ  $89.86 \pm 9.04$  และ  $249.67 \pm 23.97$  นาโนเมตร ในขณะที่ดัชนีการกระจายหลายตัวเท่ากับ  $0.36 \pm 0.02$  และ  $0.53 \pm 0.03$  ศักย์ซีตาเท่ากับ  $22.27 \pm 1.01$  และ  $13.53 \pm 0.74$  mV ตามลำดับ กลุ่มฟังก์ชันและสัญญาณวิทยา รูปแบบทรงกลมและโครงสร้างที่มีรูพรุน เมื่อทำการตรวจสอบและยืนยันโดย FTIR และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Field Emission Scanning Electron Microscope) ตามลำดับ จากนั้น ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสูตร N3 ที่ความเข้มข้น 400 ppm และสูตร N6 ที่ความเข้มข้น 200, 400, 800 ppm ในการลดการเกิดโรคใบจุดในมันสำปะหลังทั้งก่อนและหลังใช้ ในสภาพโรงเรือนตาข่าย และประเมินความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *A. alternata* หลังจากได้รับการทดสอบด้วยสูตร CS-NP ด้วยวิธีการ detached leaves ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคก่อนและหลังการทดสอบนั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคที่ทดสอบด้วย CS-NP นั้นอยู่ที่ 26.77-28.11% ใกล้เคียงกับ flutriafol (28.65%) ซึ่งน้อยกว่าอนุภาคนาโน zinc oxide เชิงพาณิชย์ (32.58%) การทดสอบด้วยสูตร N3 ความเข้มข้น 400 ppm และสูตร N6 ความเข้มข้น 200 ppm สามารถยับยั้งการงอกของโคนินเดียวได้ 32.51 และ 23.25% ตามลำดับ การแช่ชิ้นส่วนเส้นใยของ *A. alternata* ในสูตรสารข้างต้น สามารถลดการเจริญเติบโตของเส้นใยและความรุนแรงในการก่อให้เกิดแผลเน่าได้ 42.26 และ 51.11% ยิ่งไปกว่านั้น การแช่ในสารข้างต้นนี้ทำให้มีอัตราของเซลล์ตายต่อเซลล์ที่ยังมีชีวิตสูงกว่าการแช่ในอนุภาคนาโน zinc oxide เชิงพาณิชย์ แต่ต่ำกว่าใน flutriafol สรุปได้ว่า CS-NP loaded SA (N3) ที่ความเข้มข้น 400 ppm และ CS-NP loaded silver (N6) ที่ความเข้มข้น 200 ppm นั้น สามารถนำมาใช้ในการจัดการกับโรคใบจุดในมันสำปะหลังได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนักศึกษา ..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... 

NGUYEN HUY HOANG: PREPARATION OF NANOPARTICLE-BASED ELICITORS AND THEIR ABILITY TO CONTROL CASSAVA LEAF SPOT DISEASE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. DR. NATTHIYA BUENSANTEAI, 258 PP.

#### *Alternaria*/CASSAVA/LEAF SPOT/NANOPARTICLE/ELICITOR

The objectives of this study were (1) to detect fungal pathogen associated with leaf spot disease on cassava in Thailand, (2) to synthesize effective nanoparticle (NP) - based elicitors against cassava leaf spot disease, and (3) to evaluate the application method of NP elicitors to reduce cassava leaf spot disease at net-house conditions. First, the fungal pathogen causing leaf spot disease on cassava plants was detected and identified following Koch's postulates. The results showed that 36 fungal isolates were isolated and purified from 16 leaf spot samples. Among these, 23 fungal isolates showed virulent activities by causing rot lesions on detached leaves assay. The most and highly virulent fungal isolate caused rot lesions with sizes 28.35-32.72 × 25.70-29.70 mm and 26.86-30.57 × 19.20-24.05 mm, accounting for 30.4 and 34.8% of total leaf area, respectively. The morphology and molecular sequencing on ITS region identified 14 isolates of *Alternaria alternata* and 9 isolates of *Alternaria solani*, the causal agents of cassava leaf spot disease in Thailand. The *A. alternata* was found to be more virulent than *A. solani*. In the pathogenicity test, *A. alternata* caused necrotic spot lesions and blight symptoms on cassava leaves. In addition, Synchrotron (SR) Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was used to determine the biochemical changes in the epidermis and mesophyll tissues of leaves infected by *A. alternata*. The results showed an increase in pectins, polysaccharides, celluloses, and hemicelluloses and a decrease in lipids, proteins, phenolics, lignins, and carbohydrate components. Moreover, the chitosan (CS) (0.4%) and pentasodium triphosphate (TPP) (0.2%) were mixed with salicylic acid (SA) at 0.05, 0.1 and 0.2% to prepare three formulations of CS-NP-loaded SA named N1, N2, N3, respectively. Similarly, CS (0.5%) and TPP (0.5%) were mixed with silver nitrate at 1, 2, 3 mM to prepare three formulations of CS-NP-loaded silver named N4, N5, N6, respectively. The six NPs

formulations were proved to be non-toxic to cassava leaves. The CS-NP-loaded SA (N3) and CS-NP-loaded silver (N6) were more effective than the other remaining formulations (N1, N2, and N4, N5) in reducing disease severity and disease index of leaf spots. Furthermore, the N3 at 400 ppm and N6 at 200, 400, 800 ppm could reduce disease severity at 68.9-73.6% or 37.0-37.7%, depending on treatment time and pathogen density and could enhance plant growth higher than or equally to commercial fungicides (pyraclostrobin and flutriafol) or zinc oxide NPs under net house conditions. In characterization, the hydrodynamic diameters of N3 and N6 were  $89.86 \pm 9.04$  and  $249.67 \pm 23.97$  nm while polydispersity index was  $0.36 \pm 0.02$  and  $0.53 \pm 0.03$ , and the zeta potential was  $22.27 \pm 1.01$  and  $13.53 \pm 0.74$  mV, respectively. The functional group and morphology as spherical forms and porous architecture were confirmed by FTIR and Field Emission Scanning Electron Microscope, respectively. After that, the effectiveness of pre- and post-treatments of N3 at 400 ppm and N6 at 200, 400, 800 ppm on reducing cassava leaf spot at net house conditions and the potential virulence of *A. alternata* treated by the CS-NP formulations in detached leaves were evaluated. The results showed that the disease severities of pre- and post-treatments were not significant while the disease severities of CS-NP treatments were 26.77-28.11% similar to flutriafol (28.65%), which are significantly lower than commercial zinc oxide NP (32.58%). The N3 400 ppm and N6 200 ppm treatments could inhibit *A. alternata* conidial germination by 32.51 and 23.25%, respectively. The soaking of *A. alternata* plugs into these two treatments could reduce mycelial growth and their potential virulence causing rot lesions by 42.26 and 51.11%, respectively. Furthermore, the soaking of these two treatments caused a higher cell death/live rate than one of the commercial zinc oxide NPs but lower than one of the flutriafol. In conclusion, CS-NP loaded SA (N3) at 400 ppm and CS-NP loaded silver (N6) at 200 ppm are a promising solution in cassava leaf spot management.

School of Crop Production Technology  
Academic Year 2021

Student's Signature .....   
Advisor's Signature .....   
Co-advisor's Signature ..... 