ศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก

Studt on *Phytophthora* species of Taro

อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว[1/] พชร ธิตานนท์[1/] ดารณี เจริญผล[1/] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1/]
มะโนรัตน์ สุดสงวน[1/] ชนินทร ดวงสอาด[1/] พรพิมล อธิปัญญาคม[2/]
[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/] ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การเก็บตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ จากแหล่งปลูกเผือก 110 ตัวอย่าง 117 ไอโซเลท นำมาแยกเชื้อสาเหตุโรคพืชจากส่วนแผ่นใบและก้านใบ พบว่าเป็นรา *Phytopthora* sp. นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า สร้างสปอร์แรนเจียจำนวนมาก มีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ รูปไข่ หรือรูปค่อนข้างยาว หรือรูปไข่ ขนาดสปอร์แรนเจีย 98.71-179.40 x 87.78-144.40 µm อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง เท่ากับ 1.40:1

คำหลัก : *Phytophthora* taro เผือก ใบจุดตาเสือ Taro leaf blight

คำนำ

โรคใบไหม้ (โรคใบจุดตาเสือ; Taro leaf blight) สาเหตุเกิดจากรา *Phythopthera colocasiae* Rac. อาการเริ่มแรกบนใบ เป็นจุดขี้แมลงวันเล็กๆ สีน้ำตาลเข้ม หรือจุดสีน้ำตาลอ่อน ปรากฏเห็นชัดบนผิวใบ (Brooks, F.E. 2005) แผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงๆ ต่อกัน ลักษณะพิเศษ คือ บริเวณขอบแผลมีหยดสีเหลืองข้น ซึ่งต่อมาแห้งเป็นเม็ดๆ เกาะอยู่เป็นวงๆ เมื่อบีบจะแตกเป็นผงละเอียด สีสนิม ในระยะที่รุนแรงแผลขยายติดต่อกัน และทำให้ใบม้วนพับเข้าและแห้งเหี่ยว หรืออาจเน่าเละถ้าอากาศชื้นมีฝนพรำ อาการบนก้านใบ จะเกิดแผลฉ่ำน้ำยาวรี สีน้ำตาลอ่อน แผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงๆ เช่นกัน ต่อมาจะเน่า แห้ง เป็นสีน้ำตาล มีหยดสีเหลืองข้นด้วย ทำให้ก้านต้านทานน้ำหนักใบไม่ได้จึงหักพับ มีผลทำให้ใบแห้ง พบมากในระยะโรครุนแรง และมีลมพัด อาการเป็นระยะนี้ทำให้ผลผลิตลดลง และเชื้อนี้อาจเข้าทำลายหัวเผือกด้วยทำให้หัวเผือกเน่าเสียหายได้ โรคนี้เป็นโรคที่รุนแรงที่สุดของเผือกที่พบในประเทศไทยและในต่างประเทศ โรคนี้เริ่มระบาดเมื่อมีฝนตกและอากาศชุ่มชื้น ถ้ามีฝนตกหนักและติดต่อกันหลายๆ วัน โรคจะระบาดอย่างรวดเร็ว ในแปลงที่เป็นรุนแรง เผือกจะมีใบเหลืองประมาณต้นละ 3-4 ใบ เท่านั้น เผือกที่เป็นโรคนี้ถ้ายังไม่เริ่มลงหัว หรือลงหัวไม่โตนักจะเสียหายหมด หัวที่ลงจะไม่ขยายเพิ่มขนาดขึ้น ในช่วงที่หมอกลงจัดเผือกจะเป็นโรคนี้ได้ง่ายเช่นเดียวกัน (อมรรัตน์, 2552; กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2555)

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-01-60

P. colocasiae จัดอยู่ใน class Oomycetes family Pythiaceae ลักษณะของรานี้ เป็นราน้ำ เส้นใยสีขาว ไม่มีผนังกั้น แตกกิ่งก้าน สร้างสปอร์ 4 ชนิด ได้แก่ sporangia เกิดบนก้าน sporangiophores มีการขยายพันธุ์ทั้งแบบไม่ใช้เพศให้กำเนิด zoospores ภายใน sporangium ส่วนการขยายพันธุ์แบบใช้เพศให้กำเนิด oospores ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างเพศผู้ (antheridium) และเพศเมีย (oogonium) และ chlamydospores เชื้ออยู่ข้ามฤดูในรูปของ oospore และเส้นใยในพืชที่เป็นโรค เมื่อความชื้นเหมาะสมจะเกิด sporangia ให้กำเนิด zoospore ที่มีหางว่ายน้ำได้ เข้าทำลายพืชต่อไป (Erwin and Ribeiro, 1996)

P. colocasiae มีพืชอาศัยส่วนมากเป็นพืชพวก aroids (Araceae) รวมทั้ง พืชตระกูลเผือก [*Colocasia esculenta* (taro, kalo, dasheen) และ *Alocasia macrorrhiza* (giant taro)] (Brooks, F.E. 2005) มีรายงานในประเทศอินเดีย ว่า *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบไหม้และหัวเน่าที่ร้ายแรงที่สุดของเผือก (Raj *et al*., 2011) พบได้ทุกพื้นที่ที่มีการปลูกเผือกในฮาวายและยังพบได้ในพื้นที่อื่นอีก ได้แก่ ปาปัวนิวกินี, เกาะโซโลมอน, ฟิลิปปินส์, เกาะกวม,ซามัวตะวันตก, อินเดีย, ไต้หวัน และทรินิแดด เป็นต้น (Anonymous, n.p.)

อมรรัตน์ (2552; 2556) รายงานว่ารา *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบแห้ง ใบไหม้ ใบจุดตาเสือกับ เผือก บอนน้ำ บอนเขียว และคูณ

ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์เผือกให้ต้านทานโรคใบจุดตาเสือของบางประเทศ มีการนำวิธีการ Isozyme analysis and DNA markers (RAPD) มาระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *P. colocasiae* ไอโซเลทต่างๆ ทั้งภายในและนอกประเทศ ซึ่งเผือกจากการปรับปรุงพันธุ์ควรมีการทดสอบการต่อต้านเชื้อนี้ ก่อนที่จะออกเป็นพันธุ์ใหม่ต่อไป (Brooks, F.E. 2005)

Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko (2008) ทำการสำรวจและเก็บใบเผือกที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อได้ 7 ไอโซเลท จากนั้นนำมาวินิจฉัยว่าเป็น *P. colocasiae* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาลำดับของ ITS (Internal Transcribed Spacer) และความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนเผือก

ในประเทศไทย มีรายงานเกี่ยวกับรา *Phythopthora* หลายสปีชี ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชต่างๆ หลายชนิด จึงควรมีการศึกษาข้อมูลต่างๆ ของรา *P. colocasiae* สาเหตุโรคใบจุดตาเสือของเผือก เพื่อให้ได้ทราบชนิด และลักษณะประจำพันธุ์ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาวิธีการป้องกันกำจัดโรค เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับนำมาใช้กำหนดแผนการป้องกำจัดได้รวดเร็วทันเหตุการณ์ และยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า และเพื่อเก็บในศูนย์รวบรวมราสาเหตุโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช และตัวอย่างแห้งโรคพืชเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างและอุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ ปากกาเคมี, ดินสอ, กระดาษหนังสือพิมพ์, ถุงพลาสติก, กรรไกรตัดแต่งกิ่ง, ไม้ทับตัวอย่าง, ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง และ GPS ฯลฯ

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์, ปากคีบ, เข็มเขี่ยปลายแหลม, ใบมีดโกน, ใบมีดผ่าตัด, ตะเกียงแอลกอฮอล์, ยาทาเล็บ (แบบใส), cork borer, เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge), เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine), เครื่องเขย่า (vortex), เครื่อง tissue lyser, gel tank, เครื่องกำเนิดกระแสไฟ, gel plate, comb, PCR tube, เครื่องอ่านผล PCR (gel doc), microwave, micropipette ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร, tips ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร, กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo, water bath หรือ incubation chamber ฯลฯ

3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์, ขวดดูแรน, กระบอกตวง, จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฯลฯ

4. สารเคมี ได้แก่ lactophenol, lactic acid, oil immersion, sodium hypochlorite, ethyl alcohol ฯลฯ

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA), Potato Carrot Agar (PCA), V-8 juice agar, และ Carrot Agar (CA) ฯลฯ

6. ตำราสำหรับใช้ในการจัดจำแนกรา *Phytophthora* (Phytophthora Diseases Worldwide, Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints)

วิธีการ

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Phytophthora* (ปี 2560)

เก็บและรวบรวม และเก็บตัวอย่างโรคใบจุดตาเสือของเผือก จากแหล่งปลูก ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ นครสวรรค์ พิษณุโลก สิงห์บุรี นครราชสีมา สุรินทร์ สระบุรี ปราจีนบุรี อยุธยา นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุม เนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ปี 2560)

- การแยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกราโดยวิธี Tissue transplanting โดยตัดบริเวณรอยต่อเนื้อเยื่อที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar ผสม BRNAP (PDA+BRNAP) (Masago *et al.*, 1972) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25+2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยราที่เจริญจากชิ้นตัวอย่างพืช มาเลี้ยงบนอาหาร PDA+BRNAP อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25+2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยราที่เจริญจากชิ้นวุ้น มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นแครอท (อมรรัตน์ และคณะ, 2556) แล้วทำให้เป็นราบริสุทธิ์จากสปอร์เดี่ยว โดยนำราที่เจริญบนอาหารวุ้นแครอท ไปเก็บไว้ในที่มืด 72 ชั่วโมง แล้วนำออกไปไว้ใต้แสงนีออน ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ มาแตะกลุ่มสปอร์ แล้วนำไปเขี่ยให้สปอร์กระจายบนอาหารวุ้น (water agar: WA) แล้วตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อแยกสปอร์เดี่ยว นำไปวางบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง ให้สปอร์เจริญสร้างกลุ่มสปอร์ แล้วตัดขอบโคโลนี ไปเลี้ยงในหลอดอาหาร PDA (อมรรัตน์, 2556) ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

- การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (คู่มือการจำแนกชนิด *Phytophthora* ของ Stamps *et al.* (1990) และ เอกสารของ Erwin and Ribeiro (1996))

- ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

เลี้ยงรา *Phytophthora* บนอาหารวุ้นมันฝรั่ง หรืออาหารวุ้นแครอท เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย ใช้เครื่องเจาะรู (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อซึ่งเลี้ยงบนอาหาร นาน 5 วัน วางให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อคว่ำลงบนอาหารบริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มมืดอุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะการเจริญที่ผิวหน้าอาหารและความหนาแน่นของเส้นใย

- ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา

นำรา *Phytophthora* ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารวุ้นแครอท จานวน 15 มิลลิเมตร ที่บ่มในตู้บ่มมืดนาน 72 ชั่วโมง นำไปไว้ใต้แสงนีออน (White cool) 40 วัตต์ 2 หลอดระยะ 30 เซนติเมตรที่ให้แสง 200 แรงเทียน (Foot candle ftc) ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยไว้ใต้แสงนาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้าง สปอร์แรงเจีย (Sporangia) ศึกษาและบันทึกลักษณะการแตกแขนงของก้านสปอร์ (Sporangiophores) วัดความยาว (Length) และความกว้าง (Breadth) ของ สปอร์แรงเจีย เพื่อหาอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง วัดความยาวของก้านสปอร์ (Pedicel หรือ Stalk) ความยาวของปาปิลา (Papilla) และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ คลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore)

3. จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บมาได้ ส่วนหนึ่งนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยตัดส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช นำไปวางผึ่งลม ไม่ให้ถูกแดด เปลี่ยนกระดาษทุกวันจนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง จึงนำมาเก็บในถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างแห้ง พร้อมลงรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างตามระบบสากล ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

4. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม (ปี 2561)

สกัดดีเอ็น

โดยเลี้ยงรา *Phytophthora* ที่ต้องการศึกษาในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 องศาเซลเซียส) ให้มีอายุประมาณ 7 วัน จากนั้นเขี่ยเส้นใยของรา ย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ปฏิบัติตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต โดยก่อนสกัด จะเติมเอ็นไซม์ Proteinase K เพื่อช่วยในการย่อยผนังเซลล์ ใช้ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากสกัดได้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) หากยังไม่ทำ PCR ทันที จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ CO1 OomCoxI-Levup/OomCoxI-Levlo (Robideau *et al.*, 2011) CO2 FM75/FM78 (Martin and Tooley, 2003) translation elongation factor 1-alpha (Tef1) ELONGF1/ELONGR1 (Kroon *et al.*, 2004) และ Internal Transcribed Spacer (ITS) DC6 (Cooke *et al.*, 2000)/ITS4 (White *et al.*, 1990) และเอนไซม์ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาสำหรับการวิจัยนี้ คือ Taq DNA Polymerase หากพบว่ามีตัวอย่างที่มีปัญหาหรือยากต่อการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมาย เช่น ดีเอ็นเอเป้าหมายมีขนาดใหญ่ หรืออาจเกิดจากตัวดีเอ็นเอต้นแบบเอง จะพิจารณาใช้ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถทนความร้อนได้สูง ทำให้สามารถเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาได้สูง ทำให้การจับของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอต้นแบบมีความจำเพาะมากขึ้น

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอของรา *Phytophthora* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยแยกขนาดดีเอ็นเอที่ผสมสีย้อม (dye) และ ethidium bromide (GelRed) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้กับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ปรากฏบนเจล เมื่อส่องดูภายใต้

แสง UV โดยใช้บัฟเฟอร์ Lithium Borate buffer (LB buffer) หากปรากฏแถบดีเอ็นเอ ตรงตำแหน่งขนาดดีเอ็นเอเป้าหมาย จึงส่งผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ต่อไป

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR โดยส่งให้หน่วยงานที่ให้บริการ โดยอาจต้องทำดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ (DNA Purification) ก่อนหรือไม่นั้น ขึ้นอยู่กับความครอบคลุมของการให้บริการของหน่วยงานที่ให้บริการนั้น

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของรา *Phytophthora* มาทำการวิเคราะห์ เพื่อให้ได้รหัสดีเอ็นเอ หรือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) โดยนำเส้นดีเอ็นเอสองเส้นที่ได้จาก forward และ reverse primer มาเทียบกัน โดยใช้โปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Sequencher, Genious หรือ Bioedit แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับรหัสดีเอ็นเอ หรือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของรา ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank เพื่อทราบชนิดของรานั้นๆ และระบุชนิดรา

บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอ และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae* (ปี 2561-2562)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 10 ซ้ำ โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 Potato dextrose agar (PDA)

กรรมวิธีที่ 2 V8 juice agar (V8 A)

กรรมวิธีที่ 3 Oat meal agar (OMA)

กรรมวิธีที่ 4 Carrot agar (CA)

กรรมวิธีที่ 5 Corn meal agar (CMA)

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารทดสอบชนิดต่างๆ ในจานเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของราบนอาหารสูตรต่างๆ

6. ศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ของอาหารต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae* (ปี 2562)

วางแผนการทดลองแบบ Split plot โดย Main plot คือ อุณหภูมิ 3 ระดับ
Sub plot คือ ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ระดับ

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารที่ได้จากข้อ 4 ที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ ไฮโดรคลอริคแอซิค) ในจานเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยรา ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของรา

7. ศึกษาการเก็บรักษารา *P. colocasiae* (ปี 2562)

วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 กรรมวิธี 10 ซ้ำ โดยระยะเวลาการเก็บรักษาเชื้อเป็นกรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 ระยะเวลา 2 เดือน
กรรมวิธีที่ 2 ระยะเวลา 4 เดือน
กรรมวิธีที่ 3 ระยะเวลา 6 เดือน
กรรมวิธีที่ 4 ระยะเวลา 8 เดือน
กรรมวิธีที่ 5 ระยะเวลา 10 เดือน
กรรมวิธีที่ 5 ระยะเวลา 12 เดือน

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารที่ได้จากข้อ 4 ในสภาพที่ได้จากข้อ 5 ในหลอดอาหารสำหรับเก็บเชื้อ จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มนำไปเก็บในสภาพ (5) เมื่อได้ระยะเวลาตามแผนนำหลอดเชื้อมาแยกเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกการมีชีวิตและการสร้างสปอร์ หลังการเก็บรักษา 2 4 6 8 10 และ 12 เดือน

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเผือกของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Phytophthora*

เก็บตัวอย่างเผือกที่เป็นโรคใบจุดตาเสือจากแหล่งปลูกเผือก (Table 1) รวม 110 ตัวอย่าง

2. การจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- แยกราสาเหตุโรคจากส่วนก้านใบและใบเผือกที่แสดงอาการ (Figure 1 and 2) เก็บเป็นราบริสุทธิ์ เพื่อใช้ศึกษา 117 ไอโซเลท

- ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

การเจริญเติบโตของรา *Phytophthora* ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ บนอาหารแข็ง 2 ชนิด คืออาหารวุ้นมันฝรั่ง (PDA) และอาหารวุ้นแครอท (CA) บ่มไว้ที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Figure 3) พบว่าการสร้างเส้นใยบนอาหารแข็ง มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นตรง แตกกิ่งก้านออกไปสม่ำเสมอ เส้นใยใสไม่มีสี ไม่มีผนังกั้นเส้นใย ผิวผนังเส้นใยเรียบ (Smoot) ไม่มีการโป่งพอง การเจริญบนอาหารวุ้นมันฝรั่ง เต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 9 วัน แต่บนอาหารวุ้นแครอท เชื้อเจริญเติบโตช้ากว่าเต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 11 วัน นอกจากนี้ บนอาหารวุ้นมันฝรั่ง ราสร้างเส้นใยหนาแน่นกว่า แต่บนอาหารวุ้นแครอทสร้างสปอร์แรนเจีย (Sporangia) มากกว่าบนอาหารวุ้นมันฝรั่ง

- ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา (Figure 4 and 5)

รา *Phytophthora* สร้างสปอร์แรนเจียจำนวนมาก มีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ รูปไข่ หรือรูปค่อนข้างยาว หรือรูปไข่ ขนาดสปอร์แรนเจีย 98.71-179.40 x 87.78-144.40 µm อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง เท่ากับ 1.40:1 ด้านบนของสปอร์แรนเจียมีส่วนเปิดเป็นทางออกของสปอร์ที่มีหางและว่ายน้ำได้ เด่นชัด

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเก็บตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ จากแหล่งปลูกเผือก 110 ตัวอย่าง 117 ไอโซเลท นำมาแยกเชื้อสาเหตุโรคพืชจากส่วนแผ่นใบและก้านใบ พบว่าเป็นรา *Phytopthora* sp. นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า สร้างสปอร์แรนเจียจำนวนมาก มีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ รูปไข่ หรือรูปค่อนข้างยาว หรือรูปไข่ ขนาดสปอร์แรนเจีย 98.71-179.40 x 87.78-144.40 µm อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง เท่ากับ 1.40:1

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยโรคพืช. 2555. *คู่มือโรคผัก*. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 153 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2552. *รา Phytophthora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 74 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2556. *พืชที่เป็นโรคไฟทอปธอรา*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 189 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และพีระวรรณ พัฒนาวิภาส. 2556. การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici*. หน้า 2281-2292. *ใน : ผลงานวิจัย ประจำปี 2555*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

Anonymous. n.p. *Phytophthora colocasiae*. (Online). Available : http://www.extento.hawaii.edu/ kbase/crop/type/p_coloc.htm. (June 22, 2014)

Brooks, F.E. 2005. *Taro leaf blight*. (Online). Available : https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/ lession/fungi/Oomycetes/Pages/TaroLeafBlight.aspx. (June 22, 2014)

Erwin, D.C and O.K.Ribeiro. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St.Paul., MN., USA. 562 p.

Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko. 2008. Occurrence of isolates of *Phytophthora colocasiae* in Taiwan with homothaiiic behavior and its significance. *Mycologia*. 100(5) : 727-734.

Raj, S.M., A.K. Mishraa, K.S., M.L.Jeevaa and V. Hegdea. 2011. Characterisation of *Phytophthora colocasiae* isolates associated with leaf blight of taro in India. *Phytopathology and Plant Protection*. 44(6) : 581-591.

Stamps, D.J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook and G. S. Hall. 1990. Revised Tabular Key to the Species of *Phytopthora*. Mycological Papers No. 162. CB. International Mycological Institute. 28 p.

Tsopmbeng Noumbo Gaston R., Lienou Jules Appolinaire, Megatche ChristienJean P. and Fontem Dominic Ajong. 2014. Effect of different pH and temperature levels on in vitro growth and sporulation of *Phytophthora colocasiae*, taro leaf blight pathogen. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 4(4) : 202-206.

Kroon LPNM, Bakker FT, Bosch GBM van den, Bonants PJM and Flier WG. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 766 – 782.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.) Academic Press.

Robideau GP, de Cock AWAM, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, et al. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*. 11:1002-1011.

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight

No.	Sampling location			
1	สายหนึ่ง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
2			ท่ายาง	เพชรบุรี
3	ม.7 บ้านประชาสุขสาร	ทุ่งสมอ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์
4	ม.7 บ้านประชาสุขสาร	ทุ่งสมอ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์
5		วังโบสถ์	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
6		วังโบสถ์	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
7	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
8	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
9	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
10	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
11	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
12	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
13	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
14	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
15	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
16	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
17	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
18	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
19	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
20	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
21	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
22	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
23	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
24	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
25	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
26	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
27	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
28	ม.1 บ้านท่ายาง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
29	ม.7 บ้านหนองบ้วย	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
30	ม.7 บ้านหนองบ้วย	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
31	ม.9 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight (cont.)

No.	Sampling location			
32	ม.9 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
33	ม.9 สาย 2 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
34	ม.9 สาย 2 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
35	ม.4 บ้านไสค้าน	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
36	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
37	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
38	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
39	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
40	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
41	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
42	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
43	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
44	บ้านหัวทุ่ง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
45	บ้านหัวทุ่ง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
46	ม.2 บ้านทุ่งแฝก	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
47		หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
48	ม.4 บ้านโป่งกะสัง	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
49	ม.11 บ้านเขาตกน้ำ	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
50	ม.11 บ้านเขาตกน้ำ	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
51	ซ. พัชรี ม.4 บ้านโป่งกะสัง	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
52	ม.3 บ้านหาดขาม	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
53	ม.7	ท่าเรือ	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
54	ม.7	ท่าเรือ	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
55	วัดเทวธรรม ม.3 บ้านศาลตึก	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
56	ม.6 บ้านหนองสองตอน	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
57	ม.2 บ้านห้วยนาคราช	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
58	ม.2 บ้านห้วยนาคราช	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
59	ม.2 บ้านห้วยนาคราช	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
60	ม.1 ซ.12 บ้านกร่างทอง	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
61	ม.1 ซ.13 บ้านกร่างทอง	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
62	วัดสันติคีรีศรีบรมธาตุ ม.5	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight (cont.)

No.	Sampling location			
63	ม.2 บ้านสำนักคร้อ	ตะคร้ำเอน	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
64	ม.1 บ้านท่ากระบือ	เกาะสำโรง	เมือง	กาญจนบุรี
65	ม.7 หนองยายทรัพย์	สระยายโสม	อู่ทอง	สุพรรณบุรี
66	ม.4 บ้านโซ่ง	สระยายโสม	อู่ทอง	สุพรรณบุรี
67	บ้านทองลุ่ม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
68	บ้านทองลุ่ม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
69	บ้านทองลุ่ม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
70	ม.3 บ้านดอนบุปผา	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
71	ม.3 บ้านดอนบุปผา	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
72	ม.5 บ้านกล้วย	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
73	วัดโพธิ์ศรีเจริญ ม.6 บ้านดงตาป้อม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
74	วัดโพธิ์ศรีเจริญ ม.6 บ้านดงตาป้อม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
75	ม. 4 บ้านปู่เจ้า	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
76	ม. 4 บ้านปู่เจ้า	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
77	วัดดงขี้เหล็ก ม.4 บ้านดงขี้เหล็ก	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
78	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
79	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
80	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
81	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
82	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
83	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
84	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
85	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
86	ม.6	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
87	117/1 ม.11	หนองงูเหลือม	เมือง	นครปฐม
88	ม.8	ห้วยหมอนทอง	กำแพงแสน	นครปฐม
89	ม.9 บ้านหนองขี้แรด	ตะคร้ำเอน	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
90		วังขนาย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight (cont.)

No.	Sampling location			
91	ม.6	วังขนาย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
92	ม.6	วังขนาย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
93	ม.1 บ้านป่ากระพุ่ม	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
94	ม.1 บ้านป่ากระพุ่ม	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
95	ม.5 บ้านหนองโรง	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
96	ม.2 บ้านหนองเหมือง	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
97	ม.2 บ้านหนองเหมือง	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
98	ม.1 บ้านตาลพร้า	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย
99	ม.6 บ้านบึงงาม	นครเดิฐ	ศรีนคร	สุโขทัย
100	ม.6 บ้านบึงงาม	นครเดิฐ	ศรีนคร	สุโขทัย
101	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย
102	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย
103	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย
104	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย
105	ม.5 บ้านหนองสนวน	กุดโบสต์	เสิงสาง	นครราชสีมา
106	ม.7 บ้านหนองแดง	กุดโบสต์	เสิงสาง	นครราชสีมา
107	ม.7 บ้านหนองแดง	กุดโบสต์	เสิงสาง	นครราชสีมา
108	ม.7 บ้านหนองตูม	สุขไพบูลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา
109	ม.6 บ้านหนองเข้	สุขไพบูลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา
110	ม.6 บ้านหนองเข้	สุขไพบูลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา

Figure 1 Symptoms of taro leaf blight on leaf and petiole

Figure 2 Symptoms of taro leaf blight on the upper leaf surface (dark brown flecks or light brown spots, circular, zonate, some with yellow halos) (left) and on the lower leaf surface, spots have a water-soaked, or dry gray appearance (right)

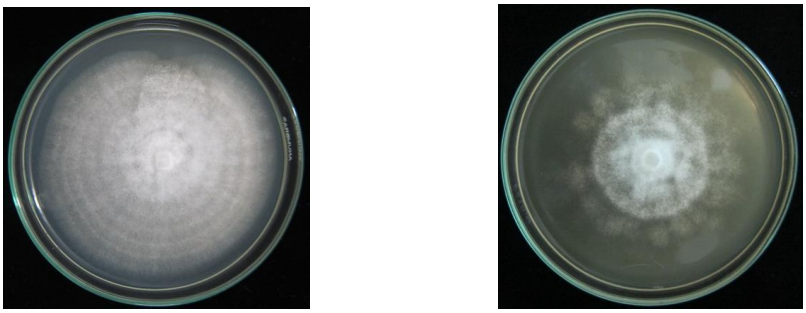

Figure 3 Colony types of *Phytophthora* isolated from taro on Potato dextrose agar (PDA) after 9 days incubation (left) and on Carrot agar (CA) after 11 days incubation (right)

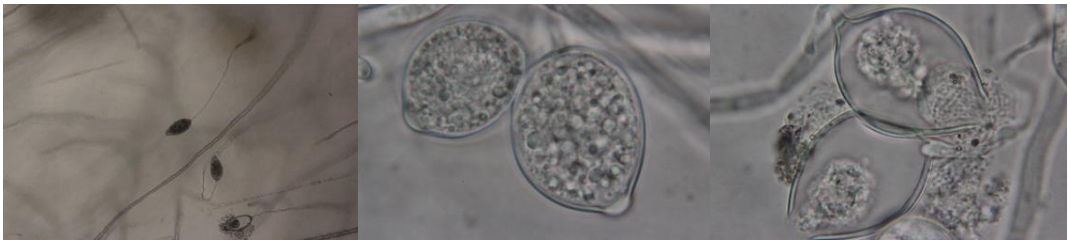

Figure 4 Microscopic view of mycelium and sporangium of *Phytophthora* on Potato dextrose agar (PDA)

Figure 5 Microscopic view of sporangium of *Phytophthora* on Carrot agar (CA)