

การใช้สารเคมี Bion และเชื้อรา *Curvularia* sp. ในการชักนำความต้านทานต่อ  
เชื้อรา *Alternaria brassicicola* ในผักกาดกวางตุ้ง  
Application of Bion and *Curvularia* sp. to induce resistance  
against *Alternaria brassicicola* in pak choy

เทอดพันธ์ ธรรมรัตน์พงษ์<sup>1</sup> และ สมศิริ แสงโชติ<sup>1</sup>  
Thurdpun tummarattanapong<sup>1</sup> and Somsiri Sangchote<sup>1</sup>

Abstract

Inducers for induced plant resistance including Bion 0.05 g/liter and spore of *Curvularia* sp. (non pathogenic fungus) were treated in pak choy (chinese mustard) before inoculated with a pathogenic fungus, *Alternaria brassicicola*(Ab). The tested pak choy both resistance and susceptible variety was applied with the inducers and then, followed by inoculation with *A. brassicicola*. Bion and *Curvularia* sp. could reduce the disease severity of leaf spots by 90 and 65% on resistant cultivar and by 30 and 15% on susceptible cultivar respectively compared with untreated. After applied inducers, enzymes activities of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POX) increased rapidly at 5 days after inoculation with pathogenic fungus, enzymes activities of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POX) were higher in the susceptible variety than the resistance variety.

**Key words:** Induced resistance, *Alternaria brassicicola*, Bion, *Curvularia* sp., Pak choy

บทคัดย่อ

การทดสอบการกระตุ้นความต้านทานภายในพืช โดยใช้สารเคมี Bion 0.05 กรัมต่อลิตร และสปอร์ของเชื้อรา *Curvularia* sp. (ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) ในผักกาดกวางตุ้งพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ แล้วฉีดพ่นด้วยเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด *Alternaria brassicicola* พบว่า ช่วยให้ผักกาดกวางตุ้งแสดงลักษณะต้านทานต่อการเกิดโรค โดยพบอาการของโรคใบจุดมีความรุนแรงของโรคลดลง 90 และ 65 % ในพันธุ์ต้านทาน และ 30 และ 15% ในพันธุ์อ่อนแอเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ใช้สารและเชื้อดังกล่าว สำหรับการตอบสนองในผักกาดกวางตุ้งที่ได้รับสารกระตุ้นความต้านทานทั้ง Bion และเชื้อรา *Curvularia* sp พบว่ามีปริมาณของเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) และ peroxidase (POX) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 5 หลังปลูกเชื้อราสาเหตุโรค โดยในผักกาดกวางตุ้งพันธุ์อ่อนแอ และมีปริมาณที่สูงมากกว่าในผักกาดกวางตุ้งพันธุ์ต้านทาน

**คำสำคัญ** การชักนำความต้านทาน *Alternaria brassicicola* Bion *Curvularia* sp. ผักกาดกวางตุ้ง

คำนำ

โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชผักจำพวก crucifers เช่น ผักคะน้า กะหล่ำดอก และ บร็อคโคลี่ เป็นต้น (Chupp and Sherf, 1960) การควบคุมโรคสามารถทำได้โดยการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานได้โดย Ziadi *et al.* (2000) พบว่าเมื่อฉีดพ่น Acibenzolar-s-methyl (ASM) ;Bion ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้กับต้นกล้ากะหล่ำดอกก่อน 1 วันสามารถชักนำให้ต้นกล้ากะหล่ำดอกเกิดความต้านทานแบบ systemic resistance ต่อโรคราน้ำค้างที่เกิดจาก *Peronospora parasitica* นอกจากนี้การใช้เชื้อ nonpathogenic *Fusarium oxysporum* ได้มีรายงานของ He *et al.* (2002) ว่าสามารถควบคุมโรค *Fusarium crown rot* ได้ และสารชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโรคที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ มีทั้งแบบเคมี และแบบชีววิธี โดยอาศัยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของพืชทางด้านเอนไซม์ และประสิทธิภาพการป้องกันโรคจะช่วยให้ข้อมูลในการใช้สารชักนำความต้านทานโรคในพืชเพื่อให้มีคุณค่าในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

<sup>1</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กทม. 10900

<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok 10900

## อุปกรณ์และวิธีการ

ศึกษาการชักนำให้เกิดความต้านทานโรคใบจุดในผักกาดขวางดั่งฮ่องกง (*Brassica campestris*) พันธุ์ต้านทานโรค และผักกาดขวางดั่งฮ่องกงใต้ (*B. campestris* var *chinensis*) พันธุ์อ่อนแอต่อโรคอายุ 30 วัน จากบริษัทเจียไต๋ จำกัด ที่ได้ผ่านการตรวจสอบหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Percentage of disease) และประเมินความรุนแรงของโรคที่ใบโดยใช้ดัชนีการทำลาย (Disease index, Di) (Jean-Francois et al. 1999) กับเชื้อรา *Alternaria* sp.; (Ab) และ *Curvularia* sp.; (Cu) (ไม่ก่อให้เกิดโรค) ที่แยกได้จากใบผักกาดขวางดั่งทั้ง 2 พันธุ์ข้างต้นจากแปลงปลูกนิสิตในเขตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม วางแผนการทดลองแบบ Factorial 2 Factors in Randomized Completed Block Design จาก 6 กรรมวิธีคือ ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยน้ำกลั่น(Cu), ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* (Cu/Ab), ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยน้ำกลั่น(Bi), ฉีดพ่นด้วย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* (Bi/Ab), ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. brassicicola* เพียงอย่างเดียว (Ab) และฉีดพ่นเฉพาะน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว (Wa) เก็บใบผักกาดขวางดั่งแต่ละพันธุ์มาครั้งละ 4 ใบ จำนวน 3 ครั้ง เพื่อประเมินความรุนแรงของโรคจากดัชนีการทำลายในวันที่ 1, 5, 10, 15, 20 และ 25 วันหลังปลูกเชื้อรา *A. brassicicola*

การตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ polyphenoloxidase (PPO) โดยชั่งน้ำหนักใบผักกาดขวางดั่งก่อนนำมาบดด้วย 0.1 M phosphate buffer (PBS) เย็นจำนวน 5 มิลลิลิตร นำของเหลวที่ได้ 2 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที เก็บตัวอย่างส่วนในที่ได้ 200 ไมโครลิตรผสมลงในน้ำกลั่นจำนวน 3 มิลลิลิตร 0.1 M ของ PBS จำนวน 1 มิลลิลิตร และ 0.006 M ของ Pyrocatechol Brenzkatechin จำนวน 1 มิลลิลิตร ตั้งสารละลายผสมทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer

ตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase (POX) ผสมตัวอย่างสารสกัดจากการปั่นเหวี่ยงข้างต้น 50 ไมโครลิตรกับสารละลาย 50mM sodium citrate จำนวน 2800 ไมโครลิตรและ 0.2% phenol red จำนวน 150 ไมโครลิตร เขย่าจนเข้ากันแล้วจึงเติมด้วย 1 mM hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) จำนวน 50 ไมโครลิตรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที จึงผสมด้วย 2 N sodium hydroxide จำนวน 120 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร

## ผลและวิจารณ์

การฉีดพ่นสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ไม่พบความรุนแรงของโรคใบจุดตลอดระยะเวลา 10 วันแต่เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 15-25 วันพบความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นเพียง 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์หรือสามารถลดโรคใบจุดลงได้ 30-20 และ 90 เปอร์เซ็นต์ การฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมงก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบความรุนแรงของโรคใบจุดที่เวลา 5-25 วันเท่ากับ 10-20 และ 20-35 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดโรคใบจุดลงได้ 15-5 และ 65-40 เปอร์เซ็นต์ ในผักกาดขวางดั่งฮ่องกงและผักกาดขวางดั่งฮ่องกงใต้อายุ 30 วันตามลำดับ ( Table1)

กิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POX ในผักกาดขวางดั่งอายุ 30 วันที่ได้รับการฉีดพ่นสารละลาย Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรและสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมงก่อนปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบปริมาณเอนไซม์ PPO ในผักกาดขวางดั่งฮ่องกงใต้เพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 69.96 และ 46.79 units  $mg^{-1}$ protein และเอนไซม์ POX เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 51.13 และ 30.4 units  $mg^{-1}$ protein ตามลำดับ เช่นเดียวกันพบปริมาณเอนไซม์ PPO ในผักกาดขวางดั่งฮ่องกงเพิ่มสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 34 และ 28.14 units  $mg^{-1}$ protein และเอนไซม์ POX เพิ่มสูงสุดเท่ากับ 21.52 และ 16.81 units  $mg^{-1}$ protein ตามลำดับนอกจากนี้พบปริมาณเอนไซม์ PPO และ POX ในผักกาดขวางดั่งฮ่องกงใต้สูงกว่าผักกาดขวางดั่งฮ่องกง (Table 2) การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ peroxidase พบว่าสอดคล้องกับงานของ Yeon et al. (2000) ที่ได้ฉีดพ่น DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid (BaBa) ให้กับพริกไทยก่อน 24 ชั่วโมงแล้วจึงฉีดพ่นตามด้วย เชื้อ *Phytophthora capsici* โดยจะพบกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase สูงภายในระยะเวลา 2 วัน และสอดคล้องกับงานของ He et al. (2002) ที่ฉีดพ่นด้วย nonpathogenic *Fusarium oxysporum* ก่อน 2 วัน แล้วจึงฉีดพ่นตามด้วยเชื้อ *F. oxysporum* f.sp. *asparagi* สาเหตุของโรค Fusarium crown rot ในหน่อไม้ฝรั่งที่จะพบปริมาณเอนไซม์ peroxidase, phenylalanine ammonia – lyase (PAL) และ lignin เพิ่มสูงขึ้น

**Table 1** disease severity among differential pak choy varieties after treated with *Curvularia* sp. and Bion at 1-25 day

Tr.	disease severity on pak choy varieties											
	Hongkong pak choy <sup>1/</sup>						Hongtae pak choy <sup>1/</sup>					
	1 day	5 days	10 days	15 days	20 days	25 days	1 day	5 days	10 days	15 days	20 days	25 days
Cu	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Cu/Ab	0 a	10 c	15 d	15 d	20 ef	20 ef	0 a	20 ef	30 fg	30 fg	35 gh	35 gh
Bi	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Bi/Ab	0 a	0 a	0 a	5 b	5 b	5 b	0 a	0 a	0 a	10 c	10 c	10 c
Ab	10 c	15 d	20 de	25 ef	30 fg	35 gh	30 gf	60 hi	80 hi	100 i	100 i	100 i
Wa	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

F-test = \*\*

CV. = 93.24%

<sup>1/</sup> within columns means followed by same letter are not significantly different at P=0.01**Table 2** Enzyme activity in various pakchoy varieties after applying with *Curvularia* sp. and Bion at 1-25 days

Tr.	PPO activities(units mg <sup>-1</sup> protein)											
	Hongkong pak choy <sup>1/</sup>						Hongtae pak choy <sup>1/</sup>					
	1 day	5 days	10 days	15 days	20 days	25 days	1 day	5 days	10 days	15 days	20 days	25 days
Cu	20.95e	20.01e	20.64e	20.43d	20.8bc	20.64e	8.15f	7.84f	8.33f	8.10e	20.64e	7.43f
Cu/Ab	25.91d	28.14d	27.97d	27.02c	20.2bc	20.36c	43.00b	46.79b	40.84b	35.40b	20.36c	23.65d
Bi	20.92e	20.97e	20.63e	20.40d	20.52c	20.82e	8.17f	7.89f	8.25f	8.10e	20.82e	7.65f
Bi/Ab	30.95c	34.00c	32.47c	31.45b	30.15b	30.43b	57.77a	69.96a	59.77a	51.14a	30.43b	34.98a
Ab	21.83e	20.10e	21.35e	21.80d	21.52c	21.41e	9.12f	8.36f	8.85f	-	21.41e	-
WaWa	20.81e	20.80e	20.26e	20.10d	20.42c	20.65e	7.93f	7.22f	7.24f	7.44e	20.65e	7.86f
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV.	9.03		9.38		10.39		11.26		18.39		6.32	

Tr.	PPO activities(units mg <sup>-1</sup> protein)											
	1 day		5 days		10 days		15 days		20 days		25 days	
	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT	HK	HT
Cu	6.22d	2.17e	6.21d	2.18d	6.24d	2.14e	6.22d	2.12e	6.23d	2.10e	6.09d	2.05e
Cu/Ab	8.78d	24.90b	16.81c	30.40b	16.74c	25.01b	15.71c	23.72b	15.85c	20.29b	15.10c	20.1ab
Bi	6.21d	2.17e	6.23d	2.15d	6.24d	2.14e	6.24d	2.12e	6.24d	2.10e	6.09d	2.05e
Bi/Ab	14.26c	35.03a	21.52c	51.13a	18.50c	41.52a	17.48c	32.27a	18.48c	28.05a	18.1bc	23.16a
Ab	6.29d	2.16e	6.28d	2.16d	6.33d	26.14e	6.32d	-	6.26d	-	6.10d	-
WaWa	6.21d	2.14e	6.22d	2.16d	6.22d	2.14e	6.32d	2.12e	6.24d	2.07e	6.10d	2.05e
F-test	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV.	21.39%		25.54%		15.08%		13.58%		23.14%		20.97%	

<sup>1/</sup> within columns means followed by same letter are not significantly different at P=0.01<sup>2/</sup>HK;Hongkong pakchoy HT;Hongtae pakchoy

## สรุป

การฉีดพ่น Bion ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตรหรือเชื้อรา *Curvularia* sp. 24 ชั่วโมง ก่อนการปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* พบความรุนแรงของโรคใบจุดในผักกาดขวางตั้งทั้ง 2 พันธุ์เพียง 5-35 เปอร์เซ็นต์ หรือสามารถลดโรคใบจุดลงได้ 5-95 เปอร์เซ็นต์ และพบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POX เพิ่มในผักกาดขวางตั้งทั้ง 2 พันธุ์สูงสุดในระยะเวลา 5 วัน โดยพบปริมาณเอนไซม์ PPO และ POX ในผักกาดขวางตั้งอ่อนต่ำสุดกว่าผักกาดขวางตั้งอ่อนหลังจากนั้นปริมาณของเอนไซม์จะเริ่มลดลง ภายหลังจากปลูกเชื้อรา *A. brassicicola* ไปแล้ว 25 วัน

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุลและสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน จ. นครปฐม

## เอกสารอ้างอิง

- Chupp, C. and A.F. Sherf. 1960. Vegetable disease and their control. The Ronald Press Company. New York. 693 p.
- He, C.Y., T. Hsiang and D.J. Wolyn. 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Plant Pathol. 51:225-230.
- Jean-Francois, G., Z. Smail, M. Claudie, C.L. Daniel and S. Drissa . 1999. Benzothiadiazole(BTH) induces resistance in cauliflower(*Brassica oleracea* var.*botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. Crop protection. 18:397-405.
- Yeon, K. L., H.K.Jeum, H. Sigrum and H. K. Byung. 2000. Histological and ultrastructural comparisons of compatible, incompatible and DL- $\beta$ -amino-n-butuyric acid induced resistance responses of peper stems to *Phytophthora capsici*. Physiological and Molecular Plant Pathology 57:269-280
- Ziadi, S., S. Barbedette, F.J. Godard, M. Claudie, C.L.Daniel and D. Silue. 2001. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower(*Brassica oleracea* var.*botrytis*)-downy mildew(*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-s-methyl. Plant Pathol. 50:579-586.