

อนุกรมวิธานและชีววิทยาของรา *Cladosporium* สาเหตุโรคIdentification and Biology of *Cladosporium*

ชนินทร์ ดวงสอดท พรมพิณ อธิปัญญาคม สุณิรัตน์ สิมะเต็อ

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

## บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Cladosporium* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ เชียงใหม่ เชียงราย อุตรดิตถ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี กระบี่ สตูล ตรัง สุโขทัย เลย เพชรบูรณ์ สระบุรี และขอนแก่น ได้ตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Cladosporium* โดยตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใหม่โดยมีเชื้อรา *Cladosporium* เป็นเชื้อราสาเหตุคือ ไฮเดรนเยียและช่อดอกมะม่วง และเมื่อจำแนกพบว่าเชื้อรา *Cladosporium* ที่แยกได้คือ เชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-01-54



## คำนำ

รา *Cladosporium* เป็นราใน Class Dematiaceous Hyphomycetes ที่สร้างเส้นใย conidiophores หรือ conidium ที่มีสีเข้ม (dark-colored) conidiophores เป็นก้านยาว ตั้งตรง และแตกกิ่งก้าน รูปร่างของ conidium ไม่แน่นอน โคลนีสีเขียวมะกอกเข้ม รา *Cladosporium* มีจำนวนชนิดมากกว่า 700 ชนิด เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคได้ทั้งกับคนและพืช ซึ่งราชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับพืชหลายชนิด เช่น *Cladosporium capsici* สาเหตุโรครดดอกไหม้ (flower blight) เบญจมาศ *C.cucumerinum* สาเหตุโรคราดำ (leaf mold) แดงโม่และสแคป (scab) ในแตงกวา *C.allii-cepae* สาเหตุโรคใบจุด (leaf blotch) หอม กระเทียม *C. fulvum* สาเหตุโรคกำมะหยี่และใบจุดมะเขือเทศ *C. musae* สาเหตุโรคใบลาย ใบจุดต่าง (leaf speckle) กล้วย *C. cladosporioides* และ *C. herbarum* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาล (brown spot) ในองุ่น และยังมีพืชอื่นที่แสดงอาการของโรคพืชที่มีเชื้อสาเหตุจาก genus *Cladosporium* เช่นโรคราดำในกล้วยไม้ ทุเรียน ลำไย โรคฝักจุด ฝักลาย ในกระเจียบเขียว โรคใบจุดในมะละกอ และอื่นๆ ที่ยังไม่ระบุชนิดของรา *Cladosporium* และยังพบว่า รา *Cladosporium* เป็นราในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) ของรา *Mycosphaerella* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชสำคัญหลายชนิด ดังนั้นการจำแนกชนิดของรา *Cladosporium* นี้จึงมีความสำคัญ ซึ่งรา *Cladosporium* หลายชนิดที่เป็นสาเหตุโรคพืชที่นำเข้ามาหรือส่งออก ดังนั้นหากทราบถึง ชนิดของรา *Cladosporium* บนพืชอาศัยต่าง ๆ จึงเป็นข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์ในทางด้านโรคพืชและการเกษตรทั่วไป และการรวบรวมเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อราดังกล่าวเข้าไปใน culture collection จะเป็นแหล่งเก็บรักษาพันธุกรรมเชื้อราเพื่อนำไปใช้ศึกษาค้นคว้าเรื่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะเป็นประโยชน์การเกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต และเป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านการจำแนกชนิดของเชื้อราและยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อ เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงทำการศึกษานิตของราสกุล *Cladosporium* สาเหตุโรคพืช

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ ถุงพลาสติก กรรไกร กรรไกรตัดแต่งกิ่ง กระดาษฟาง ไม้อัดทับตัวอย่าง
2. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เชื้อเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บีกเกอร์ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เข็มเขี่ยปลายแหลม หัวง่ายเชื้อ ปากคืบ ใบมีดผ่าตัด มีด

5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo
6. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ water agar (WA) potato dextrose agar (PDA) Malt Extract Agar, Corn Meal Agar (CMA)
7. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ และ เอธิลแอลกอฮอล์

75%

## วิธีการ

### 1. สืบค้นเอกสารและเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

สืบค้น ตรวจสอบเอกสารที่เกี่ยวข้อง และเตรียมวัสดุอุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการทดลอง

### 2. สืบค้นและเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดหีบตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีศรีสาร กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

### 3. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

#### - ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรง

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ  $32 \pm 2$  องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

#### - แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant

นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมานำตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด  $0.5 \times 0.5$  มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซบบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร  $\frac{1}{2}$ Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar บ่มที่อุณหภูมิ  $32 \pm 2$  องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

### 4. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

นำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร  $\frac{1}{2}$ Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar,

Malt Extract Agar, Corn Meal Agar หรือ water agar โดยบันทึกลักษณะอาการต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารชนิดต่าง ๆ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกสีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment)
- ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution
- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope)

### 5. การพิสูจน์โรค

นำรา *Cladosporium* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างพืชแต่ละชนิด ทำการปลูกเชื้อบนพืชชนิดเดียวกับตัวอย่างพืชที่แยกมาได้ โดยวิธี detach leaf เพื่อพิสูจน์ความเป็นสาเหตุโรคของพืชชนิดนั้นๆ

### 6. เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา

เชื้อราที่แยกได้นั้น เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีศรีการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

### 7. สรุปผลการทดลอง

รวบรวมข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

### เวลาและสถานที่

เวลา	เริ่มต้น – สิ้นสุด เดือนตุลาคม 2553 - เดือนกันยายน 2556
สถานที่	- ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช - โรงเรือนทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Cladosporium* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศ ได้ตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* จาก ไฮเดรนเยียและช่อดอกมะม่วงที่แสดงอาการไหม้

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Cladosporium* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ระหว่าง ตุลาคม 2553-กันยายน 2554 ได้ตัวอย่างเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* โดยการเก็บตัวอย่างจะต้องเพิ่มพื้นที่ในการสำรวจและชนิดของพืชปลูกให้หลากหลายและตรงตามฤดูกาล หรือสำรวจโรคในพื้นที่ที่มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมที่อาจพบการแสดงอาการของโรค

### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การทราบชนิดและวิธีการจำแนกชนิดของรา *Cladosporium* บนพืชอาศัยต่าง ๆ เป็นข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์ในทางด้านโรคพืชและการเกษตรทั่วไป และการรวบรวมเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อราดังกล่าวเข้าไปใน culture collection จะเป็นแหล่งเก็บรักษาพันธุกรรมเชื้อราเพื่อการนำไปใช้ศึกษาค้นคว้าเรื่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะเป็นประโยชน์การเกษตร การแพทย์ อุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต และเป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านการจำแนกชนิดของเชื้อรา และยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อเพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

### เอกสารอ้างอิง

- ชลธิชา รักใคร่ อุดร อุณหวุฒิ สุรพล ยินอัศวพรรณ จำลอง ลภสาธกุล และ ญฐพร อุทัยมงคล. 2550. การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าของผลไม้สดจากประเทศสหรัฐอเมริกา. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2550. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. เล่ม 2: หน้า 1084-1096.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์เพ็ชรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิ์รงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- Ellis, M. B. 1971. Demateceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 698 p.
- Ellis, M. B. 1976. More Demateceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 507 p.