การเกิดโรคใบจุดของเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) โดย *Glomerella cingulata* และผลกระทบต่อปริมาณสารเปลาโนทอลในใบ

นายธนาสาร ขาวสอาด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-883-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19652654

LEAF SPOT DISEASE OF PLAU NOI (*Croton sublyratus* Kurz.) BY *Glomerella cingulata* AND ITS EFFECT ON PLAUNOTOL LEVEL

Mr. Thanasan Khaosaad

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-334-883-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเกิดโรคใบจุดของเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) โดย *Glomerella cingulata* และผลกระทบต่อปริมาณสารเปลาโนทอลในใบ
โดย	นายธนาสาร ขาวสอาด
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ เพชรรัตน์ จันทรทิณ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์เพชรรัตน์ จันทรทิณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

ธนาสาร ขาวสอาด : การเกิดโรคใบจุดของเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.) โดย *Glomerella cingulata* และผลกระทบต่อปริมาณสารเปลาโนทอลในใบ (LEAF SPOT DISEASE OF PLAU NOI (*Croton sublyratus* Kurz.) BY *Glomerella cingulata* AND ITS EFFECT ON PLAUNOTOL LEVEL) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. เพชรรัตน์ จันทรทิณ, อ. วาสนา โตเลี้ยง, 60 หน้า. ISBN 974-334-883-2

ในการแยกเชื้อราสาเหตุของโรคใบจุดจากใบเปล้าน้อยที่นำมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และการศึกษาลักษณะเบื้องต้น พบว่า โรคดังกล่าวเกิดจากเชื้อซึ่งมีลักษณะเหมือนเชื้อรา *Glomerella cingulata* เชื้อรานี้สร้างสปอร์ได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Czapek 's agar โดยให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน

ในการปลูกเชื้อ *G. cingulata* เพื่อชักนำให้เกิดโรคใบจุดบนใบเปล้าน้อย พบว่า เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบที่เป็นโรค จะแปรผันตามปริมาณสปอร์ที่ใช้ในการปลูกเชื้อ โดยความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ ทำให้เกิดพื้นที่ใบเป็นโรคเฉลี่ย เท่ากับ 15.64 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบทั้งหมดต่อหนึ่งยอด โดยในการศึกษาการเข้าทำลายใบเปล้าน้อยของเชื้อรา *G. cingulata* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่า สปอร์ของเชื้อราจะงอกเส้นใยและสร้างแอปเพรสซอเรียมเพื่อแทงเข้าสู่พืชภายหลังการปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง เป็นต้นไป จากการจัดแบ่งกลุ่มใบที่เกิดโรคตามระดับความรุนแรงของโรคที่ปรากฏบนใบออกเป็น 6 กลุ่ม แล้ววิเคราะห์หาปริมาณสารเปลาโนทอลที่มีอยู่ในใบทั้ง 6 กลุ่ม เทียบกับปริมาณสารเปลาโนทอลในใบปกติที่เป็นสายพันธุ์เดียวกัน คือ IBGE 2 พบว่า ปริมาณสารเปลาโนทอลในใบที่เกิดโรคทั้ง 6 ระดับ ไม่มีความแตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากปริมาณสารเปลาโนทอลในใบปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต ธนาสาร ขาวสอาด

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

วาสนา โตเลี้ยง

3970664923 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Croton sublyratus* KURZ. / PLAUNOTOL / *Glomerella cingulata*

THANASAN KHAOSAAD : LEAF SPOT DISEASE OF PLAU NOI (*Croton sublyratus* Kurz.) BY *Glomerella cingulata* AND ITS EFFECT ON PLAUNOTOL LEVEL.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : PETCHARUT CHUNTARATIN, VASANA TOLIENG. 60 pp. ISBN. 974-334-883-2.

Pathogenic fungus causing leave - spot disease of Plau - Noi (*Croton sublyratus* Kurz.) was isolated from the Plau - Noi leaves collected from Prachaub Khirikhan province. It was similar to *Glomerella cingulata*. When cultivated on Czapek ' s agar with 12 - h illumination , it gave best spore formation.

When *G. cingulata* was inoculated to Plau - Noi leaves , the percentage of infected area was varied in correlation with spore density used for infection. The highest spore density tested of 10^8 spores / ml caused 15.64 % infected area on the leaf per one tip. After inoculation and observation of attacking the leaf surface with spores by scanning electron microsope , the spore germination and the formation of appressorium occurred at 48 hr. The infected leaves were classified according to their severity into 6 groups. Determination of plaunotol from the infected leaves of all groups in comparison with that of the normal leaves from Plau - Noi IBGE 2 showed that there were no significant differences among all groups including the normal one.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต ธนาสาร ขาวสอาด.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

วสนา โตเลี่อง

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์เพชรรัตน์ จันทรทิณ และ อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการวิจัยครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณไว้เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ อาจารย์ทรงศักดิ์ สำราญสุข ที่กรุณาให้คำแนะนำในการถ่ายภาพ ขอขอบคุณ คุณวีรเดช สุขเอียด ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการปลูกต้นเปล้าน้อย ตลอดจนคณะบุคคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ และ เพื่อน ๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจสำคัญและให้การสนับสนุนในการศึกษาด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญรูป..... ฏ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1
1.2 เปล้าน้อย..... 3
1.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์..... 3
1.2.2 การปลูกและขยายพันธุ์เปล้าน้อย..... 4
1.2.3 สรรพคุณของเปล้าน้อย..... 5
1.3 โรคใบจุดของเปล้าน้อย..... 6
1.3.1 ลักษณะอาการของโรค..... 6
1.3.2 การจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรค..... 6
1.3.3 สัณฐานวิทยาของเชื้อรา..... 7
1.3.4 การสร้างแอสโคสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata*..... 8
1.3.5 การงอกของสปอร์ (germination) และ การสร้างแอปเพรสซอเรียม (appressorium) เพื่อเข้าทำลายพืช..... 10
1.3.6 การแพร่ระบาดของเชื้อรา *G. cingulata*..... 11

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.3.7 โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *G. cingulata* 12
1.4 สารสำคัญในใบเปล้าน้อย 12
1.4.1 สารเปลาโนทอล (Plaunotol) 17
1.4.2 การสังเคราะห์เปลาโนทอลด้วยชีววิธี (Biosynthesis of Plaunotol) 18
1.5 มูลเหตุจูงใจ 20
1.6 ขอบเขตงานวิจัย 20

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง
2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 21
2.2 สารเคมี 22
2.3 วิธีการทดลอง 23
2.3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคใบจุดเปล้าน้อย 23
2.3.1.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรค (isolation) 23
2.3.1.2 การปลูกเชื้อบนใบเปล้าน้อย (inoculation) เพื่อทำให้เกิดโรค 23
2.3.2 ชนิดของอาหารและสภาพของแสงที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata* 24
2.3.3 ระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยที่มีผลต่อการเกิดโรคใบจุด 25
2.3.3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *G. cingulata* 25
2.3.3.2 การเตรียมต้นเปล้าน้อยที่เป็นโรคใบจุด 25
2.3.4 การเข้าทำลายใบเปล้าน้อยของเชื้อรา *G. cingulata* 26
2.3.5 ความสัมพันธ์ของระดับความรุนแรงของโรคใบจุดกับปริมาณสารเปลาโนทอลที่สกัดจากใบเปล้าน้อย 27
2.3.5.1 การสกัดสารเปลาโนทอลจากใบเปล้าน้อย 27
2.3.5.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์สารเปลาโนทอล 28
2.3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารเปลาโนทอล 28

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3. ผลการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อราสาเหตุและการเกิดโรคใบจุดของเปล้าน้อย..... 30

3.2 ชนิดของอาหารและสภาพของแสงที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata*..... 33

3.3 ระดับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *G. cingulata* ที่มีผลต่อการเกิดโรคใบจุดกับเปล้าน้อย..... 34

3.4 การเข้าทำลายใบเปล้าน้อยของเชื้อรา *G. cingulata*..... 38

3.5 ความสัมพันธ์ของระดับความรุนแรงของโรคใบจุดกับปริมาณสารเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อย..... 41

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 43

รายการอ้างอิง..... 48

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในงานวิจัย..... 55

ภาคผนวก ข แผนภาพแสดงวิธีการประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดของต้น alfalfa.... 57

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานและโครมาโตแกรมของสารเปลาโนทอล..... 58

ประวัติผู้เขียน..... 60

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1.1 ชนิดของสารเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสารที่ทำการสกัดจากใบเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz.)..... 13

2.1 แสดงชื่อเครื่องมือ รุ่น และ บริษัทผู้ผลิต..... 21

2.2 แสดงรายชื่อสารเคมี และ บริษัทผู้ผลิต..... 22

3.1 แสดงจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata* ($x10^4$ สปอร์ต่อหลอดวุ้นอาหารเอียง) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ในสภาพการเลี้ยงที่ไม่ให้แสง เปรียบเทียบกับเชื้อที่ทำการเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน..... 33

3.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดของเปล้าน้อย ซึ่งได้จากการเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดของยอดต้นเปล้าน้อยจำนวน 3 ยอด ภายหลังการปลูกเชื้อรา *G. cingulata* ด้วยการพ่นสปอร์แขวนลอย ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 10^6, 10^7 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์..... 35

3.3 แสดงเปอร์เซ็นต์เปลาโนทอล(ต่อน้ำหนักใบแห้ง)ที่สกัดได้จากใบเปล้าน้อยซึ่งมีอาการโรคใบจุด ที่มีระดับการเกิดโรคต่าง ๆ กัน 7 ระดับ..... 42

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1.1 แสดงขั้นตอนการสร้างแอสโคสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata*..... 9

1.2 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเปลาโนทอล..... 17

1.3 สมมติฐานการเกิดสารเปลาโนทอลจากเจอรานิลเจอรานิออล..... 18

1.4 แสดงกระบวนการสังเคราะห์เปลาโนทอลด้วยกระบวนการทางชีววิธี..... 19

3.1 แสดงลักษณะอาการโรคใบจุดเปล้าน้อยที่เกิดจากเชื้อรา *G. cingulata* เป็นจุดแผลกลมสีดำปรากฏด้านหลังใบ และมีวงสีเหลืองหรือสีน้ำตาล(halo)ล้อมรอบแผล..... 31

3.2 แสดงแอสคัส และ แอสโคสปอร์ของเชื้อรา *G. cingulata* 31

ก. แอสคัสที่ติดกับเนื้อเยื่อของใบเปล้าน้อย (กำลังขยาย 100 เท่า)..... 31

ข. แอสคัสเดี่ยวๆ ที่แยกออกมาจากเนื้อเยื่อใบเปล้าน้อย ภายในมี 8 แอสโคสปอร์ (กำลังขยาย 400 เท่า)..... 31

3.3 แสดงโคโลนีของเชื้อรา *G. cingulata* บนอาหารแข็ง potato dextrose agar (PDA) ซึ่งมีลักษณะเส้นใยฟู และบริเวณกลางโคโลนีเส้นใยมีสีเขียวเข้ม จนถึง สีดำ..... 32

3.4 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (กำลังขยาย 400 เท่า)..... 32

3.5 แสดงเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบเปล้าน้อยที่เกิดโรคใบจุด 80 เปอร์เซ็นต์..... 37

3.6 แสดงเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใบเปล้าน้อยที่เกิดโรคใบจุด 5 เปอร์เซ็นต์..... 37

3.7 แสดงการเข้าทำลายใบเปล้าน้อยของเชื้อรา *G. cingulata* ภายหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการตรวจผิวใบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่า สปอร์เริ่มสร้างเส้นใยเจริญบนผิวใบเปล้าน้อย.(กำลังขยาย 2,000 เท่า)..... 39

3.8 แสดงการเข้าทำลายใบเปล้าน้อยของเชื้อรา *G. cingulata* ภายหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจผิวใบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าสปอร์ของเชื้อรามีการงอกเส้นใยยาวมากขึ้น.(กำลังขยาย 700 เท่า)..... 39

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่

3.9 แสดงการเข้าทำลายใบเปล้าน้อยของเชื้อรา *G. cingulata* ภายหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจผิวใบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าเชื้อราเริ่มสร้างแอปเพรสซอเรียมเพื่อแทงเข้าสู่ใบ(กำลังขยาย2,700 เท่า)..... 40

3.10 แสดงการเข้าทำลายใบเปล้าน้อยของเชื้อรา *G. cingulata* ภายหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ทำการตรวจผิวใบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าเชื้อสร้างแอปเพรสซอเรียมที่สมบูรณ์เป็นรูปกลีบ (กำลังขยาย 2,700 เท่า)..... 40

ค-1 กราฟมาตรฐานของสารเปลาโนทอล..... 58

ค-2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเปลาโนทอลและสารนอร์มอลออกตาโคเซนซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard)..... 58

ค-3 โครมาโตแกรมของสารเปลาโนทอลที่สกัดได้จากใบเปล้าน้อยและสารนอร์มอลออกตาโคเซนซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard)... 59