

การควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*
ในผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น



นายชานนทร์ แสงจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2557

**CONTROL OF BACTERIAL SOFT ROT DISEASE
CAUSED BY *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*
IN CHINESE GREEN MUSTARD USING
RESISTANCE ELICITORS**

Chanon Saengchan

A large, faint watermark of the Suranaree University of Technology logo is centered on the page. The logo features a stylized figure standing within a circular emblem, with the university's name in Thai script below it.

**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 2014**

การควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*
ในผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร.รุจ มรกต)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ดร.วราภรณ์ ตันฑนุช)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิ้มปิ๋นงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรมการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ชานนท์ แสงจันทร์ : การควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ในผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น (CONTROL OF BACTERIAL SOFT ROT DISEASE CAUSED BY *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* IN CHINESE GREEN MUSTARD USING RESISTANCE ELICITORS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์. ดร.ณัฐธิดา เป็อนสันเทียะ, 95 หน้า.

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมโรคเน่าและในผักกาดเขียวปลี โดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น (elicitor) ทดลองโดยนำเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* จำนวน 9 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่าไอโซเลต ECC_Cr2 มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงที่สุด จากนั้นประเมินประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ไอโซเลต ECC_Cr2 ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าเชื้อไอโซเลต CaSUT007 มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยได้เท่ากับ 7.5 ± 0.032 มิลลิเมตร การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก จำนวน 4 ความเข้มข้นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ด้วยวิธี blotter method พบว่าไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ด ความยาวรากและความสูงของต้นกล้าผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุด จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพและกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตจากสิ่งกระตุ้นในผักกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 ในสภาพเรือนทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) พบว่า การคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm จำนวน 5 ครั้งทำให้พืชมีความกว้างทรงพุ่ม ความสูงทรงพุ่ม และปริมาตรของหัวสูงที่สุด การใช้เทคนิค Fourier transformed infrared spectroscopy ศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต พบกลุ่มไขมันชนิด C-H stretching ($\sim 3,000-2,800 \text{ cm}^{-1}$) กลุ่มไขมันชนิด C=O ester ($\sim 1,740 \text{ cm}^{-1}$) และกลุ่ม amide I ($\sim 1,700-1,600 \text{ cm}^{-1}$) มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แต่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450-1,350 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1,246 \text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1,200-900 \text{ cm}^{-1}$) มีปริมาณลดต่ำลงในทุกช่วงเวลาของการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อในการควบคุมโรคเน่าและ พบว่า การคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรค เท่ากับ 47.1 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ การศึกษากลไกความต้านทาน โดยการวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA) และ phenolic compound ภายในเนื้อเยื่อพืช พบว่า การคลุกเมล็ดเชื้อไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีปริมาณสาร salicylic acid (SA)

เพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง หลังฉีดเท่ากับ $4.27 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมง สำหรับสาร phenolic compound มีการเพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ $2.35 \mu\text{g gallic acid equivalent/mg dry mass}$ และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมงเช่นกัน นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุภายในเซลล์ผักกาดเขียวปลี โดยใช้เทคนิค X-ray Fluorescence (XRF) พบว่ามีการสะสมของโพแทสเซียม (K) แมงกานีส (Mn) และเหล็ก (Fe) ลดต่ำลง ต่างจากการสะสมของธาตุแคลเซียม (Ca) ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ ธาตุเหล่านี้มีความสำคัญในการส่งสัญญาณการทำงานของเอนไซม์ ขณะที่แคลเซียมช่วยให้ผนังเซลล์พืชมีความแข็งแรงเพื่อปกป้องตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้เชื้อไอโซเลต CaSUT007 คลุกเมล็ดร่วมกับการใช้กรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm ฉีดพ่นให้ทางใบสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้ผักกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 ต้านทานต่อโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ



CHANON SAENGCHAN : CONTROL OF BACTERIAL SOFT ROT
DISEASE CAUSED BY *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* IN CHINESE
GREEN MUSTARD USING RESISTANCE ELICITORS. THESIS
ADVISOR : ASST. PROF. NATTHIYA BUENSANTEAI, Ph.D., 100 PP.

CHINESE GREEN MUSTARD/*Bacillus subtilis* /SOFT ROT/*Erwinia carotovora*/
INDUCED RESISTANCE/FTIR SPECTROSCOPY/X-RAY FLUORESCENCE

The objective of this study was to control the soft rot disease in chinese green mustard caused by *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* (ECC) by induced resistance using resistance elicitors. After pathogenecity test of 9 pathogen isolates, Ecc_Cr2 was selected as the representative isolate for this study. Subsequently, inhibitory efficacy of *Bacillus* spp. on the Ecc_Cr2 was evaluated using the paper disc method and it was found that the CaSUT007 isolate was the best, having the widest average inhibition zone of 7.5 ± 0.032 mm. Experiment on plant growth promotion was done by seed treating of CaSUT007 and foliar spraying with 200 ppm salicylic acid to the MAX018 chinese green mustard under a greenhouse condition using the randomized complete block design (RCBD). From the result, it was found that seeds treated with CaSUT007 and sprayed with salicylic acid for 5 times gave the highest percentage of canopy width, canopy height and head diameter. Analysis of biochemical changes by fourier transformed infrared spectroscopy at 21, 28 and 35 days after planting found that the treatment could significantly increase the contents of C-H stretching ($\sim 3,000-2,800$ cm^{-1}) and C=O ester ($\sim 1,740$ cm^{-1}) lipids and Amide I ($\sim 1,700-1,600$ cm^{-1}), but decrease the contents of C-H bonding and C-O stretching carbohydrates. The treatment could also decrease polysaccharides ($\sim 1,450-1,350$ cm^{-1} , $\sim 1,246$ cm^{-1} and

$\sim 1,200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). The experiment on soft rot control showed that seeds treated with CaSUT007 and foliar sprayed with 200 ppm salicylic acid for 5 times gave significantly the lowest disease incidence and severity index of 47.10% and 12.50% , respectively, which were comparable to those of the copper hydroxide treatment. Analysis of salicylic acid in the induced plants found that those that were treated gave the highest increase at 48 hours after pathogen inoculation (HAI) of $4.27\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight, then leveled off, and increased again at 96 HAI. For phenolic compound, the elicitors treatment gave the highest accumulation of $2.35\text{ }\mu\text{g gallic acid equivalent/mg}$ dry mass at 24 HAI and increased again at 96 HAI when compared to that of the control treatment. Analysis of elements involved in plant defense mechanism by X-ray Fluorescence indicated the decreased content of K, Mg and Fe but the increased accumulation of Ca in induced plants when compared to those in the healthy plants, suggesting that these two resistance elicitors might suppress K, Mg and Fe accumulation for signaling transduction or increasing the defense enzyme activities. The increase of Ca accumulation could involve cell wall construction in plant defense mechanism. The results of this study indicated that seed treatment with the *Bacillus* CaSUT007 strain and foliar spraying with 200 ppm salicylic acid could be used to reduce soft rot disease severity in MAX018 chinese green mustard.

School of Crop Production Technology Student's Signature _____

Academic Year 2014

Advisor's Signature _____

ชานนทร์ แสงจันทร์ : การควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ในผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น (CONTROL OF BACTERIAL SOFT ROT DISEASE CAUSED BY *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* IN CHINESE GREEN MUSTARD USING RESISTANCE ELICITORS) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์. ดร.ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ, 100 หน้า.

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมโรคเน่าและในผักกาดเขียวปลี โดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น (elicitor) ทดลองโดยนำเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* จี 1 น ว น 9 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่าไอโซเลต ECC_Cr2 มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงที่สุด จากนั้นประเมินประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ไอโซเลต ECC_Cr2 ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าเชื้อไอโซเลต CaSUT007 มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเฉลี่ยได้เท่ากับ 7.5 ± 0.032 มิลลิเมตร การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก จำนวน 4 ความเข้มข้นในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ด้วยวิธี blotter method พบว่าไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ด ความยาวราก และความสูงของต้นกล้าผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุด จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพและกลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตจากสิ่งกระตุ้นในผักกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 ในสภาพเรือนทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) พบว่า การคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm จำนวน 5 ครั้งทำให้พืชมีความกว้างทรงพุ่ม ความสูงทรงพุ่ม และปริมาตรของหัวสูงที่สุด การใช้เทคนิค Fourier transformed infrared spectroscopy ศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต พบกลุ่มไขมันชนิด C-H stretching ($\sim 3,000-2,800 \text{ cm}^{-1}$) กลุ่มไขมันชนิด C=O ester ($\sim 1,740 \text{ cm}^{-1}$) และกลุ่ม amide I ($\sim 1,700-1,600 \text{ cm}^{-1}$) มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แต่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450-1,350 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1,246 \text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1,200-900 \text{ cm}^{-1}$) มีปริมาณลดต่ำลงในทุกช่วงเวลาของการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อในการควบคุมโรคเน่าและ พบว่า การคลุกเมล็ดด้วยเชื้อไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรค เท่ากับ 47.1 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ การศึกษากลไกความต้านทาน โดยการวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA) และ phenolic compound ภายในเนื้อเยื่อพืช พบว่า การคลุกเมล็ดเชื้อไอโซเลต

CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีปริมาณสาร salicylic acid (SA) เพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง หลังฉีดเท่ากับ $4.27 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมง สำหรับสาร phenolic compound มีการเพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ $2.35 \mu\text{g gallic acid equivalent/mg dry mass}$ และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมงเช่นกัน นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุภายในเซลล์ผักกาดเขียวปลี โดยใช้เทคนิค X-ray Fluorescence (XRF) พบว่ามีการสะสมของโพแทสเซียม (K) แมงกานีส (Mn) และเหล็ก (Fe) ลดต่ำลง ต่างจากการสะสมของธาตุแคลเซียม (Ca) ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ ธาตุเหล่านี้มีความสำคัญในการส่งสัญญาณการทำงานของเอนไซม์ ขณะที่แคลเซียมช่วยให้ผนังเซลล์พืชมีความแข็งแรงเพื่อป้องกันตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค จากผลการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้เชื้อไอโซเลต CaSUT007 คลุกเมล็ดร่วมกับการใช้กรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm ฉีดพ่นให้ทางใบสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้ผักกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 ต้านทานต่อโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

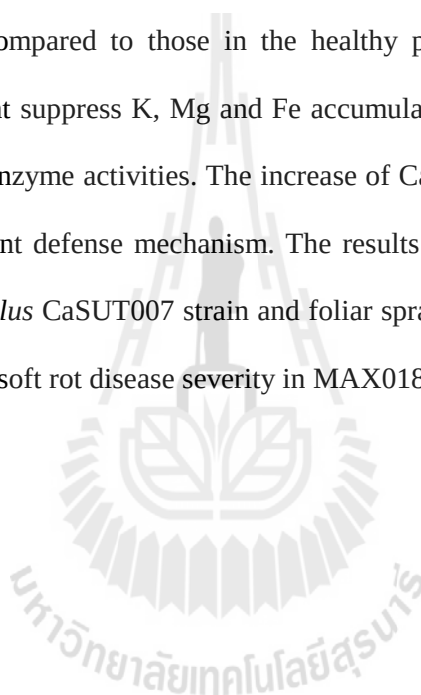


CHANON SAENGCHAN : CONTROL OF BACTERIAL SOFT ROT
DISEASE CAUSED BY *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* IN CHINESE GREEN
MUSTARD USING RESISTANCE ELICITORS. THESIS ADVISOR : ASST.
PROF. NATTHIYA BUENSANTEAI, Ph.D., 95 PP.

CHINESE GREEN MUSTARD/*Bacillus subtilis* /SOFT ROT/*Erwinia carotovora*/
INDUCED RESISTANCE/FTIR SPECTROSCOPY/X-RAY FLUORESCENCE

The objective of this study was to control the soft rot disease in chinese green mustard caused by *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* (ECC) by induced resistance using resistance elicitors. After pathogenecity test of 9 pathogen isolates, Ecc_Cr2 was selected as the representative isolate for this study. Subsequently, inhibitory efficacy of *Bacillus* spp. on the Ecc_Cr2 was evaluated using the paper disc method and it was found that the CaSUT007 isolate was the best, having the widest average inhibition zone of 7.5 ± 0.032 mm. Experiment on plant growth promotion was done by seed treating of CaSUT007 and foliar spraying with 200 ppm salicylic acid to the MAX018 chinese green mustard under a greenhouse condition using the randomized complete block design (RCBD). From the result, it was found that seeds treated with CaSUT007 and sprayed with salicylic acid for 5 times gave the highest percentage of canopy width, canopy height and head diameter. Analysis of biochemical changes by fourier transformed infrared spectroscopy at 21, 28 and 35 days after planting found that the treatment could significantly increase the contents of C-H stretching ($\sim 3,000$ - $2,800$ cm^{-1}) and C=O ester ($\sim 1,740$ cm^{-1}) lipids and Amide I ($\sim 1,700$ - $1,600$ cm^{-1}), but decrease the contents of C-H bonding and C-O stretching carbohydrates. The treatment could also decrease polysaccharides ($\sim 1,450$ - $1,350$ cm^{-1} , $\sim 1,246$ cm^{-1} and $\sim 1,200$ - 900 cm^{-1}). The experiment on soft rot control showed that seeds treated with CaSUT007 and foliar sprayed with 200 ppm salicylic acid for 5 times gave significantly the lowest disease incidence and severity index of 47.10% and 12.50% , respectively, which were comparable to those of the

copper hydroxide treatment. Analysis of salicylic acid in the induced plants found that treated samples gave the highest increase at 48 hours after pathogen inoculation (HAI) of $4.27 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight, then leveled off, and increased again at 96 HAI. For phenolic compounds, the elicitors treatment gave the highest accumulation of $2.35 \mu\text{g gallic acid equivalent/mg dry mass}$ at 24 HAI and increased again at 96 HAI when compared to that of the control treatment. Analysis of elements involved in plant defense mechanism by X-ray Fluorescence indicated the decreased content of K, Mg and Fe but the increased accumulation of Ca in induced plants when compared to those in the healthy plants, suggesting that these two resistance elicitors might suppress K, Mg and Fe accumulation for signaling transduction or increasing the defense enzyme activities. The increase of Ca accumulation could involve cell wall construction in plant defense mechanism. The results of this study indicated that seed treatment with the *Bacillus* CaSUT007 strain and foliar spraying with 200 ppm salicylic acid could be used to reduce soft rot disease severity in MAX018 chinese green mustard.



School of Crop Production Technology Student's Signature _____

Academic Year 2014 Advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อันได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา เปื่อนสันเทียะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ชี้แนะแนวทาง อบรมสั่งสอน ช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างยิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ดร.วรารณณ์ ตันฑนุช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.รุจ มรกต ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ให้ความเมตตาและคอยอบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาบางส่วน สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้บริการ BL6b: Micro XRF และ BL4.1: IR

ขอขอบคุณ คุณกิตติมา ชาญกิจโกศล และเจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาจีน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอบคุณ อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว ดร.กาญจนา ธรรมนุ คุณมธุกร สมพงษ์ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ผู้ร่วมเรียนในระดับบัณฑิตศึกษา ที่ให้คำปรึกษา คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอนและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดี อีกทั้งให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจที่ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลงด้วยดี

ชานนทร์ แสงจันทร์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 ปรัชญ์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตผักกาดเขียวปลี.....	4
2.2 โรคผักกาดเขียวปลีที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ.....	4
2.2.1 โรคเน่าดำ (black rot).....	4
2.2.2 โรคโคนเน่าคอดิน (damping off).....	5
2.2.3 โรคเน่าละ (soft rot).....	5
2.3 โรคเน่าละของผักกาดเขียวปลี.....	5
2.3.1 ความสำคัญและประวัติการระบาด.....	5
2.3.2 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	6
2.3.3 วงจรการเกิดโรค.....	7
2.3.4 การควบคุมโรคเน่าละ.....	8
2.4 การชักนำให้เกิดความต้านทาน (induced resistance).....	11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.1 กลไกการป้องกันการรุกรานจากเชื้อก่อโรค (plant defense mechanisms).....	11
2.4.2 การชักนำความต้านทานเพื่อต่อต้านเชื้อสาเหตุโรค (plant defense resistance).....	14
2.4.2.1 กลไก systemic acquired resistance (SAR).....	15
2.4.2.2 กลไก induced systemic resistance (ISR).....	18
2.5 ตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดความต้านทาน (elicitors).....	20
2.5.1 วิธีการใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์ส่งเสริมการเจริญเติบโต และควบคุมโรคพืช.....	24
2.6 เทคนิคในการศึกษาสารชีวเคมีและองค์ประกอบของธาตุที่มีผลการ ส่งเสริมการเจริญเติบโตและปกป้องตนเองของผักกาดเขียวปลี.....	24
2.6.1 การศึกษาสารชีวเคมีภายในผักกาดเขียวปลี โดยใช้เทคนิค FTIR spectroscope.....	24
2.6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในผักกาดเขียวปลี โดยใช้ เทคนิค X-ray fluorescence (XRF).....	27
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	28
3.1 การรวบรวมและยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ แบคทีเรีย <i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> สาเหตุโรคน้ำและ ผักกาดเขียวปลี.....	28
3.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และทดสอบความเข้มข้นของสาร ชาลิไซติก แอซิด ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ สาเหตุโรคน้ำและ และส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีใน ระดับห้องปฏิบัติการ.....	29
3.2.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพในการ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคน้ำและด้วยวิธี paper disc diffusion.....	29
3.2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และสารชาลิไซติก แอซิด ในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลี	

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ด้วยวิธี blotter method.....	30
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และ สารชาลิไซลิก แอซิดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลี เมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง.....	30
3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และ สารชาลิไซลิก แอซิดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาด เขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง.....	30
3.3.2 การศึกษากลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลี เมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) โดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopy.....	32
3.4 การศึกษาประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสาร ชาลิไซลิก แอซิด ในการควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง.....	32
3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสาร ชาลิไซลิก แอซิด ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีโดย ใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้น.....	32
3.4.2 การศึกษากลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสารชาลิไซลิก แอซิดในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง.....	34
3.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA) ภายในผักกาดเขียวปลี.....	34
3.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compound ภายในผักกาดเขียวปลี.....	34
3.4.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุในผักกาดเขียวปลีโดย ใช้เทคนิค X-ray fluorescence (XRF).....	35
3.5 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ.....	35

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4 ผลการทดลอง.....	36
4.1 การยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย <i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	36
4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพ และสาร ชาลิไซลิก แอซิดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและ และส่งเสริม การเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีในระดับห้องปฏิบัติการ.....	39
4.2.1 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค ด้วยวิธี paper disc diffusion.....	39
4.2.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และสารชาลิไซลิก แอซิด ในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลี ด้วยวิธี blotter method.....	40
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสาร ชาลิไซลิก แอซิดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูก สิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง.....	43
4.3.1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสารชาลิไซลิก แอซิด ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีใน ระดับเรือนทดลอง.....	43
4.3.2 การศึกษากลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลี เมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) โดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopy.....	50
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสาร ชาลิไซลิก แอซิด ในการควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง.....	54
4.4.1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสารชาลิไซลิก แอซิด ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความ ต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้นในระดับเรือนทดลอง.....	54

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4.2 การศึกษากลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสารซาลิไซลิกแอซิด ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง.....	57
4.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid ภายในผักกาดเขียวปลี.....	57
4.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compound ภายในผักกาดเขียวปลี.....	59
4.4.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุภายในเซลล์ผักกาดเขียวปลี โดยใช้เทคนิค X-ray fluorescence (XRF).....	61
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	66
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	91
ประวัติผู้เขียน.....	95

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของ PR proteins แต่ละชนิดที่สร้างขึ้นหลังถูกกระตุ้นจากเชื้อโรค จุลินทรีย์ ปลูกพืชหรือสารเคมี.....	16
2	ตัวอย่าง plant growth promoting rhizobacteria: PGPR ที่มีประสิทธิภาพในการ ควบคุมโรคส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช.....	22
3	ลักษณะของการดุดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล.....	26
3.1	กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ร่วมกับสาร ชาลิไซคลิก แอซิดในการส่งเสริมการเจริญเติบโต เมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ต่อผักกาดเขียวปลีในระดับเรือนทดลอง.....	31
3.2	กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี โดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้นในระดับเรือนทดลอง.....	33
4.1	ผลการยืนยันความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> สาเหตุโรคเน่าและทั้ง 9 ไอโซเลต.....	37
4.2.1	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ <i>Bacillus</i> sp. ในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อ <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr 2 ด้วยวิธี paper disc diffusion.....	39
4.2.2	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสารชาลิไซคลิก แอซิดในการ ส่งเสริมความงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีในระดับห้องปฏิบัติการ.....	42
4.3.1	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสารชาลิไซคลิก แอซิด ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง.....	46
4.4.1	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสารชาลิไซคลิก แอซิด ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานที่เกิดจาก การกระตุ้นในระดับเรือนทดลอง.....	56

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	วงจรโรคเน่าและของผักที่เกิดจากเชื้อ <i>E. carotovora</i> 8
2	กระบวนการต่างๆ ของการส่งสัญญาณในการตอบสนองของพืชต่อเชื้อสาเหตุโรค..... 14
3	ส่งสัญญาณของพืชเพื่อป้องกันตนเองต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค..... 19
4.1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> สาเหตุโรคเน่าและ..... 38
4.2	ผลการทดสอบการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย ECC ไอโซเลต ECC_Cr2 บนผักกาด เขียวปลีพันธุ์อ่อนแอ พันธุ์ MAX018..... 38
4.3	ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ด้วยวิธี paper disc diffusion..... 40
4.4	ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของระบบรากและลำต้นของต้นกล้า ผักกาดเขียวปลีหลังปลูก 14 วัน ด้วยวิธี blotter method ในระดับห้องปฏิบัติการ..... 41
4.5	ประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาด เขียวปลีหลังย้ายปลูก 35 วัน ในระดับเรือนทดลอง..... 44
4.6	ประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและคุณภาพ ของหัวผักกาดเขียวปลีหลังย้ายปลูก 35 วัน ในระดับเรือนทดลอง..... 45
4.7	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุลในแต่ละกรรมวิธีหลัง ย้ายปลูก 21 วัน..... 51
4.8	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุลในแต่ละกรรมวิธีหลัง ย้ายปลูก 28 วัน..... 53
4.9	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุลในแต่ละกรรมวิธีหลัง ย้ายปลูก 35 วัน..... 55
4.10	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุลในกรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยสาร ชาลิไซคลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและ ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อในแต่ละช่วงเวลาของการศึกษา (21, 28 และ 35 วัน หลังการย้ายปลูก)..... 56

สารบัญภาพ (ต่อ)

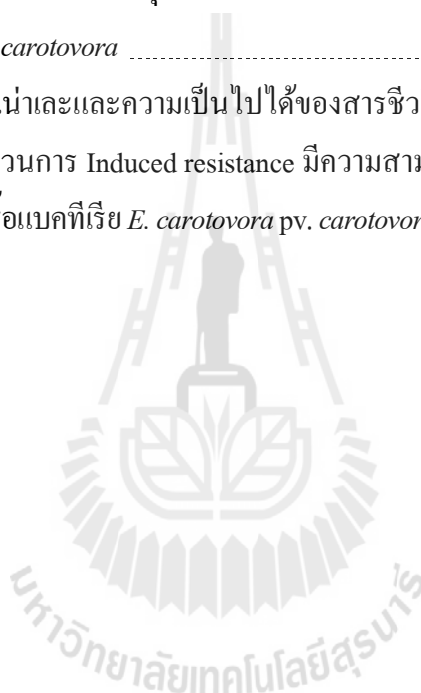
ภาพที่	หน้า
4.11	ลักษณะอาการของโรคเน่าและผกักาดเขียวป्लीหลังจากถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้น (elicitors) และหลังปลูกเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr2..... 58
4.12	การสะสมของปริมาณ salicylic acid (SA) ในผกักาดเขียวป्लीหลังการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและ ไอโซเลต ECC_Cr2 (challenge inoculation) เป็นเวลา 5 วัน..... 61
4.13	การสะสมของปริมาณ phenolic compound ในผกักาดเขียวป्लीหลังการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและ ไอโซเลต ECC_Cr2 (challenge inoculation) เป็นเวลา 5 วัน..... 63
4.14	เปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุโพแทสเซียม (K) ในผกักาดเขียวป्लीก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อ แบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) และหลังถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน)..... 65
4.15	เปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุแคลเซียม (Ca) ในผกักาดเขียวป्लीก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อ แบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) และหลังถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน)..... 66
4.16	เปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุแมงกานีส (Mn) ในผกักาดเขียวป्लीก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อ แบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) และหลังถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน)..... 67
4.17	เปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุเหล็ก (Fe) ในผกักาดเขียวป्लीก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อ แบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) และหลังถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน)..... 68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

5.1	กลไกการเกิดโรคเน่าและ (diseased) กลไกการเตรียมพร้อม (priming) และกลไกการชักนำความต้านทาน (induced resistance) ภายในเซลล์ผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกชักนำให้เกิดความต้านทานด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิกต่อเชื้อสาเหตุโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	79
5.2	วงจรการเกิดโรคเน่าและและความเป็นไปได้ของสารชีวโมเลกุลที่ผักกาดเขียวปลีสร้างขึ้นในกระบวนการ Induced resistance มีความสามารถในการยับยั้งขั้นตอนการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย <i>E. carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	81



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ผักกาดเขียวปลี (Chinese green mustard) อยู่ในตระกูล Brassicaceae (Cruciferae) เช่นเดียวกับกะหล่ำปลี กะหล่ำดอก และคะน้า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica juncea* นิยมปลูกมากในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ตาก และน่าน การผลิตผักกาดเขียวปลีในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามวัตถุประสงค์ของการผลิต คือ ผักสด เมล็ดพันธุ์ และผักดองหรือผักแปรรูป ซึ่งผักกาดดองบรรจุกระป๋องเป็นสินค้าผักแปรรูปอีกรายการหนึ่งที่มีความนิยม ซึ่งในระยะแรกจะเป็นการดองในระดับครอบครัว และเริ่มมีการขยายตัวของบริษัทผู้ผลิตผักดองหลายราย โดยมีมูลค่าการขายผักดองกระป๋องภายในประเทศประมาณ 950 ล้านบาทต่อปี แต่ต่อมาความต้องการในตลาดสูงขึ้นมีการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าสถานการณ์การส่งออกในปี 2554 ของผักดองกระป๋องและแปรรูป มีมูลค่า 6,769.20 ล้านบาท เพิ่มขึ้น 15.7% จากปี 2553 (กฤษยา สัจจาเพื่องกิจการ, 2555) อย่างไรก็ตาม ระบบการผลิตผักกาดเขียวปลีของเกษตรกรมักประสบปัญหาการเข้าทำลายของโรคพืช ได้แก่ โรคโคนเน่าคอดิน (damping off) โรคขอบใบทอง (black rot) และโรคเน่าและ (soft rot) รวมถึงแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ คือ หนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก ทั้งนี้โรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* จัดเป็นโรคที่สร้างความเสียหายต่อการผลิตในแปลงปลูกและผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวเป็นอย่างมาก โดยก่อให้เกิดความเสียหาย 30-50 % (Agrios 2006; สักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537; ศศิธร วุฒิวณิชย์, 2545) ภายในระยะเวลาเพียง 12-24 ชั่วโมง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูฝนที่มีสภาพภูมิอากาศเหมาะสมต่อการเกิดโรค นอกจากนี้ยังเป็นโรคสำคัญหลังการเก็บเกี่ยว ทั้งในระหว่างการขนส่งและระหว่างการจำหน่าย (สักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537; ศศิธร วุฒิวณิชย์, 2545) การป้องกันโรคเน่าและนั้นเกษตรกรมักใช้สารเคมีในการควบคุมโรค แต่การใช้สารเคมีมากเกินไปจนเกิดความจำเป็นและผิดวิธี ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงและมีปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิต ซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค และเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใส่ ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม (สักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537) จึงต้องป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค โดยการป้องกันกำจัดโรคพืชสามารถใช้วิธีอื่น ๆ ร่วมกับหรือทดแทนการใช้สารเคมีได้ เช่น การเกษตรกรรม การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ การควบคุมโดยชีววิธี (biological control) การกระตุ้นให้พืช

เกิดความต้านทาน (induced resistance) ด้วยการใช้สิ่งกระตุ้น (elicitor) อาทิ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ การใช้เชื้อก่อโรคที่ไม่มีความสามารถในการก่อโรคกระตุ้นความต้านทาน (non-pathogen mediated resistance, PMR) และการใช้สารเคมีสังเคราะห์กระตุ้นความต้านทานแบบแพร่กระจายทั่วทั้งต้น (induced systemic resistance, ISR หรือ systemic acquired resistance, SAR) ในปัจจุบันการควบคุมโรคโดยชีววิธีด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ (beneficial bacteria) ที่แยกได้จากบริเวณรอบ ๆ รากพืช (rhizosphere) ซึ่งมีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญเติบโต (plant growth promotion) และสร้างภูมิคุ้มกันพืช (induced resistance, IR) เช่น เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากสามารถควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถส่งเสริมการผลิตฮอร์โมนของพืช การใช้ธาตุอาหารของพืชรวมทั้งกระตุ้นให้พืชเจริญเติบโตแข็งแรง สร้างภูมิต้านทานโรคต่าง ๆ ได้ดี (สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2548) จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มคุณภาพผลผลิตที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ลดปัญหาการแพร่ระบาดของโรค ลดการใช้สารเคมี และสามารถประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมในระบบการผลิตพืชต่างชนิดในแต่ละท้องถิ่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นในการควบคุมโรคโดยใช้สิ่งกระตุ้น (elicitors) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. subtilis* และกรดซาลิไซลิกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตในผักกาดเขียวปลี และกระตุ้นความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค *E. carotovora* pv. *carotovora* ในผักกาดเขียวปลี ซึ่งยังมีการรายงานน้อยในประเทศไทย นอกจากนี้ยังจะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเทคนิคพื้นฐาน, เทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) และเทคนิค X-ray Fluorescence (XRF) เพื่อใช้ในการศึกษากลไกที่เกิดขึ้นและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบสารชีวเคมีภายในของเซลล์ผักกาดเขียวปลี เมื่อได้รับการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นความต้านทาน

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นผักกาดเขียวปลีเกิดความต้านทานต่อโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ในสภาพห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนทดลอง
2. ศึกษากลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการกระตุ้นความต้านทานในผักกาดเขียวปลีที่เกิดจากการถูกกระตุ้น ด้วยเทคนิคพื้นฐาน, เทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) และเทคนิค X-ray Fluorescence (XRF)

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1. สิ่งกระตุ้น (elicitors) สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้ผักกาดเขียวปลีเกิดความต้านทานต่อโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้
2. สิ่งกระตุ้นสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มการสร้างสารในกระบวนการชีวเคมีของพืชที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ทำให้เกิดความต้านทานในผักกาดเขียวปลีต่อโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ได้มากขึ้น
3. การใช้เทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) และเทคนิค X-ray Fluorescence (XRF) สามารถทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันนอล และองค์ประกอบของธาตุที่เป็นองค์ประกอบของกระบวนการชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นความต้านทานของผักกาดเขียวปลีได้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ศึกษาโดยใช้สิ่งกระตุ้น (elicitors) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. subtilis* และกรดซาลิไซลิก เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นความต้านทานโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ของผักกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 ในสภาพห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง นอกจากนี้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีของพืชที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดความต้านทานหลังจากถูกกระตุ้น ได้แก่ สาร salicylic acid (SA) และ phenolic compound และศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของเซลล์พืชด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) และเทคนิค X-ray Fluorescence (XRF) ที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องตนเองของผักกาดเขียวปลีต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นที่อาจนำมาใช้ทดแทนหรือร่วมกับการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคเน่าและผักกาดเขียวปลีที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora*
2. ทราบกลไกการเกิดความต้านทานในผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้น
3. ทราบการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบสารชีวเคมีของเซลล์พืชที่เกี่ยวข้องกับกลไกการปกป้องตนเอง ภายในผักกาดเขียวปลี เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) และเทคนิค X-ray fluorescence (XRF)

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญและปัญหาของการผลิตผักกาดเขียวปลี

ผักกาดเขียวปลี (*Brassica juncea* L.) มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย (Tindall, 1968; Bantoc, 1970) ชื่อสามัญมีหลายชื่อ ได้แก่ Leaf mustard หรือ Indian mustard หรือ Chinese mustard (ได้ม สมิตินันท์, 2544) หรือ Swatow mustard (เกษม พิสิก, 2524) ผักกาดเขียวปลีนิยมนำมาดองเพื่อบริโภคมากกว่ารับประทานสด และเริ่มมีความต้องการของตลาดสูงขึ้น ถือเป็นผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากมีราคาถูก มีคุณค่าทางอาหารสูง และสามารถช่วยในการเสริมสร้างกระดูกได้ ผักกาดเขียวปลีมีระบบรากตื้น อายุปลูกตั้งแต่หยอดเมล็ดจนเก็บเกี่ยว ประมาณ 55-75 วัน ปลูกได้ตลอดปี เกษตรกรปลูกได้ผลผลิตประมาณ 830-1200 กิโลกรัมต่อไร่ (เมืองทอง ทานทวี, 2525) การปลูกแบบหยอดหลุม มักใช้ระยะปลูก 25x30 ซม. ใส่ปุ๋ยคอกตารางเมตรละ 2 กิโลกรัม ใส่ 15-15-15 ตารางเมตรละ 30 กรัม (มูลนิธิโครงการศักดิ์, 2529) ในการปลูกผักกาดเขียวปลียังประสบปัญหาของโรค และแมลงตลอดช่วงระยะการเจริญเติบโตเป็นอย่างมาก โดยโรคพืชเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุดเนื่องจากเป็นตัวการที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับพืชทั้งด้านคุณภาพและปริมาณของผลผลิต โดยทั่วไปความเสียหาย จะอยู่ในระดับ 10-20% ของจำนวนผลผลิตทั้งหมดในแต่ละฤดูปลูก บางแห่งอาจพบความเสียหายสูงถึง 30-50% หากสภาพแวดล้อมเหมาะสม (มักจะเกิดการระบาดและทำความเสียหายในฤดูฝน และจะรุนแรงยิ่งขึ้นเมื่อมีสภาพอากาศแบบร้อนชื้น โดยเฉพาะในช่วงที่มีฝนตกติดต่อกันหลายวัน แสงแดดน้อยเข้าถึงน้อย อุณหภูมิระหว่าง 30-35°C โดยช่วงนี้หากเกิดการติดเชื้อจะมีการแพร่และขยายลูกกลามออกไปอย่างรุนแรง) แต่ปัจจุบันระบบการผลิตผักกาดเขียวปลีของเกษตรกรยังมักประสบปัญหาการเข้าทำลายของโรคพืชหลายชนิด ส่งผลให้ผลผลิตลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพ

2.2 โรคผักกาดเขียวปลีที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ

2.2.1 โรคเน่าดำ (Black rot) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* โดยมีลักษณะของอาการ เป็นขอบใบแห้งเข้าไปเป็นรูปสามเหลี่ยมที่มีปลายแหลมชี้ไปที่เส้นกลางใบ เนื้อเยื่อที่แห้ง มีเส้นใบสีดำเห็นชัดเจน ทำให้ใบเหลืองและแห้ง อาการใบแห้งจะลามลงไปถึงเส้นกลางใบ และลุกลามลงไปถึงก้านใบและส่วนอื่น ๆ เกิดอาการใบเหี่ยวและแห้งตาย ทำให้เกิดการชะงักการเจริญเติบโต และอาจตายในที่สุด การแพร่ระบาด และการป้องกันกำจัด

สามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์ โดยทำการปลูกพืชหมุนเวียน เช่น ปลูกข้าวโพด พริก โดยไม่ปลูกพืชพวกนี้อย่างน้อย 3 ปี เมื่อมีการระบาดของโรค

2.2.2 โรคโคนเน่าคอดิน (Damping off) เกิดจากเชื้อรา *Pythium* sp. หรือ *Phytophthora* sp. หรือ *Fusarium* sp. หรือ *Rhizoctonia* sp. โดยมีลักษณะอาการ ต้นกล้าผักจะเกิดอาการเป็นแผลซ้ำที่โคนต้นระดับดินเนื้อเยื่อตรงแผลเน่าและแห้ง ไปอย่างรวดเร็ว ถ้าถูกแสงแดดทำให้ต้นกล้าหักพับต้นเหี่ยวแห้งตายในเวลารวดเร็ว บริเวณที่เป็นโรคจะค่อย ๆ ขยายวงกว้างออกไปเป็นวงกลม ภายในวงกลมที่ขยายออกไปไม่มีต้นกล้าเหลืออยู่ในเนื้อที่ ดังกล่าว กล้าที่โตแล้วจะค่อย ๆ เหี่ยวตาย การแพร่ระบาด และการป้องกันกำจัด โรคนี้พบเฉพาะในแปลงกล้าเท่านั้น การหว่านกล้าที่แน่นทึบ อับลมและต้นเบียดกันมากจะส่งผลให้เกิดโรครุนแรง สามารถป้องกันโรคได้โดยการหว่านเมล็ดผักอย่าให้แน่นทึบเกินไป สารเคมีที่สามารถใช้ป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ไชเนบ มาเนบ นอกจากนี้การทำให้แปลงปลูกระบายน้ำได้ดี โดยการยกทรงสูงเพื่อให้ระบายน้ำได้เร็ว น้ำไม่ขังและ จะสามารถลดความรุนแรงโรคลงได้

2.2.3 โรคเน่าและ (Soft rot) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* โดยมีลักษณะอาการ เริ่มอาการของโรคเป็นจุดน้ำน้ำ ซึ่งจะเน่าอย่างรวดเร็วทำให้เนื้อเยื่อเปื่อยและเป็นน้ำเยิ้มและสั่นกลื่นเหนียวภายในเวลา 2-3 วัน ผักจะเน่ายุบหายไปหมดทั้งต้นและหัว หรือแห้งเป็นสีน้ำตาลอยู่ ที่ผิวดิน อาการเน่าจะเกิดที่ส่วนใดก่อนก็ได้ แต่โดยปกติจะเริ่มที่โคนก้านใบหรือตรงกลางใบอ่อน เชื้อแบคทีเรียจะเข้าไปทางบาดแผล ซึ่งเกิดจากหนอนทำลายไว้ก่อน การแพร่ระบาด และการป้องกันกำจัด เชื้อกระจายไปตามน้ำ หรือแมลง เชื้อเข้าสู่พืชทางบาดแผล ซึ่งอาจเกิดจากแมลงกัดกิน หรือการนิกขาด การสัมผัสของเชื้อกับส่วนของพืช ติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตร สามารถป้องกันกำจัดได้หลายวิธี คือ ทำการไถพรวนดิน หรือพลิกหน้าดินขึ้นตากก่อนที่จะทำการปลูกพืชเพื่อทำลายเชื้อสาเหตุโรคปลูกพืชหมุนเวียนในพื้นที่ที่มีการระบาดเป็นประจำ อย่าทำให้พืชช้ำหรือเกิดแผล ใช้ปุ๋ยที่มีธาตุโบรอนผสมด้วย หรือนิพ่นธาตุโบรอนเพียงอย่างเดียว ในอัตราปุ๋ยบอแรกซ์ 10-12 กรัมต่อน้ำ 1 ปีบ เมื่อผักเริ่มห่อหัว ใช้อย่างสม่ำเสมอ เช่น สารพวก สเตรปโตมัยซิน หรือสเตรปโตมัยซินผสมกับเตตระไฮคลินฉีดพ่นเมื่อเกิดโรค

2.3 โรคเน่าและของผักกาดเขียวปลี

2.3.1 ความสำคัญและประวัติการระบาด

โรคเน่าและได้รับการจัดลำดับให้อยู่ในกลุ่มของโรคที่สำคัญมากของพืชผักตระกูลกะหล่ำทั้งในด้านของการระบาดและความเสียหาย เป็นโรคพบเกิดขึ้นทั่วไปในทุกท้องถิ่นที่มีการปลูกผัก โดยเฉพาะหากสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น ในช่วงฤดูฝนที่มีอากาศร้อนอบอ้าว ความเสียหายจะเกิดขึ้นรุนแรงมากเป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้กับพืชผักต่าง ๆ หลายชนิด โดยโรคนี้จะเกิดได้

ทุกส่วนของพืชที่อ่อนนุ่ม และอวบน้ำ โรคนี้สร้างความเสียหายทั้งในแปลงปลูกหลังการเก็บเกี่ยว ระหว่างการเก็บในโรงเก็บ ระหว่างการขนส่งและรอการจำหน่าย ความเสียหายจะมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับการจัดการระบบการผลิตตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงวิธีการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว (วิลาวรรณ เชื้อบุญ, 2551)

การแพร่ระบาดและการอยู่ข้ามฤดู บริเวณแผลที่เป็นเมื่อเก็บเกี่ยวจะเต็มไปด้วยเซลล์แบคทีเรีย สาเหตุโรคเป็นจำนวนมาก แพร่กระจายได้ดีโดยน้ำ ดินไปกับปีก ขาของแมลง หรือติดไปกับมีด จอบ และเข้าสู่ พืชได้ดีทางบาดแผล เชื้อสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในเศษซากพืชและในดินได้ หลายปี (ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537) นอกจากนี้ยังมีแมลงบางชนิดที่นอกจากเป็น ตัวช่วยแพร่กระจาย เชื้อแล้ว ยังเป็นที่อาศัยอยู่ข้ามฤดูของเชื้อ ในลักษณะที่มีความสัมพันธ์กันอย่างเฉพาะเจาะจง จากการศึกษาในต่างประเทศพบว่า มีแมลงวันผัก (maggot fly) 2 ชนิด คือ *Hylemya cilicura* และ *H. brassicae* (Doane and Chapman, 1964) มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเน่าและ โดยที่ตัวเต็มวัย เพศเมียของแมลงวันผักไปวางไข่ไว้ในบริเวณแผล ตัวหนอนที่ฟักออกจากไข่จะเจริญเติบโตโดยการกินเนื้อเยื่อพืชที่เน่าและ และในขณะเดียวกันก็กินเชื้อแบคทีเรียเข้าไปด้วยจำนวนมาก เมื่อหนอน เข้าดักแด้และเตรียมเปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัย เชื้อแบคทีเรียจะถูกส่งลงไปในกระเปาะเล็ก ๆ ที่เชื่อมต่อกับท่อรังไข่ (oviduct) ทำให้ไข่ทุกฟองที่เกิดจากแมลงวันเพศเมียที่กินเชื้อแบคทีเรียเข้าไปตั้งแต่ตอนที่ยังเป็นตัวหนอน จะมีเชื้อแบคทีเรียเคลือบติดมาด้วย เมื่อไข่เหล่านั้นถูกวางลงบนพืชบริเวณที่มี รอยแผลหรือรอยขีด แบคทีเรียที่ติดอยู่ที่เปลือกไข่ก็จะเข้าสู่พืชและก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ทันที พืช จึงแสดงอาการเน่าและ ส่วนตัวหนอนที่ฟักออกจากไข่จะกินเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อพืชที่เน่าเข้าไป อยู่ในตัวอีก เมื่อพืชตายเชื้อสามารถอยู่ในเศษซากพืชและในดินได้นาน ปกติแล้วโรคนี้ไม่ถ่ายทอด ทางเมล็ดพันธุ์เพราะเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไม่สามารถทนต่อความแห้งในสภาพที่ เคลือบติดอยู่กับเมล็ดได้นาน (ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชสร้างความเสียหาย อย่างมากในช่วงฤดูฝน เนื่องจากสภาพอุณหภูมิสูง 30-36 องศาเซลเซียส เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อ การเจริญของเชื้อและการพัฒนาของโรค ทำให้อาการของโรครุนแรง แต่ถ้าหลังการติดเชื้อแล้ว อุณหภูมิลดลงกว่า 25 องศาเซลเซียส อาการของโรคจะไม่รุนแรง แผลจะไม่ค่อยขยาย ทั้งนี้เนื่องจาก อากาศเย็นไม่เหมาะสมต่อการ เจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค (ศศิธร วุฒิวิเศษย์, 2546)

2.3.2 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora*

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* Jones ซึ่งจากการจัดจำแนกในตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition (Holt et al., 1994) ซึ่งสามารถจัด จำแนกตามหมวดหมู่ได้ดังนี้

Kingdom: Prokaryote

Division: Gracilicutes

Class: Proteobacteria

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Erwinia*

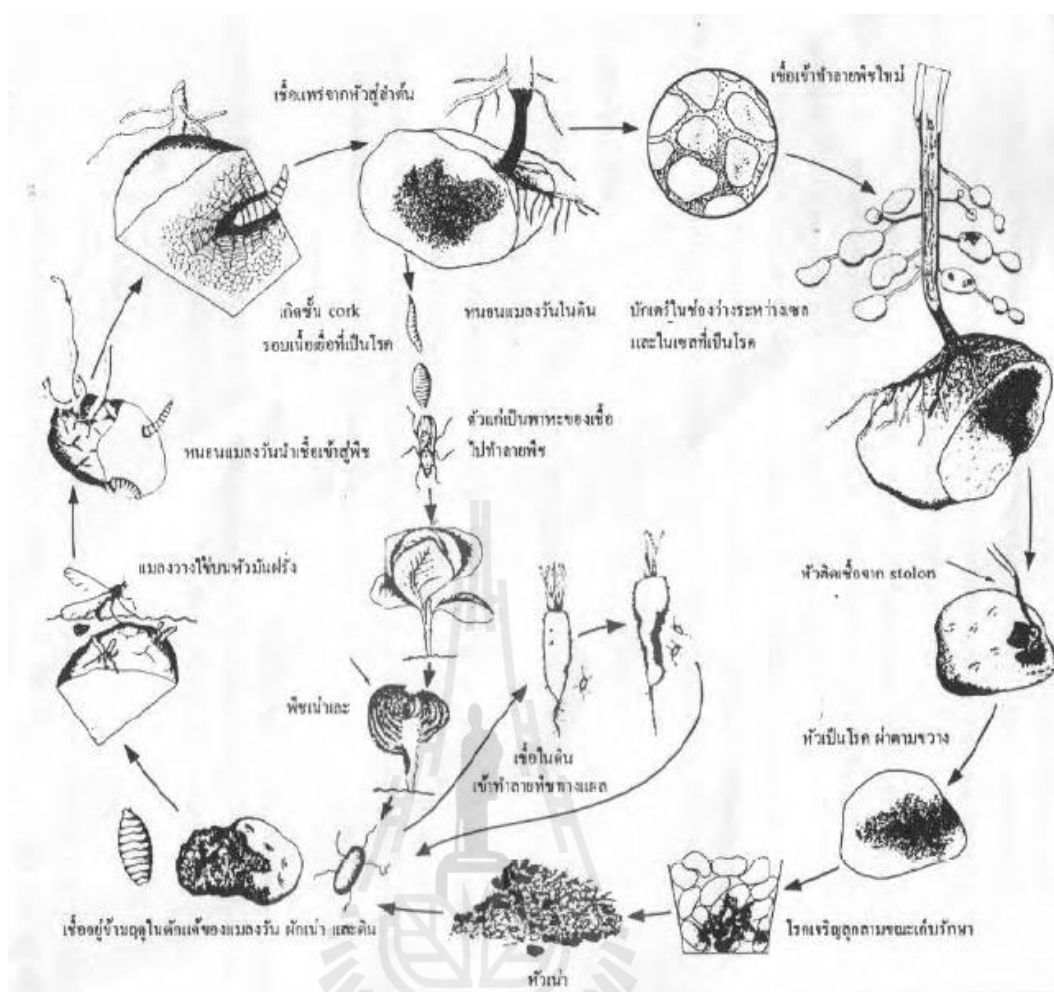
Species: *Erwinia carotovora*

Subspecies: *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ขนาดประมาณ 0.7x1.2 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella 1-6 เส้น เป็นแบคทีเรียจำพวกที่เจริญได้ทั้งในบรรยากาศที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic) (Holt et al., 1994) ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) มีลักษณะกลมมน ขอบเรียบ เป็นมัน สีครีมใส ส่วนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ endo agar จะมีลักษณะสีแดงเข้ม เข้ม เป็นมัน และผิวเรียบ รวมถึงโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ crystal Violet - pectate medium (CVP) จะมีลักษณะโปร่งแสง และบริเวณที่มีเชื้อเจริญอยู่จะยุบตัวเป็นหลุมลึก (ศศิธร วุฒินิชย์, 2545)

2.3.3 วงจรการเกิดโรค

เชื้อ *E. carotovora* pv. *carotovora* จะเข้าไปสู่ภายในพืช และก่อให้เกิดโรคขึ้นได้โดยผ่านทางบาดแผลหรือช่องเปิดธรรมชาติ แต่ก็มีอยู่มากที่เข้าทำลายซ้ำเติม (secondary infection) คือ เข้าไปหลังจากที่มีเชื้ออื่นเข้าทำลายอยู่ก่อนแล้ว ต่อมาก็จะเข้าไปเจริญเป็นจำนวนมากอยู่ระหว่างเซลล์ parenchyma ขณะเดียวกันก็จะสร้างเอนไซม์ pectase หรือ pectinase ออกมาย่อยสลายสารเพคติน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมเซลล์มีผลให้เซลล์ขาดหลุดออกจากกันแล้วเกิดการ plasmolyse ขึ้นกับเซลล์ที่บริเวณเนื้อเยื่อดังกล่าวทำให้เกิดการเน่า ขึ้นในที่สุด กระบวนการทั้งหมดตั้งแต่เชื้อเริ่มเข้าไปสู่ภายในพืชจนแสดงอาการให้เห็นจะกินเวลาตั้งแต่ 12-24 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและสิ่งแวดล้อมขณะนั้น จากนั้นการทำลายก็จะเป็นไปอย่างรวดเร็วทำให้เกิดเป็นแผลใหญ่ขยายลุกลามกว้างออกไป ขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ก็จะเพิ่มปริมาณอย่างมากมาเกิดเป็นเมือกเยิ้มปกคลุมบริเวณแผลทั้งหมดไว้ (ไพโรจน์ จ้วงพานิช, 2525; Allen et al., 2009) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 วงจรโรคเน่าและของผักที่เกิดจากเชื้อ *E. carotovora* (ไพโรจน์ จั้วพานิช, 2525)

2.3.4 การควบคุมโรคเน่าและ

การควบคุมโรคเน่าและสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การควบคุมโรคโดยวิธีชีววิธี ในการปลูกพืช ก่อนปลูกทุกครั้งควรทำลายเศษซากพืชรวมทั้งพืชอาศัยทั้งในแปลงและพื้นที่ใกล้เคียงให้หมด หรือทำการไถกลบซากพืชให้ลึกเพื่อทำลายแหล่งสะสม เชื้อสาเหตุโรคหรือลดปริมาณ inoculum ของเชื้อสาเหตุโรค (สุตฤดี ประเทืองวงศ์, 2527) หลีกเลี่ยงการสัมผัสหรือทำการเขตกรรมใด ๆ ที่จะทำให้เกิดแผลในช่วงที่ใบเปียกหรือมีความชื้นสูงเพื่อป้องกันไม่ให้แมลงทำแผลกับส่วนต่าง ๆ ของพืช การใช้สารเคมีจำพวกสารประกอบทองแดง และสารปฏิชีวนะ ในส่วนของการใช้สารเคมีควบคุมโรคเน่าและนั้นมีมานานแล้ว เช่นเดียวกับพืชอื่น ๆ เนื่องจากสะดวกและให้ผลเร็ว แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีสารเคมีชนิดใด ที่ใช้แล้วสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปมีการใช้สารเคมีในกลุ่มที่มีส่วนประกอบของทองแดง ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น copper hydroxide (ศศิธร วุฒินิชย์, 2545) ซึ่งมีรายงานว่าถ้าหากเชื้อโรคพืชโดยเฉพาะ

เชื้อแบคทีเรีย ได้รับสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะมีความต้านทานต่อสารเคมีชนิดนั้นได้ในที่สุด (Burr et al., 1988)

การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธีเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ปัจจุบันเกษตรกรเริ่มนิยมนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช โดยการควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธีคือ การใช้สิ่งมีชีวิตในการลดปริมาณประชากรของเชื้อโรคพืชหรือลดกิจกรรมของเชื้อก่อโรคอันจะก่อให้เกิดโรคกับพืช ให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ มีหลักการที่สามารถดำเนินการควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี ให้บรรลุเป้าหมายได้โดย (1) นำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จากท้องถิ่นที่เป็นต้นกำเนิดของสาเหตุโรค (2) ปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเพิ่มประชากรและบทบาทในการเป็นปฏิปักษ์ (3) คงปริมาณประชากรและบทบาทโดยการเพิ่ม/เติมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ หรือปรับสภาพแวดล้อม (4) การใช้ชีววิธีเข้าร่วมในการจัดการ โรคพืชแบบผสมผสาน (สุดฤดี ประเทืองวงศ์, 2550) การควบคุมโรคโดยชีววิธี เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ โดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ชนิดหนึ่งหรือมากกว่าที่มีอยู่ทั่วไปตามบริเวณผิวพืชส่วนเหนือดิน (Munk vald and Marois, 1993) บริเวณ รากและดิน รอบ ราก (Larkin et al., 1989) ที่มีความสามารถในการแข่งขัน (competition) ทางด้านแหล่งแร่ธาตุอาหารและแหล่งที่อยู่อาศัย การเป็นปรสิต (parasite) รวมถึงการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดอื่น (Campbell, 1989) ซึ่งถือว่าเป็นกลไกที่สำคัญของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ มาใช้ในการควบคุมโรคพืช เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี Asaka and Shoda (1996) ได้ศึกษา *B. subtilis* RB14 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช คือสารปฏิชีวนะ iturin A และ surfactin ซึ่งพบว่าสารทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคโคนเน่าคอดิน ที่เกิดจากเชื้อ *R. solani* ในมะเขือเทศ Brian et al., (2002) ได้ทำการศึกษาการฆ่าเชื้อโดยใช้สาร mutagenic ทำให้ได้ *Bacillus* สายพันธุ์ M04 ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้ง *Botrytis cinerea* (Grey mould), *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt) และ *E. carotovora* pv. *carotovora* (Bacterial soft rot) และพบสร้างสารปฏิชีวนะ เมื่อทดสอบทางเคมีและคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะแล้วพบว่าเป็นสารพวก extracellular ที่ทนความร้อนได้ และสามารถละลายได้ใน Methanol สารนี้ดูดความยาวคลื่นแสงที่ 212 นาโนเมตร ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับกลุ่ม cyclic antibiotic lipopeptides เช่น iturin นอกจากนี้ Berger et al. (1996) รายงานว่า การใช้เชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเน่าคอดินของพืชสกุล photinia และ brassica พบว่าเชื่อดังกล่าวมีความสามารถในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora* sp. และ *Pythium* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Cho et al. (2003) ได้ศึกษาเชื้อที่แยกได้จากฟางข้าว พบว่าเป็น *B. subtilis* สายพันธุ์ KS03 สามารถผลิตสารควบคุมทางชีวภาพที่ยับยั้งโรคแอนแทรกโนสจากเชื้อรา *Gloeosporium gloeosporioides* และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* KS03 ไปทำการแยก

บริสุทธิ์พบว่า สารที่ให้ผลการยับยั้งคือสารปฏิชีวนะ iturin A2 โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จะมีกลไกควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค 4 ลักษณะ ดังนี้

1. การแข่งขัน (competition) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความสามารถแข่งขันกับเชื้อโรคพืชในด้านต่าง ๆ เช่น การใช้ธาตุอาหาร อากาศ และการครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคพืชไม่สามารถเจริญเติบโต หรืออาศัยอยู่ในบริเวณที่มีเชื้อปฏิปักษ์ พืชจะเจริญเติบโตแข็งแรงมีผลผลิตสูงขึ้น การแข่งขันที่พบบ่อยคือ การนำเอาธาตุอาหารหรือสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อมนั้นมาใช้ประโยชน์ในการเติบโต ทำให้เชื้อโรคขาดสารอาหาร ไม่สามารถเจริญเติบโตเข้าทำลายพืช ซึ่งเป็นกลไกสำคัญของการยับยั้งเชื้อที่ทำลายราก และกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (อุไรจันทา กสิกรรมพิบูลย์, 2543) เช่น เชื้อ *P. fluorescent* จะผลิตสาร siderophore ช่วยในการจับยึดธาตุเหล็กในธรรมชาติมาใช้ได้ดีกว่าเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* สาเหตุโรค take-all ของข้าวสาลี ทำให้เชื้อราไม่สามารถทำลายรากของข้าวสาลีช่วยให้ข้าวสาลีเจริญเป็นปกติ และให้ผลผลิตดีขึ้น

2. การทำลายชีวิต (antibiosis) เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้รับความสนใจคัดเลือกมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยวิธีนี้นั้น จะเน้นคุณสมบัติการทำลายชีวิตของเชื้อโรคเป็นส่วนใหญ่ โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นี้มีความสามารถในการผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic)

3. การเป็นปรสิต (parasitism) เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นปรสิต (parasite) เข้าไปเจริญอาศัยทำลายสิ่งมีชีวิตอื่นนั้นพบได้ไม่มากนัก การใช้ควบคุมโรคพืช ยังไม่ประสบความสำเร็จเหมือนปฏิกิริยาแบบการทำลายชีวิต เช่น *E. uredinolytica* เข้าทำลาย pedicel ของสปอร์เชื้อราสนิม หรือเชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *M. incognita* สาเหตุโรครากปม โดยทดสอบกับต้นมะเขือเทศในกระถาง โดยพบว่าโรคโคนเน่าคอดินที่เกิดจากเชื้อรา *R. solani* เมื่อควบคุมโดยใช้ *B. subtilis* RB14-C ร่วมกับสาร flutolanil สามารถลดการใช้สารเคมี flutolanil จากปกติที่ต้องใช้ 375 ไมโครกรัมต่อกระถางลดลงเหลือเพียง 94 ไมโครกรัมต่อกระถาง แต่ยังคงความสามารถในการลดการเกิดโรคได้เท่าเดิมสำหรับการทดลองระดับโรงเรือน (Kondoh et al., 2000) นอกจากนี้สกุลลักษณะ มณีนีแสง และคณะ (2551) ได้ศึกษา *Bacillus* spp. จำนวน 503 ไอโซเลท จากดินรอบโคนต้นและใบของถั่วฝักยาว ทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Cercospora cruenta*, *Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. พบว่า *B. megaterium* HT-NK-460 และ *B. brevis* TZ-CP-342 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. cruenta*, *U. vignae* และ *Oidium* sp. ได้สูง 97.22-100 % ดังนั้นจึงนำ *Bacillus* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลท มาชักนำให้กลายพันธุ์ด้านยาปฏิชีวนะ rifampicin เพื่อใช้ติดตามจำนวนประชากรที่พบนบนต้นถั่วฝักยาว พบว่า *Bacillus* spp. ทั้ง 2 ไอโซ

เลท สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ 35.85-65.52 % อีกทั้งยังส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพผลผลิตถั่วฝักยาวเพิ่มขึ้น

4. การชักนำให้เกิดความต้านทานโรค (induced resistance) พืชสามารถสร้างความต้านทานต่อการทำลายของเชื้อโรคได้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากอิทธิพล (elicitor) สามารถทำได้โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์เป็นตัวกระตุ้น ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถชักนำกระบวนการป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคพืช ด้วยกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์พืช (Prathuangwong et al., 2000) ส่งผลให้มีการสร้างเอนไซม์และสารชีวเคมีเพื่อปกป้องตนเองของพืช

2.4 การชักนำให้เกิดความต้านทาน (induced resistance)

เป็นความต้านทานที่พืชถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นมาหลังเชื้อโรคเข้าทำลาย โดยเป็นผลเนื่องมาจากความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ของพืชและเชื้อโรค ผลจากปฏิกริยาร่วมกันนี้จะไปยับยั้งการพัฒนารูปร่างของเชื้อโรคที่ชักนำว่า defense mechanism ของพืชให้มีกิจกรรมเกิดขึ้น

2.4.1 กลไกการป้องกันการรุกรานจากเชื้อก่อโรค (plant defense mechanisms)

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

1. กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defenses)

พืชจะสร้างโครงสร้างพิเศษทางธรรมชาติ สามารถเกิดได้ทั้งก่อน และหลังการเข้ารุกรานจากเชื้อ ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าทำลายพืชได้ง่าย โครงสร้างของพืชก่อนเชื้อเข้าทำลาย ได้แก่ การสร้างสารเคลือบผิวใบ (wax) ให้หนาขึ้น เพื่อป้องกันการเกาะติดของน้ำ การที่ชั้น cuticle หนาขึ้นช่วยให้พืชทนทานต่อการแทงทะลุผ่านของเชื้อ นอกจากนี้ ตำแหน่งและรูปร่างของปากใบมีความสำคัญต่อเชื้อที่เข้าทำลายทางปากใบ รวมทั้งความหนาของผนังเซลล์ จะช่วยป้องกันการงอกของสปอร์เชื้อราให้ยากมากขึ้น (ยุรฉัตร ยอดโยธี, 2554) ส่วนโครงสร้างที่พืชสร้างขึ้นหลังถูกรุกรานจะเกิดขึ้นหลังจากที่เชื้อก่อโรคเริ่มเข้าทำลาย เนื่องจากเชื้อหลายชนิดปล่อยสารเคมีออกมาสู่พืช เช่น การผลิตสารพิษ สาร glycoprotein และเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ได้แก่ cutinase, cellulase และ hemicellulase เป็นต้น เพื่อย่อยสลายประกอบของผนังเซลล์พืช พืชจะจดจำสารเหล่านั้น และสร้างโครงสร้างพิเศษเพื่อป้องกันตัวขึ้นได้แก่ การสร้างผนังเซลล์ให้มี cellulose และ hemicelluloses เพิ่มขึ้น ทำให้พืชมีความทนทานต่อการทะลุผ่านมากขึ้น การสร้างเนื้อเยื่อพิเศษ (cork layers) เพื่อปกคลุมและจำกัดขอบเขตแพร่กระจายของเชื้อไปยังส่วนอื่น ๆ การสะสมยางเหนียว (gums) จะยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อโรคบางชนิดและการสร้าง abscission layer เพื่อป้องกันแพร่กระจายของเชื้อ (Agrios, 1997) มีรายงานของ Shetty et al. (2009) ศึกษาการใช้ β -1,3-glucan

ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเชื้อรา *Septoria tritici* สาเหตุโรคใบจุดในข้าวสาลีพบว่า มีการสะสม callose ในผนังเซลล์และเอนไซม์ β -1,3-glucanase เพิ่มขึ้น และมีผลโดยตรงในการยับยั้งเอนไซม์ และสารพิษของเชื้อก่อโรค นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาของ Franco and Iriti (2007) เกี่ยวกับการใช้ไคโตซานในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อ tobacco necrosis virus (TNV) ในถั่ว แยกพบว่า ไคโตซานสามารถกระตุ้น มีการให้สร้าง callose เพิ่มขึ้น และลดการเกิดแผลได้ถึง 95 เปอร์เซ็นต์

2. กลไกทางชีวเคมี (biochemical defenses)

นอกจากพืชจะป้องกันเชื้อโรคเข้าทำลายจากกลไกทางโครงสร้างได้แล้ว พืชยังสร้างสารป้องกันทางชีวเคมี โดยการผลิตสารเคมีที่เป็นพิษต่อเชื้อโดยตรง เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อลุกลามกระจายไปทั่วต้นพืช ซึ่งการสร้างสารชีวเคมีสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการเข้าทำลายของเชื้อ (Agrios, 1997)

2.1 สารเคมีที่พืชผลิตขึ้นก่อนการถูกเข้าทำลาย (pre-existing biochemical defense)

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

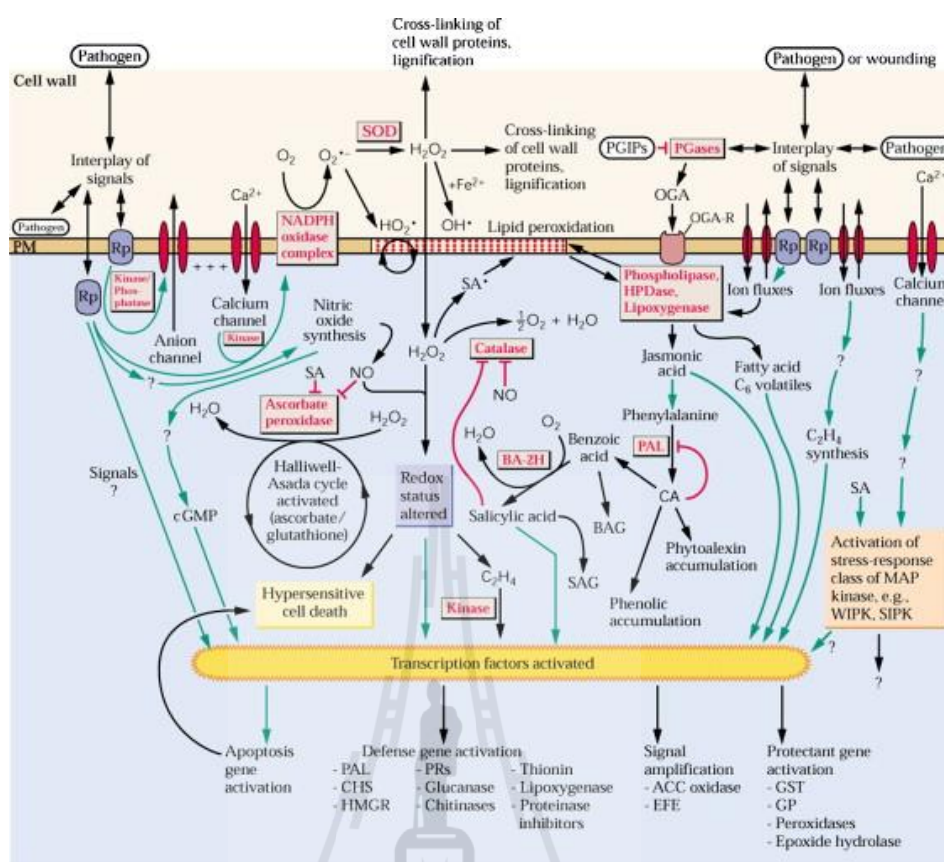
2.2 สารชีวเคมีที่พืชสร้างขึ้นหลังจากการถูกเข้าทำลาย (induced biochemical Defense)

เมื่อเชื้อโรคเข้ารุกรานพืช พืชจะเริ่มส่งสัญญาณโมเลกุลจากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และจับกับสารบางอย่างของเชื้อ (elicitor) เช่น glycoprotein, fatty acid, carbohydrates และ peptides เป็นต้น จากนั้นจะสร้างสารชีวเคมีและเกิดปฏิกิริยาขึ้น เพื่อหยุดการพัฒนาและทำลายเชื้อโรค เกิดกระบวนการต้านทานของพืช ปฏิกิริยาดังกล่าวได้แก่ hypersensitive response คือ เกิดการตายที่ตำแหน่งของเซลล์ที่เชื้อเข้าทำลายอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรค ซึ่งมี 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) เกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นการตอบสนองแรกของพืช เกิดขึ้นไม่เกิน 5 นาที จะพบสารพวก superoxide (O_2^-) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อสาเหตุโรคโดยตรง และทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงขึ้น (Thordal-Christensen et al., 1997; Shetty et al., 2009) รวมถึงมีการสร้าง nitric oxide (NO) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น โดย ROS และจากนั้นจะเกิดการสร้าง pathogenesis related proteins (PR proteins)

ประกอบด้วยโปรตีนและเอนไซม์ที่ทำหน้าที่หลากหลาย (ภาพที่ 2) ในกระบวนการต้านทานของพืช (Van Loon, 1997; Chen et al., 2000)

ปฏิกิริยา hypersensitivity reaction (HR) โดยเมื่อเชื้อผ่านเข้าไปในเซลล์พืชตรงจุดที่เชื้อโรคเข้าไปนั้น พืชจะมีกลไกการชักนำให้เกิดปฏิกิริยาแบบ incompatible interaction ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อชนิดนั้น ทำให้ไปล้อมเชื้อโรคไม่ให้เจริญลุกลามต่อไปได้ เชื้อโรคขาดอาหารและเนื้อเยื่อพืชเกิดการตายอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นวิธีการป้องกันตัวเองของพืชที่ดีที่สุดวิธีหนึ่ง ในพันธุ์ต้านทานแผล HR จะเล็กมาก และเนื้อเยื่อส่วนนี้อาจจะเจริญและดันให้แผลส่วนนี้หลุดหายไปได้

สารประกอบ phytoalexin พบเฉพาะในพืชที่ได้รับการกระตุ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคทุกชนิด (รา แบคทีเรีย ไวรัส ไวรอยด์ ไฟโตพลาสมา และไส้เดือนฝอย) หรือถูกรบกวนจากสารเคมี หรือความเสียหายจากแรงกล จัดเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเมื่อถูกเชื้อโรคต่าง ๆ เข้าทำลาย โดยทำหน้าที่ยับยั้งการผ่านเข้าสู่พืชของเชื้อโรคและการเจริญของเชื้อโรค โดยพืชจะสร้าง phytoalexin ในบริเวณจุดติดเชื้อและบริเวณใกล้เคียงเท่านั้น โดยจะชักนำให้เกิดปฏิกิริยา HR ของเนื้อเยื่อพืช และ phytoalexin จะทำหน้าที่ในเฉพาะเซลล์พืชที่มีชีวิตเท่านั้น สารที่จัดเป็น phytoalexin ได้แก่ ipomeamarone, pisatin (pea), rishitin (potato), gossypol (cotton), isoflavonoid (legumes), terpenoids (Solanaceae), phaseollin (bean), glyceollin (soybean, alfalfa) และ capsidiol (pepper) โดย ipomeamarone เป็น phytoalexin ที่ถูกค้นพบเป็นชนิดแรกใน sweet potato root ที่ถูกเข้าทำลายโดย *Ceratosystis fimbriata* ซึ่งส่วนใหญ่ phytoalexin elicitors จะเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา ได้แก่ glucans, chitosan, glycoproteins และ polysaccharides โดย elicitors เหล่านี้จะถูกปลดปล่อยออกมาโดยการทำงานของเอนไซม์บางชนิดของพืช ในพืชพันธุ์อ่อนแอก็มีการสร้าง phytoalexin เช่นกันแต่สร้างในปริมาณน้อยและช้ากว่าในพืชพันธุ์ต้านทาน จึงง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค เนื่องจากเชื้อโรคสามารถผลิต suppressor สาร phytoalexin ไว้และเชื้อโรคสายพันธุ์รุนแรงจะผลิต phytoalexin ได้ในปริมาณที่น้อยกว่า สายพันธุ์อ่อนแอ (nonpathogens) เนื่องจากเชื้อโรคสายพันธุ์รุนแรงอาจมีวิวัฒนาการปรับตัวให้สามารถทนต่อ phytoalexin



ภาพที่ 2 กระบวนการต่าง ๆ ของการส่งสัญญาณในการตอบสนองของพืชต่อเชื้อสาเหตุโรค (Hofiusa, 2007)

2.4.2 การชักนำความต้านทานเพื่อต่อต้านเชื้อสาเหตุโรค (plant defense resistance)

การชักนำความต้านทานในพืชเป็นการกระตุ้นกระบวนการในการป้องกันตนเองจากเชื้อโรคพืช ในรูปแบบต่าง ๆ ซึ่งประการหนึ่งที่สำคัญคือ การจำกัดขอบเขตของเชื้อโรคให้อยู่เฉพาะในพื้นที่ที่เข้าทำลายพืช (infection site) ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยา HR ซึ่งเป็นการกระตุ้นทางชีวเคมีที่ทำให้เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลายเกิดอาการเซลล์ตายอย่างฉับพลัน ทำให้เชื้อโรคบริเวณดังกล่าวถูกจำกัดพื้นที่และอาหาร และตายในที่สุด อันเป็นการยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อไปยังเซลล์ข้างเคียง แต่อย่างไรก็ตามเราสามารถแบ่งรูปแบบของการชักนำหรือการกระตุ้นความต้านทานในพืชได้ 2 ลักษณะ คือ

1. การต้านทานแบบเฉพาะจุดหรือเฉพาะแห่ง (localized acquired resistance; LAR)

หมายถึง ลักษณะการต้านทานที่เมื่อพืชถูกกระตุ้นจากสารกระตุ้นที่เหมาะสม ณ จุดใดจุดหนึ่งแล้ว ความต้านทานนั้นจะปรากฏให้เห็นเฉพาะบริเวณที่ถูกกระตุ้นเท่านั้น เนื่องจากกระบวนการทาง

ชีวเคมีที่เกิดขึ้นนั้นเป็นแบบเฉพาะแห่งไม่สามารถส่งสัญญาณไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ เช่น การเกิดปฏิกิริยา HR

2. การต้านทานทั้งระบบแบบกระจายทั่วทั้งต้น (systemic acquired resistance; SAR หรือ induced systemic resistance; ISR) หมายถึง ลักษณะการต้านทานจะเกิดขึ้นเมื่อพืชถูกกระตุ้นจากสารกระตุ้นที่เหมาะสม ณ จุดใดจุดหนึ่งแล้ว ความต้านทานดังกล่าวยังสามารถแสดงได้ในทุกส่วนของพืชทั่วทั้งต้นพืชในลักษณะของการส่งสัญญาณถึงกันที่เรียกว่า “signal transduction”

2.4.2.1 กลไก systemic acquired resistance (SAR)

เป็นลักษณะของความต้านทานแบบ SAR ที่ชักนำให้พืชเกิดความต้านทานทั่วต้นไม่เฉพาะแต่บริเวณจุดติดเชื้อเท่านั้น สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคหลายชนิด (broad spectrum) ดังนั้นเมื่อพืชเกิดแผลตาย (necrosis lesions) เฉพาะที่ (localization) จะเกิด hypersensitive response (HR) เนื่องจากมี receptor จากพืชรับรู้ถึงการบุกรุก ส่งสัญญาณให้สร้าง reactive oxygen species ได้แก่ super oxide radicals, hydrogen peroxide และ hydroxyl radicle ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระจะแตกตัวร่วมกับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ และต่อสู้กับโมเลกุลของเชื้อที่รุกรานเข้ามา ทำให้มีการตอบสนองโดย HR ในเซลล์ขึ้น นอกจากนี้ reactive oxygen species ยังช่วยในการทำลายแหล่งอาหาร และยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ จากกระบวนการ programmed cell death ที่ยังต้องอาศัยการส่งสัญญาณ (signal transduction) จากสาร nitric oxide (NO) หากภายในเซลล์มี NO และ reactive oxygen species เกิดขึ้น จะกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ต่าง ๆ ในวิธีการสังเคราะห์สารปกป้อง ได้แก่ lignin, phytoalexin, salicylic acid และเอนไซม์ที่ทำลายเชื้อโดยตรง ได้แก่ กลุ่มของ hydrolytic enzyme ทำให้การเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคหลายชนิดลดความรุนแรงลง (Sticher et al., 1997; Hammerschmidt, 1999; นิพนธ์ ทวีชัย, 2553) ในขณะเดียวกันนอกจากพืชจะเกิด programmed cell death แล้วภายในเซลล์และจะส่งสัญญาณโมเลกุลต่าง ๆ ซึ่งเพิ่มการสร้างและส่งสัญญาณของ salicylic acid (SA) ในการกระตุ้นการแสดงออกของ pathogenesis related protein genes (PR genes)

PR-proteins เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีความสำคัญในกระบวนการ SAR ทำให้พืชสามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค ถูกปลดปล่อยออกมาเป็นของเหลวภายในเซลล์พืช และไม่มีคุณสมบัติของการเป็นเอนไซม์ ซึ่งโดยปกติจะไม่พบโปรตีนนี้ในพืชปกติ โปรตีนนี้จะพบเฉพาะบนพืชหลังจากได้รับการเข้าทำลายจากเชื้อโรค เพื่อใช้ในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อโรค พืชจะมีการผลิต PR-proteins ในบริเวณภายในเซลล์พืช ช่องว่างระหว่างเซลล์ และผนังเซลล์พืช PR-proteins ได้รับการจัดจำแนกแล้ว 17 family (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ PR proteins แต่ละชนิดที่สร้างขึ้นหลังถูกกระตุ้นจากเชื้อโรค จุลินทรีย์
ปฏิปักษ์หรือสารเคมี

กลุ่มของ PR protein	ชนิดของ PR proteins	คุณสมบัติ
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	β -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 ₆₉	Endoprotinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III
PR-9	Tobacco“lignin-forming peroxides”	Peroxidase
PR-10	Parsley “PR1”	Ribonuclease-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

โดยหน้าที่หลักของ PR-proteins คือ เป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค เช่น ยับยั้งการสร้างหน่วยขยายพันธุ์และการเจริญเติบโตของเชื้อโรค เช่น β -1,3-glucanase และ chitinases มีประสิทธิภาพย่อยสลาย chitin-supported structure ของผนังเซลล์ของเชื้อรา ขณะที่ lysozymes ย่อยสลาย glucosamine และ muramic acid ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย lipoygenases และ lipid peroxidase เป็นสารตั้งต้นของการผลิต antimicrobial metabolites และ secondary signals molecules เช่น JA ส่วน defensin ทำหน้าที่เป็น antimicrobial activity และกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ethylene และ JA pathway ตัวอย่างเช่น การเข้าทำลายใบยาสูบโดย sporangiospores ของ *Peronospora tabacina* หรือยาสูบที่ปลูกเชื้อโดย TMV ทำให้พืชสามารถปกป้องตนเองได้โดยการสร้าง β -1,3-glucanase ย่อยสลายผนังเซลล์เชื้อรา นอกจากนี้การใช้ indole acetic acid (IAA), ethephone, fusicoccin หรือ elicitors จากเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์อ่อนแอสามารถชักนำให้พืชสร้าง PR-proteins ได้เช่นกัน เช่น การปลูกเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์อ่อนแอ บนถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทาน (Williams82) สามารถชักนำให้พืชสร้าง PR-proteins 4 family ได้แก่ PR-2, PR-4, PR-6 และ PR-10 ต้านทานต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *glycines* สายพันธุ์รุนแรง (Athinuwat et al., 2009)

lignin จัดเป็น precursor ของกระบวนการ SAR โดยเริ่มจาก phenyl ammonia lyase (PAL) และ เป็น precursor ของกระบวนการสร้าง lignin, phenolics, isoflavonoid, phytoalexins, coumarins และ salicylic ที่มีความเป็นพิษเพื่อกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน รวมทั้งทำให้ผนังเซลล์พืชมีความหนาและแข็ง ยากแก่การผ่านเข้าสู่พืช (แทงผ่านและย่อยสลาย) ของเชื้อสาเหตุโรค เช่น แดงกวาที่เกิดปฏิกิริยา HR จะเกิดการสะสม lignin ที่ผนังเซลล์ทั่วทั้งต้น ทำให้ผนังเซลล์หนาขึ้นและยากต่อการผ่านเข้าสู่พืชของเชื้อโรค และพืชต้านทานโรค นอกจากนี้การสร้างและสะสม lignin ยังทำให้มีการสะสม PR proteins เช่น glycine-rich glycoproteins และ peroxidase (PO) ที่ผนังเซลล์เพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ PO และ PAL ถูกตรวจพบในใบส้มที่ทำแผลสูงกว่าในชุดควบคุม เป็นการยืนยันว่าเอนไซม์ทั้งสองนี้เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืชใบส้มที่เกิดบาดแผลและติดเชื้อ *Phytophthora parasitica*

phenylalanine ammonia-lyase (PAL genes) ในพืชถูกกระตุ้นให้แสดงออกได้โดยการทำให้เกิดแผล การลดอุณหภูมิ สภาวะเครียดอื่น ๆ หรือการรุกรานของเชื้อโรค PAL มีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันตัวเองของพืชที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสารในกลุ่ม phenylpropanoids ส่วนใหญ่แล้วกิจกรรมของ PAL จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อพืชพันธุ์อ่อนแอถูกรุกรานด้วยเชื้อโรคสายพันธุ์รุนแรง ส่วน PO ในพืชเป็นไกลโคโปรตีนที่มากเกาะแน่นด้วยพันธะโควาเลนต์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต่าง ๆ โดยใช้ H_2O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอน บทบาทของ PO ในกลไก

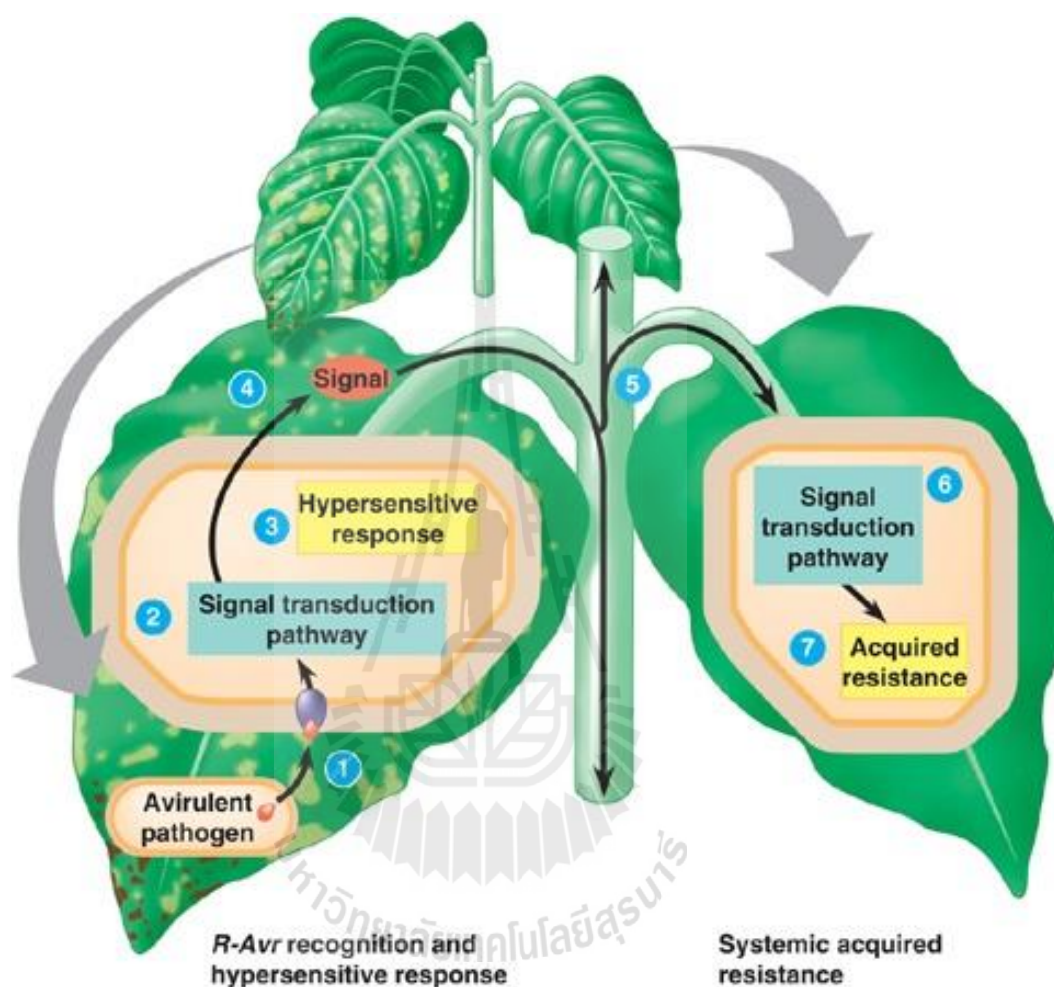
ป้องกันตัวของพืชเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาโพลีเมอไรซ์สารประกอบฟีนอลโดยใช้ hydroxy-cinnamyl alcohols เป็นสารตั้งต้นในการสร้างลิกนินและซูเบอริน (Gómez-Vásquez et al., 2004)

2.4.2.2 กลไก induced systemic resistance (ISR)

จัดเป็นลักษณะความต้านทานโรคแบบทั่วต้นอีกชนิดหนึ่งที่เกิดจากแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ที่บริเวณ รอบ ราก พืช (plant growth promoting rhizobacteria) เช่น *Pseudomonas fluorescens* สามารถผลิต elicitors กระตุ้นให้เซลล์พืชเกิดความต้านทาน โดยไม่ต้องชักนำให้เกิดปฏิกิริยา HR และพืชไม่มีการสร้างสาร peroxide-SA-mobile signal pathway และ PR- proteins แต่การชักนำให้เกิดความต้านทานแบบ ISR โดย PGPR นั้น พืชจะมีการสร้าง jasmonic acid เพื่อกระตุ้นให้พืชสร้าง defensins และ proteinase inhibitors นอกจากนี้ ISR ยังสามารถพบในพืชที่มีความต้านทานต่อแมลงอีกด้วย jasmonic acid (JA) และ methyl ester (MeJA) จัดเป็น signals ในกระบวนการปกป้องตนเองของพืช plant defence responses และเป็นสารที่มีความสำคัญในการควบคุมการปิดเปิดของปากใบ ซึ่งพืชที่มีการเปิดของปากใบช้า สามารถลดอัตราการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ โดยเฉพาะเชื้อโรคที่สามารถเข้าทำลายพืชได้เฉพาะทางปากใบเท่านั้น นอกจากพืชจะผลิต JA และ MeJA ในกระบวนการปกป้องตนเองจากเชื้อโรคแล้ว ในชั้น membrane lipids ของเซลล์พืชยังผลิตสารอื่นร่วมในกระบวนการนี้ด้วย เช่น phytodienoic acid, arachidonic acid และ traumatin กระบวนการ ISR จะเกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งกระตุ้น เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. หรือเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของโปรตีน เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ oxidative enzyme และ สาร phytoalexins เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นเพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2533) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Buensanteai et al. (2009) ที่ได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ PGPR *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 ชักนำถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycine* สาเหตุโรคใบจุดนูน ซึ่งกระตุ้นการสร้าง phytohormones jasmonate และ salicylate พร้อมทั้งเหนี่ยวนำให้เกิดการ SAR และการส่งสัญญาณใน ISR pathways (Vallad and Goodman, 2004 ; Buensanteai et al., 2009)

โดยกลไกในการปกป้องตัวเองเพื่อให้มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคสามารถทำได้โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์หรือการใช้สารเคมีสังเคราะห์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียและสารเคมีสังเคราะห์เหล่านี้สามารถชักนำกระบวนการป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคพืช ด้วยกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์พืช (Prathuangwong et al., 2000) ได้แก่ การเกิด oxidative burst ซึ่งส่งผลให้เกิดการกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการทางชีวเคมีโดยก่อให้เกิดการสะสมของ phenolic compound, phytoalexins และ โปรตีนที่

เกี่ยวข้องกับความต้านทานของพืช (pathogenesis-related protein: PR proteins) เช่น เอนไซม์ Chitinase และเอนไซม์ β -1,3-glucanase (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การส่งสัญญาณของพืชเพื่อป้องกันตนเองต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค

อ้างอิงจาก http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F08_21print.html

ตัวอย่างสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานที่พบในพืช คือ salicylic acid และ phenolic compound

1. **salicylic acid (SA)** จัดเป็น signal transduction pathway ของ SAR และ LAR โดยพืชจะมีการสร้าง SA ในปริมาณมากเพื่อปกป้องตนเองจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค โดยในสภาวะปกติแล้วพืชต้านทานจะมีการสร้าง SA ในระดับที่น้อยกว่าพืชที่ถูกรบกวนจากเชื้อสาเหตุโรค เนื่องจากในพืชมีการแสดงออกของ *nahG* gene ที่ทำหน้าที่ในการผลิต salicylate hydroxylase enzyme

(NahG) เพื่อยับยั้งการสร้าง SA นอกจาก SA จะเป็นสิ่งที่ใช้ในการกระตุ้นความต้านทานพืชแล้ว ยังมีพิษโดยตรงในการฆ่าเซลล์พืชและเชื้อโรคในบริเวณจุดติดเชื้ออีกด้วย ทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการตายอย่างเฉียบพลันในบริเวณดังกล่าว

2. phenolic compound เป็นสาร secondary metabolites ที่พืชสร้างขึ้นหลังถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย เนื่องจากเชื้อโรคไปกระตุ้นให้พืชสร้างสารนี้ขึ้นมาซึ่งสาร phenolic compound มีผลในการยับยั้งการเจริญลุกลามของเชื้อได้ (inhibitors) พืชทั่ว ๆ ไปที่พบว่ามีการสร้าง cork layer หรือ callus ใต้นั้นมักจะมีการสร้าง phenolic compound ด้วยเสมอ ซึ่งถ้าหากมีปริมาณที่เข้มข้นมากพอ สารนี้ก็จะไปยับยั้งเชื้อโรคได้ โดย phenolic compound ทำหน้าที่ในการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของเชื้อโรคที่ใช้ในการย่อยสลายผนังเซลล์พืชและฆ่าเชื้อโรค ในพืชพันธุ์ต้านทานจะมีปริมาณการสร้าง phenolic compound สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ เช่น ในพืชปาล์มน้ำมันสามารถผลิต phenolic compound (cell wall-bound hydroxybenzoic acid และ sinapic acid) เพิ่มขึ้นจากพันธุ์อ่อนแอ 11-12 เท่า เพื่อปกป้องตนเองจากการเข้าทำลายของ *Fusarium* sp. และพันธุ์พืชที่มีความต้านทานต่อ higher parasitic plant (*Orobancha aegyptiaca*) จะมีประสิทธิภาพในการผลิต phenolic compound, peroxidase และ lignin ได้ในปริมาณที่สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ ตัวอย่าง phenolic compound เช่น chlorogenic acid, tannic acid, coumarin, caffeine และ scopoletin นอกจากนี้ polyphenol สามารถเกิดปฏิกิริยา oxidation เป็น polyphenoloxidase จะทำให้เพิ่มความเป็นพิษให้สูงมากยิ่งขึ้นกว่า polyphenol เช่น การ oxidize สาร phenolic compound ทำให้ได้สารที่เรียกว่า quinones จะมีความเป็นพิษต่อเชื้อโรคสูงกว่า phenolic compound

2.5 ตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดความต้านทาน (Elicitors)

การกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานจะต้องอาศัยตัวกระตุ้น (inducer) โดยตัวกระตุ้นจะทำให้พืชมีการตอบสนองต่อการป้องกันตัวเองหลังจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชหรือสภาพความเครียดต่าง ๆ โดยอีลิซิเตอร์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ อีลิซิเตอร์จากอีลิซิเตอร์จากสิ่งที่มีชีวิต (biotic elicitors) กับสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic elicitors) ได้แก่ ส่วนประกอบของเชื้อก่อโรค (coat protein จากไวรัส, glucan และ chitin จากเชื้อรา) เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณรอบรากพืช (ที่มีสามารถในการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส) และสารเคมีสังเคราะห์ หรือสารสกัดชีวภาพ โดยตัวกระตุ้นที่มักนำมาใช้กระตุ้นให้พืชมีการตอบสนองต่อการป้องกันตัวเองหลังจากการเกิดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น

1. กรดซาลิไซลิก (salicylic acid : SA) เป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญในการตอบสนองทางสรีรวิทยา (สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์, 2544) สังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน โดยฟีนิลอะลานีนจะเปลี่ยนเป็น trans-cinnamic acid จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น Benzoic acid และเป็นกรดซาลิไซลิกใน

ที่สุด (Davies, 1995) กรดซาลิไซลิกเป็นสารประกอบที่มีอยู่ในธรรมชาติมีฤทธิ์ ในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นนักวิจัยหลายคนจึงได้จัดไว้ในกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Raskin, 1992) และทำหน้าที่เป็นสัญญาณไปกระตุ้นการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่ช่วยในการต้านทานต่อเชื้อโรค (จริงแท้ สิริพานิช, 2549) กระตุ้นการเชื่อมต่อของโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ซึ่งจะทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น (Bradley et al., 1992) ควบคุมการปิด - เปิดของปากใบ การงอกของเมล็ด การดูดซับประจุ การแสดงออกของเพศ และการต้านทานการเข้าทำลายของโรค และยังยับยั้งการสังเคราะห์และการทำงานของเอทิลีน ทำให้ถูกนำมาใช้เพื่อชะลอการสุกของผลไม้ (ศิริชัย กัลยาณรัตน์, 2548) Yildirim et al., 2008 พบว่ากรดซาลิไซลิกมีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืช โดยการฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 1 mM. ให้แก่ถั่วเหลือง ทำให้น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของต้นและราก เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบต่อต้นและปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับการรายงานของ Kling and Meyer, 1983; Singh, 1993; Li and Li, 1995 พบว่ากรดซาลิไซลิกมีผลต่อความยาวราก การแบ่งตัวและการขยายตัวของเซลล์หรือออกฤทธิ์เสริมกับออกซิน โดยการฉีดพ่นในถั่ว พบว่าสามารถเพิ่มคลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และแคโรทีนอยด์ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์แสง ดังนั้นการใช้กรดซาลิไซลิกสามารถชักนำให้พืชมีการเจริญเติบโตสูงขึ้น โดยทำให้พืชมีระบบการป้องกันตัวจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม ด้วยการสร้างสารบางอย่างขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวก่อนที่จะมีการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงช่วยลดความเสียหายของผลผลิตลงได้เมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อ ทำให้การเจริญเติบโตของพืชหรือผลผลิตดีขึ้น (Hirano et al., 2000)

2. plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในสกุล *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* และ *Serratia* เป็นต้น โดย PGPR ส่วนใหญ่จะพบอยู่ใกล้ ๆ บริเวณรากพืช แบคทีเรียเหล่านี้ จะช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช ช่วยให้ผลผลิตของพืชสูงขึ้น (ตารางที่ 2) กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชมีได้ 2 ทางคือ ทางตรง ได้แก่ กระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชโดยตรง ได้แก่ ช่วยย่อยธาตุฟอสฟอรัสในดิน ให้อยู่ในรูปที่เป็นประโยชน์ทำให้พืชสามารถนำไปใช้ได้มากขึ้น สร้างปุ๋ยในโตรเจนให้กับพืช ผลิตสาร phytohormones เช่น auxin, cytokinin, gibberelin เป็นต้น ช่วยลดความเข้มข้นของเอทิลีนในพืช สามารถผลิตซิเดอรอฟออร์ (siderophores) ช่วยนำธาตุเหล็กไปให้พืชใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น และกระบวนการในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและสร้างภูมิคุ้มกัน และทางอ้อม ได้แก่ ช่วยในการควบคุมโรคพืช ทั้งโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคพืชและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่ใช้ในการควบคุมโรคพืช ผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ผลิตสาร antifungal metabolites สามารถจำกัดปริมาณธาตุเหล็กที่เป็น

ประโยชน์ของเชื้อโรคพืช โดยการผลิตซิดเอร์โฟร์ (siderophores) (หนึ่ง เตียอำรุง, 2555) มีการศึกษาการใช้เชื้อ *Pseudomonas aureofaciens* ในการกระตุ้นให้แตงกวาด้านทานต่อเชื้อ *P. aphanidermatum* สาเหตุโรครากเน่า พบว่า *P. aureofaciens* สามารถกระตุ้นให้พืชมีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, PO และ PPO เพิ่มขึ้น (Chen et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Jetiyanon และคณะ (1997) รายงานการใช้เชื้อ *B. pumilus* strain SE49 กระตุ้นให้ถั่วมะแฮะมีการสร้างลิกนิน (lignification) และมีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Kloepper et al. (1980) และ Weller (1983) กล่าวว่า เมล็ดของ chickpea ที่ถูกลดด้วย PGPR สายพันธุ์ *B. subtilis* AF1 และ *P. fluorescent* RBT13 ให้ผลดีในการลดลงของเชื้อ *Fusarium* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยว ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ และเมื่อใช้คลุกกับเมล็ดข้าวสาลีหรือขึ้นมันฝรั่งจะแสดงถึงการครอบครองรากและสามารถตรวจพบที่บริเวณราก วิธีนี้เป็นกรเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชได้ และพบว่าเชื้อ *Serratia plymuthica* สายพันธุ์ RIGC4 สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ *P. ultimum* ซึ่งสามารถชักนำความต้านทานแบบ ISR ในแตงกวาได้ และ Liang et al. (2011) ได้ศึกษาความสามารถของ *B. megaterium* สายพันธุ์ L8 ที่เป็น PGPR ชักนำความต้านทานให้เกิดขึ้นในแตงกวาต่อโรคโคนเน่าคอดิน ที่เกิดจากเชื้อรา *P. aphanidermatum* พบว่าเมื่อใช้ *B. megaterium* สายพันธุ์ L8 ชุบที่รากของแตงกวาที่เป็นโรค สามารถลดการเกิดโรคได้ดีกว่าการไม่ชุบ คือ 83.45% และ 31.68% ตามลำดับ ที่ 28 วัน

ตารางที่ 2 ตัวอย่าง plant growth promoting rhizobacteria: PGPR ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

แบคทีเรีย	แหล่งที่มา	ประสิทธิภาพในการควบคุมโรค/ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ^{1/}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KPS46	ถั่วเหลือง	ถั่วเหลือง: BCA ควบคุมโรคใบจุดนูน โรคแอนแทรคโนส โรคไวรัส SMV และ SCLV โรคเน่าคอดิน โรคเรงตาช; PGPR ข้าวโพด: BCA ควบคุมโรคเหี่ยว โรคลำต้นเน่า โรคใบไหม้แผลเล็ก; PGPR; ISR ทานตะวัน: BCA ควบคุมโรคใบจุดจากเชื้อราต่าง ๆ หน่อข้าว: BCA ควบคุมโรคใบไหม้ ใบจุดจากแบคทีเรียและรา
<i>Bacillus cereus</i> SPt245	ดินป่า	สักร์,กระถินเทพา : โรคเน่าคอดิน; PGPR
<i>Bacillus licheniformis</i> KS217	เมล็ดงา	งา : โรคใบจุดแบคทีเรีย (<i>Pseudomonas</i> และ <i>Xanthomonas</i>)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SP007S	ดินบริเวณราก กะหล่ำดอก	พืชผักตระกูลกะหล่ำ: BCA ควบคุมโรคเน่าและ, เน่าดำ, PGPR ถั่วเหลือง: BCA ควบคุมโรคใบจุดนูน

^{1/} BCA = เชื้อปฏิปักษ์ยับยั้งเชื้อโรคพืช, PGPR = ส่งเสริมการเจริญเติบโตพืชและ ISR = ชักนำภูมิคุ้มกันด้านทานพืช
ที่มา: ดัดแปลงจากสุดฤดี ประเทืองวงศ์; 2551

เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 และ CaSUT008 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากมันสำปะหลัง มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ส่งเสริมให้พืชเจริญเติบโตและแข็งแรง สร้างความต้านทานต่อโรค และสามารถออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ในขบวนการ Induced resistance ซึ่งกลไกเหล่านี้ช่วยลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคพืชได้ (Buensanteai et al., 2012a) พบว่าการใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 และ CaSUT008 สามารถส่งเสริมให้มันสำปะหลังและแตงกวามีการสังเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชชนิด indole-3-acetic acid (IAA) เพิ่มขึ้น ซึ่งฮอร์โมน IAA จะไปส่งเสริมเจริญเติบโตได้ดีขึ้นมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (Buensanteai et al., 2012a) และสามารถกระตุ้นให้มันสำปะหลังมีการแสดงออกของ biochemical composition และโปรตีนหลายชนิดในกระบวนการ defense mechanism ของมันสำปะหลังเพื่อให้ต่อต้านต่อการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* สาเหตุโรคใบไหม้ (Buensanteai et al., 2012b) เช่นเดียวกันกับการให้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ NB111 สามารถกระตุ้นการส่งเสริมการเจริญเติบโตในต้นกล้าแตงกวาในส่วนของความยาวราก และความสูงต้นซึ่งแตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม (Buensanteai et. al., 2014) และยังพบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ D603 สามารถยับยั้งการเกิดโรคราน้ำค้าง สแคบ และราสนิมได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Manjula et. al., 2005 ที่พบว่า *B. subtilis* AF1 สามารถควบคุมโรคราสนิมของถั่วลิสง ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *P. arachidis* โดยมีผลในการยับยั้งการงอกของ uredospore ได้สูงถึง 96.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. amyloliquafaciens* สายพันธุ์ KPS46 เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. amyloliquafaciens* สายพันธุ์ KPS46 สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าและในฝักกะหล่ำดอก ซึ่งเป็นโรคที่มีผลกระทบต่อผลผลิตโดยตรงได้ดีที่สุดเทียบเท่ากับ calcium-boron และ copper oxychloride (วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ และคณะ 2549) และเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. amyloliquafaciens* สายพันธุ์ KPS46 มีความสามารถในการชักนำให้พืชสร้างสาร salicylic acid ในอ้วเหลือง เพิ่มขึ้นในวันแรกและเพิ่มสูงสุดในวันที่ 4 (Buensanteai et. al., 2008) อีกทั้งยังสามารถชักนำระบบ phenylpropanoid pathway ให้พืชสร้างเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการสะสมสารกลุ่มฟีนอลและโปรตีนที่เกี่ยวข้องซึ่งพืชจะใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดฉุนที่ลุกลามเข้าไปภายในต้นอ้วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีแนวโน้มการเป็นตัวกระตุ้นให้อ้วเหลืองต้านทานโรค (ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ และคณะ, 2550)

2.5.1 วิธีการใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์ส่งเสริมการเจริญเติบโตและควบคุมโรคพืช

แบคทีเรียที่มีประโยชน์ในดินล้วนแต่อยู่ในระดับที่ไม่สามารถจะควบคุมโรคพืชได้ จึงจำเป็นต้องเพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์อย่างน้อยที่สุดในช่วงที่ต้องการควบคุมโรคพืช ซึ่งประสบผลสำเร็จได้ ด้วยการใช้วิธีต่าง ๆ (สุทธฤดี ประเทืองวงศ์, 2548) ดังนี้

1. การคลุมเมล็ด วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดที่สุด เหมาะสำหรับการใช้ควบคุมโรคในระบบราก และลำต้นใต้ดิน นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ยังสามารถควบคุมโรคที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และเพิ่มความแข็งแรงของต้นกล้าได้ด้วย
2. การใส่หรือเติมหรือราดลงในดินเป็นวิธีการที่ช่วยให้แบคทีเรียปฏิปักษ์มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อโรคพืชในดินอย่างใกล้ชิดทำให้เชื้อโรคลดลงไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่ปลูก
3. การผสมกับวัสดุปลูก วิธีการนี้จะช่วยให้แบคทีเรียมีโอกาสสัมผัสกับเชื้อโรคและช่วยส่งเสริม การเจริญของพืชได้ เพราะจะอาศัยอยู่ในส่วนของวัสดุปลูก จะช่วยลดปริมาณเชื้อโรค
4. การพ่นบนใบพืชเป็นวิธีการพ่นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ลงบนต้นพืช เพื่อควบคุมโรคที่เกิดกับใบ
5. การใส่ลงบนส่วนขยายพันธุ์และกล้าพืช เป็นวิธีการที่ช่วยให้แบคทีเรียปฏิปักษ์ได้สัมผัสกับส่วนของพืชที่จะใช้ขยายพันธุ์ รวมทั้งกล้าพืชก่อนที่เชื้อโรคจะเข้าทำลายพืช เป็นวิธีที่ได้ผลดี ประหยัดค่าใช้จ่าย และสะดวกต่อการปฏิบัติ การพ่นหรือการใส่เชื้อแบคทีเรียหลังจากพืชเจริญและก่อนที่เชื้อโรคพืชจะเข้าทำลายยังช่วยกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงมากยิ่งขึ้น

2.6 เทคนิคในการศึกษาสารชีวเคมีและองค์ประกอบของธาตุที่มีผลการส่งเสริมการเจริญเติบโตและปกป้องตนเองของพืช

2.6.1 การศึกษาสารชีวเคมีภายในพืช โดยใช้เทคนิค FTIR spectroscope

เทคนิค infrared (IR) spectroscopy และ infrared microspectroscopy เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในศึกษาองค์ประกอบทางเคมี การวิเคราะห์และตรวจสอบเกี่ยวกับ โมเลกุลของสาร และศึกษาโครงสร้างขนาดเล็กของสารชีวโมเลกุล โดยทำการตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างที่มีความถี่ต่าง ๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะ โดยอาศัยหลักการสั่น (vibration) ของโมเลกุล ทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสงแล้ววัดแสงที่ส่งผ่านออกมาแสดงผลเป็นความสัมพันธ์ของความถี่หรือ wave Number กับค่าการส่งผ่านของแสง เรียกว่า IR spectrum ลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะ ทำให้สามารถสร้างเป็น molecular fingerprint ขององค์ประกอบสารชีวเคมีในตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ซึ่งลักษณะสเปกตรัมที่ได้จากตัวอย่างทางด้านชีวภาพจะบ่งบอกถึงลักษณะสารประกอบของสารชีวเคมีภายในเซลล์หรือ

เนื้อเยื่อเช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ฟอสโฟลิปิด (ตารางที่ 3) โดยสามารถแบ่งกลุ่มของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้

1. ช่วง $4000-3100\text{ cm}^{-1}$ ส่วนใหญ่เกิดจากการดูดกลืนแสงของ OH (3400 cm^{-1}) และ NH stretching mode (amide A $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ และ amide B $\sim 3030\text{ cm}^{-1}$)
2. ช่วง $3100-2800\text{ cm}^{-1}$ การดูดกลืนแสงของ C-H stretching vibration ของ CH_3 CH_2 ซึ่งเกิดจากการดูดกลืนแสงของกลุ่มไขมันเป็นส่วนใหญ่
3. ช่วง $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ การดูดกลืนแสงของ amide I และ amide II ของกลุ่มโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถบอกถึง secondary structure ของโปรตีน เช่น alpha-helix, beta-sheet, turn รวมถึงช่วง $1744-1739\text{ cm}^{-1}$ เป็นการดูดกลืนแสงของ C=O จาก ester group ของไขมัน
4. ช่วง $1300-1500\text{ cm}^{-1}$ การดูดกลืนแสงของ C-H bending vibration ของ CH_3 CH_2 ซึ่งเกิดจากการดูดกลืนแสงของกลุ่มไขมัน รวมไปถึง stretching vibration COO^- จาก amino acid side chains
5. ช่วง 1230 cm^{-1} เกิดจากการดูดกลืนแสงของ P=O asymmetric stretching vibrations ของ phosphodiester, free phosphate และ monoester phosphate ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการดูดกลืนแสงของ DNA/RNA polysaccharide backbone structures
6. ช่วง $1200-900\text{ cm}^{-1}$ เกิดจากการดูดกลืนแสงของ PO_4^{2-} จาก nucleic acid และ พวง C-O-C C-O-P stretching vibrations ของพวง oligo-polysaccharide

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment
~3307	N-H and O-H stretching vibration : polysaccharides, protein
~2959	CH ₃ asymmetric stretch :mainly lipids
~2927	CH ₂ asymmetric stretch: mainly lipids, with the little contribution from proteins, carbohydrates, nucleic acids
~2876	CH ₃ symmetric stretch: mainly proteins, with the little contribution from lipids, carbohydrates, nucleic acids
~2857	CH ₂ symmetric stretch: mainly lipids, with the little contribution from proteins, carbohydrates, nucleic acids
~1739-1744	ester C=O stretch: lipid, triglycerides
~1700-1600	mainly γ (C=O) associated with protein as the amide I band
~1631	β -sheet protein secondary structure
~1653	α -helix protein secondary structure
~1682	turn
~1541	amide II (protein N-H bend, C-N stretch)
~1452	CH ₂ Bending: lipids
~1391	COO ⁻ symmetric stretch: amino acid side chains, fatty acids
~1236	asymmetric stretching: mainly nucleic acids with the little contribution from phospholipids
~1152	CO-O-C asymmetric stretching: glycogen and nucleic acids
~1080	PO ₂ ⁻ symmetric stretching: nucleic acids and phospholipids

ปัจจุบันเทคนิคนี้สามารถประยุกต์ใช้ในงาน ด้านวิทยาศาสตร์ เช่น พอลิเมอร์ช่วยในการจำแนกชนิดของพอลิเมอร์ ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ และวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เช่น การตรวจสอบโครงสร้างของเนื้อเยื่อ เส้นผม ผิวหนัง กระดูก เนื่องจากเครื่องมือนี้มีค่าใช้จ่ายไม่แพง มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก ใช้ตัวอย่างน้อย และมีความแม่นยำสูง และสามารถวิเคราะห์ได้เกือบทุกชนิด (กาญจนา ธรรมนุ, 2555) โดยในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในด้าน การเกษตร เนื่องจากสามารถตรวจวัดตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย ๆ และสามารถนำมาศึกษาองค์ประกอบของการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่สนใจ โดยสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีของตัวอย่างใบพืช โดยดูลักษณะสเปกตรัมจะให้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันนอล เช่น amide I, amide II, lipid และ carbohydrate ที่เป็นลักษณะ

สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในสารแต่ละชนิด การใช้เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของพืชที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต การสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานในพืช และกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และในปัจจุบัน เริ่มมีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในตรวจสอบความแตกต่างของจุลินทรีย์แต่ละชนิดและยังสามารถใช้เทคนิคนี้มาช่วยในการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากมีความแม่นยำ ไม่ยุ่งยาก และมีค่าใช้จ่ายไม่แพง (ณัฐริญา เปือนสันเทียะและคณะ, 2555)

2.6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในผักกาดเขียวปลี โดยใช้เทคนิค X-ray Fluorescence (XRF)

เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการศึกษาร่องรอยของธาตุที่อยู่ในตัวอย่างพืช โดยอาศัยความต่างของชั้นพลังงานของแต่ละธาตุ (ชั้น K, L, M) ดังนั้นเมื่อเรากระตุ้นอะตอมด้วยการให้พลังงานที่มากกว่า พลังงานยึดเหนี่ยวของอิเล็กตรอนชั้นใน ทำให้เกิดที่ว่าง และเมื่ออิเล็กตรอนในชั้นนอกลงมาแทนที่อะตอมจะปลดปล่อยพลังงานออกมาในรูปของรังสีเอกซ์ เรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวว่าการเรืองรังสีเอกซ์ เราสามารถนำปรากฏการณ์นี้ไปใช้ในการหาชนิดของธาตุที่อยู่ในตัวอย่างที่เราสนใจได้ เรียกเทคนิคนี้ว่า เทคนิคการเรืองรังสีเอกซ์ ซึ่งมีข้อดีคือ การเตรียมตัวอย่างที่ไม่ยุ่งยาก และเป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายคุณสมบัติของตัวอย่าง (non-destructive method) การใช้แสงซินโครตรอนมีความเข้มสูง ทำให้เราสามารถโฟกัสลำรังสีเอกซ์ให้มีขนาดเล็กในระดับไมโครเมตรได้ ซึ่งเหมาะสำหรับการหาองค์ประกอบของธาตุที่บริเวณเล็ก ๆ บนตัวอย่างที่ไม่เป็นเนื้อเดียว นอกจากนั้นยังสามารถศึกษาการกระจายตัวของธาตุต่าง ๆ ได้ เราเรียกเทคนิคนี้ว่า micro X-ray Fluorescence spectroscopy/imaging ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการศึกษากลไกในความต้านทานของพืชได้

Xin et al. (2009) ได้ทำการศึกษาใบผักโขมในเรือนกระจกเพื่อตรวจสอบการกระจายตัวของแร่ธาตุในส่วนต่าง ๆ ของใบ ลำต้นและรากสด โดยการประยุกต์ใช้แสงซินโครตรอนและเทคนิค X-ray Fluorescence พบว่าความเข้มข้นของธาตุในส่วนของรากมีสูงกว่าในใบและลำต้น มีปริมาณธาตุบริเวณโคนรากมีมากที่สุดแล้วลดลงจนถึงปลายราก ในลำต้นปริมาณสารของโพแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก นิกเกิล และสังกะสีจะมีมากบริเวณโคนต้น และในใบส่วนใหญ่จะมีการสะสมของธาตุอยู่มากบริเวณรอบเส้นกลางใบ และส่วนกลางใบ ซึ่งสอดคล้องกับ Saha et al. (2010) ที่ทำการตรวจวัดความแตกต่างของปริมาณความเข้มข้นของธาตุโพแทสเซียม แคลเซียม แมงกานีส เหล็ก คอปเปอร์ และสังกะสี ในการศึกษาการพัฒนาของระดับ somatic embryo ใน *Plantago ovata* (เทียนเกร็ดหอย) โดยใช้เทคนิค X-ray Fluorescence

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การรวบรวมและยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและผกาคัดเขียวปลี

ทำการรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและที่ผ่านการทดสอบสอบโรคและวินิจฉัยเชื้อสาเหตุจากห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวโมเลกุลพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทำการคัดเลือกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ ECC_Cr2, ECC_Cr3, ECC_Cr4, ECC_Cr5, ECC_Cr6, ECC_Cr7, ECC_Cr8, ECC_Cr9 และ ECC_Cr10 มายืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคก่อนทำการทดลองครั้งนี้ โดยนำโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 1×10^8 cfu/ml โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 จากนั้นปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลตเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมคือน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ลงบนผกาคัดเขียวปลีพันธุ์อ่อนแอ MAX018 จากนั้นเก็บตัวอย่างทดสอบในกล่องขึ้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ และทำการประเมินความรุนแรงของโรคหลังปลูกเชื้อทุกวัน เป็นเวลา 4 วัน โดยวัดระดับความรุนแรงของโรคจากระดับ 0 ถึง 4 โดยระดับคะแนน 0 คือไม่ปรากฏอาการ, คะแนน 1 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลน้อยกว่า 25%, คะแนน 2 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 26-50%, คะแนน 3 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 51-75% และคะแนน 4 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลมากกว่า 75% เปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมดของผกาคัดเขียวปลี (วิลาวรรณ์ เชื้อบุญและคณะ, 2549; Paul Vincelli et. al., 2011) เมื่อสังเกตเห็นผกาคัดเขียวปลีแสดงอาการของโรค ทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง จากผกาคัดเขียวปลี (re-isolation) ที่แสดงอาการของโรครุนแรงที่สุด แล้วทำการ cross streak บนอาหาร NA จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (single colony) แล้วนำมาปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่แยกได้ลงบนผกาคัดเขียวปลีชุดใหม่ (re-inoculation) อีกครั้งตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มา streak บนอาหาร nutrient agar (NA) เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อสายพันธุ์บริสุทธิ์ไอโซเลตรุนแรงที่สุด (aggressive strain) เพื่อทำการเก็บเชื้อและศึกษาในขั้นตอนต่อไป (วิลาวรรณ์ เชื้อบุญและคณะ, 2549)

3.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และทดสอบความเข้มข้นของกรดซาลิไซลิก ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุสาเหตุโรคเน่าและ และส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีในระดับห้องปฏิบัติการ

3.2.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและด้วยวิธี paper disc diffusion

รวบรวมเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ตระกูล *Bacillus* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวโมเลกุลพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้แก่ ไอโซเลต CaSUT007, CaSUT008, NB111 และ D603 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์คุณภาพ KPS46 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน (สุดฤดี ประเทืองวงศ์ และสุพจน์ กาเข้ม, 2550) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 petri dish จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรงที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อโรคจากข้อ 3.1 และเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์จำนวน 4 ไอโซเลตดังกล่าว มาเลี้ยงแยกกันแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว nutrient broth (NB) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 ที่มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1×10^8 cfu/ml จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอย (suspension) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรงที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NA ที่หลอมอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียสปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอให้อาหารแข็งตัว (pour plate method) จากนั้นวางกระดาษกรองกรองเบอร์ 1 (paper disc: ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอย (suspension) ของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่อบฆ่าเชื้อแล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบบริเวณใส (clear inhibition zone) รอบแผ่นกระดาษหลังปลูกเชื้อ (สุพจน์, 2545; Onkar Dev Dhingra, 1994) เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณยับยั้งดังสมการข้างล่างเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค (สุพจน์, 2545) เพื่อศึกษาในสภาพเรือนทดลองต่อไป

$$\text{บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)} = \frac{\text{ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด} - \text{ความกว้างของโคโลนี}}{2}$$

3.2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และกรดซาลิไซลิกในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีด้วยวิธี blotter method

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่เตรียมไว้จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ ได้แก่ CaSUT007, CaSUT008, NB111 และ D603 รวมทั้งเตรียมกรดซาลิไซลิก จำนวน 4 ความเข้มข้น ได้แก่ 50, 100, 200 และ 300 ppm เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ด และการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดเขียวปลี วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 เมล็ด โดยการนำเมล็ดผักกาดเขียวปลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% นาน 3 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งครั้งละ 5 นาที จากนั้นคลุกเมล็ดด้วย suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ทั้ง 4 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับเชื้อไอโซเลตคุณภาพ KPS46 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 1×10^8 cfu/ml (Prathuangwong and Kasem, 2004; Prathuangwong et al., 2005) เปรียบเทียบกับกรดซาลิไซลิกทั้ง 4 ความเข้มข้น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นฝังเมล็ดให้แห้ง ก่อนนำไปทดสอบในกระดาษเพาะเมล็ด (blotter method) บันทึกผล โดยวัดอัตราการงอกของเมล็ด ความยาวราก และความสูงของต้น เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่คลุกเมล็ดผักกาดเขียวปลีด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ บันทึกผลหลังงอก 14 วัน จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ 1 ไอโซเลตที่ดีที่สุด และกรดซาลิไซลิกความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโต เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดซาลิไซลิกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (Elicitors) ในระดับเรือนทดลอง

3.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดซาลิไซลิกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดซาลิไซลิกความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพสูงสุดจากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 มาทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโต วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) 6 กรรมวิธี กรรมวิธี 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น เปรียบเทียบกับ positive control ได้แก่ คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และ negative

control ได้แก่ การคลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยนำเมล็ดผักกาดเขียวปลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 95% นาน 3 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งนาน 5 นาที จากนั้นคลุกเมล็ดด้วย สารแขวนลอย (suspension) เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 1×10^8 cfu/ml และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองในข้อ 3.2.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แช่เมล็ดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผึ่งเมล็ดให้แห้ง แล้วนำไปปลูกในกระถางพลาสติกในสภาพเรือนทดลอง ตามกรรมวิธีดังนี้

ตารางที่ 3.1 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้น (elicitors) เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดซาลิไซลิกในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ผักกาดเขียวปลีในระดับเรือนทดลอง

กรรมวิธี	รายละเอียดกรรมวิธี
1	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือก
2	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.2.2
3	คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือก และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.2.2
4	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่เหมาะสมและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการคัดเลือก
5	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์
6	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม)

พ่นสารแขวนลอย (suspension) เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือก และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่ประสิทธิภาพสูงสุดจากการทดลองข้อ 3.2.2 จำนวน 5 ครั้ง ในวันที่ 7, 14, 21, 28 และ 35 วันหลังย้ายปลูก ลงบนดินผักกาดเขียวปลี กระถางละ 100 มิลลิลิตร ทำการเก็บข้อมูลความกว้างทรงพุ่ม ความสูงทรงพุ่มหลังย้ายปลูก 21, 28 และ 35 วัน รวมถึงบันทึกปริมาณของหัวผักกาดเขียวปลีหลังย้ายปลูก 35 วัน ตามสมการดังนี้

ปริมาตรของหัวผักกาดเขียวปลี (ลบ.ซม.) = $0.524 \times (\text{ความกว้างของหัวผัก})^2 \times \text{ความสูงของหัวผัก}$

3.3.2 การศึกษากลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) โดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopy

ทำการวิเคราะห์สารชีวเคมีภายในเซลล์พืชโดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopy โดยนำตัวอย่างผักกาดเขียวปลีในทุกกรรมวิธี (ตารางที่ 3.1) หลังย้ายปลูก 21, 28 และ 35 วัน ไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยโรงแรงนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ด้วยเครื่อง fourier transform infrared spectroscopy: FTIR (tensor 27, bruker optic) ชนิด attenuated total reflectance (ATR) ที่มีระบบตรวจวัดแบบ mercury cadmium telluride (MCT) วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ช่วง 600-4000 cm^{-1} วัดที่ค่า Resolution 6 cm^{-1} จำนวน scan 32 จากนั้นทำการวิเคราะห์หาสารชีวเคมีในเซลล์พืชด้วยโปรแกรม OPUS 7.0 (bruker optic, german) แล้วหาค่าความสัมพัทธ์สารในกระบวนการชีวเคมีของพืช โดยคำนวณผลรวมของทุกหมู่ฟังก์ชันนอลเป็นเปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1-2 กรัม (ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะและคณะ, 2555; อริญา ลาภโคกสูง, 2555; Baseri and Baker, 2011)

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดชาลิไซลิก ในการควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง

3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดชาลิไซลิก ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้น

นำเชื้อสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรงที่ได้จากข้อ 3.1 ที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อโรค และนำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดชาลิไซลิกที่มีประสิทธิภาพสูงสุด จากข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าและ วางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (factors) factor A คือ สิ่งกระตุ้น (มีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดชาลิไซลิก จากการทดลองย่อยที่ 3.2.2) factor B คือ การปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและ (มีจำนวน 2 วิธี คือ การปลูกและไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและ) รวมมี Factor AB ทั้งหมด 10 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธี มี 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ต้น เปรียบเทียบกับ positive control ได้แก่ คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และ negative control ได้แก่ การคลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) ดังนั้นการทดลองนี้จะประกอบด้วยทั้งหมด จำนวน 12 กรรมวิธี ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยนำเมล็ดผักกาดเขียวปลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 95% นาน 3 นาที และล้างออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งนาน 5 นาที จากนั้นคลุก

เมล็ดด้วย suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^8 cfu/ml และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองในข้อ 3.2.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แช่เมล็ดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผึ่งเมล็ดให้แห้ง แล้วนำไปปลูกในกระถางพลาสติกในสภาพเรือนทดลอง

ตารางที่ 3.2 กรรมวิธีในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้นในระดับเรือนทดลอง

กรรมวิธี	รายละเอียดกรรมวิธี
1	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลอง ข้อ 3.2.2 ร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรง
2	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลอง ข้อ 3.2.2 ร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรง
3	คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการคัดเลือก และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.2.2 ร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรง
4	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่เหมาะสมและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย <i>B. subtilis</i> ที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองข้อ 3.2.2 ร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรง
5	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ ไฮดรอกไซด์ ร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรง
6	คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ร่วมกับการปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรง

พ่นสารแขวนลอย (suspension) เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือก และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่ประสิทธิภาพสูงสุดจากการทดลองข้อ 3.2.2 เปรียบเทียบกับสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ จำนวน 5 ครั้ง ในวันที่ 7, 14, 21, 28 และ 35 วันหลังย้ายปลูก จากนั้นปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและลงบนต้นผักกาดเขียวปลีอายุ 35 วันหลังย้ายปลูก (หลังจากฉีดพ่นถึงกระตุ้นครั้งสุดท้าย) โดยพ่นสารแขวนลอย (suspension) เชื้อสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลตรุนแรงที่สุดที่ได้จากข้อ 3.1 ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1×10^8 cfu/ml) ลงบนต้นผักกาดเขียวปลี กระถางละ 20 มิลลิลิตร ทำการประเมินการเกิดโรคเน่าและหลังจากปลูกเชื้อ

แบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* โดยวัดจากระดับความรุนแรงของโรคเป็นคะแนน 0 ถึง 4 โดยที่ระดับคะแนน 0 คือไม่ปรากฏอาการ, คะแนน 1 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลน้อยกว่า 25%, คะแนน 2 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 26-50%, คะแนน 3 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 51-75% และคะแนน 4 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลมากกว่า 75% เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมดของผักกาดเขียวปลี (วิลาวรรณ เชื้อบุญและคณะ, 2549; Paul Vincelli et. al., 2011) แล้วทำการคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และเปอร์เซ็นต์ดัชนีความรุนแรงของโรค ดังสมการนี้

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = (จำนวนต้นผักกาดเขียวปลีที่เป็นโรค/จำนวนต้นผักกาดเขียวปลีทั้งหมด) x 100

เปอร์เซ็นต์ดัชนีความรุนแรงของโรค = $\sum \frac{(\text{จำนวนต้นที่เกิดโรคในระดับคะแนนนั้น} \times \text{ระดับความรุนแรงของอาการ})}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด} \times \text{ระดับคะแนนสูงสุดของการเป็นโรค}} \times 100$

3.4.2 การศึกษากลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดซาลิไซลิกในการควบคุมโรค เน่าและของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง

ทำการประเมินผลการทดลองจากกลไกความต้านทานของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือก และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้นที่ประสิทธิภาพสูงสุดจากการทดลองข้อ 3.2.2 โดยเก็บใบผักกาดเขียวปลีเป็น 2 ชุด คือ 1.) ก่อนและหลังฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* เป็นเวลา 6 วัน เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร salicylic acid (SA) และ phenolic compound 2.) ก่อนและหลังฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ในวันที่ 35 และ 40 หลังย้ายปลูก เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค X-ray Fluorescence (XRF)

3.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic Acid (SA) ภายในผักกาดเขียวปลี

ดัดแปลงวิธีการจาก Raskin et al. (1989) โดยนำตัวอย่างผักกาดเขียวปลีที่เก็บมาในแต่ละกรรมวิธี มาบดให้ละเอียดใน 90% (v/v) methanol ในอัตราส่วน 1 กรัม/2.5 มิลลิลิตร นำมา centrifuge ที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนที่เป็น supernatant ที่สกัดได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม 0.02 M ferric ammonium sulfate ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณสาร salicylic acid ($\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากการเตรียม 1M salicylic acid เพื่อใช้เป็นสารเปรียบเทียบมาตรฐาน คูณสารละลายปริมาตร 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 และ 900 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 0.02 M ferric ammonium sulfate ในแต่ละหลอดให้ครบ 1000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้ววัดค่า absorbance ที่ 530 nm

3.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compound ภายในผักกาดเขียวปลี

นำผักกาดเขียวปลีที่เก็บมาในแต่ละซ้ำของแต่ละกรรมวิธี มาบดให้ละเอียดใน 80% (v/v) ethanol ในอัตรา 3 กรัม/12 มิลลิลิตรทำการ centrifuge ที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนที่เป็น Supernatant ผสมกับสารละลาย 10% folin-ciocalteu reagent และ 7% sodium carbonate (Na_2CO_3) ให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณ total phenolic compound จากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน gallic acid และคำนวณให้อยู่ในหน่วยของ $\mu\text{g GAE/ mg dry mass}$ (Onanong et al., 2011)

3.4.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุในผักกาดเขียวปลีโดยใช้เทคนิค X-ray Fluorescence (XRF)

นำผักกาดเขียวปลีที่เก็บมาในแต่ละซ้ำของทุกกรรมวิธี มาอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบดให้ละเอียดด้วยโกร่งนึ่งมาเชื้อ แล้วนำตัวอย่างที่บดละเอียด 1-2 กรัมต่อเข้าไปอัดเป็นเม็ดด้วยเครื่องอัดไฮดรอลิก ที่ความดันประมาณ 10 มิลลิเมตรปรอท (mmHg) เป็นเวลาประมาณ 2-5 นาที โดยให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 มิลลิเมตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบธาตุในเซลล์พืชโดยใช้เทคนิค synchrotron X - ray Fluorescence (XRF) ณ BL6b: micro - XRF ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ซึ่งมีวงแหวนกักเก็บอิเล็กตรอนมีค่าพลังงาน 1.2 GeV. ค่าพลังงานรังสีเอกซ์อยู่ระหว่าง 2-10 keV (white beam) ขนาดของลำแสงซินโครตรอน ณ ตำแหน่งตัวอย่างเท่ากับ $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ เครื่องตรวจวัดชนิด detector Si(PIN) detector มีความสามารถในการแยกค่าพลังงาน (energy resolution) เท่ากับ 160 eV เวลาสะสมที่ใช้ในการวัด 30 วินาที ทำการวัดจำนวน 3 ครั้งให้ครอบคลุมทั้งตัวอย่าง แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและหาพื้นที่ที่ได้กราฟโดยใช้โปรแกรม PyMca 4.4.1 (ROI Image Tool) (Aftab et. al., 2011; คัดแปลงจากสิริกร อนันเตา, 2550; Stephens and Calder, 2004) แล้วหาค่าความสัมพันธ้องค์ประกอบของธาตุ โดยคำนวณผลรวมของพื้นที่ที่ได้กราฟทุกธาตุเป็นเปอร์เซ็นต์

3.5 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for windows v.14.0 ตามแผนการทดลองโดย เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกรรมวิธีโดยวิธีการของ duncan's multiple range test (DMRT)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*

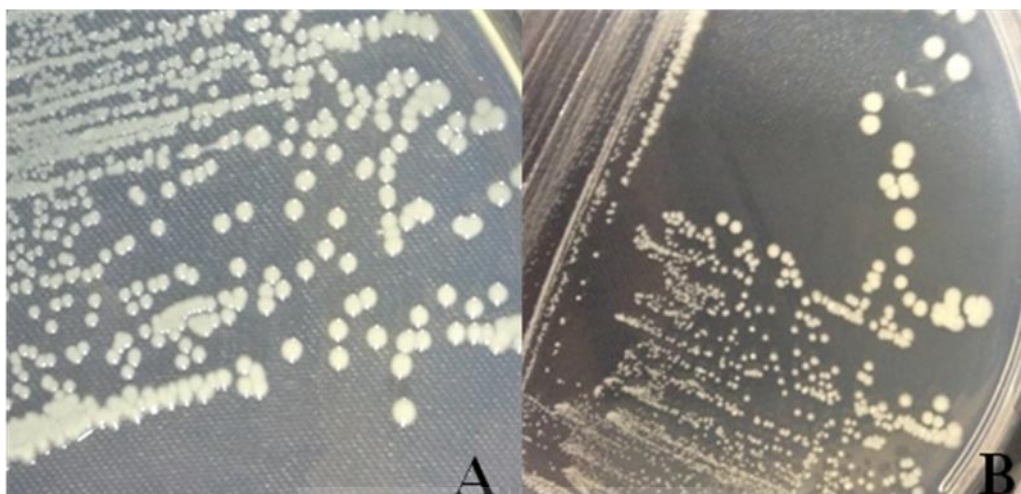
นำเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สาเหตุโรคน้ำและที่ผ่านการทดสอบโรค และวินิจฉัยเชื้อสาเหตุจากห้องปฏิบัติการ โรคพืชและชีวโมเลกุลพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว แยกได้จากผักกาดเขียวปลีที่แสดงอาการโรคน้ำและ ซึ่งเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคมาจากพื้นที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา จำนวน 9 ไอโซเลตซึ่งมีลักษณะของโคโลนีสีขาวขุ่นเป็นเมือกเยิ้ม (ภาพที่ 4.1) มายืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคอีกครั้งก่อนทำการทดลองครั้งนี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถก่อให้เกิดอาการน้ำและบนผักกาดเขียวปลีพันธุ์อ่อนแอ MAX018 ได้ โดยพบอาการน้ำและหลังจากปลูกเชื้อประมาณ 6 ชั่วโมง จากนั้นเกิดเนื้อเยื่อยุบเป็นบริเวณกว้าง และมีสีน้ำตาลอ่อน เริ่มส่งกลิ่นเหม็นฉุน มีเมือกเยิ้มอยู่บริเวณแผล (ภาพที่ 4.2) เมื่อประเมินความรุนแรงของอาการน้ำและที่ปรากฏบนผักกาดเขียวปลี หลังทำการปลูกเชื้อ 1, 2 และ 3 วัน พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตก่อให้เกิดความรุนแรงของลักษณะอาการน้ำและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยไอโซเลต ECC_Cr2 มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด สามารถสังเกตเห็นลักษณะอาการของโรคตั้งแต่วันแรกหลังการปลูกเชื้อ โดยมีคะแนนการเกิดโรคน้ำและสูงสุดคือ 3.85 คะแนน รองลงมาคือ ไอโซเลต ECC_Cr10 มีคะแนนการเกิดโรคน้ำและ 3.68 คะแนน แสดงอาการวันแรกหลังการปลูกเชื้อเช่นกัน ในขณะที่ไอโซเลต ECC_Cr4, ECC_Cr5, ECC_Cr6 และ ECC_Cr8 มีคะแนนการเกิดโรคน้ำและต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ 1.33, 1.31, 1.33 และ 1.32 คะแนนตามลำดับ โดยแสดงอาการของโรคน้ำและในวันที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ (ตารางที่ 4.1) ดังนั้นจากการทดลองจึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 ที่มีความรุนแรงสูงสุดเป็นตัวแทนในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.1 ผลการยืนยันความสามารถในการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สาเหตุโรคน้ำเน่าและทั้ง 9 ไอโซเลต

ไอโซเลต	การเกิดโรคน้ำเน่าและ	
	คะแนนการเกิดโรค ^{2/}	ระยะเวลาที่โรคแสดงอาการหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรค (วัน)
ไอโซเลต ECC_Cr2	3.85a ^{1/}	1
ไอโซเลต ECC_Cr3	3.33c	1
ไอโซเลต ECC_Cr4	1.33e	3
ไอโซเลต ECC_Cr5	1.31e	3
ไอโซเลต ECC_Cr6	1.33e	3
ไอโซเลต ECC_Cr7	2.04d	2
ไอโซเลต ECC_Cr8	1.32e	3
ไอโซเลต ECC_Cr9	2.05d	2
ไอโซเลต ECC_Cr10	3.68b	1
Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	0.36f	-
F-test	**	
CV (%)	27.32	

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

^{2/} ระดับคะแนนการเกิดโรค ระดับคะแนน 0 คือไม่ปรากฏอาการ, คะแนน 1 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลน้อยกว่า 25%, คะแนน 2 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 26-50%, คะแนน 3 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลระหว่าง 51-75% และคะแนน 4 คือพื้นที่ใบที่เป็นแผลมากกว่า 75% เมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. carotovora* pv. *carotovora* สาเหตุโรคน้ำและ A) โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ECC ไอโซเลต ECC_Cr2 และ B) โคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ECC ไอโซเลต ECC_Cr10 บนอาหาร nutrient agar (NA) โดยมีลักษณะของโคโลนีสีขาวขุ่นเป็นเมือกเยิ้ม



ภาพที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย ECC ไอโซเลต ECC_Cr2 บนผักกาดเขียวปลีพันธุ์อ่อนแอ พันธุ์ MAX018 A) ผักกาดเขียวปลีก่อนปลูกเชื้อแบคทีเรีย ECC ไอโซเลต ECC_Cr2 B) ผักกาดเขียวปลีแสดงอาการน้ำเน่า เนื้อเยื่อยุบเป็นบริเวณกว้าง และมีสีน้ำตาลอ่อน จนเริ่มส่งกลิ่นเหม็นฉุน มีเมือกเยิ้มอยู่บริเวณแผล หลังจากปลูกเชื้อแบคทีเรีย ECC ไอโซเลต ECC_Cr2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพ และกรดซาลิไซลิกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและ และส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีในระดับห้องปฏิบัติการ

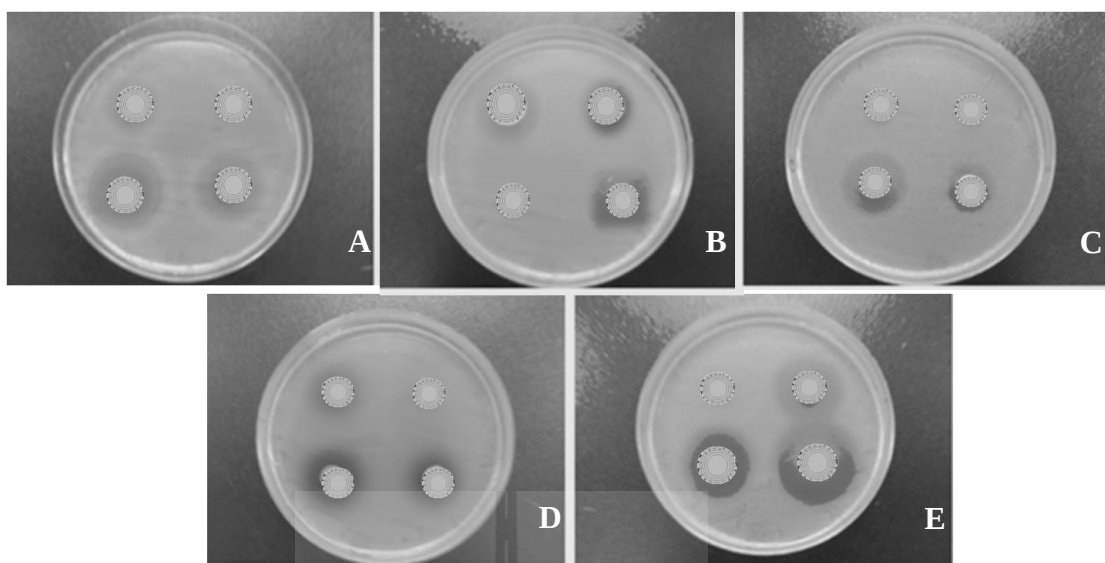
4.2.1 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี paper disc diffusion

ผลของการคัดเลือกระสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ทั้งหมด 4 ไอโซเลต คือ CaSUT007, CaSUT008, NB111 และ D603 เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquafaciens* ไอโซเลตคุณภาพ KPS46 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลตรุนแรง ECC_Cr2 ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่า หลังการบ่มเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ทั้งหมด 4 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 ได้ (ภาพที่ 4.3) โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7.5 ± 0.032 มิลลิเมตร รองลงมาคือเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT008 และ D603 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 7.0 ± 0.058 และ 7.0 ± 0.061 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2.1) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquafaciens* ไอโซเลตคุณภาพ KPS46 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลตรุนแรง ECC_Cr2 โดยมีความกว้างบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 8.0 ± 0.006 มิลลิเมตร ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 ที่มีความกว้างบริเวณยับยั้งเฉลี่ยสูงสุดเป็นตัวแทนในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.2.1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr 2 ด้วยวิธี Paper disc diffusion

แบคทีเรียที่มีประโยชน์ <i>Bacillus</i> sp.	บริเวณยับยั้ง (มม.) ^{1/}
ไอโซเลต CaSUT007	7.5 ± 0.032
ไอโซเลต CaSUT008	7.0 ± 0.058
ไอโซเลต NB111	6.0 ± 0.080
ไอโซเลต D603	7.0 ± 0.061
ไอโซเลต KPS46 (ไอโซเลตเปรียบเทียบ)	8.0 ± 0.006

^{1/} บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) = (ความกว้างบริเวณยับยั้งทั้งหมด-ความกว้างของโคโลนี)/2



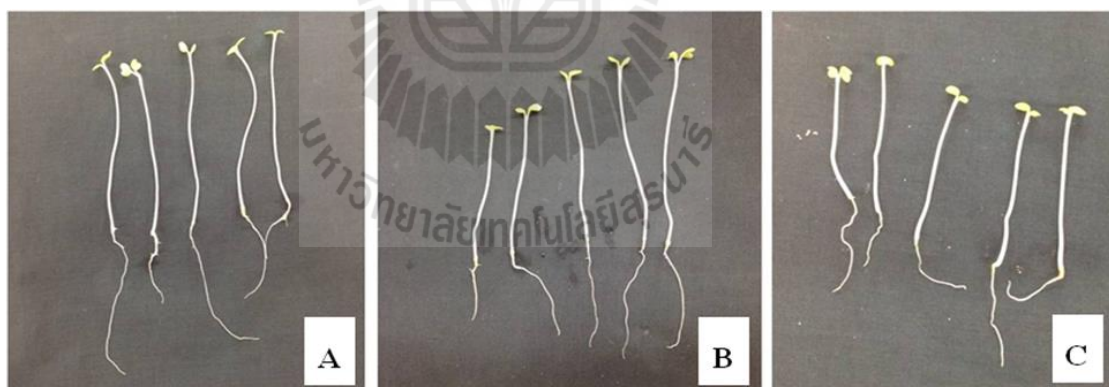
ภาพที่ 4.3 แสดงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย A) ไอโซเลต CaSUT007 B) ไอโซเลต CaSUT008 C) ไอโซเลต NB111 D) ไอโซเลต D603 และ E) ไอโซเลต KPS46 ที่มี
ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora*
ไอโซเลตรุนแรง ECC_Cr2 สาเหตุโรคน้ำและด้วยวิธี paper disc diffusion

4.2.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และกรดซาลิไซลิกในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีด้วยวิธี blotter method

พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ทั้งหมด 4 ไอโซเลต คือ CaSUT007, CaSUT008, NB111 และ D603 มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นผักกาดเขียวปลีได้ ทั้งในลักษณะของการส่งเสริมการงอกของเมล็ด และส่งเสริมการเจริญของระบบรากและลำต้นของต้นกล้าในระดับห้องปฏิบัติการเมื่อทดสอบด้วยวิธี blotter method ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นผักกาดเขียวปลี พบว่าการส่งเสริมการงอกของเมล็ด 100 เปอร์เซ็นต์ ความยาวราก 7.20 เซนติเมตรโดยเฉลี่ย และความสูงของต้นกล้า 10.20 เซนติเมตร เมื่อทำการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อ 14 วันหลังปลูก รองลงมาคือเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT008, KPS46, D603 และ NB111 โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด เท่ากับ 100, 100, 98 และ 96 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีความยาวราก เท่ากับ 6.70, 6.90, 5.80 และ 5.41 เซนติเมตรตามลำดับ และมีความสูงของต้นกล้า เท่ากับ 9.20, 9.50, 8.30 และ 7.61 เซนติเมตรตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ CaSUT007 และ KPS46 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.2.2)

นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบกรดซาลิไซลิกแต่ละความเข้มข้น คือ 50, 100, 200 และ 300 ppm พบว่ากรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้า ผักกาดเขียวปลีได้สม่ำเสมอและดีที่สุด คือ การงอกของเมล็ดเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ความยาวรากเฉลี่ย 7.20 เซนติเมตร และความสูงของต้นกล้าเฉลี่ย 10.11 เซนติเมตรหลังปลูก 14 วัน รองลงมาคือกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 300 ppm มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด 99 เปอร์เซ็นต์ ความยาวราก 6.00 เซนติเมตร และความสูงของต้นกล้า 8.40 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์และน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ โดยมีอัตราการงอกของเมล็ดเฉลี่ย 99 และ 96 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีความยาวรากเฉลี่ย 5.61 และ 4.20 เซนติเมตรตามลำดับ และมีความสูงต้นเฉลี่ย 8.11 และ 8.11 เซนติเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 4.4)

ดังนั้นจากการทดลองเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่มีประสิทธิภาพ และกรดซาลิไซลิกในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี paper disc diffusion และการทดสอบการส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธี blotter method ในขั้นตอนนี้ จึงทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm ที่มีบริเวณยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคและส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้าผักกาดเขียวปลีเฉลี่ยสูงสุด เป็นตัวแทนในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 4.4 แสดงประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของระบบรากและลำต้นของต้นกล้า ผักกาดเขียวปลีหลังปลูก 14 วัน ด้วยวิธี blotter method ในระดับห้องปฏิบัติการ A) เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 B) กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm และ C) การใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 4.2.2 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดซาลิไซลิกในการ
ส่งเสริมความงอกและการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีในระดับห้องปฏิบัติการ

กรรมวิธีการทดลอง	ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลี ระดับห้องปฏิบัติการ ^{1/}		
	การงอก	ความยาวราก	ความสูงต้น
	(%)	(ซม.)	(ซม.)
แบคทีเรียที่มีประโยชน์			
CaSUT007	100a	7.20a	10.20a
CaSUT008	100a	6.7c	9.20d
NB111	96c	5.41g	7.61i
D603	98b	5.80e	8.30f
KPS46 (ไอโซเลตเปรียบเทียบกับ)	100a	6.9b	9.50c
กรดซาลิไซลิก			
ความเข้มข้น 50 ppm	98b	5.41g	8.06h
ความเข้มข้น 100 ppm	98b	6.00d	8.20g
ความเข้มข้น 200 ppm	100a	7.20a	10.11b
ความเข้มข้น 300 ppm	99ab	6.00d	8.40e
กรรมวิธีควบคุม			
คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์	99ab	5.61f	8.11h
กรรมวิธีไม่ใส่ปัจจัยใด ๆ			
น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	96c	4.20h	8.11h
F-test	**	**	**
CV (%)	1.53	15.08	10.22

^{1/} ค่าเฉลี่ย 10 ซ้ำ ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
โดยวิธี DMRT

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดชาลิไซลิกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง

4.3.1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดชาลิไซลิก ในการ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีในระดับเรือนทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 และกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm ที่ผ่านการทดสอบจากข้อ 4.2 มาทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีในระดับเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีที่ 3 ที่มีการคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm หลังย้ายปลูก 35 วัน มีอัตราการเจริญเติบโตประกอบด้วย ความกว้างทรงพุ่มและความสูงทรงพุ่มหลัง เท่ากับ 37.14 และ 20.98 เซนติเมตรตามลำดับ (ภาพที่ 4.5) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเชิงทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 6 ที่คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) ที่มีความกว้างทรงพุ่มและความสูงทรงพุ่ม เท่ากับ 32.07 และ 19.12 เซนติเมตรตามลำดับ อย่างไรก็ตามกรรมวิธีที่ 1 ที่คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธี 2 ที่คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารชาลิไลลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และกรรมวิธีที่ 4 ที่คลุกเมล็ดด้วยกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 มีประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีรองลงมาดังแสดงในตารางที่ 4.3.1 ทั้งนี้กรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์คลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นไม่มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโต (ตารางที่ 4.3.1)

นอกจากนี้เมื่อประเมินลักษณะปริมาตรหัวผักกาดเขียวปลี ซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพของหัวผักกาดเขียวปลี พบว่า กรรมวิธีที่ 3 การคลุกเมล็ดด้วยสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm หลังย้ายปลูก 35 วัน มีปริมาตรของหัวเท่ากับ 115.10 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ซึ่งเป็นปริมาตรที่แสดงถึงความแน่นของหัวและเป็นคุณภาพที่ตรงตามความต้องการของอุตสาหกรรมการผลิตผักกาดบรรจุกระป๋อง) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ 6 ที่มีการคลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ โดยมีปริมาตรของหัวเพียง 81.37 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.5 แสดงประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีหลังย้ายปลูก 35 วัน ในระดับเรือนทดลอง A) คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 B) คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm C) คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm D) คลุกเมล็ดด้วยสารซาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 E) คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และ F) คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 4.6 แสดงประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและคุณภาพของหัวผักกาดเขียวปลีหลังย้ายปลูก 35 วัน ในระดับเรือนทดลอง A) คลุกเมล็ดและนิตพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 B) คลุกเมล็ดและนิตพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm C) คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และนิตพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm D) คลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และนิตพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 E) คลุกเมล็ดและนิตพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และ F) คลุกเมล็ดและนิตพ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งมาเชื้อ

ตารางที่ 4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดซาลิไซลิกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง

กรรมวิธีการ ทดลอง ^{3/}	การเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลี ^{1/}						ปริมาตรของหัว ผักกาดเขียวปลี (ลบ.ซม.) ^{4/}
	21 DAP ^{2/}		28 DAP		35 DAP		
	ความ กว้างทรง	ความ สูงทรง	ความ กว้าง	ความ สูงทรง	ความ กว้างทรง	ความ สูงทรง	
	พุ่ม	พุ่ม	ทรงพุ่ม	พุ่ม	พุ่ม	พุ่ม	
	(ซ.ม.)	(ซ.ม.)	(ซ.ม.)	(ซ.ม.)	(ซ.ม.)	(ซ.ม.)	
กรรมวิธีที่ 1	29.20b	11.50	36.30b	19.80	36.70bc	19.80	102.01bc
กรรมวิธีที่ 2	25.12a	13.25	33.33ab	18.58	32.77a	19.18	94.39b
กรรมวิธีที่ 3	25.85a	13.02	30.49a	18.68	37.14c	20.98	115.10c
กรรมวิธีที่ 4	24.43a	12.97	32.72ab	19.65	31.71a	19.43	96.77b
กรรมวิธีที่ 5	22.91a	11.60	29.34a	17.63	34.68bc	19.74	126.32d
กรรมวิธีที่ 6	23.61a	14.23	30.29a	17.60	32.07a	19.12	81.37a
F-test	*	ns	*	ns	*	ns	**
CV (%)	8.84	8.18	8.01	5.07	6.91	3.46	25.49

^{1/} ค่าเฉลี่ย 10 ซ้ำ ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

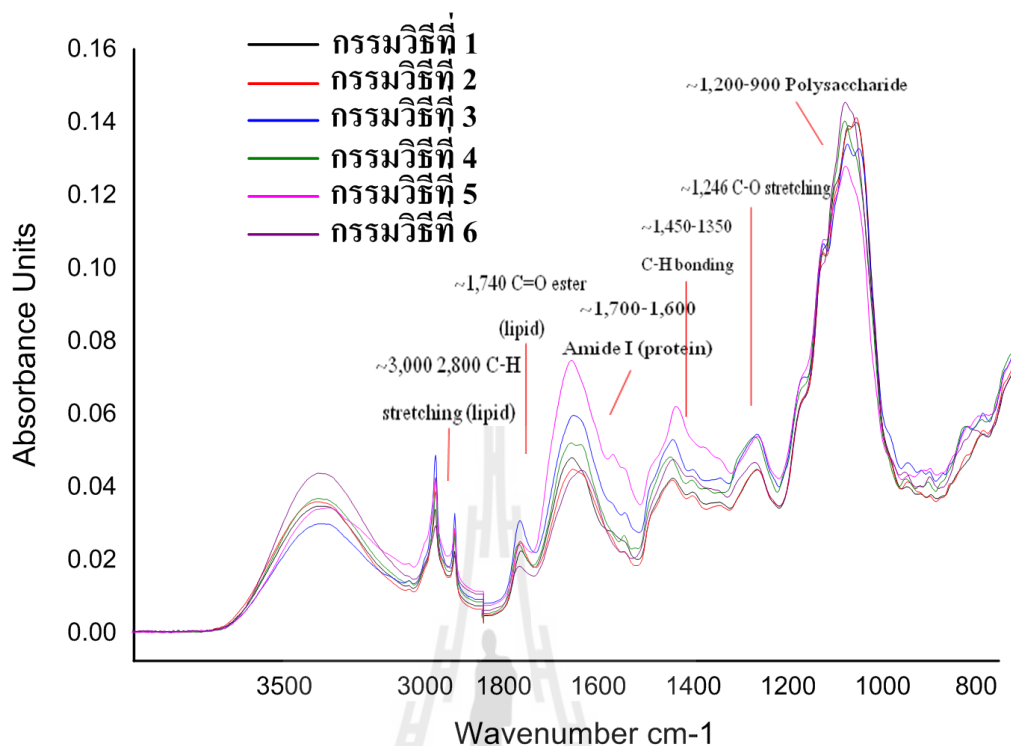
^{2/} 21, 28 และ 35 DAP (day after planting) คือ 21, 28 และ 35 วันหลังย้ายปลูก

^{3/} กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

^{4/} ปริมาตรของหัวผักกาดเขียวปลี (ลูกบาศก์เซนติเมตร) = $0.524 \times (\text{ความกว้างของหัวผัก})^2 \times \text{ความสูงของหัวผัก}$

4.3.2 การศึกษากลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) โดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopy

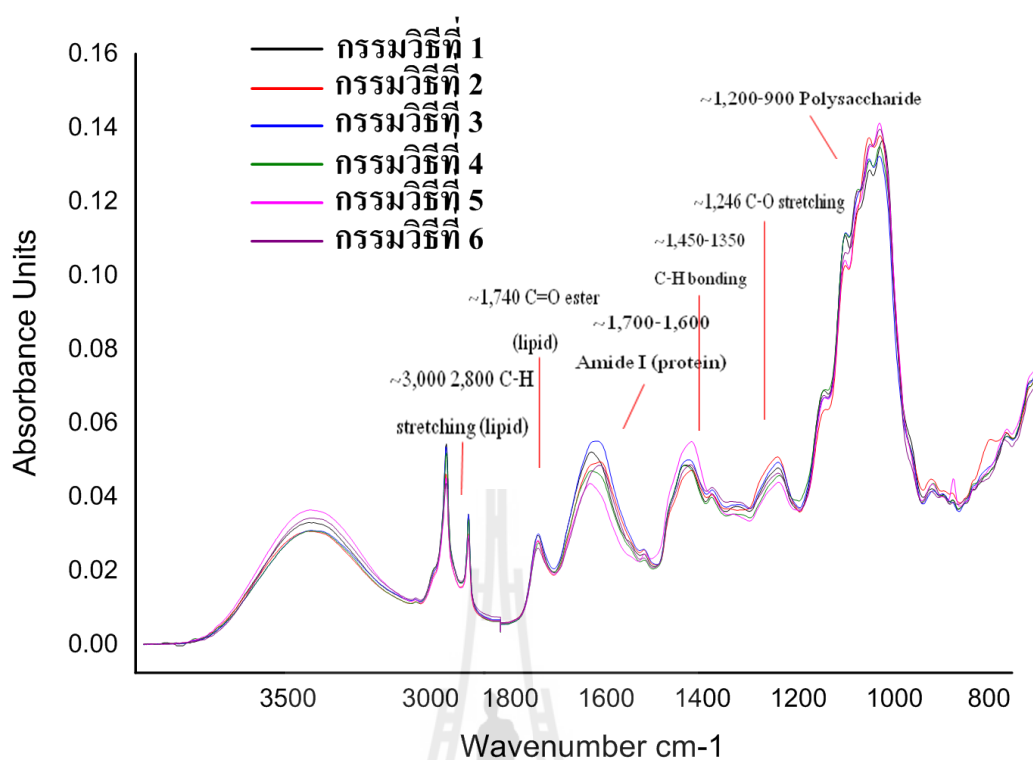
การใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ในการศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของผักกาดเขียวปลีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต เมื่อพิจารณา IR spectrum ของสารประกอบที่พบในผักกาดเขียวปลีในแต่ละกรรมวิธี จากการคัดเลือกกราฟตัวแทนกลุ่มที่ normalizes โดยการทำให้ vector normalizes ในช่วง $3,500-1,000\text{ cm}^{-1}$ และ average เพื่อให้ได้กราฟตัวแทนในแต่ละกลุ่ม แล้ว integrate พื้นที่ใต้กราฟ พบว่าที่ 21 วันหลังย้ายปลูกในกรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีเปอร์เซ็นต์กลุ่มไขมัน C-H stretching ($\sim 3,000-2,800\text{ cm}^{-1}$) สูงสุดคือ 8.460% รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm 7.494% ในขณะที่กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีเปอร์เซ็นต์กลุ่มไขมัน C=O ester ($\sim 1,740\text{ cm}^{-1}$) สูงที่สุดคือ 1.646% รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm 1.392% ขณะที่กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์มีเปอร์เซ็นต์กลุ่ม amide I ($\sim 1,700-1,600\text{ cm}^{-1}$) สูงสุดคือ 19.502% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm 16.056% (ตารางภาคผนวกที่ 4.3.2) และยังพบอีกว่าทุกกรรมวิธีที่มีการ priming ด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีเปอร์เซ็นต์ของกลุ่มคาร์โบไฮเดรต C-H bending, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450-1,350\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1,246\text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1,200-900\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ) ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ) (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ภาพแสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุลในแต่ละกรรมวิธี หลังย้ายปลูก 21 วัน กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วย กรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยสารซาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีด พ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ

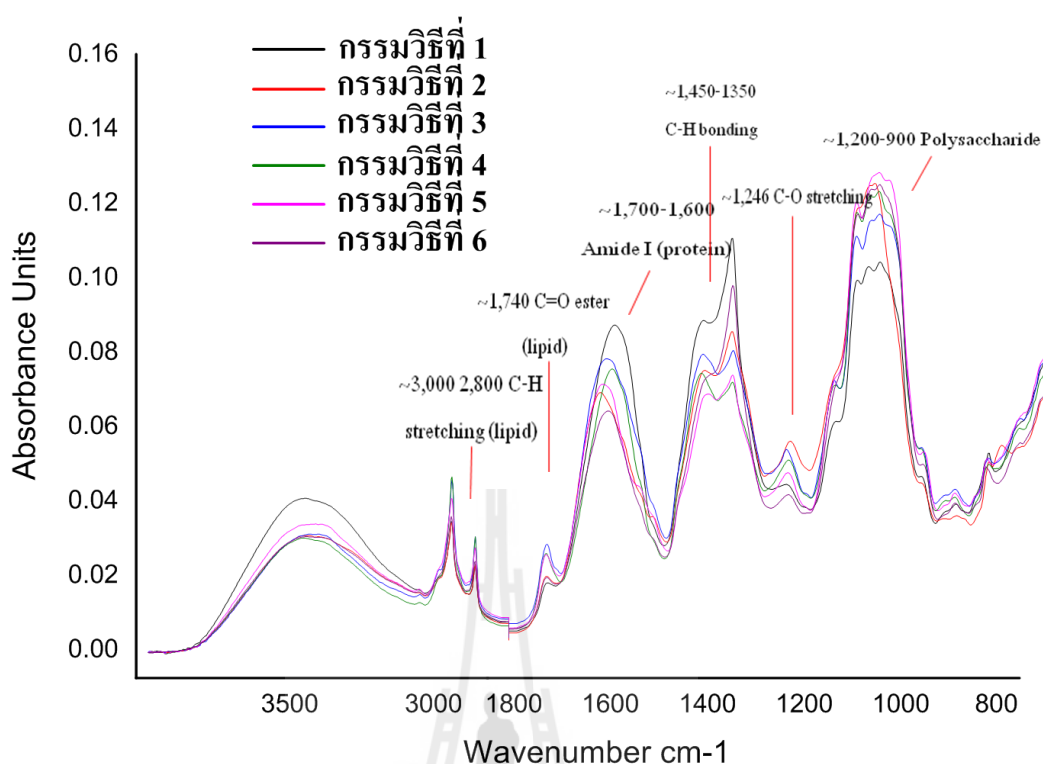
การศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของผักกาดเขียวปลีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต พบว่าที่ 28 วันหลังย้ายปลูกในกรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและนึ่งพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 มีเปอร์เซ็นต์กลุ่มไขมัน C-H stretching ($\sim 3,000-2,800\text{ cm}^{-1}$) สูงสุดคือ 9.339% รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยสารชาลิโซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และนึ่งพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 9.243% ในขณะที่กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและนึ่งพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 มีเปอร์เซ็นต์กลุ่มไขมัน C=O ester ($\sim 1,740\text{ cm}^{-1}$) สูงที่สุดคือ 1.668% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและนึ่งพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ 1.598% ขณะที่กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และนึ่งพ่นด้วยกรดชาลิโซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีเปอร์เซ็นต์กลุ่ม amide I ($\sim 1,700-1,600\text{ cm}^{-1}$) สูงสุดคือ 15.231% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและนึ่งพ่นด้วยกรดชาลิโซลิก ความเข้มข้น 200 ppm 13.986% (ตารางภาคผนวกที่ 4.3.2) และยังพบอีกว่าทุกกรรมวิธีที่มีการ priming ด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และกรดชาลิโซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีเปอร์เซ็นต์ของกลุ่มคาร์โบไฮเดรต C-H bending, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450-1,350\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1,246\text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1,200-900\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ) ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและนึ่งพ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งมาเชื้อ) (ภาพที่ 4.8)





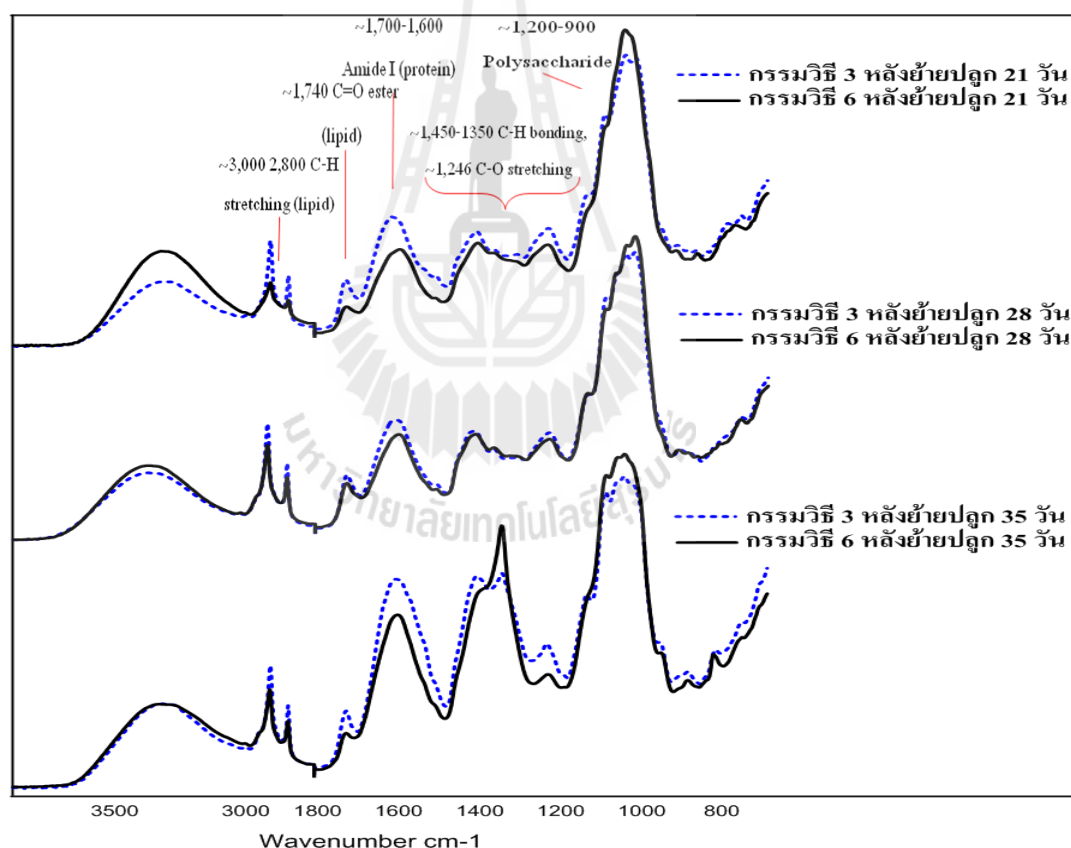
ภาพที่ 4.8 ภาพแสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุลในแต่ละกรรมวิธี หลังย้ายปลูก 28 วัน กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยสารซาลิไซลิกแอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ

และจากการศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของผักกาดเขียวปลีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต พบว่าที่ 35 วันหลังย้ายปลูกในกรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยสารชาลิโซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 มีเปอร์เซ็นต์กลุ่มไขมัน C-H stretching ($\sim 3,000-2,800\text{ cm}^{-1}$) สูงสุดคือ 6.866% รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดชาลิโซลิก ความเข้มข้น 200 ppm 6.754% ในขณะที่กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดชาลิโซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีเปอร์เซ็นต์กลุ่มไขมัน C=O ester ($\sim 1,740\text{ cm}^{-1}$) สูงที่สุดคือ 1.222% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยสารชาลิโซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 1.179% ขณะที่กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 มีเปอร์เซ็นต์กลุ่ม amide I ($\sim 1,700-1,600\text{ cm}^{-1}$) สูงสุดคือ 22.979% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดชาลิโซลิก ความเข้มข้น 200 ppm 19.978% (ตารางภาคผนวกที่ 4.3.2) และยังพบอีกว่าทุกกรรมวิธีที่มีการ priming ด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และกรดชาลิโซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีเปอร์เซ็นต์ของกลุ่มคาร์โบไฮเดรต C-H bending, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450-1,350\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1,246\text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1,200-900\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ) ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ) (ภาพที่ 4.9)



ภาพที่ 4.9 ภาพแสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุลในแต่ละกรรมวิธี หลังย้ายปลูก 35 วัน กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและนึ่งพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและนึ่งพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และนึ่งพ่นด้วย กรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยสารซาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และนึ่งพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและนึ่งพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและนึ่ง พ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ

ดังนั้นจากการศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของผักกาดเขียวปลีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตโดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopy จะเห็นว่าในแต่ละช่วงเวลาของการศึกษา (21, 28 และ 35 วันหลังการย้ายปลูก) จะมีการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของผักกาดเขียวปลีเพิ่มสูงขึ้นในทุกกรรมวิธีที่มีการกระตุ้นการส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วยสิ่งกระตุ้น (elicitors) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ (ภาพที่ 10) โดยเฉพาะในกลุ่มของไขมัน C-H stretching ($\sim 3,000-2,800\text{ cm}^{-1}$) กลุ่มของไขมัน C=O ester ($\sim 1,740\text{ cm}^{-1}$) กลุ่ม amide I ($\sim 1,700-1,600\text{ cm}^{-1}$) แต่จะเห็นว่าในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรต C-H bending, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450-1,350\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1,246\text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1,200-900\text{ cm}^{-1}$ ตามลำดับ) ในกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อสูงกว่าทุกกรรมวิธีที่มีการกระตุ้นการส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วยสิ่งกระตุ้น (elicitors)



ภาพที่ 4.10 ภาพแสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุลในกรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยสารชาลิไซคลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ ในแต่ละช่วงเวลาของการศึกษา (21, 28 และ 35 วันหลังการย้ายปลูก)

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพและกลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดชาลิไซลิก ในการควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ของ ผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง

4.4.1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดชาลิไซลิก ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้นในระดับเรือนทดลอง

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 และกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีในระดับเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีที่ 3 ที่มีคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm จำนวน 5 ครั้งหลังย้ายปลูก (7, 14, 21, 28 และ 35 วัน) สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรค เท่ากับ 47.1 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 4.11) ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 5 ที่มีการควบคุมโรคด้วยการคลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ คือ 44.4 และ 9.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 4 ที่มีการคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ดัชนีความรุนแรงของโรคเท่ากับ 53.3 และ 13.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนำมาเชื้อ พบว่าไม่สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ และมีดัชนีความรุนแรงของโรคสูงถึง 42.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.4.1)



ภาพที่ 4.11 แสดงลักษณะอาการของโรคเน่าและผักกาดเหี่ยวปลีหลังจากถูกกระตุ้นด้วยสิ่งกระตุ้น (elicitors) และหลังปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 เป็นเวลา 5 วัน A) กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm B) กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ C) กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 D) กรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 4.4.1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดชาลิไซลิก ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้นในระดับเรือนทดลอง

กรรมวิธีการทดลอง ^{4/}	การเกิดโรค (%) ^{2/}	ดัชนีความรุนแรงของโรค (%) ^{3/}
กรรมวิธีที่ 1	60.1b ^{1/}	16.0b
กรรมวิธีที่ 2	60.2b	14.5c
กรรมวิธีที่ 3	47.1d	12.5e
กรรมวิธีที่ 4	53.3c	13.5d
กรรมวิธีที่ 5	44.4d	9.5f
กรรมวิธีที่ 6	100.0a	42.0a
F-test	**	**
CV (%)	31.12	61.65

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% $P \leq 0.05$ โดยวิธี DMRT

^{2/} เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = (จำนวนต้นผักกาดเขียวปลีที่เป็นโรค/จำนวนต้นผักกาดเขียวปลีทั้งหมด) x 100

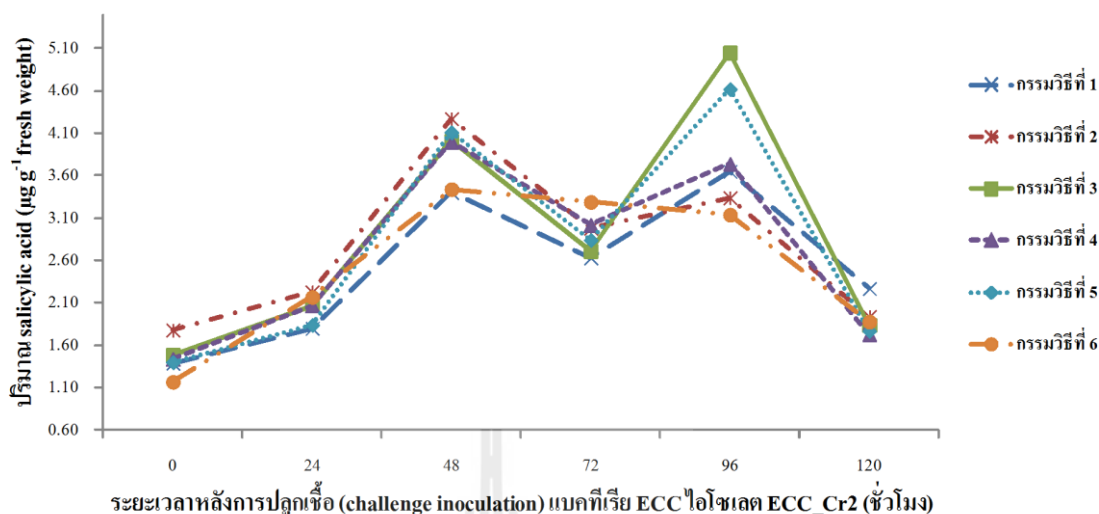
^{3/} เปอร์เซ็นต์ดัชนีความรุนแรงของโรค = $\frac{\sum (\text{จำนวนต้นที่เกิดโรคในระดับคะแนนนั้นๆ} \times \text{ระดับความรุนแรงของอาการ}) \times 100}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด} \times \text{ระดับคะแนนสูงสุดของการเป็นโรค}}$

^{4/} กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารชาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

4.4.2 การศึกษากลไกของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และกรดซาลิไซลิกในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น (elicitors) ในระดับเรือนทดลอง

4.4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid ภายในผักกาดเขียวปลี

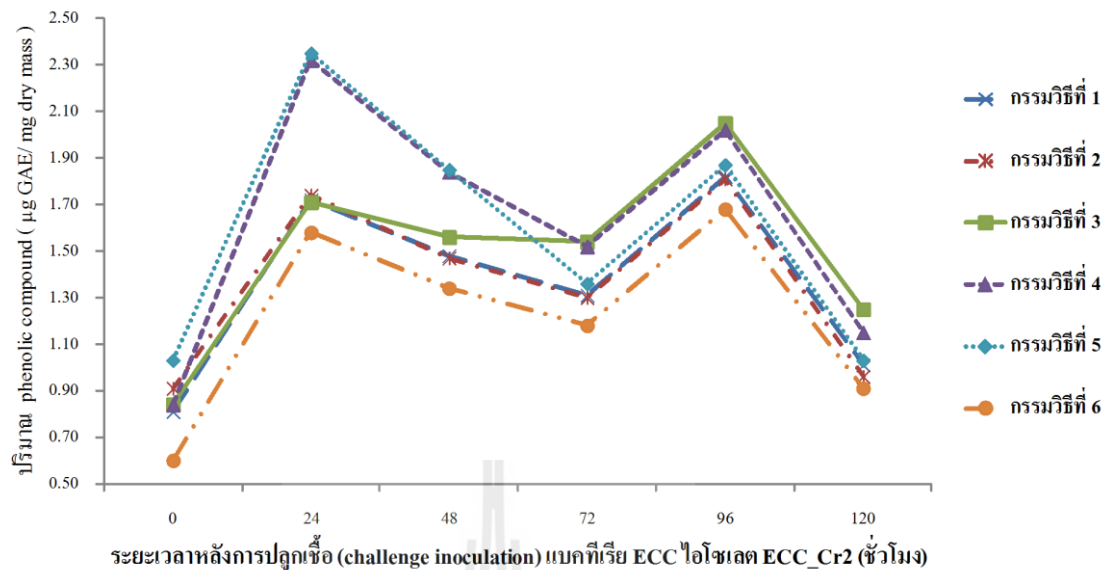
จากการศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นให้ผักกาดเขียวปลีเกิดความต้านทานต่อโรคเน่าและโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ salicylic acid (SA) พบว่าเมื่อชักนำด้วยสิ่งกระตุ้น ได้แก่ คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *โคโนเซต* CaSUT007 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารซาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *โคโนเซต* CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และคลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *โคโนเซต* CaSUT007 มีการสร้างสารซาลิไซลิก แอซิด (แต่สร้างเพียงเล็กน้อย) และเมื่อทำการ challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *ECC* *โคโนเซต* ECC_Cr2 พบว่าสารซาลิไซลิก แอซิด ภายในเซลล์ของผักกาดเขียวปลีมีการเพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง โดยกรรมวิธีที่ 2 ที่คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีปริมาณสารซาลิไซลิก แอซิดเพิ่มได้สูงสุดคือ $4.27 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ นอกจากนี้กรรมวิธีที่ 3 ที่คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *โคโนเซต* CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และกรรมวิธีที่ 4 ที่คลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm ร่วมกับการฉีดพ่นแบคทีเรีย *โคโนเซต* CaSUT007 มีปริมาณสารซาลิไซลิก แอซิด คือ 4.11 4.01 และ $4.00 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 6 ที่คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มีปริมาณสารซาลิไซลิก แอซิดเพียง $3.44 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight อย่างไรก็ตามสารซาลิไซลิก แอซิดมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมงหลังการ challenge inoculation โดยกรรมวิธีที่ 3 ที่คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *โคโนเซต* CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีปริมาณสารซาลิไซลิก แอซิดสูงสุด คือ $5.05 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight ซึ่งไม่แตกต่างจากการกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ซึ่งมีปริมาณสารซาลิไซลิก แอซิด คือ $4.62 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight (ตารางภาคผนวกที่ 4.4.2.1) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 6 ที่ทำการ challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *ECC* *โคโนเซต* ECC_Cr2 ซึ่งมีปริมาณสารซาลิไซลิก แอซิด สะสมอยู่ในต้นผักกาดเขียวปลีเพียง $1.17 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 การสะสมของปริมาณ salicylic acid (SA) ในผักกาดเขียวปลีหลังการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคน้ำและ ไอโซเลต ECC_Cr2 (challenge inoculation) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยสารซาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ

4.4.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compound ภายในผักกาดเขียวปลี

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นให้ผักกาดเขียวปลีเกิดความต้านทานต่อโรคเน่าและโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร phenolic compound พบว่าเมื่อชักนำด้วยสิ่งกระตุ้น ได้แก่ คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *ไอโซเลต CaSUT007* คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารชาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *ไอโซเลต CaSUT007* และฉีดพ่นด้วยกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และคลุกเมล็ดด้วยกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย *ไอโซเลต CaSUT007* มีการสร้างสาร phenolic compound (แต่สร้างเพียงเล็กน้อย) และเมื่อทำการ challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *ECC ไอโซเลต ECC_Cr2* พบว่าสาร phenolic compound ภายในเซลล์ของผักกาดเขียวปลีมีการเพิ่มขึ้นที่ 24 ชั่วโมง โดยกรรมวิธีที่ 5 ที่คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ มีปริมาณสาร phenolic compound เพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 2.35 $\mu\text{g GAE/ mg dry mass}$ ซึ่งไม่แตกต่างกับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่คลุกเมล็ดด้วยกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm ร่วมกับการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย *ไอโซเลต CaSUT007* ที่มีปริมาณสาร phenolic compound คือ 2.32 $\mu\text{g GAE/ mg dry mass}$ อย่างไรก็ตามสาร phenolic compound มีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมงหลังการ challenge inoculation โดยกรรมวิธีที่ 3 ที่คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *ไอโซเลต CaSUT007* ร่วมกับการฉีดพ่นกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm มีปริมาณสาร phenolic compound เพิ่มขึ้นสูงสุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 4 ที่คลุกเมล็ดด้วยกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm ร่วมกับการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย *ไอโซเลต CaSUT007* คือ 2.05 และ 2.02 $\mu\text{g GAE/ mg dry mass}$ ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 4.4.2.2) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 5 ที่ใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์และกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ) โดยมีการสะสมของปริมาณสาร phenolic compound เพียง 1.87 และ 1.68 $\mu\text{g GAE/ mg dry mass}$ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.13)

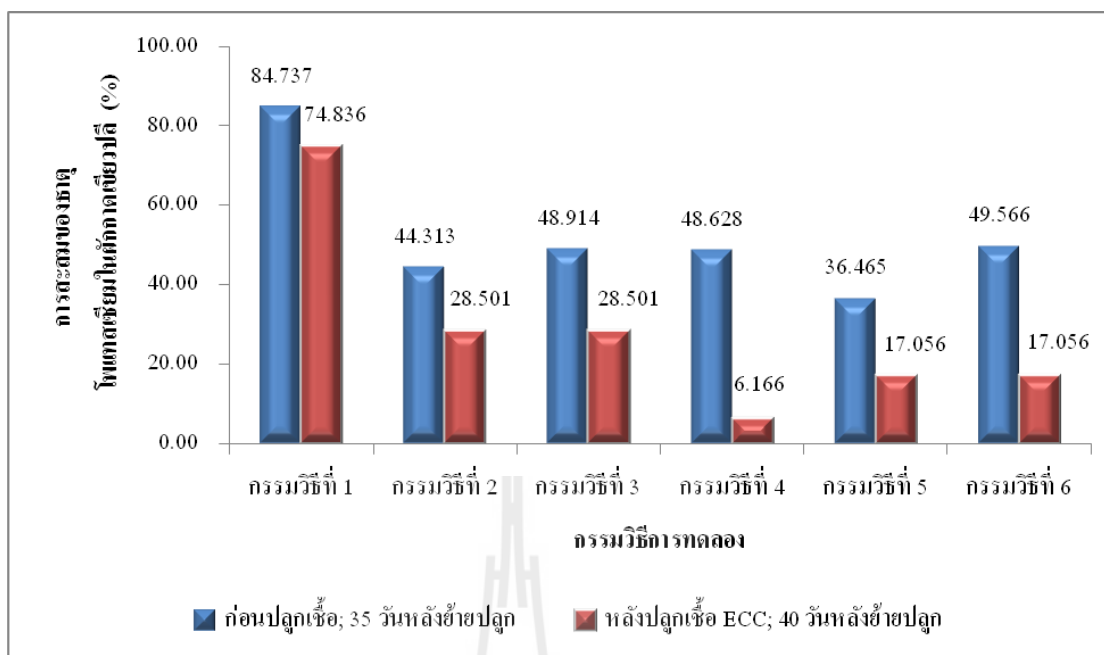


ภาพที่ 4.13 การสะสมของปริมาณ phenolic compound ในผักกาดเขียวปลีหลังการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและ ไอโซเลต ECC_Cr2 (challenge inoculation) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยสารซาลิไซลิกแอซิด ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่น ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

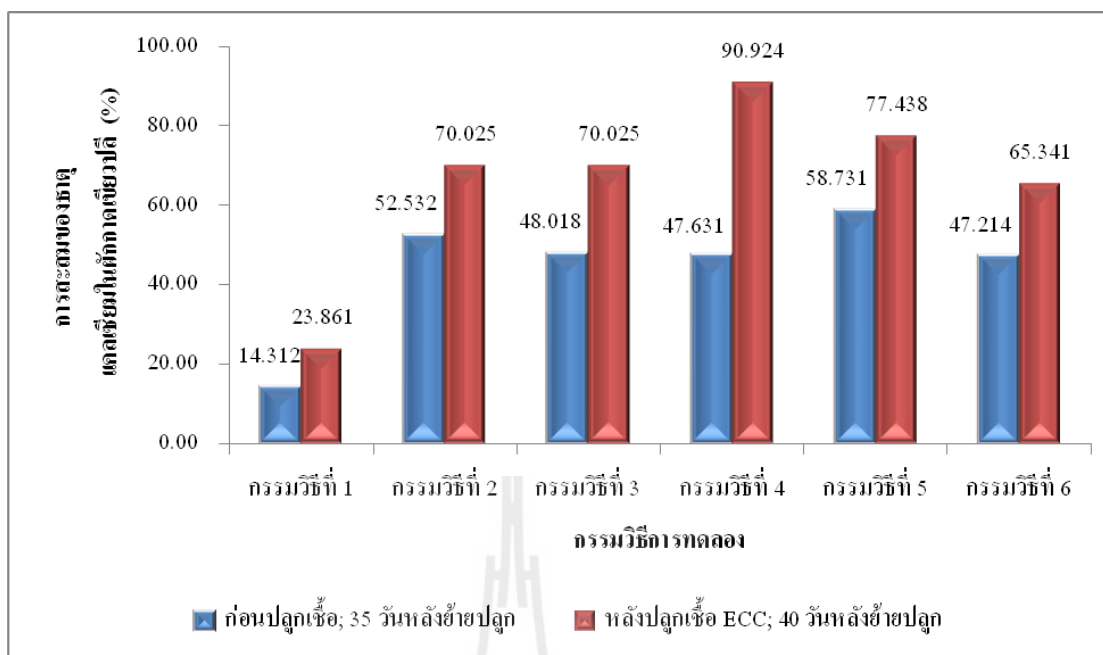
4.4.2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบธาตุภายในเซลล์ผักกาดเขียวปลี โดยใช้เทคนิค

X-ray Fluorescence (XRF)

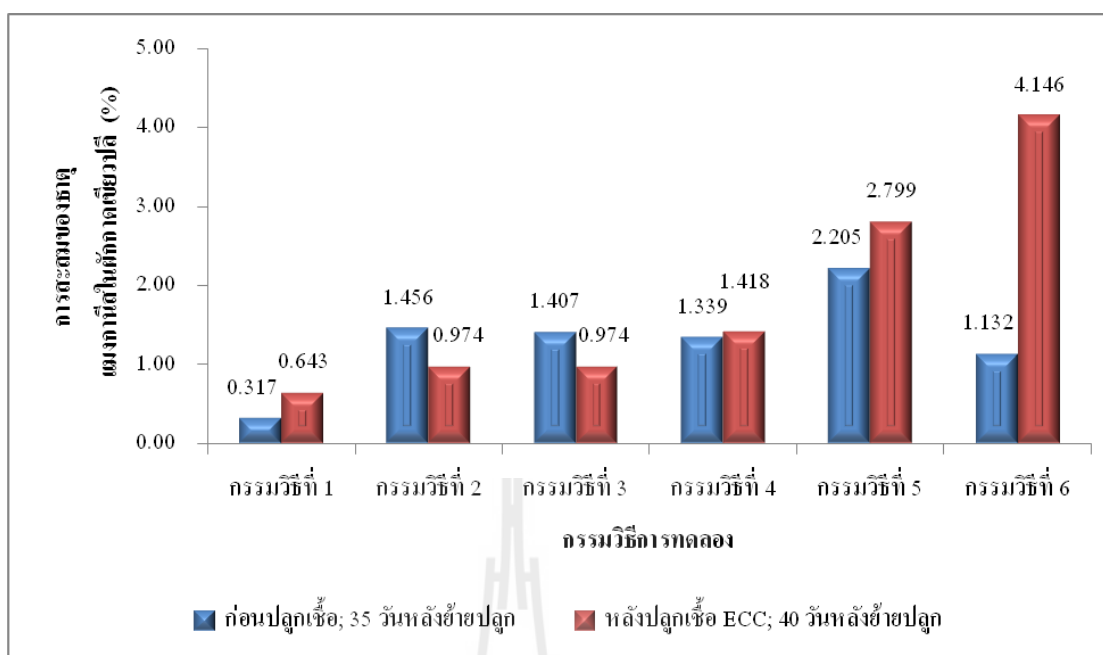
การศึกษการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของธาตุที่สะสมในใบผักกาดเขียวปลี เมื่อถูกปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 สาเหตุโรคเน่าและ โดยใช้เทคนิค X-ray fluorescence (XRF) หรือการเรืองรังสีเอกซ์ พบว่า กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 มีเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุโพแทสเซียม (K) ในผักกาดเขียวปลีก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) สูงสุดคือ 84.737% และหลังจากถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุโพแทสเซียม (K) ในผักกาดเขียวปลีลดต่ำลงทุกกรรมวิธีการทดลอง (ภาพที่ 4.14) ในขณะที่การสะสมของธาตุแคลเซียม (Ca) ในผักกาดเขียวปลีก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) พบว่ากรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์มีเปอร์เซ็นต์สูงสุดคือ 58.731% และเมื่อหลังจากถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุแคลเซียม (Ca) ในผักกาดเขียวปลีเพิ่มสูงขึ้นทุกกรรมวิธีการทดลอง (ภาพที่ 4.15) และกรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์มีเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุแมงกานีส (Mn) ในผักกาดเขียวปลีก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) สูงสุดคือ 2.205% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 200 ppm 1.456% และเมื่อหลังจากถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุแมงกานีส (Mn) ในผักกาดเขียวปลีของทุกกรรมวิธีการทดลองต่ำกว่ากรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 4.16) ในขณะเดียวกันกรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์มีเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุเหล็ก (Fe) ในผักกาดเขียวปลีก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) สูงสุดคือ 2.599% (ตารางภาคผนวกที่ 4.4.2.3) และเมื่อหลังจากถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน) มีเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุเหล็ก (Fe) ในผักกาดเขียวปลีของทุกกรรมวิธีการทดลองต่ำกว่ากรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 4.17)



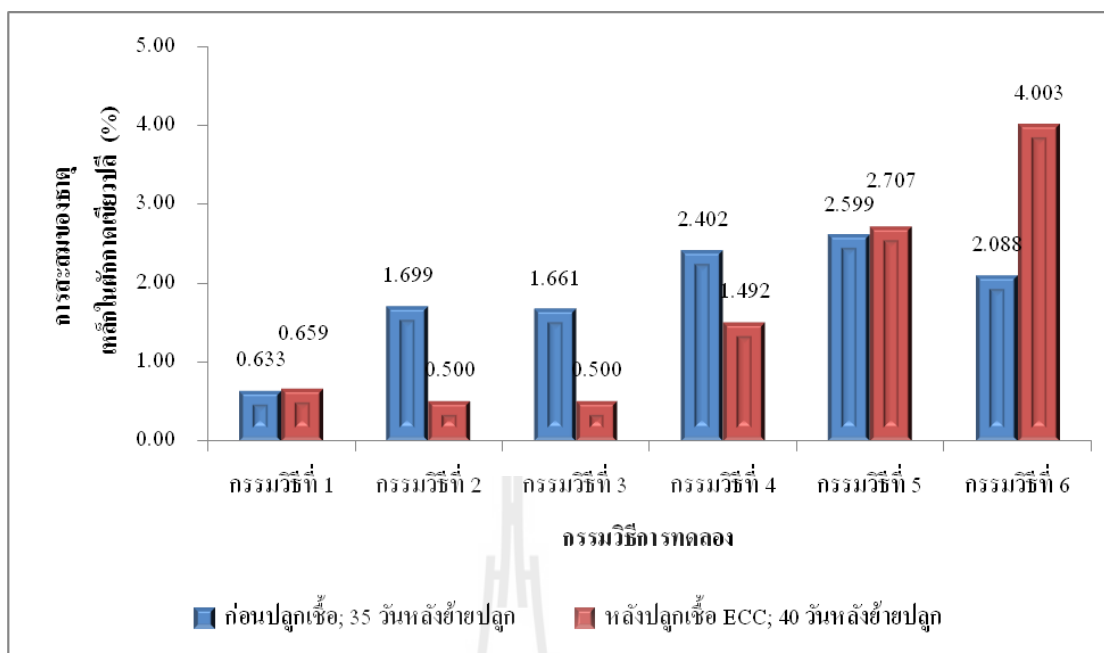
ภาพที่ 4.14 ภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุโพแทสเซียม (K) ในผักกาดเขียวปลีก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อ แบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) และหลังถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน) กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 4.15 ภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุแคลเซียม (Ca) ในผักกาดเขียวปลีก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อ แบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) และหลังถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อ แบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน) กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 4.16 ภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุแมงกานีส (Mn) ในผักกาดเขียวปลีก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อ แบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) และหลังถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน) กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ



ภาพที่ 4.17 ภาพแสดงเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุเหล็ก (Fe) ในผักกาดเขียวปลีก่อนถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อ แบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 35 วัน) และหลังถูก challenge inoculation ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 (หลังย้ายปลูก 40 วัน) กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมโรคเน่าและผกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น (elicitor) โดยทำการการศึกษาประสิทธิภาพและกลไกของสิ่งกระตุ้น 2 ชนิด คือ เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. subtilis* CaSUT007 และกรดซาลิไซลิกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นความต้านทาน พบว่า

1. เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและ ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวโมเลกุลพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จำนวน 9 ไอโซเลตสามารถก่อให้เกิดอาการเน่าและบนผกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 โดยแสดงอาการของโรคครั้งแรกในวันที่ 1 หลังทำการปลูกเชื้อ โดยพบอาการเน่าและสีน้ำตาลอ่อน มีเมือกเข้มนและกลิ่นเหม็นฉุน ที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 3 โดยไอโซเลตที่มีความรุนแรงที่สุด คือ ECC_Cr2 รองลงมาคือ ECC_Cr10 ทั้งนี้จากการทดลองจะเห็นว่า การที่จะทำ artificial inoculation เพื่อให้ผกาดเขียวปลีเกิดโรคเน่าและนั้นจะต้องปรับและควบคุมปัจจัยต่าง ๆ 3 ปัจจัย ได้แก่ เชื้อโรค (pathogen) พืชอาศัย (host plant) และสภาพแวดล้อม (environment) ให้เหมาะสมต่อการเกิดโรคและเกิดขึ้น ณ เวลาเดียวกัน โดยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคต้องใช้เชื้อสายพันธุ์รุนแรง (virulent strain) ที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีปริมาณที่พอเพียงในการทดสอบ มีการใช้พันธุ์พืชที่อ่อนแอและพร้อมจะติดเชื้อง่าย (susceptible host) โดยในการทดลองนี้ ใช้ผกาดเขียวปลี พันธุ์ MAX018 นอกจากนี้สภาพการปลูกเชื้อจะต้องอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ดังนั้นจากการทดลองนี้ ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคเน่าและผกาดเขียวปลี คือ การใช้เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์รุนแรง ECC_Cr2 และใช้ในปริมาณที่เหมาะสม คือ 1×10^8 cfu/ml ปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคลงบนผกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 ในสภาพที่มีความชื้นสูง จึงใช้ข้อมูลดังกล่าวนี้สำหรับการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและต่อไป

ทั้งนี้การที่เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์รุนแรง ECC_Cr2 ก่อให้เกิดอาการเน่าและได้นั้นเนื่องจากเชืดังกล่าวมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในการย่อยผนังเซลล์ เช่น pectinase, cellulase และ chitinase เป็นต้น (Yin et. al., 2010; Narasimhan and Shivakumar, 2012) โดยจะเห็นลักษณะอาการของโรคเป็นจุดน้ำ เกิดการเน่าอย่างรวดเร็วในระยะเวลาเพียง 6-12 ชั่วโมงทำให้เนื้อเยื่อเปื่อยเป็นน้ำเยิ้ม และส่งกลิ่นเหม็นภายในเวลา 2-3 วัน จากนั้นผกาดเขียวปลีจะเน่ายุบหายไปหมดทั้งต้นและหัวหรือแห้งเป็นสีน้ำตาล เกิดความเสียหาย 80-100% ของผลผลิต ทำให้พืช

เกิดกระบวนการหายใจเพิ่มขึ้น และทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงลดต่ำลง ส่งผลให้การเคลื่อนย้ายน้ำ และธาตุอาหารในพืชลดลง

2. จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. จำนวน 4 ไอโซเลตในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี paper disc diffusion ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษากลไกทางตรง (direct mode of action) ของเชื้อ *Bacillus* ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและ โดยนำเชื้อ ทั้ง 4 ไอโซเลต คือ CaSUT007, CaSUT008, NB111 และ D603 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวโมเลกุลพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquifaciens* ไอโซเลตคุณภาพ KPS46 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน เพื่อนำมาใช้เป็นไอโซเลตเปรียบเทียบ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ทุกไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 ได้ โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 7.5 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไอโซเลตคุณภาพ KPS46 ที่มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 8.0 มิลลิเมตร รองลงมาคือเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT008 และ D603 บริเวณยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 7.0 มิลลิเมตร ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับการทดลองของประจวบ บุตรศาสตร์ (2548) ได้ทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย *B. subtilis* จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ NA1, SU1, CH4 และ CH6 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ด้วยวิธี paper disc diffusion พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ CH4 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* ได้ดีที่สุด มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสสูงสุดคือ 9.72 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับวิลาวรรณ เชื้อบุญ (2551) ที่กล่าวว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ SP007s, SP009s, SP121s, SP126s, SP884L และ SP892L มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* pv. *carotovora* สาเหตุโรคเน่าและในกะหล่ำดอก นอกจากนี้ Baker and Cook (1974) รายงานว่ากลไกของการเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีทั้งการแข่งขันทางด้านที่อยู่อาศัย แหล่งอาหาร และมีการผลิตสาร secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ ทั้งนี้ในปี 1988 Weller รายงานว่า *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียหนึ่งที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี โดยมีกลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกันไป และสามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีฤทธิ์ต่อเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (Fiddaman และ Rossal, 1994; McKeen et al., 1986) ดังที่หุฤษฎ์ นัมรักษา (2551) ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันฝรั่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria solani* Sorauer ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับ Peng and Mustafa (2003) ที่รายงานว่าแบคทีเรียที่มีประโยชน์

B. subtilis สร้างสารปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น bacillomycin, iturin, basilysin, fengimysin, mycosubtilin และ mycobacillin รวมทั้งสามารถสร้างเอนไซม์ subtilin และ levansucrase ในการยับยั้งการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* และ *Pythium ultimum* ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 มีบริเวณยับยั้งเฉลี่ยสูงสุด อาจเนื่องมาจากสามารถผลิตสารปฏิชีวนะซึ่งมีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (Fiddaman and Rossal, 1994; McKeen et. al., 1986) ซึ่งสามารถใช้กำหนดเป็นโจทย์วิจัยการศึกษากลไกเชิงลึกสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และการใช้กรดชาลิไซลิก ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง พบว่าในระดับห้องปฏิบัติการ เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นผักกาดเขียวปลีได้ดี ทั้งในลักษณะของการส่งเสริมการงอกของเมล็ด และส่งเสริมการเจริญของระบบรากและลำต้นของต้นกล้าหลังงอก 14 วัน โดยไอโซเลต CaSUT007 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด รองลงมาคือ ไอโซเลต CaSUT008 และพบว่ากรดชาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุดและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. amyloliquifaciens* ไอโซเลตคุณภาพ KPS46

นอกจากนี้ เมื่อทดสอบในระดับเรือนทดลอง พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 และสารชาลิไซลิกมีประสิทธิภาพในกระตุ้นการเจริญเติบโตและแข็งแรงผักกาดเขียวปลีอย่างมีประสิทธิภาพ โดย กรรมวิธีที่ 3 ที่คลุมเมล็ดก่อนปลูกด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นกรดชาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีในส่วนของความกว้างและความสูงทรงพุ่มสูงที่สุด หลังย้ายปลูก 35 วัน แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CaSUT007 มีแนวโน้มสูงที่จะเป็นเชื้อในกลุ่ม plant growth promoting rhizobacteria: PGPR ที่มีคุณสมบัติในการช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้า และช่วยส่งเสริมการงอก (Prathuangwong et al., 2004) ทั้งนี้การใช้เชื้อ PGPR ให้ประสบความสำเร็จได้นั้นจะต้องมีปริมาณสูงมากพอและจะต้องให้เชื้อใกล้ชิดกับเมล็ดพืชให้มากที่สุดรวมทั้งสามารถเจริญบริเวณผิวรากอย่างทั่วถึง (Bowen and Rovira, 1976) โดยเชื้อ PGPR เหล่านี้สามารถช่วยย่อยฟอสฟอรัสภายในดินให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น อีกทั้งยังสามารถผลิตสารพวก phytohormone เช่น auxin (IAA, IBA), cytokinin และ gibberellin เป็นต้น (Trivedi et. al., 2007) จึงส่งผลให้ผักกาดเขียวปลีมีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับวิลาวรรณ เชื้อบุญ (2551) ที่รายงานว่า การคลุมเมล็ดกะหล่ำดอกด้วยสารแขวนลอย (suspension) เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *P. fluorescens* สายพันธุ์ SP007s และ *B. licheniformis* สายพันธุ์ SP009s ก่อนปลูก มีศักยภาพสูงในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดและกระตุ้นการเจริญเติบโตในส่วนของความยาวรากและความสูงต้น หลังงอก

7 และ 21 วัน นอกจากนี้ในปี 2007 Shakirova ได้ทำการศึกษากรดซาลิไซลิกซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชจากภายนอก โดยพบว่าเมื่อนำมาใช้กับข้าวสาลีที่ความเข้มข้น 0.05 mM สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน IAA และ ABA และป้องกันผลกระทบจากความเครียดของข้าวสาลีด้วย อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตกับพืชปลูกแตกต่างกันออกไป เช่น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ KDT140 ส่งเสริมการเจริญเติบโตใน *Bacillus* sp. สายพันธุ์ YP28 เหมาะสมต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตในข้าวโพด เป็นต้น เช่นเดียวกันกับการใช้กรดซาลิไซลิก ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพริกที่ความเข้มข้น 0.2 mM (Rajkumar et. al., 2008) ทั้งนี้การใช้กรดซาลิไซลิกส่งเสริมการเจริญเติบโตต้องใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อพืชปลูกนั้น ๆ เช่น ในมะเขือเทศต้องใช้กรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 100 mM จึงจะมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตสูงสุด (El-Mohamedy et. al., 2014) และนอกจากนี้สำหรับการใช้กรดซาลิไซลิก ในการเจริญเติบโตพืช Javaheri et al. (2012) รายงานว่าการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้นแตกต่างกัน (0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} M) สามารถเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศได้ โดยที่ความเข้มข้น 10^{-6} M สามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงสุด คือ 3,059.50 กรัมต่อต้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศที่ไม่ฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก (ความเข้มข้น 0 M) โดยได้ผลผลิตเพียง 2,220.00 กรัมต่อต้น จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น ชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ CaSUT007 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตผักกาดเขียวปลี ซึ่งสอดคล้องกับ Buensanteai et. al. (2012) รายงานว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 สามารถส่งเสริมให้มันสำปะหลังและแตงกวามีการสังเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนพืชชนิด Indole-3-acetic acid (IAA) เพิ่มขึ้น ซึ่งฮอร์โมน IAA จะไปส่งเสริมเจริญเติบโตได้ดีขึ้นมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับกรดซาลิไซลิก (SA) ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตมีหน้าที่กระตุ้นการทำงานของกรดอะมิโนและโปรตีน รวมถึงกระตุ้นให้เกิดการสร้าง IAA ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชอีกด้วย (จริงแท้ ศิริพานิช, 2549; Bailly, 2004; Raskin, 1992; Bradley et. al., 1992)

4. เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก ในการควบคุมโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีในระดับเรือนทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้ในการควบคุมโรคเน่าและสามารถลดอัตราการเกิดโรคและระดับดัชนีความรุนแรงของโรคได้ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการควบคุมโรค ทั้งนี้กรรมวิธีที่ 3 ซึ่งคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm จำนวน 5 ครั้ง เมื่อผักกาดเขียวปลีอายุ 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน หลังย้ายปลูก จากนั้นทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและ *E. carotovora* pv. *carotovora* สายพันธุ์ ECC_Cr2 ที่ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 1×10^8 cfu/ml เมื่อพืชอายุ 35 วันหลังย้ายปลูก พบว่ากรรมวิธี

ดังกล่าวสามารถลดการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคเน่าและได้มีประสิทธิภาพสูงสุด เท่ากับ 47.1 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ และยังพบว่ากรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าและ จะแปรผกผันกับผลผลิตต่อไร่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์สายพันธุ์ CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก มีความสามารถที่จะใช้เป็น “สิ่งกระตุ้น” (elicitor) ในการชักนำภูมิต้านทาน (induced resistance) ในผักกาดเขียวปลี เนื่องจากให้ประสิทธิภาพสูงเมื่อมีการนำมาใช้ในลักษณะของการคลุกเมล็ดรวมกับการฉีดพ่น สอดคล้องกับรายงานของ วิลาวรรณ เชื้อบุญ และคณะ (2549) ที่พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ไอโซเลต KPS46 สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเน่าและในผักกะหล่ำดอก ซึ่งเป็นโรคที่มีผลกระทบต่อผลผลิตโดยตรงได้ดีที่สุดเทียบเท่ากับ calcium-boron และ copper oxychloride นอกจากนี้จากงานวิจัยของ ศุภลักษณ์ มณีแสง และคณะ (2551) ได้ศึกษาการควบคุมโรคทางใบที่เกิดจากเชื้อราของถั่วฝักยาวด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลต HT-NK-460 และ ไอโซเลต TZ-CP-342 สามารถลดความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora cruenta*, *Uromyces vignae* และ *Oidium* sp. ได้ตั้งแต่ 35.85-65.52% อีกทั้งยังส่งผลให้ปริมาณผลผลิตของถั่วฝักยาวเพิ่มขึ้นอีกด้วย เช่นเดียวกับงานวิจัยของปฐุมพร ปลอดภัย และคณะ (2551) ที่ทำการศึกษาการควบคุม โรคของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici*, *C. capsici* และ *Sclerotium rolfsii* พบว่า การแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต SBK5.7 ผสมกับ ไอโซเลต SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคเท่ากับ 41.90% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้ ไอโซเลตเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ในปี 2014 El-Mohamedy et. al. ทำการศึกษาการควบคุม โรครากเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* และ *S. rolfsii* โดยใช้กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในสภาพเรือนทดลอง พบว่า การจุ่มรากต้นกล้ามะเขือเทศด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 mM และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 25 mM หลังย้ายปลูก สามารถลดการเกิดโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* 16.2%, *R. solani* 15.5% และ *S. rolfsii* 16.2% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม เช่นเดียวกับ Babalar et al. (2007) พบว่า การใช้กรดซาลิไซลิก สามารถลดอาการผลเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea* ในผลสตอเบอร์รี่หลังการเก็บเกี่ยวได้ ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 mmol.L⁻¹ สอดคล้องกับการศึกษาของ Yu et al. (2007) พบว่า กรดซาลิไซลิก มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Penicillium expansum* และเชื้อ *B. cinerea* สาเหตุโรคผลเน่าในผลสาลี่ และจากการศึกษาของ Zaimuri et al. (2001) รายงานว่า เมื่อใช้ salicylic acid ก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวในผลมะม่วงพันธุ์ Kensington Pride ที่ระดับความเข้มข้น 2 mg L⁻¹ สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ ทั้งนี้การใช้ กรดซาลิไซลิก ที่ระดับความเข้มข้น 2 mg L⁻¹ ยังให้ผลเช่นเดียวกับการใช้

ในไม้ตัดดอก geraldton waxflower สายพันธุ์ CWA Pink ที่ประสิทธิภาพในการลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *Alternaria* sp. และ *Epicoccum* sp. (Beasley et al., 1999)

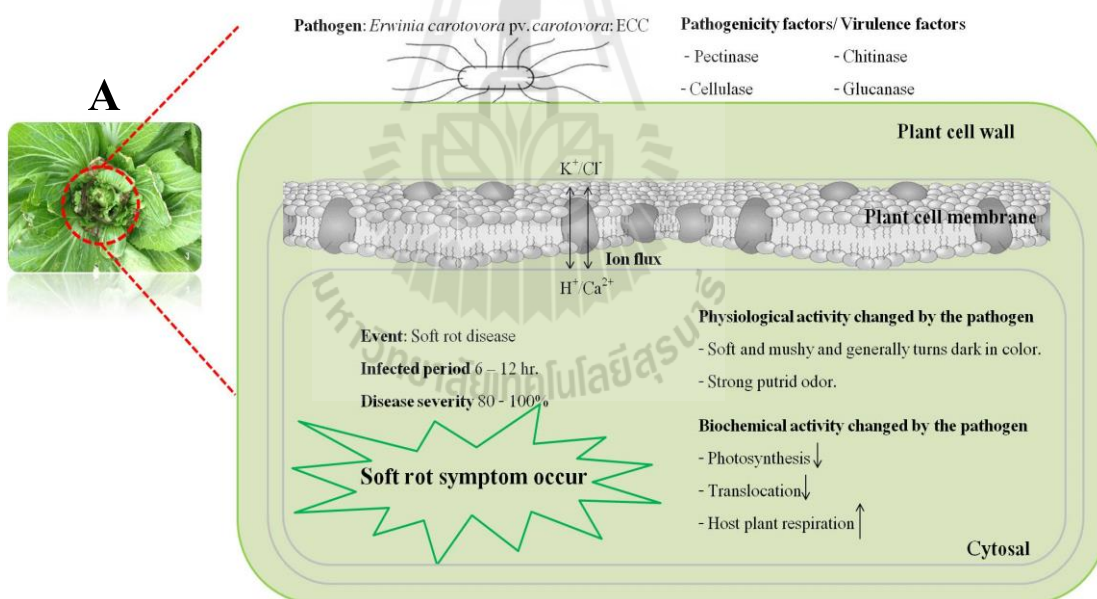
5. การศึกษากลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตและความต้านทานที่เกิดจากการถูกกระตุ้นให้ต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและโดยวิธีการคลุกเมล็ดและฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 2 ชนิดคือ *Bacillus subtilis* CaSUT007 และ กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm ในผักกาดเขียวปลีพันธุ์ MAX018 โดยทดสอบในสภาพเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จัดตั้งทดลองเป็น 2 ชุด โดยชุดแรก คือคลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสิ่งกระตุ้น จำนวน 5 ครั้ง และไม่ทำการทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค พบว่าอัตราการเจริญเติบโตประกอบด้วย ความกว้างทรงพุ่ม ความสูงทรงพุ่มและปริมาตรของหัวภายใต้กรรมวิธีที่ 3 คือ การคลุกเมล็ดด้วย CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิก จำนวน 5 ครั้งมีประสิทธิภาพสูงสุด จากนั้น และเมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวมาศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของผักกาดเขียวปลีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopy พบว่าในแต่ละช่วงเวลาของการศึกษา (21, 28 และ 35 วันหลังการย้ายปลูก) พบกลุ่มไขมันชนิด C-H stretching ($\sim 3,000-2,800\text{ cm}^{-1}$) กลุ่มไขมันชนิด C=O ester ($\sim 1,740\text{ cm}^{-1}$) และกลุ่ม amide I ($\sim 1,700-1,600\text{ cm}^{-1}$) เพิ่มขึ้น แต่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bending, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450-1,350\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1,246\text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1,200-900\text{ cm}^{-1}$) มีปริมาณลดลงเมื่อถูกสิ่งกระตุ้น ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าในเซลล์พืชมีไขมันเชิงประกอบ (compound lipid) คือ ฟอสโฟไลปิด (phospholipid), โกลโคไลปิด (glycolipid) และไลโปโปรตีน (lipoprotein) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่นเดียวกับกับโปรตีน (proteins) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของพืช เนื่องจากมีหน้าที่ในการควบคุมเมแทบอลิซึม เป็นโมเลกุลโครงสร้างและกิจกรรมภายในเซลล์ รวมทั้งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์หรือหน่วยย่อยของเอนไซม์ในเซลล์พืช ส่วนคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญต่อทั้งการทำงานและโครงสร้างของพืช โดยจะพบคาร์โบไฮเดรตในองค์ประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปของเซลลูโลส (cellulose), ไคติน (chitin), ลิกนิน (lignin) และเพกติน (pectin) (ปิยะดา ธีระกุลพิศุทธิ์, 2545) โดยสารชีวโมเลกุลดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณสูงขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก ซึ่งให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืช มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นให้พืชเกิดความแข็งแรงและสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและในผักกาดเขียวปลี เพื่อให้พืชเตรียมความแข็งแรงพร้อมรับมือกับการเข้าทำลายของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค (priming) และสำหรับสิ่งทดลองชุดที่ 2 ทำการคลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสิ่งกระตุ้นเช่นเดียวกับการทดลองชุดที่ 1 และทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าและไอโซเลต ECC_Cr2 เมื่อผักกาดเขียวปลีอายุ 35 วัน

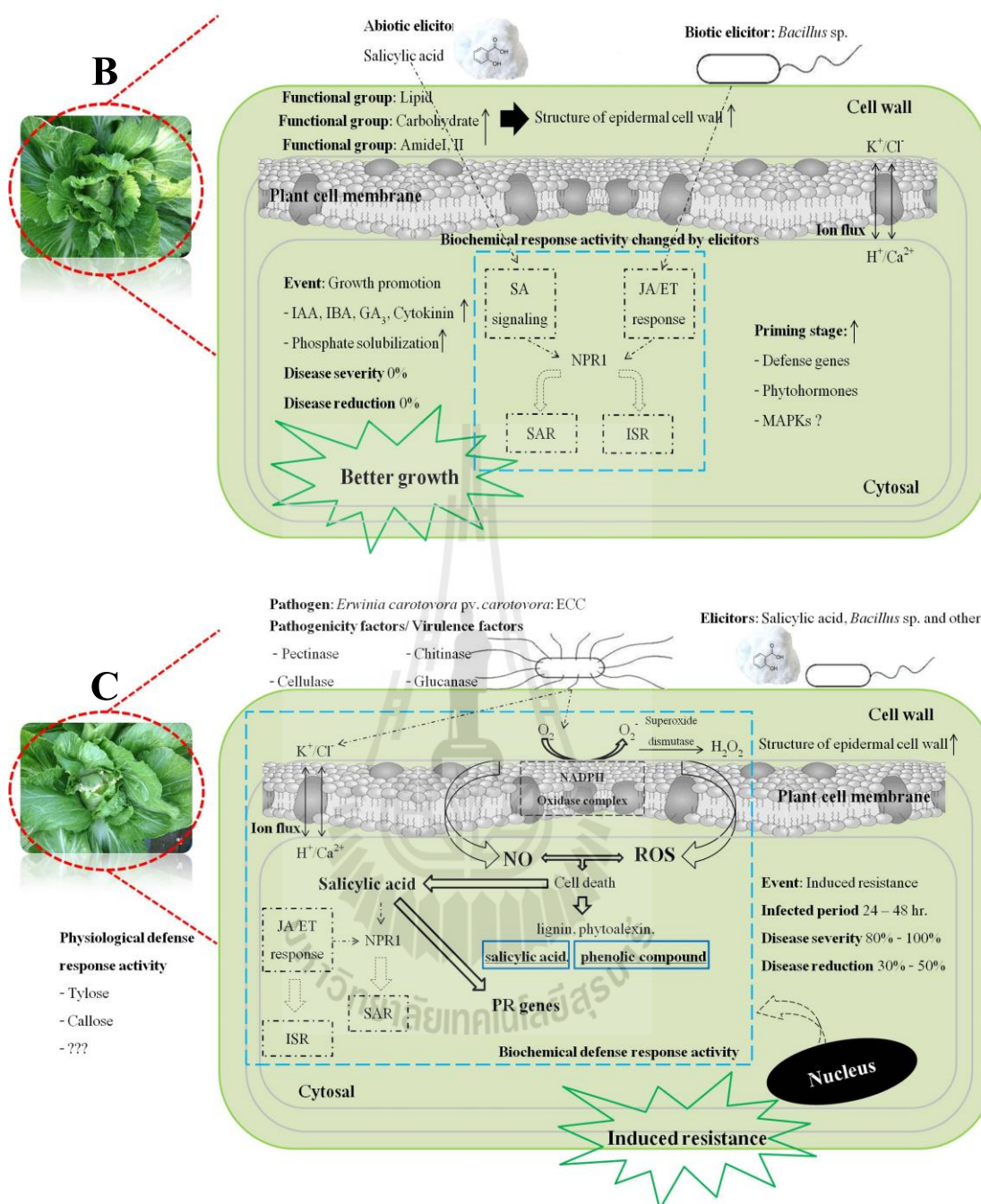
ประเมินการเกิดโรคที่ 5 วันหลังปลูกเชื้อ และเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษากลไกความต้านทาน ประกอบด้วย การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA) และ phenolic compound ด้วยวิธีทางชีวเคมี พื้นฐาน พบว่า กรรมวิธีที่ 3 การคลุกเมล็ดก่อนปลูกด้วยสารแขวนลอยของเชื้อไอโซเลต CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่นกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 200 ppm จำนวน 5 ครั้ง มี สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าและของผักกาดเขียวปลีได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและดัชนีความรุนแรงของโรค เท่ากับ 47.1 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม และเมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวมาวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA) พบว่ามีปริมาณสาร salicylic acid ภายในเซลล์พืชเพิ่มขึ้น ณ เวลา 48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ เท่ากับ $4.27 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ $5.05 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compound พบการเพิ่มขึ้นสองครั้งเช่นกัน คือที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ $2.35 \mu\text{g GAE/ mg dry mass}$ และมีการเพิ่มสูงขึ้นอีกครั้งที่ 96 ชั่วโมงคือ $2.05 \mu\text{g GAE/ mg dry mass}$ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของธาตุด้วยเทคนิค X-ray Fluorescence (XRF) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุโพแทสเซียม (K) ลดลงหลังการปลูกเชื้อ 5 วัน เนื่องจาก K มีหน้าที่ในการปรับสมดุลภายในเซลล์พืชและยังมีหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และยังพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุแคลเซียม (Ca) สูงขึ้น หลังการปลูกเชื้อ 5 วัน เนื่องจาก Ca เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโครงสร้างผนังเซลล์ (Bradley et al., 1992) รวมถึงยังทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณในการควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อตอบสนองต่อสัญญาณจากภายนอกเซลล์พืช ส่วนเปอร์เซ็นต์การสะสมของธาตุแมงกานีส (Mn) และ ธาตุเหล็ก (Fe) ของแต่ละกรรมวิธีการทดลองในผักกาดเขียวปลีไม่สม่ำเสมอ อันเนื่องมาจาก Mn เป็นตัวเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ ทำปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับ ATP และมีหน้าที่สำคัญในปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และ Fe มีหน้าที่สำคัญคือเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่กระตุ้นปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง แล้วยังมีบทบาทในปฏิกิริยาการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์นั่นเอง (ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์, 2545) จึงสรุปได้ว่าเมื่อพืชถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณธาตุภายในเซลล์พืช ซึ่งธาตุเหล่านี้แสดงถึงกลไกการป้องกันตัวเองของพืช รวมถึงการส่งสัญญาณกระตุ้นให้ยีนที่ควบคุมความต้านทานพืชแสดงออก (induced resistance mechanism) กล่าวได้ว่าสิ่งกระตุ้น (elicitors) ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้แก่เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก เมื่อใช้ร่วมกันด้วยวิธีการที่เหมาะสม มีความสามารถในการกระตุ้นให้ผักกาดเขียวปลีสังเคราะห์สาร salicylic acid และ phenolic compound เพิ่มมากขึ้นเพื่อให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค (สัมฤทธิ์ เพื่องจันทร์, 2544; Prathuangwong and Buensanteai, 2007; Buensanteai et al., 2009) ทั้งนี้ Hooft van Huijsduijnen (1986) รายงานว่าการฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกลงบนต้นยาสูบ

ก่อให้เกิดการสังเคราะห์ PR proteins และเกิดความต้านทานต่อเชื้อไวรัสโดยทำให้เกิดแผลตายบนใบยาสูบ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเกิด alfalfa mosaic virus (AIMV) ได้ถึง 90% และพบว่าการใช้ Salicylic acid ชักนำให้เกิดความต้านทานในพืชตระกูลถั่วและสามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 75% - 99% สอดคล้องกับอินชญา ประคองคำ (2554) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสิ่งกระตุ้นชนิดต่าง ๆ ให้อุ่นเกิดความต้านทานต่อโรคสแคบโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสาร salicylic acid หลังฉีดพ่นสิ่งกระตุ้น 7 วัน สิ่งกระตุ้นทุกชนิดสามารถกระตุ้นการสร้างสาร salicylic acid เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่เป็นชุดควบคุม และ Buensanteai et. al. (2008) พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 มีความสามารถในการชักนำให้พืชสร้างสาร salicylic acid ในถั่วเหลือง เพิ่มขึ้นในวันแรกและเพิ่มสูงสุดในวันที่ 4 เช่นกัน ดังนั้นจากการทดลองจึงนี้เป็นการยืนยันว่าสาร salicylic acid ที่สร้างขึ้นในผักกาดเขียวปลีมีความเกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อการป้องกันตัวเองอย่างรวดเร็วของพืช นำไปสู่การเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์พืช (Bradley et al., 1992) และสามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคเน่าและได้ นอกจากนี้จากการพบว่าสาร phenolic compound ที่เพิ่มขึ้นในผักกาดเขียวปลีที่ผ่านการชักนำด้วยสิ่งกระตุ้น มีลักษณะที่สอดคล้องกับรายงานของ ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ และคณะ (2550) พบว่า *B. amyloliquefaciens* สายพันธุ์ KPS46 สามารถชักนำระบบ phenylpropanoid pathway ให้พืชสร้างเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการสะสมสารกลุ่มฟีนอลและโปรตีนที่เกี่ยวข้องซึ่งพืชจะใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดบนที่ลุกลามเข้าไปภายในต้นถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีแนวโน้มการเป็นตัวกระตุ้นให้ถั่วเหลืองต้านทานโรค นอกจากนี้ Ramamoorthy et al. (2002) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescens* สายพันธุ์ Pfl สามารถเหนี่ยวนำให้มะเขือเทศสร้างสาร phenolic compound เพิ่มขึ้น โดยตรวจพบในใบมะเขือเทศที่ผ่านการชักนำให้เกิดความต้านทาน มากกว่ามะเขือเทศปกติ ส่งผลให้มะเขือเทศมีความต้านทานต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* และ ในปี 1982 Hammerschmidt พบว่าเมื่อทำการปลูกเชื้อที่ไม่ใช่สาเหตุโรคพืชในมันฝรั่งพบว่าการสะสมฟีนอลซึ่งเป็นสารกลุ่ม phenol ชนิดหนึ่งได้เร็วกว่ากรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีบทบาทสำคัญโดยเป็นสัญญาณการตอบสนอง (signaling) ของพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) และสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ phytoalexin ของพืช นอกจากนี้ในปี 2010 Dong et al. ตรวจสอบผลกระทบของกรดซาลิไซลิกต่อการสะสมของสาร phenolic compound และ กิจกรรมของเอนไซม์ปกป้องตนเอง PAL ในเซลล์เนื้อเยื่อพืชสมุนไพร (salvia miltiorrhiza cell culture) พบว่าเมื่อใช้ SA จะมีการเพิ่มขึ้นของสาร phenolic compound และ กิจกรรมของเอนไซม์ปกป้องตนเอง PAL หลังจากถูกกระตุ้นเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และ Dihazi (2003) พบว่ากรดซาลิไซลิกมีบทบาทสำคัญในการสร้างความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยสามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานในปาล์มต่อเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp.

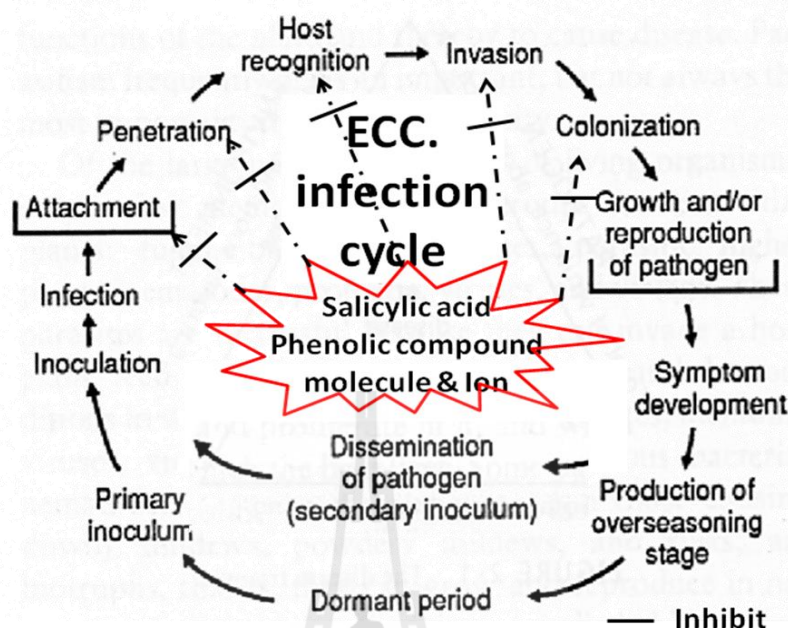
albedinis (FOA) หลังจากการใช้กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 50 M พบว่ามีการสะสมของสาร phenolic compound ในปาล์มพันธุ์ Bousthami และพันธุ์ Jihel เพิ่มขึ้นกว่ากรรมวิธีควบคุม ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้สิ่งกระตุ้นไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 หรือกรดซาลิไซลิกเพียงอย่างเดียว รวมถึงการใช้ควบคู่กัน สามารถชักนำระบบ phenylpropanoid pathway ให้พืชสร้างเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดการสะสมสาร phenolic compound และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งพืชจะใช้กีดกันหรือยับยั้งการเจริญลุกลามของเชื้อโรคที่เข้าไปภายในพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่ง Van Loon and Van Strien (1999) รายงานว่ากลไกปกป้องตัวเอง (plant defense mechanism) ในกระบวนการทางชีวเคมีภายในต้นพืชเหล่านี้เกี่ยวข้องกับ สารประกอบ phenolic, phytoalexin, lignin และโปรตีนชนิดต่าง ๆ เช่น phenylalanine ammonia lyase, peroxidase, polyphenol oxidase และ lipooxygenase ในกระบวนการ phenylpropanoid pathway (Hammerschmidt and Kuc, 1995) ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นแนวทางเบื้องต้นในการศึกษากระบวนการชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อใช้สิ่งกระตุ้นดังกล่าวส่งเสริมการเจริญเติบโตและชักนำความต้านทานโรคในผักกาดเขียวปลีจากการศึกษาทำให้ทราบว่าเมื่อเชื้อสาเหตุโรคเข้าและเข้าทำลายผักกาดเขียวปลี พืชจะเริ่มส่งสัญญาณโมเลกุลจากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และจับกับสารบางอย่างของเชื้อสาเหตุโรค (elicitor) เช่น glycoprotein, fatty acid, carbohydrates และ peptides เป็นต้น จากนั้นจะสร้างสารชีวเคมีและเกิดปฏิกิริยาขึ้น เพื่อหยุดการพัฒนาและทำลายเชื้อโรค เกิดกระบวนการต้านทานของพืช ปฏิกิริยาดังกล่าวได้แก่ 1.) hypersensitive response เกิดการตาย ณ ตำแหน่งของเซลล์ที่เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรค โดยมีการส่งสัญญาณให้สร้าง reactive oxygen species ได้แก่ super oxide radicals, hydrogen peroxide และ hydroxyl radicle ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระจะแตกตัวร่วมกับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ และต่อสู้กับโมเลกุลของเชื้อที่รุกรานเข้ามา ทำให้มีการตอบสนองโดย HR ในเซลล์ขึ้น นอกจากนี้ reactive oxygen species ยังช่วยในการทำลายแหล่งอาหาร และยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ จากกระบวนการ programmed cell death โดยจะพบการสังเคราะห์สารปกป้อง ได้แก่ lignin, phytoalexin, phenolic compound, salicylic acid และเอนไซม์ที่ทำลายเชื้อโดยตรง ได้แก่ กลุ่มของ hydrolytic enzyme 2.) salicylic acid (SA) เป็นสัญญาณโมเลกุลที่เกิดจาก HR เพื่อไปกระตุ้นการแสดงออกของ pathogenesis-related (PR) protein 3.) การสร้าง nitric oxide (NO) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น โดย ROS โดยชี้ให้เห็นว่าปริมาณสาร salicylic acid (SA) มีความสำคัญในกระบวนการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานหลังถูกชักนำด้วยสิ่งกระตุ้น การชักนำความต้านทานให้พืชเกิดความต้านทาน มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทาง metabolism และโครงสร้างภายในของพืช (Benhamou and Belanger, 1998) อย่างไรก็ตามการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานแบบ induced systemic resistance (ISR) เป็นกระบวนการที่เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตบริเวณรอบราก

plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) เช่น *Pseudomonas*, *Bacillus* sp. และ *Trichoderma* sp. กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค ในขณะเดียวกันกระบวนการที่พืชเกิดความต้านทานหลังจากกระตุ้น systemic acquired resistance (SAR) สามารถสร้างและเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในการปกป้องตนเองของพืชได้ดังที่กล่าวมาข้างต้น สารบางชนิด เช่น SA และ JA อาจเกิดการ crosstalk ระหว่าง pathway ของทั้งสองกระบวนการ แต่สารดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้พืชเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานในพืชได้เช่นกัน รวมถึงส่งผลให้มีการสร้างสารพวก tylose และ callose ที่ทำให้ผนังเซลล์เกิดความแข็งแรงขึ้น (Bostock, 2005; Buensanteai et al., 2009) ซึ่งการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคเน่าและ ด้วยสิ่งกระตุ้นนั้นสามารถลดเวลาการเกิดโรคให้ช้าลง (24-48 ชั่วโมง) และยังลดอัตราความรุนแรงของโรคลงได้ 30%-50% (ภาพที่ 5.1) สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเน่าและน้อยลงที่พบในการศึกษารั้งนี้คือ ผักกาดเขียวปลีสร้างสารปกป้องตัวเอง ได้แก่ salicylic acid และ phenolic compound เพื่อยับยั้งขั้นตอนการพัฒนาของการเกิดโรค (ภาพที่ 5.2)





ภาพที่ 5.1 (A) กลไกการเกิดโรคเน่าและ (diseased) ภายในเซลล์ผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* (B) กลไกการเตรียมพร้อม (priming) ภายในเซลล์ผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกส่งเสริมการเจริญเติบโต และเตรียมพร้อมความต้านทานด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก (C) กลไกการชักนำความต้านทาน (induced resistance) ภายในเซลล์ผักกาดเขียวปลีเมื่อถูกชักนำให้เกิดความต้านทานด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิกต่อเชื้อสาเหตุโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *Carotovora*



ภาพที่ 5.2 วงจรการเกิดโรคและและความเป็นไปได้ของสารชีวโมเลกุลที่ผักกาดเขียวปลีสร้างขึ้น
ในกระบวนการ induced resistance มีความสามารถในการยับยั้งขั้นตอนการก่อโรคของ
เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora*

6. จากการทดลองครั้งนี้ จะสังเกตเห็นว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *B. subtilis* CaSUT007 มีกลไกในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชหลากหลายวิธี โดยกลไกที่มีผลในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคทางตรง อาทิ กลไกการทำลายชีวิต (antibiosis) โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม bacillus จะมีคุณสมบัติในการทำลายชีวิตของเชื้อสาเหตุโรคเป็นส่วนใหญ่ โดยสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อสาเหตุโรคได้ เช่น สารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่มดังกล่าว สามารถผลิตสารในกลุ่มไลโปเปปไทด์ เช่น surfactin (Besson et. al., 1978) iturin (Bechard et. al., 1998) และ fengycin (Chan et. al., 2009) โดยสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Curvularia gudauskasii* (Raton et. al., 2011) *Rhizoctonia solani* (Elkahoui et. al., 2012) และ *Colletotrichum gloeosporioides* (Ruangwong et. al., 2012) ส่วนการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคทางอ้อม ทำได้โดยการกระตุ้นให้พืชส่งเสริมการเจริญเติบโตและมีระดับความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้น อาทิ *B. subtilis* สามารถผลิตฮอร์โมน indolyl-3-acetic acid (IAA), abscisic acid (ABA) และ cytokinins ในการส่งเสริมการเจริญของรากและน้ำหนักรวมของผักกาดหอมมากขึ้นกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (Trivedi et. al., 2007) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Trivedi et. al. (2007) *B. subtilis* สามารถผลิตฮอร์โมน indolyl-3-acetic acid (IAA), abscisic acid (ABA) และ cytokinins

ในการส่งเสริมการเจริญของรากและน้ำหนักของผักกาดหอมมากขึ้นกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันกับการใช้กรดซาลิไซลิก (SA) ที่สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้ทางอ้อม โดยสาร SA จะกระตุ้นให้พืชส่งเสริมการเจริญเติบโต และมีระดับความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับ *B. subtilis* อย่างไรก็ตาม SA ยังสามารถทำหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ กระตุ้นการทำงานของกรดอะมิโนและโปรตีน และส่งสัญญาณการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนให้ต้านทานต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น รวมถึงกระตุ้นให้เกิดการสร้าง IAA ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตให้กับพืชอีกด้วย (จริงแท้ ศิริพานิช, 2549; Bailly, 2004; Raskin, 1992; Bradley et. al., 1992) ซึ่งกลไกเหล่านี้มีผลให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค จึงสรุปว่าสิ่งกระตุ้น (elicitors) ทั้งเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007, กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 200 ppm และการใช้ร่วมกันด้วยวิธีที่เหมาะสมมีความสามารถในการชักนำให้เกิดความต้านทานในผักกาดเขียวปลี โดยมีการแสดงออกที่โดดเด่นด้านการชักนำให้พืชเกิดการสะสมสาร salicylic acid, phenolic compound, ไขมัน และ โปรตีน เพิ่มขึ้นในการกระตุ้นให้ผักกาดเขียวปลีต้านทานต่อการเข้าทำลายของแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* โรคเน่าและ

7. การทดลองนี้ยังชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ในการตรวจสอบสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์พืช และเทคนิค X-ray Fluorescence ในการตรวจสอบองค์ประกอบของธาตุภายในเซลล์พืชที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากเป็นวิธีที่มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างง่าย ใช้สารเคมีในการตรวจสอบน้อย วิธีการเหล่านี้จึงถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ในการศึกษากลไกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และกลไกกระตุ้นความต้านทานเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามในการทดลอง ควรมีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดลองแบบ interval times เพื่อจะได้ทราบถึงกลไกที่เกิดขึ้นได้ละเอียดมากขึ้น

8. จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถแนะแนวทางการใช้ประโยชน์ในอนาคตให้กับเกษตรกรผู้ปลูกผักกาดเขียวปลีในการปลูกผักกาดเขียวปลีในประเทศไทยได้ โดยใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* sp. ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลิไซลิก หรือใช้ทั้งสองอย่างควบคู่กันในการชักนำให้ผักกาดเขียวปลีต้านทานโรคเน่าและ ทั้งนี้ในปัจจุบันผู้บริโภคส่วนใหญ่จะรับประทานสด หากสามารถกระตุ้นให้ผักกาดเขียวปลีเกิดความต้านทานโรคจากภายในจะมีความปลอดภัย ผลผลิตมีคุณภาพ ปราศจากสารเคมีกำจัดโรคพืชตกค้าง และช่วยเพิ่มผลผลิตในผักกาดเขียวปลีพันธุ์อ่อนแออีกด้วย



1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1 Nutrient broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

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

1.2 Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
วุ้นผง (Agar)	18	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ละลายวุ้นผงก่อนแล้วจึงใส่ส่วนประกอบอื่นๆ คนให้ละลาย แล้วต้มจนกระทั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ Salicylic acid และปริมาณ Phenolic compound

2.1 0.02 M Ferric ammonium sulfate

Ferric ammonium sulfate	4.82	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

2.2 10% Folin-ciocalteu reagent

Folin-ciocalteu reagent	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2.3 7% Sodium carbonate (Na_2CO_3)

โซเดียมคาร์บอเนตแอนไฮดรัส	7	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 4.4.4.1 ปริมาณสาร salicylic acid ในใบผักกาดเขียวปลี ก่อนและหลังการปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วยเชื้อแบคทีเรีย
ไอโซเลต ECC_Cr2

กรรมวิธีการทดลอง ^{3/}	ปริมาณ salicylic acid ($\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight)											
	ช่วงเวลา (ชั่วโมง)						ช่วงเวลา (ชั่วโมง)					
	0 ^{1/}	24 ^{2/}	48	72	96	120	0 ^{1/}	24 ^{2/}	48	72	96	120
	ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคน้ำและ (ECC_Cr2)						ปลูกเชื้อสาเหตุโรคน้ำและ (ECC_Cr2)					
กรรมวิธีที่ 1	1.46b	1.74b	1.56b	1.39c	1.23b	1.94c	1.39ab	1.80bc	3.40c	2.63d	3.65b	1.80bc
กรรมวิธีที่ 2	1.56c	1.66b	1.37a	1.28b	1.10a	1.84ab	1.78e	2.23c	4.27e	2.98d	3.34a	2.23c
กรรมวิธีที่ 3	1.25ab	1.75b	1.51b	1.49c	1.12a	1.73ab	1.49b	2.07bc	4.01d	2.71d	5.05c	2.07bc
กรรมวิธีที่ 4	1.68d	1.71b	1.37a	1.44c	1.18b	1.77ab	1.44b	2.07bc	4.00d	3.02d	3.74b	2.07bc
กรรมวิธีที่ 5	1.37ab	1.64b	1.66b	1.40c	1.11a	1.88b	1.40ab	1.84bc	4.11d	2.84d	4.62bc	1.84bc
กรรมวิธีที่ 6	1.12a	1.25a	1.28a	1.17a	1.12a	1.28a	1.17a	2.17c	3.44c	3.29e	3.14a	2.17c
F-test	*	*	**	**	**	*	*	*	**	**	**	*
CV (%)	13.56	14.99	28.35	28.81	30.69	12.32	13.56	14.99	28.35	28.81	30.69	12.32

^{1/} ปริมาณ SA ที่เพิ่มขึ้นก่อนการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2

^{2/} ปริมาณ SA ที่เพิ่มขึ้นหลังการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

^{3/} กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารชาลิไซลิค แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยสารชาลิไซลิค แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยสารชาลิไซลิค แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนำมาเชื้อ

ตารางภาคผนวกที่ 4.4.4.2 ปริมาณสาร phenolic compound ในใบผักกาดเขียวปลี ก่อนและหลังการปลูกเชื้อ (challenge inoculation) ด้วยเชื้อแบคทีเรีย
ไอโซเลต ECC_Cr2

กรรมวิธีการทดลอง ^{3/}	ปริมาณ phenolic compound (µg GAE/ mg dry mass)											
	ช่วงเวลา (ชั่วโมง)						ช่วงเวลา (ชั่วโมง)					
	0 ^{1/}	24 ^{2/}	48	72	96	120	0 ^{1/}	24 ^{2/}	48	72	96	120
	ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและ (ECC_Cr2)						ปลูกเชื้อสาเหตุโรคเน่าและ (ECC_Cr2)					
กรรมวิธีที่ 1	0.84b	1.04b	1.23b	1.22b	1.07ab	0.72	0.81b	1.72d	1.48bc	1.31b	1.82c	1.01
กรรมวิธีที่ 2	0.69ab	0.70a	1.08a	1.15a	1.10ab	0.64	0.91c	1.74d	1.47bc	1.30b	1.81c	0.96
กรรมวิธีที่ 3	0.74ab	0.68a	1.17a	1.22b	1.12ab	0.66	0.84b	1.71d	1.56c	1.54c	2.05d	1.25
กรรมวิธีที่ 4	0.72ab	0.87b	1.17a	1.22b	1.17ab	0.66	0.84b	2.32e	1.84d	1.52c	2.02d	1.15
กรรมวิธีที่ 5	0.67ab	0.76ab	1.07a	1.18ab	1.23b	0.68	1.03c	2.35e	1.85d	1.36	1.87c	1.03
กรรมวิธีที่ 6	0.43a	0.66a	0.84a	0.93a	0.83a	0.49	0.60ab	1.58c	1.34b	1.18ab	1.68c	0.91
F-test	*	**	*	*	*	ns	*	**	*	*	*	ns
CV (%)	20.39	27.24	23.16	13.07	29.28	28.1	20.39	27.24	23.2	13.07	29.28	28.1

^{1/} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

^{2/} ปริมาณ SA ที่เพิ่มขึ้นก่อนการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2

^{3/} ปริมาณ SA ที่เพิ่มขึ้นหลังการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* pv. *carotovora* ไอโซเลต ECC_Cr2 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

^{3/} กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยสารชาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 และฉีดพ่นด้วยสารชาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดด้วยสารชาลิไซลิก แอซิด ความเข้มข้น 200 ppm และฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต CaSUT007 กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และกรรมวิธีที่ 6 คลุกเมล็ดและฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ

ประวัติผู้เขียน

นายชานนทร์ แสงจันทร์ เกิดเมื่อวันที่ 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2532 ที่ อำเภอเมือง จังหวัด นครพนม ได้สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2554

และในปี พ.ศ. 2554 ได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาพืชศาสตร์ สำนัก วิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยระหว่างการศึกษาได้รับทุนผู้ช่วย สอนและผู้ช่วยวิจัย และทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก

และในปี 2556 ได้ไปนำเสนอผลงานเรื่อง Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectroscopy Analysis of Chinese Cabbage Elements Infected by *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*. **10th International Congress of Plant Pathology (ICPP 2013) Beijing International Convention Centre from the 25 to 30 August 2013, Beijing China (Poster)**

และในปี 2557 ได้ส่งผลงานตีพิมพ์ เรื่อง The cellular components of cucumber seedlings after primed with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* Bs008. **African Journal of Microbiology Research**. 8(10): 1006-1011.