Agricultural Sci. J. 42 : 3 (Suppl.) : 717-720 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 3 (พิเศษ) : 717-720 (2554)

การกระตุ้นความต้านทานต่อโรคใบจุดของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ในผักตระกูลกะหล่ำ

Induced resistance against leaf spot disease caused by *Alternaria brassicicola* in crucifers

สุดารัตน์ สิริปรัชญาภิคุปต์[1] **และ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล**[1]
Sudarat Siriprachayaphikoup [1] and Chainarong Rattanakreetakul [1]

Abstract

Vegetable production using applications of resistance inducing substances was an alternative of pest control methods in order to reduction of pesticide usage and to support safe food program. Inducers as calcium-boron at 50 and 5 ppm, benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) at 200 ppm, chitosan at 1000 ppm and calcium-boron mixed with silicic acid – salicylic acid at 70, 5 and 270 ppm were used to induce the resistance against disease in chinese kale (*Brassica alboglabra*) and pak choy variety Baiyok (*Brassica chinensis*). In greenhouse, 25 days old seedlings of those vegetable were sprayed with the chemicals on leaves. Three days after inducer spraying, *Alternaria brassicicola* suspension of 7.5-8.5 x10^5spore/ml was inoculated on leaves. The plant enzymes, plant growth and disease incidence were evaluated after 6 and 9 days of inducer spraying. The results revealed that peroxidase (POX) and polyphenol oxidase (PPO) activities were increased, comparing to non-induced plant while phenylalanine ammonialyase (PAL) activity was constantly maintained. All inducers were showed no effect on plant growth. After six and nine days of application with 200 ppm BTH, leaf spot symptoms were decreased in chinese kale and pak choy as compared to control treatment. The disease reduction was also found on 1000 ppm chitosan spraying to pak choy. This may conclude that BTH and chitosan have a potential to use in disease control program as plant inducers.

Keywords: resistance inducing substance, leaf spot, *Alternaria*

บทคัดย่อ

การผลิตผักโดยใช้สารกระตุ้นความต้านทานเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช เป็นทางเลือกหนึ่งในการผลิตผักปลอดภัย ทำการทดสอบโดยใช้สารแคลเซียมโบรอน ความเข้มข้น 50 และ 5 ppm สาร benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) ความเข้มข้น 200 ppm สาร chitosan ความเข้มข้น 1000 ppm และ สารแคลเซียมโบรอนผสม silicic acid – salicylic acid ความเข้มข้น 70, 5 ppm และ 270 ppm ฉีดพ่นทั่วใบต้นกล้าคะน้า และกวางตุ้งใบหยกอายุ 25 วัน ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ภายหลังการฉีดพ่นสารกระตุ้นแล้ว 3 วัน จะฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ *Alternaria brassicicola* ที่ระดับความเข้มข้น 7.5-8.5 x 10^5สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ทั่วใบต้นกล้าผัก ผลการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ในพืชการเจริญ และการเกิดโรคภายหลังการฉีดพ่นสารกระตุ้น 6 วันและ 9 วัน พบว่า peroxidase (POX) และ polyphenol oxidase (PPO) ที่เกี่ยวกับความต้านทานพืชจะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการฉีดพ่นสารกระตุ้น ขณะที่เอนไซม์ phenylalanine ammonialyase (PAL) จะคงที่ สารกระตุ้นทุกชนิดไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในผักทดสอบ และการได้รับ BTH ความเข้มข้น 200 ppm แล้ว 6 วันและ 9 วัน ในคะน้าและกวางตุ้งใบหยกจะทำให้พืชมีอาการใบจุดน้อยกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารกระตุ้น การได้รับสาร chitosan ความเข้มข้น 1000 ppm ในกวางตุ้งใบหยกจะลดอาการโรคได้ ดังนั้น BTH และ chitosan จะสามารถนำไปใช้ในระบบควบคุมโรคเพื่อเป็นสารกระตุ้นในพืชได้

คำสำคัญ: สารกระตุ้นความต้านทาน โรคใบจุด *Alternaria*

คำนำ

ผักตระกูลกะหล่ำ (Cruciferae) เป็นผักที่นิยมบริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศเนื่องจากสามารถบริโภคได้ทั้งต้นและสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ผักชนิดนี้จะพบโรคและแมลงเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะโรคใบจุด (leaf spot) สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่ก่อให้เกิดความเสียหายทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ เชื้อราเข้าทำลายผักได้ทุกระยะการ

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen, Nakorn Pathom, 73140

เจริญเติบโต ทำให้เกิดอาการแผลจุดบริเวณใบ ก้าน ลำต้น เป็นแผลกลมสีดำหรือสีน้ำตาลเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมื่อเกิดรุนแรงมากอาจทำให้เกิดอาการใบไหม้ได้

ปัจจุบันการควบคุมโรคที่นิยมคือการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหรือการกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานโรคจากสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิต ซึ่งระบบความต้านทานในพืชจะมีการตอบสนองเป็นลักษณะ SAR (systemic acquired resistance) หรือ LAR (localized acquired resistance) (Costet *et al*., 1999) เช่น การเกิดปฏิกิริยา hypersensitivity (HR) การสร้างสารพิษ phytoalexin (Van Wess *et al*., 1999) ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้สารเคมีกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. brassicicola* เพื่อใช้เป็นทางเลือกในระบบการควบคุมโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมต้นกล้าผักคะน้าและกวางตุ้งใบหยกโดยใช้ดินผสมพีตมอสอัตรา 3 ต่อ 1 โดยปริมาตร ทำการทดสอบในโรงเรือนเมื่อต้นผักอายุ 25 วัน ทำการฉีดพ่นสารทดสอบให้ทั่วต้นพืชด้วย benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methylester (BTH) ที่ความเข้มข้น 200 ppm calcium-boron (CaB) ที่ความเข้มข้น แคลเซียมคีเลท 50 ppm และโบรอน 5 ppm chitosan ที่ความเข้มข้น 1000 ppm calcium-boron ผสม salicylic acid- silicic acid (CaB-SS) ที่ความเข้มข้น แคลเซียม 70 ppm โบรอน 4 ppm และ orthosilicic acid 270 ppm และชุดควบคุมที่สเปรย์ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากฉีดพ่นแล้วปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วันจึงทำการปลูกเชื้อ Alternaria *brassicicola* โดยฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 7.5 – 8.5 x10^5สปอร์ต่อมิลลิลิตร คลุมด้วยถุงพลาสติกพรมน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงเปิดถุงเพื่อตรวจวัดระดับการเกิดโรคภายหลังการฉีดพ่นสาร 6 วันและ 9 วัน ตรวจกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase (POX) ตามวิธีของ Rathmell and Sequeira (1974), polyphenoloxidase (PPO) และ phenylalanine ammonialyase (PAL) ตามวิธีของ Beaudoin-Eagan and Thorpe (1985)

ผล

การทดสอบการฉีดพ่นสารกระตุ้นในผักคะน้าและผักกวางตุ้งใบหยกที่อายุ 25 วัน หลังจากการฉีดสารกระตุ้นแล้ว 3 วันจึงปลูกเชื้อ *A. brassicicola* ทำการตรวจวัดการเกิดโรคภายหลังการฉีดพ่นสารกระตุ้น 6 วันและ 9 วัน ผลได้แสดงไว้ใน table 1 โดยพบว่าการเกิดโรคในผักคะน้าที่ได้รับสาร BTH แล้ว 6 วัน เท่ากับ 0.647 ซึ่งมีอาการโรคที่น้อยกว่าชุดควบคุมที่แสดงอาการโรคเท่ากับ 0.765 สำหรับกวางตุ้งใบหยกเมื่อได้รับสาร BTH และ chitosan แล้ว 6 วัน จะแสดงอาการโรคเฉลี่ยเท่ากับ 1.063 ซึ่งน้อยกว่าอาการโรคในชุดควบคุมที่แสดงอาการโรคเท่ากับ 1.389 เช่นเดียวกับผักกวางตุ้งใบหยกที่ได้รับสารทดสอบ BTH และ chitosan แล้ว 9 วันจะแสดงอาการโรค 1.231 และ 1.538 ตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมจะแสดงอาการโรค 1.765 ผลของสารกระตุ้นต่อการเจริญของผักทั้ง 2 ชนิดในด้านความสูงหลังจากได้รับการฉีดพ่นสารกระตุ้นแล้วจะไม่มีผลต่อผักคะน้าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่ผักกวางตุ้งใบหยกที่ได้รับสาร chitosan และ CaB-SS จะพบว่าความสูงมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย

การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์พืชภายหลังฉีดพ่นสารกระตุ้นแล้วได้แสดงใน figure 1 โดยพบว่าผักคะน้าที่ได้รับสารทดสอบ CaB และ BTH 6 วัน จะมีกิจกรรมของ PPO และ PAL เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร แต่ที่ระยะ 9 วัน หลังจากได้รับสารระดับของเอนไซม์จะลดต่ำลง ส่วนกิจกรรมของ POX ในผักคะน้าที่ได้รับสาร chitosan และสาร CaB-SS แล้ว 6 วันและ 9 วัน จะพบว่ามีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร

สำหรับในผักกวางตุ้งใบหยกจะพบว่าการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ PPO ภายหลังได้รับสาร BTH, chitosan และ CaB-SS แล้ว 6 วันมีการเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร แต่จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ 9 วันเมื่อเทียบกับชุดควบคุม กิจกรรมเอนไซม์ POX ในกวางตุ้งใบหยกจะพบการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นภายหลังการได้รับสาร CaB, BTH และ CaB-SS แล้ว 6 วัน และที่ 9 วันจะพบว่ากิจกรรมจะเพิ่มสูงขึ้นในชุดที่ได้รับ BTH การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ PAL เพิ่มขึ้นในกวางตุ้งใบหยกที่ได้รับ CaB และ chitosan แล้ว 6 วันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร แต่ที่ 9 วันไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์

Table 1 Effect on growth of chinese kale and pak choy var. Baiyok and disease symptom after induced with various inducer substances for 6 days and 9 days.

	chinese kale				pak choy variety Baiyok			
	induce substant 6 days (after inoculate 3 days)		induce substant 9 days (after inoculate 6 days)		induce substant 6 days (after inoculate 3 days)		induce substant 9 days (after inoculate 6 days)	
	high(cm)	disease incidence	high(cm)	disease incidence	high(cm)	disease incidence	high(cm)	disease incidence
control	18.03	0.765	18.63	0.867	9.86	1.389	11.23	1.765
CaB	16.55	0.933	16.70	1.067	9.96	1.412	10.65	1.769
BTH	16.23	0.647	16.33	0.882	10.06	1.063	9.90	1.231
chitosan	14.55	0.765	15.47	1.333	10.00	1.063	11.00	1.538
CaB-SS	15.07	0.800	14.70	0.909	10.02	1.474	11.60	1.875

Disease incidence were categorized into 5 levels from percent of leaf area damage as 0 = 0.0- 0.9, 1 = 1- 4.9, 2 = 5 - 9.9, 3 = 10-14.9, 4=15 -19.9 and 5= 20- 24.9.

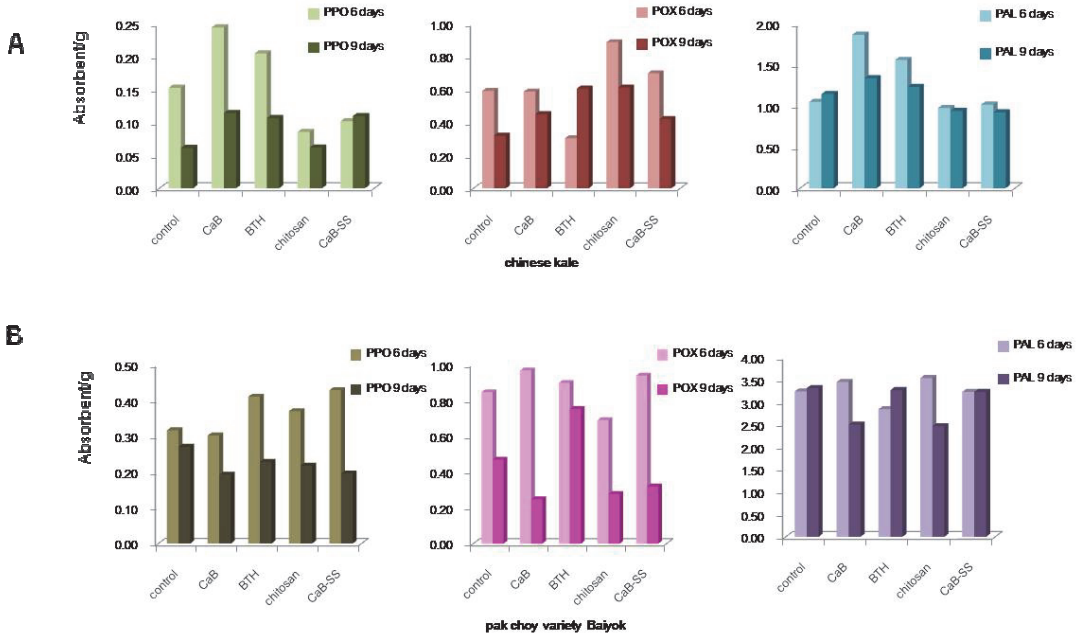

Figure 1 Induced enzymes activity from Chinese kale (A) and pak choy var. Baiyok (B) after 6 and 9 days of inducer spraying.(PPO = polyphenoloxidase, POX = peroxidase, PAL = phenylalanine ammonialyase)

วิจารณ์ผล

สารกระตุ้นความต้านทานโรคหลายชนิดอาจเกิดจากการใช้สิ่งมีชีวิตเช่น เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการกระตุ้นต้นพืชให้แข็งแรง (ดวงใจ, 2548) การใช้เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ที่เป็น nonpathogenic (He *et al*., 2002) หรือการใช้สารเคมีเช่น salicylic acid (Mandal *et al*., 2009) รวมไปถึงการใช้ BTH ให้ต้านทานต่อโรคใบจุด (เทอดพันธ์, 2548) ประสิทธิภาพของสารกระตุ้นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ที่สามารถควบคุมการเกิดโรคใบจุดในผักคะน้าและผักกาดกวางตุ้งใบหยกได้ดีได้แก่ BTH และ chitosan โดยจะพบการเกิดอาการโรคที่น้อยกว่าชุดควบคุม ภายหลังการฉีดพ่นสารกระตุ้นแล้ว 6 ถึง 9 วัน ประสิทธิภาพของสาร BTH ในการลดการเกิดโรคนี้มีความคล้ายคลึงกับที่ได้รายงานของเทอดพันธ์ (2548) และ Anfoka (2000) นอกจากนี้ฤทธิ์ของ chitosan ยังคล้ายกับการทดสอบของ Hofgaard *et al.* (2005) ที่ได้ทดสอบในข้าวสาลีและหญ้าต่อเชื้อรา *Microdochium nivale* การใช้สารกระตุ้นถูกนำมาเปรียบเทียบถึงการป้องกันตนเองของพืชที่เกิดจาก phytoalexin, PR-protein และการยับยั้ง proteinase (Hadrami *et al*., 2010) ซึ่งจะสารถช่วยลดอาการโรคและเพิ่มอัตราของผลผลิตได้

สำหรับการป้องกันตัวด้วยการสร้าง phytoalexin, PR-protein นั้น ได้ใช้การตรวจวัด PPO และ POX จะพบว่าสามารถอธิบายการยับยั้งการเกิดโรคได้ โดยเอนไซม์เหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มของ phenolic compound ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีอิทธิพลในการเตือนให้มีการสร้าง secondary product เพื่อให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อโรค การเพิ่มขึ้นของ PPO และ POX ภายหลัง

การได้รับสารกระตุ้น BTH, chitosan, CaB และ CaB-SS จะมีลักษณะที่พบในการศึกษาของ Arun *et al.* (2010) ที่ได้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ PPO, POX, CAT และ IAAO ต่อความต้านทานโรคราน้ำค้างจากเชื้อ *Sclerospora graminicola* ใน pearl millet หรือการป้องกันโรค black spot ในกุหลาบที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria tenuis* (Khatun *et al*., 2009) ในการศึกษาครั้งนี้ PAL มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยภายหลังการได้รับสารกระตุ้นซึ่งตรงข้ามจากการศึกษาของ Mandal *et al*. (2009) ที่พบ PAL เพิ่มขึ้นในมะเขือเทศ 3.5 เท่า เมื่อได้รับ salicylic acid 200 µM ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพันธุ์พืชที่ใช้ไม่สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสารกระตุ้นได้

สรุป

การใช้สาร BTH ความเข้มข้น 200 ppm ฉีดกระตุ้นผักคะน้าและกวางตุ้งใบหยกแล้ว 6 วันจะพบอาการโรคน้อยกว่าชุดควบคุม แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 9 วันหลังจากได้รับสารจะพบโรคน้อยกว่าชุดควบคุมเช่นกัน การใช้ chitosan ความเข้มข้น 1000 ppm จะมีผลต่อการลดโรคในกวางตุ้งใบหยก สารกระตุ้นทุกชนิดไม่มีผลต่อความเจริญเติบโตของพืชทดสอบ และพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase (POX) และ polyphenol oxidase (PPO) ของสารทดสอบเพิ่มสูงขึ้น แต่กิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonialyase (PAL) คงที่

เอกสารอ้างอิง

ดวงใจ เสรีไพบูลย์ทรัพย์. 2548. การตรวจสอบเอนไซม์บางชนิดในต้นแตงกวาที่ได้รับการชักนำด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ให้ต้านทานต่อเชื้อรา *Pythium aphanidermatum*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 103 น.

เทอดพันธ์ ธรรมรัตนพงษ์. 2548. ชีววิทยาและการก่อให้เกิดโรคของ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดกวางตุ้งและการกระตุ้นเพื่อให้ต้านทานต่อโรคก่อนการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 119 น.

Anfoka, G. H. 2000. Benzo-(1, 2, 3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. Crop protection 19: 401-405.

Arun, K., P.C. Mali and V.K. Manga. 2010. Changes of some phenolic compounds and enzyme activities on infected pearl millet caused by *Sclerospora graminicola*. J. Int. J. Plant Physiol. Biochem. 2: 6-10.

Beaudoin-Eagan, L. and T. A. Thorpe. 1985. Tyrosine and phenylalanine ammonia lyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. Plant Physiol. 78: 438-441.

Costet, L., S. Cordelier., S. Dorey., F. Baillieul., B. Fritig and S. Kauffmann. 1999. Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. MPMI. 12: 655-662.

Hadrami, A. E., L. R. Adam., I. E. Hadrami and F. Daayf. 2010. Chitosan in plant protection. J. Mar. Drugs. 8: 968-987.

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

Hofgaard, I. S., A. Ergon., L. A. Wanner and A. M. Tronsmo. 2005. The effect of chitosan and bion on resistance to pink snow mold in perennial ryegrass and winter wheat. J. Phytopathology. 153: 108-119.

Khatun, S., P.K. Bandyopadhyay and N.C. Chatterjee. 2009. Phenol with their oxidizing enzymes in defence against black spot of rose (*Rosa centifolia*). J. Asian J. Exp. Sci. 23: 249-252.

Mandal, S., N. Mallick and A. Mitra. 2009. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in tomato. Plant Physiology and Biochemistry 47: 642-649.

Rathmell, W. G. and L. Sequeira. 1974. Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. Plant Physiol. 53: 517-518.

Van Wess, S.C. M., M. Luijendijk, I. Smoorenburg, L. C. vanLoon and C. M. J. Pieterse. 1999. Rhizobacteria-mediated induce systemic resistance (ISP) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-relate genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. Plant Molecular Biology 41: 567-549.