

การควบคุมโรคสแคบในองุ่นที่เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary  
โดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้น

นางสาวอินชญา ประกองคำ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพืชศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
ปีการศึกษา 2554

**CONTROL OF SCAB DISEASE IN GRAPES CAUSED BY**  
***Sphaceloma ampelinum* de BARY BY INDUCED**  
**RESISTANCE**



**Inchaya Prakongkha**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the**  
**Degree of Master of Science Program in Crop Science**  
**Suranaree University of Technology**  
**Academic Year 2011**

การควบคุมโรคสแคปในองุ่นที่เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary โดยใช้  
ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผศ. ดร.สุดชล วุ่นประเสริฐ)

ประธานกรรมการ

(ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(อ. ดร.ณัฐธิญา เป็อนสันเทียะ)

กรรมการ

(รศ. ดร.พิศาล ศิริธร)

กรรมการ

(อ. ดร.วุฒิ คำนกิตติกุล)

รักษาการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

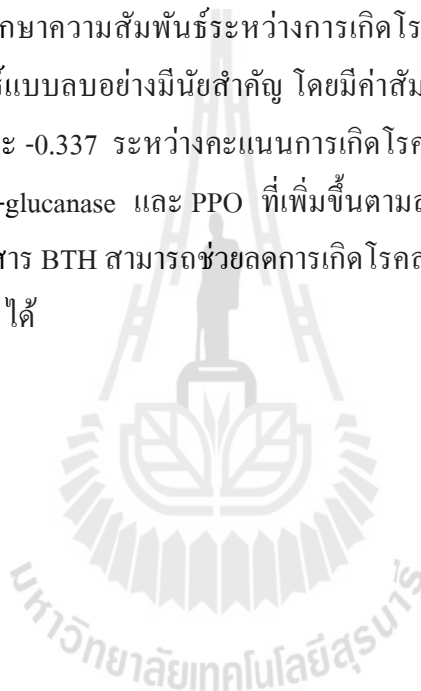
(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อินชญา ประกองคำ : การควบคุมโรคสแคบในองุ่นที่เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary โดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้น (CONTROL OF SCAB DISEASE IN GRAPES CAUSED BY *Sphaceloma ampelinum* de Bary BY INDUCED RESISTANCE) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว, 55 หน้า.

การควบคุมโรคสแคบในองุ่นที่เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* โดยใช้ความต้านทานหลังถูกกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้น กระทำโดยแยกเชื้อ *S. ampelinum* จากองุ่นพันธุ์ Black queens จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่าไอโซเลต GB4 ให้จำนวนแผลมากที่สุด เฉลี่ย 12.5 แผลต่อชิ้นใบ การศึกษาความต้านทานที่เกิดจากการถูกกระตุ้นต่อเชื้อไอโซเลต GB4 กระทำโดยฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 2 ชนิดคือ ไคโตซานและ Benzo (1,2,3)-thiadiazole-7-carbothionic acid S-methyl ester (BTH) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น และสปอร์ของเชื้อราสนิมองุ่น (*Phakopsora ampelopsidis*) และลิลาวดี (*Coleosporium plumeriae*) บนใบกลางของกิ่งชำองุ่นพันธุ์ Black queens อายุ 2 เดือนในสภาพเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยการเก็บผลวิเคราะห์ปริมาณ Salicylic acid (SA) และกิจกรรมเอนไซม์ chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase และ polyphenoloxidase (PPO) การทดลองจัดตั้งทดลองเป็น 4 ชุด โดย 3 ชุดเก็บผลเพื่อนำไปวิเคราะห์ SA และเอนไซม์ สุ่มเก็บตัวอย่างใบมาวิเคราะห์ 3 ช่วงเวลา คือหลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้นทันที หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วันและหลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 14 วัน ซึ่งเป็นครั้งที่โรคแสดงอาการและ 1 ชุด ใช้สำหรับประเมินคะแนนการเกิดโรคหลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 14 วัน หลังจากฉีดพ่นกิ่งองุ่นที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้นแล้ว 7 วันโดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *S. ampelinum* GB4 ผลประเมินการเกิดโรคพบว่า การฉีดพ่นสิ่งกระตุ้นสารละลายไคโตซานเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัม/ลิตร เกิดโรคสแคบต่ำที่สุดเฉลี่ย 1.33 คะแนน และเริ่มแสดงอาการของโรคในวันที่ 5 หลังปลูกเชื้อ ในขณะที่การใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นชุดควบคุม เกิดโรคสแคบสูงสุดเฉลี่ย 4.89 คะแนน และเริ่มปรากฏอาการของโรคในวันที่ 2 หลังการปลูกเชื้อ สำหรับการใส่สปอร์ของราสนิมทั้งสองชนิดไม่มีผลในการลดความรุนแรงของการเกิดโรค นอกจากนี้การวิเคราะห์ปริมาณ SA และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 7 วันพบว่าไคโตซานและ BTH ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นสามารถกระตุ้นให้องุ่นมีปริมาณสาร SA และมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การกระตุ้นโดยใช้สปอร์ของเชื้อราสนิมทั้งสองชนิดทำให้ระดับของ SA และเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม การเพิ่มของปริมาณ SA และกิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 14 หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น เป็นไปในแนวทางเดียวกันกับที่พบในวันที่ 7 แต่ความแตกต่างของปริมาณสารและกิจกรรมสูงมากกว่าที่พบใน 7 วัน โดยสารไคโตซานเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัม/ลิตร และ BTHเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณสาร SA เพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 13.08 และ 12.15  $\mu\text{g g}^{-1}$  fresh

weight ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากความเข้มข้นในระดับอื่น ๆ สำหรับกิจกรรมของ เอนไซม์ chitinase พบว่า BTH เข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้อ่อนนุ่มกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 0.765 Unit/mg protein รองลงมาคือ ไคโตซานทุกความเข้มข้นและ BTH ความเข้มข้น ที่เหลือ ซึ่งเพิ่มกิจกรรมได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างจากกิจกรรมในชุดควบคุม และใน การรับการทดลองที่ฉีดพ่นด้วยสปอร์ราสนิม ซึ่งมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย การเพิ่มขึ้นของกิจกรรม เอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase มีลักษณะคล้ายกันกับการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase การเพิ่มขึ้น ของกิจกรรมเอนไซม์ PPO พบว่า BTH 200 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถเพิ่มกิจกรรมได้สูงสุดคือ 11.23  $\mu\text{mol Quinone formed min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$  รองลงมาคือ BTH 100 มิลลิกรัม/ลิตร และสปอร์ของรา สนิมลีลาวดี สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรค และการเกิดสารในกระบวนการ SAR พบว่า มีสหสัมพันธ์แบบลบอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ - 0.770, -0.771, -0.566 และ -0.337 ระหว่างคะแนนการเกิดโรคกับปริมาณสาร SA, กิจกรรมของ เอนไซม์ chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase และ PPO ที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การใช้สารไคโตซาน และสาร BTH สามารถช่วยลดการเกิดโรคสแคบที่เกิดจากเชื้อรา *S. ampelinum* ในองุ่นพันธุ์ Black queens ได้



INCHAYA PRAKONGKHA : CONTROL OF SCAB DISEASE IN  
GRAPES CAUSED BY *Sphaceloma ampelinum* de Bary BY INDUCED  
RESISTANCE. THESIS ADVISOR : SOPONE WONGKAEW, Ph.D., 55 PP.

GRAPES/*Sphaceloma ampelinum*/INDUCED RESISTANCE

Control of scab disease in grape caused by *Sphaceloma ampelinum* by induced resistance was done by isolating *S. ampelinum* from Black queens grape in the Suranaree University of Technology Farm. After pathogenecity test, the GB4 which gave the highest averaged lesion number of 12.5 lesions per detached leaf was used as a representative isolate for the study. Resistance induction was done by spraying 2 activators, chitosan and Benzo (1,2,3)-thiadiazole-7-carbothionic acid S-methyl ester (BTH) at 3 different concentrations and 2 spore suspensions of grape rust (*Phakopsora ampelopsidis*) and Frangipani rust (*Coleosporium plumeriae*) onto the middle leaf of Black queens grape cuttings using the Randomized Complete Block Design (RCBD), sample collection for Salicylic acid (SA) and enzyme activity analysis. The experiment was conducted under a greenhouse condition. The experimental units were divided into 4 sets in which 3 were used for leaf analysis of SA and enzyme activities immediately, 7 and 14 days after spraying. The 4<sup>th</sup> set was used for disease scoring at 14 days after the induction. After the induced grapes were inoculated with suspension of *S. ampelinum* conidia, it was found that grape cuttings sprayed with 5,000 mg/l chitosan gave the lowest averaged disease score of 1.33 and the symptoms appeared at 5 days after inoculation compared to the score of 4.89 and 2 days latent period in the control treatment in which the sterile water was applied. Induction by spore suspension of rust pathogens failed to reduce scab severity on the tested grapes.

Analysis of SA content and enzyme activities in induced grape leaves at 7 days found that chitosan and BTH at 3 concentrations could increase SA content and enzyme activities significantly while those induced by rust spores increased only marginally compared to that of the control treatment. Elevations of the SA content and enzyme activities at 14 days after induction were similar to that at 7 days but the differences between the treated and control treatments were much higher. At 14 days, 2500 mg/l chitosan and 100 mg/l BTH gave the highest increase of SA at 13.08 and 12.15  $\mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight respectively although there was no statistical difference among these of other concentrations. For chitosan activities, 200 mg/l BTH could increase the highest activity of 0.765 Unit/mg protein seconded by all concentrations of chitosan and BTH at other concentrations. For the latter, they were statistically different from that of the control treatment but were not different among each other. Grapes sprayed with rust spore had slight increase of chitinase activity compared to that of the control. For  $\beta$ -1,3-glucanase, the increase was similar to that of the chitinase. For PPO, it was found that 200 mg/l BTH could increase the highest activity of 11.23  $\mu\text{mol Quinone formed min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein seconded by 100 mg/l BTH and Frangipani rust spore. Negative correlations were found in the relationship between disease score and systemic acquired resistance (SAR) chemicals. The correlation coefficients between scab scores and SA content, chitinase activity,  $\beta$ -1,3-glucanase activity and PPO activity were -0.770, -0.771, -0.566 and -0.337 respectively. Results of this study indicated that chitosan and BTH could be used to reduce scab severity in Black queens grapes.

School of Crop Production Technology      Student's Signature\_\_\_\_\_

Academic Year 2011      Advisor's Signature\_\_\_\_\_

Co-advisor's Signature\_\_\_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อันได้แก่

อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ชี้แนะแนวทาง อบรมสั่งสอน ช่วยเหลือเอาใจใส่เป็นอย่างดี และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

อาจารย์ ดร.ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำ ติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พิศาล ศิริขรร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุธชล วุ่นประเสริฐ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ สำหรับคำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไข ระหว่างการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อติมานันต์ ต้นตอสวัสดิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะณีโกวิท ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแนะนำระหว่างทำงานวิจัย พร้อมทั้งขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาฯ ที่ให้ความเมตตา และคอยอบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาบางส่วน

ขอขอบคุณ คุณกิตติมา ชาญกิจโกศล และเจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาชน คุณกิริติ กิริติเลขา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอบคุณ คุณมรรุกร สมพงษ์ คุณสุลิตา กล้าการชาย คุณวิโรจน์ เขาวัวพิเศษ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ผู้ร่วมเรียนในระดับบัณฑิตศึกษา ที่ให้คำปรึกษา คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอนและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดี อีกทั้งให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจที่ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลงด้วยดี

อินชญา ประครองคำ

## สารบัญ

หน้า

|                                                |   |
|------------------------------------------------|---|
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย)                             | ก |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)                          | ค |
| กิตติกรรมประกาศ                                | จ |
| สารบัญ                                         | ฉ |
| สารบัญตาราง                                    | ณ |
| สารบัญภาพ                                      | ญ |
| บทที่                                          |   |
| 1. บทนำ                                        | 1 |
| 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา                  | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย                       | 3 |
| 1.3 สมมติฐานการวิจัย                           | 3 |
| 1.4 ขอบเขตการวิจัย                             | 3 |
| 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ                  | 3 |
| 2. ทัศนัวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง       | 4 |
| 2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตองุ่น           | 4 |
| 2.2 โรคองุ่นที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ     | 5 |
| 2.2.1 โรคราน้ำค้าง (Downy mildew)              | 5 |
| 2.2.2 โรคราสนิม (Rust)                         | 5 |
| 2.2.3 โรคสแคบ (Scab, Antracnose)               | 6 |
| 2.3 โรคสแคบขององุ่น                            | 6 |
| 2.3.1 ความสำคัญและประวัติการระบาด              | 6 |
| 2.3.2 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อ <i>S. ampelimum</i> | 7 |
| 2.3.3 อาการวิทยา                               | 8 |
| 2.3.4 วงจรการเกิดโรค                           | 8 |
| 2.3.5 การควบคุมโรคสแคบ                         | 9 |

## สารบัญ (ต่อ)

### หน้า

|         |                                                                                                                                                                        |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4     | การควบคุมโรคโดยวิธีกระตุ้นให้เกิดความต้านทาน (Induced resistance)                                                                                                      | 10 |
| 2.4.1   | กลไกการป้องกันการรุกรานจากเชื้อก่อโรค                                                                                                                                  | 10 |
| 2.4.2   | กระบวนการสร้างความต้านทานของพืชจากการถูกกระตุ้น<br>(Systemic Acquired Resistance, SAR)                                                                                 | 12 |
| 3.      | วิธีดำเนินงานวิจัย                                                                                                                                                     | 22 |
| 3.1     | การแยกเชื้อ <i>S. ampelinum</i> จากองุ่นพันธุ์ Black queens                                                                                                            | 22 |
| 3.2     | การทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenecity test)                                                                                                                     | 22 |
| 3.3     | การแยกเชื้อและเตรียม inoculum ของเชื้อราสนิมจากลิลาวดี<br>( <i>Coleosporium plumeriae</i> Pat.) และเชื้อราสนิมจากองุ่น<br>( <i>Phakopsora ampelopsidis</i> Diet.&Syd.) | 22 |
| 3.4     | การศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นความต้านทานในการควบคุม<br>โรคสแคบ                                                                                                     | 23 |
| 3.5     | การประเมินผลการทดลอง                                                                                                                                                   | 24 |
| 3.5.1   | วิธีการประเมินคะแนนการเกิดโรค (disease scores)                                                                                                                         | 24 |
| 3.5.2   | การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic Acid (SA)                                                                                                                                 | 24 |
| 3.5.3   | การสกัดโปรตีนรวม                                                                                                                                                       | 24 |
| 3.5.3.1 | การวิเคราะห์ chitinase activity                                                                                                                                        | 25 |
| 3.5.3.2 | การวิเคราะห์ $\beta$ -1,3-glucanase activity                                                                                                                           | 25 |
| 3.5.3.3 | การวิเคราะห์ปริมาณ polyphenol oxidase (PPO)                                                                                                                            | 26 |
| 3.6     | การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ                                                                                                                                         | 26 |
| 4.      | ผลการทดลอง                                                                                                                                                             | 27 |
| 4.1     | การแยกเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> จากองุ่นพันธุ์ Black queens                                                                                                          | 27 |
| 4.2     | การทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenecity test)                                                                                                                     | 28 |
| 4.3     | การศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นความต้านทานในการ<br>ควบคุมโรคสแคบ                                                                                                     | 29 |
| 4.3.1   | การประเมินคะแนนการเกิดโรค (disease scores)                                                                                                                             | 29 |

## สารบัญ (ต่อ)

### หน้า

|       |                                                                                                                                                   |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.2 | การวิเคราะห์ปริมาณ (Salicylic acid).....                                                                                                          | 30 |
| 4.3.3 | การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส (Chitinase activity).....                                                                                      | 31 |
| 4.3.4 | การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูคาเนส<br>( $\beta$ -1,3-glucanase activity).....                                                                | 33 |
| 4.3.5 | การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส<br>(polyphenol oxidase activity : PPO).....                                                        | 34 |
| 4.3.6 | สหสัมพันธ์ระหว่างคะแนนการเกิดโรคกับปริมาณสารที่<br>เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Systemic acquired resistance (SAR)<br>ที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้น..... | 36 |
| 5.    | สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....                                                                                                                     | 38 |
|       | รายการอ้างอิง.....                                                                                                                                | 43 |
|       | ภาคผนวก.....                                                                                                                                      | 52 |
|       | ประวัติผู้เขียน.....                                                                                                                              | 55 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                                                                                            | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 2.1 คุณสมบัติของ PR proteins แต่ละชนิดที่สร้างขึ้นหลังถูกกระตุ้นจากเชื้อโรค จุลินทรีย์<br>ปฏิปักษ์หรือสารเคมี.....                                                                  | 16   |
| 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สีและขนาดของโคโลนีของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> 4 ไอโซเลต<br>ที่อายุ 30 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA).....                              | 28   |
| 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบ<br>ทั้ง 4 ไอโซเลต ในองุ่นพันธุ์ Black queens ในสภาพใบตัด.....                                         | 28   |
| 4.3 การประเมินการเกิดโรคสแคบในใบองุ่นพันธุ์ Black queens หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้น<br>และปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย <i>S. ampelinum</i> .....                            | 29   |
| 4.4 ปริมาณสาร salicylic acid ในใบองุ่นพันธุ์ Black queens หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและ<br>ปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย <i>S. ampelinum</i> .....                           | 31   |
| 4.5 กิจกรรมเอนไซม์ chitinase ในใบองุ่นพันธุ์ Black queens หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้น<br>และปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย <i>S. ampelinum</i> .....                           | 32   |
| 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์ $\beta$ -1,3-glucanase ในใบองุ่นพันธุ์ Black queens หลังจากได้รับ<br>สิ่งกระตุ้นและปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย <i>S. ampelinum</i> .....           | 34   |
| 4.7 กิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase activity (PPO) ในใบองุ่นพันธุ์ Black queens<br>หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย <i>S. ampelinum</i> ..... | 35   |
| 4.8 สหสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคสแคบกับปริมาณสารและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรม<br>กระบวนการ SAR ที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้น.....                                                 | 36   |

## สารบัญภาพ

ภาพที่

หน้า

|     |                                                                                                                                                             |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 | กลไกการเกิด SAR ภายใน cell ที่ถูกกระตุ้นด้วย SAR elicitors .....                                                                                            | 14 |
| 2.2 | กระบวนการเกิด SAR ที่กระจายไปยังส่วนต่างๆของพืชหลังถูกกระตุ้น .....                                                                                         | 15 |
| 4.1 | ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> 4 ไอโซเลตที่แยกได้จากองุ่นพันธุ์<br>Black queens บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) อายุ 30 วัน ..... | 27 |
| 4.2 | ความรุนแรงของโรคสแคบจากเชื้อ <i>S. ampelinum</i> บนองุ่นพันธุ์ Black queens ที่ได้รับ<br>สิ่งกระตุ้นต่าง ๆ กัน .....                                        | 37 |

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

องุ่น (*Grape, Vitis vinifera* L.) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอบอุ่น แถบเอเชียไมเนอร์ เป็นไม้ผลประเภทไม้เนื้อแข็ง ลำต้นและกิ่งเลื้อยเป็นเถา ดอกและผลออกเป็นช่อ (นันทกร บุญเกิด, 2546) ในปี 2550 มีพื้นที่ปลูกทั่วโลก 47,416,250 ไร่ มีผลผลิตรวมประมาณ 67,221,000 ตัน โดยผลผลิตส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมไวน์คิดเป็นร้อยละ 71 บริโภคผลสดร้อยละ 27 และทำองุ่นแห้งร้อยละ 2 (FAO, 2007) องุ่นเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เพราะอุดมไปด้วยกลูโคส กรดซิตริก วิตามินซี เหล็ก แคลเซียม และโปแตสเซียม นอกจากนี้ ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม มีสรรพคุณในการแก้กระหายน้ำ ขับปัสสาวะ รวมทั้งป้องกันโรคตับและดีซ่าน องุ่นจึงเป็นพืชที่สร้างรายได้ให้กับเกษตรกร และมีแนวโน้มที่จะพัฒนาประโยชน์ต่อไปอย่างมากในอนาคต

ในปี 2550 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกองุ่นรวม 26,180 ไร่ อยู่ในภาคตะวันตก ภาคกลาง ภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีผลผลิตรวมประมาณ 71,561 ตัน (รัฐพล นัตรบรรยงค์, 2551) พันธุ์ที่นิยมปลูก มีทั้งชนิดที่มีเมล็ด และไม่มีเมล็ดได้แก่ ไวท์มะละกา (White malaga) คาร์ดินัล (Cardinal) ไวท์โกโก้ (White gogo) โกลเด้นมัสแคต (Golden muscat) และอัลมาเรีย (Almaria) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีเมล็ด ส่วนพันธุ์ที่ไม่มีเมล็ดได้แก่ ทอมสันซีสเลส (Thomson seedless) ลูสเพิลเล็ต (Loose perlette) ดีไลท์ (Delight) และเฟรมซีสเลส (Flame seedless) เป็นต้น นอกจากการผลิตเพื่อบริโภคสดและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ แล้ว ปัจจุบันมีการปลูกองุ่นเพื่อการท่องเที่ยวกันอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันประเทศไทยยังมีแนวโน้มการนำเข้าองุ่นสูงขึ้นทุกปี จากสถิติการนำเข้าองุ่นในปี พ.ศ. 2554 มีการนำเข้าสูงถึง 1,298 ตัน คิดเป็นมูลค่า 39.6 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) เหตุที่มีการนำเข้าองุ่นเพิ่มขึ้นนั้น เป็นเพราะผลผลิตภายในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่ขาดความรู้ในการจัดการและดูแลรักษาต้นองุ่น และผลผลิตองุ่น นอกจากนี้ ปัญหาเกี่ยวกับความเสียหายจากโรค และแมลงทำให้ผลผลิตลดลงกว่าที่ควรจะเป็น เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น มีฝนตกชุกตลอดปี ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเข้าทำลายจากศัตรูพืช โรคที่พบประจำในองุ่น ได้แก่ ราเน่าค้ำ (downy mildew) ราสนิม (rust) และสแคบ (scab) ส่วนแมลงที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ เพลี้ยไฟ (thrips) หนอนกระทู้หอม (beet armyworm)

และหนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton bollworm) (กรมวิชาการเกษตร, 2545) ทำให้จำเป็นต้องใช้สารเคมีปริมาณมากในการป้องกันกำจัด ส่งผลให้เกิดการต้านทานของโรคและแมลง อีกทั้งยังเกิดการสะสมของสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค อย่างไรก็ดี ยังมี การป้องกันกำจัดโดยวิธีอื่นที่ใช้ร่วมกับหรือทดแทนการใช้สารเคมีได้ เช่น การเขตกรรม การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ การควบคุมโดยชีววิธี (biological control) การกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ การใช้เชื้อก่อโรคกระตุ้นความต้านทาน (pathogen mediated resistance, PMR) และ การใช้สารเคมีสังเคราะห์กระตุ้นความต้านทานแบบแพร่กระจายทั่วทั้งต้น (systemic acquired resistance, SAR) ซึ่ง Kuć และคณะ (1976) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคโดยทดลองปลูกเชื้อ *Collectotrichum lagenarium* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนส (anthracnose) ในแตงกวาลงบนใบจริงของแตงกวา ซึ่งต่อมาได้ทำการปลูกเชื้อดังกล่าวซ้ำอีกครั้งในใบตำแหน่งที่สองถึงสี่ผล การทดลองพบว่า ขนาดและจำนวนแผลลดลง หลังจากปลูกเชื้อครั้งแรก 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ Caruso และคณะ (1977) พบว่า เมื่อปลูกเชื้อ *C. lagenarium* ลงบนใบจริงของแตงโมและแตงเทศ จะช่วยให้แผลบนใบที่ตำแหน่งถัดไป มีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ และความต้านทานดังกล่าว เกิดขึ้นได้นาน 4 สัปดาห์ หลังจากการปลูกเชื้อครั้งแรก ต่อมา Perazzolli และคณะ (2008) ได้ทำการทดลองโดยใช้สาร Benzo (1,2,3)-thiadiazole-7-carbothionic acid S-methyl ester (BTH) ฉีดพ่นให้กับองุ่นก่อนปลูกเชื้อ *Plasmopara viticola* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถลดการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่นได้ 83 เปอร์เซ็นต์ นอกจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์แล้ว ยังมีการใช้สารโคโตซาน ซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรค และสามารถออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ในกระบวนการ SAR ทำให้ลดโอกาสการเกิดโรคในพืชได้ (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2551) Sathiyabama และคณะ (1998) สารโคโตซานป้องกันโรคราสนิมในถั่วลิสง พบว่า เอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากฉีดพ่น 48 ชม. และเพิ่มขึ้นสูงต่อเนื่อง 10 วัน ซึ่งในระหว่างนั้น ขนาดและจำนวนแผลที่เกิดขึ้นลดลงด้วย นอกจากนี้ Nandeeshkumar และคณะ (2008) พบว่าโคโตซานสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ PPO, PAL, POD, chitinase, Pr-1,  $\beta$ -1,3-glucanase ในระยะต้นกล้าของทานตะวัน ทำให้ต้านทานต่อเชื้อ *P. halstedii* สาเหตุโรคราน้ำค้างในทานตะวัน

ในปัจจุบัน การศึกษาการควบคุมโรคโดยการชักนำ/กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน (induced resistance) ยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยในประเทศไทย จึงได้ทำการศึกษาครั้งนี้ขึ้นโดยเลือกศึกษาเฉพาะในองุ่น เนื่องจากเป็นผลไม้ที่มีความนิยมในการบริโภคผลสดและเป็นผลไม้ที่มีการใช้สารเคมีปริมาณมากในการดูแลรักษา การใช้วิธีกระตุ้นให้เกิดความต้านทานนี้ จะช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมี ลดต้นทุนการผลิต และลดอันตรายจากสารเคมีให้แก่ผู้บริโภคสามารถนำมาใช้ในการจัดการและการควบคุมการเข้าทำลาย และแพร่ระบาดของโรคสแคบขององุ่นในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพ

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นความต้านทานในการควบคุมโรคสแคบที่เกิดจากเชื้อรา *S. ampelinum* ในองุ่น
2. ศึกษากลไกการเกิดความต้านทานในองุ่นที่เกิดจากการถูกกระตุ้น

## 1.3 สมมติฐานการวิจัย

1. สิ่งกระตุ้นสามารถกระตุ้นให้องุ่นเกิดความต้านทานต่อโรคสแคบที่เกิดจากเชื้อรา *S. ampelinum* ได้
2. สิ่งกระตุ้นสามารถเพิ่มสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ทำให้เกิดความต้านทานในองุ่นต่อโรคสแคบที่เกิดจากเชื้อรา *S. ampelinum* ได้มากขึ้น

## 1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาโดยใช้สารโคโตซานและ BTH เป็นสิ่งกระตุ้นและใช้เชื้อก่อโรคคือ สปอร์ของราสนิมองุ่นและราสนิมของลิลาวดีเป็นเชื้อกระตุ้นเพื่อให้องุ่นพันธุ์ Black queens เกิดความต้านทานต่อโรคสแคบที่เกิดจากเชื้อรา *S. ampelinum* ในสภาพโรงเรือน และทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ SAR 4 ชนิดคือ salicylic acid (SA), polyphenol oxidase (PPO), chitinase และ  $\beta$ -1,3-glucanase หลังจากการกระตุ้น และปลูกเชื้อสาเหตุโรคสแคบ *S. ampelinum*

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นที่อาจนำมาใช้แทนการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคองุ่น
2. ทราบกลไกการเกิดความต้านทานในองุ่นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้น

## บทที่ 2

### ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตองุ่น

องุ่นมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vitis vinifera* Linn. เป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Vitis* วงศ์ Vitaceae ซึ่งมีประมาณ 11 สกุล รวม 600 ชนิด สกุล *Vitis* เป็นสกุลเดียวที่เป็นผลไม้รับประทานได้ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอบอุ่น (นันทกร บุญเกิด, 2546) โดยเริ่มจากบริเวณเอเชียไมเนอร์และแพร่ขยายออกไป ทั้งทางตะวันออก และตะวันตกไปสู่ทวีปยุโรป อเมริกาและแหล่งอื่น ๆ ของโลก พันธุ์ขององุ่นทั้งหมดทั่วโลกมีไม่น้อยกว่า 8,000 พันธุ์ ซึ่งมีชื่อและลักษณะประจำพันธุ์แตกต่างกันออกไป แต่มีเพียง 20% เท่านั้น ที่ปลูกเป็นการค้า (FAO, 2007) องุ่นเป็นไม้เลื้อยประเภทไม้ยืนต้น การเจริญเติบโตในเขตอบอุ่นมีการผลัดใบในฤดูใบไม้ร่วง พักตัวในฤดูหนาว แตกตาใบในฤดูใบไม้ผลิและเจริญไปเป็นผลแก่ในฤดูร้อน สำหรับองุ่นที่ปลูกในเขตร้อนจะมีใบสีเขียวตลอดปี ไม่มีการพักตัวตามธรรมชาติและคุณภาพผลผลิตองุ่นในเขตร้อนมักจะดีกว่าองุ่นในเขตอบอุ่น (ยงยุทธ ชำรงนิमित, 2547) ปัจจุบันทั่วโลกมีการปลูกองุ่นประมาณ 47,416,250 ไร่ ยุโรปมีพื้นที่ปลูกประมาณ 21,724,000 ไร่ แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ ประเทศสเปน ฝรั่งเศส อิตาลี ในเอเชีย และตะวันออกกลาง มีพื้นที่ปลูกประมาณ 8,914,000 ไร่ และทวีปอเมริกามีพื้นที่ปลูก 5,044,000 ไร่ มีผลผลิตขององุ่นรับประทานผลสดประมาณ 67.2 ล้านตัน (FAO, 2007) สำหรับประเทศไทยมีหลักฐานการนำเข้าองุ่น เมื่อประมาณสมัยรัชกาลที่ 5 โดยขนส่งทางเรือเข้ามาทางอินโดจีนโดยชาวฝรั่งเศส และเริ่มมีการปลูกองุ่นในสมัยรัชกาลที่ 7 แต่ยังไม่แพร่หลายจนกระทั่ง ปี 2493 หลวงสมานวนกิจได้นำองุ่นจากแคลิฟอร์เนียมาปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ.2512 ศาสตราจารย์ปวิณ ปุณศรี และคณะ ได้ริเริ่มศึกษาวิจัยการปลูกองุ่นในประเทศไทยขึ้น โดยได้นำองุ่นจากยุโรปหลายสายพันธุ์มาปลูกทดสอบที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้แก่ พันธุ์คาร์ดินัล (Cardinal) พันธุ์มัสเกตแฮมเบิร์ก (Muscat hamburg) พันธุ์โกลเดนมัสเกต (Golden muscat) และพันธุ์ไวท์มะละกา (White malaga) ซึ่งเป็นองุ่นรับประทานผลสดพันธุ์แรก ๆ ที่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ จึงขยายผลไปทดลองปลูกในแปลงของเกษตรกร และในเชิงการค้า ออกไปอย่างกว้างขวางในจังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2544) ปัจจุบันได้มีการขยายพื้นที่ปลูกไปทั่วประเทศ และมีการนำองุ่นพันธุ์ใหม่เข้ามาปลูกมากขึ้น เช่น ลูสเฟิลเล็ด (Loose perlette) แบล็คควีน (Black queens) และน่านฟ้า (Kyoho) นอกจากนี้ ยังมีการนำเข้าองุ่นพันธุ์ที่ใช้ทำไวน์ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมไวน์ เช่น ชีราซ (Shiraz) และกาแบร์เน โซวีญง (Cabernet Sauvignon) เป็นต้น

องุ่น นับเป็นผลไม้ที่มีมูลค่าค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้ชนิดอื่น ๆ แต่การปลูกองุ่นยังประสบปัญหาโรคและแมลงเข้าทำลายตลอดช่วงระยะการเจริญเติบโต ซึ่งปัจจัยที่สำคัญที่ส่งเสริมให้ปัญหาดังกล่าวรุนแรงในพื้นที่ปลูกองุ่นเขตร้อน เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น มีฝนตกชุก และองุ่นสามารถออกดอกติดผลได้มากกว่า 1 ครั้งต่อปี จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของโรคได้ง่าย และต่อเนื่องตลอดทั้งปี ซึ่งโรคองุ่นจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น เนื่องจากต้องมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคอย่างต่อเนื่อง โดยกรมส่งเสริมการเกษตร (2545) รายงานว่า โรคที่พบในประเทศไทยมีหลายชนิดได้แก่ โรคราน้ำค้าง โรคราสนิม โรคกิ่งแห้งหรือเน่าขมและโรคสแคบ (อินบ) หรือแอนแทรคโนส โดยโรคที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจในประเทศไทยมีเพียง 3 ชนิดคือ โรคราน้ำค้าง ราสนิม และสแคบ

## 2.2 โรคองุ่นที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ

### 2.2.1 โรคราน้ำค้าง (Downy mildew)

เกิดจากเชื้อรา *P. viticola* (Berk.&Curt.) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายมากที่สุด มีการระบาดรุนแรงตลอดปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูฝนเนื่องจากมีความชื้นในอากาศสูง อาการของโรคสามารถเกิดขึ้นได้กับส่วนต่าง ๆ ขององุ่น ทั้งใบ ดอก ยอดอ่อน เถา และผล โดยลักษณะอาการบนใบองุ่นจะพบจุดเหลืองด้านบนใบ ในองุ่นบางพันธุ์จุดอาจมีลักษณะเป็นเหลี่ยมหรือจุดอาจขยายขนาดจนโตเชื่อมต่อกัน ด้านใต้ใบตรงข้ามจุดเหลืองจะพบกลุ่มสปอร์และก้านชูสปอร์สีขาวเห็นได้ชัด ซึ่งสามารถที่จะเจริญและแพร่ระบาดไปยังใบอื่น ๆ หรือแปลงอื่นโดยปลิวไปกับลม อาการของโรคจะสังเกตได้ต่อเมื่อเชื้อราเข้าทำลายแล้ว 4-6 วัน อาการที่ยอดอ่อน มีลักษณะแคระแกร็น ยอดสั้น มีกลุ่มสปอร์และก้านชูสปอร์ขึ้นปกคลุมเห็นได้ชัดเจน ยอดอ่อนที่ถูกทำลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งตายอย่างรวดเร็ว อาการที่ช่อดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเป็นหย่อม ๆ ต่อมาจะเห็นกลุ่มของเชื้อราสีขาวขึ้นปกคลุม ช่อดอกจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งติดเถาจากโคนช่อ กลางช่อ หรือปลายช่อ อาการที่ช่อผลมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาล เปลือกผลเหี่ยว เปลี่ยนเป็นสีเทาน้ำเงินหรือน้ำตาลแก่ อาจทำให้ผลเหี่ยวทั้งช่อ อาการเนื้อเยื่อผลแข็งเป็นแอ่งบวม บนผลที่โตแล้ว เรียกว่า gray rot อาการที่เถาและมือเกาะ เริ่มจากเกิดแผลสีเหลืองซีดเมื่อแผลมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หากเกิดอาการที่เถาจะทำให้ยอดแคระแกร็นเนื่องจากขาดธาตุอาหาร การแพร่ระบาดสามารถแพร่ไปทางลม และฝนได้ และสามารถพักตัวในสภาพ oospore ในเศษซากพืช และในสภาพเส้นใยที่พักตัวที่ตาบนกิ่งองุ่น (Person and Goheen, 1998 และนิพนธ์ วิสารทนนท์, 2542)

### 2.2.2 โรคราสนิม (Rust)

สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phakopsora ampelopsidis* (Diet.&Syd.) หรือ *Physopella vitis* (Diet.&Syd.) Cumm.&Ramachar หรือ *Uredo vitis* เป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับองุ่นเขตร้อนและกึ่งร้อน

ในเขตเอเชียมากกว่าเขตอบอุ่น สามารถเข้าทำลายองุ่นได้ทุกสายพันธุ์ ลักษณะอาการบริเวณใต้ใบองุ่นจะพบเชื้อในระยะ uredia stage มีลักษณะเป็นตุ่มแผลเล็ก ๆ สีเหลืองเกิดเป็นกลุ่ม หรือกระจุกกระจายทั่วไป โรคราสนิมระบาดได้รวดเร็วโดยส่วนมากมักจะสร้างความเสียหายกับใบแก่ ทำให้ใบเหลือง เหี่ยว และร่วงหล่น สามารถแพร่ระบาดได้ดี ทางลมจากแหล่งเชื้อที่สะสมบนเศษซากพืช (Person and Goheen, 1998 และนิพนธ์ วิสารทนนท์, 2542)

### 2.2.3 โรคสแคบ (Scab, Antracnose)

เนื่องจากเป็นโรคเป้าหมายที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จะปริทัศน์รายละเอียดในส่วนต่อไป

การควบคุมโรคทั้ง 3 ชนิด ปัจจุบันนิยมใช้สารเคมีเป็นส่วนใหญ่ สำหรับโรคน้ำค้างสารเคมีที่นิยมใช้ในการป้องกันกำจัดมี 2 กลุ่มคือสารเคมีประเภทสัมผัส เช่น dithiocarbamates, phthalimides และ cupric salts ซึ่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันเท่านั้น ส่วนกลุ่มที่สองเป็นสารเคมีดูดซึม เช่น metalaxyl, benalaxyl, oxadixyl, และ ofurace สำหรับโรคสแคบ (แอนแทรคโนส) นิยมใช้ bordeaux mixture, DNBP และ copper oxychloride ส่วนโรคราสนิมนิยมใช้สารเคมีประเภทป้องกันได้แก่ captafol, zineb, ferbam และ bordeaux mixture (Pearson and Goheen, 1998)

## 2.3 โรคสแคบขององุ่น

### 2.3.1 ความสำคัญและประวัติการระบาด

โรคสแคบหรือแอนแทรคโนสในประเทศไทย จัดเป็นโรคที่สร้างความเสียหายรองจากโรคน้ำค้าง สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อรา *S. ampelinum* de Bary (*Elsinoe ampelina* ในระยะ teleomorph) (Pearson and Goheen, 1998)

ในปี ค.ศ. 1839 ได้มีรายงานการพบโรคสแคบขององุ่นครั้งแรก ในประเทศฝรั่งเศส โดย Viala ได้ทำการเก็บตัวอย่างของโรคไว้ที่เมือง Montpellier ในปี ค.ศ. 1881 Burril รายงานการพบในประเทศสหรัฐอเมริกา (Shear, 1929 อ้างถึงใน มธุกร สมพงษ์, 2553) ต่อมา มีรายงานการพบโรคนี้ในอีกหลายประเทศ เช่น ออสเตรเลีย คิวบา บราซิล ชิลี นิวกินี และอินเดีย ในประเทศไทย มีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2506 ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (กรรณิการ์ เพียนภักตร์ และคณะ, 2537; ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553) ปัจจุบันโรคนี้ พบการระบาดในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกองุ่น เช่น สมุทรสาคร นครปฐม ลำปาง เชียงราย พิจิตร ราชบุรี และนครราชสีมา เป็นต้น ส่วนใหญ่พื้นที่ที่มีการระบาดรุนแรงมากมักจะมีสภาพอากาศค่อนข้างร้อน และมีฝนตกหรือน้ำค้าง (กรรณิการ์ เพียนภักตร์, 2536) โรคสแคบขององุ่นหรือที่ชาวบ้านเรียกว่า โรคอิบูน มีอาการคล้ายโรคแอนแทรคโนส และมักเข้าใจว่าเป็นโรคเกิดจากเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรคโนส ซึ่งสามารถทำให้เกิดโรคกับองุ่นได้เช่นเดียวกัน จึงทำให้เกิดความสับสน (นันทกร บุญเกิด,

2546; ขนิษฐา มากรุง, 2548) ในอดีตประเทศไทยมีรายงานเกี่ยวกับโรคแอนแทรคโนสว่า เกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดอาการกับองุ่น 2 ลักษณะคือ อาการแผลน้ำคร่ำ และแผลแห้งแข็ง (กรรณิการ์ เพ็ชรภักตร์ และคณะ, 2544 และนิพนธ์ วิสารทนนท์, 2542) รายงานว่า ลักษณะการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนสคล้ายกับโรคสแคบมาก แต่มีข้อแตกต่างกันคือโรคสแคบแผลมีลักษณะแห้งแข็งทำให้เห็นบริเวณขอบแผลชัดเจน แต่โรคแอนแทรคโนสแผลยุบตัวลักษณะน้ำคร่ำขอบแผลไม่จำกัดขอบเขตอย่างเด่นชัด มีกลุ่มของสปอร์สีส้มปรากฏเป็นวงซ้อนกัน ทำให้แผลมีลักษณะคล้ายดวงตานก (bird's eye spot) (ขนิษฐา มากรุง, 2548 และมธุกร สมพงษ์, 2553)

### 2.3.2 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา *S. ampelinum*

เชื้อ *S. ampelinum* จัดอยู่ในสกุล *Sphaceloma* เป็นระยะ Anamorph มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งจำแนกตามหมวดหมู่ได้ดังนี้ (Alexopoulos, 1962 : Sutton, 1973 อ้างถึงในกรรณิการ์ เพ็ชรภักตร์, 2545)

Anamorph : Subdivision Deuteromycotina

Class Deuteromycetes

Order Melanconiales

Family Melanconiaceae

Genus *Sphaceloma*

Species depend on host

เชื้อ *S. ampelinum* มี teleomorph stage คือเชื้อ *E. ampelina* ซึ่งสามารถจัดจำแนกหมวดหมู่ได้ดังนี้

Teleomorph : Subdivision Ascomycotina

Class Ascomycetes

Order Myriangiales

Family Elsinoaceae

Genus *Elsinoe*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพบว่า เชื้อขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โครงสร้างของ asexual spore เรียกว่า conidium เกิดขึ้นบริเวณส่วนปลายของก้านชูที่เรียกว่า conidiophore ภายใน fruiting body ซึ่งเรียกว่า acervulus อยู่ในชั้น epidermis ของพืช หากอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เชื้อจะสามารถสร้าง conidia ได้จำนวนมากและรวดเร็ว ลักษณะของสปอร์ใส ไม่มีสี มีเซลล์เดียว ทรงกระบอกหัวท้ายมน จะพบวงกลมใสอยู่ทางด้านหัวและท้ายเซลล์เมื่อสปอร์แก่เต็มที่มีผนังเซลล์

ด้านนอกมีวุ้นใสหุ้ม(mucilaginous wall) สปอร์มีขนาด  $6.37-8.75 \times 2.61-4.77$  ไมครอน (กรรณิการ์ เพียนภักตร์, 2536; ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553) สปอร์ที่หลุดออกจาก conidiophore มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มทำให้มองเห็นเป็นสีชมพู (Singh, 2000 อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์, 2546)

เชื้อ *E. ampelina* สร้างสปอร์ขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เรียกว่า ascospore จำนวน 8 สปอร์/ถุง แต่ละสปอร์มี 4 เซลล์ มีขนาดตั้งแต่  $29-35 \times 4.5-7$  ไมครอน ในถุงหุ้ม(ascus) ascospore สามารถงอกได้ในช่วงอุณหภูมิ 2-32 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะเข้าทำลายเนื้อเยื่อและเกิดแผลบนใบองุ่น (Singh, 2000 อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์, 2546; อ้างถึงใน ขนิษฐา มากรุง, 2548; อ้างถึงใน มธุกร สมพงษ์, 2553)

### 2.3.3 อาการวิทยา

เชื้อรา *S. ampelinum* เข้าทำลายส่วนต่าง ๆ ขององุ่น โดยเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ที่ยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ได้แก่ ใบอ่อน ยอดอ่อน มือเกาะ ช่อดอกและผลอ่อน บางครั้งอาจพบอาการบนผล เถา กิ่ง หรือใบแก่ หากเชื้อเข้าทำลายบริเวณข้อใบ หรือข้อผล จะทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นแห้งตาย เนื่องจากขาดน้ำ และอาหารทำให้ร่วงหล่น อาการบนใบ หรือส่วนยอดจะเป็นจุดน้ำสีน้ำตาลอ่อน หรือเทา มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-5 มิลลิเมตร หากเกิดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จุดเหล่านี้ จะหยุดชะงักการเจริญเติบโต และเนื้อเยื่อที่ตายจะหลุดไปเหลือเพียงรอยใบทะลุ แต่หากสภาพแวดล้อมมีความเหมาะสม จุดแผลจะขยายขนาดและลามรวมกัน อาการจะรุนแรงขึ้นจนทำให้เนื้อเยื่อใบเหี่ยว และบิดงอ สำหรับอาการที่ผลจะพบในช่วงผลมีอายุประมาณ 2 เดือน ลักษณะแผลจะเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนถึงดำ ลักษณะแผลยุบตัว แห้งและแข็ง ขนาดแผลตั้งแต่ 2-10 มิลลิเมตร ทำให้ผลบิดงอ อาการบนกิ่งหรือเถาขององุ่น เกิดจากเชื้อเข้าทำลายบริเวณยอดอ่อน จะแสดงอาการบิดงอ ขอบแผลนูนและแห้งตายในที่สุด ทำให้กิ่ง ใบ หรือดอกกรอบข้างแห้งตายไปด้วย (กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ, 2545; ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553)

### 2.3.4 วงจรการเกิดโรค

เชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูได้โดยสะสมอยู่ในเศษซากขององุ่นที่เคยเป็นโรค เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะสร้าง inocula ขึ้นมาใหม่ในรูปของโคนิเดีย (conidia) ซึ่งเป็นแหล่ง primary inoculum โคนิเดีย จะแพร่กระจายโดยลม และละอองน้ำฝนไปยังส่วนที่มีสีเขียวและอวบน้ำ (Brook, 1973 อ้างถึงใน ขนิษฐา มากรุง, 2548) เมื่อปริมาณของน้ำฝน 2 มิลลิเมตร หรือมากกว่านั้นโคนิเดีย จะงอกและมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเชื้อได้ดีที่อุณหภูมิ 23-32 องศาเซลเซียส conidia และ ascospore

สามารถอยู่ข้ามฤดูหนาวในบริเวณพื้นที่สวนองุ่นและสามารถเป็น primary inoculum ได้ อุณหภูมิ และความชื้นเป็นสภาพแวดล้อมหลักที่มีผลต่อการพัฒนาของโรค นอกจากนี้ หากมีสภาพแวดล้อมอื่นที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค ได้แก่ ฝนตกหนักในฤดูร้อนจะส่งผลให้เชื้อระบาดได้

รุนแรงมากขึ้น (Mirica, 1988 อ้างถึงใน กรรณิกา เพียนักตร์, 2547; อ้างถึงใน ขนิษฐา มากรุง, 2548; อ้างถึงใน มธุกร สมพงษ์, 2553)

Burkholder (1917) อ้างถึงในมธุกร สมพงษ์ (2553) ได้ศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อ *E. veneta* ซึ่งเป็นระยะ teleomorph ของเชื้อ *Sphaceloma* ซึ่งวงจรชีวิตของเชื้อราเริ่มเมื่อ ascospores ใน 4 cell จะแตกในช่วงปลายฤดูใบไม้ร่วงหรือฤดูใบไม้ผลิ ภายใน asci ที่มีลักษณะกลมซึ่งเกิดกระจายอย่างอิสระอยู่ในช่องว่างของ stromatic ascocarp หากได้รับความชื้นในบรรยากาศเพียงพอ ผนังส่วนบนของ stroma จะเปิดออกจากนั้น asci ถูกดันออกมาภายนอกแล้วปลดปล่อย ascospore ที่หุ้มด้วยสารที่มีลักษณะคล้ายวุ้น (gelatinous substance) ออกมา ascospore จะสามารถยึดติดบนผิวพืชได้ หากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ascospore จะสร้าง sterigmata ขึ้น ๆ เพื่อผลิต conidia เมื่อ conidia งอก mycelium จะฝังแน่นอยู่ในชั้น cuticle ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของ acervulus และสร้าง conidia บน conidiophore ขึ้น ๆ ต่อไป

Gable and Tiffany (1987) อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์ (2546) รายงานว่า stromata เป็นแหล่งกำเนิดของ reproductive spore ของเชื้อ *E. panici* เมื่ออายุมากขึ้นผนังจะหนาและประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อ pseudoparenchyma ที่อัดตัวแน่นและพัฒนาไปเป็น acervulus ฝังตัวอยู่ในเซลล์พืชบริเวณชั้น sub epidermis ภายใน acervulus จะสร้างชั้น conidiogenous cells ในชั้นนี้มีกลุ่มของเส้นใยอัดตัวแน่นทำให้มองดูเหมือน pycnidium จากนั้น conidium จะถูกสร้างขึ้นเหนือ conidiogenous cells conidium มีรูปไข่ขนาด  $5-9 \times 2-3 \mu\text{m}$  ซึ่งเมื่อหลุดออกจาก conidiogenous cells จะรวมกลุ่มอยู่บนสารเมือก (mucous matrix) ในสภาวะที่อากาศเย็น stroma จะพัฒนาเป็น ascocarp จากนั้นจะสร้าง ascus และ ascospore (ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553)

### 2.3.5 การควบคุมโรคสแคบ

มีรายงานเกี่ยวกับการควบคุมโรคสแคบในองุ่นดังต่อไปนี้

#### 1. การควบคุมโรคโดยวิธีเขตกรรม

วัฒนา สวรรยาธิปติ (2531) แนะนำให้ทำความสะอาดสวน ทำลายผลองุ่นทั้งสด และแห้งที่อยู่ใต้ดินโดยวิธีเผาหรือฝังเพื่อลดแหล่งแพร่เชื้อ ควรตัดแต่งและจัดกิ่งให้โปร่ง เพื่อให้อากาศภายในทรงพุ่มถ่ายเทได้สะดวก สามารถลดความชื้นสะสมในช่วงที่โรคระบาดได้ กรรณิกา เพียนักตร์ และคณะ (2533) พบว่า การหลีกเลี่ยงการปลูกองุ่นในพื้นที่ที่มีประวัติการระบาดมาก่อน และในช่วงที่มีอากาศร้อนชื้น หรือช่วงฤดูฝนเนื่องจากสภาพอากาศเหมาะสม สามารถลดการแพร่ระบาดของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Ravaz (1927) อ้างถึงใน กรรณิกา เพียนักตร์ (2457) แนะนำให้ใช้ปุ๋ย Nitrate of soda lime หรือ Potash ประมาณ 3 สัปดาห์ก่อนทาบกิ่งหรือตอนกิ่งจะช่วยให้ส่วนขยายพันธุ์ขององุ่นสมบูรณ์และแข็งแรง นอกจากนี้ควรให้น้ำโดยระบบน้ำหยด และหลีกเลี่ยงการให้น้ำระบบพ่นฝอยเหนือทรงพุ่ม (overhead sprinkler irrigation) โดยเฉพาะช่วงที่องุ่น

อ่อนแอ

## 2. การควบคุมโรคโดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติ

กานต์ คำทรัพย์ (2546) อ้างถึงใน มธุกร สมพงษ์ (2553) ได้ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพร 19 ชนิด พบว่า สารสกัดจากมะขามมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการสร้างสปอร์ ในขณะที่สารสกัดจากผลยอแก้วมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะการสร้างสปอร์ของเชื้อ *S. ampelinum*

## 3. การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี

สารคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ และแคลเพเทน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. ampelinum* ส่วนคาร์เบนดาซิมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนี *S. ampelinum* เฉพาะการสร้างเส้นใยแต่ไม่ยับยั้งการสร้างสปอร์ (กานต์ คำทรัพย์, 2546) นอกจากนี้ นันทกร บุญเกิด (2546) แนะนำการป้องกันกำจัดควรใช้สารชนิดที่ไม่รุนแรงก่อน เช่น แคลเพเทนหรือคอปเปอร์ออกไซด์คลอไรด์ กรณีการ เพียนกักตักและคณะ (2544) แนะนำให้มีการป้องกันก่อนการแพร่ระบาดของโรค โดยการใช้ Bordeaux mixture 1% ฉีดพ่นยอดอ่อนที่แตกใหม่ขององุ่นในช่วงฤดูฝน

## 4. การควบคุมโดยชีววิธี

มีรายงานการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดย Chen and Shao (1991) รายงานว่า เชื้อ *Brevibacterium* strain M สามารถยับยั้งเชื้อ *E. ampelina* ได้ (ขนิษฐา มากรุง, 2548)

## 2.4 การควบคุมโรคโดยวิธีกระตุ้นให้เกิดความต้านทาน (Induced resistance)

จากการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรคที่เข้าทำลาย พบว่า พืชมีกระบวนการป้องกันตัวจากการเข้ารุกรานของเชื้อทั้งในเชิงกลไกทางโครงสร้าง และกลไกทางชีวเคมี ในปัจจุบันได้ให้ความสนใจในเรื่องดังกล่าวจึงนำมาพัฒนาเป็นวิธีการควบคุมโรค เพื่อเป็นแนวทางเลือกหนึ่งในการป้องกันโรคพืช โดยอาศัยกลไกความต้านทานของพืชซึ่งถูกชักนำจากสารกระตุ้นให้เกิดกลไกการปกป้องตนเอง

### 2.4.1 กลไกการป้องกันการรุกรานจากเชื้อก่อโรค (Plant defense mechanisms)

โดยทั่วไปพืชจะมีกลไกการป้องกันและยับยั้งเชื้อโรค 2 ทางได้แก่ กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defense mechanism) และกลไกทางชีวเคมี (biochemical defense mechanism) ซึ่งเกิดขึ้นได้โดยไม่เฉพาะเจาะจงกับพืชและเชื้อโรค

#### 2.4.1.1 กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defenses)

พืชจะสร้างโครงสร้างพิเศษทางธรรมชาติ สามารถเกิดได้ทั้งก่อน และหลังการเข้ารุกรานจากเชื้อ ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าทำลายพืชได้ง่าย โครงสร้างของพืชก่อนเชื้อเข้าทำลายได้แก่ การสร้างสารเคลือบผิวใบ (wax) ให้หนาขึ้น เพื่อป้องกันการเกาะติดของน้ำ การที่ชั้น cuticle

หนาขึ้นช่วยให้พืชทนทานต่อการแทงทะลุผ่านของเชื้อ นอกจากนี้ ตำแหน่งและรูปร่างของปากใบมีความสำคัญต่อเชื้อที่เข้าทำลายทางปากใบ รวมทั้งความหนาของผนังเซลล์ จะช่วยป้องกันการงอกของสปอร์เชื้อราให้ยากมากขึ้น (ยรรธิตร์ ยอดโยธี, 2554) ส่วนโครงสร้างที่พืชสร้างขึ้นหลังถูกรุกรานจะเกิดขึ้นหลังจากที่เชื้อก่อโรคเริ่มเข้าทำลาย เนื่องจากเชื้อหลายชนิดปล่อยสารเคมีออกมาสู่พืช เช่น การผลิตสารพิษ สาร glycoprotein และเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ได้แก่ cutinase, cellulase และ hemicellulase เป็นต้น เพื่อย่อยสลายส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช พืชจะจดจำสารเหล่านั้น และสร้างโครงสร้างพิเศษเพื่อป้องกันตัวขึ้นได้แก่ การสร้างผนังเซลล์ให้มี cellulose และ hemicelluloses เพิ่มขึ้น ทำให้พืชมีความทนทานต่อการทะลุผ่านมากขึ้น การสร้างเนื้อเยื่อพิเศษ(cork layers) เพื่อปกคลุมและจำกัดขอบเขตแพร่กระจายของเชื้อไปยังส่วนอื่น ๆ การสะสมยางเหนียว (gums) จะยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อโรคบางชนิดและการสร้าง abscission layer เพื่อป้องกันแพร่กระจายของเชื้อ (Agrios, 1997) มีรายงานของ Shetty และคณะ (2009) ศึกษาการใช้  $\beta$ -1,3-glucan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเชื้อรา *Septoria tritici* สาเหตุโรคใบจุดในข้าวสาลีพบว่า มีการสะสม callose ในผนังเซลล์และเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase เพิ่มขึ้น และมีผลโดยตรงในการยับยั้งเอนไซม์ และสารพิษของเชื้อก่อโรค นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาของ Franco and Iriti (2007) เกี่ยวกับการใช้โคโคซานในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อ tobacco necrosis virus (TNV) ในถั่วแขกพบว่า โคโคซานสามารถกระตุ้น มีการให้สร้าง callose เพิ่มขึ้น และลดการเกิดแผลได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์

#### 2.4.1.2 กลไกทางชีวเคมี (biochemical defenses)

นอกจากพืชจะป้องกันเชื้อโรคเข้าทำลายจากกลไกทางโครงสร้างได้แล้ว พืชยังสร้างสารป้องกันทางชีวเคมี โดยการผลิตสารเคมีที่เป็นพิษต่อเชื้อโดยตรง เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อลุกลามกระจายไปทั่วต้นพืช ซึ่งการสร้างสารชีวเคมีสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการเข้าทำลายของเชื้อ (Agrios, 1997)

##### 1. สารเคมีที่พืชผลิตขึ้นก่อนการถูกเข้าทำลาย (pre-existing biochemical defense)

โดยทั่วไปพืชจะสร้างสารเคมีเพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้แก่ ในธรรมชาติพืชจะปลดปล่อยสารที่เป็นพิษกับเชื้อโดยตรง (fungitoxic exudates) เช่น ในปืทุทและมะเขือเทศจะปล่อยสารที่เป็นพิษต่อเชื้อราสามารถยับยั้งการงอกของ zoospore ของเชื้อโรคได้ การผลิตสารพวก phenolic compound และในพืชบางชนิดยังสร้างสาร phytoanticipins ก่อนถูกเข้าทำลาย นอกจากนี้ พืชยังสร้างพวก hydrolytic enzymes เช่น chitinase และ glucanase ช่วยยับยั้งเชื้อโรค (Agrios, 1997)

##### 2. สารชีวเคมีที่พืชสร้างขึ้นหลังจากการถูกเข้าทำลาย (induced biochemical Defense)

เมื่อเชื้อโรคเข้ารุกรานพืช พืชจะเริ่มส่งสัญญาณโมเลกุลจากบริเวณเชื้อหุ้มเซลล์ และ

จับกับสารบางอย่างของเชื้อ (elicitor) เช่น glycoprotein, fatty acid, carbohydrates และ peptides เป็นต้น จากนั้นจะสร้างสารชีวเคมีและเกิดปฏิกิริยาขึ้น เพื่อหยุดการพัฒนาและทำลายเชื้อโรค เกิดกระบวนการต้านทานของพืช ปฏิกิริยาดังกล่าวได้แก่ 1.) hypersensitive response คือ เกิดการตาย ณ ตำแหน่งของเซลล์ที่เชื้อเข้าทำลายอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรค 2.) Salicylic acid (SA) เป็นสัญญาณโมเลกุลที่เกิดจาก HR เพื่อไปกระตุ้นการแสดงออกของ pathogenesis-related (PR) protein (Ryal et al., 1996; Maleck et al., 2000; Wang et al., 2006; Vleesschauwer et al., 2008) 3.) การสร้าง Reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นการตอบสนองแรกของพืช เกิดขึ้นไม่เกิน 5 นาที จะพบสารพวก Superoxide ( $O_2^-$ ) และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อโรคโดยตรง และทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงขึ้น (Thordal-Christensen et al., 1997; Shetty et al., 2009) 3.) การสร้าง Nitric oxide (NO) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย ROS และ 4.) การสร้าง Pathogenesis related proteins (PR proteins) ประกอบด้วยโปรตีนและเอนไซม์ที่ทำหน้าที่หลากหลาย ในกระบวนการต้านทานของพืช (Van Loon, 1997; Chen et al., 2000)

#### 2.4.2 กระบวนการสร้างความต้านทานของพืชจากการถูกกระตุ้น

##### (systemic acquired resistance, SAR)

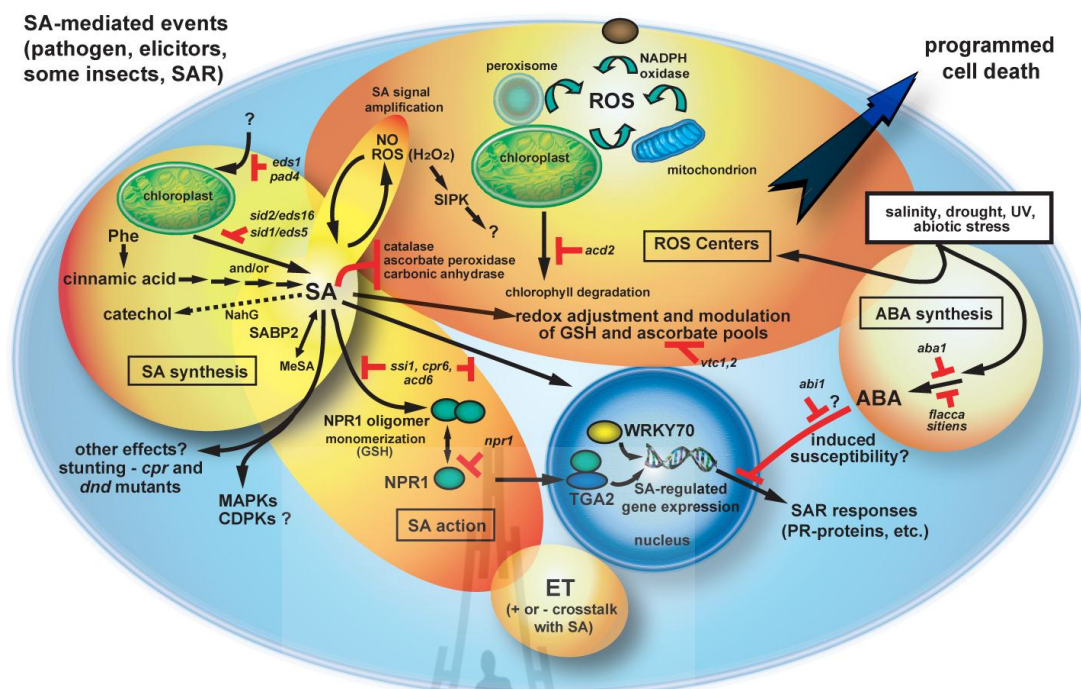
ในพืชหลายชนิดมีการพัฒนาความต้านทานขึ้น เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค สามารถสร้างความต้านทานหลังได้รับการกระตุ้นจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonistic microorganism) สารเคมีสังเคราะห์ (synthetic chemical) หรือเชื้อโรค (non-pathogen) และแมลง (insect) หลังถูกกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นดังกล่าว จะทำให้พืชเกิดแผลตายเฉพาะที่ขึ้น จากนั้นจะเกิดความต้านทานซึ่งแพร่กระจายไปทั้งระบบของพืช (systemic acquired resistance, SAR) นอกจากนี้สารเคมีบางชนิด เช่น Salicylic acid, arachidonic acid และ 2,6-dichloroisonicotinic acid จะไปกระตุ้นระบบความต้านทาน แต่ไม่ทำให้เกิดแผลตายบริเวณเนื้อเยื่อพืช การแสดงออกของ SAR จะไม่เฉพาะเจาะจงกับชนิดพืชและเชื้อโรคทำให้เกิดโรคได้หลายชนิด ทั้งโรคที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส นอกจากนี้ SAR ยังแสดงออกได้เป็นระยะเวลานานประมาณ 4-6 สัปดาห์ แต่ SAR มีข้อจำกัดคือไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดได้หากพืชอยู่ในระยะหลังออกดอกและติดผล

##### 2.4.2.1 หลักการของ SAR

เมื่อพืชเกิดแผลตาย (necrosis lesions) เฉพาะที่ (localization) ครั้งแรกจาก hypersensitive response (HR) เนื่องจากมี receptor จากพืชรับรู้ถึงการบุกรุก ส่งสัญญาณให้สร้าง reactive oxygen species ได้แก่ super oxide radicles, hydrogen peroxide และ hydroxyl radicle ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระ จะแตกตัวร่วมกับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ และต่อสู้กับโมเลกุลของเชื้อที่รุกรานเข้ามา ทำให้มีการตอบสนองโดย HR ในเซลล์ขึ้น นอกจากนี้ reactive oxygen species ยังช่วยในการทำลาย

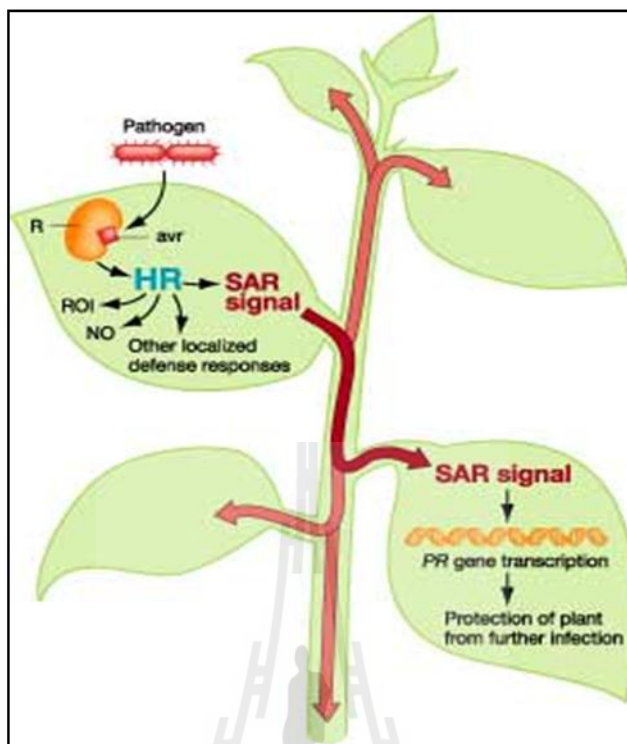
แหล่งอาหารและยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ จากกระบวนการ programmed cell death ที่ยังต้องอาศัยการส่งสัญญาณ (signal transduction) จากสาร nitric oxide (NO) หากภายในเซลล์มี NO และ reactive oxygen species เกิดขึ้น จะกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ต่าง ๆ ในวิธีการสังเคราะห์สารปกป้องได้แก่ lignin, phytoalexin, salicylic acid และเอนไซม์ที่ทำลายเชื้อโดยตรงได้แก่ กลุ่มของ hydrolytic enzyme ทำให้การเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคหลายชนิดลดความรุนแรงลง (Sticher et al., 1997; Hammerschmidt, 1999 และนิพนธ์ ทวีชัย, 2553) ในขณะเดียวกันนอกจากพืช จะเกิด programmed cell death แล้วภายในเซลล์ จะส่งสัญญาณโมเลกุลต่าง ๆ ซึ่งเพิ่มการสร้าง และส่งสัญญาณของ salicylic acid (SA) ในการกระตุ้นการแสดงออกของ pathogenesis related protein genes (PR genes) ยีนบางชนิดจะสร้างเอนไซม์ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา สาเหตุโรคโดยตรง เช่น chitinase และ glucanase ซึ่งช่วยในการย่อยผนังเซลล์เชื้อราหรือสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สำคัญในกระบวนการต้านทานโรคในพืช เช่น lectin, thionin, defensin, coumarin เป็นต้น (ดังภาพที่ 2.1) โดย Serghini และคณะ (2001) รายงานว่า coumarin สามารถยับยั้งการงอก และเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน สาร defensin lectin และ thionin จะมีการสะสมหลังจากที่เชื้อโรคสัมผัสกับพืช และเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคได้หลายชนิด อีกทั้งยังเป็นสารต่อต้านเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย (Van Loon., 1994; Thomma et al., 2002; Mazid et al., 2011)





ภาพที่ 2.1 กลไกการเกิด SAR ภายใน cell พืชที่ถูกกระตุ้นด้วย SAR elicitors  
ที่มา : Bostock (2005)

กระบวนการเกิด SAR จะเริ่มจากสัญญาณจากสิ่งกระตุ้น (elicitor) จับกับตัวรับสัญญาณจากพืช (receptor) เกิด programmed cell death ขึ้นและจะเกิดสัญญาณ SAR กระจายทั่วทั้งต้นพืชเพื่อกระตุ้นการทำงานของ PR Proteins ต่าง ๆ เพื่อป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อโรค ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 กระบวนการเกิด SAR ที่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชหลังถูกกระตุ้น

ที่มา : <http://www.lidaplantresearch.com/>

PR proteins (ตารางที่ 2.1) เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีความสำคัญในกระบวนการ SAR ทำให้พืชสามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค ซึ่งจะแบ่งกลุ่มตามหน้าที่ ลำดับกรดอะมิโน ความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยา (serological relationship) รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเหล่านั้น ปัจจุบันสามารถจัดแบ่งได้ 17 กลุ่ม และได้มีการจัดแบ่งตามคุณสมบัติต่าง ๆ โดยใช้หลักเกณฑ์ในการแบ่งคือ 1.) โปรตีนนั้นจะต้องถูกผลิตขึ้นในเนื้อเยื่อพืชภายหลังถูกกระตุ้นจากเชื้อโรคซึ่งในภาวะปกติพืชจะไม่สร้างโปรตีนเหล่านี้ 2.) การชักนำการแสดงออกของโปรตีนนั้น ๆ จะต้องเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรคอย่างน้อย 2 คู่ หรือในกรณีที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์เพียงคู่เดียวจะต้องมีการยืนยันผลวิจัยจากห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน (Van Loon and Van Strien, 2006)

การทดลองที่เกี่ยวกับ SAR เริ่มจาก Metraux และคณะ (1990) ได้ทำการปลูกเชื้อ Tobacco necrosis virus และเชื้อรา *Colletotrichum lagenarium* ลงบนใบแตงกวาพบว่า หลังจากเกิดแผลตาย ปริมาณของ SA จะเพิ่มสูงขึ้นพร้อมกับการเกิด SAR ในขณะที่ยาสูบที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม โดยตัดต่อ bacterial salicylate hydroxylase gene นั้น ไม่เกิดการสะสมของ SA และไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด SAR (Gaffney et al., 1993) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แครอทที่เติม elicitor ส่วนที่เป็นผนังเซลล์

ของเชื้อราเข้าไปในอาหารพบว่า มีการสังเคราะห์และปลดปล่อย SA ออกมาในอาหารในปริมาณมากกว่าปกติ (Schneider-Muller et al., 1994) การสะสม PRs protein จะเกิดขึ้นเมื่อเกิด SAR โดยเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2) จะมีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา สาเหตุโรคพืชโดยตรง (Wessels, 1993) Velazhahan และคณะ (2003) ได้ทำการทดลองสกัดเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanases จากใบข้าวฟ่างพบว่า เอนไซม์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma viride* ได้

**ตารางที่ 2.1** คุณสมบัติของ PR proteins แต่ละชนิดที่สร้างขึ้นหลังถูกกระตุ้นจากเชื้อโรคจุลินทรีย์ ปฏิภูมิหรือสารเคมี

| กลุ่มของ<br>PR protein | ชนิดของ<br>PR proteins            | คุณสมบัติ                            |
|------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| PR-1                   | Tobacco PR-1a                     | Unknown                              |
| PR-2                   | Tobacco PR-2                      | $\beta$ -1,3-glucanases              |
| PR-3                   | Tobacco P, Q                      | Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII |
| PR-5                   | Tobacco S                         | Thuamatin-Like                       |
| PR-6                   | Tomato Inhibitor I                | Protinase-Inhibitor                  |
| PR-7                   | Tomato P <sub>69</sub>            | Endoprotinase                        |
| PR-8                   | Cucumber chitinase                | Chitinase type III                   |
| PR-9                   | Tobacco“lignin-forming peroxides” | Peroxidase                           |
| PR-10                  | Parsley “PR1”                     | Riboneclease-Like                    |
| PR-11                  | Tobacco class“V”chitinase         | Chitinase, type 1                    |
| PR-12                  | Radish Rs-AFP3                    | Defensin                             |
| PR-13                  | Arabidopsis THI2.1                | Thionin                              |
| PR-14                  | Barley LTP4                       | Lipid-transfer protein               |
| PR-15                  | Barley OxOa (germin)              | Oxalate oxidase                      |
| PR-16                  | Barley OxOLP                      | Oxalate – oxidase – Like             |
| PR-17                  | Tobacco PRp27                     | Unknown                              |

ที่มา : Van Loon and Van Strien, 2006

ตัวอย่างเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานที่พบในพืชคือ chitinase, glucanase และ polyphenol oxidase

1. เอนไซม์ไคติเนส (chitinase)

Chitinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน ให้เป็นโมโนเมอร์ของไคติน คือ N-acetylglucosamine (GlcNAc) ส่วนใหญ่พบในเปลือกแมลง และในเปลือกแข็งที่หุ้มตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในพวก Arthropod และ Mollusca พืชชั้นสูง และจุลินทรีย์ เอนไซม์ chitinase ที่มีอยู่ในพืช จะทำหน้าที่ป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยจะย่อยสลายผนังเซลล์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (Hammerschmidt and Kuć., 1982) ในกลไกการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานเอนไซม์ chitinase สามารถทำงานได้นานถึง 7 สัปดาห์ หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคในแตงกวา (Dalisay and Kuć., 1995)

## 2. เอนไซม์เบต้ากลูคาเนส ( $\beta$ -1,3-glucanase)

เอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ทำหน้าที่ย่อยสลาย  $\beta$ -1,3-glucan พบได้ทั่วไปในพืชและจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในพืช เอนไซม์นี้มีบทบาทในการลำเลียงอาหารและกระบวนการป้องกันตัวต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา โดยจะย่อยสลายผนังเซลล์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเชื้อราสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้ ยังพบในเชื้อราซึ่งมีบทบาทเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรืออวัยวะในการเจริญเติบโต และพัฒนาการของเชื้อรา อีกทั้งยังช่วยในการดูดซึมสารอาหารในการดำรงชีพแบบ saprophyte และแบบปรสิตของเชื้อราอีกด้วย (Hammerschmidt and Kuć., 1982) ในกลไกการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน เอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase สามารถทำงานได้นานถึง 7 สัปดาห์ หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคในแตงกวา (Dalisay and Kuć., 1995)

## 3. เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases: PPOs)

เอนไซม์ Polyphenol oxidases (PPOs) เป็นเอนไซม์ที่เป็น copper metalloprotein (Steffens et al., 1994) พบอยู่ทั่วไปในพืชชั้นสูง พบมากในใบ ราก รากสะสมอาหาร หัว ส่วนของดอก และผล ในสภาพปกติ PPOs ถูกเก็บอยู่ใน thylakoid ของคลอโรพลาสต์ ส่วนสารฟีนอลิกซึ่งเป็น substrate อยู่ใน vacuole แต่เมื่อถูกโรคแมลงเข้าทำลาย หรือเกิดการชราภาพ (senescence) จะทำให้เซลล์แตกออกและทำให้ออกซิเจน และสารฟีนอลิก มาทำปฏิกิริยากัน โดยมี PPOs เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันกลายเป็นควิโนน (quinones) โดยกลไกการเกิดปฏิกิริยาของ PPOs มี 2 ปฏิกิริยา คือ

3.1 ปฏิกิริยา hydroxylation เป็นปฏิกิริยาที่เปลี่ยน monophenol ไปเป็น *o*-diquinone (เป็นกิจกรรมจากเอนไซม์ cresolase, tyrosinase หรือ monophenol oxidase activity) ปฏิกิริยานี้ เริ่มจากการที่ *o*-diquinone ไปจับตัวกับ mettyrosinase โดยมี binuclear copper cluster เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ทำให้เกิดเป็น deoxytyrosinase และมีการปลดปล่อยควิโนนออกมา และ deoxytyrosinase จะมารวมตัวกับออกซิเจนเกิดเป็น oxytyrosinase จากนั้น *o*-diquinone อีกโมเลกุล จะเข้ามาทำปฏิกิริยากับเพอรอกซิเดส เกิดเป็นโมเลกุลของน้ำและควิโนน

3.2 ปฏิกิริยา dehydrogenation เปลี่ยน *o*-dihydroxy phenol ไปเป็น *o*-quinone

(เป็นกิจกรรมจากเอนไซม์ catecholase หรือ diphenol oxygen oxidoreductase activity) เริ่มจากการที่ monophenol มาจับกับ copper อะตอมหนึ่งที่อยู่บนโมเลกุลของ oxytyrosinase ทำให้โมเลกุลนี้ เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ เพื่อให้เกิดเสถียรภาพในโมเลกุลโดยปลดปล่อยโปรตอนออกมาแล้ว มาจับตัวกับ copper อีกอะตอมที่เหลืออยู่ จากนั้น binuclear copper cluster ปลดปล่อยอิเล็กตรอนออกมาเกิดเป็น deoxytyrosinase และ *o*-diquinone และเมื่อ deoxytyrosinase เกิดการรวมตัวกับออกซิเจนจึงเกิดเป็น oxytyrosinase อีกครั้ง

ควิโนนที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เป็นโมเลกุลที่สามารถเกิดปฏิกิริยา covalent และ crosslink กับ nucleophiles ภายในเซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ sulfhydryl, amine, amide, indole และ imidazole เนื่องจากควิโนนที่เกิดขึ้นนี้ เมื่ออยู่ในสภาพที่มีความเป็นกรดต่ำกว่า 4 ควิโนน จะทำปฏิกิริยา reversed disproportionation กับสารฟีนอลิกได้เป็น semiquinone radicals ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จะเกิดเป็น reactive oxygen species (ROS) ส่วนในสภาพที่มีความเป็นกรดสูงขึ้น ควิโนนจะเกิดปฏิกิริยา nucleophilic Michael addition ทำให้เกิดเมดสี สีน้ำตาล ซึ่งพบในผัก และผลไม้เมื่อถูกโรคแมลงเข้าทำลาย เกิดบาดแผลหรือเกิดการชราภาพ ผลของปฏิกิริยาทุติยภูมินี้ อาจทำความเสียหายกับดีเอ็นเอ โปรตีน หรือไขมัน ได้ (Vámos-Vigyázó, 1981; Steffens et al., 1994 อ้างถึงใน อนงค์นุช พลวงษ์, 2548)

มีการศึกษาของ Weber และคณะ (1964) พบว่า เมื่อกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคเน่าดำ (black rot) ด้วยเชื้อ *Ceratocystis fimbriata* ซึ่งเป็น nonpathogenic ใน sweet potato พบว่า เนื้อเยื่อบริเวณรากมีเอนไซม์ PPO และ peroxidase (POX) สูงขึ้น

## 2.5 ตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดความต้านทาน (SAR inducers/ elicitor)

ในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน จะต้องอาศัยตัวกระตุ้น (inducer) ได้แก่ เชื้อสาเหตุโรค (เชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส) ส่วนประกอบของเชื้อก่อโรค (coat protein จากไวรัส, glucan และ chitin จากเชื้อรา) สารเคมีสังเคราะห์ หรือสารสกัดชีวภาพ

### 1. Pathogen Mediated Resistance (PMR)

เป็นการใช้เชื้อก่อโรค ส่วนประกอบหรือ products ของเชื้อก่อโรคเป็นตัวกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน มีการศึกษาเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากไวรัส โดยแทรกยีนของไวรัสที่ก่อโรคหรือเชื้อที่เป็น mild strain เข้าไปในพืชอาศัย Gonsalves (1997) รายงานว่า วิธีการนี้สามารถกระตุ้นความต้านทานของพืช และยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสได้ Hammerschmidt และคณะ (1976) ได้ทำการทดลองโดยปลูกเชื้อ *C. lindemuthianum* เชื้อสาเหตุโรค anthracnose ของถั่วลงบนแตงกวา หลังจากนั้นได้ทำการปลูกเชื้อ *Cladosporium cucumerinum* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคในแตงกวาลงบนใบตำแหน่งที่สองหลังจากปลูกเชื้อครั้งแรก 2-3 วัน พบว่า ขนาดของแผลและจำนวนแผลลดลง Zhang

และคณะ (2002) รายงานว่า chitin ที่ได้จากผนังเซลล์ของเชื้อรา สามารถกระตุ้นให้พืชหลายสปีชีส์เกิดความต้านทานได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าว ถั่วเหลือง มะเขือเทศ และข้าวสาลี Kopp และคณะ (1989) พบว่า oligosaccharide elicitor จากเชื้อรา *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* ช่วยเพิ่มความต้านทาน 50-100% ในใบยาสูบที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อไวรัสหลายกลุ่ม โดยประเมินจากจำนวนแผลและปริมาณของไวรัส การใช้ Yeast derived elicitor สามารถเพิ่มความต้านทาน และการตอบสนองของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโรคราแป้งในข้าวบาร์เลย์ (Reglinski et al., 1994) และมีรายงานเกี่ยวกับกิจกรรมของ Yeast derived elicitor ในผักกาดหอมพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cineria* และ *Rhizoctinia solani* ได้ การศึกษาสาร Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเพิ่มสารที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของพืช เช่น เพิ่มปริมาณ NO และกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานใน *Arabidopsis* (Zeidler et al., 2004) Silipo และคณะ (2005) พบว่า lipid A และ oligosaccharide ในสาร Lipooligosaccharide ที่ได้จาก *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน PR1 และ PR2 ใน *Arabidopsis* และไปขัดขวางการเกิดกระบวนการ HR ที่ถูกกระตุ้นด้วย avirulent bacteria การศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์จำนวนหนึ่ง สามารถกระตุ้นให้มีการตอบสนองต่อความต้านทานในพืชได้เช่นกัน ตัวอย่าง เอนไซม์ xylanase จากเชื้อรา *T. viride* กระตุ้นให้เกิด ethylene (Fuch et al., 1989) และ PR proteins ในยาสูบและเอนไซม์ xylanase จากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* (Fermer and Helgeson, 1987) กระตุ้นการสร้างเอทิลีน และการสะสม phytoalexin ในยาสูบ

## 2. สารสังเคราะห์ที่กระตุ้นให้เกิดความต้านทาน (synthetic resistance inducer)

Benzo (1,2,3)-thiadiazole-7-carbothionic acid S-methyl ester (BTH) เป็นสารเคมีสังเคราะห์ที่สามารถกระตุ้นการเกิด SAR โดยจะยับยั้ง catalase และ ascorbate peroxidase enzyme ได้ดีกว่าสาร SA (Wendehenne et al., 1997) สามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานได้ในพืชหลายชนิด และยับยั้งเชื้อก่อโรคได้อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ BTH ยังเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวของพืช เช่น phytoalexin biosynthetic enzymes, proteinase inhibitors, hydrolytic enzymes, antiviral factors และ pathogenesis – related (PR) proteins (Wobbe et al., 1996) มีรายงานพบว่าเมื่อใส่ BTH ที่ความเข้มข้น  $500 \mu\text{g a.i. ml}^{-1}$  ก่อนปลูกเชื้อรา *Phytophthora cactorum* สามารถลดอาการ crown rot ในสตรอเบอรี่ได้ (Eikemo et al., 2003) Anfoka, G. H. (2000) รายงานว่า หลังจากพ่น BTH 7 วันก่อนปลูกเชื้อไวรัส CMV-Y พบว่า อัตราการเกิดโรคลดลง 12.5 เปอร์เซ็นต์โดยมะเขือเทศไม่แสดงอาการต่าง และการตายของเนื้อเยื่อใบ และมีรายงานพบว่า หลังจุ่ม peach fruit ในสารละลาย BTH สามารถลดขนาดแผล และอัตราการเกิดโรคจากเชื้อรา *Penicillium expansum* ได้ดี เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonialyase (PAL), polyphenoloxidase (PPO) และ

peroxidase (POX) ได้ดีขึ้น (Liu et al., 2005) มีรายงานถึงประสิทธิภาพการยับยั้งรา น้ำค้างในข้าวสาลี และสามารถมีประสิทธิภาพสูงถึง 10 สัปดาห์ (Ruess et al., 1996) แต่ที่น่าสนใจคือสามารถกระตุ้นความต้านทานในมะเขือเทศ และทานตะวันต่อวัชพืชพวก broomrape (*Orobanchaceae*) ได้อีกด้วย (Buschmann et al., 2005)

นอกจากนี้ มีการศึกษาของ Hwang และคณะ (1997) พบว่า การกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora capsici* หลังจากฉีดพ่น  $\beta$ -amino-n-butyric (BABA) ส่งผลให้ปริมาณ SA เพิ่มขึ้นซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสะสมเอนไซม์ chitinase และ  $\beta$ -1,3-glucanase ในลำต้นของพริกและรายงานการศึกษาของ Ahn และคณะ (2007) โดยการนำ Thiamine มาทดสอบในการกระตุ้นให้ *Arabidopsis* ต้านทานต่อเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. tomato ซึ่งพบว่า Thiamine สามารถเพิ่ม HR, PR-1, PAL และการสะสม callose มากขึ้น

### 3. สารชีวภาพไคโตซาน (bioactive chitosan)

เป็นสารพอลิเมอร์ไฮโดรเจน และเป็นอนุพันธ์ของไคติน ที่ตัดหมู่อะซิไทลของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ออกตั้งแต่ 50% สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อพืช มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2551) มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรค สร้างความต้านทานต่อโรค และสามารถออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ในกระบวนการกระตุ้น SAR ช่วยลดโอกาสการเกิดโรคได้ มีรายงานพบว่า ไคโตซานสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ PPO, PAL, POD, chitinase, Pr-1,  $\beta$ -1,3-glucanase และ chalcone synthase (Nandeeshkumar et al, 2008) ในระยะต้นกล้าของทานตะวัน ทำให้ต้านทานต่อเชื้อ *P. halstedii* สาเหตุโรคราน้ำค้างในทานตะวัน Sathiyabama และคณะ (1998) พบว่า เมื่อพ่นไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถกระตุ้นการสร้าง SA และเพิ่มกิจกรรมของ chitinase และ  $\beta$ -1,3-glucanase ทำให้ลดการเกิดโรคราสนิมในถั่วลิสงได้ Iriti และคณะ (2010) รายงานว่า การดูดซึมไคโตซานเข้าทางปากใบ จะสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตัวเองในพืช โดยทำให้เกิดการสะสมแคลโลสเพิ่มขึ้น ทำให้พืชที่ทดสอบมีความต้านทานโรคเพิ่มขึ้น Fajardo et al. (1994) พบว่า เมื่อคลุกเมล็ดถั่วลิสงด้วยไคโตซาน จะเพิ่มการสังเคราะห์ phenolic acids (*p*-coumaric), ferulic acids และต้านทานต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* Sathiyabama and Balasubramanian (1998) ศึกษาการใช้สารไคโตซานป้องกันโรคราสนิมในถั่วลิสงพบว่า เอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากฉีดพ่น 48 ชม. และเพิ่มขึ้นสูงต่อเนื่อง 10 วัน ซึ่งในระหว่างนั้น ขนาดและจำนวนแผลที่เกิดขึ้นลดลงด้วย ไคโตซานยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้โดยตรง Barka และคณะ (2004) ได้ผสมไคโตซานลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา *B. cinerea* สาเหตุโรค gray mold rot ขององุ่นในอัตราส่วน 5% (v/v) พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 64%

### 4. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) คือเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืช

สามารถในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส ความต้านทานที่เกิดขึ้นเป็นกระบวนการ induced systemic resistance (ISR) (Chen et al., 1998; Liu et al., 1995; Maurhofer et al., 1994; Wei et al., 1991) มีการศึกษาการใช้เชื้อ *Pseudomonas aureofaciens* ในการกระตุ้นให้แตงกวาต้านทานต่อเชื้อ *P. aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่า พบว่า *P. aureofaciens* สามารถกระตุ้นให้พืชมีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, PO และ PPO เพิ่มขึ้น (Chen et al., 2000) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาของ Jetiyanon และคณะ (1997) รายงานการใช้เชื้อ *Bacillus pumilus* strain SE49 กระตุ้นให้ถั่วมะแฮะมีการสร้างลิกนิน (lignification) และมีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase เพิ่มขึ้น



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การแยกเชื้อรา *S. ampelinum* จากองุ่นพันธุ์ Black queens

รวบรวมใบองุ่นพันธุ์ Black queens จากบริเวณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำมาแยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting โดยนำใบองุ่นที่แสดงอาการของโรคมาล้างด้วยน้ำสบู่ และน้ำสะอาด จากนั้นตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลส่วนที่ติดกับเนื้อเยื่อดี เป็นชิ้นขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร แล้วฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1% นาน 2-3 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แล้ววางบนอาหาร Water agar (WA) จำนวน 5 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-7 วัน เมื่อเชื้อเริ่มสร้างเส้นใย ทำการตัดปลายเส้นใยของเชื้อย้ายลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) จำนวน 1 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อหลังจากเชื้อเจริญประมาณ 2 สัปดาห์ จึงทำการตรวจลักษณะของเส้นใย โคนิเดีย และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ย้ายเชื้อไปโชนบนอาหารที่มีลักษณะตรงกันกับเชื้อ *S. ampelinum* (กรรณิการ์ และคณะ, 2537; ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553) ลงเลี้ยงและเก็บรักษาในสภาพ PDA slant เพื่อใช้ในการศึกษาในลำดับต่อไป

#### 3.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test )

นำเชื้อที่แยกได้มากระตุ้นให้สร้างโคนิเดียภายใต้แสง black light จากนั้นนำเชื้อแต่ละไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการก่อโรคโดยเตรียมเชื้อ *S. ampelinum* ในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำ ตรวจระดับความเข้มข้นโดยการนับจำนวนสปอร์ด้วย Haemocytometer ปรับระดับความเข้มข้นให้ได้  $1 \times 10^6$  สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นทำการปลูกเชื้อลงบนใบอ่อนขององุ่นที่ตัดเป็นชิ้นขนาด 1x1 เซนติเมตร วางบน WA จำนวน 4 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อในสภาพปลอดเชื้อ ปลูกเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหยด จำนวน 4 หยดต่อชิ้น วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อแต่ละไอโซเลต จากนั้นเก็บไอโซเลตที่มีความรุนแรงมากที่สุดไว้ทำการศึกษาในขั้นต่อไป (ขนิษฐา มากรุง, 2548 และมธุกร สมพงษ์, 2553)

#### 3.3 การแยกเชื้อและเตรียม inoculum ของเชื้อราสนิมจากลิลาวดี (*Coleosporium plumeriae* Pat.) และเชื้อราสนิมจากองุ่น (*Phakopsora ampelopsidis* Diet. & Syd.)

เก็บใบลิลาวดี และใบองุ่นที่มีเชื้อราสนิมในระยะ uredospore จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อรวบรวมสปอร์ นำไปตรวจความเข้มข้นโดยนับจำนวนสปอร์ของเชื้อด้วย haemocytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้  $4 \times 10^6$  สปอร์/มิลลิลิตร

### 3.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นความต้านทานในการควบคุมโรคสแคบ

เตรียมต้นองุ่นจากการชำกิ่งอายุ 2 เดือน ทำการวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยการเก็บผลวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA) และกิจกรรมเอนไซม์ chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, และ polyphenoloxidase (PPO) การทดลองจัดตั้งทดลองเป็น 4 ชุด โดย 3 ชุดเก็บผลเพื่อนำไปวิเคราะห์ salicylic acid และเอนไซม์ โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบมาวิเคราะห์ 3 ช่วงเวลา คือ หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้นทันที, หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วัน และหลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 14 วัน ซึ่งเป็นครั้งที่โรคแสดงอาการ และ 1 ชุด ใช้สำหรับประเมินคะแนนการเกิดโรคหลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้นที่ 14 วัน โดยมีดำรับการทดลองดังนี้

1. ฉีดพ่นโดยใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm)
2. ฉีดพ่นโดยใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 2,500 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm)
3. ฉีดพ่นโดยใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm)
4. ฉีดพ่นโดยใช้สาร BTH ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm)
5. ฉีดพ่นโดยใช้สาร BTH ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm)
6. ฉีดพ่นโดยใช้สาร BTH ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm)
7. ฉีดพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อราสนิมลิลาวดี (*C. plumeriae*) ในรูปของ spore suspension ความเข้มข้น  $4 \times 10^6$  สปอร์/มิลลิลิตร
8. ฉีดพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อราสนิมองุ่น (*P. ampelopsidis*) ในรูปของ spore suspension ความเข้มข้น  $4 \times 10^6$  สปอร์/มิลลิลิตร
9. ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น เป็นชุดควบคุม

การเตรียมสารละลายไคโตซาน (Fluka-Chitosan from crab shells, low molecular weight) กระทำโดยละลายไคโตซานในน้ำและกรดอะซิติก 100% ในสัดส่วนไคโตซาน 0.1 กรัม : น้ำ 2 มิลลิลิตร : กรดอะซิติก 1.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปปรับความเข้มข้นตามที่กำหนด ส่วนการเตรียมสารละลาย BTH กระทำโดยละลาย Bion 50% a.i. (w/v) ในน้ำ sterile distilled water ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว คำนวณให้ได้ความเข้มข้นตามที่กำหนด จากนั้นพ่นสารกระตุ้นลงบนใบบริเวณตอนกลางของกิ่งชำ หลังจากนั้น 7 วันทำการปลูกเชื้อ *S. ampelinum* โดยฉีดพ่น spore suspension ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  สปอร์/มิลลิลิตรทั่วทั้งต้น

### 3.5 การประเมินผลการทดลอง

เก็บใบอ่อน 3 ช่วงเวลา คือ 1.) หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้นทันที 2.) หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วัน 3.) หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 14 วัน หลังฉีดพ่นเชื้อรา *S. ampelinum* 7 วัน ซึ่งเป็นครั้งที่โรคแสดงอาการ ลุ่มเก็บตัวอย่างใบโดยแยกเก็บใบ (ใบที่ฉีดพ่นสารกระตุ้น) และใบบนตำแหน่งละ 1 ใบ ซึ่งอ่อนที่ ลุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาเป็นองุ่นจากแต่ละชุดทดลอง จากนั้นนำมาประเมินคะแนนการ เกิดโรคสแคบที่เกิดจากเชื้อรา *S. ampelinum* และตรวจวิเคราะห์ปริมาณ salicylic Acid (SA), เอนไซม์ chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, และ polyphenoloxidase (PPO)

#### 3.5.1 วิธีการประเมินคะแนนการเกิดโรค (disease scores)

ประเมินโดยใช้กิ่งชำที่ไม่ได้เก็บใบ แต่ได้รับสิ่งกระตุ้น และฉีดพ่นเชื้อ *S. ampelinum* เช่นเดียวกับสารที่ใช้เก็บใบเพื่อวิเคราะห์สารที่เกี่ยวข้อง SAR ประเมินโดยใช้ค่าเฉลี่ยจากทั้ง 3 ใบ/ชำ โดยใช้วิธีการของ อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์ (2553) หลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน (14 วันหลังฉีดสารกระตุ้น) โดยใช้ระดับคะแนน 1-5 คือ 1 คือ ไม่ปรากฏอาการ, 2 คือ พื้นที่ใบที่เป็นแผลน้อยกว่า 25%, 3 คือ พื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 26-50%, 4 คือ พื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 51-75% และ 5 คือ พื้นที่ใบที่เป็นแผลมากกว่า 75% เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด

#### 3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic Acid (SA)

ทำการทดลองโดยประยุกต์วิธีการของ Raskin และคณะ (1989) และนลินี และสุฤติ (2552) โดยเก็บใบตามตำแหน่งและระยะเวลาที่ระบุในข้อ 3.5 มาตัดครึ่งใบแรก ตัดซอยให้มีขนาด  $1 \times 1$  ซม. นำมาคลุกรวมกัน ลุ่มใบขึ้นมาชั่งให้น้ำหนัก 0.5 กรัมต่อ 1 ตัวอย่าง นำไปบดในโกร่งซึ่ง ทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว โดยใช้สารสกัดที่ประกอบด้วย 90% (v/v) methanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง นำมา centrifuge ที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็น supernatant จากนั้นนำส่วนที่เป็น pellet ที่ได้จากการ centrifuge ครั้งแรก มาสกัดใน 100% (v/v) methanol และ centrifuge ที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ซ้ำอีกครั้ง ดูดสารละลายที่สกัดได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้น supernatant ที่สกัดได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม ferric ammonium sulfate 0.02 M ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่า ดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณสาร salicylic acid ( $\mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน  $y = 5.783x + 0.262$ ,  $R^2 = 0.87$  ซึ่งได้จากการเตรียม salicylic acid 1M เพื่อใช้เป็นสารเปรียบเทียบมาตรฐาน ดูดสารละลายปริมาตร 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 และ 900 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 0.02 M ferric ammonium sulfate ในแต่ละหลอด ให้ครบ 1000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้ววัดค่า absorbance ที่ 530 nm

#### 3.5.3 การสกัดโปรตีนรวม

สกัดโปรตีนรวมใช้ตัวอย่างใบที่เก็บในข้อ 3.5 ครึ่งใบ ที่เหลือ ตัดซอยให้มีขนาด  $1 \times 1$  ซม.

นำมาคลุกรวมกัน สุ่มใบขึ้นมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัมต่อ 1 ตัวอย่าง มาบดด้วยโกร่งที่ทำให้เย็นด้วยไนโตรเจนเหลวจากนั้นผสม homogenization buffer[0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 M KCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, triton X-100, 3% (w/v) polyvinylpyrrolidone] 1 ml นำไป vortex ให้เข้ากัน ปั่นแยกตะกอนชิ้นส่วนพืช ในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที คัดสารละลายส่วนบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

ตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนรวมโดยวิธีของ Bradford (1976) โดยเตรียม bovine serum albumin (BSA) standard ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10, 15 และ 20 µg/ml ในน้ำ sterile distilled water เตรียม homogenate 2 ความเข้มข้น ในแต่ละตัวอย่าง คือ 5 และ 10 ไมโครลิตร ในปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสม BSA standard และ homogenate แต่ละความเข้มข้นมาใส่ในหลอดใหม่ตัวอย่างละ 400 ไมโครลิตร เติม protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 100 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน ผสมใส่ microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตรตัวอย่างละ 2 หลุม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่เกิน 1 ชม. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ด้วยเครื่อง spectracount microplatephotometer สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ BSA และค่าการดูดกลืนแสง หาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) คำนวณหาปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่างโดยแทนค่าลงในสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) แล้วจึงนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีน (}\mu\text{g)}}{\text{ปริมาณของ homogenate (}\mu\text{l)}}$$

### 3.5.3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase activity)

ทำการทดลองตามวิธีการของ Rohringer และคณะ (1983) ซึ่งมีรายละเอียด โดยนำ homogenate ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างใบองุ่นที่ระบุในข้อ 3.5.3 ปริมาตร 0.4 ml ผสม colloidal chitin (0.1%, w/v in sodium acetate buffer, 0.05 M, pH 5.0) ในอัตรา 0.4:0.4 มิลลิลิตร บ่มทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C จะได้ปริมาณของ N-acetyl glucosamine (GlcNAc) แล้วนำไปวิเคราะห์ Chitinase activity ตามวิธีของ Reissig และคณะ (1955) โดยไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 585 nm ใช้ GlcNAc เป็น standard โดย chitinase activity หนึ่งหน่วย เทียบจากสารผลิตภัณฑ์ 1 µmol GlcNAc formed min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein

### 3.5.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูคาเนส (β-1,3-glucanase activity)

นำ protein ที่สกัดได้ใน 3.5.3 ส่วนที่เหลือจาก 3.5.3.1 มาวิเคราะห์ β-1,3-glucanase activity ตามวิธีการของ Pan และคณะ (1991) โดยผสม homogenate ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร กับ

laminarin (4% w/v ใน 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.0) ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 10 นาที อุณหภูมิ 40°C จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย dinitrosalicylic acid ปริมาตร 375 ไมโครลิตร ต้มด้วยน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm จะได้ปริมาณทั้งหมดของ reducing sugar หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ตามวิธีของ Dygert และคณะ (1965) โดยใช้น้ำตาล glucose เป็น standard และ  $\beta$ -1,3-glucanase activity หนึ่งหน่วยเทียบจากสารผลิตภัณฑ์ 1  $\mu\text{mol}$  glucose formed  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein

### 3.5.3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase activity: PPO)

นำ protein ที่สกัดได้ใน 3.5.3 ส่วนที่เหลือจาก 3.5.3.2 มาวิเคราะห์ PPO activity ตามวิธีของ Thipyapong (1995) อ้างถึงใน อนงคันทุช พลวงษ์ (2548) โดยเตรียม homogenate ที่สกัดได้ 4 ความเข้มข้น โดยใช้อัตราส่วน homogenate/ homogenization buffer 10/30, 20/20, 30/10 และ 40/0 เติม catalase (84 unit/ $\mu\text{l}$ ) 5  $\mu\text{l}$  ลงใน homogenate ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง 15 นาที แล้วนำ homogenate ในแต่ละความเข้มข้นใส่ใน substrate solution (96  $\mu\text{M}$  2-nitro-5-thiobenzoic acid และ 1.77 mM 4-methylcatechol ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0) ปริมาตร 1 ml ทำการตรวจวัดระดับ substrate ที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน ต่อหนึ่งหน่วยเวลา (1 นาที) โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) วัดค่าที่ 412 nm ทุก ๆ 5 วินาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วบันทึกการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง (Thipyapong, 1995 อ้างถึงใน อนงคันทุช พลวงษ์, 2548) นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเส้น เพื่อคำนวณค่า PPO activity ( $\Delta\text{OD min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  leaf homogenate) จากสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) แล้วทำการ standardize ด้วยปริมาณโปรตีนรวม จากนั้นเปลี่ยนค่าของ PPO activity เป็น  $\mu\text{mol}$  quinone formed  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein โดยนำค่าที่ได้มาคูณ 0.272

## 3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

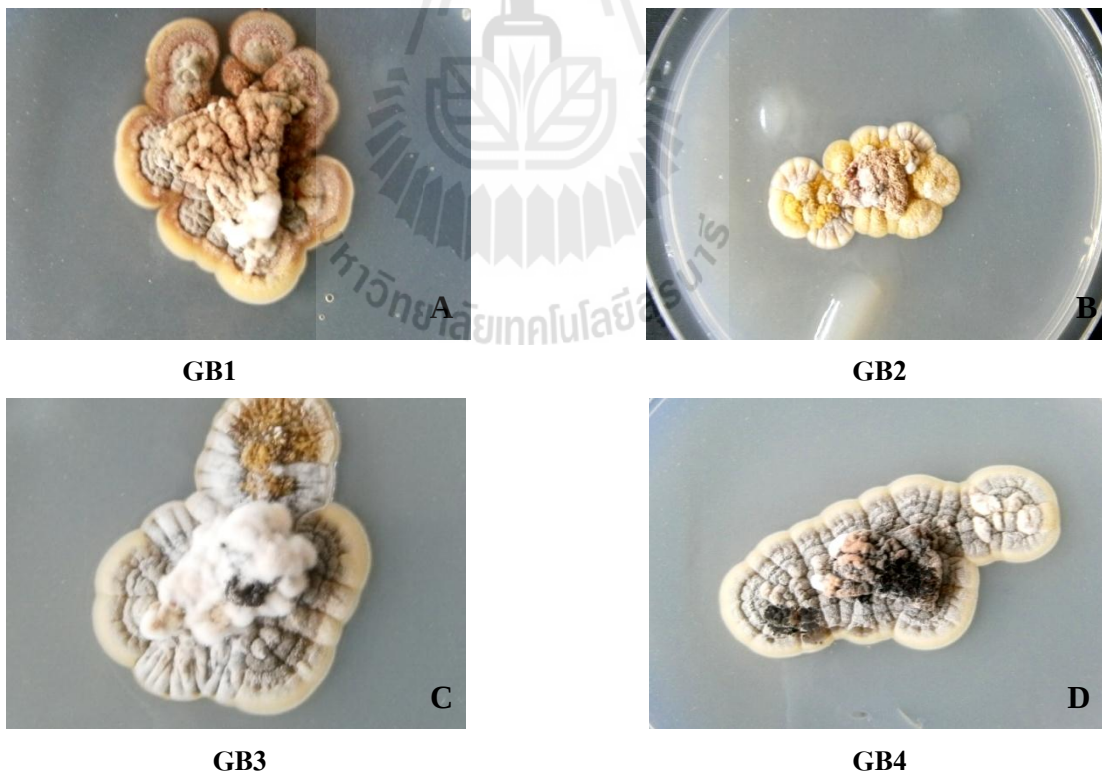
วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows V.14.0 ตามแผนการทดลองแบบ RCBD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์โดยวิธีการของ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากนั้นวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างคะแนนการเกิดโรคและปริมาณสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ SAR

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การแยกเชื้อรา *S. ampelinum* จากองุ่นพันธุ์ Black queens

จากการรวบรวมตัวอย่างใบองุ่นพันธุ์ Black queens ที่เป็นโรคสแคบจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting จากนั้นย้ายเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ได้เชื้อรา *S. ampelinum* ได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลต ดังแสดงในภาพที่ 4.1 เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตมีลักษณะโคโลนี (ขนินฐา มากรุง, 2548; อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์, 2553; มธุกร สมพงษ์, 2553) เชื้อมีการเจริญเติบโตช้า สามารถเห็นเส้นใยเจริญออกมาจากบริเวณเนื้อเยื่อใบ หลังจาก 3-5 วัน เมื่อเลี้ยงบนอาหาร water agar (WA) เส้นใยบางส่วนของเชื้อเจริญอยู่ในวุ้นโดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สีของโคโลนี และอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *S. ampelinum* 4 ไอโซเลตที่แยกได้จากองุ่นพันธุ์ Black queens บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) อายุ 30 วัน (A) เชื้อไอโซเลต GB 1, (B) เชื้อไอโซเลต GB 2, (C) เชื้อไอโซเลต GB 3, (D) เชื้อไอโซเลต GB

**ตารางที่ 4.1** ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สีและขนาดของโคโลนีของเชื้อ *S. ampelinum* ทั้ง 4 ไอโซเลต ที่อายุ 30 วัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)

| ไอโซเลต | ลักษณะของโคโลนี              | ขนาดของโคโลนีที่อายุ 30 วัน (มม.)* |         |
|---------|------------------------------|------------------------------------|---------|
|         |                              | ความกว้าง                          | ความยาว |
| GB 1    | นูนสูง ผิวขรุขระมาก สีน้ำตาล | 26.50                              | 30.50   |
| GB 2    | นูน ผิวขรุขระ สีเหลือง       | 20.88                              | 22.75   |
| GB 3    | นูน ผิวขรุขระ สีเทา          | 23.88                              | 26.75   |
| GB 4    | แบน ผิวขรุขระมาก สีดำ        | 23.13                              | 24.25   |

\* หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ/ไอโซเลต

#### 4.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรค (Pathogenicity test)

จากการนำเชื้อที่แยกได้ทั้ง 4 ไอโซเลต มากระตุ้นให้สร้างโคนิเดียภายใต้แสง black light จากนั้นนำเชื้อแต่ละไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการก่อโรคในสภาพใบตัดพบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการก่อโรคแตกต่างกันโดยไอโซเลต GB 4 มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด โดยให้จำนวนแผลเฉลี่ยต่อชิ้นใบมากที่สุดคือ 12.5 แผล ในขณะที่ไอโซเลต GB 1 มีจำนวนแผลต่อชิ้นใบน้อยที่สุดคือ 3.5 แผล (ตารางที่ 4.2) ดังนั้น จึงทำการเก็บเชื้อรา *S. ampelinum* ไอโซเลต GB 4 มาทำการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการกระตุ้นความต้านทานองุ่นเพื่อให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคสแคบในขั้นต่อไป

**ตารางที่ 4.2** ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อ *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ ทั้ง 4 ไอโซเลต ในองุ่นพันธุ์ Black queens ในสภาพใบตัด

| ไอโซเลต                    | การเกิดโรคสแคบ      |               |
|----------------------------|---------------------|---------------|
|                            | จำนวนแผล            | ขนาดแผล (ซม.) |
| GB 1                       | 3.5ab <sup>1/</sup> | 0.48cd        |
| GB 2                       | 4.5b                | 0.38b         |
| GB 3                       | 4.0b                | 0.40bc        |
| GB 4                       | 12.5c               | 0.18a         |
| Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) | 1.25a               | 0.52d         |
| F-test                     | **                  | **            |
| CV(%)                      | 30.29               | 14.04         |

<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $P \leq 0.05$  โดยวิธี DMRT

### 4.3 การศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นความต้านทานในการกระตุ้นให้อ่อนต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคสแคบ

#### 4.3.1 การประเมินคะแนนการเกิดโรค (disease scores)

จากการประเมินคะแนนการเกิดโรคสแคบ โดยใช้ระดับคะแนน 1-5 หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคสแคบ *S. ampelinum* 7 วันบนต้นองุ่นที่ได้รับการฉีดพ่นสารกระตุ้นแล้ว 14 วัน พบว่าการฉีดพ่นสิ่งกระตุ้นโดยใช้สารละลายไคโตซานเข้มข้น 5,000 ppm เกิดโรคสแคบต่ำสุดคือ 1.33 คะแนน มีพื้นที่ใบเป็นแผลจากโรคสแคบน้อยกว่า 25% และแสดงอาการของโรคล่าช้า โดยสังเกตเห็นโรคแสดงอาการวันแรกในวันที่ 5 หลังปลูกเชื้อ ในขณะที่การใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้นอื่นและสารละลาย BTH ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm มีผลทำให้การเกิดโรคสแคบลดลงใกล้เคียงกันไม่แตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ให้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ ซึ่งเกิดโรคสแคบสูงสุดคือ 4.89 คะแนน และโรคแสดงอาการในวันที่ 2 หลังปลูกเชื้อ นอกจากนี้การใช้สปอร์ของเชื้อราสนิมจากองุ่นและสลิลาดีในการฉีดพ่นองุ่นเพื่อกระตุ้นความต้านทานให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (ตารางที่ 4.3), (ภาพที่ 4.2)

ตารางที่ 4.3 การประเมินการเกิดโรคสแคบในใบองุ่นพันธุ์ Black queens หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย *S. ampelinum*

| ตำรับการทดลอง                                     | การเกิดโรคสแคบ                |                               |
|---------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                                   | คะแนนการเกิดโรค <sup>2/</sup> | ระยะเวลาที่โรคแสดงอาการ (วัน) |
| สารละลายไคโตซาน 1,000 ppm (CHN 1,000 ppm)         | 2.33ab <sup>1/</sup>          | 4                             |
| สารละลายไคโตซาน 2,500 ppm (CHN 2,500 ppm)         | 2.33ab                        | 4                             |
| สารละลายไคโตซาน 5,000 ppm (CHN 5,000 ppm)         | 1.33a                         | 5                             |
| สารละลาย BTH 50 ppm (BTH 50 ppm)                  | 2.33ab                        | 5                             |
| สารละลาย BTH 100 ppm (BTH 100 ppm)                | 2.33ab                        | 4                             |
| สารละลาย BTH 200 ppm (BTH 200 ppm)                | 3.00b                         | 5                             |
| สปอร์เชื้อราสนิมสลิลาดี $4 \times 10^6$ สปอร์/มล. | 4.33c                         | 3                             |
| สปอร์เชื้อราสนิมองุ่น $4 \times 10^6$ สปอร์/มล.   | 4.69c                         | 3                             |
| Control (น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ)                     | 4.89c                         | 2                             |
| F-test                                            | **                            |                               |
| CV(%)                                             | 17.89                         |                               |

<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

<sup>2/</sup> ระดับคะแนนการเกิดโรค ระดับคะแนน 1 คือไม่ปรากฏอาการ, คะแนน 2 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลน้อยกว่า 25%, คะแนน 3 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 26-50%, คะแนน 4 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 51-75% และคะแนน 5 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลมากกว่า 75% เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด

#### 4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Salicylic acid

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นให้อองุ่นเกิดความต้านทานต่อโรคสแคบโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ salicylic acid (SA) พบว่า หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วัน สิ่งกระตุ้นทุกชนิดสามารถกระตุ้นการสร้าง SA เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยไคโตซานความเข้มข้น 2,500 ppm เพิ่มปริมาณ SA ได้สูงสุดคือ  $3.99 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight รองลงมาคือ BTH เข้มข้น 100 ppm ขณะที่สปอร์ของเชื้อราสนิมอองุ่นและสลิลาดีเพิ่ม SA ได้ในปริมาณที่ต่ำและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นด้วยไคโตซานและ BTH (ตารางที่ 4.4)

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความแตกต่างของปริมาณ SA ที่เพิ่มขึ้นหลังจาก 14 วัน (7 วัน หลังจาก challenge inoculation ด้วยเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบขององุ่น) พบว่า สารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดคือไคโตซานและ BTH ในทุกระดับความเข้มข้นโดยมีการกระตุ้นปริมาณสาร SA ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการใช้ไคโตซานความเข้มข้น 5,000 ppm และ BTH เข้มข้น 100 ppm มีปริมาณ SA เพิ่มขึ้นสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ คือ 13.08 และ  $12.15 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น การใช้ไคโตซานและ BTH ทุกความเข้มข้นมีผลทำให้มีปริมาณ SA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อที่เป็นชุดควบคุม ซึ่งมีปริมาณ SA เพิ่มขึ้นเพียง  $2.90 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight (ตารางที่ 4.4) ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้สปอร์ของราสนิมทั้งสองชนิดเป็นสิ่งกระตุ้นเพียง 3.63 และ  $3.90 \mu\text{g g}^{-1}$  fresh weight ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสาร salicylic acid ในใบอ่อนพันธุ์ Black queens หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย *S. ampelinum*

| คำรับการทดลอง                                        | ปริมาณ salicylic acid ( $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight) <sup>1/</sup> |                 |                  |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|
|                                                      | ช่วงเวลา (วัน) <sup>2/</sup>                                             |                 |                  |
|                                                      | 0                                                                        | 7 <sup>3/</sup> | 14 <sup>4/</sup> |
| 1. CHN 1,000 ppm                                     | 0.78b                                                                    | 3.57e           | 12.19b           |
| 2. CHN 2,500 ppm                                     | 0.60a                                                                    | 3.99f           | 10.58b           |
| 3. CHN 5,000 ppm                                     | 0.99c                                                                    | 2.98d           | 13.08b           |
| 4. BTH 50 ppm                                        | 0.79b                                                                    | 3.06ef          | 10.85b           |
| 5. BTH 100 ppm                                       | 1.04c                                                                    | 3.83ef          | 12.15b           |
| 6. BTH 200 ppm                                       | 1.46e                                                                    | 2.16c           | 11.54b           |
| 7. สปอร์เชื้อราสนิมิลาวดี $4 \times 10^6$ สปอร์/มล.  | 0.95c                                                                    | 1.47b           | 3.63a            |
| 8. สปอร์เชื้อราสนิมิมองุ่น $4 \times 10^6$ สปอร์/มล. | 0.91bc                                                                   | 1.91c           | 3.90a            |
| 9. Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)                        | 1.21d                                                                    | 0.19a           | 2.90a            |
| F-test                                               | **                                                                       | **              | **               |
| CV(%)                                                | 8.63                                                                     | 12.87           | 18.17            |

<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

<sup>2/</sup> ช่วงเวลาที่วัดปริมาณ salicylic acid ที่ 0, 7 และ 14 วัน หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น โดยวันที่ 14 เป็นวันที่ประเมินผลการเกิดโรคสแกลบ

<sup>3/</sup> ปริมาณ SA ที่เพิ่มขึ้นที่ 7 วัน หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น

<sup>4/</sup> ปริมาณ SA ที่เพิ่มขึ้นจากช่วง 7 วัน หลังจากปลูกเชื้อ *S. ampelinum*

#### 4.3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส (Chitinase activity)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นให้อ่อนเกิดความต้านทานต่อโรคสแกลบโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase พบว่า หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วัน สิ่งกระตุ้นทุกชนิดสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดย BTH ความเข้มข้น 200 ppm เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ได้สูงสุดคือ 0.451 Unit/mg protein รองลงมาคือไคโตซานความเข้มข้น 5,000 ppm ขณะที่สปอร์ของเชื้อราสนิมิมองุ่นและสปอร์ของเชื้อราสนิมิลาวดีเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ได้ไม่มากนัก (ตารางที่ 4.5)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ที่เพิ่มขึ้นหลังจาก 14 วัน พบว่า สารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดในทุกๆระดับความเข้มข้นยกเว้น CHN 1,000 ppm กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

chitinase ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่า การใช้ BTH เข้มข้น 200 ppm และไคโตซานความเข้มข้น 5,000 ppm มีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ คือ 0.765, 0.755 Unit/mg protein ตามลำดับ การใช้ไคโตซานและ BTH ทุกความเข้มข้นมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่เป็นชุดควบคุมซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นเพียง 0.303 Unit/mg protein (ตารางที่ 4.5) ซึ่งแตกต่างจากการใช้สปอร์ของราสนิม่องุ่นและสืลาวาคีเป็นสังกะตุน

**ตารางที่ 4.5** กิจกรรมเอนไซม์ chitinase ในใบองุ่นพันธุ์ Black queens หลังจากได้รับสังกะตุนและปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย *S. ampelinum*

| ตำรับการทดลอง                                         | chitinase activity (Unit/mg protein) <sup>1/</sup> |                 |                  |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|------------------|
|                                                       | ช่วงเวลา (วัน) <sup>2/</sup>                       |                 |                  |
|                                                       | 0                                                  | 7 <sup>3/</sup> | 14 <sup>4/</sup> |
| 1. CHN 1,000 ppm                                      | 0.133                                              | 0.396c          | 0.691c           |
| 2. CHN 2,500 ppm                                      | 0.135                                              | 0.417cd         | 0.726cd          |
| 3. CHN 5,000 ppm                                      | 0.132                                              | 0.444cd         | 0.755cd          |
| 4. BTH 50 ppm                                         | 0.130                                              | 0.423cd         | 0.710cd          |
| 5. BTH 100 ppm                                        | 0.131                                              | 0.434cd         | 0.732cd          |
| 6. BTH 200 ppm                                        | 0.133                                              | 0.451d          | 0.765d           |
| 7. สปอร์เชื้อราสนิมสืลาวาคี $4 \times 10^6$ สปอร์/มล. | 0.132                                              | 0.324b          | 0.473b           |
| 8. สปอร์เชื้อราสนิม่องุ่น $4 \times 10^6$ สปอร์/มล.   | 0.139                                              | 0.289b          | 0.463b           |
| 9. Control (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)                     | 0.135                                              | 0.242a          | 0.303a           |
| F-test                                                | ns                                                 | **              | **               |
| CV(%)                                                 | 15.44                                              | 9.75            | 5.10             |

<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

<sup>2/</sup> ช่วงเวลาที่วัดกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ที่ 0, 7 และ 14 วัน หลังฉีดพ่นสังกะตุน โดยวันที่ 14 เป็นวันที่ประเมินผลการเกิดโรคสแคบ

<sup>3/</sup> กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ที่เพิ่มขึ้น 7 วัน หลังจากฉีดพ่นสังกะตุน

<sup>4/</sup> กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ที่เพิ่มขึ้น 7 วัน หลังจากปลูกเชื้อ *S. ampelinum*

#### 4.3.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูคาเนส ( $\beta$ -1,3-glucanase activity)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นให้อองุ่นเกิดความต้านทานต่อโรคสแคบโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase พบว่าหลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วันสิ่งกระตุ้นทุกชนิดสามารถกระตุ้นการทำงานของกิจกรรม  $\beta$ -1,3-glucanase เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยไคโตซานความเข้มข้น 5,000 ppm เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ได้สูงสุดคือ 0.523 Unit/mg protein รองลงมาคือ BTH ความเข้มข้น 200 ppm ขณะที่สปอร์ของเชื้อราสนิมอองุ่นและลีลาวดีเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ได้แต่ปริมาณใกล้เคียงกับกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ในชุดควบคุม (ตารางที่ 4.6)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ที่เพิ่มขึ้นหลังจาก 14 วัน (7 วัน หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคสแคบ *S. ampelinum*) พบว่า สารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดคือ BTH ทุกระดับความเข้มข้นและไคโตซานความเข้มข้น 5,000 ppm กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการใช้ BTH เข้มข้น 200 ppm และ BTH เข้มข้น 100 ppm มีกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นคือ 0.843, 0.790 Unit/mg protein ตามลำดับ การใช้ไคโตซาน และ BTH ทุกความเข้มข้น มีผลทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่เป็นชุดควบคุมซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase เพิ่มขึ้นเพียง 0.467 Unit/mg protein (ตารางที่ 4.6) ซึ่งแตกต่างจากการใช้สปอร์ของราสนิมทั้งสองชนิดเป็นสิ่งกระตุ้นเพียง 0.600 และ 0.533 Unit/mg protein ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ในใบองุ่นพันธุ์ Black queens หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย *S. ampelinum*

| ตำรับการทดลอง                                        | $\beta$ -1,3-glucanase activity (Unit/mg protein) <sup>1/</sup> |                 |                  |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|
|                                                      | ช่วงเวลา(วัน) <sup>2/</sup>                                     |                 |                  |
|                                                      | 0                                                               | 7 <sup>3/</sup> | 14 <sup>4/</sup> |
| 1. CHN1,000 ppm                                      | 0.211b                                                          | 0.470d          | 0.690c           |
| 2. CHN2,500 ppm                                      | 0.270cd                                                         | 0.493de         | 0.707c           |
| 3. CHN5,000 ppm                                      | 0.223b                                                          | 0.523de         | 0.750cd          |
| 4. BTH 50 ppm                                        | 0.312g                                                          | 0.497de         | 0.747cd          |
| 5. BTH 100 ppm                                       | 0.282de                                                         | 0.473d          | 0.790cd          |
| 6. BTH 200 ppm                                       | 0.213b                                                          | 0.501de         | 0.843cd          |
| 7. สปอร์เชื้อราสนิมิลิลาดี $4 \times 10^6$ สปอร์/มล. | 0.261c                                                          | 0.420c          | 0.600b           |
| 8. สปอร์เชื้อราสนิมองุ่น $4 \times 10^6$ สปอร์/มล.   | 0.290f                                                          | 0.373b          | 0.553b           |
| 9. Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)                        | 0.195a                                                          | 0.303a          | 0.467a           |
| F-test                                               | **                                                              | **              | **               |
| CV(%)                                                | 19.14                                                           | 11.02           | 4.65             |

<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

<sup>2/</sup> ช่วงเวลาที่วัดกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ที่ 0, 7 และ 14 วัน หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น โดยวันที่ 14 เป็นวันที่ประเมินผลการเกิดโรคสแคบ

<sup>3/</sup> กิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ที่เพิ่มขึ้น 7 วัน หลังจากฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น

<sup>4/</sup> กิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase ที่เพิ่มขึ้น 7 วัน หลังจากปลูกเชื้อ *S. ampelinum*

#### 4.3.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดส

##### (polyphenol oxidase activity: PPO)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นให้อองุ่นเกิดความต้านทานต่อโรคสแคบ โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ PPO พบว่า หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วันสิ่งกระตุ้นทุกชนิดสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดย BTH เข้มข้น 100 ppm เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ได้สูงสุดคือ  $4.217 \mu\text{mol quinone formed min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$  รองลงมาคือ BTH เข้มข้น 200 ppm ขณะที่สปอร์ของเชื้อราสนิมองุ่นและสปอร์ของเชื้อราสนิมิลิลาดีเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(ตารางที่ 4.7)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ที่เพิ่มขึ้นหลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 14 วัน (7 วัน หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคสแคบ *S. ampelinum*) พบว่า สารกระตุ้นทั้ง 2 ชนิดในทุกระดับความเข้มข้นกระตุ้นการทำงานของกิจกรรม PPO ได้แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าการใช้ BTH เข้มข้น 200 ppm และ BTH เข้มข้น 100 ppm มีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้นสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ คือ 11.227, 10.153  $\mu\text{mol quinone formed min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$  ตามลำดับ นอกจากนี้ การใช้ไคโตซาน และ BTH ทุกความเข้มข้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อที่เป็นชุดควบคุมซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้นเพียง 4.053  $\mu\text{mol quinone formed min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$  (ตารางที่ 4.7) ซึ่งแตกต่างจากการใช้สปอร์ของราสนิมอ่อนเป็นสิ่งกระตุ้นเพียง 5.733  $\mu\text{mol quinone formed min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$

**ตารางที่ 4.7** กิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase activity (PPO) ในใบอ่อนพันธุ์ Black que หลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นและปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วย *S. ampelinum*

| ตำรับการทดลอง                                       | PPO activity ( $\mu\text{mol quinone formed min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) <sup>1/</sup> |                 |                  |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|
|                                                     | ช่วงเวลา (วัน) <sup>2/</sup>                                                                         |                 |                  |
|                                                     | 0                                                                                                    | 7 <sup>3/</sup> | 14 <sup>4/</sup> |
| 1. CHN 1,000 ppm                                    | 3.061ef                                                                                              | 2.987ef         | 8.297e           |
| 2. CHN 2,500 ppm                                    | 3.170f                                                                                               | 2.687de         | 7.843c           |
| 3. CHN 5,000 ppm                                    | 2.514c                                                                                               | 1.757bc         | 7.363c           |
| 4. BTH 50 ppm                                       | 2.612c                                                                                               | 2.497cd         | 7.953de          |
| 5. BTH 100 ppm                                      | 1.403a                                                                                               | 4.217g          | 10.153g          |
| 6. BTH 200 ppm                                      | 2.171b                                                                                               | 3.383f          | 11.227h          |
| 7. สปอร์เชื้อราสนิมสีลาวา $4 \times 10^6$ สปอร์/มล. | 2.204b                                                                                               | 2.060b          | 9.287d           |
| 8. สปอร์เชื้อราสนิมอ่อน $4 \times 10^6$ สปอร์/มล.   | 2.970de                                                                                              | 0.853a          | 5.733b           |
| 9. Control (น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ)                    | 2.861d                                                                                               | 0.633a          | 4.053a           |
| F-test                                              | **                                                                                                   | **              | **               |
| CV(%)                                               | 22.48                                                                                                | 13.46           | 2.71             |

<sup>1/</sup> ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

<sup>2/</sup> ช่วงเวลาที่วัดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ที่ 0, 7 และ 14 วัน หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น โดยวันที่ 14 เป็นวันที่ประเมินผล การเกิดโรคสแคบ

<sup>3/</sup> กิจกรรมของเอนไซม์ PPO ที่เพิ่มขึ้น 7 วัน หลังจากฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น

<sup>4/</sup> กิจกรรมของเอนไซม์ PPO ที่เพิ่มขึ้น 7 วัน หลังจากปลูกเชื้อ *S. ampelinum*

#### 4.3.6 สหสัมพันธ์ระหว่างคะแนนการเกิดโรคกับปริมาณสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Systemic acquired resistance (SAR) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้น

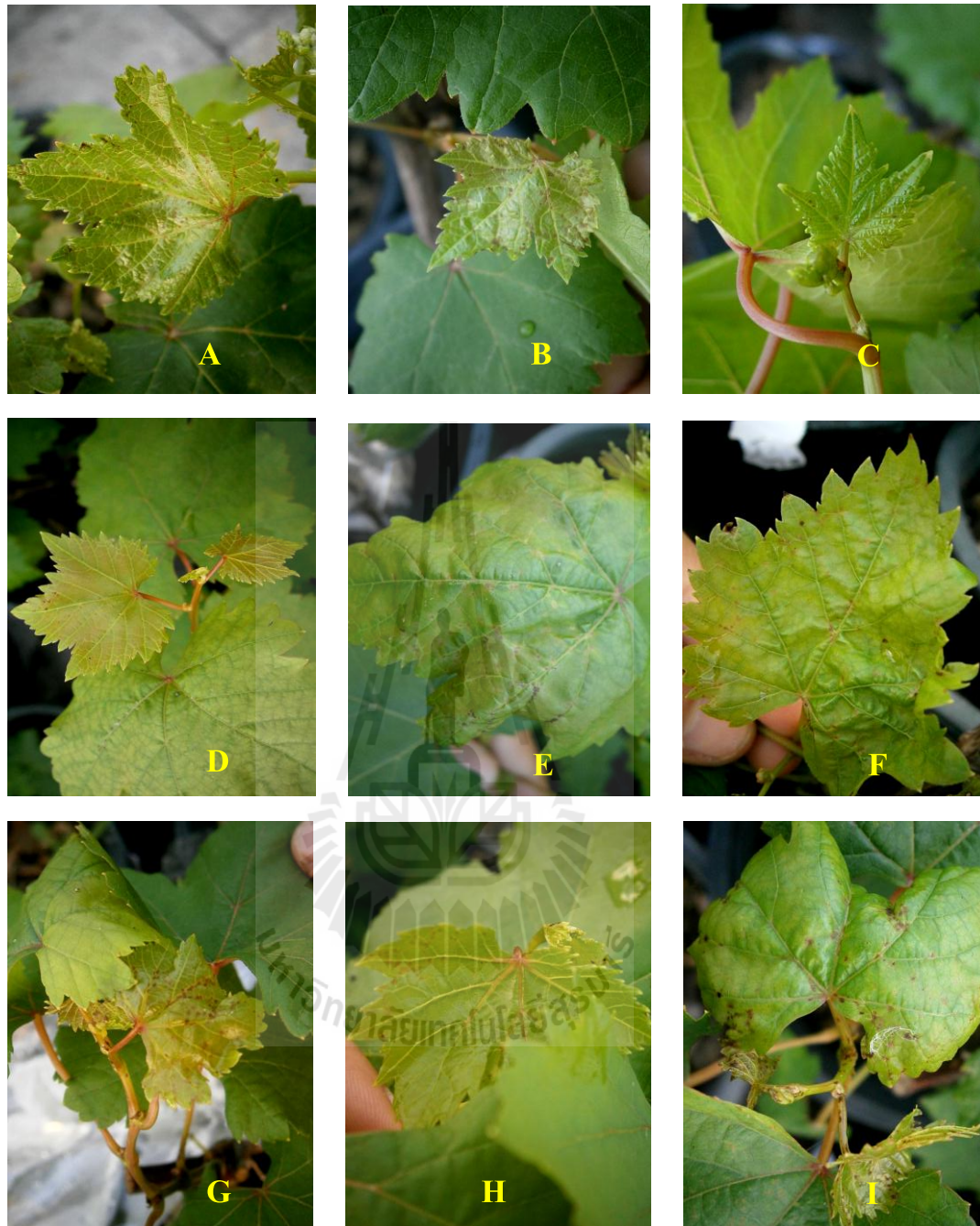
จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคกับปริมาณสาร salicylic acid (SA) และกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase และ polyphenol oxidase โดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Pearson correlation) พบว่า มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ระหว่างการเกิดโรคกับปริมาณสาร salicylic acid และกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase และ polyphenol oxidase (PPO) โดยมีค่าเท่ากับ -0.770, -0.771, -0.566 และ -0.337 ตามลำดับโดยความสัมพันธ์เป็นไปในลักษณะ negative correlation กล่าวคือเมื่อปริมาณสาร salicylic acid และกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase และ polyphenol oxidase (PPO) เพิ่มขึ้น จะมีการเกิดโรคสแคบขององุ่นลดลง (ตารางที่ 4.8)

**ตารางที่ 4.8** สหสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคสแคบกับปริมาณสารและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมกระบวนการ SAR ที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้น

| สารและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ<br>กระบวนการ SAR | สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์กับ<br>การเกิดโรคสแคบ (r) |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| ปริมาณสาร SA                                   | - 0.770**                                       |
| กิจกรรมเอนไซม์ chitinase                       | - 0.771**                                       |
| กิจกรรมเอนไซม์ $\beta$ -1,3-glucanase          | - 0.566*                                        |
| กิจกรรมเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO)        | - 0.337*                                        |

\* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (significant)

\*\* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (highly significant),



ภาพที่ 4.2 ความรุนแรงของโรคสแคบจากเชื้อ *S. ampelinum* บนองุ่นพันธุ์ Black queens ที่ได้รับสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ กัน

A ไคโตซานเข้มข้น 1,000 ppm

B ไคโตซานเข้มข้น 2,500 ppm

C ไคโตซานเข้มข้น 5,000 ppm

D BTH เข้มข้น 50 ppm

E BTH เข้มข้น 100 ppm

F BTH เข้มข้น 200 ppm

G สปอร์เชื้อราสนิมิลิลาเวดี  $4 \times 10^6$  สปอร์/มล. H สปอร์เชื้อราสนิมิลิลาเวดี  $4 \times 10^6$  สปอร์/มล.

I น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการควบคุมโรคสแคปในองุ่นที่เกิดจากเชื้อรา *S. ampelinum* โดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้น พบว่า

1. วิธีการที่สามารถแยกเชื้อจากตัวอย่างใบองุ่นพันธุ์ Black queens ได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ การแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยชักนำเชื้อให้เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค โดยนำเนื้อเยื่อไปวางบนอาหาร water agar ก่อน หลังจากนั้น 3-5 วันจึงทำการเขี่ยย้ายเส้นใยของเชื้อที่เจริญออกมาเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar (PDA) วิธีนี้สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้ออื่น ๆ ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อเยื่อพืชซึ่งจะแข่งขันกับเชื้อ *S. ampelinum* เมื่อเชื้อมีอายุ 15-20 วันในอาหาร PDA สามารถนำเชื้อมาตรวจสอบและจำแนกเชื้อโดยสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สีของโคโลนีและอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละไอโซเลต โดยการเลือกเนื้อเยื่อใบควรเลือกเนื้อเยื่อที่แสดงอาการของโรคในระยะเริ่มต้น ซึ่งสอดคล้องกับวิธีที่ กรรณิการ์ เพี้ยนพัตร์ และคณะ (2545); ขนิษฐา มากรุง (2548); มรุกร สมพงษ์ (2553) แนะนำ

2. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคและคัดเลือกไอโซเลตที่รุนแรงในการเข้าทำลาย ซึ่งทดสอบกับองุ่นพันธุ์ Black queens โดยนำเชื้ออายุ 30 วันมากระตุ้นให้เชื้อสร้างโคโคนีเดียโดยการให้แสง black light สลับกับแสงฟลูออเรสเซนซ์ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อมีความแตกต่างกันทั้งโคโลนีที่มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบแบน ผิวหน้าขุ่น แบบนูน ผิวหน้าขุ่นถึงขุ่นมาก สีของโคโลนีมีทั้งสีเหลือง น้ำตาล เทา และดำ ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตสามารถก่อโรคได้ แต่ไอโซเลต GB 4 ทำให้เกิดจำนวนแผลมากที่สุดใสภาพใบตัด จึงได้เชื้อไอโซเลต GB 4 เป็นตัวแทนในการศึกษาในเรื่องประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นความต้านทาน อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยมีค่าสัมประสิทธิ์แห่งความแปรผัน (coefficient of variation; CV) ค่อนข้างสูง เนื่องจากเวลาปลูกเชื้อ *S. ampelinum* เชื้อจะตกตะกอนอยู่ในสารละลาย เมื่อโรคแสดงอาการจึงเกิดความไม่สม่ำเสมอของขึ้นใบในแต่ละซ้ำทำให้มีค่า CV สูง

3. การศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นความต้านทานในการควบคุมโรคสแคปพบว่า การเกิดโรคสแคปในองุ่นลดลงเมื่อใช้สารไคโตซานและ BTH เป็นสิ่งกระตุ้น โดยสารไคโตซานความเข้มข้น 5,000 ppm มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ขณะที่ BTH ทุกความเข้มข้นมีประสิทธิภาพรองลงมาและไม่แตกต่างจากไคโตซานความเข้มข้นอื่น สำหรับสปอร์ของราสนิมทั้งสองชนิดไม่สามารถลด

การเกิดโรคสแคบได้ สำหรับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร salicylic acid กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase และ PPO มีการเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วัน และปลูกเชื้อสาเหตุโรคสแคบ *S. ampelinum* ที่ 7 วัน (14 วัน หลังจากฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น) นอกจากนี้พบว่า การเกิดโรคสแคบขององุ่น มีความสัมพันธ์เชิงลบกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารต่าง ๆ และกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการ SAR คือเมื่อระดับของสาร salicylic acid กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase และ PPO เพิ่มขึ้น จะมีการเกิดโรคสแคบลดลง ซึ่งสารและกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้เป็นตัวชี้วัดที่ดีในการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยจากการทดลองนี้ พบว่าตัวบ่งชี้ที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่ สาร salicylic acid และกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ซึ่งให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูงสุด คือ -0.770 และ -0.771 ตามลำดับ และการวิเคราะห์สารและเอนไซม์นี้ ทำได้ค่อนข้างง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับสารและกิจกรรมเอนไซม์ชนิดอื่นที่วิเคราะห์และสารและเอนไซม์ดังกล่าว มีความสอดคล้องกับการลดลงของการเกิดโรคสแคบมากที่สุดยิ่งไปว่านั้น ในการทดลองนี้ การใช้โคโตซานจะให้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้ BTH และความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารดังกล่าว สอดคล้องกับการทดลองของ Nandeeshkumar และคณะ (2008) ที่พบว่า โคโตซานสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ PPO, PAL, POD, chitinase และ  $\beta$ -1,3-glucanase ในระยะต้นกล้าของทานตะวัน ส่งผลให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายเชื้อ *Plasmopara halstedii* สาเหตุโรคน้ำค้างในทานตะวัน และสอดคล้องกับการทดลองของ Sathiyabama และ Balasubramanian (1998) ที่พบว่า การใช้สารละลายโคโตซาน สามารถกระตุ้นการสร้างสาร Salicylic acid และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ  $\beta$ -1,3-glucanase อย่างรวดเร็วหลังฉีดพ่น 48 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นสูงต่อเนื่องเป็นเวลา 10 วัน ส่งผลให้เกิดโรคราสนิมในถั่วลิสงลดลง นอกจากนี้ Aziz และคณะ (2006) พบว่า โคโตซานสามารถกระตุ้นการสร้าง phytoalexin และการทำงานของกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ  $\beta$ -1,3-glucanase ภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคน้ำค้างองุ่นสายพันธุ์อ่อนแอ ส่งผลให้องุ่นต้านทานต่อการเข้าทำลายอย่างรุนแรงโรคดังกล่าว โดยลดการเกิดโรคได้ 71 เปอร์เซ็นต์ และลดการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 85 เปอร์เซ็นต์ และในปี 2011 Iriti และคณะพบว่า โคโตซานสามารถกระตุ้นการสร้าง polyphenol content ในองุ่นเพื่อชักนำให้องุ่นปกป้องตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อราแป้ง โดยพบว่า เมื่อใช้สารโคโตซานสามารถลดการเกิดโรค(disease incidence) ทั้งใบและในกิ่งได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดความรุนแรง(disease severity) ได้มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเหตุนี้สารโคโตซานในรูปแบบ (Formular) ที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรคสแคบในองุ่น อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของโคโตซานเหล่านี้ ในสภาพไร่นาก่อนที่จะมีการ

แนะนำให้อย่างเป็นทางการ สำหรับสาร BTH นั้น แม้ว่าจะให้ผลในการลดความรุนแรงของการเกิดโรค แต่ก็ยังมีประสิทธิภาพด้อยกว่าไคโตซาน นอกจากนี้ ยังเป็นสารที่ยังไม่ได้รับการขึ้นทะเบียนในประเทศไทย แม้ว่าจะมีผลการทดลองมากมายที่ยืนยันประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช ตัวอย่างเช่น การใช้ควบคุมโรคแคงเกอร์ในส้ม (Graham and Myers, 2011) การควบคุมโรคใบจุดจากแบคทีเรียในพริก (Romero et al., 2011) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาของ Eikemo และคณะ (2003) เมื่อใช้ BTH ที่  $500 \mu\text{g a.i. ml}^{-1}$  ก่อนปลูกเชื้อรา *Phytophthora cactorum* สามารถลดอาการ crown rot ในสตรอเบอรี่ได้ การศึกษาของ Liu และคณะ (2005) พบว่า BTH สามารถลดขนาดแผลและอัตราการเกิดโรคจากเชื้อรา *Penicillium expansum* ในลูกพีช และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ phenylalanine ammonialyase (PAL), PPO และ peroxidase (POD) ได้ดี และ Anfoka, G. H. (2000) รายงานว่าหลังจากพ่น BTH 7 วัน ก่อนปลูกเชื้อไวรัส CMV-Y พบว่า อัตราการเกิดโรคลดลง 12.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมะเขือเทศไม่แสดงอาการต่าง และการตายของเนื้อเยื่อใบ ซึ่งการนำ BTH มาใช้ประโยชน์ในประเทศไทย จึงยังมีข้อจำกัด และไม่แพร่หลาย แต่ผลการทดลองนี้พบว่า การ BTH ดังกล่าว อาจนำประยุกต์ใช้กับโรคอื่น ๆ ในองุ่น หรือกับพืชชนิดอื่น เพื่อกระตุ้นกลไกการป้องกันตนเองของพืช เนื่องจากในกระบวนการ Induced resistance มีการผลิตสาร และกลไกการป้องกันแบบไม่เฉพาะเจาะจงและมีผลกับเชื้อก่อโรคอื่นได้เช่นกัน

จากการศึกษาทดลองครั้งนี้ จึงให้เห็นว่าปริมาณสารและเอนไซม์มีความสำคัญในกระบวนการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานหลังถูกชักนำด้วยสิ่งกระตุ้น การชักนำความต้านทานให้พืชเกิดความต้านทาน มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทาง metabolism และโครงสร้างภายในของพืช (Benhamou and Belanger, 1998) มีการทดลองการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคในมันฝรั่งพบว่า มีการกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ  $\beta$ -1,3-glucanase เพิ่มขึ้น (Beerhues and Kombrink, 1994; Rahimi et al., 1996; Bokshi et al., 2003) ในปี 2002 Mohammadi and Kazeni พบว่า มีการทำงานของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้น หลังจากปลูกเชื้อ *Fusarium graminearum* ในข้าวสาลีพันธุ์อ่อนแอ (mild strain) มีผลทำให้การเกิดโรคลดลง นอกจากนี้ การศึกษาของ Hwang และคณะ (1997) พบว่า การกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora capsici* หลังจากฉีดพ่น  $\beta$ -amino-n-butyric (BABA) ส่งผลให้ปริมาณ SA เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสะสมเอนไซม์ chitinase และ  $\beta$ -1,3-glucanase ในลำต้นของพริก อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน induced systemic resistance (ISR) เป็นกระบวนการที่เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตบริเวณรอบราก plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) เช่น *Pseudomonas aureofaciens*, *Bacillus* sp. และ *Trichoderma* sp. กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค มีการศึกษาการใช้เชื้อ *Pseudomonas aureofaciens* ในการกระตุ้นให้แตงกวาด้านทานต่อเชื้อ *Pythium aphanidermatum*

สาเหตุโรครากเน่า (root rot) พบว่า *P. aureofaciens* สามารถกระตุ้นให้พืชมีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, POX และ PPO เพิ่มขึ้น (Chen et al., 2000) ในขณะเดียวกัน กระบวนการที่พืชเกิดความต้านทานหลังจากกระตุ้น systemic acquired resistance (SAR) สามารถสร้างสารและเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในการปกป้องตนเองของพืชได้ดังที่กล่าวมาข้างต้น สารบางชนิด เช่น SA และ JA อาจเกิดการ crosstalk ระหว่าง pathway ของทั้งสองกระบวนการ แต่สารดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้พืชเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานในพืชได้เช่นกัน (Bostock, 2005; Buensanteai et al., 2009)

4. ในการทดลองการใช้สปอร์ของเชื้อราสนิมในองุ่น และราสนิมลิลาวดีเป็น aathogen mediated resistance ใช้ไม่ได้ผลอาจเกิดจาก 1) ชนิดและอายุของพืช การทดลองในกิ่งชำองุ่นอายุ 2 เดือน ซึ่งองุ่นเป็นพืชยืนต้นมีกลไกต่าง ๆ ของพืชไม่เหมือนกับพืชตระกูลผักที่เคยมีการทดลองได้ผล ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ใช้ PMR กระตุ้นกระบวนการ SAR ไม่ได้ผล 2) เชื้อดังกล่าวเป็น obligate parasite การสัมผัสกับพืช หรือการเลือกพืชอาศัยจะมีความจำเพาะจงมากกว่าเชื้อพวก facultative saprophyte เช่น *Colletotrichum* sp. เป็นต้น ซึ่งจะมีความหลากหลายในการเข้าทำลายในพืชหลายชนิดมากกว่า ซึ่งอาจเกิดการส่งสัญญาณในพืชที่ผิดกว่า จึงมีการทดลองที่ใช้เชื้อ *Colletotrichum* sp. กระตุ้นความต้านทานต่อโรคในพืชต่าง ๆ อย่างได้ผล ตัวอย่างการทดลองที่เกี่ยวกับการใช้เชื้อ *Colletotrichum* sp. อย่างได้ผล Hammerschmidt และคณะ (1976) ทดลองปลูกเชื้อ *C. lindemuthianum* เชื้อสาเหตุโรคถั่วลงบนแตงกวา หลังจากนั้นได้ปลูกเชื้อ *Cladosporium cucumerinum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในแตงกวา ลงบนใบตำแหน่งที่สอง หลังจากปลูกเชื้อครั้งแรก 2-3 วัน พบว่า ขนาดและจำนวนของแผลลดลง และ Kuć และคณะ (1976) ได้ทำการปลูกเชื้อ *C. lagenarium* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสในแตงกวาลงบนใบจริงของแตงกวา ซึ่งต่อมาได้ทำการปลูกเชื้อดังกล่าว ซ้ำอีกครั้งในใบตำแหน่งที่สองถึงสี่ ผลการทดลองพบว่า ขนาดและจำนวนแผลลดลง ข้อดีของการใช้ PMR ในการกระตุ้น SAR คือหาก PMR สามารถกระตุ้น SAR ได้จริงจะช่วยลดต้นทุนในการควบคุมโรคจากสารเคมีได้ แต่ข้อเสียของการใช้ PMR คืออาจใช้เวลานานในการหา PMR ที่เหมาะสมในการกระตุ้น

5. การทดลองครั้งนี้ มีข้อจำกัดหลายประการ 1) ชนิดพืช และการเจริญเติบโต องุ่นเป็นพืชที่ต้องมีการดูแลรักษาเป็นอย่างมาก การเจริญเติบโตขององุ่นแต่ละต้นแตกต่างกันไปไม่เท่ากัน การเก็บผล การทดลองจึงต้องเก็บใบทั้ง 3 ตำแหน่งแล้วนำมาตัดซอยและลุ่มมาวิเคราะห์สารและกิจกรรมของเอนไซม์ 2) ควรศึกษาสภาพการปลูกต้นองุ่นที่เหมาะสม เช่น ตัดชำในสารละลาย แกลบดำ และดินปลูก ซึ่งแต่ละสภาพการปลูกก็มีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกัน แต่ได้เลือกการปลูกในดินปลูกจากดินก้ามปู เพราะทำให้กิ่งชำองุ่นมีการแตกรากและเจริญเติบโตได้ดี การให้น้ำสามารถซึมผ่านดินปลูกได้อย่างดี 3) การเลี้ยงเชื้อ *S. ampelinum* จะต้องมียูให้สอดคล้องกับอายุของต้นองุ่น ซึ่งค่อนข้างยาก

เพราะเชื่อมีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่าย และเจริญเติบโตช้า 4) ดันอ่อนพันธุ์ Black queens เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค แต่ในการทดลองจะต้องทำให้ปลอดโรค และแมลงเข้าทำลาย แต่เนื่องจากสภาพแวดล้อมในโรงเรือนที่ไม่เหมาะสม อากาศร้อน และอากาศถ่ายเทไม่สะดวก ทำให้มีเพลี้ยแป้งที่อยู่ภายในโรงเรือนเข้าทำลาย แต่สามารถแก้ไขได้โดยการฉีดพ่น petroleum oil 5) สภาพแวดล้อมในโรงเรือนไม่เหมาะสม พัฒนาระบายอากาศไม่ทำงาน รอคอยซ่อมแซมเป็นเวลานาน ทำให้ดันอ่อนเกิดความเครียดจากสภาพอากาศที่ร้อนเกินไป จึงต้องแก้ไขโดยการกางทำโรงเรือนขนาดเล็กมุงด้วยตาข่ายกันแมลง และพรางแสงด้วยซาแลน เพื่อการระบายอากาศและลดอุณหภูมิ

6. แนวทางการใช้ประโยชน์ในอนาคต สามารถแนะนำให้เกษตรกรใช้กระบวนการ induced resistance ในการปลูกองุ่นในประเทศไทย โดยใช้ chitosan สูตรที่เหมาะสมหรือ BTH เพราะผู้บริโภคส่วนใหญ่จะรับประทานผลสด หากสามารถกระตุ้นให้อองุ่นเกิดความต้านทานโรคจากภายในจะมีความปลอดภัย ผลผลิตมีคุณภาพปราศจากสารเคมี และช่วยเพิ่มผลผลิตในองุ่นพันธุ์อ่อนแออีกด้วย



## รายการอ้างอิง

- กานต์ คำทรัพย์. (2546). ชีววิทยา ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและการควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบขององุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. 134 หน้า
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อุบล กือประโคน. (2533). โรคเชื้อราขององุ่นที่พบ ใหม่. **วารสารกสิกร.** 63(5) : 444-447.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อุบล กือประโคน. (2536). โรคสแคบขององุ่น. **วารสารวิชาการเกษตร** 11(2) : 66-72.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อุบล กือประโคน. (2537). อีบุบไม่ใช่เตาเผา. **วารสารกสิกร** 67(2) : 124-126.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อภิรักษ์ สมฤกษ์. (2541). มะม่วงกับโรค สแคบ. **วารสารเกษตร** 22(10) : 101-104.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, อภิรักษ์ สมฤกษ์ และ ธนิตย์ ปล่อยบรรจง. (2545). การแยกเชื้อราโรคสแคบจากพืชต่างๆ ในประเทศไทย. **ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา** 12(1) : 14-20.
- ขนิษฐา มากรุง. (2548). การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 77 หน้า
- นันทกร บุญเกิด. (2546). **คู่มือการสร้างสวนองุ่น.** สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 36 หน้า.
- นิพนธ์ ทวีชัย. (2553). **โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ** [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.nstda.or.th>
- นิพนธ์ วิสารทานนท์. (2542). **โรคองุ่น เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตรหมอฟืช-ไม้ผล ฉบับที่ 5.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 45 หน้า
- ปิยะ เฉลิมกลิ่น. (2544). **การปลูกองุ่น** [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.tistr.or.th>
- พรพรรณ อุสุวรรณ. (2550). การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. และ *Streptomyces* spp. ในการควบคุมโรค เชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 77 หน้า

- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. (2551). สารชีวภาพไคติน-ไคโตซาน สำหรับเกษตรอินทรีย์. ใน **โรคพืช มข.ปริทรรศน์** (หน้า 30-35). ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- มธุกร สมพงษ์. (2553). ความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Sphaceloma* spp. สาเหตุโรคสแครบขององุ่นพันธุ์ต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 71 หน้า
- ยังยุทธ ชำรงนิมิตร. (2547). **โรคไม้ผล**. อักษรสยามการพิมพ์. ภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร. หน้า 119.
- ยุรฉัตร ยอดโยธี. (2554). การชักนำการต้านทานโรคและการแสดงออกของยีน PR-1 ในยางพารา โดยใช้ตัวกระตุ้นชนิดต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 120 หน้า
- รัฐพล นัตรบรรยงค์. (2551). **เทคนิคการปลูกองุ่นในเมืองไทย**. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 48 หน้า
- วัฒนา สวรรยาธิปิติ. (2531). **การปลูกองุ่น**. โครงการคู่มือประกอบอาชีพสำหรับประชาชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 42 หน้า
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). **ข้อมูลนำเข้า-ส่งออกองุ่น** [ออนไลน์]. ได้จาก : [http : //www.oae.go. th](http://www.oae.go.th)
- อนงค์นุช ผลวงษ์. (2548). บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) ในมะเขือเทศต่อการเข้าทำลายของหนอนเจาะสมอฝ้าย [*Heliothis armigera*(Hübner)] และหนอนกระทู้หอม [*Spodoptera exigua* (Hübner)]. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 130 หน้า
- อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์. (2550). ความหลากหลายของเชื้อ ความต้านทาน และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับยีนต้านทานเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรคสแครบ (แอนแทรคโนส) ในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 174 หน้า
- Agrios, G. N. (1997). **Plant Pathology 4<sup>th</sup> ed.** Academic Press. New York. 635 pp.
- Ahn, P. I., Kim, S., Lee, Y. H. and Suh, S. C. (2007). Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the *NPR1* gene in Arabidopsis. **Plant Physiology** 143 : 838-848.
- Anfoka, H. G. (2000). Benzo-(1,2,3)-thiadizide-7-carbothioic acid s-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill cv. Vollendung) to cucumber mosaic

- virus. **Crop protection** 19 : 401-405.
- Aziz, A., Gauthier, A., Bezier, A., Poinssot, B., Jean-Marie, J., Pugin, A., Heyraud, A. and Baillieul, F. (2007). Elicitor and resistance-inducing activities of  $\beta$ -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with  $\beta$ -1,3glucans and  $\alpha$ -1,4 oligogalacturonides. **J. Exp. Bot.** 58(6) : 1463-1472.
- Barka, E. A., Eullaffroy, P., Clément, C. and Vernet, G. (2004). Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. **Plant Cell Rep.** 22 : 608-614.
- Beerhues, L. and Kombrink, E. (1994). Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3- $\beta$ -glucanase in potato. **Plant Molecular Biology** 24, 353-367.
- Benhamou, N. and Belanger, P. R. (1998). Benzothiadiazole mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* in tomato. **Plant Physiology** 188. 1203-1212.
- Bokshi, A. I., Morris, S. C. and Deverall, B. J. (2003). Effect of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on  $\beta$ -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology** 52, 22-27.
- Bostock, R. M. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annu. Rev. Phytopathol.** 43 : 545–580.
- Brook, P. J. (1973). Epidemiology of grapevine anthracnose, caused by *Elsinoe ampelina*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, 16(3) : 333-342.
- Buensanteai, N., Yuen, G. Y. and Prathuangwong, S. (2009). Priming, signaling, and protein production associated with induced resistance by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. **World J Microbiol Biotechnol.** 25 : 1275-1286.
- Burkholder, W. (1917). The history of lesion development in raspberry canes infected by *Elsinoe veneta*. **Annals of Applied Biology.** 114(1) : 35-44.
- Buschmann, H., Fan, Z. W. and Sauerborn, J. (2005). Effect of resistance-inducing against on sunflower (*Helianthus annuus* L.) and its infection with the parasitic weed *Orobancha cumana* Wallr. **Journal of Plant Disease and Protection** 112 : 386-397
- Caruso, F. L. and Kuć, J. (1977). Protection of watermelon and muskmelon against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. **Phytopathology** 67 : 1285-1289.

- Chen, C., Bélanger, R. R., Benhamou, N. and Paulitz, T. C. (1998). Induced systemic resistance (ISR) by *Pseudomonas* spp. Impairs pre- and post-infection development of *Pythium aphanidermatum* on cucumber roots. **Eur. J. Plant Pathol.** 104 : 877-886.
- Chen, C., Bélanger, R. R., Benhamou, N. and Paulitz, T. C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiology and Molecular Plant Pathology** 56 : 13-23.
- Dalisay, R. F. and Kuć, J. J. (1995). Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plant. **Physiology and Molecular Plant Pathology** 47 : 315-327.
- Eikemo, H., Stensvand, A. and Tronsmo, A. M. (2003). Induced resistance as a possible mean to control diseases of strawberry caused *Phytophthora* spp. **Plant Dis.** 87 : 345-350.
- Fermer, E. E. and Helgeson, J. P. (1987). An extracellular protein from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is associated with stress metabolic accumulation in tobacco callus. **Plant Physiology** 85 : 733-740.
- Food and Agriculture. (2007). **Grape** [On Line]. Available : [http:// en.wikipedia.org/wiki/grape](http://en.wikipedia.org/wiki/grape)
- Franco, F. and Iriti, M. (2007). Callose synthesis as a tool to screen chitosan efficacy in inducing plant resistance to pathogens. **Caryologia** 60 : 121-124.
- Fuchs, Y., Saxena, A., Gamble, H. R. and Anderson, J. D. (1989). Ethylene biosynthesis-inducing protein from cellulysin is an endoxylanase. **Plant Physiology** 89 : 138-143.
- Gable, A. W. and Tiffany, L. H. (1987). Host parasite relation and development of *Elsinoe panici*. **Mycologia** 79 : 734-774.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessman, H. and Ryals, J. (1993). Requirement of Salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science** 261 : 754-756.
- Gonsalves, C., Cai, W., Tennant, P. and Gonsalves, D. (1997). Efficient production of virus resistant transgenic papaya plants containing the untranslatable coat protein gene of papaya ringspot virus. **Phytopathology** 87 : 534-539.
- Graham, J. H. and Myers, M. E. (2011). Soil application of SAR inducers imidacloprid, thiamethoxam, and acibenzolar-*S*-methyl for citrus canker control in young grapefruit trees. **Plant Dis.** 95 : 725-728.

- Hammerschmidt, R., Acres, S. and Kuć, J. (1976). Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* and *Cladosporium cucumerinum*. **Phytopathology** 66 : 790-793.
- Hammerschmidt, R. and Kuć, J. A. (1982). Lignification as a mechanism for induced resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology** 20 : 61-71.
- Hammerschmidt, R. (1999). Induced disease resistance : How do induced plant stop pathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 55: 77-84.
- Hwang, B. K., Sunwoo, J. Y., Kim, Y. J. and Kim, B. S. (1997). Accumulation of  $\beta$ -1,3 glucansae and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino- n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *phythophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 51 : 305-322.
- Iriti, M., Castorina, G., Vitalini, S., Mignani, I., Soave, C., Fico, G. and Faoro, F. 2010). Chitosan-induced ethylene-independent resistance does not reduce crop yield in bean. **Biological Control** 54 : 241-247.
- Jetiyanon, K., Tuzun, S. and Kloepper, J. W. (1997). Lignification, peroxidase and superoxidase dismutases as early plant defense reactions associated with PGPR-mediated induced systemic resistance. **In** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects. Eds. Ogoshi, A., Kobayashi, K., Homma, Y., Kodama, F., Kondo, N. and Akino, S., Sapporo. Japan, pp. 265-268.
- Kopp, M., Rouster, J., Fritig, B., Darvill, A. and Albersheim, P. (1989). Host-pathogen interactions XXXII. A fungal glucan preparation protection protects Nicotinae against infection by viruses. **Plant Physiology** 90 : 208-216.
- Kuć, J. and Richmond, S. (1997). Aspects of protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. **Phytopathology** 67 : 533-536.
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y. and Luo, Y. (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanism. **Postharvest Biology and Technology** 35 : 265-269.
- Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. (1995). Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology** 85 : 843-847.

- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L. and Dietrich, R. A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nat. Genet.** 26 : 403-410.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Métraux, J. P. and Défago, G. (1994). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 : Influence of the *gac* A gene and of pyoverdine production. **Phytopathology** 84 : 139-146.
- Mazid, M., Khan, T. A. and Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolite in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine** 3(2) : 232-249.
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, H. and Inverardi, B. (1990). Increase in Salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science** 250 : 1004-1006.
- Mirica, I. I. (1988). Anthracnose. (18-19 pp). **Compendium of Grape Diseases**. Pearson, R. C. and Goheen, A. C. : The American Phytopathological Society. Minnesota, USA.
- Mohammadi, M. and Kazemi, H. (2002). Change in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science** 162 : 491-498.
- Nandeeshkumar, P., Sudshu, J., Ramachandar, K. K., Prakash, S. H., Niranjana, R. S. and Shekar, H. S. (2008). Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. **Physiology and Molecular Plant Pathology** 72 : 188-194.
- Pan, S. Q., Ye, X. S. and Kuć, J. (1991). Association of  $\beta$ -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabanica* on leaf inoculated with tobacco mosaic virus. **Physiology and Molecular Plant Pathology** 39 : 25-29.
- Pearson, R. C. and Goheen, A. C. (1998). **Compendium of Grape Diseases**. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 93 pp.
- Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y. and Pertot, I. (2008). Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzotriadiazole. **Biological control** 47 : 228-234.
- Rahimi, S. Perry, R. N. and Wright, D. J. (1996). Identification of pathogenesis-related proteins in

- leaves of potato plants infected with potato cyst nematodes, *Globodera* species. **Physiology and Molecular Plant Pathology** 49, 49-59.
- Ravaz, L. (1927). Anthracnose. **Progressive Agriculture and Viticulture** 87 : 3-7.
- Reglinski, T., Lyon, G. D. and Newton, A. C. (1994). Induction of resistance mechanisms in barley by yeast derived elicitors. **Annals of Applied Biology** 124 : 509-517.
- Romero, A. M., Kousik C. S. and Ritchie, D. F. (2001). Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Dis.** 85 : 189-194.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H. Y. and Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. **Plant Cell** 8 : 1809-1819.
- Sathiyabama, M. and Balasubramanian, R. (1998). Chitosan induces resistance component in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. **Crop Protection** 17(4) : 307-313.
- Scheider-Muller, S., Kurosaki, F. and Nishi, A. (1994). Role of Salicylic acid and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the induction of chitinase activity in carrot suspension culture. **Physiology and Molecular Plant Pathology** 45 : 101-109.
- Serghini, K., Perez De L. A., Castejon, M. M., Garcia, T. L. and Jorin, J. V. (2001). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobancha cernua* loefl.) parasitism : induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. **Journal of Experimental Botany** 52 : 227-234.
- Shear, C. L. (1929). The life history of *Sphaceloma ampelinum* de Bary. **Phytopathology** 19 : 673-679.
- Shetty, P. N., Jensen, D. J., Knudsen, A., Finnie, C., Naomi, G., Blennow, A., Collinge, B. D. and Jorgensen, L. J. H. (2009). Effect of  $\beta$ -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. **Journal of Experimental Botany** 60(15) : 4287-4300.
- Singh, R. S. (2000). **Diseases of Fruit Crop**. Plant Pathology Department, G. B. Pant University, Pantnagar, India. 130 pp.
- Sticher, L. B., Mauch-Mani, B. and Métraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology** 35 : 235-270.
- Sutton, B. C. and Pollack, F. G. (1973). *Gloeosporium cercocarpi* and *Sphaceloma cercocarpi*. **Mycology** 65 : 1125-1134.

- Thipayapong, P., Hunt, M. D. and Steffens, J. C. (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. **Phytochem.** 40 : 673-676.
- Thomma, B. P. H. J., Cammue, B. P. A and Thevissen, K. (2002). Plant defense. **Planta** 216 : 193-202.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal** 11 : 1187-1194.
- Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related protein. **Eur. J. Plant Pathol.** 103 : 753-765.
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related protein in infected plant. **Annual Review of Phytopathology** 44 : 135-162.
- Velazhahan, R., Jayaraj, J., Liang, G. H. and Muthukrishnan, S. (2003). Partial purification and N- terminal amino acid sequencing of a  $\beta$ -1,3-glucanase from sorghum leaves. **Biol. Plant.** 46 : 29-33.
- Vleesschauwer, D. D., Djavaheiri, M., Bakker, A. H. M. P. and Höfle, M. (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on Pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. **Plant Physiology** 148 : 1996-2012.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N. and Dong, X. N. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. **PLoS. Pathol.** 2 : 1042-1050.
- Weber, D. J. and Stahmann, M. A. (1964). Ceratocystis infection in sweet potato : Its effects on protein isozymes and acquired immunity. **Science** 146 : 929-931.
- Wendehenne, D., Dumer, J., Chen, Z. and Kiessig, F. D. (1997). Benzoethiadiazole an inducer of plant defenses inhibits catalase and ascorbate peroxidase. **Phytochemistry** 47(4) : 651-657.
- Wei, G., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology** 81 : 1508-1512.
- Wessels, J. G. H. (1993). Wall growth, protein extraction and morphogenesis in fungi. **New Phytology.** 123 : 397-413.

- Wobbe, K. K. and Klessig, D. F. (1996). Salicylic acid and important signal in plants. **Plant Gene Research Series, Signal Transduction in plant Growth and Development.** Verma D. P. S. (Eds). Spring-Verlag Vienna. Page 167-196.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, D. and Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana* : lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induced defense genes. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA** 101 : 1581-1586.
- Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S. and Stacey, G. (2002). Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interaction** 15 : 963-970.





## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

### 1.1 Water Agar (WA)

|                     |       |           |
|---------------------|-------|-----------|
| วุ้นผง (Agar)       | 18    | กรัม      |
| น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง | 1,000 | มิลลิลิตร |

ผสมวุ้นผงกับน้ำกลั่น หรือน้ำกรอง นำไปต้มจนรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

### 1.2 Potato Dextrose Agar (PDA)

|                              |       |           |
|------------------------------|-------|-----------|
| มันฝรั่ง                     | 200   | กรัม      |
| น้ำตาล Dextrose หรือ Glucose | 20    | กรัม      |
| วุ้นผง (Agar)                | 18    | กรัม      |
| น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง          | 1,000 | มิลลิลิตร |

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลบ. ซม. ต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตร จนนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำสกัดผสม dextrose ทั้งหมดลงในน้ำสกัด นำไปผสมกับวุ้นผงที่ต้มจนละลายแล้ว ด้วยน้ำส่วนที่เหลือ คนให้เข้ากัน เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำเข้านึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

## 2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Salicylic acid และเอนไซม์

### 2.1 0.02 M Ferric ammonium sulfate

|                         |      |           |
|-------------------------|------|-----------|
| Ferric ammonium sulfate | 4.82 | กรัม      |
| น้ำกลั่น                | 500  | มิลลิลิตร |

### 2.2 1 M Tris – HCl, pH 8.0

|                     |       |           |
|---------------------|-------|-----------|
| Tris base           | 121.1 | กรัม      |
| deionization water  | 1,000 | มิลลิลิตร |
| ปรับ pH ให้เป็น 8.0 |       |           |

### 2.3 1 M KCl

|          |       |           |
|----------|-------|-----------|
| KCl      | 74.56 | กรัม      |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

### 2.4 1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

|      |        |      |
|------|--------|------|
| PMSF | 174.20 | กรัม |
|------|--------|------|

|             |       |           |
|-------------|-------|-----------|
| Isopropanol | 1,000 | มิลลิลิตร |
|-------------|-------|-----------|

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

## 2.5 3% Triton-x 100

|              |    |           |
|--------------|----|-----------|
| Triton-x 100 | 3  | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น     | 97 | มิลลิลิตร |

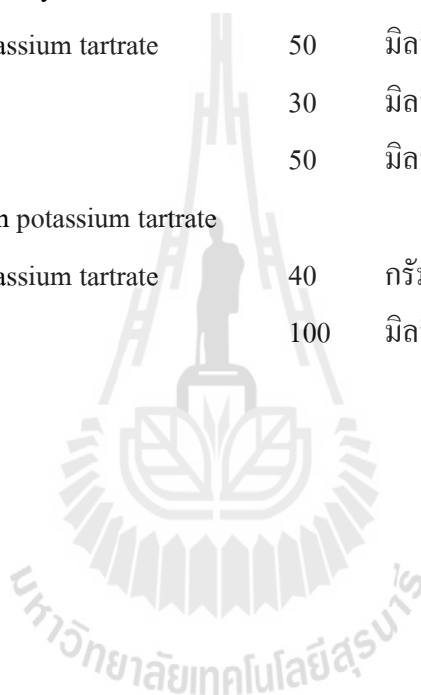
เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 2.6 Dinitrosalicylic acid

|                            |    |           |
|----------------------------|----|-----------|
| 3, 5-dinitrosalicylic acid | 1  | กรัม      |
| Sodium potassium tartrate  | 50 | มิลลิลิตร |
| 2 N NaOH                   | 30 | มิลลิลิตร |
| น้ำกลั่น                   | 50 | มิลลิลิตร |

## 2.7 40% Sodium potassium tartrate

|                           |     |           |
|---------------------------|-----|-----------|
| Sodium potassium tartrate | 40  | กรัม      |
| น้ำกลั่น                  | 100 | มิลลิลิตร |



## ประวัติผู้เขียน

นางสาวอินชญา ประกองคำ เกิดเมื่อวันที่ 22 พฤษภาคม พ.ศ. 2529 ที่ อำเภอพิมาย จังหวัดนครราชสีมา ได้สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2551

และในปี พ.ศ. 2552 ได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาพืชศาสตร์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยระหว่างการศึกษาได้รับทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย และทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก

