

กลไกการชักนำความต้านทานต่อโรคสแคปในอู่นของสูตรสำเร็จโคโตซาน



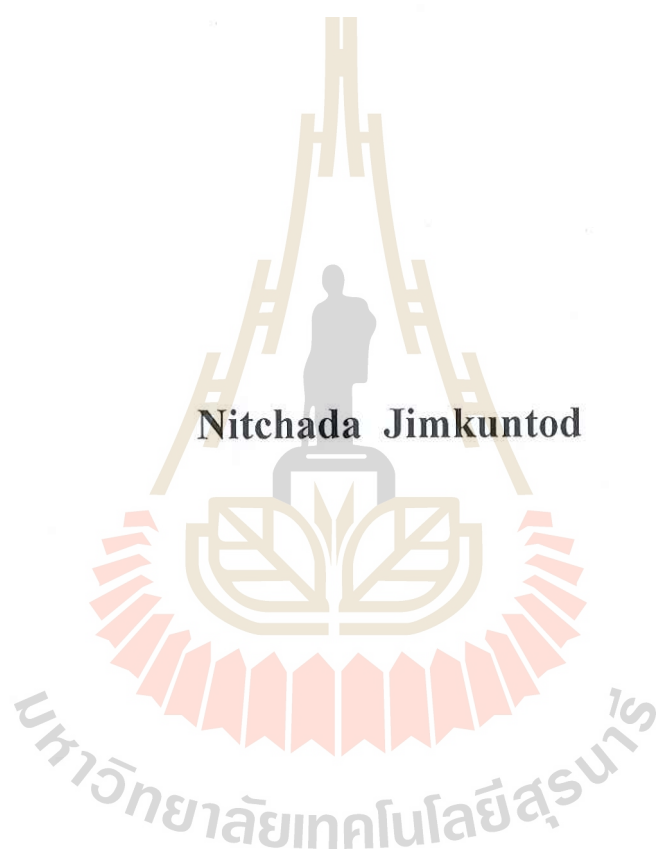
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2561

**MECHANISMS OF INDUCED RESISTANCE AGAINST
SCAB IN GRAPEVINE OF CHITOSAN FORMULATION**



Nitchada Jimkuntod

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Crop Science

Suranaree University of Technology

Academic Year 2018

กลไกการชักนำความต้านทานต่อโรคสแคบในอู่นของสูตรสำเร็จโคโตซาน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผศ. ดร. จิตติพร มะจิโกวา)

ประธานกรรมการ



(ผศ. ดร. ณัฐธิญา เปื่อนสันเทียะ)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



(ผศ. ดร. อัญมณี อาวูวานนท์)

กรรมการ



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



(ศ. ดร. สันติ แม่นศิริ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและพัฒนาความเป็นสากล



(ศ. ดร. นุ่ง เตียอ่ำรุง)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

นิชดา จิมขุนทด : กลไกการชักนำความต้านทานต่อโรคสแคบในองุ่นของสูตรสำเร็จ
ไคโตซาน (MECHANISMS OF INDUCED RESISTANCE AGAINST SCAB IN
GRAPEVINE OF CHITOSAN FORMULATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร.ณัฐธิญา เปือนสันเทียะ, 97 หน้า.

โรคสแคบ หรือแอนแทรคโนสขององุ่น เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* เป็นโรคที่มีความสำคัญโดยทำความเสียหายให้กับผลผลิตองุ่นสูงถึง 50% เกษตรกรใช้สารเคมีในการควบคุมโรคองุ่นในปริมาณมาก ปัจจุบันมีการคำนึงถึงเรื่องความปลอดภัยด้านพืชอาหาร จึงเริ่มมีการใช้ไคโตซาน (β -1,4-linked glucosamine oligomer) ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคและชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษากลไกการชักนำความต้านทานในองุ่นรับประทานผลสดพันธุ์มารูซีดเลส (*Vitis vinifera* cv. Marroo seedless) ของสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพของ CHIZA4[®] ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราพบว่า สูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 และ 1,200 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราได้ 84.73 และ 88.55% ตามลำดับ จากนั้นจึงนำสูตรสำเร็จไคโตซานทั้ง 2 ความเข้มข้นดังกล่าว ไปฉีดพ่นให้กับกิ่งชำองุ่นอายุ 2 เดือน เปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์เบนดาซิมและไคโตซานการค้า BIG[®] จำนวน 7 ครั้ง ทุก ๆ 7 วัน ในสภาพโรงเรือนทดลอง ภายหลังจากฉีดพ่นครั้งสุดท้าย 7 วัน ทำการปลูกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ พบว่าเมื่อประเมินการเกิดโรค 14 วันหลังปลูกเชื้อ กรรมวิธีที่ใช้สูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 ppm สามารถลดการเกิดโรคสแคบได้ 87.64% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารเคมีคาร์เบนดาซิมที่ลดการเกิดโรคได้ 74.9% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม จากนั้นเก็บตัวอย่างใบองุ่นที่ 3 ช่วงเวลาได้แก่ ใบองุ่นที่ถูกฉีดพ่นสิ่งกระตุ้นและปลูกเชื้อสาเหตุโรคทันที ภายหลังจากปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง และภายหลังจากปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง มาทำการตรวจสอบกลไกการปกป้องตนเองได้แก่ ปริมาณกรดซาลิไซลิก (SA) ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ chitinase (Chi) พบว่าภายหลังจากปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง องุ่นที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม สูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 ppm และไคโตซานการค้า BIG[®] มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นของปริมาณ SA สูงสุดที่ 32.44, 17.28 และ 11.87 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 8.76, 7.96 และ 7.37 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ขณะเดียวกัน ที่เวลา 48 ชั่วโมงภายหลังจากการปลูกเชื้อ องุ่นที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] 600 ppm และสารเคมีคาร์เบนดาซิม มีแนวโน้มปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ Chi เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 6.66 และ 6.44 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม

โปรตีนตามลำดับ รองลงมาคือ สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm ที่ 4.97 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ เมื่อนำใบองุ่นที่ฉีดพ่นด้วยสิ่งกระตุ้นและปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการปลูกเชื้อมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy พบว่า สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] 600 ppm ส่งเสริมให้อองุ่นมีการสังเคราะห์สารในกลุ่มไขมัน C=O ester และ polysaccharide เพิ่มขึ้นที่ $0.019 \pm 0.01\%$ และ $0.064 \pm 0.01\%$ ตามลำดับ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสแคบขององุ่นทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคโดยตรงและสามารถชักนำให้อองุ่นเกิดกระบวนการปกป้องตนเองให้ต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคผ่านกระบวนการ phenylpropanoid pathway ที่สังเคราะห์สารประกอบฟีนอลและลิคินินในการช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงของผนังเซลล์อองุ่น ให้มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค การชักนำความต้านทานพืชโดยใช้สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] จึงเป็นแนวทางที่ดีในการนำไปใช้ในระบบการผลิตองุ่นปลอดภัย ลดการใช้สารเคมีในการควบคุมโรค และลดสารเคมีตกค้างซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนักศึกษา จิรัชดา จิรัชชานนท์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [ลายมือ]

NITCHADA JIMKUNTOD : MECHANISMS OF INDUCED RESISTANCE
AGAINST SCAB IN GRAPEVINE OF CHITOSAN FORMULATION.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. NATTHIYA BUENSANTEAI, Ph.D.,

97 PP.

GRAPEVINE/SCAB/ANTHRACNOSE/*Sphaceloma ampelinum*/CHITOSAN/
FORMULATION/INDUCED RESISTANCE/FT-IR MICROSPECTROSCOPY


Grape scab (anthracnose) disease, caused by *Sphaceloma ampelinum*, is an important disease of the grapevine industry in Thailand. It can reduce grapevine products, causing up to 50% yield losses in many grapevine growing areas. In the past year, chitosan has been considered as a favorable alternative method to control phyto-fungal pathogens under a food security/safety system. Chitosan (β -1, 4-linked glucosamine oligomer) is an effective elicitor to induce plant defense mechanisms and reduce plant diseases. The objective of this study was to investigate the defense mechanisms in grapevine (*Vitis vinifera*) cv. 'Marroo Seedless' against scab disease after resistance induction by the chitosan formulation (CHIZA4[®]). The efficacy of CHIZA4[®] on fungal growth colony inhibition was investigated. The results showed that CHIZA4[®] at the concentrations of 600 and 1,200 ppm can significantly inhibit *S. ampelinum* colony growth at 84.73 and 88.55%, respectively. Then, CHIZA4[®] at the concentrations of 600 and 1,200 ppm, Carbendazim fungicide (Carb), and commercial chitooligosaccharide BIG[®] were used to investigate scab disease controlling and resistance mechanisms inducing on 2 months cutting grapevine under greenhouse condition. When applied as foliar treatment every week for 7 weeks and after inoculated with the fungal for 14 days, the results showed that CHIZA4[®] at the concentration of 600 ppm could significantly reduce anthracnose disease severity with Carb up to 87.64 and 74.9%, respectively.

Moreover, for the defense mechanism investigation in grapevine leaves, the signaling molecule in plant defense: salicylic acid (SA), the defense enzymes: phenylalanine ammonia lyase (PAL), and PR-protein: Chitinase (Chi) were investigated at 0, 24 and 48 hours after the fungal challenged inoculation. The accumulation of SA significantly increased at 24 hours after inoculation to SA levels of 32.44, 17.28 and 11.87 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight from foliar treated with Carb, CHIZA4[®] at the concentration of 600 ppm and BIG[®], respectively. Similar to SA, PAL activity also significantly increased at 24 hours after inoculation with PAL levels of 8.76, 7.96 and 7.37 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein, respectively. On the other hand, Chi activity significantly increased at 48 hours after inoculation with Chi levels of 6.44, 6.66 and 4.97 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein, respectively. In addition, the samples foliar treated at 24 hours after inoculation were investigated for their biochemical change by the synchrotron FT-IR microspectroscopy technique. The results showed that the lipid C=O ester group and polysaccharide in grapevine cells increased at the levels of 0.019 ± 0.01 and $0.064\pm 0.01\%$, respectively. Our results indicated that the CHIZA4[®] has a double effect that could act as an antimicrobial agent and activate several plant defense mechanisms during host-pathogen interactions. The CHIZA4[®] induced grapevine resistance mechanisms through phenylpropanoid pathway, the phenols and lignin accumulation pathway. Lignin and other phenolic compounds can play the role of plant cell wall reinforcement against plant pathogens. Induced plant resistance using CHIZA4[®] can be an alternative method to control grapevine diseases. This is an agricultural safety strategy to reduce chemical fungicide use and chemical residues for human health and the environment.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2018

Student's Signature Nitchada Jimkuntod

Advisor's Signature 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อันได้แก่

ผศ. ดร. ณัฐริญา เบื่อนสันเทียะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา อบรมสั่งสอน ทั้งทางด้านวิชาการและหลักการดำรงชีวิต ชี้แนะแนวทางอันดีให้กับลูกศิษย์ช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนแล้วเสร็จสมบูรณ์

ดร. โสภณ วงศ์แก้ว และ ผศ. ดร. อัญมณี อวูชานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาดูแลให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางการแก้ไขปัญหา และติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ผศ. ดร. จูติพร มะชิโกวา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ให้ความเมตตากรุณาและคอยอบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบริษัท ไบโอดีคทีฟ อุตสาหกรรมเกษตร จำกัด ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท ปี พ.ศ. 2559 สัญญาเลขที่ MSD59I0028 ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาและวิจัย

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนทุนการศึกษาแก่นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ที่คณาจารย์ได้รับทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก (OROG) สนับสนุนทุนการศึกษาบางส่วน และสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้บริการ BL4.1 IR Spectroscopy and Imaging

ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงษ์ คุณอรทัย นาชิน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช คุณชนิษฐา กูโบราณ เจ้าหน้าที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์เครื่องมือ สถานที่ดำเนินงานวิจัย และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอบคุนพี่ เพื่อน และน้องในห้องปฏิบัติการ Plant Pathology and Biopesticides และผู้ร่วมเรียนในระดับบัณฑิตศึกษา ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ตลอดการศึกษาและทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอนและส่งเสริม ด้านการศึกษา อีกทั้งให้ความช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ ที่ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี

นิชดา จิมขุนทด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฒ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	4
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	4
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 ปรัชญาวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ความสำคัญและปัญหาในการผลิตองุ่น.....	5
2.2 โรคที่สำคัญขององุ่น.....	6
2.2.1 โรคราน้ำค้าง (Downy mildew).....	6
2.2.2 โรคราสนิม (Rust).....	7
2.2.3 โรคราแป้ง (Powdery mildew).....	7
2.2.4 โรคสแคบ (Scab, Anthracnose).....	8
2.2.4.1 ข้อมูลทั่วไปของโรคสแคบ.....	8
2.2.4.2 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> de Bary.....	
สาเหตุโรคสแคบขององุ่น.....	9

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.2.4.3	วงจรการเกิดโรคสแคบ.....	10
2.3	การควบคุมโรคสแคบ.....	11
2.3.1	การควบคุมโรคโดยวิธีเขตกรรม (cultural practice).....	11
2.3.2	การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี (chemical control).....	12
2.3.3	การควบคุมโรคโดยวิธีชักนำให้เกิดความต้านทาน (induced resistance).....	12
2.4	กลไกความต้านทานของพืชต่อโรคพืช.....	13
2.4.1	กลไกความต้านทานพืชที่มีอยู่เดิม (pre-formed resistance หรือ constitutive resistance).....	14
2.4.2	กลไกความต้านทานพืชที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้น (induced resistance).....	15
2.4.2.1	กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defense mechanism)).....	16
2.4.2.2	กลไกทางชีวเคมี (biochemical defense mechanism)).....	18
2.4.2.2.1	กลไกการปกป้องตนเองของพืชระยะแรก (early plant defense mechanism)).....	18
2.4.2.2.2	กลไกการปกป้องตนเองของพืชระยะที่สอง (secondary plant defense mechanism)).....	20
2.5	สิ่งกระตุ้นที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน (elicitor).....	23
2.5.1	สิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต (biotic elicitor).....	28
2.5.2	สิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (abiotic elicitor).....	28
2.5.2.1	กรดซาลิไซลิก (salicylic acid: SA).....	28
2.5.2.2	กรดเบนโซอิก (benzoic acid: BA).....	28
2.5.2.3	ไคโตซาน (chitosan).....	30
2.6	เทคนิคการตรวจสอบกลไกในการปกป้องตนเองของพืช และองค์ประกอบของเซลล์พืช.....	31
2.6.1	การศึกษากลไกการปกป้องตนเองของพืชด้วยวิธีทางชีวเคมีพื้นฐาน.....	31
2.6.2	การศึกษากลไกการปกป้องตนเองของพืชด้วยเทคนิคขั้นสูง.....	32
2.6.2.1	การศึกษาการแสดงออกระดับยีน.....	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.2.2 การศึกษาการแสดงออกระดับโปรตีน.....	33
2.6.2.3 การศึกษาระดับชีวเคมี.....	33
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	36
3.1 วางแผนการทดลองการเตรียมเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบขององุ่น.....	36
3.1.1 การแยกเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบจากองุ่นพันธุ์ มารูซิดเลส.....	36
3.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของ <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบ (pathogenicity test).....	36
3.2 ทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จโคโคซานต่อการเจริญเติบโตของ โคโคไนเชื้อรา <i>S. ampelinum</i>	37
3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโคซานระดับโรงเรือนทดลอง.....	38
3.4 ศึกษากลไกการปกป้องตนเองขององุ่นภายหลังการเข้าทำลาย ของเชื้อรา <i>S. ampelinum</i>	38
3.4.1 ศึกษากลไกการปกป้องตนเองขององุ่นด้วยเทคนิคพื้นฐาน.....	38
3.4.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA).....	38
3.4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ปกป้องตนเอง.....	39
3.4.1.2.1 การสกัดโปรตีนรวม.....	39
3.4.1.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase.....	40
3.4.1.2.3 กิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL).....	40
3.4.2 ศึกษากลไกการปกป้องตนเองขององุ่นด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy.....	40
3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	40
3.4.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy.....	41

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5	การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ.....	41
4	ผลการทดลอง.....	42
4.1	การเตรียมเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบขององุ่น.....	42
4.1.1	การแยกเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบจากองุ่นพันธุ์ มารูชีดเลสองุ่น.....	42
4.1.2	การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบ (pathogenicity test).....	43
4.2	ทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จโคโตซานต่อการเจริญเติบโต ของโคโลนีเชื้อรา.....	44
4.3	ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซานระดับโรงเรียนทดลอง.....	52
4.4	ศึกษากลไกการปกป้องตนเองขององุ่นภายหลังการเข้าทำลายของเชื้อรา <i>S. ampelinum</i>	55
4.4.1	ศึกษากลไกการปกป้องตนเองขององุ่นด้วยเทคนิคพื้นฐาน.....	55
4.4.1.1	การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA).....	55
4.4.1.2	การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ปกป้องตนเอง.....	56
4.4.1.2.1	กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase.....	56
4.4.1.2.2	กิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL).....	58
4.4.2	ศึกษากลไกการปกป้องตนเองขององุ่นด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy.....	59
5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	68
5.1	การแยกเชื้อด้วยเทคนิค tissue transplanting มีประสิทธิภาพในการแยกเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบขององุ่น.....	68
5.2	การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรค (pathogenicity test) ในสภาพใบตัด (detach leave assay).....	69
5.3	สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของโคโลนีเชื้อรา <i>S. ampelinum</i>	69

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.4	สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4 [®] มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคสแคบ และชักนำความต้านทานในองุ่น.....	71
5.5	กลไกการชักนำความต้านทานในองุ่นของสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4 [®]	74
5.6	การศึกษากลไกการปกป้องตนเองของพืชภายหลังถูกกระตุ้นด้วยเทคนิค Synchrotron FT-IR microspectroscopy.....	76
5.7	แนวทางในการนำสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4 [®] ไปใช้ในระบบ เกษตรปลอดภัย.....	77
	รายการอ้างอิง.....	78
	ภาคผนวก.....	92
	ประวัติผู้เขียน.....	97



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	Recognized families of pathogenesis-related proteins.....22
2.2	สิ่งกระตุ้นที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน.....24
3.1	การให้คะแนนการเกิดโรคสแคบในใบองุ่น.....37
3.2	กรรมวิธีทดลอง และความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพในระดับโรงเรือน.....38
4.1	คะแนนการเกิดโรคสแคบในใบองุ่นภายหลังการฉีดพ่นสารแขวนลอย สปอร์เชื้อรา <i>S. ampelinum</i> 3 ไอโซเลตบนใบอ่อนองุ่นเป็นเวลา 3 วัน.....43
4.2	แสดงประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จไคโตซานในการลดความรุนแรง ของโรคสแคบในองุ่นพันธุ์มาร์ชชีดเลสในระดับโรงเรือนทดลอง.....53
4.3	แสดงปริมาณการสะสมกรดซาลิไซลิก (Salicylic acid accumulation) ในใบองุ่นพันธุ์มาร์ชชีดเลสภายหลังถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน และปลูกเชื้อ <i>S. ampelinum</i> ในระดับโรงเรือนทดลอง.....56
4.4	แสดงปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในใบองุ่นพันธุ์มาร์ชชีดเลส ภายหลังถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซานและปลูกเชื้อ <i>S. ampelinum</i> ในระดับโรงเรือนทดลอง.....57
4.5	แสดงปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในใบองุ่นพันธุ์มาร์ชชีดเลส ภายหลังถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซานและปลูกเชื้อ <i>S. ampelinum</i> ในระดับโรงเรือนทดลอง.....59
4.6	แสดงเปอร์เซ็นต์ปริมาณสารชีวเคมีในเนื้อเยื่อชั้น epidermis ของใบองุ่นพันธุ์มาร์ชชีดเลส ภายหลังถูกกระตุ้นด้วยกรรมวิธีต่าง ๆ ทุก 7 วัน เป็นเวลา 7 ครั้ง และภายหลังการปลูกเชื้อ <i>S. ampelinum</i> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในระดับโรงเรือนทดลอง.....66
5.1	แสดงระยะเวลาที่สัมพันธ์กับการเกิดกลไกการปกป้องตนเองของพืช.....75

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	แสดงวงจรการเกิดโรคสแคบขององุ่นที่เกิดจากเชื้อ <i>S. ampelinum</i> de Bary.....11
2.2	แผนผังแสดงกลไกความต้านทานของพืชต่อโรคพืช.....14
2.3	แสดงการสะสม papilla ที่ประกอบไปด้วยแคลโลสและเซลลูโลสในผนังเซลล์ ด้านในของพืช (epidermis) ใต้ตำแหน่งที่ถูกเส้นใยเชื้อราเจาะเข้าทำลาย เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา.....17
2.4	กลไกทางชีวเคมีที่พืชถูกชักนำให้สร้างขึ้น แบ่งออกเป็นกลไกที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (rapid defense) และกลไกที่เกิดขึ้นภายหลัง (delayed defense).....18
2.5	แสดงภาพรวมของวิธีการส่งสัญญาณที่กระตุ้นและประสานความต้านทานในพืช.....23
4.1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> ที่แยกได้จากองุ่นพันธุ์มารูซีดเลส บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อายุ 30 วัน.....42
4.2	การเกิดโรคสแคบในใบองุ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน.....44
4.3	ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จ โคโตซาน CHIZA4 [®] , วัคซีนพืช BIG [®] , 2% โคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และชุดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) 5 ระดับความเข้มข้น 75, 150, 300, 600 และ 1,200 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน.....46
4.4	ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จ โคโตซาน CHIZA4 [®] , วัคซีนพืช BIG [®] , 2% โคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และชุดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 75 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน.....47
4.5	ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จ โคโตซาน CHIZA4 [®] , วัคซีนพืช BIG [®] , 2% โคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และชุดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน.....48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
4.6	ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4 [®] , วัคซีนพีช BIG [®] , 2% โคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และซูดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 300 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน.....	49
4.7	ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4 [®] , วัคซีนพีช BIG [®] , 2% โคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และซูดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 600 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน.....	50
4.8	ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4 [®] , วัคซีนพีช BIG [®] , 2% โคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และซูดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน.....	51
4.9	แสดงประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซานในการลดความรุนแรงของโรคสแคบ ในองุ่นพันธุ์มารูซิดเลสในอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบขององุ่นเป็นเวลา 14 วัน ในระดับโรงเรือนทดลอง.....	54
4.10	แสดงแผนที่อินฟราเรด (infrared mapping) โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.5 (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany) ของภาพตัดขวาง (cross section) เนื้อเยื่อใบองุ่นพันธุ์มารูซิดเลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	61
4.11	การแยก cluster ของกลุ่มสีเพื่อคัดเลือกสเปกตรัมของเนื้อเยื่อใบองุ่นพันธุ์มารูซิดเลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในชั้น epidermis โดยใช้โปรแกรม CytoSpec 1.3 trial (Cytospec Inc., NY, USA).....	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.12 การวิเคราะห์ principle component analysis (PCA) score ของเนื้อเยื่อใบองุ่น พันธุ์มราฐีตเลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในชั้น epidermis โดยใช้โปรแกรม Unscrambler 9.7 (CAMO, Norway).....	64
4.13 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (average FTIR spectrum) ของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อชั้น epidermis ของใบองุ่นพันธุ์มราฐีตเลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ณ ช่วงความถี่ 1800 - 900 cm^{-1}	65
4.14 แสดงเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อชั้น epidermis ใบองุ่นพันธุ์มราฐีตเลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	67
5.1 แสดงกลไกการปกป้องตนเองขององุ่นภายหลังจากถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน และปลูกเชื้อรา <i>S. ampelinum</i> สาเหตุโรคสแคบขององุ่น.....	76
ภาพภาคผนวกที่	
1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรกับปริมาณ salicylic acid.....	95
2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรกับปริมาณ trans - cinnamic acid.....	95
3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 585 นาโนเมตรกับปริมาณ N-acetyl glucosamine.....	96

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ASM	=	acibenzolar-S-methyl
BA	=	benzoic acid
BABA	=	β -aminobutyric acid
BTH	=	benzothiadiazole
CA	=	cereal agar
C4H	=	cinnamate 4-hydroxylase
DA	=	degree of acetylation
DNOC	=	dinitro-ortho-cresol
DNP	=	2,4-dinitrophenol
EC	=	emulsifiable concentrate
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
EUREPGAP	=	Euro-retailer produce working group good agricultural practices
FT-IR	=	fourier transform infrared spectroscopy
GAP	=	good agricultural practices
GlcNAc	=	N-acetyl glucosamine
HR	=	hypersensitive response
HRGP	=	hydroxyl protein rich-glycoprotein
IFOAM	=	International federation of organic agriculture movements
JA	=	jasmonic acid
MAMPs	=	microbial-associated molecular patterns
NADP	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NO	=	nitric oxide
O.C.T	=	optimal cutting temperature compound
OH	=	hydroxyl radicals
PAL	=	phenylalanine ammonia-lyase
PAMPs	=	pathogen-associated molecular patterns

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PCA	=	principle component analysis
PDA	=	potato dextrose agar
PGPR	=	plant growth promoting rhizobacteria
POX	=	peroxidase
ppm	=	part per million
PPO	=	polyphenol peroxidase
PR protein	=	pathogenesis-related protein
PRR	=	pattern recognition receptor
PTI	=	PAMP - triggered immunity
RP	=	receptor protein
SA	=	salicylic acid
SAG	=	salicylic acid glucoside
SAR	=	systemic acquired resistance
SOD	=	superoxide dismutase
USDA organic	=	United States Department of Agriculture organic
WA	=	water agar
WP	=	wettable powder

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

องุ่น (*Vitis vinifera* Linn.) เป็นผลไม้ที่เป็นพืชเศรษฐกิจทางเลือกชนิดหนึ่งของประเทศไทย เป็นพืชที่ทำรายได้สูงให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกองุ่น รายได้เฉลี่ยต่ำสุดประมาณ 20,000 บาทต่อไร่ใน ระยะ 1 ฤดูปลูกซึ่งใช้เวลา 3-4 เดือน ปัจจุบันมีความต้องการผลผลิตองุ่นปริมาณสูงอย่างต่อเนื่องเพื่อนำไปใช้ในการบริโภคสดและการแปรรูปในอุตสาหกรรมไวน์ ในอดีตพันธุ์องุ่นที่นิยมปลูกมีเพียงพันธุ์ไวท์มะละกาและพันธุ์คาร์ดินัล โดยปลูกในท้องที่จังหวัดสมุทรสาคร ราชบุรี และนครปฐม (วิทย์ นามเรืองศรี, 2554) ต่อมาการปลูกองุ่นในประเทศไทยได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากองุ่นเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ในหลาย ๆ สภาพอากาศ จึงทำให้การปลูกขยายไปในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง โดยพันธุ์ที่นิยมปลูก เช่น พันธุ์แบล็กโอปอร์ (black opal) และพันธุ์ลูสเพิร์ลเลท (loose perlette) ซึ่งเป็นองุ่นไร้เมล็ดนำเข้าสายพันธุ์จากประเทศชิลี (ฉัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ, 2547; ขนิษฐา มากรุ่ง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553; อัญชญา ประคองคำ, 2555; ธัญมน ผิวทอง, 2558) เน้นการผลิตองุ่นปลอดสารพิษ โดยผ่านการรับรองแหล่งผลิต GAP (good agriculture practice) ซึ่งผ่านการตรวจสอบโดยกรมวิชาการเกษตรและได้รับการรับรองจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข อย่างไรก็ตามแม้ผลผลิตองุ่นจะมีราคาสูงและการปลูกองุ่นได้รับความนิยม แต่เกษตรกรไม่สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่องและมีเกษตรกรจำนวนมากขาดทุนและล้มเลิกการผลิต เนื่องจากองุ่นเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรคและแมลง โดยในปี 2552 มีรายงานว่าเกษตรกรผู้ปลูกองุ่นใน อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา เลิกปลูกองุ่นไปแล้วกว่า 50% จากเดิมที่มีผู้ปลูกองุ่นมากกว่า 200 ราย ปัจจุบันเหลือผู้ปลูกองุ่นเพียง 100 กว่ารายเท่านั้น โดยบางรายต้องปล่อยไร่องุ่นร้างเนื่องจากประสบปัญหาด้านต้นทุนที่เพิ่มสูงขึ้น จากการปรับราคาปุ๋ยเคมีและสารเคมีกำจัดศัตรูพืชสูงขึ้น ทั้งนี้ในปัจจุบันพื้นที่ปลูกองุ่นในจังหวัดนครราชสีมาเหลือผู้ปลูกรายใหญ่เพียง 6 รายเท่านั้น ที่เหลือเป็นผู้ปลูกองุ่นรายย่อย โดยเกษตรกรที่ล้มเลิกการปลูกองุ่นได้มีการเปลี่ยนปลูกพืชชนิดอื่นทดแทน เช่น มันสำปะหลัง อ้อย ข้าวโพด เป็นต้น ส่งผลให้ในปี 2559 ประเทศไทยมีการส่งออกผลผลิตองุ่นมูลค่าเพียง 10, 189, 369 ล้านบาท ลดลงจากปี 2558 ซึ่งมีมูลค่าการส่งออก 10,998,951 ล้านบาท คิดเป็น 7.36% และในปี 2559 มีการนำเข้าผลผลิตองุ่นมูลค่าสูงถึง 3,823,188,216 ล้านบาท ซึ่งสูงกว่าปี 2558 ที่มูลค่า 2,695,742,165 ล้านบาท คิดเป็น 29.49% (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) จากการนำเข้าผลผลิตองุ่นที่สูงขึ้นและการส่งออกผลผลิต

องุ่นที่ลดลงนั้น เนื่องจากผลผลิตมีคุณภาพต่ำจากปัญหาการเข้าทำลายของโรค ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น มีฝนตกชุกตลอดปี เป็นสาเหตุทำให้เกิดการระบาดของโรคได้ง่าย การเข้าทำลายของโรคองุ่น มักเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา โดยเฉพาะราน้ำค้าง ราแป้งและสแคบ โรคเหล่านี้ ทำความเสียหายให้กับองุ่นในทุกระยะการเจริญเติบโต ส่งผลให้ผลผลิตองุ่นมีคุณภาพต่ำ (ฉัฐธิญา เบือนสันเทียะ, 2547; ขนิษฐา มารุ่ง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553; อัญชญา ประคองคำ, 2555; รัชมน พิวทอง, 2558)) ไม่เพียงพอสอดคล้องความต้องการของผู้บริโภค อีกทั้งโรคองุ่นเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น เนื่องจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคองุ่นอย่างต่อเนื่อง และนอกจากการใช้สารเคมีในปริมาณมากจะทำให้ต้นทุนการผลิตองุ่นสูง ยังเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ผลิต ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม

ปัจจุบันกระแสเรื่องการดูแลสุขภาพเข้ามามีบทบาทมาก ผู้บริโภคทุกกลุ่มให้ความสนใจเรื่องสุขภาพมากขึ้น ทั้งนี้พืชผักและผลไม้ส่วนใหญ่ที่จำหน่ายและส่งออกจะต้องมีการตรวจมาตรฐานต่าง ๆ ทั้งมาตรฐานของประเทศไทยและสากล เช่น Thailand-organics, GAP, EUREPGAP, IFOAM, USDA-organic, Canada-organics เป็นต้น โดยมีจุดมุ่งหมายในการคุ้มครองตลาดหรือเพื่อคุ้มครองให้ผู้บริโภคเกิดความเชื่อมั่นว่าผลผลิตทางการเกษตรหรืออาหารที่มีองค์ประกอบจากผลผลิตทางการเกษตรตลอดห่วงโซ่อาหารนั้นผลิตภายใต้ระบบที่มีความรับผิดชอบต่อชุมชน ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม จากผลงานวิจัยด้านเทคโนโลยีการผลิต เป็นพื้นฐานสำคัญที่ช่วยส่งเสริมและสนับสนุนการผลิต แต่จากผลการวิจัยแบบการมีส่วนร่วมในการลงพื้นที่ในแปลงเกษตรกรพบว่า เทคโนโลยีดังกล่าวเป็นเพียงมิติหนึ่งที่ยังขาดการพัฒนาองค์ความรู้ดังกล่าวให้ง่ายและรวดเร็ว และผู้ต้องการใช้ความรู้นั้น อาทิ เกษตรกร สามารถเข้าถึง (Accessibility) ได้

ดังนั้นการวิจัยเพื่อค้นหาวิธีการในการป้องกันกำจัดโรคทดแทนสารเคมีจึงสำคัญต่อการควบคุมโรคพืช ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้วิธีต่าง ๆ ในการป้องกันกำจัดโรคพืช เช่น การเขตกรรม (cultural practices) การควบคุมโดยชีววิธี (biological control) และวิธีผสมผสาน (ไพโรจน์ จ้วงพานิช, 2525) นอกจากนี้การชักนำให้พืชเกิดความต้านทาน (induced resistance : IR) เป็นวิธีการหนึ่งซึ่งช่วยให้พืชสามารถสร้างความต้านทานต่อโรค และช่วยลดการใช้สารเคมีได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Klopper and Schroth, 1978; Buensanteai et al., 2008; สุธฤดี ประเทืองวงศ์ และคณะ, 2554) การกระตุ้นหรือชักนำความต้านทานแบบป้องกันตัวเองของพืชโดยไม่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อโรคพืช จะส่งผลให้พืชมีความต้านทานทั้งบริเวณที่ถูกบุกรุกโดยตรงและบริเวณที่ไกลออกไปที่ไม่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค ซึ่งจะเกิดขึ้นในช่วงสั้น ๆ ภายหลังจากการติดเชื้อโรค แต่จะสามารถคงอยู่ได้เป็นระยะเวลาสั้น ทำให้พืชมีความทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค (Klopper and Schroth, 1978; Buensanteai et al., 2008) การชักนำให้เกิดความต้านทานของพืชจะอาศัยสิ่งกระตุ้น (elicitor) ซึ่งสิ่งกระตุ้นนี้สามารถชักนำกลไกการปกป้องตนเองของพืชทั้งทาง

โครงสร้างและทางเคมี เพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยแบ่งออกเป็นสิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต (biotic elicitor) เช่น เชื้อ *Trichoderma* spp. (Hoitink et al., 2006; Palmirei et al., 2012), เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) เช่น เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* (Vleesschauwer et al., 2008; Verhagen et al., 2010), เชื้อ *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* (Buensanteai et al., 2009; Rudrappa et al., 2010; สุกฤดี ประเทืองวงศ์และคณะ, 2554) และสิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (abiotic elicitor) เช่น กรดซาลิไซลิก (salicylic acid), กรดจัสโมนิก (jasmonic acid), β -aminobutyric acid (BABA), thiamine (vitamin B1), acibenzolar-S-methyl (ASM), benzothiadiazole (BTH) และไคโตซาน (chitosan) (Repka, 2001; Compant and Mathieu, 2016) เป็นต้น โดยไคโตซาน (ไคติน) เป็นสารที่นิยมใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตและเป็นอนุพันธ์ของไคติน ที่ตัดหมู่อะซิทิลของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ออกสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อพืช มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2532) ในปี 2006 Aziz et al. พบว่าการใช้ไคติน oligomers ร่วมกับ copper sulfate ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm) สามารถช่วยกระตุ้นให้อุ่นมีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและโรคราสีเทาโดยการสังเคราะห์สาร phytoalexin เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ Trotel-Aziz et al. (2006) พบว่า ไคโตซานที่ความเข้มข้น 150 ppm สามารถชักนำให้อุ่นมีความต้านทานต่อโรคราสีเทาของุ่นที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea* โดยกระตุ้นกลไกการปกป้องตนเอง ต่อมาในปี 2016 Llorens et al. พบว่าไคโตซานว่าสามารถชักนำให้อุ่นต้านทานต่อโรคราน้ำค้างได้เช่นกัน สำหรับในประเทศไทยอินชญา ประคองคำ (2555) รายงานว่าการฉีดพ่นอุนด้วยไคโตซานความเข้มข้น 5,000 ppm แสดงอาการของโรคสแคบช้ากว่ากรรมวิธีอื่น ๆ และสามารถกระตุ้นให้อุ่นมีการสร้าง PR-protein เช่น chitinase และ glucanase ไปย่อยไคตินเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบในอุน สอดคล้องกับการทดลองของ รัชมน ผิวทอง (2557) ที่พบว่า เมื่อฉีดพ่นอุนโดยใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1,000 ppm มีการแสดงออกของโรคสแคบช้ากว่ากรรมวิธีอื่นและมีการสร้างสารลิกนินและฟีนอลิกในปริมาณที่สูงขึ้น ไคโตซานจึงถือเป็นสารสำคัญในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคสแคบ เพื่อให้สารมีประสิทธิภาพสูงขึ้นและสามารถใช้งานได้สะดวก จำเป็นต้องมีการพัฒนาสูตรสำเร็จไคโตซาน ซึ่งเป็นสิ่งกระตุ้นกลไกการปกป้องตนเองของพืช (elicitor: อลิซิเตอร์) เพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นชักนำความต้านทานต่อโรคสแคบของอุน เป็นหนึ่งในวิธีการทางเลือกที่ดีในการลดใช้หรือทดแทนสารเคมีควบคุมโรคอุนซึ่งส่งผลไม่รับประทานผลสด ซึ่งหากใช้สารเคมีควบคุมจำนวนมากอาจส่งผลเป็นอันตรายโดยตรงต่อผู้บริโภค

ปัจจุบันประเทศไทยมีการศึกษาการชักนำความต้านทานและมีข้อมูลการศึกษากลไกความต้านทานขององุ่นยังไม่มากนัก ทั้งกลไกความต้านทานทางโครงสร้างและทางชีวเคมี เพื่อนำความรู้ความเข้าใจในกลไกความต้านทานขององุ่นไปใช้ในการพัฒนาวิธีการควบคุมโรคทดแทนการใช้สารเคมี จึงต้องมีการศึกษากลไกความต้านทานขององุ่นในการต้านทานโรคสแคบโดยใช้สูตรสำเร็จไคโตซานเป็นสิ่งกระตุ้น

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษากลไกความต้านทานขององุ่นพันธุ์มารูซีดเลสหลังจากถูกชักนำด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน

1.3 สมมติฐานการวิจัย

องุ่นมีการชักนำความต้านทานเพิ่มขึ้นหลังจากถูกกระตุ้นสูตรสำเร็จไคโตซาน

1.4 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษากลไกการความต้านทานทางโครงสร้างและทางชีวเคมีขององุ่นรับประทานผลสดสายพันธุ์มารูซีดเลส ที่เปลี่ยนแปลงไปภายหลังถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซานในระดับโรงเรือนทดลอง โดยใช้เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ เป็นเชื้อราสาเหตุโรคต้นแบบในการทดลอง โดยใช้เทคนิคการตรวจสอบกลไกความต้านทานพืชทางชีวเคมี ได้แก่ ปริมาณกรดซาลิไซลิก (salicylic acid: SA) และเอนไซม์ปกป้องตนเอง นอกจากนี้ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีในองุ่นด้วยเทคนิคขั้นสูง synchrotron FT-IR microscopy

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบกลไกการป้องกันตนเองขององุ่นหลังจากถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญและปัญหาในการผลิตองุ่น

องุ่น (*Vitis vinifera* Linn.) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตอบอุ่น (นันทกร บุษยเกิด, 2546) โดยเริ่มจากบริเวณเอเชียไมเนอร์และแพร่ขยายออกไป ทั้งทางตะวันออก และตะวันตกไปสู่ทวีปยุโรป อเมริกา และแหล่งอื่น ๆ ของโลก ทั่วโลกมีพันธุ์องุ่นไม่น้อยกว่า 8,000 พันธุ์ ซึ่งมีชื่อและลักษณะประจำพันธุ์แตกต่างกันออกไป แต่มีเพียง 20% เท่านั้น ที่นิยมปลูกเป็นการค้า (FAO, 2007; ญัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ, 2547; ขนิษฐา มากรุง, 2548; มรุกร สมพงษ์, 2553; อัญชญา ประคองคำ, 2555; รัชมน พิวทอง, 2558) องุ่นเป็นไม้เลื้อยประเภทไม้ยืนต้น การเจริญเติบโตในเขตอบอุ่นมีการผลัดใบในฤดูใบไม้ร่วง พักตัวในฤดูหนาว แยกตาใบในฤดูใบไม้ผลิและเจริญไปเป็นผลแก่ในฤดูร้อน สำหรับองุ่นที่ปลูกในเขตร้อนจะมีใบสีเขียวตลอดปี ไม่มีการพักตัวตามธรรมชาติและคุณภาพผลผลิตองุ่นในเขตร้อนมักจะด้อยกว่าองุ่นในเขตอบอุ่น (ยงยุทธ ชำรงนิमित, 2547) ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกองุ่นประมาณ 28,742 ไร่ กระจายอยู่เกือบทั่วทุกภาค (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2548) พันธุ์องุ่นที่นิยมปลูกในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ องุ่นที่ใช้รับประทานผลสด เช่น ไวท์มะละกา (white malaga), ราชินีดำ (black queen), แบล็คโรส (black rose), เพอร์เลท (perlette), มาร์รูซีดเลส (marroo seedless) หรือ แบล็คโอปอลด์ (black opal), เฟลมซีดเลส (flame seedless) เป็นต้น องุ่นทำไวน์ เช่น ชีราซ (shiraz) หรือ ชีราห์ (shirah), กาแบร์เนต์ฟร็องค์ (Cabernet Franc), แมร์โลต์ (Merlot), ชาร์โดเนย์ (Chardonnay), เรซลิง (Riesling) เป็นต้น และองุ่นสำหรับทำต้นตอที่นิยมใช้ในประเทศไทยคือ โซโลนิช – โอเทลโล 1613 (Solonish x Othello 1613) หรือ Couderc 1613 (1613C) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้ในประเทศไทยมากกว่า 40 ปี แต่มีข้อเสียคือ อ่อนแอต่อโรคราสนิมและแอนแทรคโนส (รัฐพล ฉัตรบรรยงค์, 2551)

ในปี 2559 ประเทศไทยมีการส่งออกผลผลิตองุ่นมูลค่า 10,189,369 ล้านบาท ลดลงจากปี 2558 ซึ่งมีมูลค่าการส่งออก 10,998,951 ล้านบาท คิดเป็น 7.36% และในปี 2559 มีการนำเข้าผลผลิตองุ่นมูลค่าสูงถึง 3,823,188,216 ล้านบาท ซึ่งสูงกว่าปี 2558 ที่มีมูลค่า 2,695,742,165 ล้านบาท คิดเป็น 29.49% (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) เหตุที่มีการส่งออกผลิตภัณ์จากองุ่นลดลงและนำเข้าองุ่นเพิ่มขึ้นนั้น เป็นเพราะผลผลิตภายในประเทศยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค เนื่องจากสภาพอากาศในประเทศไทยเป็นเขตร้อนชื้น เหมาะสมกับการเกิดและแพร่ระบาดของโรคโรคราขององุ่นจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ปริมาณและคุณภาพผลผลิตองุ่นต่ำ กรมส่งเสริมการเกษตร

(2545) รายงานว่า โรคองุ่นที่พบในประเทศไทยมีหลายชนิดได้แก่ โรคราน้ำค้าง ราแป้ง โรคราสนิม โรคกิ่งแห้งหรือเน่าขม และโรคสแคบ (อับบ) หรือแอนแทรคโนส โดยโรคที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจต่อผลผลิตองุ่นในประเทศไทยมากที่สุดคือ ราน้ำค้าง สแคบ ราสนิม และราแป้ง ตามลำดับ (อิณชญา ประคองคำ, 2555) เกษตรผู้ปลูกนิยมใช้สารเคมีในการควบคุมโรค เนื่องจากสามารถควบคุมโรคได้รวดเร็ว โดยมีรายงานการใช้สารเคมีควบคุมโรคองุ่นในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 2012 สูงถึง 26,312,300 ปอนด์ สารเคมีที่ใช้ปริมาณสูงสุดคือ sulfur, mineral oil, 1,3-Dichloropropene, lime – sulfur และ glyphosate, potassium salt ตามลำดับ (PAN Pesticide Database, 2016) ในประเทศไทยนิยมใช้ carbendazim, metalaxyl, bordaux mixture, lime – sulfur มีรายงานการพบสารปราบศัตรูพืช 10 ชนิด อาทิ คาร์เบนดาซิม (Carbendazim) คลอไพริฟอส (Chlorpyrifos) ไซเปอร์เมทริน (Cypermethrin) เป็นต้น มีการตรวจพบสารตกค้างในองุ่นร้อยละ 91.3 ขณะที่องุ่นอีกร้อยละ 3 พบปริมาณสารตกค้างเกินกว่าระดับที่กฎหมายกำหนด (อิริดา มีเดช, 2556) ในการควบคุมโรคองุ่น การใช้สารเคมีในปริมาณมากนั้นส่งผลกระทบต่อทั้งเกษตรกรผู้ปลูก ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม

2.2 โรคที่สำคัญขององุ่น

2.2.1 โรคราน้ำค้าง (downy mildew)

เกิดจากเชื้อรา *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายมากที่สุด มีการระบาดรุนแรงตลอดปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูฝนเนื่องจากมีความชื้นในอากาศสูง อาการของโรคสามารถเกิดขึ้นได้กับส่วนต่าง ๆ ขององุ่น ทั้งใบ ดอก ยอดอ่อน เถา และผล โดยลักษณะอาการบนใบองุ่นจะพบจุดเหลืองด้านบนใบ ในองุ่นบางพันธุ์จุดอาจมีลักษณะเป็นเหลี่ยมหรือจุดอาจขยายขนาดจนโตเชื่อมต่อกัน ด้านใต้ใบตรงข้ามจุดเหลืองจะพบกลุ่มสปอร์และก้านชูสปอร์สีขาวเห็นได้ชัด ซึ่งสามารถเจริญและแพร่ระบาดไปยังใบอื่น ๆ หรือแปลงอื่นโดยปลิวไปกับลม อาการของโรคจะสังเกตได้ต่อเมื่อเชื้อราเข้าทำลายแล้ว 4-6 วัน อาการที่ยอดอ่อน มีลักษณะแคะแกร็น ยอดสั้น มีกลุ่มสปอร์และก้านชูสปอร์ขึ้นปกคลุมเห็นได้ชัดเจน ยอดอ่อนที่ถูกทำลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งตายอย่างรวดเร็ว อาการที่ช่อดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเป็นหย่อม ๆ ต่อมาจะเห็นกลุ่มของเชื้อราสีขาวขึ้นปกคลุม ช่อดอกจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและแห้งติดเถาจากโคนช่อ กลางช่อ หรือปลายช่อ อาการที่ช่อผลมีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาล เปลือกผลเหี่ยว เปลี่ยนเป็นสีเทาน้ำเงินหรือน้ำตาลแก่ อาจทำให้ผลเหี่ยวทั้งช่อ อาการเนื้อเยื่อผลแข็งเป็นแอ่งนูน บนผลที่โตแล้ว เรียกว่า gray rot อาการที่เถาและมือเถา เริ่มจากเกิดแผลสีเหลืองซีดเมื่อแผลมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หากเกิดอาการที่เถาจะทำให้ยอดแคะแกร็นเนื่องจากขาดธาตุอาหาร การแพร่ระบาดสามารถแพร่ไปทางลม และฝนได้ และสามารถพักตัวในสภาพ oospore ในเศษซากพืช และในสภาพเส้นใยที่พักตัวที่ตามกิ่งองุ่น (Person and Goheen, 1998 และนิพนธ์ วิสารทานนท์, 2542)

การป้องกันกำจัดโรคราน้ำค้าง กรมส่งเสริมการเกษตร (2559) แนะนำให้สำรวจแปลงองุ่นอย่างสม่ำเสมอทุกสัปดาห์ บำรุงรักษาต้นองุ่นให้สมบูรณ์โดยตัดแต่งพุ่มต้นให้โปร่งให้อากาศถ่ายเทสะดวก จะสามารถช่วยลดความชื้นและช่วยลดการระบาดของโรค ทำความสะอาดสวน ตัดแต่งกิ่งรวมทั้งใบที่ตัดออกจากต้นให้นำไปเผาทิ้งหรือฝังเพื่อลดแหล่งสะสมโรค เมื่อเริ่มพบอาการของโรคให้พ่นเชื้อแบคทีเรียบีเอส หรือ บาซิลลัส ซับทิลิส (*Bacillus subtilis*) ควบคุมโรคบริเวณที่เกิดอาการของโรคในช่วงเวลาเย็นแดดอ่อน โดยใช้อัตราการใช้ตามอัตราแนะนำ หากมีความจำเป็นต้องใช้สารเคมี แนะนำให้ใช้ เมทาแลกซิล (metalexyl) + แมน โคเซบ (mancozeb) 72% WP อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือฟอสอิทธิลอลูมิเนียม (focetyl-aluminum) 80% WP อัตรา 25 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร

2.2.2 โรคราสนิม (rust)

โรคราสนิมองุ่น สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Phakopsora ampelopsidis* (Diet. & Syd.) หรือ *Physopella vitis* (Diet. & Syd.) Cumm & Ramachar หรือ *Uredo vitis* เป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับองุ่นเขตร้อนและกึ่งร้อนในเขตเอเชียมากกว่าเขตอบอุ่น สามารถเข้าทำลายองุ่นได้ทุกสายพันธุ์ ลักษณะอาการบริเวณใต้ใบองุ่นจะพบเชื้อในระยะ uredial stage มีลักษณะเป็นตุ่มแผลเล็ก ๆ สีเหลืองเกิดเป็นกลุ่ม หรือกระจุกกระจายทั่วไป โรคราสนิมระบาดได้รวดเร็วโดยส่วนมากมักจะสร้างความเสียหายกับใบแก่ ทำให้ใบเหลืองแห้ง และร่วงหล่น สามารถแพร่ระบาดได้ดี ทางลมจากแหล่งเชื้อที่สะสมบนเศษซากพืช (Person and Goheen, 1998 และนิพนธ์ วิสารทานนท์, 2542)

การป้องกันกำจัดโรคราสนิม กรมวิชาการเกษตร (2559) แนะนำให้เกษตรกรหมั่นตรวจแปลงปลูกอย่างสม่ำเสมอ ตัดแต่งทรงพุ่มให้โปร่ง มีอากาศถ่ายเท ควรหลีกเลี่ยงการตัดแต่งทรงพุ่มช่วงฝนตก และให้เก็บส่วนที่เป็นโรคออกจากแปลงไปเผาทำลายนอกแปลงปลูก หากพบโรคราสนิมระบาด ควรฉีดพ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืชแมน โคเซบ (mancozeb) 80% WP อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือสารไตรอะดิมิฟอน (triadimefon) 25% WP อัตรา 12 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือสารไดฟีโนโคนาโซล (difenoconazole) 25% EC อัตรา 20-30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ทุก 5-7 วัน

2.2.3 โรคราแป้ง (powdery mildew)

โรคราแป้งถือเป็นอีกโรคสำคัญขององุ่น โดยมีสาเหตุจากเชื้อ *Uncinula necator* หรือ *Erysiphe necator* ลักษณะสำคัญของโรคราแป้งคือ เป็นผงสีขาวหรือเทาเป็นจุดหรือเป็นบนส่วนของพืช สามารถเข้าทำลายได้ทั้งใบ ต้นอ่อน ตา ดอก ผลอ่อน ถ้าเป็นที่ใบรุนแรงจะทำให้ใบบิดเบี้ยวเสียรูปร่างและร่วงหล่นก่อนกำหนด ถ้าเข้าทำลายตาจะทำให้ตาไม่แตกออก มีระบาดในที่อากาศแห้ง การระบายอากาศไม่ดี ความชื้นประมาณไม่เกิน 90 เปอร์เซ็นต์และส่วนผิวของพืชไม่เปียก พืชอบน้ำในระยะต้นอ่อนจะอ่อนแอมากกว่าต้นแก่ ราแป้งมีความจำเพาะเจาะจงกับพืชสูง Gubler et al (2006) รายงานว่าเชื้อราแป้งในองุ่น สามารถมีชีวิตในฤดูหนาวโดยอยู่ในตาของพืชและสร้าง cleistothecia ซึ่งเป็นส่วนสำคัญสำหรับการอยู่ข้ามฤดูของเชื้อ เมื่อถึงปลายฤดูร้อนต้นฤดูฝน เชื้อจะ

เข้าทำลายเนื้อเยื่อพืช โดย cleistothecia จะปล่อย ascospores งอกเข้าทำลายพืช ใช้เวลาประมาณ 7-10 วัน (ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ, 2553) เมื่อราแบ่งเข้าทำลายจะทำให้องุ่นมีผลผลิตคุณภาพต่ำและความหวานลดลง (Wilcox, 2003)

การป้องกันกำจัดโรคราแป้ง Wilcox (2003) แนะนำให้ตัดแต่งกิ่งองุ่นให้ปลอดโปร่ง อากาศถ่ายเท ระบายความชื้นได้ดี จะช่วยลดโอกาสการเกิดราแป้ง กรมวิชาการเกษตร (2559) แนะนำว่าหากพบโรคราแป้งระบาดควรฉีดพ่นด้วยผงกำมะถันอัตราไร่ละ 1.5-5 กิโลกรัม ทุก 5-7 วัน ฉีดพ่นประมาณ 5-6 ครั้ง เพื่อป้องกันการระบาดของโรค การใช้สารเคมีควรใช้ เบนโนมิล (เบนเลท 50% WP) อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตรหรือคาร์เบนดาซิม 50%WP อัตราการใช้ 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นทุก 7 วัน

2.2.4 โรครสแคบ (scab, anthracnose)

โรครสแคบหรือแอนแทรคโนส ในประเทศไทย (โรคอีบุบ) จัดเป็นโรคที่สร้างความเสียหายรองจากโรคราน้ำค้าง สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary (*Elsinoe ampelina* ในระยะ telemorph) (Pearson and Goheen, 1998; อิณชญา ประคองคำ 2555) เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้คุณภาพและปริมาณผลผลิตองุ่นลดลง และมีผลต่อรสชาติของไวน์ (กรรณิการ์ เพ็ญภักตร์, 2547) ทำความเสียหายให้องุ่นมากที่สุดในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ และอีกหลายประเทศ เช่น ชิลี บราซิล ออสเตรเลีย เป็นต้น ในปี ค.ศ. 1839 กรรณิการ์ เพ็ญภักตร์ และคณะ (2545) รายงานว่า การเข้าทำลายของแอนแทรคโนสจากเชื้อ *Colletotrichum* คล้ายกับสแคบมาก แต่มีข้อแตกต่างกันคือ โรครสแคบมีลักษณะแห้ง แข็งทำให้เห็นบริเวณขอบแผลชัดเจน แต่โรคแอนแทรคโนสแผลยุบตัวลักษณะฉ่ำน้ำ ขอบแผลไม่จำกัดขอบเขตอย่างเด่นชัด อาการเน่าที่ผลเป็นจุดขยายออกกว้างอย่างรวดเร็วทำให้แผลมีลักษณะคล้ายดวงตานก (bird's eye spot) (ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553; ชัญมนี ผิวทอง, 2557)

2.2.4.1 ข้อมูลทั่วไปของโรครสแคบ

มีรายงานการพบโรครสแคบขององุ่นครั้งแรก ในประเทศฝรั่งเศส โดย Viala ได้ทำการเก็บตัวอย่างของโรคไว้ที่เมือง Montpellier ในปี ค.ศ. 1881 Burril รายงานการพบในประเทศสหรัฐอเมริกา (Shear, 1929; มธุกร สมพงษ์, 2553) ในประเทศไทย มีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2506 ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (กรรณิการ์ เพ็ญภักตร์ และคณะ, 2537; ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553; อิณชญา ประคองคำ, 2555) ในขณะนั้นเรียกโรคนี้ว่า แอนแทรคโนส และรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *Gloeosporium ampelophagum* เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาแยกเชื้อสาเหตุโรครสแคบด้วยวิธี tissue transplanting ซึ่งมีการทำลายเชื้อที่แท้จริง เนื่องจากเชื้อ *Sphaceloma* spp. ตอบสนองต่อสารเคมีได้เร็ว ดังนั้นเชื้อที่เหลืออยู่จึงเป็นเชื้อที่ทนทานต่อสารเคมีมากกว่า เช่น *Colletotrichum gloeosporioides* (Prnz.) Sacc. ซึ่งมักเป็นพวกใช้อินทรีย์วัตถุเป็น

อาหาร (saprophyte) และปรสิตพืช (plant parasite) ส่วนเชื้อ *Sphaceloma* spp. เป็นปรสิตพืชเพียงอย่างเดียว และเจริญซ้ำจึงไม่อาจแข่งขันกับเชื้อใด ๆ (กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์ และคณะ, 2545; Ellett, 1957; อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์, 2553) ต่อมาในปี พ.ศ. 2533 ได้มีรายงานใหม่ที่เกิด จากเชื้อ *S. ampelinum* (กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์ และคณะ, 2536; อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์, 2553) โรคสแคบมีการแพร่ระบาดรุนแรงในฤดูฝน ลักษณะอาการ เมื่อเชื้อเข้าทำลายที่ยอดหรือช่อดอก และช่อผล ลักษณะอาการใบอ่อนเป็นจุดสีน้ำตาลดำ ขอบแผล สีเข้ม เกิดการจัดกระจายบนใบทำให้ใบอ่อนหงิกงอ เนื่องจากเนื้อเยื่อตาย การเจริญที่ผิวใบไม่สม่ำเสมอ ที่ใบแก่มีแก้มแตกกลางจุด ทำให้เนื้อเยื่อที่แห้งขาดอยู่ เกิดบริเวณกลางจุดเป็นรู จุดอาจเชื่อมกันทำให้ลักษณะใบแห้งตาย เชื้อราเข้าทำลายยอดอ่อนงอจนทำให้ยอดถูกปกคลุมด้วยจุดสีน้ำตาลอย่างรุนแรงและเป็นแผลแตกเกิดกระจายทั่วไป (นิพนธ์ วิจารณ์, 2542, ชัญมน พิวทอง, 2557)

2.2.4.2 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อรา *S. ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบขององุ่น

เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในสกุล *Sphaceloma* เป็นระยะ Anamorph มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งจำแนกตามหมวดหมู่ได้ดังนี้ (Alexopoulos, 1962: Sutton, 1973; มธุกร สมพงษ์, 2553)

Anamorph: Subdivision Deuteromycotina

Class Deuteromycetes

Order Melanconiales

Family Melanconiaceae

Genus *Sphaceloma*

Species depend on host

เชื้อ *S. ampelinum* มี telemorph stage คือเชื้อ *Elsinoe ampelinua* เชื้อ *E. ampelinua* สามารถจัดจำแนกตามหมวดหมู่ดังนี้

Telemorph: Subdivision Ascomycotina

Class Ascomycetes

Order Myriangiales

Family Elsinoaceae

Genus *Elsinoe*

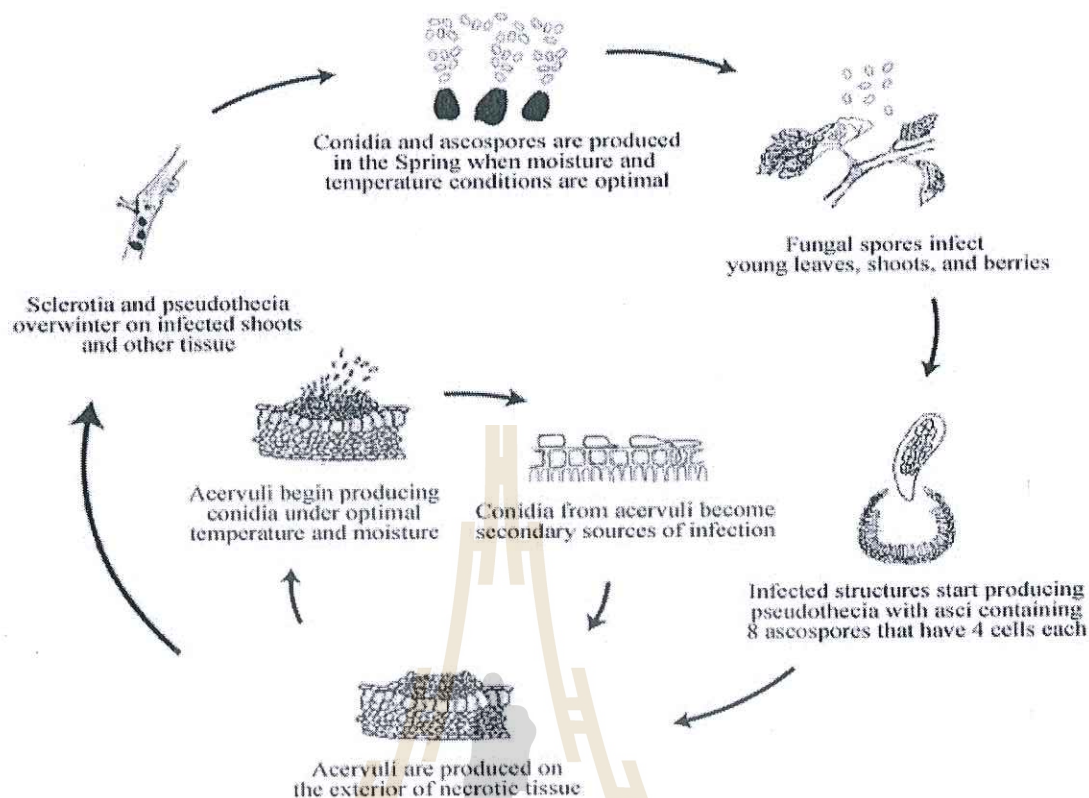
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เชื้อมีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) โดยการสร้างโคนิเดีย มีก้านชูที่เรียกว่า conidiophores และถ้ามีสภาพแวดล้อมเหมาะสม เชื้อจะสามารถสร้างโคนิเดียได้อย่างรวดเร็ว (ประสาทร สมิติตะมาน, 2534; ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553) โคนิเดียสร้างอยู่ภายใน fruiting body ซึ่ง fruiting body มีลักษณะคล้ายจานปากกว้าง

เรียกว่า acervulus ซึ่งโคนิเดียมีขนาดเล็ก มีลักษณะใส กลมรี หัวท้ายมน เมื่อแก่จะเห็นเซลล์กลมใส ภายใน (teleomorph state คือ Elsinoe) เป็นสาเหตุของโรคสแคบ (กรรณิการ์ เพียนภักตร์ และคณะ, 2544, อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์, 2553) ผงเซลล์ด้านนอกมีลักษณะคล้ายวุ้นใสและเหนียวหุ้ม (mucilaginous walls) โดยมีความหนาประมาณ $3-6 \times 2-8$ ไมโครเมตร และสปอร์มีขนาด $6.37-8.75 \times 2.61-4.77$ ไมโครเมตร (Pearson and Goheen, 1988; รัชมน พิวทอง, 2557)

2.2.4.3 วงจรการเกิดโรคสแคบ

เชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูได้ โดยอาศัยอยู่ในซากของงุ่นที่เคยเป็นโรค เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เชื้อจะสร้าง inoculum ขึ้นมาใหม่ในรูปของโคนิเดีย ซึ่งเป็น primary inoculum โคนิเดียจะแพร่กระจายโดยลมและละอองน้ำฝน เมื่อมีความชื้นสูงเชื้อจะงอก germ tube เข้าทำลายพืช ไปเจริญอยู่ในเซลล์และเข้าทำลายส่วนต่างๆ ของงุ่น โคนิเดียจะงอกได้เมื่อได้รับความชื้นเป็นเวลานาน 4 – 7 ชั่วโมง และมีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อการงอกของโคนิเดียคือ ระยะเวลาที่ใบพืชเปียก อาการของโรคจะเริ่มปรากฏภายใน 3 – 5 วัน หลังจากปลูกเชื้อลงบนพืชแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 12 – 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บไว้ในที่แห้งที่อุณหภูมิ 12 – 13 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน โคนิเดียจะปรากฏบนใบใหม่ ภายใน 12 – 14 วัน หลังจากการเข้าทำลาย (Brook, 1973 อ้างถึงใน ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุรกรรมพงษ์, 2553)





ภาพที่ 2.1 แสดงวงจรการเกิดโรคสแคบขององุ่นที่เกิดจากเชื้อ *S. ampelinum* de Bary

ที่มา: Gacharnaah, 2015 ออนไลน์:

https://en.wikipedia.org/wiki/Elsino%C3%AB_ampelina)

2.3 การควบคุมโรคสแคบ

2.3.1 การควบคุมโรคโดยวิธีเขตกรรม (cultural practices)

การป้องกันกำจัดโรคด้วยวิธีเขตกรรมสามารถทำได้หลายวิธี อาทิการทำความสะอาดสวน ทำลายผลองุ่นทิ้งสด และแห้งที่อยู่ใต้ดิน โดยวิธีเผาหรือฝังเพื่อลดแหล่งแพร่เชื้อ ควรตัดแต่งและจัดกิ่งให้โปร่ง เพื่อให้อากาศภายในทรงพุ่มถ่ายเทได้สะดวก สามารถลดความชื้นสะสมในช่วงที่โรคระบาดได้ (วัฒนา สวรรยาธิปิติ, 2531) กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์ และคณะ (2533) พบว่า การหลีกเลี่ยงการปลูกองุ่นในพื้นที่ที่มีประวัติการระบาดมาก่อน และในช่วงที่มีอากาศร้อนชื้น หรือช่วงฤดูฝน เนื่องจากสภาพอากาศเหมาะสม สามารถลดการแพร่ระบาดของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ Ravaz (1927) อ้างถึงใน กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์ (2457) แนะนำให้ใช้ปุ๋ย Nitrate of soda lime หรือ Potash ประมาณ 3 สัปดาห์ก่อนทาบกิ่งหรือดองกิ่งจะช่วยให้ส่วนขยายพันธุ์ขององุ่น สมบูรณ์และแข็งแรง

2.3.2 การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี (chemical control)

ในการใช้สารเคมีควบคุมโรคสแคบ มีการรายงานว่าคาร์เบนดาซิมเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของโคโคนีลักษณะที่เป็นเส้นใยได้ดีที่สุด แต่ไม่ยับยั้งการสร้างโคโคนีของเชื้อที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ (yeast like colony) แสดงว่า กลไกการออกฤทธิ์ของคาร์เบนดาซิมต่อเชื้อ *S. ampelinum* ยับยั้งการสร้างเส้นใยแต่ไม่ยับยั้งการสร้างสปอร์ ส่วนสารคอปเปอร์ออกซิคลอไรด์ และแคลแทนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. ampelinum* ได้ (กานต์ คำทรัพย์, 2546; มธุกร สมพงษ์, 2553) กนิษฐ์ ฐนเทพ และคณะ (2545) รายงานว่าสารเคมีเบลคัท (iminocadine tris [albesilate]) 40% WP ที่อัตรา 5-15 กรัม/20 ลิตร สามารถควบคุมโรคสแคบได้ดีในระดับเดียวกับสารไดฟีโนโคนาโซล (difenoconazole) ที่อัตรา 5 ซีซี/ 20 ลิตร และดีกว่าสาร โพรพิเนบ (propineb) ที่อัตรา 10 กรัม/20 ลิตร นอกจากนี้ สารเบลคัททุกอัตราที่ทดสอบมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหมือนกัน และไม่มีพิษต่อกิ่ง ใบ ช่อดอก และผลขององุ่น (อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์, 2553) Tourjee (2004) แนะนำให้ใช้สารเคมีไลม์ซัลเฟอร์ชนิดเหลว (Liquid lime sulfur) กำจัดเชื้อรา โดยฉีดพ่นทางใบก่อนการแตกตา อัตราส่วน 112 ลิตร/เฮกตาร์ (อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์, 2553) กรรณิการ์ เพ็ญพักตร์ (2547) แนะนำว่า ในระยะที่พืชพักตัว ควรพ่นด้วย DNOC, DNP, Bordeaux mixture หรือ lime sulfur ในแหล่งปลูกองุ่นที่ควรป้องกันและควบคุมโรคดังกล่าว รวมทั้งในช่วงการเจริญแตกเถา ใบอ่อน และยอดอ่อนยาว 5 – 10 เซนติเมตร ฉีดพ่นด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อราทุก 2 สัปดาห์ และหลังจากฝนตก แดดออก หรือหมอกและน้ำค้างลงจัด ควรฉีดพ่นด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อราภายใน 24 ชั่วโมง

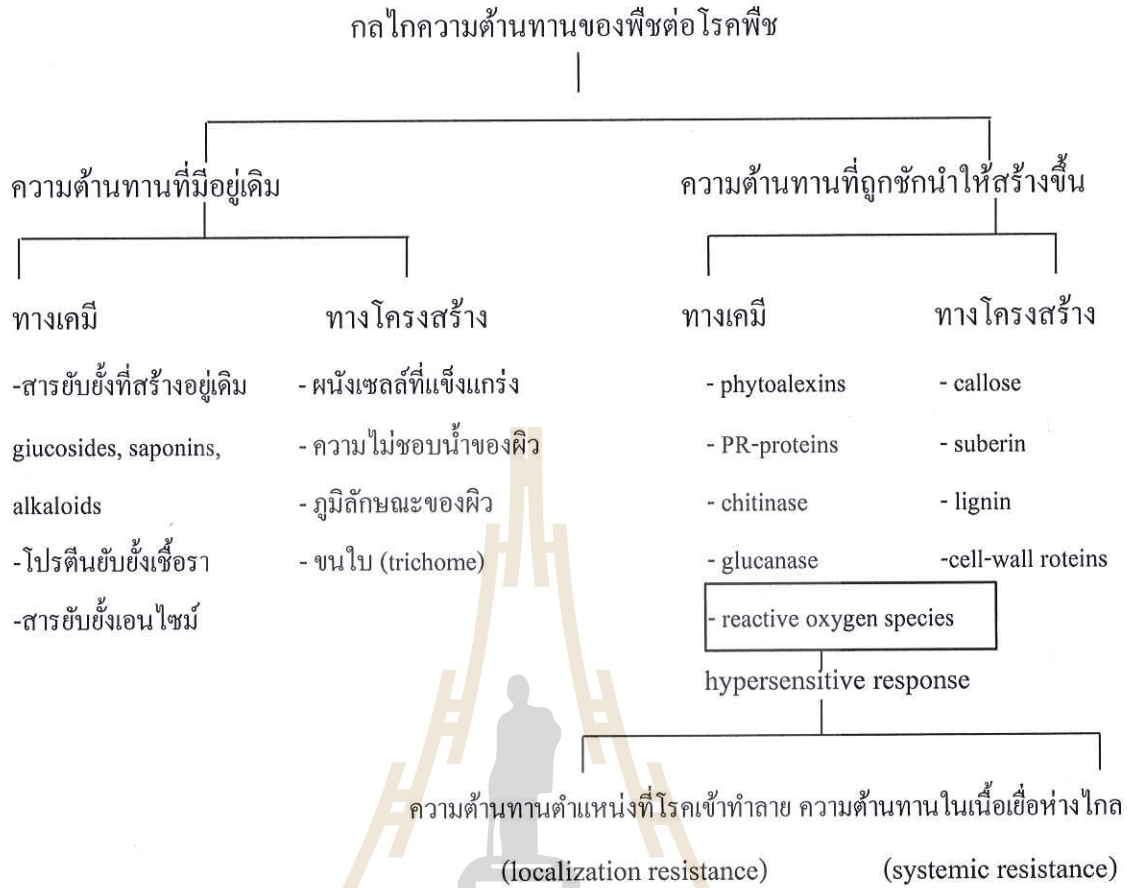
2.3.3 การควบคุมโรคโดยวิธีชักนำให้เกิดความต้านทาน (induced resistance)

การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค สามารถทำได้โดยได้รับการกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นในอัตราที่เหมาะสม โดยสิ่งกระตุ้นเหล่านี้เรียกว่า อิลิซิเตอร์ (elicitor) การใช้สิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต (biotic elicitors) ได้แก่ การปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่มีความรุนแรงน้อย หรือเชื้อต่างสายพันธุ์หรือเชื้อที่ไม่ใช่สาเหตุโรคของพืชชนิดนั้น, การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Trichoderma* นอกจากนี้ ยังอาจใช้สิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (abiotic elicitors) ได้แก่ สารสกัดจากจุลินทรีย์, สารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ กระตุ้นให้พืชต้านทานโรคพืชเพิ่มขึ้น กลไกที่พืชสามารถต้านทานโรคได้ อาจเนื่องมาจากการกระตุ้นการสร้างและสะสมสาร secondary metabolite ต่าง ๆ ซึ่งบางชนิดเป็นพิษต่อเชื้อโรค ขึ้นในตำแหน่งที่เชื้อเข้าทำลาย หรือการสร้างสารชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อและส่งผ่านไปตลอดลำต้นพืช ทำให้สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อได้อย่างทั่วถึง (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2532) ปัจจุบันพบการควบคุมโรคสแคบด้วยวิธีการชักนำความต้านทานไม่มากนัก เนื่องจากโรคสแคบขององุ่นพบการระบาดและทำความเสียหายในประเทศไทยมากกว่าต่างประเทศ โดยมีปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค

ในประเทศไทยมีการศึกษาการควบคุมโรคอุนด้วยวิธีการชักนำความต้านทาน โดยอิณชญา ประคองคำ (2555) รายงานว่า การใช้สารไคโตซานความเข้มข้น 5000 ppm ฉีดพ่นบนใบกิ่งชำอุนพันธุ์ black queens สามารถลดการเกิดโรคสแคบได้สูงสุด และไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000, 2,500 และ 5,000 ppm สามารถชักนำให้อุนเกิดความต้านทานต่อโรคสแคบได้ โดยส่งผลให้อุนมีปริมาณสาร SA และมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทาน เช่น เอนไซม์ PPO, chitinase, และ β -1,3-glucanase เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับรัชฎมน ผิวทอง (2557) ที่รายงานว่า ทำการฉีดพ่นไคโตซานที่ความเข้มข้น 1000 ppm ให้กับอุนพันธุ์มารูชีดเลส สามารถลดการเกิดโรคสแคบได้ 30% เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ) ในระดับโรงเรือนทดลอง และลดความรุนแรงของโรคสแคบได้ 27% ในระยะแตกใบอ่อนถึงติดผลอ่อน ในระดับแปลงทดลองฤดูฝน และ 46% ในระยะแตกใบอ่อนถึงติดผลอ่อน ในระดับแปลงทดลองฤดูหนาว และไคโตซานยังเพิ่มปริมาณสาร lignin ซึ่งเป็นหนึ่งในกลไกการปกป้องตนเองของพืช แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

2.4 กลไกความต้านทานของพืชต่อโรคพืช (plant resistance to diseases)

โดยทั่วไปพืชมีกลไกป้องกันเชื้อสาเหตุโรคพืช โดยปกป้องตนเองเพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ทำให้พืชได้รับความเสียหายจากโรคลดลง ดังนั้นพืชจึงเจริญเติบโตได้ดี ให้ผลผลิตสูง ซึ่งกลไกความต้านทานของพืชต่อโรคพืชนั้น สามารถแบ่ง 2 ประเภท คือ 1) กลไกความต้านทานที่มีอยู่เดิมตามลักษณะประจำพันธุ์ของพืช และ 2) กลไกความต้านทานที่พืชถูกชักนำให้สร้างขึ้นจากสิ่งกระตุ้นความต้านทาน (elicitor) ซึ่งกลไกความต้านทานทั้ง 2 ประเภทนี้จะแบ่งออกเป็นกลไกความต้านทานทางโครงสร้าง และกลไกความต้านทานทางเคมี ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2.2 แผนผังแสดงกลไกความต้านทานของพืชต่อโรคพืช

2.4.1 กลไกความต้านทานที่พืชมีอยู่เดิม (pre-formed resistance หรือ constitutive resistance)

กลไกความต้านทานที่มีอยู่เดิม หรือลักษณะประจำพันธุ์ของพืชซึ่งเป็นกลไกความต้านทานที่พืชมีอยู่เดิม ประกอบด้วยโครงสร้างของพืช เช่น ความหนาและความแข็งแรงของผนังเซลล์ ชั้นของแว็กซ์ (wax) และคิวติเคิล (cuticle) ที่ปกคลุมบริเวณลำต้นและผิวใบช่วยขัดขวางเชื้อราบางชนิดในการแทงเข้าสู่เซลล์พืช พืชที่มีจำนวนขนใบหนาแน่นช่วยขัดขวางการทำลายโดยแมลงซึ่งอาจเป็นพาหะนำโรคพืชมาสู่พืช ตำแหน่งและจำนวนของปากใบที่มีผลต่อการเข้าสู่พืชของเชื้อราและแบคทีเรีย พืชบางชนิดสังเคราะห์สารไฟโตแอนติซิปีน (phytoanticipin) ที่มีผลในทางยับยั้งการเจริญของเชื้อราหรือแบคทีเรียสาเหตุโรค ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้เป็นเสมือนเกราะป้องกันขั้นแรกของพืช (Buchanan et al., 2000) อย่างไรก็ตาม ความต้านทานลักษณะนี้ของพืชจะถูกควบคุมโดยยีนจำนวนหลายยีน นอกจากนี้พืชยังต้องใช้เวลาและพลังงานในการสร้างลักษณะหรือสารให้สมบูรณ์

เพื่อเตรียมตัวให้พร้อมก่อนที่เชื้อจะเข้าทำลาย พืชจึงจะสามารถป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ (นงลักษณ์ เกรินทวงศ์, 2556)

2.4.2 กลไกความต้านทานที่พืชถูกชักนำให้สร้างขึ้น (induced resistance)

กลไกความต้านทานที่พืชถูกชักนำให้สร้างขึ้น (induced resistance) จะเป็นลักษณะความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้สร้างแพร์กระจายทั้งต้น หากความต้านทานเกิดจากการชักนำด้วยสิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต (biotic elicitor) เช่น เชื้อรา *Trichoderma* spp., เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) เช่น เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens*, เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* จะเรียกลักษณะความต้านทานนี้ว่า ‘induced systemic resistance: ISR’ และหากลักษณะความต้านทานเกิดจากการชักนำด้วยสิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (abiotic elicitor) เช่น กรดซาลิไซลิก (salicylic acid: SA), กรดจัสโมนิก (jasmonic acid: JA), β -aminobutyric acid (BABA), thiamine (vitamin B1), acibenzolar-S-methyl (ASM), benzothiadiazole (BTH) และไคโตซาน (chitosan) จะเรียกลักษณะความต้านทานนี้ว่า systemic acquired resistance: SAR ในปี 1985 Dean and Kuc ได้ทดลองปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดที่ก่อให้เกิดอาการแผลจุด (necrosis) บนใบพืชในครั้งแรกทำการปลูกเชื้อสายพันธุ์อ่อนแอ ต่อมาเมื่อนำมาปลูกเชื้อสาเหตุโรคชนิดเดียวกันซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์รุนแรงที่ใบที่อยู่ตำแหน่งอื่นๆ พบว่าใบพืชที่ถูกปลูกเชื้อครั้งหลังไม่แสดงอาการของโรค (นงลักษณ์ เกรินทวงศ์, 2556) นอกจากนี้สารเคมีบางชนิดเช่น SA, BABA สามารถกระตุ้นระบบความต้านทาน แต่ไม่ทำให้เกิดผลตายบริเวณเนื้อเยื่อพืช การแสดงออกของ SAR จะไม่เฉพาะเจาะจงกับชนิดพืชและเชื้อสาเหตุโรคทำให้ลดการเกิดโรคได้หลายชนิด ทั้งโรคที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัส นอกจากนี้ SAR ยังแสดงออกได้เป็นระยะเวลานานประมาณ 4-6 สัปดาห์ แต่ SAR มีข้อจำกัดคือไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดได้หากพืชอยู่ในระยะหลังออกดอกและติดผล (อิณชญา ประคองคำ, 2555)

ลักษณะความต้านทานที่พืชถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองภายหลังเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย ความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นนี้มีกลไกที่คล้ายกับกลไกที่เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือ basal resistance ที่ทำงานโดยโมเลกุลของพืชที่ทำหน้าที่เป็นตัวตอบสนองการกระตุ้น (pattern recognition receptor; PRR) สามารถตรวจจับโมเลกุลจากเชื้อสาเหตุโรค (pathogen-associated molecular pattern; PAMP) เช่น โปรตีนแฟลกเจลลิน (flagellin) องค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (lipopolysaccharide) หรือองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา (chitin) ความต้านทานลักษณะนี้มีชื่อเรียกเฉพาะว่า PAMP - triggered immunity หรือ PTI (Thomma et al., 2011) โดยแบ่งเป็นกลไก 2 ประเภท ได้แก่

2.4.2.1 กลไกทางโครงสร้างของพืช (structural defense mechanism)

เนื่องจากเชื้อหลายชนิดปล่อยสารเคมีออกมาสู่พืช เช่น การผลิตสารพิษ และเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ได้แก่ cutinase, cellulase และ hemicellulase เป็นต้น เพื่อย่อยสลายส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช พืชจะจดจำสารเหล่านั้นและสร้างโครงสร้างพิเศษเพื่อป้องกันตัวขึ้น ทำให้พืชมีความทนทานต่อการทะลุผ่านมากขึ้น (Agrios, 1997) โดยการเสริมสร้างความแข็งแรงทางโครงสร้างอาจมีหลากหลายวิธีการ ได้แก่

2.4.2.1.1 การเสริมสร้างผนังเซลล์ให้แข็งแรงขึ้นด้วยการตัดแปลงองค์ประกอบเดิม เพิ่มองค์ประกอบของผนังเซลล์ชนิดใหม่เข้าไปยังผนังเซลล์เดิม เช่น การสะสมลิกนิน ซิลิกอน และฟีนอลิก รวมถึงการ cross-link ของ hydroxyproline-rich-glycoprotein (HRGP) กับ wall matrix อย่างรวดเร็ว เอนไซม์ peroxidase อาจเร่งปฏิกิริยา cross-link โปรตีนและฟีนอลิกเหล่านี้โดยใช้ H_2O_2 จากกระบวนการ oxidative burst การสะสมซิลิกอนร่วมกับองค์ประกอบผนังเซลล์อย่างน้อย 1 ชนิด ทำให้ทนทานต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของเชื้อรา เช่น *Pyricularia (Magnaporthe)* spp. จึงลดการเจาะเข้าทำลายของเส้นใยเชื้อราเข้าไปในเนื้อเยื่อใบ (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554)

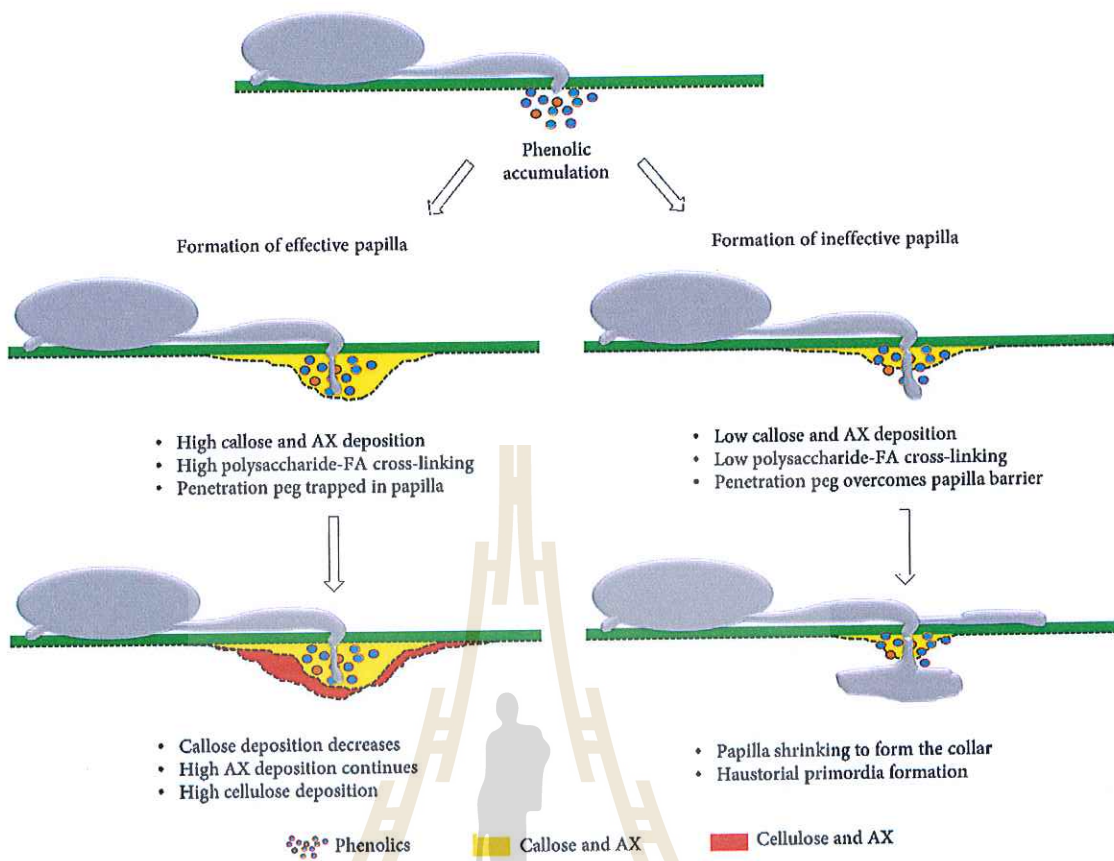
2.4.2.1.2 การสร้าง papilla ซึ่งประกอบด้วยแคลโลส เซลลูโลส และลิกนิน ป้องกันการเจาะทำลายของเชื้อราเข้าไปในเซลล์พืช (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554) ดังแสดงในภาพที่ 2.3

2.4.2.1.3 การสร้างไทโลส (tylose) ในเนื้อเยื่อลำเลียงของพืชเพื่ออุดตันท่อลำเลียง ใช้ในการป้องกันการแพร่ของเชื้อที่มักแพร่กระจายในท่อลำเลียงของพืช เกี่ยวข้องกับพืชต่อโรคเหี่ยว เช่น กล้วย, มะเขือเทศ, ฝ้าย ต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* sp. ไทโลสเกิดจากไซโทพลาซึมมีชีวิตของเซลล์ xylem parenchyma ที่ขยายตัวเข้าไปยังท่อลำเลียงของ xylem ผ่านรู และมีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554)

2.4.2.1.4 การสะสมแคลโลสภายในช่องว่างระหว่างเซลล์พืช หรือ plasmodesmata ป้องกันการเคลื่อนย้ายของไวรัสจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554)

2.4.2.1.5 การสะสมยางเหนียว (gum) หลายชนิดอย่างรวดเร็วใน plasmodesmata และภายในเซลล์รอบแผลพืช เป็นการกักบริเวณโรคพืช และทำให้เชื้อโรคพืชตายในที่สุด (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554)

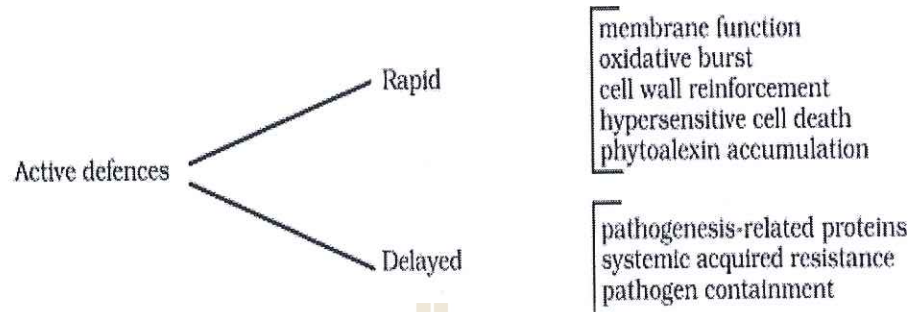
2.4.2.1.6 การสร้างสิ่งกีดขวาง (barrier zone) ที่ประกอบด้วยเซลล์ xylem และ phloem ซึ่งเป็นเซลล์ไฟเบอร์ที่ผนังเซลล์ประกอบไปด้วยลิกนิน ซูเบอร์ริน และ vessel element ที่อุดตันด้วยไทโลส กีดขวางล้อมรอบท่อลำเลียงที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554)



ภาพที่ 2.3 แสดงการสะสม papilla ที่ประกอบไปด้วยแคลโลสและเซลลูโลสในผนังเซลล์ด้านในของพืช (epidermis) ใต้ตำแหน่งที่ถูกเส้นใยเชื้อราเจาะเข้าทำลาย เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อรา
ที่มา : Chowdhury et al., 2014

2.4.2.1.7 การสร้าง abscission layer เมื่อโรคพืชเข้าทำลาย จะมีการสลายตัวของ middle lamella ตลอดความหนาของใบ ทำให้ใบร่วงหล่น เป็นการกำจัดเนื้อเยื่อที่เป็นโรคและป้องกันการแพร่ของโรคพืชไปยังเนื้อเยื่อส่วนอื่น

2.4.2.2 กลไกทางชีวเคมี (biochemical defense mechanism)



ภาพที่ 2.4 กลไกทางชีวเคมีที่พืชถูกชักนำให้สร้างขึ้น แบ่งออกเป็นกลไกที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (rapid defense) และกลไกที่เกิดขึ้นภายหลัง (delayed defense)

ที่มา: Guest and Brown, 1997

กลไกทางชีวเคมีมีส่วนเกี่ยวข้องทำให้พืชมีความต้านทานโรค ซึ่งกลไกทางชีวเคมีจะแบ่งเป็น 2 ระยะ ตามช่วงเวลาการตอบสนองของพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืช ได้แก่

2.4.2.2.1 กลไกการปกป้องตนเองของพืชระยะแรก (early plant defense mechanism)

พืชพันธุ์ต้านทานหรือพืชพันธุ์อ่อนแอที่ถูกชักนำด้วยอิทธิพลเพื่อให้เกิดความต้านทาน เมื่อพืชเหล่านี้ถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย จะมีลักษณะตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชอย่างรวดเร็ว กลไกการปกป้องตนเองของพืชระยะแรกจะเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยมีการสร้างเอนไซม์ โปรตีน และสารชีวเคมีต่างๆ ภายในเซลล์พืช ดังนี้ (อินชญา ประคองคำ, 2555)

2.4.2.2.1.1 การสร้างสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species: ROS)

การสร้าง ROS มักเป็นการตอบสนองแรก ซึ่งเกิดภายในเวลาน้อยกว่า 5 นาที เรียกว่าเกิด oxidative burst โดย ROS ที่พบส่วนมากคือ O_2^- และ H_2O_2 ซึ่ง H_2O_2 อาจเป็นพิษโดยตรงต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากเป็นสารพลังงานสูง โดยเฉพาะเมื่อเปลี่ยนรูปมาเป็น hydroxyl radicals (OH) นอกจากนี้ H_2O_2 ยังมีส่วนทำให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรงโดยทำให้เกิด cross-link ระหว่าง hydroxyl proline และ proline-rich glycoprotein กับ polysaccharide matrix หรือเพิ่มอัตราการสร้างโพลีเมอร์ลิกนิน (lignin) จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase และ H_2O_2 ยังเป็น

สัญญาณกระตุ้นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์สาร SA ซึ่งจะเป็นสาระสำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์พืช (ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์, 2554)

2.4.2.2.1.2 การสร้างสารไนตริกออกไซด์ (nitric oxide: NO)

NO มีความสามารถในการก่อให้เกิดการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย ROS โดยพบว่า NO จับตัวกับ heme และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ catalase และ ascorbate peroxidase ซึ่งสลาย H_2O_2 นอกจากนี้ยังเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานและการป้องกันตัวเองของพืช (ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์, 2554)

2.4.2.2.1.3 การเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน (Hypersensitive response: HR)

เกิดการตายของเซลล์ในตำแหน่งที่โรคพืชเข้าทำลายอย่างรวดเร็ว ทำให้โรคพืชชนิด biotrophic ขาดอาหาร ส่วนโรคพืชชนิดอื่นนั้น การสูญเสียห้องกั้นภายในเซลล์จะปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างไว้ก่อน ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชตาย ในระหว่างเกิด HR เซลล์พืชที่ถูกโรคพืชเข้าทำลายเริ่มตายลง เนื่องจากเซลล์ได้รับสารพิษและอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่สร้างขึ้น เซลล์พืชจึงตายเนื่องจากอาการ necrosis (ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์, 2554)

2.4.2.2.1.4 การสร้างเอนไซม์ปกป้องตนเองของพืช (plant defense enzyme)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการปกป้องตนเองของพืช เช่น phenylalanine ammonialyase (PAL) เป็นเอนไซม์สำคัญซึ่งเชื่อมโยงระหว่าง primary และ secondary metabolisms ใน phenylpropanoid pathway ที่นำไปสู่การสร้างลิกนินและ phytoalexin หลายชนิด (ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์, 2554) โดยจะเร่งการเกิดปฏิกิริยา (catalyzes) ในการสลาย phenylalanine ไปเป็น trans-cinnamic acid และแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารสำคัญในการสังเคราะห์ phenolic compound ทั้งนี้กิจกรรมของ PAL จะถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ethylene และโมเลกุลส่งสัญญาณ ได้แก่ salicylic acid และ jasmonic acid (Prasannath, 2017)

Peroxidase (POX) เป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินและซูเปอร์ออกไซด์ และเกี่ยวข้องกับ hypersensitive responses โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidation ที่เปลี่ยน hydroxyl cinnamyl alcohol เป็นสาร free radical, polysaccharide cross linking และสะสมสารฟีนอลิกในผนังเซลล์พืชระหว่างการเกิดกลไกการปกป้องตนเอง (Thakker et al., 2013) เมื่อกิจกรรมเอนไซม์ POX เพิ่มขึ้น ROS จะถูกสังเคราะห์ขึ้นอย่างรวดเร็วและนำไปสู่กระบวนการ HR ที่เป็นพิษต่อเชื้อโรคพืช (Halfeld-Vieira et al., 2006)

Polyphenol oxidases (PPOs) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ประกอบด้วย copper (copper metalloprotein) ในสภาพปกติ PPOs ถูกเก็บอยู่ใน thylakoid ของคลอโรพลาสต์ เมื่อพืชถูก

โรคหรือแมลงเข้าทำลาย หรือเกิดการชราภาพ (senescence) จะทำให้เซลล์แตกออกและทำให้ออกซิเจน และ hydroxy phenols เกิดปฏิกิริยา oxidation ไปเป็นสารประกอบควิโนน (อินชญา ประคองคำ, 2555) ซึ่งสารกลุ่มควิโนนมีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเชื้อโรค (Chunhua et al., 2001) PPOs มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้พืชต้านทานต่อเชื้อก่อโรค โดยพบว่าพืชที่มีกิจกรรมของ PPOs สูง จะสามารถปกป้องตนเองและต้านทานต่อเชื้อโรคได้ดี

2.4.2.2.2 กลไกการปกป้องตนเองของพืชระยะที่สอง (secondary plant defense mechanism)

ตัวอย่างสารชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการปกป้องตนเองของพืชระยะที่สองของกระบวนการต้านทานที่พบในพืช อาทิ เช่น โมเลกุลสัญญาณสัญญาณของกรดซาลิไซลิก (salicylic acid: SA) SA เป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง ที่พบว่าทำหน้าที่เป็นสารนำสัญญาณ (signal molecule) ในกระบวนการชักนำความต้านทานของพืช ภายหลังจากที่ SA ถูกสังเคราะห์ขึ้นในคลอโรพลาสต์ จะมีการเติมกลูโคสเข้าไปที่โมเลกุลของ SA (SA glucoside หรือ SAG) และส่งไปเก็บไว้ที่แวคิวโอล เมื่อพืชถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายหรือถูกกระตุ้น โมเลกุล SAG จะเกิดการไฮโดรไลซ์เพื่อให้ได้โมเลกุล SA อิสระอีกครั้ง การทดลองทำให้อื่นต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ SA เกิดการกลายพันธุ์มีผลทำให้พืชไม่สังเคราะห์โปรตีน PR-1 ที่เป็น โปรตีนเครื่องหมายของกระบวนการ SAR รวมทั้งสูญเสียความต้านทานโรค (นงลักษณ์ เกรินทวงศ์, 2556) การส่งสัญญาณของกรดซาลิไซลิก (SA signaling) ถือเป็นหนึ่งในการะบวนการสำคัญในกลไกการเกิดการปกป้องตนเองของพืช ซึ่งมีกลไกและวิธีการส่งสัญญาณที่ซับซ้อน ในขั้นแรกจะต้องอาศัยการตอบสนองและจดจำสัญญาณโมเลกุลระหว่างพืชและเชื้อสาเหตุโรค หรือระหว่างพืชและอิทธิพลโปรตีนรับสัญญาณ (receptor protein: RP) ตรวจจับสัญญาณจากโรคพืชและปัจจัยอื่น (elicitors) การส่งสัญญาณหลังการตรวจจับของตัวรับสัญญาณเกี่ยวข้องกับ kinase, phosphate, G protein และการไหลเข้าออกของไอออน (ion flux) ผลที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วได้แก่ การสร้าง reactive oxygen species (ROS) เช่น H_2O_2 , O_2^- และ nitric oxide (NO) การกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทาน และอาจรวมถึงยีนที่ก่อให้เกิดอาการตายของเซลล์ (apoptosis gene) ที่ส่งผลให้เกิดการตายเฉียบพลันของเซลล์ (program cell death) นอกจากนี้ ยังมีการขยายเพิ่มระดับความต้านทานโดยการสร้างโมเลกุลสัญญาณเพิ่มเติม ได้แก่ ROS, lipid peroxidase, benzoic acid (BA), salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) และเอทิลีน (ethylene: C_2H_4) ซึ่งสัญญาณเหล่านี้จะกระตุ้นยีนต้านทานอื่นๆ และคัดแปลงเอนไซม์/โปรตีนต้านทาน ในขณะเดียวกัน การปรับเปลี่ยน redox status หรือความเสียหายที่เกิดกับเซลล์จะกระตุ้นกลไกการปกป้องตนเองของเซลล์ที่มีอยู่แล้ว เช่น superoxide dismutase (SOD) และ catalase และกระตุ้นการแสดงออกของยีนสำหรับสังเคราะห์สารปกป้องเซลล์ รวมถึงการ cross-talk

กันของวิถีการส่งสัญญาณ (pathway) (ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์, 2554; อิณชญา ประคองคำ, 2555) เช่น การสะสม lignin บริเวณผนังเซลล์ (lignification) ดังแสดงในภาพที่ 2.5

สาร phytoalexin เป็นสาร lipophilic น้ำหนัก โมเลกุลต่ำที่มีฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์ ซึ่งมักสะสมอย่างรวดเร็วในตำแหน่งที่โรคพืชชนิด incompatible เข้าทำลาย พบในพืช หลายชนิด เช่น camalexin ใน *Arabidopsis*, pisatin ในถั่ว และ resveratrol ในองุ่น ความเป็นพิษอาจ เป็นผลจากการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ หรือเกิดจากขบวนการทางสรีรวิทยาและชีวเคมีอื่น พืชต้านทาน มักสะสม phytoalexin ในระดับสูงกว่าและรวดเร็วกว่าพันธุ์อ่อนแอ (ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์, 2554)

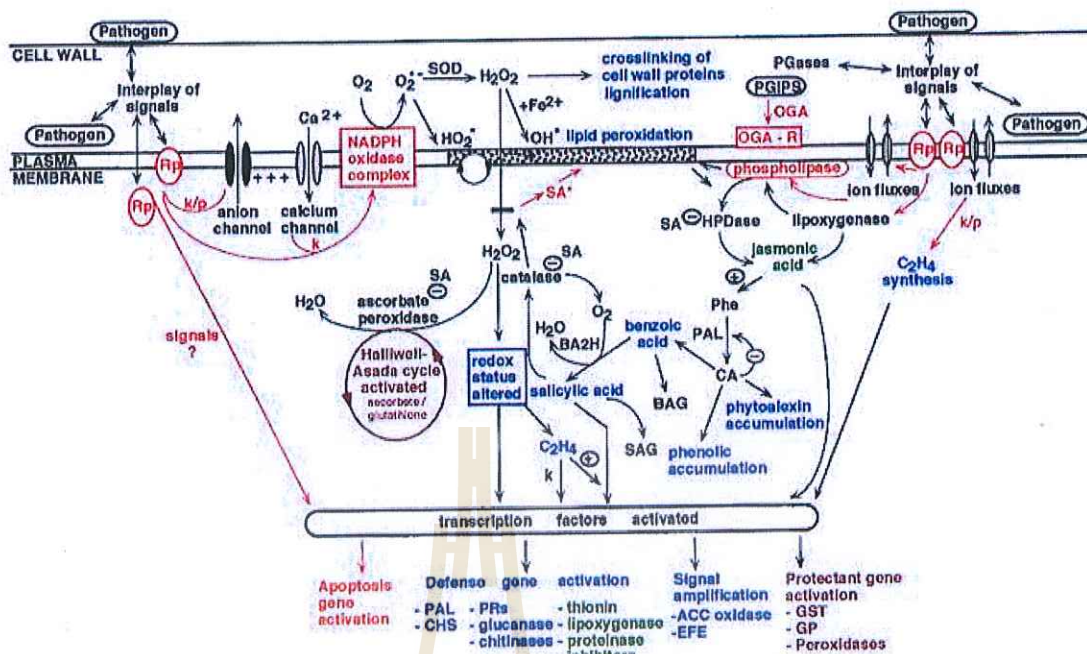
สาร lignin จัดเป็น precursor ของกระบวนการ SAR โดยเริ่มจาก phenyl ammonia lyase (PAL) และเป็น precursor ของกระบวนการสร้าง lignin, phenolics, isoflavonoid, phytoalexins, coumarins และ salicylic ที่มีความเป็นพิษเพื่อกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน รวมทั้ง ทำให้ผนังเซลล์พืชมีความหนาและแข็ง ยากแก่การผ่านเข้าสู่พืช (แทงผ่านและย่อยสลาย) ของเชื้อ สาเหตุโรค เช่น แดงกวางที่เกิดปฏิกิริยา HR จะเกิดการสะสม lignin ที่ผนังเซลล์ทั่วทั้งต้น ทำให้ผนัง เซลล์หนาขึ้นและยากต่อการผ่านเข้าสู่พืชของเชื้อ โรค และพืชต้านทาน โรค (อิณชญา ประคองคำ, 2555)

โปรตีนต้านทานเชื้อสาเหตุโรคพืช (pathogenesis-related protein: PR protein) มีคุณสมบัติในการต้านทานโรคหรือเชื้อสาเหตุโรคอย่างไม่จำเพาะ ได้มีการศึกษาโปรตีนพี อาร์อย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิดโดยมีเป้าหมายในการพัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีการสังเคราะห์ โปรตีนพีอาร์เพื่อสร้างลักษณะความต้านทานแบบกว้าง (broad spectrum disease resistance) ให้กับ พืช โดยปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกโปรตีนพีอาร์โดยอาศัยคุณสมบัติของโปรตีนไว้ทั้งหมด 17 กลุ่ม (Sels et al., 2008) ในจำนวนนี้มีบางกลุ่มพบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของ แบคทีเรีย (b-1,3-glucanase; PR-2) หรือผนังเซลล์เชื้อรา (chitinase; PR-3) ได้โดยตรง (นงลักษณ์ เกรินทวงศ์, 2556) เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน ให้เป็นโมโนเมอร์ ของไคติน คือ N-acetylglucosamine (GlcNAc) ส่วนใหญ่พบในเปลือกแมลง และในเปลือกแข็งที่ หุ้มตัวของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในพวก Arthropod และ Mollusca พืชชั้นสูง และจุลินทรีย์ เอนไซม์ chitinase ที่มีอยู่ในพืช จะทำหน้าที่ป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค พืช (อิณชญา ประคองคำ, 2555) โดยจะย่อยสลายผนังเซลล์ซึ่งมี chitin เป็นองค์ประกอบของเชื้อรา สาเหตุโรคพืช (Hammerschmidt and Kuć., 1982) ในกลไกการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน เอนไซม์ chitinase สามารถทำงานได้นานถึง 7 สัปดาห์ หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคในแตงกวา (Dalisay and Kuć., 1995) เอนไซม์เบต้ากลูคาเนส (β -1,3-glucanase) ทำหน้าที่ย่อยสลาย β -1,3-glucan พบได้ทั่วไปในพืชและจุลินทรีย์ต่าง ๆ ในพืช เอนไซม์นี้มีบทบาทในการลำเลียงอาหารและ กระบวนการป้องกันตัวต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา โดยจะย่อยสลายผนังเซลล์ซึ่งเป็นองค์ประกอบ

ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้ ยังพบในเชื้อราซึ่งมีบทบาทเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรืออวัยวะ ในการเจริญเติบโต และพัฒนาการของเชื้อรา อีกทั้งยังช่วยในการดูดซึมสารอาหารในการดำรงชีพ แบบ saprophyte และแบบปรสิตของเชื้อราอีกด้วย (Hammerschmidt and Kuć., 1982; อดิษญา ประคองคำ, 2553) ในกลไกการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน เอนไซม์ β -1,3-glucanase สามารถทำงานได้นานถึง 7 สัปดาห์ หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคในแตงกวา (Dalisy and Kuć., 1995)

ตารางที่ 2.1 Recognized families of pathogenesis-related proteins (นงลักษณ์ เกรินทวงศ์, 2556)

Family	Type member	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown
PR-2	Tobacco PR-2	β -1, 3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P69	Endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin
PR-14	Barley LTP4	Lipid - transfer protein
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown



ภาพที่ 2.5 แสดงภาพรวมของวิธีการส่งสัญญาณที่กระตุ้นและประสานความต้านทานในพืช
 ที่มา : Buchanan et al., 2000; Walters, 2011

2.5 สิ่งกระตุ้นที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน (elicitors)

การชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค สามารถทำได้โดยได้รับสิ่งกระตุ้น (elicitors) ที่เหมาะสม เช่น การใช้สิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต (biotic elicitors) ได้แก่ การปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่มีความรุนแรงน้อย หรือเชื้อต่างสายพันธุ์หรือเชื้อที่ไม่ใช่สาเหตุโรคของพืชชนิดนั้น การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Trichoderma* นอกจากนี้ยังอาจใช้สิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (abiotic elicitors) ได้แก่ สารเคมีบางประเภทที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อ สารสกัดจากจุลินทรีย์ สารอินทรีย์ รวมถึงสารอนินทรีย์บางชนิดกระตุ้นให้พืชต้านทานโรคพืช โดยตัวอย่างของสิ่งกระตุ้น (elicitor) แสดงในตารางที่ 2.2 ซึ่งกลไกที่เกิดขึ้นทำให้พืชมีความสามารถในการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ (อิณชญา ประคองคำ, 2555; รัชมน ผิวทอง, 2557)

ตารางที่ 2.2 สิ่งกระตุ้นที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน

ประเภทสิ่งกระตุ้น	ชนิดสิ่งกระตุ้น	พืช	ผลของสิ่งกระตุ้น	อ้างอิง
มีชีวิต (biotic)	<i>Bacillus subtilis</i>	องุ่น	กระตุ้นความต้านทานจากเชื้อ <i>Botrytis cinerea</i>	Rodgers, 1989
			กระตุ้นความต้านทานจากเชื้อ <i>Eutypa lata</i>	Ferreira et al., 1991
			กระตุ้นความต้านทานจากเชื้อ <i>Fusarium oxysporum</i> และ <i>Botryodiplodia theobromae</i>	Swain et al., 2008
		ผักกาด	กระตุ้นความต้านทานจากเชื้อ <i>Pythium</i> <i>aphanidermatum</i>	Correa et al., 2010
		แตงกวา	กระตุ้นความต้านทานจากเชื้อ <i>Rhizoctonia solani</i>	Kita et al., 2005
	<i>Trichoderma harzianum</i> T39	องุ่น	กระตุ้นความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง	Perazzolli et al., 2012
	<i>Trichoderma xylanases</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	กระตุ้นความต้านทานจากเชื้อ <i>Pseudomonas syringae</i>	Ron and Avni, 2004
	<i>Trichoderma peptaibol</i>	ฝ้าย	กระตุ้นความต้านทานจากเชื้อ <i>Botrytis cinerea</i>	Yang et al., 2009
ไม่มีชีวิต (abiotic)	Salicylic acid (SA)	มะเขือเทศ	เสริมสร้างความแข็งแรงให้กับพันธุ์อ่อนต่อเชื้อก่อโรคและ abiotic stress	Shirasu et al., 1997
		กล้วย	ชะลอการสุกแก่ของผลกล้วย	Srivastava and Dwivedi, 2000

ตารางที่ 2.2 สิ่งกระตุ้นที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน (ต่อ)

ประเภทสิ่งกระตุ้น	ชนิดสิ่งกระตุ้น	พืช	ผลของสิ่งกระตุ้น	อ้างอิง
	Salicylic acid (SA)	มะเขือเทศ	เพิ่มการ transcription ของยีน PR1 และ BLG2 (ยีนเครื่องหมายในกระบวนการสังเคราะห์ SA), เพิ่มปริมาณ H ₂ O ₂ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านทานต่อเชื้อ <i>Helicoverpa armigera</i>	Peng et al., 2004
		กระเจียวเขียว	สังเคราะห์ phenolic compound และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL	Vimala and Suriachandraselvan, 2009
		พืชตระกูลกะหล่ำ	ส่งเสริมการสร้าง membrane เพื่อปกป้องตนเอง และเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase	Kaur et al., 2009
		ผักกาดเขียวปลี	ลดการเกิดโรคเน่าและได้ 52.9%	Chanon Saengchan, 2014
		ข้าว	เพิ่มการสังเคราะห์ superoxide anion และยีน <i>pal</i> ทำให้ข้าวต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง	Toan Le Thanh, 2015
	SA and 4-aminobutyryc cid	ถั่วสนเตา	เพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ phenol metabolizing POD, PPO, PAL ที่ช่วยในกระบวนการต้านทานต่อเชื้อ <i>Erysiphe polygony</i> ในถั่ว	Katoch, 2005
		Benzothiadiazole	ช่วยในกระบวนการปกป้องตนเองให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคราแป้ง	Gorlach et al., 1996

ตารางที่ 2.2 สิ่งกระตุ้นที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน (ต่อ)

ประเภทสิ่งกระตุ้น	ชนิดสิ่งกระตุ้น	พืช	ผลของสิ่งกระตุ้น	อ้างอิง
	Benzothiadiazole	บีทรูท	กระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ chitinase และ β -1,3 glucanase เพื่อปกป้องตนเองจากการเข้าทำลายของ	Burketova et al., 1999
		กะหล่ำดอก	โรค tobacco necrosis virus	
		ทานตะวัน	กระตุ้นความต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคน้ำค้างในต้นกล้ากะหล่ำดอกอายุ 30 วัน	Godard et al., 1999
		มันฝรั่ง	กระตุ้นกระบวนการปกป้องตนเองต่อไวรัสช่วยในการสังเคราะห์ phytoalexin, PR-protein chitinase, H ₂ O ₂ ซึ่งพืชปลดปล่อยสารเหล่านี้ทางราก	Sauerborn et al., 2002
		มันฝรั่ง	กระตุ้นการสร้างสาร phenolic compound และ marker protein	Guleria and Kumar, 2006
	Benzothiadiazole and SA	มันฝรั่ง	กระตุ้นการสร้าง defense enzyme peroxidase	Sharma and Sohal, 2010
	β -amino butaric acid	ส้ม	ยับยั้งการออกและเจริญของสปอร์ <i>Penicillium italicum</i>	Tavallali et al., 2008
	Chitosan	มะเขือเทศ	กระตุ้นความต้านทานต่อโรค Fusarium crown และ Root rot ในต้นกล้า (seed priming)	Benhamou et al., 1994

ตารางที่ 2.2 สิ่งกระตุ้นที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน (ต่อ)

ประเภทสิ่งกระตุ้น	พืช	ผลของสิ่งกระตุ้น	อ้างอิง
	ข้าวโอ๊ต, ข้าว, แบริซ, ถั่วลิสง	กระตุ้นให้เกิด กระบวนการ hypersensitive reaction, Lignification	Maksimov et al., 2003
	มะเขือเทศ	กระตุ้นความต้านทานในระดับสูงให้ต้านทานต่อเชื้อ <i>Fusarium oxysporum</i> และ <i>Phytophthora capsici</i>	Ortega-Ortiz et al., 2003
	มันฝรั่ง	กระตุ้นความต้านทานต่อเชื้อ <i>Fusarium sulphureum</i>	SUN et al., 2008
	ข้าวฟ่าง	หลังการเก็บเกี่ยว กระตุ้นความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง เพิ่มการ สังเคราะห์ NO (seed priming)	Manjuntha et al., 2009
	ข้าว องุ่น	เพิ่มการสังเคราะห์ H ₂ O ₂ ลดการเกิดโรคสเตรป, เพิ่มการสังเคราะห์ SA, เพิ่มการ สังเคราะห์เอนไซม์ chitinase, β -1,3 glucanase, PPO	Pongorayoon et al., 2013 Prakongkha et al., 2013
	องุ่น	ลดการเกิดโรคสเตรป, เพิ่มการสะสม lignin	Tunyamon Phiwthong, 2014

คัดแปลงจาก Thakur and Sohal, 2013 และ Wiesel et al., 2014

2.5.1 สิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต (biotic elicitors)

การใช้สิ่งกระตุ้นที่มีชีวิต (biotic elicitors) ได้แก่การปลูกเชื้อสาเหตุโรคที่มีความรุนแรงน้อย หรือเชื้อต่างสายพันธุ์หรือเชื้อที่ไม่ใช่สาเหตุโรคของพืชชนิดนั้น การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิบัติในสกุล *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Trichoderma* ซึ่งกลไกที่เกิดขึ้นทำให้พืชมีความสามารถในการต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ พืชมีการสะสมไฟโตอะเล็กซิน การสังเคราะห์ PRs และการตายของเซลล์ (necrosis) เป็นต้น สิ่งกระตุ้นนี้จะกระตุ้นวิถีต่าง ๆ ของระบบป้องกันตนเองในพืชให้มีการส่งสัญญาณต่อไปทำให้พืชมีความต้านทานเพิ่มขึ้น (ดาราวัต วิงษ์ชาติ, 2558) มีรายงานการชักนำให้เกิดความต้านทานขององุ่น โดยใช้ตัวกระตุ้นให้เกิดการชักนำ ทั้งการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์ ในการชักนำ เช่น มีการใช้ *Pseudomonas* sp. กระตุ้นความต้านทานในองุ่นต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *Botrytis cinerea* (Verhagen et al., 2010) และในปีต่อมา มีรายงานการใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการชักนำให้เกิด oxidative burst และกระตุ้นการสร้างสาร phytoalexin สามารถต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อ *B. cinerea* ได้เช่นกัน (Verhagen et al., 2011)

2.5.2 สิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (abiotic elicitor)

การใช้สิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิต (abiotic elicitor) โดยการใช้สารเคมีที่ปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต (fine agrochemical) หรือสารที่หุติขุมจากเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงสารเคมีที่ได้จากการย่อยสลายหรือสกัดจากธรรมชาติ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับนิยมนิยม เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถหาได้ง่าย ทั่วไป เช่น การใช้ Thiamine ในการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. viticola* ซึ่งวิธีการนี้จะไปชักนำให้เกิด HR หลังจากมีการเข้าทำลายของเชื้อ *P. viticola* (Boubakri et al., 2012) การใช้ β -aminobutyric acid กระตุ้นการแสดงออกของ *LOX-9* gene และ PR-4 protein ให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อ *P. viticola* ในองุ่น (Hamiduzzaman et. al, 2005) และพบว่าการใช้ไคติน Oligomers ร่วมกับ Copper Sulfate สามารถชักนำให้องุ่นเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *B. cinerea* และ *P. viticola* ได้ (Aziz et. al, 2006) นอกจากนี้ ยังมีสิ่งกระตุ้นที่ไม่มีชีวิตที่นิยมใช้ในการชักนำความต้านทานพืช ดังนี้

2.5.2.1 กรดซาลิไซลิก (salicylic acid: SA)

เป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญในการตอบสนองทางสรีรวิทยา (สัมฤทธิ์ เพื่อจันท์, 2544) สังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) โดย phenylalanine จะเปลี่ยนเป็น trans-cinamic acid จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น benzoic acid และเป็น SA ในที่สุด (Davies, 1995) SA เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในธรรมชาติมีฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นนักวิจัยหลายคนจึงได้จัดไว้ในกลุ่มสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (Raskin, 1992) และทำหน้าที่เป็นสัญญาณกระตุ้นการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (จริงแท้ สิริพานิช, 2549) กระตุ้นการเชื่อมต่อนของโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์

ซึ่งจะทำให้ผนังเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น (Bradley et al., 1992) ทั้งนี้ยังมีผลในการควบคุมการปิด - เปิดของปากใบ การงอกของเมล็ด การดูดซับประจุการแสดงออกของเพศ และการต้านทานการเข้าทำลายของโรค และยับยั้งการสังเคราะห์และการทำงานของเอธิลีน ทำให้ถูกนำมาใช้เพื่อชะลอการสุกของผลไม้ (ศิริชัย กัทยาธรรัตน์, 2548)

มีรายงานพบว่า เริ่มมีการใช้สาร SA ในการกระตุ้นความต้านทานพืชในปี 1996 โดย Renault และคณะ ได้ศึกษาการกระตุ้นความต้านทานในองุ่นด้วย SA และเชื้อรา *B. cinerea* พบว่าองุ่นมีการสังเคราะห์ PR-protein กลุ่ม tobacco PR-2 ซึ่งมีคุณสมบัติทำหน้าที่เป็น β -1, 3-glucanase เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Shirasu และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาการกระตุ้นความต้านทานโดยใช้สาร SA กระตุ้นมะเขือเทศ พบว่า SA ช่วยลดการเกิดโรคในมะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอ และ SA ช่วยกระตุ้นการสร้าง PR-protein ที่ช่วยในการต้านทานโรค รวมถึง Peng และคณะ (2004) ที่พบว่า SA มีผลต่อการเพิ่มการ transcription ของยีน *pr1* และ *bgl2* ซึ่งเป็นยีน marker ใน SA pathway และยังเพิ่มปริมาณ H_2O_2 ที่มีผลกับความต้านทานต่อเชื้อ *Helicoverpa armigera* นอกจากนี้ Katoch (2005) รายงานว่า SA ช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ POD, PPO, และ PAL ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อเชื้อ *Erysiphe polygoni* ในถั่ว ในปี 2009 Vimala และ Surichandraselvan รายงานว่า SA ช่วยเพิ่มการสังเคราะห์สาร phenolic compound และเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ PAL ในกระเจี๊ยบเขียว (Bhendi) ให้ต้านทานต่อเชื้อ *Erysiphe cichoracearum* รวมถึง Kaur และคณะ ที่รายงานว่า SA ส่งเสริม membrane protection และเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ในพืชตระกูลกะหล่ำ Mandal (2010) พบว่า SA ช่วยส่งเสริมความต้านทานของมะเขือยาวให้ต้านทานต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ชานนทร์ แสงจันทร์ (2557) รายงานว่า การคลุกเมล็ดผักกาดเขียวปลีด้วย *Bacillus subtilis* CaSUT007 ร่วมกับการฉีดพ่น SA ความเข้มข้น 200 ppm สามารถลดการเกิดโรคน้ำและในผักกาดเขียวปลีได้ 52.9% และลดความรุนแรงของโรคได้ 87.5% นอกจากนี้ Le Thann และคณะ (2015) พบว่า SA สามารถลดการเกิดโรคใบไหม้ข้าวจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ได้ 55.35% และมีการแสดงออกของยีนต้านทานสูงขึ้นและรวดเร็วกว่ากรรมวิธีควบคุม

2.5.2.2 กรดเบนโซอิก (benzoic acid: BA)

เป็นสารเคมีที่นิยมใช้เป็นวัตถุกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย เป็นสารที่พบได้ในธรรมชาติ ได้แก่ ลูกพรุน, ออบเชย, แอปเปิล, กานพลู และมะกอกสุก เป็นต้น มักใช้ร่วมกับกรดซอร์บิก และพาราเบนส์สำหรับเป็นวัตถุกันเสีย (จิราพรณี หุมมาลี, 2550; ขวัญตา หทัยทัศน์, 2547) สำหรับในพืช BA นั้นเป็นสารตั้งต้น (precursor) ในการสังเคราะห์ SA โดยเริ่มจากกระบวนการ decarboxylation ของ cinnamic acid ในรูป trans-cinnamic acid ได้เป็น BA และผ่านการ hydroxylation ได้เป็น SA โดยอาศัยการ catalyze ของเอนไซม์ benzoic acid 2-hydroxylase (BA-2H) (LeÓN, 1993) ซึ่ง SA นั้นเป็นสารที่สำคัญในกระบวนการกระตุ้นความต้านทานของพืชต่อ

โรคพืช ในปี 2001 มีรายงานการตรวจสอบปริมาณ BA ในการกระตุ้นความต้านทานของยาสูบ เนื่องจากเป็น precursor ในการสังเคราะห์ SA ซึ่งจะนำไปสู่กระบวนการต้านทานของพืช โดย Chong และคณะได้ตรวจสอบปริมาณ BA จากการใช้สารแวนอลอยเซลล์ β -megaspermin ที่สกัดได้จากเชื้อ *Phytophthora megasperma* และพบว่า มีระดับของ BA สูงขึ้นภายหลังจากการกระตุ้น และอัตราการสังเคราะห์ SA ก็สูงขึ้นเช่นเดียวกัน และในปี 2003 ได้มีการใช้ BA ในการกระตุ้นความต้านทานพืชครั้งแรก โดย Williams และคณะ ได้ศึกษาการให้ BA แก่ *Banksia attenuata* โดยการราดทางดิน และปลูกเชื้อ *Phytophthora cinnamomi* ภายหลังจากการให้ BA 7 วัน พบว่า BA ที่ความเข้มข้น 0.05 mM สามารถลดขนาดแผลที่เกิดจาก *P. cinnamomi* ได้ดีที่สุด

2.5.2.3 ไคโตซาน (chitosan)

เป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต และเป็นอนุพันธ์ของไคติน ที่ตัดหมู่อะซิทิลของน้ำตาล N-acetyl-D-glucosamine ออก สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อพืช มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2551) พบเป็นองค์ประกอบของเปลือกแข็งที่หุ้มเซลล์ของรา ยีสต์ และจุลินทรีย์หลายชนิด เนื่องจากไคตินมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ไนโตรเจน จะถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลอย่างช้า ๆ ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช และกระตุ้นการนำแร่ธาตุไปใช้ (ประภัสสร สุรวฒนาวรรณ, 2554; ธัญมน ศิวทอง, 2557) ไคโตซานมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรค สร้างความต้านทานต่อโรค และสามารถออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ในกระบวนการกระตุ้น SAR ช่วยลดโอกาสการเกิดโรคได้ (อินชญา ประคองคำ, 2555)

มีรายงานพบว่า ไคโตซานสามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ PPO, PAL, POD, chitinase, Pr-1, β -1,3-glucanase และ chalcone synthase นอกจากนี้ในปี 1998 Sathiyabama และคณะ พบว่า เมื่อพ่นไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถกระตุ้นการสร้าง salicylic acid (SA) และเพิ่มกิจกรรมของ chitinase และ β -1,3-glucanase ทำให้ลดการเกิดโรคราสนิมในถั่วลิสงได้ เช่นเดียวกับ Chakraborty และคณะ (2015) ที่พบว่าเมื่อฉีดพ่นไคโตซานให้กับพริกทางใบ ทำให้เพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ β -1,3-glucanase, PPO, POD, PAL และเพิ่มปริมาณ phenolic compound ในพริก โดย Iriti และคณะ (2010) รายงานว่า การดูดซึมไคโตซานเข้าทางปากใบ จะสามารถกระตุ้นระบบป้องกันตัวเองในพืช โดยทำให้เกิดการสะสมแคลโลสเพิ่มขึ้น ทำให้พืชที่ทดสอบมีความต้านทานโรคเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ Fajardo และคณะ (1994) พบว่า เมื่อคลุกเมล็ดถั่วลิสงด้วยไคโตซาน จะเพิ่มการสังเคราะห์ phenolic acids (p-coumaric), ferulic acids และต้านทานต่อเชื้อรา *Aspergillus flavus* เช่นเดียวกับ Sathiyabama และ Balasubramanian (1998) ศึกษาการใช้สารไคโตซานป้องกันโรคราสนิมในถั่วลิสงพบว่า เอนไซม์ chitinase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากฉีดพ่น 48 ชั่วโมง และ

เพิ่มสูงขึ้น 10 วัน ซึ่งในระหว่างนั้น ขนาดและจำนวนแผลที่เกิดขึ้นลดลงด้วย ไคโตซานยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้โดยตรง

สำหรับการใช้ไคโตซานในองุ่น Barka และคณะ (2004) ได้ผสมไคโตซานลงไปให้อาหารเลี้ยงเชื้อรา *B. cineria* สาเหตุโรค gray mold rot ขององุ่นในอัตราส่วน 5% (v/v) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ 64% และการใช้สารไคโตซานสามารถกระตุ้นการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคสแคบในองุ่นได้ (อิณชญา ประคองคำ, 2555; รัชมน ผิวทอง, 2557) Aziz et al. (2006) พบว่า การใช้ไคติน Oligomers ร่วมกับ Copper Sulfate สามารถช่วยกระตุ้นให้อองุ่นมีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง Trotel-Aziz et al. (2006) พบว่า ไคโตซานสามารถชักนำให้อองุ่นมีความต้านทานต่อโรคราสีเทาองุ่นที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea* โดยกระตุ้นกลไกการปกป้องตนเอง Xing et al. (2015) พบว่า ไคโตซานสามารถชักนำให้อองุ่นต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง (Llorens et al., 2016) นอกจากนี้ Aubel et al. (2014) พบว่า อิทธิฤทธิ์ชนิด COS-OGA ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น oligosaccharidic elicitor สามารถชักนำให้อองุ่นและแดงกวาด้านทานต่อโรคราแป้ง (powdery mildew) โดยพบว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ 72% ในประเทศ Belgium และ 69% ในประเทศ Spain อิณชญา ประคองคำ (2555) รายงานว่าการฉีดพ่นองุ่นด้วยไคโตซานความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm) แสดงอาการของโรคสแคบช้ากว่ากรรมวิธีอื่นๆ เนื่องจากเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบในองุ่น เป็นเชื้อราในไฟลัม Eumycota ซึ่งมีไคตินเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ (ไฟโรจน์ จ้างพานิช, 2525; นุกูล อินทระสังขา, 2551) จึงทำให้เซลล์ของเชื้อรา *S. ampelinum* ถูกทำลายโดยเอนไซม์ chitinase สอดคล้องกับการทดลองของ รัชมน ผิวทอง (2557) ที่พบว่า เมื่อฉีดพ่นองุ่นโดยใช้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร (ppm) มีการแสดงออกของโรคสแคบช้ากว่ากรรมวิธีอื่น

2.6 เทคนิคการตรวจสอบกลไกในการปกป้องตนเองของพืชและองค์ประกอบของเซลล์พืช

2.6.1 การศึกษาการกลไกการปกป้องตนเองของพืชด้วยวิธีทางชีวเคมีพื้นฐาน

วิธีทางชีวเคมี เป็นการวิเคราะห์เพื่อให้ทราบชนิดและหน้าที่ของกลุ่มสารชีวเคมีภายในเซลล์พืช (functional group) หรือสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) ในตัวอย่าง ซึ่งอาศัยเทคนิคต่าง ๆ ในการศึกษาการกลไกการป้องกันตนเองของพืชด้วยวิธีทางชีวเคมี ด้วยเทคนิคพื้นฐาน เช่น การชั่ง การตวง การไทเทรต การใช้สารเร่งการตกตะกอน หรือการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักทางเคมี ฟิสิกส์มาช่วยในการวิเคราะห์ เช่น การใช้หลักทางแสง (spectrophotometry) ได้แก่ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และเทคนิค UV-VIS spectroscopy เป็นต้น เช่นการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในผักแว่น โดยวิธีการดูดกลืนแสง (วิไลพร ปองเพียร, 2551) การหาปริมาณฟีนอลรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำผลไม้แปรรูปด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (รวินิภา ศรีมุต และ

คณะ, ม.ม.ป.) การเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบ ฟีนอลิกรวมของเปลือกผลไม้ด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (ปฏิกิริยา ลอยพิมาย และคณะ, 2554) การวิเคราะห์หาปริมาณสาร SA ในกระบวนการชักนำให้คะน้ำต้านทานโรคขอบใบทอง ด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (นลินา เหมสนิท และคณะ, 2552) การวิเคราะห์หาปริมาณสาร SA ในกระบวนการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคสแคบในองุ่น ด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (อิญาญา ประคองคำ, 2555) การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในใบข้าวโพด ด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (รังสิมา วิเศษศรี และคณะ, 2555) การวิเคราะห์ปริมาณ phenolic compound และการวิเคราะห์ปริมาณ lignin ด้วยวิธีการดูดกลืนแสง (รัญมน ผิวทอง, 2557)

2.6.2 การศึกษาการกลไกการปกป้องตนเองของพืชด้วยเทคนิคขั้นสูง

2.6.2.1 การศึกษาการแสดงออกในระดับยีน

การตรวจสอบกลไกการปกป้องตนเองของพืชในระดับยีนนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่ง การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการปกป้องตนเองสามารถนำไปสู่การศึกษาด้วยเทคนิคทางโปรตีนหรือชีวเคมีในลำดับถัดไปได้ ซึ่งการศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเชิงปริมาณจะทำให้เกิดความเข้าใจในกลไกการปกป้องตนเองของพืชต่อเชื้อสาเหตุโรค รวมถึงสถานะแสดงล้อมต่างๆ ได้ดียิ่งขึ้น (Kwan et al., 2016) โดยการศึกษาการศึกษาการแสดงออกในระดับยีนนี้หมายรวมถึงการศึกษาการแสดงออกของ DNA (deoxyribonucleic acid) และ RNA (ribonucleic acid) ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานของพืช โดยเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกในระดับยีนมีหลากหลายเทคนิค ซึ่งส่วนมากใช้หลักการพื้นฐานของเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) หรือการเพิ่มจำนวน DNA หรือ RNA แล้วศึกษาลำดับเบสหรือปริมาณที่พบ เช่น qRT-PCR (quantitative real-time PCR) ที่ใช้ตรวจสอบปริมาณของ DNA หรือ RNA เป้าหมาย, RT-PCR (reverse transcriptase) ที่ใช้ในการ reverse transcribe จาก RNA เป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้เอนไซม์จำเพาะ เนื่องจาก RNA มีความเสถียรต่ำ ใช้ในตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องตนเองของพืชต่อเชื้อก่อโรค (Mirmajlessi et al., 2015)

โดยในปี 2008 Herman et al. ได้ศึกษาการใช้สิ่งกระตุ้น Benzothiadiazole (BTH, SAR-inducing compound) ชักนำให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรค Bacterial speck ที่เกิดจากเชื้อ *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* พบว่า BTH ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์กรดซาลิไซลิกและเอทิลิน โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องโดยใช้เทคนิค real-time pcr ซึ่งพบระดับการแสดงออกของยีน PR-1 ที่สูงขึ้น ณ เวลา 60 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ นำไปสู่การชักนำความต้านทานของพืชต่อเชื้อก่อโรค ต่อมาในปี 2014 Casassola et al. ทำการศึกษาการเปลี่ยนการแสดงออกของโปรไฟล์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อโรคราสนิมของข้าวสาลีพันธุ์ต้านทาน โดยใช้เทคนิค quantitative PCR พบการแสดงออกของยีนต้านทาน ได้แก่ peroxidases, b-1,3-glucanases

และ endochitinase ที่เวลา 72 ชั่วโมง ภายหลังจากเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค ซึ่งยีนเหล่านี้มีผลต่อกระบวนการ lignification, oxidative stress, regulation of energy supply, water and lipid transport, และ cell cycle regulation ที่ช่วยให้ข้าวสาลีมีความต้านทานต่อเชื้อรา *Puccinia triticina* นอกจากนี้ในปี 2018 Huang et al. ศึกษาการ identification interaction system genes ของอ้อยและเชื้อรา *Sporisorium scitamineum* สาเหตุโรคเส้ดำของอ้อย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Northern blotting, ribonuclease protection assay (RPA), semi-qPCR, molecular in situ hybridization, และ cDNA microarray นั้น การใช้เทคนิค qRT-PCR ร่วมกับ PCR reference genes นั้นมีความรวดเร็ว สะดวก และสามารถศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องได้ดีที่สุด

2.6.2.2 การศึกษาการแสดงออกในระดับโปรตีน

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนของพืชในระหว่างการพัฒนาและเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคสามารถทำให้เข้าใจถึงกลไกการปรับตัวและปกป้องตนเองอันซับซ้อนของพืชได้ ซึ่งในปัจจุบัน เทคนิค proteomics has เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อสาเหตุโรค (host-pathogen interactions) และวิวัฒนาการของเชื้อก่อโรค ซึ่งการระบุชนิดโปรตีนนั้นจะทำให้ทราบโครงสร้างทางโมเลกุลและบทบาทของโปรตีนที่ทำหน้าที่เฉพาะในปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อก่อโรค (Kaur et al., 2017) ในปี 2012 Yao et al. ได้ศึกษากลไกการปกป้องตนเองจากการใช้แมงกานีสชักนำความต้านทานให้อุ่นต้านทานต่อโรคราแป้งด้วยเทคนิค proteomics พบว่าการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโดยใช้แมงกานีสที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 2,500 ppm เป็นสิ่งกระตุ้น ได้แก่ PR-like protein, NBS-LRR analogue, และ JOSL protein ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของ phenylalanine ammonia lyase จึงสามารถสรุปได้ว่าแมงกานีสสามารถชักนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคในอุ่นได้ และในปีเดียวกันนั้น Palmieri et al. ได้ใช้เทคนิค proteomics ศึกษาการชักนำให้อุ่นต้านทานต่อโรคราน้ำค้างด้วยเชื้อราปฏิภูมิ *Trichoderma harzianum* T39 พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีนรวมกว่า 800 โปรตีน ซึ่งโปรตีนที่เกิดจากการกระตุ้นของ T39 นั้นพบว่า มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งสัญญาณความต้านทาน (signal transduction) นอกจากนี้ T39 ยังกระตุ้นให้เกิดการสะสม reactive oxygen species อย่างรวดเร็วและการสะสม callose บริเวณผนังเซลล์พืชที่ถูกเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย รวมถึงเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา redox balance ซึ่งล้วนนำไปสู่กระบวนการปกป้องตนเองต่อเชื้อ *P. viticola* ของอุ่นพันธุ์ Pinot Noir

2.6.2.3 การศึกษาในระดับชีวเคมี

เทคนิค fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR Spectroscopy) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ตรวจสอบเกี่ยวกับโมเลกุลของสาร ซึ่งประกอบด้วยอะตอมที่ยึดเกาะกันด้วยพันธะเคมี ซึ่งปกติแล้วอะตอมเหล่านี้ จะมีการเคลื่อนไหวหรือสั่น (vibration) อยู่ตลอดเวลาการสั่น

แบบพื้นฐานของพันธะเคมีมีอยู่ 2 แบบ คือ การยืด (stretching) และการงอ (bending) โดยใช้แสงอินฟราเรดช่วงกลาง 2.5-25 นาโนเมตร หรือ 4000-670 เซนติเมตร⁻¹ (สมเดช กนกเมธากุล, 2547; นิพนธ์ และคณะ, 2547) ทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสงแล้ว วัสดุที่ส่งผ่านออกมาแสดงผลเป็นความสัมพันธ์ของ ความถี่หรือ Wave Number กับค่าการส่งผ่านของแสง เรียกว่า IR Spectrum ลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะ ทำให้สามารถสร้างเป็น molecular fingerprint ขององค์ประกอบสารชีวเคมีในตัวอย่างเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ ได้ซึ่งลักษณะสเปกตรัมที่ได้จากตัวอย่าง ทางด้านชีวภาพจะบ่งบอกถึงลักษณะสารประกอบของสารชีวเคมีภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ฟอสโฟลิปิด สามารถแบ่งกลุ่มของการดูดกลืนแสง อินฟราเรดออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้

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

การนำแสงซินโครตรอนย่านพลังงานอินฟราเรดมาใช้กับเทคนิค FTIR Spectroscopy ร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์ หรือที่เรียกว่า Synchrotron Radiation-based IR Spectro-microscopy (SR-FTIR) เป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของเทคนิค FTIR Spectroscopy ให้มีความสามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก หรือสารตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้นต่ำ (กาญจนา ชรรณู, 2010) การใช้เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของพืชที่เกี่ยวข้องกับกลไกการ ส่งเสริมการเจริญเติบโต การสร้างภูมิคุ้มกันทานในพืช และ กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และในปัจจุบัน เริ่มมีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจดูความแตกต่างของจุลินทรีย์แต่ละชนิดและยังสามารถ ใช้เทคนิคนี้มาช่วยในการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุ

โรคพืช เนื่องจากมีความแม่นยำไม่ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายไม่แพง (ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ และคณะ, 2555) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค FTIR-spectroscopy มาใช้ตรวจสอบกลไกการชักนำความต้านทานพืชให้พืชมีความแข็งแรงและต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคมมากขึ้น โดยในปี 2014 Buensanteai et al. ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีภายในเซลล์ต้นกล้าแตงกวาที่ถูกส่งเสริมการเจริญเติบโตด้วย *B. subtilis* strain Bs008 พบว่าแตงกวาที่ถูกกลูเมล็ดด้วย Bs008 มีโครงสร้างโปรตีนแบบ beta sheet secondary structure และมีปริมาณ polysaccharide สูงกว่า แต่ปริมาณ lipid ต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Bs008 ส่งเสริมให้แตงกวามีการเจริญเติบโตและแข็งแรงขึ้นจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีดังกล่าว ในปีเดียวกันนั้น ชานนทร์ แสงจันทร์ ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีภายในผักกาดเขียวปลีภายหลังจากการชักนำความต้านทานต่อโรคเน่าและด้วย *B. subtilis* และกรดซาลิไซลิก โดยการคลุกเมล็ดด้วย *B. subtilis* และฉีดพ่นด้วย SA 200 ppm ส่งเสริมการเจริญเติบโตของผักกาดเขียวปลีและควบคุมโรคเน่าและได้ดีที่สุดได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค FTIR spectroscopy พบว่า กลุ่มไขมันชนิด C-H stretching ($\sim 3,000-2,800 \text{ cm}^{-1}$) กลุ่ม ไขมันชนิด C=O ester ($\sim 1,740 \text{ cm}^{-1}$) และกลุ่ม amide I ($\sim 1,700-1,600 \text{ cm}^{-1}$) มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แต่สารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide ($\sim 1,450-1,350 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1,246 \text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1,200-900 \text{ cm}^{-1}$) มีปริมาณลดต่ำลง ซึ่งอาจเกิดจากการที่พืชกระบวนกรปกป้องตนเองโดยใช้สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน สะสมสารกลุ่มไขมันไว้ในบริเวณผนังเซลล์ รวมถึงการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ปกป้องเองต่าง ๆ เพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค จึงส่งผลให้ปริมาณไขมัน และ โปรตีนเพิ่มสูงขึ้น แต่คาร์โบไฮเดรตลดลง เช่นเดียวกับ ชัยมณ พิวทอง (2014) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีในใบองุ่นภายหลังการชักนำความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและโรคสแคบด้วย *B. subtilis* และโคโตซาน พบว่าทั้ง 2 กรรมวิธีส่งเสริมให้อองุ่นพันธุ์มารูซิดเลสมีปริมาณสารในกลุ่มของ amide protein (ช่วงการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น $1500-1700 \text{ cm}^{-1}$) เพิ่มขึ้น รวมถึงสารในกลุ่ม cellulose, hemicellulose (ช่วงการดูดกลืนแสงที่ $1200-1350 \text{ cm}^{-1}$) ที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าองุ่นมีกลไกการปกป้องตนเองโดยการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ปกป้องตนเอง รวมถึงการสะสมสารในกลุ่ม cellulose และ hemicellulose เสริมสร้างผนังเซลล์ให้แข็งแรง เชื้อราเข้าทำลายได้ยาก ในปี 2017 Thumanu et al. ได้ใช้เทคนิค SR-FTIR ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีในใบพริกที่ถูกชักนำความต้านทานต่อโรคแอนแทรกคโนสด้วย *B. subtilis* D606 พบว่าในชั้น epidermis และ mesophyll ของใบพริกมีการเพิ่มปริมาณของสารในกลุ่มไขมัน ลิกนิน หรือเพคติน ($1770-1700 \text{ cm}^{-1}$) เช่นเดียวกับสารในกลุ่ม polysaccharides ($1200-900 \text{ cm}^{-1}$) แสดงให้เห็นว่า D606 มีประสิทธิภาพในการชักนำให้พริกเกิดกลไกปกป้องตนเองให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum acutatum* โดยทำให้ผนังเซลล์แข็งแรง ยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบขององุ่น

3.1.1 การแยกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบจากองุ่นพันธุ์มราฐิเดส

รวบรวมใบองุ่นพันธุ์มราฐิเดส จากบริเวณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting โดยนำใบองุ่นที่แสดงอาการของโรคมาล้างด้วยน้ำสบู่และน้ำสะอาด จากนั้นตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลส่วนที่ติดกับเนื้อเยื่อดี เป็นชิ้นขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร แล้วพอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลาย clorox 20% นาน 2-3 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง แล้ววางบนอาหาร water agar (WA) จำนวน 4 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ ภายใต้อุณหภูมิห้องประมาณ 5-7 วัน เมื่อเชื้อเริ่มสร้างเส้นใยทำการตัดปลายเส้นใย ของเชื้อย้ายลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จำนวน 1 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อหลังจากเชื้อเจริญประมาณ 2 สัปดาห์ จึงทำการตรวจลักษณะของเส้นใย โคนิเดีย และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ย้ายเชื้อไอโซเลตที่มีลักษณะตรงกันกับเชื้อ *S. ampelinum* (กรรณิการ์ และคณะ, 2537; ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553; อธิชญา ประคองคำ, 2555) ลงเลี้ยงในอาหาร PDA เพื่อใช้ในการศึกษาในลำดับต่อไป

3.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ (Pathogenicity test)

นำเชื้อที่แยกได้มากระตุ้นให้สร้าง โคนิเดียภายใต้แสงสีม่วง (black light) จากนั้นนำเชื้อแต่ละไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการก่อโรคโดยเตรียมเชื้อ *S. ampelinum* ในรูปของสารแขวนลอย สปอร์ในน้ำตรวจระดับความเข้มข้น โดยการนับจำนวนสปอร์ด้วย haemocytometer ปรับระดับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นทำการปลูกเชื้อลงบนใบอ่อนขององุ่นที่ในสภาพใบตัด โดยนำใบองุ่นมาล้างด้วยน้ำสบู่และน้ำสะอาด ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหนึ่งฆ่าเชื้อวางในกล่องขึ้นที่ทำความสะอาดด้วย 70% ethanol กล่องละ 1 ใบ จากนั้นทำการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา ให้ทั่วใบองุ่นจำนวน 1.5 มิลลิลิตรต่อ 1 ใบ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อแต่ละไอโซเลต ทำการประเมินความรุนแรงของโรคที่ 3 วันภายหลังจากปลูกเชื้อ ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นเก็บไอโซเลตที่มีความรุนแรงมากที่สุดไว้ทำการศึกษาในขั้นต่อไป (ดัดแปลงจาก ขนิษฐา มากรุง, 2548 และมธุกร สมพงษ์, 2553; อธิชญา ประคองคำ, 2555)

ตารางที่ 3.1 การให้คะแนนการเกิดโรคสแคบในใบองุ่น (ดัดแปลงจาก อิณชญา ประคองคำ, 2555)

เปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบที่เกิดแผล	คะแนนการเกิดโรค
0 – 3	1
4 – 12	2
13 – 25	3
26 – 50	4
>50	5

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จโคโตซานต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา

S. ampelinum

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซานต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design (factorial in CRD) โดยนำสูตรสำเร็จโคโตซานและสารเปรียบเทียบผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ cereal agar (CA) ที่ผสมสารละลายสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®], BIG[®], 2% โคโตซาน, 1% acetic acid ที่ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 75, 150, 300, 600 และ 1,200 ppm โดยใช้ CA ที่ผสม สารเคมี คาร์เบนดาซิมตามอัตราแนะนำ 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร และอาหาร CA ที่ไม่ผสมสารใด ๆ เป็นชุดควบคุม จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณเส้นใยของเชื้อรา ย้ายมาวางลงใน CA กรรมวิธีต่างๆ ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน (ชาติณี สังขจร และคณะ, 2556) บันทึกผลโดยวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเชื้อราสาเหตุโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth; PIRG) (Tronsmo, 1992) ดังสูตรด้านล่าง แล้วนำไป

$$\text{PIRG} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

โดย R1 = เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *S. ampelinum* ในชุดควบคุม

R2 = เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อรา *S. ampelinum* ที่เลี้ยงร่วมกับอติซิเตอร์สูตรต่าง ๆ

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จโคโตซานระดับโรงเรือนทดลอง

เตรียมต้นอ่อนพันธุ์อ่อนแอจากกิ่งชำอายุ 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ต้น ทำการฉีดพ่นอิลิซิเตอร์กรรมวิธีต่างๆดังตารางที่ 3.2 บริเวณใบอ่อนทุกๆ 7 วัน เป็นเวลา 7 ครั้ง ภายหลังจากฉีดพ่นสูตรสำเร็จโคโตซานครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 7 วัน ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคโดยฉีดพ่นเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบที่ระดับความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ประเมินการเกิดโรคภายหลังจากการปลูกเชื้อ 14 วัน โดยให้ระดับคะแนนดังตารางที่ 3.1 แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้โปรแกรมคำนวณ SPSS statistics 17.0 โดยทดสอบวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) และทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อน 3 ช่วงเวลา คือ หลังฉีดปลูกเชื้อสาเหตุโรคทันที, หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 24 ชั่วโมง และหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 48 ชั่วโมงในชุดควบคุมและชุดทดสอบ เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดซาลิซิลิก ปริมาณเอนไซม์ปกป้องตนเอง (chitinase, β -1,3-glucanase, PAL) และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในเซลล์ใบอ่อน โดยใช้เทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy (อินชญา ประคอง คำ, 2555; รัชฎมน พิวทอง, 2557)

ตารางที่ 3.2 กรรมวิธีทดลอง และความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพในระดับโรงเรือน

กรรมวิธีทดลอง	ความเข้มข้น
สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4 [®]	600 ppm (300 มิลลิลิตร/ 20 ลิตร)
สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4 [®]	1,200 ppm (600 มิลลิลิตร/ 20 ลิตร)
BIG [®]	40 มิลลิลิตร/ 20 ลิตร
สารเคมีคาร์เบนดาซิม (positive control)	20 มิลลิลิตร/ 20 ลิตร
น้ำกลั่น (negative control)	

3.4 ศึกษากลไกการปกป้องตนเองของอ่อนภายหลังจากเข้าทำลายของเชื้อรา *S. ampelinum*

3.4.1 ศึกษากลไกการปกป้องตนเองของอ่อนด้วยเทคนิคพื้นฐาน

3.4.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA)

ทำการทดลองโดยดัดแปลงวิธีการของ Raskin et al. (1989) และอินชญา ประคองคำ (2555) โดยสับชิ้นใบอ่อนขนาด 1x1 เซนติเมตร ที่สุ่มเก็บในแต่ละกรรมวิธี 0.5 กรัม นำมาบดในโถงเย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม 90% (v/v) methanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำตัวอย่างที่บดได้ใส่ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

หยอดลงใน 96 well microtiter plate เติม 0.02 M Ferric ammonium sulfate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณสาร salicylic acid ($\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รัญมน ผิวทอง, 2557) ซึ่งได้จากการเตรียม salicylic acid 1M เพื่อใช้เป็นสารเปรียบเทียบมาตรฐาน คุณสารละลายปริมาตร 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 และ 900 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 0.02M ferric ammonium sulfate ในแต่ละหลอด ให้ครบ 1000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที แล้ววัดค่า absorbance ที่ 530 นาโนเมตร

3.4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอนไซม์ปกป้องตนเอง

3.4.1.2.1 การสกัดโปรตีนรวม

สกัดโปรตีนรวม (อินชญา ประคองคำ, 2553) โดยใช้ตัวอย่างใบที่เก็บในข้อ 3.4.1.1 ตัดซอยให้มีขนาด 1×1 เซนติเมตร นำมาคลุกรวมกัน สุ่มใบขึ้นมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัมต่อ 1 ตัวอย่าง มาบดด้วยโกร่งเย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว นำตัวอย่างที่บดได้ใส่ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นผสม homogenization buffer [0.1 M Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 M KCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, triton X-100, 3% (w/v) polyvinylpyrrolidone 1 มิลลิลิตร] นำไป vortex ให้เข้ากัน บั่นตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที คุณสารละลายส่วนบน (supernatant) ใต้อหลอดใหม่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดโปรตีน (homogenate) ของอุ้งนแต่ละกรรมวิธีที่ 3 ช่วงเวลาคือ หลังฉีดปลูกเชื้อสาเหตุโรคทันที หลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 24 ชั่วโมง และหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรค 48 ชั่วโมง

ตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนรวมตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเตรียม bovine serum albumin (BSA) standard ที่ 7 ความเข้มข้น คือ 0, 1, 2, 5, 10, 15 และ 20 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ และเตรียม homogenate ตัวอย่างละ 2 ความเข้มข้น ที่ 5 และ 10 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการดูด BSA standard แต่ละความเข้มข้นมาใส่ในหลอดใหม่ตัวอย่างละ 400 ไมโครลิตร เติม protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 100 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน คุณใส่ 96 well microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 2 หลุม ทำเช่นเดียวกันกับ homogenate ทั้ง 2 ความเข้มข้นทุก ๆ ตัวอย่าง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที แต่ไม่เกิน 1 เซนติเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectracount microplatephotometer สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ BSA และค่าการดูดกลืนแสง หาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) คำนวณหาปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่างโดยแทนค่าลงในสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) แล้วจึงนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยใช้สูตร

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

3.4.1.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase

ทำการทดลองตามวิธีการของ Rohringer และคณะ (1983) โดยนำ homogenate ที่ได้จากการสกัดตัวอย่างไบออนุ่นดังกล่าวในข้อ 3.4.1.2.1 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสม colloidal chitin (0.1%, w/v) และ 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5.0) ในอัตรา 0.4: 0.4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้ปริมาณของ N-acetyl glucosamine (GlcNAc) แล้วนำไปวิเคราะห์ chitinase activity ตามวิธีของ Reissig และคณะ (1955) โดยหยอดลงใน 96 well microtiter plate หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 3 หลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 585 นาโนเมตร ใช้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ GlcNAc เป็น standard โดยเตรียม GlcNAc ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หยอดลงใน 96 well microtiter plate ในอัตรา 200 ไมโครลิตร (Dumas et al., 2009) โดย chitinase activity หนึ่งหน่วย เทียบจากสารผลิตภัณฑ์ 1 μmol GlcNAc formed $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein (อินชญา ประคองคำ, 2553)

3.4.1.2.3 กิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

นำโปรตีนที่ได้จากการสกัดตัวอย่างไบออนุ่นดังกล่าวในข้อ 3.4.1.2.1 มาวิเคราะห์ PAL activity assay ดัดแปลงจากวิธีการของ Giorgi et al. (2009) โดยนำ homogenate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลalani นีลแอมโมเนียไลเอส (L-phenylalanine ammonia lyase activity: PAL activity) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 10 mM borate buffer, pH 8.8 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และ 20 mM L-phenylalanine จำนวน 0.25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นหนึ่งขวด 0.25 มิลลิลิตร บ่มไว้นาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ PAL เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ cinnamic acid เป็น standard โดยเตรียม cinnamic acid ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 และ 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ หยอดลงใน 96 well microtiter plate ในอัตรา 200 ไมโครลิตร (Riaz et al., 2014) โดยให้ 1 หน่วยของกิจกรรม หมายถึง เอนไซม์ PAL ที่ออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมลของสับสเตรทในเวลา 1 นาที ($\mu\text{mol trans-cinnamic acid min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)

3.4.2 ศึกษากลไกการปกป้องตนเองขององุ่นด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy

3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางทางชีวเคมีของไบออนุ่นด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy ดัดแปลงจากคาราวตี วงษ์ชาติ (2558) โดยนำตัวอย่างไบออนุ่นดังกล่าวในข้อ 3.3

มาตัดเป็นสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 เซนติเมตร ใช้กระดาษฟรอยด์พับเป็นกระทงสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก หยดสาร optimal cutting temperature compound (O.C.T) (Tissue-Trek, Electron Microscopy Science, PA) ลงไปครึ่งกระทง นำชิ้นตัวอย่างไปอุ้งนวางในลักษณะตั้งฉากกับกระทง แล้วหยดสาร O.C.T เพิ่มให้ท่วมตัวอย่างไปอุ้งน (Tissue-Trek, Electron Microscopy Science, PA) ทำให้สารแข็งตัวโดยการนำกระทงไปแช่ในไนโตรเจนเหลว เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่แช่แข็งไปตัดด้วยเครื่อง cryostat ให้ได้ขนาด 20 ไมครอน นำตัวอย่างที่ตัดแล้ววางบนแผ่นกรองแสงแบบส่องผ่าน (infrared transparent BaF₂ windows) ขนาด 13x2 มิลลิเมตร นำไปดูความชื้นด้วยเครื่อง vacuum desiccator ประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง

3.4.2.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy

นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy ณ BL4.1 IR spectroscopy and imaging ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) โดยวัดในช่วง 4000-800 cm⁻¹ รูรับแสงขนาด 10x10 ไมครอน จำนวน 64 สแกน จากนั้นนำข้อมูลที่วัดได้ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.2 (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany) เพื่อทำการแยก cluster ของกลุ่มสี แล้วเลือกสเปกตรัมในเนื้อเยื่อไปอุ้งนชั้น epidermis โดยใช้โปรแกรม Cytospec 1.3.4 (Cytospec Inc., NY, USA) และนำมาวิเคราะห์ principle component analysis (PCA) โดยใช้โปรแกรม Unscrambler 9.7 (CAMO, Norway) (Lasch et al., 2003) เพื่อแยกความแตกต่างของกลุ่มในเนื้อเยื่อไปอุ้งนชั้น epidermis จากนั้นนำสเปกตรัมมาทำการวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟเพื่อดูปริมาณสารชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปโดยใช้โปรแกรม OPUS 7.2 (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany)

3.5 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows statistic version 16.0 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกรรมวิธีโดยวิธีการของ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

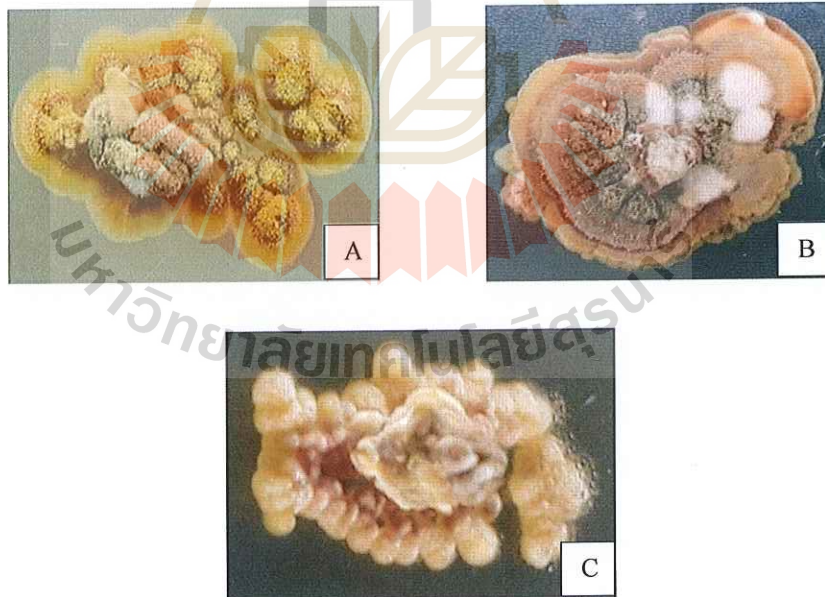
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบขององุ่น

4.1.1 การแยกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบจากองุ่นพันธุ์มราฐีตเลส

จากการรวบรวมใบองุ่นพันธุ์มราฐีตเลส จากบริเวณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำมาแยกเชื้อ โดยวิธี tissue transplanting และเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar (PDA) พบว่าสามารถแยกเชื้อรา *S. ampelinum* ได้จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต GSUTMR01 ที่มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างแบนราบ มีความหนูนและเหี่ยวยุบเล็กน้อย โคโลนีมีสีเหลืองและน้ำตาล ไอโซเลต GSUTMR02 ที่มีลักษณะโคโลนีค่อนข้างนูนและเหี่ยวยุบ โคโลนีมีสีน้ำตาลเข้มอมแดง และน้ำตาลอมเหลือง และไอโซเลต GSUTMR03 ที่มีลักษณะโคโลนีนูนมาก โคโลนีจับกันเป็นลักษณะก้อนกลมนูนสูง โคโลนีมีสีเหลืองและน้ำตาลอมส้ม ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *S. ampelinum* ที่แยกได้จากองุ่นพันธุ์มราฐีตเลส บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อายุ 30 วัน (A) ไอโซเลต GSUTMR01, (B) ไอโซเลต GSUTMR02, (C) ไอโซเลต GSUTMR03

4.1.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ

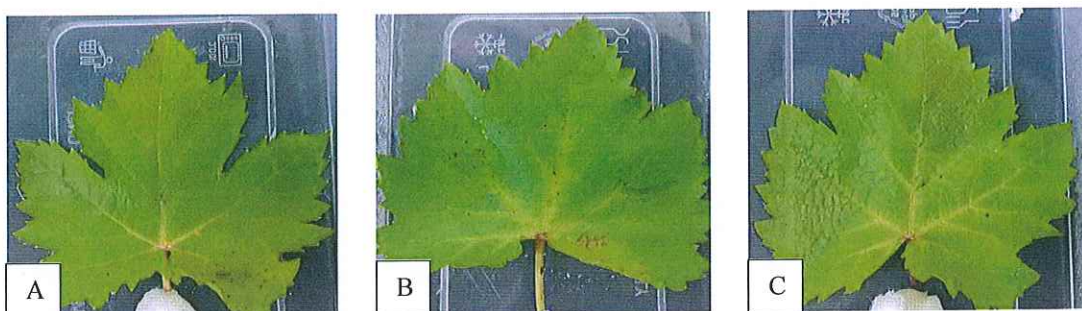
(Pathogenicity test)

ภายหลังจากฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ลงบนใบอ่อนอุณหภูมิ 1.5 มิลลิลิตรต่อ 1 ใบ ทำการประเมินความรุนแรงของโรคที่ 3 วันภายหลังจากปลูกเชื้อ โดยทดสอบในสภาพใบตัดวางในกล่องขึ้น ระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า เชื้อรา *S. ampelinum* ทั้ง 3 ไอโซเลต มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเชิงทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต GSUTMR02 ให้คะแนนการเกิดโรคสแคบสูงสุดที่ 4.67 คะแนน (ภาพที่ 4.2) ส่วนไอโซเลต GSUTMR01 และ GSUTMR03 ให้คะแนนการเกิดโรคที่ 2.33 และ 1.33 คะแนน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จึงทำการคัดเลือกเชื้อราไอโซเลต GSUTMR02 ไปใช้ในการศึกษากลไกของสูตรสำเร็จโคโตซานในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรค และการชักนำความต้านทานต่อโรคสแคบอุณหภูมิในลำดับถัดไป

ตารางที่ 4.1 คะแนนการเกิดโรคสแคบในใบอ่อนภายหลังจากฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *S. ampelinum* 3 ไอโซเลตบนใบอ่อนอุณหภูมิเป็นเวลา 3 วัน

ไอโซเลต	คะแนนการเกิดโรคสแคบ
GSUTMR01	2.33b ^{1/}
GSUTMR02	4.67a
GSUTMR03	1.33b
F-Test	**
CV (%)	11.99

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี DMRT ($\alpha = 0.05$)



ภาพที่ 4.2 การเกิดโรคสแคบในใบองุ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 วัน (A) ไอโซเลต GSUTMR01, (B) ไอโซเลต GSUTMR02, (C) ไอโซเลต GSUTMR03

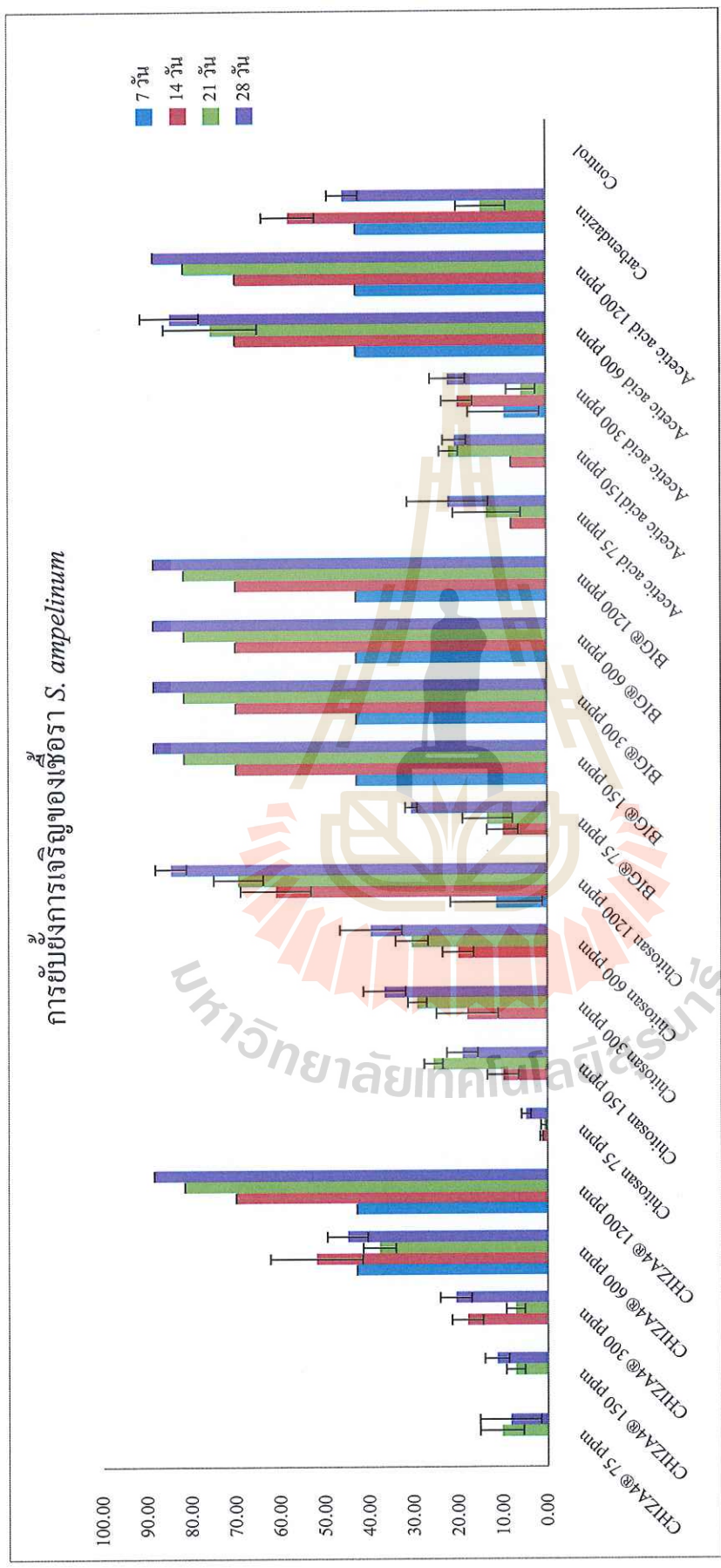
4.2 ทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จอิลิซิเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา

S. ampelinum

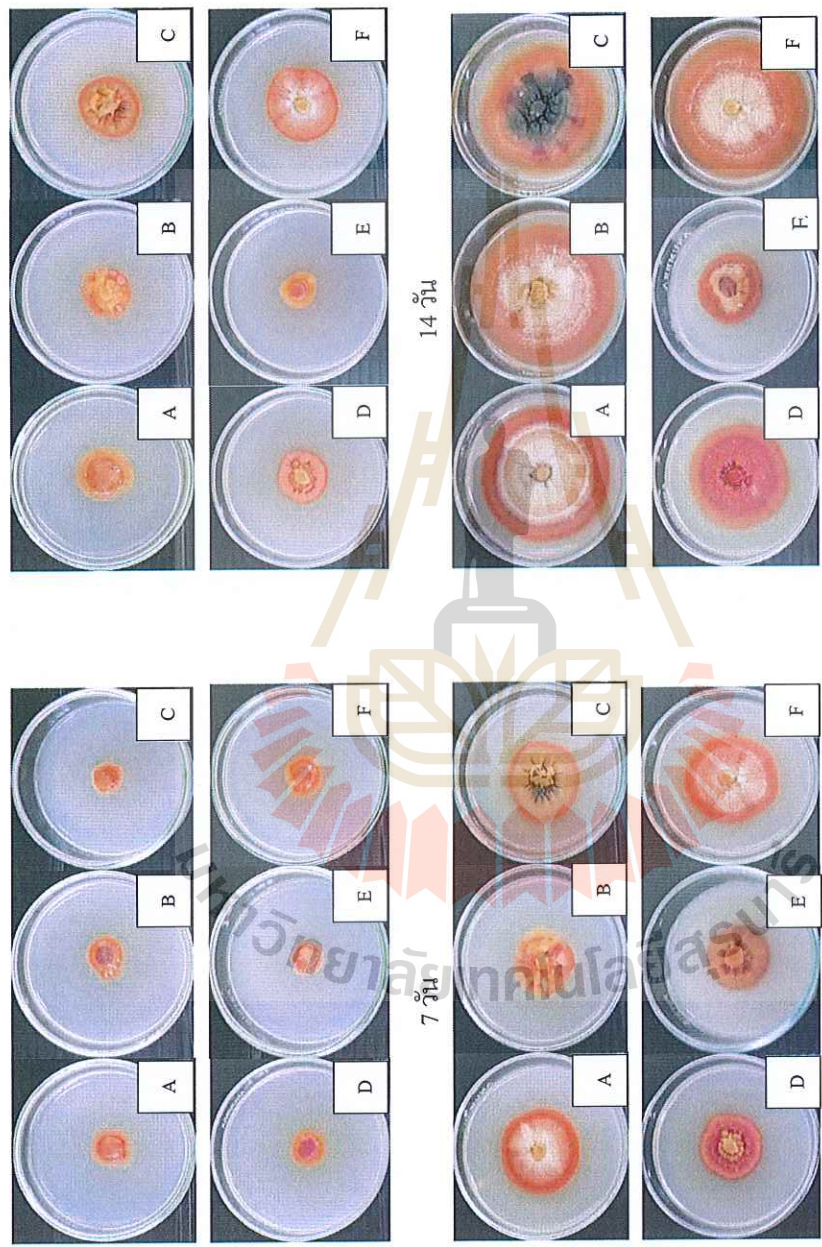
เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จอิลิซิเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา โดยนำสูตรสำเร็จอิลิซิเตอร์ ที่มีส่วนผสมของสารละลายไคโตซาน CHIZA4[®], BIG[®], 2% ไคโตซาน และ 1% acetic acid ที่ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 75, 150, 300, 600 และ 1,200 ppm มาทำการทดสอบในอาหาร cereal agar (CA) โดยใช้ CA ที่ผสมสารเคมีคาร์เบนดาซิมตามอัตราแนะนำ 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร และอาหาร CA ที่ไม่ผสมสารใด ๆ เป็นชุดควบคุมเลี้ยงเชื้อรา *S. ampelinum* จากนั้นทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (ซาลินี สังขจร และคณะ, 2556) พบว่า ที่เวลา 7 วัน อาหาร CA ที่ผสม CHIZA4[®] ความเข้มข้น 600 และ 1,200 ppm, BIG[®] ความเข้มข้น 150, 300, 600 และ 1,200 ppm 1% acetic acid ความเข้มข้น 600 และ 1,200 ppm และสารเคมีคาร์เบนดาซิม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราสูงสุดที่ 42.86% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคืออาหาร CA ที่ผสม 2% ไคโตซาน ความเข้มข้น 1,200 ppm และ 1% acetic acid ความเข้มข้น 300 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญโคโลนีเชื้อราที่ 11.43 และ 9.52% ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่เวลา 14 วัน อาหาร CA ที่ผสม CHIZA4[®] ความเข้มข้น 1,200 ppm, BIG[®] ความเข้มข้น 150, 300, 600 และ 1,200 ppm และ 1% acetic acid ความเข้มข้น 600 และ 1,200 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราสูงสุดที่ 70.01% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคืออาหาร CA ที่ผสม 2% ไคโตซาน ความเข้มข้น 1,200 ppm และสารเคมีคาร์เบนดาซิม มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญโคโลนีเชื้อราที่ 61 และ 58% ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่เวลา 21 วัน อาหาร CA ที่ผสม CHIZA4[®] ความ

เข้มข้น 1,200 ppm, BIG® ความเข้มข้น 150, 300, 600 และ 1,200 ppm และ 1% acetic acid ความเข้มข้น 1,200 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราสูงสุดที่ 81.71% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคืออาหาร CA ที่ผสม 1% acetic acid และ 2% ไคโตซาน ความเข้มข้น 1,200 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญโคโลนีเชื้อราที่ 75.61 และ 69.51% ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และที่เวลา 28 วัน อาหาร CA ที่ผสม CHIZA4® ความเข้มข้น 1,200 ppm, BIG® ความเข้มข้น 150, 300, 600 และ 1,200 ppm และ 1% acetic acid ความเข้มข้น 1,200 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อราสูงสุดที่ 88.55% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคืออาหาร CA ที่ผสม 1% acetic acid ความเข้มข้น 600 ppm และ 2% ไคโตซาน ความเข้มข้น 1,200 ppm มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญโคโลนีเชื้อราที่ 84.73% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.3

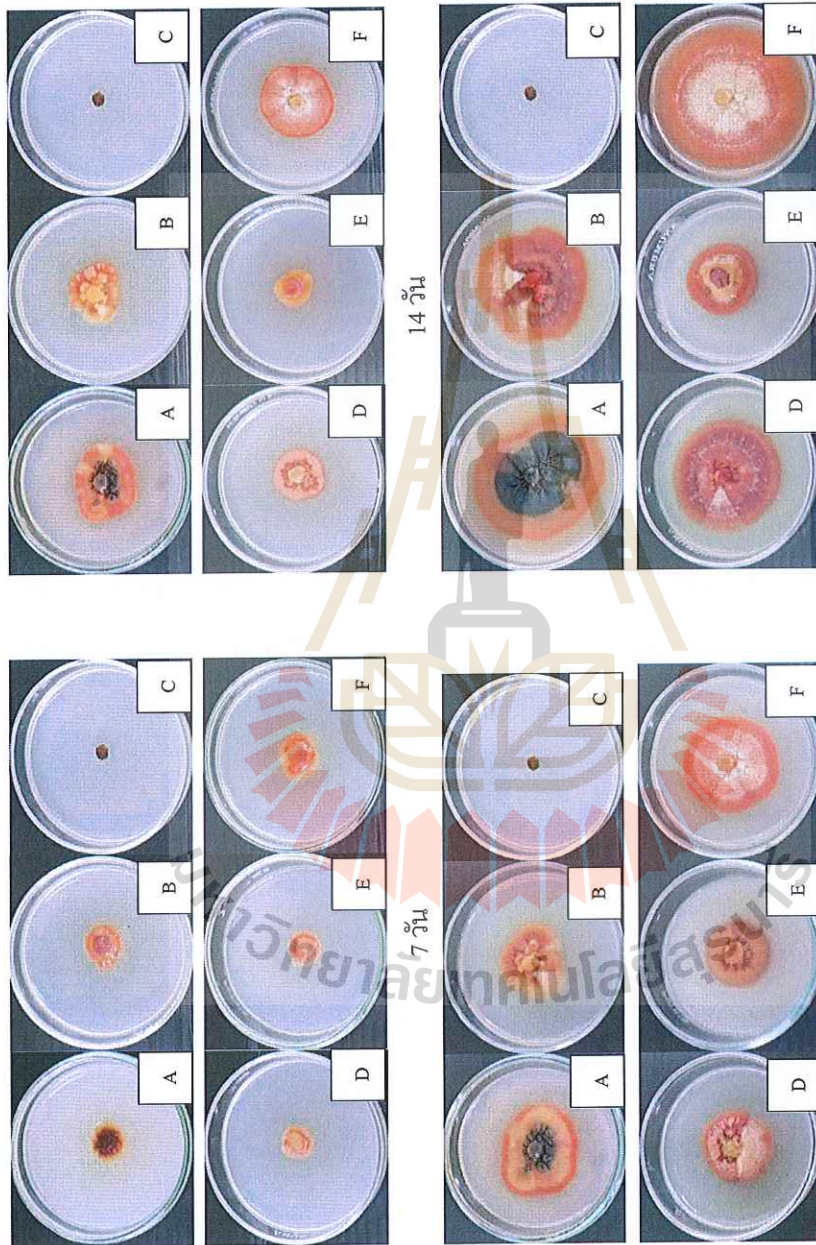




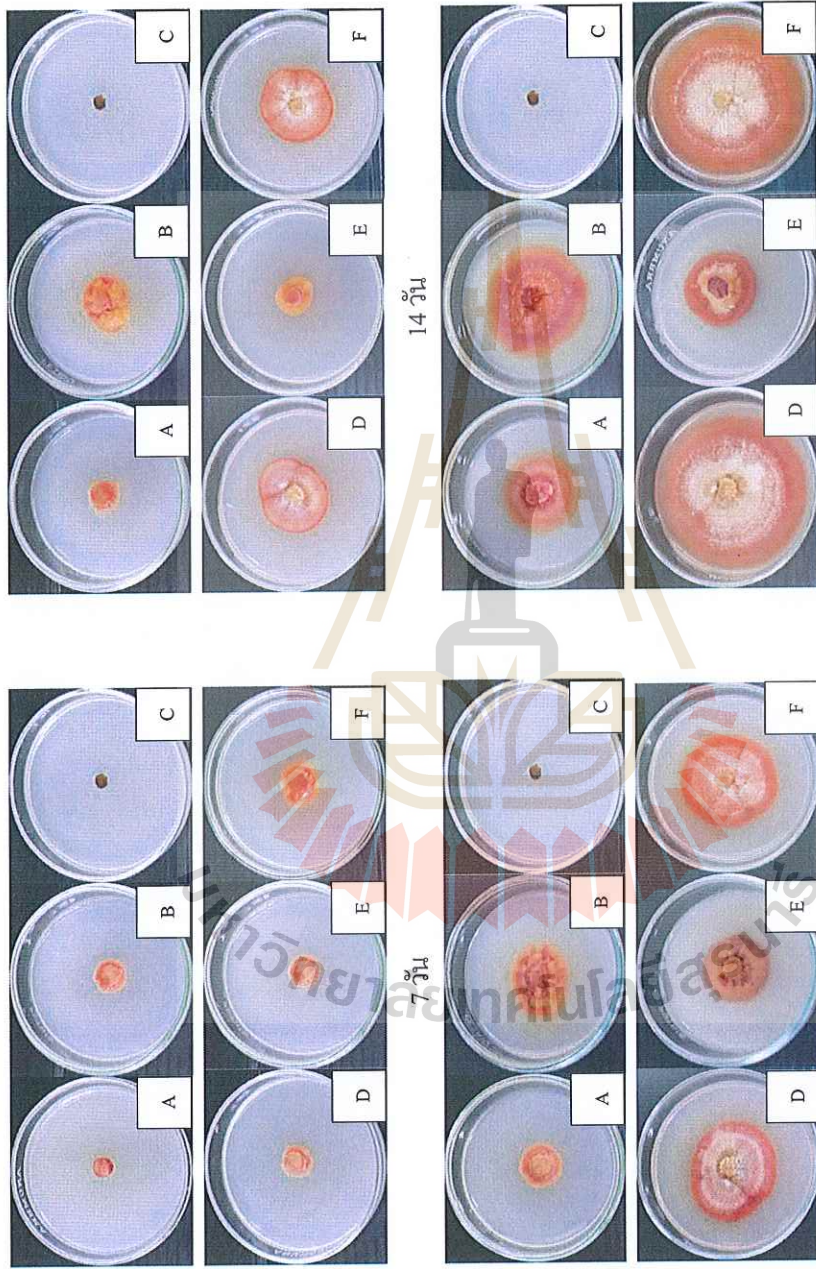
ภาพที่ 4.3 ประสิทธิภาพของสูตรตำรับ โคโตซาน CHIZA4®, วัตซีนพีช BIG®, 2% โคนิกซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และชุดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโตนีเซอรา *S. ampeligenum* โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) 5 ระดับความเข้มข้น 75, 150, 300, 600 และ 1,200 ppm ที่เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน



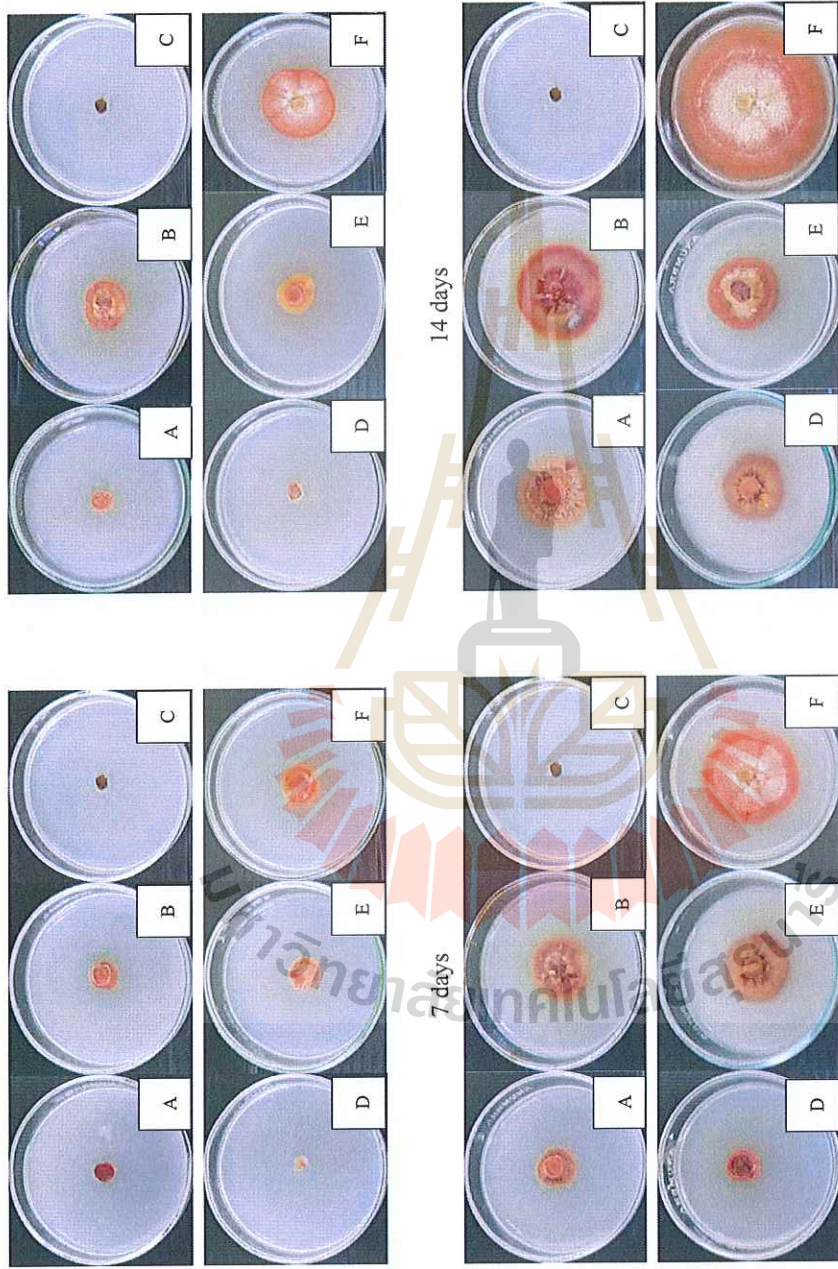
ภาพที่ 4.4 ประสิทธิภาพของสูตรตำรับโคโตซาน CHIZA4[®], วัคซีนพืช BIG[®], 2% โคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และชุดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโตเนอเรีย *S. ampeliformis* โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 75 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (A) CHIZA4[®], (B) 2% โคโตซาน, (C) 1% acetic acid, (D) สารเคมีคาร์เบนดาซิม อัตราแนะนำ 20 มิลลิกรัม ต่อ น้ำ 20 ลิตร และ (F) อาหาร CA



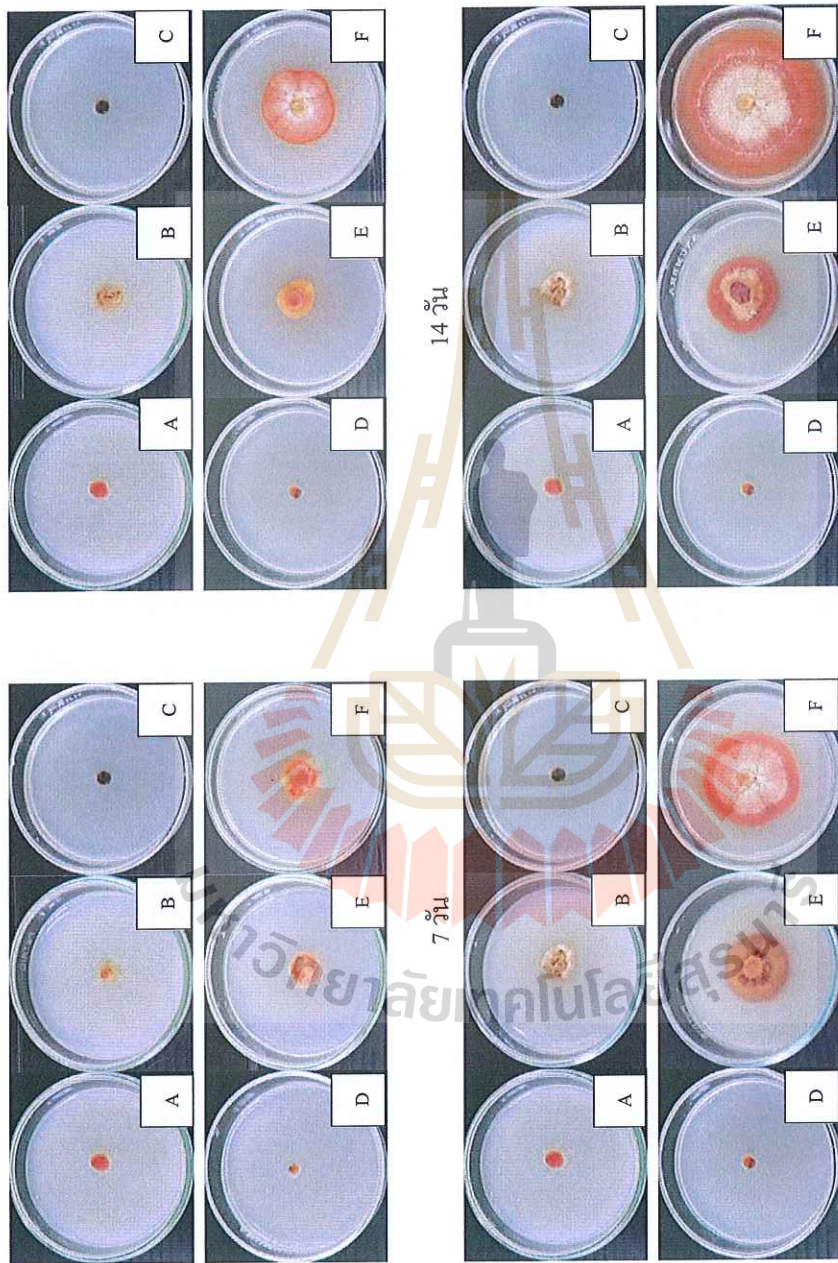
ภาพที่ 4.5 ประสิทธิภาพของสูตรตำรับโคโตซาน CHIZA4[®], วัตซีนพีช BIG[®], 2% โคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และชุดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโตสนี้เชื้อรา *S. ampelinum* โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 150 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (A) CHIZA4[®], (B) 2% โคโตซาน, (C) วัตซีนพีช BIG[®], (D) 1% acetic acid, (E) สารเคมีคาร์เบนดาซิม อัตราแนะนำ 20 มิลลิกรัม ต่อ น้ำ 20 ลิตร และ (F) อาหาร CA



ภาพที่ 4.6 ประสิทธิภาพของสูตรตำรับโคโตซาน CHIZA4[®], วัคซีนพืช BIG[®], 2% โคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และชุดความคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *S. ampelina* โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 300 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (A) CHIZA4[®], (B) 2% โคโตซาน, (C) วัคซีนพืช BIG[®], (D) 1% acetic acid, (E) สารเคมีคาร์เบนดาซิม อัตราแนะนำนำ 20 มิลลิตร ต่อหน้า 20 ลิตร และ (F) อาหาร CA



ภาพที่ 4.7 ประสิทธิภาพของสูตรตำรับไคโตซาน CHIZA4[®], วัคซีนพืช BIG[®], 2% ไคโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และชุดควบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *S. ampelimum* โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 600 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (A) CHIZA4[®], (B) 2% ไคโตซาน, (C) วัคซีนพืช BIG[®], (D) 1% acetic acid, (E) สารเคมีคาร์เบนดาซิม อัตราแนะนำ 20 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร และ (F) อาหาร CA



ภาพที่ 4.8 ประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®], วัคซีนพืช BIG[®], 2% โดโตซาน, 1% acetic acid, สารเคมีคาร์เบนดาซิม และซูดควาบคุม (cereal agar) ในการยับยั้งการเจริญของโคโตนีเซอรา *S. ampeliformis* โดยวิธีการผสมในอาหาร cereal agar (CA) ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน (A) CHIZA4[®], (B) 2% โดโตซาน, (C) วัคซีนพืช BIG[®], (D) 1% acetic acid, (E) สารเคมีคาร์เบนดาซิม อัตราแนะนำ 20 มิลลิกรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร และ (F) อาหาร CA

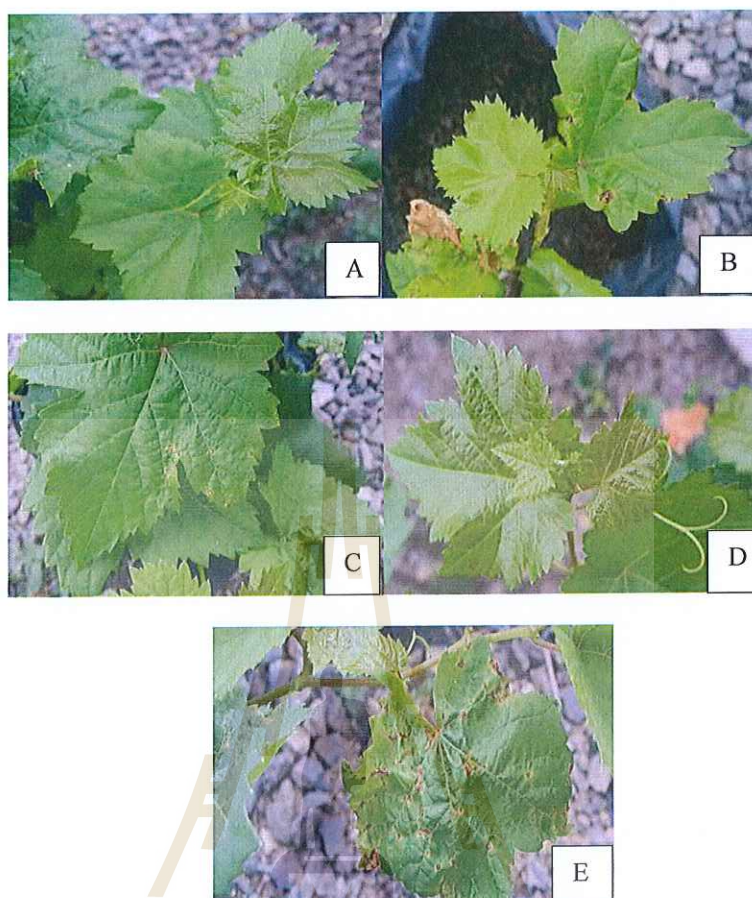
4.3 ทดสอบประสิทธิภาพสูตรสำเร็จโคโตซานระดับโรงเรือนทดลอง

เมื่ออุณหภูมิ 123 วัน ทำการการฉีดพ่นสูตรสำเร็จโคโตซานครั้งสุดท้าย หลังจากนั้นเป็นเวลา 7 วัน ทำการปลูกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบด้วยการฉีดพ่นที่ระดับความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ประเมินการเกิดโรคลงภายหลังการปลูกเชื้อ 14 วัน (อิณชญา ประคองคำ, 2553; รัชฎมน พิวทอง, 2557) พบว่า อุณหภูมิที่มรดูชีดเลสที่ถูกฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 ppm มีคะแนนการเกิดโรคสแคบน้อยที่สุดที่ 0.33 คะแนน (ภาพที่ 4.9, A) และมีระยะเวลาการแสดงอาการของโรคช้าที่สุดที่ 5 วัน ภายหลังจากปลูกเชื้อ สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ 87.64% ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิมที่มีคะแนนการเกิดโรค 0.67 คะแนน (ภาพที่ 4.9, D) และแสดงอาการของโรคในวันที่ 5 ภายหลังจากปลูกเชื้อเช่นเดียวกัน ลดความรุนแรงของโรคได้ 74.9% ในขณะที่กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm (ภาพที่ 4.9, B) และโคโตซานการค้า BIG[®] (ภาพที่ 4.9, C) มีคะแนนการเกิดโรคที่ 1.33 คะแนน แสดงอาการของโรคที่ 4 วันภายหลังจากปลูกเชื้อ ลดความรุนแรงของโรคได้ 50.19% โดยทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 4.9, E) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซานในการลดความรุนแรงของโรคสแคบใน
องุ่นพันธุ์มราฐีตเลสในระดับโรงเรือนทดลอง

กรรมวิธีทดลอง	ความรุนแรงของโรค ^{1/}	
	คะแนนการเกิดโรค ^{2/}	ระยะเวลาแสดงอาการ (วันภายหลังจากปลูกลง)
CHIZA4 [®] 600 ppm	0.33 c ^{3/}	5
CHIZA4 [®] 1,200 ppm	1.33 b	4
BIG [®]	1.33 b	4
Carbendazim	0.67 c	5
Control	2.67 a	2
F-test	**	
CV (%)	27.35	

^{1/}องุ่นที่ได้รับการปลูกลง *S. ampelimum* สาเหตุโรคสแคบ 7 วันภายหลังจากกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®], วัคซิมพีซ BIG[®], สารเคมีคาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ; ^{2/}คะแนนการเกิดโรค 1-5 คะแนน (Prakongkha et al., 2013) 1 คะแนน = เกิดแผล 0-6% ของพื้นที่ใบ; 2 คะแนน = เกิดแผลน้อยกว่า 25% ของพื้นที่ใบ; 3 คะแนน = เกิดแผล 26-50% ของพื้นที่ใบ; 4 คะแนน = เกิดแผล 51-75% ของพื้นที่ใบ; 5 คะแนน = เกิดแผลมากกว่า 75% ของพื้นที่ใบ; ^{3/}ค่าเฉลี่ยที่แสดงตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT ($\alpha=0.05$)



ภาพที่ 4.9 แสดงประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซานในการลดความรุนแรงของโรคสแคบใน
 องุ่นพันธุ์มารูซิดเลสในอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิติเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อรา
S. ampelinum สาเหตุโรคสแคบขององุ่นเป็นเวลา 14 วัน ในระดับโรงเรือนทดลอง (A)
 กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] 600 ppm (B) กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย
 สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] 1200 ppm (C) กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยโคโตซานการค้า
 BIG[®] (D) กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม (E) กรรมวิธีควบคุม ฉีดพ่นด้วย
 น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ

4.4 ศึกษากลไกการปกป้องตนเองขององุ่นภายหลังการเข้าทำลายของเชื้อรา *S. ampelinum*

4.4.1 ศึกษากลไกการปกป้องตนเองขององุ่นด้วยเทคนิคพื้นฐาน

4.4.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณ salicylic acid (SA)

ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณ SA ในแต่ละกรรมวิธีภายหลังจากการปลูกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบขององุ่นที่ 3 ช่วงเวลา ได้แก่ ภายหลังจากการปลูกเชื้อทันที (0 HAI), ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง (24 HAI) และภายหลังจากการปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง (48 HAI) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (อินชญา ประคองคำ, 2553; รัชมนน ผิวทอง, 2557) พบว่า ภายหลังจากการปลูกเชื้อทันที กรรมวิธีควบคุมมีปริมาณ SA สูงสุดที่ $7.47 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยไคโตซานการค้า BIG[®] และสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] 600 ppm ที่ 6.58 และ $6.52 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight ตามลำดับ และกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิมมีปริมาณ SA ต่ำที่สุดที่ $3.73 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight โดยทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต่อมาภายหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม, สูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 ppm และไคโตซานการค้า BIG[®] มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นของปริมาณ SA แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 32.44 , 17.28 และ $11.87 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm มีแนวโน้มที่ลดลงของปริมาณ SA ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณ SA ที่ได้มีความสัมพันธ์กับการลดความรุนแรงของโรค โดยในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 ppm และสารเคมีคาร์เบนดาซิมสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด โดยกรรมวิธีที่มีปริมาณ SA สูงสุดคือ กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 ppm มีปริมาณ SA ที่ $3.10 \mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight และภายหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ทุกกรรมวิธีมีแนวโน้มที่ลดลงของปริมาณ SA ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณการสะสมกรดซาลิไซลิก (Salicylic acid accumulation) ในใบองุ่นพันธุ์ มารูซีดเลสภายหลังจากกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซานและปลุกเชื้อ *S. ampelinum* ในระดับโรงเรือนทดลอง

กรรมวิธีทดลอง	ปริมาณ Salicylic acid ภายใบบองุ่น ($\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight) ^{1/}		
	0 HAI ^{2/}	24 HAI	48 HAI
CHIZA4 [®] 600 ppm	6.52 ab ^{3/}	17.28 b	3.10 a
CHIZA4 [®] 1,200 ppm	5.09 b	5.60 d	1.77 c
BIG [®]	6.58 ab	11.87 c	1.36 d
Carbendazim	3.73 c	32.44 a	2.41 b
Control	7.47 a	6.36 d	2.44 b
F-test	**	**	**
CV (%)	7.84	8.41	5.59

^{1/}ปริมาณกรดซาลิไซลิกภายหลังจากการกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®], วัคซีนพีช BIG[®], สารเคมีคาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน และภายหลังจากการปลุกเชื้อ *S. ampelinum* ที่ 0, 24, 48 ชั่วโมง (Prakongkha et al., 2013); ^{2/}HAI = ชั่วโมงภายหลังจากการปลุกเชื้อ *S. ampelinum*; ^{3/} ค่าเฉลี่ยที่แสดงได้จากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ จากใบองุ่น 2 ใบต่อต้น ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT ($\alpha=0.05$)

4.4.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ปกป้องตนเอง

4.4.1.2.1 กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase

ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในแต่ละกรรมวิธีภายหลังจากการปลุกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบขององุ่นที่ 3 ช่วงเวลา ได้แก่ ภายหลังจากการปลุกเชื้อทันที (0 HAI) ภายหลังจากการปลุกเชื้อ 24 ชั่วโมง (24 HAI) และภายหลังจากการปลุกเชื้อ 48 ชั่วโมง (48 HAI) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร (อิณชญา ประคองคำ, 2553) พบว่า ภายหลังจากการปลุกเชื้อทันที กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม และสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 ppm มีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงสุด เท่ากับ 0.22 และ 0.19 $\mu\text{mol GlcNAc formed min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ตามลำดับ รองลงมาคือ กรรมวิธีควบคุม มีปริมาณเท่ากับ 0.03 $\mu\text{mol GlcNAc formed min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ต่อมาภายหลังจากการปลุกเชื้อ 24 ชั่วโมง พบว่า กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 ppm และสารเคมีคาร์เบนดาซิม มีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงสุด มีปริมาณเท่ากับ 4.37 และ 3.78 $\mu\text{mol GlcNAc formed min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ตามลำดับ รองลงมาคือ

กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm ที่ 1.08 $\mu\text{mol GlcNAc formed min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ และภายหลังจากการปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 600 ppm และสารเคมีคาร์เบนดาซิม มีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับภายหลังจากการปลูกเชื้อทันที และภายหลังจากการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง มีปริมาณเท่ากับ 6.66 และ 3.23 $\mu\text{mol GlcNAc formed min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ ตามลำดับ รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm มีปริมาณเท่ากับ 4.97 $\mu\text{mol GlcNAc formed min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ในใบอ่อนพันธุ์มารูซิดเลสภายหลังจากกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซานและปลูกเชื้อ *S. ampelinum* ในระดับโรงเรือนทดลอง

กรรมวิธีทดลอง	กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ($\mu\text{mol GlcNAc formed min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{protein}$) ^{1/}		
	0 HAI ^{2/}	24 HAI	48 HAI
CHIZA4 [®] 600 ppm	0.19 b ^{3/}	4.37 a	6.66 a
CHIZA4 [®] 1,200 ppm	0.02 c	1.08 c	4.97 b
BIG [®]	0.01 c	0.20 d	0.20 d
Carbendazim	0.22 a	3.78 b	6.44 a
Control	0.03 c	0.01 d	3.23 c
F-test	**	**	**
CV (%)	0.00	2.12	6.13

^{1/}ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ภายหลังจากกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®], วัคซีนพืช BIG[®], สารเคมีคาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน และภายหลังจากการปลูกเชื้อ *S. ampelinum* ที่ 0, 24, 48 ชั่วโมง (Prakongkha et al., 2013); ^{2/}HAI = ชั่วโมงภายหลังจากการปลูกเชื้อ *S. ampelinum*; ^{3/}ค่าเฉลี่ยที่แสดงได้จากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ จากใบอ่อน 2 ใบต่อต้น ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT ($\alpha=0.05$)

4.4.1.2.2 กิจกรรมเอนไซม์ Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในแต่ละกรรมวิธีภายหลังจากการปลูกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบขององุ่นที่ 3 ช่วงเวลา ได้แก่ ภายหลังจากการปลูกเชื้อทันที (0 HAI), ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง (24 HAI) และภายหลังจากการปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง (48 HAI) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร (Giorgi et al., 2009) พบว่า ภายหลังจากการปลูกเชื้อทันที (0 HAI), ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง (24 HAI) และภายหลังจากการปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง (48 HAI) มีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ PAL แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยภายหลังจากการปลูกเชื้อทันที กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม และสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® ที่ความเข้มข้น 600 ppm มีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL สูงสุด เท่ากับ 6.78 และ 5.91 รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm มีปริมาณเท่ากับ 5.20 $\mu\text{mol trans-cinnamic acid min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ตามลำดับ ต่อมาภายหลังจากการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง พบว่า กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม และสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® 600 ppm มีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL สูงสุด เท่ากับ 8.76 และ 7.96 รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยโคโตซานการค้า BIG® เท่ากับ 7.37 $\mu\text{mol trans-cinnamic acid min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ตามลำดับ และภายหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® 600 ppm และสารเคมีคาร์เบนดาซิมมีปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL สูงสุด เท่ากับ 7.17 และ 7.03 รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยโคโตซานการค้า BIG® เท่ากับ 6.59 $\mu\text{mol trans-cinnamic acid min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งแนวโน้มปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่ได้ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่ภายหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการปริมาณกรดซาลิไซลิกที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงที่สุดที่ภายหลังจากการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในใบอ่อนงุ่นพันธุ์มารูซีดเลสภายหลังจากกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซานและปลูกเชื้อ *S. ampelinum* ในระดับโรงเรือนทดลอง

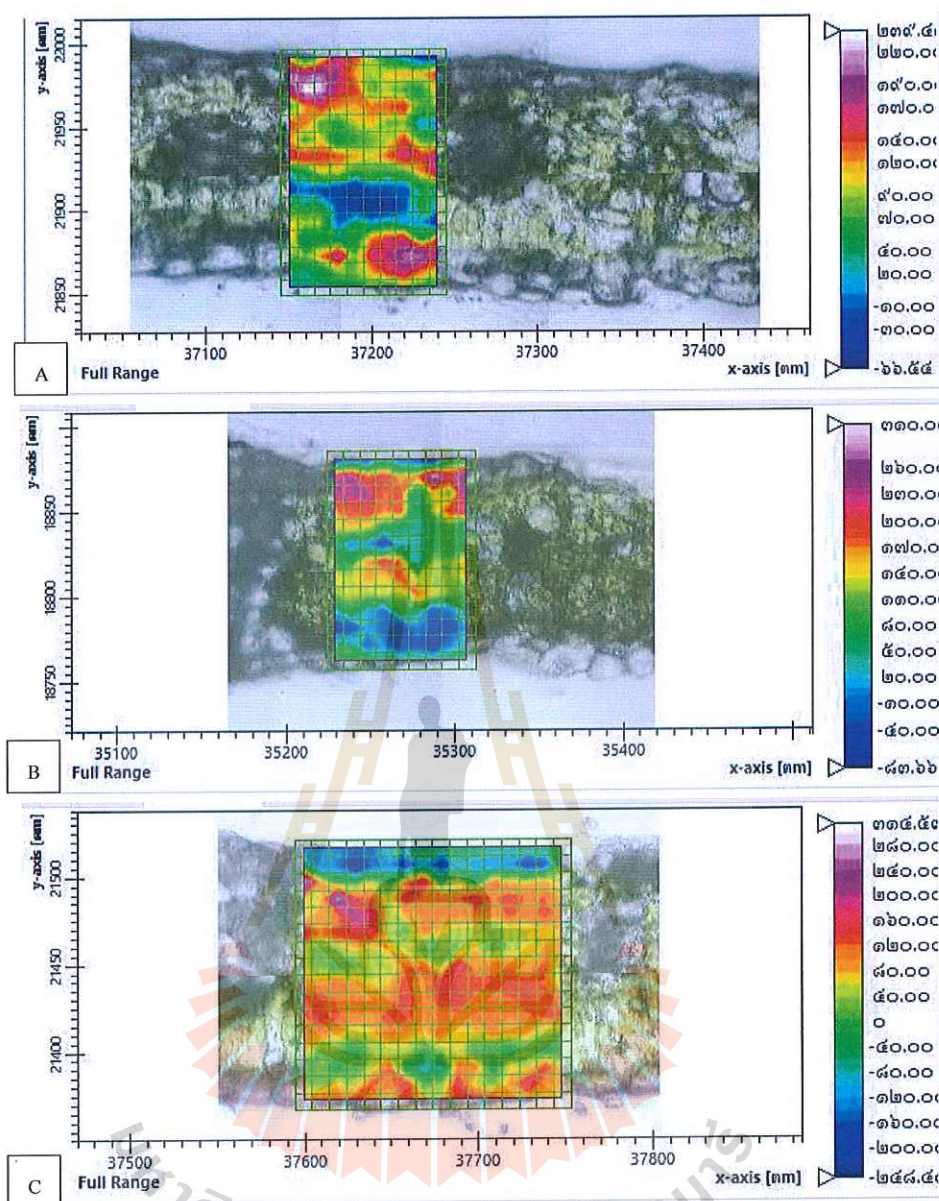
กรรมวิธีทดลอง	กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ($\mu\text{mol trans-cinnamic acid min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) ^{1/}		
	0 HAI ^{2/}	24 HAI	48 HAI
CHIZA4 [®] 600 ppm	5.91 b ^{3/}	7.96 b	7.17 a
CHIZA4 [®] 1,200 ppm	5.20 c	6.75 c	6.26 c
BIG [®]	5.00 cd	7.37 bc	6.59 b
Carbendazim	6.78 a	8.76 a	7.03 a
Control	4.84 d	5.99 e	5.50 d
F-test	**	*	**
CV (%)	0.34	5.12	0.43

^{1/}ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ภายหลังจากกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®], วัคซีนพีช BIG[®], สารเคมีคาร์เบนดาซิม และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน และภายหลังจากปลูกเชื้อ *S. ampelinum* ที่ 0, 24, 48 ชั่วโมง (Prakongkha et al., 2013); ^{2/}HAI = ชั่วโมงภายหลังจากปลูกเชื้อ *S. ampelinum*; ^{3/}ค่าเฉลี่ยที่แสดงได้จากค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ จากใบอ่อนงุ่น 2 ใบต่อต้น ตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT ($\alpha = 0.05$)

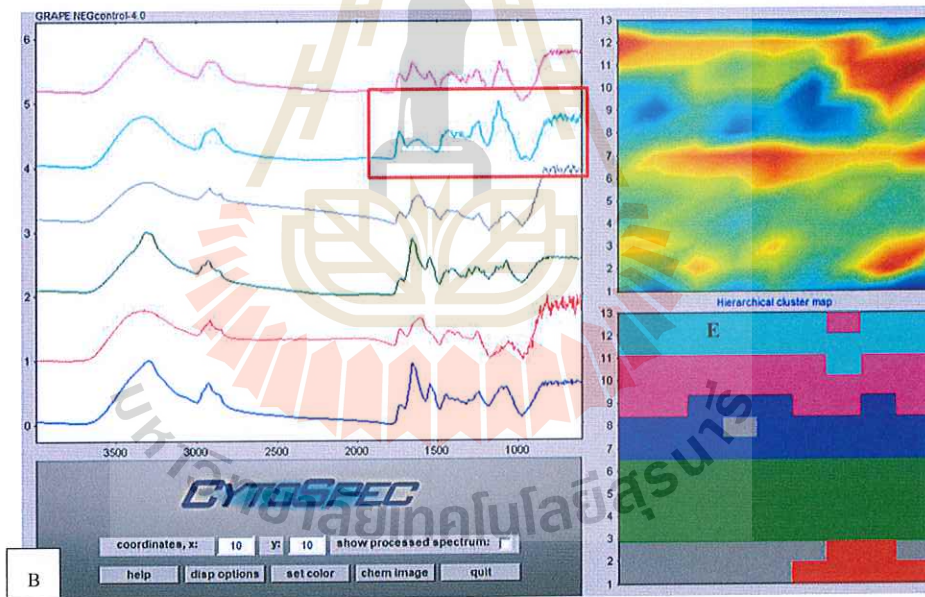
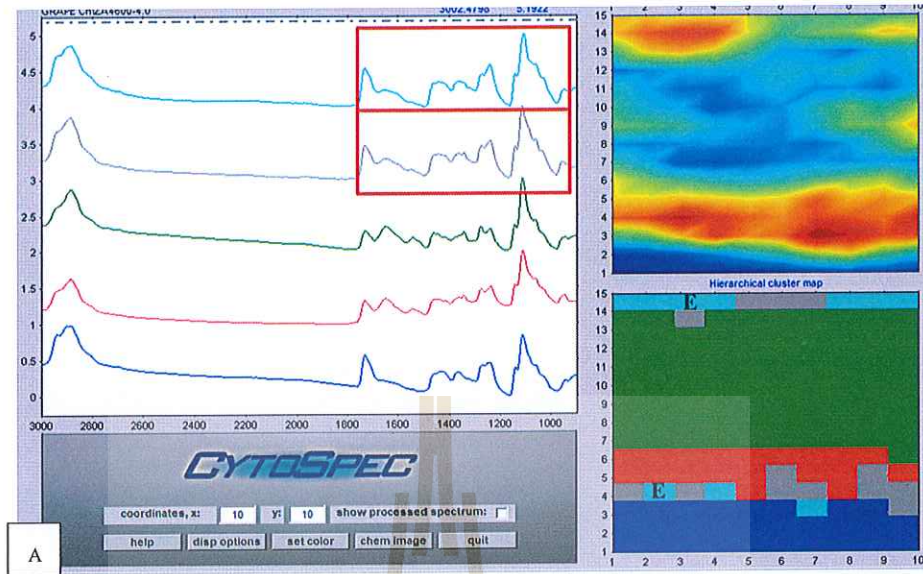
4.4.2 ศึกษากลไกการปกป้องตนเองของงุ่นด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy

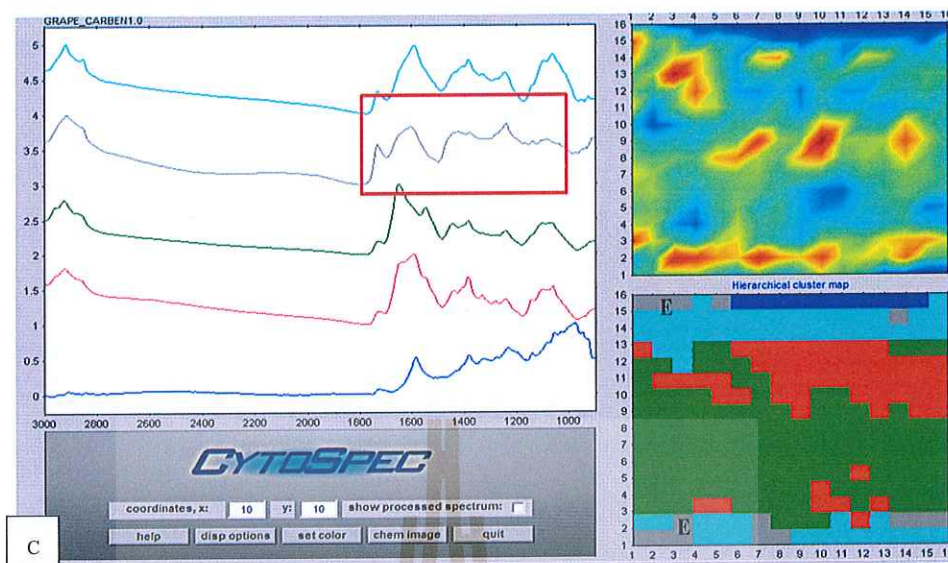
ทำการสุ่มคัดเลือกตัวอย่างใบอ่อนงุ่นในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] 600 ppm สารเคมีคาร์เบนดาซิม และกรรมวิธีควบคุม ภายหลังจากการปลูกเชื้อสาเหตุโรค เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีภายในเซลล์ของใบอ่อนงุ่นด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy โดยวัดในช่วงความยาวคลื่น $4000-800 \text{ cm}^{-1}$ รูรับแสงขนาด 10×10 ไมโครเมตร จำนวน 64 สแกน ทำการแยก cluster ของกลุ่มสี แล้วเลือกสเปกตรัมในเนื้อเยื่อใบอ่อนงุ่นชั้น epidermis และนำมาวิเคราะห์ principle component analysis (PCA) เพื่อแยกความแตกต่างของกลุ่มในเนื้อเยื่อใบอ่อนงุ่นชั้น epidermis (ภาพที่ 4.10 และ 4.11) จากนั้นนำสเปกตรัมมาทำการวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟเพื่อดูปริมาณสารชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่า แกน PC1 สามารถแยกกลุ่มสเปกตรัมของเนื้อเยื่อใบอ่อนงุ่นชั้น epidermis ระหว่างกลุ่มที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม ซึ่งจัดอยู่ในแนวแกนนอน ค่าลบ ออกจากกลุ่มที่พ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4[®] 600 ppm

และน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (control) (แนวแกนนอน ค่าบวก) ได้ที่ความแตกต่าง 67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สเปกตรัมของกลุ่มที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® 600 ppm ซึ่งจัดอยู่ในแนวแกน Z ค่าบวก ถูกแยกออกจากกลุ่ม control ซึ่งจัดอยู่ในแกน Z ค่าลบ ได้ที่ความแตกต่าง 7 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.12 โดยมีสเปกตรัมที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างที่ตำแหน่ง peak 1733 cm^{-1} (lipid), 1467 cm^{-1} (C-H bending), 1279 และ 1240 cm^{-1} (hemicellulose) 1146 ; 1115 และ 1062 cm^{-1} (polysaccharide) (ภาพที่ 4.13) จากนั้นนำสเปกตรัมที่ได้มาทำการวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟเพื่อตรวจสอบปริมาณสารชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่า ไบองุ่นที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® ที่ความเข้มข้น 600 ppm มีปริมาณสารในกลุ่มไขมัน และ polysaccharide ในเนื้อเยื่อสูงกว่าไบองุ่นที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อและสารเคมีคาร์เบนดาซิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ 0.019 และ 0.064 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยกรรมวิธีควบคุมมีปริมาณสารในกลุ่ม C-H bending และ hemicellulose สูงกว่าไบองุ่นที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® 600 ppm และสารเคมีคาร์เบนดาซิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ที่ 0.025 และ 0.031 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.14 สอดคล้องกับผลการทดลองด้วยเทคนิคทางชีวเคมีพืช โดยกรรมวิธีที่ฉีดพ่นไบองุ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® ที่ความเข้มข้น 600 ppm และสารเคมีคาร์เบนดาซิมจะมีปริมาณ SA และกิจกรรมเอนไซม์ Chitinase, และ PAL สูง สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy ซึ่งพบว่า มีปริมาณสารในกลุ่มไขมันและ polysaccharide สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม

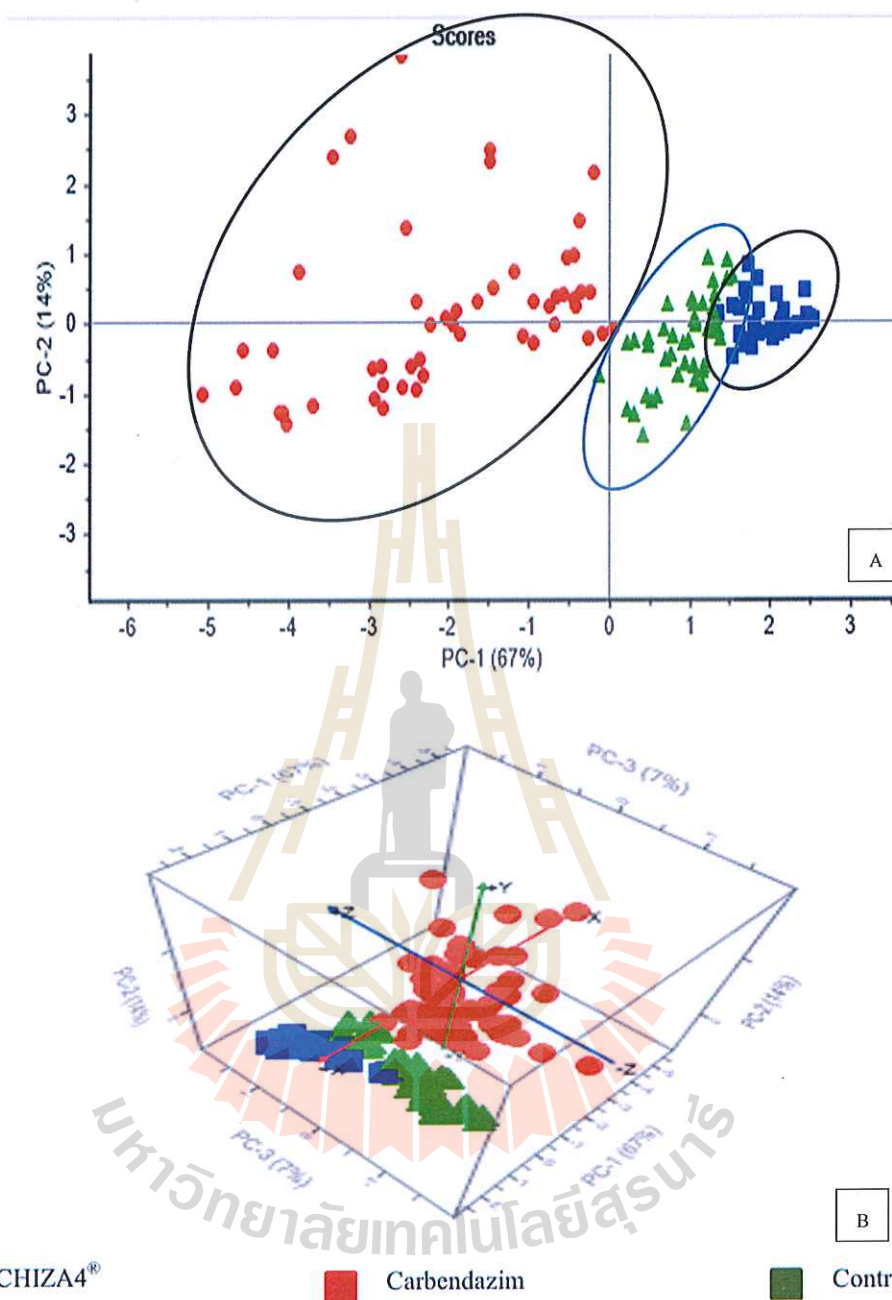


ภาพที่ 4.10 แสดงแผนที่อินฟราเรด (infrared mapping) โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.5 (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany) ของภาพตัดขวาง (cross section) เนื้อเยื่อไบบองุ่นพันธุ์มารูซีตเลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่นำไปตรวจสอบสารชีวเคมีใน เนื้อเยื่อชั้น epidermis โดยตรวจสอบกลุ่มไขมันชนิด C=O ester ($\sim 1740-1700\text{ cm}^{-1}$) กลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bending, hemicellulose และ polysaccharide ($\sim 1470-1350\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1300-1200\text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1200-1000\text{ cm}^{-1}$) และ protein amide I และ amide II ในช่วงความถี่ $1704-1566\text{ cm}^{-1}$ โดยสีแดงหมายถึง ปริมาณของสารชีวเคมีในเนื้อเยื่อมีปริมาณมาก สีน้ำเงินแสดงปริมาณสารชีวเคมีในเนื้อเยื่อมีปริมาณน้อย (ดาราวัต วิงษ์ชาติ, 2558) โดย (A) ไบบองุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จ ไคโตซาน CHIZA4[®] 600 ppm; (B) ไบบองุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (negative control) และ (C) ไบบองุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม

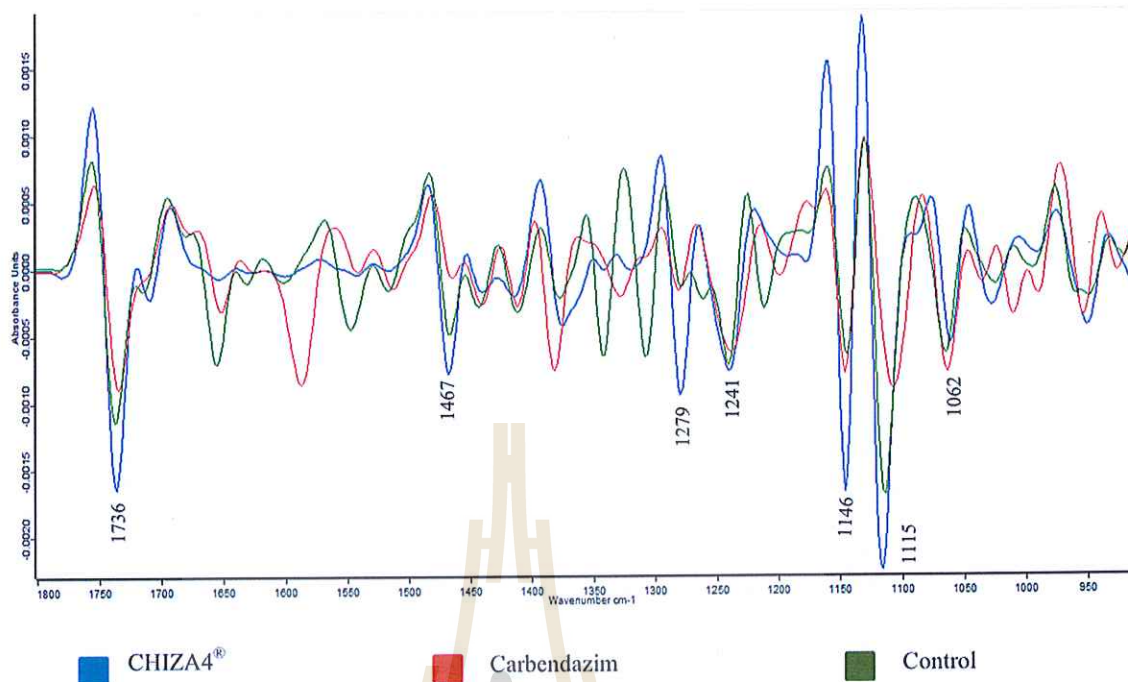




ภาพที่ 4.11 การแยก cluster ของกลุ่มสีเพื่อคัดเลือกสเปกตรัมของเนื้อเยื่อไบอูงุ่นพันธุ์มารูชีด-เลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิติเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในชั้น epidermis (ที่แสดงอักษร E) โดยใช้โปรแกรม CytoSpec 1.3 trial (Cytospec Inc., NY, USA) โดยคัดเลือกสเปกตรัมในกรอบสีแดงนำไปวิเคราะห์ Principle component analysis (PCA) (ดาราวัตติ วงษ์ชาติ, 2558) โดย (A) ไบอูงุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4® 600 ppm; (B) ไบอูงุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ (negative control) และ (C) ไบอูงุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม



ภาพที่ 4.12 การวิเคราะห์ principle component analysis (PCA) score ของเนื้อเยื่อ ใบบองุ่นพันธุ์มารู-ชิดเลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิปเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในชั้น epidermis โดยใช้โปรแกรม Unscrambler 9.7 (CAMO, Norway) (दारาวดี วงษ์ชาติ, 2558) ที่แสดงการแยกกลุ่มสเปกตรัมของใบบองุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® 600 ppm (สีน้ำเงิน); ใบบองุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (สีเขียว) และ ใบบองุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม (สีแดง); (A) PCA ที่แนวแกน PCA 1-2 ในระนาบ 2 มิติ; (B) PCA ที่แนวแกน PCA 1-2-3 ในแนว 3 มิติ



ภาพที่ 4.13 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (average FTIR spectrum) ของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อชั้น epidermis ของใบองุ่นพันธุ์มราูซิดเลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิติเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ณ ช่วงความถี่ 1800 - 900 cm^{-1} ในกลุ่มไขมันชนิด C=O ester ($\sim 1740\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) กลุ่มคาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bending, hemicellulose และ polysaccharide ($\sim 1470\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1300\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ และ $\sim 1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) ของใบองุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4® 600 ppm (สีน้ำเงิน); ใบองุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (สีเขียว) และใบองุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม (สีแดง)

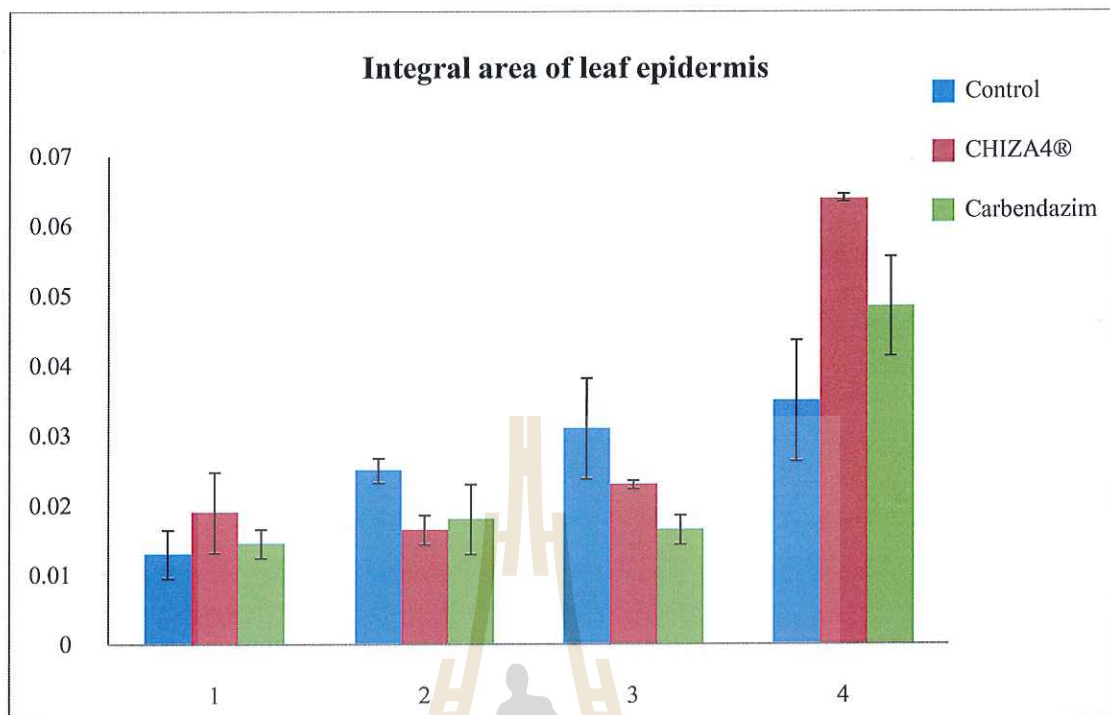
ตารางที่ 4.6 แสดงเปอร์เซ็นต์ปริมาณสารชีวเคมีในเนื้อเยื่อชั้น epidermis ของใบองุ่นพันธุ์มารูซีด-เลส ภายหลังจากกระตุ้นด้วยกรรมวิธีต่างๆ ทุก 7 วัน เป็นเวลา 7 ครั้ง และภายหลังจากการปลูกเชื้อ *S. amphelinum* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในระดับโรงเรือนทดลอง

กรรมวิธีทดลอง ^{2/}	ปริมาณสารชีวเคมี (เปอร์เซ็นต์)			
	1	2	3	4
	C=O ester 1740-1700	CH bending 1470-1350	hemicellulose 1300-1200	polysaccharide 1200-1000
CHIZA4 [®]	0.019±0.01a ^{1/}	0.017±0.00b	0.023±0.01b	0.064±0.01a
Control	0.013±0.00c	0.025±0.00a	0.031±0.00a	0.035±0.01c
Carbendazim	0.015±0.00b	0.018±0.01b	0.017±0.00c	0.049±0.01b
F-test	**	*	**	**
CV (%)	2.63	9.90	7.16	4.47

^{1/}ตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ DMRT ($\alpha=0.05$),

^{2/}กรรมวิธีที่ทดลองกลุ่มที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จ โคโตซาน CHIZA4[®] 600 ppm; น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ (control) และ สารเคมีคาร์เบนดาซิม พื้นที่ได้กราฟคำนวณโดยใช้โปรแกรม OPUS 7.5 software





ภาพที่ 4.14 แสดงเปอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟของสารชีวโมเลกุลในเนื้อเยื่อชั้น epidermis ใบของงุ่นพันธุ์มารูซีดเลสอายุ 2 เดือน ภายหลังจากฉีดพ่นอิลิซิเตอร์ 7 ครั้ง และปลูกเชื้อสาเหตุโรคเป็นเวลา 24 ชั่วโมง: ใบงุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® 600 ppm (สีแดง); ใบงุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (สีน้ำเงิน) และใบงุ่นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิม (สีเขียว) โดย 1 หมายถึง ปริมาณสารกลุ่มไขมัน C=O ester ($1740-1700\text{ cm}^{-1}$); 2 หมายถึง ปริมาณสารกลุ่ม CH bending ($1470-1350\text{ cm}^{-1}$); 3 หมายถึง ปริมาณสารกลุ่ม hemicellulose ($1300-1200\text{ cm}^{-1}$) และ 4 หมายถึง ปริมาณสารในกลุ่ม polysaccharide ($1200-1000\text{ cm}^{-1}$)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษากลไกการชักนำความต้านทานต่อโรคสแคบในองุ่นของสูตรสำเร็จโคโตซาน โดยทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อก่อโรค *S. ampelinum* โดยตรงในระดับห้องปฏิบัติการ และทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคระดับโรงเรือนทดลอง รวมถึงการศึกษากลไกการชักนำความต้านทานด้วยเทคนิคทางชีวเคมีพื้นฐาน และเทคนิคทางชีวเคมีระดับสูง สามารถสรุปได้ดังนี้

5.1 การแยกเชื้อด้วยเทคนิค tissue transplanting มีประสิทธิภาพในการแยกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบขององุ่น

โดยทำการล่อเชื้อก่อโรคให้สร้างเส้นใยบนอาหาร WA แล้วทำการเขี่ยเส้นใยมาเลี้ยงให้เจริญต่อบนอาหาร PDA (กรรณิการ์ และคณะ, 2537; ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553; อินชญา ประคองคำ, 2555) ซึ่งหลักการสำคัญในการแยกให้ได้เชื้อก่อโรคคือ การเลือกเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาแยกเชื้อ โดยจะต้องเลือกเก็บตัวอย่างใบองุ่นอ่อน ที่มีลักษณะแผลที่มีความสดใหม่ (กรรณิการ์ และคณะ, 2537; ขนิษฐา มากรุง, 2548; อินชญา ประคองคำ, 2555) คือเป็นจุดสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำขนาดเล็ก และมีวงสีเหลืองล้อมรอบ หากเก็บตัวอย่างใบองุ่นที่มีลักษณะแผลเป็นใบจุดทะเล จะไม่สามารถแยกเชื้อก่อโรคได้เนื่องจากแผลถูกเชื้อเข้าทำลายเป็นระยะเวลาานาน ทำให้มีเชื้ออื่น ๆ ปนเปื้อน และเมื่อเก็บตัวอย่างมาแล้วควรทำการแยกเชื้อในตู้ปลอดเชื้อทันที เมื่อเขี่ยเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ระยะเวลา 20 วัน เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี ตรงตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการสร้างโคนิเดียของเชื้อรา *S. ampelinum* จึงนำไปใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปได้ สอดคล้องกับวิธีการที่แนะนำโดย กรรณิการ์ และคณะ (2537); ขนิษฐา มากรุง (2548); มธุกร สมพงษ์ (2553); อินชญา ประคองคำ (2555) ทั้งนี้ ลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA จะมีลักษณะนูน ซึ่งเกิดจากการสร้างเส้นใยชูขึ้นไปในอากาศ เรียกว่า aerial mycelium และมีการเจริญเติบโตช้า (ณรงค์ ลิงห์บุระอุดม, 2547; อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์, 2553) ยากต่อการตรวจวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อในการทดลองประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จโคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคสแคบ ซึ่งอ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์ (2553) รายงานว่าอาหาร CA ทำให้เชื้อสร้าง aerial mycelium ได้น้อยที่สุด เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CA พบว่าเชื้อมีการเจริญแบบแผ่ขยาย

เต็มงานเพาะเชื้อ ที่มีการสร้าง aerial mycelium สอดคล้องกับคำแนะนำของอ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์ (2553) จึงเลือกใช้อาหาร CA เพื่อใช้ในการผสมสารละลายต่าง ๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคสแคบต่อไป

5.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรค (pathogenicity test) ในสภาพใบตัด (detach leave assay)

โดยฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตที่ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร พบว่าเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตที่แยกได้สามารถก่อโรคสแคบได้ โดยเชื้อราไอโซเลต GSUTMR02 มีความสามารถในก่อโรคสูงที่สุด ซึ่งถือว่าการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคในสภาพใบตัดให้ผลที่ดี มีความสะดวกต่อการทดลอง และใช้ระยะเวลาในการทดสอบที่รวดเร็ว เนื่องจากทำการบ่มในสภาพกล่องขึ้น สอดคล้องกับ Mo et al. (2007) ที่รายงานว่า การทดลองในสภาพใบตัดเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพในการทดสอบความต้านทานต่อการเกิดโรคราแป้งและราสนิมของถั่วเหลือง เช่นเดียวกับ Boyd et al. (2013) สามารถใช้วิธีนี้ในการทดสอบความต้านทานของข้าวสาลีต่อการเกิดโรคราสนิม

5.3 สูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา *S. ampelinum*

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อรา *S. ampelinum* พบว่า สูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 1,200 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคสูงที่สุดที่ 88.55% โดย 2% ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,200 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา 84.73% สอดคล้องกับ Park et al. (2001) ที่รายงานว่า เมื่อผสมไคโตซาน 57.3% DA (หมู่อะซิติลที่ถูกตัดออกจากโมเลกุล หรือ degree of deacytilation: DA) ที่ความเข้มข้น 1 mg.ml^{-1} (1,000 ppm) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Monosporascus cannonballus* ได้ 100% และยับยั้งเชื้อรา *Pythium irregular* ได้ 83.1% และสอดคล้องกับ Rahman et al. (2008) ที่รายงานว่าไคโตซานความเข้มข้น 1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 82% ในขณะที่ Edirisinghe et al. (2012) ทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกหวาน พบว่าเมื่อผสมไคโตซานที่มีมวล 50 kDa ละลายใน 0.5% acetic acid ที่ความเข้มข้น 1.5% และ 2% ลงในอาหาร PDA สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับ El Ghaouth et al. (1992) ที่พบว่า เมื่อผสมไคโตซานลงในอาหาร PDA ความเข้มข้น 6,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. cinerea* และ *Rhizopus stolonifera* ได้บางส่วน เช่นเดียวกับ Krol (2005) ที่พบว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อรา *Phomopsis*

viticola ได้แต่ไม่สมบูรณ์ แต่จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งความงอกของสปอร์มากกว่าเมื่อทดสอบในองุ่น โดยประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่แตกต่างกันของไคโตซานนี้ ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของไคโตซาน ได้แก่ มวลโมเลกุล, คุณสมบัติการละลาย รวมถึงจำนวนหมู่อะมิโนในโมเลกุลไคโตซาน โดยไคโตซานที่มีมวลโมเลกุลต่ำ <math>< 10 \text{ kDa}</math> จะสามารถละลายน้ำได้ดีและโมเลกุลมีประจุบวกมาก มีความเป็นพิษกับเชื้อก่อโรคสูงกว่าไคโตซานที่มีมวลโมเลกุล 10-100 kDa (Tayel et al., 2010) ทั้งนี้ จะต้องพิจารณาจำนวนหมู่อะมิโนของโมเลกุลประกอบด้วย ซึ่งไคโตซานที่มีจำนวนหมู่อะมิโนมาก หรือไคโตซานที่มีเปอร์เซ็นต์ DA สูง เมื่อตัดหมู่อะมิโนออกไปจะเหลือประจุรวมที่เป็นบวกมากกว่า สามารถจับกับประจุลบของผนังเซลล์เชื้อราก่อโรค (Park et al., 2001) โดย Tayel et al. (2010) กล่าวว่า กลไกที่แท้จริงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าเกิดจากการจับตัวกันของประจุบวกของไคโตซานและประจุลบของผนังเซลล์เชื้อราก่อโรค (Stossel and Leuba, 1984) ทำให้ไคโตซานสามารถซึมผ่านเข้าไปในผนังเซลล์เชื้อรา ทำให้เกิดรอยร้าวทั้งภายนอกและภายในเซลล์ เกิดการบวกรบกวนการสังเคราะห์ DNA และ mRNA ของเชื้อ (Hardwiger and Loschke, 1981) และมีผลทำให้เซลล์เชื้อราตายในที่สุด ทั้งนี้ ในการทดลองนี้ยังได้ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคโดยใช้ไคโตซานการค้า BIG[®] ซึ่งมีส่วนผสมหลักคือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มาใช้ในการเปรียบเทียบ รวมถึงกรดอะซิติกความเข้มข้น 1% ซึ่งเป็นตัวทำลายของสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] และ 2% ไคโตซาน เป็นกรรมวิธีควบคุมเพื่อตรวจสอบว่าคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคของสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] นั้นเกิดจากคุณสมบัติของไคโตซานหรือเกิดจากความเข้มข้นของตัวทำลาย พบว่า สูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ที่ความเข้มข้น 75, 150 และ 300 ppm ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ในวันที่ 7 และ 14 ในขณะที่กรดอะซิติก 1% ที่ความเข้มข้น 75 และ 150 ppm สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ในวันที่ 14, 21 และ 28 ในขณะที่ความเข้มข้น 300 ppm สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ทั้ง 4 ช่วงเวลา คือ 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยอาหาร CA ที่ผสมกรดอะซิติก 1% มีค่าความเป็นกรดต่างที่ 2.79 ส่วนอาหารที่ผสมสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] มีค่าความเป็นกรดต่างที่ 4.68 สอดคล้องกับ Tayel et al. (2010) ที่รายงานว่า ค่าความเป็นกรดต่างนั้นมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามค่าความเป็นกรดต่างที่ลดลงจาก 7.0 – 4.5 ซึ่งที่ค่า 4.5 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการเกิดกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค และการยับยั้งจะค่อยๆ ลดประสิทธิภาพลงเมื่อค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.0 ดังนั้น การที่กรดอะซิติก 1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ อาจเนื่องมาจากค่าความเป็นกรดที่มากเกินไป ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา ไม่ได้เกิดกลไกการยับยั้งต่อเชื้อราก่อโรคดังที่กล่าวมา ในขณะที่ไคโตซานการค้า BIG[®] มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ดี ตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 150, 300, 600 และ 1,200 ppm เนื่องจากมีส่วนประกอบหลักคือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งมีมวลโมเลกุลเล็กกว่าไคโตซาน สามารถละลายน้ำและมีประจุบวกมาก

จึงสามารถจับตัวกับประจุลบของผนังเซลล์เชื้อรา ยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ดี (Tayel et al., 2010; Lodhi et al., 2014; Yin et al., 2016)

5.4 สูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคสแคบและชักนำความต้านทานในองุ่น

จากการทดสอบประสิทธิภาพการลดการเกิดโรคสแคบในองุ่น โดยการฉีดพ่นสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] ระดับโรงเรือนทดลอง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 600 ppm สามารถลดการเกิดโรคสแคบได้ 87.64% เทียบเท่ากับสารเคมีคาร์เบนดาซิมที่ลดโรคได้ 74.9% โดยภายหลังการฉีดพ่นอิลิซิเตอร์เป็นเวลา 7 ครั้ง และปลูกเชื้อราสาเหตุโรคภายหลังการฉีดพ่นครั้งสุดท้าย 7 วัน พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ สูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4[®] สามารถส่งเสริมให้องุ่นพันธุ์มารูซีดเลสมีการสะสมปริมาณกรดซาลิไซลิก, กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และกิจกรรมของเอนไซม์ PAL เช่นเดียวกับสารเคมีคาร์เบนดาซิม โดยแนวโน้มของปริมาณกรดซาลิไซลิกจะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค และลดลงที่เวลา 48 ชั่วโมง สอดคล้องกับชัยมณ ฝิวทอง (2558) ที่รายงานว่า ภายหลังการฉีดพ่นไคโตซานความเข้มข้น 1000 ppm องุ่นพันธุ์มารูซีดเลสจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารชีวเคมีสูงที่สุดในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค แสดงให้เห็นว่าใบองุ่นเมื่อมีการชักนำให้เกิดความต้านทาน จะมีการส่งสัญญาณและสร้างสารชีวเคมีอื่น ๆ ในการปกป้องตนเองและ SA จะเริ่มลดลงเมื่อองุ่นเริ่มแสดงอาการของโรค เช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง สอดคล้องกับ Kim and Hwang (2014) ที่รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่เกิดจากยีน *CaPAL1* ในพริกไทยมีผลต่อการสังเคราะห์กรดซาลิไซลิกอิสระ (free salicylic) ที่เป็น โมเลกุลส่งสัญญาณที่สำคัญในกระบวนการปกป้องตนเองของพืช โดยเมื่อยีน *CaPAL1* แสดงออกมาก เกิดกิจกรรมเอนไซม์ PAL มาก จะพบการสังเคราะห์กรดซาลิไซลิกเพิ่มสูงขึ้น ขณะเดียวกันเมื่อ ยีน *CaPAL1* ไม่แสดงออก เกิดกิจกรรมเอนไซม์ PAL ต่ำ การสังเคราะห์กรดซาลิไซลิกจะต่ำไปด้วย เนื่องจากเอนไซม์ PAL เป็นเอนไซม์สำคัญของ phenylpropanoid pathway ที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลที่สำคัญในกระบวนการปกป้องตนเองของพืชและเป็นพืชต่อเชื้อก่อโรค ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ chitinase จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นที่เวลา 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง สอดคล้องกับ Gupta et al. (2012) ที่ศึกษาปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ chitinase และ β -1-3 glucanase ในผักกาดกั้ว (Eruca sativa) พันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ พบว่าที่อายุ 1 เดือน ผักกาดกั้วพันธุ์ต้านทานมีการปริมาณของกิจกรรมเอนไซม์ chitinase และ β -1-3 glucanase สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ภายหลังการปลูกเชื้อ *Alternaria brassicicol*

นอกเหนือจากการประสิทธิภาพในการลดโรค และการเปลี่ยนแปลงของกรดซาลีไซลิก และเอนไซม์ปกป้องตนเองแล้ว เมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy พบว่า ในเนื้อเยื่อใบอ่อนงุ่นพันธุ์มารูซิดเลสที่ฉีดพ่นด้วยสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4® ความเข้มข้น 600 ppm มีปริมาณสารในกลุ่มไขมันกลุ่ม C=O ester และ polysaccharide สูงกว่ากรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิมและน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อที่มีปริมาณสารในกลุ่ม CH-bending และ hemicellulose สูงกว่าสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4® และสารเคมีคาร์เบนดาซิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งในเซลล์พืชมีไขมันเชิงประกอบ (compound lipid) คือ ฟอสโฟลิปิด (phospholipid), ไกลโคลิปิด (glycolipid) และลิโปโปรตีน (lipoprotein) ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช ส่วนคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญต่อทั้งการทำงานและโครงสร้างของพืช โดยจะพบโพลีแซคคาไรด์หรือคาร์โบไฮเดรตในองค์ประกอบของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปแบบของเซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose), ไคติน (chitin), ลิกนิน (lignin) และเพกติน (pectin) (ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์, 2545; คาราวดี วงษ์ชาติ, 2558) การฉีดพ่นสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4® ส่งผลให้อุ่นมีการสะสมสารชีวเคมีดังกล่าวเพื่อส่งเสริมกระบวนการปกป้องตนเองเช่น สารกลุ่ม flavonoid ที่เป็นพืชต่อเชื้อก่อโรค หรือการสะสมสารประเภทคาร์โบไฮเดรตเสริมสร้างความแข็งแรงบริเวณผนังเซลล์พืช ทำให้เชื้อก่อโรคเข้าทำลายได้ยาก (Kim and Hwang, 2014) สอดคล้องกับผลการทดลองของชานนทร์ แสงจันทร์ (2557) ที่มีการใช้เทคนิค Fourier transformed infrared spectroscopy ศึกษาการสะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโตหลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* ไอโซเลต CaSUT007 และกรดซาลีไซลิก พบกลุ่มไขมันชนิด C-H stretching กลุ่มไขมันชนิด C=O ester มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แต่ในกลุ่ม คาร์โบไฮเดรตชนิด C-H bonding, C-O stretching และ polysaccharide มีปริมาณลดต่ำลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีเหล่านี้ มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโต และกระตุ้นให้พืชเกิดความแข็งแรงและสามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคนำและในผักกาดเขียวปลีได้ เช่นเดียวกับการทดลองของคาราวดี วงษ์ชาติ (2558) ที่ใช้เทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีของใบพริกที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus* ไอโซเลต D604 พบว่าปริมาณของไขมัน ในกลุ่ม C=O ester, CH-bending, hemicellulose และ polysaccharide ในเนื้อเยื่อสูงกว่าใบพริกที่พ่นด้วยน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ ซึ่งมีผลทำให้พริกมีการเจริญเติบโตที่ดี เพิ่มผลผลิต และมีความต้านทานต่อโรคแอนแทรกคโนส นอกจากนี้รัชมนน ผิวทอง (2557) ศึกษากลไกปกป้องตนเองของงุ่นพันธุ์มารูซิดเลสด้วยเทคนิค FT-IR พบว่า กรรมวิธีที่ใช้สาร SecCaSUT007 และกรรมวิธีที่ใช้ไคโตซาน มีการเปลี่ยนแปลงไปของสารในกลุ่ม lipid, C=O ester, amide protein, CH bending, cellulose,

hemicellulose และ carbohydrate แตกต่างกันในแต่ละกรรมวิธีการทดลองและเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลา หลังการปลูกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่มีปริมาณสารในกลุ่ม CH-bending และ hemicellulose สูงกว่าสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® และสารเคมีคาร์เบนดาซิม อาจเนื่องมาจากสารในกลุ่ม CH-bending นั้นประกอบไปด้วย ethylene (คาราวดี วงษ์ชาติ, 2558) ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและกลไกการปกป้องตนเองของพืชที่เกิดจากบาดแผลและแมลงรวมถึงเกี่ยวข้องกับ jasmonic acid pathways ซึ่งปริมาณของกรดซาลิไซลิกนั้นมีแนวโน้มผกผันกับปริมาณของ JA และ ethylene (Verhagen et al., 2006) และที่เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อรา พบว่าสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® และสารเคมีคาร์เบนดาซิม มีปริมาณกรดซาลิไซลิกสูงกว่าน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จึงส่งผลให้สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® และสารเคมีคาร์เบนดาซิมพบสารในกลุ่ม CH-bending ต่ำกว่าน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และนอกจากนี้ อาจเกิดการสังเคราะห์ hemicellulose ต่ำลง และเพิ่มการสังเคราะห์ cellulose และ lignin จับตัวกันเป็น lignocellulose ภายหลังจากการเกิดกระบวนการปกป้องตนเองของพืช (Vogt, 2010; Jönsson and Martín, 2016) และอาจเกิดการสลาย hemicellulose (hemicellulosic hydrolysates formed) ในกระบวนการสะสม phenolic acid ต่าง ๆ (Jönsson and Martín, 2016) ที่นำไปใช้ในกระบวนการสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลที่เป็นพิษต่อเชื้อก่อโรค จึงส่งผลให้กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อที่มีปริมาณสารในกลุ่ม hemicellulose สูงกว่าสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® และสารเคมีคาร์เบนดาซิม

นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่ากรรมวิธีที่ฉีดพ่นใบองุ่นด้วยสารเคมีคาร์เบนดาซิมนั้น มีการเกิดกลไกในการชักนำความต้านทานของพืช นั่นคือ ปริมาณกรดซาลิไซลิกและกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่เพิ่มขึ้น ณ เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ รวมถึงกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase ที่เพิ่มขึ้น ณ เวลา 48 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ruiz et al. (1999) ที่ได้ศึกษาการฉีดพ่นสารเคมีคาร์เบนดาซิมร่วมกับธาตุอาหารโบรอน (Boron: B) พบว่า เมื่อฉีดพ่นสารเคมีคาร์เบนดาซิมและโบรอนในใบยาสูบ โดยไม่ได้ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรค พบว่า ในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นสารเคมีคาร์เบนดาซิมเพียงอย่างเดียวนั้นมีการเพิ่มของกิจกรรมเอนไซม์ PAL 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ยังมีปริมาณ total phenols เพิ่มสูงขึ้น 35% จากกรรมวิธีควบคุม นอกจากนี้ ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PAL นั้นมีความเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) โดยเอนไซม์ PPO จะทำการ catalyze สารประกอบ phenol ไปเป็นสารในกลุ่ม quinones (Thipyapong et al., 1995; Ruiz et al., 1999) ซึ่ง PPO ยังถือว่าเป็น PR-protein ที่สำคัญและเชื่อมโยงกับ PR-protein ชนิดอื่นๆ ทั้งนี้ กลไกที่แท้จริงของสารเคมีคาร์เบนดาซิมในการชักนำความต้านทานพืชนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการชักนำความต้านทานพืชโดยใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมต่อไป

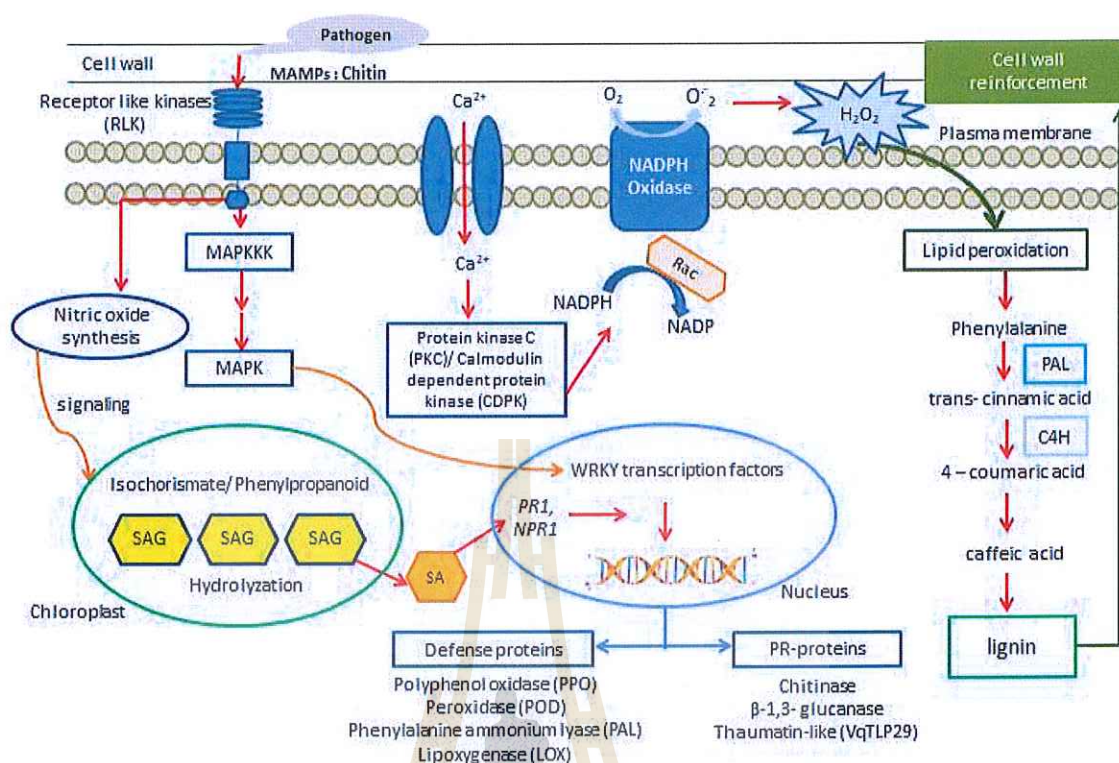
5.5 กลไกการชักนำความต้านทานในอณูของสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4®

การศึกษากลไกการชักนำความต้านทานในอณูพันธุ์มารูซิดเลส ของสูตรสำเร็จไคโตซาน CHIZA4® พบว่า การฉีดพ่นสูตรสำเร็จไคโตซานสามารถชักนำให้พืชมีความต้านทานและเกิดกลไกในการปกป้องตนเองได้ โดยภายหลังการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคที่ 0 - 24 ชั่วโมง อณูจะเกิดกระบวนการรับรู้และจดจำโมเลกุลที่คล้ายคลึงกับเชื้อสาเหตุโรค (microbial-associated molecular patterns: MAMPs) เช่น ไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา ที่ตรวจจับโดยตัวรับสัญญาณภายนอก plasma membrane (extracellular receptor-like kinases: RLKs) จากนั้นส่งสัญญาณผ่านกระบวนการ MAP kinase cascades จากนั้นจะเกิดการ transcription อย่างรวดเร็วผ่าน WRKY transcription factors (Dry et al., 2010) เพื่อทำการสังเคราะห์โปรตีน VqTLP29 ซึ่งเป็นโปรตีนประเภท thaumatin-like protein ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของอณู (Yan et al., 2017) โดยกลไกแรกที่เกิดขึ้นคือการเปิดปิดของ ion channel ที่อยู่ระหว่าง plasma membrane เกิดการสังเคราะห์ active oxygen species (AOS) เช่น O_2^- และ H_2O_2 หรือเรียกว่าการเกิด oxidative burst รวมถึงการเกิด phosphorylation หรือ dephosphorylation ของโปรตีน kinase ที่มีความสำคัญในการส่ง signaling network เพื่อกระตุ้นกลไกการปกป้องตนเองขึ้นตอนอื่นๆ (Thakur and Sohal, 2013) ขณะเดียวกันก็มีการสร้าง SA ที่มีหน้าที่ส่งสัญญาณ resistance สังเคราะห์จาก isochlorogenic acid pathway ในคลอโรพลาสต์ มี ICS1 เป็นเอนไซม์ที่สำคัญ (Seyfferth et al., 2014) โดย Yan et al. (2017) รายงานว่า อณูจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ ICS1 เพิ่มขึ้นและลดลงภายใน 12-24 ชั่วโมง ภายหลังจากที่เชื้อรา *E. necator* และ *B. cinerea* เข้าทำลายโดยเกี่ยวข้องกับโปรตีน VqTLP29 และ Ca^{2+} -dependent protein kinase โดย SA จะไปกระตุ้นการทำงานของ SA-defense ยีน ได้แก่ *PR1* และ *NPR1* เกิดการ transcription สังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ เพื่อให้สร้างสารชีวเคมีที่เป็น induced biochemical defense เช่น glycoprotein, fatty acid, carbohydrates peptides และ phytohormones ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ โครงสร้างพืชที่เป็น induced structural defenses เช่น cutinase, cellulose, hemicellulose, lignin และ เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น β -1,3-glucanase, chitinase, PPO, PAL และ POD เป็นต้น (Vickers et al., 2009; Loreto et al., 2001; Belinky et al., 2003; Miedes et al., 2014; Trouvelot et al., 2014; ธัญมน พิฆทอง, 2558) โดยในการศึกษารุ่นนี้พบว่าอณูจะมีการสังเคราะห์สารในกลุ่ม phenolic compound เพื่อสังเคราะห์เป็น lignin และสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ ที่ช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงของผนังเซลล์ผ่านกระบวนการ phenyl propanoid pathway โดยมีเอนไซม์สำคัญคือ เอนไซม์ PAL ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงภายหลังจากการถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย จากนั้นจะเกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ chitinase ที่มีผลในการทำลายเชื้อราสาเหตุโรคโดยตรง เนื่องจากผนังเซลล์เชื้อราประกอบไปด้วย chitin เอนไซม์ chitinase จะไปย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราให้ไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ (Trouvelot et al., 2014) โดยพบว่า การสังเคราะห์เอนไซม์

chitinase นี้ จะเกิดขึ้นที่เวลา 24-48 ชั่วโมง ภายหลังจากการที่เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย ดังแสดงในภาพที่ 5.1 สอดคล้องกับ Guest and Brown (1997) ที่ได้กล่าวสรุปเกี่ยวกับระยะเวลาที่สัมพันธ์กับการเกิดกลไกการปกป้องตนเองของพืชไว้ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงระยะเวลาที่สัมพันธ์กับการเกิดกลไกการปกป้องตนเองของพืช

เวลา	กลไกการปกป้องตนเองที่เกิดขึ้น
นาที	<ul style="list-style-type: none"> - เกิดการทำลายผนังเซลล์พืชโดยเชื้อสาเหตุโรค เกิดรอยร้าวบริเวณผนังเซลล์พืช และการไหลเข้าออกที่ผิดปกติของไอออน - เกิดการสร้าง reactive oxygen species - เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง phytoalexin
ชั่วโมง	<ul style="list-style-type: none"> - เกิดกระบวนการ oxidative burst - เกิดกระบวนการ membrane lipid peroxidation - เพิ่มปริมาณ SA เพื่อส่งสัญญาณกระตุ้นกลไกความต้านทาน - เกิดการสังเคราะห์ phytoalexin - เกิดกระบวนการ cell wall reinforcements เสริมสร้างความแข็งแกร่งของผนังเซลล์จากลิกนินและสารประกอบฟีนอล
วัน	<ul style="list-style-type: none"> - เกิดการสังเคราะห์ pathogenesis-related proteins (PR-protein) - เกิดการกระตุ้นความต้านทานในเนื้อเยื่อที่ห่างไกล (SAR)



ภาพที่ 5.1 แสดงกลไกการปกป้องตนเองขององุ่นภายหลังการถูกกระตุ้นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน และปลูกเชื้อรา *S. ampelinum* สาเหตุโรคสแคบขององุ่น

5.6 การศึกษากลไกการปกป้องตนเองของพืชภายหลังถูกกระตุ้นด้วยเทคนิค synchrotron FT-IR microspectroscopy

การศึกษากลไกการปกป้องตนเองของพืชด้วยเทคนิคนี้ถือเป็นวิธีการทางเลือกที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง เนื่องจากทำให้สามารถเห็นภาพรวมของปริมาณสารชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละกลุ่มของแต่ละกรรมวิธีการทดลอง เช่น กลุ่มคาร์โบไฮเดรต กลุ่มโปรตีน และกลุ่มไขมันของกรรมวิธีการทดลองสูงกว่าหรือต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม ทำให้ประหยัดเวลาในการศึกษากลไกการปกป้องตนเองของพืช โดยสามารถเจาะจงเลือกกลุ่มสารชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปไปศึกษาต่อโดยใช้เทคนิคชีวเคมีพื้นฐาน หรือเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ อีกทั้งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างง่าย ใช้สารเคมีในการตรวจสอบน้อย (คาราวดี วงษ์ชาติ, 2558) จึงถือเป็นวิธีการศึกษากลไกการปกป้องตนเองของพืชที่ดีควบคู่กับเทคนิคชีวเคมีพื้นฐาน และเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ เพื่อให้ทราบรายละเอียดของกลไกการปกป้องตนเองของพืชได้อย่างถ่องแท้และแม่นยำมากยิ่งขึ้น

5.7 แนวทางการนำสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® ไปใช้ในระบบเกษตรปลอดภัย

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสแคบขององุ่นได้ใน 2 ลักษณะ คือ 1) การเป็นพืชต่อเชื้อราสาเหตุโรค ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคโดยตรง และ 2) ชักนำให้องุ่นมีกลไกความต้านทานสามารถปกป้องตนเองได้จากการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค โดยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® ฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 600 ppm คิดเป็น 300 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ทุก ๆ 7 วัน สามารถควบคุมโรคสแคบได้เทียบเท่ากับสารเคมีคาร์เบนดาซิมในระดับโรงเรือนทดลอง การใช้สูตรสำเร็จโคโตซานจึงเป็นแนวทางที่ดีในการลดใช้สารเคมีควบคุมโรคในการผลิตองุ่น ทั้งนี้ สูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® นั้น มีตัวทำละลายคือกรดอะซีติก 1% จึงยังไม่สามารถนำไปใช้ในระบบเกษตรอินทรีย์ได้ ซึ่งหากต้องการนำไปใช้ในระบบเกษตรอินทรีย์อาจสามารถทำได้โดยย่อยโมเลกุลของโคโตซานให้เล็กลงอยู่ในระดับ โคลิโกลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก สามารถละลายน้ำได้ โดยมีการศึกษาการย่อยโคโตซานเป็นโคลิโกลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์มากมาย อาทิ เช่น การเอนไซม์ chitosanase ย่อยโคโตซานให้เป็นโคลิโกลิโกแซคคาไรด์ (Jeon et al., 2001; Qin et al., 2004; Lodhi et al., 2014) และในปี 2004 Sorbotten et al. ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ chitinase B ที่สกัดได้จากแบคทีเรียแกรมลบ *Serratia marcescens* รวมถึง Jung and Park (2014) ที่ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ chitinase, chitosanase และ lysozyme ใน การย่อยโคโตซานให้เป็นโคลิโกลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งโคลิโกลิโกแซคคาไรด์หรือ COS มีประสิทธิภาพในการช่วยชักนำความต้านทานพืชให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคต่าง ๆ และยังสามารถละลายน้ำได้เป็นโมเลกุลเล็ก สามารถนำไปใช้ในแนวทางการผลิตองุ่นหรือพืชอินทรีย์ได้

ทั้งนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบต้นทุนในการฉีดพ่นสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® ที่ความเข้มข้น 600 ppm กับสารเคมีคาร์เบนดาซิม พบว่าสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® มีต้นทุนอยู่ที่ 70.6 บาทต่อลิตร เมื่อฉีดพ่นตามอัตราแนะนำ 300 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร คิดเป็นเงิน 21.18 บาทต่อการฉีดพ่น 1 ครั้ง รวมฉีดพ่น 7 ครั้งมีต้นทุนเท่ากับ 148.26 บาท ขณะที่สารเคมีคาร์เบนดาซิมมีต้นทุนอยู่ที่ 1,650 บาทต่อลิตร ฉีดพ่นตามอัตราแนะนำ 20 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร คิดเป็นเงิน 33 บาทต่อการฉีดพ่น 1 ครั้ง รวมฉีดพ่น 7 ครั้งมีต้นทุนเท่ากับ 231 บาท ดังนั้น เมื่อฉีดพ่นองุ่นด้วยสูตรสำเร็จโคโตซาน CHIZA4® ที่ความเข้มข้น 600 ppm ทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 7 ครั้ง จะมีต้นทุนต่ำกว่าการฉีดพ่นสารเคมีคาร์เบนดาซิม 82.47 บาท ต่อการฉีดพ่นครั้งละ 20 ลิตร

รายการอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2548). สถิติแสดงแหล่งเพาะปลูกปี 2543 – 2547. ฝ่ายข้อมูลสำหรับเกษตรกร กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมวิชาการเกษตร. (2559). สสำรวจรวบรวมและจำแนกเชื้อราแป้งสาเหตุโรคพืช. **คลังผลงานวิจัยและเอกสารเผยแพร่ กรมวิชาการเกษตร ผลงานวิจัยและพัฒนา ปี 2553.** [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.doa.go.th/research/showthread.php?tid=727>
- กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. (2536). โรคสแคปขององุ่น (*Sphaceloma ampelinum* de Bary). **วารสารวิชาการเกษตร.** 11(2).
- กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอภิรัชต์ สมฤทธิ์. (2544). การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคสแคปของฝรั่งในประเทศไทย. **ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา.** 11(3): 2-12.
- กรรณิการ์ เพ็ญนภักตร์. (2547). *Sphaceloma* spp. สาเหตุโรคสแคปของพืชต่าง ๆ ในประเทศไทย. **เอกสารวิชาการ 25/2547.** 67 หน้า.
- กาญจนา ธรรมนุ. (2553). การใช้แสงซินโครตรอนร่วมกับเทคนิค FTIR Spectroscopy และ Microscope ในงานวิเคราะห์และวิจัยด้านต่างๆ. **วารสารเทคโนโลยี.** 10(71): 70 - 71.
- กาญจนา ธรรมนุ. (2555). เทคนิค FTIR spectroscopy และ Microscope ในงานวิเคราะห์และวิจัย. **วารสารเทคโนโลยี.** 37(212): 95-96.
- กานต์ คำทรัพย์. (2546). ชีววิทยาความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และการควบคุมโดยใช้สารเคมีของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคปขององุ่น. **วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.** 134 หน้า.
- เกษม สร้อยทอง. (2532). **การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี.** คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 326 หน้า.
- ชนิษฐา มากรุ่ง. (2548). การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคปในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ. **วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.** 77 หน้า.
- จิ่งแท้ ศิริพานิช. (2549). **สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้.** พิมพ์ครั้งที่ 6. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 396 หน้า.
- จิราพรธณี หุมมาลี และ ขวัญตา หทัยทัศน์. (2558). กรดเบนโซอิก (benzoic acid). [ออนไลน์]. ได้จาก:

<http://www.siamchemi.com/%E0%B8%81%E0%B8%A3%E0%B8%94%E0%B9%80%E0%B8%9A%E0%B8%99%E0%B9%82%E0%B8%8B%E0%B8%AD%E0%B8%B4%E0%B8%81/>

ชานนทร์ แสงจันทร์. (2557). การควบคุมโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* ในผักกาดเขียวปลีโดยใช้ความต้านทานจากสิ่งกระตุ้น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 95 หน้า.

ชาลิตี สังขจร, ชนิตรา โพธิคเวษฐ์, นวลจันทร์ ภูคลัง, และ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย. (2556). บทบาทของไคโตซานต่อการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 44 (3): 538-542.

ณรงค์ สิงห์ระอุดม. (2547). ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของสารพิษสกัดหยาบของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC4201003.pdf>

ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ. (2547). การระบุชนิดเชื้อสาเหตุ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ และการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 102 หน้า.

ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ, มรุกร สมพงษ์, รุ่งทิพย์ สังข์เผือก, ชัญมน ผิวทอง, ชานนทร์ แสงจันทร์, กาญจนา ชรรมนู และ วราภรณ์ ตัณฑนุช. (2555). การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการควบคุมการเกิดโรคใบไหม้มันสำปะหลังด้วยเทคนิค IR. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.slri.or.th/th/index.php?option=com>.

คาราวดี วงษ์ชาติ. (2558). ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กษ์ *Bacillus* สูตร encapsulate ในการควบคุมโรคแอนแทรก โนสของพริก. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 130 หน้า.

ชัญมน ผิวทอง. (2557). การใช้สารทุติยภูมิจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 และไคโตซานชักนำความต้านทานต่อโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 119 หน้า.

นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. (2556). กลไกการต้านทานโรคของพืช. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 31(3): 76-82.

นลินา เหมสนิท และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. (2552). *Pseudomonas fluorescens* SP007s กระตุ้นให้คะน้ำสร้าง salicylic acid เพื่อต้านทานการเกิดโรคขอบใบทอง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47

นันทกร บุญเกิด. (2546). คู่มือการสร้างสวนองุ่น. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยี

- การเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 36 หน้า.
- นิพนธ์ วิสารทนนท์. (2542). โรคองุ่น. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตรหมอฟืช-ไม้ผล ฉบับที่ 5.กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 45 หน้า.
- นุกูล อินทระสังขา. (2551). **วิทยาเชื้อรา**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. 245 หน้า
- ปฎิวิทย์ ลอยพิมาย, ทิพวรรณ ผาสกุล และ ราตรี มงคลไทย. (2554). เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกรวมของเปลือกผลไม้. **วิทยาศาสตร์เกษตร**. 42(2) (พิเศษ): 385-388
- ประภัสสร สุรวฒน์วารรณ. (2554). ไคติน - ไคโคซาน [ออนไลน์] ได้จาก :
<http://www.gpo.or.th /rdi/html/chitin.html>
- ประสาทพร สมิตะมาน. (2537). **โรคพืชวิทยา**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 338 หน้า.
- ปิยะดา ตันตสวัสดิ์. (2554). การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ต้านทานศัตรูพืช. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 206 หน้า.
- ปิยะดา ชีระกุลพิสุทธิ์. (2545). สรีรวิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพของพืชเบื้องต้น. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. โรงพิมพ์คลังน่านาวิทยา.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. (2532). การชักนำให้พืชสร้างภูมิคุ้มกันโรค. **วารสารวิชาการเกษตร**. กรมวิชาการเกษตร. 7(1).
- ไพโรจน์ จ้วงพานิช. (2525). **หลักวิชาโรคพืช**. หนังสืออิเล็กทรอนิกส์ .มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://ag-ebook.lib.ku.ac.th/index.php/component/content/article/251>
- มธุกร สมพงษ์. (2553). ความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Sphaceloma* spp. สาเหตุโรคสแคบขององุ่นกับพืชชนิดอื่น. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต** มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 71 หน้า.
- ยงยุทธ ชำรงนิมิตร. (2547). **โรคไม้ผล**. อักษรสยามการพิมพ์. ภาณีเจริญ กรุงเทพมหานคร. หน้า 119.
- ยุทธศักดิ์ เขียมไชยศรี, อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ ชารทิพย์ ภาสบุตร. (2553). สำนักรวบรวมและจำแนกเชื้อราแป้งสาเหตุโรคพืช. **คลังผลงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร**. [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=769>
- รวินิภา ศรีมูถ และ ศิริจันทร์ ตาใจ. (ม.ม.ป.). ปริมาณฟีนอลรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำผลไม้แปรรูปในจังหวัดจันทบุรี. คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี

- รังสิมา วิเศษศรี และ วัฒนา พัฒนากุล. (2555). อิทธิพลของกรดซาลิไซลิกต่อการเจริญเติบโตและ เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ของข้าวโพดข้าวเหนียวในสภาวะขาดน้ำ. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 13. มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- รัฐพล ฉัตรบรรยงค์. (2551). เทคนิคการปลูกองุ่นในเมืองไทย ชุด โครงการผลิตเอกสารวิชาการ เผยแพร่แก่เกษตรกร เรื่องที่ 9. หนังสืออิเล็กทรอนิกส์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://ag-ebook.lib.ku.ac.th/index.php/component/content/article/308>
- วัฒนา สวรรยาธิปัติ. (2531). การปลูกองุ่น. โครงการคู่มือประกอบอาชีพสำหรับประชาชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 42 หน้า.
- วิไลพร ปองเพียร. (2551). การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผักแม้ว. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์
- วิทย์ นามเรืองศรี. (2554). องุ่น: แมลงศัตรูองุ่น. ไทยเกษตรศาสตร์. [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://www.thaikasetsart.com/องุ่นแมลงศัตรูองุ่น-2/>
- ศิริชัย กัลยาณรัตน์. (2548). ผลของ Salicylic acid ต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. Postharvest Newsletter. 4(2): 1-3.
- สมเดช กนกเมธากุล. (2547). สเปกโทรสโกปีในการพิสูจน์โครงสร้างสารอินทรีย์. ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 17-22
- สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. (2554). สรีรวิทยาการพัฒนาริพ. คลังน่านาวิทยา, กรุงเทพฯ.
- สุดฤดี ประเทืองวงศ์, ชัยสิทธิ์ ปรีชา, สุพจน์ กาเข้ม และ จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์. (2554). แบคทีเรียพืชเพื่อพืช ที่มีคุณสมบัติเป็นปุ๋ย ฮอร์โมนพืช และฆ่าเชื้อโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุรทิน ใจดี. (2553). ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อผลผลิตและคุณภาพขององุ่นรับประทานผลสดในเขตร้อนชื้น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 61 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2559). นำเข้า-ส่งออก สินค้าที่สำคัญ (Agricultural import-export): องุ่น. ระบบแสดงข้อมูลทางสถิติ. [ออนไลน์]. ได้จาก:
http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php
- อภิรดา มีเดช. (2556). ปัญหาสารตกค้างในผักผลไม้. Waymagazine. [ออนไลน์]. ได้จาก:
<http://waymagazine.org/สารตกค้าง/>
- อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์. (2553). ความหลากหลายของเชื้อ ความต้านทาน และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล สำหรับยีนต้านทานเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรครสแคบ (แอนแทรก)

โนส) ในองุ่น. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 174 หน้า.

อิณชญา ประคองคำ. (2555). การควบคุม โรคสแคบในองุ่นที่เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary โดยใช้ความต้านทานที่เกิดจากการกระตุ้น. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 55 หน้า.

Agrios, G. N. (1997). **Plant Pathology** 4th. Academic Press New York. 635 pp.

Aubel, G., Buonatesta, R. and Cutsem, P. V. (2014). COS-OGA: A novel oligosaccharidic elicitor that protects grapes and cucumbers against powdery mildew. **Crop Protection**. 65: 129-137.

Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhucq, L., Jeandet, P., Couderchet, M. and Vernet, G. (2006). Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. **Phytopathology**. 96(11): 1188-1194.

Barka, E. A., Eullaffroy, P., Clement, C. and Vernet, G. (2004). Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. **Plant Cell Reports**. 22: 608-614.

Belinky, P. A., Flikshtein, N., Lechenko, S., Gepstein, S. and Dosoretz, C. G. (2003). Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**. 69(11): 6500-6506.

Bostock, R. M. (2005). Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annu. Rev. Phytopathol.** 43: 545-580.

Boubakri, H., Mohamed, A. W., Julie, C., Christophe, B., Ahmed, M., Isabelle, S. G. (2012). Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host defense responses, including HR like-cell death. **Plant Physiology and Biochemistry** 57: 120-133.

Bouranis, L. D., Chorianopoulou, N. S., Protonotarios, E. V., Siyiannis, F. V. and Hawkesford, J. M., (2007). Localization of reactive oxygen species and lignification in leaves of young sulphate-deprived maize plants. **Functional Plant Science and Biotechnology**. 1(2): 347-354.

Boydton, A., Dawit, W. and Getaneh, W. (2013). Evaluation of detached leaf assay for assessing leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) resistance in wheat. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**. 4(5): 1-4.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities

- of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72(1-2): 248-254.
- Bradley, D. J., Kjellbom, I. and Lamb, C.J. (1992). Elicitor- and wound induced oxidative cross-linking of a plant cell wall proline-rich protein: A novel, rapid defense response. **Cell**. 70: 21-30.
- Brook, P.J. (1973). Epidemiology of grapevine anthracnose, caused by *Elsinoe ampelina*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**. 16(3): 333-342.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. and Jones, R. L. (2000). Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, USA.
- Buensanteai, N., Dusit, A., Tiyaikhon, C., Gary, Y. Y. and Sutruedee, P. (2008). Extracellular proteome of *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 and its effect on enhanced growth promotion and induced resistance against bacterial pustule on soybean plant. **Kasetsart journal. (Nat. Sci.)** 42: 13-26
- Buensanteai, N., Gary, Y. Y. and Sutruedee, P. (2009). Priming, signaling, and protein production associated with induced resistance by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. **World J Microbiol Biotechnol**. 25: 1275-1286
- Carisse, O. and Lefebvre, A. (2011). Evaluation of northern grape hybrid cultivars for their susceptibility to anthracnose caused by *Elsinoe ampelina*. **Plant Management**. 10: 1094.
- Casassola, A., Brammer, S, P., Chaves, M, S., Martinelli, J, A., Stefanato, F. and Boyd, L, A. (2014). Changes in gene expression profiles as they relate to the adult plant leaf rust resistance in the wheat cv. Toropi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 2015(89): 49-54.
- Chakraborty, N., Chandra, S. and Acharya, K. (2014). Sublethal heavy metal stress stimulates innate immunity in tomato. **The Scientific World Journal**. 2015: 1-7.
- Chong, J., Pierrel, M. A., Atanassova, R., Werck-Reichhart, D., Fritig, B. and Saindrenan, P. (2001). Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. Induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. **Plant Physiology**. 125: 318-328.
- Chowdhury, J., Henderson, M., Schweizer, P., Burton, R. A., Finocher, G. B. and Little, A. (2014). Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated

- versus penetrated papillae on leaves of barley infected with *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. **New Phytologist**. 204(3): 650-660.
- Chunhua, S., Ya, D., Bingle, X., Xiao, L., Yonshu, X. and Qinguang, L. (2001). The purification and spectral properties of PPO I from Nicotianan tababcum. **Plant Molecular Biology**. 19: 301–314.
- Compant, S. and Mathieu, F. (2016). Biocontrol of Major Grapevine Diseases: Leading Research. [online]. Available: <https://books.google.co.th/books?id=EEwjDAAAQBAJ&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
- Dalisay, R. F. and Kuć, J. J. (1995). Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plant. **Physiology and Molecular Plant Pathology**. 47: 315-327.
- Davies, W. J. and Jones, H. G. (1991) **Abscisic acid: Physiology and biochemistry**. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK.
- Donnini, S., Orto, D. M. and Zocchi, G. (2010). Oxidative stress responses and root lignification induced by Fe deficiency conditions in pear and quince genotype. **Tree Physiology**. 31: 102-113.
- Dry, I. B., Feechan, A., Anderson, C., Jermakow, A. M., Bouquet, A., Adam-Blondon, A. F. and Thomas, M. R. (2010). Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. 16: 94-105.
- Edirisinghe, M., Ali, A., Maqbool, M. and Alderson, P. G. (2012). Chitosan controls postharvest anthracnose in bell pepper by activating defense-related enzymes. **Journal of Food Science and Technology**. 51(12): 4078–4083.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J. and Asselin, A. (1992). Effect of chitosan and other polyions on chitin deacetylase in *Rhizopus stolonifer*. **Experimental Mycology**. 16(3): 173-177.
- Ellett, C. W. (1957). The parasitic fungi of Ohio plants. Department of Botany and Plant Pathology, The Ohio State University. **Ohio Journal Science**. 57(4): 236-242.
- Food and Agriculture. (2007). Grape [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/grape>

- Gacharnaah. (2015). Disease cycle of *Elsinoe ampelina*, causal agent of Anthracnose in grapes. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Elsinoe_ampelina#/media/File:Grape_Anthracoise_Disease_Cycle.jpg
- Giorgi, A., Mingozi, M., Madeo, M., Speranz, G. and Cocucci, M. (2009). Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (*Achillea collina* Becker ex Rechb). **Food Chemistry**. 114(2009): 204-211.
- Gubler, W. D., Smith, R. J. and Varela, L. G. (2006). Grape powdery mildew. **Grape: UC IPM Pest Management Guidelines**. USA. University of California ANR Publication. 3448: 85-90.
- Guest, D. and Brown, J. (1997). **Plant defences against pathogens**. [Online]. Available: [https://www.appsnet.org/Publications/Brown_Ogle/17%20Defence%20mechanisms%20\(DIG&JFB\).pdf](https://www.appsnet.org/Publications/Brown_Ogle/17%20Defence%20mechanisms%20(DIG&JFB).pdf)
- Gupta, P., Ravi, I. and Sharma, V. (2012). Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. **Journal of Plant Interactions**. 8(2): 155-161.
- Halfeld-Vieira, B. A., Vieira, J. R. J., Romeiro, R. S., Silva, H. S. A. and Baracat-Pereira, M. C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 41(8): 1247-1252.
- Hamiduzzaman, M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J. and Mani, B. (2005). β -aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 18: 819-829.
- Hammerschmidt, R. and Kuć, J. A. (1982). Lignification as a mechanism for induced resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**. 20: 61-71.
- Herman, M. A. B., Davidson, J. K. and Smart, C. D. (2008). Induction of plant defense gene expression by plant activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in greenhouse-grown tomatoes. **Phytopathology**. 98(11): 1226-1232.
- Hoitink, H. A. J., Madden, L. V. and Dorrance, A. E. (2006). Systemic Resistance Induced by *Trichoderma* spp.: Interactions Between the Host, the Pathogen, the Biocontrol Agent, and Soil Organic Matter Quality. **Phytopathology**. 96(2): 186-189.

- Huang, N., Ling, H., Liu, F., Su, Y., Su, W., Mao, H., Zhang, X., Wang, L., Chen, R. and Que, Y. (2018). Identification and evaluation of PCR reference genes for host and pathogen in sugarcane-*Sporisorium scitamineum* interaction system. **MBC Genomics**. 19(479): 1-13.
- Jeon, Y. J., Park, P. J. and Kim, S.K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydrate Polymers**. 44: 71-76.
- Jönsson, L. J. and Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**. 199(2016): 103–112.
- Jung, W. J. and Park, R. D. (2014). Bioproduction of chitooligosaccharides: Present and perspectives. **Marine Drugs**. 12(11): 5328–5356.
- Katoch, R., Mann, A. P. S. and Sohal, B. S. (2005). Enhanced enzyme activities and induction of acquired resistance in pea with elicitors. **Journal of Vegetation Science**. 11: 67–83.
- Kaur, S., Sarkar, B. C., Sharma, H. K. and Singh, C. (2009). Response surface optimization of conditions for the clarification of guava fruit juice using commercial enzyme. **Journal of Food Process Engineering**. 34(4): 1298-1318.
- Kaur, A., Kumar, A. and Reddy, M, S. (2017). Plant–pathogen interactions: a proteomic approach. **Anal Bioanal Chem**.
- Kim, D. S., Hwang, B. K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. **Journal of Experimental Botany**. 65(9): 2295–2306.
- Kloepper, J. W. and Schroth, M. N., (1975). Association of *in vitro* antibiosis with inducibility of increased plant growth by *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**. 12: 136.
- Król, E. (2005). Chitosan activity in an inhibit of *in vitro* growth of *Phomopsis viticola* and protection of grapevine canes against the pathogens. **Phytopathology**. 39: 155–162
- Kwan, Y, M., Meon, S. Ho, C, L. and Wong, M, Y. (2016). Selection of reference genes for quantitative real-time PC normalization in Ganoderma-infected oil palm (*Elaeis guineensis*) seedlings. **Australians Plant Pathology**. 45(261): 8.
- Leon, J., Yalpani, N., Raskin I. and Lawton, M. A. (1993). Induction of benzoic Acid 2-hydroxylase in virus-inoculated Tobacco. **Plant Physiology**. 103(2): 323-328.
- Le Than. (2015). Efficacy and mechanism of inducers triggering induced resistance in rice against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing bacterial leaf blight disease. **Degree of Doctor**

of Philosophy in Crop Science Thesis. Suranaree University of Technology. 195 p.

- Llorens, E., García-Agustín, P. and Lapeña. L. (2016). Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. **Scientia Agricola.** 74(1): 90-100.
- Lodhi, G., Kim, Y. S., Hwang, J. W., Kim, S. K., Jeon, Y. J., Je, J. Y., Ahn, C. B. et al. (2014). Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications. **BioMed Research International.** 2014: 1-13.
- Loreto, F., Mannozi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F. and Pasqualini, S. (2001). Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. **Plant Physiology.** 126(3): 993-1000.
- Mandal, S. (2010). Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. **African Journal of Biotechnology.** 9: 8038-8047.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W. and Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Front Plant Sci.** 5: 358.
- Mo, J. Y., Navi, S. S., Li, X., Guo, T. and Yang, X. B. (2007). Detached leaf assay: A rapid screening technique to study foliar diseases of soybean. **Plant Pathology Presentations and Posters.** Iowa State University.
- OECD. (2003). OECD guideline for the testing of chemicals proposal for a new guideline 227 terrestrial plant test: vegetative vigour test . [online]. Available: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/11988186.pdf>
- Palmieri, M. C., Perazzolli, M., Matafora, V., Moretto, M., Bachi, A. and Pertot, I. (2012). Proteomic analysis of grapevine resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 reveals specific defense pathways activated against downy mildew. **Journal of Experimental Botany.** 63(17): 6237-6251.
- PAN Pesticides database. (2016). Pesticide Use on Wine Grapes in 2012. **PAN Pesticides Database – California Pesticide Use.** [online]. Available: <http://www.pesticideinfo.org/DS.jsp?sk=29143>
- Park, R. D., Kyu, J. J., You, Y. J., Yu, L. J., Kil, Y. K., Jae, H. S. and Yong, W. K. (2001). Variation of antifungal activities of chitosan on plant pathogens. **Journal of Microbiology and Biotechnology.** 12(1): 81-88.

- Pearson, R. C. and Goheen, A. C. (1998). Compendium of grape disease. USA: **The American Phytopathological Society**.
- Peng, J., Bao, Z., Ren, H., Wang, J. and Dong, H. (2004). Expression of harpin_{xoo} in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive response. **Phytopathology**. 94: 1048–1055.
- Prasannath, K. (2017). Plant defense-related enzymes against pathogens: A Review. **Research Gate**. 11(1): 38-48.
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J. and Du, Y. (2006). Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**. 63: 367-374.
- Rahman, M. A., Mahmud, T. M. M., Kadir, J., Abdul Rahman, R. and Begum, M. M. (2008). Antimicrobial activities of chitosan and calcium chloride on *in vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides* from papaya. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**. 31(2): 223–232.
- Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Biology**. 43: 439-463.
- Raskin, I., Turner, I. M., and Melander, W. R. (1989). Regulation of heat production in fluorescence of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. **Proceeding of National Academy of Science, USA**. 86: 2214-2218.
- Reissig, J., Strominger, J. L. and Lelior, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. **The Journal of Biological Chemistry**. 217: 959-966.
- Renault, A. S., Deloire, A. and Bierne, J. (1996). Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis*. 35: 49-52.
- Repka, V. (2001). Elicitor – stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. **Biology Plantarum**. 44: 555-565.
- Riaz, A., Riaz, A., Rattu A. U. R., Tahir, M. I. and Azeem, M. (2014). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and peroxidase activity in brown rust infected tissues of Pakistani Wheat cultivars. **Pakistan Journal of Botany**. 46(3): 1101-1107.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M. A., Kunjeti, S. A., Donofrio, N. M., Czymbek, K. J., Paré, P. W. and Bais, H. P., (2010). The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Communicative & Integrative Biology**. 3(2): 130-138.
- Ruiz, J. M., Garcia, P. C., Rivero, R. M. and Romero, L. (1999) Response of phenolic metabolism

- to the application of carbendazim plus boron in tobacco. **Physiologia Plantarum** 106: 151–157.
- Sathiyabama, M. and Balasubramanian, R. (1998). Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. **Crop Protection**. 17: 307–313.
- Seyfferth, C. and Tsuda, K. (2014). Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. **Frontiers in Plant Science**. 5(2): 697.
- Shear, C. L., (1929). The life history of *Sphaceloma ampelina*. de Bary and *Gloeosporium ampelophagum* Sac. **Phytopathology**. 19(7): 673 – 679.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V. K., Dixon, R. A. and Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defence mechanisms. **Plant Cell**. 9: 261–270.
- Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. and Varum, K. M. (2004). Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. **PubMed**. 272(2).
- Stössel, P. and Leuba, J. L. (1984). Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi. **Journal of Phytopathology**. 111(1): 82-90.
- Sutton, B.C. and Pollack, F.G. (1973). *Gloeosporium cercocarpi* and *Sphaceloma cercocarpi*. **Mycologia**. 65: 1125 – 1134.
- Tayel, A. A., Moussa, S., El-Tras, W. F., Knittel, D., Opwis, K. And Schollmeyer, E. (2010). Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 47: 454–457.
- Taylor, A. (2015). Downy mildew of grapevines. [online]. Available: <https://www.agric.wa.gov.au/table-grapes/downy-mildew-grapevines>
- Thakur, M. and Sohal. S. B. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. **ISRN Biochemistry**. 2013: 1-10.
- Thipyapong, P., Hunt, M. D., Steffens, J. C. (1995). Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. **Phytochemistry**. 40: 673-676.
- Thomma, B. P. H. J., Nurnberger, T. and Joosten. M. H. A. J. (2011). PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. **Plant Cell**. 23: 4-15.

- Tronsmo, A. (1992). Leaf and blossom epiphytes and endophytes as biological agents of plant diseases. **A life sciences**. 230: 43-54.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, V. and Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**. 114: 405–413.
- Trouvelot, S., Héloir, M. C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M. et al. (2014). Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. **Frontiers in Plant Science**. 5: 1-14.
- Verhagen, B. W. M., Van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J. (2006). Induced disease resistance signaling in plants. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. 3: 334-343.
- Verhagen, B. W. M., Patricia, T. A., Michel, C., Monica, Hfte. and Aziz, A. (2011). *Pseudomonas* spp. induced systemic resistance to *Botrytis cinereais* associated with induction and priming of defence responses in grapevine. **Journal of Experimental Botany**. 61(1): 249-260.
- Vickers, C. E., Possell, M., Cojocariu, C. I., Velikova, V. B., Laothawornkitkul, J., Ryan, A., Mullineaux, P. M. and Hewitt, C. N. (2009). Isoprene synthesis protects transgenic tobacco plants from oxidative stress. **Plant, Cell and Environment**. 32(5): 520-531.
- Vimala, R. and Suriachandraselvan, M. (2009). Induced resistance in bhendi against powdery mildew by foliar application of salicylic acid. **Journal of Biopesticides**. 2(1): 111–114.
- Vleesschauwer, D.D., Djavaheri, M., Bakker, A. H. M. P. and Höfte, M. (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-Induced Systemic Resistance in Rice against *Magnaporthe oryzae* Is Based on Pseudobactin-Mediated Priming for a Salicylic Acid-Repressible Multifaceted Defense Response. **Plant Physiology**. 148(4): 1996-2012.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**. 3(1): 2-20.
- Walrets, D. R. (2011). Plant defense: Warding off attack by pathogens, herbivores, and parasite plants. Wiley-Backwell, West Sussex, UK.
- Westover, F. (2014). Frost or Fungi? How will your grape leaves meet their postharvest fate?. [online]. Available: <http://www.vineyardadvising.com/wpcontent/uploads/2013/09/DM-up-down.png>
- Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M. and Birch, P. R. J., Hein, I. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop

- protection. **Frontiers in Plant Science**. 5(655): 1-13.
- Wilcox, W. F. (2013). **Grape disease control**. Department of Plant Pathology, Cornell University.
- Williams, M., Senaratna, T., Dixon, K. and Sivasithamparam, K. (2003). Benzoic acid induces tolerance to biotic stress caused by *Phytophthora cinnamomi* in *Banksia attenuate*. **Plant Growth Regulation**. 41(1): 89–91.
- Xing, K., Zhu, X., Peng, X. and Qin, S. (2015). Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**. 35: 569–588.
- Yan, X., Qiao, H., Zhang, X., Guo, C., Wang, M., Wang, Y. and Wang, X. (2017). Analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) thaumatin-like protein (TLP) gene family and demonstration that *TLP29* contributes to disease resistance. **Scientific Reports**. 7(4269): 1-14.
- Yao, Y. A., Wang, J., Ma, X. M., Lutts, S., Sun, C., Ma, J., Yang, Y., Achal, V. and Xu, G. (2012). Proteomic analysis of Mn-induced resistance to powdery mildew in grapevine. **Journal of Experimental Botany**. 63(14): 5155–5170.
- Yin, H., Du, Y. and Dong Z. (2016). Chitin oligosaccharide and chitosan oligosaccharide: two similar but different plant elicitors. **Frontiers in Plant Science**. 7:522.



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

1.1 Water Agar (WA)

วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมวุ้นผงกับน้ำกลั่น นำไปต้มจนเดือดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

1.2 Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose หรือ Glucose	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตรจนนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำสกัดผสมน้ำตาล dextrose ทั้งหมดลงในน้ำสกัด นำไปผสมกับวุ้นผงที่ต้มจนละลายแล้วด้วยน้ำส่วนที่เหลือ คนให้เข้ากัน เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำเข้านึ่งฆ่าเชื้อ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

1.3 Cereal Agar (CA)

ธัญพืชสำเร็จรูป	20	กรัม
- ข้าวโอ๊ต	37%	
- ข้าวสาลี	32%	
- ข้าวไรย์	15%	
- ข้าวข้าว	5%	
- ข้าวบาเลย์	4%	
- เมล็ดทานตะวัน	7%	
น้ำตาล Dextrose หรือ Glucose	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำธัญพืชมาต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตรจนเดือด ธัญพืชนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำสกัดผสมน้ำตาล dextrose ทั้งหมดลงในน้ำสกัด นำไปผสมกับวุ้นผงที่ต้มจนละลายแล้วด้วยน้ำส่วนที่เหลือ คนให้เข้ากัน เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำเข้านึ่งฆ่าเชื้อ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดชาติไซติกและเอนไซม์

2.1 0.02 M Ferric ammonium sulfate

Ferric ammonium sulfate	4.82	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

2.2 1 M Tris – HCl, pH 8.0

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

2.3 1 M KCl

KCl	74.56	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2.4 1 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

PMSF	174.20	กรัม
Isopropanol	1,000	มิลลิลิตร
เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส		

2.5 3% Triton-x 100

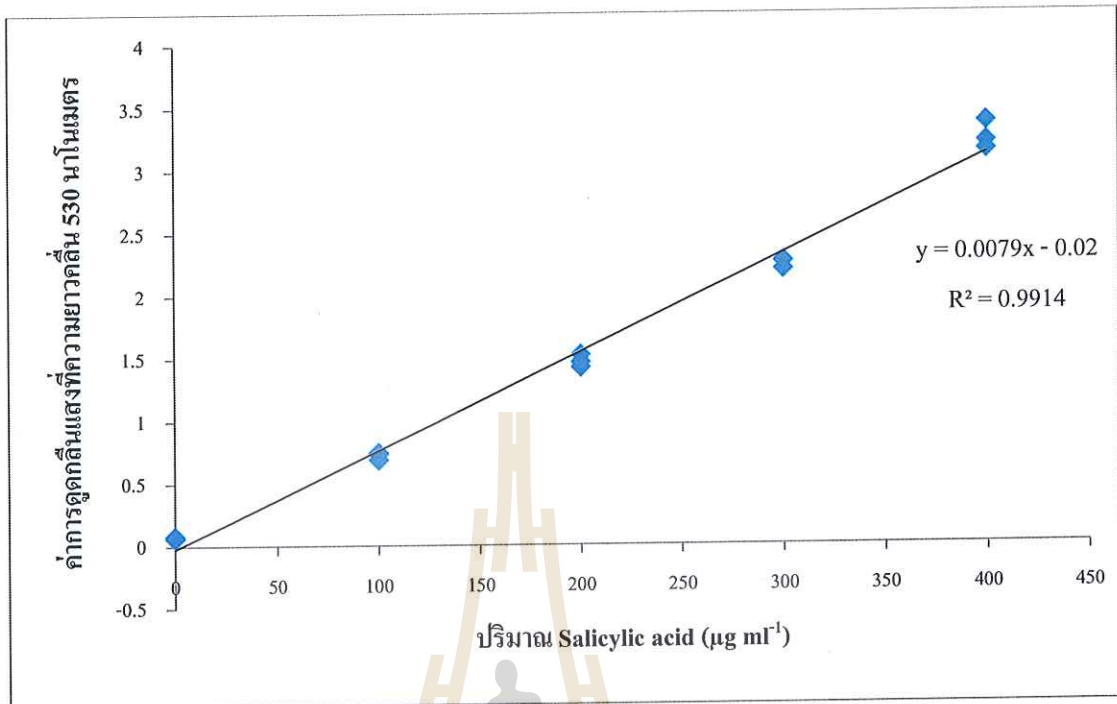
Triton-x 100	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	97	มิลลิลิตร
เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส		

2.6 10 mM borate buffer, pH 8.8

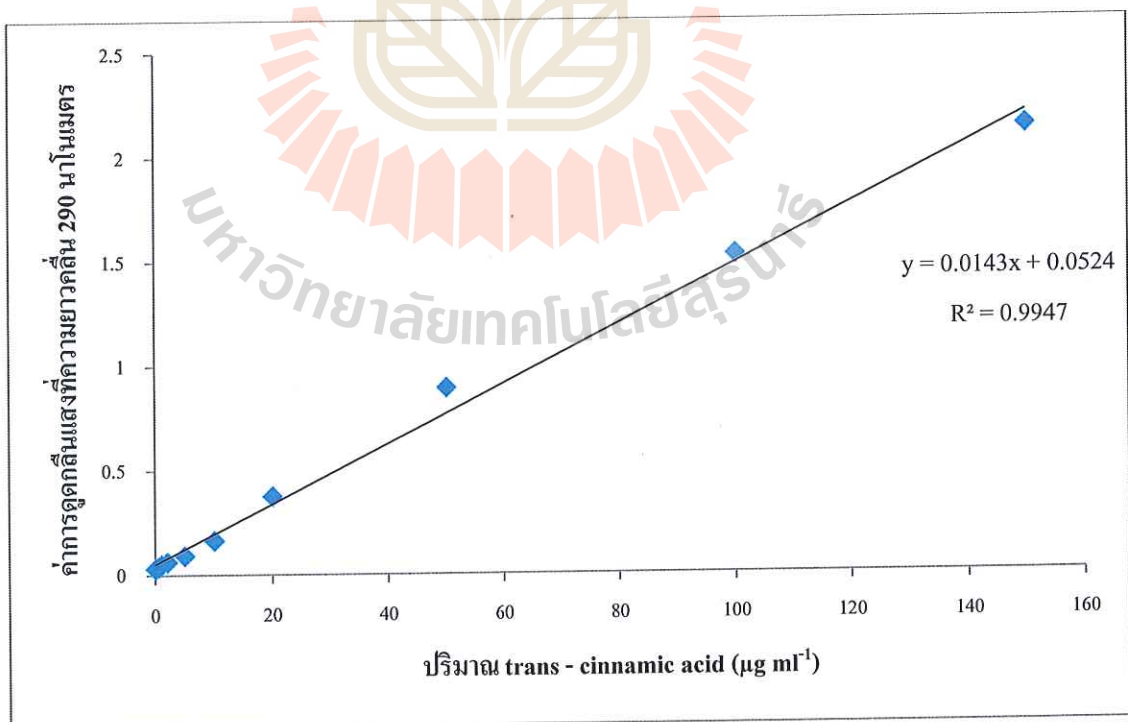
Sodium tetraborate	0.38	กรัม
Boric acid	62	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2.7 20 mM L-phenylalanine

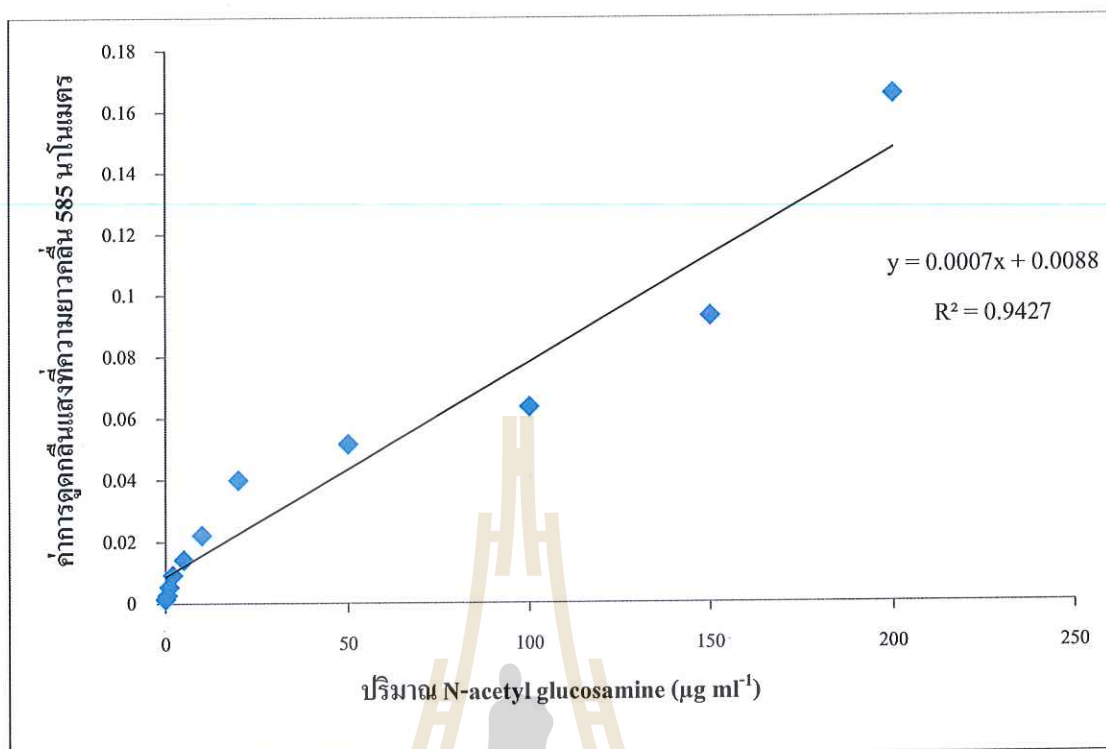
L-phenylalanine	0.33	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรกับปริมาณ salicylic acid



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรกับปริมาณ trans - cinnamic acid



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 585 นาโนเมตรกับปริมาณ N-acetyl glucosamine

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนิชดา จิมขุนทด เกิดเมื่อวันที่ 12 กันยายน 2536 ณ ตำบลในเมือง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2558 ได้สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และในปี พ.ศ. 2558 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาพืชศาสตร์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยระหว่างการศึกษาได้รับทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย พร้อมทั้งได้รับทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก และทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบริษัทไบโอแอกทีฟอุตสาหกรรมเกษตร จำกัด ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท

