Thesis Title **Seed-borne *Macrophomina phaseolina* in Mungbean *(Vigna radiata)* and Blackgram (*Vigna mungo*): Effects on Seed Qualities and Its Control**

Author **Mr. Md. Shamsur Rahman**

Ph.D. **Agronomy**

Examining Committee

Dr. Suchada Vearasilp	**Chairman**
Associate Professor Dr. Sombat Srichuwong	**Member**
Associate Professor Dr. Pornchai Lueang-A-Papong	**Member**
Assistant Professor Dr. Chaiwat Jatisatieur	**Member**
Professor Dr. Ismail Hossain	**Member**

ABSTRACT

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. in mungbean and blackgram with special reference to its effects on seed quality, health, and efficacy of contemporary seed treatment methods against this pathogen were investigated. Seed-lots of four varieties and three elite lines of mungbean and two varieties of blackgram obtained from the different crop research institutes of Thailand were assayed using blotter method for the presence of different seed-borne fungi. The incidence of seed-borne *M. phaseolina* ranged from 2.00 to 29.75% in mungbean and 24.00 to 27.25% in blackgram samples. In addition to *M. phaseolina*, other 12 fungi *viz. Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger, Aspergillus terreus, Alternaria sp., Cladosporium sp., Curvularia sp., Fusaium sp., Penicillium sp., Colletotrichum sp., Drechslera sp., Rhizopus sp. and Myrothecium sp.* in mungbean and 10 fungi *viz. Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger, Aspergillus terreus, Alternaria sp., Cladosporium sp., Curvularia sp., Fusarium sp., Penicillium sp., Colletotrichum sp. and Myrothecium sp.* in blackgram were found to be associated. However, among all fungi, *M. phaseolina* was the principal cause of germination reduction. It also rendered the germinating radicles

blemished, and in most of the cases, inhibited the initiation of plumules, which eventually led to rotting of whole germinating seedlings. Numerous pycnidia, mycelia, and microsclerotia were commonly observed on the sprout.

The different types of pathogenicity tests confirmed that *M. phaseolina* is highly pathogenic producing pycnidia and microsclerotia on the host tissues. The infected plant parts were re-cultured in PDA and presence of *M. phaseolina* was proved by the Koch's postulates. The fungus was located exclusively in the seed coat. Various types of transmission studies indicated that *M. phaseolina* could transmit from seed to germinating seeds and seedlings causing seed rot, blemish of radicle, arrested growth of plumule, and lesion in the cotyledonary leaves, stems, and true leaves. As a result, pre-emergence and post-emergence mortality appeared, and profuse pycnidia and microsclerotia developed on the dead plant parts. A considerable number of seedlings did not show apparent symptoms shortly after emergence, but all plants died within 21 days, following the production of copious pycnidia and microsIcerotia on the dead seedlings.

Macrophomina phaseolina severely curtailed the seed quality and post-emergence health of mungbean and blackgram. Upon inoculation of the mungbean and blackgram seeds with this fungus, the number of abnormal seedlings increased to a great extent and the seedling vigor in terms of shoot length, root length and dry weight was significantly lower. In addition to viability and vigor, *M. phaseolina* could severely reduce the storability of seeds. The Accelerate aging test detected significant amount of abnormal seedlings from the inoculated seeds of mungbean and blackgram. Biochemical analysis of *M. phaseolina* infected seeds revealed depletion of carbohydrate and concurrent increase in protein content.

Different types of seed treatment methods were found to be effective in preventing the menace of this pathogen in mungbean and blackgram seeds. Hot water treatment at 56^{0}C to 58^{0}C for 10 to 15 minutes enhanced germination and culminated in the best results in mungbean, whereas the treatment for 15 to 20 minutes at the same temperature range turned out to be the best in blackgram. Seed treatment with six fungicides viz. Thiram, Metalexyl, Captan, Dithane M-45,

Vitavax and Benlate were done of which three fungicides namely Dithane M-45, Benlate and Thiram were found to be very effective against of *M. phaseolina* in *in-vitro* trial. Treatment of seeds with these three fungicides also showed absolute elimination of *M. phaseolina* along with significant increase in germination. Biological seed treatment with six antagonists *viz. Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma harzianum*, *T. hamatum* and *T. viride* were done. Among them, only three *Trichoderma* species gave the best antagonistic performance against *M. phaseolina* in *in-vitro* condition. Moreover, when seed treatment was done with the spores of these *Trichoderma* species, all three species were able to control *M. phaseolina* successfully and promote germination noticeably.

Therefore, on the basis of the present study, all three methods of seed treatments *viz.* hot water treatment, chemical seed treatment with three fungicides and biological seed treatment with three *Trichoderma* species hold promise against *M. phaseolina* in mungbean and blackgram. However, before making any recommendation of seed treatment to farmers, comprehensive research including field trials is needed.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ เชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ที่ติดมากับเมล็ดถั่วเขียว และถั่วเขียวผิวดำ : ผลต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์และการป้องกันกำจัด

ชื่อผู้เขียน นายชามซูร รอฮอมาน

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่

คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร. สุชาดา เวียรศิลป์	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. สมบัติ ศรีชวงศ์	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. พรชัย เหลืองอาภาพงศ์	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ จาติเสถียร	กรรมการ
ศาสตราจารย์ ดร. อิสมายล์ สุสเซน	กรรมการ

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ค้นคว้าขบวนการเกิดโรคของเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* ในถั่วเขียวและถั่วเขียวผิวดำ โดยเน้นด้านผลกระทบต่อคุณภาพเมล็ด ความงอกของเมล็ดและสุขภาพของต้นกล้า รวมทั้งการหาวิธีการกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ด โดยใช้เมล็ดถั่วเขียว 7 พันธุ์และถั่วเขียวผิวดำ 2 พันธุ์ ซึ่งรวบรวมมาจากศูนย์วิจัยพืชไร่หลายแห่ง นำเมล็ดไปเพาะในกระดาษชื้นเพื่อตรวจหาเชื้อราต่างๆที่ติดมากับเมล็ด พบว่าในเมล็ดถั่วเขียวมีเชื้อรา *M. phaseolina* ติดมา 2.00-29.75 % ส่วนในถั่วเขียวผิวดำพบ 24.00-27.75% นอกจากนั้นยังพบเชื้อราอื่นๆที่ติดมากับเมล็ดถั่วเขียวอีก 12 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Drechslera* sp., *Rhizopus* sp. and *Myrothecium* sp. และในถั่วเขียวผิวดำ 10 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., and *Myrothecium* sp. อย่างไรก็ตาม เฉพาะเชื้อรา *M. phaseolina* เท่านั้นที่ทำให้ความงอกลดลง รากอ่อนมีแผล ส่วนของยอดอ่อนเจริญช้าและต้นอ่อนเน่าตาย ตามส่วนต่างๆที่เป็นโรคพบโครงสร้างหลายชนิดของเชื้อราเช่น เส้นใย pycnidia และ microsclerotia ขึ้นคลุมอยู่

จากการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *M. phaseolina* ด้วยวิธีการต่างๆ พบว่าเชื้อรานี้มีความสามารถสูงในการทำให้เกิดโรคทั้งในถั่วเขียวและในถั่วเขียวผิวดำ บนส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรคพบโครงสร้าง pycnidia และ microsclerotia อยู่มากมาย และเมื่อนำเนื้อเยื่อ

ส่วนที่เป็นโรคไปทำการพิสูจน์โรค (Koch's postulates) บนอาหาร PDA พบว่าเป็นเชื้อรา *M. phaseolina* เชื้อรานี้พบอาศัยอยู่ในเปลือกหุ้มเมล็ด สำหรับการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดด้วยวิธีการต่างๆ แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *M. phaseolina* ถ่ายทอดจากเปลือกหุ้มเมล็ดไปยังเมล็ดที่กำลังงอกและต้นกล้า เป็นสาเหตุให้เมล็ดเน่า เกิดรอยแผลที่รากอ่อน การเจริญของยอดอ่อนชะงัก และมีรอยแผลบนใบเลี้ยงและใบจริง ผลต่อมาคือการตายของต้นกล้าและมีโครงสร้าง pycnidia และmicrosclerotia ขึ้นอยู่บนส่วนของต้นที่ตาย ส่วนต้นกล้าบางส่วนที่ไม่แสดงอาการของโรคให้เห็นภายหลังการงอกแต่จะตายทั้งหมดภายในเวลา 21 วัน และพบโครงสร้างต่างๆของเชื้อราเจริญอยู่

เชื้อรา *M. phaseolina* มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดและสุขภาพของต้นกล้าถั่วเขียวและถั่วเขียวผิวดำมาก จากการปลูกเชื้อราลงบนเมล็ดพืชทั้งสองชนิดพบว่า มีจำนวนต้นกล้าผิดปกติเพิ่มขึ้นรวมทั้งความแข็งแรงของต้นกล้าที่วัดจากความยาวราก ความยาวต้นอ่อนและน้ำหนักแห้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากเชื้อรานี้มีผลต่อความมีชีวิตและความแข็งแรงของต้นกล้าแล้วยังมีผลต่ออายุการเก็บรักษาเมล็ดด้วย จากการทดสอบคุณภาพโดยการเร่งอายุการเก็บรักษาเมล็ด พบต้นกล้ามีลักษณะผิดปกติมากขึ้น ผลการวิเคราะห์ทางด้านชีวเคมีในเมล็ดพืชที่มีเชื้อนี้อยู่พบว่ามีปริมาณ คาร์โบไฮเดรตลดลงแต่ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น

การหาวิธีการกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธีการต่างๆพบว่า วิธีการแรกการใช้น้ำร้อนสามารถลดปริมาณเชื้อราและช่วยเพิ่มความงอกของเมล็ดได้มาก เมล็ดที่ผ่านการแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 56°C และ 58°C นาน 10 –15 นาที ได้ผลดีในเมล็ดถั่วเขียว ในขณะที่เมล็ดถั่วเขียวผิวดำต้องใช้เวลานาน 15-20 นาที วิธีที่สองการใช้สารเคมี โดยใช้สารเคมี 6 ชนิด ได้แก่ Thiram, Metalaxyl, Captan, Dithane M-45, Vitavax และ Benlate พบว่า Benlate, Dithane M-45 และ Thiram มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งเมื่อใช้คลุกเมล็ดก็พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อรา *M. phaseolina* และช่วยให้ความงอกของเมล็ดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ วิธีสุดท้ายการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อและคลุกเมล็ดก่อนปลูก โดยจุลินทรีย์ทั้ง 6 ชนิดที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa, P. putida, Bacillus cereus, Trichoderma harzianum, T. hamatum* และ *T. viride* พบว่า *Trichoderma* ทั้ง 3 species มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *M. phaseolina* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้นเมื่อนำ สปอร์ของเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดนี้คลุกเมล็ดก่อนปลูกพบว่าสามารถช่วยเพิ่มความงอกของเมล็ดให้สูงขึ้น

ดังนั้นจากการศึกษาการหาวิธีกำจัดเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ติดมากับเมล็ดทั้ง 3 วิธี ซึ่งได้แก่ การใช้น้ำร้อน การใช้สารเคมี และการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยเฉพาะ *Trichoderma* spp. สามารถนำมาใช้ต่อต้านหรือควบคุมเชื้อรา *M. phaseolina* ได้ดี อย่างไรก็ตาม การจะนำวิธีการต่างๆนี้ไปแนะนำเกษตรกร ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในสภาพแปลงปลูกด้วย