การคัดเลือกสายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองภาคใต้ของประเทศไทยที่ต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Bult.) Bult. ด้วยวิธีทดสอบโรคและไอโซไซม์

Screening for Local Durian in Southern Thailand Resistance to *Phytophthora palmivora* (Bult.) Bult. by Pathogenicity Test and Isozyme

เบ็ญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์

Benjamas Bunjerdpradit

Order Key 21915
BIB Key 161209

เลขหมู่ SB211.P58 บ74
เลขทะเบียน 2542 ก.2
.....

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองภาคใต้ของประเทศไทยที่ต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Bult.) Bult. ด้วยวิธีทดสอบโรคและไอโซไซม์
ผู้เขียน	นางสาวเบ็ญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา	คณะกรรมการสอบ
.....ประธานกรรมการ	.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)	(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)	(รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต)
	.....กรรมการ
	(อาจารย์สุทธิรักษ์ แซ่หลิม)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรรยา นครินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองภาคใต้ของประเทศไทยที่ต้านทานต่อเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Bult.) Bult. ด้วยวิธีทดสอบโรคและไอโซไซม์
ผู้เขียน	นางสาวเบ็ญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2542

บทคัดย่อ

การเก็บรวบรวมทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง 26 สายพันธุ์ใน 4 จังหวัด คือ สุราษฎร์ธานี (2 สายพันธุ์) นครศรีธรรมราช (8 สายพันธุ์) ปัตตานี (11 สายพันธุ์) และนราธิวาส (5 สายพันธุ์) ทำการเพาะปลูกต้นกล้าทุเรียนในแปลงเพาะภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อนำต้นกล้าทุเรียนไปใช้ในการทดสอบโรคและคัดเลือกสายพันธุ์ที่อาจมีแนวโน้มต้านทานโรครากและโคนเน่าของทุเรียนสายพันธุ์ต่าง ๆ การทดสอบการเกิดโรคทำโดยการปลูกเชื้อสาเหตุลงบนใบทุเรียนด้วยสารแขวนลอยของ zoospore ของเชื้อ *Phytophthora palmivora* เพื่อดูอัตราการขยายตัวของแผลบนใบ (rate of lesion expansion) เพื่อหาพันธุ์ต้านทาน และดูจำนวนต้นกล้าที่ตายภายหลังการปลูกเชื้อในระบบรากด้วยวิธีจุ่มราก (root dipping)

การทดสอบโรคในใบมีทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง 26 สายพันธุ์ พบว่ามีทุเรียนพื้นเมือง 18 สายพันธุ์มีอัตราการขยายตัวของแผลบนใบลดลงคือ สายพันธุ์ผมร่วง จุกดำ อีก่อ ขันทอง ฉวางมุด ลูกดก หัวช้าง น้ำฝน อารี 5 หัวโต ก้านยาว จำปา ไอ้เขียว สุคิริน1.4 สุคิริน1.8 สุคิริน1.9 สุคิริน1.10 สุคิริน1.13 ส่วนการทดสอบโรคในระบบรากพบว่า มีต้นกล้าทุเรียน 11 สายพันธุ์ที่มีแนวโน้มต้านทานโรคคือ จำปา ไอ้เขียว ก้านยาว ต่อไพ ไม้แดง ฉวางมุด ไอ้ม่วง สุคิริน 1.4 หัวช้าง น้ำตก อารี 4

การศึกษาปลายรากฝอยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด เมื่อจุ่มรากใน zoospore suspension 180 นาที พบว่ามี encysted zoospore มาเกาะบริเวณพื้นผิวราก และมี

ตำแหน่งการเกาะที่ผิวรากแตกต่างกันคือ เกาะบริเวณปลายราก 1 ส่วน มี 10 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ฟ้าคะนอง หัวช้าง สุคิริน1.10 ก่อพ้อ น้ำฝน สุคิริน1.4 น้ำตก ผมร่วง ขันทอง และอารี 4 เกาะปลายราก 2 ส่วนมี 7 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์สุคิริน1.9 ฉวางมุด ลูกดก อีก่อ ไอ้เขียว ก้านยาว และอารี 5 เกาะปลายราก 3 ส่วนมี 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์จำปา ต่อไพ และสุคิริน1.13 เกาะปลายราก 4 ส่วนมี 3 สายพันธุ์คือ สุคิริน1.8 จุกดำ และไม้แดง และไม่พบ zoospore มาเกาะเลย 1 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์เหลืองอร่าม

การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ เปอร์ออกซิเดส และเอสเตอร์เรส ในรากและใบของทุเรียน 10 สายพันธุ์ พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งจำนวนของแถบสีและรูปร่างของแถบสี โดยพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงในใบทุเรียนสายพันธุ์สุคิริน1.8 สุคิริน1.13 และจำปา ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสายพันธุ์ก้านยาวและฟ้าคะนองต่ำ ส่วนกิจกรรมเอสเตอร์เรสเอนไซม์ในใบพบว่าเพิ่มขึ้นมี 3 สายพันธุ์คือ สุคิริน1.4 สุคิริน1.13 และก้านยาว สำหรับในรากพบว่าไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมเอสเตอร์เรสเอนไซม์ได้ เนื่องจากย้อมไม่ติดสี

Thesis Title	Screening for Local Durians in Southern Thailand Resistance to *Phytophthora palmivora* (Bult.) Bult. by Pathogenicity Test and Isozyme
Author	Miss Benjamas Bunjerdpradit
Major Program	Plant Pathology
Academic Year	1999

Abstract

Twenty-six indigeneous durian cultivars were collected from Suratthani (2 cultivars), Nakornsithammarat (8 cultivars), Patthani (11 cultivars) and Narathiwat (5 cultivars). Seedlings of these durian cultivars were planted in the greenhouse of the Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. The seedlings were later used in the pathogenicity studies to screen and detect resistance in these cultivars. Pathogenicity studies were carried out using both detached leaves and root dipping methods. Inoculation was done by dispensing a zoospore suspension of *Phytophthora palmivora* onto detached leaves and dipping roots of durian seedlings in a zoospore suspension. Rate of lesion expansion (RLE) was used as a predictor to detect resistant durian cultivars in the detached leaf study, and the death rate of durian seedlings death over time was used as a predictor in the root dipping study.

Among twenty-six indigeneous durian cultivars tested, 18 had reduced RLE. These cultivars included Pomrung, Jukdam, E-ko, Kunthong, Lukdok, Sukirin 1.13, 1.10, 1.9, 1.8, 1.4, Chawangmud, Houchang, Kanyang, Jumpa Nan-Fon Aree5 and A-keau. Eleven cultivars showed resistance potential, using the length of time between zoospore inoculation and seedling death as a criteria. These cultivars included Jumpa, A-keau,

Kanyang, To-pi, Mai-dang, Chawangmud, A-mung, Hauchang, Num-tok, Aree 4 and Sukirin 1.4.

Scanning Electron Microscope (SEM) observation on small root tip pieces of the twenty-six indigeneous cultivars showed that zoospore of *P. palmivora* became encysted on root surface after 180 minutes after root tip pieces were placed in zoospore suspension. SEM micrograph showed that zoospore encysted on different location on the root pieces according to the different durian cultivars.

Ten of the 26 durian cultivars were selected and analysed for peroxidase and esterase isozyme activity on acrylamide gel electrophoresis. This revealed differences in the number of bands and patterns of both isozymes. Peroxidase isozyme activity in leaf was high in Sukirin1.8, Sukirin1.13 and Jumpa, but activity of this enzyme in root was high in Ai-keau, Jumpa and Jukdam. Esterase isozyme activity was found in leaves of Sukirin1.4, Sukirin1.13 and Hua Chang. No colour stains (i.e. activities of the later isozyme) were detected in roots of the 10 tested cultivars .

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นลงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์มานะ กาญจนมณีเสถียร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์ รองศาสตราจารย์สมปอง เตชะโต กรรมการที่ปรึกษา อาจารย์สุทธิรักษ์ แซ่หลิม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จรรยา นครินทร์ กรรมการจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไข ข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้การช่วยเหลือในการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และบุคลากรภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่านที่กรุณาช่วยเหลือให้ความรู้ และประสบการณ์ในด้านต่าง ๆ เพื่อนำไปใช้ในการประกอบอาชีพ ขอขอบคุณ อาจารย์วันวิศาข์ อาจารย์อรัญ งามผ่องใส และอาจารย์อัจฉรา เพ็งหนู ที่ให้ความอนุเคราะห์ที่พักตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สุทธิรักษ์ อาจารย์มงคล แซ่หลิม ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านต่าง ๆ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (เงินรายได้) ผ่านศูนย์วิจัยพืชยืนต้นและไม้ผลเมืองร้อน คณะทรัพยากรธรรมชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอบคุณคุณสากล สุวลักษณ์ และคุณอารมย์ สมบัติมาก หน่วยจุลทรรศน์อิเลคตรอน ภาควิชาพยาธิ คณะแพทยศาสตร์ ในการให้คำแนะนำการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดและการถ่ายภาพตัวอย่างเป็นอย่างดี

ขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ เพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ ขอบคุณคุณสิริพร สุขตุก คุณปัทมพร อินสุวรรโณ คุณบุญเชิญ แสงเทียน คุณสุภาพ จันทรัตน์ และคุณจำลอง ชูกำเนิด ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช และ คุณสุรชาติ เพชรแก้ว ภาควิชาธรณีศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยเหลือในการจัดพิมพ์วิทยานิพนธ์

ขอบคุณคุณแม่บรรจง คุณพ่อแปะโห้ว และน้อง ๆ ทุกคนที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษา และให้กำลังใจ

เบ็ญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(10)
รายการตารางภาคผนวก	(12)
บทที่	1
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	8
2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	
วัสดุ	9
อุปกรณ์	9
วิธีการ	11
3 ผลและวิจารณ์	27
4 บทสรุป	50
เอกสารอ้างอิง	53
ภาคผนวก	60
ประวัติผู้เขียน	64

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะทางสัณฐานของผลและสีเนื้อทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง	31
2	จำนวนต้นกล้าทุเรียนตายภายหลังปลูกเชื้อ *P. palmivora* ระยะเวลาต่าง ๆ	33
3	ข้อมูลเปรียบเทียบวันที่ต้นกล้าตายภายหลังปลูกเชื้อ *P. palmivora*	34
4	ผลการทดลองการตรวจสอบ zoospore เข้าเกาะติดรากใต้กล้อง-จุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์	35
5	พื้นที่การเกิดโรคบนใบและอัตราการขยายตัวของแผลบนใบ	42
6	จำนวนแผลและพื้นที่ใบที่เกิดโรคภายหลังปลูกเชื้อ *P. palmivora* 4 วัน	43

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนที่แสดงจังหวัดและพันธุ์ทุเรียนที่เก็บจาก 4 จังหวัดในภาคใต้ คือ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ปัตตานี และนราธิวาส	12
2	ลักษณะลำต้นของทุเรียนพื้นเมืองที่มีขนาดใหญ่ที่พบในจังหวัดนครศรีธรรมราช	13
3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *P. palmivora* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ carrot agar (CA) อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 26-32 องศาเซลเซียส	16
4	ลักษณะลำต้นกล้าทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองอายุ 2 เดือน ที่ปลูกในกระบะทราย ก่อนนำมาใช้ในการทดสอบโรคในระบบรากด้วยวิธี root dipping	16
5	การทดสอบโรคในระบบรากโดยวิธี root dipping และเลี้ยงต้นกล้าทุเรียนในตู้เพาะเลี้ยง (growth chamber)	17
6	ลักษณะรากของทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองอายุ 2 ปี บริเวณปลายรากฝอย (ศรชี้) ที่ใช้ศึกษาการเข้าเกาะติดของ zoospore บนผิวรอบราก	19
7	การทดสอบการเข้าเกาะรากของ zoospore โดยใช้ปลายรากทุเรียนทั้งหมด 26 สายพันธุ์วางในหลุมที่เจาะเอาส่วนของวุ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อออกและวางปลายรากทุเรียนลงไปในหลุม	19
8	การทดสอบการเกิดโรคบนใบด้วยวิธี detached leaf	23
9	การบันทึกอาการ necrotic lesion บนแผ่นใส	24
10	การบันทึกอาการ necrotic lesion บนกระดาษ A4	24
11	การบันทึกข้อมูลด้วยเครื่อง scanner	25
12	ข้อมูลพื้นที่ใบและการคำนวณพื้นที่ใบด้วยโปรแกรม DT-SCAN	26
13	ตำแหน่งการเข้าเกาะติดของ encysted zoospore บนรากฝอยทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง 26 สายพันธุ์	36

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ปลายรากที่มี zoospore เกาะถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์ กำลังขยาย 100X	38
15	ปลายรากพันธุ์สุคิริน1.18 ที่มี zoospore เกาะถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) A) zoospore 81X (ศรชี้) B) encysted zoospore 300X (ศรชี้)	39
16	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบทุเรียนพื้นเมือง 10 สายพันธุ์	45
17	รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของรากทุเรียนพื้นเมือง 10 สายพันธุ์	46
18	รูปแบบเอนไซม์เอสเตอร์เรสของใบทุเรียนพื้นเมือง 10 สายพันธุ์	48

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
1	แสดงส่วนประกอบของเจลเพื่อใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับแยกไอโซไซม์ตามสูตรดัดแปลงของ Hame และ Rickwood (1981)	62
2	สถานที่เก็บตัวอย่างทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง 26 พันธุ์ ที่ใช้ในการคัดพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อรา *P. palmivora*	63

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ทุเรียน [*Durio zibethinus* (Linn.) Murr.] เป็นไม้ผลเมืองร้อนจัดอยู่ในวงศ์ Bombacaceae ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและได้รับความนิยมในการบริโภคอย่างแพร่หลายทั้งภายในและต่างประเทศ ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตทุเรียนที่มีชื่อเสียงและมีคุณภาพ ปัจจุบันมีการปลูกทุเรียนทั่วทุกภาคของประเทศ รวมพื้นที่ปลูก 722,454 ไร่ โดยภาคตะวันออกมีพื้นที่ในการเพาะปลูกทุเรียนพันธุ์เศรษฐกิจมากที่สุดถึง 375,385 ไร่ สำหรับทางภาคใต้มีพื้นที่ปลูกทุเรียน 298,966 ไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2537) ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตทุเรียนที่มีชื่อเสียงและมีคุณภาพดี เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ โดยมีแนวโน้มการส่งออกเพิ่มมากขึ้นทุกปี ผลผลิตรวม 711,371 ตัน ปริมาณการส่งออกในปี 2536 รวม 21,201 ตัน คิดเป็นมูลค่า 533.99 ล้านบาท ตลาดต่างประเทศที่สำคัญของทุเรียนสด ได้แก่ ฮ่องกง บรูไน ไต้หวัน และ สิงค์โปร์ (ราตรี เม่นประเสริฐ, 2538)

ปัญหาที่สำคัญของการปลูกทุเรียน คือ การแพร่ระบาดของโรครากเน่าและโคนเน่า ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Bult.) Bult. มีรายงานการระบาดของโรครากเน่าและโคนเน่าในประเทศไทยเป็นครั้งแรกที่ อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี เมื่อปีพ.ศ. 2509 ต่อจากนั้นก็ระบาดทั่วไปตามแหล่งปลูกทุเรียน เช่น ระยอง จันทบุรี อุตรดิตถ์ และภาคใต้ของประเทศไทย ทำให้เกิดความเสียหาย เพราะต้นทุเรียนที่เป็นโรคนี้แล้วโดยมากมักจะตาย บางสวนตายเป็นจำนวนมากหรือทั้งสวน ดังนั้นจึงเกิดความเสียหายขึ้นอย่างมหาศาล เพราะระยะเวลาในการปลูกต้นทุเรียนต้นหนึ่ง ๆ จนให้ผลผลิตใช้เวลานาน และในช่วงระยะเวลา ดังกล่าวต้องใช้ปัจจัยในการปลูกและดูแลรักษาจำนวนมาก วรรลดา กีรติภัทรกุล 2522 รายงานว่าจากการสำรวจโรครากและโคนเน่าของทุเรียนในจังหวัดระยองในปี 2512-2517 พบว่าพันธุ์ทุเรียนที่เป็นโรค คือ พันธุ์กระดุม เป็นโรค 60 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ลวง เป็นโรค 59.5 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์กบ เป็นโรค 45 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์สาวน้อย เป็นโรค 35 เปอร์เซ็นต์

พันธุ์ก้านยาว เป็นโรค 20 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์ชะนี เป็นโรค 10 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ทุเรียนที่อ่อนแอต่อโรคและตายมากที่สุดคือ พันธุ์ลวง และรองลงมาคือ พันธุ์หมอนทอง กระดุม กบ และสาวน้อย ตามลำดับ ในปี พ.ศ. 2537 โรครากและโคนเน่าของทุเรียนได้ทวีความรุนแรงขึ้น ทำความเสียหายให้กับพื้นที่ปลูกทุเรียนมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็นพื้นที่ปลูกไม่ต่ำกว่า 40,000 ไร่ ทำให้เกษตรกรได้รับความเสียหาย (สุขวัฒน์ จันทรปราชิก, 2538)

โดยทั่วไป การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรครากและโคนเน่าของทุเรียนเป็นวิธีการที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น และเป็นสาเหตุทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม รวมทั้งอาจทำให้เชื้อโรคมีการพัฒนาการทนทานต่อสารเคมี ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงมีความพยายามที่จะหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี โดยใช้พันธุ์ต้านทานเป็นต้นตอทุเรียนพันธุ์ดี

แสวง ภูศิริ (2527) รายงานว่า พบทุเรียนพื้นเมืองที่มีลำต้นขนาดใหญ่และมีอายุ 80-150 ปี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50-120 เซนติเมตร เปลือกแข็งสีเทาแก่ มีลักษณะที่ทนทานและต้านทานต่อโรครากและโคนเน่าในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามการศึกษาเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานโรคอย่างจริงจัง พร้อมกับตรวจสอบสายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองโดยใช้เทคนิคที่เหมาะสมยังไม่มีผู้ดำเนินการมาก่อน การศึกษาครั้งนี้จึงทำการคัดเลือกทุเรียนพื้นเมืองภาคใต้ 26 สายพันธุ์ เพื่อหาระดับความต้านทานโดยการปลูกเชื้อราลงบนใบและราก รวมทั้งการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีคือไอโซไซม์ (isozyme) เพื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทุเรียนพื้นเมือง

ตรวจเอกสาร

1. พืชอาศัย : ทุเรียน

ทุเรียนเป็นไม้ผลเมืองร้อนจัดอยู่ในอันดับ Mavales วงศ์ Bombacaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Durio zibethinus* (Linn.) Murr. มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปลูกกันมากในประเทศมาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของทุเรียนอยู่ในเขตร้อนชื้น อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75-80 เปอร์เซ็นต์ มีฝนตกชุก และมีการกระจายตัวของฝนดี ปริมาณน้ำฝนที่พอเหมาะต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง 2,000-2,500 มิลลิลิตรต่อปี ชอบดินร่วนซุย มีการระบายน้ำดี ความเป็นกรดด่าง (pH) ของดิน ประมาณ 5.0-6.5 หน้าดินมีความลึกไม่น้อยกว่า 1.5 เมตร (ทรงพล สมศรี, 2531) ทุเรียนสามารถทนความเค็มได้ไม่เกิน 0.2 เปอร์เซ็นต์ ปกติเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ซึ่งสูงกว่าระดับน้ำทะเล 2,000-3,000 ฟุต หากพื้นที่สูงกว่านี้ทุเรียนจะไม่ให้ผลผลิต และหากอุณหภูมิต่ำกว่า 18.5 องศาเซลเซียสทำให้ทุเรียนเจริญเติบโตช้า (ธิรา แดงกนิษฐ์, 2538)

ฝ่ายข้อมูล วารสารเคหการเกษตร (2537) รายงานว่าทุเรียนที่พบในประเทศไทยมี 4 กลุ่ม คือ

(1) *Durio zibethinus* (Linn.) Murr. ได้แก่ ทุเรียนสวนและทุเรียนพื้นเมืองที่นิยมรับประทานในปัจจุบัน

(2) *Durio malaccensis* Planch.ex Mast. ได้แก่ ทุเรียนดอน พบมากในป่าภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงไป พบมากที่จังหวัดพังงา มีดอกสีแดง ผลกลมเล็ก หนามละเอียด ใบหนา ขอบใบเกือบขนานกัน

(3) *Durio griffithii* (Mast.) Bakh. ทุเรียนนก พบในป่าทางภาคใต้ พบมากในจังหวัดระนอง มีลักษณะคล้ายทุเรียนดอนแต่ใบบางกว่า ใบเป็นรูปกระสวย ทุเรียนนกในจังหวัดตรังพบว่าเป็นทุเรียนนกหนามสั้น (*Durio lowianus* Scot. ex King)ในขณะที่ทุเรียนนกที่พบในจังหวัดพังงาเป็นทุเรียนนกหนามยาว (*Durio mansoni* Bakh.)

(4) *Durio pinangianus* Ridley ทุเรียนป่าพบมากในจังหวัดพังงา ลักษณะคล้ายทุเรียนนก

ทุเรียนที่นำมาใช้ในการทดสอบการเกิดโรคเพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ต้านทานในการทดลองนี้ทั้ง 26 สายพันธุ์น่าจะเป็นทุเรียนในกลุ่มที่ 1 อย่างไรก็ตามการศึกษาเพื่อจำแนกกลุ่ม

ของทุเรียนโดยเทคนิคไอโซไซม์และชีวโมเลกุลน่าจะช่วยให้การจัดจำแนกมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น และควรมีการทำวิจัยเพื่อจะให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่ถูกต้อง เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาด้านอื่น ๆ ต่อไป

2. เชื้อสาเหตุ : *P. palmivora*

Zentmyer (1988) และ Zentmyer and Mitchell (1985) รายงานว่าทำลายโกโก้และไม้ผลเมืองร้อนบางชนิดในเอเชีย เชื้อรามีถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ และแพร่กระจายไปทั่วโลกโดยพืชที่ติดเชื้อและมนุษย์เป็นตัวการ เป็นเชื้อราที่มีพืชอาศัยกว้าง (Chee and Newhook, 1966) สามารถทำลายพืชได้ถึง 138 ชนิด เช่นมี รายงานเกิดโรคกับ sweet orange ในฟลอริด้า (Zitko *et al.*, 1991) ทำลายโกโก้และไม้ผลเมืองร้อนบางชนิดทำลายกล้วยไม้ในฮาวาย (Uchida and Aragaki, 1991) ในประเทศไทยเชื้อราชนิดนี้ทำให้เกิดโรคกับพริกไทย (Tsao, 1974) ทุเรียน (Suzui *et al.*, 1976) กล้วยไม้ (อุบล คือประโคน และคณะ, 2528) ยางพารา (เกื้อกูล บุญญานุภาพพงศ์, 2533) และ โกโก้ (ยุพิน กสินเกษมพงษ์, 2534) เชื้อราสามารถมีชีวิตอยู่ทั้งในดิน น้ำ และอากาศ ทำลายพืชได้ทั้งส่วนราก ลำต้น กิ่ง ใบ และผล

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคจะอาศัยอยู่ข้ามฤดูปลูกบนเศษซากพืชที่เคยเป็นโรค เศษอินทรียวัตถุในดินหรือบนพืชอาศัยบางพืช เมื่ออยู่ในดินจะสร้างเส้นใยมีผนังหนามีรูปร่างกลมเรียกว่า chlamydospore หากมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมี oogonium ผสมกับ antheridium ทำให้เกิดสปอร์ที่มีผนังหนาเรียกว่า oospore ซึ่งมีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ถ้ามีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม oospore จะงอกเป็นเส้นใยจะสร้าง sporangium หากมีความชื้นสูงหรือมีฝนตก sporangium พัฒนาให้ zoospore มีลักษณะ 2 หางขนาดเล็กจำนวนมาก สามารถว่ายน้ำไปถึงรากพืช และเข้าทำลายพืชบริเวณรากได้ (ทวี เก่าศิริ, 2532)

3. การทดสอบเพื่อคัดเลือกพันธุ์ทุเรียนต้านทาน

การศึกษาคัดเลือกพันธุ์ทุเรียนที่ต้านทานต่อโรครากและโคนเน่ามีไม่มากนัก ขจรศักดิ์ ภวกุล และคณะ (2520) ทำการศึกษาต้นตอที่ต้านทานโรครากและโคนเน่าของทุเรียน โดยใช้ทุเรียนนกหนามสั้น (*D. lowianus*) ซึ่งมีแนวโน้มจะเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรค

พบว่าต้นตอยังไม่ปรากฏอาการเป็นโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *P. palmivora* หลังจากทดลองเป็นเวลา 4 ปี และได้ทำการศึกษาทุเรียนป่าอีกเช่น ทุเรียนนกหนามยาว (*D. mansoni*) โดยทำการปลูกเชื้อบนต้นกล้าอายุ 2 เดือน เปรียบเทียบกับพันธุ์ลวง พบว่าทุเรียนพันธุ์ลวงแสดงอาการเป็นโรคตายหลังปลูกเชื้อ 1 เดือน ส่วนกล้าทุเรียนนกหนามยาวไม่ปรากฏเป็นโรครากเน่า หลังปลูกเชื้อแล้ว 1 เดือนจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ารากของพันธุ์ลวงมี zoospore เกาะอยู่หนาแน่นกว่าทุเรียนนกหนามยาว โดยเฉพาะส่วนของปลายราก หรือส่วนที่เป็นแผลจากการทดสอบโรคโดยการดัดแปลงพัฒนาวิธีการวัดผล การทดลองนี้จึงทดสอบโรคด้วยการปลูกเชื้อลงในใบและราก ทำการวัดผลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปและเครื่องทำแผนที่ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ให้ความแม่นยำสูงมาประยุกต์ใช้ เพื่อให้ผลการวัดการเกิดโรคมีความถูกต้องมากที่สุด (เบ็ญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์ และคณะ, 2540)

4. การศึกษาเพื่อจำแนกสายพันธุ์พืชโดยใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี (isozyme)

ไอโซไซม์ หรือไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) หมายถึงเอนไซม์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลหลายรูปแบบ (ประเทือง สง่าจิตร, 2533 ; ดวงพร วรสุนทโรสถ, 2534) แต่เร่งปฏิกริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และชนิดของสิ่งมีชีวิต (Merkert and Moller, 1959) รูปแบบของไอโซเอนไซม์ต่าง ๆ นี้แตกต่างกันในลำดับกรดอะมิโน และอาจมีพันธะโควาเลนท์บางอย่างเช่น หมู่ hydroxyl ตลอดจนโครงสร้างแตกต่างกัน จึงทำให้ไอโซเอนไซม์เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลหลายขนาดและหลายรูปร่าง เมื่อนำมาศึกษาด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซิส จึงให้ผลของการศึกษาที่แสดงความแตกต่างของโมเลกุลของเอนไซม์ ตามการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า (Shanon, 1986; Scandalios, 1974) นับว่าเป็นวิธีการที่กระทำได้รวดเร็วไม่สิ้นเปลือง เวลาในการศึกษาและสามารถตรวจสอบผลซ้ำได้ (Cerezo and Arus, 1989) อาศัยหลักการที่สำคัญคือ ไอโซไซม์เป็นสายโพลีเปปไทด์ซึ่งประกอบด้วยกรดแอมิโนเรียงกันอยู่ ลำดับของกรดอะมิโนนี้ได้รับการแปลมาจากรหัสพันธุกรรมบนสายนิวคลีโอไทด์ ไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกันก็ย่อมจะมีประจุสุทธิ ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกันด้วย (พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, 2531) เมื่อนำไอโซไซม์มาแยกบนตัวกลางที่เหมาะสมด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส ซึ่งเป็นการแยกอนุภาคซึ่งมีประจุในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของเอนไซม์จะเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน และหลังจากที่ทำการย้อมสีด้วยปฏิกิริยาจำเพาะสำหรับไอโซไซม์แต่ละชนิด ก็จะเห็นแถบสี

เอนไซม์รูปแบบต่าง ๆ (Bailey, 1983) แถบสีที่ปรากฏนี้เรียกว่ารูปแบบของไซโมแกรม (zymogram) ซึ่งไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิเป็นลบมากหรือมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยก็จะเคลื่อนที่ได้เร็ว โดยอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกด้วยอัตราการเคลื่อนที่ที่ขึ้นอยู่กับความเข้มในสนามไฟฟ้าและจำนวนประจุไฟฟ้ารวมของอนุภาค การเคลื่อนที่ของไอโซ-ไซม์ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันนั้น เป็นผลโดยตรงจากลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Crawford, 1983) สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างของพันธุ์พืชได้ถูกต้องแน่นอนกว่าการพิจารณาลักษณะภายนอก และสามารถจดทะเบียนรับรองพันธุ์ได้ (Moore and Collin, 1983) การศึกษาไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์มีรายงานการศึกษาและประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น หญ้าอัลฟัลฟ่า (Quiros, 1980) สตรอเบอรี่ (Bringhurst *et al.*, 1981) อ้อย (Ruiz and Maribona, 1983) แอปเปิ้ล (Weeden and Lamb, 1985) กล้วย (Jarret and Litz, 1986) สับปะรด (Dewald *et al.*, 1988) ท้อ (Mowrey and Werner, 1990) มะม่วง (Degani *et al.*, 1990) และมันเทศ (Kennedy and Thompson, 1991) เป็นต้น

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาการใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีคือไอโซไซม์ จำนวนมาก เช่นเดียวกัน ปุณฑริกา หะริณสุต (2534) ศึกษาไซโมแกรมเปอร์ออกซิเดสจากใบแก่ของมะม่วงอายุ 12 ปี สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 18 สายพันธุ์ พบว่ารูปแบบของไซโมแกรมหลักในระหว่างสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน โดยไซโมแกรมเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการทดลองมีประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์มะม่วง และพบว่ามะม่วงอกร่อง 3 พันธุ์ มีจำนวนไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสน้อยกว่ามะม่วงมันพันธุ์อื่น ๆ เสริมศิริ เมธีวรกุล (2536) ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส ระหว่างพันธุ์อ้อยที่มีความต้านทานในระดับต่าง ๆ ต่อโรคแส้ดำ และโรครากเน่า พบว่าในพันธุ์ต้านทานส่วนใหญ่มีแถบของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ระยะทางการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ 0.527 (Rf) ซึ่งไม่พบในกลุ่มพันธุ์อ่อนแอ และในกลุ่มพันธุ์อ่อนแอต่อโรคแส้ดำส่วนใหญ่เท่านั้นที่พบแถบเอนไซม์ที่ Rf 0.418 สำหรับในอ้อยพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใบจุดวงแหวน ส่วนมากพบแถบเอนไซม์จางที่ Rf 0.410 ในขณะที่พันธุ์ต้านทานไม่พบแถบเอนไซม์ที่ Rf นี้ ส่วนรูปแบบของเอสเตอร์เรสไอโซไซม์ในกลุ่มพันธุ์ที่มีระดับความต้านทานต่อโรคไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของแถบสีได้อย่างชัดเจน ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีสำหรับทุเรียนพันธุ์ต่าง ๆ นั้น มีผู้ศึกษาไม่มากและยังไม่มีรายงานการตีพิมพ์ในเอกสารใดมาก่อน ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงได้เริ่มศึกษาเพื่อจำแนกพันธุ์ทุเรียนโดยใช้ไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสและเอสเตอร์เรสเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี ข้อมูลที่ได้ประกอบกับข้อมูล

การทดสอบโรคโดยเทคนิคต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วน่าจะช่วยให้สามารถกำหนดสายพันธุ์ทุเรียนที่ต้านทานต่อโรครากเน่าโคนเน่าได้อย่างแม่นยำมากขึ้น รวมทั้งอาจจะนำไปสู่การอธิบายถึงสาเหตุของความต้านทานที่เกิดขึ้นได้ในอนาคต

Central Library
Prince of Songkhla University

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกสายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองที่มีแนวโน้มที่ต้านทานต่อโรครากและโคนเน่า
2. เพื่อตรวจสอบไอโซไซม์ในสายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองในภาคใต้ที่มีศักยภาพในการต้านทานโรค

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ต้นกล้าทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง 26 สายพันธุ์
2. อาหารเลี้ยงเชื้อราและอาหารที่เป็นส่วนประกอบคือ potato dextrose agar, carrot agar
3. สารเคมีต่าง ๆ คือ
   - 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อราประกอบด้วย benomyl, nystatin, parachloronitrobenzene PCNB, rifampicin, ampicilin, hymexazal
   - 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ประกอบด้วย tris-hydroxymethyl aminomethane (tris-HCl), polyvinylpyrrolidone (PVP), 2-mercapthoethanol และ disodiumethylenediaminetetraacetate (Na_2EDTA)
   - 3.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลประกอบด้วย acrylamide, N, N′-methylene bis-acrylamide, tris-HCl, amnonium peroxydisulfate และ N, N, N′, N′-, tetramethylethylenediamine (TEMED)
   - 3.4 สารเคมีที่ใช้เป็นอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl และ glycine
   - 3.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมย้อมสีเจล (รายละเอียดในภาคผนวก)
4. เชื้อรา *P. palmivora*

เชื้อรา *P. palmivora* (ภาพที่ 3) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเชื้อราสาเหตุที่แยกจากต้นทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ณ อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา โดยวิธี tissue transplanting technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (Masago *et al.*, 1977) ซึ่งดำเนินงานวิจัยโดย Kanjanamaneesathian *et al.*, (1995)

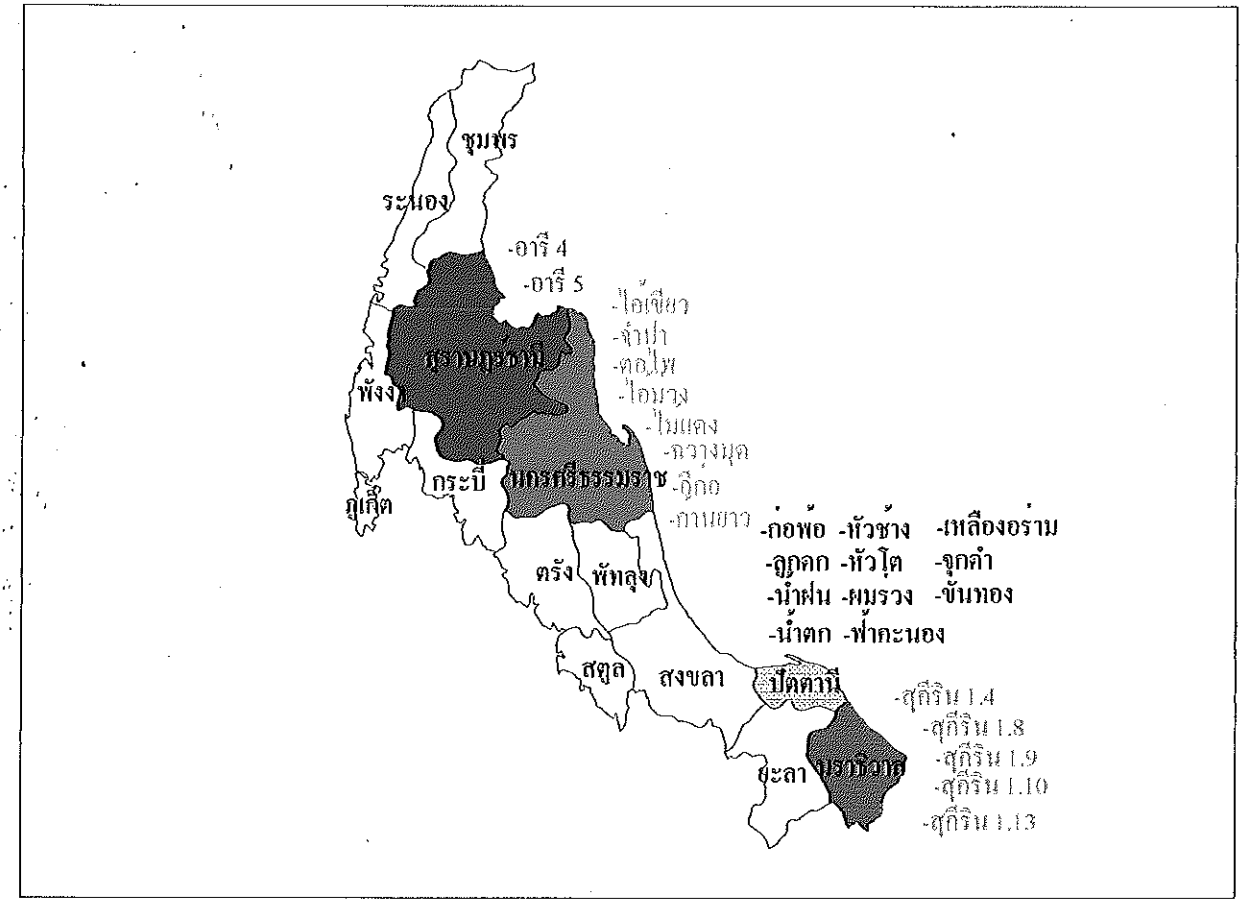
อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้วคือ จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ฟลาสค์ขนาด 250, 500 มิลลิลิตร, บีคเกอร์ขนาด 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร กระบอกตวงและเครื่องแก้วอื่น ๆ
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
4. ตู้อบเครื่องแก้ว
5. หม้อนึ่งความดัน
6. ตู้เพาะเลี้ยงควบคุมอุณหภูมิ
7. ตู้ปลอดเชื้อ
8. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
9. กล้องจุลทรรศน์ และสไลด์นับเซลล์
10. ที่เจาะอาหาร (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 และ 9 มิลลิเมตร
11. เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติและแท่งแม่เหล็ก
12. ตู้อบไมโครเวฟ
13. ตู้เย็น และตู้แช่แข็ง -76 องศาเซลเซียส
14. โกร่งสำหรับบดตัวอย่างพืชขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซ็นติเมตร
15. กระติกน้ำแข็ง
16. เครื่องหมุนเหวี่ยง (ไมโครเซ็นตริฟิวก์ TOMY รุ่น MC150)
17. เครื่องวัดสารละลายอัตโนมัติปรับปริมาตรได้ 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
18. เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีสแบบชนิดแนวตั้งแบบ Midgel Multicast รุ่น 2050-200
19. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า Pharmacia รุ่น CPS 200/400
20. เครื่องวัดแสง (light meter) ยี่ห้อ Extech

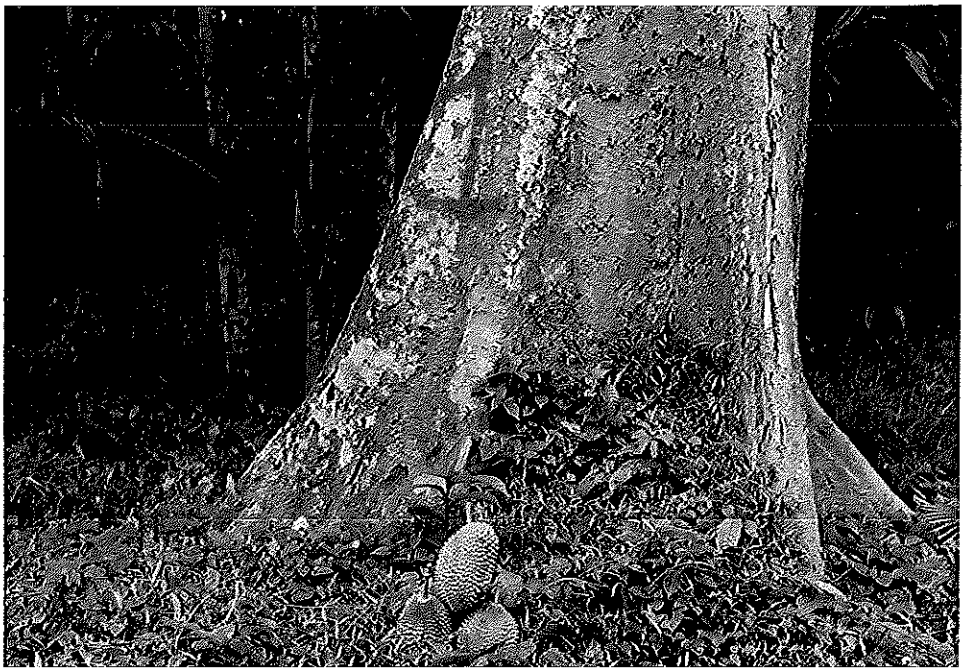
วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง

การเก็บทุเรียนพื้นเมืองในระหว่างวันที่ 20 มิถุนายน - 9 สิงหาคม 2539 โดยให้เกษตรกรเจ้าของสวนเก็บรวบรวมผลทุเรียนจากพันธุ์พื้นเมืองมีลำต้นสูงที่ร่วงลงมากองไว้ใต้ต้น แล้วบรรจุผลทุเรียนทุกผลใส่ถุงทำเครื่องหมายบนลำต้นของทุเรียนแต่ละสายพันธุ์ที่เก็บผลทุเรียน สถานที่เก็บพันธุ์ทุเรียน (ตารางภาคผนวกที่ 2 ภาพที่ 1 และ 2) ผลทุเรียนที่เก็บได้เมื่อนำกลับมายังเรือนทดลองแล้วทำการถ่ายรูปและบันทึกข้อมูลขนาดของผล ลักษณะสีผิว เปลือกและผ่าผลทุเรียน เพื่อบันทึกสีเนื้อผล แล้วจึงแกะเนื้อออกจากเมล็ด ล้างเมล็ดให้สะอาด จากนั้นนำเมล็ดทุเรียนมาใส่ตะกร้าพลาสติกขนาด 10x15x5 เซนติเมตร โดยแยกใส่ภาชนะตามพันธุ์ ผึ่งให้แห้งในเรือนกระจกทดลองของคณะทรัพยากรธรรมชาติ เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปเพาะใส่กระบะเพาะชำในเรือนเพาะชำแปลงภาควิชาการจัดการศัตรูพืช โดยใช้ทรายอบฆ่าเชื้อ เมื่องอกเป็นต้นกล้าจึงนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาการทดสอบการเกิดโรค และการตรวจสอบความแตกต่างของไอโซไซม์



ภาพที่ 1. แผนที่แสดงจังหวัดและพันธุ์ทุเรียนที่เก็บจาก 4 จังหวัดในภาคใต้คือ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ปัตตานี และนราธิวาส



ภาพที่ 2. ลักษณะลำต้นทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองที่มีลำต้นขนาดใหญ่ที่พบในเขตจังหวัดนครศรี-ธรรมราช

2. การทดสอบการเกิดโรคในระบบรากด้วยวิธี root dipping

2.1 ต้นกล้าทุเรียนที่ใช้ทดสอบ

นำต้นกล้าทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองอายุ 2 เดือน (ภาพที่ 4) จำนวน 26 สายพันธุ์ พันธุ์ละ 14-27 ต้นใช้เป็นต้นทดสอบโรค 10-23 ต้น และชุดควบคุม (control) 4 ต้น โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด completely randomized design (CRD) โดยถอนต้นกล้าทุเรียนที่ปลูกอยู่ในกระบะทราย นำมาล้างทรายออกจากรากให้สะอาด จากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จุ่มรากของต้นกล้าทุเรียนลงในฟลาสค์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุน้ำ deionize ฆ่าเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมเชื้อราสาเหตุ *P. palmivora*

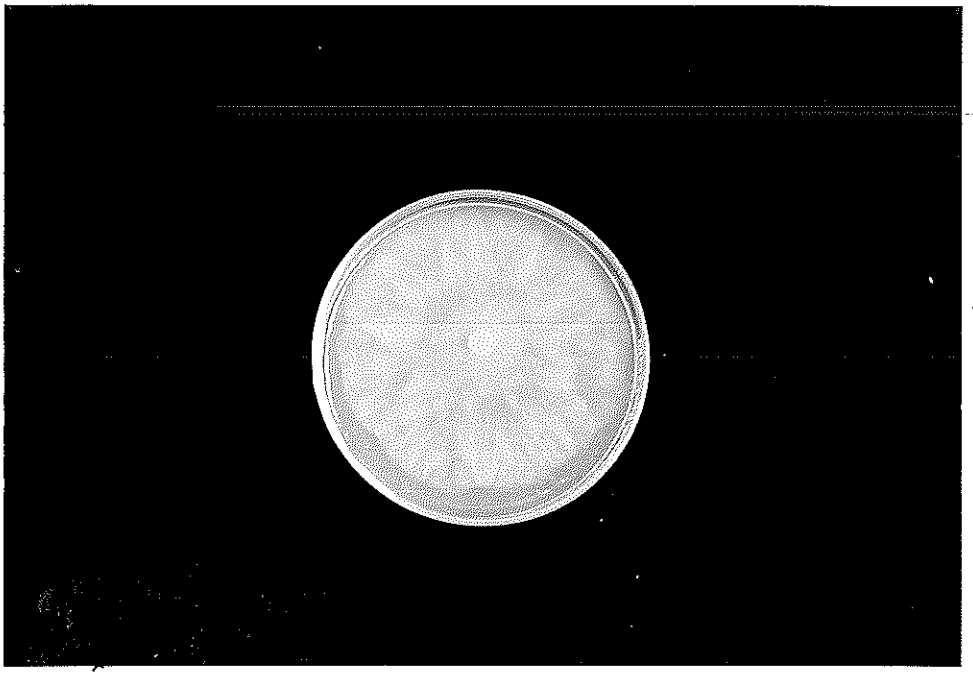
เลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* บนอาหาร carrot agar (CA) จำนวน 180 จาน เลี้ยงเชื้อจนเชื้อรามีอายุ 14 วัน ใช้น้ำ deionize ฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ เทลงในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปวางในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อชักนำ zoospore ให้ออกจาก sporangium เพื่อเตรียม zoospore suspension ความเข้มข้น $1x10^6$ zoospore ต่อมิลลิลิตร (นับจำนวน zoosporeโดยใช้สไลด์นับเซลล์) สำหรับใช้ในการทดลองการทดสอบการเกิดโรคต่อไป

2.3 การทดสอบการเกิดโรค

นำต้นกล้าทุเรียนที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 เติม zoospore suspension ความเข้มข้น $1x10^6$ zoospore ต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 จำนวน 4 มิลลิลิตร ลงในฟลาสค์ที่มีต้นกล้าทุเรียนจุ่มอยู่แล้วนำขวดไปวางเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ความเข้มของแสงเฉลี่ย 1,200 ลักซ์ ความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (โดยให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง มืด 12 ชั่วโมง) จากนั้นทำการย้ายต้นกล้าทุเรียนไปไว้ในฟลาสค์ชุดใหม่ขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำ deionize ฆ่าเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร วางตัวอย่างไว้ในตู้เพาะเลี้ยงในสภาพเดิม (ภาพที่ 5) สังเกตอาการเกิดโรคคือใบเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นจะเหี่ยวแห้งใบร่วงทั้งต้นและตายในที่สุด และบันทึกจำนวนต้นกล้าทุเรียนที่ตายเพื่อเปรียบเทียบความต้านทานระหว่างสายพันธุ์

2.4 การวัดผลการเกิดโรค

ทำการนับระยะเวลาการตายของต้นกล้าและเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าตายภายหลังปลูกเชื้อ 7-43 วัน หลังจากนั้นทำการวัดความยาวรากด้วยวิธีกริดไลน์ (gridline method) (Tennant, 1975)



ภาพที่ 3. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *P. palmivora* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ carrot agar (CA) อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 26-32 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 4. ลักษณะต้นกล้าทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองอายุ 2 เดือน ที่ปลูกในกระบะทราย ก่อนนำมาใช้ในการทดสอบโรคในระบบรากด้วยวิธี root dipping

ภาพที่ 5. การทดสอบโรคในระบบราก โดยวิธี root dipping และเลี้ยงต้นกล้าทุเรียนในตู้เพาะเลี้ยง (growth chamber)

3. การศึกษาการเข้าเกาะติดของ zoospore บนผิวรอบรากของเชื้อรา *P. palmivora*

3.1 การเตรียมรากของทุเรียนที่ใช้ในการทดลอง

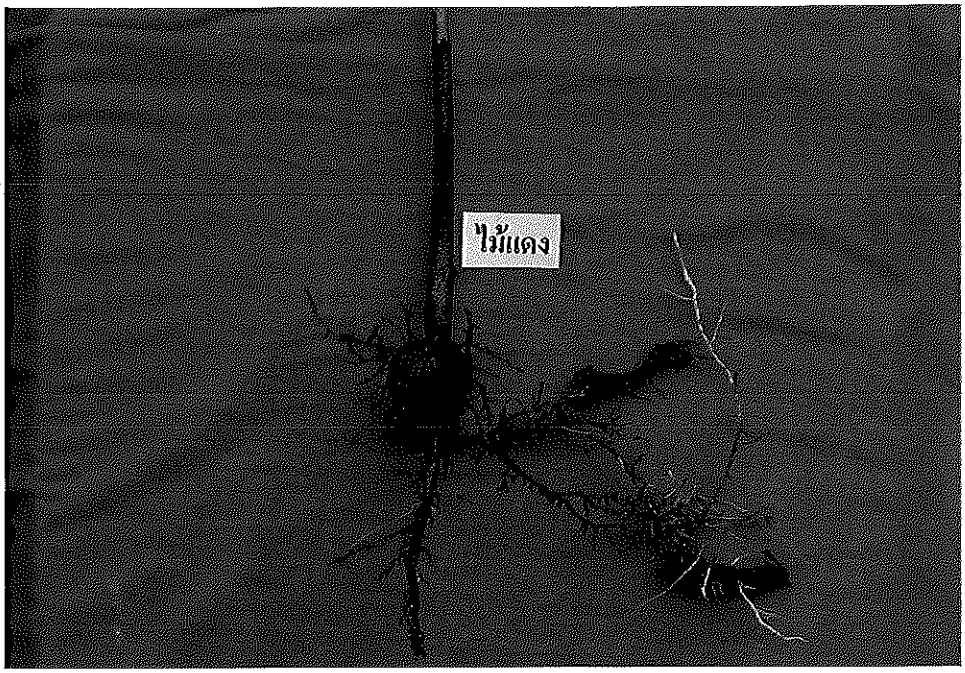
ถอนต้นกล้าทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองอายุ 2 ปี จำนวน 26 สายพันธุ์ (พันธุ์ละ 1 ต้น) ที่ปลูกอยู่ในกระบะทราย นำมาล้างทรายออกจากรากให้สะอาด จากนั้นล้างรากด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ทำการสุ่มตัดรากฝอย(ปลายรากฝอยบริเวณที่มีเนื้อเยื่อเจริญ) (ภาพที่6)ของทุเรียนแต่ละสายพันธุ์ให้มีขนาด 1 เซนติเมตร นำรากที่ตัดแล้วไปวางแช่ไว้ในจานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 การเตรียมเชื้อราสาเหตุ *P. palmivora*

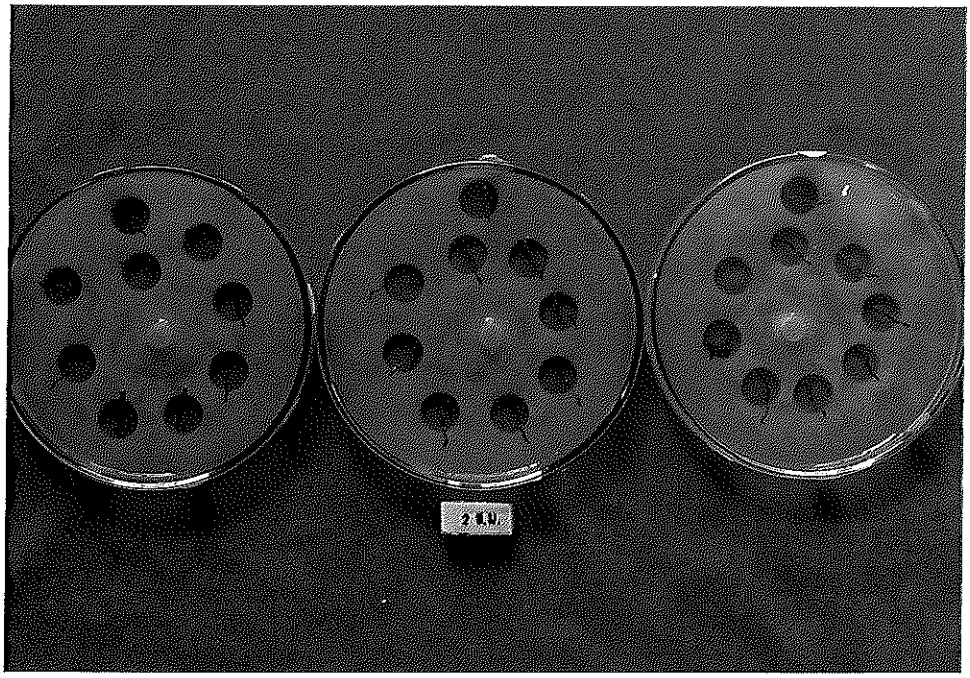
เลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* บนอาหาร carrot agar จนเชื้อรามีอายุ 14 วัน การทดสอบครั้งนี้ใช้เชื้อราจำนวน 6 จานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตรเจาะ บนอาหารให้เป็นหลุมจำนวน 9 หลุมต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเทน้ำ deionize ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อให้ท่วมผิวของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อและทำการชักนำ zoospore ให้ออกจาก sporangium โดยนำจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปวางในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำกลับมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดสอบการเข้าเกาะติดของ zoospore บนผิวรอบปลายราก

3.3 การทดสอบการเข้าเกาะติดของ zoospore บนผิวรอบราก

นำรากทุเรียนที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 นำมาแช่ในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียม zoospore suspension ในข้อ 4.2 โดยนำปลายรากทุเรียนมาใส่หลุมละ 1 ราก (1 สายพันธุ์) จำนวน 26 หลุม (26 สายพันธุ์) (ภาพที่ 7) ทำการตรวจสอบการเข้ามาเกาะรากของ zoospore หลังจากใส่รากทิ้งไว้ 3 ช่วงเวลา คือ 40-50 นาที 90-145 นาที และ 150-190 นาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์กำลังขยาย 100 เท่า เตรียมปลายรากในลักษณะเดียวกันนี้ เพื่อใช้ตรวจสอบการเข้าเกาะติดปลายรากทุเรียนโดย zoospore ของเชื้อ *P. palmivora* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) โดยแช่ปลายรากในสารแขวนลอยของ zoospore นาน 180 นาที ทำการแบ่งปลายรากออกเป็น 6 ส่วน ตรวจสอบการเกาะติดของ zoospore บริเวณปลายรากในแต่ละพันธุ์ นำไปทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วย SEM (รายละเอียดการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM ในภาคผนวก ก.)



ภาพที่ 6. ลักษณะรากของทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองอายุ 2 ปีบริเวณปลายรากฝอย (ศรชี้) ที่ใช้ศึกษาการเข้าเกาะติดของ zoospore บนผิวรอบราก



ภาพที่ 7. การทดสอบการเข้าเกาะรากของ zoospore โดยใช้ปลายรากทุเรียนทั้งหมด 26 สายพันธุ์วางในหลุมที่เจาะเอาส่วนของวุ้นจากอาหารเลี้ยงเชื้อออกและวางปลายรากทุเรียนลงไปในหลุม

3.4 การวัดผลการเข้าเกาะติดรากโดย zoospore

ทำการตรวจสอบบริเวณการเข้าเกาะติดปลายรากทุเรียนของ zoospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์ใน 3 ช่วงเวลาคือ 40-50 นาที 90-145 นาที และ 150-190 นาที เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด และถ่ายภาพบริเวณที่พบ zoospore ที่ผิวราก เพื่อประเมินว่า zoospore จะเกาะบริเวณช่วงใดของปลายราก

4. การทดสอบการเกิดโรคด้วยวิธี detached leaf

4.1 การเตรียมใบทุเรียนที่ใช้ในการทดลอง

เก็บใบจากต้นกล้าทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองอายุ 1.5 ปี ซึ่งปลูกในกระบะทรายในเรือนเพาะชำ โดยทำการเก็บใบที่ 2-3 จากยอดจำนวน 26 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 5 ใบจากต้นกล้าทุเรียน 5 ต้น นำใบมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งเพื่อใช้ทดสอบโรคบนใบ

4.2 เชื้อรา *P. palmivora*

เลี้ยงเชื้อรา *P. palmivora* บนอาหาร carrot agar เป็นเวลา 14 วัน เพื่อเตรียม zoospore suspension โดยเทน้ำ deionize ที่อบฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 มิลลิลิตร ให้ท่วมผิวของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการชักนำ zoospore ให้ออกจาก sporangium โดยนำจานเลี้ยงเชื้อไปวางในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3 การทดสอบการเกิดโรค

นำใบทุเรียนที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 วางใส่ในกล่องพลาสติก ขนาด 19x28x10 เซนติเมตร ที่มีกระดาษซับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อวางอยู่ จากนั้นฉีดพ่นน้ำกลั่นเพื่อให้ภายในกล่องพลาสติกมีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นหยด zoospore suspension ความเข้มข้น $8x10^4$ zoospore ต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.84 มิลลิลิตรต่อใบ ปิดฝากล่องให้สนิทนำไปวางที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 8) สังเกตอาการแผลไหม้บนใบ (necrotic lesion) และบันทึกผล เปรียบเทียบกันในแต่ละพันธุ์ที่ทดสอบ

4.4 การวัดผลการเกิดโรค

ทำการนับจำนวนแผลและวัดขนาดของแผลบนใบหลังการปลูกเชื้อ 4, 6 และ 8 วัน บันทึกขนาดและการขยายตัวของแผลโดยการนำแผ่นใสมาทาบบนใบที่แสดงอาการ necrotic lesion และทำการวาดรูปแผลบนใบ (ภาพที่ 9) นำแผ่นใสที่บันทึกพื้นใบ และขนาดของแผลที่มีอาการ necrotic lesion มาลอกใส่กระดาษถ่ายเอกสารขนาด A4 (ภาพที่ 10)โดยใช้ดินสอที่มีความเข้ม 2B ขึ้นไป นำกระดาษที่ลอกอาการ necrotic lesion และพื้นที่ใบเข้าเครื่อง scanner (Hewlett Packard รุ่น Scanjet II CX) (ภาพที่ 11) เพื่อเก็บบันทึกและวัดพื้นที่ใบและอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. palmivora* นำข้อมูลที่ได้จากเครื่อง scanner ไปหาพื้นที่ใบที่เกิดโรคด้วยโปรแกรม DT-SCAN (ภาพที่ 12) (Webb, 1993) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้แผนการทดลองแบบ Completly Randomized Design (CRD) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าอัตราการขยายตัวของแผล (RLE= rate of lesion expansion=$(d_2-d_1)/(t_2-t_1)$ค่า d_1=พื้นที่ของแผลในวันที่1, d_2=พื้นที่ของแผลในวันที่2, t_1=เวลาที่เกิดโรควันที่1, t_2=เวลาที่เกิดโรควันที่ 2) จำนวนแผลที่เกิดบนใบ พื้นที่ที่เกิดโรค เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคหลังปลูกเชื้อ 4, 6 และ 8 วันตามลำดับ (Reynolds and Cunfer, 1997)

5. การศึกษาการตรวจสอบพันธุ์โดยเทคนิคทางไอโซไซม์

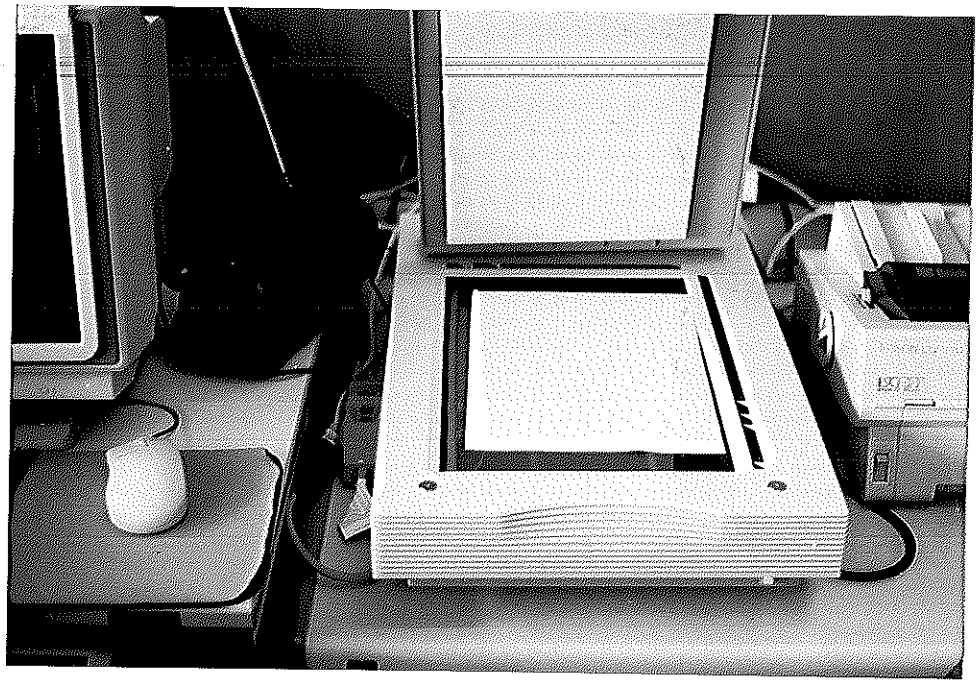
ดำเนินการทดลองโดยนำใบอ่อนหรือใบแก่ของต้นกล้าอายุ 2 ปี มาสกัดด้วย extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย tris- HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 0.5 M , EDTA ความเข้มข้น 100 mM, ดัดแปลงโดยการเติม KCl ความเข้มข้น 1M, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1M, polyvinylpyrrolidone(PVP MW 40000) 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ β-mercaptoethanol 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดใช้ตัวอย่างพืช 1.0 กรัมน้ำหนักสดต่อสารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ทำการบดตัวอย่างพืชในโกร่งที่เย็นจัด จนกระทั่งตัวอย่างพืชละเอียด เทใส่หลอด Eppendorf นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอน โดยเครื่องไมโครเซ็นตริฟิวก์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน ใส่หลอด Eppendorf ใหม่ที่สะอาด ในกรณีที่ไม่ใช้ทันทีเติมกลีเซอรอล เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง ที่อุณหภูมิ -76 องศาเซลเซียส นำสารสกัดที่ได้มาแยกเอนไซม์ในตัวกลางวุ้นโพลีอะคริลาไมด์ แบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งประกอบด้วย stacking gel ความเข้มข้น 3.7 เปอร์เซ็นต์ และส่วน separating gel ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรดัดแปลงของ Hame และ Rickwood (1981)ภายใต้แรงเคลื่อน

ไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 5±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง นำแผ่นเจลที่ได้มาตรวจสอบรูปแบบ ของเอนไซม์โดยการย้อมสีที่จำเพาะของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส หรือเอสเตอเรสในที่มืดเมื่อเจลติดสีชัดเจนแล้วทำการตรึงเอนไซม์และล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซีติก 7 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นบันทึกภาพรูปแบบ ไซโมแกรมด้วยกล้องโพลาลอยด์ และกล้องถ่ายรูปธรรมดา

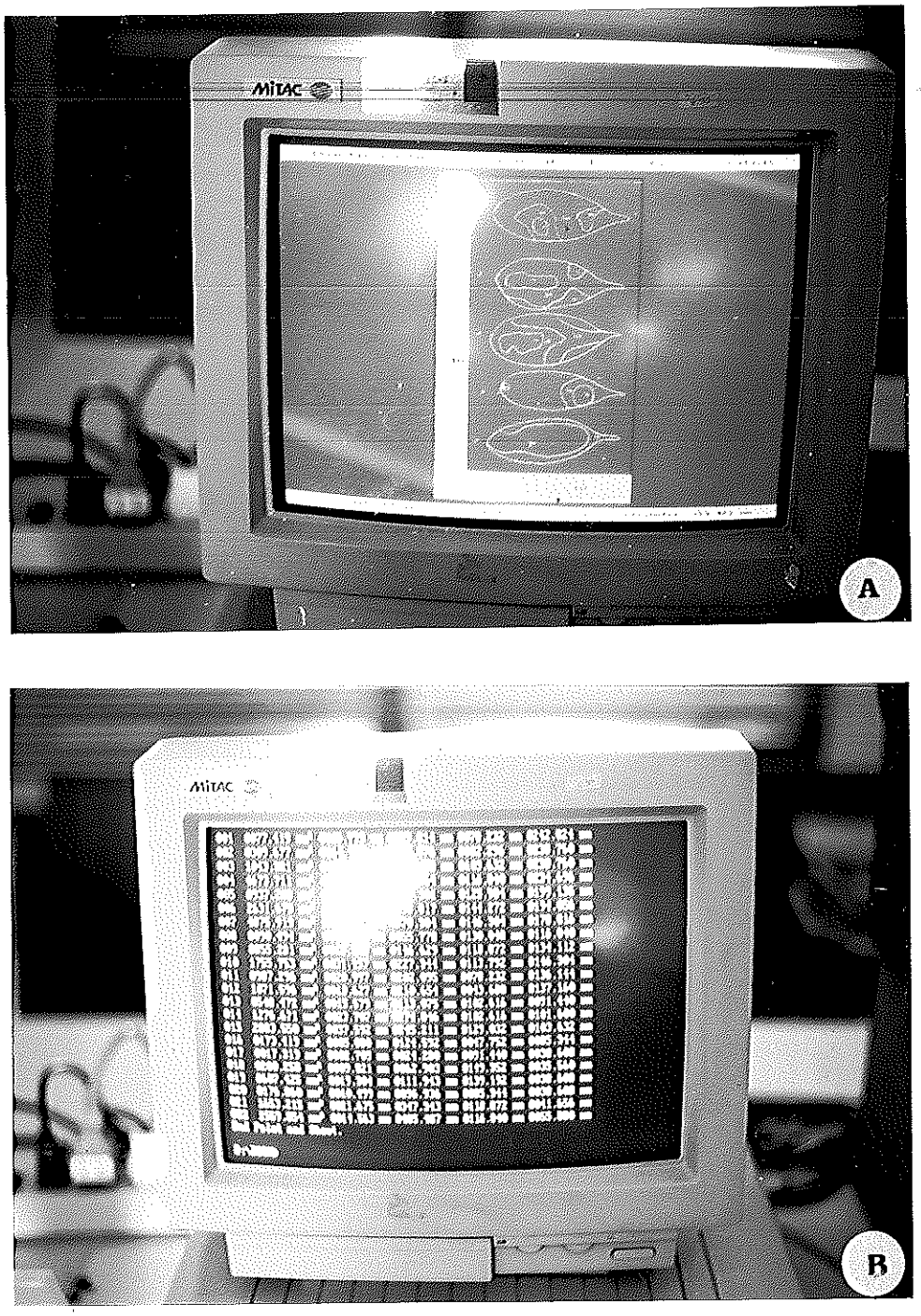
ภาพที่ 8. การทดสอบการเกิดโรคบนใบด้วยวิธี detached leaf

ภาพที่ 9. การบันทึกอาการ necrotic lesion บนแผ่นใส

ภาพที่ 10. การบันทึกอาการ necrotic lesion บนกระดาษ A4



ภาพที่ 11. การบันทึกข้อมูลด้วยเครื่อง scanner



ภาพที่ 12. ข้อมูลพื้นที่ใบ และการคำนวณพื้นที่ใบด้วยโปรแกรม DT-SCAN

A) การคำนวณพื้นที่โดยใช้โปรแกรม DT-SCAN

B) ข้อมูลพื้นที่ใบ

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวมทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง

เก็บรวบรวมทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองจาก 4 จังหวัดภาคใต้ดังนี้

จังหวัดนราธิวาส จำนวน 5 สายพันธุ์คือ สุคิริน 1.4, สุคิริน 1.8, สุคิริน 1.9, สุคิริน 1.10 และ สุคิริน 1.13

จังหวัดปัตตานี จำนวน 11 สายพันธุ์คือ ลูกดก, ก่อพ้อ, น้ำตก, น้ำฝน, หัวช้าง, หัวโต, ผมร่วง, ฟ้าคะนอง, เหลืองอร่าม, ขันทอง และจุกดำ

จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ ไอ้เขียว, จำปา, ต่อไพ, ฉวางมุด, อีก่อ, ไอ้ม่วง, ไม้แดง และก้านยาว

จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ อารี4, อารี5

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของผล และสีเนื้อทุเรียน (รายละเอียดในตารางที่ 2)

จากการเก็บรวบรวมพันธุ์ทุเรียนในปี 2539 ทุเรียนในจังหวัดนราธิวาสและปัตตานี พบว่าให้ผลผลิตในช่วงเดือนมิถุนายน-สิงหาคม ส่วนทุเรียนในจังหวัดนครศรีธรรมราชและสุราษฎร์ธานีจะให้ผลผลิตในเดือนสิงหาคม

ขนาดของผลสายพันธุ์เดียวกันมีค่าใกล้เคียงกันส่วนลักษณะรูปทรงของผลจะคล้ายกันในด้านรสชาติ มีความหวานทุกสายพันธุ์ แต่มีข้อด้อยกว่าทุเรียนพันธุ์เศรษฐกิจคือเนื้อบาง แต่ยังเป็นที่ต้องการของตลาดในภาคใต้

เมล็ดของทุเรียนพื้นเมืองมีขนาดใหญ่ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูง ระบบรากแข็งแรง เหมาะที่จะนำมาทำต้นตอเพื่อเสียบยอดทุเรียนพันธุ์เศรษฐกิจ ทุเรียนเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งในหลายชนิดเช่นเดียวกับมังคุดและลองกองที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก และมีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทำให้ขาดข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคชีวโมเลกุลหรือตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีอื่น ๆ ในการเก็บรวบรวมทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองในการวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการอธิบายถึงความแตกต่างของพันธุ์ทุเรียนที่เก็บโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานของผลและรูปทรงของผล (ตารางที่ 1) เป็นประการสำคัญ อย่างไรก็ตามทุเรียนที่

เก็บมาศึกษาในการวิจัยครั้งนี้อาจมีความแตกต่างทางพันธุกรรมปรากฏอยู่ แต่ไม่สามารถจำแนกได้โดยตัวบ่งชี้ทางสัณฐานวิทยา ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีเช่น รูปแบบของแถบสีของไอโซ-ไซม์น่าจะสามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ทุเรียนที่เก็บมาดำเนินการวิจัยครั้งนี้ได้เช่นเดียวกับที่มีการจำแนกสายพันธุ์ของพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น ลองกอง (วันทนา นวรังสรรค์, 2538)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานของผล และสีเนื้อทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง

พันธุ์	ฐานหนาม	สีผิวเปลือก	ความหนาของเปลือกผล	ขนาดผลเฉลี่ย (ซม.)	จำนวนเมล็ดต่อผล	จำนวนพูต่อผล	ขนาดของเมล็ด	รสชาติ	เปอร์เซ็นต์ความงอก
ลูกดก	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	16.0	21.5	6.0	กลาง-ใหญ่	หวาน	88.3
กอพ้อ	ใหญ่	เขียวอมเหลือง	บาง	13.5	21.5	5.0	เล็ก	หวาน	86.0
น้ำตก	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	บาง	16.5	14.8	5.0	เล็ก	หวาน	59.3
น้ำฝน	ใหญ่	เขียวอมเหลือง	บาง	18.0	16.0	5.0	เล็ก	หวาน	95.8
หัวช้าง	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	20.0	8.2	4.5	ใหญ่	หวาน	55.6
หัวโต	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	17.5	18.8	4.8	ใหญ่	หวาน	84.8
ผมร่วง	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	14.5	13.9	4.8	ใหญ่	หวาน	43.2
ฟ้าคะนอง	ใหญ่	เขียวเข้ม	หนา	22.5	14.3	4.5	ใหญ่	หวาน	89.3
เหลืองอร่าม	ใหญ่	เขียวอมเหลือง	หนา	22.0	15.2	5.0	ใหญ่	หวาน	80.2
ขันทอง	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	บาง	12.5	11.5	4.3	ใหญ่	หวาน	71.4
จุกดำ	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	บาง	14.7	10.2	4.5	ใหญ่	หวาน	68.8
สุคิริน 1.4	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	บาง	16.5	13.2	5.0	เล็ก	หวาน	79.8
สุคิริน 1.8	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	23.0	8.6	3.9	ใหญ่	หวาน	59.8

จำนวนผลที่ใช้ในการศึกษาคือ 5 ผล

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานของผล และสีเนื้อทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง (ต่อ)

พันธุ์	ฐานหนาม	สีผิวเปลือก	ความหนาของเปลือกผล	ขนาดผลเฉลี่ยยาว (ซม.)	จำนวนเมล็ดต่อผล	จำนวนพูต่อผล	ขนาดของเมล็ด	รสชาติ	เปอร์เซ็นต์ความงอก
สุคิริน 1.9	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	20.0	14.7	5.0	ใหญ่	หวานขม	43.1
สุคิริน 1.10	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	16.0	10.7	4.7	ใหญ่	หวาน	70.6
สุคิริน 1.13	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	17.5	9.6	4.4	ใหญ่	หวาน	58.3
ไอ้เขียว	ใหญ่	เขียวอมเหลือง	บาง	15.0	12.3	4.3	เล็ก	หวานขม	83.3
จำปา	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	18.0	10.8	4.0	ใหญ่	หวาน	72.2
ต่อไฟ	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	บาง	10.5	9.3	4.2	เล็ก	หวาน	85.7
ฉวางมุด	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	12.0	11.0	4.2	เล็ก	หวาน	81.8
อีก่อ	ใหญ่	เขียว	บาง	24.5	15.0	5.0	เล็ก	หวาน	96.6
ไอ้ม่วง	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	บาง	13.5	12.8	5.5	เล็ก	หวาน	86.2
ไม้แดง	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	บาง	13.0	12.8	4.3	เล็ก	หวาน	83.5
ก้านยาว	ใหญ่	เขียว	บาง	17.5	14.6	3.8	เล็ก	หวาน	86.2
อารี 4	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	13.0	13.3	4.3	เล็ก	หวาน	83.5
อารี 5	ใหญ่	เขียวอมน้ำตาล	หนา	12.5	12.2	4.4	เล็ก	หวาน	77.0

2. การทดสอบการเกิดโรคในระบบรากด้วยวิธี root dipping

ต้นกล้าทุเรียนจะแสดงอาการใบเหลืองแห้ง จากนั้นใบจะร่วงและลำต้นแห้งตาย พบว่าสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคคือ สุคิริน1.4 และไอ้เขียว เกิดโรค 10 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์จำปาและก้านยาวเกิดโรค 20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ในด้านความทนทานต่อโรค พบว่าทุเรียนในกลุ่มจังหวัดนครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี แสดงอาการของโรคช้ากว่าทุเรียนในกลุ่มจังหวัดปัตตานีและนราธิวาส เมื่อสังเกตเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของต้นกล้าทุเรียนจะพบว่ามีทุเรียน 8 สายพันธุ์ที่น่าจะมีความต้านทานต่อโรค คือ เป็นโรค 10-30 เปอร์เซ็นต์ คือ สุคิริน1.4 ไอ้เขียว จำปา ก้านยาว ต่อไพ ฉวางมุด ไม้แดง และไอ้ม่วง วันที่ต้นกล้าทุเรียนเริ่มตายหลังจากปลูกเชื้อ *P. palmivora* และเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าทุเรียนที่ตายที่แตกต่างกันอาจเป็นผลจากความยาวรากที่แตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์เช่น พบว่าสายพันธุ์ไอ้เขียว จำปา ต่อไพ และสุคิริน1.4 มีความยาวรากค่อนข้างจะมากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ทำให้วันที่ต้นกล้าทุเรียนเริ่มตายช้ากว่าทุเรียนสายพันธุ์ที่มีความยาวรากสั้นกว่า (ตารางที่ 3) ส่วนสายพันธุ์ที่มีความยาวรากค่อนข้างน้อย เช่น น้ำตก ขันทอง ผมร่วง ก่อพ้อ และเหลืองอร่ามนั้น ปรากฏว่าต้นกล้าทุเรียนเริ่มตายปรากฏขึ้นเร็วกว่าสายพันธุ์ที่มีรากยาวกว่า อย่างไรก็ตามมีทุเรียนบางสายพันธุ์ที่มีความยาวรากค่อนข้างมากแต่พบต้นกล้าทุเรียนตายปรากฏขึ้นเร็วหลังการปลูกเชื้อนั้นอาจเป็นไปได้ว่ามีกลไกอื่น ๆ อีกเช่น ความทนทานของผนังของเซลล์ที่ประกอบเป็นราก หรือความแตกต่างในการชักนำ zoospore เข้าหาราก เป็นกลไกที่มีอิทธิพลเหนือความยาวราก ในการกำหนดการตายของพันธุ์ทุเรียนที่แตกต่างกัน มีรายงานว่า zoospore ของเชื้อ *P. palmivora* จะเข้าเกาะรอบรากด้วยรูปแบบที่แตกต่างกันในพืชต่างชนิด (Hinch and Weste, 1979) อาจเป็นไปได้ว่ารูปแบบและปริมาณของ zoospore ที่เข้าเกาะในพืชต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์น่าจะมีความแตกต่างกันด้วย และอาจเป็นสาเหตุทำให้ผลของการเกิดโรคโดย zoospore มีความแตกต่างกันด้วย

ในการทดลองครั้งนี้หลังจากทำการบันทึกผลการทดลองเสร็จสิ้น สังเกตต้นกล้าทุเรียนที่ได้รับการปลูกเชื้อแต่ยังสามารถมีชีวิตอยู่กับต้นกล้าชุดควบคุมในระยะเวลา 2 เดือน พบว่าต้นกล้าทุเรียนมีลักษณะปกติไม่เกิดโรคและบางสายพันธุ์มีรากใหม่งอกขึ้นมาแสดงให้เห็นว่าลักษณะพันธุ์ที่ทนทานจะมีการเจิญเติบโตเพื่อชดเชยส่วนที่สูญเสียไป

ตารางที่ 2 จำนวนต้นกล้าทุเรียนที่ตายภายหลังปลูกเชื้อ *P. palmivora* ระยะเวลาต่าง ๆ

พันธุ์	วันที่ต้นกล้าตายภายหลังปลูกเชื้อ														ฟอร์เซ็นต์โรค
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	24	27	43	
น้ำตก	-	-	-	2	-	-	-	1	-	1					33.3
ผมร่วง	1	-	-	2	-	-	6	1	-	1					80.0
น้ำฝน	3	-	-	7	-	-	8	1	-	2					95.0
หัวช้าง	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-					30.0
ฟ้าคะนอง	2	-	-	2	-	-	-	-	-	1					50.0
ก่อพ้อ	10	-	-	4	-	-	1	-	-	-					93.7
เหลืองอร่าม	9	-	-	-	-	-	8	-	-	-					100.0
ลูกดก	7	-	-	1	-	-	9	-	-	-					100.0
ขันทอง	7	-	-	4	-	-	1	-	-	-					70.5
จุกดำ	3	-	-	6	-	-	5	-	-	-					90.0
หัวโต	2	1	1	-	1	-	-	1	-	-					60.0
สุคิริน 1.4	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-					10.0
สุคิริน 1.8	1	2	2	1	3	-	-	-	-	-					90.0
สุคิริน 1.9	2	3	1	-	-	1	-	-	-	-					70.0
สุคิริน 1.10	2	2	1	-	2	-	-	-	-	-					70.0
สุคิริน 1.13	-	1	1	-	1	-	1	-	-	-					40.0
ต่อไพ	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	1	30.0
ไอ้เขียว	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	10.0
ฉวางมุด	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	30.0
จำปา	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	20.0
ไม้แดง	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	30.0
ไอ้ม่วง	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	-	30.0
ก้านยาว	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	20.0
อีก่อ	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	1	-	1	60.0
อารี 4	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	40.0
อารี 5	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	1	1	1	70.0

ตารางที่ 3 ข้อมูลเปรียบเทียบวันที่ต้นกล้าตายภายหลังปลูกเชื้อ *P. palmivora*

ชื่อพันธุ์	วันที่ตายหลังปลูกเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	จำนวนต้นตาย/จำนวนต้นทั้งหมด	ความยาวราก (มิลลิเมตร)
ไอ้เขียว	13	10	1/10	114.7
จำปา	24	20	2/10	260.1
ก้านยาว	13	20	2/10	111.2
ต่อไพ	13	30	3/10	122.0
ไม้แดง	13	30	3/10	202.1
ฉวางมุด	13	30	3/10	76.7
ไอ้ม่วง	13	30	3/10	169.4
สุคิริน1.4	11	10	1/10	181.3
หัวช้าง	7	30	3/10	116.3
น้ำตก	10	33.3	4/12	114.4
อารี 4	13	40	4/10	79.3
สุคิริน1.13	8	50	5/10	77.2
ฟ้าคะนอง	7	50	5/10	107.1
หัวโต	7	60	6/10	66.1
อีก่อ	13	60	6/10	77.7
สุคิริน1.9	7	70	7/10	42.6
อารี 5	13	70	7/10	129.7
ขันทอง	7	70.5	12/17	100.36
ผมร่วง	7	80	8/10	89.5
สุคิริน1.10	7	90	9/10	128.3
สุคิริน1.8	7	90	9/10	90.6
จุกดำ	7	90	14/16	89.80
ก่อพ้อ	7	93.7	15/16	63.7
น้ำฝน	7	95.3	21/23	61.8
เหลืองอร่าม	7	100	17/17	121.7
ลูกดก	7	100	17/17	138.1

3. การศึกษาการเข้าเกาะติดของ zoospore ของเชื้อรา *P. palmivora* บนผิวรอบรากทุเรียน

การศึกษาการเข้าเกาะติดรากของ zoospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์ พบว่า 10 นาที zoospore เริ่มว่ายน้ำเข้ามาเกาะราก และเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นก็เข้ามาเกาะมากขึ้น และมาเกาะบริเวณพื้นผิวของรากที่ขรุขระเป็นปุ่มปม เกาะซ้อนกันมากขึ้น รากของทุเรียนทุกสายพันธุ์มีแนวโน้มการเข้ามาเกาะติดเหมือน ๆ กันคือ เมื่อเวลาผ่านไปในช่วงเวลา 150-190 นาที มีเกาะติดและหยุดนิ่งเหมือนรวงผึ้ง ทำการจัดกลุ่มทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองที่มี zoospore เกาะติดได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 มีzoospore เกาะติดน้อย 7 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จุกดำ ผมร่วง ขันทอง ฟ้าคะนอง น้ำตก ไอ้ม่วง และก้านยาว กลุ่มที่ 2 มี zoospore เกาะติดมากมี 19 สายพันธุ์คือ ลูกดก เหลืองอร่าม น้ำฝน ก่อพ้อ สุคิริน1.4 สุคิริน1.8 สุคิริน1.9 สุคิริน1.10 สุคิริน1.13 อารี 4 อารี 5 หัวช้าง อีก่อ หัวโต ฉวางมุด ไม้แดง ต่อไพ จำปา และไอ้เขียว (ตารางที่ 5)

จากผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด และทำการถ่ายรูปใต้กล้อง บริเวณที่พบ zoospore เกาะผิวราก จากความยาวราก 6 ส่วน (1 ส่วน : 1 มิลลิเมตร) พบ zoosporeเข้าเกาะหลายรูปแบบ คือ เกาะปลายราก 1ตำแหน่งมี 10 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ฟ้าคะนอง หัวช้าง สุคิริน 1.10 ก่อพ้อ น้ำฝน สุคิริน 1.4 น้ำตก ผมร่วง ขันทอง และอารี 4 เกาะปลายราก 2 ตำแหน่งมี 7 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์สุคิริน 1.9 ฉวางมุด ลูกดก อีก่อ ไอ้เขียว ก้านยาว และอารี 5 เกาะปลายราก 3 ตำแหน่งมี 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ไอ้ม่วง หัวโต จำปา ต่อไพ และสุคิริน 1.13 เกาะปลายราก 4 ตำแหน่งมี 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์สุคิริน 1.8 จุกดำ และไม้แดง และมีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ไม่พบ zoospore เกาะผิวรากคือ พันธุ์เหลืองอร่าม (ตารางที่ 6 และภาพที่ 19)

การศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจสอบและยืนยันได้ว่าเชื้อรา *P. palmivora* เข้าทำลายรากและเป็นสาเหตุทำให้ต้นกล้าทุเรียนเกิดโรคและตาย เป็นประโยชน์ทำให้ทราบตำแหน่งของรากที่ zoospore มาเกาะเพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับไปศึกษากระบวนการเข้าทำลายเนื้อเยื่อของเชื้อรา *P. palmivora* ในรากของทุเรียนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) ต่อไป

ในพืชต่างชนิดกันมีรูปแบบการเกาะติดรากของ encysted zoospore ต่างกันในทำนองเดียวกัน การทดลองนี้ทดลองในพืชชนิดเดียวกันคือ ทุเรียนแต่ก็มีรูปแบบการเกาะติดรากแตกต่างกัน โดยมีการเกาะรากตั้งแต่ไม่มีการเกาะติดเลย เกาะติด 1-4 ตำแหน่ง เห็นว่า

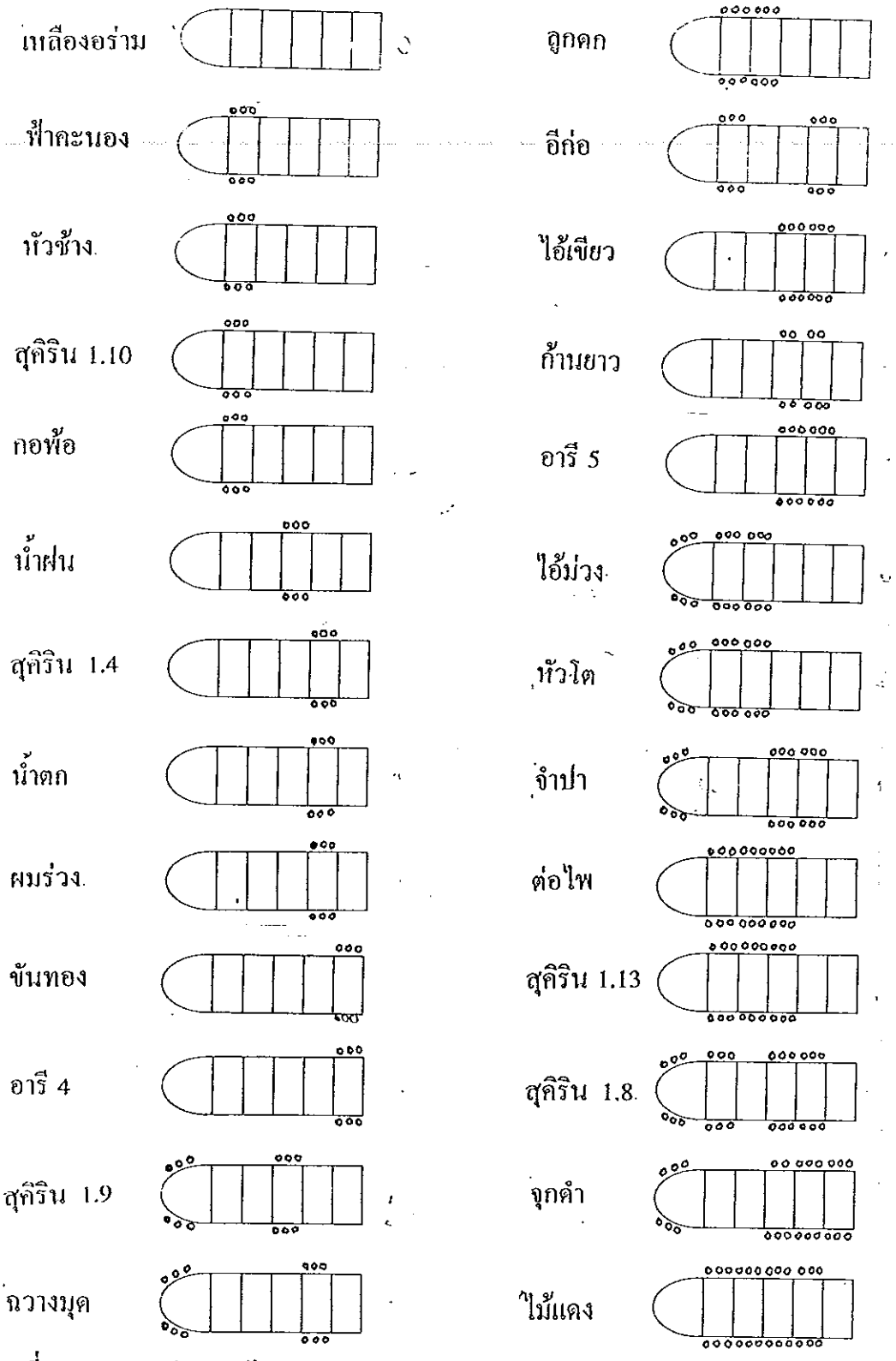
ปลายรากที่มีพื้นที่ผิวที่ zoospore เกาะติดมากแต่เป็นโรคน้อยมี 6 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ไอ้เขียว ก้านยาว จำปา ไอ้ม่วง ต่อไพ และน้ำตก อีกกรณีหนึ่งคือในปลายรากที่มีพื้นที่ zoospore เกาะติดน้อยและเป็นโรคน้อยมี 5 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์สุคิริน1.4 หัวช้าง ฉวาง-มุด ไม้แดง และอารี 4

ตารางที่ 4 ผลการทดลองการตรวจสอบ zoospore เข้าเกาะติดรากใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวส์

ชื่อพันธุ์	40-50 นาที	90-145 นาที	150-190 นาที
ไอ้เขียว	+++	++++	+++++
จำปา	++++	++++	+++++
ก้านยาว	+++	+++	+++
ต่อไพ	++	+++	++++
ไม้แดง	++	+++	++++
ฉวางมุด	++	++	++++
ไอ้ม่วง	+++	++	+++
สุคิริน 1.4	+	+++	+++++
น้ำตก	+	+	+++
อารี 4	+++	++++	+++++
สุคิริน 1.13	+	+	+++++
ฟ้าคะนอง	+	+	+++
หัวโต	+++	++++	++++++
อีก่อ	++	+++	++++++
สุคิริน 1.9	+++	++++	+++++++
หัวช้าง	+++	+++	+++++
อารี 5	+++	++++	++++++
ขันทอง	+	+	+
ผมร่วง	+	+	+
สุคิริน 1.10	+	+++	++++++
สุคิริน 1.8	+++	++++	+++++++
จุกดำ	+	+	+
กอพ้อ	++	+++	+++++
น้ำฝน	+++	++++	+++++
เหลืองอร่าม	+	+	++++
ลูกดก	+++	+++	++++

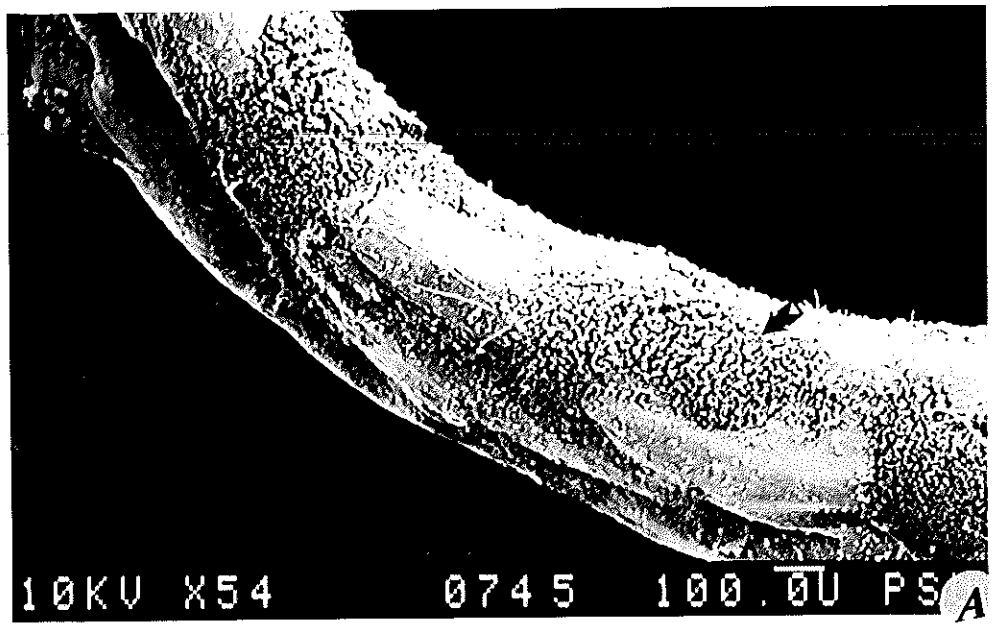
+ = ปริมาณ encysted zoospore ที่เกาะติดราก

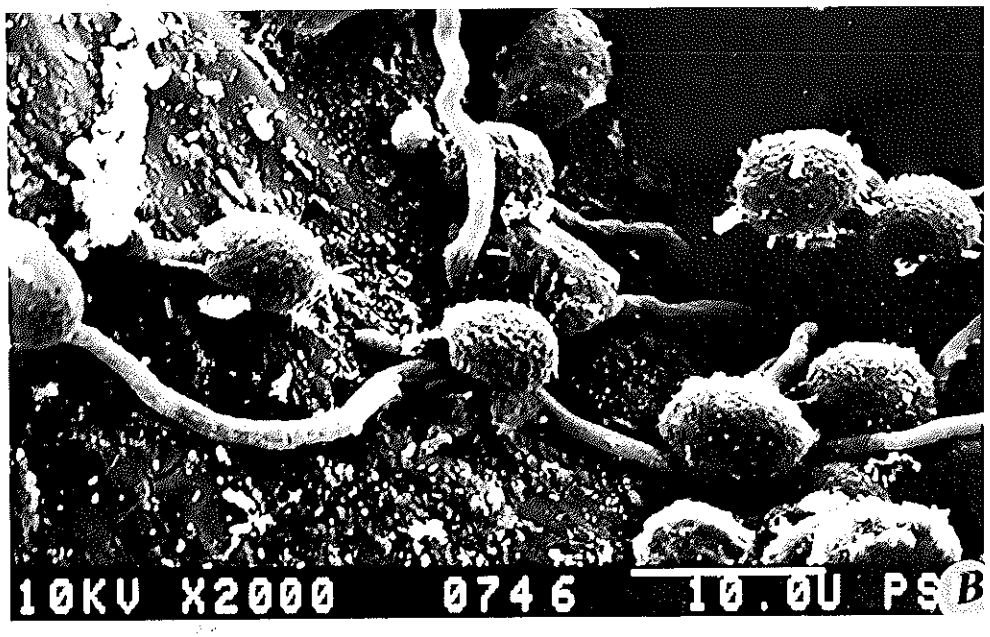
+-+++ = น้อย, ++++-+++++ = ปานกลาง, ++++++ = มาก



ภาพที่ 13. ตำแหน่งการเข้าเกาะติดของ encysted zoospore บนรากฝอยของทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง 26 สายพันธุ์ (1 ส่วนมีความยาวประมาณ 1.7 มิลลิเมตร) (พื้นที่เกิดโรค)

ภาพที่ 14. ปลายรากที่มี zoospore เกาะ ถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์กำลังขยาย 100X





ภาพที่ 15. ปลายรากพันธุ์สุคิริน 1.18 ที่มี zoospore เกาะถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์-อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

A) zoospore 81X

B) encysted zoospore 3000X

4. การทดสอบการเกิดโรคบนใบด้วยวิธี detached leaf

ผลการใช้ความเข้มข้นของ zoospore suspension $8x10^4$ zoospore/มิลลิลิตร ปลูกบนใบทุเรียนพื้นเมือง พบว่าทุเรียนพื้นเมืองทุกสายพันธุ์แสดงอาการของโรคใบไหม้ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ทั้ง 3 วันคือ ในวันที่ 4, 6, 8 และแสดงอาการของโรคในวันที่เกิดโรครั้งแรกหลังปลูกเชื้อ 4 วัน จำนวนแผลที่เกิดขึ้นในวันที่ 4 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทุกสายพันธุ์ (ตารางที่ 6) อัตราการขยายตัวของแผล RLE ในวันที่ 6 และวันที่ 8 มีแนวโน้มไม่คงที่แสดงให้เห็นว่าในสายพันธุ์ทุเรียนที่ค่อนข้างต้านทานโรคมีอัตราการขยายตัวของแผลค่อนข้างต่ำ มีทุเรียน 18 สายพันธุ์ที่มีอัตราการขยายตัวของแผลลดลงคือสายพันธุ์ผมร่วง จุกดำ อีก่อ ขันทอง ฉวางมุด ลูกดก หัวช้าง น้ำฝน อารี 5 หัวโต ก้านยาว จำปา ไอ้เขียว สุคิริน1.4 สุคิริน1.8 สุคิริน1.9 สุคิริน1.10 และสุคิริน1.13 (ตารางที่ 5) มีความเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ทุเรียนที่มีอัตราการขยายตัวของแผล (RLE) ลดลง อาจมีลักษณะต้านทานต่อการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อรา *P. palmivora* เข้าทำลาย มีรายงานว่าเนื้อเยื่อพืชที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายจะมีการสร้างโปรตีนที่เรียกว่า pathogenesis-related proteins สาร proteins ในกลุ่มนี้จะถูกสร้างขึ้นภายหลังจากเนื้อเยื่อพืชถูกเชื้อเข้าทำลาย และมีการสะสมจนมีปริมาณสูงสุด 7-10 วัน ภายหลังเกิด infection โดยเชื้อสาเหตุโรค มีรายงานว่าสาร pathogenesis-retated proteins ได้แก่ β-glucanase, ไคติเนส และเปอร์ออกซิเดส ซึ่งสารดังกล่าวบางชนิดอาจมีสมบัติในการยับยั้งหรือลดความสามารถในการเจริญของเชื้อราสาเหตุในเนื้อเยื่อพืช

จากการทดสอบพบว่าทุเรียนพันธุ์สุคิริน1.8 มี peroxidase activity ที่ค่อนข้างจะสูงในใบ ซึ่งสอดคล้องกับผลของการลดลงของอัตราการขยายตัวของแผลที่ลดลง มีรายงานโดย (Okey *et al.*, 1997) ว่าสามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ที่เพิ่มขึ้นในลำต้นของโกโก้ที่ปลูกเชื้อรา *P. palmivora* ลงไป จึงควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมกับทุเรียนเช่นกัน โดยทดสอบกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดส และหาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเปอร์-ออกซิเดสกับการเข้าทำลายพืชโดยเชื้อสาเหตุโรครากและโคนเน่า (Guest and Brown, 1997)

สำหรับการเลือกใช้ส่วนของใบพืชเป็นเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ในการทดสอบโรคนั้นมีรายงานการคัดเลือกพันธุ์โกโก้ที่ต้านทานต่อเชื้อรา *P. palmivora* ใช้ส่วนของใบเป็นเนื้อเยื่อทดสอบพบว่าสามารถใช้ส่วนของใบทดสอบโรคเบื้องต้นและใช้บอกถึงระดับความต้านทานได้เหมือนกับการใช้ส่วนของผลโกโก้เป็นส่วนทดสอบโรค Iwaro and Sreenivasan, 1997)

ในการทดสอบนี้ใช้ส่วนของใบเป็นเนื้อเยื่อทดสอบความต้านทาน โดยมีความมุ่งหมายว่าจะใช้เป็นวิธีคัดเลือกพันธุ์ทุเรียนต้านทานต่อ *P. palmivora* เช่นกัน อย่างไรก็ตามควรศึกษาเพิ่มเติมว่ามีความสัมพันธ์ของผลที่ได้จากการทดสอบหาลักษณะต้านทานบนใบ การเกิดโรครากและโคนเน่าของต้นทุเรียนในสภาพธรรมชาติเพื่อยืนยันว่าลักษณะต้านทานบนใบสามารถเป็นตัวบ่งชี้ที่น่าเชื่อถือได้หรือไม่

ตารางที่ 5 พื้นที่การเกิดโรคบนใบและอัตราการขยายตัวของแผลบนใบ

พันธุ์	เปอร์เซ็นต์เกิดโรควันที่ 4	เปอร์เซ็นต์เกิดโรควันที่ 6	เปอร์เซ็นต์เกิดโรควันที่ 8	RLE1	RLE2
ไอ้เขียว	756.0	967.3	1043.6	13.4	11.3
จำปา	1025.4	1429.8	1497.0	12.9	12.6
ก้านยาว	706.8	1113.7	1202.3	10.0	9.7
ต่อไพ	736.1	1208.6	1262.5	4.5	5.6
ไม้แดง	402.0	712.5	746.6	5.2	10.0
ฉวางมุด	517.0	1208.0	1248.0	12.2	3.1
ไอ้ม่วง	210.9	436.1	471.0	13.5	14.3
สุคริน1.4	511.9	708.4	756.3	20.4	12.5
อารี4	466.7	740.5	804.9	9.4	10.3
สุคิริน1.13	947.3	1297.0	1374.5	14.6	14.1
ฟ้าคะนอง	557.2	937.0	977.2	10.8	11.2
หัวโต	608.4	899.8	968.6	7.8	7.7
อีก่อ	585.0	840.6	908.4	7.4	5.6
สุคิริน1.9	657.8	911.7	993.7	13.5	7.1
หัวช้าง	408.0	658.6	713.0	16.2	10.6
อารี5	587.6	718.6	787.3	28.2	9.5
ขันทอง	998.9	1390.8	1467.8	19.8	8.2
ผมร่วง	1025.2	1915.1	1982.3	7.0	4.6
สุคิริน1.10	1855.6	2307.0	2401.0	18.2	5.7
สุคิริน1.8	290.9	499.3	532.7	17.8	11.0
จุกดำ	697.8	892.0	989.1	19.0	4.8
ก่อฟ้อ	366.7	665.4	712.5	5.0	7.9
น้ำตก	230.1	282.7	310.7	6.9	9.6
เหลืองอร่าม	326.8	401.6	458.4	5.9	7.3
ลูกดก	63.9	226.7	248.2	19.7	5.9

RLE 1 = เปอร์เซ็นต์ของโรควันที่ 6 - เปอร์เซ็นต์ของโรคในวันที่ 4/จำนวนวันที่เกิดโรค 6-4

RLE 2 = เปอร์เซ็นต์ของโรควันที่ 8 - เปอร์เซ็นต์ของโรคในวันที่ 6/จำนวนวันที่เกิดโรค 8-6

RLE 3 = เปอร์เซ็นต์ของโรควันที่ 8 - เปอร์เซ็นต์ของโรคในวันที่ 4/จำนวนวันที่เกิดโรค 8-4

ตารางที่ 6 จำนวนแผลและพื้นที่ใบที่เกิดโรคภายหลังปลูกเชื้อ *P. palmivora* 4 วัน

พันธุ์	จำนวนแผลที่เกิดขึ้นในวันที่ 4	พื้นที่ที่เกิดโรคในวันที่ 4 (มม)^2
ไอ้เขียว	1.4	998.9
จำปา	1.0	1025.2
ก้านยาว	1.0	576.1
ต่อไพ	0.6	63.9
ไม้แดง	1.0	210.9
ฉวางมุด	0.6	517.0
ไอ้ม่วง	1.8	585.0
สุคิริน1.4	1.8	657.8
น้ำตก	1.2	511.9
อารี 4	1.0	366.7
สุคิริน1.13	1.8	756.0
ฟ้าคะนอง	1.4	408.0
หัวโต	1.4	736.1
อีก่อ	1.0	557.2
สุคิริน1.9	1.2	1025.4
หัวช้าง	1.6	466.7
อารี 5	2.0	697.8
ขันทอง	1.8	608.4
ผมร่วง	1.4	230.1
สุคิริน1.10	1.8	1855.6
สุคิริน1.8	2.4	947.3
จุกดำ	1.4	326.8
ก่อพ้อ	1.2	402.0
น้ำฝน	2.4	706.8
เหลืองอร่าม	0.8	290.9
ลูกดก	1.8	587.6

ns = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

($P \leq 0.05$) แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

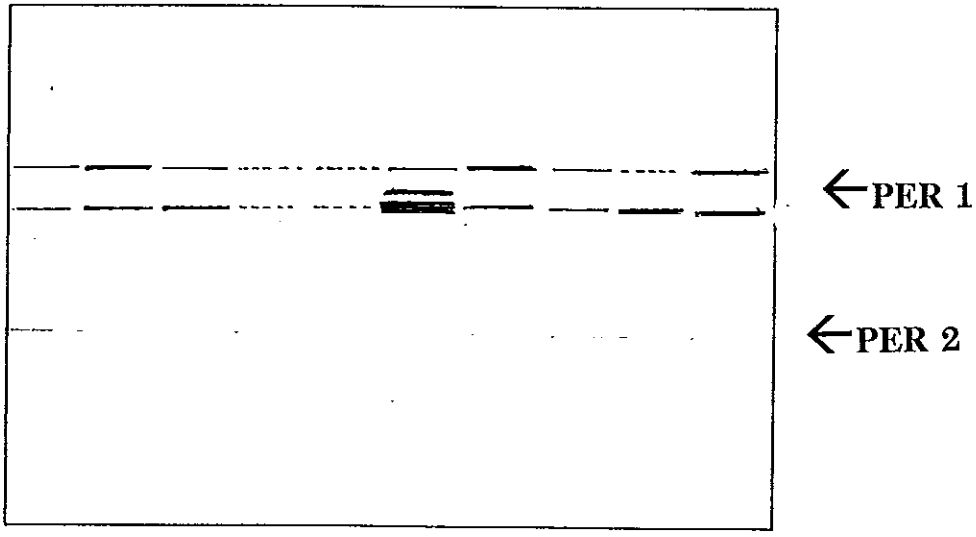
5. การศึกษาการตรวจสอบพันธุ์โดยเทคนิคไอโซไซม์

5.1 การศึกษารูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

จากการศึกษารูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในใบทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง 10 สายพันธุ์โดยเลือกจากกลุ่มพันธุ์ต้านทาน พบว่ามีการเคลื่อนที่ของไซโมแกรม 2 โซน คือ PER1 และ PER2 (ภาพที่ 16) เมื่อพิจารณา PER1 พบว่าไซโมแกรมภายในโซนมีความเข้มและรูปแบบแตกต่างกัน สายพันธุ์สุคิริน1.8 มีรูปแบบของเอนไซม์ 3 แถบ ในขณะที่สายพันธุ์อื่น ๆ ให้รูปแบบเอนไซม์เพียง 2 แถบ อย่างไรก็ตามความเข้มของแถบหรือกิจกรรมของ PER1 ในสายพันธุ์จุกดำ จำปา ลูกดก เหลืองอร่าม และสุคิริน1.13 มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวสูง เมื่อพิจารณารูปแบบของเอนไซม์ PER2 พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 16)

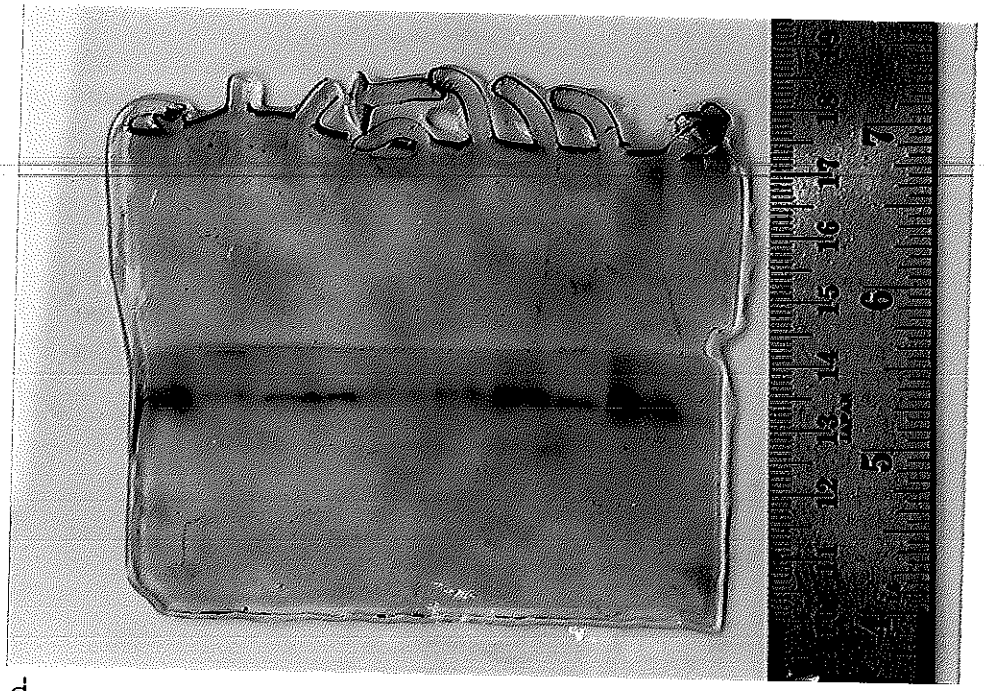
รูปแบบของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในรากพบว่าทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 10 สายพันธุ์มีการเคลื่อนที่ของไซโมแกรมมีเพียง 1 โซน เมื่อพิจารณาไซโมแกรมภายในโซนพบว่าทุกสายพันธุ์ให้รูปแบบไซโมแกรมแตกต่างกันโดยสายพันธุ์ไอ้เขียว และจุกดำ ให้รูปแบบเอนไซม์ 2 แถบ เมื่อพิจารณาความเข้มของแถบเอนไซม์ พบว่าสายพันธุ์จำปาที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ก้านยาว โดยสังเกตุจากความเข้มของไซโมแกรมที่ปรากฏ (ภาพที่ 17)

เลนที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

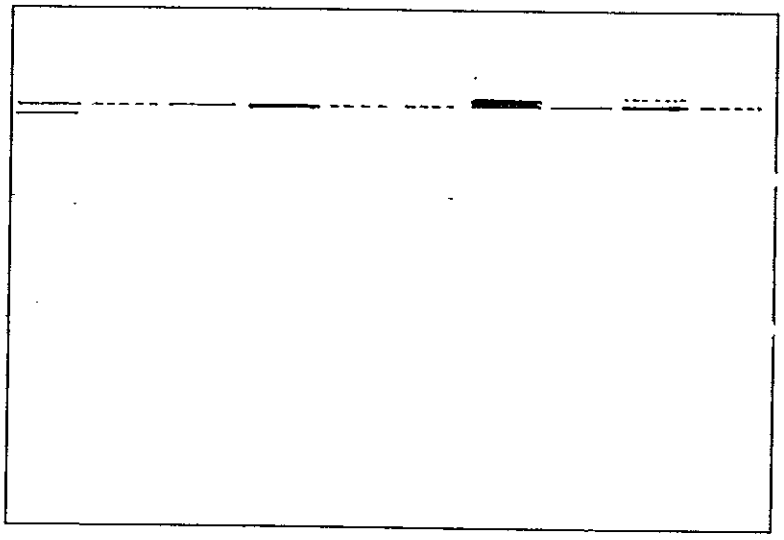


เลนที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ภาพที่ 16. รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของใบทุเรียนพื้นเมือง 10 สายพันธุ์ เลนที่ 1 = ไอ้เขียว, 2 = เหลืองอร่าม, 3 = ลูกดก, 4 = ก้านยาว, 5 = ฟ้าคะนอง, 6 = สุคิริน1.8, 7 = จำปา, 8 = อารี 5, 9 = จุกดำ, 10 = สุคิริน1.13



เลนที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



เลนที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

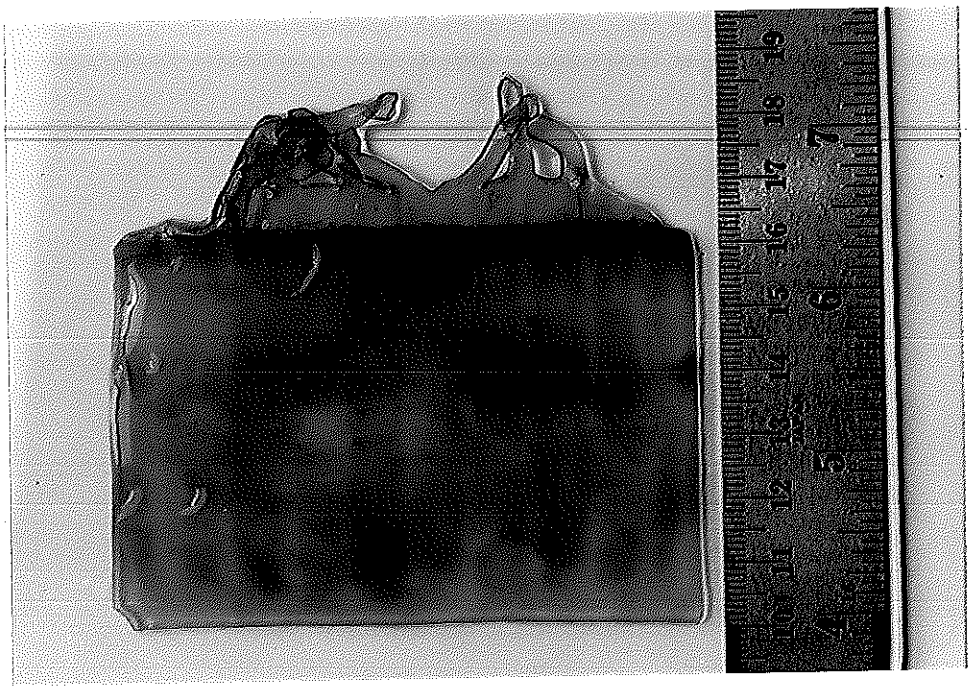
ภาพที่ 17. รูปแบบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของรากทุเรียนพื้นเมือง 10 สายพันธุ์ เลนที่ 1 = ไอ้เขียว, 2 = เหลืองอร่าม, 3 = ลูกดก, 4 = ก้านยาว, 5 = ฟ้าคะนอง, 6 = สุคิริน1.8, 7 = จำปา, 8 = อารี 5, 9 = จุกดำ, 10 = สุคิริน1.13

5.2 การศึกษารูปแบบของเอนไซม์เอสเตอร์เรส

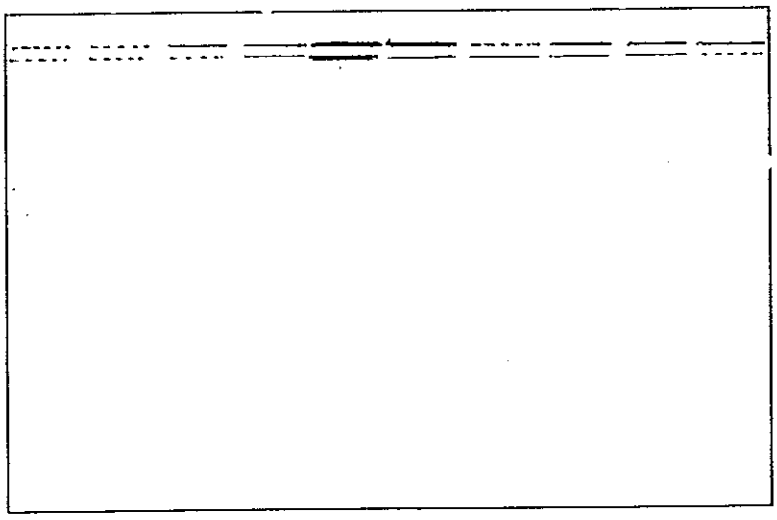
จากการศึกษารูปแบบของเอนไซม์ดังกล่าวจากใบทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง 10 สายพันธุ์ พบว่ามีการเคลื่อนที่ของไซโมแกรม 1 โซน เมื่อพิจารณาไซโมแกรมภายในโซนพบว่าทุกสายพันธุ์ให้รูปแบบไซโมแกรม 2 แถบเหมือนกัน เมื่อพิจารณาความเข้มของแถบเอนไซม์พบว่าสายพันธุ์สุคิริน1.13 และก้านยาวมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ (ภาพที่ 18)

สำหรับรูปแบบของเอนไซม์เอสเตอร์เรสในรากไม่สามารถตรวจสอบได้เนื่องจากย้อมไม่ติดสี

การศึกษาความเข้มข้นของวุ้นอะคริลาไมด์ เนื่องจากการใช้สีย้อมเอนไซม์ 2 ระบบ ดังกล่าวติดสีไม่ชัดเจน ดังนั้นการศึกษาการใช้วุ้นอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเป็นตัวกลางในการแยกไอโซไซม์ จากการทดลองพบว่าวุ้นความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ให้แถบคมชัดกว่าความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์



เลนที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



เลนที่ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

ภาพที่ 18. รูปแบบเอนไซม์เอสเตอร์เรสของใบทุเรียนพื้นเมือง 10 สายพันธุ์ เลนที่ 1 = น้ำฝน, 2 = น้ำตก, 3 = ผมร่วง, 4 = หัวช้าง, 5 = สุคิริน1.13, 6 = ก้านยาว, 7 = สุคิริน1.4, 8 = จำปา, 9 = ไอ้เขียว, 10 = อารี 5

จากการตรวจสอบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและเอสเตอร์เรสพบว่าสายพันธุ์ทุเรียนพื้นเมืองมีความแตกต่างกันทั้งรูปแบบและกิจกรรม ผลดังกล่าวอาจมีความสัมพันธ์กับลักษณะความทนทานต่อโรค เมื่อศึกษาทดสอบการเกิดโรคบนใบและรากด้วยวิธีการ detached leaf และ root dipping พบว่า 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์จำปา, สุคิริน1.8 และสุคิริน1.13 ที่มีความทนทานต่อโรคมีค่า RLE ลดลง สายพันธุ์ทั้ง 3 มีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าพันธุ์อื่น ๆ ดังนั้นผลของการต้านทานอาจเนื่องมาจากกิจกรรมของเปอร์ออกซิเดสที่ปรากฏภายในพันธุ์

การศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในรากพันธุ์ที่แสดงความต้านทานต่อโรคจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากคือ สายพันธุ์ไอ้เขียวและจำปา

การศึกษาเอนไซม์เอสเตอร์เรสในใบ สายพันธุ์ที่แสดงความต้านทานต่อโรคในใบคือมีค่า RLE ลดลง มีกิจกรรมของเอนไซม์เอสเตอร์เรสมากกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือ สายพันธุ์หัวช้าง สุคิริน1.4 และสุคิริน1.13

บทที่ 4

บทสรุป

1. การเก็บรวบรวมทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง

เก็บทุเรียนได้ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ จาก 4 จังหวัดดังนี้ นราธิวาส ปัตตานี นครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี จำนวน 5, 11, 8 และ 2 สายพันธุ์ตามลำดับ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของผลเฉลี่ย 10.5-24.5 เซนติเมตร จำนวนเมล็ดต่อผลเฉลี่ย 8.6-21.5 เมล็ด จำนวนพูต่อผลเฉลี่ย 3.9-6 พู เปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย 43.1-96.6 เปอร์เซ็นต์ ความยาวของรากอายุ 2 เดือน เฉลี่ย 35.88-175.85 มิลลิเมตร

2. การทดสอบการเกิดโรคในระบบรากด้วยวิธี root dipping

ทำการปลูกเชื้อ *P. palmivora* กับรากของต้นกล้าทุเรียนพื้นเมืองอายุ 2 เดือน พบว่าการใช้สารแขวนลอยของ zoospore ที่มีความเข้มข้น $1x10^6$ zoospore ต่อมิลลิลิตร จะทำให้ต้นกล้าทุเรียนเกิดโรคและตายภายหลังการปลูกเชื้อ 7-43 วัน กลุ่มพันธุ์ในจังหวัดนครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานีมีแนวโน้มทนทานต่อโรคมากกว่าเนื่องจากเกิดอาการของโรคช้ากว่า และมีจำนวนต้นกล้าที่ตายน้อยกว่า โดยมีทุเรียน 11 สายพันธุ์ที่ทนทานได้แก่ พันธุ์ไอ้เขียว จำปา ก้านยาว ต่อไพ ฉวางมุด ไม้แดง สุดิริน 1.4 หัวช้าง น้ำตก อารี 4 และไอ้ม่วง เกิดโรคหลังปลูกเชื้อ 13-24 วัน และมีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าตาย 10-30 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองการตรวจสอบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในรากมี 2 สายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมาก ที่สอดคล้องกับลักษณะที่ต้านทานโรคในรากคือ สายพันธุ์ไอ้เขียวและจำปา

3. การเข้าเกาะติดของ zoospore บริเวณรอบรากของเชื้อรา *P. palmivora* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดคอมพาวด์

เมื่อจุ่มรากลงในสารแขวนลอยของ zoospore zoospore เข้ามาเกาะรากเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที เมื่อเวลาผ่านไป 40-50 นาที พบว่าเพิ่มขึ้นเกาะมากขึ้น โดยแบ่งได้ 2 ระดับคือ เกาะน้อยมี 7 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์จุกดำ ผมร่วง ขันทอง ฟ้าคะนอง น้ำตก ไอ้ม่วง

และก้านยาวมี zoospore มาเกาะมากมี 19 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์สุคิริน1.4 สุคิริน1.8 สุคิริน1.9 สุคิริน1.10 สุคิริน1.13 ไอ้เขียว จำปา ต่อไพ ไม้แดง ฉวางมุด อารี 4 อารี 5 หัวโต อีก่อ หัวช้าง กอพ้อ น้ำฝน เหลืองอร่าม และลูกดก

4. การศึกษาการเข้าเกาะติดของ zoospore ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

ทุเรียนมีรูปแบบการเกาะติด zoospore ในรากแตกต่างกันดังนี้คือ ไม่มี zoospore เกาะติดเลย, มี zoospore เกาะติด 1, 2, 3 และ 4 ส่วนจากความยาวของปลายราก 6 ส่วนดังนี้ คือ ไม่มี zoospore เกาะติดเลยมี 1 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์เหลืองอร่าม เกาะปลายราก 1 ส่วน คือ สายพันธุ์ฟ้าคะนอง หัวช้าง สุคิริน1.10 ก่อพ้อ น้ำฝน สุคิริน1.4 น้ำตก ผมร่วง ขันทอง อารี 4 เกาะปลายราก 2 ส่วนคือ สายพันธุ์ สุคิริน1.9 ฉวางมุด ลูกดก อีก่อ ไอ้เขียว ก้านยาว อารี 5 เกาะปลายราก 3 ส่วนคือ สายพันธุ์ไอ้ม่วง หัวโต จำปา ต่อไพ และสุคิริน1.13 และเกาะปลายราก 4 ส่วนคือ พันธุ์สุคิริน1.8 จุกดำ และไม้แดง

5. การศึกษาการปลูกเชื้อบนใบ

พบว่าเกิดอาการ necrotic lesion บนใบหลังปลูกเชื้อ 4 วัน ในพันธุ์ที่ทนทานต่อโรค ส่วนใหญ่มีอัตราการขยายตัวของแผลต่ำ และมี 18 สายพันธุ์ที่มีอัตราการขยายตัวของแผลลดลงคือ สายพันธุ์ผมร่วง จุกดำ อีก่อ ขันทอง ฉวางมุด ลูกดก หัวช้าง น้ำฝน อารี 5 หัวโต ก้านยาว จำปา ไอ้เขียว สุคิริน1.4 สุคิริน1.8 สุคิริน1.9 สุคิริน1.10 และสุคิริน1.13

6. การตรวจสอบพันธุ์ทุเรียนด้วยไอโซไซม์

การศึกษารูปแบบของเปอร์ออกซิเดส และเอสเตอร์เรสในใบทุเรียนพื้นเมือง พบว่ามีความแตกต่างของไอโซไซม์ทั้งสอง ทั้งรูปแบบและกิจกรรม โดยทุเรียนสายพันธุ์สุคิริน1.18 และสุคิริน1.13 มีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าพันธุ์อื่น ๆ ส่วนเอนไซม์เอสเตอร์เรสนั้น พบว่าทุเรียนสายพันธุ์สุคิริน1.13 และก้านยาวมีกิจกรรมของเอสเตอร์เรสสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ

การศึกษารูปแบบของเปอร์ออกซิเดสและเอสเตอร์เรสในรากทุเรียนพื้นเมือง พบว่ามีความแตกต่างของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส ทั้งรูปแบบและกิจกรรม รากทุเรียนพื้นเมืองสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออสซิเดสสูงคือ จำปา และก้านยาว ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์เอสเตอร์เรสในรากนั้นไม่สามารถตรวจสอบได้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2537. สถิติการปลูกไม้ผลยืนต้น. รายงานประจำปี 2537. กรมส่งเสริมการเกษตร กรุงเทพมหานคร. หน้า 136.

เกื้อกูล บุญญานุภาพพงศ์. 2533. ประสิทธิภาพของสารโมโน-ไดโปแตสเซียมฟอสไฟด์ในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Bult.) Bult. ของทุเรียน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.65 หน้า.

ขจรศักดิ์ ภวกุล, สุชาติ วิจิตรานนท์ และ สามารถ จิตนาวสาร. 2520. การศึกษาต้นตอที่ต้านทานต่อโรครากเน่าของทุเรียน. รายงานผลการทดลอง และวิจัย. กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. หน้า 91-93.

ดวงพร วรสุนทรโรสถ. 2534. เอนไซม์ในพืชกับการศึกษาและตรวจสอบสายพันธุ์, เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องชีวเคมีทางการเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.หน้า 25-39.

ทวี เก่าศิริ. 2532. เทคนิคและกลยุทธ์ในการต่อสู้โรคทุเรียน และพริกไทย. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. ชวนพิมพ์ 61 หน้า.

ทรงพล สมศรี. 2531. พันธุ์และการดูแลรักษาทุเรียน. การสัมมนาทางวิชาการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี่และการพลังงาน.กรุงเทพฯ, 25-26 กุมภาพันธ์ 2531, 21 หน้า.

ชิรา แดงกนิษฐ์. 2538. ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ polygalacturonase, pectin methylesterase, cellulase และ β-galactosidase ต่อการอ่อนตัวของเนื้อทุเรียนสุก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 65 หน้า.

เบ็ญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์, สุทธิรักษ์ แซ่หลิม, สุภาณี ชนะวีรวรรณ และ มานะ กาญจนมณีเสถียร. 2540. การทดสอบการเกิดโรคโดยวิธี Detached leaf และการวัดระดับความรุนแรงของโรครากเน่าโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ DT-SCAN ของทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 18-20 พฤศจิกายน 2540, 97 หน้า.

ปุณฑริกา หะริณสุต. 2534. ไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสในมะม่วงต่างสายพันธุ์. รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องชีวเคมีทางการเกษตร. ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 7-9 พฤษภาคม 2534, หน้า 107-109.

ประเทือง สง่าจิตร. 2533. เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในการตรวจสอบลูกผสมชั่วที่หนึ่งของถั่วฝักยาว. ปัญหาพิเศษปริญญาโท. ภาควิชาพืชสวน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, 54 หน้า.

ฝ่ายข้อมูล วารสารเคหการเกษตร. 2537. การทำสวนทุเรียน-เงาะและเทคนิคต่างๆเกี่ยวกับการทำสวนทุเรียน-เงาะ.กรุงเทพฯ.เจริญรัฐการพิมพ์. 110 หน้า.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2533. โรคพืชวิทยาขั้นสูง. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 282 หน้า.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2531. เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในการจำแนกพันธุ์พืช. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่องเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีสในการจำแนกพันธุ์พืช. ศูนย์-ปฏิบัติการวิจัยและเรือนทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.หน้า 1-13.

ยุพิน กสินเกษมพงษ์. 2534. โรคผลเน่าดำของโกโก้ซึ่งเกิดจากเชื้อราไฟทอฟธอร่าในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ. 62 หน้า.

ราตรี เม่นประเสริฐ. 2538. ทุเรียน. ข่าวเศรษฐกิจเกษตร 41 : 459.

วรรลดา กีรติภัทรกุล. 2522. การสำรวจโรครากและโคนเน่าของทุเรียนและการใช้สารเคมีบางชนิดในการป้องกันกำจัด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ. 51 หน้า.

วันทนา นวรังสรรค์. 2538. การจำแนกพันธุ์ *Lansium domesticum* Correa. โดยใช้ไอโซไซม์และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 105 หน้า.

สุขวัฒน์ จันทรปราชิก. 2538. การป้องกันกำจัดโรครากและโคนเน่าของทุเรียนเนื่องจากเชื้อราไฟทอปทอรา. คณะทำงานประสานงานวิจัยและส่งเสริมพืชสวนในภาคตะวันออก. 31 หน้า.

เสริมศิริ เมธีวรกุล. 2536. ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ peroxidase และ esterase กับลักษณะการต้านทานโรคที่สำคัญบางชนิดของอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 77หน้า.

แสวง ภูศิริ. 2527. ทุเรียน. ฟาร์มรัตนา. เขาช่อง ตรัง. 242 หน้า.

อุบล คือประโคน สมศักดิ์ เสียงก้อง และ สัญชัย ตันตยาภรณ์. 2528. เชื้อรา *Phytophthora* ชนิดต่างๆในประเทศไทย. รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 23 ปี 2528. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 409-421.

Bailey, D.C. 1983. Isozymic variation and plant breeders rights. *In* Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. (eds. Tanksley, S.D. and T.J. Orton). pp.425-441. B.V. Amsterdam : Elsevier Science Publishers.

Benedict, W.G. 1972. Influence of light on peroxidase activity associated with resistance of tomato cultivars to *Septoria lycopersici*. Can. J. Bot. 50 : 1931-1936.

Bringhurst, R.S., S. Arulsekar., J.F. Hamcock. and Jr. V. Voth. 1981. Electrophoretic characterization of strawberry cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106:684-687.

Cerezo, M. and P. Arus. 1989. Identification of almond cultivars by pollen isozymes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114:164-169.

Chee, K.H., and F.J. Newhook, 1966. Relationship of microorganism to sporulation of *Phytophthora cinnamomi* Rands. N.Z.J. Agric. Res. 9 : 32-43.

Crawford, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic interferences from electrophoretic studies. *In* Isozymes in Plant Genetic and Breeding. Part A. (eds. S.D. Tanksley, and T.J. Orton) pp. 257-287. Amsterdam : Elsevier Science Publishers.

Degani, C., R. El-Batsri and S. Gazit. 1990. Enzyme polymorphism in mango. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 : 844-847.

Dewald, M.G., G.A. Moore and W.B. Sherman. 1988. Identification of pineapple cultivars by isozyme genotypes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113 : 935-938.

Guest, D. and J. Brown. 1997. Plant defences against pathogens. In Plant pathogens and Plant Diseases. Armidale, Australia : Rockvale Publications. pp. 263-286

Hame, B.D. and D. Rickwood. 1981. Gel Electrophoresis of Protein. Oxford: IRI Press.

Hinch, J. and G. Weste. 1979. Behaviour of *Phytophthora cinnamomi* zoospores on roots of Australia forest species. J. Aust. Bot. 27 : 679.

Iwaro, A.D. and T.N. Sreenivasan. 1997. Folias Resistance to *Phytophthora palmivora* as an Indicator of Pod Resistance in *Theobroma cacao*. Plant Dis. 81 : 619-624.

Jarret, R.L. and R.E. Litz. 1986. Determinating the interspecific origins of clones within the "Saba" cooking banana complex. Hort.Science 21 : 1433-1435.

Kanjanamaneesathian, M., T. Laung-aram and S. Chantarat. 1995. Testing for *Phytophthora palmivora* inoculation technique. Part 1 : Simplified Hydroponice (SH) system for pathogenicity study. Songklanakarin J. Sci. Technol., 17 : 363-371.

Kennedy, L.S. and P.G. Thompson. 1991. Identification of sweetpotato cultivars using isozyme analysis. Hort.Science 26:300-302.

Masago, M., M. Yoshikawa., M. Fukada and N. Nakanishi. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soil and plants. Phytopathology 67 : 425-428.

Merkert, C.L. and F. Moller. 1959. Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenetic and species specific patterns. Proc. Nat. Acad. Sci. 45 : 753-763.

Moor, G. A. and G. B. Collin. 1983. New challenges confronting plant breeders. In Isozymes in Plant Genetic and Breeding. Part A. (eds. Tanksley, S.D. and T.J. Ortron) pp.25-51. Amterdams : Elsevier Science Publishers.

Mowrey, B.D. and D.J. Werner. 1990. Inheritance of isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase and shikimate dehydrogenase in peach and peach x almond hybrids. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 : 312-319.

Okey, E. N., E. J. Duncan., G. Sirju-Charran and T. N. Srunivasan. 1997. *Phytophthora* canker resistance in cacao : role of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia-lyase. Journal of Phytopathology 145 : 295-299.

Quiros, C.F. 1980. Identification of alfalfa plants by enzyme electrophoresis. Crop Science. 20 : 262-264.

Reynolds, K. L. and B. M. Cunfer. 1997. Companents of partial host resistance and epidemic progress. *In* Exercises in plant Disease Epidemiology (eds. L. J. Francl, and D. A. Neher) pp. 111-114. APS Press. Minnesota.

Ruiz, A. and R.H. Maribona. 1983. Peroxidase isozyme analysis: a massive method of identification of sugarcane varieties. Proc. ISSCT. 19 : 625-638.

Scandalios, J.G. 1974. Isozyme in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol. 25 : 225-258.

Shanon, L.M. 1986. Plant isozyme. Ann. Rev. Plant Physiol. 19 : 187-210.

Suzui, T., U. Kueprakone. and T. Kamhangridthirong. 1976. *Phytophthora* Disease on some Economic Plants in Thailand. Plant Pathology Div. Dept. of Agr. 113 p.

Tennant, D. 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. J. of Ecology 63 : 995-1001.

Thom, M. and Maretzki, A. 1970. Peroxidase and esterase isozyme in Hawaiian sugarcane. Hawaiian Planter's Record 58 : 81-84.

Tsao, P.H. 1974. *Phytophthora* Disease of Durian, Black Pepper, and Citrus in Thailand. Working Rept. FAO. 43 pp.

Uchida, J.Y., and M. Aragaki. 1991. *Phytophthora* diseases of orchids in Hawaii. Res. Ext. Ser. 129. HITAHR, University of Hawaii. 7 pp.

Webb, N. 1993. Delta-T SCAN® User Manual. Delta-T Sevices Ltd. 128 Low Road, Burwell Cambridge England : p.190.

Weeden, N.F. and R.C. Lamb. 1985. Identification of apple cultivars by isozyme phenotype. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 : 509-515.

Zentmyer, G.A. 1988. Origin and distribution of four species of Phytophthora. Trans. Br. Mycol. Soc. 91 : 367-378.

Zentmyer, G.A., and D.J. Mitchell. 1985. *Phytophthora* diseases of fruit trees in the tropics. Rev. Trop. Plant Pathol. 2 : 287-309.

Zitko, S. E., L. W. Timmer and H: A. Sandler. 1991. Isolation *Phytophthora palmivora* pathogenic to citrus in Florida. Plant Disease. 75 : 532-535.

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงส่วนประกอบของเจลเพื่อใช้เป็นสารตัวกลางสำหรับแยกไอโซไซม์ตามสูตรดัดแปลงของ Hame และ Rickwood (1981)

Stock solution	Stacking gel 3.7 (%)	Resolving gel (%)			
		7	10	12	
H_2O	2.35	5.7	4.6	3.8	ml
30% acrylamide + 0.8% bisacrylamide	0.46	2.63	3.75	4.5	ml
1.5 M tris-HCl pH 8.8	-	2.81	2.81	2.81	ml
0.5 M tris-HCl pH 6.8	0.94	-	-	-	
TEMED	3.8	3.75	3.75	3.75	ul
10% ammonium-peroxydisulfate	0.05	112.5	112.5	112.5	ul

สีย้อมเอสเตอเรส (Thom and Maretzki, 1970)

สารเคมี 1. 0.1 M phosphate buffer pH 6.0 100 มิลลิลิตร

2. fast blue B Salt 150 มิลลิกรัม

3. 1% α - napthyl acetate in absolute alcohol 3 มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารในข้อ 3 ในสารละลายข้อ 1 ให้เข้ากันแล้วกรองในที่มืดก่อนย้อม 30 นาที และเติมสารละลายในข้อ 2 ในทันทีที่ย้อมเจล ย้อมนานจนเจลติดสีชัดเจน

สีย้อมเปอร์ออกซิเดส (Thom and Maretzki, 1970)

สารเคมี Stock A

1. 3-amino-9-ethylcarbazole 420 มิลลิกรัม

2. β-napthol	290	มิลลิกรัม
3. acetone	200	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายสารในข้อ 1 และ 2 ใน acetone ให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บไว้ในขวดสีชา

สารเคมี Stock B (0.0125 M Tris-acetate buffer, pH 4.0)

1. tris-HCl	1.5	กรัม
2. acetic acid	1.7	มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น	1	ลิตร

สารเคมี Stock C (3% hydrogen peroxide (H_2O_2)

1. 30% H_2O_2	0.1	มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น	0.9	มิลลิลิตร

วิธีการ ใช้ Stock A:B:C เท่ากับ 20:80:1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนย้อมเจล ย้อมเจลในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 30-60 นาที

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Carrot Agar (CA)

Carrot	200	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำแครอทมาล้างให้สะอาดปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปปั่นในเครื่องปั่นน้ำผลไม้ โดยเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียดและนำมากรองด้วยผ้ากรอง 4 ชั้น แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 500 มิลลิลิตร ใส่วุ้นนำขึ้นตั้งไฟให้วุ้นละลายหมด นำอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วใส่ขวด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เมื่อจะนำไปใช้ให้นำไปหลอมให้ละลายแล้วจึงเทใส่จานเลี้ยงเชื้อ

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างรากพืชเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

1. ทำการดองรักษาตัวอย่างขั้นต้น (primary fixation)
   นำตัวอย่างพืชมาดองใน glutaraldehyde เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง
2. ทำการล้างตัวอย่างพืช ในน้ำยาชนิดเดียวกับที่ใช้เป็นตัวทำละลายใน fixative คือล้างใน phosphate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์นาน 24 ชั่วโมง
3. ทำตัวอย่างให้แข็งตัวโดยดองใน osmiumtetroxide ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 ชั่วโมง
4. กำจัดน้ำออก (dehydration) โดยผ่านตัวอย่างพืชในเอธานอลความเข้มข้นต่ำไปจนถึงความเข้มข้นสูง 50, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อย่างละ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที และในเอธานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที
5. นำตัวอย่างพืชเข้าเครื่องทำแห้ง (SAMDRI Model) เพื่อทำแห้งที่จุดวิกฤต
6. นำตัวอย่างไปติดบนแท่งทองเหลือง โดยใช้กาวสองหน้าหรือ silver paste นำตัวอย่างไปวางในโถดูดความชื้นข้ามคืนเพื่อให้ตัวอย่างแห้ง
7. การฉาบผิวตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (metal coating) เริ่มจากฉาบ (coat) ด้วยคาร์บอน และตามด้วยโลหะผสมของทองและพาลลาเดียมภายใต้สูญญากาศ จากนั้นนำไปศึกษาด้วย SEM

ตารางภาคผนวกที่ 2. สถานที่เก็บตัวอย่างทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง 26 พันธุ์ที่ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อรา *P. palmivora*

จังหวัด	ชื่อเจ้าของสวน	สถานที่เก็บ	จำนวนพันธุ์	ชื่อพันธุ์
นราธิวาส	นายสมัย หอมกลิ่น	4 หมู่ 3 ต.มามอง อ.สุคิริน	5	สุคิริน 1.4 สุคิริน 1.8 สุคิริน 1.9 สุคิริน 1.10 สุคิริน 1.13
ปัตตานี	นายแวเดร์ ฤทา	20 หมู่ 3 ต.กระโด อ.ยะรัง	11	ลูกดก ก่อพ้อ น้ำฝน น้ำตก หัวช้าง หัวโต ผมร่วง ฟ้าคะนอง เหลืองอร่าม ขันทอง จุกดำ
นครศรี-ธรรมราช	นายสมบูรณ์ ศรีสุวรรณ	81 หมู่ 2 ต.พรหมโลก อ.พรหมคีรี	3	ไอ้เขียว จำปา ต่อไพ
	นายจงรักษ์ จุลบล	119/4 หมู่ 1 ต.พรหมโลก อ.พรหมคีรี	2	ไอ้ม่วง ไม้แดง
	นางเคลือบ อุปรา	51 ต.นางเขลี้ยง อ.ฉวาง	2	ฉวางมุด อีก่อ
	นายนิยม รัตนพันธ์	105 ต.ร่อนพิบูลย์ อ.ร่อนพิบูลย์	1	ก้านยาว
สุราษฎร์-ธานี	นางสาวอารี ทวีสิน	36 หมู่ 6 ต.ควนสุบรรณ อ.บ้านนาสาร	2	อารี 4 อารี 5
รวม			26	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวเบ็ญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์

วันเดือนปีเกิด 3 เมษายน 2511

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2533