สำรวจ รวบรวม และจำแนกราสกุล *Macrophomina* สาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ

Survey, Collection and Identification of *Macrophomina* spp. in Economic Crops

พจนา ตระกูลสุขรัตน์ อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ พรพิมล อธิปัญญาคม
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชเป็นโรคที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Macrophomina* spp. ในแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจบางพื้นที่ในเขตจังหวัดภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน และภาคเหนือในระหว่างเดือนมกราคม – สิงหาคม 2552 ได้ตัวอย่างพืชเป็นโรค 2 ชนิดจำนวน 3 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี Tissue transplanting technique และเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการทดลองสามารถจำแนกเชื้อสาเหตุโรคได้เป็นเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* โดยเส้นผ่าศูนย์กลาง sclerotia และ pycnidia บนพืชมีขนาดเฉลี่ยใกล้เคียงกัน conidia ถูกสร้างอยู่ใน pycnidia เท่านั้นไม่สร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

รหัสการทดลอง 09 02 49 01 02 01 30 51

คำนำ

เชื้อราในสกุล *Macrophomina* spp. มีเชื้อราเพียงชนิดเดียวคือ *Macrophomina phaseolina* (Dhingra and Sinclair, 1972) เป็นสาเหตุของโรคลำต้นเน่าดำหรือ Charcoal rot หรือ Ashy stem rot เป็นโรคทางลำต้นที่สำคัญโรคหนึ่งมีพืชอาศัยมากกว่า 500 ชนิด (Mehan and McDonald, 1997) ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชในกลุ่มพืชไร่เศรษฐกิจ เช่น ข้าวฟ่าง (Frederiksen, 1986) ทานตะวัน (Suriachandrasel Van *et al*., 2005) ข้าวโพด ถั่วเหลือง (Short *et al*., 1980) และถั่วเขียว งา (Farr *et al*., 1989) นอกจากนี้ยังพบการระบาดในพืชชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด อาทิเช่น สตรอเบอร์รี่ (Mertely *et al*., 2005) มันฝรั่ง หอม และเบญจมาศ (Farr *et al*., 1989) เป็นต้น เชื้อราชนิดนี้ทำลายระบบท่อน้ำท่ออาหารของพืชและเปลี่ยนภายในลำต้นพืชเป็นสีน้ำตาลไหม้ถึงดำ สภาพแวดล้อมที่ร้อนและแห้งเป็นปัจจัยหนึ่งที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค (Cook *et al*., 1973) และโรคจะระบาดมากขึ้นเมื่อมีการปลูกพืชชนิดเดิมซ้ำในพื้นที่ที่มีประวัติการระบาดของโรค เนื่องจาก *M. phaseolina* สามารถอยู่ข้างฤดูได้ในรูป sclerotia ในเศษซากพืชในดิน (Short *et al*., 1980) และลำต้นพืชจากปีที่ผ่านมา ทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้น (Summer *et al*., 1995) ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคกับข้าวโพด ถั่วเหลือง และข้าวฟ่าง (พัฒนา และคณะ, 2542) การเกิดโรคของพืชที่มีรายงานไว้แต่เดิมอาจเกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากหลายสาเหตุอาทิเช่นสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม การปฏิบัติของเกษตรกร หรือจากความต้านทานของพืชเอง

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจ รวบรวมพืชอาศัยที่เป็นพืชเศรษฐกิจของเชื้อราสาเหตุ *M. phaseolina* สาเหตุโรคลำต้นเน่าดำและพื้นที่ที่มีการแพร่ระบาดของโรคในประเทศไทยสำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการศึกษาการป้องกันกำจัดโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชเป็นโรค Charcoal rot
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)
3. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการและกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound และชนิด stereo
4. อุปกรณ์บันทึกผลการทดลองได้แก่ กล้องถ่ายภาพ และสมุดบันทึก

วิธีการ

1. การแยกเชื้อสาเหตุ

เก็บตัวอย่างพืชเป็นโรคลำต้นเน่าดำจากพื้นที่ปลูกในเขตภาคต่างๆ ของประเทศในช่วงระหว่างเดือนมกราคม – สิงหาคม 2552 บันทึกลักษณะอาการที่พบในแปลง และนำตัวอย่างมาแยกหาเชื้อราสาเหตุโรคโดยใช้วิธี Tissue transplanting technique โดยตัดลำต้นพืชและตัดเนื้อเยื่อท่อน้ำท่ออาหารบริเวณที่พบเม็ด sclerotia สีดำให้มีความยาวประมาณ 1.0 เซนติเมตร นำมาฆ่าเชื้อด้วยการแช่ในคลอร๊อกซ์ (clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3-5 นาทีและ ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งเพื่อล้างคลอร๊อกซ์ที่ยังตกค้างอยู่ที่ผิวพืชออก แยกเม็ด sclerotia เดี่ยวเหล่านั้นวางบนอาหาร water agar (WA) บ่มเชื้อไว้ 3-4 วันที่อุณหภูมิห้อง ($25\pm2^{\circ}C$) จนเชื้อราสร้างเส้นใย ใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราเจริญ และย้ายเส้นใยเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเชื้อราสร้างโคโลนี บันทึกลักษณะและสี

2. ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากเนื้อเยื่อพืชที่แสดงอาการโรคและเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยตัดชิ้นส่วนพืชเป็นโรคลำต้นเน่าดำบริเวณลำต้นที่พบเม็ดสีดำขนาดยาว 0.5-1 เซนติเมตรวางบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่ชิ้นส่วนพืช ปิดทับด้วยแผ่น cover slip นำแผ่นสไลด์ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูปร่างลักษณะและวัดขนาดเม็ดสีดำที่พบ ก่อนใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมกดทับเม็ดสีดำที่อยู่ใต้แผ่น cover slip เบาๆ เพื่อให้เม็ดสีดำแตกและ conidia ที่อยู่ภายในหลุดออกมา ก่อนนำแผ่นสไลด์ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูปร่างลักษณะและวัดขนาดของ conidia การศึกษา sclerotia บนอาหารจะใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่มีเชื้อราสาเหตุโรคเจริญอยู่ วางบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำยา Shear's mounting solution (ภาคผนวก 1) ที่ชิ้นวุ้นนั้น ปิดทับด้วยแผ่น cover slip นำแผ่นสไลด์ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูปร่างลักษณะและขนาด sclerotia ของเชื้อราสาเหตุโรค ก่อนส่งตัวอย่างแห้งเข้าเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช และตัวอย่างเชื้อเข้าเก็บรักษาใน culture collection

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2550 สิ้นสุด กันยายน 2553

พื้นที่ปลูกพืชในภาคต่างๆ ของประเทศ

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อสาเหตุ

ผลการสำรวจพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบตัวอย่างพืชเป็นโรคลำต้นเน่าดำจากจังหวัดในเขตภาคกลางคือ นครสวรรค์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ อุบลราชธานี ได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 3 ตัวอย่างจากพืชอาศัย 2 ชนิด คือ งาจำนวน 2 ตัวอย่าง และถั่วเหลืองฝักสด จำนวน 1 ตัวอย่าง

อาการโรคลำต้นเน่าดำในตัวอย่างพืช จะปรากฏให้เห็นโดยในระยะแรกแผลจะมีลักษณะเป็นรอยฉ่ำน้ำ สีน้ำตาล ต่อมาเมื่อแผลลุกลามขยายไปตามลำต้น ต้นพืชจะล้มเนื่องจากท่อน้ำท่ออาหารถูกทำลาย เปลือกลำต้นและรากล่อนหลุดลอกง่าย พบกลุ่มผงสีดำขนาดเล็กคล้ายผงถ่านบริเวณผิวเปลือกด้านในที่หลุดล่อน ผิวด้านในของลำต้นที่อยู่เหนือดินและรากพืชใต้ดิน ต้นพืชที่มีอาการรุนแรงเมื่อตัดทางขวางจะพบส่วนกลางต้นกลวง และกลุ่มของท่อน้ำท่ออาหารแตกยุ่ยเป็นเส้น ผงสีดำคล้ายผงถ่านดังกล่าวคือ pycnidia ซึ่งมี conidia อยู่ภายในและ sclerotia ที่เชื้อสาเหตุโรคสร้างขึ้นเพื่อใช้อยู่ข้ามฤดู โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เริ่มแรกเป็นสีขาวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ และสีดำ เมื่อโคโลนีอายุมากจะเปลี่ยนเป็นสีดำทั้งหมด เส้นใยขึ้นฟู พบการสร้าง sclerotia เป็นเม็ดสีดำขนาดเล็กจำนวนมากในอาหาร ซึ่ง Sutton (1980) และ Watanabe (2002) รายงานว่าเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* เป็นสาเหตุโรค Charcoal rot และ Ashy stem rot โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีดำ และสร้าง sclerotia เป็นเม็ดสีดำขนาดเล็กทั้งบนอาหารและบนพืช conidia สร้างอยู่เฉพาะใน pycnidia ไม่สร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

นอกจากนี้ผลการสำรวจพื้นที่เดิมที่พบการแพร่ระบาดของโรคอย่างรุนแรงในปี 2551 คือ จังหวัดสุโขทัย เพชรบูรณ์และชัยนาท และที่มีรายงานการระบาดของโรคในจังหวัดอุบลราชธานี พบว่า ไม่พบการแพร่ระบาดของโรคในพื้นที่ดังกล่าวในฤดูปลูกปี 2552 ทั้งนี้เนื่องจากเกิดสภาวะฝนแล้งติดต่อกันเป็นเวลานานในพื้นที่ดังกล่าว สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งสภาพที่เหมาะสมในการแพร่ระบาดของโรคคือ มีฝนตกและอากาศร้อนอบอ้าว (สมภาค, 2530) ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญทำให้ไม่มีการแพร่ระบาดของโรคลำต้นเน่าดำในพื้นที่ที่เคยพบการแพร่ระบาดอย่างรุนแรงจากปีก่อนหน้า

2. ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *M. phaseolina* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าผงสีดำขนาดเล็กบนพืชคือ sclerotia และ pycnidia โดย sclerotia เป็นกลุ่มเส้นใยที่มาเกาะ

รวมตัวกันจนเห็นเป็นก้อน มีลักษณะค่อนข้างกลม ผนังหนา สีน้ำตาลเข้มถึงสีน้ำตาลดำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ sclerotia จากเชื้อรา *M. phaseolina* 3 ไอโซเลทที่เก็บรวบรวมได้คือ

- งา จาก จ.นครสวรรค์ มีขนาด 109.8 (±29.47) x 134.31 (±37.78) ไมครอน

- งา จาก จ.อุบลราชธานี มีขนาด 126.48 (±21.72) x 147.19 (±23.85) ไมครอน

- ถั่วเหลืองฝักสด จาก จ.นครสวรรค์ มีขนาด 122.75(±38.03) x 147.91(±46.47)ไมครอน เป็นขนาดที่ตรงกับ Sutton (1980) รายงานไว้คือ 50-300 ไมครอน sclerotia

pycnidia มีสีน้ำตาลเข้มถึงสีน้ำตาลดำ และมีลักษณะค่อนข้างกลมคล้าย sclerotia ต่างกันตรงที่ pycnidia มีช่องเปิดเรียกว่า ostioles ปรากฏออกมาจากผิวเล็กน้อย และมีขนาดใหญ่กว่า sclerotia ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ pycnidia จากเชื้อรา *M. phaseolina* 3 ไอโซเลทคือ

- งา จาก จ.นครสวรรค์ มีขนาด 155.97 (±59.63) x 186.14 (±70.81) ไมครอน

- งา จาก จ.อุบลราชธานี มีขนาด 150.28 (±43.64) x 186.22 (±37.30) ไมครอน

- ถั่วเหลืองฝักสด จาก จ.นครสวรรค์ มีขนาด 157.49(±44.85) x 186.02(±89.63)ไมครอน มีขนาดใหญ่กว่าขนาดที่ Watanabe (2002) รายงานไว้คือ 130-230 ไมครอน

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ เส้นใยใสไม่มีสี มีผนังกั้น พบ sclerotia สีน้ำตาลดำจำนวนมากถูกสร้างอยู่ระหว่างเส้นใย ลักษณะค่อนข้างกลมถึงยาวรี (ellipsoid to oboviod) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ sclerotia บนอาหารจากเชื้อรา *M. phaseolina* 3 ไอโซเลทคือ

- งา จาก จ.นครสวรรค์ มีขนาด 145.56 (±29.43) x 157.41 (±73.15) ไมครอน

- งา จาก จ.อุบลราชธานี มีขนาด 113.30 (±33.80) x 161.35 (±48.26) ไมครอน

- ถั่วเหลืองฝักสด จาก จ.นครสวรรค์ มีขนาด 104.25(±24.00) x 130.00(±30.97)ไมครอน มีขนาดใกล้เคียงกับ sclerotia ที่เชื้อราสร้างบนพืชและเป็นขนาดที่ใหญ่กว่าที่ Watanabe (2002) รายงานไว้คือ 60-120 ไมครอน

conidia เป็นเซลเดี่ยว (1–celled conidia) ใสไม่มีสี ถูกสร้างอยู่เฉพาะใน pycnidia ไม่สร้างบนอาหาร ขนาดเฉลี่ยรวมของ conidia จากเชื้อรา *M. phaseolina* 3 ไอโซเลทคือ

- งา จาก จ.นครสวรรค์ มีขนาด 4.60 (±2.34) x 15.71 (±7.62) ไมครอน

- งา จาก จ.อุบลราชธานี มีขนาด 6.12 (±0.73) x 18.15 (±2.39) ไมครอน

- ถั่วเหลืองฝักสด จาก จ.นครสวรรค์ มีขนาด 5.34(±1.45) x 17.94(±3.54)ไมครอน มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่ Watanabe (2002) รายงานไว้คือ 14-35 x 6-11.5 ไมครอน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการสำรวจและรวมรวมตัวอย่างพืชเป็นโรคลำต้นเน่าดำหรือ Charcoal rot ที่มีเชื้อราในสกุล *Macrophomina* เป็นเชื้อสาเหตุ ในพื้นที่ปลูกพืชทั่วประเทศระหว่างเดือนเดือนมกราคม – สิงหาคม 2552 ได้ตัวอย่างพืชเป็นโรคจำนวน 3 ตัวอย่าง แยกตามชนิดพืชอาศัยได้เป็น 2 ชนิด คือ งา 2 ตัวอย่าง และถั่วเหลืองฝักสด 1 ตัวอย่าง และจำแนกราสาเหตุโรคได้เป็น *Macrophomina phaseolina* โคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเทาดำ เส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใสไม่มีสี พบการสร้าง pycnidia และ sclerotia บนเนื้อเยื่อพืช และสร้าง conidia อยู่ภายใน pycnidia บนอาหารพบเฉพาะการสร้าง sclerotia ไม่พบการสร้าง conidia และผลการสำรวจพืชที่ปลูกในพื้นที่เดิมที่เคยพบการระบาดของโรคในฤดูปลูกปี 2551 บางพื้นที่ พบว่าไม่มีการแพร่ระบาดของโรคลำต้นเน่าดำในฤดูปลูกปี2552

เอกสารอ้างอิง

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2542. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 284 หน้า.

สมภาค สิทธิพงศ์. 2530 โรคพืชเส้นใยและการป้องกันกำจัด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 84 หน้า.

Cook,G.E., M.G. Boosalis, L.D. Dunkle, and G.N. Odvody. 1973. Survival of *Macrophomina phaseolina* in corn and sorghum stalk residue. Plant Dis. Reptr. 57:873-875.

Dhingra, O.D., and J.B. Sinclair. 1972. Variation among isolates of *Macrophomina phaseolina* (*Rhizoctonia bataticola*) from the same soybean plant. Phytophatology 62:S1108. (Abstract)

Farr, D.F., G.F. Bills, G.P. Chamuris and A.Y. Rossman. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United State. APS Press, St. Paul, MN. USA. 1252 pp.

Frederiksen, R.A. 1986. Compendium of Sorghum Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. USA. 82 pp.

Mehan, V. K., and D. McDonald. 1997. Charcoal Rot. *In* Compendium of Peanut Diseases, 2nd ed. N. Kokalis-Burelle *et al*. eds. APS Press. St. Paul, MN. USA. 94 pp.

Mertly, J., T. Seijo and N. Peres. 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown rot of strawberry in Florida. Plant Diseases 89: 434.

Short, G.E., T.D. Wyllie and P.W. Bristow. 1980. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and in residue of soybean. Phytopathology 70:13-17.

Summer, D.R., C.C. Dowler, A.W. Hohnson and S.H. Baker. 1995. Conservation tillage and seedling diseases in cotton and soybean double-cropped with triticale. Plant Dis. 79:372-375.

Suriachandrasel Van, M., K.E.A. Aiyyanathan and R. Vimala. 2005. Host range and cross inoculation studies on *Macrophomina phaseolina* from sunflower. Madras Agric. J. 92(4-6) : 238-240.

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes : Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acevuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, London, UK. 696 pp.

Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi : Morphologies of Cultured Fungi and Key to Specids. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 486 pp.

ภาคผนวก 1

Shear's mounting solution

potassium acetate	3	g
glycerin	60	ml
ethanol 95%	90	ml
water	150	ml

ที่มา : Samson, R.A., E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad and O. Filtenborg. 2002. Introduction to Food and Airborne Fungi. 6th ed. CBS Ponsen& Looyen, Wageningen, The Netherlands. 389 pp.