สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานต่อโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในผักสลัดที่ปลูกในระบบปลูกแบบไม่ใช้ดิน ภายหลังการชักนำด้วย salicylic acid, methyl jasmonate และ β-aminobutyric acid เพื่อการพัฒนาเป็น gene marker สำหรับการตรวจหาระดับความต้านทานโรค

Characterization of disease resistance genes in hydroponically grown lettuce for their expression upon salicylic acid, methyl jasmonate and β-aminobutyric acid treatments and application as resistance gene marker

นางสาวนงลักษณ์ เภรินทวงค์
นายพรหมมาศ คูหากาญจน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
QH
450
น148ก

เลขหมู่.....131059
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....21 พ.ค. 2557

b.12596863
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานต่อโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในผักสลัดที่ปลูกในระบบปลูกแบบไม่ใช้ดิน ภายหลังการชักนำด้วย salicylic acid, methyl jasmonate และ β-aminobutyric acid เพื่อการพัฒนาเป็น gene marker สำหรับการตรวจหาระดับความต้านทานโรค

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประจำปีงบประมาณ 2551 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 160,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 ถึง 30 กันยายน 2552 ✓

หัวหน้าโครงการ นางสาวนงลักษณ์ เภรินทวงค์ สังกัดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นายพรหมมาศ คูหากาญจน์ สังกัดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

บทคัดย่อ

โรครากเน่าและโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินจัดเป็นโรคที่สำคัญ เนื่องจากทำความเสียหายต่อผักสลัดได้อย่างรวดเร็ว เชื้อสาเหตุโรครากเน่าคือเชื้อรา *Pythium* spp. ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในผักสลัดคือทั้ง *P. myriotylum* และ *P. aphanidermatum* และเชื้อสาเหตุโรคใบจุดที่สำรวจและเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินในจังหวัดฉะเชิงเทราคือเชื้อรา *Cercospora* sp. การป้องกันกำจัดโรครากเน่าและโรคใบจุดของผักสลัดที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินมีข้อจำกัดในการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเนื่องจากปัญหาสารเคมีตกค้างที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้น เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาแนวทางในการชักนำความต้านทานโรคให้กับผักสลัดโดยการใช้สารชักนำที่เป็นสารสังเคราะห์คือ salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β-aminobutyric acid (BABA) การทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสังเคราะห์ทั้ง 3 ชนิดในผักสลัดบัตเตอร์เฮด พบว่า ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีผลกระทบทางลบกับผักสลัดของ SA, MeJA คือ 10mM และ BABA คือ 0.1mM เมื่อทดสอบผลของสารชักนำต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพบว่า SA, MeJA และ BABA ที่ 10mM มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cercospora* sp. และที่ความเข้มข้น 1mM มีผลในการยับยั้งเชื้อรา *P. myriotylum* และ *P. aphanidermatum* ในสภาพ in vitro ผลการใช้สารชักนำทั้ง 3 ชนิดฉีดพ่นทางใบเพื่อชักนำความต้านทานต่อโรคใบจุดพบว่า SA 0.1mM และ MeJA 0.01mM เป็นเวลา 3 วันก่อนปลูกเชื้อสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ ในขณะที่ BABA ให้ผลไม่แตกต่างจากการทดลองควบคุม และพบว่าการฉีดพ่นสารทั้ง 3 ชนิดทางใบให้ผลควบคุมโรครากเน่าน้อยมาก การทดลองให้สารชักนำความต้านทานทางสารละลายธาตุอาหารเพื่อชักนำให้ผักสลัดต้านทานต่อโรครากเน่า พบว่า BABA มีแนวโน้มในการกระตุ้นความต้านทานในสายพันธุ์บัตเตอร์เฮด เมื่อตรวจหายีนที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแสดงออกในผักสลัดภายหลังการให้สารชักนำความต้านทานด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR พบว่ายีน enhanced disease succeptibitity5 in lettuce (EDS5L) มีการสังเคราะห์เมื่อฉีดพ่นผักสลัดด้วย SA เท่านั้น ในขณะที่ยีน pathogenesis related1 (PR1), sesquiterpene synthase gene (LTC1 และ LTC2) สังเคราะห์ภายหลังการฉีดพ่นด้วย SA, BABA และ MeJA และพบว่ายีน PR1 และ disease induced resistance (DIR) มีการสังเคราะห์ทั้งในต้นการทดลองควบคุม ต้นที่ฉีดพ่นสาร และต้นที่ปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* ทั้งนี้ยีน EDS5L เป็นยีนที่ตรวจพบครั้งแรกในผักสลัดบัตเตอร์เฮด

คำสำคัญ : โรครากเน่า, โรคใบจุด, ยีนต้านทานโรคพืช, PR1, LTC, DIR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

healthy, chemical sprayed or *P. aphanidermatum* inoculation. An expression pattern of EDS5L reported here was the first study in lettuce.

Keywords : root rot, leaf spot, resistance gene, PR1, LTC, DIR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

นางสาวนงลักษณ์ เภรินทวงค์
นายพรหมมาศ คูหากาญจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**I**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**II**
กิตติกรรมประกาศ	**III**
สารบัญ	**IV**
สารบัญตาราง	**VI**
สารบัญภาพ	**VIII**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 สมมติฐานงานวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์หลัก	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**4**
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	**7**
3.1 ผลของการให้สารละลาย Salicylic acid, methyl jasmonate และ β-aminobutyric acid ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรคใบจุด	7
3.2 ผลของการให้สารละลาย salicylic acid, methyl jasmonate และ β-aminobutyric acid ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า	8
3.3 ผลของการให้สารละลาย salicylic acid, methyl jasmonate และ β-aminobutyric acid ทางรากแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรคใบจุด	9
3.4 ผลของการให้สารละลาย salicylic acid, methyl jasmonate และ β-aminobutyric acidทางรากแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า	10
3.5 ผลของสารละลาย salicylic acid, methyl jasmonate และ β - aminobutyric acid ต่อเชื้อสาเหตุโรค	10
3.6 การจัดการด้านข้อมูล	11
3.7 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp. และโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp.	11
3.8 สถานที่ทำการทดลอง	15
3.9 สถานที่ทำการเก็บตัวอย่าง	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	**16**
4.1 การทดลองเบื้องต้น (pre-experiment) ถึงผลของการให้สารชักนำความต้านทาน (inducers) ต่อผักสลัดและความสามารถในการทำให้เกิดโรครากเน่าของเชื้อ *Pythium* spp.	16
4.2 การแยกเชื้อและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคใบจุดในผักสลัด	17
4.3 ผลของการให้สารละลาย salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β - aminobutyric acid (BABA) ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรคใบจุด	19
4.4 ผลของการให้สารละลาย salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β - aminobutyric acid (BABA) ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า	22
4.5 การทดสอบผลของการให้ salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β - aminobutyric acid (BABA) ในสารละลายธุอาหารต่อพืชทดสอบ	31
4.6 ผลของการให้สารละลาย β - aminobutyric acid (BABA) ทางรากแก่ผักสลัดในการชักนำให้ต้านทานต่อโรคใบจุด	32
4.7 ผลของการให้สารละลาย β - aminobutyric acid (BABA) ทางรากแก่ผักสลัดในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า	35
4.8 ผลของสารละลาย salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β - aminobutyric acid (BABA) ต่อเชื้อสาเหตุโรค	37
4.9 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp.	41
4.10 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp.	41
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	**50**
บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง	**52**
ประวัตินักวิจัย	**56**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *P. aphanidermatum* และ *P. myriotylum* ในผักสลัดบัตเตอร์เฮด ที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่าง ๆ	17
4.2	การเกิดโรคใบจุดในผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่าง ๆ	20
4.3	ความรุนแรงของการเกิดโรครากเน่าในผักสลัดบัตเตอร์เฮด และเรดโอ๊ก ที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่าง ๆ แล้วทำการปลูกเชื้อ *P. myriotylum* (การปลูกครั้งที่ 1)	23
4.4	ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัดบัตเตอร์เฮด และเรดโอ๊กที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่าง ๆ แล้วทำการปลูกเชื้อ *P. myriotylum* (การปลูกครั้งที่ 1)	24
4.5	ความรุนแรงของการเกิดโรครากเน่าในผักสลัดบัตเตอร์เฮด และเรดโครอล ที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่าง ๆ แล้วทำการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* (การปลูกครั้งที่ 2)	27
4.6	ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัดบัตเตอร์เฮด และเรดโครอลที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่าง ๆ แล้วทำการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* (การปลูกครั้งที่ 2)	28
4.7	ผลของการให้ SA, MeJA และ BABA ในสารละลายธาตุอาหารต่อพืชทดสอบ	31
4.8	การเกิดโรคใบจุดในผักสลัดบัตเตอร์เฮด[1/] ที่ได้รับ BABA ความเข้มข้นต่าง ๆ ทางสารละลายธาตุอาหาร	32
4.9	ผลผลิตของผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่ได้รับ BABA ความเข้มข้นต่าง ๆ ทางสารละลายธาตุอาหาร และทำการปลูกเชื้อ *Cercospora* sp.	33
4.10	การเกิดโรคใบจุดในผักสลัดเรดโครอลที่ได้รับ BABA ความเข้มข้นต่างทางสารละลายธาตุอาหาร	34
4.11	ผลผลิตของผักสลัดเรดโครอล ที่ได้รับ BABA ความเข้มข้นต่างทางสารละลายธาตุอาหาร และทำการปลูกเชื้อ *Cercospora* sp.	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.12	ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรค และน้ำหนักสดของกล้าผักสลัดบัตเตอร์เฮด ที่ได้รับ BABA ในอัตราต่างๆ ก่อนการปลูกเชื้อ *Pythium* sp.	35
4.13	ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรค และน้ำหนักสดของกล้าผักสลัดเรดโครอล ที่ได้รับ BABA ในอัตราต่างๆ ก่อนการปลูกเชื้อ *Pythium* sp.	36
4.14	การเจริญของเชื้อ *Cercospora* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ	38
4.15	การเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ	39
4.16	การเจริญของเชื้อ *P. myriotylum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ	40
4.17	ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคที่คัดเลือกมาใช้วิเคราะห์ผลการชักนำความต้านทาน	42
4.18	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของข้อมูลยีน EDS5L และ DIR เท่าที่ปรากฏบน GenBank	43
4.19	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากบางส่วนของยีน EDS5L ขนาด 300 คู่เบสกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชต่างๆ ที่มีปรากฏใน GenBank	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	เชื้อ *Cercospora* sp. สาเหตุโรคใบจุดในผักสลัด	18
4.2	ผลของการพ่นสารละลาย SA ต่อการเกิดโรคใบจุดในผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp.	21
4.3	ผลของการพ่นสารละลาย MeJA ต่อการเกิดโรคใบจุดในผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp.	22
4.4	ผลของการพ่นสารละลาย BABA ต่อการเกิดโรคใบจุดในผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp.	22
4.5	ผลของการให้สารละลาย SA, MeJA หรือ BABA ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า (การปลูกครั้งที่ 1)	25
4.6	แสดงรากผักสลัดที่พ่นสารชักนำฯ ชนิดต่าง ๆ (การปลูกครั้งที่ 1)	26
4.7	ผลของการให้สารละลาย SA, MeJA หรือ BABA ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า (การปลูกครั้งที่ 2)	29
4.8	แสดงรากผักสลัดที่พ่นสารชักนำฯ ชนิดต่าง ๆ (การปลูกครั้งที่ 2)	30
4.9	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน DIR, EDS5L, LTC1, LTC2 และ PR1 ด้วยเทคนิค PCR ภายหลังการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เพียงอย่างเดียว หรือการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* ร่วมกับการสเปรย์สาร SA หรือ BABA เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมคือเอทานอล (EtOH) 10% ปรับปริมาณ DNA ต้นแบบสำหรับเทคนิค PCR ให้เท่ากันด้วยยีน 18S	46
4.10	เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน DIR, EDS5L, LTC1, LTC2 และ PR1 ด้วยเทคนิค PCR ภายหลังการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* หรือการสเปรย์สาร MeJA 0.001mM เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมคือพืชปกติในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ปรับปริมาณ DNA ต้นแบบสำหรับเทคนิค PCR ให้เท่ากันด้วยยีน 18S	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และลดข้อโต้แย้งในเรื่องของพืชดัดต่อพันธุกรรม (Genetic modified organisms: GMOs) ในกรณีที่ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม ในการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ Inducing agents ส่วนใหญ่ก็ได้มาจากสารที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์ของเชื้อสาเหตุ หรือในเซลล์พืช สารเคมีหรือแร่ธาตุบางชนิดที่ไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (Biocide) จึงลดความกังวลในเรื่องพิษตกค้างที่มีอยู่ในผลิตผล ซึ่งสอดคล้องกับกระแสความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการนำเอาวิธีดังกล่าวไปใช้ในทางปฏิบัติ ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากในสภาพแปลงปลูกพืชจริงนั้น พืชมักจะได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมต่างๆ ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดความเครียด และเกิดการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นดังกล่าวตลอดเวลา แต่ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ปัจจัยทางสภาพแวดล้อมหลายๆ อย่างสามารถควบคุมได้ จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาหาความเป็นไปได้ในการชักนำพืชที่ปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินให้มีความต้านทานต่อโรคพืช โดยสิ่งกระตุ้นทางเคมีบางชนิดที่มีรายงานว่าสามารถชักนำให้เกิดความต้านทานได้

การใช้ gene marker มาช่วยในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นที่ยอมรับในการใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการ เนื่องจาก gene เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมที่เป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิต และการแสดงออกของแต่ละยีนจะขึ้นอยู่กับสิ่งกระตุ้นที่เฉพาะเจาะจง ดังได้กล่าวแล้วว่า ระบบของ induced resistance นั้น การแสดงออกของยีนจะมีความจำเพาะต่อสิ่งกระตุ้น นอกจากนี้ ยังมีผลต่อเชื้อโรคอย่างจำเพาะเจาะจงด้วย ดังนั้นการพัฒนายีนที่มีการแสดงออกแบบจำเพาะดังกล่าวมาใช้เป็น gene marker จึงเป็นวิธีที่ช่วยประหยัดเวลา และมีความแม่นยำในการคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานโรคที่ต้องการ

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาหาความเป็นไปได้ ในการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรค โดยทำการทดสอบในผักสลัด แล้วทำการวัดผลจากค่าดัชนีการเกิดโรค (Disease index) ซึ่งจะเป็นตัวที่ใช้ในการบ่งชี้ ถึงระดับความต้านทานที่อาจจะเกิดขึ้นจากกรรมวิธีที่ใช้ในการทดลอง ร่วมกับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานซึ่งบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล และนำมาพัฒนาใช้เป็น gene marker เพื่อตรวจหาระดับความต้านทานโรค

1.2 สมมติฐานงานวิจัย

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์จะมีกลไกในการป้องกันตนเอง (self defense mechanisms) จากศัตรูธรรมชาติหรือสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การชักนำความต้านทาน (induced resistance) คือการกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวทำงาน ก่อนที่จะต้องเผชิญกับการเข้าทำลายของเชื้อโรค หรือพร้อมที่จะทำงานได้อย่างทันที เมื่อต้องเผชิญหน้ากับเชื้อโรค ซึ่งจะเป็นการบรรเทาความรุนแรงของการเกิดโรคลงไปได้ในระดับหนึ่ง ขบวนการดังกล่าวเกี่ยวข้องกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ มากมาย ทั้งที่สร้างจากพืช และเชื้อโรค ในจำนวนนี้ SA JA และ BABA มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทบาทที่สำคัญในการตอบสนองต่อกลไกการป้องกันดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาวิธีที่ทำให้ระดับของ SA JA หรือ BABA ในเซลล์พืชเพิ่มมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการให้จากภายนอก (exogenous applications) หรือจากการกระตุ้นโดย elicitors ที่เหมาะสม จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคได้ และการศึกษายีนต้านทานที่แสดงออกจะเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้

1.3 วัตถุประสงค์หลัก

1.2.1 ศึกษาความต้านทานต่อโรคที่เกิดขึ้นภายหลังการชักนำด้วยสาร salicylic acid, methyl jasmonate และ B-aminobutyric acid แก่ผักสลัดในสภาพปลูกแบบไม่ใช้ดิน

1.2.2 ศึกษายีนต้านทานที่แสดงออกภายหลังถูกชักนำด้วย salicylic acid, methyl jasmonate และ B-aminobutyric acid และพัฒนาให้เป็น marker สำหรับตรวจหาความต้านทาน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยขั้นต่อไปในเรื่องของการชักนำพืชให้เกิดความต้านทาน และ Gene marker ที่ดีในการใช้คัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานโรค

1.3.2 ผลงานวิจัยที่ได้สามารถถ่ายทอดผ่านทางบทความทางวิชาการ หรือการนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1.3.3 เกษตรกรผู้ปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน จะมีทางเลือกในการป้องกันกำจัดโรคโดยไม่ใช้สารเคมีปราบศัตรูพืช

1.3.4 ส่งเสริมนโยบายของรัฐในเรื่องอาหารปลอดภัย (Food safety)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การชักนำให้เกิดความต้านทาน เป็นขบวนการที่สลับซับซ้อน โดยจะเกี่ยวข้องกับการสื่อสารหรือส่งสัญญาณทั้งจากภายในเซลล์ และระหว่างเซลล์จากสารเคมีที่พืชสร้างขึ้น เรียกขบวนการนี้ว่า signal transduction โดยสารชีวเคมีที่ทำให้เกิดขบวนดังกล่าวประกอบด้วย signal molecules และ secondary messenger ซึ่งจะถูกผลิตเพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชได้รับรู้ของการมาถึงของเชื้อโรค หรือสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป สิ่งที่ส่งสัญญาณให้พืชรับรู้ อาจจะเป็นตัวเชื้อโรคโดยตรง องค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อโรค เชื้อจุลินทรีย์ แร่ธาตุ หรือสารเคมีบางชนิดที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่งรวมเรียกว่า elicitors ในปัจจุบันพบว่า ระบบการตอบสนองของพืชให้เกิดการป้องกันตนเอง แบ่งเป็น 2 ระบบ คือ 1) ระบบการทำงานที่เกี่ยวข้องกับ signal molecule ที่ชื่อว่า salicylic acid (salicylic acid-dependent defense responses และ 2) ระบบการทำงานที่ไม่เกี่ยวข้องกับ salicylic acid แต่จะเกี่ยวข้องกับ signal moleculesตัวอื่นๆ jasmonic acid หรือ ethylene (salicylic acid-independent defense responses) (Thomma et.al., 2001) ตัวอย่างของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) และ elicitor บางตัว เช่น β - aminobutyric acid (BABA) มีดังต่อไปนี้

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่าสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช สารประกอบฟีนอลบางชนิด เช่น catachol และ cholrogenic acid จะมีส่วนร่วมในการต่อต้านเชื้อโรค และเป็นโครงสร้างเบื้องต้นของสารปฏิชีวนะ และการสังเคราะห์ phytoalexin ของพืช นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลยังเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ลิกนิน ตลอดจนช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์พืช (Hammerschmidt and Schultz, 1996)

Salicylic acid (SA) หรือ 2-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบฟีนอลที่ถือได้ว่ามีบทบาทสำคัญในฐานะเป็น signal molecule ในระบบการตอบสนองหลายชนิดในพืช เช่น การเพิ่มอุณหภูมิในต้น voodoo lily ซึ่งมีส่วนสำคัญในการดึงดูดให้เกิดการผสมเกสร SA มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมระบบความต้านทานในพืช โดย White (1979) พบว่าการให้ SA แก่ต้นยาสูบ สามารถที่จะชักนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อ TMV ได้

ต้นพืชเมื่อทำการปลูกเชื้อด้วย necrotophic pathogens (เชื้อโรคที่ทำให้เซลล์พืชเกิดการตายอย่างเฉียบพลัน) พืชจะมีการตอบสนองต่อการรุกรานดังกล่าว และมักจะพบเสมอว่าระดับของ SA ในเซลล์จะเพิ่มมากขึ้น Metraux et.al. (1990) พบว่า การให้ SA ที่ความเข้มข้น14.5 mM แก่ใบอ่อนของต้นแตงกวา จะชักนำให้เกิดความต้านต่อเชื้อ *Colletotrichum lagenarium*

SA ยังสามารถกระตุ้นให้ยีนส์ที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเกิดโรค (pathogenesis related proteins: PR protein) แสดงออก โปรตีนดังกล่าวได้แก่ PR-1, PR-2, PR-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ PR-5 ซึ่งบางชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค (Vidhyasekaran, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่า SA สามารถเคลื่อนย้ายได้ในพืชผ่านทางท่อลำเลียงอาหาร (phloem)

เมทธิลเอสเตอร์ของ JA (methyl jasmonate: MeJA) ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1962 จากน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชพวก jasmine (*Jasminum grandiflorum*) ในปี 1980 มีรายงานว่า JA เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโต และพัฒนาการของพืช อย่างไรก็ตามความสนใจต่อ JA ในฐานะเป็น signal molecule ค่อนข้างจะมีน้อย จนกระทั่ง 10 ปีต่อมา หลังจากที่ Farmer and Bryon (1990) ได้ค้นพบว่า MeJA ซึ่งเป็นสารระเหยจากต้น *Artemesia* (Sagbrush) สามารถที่จะไปกระตุ้นให้ยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกัน (Defense genes) ของต้นมะเขือเทศที่ปลูกอยู่ข้างเคียง การค้นพบนี้ทำให้เกิดการตื่นตัวต่อความสำคัญของ JA ต่อการตอบสนองของพืชในการสร้างภูมิคุ้มกัน (Staswick and Lehman, 1999)

Creelman and Mullet (1997) พบว่า ระดับของ JA ในพืชจะเพิ่มมากขึ้น จากการกระตุ้นของสิ่งเร้าต่างๆ เช่น การทำให้เกิดบาดแผล หรือการขาดน้ำ นอกจากนี้ ระดับของ JA ยังเพิ่มขึ้นได้จากการกระตุ้นของ elicitor ที่ได้มาจากผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และ systemin ซึ่งเป็น peptide ชนิดหนึ่ง และการแทะเล็มของแมลง (McCloud and Baldwin, 1997; Blecher et.al, 1995; Bergey et.al., 1996) การเพิ่มขึ้นของ JA ที่เกิดจากสิ่งกระตุ้นดังกล่าวนี้ มีผลทำให้เกิดการแสดงออกของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในพืช

MeJA ที่ให้แก่ผลิตผลทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวในรูปของสารระเหย จะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา และเชื้อแบคทีเรียได้ และมีแนวโน้มว่าจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนานขึ้น (Buta and Moline, 1998)

การฉีดพ่น JA ลงในมะเขือเทศที่ปลูกในสภาพไร่ สามารถชักนำให้ต้นมะเขือเทศเกิดความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชได้ในระดับเดียวกันกับที่ถูกกระตุ้นโดยแมลงกัดกิน นอกจากนี้ยังพบศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูพืชจะเพิ่มมากขึ้นด้วย (Thaler, 1999)

Thomma et.al. (2001) รายงานว่า JA เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิด เช่น *Alternaria, Pythium, Plectospharella* และ *Botrytis*

ในระบบที่ไม่เกี่ยวข้องกับ SA นั้น พบว่ามีการสังเคราะห์สารเคมีที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น camalexin ซึ่งเป็น phytoalexin ชนิดหนึ่ง ในบริเวณที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย โดย camalexin มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ได้อย่างสมบูรณ์ (Thomma et al., 1999a) นอกจาก camalexin แล้ว ยังพบการแสดงออกของยีนควบคุมการผลิตโปรตีน PDF1.2 (plant defensin), PR-3 (chitinase) และ PR-4 (hevein-like protein) ซึ่งสามารถทำให้พืชต้านทานต่อเชื้อรา Botrytis cinerea (Thomma et al., 1998, 1999b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

β - aminobutyric acid (BABA)เป็นกรดอะมิโนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein amino acid) ที่พบได้ยากตามธรรมชาติ โดยมีรายงานว่าสามารถพบได้เฉพาะแต่ในสารขับราก (root exudates) ของมะเขือเทศ (Gamliel and Katan, 1992)

ในมะเขือเทศที่ฉีดพ่นด้วย BABA ที่ความเข้มข้น 9.7 mM สามารถป้องกันการติดเชื้อจาก *Phytophthora infestans* ได้ (Cohen et.al., 1994)

การฉีดพ่นด้วย BABA ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์ mRNA ของ PR-1 และ PR-5 จากการรายงานของ Jakab et.al. (2001) พบว่า BABA สามารถชักนำให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อย่างกว้างขวาง คือ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และไส้เดือนฝอย (Cohen and Gisi, 1994 ; Oka et al., 1999 ; Siegrist et al., 2000 ; Zimmerli et al., 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ผลของการให้สารละลาย Salicylic acid, methyl jasmonate และ β - aminobutyric acid ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรคใบจุด

3.1.1 แผนการทดลองและกรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธี (Treatment) ดังต่อไปนี้

Tr1	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย SA ความเข้มข้น	0.1	mM
Tr2	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย SA ความเข้มข้น	1	mM
Tr3	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย SA ความเข้มข้น	10	mM
Tr4	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย MeJA ความเข้มข้น	0.1	mM
Tr5	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย MeJA ความเข้มข้น	1	mM
Tr6	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย MeJA ความเข้มข้น	10	mM
Tr7	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย BABA ความเข้มข้น	0.1	mM
Tr8	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย BABA ความเข้มข้น	1	mM
Tr9	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย BABA ความเข้มข้น	10	mM
Control	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย DMSO 0.1%		
Healthy control	ฉีดพ่นด้วยสารละลาย DMSO 0.1% ไม่ทำการปลูกเชื้อ		

3.1.2 การเตรียมพืชทดลองและเชื้อสาเหตุ

พืชทดลองที่ใช้ได้แก่ผักสลัด ที่การปลูกในวัสดุปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (soilless mix) ให้สารละลายธาตุอาหารจนพืชทดสอบเจริญมีขนาดเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลอง เชื้อสาเหตุโรคที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เชื้อรา *Cercospora* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบจุดที่สำคัญของผักสลัด เชื้อดังกล่าวจะทำการแยกจากส่วนของพืชที่เป็นโรค โดยวิธี tissue transplanting technique

3.1.3 การเตรียมสารละลาย salicylic acid, methyl jasmonate และ β - aminobutyric acid

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลองโดยจะทำการละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.1% ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ให้ได้ความเข้มข้นตามที่กำหนด ผสมกับสารจับใบก่อนฉีดพ่น

3.1.4 การฉีดพ่นสารและการปลูกเชื้อ

ทำการฉีดพ่นสารละลาย salicylic acid, methyl Jasmonate หรือ β - aminobutyric acid ให้แก่พืชเป็นเวลา 2 ครั้ง คือ ตอนเช้า และตอนเย็น หลังจากทำการฉีดพ่นแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการปลูกเชื้อโดยวิธี patch inoculation โดยการใช้ agar plug ของเชื้อสาเหตุวางแปะลงบนใบพืช ใบละ 3 จุด จำนวนอย่างน้อย 3 ใบ คลุมต้นพืชด้วยถุงพลาสติกใส เพื่อให้เกิดการติดเชื้อดียิ่งขึ้น

3.1.5 การตรวจผล

ทำการเก็บตัวอย่างใบที่ทำการเก็บเชื้อในวันที่ 3, 7 และ 14 มาทำการประเมินความเสียหายที่เกิดขึ้น โดยใช้ค่าคะแนนดังต่อไปนี้

0 = ใบพืชปกติ ไม่มีการติดเชื้อ

1 = ใบพืชมีแผลแห้งตายน้อยกว่า 25% ของพื้นที่ใบ

2 = ใบพืชมีแผลแห้งตาย 25-50% ของพื้นที่ใบ

3 = ใบพืชมีแผลแห้งตาย 50-75% ของพื้นที่ใบ

4 = ใบพืชมีแผลแห้งตายมากกว่า 75% ของพื้นที่ใบ

จากนั้นนำมาคำนวณเป็นค่าดัชนีการเกิดโรคที่ใบ (Leaf disease index: LDI) จากสูตร

$$LDI = \frac{\sum (\text{ค่าคะแนนของใบที่ถูกทำลายในแต่ละระดับ X จำนวนใบ}) \text{ X } 100}{\text{จำนวนใบที่ทำการปลูกเชื้อ}}$$

ตัวอย่างบางส่วนจะถูกนำไปศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลตามรายละเอียดวิธีการในข้อ 14.7

3.2 ผลของการให้สารละลาย salicylic acid, methyl jasmonate และ β - aminobutyric acid ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่เปลี่ยนเชื้อสาเหตุที่ใช้ในการปลูกเชื้อมาเป็นเชื้อ *Pythium* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในผักสลัด ในการปลูกเชื้อให้ใช้ suspension ของเชื้อดังกล่าวเทราดลงไปในวัสดุปลูก และทำการตรวจผล ในวันที่ 3, 7 และ14 หลังการปลูกเชื้อ โดยมีระดับของการเกิดโรคดังนี้

0 = ใบพืชปกติ ไม่เป็นโรค

1 = รากพืชมีสีแดง

2 = รากพืชมีอาการเน่า

3 = รากพืชมีอาการเน่า พืชแสดงอาการเหี่ยวชั่วคราว

4 = รากเน่า พืชแสดงอาการเหี่ยวอย่างถาวร

5 = พืชตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำมาคำนวณเป็นค่าดัชนีการเกิดโรคที่ราก (Root disease index: RDI)

จากสูตร $$RDI = \frac{\sum (\text{ค่าระดับของการเกิดโรค X จำนวนพืชที่เป็นโรค}) \text{ X } 100}{\text{จำนวนพืชที่ทำการปลูกเชื้อ}}$$

3.3 ผลของการให้สารละลาย salicylic acid, methyl jasmonate และ β - aminobutyric acid ทางรากแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรคใบจุด

3.3.1 แผนการทดลองและกรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธี (treatment) ดังต่อไปนี้

Tr1 พืชทดสอบปลูกในสารละลาย SA ความเข้มข้น 0.01 mM
Tr2 พืชทดสอบปลูกในสารละลาย SA ความเข้มข้น 0.1 mM
Tr3 พืชทดสอบปลูกในสารละลาย SA ความเข้มข้น 1 mM
Tr4 พืชทดสอบปลูกในสารละลาย MeJA ความเข้มข้น 0.01 mM
Tr5 พืชทดสอบปลูกในสารละลาย MeJA ความเข้มข้น 0.1 mM
Tr6 พืชทดสอบปลูกในสารละลาย MeJA ความเข้มข้น 1 mM
Tr7 พืชทดสอบปลูกในสารละลาย BABA ความเข้มข้น 0.01 mM
Tr8 พืชทดสอบปลูกในสารละลาย BABA ความเข้มข้น 0.1 mM
Tr9 พืชทดสอบปลูกในสารละลาย BABA ความเข้มข้น 1 mM
Control พืชทดสอบปลูกในสารละลายปกติ
Healthy control พืชทดสอบปลูกในสารละลาย ไม่ทำการปลูกเชื้อ

3.3.2 การเตรียมพืชทดลองและเชื้อสาเหตุ

ผักสลัดที่ใช้ในการทดลองจะทำการปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน ในระบบ Solution culture จนกระทั่งมีใบแท้ประมาณ 4-5 ใบ จึงถูกนำมาใช้ในการทดลอง เชื้อสาเหตุและการเตรียมเชื้อสาเหตุ เช่นเดียวกับข้อ 13.1

3.3.3 การทรีตสารและการปลูกเชื้อ

เมื่อพืชมีขนาดที่ทำการทดลองได้ ให้ย้ายลงมาปลูกในภาชนะที่มีการเตรียมสารละลายธาตุอาหารขึ้นมาใหม่ โดยให้มีองค์ประกอบของ SA, MeJA หรือ BABA ในสารละลายธาตุอาหาตามความเข้มข้นที่กำหนด หลังจากทำการย้ายพืชมาปลูกในสารละลายธาตุอาหารใหม่เป็นเวลา 3 วัน จึงปลูกเชื้อ

3.3.4 การเช็คผลและการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุล เช่นเดียวกับข้อ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4. ผลของการให้สารละลาย salicylic acid, methyl jasmonate และ β - aminobutyric acid ทางรากแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3 แต่เปลี่ยนเชื้อสาเหตุที่ใช้ในการปลูกเชื้อมาเป็นเชื้อ *Pythium* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรครากเน่าในผักสลัด ในการปลูกเชื้อให้ใช้ suspension ของเชื้อดังกล่าวเทราดลงไปในดิน และทำการเช็คผล ในวันที่ 3, 7 และ14 เช่นเดียวกับข้อ 13.2

3.5 ผลของสารละลาย salicylic acid, methyl jasmonate และ β - aminobutyric acid ต่อเชื้อสาเหตุโรค

3.5.1 แผนการทดลองและกรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธี (treatment) ดังต่อไปนี้

Tr1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ SA ความเข้มข้น 0.01 mM
Tr2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ SA ความเข้มข้น 0.1 mM
Tr3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ SA ความเข้มข้น 1 mM
Tr4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ SA ความเข้มข้น 10 mM
Tr5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ MeJA ความเข้มข้น 0.01 mM
Tr6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ MeJA ความเข้มข้น 0.1 mM
Tr7 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ MeJA ความเข้มข้น 1 mM
Tr8 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ MeJA ความเข้มข้น 10 mM
Tr9 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ BABA ความเข้มข้น 0.01 mM
Tr10 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ BABA ความเข้มข้น 0.1 mM
Tr11 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ BABA ความเข้มข้น 1 mM
Tr12 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ BABA ความเข้มข้น 10 mM
Control อาหารเลี้ยงเชื้อปกติ

3.5.2 วิธีการ

ทำการย้ายเชื้อสาเหตุโรคที่ต้องการจะทดสอบ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ salicylic acid, methyl jasmonate หรือ β - aminobutyric ดังที่แสดงไว้ในข้อ 1) จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (colony diameter) บนอาหารแข็ง หรือ น้ำหนักของเส้นใยในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การจัดการด้านข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

3.7 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp. และโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp.

3.7.1 การคัดเลือกยีนของผักสลัด (*Lactuca sativa*) ที่มีการแสดงออกอย่างจำเพาะภายหลังการชักนำด้วยสารเคมี salicylic acid, methyl jasmonate หรือ β - aminobutyric

ทำการคัดเลือกยีนของผักสลัดที่มีรายงานผลการวิจัยด้านความต้านทานโรคพืช คือ ยีน LTC1 และ LTC2 (Bennett et al., 2002) ยีน PcRG1-6-2, PcRG7-5 และ PcRG4-D-5 (Kiba et al., 2008) โดยยีน LTC1 และ LTC2 เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ LTC1 และ LTC2 ตามลำดับ เอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่สังเคราะห์สารในกลุ่ม sesquiterpene ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของสาร lactucin รวมทั้งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสังเคราะห์สาร phytoalexin ในผักสลัด ยีน LTC1 และ LTC2 แสดงออกในราก hypocotyl และที่ใบจริงของผักสลัดตลอดอายุพืช (constitutive expression) และแสดงออกที่ใบเลี้ยงของผักสลัดสายพันธุ์ Diana เมื่อเชื้อราน้ำค้าง (*Bremia lactucae*) เข้าทำลาย (Bennett et al., 2002) สำหรับยีนในกลุ่ม *Pseudomonas cichorii* responsive gene (PcRGs) เช่น PcRG1-6-2, PcRG7-5 และ PcRG4-D-5 เป็นยีนที่ตรวจพบโดย Kiba และคณะ (2008) ภายหลังการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas cichorii* ลงบนผักสลัดแล้วก่อให้เกิดการตายของเซลล์พืชในบริเวณปลูกเชื้ออย่างเร็ว (programmed cell death; PCD) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นการป้องกันตัวเองของพืชเพื่อจำกัดบริเวณของเชื้อสาเหตุโรคไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์โดยรอบ ยีน PcRG1-6-2 สังเคราะห์เอนไซม์ ACC oxidase ยีน PcRG7-5 สังเคราะห์เอนไซม์ oxidase ยีน PcRG4-D-5 สังเคราะห์เอนไซม์ protein kinase ซึ่งยีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในพืชรวมทั้งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ hypersensitive response และพบว่ายีน PcRG1-6-2 และยีน PcRG7-5 เป็นยีนที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย salicylic acid และ methyl jasmonate ในขณะที่ PcRG4-D-5 ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยสารชักนำทั้งสองชนิด

ทำการคัดเลือกยีนที่มีรายงานในพืชอื่นที่มีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคของพืช หรือยีนที่ถูกกระตุ้นโดยสาร salicylic acid, methyl jasmonate หรือ β - aminobutyric เพื่อออกแบบไพร์เมอร์สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในผักสลัด เช่น ยีน EDS5 (enhanced disease succeptibility 5) ที่มีรายงานใน *Arabidopsis thaliana* ถึงความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ salicylic acid และความต้านทานโรคชนิด SA-dependent pathway (Nawrath et al., 1999; Nawrath et al., 2002) และยีน DIR (disease resistance response) ที่มีรายงานการแสดงออกในพืชหลายชนิดภายหลังการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าทั้งแบบ biotic หรือ abiotic โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตของยีน DIR ทำหน้าที่เป็นโมเลกุลที่ส่งสัญญาณไปยังส่วนต่างๆ ของพืชทั้งแบบ local และ systemic ส่งผลให้พืชเกิดความต้านทานทั่วทั้งต้น หรือ systemic disease resistance (Suzuki et al., 2003)

นอกจากนี้ ทำการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (housekeeping gene) ในผักสลัด (*Lactuca sativa*) เพื่อใช้เป็นยีนมาตรฐานสำหรับการควบคุมปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นให้เท่ากันในปฏิกิริยาพีซีอาร์ และ semi-quantitative PCR ก่อนทำการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของยีนต่างๆ ข้างต้น สำหรับการทดลองนี้เลือกใช้ยีน TPI (triose phosphate isomerase) ที่แสดงออกทั้งที่ plastid และ cytosol ของผักสลัด (Pichersky and Gottlieb, 1984) และยีน Nad4 (NADH dehydrogenase subunit 4) ที่มีการแสดงออกตลอดเวลาใน mitochondria ของผักสลัด (Marienfeld and Newton, 1994; Araya et al., 2011)

3.7.2 สร้างไพร์เมอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีนนั้นๆ และทดสอบไพร์เมอร์เพื่อป้องกันปฏิกิริยาข้ามกับยีนอื่นๆ (primer specificity)

ในการตรวจสอบยีน LTC1, LTC2, PcRG1-6-2, PcRG7-5, PcRG4-D-5, TPI, และ Nad4 ใช้ไพร์เมอร์ที่มีรายงานไว้แล้ว สำหรับยีน EDS5 และ DIR ทำการออกแบบไพร์เมอร์โดยการค้นหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของยีน จากนั้นจึงออกแบบไพร์เมอร์จากบริเวณดังกล่าวด้วยโปรแกรม Primer3 (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)

3.7.3 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่สนใจในผักสลัดที่ผ่านการชักนำด้วย salicylic acid, methyl jasmonate หรือ β - aminobutyric เปรียบเทียบกับพืชปกติ ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) หรือเทคนิค real-time PCR ซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

3.7.3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบ หรือรากของผักสลัด

บดใบหรือรากของผักสลัดในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่งแช่เย็นจนเป็นผงละเอียด แบ่งตัวอย่างที่บดได้ประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอพืช 600 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 2M Tris/HCl, pH8.2, 0.5M EDTA, 20% SDS ในอัตราส่วน 1:2:1 ผสมสารละลายให้เข้ากับตัวอย่างพืชด้วยการเขย่านาน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ เติม chloroform ปริมาตรเท่ากัน เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำซ้ำในขั้นตอนการสกัดด้วย chloroform อีกครั้ง จากนั้นดูดสารละลายใสส่วนบนใสหลอด microtube หลอดใหม่ วัดปริมาตรสารละลายที่ได้ก่อนเติม 6M LiCl ด้วยปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายที่ได้ และ absolute alcohol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีเพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ จากนั้นเทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% alcohol ปริมาตร 500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เท alcohol ทิ้งแล้วปล่อยให้ตะกอนแห้งก่อนละลายตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วย DEPC-water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอและเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ขั้นตอนต่อไป

3.7.3.2 การสังเคราะห์ cDNA

เตรียมหลอดปฏิกิริยาบนน้ำแข็งจำนวน 2 หลอด หลอดแรก เตรียม RNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม และ Oligo dT primer (10 uM) ใน DEPC-water ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ในหลอดพีซีอาร์ หลอดที่สองเตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยาสังเคราะห์ cDNA ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตามวิธีการของเอนไซม์ RevertAidReverse Transcriptase (Fermentas, China) ในหลอดปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Reaction buffer (5X) 4 ไมโครลิตร dNTP mix (10 uM) 2 ไมโครลิตร Ribolock RNase Inhibitor (Fermentas, China) 0.5 ไมโครลิตร และ RevertAidReverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งสองหลอดเข้าด้วยกัน บ่มหลอดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาหลอดปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.7.3.3 การทำปฏิกิริยา PCR และ semi-quantitative PCR

เตรียมปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตรบนน้ำแข็ง ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR buffer (10x) MgCl2 (25mM) Forward primer (10uM) Reverse primer (10 uM) dNTP mix (10mM) Taq DNA polymerase (5 unit/ul) DNA template (5-10 ng) เติมน้ำให้ครบ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนเริ่มปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal Cycler (Biometra, Germany) โดยกำหนดขั้นตอนดังนี้ 1) denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 2) denaturation 94 องศาเซลเซียส 50 วินาที 3) annealing 58 หรือ 60 องศาเซลเซียส 50 วินาที 4) extension 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 25-31 รอบ และ 5) extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เมื่อทำปฏิกิริยาครบทุกขั้นตอนแล้ว นำผลปฏิกิริยาที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Semi-quantitative PCR เริ่มจากการปรับ DNA template ที่ใช้ในกระบวนการ PCR ให้มีปริมาณเท่ากันทุกตัวอย่างโดยใช้ *18S* rRNA และ *Nad4* ซึ่งเป็น housekeeping gene จากนั้นปรับและเลือกจำนวนรอบสำหรับปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมสำหรับแสดงความแตกต่างของผลปฏิกิริยา PCR บน agarose gel

3.7.3.4 ตรวจผลจาก PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis และบันทึกผล

เตรียม agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TAE (1X) หลอมวุ้นให้ละลาย ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเย็นลงเล็กน้อยก่อนเทลงในพิมพ์ที่มีหวี ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งประมาณ 1 ชั่วโมง ถอดหวีออก จากนั้นจัดลงภาชนะสำหรับวิเคราะห์ด้วยกระแสไฟฟ้า (MyRun,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cosmo Bio.Co.Ltd) เติม running buffer (1X TAE) ให้ท่วมวุ้น หยดสารละลายจากปฏิกิริยา PCR ที่ผสมกับ loading dye (10X) ลงในหลุม รวมทั้ง DNA size marker (1 kb ladder หรือ 100 bp ladder) ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ภายใต้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ agarose gel ไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (10 mg/ml) นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง ก่อนนำไปบันทึกภาพด้วย gel document (Syngene, United Kingdom)

3.7.4 คัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกสอดคล้องกับแนวโน้มความต้านทานที่เกิดขึ้นภายหลังการฉีดพ่นหรือเติมสาร SA, MJ หรือ BABA โดยการตัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาผ่านคอลัมน์สำหรับแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจล (GeneAid, Taiwan) เริ่มจากตัดเจลตามขนาดแบนด์ที่ต้องการ โดยมีน้ำหนักไม่เกิน 300 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม DF Buffer 500 ไมโครลิตร นำไป vortex ให้สารละลายเข้ากัน บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยกลับหลอดทุกๆ 2-3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายใส่ลงใน DF Column ที่อยู่ใน 2 ml Collection Tube ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใสด้านล่างทิ้ง จากนั้นเติม W1 Buffer 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใสด้านล่างทิ้ง เติม Wash Buffer 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใสด้านล่างทิ้ง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้ column แห้ง จากนั้นย้าย DF Column วางลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นเติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร ที่บ่มอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะ DNA ลงหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

โคลนชิ้นดีเอ็นที่ต้องการเข้าสู่ cloning vector (pCR8-TOPO, Invitrogen, USA) ที่มีตำแหน่ง *att*L1 และ *att*L2 และต้านทานต่อยาปฏิชีวนะสเปคติโนมัยซิน โดยปฏิกิริยาของการเชื่อมต่อ DNA สายผสม ใน 6 ไมโครลิตร ประกอบด้วย insert DNA 4 ไมโครลิตร salt solution 1 ไมโครลิตร เวคเตอร์ pCR8-TOPO 1 ไมโครลิตร ผสมทั้งหมดให้เข้ากันอย่างเบาและบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นถ่ายโอน DNA สายผสมเข้าสู่คอมพีเทนท์เซลล์ (*E.coli* สายพันธุ์ DH5α) ด้วยวิธี heat-shock และเลี้ยงเซลล์บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะสเปคติโนมัยซิน 100 μg/ml จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิด pCR8 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการแทรกอยู่นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสเปคติโนมัยซิน ความเข้มข้น 100 μg/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 200 rpm เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสกัดแยกพลาสมิดด้วย High-Speed Plasmid Mini kit (GeneAid, Germany) เริ่มด้วยการเติม PD1 Buffer ที่เย็น 200 ไมโครลิตร ละลายเซลล์ด้วยการปิเปตขึ้นลงและนำไป vortex เติม PD2 Buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และพลิกหลอดไปมา 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที จากนั้นเติม PD3 Buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และกลับหลอดทันที 10 ครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ต่อมาดูดสารละลายใสจำนวน 600 ไมโครลิตรลงใน PD Column ที่อยู่บน Collection Tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติม W1 Buffer 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง เติม Wash Buffer 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายด้านล่างทิ้ง สุดท้ายปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ column แห้ง จากนั้นเติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร ที่บ่มอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตั้ง column ทิ้งไว้ 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะพลาสมิดลงหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการตรวจสอบพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม จากนั้นคัดเลือกโคลนที่ต้องการเพื่อนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลบนธนาคารยีนด้วยโปรแกรม Blast (GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov)

3.8 สถานที่ทำการทดลอง

3.8.1 ห้องปฏิบัติการโรคพืชและโรงเรือนทดลอง ของภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

3.8.2 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

3.9 สถานที่ทำการเก็บตัวอย่าง

3.9.1 ฟาร์มปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การทดลองเบื้องต้น (pre-experiment) ถึงผลของการให้สารชักนำความต้านทาน (inducers) ต่อผักสลัดและความสามารถในการทำให้เกิดโรครากเน่าของเชื้อ *Pythium* spp.

ทำการทดลองในผักสลัดบัตเตอร์เฮต (*Lectuca sativa* var *capitana*) สายพันธุ์ Rex RZ® , The Netherlands จัดจำหน่ายและนำเข้าโดย บ. ดัทช์กรีนเนอรีจำกัด ประเทศไทย โดยปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน แบบสารละลายธาตุอาหาร ที่มีการเป่าอากาศ (solution culture with air pump) จากนั้นทำการพ่นสารชักนำชนิดต่างๆ ได้แก่ BABA, MeJA และ SA ที่ความเข้มข้นสูงสุด 2 อันดับแรกที่ได้กำหนดไว้ในระเบียบวิธีการวิจัย (10.0 และ 1.0 mM) เมื่อพืชทดสอบมีอายุได้ประมาณ 2 เดือนจำนวน 1 ครั้งที่เวลา 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อ เชื้อ *Pythium* ที่ใช้ได้แก่ *P. aphanidermatum* และ *P. myriotylum* จาก stock culture ของภาควิชาเทคโนโลยีการจักการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล. โดยการนำรากพืชไปจุ่มลงใน ส่วนของเส้นใย (mycelial segments) ที่มีความเข้มข้น 10^4 propogules/ml จากนั้นประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคที่ 5 วันหลังการปลูกเชื้อได้ผลดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 4.1 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *P. aphanidermatum* และ *P. myriotylum* ในผักสลัดบัตเตอร์เฮด ที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ

สารชักนำ	ความเข้มข้น	ค่าความรุนแรงของการเกิดโรค (0-4)[1]				เฉลี่ย
		P. aphanidermatum		*P. myriotylum*		
BABA	1.0	1	1	2	2	1.5
	10.0	3	1	2	2	2.0
MeJA	1.0	1	1	2	3	1.8
	10.0	2	3	3	3	2.8
SA	1.0	2	2	3	4	2.8
	10.0	1	2	3	2	2.0
Ctrl	10%	1	1	1	1	1.0
Ctrl	0.5%	2	2	3	1	2.0
		เฉลี่ย	1.63	เฉลี่ย	2.31	

[1] ค่าความรุนแรงของการเกิดโรค 0=พืชสมบูรณ์ รากมีสีขาว, 1=รากมีสีแดง, 2=รากมีสีแดง-เน่า, 3=รากเน่าทั้งหมด-พืชเหี่ยว, 4= พืชเหี่ยวถาวร-ตาย

ผลการทดลองเบื้องต้นนี้ชี้ให้เห็นว่า *P. myriotylum* และ *P. aphanidermatum* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคในผักสลัดได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของการเกิดโรคที่ 5 วันหลังการปลูกเชื้อท่ากับ 2.31 และ 1.63 ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองจริงจะใช้เชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อสาเหตุที่ใช้ในการทดลองต่อไป การทดลองนี้ยังบอกได้ว่าผักสลัดบัตเตอร์เฮดสามารถทนต่อความเข้มข้นสารชักนำความต้านทานได้สูงถึง 10 mM อย่างไรก็ตาม ไม่พบความต้านทานที่เกิดจากการชักนำด้วยสารชักนำฯ ชนิดต่างๆ จากการทดลองนี้แต่อย่างไร

4.2 การแยกเชื้อและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคใบจุดในผักสลัด

สำรวจและเก็บตัวอย่างผักสลัดที่เป็นโรคใบจุดจากฟาร์มปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินแห่งหนึ่งในจังหวัดฉะเชิงเทรา มาทำการแยกเชื้อโดยวิธี single spore isolation จากการจัดจำแนกเบื้องต้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทียบกับรายละเอียดของเชื้อรา (description of fungi) ที่ให้ไว้โดย Barnett and Hunter (1972) สามารถจัดจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อ *Cercospora* sp. (ภาพที่ 4.1) เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ 1) การปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นวุ้นของเชื้อแปะลงบนใบพืช (patch inoculation) 2) การปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นวุ้นของเชื้อแปะลงบนใบพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
131059

ร่วมกับการทำบาดแผล และ 3) การปลูกเชื้อโดยทาใบพืชด้วยส่วนของเชื้อก่อโรค พบว่าทุกวิธีสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ โดยพบว่าปัจจัยที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ดีได้แก่ ความชื้น การยึดติดของส่วนของเชื้อก่อโรคบนใบพืช และอายุของเชื้อก่อโรค โดยวิธีการที่ทำให้การปลูกเชื้อประสบผลสำเร็จมากที่สุดจากสามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นคือ การปลูกเชื้อโดยทาใบพืชด้วยส่วนของเชื้อก่อโรค ซึ่งต้องทำการเตรียมส่วนของเชื้อก่อโรคโดยการเลี้ยงเชื้อ *Cercospora* sp. บนอาหารใบคื่นฉ่าย (celery leaf decoction agar) ให้มีอายุได้ 3-4 สัปดาห์ หรือจนกว่าเชื้อจะสร้างส่วนขยายพันธุ์ (conidia) จากนั้นนำวุ้นเชื้อดังกล่าวไปปั่นในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้ปริมาณ 10 วุ้นเชื้อ/น้ำ 1ลิตร ก็จะได้ส่วนของเชื้อก่อโรคที่มีลักษณะเป็นเมือกวุ้น (slurry) ซึ่งจะช่วยในการยึดติดกับใบพืชได้ดี ทำการปลูกเชื้อในเวลาเย็นจากนั้นคลุมพืชทดสอบด้วยถุงพลาสติก แล้วพ่นน้ำเพื่อให้มีความชื้นอยู่เสมอเป็นเวลา 5-7 วัน ก็จะพบอาการของโรคเกิดขึ้น

ภาพที่ 4.1 เชื้อ *Cercospora* sp. สาเหตุโรคใบจุดในผักสลัด

(บนซ้าย: ลักษณะอาการของโรค, ล่างซ้าย: การแยกเชื้อด้วยวิธี single spore isolation, บนขวา: ลักษณะของ conidia จากส่วนของพืชที่เป็นโรค, ล่างขวา: conidiophores และ conidia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของการให้สารละลาย salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β - aminobutyric acid (BABA) ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรคใบจุด

ทำการทดลองในผักสลัดบัตเตอร์เฮต (*Lectuca sativa* var *capitana*) พันธุ์ Rex RZ® โดยปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน แบบสารละลายธาตุอาหาร ที่มีการเป่าอากาศ (solution culture with air pump) จนพืชทดสอบมีอายุได้ประมาณ 2 เดือนจึงทำการพ่นสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ ได้แก่ BABA, MeJA และ SA ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0 และ10.0 mM จำนวน 1 ครั้งที่เวลา 72 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อ จากนั้นจึงทำการปลูกเชื้อ *Cercospora* sp. ตามกรรมวิธีที่ได้รายงานไว้ในผลการดำเนินงานข้อ 2 ซึ่งผลการประเมินการเกิดโรคที่ใบหลังการปลูกเชื้อได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การเกิดโรคใบจุดในผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ

กรรมวิธี [1/]	การเกิดโรคที่ 8 วันหลังการปลูกเชื้อ		การเกิดโรคที่ 12 วันหลังการปลูก	
	อัตราการเกิดโรค	ความรุนแรง	อัตราการเกิด	ความ
SA 0.01	76.1	43.4	68.4	50.2
SA 0.1	64.1	31.1*	55.9	39.7
SA 1.0	72.7	35.3	66.7	43.6
SA 10 mM	69.5	37.8	60.3	42.1
Ctrl	78.5	48.5	70.8	51.6
MeJA 0.01	56.7	20.7*	56.8	31.1*
MeJA 0.1	68.2	30.7*	60.1	33.9
MeJA 1.0	72.4	33.1*	70.4	46.9
MeJA 10	56.8	28.2*	59.7	33.7
Ctrl	78.5	48.5	70.8	51.6
BABA 0.01	73.0	38.7	58.8	37.6
BABA 0.1	74.5	40.0	62.4	46.9
BABA 1.0	72.1	43.9	60.0	40.7
BABA 10	71.4	39.6	61.6	41.9
Ctrl (water)	83.5	39.2	65.7	43.1
Ctrl (ไม่	7.2**	2.2**	14.6**	2.4**

[1/]สารละลาย SA และ MeJA ใช้ 10% ethanol เป็นตัวทำละลาย สารละลาย BABA ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

[2/]อัตราการเกิดโรคคำนวนจากร้อยละของ จำนวนใบที่แสดงอาการใบจุด ต่อจำนวนใบทั้งหมดของในแต่ละต้น

[3/]ความรุนแรงคำนวนจาก Σ (ค่าดัชนีการเกิดโรคของแต่ละใบ [0-4] x จำนวนใบที่เป็นโรค) x 25
จำนวนใบทั้งหมด

โดยที่ 0=ไม่มีจุด, 1=มีจุดน้อยกว่า 25%, 2=มีจุดประมาณ 25-50%, 3=มีจุดประมาณ 50-70%, 4=มีจุดมากกว่า 75%

* มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control ของแต่กลุ่มทดลอง, ** มีความแตกต่างกันทางสถิติกับทุกกรรมวิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลอง พบการเกิดโรคที่ใบในทุกกรรมวิธีที่ทำการปลูกเชื้อ โดยมีอัตราการเกิดโรคอยู่ประมาณ 60-80% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมไม่ปลูกเชื้อ (ctrl ไม่ปลูกเชื้อ) โดยมีอัตราการเกิดโรคอยู่ที่ประมาณ 7-15% แสดงให้เห็นถึงผลสำเร็จของการปลูกเชื้อในครั้งนี้ (ตารางที่ 4.2, ภาพที่ 4.2-4.4) ในส่วนของกรรมวิธีที่ทำการพ่นด้วยสารละลาย SA พบว่ามีอัตราการเกิดโรคที่ไม่ต่างจากกรรมวิธีควบคุม (ctrl ethanol) ทั้งที่ 8 วันและ 12 วันหลังการปลูกเชื้อ แต่พบว่าจะมีความรุนแรงของการเกิดโรคน้อยกว่า โดยกรรมวิธีที่พบความรุนแรงของการเกิดโรคน้อยที่สุดได้แก่การพ่นด้วยสารละลาย SA ที่ความเข้มข้น 0.1 mM ซึ่งมีความรุนแรงของการเกิดโรคที่ 8 วัน หลังการปลูกเชื้อเท่ากับ 31.1 % แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 48.5 % (ตารางที่ 4.2, ภาพที่ 4.2) ในส่วนของกรรมวิธีที่ทำการพ่นด้วยสารละลาย MeJA พบว่ามีอัตราการเกิดโรคที่ไม่ต่างทางสถิติจากกรรมวิธีควบคุม (ctrl ethanol) เช่นกันทั้งที่ 8 วันและ 12 วันหลังการปลูกเชื้อ แต่พบว่าจะมีความรุนแรงของการเกิดโรคน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง โดยที่ความรุนแรงที่พบน้อยที่สุดอยู่ที่ความเข้มข้น 0.01 mM ซึ่งมีความรุนแรงที่ 8 และ 12 วันหลังการปลูกเชื้อเท่ากับ 20.7 และ 31.1% ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 48.5 และ 51.6 % ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2, ภาพที่ 4.3) ในส่วนของการพ่นด้วยสารละลาย BABA พบว่าแม้จะมีค่าความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม แต่ก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยพบว่าการพ่นด้วยสารละลาย BABA ความเข้มข้น 0.01 mM จะค่าความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำที่สุด (ตารางที่ 4.2, ภาพที่ 4.4)

ภาพที่ 4.2 ผลของการพ่นสารละลาย SA ต่อการเกิดโรคใบจุดในผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.3 ผลของการพ่นสารละลาย MeJA ต่อการเกิดโรคใบจุดในผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp.

ภาพที่ 4.4 ผลของการพ่นสารละลาย BABA ต่อการเกิดโรคใบจุดในผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp.

4.4 ผลของการให้สารละลาย salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β - aminobutyric acid (BABA) ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า

การปลูกครั้งที่ 1

การทดลองในช่วงเดือน มกราคม-กุมภาพันธ์ 2551 ในผักลัด 2 ชนิดคือ ผักสลัดบัตเตอร์เฮต (*Lectuca sativa* var *capitana*) พันธุ์ Rex RZ® และผักสลัดเรดโอ๊ก (*Lectuca sativa* var *crispa*) พันธุ์ Mondai RZ® โดยปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน แบบสารละลายธาตุอาหาร ที่มีการเป่าอากาศ (solution culture with air pump) จนพืชทดสอบมีอายุได้ 6 สัปดาห์จึงทำการพ่นสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ ได้แก่ BABA, MeJA และ SA ความเข้มข้น 0.01, 0.1และ1.0 mM จำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ครั้ง (เช้า-เย็น) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อ การปลูกเชื้อโดยการจุ่มรากของผักสลัดลงในส่วนของเส้นใยของเชื้อ *P. myriotylum* ความเข้มข้น 10^4 propagules/ml ปริมาตร 10 ml และใช้ส่วนของเส้นใยที่เหลือเทผ่านรากพืชลงไปในสารละลายธาตุอาหาร ผลการประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคแสดงไว้ในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความรุนแรงของการเกิดโรครากเน่าในผักสลัดบัตเตอร์เฮด และเรดโอ๊ก ที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ แล้วทำการปลูกเชื้อ *P. myriotylum* (การปลูกครั้งที่ 1)

กรรมวิธี [1/]	บัตเตอร์เฮด[2/]				เรดโอ๊ก[2/]			
	3 DAI	5 DAI	7 DAI	เฉลี่ย	3 DAI	5 DAI	7 DAI	เฉลี่ย
SA 0.01	1.3	1.3	1.8	1.5	1.3	1.5	1.8	1.5
SA 0.1 mM	1.5	1.5	2.3	1.8	1.0	1.3	1.8	1.4
SA 1.0 mM	0.8	0.8	1.0	0.9	0.5*	0.0*	1.0	0.5
MeJA 0.01	0.8	0.8	1.3	1.0	1.0	0.3	1.0	0.8
MeJA 0.1	1.5	1.8*	1.5	1.0	1.0	0.8	1.0	0.8
MeJA 1.0	1.3	1.3	1.0	1.2	1.0	0.8	1.0	0.9
BABA 0.01	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8*	0.8	0.9
BABA 0.1	1.0	0.8	1.0	0.9	0.8	0.5	1.0	0.8
BABA 1.0	1.3	1.5	1.5	1.4	1.3	0.8	1.5	1.2
Ctrl (ปลูก	1.0	0.8	1.5	1.1	1.5	1.5	1.5	1.5
Ctrl (ไม่ปลูก	0.3	0.3	0.5	0.6	0.3	0.3	0.3	0.3

[1/] inducers ทุกตัวละลายใน 10% ethanol

[2/] ความรุนแรงของการเกิดโรครากเน่าประเมินเป็น 5 ระดับ (0-4) โดยที่ 0=พืชปกติรากมีสีขาว, 1= รากมีสีแดง, 2=รากมีสีแดง-เน่า, 3=รากเน่าทั้งหมด พืชหี่ยว, 4=พืชเหี่ยว-ตาย

* มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control (ปลูกเชื้อ) โดย Student' t

ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่ากลุ่มทดลองที่ทำการปลูกเชื้อและไม่ปลูกเชื้อมีความแตกต่างของความรุนแรงของโรคไม่มากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากเป็นช่วงฤดูหนาวซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของผักสลัด ทำให้พืชทดสอบดังกล่าวมีความต้านทานตามธรรมชาติต่อการเกิดโรครากเน่าได้มาก (ภาพที่ 4.5 และ 4.6) ประกอบกับเชื้อสาเหตุอาจมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคลดลง ทำให้การเปรียบเทียบผลของสารชักนำต่อความรุนแรงของการเกิดโรคเห็นผลได้ไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคที่ 3, 5 และ 7 วันหลังการปลูกเชื้อพบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยสารละลาย SA 1.0 mM และ สารละลาย BABA 0.1 mM จะมีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม โดยในสลัดบัตเตอร์เฮดที่พ่นด้วยสารละลาย SA 1.0 mM และสารละลาย BABA 0.1 mM จะมีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 0.9 ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 1.1 ในผักสลัดเรดโอ๊กผลก็เป็นไปในทำนองเดียวกันคือ การพ่นด้วยสารละลาย SA 1.0 mM และ สารละลาย BABA 0.1 mM จะมีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 0.5 และ 0.8 ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมจะมีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 1.5 (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.4 ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัดบัตเตอร์เฮด และเรดโอ๊กที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ แล้วทำการปลูกเชื้อ *P. myriotylum* (การปลูกครั้งที่ 1)

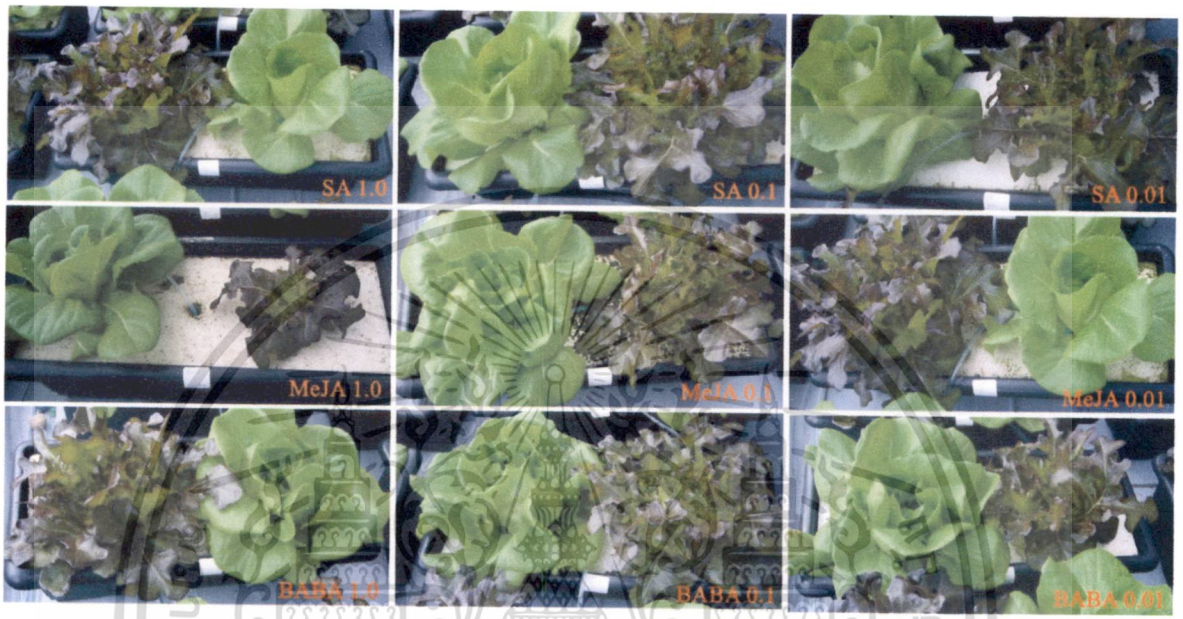
กรรมวิธี [1/]	บัตเตอร์เฮด				เรดโอ๊ก			
	นน. ลำต้น	นน. ราก	นน. รวม	ความยาว	นน. ลำต้น	นน. ราก	นน. รวม	ความยาว
SA 0.01	52.0	7.2	59.2	19.4	34.8	5.9	40.7	20.0
SA 0.1	54.3	8.3	62.5	24.0	30.0	5.5	35.5	19.3
SA 1.0	68.0	10.9	78.9	27.2	23.5	4.5	28.0	18.8
MeJA	55.8	6.7	62.5	21.4	49.8	8.4	58.2	22.7
MeJA 0.1	65.3	8.3	73.6	21.6	32.8	5.3	38.1	17.1
MeJA 1.0	56.0	6.4	62.4	23.7	25.0	4.6	29.6	17.0
BABA	65.8	8.5	74.2	27.7	41.3	6.6	47.9	21.9
BABA 0.1	65.3	8.8	74.0	25.4	40.0	6.8	46.8	18.8
BABA 1.0	71.8	9.0	80.7	26.7	44.6	7.3	51.9	19.3
Ctrl (ปลูก	78.3	9.2	87.4	24.5	40.0	7.1	47.1	16.9
Ctrl (ไม่	86.0	10.2	96.2	24.3	40.3	7.0	47.2	19.9

[1/] inducers ทุกตัวละลายใน 10% ethanol

เมื่อพิจารณาจากค่าการเจริญเติบโตในผักสลัดทั้งสองชนิด พบว่าการพ่นสารชักนำฯ ไม่มีผลทำให้ผักสลัดบัตเตอร์เฮดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมแต่อย่างไร แต่ในผักสลัดเรดโอ๊กนั้นพบว่าในบางกรรมวิธีมีการเจริญที่มากว่ากรรมวิธีควบคุม เช่นในกรรมวิธีที่พ่นด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MeJA 0.01 mM และ BABA 1.0 mM ซึ่งทำให้มีค่าน้ำหนักสดรวมทั้งลำต้นและรากสูงสุด เท่ากับ 58.2 และ 51.9 g ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมปลูกเชื้อมีน้ำหนักสดรวมเท่ากับ 47.1 g (ตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.5 ผลของการให้สารละลาย SA, MeJA หรือ BABA ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า (การปลูกครั้งที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.6 แสดงรากผักสลัดที่พ่นสารชักนำฯ ชนิดต่างๆ (การปลูกครั้งที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปลูกครั้งที่ 2

ทำการทดลองในช่วงเดือน พฤษภาคม – มิถุนายน 2551 ในผักลัด 2 ชนิดคือ ผักสลัดบัตเตอร์เฮต (*Lectuca sativa* var *capitana*) พันธุ์ Rex RZ® และผักสลัดเรดโครอล (*Lectuca sativa* var *crispa*) พันธุ์ Mondai RZ® โดยปลูกในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน แบบสารละลายธาตุอาหาร ที่มีการเป่าอากาศ (solution culture with air pump) จนพืชทดสอบมีอายุได้ 8 สัปดาห์จึงทำการพ่นสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ ได้แก่ SA, MeJA และ BABA ความเข้มข้น 0.01, 0.1 และ1.0 mM จำนวน 2 ครั้ง (แต่ละครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อ การปลูกเชื้อใช้ส่วนของเส้นใยของเชื้อ *P. aphanidermatum* ความเข้มข้น 10^4 propagules/ml จำนวน 10 ml/ต้น เทผ่านรากพืชลงไปในสารละลายธาตุอาหาร ผลการประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคแสดงไว้ในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ความรุนแรงของการเกิดโรครากเน่าในผักสลัดบัตเตอร์เฮต และเรดโครอล ที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆแล้วทำการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* (การปลูกครั้งที่ 2)

กรรมวิธี [1/]	บัตเตอร์เฮต [2/]			เรดโครอล [2/]		
	4 DAI	7 DAI	เฉลี่ย	4 DAI	7 DAI	เฉลี่ย
SA 0.01 mM	2.0	2.3	2.4	1.5	1.3	1.4
SA 0.1 mM	1.3	1.3	1.3	1.0	0.8	0.9
SA 1.0 mM	1.3	1.0	1.2	1.5	1.5	1.5
Ctrl (ethanol)	1.0	0.5	0.8	0.8	0.8	0.8
MeJA 0.01 mM	0.5	1.0	0.8	0.5	0.8	0.7
MeJA 0.1 mM	1.3	1.5	1.4	2.3	1.8	2.1
MeJA 1.0 mM	0.8	1.3	1.1	1.0	1.0	1.0
Ctrl (ethanol)	1.0	0.5	0.8	0.8	0.8	0.8
BABA 0.01 mM	0.5	1.3	0.9	0.8	1.3	1.1
BABA 0.1 mM	0.3	1.3	0.8	0.5	0.8	0.7
BABA 1.0 mM	0.0	0.5	0.3	0.3	1.0	0.7
Ctrl (water)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Ctrl (ไม่ปลูกเชื้อ)	0.00	0.00	0.0	0.00	0.25	0.1

[1/] inducers ทุกตัวละลายใน 10% ethanol ยกเว้น BABA ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

[2/] ความรุนแรงของการเกิดโรครากเน่าประเมินเป็น 5 ระดับ (0-4) โดยที่ 0=พืชปกติรากมีสีขาว, 1= รากมีสีแดง, 2=รากมีสีแดง-เน่า, 3=รากเน่าทั้งหมด พืชหี่ยว, 4=พืชเหี่ยว-ตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่ากลุ่มทดลองที่ทำการปลูกเชื้อ และไม่ปลูกเชื้อมีความแตกต่างของความรุนแรงของโรคไม่มากนัก เช่นเดียวกับในกาปลูกครั้งที่ 1 ทำให้การเปรียบเทียบผลของสารชักนำต่อความรุนแรงของการเกิดโรคเห็นผลได้ไม่ชัดเจน อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้มานี้พบว่า ในผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่พ่นด้วยสารละลาย BABA 1.0 mM จะมีความรุนแรงของการเกิดโรคน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุม คือมีความรุนแรงของการเกิดโรคที่ 7 วันหลังการปลูกเชื้อเท่ากับ 0.5 และมีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคที่ 4 และ 7 วันหลังการปลูกเชื้อเท่ากับ 0.3 ขณะที่กรรมวิธีควบคุมมีค่าความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 1.0 ส่วนในกรณีของผักสลัดเรดโครอลพบว่ากรรมวิธีที่มีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมได้แก่ กรรมวิธีที่พ่นด้วยสาระลาย MeJA 0.01 mM, BABA 0.1 mM และ BABA 1.0 mM โดยมีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคเท่ากับ 0.7 (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.6 ค่าการเจริญเติบโตของผักสลัดบัตเตอร์เฮด และเรดโครอลที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ แล้วทำการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* (การปลูกครั้งที่ 2)

กรรมวิธี [1/]	บัตเตอร์เฮด				เรดโครอล			
	นน.	นน	นน.	ควา	นน	นน	นน	ควา
SA	85.3	11.	96.2	30.3	48.	10.	58.	39.5
SA 0.1	75.2	14.	89.3	41.8	52.	12.	64.	35.6
SA 1.0	111.	10.	122.	58.0	37.	7.9	45.	38.4
Ctrl	107.	12.	119.	59.4	58.	10.	69.	47.8
MeJA	136.	16.	152.	56.0	63.	14.	77.	52.4
MeJA	133.	18.	152.	48.6	25.	6.1	31.	26.5
MeJA	115.	16.	132.	43.8	51.	12.	64.	41.0
Ctrl	107.	12.	119.	59.4	58.	10.	69.	47.8
BABA	128.	13.	142.	45.8	65.	15.	80.	33.3
BABA	133.	15.	148.	47.8	77.	17.	94.	44.1
BABA	146.	16.	162.	49.8	62.	13.	76.	45.6
Ctrl	119.	12.	131.	52.0	63.	12.	75.	50.9
Ctrl (ไม่	116.	12.	128.	69.3	40.	6.3	46.	50.0

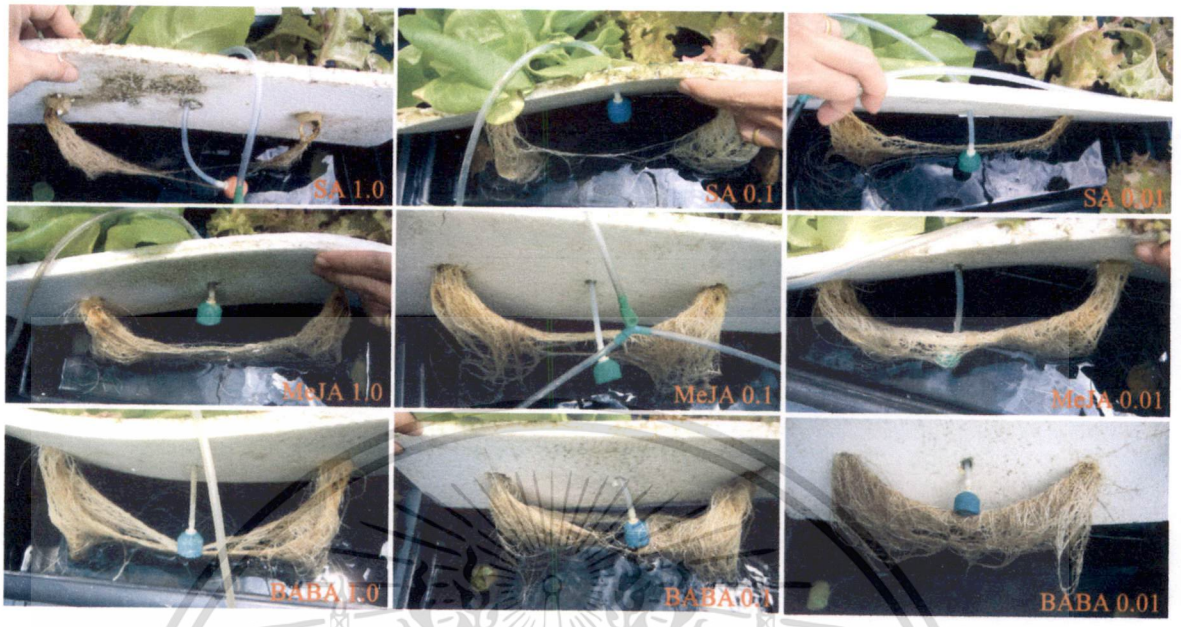
[1/] inducers ทุกตัวละลายใน 10% ethanol ยกเว้น BABA ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาจากค่าการเจริญเติบโตของพืชทดสอบที่พ่นด้วยสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ พบว่าผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่พ่นด้วยสารละลาย MeJA 0.01, MeJA 0.1, BABA 0.01, BABA 0.1 และ BABA 1.0 mM ให้ค่าการเจริญเติบโตที่ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดลำต้นเท่ากับ 136.0, 133.8, 128.9, 133.0 และ 146.0 g ตามลำดับในขณะที่กรรมวิธีควบคุม ไม่ปลูกเชื้อค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดต่อต้นเท่ากับ 116.8 g ในกรณีของสลัดเรดโครอลพบว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยสารละลาย BABA 0.1 mM จะมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดต่อต้นดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 77.5 g (ตารางที่ 4.6)

ภาพที่ 4.7 ผลของการให้สารละลาย SA, MeJA หรือ BABA ทางใบแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า (การปลูกครั้งที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 แสดงรากผักสลัดที่พ่นสารชักนำฯ ชนิดต่างๆ (การปลูกครั้งที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทดสอบผลของการให้ salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β - aminobutyric acid (BABA) ในสารละลายธุอาหารต่อพืชทดสอบ

เนื่องจากสารชักนำบางตัวได้แก่ SA และ MeJA ต้องเตรียมเป็น stock solution ใน 10% ethanol และเมื่อเติมสารดังกล่าวลงในสารละลายธาตุอาหาร อาจส่งผลกระทบต่อพืชทดสอบได้ ดังนั้นจึงได้ ทำการทดสอบเบื้องต้นถึงผลของการให้ SA, MeJA หรือ BABA ลงในสารละลายธาตุอาหารที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1 mM ต่อพืชทดสอบสองชนิดคือ ผักสลัดบัตเตอร์เฮดและเรดโครอลที่อายุ 4 สัปดาห์ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลของการให้ SA, MeJA และ BABA ในสารละลายธุอาหารต่อพืชทดสอบ

สารทดสอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย (mM)		
	0.001	0.01	0.1
SA in 10% ethanol	+	±	-
MeJA in 10% ethanol	+	±	-
BABA in water	+	+	+
10% ethanol	ปริมาตร (ml)[1/]		
	0.5 ml	5 ml	50 ml
	±	±	-

+ ไม่มีผลกระทบต่อพืช ± มีผลกระทบต่อพืชเล็กน้อย - มีผลกระทบต่อพืชอย่างรุนแรง

[1/] ปริมาตรที่เติมลงในสารละลายธาตุอาหารเทียบเท่ากับที่ใช้ในการละลาย SA หรือ MeJA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ผลการทดลองพบว่าการเติม BABA ลงในสารละลายธาตุอาหารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.001, 0.01 และ0.1mM ไม่มีผลกระทบต่อพืชทดสอบ แต่การเติม SA และ MeJA ลงในสารละลายจนมีความเข้มข้นดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อพืชได้เนื่องจาก ethanol (ตารางที่ 4.7) ดังนั้นในการทดสอบผลของการให้สารชักนำทางสารละลายธาตุอาหารจะทำการทดลองเฉพาะสารละลาย BABA เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลของการให้สารละลาย β - aminobutyric acid (BABA) ทางรากแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรคใบจุด

ทำการทดสอบในช่วงเดือน ธันวาคม 2551-มกราคม 2552 ในสลัดบัตเตอร์เฮต และเรดโครอล อายุประมาณ 5 สัปดาห์ โดยการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารสูตรปกติ เป็นสารละลายธาตุอาหารที่มี BABA อัตราความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 mM จากนั้น 3 วันจึงปลูกเชื้อ *Cercospora* sp. สาเหตุโรคใบจุดของผักสลัด. ตามกรรมวิธีที่ได้รายงานไว้ในผลการดำเนินงานข้อ 2 ประเมินอัตราการเกิดโรค และความรุนแรงหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงเก็บเกี่ยวผลผลิตเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ได้ผลการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.8-4.11

ตารางที่ 4.8 การเกิดโรคใบจุดในผักสลัดบัตเตอร์เฮต[1/] ที่ได้รับ BABA ความเข้มข้นต่างๆ ทางสารละลายธาตุอาหาร

ความเข้มข้นของ BABA (mM)	อัตราการเกิดโรค (Disease incidence)		ความรุนแรง (Disease severity %)[3/]	
	7 วันหลังปลูกเชื้อ	16 วันหลังปลูกเชื้อ	7 วันหลังปลูกเชื้อ	16 วันหลังปลูกเชื้อ
0 (control)	35.6	56.7	9.5	40.2
0.001	25.0	59.6	6.8	33.9
0.01	44.4	54.9	11.8	36.6
0.1	38.7	55.9	9.7	39.2
1	33.7	53.2	8.4	36.1

[1/] ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 6 ซ้ำ

[2/] อัตราการเกิดโรคคำนวนจากร้อยละของ จำนวนใบที่แสดงอาการใบจุด ต่อจำนวนใบทั้งหมดของในแต่ละต้น

[3/] ความรุนแรงคำนวนจาก $\sum \frac{(\text{ค่าดัชนีการเกิดโรคของแต่ละใบ [0-4] x จำนวนใบที่เป็นโรค})}{\text{จำนวนใบทั้งหมด}} \times 25$

โดยที่ 0=ไม่มีจุด, 1=มีจุดน้อยกว่า 25%, 2=มีจุดประมาณ 25-50%, 3=มีจุดประมาณ 50-70%, 4=มีจุดมากกว่า 75%

* แตกต่างทางสถิติกับ control โดย Studen's T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ผลผลิตของผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่ได้รับ BABA ความเข้มข้นต่างๆ ทางสารละลายธาตุอาหาร และทำการปลูกเชื้อ *Cercospora* sp.

ความเข้มข้นของ BABA (mM)	ผลผลิตต่อต้น (g)			
	นน. สดลำต้น	นน. ส่วนดี	นน. ส่วนเสีย	% ส่วนเสีย
0 (control)	56.7	21.2	35.5	36.0
0.001	54.5	15.6	38.9	28.6
0.01	47.6	14.6	33.0	29.7
0.1	46.7	19.3	27.5	43.6
1	40.3	17.1	23.2	45.7

* แตกต่างทางสถิติกับ control โดย Studen's T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดสอบในสลัดบัตเตอร์เฮดที่ได้รับ BABA ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลายธาตุอาหาร พบว่าอัตราการเกิดโรค และความรุนแรงของโรคไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับการทดลองชุดควบคุม แต่มีแนวโน้มว่าจะมีความรุนแรงของโรคต่ำกว่า (ตารางที่ 4.8) ในด้านของผลผลิตก็พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน สำหรับความเสียหายโดยรวมจากการปลูกเชื้อ *Cercospora* คิดจากร้อยละของส่วนที่เสียหายเทียบกับส่วนดีพบว่าอยู่ในช่วง 29-46% อย่างไรก็ตามพบว่ากรรมวิธีที่มีเปอร์เซ็นต์เสียหายค่อนข้างน้อยในการทดลองนี้ได้แก่ กรรมวิธีที่ได้รับ BABA 0.001 และ 0.01 mM โดยมีเปอร์เซ็นต์เสียหายเท่ากับ 28.6 และ 29.7% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 การเกิดโรคใบจุดในผักสลัดเรดโครอลที่ได้รับ BABA ความเข้มข้นต่าง ทางสารละลายธาตุอาหาร

ความเข้มข้นของ BABA (mM)	อัตราการเกิดโรค (Disease incidence)		ความรุนแรง (Disease severity %)[3/]	
	7 วันหลังปลูกเชื้อ	16 วันหลังปลูกเชื้อ	7 วันหลังปลูกเชื้อ	16 วันหลังปลูกเชื้อ
0 (control)	11.8	44.3	2.9	24.5
0.001	15.8	55.4	3.9	36.8
0.01	16.5	55.4	4.1	33.8
0.1	17.3	54.8	5.4	25.8
1	14.4	51.1	3.6	26.9

[1/] ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 3 ซ้ำ

[2/] อัตราการเกิดโรคคำนวนจากร้อยละของ จำนวนใบที่แสดงอาการใบจุด ต่อจำนวนใบทั้งหมดของในแต่ละต้น

[3/] ความรุนแรงคำนวนจาก $\sum \frac{(\text{ค่าดัชนีการเกิดโรคของแต่ละใบ [0-4] x จำนวนใบที่เป็นโรค)}}{\text{จำนวนใบทั้งหมด}} \times 25$

โดยที่ 0=ไม่มีจุด, 1=มีจุดน้อยกว่า 25%,2=มีจุดประมาณ 25-50%, 3=มีจุดประมาณ 50-70%, 4=มีจุดมากกว่า 75%

* แตกต่างทางสถิติกับ control โดย Student's T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4.11 ผลผลิตของผักสลัดเรดโครอล ที่ได้รับ BABA ความเข้มข้นต่างทางสารละลายธาตุอาหาร และทำการปลูกเชื้อ *Cercospora* sp.

ความเข้มข้นของ BABA (mM)	ผลผลิตต่อต้น (g)			
	นน. สดลำต้น	นน. ส่วนดี	นน. ส่วนเสีย	% ส่วนเสีย
0 (control)	56.7	10.8	18.7	37.6
0.001	23.4	8.2	15.2	34.5
0.01	28.7	10.9	17.9	39.6
0.1	37.6	11.3	26.3	37.6
1	22.4	8.6	13.8	44.1

* แตกต่างทางสถิติกับ control โดย Student's T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกรณีของผักสลัดเรดโครอล ผลก็เป็นไปในทำนองเดียวกันกับผักสลัดบัตเตอร์เฮด กล่าวคือ อัตราการเกิดโรค ความรุนแรงของโรค และผลผลิต ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับกรรมวิธีทดลองควบคุม

4.7 ผลของการให้สารละลาย β - aminobutyric acid (BABA) ทางรากแก่ผักสลัด ในการชักนำให้ต้านทานต่อโรครากเน่า

ทำการทดสอบในกล้าผักสลัดพันธุ์บัตเตอร์เฮดและเรดโครอลอายุ 2 สัปดาห์ โดยให้พืชทดสอบได้รับสารละลายที่มีส่วนผสมของ BABA ในอัตรา 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 mM เป็นเวลา 6 วันก่อนการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. จากนั้นประเมินความรุนแรงของโรคของแต่ละกรรมวิธี เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วชั่งน้ำหนักสดเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (พืชที่ไม่ได้รับ BABA) ได้ผลการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.12 และ 4.13

ตารางที่ 4.12 ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคและน้ำหนักสดของกล้าผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่ได้รับ BABA ในอัตราต่างๆ ก่อนการปลูกเชื้อ *Pythium* sp.

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค (%)			ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด/ต้น[1/] (g)
	3 DAI	5 DAI	7 DAI	
BABA 0.001mM	64	80	80	0.43
BABA 0.01 mM	60	68	80	0.67
BABA 0.1 mM	72	76	76	0.40
BABA 1.0 mM	52	68	72	0.48
Control (inoculation)	84	92	92	0.47
Control (Healthy)	0	0	0	0.91

[1/] ค่าเฉลี่ยจากจำนวนต้นที่เหลืออยู่ในแต่ละกรรมวิธี

[2/] ความรุนแรงคำนวนจาก Σ (ระดับการเกิดโรคของแต่ละต้น [0-5] x จำนวนต้นที่เป็นโรค) x 20 / จำนวนต้นทั้งหมด

โดยที่ระดับการเกิดโรค 0=พืชปกติรากขาว, 1=รากแดง, 2=รากเน่า, 3=รากเน่าใบเหี่ยว, 4=พืชเหี่ยวถาวร, 5=พืชตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบในกล้าผักสลัดบัตเตอร์เฮดที่ได้รับ BABA ทางสารละลายธาตุอาหารในอัตราต่างๆ ก่อนการปลูกเชื้อ *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่าพบว่าการให้ BABA ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.001-1.0 mM มีแนวโน้มที่จะทนทานต่อการเกิดโรคได้ในระดับหนึ่ง โดยมีความรุนแรงของการเกิดโรคในวันที่ 3, 5 และ 7 หลังการปลูกเชื้อต่ำกว่ากรรมวิธีควบคุม ที่ทำการปลูกเชื้อ (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.13 ค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรค และน้ำหนักสดของกล้าผักสลัดเรดโครอลที่ได้รับ BABA ในอัตราต่างๆ ก่อนการปลูกเชื้อ *Pythium* sp.

กรรมวิธี	ความรุนแรงของโรค (%)			ค่าเฉลี่ยน้ำหนักสด/ต้น [1/] (g)
	3 DAI	5 DAI	7 DAI	
BABA 0.001mM	80	88	88	0.38
BABA 0.01 mM	80	84	84	0.39
BABA 0.1 mM	64	76	76	0.34
BABA 1.0 mM	68	72	84	0.52
Control (inoculation)	68	76	80	0.39
Control (Healthy)	0	0	0	0.65

[1/] ค่าเฉลี่ยจากจำนวนต้นที่เหลืออยู่ในแต่ละกรรมวิธี

[2/] ความรุนแรงคำนวนจาก $\sum \frac{\text{(ระดับการเกิดโรคของแต่ละต้น [0-5] x จำนวนต้นที่เป็นโรค)}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 20$

โดยที่ระดับการเกิดโรค 0=พืชปกติรากขาว, 1=รากแดง, 2=รากเน่า, 3=รากเน่าใบเหี่ยว, 4=พืชเหี่ยวถาวร, 5=พืชตาย

ส่วนการทดสอบในผักสลัดเรดโอ๊กนั้นเห็นผลได้ไม่ชัดเจน โดยทุกกรรมวิธีที่ทำการปลูกเชื้อจะมีความรุนแรงของการเกิดโรคในระดับที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ผลของสารละลาย salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β - aminobutyric acid (BABA) ต่อเชื้อสาเหตุโรค

ผลต่อเชื้อ* Cercospora sp. *สาเหตุโรคใบจุด

ทำการทดสอบในอาหาร v8® agar ที่มีส่วนผสมของสารชักนำฯ ชนิดต่างๆ ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.001-10.0 mM วัดผลโดยเปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งได้แก่ น้ำ หรือ เอทานอลตามความเข้มข้นและปริมาตรเท่าที่ใช้เป็นตัวทำละลายของสารชักนำแต่ละชนิด ผลการทดสอบได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 การเจริญของเชื้อ *Cercospora* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ

กรรมวิธี [1/]	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (mm) ของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อายุต่างๆ				
	7 วัน	10 วัน	14 วัน	20 วัน	30 วัน
SA 10.0	17.3	14.5*	18.9*	30.8*	58.0
SA 1.0	18.7	24.1	34.5	47.7	66.0
SA 0.1	19.2	27.4	37.8	52.1	66.4
SA 0.01	18.3	25.8	36.9	52.3	66.1
SA 0.001	18.8	32.7	37.7	49.7	65.5
Ctrl	15.5	23.1	33.1	47.6	66.0
MeJA	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*
MeJA 1.0	16.3	24.2	33.0	43.9*	62.4*
MeJA 0.1	15.5	22.5	31.8	43.8*	66.0
MeJA	15.9	24.3	32.6	45.0	64.1
MeJA	16.4*	23.9	33.7	45.3	65.0
Ctrl	15.5	23.1	33.1	47.6	66.0
BABA	11.0*	15.2*	21.7*	31.6*	50.5*
BABA 1.0	14.0	20.7*	32.2	44.1*	62.6
BABA 0.1	16.1	23.1	30.6*	46.5	66.5
BaBa	15.5	23.0	32.7	46.5	63.7
BABA	17.0*	24.9	34.9	49.5	70.0
Ctrl	14.8	23.1	34.2	47.9	66.1

[1/] inducers ทุกตัวละลายใน 10% ethanol ยกเว้น BABA ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
* มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control ของแต่กลุ่มทดลอง

จากตารางที่ 4.14 พบว่าสารชักนำชักนำที่นำมาทดลองจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Cercospora* sp. ก็ต่อเมื่อใช้ในอัตราความเข้มข้นที่สูง ในกรณีของ SA พบว่าที่ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 mM นั้นไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Cercospora* sp. แต่อย่างไร แต่การเจริญจะลดลงเมื่อมีส่วนผสมของ SA ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 mM ในกรณีของ MeJA และ BABA นั้นพบว่าความเข้มข้น 0.001, 0.01 และ 0.1 mM ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Cercospora* sp. แต่อย่างไร แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของเชื้อจะเริ่มลดลงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0 mM เป็นต้นไป โดยเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของ MeJA 10 mM นั้นเชื้อดังกล่าวไม่สามรถเจริญได้เลย อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นที่ต่ำๆ เช่นที่ 0.001mM นั้น MeJA อาจมีผลในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อ

ผลต่อเชื้อ* P. aphanidermatum *สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่า

ตารางที่ 4.15 การเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ

กรรมวิธี [1/]	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (mm) ของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่			
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
SA 10.0	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*
SA 1.0	12.3*	32.3*	60.6*	74.9*
SA 0.1	34.9	72.8*	90.0	90.0
SA 0.01	38.7	74.7*	90.0	90.0
SA 0.001	36.0	71.3*	90.0	90.0
Ctrl (ethanol)	38.0	58.8	90.0	90.0
MeJA 10.0	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*
MeJA 1.0	4.1*	12.0*	33.2*	45.0*
MeJA 0.1	30.2*	64.9*	90.0	90.0
MeJA 0.01	35.8	70.1*	90.0	90.0
MeJA 0.001	33.4	71.4*	90.0	90.0
Ctrl (ethanol)	38.0	58.8	90.0	90.0
BABA 10.0	32.1*	66.5*	90.0	90.0
BABA 1.0	37.0*	75.3	90.0	90.0
BABA 0.1	34.8*	75.7	90.0	90.0
BaBa 0.01	32.6*	72.4	90.0	90.0
BABA 0.001	37.5*	77.1	90.0	90.0
Ctrl (water)	44.6	78.3	90.0	90.0

[1/] inducers ทุกตัวละลายใน 10% ethanol ยกเว้น BABA ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
* มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control ของแต่กลุ่มทดลอง

การทดสอบผลของสารชักนำฯ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* พบว่าสารชักนำฯ ทั้งสามชนิดจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อดังกล่าวในความเข้มข้นที่สูง กล่าวคือในกรณีของ SA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ MeJA จะทำให้การเจริญของเชื้อ *P. aphanidermatum* ลดลงเมื่อมีส่วนผสมดั่งกล่าวอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 1.0-10.0 mM โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีวัดที่ 36 และ 48 ชั่วโมงน้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในกรณีของ BABA พบว่ามีผลกระทบน้อยกว่า SA และ MeJA โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 10 mM ขึ้นไปถึงจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อดังจะเห็นได้จากที่อายุเชื้อ 36 ชั่งโมงจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี น้อยกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.15)

ผลต่อเชื้อ* P. myriotylum *สาเหตุโรครากเน่า

ตารางที่ 4.16 การเจริญของเชื้อ *P. myriotylum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารชักนำความต้านทานชนิดต่างๆ

กรรมวิธี [1/]	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (mm) ของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่			
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
SA 10.0	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*
SA 1.0	4.8*	15.9*	36.4*	43.2*
SA 0.1	26.5	49.4	90.0*	90.0*
SA 0.01	20.5	45.4	87.7*	90.0*
SA 0.001	30.9	47.1	89.1*	90.0*
Ctrl (ethanol)	27.8	45.0	69.6	77.9
MeJA 10.0	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*
MeJA 1.0	2.2*	5.4*	25.3*	33.0*
MeJA 0.1	24.0	45.1	74.8	90.0*
MeJA 0.01	29.0	57.2*	89.1*	90.0*
MeJA 0.001	27.1	55.2*	90.0*	90.0*
Ctrl (ethanol)	27.8	45.0	69.6	77.9
BABA 10.0	24.7*	48.4	84.1	87.5
BABA 1.0	25.4*	57.3	90.0	90.0
BABA 0.1	20.1*	50.4	84.0	90.0
BaBa 0.01	31.6	53.0	90.0	90.0
BABA 0.001	30.0	54.2	90.0	90.0
Ctrl (water)	35.3	56.8	82.1	89.0

[1/] inducers ทุกตัวละลายใน 10% ethanol ยกเว้น BABA ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

* มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ control ของแต่กลุ่มทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบผลของสารชักนำฯ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *P. myriotylum* พบว่าผลเป็นไปในทำนองเดียวกันกับกรณีของ *P. aphanidermatum* นั่นคือการเจริญของเชื้อจะลดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารชักนำฯ ในอัตราความเข้มข้นที่สูง ในกรณีของ SA และ MeJA จะมีผลทำให้การเจริญของเชื้อลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่อัตราความเข้มข้น 1.0-10.0 mM ส่วน BABA จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อที่อัตราความเข้มข้น 10.0 mM แต่จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อในระยะแรก (อายุ 24 ชั่วโมง) เท่านั้น (ตาราง ที่ 4.16)

4.9 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora* sp.

เนื่องจากผลการดำเนินงานในตอนที่ 1 พบว่าการสเปรย์ด้วยสาร SA, BABA หรือ MeJA ให้ผลในการชักนำความต้านทานน้อย จึงไม่ได้นำผลการทดลองไปศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค

4.10 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Pythium* sp.

นำผลการทดสอบการเติมสารกับรากผักสลัดและการพ่นทางใบทั้ง 2 ครั้งมาวิเคราะห์ เพื่อคัดเลือกชนิดของสาร และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีผลทำให้ผักสลัดมีอัตราการเกิดโรคลดลง หรือมีผลการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว โดยสารที่คัดเลือกมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคประกอบด้วย SA ความเข้มข้น 1 และ 10 mM BABA ความเข้มข้น 1 และ 10 mM และ MeJA ความเข้มข้น 0.001 mM สำหรับการทดลองพ่นสารทางใบ และคัดเลือก BABA ที่ความเข้มข้น 0.1 mM สำหรับการทดลองเติมสารให้กับผักสลัดทางราก

สำหรับการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของยีน ได้เลือกใช้ยีน 18S rRNA ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกตลอดเวลาหรือ housekeeping gene ในการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบให้เท่ากันก่อนเริ่มเปรียบเทียบการแสดงออกของแต่ละยีนด้วยกระบวนการพีซีอาร์ (semi-quantitative PCR)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคที่คัดเลือกมาศึกษามีทั้งหมด 9 ยีน ซึ่งรายชื่อยีนความสำคัญของแต่ละยีนรวมทั้งการอ้างอิงแสดงในตารางที่ 4.17 สำหรับยีนในลำดับที่ 1 และ 2 ได้ทำการออกแบบไพร์เมอร์จากบริเวณอนุรักษ์ของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับยีนเดียวกันจากพืชในกลุ่มต่างๆ เท่าที่มีปรากฏใน GenBank (ตารางที่ 4.18)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคที่คัดเลือกมาใช้วิเคราะห์ผลการชักนำความต้านทาน

No.	Gene Name	Gene function	Reference
1	Enhanced disease succeptibility5 (EDS5L)	Homology to protein transporter importance in SA biosynthesis pathway (Arabidopsis), SA inducible	GenBank: AAL27003.1
2	Disease resistance gene (DIR)	Homology to disease resistance response protein in Arabidopsis and grapevine	GenBank: BAB03020.1
3	Pathogenesis-related protein (PR1)	Involved in plant defense, SA inducible	Klerks et al., 2007
4	LTC1	Lettuce sesquiterpene synthase	Bennette et al., 2002
5	LTC2	Lettuce sesquiterpene synthase	Bennette et al., 2002
6	PcRG1-5-5	Spliceosomal protein, SA or MeJA inducible	Kiba et al., 2008
7	PcRG1-6-2	Similar to ACC oxidase, SA or MeJA inducible	Kiba et al., 2008
8	PcRG4-D-5	Similar to protein kinase, SA or MeJA inducible	Kiba et al., 2008
9	PcRG7-5	Similar to alternative oxidase, MeJA inducible	Kiba et al., 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของข้อมูลยีน EDS5L และ DIR เท่าที่ปรากฏบน GenBank

Gene name	Direction	Sequence (5'-> 3')
EDS5L	Forward	ACAAGGTTCCGTGGAGAATG
	Reverse	CATAAATCCGGCAACAACCT
DIR	Forward	CGCTAGACGCATAGGTTTCC
	Reverse	CTCACCTCCTTCCATCATCG

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในผักสลัดภายหลังการเหนี่ยวนำด้วย SA, BABA หรือ MeJA พบว่า จากที่ทำการศึกษาทั้งหมด 9 ยีน มีเพียง 5 ยีน คือ DIR, EDS5L, LTC1, LTC2, และ PR1 ที่มีการตอบสนองต่อการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* หรือต่อการสเปรย์ด้วยสาร SA, BABA หรือ MeJA (ภาพที่ 4.9 และ 4.10) ในขณะที่ยีน PcRG1-5-5, PcRG1-6-2, PcRG4-D-5 และ PcRG7-5 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ยีน PR1 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานที่มีการรายงานในพืชหลายชนิด (Ref) การแสดงออกของยีน PR1 มีลักษณะเฉพาะคือ สามารถถูกกระตุ้นโดย SA ไม่ว่าสาร SA นั้นจะถูกสร้างขึ้นโดยพืช หรือโดยวิธีเติมให้กับพืช สำหรับในพืชตระกูลผักสลัด Klerks et al (2007) รายงานผลการศึกษาการความสัมพันธ์ระหว่างผักสลัด *L. sativa* cv. *tamburo* (mini-Roman lettuce) กับแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Dublin พบว่า ภายหลังจากผักสลัดที่มีอายุ 3 สัปดาห์ได้รับแบคทีเรียดังกล่าว ผักสลัดจะมีการตอบสนองโดยการสังเคราะห์ยีน PR1 ซึ่งสามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR เมื่อใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีน PR1 รายงานวิจัยนี้จึงทำการตรวจหาการแสดงออกของยีน PR1 ภายหลังการสเปรย์ผักสลัดด้วย SA ซึ่งผลการทดลองพบว่ายีน PR1 มีการสังเคราะห์ตลอดเวลาในผักสลัด ทั้งในกรณีสเปรย์และในการทดลองควบคุมที่ไม่มีการสเปรย์สาร SA (ภาพที่ 4.9 และ 4.10) อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้พบว่าการสเปรย์สาร BABA และ MeJA สามารถกระตุ้นให้ผักสลัดมีการสังเคราะห์ยีน PR1 ได้เช่นกัน

ยีน LTC1 และยีน LTC2 เป็นยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์สาร sesquiterpenoid lactones (SLs) ในผักสลัด สาร SLs เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของ lactucin ที่มีลักษณะคล้ายยาง และยังมีบทบาทกระตุ้นการสังเคราะห์ phytoalexin และ lettucenin A ในผักสลัดด้วย Bennett et al (2002) พบว่ายีน LTC1 และ LTC2 มีการแสดงออกตลอดเวลาในราก ลำต้นเหนือราก และใบจริงของผักสลัด ในขณะที่การแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดนี้ที่ใบเลี้ยงจะเกิดขึ้นเมื่อทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคราน้ำค้างคือ *Bremia lactuca* ให้กับต้นกล้าผักสลัดเท่านั้น งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน LTC1 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LTC2 ในใบผักสลัดพันธุ์ Butter Head ซึ่งผลการทดลองพบว่ายีน LTC1 และยีน LTC2 มีการแสดงออกอย่างจำเพาะในการทดลองสเปรย์สาร SA, BABA หรือ MeJA ภายหลังการสเปรย์สาร SA พบว่า LTC1 มีการแสดงออกภายหลังการสเปรย์ด้วย SA 1mM และพบปริมาณการแสดงออกเพิ่มขึ้นภายหลังการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* แล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการทดลองสเปรย์สาร BABA พบว่าสาร BABA 1mM สามารถชักนำการแสดงออกของยีน LTC1 ได้เช่นกัน แต่การแสดงออกของยีน LTC1 ลดลงเมื่อปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.9) และพบว่ายีน LTC1 มีการแสดงออกในทุกการทดลองสปรย์สาร MeJA 0.001 mM แต่มีแนวโน้มลดลงภายหลังการสเปรย์ BABA เมื่อติดตามการแสดงออกของยีนที่ 24 ชั่วโมง และยังพบว่ายีน LTC1 ตอบสนองต่อเชื้อ *P. aphanidermatum* ซึ่งการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยภายหลังปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของยีน LTC1 ยังสามารถตรวจพบในการทดลองควบคุม (ภาพที่ 4.10) หรือในผักสลัดปกติ จึงอาจเป็นไปได้ว่ายีน LTC1 มีการแสดงออกตลอดเวลาในใบผักสลัด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bennett et al (2002)

ในการทดลองนี้ พบการแสดงออกของยีน LTC2 ตอบสนองต่อการปลูกเชื้อ เชื้อ *P. aphanidermatum* และต่อการสเปรย์ด้วย SA 1mM และ 10mM โดยผักสลัดที่สเปรย์ SA 1mM ผ่านไป 24 ชั่วโมงมีการสังเคราะห์ยีน LTC2 แต่ในระดับที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองสเปรย์ SA 1mM แล้วตามด้วยการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และยังพบการแสดงออกของยีนนี้ภายหลังการสเปรย์ด้วย SA 10mM และปลูกเชื้อเชื้อ *P. aphanidermatum* เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเช่นกัน การชักนำด้วยสาร BABA 1mM และ MeJA 0.001mM สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน LTC2 ได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.9 และ 4.10) ดังนั้น การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการสเปรย์สาร และการปลูกเชื้อ เชื้อ *P. aphanidermatum* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน LTC1 และ LTC2 และยีนทั้งสองนี้อาจมีบทบาทในการส่งเสริมให้ผักสลัดมีความทนทานโดยการสังเคราะห์สาร SLs

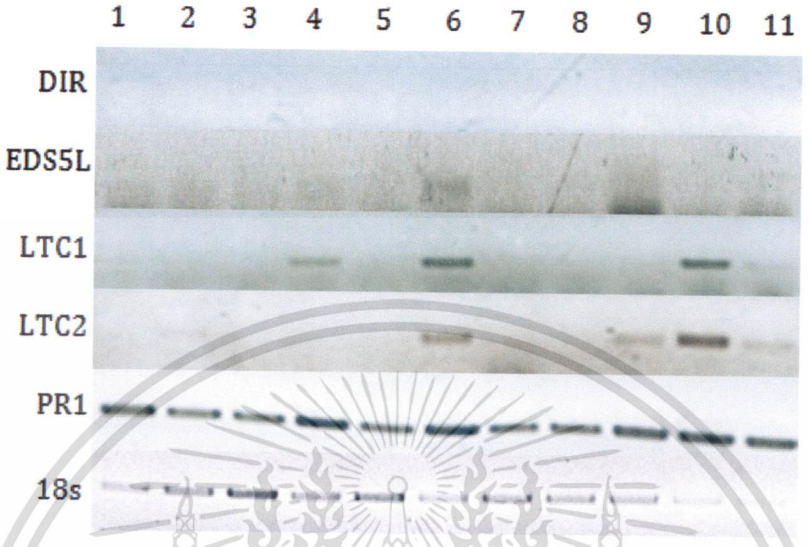
ยีน EDS5L เป็นยีนที่มีความคล้ายกับยีน EDS5 หรือ sid1 ของอะราบิดอปสิส ยีน EDS5 มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ PR1 ภายหลังจากพืชได้รับการกระตุ้นโดยการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคบางชนิด เช่น *Pseudomonas syringae* การฉีดพ่นสาร SA หรือเมื่อพืชได้รับสภาพเครียด ในต้นอะราบิดอปสิสที่ยีน EDS5 ถูกทำให้กลายพันธุ์ (*eds5*) จะส่งผลให้พืชต้นดังกล่าวไม่มีการสังเคราะห์ PR1 และแสดงอาการอ่อนแอต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* (Nawrath et al, 1999; Nawrath et at, 2002) งานวิจัยนี้ได้ออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่มีความคล้ายคลึงกับยีน EDS5 ของอะราบิดอปสิส คือ EDS5L (EDS5 in Lettuce) ยีน EDS5L บางส่วนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 300 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับธนาคารยีน (GenBank) พบว่า ยีนบางส่วนของ EDS5L ที่สังเคราะห์ได้มีความเหมือนกับยีน EDS5 และยีนที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม multidrug and toxic compound extrusion family (MATE family) ของพืชหลายชนิด เช่น องุ่น พืชตระกูลถั่ว ธัญพืช รวมทั้งอะราบิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อปสิส (ตารางที่ 4.19 และภาพที่ 4.11) เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน EDS5L ในผักสลัดภายหลังสเปรย์สาร SA, BABA หรือ MeJA และภายหลังปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* พบว่ายีน EDS5L มีการแสดงออกที่ตอบสนองต่อการสเปรย์ด้วยสาร SA 1mM และการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ภายหลังสเปรย์สาร MeJA หรือ BABA อย่างไรก็ตาม การปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เพียงอย่างเดียวให้กับผักสลัดสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน EDS5L ได้เช่นกัน (ภาพที่ 4.9 และ 4.10) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nawrath et al (1999) และ Nawrath et al (2002)

ยีน DIR (disease induced resistance) เป็นยีนที่มีการรายงานในพืชอะราบิดอปสิสและองุ่นว่ามีความคล้ายกับโปรตีนในกลุ่มต้านทานโรคพืช ที่พืชมีการแสดงออกเมื่อมีการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคเพื่อป้องกันตัวเองจากการถูกทำลายโดยเชื้อสาเหตุโรคโดยพบว่าโปรตีนที่สังเคราะห์โดยยีนนี้มีลักษณะคล้ายโปรตีนในกลุ่ม Disease resistance-responsive (Dirigent-like protein) family protein ซึ่งมีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์ลิกนิน (lignifications) ของพืช โดยผลการศึกษายีน Dirigent-like protein ในฝ้ายพบว่ายีนนี้แสดงออกเมื่อฝ้ายถูกเข้าทำลายโดยเชื้อรา *Verticillium dahlia* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเหี่ยว (Verticillium wilt) ในฝ้าย (Zhu et al, 2007) โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการติดตามการแสดงออกของยีน DIR ภายหลังการสเปรย์สาร SA, BABA และ MeJA และภายหลังการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* ผลการทดลองพบว่ายีน DIR ได้รับการกระตุ้นในผักสลัดทุกชุดการทดลองทั้งที่มีการสเปรย์สารเพียงอย่างเดียว การปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เพียงอย่างเดียว การสเปรย์สารร่วมกับการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* และในการทดลองชุดควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าการแสดงออกของยีน DIR ยังมีความผันแปรกับสภาพแวดล้อมในการทดลอง (ภาพที่ 4.9 และ 4.10)

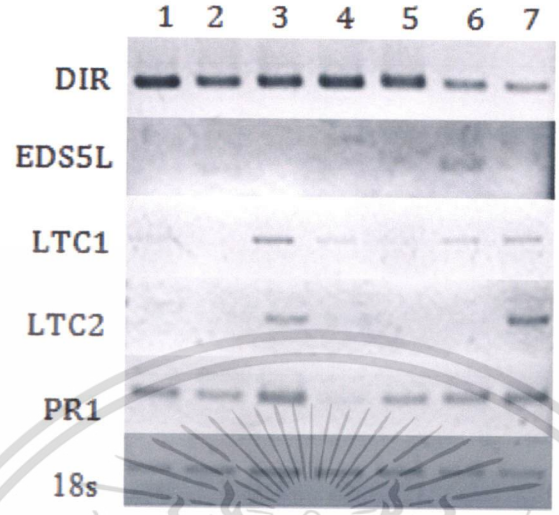
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 การแสดงออกของยีน DIR, EDS5L, LTC1, LTC2 และ PR1 ด้วยเทคนิค PCR ภายหลังการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เพียงอย่างเดียว หรือการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* ร่วมกับการสเปรย์สาร SA หรือ BABA เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมคือ เอทานอล (EtOH) 10% ปรับปริมาณ DNA ต้นแบบสำหรับเทคนิค PCR ให้เท่ากันด้วยยีน 18S

หมายเหตุ: ช่องที่ 1 คือ สเปรย์ด้วย DMS0
ช่องที่ 2 คือ สเปรย์ด้วย EtOH 12 ชั่วโมง
ช่องที่ 3 คือ สเปรย์ด้วย EtOH 24 ชั่วโมง
ช่องที่ 4 คือ สเปรย์ด้วย SA 1mM 24 ชั่วโมง
ช่องที่ 5 คือ สเปรย์ด้วย SA 1mM และปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* 12 ชั่วโมง
ช่องที่ 6 คือ สเปรย์ด้วย SA 1 mM และปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* 24 ชั่วโมง
ช่องที่ 7 คือ สเปรย์ด้วย SA 10mM 12 ชั่วโมง
ช่องที่ 8 คือ สเปรย์ด้วย SA 10mM และปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* 12 ชั่วโมง
ช่องที่ 9 คือ สเปรย์ด้วย SA 10mM และปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* 24 ชั่วโมง
ช่องที่ 10 คือ สเปรย์ด้วย BABA 1mM 12 ชั่วโมง
ช่องที่ 11 คือ สเปรย์ด้วย BABA 1mM และปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 การแสดงออกของยีน DIR, EDS5L, LTC1, LTC2 และ PR1 ด้วยเทคนิค PCR ภายหลังการปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* หรือการสเปรย์สาร MeJA 0.001mM เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมคือพืชปกติในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ปรับปริมาณ DNA ต้นแบบสำหรับเทคนิค PCR ให้เท่ากันด้วยยีน 18S

หมายเหตุ; ช่องที่ 1 คือ พืชปกติที่เก็บตัวอย่างเวลา 12 ชั่วโมงหลังเริ่มการทดลอง
ช่องที่ 2 คือ พืชปกติที่เก็บตัวอย่างเวลา 24 ชั่วโมงหลังเริ่มการทดลอง
ช่องที่ 3 คือ สเปรย์ด้วย MeJA 0.001mM เก็บตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง
ช่องที่ 4 คือ สเปรย์ด้วย MeJA 0.001mM เก็บตัวอย่างที่ 12 ชั่วโมง
ช่องที่ 5 คือ สเปรย์ด้วย MeJA 0.001mM เก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง
ช่องที่ 6 คือ ปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เก็บตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง
ช่องที่ 7 คือ ปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากบางส่วนของยีน EDS5L ขนาด 300 คู่เบส กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชต่างๆ ที่มีปรากฏใน GenBank

Accession number	**Gene description**	**Identity**
XM_002274747.1	*Vitis vinifera* MATE efflux family protein	84%
XM_003606979.1	*Medicago truncatula* Enhanced disease susceptibility	82%
NM_001052259.2	*Oryza sativa* Japonica Group Os02g0122200	79%
NM_127706.8	*Arabidopsis thaliana* MATE efflux family protein (AT2G21340)	78%
XM_002512931.1	*Ricinus communis* DNA-damage-inducible protein f	78%
K356145.1	*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* mRNA for predicted protein	77%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.11 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน EDS5L (*Lactuca sativa*) ขนาด 300 คู่เบส กับลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน AtEDS5H (*Arabidopsis thaliana*), VitisMATE (*Vitis vinifera*) และ AtEDS5 (*Arabidopsis thaliana*) โดยสัญลักษณ์รูปดอกจันแสดงความเหมือนกัน (identity) ของนิวคลีโอไทด์ในแนวตั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

5.1 ความต้านทานต่อโรคที่เกิดขึ้นภายหลังการชักนำด้วยสาร salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA) และ β- aminobutyric acid (BABA) แก่ผักสลัดในสภาพปลูกแบบไม่ใช้ดิน การดำเนินงานในขั้นตอนนี้สรุปได้ว่า

5.1.1 การให้สารชักนำความต้านทาน (inducers) ต่อผักสลัด พบว่าการให้สารชักนำทั้งสามชนิดคือ SA, MeJA และBABA ฉีดพ่นทางใบ ไม่มีผลกระทบทางลบกับผักสลัด (ทดสอบที่ระดับ 1 และ 10 mM ในผักสลัดบัตเตอร์เฮด) ส่วนการให้สารชักนำฯ ในสารละลายธาตุอาหาร พบว่ามีเพียง BABA เท่านั้นที่ไม่แสดงผลทางลบกับพืชทดสอบ (ทดสอบที่ระดับ 0.001-0.1 mM)

5.1.2 เชื้อสาเหตุโรคที่ทำให้เกิดโรครากเน่าโคนเน่าในผักสลัดได้แก่ เชื้อ *Pythium aphanidermatum* และ *Pythium myriotylum* ส่วนเชื้อเป็นสาเหตุของโรคใบจุดในผักสลัดได้แก่เชื้อ *Cercospora* sp.

5.1.3 สารชักนำฯ แต่ละชนิดมีผลต่อการเจริญของเชื้อแตกต่างกันดังนี้

ต่อเชื้อ *Cercospora* sp.

SA 0.001-1.0 mM ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และ SA ที่ 10 mM มีผลในการยับยั้ง

MeJA 0.001-1.0 mM ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และ MeJA ที่ 10 mM มีผลในการยับยั้ง

BABA 0.001-1.0 mM ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และ BABA ที่ 10 mM มีผลในการยับยั้ง

ต่อเชื้อ *P. aphanidermatum* และ *P. myriotylum*

SA 0.001-0.1 mM ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และ SA ที่ 1.0 mM มีผลในการยับยั้ง

MeJA 0.001-0.1 mM ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และ MeJA ที่ 1.0 mM มีผลในการยับยั้ง

BABA 0.001-1.0 mM ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และ BABA ที่ 10 mM มีผลในการยับยั้ง

ดังนั้นหากให้สารชักนำฯ แก่พืชในระดับความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค แต่สามารถลดความรุนแรงของโรคลงได้ ก็เป็นไปได้ว่าการให้สารชักนำฯ ดังกล่าว จะไปกระตุ้นพืชให้เกิดความต้านทานขึ้นมา

5.1.4 การให้ SA, MeJA และ BABA โดยการฉีดพ่นทางใบ แก่ผักสลัดเพื่อให้ต้านทานต่อโรคใบจุด พบว่าการให้ SA ความเข้มข้น 0.1mM และ MeJA ความเข้มข้น 0.01mM เป็นเวลา 3 วันก่อนการปลูกเชื้อสามารถลดความรุนแรงของโรคได้ ส่วน BABA ให้ผลไม่แตกต่างจาก control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.5 การให้ SA, MeJA และ BABA โดยการฉีดพ่นทางใบ แก่ผักสลัดเพื่อให้ต้านทานต่อโรครากเน่า พบว่าเห็นผลในการกระตุ้นความต้านทานได้ไม่ชัดเจน

5.1.6 การให้ BABA ทางสารละลายธาตุอาหาร เพื่อให้ต้านทานต่อโรคใบจุด พบว่าเห็นผลในการกระตุ้นความต้านทานได้ไม่ชัดเจน

5.1.7 การให้ BABA ทางสารละลายธาตุอาหาร เพื่อให้ต้านทานต่อโรครากเน่า มีแนวโน้มว่าจะกระตุ้นความต้านทานได้ในสลัดสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อโรคเช่นสลัดบัตเตอร์เฮด ส่วนสายพันธุ์ที่มีความอ่อนแอเช่น สลัดเรดโครอลนั้น เห็นผลได้ไม่ชัดเจน

5.2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อราคือ *P. aphanidermatum* ภายหลังการสเปรย์ด้วยสารชักนำความต้านทาน SA, BABA หรือ MeJA การดำเนินงานในขั้นตอนนี้สรุปได้ว่า

5.2.1 ยีนที่มีการสังเคราะห์ทั้งในต้นปกติ ต้นที่สเปรย์สารและต้นที่ปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* คือ PR1 และ DIR

5.2.2 การสเปรย์สาร SA 1mM ตรวจพบการแสดงออกของยีน PR1, LTC2 และ EDS5L หลังการปลูกเชื้อ และการแสดงออกของยีน LTC1 ทั้งก่อนและหลังการปลูกเชื้อ

5.2.3 การสเปรย์สาร BABA 1mM ตรวจพบการแสดงออกของยีน PR1, LTC1 และ LTC2 ทั้งก่อนและหลังการปลูกเชื้อ

5.2.4 การสเปรย์สาร MeJA 0.001mM เพียงอย่างเดียวสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ของยีน PR1, LTC1 และ LTC2 ได้อย่างรวดเร็ว และจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 12 และ 24 ชั่วโมง

5.2.5 การปลูกเชื้อ *P. aphanidermatum* เพียงอย่างเดียว สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์ยีน PR1, LTC1, LTC2, EDS5L และ DIR ได้ แต่ในระดับต่ำกว่าการสเปรย์ด้วยสารชักนำ

5.2.6 ยีน EDS5L ตอบสนองต่อการสเปรย์ด้วย SA เท่านั้น

5.2.7 ในงานวิจัยนี้ ยีน EDS5L เป็นยีนที่ตรวจพบครั้งแรก ซึ่งพบว่ามีการสังเคราะห์ภายหลังการสเปรย์ด้วย SA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company, Minisota, USA. 241pp.

Bennett, M.H., Mansfield, J.W., Lewis, M.J., and Beale, M.H. 2002. Cloning and expression of sesquiterpene synthase genes from lettuce (Lactuca sativa L.). Phytochemistry 60, 255-261.

Bergey, D.R., Howe, G.A. and Ryan, C.A. 1996. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. Proceeding of the National Academy of Science USA 93: 12053-12058.

Buta, J.G. and Moline, H.E. 1998. Methyl jasmonate extends shelf life and reduces microbial contamination of fresh-cut celery and peppers. Journal of Agricultural and Food chemistry 46: 1253-1256.

Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z-H. and Zenk, M.H. 1995. The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. Proceeding of the National Academy of Science USA 92: 4099-4015.

Creelman, R.A. and Mullet, J.E. 1997. Biosynthesis and actions of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 355-381.

Cohen, Y. and Gisi, U. 1994. Systemic translocation of 14C-DL3-aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans.* Physiology and Molecular Plant Pathology 45: 441-446.

Farmer, E.E. and Ryan, 1990. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitor in plant leaves. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 87: 7713-7716.

Gamliel, A. and Katan, J. 1992. Influence of seed and root exudates on the fluorescent *Pseudomonas* and fungal in solarlized soil. Phytopathology 82: 320-327

Hammerschmidt, R. and Schultz, J.C. 1996. Acquired resistance to disease. Horticultural Reviews 18: 247-289.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jakab, G., Cottier, V., Topuin, V., Rigoli, G., Zimmerli, L., Metraux, J-P. and Mauch-Mani, B. 2001. β - aminobutyric acid-induced resistance in plants. European Journal of Plant Pathology 107: 29-37.

Kiba, A., Lee, K.Y., Ohnishi, K., and Hikichi, Y. 2008. Comparative expression analysis of genes induced during development of bacterial rot and induction of hypersensitive cell death in lettuce. Journal of plant physiology 165, 1757-1773.

Klerks, M.M., van Gent-Pelzer, M., Franz, E., Zijlstra, C., and van Bruggen, A.H. 2007. Physiological and molecular responses of Lactuca sativa to colonization by Salmonella enterica serovar Dublin. Applied and environmental microbiology 73, 4905-4914.

Lyon, G.D. and Newton, A.C. 1999.Implementation of elicitor mediated induced resistance in agriculture. *In* Induced plant defenses against pathogens and herbivores. Agrawal, A.A., Tuzun, S. and Bent, E. (Eds.) APS Press, Minnesota. P. 299-318.

McCloud, E.S. and Baldwin, I.T. 1997. Herbivore and caterpillar regurgitate amplify the wound-induced increase in jasmonic acid but not nicotine in *Nicotiana sylvertris*. Planta 203: 430-435.

Metraux, J.P., Singer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. and Inverrardi, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. Science 250: 1004-1006.

Nawrath, C., and Metraux, J.P. 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. Plant Cell 11, 1393-1404.

Nawrath, C., Heck, S., Parinthawong, N., and Metraux, J.P. 2002. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. Plant Cell 14, 275-286.

Oka, Y., Cohen, Y., and Spiegel, Y. 1999. Local and systemic induced resistance to the root knot nematode in tomato by DL-β - amino-n-butyric acid. Phytopathology. 89:1138-1143.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. and Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. European Journal of Plant Pathology 107: 19-28.

Staswick. P.E. and Lehman, C.C. 1999. Jasmonic acid-signaling responses in plants. *In* Induced plant defenses against pathogens and herbivores. Agrawal, A.A., Tuzun, S. and Bent, E. (Eds.) APS Press, Minnesota. P. 117-136.

Thaler, J.S. 1999. Jasmonic acid mediate interaction between plants, herbivores, parasitoid, and pathogens: A review of field experiments in tomato. *In* Induced plant defenses against pathogens and herbivores. Agrawal, A.A., Tuzun, S. and Bent, E. (Eds.) APS Press, Minnesota. P. 319-334.

Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylic-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceeding of the National Academy of Science USA 95 :15107-15111.

Thomma, B.P.H.J., Nelissen, I., Eggermont, K., and Broekaert, W.F. 1999a. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. Plant Journal 19 :163-171.

Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, F.M.J., and Broekaert, W.F. 1999b. Requirement of a functional *ethylene-insensitive* 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. Plant Physiology. 121: 1093-1101.

Thomma, B.H.T.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F. and Cammue, B.P.A. 2001. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. Current Opinion in Immunity 13: 63-68.

White, R.F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology 99: 410-412.

Vidhyasekaran, P. 1997. Fungal pathogenesis in plants and crops. Marcel Dekker, Inc. New york. 533 pp.

Zhu, L., Zhang, X., Tu, L., Zeng, F., Nie, Y., and Guo, X. 2007. Isolation and charactherization of two novel dirigent-likt genes highly induced in cotton (*Gossypium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

barbadense and *G. hirsutum*) after infection by *Verticillium dahliae*. Journal of Plant Pathology 89, 41-45.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นางสาวนงลักษณ์ เภรินทวงค์

เพศ ☐ ชาย ☑หญิง วันเดือนปีเกิด 30 ตุลาคม พ.ศ. 2515 อายุ 39 ปี

สถานภาพ ☑ โสด ☐ สมรส

ตำแหน่งปัจจุบัน

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	เกษตรศาสตร์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2537
วท.ม. (เกษตรศาสตร์)	เกษตรศาสตร์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2543
Ph.D. (Plant Biology)	Plant Biology	University of Fribourg, Switzerland	2548

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) : กลไกความต้านทานโรคของพืช

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่น ๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2542-2543	Fellowship at the Department of Biology, University of Fribourg, Switzerland	University of Fribourg, Switzerland
2550	Fellowship at the Department of Biology, University of Fribourg, Switzerland.	UMAP (University Mobility in Asia and the Pacific)

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

-

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pennapar Tansian, Nawarat Jaihom and **Nonglak Parinthawong**. 2012. Effect of Some Plant Crude Extracts on Conidia Germination and Mycelia Growth of Rice Blast Fungus (*Pyricularia grisea*). Poster presented at The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases 2012. February 7-10, 2012.

Parinthawong, N. and R. Moonsarn. 2010. Effects of some plant crude extracts on mycelia growth of *Colletotrichum* sp. Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Parinthawong, N., P. Tansian and C. Youngnit. 2010. Effects of three plant crude extracts on fungal spore germination and hyphal growth of *Curvularia* sp. Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. p710-713.

Talubnak, C., P Koohakakan, **N. Parinthawong** and T. Jaenaksorn. 2010. Effect of the indigenous non-pathogenic *Pythium* spp. on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydrogonics. Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Koohakan, P., J. Rangjaroen, **N. Parinthawong** and T. Jaenaksorn. 2010. Distribution of bacterial antagonist in hydroponics. Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Christiane Nawrath, Silvia Heck, **Nonglak Parinthawong**, and Jean-Pierre Métraux. 2002. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling from disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. Plant Cell 14, 275-286.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chakrapong Rangjaroen, **Nonglak Parinthawong**, Tanimnun Jaenakson and Prommart Koohakan. 2008. Isolation of rhizobacteria from lettuce grown in hydroponics for controlling *Pythium* spp. Proceeding of The 34th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 34). Queen Sirikit national convention center, Bangkok, Thailand. P.247.

ชัยวรกุล ไชยปัญญา กัญจนา แซ่เตียว สุเม อรัญนาถ และ**นงลักษณ์ เภรินทวงค์**. 2555. การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน Flavanone 3-Hydroxylase (F3H) ในอุบลชาติส้มลุกเซนต์หลุยส์. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 11. 1-3 กุมภาพันธ์ 2555 (อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์).

วรวุฒิ เอื้อมงคลการ กัญจนา แซ่เตียว สุเม อรัญนาถ และ**นงลักษณ์ เภรินทวงค์**. 2555. การสร้าง DNA สายผสมของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (4'CGT) from snapdragon (*Antirrhinum majus*) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงปุณฑริก. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 11. 1-3 กุมภาพันธ์ 2555 (อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์).

นงลักษณ์ เภรินทวงค์. 2553. กลไกการต้านทานโรคพืช. ข่าวสารศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพและความปลอดภัยทางชีวภาพ. 9(28): 2-4.

นงลักษณ์ เภรินทวงค์ กัญจนา แซ่เตียว และ สุเม อรัญนารถ. 2552. การโคลนยีน flavanone 3-hydroxylase จากลิ้นมังกร และยีน chalcone synthase จากอุบลชาติส้มลุกพันธุ์เซนต์หลุยส์. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 6-9 พฤษภาคม 2552.

นิติกรณ์ เผือกบัวขาว พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ **นงลักษณ์ เภรินทวงค์**. 2552. ผลของสาร β-aminobutyric acid, methyl jasmonate และ salicylic acid ชักนำผักสลัดให้เกิดความต้านทานต่อโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Cercospora sp.* การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 6-9 พฤษภาคม 2552.

การเสนอผลงานวิชาการ

2008 : Chatchada Youngnit, Jantorn Rattanajarupak, Pasinee Wasikdilok and **Nonglak Parinthawong**. 2008. Effect of *Xylocarpus moluccensis* and *Sapindus rarak* on hypha growth and conidial germination of *Fusarium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and *Helminthosporium* sp. The 3rd Annual Meeting of Thai Mycological Association and Mycology Conference in Thailand. 11 October 2008, p. 43.

2005 : NCCR Plant Survival International Conference, Leysin, Switzerland: Characterization of *EDS5H*, a close homologue of *EDS5* (Poster and oral presentation)

2004 : Environmental Control of Chloroplast Biogenesis and Function, IIIe cycle Romand en Science Biologiques and NCCR Plant Survival, Neuchâtel: Localization of Two MATE Proteins Involved in SA Biosynthesis.

2003 : NCCR Review panel meeting, Neuchâtel : *Arabidopsis* as a Model Plant for an Analysis of Signaling Pathway Leading to Plant Defense.

2002 : Arabidopsis Meeting, Spain: Analysis of the signaling network in Arabidopsis mutants impaired in the accumulation of salicylic acid.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่น ๆ)

-

อื่น ๆ

-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นายพรหมมาศ คูหากาญจน์

เพศ ☑ ชาย ☐หญิง วันเดือนปีเกิด 11 กันยายน 2511 อายุ 44 ปี

สถานภาพ ☐ โสด ☑ สมรส

ตำแหน่งปัจจุบัน

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	สัตวศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2532
วท.ม. (เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช)	เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง	2540
Ph.D. (Agriculture and Environmental Science)	Agriculture and Environmental Science	Osaka Prefecture University, Japan	2545

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา การควบคุมโรคพืชที่ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่น ๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2543-2545	Monbusho scholarship	Osaka Prefecture University, Japan

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

พรหมมาศ คูหากาญจน์, ศุภชัย รตโนภาส และถนิมนันต์ เจนอักษร. 2539. การแพร่กระจายของเชื้อราบางชนิดในสารละลายหมุนเวียนของระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 14 (2): 26-37.

พรหมมาศ คูหากาญจน์, ถนิมนันต์ เจนอักษร และศุภชัย รตโนภาส. 2539. ศักยภาพการปลูกแตงกวาพันธุ์ยุโรป ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. เอกสารการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 22: หน้า 678-679.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2539. เรื่องน่ารู้บางประการเกี่ยวกับเชื้อ *Pythium* <ตอนที่ 1>. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 14 (3): 41-45.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2540. เรื่องน่ารู้บางประการเกี่ยวกับเชื้อ *Pythium* <ตอนที่ 2>. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 15 (3): 47-53.

พรหมมาศ คูหากาญจน์, ถนิมนันต์ เจนอักษร และศุภชัย รตโนภาส. 2540. โรคที่พบบนแตงกวายุโรป ที่ปลูกในระบบปลูกพืชที่ไม่ใช้ดิน ในช่วงฤดูหนาว. เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการ ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 กุมภาพันธ์ 2540: หน้า 179-187.

พรหมมาศ คูหากาญจน์, ถนิมนันต์ เจนอักษร และศุภชัย รตโนภาส. 2541. ศักยภาพของการปลูกแตงกวายุโรปในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 16 (1): 33-40.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2541. แตงกวายุโรป : คุณรู้จักหรือยัง. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 16(1): 50-55.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2546. โรคของพืชในระบบการปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินและการควบคุมโรค. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 21 (3): 76-87.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2547. ผลของแคลเซียมต่อกระบวนการสร้างส่วนขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศและการเคลื่อนที่ของ zoospore ของเชื้อ *Pythium aphanidermatum*. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 22 (1): 10-21.

พรหมมาศ คูหากาญจน์. 2547. Zoosporic pathogens บทบาทที่สำคัญในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. วารสารวิทยาศาสตร์ประยุกต์ 3 (1): 49-54.

พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ อิทธิสุนทร นันทกิจ. 2548. ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ในการควบคุมโรครากเน่าของผักสลัดที่เกิดจากเชื้อ Pythium ในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36 (5-6) : 1191-1194.

พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ อิทธิสุนทร นันทกิจ. 2548. ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี และจุลินทรีย์บริเวณเขตรากพืชที่แยกได้จากผักสลัดที่ปลูกในระบบปลูกพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Technology for Sustainable Development (ICIST). 26-27 April, 2007 Bangkok, Thailand: 418-422.

Koohakan, P., Jaenaksorn, P. and I Nantagij. 2008. Major disease of lettuce grown by commercial nutrient film technique in Thailand. KMITL Sci. Tech. J. Vol. 8 (2): 56-63.

Chakrapong Rangjaroen, Nonglak Parinthawong, Tanimnun Jaenaksorn and **Prommart Koohakan**. 2008. Isolation of rhizobacteria from lettuce grown in hydroponics for controlling Pythium spp. Proceeding of The 34th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 34). Queen Sirikit national convention center, Bangkok Thailand. P. 247.

Jaenaksorn T., **Koohakan P.**, and Prathuangwong, S. 2010. Efficacy of indigeneous Trichoderma and PGPR for controlling Pythium root rot of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in deep flow technique. Pages 671-674 in: 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Jaenaksorn T., **Koohakan P.**, and Prathuangwong, S. 2010. Test of four commercial bioproduct on Pythium root rot of hydroponically-grown cos lettuce (*Lactuca sativa* L.). Pages 667-670 in: 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Koohakan P., Rangjaroen J., Parinthawong, N., and Jeanaksorn T. 2010. Distribution of bacterial antagonist in hydrponics. Pages 692-695 in: 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Talubnak, C., **Koohakan, P.**, Parinthawong, N., and Jeanaksorn T. 2010. Effect of indidenous Non-pathogenic Pythium spp. on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponics. Pages 309-312 in: 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

vegetables. Page 80. *In* the International Conference on Fungal Evolution and Charles Darwin: From Morphology to Molecules. 9-11 July, 2009. Sirindhorn Science Home, Thailand Science Park, Thailand: p 80.

Koohakan, P. and Rangjaroen, J. 2009. Evaluation of indigenous bacteria for biological control agent of root rot disease in leafy vegetables grown in hydroponics. Page 190. *In* Agricultural Biotechnology International Conference (ABIC 2009): Agricultural Biotechnology for Better Living and Clean Environment. 22-25 September, 2009. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

Prommart Koohakan. 2010. Efficiency of indigenous rhizobacteria on growth of hydroponics lettuce. The Annual Meeting of Thai Phytopathological Society and Plant Pathology Conference Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 15 May 2010.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่น ๆ)

-

อื่น ๆ

-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้