วิทยานิพนธ์

ชีววิทยาและการก่อให้เกิดโรคของ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดกวางตุ้งและการกระตุ้นเพื่อให้ต้านทานต่อโรคก่อนการเก็บเกี่ยว

Biology and Pathogenicity of *Alternaria brassicicola* Causing Leaf Spot of Chinese Mustard and Pre-Harvest Induced Resistance Against This Disease

นายเทอดพันธ์ ธรรมรัตนพงษ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๔๘

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	ภาควิชา

เรื่อง ชีววิทยาและการก่อให้เกิดโรคของ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดกวางตุ้งและการกระตุ้นเพื่อให้ต้านทานต่อโรคก่อนการเก็บเกี่ยว

Biology and Pathogenicity of *Alternaria brassicicola* Causing Leaf Spot of Chinese Mustard and Pre-Harvest Induced Resistance Against This Disease

นามผู้วิจัย นายเทอดพันธ์ ธรรมรัตนพงษ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....
(รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D.)

กรรมการ .....
(อาจารย์ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, Dr. sc. agr)

กรรมการ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุเทวี ศุขปราการ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....
(รองศาสตราจารย์ณรงค์ สิงห์บุระอุดม, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 20 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2548

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ชีววิทยาและการก่อให้เกิดโรคของ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดกวางตุ้ง และการกระตุ้นเพื่อให้ต้านทานต่อโรคก่อนการเก็บเกี่ยว

Biology and Pathogenicity of *Alternaria brassicicola* Causing Leaf Spot of Chinese Mustard and Pre-Harvest Induced Resistance Against This Disease

โดย

นายเทอดพันธ์ ธรรมรัตนพงษ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2548

ISBN 974-9844-81-5

เทอดพันธ์ ธรรมรัตนพงษ์ 2548: ชีววิทยาและการก่อให้เกิดโรคของ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดกวางตุ้งและการกระตุ้นเพื่อให้ต้านทานต่อโรคก่อนการเก็บเกี่ยว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D. 119 หน้า
ISBN 974-9844-81-5

เชื้อรา 15 สายพันธุ์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆของผักกาดกวางตุ้งพบ เชื้อรา 3 ชนิด คือ เชื้อรา *Alternaria brassicicola* เชื้อรา *A. brassicae* และ เชื้อรา *Curvularia* sp. โดยเชื้อรา *A. brassicicola* สายพันธุ์ที่แยกได้จาก ต. กำแพงแสน จ. นครปฐม สามารถก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคใบจุดได้ต่ำสุดเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ และ สูงสุดเท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง(พันธุ์ต้านทาน) และฮ่องเต้(พันธุ์อ่อนแอ) ตามลำดับ การฉีดพ่นเชื้อรา *Curvularia* sp.และสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรก่อนปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถป้องกันโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ ได้ โดยการฉีดพ่นเชื้อรา *Curvularia* sp. พบลักษณะของปากใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทำให้ลดการเข้าทำลายผ่านทางช่องปากใบของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้เท่ากับ 1.77 และ 0.96 เปอร์เซ็นต์ และ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร พบเซลล์ผิวใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลช่วยลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงลงเท่ากับ 1.55 และ 0.79 เปอร์เซ็นต์ และ ลดการสร้าง appressoria ลงเท่ากับ 1.24 และ 0.69 เปอร์เซ็นต์ ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ ตามลำดับที่เวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้การฉีดพ่นเชื้อรา *Curvularia* sp. และ Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อนปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถลดความรุนแรงของโรคในวันที่ 25 ลงได้ 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ 65 และ 90 เปอร์เซ็นต์ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ ตามลำดับ ในผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วัน และ 15 และ 30 เปอร์เซ็นต์ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ 65 และ 90 เปอร์เซ็นต์ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ ตามลำดับ ในผักกาดกวางตุ้งอายุ 30 วัน

การฉีดพ่นเชื้อรา *Curvularia* sp.และ Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร พบกิจกรรมเอนไซม์ PPO และ POX เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 ในผักกาดกวางตุ้งพันธุ์อ่อนแอมากกว่าพันธุ์ต้านทาน ภายหลังปลูกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด โดยการฉีดพ่นเชื้อรา *Curvularia* sp.ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมเอนไซม์ PPO เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 41.75 และ 53.77 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนในผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วัน และ 28.14 และ 46.79 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนในผักกาดกวางตุ้งอายุ 30 วัน และพบกิจกรรมเอนไซม์ POX เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 20.88 และ 31.15 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ในผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วันและ 16.81 และ 25.01 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ในผักกาดกวางตุ้งอายุ 30 วัน และการฉีดพ่น Bion ก่อนปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมเอนไซม์ PPO เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 57.27 และ 68.59 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วันและ 34 และ 69.96 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในผักกาดกวางตุ้งอายุ 30 วัน และพบกิจกรรมเอนไซม์ POX เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 27.96 และ 42.91 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ในผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วันและ 21.52 และ 51.13 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ในผักกาดกวางตุ้งอายุ 30 วันในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ ตามลำดับ และหลังจาก 5 วันกิจกรรมเอนไซม์ PPO และ POX จะค่อยๆลดลง

เทอดพันธ์ ธรรมรัตนพงษ์ — ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ — 15 / ธ.ค. / 48

Thurdpan Tummarattanapong 2005: Biology and Pathogenicity of *Alternaria brassicicola* Causing Leaf Spot of Chinese Mustard and Pre-Harvest Induced Resistance Against This Disease. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Somsiri Sangchote, Ph.D. 119 pages.
ISBN 974-9844-81-5

Fiveteen isolates of fungi were isolated from pak choy plant parts and identified into 3 groups including *Alternaria brassicicola A. brassicae* and *Curvularia* sp.. *A. brassicicola* isolated from Kamphaeng Saen Nakhon Pathom caused the lowest disease severity on Hongkong pak choy (resistance variety) at 10% and highest on Hongtae(susceptible variety) at 64% and all of *Curvularia* sp. isolated caused no disease on Hongkong and Hongtae pak choy. *Curvularia* sp. or solution of Bion at concentration of 0.05 g/L. was applied to induce resistance against subsequent challenge with pathogenic *A. brassicicola* was examined in Hong Kong and Hong tae pak choy. At 24 hours, leafs inoculated with *Curvularia* sp. were exhibited a brown stomata, reduced *A. brassicicola* penetrated into the stomatal pores at 1.77 and 0.96% and Bion concentration of 0.05 g/L. were exhibited a brown epidermal cell, reduced *A. brassicicola* penetrated into the epidermal cells at 1.55 and 0.79% and reduced appressoria formation at 1.24 and 0.69% on Hongkong and Hongtae pak choy respectively. At 25 days, resistance induced by *Curvularia* sp. and Bion concentration 0.05 g/L. reduced disease severity of *A. brassicicola* by 20 and 30% on Hongtkong pak choy and 65 and 90% on Hongtae pak choy respectivety, on 7 day-old plants. Similar result, disease severity was reduced by 15 and 30% on Hongkong pak-choy and 65 and 90 % on Hongtae pakchoy respectively on 30 day-old plants

On *Curvularia* sp. and Bion concentration of 0.05 g/L. treated plants, polyphenoloxidase; PPO and peroxidase;POX activities were higher in the susceptible than the resistance variety at 25 days after treated. *Curvularia* sp. treated and then, inoculated with *A. brassicicola*, PPO activities were maximum level at 41.75 and 53.77 units mg^{-1} protein on 7 day-old plants and 28.14 and 46.79 units mg^{-1} protein on 30 day-old plants. POX activities were maximum level at 20.88 and 31.15 OD_{610nm} mg^{-1} protein per min on 7 day-old plants and 16.80 and 25.01 OD_{610nm} mg^{-1} protein per min on 30 day-old plants. Bion treated plants, PPO activities were maximum level at 57.27 and 68.59 units mg^{-1} protein on 7 day-old plants and 34 and 69.96 units mg^{-1} protein on 30 day-old plants. POX activities were maximum level at 27.96 and 42.9 OD_{610nm} mg^{-1} protein per min on 7 day-old plants and 21.52 and 51.13 OD_{610nm} mg^{-1} protein per min on 30 day-old plants on Hongkong and Hongtae pak choy respectively. Both enzymes showed the highest level after 5 days of testing and then, gradually decreased.

Thurdpan Tummarattanapong S. Sangchote 15/12/05

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ดร. ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล กรรมการสาขาวิชาเอก ผศ.ดร. สุเทวี ศุขปราการ กรรมการสาขาวิชารอง ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณ ศ. รังสิต สุวรรณเขตนิคม ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร งานวิจัยสภาวะแวดล้อมฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ต. กำแพงแสน จ. นครปฐม ทุกท่านที่เอื้ออำนวยความสะดวกและความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องต่างๆ ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆและน้องๆชาวโรคพืชทุกคนที่ได้มอบความเป็นมิตร คำแนะนำ และช่วยเหลือในการเรียนและทำวิจัยมาโดยตลอด

และที่สำคัญยิ่งประโยชน์อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ น้องชายและคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนให้มีความรู้ ณ. ปัจจุบัน

เทอดพันธ์ ธรรมรัตนพงษ์

สิงหาคม 2548

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	26
ผล	34
วิจารณ์	88
สรุป	95
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	97
ภาคผนวก	107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา 15 สายพันธุ์บนใบผักกาดกวางตุ้ง ภายหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส	36
2	ลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อราที่แยกได้ 15 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	38
3	แสดงลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อรา 15 สายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	41
4	แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคบนใบผักกาดกวางตุ้ง 4 พันธุ์ จากการปลูกเชื้อรา 15 สายพันธุ์ ในสภาพเรือนทดลอง	45
5	แสดงผลของการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.และ Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ต่อการงอกของ conidia การแทง germ tube ทำลายทางปากใบ และผิวใบโดยตรง การแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressorium ของเชื้อรา *A. brassicicola* และ ลักษณะของปากใบ และ เซลล์ผิวใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ ที่เวลา 12-24 ชั่วโมง	62
6	ความรุนแรง(Disease severity) ของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และฮ่องเต้ อายุ 7 วัน ภายหลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.และฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร แล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25	65
7	การวัดความรุนแรง(Disease severity) ของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และฮ่องเต้ อายุ 30 วันที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.และ ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร แล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25	69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

8 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 วัน ภายหลังจากปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* และ ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร แล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25 75

9 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และฮ่องเต้อายุ 30 วัน ภายหลังจากปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.และฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร แล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25 79

10 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 วัน ภายหลังจากปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.และฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร แล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25 83

11 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 30 วัน ภายหลังจากปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.และฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร แล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25 87

ตารางผนวกที่

1 สารชักนำความต้านทานและพืชเป้าหมายในการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคพืช 108

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 1-3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน	39
2	รูปร่างและการเจริญของเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 1-3 ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	43
3	จำนวนการงอก conidia ของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* หรือฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว ที่เวลา 12-24 ชั่วโมง	47
4	การงอก conidia ของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งที่ระยะเวลา 3 และ 12ชั่วโมง	48
5	การแทง germ tube ทำลายทางเซลล์ผิวใบโดยตรงของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* หรือฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง	49
6	การแทง germ tube ทำลายทางปากใบของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* หรือฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

7 จำนวนปากใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเกิดการปิดของปากใบในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และฮ่องเต้ จากการปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว; Cu หรือฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง 53

8 ลักษณะของปากใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อฉีดพ่นเฉพาะเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียวหรือฉีดพ่นตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ภายหลัง 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวไม่พบลักษณะของปากใบเปลี่ยนสีน้ำตาลเมื่อเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tubeเข้าสู่ปากใบผักกวางตุ้ง 54

9 การแทง germ tube ทำลายผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* หรือการฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง 56

10 การแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressorium ของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* หรือการฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง 58

11 จำนวนเซลล์ผิวใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ จากการฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง 59

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

12 ลักษณะการสะสมของเม็ดสารต่างๆ บริเวณจุดที่มีการแทง germ tube ของเชื้อรา *A. brassicicola* และ ลักษณะเซลล์ผิวใบผักกาดกวางตุ้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อฉีดพ่น Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะเชื้อ *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว พบการแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria และการแทง germ tube เข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยตรงสูงกว่าการฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อนการปลูกเชื้อ *A. brassicicola* 60

13 ความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง อายุ 12 วัน จากการปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp หรือภายหลัง 24 ชั่วโมง ปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* และ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร หรือภายหลัง 24 ชั่วโมง ปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* หรือ ฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว 66

14 ความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ อายุ 12 วันจากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp หรือภายหลัง 24 ชั่วโมง ปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* และ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร หรือภายหลัง 24 ชั่วโมง ปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A .brassicicola* หรือ ฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว 67

15 ความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง อายุ 35 วันจากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp หรือภายหลัง 24 ชั่วโมง ปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* และ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร หรือภายหลัง 24 ชั่วโมง ปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* หรือ ฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว 70

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

16 ความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ อายุ 35 วันจากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp หรือภายหลัง 24 ชั่วโมง ปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* และ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร หรือภายหลัง 24 ชั่วโมง ปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* หรือ ฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว 71

17 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase ตั้งแต่วันที่ 1-25 ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ อายุ 7 วัน ภายหลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* และการฉีดพ่นด้วย Bion เพียงอย่างเดียว หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว หรือฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว 73

18 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase ตั้งแต่วันที่ 1-25 ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ อายุ 30 วัน ภายหลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* และการฉีดพ่นด้วย Bion เพียงอย่างเดียว หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว หรือฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว 77

19 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ตั้งแต่วันที่ 1-25 ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ อายุ 7 วัน ภายหลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียวหรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* และการฉีดพ่นด้วย Bion เพียงอย่างเดียว หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว หรือฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว 81

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

20 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ตั้งแต่วันที่ 1-25 ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง และ ฮ่องเต้ อายุ 30 วัน ภายหลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียวหรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* และการฉีดพ่นด้วย Bion เพียงอย่างเดียว หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว หรือฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว 85

ภาพผนวกที่

1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น BSA กับการดูดกลืนแสงที่ 595 nm 118

2 ผักกาดกวางตุ้ง 4 พันธุ์ จากบริษัทเจียไต๋ จำกัด ที่ใช้ประเมินความรุนแรงของโรคใบจุด 119

ชีววิทยาและการก่อให้เกิดโรคของ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดกวางตุ้งและการกระตุ้นเพื่อให้ต้านทานต่อโรคก่อนการเก็บเกี่ยว

Biology and Pathogenicity of *Alternaria brassicicola* Causing Leaf Spot of Chinese Mustard and Pre-Harvest Induced Resistance Against This Disease

คำนำ

ผักกาดกวางตุ้งเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจนิยมปลูกกันมากในประเทศไทยและประเทศแถบเอเชีย นิยมใช้ใบและดอกบริโภค (พิเชษฐ, 2536) ในการผลิตผักกาดกวางตุ้งมักพบปัญหาโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชผักจำพวก Crucifers เช่น ผักคะน้า กะหล่ำดอก และ บร็อคโคลี่เป็นต้น (Chupp and Sherf, 1960) เชื้อรา *A. brassicicola* สามารถทำลายพืชผักได้ทุกส่วนโดยเฉพาะ อาการแผลจุดบนใบสามารถทำให้ผักมีการสังเคราะห์แสงลดลง ส่งผลให้คุณภาพของผลผลิตลดลง การแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็วโดยมีปัจจัยที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของโคนิเดีย(conidia)ได้แก่ ลม ฝน หรือสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์ และ เครื่องมือทางการเกษตร (ไพโรจน์, 2525) การควบคุมโรคที่ปฏิบัติกันอยู่ในปัจจุบันสามารถทำได้ตั้งแต่การทำความสะอาดแปลงปลูก การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราทั้งประเภทสัมผัส และ ดูดซึม แต่การใช้สารเคมีอาจก่อให้เกิดปัญหาเรื่องสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม และผลผลิตซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคโดยเฉพาะผู้บริโภคนิยมรับประทานผักสดมีโอกาสจะได้รับสารพิษเข้าไปในร่างกายได้ง่าย และสะสมอยู่จนมีปริมาณมากขึ้น ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงการกระตุ้นความต้านทาน(induced resistance) ในพืชเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการควบคุมโรคซึ่งโดยปกติพืชอาศัยกับเชื้อโรคพืชนั้นมีความสัมพันธ์กัน เมื่อเชื้อโรคเข้าสู่พืชพันธุ์ต้านทานพืชจะมีการสร้างโครงสร้างต่างๆเพื่อการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค แต่ถ้าเป็นพันธุ์อ่อนแอเชื้อโรคพืชจะประสบความสำเร็จในการเข้าทำลายพืชสามารถเจริญใช้อาหาร และสามารถหลีกหนีการป้องกันตัวเองของพืชได้ สุดท้ายพืชพันธุ์อ่อนแอนั้นจะแสดงอาการของโรคออกมา แต่หากมีการชักนำให้พืชพันธุ์อ่อนแอนั้นเตรียมพร้อมด้านกลไกการป้องกันตัวเองก่อนที่จะมีการติดเชื้อสาเหตุของโรค พืชพันธุ์อ่อนแอนั้นย่อมจะแสดงลักษณะของความต้านทานต่อโรคนั้นได้ จากการศึกษาของ Ziadi *et al*.(2001) พบว่า เมื่อฉีด acibenzolar-S-methyl(ASM);Bion ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตรให้กับต้นกล้ากะหล่ำดอกก่อน 1 วันสามารถชักนำให้ต้นกะหล่ำดอก

เกิดความต้านทานแบบ systemic resistance ต่อโรคราน้ำค้างที่เกิดจากเชื้อรา *Peronospora parasitica* ได้ นอกจากนี้การใช้เชื้อ nonpathogenic strain ของ *Fusarium oxysporum* ได้มีรายงานว่าสามารถควบคุมโรค Fusarium crown rot ได้ (He *et al*., 2002)

การศึกษานี้เพื่อให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างกลไกการป้องกันตัวเองของผักกาดกวางตุ้งต่อเชื้อรา *A. brassicicola* จากการชักนำให้เกิดความต้านทานเพื่อเป็นแนวทางในการหาวิธีการควบคุมโรคโดยอาศัยกลไกการป้องกันตัวเองของพืช และการใช้สารกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานโรคในครั้งนี้มีทั้งการใช้สารเคมีและเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นสาเหตุของโรค โดยตรวจวัดการเปลี่ยนแปลง oxidative enzyme ชนิด polyphenoloxidase และ peroxidase และประสิทธิภาพของการกระตุ้นความต้านทานเพื่อการควบคุมโรค

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของผักกาดกวางตุ้ง

ผักกาดกวางตุ้งเป็นพืชในวงศ์ Crucifereae มีชื่อสามัญหลายชื่อได้แก่ Pak choy, chinese mustard และ green petiole มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica campestris* (L.) มีถิ่นกำเนิดในภาคกลางของประเทศจีน เป็นพืชฤดูเดียว ระบบรากแก้ว ใบมีรูปร่างแบบ oblong จัดเรียงแบบ spiral ขอบใบมนเป็นคลื่น ไม่ห่อปลี มีก้านใบสีขาวหรือเขียวแตกต่างไปตามพันธุ์ ช่อดอกเป็นแบบ compound raceme เกิดที่ปลายยอดของลำต้นและกิ่งแขนง ดอกเป็นดอกสมบูรณ์ประกอบด้วย กลีบเลี้ยงสีเขียว 4 อัน กลีบดอกสีเหลืองเข้ม 4 อัน และเกสรตัวผู้ 6 อัน (พิเชษฐ, 2536) ภายในหนึ่ง ovary มีหลาย ovules ดอกเริ่มบานตอนเย็นและบานเต็มที่ในตอนเช้า โดยดอกที่อยู่บนช่อดอกหลักจะพัฒนาก่อนกิ่งข้างที่อยู่ต่ำลงมา และทยอยบานจากโคนช่อดอกไปสู่ปลายช่อดอก ฝักเป็นแบบ glabous silique เมื่อแก่มีสีน้ำตาลอ่อนคล้ายสีฟางข้าว แต่ละฝักประกอบ ด้วยเมล็ด 1-25 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะค่อนข้างกลม ผิวเรียบ สีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลดำ (จานุลักษณ์, 2534)

เมฆ (2541) ศึกษาพบว่าผักกาดกวางตุ้งเป็นพืชผักที่ปลูกเพื่อบริโภคส่วนของใบ ลำต้นและดอกอ่อน ในใบผักกาดกวางตุ้งพบว่ามีคุณค่าทางโภชนาการ (nutrition values) ที่จำเป็นต่อร่างกาย โดยส่วนที่กินได้ 100 กรัม จะมีพลังงาน 8 แคลอรี่ โปรตีน 1.9 กรัม ไขมัน 0.2 กรัม คาร์โบไฮเดรต 8.5 กรัม เหล็ก 0.69 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 1.80 มิลลิกรัม แคลเซียม 8.5 มิลลิกรัม โดยร่างกายสามารถดูดซึมแคลเซียมจากผักกาดกวางตุ้งได้ไม่น้อยกว่าแคลเซี่ยมจากนม และยังพบว่าในผักกาดกวางตุ้งมีเบต้าแคโรทีน(β-carotene) อยู่มาก สารนี้เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกนำไปใช้ในการสร้างวิตามินเอ นอกจากนี้ยังพบว่ามีวิตามินซีและเกลือแร่เป็นจำนวนมากโดยวิตามินซีช่วยเสริมสร้างเนื้อเยื่อให้ชุ่มชื้นและทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคสมบูรณ์แข็งแรง (เมฆ, 2541)

2. ลักษณะของเชื้อรา *A. brassicicola* (Schw.) Wiltshire สาเหตุของโรคใบจุด

เชื้อรา *Alternaria* Nees ex. Fries พบว่ามีประมาณ 50 species สำหรับ *A. brassicicola* เป็น Dictyosporic genus (Dixon, 1981; Ellis, 1971)

จัดอยู่ใน Kingdom Fungi

Division Eumycota

Sub-Division Deuteromycotina

Form-Class Hyphomycetes

Form-Order Moniliales

Form-Family Dematiaceae

เชื้อรา *A. brassicicola* พบว่ามีชื่อพ้อง (synonym) 2 สกุล คือ *Helminthosporium brassicicola* และ *Macrosporium cheiranthi* var. *circinaus* Bark & Curt., 1875 (Paul, 1980)

ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อรา *A. brassicicola* โคโลนีเมื่ออายุ 5 วันมีสีเขียวมะกอกอ่อน เมื่อมีอายุมากกว่า 7 วันจะมีสีดำอมเขียวมะกอก ไม่สร้าง stroma และ setae การขยายพันธุ์เป็นแบบไม่อาศัยเพศ สปอร์หรือโคนิเดีย(conidia) เกิดบนส่วนของก้านชูสปอร์(conidiophore) มีลักษณะที่แตกต่างไปจากเส้นใยโดยทั่วไป อาจเป็นแบบ macronematous หรือ mononematous ก้าน conidiophore เป็นแบบ simple เกิดในลักษณะ porospore รูปร่าง dictyospore สามารถ proliferate แบบ geniculate มีการงอกก้านใหม่จากส่วนปลายทางด้านข้างของรูที่สร้างสปอร์อันแรก แต่ละเซลล์ของ conidia จะทำหน้าที่สร้าง conidium อันใหม่ต่อกันไปเรื่อยๆ (Ellis, 1971) conidium ลักษณะเป็น muriform มีผนังกั้นขวาง(transverse septa) น้อยกว่า 6 septa ส่วนผนังกั้นตามยาว (longitudinal septa) มักมีมากกว่า 6 septa และมักคอดเล็กน้อยที่ septum รูปร่าง conidia เป็นแบบ ovoid, obclavate, tapered ovoid, beaked ovoid, cylindrical หรือ rostrate conidia ในบางครั้ง conidium อาจแตกแขนงได้และพบ apical cell มีลักษณะเป็น truncate cone สั้นและหนา ส่วนฐานของ conidium ที่ติดกับ conidiophore หรือส่วน basal end กว้างกว่าส่วนปลาย ผนัง conidium อาจเรียบหรือขรุขระสีเข้ม conidia มักเกิดอย่างเดี่ยวๆหรือเกิดต่อกันเป็นลูกโซ่และ conidia มักหลุดออกจากก้าน conidiophore ได้ง่าย (พัฒนา และ คณะ, 2526; Barnett and Hunter, 1987; Dixon, 1981) ขนาดของเส้นใยเชื้อรา *A. brassicicola* กว้าง 1.5-1.7 ไมโครเมตร มีผนังกั้นสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเทา ขนาดกว้าง 5-8 ไมโครเมตร และอาจยาวได้มากกว่า 70 ไมโครเมตร บนปลายก้านชูสปอร์จะสร้าง conidia ต่อกันมากกว่า 20 conidia และ conidia มีขนาด 8-30×18-130 ไมโครเมตร ส่วนหาง(beak) มีความยาวเป็น 1 ใน 6 เท่าของ conidia โดยจะมีความกว้าง 6-8 ไมโครเมตร (Ellis,

1971) (Paul, 1980) พบว่า อุณหภูมิและความเป็นกรดเป็นด่าง(pH) ที่เชื้อรา *A. brassicicola* เจริญเติบโตได้ดีที่สุดคืออุณหภูมิระหว่าง 24-28 องศาเซลเซียส pH ระหว่าง 6.5-7.1 ส่วนอุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้น้อยคืออุณหภูมิระหว่าง 4-8 องศาเซลเซียส pH ที่ 2.6 และต้องได้รับความชื้นจากฝนหรือน้ำค้างติดต่อกันไม่ต่ำกว่า 9 ชั่วโมงในการเข้าทำลายพืช สำหรับการงอกของ conidia อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถงอกได้คือ 1.5 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการงอกคือ 28-31 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดคือ 40 องศาเซลเซียส บนกะหล่ำดอกและคะน้าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการงอกคือ 15 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง conidia ในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 22 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำที่สุดน้อยกว่า 12 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิสูงสุดคือ 35 องศาเซลเซียสและในพืชอาศัยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้าง conidia คือ 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่ยังสามารถสร้าง conidia ได้คือ 5 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิสูงสุดคือ 24 องศาเซลเซียส conidia จะงอกได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีแสง แต่การกระจายและการสร้าง conidia มากที่สุดเกิดขึ้นในสภาพที่มีและไม่มีแสงสลับกัน และพบว่าการให้แสงต่อเนื่องเต็มที่จะยับยั้งการสร้าง conidia

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ *Alternaria sp*. เจริญเติบโตได้ดีคือ potato dextrose agar, maltose extract agar, corn meal agar, lima bean agar, ray agar และ 2 เปอร์เซ็นต์ water agar โดยพบว่าอาหาร ray agar เชื้อจะสร้างโคโลนีได้กว้างที่สุดคือ 4.3 เซนติเมตรแต่จะสร้าง conidia ได้น้อยที่สุดคือ 1.2×10^6 conidia ต่อจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนอาหาร PDA จะสร้าง conidia ต่อจานเลี้ยงเชื้อได้มากที่สุดคือ 2.8×10^6 conidia และมีขนาดของโคโลนี 3.96 เซนติเมตร โดยวัดการเจริญเติบโตหลังจากบ่มเชื้อไว้ 4 วันที่อุณหภูมิห้อง (Shahin and Shepard, 1979)

3. <u>การเข้าทำลายพืชของเชื้อรา *A. brassicicola*</u>

เชื้อรา *A. brassicicola* สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิดโดยเฉพาะกับพืชผักตระกูลกะหล่ำมีรายงานในหลายประเทศ ได้แก่ เนปาล ลิเบีย ญี่ปุ่น อินเดีย ฮ่องกง อังกฤษ เอธิโอเปีย ไซปรัส แคนาดา พม่า ออสเตรเลีย โรมาเนีย แอฟริกาใต้ ซูดาน ตูรกี อูกานดา แซมเบียและไทย เชื้อราที่มักทำลายผักตระกูลกะหล่ำ คือ เชื้อรา *Alternaria* sp. ซึ่งมีหลายสปีชีส์ แต่ที่พบทำลายอยู่ทั่วไปก็มี 2 สปีชีส์ คือ *A. brassicicola* และ *A. brassicae* (Walker, 1958) เชื้อรา *A. brassicicola* เป็นสาเหตุ

ของโรคใบจุดออลเทอนาเรีย(Alternaria leaf spot) (Ellis, 1971) นอกจากนี้ พัฒนาและคณะ (2526) พบว่าโรคใบจุดออลเทอนาเรียนี้ก่อให้เกิดโรคกับพืชตระกูลกะหล่ำได้หลายชนิดเช่น คะน้าจีน ผักกาดกวางตุ้ง กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี กะหล่ำปม และบล๊อคโคลี่

Degenhardt *et al*. (1982) พบว่าเมื่อพืชอายุมากขึ้นความต้านทานต่อการเข้าทำลายต่อเชื้อรา *A. brassicicola* จะลดลง ในกะหล่ำปลีและผักสลัด จำนวนเนื้อเยื่อที่ตาย(necrotic tissue) จากเชื้อรานี้จะพบบนใบแก่ที่อยู่ข้างล่างมากกว่าบนใบอ่อนที่อยู่ด้านบน ในใบแก่แผลจะมีขนาดใหญ่และเจริญขยายขนาดจนทำให้เกิดเซลล์ตายเป็นพื้นที่ขยายใหญ่บนผิวใบพืช บนใบอ่อนแผลจะมีขนาดเล็กและมีพื้นที่น้อยกว่า การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* บนส่วนของพืชอาศัยพบว่าเกิดการแทงเข้าผิวพืชมากที่สุดเมื่อมีหยดน้ำบนส่วนของพืชอย่างน้อยที่สุด 5-8 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเข้าทำลายพืชคือ 25-27 องศาเซลเซียส การแทงเข้าผิวพืชโดยตรงพบว่ามีการสร้าง appressoria ลักษณะเป็น unicellular swellings ตรงบริเวณด้านปลายของ germ tube ซึ่งมีลักษณะเป็นทรงกลม(spherical) หรือทรงกระบอง(club-shaped) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 ไมโครเมตร เชื้อรา *A. brassicicola* สามารถเข้าทำลายผ่านทางปากใบของพืชอาศัยได้ การเจริญของเส้นใยจะแตกแขนงเจริญครอบครองคลุมไปทั่วทั้งในเนื้อเยื่อมีโซฟิลล์(mesophyll) และ palisade tissue กระทั่งใบพืชถูกทำลายในที่สุด เชื้อรา *A. brassicicola* เมื่อเข้าทำลายใบกะหล่ำปลีก่อให้เกิด senescence ขึ้น โดยพบว่ามีปริมาณการสร้างเอธิลีนเพิ่มมากขึ้น

Humpherson-Jones and Maude (1982) พบว่าสามารถดักจับสปอร์ของเชื้อรา *A. brassicicola* บนพืชตระกูลกะหล่ำได้มากที่สุดหลังจากที่มีฝนตกหรือมีช่วงระยะเวลาของการเปียกบนใบพืชนานติดต่อกันอย่างน้อย 13 ชั่วโมง โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ยสูงกว่า 13 องศาเซลเซียสจะมีการเข้าทำลายพืชตระกูลกะหล่ำได้มากขึ้น

4. <u>ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola*</u>

อาการของโรค Alternaria leaf spot มักเกิดได้กับทุกส่วนของต้นผัก และทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ต้นอ่อนที่เริ่มงอกจากเมล็ดไปจนกระทั่งต้นโตเต็มที่ อาการขั้นแรกจะปรากฏให้เห็นโดยเกิดเป็นแผลเล็กๆสีดำคล้ายโรคโคนเน่าคอดิน(damping off) ขึ้นที่ลำต้น ต้นที่ถูกเชื้อราเข้า

ทำลายตั้งแต่ระยะต้นกล้านี้จะหยุดการเจริญเติบโตหรือชะงัก ต้นกล้าที่เป็นโรคนี้หากย้ายไปปลูกจะกลายเป็นต้นที่ไม่สมบูรณ์ (ศักดิ์, 2537) ในต้นแก่จะเกิดแผลจุดขึ้นบนใบ โดยเริ่มจากจุดเซลล์ตายเล็กๆสีเหลืองขึ้นที่ใบมีขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร ซึ่งปกติจะเกิดที่ใบล่างก่อนโดยจะเกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อแล้ว 36 ชั่วโมง ต่อมาจุดเล็กๆบนใบจะขยายออกเป็นแผลวงกลมสีน้ำตาลหรือดำ เชื้อราจะสร้าง conidia สีเข้มบนแผลเรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้น(concentric ring) ขนาดของแผลมีทั้งใหญ่และเล็กขยายได้มากกว่า 2.5 เซนติเมตร เนื้อเยื่อรอบๆแผลจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่ออาการรุนแรงมากขึ้นแผลเหล่านั้นจะเชื่อมติดต่อกันทำให้ใบไหม้ (Ellis, 1971) และทำให้ใบฉีกขาดจากการถูกกระทบกระเทือนได้ง่าย นอกจากนี้แผลที่ก้านใบมีลักษณะเป็นจุดหรือแผลรูปวงกลมรีสีน้ำตาล เนื้อเยื่อบุ๋มลงไปเล็กน้อย (ศุภลักษณ์, 2527) หากเกิดอาการที่ดอกจะทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลโดยจะเริ่มจากช่อดอกที่อยู่ริมนอกเข้ามา หากเป็นรุนแรงดอกทั้งดอกจะถูกทำลายหมด ในต้นแก่ที่ให้ดอกหรือติดฝักแล้วเชื้อจะเข้าทำลายที่ก้านดอกและฝักเกิดเป็นแผลสีน้ำตาลเข้มหรือดำ อาจกลมหรือยาวรีไปตามลักษณะของก้านมองเห็นได้ชัดเจนแผลเหล่านี้หากเกิดขึ้นมากๆจะมีผลทำให้ช่อดอกแห้งทั้งช่อ ซึ่งจะทำให้ฝักที่มีอยู่แห้งฝ่อไม่มีการสร้างเมล็ด แต่ถ้าโรคเกิดขึ้นหลังจากติดฝักแก่แล้ว ฝักจะเกิดเป็นจุดสีดำเล็กๆต่อมาฝักจะแห้งและแตกก่อนกำหนดเมล็ดที่ถูกเชื้อราชนิดนี้เข้าทำลายจะทำให้เมล็ดนั้นๆเสีย หมดคุณสมบัติที่จะงอกและเชื้อราสามารถติดไปกับเมล็ดทำให้เกิดเป็น seed-borne ระบาดก่อโรคให้กับต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดนั้นได้อีกครั้ง (กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ, 2535; ศุภลักษณ์, 2527; Bolkan, 1983, Dixon, 1981)

ลักษณะอาการที่เกิดขึ้นกับพืชชนิดอื่นๆนอกเหนือจากพืชในตระกูลกะหล่ำได้มีรายงานไว้ว่า *A. cucumerina* และ *A. longissima* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคใบจุดและใบไหม้กับแตงกวา (*Cucumis sativa* cultivar "Sayo") *A. porri* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคใบจุดสีม่วงกับพืชสกุล *Allium* เช่น หอมแบ่ง และ หอมหัวใหญ่ *A. cucumerina* พบเป็นสาเหตุสำคัญในใบฟักทองที่มีอาการของใบแห้งและยังพบเชื้อรา *Alternaria* sp. เข้าทำลายไม้ดอกบางชนิดด้วย นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อพืชหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้พืชผลเน่าเสียเร็วยิ่งขึ้น (พัฒนา และคณะ, 2526) เชื้อรา *A. brassicicola* สามารถเข้าทำลายต้น *Crambe abyssinica* โดยเกิดอาการของโรคได้กับทุกส่วนและทุกระยะการเจริญเติบโตโดยจะเกิดจุดเล็กๆสีดำที่ใบ ก้านใบ ลำต้น เส้นใบ และเมล็ด ขนาดของแผล 1-3 × 1-5 มิลลิเมตรซึ่งเกิดขึ้นหลังจากปลูกเชื้อ 3-4 วันรอบๆแผลจะเกิดอาการเหลืองส่วนเมล็ดที่ได้รับเชื้อนี้พบว่าในระยะกล้าลำต้นที่ส่วนฐานและยอดรวมทั้งก้านใบจะเกิดจุดสีดำขยายใหญ่ขึ้น ต้นจะเหี่ยวและหักตรงจุดแผลนั้น (Kilpatrick, 1976) อาการเหลืองที่เกิดรอบๆจุดแผลของโรคใบจุดในผักตระกูลกะหล่ำนั้น Bains and Tewari (1985) รายงานว่าเกิดจาก phytotoxin ชนิด

partially purified(PPF) toxin ซึ่งจะทำให้เกิดอาการ chlorosis และ necrosis กับพืชพวก *Brassica* sp. โดยไม่มีผลต่อ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ มันฝรั่ง มะเขือเทศหรือพืชตระกูลถั่ว ส่วนอาการที่เกิดกับกะหล่ำปลีและผักกาดขาวปลีนั้น Bolkan (1983) รายงานว่าในกะหล่ำปลีเชื้อสามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโตจุดแผลที่พบส่วนใหญ่จะเป็นจุดแผลสีดำไม่มีวงชั้นและมีขนาดของแผลไม่แน่นอน ส่วนผักกาดขาวปลีจะเกิดจุดแผลสีดำเช่นกันแต่มีขนาดของจุดแผลเพียง 1-2 มิลลิเมตรเท่านั้น

5. <u>วงจรของโรค</u>

การขยายพันธุ์และการแพร่กระจายของเชื้อรา *A. brassicicola* ศุภลักษณ์ (2527) รายงานว่าเชื้อราชนิดนี้มีการขยายพันธุ์อย่างรวดเร็วมาก เนื่องจากเชื้อรา *A. brassicicola* มีการขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ(asexual reproduction) โดยเชื้อราสามารถสร้าง conidia ขึ้นบริเวณแผล ซึ่ง conidia สามารถแพร่กระจายไปได้ง่ายด้วยลมและฝน ดังนั้นจึงมีการแพร่กระจายไปอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ วราภรณ์ (2545) รายงานว่า *A. brassicicola* สามารถติดไปกับเมล็ด(seed borne) และยังสามารถที่จะดำรงชีพอยู่ได้นานบนเมล็ดหลังการเก็บเกี่ยว นอกจากนี้เชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูในเศษซากพืชในรูปของเส้นใย อยู่ในเมล็ดในรูปของเส้นใยหรือสปอร์และอยู่บนวัชพืชหรืออยู่บนผักที่หลงเหลือจากการเก็บเกี่ยว จนถึงการปลูกพืชอีกครั้งหนึ่ง และเชื้อจะเข้าทำลายพืชในระยะต้นกล้าทำให้เกิดโรคโคนเน่าระดับดิน ลำต้นเป็นแผลเน่า Humpherson-Jones and Maude (1982) กล่าวว่า conidia ของเชื้อราสร้างได้มากหากมีความชื้นสูง เช่นขณะฝนตก น้ำค้างมาก โดย conidia ของเชื้อราจะสร้างได้สูงสุดบนใบพืชหลังจาก 20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียสบนใบพืชที่มีความชื้นสูงซึ่งความหนาแน่นของ conidia มีมากในตอนเช้าตรู่ และพบได้น้อยในช่วงบ่าย เมื่อมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้ว ผักที่อ่อนแอมากเช่นกะหล่ำดอกอาการของโรคจะปรากฏภายใน 2 วัน เชื้อราสร้าง conidia ใหม่ปลิวไปตามลมหรือกระเด็นไปตามฝน ติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตรและเมล็ดพันธุ์และแพร่ระบาดต่อไป

6. <u>การควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria spp.*</u>

การควบคุมโรค ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria* spp. สามารถทำได้โดย

1. เลือกใช้เมล็ดพันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรค หากไม่แน่ใจให้ฆ่าเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดเสียก่อน โดยแช่ในน้ำอุ่น 49-50 องศาเซลเซียส 20-25 นาที (ศักดิ์, 2537)

2. งดหรือหลีกเลี่ยงการปลูกผักกาดหรือกะหล่ำชนิดต่างๆลงในดินที่เคยปลูกและมีโรคเกิดมาก่อนอย่างน้อย 3-4 ปี (ศักดิ์, 2537)

3. กำจัดทำลายวัชพืชพวกผักต่างๆ โดยเก็บใบล่างหรือใบที่แสดงอาการเผาทำลาย อย่าให้มีอยู่บริเวณไร่หรือแปลงปลูกรวมทั้งพวกที่จะงอกขึ้นมาเองจากเมล็ดที่ร่วงหล่นอยู่ตามดิน (ศักดิ์, 2537)

4. ใช้พันธุ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *A. brassicae* ในกะหล่ำปลีเช่นพันธุ์ pis 231208, 231209, 217934, และ 267725 เป็นต้น (ศักดิ์, 2537)

7. <u>การชักนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อโรคพืช</u>

สารเคมีชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรคดังตัวอย่างที่พบได้ทั่วไป เช่น chitosan salicylic acid jasmonic acid DL-beta-amino-n-butyric acid(BABA) benzothiadiazole(BTH)(benzo[1, 2, 3]thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester)(CGA-245704)(acibenzolar-S-methyl;Bion)

acibenzolar มีชื่อตามระบบ IUPAC ว่า benzo[1, 2, 3]thaiadiazole-7-carbothioic S-acid มีชื่อทางการค้า คือ ACTIGARD®, BOOST® มีสูตรโมเลกุลคือ $C_7H_4N_2OS_2$ ลักษณะสารออกฤทธิ์

คือ acibenzolar-S-methyl ชักนำให้พืชสร้างกลไกต้านทานต่อเชื้อรา แบคทีเรียและไวรัสสาเหตุโรคพืช แบบทั่วทั้งต้น(Systemic Acquired Resistance) ในพืชหลายชนิด ดังตารางผนวกที่ 1

7.1 การตอบสนองของพืชที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค

พืชตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคโดยแสดงความต้านทานหรืออ่อนแอต่อการเกิดโรค การตอบสนองของพืชที่ทำให้เกิดความต้านทานมี 2 ลักษณะคือ

1. การแสดงความต้านทานโดยการยับยั้งกระบวนการเข้าทำลายของเชื้อเนื่องจากโครงสร้างที่มีอยู่ก่อนแล้วในพืช เช่น ความหนาของชั้น cuticle และ epidermis

2. การแสดงความต้านทานที่พืชถูกชักนำให้เกิดขึ้นภายหลัง เนื่องจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ สารเคมี หรือวิธีกล เช่น การตายของเซลล์อย่างรวดเร็วบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ เรียกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ว่า hypersensitive response(HR) (Hammond-kosack and Jones, 1996)

Kombrink and Schmelzer (2001) พบว่ากลไกความต้านทานของพืชเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อโรค โดยพืชต้านทานจะเกิดการตอบสนองด้านปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว(hypersensitive response;(HR)) และแสดงลักษณะการตายของเซลล์พืชอย่างรวดเร็ว(cell death) ซึ่งการตอบสนองของพืชลักษณะนี้เป็นปฏิกิริยาที่เข้ากันไม่ได้(incompatible interaction) ระหว่างพืชกับเชื้อโรค โดยพืชแต่ละชนิดจะมีจุดรับ(receptor site) ในพืชที่จะจำเพาะกับตัวรับ (elicitor) เชื้อโรคต่างกันและพบการสะสมของ secondary metabolites เช่น เกิดการสะสม H_2O_2 NaDPH oxidase และ Ca^{2+} ขึ้นอย่างรวดเร็วในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ และ inhibitory proteins โดยเฉพาะ pathogenesis related proteins รอบๆจุดที่มีการติดเชื้อและเกิดลักษณะการตายของเซลล์พืชอย่างรวดเร็ว

การเกิดปฏิกิริยา HR มีผลให้เกิดความต้านทานกับพืชด้วยขบวนการที่เรียกว่า systemic aquired resistance(SAR) คือหลังจากเกิดการตายของเซลล์อย่างรวดเร็วบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายแล้ว ส่งผลให้เกิดความต้านทานกับพืชทั่วทั้งต้นซึ่งอาจต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคชนิดแรกที่เข้าทำลาย หรือต้านทานต่อสาเหตุโรคชนิดอื่น (Schneider *et al*., 1996)

การเกิดปฏิกิริยา HR หลังจากเชื้อเข้าทำลายพืชแล้วก่อให้เกิดความต้านทานโรคเป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยสารพันธุกรรมของพืชและเชื้อสาเหตุตามทฤษฎี gene-for-gene (Flor, 1971) โดยการตอบสนองต่อกันระหว่างยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานของพืช(R gene) กับยีนที่ควบคุมลักษณะอ่อนแอของเชื้อ(Avr gene) ซึ่งทั้ง 2 ยีนเป็นยีนเดี่ยว(single gene) และในปัจจุบันสามารถแยกสกัดยีนต้านทานของพืชหลายๆชนิดได้สำเร็จ (Hammond-Kosack and Jones, 1996)

SAR เกิดขึ้นเมื่อเชื้อเข้าทำลายพืช หลังจากนั้นเชื้อจะมีการปล่อยสารที่เรียกว่า elicitor และพืชจะมีตัวรับที่เรียกว่า receptor ซึ่งเป็นกระบวนการจดจำ(recognition) ของพืชต่อเชื้อส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไอออนที่ชั้น plasma membrane ทำให้เกิดการแตกตัวของออกซิเจนและสร้าง nitric oxide(NO) และสารพวก reactive oxygen intermediates(ROIS) ได้แก่ superoxide(O_2) และ hydrogen peroxide(H_2O_2) นอกจากมีการสร้าง NO และ ROIs พบว่ามีการสะสมของ salicylic acid(SA) ทั้ง NO, ROIs และ SA อาจมีผลโดยตรงต่อเชื้อ หรือ เป็นสารที่ส่งสัญญาณเพื่อให้พืชสร้างความต้านทาน เช่น การสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น หรือการสร้างสารเคมีเพื่อทำลายเชื้อ นอกจากนี้ในขบวนการ SAR ยังพบว่า jasmonic acid และ ethylene ซึ่งเป็นฮอร์โมนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองเพื่อให้เกิดความต้านทานในพืช หลังจากพืชแสดงความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อพบว่าพืชสร้างโปรตีนที่เรียกว่า pathogenesis related protein หรือ (PR-proteins) ชนิดของ PR-proteins ที่พืชสร้างขึ้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพืชและเชื้อสาเหตุโรค เช่น ในมันฝรั่งที่แสดงความต้านทานต่อเชื้อรา *Phythopthora infestans* สร้าง β-1-3 gluconase (PR2-proteins) (Stroemberg and Brishammer, 1993) ในข้าวที่แสดงความต้านทานต่อเชื้อรา *Magnaporthe grisea* สร้างโปรตีนที่เรียกว่า lipoxygenase (Hofmann and Babuin, 1993)

Ubnes *et al*. (1996) พบว่า systemic acquired resistance(SAR) เป็นปฏิกิริยาตอบสนองความต้านทานต่อสาเหตุของโรคพืช โดยพบว่าเกี่ยวข้องกับการเพิ่มของกิจกรรม SAR genes ซึ่งมักเกี่ยวข้องกับ mutations transgenes และสารเคมีเป็นต้นแต่พบว่าพืชพันธุ์ต้านทานมีกิจกรรมของ SAR genes สูงเมื่อมีการติดเชื้อจากเชื้อโรค

Morris *et al*. (1998) พบว่า systemic acquired resistance(SAR) เป็นระบบความต้านทานโรคโดยทั่วไปและมักเกี่ยวข้องกับ SAR gene พืชสามารถถูกกระตุ้นให้สร้าง SAR gene ได้โดยการใช้สารเคมีเป็นตัวกระตุ้นเช่นการใช้ salicylic acid กระตุ้นความต้านทานโรคราน้ำค้างในข้าวโพดและพบว่าภายหลังการติดเชื้อต้นข้าวโพดที่ถูกกระตุ้น มีกิจกรรมของ PR-1 และ PR-5 gene สูง gene เหล่านี้พืชแต่ละชนิดจะผลิตออกมาแบบจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อที่เข้าทำลายและรูปแบบความต้านทานในพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยวการเปลี่ยนแปลงของ oxidative enzymes ในการป้องกันตัวของพืชพบว่ามีการเกิดความต้านทานคล้ายคลึงกัน

Chen *et al*. (1993) รายงานว่า salicylic acid(SA) สามารถชักนำความต้านทานแบบ systemic acquired resistance(SAR)ในพืชได้โดย SA จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม catalases แต่ชักนำให้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการป้องกันตนเองของพืชจากอันตราย

7.1.1 กิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค

เอนไซม์ peroxidase มักจะ catalyze ปฏิกิริยา redox ระหว่าง H_2O_2 โดยเป็น electron acceptor นอกจากนี้ยังสามารถย่อยแบบ catalytic สารอื่นๆเช่นสารประกอบฟีโนลิก aromatic amines, ascorbic acid, ferrocytochrome C, $NADH_2$ และอื่นๆ เอนไซม์ peroxidase มีหน้าที่ต่างๆในขบวนการเมตะโบลิสซึมของเซลล์ ขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์ เช่นนิวเครียส mitochondria ribosome ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์หรือ membrane ที่ผนังเซลล์ peroxidase จะมีบทบาทในการสร้าง lignin และการสร้าง hydroxyproline ในพืชเป็นโรคหรือพืชที่ได้รับเชื้อ

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของส่วนประกอบ isozymes ของ peroxidase เป็นปฏิกิริยาตอบสนองโดยทั่วไปของพืชที่เกิดขึ้นร่วมกับการเปลี่ยนแปลงเมตะโบลิซึมของเซลล์ภายใต้อิทธิพลของปัจจัยเกี่ยวข้องทั้งภายในและภายนอกเซลล์ การเพิ่มขึ้นของกิจกรรม peroxidase มีความสัมพันธ์กับความต้านทานของพืช อย่างไรก็ตามความต้านทานโรคยังขึ้นอยู่กับขบวนการทางชีวเคมีหลายขบวนการที่ให้ผลร่วมกัน โดยการตัดสินปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายของการเกิดโรคจากการรุกรานของเชื้อ ซึ่งขบวนการทางชีวเคมีต่างๆนั้นก็อาจมีส่วนเกี่ยวข้องทั้งโดยตรงและโดยอ้อมต่อกิจกรรม peroxidase สำหรับบทบาทของ peroxidase ในความต้านทานโรคของพืชขึ้นอยู่กับความสามารถที่จะทำปฏิกิริยา oxidation กับสาร metaboliles ที่สำคัญของเชื้อหรือของพืช เช่น สารประกอบฟีโนลิกเอนไซม์ ท็อกซิน IAA หรืออื่นๆปฏิกิริยา oxidation กับสารประกอบฟีโนลิกจะทำให้เกิดสารสังเคราะห์สารใหม่ที่มีความเป็นพิษทั้งต่อเชื้อและต่อเซลล์พืชขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสารนั้น บางครั้ง peroxidase ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคโดยตรงจากคุณสมบัติของเอนไซม์เอง ในการศึกษาบทบาทในการเพิ่มความต้านทานโรคมีผลการทดลองที่สนับสนุนบทบาทสำคัญของ peroxidase เช่นการใส่เชื้อ *Pseudomonase syringae* pv. *tabaci* ที่ตายเนื่องจากการให้ความร้อนแล้วเข้าสู่ใบยาสูบมีผลทำให้เพิ่มกิจกรรมของ peroxidase และชักนำความต้านทานต่อเชื้อมีชีวิตของแบคทีเรียจากการปลูกเชื้อทดสอบปฏิกิริยาในเวลาต่อมา การฉีด peroxide บริสุทธิ์เข้าใบยาสูบในการทดลองนี้ก็สามารถชักนำความต้านทานโรคใบไหม้จากเชื้อนี้ได้ในลักษณะเดียวกัน (พรทิพย์, 2533)

Peng and Kuc (1992) พบว่า hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 2.16×10^{-5} M สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *Peronospora tabacina*,*Cladosporium cucumerinum* และ *Colletotrichum lagenarium* ในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนี้ NADH หรือ NADPH และ peroxidase ในสารละลาย buffer pH 7.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมงสามารถยับยั้งการงอกของ sporangiospores ของ *P. tabacina* ได้ถึง 72-78 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อลองผสม NADH หรือ NADPH และ peroxidase ลงบนผิวใบด้านบนของยาสูบพบว่าสามารถลดการงอก germ tube ของ sporangiospore ของ *P. tabacina* ได้เช่นกัน

Weber *et al*. (1967) ได้ทำการศึกษา isozyme ของมันเทศ(*Ipomoea batatas*) ที่เป็นพันธุ์ต้านทานโรคและพันธุ์อ่อนแอต่อโรคพบว่ารูปแบบของ isozyme ที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Ceratocystis fimbriata* จะแตกต่างจากรูปแบบของ isozyme ในต้นพืชปกติและพบว่า

กิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase, polyphenoloxidase และ acid phosphatase จะเพิ่มขึ้นในต้นที่ต้านทานโรค สำหรับในพืชชนิดอื่นๆก็ได้มีการศึกษารูปแบบของเอนไซม์ในต้นพืชปกติและพืชที่เป็นโรคเช่นเดียวกันคือ Solymosy *et al*. (1967) ได้ทำการศึกษารูปแบบของ peroxidase ในต้นถั่วพุ่ม(*Phaseolus vulgaris*) และยาสูบ(*Nicotina glutinosa*) ปกติเปรียบเทียบกับรูปแบบของ peroxidase isozyme ของต้นที่ได้รับเชื้อไวรัสพบว่า รูปแบบของ isozyme มีการเปลี่ยนแปลงไป

การปลูกเชื้อรา *Septoria lycopersici* บนมะเขือเทศ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในมะเขือเทศที่มีความต้านทาน ในขณะที่อาการของโรคจะลดลงและพบว่าความเข้มของแสงและช่วงคลื่นของแสงในใบที่ได้รับการปลูกเชื้อมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase ซึ่งจะทำให้มีความต้านทานโรคเพิ่มขึ้น (Benedict, 1972) Reuveni and Ferreira (1985) พบว่ารากมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อจะมีปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase มากกว่ารากของพันธุ์อ่อนแอและเมื่อนำส่วนต่างๆของมะเขือเทศคือรากใบและลำต้นมาทำการปลูกเชื้อพบว่า ปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นทั้งในพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทาน

Kerby and Somerville (1989) พบว่าปฏิยาของเอนไซม์ peroxidase จะเพิ่มขึ้นหลังการปลูกเชื้อเช่นปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase เพิ่มขึ้นหลังการปลูกเชื้อ *Erysiphe graminis* ไปแล้ว 8 และ 16 ชั่วโมงซึ่งกิจกรรมที่เพิ่มขึ้นนี้พบว่าเกี่ยวข้องกับการสร้าง papillae ของข้าวบาร์เลย์และการศึกษาในถั่วเขียว พบว่าปฏิกิริยาของ peroxidase เพิ่มขึ้นหลังจากการปลูกเชื้อ *Rhizoctonia solani* แล้ว 24 ชั่วโมงรวมทั้งรูปแบบของ isozyme ก็มีการเปลี่ยนแปลงด้วย และยังพบว่าสาร Ethephon ที่ใช้ชักนำในการเพิ่มความต้านทานโรคนี้ให้แก่ต้นถั่วมีผลทำให้ปฏิกิริยาและรูปแบบของ isozyme เปลี่ยนแปลงไป (Arora and Bajaj, 1985)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง peroxidase กับเชื้อราโรคราสนิมในระดับเซลล์กับข้าวบาร์เลย์ แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของ peroxidase ใน epidermal และ guard cell มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อเชื้อทั้งที่เป็นแบบรุนแรงและไม่รุนแรง ส่วนใน mesophyll ที่กำลังเกิดอาการแห้งตายมีการตอบสนองต่อเชื้อแบบไม่รุนแรงเท่านั้นแสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase อาจจะมีผลต่อการแสดงความต้านโรคของพืช (Southerton and Deverall, 1990)

7.1.2 กิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase ต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค

เอนไซม์ phenoloxidases ทำหน้าที่ในปฏิริยา oxidation ของสารประกอบฟีโนลิกด้วยโมเลกุลออกซิเจน กิจกรรมเอนไซม์โดยทั่วไป มี 2 ประเภทคือ

1. o–Diphenol: oxigen oxidoreductase ซึ่งอาจเรียกเป็น phenolase, polyphenoloxidase, tyrosinase และ DOPA-oxidase ส่วนมากจะเป็นที่รู้จักกันในรูปของ phenolase complex เพราะประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรม catacholase เท่านั้นส่วนอีกชนิดหนึ่งแสดงกิจกรรมทั้ง catecholase และ cresolase

2. p-Diphenol:oxigen oxidoreductase หรือ laccase ทำหน้าที่ catalyze ปฏิกิริยา aerobic xidation ของ p-hydroquinones หรือ p-phenylenediamines ให้เป็น p-quinones หรือ p-quinonediimines

นอกจาก 2 ประเภทนี้ยังพบว่าเชื้อราบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ m-dihydroxiphenolase ที่ catalyse ปฏิกิริยา aerobic oxidation ของ dihydroxiphenol กิจกรรมของ hydrolase มีความเฉพาะเจาะจงต่อ substrate ต่างๆกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ชนิดเนื้อเยื่อพืช หรือระยะการเจริญของพืชและมักถูกยับยั้งในระหว่าง ปฏิกิริยา oxidation ของ dilydrophenol เนื่องจากคุณสมบัติของ quinone ที่ผลิตขึ้นในปฏิกิริยานี้

หน้าที่ทางสรีรวิทยาของเอนไซม์พบว่ามีส่วนร่วมในปฏิกิริยา redox ภายในเซลล์พืชซึ่งมักพบในคลอโรพลาสต์ mitochondria, microbodies และใน soluble cytoplasmic fraction กิจกรรมที่พบได้แก่การทำ monophenol เป็น diphenol ในปฏิกิริยา oxidation การยับยั้งกิจกรรมของ IAA โดย tyrosinase ในที่มี catechol เช่น o-quinone หรือการเกาะยึดกับโมเลกุล IAA ด้วย phenol ในปฏิกิริยา oxidation

ในปฏิกิริยาการเกิดโรคของพืช หลายกรณีมักจะพบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม phenolase และ peroxidese หรือปริมาณสารประกอบฟีโนลิค ในพืชต้านทานมากกว่าพืชอ่อนแอเมื่อได้รับเชื้อกลไกการเพิ่มชนิดของกิจกรรม phenolase อาจเกิดขึ้นในลักษณะที่เป็น

1. latent form ในพืชบางชนิด ซึ่งการเพิ่มกิจกรรม phenolase หลังการติดเชื้อหรือการเกิดบาดแผล จากการกระตุ้น latent form ของ phenolase หรือการละลาย phenolase จากโครงสร้างในเซลล์

2. เป็นปฏิกิริยาต่อเนื่องของการสังเคราะห์ภายในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งพบในกรณีมันเทศซึ่งได้รับเชื้อ *Ceratocystis fimbriata*

3. การผลิตขึ้นโดยเชื้อรา ทำให้มี Phenolase เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อพืช เช่น *Helminthosporium oryza*eและ *Fusarium* spp.

การเพิ่มชนิดของ phenolase ในเนื้อเยื่อเป็นโรคหรือเป็นแผลมักเกิดขึ้นร่วมกับการเพิ่มปริมาณของสารประกอบฟีโนลิกที่หลายชนิดจะมีพิษต่อเชื้อสาเหตุโรคในระดับต่างๆกันแต่จะไม่มีพิษมากต่อเนื้อเยื่อพืชส่วนผลผลิตจากปฏิกิริยา oxidation หรือโพลีเมอร์ของฟีโนลิกจะมีความเป็นพิษแตกต่างกันเช่น quinines มีความเป็นพิษมากที่สุดและมีประสิทธิภาพมากที่สุด ส่วนโพลีเมอร์ที่สูงขึ้นของฟีโนลิกจะมีพิษน้อยหรือไม่มีความเป็นพิษเลย เอนไซม์ polyphenol phenolase หรือ polyphenol-peroxidase-H_2O_2 อาจเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาป้องกันตัวเองของพืชต่อเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส โดยเฉพาะในปฏิกิริยา hypersensitive reaction และยังเกี่ยวข้องกับอาการสีดำคล้ำของเนื้อเยื่อพืชหลังการเกิดแผลและในการสร้างสิ่งป้องกันเชื้อกายภาพ phenolase จะทำการ oxidize สาร mono และ dihydrophenols เมื่อผลิตสารโพลีเมอร์สีน้ำตาลหรือดำที่เรียกว่าเม็ดสีเมลานินการผลิต oxidative โดยเชื้ออาจมีผลทำให้เปลี่ยนสาร polyphenol ให้ลดความเป็นพิษลงทำให้เชื้อสามารถเข้าทำลายพืชได้ดีขึ้น ในการพิสูจน์บทบาทของ phenolase ต่อการเกิดความต้านทานโรคในพืชก็ได้ผลในทำนองเดียวกันกับ peroxidase ที่เอนไซม์หรือการสะสมสารประกอบฟีโนลิกเป็นผลมาจากปฏิกิริยาตอบสนองโดยทั่วไปของพืช มากกว่าจะเป็นสาเหตุหลักในการแสดงความต้านทานหรือการเกิดแผลจุดของพืช (พรทิพย์, 2533)

7.2 การชักนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อโรคพืชโดยใช้สารเคมี

Benhamou and Belanger (1998) รายงานว่า benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester(BTH) ที่ฉีดพ่นทางใบให้กับต้นมะเขือเทศ(*Lycopersicon esculentum*) สามารถกระตุ้นความต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*(FORL) ได้โดย ต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้ฉีดพ่น BTH บริเวณเนื้อเยื่อของรากพบกลุ่มของเส้นใย FORL เจริญในส่วนท่อน้ำและอาหาร สำหรับต้นมะเขือเทศที่ฉีดพ่น BTH ก่อนเชื้อ FORL มีการเจริญในส่วนของ epidermis และส่วนนอก cortex รากมะเขือเทศเท่านั้นเนื่องจากพบการสะสมของ callose บริเวณจุดที่มีการแทงของเส้นใย โดยที่ผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราพบว่า cytoplasm ข้นและจับตัวเป็นก้อนแข็งและส่วนของ protoplasm ของเส้นใยค่อยๆสลายไป นอกจากนี้บริเวณผนังเซลล์ของรากมะเขือเทศยังพบการสะสมของสารประกอบ phenolic จำนวนมากและการฉีดพ่น BTH ให้มะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอต่อโรคก่อนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้มะเขือเทศพันธุ์อ่อนแอต้านทานต่อเชื้อรา FORL สาเหตุโรคเหี่ยวได้ นอกจากนั้น Benhamou and Belanger ยังพบว่า benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester(BTH,CGA 245704) สามารถกระตุ้นความต้านทานต่อเชื้อ *Pythium ultimum* สาเหตุโรครากเน่าในแตงกวาได้โดยต้นมะเขือเทศที่ฉีดพ่น BTH เชื้อ *P. ultimum* สามารถเจริญเข้าไปในส่วนของท่อน้ำแต่เชื้อจะถูกยับยั้งโดยสารประกอบ phenolic ที่สะสมก่อนในส่วนของท่อลำเลียงน้ำ และ vascular parenchyma cells นอกจากนี้การให้ BTH กับต้นแตงกวาพันธุ์อ่อนแอก่อนการติดเชื้อพบว่าแตงกวามีการสะสมสารประกอบ phenol ขึ้นอย่างรวดเร็วก่อนที่เชื้อ *P. ultimum* จะเจริญเข้าครอบครองเนื้อเยื่อลำเลียงแตงกวาทั้งหมด

Gorlach *et al*. (1996) ศึกษาพบว่า benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester(BTH) สามารถกระตุ้นความต้านทานแบบ systemic resistance ต่อโรคราแป้งข้าวสาลีได้โดยพบว่า BTH ช่วยกระตุ้นยีนต้านทานเช่น lipoxygenase และ sulfur-rich protein ในขบวนการต้านทานโรคและหากเทียบกับสารกระตุ้นความต้านทานอื่นๆ เช่น 2,6-dichloroisonicotinic acid และ salicylic acid แล้ว BTH จัดเป็นสารเคมีที่สามารถกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานโดยตรงและเหนี่ยวนำให้ยีนในพืชสร้างความต้านทานขึ้น Iriti and Faoro(2003) รายงานว่า benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester(BTH) ความเข้มข้น 0.3 mM ฉีดพ่น 7 วันก่อนปลูกเชื้อสามารถกระตุ้นความต้านทานเชื้อราสนิม *Uromyces appendiculatus* ในถั่วพันธุ์ Borlotto Nano lingua di Fuoco(BLF), Borlotto Tayloy, Cannellino, Cannellino Montalbano, Sexa และ Top crop จากการศึกษาพบว่าการฉีดพ่น BTH พบการสะสมของ hydrogen peroxide(H_2O_2) ในเนื้อเยื่อถั่วเป็น

จำนวนมากโดยพบมีการสะสมในส่วนของชั้น epidermis ของใบเป็นส่วนแรกและเมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ peroxidase สูงแต่ไม่พบว่าเกิดการตายของเซลล์(Cell death)

Colson-Hanks and Deverall (2000) ศึกษาพบว่า benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester(BTH) ในรูปแบบเม็ดอัตรา 35 mg/ml สามารถชักนำให้ใบอ่อนฝ้ายต้านทานโรคใบไหม้สาเหตุจากเชื้อรา *A. macrospora* ได้โดยพบกิจกรรมของ β-1,3-glucanase สูงที่ใบและก้าน นอกจากนี้ 2,6-dichloroisonicotinic acid(INA)ในรูปผงอัตรา 15-75 mg/mL. สามารถชักนำให้ใบใหม่ของฝ้ายต้านทานต่อเชื้อรา *A. macrospora* ได้เช่นกัน

Godard *et al*. (1999) พบว่าสารละลาย BTH ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดพ่นก่อน 4 วัน สามารถชักนำให้กล้ากะหล่ำดอกอายุ 7 วัน และกะหล่ำดอกอายุ 30 วัน ต้านทานต่อราน้ำค้างได้และสามารถต้านทานโรคได้นานถึง 30 วัน หลังฉีดพ่น BTH โดยสามารถลดความรุนแรงของโรคได้สูงสุดถึง 22 เปอร์เซนต์ และ BTH ความเข้มข้นที่ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วยให้ใบกะหล่ำดอกมีความยาวและความกว้างเพิ่มขึ้น 14.1 และ 12.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมตามลำดับ Ishii *et al*. (1999) ทดสอบพบว่าสาร benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester มีผลต่อการเจริญของเส้นใยและการงอกของ conidia เชื้อรา *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคเน่าของ melon ในห้องปฏิบัติการได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ASM ที่ปลูกทดลองในกระถางสามารถควบคุมโรค anthracnose และ scab ในแตงกวาและโรคราสนิมบนต้นสาลี่ญี่ปุ่นได้ แต่พบว่า ASM ไม่สามารถควบคุมโรคเหี่ยว Fusarium ของแตงกวาได้ Burketova *et al*. (1999) ศึกษาบริเวณแผล necrotic และบริเวณที่มีการปลูกเชื้อแต่ไม่พบอาการโรคหลังจากฉีดพ่น BTH และพบว่า BTH เป็นสารชักนำให้ sugar beet สร้าง protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับความต้านทานขึ้นโดย BTH เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ acidic chitinase isozymes, acidic beta-1,3-glucanase isozymes, basic chitinase isozymes, basic bata-1,3-glucanase isozymes

Ton and Mauch-Mani (2004) รายงานว่า β-amino-butyric acid(BABA) สามารถกระตุ้นให้ Arabidopsis ต้านทานต่อเชื้อ *A. brassicicola* และ *Plectosphaerella cucumerina* ได้ดีพอกับการใช้ jasmonic acid(JA), benzothiadiazole(BTH) และ salicylic acid(SA) โดยรูปแบบความต้านทานในพืชภายหลังการใช้ BABA พบว่าเกิดการสะสมของ callose ขึ้น Rohilla *et al*.

(2002) ศึกษาพบว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ acibenzolar-S-methyl(BTH) ในด้านความต้านทานต่อโรคกาบใบไหม้ของข้าวสาเหตุจากเชื้อ *Rhizoctonia solani* พบว่า BTH ที่ให้โดยการฉีดพ่นทางใบและราดลงดินให้ผลในการยับยั้งสารพิษ(fungitoxicity) ที่เชื้อราหลั่งออกมา ยับยั้งการแทงเข้าสู่พืช การเจริญของเส้นใยภายในพืช การสร้างเม็ด sclerotia โดย BTH ยังสามารถชักนำให้ปลายเส้นใย *R. solani* โป่งพอง เกิด papillae เกิดการตายของเซลล์ยังผลให้เชื้อราลดการเข้าทำลายส่วนของเนื้อเยื่อ epidermis และชั้น mesophyll ชักนำให้ใบใหม่เกิดความต้านทานขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ BTH ก่อนการปลูกเชื้อ 1 ชั่วโมงยังสามารถชักนำให้ต้นข้าวต้านทานต่อโรคกาบใบแห้งได้อีกด้วยแต่จะให้ผลความต้านทานโรคสูงสุดเมื่อฉีดพ่น BTH ก่อน 24 ชั่วโมง

Buzi *et al*. (2004) ศึกษาพบว่า acibenzolar-S-mrthyl(BTH) และ methyl jasmonate(MeJA) ฉีดพ่นให้กับกล้า melon สามารถป้องกันโรค gummy stem blight และ white mould สาเหตุจากเชื้อ *Didymella bryoniae* และ *Sclerotinia sclerotorum* ตามลำดับได้ โดยการใช้ BTH และ MejA ฉีดพ่นให้กับ melon ก่อนปลูกเชื้อ *D. bryoniae* 1 วัน พบปฏิกิริยา hypersensitive response อาการ necrotic lesions และ water soaked lesions เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วอย่างไรก็ตามการใช้ MeJA ในการชักนำความต้านทานจะพบอาการ necrotic lesionsและ water soaked lesions น้อยกว่าการใช้ BTH นอกจากนี้การใช้ BTH ยังช่วยป้องกันการเข้าติดเชื้อจากเชื้อ *S. sclerotiorum* โดยพบปริมาณ necrotic lesions สูงในบริเวณที่มีการปลูกเชื้อ และการใช้ BTH และ MeJA พบกิจกรรมของ pathogenesis-related proteins, chitinase และperoxidase เพิ่มมากขึ้น โดยการใช้ MeJA ยังช่วยเพิ่มการสะสมของ lipoxygenase ซึ่งเกี่ยวข้องกับ metabolic pathways ที่เกี่ยวกับขบวนการต้านทานต่อโรคในพืชด้วย Tosi *et al*. (1999) พบว่าการใช้ benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid s-methyl ester acibenzolar-S-methyl(BTH) ราดลงดินและฉีดพ่นช่วยชักนำให้ทานตะวันต้านทานต่อเชื้อ *Plasmopara helianthi* ได้ โดยอัตราการใช้ราดลงดินและฉีดพ่นที่ใบอัตรา 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนการปลูกเชื้อโรคราน้ำค้าง 3 วันช่วยป้องกันโรคราน้ำค้างได้ถึง 80-82 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการราดดิน และฉีดพ่นที่ใบที่ความเข้มข้นมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ช่วยป้องกันโรคได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าต้นทานตะวันเกิดอาการ phytotoxic การใช้ BTH ราดลงดินหรือฉีดพ่นบนใบก่อนหรือหลังปลูกเชื้อโรคราน้ำค้าง 1 วันให้ผลในการชักนำให้ทานตะวันเกิดความต้านทานโรคไม่แตกต่างกัน และการใช้ BTH ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *P. helianthi* ในห้องปฏิบัติการนอกจากนี้การใช้ BTH ชักนำความต้านทานยังให้ผลด้านความรุนแรงของโรคไม่แตกต่างจากการใช้สารเคมี metalaxyl ในการควบคุมโรค

Jean-Francois *et al*. (1999) ศึกษาถึงความต้านทานโรคราน้ำค้าง *Peronospora parasitica* ในต้นกล้ากะหล่ำดอก(*Brassica oleracea*) ลูกผสม(F_1 hybrid) พันธุ์อ่อนแอต่อโรค พบว่าหลังจากฉีดพ่นด้วย benzothaiadiazole(BTH) ให้กับต้นกล้ากะหล่ำดอกพันธุ์อ่อนแอที่ความเข้มข้นของ BTH 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้ต้นกล้ากะหล่ำดอกต้านทานแบบ systemic resistance ได้จากการฉีดพ่น BTH ให้กับกล้ากะหล่ำดอกก่อน 1 วัน โดยพบว่าสามารถลดการงอกของสปอร์เชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุของโรคลงได้ถึง 22 เปอร์เซ็นต์

Ziadi *et al*. (2001) ศึกษาพบว่า เมื่อฉีด acibenzolar-S-methyl(ASM) จำนวน 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้กับต้นกล้ากะหล่ำดอกก่อนการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *P. parasitica* 1 วันพบว่าสามารถชักนำให้เกิดความต้านทานต่อราน้ำค้างได้โดยสามารถลดปริมาณการสร้างสปอร์ของราน้ำค้างลงได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้พบว่า ASM ช่วยกระตุ้นปฏิกิริยาของ PR-proteins, chitinase และ β-1,3 glucanase ในต้นกล้ากะหล่ำดอกให้มีปริมาณสูงขึ้น ซึ่ง AMS ช่วยกระตุ้นปฏิกิริยาของ PR-protein โดยเฉพาะ PR-1 และ PR-5 จะพบว่ามีปริมาณการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ

Soner *et al*. (2003) รายงานว่าการใช้สาร acibenzolar-S-methyl (benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester, ASM; Bion 50 WG) สามารถกระตุ้นความต้านทานในกล้ามะเขือเทศต่อเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*(Cmm) สาเหตุโรค bacterial canker ของมะเขือเทศได้ โดยการใช้ ASM กับกล้ามะเขือเทศก่อนปลูกช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ และช่วยชะลอการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า 68.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปลูกด้วยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคตาม ในภายหลัง และพบกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase(POX) และ glutathione peroxidase(GPX) สูงในต้นมะเขือเทศที่ใช้ ASM แล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค Resende *et al*. (2002) รายงานว่าสาร acibenzolar-S-methyl(ASM) สามารถกระตุ้นความต้านทานต่อเชื้อ *Crinipellis pemiciosa* สาเหตุของโรคพุ่มแจ้(Witches'broom) และเชื้อ *Verticillium dahliae* สาเหตุของโรค vascular wilt ในต้นโกโก้ได้โดยพบว่าสามารถลดความรุนแรงของโรคพุ่มแจ้ได้ถึง 84.5 เปอร์เซ็นต์ในโกโก้พันธุ์ Catongo เมื่อฉีด ASM ให้กับต้นกล้าโกโก้ก่อน 30 วันแล้วจึงตามด้วยการฉีดพ่นเชื้อสาเหตุโรคและ ASM สามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวได้ถึง 55.4 เปอร์เซ็นต์ในโกโก้พันธุ์ Theobahia นอกจากนี้พบว่า ASM ช่วยกระตุ้นให้สารประกอบ phenollics เอนไซม์ polyphenol oxidase และ peroxidase เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3, 15 และ 30 วันในโกโก้ พันธุ์ Catongo ตามลำดับและพบ

กิจกรรมเอนไซม์ peroxidase เพิ่มสูงขึ้นอย่างมากสำหรับสารประกอบ phenolic และเอนไซม์ polyphenol oxidase พบว่ามีปริมาณไม่แตกต่างกันภายหลังฉีด ASM ให้กับโกโก้ ในโกโก้พันธุ์ theobahia พบกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase และ polyphenol oxidase เพิ่มสูงขึ้นอย่างมากสำหรับสารประกอบ phenolic พบเพียงในระดับต่ำภายหลังจากฉีดพ่น ASM ในการกระตุ้นให้โกโก้เกิดความต้านทานต่อโรค

Miyazawa *et al*. (1998) พบว่า nicotinic acid และ furoic acid สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ peroxidase ที่บริเวณผนังเซลล์ของยอดอ่อนมะเขือเทศได้ นอกจากนี้การให้สารละลายเพียง 1 μM ของ 4-hydroxybenzoichydrazide(4HBHZ) salicylic hydrazide(SHZ) และ 2-furoic acid(2FA) กับรากมะเขือเทศช่วยกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อโรคเหี่ยวสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ได้ นอกจากนั้น Yigal *et al*. (1994) รายงานว่าเมื่อทำการฉีดพ่นด้วยสารละลาย β-aminobutyric acid ให้กับต้นกล้ามะเขือเทศ พบว่ามะเขือเทศมีการสะสม pathogenesis-related(PR) protrins ปริมาณเพิ่มมากขึ้น ทำให้ต้นกล้ามะเขือเทศเกิดความต้านทานต่อโรคไหม้ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora infestans* ได้ และ β-aminobutyric acid ยังกระตุ้นการสะสมของโปรตีนจำพวก β-1,3 glucanase และ chitinase เพิ่มขึ้นในต้นกล้ามะเขือเทศเมื่อทำการฉีดพ่นด้วย β-aminobutyric acid ก่อนการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 1 วัน

Yeon *et al*. (2000) รายงานว่า DL-β-amino-n-butyric acid (BABA) ช่วยกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อโรคไหม้ของพริกไทยได้ โดยลดการเข้าทำลาย การเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Phytophthora capsici* ลง ทั้งนี้พบว่า BABA กระตุ้นให้ผนังเซลล์พริกไทยหนาขึ้น ยากต่อการแทงเส้นใยของเชื้อราเข้าสู่เซลล์พืช และนอกจากนี้ยังพบปริมาณของ cytoplasm สะสมในเซลล์พืชมากขึ้น และเกิดการตายของเซลล์บริเวณที่มีการเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้อย่างรวดเร็วก่อนที่ส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราจะประสบความสำเร็จในการเข้าสู่เซลล์พืชได้ นอกจากนี้ Reglinski *et al*. (1997) รายงานว่าสาร salicylic acid(SA), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC) และDL-beta-amino-n-butyric acid(BABA) สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase(PAL) สูงขึ้นภายหลังติดเชื้อโรคใบไหม้สาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* ในกีวี นอกจากนี้พบว่าการฉีดพ่นด้วย SA ความเข้มข้น 2 mM สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ให้สูงขึ้น 10 เท่าภายใน 2 วัน และการฉีดพ่นด้วย ACC ความเข้มข้น 0.5 mM สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ PAL ให้สูงขึ้น 4 เท่าภายใน 5 วันภายหลังจากติด

เชื้อ สำหรับการฉีดพ่น BABA ให้กับต้นกีวีไม่พบการเพิ่มของกิจกรรมเอนไซม์ PAL แต่อย่างใด นอกจากนี้พบว่า 4-chlorosalicylic acid(4CSA) สามารถควบคุมโรคใบไหม้สาเหตุจาก *Sclerotinia sclerotiorum* ในกีวีได้โดยพบว่า 4 CSA สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ บนแผ่นใบ และ 78 เปอร์เซ็นต์บนเส้นใบเปรียบเทียบกับการฉีดพ่นด้วย SA สามารถลดอาการของโรคลงได้เพียง 48 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการฉีด 4CSA สามารถกระตุ้นให้กีวีสร้างความต้านทานขึ้นได้ภายหลังการฉีด 4 วัน และการฉีด 4CSA ยังพบว่าไม่ก่อให้เกิด phytotoxic ขึ้นภายในพืชอีกด้วย

Hofgaard *et al*. (2005) ศึกษาพบว่า Chitosan และ Bion ความเข้มข้น 1,000 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร สามารถ ชักนำให้ young winter wheat(*triticum aestivum* L.) และ perennial ryegrass(*Lolium peerenne* L.) ต้านทานต่อโรค pink snow mold(*Microdochium nivale*) ได้โดยพบว่าภายหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคพบปริมาณ pathogenesis-related protein และchitinase สูงอย่างมากในพืช

7.3 การชักนำให้เกิดความต้านทานโดยวิธีทางชีววิธี

Tessier *et al*. (1990) ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุของโรคเหี่ยวในถั่วปากอ้าพันธุ์ต้านทาน และพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ภายหลังจากการเข้าติดเชื้อแล้ว 4 วัน พบเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* เจริญเป็นจำนวนมากในส่วนของ parenchyma cell และ vascular bundle ในถั่วปากอ้าพันธุ์อ่อนแอ สำหรับถั่วปากอ้าพันธุ์ต้านทานจะมีการสร้าง callose และมีการสะสมสาร phenolic compounds ขึ้นบริเวณที่มีการติดเชื้อ

Jian and George (2001) ศึกษาความแตกต่างของการเข้าครอบครองเนื้อเยื่อมะเขือเทศของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศและ nonpathogenic *F. oxsporum* strain 70T01 ซึ่งพบว่าเมื่อตัดท่อลำเลียงน้ำ และอาหารของลำต้นมะเขือเทศ พบว่าเส้นใยเชื้อรา nonpathogenic *F. oxsporum* strain 70T01 เจริญเฉพาะในส่วนของ epidermal cell และ cortex cell เท่านั้น ซึ่งต่างจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศจะพบเส้นใยเจริญในส่วนของ vascular bundle และยังพบอีกว่าบริเวณที่ทำการปลูกเชื้อ strain 70T01

พืชมีการตอบสนองโดยการสร้างผนังเซลล์พืชให้หนาขึ้นหรือมีการพบลักษณะการสร้าง papilla ขึ้นบนใบพืช

Biles and Martyn (1989) ฉีดพ่นเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *niveum* ให้กับต้นแตงโม ก่อน 24 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคเหี่ยวเฉาให้กับต้นแตงโมได้หลังทำการปลูกเชื้อด้วย *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* เชื้อสาเหตุของโรคเหี่ยวเฉาตาม และการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *niveum* ก่อน 24 ชั่วโมง ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อโรค anthracnase สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum lagenarium* บนใบแตงโม

การใช้ nonpathogenic *F. oxysporum* strain *Fo*47 ในการควบคุมโรค Fusarium wilt สาเหตุจาก *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* โดยชีววิธี พบว่า non pathogenic *F. oxysporum* strain *Fo*47 ความเข้มข้น 10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้ต้นมะเขือเทศต้านทานจากโรคเหี่ยวสาเหตุจาก *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ได้(Fuchs *et al*., 1990) He *et al*. (2002) ศึกษาพบว่า nonpathogenic *F.oxsporum*(np*Fo*) สามารถชักนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *asparagi*(*Foa*) สาเหตุของโรค Fusarium crown rot ในหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธี split-root พบว่าต้นหน่อไม้ฝรั่งเกิดโรค Fusarium crown rot ลดลงเมื่อทำการปลูกเชื้อ np*Fo* ก่อน 2 วันแล้วจึงตามด้วยเชื้อ *Foa* จะเกิดปฏิกิริยาแผลตาย(necrotic lesions) อย่างรวดเร็วและเมื่อนำน้ำคั้นรากหน่อไม้ฝรั่งมาหยดทดสอบการงอกและเจริญของ germ-tube พบว่าการงอกของ germ tube ลดลง นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์รากหน่อไม้ฝรั่งที่ต้านทานโรคพบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase(PAL) และ lignin นอกจากนี้ Blok *et al*. (1997) รายงานว่า nonpathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi*(np*Fo*) isolate *Fo*47 สามารถลดโรค Fusarium root rot สาเหตุจาก *F. oxysporum* f.sp. *asparagi*(*Foa*) ลงได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ภายในเรือนปลูก และ 23-49 เปอร์เซ็นต์ในแปลงปลูกทดลอง แต่พบว่าประสิทธิภาพการควบคุม *Foa* ใน แปลงปลูกทดลองจะให้ผลน้อยหากต้นหน่อไม้ฝรั่งมีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป โดยกลไกการยับยั้ง *Foa* ของ np*Fo* พบว่าเส้นใย np*Fo* จะเจริญคลุมทั่วผิวรากหน่อไม้ฝรั่งได้เร็วกว่า *Foa* และพบว่า np*Fo* ช่วยชักนำให้รากหน่อไม้ฝรั่งหลั่งสารเกี่ยวกับการยับยั้งขบวนการงอกของ Chlamydospores ได้ 43-64 เปอร์เซ็นต์ในสภาพแปลงทดลอง

Ben *et al*. (1998) ศึกษาพบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonase fluorescent* และเชื้อรา nonpathogenic *F. oxysporum* สามารถลดปริมาณของโรค Fusarium wilts ได้โดยเชื้อทั้งสองมีความสามารถเป็นได้ทั้ง microbial antagonism และสามารถกระตุ้นให้มะเขือเทศต้านทานต่อโรคเหี่ยวแบบ systemic induced resistance ได้โดยการใส่เชื้อแบคทีเรีย *P. fluorescent* พบการสะสมของ PR-proteins(PR-1) และ chitinase สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใส่เชื้อ nonpathogenic *F. oxysporum* ให้กับต้นมะเขือเทศ พบว่าเชื้อราชนิดนี้มีความสามารถเป็น microbial antagonism มากกว่าจะกระตุ้นให้มะเขือเทศเกิดความต้านทานแบบ systemic resistance

Larkin and Fraval (1999) ศึกษาพบว่า nonpathogenic *Fusarium* isolate CS-1, CS-20 และ *Fo*47 สามารถลดความรุนแรงของโรค Fusarium wilt ได้โดยกลไกความต้านทานโรคของnp*Fo* พบว่าเกี่ยวข้องกับการเป็นปฏิปักษ์(antagonism) การแข่งขัน(competition) ด้านอาหารและชักนำให้เกิดความต้านทานแบบ systemic ในมะเขือเทศ(*Lycopersicon esculentum*) และแตงโม (*Citrullus lanatus*) โดย Isolate CS-20 สามารถลดความรุนแรงของโรคได้ 39-53 เปอร์เซ็นต์ และ Isolate *Fo*47 สามารถลดความรุนแรงของโรคลงได้ 23-25 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้มีเพียงการใช้ np*Fo* isolate *Fo*47 เท่านั้นที่สามารถพบจำนวนเชื้อราโรคเหี่ยวได้น้อยกว่า 10 chlamydospores per g of soil(egs) สำหรับ np*Fo* isolates CS-20 และCS-1 สามารถพบจำนวนเชื้อราได้เพียงเล็กน้อย(100-5,000 cgs) เท่านั้น โดยกลไกความต้านทานในมะเขือเทศพบว่า np*Fo* isolate CS-20 และ CS-I เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดความต้านทานและ np*Fo* isolate *Fo*47 เกี่ยวข้องกับกลไกด้านการแก่งแย่งแข่งขันกับเชื้อราโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ

Sneh (1998) รายงานว่า nonpathogenic(avirulent) หรือ low virulent(hypovirulent) strains สามารถเข้าครอบครองผิวเพื่อแก่งแย่ง(competition) แหล่งอาหารเช่นแหล่งของ carbon และ iron นอกจากนี้การปลูกเชื้อ hypovirulent strains ของ *Cryphonectria*(*Endothia*) *parasitica* ช่วยป้องกันโรค chestnut blight จากเชื้อสายพันธุ์รุนแรงได้นอกจากนี้ Claudie *et al*. (2002) ได้ศึกษาการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานในพืชตระกูลกะหล่ำโดยใช้ avirulent isolate ของเชื้อรา *P. parasitica* ที่แยกได้จากบล็อคโคลี่สามารถใช้ในการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุของโรครา น้ำค้างสายพันธุ์รุนแรงของกะหล่ำดอกได้โดยสามารถลดอาการของโรคลงได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้ากะหล่ำดอกสามารถต้านทานโรคได้นานถึง 15 วันหลังจาก

ปลูกเชื้อสายพันธุ์รุนแรง นอกจากนั้นการศึกษาการกระตุ้นความต้านทานพบปริมาณของ PR-proteins PR-2 และ PR-5 เพิ่มมากขึ้นในต้นกล้ากะหล่ำที่ได้จากการกระตุ้นให้เกิดความต้านทาน

Singh (2003) ศึกษาเชื้อ *Oidium* sp., *Phyllactinia corylea* และ *P. delbergiae* ซึ่งเป็น pea non-pathogenic powdery mildews(PNPM) สามารถชักนำให้เกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *Erysiphe pisi* ได้โดยพบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ของ PNPM ช่วยชักนำให้พืชสร้างความต้านทานโรคราแป้งโดยลดการงอกของ conidia การสร้าง appressorium และการสร้าง secondary branch ของ conidia บนถั่ว(*Pisum sativum*)ได้นานถึง 12 วัน ภายหลังจากการปลูกเชื้อราแป้ง 3 สายพันธุ์ โดยพบปริมาณของ total phenolics, gallic tannic และ ferulic acids เพิ่มมากขึ้นแต่ไม่พบปฏิกิริยาของ hypersensitive cell death หรือการสร้าง lignin ในเนื้อเยื่อใบถั่ว

Hezhong *et al*. (2003) ใช้ mycelium แห้งของ *Penicilium chrysogenum* กระตุ้นความต้านทานโรคเหี่ยวสาเหตุจากเชื้อรา *Verticillium dahliae* ให้กับต้นกล้าฝ้ายพันธุ์ *Gossypium hirsutum* cultivars(H552และvered) และ *G. barbadense* cultivars(PF15 และP906) โดยเมื่อปลูกเชื้อด้วย *P. chrysogenum* แล้วปลูกเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวตามคือเชื้อรา *V. dahliae* ภายหลัง 24 ชั่วโมง พบการเพิ่มสูงของปริมาณเอนไซม์ peroxidase(POX) และ lignin ขึ้นบนใบอ่อนที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *P. chrysogenum* นอกจากนี้ Resende *et al*. (1996) พบว่า *V. dahliae* บาง isolates(avirulance isolates) สามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวในต้นโคคา ได้โดยพบว่าบริเวณที่มีการติดเชื้อ ปากใบ ท่อลำเลียงน้ำและอาหารหยุดการเคลื่อนย้ายน้ำและอาหารไปยังบริเวณที่ติดเชื้อ นอกจากนี้ใบที่มีการติดเชื้อยังพบการสะสมของฮอร์โมนเอทิลีนปริมาณสูงทำให้ใบที่ติดเชื้อเหลืองและหลุดร่วงไปในที่สุด

Attitalla *et al*. (2001) รายงานว่า การฉีดพ่น zoospore suspension ของเชื้อรา *Phytophthora cryptogea*(PC) ให้กับมะเขือเทศพันธุ์ Danish export พันธุ์อ่อนแอต่อโรคและพันธุ์ Elin F1 พันธุ์กึ่งต้านทานช่วยให้มะเขือเทศทั้ง 2 พันธุ์ต้านทานต่อโรคเหี่ยวสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*(FOL) ได้โดยพบว่าอาการของโรคลดลงเนื่องจากการแก่งแย่งพื้นที่และอาหารบริเวณผิวรากนอกจากนี้ PC เป็นปฏิปักษ์กับ FOL โดยตรงซึ่งการฉีด PC ก่อน 1 วันก่อนปลูกเชื้อ FOL ช่วยชักนำให้พืชต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราโรคเหี่ยวได้นานถึง 40 วัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ชีววิทยาของเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดและเชื้อราที่แยกได้จากผักกาดกวางตุ้ง

1.1 การศึกษาชีววิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากผักกาดกวางตุ้ง

1.1.1 การเก็บตัวอย่าง: เก็บตัวอย่างส่วนต่างๆของผักกาดกวางตุ้ง (ใบ ลำต้น ก้านใบ) จากแหล่งปลูกผักกาดกวางตุ้ง 12 ตำบล จาก 5 จังหวัด ดังนี้ คือ จ. เชียงราย จ. เชียงใหม่ จ. ลำปาง จ. ร้อยเอ็ด และ จ. นครปฐม เพื่อนำไปแยกเชื้อราภายในห้องปฏิบัติการ

1.1.2 วิธีการแยกเชื้อจากส่วนของพืช: นำใบและส่วนต่างๆของผักกาดกวางตุ้ง จากข้อ 1.1.1 ล้างผ่านน้ำไหลด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ สุ่มตัดดอกย่อย ใบ และ ก้านใบเป็นชิ้นเล็กๆ (ประมาณ 0.5×0.5 เซนติเมตร) ด้วยมีดลนไฟฆ่าเชื้อ ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้ง ใช้ปากคีบหรือเข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อย้ายส่วนของพืชไปซับให้แห้งบนกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวางบนอาหาร potato dextrose agar(PDA) จำนวน 10 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ(กรรมวิธีละ 3 จานเลี้ยงเชื้อ) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-7 วัน แยกเชื้อราที่ตรวจพบให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทำ single spore isolation ด้วยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วันหรือจนสร้างสปอร์ นำมาเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น 10^3-10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปเกลี่ยบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนตักสปอร์ที่งอกภายใต้กล้องสเตอริโอและเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้งเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆบนอาหาร PDA จากนั้นใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อ ย้ายปลายเส้นใยเชื้อราเก็บไว้ในหลอดอาหารเอียง(slant) ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.1.3 วิธีการแยกเชื้อโดยการล้างใบ: นำใบผักกาดกวางตุ้งมาล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ โดยหั่นใบพืชให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่(flask) ที่มีน้ำนึ่งฆ่าเชื้ออยู่แล้ว เขย่าด้วย mixer เพื่อให้ผิวใบสัมผัสกับน้ำแล้วทำให้เจือจาง 10^{-1}-10^{-3} เท่า ดูดไปจำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดและเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อไว้ 24-72 ชั่วโมง แยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวหรือเชื้อบริสุทธิ์ ย้ายลงในหลอดอาหารเอียงแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

1.1.4 ศึกษาความสามารถในการก่อโรคและลักษณะรูปร่างของเชื้อราที่แยกได้จากผักกาดกวางตุ้ง

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนใบผักกาดกวางตุ้ง: เตรียมใบผักกาดกวางตุ้งใบที่ 3-4 นับจากยอด เช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3 นาที ผึ่งจนแห้ง และหุ้มก้านใบด้วยสำลีชื้นและห่อด้วยอลูมินัมฟลอย์ ทำแผลบนใบดังกล่าว 1 จุด นำเชื้อ *A. brassicicola* ที่แยกได้ในข้อ 1.1.2 และ 1.1.3 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-10 วันใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบของโคโลนีเชื้อรา จากนั้นจึงใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วย้ายชิ้นวุ้นนำไปวางคว่ำส่วนของเชื้อลงบริเวณแผลบนใบผักกาดกวางตุ้งที่ได้เตรียมไว้จำนวน 10 ใบต่อ 1 ซ้ำ ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ นำไปบ่มในถุงพลาสติกชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบอาการโรคที่พบและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์(isolate) ที่แยกได้

ศึกษาลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อราที่แยกได้ แต่ละชนิดหลังจากได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์แล้วโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะบริเวณขอบของโคโลนีเชื้อรา ใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วย้าย inoculum(mycelial disk)ไปวางตรงกลางจานอาหาร PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จานละ 1 ชิ้น จำนวน 10 จานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อภายใต้แสง NUV ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีด้วย vernier caliper ทุกๆวัน จนกระทั่งเชื้อราแต่ละชนิดเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ สังเกตลักษณะรูปร่างโคโลนี(gross morphology) ของเชื้อรา

ศึกษาลักษณะรูปร่าง conidia ของเชื้อราที่แยกได้แต่ละชนิด จากวิธี silde culture โดยการวาง microscope slide บน tip ที่วางสลับหัวท้ายในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นวุ้น PDA ขนาด 0.5×0.5×0.5 เซนติเมตรมาวางตรงกลาง microscope slide จำนวนจานละ1ชิ้น นำเข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะเชื้อราแต่ละชนิดบนก้อนวุ้นด้านข้างทั้ง 4 ด้าน ในจานเลี้ยงเชื้อของเชื้อราแต่ละชนิดที่แยกได้ ปิดด้วย cover slip บนก้อนชิ้นวุ้นนั้นๆแล้วจึงคลอบด้วยฝาจานเลี้ยงเชื้ออีกครั้ง ก่อนนำไปวางภายใต้แสง NUV ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72-96 ชั่วโมงจึงทำการดึงเอา cover slip ที่ปิดทับ โคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิดไปทำสไลด์ ตรวจดูลักษณะรูปร่างและการเจริญของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมทั้งจำแนกชนิดของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้

1.2 การประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดผักกาดกวางตุ้งในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง กับผักกาดกวางตุ้ง 4 พันธุ์ จากบริษัทเจียไต๋ จำกัด คือ

1. ผักกาดกวางตุ้งดอกต้นขาว(Flowering pak choy) *Brassica campertris* var. *chinensis*

2. ผักกาดเขียวกวางตุ้งพันธุ์คัดพิเศษ(Selected pak choy) *B. campestris* var. *chinensis*

3. ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้(Hongtae pak choy) *B. campestris* var. *chinensis*

4. ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง(Hongkong pak choy) *B. campestris*

เพาะเมล็ดผักกาดกวางตุ้งลงในกระบะเพาะโดยใช้ 3-4 เมล็ดต่อหลุม ในแต่ละหลุมระบุพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งและเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ ที่จะทำการปลูกเชื้อ เมื่อผักกาดกวางตุ้งแต่ละพันธุ์เจริญจนมีใบจริง 1 คู่ ย้ายลงกระถางปลูกโดยคัดให้เหลือต้นที่สมบูรณ์เพียง 2 ต้น เมื่อผักกาดกวางตุ้งอายุ 30 วัน ฉีดพ่นใบพืชทดสอบด้วย clorox 10 เปอร์เซนต์ ให้ทั่วทั้งใบแล้วปล่อยไว้เป็นเวลา 3 นาทีแล้วจึงฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อล้าง colrox ออก จากนั้นทำการเตรียม inoculum ของเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1.1.2 และ 1.1.3 แต่ละสายพันธุ์นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7-10 วัน ภายใต้แสง NUV และนำมาทำ spore suspension โดยใช้ระดับความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 1×10^4 สปอร์ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยการล้างสปอร์จากผิวหน้าอาหารด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้วตรวจนับด้วย haemacytometer ให้มีระดับความเข้มข้นดังกล่าว ฉีดพ่นด้วย foggy ทางด้านบนใบและใต้ใบในแต่ละพันธุ์จำนวนการฉีดพ่น 5 ครั้งแล้วจึงคลุมด้วยถุง polyethylene ชนิดใส เพื่อให้สามารถรักษาความชื้นได้ในระดับ 95-100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อผักกาดกวางตุ้งแสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อไปแล้ว 5-7 วัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค(Percentage of Disease,PD) และประเมินความรุนแรงของโรคที่ใบโดยใช้ดรรชนีการทำลาย(Disease index,di) 5 ระดับดังนี้

ระดับ 1 ใบผักกาดกวางตุ้งมีอาการใบจุด 1-10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ
ระดับ 2 ใบผักกาดกวางตุ้งมีอาการใบจุด 11-25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ
ระดับ 3 ใบผักกาดกวางตุ้งมีอาการใบจุด 26-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ
ระดับ 4 ใบผักกาดกวางตุ้งมีอาการใบจุด 51-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ
ระดับ 5 ใบผักกาดกวางตุ้งมีอาการใบจุด 76-100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

จากนั้นตรวจวัดทำโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างใบผักกาดกวางตุ้งมาจำนวน 50 ใบวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Randomized Completed Block Design ทำการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค(Percentage of disease,PD) และประเมินความรุนแรงของโรค โดยเทียบเป็นดรรชนีความรุนแรงซึ่งคำนวณได้จาก

$$\text{ดรรชนีการวัดความรุนแรง(Disease severity,DS)} = \frac{\sum(ni \times di) \times 100}{N \times 5}$$

ni= จำนวนใบที่เกิดโรคในระดับความรุนแรงนั้นๆ, di=ดรรชนีการทำลาย, N=จำนวนใบทั้งหมดที่ใช้

จากการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค(Percentage of disease;PD) และดรรชนีการวัดความรุนแรง(Disease severity;DS) ทำการคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงมาก(virulent) และสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงน้อยหรือไม่ก่อโรค(avirulent; nonpathogenic) กับผักกาดกวางตุ้ง และคัดเลือกผักกาดกวางตุ้งพันธุ์ต้านทาน(resistance) และอ่อนแอ(susceptible) ต่อโรค

2. <u>การศึกษาการกระตุ้นความต้านทานของผักกาดกวางตุ้งต่อเชื้อรา *A. brassicicola* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์</u>

นำต้นผักกาดกวางตุ้งพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.2 อายุ 30 วัน ปลูกเชื้อราสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงมากและก่อโรครุนแรงน้อยหรือไม่ก่อโรค ลงบนใบผักกาด

กวางตุ้งด้วย spore suspension ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์ต่อ 1 มิลลิลิตร ฉีดพ่นด้วย foggy เข้าทางด้านบนใบและใต้ใบผักกาดกวางตุ้งในแต่ละพันธุ์ หลังจากนั้นจึงทำการคลุมถุง polyethylene ชนิดใส เพื่อให้สามารถรักษาความชื้นได้ในระดับ 95-100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ ตามกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 : ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น;(Cu)

กรรมวิธีที่ 2 : ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola*;(Cu/Ab)

กรรมวิธีที่ 3 : ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น;(Bi)

กรรมวิธีที่ 4 : ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola*;(Bi/Ab)

กรรมวิธีที่ 5 : ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว;(Ab)

กรรมวิธีที่ 6 : ฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว;(Wa)

สุ่มเก็บตัวอย่างใบผักกาดกวางตุ้งพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรค มาครั้งละ 4 ใบ ทุก 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างใบผักกาดกวางตุ้งที่ได้มาตัดให้มีขนาดประมาณ 0.5 × 0.5 เซนติเมตร แช่ลงในสารละลาย absolute alcohol เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ใบผักกาดกวางตุ้งที่ผ่านขบวนการขั้นต้นจะมี

ลักษณะใส) นำใบผักกาดกวางตุ้งที่ล้าง chlorophyll ออกแล้วมาล้างน้ำกลั่นเป็นเวลา 1-2 นาที แล้วจึงนำไปย้อมสีโดยหยด acid fuchsinใน lactophenol solution ลงบนเนื้อเยื่อพืชที่ล้าง absolute alcohol ออกแล้วบนกระจกสไลด์ เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วนำไปล้างสี acidfuchsin ใน lactophenol solution ส่วนเกินออกด้วย lactophenol solution เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างใบผักกาดกวางตุ้งไปศึกษากลไกความต้านทานและการเข้าทำลายของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป

3. <u>ศึกษาการกระตุ้นความต้านทานของผักกาดกวางตุ้งต่อเชื้อรา *A. brassicicola* ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง</u>

เพาะเมล็ดผักกาดกวางตุ้งพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคจำนวน 3-4 เมล็ดต่อหลุม ลงในกระบะเพาะเมื่อผักกาดกวางตุ้งมีใบจริงคู่แรกแล้ว 1 คู่ หรือเมื่อผักกาดกวางตุ้งมีอายุประมาณ 7 วัน ย้ายต้นกล้าผักกาดกวางตุ้งลงในถุงปลูกนำไปวางในเรือนปลูกพืชทดลองรดน้ำให้ความชื้นจนกระทั่งผักกาดกวางตุ้งอายุประมาณ 30 วัน ฉีดพ่นใบพืชทดสอบด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ทั่วทั้งใบแล้วปล่อยไว้เป็นเวลา 3 นาทีแล้วจึงฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อล้าง clorox ออก ปลูกเชื้อโดยใช้เชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน นำไปเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย โดยการล้างสปอร์จากผิวหน้าอาหารด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วตรวจนับด้วย haemacytometer ให้มีความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการทดลองในต้นกล้าผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วัน ศึกษาการชักนำให้เกิดความต้านทานโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 : ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น;(Cu)

กรรมวิธีที่ 2 : ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola*;(Cu/Ab)

กรรมวิธีที่ 3 : ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น;(Bi)

กรรมวิธีที่ 4 : ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola*;(Bi/Ab)

กรรมวิธีที่ 5 : ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว;(Ab)

กรรมวิธีที่ 6 : ฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว;(Wa)

แยกกรรมวิธีทดลองข้างต้นออกเป็น 2 ส่วนโดยส่วนแรกฉีดพ่นให้กับผักกาดกวางตุ้งพันธุ์ต้านทาน และส่วนที่ 2 ฉีดพ่นให้กับผักกาดกวางตุ้งพันธุ์อ่อนแอ ทดสอบในผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วันและอายุ 30 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างต้นกล้าผักกาดกวางตุ้งแต่ละพันธุ์มาครั้งละจำนวน 4 ใบ จำนวน 3 ครั้งในแต่ละกรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ Factorial in Randomized Completed Block Design ตรวจผลในวันที่ 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 วัน หลังจากปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพื่อประเมินการเกิดโรคและประเมินความรุนแรงของโรคจากดรรชนีการทำลาย

3.1 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ polyphenoloxidase (PPO)

สุ่มเก็บใบผักกาดกวางตุ้งจำนวน 4 ใบต่อครั้ง จากการทดลองข้างต้น กรรมวิธีละ 3 ครั้ง นำมาชั่งให้มีน้ำหนัก 1 กรัม และบดด้วย 0.1M Phosphate Buffer(PBS) เย็นจำนวน 5 มิลลิลิตร ย้ายของเหลวที่ได้จากการบดจำนวน 2 มิลลิลิตรใส่ใน microtube แช่ในน้ำแข็ง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บตัวอย่างส่วนใสที่ได้จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน microtube และแช่ในน้ำแข็ง นำหลอดทดลองมาใส่น้ำกลั่นจำนวน 3 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 M ของ PBS จำนวน 1 มิลลิลิตร 0.006M ของ Pyrocatechol Brenzkatechin(Catechol) จำนวน 1มิลลิลิตรและของเหลวที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชที่ต้องการตรวจผลเอนไซม์จำนวน 200

ไมโครลิตร ผสมของเหลวที่ได้ภายในหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 nm ด้วยเครื่อง spectophotometer

3.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase (POX)

ผสมสารละลาย 50 mM sodium citrate จำนวน 2800 ไมโครลิตร กับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ phenol red จำนวน 150 ไมโครลิตร ใช้ตัวอย่างที่สกัดจากข้อ 3.1 จำนวน 50 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลองและผสมให้เข้ากันเติมด้วย 1mM hydrogen peroxide(H_2O_2) จำนวน 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที หลังจากนั้นจึงผสม 2N sodiumhydroxide จำนวน 120 ไมโครลิตร เขย่าของเหลวให้เข้ากัน ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 nm ด้วยเครื่อง spectophotometer

4. <u>สถานที่ทำการทดลองและระยะเวลาของการวิจัย</u>

งานวิจัยสภาวะแวดล้อมฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม

5. <u>ระยะเวลาทำการทดลอง</u>

1 พฤษภาคม 2546 ถึง 16 มกราคม 2548

ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาชีววิทยาของเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดและเชื้อราที่แยกได้จากผักกาดกวางตุ้ง

1.1 การศึกษาชีววิทยาของเชื้อราที่แยกได้จากผักกาดกวางตุ้ง

การแยกจุลินทรีย์จากดอก ใบ และ ก้านใบ ของผักกาดกวางตุ้งจากแปลงปลูกผักกาดกวางตุ้ง 5 จังหวัด ได้แก่ จ. เชียงราย จ. เชียงใหม่ จ. ลำปาง จ. ร้อยเอ็ด และ จ. นครปฐม พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 35 สายพันธุ์(isolate)

การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของผักกาดกวางตุ้งด้วยวิธีการวางตัวอย่างพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin พบว่าสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อราได้มากกว่าวิธีการล้างตัวอย่างพืช คือ วิธีการวางส่วนของผักกาดกวางตุ้งสามารถแยกเชื้อราได้จำนวน 21 สายพันธุ์ โดยได้จาก ดอก ลำต้น ก้านใบ และ ใบจำนวน 1, 2, 4 และ 14 สายพันธุ์ ตามลำดับ สำหรับวิธีการล้างส่วนของผักกาดกวางตุ้งสามารถแยกเชื้อราได้จำนวน 14 สายพันธุ์ โดยได้จาก ดอก ลำต้น ก้านใบ และ ใบ จำนวน 1, 1, 4 และ 8 สายพันธุ์ ตามลำดับ

จากตัวอย่างข้างต้นเชื้อรา 35 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากส่วนของผักกาดกวางตุ้ง พบว่าเชื้อรา 20 สายพันธุ์ เป็นเชื้อราใน genus *Penicillium*, *Aspergillus* และเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ทำให้ไม่สามารถจำแนกได้ นอกจากนี้เชื้อรา *Penicillium* และ *Aspergillus* ยังมีรายงานว่าสามารถสร้างสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้จึงไม่นำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป สำหรับเชื้อราที่เหลือ 15 สายพันธุ์ เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนใบผักกาดกวางตุ้ง พบเพียงเชื้อรา 11 สายพันธุ์(สายพันธุ์ที่ 1-11) เท่านั้นที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้ โดยเชื้อราที่แยกได้ทั้ง 11 สายพันธุ์ทำให้ใบผักกาดกวางตุ้งที่ทำการทดสอบแสดงอาการแผลจุดเป็นวงซ้อนกัน ซึ่งใบผักกาดกวางตุ้งที่ทำการทดสอบสามารถเกิดโรคได้ทั้งการปลูกเชื้อบนหน้าใบและหลังใบ โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 3 แยกได้จากวิธีการวางส่วนใบของผักกาดกวางตุ้ง ในท้องที่แปลงปลูกผักกาดกวางตุ้งภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ก่อให้เกิดโรคสูงที่สุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลเฉลี่ย 5.56 เซนติเมตร และเชื้อราสายพันธุ์ที่ 12-15 สามารถแยกได้จาก

ส่วนใบผักกาดกวางตุ้งทั้งหมด ซึ่งได้จากวิธีการวางส่วนของผักกาดกวางตุ้งคือเชื้อราสายพันธุ์ที่ 12, 13 และ 14 จากแหล่งปลูกผักกาดกวางตุ้งภายใน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ต. เวียงเหนือ จ.ลำปางและ ต.แวงใต้ จ. ร้อยเอ็ด ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้จากวิธีการล้างส่วนของผักกาดกวางตุ้ง คือเชื้อราสายพันธุ์ที่ 15 จากแหล่งปลูกผักกาดกวางตุ้ง ต. ทุ่งลูกนก จ. นครปฐม และพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 12-15 ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคใบจุดได้ ทั้งจากการปลูกเชื้อราบนหน้าใบและหลังใบผักกาดกวางตุ้ง ภายหลังจากบ่มเชื้อไว้ในกล่องพลาสติกชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคใบจุด ของเชื้อรา 15 สายพันธุ์บนใบผักกาดกวางตุ้ง ภายหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ (isolate)	ความรุนแรงของโรค (ϕ ซม.)[1/]	ส่วนของพืชที่แยกได้	แหล่งของตัวอย่างพืช
1	4.15 c[2/]	ก้านใบ[3/]	ต. เวียง จ. เชียงราย
2	5.04 b	ใบ	ต. หนองหาร จ. เชียงใหม่
3	**5.56 a**	**ใบ**	**ต. กำแพงแสน จ. นครปฐม**
4	5.04 b	ใบ	ต. เวียงเหนือ จ. ลำปาง
5	4.11 c	ลำต้น	ต. แวงใต้ จ. ร้อยเอ็ด
6	4.11 c	ใบ	ต. วังน้ำเขียว จ. นครปฐม
7	5.07 b	ก้านใบ	ต. ดอนข่อย จ. นครปฐม
8	2.37 fg	ใบ	ต. ต้นธงชัย จ. ลำปาง
9	2.72 fg	ก้านใบ	ต. สว่าง จ. ร้อยเอ็ด
10	2.49 fg	ใบ	ต. สระนกแก้ว จ. ร้อยเอ็ด
11	3.21 ef	ใบ	ต. ทุ่งบัว จ. นครปฐม
12	0 h	ใบ	ต. กำแพงแสน จ. นครปฐม
13	0 h	ใบ	ต. เวียงเหนือ จ. ลำปาง
14	0 h	ใบ	ต. แวงใต้ จ. ร้อยเอ็ด
15	0 h	ใบ	ต. ทุ่งลูกนก จ. นครปฐม
control [3/]	0 h	-	-

F-tast = **

CV. = 3.05%

[1/]ค่าเฉลี่ยจากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลบนใบผักกาดกวางตุ้ง จำนวน 50 ใบ

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's new multiple rang tast(DMRT) P=0.01

[3/]กรรมวิธีที่วางทับด้วยชิ้นวุ้นที่ปราศจากเชื้อสาเหตุโรค

** มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

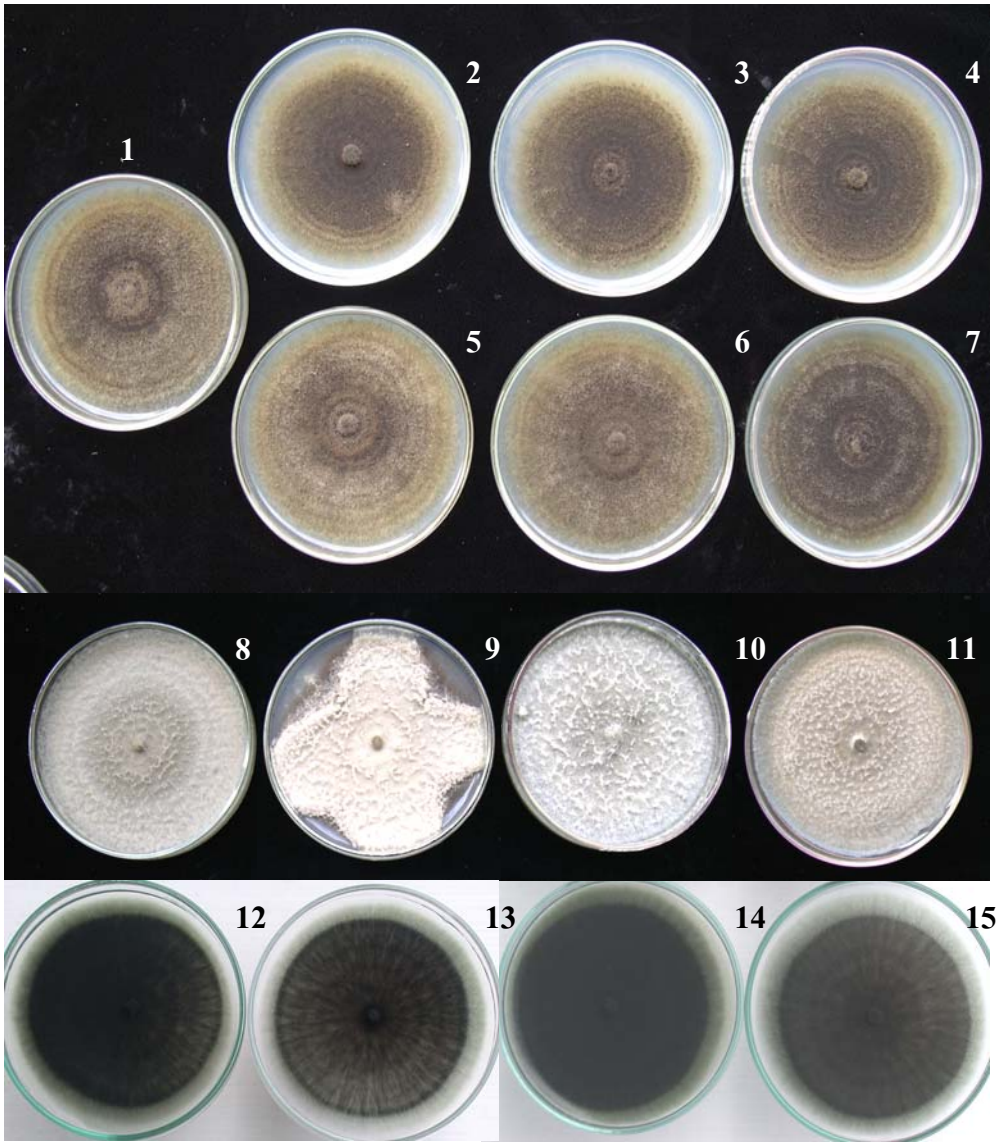
การศึกษาลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อรา 15 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลักษณะของเชื้อรา 15 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผักกาดกวางตุ้งพบว่าสามารถแยกได้เป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มสายพันธุ์ที่ 1(สายพันธุ์ที่ 1-7) ลักษณะโคโลนีเชื้อรามีสีเขียวมะกอกสร้างเส้นใยน้อยลักษณะหยาบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อราเจริญมีสีเขียวถึงสีเขียวเข้ม อัตราการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 1-7 ต่อวันคือ 0.6, 0.59, 0.6, 0.59, 0.58, 0.59 และ 0.58 เซนติเมตร ตามลำดับและพบว่า เชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อได้ต้องใช้เวลาเจริญมากกว่า 15 วัน

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 2(สายพันธุ์ที่ 8-11) ลักษณะโคโลนีเชื้อรามีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม สร้างเส้นใยมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อราเจริญมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม มีอัตราการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 8-11 ต่อวันที่ 0.58, 0.88, 0.82 และ 0.82 เซ็นติเมตรตามลำดับโดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 8 ต้องใช้เวลาเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเชื้อมากกว่า 15 วัน และสายพันธุ์ที่ 9 ต้องใช้เวลาเจริญของเส้นใยจนเต็มจานเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 14 วัน สำหรับสายพันธุ์ที่ 10 และ11 เส้นใยเชื้อราสามารถเจริญจนเต็มจานเลี้ยงเชื้อได้ต้องใช้เวลาเท่ากับ 11 วัน

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 (สายพันธุ์ที่ 12-15) ลักษณะโคโลนีเชื้อรามีสีเขียวเข้ม สร้างเส้นใยมากและฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อราเจริญมีสีเขียวเข้มถึงดำมีอัตราการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 12-15 ต่อวันที่ 0.91, 0.9, 0.9 และ 0.9 เซ็นติเมตรตามลำดับโดยเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อได้ต้องใช้เวลาเจริญอย่างน้อย 10 วัน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อราที่แยกได้ 15 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

กลุ่มสายพันธุ์ (isolate group)	สายพันธุ์ (isolate)	ลักษณะโคโลนี	อัตราการเจริญต่อวัน(ซม.)	จำนวนวันที่เจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ(วัน)
1	1	สีเขียวมะกอก สร้างเส้นใย น้อยลักษณะหยาบบนอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อราเจริญมีสีเขียวถึงสีเขียวเข้ม	0.60	>15
	2		0.59	>15
	3		0.60	>15
	4		0.59	>15
	5		0.58	>15
	6		0.59	>15
	7		0.58	>15
2	8	สีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม สร้างเส้นใยมากบนอาหารเลี้ยงเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อราเจริญมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม	0.58	>15
	9		0.88	14
	10		0.82	11
	11		0.82	11
3	12	สีเขียวเข้ม สร้างเส้นใยมาก ฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อราเจริญมีสีเขียวเข้มถึงดำ	0.91	10
	13		0.90	10
	14		0.90	10
	15		0.90	10



<u>ภาพที่ 1</u> ลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 1;สายพันธุ์ 1-7 เชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 2;สายพันธุ์ 8-11 เชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 3;สายพันธุ์ 12-15 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

การศึกษาลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า กลุ่มสายพันธุ์ที่ 1(สายพันธุ์ที่ 1-7) ลักษณะโดยทั่วไปของ conidia มีสีน้ำตาลดำ รูปร่างเป็น muriform ท้ายป้าน apical cell เป็น truncate cone สั้นและหนาเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 ทั้งหมดสร้าง conidia เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่(chain of conidia) ยาวมากกว่า 10 conidia ขึ้นไปมีกำเนิดจากปลายก้าน conidiophore ก้าน conidiophore มีความยาว เท่ากับ 23-84 ไมโครเมตร ก้าน conidiophore ไม่แตกแขนงมีสีเข้ม conidia มีจำนวน septa ทางแนวดิ่ง(longitudinal septum)เท่ากับ 0-4 septa และทางแนวระดับ(transverse septum) เท่ากับ 2-9 septa ความกว้างของ conidia ในเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 มีความกว้างเท่ากับ 11-17 ไมโครเมตร ความกว้างของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 11 ไมโครเมตรและความยาวของ conidia มีความยาวเท่ากับ 19-50 ไมโครเมตร ความยาวของ conidia โดยเฉลี่ยเท่ากับ 28-31 ไมโครเมตร เชื้อราในกลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 ทั้งหมดเป็นลักษณะของเชื้อรา genus *Alternaria brassicicola*

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 2(สายพันธุ์ที่ 8-11) ลักษณะโดยทั่วไปของ conidia มีสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างเป็น muriform ท้ายป้านปลายเรียวมน beak ค่อนข้างยาว เชื้อราสายพันธุ์ที่ 2 ทั้งหมดสร้าง conidia เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวมากกว่า 10 สปอร์ขึ้นไป ก้าน conidiophore วัดความยาวได้เท่ากับ 19-194 ไมโครเมตร ก้าน conidiophore ไม่แตกแขนงมีสีเข้ม conidia มีจำนวน septa ทางแนวดิ่งประมาณ 0-8 septa และทางแนวระดับเท่ากับ 2-13 septa ความกว้างของ conidia ในเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 2 มีความกว้างระหว่าง 11-12 ไมโครเมตร ความกว้างของ conidia โดยเฉลี่ยเท่ากับ 14-16 ไมโครเมตรและความยาวของ conidia มีความยาวเท่ากับ 22-50 ไมโครเมตร ความยาวของ conidia โดยเฉลี่ยเท่ากับ 32-37 ไมโครเมตร เชื้อราในกลุ่มสายพันธุ์ที่ 2 ทั้งหมดเป็นลักษณะของเชื้อรา genus *Alternaria brassicae*

กลุ่มสายพันธุ์ที่ 3(สายพันธุ์ที่ 12-15) ลักษณะโดยทั่วไป conidia มีสีเข้มเซลล์ตรงกลางของ conidia มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่อยู่ด้านข้าง เชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 ทั้งหมดสร้าง conidia เกิดเดี่ยวๆหรือเกิดเป็นกลุ่มบนปลายก้าน conidiophore ก้าน conidiophore มีความยาวเท่ากับ 42-123 ไมโครเมตร ความกว้างของ conidia โดยเฉลี่ยเท่ากับ 9-11 และ ความยาวของ conidia มีความยาวเท่ากับ 11-19 ไมโครเมตร ความยาวของ conidia เฉลี่ยเท่ากับ 16 ไมโครเมตรเชื้อราในกลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 ทั้งหมดเป็นลักษณะของเชื้อรา genus *Curvuraria* sp. (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากผิวผักกาดกวางตุ้งจำนวน 15 สายพันธุ์ ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

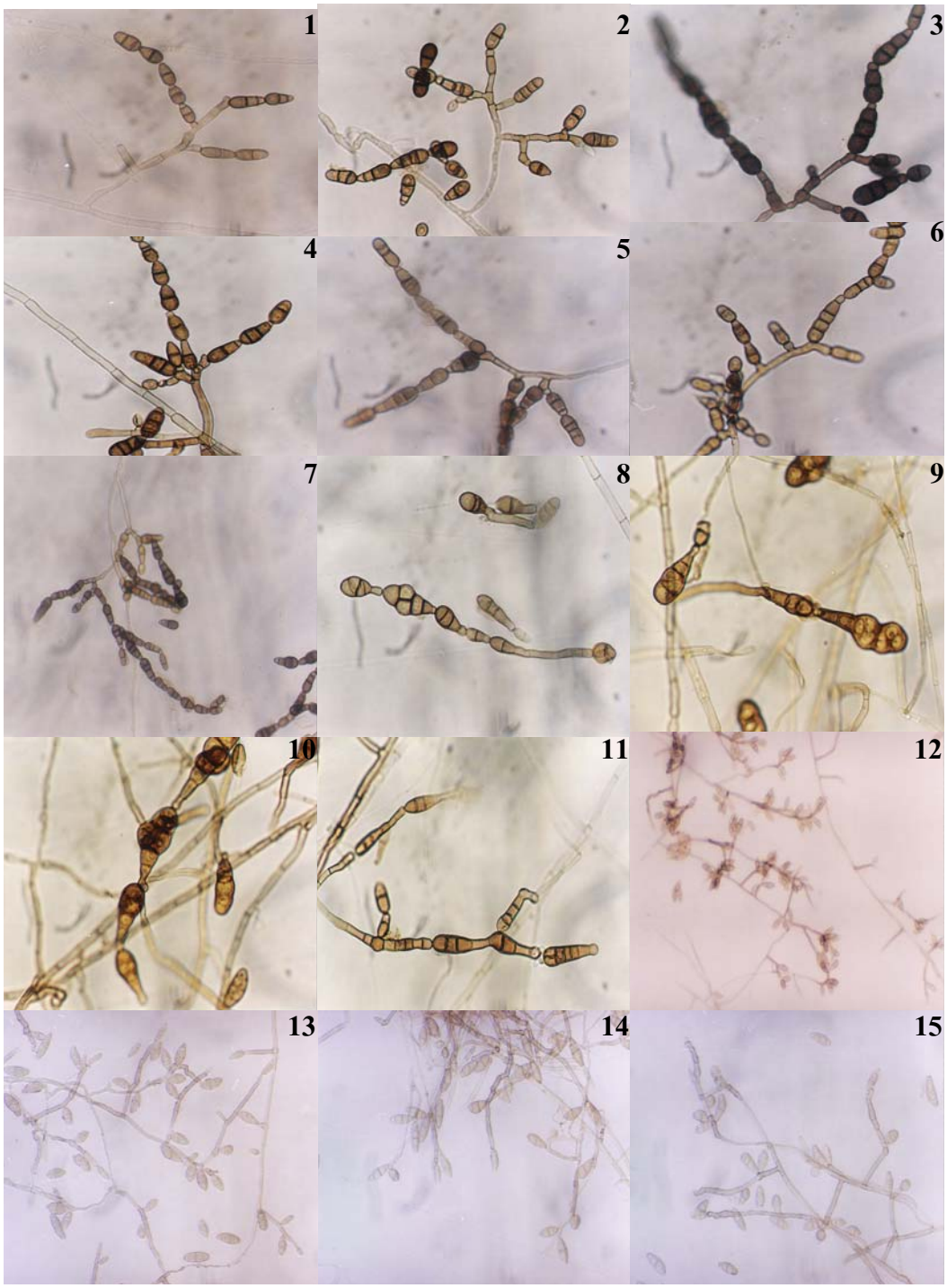
กลุ่มสายพันธุ์ (isolate group)	สายพันธุ์ (isolate)	ลักษณะ conidia	จำนวน chain of conidia	ความยาวก้าน conidiophore	จำนวน LS[1/]	จำนวน TS[2/]	ความกว้าง conidia(µm) กว้าง	ความกว้าง conidia(µm) เฉลี่ย	ความยาว conidia(µm) ยาว	ความยาว conidia(µm) เฉลี่ย
	1		> 10	40-76	2-9	0-3	11-17	11	22-39	29
	2	ลักษณะ muriform	> 10	32-82	0-4	3-8	11-17	11	22-39	30
	3	ท้ายป้าน apical cell	> 10	34-76	0-4	3-7	11-17	11	22-39	30
	4	เป็น truncate cone	> 10	26-54	0-3	2-9	11-17	11	22-39	30
	5	สั้นและหนา	> 10	23-71	0-3	2-8	11-17	11	22-44	30
	6		> 10	35-62	0-4	2-8	11-17	11	19-33	28
	7		> 10	35-84	0-4	2-9	11-17	11	22-50	31
	8	ลักษณะ muriform	> 10	32-172	0-8	3-12	11-22	14	28-55	37
2	9	ท้ายป้าน ปลายเรียว	> 10	22-163	0-7	2-13	11-22	15	28-55	34
	10	มน beak ค่อนข้างยาว	> 10	46 -175	0-8	3-11	11-22	14	22-55	32
	11		> 10	19-194	0-8	3-11	11-22	16	22-50	32

ตารางที่ 3 (ต่อ)

กลุ่มสายพันธุ์ (isolate group)	สายพันธุ์ (isolate)	ลักษณะ conidia	จำนวน chain of conidia	ความยาวก้าน conidiophore	จำนวน LS[-]	จำนวน TS[-]	ความกว้าง conidia(µm) กว้าง	ความกว้าง conidia(µm) เฉลี่ย	ความยาว conidia(µm) ยาว	ความยาว conidia(µm) เฉลี่ย
	12	เซลล์ตรงกลางของ	ไม่พบ	54-102	-	4	6-14	11	11-17	16
3	13	conidia มีขนาดใหญ่	ไม่พบ	63-115	-	4	6-14	9	11-17	16
	14	กว่าเซลล์ที่อยู่ด้านข้าง	ไม่พบ	42-94	-	4	11	11	11-19	16
	15		ไม่พบ	73-123	-	4	11	11	11-19	16

[1/] LS;longitudinal septa

[2/] LT;transverse septa



ภาพที่ 2 ลักษณะรูปร่างของเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 1;สายพันธุ์ 1-7(ภาพที่ 1-7) เชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 2;สายพันธุ์ 8-11(ภาพที่ 8-11) และเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 3;สายพันธุ์ 12-15 (ภาพที่ 12-15) ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.4 การประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดผักกาดกวางตุ้ง

จากการรวบรวมเชื้อรา *Alternaria* sp.และ *Curvularia* sp. ซึ่งแยกได้จากผักกาดกวางตุ้ง 12 แหล่ง 15 สายพันธุ์ คือ ต. เวียง (สายพันธุ์ที่ 1) จ. เชียงราย, ต. หนองหาร (สายพันธุ์ที่ 2) จ.เชียงใหม่, ต. เวียงเหนือ (สายพันธุ์ที่ 4และ13)และ ต. ต้นธงชัย (สายพันธุ์ที่ 8) จ.ลำปาง, ต. แวงใต้ (สายพันธุ์ที่ 5และ14), ต. สว่าง (สายพันธุ์ที่ 9) และ ต. สระนกแก้ว (สายพันธุ์ที่ 10) จ.ร้อยเอ็ด, ต. วังน้ำเขียว (สายพันธุ์ที่ 6), ต. ดอนข่อย (สายพันธุ์ที่ 7), ต. ทุ่งบัว (สายพันธุ์ที่ 11), ต. ทุ่งลูกนก (สายพันธุ์ที่ 15)และ ต. กำแพงแสน(สายพันธุ์ที่ 3และ12) จ. นครปฐม ดังในหัวข้อที่ 1.2 เมื่อทำการทดสอบการปลูกเชื้อราลงบนผักกาดกวางตุ้ง 4 พันธุ์ คือ ผักกาดกวางตุ้งดอกต้นขาว(*Brassica campestris* var. *chinensis*) ผักกาดเขียวกวางตุ้ง(*B. campestris* var. *chinensis*) ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ (*B. campestris* var. *chinensis*) ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ (*B. campestris* var. *chinensis*) และผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง(*B. campestris*) อายุ 30 วัน เพื่อตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและวัดดรรชนีความรุนแรง พบว่าเชื้อรา *Alternaria* sp. ทุกสายพันธุ์ (สายพันธุ์ที่ 1-11) สามารถทำให้ผักกาดกวางตุ้งทั้ง 4 พันธุ์เกิดโรคได้โดยพบว่าเชื้อรา *Alternaria* sp. ที่แยกได้จาก ต. กำแพงแสน (สายพันธุ์ที่ 3) จ. นครปฐม มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคกับผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง ผักกาดกวางตุ้งดอกต้นขาว ผักกาดเขียวกวางตุ้งและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้เท่ากับ 44, 64, 92 และ 98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับและความรุนแรงของโรคในผักกาดกวางตุ้ง 4 พันธุ์เท่ากับ 10, 40, 32 และ 64 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าเชื้อรา *Curvularia* sp. ที่แยกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ที่ 12-15) ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคในผักกาดกวางตุ้งทั้ง 4 พันธุ์ได้ สำหรับการประเมินลักษณะต้านทานในผักกาดกวางตุ้งทั้ง 4 พันธุ์จากการปลูกเชื้อราที่แยกได้พบว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงจะแสดงลักษณะต้านทานและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้จะแสดงลักษณะอ่อนแอ (ตารางที่ 4)

<u>ตารางที่ 4</u> ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคบนใบผักกาดกวางตุ้ง 4 พันธุ์ จากการปลูกเชื้อรา 15 สายพันธุ์ ในสภาพเรือนทดลอง

เชื้อรา	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค				เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค			
สายพันธุ์	HK[1/]	FP	GP	HT	HK	FP	GP	HT
1	50 g-j[2/]	80 c-d	82 b-e	86 a-c	10 mn	30 gh	28 hi	50 c
2	54 g-j	84 a-d	90 a-c	90 a-c	14 kl	36 e	30 gh	60 b
3	**44** i-k	64 fg	92 a-c	**98** a	**10** mn	40 d	32 fg	**64** a
4	42 i-k	70 d-f	86 a-c	92 a-c	14 kl	32 fg	30 gh	60 b
5	42 i-k	58 f-I	84 a-d	92 a-c	10 mn	30 gh	30 gh	52 c
6	50 g-j	68 e-g	82 b-e	94 a-c	10 mn	30 gh	30 gh	52 c
7	42 I-k	64 fg	80 c-e	94 a-c	14 kl	32 fg	30 gh	60 b
8	30 kl	58 f-i	56 f-i	96 ab	6 op	14 kl	18 j	32 fg
9	20 l	40 jk	60 e-g	96 ab	2 pq	8 no	16 jk	32 fg
10	20 l	50 g-j	40 jk	92 a-c	2 pq	10 mn	8 no	32 fg
11	20 l	60 e-g	50 g-j	92 a-c	2 pq	12 lm	10 mn	34 ef
12	0 m	0 m	0 m	0 m	0 q	0 q	0 q	0 q
13	0 m	0 m	0 m	0 m	0 q	0 q	0 q	0 q
14	0 m	0 m	0 m	0 m	0 q	0 q	0 q	0 q
15	0 m	0 m	0 m	0 m	0 q	0 q	0 q	0 q
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**
CV.	21.84 %				12 %			

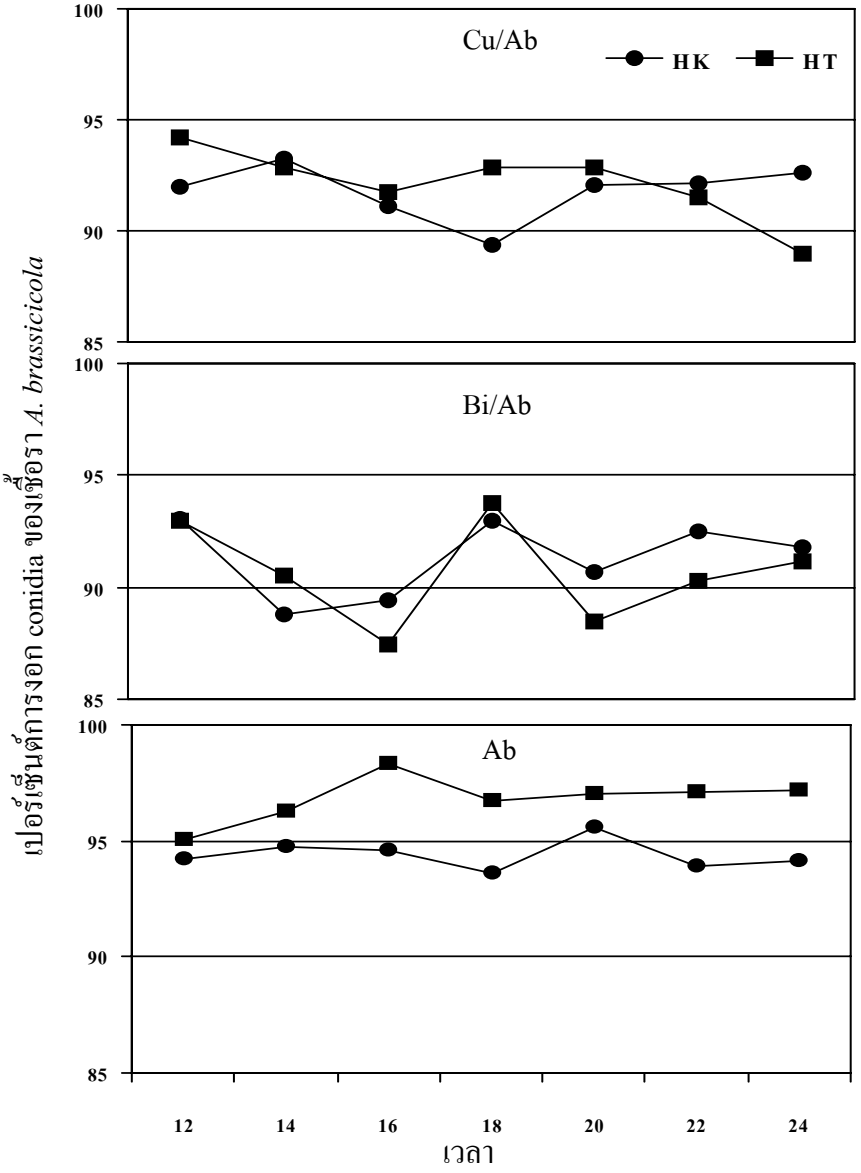
[1/] ผักกาดกวางตุ้งที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 4 พันธุ์ได้แก่ ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง;HK ผักกาดกวางตุ้งดอกต้นขาว;FP ผักกาดเขียวกวางตุ้ง;GP ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้;HT

[2/] ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธี Duncan's new multiple rang tast(DMRT) P=0.01

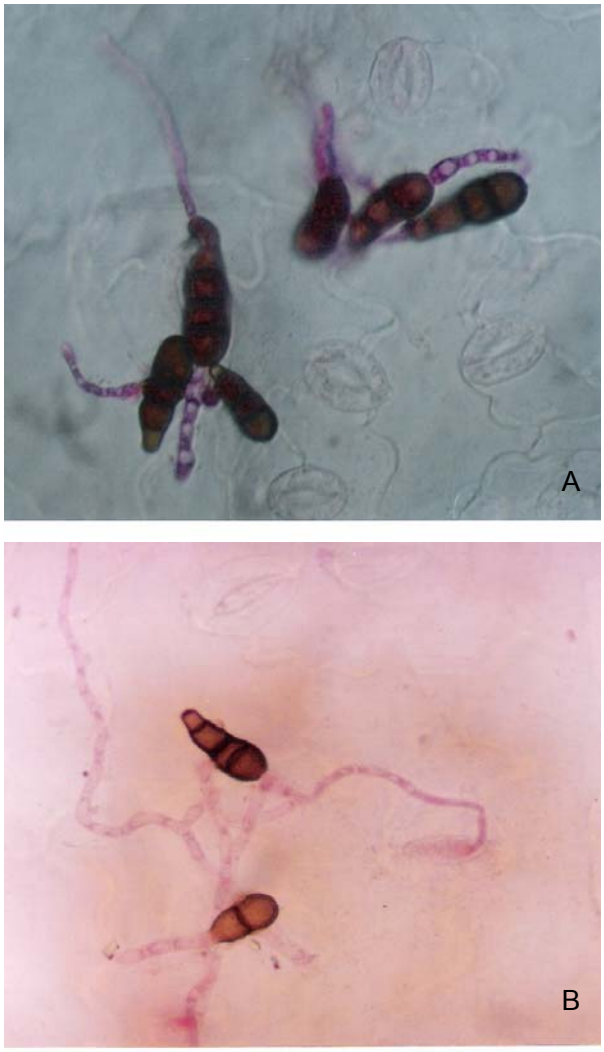
2. <u>การศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* บนผิวใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ระยะเวลา 24 ชั่วโมงภายใต้กล้องจุลทรรศน์</u>

เมื่อปลูกเชื้อราเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เชื้อรา *A. brassicicola* เริ่มงอก germ tube และจะเจริญบนผิวใบของผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ โดยคิดเป็นความงอกเฉลี่ยเท่ากับ 70-80 เปอร์เซ็นต์ และการงอก germ tube ของเชื้อรา *A. brassicicola* บนผิวใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ที่เวลา 12-24 ชั่วโมงพบว่าการฉีดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เชื้อรา *A. brassicicola* สามารถงอก germ tube ได้เท่ากับ 89.39-93.27 และ 88.99-94.18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เชื้อรา *A. brassicicola* สามารถงอก germ tube ได้เท่ากับ 88.79-93.07 และ 87.44-93.78 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถงอก germ tube ได้เท่ากับ 92.52-95.61 และ 95.08-98.29 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4

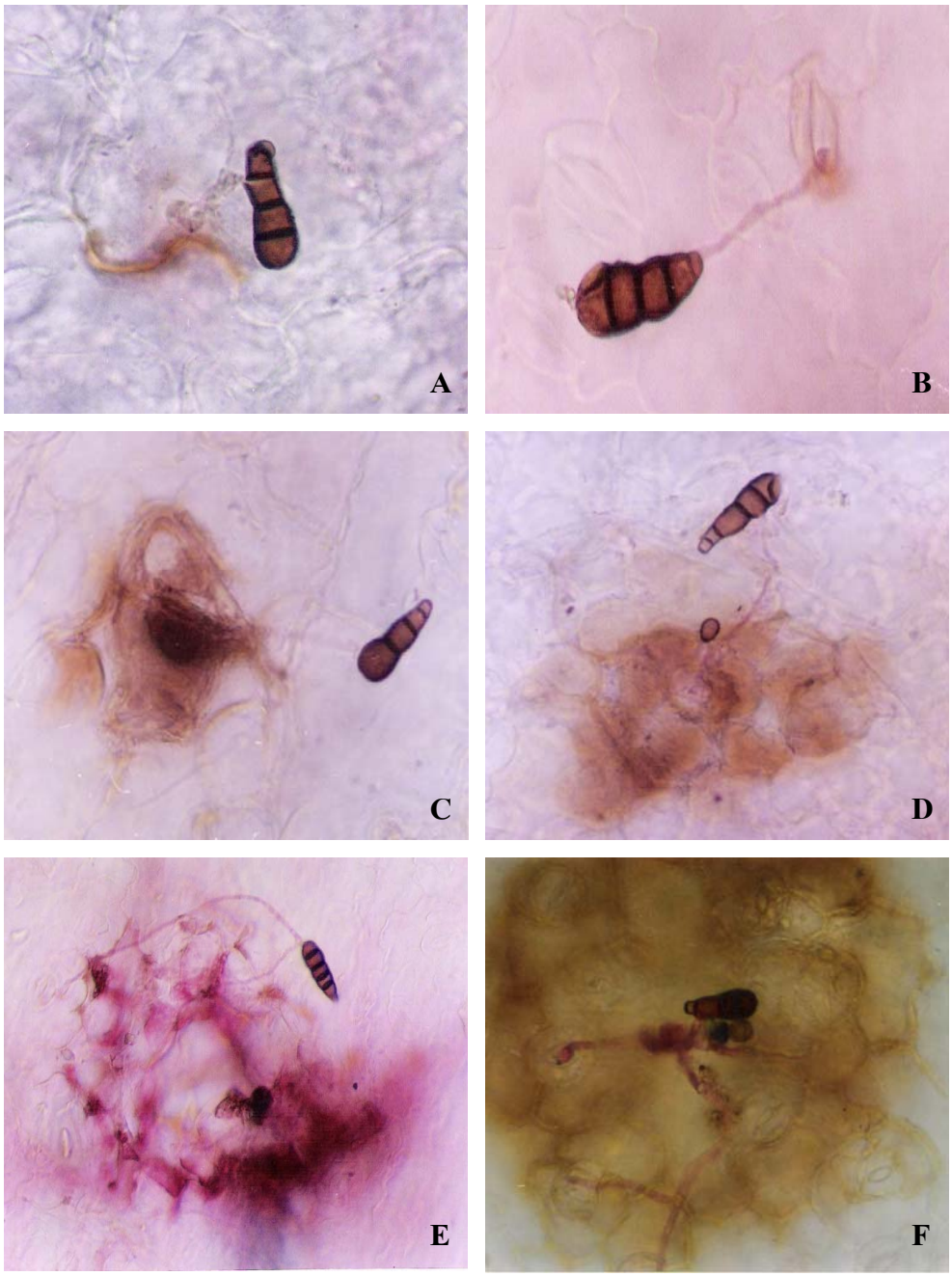
การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งทั้งสองพันธุ์ พบว่า เชื้อราเข้าทำลายโดยการแทง germ tube ทำลายทางปากใบและเซลล์ผิวใบโดยตรง และการแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัย appressoria ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 3 การงอก conidia ของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง;HK และฮ่องเต้;HT จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*;Cu/Ab หรือการฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*;Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว;Ab ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง

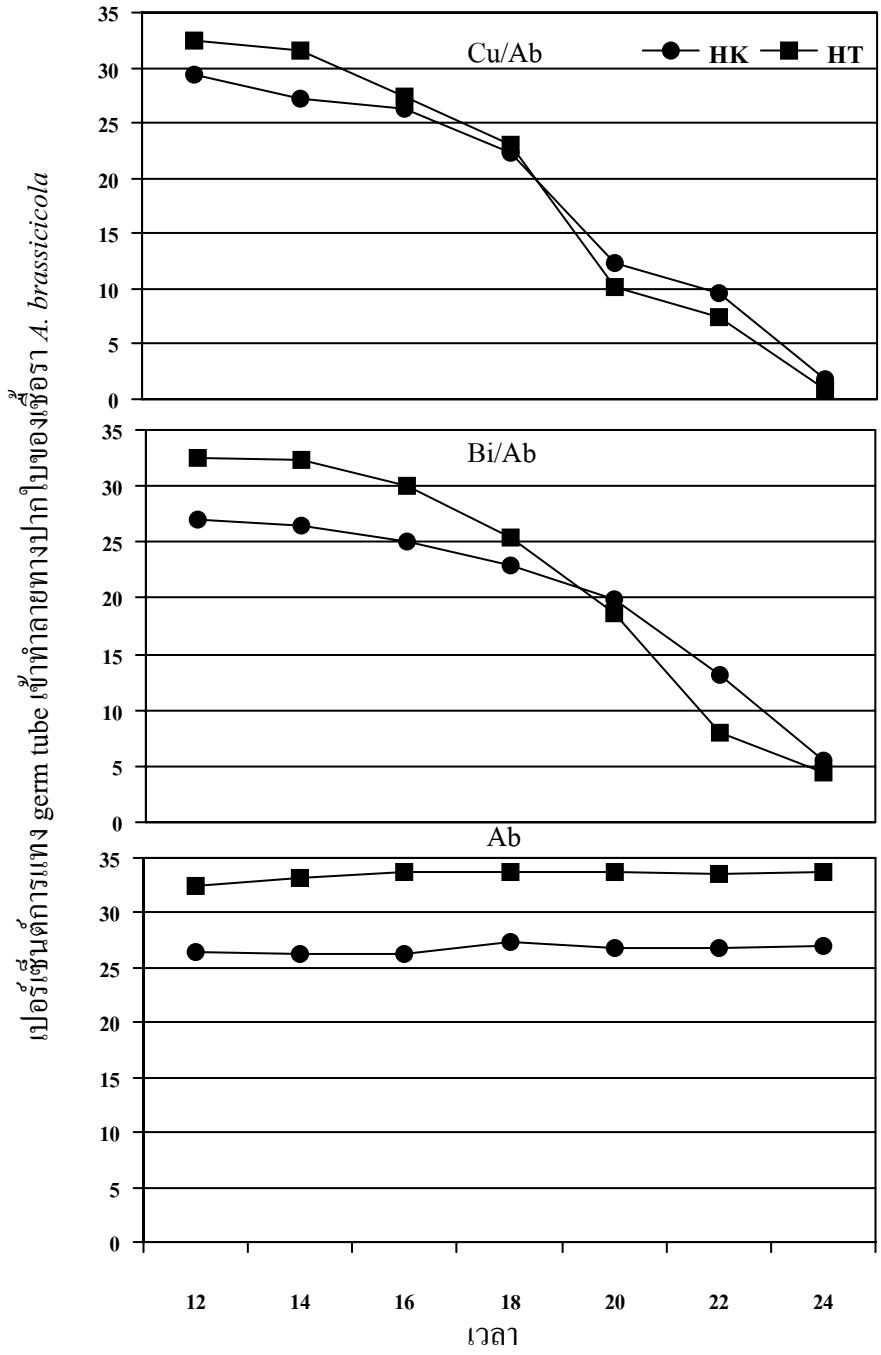


<u>ภาพที่ 4</u> การงอก conidia ของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง; ภาพ A และ 12 ชั่วโมง; ภาพ B ในสภาพเรือนทดลอง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส



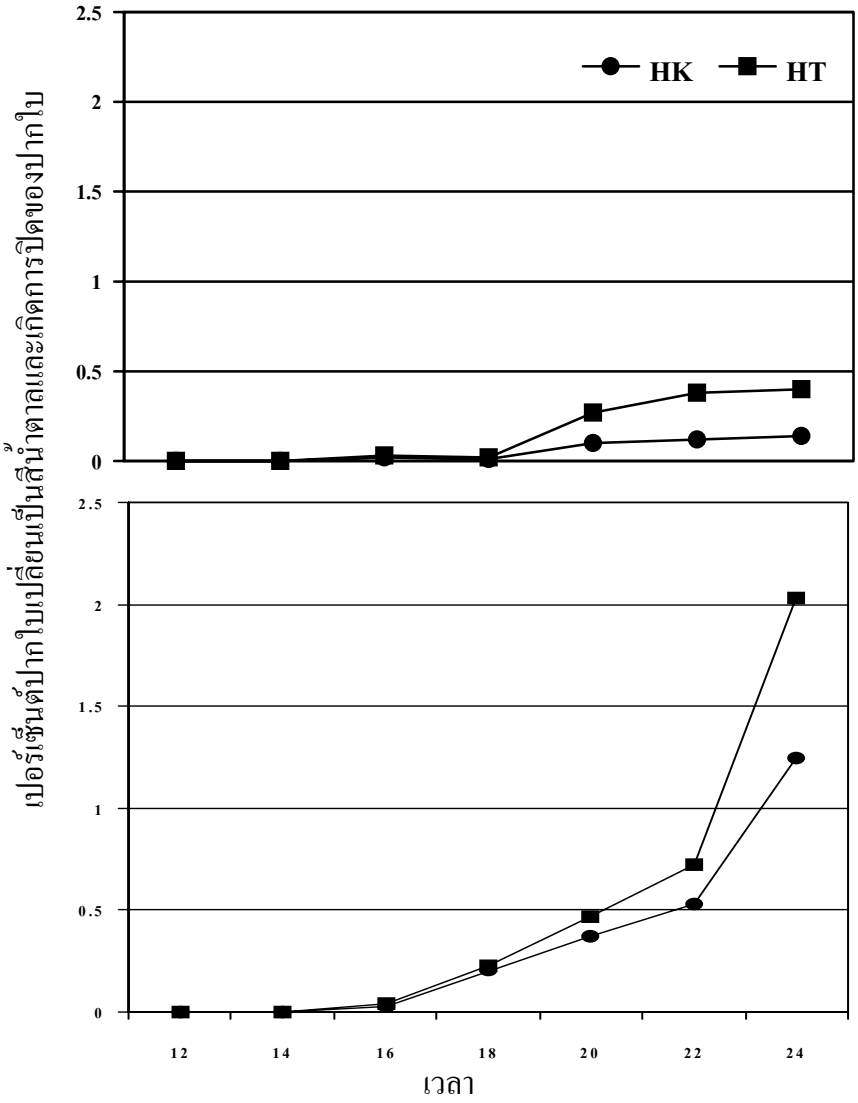
ภาพที่ 5 การแทง germ tube ทำลายทางเซลล์ผิวใบโดยตรงของเชื้อรา *A. brassicicola*; ภาพ A, C และ E และการแทง germ tube ทำลายทางปากใบของเชื้อรา *A. brassicicola*; ภาพ B, D และ F

ความสามารถในการเข้าทำลายผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยการแทง germ tube ทำลายทางปากใบพบว่า การฉีดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tube ทำลายทางปากใบผักกาดกวางตุ้งลดลงเท่ากับ 29.29, 27.12, 26.21, 22.35, 12.38, 9.62 และ 1.77 เปอร์เซ็นต์และ 32.48, 31.52, 27.31, 23, 10.21, 7.36 และ 0.96 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tube ทำลายทางปากใบลดลงเท่ากับ 26.97, 26.5, 25.07, 22.99, 19.97, 13.08 และ 5.56 เปอร์เซ็นต์และ 32.5, 32.39, 29.99, 25.38, 18.63, 8.01 และ 4.41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tube ทำลายทางปากใบค่อนข้างคงที่เท่ากับ 26.45, 26.21, 26.27, 27.32, 26.81, 26.83 และ 27.03 เปอร์เซ็นต์ และ 32.46, 33.23, 33.65, 33.65, 33.8, 33.59 และ 33.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับที่เวลา 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง และพบการแทง germ tube ทำลายทางปากใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงที่เวลา 12-18 ชั่วโมงหลังจากนั้นที่เวลา 20-24 ชั่วโมงการแทง germ tube ทำลายทางปากใบของเชื้อรา *A. brassicicola* ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้จะต่ำกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงทั้งจากการฉีดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หรือ การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* และการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบ การงอก germ tube เข้าทำลายทางปากใบของเชื้อรา *A. brassicicola* สูงกว่า 2 กรรมวิธีข้างต้นและยังพบว่าการงอก germ tube เข้าทำลายทางปากใบในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้จะสูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง เมื่อฉีดเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในภาพที่ 6

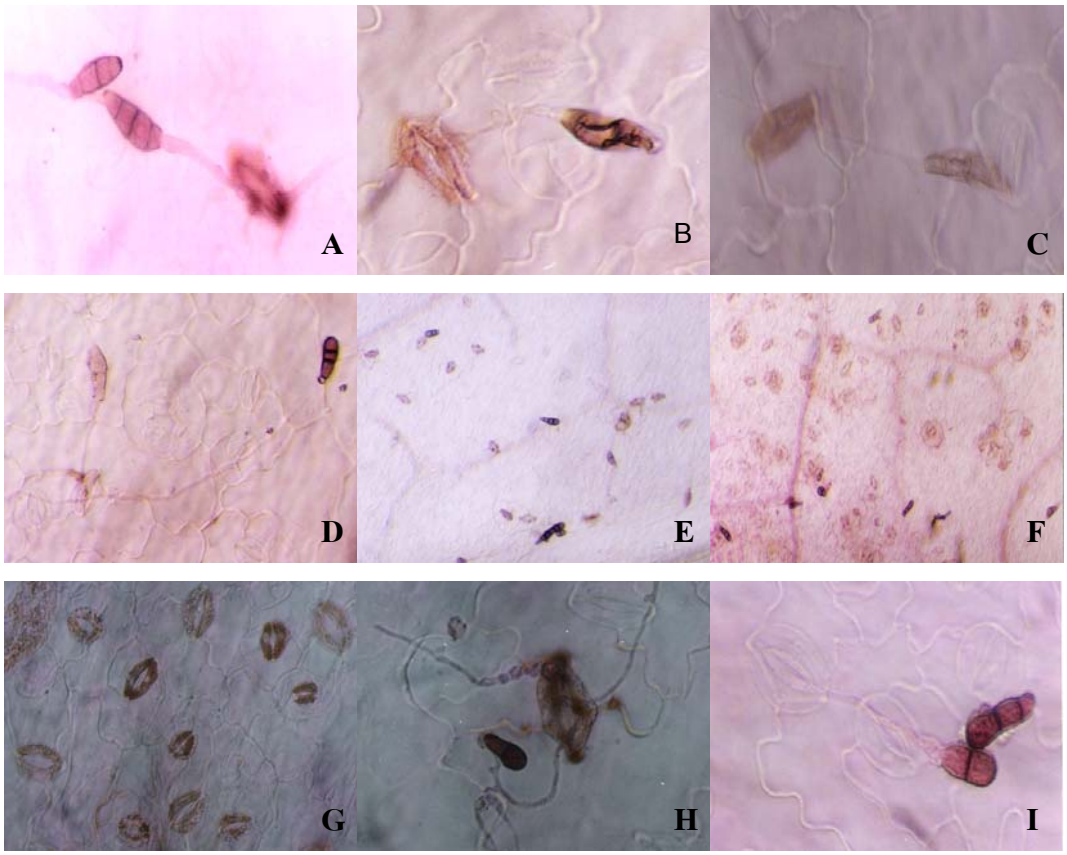


ภาพที่ 6 การแทง germ tube ทำลายทางปากใบของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง;HKและฮ่องเต้;HT จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*;Cu/Ab หรือการฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*;Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว;Ab ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง

ลักษณะความต้านทานของผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้และผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงต่อเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่าการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. พบปากใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเปิดการปิดของปากใบมากกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงเท่ากับ 0.03, 0.19, 0.27, 0.38 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์และ 0.02, 0.05, 0.09, 0.12 และ 0.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบลักษณะของปากใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเปิดการปิดของปากใบมากกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงเท่ากับ 0.04, 0.23, 0.47, 0.72 และ 2.03 เปอร์เซ็นต์ และ 0.03, 0.2, 0.37, 0.53 และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับที่เวลา 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมงและพบลักษณะของปากใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้จากการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียวหรือพบมากขึ้นหากปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุของโรคตาม ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8

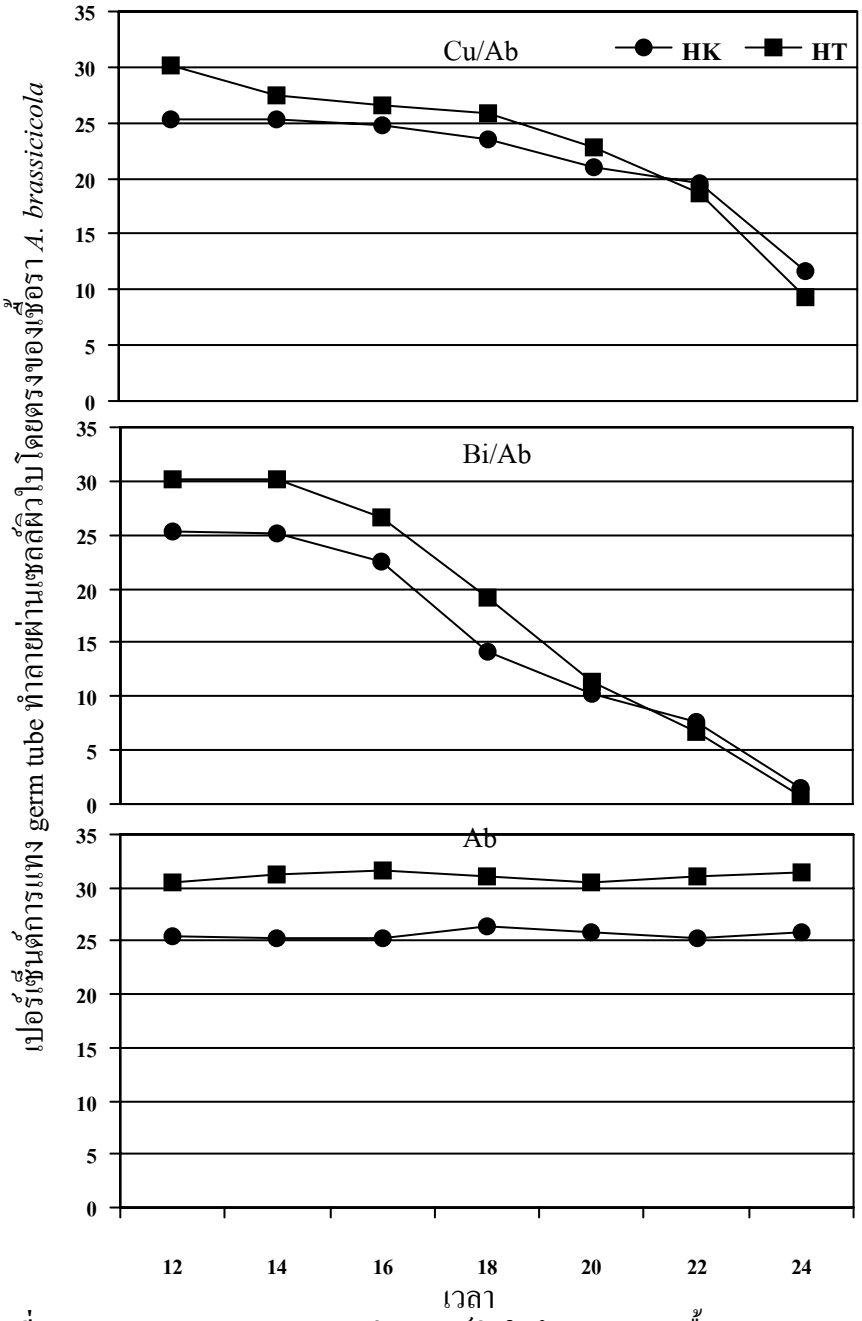


ภาพที่ 7 จำนวนปากใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเกิดการปิดของปากใบในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง กง; HK และ ฮ่องเต้;HT จากการปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว หรือฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง



<u>ภาพที่ 8</u> การฉีดพ่นเชื้อรา *Curvularia* sp.บนผิวใบผักกาดกวางตุ้งพบลักษณะของปากใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเกิดการปิดของปากใบทำให้เชื้อรา *Curvularia* sp. ไม่สามารถแทง germ tube เข้าทำลายทางปากใบได้; ภาพ A-C และการฉีดพ่นตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ภายหลัง 24 ชั่วโมงพบลักษณะของปากใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและเกิดการปิดของปากใบเพิ่มขึ้น; ภาพ D-H เปรียบเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวไม่พบว่าลักษณะของปากใบเปลี่ยนสีน้ำตาลทำให้เชื้อรา *A. brassicicola* สามารถแทง germ tube เข้าสู่ปากใบผักกาดกวางตุ้งได้;ภาพ I

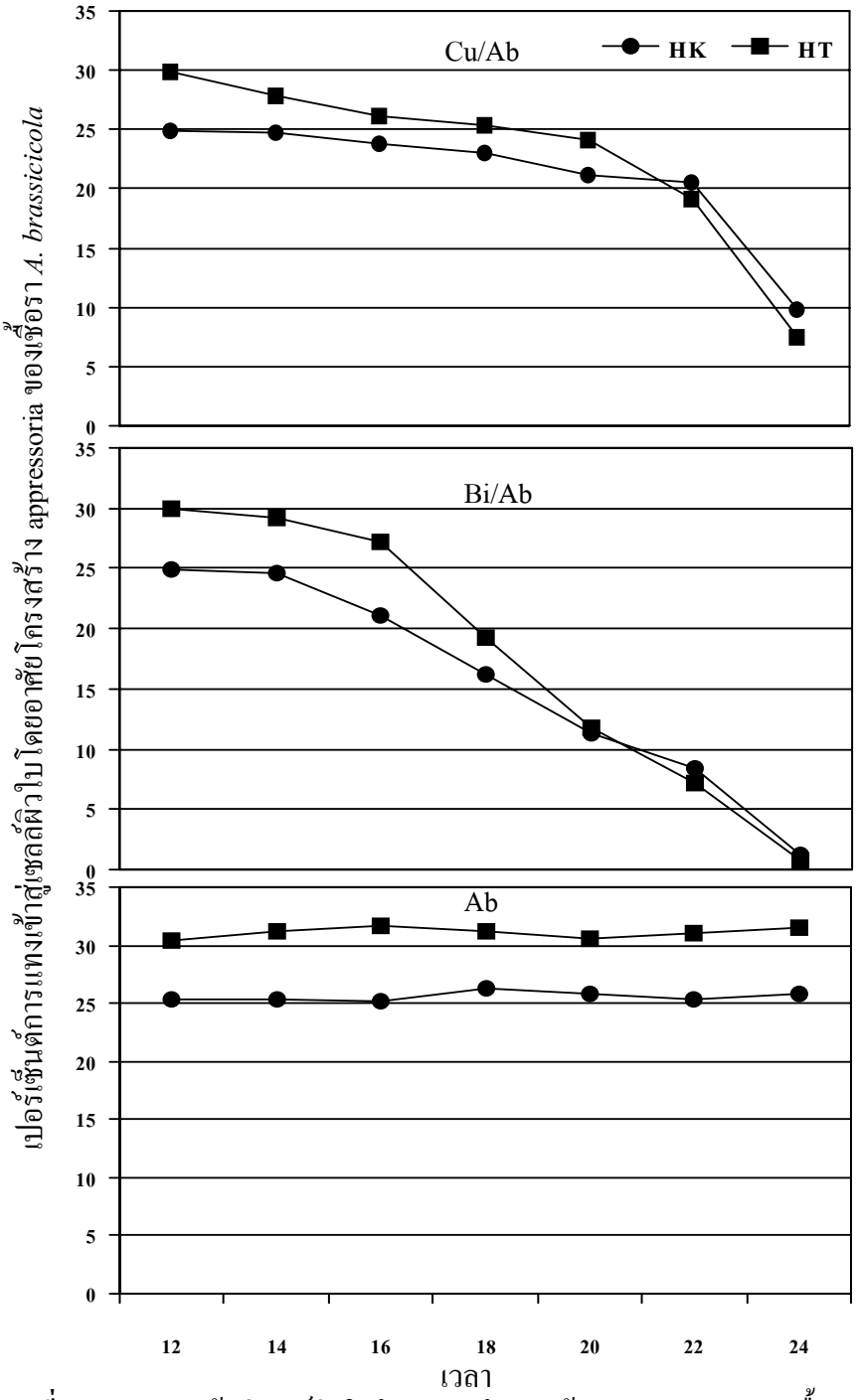
ความสามารถในการเข้าทำลายผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยการแทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรง พบว่าการฉีดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงในผักกกาดกวางตุ้งลดลงเท่ากับ 25.37, 25.24, 24.71, 23.48, 20.95, 19.54 และ 11.72 เปอร์เซ็นต์ และ 30.21, 27.49, 26.5, 25.88, 22.81, 18.59 และ 9.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมง แล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงลดลงเท่ากับ 25.27, 25.21, 22.44, 14.17, 10.31, 7.63 และ 1.55 เปอร์เซ็นต์และ 30.17, 30.16, 26.54, 19.16, 11.4, 6.78 และ 0.79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบเชื้อรา *A brassicicola* แทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงค่อนข้างคงที่เท่ากับ 25.23, 25.11, 25.2, 26.05, 25.56, 25.43 และ 25.91 เปอร์เซ็นต์ และ 30.77, 31.84, 31.94, 31.48, 31.76, 31.71 และ 31.91 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับที่เวลา 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง และพบเชื้อรา *A brassicicola* แทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงที่เวลา 12-20 ชั่วโมงหลังจากนั้นที่เวลา 22-24 ชั่วโมง การแทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้จะน้อยกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงทั้งจากการฉีดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หรือการฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* และ การฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบการแทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและการฉีดเฉพาะสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว พบการแทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงของเชื้อรา *A. brassicicola* สูงกว่า 2 กรรมวิธีข้างต้น ดังแสดงในภาพที่ 9



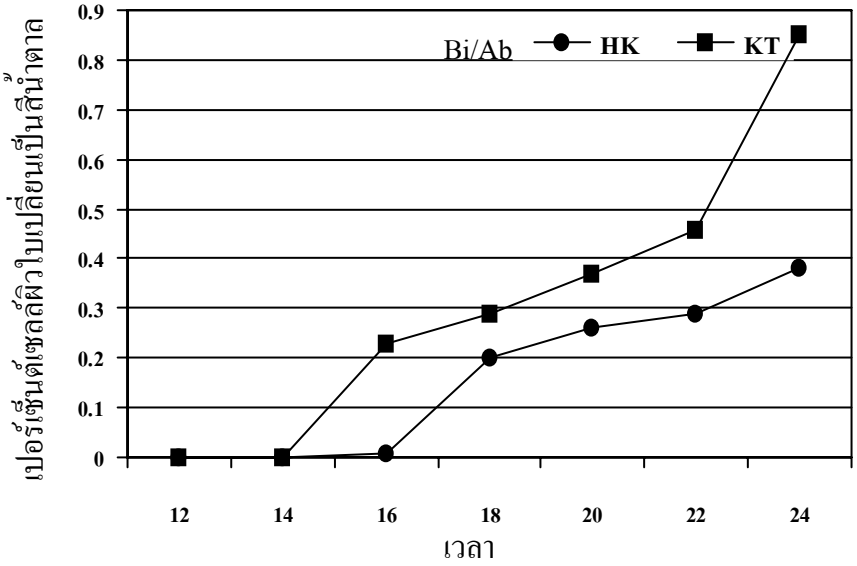
ภาพที่ 9 การแทง germ tube ทำลายผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง;HK และ ฮ่องเต้;HT จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*;Cu/Ab หรือ การฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*;Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว;Ab ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง

การเข้าทำลายผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยการสร้าง appressoria เมื่อแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบผักกาดกวางตุ้งพบว่า การฉีดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบการแทงเข้าเซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria บนใบผักกาดกวางตุ้งทั้ง 2 พันธุ์ลดลงเท่ากับ 24.88, 24.76, 23.76, 23, 21.12, 20.52 และ 9.8 เปอร์เซ็นต์ และ 29.89, 27.8, 26.18, 25.41, 24.09, 19.08 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบการแทงเข้าเซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria บนใบผักกาดกวางตุ้งลดลงเท่ากับ 24.96, 24.56, 21.05, 16.24, 11.27, 8.41 และ 1.24 เปอร์เซ็นต์และ 30, 29.23, 27.16, 19.33, 11.73, 7.24 และ 0.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบการแทงเข้าเซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria บนใบผักกาดกวางตุ้ง เท่ากับ 25.38, 25.27, 25.2, 26.36, 25.87, 25.27 และ 25.75 เปอร์เซ็นต์ และ 30.46, 31.22, 31.63, 31.46, 30.51, 31.08 และ31.44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับที่เวลา 12, 14, 16, 18, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง และพบการแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงที่เวลา 12-20 ชั่วโมงหลังจากนั้นที่เวลา 22-24 ชั่วโมง เชื้อราแทงเข้าเซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ได้น้อยกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงทั้งจากการฉีดสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หรือการฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* แต่พบว่าการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบ การแทงเข้าเซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและการฉีดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวจะพบการแทงเข้าเซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria สูงกว่า 2 กรรมวิธีข้างต้น ดังแสดงในภาพที่ 10

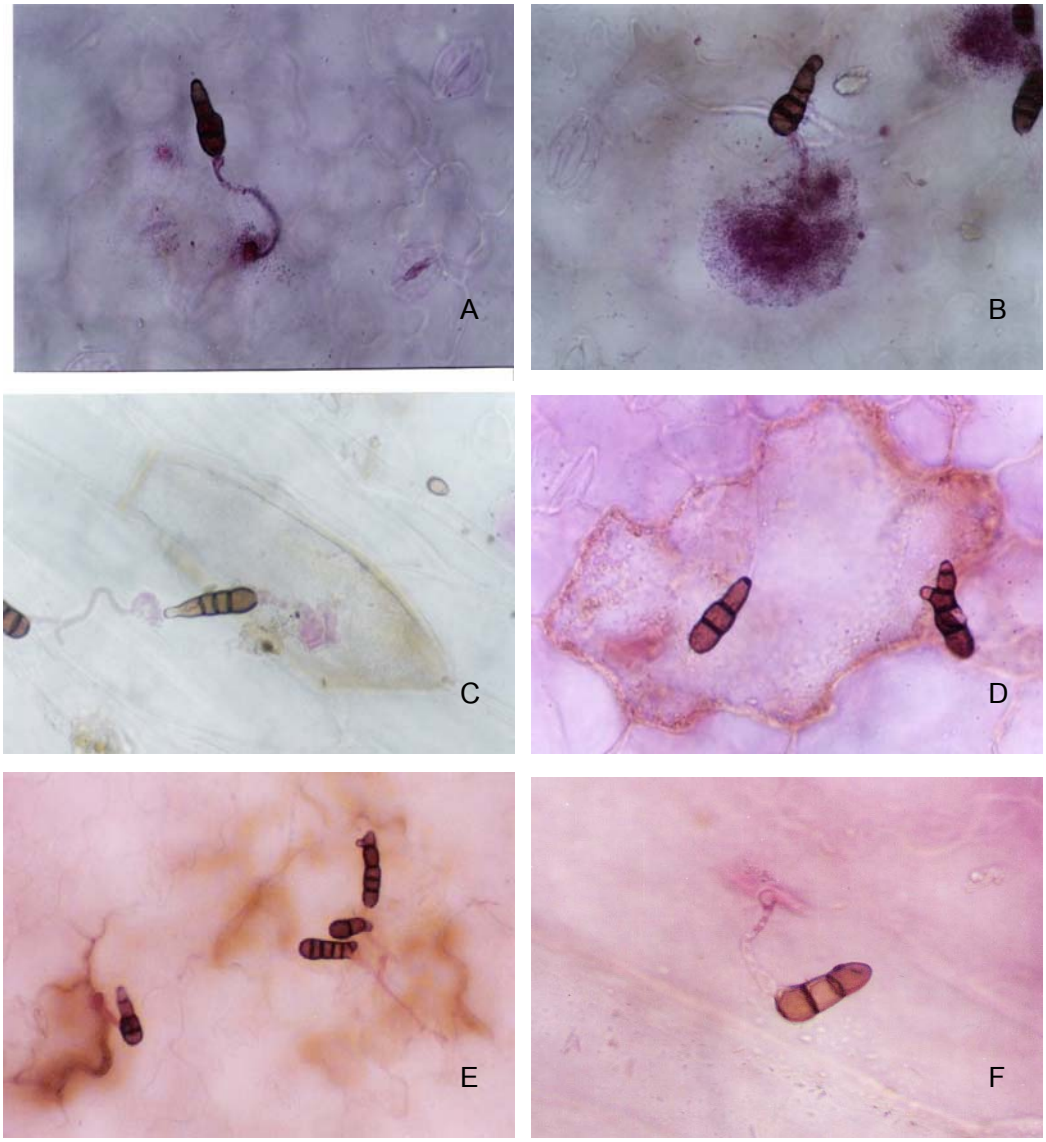
ลักษณะความต้านทานของผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้และผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงต่อเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุของโรคใบจุดพบว่าการฉีดพ่นสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่งโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบลักษณะเซลล์ผิวใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงเท่ากับ 0.02, 0.29, 0.37, 0.46 และ 0.85 เปอร์เซ็นต์และ 0.01, 0.2, 0.26, 0.29 และ 0.38 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับที่เวลา 16, 18, 20, 22และ24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 11 และ 12



ภาพที่ 10 การแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria ของเชื้อรา *A. brassicicola* บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง;HK และฮ่องเต้;HT จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*;Cu/Ab หรือการฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*;Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว;Ab ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง



<u>ภาพที่ 11</u> จำนวนเซลล์ผิวใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง;HK และฮ่องเต้;HT; จากการฉีดพ่นด้วย Bion 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*;Bi/Ab ที่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง



<u>ภาพที่ 12</u> ลักษณะการสะสมของเม็ดสารต่างๆ บริเวณจุดที่มีการแทง germ tube ของเชื้อรา *A. brassicicola*; ภาพที่ AและB และลักษณะเซลล์ผิวใบผักกาดกวางตุ้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อฉีดพ่น Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola;* ภาพที่ CและD เปรียบเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะเชื้อ *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบการแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria และการแทง germ tube เข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยตรงสูงกว่าการฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 g/L. ก่อนการปลูกเชื้อ *A. brassicicola*ภาพที่ EและF

การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* ในแต่ละสิ่งทดลองพบว่าที่เวลา 12-14 ชั่วโมงไม่พบลักษณะของปากใบและเซลล์ผิวใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลโดยการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.หรือสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* หรือการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* การแทง germ tube ทำลายทางปากใบหรือแทงเข้าเซลล์ผิวใบโดยตรง หรือ จากโครงสร้าง appressoria ของเชื้อรา *A. brassicicola* พบมีปริมาณใกล้เคียงกันและที่เวลา 16 ชั่วโมงพบลักษณะของปากใบและเซลล์ผิวใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทำให้การแทง germ tube ทำลายทางปากใบหรือแทงเข้าเซลล์ผิวใบโดยตรงและจากโครงสร้าง appressoria ของเชื้อรา *A. brassicicola* ค่อยๆ ลดลงและพบได้ชัดที่เวลา 24 ชั่วโมง การฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบปากใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 1.25 และ 2.03 เปอร์เซ็นต์ดังนั้นจึงพบการแทง germ tube ทำลายทางปากใบเพียง 1.77และ 0.96 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบการแทง germ tube ทำลายทางปากใบเท่ากับ 27.03 และ 33.81 เปอร์เซ็นต์ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ตามลำดับนอกจากนี้การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบลักษณะเซลล์ผิวใบผักกาดกวางตุ้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเท่ากับ 0.38 และ 0.85 เปอร์เซ็นต์และพบการแทง germ tube ทำลายทางผิวใบโดยตรงเพียง 1.55 และ 0.79 เปอร์เซ็นต์และจากโครงสร้าง appresssoria เพียง 1.24 และ 0.69 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบการแทง germ tube เข้าทำลายทางผิวใบโดยตรงเท่ากับ 25.91 และ31.91 เปอร์เซ็นต์ และ พบจากโครงสร้าง appressoria เท่ากับ 25.75 และ 31.44 เปอร์เซ็นต์ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงผลของการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.และ Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ต่อการงอกของ conidia การแทง germ tube ทำลายทางปากใบและผิวใบโดยตรง การแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressorium ของเชื้อรา *A. brassicicola* และลักษณะของปากใบและเซลล์ผิวใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ที่เวลา 12-24 ชั่วโมง

ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง

	12 ชั่วโมง						14 ชั่วโมง						16 ชั่วโมง						18 ชั่วโมง					
Exp.	Cu[1/]	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa
1[2/]	0	91.97	0	93.07	94.19	0	0	93.27	0	88.79	94.73	0	0	91.15	0	89.46	94.58	0	0	89.39	0	93.00	93.61	0
2	0	29.29	0	26.97	26.45	0	0	27.12	0	26.50	26.21	0	0	26.21	0	25.07	26.27	0	0	22.35	0	22.99	27.32	0
3	0	25.37	0	25.27	25.23	0	0	25.24	0	25.21	25.11	0	0	24.71	0	22.44	25.20	0	0	23.48	0	14.17	26.05	0
4	0	24.88	0	24.96	25.38	0	0	24.76	0	24.56	25.27	0	0	23.76	0	21.05	25.20	0	0	23.00	0	16.24	26.36	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0.03	0	0	0	0	0.05	0.2	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0.2	0	0

ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้

	12 ชั่วโมง						14 ชั่วโมง						16 ชั่วโมง						18 ชั่วโมง					
Exp.	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa
1	0	94.18	0	92.97	95.08	0	0	92.86	0	90.53	96.28	0	0	91.78	0	87.44	98.29	0	0	92.82	0	93.78	96.74	0
2	0	32.48	0	32.50	32.46	0	0	31.52	0	32.39	33.23	0	0	27.31	0	29.99	33.65	0	0	23.00	0	25.38	33.65	0
3	0	30.21	0	30.17	30.77	0	0	27.49	0	30.16	31.84	0	0	26.5	0	26.54	31.94	0	0	25.88	0	19.16	31.48	0
4	0	29.89	0	30.00	30.46	0	0	27.80	0	29.23	31.22	0	0	26.18	0	27.16	31.63	0	0	25.41	0	19.33	31.16	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0.04	0	0	0	0	0.19	0.23	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0.29	0	0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง

	20 ชั่วโมง						22 ชั่วโมง						24 ชั่วโมง					
Exp.	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa
1-	0	92.06	0	90.66	95.61	0	0	93.18	0	92.52	93.60	0	0	92.62	0	91.80	94.11	0
2	0	12.38	0	19.97	26.81	0	0	9.62	0	13.08	26.83	0	0	**1.77**	0	5.56	27.03	0
3	0	20.96	0	10.31	25.56	0	0	19.54	0	7.63	25.43	0	0	11.72	0	**1.55**	25.91	0
4	0	21.12	0	11.27	25.87	0	0	20.52	0	8.41	25.27	0	0	9.8	0	**1.24**	25.75	0
5	0.09	0.37	0	0	0	0	0.12	0.53	0	0	0	0	0.14	**1.25**	0	0	0	0
6	0	0	0	0.26	0	0	0	0	0	0.29	0	0	0	0	0	**0.38**	0	0

ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้

	20 ชั่วโมง						22 ชั่วโมง						24 ชั่วโมง					
Exp.	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa	Cu	Cu/Ab	Bi	Bi/Ab	Ab	Wa
1-	0	92.82	0	88.44	97.03	0	0	91.51	0	90.29	97.12	0	0	88.99	0	91.18	97.15	0
2	0	10.21	0	18.63	33.80	0	0	7.36	0	8.01	33.59	0	0	**0.96**	0	4.41	33.81	0
3	0	22.81	0	11.40	31.76	0	0	18.59	0	6.78	31.71	0	0	9.24	0	**0.79**	31.91	0
4	0	24.09	0	11.73	30.51	0	0	19.08	0	7.24	31.08	0	0	7.50	0	**0.69**	31.44	0
5	0.27	0.47	0	0	0	0	0.38	0.72	0	0	0	0	0.40	**2.03**	0	0	0	0
6	0	0	0	0.37	0	0	0	0	0	0.46	0	0	0	0	0	**0.85**	0	0

[2/] 1;จำนวนเชื้อรา *A. brassicicola* งอก conidia 2; จำนวนเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tube ทำลายทางปากใบ 3; จำนวนเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tube ทำลายทางผิวใบโดยตรง 4; จำนวนการแทงโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria 5;จำนวนปากใบผักกาดกวางตุ้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล 6; จำนวนผิวใบผักกาดกวางตุ้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

[1/]Cu; ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น

Cu/Ab; ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola*

Bi; ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น

Bi/Ab; ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola*

Al; ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว

Wa; ฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว

3. <u>ศึกษาการชักนำความต้านทานของผักกาดกวางตุ้งต่อเชื้อรา *A. brassicicola* ในสภาพเรือนปลูกพืชทดสอบ</u>

3.1 การวัดความรุนแรงของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้

ความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วันจากการวัดความรุนแรงของโรค(Disease severity) การฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบอาการโรคใบจุดในวันที่ 5 เท่ากับ5 และ20 เปอร์เซ็นต์หรือสามารถลดอาการโรคใบจุดลงได้ 10 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 10-25 พบอาการของโรคเท่ากับ 10-15 และ 30-35 เปอร์เซ็นต์ หรือสามารถลดอาการของโรคใบจุดลงได้ 10-20 และ 30-65 เปอร์เซ็นต์และการฉีดสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบอาการโรคใบจุดในวันที่ 15 โดยความรุนแรงของโรคคงที่จนถึงวันที่ 25 เท่ากับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถลดอาการของโรคใบจุดลงได้ 30 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตลอดระยะเวลา 25 วัน เมื่อเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* ให้กับผักกาดกวางตุ้งทั้ง 2 พันธุ์เพียงอย่างเดียวพบอาการของโรคใบจุดรุนแรงกว่า 2 สิ่งทดลองข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 0-35 เปอร์เซ็นต์ และ 10-100 เปอร์เซ็นต์ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ในวันที่ 1-25 ตามลำดับและพบความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6)

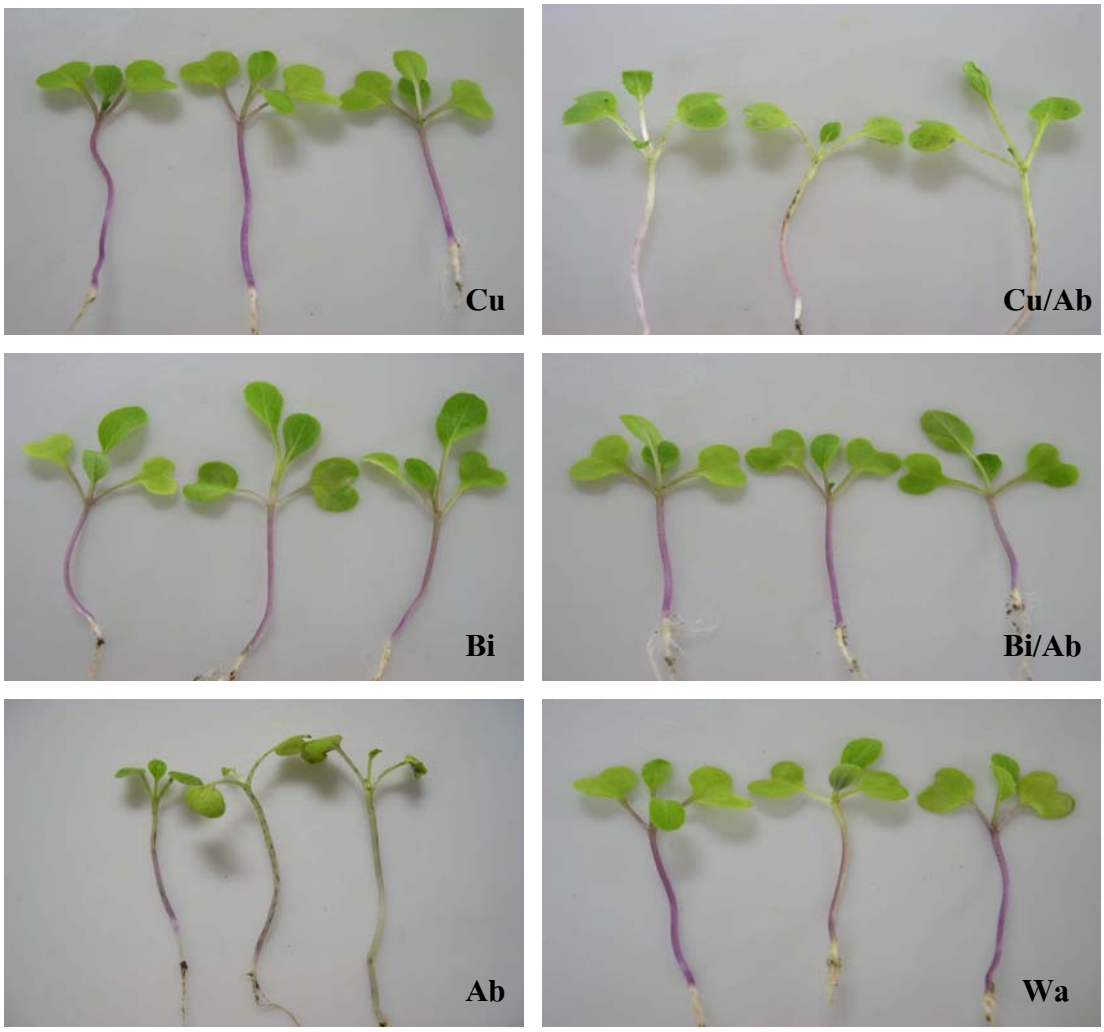
ตารางที่ 6 ความรุนแรง(Disease severity) ของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 วันภายหลังจากปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. และฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรแล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25

	การวัดความรุนแรงของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้ง											
	ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง						ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้					
TR.	วันที่ 1	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20	วันที่ 25	วันที่ 1	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20	วันที่ 25
Cu[1/]	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Cu/Ab	0 a	5 b	10 c	15 c	15 c	15 c	0 a	20 d	30 def	30 def	35 efg	35 efg
Bi	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Bi/Ab	0 a	0 a	0 a	5 b	5 b	5 b	0 a	0 a	0 a	10 c	10 c	10 c
Ab	0 a	15 c	20 d	25 de	30 def	35 efg	10 c	50 fgh	60 ghi	80 hi	100 i	100 i
Wa	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

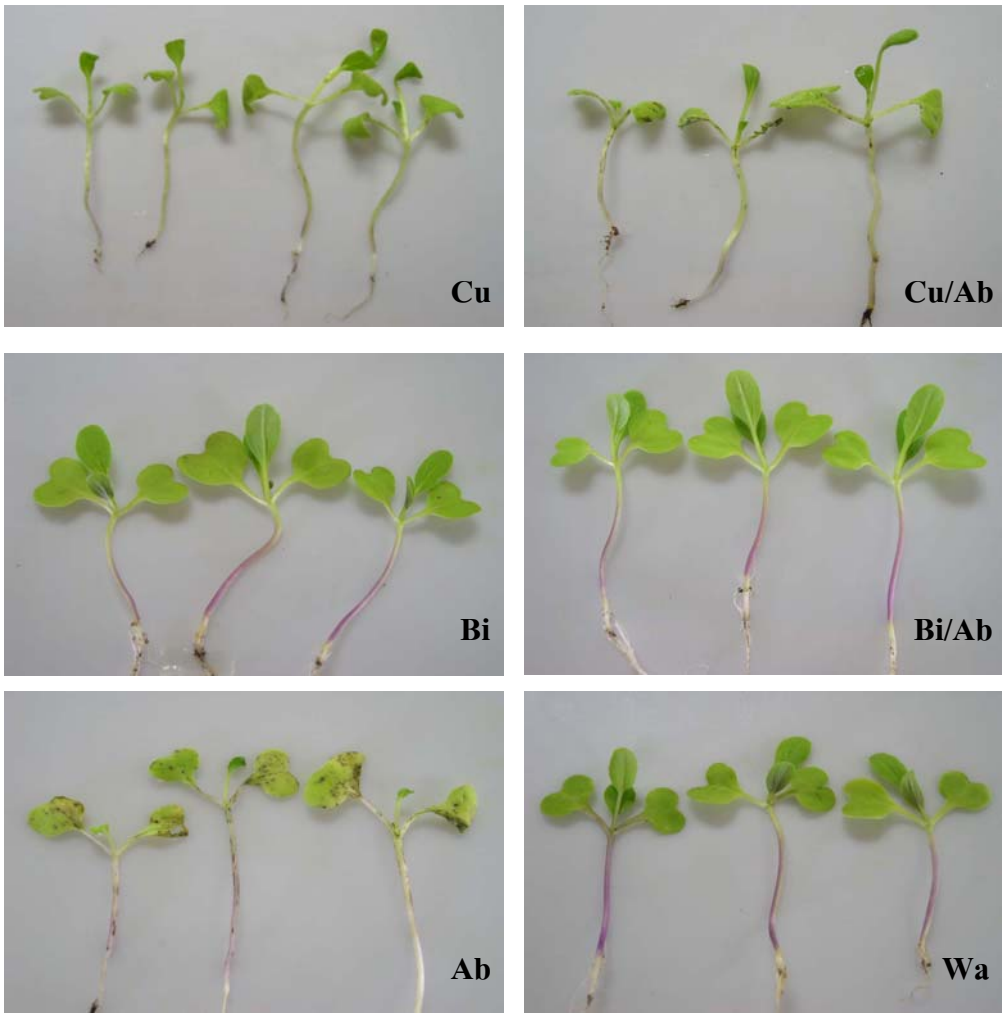
F-test = **

CV. = 73.21%

[1/]วิธีการที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว; Cu, วิธีการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab; วิธีการฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว; Bi, วิธีการฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab, วิธีการที่ปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab, ฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียง **อย่างเดียว**;Wa



ภาพที่ 13 ความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง อายุ 12 วันจากการปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.; Cu หรือภายหลัง 24 ชั่วโมง ปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab และ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร; Bi หรือภายหลัง 24 ชั่วโมงปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Ab หรือ ฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ; Wa เพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 14 ความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ อายุ 12 วันจากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.; Cu หรือภายหลัง 24 ชั่วโมงปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab และ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร; Bi หรือภายหลัง 24 ชั่วโมงปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Ab หรือ ฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ; Wa เพียงอย่างเดียว

การวัดความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งอายุ 30 วัน การฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบอาการโรคใบจุดในวันที่ 5 เท่ากับ 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์หรือสามารถลดอาการของโรคใบจุดลงได้ 5 และ 40 เปอร์เซ็นต์หลังจากนั้นในวันที่ 10-25 อาการของโรคจะพบอาการโรคเท่ากับ 15-20 และ 30-35 เปอร์เซ็นต์หรือสามารถลดอาการของโรคใบจุดลงได้ 5-15 และ 50-65 เปอร์เซ็นต์ และการฉีดสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบอาการโรคใบจุดในวันที่ 15 โดยความรุนแรงของโรคคงที่จนถึงวันที่ 25 เท่ากับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์หรือสามารถลดอาการของโรคใบจุดลงได้ 30และ90 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลา 25 วัน เมื่อเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* ให้กับกับผักกาดกวางตุ้งทั้ง 2 พันธุ์เพียงอย่างเดียวพบอาการของโรคใบจุดรุนแรงกว่า 2 สิ่งทดลองข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ10-35 และ 30-100 เปอร์เซ็นต์ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ในวันที่1-25 ตามลำดับและพบความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ความรุนแรง(Disease severity) ของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 30 วันที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. และฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรแล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25

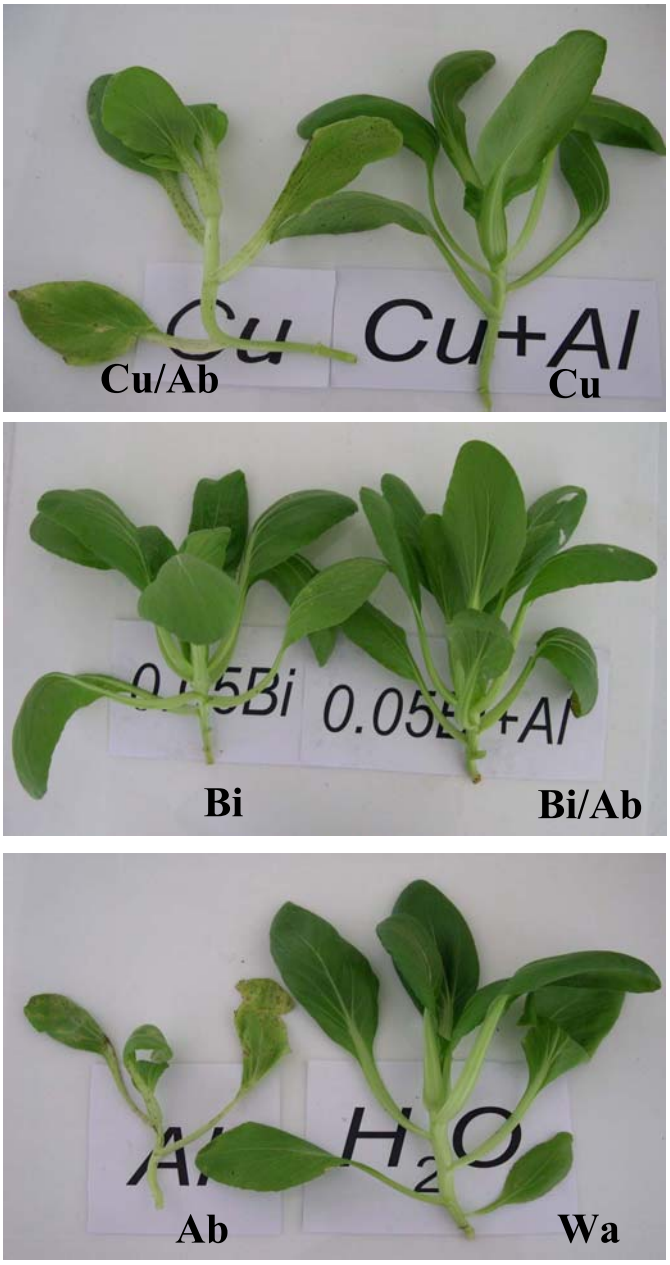
	การวัดความรุนแรงของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้ง											
	ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง						ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้					
TR.	วันที่ 1	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20	วันที่ 25	วันที่ 1	วันที่ 5	วันที่ 10	วันที่ 15	วันที่ 20	วันที่ 25
Cu[1/]	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Cu/Ab	0 a	10 c	15 d	15 d	20 ef	20 ef	0 a	20 ef	30 fg	30 fg	35 gh	35 gh
Bi	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Bi/Ab	0 a	0 a	0 a	5 b	5 b	5 b	0 a	0 a	0 a	10 c	10 c	10 c
Ab	10 c	15 d	20 de	25 ef	30 fg	35 gh	30 gf	60 hi	80 hi	100 i	100 i	100 i
Wa	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

F-test = **

CV. = 93.24%

[1/]วิธีการที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว; Cu, วิธีการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab; วิธีการฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว; Bi, วิธีการฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab, วิธีการที่ปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab, ฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว;Wa

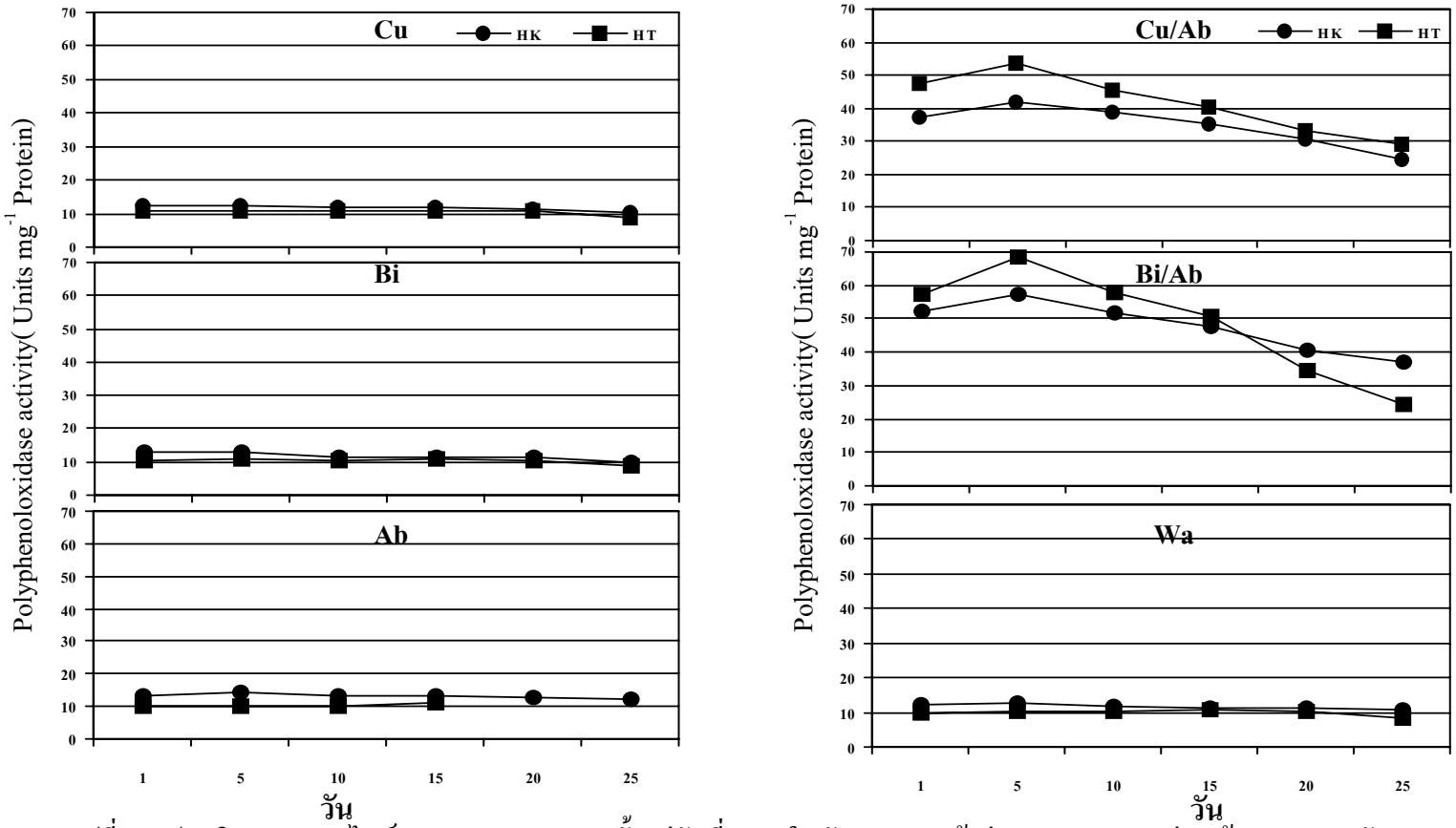
ภาพที่ 15 ความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง อายุ 35 วันจากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.; Cu หรือภายหลัง 24 ชั่วโมงปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab และ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร; Bi หรือภายหลัง 24 ชั่วโมงปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Ab หรือ ฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ; Wa เพียงอย่างเดียว



<u>ภาพที่ 16</u> ความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ อายุ 35 วันจากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.; Cu หรือภายหลัง 24 ชั่วโมงปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab และ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร; Bi หรือภายหลัง 24 ชั่วโมงปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Ab หรือ ฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ; Wa เพียงอย่างเดียว

3.2 การตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase(PPO) และ peroxidase(POX)

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อายุ 7 วันที่ได้รับการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 12.59, 12.56, 11.97, 11.91, 11.46 และ 10.36 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 10.64, 10.64, 10.82, 10.95, 10.87และ8.5 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน การฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5และค่อยๆ ลดลงเท่ากับ 37.07, 41.75, 38.75, 35.51, 30.57 และ 24.44 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ47.35, 53.77, 45.64, 40.56, 33.42 และ 29.11 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 13.05, 12.84, 11.39, 11.65, 11.47 และ 10.11 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 10.43, 10.8, 10.62, 10.78, 10.58 และ8.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 และค่อยๆลดลงเท่ากับ 52.34, 57.27, 51.58, 47.91, 40.49และ 36.82 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 57.28, 68.59, 57.65, 50.65, 34.52 และ 24.44 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน การฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ค่อนข่างคงที่เท่ากับ 13.1, 14.21, 13.16, 13.16, 12.66 และ 12.05 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ10.08, 10.1, 10.2 และ 10.88 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดพ่นน้ำกลั่นให้กับผักกาดกวางตุ้งเพียงอย่างเดียวพบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ที่ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Curvularia* sp. หรือ *A. brassicicola* และสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวเท่ากับ 12.45, 12.55, 11.58, 11.03, 11.44 และ 10.64 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 10.01, 10.24, 10.5, 10.75, 10.48 และ 8.41 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ที่เวลา 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 ชั่วโมงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase ตั้งแต่วันที่ 1-25 ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง; HK และ ฮ่องเต้; HT อายุ 7 วัน ภายหลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว; Cu หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab และการฉีดพ่นด้วย Bion เพียงอย่างเดียว; Bi หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola;* Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab หรือฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว; Wa

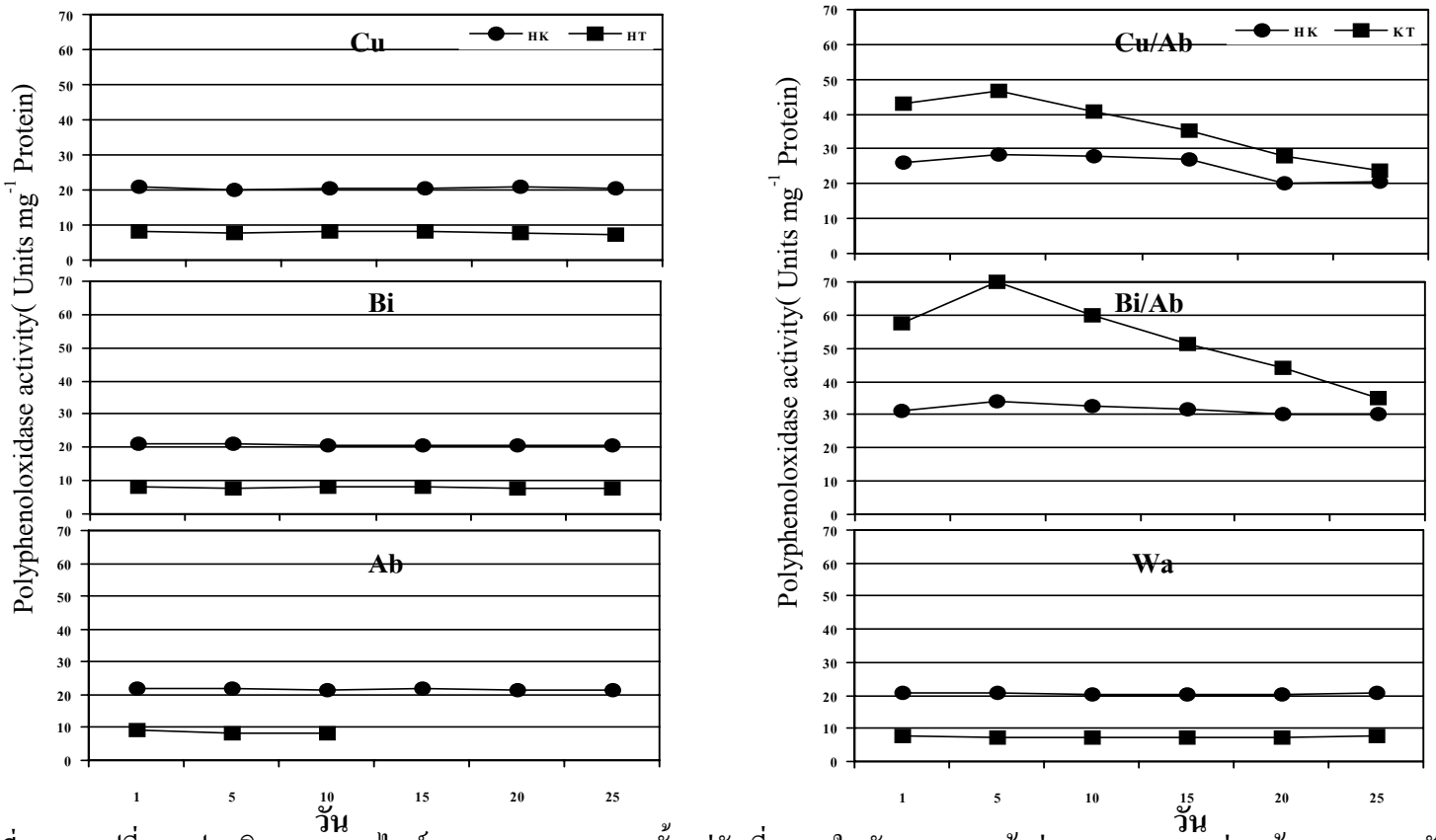
ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งทดลองกับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อายุ 7 วันพบการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อนหรือสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 และการฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้และผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 68.59 และ 57.27 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และเท่ากับ 53.77 และ 41.75 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมง แล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* และการชักนำความต้านทานด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหรือสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 1-10 หลังจากนั้นในวันที่ 20-25 กิจกรรมเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้จะต่ำกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงในสิ่งทดลองที่ฉีดด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* สำหรับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvuraria* sp. หรือสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPOไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวลอยเชื้อรา *A. brassicicola* หรือการฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวนอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างด้านสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงกับผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ในการทดลองที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 วันภายหลังจากปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. และฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรแล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25

	กิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase (units mg^{-1} protein) ในผักกาดกวางตุ้ง											
	วันที่ 1		วันที่ 5		วันที่ 10		วันที่ 15		วันที่ 20		วันที่ 25	
TR.	HK[1/]	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT
Cu[2/]	12.59 e	10.64 e	12.56 d	10.64 d	11.97 ef	10.82 f-h	11.91 d	10.95 d	11.46 de	10.87 de	10.36 d	8.50 d
Cu/Ab	37.07 d	47.35 c	**41.75 c**	**53.77 b**	38.75 d	45.64 c	35.51 c	40.56 b	30.57 c	33.42 b	24.44 c	29.11 b
Bi	13.05 e	10.43 e	12.84 d	10.80 d	11.39 f-h	10.62 gh	11.65 d	10.78 d	11.47 de	10.58 de	10.11 d	8.70 d
Bi/Ab	52.34 b	57.28 a	**57.27 b**	**68.59 a**	51.58 b	57.65 a	47.91 a	50.65 a	40.49 a	34.52 b	36.82 a	24.44 c
Ab	13.10 e	10.08 e	14.21 d	10.10 d	13.16 e	10.20 h	13.16 d	10.88 d	12.66 d	-	12.05 d	-
Wa	12.45 e	10.01 e	12.55 d	10.24 d	11.58 fg	10.50 gh	11.03 d	10.75 d	11.44 de	10.48 e	10.64 d	8.41 d
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV.	9.18 %		8.21 %		3.04 %		7.81 %		6.22 %		14.15 %	

[1/] HK;ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง, HK;ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ [2/]วิธีการที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว; Cu,การปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab; การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว; Bi, การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab, วิธีการที่ปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab, ฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว;Wa

ความสำพันธ์ระหว่างระยะเวลากับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อายุ 30 วันที่ได้รับการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 20.95, 20.01, 20.64, 20.43, 20.86 และ 20.64 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 8.15, 7.84, 8.33, 8.1, 7.77 และ 7.43 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน การฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของ เอนไซม์ PPO เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 และค่อยๆลดลงตามลำดับเท่ากับ 25.91, 28.14, 27.97, 27.02, 20.2 และ 26.36 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ43, 46.79, 40.84, 35.4, 28.12 และ 23.65 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน การฉีดพ่นเฉพาะสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร พบกิจกรรมของ PPO ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 20.92, 20.97, 20.63, 20.4, 20.52 และ 20.82 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 8.17, 7.89, 8.25, 8.1, 7.46 และ 7.56 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 และค่อยๆลดลง เท่ากับ 30.95, 34, 32.47, 31.45, 30.15 และ 30.43 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ57.77, 69.96, 59.77, 51.14, 44.34 และ 34.98 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน การฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 21.83, 22.1, 21.35, 21.8, 21.52 และ 21.41 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ9.12, 8.36, 8.25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดพ่นน้ำกลั่นให้กับผักกาดกวางตุ้งเพียงอย่างเดียวพบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ที่ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หรือ *A. brassicicola* และสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว เท่ากับ 20.81, 20.8, 20.26, 20.1, 20.42และ20.65 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 7.93, 7.22, 7.24, 7.44, 7.35 และ 7.86 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ที่เวลา 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 ชั่วโมงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 18



ภาพที่18 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase ตั้งแต่วันที่ 1-25 ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง;HK และ ฮ่องเต้;HT อายุ 30 วัน ภายหลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว;Cu หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab และการฉีดพ่นด้วย Bion เพียงอย่างเดียว; Bi หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola;*Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab หรือฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว; Wa

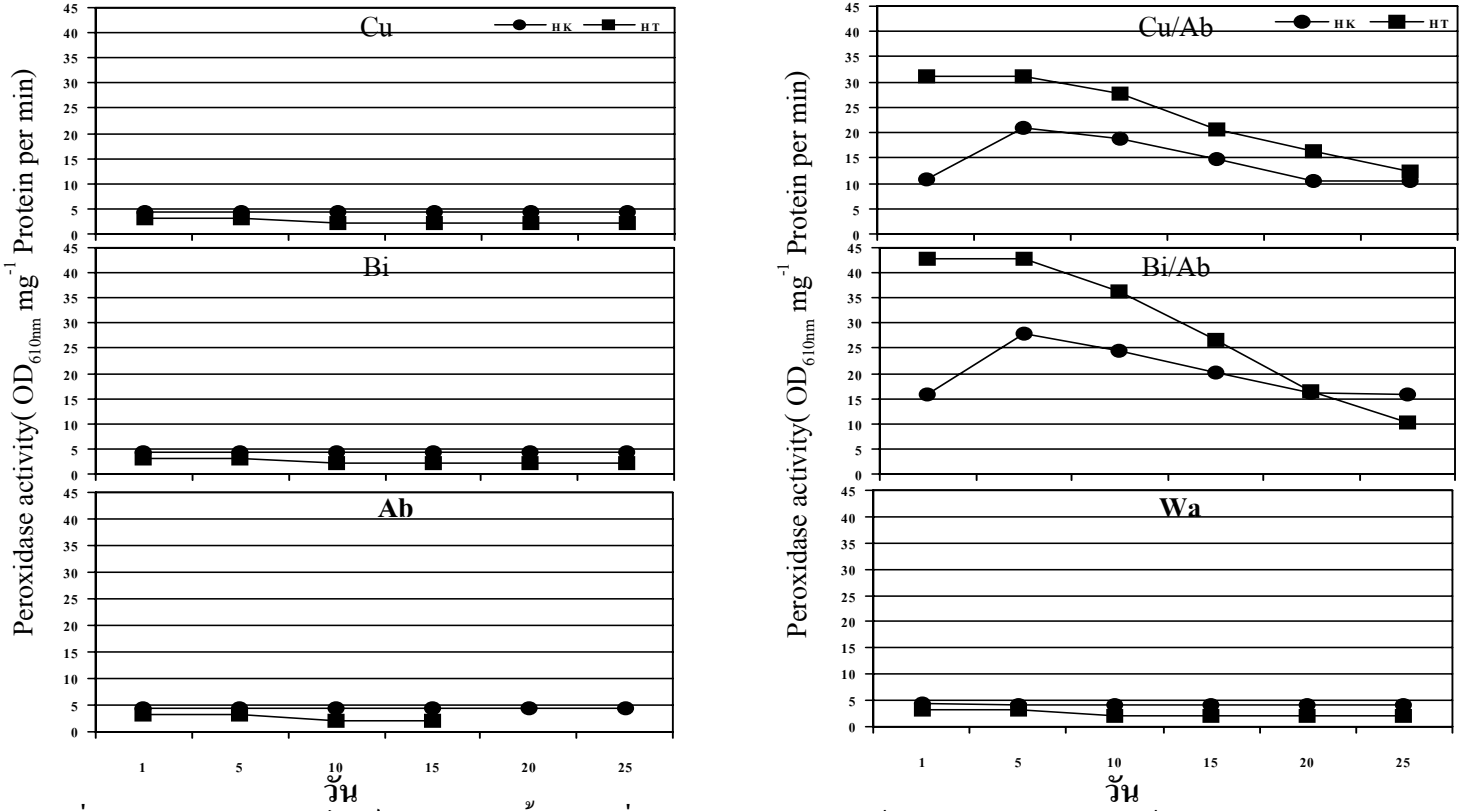
ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งทดลองกับกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อายุ 30 วัน พบการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน หรือสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของ PPO เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 เช่นเดียวกับผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วันและการฉีดพ่นสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้และผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 69.96 และ 34 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และ 46.79 และ 28.41 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* การชักนำความต้านทานด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหรือสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvuraria* sp. หรือสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้พบกิจกรรมของ PPO ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวลอยเชื้อรา *A. brassicicola* หรือการฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวนอกจากนี้ยัง พบกิจกรรมเอนไซม์ PPO ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงสูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 30 วันภายหลังจากปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* spและฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรแล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25

	กิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase (units mg^{-1} protein) ในผักกาดกวางตุ้ง											
	วันที่ 1		วันที่ 5		วันที่ 10		วันที่ 15		วันที่ 20		วันที่ 25	
TR.	HK[1/]	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT
Cu[2/]	20.95 e	8.15 f	20.01 e	7.84 f	20.64 e	8.33 f	20.43 d	8.10 e	20.80 bc	7.77 d	20.64 e	7.43 f
Cu/Ab	25.91 d	43.00 b	**28.14 d**	**46.79 b**	27.97 d	40.84 b	27.02 c	35.40 b	20.20 bc	28.12 b	20.36 c	23.65 d
Bi	20.92 e	8.17 f	20.97	7.89 f	20.63 e	8.25 f	20.40 d	8.10 e	20.52 c	7.46 d	20.82 e	7.65 f
Bi/Ab	30.95 c	57.77 a	**34.00 c**	**69.96 a**	32.47 c	59.77 a	31.45 b	51.14 a	30.15 b	44.34 a	30.43 b	34.98 a
Ab	21.83 e	9.12 f	22.10 e	8.36 f	21.35 e	8.25 f	21.80 d	-	21.52 c	-	21.41 e	-
Wa	20.81 e	7.93 f	20.80 e	7.22 f	20.26 e	7.24 f	20.10 d	7.44 e	20.42 c	7.35 d	20.65 e	7.86 f
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV.	9.03 %		9.38 %		10.39 %		11.26 %		18.39 %		6.32 %	

[1/] HK;ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง, HK;ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ [2/]วิธีการที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว; Cu,การปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab; การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว; Bi, การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab, วิธีการที่ปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab, ฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว;Wa

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับกิจกรรมของเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อายุ 7 วันที่ได้รับการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 4.33, 4.27, 4.27, 4.26, 4.24 และ 4.22 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 3.23, 3.23, 2.17, 2.16, 2.11 และ 2.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที การฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของ POX เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 และค่อยๆ ลดลงเท่ากับ 10.7, 20.88, 18.85, 14.88, 10.62 และ 10.52 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 31.15, 31.15, 27.83, 20.69, 16.34 และ 12.3 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที การฉีดพ่นเฉพาะสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 4.34, 4.27, 4.24, 4.26, 4.24 และ 4.23 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 3.21, 3.21, 2.18, 2.14, 2.11 และ 2.12 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 และค่อยๆลดลงเท่ากับ 15.92, 27.96, 24.53, 20.29, 16.01 และ 15.81 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 42.89, 42.9, 36.46, 26.68, 16.48, 10.24 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที การฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 4.46, 4.33, 4.31, 4.32, 4.31 และ 4.33 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ3.22, 3.22, 2.16 และ 2.15 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดพ่นน้ำกลั่นให้กับผักกาดกวางตุ้งเพียงอย่างเดียวพบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกิจกรรมของเอนไซม์ POX ที่ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Curvularia* sp.หรือ *A. brassicicola* และสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว เท่ากับ 4.36, 4.24, 4.25, 4.25, 4.22 และ 4.22 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 3.2, 3.2, 2.15, 2.15, 2.1 และ 2.11 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ที่เวลา 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 ชั่วโมงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 19



ภาพที่ 19 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ตั้งแต่วันที่ 1-25 ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง;HK และ ฮ่องเต้;HT อายุ 7 วัน ภายหลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว;Cu หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab และการฉีดพ่นด้วย Bion เพียงอย่างเดียว; Bi หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola;*Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab หรือฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว; Wa

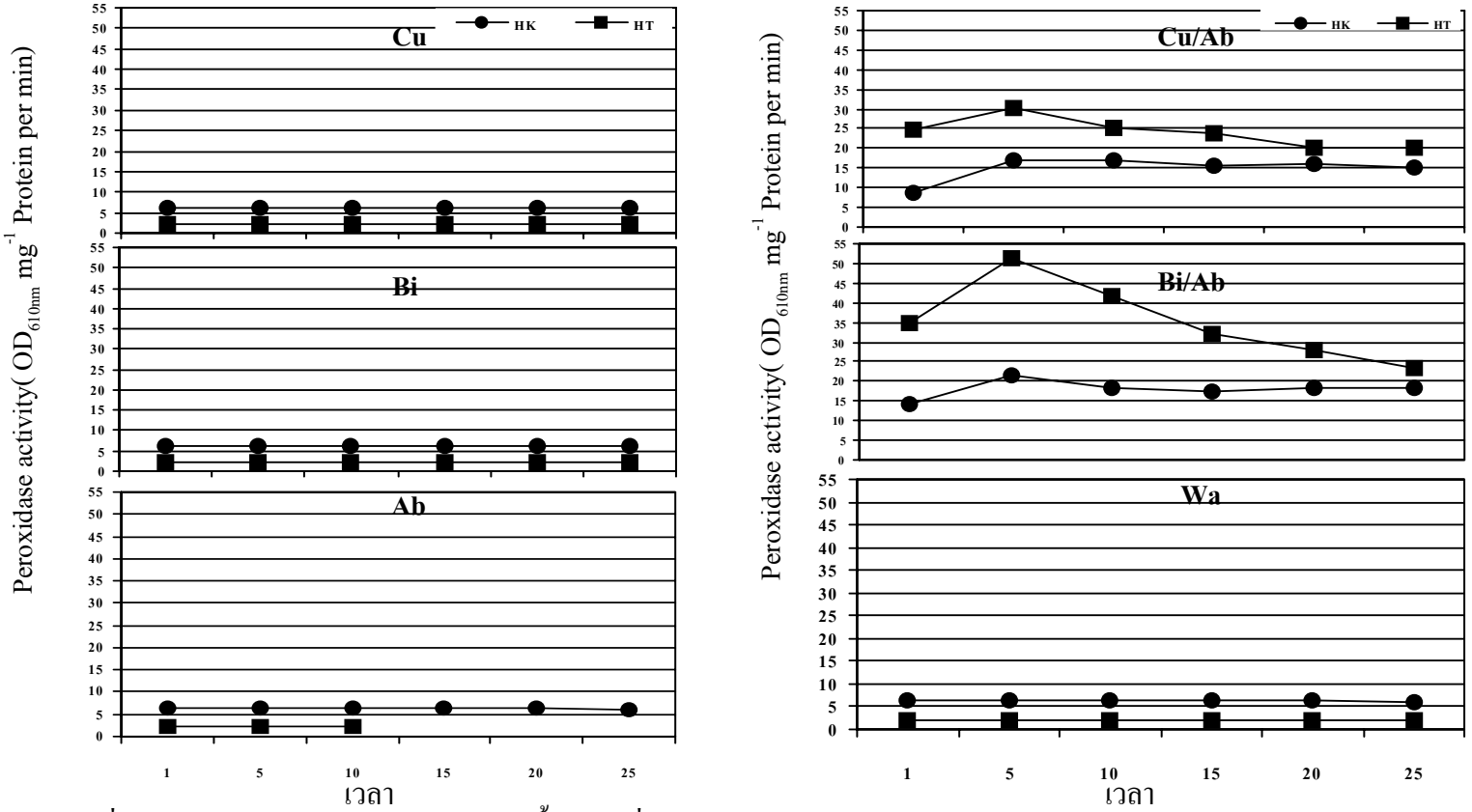
ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งทดลองกับกิจกรรมของเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อายุ 7 วันพบการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อนหรือสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 เช่นเดียวกับเอนไซม์ PPO และการฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้และผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 42.9 และ 27.96 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ตามลำดับ และ 31.15 และ 20.88 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ตามลำดับเมื่อฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วย สปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* และการชักนำความต้านทานด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร หรือสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 1-15 หลังจากนั้นไม่พบความแตกต่างทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้และกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง สำหรับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.หรือสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* หรือการฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียวและพบกิจกรรมเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงสูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อย่างมีนัยสำคัญ(ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 วันภายหลังจากปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp และฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรแล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 25

	กิจกรรมเอนไซม์ peroxidase (OD_{610nm} mg^{-1}protein per min) ในผักกาดกวางตุ้ง											
	วันที่ 1		วันที่ 5		วันที่ 10		วันที่ 15		วันที่ 20		วันที่ 25	
TR.	HK[1/]	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT
Cu[2/]	4.33 e	3.23 e	4.27 e	3.23 e	4.27e	2.17e	4.26 d	2.16 d	4.24 c	2.11 cd	4.22 c	2.12 cd
Cu/Ab	10.70 d	31.15 b	**20.88 d**	**31.15 b**	18.85 d	27.83 b	14.88 c	20.69 b	10.62 b	16.34 a	10.52 b	12.30 b
Bi	4.34 e	3.21 e	4.27 e	3.21 e	4.24 e	2.18 e	4.26 d	2.14 d	4.24 c	2.11 cd	4.23 c	2.12 cd
Bi/Ab	15.92 c	42.89 a	**27.96 c**	**42.90 a**	24.53 c	36.46 a	20.29 b	26.68 a	16.01 a	16.48 a	15.81 a	10.24 b
Ab	4.46 e	3.22 e	4.33 e	3.22 e	4.31 e	2.16 e	4.32 d	2.15 d	4.31 c	-	4.33 c	-
Wa	4.36 e	3.20 e	4.24 e	3.20 e	4.25 e	2.15 e	4.25 d	2.15 d	4.22 c	2.10 cd	4.22 c	2.11 cd
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV.	13.03 %		8.86 %		13.36 %		13.48 %		17.49 %		20.62 %	

[1/] HK;ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง, HK;ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ [2/]วิธีการที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว; Cu,การปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab; การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว; Bi, การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab, วิธีการที่ปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab, ฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว;Wa

ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับกิจกรรมของเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อายุ 30 วันที่ได้รับการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 6.22, 6.21, 6.24, 6.22, 6.23 และ 6.09 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 2.17, 2.18, 2.14, 2.12, 2.1 และ 2.05 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที การฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของ POX เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 และค่อยๆลดลงเท่ากับ 8.78, 16.81, 16.74, 15.71, 15.85 และ 15.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 24.9, 30.4, 25.01, 23.72, 20.29 และ 20.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที การฉีดพ่นเฉพาะสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 6.21, 6.23, 6.24, 6.24, 6.24 และ 6.09 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ2.17, 2.15, 2.14, 2.12, 2.1 และ 2.05 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที การฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 และค่อยๆลดลงเท่ากับ 14.26, 21.52, 18.5, 17.48, 18.48 และ 18.14 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 35.03, 51.13, 41.52, 32.27, 28.05 และ 23.16 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที การฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ค่อนข้างคงที่เท่ากับ 6.29, 6.28, 6.33, 6.32, 6.26 และ 6.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 2.16, 2.16 และ 2.14 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดพ่นน้ำกลั่นให้กับผักกาดกวางตุ้งเพียงอย่างเดียวพบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกิจกรรมของเอนไซม์ POX ที่ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Curvularia* sp.หรือ *A. brassicicola* และสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว เท่ากับ 6.21, 6.22, 6.22, 6.23, 6.24 และ 6.09 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที และ 2.14, 2.16, 2.14, 2.12, 2.07 และ 2.05 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ที่เวลา 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 ชั่วโมงตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 20



ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ตั้งแต่วันที่ 1-25 ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง;HK และ ฮ่องเต้;HT อายุ 30 วัน ภายหลังจากปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.เพียงอย่างเดียว;Cu หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab และการฉีดพ่นด้วย Bion เพียงอย่างเดียว; Bi หรือปลูกตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola;*Bi/Ab เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab หรือฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว; Wa

ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งทดลองกับกิจกรรมของเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อายุ 30 วัน พบการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อนหรือสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 เช่นเดียวกับผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วัน และการฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้และผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 51.13 และ 21.52 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ตามลำดับ และ 30.4 และ 16.81 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ตามลำดับ เมื่อฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* และการชักนำความต้านทานด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร หรือสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงอย่างมีนัยสำคัญทุกการทดลองที่ปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* สำหรับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp.หรือสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้พบกิจกรรมของเอนไซม์ POX ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* หรือการฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยัง พบกิจกรรมเอนไซม์ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงสูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 30 วันภายหลังจากปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp และฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรแล้วปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* ตั้งแต่วันที่ 1ถึงวันที่ 25

	กิจกรรมเอนไซม์ peroxidase (OD_{610nm} mg^{-1}protein per min) ในผักกาดกวางตุ้ง											
	วันที่ 1		วันที่ 5		วันที่ 10		วันที่ 15		วันที่ 20		วันที่ 25	
TR.	HK[1/]	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT
Cu[2/]	6.22 d	2.17 e	6.21 d	2.18 d	6.24 d	2.14 e	6.22 d	2.12 e	6.23 d	2.10 e	6.09 d	2.05 e
Cu/Ab	8.78 d	24.90 b	**16.81 c**	**30.40 b**	16.74 c	25.01 b	15.71 c	23.72 b	15.85 c	20.29 b	15.10 c	20.08 ab
Bi	6.21 d	2.17 e	6.23 d	2.15 d	6.24 d	2.14 e	6.24 d	2.12 e	6.24 d	2.10 e	6.09 d	2.05 e
Bi/Ab	14.26 c	35.03 a	**21.52 c**	**51.13 a**	18.50 c	41.52 a	17.48 c	32.27 a	18.48 c	28.05 a	18.14 bc	23.16 a
Ab	6.29 d	2.16 e	6.28 d	2.16 d	6.33 d	2.14 e	6.32 d	-	6.26 d	-	6.10 d	-
Wa	6.21 d	2.14 e	6.22 d	2.16 d	6.22 d	2.14 e	6.32 d	2.12 e	6.24 d	2.07 e	6.09 d	2.05 e
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV.	21.39 %		25.54 %		15.08 %		13.58 %		23.14 %		20.97 %	

[1/] HK;ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง, HK;ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้ [2/]วิธีการที่ปลูกด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. เพียงอย่างเดียว; Cu,การปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Cu/Ab; การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว; Bi, การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ปลูกเชื้อตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola*; Bi/Ab, วิธีการที่ปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว; Ab, ฉีดพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว;Wa

วิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อรา จากดอก ลำต้น ก้านใบและใบ ที่แสดงอาการของโรค ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้โดยใช้อาหาร PDA พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 35 สายพันธุ์(isolate)โดยการแยกเชื้อราจากส่วนของผักกาดกวางตุ้งด้วยวิธี Tissue transplanting สามารถแยกเชื้อราได้ 21 สายพันธุ์มากกว่าวิธีการล้างตัวอย่างพืชซึ่งแยกได้ 14 สายพันธุ์ โดยการล้างตัวอย่างจากผิวพืชพบเชื้อราที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นเชื้อรา *Aspergillus* sp.และ *Penicillium* sp. เนื่องจากสปอร์สามารถหลุดออกมาแขวนลอยในน้ำได้มากกว่า นอกจากนั้นพบว่าวิธีการแยกเชื้อราจากทั้ง 2 วิธีข้างต้นสามารถแยกเชื้อราจากใบได้มากกว่าก้านใบ ลำต้นและดอกตามลำดับทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อราหลายชนิดชอบอาศัยบนผิวใบมากกว่าก้านใบ ลำต้นหรือดอก (วราภรณ์, 2545)

เชื้อราที่แยกได้ 35 สายพันธุ์จากส่วนของผักกาดกวางตุ้งเมื่อจำแนกด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเชื้อรา 20 สายพันธุ์เป็นเชื้อราใน genus *Penicillium*, *Aspergillus* และเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ทำให้ไม่สามารถจำแนกได้ นอกจากนี้เชื้อรา *Penicillium* sp.และ *Aspergillus* sp. ยังมีรายงานว่าสามารถสร้างสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้จึงไม่นำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป สำหรับเชื้อราที่เหลือ 15 สายพันธุ์เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนใบผักกาดกวางตุ้งพบเพียงเชื้อรา 11 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้โดยแสดงอาการแผลวงกลมสีน้ำตาลเป็นวงซ้อนกัน เนื้อเยื่อบุ๋มลงไปเล็กน้อยทั้งบนหน้าใบและหลังใบ ศุภลักษณ์ (2527) เชื้อราอีก 4 สายพันธุ์ไม่พบลักษณะอาการของโรค เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคบนใบผักกาดกวางตุ้ง

ลักษณะรูปร่างและการเจริญของเชื้อรา 15 สายพันธุ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าสามารถแยกได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 ลักษณะโคโลนีเชื้อรามีสีเขียวมะกอกสร้างเส้นใยน้อยลักษณะหยาบ ฟูเล็กน้อยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีอัตราการเจริญ 0.58-0.6 เซ็นติเมตรต่อวันและใช้เวลาเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อมากกว่า 15 วัน ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *A. brassicicola* โดย Ellis (1971) พบโคโลนีเมื่ออายุ 5 วันมีสีเขียวมะกอกอ่อนและเมื่ออายุมากกว่า 7 วันจะมีสีดำอมเขียวมะกอกและ Shahin and Shepard (1979) พบการเจริญของโคโลนีเท่ากับ 3.96 เซ็นติเมตรหลังบ่มเชื้อไว้ 4 วันที่อุณหภูมิห้อง กลุ่มสายพันธุ์ที่ 2 ลักษณะโคโลนีเชื้อรามีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม สร้างเส้นใยมาก ฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *A. brassicae* โดย Ellis (1971) ศึกษาพบโคโลนีเป็นสี

เขียวมะกอกหรือน้ำตาลเข้ม ฟูมาก โคโลนีเมื่ออายุ 3 วันมีสีเหลืองหรือน้ำตาลอ่อนและเมื่ออายุมากกว่า 7 วันจะมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำและสายพันธุ์ที่ 3 ลักษณะโคโลนีเชื้อรามีสีเขียวเข้ม สร้างเส้นใยมากและฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *Curvularia* sp. โดย Ellis (1971) รายงานว่าโคโลนีเป็นสีเทาหรือดำ ฟูมาก โคโลนีเมื่ออายุ 3 วัน มีสีเขียวเข้มและเมื่ออายุมากกว่า 7 วันจะมีสีเทาถึงดำ

ลักษณะรูปร่างของเชื้อรา 15 สายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะ conidia ของเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 1 มีสีน้ำตาลดำ รูปร่างเป็น muriform ท้ายป้าน apical cell เป็น truncate cone สั้นและหนา conidia เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่(chain of conidia)ยาวมากกว่า 10 conidia ขึ้นไป ก้าน conidiophore ยาวเท่ากับ 23-84 ไมโครเมตร conidia มีจำนวน septa ทางแนวดิ่ง(longitudinal septum)เท่ากับ 0-4 septa และทางแนวระดับ(transverse septum)เท่ากับ 2-9 septa conidia มีความกว้างเท่ากับ 11-17 ไมโครเมตรและมีความยาวเท่ากับ 19-50 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *A. brassicicola* (Ellis, 1971) เชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 2 ลักษณะโดยทั่วไปของ conidia มีสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างเป็น muriform ท้ายป้านปลายเรียวมน beakค่อนข้างยาว conidia เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวมากกว่า 10 conidia ขึ้นไป ก้าน conidiophore ยาวเท่ากับ 19-194 ไมโครเมตร conidia มี longitudinal septa เท่ากับ 0-8 septaและ transverse septa เท่ากับ 2-13 septa และ conidia มีความกว้างเท่ากับ 11-12 ไมโครเมตรและมีความยาวเท่ากับ 22-50 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *A. brassicae* (Ellis, 1971) เชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 ลักษณะโดยทั่วไปของ conidia มีสีเข้มเซลล์ตรงกลางมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ที่อยู่ด้านข้าง เชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ที่ 3 ทั้งหมดสร้าง conidia เกิดเดี่ยวๆ หรือเกิดเป็นกลุ่มบนปลายก้าน conidiophore ก้าน conidiophore ยาวเท่ากับ 42-123 ไมโครเมตร conidia มี 3-4 septa ความกว้างของ conidia เท่ากับ 6-14 ไมโครเมตรและมีความยาวเท่ากับ 11-19 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อรา *Curvularia sp.* (Ellis, 1971)

การประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดผักกาดกวางตุ้งจากการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* *A. brassicae* และ *Curvularia* sp. ซึ่งแยกได้ 15 สายพันธุ์ลงบนผักกาดกวางตุ้ง 4 พันธุ์ อายุ 30 วัน เพื่อตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและวัดดรรชนีความรุนแรง พบว่าเชื้อรา *A. brassicicola* และ *A. brassicae* (สายพันธุ์ 1-11) สามารถทำให้ผักกาดกวางตุ้งทั้ง 4 พันธุ์เกิดลักษณะแผลจุดสีน้ำตาลดำเนื้อเยื่อบุ๋มลงไปเล็กน้อยทั้งบนหน้าใบและหลังใบ และพบว่าเชื้อรา *A. brassicicola* ที่แยกได้จาก ต. กำแพงแสน จ.นครปฐม มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคกับผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง ผักกาดกวางตุ้งดอกต้นขาว ผักกาดเขียวกวางตุ้ง และผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้เท่ากับ 44, 64, 92และ96 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับและความรุนแรงของโรคเท่ากับ 10, 40, 32 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นการประเมินลักษณะต้านทานในผักกาดกวางตุ้งทั้ง 4 พันธุ์จากการปลูกเชื้อราที่แยกได้พบว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงจะแสดงลักษณะต้านทานและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้จะแสดงลักษณะอ่อนแอ นอกจากนี้การปลูกเชื้อรา *Curvularia* sp.ทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่พบลักษณะอาการโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งทั้ง 4 พันธุ์ ดังนั้นเชื้อรา *Curvularia* sp. ที่แยกได้จึงไม่ใช่เชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคบนใบผักกาดกวางตุ้ง

ความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* พบว่าที่เวลา 2 ชั่วโมงเชื้อรา *A. brassicicola* งอก germ tube ความยาว 1 ใน 2 หรือครึ่งหนึ่งของความยาว conidia โดยมีความงอกของ conidia เท่ากับ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 12-24 ชั่วโมงหลังจากการฉีดด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. หรือฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* หรือการฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถงอก conidia ได้ใกล้เคียงกันบนผิวใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้เท่ากับ 88.79-95.61 และ 88.79-95.61 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งคล้ายกับ He *et al*. (2002) ปลูกเชื้อรา nonpathogenic *Fusarium oxysporum* ให้กับรากหน่อไม้ฝรั่งพันธุ์อ่อนแอก่อน พบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* สาเหตุของโรค Fusarium crown rot งอก germ tube บนผิวรากหน่อไม้ฝรั่งจำนวนมากและไม่มีความแตกต่างในด้านการงอก germ tube กับการปลูกเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* เพียงอย่างเดียว แต่หากนำน้ำคั้นรากหน่อไม้ฝรั่งมาทดสอบความงอก conidia ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของ conidia ได้ ทั้งนี้เนื่องจากรากหน่อไม้ฝรั่งที่ปลูกเชื้อ nonpathogenic *Fusarium oxysporum* ก่อนแล้วจึงปลูกเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* ตามพบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ POX, PALและ lignin โดยเฉพาะ เอนไซม์ PAL สามารถเปลี่ยนไปเป็นสารพิษที่มีผลต่อเชื้อโรคพืชเช่น phytoalexins, phenols, lignins และ salicylic acid ได้ และ Jean-Francois *et al*. (1999); Silve *et al*. (2002) ฉีดสารละลาย BTH ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรให้กับกะหล่ำดอกพบว่าสามารถลดการสร้าง sporangia ได้ แต่ไม่มีผลต่อรูปร่างสปอร์และการงอก sporangia ของเชื้อรา *Peronospora. parasitica* ได้

การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยการแทง germ tube ของเชื้อรา *A. brassicicola* เข้าทำลายทางปากใบในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ พบว่าที่เวลา 12-14 ชั่วโมง การฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* เชื้อรา *A. brassicicola* งอก germ tube ทำลายทางปากใบในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ใกล้เคียงกับวิธีการที่ปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุของโรคเพียงอย่างเดียว แต่พบว่าเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tube เข้าทำลายทางปากใบผักกาดกวางตุ้งลดลงเมื่อพบลักษณะของปากใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังจากปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดโดยพบการแทง germ tube เข้าทำลายทางปากใบในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้เพียง 1.77 และ 0.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุของโรคใบจุดเพียงอย่างเดียว พบการแทง germ tube เข้าทำลายทางปากใบในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้สูง เท่ากับ 27.03และ 33.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากมีการปิดของช่องปากใบที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ทำให้เชื้อรา *A. brassicicola* ไม่สามารถแทง germ tube เข้าสู่เซลล์ผิวใบผักกาดกวางตุ้งผ่านทางช่องเปิดปากใบได้ โดย พรทิพย์ (2533) รายงานว่า ลักษณะเซลล์พืชที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มักเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase โดยที่ผนังเซลล์ เอนไซม์ peroxidase;POX จะมีบทบาทในการสร้าง lignin และการสร้าง hydroxyproline บริเวณที่มีการติดเชื้อของเชื้อโรคทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญภายในเซลล์พืชที่เป็นสีน้ำตาลได้นอกจากนี้เอนไซม์ peroxidase ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคโดยตรงในด้านความเป็นพิษต่อเชื้อโรคจากคุณสมบัติของเอนไซม์ peroxidase เอง

การเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยการแทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรง และ การแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ พบว่า ที่เวลา 12-14 ชั่วโมง การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* การเข้าทำลายทางผิวใบโดยตรงของเชื้อรา *A. brassicicola* ใกล้เคียงกับวิธีการที่ปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว แต่พบว่าเชื้อรา *A. brassicicola* แทง germ tube ทำลายทางผิวใบโดยตรงลดลงเมื่อพบลักษณะของเซลล์ผิวใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบการแทง germ tube เข้าทำลายใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ลดลงเท่ากับ 1.55 และ 0.79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว พบการแทง germ tube ผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงสูงเท่ากับ 25.91 และ 31.91 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบการแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria ลดลงเท่ากับ 1.24 และ 0.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียวพบการแทงเข้าสู่เซลล์ผิวใบโดยอาศัยโครงสร้าง appressoria สูงถึง

25.75 และ 31.44 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจาก Hammerschmidt (1999) พบลักษณะเซลล์ผิวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล(Browning) เนื่องจากมีการพบ lignin-like polymer และcallose สะสมบริเวณที่มีการติดเชื้อในปริมาณที่สูง ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญบริเวณเซลล์ที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้ Haugaard *et al*.(2002) พบว่าการใช้ mycelial extract ของเชื้อรา *Bipolalis oryzae*, *Pythium ultimum* และ*Rhizopus stolonifer* ชักนำให้ข้าวบาร์เลย์(*Hordeum vulgare*)ต้านทานต่อเชื้อรา *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* ได้โดยระยะแรกเชื้อราสามารถสร้าง primary germ tube และ appressoria ได้ตามปกติ แต่หลังจากนั้นบริเวณที่มีการแทงของ appressorial germ tube พบลักษณะของ papilla เกิดขึ้นรอบๆจุดที่มีการแทง ทำให้ไม่สามารถพัฒนาไปเป็น haustoria เพื่อแย่งใช้อาหารจากข้าวบาร์เล่ย์ได้ เช่นเดียวกับ Elliston *et al*. (1997) พบเชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* สามารถพัฒนา primary germ tube และ appressoria ในถั่ว *Phaseolus vulgaris* ที่ชักนำให้เกิดความต้านทานได้เช่นเดียวกับชุดควบคุม แต่ชุดควบคุมมีการพัฒนาของ primary hyphae ไปเป็น secondary hyphae ได้เร็วกว่าถั่วที่ชักนำให้เกิดความต้านทาน นอกจากนี้ Andrea *et al*. (2004) พบว่ามีการเจริญของ primary germ tube และ appressorium ที่มีการพัฒนาไปเป็น haustoria ของเชื้อรา *Uncinula necator* ช้าลงหรือหยุดเจริญในองุ่นพันธุ์ต้านทาน เนื่องจากพบชั้นของ cuticle ที่หนาและผนังเซลล์ที่แข็งแรงกว่าพันธุ์อ่อนแอ(*Vitis vinifera* และ *V. labruscana*) และพบว่าสามารถให้องุ่นพันธุ์อ่อนแอต้านทานต่อโรคราแป้งได้หากมีการชักนำให้เกิดความต้านทานตั้งแต่ในระยะต้นกล้า

การประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 และ 30 วัน พบว่าการฉีดพ่นสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ไม่พบความรุนแรงของโรคใบจุด(ไม่พบอาการโรคใบจุด) ตลอดระยะเวลา 10 วัน หรือ การฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ไม่พบความรุนแรงของโรคใบจุดตลอดระยะเวลา 5 วัน ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Jean-Francois *et al*. (1999) พบว่าการฉีดพ่น benzothiadidzole ช่วยชักนำให้เกิดความต้านทาน โดยสามารถลดอาการของโรคราน้ำค้างลงได้ทั้งจากกะหล่ำดอกอายุ 7 หรือ 30 วัน และสามารถชักนำความต้านทานโรคได้นานถึง 30 วัน ภายหลังจากปลูกเชื้อรา *Peronospora parasitica* สาเหตุของโรคราน้ำค้าง และการฉีดพ่นสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบความรุนแรงของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้ง อายุ 7 และ 30 วัน ตลอดระยะเวลา 25 วัน เท่ากับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับการปลูกเฉพาะเชื้อรา *A. brassicicola* พบความรุนแรงของโรคใบจุดสูงถึง 35 และ 100 เปอร์เซ็นต์ บนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและ

ฮ่องเต้ ตามลำดับ เช่นเดียวกัน การฉีดพ่นเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบความรุนแรงของโรคใบจุดตลอดระยะเวลา 25 วัน บนใบผักกาดกวางตุ้งอายุ 7 วัน เท่ากับ 5-15 และ 20-35 เปอร์เซ็นต์ และบนใบผักกาดกวางตุ้งอายุ 30 วันเท่ากับ 10-20 และ 20-35 เปอร์เซ็นต์ ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดเพียงอย่างเดียว พบอาการของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 และ 30 วัน สูงถึง 35 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากมีการพบลักษณะของปากใบและเซลล์ผิวใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ ทำให้เชื้อรา *A. brassicicola* ไม่สามารถเข้าทำลายเซลล์ผิวใบผักกาดกวางตุ้งได้ โดยการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเซลล์พืช Ketsa (1996); Ke and Saltveit (1988) พบว่าเกี่ยวข้องกับกิจกรรม เอนไซม์ polyphenoloxidase ในการ oxidize สาร จำพวก chlorogenic acid ไปเป็นสาร quinone ทำให้เซลล์พืชที่มีการติดเชื้อเกิดลักษณะจุดสีน้ำตาลสามารถมองเห็นได้ชัดเจนที่บริเวณเส้นกลางใบ โดยการเกิดเริ่มจากในเซลล์ชั้นผิวหรือ mesophyll และลุกลามไปยัง เซลล์ข้างเคียง ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ peroxidase สร้าง lignin มาสะสมในเซลล์บริเวณนั้นมากกว่าปกติ พรทิพย์ (2533) รายงานว่าการเกิดสีน้ำตาลในเซลล์พืชมักเกี่ยวข้องกับเอนไซม์เช่นเอนไซม์ polyphenol phenolase หรือ polyphenol peroxidase-H_2O_2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาป้องกันตัวเองของพืชต่อเชื้อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิกิริยา hypersensitive reaction เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการเซลล์เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อพืชหลังการเกิดแผลโดย phenolase จะ oxidize สาร monoและdihydrophenols เพื่อผลิตสารโพลิเมอร์สีน้ำตาลหรือสีดำ โพลิเมอร์ของฟีโนลิกจะมีพิษแตกต่างกันเช่น quinone มีความเป็นพิษและมีประสิทธิภาพต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชมากที่สุด

กิจกรรมของเอน PPO และ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 และ 30 วัน ที่ได้รับการฉีดพ่น Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร และ เชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมเอนไซม์ PPO และ POX เพิ่มสูงที่สุดในวันที่ 5 วิธีการที่ฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร พบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POX มีปริมาณสูงกว่าการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. ภายหลังจากปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ไปแล้วเป็นเวลา 5 วัน โดยกิจกรรมเอนไซม์ PPO เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 57.27 และ 68.59 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 วัน ตามลำดับ และ ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 30 วัน กิจกรรมเอนไซม์ PPO เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 34 และ 69.96 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และกิจกรรมเอนไซม์ POX เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 51.13 และ 21.52 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ตามลำดับ ดังนั้นการฉีดพ่นด้วยสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24

ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* จึงไม่พบความรุนแรงของโรคใบจุดตลอดระยะเวลา 10 วัน ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ที่พบสอดคล้องกับงานของ Yeon *et al.* (2000) ที่ฉีดพ่น DL-β-amino-n-butyric acid (BABA) ให้กับพริกไทยก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยเชื้อรา *Phytophthora capsici* พบกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase สูงภายในระยะเวลา 2 วัน นอกจากนี้ Resende *et al*. (2002) พบว่าเมื่อฉีด acibenzolar-S-methyl หรือ Bion 50 WG ให้กับโกโก้ก่อน 30 วันสามารถลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวจากเชื้อรา *Verticillium dahliae* และ *Crinipellis pemiciosa* สาเหตุของโรคพุ่มแจ้(witches' broom) ได้ถึง 84.5 และ 55.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับโดยพบปริมาณสารประกอบ phenolics เอนไซม์ polyphenol oxidase และ peroxidase เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3, 15 และ 30 วันตามลำดับ และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ He *et al*. (2002) ที่ฉีดพ่นด้วย nonpathogenic *Fusarium oxysporum* ก่อน 2 วันแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* สาเหตุขอโรค Fusarium crown rotในหน่อไม้ฝรั่งซึ่งพบปริมาณของเอนไซม์ peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase(PAL) และ lignin เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว

สรุปผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างผักกาดกวางตุ้งจากแหล่งปลูกผักกาดกวางตุ้งใน 5 จังหวัด เพื่อทำการแยกเชื้อราบนผิวใบผักกาดกวางตุ้งที่มีอาการของโรคใบจุด พบว่าสามารถแยกเชื้อราได้ 35 สายพันธุ์ (isolate) การแยกเชื้อราโดยการวางส่วนพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถแยกเชื้อราได้มากว่าวิธีการล้างตัวอย่างพืช จำนวน 21 และ 14 สายพันธุ์ตามลำดับ โดยพบว่าเชื้อรา 20 สายพันธุ์เป็นเชื้อราใน genus *Penicillium*, *Aspergillus* และเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์ทำให้ไม่สามารถจำแนกได้

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ 1-11 เท่านั้นที่สามารถก่อให้เกิดโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งได้โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 3 ที่แยกได้จาก ต. กำแพงแสน จ. นครปฐม ก่อให้เกิดโรคสูงที่สุดมีเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลเฉลี่ยเท่ากับ 5.56 เซ็นติเมตรและเชื้อราสายพันธุ์ที่ 12-15 ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งได้

การจำแนกเชื้อรา 15 สายพันธุ์ จากลักษณะรูปร่างและการเจริญของ โคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และลักษณะรูปร่างและการเจริญของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ที่ 1-7 จัดอยู่ใน genus *Alternaria brassicicola* เชื้อราสายพันธุ์ที่ 8-11 จัดอยู่ใน genus *Alternaria brassicae* และ เชื้อราสายพันธุ์ที่ 12-15 จัดอยู่ใน genus *Curvularia* sp.

การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์ก่อโรครุนแรงและไม่ก่อให้เกิดโรคบนใบผักกาดกวางตุ้ง 4 พันธุ์ จากการประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดที่ทำการปลูกด้วยเชื้อรา 15 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อรา *A. brassicicola* สายพันธุ์ที่ 3 ก่อให้เกิดโรคและความรุนของโรคต่ำที่สุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง เท่ากับ 44 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของโรคสูงที่สุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้เท่ากับ 98 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงพบว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงจะแสดงลักษณะต้านทานและผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้จะแสดงลักษณะอ่อนแอ

จากการศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* บนผิวใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้พบว่าที่เวลา 12-24 ชั่วโมง การฉีดพ่นด้วยชื้อรา *Curvularia* sp. หรือฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุด หรือ การฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว พบว่า conidia ของเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถงอก germ tube ได้ใกล้เคียงกันบนผิวใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ แต่

พบว่าการฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* การแทง germ tube ของเชื้อรา *A. brassicicola* เข้าทำลายทางปากใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1.77 และ0.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อพบลักษณะของปากใบผักกาดกวางตุ้งมีการปิดและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การฉีด Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงก่อนปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบการแทง germ tube ของเชื้อรา *A. brassicicola* เข้าทำลายผ่านเซลล์ผิวใบโดยตรงบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้ลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1.55 และ 0.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการแทงเข้าสู่ผิวใบโดยอาศัยโครสร้าง appressoria ลดลงเท่ากับ 1.24 และ 0.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อพบลักษณะของเซลล์ผิวใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเพิ่มขึ้น โดยที่เชื้อราสาเหตุโรคไม่สามารถเข้าไปเจริญภายในเซลล์ที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้

การประเมินความรุนแรงของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 และ 30วัน พบว่า การฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp.และ Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงแล้วจึงปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ตาม พบอาการโรคใบจุดในวันที่ 5 และ 10 ตามลำดับ การฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* สามารถลดความรุนแรงของโรคใบจุดลงได้มากว่า การฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบจุด โดยสามารถลดความรุนแรงของโรคใบจุดบนใบผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้อายุ 7 และ 30 วันลงได้เท่ากับ 20-30 และ 70-90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การศึกษาด้านการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ PPO และ POX ภายหลังจากการชักนำให้เกิดความต้านทานโดยการฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรและเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบกิจกรรมเอนไซม์ PPOและPOX เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POX ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้สูงกว่าผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและหลังจากปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ไปแล้ว 10 วัน ปริมาณของเอนไซม์ทั้งสองจะเริ่มลดลง นอกจากนี้การฉีดพ่นเชื้อรา *Curvularia* sp. หรือ Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวไม่พบความแตกต่างทางสถิติของกิจกรรมเอนไซม์ PPO และ POX กับการปลูกด้วยเชื้อรา *A. brassicicola* และการฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว ในผักกาดกวางตุ้งฮ่องกงและฮ่องเต้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผัก ไม้ดอกและไม้ประดับ. 2535. **โรคพืชผักและการป้องกันกำจัด**, น. 2. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรุงเทพฯ.

จานุลักษณ์ ขนบดี. 2534. **การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก**. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, ลำปาง.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2533. **โรคพืชวิทยาขั้นสูง**, น.196-201. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

พัฒนา สนธิรัตน์ วิรัช ชูบำรง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และ ปิยะ เกียรติก้อง. 2526. เชื้อรา *Alternaria* ก็เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. **วารสารโรคพืช**. 3(4): 154-167.

พิเชษฐ เวชวิฐาน. 2536. **อิทธิพลของวันปลูกและอายุการเก็บเกี่ยวต่อผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ผักกาดเขียวกวางตุ้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพโรจน์ จ๋วงพานิช. 2526. **หลักวิชาโรคพืช**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เมฆ จันทร์ประยูร. 2541. **ผักสวนครัว**. สำนักพิมพ์ไททรรศน์, กรุงเทพฯ.

วราภรณ์ สุทธิสา. 2545. **การคัดเลือกและการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากผิวพืชในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. **โรคของผักและการป้องกันกำจัด**. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศุภลักษณ์ ฮอกกะวัด. 2527. **เอกสารประกอบการสอนโรคพืชผัก**. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุดคนึง พึ่มชัย. 2546. **ผลของไคโตซานต่อการชักนำความต้านทานและการควบคุมโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยพระจอมกล้าธนบุรี.

Arora, Y.K. and K.L. Bajaj. 1985. Peroxidase and polyphenol oxidase associated with induced resistance of mung been to *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology.** 114: 325-311.

Andrea, F., D.M. Gadoury, R.C. Seem, D. Godfrey and I.B. Dry. 2004. Host barriers and responses to *Uncinula nacator* in developing grape berries. **Phytopathology.** 94: 438-444.

Attitalla, I.H., P. johnson, S. Brishammar and P. Quintanilla. 2001. Systemic Resistance to Fusarium wilt in Tomato induced by *Phytopthora cryptogea*. **Phytopathology.** 149: 373-380.

Bains, P.S. and J.P. Tewari. 1985. Purification and properties of the phytotoxins produced by *Alternaria brassicicola*. **Phytopathology.** 75: 1298.

Barnett, H.L. and B. B. Hunter. 1987. **Illustrated genera of imperfect fungi,** pp. 132-133p. 4th ed. Britain, New York.

Ben, J.D., D. Pouhair, C. Olivain, C. Alabouvette and P. lemanceau. 1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of Fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens.* WCS417r and by Nonpathogenic *Fusarium oxysporum Fo*47. **Plant pathology**. 104: 903-910.

Benedict, W.G. 1972. Infuence of light on peroxidase activity associated with resistance of tomato cultivars to *Septoria lycopersici*. **Phytopathology**. 50: 1931-1936.

Benhamou, N. and R.R. Belanger. 1998. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicislycopersici* in tomato. **Plant Physiology**. 118(4): 1203-1212.

Biles, L.C. and R.D.Martyn. 1989. Local and systemic resistance induced in watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum.* **Phytopathology**. 79: 856-860.

Blok, W.J., J.M. Zwankhuizen and J.G. Bollen. 1997. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* by applying non-pathogenic isolates of *F-oxysporum*. **Biocontrol Science and Technology**. 7(4): 527-541.

Bolkan, H.A. 1983. Occurrence and pathogenicity of *Alternaria brassicicola* in Brazil. **Plant Disease**. 67: 825-826.

Burketova, L., M. Sindelarova and L. Sindelar. 1999. Benzothiadiazole as an inducer of beta-1,3-glucanase and chitinase isozymes in sugar beet. **Biologia Plantarum**. 42(2): 279-287.

Buzi, A., G. Chilosi, D. Desillo and P. Magro. 2004. Induction of resistance in molon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Phytopathology**. 152: 34-42.

Chen, Z.X., H. Silva and F. D. Klessig. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic-acid. **Science**. 262(5141): 1883-1886.

Chupp, C. and A. F. Sherf. 1960. Vegetable disease and their control, p. 693. **Vegetables Disease and Pests.**

Claudie, M., P. Emmanuel, C.L. Daniel and S. Drissa. 2002. Induction of systemic resistance in broccoli(*Brassica oleracca var.botrytis*) against downy mildew(*Peronospora parasitica*)by avirulent isolates. **Biological Control.** 24: 75-81.

Colson-Hanks, E.S. and J.B. Deverall. 2000. Effect of 2,6-dichloroisonicotinic acid, its formulation materials and benzothiadiazole on systemic resistance to alternaria leaf spot in cotton. **Plant Pathology**. 49(2): 171-178.

Degenhardt, K.J., G.A. Petric and A. R. Morrall. 1982. Effects of temperature on spore germination and infection of rapeseed by *Alternaria brassicicola*, *Alternaria brassicae* and *A. raphani*. **Plant Pathology**. 4: 115-118.

Dixon, G.R. 1981. **Vegetable Crop Disease**, p 404. Horticulture division, School of agriculture, Aberdeen, UK.

Ellis, M.B. 1971. **Dematiaceous Hyphomycetes**, p 608. Commonwealth mycological institute, Kew, England.

Elliston, J.,J. Kuc, B.E. Williams, E.J. Rahe. 1977. Relationship of phytoalexin accumulation to local and systemic protection of bean against anthracnose. **Phytopathology**. 88: 114-130.

Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. **Phytopathology**. 28: 365-391.

Fuchs, J.G., Y. Moenne and G. Defago. 1990. Ability of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 to protect tomato against Fusarium wilt. **Biological Control.** 14: 105-110.

Godard, J.F., S. Ziadi, C. Monot, D.C. Le and D. Silue. 1999. Benzothiadiazole(BTH) induces resistance in cauliflower(*Brassica oleracea* ver *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. **Crop Protection**. 18(6): 397-405.

Gorlach, J.,S. Volrath, G. Knaufbeiter., G. Hengy, U. Beckhove, K.H. Kogel, H. Oostendorp, T. staub, E. ward, H. Kessmann and J. Ryals. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**. 8(4): 629-643.

Hammerschmidt, R. 1999. Induced disease resistance:how do induced plants stop pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 55: 77-84.

Hammond-kosack, K.E. and J.D.G. Jones. 1996. Resistance gene-development plant defense responses. **Plant Cell**. 8: 1773-1791.

Haugaard, H., D.B. Collinge and M.F. Lyngkjaer. 2002. Mechanisms involved in control of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* in barley treated with mycelial extracts from cultured fungi. **Plant Pathology**. 51: 612-620.

He, C.Y., T. Hsiang and D.J. Wolyn. 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Plant Pathology**. 51: 225-230.

Hezhong, D., L. Weijiang, Z. Dongmei and T. Wei . 2003. Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against Verticillium wilt of cotton. **Crop Protection**. 22: 129-134.

Hofgaard, S.I., A. Ergon, L.A. wanner and A. M. Tronsmo. 2005. The effect of chitosan and Bion on resistance to pink snow mould in perennial ryegrass and winter wheat. **Phytopathology**. 153: 108-121.

Hofmann. C.O. and K. Babuin. 1993. Lipoxygenase activity in rice treated with resistance inducers. **Plant-Microbeinteract**, pp 21-24. Rutgers university, Abstr.

Humpherson-Jones, F.M. and R.B. Maude. 1982. Studies on the epidemiology of *Alternaria brassicicola* in *Brassica oleracea* seed production crops. **Biologycal Control**. 100: 61-71.

Iriti, M. and F. Faoro. 2003. Benzothiadiazole(BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus.* **Phytopathology**. 151: 171-178.

Ishii, H., Y. Tomiya, T. Horio, Y. Narusaka, Y. Nakazawa, K. Nishimura and S. Iwamoto. 1999. Induced resistance of acibenzolar-S-methyl(CGA245704) to cucumber and japanese pear aisease. **European Journal Plant Pathology**. 105(1): 77-85.

Jean-Francois, G., Z. Smail, M. Claudie, C.L. Daniel and S. Drissa . 1999. Benzothiadiazole(BTH) induces resistance in cauliflower(*Brassica oleracea* var.*botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. **Crop Protection**. 18: 397-405.

Jian, R. B. and L.George. 2001. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence Fusarium wilt control. **Phytopathology**. 91: 449-456.

Ke, D.and M.E. Saltveit. 1988. Plant hormone interaction and phenolic metabolism in the regulation of russet spotting in iceberg lettuce. **Plant Physiology**. 28: 1136-1110.

Kerby, K. and S. Somerville. 1989. Enhancement of specific intercellular peroxidase following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei.* **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 35: 323-337.

Ketsa, S. 1996. **Control of senescent spots in 'Kluai Khai' by modified atmospheres**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.

Kilpatrick, R.A. 1976. Fungal flora of crambe seeds and virulence of *Alternaria brassicicola*. **Phytopathology**. 66: 945-948.

Kombrink, E. and E. schmelzer. 2001. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European Journal. Plant Pathology**. 107(1): 69-78.

Larkin, R.P. and R.D. Fravel. 1999. Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of Fusarium wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. **Phytopathology**. 89(12): 1152-1161.

Miyazawa, J., T. Kawabata and N. Ogasawara. 1998. Induction of an acidic isozyme of peroxidase and acquired resistance to wilt disease in response to treatment of tomato roots with 2-furoic acid,4-hydroxybenzoic hydrazide or salicylic hydrazide. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 52: 115-126.

Morris, S.W., B. Vernooij, S. Titatarn, M. Starrett, S. Thomas, C.C. Wiltse, R.A. Frederiksen. 1998. Induced resistance responses in maize. **Moleccular Plant-Microbe Interactions**. 11(7): 643-658.

Peng, M. and J. Kuc. 1992. Peroxidase-generated hydrogen-peroxide as a source of antifungal activity invitro and on tobacco leaf-disks**. Phytopathology**. 82(6):696-699.

Paul, H. 1980. **Fungus Disease of Tropical Crop**, p. 607. Cambridge University Press.

Reglinski, T., R.P. Poole, G. Whitaker and M. S. Hoyte. 1997. Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwifruit leaves. **Plant Pathology**. 46(5): 716-721.

Resende, M.L.V., G. B. A. Nojosa, L.S. Cavalcanti, M.A.G. Aguilar, L.H.C.P. Silva, J.O. Perez, G.C.G. Andrade, G. A. Carvalho and R. M. Castro. 2002. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciosa* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl(ASM). **Plant Pathology**. 51: 621-628.

Resende, M.L. V., R. Mepsted, J. Flood and M.R. Cooper. 1996. Water relations and ethylene production as related to symptom expression in cocoa seedlings infected with defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae.* **Plant Pathology**. 45(5): 964-972.

Reuveni, R. and J. F. Ferreira. 1985. The relationship between peroxidase activity and the resistance of tomatoes(*Lcopersicon esculentum*) to *Verticillium dahliae.* **Phytopathology**. 112: 193-197.

Rohilla R., S.U. Singh, L.R. Singh. 2002. Mode of action of acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, casused by *Rhizoctonia solani* Kchn. **Pest Management Science**. 58(1): 63-69

Schneider, M., P. Schweizer, P. Meuwly and J.P. Me'traux. 1996. Systemic acquired resistance in plant. **International Review of Cytology**. 168: 303-340.

Scottish. 2003. Fungicides, Synthetic elicitors, Commercial products. **Crop Research Institute**, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, Scotland.

Shahin, E.A. and J.F. Shepard. 1979. An efficient technique for inducing profuse sporulation of *Alternaria* species. **Phytopathology**. 69: 618-620.

Silue, D., E. Pajot and Y. Cohen. 2002. Induction of resistance to downy mildew(*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL-β-amino-n-butanoic acid(BABA). **Plant Pathology**. 51: 97-102.

Singh, U.P., A. Bahadur, D.P. singh and B.K. Sarma. 2003. Non-pathogenic powdery mildews induce resistance in pea(*Pisum sativum*) against *Erysiphe pisi.* **Phytopathology**. 151: 419-424.

Sneh, B. 1998. Use of non-pathogenic or hypovirulent fungal strains to protect plants against closely related fungal pathogens. **Biotechnology Control**. 16(1): 1-32.

Solymosy, F., J. Szirmai, L. Beczner and G. L. Farkas. 1967. Changes in peroxidase isozyme patterns induce by virus infection. **Virology**. 32: 117-121.

Soner, S., O. Baysal and E. M. Soylu. 2003. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl(ASM), against bacterial canker(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**. 165: 1069-1075.

Southerton, S.G. and B.J. Deverall. 1990. Changes in phenylalanine amonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus. **Plant Pathology**. 39: 223-230.

Stroemberg, A. and S. Brishammer. 1993. A histological evalution of induce resistance to *Phytopthora infestans*(Mout.) de Bary in potato leaves. **Phytopathology**. 137: 15-25.

Tessier, B.J., C.W. Mueller and A.T. Morgham. 1990. Histopathology and ultrastructure of vascular responses in peas resistant or susceptible to *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. **Phytopathology**. 80: 756-764.

Ton, J. and B. Mauch-Mani. 2004. β-amino-bytyric acid- Induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABS-dependent priming for callose. **The Plant Journal**. 38: 119-130.

Tonsi, L., R. Luigetti and A. Zazzerini. 1999. Benzothiadiazole iduces resistance to *Plasmopara helianthi* in sunflower plants. **Phytopathology**. 147: 365-370.

Walker, J.C. 1958. **Disease of cabbage and related plants**, p. 181. Agr. Handbook No 144. U.S. Department of Agriculture, Washington D.C.

Weber, D.J., B. Clare and M. A. Stahmann. 1967. Enzymic changes associated with induced and natural resistance of sweet potato to *Ceratocystis fimbriata*. **Phytopathology**. 57: 421-424.

Yeon, K. L., H.K.Jeum, H. Sigrum and H. K.Byung. 2000. Histological and ultrastructural comparisons of compatible,incompatible and DL-β-amino-n-butyric acid-induced resistance responses of peper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 57: 269-280

Yigal, C., N. Tierry, M. Egan and F. Robert. 1994. β-Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-rolated proteins in tomato(*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**. 104: 59-66.

Ziadi, S., S. Barbedette, F.J. Godard, M. Claudie, C.L.Daniel and D. Silue. 2001. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower(*Brassica oleracea* var.*botrytis*)-downy mildew(*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. **Plant Pathology**. 50: 579-586.

ภาคผนวก

1. สารชักนำความต้านทานและพืชเป้าหมายในการชักนำให้เกิดความต้านทาน

<u>ตารางผนวกที่ 1</u> สารชักนำความต้านทานและพืชเป้าหมายในการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคพืช

สารชักนำความต้านทาน	พืช	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการออกฤทธิ์
-Alielte(Aluminium tris-o-ethylphosphonate	-grape vine	-*Plasmopara viticola*	
-benzothiadiazole(BTH) (benzo[1,2,3]thiadiazole -7-carbothioic acid s-methyl ester)(CGA-245704)(acibenzolar-s-methyl;Bion)	-apple	-*Erwinia amylovora*(fire blight)	
-BTH	-*Arabidopsis* PR-1 *thaliana* genes	-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	–ชักนำการสะสม PR2 PR-5
		-*Peronospora parasitica*	-ชักนำการสะสม PR-1 PR2 PR-5 genes
PR-1		-turnip crinckle virus	-ชักนำการสะสม PR2 PR-5 genes
-BTH	-banana	-*Mycosphaerella fijiensis* (black sigatoka)	
-BTH	-barley	-*Blumeria graminis*(mildew)	
-BTH(acibenzolar-s-methyl)	-*Brassica olereacea* var. *botrytis* (cauliflower)	-*P. parasitica*(downy mildew) -*Rhizoctonia solani*	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สารชักนำความต้านทาน	พืช	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการออกฤทธิ์
-BTH	-cashew (*Anacardium*) *occidentale*	-*Colletotrichum gloeosporioides* (anthracnose)	
-BTH	-chilipapper	-*Colletotrichum* sp.	
-BTH	-cotton	-*Alternaria macrospora*	
-BTH	-cowpea(*Vigna unguiculata*	-*C. destructum*	
-BTH(acibenzolar-s-methyl) 50 WG	-cucumber	-*C. lagenarium*(anthracnose) -*Cladosporium cucumerinum* (cucumber scab) -*C. orbiculare* -*Pythium ultimum*	-ชักนำการสะสม chaitinase
-BTH	-lettuce	-*Bremia lactucae* (downy mildew)	
-BTH PR-5	-maize	-downy mildew	-ชักนำ PR-1และ genes
-BTH	-pea	-*M. pinoges* -*P. syringae* pv. *pisi* -*Uromyces viciaefabae*	
-BTH(Acti gard)	-pear -paper (*Capsicum annuum*)	-*E. amylovora* -*Phytophthora capsici*	
-BTH chitinase	-*Phaseolus*	-*U. appendiculatus*	-BTH ชักนำ

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สารชักนำความต้านทาน	พืช	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการออกฤทธิ์
-BTH	-*Phaseolus vulgaris*	-*R. solan* -*C. lindemuthianum*	β-1,3-glucanase และperoxidase
-BTH(Bion WG 50)	-potato	-*Alternaria solani*(early blight) -Powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*) -*Fusarium semitectum*(dry rot)	
		-*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*	-ชักนำ BTH และ chitinase β-1,3-glucanase และ peroxidase
-BTH(acibenzolar-S-methyl;50 WG)	-Pyrus pyrifolia (Japanese pear)	-*Gymnosporangium asiaticum* (Japanese pear rust) -scab	
-BTH	-rice	-*P. syringae* -*Pyricularia oryzae*	
-BTH	-rose	-*Diplocarpon rosea* -*Agrobacterium tumefacens*	
-BTH(Actigard)	-spinach	-white rust(*Albugo occidentalis*)	
	-strawberry	-*P. cactorum*(crown rot) -*P. fragariae* var. *fragariae*	
	-sugarcane	-*C. falcatum*	
	-sunflower (Helianthus annuus)	-*Botrytis cinerea* -*Orobanche cumana* (a root parasitic weed)	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สารชักนำความต้านทาน	พืช	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการออกฤทธิ์
-BTH	-tobacco	-*P. syringae* pv. *tabaci* tox^{+} -*P. syringae* pv. *tabaci* tox^{-} -*Cercospora nicotianae* -cucumber mosaic virus -Erysiphe powdery mildew -*P. tabacina* -*P. parasitica* -Potato virus Y. -Rhyzoctonia leaf spot -tobacco mosaic virus -tomato spotted wilt virus -*Fusarium* f.sp. *radicis-lycopersici*	-กระตุ้น PR-1 chitinase β-1,3-glucanase และ peroxidase
-BTH	-tomato	-*P. infestans* -*P. syringae* pv. *tomato* -*X. campestris* pv. *vesicatoria* -cucumber mosaic virus	
-BTH	-wheat	-*E. graminis*(*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*)	-ชักนำ systemic resistance
-N-cyanomethyl-2-Chloroisonicotinamide (NCL)	-Arabidopsis	-*P. syringae* pv. *tomato*	
-2,2-dichloro3,3-dimethyl cyclopropane carboxylic acid(DCP)(WL28325)	-rice	-*Magnaporthe grisea* (rice blast)	-กระตุ้นการสะสม Phytoalexin (momilactone)

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สารชักนำความต้านทาน	พืช	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการออกฤทธิ์
-Elexa	-grapevines -cucumber -potato -strawberry -tomato		
-DCINA(2,6-dichloroisonicotinic acid;CGA-41396)	-arabidopsis	-*P. Parasitica* -*P. syringae* pv. *tomato*	
-DCINA	-barley	-*Blumeria graminis*(mildew)	
-DCINA	-red cabbage (*Brassica oleracea*)	-*P. parasitica*	
-DCINA	-cashew (*Anacardium occidentale*)	-*C. gloeosporioides*	
-DCINA	-cotton	- *Alternaria macrospora*	
-DCINA(CGA41396)	-cucumber (*cucumis sativus*)	-*Sphaerotheca fuliginea*	
-DCINA(CGA41396)	-pear	-*Erwinia* sp.	
-DCINA(CGA41396)	-paper	-*Xanthomonas* sp.	
-DCINA(CGA41396)	-rice	-*Pyricularia oryzae* -*Xanthomonas* sp.	
-DCINA	-roses	-*Sphaerotheca pannosa*	
-DCINA	-sunflower	-*Botrytis cinerea*	
-DCINA(CGA41396)	-tobacco	-*P. tabacina*	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สารชักนำความต้านทาน	พืช	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการออกฤทธิ์
-DCINA	- *P. parasitica*		
	-tobaco	-TMV	
		-TNV	
-Messenger®	-rough lemon	-*A. alternata*	
		(Alternaria leaf spot)	
		-*Diaparthe citri*(melanose)	
		-*Elsinose fawcettiic*	
		(citrus scab)	
-Phytogard®	-lettuce	-*Bremia lactucae*	
-Probenazole(oryzemate) (PBZ;3-allyloxy-1,2-benzisothiazole-1,1-dioxide)	-rice	-*P. oryzae*	
- PBZ	-arabidopsis	-*P. parasitica*	
		-*P. syringae* pv. *tomato*	
-1,2-benzisothiazol1-3 (2H)-one 1,1-dioxide(Bit) (active mettabolite of PBZ)	-arabidopsis	-*P. parasitica*	
		-*P. syringae* pv. *tomato*	
-TOGE-1(1,2,3,4-tetra-O-acetyl-6-ethyladipate -beta-D-glucopyranose (TOGE)plus furfurylamine)	-tomato	-*A. solani*	
- TOGE-1		-*P. citrophthora*	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

สารชักนำความต้านทาน	พืช	เชื้อสาเหตุโรค	กลไกการออกฤทธิ์
-TOGE-2(1,2,3,4-tetra-O-acetyl-6-ethyladipate	-tomato	-*A. solani*	
- TOGE-2	-tomato	-*P. citrophthora*	
-VacciPlant(a glucan form brown algae)	-apple trees	-*Venturia inaequalis* (apple scab)	
	-bean	-*C. lindermutianum*	
	-potato	-*P. infestans*	
	-rice	-*P. oryzae*	
	-wheat	-*P. herpotrichoides*(eye spot)	
		-*Septoria tritici*(Septoria spot)	
		-*Septoria nodorum*	
		-*E. graminis*	
		-*F. roseum*(dry rot)	
		-*Puccinia recondita*(rust)	
	-vine	-*Botrytis cinerea*(Grey mould)	
	-vine	-*Plasmopara. viticola*	

ที่มา: Scottish (2003)

2. การเตรียมสารละลาย lactophenol

เตรียมสารละลาย lactophenol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยผสม lactic acid ปริมาตร 20 มิลลิลิตร glycerin ปริมาตร 40 มิลลิลิตรและ phenol ปริมาตร 20 มิลลิลิตรเข้าด้วยกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์1 ก่อนนำมาใช้และเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง ภายหลังจากการเก็บเป็นระยะเวลานาน อาจเกิดการตกตะกอนควรกรองก่อนใช้

3. การเตรียมสารละลาย acid fuchsin ใน lactophenol solution

เตรียมสารละลาย acidfuchsin ใน lactophenol solution ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยผสม lactic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร acidfuchsin ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและ aceticacid ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้เข้ากันแล้วเติม lactophenol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ก่อนนำมาใช้และเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

4. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer:PBS สำหรับบดตัวอย่างพืช

สารละลาย PBS เข้มข้น 0.1 N pH 6.35

เตรียมโดยผสมสารละลายA(KH_2PO_4 ปริมาตร 27.22 กรัมต่อลิตร)

สารละลายB(K_2HPO_4 ปริมาตร 45.6 กรัมต่อลิตร)

(A)77.5 mL.+ (B)22.5 mL.

ปรับปริมาตรด้วยน้ากลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 2,000 มิลลิลิตรและปรับ pH ด้วยสารละลาย NaOH ให้ได้เท่ากับ 6.35

5. การเตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบเอ็นไซม์ polyphenol oxidase

การเตรียมสารละลาย pyrocatechol brenzkatechin(Catechol)

โดย Catechol เข้มข้น 1 M เท่ากับ 110 กรัมต่อลิตร
ถ้า Catechol เข้มข้น 0.06 M เท่ากับ 0.06 M X 110 กรัมต่อลิตร
เท่ากับ 6.6 กรัมต่อลิตร

6. การเตรียมสารละลายสำหรับตรวจสอบเอ็นไซม์ peroxidase

6.1 การเตรียมสารละลาย phenol red ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์(0.2g./100mL.)

ชั่ง phenol red จำนวน 0.2 กรัมละลายในน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

6.2 การเตรียมสารละลาย sodium citrate เข้มข้น 50 mM pH 4.2

สารละลาย sodium citrate 1,000 มิลลิโมลาร์มีเนื้อสารอยู่ 378 กรัมต่อลิตร
สารละลาย sodium citrate 50 มิลลิโมลาร์มีเนื้อสารอยู่ $\frac{50 \text{ X } 378}{1,000} = 18.98$ กรัมต่อลิตร

6.3 การเตรียมสารละลาย hydrogen peroxides(HCl) ความเข้มข้น 1 mM

สารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เท่ากับ 31 ไมโครลิตรต่อ 1,000 มิลลิลิตร

6.4 การเตรียมสารละลาย sodium hydroxide(NaOH) ความเข้มข้น 2 N

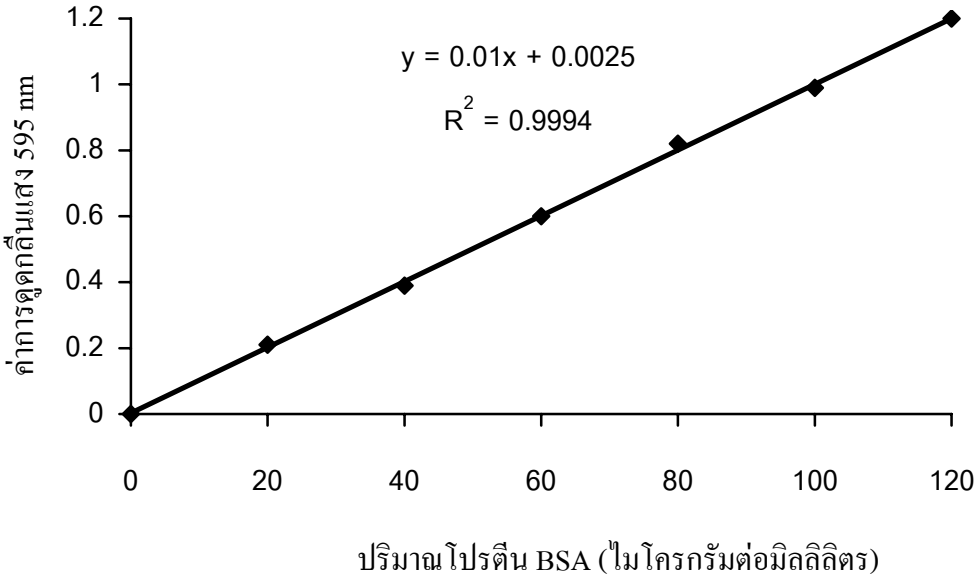
1 N ของ NaOH มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร
ถ้า 2 N ของ NaOH มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 80 กรัมต่อลิตร

7. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (สุดคนึง 2546)

เตรียมสารละลาย coomasia blue โดยชั่งสาร coomasie blue 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จนกระทั่ง coomasie blue ละลายหมดเติมสาร phosphoric acid ความเข้มข้นร้อยละ 85 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 2 โดยใช้ vacuum pump เก็บไว้ในขวดสีชา ดูดสารละลายเอ็นไซม์ ที่ได้จากการสกัดเพื่อหากิจกรรมของเอ็นไซม์ PPO และ POX 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย coomasie blue 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณโปรตีนมาตรฐาน BSA(bovine serum albumin) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรแล้วนำไปคำนวณหากิจกรรมของเอ็นไซม์ PPOและPOX

8. การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

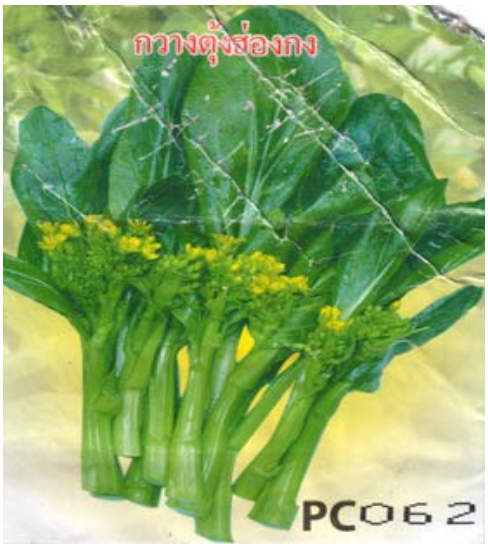
ชั่งสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA จำนวน 2.5 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย citric acid phosphate buffer(pH 6.2) ได้สารละลายที่มีโปรตีน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย citric acid phosphate buffer ให้ได้ความเข้มข้น 20 40 60 80 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายโปรตีนแต่ละความเข้มข้นที่ได้ เติมสารละลาย coomasie blue ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixter ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำมาเขียนกราฟมาตรฐาน



<u>ภาพผนวกที่ 1</u> ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น BSA กับการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

1. ผักกาดกวางตุ้งดอกต้นขาว
(Flowering pak choy)
Brassica campertris var. *chinensis*

2. ผักกาดเขียวกวางตุ้งพันธุ์คัดพิเศษ(Selected pak choy)
B. campestris var. *chinensis*



3. ผักกาดกวางตุ้งฮ่องเต้(Hongtae pak choy)
B. campestris var. *chinensis*

4. ผักกาดกวางตุ้งฮ่องกง(Hongkong pak choy)
B. campestris

<u>ภาพผนวกที่ 2</u> ผักกาดกวางตุ้ง 4 พันธุ์ จากบริษัทเจียไต๋ จำกัด ที่ใช้ประเมินความรุนแรงของโรคใบจุด