Dissertation Title	Induction of Tomato Resistance Against *Fusarium* Wilt by *Streptomyces*	
Author	Miss Vilasinee Saengnak	
Degree	Doctor of Philosophy (Plant Pathology)	
Advisory Committee	Lect. Dr. Sarunya Valyasevi	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Chaiwat To-anun	Co-advisor
	Lect. Dr. Ratchadawan Cheewangkoon	Co-advisor

ABSTRACT

Naturally infected tomato plants cv. 'Cherry' and cv. 'Thomas' showing typical *Fusarium* wilt symptoms were collected from eleven commercial fields at Doi Inthanon National Park, Chiang Mai, Thailand. A tissue transplanting technique yielded one hundred and twenty-six pathogenic isolates from infected stems. The initial color of colonies on Potato Dextrose Agar (PDA) was white, and then the color turned to deepen with aging within 10 days, which divided, according to a visual representation of colors, into 3 categories as follows:- purplish-white cottony colony (67 isolates, 53.17%), white cottony colony (43 isolates, 34.13%) and orangish-white cottony colony (16 isolates, 12.70%). The average growth rate of the colonies was 8.51 ± 0.13 mm/day. The colonies from cultures showed hyaline branching septate hyphae and smooth margins. Conidiophores typically scattered as solitary phialides on the aerial mycelium. They formed 3 types of asexual spore including:- 1) microconidia are one-celled hyaline oval-ellipsoid, straight to curved with an average 6.63-8.50 × 2.65-2.82 µm, 2) macroconidia are 3 - 5 septate, fusoid-subulate, straight to curved with an average with an average 35.37-39.20 × 3.43-5.50 µm and 3) chlamydospores are both smooth and rough walled, generally solitary and vary in shape and size. These morphological

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

characteristics were identified as *Fusarium oxysporum* based on the identification criteria by Nelson *et al*. (1983) and Synder and Hans (2003).

The pathogenicity test confirmed that one hundred and twenty-six isolates of isolated *F. oxysporum* were pathogenic to tomato seedlings cv. 'Bonny Best' (susceptible to *Fusarium* wilt). At final assessment (21 days after pathogen inoculation), 59 (46.83%), 57 (45.24%), 4 (3.17%), 5 (3.97%) and 1 (0.79%) isolates of *F. oxysporum* revealed variable scale 1 – 5 of disease severity index, respectively. According to disease severity index, 3 (2.38%), 113 (89.69%), 9 (7.14%) and 1 (0.79%) isolates were categorized as avirulent (DSI = 1), low (DSI ≤ 3.5), moderate (DSI > 3.5 to 4.5) and high virulent groups (DSI > 4.5) based on pathogenicity, respectively. In addition, some *F. oxysporum* isolates of each pathogenic group were randomly selected to re-test for pathogenicity. The results of disease severity were the same as the first test that cv. 'Bonny Best', whereas unable to infect the resistant cv. 'EWS-37434' (resistant to *Fusarium* wilt). The more detailed tests confirmed that these isolates were identified as *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*). The isolate *Fol*CK_117 was identified as race2 virulent phenotype and was selected to be used as the presentative of virulent strains in further experiments.

Streptomyces isolate NSP3 was selected to be the representative of the antagonistic strain from six isolates; NSP1 – 6, by to Dual culture assay. The NSP3 revealed the highest rate of colony growth inhibition of *Fol*CK_117 at 79.50% and sporulation at 89.00%.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Plants have acquired defense mechanisms to counteract potential pathogens and the strategy involves inducible defense reactions that are activated after elicitor applications. The recognition event leading to expression of 4 pathogenesis-related proteins (*PR*-protein), including 1) *PR-1a* encoding pathogenesis-related class 1, 2) *Chi3* encoding acidic chitinase, 3) *Chi9* encoding basic chitinase and 4) *CEVI-1* encoding peroxidase, was analysed from mRNA of tomato plants cv. 'Bonny Best' after inoculation of *Streptomyces* NSP3. The effects of either seed treatment or soil application with the NSP3 and the combination of two methods were compared against

challenge the inoculation with *Fol*CK_117. Afterwards, samples were analysed using Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) and normalized to the *Actin* gene at 0, 3, 6, 12 and 24 hour post-inoculation (hpi). The results implied that combination of seed treatment and together with soil application was the most effective for induction and accumulation of these *PR* proteins. Gene expression of *PR-1a* was increased to maximum (73.1 fold) at 3 hpi. Gene expression of *Chi3* was remarkably increased at 24 hpi to 56.1 fold. Gene expression of *Chi9* and *CEVI-1* were also increased to maximum at 12 hpi (50.7 and 43.3 fold, respectively). These results suggested that *Streptomyces* NSP3 is a strong elicitor of plant defense responses.

In greenhouse conditions, the effects of combination of seed treatment or soil application with the *Streptomyces* NSP3 were tested against *Fusarium* wilt disease. The tomato cv. 'Bonny Best' (susceptible to *Fusarium* wilt) and cv. 'EWS-37434' (resistant to *Fusarium* wilt) were used for comparison. Overall results confirmed that induction of defense proteins positively correlates with defense against pathogen invasion involved with *Fusarium* wilt disease in the pot experiments. This study implied that the NSP3 did not have the effect the increasing of tomato seed germination, but higher vigour index potential was affected. The NSP3 also protected tomato plants from infection of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici Fol*CK_117 causing *Fusarium* wilt by colonization inner root tissues and potting soil. Moreover, this study clearly showed that *Streptomyces* NSP3 could increase seedling vigour and consistently reduced the disease incidence. Disease assessment showed potential of the NSP3 on disease reduction. The results clearly showed that cv. 'Bonny Best' plants treated wiyh challenge inoculation of the NSP3 and with *Fol*CK_117 survived until harvesting, whereas plants inoculated with only *Fol*CK_117 died at 21 days after inoculation. Furthermore, they had the ability on increasing plant growth parameters, plant height, root length, aerial fresh and dry weight, root fresh and dry weight and fruit weight.

.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หัวข้อดุษฎีนิพนธ์	การชักนำมะเขือเทศให้ต้านทานต่อโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมโดยสเตรปโตมัยซีส	
ผู้เขียน	นางสาววิลาสินี แสงนาค	
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (โรคพืช)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. สรัญยา วัลยะเสวี	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	อาจารย์ ดร. รัชดาวรรณ ชีวังกูร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างต้นมะเขือเทศพันธุ์เชอร์รี และโทมัส ที่แสดงอาการโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมจากแปลงปลูกเชิงการค้า จำนวน 11 แปลง ในบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย แล้วแยกเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี tissue transplanting technique จากท่อลำเลียงได้จำนวน 126 ไอโซเลท เชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) แสดงลักษณะโคโลนีคล้ายสำลี โดยแรกเริ่มพบโคโลนีสีขาว ต่อมาจึงเปลี่ยนสีตามระยะเวลา ภายใน 10 วัน ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มโคโลนีสีขาวอมม่วง จำนวน 67 ไอโซเลท (53.17%) กลุ่มโคโลนีสีขาว 43 ไอโซเลท (34.13%) และกลุ่มโคโลนีสีขาวอมส้ม 16 ไอโซเลท (12.70%) อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีเฉลี่ย 8.51 ± 0.13 มม/วัน พบเส้นใยมีผนังกั้น แตกแขนง สีใส และผิวเรียบ สร้างก้านชูสปอร์ (conidiophore) แบบเดี่ยวบนเส้นใย สร้างสปอร์เซลล์แบบไม่อาศัยเพศ 3 ชนิด ได้แก่ 1) microconidia มีเซลล์เดียว สีใส รูปทรงไข่ (oval-ellipsoid) บางเซลล์หัวท้ายงอเล็กน้อย มีขนาดเฉลี่ย 6.63-8.50 × 2.65-2.82 ไมครอน 2) macroconidia มี 3 – 5 เซลล์ สีใส รูปทรงจันทร์เสี้ยว (fusoid-subulate) มีทั้งแบบตรง และหัวท้ายงอเล็กน้อย มีขนาดเฉลี่ย 35.37-39.20 × 3.43-5.50 ไมครอน และ 3) chlamydospore สีใสมีทั้งผนังเรียบและหยาบ ส่วนมากเกิดแบบเดี่ยว มีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอน ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวสามารถจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ตามหลักเกณฑ์ของ Nelson *et al*. (1983) และ Synder and Hans (2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลทสามารถก่อให้เกิดโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมบนต้นมะเขือเทศพันธุ์บอนนีเบสท์ ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคนี้ โดยในวันสุดท้ายของการประเมินโรค (21 วัน หลังปลูกเชื้อราสาเหตุโรค) พบเชื้อราที่ก่อโรคได้ในระดับ 1 – 5 (disease severity index; DSI) จำนวน 59 (46.83%), 57 (45.24%), 4 (3.17%), 5 (3.97%) และ 1 (0.79%) ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อจัดกลุ่มเชื้อราตามความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มไม่ก่อโรค (DSI เท่ากับ 1) จำนวน 3 ไอโซเลท (2.38%) กลุ่มก่อโรคในระดับต่ำ (DSI มากกว่าหรือเท่ากับ 3.5) จำนวน 113 ไอโซเลท (89.69%) กลุ่มก่อโรคในระดับปานกลาง (DSI 3.5 – 4.5) จำนวน 9 ไอโซเลท (7.14%) และกลุ่มก่อโรคในระดับสูง (DSI มากกว่า 4.5) จำนวน 1 ไอโซเลท (0.79%) นอกจากนี้เมื่อสุ่มคัดเลือกตัวแทนเชื้อราจากแต่ละกลุ่มมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคอีกครั้ง พบว่าให้ผลการทดสอบใกล้เคียงกับการทดสอบครั้งแรกในต้นมะเขือเทศพันธุ์บอนนีเบสท์ แต่กลับไม่สามารถก่อโรคได้ในต้นมะเขือเทศพันธุ์ EWS-37434 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวฟิวซาเรียม ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคนี้พบว่าเชื้อราที่แยกได้จัดจำแนกเป็นเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) ซึ่งคัดเลือกเชื้อราที่สามารถก่อโรคได้รุนแรงที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท *Fol*CK_117 ถูกจำแนกอยู่ใน race 2 เป็นตัวแทนสำหรับการทดสอบขั้นต่อไป

ในการทดสอบนี้สามารถคัดเลือกเชื้อสเตรปโตมัยซีสไอโซเลท NSP3 จากทั้งหมดจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1 – 6 ด้วยวิธี Dual Culture test เพื่อเป็นตัวแทนเชื้อปฏิปักษ์ในการทดสอบขั้นต่อไป เนื่องจากสามารถมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Fol* ไอโซเลท *Fol*CK_117 เท่ากับ 79.50% และยับยั้งการสร้างโคนิเดียได้ 89.00%

พืชมีกลไกการป้องกันตนเองในการถูกเข้าทำลายจากเชื้อสาเหตุโรคพืช และปฏิกิริยาชักนำความต้านทานนี้สามารถเกิดขึ้นได้หลังจากได้รับตัวกระตุ้น (elicitor) เมื่อศึกษาการกระตุ้นยีนต้านทาน (pathogenesis-related protein; *PR*-protein) ในต้นมะเขือเทศพันธุ์บอนนีเบสท์ต่อเชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 4 ยีน ได้แก่ *PR-1a* (pathogenesis-related class 1), *Chi3* (acidic chitinase), *Chi9* (basic chitinase) และ *CEVI-1* (peroxidase) โดยการสกัด mRNA ของต้นมะเขือเทศพันธุ์บอนนีเบสท์ที่ได้รับการปลูกเชื้อสเตปโตมัยซีส ไอโซเลท NSP3 ด้วยวิธีแช่เมล็ด (seed treatment) การราดดิน (soil application) วิธีการร่วมระหว่างสองวิธีดังกล่าว และการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค จากนั้นนำมาศึกษาด้วยเทคนิค Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าว เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน *Actin* หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเป็นเวลา 0, 3, 6,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าการปลูกเชื้อสเตรปโตมัยซีสด้วยวิธีการร่วมระหว่างสองกรรมวิธีสามารถกระตุ้นยีนต้านทานทั้ง 4 ชนิด ได้มากที่สุด โดยที่ยีน *PR-1a* ถูกกระตุ้นสูงสุดได้ในชั่วโมงที่ 3 หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรค โดยพบการแสดงออกสูงขึ้น 73.1 เท่า ส่วนยีน *Chi3* สามารถกระตุ้นได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรค โดยพบการแสดงออกสูงขึ้น 56.1 เท่า ในขณะที่การแสดงออกของยีน *Chi9* และ *CEVI-1* พบถูกกระตุ้นสูงสุดในเวลาเดียวกัน คือ 12 ชั่วโมง หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรค ตุโรค โดยพบการแสดงออกสูงขึ้น 50.7 และ 43.3 เท่า ตามลำดับ ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า เชื้อสเตรปโตมัยซีสไอโซเลท NSP3 มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นตัวกระตุ้นความต้านทานโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมทางชีวภาพ

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของการใช้เชื้อสเตรปโตมัยซีส ไอโซเลท NSP3 ด้วยกรรมวิธีร่วมระหว่าง seed treatment และ soil application เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวฟิวซาเรียมในสภาพโรงเรือน โดยทดสอบกับมะเขือเทศพันธุ์บอนนีเบสท์ ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ และ EWS-37434 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคเหี่ยวฟิวซาเรียม ผลการทดสอบทั้งหมดสามารถยืนยันได้ว่า การกระตุ้นยีนต้านทานในต้นมะเขือเทศให้สูงขึ้น มีผลสอดคล้องต่อการควบคุมโรคในสภาพโรงเรือน ซึ่งในการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อสเตรปโตมัยซีส ไอโซเลท NSP3 ไม่มีผลต่อความงอกของเมล็ด แต่มีผลทำให้ความแข็งแรงของต้นกล้า (Seedling vigour index) สูงขึ้น นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการตั้งรกราก (Colonization) ในเนื้อเยื่อราก และดินปลูกได้ เมื่อตรวจสอบการเกิดโรคเหี่ยวฟิวซาเรียม พบว่าเชื้อสเตรปโตมัยซีสมีความสามารถลดการเกิดโรคได้ ซึ่งเห็นผลชัดเจนในพันธุ์บอนนีเบสท์ วิธีที่ใช้เชื้อสเตรปโตมัยซีส และปลูกเชื้อราสาเหตุโรค พบว่าต้นมะเขือเทศสามารถมีชีวิตรอดได้จนถึงระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต ในขณะที่ต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อราสาเหตุเพียงอย่างเดียว ตายตั้งแต่ 21 วันหลังปลูกเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อสเตรปโตมัยซีส ไอโซเลท NSP3 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของต้นมะเขือเทศได้ ได้แก่ เพิ่มความสูงต้น เพิ่มความยาวราก เพิ่มน้ำหนักสดและแห้งของส่วนเหนือดินและราก รวมถึงเพิ่มน้ำหนักของผลผลิตอีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved