

การศึกษาความรุนแรงในระดับแปลงปลูกและทดสอบปฏิกิริยาต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราของ เชื้อรา *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคต้นแตกยางไหลของพืชตระกูลแตง

Field severity and fungicide reaction of *Didymella bryoniae* casual agent of gummystem blight in cucurbits

พัชรภรณ์ บุษอม^{1,2} และ พิศาล ศิริธร^{2,3}

Pacharaporn Buhome^{1,2} and Pisan Sirithorn^{2,3}

บทคัดย่อ: โรคต้นแตกยางไหลทำความเสียหายให้กับผลผลิตพืชตระกูลแตงและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี แม้มีการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราแล้วก็ตาม ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบถึงความรุนแรงของโรคต้นแตกยางไหล (gummy stem blight) ที่เกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae* และปฏิกิริยาของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยการเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคต้นแตกยางไหลและมีจุดดำ (pycnidium) ในแปลงปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 55 ตัวอย่าง มาศึกษารูปร่างและ ขนาดสปอร์พบว่ามีความเพียง จำนวน 18 ตัวอย่าง ซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคต้นแตกยางไหล จากนั้นนำมาตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ RG I specific primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *D. bryoniae* และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนการศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD บนอาหารที่ผสมสาร benomyl , chlorothalonil , pyraclostrobin และ mancozeb ความเข้มข้น 4 ระดับ พบว่าปฏิกิริยาของเชื้อราต่อสาร benomyl มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ทุกระดับความเข้มข้น ส่วนสาร chlorothalonil และ pyraclostrobin มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ความเข้มข้น 3 ระดับแรก แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด โดยเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโต เช่นเดียวกับสาร mancozeb ทุกระดับความเข้มข้น

คำสำคัญ: *Phoma cucurbitacearum* พินิดิเทียมโรคต้นแตกยางไหล

¹ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น , ขอนแก่น 40002

¹ Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University , Khon Kaen 40002

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ, กรุงเทพฯ

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok

³ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร เพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น , ขอนแก่น 40002

³ Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: pissir@kku.ac.th

Abstract: Gummy stem blight is a serious disease considerable damage to cucurbit production and increasing every year. Therefore, this study aimed to evaluate the field severity of gummy stem blight disease (GSB) caused by *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm. and its reaction to the fungicides. The 55 diseased samples with presence of pycnidia in the seed production field in the Northeast of Thailand were collected for preliminary study on symptomology and morphology and size of spore. It showed that only 18 samples were infected by *D. bryoniae*. Furthermore, *D. bryoniae* isolates from those diseased samples were isolated and confirmed by polymerase chain reaction (PCR) using RG I specific primer, sequence of PCR product fragment. Then the fungicide reaction of the isolates were investigated by employing completely randomized design (CRD). The result indicated that reaction of all isolates to four fungicides including benomyl, chlorothalonil, pyraclostrobin and mancozeb at four concentrations was statistically significant difference.

Key words: *Phoma cucurbitacearum* , Pycnidium, Gummy stem blight

บทนำ

พืชตระกูลแตง (cucurbitaceae) เป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมปลูกกันมากทั้งในประเทศและต่างประเทศ เพื่อรับประทานผลสดและเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งออกต่างประเทศ การปลูกนั้นมักเกิดปัญหาของโรคที่ทำความเสียหายทำให้ผลผลิตลดลงและยังสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งในการนำเชื้อสาเหตุโรคพืชเข้าไปยังแหล่งปลูกใหม่ และเป็นแหล่งอาศัยข้ามฤดูของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Maddox, 1998 อ้างตาม อัญชนา, 2549) โดยเฉพาะโรคต้นแตกยางไหล (gummy stem blight disease) ที่เกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw) Rehm. มีรายงานการเกิดโรคกับ แตงโม แตงกวา แตงเทศ ฟักทอง สควอช และแคนตาลูป (Sudisha. et al., 2006) โดยเชื้อราที่สร้างจุดสีดำเล็กๆ (pycnidium) บริเวณอาการของโรคซึ่งใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้นในแปลงปลูก จากการตรวจแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โรคต้นแตกยางไหลมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี แม้เกษตรกรภายใต้คำแนะนำและการกำกับดูแลของบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์ยังใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราแล้วก็ตาม ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินความรุนแรงของโรคต้นแตก

ยางไหลที่เกิดจากเชื้อรา *D. bryoniae* ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง พร้อมทั้งศึกษาปฏิกิริยาต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราของเชื้อรา *D. bryoniae*

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาความรุนแรงของโรคต้นแตกยางไหลที่เกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae*

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการใบไหม้ ลำต้นแตกน้ำยางไหล และมีการสร้าง pycnidium บริเวณแผลเป็นโรค ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แล้วนำมาตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาลักษณะอาการ และรูปร่างพร้อมทั้งขนาดสปอร์ โดยวัดความกว้างและความยาวของสปอร์แต่ละตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อการจำแนกเชื้อราดังกล่าว แล้วทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (isolation) เพื่อศึกษาต่อไป จากนั้นนำเชื้อรา 18 ไอโซเลตที่มีขนาดสปอร์คล้ายคลึงกับเชื้อรา *D. bryoniae* มาทำการยืนยันด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยทำการสกัด genomic DNA ตามวิธีของ Suriyawanakul, (2010) จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณ genomic DNA ของเชื้อราด้วย RG I specific primer สำหรับเชื้อรา *D. bryoniae*

(Somai and Keinath, 2002) จากนั้นนำผลผลิต DNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาหาลำดับเบส (sequencing)

2. การศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อรา *Didymella bryoniae* ด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicides)

การทดสอบปฏิกิริยาต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราของเชื้อราสาเหตุโรคแตงจำนวน 18 ไอโซเลต โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลองกับสารเคมี 4 ชนิด คือ benomyl, chlorothalonil, pyraclostrobin และ mancozeb แต่ละชนิดทำการทดลอง 4 ระดับความเข้มข้น (benomyl และ chlorothalonil 0, 250, 500 และ 1,000 ppm ส่วนสาร Pyraclostrobin 0, 188, 375 และ 750 ppm และสาร mancozeb 0, 500, 1,000, 2,000 ppm และใช้ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ (replication) โดยเลี้ยงเชื้อราดังกล่าว บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วจะปลายเส้นใยของเชื้อรา ไอโซเลตต่างๆ นำมาวางเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารความเข้มข้นต่างๆและไม่ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา บ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเป็นเวลาอย่างน้อย 5 วัน หลังบ่ม แล้วนำผลไปวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการศึกษา

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่เป็นโรคในแหล่งปลูกผลิตเมล็ดพันธุ์ทั้งหมดจำนวน 55 ไอโซเลต มาศึกษารูปร่าง และวัดขนาดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีรูปร่างและขนาดสปอร์อยู่ระหว่าง $2.5-5 \times 4-9 \mu\text{m}$ จำนวน 18 ตัวอย่าง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 32.7% ส่วนอีก 37 ตัวอย่าง มีรูปร่างและขนาดสปอร์อยู่ระหว่าง $10-18 \times 20-33 \mu\text{m}$ ใกล้เคียงกับเชื้อรา *Phylospora rhodina* สาเหตุโรคยางไหล (gummosis) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 67.3% เมื่อนำเชื้อรา 18 ไอโซเลตที่มี

ขนาดสปอร์คล้ายคลึงกับเชื้อรา *D. bryoniae* (Figure 1) มาทำการยืนยัน โดยนำมาเพิ่มปริมาณ genomic DNA ด้วย RG I specific primer ของเชื้อรา *D. bryoniae* โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ genomic DNA ขนาด 750 bp. ซึ่งตรงกับรายงานของ Somai and Keinath (2002) จากนั้นนำ band เป้าหมายไปวิเคราะห์หาลำดับเบสพบว่ามีความเหมือนกันทางพันธุกรรมกับเชื้อรา *D. bryoniae* ดัชนีถึง 99 % ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าทั้ง 18 ไอโซเลต เป็นเชื้อรา *D. bryoniae* ส่วนการศึกษาปฏิกิริยาต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราของเชื้อรา *D. bryoniae* พบว่าการศึกษาปฏิกิริยาของเชื้อราต่อสาร benomyl มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ทุกระดับความเข้มข้น โดยทุกไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้ ส่วนสาร chlorothalonil มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 ppm. ได้แก่ ไอโซเลต WL-A-8 และ MS-DB052 ทำนองเดียวกันกับสาร pyraclostrobin ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเข้มข้น 188 และ 375 ppm. ได้แก่ ไอโซเลต MS-DB053, MS-DB052 และ CUS-DB002 แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด โดยเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตเช่นเดียวกับสาร mancozeb เชื้อดังกล่าวไม่สามารถเจริญเติบโตได้ทุกระดับความเข้มข้น (Table 1)

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคต้นแตงยางไหลและมีการสร้าง pycnidium นั้นพบว่าส่วนเกิดจากเชื้อรา *P. rhodina* จำนวนตัวอย่างคิดเป็น 67.3% และเกิดจากเชื้อรา *D. bryoniae* จำนวนตัวอย่างคิดเป็น 32.7% จึงชี้ให้เห็นว่าการวินิจฉัยเบื้องต้น

ในแปลงโดยดูเพียงลักษณะอาการลำต้นแตงน้ำยางไหล ใบไหม้และผลเน่าที่มีการสร้าง pycnidium เพียงอย่างเดียวแล้วยืนยันว่าเป็นโรคต้นแตงยางไหลที่เกิดจากเชื้อรา *D. bryoniae* นั้นอาจเกิดการผิดพลาดได้ ดังนั้นควรนำตัวอย่างกลับมาตรวจสอบรูปร่างและขนาดสปอร์ในห้องปฏิบัติการเพื่อการยืนยันผลการตรวจด้วย เมื่อนำเชื้อรานี้มาทดสอบกับสารป้องกันกำจัดเชื้อรานั้นพบว่าเชื้อรา *D. bryoniae* ทุกไอโซเลตสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา benomyl แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ผสมสาร chlorothalonil และ pyraclostrobin ในระดับความเข้มข้นตามอัตราแนะนำในฉลาก ดังนั้นชี้ให้เห็นว่าเชื้อรามีความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา benomyl เป็นสารในกลุ่ม Benzimidazole เป็นสารประเภทดูดซึมที่มีฤทธิ์ควบคุมเชื้อราได้กว้างขวาง โดยเข้าทำลายเชื้อเฉพาะจุด (single site action) เมื่อใช้ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานานทำให้การควบคุมเชื้อราไม่ได้ผล นอกจากนั้นยังพบว่า mancozeb สามารถนำมาใช้ควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* ได้ดีซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Keinath (2002) แต่เกษตรกรต้องใช้ในอัตราตามคำแนะนำอย่างเคร่งครัด หากเกษตรกรใช้ในอัตราที่น้อยกว่าอัตราแนะนำก็ไม่สามารถควบคุมการระบาดของโรคนี้ได้เนื่องจากมีเชื้อรา *D. bryoniae* บางไอโซเลตสามารถเจริญได้

คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

- มนัสวี สุริยวานากุล. 2553. การพัฒนาเทคนิค RAPD, SCAR marker และ DNA probe ในการบ่งชี้เชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อัญชนา อินทรกำแหง. 2550. การพัฒนา specific primer สำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตง ด้วยเทคนิค Bio-PCR. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Keinath, A.P. 2002. Survival of *Didymella bryoniae* in butted watermelon vines in South Carolina. Plant Disease 86 : 32-38.
- Somai, B.M., and A.P. Keinath. 2002. Development of PCR-ELISA for detection and differentiation of *Didymella bryoniae* from related *Phoma* species. Plant Disease 83 : 710-716.
- Sudisha, J., S.R. Niranjana, S. Umesh, H.S. Prakash, and H.S. Shetty. 2006. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and effect of seed treatment on disease incidence and fruit yield. Biological Control 37 : 196-205.

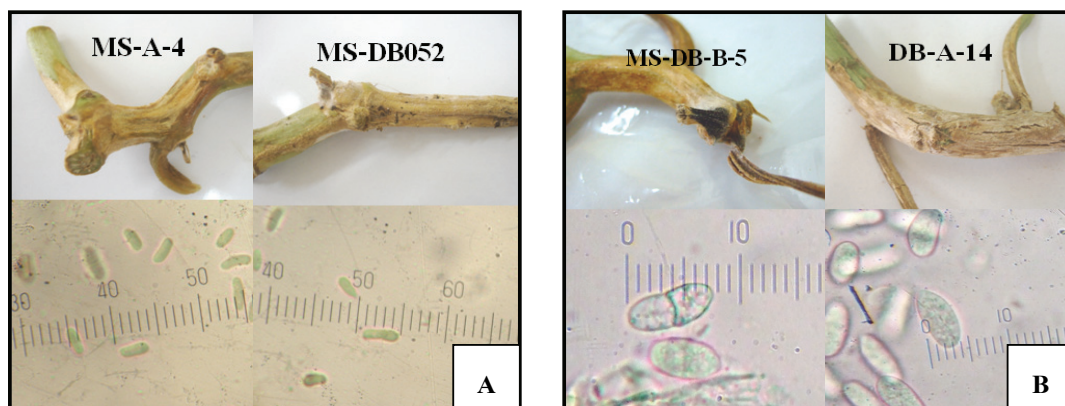


Figure 1 Size of spore of 55 diseased samples with presence of pycnidia in the seed production field in

The Northeast

A : *Didymella bryoniae* : conidia 2.5-5×4-9 μm 18 samples (32.7%)

B : *Physalospora rhodina* : conidia 10-18×20-33 μm 37 samples (67.3%)

Table 1 Effect of fungicides on the colony growth of *Didymella bryoniae*

Clear zone measured 5 day (cm.) after incubation at 28 °C																
Isolate	Benomyl ((mg/l)				Chlorothanil (mg/l)				Pyraclostrobin (mg/l)				Mancozeb (mg/l)			
	0	375	750	1,500	0	250	500	1,000	0	188	375	750	0	500	1,000	2,000
WL-A-1	2.770 abc	2.550 bc	1.350 h	1.100 h	2.625 abc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	2.625 abc	0.500 c	0.500 c	0.500 a	2.875 ab	0.500 a	0.500 a	0.500 a
WL-A-2	2.120 def	3.000 a	1.950 c	2.175 ab	2.450 abc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	2.450 abc	0.500 c	0.500 c	0.500 a	2.650 abc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
MS-A-4	2.875 abc	1.825 h	1.750 f	1.150 h	2.775 ab	0.500 c	0.500 b	0.500 a	2.775 ab	0.500 c	0.500 c	0.500 a	2.125 abc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
WL-A-8	2.200 edf	2.725 ab	1.850 f	1.950 b	2.200 abc	1.650 b	0.500 b	0.500 a	2.200 abc	0.500 c	0.500 c	0.500 a	2.000 abc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
ML-A-12	1.880 ef	2.000 gh	1.825 f	1.800 cd	1.750 c	0.500 c	0.500 b	0.500 a	1.880 bcd	0.500 c	0.500 c	0.500 a	1.750 c	0.500 a	0.500 a	0.500 a
MS-DB053	1.820 ef	2.300 d	1.950 c	2.325 a	1.730 c	0.500 c	0.500 b	0.500 a	1.825 cd	2.200 a	2.625 a	0.500 a	1.730 c	0.500 a	0.500 a	0.500 a
MS-DB052	3.020 ab	2.625 ab	2.275 b	1.425 f	3.025 a	2.775 a	2.175 a	0.500 a	3.025 a	1.400 b	0.500 c	0.500 a	2.525 abc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
SQL-DB048	2.475 cd	2.600 bc	2.150 b	1.275 g	2.475 abc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	2.475 abc	0.500 c	0.500 c	0.500 a	3.000 a	0.500 a	0.500 a	0.500 a
WS-DB046	1.717 f	2.875 ab	2.600 a	1.900 bc	1.717 c	0.500 c	0.500 b	0.500 a	1.717 d	0.500 c	0.500 c	0.500 a	1.702 c	0.500 a	0.500 a	0.500 a
MS-DB051	2.050 ef	1.275 j	1.000 i	1.900 bc	1.775 c	0.500 c	0.500 b	0.500 a	1.775 cd	0.500 c	0.500 c	0.500 a	1.800 bc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
MS-DB055	2.175 de	1.975 g	2.175 b	2.000 ab	1.975 bc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	1.975 bcd	0.500 c	0.500 c	0.500 a	2.275 abc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
ML-DB054	1.925 ef	2.450 cd	1.875 e	1.625 d	2.175 abc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	2.300 abc	0.500 c	0.500 c	0.500 a	1.775 bc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
MSE-DB018	2.25 cde	1.550 i	1.875 e	1.700 c	2.300 abc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	2.150 abc	0.500 c	0.500 c	0.500 a	2.150 abc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
WL-DB047	1.825 ef	2.275 de	2.075 bc	1.500 ef	1.950 bc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	1.950 bcd	0.500 c	0.500 c	0.500 a	2.275 abc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
WL-DB049	1.702 f	2.100 f	2.075 bc	1.000 i	1.700 c	0.500 c	0.500 b	0.500 a	1.650 d	0.500 c	0.500 c	0.500 a	1.767 bc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
CUS-DB002	3.250 a	2.200 e	1.925 d	1.950 bc	2.200 abc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	1.925 bcd	1.550 b	1.375 b	0.500 a	1.925 abc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
MS-DB012	1.950 ef	1.975 g	1.600 g	1.825 cd	1.800 bc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	1.950 bcd	0.500 c	0.500 c	0.500 a	1.810 bc	0.500 a	0.500 a	0.500 a
CUFR-DB056	2.175 def	2.175 e	2.125 bc	1.825 cd	2.125 abc	0.500 c	0.500 b	0.500 a	2.175 abc	0.500 c	0.500 c	0.500 a	2.925 a	0.500 a	0.500 a	0.500 a
C.V. (%)	21.26	12.1	7.69	14.27	24.5	35.91	10.4	0	22.1	25.02	13.77	0	27.1	0	0	0

Average of four replications. Means followed by the same letter within a column are not significantly different by LSD.

** = significant at < P 0.01, ns = non - significant