

การตอบสนองของมะเขือเทศต่อการเข้าทำลาย โดยเชื้อ *Fusarium*

Response of Tomato to *Fusarium* Infection

ชัยวัฒน์ โตอนันต์ 1/

Chaiwat To-anun

Abstract : Examination of the vascular exudate, leaves and stems of tomato seedlings cut at the base of the stem 1 or 2 weeks after they were inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and with two formae speciales non-pathogenic to tomato was undertaken. Some difference between treatment were noted in the amount, pH and protein concentration of vascular exudate. SDS-PAGE of leaf proteins extracted at pH 3.0 from plants two weeks after inoculation showed some differences in the protein profile especially in the leaf extract of *lycopersici* - inoculated plants, in which a new band (ca. 8kDa) appeared. The results of this study suggest that among the wide range of metabolic changes which occur in plants inoculated with either a pathogen or non-pathogen, some differences exist depending on the type of interaction. Some of the changes found in this study may be useful markers for the study of the induction of resistance.

บทคัดย่อ : จากการทดลองปลูกเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ซึ่งเป็นราสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ เปรียบเทียบกับราอีก 2 สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ เป็นระยะเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ ความล้าดับ จากนั้นเก็บรวบรวมของเหลวที่ได้จากท่อน้ำท่ออาหารโดยการตัดส่วนลำต้นที่โคนของกล้ามมะเขือเทศ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบ พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่าง สิ่งทดลองทั้งในด้านปริมาณ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และ ปริมาณของโปรตีนของของเหลวที่ได้จากท่อน้ำ ท่ออาหาร เมื่อสกัดโปรตีนจากใบที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.0 มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าในพืชที่ถูกปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 อาทิตย์ แสดงความแตกต่างของโปรตีน

1/ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University 50200

โดยเฉพาะในพืชที่ปลูกเชื้อ ด้วย *F. o. f. sp. lycopersici* ที่พบว่ามีความต้านทานประมาณ 8 กิโลดาลตัน ปรากฏเห็นได้ชัด ในขณะที่พืชในกลุ่มอื่น ๆ ไม่พบแถบโปรตีนนี้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างบางประการ ในขบวนการเมตาโบลิซึมภายในต้นมะเขือเทศ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราแต่ละสายพันธุ์กับพืชอาศัยนั่นเอง ซึ่งความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้อาจนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการกระตุ้น เพื่อชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรคได้

Index words : *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *Lycopersicon esculentum*, Induced resistance, Cross-Protection.

คำนำ

การชักนำให้พืชต้านทานโรค (Induced resistance) หรือการป้องกันโรคแบบข้าม (Cross protection) เป็นปรากฏการณ์ที่พบครั้งแรก จากการปลูกเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Avirulent หรือ Hypovirulent strains) ลงบนพืชอาศัย และมีผลทำให้พืชอาศัยนั้นเกิดความต้านทานต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Virulent strain) ปรากฏการณ์นี้ถูกค้นพบ โดย McKinney (1929) และต่อมาได้มีผู้นำมาปรับใช้เพื่อป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากไวรัสบางชนิดอย่างได้ผล เช่น การป้องกันกำจัดเชื้อ Tobacco Mosaic Virus และ Citrus Tristeza Virus (Motoyoshi, 1988) เป็นต้น จากความสำเร็จดังกล่าว ก่อให้เกิดการศึกษาถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อสาเหตุของโรคอื่น ๆ อย่างกว้างขวาง ทั้งในโรคที่เกิดขึ้นจากเชื้อราที่เข้าทำลายที่ใบ และเชื้อที่เข้าทำลายที่ระบบรากพืช (Kuc and Richmond, 1977 และ Davis, 1967)

สำหรับโรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียมีรายงานว่า ใช้จุลินทรีย์ที่เป็น Antagonis เพื่อป้องกันกำจัด (Kerr, 1988) ส่วนการใช้สายพันธุ์แบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคนั้น มีรายงานว่ามีการใช้เชื้อ *Pseudomonas solanacearum* เพื่อชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคเหี่ยวของต้นยาสูบ

(Averre and Kelman, 1964) การนำวิธีชักนำให้พืชอาศัยมีความต้านทานต่อเชื้อมาปรับใช้นี้ จัดเป็นวิธีที่มีประโยชน์อย่างมาก โดยเฉพาะการนำวิธีนี้มาใช้ป้องกันโรคที่ติดมากับดิน (Soilborn disease) เนื่องจากเป็นโรคที่ควบคุมหรือป้องกันกำจัดได้ยาก ด้วยสารเคมี (Yamaguchi et al, 1992) และเชื้อราในดินที่จัดว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งชนิดหนึ่ง ได้แก่ รา *Fusarium* โดยมีรายงานการใช้เชื้อรา *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum* ซึ่งเป็นราที่ไม่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ ในการชักนำให้ต้นมะเขือเทศเกิดความต้านทานต่อรา *F. o. f.sp. lycopersici* ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศได้ (Nelson et al, 1992) นอกจากนี้ ยังมีรายงานเกี่ยวกับเชื้อโรคที่เข้าทำลายที่ระบบราก สามารถชักนำให้พืชนั้นเกิดความต้านทานต่อโรคที่เข้าทำลายที่ใบของพืชนั้นได้ (Ishiba et al, 1981) จากรายงานต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นนี้ นับเป็นเครื่องบ่งชี้ให้เห็นว่าการชักนำที่ส่วนใดส่วนหนึ่งบนต้นพืช สามารถส่งผลทำให้เกิดความต้านทานขึ้นได้บนทุกส่วนของต้นพืชนั้น ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จึงเป็นการศึกษาเพื่อตรวจสอบความเปลี่ยนแปลง ที่อาจเกิดขึ้นในระบบเมตาโบลิซึมของต้นมะเขือเทศ หลังจากปลูกเชื้อด้วยสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคและสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เพื่อเปรียบเทียบหาตัวบ่งชี้ (Marker) ที่เกิดขึ้นจากการชักนำให้เกิดความต้านทานในพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชอาศัย : นำเมล็ดมะเขือเทศสายพันธุ์ ฟอนเดอโรซา (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Ponderosa) มาปลูกในกระบะเพาะ โดยใช้ Vermiculite แทนดินปลูก จากนั้นนำไปเก็บไว้ใน อุณหภูมิ 27° ซ ในเรือนทดลอง (Glasshouse) หลังจากที่ดินมะเขือเทศงอกจากเมล็ดได้ 1 สัปดาห์ จึงแยกมาใส่กระถางพลาสติกขนาด 10 ซม.นำไป เพาะเลี้ยงต่อในเรือนทดลองอีกประมาณ 4-5 สัปดาห์ จึงนำมาใช้ทดสอบ

เชื้อราสาเหตุโรค : เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 1, *F. o. f.sp. cucumerinum* และ *F. o. f.sp. melonis* นำเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยง บนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ในจาน เลี้ยงเชื้อ เมื่อต้องการสปอร์จึงนำมาปลูกเชื้อใน อาหารเหลว Potato Dextrose Broth (Difco Laboratories, Michigan) และนำไปปั่นเชื้อไว้ใน ที่อุณหภูมิ 25° ซ บนเครื่องเขย่า (Reciprocal shaker) เป็นเวลาประมาณ 10 วัน จากนั้นจึงนำมากรอง ผ่าน Sterile cheesecloth 4 ชั้น เพื่อแยกส่วนของ Mycelium ออกจากสปอร์ นำส่วนของสปอร์ ที่กรอง ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ด้วย วิธีหมุนเหวี่ยง (Centrifugation) ให้ตกตะกอน จากนั้นนำมาปรับความเข้มข้นให้ได้ 10⁷ สปอร์/มล. เพื่อใช้เป็น Inoculum ค่อยไป สปอร์ที่เตรียม ได้นี้นำไปใช้ทันทีที่เตรียมเสร็จ เพื่อป้องกันการ สูญเสียความแข็งแรง และความงอกของสปอร์

การปลูกเชื้อบนต้นมะเขือเทศ : นำต้น มะเขือเทศ (อายุประมาณ 4-5 สัปดาห์) มาแบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 20 กระถาง แต่ละกลุ่มนำมาปลูก

เชื้อด้วยราสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ปลูกเชื้อด้วยรา *F. o. f.sp. lycopersici*, *melonis* หรือ *cucumerinum* ตามลำดับ โดยนำ สปอร์แขวนลอย (Spore suspension) ที่เตรียมได้ จากเชื้อราแต่ละสายพันธุ์มาราดที่บริเวณรอบ ๆ โคนต้น (ประมาณ 20 มล.ต่อพืช 1 ต้น) สำหรับ พืชในกลุ่มที่ 4 ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ(Control) นั้น ราดด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ต้นละ 20 มล. เช่นกัน จากนั้นนำพืชเหล่านี้มาเก็บไว้ในตู้ควบคุม อุณหภูมิ ที่ 28 ± 2° ซ ภายหลัง จากเพาะเลี้ยง ต้นมะเขือเทศไปได้ 1 หรือ 2 สัปดาห์ ทำการเก็บ รวบรวม ตัวอย่างพืช โดยพืชแต่ละกลุ่มทดลอง จะถูกตัดที่บริเวณโคนต้นได้ใบคู่แรก (First node) ประมาณครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมด (จำนวน 10 ต้น) พืชที่เหลืออีกประมาณครึ่งหนึ่ง ทำการ เพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 2 สัปดาห์ แล้วจึงตัดลำต้น เช่นกัน จากนั้นเก็บรวบรวมส่วนของของเหลว ที่ขับออกมาจากท่อลำเลียงอาหาร (Vascular exudate) หรือที่จะเรียกคั่งคั่งต่อไปว่า Exudate โดย แบ่งระยะเวลาในการเก็บเป็น 3 ระยะคือ ระยะที่ 1 ทำการเก็บรวบรวม Exudate ตั้งแต่ชั่วโมงแรก ถึงชั่วโมงที่ 6 หลังจากตัดลำต้นพืช ระยะที่สอง เก็บรวบรวม Exudate ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 18 หลังจากตัดลำต้นพืชและระยะที่สาม เก็บ รวบรวม Exudate ที่ได้จากลำต้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ถึงชั่วโมงที่ 30 หลังจากตัดลำต้นพืช บันทึก ปริมาณ Exudate ที่เก็บรวบรวมได้ แล้วจึงตรวจ หาคความเข้มข้นของน้ำตาลด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid assay (McNeill et al, 1984) โดยใช้กลูโคส เป็นมาตรฐาน ตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยวิธี Bradford method โดยใช้ Bovine serum albumin เป็น มาตรฐาน (Bradford, 1976) ขณะเดียวกันวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ Exudate ที่ได้จากพืชในแต่ละกลุ่ม ข้อมูลที่แสดง

ในการทดลองนี้ได้จากค่าเฉลี่ยของพืช 10 ต้นของแต่ละกรรมวิธี สำหรับใบพืชที่เก็บรวบรวมได้นำมาแยกสกัดโปรตีน และวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

การแยกสกัดโปรตีน จากใบมะเขือเทศ

นำใบพืช 1 กรัม มาบดละเอียดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว เมื่อบดได้ละเอียดแล้วจึงผสมสารสกัด (Extraction buffer; 50 mM citrate buffer, pH 3.0, 1 mM DTT) ในอัตราใบพืชบดละเอียด:สารสกัดเท่ากับ 3:1 จากนั้นนำสารผสมนี้ (Homogenate) มาวางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชม. เพื่อให้โปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาในสารสกัด จากนั้นนำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว $16,100 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเก็บส่วนของของเหลวด้านบน (Supernatant) นำไปเก็บไว้ที่ -80°C จนกว่าจะนำมาทดสอบในขั้นต่อไป คำนวณหาปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้ ตามวิธีของ Bradford (1976)

การวิเคราะห์โปรตีน

โปรตีนที่สกัดได้จากใบจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 10-25 % gradient) ตามวิธีของ Ausubel และคณะ (1993) เป็นเวลา 6-7 ชม.

ภายใต้แรงดันไฟฟ้าที่ 20 โวลต์ โปรตีนขนาดมาตรฐาน (Molecular weight markers) ที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบหาขนาดของโปรตีนจากพืชเป็นของบริษัท Pharmacia (LMW; 14-94 kDa) และ Sigma Chemical Co. (MW-SDS-17S; 2.5-17 kDa) การย้อมสีโปรตีน (Silver-stained) ทำตามวิธีของ Blum และคณะ (1987)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองปลูกเชื้อบนต้นมะเขือเทศด้วยราสายพันธุ์ต่าง ๆ 3 สายพันธุ์ เป็นระยะเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ตามลำดับ จากนั้นตัดส่วนของลำต้นที่บริเวณใต้ใบเลี้ยงคู่แรก และแบ่งเก็บ Exudate จากลำต้นพืชเป็น 3 ระยะ พบว่าปริมาณของ Exudate ที่เก็บรวบรวมได้ในช่วงระยะเวลา 18-30 ชม. ภายหลังจากตัดลำต้นพืช จะมีปริมาณที่น้อยกว่า Exudate ที่เก็บได้ในสองช่วงแรก (Fig. 1 A และ B) เมื่อนำปริมาณของ Exudate ที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมดมาเปรียบเทียบกันพบว่า ในกลุ่มพืชที่ปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่ในกลุ่มพืชที่ปลูกเชื้อได้ 2 สัปดาห์ มีปริมาณของ Exudate ที่แตกต่างกัน โดยในพืชที่ปลูกเชื้อ *F. o. f.sp. lycopersici* มีปริมาณ Exudate ที่มากกว่าพืชที่ปลูกเชื้อด้วยรา *F. o. f.sp. melonis* หรือ *cucumerinum* (Fig. 2)

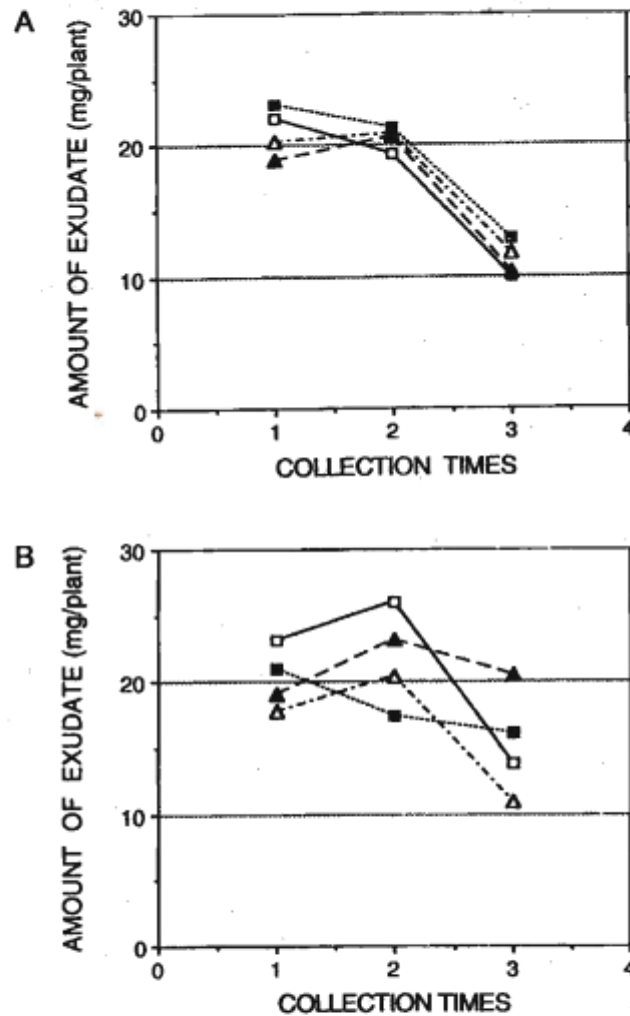


Fig. 1 Changes in amount of vascular exudate collected from the cut tomato plants inoculated with either of 3 formae speciales of *Fusarium oxysporum*, one week (A) or two weeks (B) after inoculation, the stems were severed below the first node. The vascular exudate was collected and pooled for each treatment during 0-6 hr (1), 6-18 hr (2) and 18-30 hr (3) after cutting from non-inoculated plants (—□—) : control); *melonis*-inoculated (···■···); *cucumerinum*-inoculated plants (---△---); and *lycopersici*-inoculated plants (-·-·-▲-·-·-).

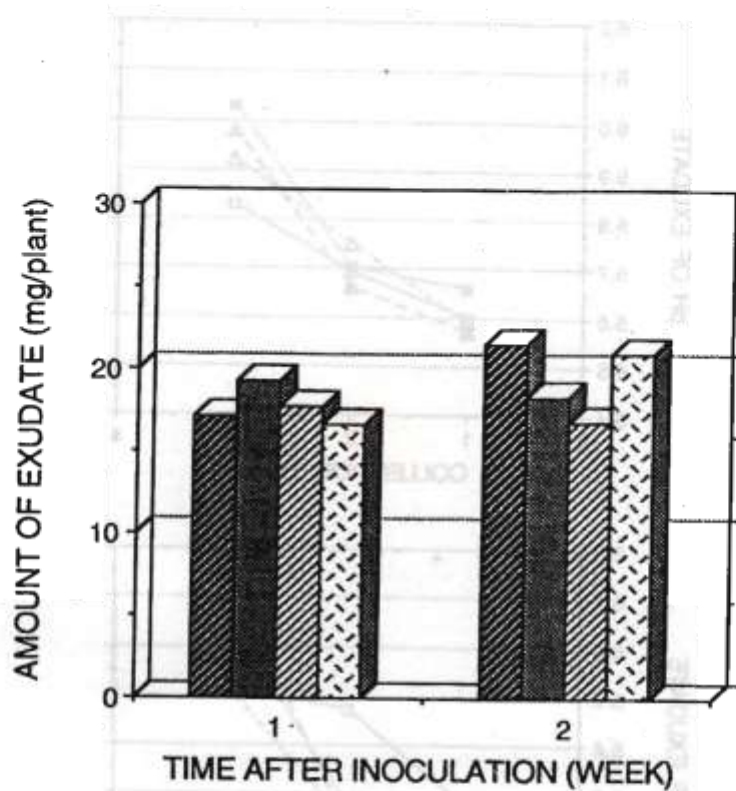


Fig. 2 Total amount of vascular exudate collected from the cut tomato plants. The vascular exudate was collected from non-inoculated plants (control), ; *melonis*-inoculated plants, ; *cucumerinum* - inoculated plants, ; and *lycopersici*-inoculated plants,

เมื่อตรวจสอบ pH ของ exudate ทั้งจากพืชที่ปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่า pH ของ Exudate มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาหลังจากตัดลำต้น (Fig 3A และ B) โดย

เฉพาะในกลุ่มพืชที่ปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แสดงความแตกต่างระหว่างพืชที่เป็นตัวเปรียบเทียบ กับพืชที่ปลูกเชื้อด้วยราสายพันธุ์ต่าง ๆ อย่างเห็นได้ชัด (Fig 3B)

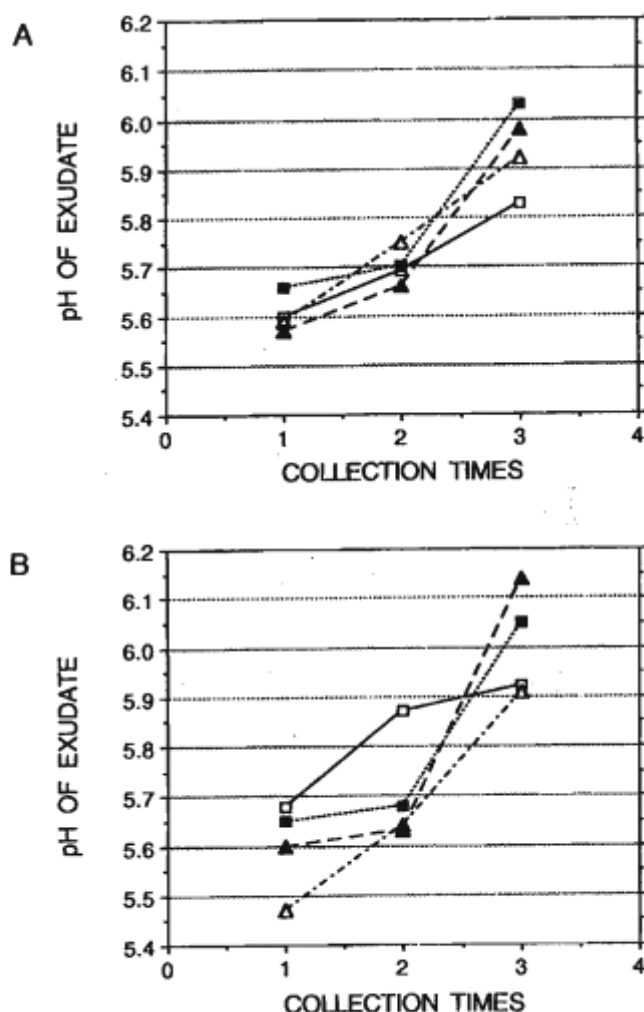


Fig. 3 Changes in pH of vascular exudate collected from the cut tomato plants inoculated with either of 3 formae speciales of *Fusarium oxysporum*, one week (A) or two weeks (B) after inoculation, the stems were severed below the first node. The vascular exudate was collected during 0-6 hr (1), 6-18 hr (2) and 18-30 hr (3) after cutting and the pH of each collection was determined; non-inoculated plants (—□—) : control); *melonis*-inoculated (...■...); *cucumerinum*-inoculated plants (...△...); and *lycopersici*-inoculated plants (...▲...).

เมื่อทำการตรวจสอบหาปริมาณของน้ำตาลใน Exudate จากตัวอย่างพืชที่ปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 และ 2 สัปดาห์ พบว่าในกลุ่มพืชที่ถูกปลูกเชื้อ

ด้วยราสายพันธุ์ต่าง ๆ มีแนวโน้มว่าปริมาณของน้ำตาลจะลดลงตามระยะเวลาหลังจากตัดลำต้น (Fig. 4A และ B)

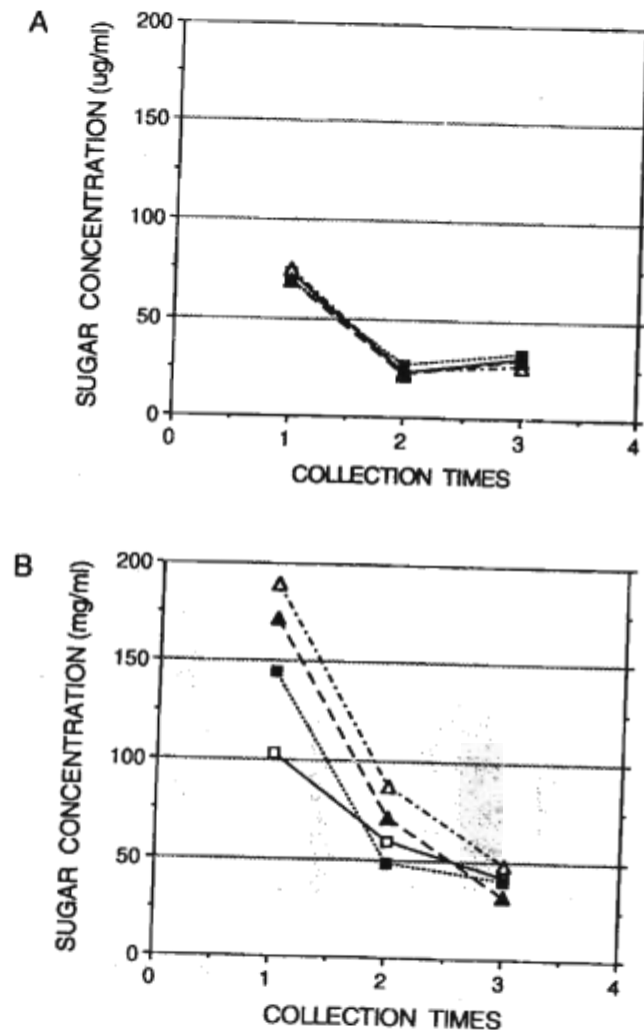


Fig. 4 Changes in sugar concentration of vascular exudate collected from the cut tomato plants inoculated with either of 3 formae speciales of *Fusarium oxysporum*, one week (A) or two weeks (B) after inoculation, the stems were severed below the first node. The vascular exudate was collected during 0-6 hr (1), 6-18 hr (2) and 18-30 hr (3) after cutting and the sugar concentration of each exudate was determined by phenol-sulfuric acid assay using glucose as a standard; non-inoculated plants (—□—) : control; *melonis*-inoculated (...■...); *cucumerinum*-inoculated plants (...△...); and *lycopersici*-inoculated plants (...▲...).

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (รวมทั้ง 3 ระยะเวลา) พบว่า ในพืชกลุ่มที่ถูกเชื้อ 1 สัปดาห์ มีปริมาณน้ำตาลใน Exudate ที่ใกล้เคียงกัน แต่ในกลุ่มพืชที่ถูกปลูกเชื้อเป็นเวลา 2

สัปดาห์ พบว่าปริมาณน้ำตาลในพืชที่ถูกเชื้อด้วยรา *F. o. f.sp. cucumerinum* มีปริมาณน้ำตาลรวมสูง กว่าพืชใน Treatment อื่น ๆ (Fig. 5)

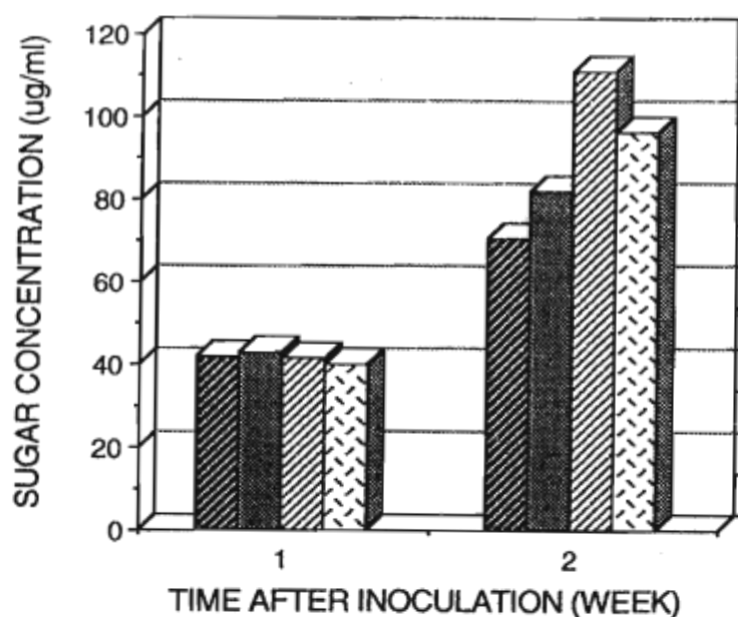


Fig. 5 Average of sugar concentration of vascular exudate of the three collection times from cut tomato plants. The vascular exudate was collected from non-inoculated plants (control), ; *melonis*-inoculated plants, ; *cucumerinum*- inoculated plants, ; and *lycopersici*-inoculated plants,

สำหรับปริมาณโปรตีน ที่ตรวจพบใน Exudate ในกลุ่มพืชที่ถูกปลูกเชื่อมมาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีปริมาณโปรตีนที่ใกล้เคียงกัน (Fig. 6A และ B) ยกเว้นในพืชที่ปลูกเชื่อมด้วยรา *F. o. f. sp. cucumerinum* ที่มีข้อสังเกตว่าเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford และ อ่านค่าของปฏิกิริยาที่โปรตีนใน Exudate ทำปฏิกิริยากับสีของ Coomassie Brilliant Blue ด้วย เครื่อง Spectrophotometer (ที่ A280) ได้ค่าที่ไม่คงที่ (ไม่สามารถอ่านค่าที่แน่นอนได้) ทั้งนี้พบว่า มีสารประกอบบางอย่าง (Unknow) ที่ทำปฏิกิริยากับสีของ Coomassie Brilliant Blue แล้วเกิดตะกอนขุ่นที่ผิดจาก Treatment อื่นๆ สำหรับปริมาณโปรตีนใน Exudate ที่ได้จากพืชที่ปลูกเชื่อมด้วยราสายพันธุ์ต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และในพืชที่เป็นตัวเปรียบเทียบมีปริมาณที่ลดต่ำลง ตามระยะเวลาหลังจากตัดลำต้นพืช โดยปริมาณโปรตีนในพืชที่ปลูกเชื่อม ด้วยรา *F. o. f. sp. lycopersici* มีแนวโน้มว่าจะ สูงกว่าพืชใน Treatment อื่น ๆ เล็กน้อย

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่ใบพืช

เมื่อนำใบมะเขือเทศจาก Treatment ต่าง ๆ มาทำการสกัดด้วยสารสกัดที่ pH เท่ากับ 3.0 และ นำโปรตีนที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ในกลุ่มพืชที่ปลูกเชื่อมด้วยราสายพันธุ์ต่าง ๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีความแตกต่างกันที่รูปแบบของแถบโปรตีนน้อยมาก (Protein profiles) แต่ในกลุ่มพืชที่ผ่านการปลูกเชื่อมได้ 2 สัปดาห์ จะพบความแตกต่างของแถบโปรตีนต่าง ๆ อย่างเห็น

ได้ชัด (Fig. 7) โดยเฉพาะพืชที่ปลูกเชื่อมด้วยรา *F. o. f. sp. lycopersici* พบว่ามีการสร้างโปรตีนขนาดประมาณ 8 kDa ขึ้นมาใหม่ ในขณะที่พืชจาก Treatment อื่น ๆ ไม่พบโปรตีนนี้

จากความแตกต่างกันของ Exudate ที่ได้จากต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื่อมราต่างสายพันธุ์กันนี้ แสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคที่แตกต่างกันไป ซึ่งหากมีการศึกษาอย่างละเอียดต่อไป จะสามารถทำให้ทราบถึงกลไกในการเข้าทำลายพืชของเชื้อรา ในขณะที่เดียวกันก็ทำให้ทราบถึงกลไกในการป้องกันตนเองของพืชอาศัยนั้นได้ ซึ่งข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้สามารถนำไปใช้อธิบายได้ว่า เหตุใดเชื้อราชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันจึงมีความสามารถในการทำให้เกิดโรครากับพืชต่างชนิดกันได้ และ ในท้ายที่สุดก็จะนำไปสู่การค้นคว้าหาวิธีป้องกันกำจัดโรคพืชเหล่านี้ได้อย่างได้ผลต่อไปในอนาคต

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ เมื่อสกัดโปรตีนจากใบพืชมาวิเคราะห์ พบว่าการปลูกเชื่อมราสายพันธุ์ต่าง ๆ ลงบนต้นมะเขือเทศนั้น มีผลทำให้พืชเพิ่มการสร้างโปรตีนต่าง ๆ มากเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้รับการปลูกเชื่อม ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนที่สกัดได้จากพืชที่ปลูกเชื่อมด้วยราต่างสายพันธุ์กันพบว่าพืชที่ปลูกเชื่อมด้วยรา *F. o. f. sp. lycopersici* นั้นมีการสร้างโปรตีนชนิดใหม่ (ca. 8 kDa) ขึ้นมา ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้ ขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์หรือความเฉพาะเจาะจงระหว่างพืชอาศัยกับราสายพันธุ์นั้น ๆ นั่นเอง

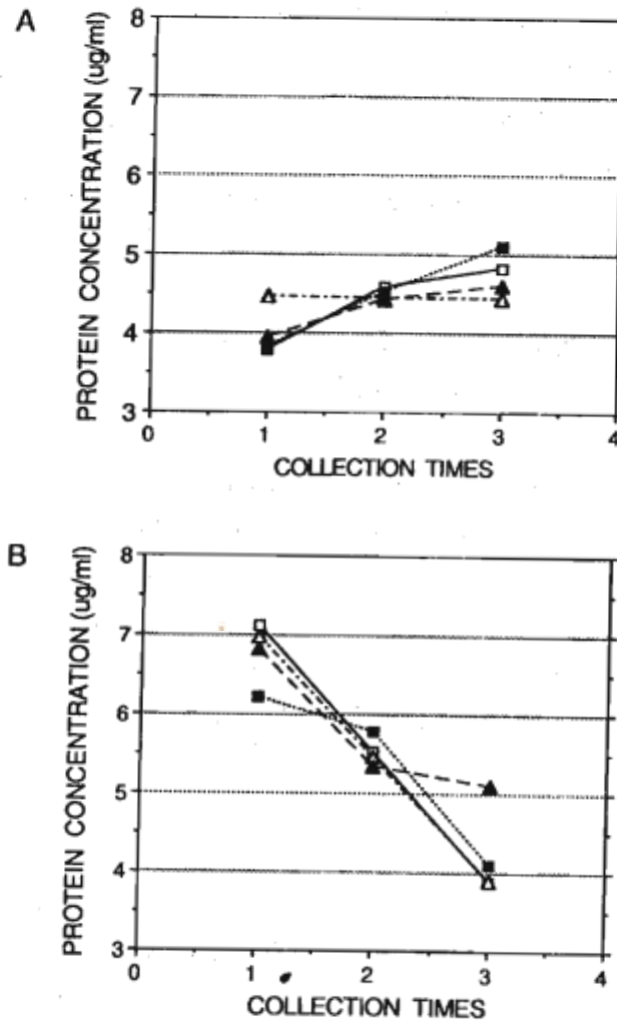


Fig. 6 Changes in protein concentration of vascular exudate collected from the cut tomato plants inoculated with either of 3 formae speciales of *Fusarium oxysporum*, one week (A) or two weeks (B), the stems were severed below the first node. The vascular exudate was collected during 0-6 hr (1), 6-18 hr (2) and 18-30 hr (3) after cutting and the protein concentration of each exudate was determined by Bradford method, using bovine serum albumin as a standard: non-inoculated plants (—□—) : control; *melonis*-inoculated (...■...); *cucumerinum*-inoculated plants (...△...); and *lycopersici*-inoculated plants (...▲...).

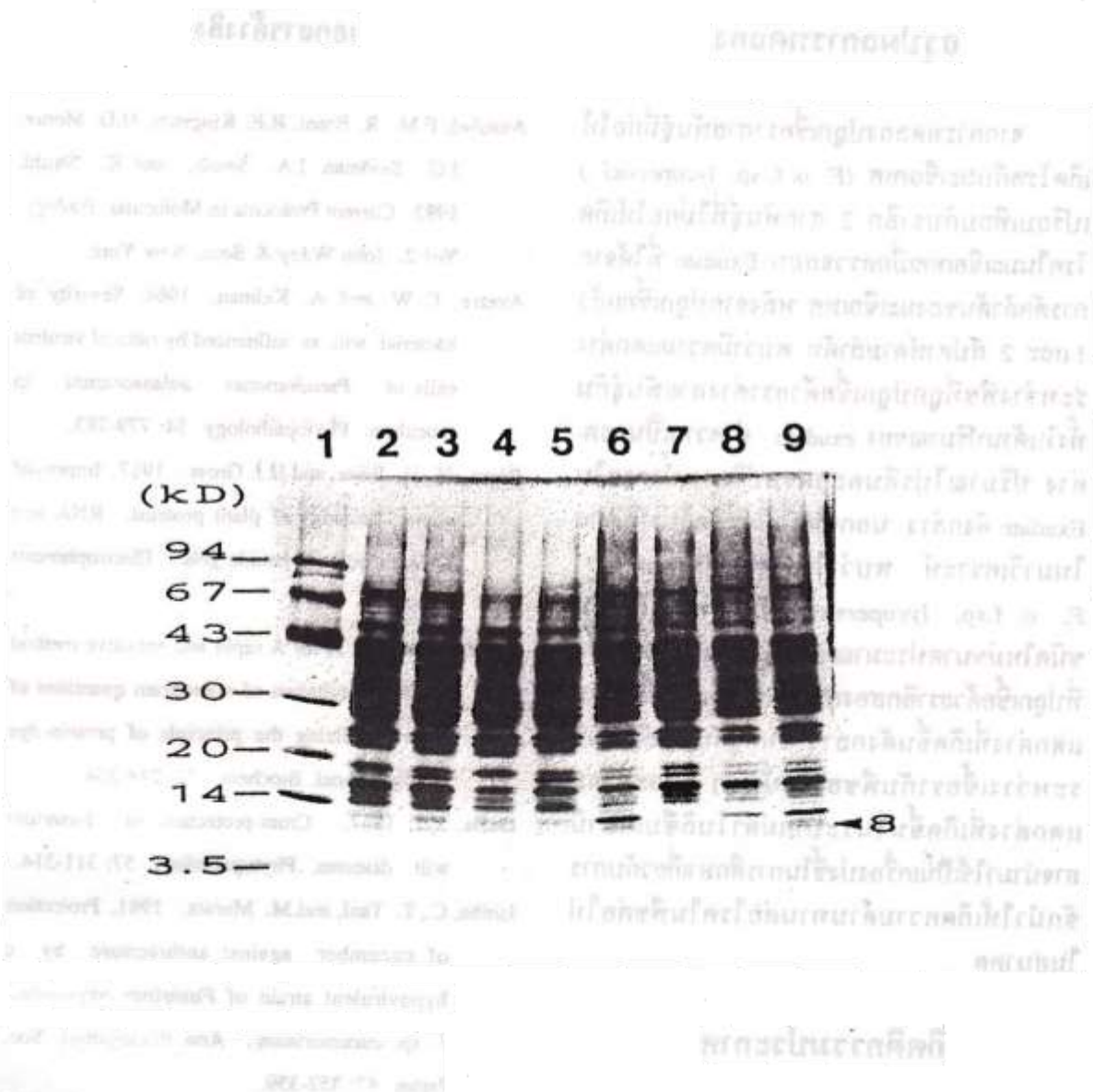


Fig. 7 Protein profiles of tomato leaf extracts from plants one and two weeks after inoculation with *Fusarium oxysporum*. 1: molecular weight marker; lanes 2-5 are proteins extract from plants one week after inoculation, 2: non-inoculated plants (control); 3: *cucumerinum*-inoculated plants; 4: *melonis*-inoculated plants; 5: *lycopersici*-inoculated plants; lanes 6-9 are proteins extract from plants two weeks after inoculation, 6: uninoculated plants (control) ; 7: *cucumerinum*-inoculated plants ; 8: *melonis*-inoculated plants ; 9: *lycopersici*-inoculated plants.

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองปลูกเชื้อราสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคกับมะเขือเทศ (*F. o. f. sp. lycopersici*) เปรียบเทียบกับราอีก 2 สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศเมื่อตรวจสอบ Exudate ที่ได้จากการตัดลำต้นของมะเขือเทศ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 1 และ 2 สัปดาห์ตามลำดับ พบว่ามีความแตกต่างระหว่างพืชที่ถูกปลูกเชื้อด้วยราต่างสายพันธุ์กันทั้งในด้านปริมาณของ exudate ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณโปรตีนตลอดจนปริมาณน้ำตาลใน Exudate ดังกล่าว นอกจากนี้เมื่อสกัดโปรตีนจากใบมาวิเคราะห์ พบว่าในพืชที่ปลูกเชื้อด้วยรา *F. o. f. sp. lycopersici* มีการสร้างโปรตีนชนิดใหม่ขนาดประมาณ 8 kDa ที่แตกต่างจากพืชที่ปลูกเชื้อด้วยราอีกสองสายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นดังกล่าว ขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรากับพืชอาศัยนั้น ๆ และความแตกต่างที่เกิดขึ้นในระบบเมตาโบลิซึมเหล่านี้ อาจนำมาใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ในการศึกษาเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดความต้านทานต่อโรคในพืชต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Henry Nelson และ Prof. Dr. Seiji Ouchi คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย Kinki ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และให้คำปรึกษาแนะนำต่าง ๆ และขอขอบคุณ โครงการ Chiang Mai University Plant Biotechnology Research Project (CMUPB) และองค์กร JICA ที่ช่วยให้การสนับสนุนงานวิจัยมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1993. Current Protocols in Molecular Biology. Vol 2. John Wiley & Sons, New York.
- Averre, C. W. and A. Kelman. 1964. Severity of bacterial wilt as influenced by ratio of virulent cells of *Pseudomonas solanacearum* in inoculum. *Phytopathology* 54: 779-783.
- Blum, H., H. Beier, and H.J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Davis, D. 1967. Cross-protection in *Fusarium* wilt diseases. *Phytopathology* 57: 311-314.
- Ishiba, C., T. Tani, and M. Murata. 1981. Protection of cucumber against anthracnose by a hypovirulent strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 47: 352-359.
- Kerr, A. 1988. Biological control of bacterial pathogens. In 5 th International Congress of Plant Pathology. Abstract of Papers, Kyoto pp 18.
- Kuc, J. and S. Richmond. 1977. Aspects of the protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* 67: 533-536.

- McKinney, H. H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Island, West Africa, and Gibraltar. J. Agr. Res. 39: 557-578.
- McNeill, M., A.D Darvill, S.D. Fry, and P. Albersheim. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. Ann. Rev. Biochem. 53: 625-663.
- Motoyoshi, F. 1988. Biological control of virus disease by attenuated viruses. In 5 th International Congress of Plant Pathology Abstracts of Papers, Kyoto pp 18.
- Nelson, H., S. Ouchi, T. Shiraishi, and H. Oku. 1992. Induced resistance to *Fusarium* wilt of tomato and cucumber : symptoms and pathogen proliferation. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 58: 659-663.
- Yamaguchi, K., T. Sano, M. Arita, and M. Takahashi, 1992. Biocontrol of *Fusarium* wilt of tomato and *Verticillium* wilt of eggplant by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* MT 0062. Ann. Phytopath. Soc. Japan 58: 188-194.
-