การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris*

Identification of *Curvularia* and *Bipolaris*

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

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างโรคพืชจากแปลงปลูกพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้าวโพด ข้าว และปาล์มน้ำมัน โดยเก็บจากพื้นที่เพาะปลูกในจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้ จังหวัดลพบุรี เพชรบูรณ์ พะเยา ลำพูน ตาก เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา และสุราษฎร์ธานี ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 - เดือนกันยายน 2560 แยกราจากตัวอย่างโรคพืชด้วย วิธี tissue transplanting สามารถแยกรา *Curvularia* spp. ได้จำนวน 11 ไอโซเลท และรา *Bipolaris* spp. ได้จำนวน 9 ไอโซเลท ทำการเก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์เพื่อจัดจำแนกชนิดต่อไป และได้ตัวอย่างแห้งโรคพืชเข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืช จำนวน 37 ตัวอย่าง

คำหลัก : โรคใบจุด โรคใบไหม้ *Curvularia Bipolaris*

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-02-60

คำนำ

ราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* (Teleomorph: *Cochiobolus* Drechsler) สามารถพบได้ทั่วไปและเป็นสาเหตุของโรคพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น ใบจุดปาล์มน้ำมัน ใบจุดสีน้ำตาลของข้าว โรคเมล็ดด่างข้าว โรคใบจุดข้าวลาสี และโรคใบไหม้ข้าวโพด (จิตรา, 2557; กลุ่มอารักขาพืช สำนักงานเกษตรจังหวัดกาญจนบุรี, 2558; Manamgoda *et al*., 2011; 2012) และมีรายงานเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญในข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลี ได้แก่ โรค root rot leaf spot และ seedling blight (Knight *et al*, 2010; Kumar *et al*, 2002; Gurung *et al*., 2013)

Torres *et al*. (2015) รายงาน *Curvularia gladioli* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดที่สำคัญของ gladiolus นอกจากนี้มีรายงานการพบโรคใบจุดในอ้อยเป็นครั้งแรกในประเทศจีน ซึ่งมีเชื้อรา *Bipolaris spicifera* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค (Lin *et al*., 2012)

ประเทศไทย พีระวรรณ และคณะ (2553) ทำการสำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อราสกุล *Curvularia* โดยเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และใบจุด มาทำการแยกเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสามารถแยกได้เชื้อ *Curvularia* ทั้งหมด 45 ไอโซเลท โดยแยกเชื้อสาเหตุได้จากพืชที่เป็นโรคต่างๆ ดังนี้ โรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดด่างข้าว โรคใบจุด โรคใบไหม้เยอบีร่า โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สบู่ดำ โรคใบไหม้วัชพืชหญ้ายาง โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน โรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนดอกไม้สกุลหวาย โรคจุดบนกล้วยไม้สกุลออยเดียม โรคใบแกลดดิโอลัส โรคใบไหม้ลิ้นมังกรใบจุดบานชื่นและฝักจุดกระเจี๊ยบแดง ซึ่งจากรายงานดังกล่าวในข้างต้นพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถพบก่อโรคได้ในพืชทุกชนิดและก่อให้เกิดปัญหาผลผลิตลดลงและไม่ได้มาตรฐาน ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการสำรวจ เก็บรวบรวม และจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* เพื่อทราบถึงการระบาดและเพื่อศึกษาหาแนวทางในการป้องกันกำจัดและลดปัญหาการเกิดโรคจากเชื้อสาเหตุทั้ง 2 ชนิดนี้ เพื่อเพิ่มผลผลิตที่มีคุณภาพและสามารถส่งออกได้มากยิ่งขึ้น ส่งผลต่อความเจริญก้าวหน้าทางเศรษฐกิจทั้งในประเทศและต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ มีด กรรไกร กรรไกรตัดกิ่ง ถุงพลาสติก กระดาษบันทึก ปากกาเคมี เครื่องระบุพิกัด
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บีกเกอร์ สไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด ด้ามมีด
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อม กล้องถ่ายภาพ
6. camera lucida สำหรับวาดภาพเชื้อรา

7. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), ½Potato Dextrose Agar (½PDA) และ Potato Dextrose Agar (PDA)

8. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และเอธิลแอลกอฮอล์ 75%

9. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแห้ง ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ ไม้อัดตัวอย่าง กระดาษฟาง และซองกระดาษสำหรับใส่ตัวอย่าง

วิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแปลงปลูกพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด ข้าว ข้าวฟ่าง อ้อย ปาล์มน้ำมัน แก้วมังกร และกล้วยไม้ เป็นต้น จากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย เช่น จังหวัดนครราชสีมา ศรีสะเกษ อุบลราชธานี ขอนแก่น เพชรบูรณ์ ลพบุรี นครสวรรค์ สระบุรี พิษณุโลก สุโขทัย เชียงใหม่ สุราษฎร์ธานี กระบี่ นครศรีธรรมราช เป็นต้น ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดทับตัวอย่างแห้งจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- แยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือโคนิเดีย (conidia) โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยส่วนของรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำชิ้นพืชไปวางบนอาหาร ½PDA PDA หรือ WA บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน เมื่อพบเส้นใยของราที่เจริญออกจากชิ้นพืชให้ทำการแยกราบริสุทธิ์เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และเก็บรักษาสายพันธุ์ราเพื่อศึกษาต่อไป

3. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย ก้านชูสปอร์ (conidiophores) โคนิเดีย (conidia) และโครงสร้างอื่น ๆ เช่น fruiting body, ตำแหน่งการเกิดของสปอร์ เป็นต้น โดยการใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยโครงสร้างของรานำมาวางบนแผ่นสไลด์

และหยดด้วยน้ำ หรือ shear's solution ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์และนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี ขนาด และสี ลักษณะของเส้นใย ลักษณะของก้านชูสปอร์ และลักษณะของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ

- จำแนกชนิดของรา ตามเอกสารของ Ellis (1971, 1976)

4. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างโรคพืช จากจังหวัดลพบุรี เพชรบูรณ์ พะเยา ลำพูน ตาก เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา และสุราษฎร์ธานี (ตารางที่ 1) ได้ตัวอย่างโรคพืช (ภาพที่ 1) และตัวอย่างแห้งโรคพืชที่เกิดจากรา *Curvularia* และ *Bipolaris* เพื่อเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช 37 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนำมาแยกรา *Curvularia* spp. ได้ 11 ไอโซเลท และรา *Bipolaris* spp. ได้ 9 ไอโซเลท (ภาพที่ 2 และ 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืชในช่วงเดือนกันยายน 2559 - กันยายน 2560 จากจังหวัดลพบุรี เพชรบูรณ์ พะเยา ลำพูน ตาก เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา และสุราษฎร์ธานี และแยกราจากตัวอย่างโรคพืชได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท ดังนี้ รา *Curvularia* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท และรา *Bipolaris* spp. จำนวน 9 ไอโซเลท และได้ตัวอย่างแห้งโรคพืชเข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 37 ตัวอย่าง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูลในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มอารักขาพืช สำนักงานเกษตรจังหวัดกาญจนบุรี กรมส่งเสริมการเกษตร. 2558. แจ้งเตือนภัยการระบาดศัตรูพืช. ปีที่ 4 ฉบับที่ 12.

จิตรา เกาะแก้ว. 2547. ความหลากหลายของเชื้อราบนวัชพืชที่เป็นโรคในแปลงผักและแนวทางการนำมาใช้ควบคุมวัชพืชทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พีระวรรณ พัฒนวิภาส ทัศนาพร ทัศคร ธารทิพย ภาสบุตร. 2553. สำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อรา *Curvularia* spp.*ใน* ผลงานวิจัยและพัฒนา ปี 2553. น. 1782-1793.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surry.

Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surry.

Gurung, S., B. N. Mahto, S. Gyawali and T. B. Adhikari. 2013. Phetypic and molecular diversity of *Cochlibolus sativus* populations from wheat. Plant Disease. 97:62-73.

Manamgoda, D.S., L. Cai, A.H. Bahkali, E. Chukeatirote and K.D. Hyde. 2011. *Cochlibolus*: an overview and current status of species. Fungal Diversity. 51(1): 3-42.

Manamgoda, D. S., L. Cai, E. H. C. McKenzie, P.W. Crous, H. Madrid, E.i Chukeatirote, R. G. Shivas, Y. P. Tan and K. D. Hyde. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris - Cochliobolus - Curvularia* Complex. Fungal Diversity 56:131–144.

Knight, N. L., G. J. Platz, A. Lehmensiek and M. W. Sutherlan. 2010. An investigation ofgenetic variation among Australian isolates of *Bipolaris sorokiniana* from different cereal tissues and comparison of their abilities to cause spot blotch on barley. Australasian Plant Pathology. 39:207-216.

Kumar,J., P. Schäfer, R. Hückelhoven, G. Langen, H. Baltruschat, E. Stein, S. Nagarajan and KH. Kogel. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better controldouble dagger. Molecular Plant Pathology. 3(4): 185-195.

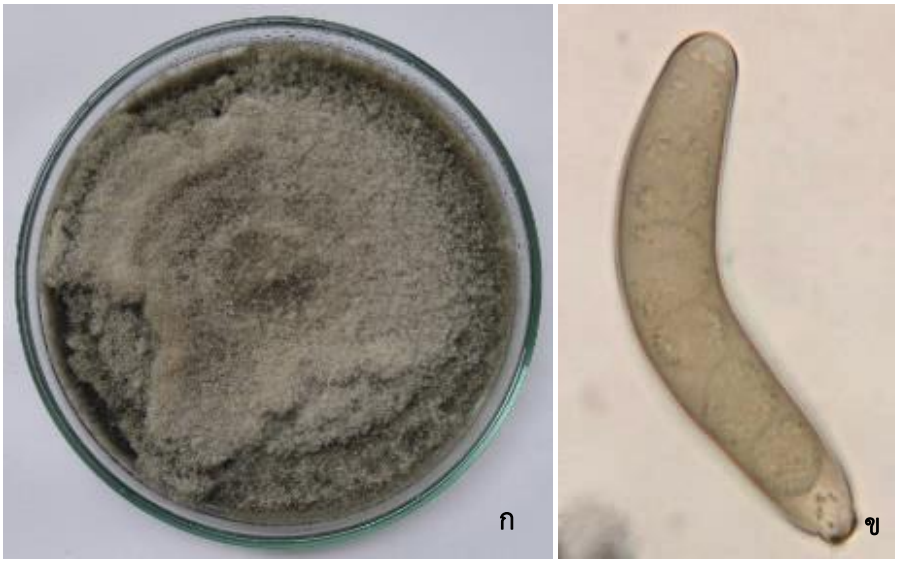
Lin. S.H., C.H. Huang, Z.Y. Deng, M.X. Yan, W.H. Huang, J.J. Wei and Z.Q. Qin. 2012. First report of leaf spot disease on sugarcane caused by *Bipolaris spicifera* in China. Australasian Plant Disease 7: 51-53.

Torres, D. P., M. A. Silva and G. Q. Furtado. 2015. Infection process of Curvularia gladioli on Gladiolus leaves. Tropical Plant Pathology. 40(6):382-387.

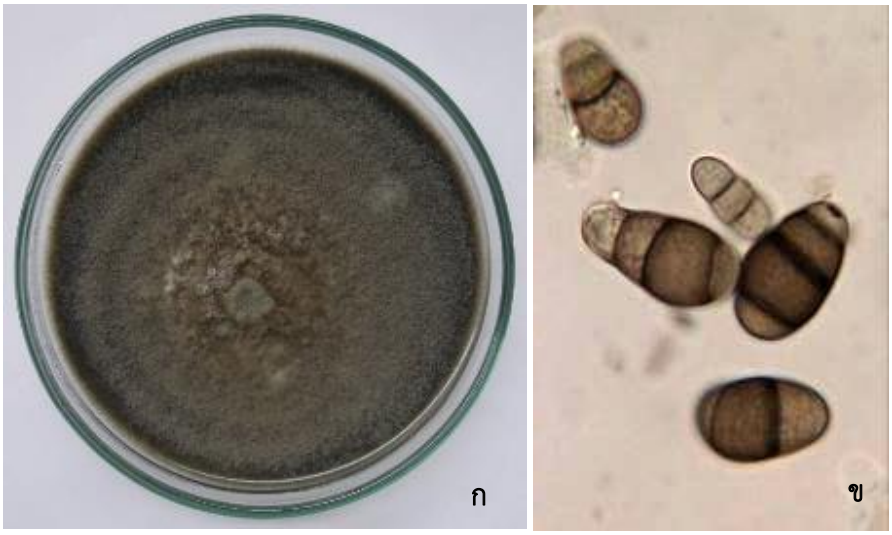
ตารางที่ 1 ตัวอย่างโรคพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* ที่ทำการเก็บจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ระหว่าง เดือนตุลาคม 2559 - เดือนกันยายน 2560

ชื่อพืช	สถานที่	จำนวนตัวอย่าง
ข้าวโพด	บ้านเขาศิริบรรพต ต.ชัยนารายณ์ อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	2
ข้าวโพด	ต.นางั่ว อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์	1
ข้าวโพด	ต.เขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์	2
ข้าว	ต.เขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์	1
ข้าวโพด	ต.ทุ่งสมอ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์	2
ข้าวโพด	ต.สระ อ.เชียงม่วน จ.พะเยา	2
ข้าวโพด	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก	1
ข้าวโพด	บ้านหัวเมืองงาม ต.ท่าดอน อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่	3
ข้าวโพด	อ.ไชยปราการ จ.เชียงใหม่	2
ข้าวโพด	อ.แม่สรวย จ.เชียงราย	4
ข้าวโพด	บ้านห้วยล้าน อ.แม่สรวย จ.เชียงราย	3
ข้าวโพด	บ้านห้วยพลับพลา ต.โป่แพร่ อ.แม่ลาว จ.เชียงราย	1
ข้าวโพด	ต.ป่าตึง อ.แม่จัน จ.เชียงราย	1
ข้าวโพด	บ้านเล่าฟู ต.ป่าตึง อ.แม่จัน จ.เชียงราย	1
มะพร้าว	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ ต. ท่าอุแท อ. กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี	2
ปาล์มน้ำมัน	ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ ต. ท่าอุแท อ. กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี	2
ข้าวโพด	อ.ลี้ จ.ลำพูน	3
ข้าวโพด	อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	2
ข้าวโพด	อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	2
	รวม	**37**

ภาพที่ 1 ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคใบจุดและโรคใบไหม้ที่เกิดจากราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* ที่เก็บจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนี (ก) และโคนิเดีย ขนาด 100X (ข) ของรา *Curvularia* sp.



ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนี (ก) และโคนิเดียม ขนาด 100X (ข) ของรา *Bipolaris* sp.