ธนา ใจชอบสันเทียะ: ความหลากหลายของเชื้อ *Cercospora canescens* และกลไกการต้านทานของถั่วเขียวต่อโรคใบจุด (DIVERSITY OF *Cercospora canescens* AND RESISTANCE MECHANISMS OF MUNGBEAN TO CERCOSPORA LEAF SPOT) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิฌาณ์ ตันตสวัสดิ์, 119 หน้า.

คำสำคัญ: โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค/เบต้ากลูคาเนส/ไคติเนส/พอลิฟีนอลออกซิเดส/การตอบสนองอย่างเฉียบพลัน/ความต้านทานในเนื้อเยื่อที่ห่างไกลบาดแผล

โรคใบจุด เป็นโรคที่มีความสำคัญในการผลิตถั่วเขียวในประเทศไทย โรคชนิดนี้ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดถั่วเขียว ดังนั้นการทดสอบระดับความต้านทานของพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเขียว และการพัฒนาวิธีการจัดการโรคจึงมีความจำเป็นเร่งด่วน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดในถั่วเขียว (*Cercospora canescens*) ศึกษากลไกความต้านทานของพันธุ์/สายพันธุ์ถั่วเขียวต่อการเข้าทำลายของโรคใบจุด และประเมินประสิทธิภาพของวิธีการปลูกถ่ายเชื้อด้วยเส้นใยของเชื้อ *C. canescens* ซึ่งการทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ 1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการก่อโรค และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *C. canescens* ด้วยเครื่องหมาย randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 2) การตรวจสอบกลไกความต้านทานของถั่วเขียวพันธุ์/สายพันธุ์ต่าง ๆ ต่อโรคใบจุด และ 3) การประเมินประสิทธิภาพของวิธีการปลูกถ่ายเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับการประเมินในสภาพไร่โดยใช้เส้นใยของเชื้อ *C. canescens* ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าอาหารสูตร mungbean leaf agar (MLA) และ lettuce leaf agar (LLA) มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมขนาดโคโลนีในการเจริญเติบโตของ *C. canescens* และพบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเมื่อเลี้ยงบนอาหารต่างชนิดกัน การวิเคราะห์เครื่องหมาย RAPD แสดงว่าเชื้อ 20 ไอโซเลตมีความเหมือนกันทางพันธุกรรม 0.84-1.00 จากการวิเคราะห์ unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) สามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 4 กลุ่มตามจังหวัดต้นกำเนิด จากการประเมินระดับความรุนแรงในการก่อโรคในถั่วเขียว พบว่า ถั่วเขียวสายพันธุ์ V4718 และ Super5 มีความต้านทานต่อไอโซเลตของเชื้อส่วนใหญ่ จากผลการวิจัยนี้ บ่งชี้ว่าเชื้อ *C. canescens* จากต่างแหล่งกันมีการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พันธุกรรม และระดับความรุนแรงในการก่อโรคที่แตกต่างกัน ดังนั้นถั่วเขียวที่มียีนต้านทานแบบเดี่ยวอาจไม่มีประสิทธิภาพมากพอในการต้านทานต่อโรคชนิดนี้ในทุกพื้นที่ จากการทดสอบกลไกความต้านทานของถั่วเขียวหลากหลายพันธุ์/สายพันธุ์ พบว่าถั่วเขียวพันธุ์อ่อนแอสองสายพันธุ์ ได้แก่ EGMD-6D และ SUT1 มีระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ β-1,3-glucanase chitinase และ polyphenol oxidase (PPO) ต่ำกว่าในพันธุ์/สายพันธุ์อื่นในใบที่เชื้อเข้าทำลายในขณะที่สายพันธุ์ต้านทาน ได้แก่

V4718 และ Super5 มีปฏิกิริยาของเอนไซม์เหล่านี้ในระดับที่สูงกว่า นอกจากนี้ถั่วเขียวพันธุ์/สายพันธุ์ต่าง ๆ แสดงการเกิด hypersensitive response (HR) ในระดับแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยการเกิด HR นั้น พบเฉพาะในสายพันธุ์ต้านทาน V4718 และ Super5 และไม่พบในพันธุ์/สายพันธุ์อ่อนแอหรือต้านทานปานกลาง อย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้ ไม่พบการกระตุ้นเพิ่มระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ β-1,3-glucanase chitinase และ PPO ในใบที่อยู่ด้านบนและด้านล่างซึ่งไม่ถูกเชื้อเข้าทำลาย รวมทั้งความต้านทานที่ถูกกระตุ้นในเนื้อเยื่อที่ห่างไกลบาดแผล (systemic acquired resistance; SAR) การวิเคราะห์ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ของโปรตีนรวมจากใบที่เชื้อเข้าทำลาย แสดงแถบโปรตีนขนาด 17 kDa ที่เพิ่มขึ้นเฉพาะในพันธุ์อ่อนแอ ได้แก่ EGMD-6D และ SUT1 และแถบโปรตีนขนาด 39 kDa ที่เพิ่มขึ้นในพันธุ์/สายพันธุ์ส่วนใหญ่หลังการปลูกถ่ายเชื้อ ยกเว้นสายพันธุ์ Super5 ที่มีการแสดงออกตั้งแต่ก่อนการปลูกถ่ายเชื้อ (0 วัน) การแสดงออกที่แตกต่างกันของโปรตีนเหล่านี้แสดงถึงกลไกความต้านทานที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ของถั่วเขียว จากการทดลองนี้บ่งชี้ว่า เอนไซม์ β-1,3-glucanase chitinase และ PPO มีบทบาทสำคัญต่อกลไกความต้านทานของถั่วเขียวต่อการเข้าทำลายของโรคใบจุด เพื่อพัฒนาวิธีการปลูกถ่ายเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการโดยการใช้สายละลายแขวนลอยเส้นใยของเชื้อ *C. canescens* ทำการทดลองด้วยวิธีใบตัด (detached leaf inoculation) โดยใช้เส้นใยที่ได้จากเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อโรคมากที่สุดจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต SUT-1 SUT-4 PAK-1 และ PAK-2 ในการทดสอบระดับความต้านทาน/อ่อนแอของถั่วเขียวจำนวน 19 พันธุ์/สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ พบว่าระดับความรุนแรงของโรคของถั่วเขียวแต่ละพันธุ์/สายพันธุ์ที่ประเมินโดยวิธีใบตัดให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในสภาพไร่ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.822 ($p < 0.01$) จากวิธีการประเมินระดับความต้านทานทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพไร่ พบว่าถั่วเขียวสายพันธุ์ V4718 V4785 V4758 และ Super5 มีความต้านทานต่อโรคใบจุด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต จากผลการทดลองนี้ บ่งชี้ว่าการประเมินระดับความต้านทานด้วยวิธีการปลูกถ่ายเชื้อลงบนใบตัดในระดับห้องปฏิบัติการโดยการใช้สายละลายแขวนลอยเส้นใยของเชื้อ *C. canescens* มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เกิดอาการของโรคและการระบุพันธุ์/สายพันธุ์ต้านทานเทียบเท่ากับการประเมินในสภาพไร่

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนักศึกษา ชม ใจของสันเทียะ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

TANA JAICHOPSANTHIA: DIVERSITY OF *Cercospora canescens* AND RESISTANCE MECHANISMS OF MUNGBEAN TO CERCOSPORA LEAF SPOT. THESIS ADVISOR: PROF. PIYADA ALISHA TANTASAWAT, Ph.D., 119 PP.

Keyword: Pathogenesis related proteins/β-1,3-glucanase/Chitinase/Polyphenol oxidase/Hypersensitive response/Systemic acquired resistance

Cercospora leaf spot (CLS) is a serious disease that poses a significant threat to mungbean cultivars in Thailand, leading to considerable damage, yield losses, and reduced seed quality. Assessing resistance levels in mungbean genotypes and developing effective disease management strategies are essential. The objectives of this study were to evaluate the diversity of *Cercospora canescens*, the causal agent of CLS, investigate the resistance mechanisms of mungbean genotypes against CLS, and determine the effectiveness of the laboratory inoculation using the mycelium of *C. canescens*. The experiment consisted of three main parts: 1) examination of the morphological characteristics, pathogenicity, and genetic diversity of *C. canescens* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, 2) investigation of the resistance mechanisms exhibited by various mungbean genotypes against CLS, and 3) evaluation of the effectiveness of the laboratory inoculation method compared with field evaluation by using the mycelium of *C. canescens.* In the morphological study of *C. canescens*, it was discovered that mungbean leaf agar (MLA) and lettuce leaf agar (LLA) provided optimal conditions for promoting colony diameter in the growth of *C. canescens*, and each isolate demonstrated variations in morphological traits when grown on different media. Analysis using RAPD revealed a genetic similarity ranging from 0.84 to 1.00 among the twenty isolates studied. Cluster analysis, employing the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA), classified these isolates into four distinct groups based on their location origins. The pathogenicity assessment demonstrated that mungbean genotypes V4718 and Super5 exhibited resistance against the majority of the isolates. The findings indicate that *C. canescens* isolates from various locations exhibit variations in growth, morphology, genetics, and virulence. Consequently, it suggests that a single resistance gene may not be effective across all geographical regions. The investigation of the resistance mechanisms of various mungbean genotypes to CLS showed that two susceptible genotypes, EGMD-6D and

SUT1 had lower levels of β-1,3-glucanase, chitinase, and polyphenol oxidase (PPO) activities in infected leaves. The resistant genotypes V4718 and Super5, on the other hand, had higher levels of β-1,3-glucanase, chitinase, and PPO activities. Moreover, the mungbean genotypes displayed varying levels of hypersensitive response (HR) symptoms, which was consistent with the enzyme activities. HR symptoms were observed in the resistant genotypes, V4718 and Super5, but not in the susceptible or moderately resistant genotypes. However, no evidence of systemic induction of β-1,3-glucanase, chitinase, and PPO activities in non-infected upper and lower leaves as well as systemic acquired resistance (SAR) was found in this study. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis revealed the 17 kDa band that was only induced in the susceptible mungbean genotypes EGMD-6D and SUT1, and the 39 kDa band which was induced in most mungbean genotypes following inoculation, with the exception of Super5 that expressed this band since the pre-inoculation stage (0 DAI). The differential expression of these proteins suggests that resistance mechanisms differ among mungbean genotypes. This finding suggests that β-1,3-glucanase, chitinase, and PPO play important roles in the defense mechanisms of mungbean against CLS. To develop a laboratory inoculation method utilizing mycelium of *C. canescens*, the detached leaf inoculation was performed using mycelium obtained from the most virulent *C. canescens* isolates, namely SUT-1, SUT-4, PAK-1, and PAK-2 to assess the resistance/susceptibility levels of 19 mungbean genotypes. When comparing genotypes, the disease severity levels of mungbean genotypes evaluated by detached leaf inoculation were comparable to field inoculation with a correlation coefficient of 0.822 ($p < 0.01$). Both laboratory and field inoculation methods consistently identified genotypes V4718, V4785, V4758, and Super5 as CLS-resistant, which were useful for future breeding programs. These findings indicate that the laboratory *C. canescens* mycelium-inoculated detached leaf assay was just as effective as field inoculation at inducing disease symptoms and identifying resistant genotypes.

School of Crop Production Technology
Academic Year 2022

Student's Signature Tana Jaichapanthia
Advisor's Signature Pimol Absha Tantivit