การปรับปรุงพันธุ์พิทูเนียเพื่อให้ทนโรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora parasitica*

Breeding of Petunia for Tolerance to Stem Rot Caused by *Phytophthora parasitica*

ยุภาวดี พิมพ์สมาน[1] สุดฤดี ประเทืองวงศ์[2] และ ธัญญะ เตชะศีลพิทักษ์[1]

Yupawadee Pimsamarn[1] Sutruedee Prathuangwong[2] and Thunya Thachasinpituk[1]

Abstract

Breeding of petunia between 4-tolerant clones (female parent) and 13 commercials (male parent) using the cross breeding technique has been conducted. Selection of combination hybrid with early flowering, compact habit was further evaluated for stem rot tolerance against Phytophthora parasitica. The 3 combination-hybrids included P1 x Multis Pink, P1 x Tornado Sky Blue and P2 x Tornado Plum Crystal exhibited low disease incidence (number of infected plant) and disease index (% infected leaf area) of 11.11-22.22% and index 1; and 5.56-11.11% and index 1 and evaluated on seedling and adult growth stage. After stem base were inoculated with pathogen disc where the promised clone P1 showed higher assessmently of both of 44.45% and 2; and 38.89% and 2, respectively. A correlation between disease reduction and resistance induction were observed. Phenol and peroxidase were expressed increasingly maximum at 3; and 4 days from the 3 combination-hybrids which compared to P1 and P2 (male parent). After having inoculated, the highest accumulation of phenol and peroxidase activity were 106.11, 101.51, 103.17, 90.85 and 92.41 ?g catechol mg-1protein, respectively, and 3.75, 3.62, 3.67, 3.56 and 3.30 min-1mg-1 protein min-1mg-1 protein, respectively. This study shows the tolerant possibility of 3-combonation hybrids that can limit disease development with rapid response of their defense mechanism. The defense-related enzymes detected in the tested plant are also validated in evaluating tolerance of petunia.

Keywords : Cross breeding, defense-related enzymes, hybrid petunia

[1]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพ 10900

[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok 10900. THAILAND

[2]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพ 10900

[2]Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok 10900. THAILAND

รับเรื่อง: มีนาคม 2554

* Corresponding author: agrtyt@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์พิทูเนียโดยการผสมเกสรระหว่างพันธุ์ที่ทนทานต่อการเกิดโรคลำต้นเน่า จำนวน 4 พันธุ์ กับพันธุ์การค้า จำนวน 15 พันธุ์ ได้ลูกผสมรุ่นที่ 1 จำนวน 30 คู่ผสม การเจริญเติบโตของลูกผสม พบว่า มีกระจายตัวของลักษณะต่าง ๆ มาก คัดเลือกต้นที่มีลักษณะ ดอกดก สีสันสวยงาม ทรงพุ่มแน่น และทนทานต่อโรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อ Phytophthora parasitica พบว่าคู่ผสมที่ผ่านการคัดเลือกคือคู่ผสม P1 x Multis Pink, P1 x Tornado Sky Blue และ P2 x Tornado Plum Crystal ซึ่งมีเปอร์เซ็นการเกิดโรค (จำนวนต้นที่เป็นโรค) และดัชนีความรุนแรง (บริเวณเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค) อยู่ในระดับต่ำ โดยมีเปอร์เซ็นการเกิดโรคในระยะต้นกล้าเท่ากับ 11.11 - 22.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในระยะต้นโตเต็มวัยเท่ากับ 5.56 - 11.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคอยู่ในระดับ 1 หลังจากปลูกเชื้อโดยการวางชิ้นวุ้นที่โคนต้น ทั้งระยะต้นกล้าและต้นโตเต็มวัย ในขณะที่พันธุ์เปรียบเทียบ P1 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงกว่า ทั้งในระยะต้นกล้าและระยะต้นโตเต็มวัย คือ 44.45 และ 38.89% ตามลำดับ และมีดัชนีการเกิดโรคระดับ 2 โดยพันธุ์ลูกผสมทั้ง 3 คู่ผสม จะมีสารและกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความทนทาน คือ ฟีนอล และ peroxidase สะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ทนทานต้นแม่พันธุ์ P1 และ P2 พบว่ามีการเกิดขึ้นได้รวดเร็วในวันที่ 1 และ2 และสูงสุดในวันที่ 3 และ 4 วัดระดับ ฟีนอลสูงสุดได้ 106.11, 101.51, 103.17, 90.85 และ 92.41 µg catechol mg-1protein ตามลำดับ และระดับกิจกรรมของ peroxidase เพิ่มสูงสุดที่ 3.75, 3.62, 3.67 3.56 และ 3.30 min-1mg-1 protein ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า พิทูเนียลูกผสมทั้ง 3 คู่ผสม มีแนวโน้มทนทานต่อโรค ซึ่งสามารถตอบสนองด้วยการสร้างสารดังกล่าวออกมา ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบพันธุ์ทนทานโรคได้อย่างถูกต้อง ดังนั้น ลูกผสมพิทูเนียทั้ง 3 คู่ผสม จึงทนทานต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าได้เป็นอย่างดี

คำนำ

พิทูเนีย (*Petunia hybrida*) เป็นไม้ดอกล้มลุกจัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae นิยมปลูกกันมากทั้งเป็นไม้กระถาง แขวน ปลูกประดับแปลง ปัจจุบันพิทูเนียได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพิทูเนียมีรูปทรง เอกลักษณ์เฉพาะตัว ทรงเลื้อย สีสันที่สดใส และหลากหลาย การปรับปรุงพันธุ์พิทูเนียนอกจากจะมุ่งเน้นในเรื่องของทรงพุ่มที่สวยงาม และสีดอก ที่หลากหลายแล้ว ยังต้องคำนึงถึงความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมรวมทั้งโรค และแมลง แต่เนื่องจากในปัจจุบันพบปัญหาสภาพอากาศแปรปรวน เมื่อปลูกพิทูเนียในฤดูฝน หรือช่วงที่มีฝนตกชุก ส่งผลให้เกิดการระบาดของโรคลำต้นเน่าที่มีสาเหตุจาก *Phytopthora. parasitica* (Le Berre, 2007) ทำให้พิทูเนียได้รับความเสียหาย โดยโรคดังกล่าวจะทำให้ พิทูเนียแสดงอาการกิ่งเหี่ยว เน่า และตายจากยอดลงมา ทั้งนี้พืชจะมีกลไกป้องกันตัวเอง เมื่อพืชถูกเชื้อโรคเข้าทำลายหรือได้รับบาดแผลจากวิธีกลอื่นๆ โดยสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของพืช (defense related enzyme) เช่น peroxidase, phenylalanine ammonia lyase และสารประกอบฟีนอล เป็นต้น(Hammerschmidt, 1999) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์พิทูเนียให้มีความทนทานต่อลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora parasitica* โดยศึกษาถึงประกอบ ฟีนอลและกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ในพิทูเนียลูกผสมที่เกิดขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การผสมพิทูเนียพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์การค้า

วิธีการผสมเกสร

นำพิทูเนียพันธุ์ต้านทานที่ได้คัดเลือกไว้ทั้ง 4 พันธุ์ (Longpichai, 2008)ใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ P1, P2,

P3 และ P4 ผสมเกสรกับ พิทูเนียพันธุ์การค้า F_1 ซื้อจาก บริษัท เอ เอฟ เอ็ม ฟลาวเวอร์ ซีดส์ (ไทยแลนด์) จำกัด จำนวน 13 พันธุ์ ใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์ ได้แก่ Multis Pink, Multis Rose, Multis Straberry Burgunny, Multis Blue, Multis purple, Multis Purple, Tornado Plum Crystal, Tornado Sky Blue, Tornado Blue Frost, Tornado Carmine, Tornado Lavender, Tornado Red Halo และ Tornado Salmon ทำการผสมเกสรแบบสุ่ม จำนวนทั้งหมด 30 คู่ผสม จากนั้นนำเมล็ดลูกผสมที่ได้มาเพาะเมล็ดโดยใช้ peat moss เป็นวัสดุเพาะ เมื่อต้นกล้ามีอายุ 10-15 วัน ย้ายกล้าลงถาดหลุมในวัสดุปลูก peat moss เมื่อต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ ย้ายปลูกลงกระถาง 4 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูก ประกอบด้วย ทราย: ขุยมะพร้าว: กาบมะพร้าวสับ: ถ่าน: แกลบ: ปุ๋ยหมัก อัตรา 1: 1: 1: 1: 1: 0.5 ใส่ปุ๋ยละลายช้า อัตรา 5 กรัมต่อกระถาง ให้ปุ๋ยชนิดเกล็ดละลายน้ำสูตร 21- 21- 21 อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุกสัปดาห์คัดเลือกต้นที่มีดอกดก สีสวยงาม ขนาดดอกปานกลาง 3-5 เซนติเมตร ทรงพุ่มแน่น และแข็งแรง มาศึกษาทดลอง

การทดสอบความทนทานต่อโรคลำต้นเน่าระดับสัณฐานวิทยา

การเตรียมเชื้อ *P. parasitica* เชื้อสาเหตุโรค

แยกเชื้อ *P. parasitica* จากใบ ลำต้นและราก ของต้นพิทูเนียที่แสดงอาการโรคลำต้นเน่า โดยวิธี tissue transplanting จากพิทูเนียพันธุ์ Multis Pink โดยนำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคไปวางบนอาหารจำเพาะ PDA+RNV (benlate, ritadin, pentachloronitrobenzene, ampicilin, และ mycostatin (Fujisawa and Masako, 1975) เมื่อมีเส้นใยเชื้อราเจริญบนอาหารจำเพาะจึงทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และนำไปเลี้ยงบนอาหาร carrot agar (CA) เพื่อเก็บรักษาเชื้อรา สำหรับการศึกษาต่อไป

การคัดเลือกพันธุ์พิทูเนียลูกผสม ที่มีความทนทานต่อเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่า

ระยะต้นกล้า นำ (ต้นกล้าอายุ 45 วัน จำนวน 30 คู่ผสม) ไปทดสอบความทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *P. parasitica* ในกระบะเพาะ ซึ่งใช้ peat moss เป็นวัสดุปลูก โดยตัดเส้นใยเชื้อราด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ที่มีอาหาร CA จากนั้นนำไปวางลงบริเวณโคนต้นพิทูเนียจำนวน 2 ชิ้นต่อต้น (Nibuntham, 2009)

ระยะต้นโตเต็มวัย (Adult stage) โดยใช้กิ่งปักชำอายุ 21 วัน ของ (ต้นพิทูเนียอายุ 5 เดือน จำนวน 30 คู่ผสม) ปลูกในกระถางขนาด 4 นิ้ว ตัดเส้นใยเชื้อราด้วย cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ที่มีอาหาร CA วางลงบริเวณโคนต้นพิทูเนียจำนวน 4 ชิ้นต่อต้น (Nibuntham, 2009) ตรวจผลการทดลองทุกวัน เป็นเวลา 14 วันหลังการปลูกเชื้อ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวนละ 3 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ F-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ประเมินประสิทธิภาพความทนทานต่อการเกิดโรค โดยวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของการเกิดโรค แบ่งระดับความรุนแรงอาการโรค แบ่งเป็น 5 ระดับ ดังนี้ 0 = พืชไม่เป็นโรค; 1 = $\leq$50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ, $\leq$50% ใบเหี่ยว; 2 = >50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ หรือ >50% ใบเหี่ยว; 3 = $\leq$50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ และ >50% ใบเหี่ยว หรือ >50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ และ $\leq$50% ใบเหี่ยว; 4 = >50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ และ >50%ใบเหี่ยว-เน่า; 5 = พืชเน่าตายทั้งต้น (Silvar *et al*. 2005.) แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าดัชนีของโรคตามวิธีการของ (Cirulli and Alexander, 1966)

$$\text{การวัดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นที่แสดงอาการของโรค}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ดัชนีของโรค (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นที่แสดงอาการ x ระดับอาการ)}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด x ระดับอาการสูงสุด}} \times 100$$

การทดสอบความทนทานต่อโรคในระดับชีวเคมี

โดยแบ่งพืชทดสอบเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแข็งแรง (พันธุ์ต้านทาน) กลุ่มอ่อนแอ (พันธุ์การค้า) และกลุ่มลูกผสมที่ทนทาน นำพิทูเนียลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกซึ่งมีการเจริญเติบโตดี ดอกดก ทรงพุ่มแน่น แข็งแรง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของอาการโรคต่ำที่สุด มา 3 คู่ผสม วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ต้น มีโดยการปลูกพืชและปลูกเชื้อสาเหตุโรคในระยะต้นโตเต็มวัย โดยหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 1 วันเริ่มนำใบพืชที่ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ที่สะสมเพิ่มขึ้นและตรวจสอบติดต่อกันทุกวัน นาน 5-7 วัน หลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคจนกว่ากิจกรรมการสะสมสารที่เกี่ยวข้องเริ่มลดลงสู่ปกติ

การสกัดโปรตีนรวมของพิทูเนีย

บดใบพิทูเนีย 0.1 กรัม ใน homogenization buffer ปริมาตร 1 ml เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976) นำไปตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer CE 1011 1000 SERIES โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน

การตรวจหาปริมาณสารฟีนอล

บดใบพิทูเนีย 1 กรัม ด้วย 80 % methanol ปริมาตร 10 ml ใส่ในหลอดทดลองไปต้มในน้ำพร้อมเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิ 70 ºC เป็นเวลา 15 นาที นำสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมสาร 1 *N* Folin-Ciocalteau phenol reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ºC วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร โดย 1 หน่วยของปริมาณสารฟีนอล แสดงเป็นหน่วย μg catechol mg^{-1}protein (Zieslin and Ben-Zaken, 1993)

การวิเคราะห์กิจกรรมของ peroxidase

นำโปรตีนทั้งต้น ที่สกัดได้จากใบพิทูเนีย ปริมาตร 10 ml มาหาค่ากิจกรรมของ peroxidase โดยปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 1,019 ไมโครลิตร ของสารลายซับเตรทของ peroxidase (guaiacol, hydrogen peroxide และ 10 nM sodium phosphate buffer, pH 6.0 ปริมาตร 50 ml) จากนั้นทำการวัดค่าความดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร บันทึกค่าทุกๆ 30 วินาที จนครบ 2 นาที ที่อุณภูมิห้อง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ peroxidase เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยให้ 1 หน่วย ของกิจกรรม หมายถึง peroxidase ที่ออกซิไดส์ 1 ไมโครโมล ของซับสเตรท ในเวลา 1 นาที ($min^{-1}mg^{-1}$protein) (Hammerschmidt, 1999)

ผลและวิจารณ์

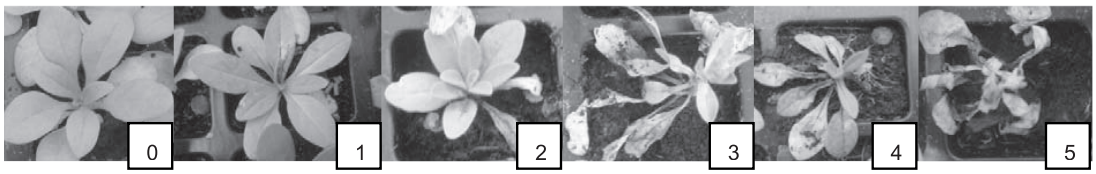
การเจริญเติบโตของพิทูเนียลูกผสม

จากการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของลูกผสม ขนาดความสูง ความกว้างทรงพุ่ม จำนวนดอก และเส้นผ่าศูนย์กลางดอก ของลูกผสมทั้งหมด 30 คู่ผสม ซึ่งแสดงข้อมูลเพียง 10 คู่ผสมที่ผ่านการคัดเลือกเนื่องจากมีการเจริญเติบโตดี ต้นโตเร็ว ดอกดก ทรงพุ่มแน่น มีการเจริญเติบโตดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ พบว่า ลูกผสมที่ได้มีการกระจายตัวสูง และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) เนื่องจากลูกผสมที่ได้เป็นลูกผสมรุ่นที่ 1 จึงมีลักษณะที่กระจายตัวมาก สอดคล้องกับการทดลองของ (Longpichai, 2008) รายงานผลการกระจายตัวของลักษณะต่าง ๆ ของลูกผสมชั่วที่ 1 ของพิทูเนีย พบลักษณะที่แสดงออกไม่สามารถจัดหมวดหมู่ได้ มีการกระจายตัวมากกว่ารุ่นพ่อแม่ แต่ละพันธุ์มีจีโนไทป์ที่แตกต่างกันทุกต้น รวมอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมภายนอกเข้าไปด้วย จึงเป็นสาเหตุต่างๆให้มีความแปรปรวนมากยิ่งขึ้น

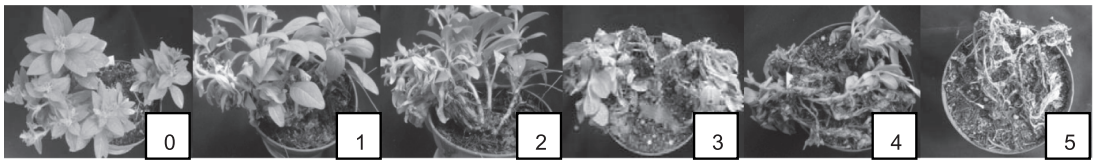
ความทนทานต่อโรคลำต้นเน่าของพิทูเนียลูกผสม

จากการปรับปรุงพันธุ์พิทูเนียทั้งหมด 30 คู่ผสม พบว่า ลูกผสมส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของอาการโรคต่ำกว่าประชากรรุ่นพ่อแม่ และลูกผสมส่วนใหญ่ มีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคอยู่ในระดับ 2 (ภาพที่ 1-2) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคอยู่ระหว่าง 26-50% (ไม่ได้แสดงข้อมูล) พบว่ามีเพียง 3 คู่ผสมที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำสุด และมีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคอยู่ในระดับ 1 โดยระยะต้นกล้า เริ่มแสดงการเกิดโรคในวันที่ 8 ส่วนระยะต้นโตเต็มวัย เริ่มแสดงการเกิดโรค

ในวันที่ 13 จากผลการทดลองพบพิทูเนียที่มีความทนทานต่อโรคลำต้นเน่าทั้งในระยะต้นกล้าและระยะต้นโตเต็มวัย คือ คู่ผสม P1 x Multis Pink, P1 x Tornado Sky Blue และ P2 x Tornado Plum Crystal โดยคู่ผสม P1 x Multis Pink ทนทานต่อการเกิดโรคลำต้นเน่ามากที่สุดทั้งในระยะต้นกล้าและระยะต้นโตเต็มวัย มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 11.11 และ 5.56% ตามลำดับ รองลงมาคือคู่ผสม P1 x Tornado Sky Blue และ P2 x Tornado Plum มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 16.67 และ 22.22% ตามลำดับ ส่วนในระยะต้นโตเต็มวัย มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 11.11% (ตารางที่ 2) จะเห็นได้ว่าการเกิดโรค ในระยะต้นกล้าจะสูงกว่าระยะต้นโตเต็มวัย เนื่องจากในระยะต้นกล้านั้น อยู่ในระยะที่กำลังเจริญเติบโตและเซลล์พืชจะมีลักษะอวบน้ำยังไม่แข็งแรงเพียงพอ เมื่อถูกเชื้อโรคเข้าทำลายจึงง่ายต่อการติดเชื้อ โดยเฉพาะส่วนของใบและลำต้นจะอ่อนและอวบน้ำ อีกทั้งช่วงเวลาที่ได้ทำการทดลองปลูกพิทูเนียในระยะต้นกล้า เป็นช่วงที่มีฝนตกชุกติดต่อกัน 1- 2 สัปดาห์ ซึ่งเหมาะสมต่อการระบาดของโรค เพราะ พิทูเนียเป็นพืชที่อ่อนแอต่อสภาพที่มีความชื้นสูง โดยเชื้อ *P. parasitica* อาศัยอยู่ในดินสามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว ในสภาพที่ดินมีน้ำขังหรือมีความชื้นสูง (Le Berre, 2007) ส่วนในระยะต้นโตเต็มวัย ลูกผสมทั้งสาม มีลักษณะใบที่หนาและ ลำต้นแข็งแรง ทั้งนี้เนื่องจากพืชที่แก่เต็มที่มีสาร lignin like polymers มีความเข้มข้นของสารสูงกว่าพันธุ์อ่อนหรือต้นที่อายุน้อยกว่า ซึ่งมีหน้าที่คล้ายกับสารที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค (Huckelhoven, 2007)



ภาพที่ 1 อาการโรคลำต้นเน่าทั้ง 5 ระดับ ของพิทูเนียในระยะต้นกล้าที่เกิดจาก *Phytophthora parasitica* 0 = พืชไม่เป็นโรค; 1 = ≤50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ, ≤50% ใบเหี่ยว; 2 = >50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ หรือ >50% ใบเหี่ยว; 3 = ≤50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ และ >50% ใบเหี่ยว หรือ >50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ และ ≤50% ใบเหี่ยว; 4 = >50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ และ >50%ใบเหี่ยว-เน่า; 5 = พืชเน่าตายทั้งต้น



ภาพที่ 2 อาการโรคลำต้นเน่าทั้ง 5 ระดับ ของพิทูเนียในระยะต้นกล้าที่เกิดจาก *Phytophthora parasitica* 0 = พืชไม่เป็นโรค; 1 = ≤50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ, ≤50% ใบเหี่ยว; 2 = >50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ หรือ >50% ใบเหี่ยว; 3 = ≤50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ และ >50% ใบเหี่ยว หรือ >50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ และ ≤50% ใบเหี่ยว; 4 = >50% ลำต้นมีแผลสีน้ำตาลฉ่ำน้ำ และ >50%ใบเหี่ยว-เน่า; 5 = พืชเน่าตายทั้งต้น

ความทนทานของพิทูเนียลูกผสมต่อโรคในระดับชีวเคมี

การตรวจหาปริมาณสารฟีนอล

จากการตรวจหาปริมาณสารฟีนอลของพิทูเนียลูกผสมในระยะต้นโตเต็มวัย พบว่า คู่ผสม P1 x Multis Pink, P1 x Tornado Sky Blue, P2 x Tornado Plum Crystal และพันธุ์ P2 พบมีการสะสมสารฟีนอล เพิ่มขึ้นในวันที่ 1 หลังจากปลูกเชื้อ *P. parasitica* วัดระดับฟีนอลได้ 91.3, 86.79, 85.42 และ 79.44 µg catechol mg^{-1}protein ตามลำดับ และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3, 3, 3 และ 5 ตามลำดับ วัดระดับ การสะสมของฟีนอลได้ 106.11, 101.51, 103.17 และ 92.41 µg catechol mg^{-1}protein ตามลำดับ ส่วนพันธุ์เปรียบเทียบ พันธุ์ P1, Multis Pink, Tornado Sky Blue และTornado Plum Crystal มีการสะสมสารฟีนอลเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 วัดระดับฟีนอลได้ 82.10, 75.71, 69.01 และ 60.31 µg catechol mg^{-1}protein ตามลำดับ และมีการสะสมปริมาณสารฟีนอลสูงสุดในวันที่ 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ วัดระดับการสะสมของฟีนอลได้ 90.85, 87.45, 84.61 และ 70.17 µg catechol mg^{-1}protein ตามลำดับ (ภาพที่ 3A-3C)

การวิเคราะห์กิจกรรมของ peroxidase

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของ peroxidase ในระยะต้นโตเต็มวัย พบว่า คู่ผสม P1 x Multis Pink, P1 x Tornado Sky Blue, P2 x Tornado Plum Crystal และพันธุ์ P1 มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase สะสมเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 โดยสามารถวัดระดับกิจกรรมเอนไซม์ได้ 3.51, 3.30, 3.21 และ 3.29 $min^{-1}mg^{-1}$ protein ตามลำดับ และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3, 3, 3 และ 4 ตามลำดับ ที่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ 3.75, 3.62, 3.67 และ 3.56 $min^{-1}mg^{-1}$protein ตามลำดับ ส่วนพันธุ์เปรียบเทียบ P2, Multis Pink, Tornado Sky Blue และ Tornado Plum Crystal มีระดับกิจกรรมของ peroxidase สะสมเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 วัดระดับกิจกรรมเอนไซม์ได้ 3.04, 2.97, 3.02 และ 2.85 $min^{-1}mg^{-1}$protein ตามลำดับ และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 4, 5, 5 และ 5 ตามลำดับ ที่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ 3.30, 3.45, 3.31 และ 3.19 $min^{-1}mg^{-1}$protein ตามลำดับ (ภาพที่ 3D-3F)

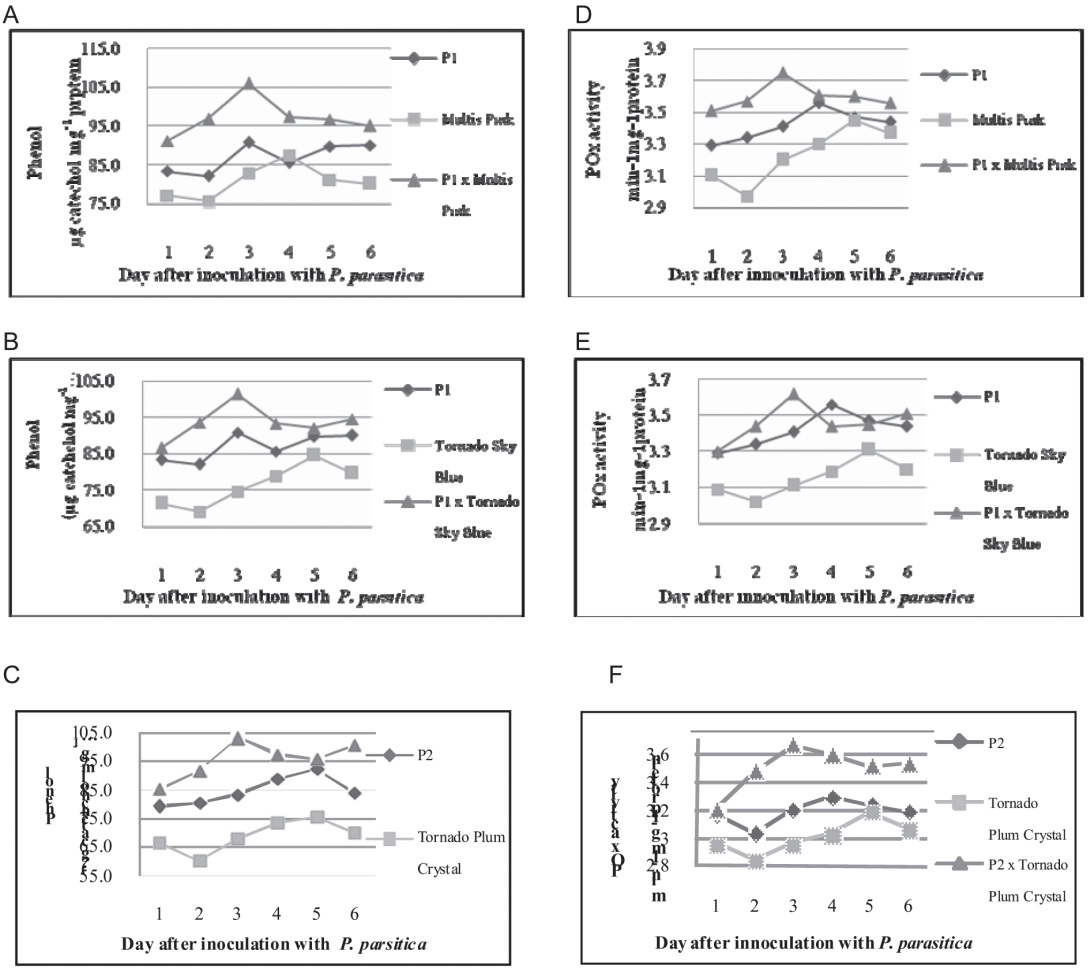
การตรวจสอบลักษณะความทนทานต่อโรคลำต้นเน่าทางชีวเคมี พบว่า ลูกผสมที่คัดมาทั้ง P1x Multis Pink, P1 x Tornado Sky Blue และ P2 x Tornado Plum Crystal มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำ ซึ่งสัมพันธ์กับการสะสมปริมาณสารฟีนอลและระดับกิจกรรมของ peroxidase เกิดขึ้นได้รวดเร็วในวันที่ 1 และ 2 หลังจากปลูกเชื้อ แสดงว่าพิทูเนียลูกผสมทั้งสามคู่ผสม มีกลไกในการป้องกันตัวเองที่รวดเร็วและเมื่อเกิดโรค พบแผลเป็นจุดสีน้ำตาลบนใบ หลังจากนั้นเนื้อเยื่อจะเริ่มแห้งตาย ไม่มีการเจริญลุกลามของเชื้อ โดย Wang (2003) รายงานว่า ลักษณะเซลล์พืชที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มักเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase โดยที่ผนังเซลล์ เอนไซม์ peroxidase; POX จะมีบทบาทในการสร้าง lignin และการสร้าง hydroxyproline บริเวณที่มีการติดเชื้อของเชื้อโรคทำให้เชื้อโรคไม่สามารถเจริญภายในเซลล์พืชที่เป็นสีน้ำตาลได้นอกจากนี้เอนไซม์ peroxidase ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคโดยตรง ในด้านความเป็นพิษต่อเชื้อโรค จากคุณสมบัติของเอนไซม์ peroxidase เอง สอดคล้องกับการรายงานของ Prathuangwong (2007) เมื่อพืชถูกเชื้อโรคเข้าทำลายพืชจะสร้างกระบวนการต้านทานเพื่อป้องกันตนเอง โดยพวกฟีนอลทั้งที่พืชมีอยู่เดิมและหลังจากถูกชักนำให้สะสมเพิ่มขึ้นด้วยกลไกปกป้องตนเองของพืช ซึ่งมีพิษต่อเชื้อโรคโดยตรง ในขณะที่ peroxidase จะไปสร้างเสริมให้ผนังเซลล์พืชแข็งแรงและทนต่อการติดเชื้อภายหลังชักนำให้พืชสร้าง phythogenesis related protein protein (PR-protein) และ phytoalexin ซึ่งส่งผลยับยั้งกระบวนการเกิดโรค

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ลูกผสมพิทูเนียมีความทนทานต่อโรคลำต้นเน่าทั้งในระยะต้นกล้า และระยะต้นโตเต็มวัย แสดงให้เห็นว่า การถ่ายทอดยีนถูกควบคุมด้วยยีนแบบ oligogenic gene หรือ monogenic resistance ควบคุมด้วยยีนหลัก (major gene) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วมักเป็นยีนเด่น (dominant gene) สามารถถ่ายทอดต่อไปได้ง่าย โดยทั่วไปลักษณะความต้านทานแบบนี้จะมีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อโรค กล่าวคือ ลักษณะความต้านทานจะ

แสดงออกทั้งในระยะที่เป็นต้นอ่อน และระยะที่เป็นต้นโตเต็มวัย (Jin *et al*., 2007)

สรุป

การปรับปรุงพันธุ์พิทูเนียลูกผสม โดยการผสมพันธุ์ระหว่างพิทูเนียพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์การค้า พบว่าลูกผสมมีการกระจายตัวสูง เนื่องจากเป็นลูกผสมรุ่นที่ 1 และพ่อแม่พันธุ์ไม่ใช่สายพันธุ์แท้ และ เมื่อประเมินความทนทานต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าในระดับสัญฐานวิทยาและกระบวนการทางชีวเคมีของพิทูเนียลูกผสมที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ พบว่าคู่ผสม P1x Multis Pink, P1 x Tornado Sky Blue และ P2 x Tornado Plum Crystal มีการเกิดโรคต่ำ ในระยะต้นกล้ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 11.11-22.22% ส่วนระยะต้นโตเต็มวัยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 5.56-11.11% และมีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคอยู่ในระดับ 1 ทั้งในระยะต้นกล้าและต้นโตเต็มวัย การสะสมของปริมาณสารฟีนอลและระดับกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase เกิดขึ้นได้รวดเร็วในวันที่ 1 และ 2 หลังจากปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นว่าลูกผสมทั้งสาม มีความทนทานต่อการเกิดโรคลำต้นเน่าได้เป็นอย่างดี ทั้งในระยะต้นกล้าและระยะต้นโตเต็มวัย เหมาะที่จะนำพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เหมาะสมที่จะส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกจำหน่าย และใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในงานปรับปรุงพันธุ์ต่อไป



ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารฟีนอลของพิทูเนียลูกผสม (A-C) และการเปลี่ยนแปลงกิจกรรม POX ของพิทูเนียลูกผสม (D-F) ที่ปลูกด้วยเชื้อ *P. parasitica*

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของลักษณะต่าง ๆ ในพิทูเนียลูกผสม เปรียบเทียบกับพ่อแม่พันธุ์หลังย้ายปลูก 90 วัน[1/]

พ่อแม่พันธุ์/ลูกผสม	ความสูงทรงพุ่ม (เซนติเมตร)	ความกว้างทรงพุ่ม (เซนติเมตร))	จำนวนดอก/ต้น (ดอก)	เส้นผ่านศูนย์กลางดอก (เซนติเมตร)
P1	16.2±4.3^{e}	34.4±3.3^{ab}	30.2±2.3^{ef}	3.3±2.1^{de}
P2	15.7±2.8^{e}	32.6±2.3^{c}	29.4±3.3^{f}	3.5±2.9^{cd}
Multis Pink	19.7±3.3^{cd}	26.7±3.5^{f}	18.7±4.4^{h}	4.3±1.4 ^{b}
Tornado Sky Blue	18.6±3.5^{d}	28.4±4.1^{le}	21.3±3.9^{g}	4.5±2.1 ^{ab}
P1 x Multis Pink	18.9±5.3^{d}	35.6±4.2^{a}	34.2±4.5^{a}	3.1±2.3^{e}
P1 x Tornado Sky Blue	19.4±2.9^{d}	33.4±1.4^{bc}	32.4±1.9^{bcd}	3.3±5.2^{de}
P1 x Tornado Plum Crystal	18.3±4.1^{d}	32.0±4.2^{c}	30.3±3.1^{ef}	3.5±2.1^{cd}
P2 x Tornado Plum Crystal	18.5±4.1^{d}	31.3±2.9^{d}	31.3±3.3^{ed}	3.5±1.8^{cd}
P3 x Multis Rose	19.4±3.2^{d}	29.2±3.1^{de}	30.6±1.3^{ef}	3.3±4.9^{de}
P3 x Multis Blue	21.2±2.8^{bc}	32.3±3.3 ^{c}	31.7±3.3^{bcde}	3.6±4.3^{cd}
P3 x Tornado Blue Frost	21.3±3.5^{b}	31.0±2.3^{d}	30.0±1.7^{ef}	4.5±2.4^{ab}
P3 x Tornado Plum Crystal	21.5±4.1^{b}	30.2±4.1^{d}	33.2±1.1^{ab}	4.7±1.6^{a}
P4 x Tornado Blue Frost	22.6±3.4^{b}	30.2±1.1^{d}	33.1±4.1^{ab}	4.7±3.8^{a}
P4 x Tornado Plum Crystal	24.4±4.3^{a}	33.3±3.2^{bc}	31.4±3.3^{cde}	3.8±5.1^{c}
F-test	**	**	**	**
DMRT $_{0.01}$	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
C.V.	5.00%	2.86%	3.15%	4.69%

/**หมายเหตุ** [1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 99% โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและระดับความรุนแรงของการเกิดโรคของพิทูเนียลูกผสมในระยะต้นกล้าและระยะต้นโตเต็มวัย หลังถูกปลูกเชื้อ *P. parasitica* 14 วัน

พ่อแม่พันธุ์/ลูกผสม	ระยะต้นกล้า		ระยะต้นโตเต็มวัย	
	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค(%)[1/]	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค(%)	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค(%)[2/]	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค(%)
P1	44.45[bc]	2	38.89[ab]	2
P2	55.56[bc]	3	50.56[ab]	3
Multis Pink	88.89[a]	4	72.22[a]	4
Tornado Sky Blue	94.44[a]	4	77.78[a]	4
Tornado Plum Crystal	100.00[a]	4	88.89[a]	4
P1 x Multis Pink	11.11[d]	1	5.56[b]	1
P1 x Tornado Sky Blue	16.67[cd]	1	11.11[b]	1
P2 x Tornado Plum Crystal	22.22[cd]	1	11.11[b]	1
F-test	**		*	
DMRT	0.0001		0.0034	
C.V. (%)	25.72%		51.61%	

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 99% โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

[2/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ภาควิชาพืชสวนและภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตร วิทยาเขตบางเขน ที่เอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์และสารเคมี ในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**. 72: 248-254.

Cirulli, M. and L.J. Alexander. 1966. A comparison of pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and different sources of resistance in tomato. **Phytopathology** 56: 1301-1304.

Fujisawa, T. and H. Masage. 1975. Studies on selective medium of *Phytopthora*, Ann, Phytopath. **Science Direct** 41: 267.

Hammerschmidt, R. 1999. Induced disease resistance:.how do induced plant stop pathogens. **Physio. Mol. Plant Patho** 55:77-84.

Huckelhoven R. 2007 Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. **Annu. Rev. Phytopathology**. 45:1–27.

Longpichai J. 2008. **Breeding of yellow flower petunia for rain tolerance and vegetative Propagating Type**. M. S. Thesis. Kasetsart University. (in Thai)

Jin, Y. R.P.Singh, R.W. Ward, R. Wanyera, M. Kinyua, P. Njau, T. Fetch, Z.A. Pretorius and A. Yahyaoui. 2007. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Plant Disease. 91: 1096-1099.

Le Berre, J. Y., G. Engler and F. Panabieres. 2007 Exploration of the late stages of the tomato–*Phytophthora parasitica* interactions through histological analysis and generation of ESTs. **New Phytol;** in revision.

Nibuntham P. 2009. **Breeding of trail vinca (*Catharanthus roseus* L. Don) for *Phytophthora parasitica* root rot tolerance**. M. S. Thesis. Kasetsart University. (in Thai)

Prathuangwong, S. and N. Buensantea. 2007. *Bacillus amyloliquefaciens* induced systemic resistance against bacterial pustule pathogen with increased phenols, phenylalanine ammonia lyase, peroxidases and 1,3-β-glucanases in soybean plants. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica.** 42: 321-330

Silvar, C., Díaz, J., and Merino, F. 2005. Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. **Phytopathology** 95:1423-1429.

Wang, Y.C., D.W. Hub, Z.G. Zhang, Z.C. Ma, X.B. Zheng, D.B. Li. 2003. Purification and immunocytolocalization of a novel *Phytophthora boehmeriae* protein inducing the hypersensitive response and systemic acquired resistance in tobacco and Chinese cabbage. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 63: 223–232

Zieslin, N. and R. Ben-Zaken. 1993. Peroxidase activity and presence of phenolic substance in peduncles of rose flower. **Plant. Physiol. Biochem**. 31: 333-339.