# การประเมินแหล่งเชื้อเริ่มต้นของ *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. ที่ทำให้เกิดโรคกุ้งแห้งในพริก

**นายรณชีพ ลี้ประเสริฐ**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**

**สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช**

**มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี**

**ปีการศึกษา 2552**

# INITIAL INOCULUM ASSESSMENT OF *Colletotrichum* *gloeosporioides* PENZ., THE CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN CHILLI PEPPER

**Ronnachip Leeprasert**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Crop Production Technology**

**Suranaree University of Technology**

**Academic Year 2009**

**การประเมินแหล่งเชื้อเริ่มต้นของ *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. ที่ทำให้เกิดโรคกุ้งแห้งในพริก**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

______________________________

(อ. ดร.สุดชล วุ้นประเสริฐ)
ประธานกรรมการ

______________________________

(อ. ดร.โสภณ วงศ์แก้ว)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

______________________________

(รศ. ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์)
กรรมการ

______________________________

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

______________________________

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

รณชีพ ลี้ประเสริฐ : การประเมินแหล่งเชื้อเริ่มต้นของ *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. ที่ทำให้เกิดโรคกุ้งแห้งในพริก (INITIAL INOCULUM ASSESEMENT OF *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., THE CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN CHILLI PEPPER) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว, 47 หน้า.

การใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนสของพริกมักไม่ได้ผล เนื่องจากการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีการตรวจประเมินปริมาณแหล่งเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริกเพื่อประกอบการตัดสินใจในการป้องกันกำจัด โดยการกระตุ้นให้พริกแสดงอาการด้วยการใช้สารพาราควอต เอทีฟอน และการขาดน้ำ และใช้วิธีการทางเซรุ่มวิทยาตรวจหาการเข้าทำลายในสภาพแฝง การทดลองใช้เชื้อไอโซเลตที่แยกได้จากสวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคดีที่สุด ก่อนการทดลองเตรียมพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อตอายุ 2 เดือน ให้อยู่ในสภาพที่มีเชื้อเข้าทำลายแบบแฝงโดยปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี horizontal spraying บนใบในรูปของ spore suspension ความเข้มข้น $1 \times 10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร เก็บพืชที่ปลูกเชื้อไว้ 48 ชั่วโมงในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90% วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design 4 ซ้ำ ใช้ พริก 1 ต้น/ซ้ำ การทดลองใช้สารพาราควอตประกอบด้วย 14 ตำรับทดลอง ๆ ที่ 1-7 ฉีดพ่นพริกที่เตรียมไว้ด้วยสารพาราควอตความเข้มข้น 0, 6.92, 13.84, 20.75, 27.67, 41.51 และ 55.34 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ตำรับทดลองที่ 8-14 ฉีดพ่นสารที่ความเข้มข้นเดียวกันโดยไม่ปลูกเชื้อ การทดลองใช้สารเอทีฟอนประกอบด้วย 18 ตำรับทดลอง ๆ ที่ 1-9 ฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 mg/l ของสารออกฤทธิ์ตามลำดับ ตำรับทดลองที่ 10-18 ฉีดพ่นสารที่ความเข้มข้นเดียวกันโดยไม่ปลูกเชื้อ และการทดลองควบคุมการให้น้ำประกอบด้วย 8 ตำรับ ทดลอง ๆ ที่ 1-4 ให้น้ำกับพริกที่เตรียมไว้ที่ระดับ 300, 150, 75 และ 38 มิลลิลิตร/กระถาง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1, 1/2, 1/4 และ1/8 WHC ตำรับทดลองที่ 5-8 ให้น้ำที่ระดับเดียวกันโดยไม่ปลูกเชื้อ ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมงโดยไม่ให้น้ำและความชื้น หลังจากการกระตุ้นนำพริกไปเก็บไว้ในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90% เพื่อสร้างสภาพที่เหมาะต่อการเกิดโรค ทำการตรวจผลโดยนับจำนวนแผลและจำนวนใบร่วงที่เกิดขึ้นจนจำนวนแผลและใบร่วงไม่เปลี่ยนแปลง ผลการทดลองพบว่า ตำรับทดลองที่ฉีดพ่นสารพาราควอตเพียงอย่างเดียวไม่เกิดแผล แต่ตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารพาราควอตเกิดแผลเฉลี่ย 4, 4.50, 3.25, 5.75, 10, 9 และ 9 แผลต่อต้นเมื่อได้รับสารที่ความเข้มข้น 0, 6.92, 13.84, 20.75, 27.67, 41.51 และ 55.34 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ การร่วงของใบพบว่าตำรับที่ฉีดพ่นสารพาราควอตเพียงอย่างเดียวทำให้เกิดใบร่วงเฉลี่ย 0.5, 3 และ 7.25 ใบต่อต้นเมื่อได้รับสารความ

เข้มข้น 27.67, 41.51 และ 55.34 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ขณะที่การปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารความเข้มข้น 20.75, 27.67, 41.51 และ 55.34 mg/l ของสารออกฤทธิ์ทำให้เกิดใบร่วงเฉลี่ย 1.75, 4.25, 5.75 และ 12 ใบ การทดลองโดยใช้เอทีฟอนพบว่า ตำรับทดลองที่ฉีดพ่นสารเอทีฟอนเพียงอย่างเดียวไม่เกิดแผล แต่ตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารเอทีฟอนเกิดแผลเฉลี่ย 2.75, 4.25, 3.25, 6.35, 7.25, 2.5, 2.5, 3.5 และ 3 แผลต่อต้นเมื่อได้รับสารที่ความเข้มข้น 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ การร่วงของใบพบว่า ตำรับที่ฉีดพ่นสารเอทีฟอนเพียงอย่างเดียวทำให้เกิดใบร่วงเฉลี่ย 3.25, 3.25 และ 6.25 ใบต่อต้นเมื่อได้รับสารเอทีฟอนความเข้มข้น 72, 84 และ 96 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ขณะที่การปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ทำให้เกิดใบร่วงเฉลี่ย 1.75, 2.25, 3.25, 5.25, 6.25 และ 8.25 ใบ และตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับควบคุมการให้น้ำทำให้เกิดแผลเฉลี่ย 4.5, 8.25, 10, 18.5 แผลต่อต้นเมื่อได้รับน้ำปริมาณ 1, 1/2, 1/4 และ 1/8 WHC ตามลำดับ การทดสอบทางสถิติพบว่า จำนวนแผลและใบร่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างตำรับทดลอง ดังนั้นการใช้สารพาราควอตที่ความเข้มข้น 27.67 mg/l ของสารออกฤทธิ์ การใช้สารเอทีฟอนความเข้มข้น 36 mg/l ของสารออกฤทธิ์ และการควบคุมการให้น้ำที่ 1/8 WHC สามารถใช้ประเมินการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายแบบแฝงโดยใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา กระทำโดยใช้สารสกัดเส้นใยและโคนีเดียของเชื้อ *C. gloeosporioides* กระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบแอนติเจนที่ระดับความเข้มข้น $1\times10^6$ โคนีเดีย/มิลลิลิตร โดยวิธี direct antigen coating indirect enzyme-linked immunosorbent assay (DAC-indirect ELISA) แอนติเซรุ่มที่ได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* มีปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับ *C. capsici* และ *Sphaceloma sp.* เล็กน้อย แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อรา *Phytophthora* spp. การทดสอบการเข้าทำลายแบบแฝงบนใบด้วยวิธี ทาง ELISA โดยใช้ชิ้นส่วนของใบเป็น solid surface แทนพื้นผิวของหลุมพลาสติก เพื่อตรวจสอบหาแอนติเจนตั้งแต่ที่ยังไม่ปรากฏอาการ พบว่า การต้มใบพริกเป็นเวลา 5 นาทีก่อนนำไปตรวจสามารถใช้ตรวจสอบการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *C. gloeosporioides*

| | |
|---|---|
| สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช | ลายมือชื่อนักศึกษา__________________ |
| ปีการศึกษา 2552 | ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา____________ |

RONNACHIP LEEPRASERT : INITIAL INOCULUM ASSESSMENT OF *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., THE CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN CHILLI PEPPER. THESIS ADVISOR : SOPONE WONGKAEW, Ph.D. 47 PP.

INITIAL INOCULUM ASSESSMENT/*Colletotrichum gloeosporioides/*CHILLI PEPPER ANTHRACNOSE

Applying chemicals to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* is rather difficult because the quiescent infection cannot be estimated. Stimulating chilli peppers to show symptoms of the quiescent infection may enable the fungicide application to be done more effectively. This study aimed to use paraquat, ethephon, and water deficit to stimulate symptom expression and serological technique to detect the quiescent infection. The experiments utilized *C. gloeosporioides* isolated from Suranaree University of Technology's organic farm which was the most virulent isolate and Super Hot chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) as tested variety. Prior to the experiments, spore suspension of *C. gloeosporioides* ($1x10^6$spores/ milliliter) was sprayed horizontally on to the leaves of 2 months old plants and kept for 48 hours in greenhouse at 27ºC and 90% RH. The experiment was conducted in a randomized complete block design (RCBD) with 4 replications, 1 plant/replication. Fourteen treatments were conducted in the paraquat experiment. In treatments 1–7, paraquat was sprayed at the concentration of 0, 6.92, 13.84, 20.75, 27.67, 41.51 and 55.34 mg/l respectively. In treatments 8–14, the same concentrations of paraquat as that of treatments 1–7 were also sprayed on to the plants but without inoculation. The ethephon experiment was conducted in 18 treatments. In treatments

1–9, the pre inoculated peppers were sprayed with ethephon at the concentration of 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 mg/l respectively. In treatments 10–18, the same concentrations of ethephon as that of treatments 1–9 were also sprayed on to the plants but without inoculation. For water deficit, the experiment was conducted in 8 treatments. In treatments 1-4, the pre inoculated peppers were watered at 300, 150, 75 and 38 ml/pot equivalent to 1, 1/2, 1/4 and 1/8 water holding capacity (WHC). In treatments 5-8 the same amount of water were given but without inoculation. The plants were kept in a greenhouse at 27ºC and 90% RH after the treatment to stimulate symptom expression. The treatment effects were evaluated by counting the lesions and falling leaf number. For paraquat application, no lesions were observed on the uninoculated treatments (8–14) while in the inoculated treatments, the plants showed 4, 4.5, 3.25, 5.75, 10, 9 and 9 average lesions per plant when received paraquat at the concentration of 0, 6.92, 13.84, 20.75, 27.67, 41.51 and 55.34 mg/l respectively. The uninoculated plants received paraquat at 27.67, 41.51 and 55.34 mg/l had 0.5, 3 and 7.25 of average falling leaves/plant, while the inoculated plants sprayed with 20.75, 27.67, 41.51 and 55.34 mg/l had 1.75, 4.25, 5.75 and 12 of average falling leaves per plant respectively. For ethephon application, no lesions were observed on the uninoculated treatments (10–18) while the inoculated treatments, the plants showed 2.75, 4.25, 3.25, 6.35, 7.25, 2.5, 2.5, 3.5 and 3 average lesions per plant when received ethephon at the concentration of 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 mg/l respectively. The uninoculated plants received ethephon at 72, 84 and 96 mg/l had 3.25, 3.25 and 6.25 of average falling leaves/plant, while the inoculated plants sprayed with 36, 48, 60, 72, 84 and 96 mg/l had 1.75, 2.25, 3.25, 5.25, 6.25 and 8.25 of average falling leaves per plant respectively. For water application, the plants showed 4.5, 8.25, 10.0, 18.5 average lesions per plant when water was given at the 1, 1/2, 1/4 and 1/8 WHC

respectively. The number of lesions and leaf fallings were statistically different among the treatments. Therefore spraying paraquat at the concentration of 27.67 mg/l, spraying ethephon at the concentration of 36 mg/l or giving water deficit at 1/8 WHC could be used to estimate the degree of quiescent infection by *C. gloeosporioides* in chilli pepper. A polyclonal antiserum was produced in rabbit by injections with mycelia and conidial extracts of *C. gloeosporioides*. When tested with $1x10^6$ conidia/ml spore suspension of selected fungi using DAC-indirect ELISA protocol, it reacted specifically with *C. gloeosporioides* and weakly cross reacted with *C. capsici* and *Sphaceloma sp.*but not with *Phytophthora* spp. By using infected pepper leaf as solid surface instead of the plastic plate surface to detect quiescent infection by ELISA, it was found that 5 minute-boiled infected leaf could be used for the detection of *C. gloeosporioides*.

School of Crop Production Technology Student's Signature__________________

Academic Year 2009 Advisor's Signature__________________

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณา ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและแนะนำอย่างดียิ่งจากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ทั้งด้านวิชาการและการดำเนินงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความเมตตากรุณา ให้การสนับสนุนการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา นอกจากนั้นยังคอยให้คำปรึกษาและคอยชี้แนะแนวทางทั้งในด้านงานวิจัย พร้อมทั้งอบรมสั่งสอนเพื่อให้ศิษย์ประพฤติตนเป็นคนดีของสังคม

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สุดชล วุ้นประเสริฐ และรองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้ตรวจสอบและช่วยแก้ไขรวมทั้งให้คำแนะนำในการ เขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการเรียนต่อในระดับบัณฑิตศึกษา และขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาที่ได้สนับสนุนทุนในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่าน ที่ให้ความเมตตาและคอยอบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤกษพงษ์, คุณอรทัย นาชิน, คุณกีรติ กีรติเลขา คุณนวลปรางค์ อุทัยดาและคุณสมยง พิมพ์พรม เจ้าหน้าที่ห้องอาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย รวมทั้งให้ความช่วยเหลือ ดูแลห่วงใยและคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบคุณรุ่นพี่และเพื่อน ๆ ร่วมเรียนในระดับบัณฑิตศึกษา ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอกราบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดูอบรมสั่งสอนและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีเสมอมา รวมทั้งเป็นกำลังที่สำคัญที่สุดในการทำให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

รณชีพ ลี้ประเสริฐ

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ค
กิตติกรรมประกาศ ฉ
สารบัญ ช
สารบัญตาราง ญ
สารบัญรูป ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ฏ

**บทที่**

**1 บทนำ** 1
1.1 ความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 สมมติฐานการวิจัย 2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

**2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง** 4
2.1 ความสำคัญของพริกและลักษณะทางพฤษศาสตร์ 4
2.1.1 ความสำคัญ 4
2.1.2 ลักษณะทางพฤษศาสตร์ 5
2.2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพริก 8
2.3 โรคแอนแทรกโนสและลักษณะอาการบนพริก 9
2.3.1 โรคแอนแทรกโนสของพริก 9
2.3.2 ลักษณะอาการ 9

# สารบัญ (ต่อ)

**หน้า**


2.3.3 ความสามารถในการเกิดโรคบนพริกพันธุ์ต่าง ๆ ..... 10

2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกระบวนการเข้าทำลายพืชของเชื้อ *Colletotrichum* spp ..... 10

2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ..... 10

2.4.2 กระบวนการเข้าทำลายพืช ..... 11

2.4.3 การเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *Colletotrichum* spp ..... 12

2.4.4 การศึกษาการติดเชื้อแบบแฝง ..... 13

2.5 การแพร่กระบาดและวงจรการเกิดโรค ..... 14

2.6 พฤติกรรมของเกษตรกรที่ส่งเสริมการระบาดของโรค ..... 15

2.7 การป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนส ..... 16

**3 วิธีดำเนินการวิจัย** ..... 19

3.1 การแยกเชื้อ *Collectotrichum gloeosporioides* จากพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* L.) ..... 19

3.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test) ..... 19

3.3 การศึกษาปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของเชื้อ *Collectotrichum gloeosporioides* ในสภาพแฝง ..... 19

3.3.1 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยการใช้สารพาราควอต (paraquat) ..... 19

3.3.2 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝง โดยใช้สารเอทีฟอน (ethephon) ..... 20

3.3.3 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝง โดยการควบคุมการให้น้ำ ..... 20

3.4 การตรวจแหล่งเชื้อเริ่มต้นด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา ..... 21

3.4.1 การเตรียมแอนติเจน ..... 21

3.4.2 การเก็บ normal serum ..... 21

3.4.3 การฉีดแอนติเจน ..... 22

# สารบัญ (ต่อ)

**หน้า**


3.4.4 การเก็บแอนติเซรุ่ม 22

3.5 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเซรุ่มที่ผลิตได้ 22

3.6 การตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* ในสภาพแฝงด้วยวิธี ELISA 23

**4 ผลการทดลอง** 24

4.1 การแยกเชื้อ *Collectotrichum gloeosporioides* จากพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* L.) 24

4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test) 24

4.3 การศึกษาปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของเชื้อ *Collectotrichum gloeosporioides* ในสภาพแฝง 27

4.3.1 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยใช้สารพารา-ควอต (paraquat) 27

4.3.2 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยใช้สารเอที-ฟอน (ethephon) 27

4.3.3 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยงดการให้น้ำ 28

4.4 การตรวจแหล่งเชื้อเริ่มต้นด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา 31

4.4.1 การผลิตแอนติเซรุ่มของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* 31

4.4.2 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเซรุ่มที่ผลิตได้ 31

4.4.3 การตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* ในสภาพแฝงด้วยวิธี ELISA 33

**5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง** 34

รายการอ้างอิง 38

ภาคผนวก 43

ประวัติผู้เขียน 47

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า


4.1 ผลการใช้สารพาราควอตกระตุ้นการแสดงอาการของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อต สังเกตผลหลังจากฉีดพ่นสารพาราควอต3 วัน 28

4.2 ผลการใช้สารสารเอทีฟอนกระตุ้นการแสดงอาการของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อต สังเกตผลหลังจากฉีดพ่นสารเอทีฟอน 3 วัน 29

4.3 ผลการควบคุมการให้น้ำเพื่อกระตุ้นการแสดงอาการของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อต สังเกตผลหลังงดการให้น้ำ 3 วัน 30

4.4 ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติเซรุ่มที่ผลิตจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporiotdes* ไอโซเลต SRCG4 กับเชื้อ *C. gloeosporiotdes* บางไอโซเลตและเชื้อราอื่น ๆ 31

4.5 ผลค่าดูดกลืนแสงจากการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* บนใบพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อตอายุ 2 เดือน เป็นเวลา 3 วันก่อนการทดสอบด้วยวิธี ELISA 32

# สารบัญรูป

**รูปที่** **หน้า**


2.1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของพริก 6

2.2 การจัดอนุกรมวิธานของพริก 8

2.3 วงจรการเกิดโรคแอนแทรกโนสของพริก 14

4.1 โคโลนีของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากพริกบนอาหาร PDA 25

4.2 โคนิเดียและ appressoria ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* หลังจากย้ายลงบน snakeskin pleated dialysis tubing 25

4.3 อาการของโรคแอนแทรกโนสบนใบพริก 26

4.4 ดอกพริกที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส 26

# คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | | |
|---|---|---|
| A | = | absorbance |
| Ab | = | antibody |
| Ag | = | antigen |
| As | = | antiserum |
| DAC | = | Direct Antigen Coating |
| ELISA | = | enzyme-linked immunosorbent assay |
| MWCO | = | Mountain West Council of Optometrists |
| PBS | = | phosphate buffer saline |
| PBS-T | = | phosphate buffer saline tween |
| PDA | = | potato dextrose agar |
| PDB | = | potato dextrose broth |
| WA | = | water agar |
| WHC | = | water holding capacity |

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พริก (*Capsicum* sp.) เป็นพืชในตระกูล Solanaceae สกุล Capsicum มีประมาณ 25 ชนิด มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกาใต้ เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยมียอดการส่งออกเป็นอันดับ 4 ของโลกรองจากประเทศเม็กซิโก จีน และอินเดีย (คมชัดลึก, 2547) จากสถิติกรมศุลกากรปี พ.ศ. 2549 พบว่ามีการส่งออกพริกทั้งรูปผลสด ซอสพริก พริกแห้ง เครื่องแกงสำเร็จรูป และพริกป่นเป็นมูลค่ารวม 2,161 ล้านบาท มีพื้นที่ปลูกในปี พ.ศ. 2549 รวมทั้งประเทศ 474,717 ไร่ ซึ่งพริกที่นิยมปลูกมี 5 ชนิด คือ พริกขี้หนูเล็ก พริกขี้หนูใหญ่ พริกยักษ์ พริกหยวกและพริกใหญ่ ผลผลิตรวม 333,672 ตันโดยแหล่งผลิตที่สำคัญอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร, 2550)

การปลูกพริกมักประสบปัญหาเรื่องการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพโดยโรคที่สร้างความเสียหายมากที่สุดคือโรคกุ้งแห้ง (Anthracnose) ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler& Bisby และ *C. gloeosporioides* Penz. สปอร์ของเชื้อสาเหตุแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืชตั้งแต่ต้นกล้า ใบ ก้านใบ ลำต้น ดอกและผล (อรพรรณ วิเศษสังข์และคณะ, 2525) โดยมีพืชอาศัยมากถึง 470 สกุล (Sutton, 1980) อาการของโรคที่พบบนผลในตอนแรกปรากฏเป็นจุดวงกลมช้ำสีน้ำตาล บุ๋มลึกลงจากผิวเล็กน้อย ต่อมาจุดช้ำสีน้ำตาลจะลุกลามกว้างออกไปเป็นแผลวงกลมหรือรูปไข่ ขนาดของแผลไม่เท่ากัน บางแผลอาจมีขนาด 2 ใน 3 ของผล ทำให้ผลพริกเน่าทั้งผลและร่วงก่อนแก่เต็มที่หากนำผลพริกที่มีโรคนี้เข้าทำลายไปทำเป็นพริกแห้งในระหว่างตากมักจะมีการเน่ามากขึ้น และถ้านำไปเก็บไว้ในที่ที่มีความชื้นสูงผลพริกอาจเน่าจนเสียหายถึง 100 เปอร์เซนต์ (Melanie *et al.*, 2004) เนื่องจากเชื้อสาเหตุของโรคยังมีชีวิตอยู่ภายในแผลของผลพริกที่เป็นโรคในระหว่างการเก็บเกี่ยว จึงสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์และทำให้เกิดการแพร่ระบาดไปยังแหล่งปลูกอื่นได้อย่างกว้างไกล

การป้องกันกำจัดโรคกุ้งแห้งที่ได้ผลดีและมีประสิทธิภาพ ไม่สามารถทำได้ด้วยวิธีการใดวิธีการหนึ่งเพียงอย่างเดียว เกษตรกรต้องผสมผสานหลาย ๆ วิธีร่วมกัน เพื่อลดความรุนแรงของโรค (ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, 2549) แต่ปัจจุบันเกษตรกรมักใช้สารเคมี เช่น benomyl carbendazim หรือ mancozeb ฉีดพ่นซึ่งมักประสบกับปัญหาการดื้อยา เนื่องจากเชื้อ *Colletotrichum* spp. สามารถสร้างความต้านทานต่อสาร benomyl ได้สูงถึง 8000 ppm (Griffee, 1973) กรองจิต แซ่หงอ (2528)

รายงานว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถต้านทานต่อสารเคมี benomyl และสารเคมีกลุ่ม benzimidazole ได้หลังจากที่มีการใช้สารเคมีดังกล่าวติดต่อกันในระยะหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถต้านทานต่อสาร benomyl ได้ทั้งในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (Spalding, 1982; Jeffries *et al*., 1990) วิธีการใช้สารเคมีในปัจจุบันของเกษตรกรส่วนใหญ่มักจะเริ่มฉีดพ่นสารเคมีหลังจากเกิดการระบาดของโรคแล้ว ทำให้ไม่สามารถควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะช่วงการระบาดจะเป็นช่วงเวลาเดียวกับที่มีฝนตกชุก เกษตรกรมักแก้ปัญหาโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีและจำนวนครั้งของการฉีดพ่น ทำให้มีปัญหาในเรื่องเพิ่มค่าใช้จ่ายในการผลิตและส่งเสริมให้เกิดการดื้อยาของเชื้อ เกษตรกรบางรายใช้วิธีกำหนดตารางฉีดพ่น (calendar based) ตามช่วงอายุของพืช ซึ่งอาจจะเป็นวิธีที่ดีกว่า เพราะเป็นการกำจัดเชื้อก่อนเข้าทำลายพืช อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและส่งเสริมให้เกิดการดื้อยาเช่นกัน การใช้สารเคมีอย่างถูกวิธีควรกระทำเมื่อสามารถระบุได้ว่ามีแหล่งของเชื้อในสภาพพร้อมเข้าทำลายอยู่บนใบหรือผลของพริกในปริมาณที่จะทำให้เกิดความเสียหาย ซึ่งในกรณีของโรคชนิดอื่น ๆ จะใช้วิธีเฝ้าระวังการแพร่ระบาดอย่างต่อเนื่อง เมื่อเริ่มพบการแสดงอาการจึงทำการฉีดพ่นสารเคมี วิธีการดังกล่าวแม้จะได้ผลดีกับโรคเชื้อราและแบคทีเรียหลายชนิด แต่มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำกับโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เนื่องจากเชื้อสามารถเข้าทำลายแบบแฝงในช่วงที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม โดยจะพักตัวอยู่บนผิวพืชในรูปของ appressoria รอจนกระทั่งสภาพแวดล้อมเหมาะสมจึงแสดงอาการออกมาพร้อม ๆ กันทั้งหมด ทำให้การระบาดรวดเร็วและรุนแรงจนไม่สามารถควบคุมได้ด้วยสารเคมี การใช้สารเคมีจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น หากเกษตรกรสามารถประเมินปริมาณของเชื้อที่อยู่ในสภาพแฝงเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจการฉีดพ่นก่อนที่อาการของโรคจะปรากฏ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาหาวิธีการตรวจประเมินปริมาณแหล่งเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Colletotrichum gloeo-porioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริก

## 1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 ปัจจัยบางอย่างอาจกระตุ้นให้พริกแสดงอาการของโรคจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงได้ ทั้ง ๆ ที่สภาพแวดล้อมยังไม่เหมาะสมต่อการแสดงออกของอาการ

1.3.2 วิธีการทางเซรุ่มวิทยาสามารถใช้ตรวจสอบเชื้อ *C. gloeosporioides* ในระยะเริ่มต้นก่อนที่อาการของโรคจะปรากฏ

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การตรวจประเมินปริมาณแหล่งเชื้อใช้วิธีกระตุ้นให้เกิดความเครียดกับพริก เพื่อกระตุ้นการเข้าทำลายจากเชื้อที่อยู่ในสภาพแฝง วิธีการทางเซรุ่มวิทยาทดลองโดยใช้เชื้อ *Collectotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากพริกเป็นแอนติเจน ทำการทดลองเฉพาะกับพริกพันธุ์ Super Hot ในสภาพเรือนทดลอง

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงวิธีการที่จะใช้กระตุ้นให้เชื้อ *C. gloeosporioides* แสดงอาการขณะที่สภาพ-แวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการแสดงอาการ ทำให้สามารถประเมินศักยภาพในการแพร่ระบาดของโรคและสามารถดำเนินการจัดการกับโรคได้ก่อนที่จะเกิดการแพร่ระบาด

1.5.2 ได้วิธีการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาที่เหมาะสมและใช้ประเมินปริมาณเชื้อสาเหตุที่ติดอยู่กับใบพริกได้ ทำให้เตรียมการป้องกันได้ทันเวลาก่อนอาการของโรคปรากฏ

# บทที่ 2
# ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ความสำคัญของพริกและลักษณะทางพฤกษศาสตร์

### 2.1.1 ความสำคัญ

พริก (*Capsicum* sp.) เป็นพืชในตระกูล Solanaceae สกุล Capsicum มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกาใต้ พริกเป็นเครื่องเทศที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก มีการปลูกอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตร้อน แหล่งผลิตที่สำคัญของโลกคือ จีน อินโดนีเซีย เม็กซิโก ไนจีเรีย เกาหลีใต้ กานา ตุรกี สหรัฐอเมริกา อียิปต์ อิตาลีและสเปน โดยประเทศจีนมีพื้นที่การปลูกมากที่สุด ในขณะที่ประเทศเนเธอร์แลนด์มีผลผลิตเฉลี่ยต่อพื้นที่สูงที่สุด (สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร, 2549) พริกได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2300 ในสมัยกรุงศรีอยุธยาโดยพ่อค้าชาวโปรตุเกส และกลายเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย พบการปลูกเป็นอาชีพในทุกภาคของประเทศ ข้อมูลสถานการณ์ด้านการผลิตปี 2549/2550 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกรวม 474,717 ไร่ ผลผลิตรวม 333,672 ตัน/ปี โดยมีแหล่งผลิตที่สำคัญอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ เลย ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี (สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร, 2550) สถิติกรมศุลกากรปี 2551 พบว่าการส่งออกพริกแห้งมีมูลค่าถึง 112,420,132 ล้านบาท โดยประเทศที่นำเข้าพริกจากประเทศไทยมากที่สุดคือประเทศสหรัฐอเมริกา อิสราเอล ออสเตรเลีย เยอรมันและสวิตเซอร์แลนด์ พริกใช้เป็นส่วนประกอบในการปรุงแต่งรสชาติของอาหารทั้งในรูปพริกสด พริกแห้งหรือพริกป่นรวมทั้งผลิตภัณฑ์แปรรูปอื่น ๆ พริกมีคุณค่าทางอาหารสูง เป็นแหล่งของวิตามินเอ ซีและอี นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนประกอบของยารักษาโรค เนื่องจากมีสาร capsaicin ในรูป vanillylamide ของ isodecyanic acid ที่อยู่ในแกนกลางของผลพริก (มณีฉัตร นิกรพันธุ์, 2538) ในภาคอุตสาหกรรมอาหารและยา พริกได้ถูกนำมาใช้ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์ Cayenne ในรูปแคปซูลใช้เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะอาหารและผลิตภัณฑ์ Thaxtra-P Capsaicin ในรูปโลชั่นและครีม ใช้เป็นยาทาภายนอกบรรเทาอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ข้ออักเสบและยาฉีดพ่นเพื่อรักษาอาการโรคไซนัส เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่พริกได้เป็นอย่างดี

### 2.1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

โดยทั่วไปพริกเป็นได้ทั้งพืชล้มลุก ไม้พุ่มและไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สามารถปลูกเป็นพืชฤดูเดียวหรือหลายฤดู ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพริกมีดังนี้

**ราก** พริกส่วนใหญ่มีอายุยืนจึงมีระบบรากลึก ต้นโตเต็มที่จะมีรากลึกเกินกว่า 1.20 เมตร รากฝอยแผ่ออกด้านข้างรัศมีเกิน 1 เมตร สานกันอย่างหนาแน่น

**ลำต้น** มีลำต้นทั้งแบบตรงหรือเป็นพุ่ม การเจริญของกิ่งเป็นแบบ dichotomous โดยแตกออกเป็น 2 กิ่งแล้วแตกออกเป็น 4, 8, 16 กิ่งไปเรื่อย ๆ จึงมักพบว่าต้นพริกที่สมบูรณ์มีกิ่งแตกขึ้นมาจากต้นที่ระดับดินหลายกิ่งจนดูเหมือนว่ามีหลายต้นอยู่รวมกัน ในระยะต้นกล้าลำต้นจะมีลักษณะเป็นไม้เนื้ออ่อนสีเขียวเมื่อมีอายุมากขึ้นลำต้นและกิ่งจะมีสีน้ำตาลเทาและมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น แต่กิ่งและลำต้นยังคงเปราะหักง่าย บางพันธุ์มีสีม่วงที่ข้อ

**ใบ** เป็นแบบใบเดี่ยวสีเขียวอ่อนถึงเขียวเข้ม ลักษณะแบนเรียบ มีขนเล็กน้อย ใบมีหลายแบบตั้งแต่รูปไข่จนถึงเรียวยาว ในระยะต้นกล้ารวมทั้งส่วนใบล่างของต้นโตเต็มวัยใบจะมีขนาดค่อนข้างใหญ่

**ดอก** เป็นดอกเดี่ยวเกิดที่ข้อระหว่างกิ่ง บางพันธุ์พบว่ามีหลายดอกที่เกิดตรงจุดเดียวกัน ดอกมีสีขาว สีครีมจนถึงเขียวอ่อนบางพันธุ์เป็นสีม่วงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.2–3.5 เซนติเมตร ประกอบด้วยกลีบรองดอก (calyx) ลักษณะเป็นพู 5 พู กลีบดอก 4–7 กลีบขึ้นอยู่กับพันธุ์ โดยปกติจะมีเกสรตัวผู้ (stamen) 5–6 อันหรือเท่าจำนวนกลีบดอกแตกออกจากโคนของกลีบดอก อับเกสรสีน้ำเงินแยกตัวเป็นกระเปาะ ส่วนเกสรตัวเมียจะชูขึ้นเหนือเกสรตัวผู้ รูปร่างคล้ายกระบอกหัวมน รังไข่มีจำนวน 2–4 พู มักออกดอกและติดผลในสภาพวันสั้น

**ผล** เป็นแบบ Berry มีลักษณะเป็นกระเปาะ ฐานขั้วผล (peduncle) สั้นและหนา ผลอ่อนมักชี้ขึ้นเมื่อผลแก่อาจชี้ขึ้นหรือห้อยลงขึ้นอยู่กับพันธุ์ พริกส่วนใหญ่ทั้ง *Capsicum annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum* และ *C. pubescens* มีทั้งผลที่ชี้ขึ้นและผลที่ห้อยลง ส่วน *C. frutescens* มักมีผลชี้ขึ้น ผลมีหลายแบบตั้งแต่แบน กลม ยาว จนถึงพอง อ้วน สั้น ขนาดมีขนาดตั้งแต่ 0.9–33.02 เซนติเมตร ผนังผล (pericarp) มีตั้งแต่บางจนถึงหนาขึ้นอยู่กับพันธุ์และสิ่งแวดล้อม ผลอ่อนสีเขียวเมื่อสุกแก่อาจเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นสีเหลืองหรือแดงพร้อม ๆ กับการแก่ของเมล็ดควบคู่กันและมีความเผ็ดแตกต่างกัน ในระหว่างการเจริญเติบโตหากอุณหภูมิในเวลากลางวันสูงและความชื้นในบรรยากาศต่ำจะทำให้ผลพริกมีการเจริญเติบโตผิดปกติและมีขนาดเล็ก รวมทั้งมีการติดเมล็ดต่ำกว่าปกติอีกด้วย

**เมล็ด** มีขนาดเล็กประมาณ 2.5–5 มิลลิเมตร ลักษณะกลมแบนคล้ายกับเมล็ดมะเขือเทศ มีสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาลเกาะรวมกันอยู่ที่รก (placenta) โดยทั่วไปเมล็ดพริกหวาน 1 กรัม จะมีเมล็ด 166 เมล็ดขึ้นไป ส่วนพริกเผ็ดที่มีขนาดผลเล็กจะมีเมล็ดขนาดเล็กลง เช่น เมล็ดพริกพันธุ์ห้วยสีทน 1 น้ำหนัก 1 กรัม จะมีจำนวนเมล็ดถึง 256 เมล็ด (สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร, 2549) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพริกแสดงดังรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของพริก
(ที่มา : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Koeh-027.jpg)

จากการศึกษาลักษณะทั่วไปของพริกโดย Purseglove *et* al (1981); Smith *et al.* (1987); Worayos (1986) และ Pickersgill (1989) สามารถจำแนกได้ 5 species ประกอบด้วย

*C. annuum* L. เป็นพริกที่นิยมปลูกกันมากที่สุดเมื่อเทียบกับพริกชนิดอื่น ๆ มีกลีบดอกสีขาว อับละอองเกสรตัวผู้สีม่วง ขอบกลีบเลี้ยงเป็นรอยหยักมี 1 ดอกต่อข้อ แต่บางต้นที่ข้อแรกมี 2 ดอกต่อข้อ ชนิดที่เป็นพันธุ์ป่าก้านดอกตั้งขึ้น ส่วนพันธุ์ปลูกก้านดอกห้อยลง ผลมีรูปร่างหลายแบบ ความยาวผลอยู่ในช่วงน้อยกว่า 1 ถึง 25 เซนติเมตร มีตั้งแต่ผลเรียวเล็กจนกระทั่งความกว้างของผลมากกว่า 10 เซนติเมตร เมื่อตัดผลตามขวางมีทั้งผลชนิดที่มีขอบเรียบหรือย่น ผลอ่อนมีสีเขียวส่วนผล

แก่มีสีแดง สีส้มอมแดงหรือสีน้ำตาล จากการสำรวจในประเทศไทย พบว่าพริกชนิดนี้ใช้เป็นพันธุ์ปลูกมีมากสายพันธุ์ที่สุดเมื่อเทียบกับพริกชนิดอื่น โดยรวบรวมได้ 31 สายพันธุ์ เช่น พริกชี้ฟ้า พริกชี้ฟ้าใหญ่ พริกจินดา พริกแดง พริกฟักทอง พริกขี้หนู พริกขี้หนูชี้ฟ้า พริกขี้หนูจินดา พริกหวานและพริกยักษ์ เป็นต้น

*C. frutescens* L. กลีบดอกสีเขียวอมเหลือง อับละอองเกสรตัวผู้สีม่วง กลีบเลี้ยงมีลักษณะคล้ายรูปถ้วยขอบเรียบมี 2–5 ดอกต่อข้อ แต่ส่วนมากมี 2 ดอกต่อข้อ ก้านดอกตั้งขึ้น พันธุ์ป่ามีผลเรียวเล็กยาว 15–20 มิลลิเมตร ส่วนผลของพันธุ์ปลูกมีความยาวมากกว่าและอาจยาวถึง 15 เซนติเมตร มีรสเผ็ดจัด ผลอ่อนมีสีเขียวหรือเหลือง ผลแก่มีสีแดง ในประเทศไทยมีรายงานว่ามีพริกชนิดนี้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พริกชี้ฟ้า พริกเกษตรและพริกขาว

*C. chinense* Jacq. กลีบดอกสีขาว อับละอองเกสรตัวผู้สีม่วง ขอบกลีบเลี้ยงเป็นรอยหยักเล็กน้อย รอยต่อระหว่างก้านผลและกลีบเลี้ยงเห็นเป็นร่องชัดเจนมี 2-5 ดอกต่อข้อ ส่วนมากที่ 3 ดอกต่อข้อ ก้านดอกห้อยลง ผลพันธุ์ป่ามีรูปร่างกลม ส่วนผลของพันธุ์ปลูกมีรูปร่างหลายแบบ ความยาวผลอาจยาวถึง 20 เซนติเมตร ผลอ่อนสีเขียวหรือเหลือง ผลแก่มีสีส้มอมแดง สีเหลืองอมแดงและสีน้ำตาล ในประเทศไทยสายพันธุ์พริกที่เก็บรวบรวมมีพริกชนิดนี้อยู่ 18 สายพันธุ์ มีชื่อเรียกว่าพริกขี้หนู พริกขี้หนูแดง พริกกลาง พริกเล็บมือนาง พริกขี้หนูหอม พริกสวนและพริกใหญ่ เป็นต้น

*C. baccatum* L. กลีบดอกสีขาว โคนกลีบมีจุดสีเหลือง มี 1 ดอกต่อข้อแต่โคนกลีบของพันธุ์ป่าสีเขียวอ่อนมี 2 ดอกต่อข้อ อับละอองเกสรตัวผู้สีน้ำตาล ขอบกลีบเลี้ยงมีรอยหยักเห็นได้ชัด รูปร่างผล มีหลายแบบ ส่วนมากรูปร่างผอมยาวถึง 20 เซนติเมตร แต่อาจมีผลยาวกว่านี้ได้ ผลอ่อนมีสีเขียว สีเหลือง ผลแก่สีแดง สีส้มอมแดงและสีน้ำตาล จากการรวบรวมพันธุ์พริกในประเทศไทยคาดว่ามีพริกชนิดนี้ปลูกเพียง 1 สายพันธุ์ พริกพวกนี้มีความแตกต่างจากพริกชนิดอื่นที่มีดอกสีขาวและมีจุดสีเหลืองที่กลีบดอกขาว ในกลุ่มพริกนี้ยังมี *C. pendulum* และ *C. microcarpum* ที่ถูกจัดให้อยู่ใน *C. baccatum* ด้วย

*C. pubescens* R & P กลีบดอกสีขาว โคนกลีบสีขาวหรือเหลือง อับละอองเกสรตัวผู้สีม่วง เป็น species ที่มีขนมากโดยเฉพาะส่วนต้นและใบ ผลแก่สีส้ม สีแดง รสเผ็ด เมล็ดมีสีดำ ต้องการอากาศหนาวเย็นบริเวณภูเขาสูงในการเจริญเติบโตจากการสำรวจและรวบรวมพันธุ์พริกในประเทศไทยพบว่ามีพริกชนิดนี้อยู่เพียงสายพันธุ์เดียวเรียกว่าพริกขาวดำ อนุกรมวิธานของพริกดังแสดงในรูปที่ 2.2

**Kingdom :** Plantae

**Division :** Magnoliophyta

**Class :** Magnoliopsida

**Subclass :** Arteridae

**Order:** Solanales

**Family:** Solanaceae

**Genus:** *Capsicum*

**Species:** *C. annuum* *C. pubescens* *C. baccatum* *C. fructescens* *C. chinense*

รูปที่ 2.2 การจัดอนุกรมวิธานของพริก

## 2.2 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพริก

โดยทั่วไปพริกเป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้น สามารถทนร้อนได้ค่อนข้างดีแต่ไม่ชอบสภาพอากาศหนาวเย็น หากสภาพอากาศมีความความชื้นน้อยและดินแห้งหรืออากาศค่อนข้างร้อนจัดพริกจะมีการติดผลน้อยลง เนื่องจากยอดเกสรตัวเมียจะแห้งไม่สามารถจับละอองเกสรตัวผู้ได้ ดังนั้นการเลือกฤดูปลูกให้เหมาะสมจะช่วยให้พริกติดผลมากขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพริกคือ 25 องศาเซลเซียสและเจริญได้ดีในดินร่วนที่อุดมสมบูรณ์มีอินทรียวัตถุสูง ระบายน้ำได้ดี ความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ระหว่าง 6–6.8 หากดินเป็นกรดด่างมากเกินไปอาจทำให้พริกเป็นโรคเหี่ยวได้ง่ายและมีการเจริญเติบโตไม่ดีทำให้ผลผลิตต่ำ (ทวีศักดิ์ นวลพลับ, 2543) ผลพริกเริ่มเก็บเกี่ยวได้หลังย้ายปลูกประมาณ 2.5–5 เดือนขึ้นอยู่กับพันธุ์ที่ปลูก โดยอาจเก็บเกี่ยวผลพริกตอนพริกเริ่มเปลี่ยนสีเพื่อขายผลสด หรือเมื่อพริกมีสีแดงสุกเพื่อทำพริกแห้งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ประโยชน์และราคาของตลาด (สมพร ทรัพยสาร, 2525)

## 2.3 โรคแอนแทรกโนสและลักษณะอาการบนพริก

### 2.3.1 โรคแอนแทรกโนสของพริก

โรคแอนแทรกโนสเป็นโรคที่สร้างความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ธัญพืช ถั่ว พืชผักและผลไม้ (Baily and Jeger, 1992) สำหรับพริกโรคนี้นับว่าเป็นโรคที่สำคัญที่สุดโดยสร้างความเสียหายมากถึง 50 เปอร์เซนต์ (Pakdeevaraporn *et al.*, 2005) ในประเทศไทยโรคแอนแทรก-โนสของพริกมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ใน 4 species คือ *C. gloeoporioides* (Penz.) Sacc., *C. capsici* (Syd.) Butl. & Bisby, *C. acutatum* Simmonds และ*C. coccodes* (Wallr.) Hughes (Hadden and Black, 1987) โดย *C. gloeosporioides* พบมากที่สุดสามารถระบาดทำความเสียหายกับพริกในทุกแหล่งรองลงมา คือ *C. capsici* พบในตัวอย่างจากจังหวัดขอนแก่น หนองคาย ร้อยเอ็ด เพชรบูรณ์และชัยภูมิ *C. acutatum* พบในตัวอย่างจากจังหวัด ขอนแก่น และชัยภูมิ ส่วน *C. coccodes* พบเฉพาะในตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบูรณ์ (ฉัตรนัททรี กันทะลาและคณะ, 2550) โดยความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับพันธุ์ สภาพแวดล้อมและการดูแลรักษา พริกที่มีขนาดใหญ่ความยาว 6-9 เซนติเมตร เช่น พริกชี้ฟ้า จะเป็นโรคค่อนข้างรุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับพริกที่มีขนาดผลกลางความยาว 3-5 เซนติเมตร เช่น พริกพันธุ์ห้วยสีทน พันธุ์นิ้วมือนาง และผลขนาดเล็กความยาว 1-2 เซนติเมตร เช่นพริกกะเหรี่ยง (อรพรรณ วิเศษสังข์, 2525) ปัจจุบันมีการปลูกพริกในหลายพื้นที่ เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดพัทลุงและจังหวัดสุโขทัยซึ่งมีความชื้นสูงและมีวิธีการเขตกรรมไม่เหมาะสม ส่งผลให้เกิดโรคระบาดรุนแรงกับพริกผลขนาดกลางซึ่งสร้างความเสียหายมากกว่า 50 เปอร์เซนต์ (บุญญวดี จิระวุฒิ, 2540)

### 2.3.2 ลักษณะอาการ

โรคแอนแทรกโนสสามารถทำลายพริกได้ทุกระยะการเจริญเติบโต หากมีเชื้อติดมากับเมล็ดพันธุ์เชื้อจะเข้าไปทำลายต้นกล้าทำให้แห้งตาย ในระยะต้นโตจะทำให้เกิดแผลที่ใบและกิ่งก้าน ดอก ใบ ทำให้ใบร่วงและเกิดอาการแห้งตายจากปลายยอดเข้ามา (Die back) อาการของโรคจะเห็นได้ชัดเจนถ้าโรคระบาดในระยะติดผลโดยเฉพาะเมื่อผลพริกเริ่มสุก โดยเกิดรอยช้ำเป็นแอ่งยุบลงจากผิวแล้วกลายเป็นแผลสีน้ำตาลรูปร่างกลมรีขนาดใหญ่ มีจุดเล็ก ๆ สีดำเรียงซ้อนกันเป็นวง (Concentric ring) อยู่ในบริเวณแผล เนื้อเยื่อบริเวณแผลที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะหยุดเจริญในขณะที่บริเวณรอบ ๆ ยังเจริญต่อไป ทำให้ผลพริกที่เป็นโรคมีลักษณะโค้งงอหรือหดย่น ชาวบ้านจึงมักเรียกว่าโรคกุ้งแห้ง ถ้าโรคระบาดรุนแรงหรือในสภาพแวดล้อมที่เหมาะต่อการเกิดโรค เชื้อจะเข้าไปทำลายใบ กิ่งก้านและลำต้นทำให้ใบร่วงเป็นจำนวนมากและลำต้นแห้งตาย (ศศิธร วุฒิวณิชย์, 2543)

**2.3.3 ความสามารถในการเกิดโรคบนพริกพันธุ์ต่าง ๆ**

เชื้อรา *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* สามารถทำให้เกิดโรคบนผลสุกได้กับพริกทุกพันธุ์ แต่ความรุนแรงต่างกัน Higgin (1926) พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีความรุนแรงกับพริกยักษ์ เช่นเดียวกับสมศิริ จิ๋วสกุล (2521) ที่พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับพริกยักษ์ แสดงอาการปานกลางกับพริกชี้ฟ้าและพริกเหลือง แต่เป็นโรคน้อยที่สุดกับพริกขี้หนู ส่วนเชื้อรา *C. capsici* จะทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับพริกหยวกและพริกเหลือง แสดงอาการปานกลางกับพริกชี้ฟ้าและเป็นโรคน้อยที่สุดกับพริกขี้หนู พริกบางช้างและพริกเหลืองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคสูง เช่นเดียวกับรายงานของอุดม ฟ้ารุ่งสาง (2530) พบว่าพริกบางช้างอ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนสมากที่สุด รองลงมาคือพริกหนุ่มเชียงใหม่ ส่วนพริกช่อ มข. อ่อนแอน้อยที่สุด

## 2.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกระบวนการเข้าทำลายพืชของเชื้อ *Colletotrichum* spp.

**2.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา**

*Colletotrichum* spp. จัดเป็นเชื้อราอยู่ใน subdivision Deuteromycotina form-class Coelomycetes form-order Melanconiales form-family Melanconiaceae ลักษณะทั่วไปของเชื้อชนิดนี้คือสร้างเส้นใยฝังอยู่ในผิวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลแก่ แตกกิ่งก้าน มีผนังกั้น conidia เกิดบน conidiophore ซึ่งมีกำเนิดจาก stromatic cell ของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า acervulus ใต้ชั้น epidermis ของพืช เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออก conidia จะถูกปล่อยออกมา เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะสร้าง conidia เป็นกลุ่มบน stromatic cell คล้าย sporodochium บางครั้งพบการสร้าง sclerotia บนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจาก conidia งอกจะสร้าง appressoria สีน้ำตาลเข้มตรงส่วนปลายของ germ tube ลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน บางครั้งค่อนข้างกลมหรือกลมรีคล้ายกระบอง บางครั้งผนังมีรอยหยัก (lobe) สร้างเดี่ยว ๆ หรือเกิดติดกันเป็นกลุ่ม เชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่เข้าทำลายพริกพบการระบาดมากมี 2 ชนิดคือ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* โดยเชื้อ *C. capsici* มักจะสร้างความเสียหายกับพริกแดง (พริกที่สุกแก่แล้ว) ลักษณะของแผลจะยุบลง แผลมีรูปร่างกลมหรือรี ขอบแผลสม่ำเสมอ มีจุดสีดำอยู่มากมายซึ่งเป็นกลุ่มของ acervuli ที่กระจายอยู่บนแผล มีการสร้าง sterile hypha สีน้ำตาล ผนังหนาเรียบปลายแหลมคล้ายหนามเรียกว่า setae เกิดบริเวณขอบของ acervulus หรือปะปนอยู่กับก้านชู conidia ลักษณะการสร้าง setae ของรานี้ เป็นลักษณะที่ไม่คงที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีสีน้ำตาลดำบริเวณโคนค่อนข้างใหญ่และเรียวไปหาปลายขนาด 2.42×11.13 ไมครอน (Sutton, 1980) conidia เซลล์เดี่ยว ใส รูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ขนาดเฉลี่ย 9-14×6.5-11 ไมโครเมตร ขณะที่ *C. gloeosporioides* สามารถทำลายได้ทั้งพริกผลเขียว (พริกอ่อน) และผลแดง (Kim *et al.*, 1989;

Sangchote *et al.*, 1998) ก่อให้เกิดแผลรูปกลมรีขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 1-2 เซนติเมตร หรือใหญ่กว่า เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวลงเป็นแอ่ง แผลเมื่อเริ่มเกิดใหม่จะมีสีเหลืองเข้มและมี acervulus สีเหลืองเข้มอยู่ในบริเวณแผล เมื่อเวลาผ่านไปจะกลายเป็นสีดำ conidia เซลล์เดียว ใส รูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมนขนาดเฉลี่ย 9-24×3-4.5 ไมโครเมตร ไม่สร้าง setae สปอร์จะงอก germ tube ในน้ำภายใน 6-8 ชั่วโมง และสร้าง apperssorium ภายใน 10-12 ชั่วโมง ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) มีสีเทา-น้ำตาลดำ (Ploetz *et.al.,* 1994) มักพบการระบาดรุนแรงในฤดูฝนหรือแหล่งปลูกพริกที่มีความชื้นสูง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของโรคคือ 27-32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95% อาการจะแสดงให้เห็นภายใน 3-5 วัน ในแปลงพริกที่ปลูกแน่นและต้นพริกที่มีทรงพุ่มหนาทึบ เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดย ลม ฝน และแมลง (ทวีศักดิ์ นวลพลับ, 2534) conidia ของเชื้อจะไม่งอกใน acervulus เนื่องจากถูกยับยั้งจากของเหลวที่ถูกขับออกมาจากภายในสปอร์แต่สามารถงอกได้ในน้ำ conidia กระจายบนน้ำที่ติดกับผิวของผลเกิดการสร้าง germ tube และ appressoria ซึ่งสามารถทะลุทะลวงผิวเพื่อเข้าทำลาย น้ำคั้นจากผลของพริกแดงสามารถกระตุ้นการสร้าง appressoria ของ *C. gloeosporioides* ได้ดีกว่าพริกเขียว ส่วนน้ำคั้นจากพริกเขียวจะกระตุ้นการสร้าง appressoria ของ *C. capsici* ได้ดีกว่าพริกแดง (Manandhar, 1995)

**2.4.2 กระบวนการเข้าทำลายพืช**

การเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum spp.* เป็นการเข้าทำลายโดยตรง (direct penetration) สปอร์ของเชื้อราบนผลพริกที่เป็นโรคจะปลิวตามลม ถูกชะล้างโดยน้ำหรือติดไปกับเครื่องมือเพาะปลูกไปยังต้นปกติ เมื่อสปอร์ตกลงบนผิวพืชจะมีสารเมือกเกิดขึ้นรอบสปอร์เพื่อช่วยให้สปอร์ยึดเกาะกับผิวพืชได้ (รัตนา อเนกธนโชติ, 2542) จากการศึกษาของ Pring *et.al.* (1995) พบว่าเชื้อ *C. capsici* สามารถงอก grem tube บนผิวของส่วน hypocotyl ภายใน 16 ชั่วโมงและสร้าง appressoria สีเข้มที่ปลายของ grem tube ภายใน 30 ชั่วโมง บริเวณรอบ ๆ appressoria จะพบเส้นใยสายเล็ก ๆ เชื่อมระหว่าง appressoria กับผิวพืชและภายใน 48 ชั่วโมง จะสร้าง penetration peg แทงทะลุผ่านชั้น cuticle ไปยังผนังเซลล์แล้วแทงเข้าทาง cell lumen ที่ส่วนปลาย penetration peg ของเชื้อจะเกิดการปล่อยเอนไซม์ pectolytic enzyme และ cellulolytic enzyme ออกมาย่อย pectin substance และ cellulose ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์แยกออกจากกันไม่รวมกันเป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ (รัตนา อเนกธนโชติ, 2542) ทำให้เนื้อเยื่อพืชยุบตัวและเกิดการเน่า อาการเริ่มจากจุดช้ำ บุ๋มและขยายใหญ่ขึ้น หากมีสภาพความชื้นสูงจะเกิดอาการเน่าและสร้าง acervulus ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดสปอร์ (Higgin, 1926)

### 2.4.3 การเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *Colletotrichum spp.*

การเข้าทำลายแบบแฝงและโครงสร้างที่ใช้ในการแฝงของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ในเนื้อเยื่อพืชมีรายงานในผลไม้ชนิดต่าง ๆ มากมาย ซึ่งการศึกษากระบวนการเข้าทำลายแบบแฝงครั้งแรกโดยการปลูกเชื้อ *C. musae* บนผลกล้วยและ *C. gloeosporioides* บนผลมะม่วงและมะละกอหลังการปลูกเชื้อพบว่าสปอร์จะงอก germ tube และสร้าง appressorium บนผิวของผลที่ยังไม่สุก จากนั้นจะสร้าง infection peg แทงผ่านชั้น cuticle ก่อนเจริญเป็นเส้นใยกระจายอยู่ภายในหรือใกล้กับผนังของเซลล์ใต้ชั้น epidermis และจะไม่มีการพัฒนาของ subcuticular hypha จนกว่าผลจะสุก (Simonds, 1941) Binyamini and Schiffman-Nadel (1972) รายงานว่า appressorium เป็นระยะแฝงตัวของ *Colletotrichum* spp. ในไม้ผลเขตกึ่งร้อนและเขตร้อนจากการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* บนผลอาโวกาโดในสวนพบว่า apperssoria เป็นระยะแฝงตัวมากกว่า subcuticular hypha และมีข้อมูลสนับสนุนจากการศึกษาการติดเชื้อตามธรรมชาติของ *C gloeosporioides* ในผลส้มพบว่ามี apperssorium จำนวนเพียงเล็กน้อยที่สร้าง infection peg โดยจะพบอยู่ในหรือใต้ cuticle บริเวณ intercellular ของ epidermis และจะไม่มีการพัฒนาของ infection peg (Brown, 1975) หลักฐานอื่น ๆ ต่อมาที่แสดงว่า appressorium เป็นระยะแฝงตัวของ *Colletotrichum* spp. ได้มาจากการตรวจสอบซ้ำในกล้วยด้วยการปลูกเชื้อบนผลที่ยังไม่สุกด้วย *C. musae* พบมีการสร้างทั้ง appressorium ใสและสีเข้ม ซึ่งต่อมา appressorium ใสจะสร้าง subcuticle hypha ในส่วนเปลือกสีเขียวของผลแต่ไม่พบการพัฒนาของ subcuticle hypha เนื่องจากการเกิด hypersensitivity reaction ในบริเวณเซลล์ที่อยู่ใกล้ ๆ กัน ส่วน appressorium สีเข้มจะพักตัวอยู่บนผิวของผลที่ยังไม่สุกและพบว่ามีการสร้าง subcuticle hypha ระหว่างการสุกเท่านั้นและจะสร้างแผลแอนแทรกโนสออกมา (Muirhead and Deverall, 1981) โดยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สร้าง appressoria ที่สมบูรณ์และเริ่มเข้าทำลายพืชได้ภายใน 9-72 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ แต่ถ้าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมหรือ พืชอาศัยยังเจริญไม่เต็มที่ทำให้เชื้อรา *Colletotrichum* spp.ไม่สามารถเข้าทำลายได้ appressoria จะเป็นโครงสร้างในการพักตัว เนื่องจากมีผนังหนาจึงเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สามารถเข้าทำลายแบบแฝงในผลไม้ได้ (Jefffries *et.al.*, 1990)

Adikaram *et.al.* (1983) ได้ศึกษาการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *Glomerella cingulata* ในผลพริกเขียวที่ยังไม่สุกพบว่าบางสปอร์สามารถเข้าทำลายพริกได้แต่เป็นส่วนน้อย เนื่องจากผลพริกสร้างสาร phytoalexin ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อราคือ capsicannol ซึ่งเกิดขึ้นหลังปลูกเชื้อ 18 ชั่วโมง และปริมาณมากสุดหลังปลูกเชื้อ 4 วัน ซึ่งมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาร capsicannol ตรวจไม่พบในผลปกติและพบสารสะสมเล็กน้อยถ้าผลพริกที่มีบาดแผล ส่วนในผลสุกหลังปลูกเชื้อพบว่ามีการสะสมของสาร capsicannol อย่างรวดเร็ว แต่ปริมาณน้อยกว่าผลสีเขียว เมื่อผลสุกมากขึ้น

ปริมาณสาร capsicannol จะลดลงจนไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ทำให้ผลพริกแสดงอาการของโรคเพิ่มขึ้น การปลูกเชื้อลงบนผลพริกที่ยังไม่สุกด้วย *Glomerella cingulata* พบว่า มีอัตราส่วนของ appressorium จำนวนเพียงเล็กน้อยที่สร้าง infection peg แทงทะลุผ่านชั้น cuticle และบริเวณผนังด้านนอกของ epidermis ก่อนจะหยุดการเจริญเติบโตในช่องว่าง (lumen) และ appressorium ทั้งหมดยังคงแฝงตัวอยู่บริเวณผิวของผล (Adikaram *et al*, 1983) ส่วนปัจจัยด้านอื่น ๆ เช่น ethylene ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ทำให้ผลไม้สุกมีผลต่อการงอกของสปอร์และการสร้าง appressorium ของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. musae* บนผลมะเขือเทศ อาโวกาโดและกล้วยที่เริ่มสุก ทำให้เกิดการแตกแขนงของ germ tube และสร้าง appressorium ตั้งแต่ 1-6 อันจาก 1 สปอร์ การชักนำของ ethylene ต่อการสร้าง multiple appressorium มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อหลังการเก็บเกี่ยวโดยสังเกตจากสปอร์ของ *C. gloeosporioides* สร้าง multiple appressorium บนผลของมะเขือเทศที่สุก ซึ่งมีการสร้าง ethylene แสดงว่า ethylene ที่ปลดปล่อยออกมามีผลต่อการสร้าง multiple appressorium และการแสดงอาการของโรค จากเหตุผลนี้เชื้อรามีวิวัฒนาการในการใช้ฮอร์โมน ethylene เป็นสัญญาณให้เกิดการสร้าง multiple appressorium ในขั้นตอนของการเข้าทำลายของเชื้อ (Flaishman and Kolattukudy, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่า ผิวหน้าที่แข็งและหนาของพืช เช่น ชั้นไข (wax layer) เคลือบอยู่จะเป็นสัญญาณกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์และสร้าง appressorium ซึ่งจำเป็นต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *C. gloeosporioides* (Kim *et al.*1998)

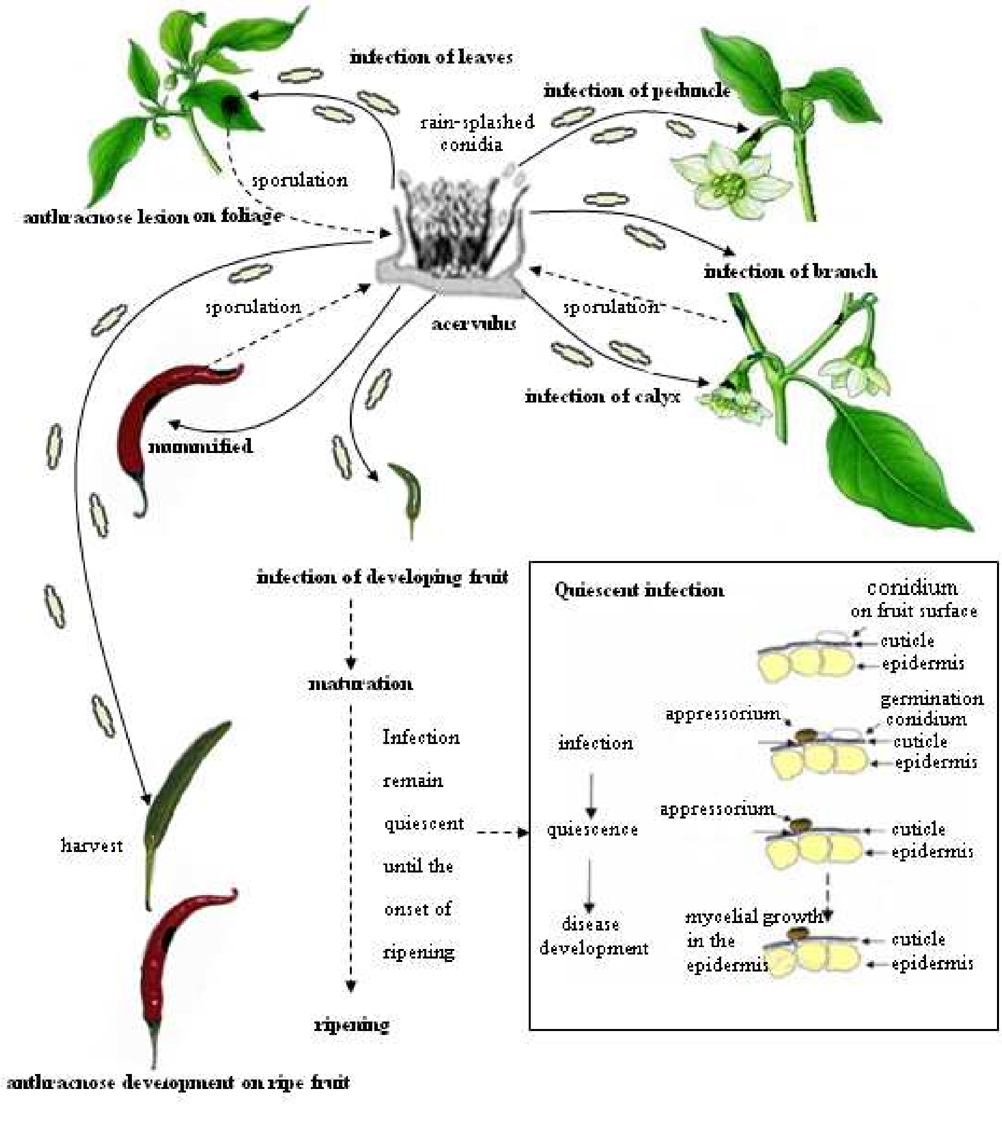
**2.4.4 การศึกษาการติดเชื้อแบบแฝง**

มีการศึกษาการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *Colletotrichum* sp. โดยการใช้พาราควอต (paraquat) ตรวจหาการเข้าทำลายแบบแฝงครั้งแรกในถั่วเหลือง โดยทำการฆ่าเชื้อที่ผิวของฝักและลำต้นของถั่วเหลืองด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% และ 10% clorox แล้วจุ่มในสารละลายพาราควอต บ่มไว้ในที่มีความชื้นสูง 4 วัน ภายใต้สภาพแสงและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปรากฏโครงสร้างของ fruiting body และสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum truncatum, Phomopsis phaseoli,* และ *Cercospora kikuchii* จำนวนมาก (Cerkauskas and Sinclair, 1980) ต่อมาได้นำพาราควอตมาใช้ในการศึกษาปัจจัยของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเข้าทำลายและการพักตัวของเชื้อ *Phomopsis longicolla* (Rupe and Ferriss, 1987) มีการศึกษาการแพร่ระบาดและการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ในเนื้อเยื่อของถั่วและวัชพืช โดยใช้พาราควอตในการตรวจสอบพบ *C. destructivum*, *C. truncatum* และ *Glomerella glycin*es บนตอซังของถั่วเหลืองนอกจากนี้ยังพบ *Colletotrichum* spp. บนใบอ่อนของถั่วเหลือง ก้านและใบของวัชพืชด้วย (Hartman *et al.*, 1986) การศึกษาการติดเชื้อแบบแฝงในมะม่วงโดยนำใบมะม่วงปกติมาแช่น้ำเป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวใบด้วยแอลกอฮอล์ 95% และ 10% clorox แล้วนำไปแช่สารละลายพาราควอตเข้มข้น

0.5% เป็นเวลา 1 นาที นำไปบ่มในสภาพที่มีความชื้นและมีแสงเป็นเวลา 4-5 วัน พบ fruiting body ของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *Pestalotia* sp. (กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร, 2536) เช่นเดียวกับการทดลองของศุภาลักษณ์ โตสุขเจริญกุล และสมศิริ แสงโชติ (2550) ที่ศึกษาผลของสารพาราควอตต่อการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว จากการทดลองพบว่าสารพาราควอตความเข้มข้น 50000 ppm สามารถใช้ตรวจสอบการเข้าทำลายแบบแฝงบนผลมะม่วงได้ภายใน 4 วัน โดยตรวจพบ acervulus ได้ถึง 95% และเมื่อนำผลแอปเปิ้ลที่ปลูกเชื้อมาจุ่มด้วยสารละลายพาราควอตพบ acervuli ของเชื้อ *C. acutatum* เจริญอยู่บนผิวของผลแอปเปิ้ล 80% ของพื้นที่ทั้งหมด ส่วนผลที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไม่พบว่ามีเชื้อเกิดขึ้น (Biggs, 1995)

## 2.5 การแพร่กระบาดและวงจรการเกิดโรค

เชื้อ *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสมีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศโดยการสร้างสปอร์บนก้านสั้น ๆ ภายใน fruiting body ลักษณะรูปถ้วย (acervulus) ซึ่งมองเห็นเป็นจุดดำ ๆ เรียงซ้อนกันเป็นวงบนแผล เมื่อสปอร์แก่จะดันเปลือกด้านบน fruiting body ให้แตกออกแล้วหลุดออกมาข้างนอกปลิวแพร่กระจายไปตามลม น้ำที่สาดกระเซ็น แมลง เครื่องมือด้านเกษตรกรรมและสิ่งเคลื่อนไหวทุกชนิดที่ไปสัมผัสเข้า (ศักดิ์ สุนทรสิงห์, 2537) เมื่อสปอร์ตกลงบนส่วนต่าง ๆ ของพืชเช่น ใบ ดอก ก้านดอก ลำต้น รวมถึงผล หากสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรคสปอร์จะงอก germ tube และสร้าง appressorium เข้าทำลายพืชโดยตรง เมื่อเชื้อราแทงเส้นใยลงสู่ชั้น cuticle และชั้น epidermal cell wall เส้นใยเจริญแบบ biotropic คือเส้นใยใช้อาหารจากเซลล์พืชโดยไม่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย หลังจากนั้นเชื้อเปลี่ยนลักษณะการทำลายเป็นแบบ necrotrophic hyphae ภายใน 48-72 ชั่วโมง โดยเชื้อราเจริญเพิ่มปริมาณขยายพันธุ์ภายในเซลล์ เป็นสาเหตุทำให้เนื้อเยื่อตายและพืชแสดงอาการของโรค ในระยะเดียวกันจะสร้างสปอร์จำนวนมากในชั้น epidermis ส่งผลทำให้ผิวพืชเกิดรอยแตกและมี acervulus ปรากฏขึ้น โดยพบ acervulus เป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่อที่ตายหรืออาจพบในเนื้อเยื่อที่ยังมีชีวิตอยู่ หากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมเชื้อราจะงอก grem tube และสร้าง appressorium เกาะติดผิวพืชไว้จนกว่าสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการแสดงออกของโรค ก็จะเกิดกระบวนการเข้าทำลายพืชต่อไป (ปริฉัตร พละพึง, 2549) ดังแสดงในรูปที่ 2.3




รูปที่ 2.3 วงจรการเกิดโรคแอนแทรกโนสของพริก
(ที่มา : ดัดแปลงจาก Arauz, 2000)

## 2.6 พฤติกรรมของเกษตรกรที่ส่งเสริมการระบาดของโรค

จากการศึกษาของ อรพรรณ วิเศษสังข์ (2549) พบว่าพฤติกรรมที่ส่งเสริมต่อการเกิดการระบาดของโรคมีดังนี้

1. การปลูกพริกแน่นเกินไป โดยไม่เว้นช่องทางเดินในแปลงจะทำให้การดูแลรักษาไม่ทั่วถึง ส่งผลให้การระบาดของโรครุนแรงมากขึ้น

2. การเก็บเกี่ยวผลผลิต ส่วนใหญ่เกษตรกรมักเก็บผลพริกที่ดีออกจากต้นเพื่อจำหน่าย แต่ปล่อยให้ผลพริกที่เป็นโรคตกค้างอยู่บนต้นและร่วงไปในที่สุด ซึ่งจะเป็นการสะสมโรคเพิ่มขึ้น

เรื่อย ๆ และเป็นแหล่งแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุตลอดเวลา แม้จะมีการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดโรคอย่างสม่ำเสมอก็ไม่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ ทำให้มีการระบาดของโรคอย่างต่อเนื่องจนบางครั้งเกษตรกรคิดว่าเชื้อดื้อยาต่อการสารป้องกันกำจัดได้

3. การใช้พันธุ์พริกลูกผสมที่อ่อนแอต่อโรค จากการสำรวจแหล่งปลูกพริกที่มีการระบาดของโรคและจากการทดสอบปฏิกิริยาของพริกบางสายพันธุ์ พบว่าพริกลูกผสมส่วนมากจะอ่อนแอต่อโรคมากกว่าพริกที่เกษตรกรเก็บเมล็ดพันธุ์เอง

## 2.7 การป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนส

การป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนสสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้พันธุ์ต้านทาน วิธีเขตกรรม การควมคุมโดยชีววิธี และการใช้สารเคมี ทั้งนี้ความเหมาะสมของการป้องกันกำจัดในแต่ละวิธีขึ้นอยู่ปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของพืช ช่วงระยะเวลาการระบาด รวมทั้งความรุนแรงของโรค โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

**การใช้วิธีเขตกรรม**

เป็นการป้องกันและกำจัดโรคโดยการจัดการระบบนิเวศน์ของสถานที่ปลูก เพื่อสนับสนุนกระบวนการทางธรรมชาติตามระบบนิเวศที่ไม่ให้เอื้ออำนวยต่อการระบาดของโรคโดยลดจำนวนให้น้อยลงด้วยการปฏิบัติการทางเกษตร เช่น การกำหนดระยะปลูกให้เหมาะสมโดยการปลูกพริกระยะ 50×50 เซนติเมตร มีการเกิดโรคแอนแทรกโนสต่ำที่สุดและให้ผลผลิตได้มากกว่าการปลูกโดยใช้ระยะอื่น (อรพรรณ วิเศษสังข์และจุมพล สาระนาค, มปป) หากระยะการปลูกเหมาะสมอยู่แล้วควรทำการตัดแต่งกิ่งที่ไม่สมบูรณ์ออกและแต่งทรงพุ่มให้โปร่ง เพื่อให้อากาศถ่ายเทภายในทรงพุ่มเป็นการลดความชื้นทำให้ไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุ นอกจากนี้เมื่อทำการเก็บผลผลิตออกจากแปลงควรเก็บผลพริกออกทั้งหมดรวมทั้งผลพริกที่เป็นโรคด้วยเพื่อไม่ให้เป็นแหล่งสะสมของโรคในพริกรุ่นหลังและควรให้น้ำอย่างเพียงพอเพื่อช่วยให้พืชพ้นสภาวะเครียดได้เร็วขึ้น (อรณพรรณ วิเศษสังข์, 2549)

**การควบคุมโดยชีววิธี**

การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคต้องอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการเจริญและสามารถแข่งขันการใช้อาหารบนผิวใบ ดอก หรือผลของพืชได้ดี

การดำรงชีวิตของจุลินทรีย์เหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อม เช่น อาหาร อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด การดำรงชีพของจุลินทรีย์มีทั้งแบบที่เป็น epiphytes และ endophytes ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ เพื่อจะนำมาใช้ในการควบคุมโรคจึงต้องพยายามแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ โดยจุลินทรีย์ที่ดีควรจะมีชีวิตอยู่รอดได้บนผิวพืชในสภาพแวดล้อมเช่นเดียวกับการเกิดโรคมีการเจริญและเพิ่มปริมาณที่ดี สามารถสร้างเซลล์หรือสปอร์ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากรายงานที่มีการศึกษา พบว่ามีทั้งที่เป็นเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์ในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนสโดยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เป็นเชื้อราพบว่า nonpathogenic strain ของเชื้อรา *Colletotrichum magna* เมื่อเข้าครอบครองพืชจะมีลักษณะเป็น endophyte ซึ่งจะไปขัดขวางการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ Sariah *et.al.* (1994) ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เพื่อควบคุมโรคแอนแทรกโนสของพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ได้รวมทั้งทำให้เส้นใยมีรูปร่างที่ผิดปกติไป โดยทำให้เส้นใยหนาขึ้นและมีช่องว่างเกิดขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรียสร้างสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อฉีดพ่นด้วยสารแขวนลอยแบคทีเรียทำให้ลดการเข้าทำลายและลดจำนวนแผลที่เกิดขึ้นได้ (Freeman and Rodriguez, 1992) Koomen and Jeffries (1993) แยกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้จากช่อดอก ใบ และผลของมะม่วงทั้งหมด 648 isolates ประกอบด้วยแบคทีเรีย ยีสต์ และ filamentous fungi เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *C. gloeosporioides* ความสามารถในการยับยั้งการงอกของ conidia และความสามารถในการลดการพัฒนาของแผลแอนแทรกโนสพบว่ามีแบคทีเรีย 2 isolates คือ isolate 204 ซึ่งจำแนกได้เป็น *Bacillus cereus* และ isolate 558 ซึ่งจำแนกได้เป็น *Pseudomonas fluorescens* ที่สามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของ conidia ของ *C. gloeosporioides* และการพัฒนาของแผลแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงได้ เมื่อนำทั้ง 2 isolates ไปทดสอบการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวภายใต้สภาพทางการค้าร่วมกับการใช้ adhesive material, peptone, fruit wax และ sucrose polyester พบว่าสารต่าง ๆ ไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสให้กับ *Bacillus cereus* และ *Pseudomonas fluorescens* กลไกของแบคทีเรียที่สามารถลดการพัฒนาของแผลแอนแทรกโนสยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานการสร้างปฏิชีวนะสารที่ระเหยได้ และระเหยไม่ได้ หรือการเป็นปรสิต ภายใต้สภาวะที่เป็น ironlimiting *Pseudomonas fluorescens* สามารถสร้าง siderophore และเป็นสาเหตุของการเพิ่มค่า pH ในอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต การยับยั้งการเกิดโรคอันเป็นผลเนื่องมาจากการแก่งแย่งธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ เห็นว่ามีความเป็นไปได้ค่อนข้างมากสำหรับการพัฒนาเป็น biological control agent เพื่อควบคุมโรคแอนแทรก-โนสของมะม่วง นอกจากนี้การใช้เชื้อราปฏิปักษ์ เช่น*Trichoderma* spp. พบว่าสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *C. musae* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าของกล้วยได้ โดยการเข้าไปเป็นปรสิตภายในเส้นใย

ของเชื้อราและการสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งสังเกตได้จากเกิด clear zone ตลอดจนมีผลต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์และการสร้าง germ tube (Mortuza, 1997)

**การใช้สารเคมี**

สารเคมีที่ใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้แก่ สารเคมีประเภทไม่ดูดซึม เช่น zineb, maneb, captan และสารประกอบทองแดง โดยใช้เดี่ยว ๆ หรือใช้ร่วมกัน (McMillan, 1972; Frean, 1985) Cordoba (1992) พบว่าการใช้ dithiocarbamate มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคแอนแทรกโนส สามารถยืดระยะเวลาในการขนส่งทางเรือออกไปได้นาน ส่วนสารกำจัดเชื้อราพวก copper พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่า dithiocarbamate มากในสภาพที่มีการเข้าทำลายของโรคสูง ส่วนสารเคมีประเภทดูดซึมเช่น carbendazim, benomyl, prochloraz สามารถควบคุมโรคได้ผลดี ดังเช่น รายงานของ Sohi *et.al.* (1973) ที่ได้ทำการทดลองใช้สารเคมี benomyl ความเข้มข้น 500 ppm และ thiabendazole เข้มข้น 900 ppm โดยการแช่ผลมะม่วงแล้วเอาขึ้นพักกับการแช่ผลนาน 10 นาที ผลการทดลองพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงได้และให้ผลในการควบคุมโรคไม่แตกต่างกันส่วน captan, aureofungin และ formalin ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค จากการศึกษาของ Eckert *et.al.* (1979) ; Ben-Aire (1975) รายงานว่าสารเคมีในกลุ่ม benzimidazole เหมาะที่จะใช้ในการควบคุมโรคของผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวเนื่องจากสามารถแทรกซึมลงไปในชั้น wax บนผิวผลิตผลถึงชั้นที่เกิดการเข้าทำลายได้ พบว่า benomyl มีประสิทธิภาพในการแทรกซึมลงไปใต้ผิวผลิตผลสูงกว่า thiabendazole, carbendazim และ thiaphanate-methyl จึงมีผลให้ benomyl มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดีด้วย (Eckert, 1983) McMillan (1973) รายงานว่าการผสม benomyl กับสารจับใบให้ผลในการควบคุมโรคแอน-แทรกโนสได้ดีและจัดเป็นสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าชนิดอื่น การฉีดพ่นสาร prochloraz ร่วมกับสารทองแดงให้ผลในการควบคุมโรคช่อดอกไหม้ได้ดีกว่าสาร mancozeb และ copper (Fitzell and Peak, 1986)

Griffe (1973) ได้ทำการศึกษาความต้านทานของเชื้อโรคแอนแทรกโนสต่อสารเคมีประเภทดูดซึมและประเภทไม่ดูดซึม ผลการศึกษาได้แก่ *C. musae* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของกล้วยต้านทานต่อ benomyl และ thiabendazole ได้สูงถึง 8,000 ppm ในประเทศมาเลเซียได้มีรายงานการดื้อยาของเชื้อ *C. gloeoporioides* ต่อสาร benomyl เมื่อใช้ในระยะก่อนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยวมากเกินไป (Jeffries *et.al.*, 1990; Spalding, 1982) นอกจากนี้ Reddy *et.al.* (1980) ได้รายงานว่าเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริกต้านทานต่อ copper sulphate และ Dithane M-45 ได้ถึง 500 ppm

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 การแยกเชื้อ *Collectotrichum gloeosporioides* จากพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* L.)

เก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการของโรคกุ้งแห้งในจังหวัดนครราชสีมาระหว่างเดือนมกราคม–กุมภาพันธ์ 2551 มาล้างด้วยน้ำสบู่ จากนั้นตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 3×3 มิลลิเมตร แช่ตัวอย่างลงในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1% นาน 2-3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แล้ววางบนอาหาร water agar (WA) จำนวน 5 ชิ้นต่อ plate นำไปบ่ม (incubate) ภายใต้แสงฟลูออ-เรสเซนต์ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น 3 วัน ทำการตัดปลายเส้นใยของเชื้อย้ายลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จำนวน 4 ชิ้นต่อ plate

## 3.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test)

ทำการทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่แยกได้แต่ละไอโซเลตบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำไปเตรียมเป็น inoculum ของเชื้อในรูปของ spore suspension ความเข้มข้น $10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร ทำการฉีดพ่นลงบนใบพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อตอายุ 2 เดือนด้วยวิธี horizontal spraying เก็บพริกไว้ในโรงเรือนทดลองที่อุณหภูมิ 27 องซาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูระยะเวลาการเกิดโรคเพื่อเปรียบเทียบความสามารถการทำให้เกิดโรคของแต่ละไอโซเลต

## 3.3 การศึกษาปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของเชื้อ *Collectotrichum gloeosporioides* ในสภาพแฝง

### 3.3.1 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยใช้สารพาราควอต (paraquat)

ปลูกพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อตในกระบะเพาะในเดือนมีนาคม 2552 โดยใช้ peat moss เมื่อพริกอายุได้ 1 เดือน ย้ายต้นพริกใส่กระถางพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้วกระถางละ 1 ต้น จากนั้น 1 สัปดาห์ทำการใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 อัตรา 2 กรัมต่อกระถาง เมื่อพริกอายุได้ 2 เดือนจึงนำมาทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ประกอบด้วย 14 ตำรับทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ใช้พริก 1 ต้น/ซ้ำ โดยตำรับทดลองที่ 1-7 ทำการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* บนใบด้วยวิธี horizontal spraying ในรูปของ spore suspension ความเข้มข้น

$1\times10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร เก็บพริกที่ปลูกเชื้อไว้ 48 ชั่วโมงในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซนต์ จากนั้นฉีดพ่นสารพาราควอต (1,1' – dimethyl - 4, 4' – bipyridinium dichloride 27.67% W/V) ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 ppm ซึ่งมีสารออกฤทธิ์เท่ากับ 0, 6.92, 13.84, 20.75, 27.67, 41.51 และ 55.34 mg/l ตามลำดับ ตำรับทดลองที่ 8-14 ฉีดพ่นสารพาราควอตที่ความเข้มข้นเดียวกันกับตำรับทดลองที่ 1-7 โดยไม่มีการปลูกเชื้อ นำพริกที่ผ่านการฉีดพ่นพาราควอตเข้าเก็บในเรือนทดลอง ภายใต้สภาพเดียวกันกับที่ใช้หลังการปลูกเชื้อ จากนั้น 24 ชั่วโมง เริ่มทำการตรวจผลโดยนับจำนวนแผลที่เกิดขึ้นและจำนวนใบที่ร่วง ทำการตรวจผลต่อไปทุกวันจนจำนวนแผลและจำนวนใบร่วงไม่เปลี่ยนแปลง

### 3.3.2 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยใช้สารเอทีฟอน (ethephon)

ทำการเตรียมต้นพริกเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3.1 วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ประกอบด้วย 18 ตำรับทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ใช้พริก 1 ต้น/ซ้ำ โดยตำรับทดลองที่ 1-9 ทำการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* บนใบด้วยวิธี horizontal spraying ในรูปของ spore suspension ความเข้มข้น $1\times10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร เก็บพริกที่ปลูกเชื้อไว้ 48 ชั่วโมงในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นฉีดพ่นสารเอทีฟอน (ethephon, 2-chloroethylphosphonic acid 48% w/v) ความเข้มข้น 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 และ 200 ppm ซึ่งมีสารออกฤทธิ์เท่ากับ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 mg/l ตามลำดับ ตำรับทดลองที่ 10-18 ฉีดพ่นสารเอทีฟอนที่ความเข้มข้นเดียวกันกับตำรับทดลองที่ 1-9 โดยไม่มีการปลูกเชื้อแล้วนำพริกที่ทำการฉีดพ่นสารเอทีฟอนเก็บในโรงเรือนทดลองในสภาพเดียวกับตำรับที่ทำการปลูกเชื้อ จากนั้น 24 ชั่วโมงเริ่มทำการตรวจผลโดยนับจำนวนแผลที่เกิดขึ้นและจำนวนใบที่ร่วง ทำการตรวจผลต่อไปทุกวันจนจำนวนแผลและจำนวนใบร่วงไม่เปลี่ยนแปลง

### 3.3.3 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยการควบคุมการให้น้ำ

ทำการเตรียมต้นพริกเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3.1 ทำการหาความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน (water holding capacity) โดยวิธี gravimetric (สมศักดิ์ มณีพงศ์, 2546) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ประกอบด้วย 8 ตำรับทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ ใช้พริก 1 ต้น/ซ้ำ โดยตำรับทดลองที่ 1-4 ทำการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* บนใบด้วยวิธี horizontal spraying ในรูปของ spore suspension ความเข้มข้น $1\times10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร เก็บพริกที่ปลูกเชื้อไว้ 48 ชั่วโมงในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซนต์ จากนั้นทำการให้น้ำที่ระดับ 100, 50, 25 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการอุ้มน้ำของดิน ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 300, 150, 75 และ 38 มิลลิลิตรต่อกระถาง ตำรับทดลองที่ 5-8 ให้น้ำที่ระดับเดียวกันโดยไม่มี

การปลูกเชื้อ นำต้นพริกทั้งหมดเก็บไว้ในโรงเรือนโดยไม่ให้น้ำและความชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นให้น้ำตามปกติพร้อมทั้งให้ความชื้นที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับการสเปรย์น้ำกลั่นทั่วใบพริก ทำการตรวจผลโดยนับจำนวนแผลที่เกิดขึ้นทุกวันจนจำนวนแผลและจำนวนใบร่วงไม่เปลี่ยนแปลง

## 3.4 การตรวจแหล่งเชื้อเริ่มต้นด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

### 3.4.1 การเตรียมแอนติเจน

เลี้ยงเชื้อ *C. gloeosporioides* ลงใน potato dextrose broth (PDB) ปริมาณ 40 มิลลิลิตร ในขวด 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน กรองอาหารด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำเส้นใยมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตามด้วย 0.85% NaCl อีก 1 ครั้ง จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยวางเส้นใยของเชื้อบนกระดาษกรอง ใส่ในกล่องพลาสติกใสที่บรรจุซิลิ-กาเจล จากนั้นวางทับด้วยกระดาษกรองอีกชั้น ปิดฝากล่องและใช้เทปใสพันขอบเพื่อป้องกันความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำเส้นใยที่แห้งแล้วมาชั่งน้ำหนักนำไปสกัดโปรตีนโดยประยุกต์จากวิธีของ Gooding (1966) โดยใช้ celite แทนผง quartz นำเอา celite ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและ 0.85% NaCl แล้วไปทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการบดเส้นใยใน 0.5 M phosphate buffer pH 7.2 ในอัตราส่วน 3 เท่าของน้ำหนักแห้ง (w/v) ในโกร่งที่แช่เย็นโดยใช้ celite เป็นสารช่วยทำให้เส้นใยแตก หลังจากบดจนละเอียดแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดของเหลวชั้นบนมาทำการตรวจความเข้มข้นของแอนติเจนโดยวิธี Bradford Method แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อไป

### 3.4.2 การเก็บ normal serum

ทำการเก็บ normal serum เพื่อใช้สำหรับเปรียบเทียบกับแอนติเซรุ่มที่ผลิต โดยใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White เพศเมีย สีขาว ตาแดง จำนวน 2 ตัว ที่ไม่เคยได้รับการฉีดสารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนมาก่อน ทำความสะอาดใบหูของกระต่ายและทำการเจาะเลือดบริเวณใบหูด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 21G ประมาณ 2 มิลลิลิตรต่อกระต่าย 1 ตัว โดยแทงเข็มเข้าเส้นเลือดบริเวณใบหูของกระต่ายและปล่อยให้เลือดไหลลงในหลอด eppendorf ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำหลอดที่บรรจุเลือดดังกล่าววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เลือดแข็งตัว จากนั้นใช้ปลายเข็มกรีดบริเวณรอยต่อระหว่างผิวหน้าของเลือดที่แข็งตัวกับผนังหลอด eppendorf เพื่อให้ส่วนที่แข็งตัวของเลือดจมลงก้นหลอด นำหลอด eppendorf ที่บรรจุเลือดนี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดส่วนที่เป็น

น้ำเหลืองในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 0.02 % Sodium azide ($NaN_3$) เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อเก็บ normal serum ไว้เป็นเวลานาน

### 3.4.3 การฉีดแอนติเจน

นำแอนติเจนที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.1 ฉีดเข้ากระต่ายทั้งหมด 3 ครั้งแต่ละครั้งห่างกัน 7-10 วันโดยครั้งที่ 1 และ 2 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) บริเวณสะโพกโดยผสมสารแขวนลอยแอนติเจนกับ Freund's adjuvant, complete (Difco Laboratories, USA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ผสมให้เข้ากันจนมีลักษณะเป็นครีมขาวข้น ซึ่งกระต่ายแต่ละตัวจะฉีดปริมาตรสารแขวนลอยแอนติเจนเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1.69 µg/ml ส่วนครั้งที่ 3 ฉีดเข้าเส้นเลือด (intravascular) บริเวณใบหูโดยใช้สารแขวนลอยแอนติเจน 1 มิลลิลิตรโดยไม่ผสมกับ Freund's adjuvant

### 3.4.4 การเก็บแอนติเซรุ่ม

เก็บแอนติเซรุ่มลักษณะเดียวกับการเก็บ normal serum เก็บแอนติเซรุ่มครั้งแรกหลังจากฉีดครั้งที่ 3 ครบ 15 วัน จำนวน 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำแอนติเซรุ่มไปทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแอนติเจน และเก็บแอนติเซรุ่มครั้งที่ 2 โดยเก็บห่างจากครั้งแรก 7 วัน จำนวน 5 มิลลิลิตร

## 3.5 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเซรุ่มที่ผลิตได้

นำแอนติเซรุ่มที่ได้มาประเมินหาความจำเพาะเจาะจงโดยใช้เทคนิค Direct Antigen Coating (DAC) indirect ELISA ตามวิธีของโสภณ วงศ์แก้ว (2536) โดยนำเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลตที่ใช้ผลิตแอนติเซรุ่มและไอโซเลตอื่นรวมทั้งเชื้อ *Sphaceloma* sp. ไอโซ-เลตต่าง ๆ ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA รวมทั้ง soluble mycelial protein ที่ใช้ผลิตแอนติเซรุ่มสำหรับ negative control ใช้เชื้อ *Phytophthora* spp. นำเส้นใยและสปอร์ของเชื้อต่าง ๆ ผสมกับ carbonate coating buffer pH 9.6 บดส่วนผสมจนละเอียดด้วยโกร่ง ใช้ไมโครปิเปตดูดเอาสารแขวนลอยของเชื้อ และ soluble mycelial protein ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของจานทดสอบ (microtiter plate) จำนวน 2 ซ้ำ (หลุม) ต่อตัวอย่าง บ่มจานทดสอบในกล่องชื้น (กล่องพลาสติกใส่กระดาษชื้น) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง หรือเก็บใส่ตู้เย็นค้างไว้ 1 คืน เทส่วนประ-กอบที่บ่มทิ้งไว้จากนั้นหยอด blocking solution (1% skimmed milk)ใน carbonate coating buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ในกล่องชื้นนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาล้างด้วย phosphate buffer saline-tween (PBS-T) 3 ครั้ง แช่ไว้ 2-3 นาทีต่อครั้ง หยอด antiserum ($1^{\circ}$ As) ที่เจือจางใน conjugate buffer ที่ 1:5,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ในกล่องชื้น 1 ชั่วโมงที่

37 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง ทำการเตรียม anti-rabbit IgG alkaline phosphate conjugate (Sigma, Cat. No. A3687) อัตรา 1:10,000 (v/v) ใน conjugate buffer นำไปหยดลงในหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นนาน 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง จากนั้นใส่ 0.01% p-nitrophenyl phosphate (Gibco BRL, Cat. No. 15978-098) ใน substrate buffer pH 9.8 หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำออกมาตรวจปฏิกิริยาเมื่อมีสีเหลืองปรากฏขึ้นบนหลุม positive control จนเห็นชัดด้วยตาเปล่า หยุดปฏิกิริยาด้วย 3 M potassium hydroxide (KOH) อัตรา 25/100 ไมโครลิตร จากนั้นนำจาน ELISA plate ไปวัดการดูดซับแสงด้วย ELISA reader (SpectraCount™ Microplate) ที่ความยาวช่วงคลื่น 405 นาโนเมตร

## 3.6 การตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* ในสภาพแฝงด้วยวิธี ELISA

ทำการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* บนใบพริกพันธุ์ Super Hot อายุ 2 เดือน ที่ระดับความเข้มข้น $10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ในเรือนทดลองอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ เก็บใบพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อมาตรวจสอบการเข้าทำลายหลังปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง โดยวิธี indirect ELISA โดยตัดชิ้นใบพริกขนาด 3×3 มิลลิเมตร บริเวณที่ปลูกเชื้อ 2 ชิ้นต่อใบ ล้างชิ้นใบพริกด้วย phosphate buffer saline–tween (PBS-T) 3 ครั้ง แช่ไว้นาน 2 นาทีต่อครั้ง ทำการเตรียมตัวอย่างจากใบพืชปกติเพื่อใช้เป็น negative control ในลักษณะเดียวกันกับการเตรียมตัวอย่างทำการเปรียบเทียบระหว่างใบพริกปกติ ใบพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อและใบพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อแล้วผ่านการต้มใบเป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาทีตามลำดับ ตรวจสอบปฏิกิริยาโดยใส่ชิ้นใบพริกแต่ละชิ้นลงในหลอด eppendorf ใหม่ที่บรรจุ antiserum ความเข้มข้น 1:1000 ใน conjugate buffer บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที จากนั้นเท antiserum ทิ้ง เติม PBS-T เพื่อล้างใบพริก 3 ครั้ง แช่ไว้นาน 2 นาทีต่อครั้ง ย้ายชิ้นใบพริกลงหลอด eppendorf ใหม่ที่บรรจุ anti-rabbit IgG alkaline phosphate conjugate ความเข้มข้น 1:10000 (v/v) ใน conjugate buffer บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที เท antiserum ทิ้ง ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง ย้ายชิ้นใบพริกลงในหลอด eppendorf ที่บรรจุ p–nitrophenyl phosphate 0.01% ใน substrate buffer pH 9.8 บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10–30 นาที เมื่อมีสีเหลืองปรากฏขึ้นจนเห็นได้ด้วยตาเปล่า หยุดปฏิกิริยาด้วย 3 M KOH 50 ไมโครลิตรต่อหลอด ใช้ micropipette ดูดสารละลายจากหลอด eppendorf ที่ใช้ทำปฏิกิริยาใส่ลงในหลุม ELISA plate นำไปอ่านปฏิกิริยาด้วยเครื่องอ่าน ELISA Reader ที่ช่วงคลื่น 405 นาโนเมตร

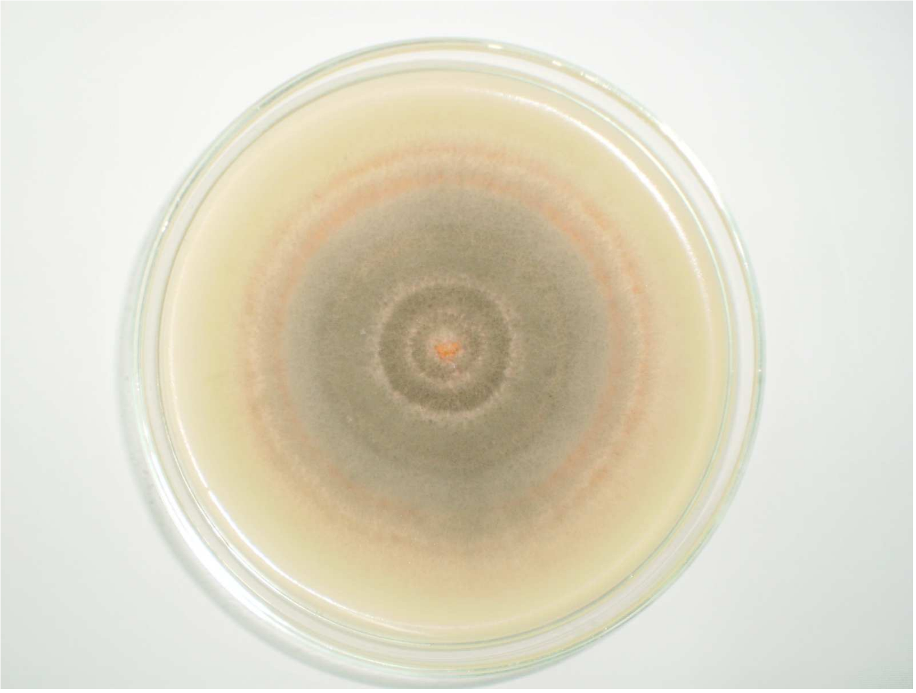
# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

## 4.1 การแยกเชื้อ *Collectotrichum gloeosporioides* จากพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* L.)

จากการนำผลพริกที่เป็นโรคมาทำการแยกเชื้อสามารถแยกได้ 5 ไอโซเลตคือ SRCG-1 SRCG-2 และ SRCG-3 จากตลาดแม่กิมเฮง อ. เมือง จ. นครราชสีมา SRCG-4 และ SRCG-5 จากสวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหาร PDA ระยะแรกเป็นเส้นใยสีขาวซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีเทาอมชมพูในระยะต่อมา และสร้าง spore mass เป็นเมือกสีส้ม กระจายเป็นวงทั่วโคโลนี (รูปที่ 4.1) โคนิเดียมีเซลล์เดียว ลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกใส ไม่มีสี ขนาดประมาณ $4.5\times13.5$ ไมครอน เมื่อนำโคนิเดียของเชื้อใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อและ snakeskin pleated dialysis tubing (10,000 MWCO) ขนาด $1\times1$ เซนติเมตร เซลล์จะสร้าง appressoria ลักษณะคล้ายรูปกระบอง สีน้ำตาลเข้มขนาดประมาณ $6.3\times7.1$ ไมครอน ภายใน 3 วัน (รูปที่ 4.2)

## 4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Pathogenicity test)

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคพบว่าไอโซเลต SRCG-4 ทำให้ใบพริกแสดงอาการภายใน 3 วันหลังจากการปลูกเชื้อ ส่วนไอโซเลต SRCG-5 ทำให้เกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน ขณะที่ไอโซเลต SRCG-1 SRCG-2 และ SRCG-3 ทำให้เกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ 6 วัน อาการของโรคบนใบเป็นจุดแผลแห้งกลมหรือรี สีน้ำตาลเข้ม ขอบแผลยุบต่ำกว่าระดับผิวใบเล็กน้อย เนื้อเยื่อบริเวณรอบแผลเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (รูปที่ 4.3) อาการที่พบบนดอกหากเกิดบริเวณฐานกลีบดอก ลักษณะเป็นจุดช้ำสีน้ำตาลดำ เนื้อเยื่อของแผลบุ๋มลึกลงไปเล็กน้อย (รูปที่ 4.4) จะขยายใหญ่ขึ้นเมื่อดอกบานและลุกลามไปกับผลอ่อนได้ หากเกิดบนก้านดอกจะทำให้ดอกร่วง



รูปที่ 4.1 โคโลนีของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่แยกได้จากพริก บนอาหาร PDA อายุ 7 วัน

รูปที่ 4.2 โคนิเดียและ appressoria ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* หลังจากย้ายลงบน snakeskin pleated dialysis tubing 3 วัน

รูปที่ 4.3 อาการของโรคแอนแทรกโนสบนใบพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อต

รูปที่ 4.4 ดอกพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อตที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส

## 4.3 การศึกษาปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของเชื้อ *Collectotrichum gloeosporioides* ในสภาพแฝง

### 4.3.1 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยใช้สารพาราควอต (paraquat)

ผลของการทดลองพบว่าตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารพาราควอตความเข้มข้น 27.67 mg/l เกิดจำนวนแผลมากที่สุดเฉลี่ย 10 แผลต่อต้น รองลงมาคือการปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารพาราควอตความเข้มข้น 41.51, 55.34 และ 20.75 mg/l โดยเกิดแผลเฉลี่ย 9, 9 และ 5.75 แผลต่อต้นตามลำดับ แต่ตำรับทดลองที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อไม่เกิดแผล การทดสอบทางสถิติพบว่าจำนวนแผลที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนการร่วงของใบพบว่าตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารพาราควอตความเข้มข้น 55.34 mg/l ทำให้ใบร่วงมากที่สุดเฉลี่ย 12 ใบต่อต้น รองลงมาคือตำรับทดลองที่ฉีดพ่นสารพาราควอตความเข้มข้น 55.34 mg/l ตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารพาราควอตความเข้มข้น 41.51 mg/l และ 27.67 mg/l โดยมีใบร่วงเฉลี่ย 7.2 5.75 และ 4.25 ใบต่อต้นตามลำดับ การทดสอบทางสถิติพบว่า การร่วงของใบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติด้วยเช่นกัน จากผลการทดลองพบว่า การปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดและไม่ฉีดสารพาราควอตทำให้เกิดแผล แต่การฉีดพ่นสารพาราควอตความเข้มข้น 27.67 mg/l ทำให้เกิดแผลเฉลี่ยต่อต้นมากกว่าการปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียวถึง 2 เท่า ส่วนการร่วงของใบพบว่าการปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารพาราควอตทำให้เกิดใบร่วง 4.25 ใบต่อต้นในขณะที่การฉีดพ่นสารพาราควอตที่ความเข้มข้นเดียวกันไม่ทำให้ใบร่วงดังแสดงในตารางที่ 4.1

### 4.3.2 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยใช้สารเอทีฟอน (ethephon)

จากการทดลอง พบว่าตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 48 mg/l ให้แผลเฉลี่ยต่อต้นมากที่สุดเฉลี่ย 7.25 แผลต่อต้น รองลงมาคือตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 36 และ 12 mg/l โดยเกิดแผลเฉลี่ย 6.25 และ 4.25 แผลต่อต้นตามลำดับ ส่วนตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 60 และ 72 mg/l ทำให้เกิดจำนวนแผลน้อยที่สุดเฉลี่ย 2.5 แผลต่อต้น ในขณะที่ตำรับทดลองที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อไม่เกิดแผล ผลการทดสอบทางสถิติพบว่า จำนวนแผลที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนการร่วงของใบพบว่าตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 96 mg/l ทำให้ใบร่วงมากที่สุดเฉลี่ย 8.25 ใบต่อต้น รองลงมาคือตำรับทดลองที่ฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 96 mg/l ตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 84 mg/l และ 72 mg/l โดยมีใบร่วงเฉลี่ย 6.25 6.25 และ 5.25 ใบต่อต้น การทดสอบทางสถิติพบว่า การร่วงของใบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติด้วยเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.2

### 4.3.3 การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อในสภาพแฝงโดยการควบคุมการให้น้ำ

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า ตำรับทดลองที่ให้น้ำปริมาณ 38 มิลลิลิตรต่อกระถางทำให้เกิดจำนวนแผลเฉลี่ยมากที่สุดคือ 18.5 แผลต่อต้น ขณะที่ตำหรับทดลองที่ให้น้ำปริมาณ 75, 150 และ 300 มิลลิลิตรต่อกระถางเกิดแผลเฉลี่ย 10, 8.25 และ 4.5 แผลต่อต้น ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าจำนวนแผลที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยตำรับทดลองที่ให้น้ำปริมาณ 38 มิลลิลิตรต่อกระถางทำให้เกิดจำนวนแผลเฉลี่ยมากกว่าการให้น้ำที่ปริมาณ 300 มิลลิลิตรต่อกระถางถึง 4 เท่าและมีความแตกต่างกว่าตำรับทดลองอื่น ๆ

**ตารางที่ 4.1** ผลการใช้สารพาราควอตกระตุ้นการแสดงอาการของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อต สังเกตผลหลังจากฉีดพ่นสารพาราควอต 3 วัน

| ตำรับทดลอง | จำนวนแผล/ต้น[1/] | จำนวนใบร่วง/ต้น[1/] |
|---|---|---|
| 1. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 0 mg/l | 4[b] | 0[f] |
| 2. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 6.92 mg/l | 4.5[b] | 0[f] |
| 3. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 13.84 mg/l | 3.25[b] | 0[f] |
| 4. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 20.75 mg/l | 5.75[b] | 1.75[de] |
| 5. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 27.67 mg/l | 10[a] | 4.25[c] |
| 6. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 41.51 mg/l | 9[a] | 5.75[b] |
| 7. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 55.34 mg/l | 9[a] | 12[a] |
| 8. ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 0 mg/l | 0[c] | 0[f] |
| 9. ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 6.92 mg/l | 0[c] | 0[f] |
| 10. ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 13.84 mg/l | 0[c] | 0[f] |
| 11. ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 20.75 mg/l | 0[c] | 0[f] |
| 12. ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 27.67 mg/l | 0[c] | 0.5[ef] |
| 13. ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 41.51 mg/l | 0[c] | 3[cd] |
| 14. ฉีดพ่นพาราควอตความเข้มข้น 55.34 mg/l | 0[c] | 7.2[b] |
| C.V.( %) | 10.43 | 31.17 |

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

**ตารางที่ 4.2** ผลการใช้สารสารเอทีฟอนกระตุ้นการแสดงอาการของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อต สังเกตผลหลังจากฉีดพ่นสารเอทีฟอน 3 วัน

| ตำรับทดลอง | จำนวนแผล/ต้น[1/] | จำนวนใบร่วง/ต้น[1/] |
|---|---|---|
| 1. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 0 mg/l | 2.75[c] | 0[d] |
| 2. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 12 mg/l | 4.25[bc] | 0[d] |
| 3. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 24 mg/l | 3.25[c] | 0[d] |
| 4. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 36 mg/l | 6.25[ab] | 1.75[d] |
| 5. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 48 mg/l | 7.25[a] | 2.25[cd] |
| 6. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 60 mg/l | 2.5[c] | 3.25[c] |
| 7. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 72 mg/l | 2.5[c] | 5.25[b] |
| 8. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 84 mg/l | 3.5[c] | 6.25[b] |
| 9. ปลูกเชื้อ+ ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 96 mg/l | 3[c] | 8.25[a] |
| 10. ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 0 mg/l | 0[d] | 0[d] |
| 11. ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 12 mg/l | 0[d] | 0[d] |
| 12. ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 24 mg/l | 0[d] | 0[d] |
| 13. ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 36 mg/l | 0[d] | 0[d] |
| 14. ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 48 mg/l | 0[d] | 0[d] |
| 15. ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 60 mg/l | 0[d] | 0.5[d] |
| 16. ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 72 mg/l | 0[d] | 3.25[c] |
| 17. ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 84 mg/l | 0[d] | 3.25[c] |
| 18. ฉีดพ่นเอทีฟอนความเข้มข้น 96 mg/l | 0[d] | 6.25[b] |
| C.V.( %) | 1.59 | 32.25 |

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

**ตารางที่ 4.3** ผลการควบคุมการให้น้ำเพื่อกระตุ้นการแสดงอาการของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อต สังเกตผลหลังงดการให้น้ำ 3 วัน

| ตำรับทดลอง | จำนวนแผล/ต้น[1/] | จำนวนใบร่วง/ต้น[1/] |
|---|---|---|
| ปลูกเชื้อ+ให้น้ำปริมาณ 300 มล./กระถาง (1WHC*) | 4.50[b] | 0[a] |
| ปลูกเชื้อ+ให้น้ำปริมาณ 150 มล./กระถาง (1/2WHC) | 8.25[b] | 0[a] |
| ปลูกเชื้อ+ให้น้ำปริมาณ 75 มล./กระถาง (1/4WHC) | 10.00[b] | 0[a] |
| ปลูกเชื้อ+ให้น้ำปริมาณ 38 มล./กระถาง (1/8WHC) | 18.50[a] | 0[a] |
| ให้น้ำปริมาณ 300 มล./กระถาง (1WHC) | 0[c] | 0[a] |
| ให้น้ำปริมาณ 150 มล./กระถาง (1/2WHC) | 0[c] | 0[a] |
| ให้น้ำปริมาณ 75 มล./กระถาง (1/4WHC) | 0[c] | 0[a] |
| ให้น้ำปริมาณ 38 มล./กระถาง (1/8WHC) | 0[c] | 0[a] |
| C.V.( %) | 11.44 | 0 |

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT) * WHC = Water Holding Capacity

## 4.4 การตรวจแหล่งเชื้อเริ่มต้นด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

### 4.4.1 การผลิตแอนติเซรุ่มของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides*

การผลิตแอนติเซรุ่มโดยใช้ของเหลวที่ได้จากการบดเส้นใยและโคโลนีซึ่งมีปริมาณโปรตีน 0.85 ไมโครกรัมต่อการฉีด 1 ครั้ง ฉีดเข้ากระต่ายในลักษณะฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยผสมกับ Freund’s adjuvant, complete 2 ครั้งร่วมกับการฉีดเข้าเส้นเลือดโดยมีปริมาณโปรตีน 1.69 ไมโครกรัม โดยไม่ผสม Freund’s adjuvant, complete 1 ครั้ง พบว่าสามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้

### 4.4.2 การตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเซรุ่มที่ผลิตได้

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติเซรุ่มพบว่า normal serum ที่นำมาใช้ในการทดสอบไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *C. gloeosporioides* และเชื้อราอื่น ๆ ส่วนแอนติเซรุ่มที่ผลิตได้ให้ค่าดูดกลืนแสงสูงเมื่อทำปฏิกิริยากับ soluble mycelial protein และเชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลตที่ใช้ผลิตแอนติเซรุ่มซึ่งมีค่ามากกว่า negative control ถึง 2 เท่า ในขณะที่ทำปฏิกิริยาเล็กน้อยกับเชื้อ

*C. gloeosporioides* ไอโซเลต SRCG1, *C. capsici* ไอโซเลต BRCC2 และ BRCC3 และเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* ไอโซเลต GCMK3-2, GCMKCl-1 และ GF 901 แต่ให้ค่าต่ำกับเชื้อ *Phytophthora* spp. ดังแสดงในตารางที่ 4.4 แสดงว่าแอนติเซรุ่มที่ได้สามารถทำปฏิกิริยาค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลต SRCG4 และมี cross reaction กับเชื้อ *C. capsici* และ *S. ampelinum* เล็กน้อย

**ตารางที่ 4.4** ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติเซรุ่มที่ผลิตจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporiotdes* ไอโซเลต SRCG4 กับเชื้อ *C. gloeosporiotdes* บางไอโซเลตและเชื้อราอื่น ๆ

| ไอโซเลต | ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร[1/] | |
|---|---|---|
| | **Normal serum** | **Antiserum** |
| *Colletotrichum gloeosporioides* | | |
| SRCG1 | 0.048±0.001 | 0.077±0.002 |
| SRCG4 | 0.052±0.000 | 0.136±0.001 |
| *Colletotrichum capsici* | | |
| BRCC2 | 0.048±0.001 | 0.061±0.001 |
| BRCC3 | 0.050±0.000 | 0.077±0.003 |
| *Sphaceloma ampelinum* | | |
| GCMK3-2 | 0.048±0.000 | 0.088±0.007 |
| GCMKCl-1 | 0.054±0.001 | 0.068±0.001 |
| GF 901 | 0.055±0.004 | 0.068±0.001 |
| *Phytophthora* spp. (negative control) | 0.048±0.000 | 0.049±0.001 |
| Antigen (soluble mycelial protein) | 0.049±0.000 | 0.271±0.003 |
| Blank (carbonate buffer) | 0.047±0.002 | 0.047±0.001 |

[1/] ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ผลการอ่านค่าจาก 2 ซ้ำ (หลุม)/ตัวอย่าง

### 4.4.3 การตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* ในสภาพแฝงตัวด้วยวิธี ELISA

จากผลการทดสอบด้วยวิธี ELISA กับใบพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อตพบว่าตำรับที่มีการปลูกเชื้อให้ค่าดูดกลืนแสงมากกว่าตำรับที่ไม่มีการปลูกเชื้อ การต้มใบพริกก่อนทำ ELASA ให้ผลการ

ดูดกลืนแสงมากกว่าการไม่ต้มโดยการต้มใบพริก 5 นาทีให้ผลการดูดกลืนแสงมากที่สุดรองลงมาคือการต้มใบพริกเป็นเวลา 3 และ 1 นาทีตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** ผลค่าดูดกลืนแสงจากการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* บนใบพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อต อายุ 2 เดือน เป็นเวลา 3 วันก่อนการทดสอบด้วยวิธี ELISA

| ตำรับทดลอง | ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร[1/] | |
|---|---|---|
| | ไม่ปลูกเชื้อ | ปลูกเชื้อ |
| ไม่ต้มใบ | 0.085±0.003 | 0.095±0.002 |
| ต้มใบ 1 นาที | 0.106±0.006 | 0.155±0.001 |
| ต้มใบ 3 นาที | 0.122±0.005 | 0.191±0.001 |
| ต้มใบ 5 นาที | 0.136±0.002 | 0.229±0.002 |
| ไม่ใส่แอนติเซรุ่ม (control) | 0.084±0.001 | 0.085±0.001 |

[1/] ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ผลการอ่านค่าจาก 2 ซ้ำ (หลุม)/ตัวอย่าง

# บทที่ 5
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิธีการตรวจประเมินปริมาณแหล่งเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริกโดยใช้วิธีกระตุ้นให้เกิดความเครียดกับพริกและวิธีการทางเซรุ่มวิทยาพบว่า

1. วิธีการที่สามารถใช้ในการแยกเชื้อ *C. gloeosporioides* จากตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรคคือการแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยทำการชักนำให้เชื้อเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรคด้วยอาหาร water agar (WA) จากนั้น 3 วัน จึงทำการเขี่ยย้ายเส้นใยของเชื้อออกมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA)

2. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคจากเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมด 5 ไอโซเลต พบว่ามีความสามารถในการทำให้เกิดโรคได้ต่างกัน เชื้อไอโซเลต SRCG-4 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่แยกได้จากสวนเกษตรอินทรีย์ภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทำให้พริกแสดงอาการของโรคได้ภายใน 3 วัน ในขณะที่เชื้อไอโซเลตอื่น ๆ ทำให้พริกแสดงอาการของโรคได้ในระยะเวลาที่ต่างกัน

3. การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อที่อยู่ในสภาพแฝงโดยใช้สารพาราควอต (paraquat) พบว่าการปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นและไม่ฉีดพ่นสารพาราควอตทำให้เกิดแผลเช่นกัน เนื่องจากอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค แต่การฉีดพ่นสารพาราควอตความเข้มข้น 27.67 mg/l ทำให้เกิดแผลเฉลี่ยต่อต้นมากกว่าการปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียวถึง 2 เท่า ส่วนการร่วงของใบพบว่า การปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารพาราควอตความเข้มข้น 27.67 mg/l ทำให้เกิดใบร่วง 4.25 ใบต่อต้นในขณะที่การฉีดพ่นสารพาราควอตที่ความเข้มข้นเดียวกันโดยไม่ได้ทำการปลูกเชื้อไม่ทำให้ใบร่วง หากพิจารณาการเกิดแผลร่วมกับใบร่วงจะพบว่าการฉีดพ่นสารพาราควอตที่ความเข้มข้น 27.67 mg/l น่าจะสามารถใช้ประเมินการติดเชื้อแบบแฝงของพริกได้และเป็นไปตามการทดลองของศุภาลักษณ์ โตสุขเจริญกุล และสมศิริ แสงโชติ (มปป) ที่ศึกษาผลของสารพาราควอตต่อการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว จากการทดลองพบว่าสารพาราควอตความเข้มข้น 50000 ppm สามารถใช้ตรวจสอบการเข้าทำลายแบบแฝงบนผลมะม่วงได้ภายใน 4 วัน โดยตรวจพบ acervulus ได้ถึง 95% ส่วนการตรวจสอบโดยใช้วิธี tissue transplanting นั้นตรวจพบเชื้อได้ในวันที่ 7 ซึ่งช้ากว่าการใช้สารเคมีพาราควอตถึง 3 วัน Hartman *et al.* (1986) ได้ทำการศึกษาการเจริญแบบแฝงของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ในเนื้อเยื่อของ

ถั่วและวัชพืชโดยใช้สารพาราควอตในการตรวจสอบพบ *C. destructivum*, *C. truncatum* และ *Glomerella glycines* บนตอซังของถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังพบ *Colletotrichum* spp. บนใบอ่อนของถั่วเหลืองรวมทั้งก้านและใบของวัชพืชด้วย ทั้งนี้เชื้อที่อยู่ในสภาพแฝงสามารถแสดงอาการของโรคเมื่อได้รับสารพาราควอตได้ เนื่องจากสารพาราควอตสามารถกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระ จึงเกิดการทำลายของผนังเซลล์ทำให้พืชเกิดความเครียดส่งผลให้กระตุ้นการสร้างเอทิลีน (Lehoczki *et al.*, 1992) เอทิลีนดังกล่าวจะส่งเสริมการเข้าทำลายของเชื้อที่แฝงตัวอยู่ในพืช (Brown, 1978) จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สามารถประยุกต์การตรวจประเมินการเข้าทำลายของเชื้อในสภาพแปลงปลูกได้ โดยในระหว่างการย้ายกล้าพริกลงแปลงปลูก อาจทำการย้ายกล้าบางส่วนใส่กระถาง นำไปวางไว้ในแปลงตามจุดต่าง ๆ หลังจากพริกออกดอกให้สุ่มพริกที่ปลูกในกระถางมาฉีดพ่นด้วยสารพาราควอตที่ความเข้มข้น 27.67 mg/l แล้วสร้างสภาพความชื้นสัมพัทธ์สูงให้กับต้นพริก เปรียบเทียบกับต้นพริกที่ไม่ได้ฉีดพ่น ถ้าต้นพริกที่ฉีดพ่นแสดงอาการใบจุดและใบร่วงมากกว่าแสดงว่ามีเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงค่อนข้างสูง เกษตรกรสามารถทำการป้องกันกำจัดได้ก่อนที่อาการของโรคจะปรากฏ เพราะหากเกิดฝนตกชุกจะทำให้การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดไม่ได้ผล แต่หากไม่พบอาการใบจุดร่วมกับใบร่วงหลังฉีดพ่นสารพาราควอตแสดงว่าไม่มีเชื้อที่อยู่ในสภาพแฝง ดังนั้น เกษตรกรไม่จำเป็นต้องฉีดพ่นสารเคมี เพราะเป็นการใช้สารเคมีอย่างผิดวิธี นอกจากนั้นยังเป็นการลดต้นทุนในการใช้สารเคมีลงและผลผลิตมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคอีกด้วย

4. การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อที่อยู่ในสภาพแฝงโดยใช้สารเอทีฟอน (ethephon) พบว่าตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับฉีดพ่นสารเอทีฟอนและไม่ฉีดสารเอทีฟอนทำให้เกิดแผลได้เช่นกัน แต่การปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 48 mg/l ทำให้เกิดจำนวนแผลมากที่สุด รองลงมาคือ ตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 36 mg/l แต่จากการทดสอบทางสถิติพบว่าตำรับการทดลองทั้ง 2 ไม่แตกต่างกัน แต่แตกต่างจากตำรับทดลองที่ทำการปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียวถึง 2 เท่า ส่วนการร่วงของใบพบว่า การปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 36 mg/l ทำให้เกิดใบร่วงในขณะที่การฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้นเดียวกันโดยไม่ได้ทำการปลูกเชื้อไม่ทำให้ใบร่วง หากพิจารณาการเกิดแผลร่วมกับใบร่วงจะพบว่าการฉีดพ่นสารเอทีฟอนที่ความเข้มข้น 36 mg/l น่าจะสามารถใช้ประเมินการติดเชื้อแบบแฝงของพริกได้ และจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประยุกต์ตรวจประเมินการเข้าทำลายของเชื้อในสภาพแปลงปลูกได้เช่นเดียวกับวิธีการใช้สารพาราควอต

5. การกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อที่อยู่ในสภาพแฝงโดยการควบคุมการให้น้ำพบว่าสภาพการขาดน้ำของพืชสามารถกระตุ้นการแสดงออกของเชื้อที่อยู่ในสภาพแฝงได้ เนื่องจากการขาดน้ำสามารถกระตุ้นการสร้างเอทิลีนได้ (Yehoshua and Aloni, 1974) เอทิลีนเป็นก๊าซดังนั้นการปิดปากใบในขณะเกิดความเครียดจากการขาดน้ำจะไปจำกัดการแพร่กระจายออกไปจากต้นพืชทำ

ให้มีความเข้มข้นของเอทิลีนภายในสูงขึ้น (Bradford and Hsiao, 1982) โดยตำรับทดลองที่ให้น้ำปริมาณ 38 มิลลิลิตรต่อกระถาง (1/8 WHC) ทำให้เกิดจำนวนแผลเฉลี่ยมากกว่าการให้น้ำที่ปริมาณ 300 มิลลิลิตร (1 WHC) ถึง 4 เท่า จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้ตรวจประเมินการเข้าทำลายของเชื้อในสภาพแปลงปลูก โดยขั้นแรกหาความสามารถในการอุ้มน้ำของดินโดยนำดินตากแดดให้แห้งสนิท จากนั้นนำมาใส่กระถางแล้วค่อย ๆ เทน้ำลงไปจนกว่าน้ำจะไหลออกจากกระถางแสดงว่าดินอิ่มตัวด้วยน้ำแล้วบันทึกปริมาณน้ำที่ใช้แล้วหารด้วย 8 จะได้ปริมาณน้ำที่จะนำมาทดลอง จากนั้นย้ายกล้าพริกปลูกใส่กระถางพลาสติก เมื่อต้องการตรวจประเมินการเข้าทำลายให้ควบคุมการให้น้ำพริกที่อยู่ในกระถางในระดับ 1/8 WHC ติดต่อกันนาน 2-3 วัน จากนั้นให้น้ำตามปกติพร้อมกับสร้างสภาพความชื้นสัมพัทธ์สูงโดยฉีดพ่นน้ำที่ต้นพริกร่วมกับการคลุมถุงพลาสติกหากสังเกตว่าต้นพริกที่ควบคุมการให้น้ำแสดงอาการใบจุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติแสดงว่ามีเชื้อ *C. gloeosporioides* แฝงตัวอยู่ เกษตรกรสามารถทำการฉีดพ่นสารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดก่อนฝนตกได้ทันที แต่ถ้าไม่พบอาการดังกล่าวแสดงว่าไม่มีเชื้อแฝงตัวอยู่ ดังนั้นเกษตรกรไม่จำเป็นต้องฉีดพ่นสารเคมีใด ๆ

6. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา พบว่า สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงได้โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธีการบดเส้นใยและโคนีเดียของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งวิธีการเตรียมแอนติเจนดัดแปลงจากวิธีการของ Gooding (1966) เมื่อทำการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติเซรุ่มพบว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลต SRCG4 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ใช้ผลิตแอนติเซรุ่มให้ค่าดูดกลืนแสงมากกว่า negative control ถึง 2 เท่าในขณะที่ทำปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยกับเชื้อ *C. gloeosporioides* ไอโซเลต SRCG1 และมี cross reaction กับเชื้อ *C. capsici* และ *S. ampelinum* เล็กน้อยซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Hudge *et al.* (1967) ที่ได้รายงานว่าแอนติเซรุ่มของ *C. lindemuthianum* จากถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์บางส่วนกับแอนติเจนของเชื้อ *C. capsici* แสดงว่าเชื้อทั้งสองมีลักษณะโปรตีนที่คล้ายคลึงกันแต่สามารถแก้ไขได้โดยเจือจางแอนติเซรุ่มหรือการเตรียมแอนติเจนที่มีลักษณะจำเพาะก็จะสามารถแก้ไขปัญหานี้ได้ การที่เชื้อไอโซเลต SRCG1 ทำปฏิกิริยาได้น้อยกับแอนติเซรุ่ม บ่งชี้ให้เห็นว่า เชื้อไอโซเลตนี้อาจไม่ใช่ *C. gloeosporioides* แต่เป็นเชื้อชนิดอื่นที่มีลักษณะของสปอร์คล้ายกับ *C. gloeosporioides*

7. การตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* ในสภาพแฝงบนใบตัวด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชิ้นส่วนของใบเป็น solid surface แทนพื้นผิวของหลุมพลาสติก (plastic plate surface) สำหรับการพัฒนาการตรวจสอบหาแอนติเจนตั้งแต่ที่ยังไม่ปรากฏอาการหลังจากการปลูกเชื้อ 3 วัน พบว่าสามารถตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อได้ โดยตำรับทดลองที่ทำการปลูกเชื้อให้ค่าดูดกลืนแสงมากกว่าตำรับที่ไม่มีการปลูกเชื้อและการต้มใบพริกเป็นเวลา 5 นาทีก่อนทำ ELISA ให้ผลการ

ดูดกลืนแสงมากกว่าใบพริกที่ไม่ได้รับการต้มเนื่องจากการต้มทำให้แอนติเซรุ่มเข้าไปจับกับแอนติเจนได้ดีขึ้น การใช้รูปแบบนี้ในการทดสอบทำให้ไม่จำเป็นต้องบดละเอียดตัวอย่างเพื่อปลดปล่อยแอนติเจน และน่าจะปรับใช้ตรวจเชื้อในระยะแรกเข้าทำลายซึ่งอาจอยู่ในรูปโคนีเดีย เส้นใยเริ่มงอกหรือ appressorium ที่เกาะติดผิวพืชได้ จากการทดลองดังกล่าวทำให้สามารถทำการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อได้โดยเมื่อสังเกตว่าสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยและเหมาะสมต่อการเกิดโรค ควรสุ่มใบพริกมาตรวจด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นระยะ เพื่อตรวจหาการเข้าทำลาย ถ้าผลของการตรวจเป็นบวกจะทำให้สามารถทำนายได้ว่าเชื้อเริ่มระบาดในแปลงปลูกแล้ว สามารถทำการป้องกันกำจัดได้ก่อนที่จะเห็นอาการปรากฏ นอกจากนี้ยังทำให้ลดต้นทุนในการผลิตได้ โดยสามารถใช้สารเคมีได้ถูกเวลา ลดการใช้สารเคมีอย่างพร่ำเพรื่อในการฉีดพ่นสารเคมีตามโปรแกรม

# รายการอ้างอิง

กรองจิต แซ่หงอ. (2528). การศึกษาลักษณะความต้านทานของเชื้อ *Colletotrichum* spp. ต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึมบางชนิด. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 102 หน้า.

กาญจนา วิชิตตระกูลถาวร. (2536). การใช้กรัมม็อกโซนในการตรวจสอบเชื้อราบนใบมะม่วง. **ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต.** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่.

ฉัตรนัททรี กันทะลา เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. (2550). **สปีชีส์ของเชื้อราคอลเลตโตตริคัมสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในพริก**. สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ทวีศักดิ์ นวลพลับ. (2534). **การปลูกพริก**. พิมพ์ครั้งที่ 4. ศูนย์ผลิตตำราการเกษตรเพื่อชนบท. 62 หน้า.

บุญญวดี จิระวุฒิ. (2540). การทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* บนผลพริกและถ่ายทอดเชื้อจากผลที่เป็นโรคส่วนเมล็ดและต้นกล้า. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 96 หน้า.

ปริฉัตร พละพลึง. (2549). การปรับปรุงพันธุ์สตรอเบอรี่ต้านทานโรคแอนแทรกโนส. **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.** สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 123 หน้า.

มณีฉัตร นิกรพันธุ์. (2538). **พริก**. เอกสารประกอบการสอนวิชาการจำแนกพืชผักและการปรับปรุงพันธุ์ผัก. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 186 หน้า.

รัตนา เอนกธนโชติ. (2542). ปฏิกิริยาที่มีต่อกันระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสกับพริก. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 112 หน้า.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. (2543). **โรคของผักและการควบคุมโรค**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 57 หน้า.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. (2537). **โรคของผักและการป้องกันกำจัด**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ. 198 หน้า.

ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์. (2549). โรคกุ้งแห้งของพริก. [ ออนไลน์]. ได้จาก: http://61.19.192.250/main/newsboard/view.php?No=212.

สมพร ทรัพยสาร. (2525). การปรับปรุงพันธุ์พริก. **วารสารพืชสวน** 17(4) 23:25.

สมศักดิ์ มณีพงศ์. (2546). **คู่มือวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ดินและพืช.** โครงการจัดตั้งเครือข่ายห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ดินและพืช. สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์. 117 หน้า.

สมศิริ จิ๋วสกุล. (2521). เซรุ่มวิทยาการถ่ายทอดทางเมล็ดของโรคแอนแทรกโนสของพริกและประสิทธิภาพของสารเคมีควบคุมโรคบนใบ. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 89 หน้า.

สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร. (2549). **พริก การผลิต การจัดการและการปรับปรุงพันธุ์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ ADVANCE AGRICULTURE TECHNOLOGY&SUPPLIES. กรุงเทพฯ. 168 หน้า.

สุชีลา เตชะวงศ์เสถียร. (2550). **ศักยภาพการผลิตพริกเพื่ออุตสาหกรรมการส่งออกของไทยในปัจจุบันและอนาคต**. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 159 หน้า.

หนังสือพิมพ์ คม ชัด ลึก. (2547). ดันเมืองไทยเป็นราชาแห่งพริก . ข่าวประจำวันพุธที่ 10 มีนาคม พ.ศ. 2547. หน้า 9.

อรพรรณ วิเศษสังข์ จุมพล สาระนาค วิชิต จรัสเจษฎา และ ลักษณา วรรณภีร์. (2525). ปฏิกิริยาของพริกบางพันธุ์ต่อโรคแอนแทรคโนส. **รายงานผลการทดลอง.** สาขาโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร: หน้า 78- 82.

อรพรรณ วิเศษสังข์และจุมพล สาระนาค. (มปป). การบริหารโรคกุ้งแห้งของพริก.รายงานผลการทดลอง. สาขาโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ.กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 456-466.

อุดม ฟ้ารุ่งสาง. (2530). การศึกษาโรคที่สำคัญของพืชผักเพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1. **รายงานผลการวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adikaram, N.K.B, Brown, A.E. and Swinburne, T.R. (1983). Observation on infection of *Capsicum annuum* L. fruit by *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum capsici*. **Transactions of the British Mycological Society**. 80: 395-401.

Apelbaum, A. and Yang F. S. (1981). Biosynthesis of stress ethylene induced by water deficit. **Plant physiol**. 68: 594-596.

Arauz, L. F. (2000). Mango anthracnose : Economic impact and current options for integrated management. **Plant Disease**. 84: 600-611.

Baily, J.A. and Jeger, M.J. (Eds.). (1992). *Colletotrichum*: **Biology**, **Pathogen and Control**. Commonwealth Mycological Institute, Wallingford, p.388.

Ben-Aire, R. (1975). Benzimidazole penetration distribution and persistance in postharvest treated pears. **Phytopathology**. 65: 1187.

Biggs, A. R. (1995). Detection of latent infection in apple fruit with paraquat. **Plant Disease**. 79: 1062-1067.

Binyamini, N. and Schiffmann-Nadal, M. (1972). Latent infection in avocdo fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**. 62: 592-594.

Bradford, K.J. and Hsiao, T.C. (1982). Physiological response to moderate water stress, pp. 264-312. *In* O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler, eds. **Physiological PlantEcology II**. Water Relations and Carbon Assimilation. Springer-Verlag, Berlin.

Brown, G.E. (1975). Factors affecting posthavest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**. 65: 404-409.

Cerkauskas, R.F. and Sinclair, J.B. (1980). Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean tissue. **Phytopathology**. 70: 1036-1038.

Cordoba, M.A. (1992). Pruba d fungicides para el combate quimico de la anthracnosis ( *Colletro-trichum gloeosporioides* ) en mango ( *Mangifera indica* L. ). Ing. Agric. Thesis. Universi-dad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica.

Eckert, J.W. (1983). Control of postharvest diseases with antimicrobial agents, pp. 256-283. *In* **Post-harvest Physiology and Crop Presentation**. McGraw-Hill Book Co., New York.

Eckert, J.W., M.J. Kolbezen, M.L. Rahm and K.J. Eckard. (1979). Influence of benomyl and methyl 2-benzimidazole carbamate on the development of *Penicillium digitatum* in the pericarp of orange fruit**. Phytopathology**. 69: 934.

Hartman, G.L., Manandhar, J.B. and Sinclair, J.B. (1986). Incidence of *Colletotrichum* spp. On soybeans and weeds in Illinosis and pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Plant Disease**. 70: 780-782.

Fitzell, R.D. and Peak, C.M. (1986). Pre-harvest fungicides, pp. 356-358. Cited by P.Joffries, Dodd, J.C., M.J. Jeger and R.A. Plumbley. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathol**. 39: 343-366.

Flaishman, M.A. and Kolattukudy, P.E. (1994). Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal.*In* **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 91: 6579-6583.

Frean, R.T. (1985). Pre-harvest fungicides, pp. 350-358. Cited by P. Jeffries, J.C. Dodd, M.J. Jeger and R.A. Plumbley. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathol**. 36: 343-366.

Freeman, S., and Rodriguez, R.J. (1992). A rapid, reliable bioassay for pathogenicity of *Colletotrichum magna* on cucurbits and its use in screening for nonpathogenic mutants. **Plant Disease**. 76: 901-905.

Gooding, C.V. (1966). Preparative of molecular antigens from *Fomes annosus*. **Phytopathology**. 65: 1310.

Griffee, P.J. (1973). Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae.* **Transactions of the British Mycological Society**. 60: 433-439.

Hadden, J.F. and L.L. Black. (1987). Comparison of virulence of tomato and pepper isolates of *olletotrichum* spp. (Abstc.). **Phytopathology**. 70: 641.

Higgin, B.B. (1926). Anthracnose of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant Pathol**. 16: 333-343.

Hudge, R.H. *et al.* (1967). Serology in differentiation of pathogenic race of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sace & Magn.) Bri & Cav and determination of varietal resistance to disease. **Indian Phytopath**. 6: 166-167.

Jeffrise, P., Dodd, J.C., Jeger, M.J. and Plumbley, R.A. (1990). The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathol**. 39: 343-366

Kim, B.S., Park, H.K. and Lee, W.S. (1989). Resistance to anthracnose (*Colletotrichum* spp.) in pepper, pp. 184-188. *In* **Proceedings of the International symposium on Integrated Management Practices: Tomato and Pepper Production in the Tropics**, AVRDC, Tainan, Taiwan.

Kim Y.K., Li d. and Kolattukudy P.E. (1998). Induction of $Ca^{2+}$ -calmodulin signaling by hard surface contact prime *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria**. Journal of Bacteriology**. 180: 5144-5150.

Koomen, I. And P. Jeffries. (1993). Effects of antagonistic microorganisms on the postharvest development of *Colletrotrichum gloeosporioides* on mango. **Plant Pathol**. 42 :230-237.

Manandhar, J.B., Hartman G.L. and Wang, T.C. (1995). Conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum capsici* and *C. gloeosporioides* isolates from pepper. **Plant Disease**. 79: 361–366.

Melanie L., Lewis, I. and Miller, S.A. (2004). Anthracnose Fruit Rot of Pepper. Fact sheet extension. [Online]. Available from: http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3307.html.

Mortuza, M.D. (1997). Effects of antagonists, alum and ultraviolet irradiation on major fruit rots of banana ( *Musa sapientum* ) Kontze. College, Laguna ( Phillippines ). 138p.

Murihead, I.F. and Deverall, B.J. (1981). Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. **Physiological Plant Pathology**. 19: 77-84.

Pakdeevaraporn, P., Wasee, S., Taylor, P.W.J., Mongkolporn, O. (2005). Inheritance of Resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. **Plant Breeding**. 124(2): 206-208.

Pickergill, B. (1989). The archeologicl record of chilli pepper ( *Capicum* spp.) and the sequence of plant domestication in Peru. **American Antiquity**. 34 : 53-61.

Ploetz, R.C., Zentmyer, G.A., Nishijima, W.T., Rohrbach, K.G. and Ohr, H.D. (1994). **Compendium of Tropical Fruit Diseases**. APS press. USA. pp. 33-34.

Pring, R.J., C. Nash, M. Zakaria and Bailey, J.A. (1995). Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. **Plant Pathol**. 46: 137-152.

Purseglove, J.W., Brown, E.G., Green, C. L. and Robbins, S.R.J.. (1981). **Spices**. Volume 1. Longman, Inc., New York. 439 p.

Reddy, M.S., Ramapandu, S. and Rao, A. P. (1980). Cross resistance of fungicide resistant strains of *Gloeosporium ampelophagum*, *Colletotrichum capsici* and *Fusarium oxyporum* f.sp. *lycopersici* to other fungicides. **Indian Phytopathol**. 33: 450-455.

Rupe, J.C. and Ferriss, R.S. (1987). A model for predicting the effect of microclimate on infection of soybean by *Phomopsis longicolla*. **Phytopathology**. 77: 1162-1166.

Sangchote, S., Pongpisutta R., Kongsamai B., Taweechai N. and Sukprakarn S. (1998). Resistance of pepper to *Colletotrichum* spp. *In* **Proceedings of the first Announcement and International Conference on Periurban Vegetable Production in the Asia – Pacific Region for the 21 st century.**

Sariah, M. (1994). Potential of *Bacillus* spp. as biocontrol agent for anthracnoe fruit rot of chilli. Malayian **Applied Biol**. 23 (1-2) : p. 53-60.

Simmonds, J.H. (1941). Latent infection in fruit discussed in relation to the port plays by species of *Gloeosporium* and *Colletotrichum* **Proc. Roy. Soc. Queensland**. 52: 92-120.

Smith, P.G., B. Villalon and Villa ,P.L. (1987). Horticultural classification of peppers grown in the United States. **Hort Science**. 22: 11-13.

Sohi, H.S., S.S. Sokhi and Tiwari, R.P. (1973). Studies on the storage rot of mango caused by *Colletrotrichum gloeosporioides*. Penz. and its control. **Phytopath. Mediteranea**. 12: 114-116.

Spalding, D.H. (1982). Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases. **Plant Disease**. 66: 1185-1186.

Sutton, B.C. (1980). **The Coelomycetes**. Commonwealth Mycological Institute. UK. 530 pp. CMI. Kew Surrey, England. 695 p.

Worayos, Y. (1986). **Collection of Capsicum germplasm in Thailand**. IBGPR News Letter. Vol. 10 No. 3 IBGPR/SEAP Regional Coordinator, FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok Thailand.

Yehoshua, S. Ben and Aloni B. (1974). Effect of water stress on ethylene production by detached leaves of valencia orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **Plant Physiol**. 53: 863-865.

# ภาคผนวก

**1. สารเคมีที่ใช้ในวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

1.1 0.5 M Carbonate coating buffer, pH 9.6

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2CO_3$ | 1.59 | กรัม |
| $NaHCO_3$ | 2.93 | กรัม |
| $NaN_3$ | 0.20 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH ให้เป็น 9.6

1.2 0.02 M Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 8 | กรัม |
| $KP_2PO_4$ | 0.2 | กรัม |
| $Na_2HPO_4$ | 2.9 | กรัม |
| KCl | 0.2 | กรัม |
| $NaN_3$ | 0.2 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

1.3 Phosphate Buffer Saline Tween (PBS-T)

| | | |
|---|---|---|
| 0.02 M, pH 7.4 | 1.0 | ลิตร |
| Tween-20 | 0.5 | มิลลิลิตร |

1.4 Conjugate Buffer

| | | |
|---|---|---|
| Polyvinyl pyrolidone 40T (PVP) | 2.0 | กรัม |
| ovalbumin (egg albumin) | 2.0 | กรัม |
| PBS-T | 1.0 | ลิตร |

1.5 Substrate Buffer pH 9.8

| | | |
|---|---|---|
| Diethanolamine | 100 | มิลลิลิตร |
| $NaN_3$ | 0.20 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH ให้เป็น 9.8

1.6 3M KOH

| | | |
|---|---|---|
| KOH | 168.327 | กรัม |
| น้ำกลั่นปริมาตร | 1,000 | มิลลิลิตร |

** สารเคมีที่เตรียมเสร็จแล้วจะต้องเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้และไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 เดือน

**2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา**

2.1 Potato dextrose agar (PDA)

| | | |
|---|---|---|
| มันฝรั่ง | 200 | กรัม |
| Dextrose หรือ glucose | 20 | กรัม |
| วุ้นผง (Agar) | 18 | กรัม |
| น้ำกรองหรือน้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตร จนนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำสกัดผสม dextrose ทั้งหมดลงในน้ำสกัด นำไปผสมกับวุ้นผงที่ต้มจนละลายแล้วด้วยน้ำส่วนที่เหลือ คนให้เข้ากันเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำเข้านึ่งภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

2.2 Potato dextrose broth (PDB)

| | | |
|---|---|---|
| มันฝรั่ง | 200 | กรัม |
| Dextrose หรือ glucose | 20 | กรัม |
| น้ำกรองหรือน้ำกลั่น | 1,000 | มิลลิลิตร |

2.3 Water ager (WA)

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

วิธีเตรียมคล้ายกันกับการเตรียม PDA แต่ไม่ต้องต้มน้ำสกัด ใช้แยกเชื้อรา

**3. การหาค่าความชื้นของดิน (water holding capacity: WHC)**

**วิธีการ**

**การหาความชื้นของดินขณะดินอิ่มตัวน้ำ (M1)**

1. อบกระป๋องอลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก ($W_1$)
2. ค่อย ๆ เทน้ำลงดินให้ดินอิ่มตัวด้วยน้ำ ตักดินใส่กระป๋องอลูมิเนียมหนักประมาณ 5 กรัม ถ้าใช้เครื่องชั่งความแม่นยำ 0.1 มิลลิกรัมหรือสูงกว่าและใช้ดินประมาณ 10 กรัม ถ้าใช้เครื่องชั่งความแม่นยำน้อยกว่านี้ แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของดินและกระป๋อง ($W_2$)
3. นำดินไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 3 ชั่งโมง ถ้ากระป๋องมีฝา จะต้องเปิดฝาออก จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก ($W_3$)

**การคำนวณ % ความชื้นของดิน = (W2 – W1)/(W3 – W1) × 100**

**การหาความชื้นของดิน (M1)**

1. อบกระป๋องอลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก ($W_1$)
2. ตักดินใส่กระป๋องอลูมิเนียมหนักประมาณ 5 กรัม ถ้าใช้เครื่องชั่งความแม่นยำ 0.1 มิลลิกรัมหรือสูงกว่าและใช้ดินประมาณ 10 กรัม ถ้าใช้เครื่องชั่งความแม่นยำน้อยกว่านี้ แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของดินและกระป๋อง ($W_2$)
3. นำดินไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 3 ชั่งโมง ถ้ากระป๋องมีฝา จะต้องเปิดฝาออก จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถแก้วดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก ($W_3$)

**การคำนวณ % ความชื้นของดิน = (W2 – W1)/(W3 – W1) × 100**

**WHC =** M2 – M1

# ประวัติผู้เขียน

นายรณชีพ ลี้ประเสริฐ เกิดวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2527 อำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัย-ธานี เริ่มศึกษาชั้นประถมจนถึงมัธยมศึกษาปีที่ 1-3 ที่โรงเรียนบ้านหนองกระทุ่ม ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4-6 โรงเรียนหนองฉางวิทยา จังหวัดอุทัยธานี สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2549 และได้รับทุนจากสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชเพื่อเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโน-โลยีสุรนารี เป็นผู้ช่วยสอนสาขาวิชาเทคโนโลยีการ ผลิตพืชและเป็นผู้ช่วยวิจัยในโครงการไฟฟ้าพลังน้ำ สถานที่ติดต่อได้สะดวก บ้านเลขที่ 2/8 หมู่ 9 ตำบลทุ่งโพ อำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัยธานี 61110

ผลงานวิจัย : ได้เสนอบทความเข้าร่วมในการประชุมอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 9 ประจำปี พ.ศ. 2552 เรื่องการใช้พาราควอตกระตุ้นให้พริกแสดงอาการของโรคกุ้งแห้ง