Agricultural Sci. J. 44 : 3 (Suppl.) : 125-128 (2013) ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 125-128 (2556)

ชีววิทยาของเชื้อรา *Phomopsis* species สาเหตุโรคใบจุดและผลเน่าของทุเรียน (*Durio zibethinus* L.)

Biology of *Phomopsis* species Causal Agent of Leaf Spot and Fruit Rot on Durian (*Durio zibethinus* L.)

วีระณีย์ ทองศรี[1] พงศกร เพลินสุข[2] กัลยา พวงขจร[2] และสมศิริ แสงโชติ[1]

Veeranee Tongsri[1] Pongsakorn Pleansook[2] Kanlaya Poungkajohn[2] and Somsiri Sangchote[1]

Abstract

Phomopsis species is the one of important pathogenic fungi that can cause leaf spot and fruit rot of durian. These infected leaves can be the source of inoculum which infected the fruit. Therefore, this research was investigated on preliminary biology of *Phomopsis*. In this study, diseased samples of fruit rot and leaf spot were collected from durian orchard in Chantaburi Province, and isolated by Tissue Transplanting Technique. The result showed that Phomopsis cultures obtained from both fruit and leaf had different colony color - white to grayish green. These pathogens were separated to be different isolates according to their colors. These isolates of *Phomopsis* were evaluated on mycelial growth and pycnidial production on four culture media including carrot agar (CA) potato carrot agar (PCA) half potato dextrose agar (half PDA) and durian leaf extract agar (DLA) and incubated in two different conditions - room temperature (28-32ºC) and growth chamber (25ºC, light/dark 12/12 h). It showed that the highest mycelial growth was obtained on PCA and half PDA, whereas pycnidial production was greatly shown on CA and PCA which incubated at room temperature, but showed small amount of conidia. The best quality and proper amount of conidia for further study were induced by using sterile durian leaf tissues. This technique could reduce the incubation period for conidial production from 1 month on culture media to be 5-6 days on leaf tissues.

Keywords: Culture media, mycelial growth, pycnidial production

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Phomopsis* species เป็นหนึ่งในเชื้อราที่มีความสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดและผลเน่าในทุเรียน ซึ่งเชื้อที่มีอยู่แล้วในแปลงปลูกจะเป็นแหล่งของเชื้อที่ทำให้เกิดอาการผลเน่าในภายหลังได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อเพื่อให้เกิดความเข้าใจในเบื้องต้น โดยทำการแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue Transplanting Technique จากบริเวณผลเน่าและอาการใบจุดจากแหล่งปลูกจังหวัดจันทบุรี พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากทั้งในส่วนของผลและใบมีความหลากหลายในลักษณะสีของโคโลนี ตั้งแต่สีขาวจนถึงสีเขียวปนเทา จึงแบ่งเชื้อราออกเป็นไอโซเลทต่างๆ ตามความแตกต่างกันของสี และเมื่อนำเชื้อรามาทดสอบการเจริญบนอาหารต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ carrot agar (CA) potato carrot agar (PCA) half potato dextrose agar (half PDA) และ durian leaf extract agar (DLA) โดยบ่มเชื้อไว้ใน 2 สภาพ คือ สภาพอุณหภูมิห้อง (28-32ºซ) และตู้ควบคุมอุณหภูมิ (25ºซ สว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง) พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตดีที่สุดบนอาหาร PCA และ half PDA และสร้าง pycnidium มากที่สุดบนอาหาร CA และ PCA ซึ่งบ่มในอุณหภูมิห้อง แต่พบปริมาณการสร้าง conidia น้อยมาก จึงทำการกระตุ้นให้มีการสร้าง conidia บนเนื้อเยื่อใบทุเรียนที่ปลอดเชื้อเพื่อให้มีคุณภาพที่ดีและมีปริมาณที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการทดลองต่อๆ ไป ซึ่งพบว่า เชื้อราสามารถสร้าง pycnidium ได้เร็วกว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 1 เดือน เป็น 5-6 วันบนเนื้อเยื่อพืช

คำสำคัญ: อาหารเลี้ยงเชื้อ การเจริญของเส้นใย การสร้าง pycnidium

คำนำ

เชื้อรา *Phomopsis* spp. สาเหตุโรคใบจุด (Phomopsis leaf spot) ในทุเรียน ปัจจุบันพบโรคดังกล่าวแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้าง โดยเฉพาะในแหล่งปลูกทุเรียนแถบภาคตะวันออกของประเทศไทย เชื้อราสาเหตุโรคสามารถก่อให้เกิดอาการใบจุดได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงต้นโต โดยเฉพาะในระยะใบแก่ ซึ่งพบอาการใบจุดกระจัดกระจายทั่วไปอย่างหนาแน่น จึง

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhaen Campus, Bangkok

[2] นิสิตปริญญาตรี คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

[2] Undergraduate Student, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhaen Campus, Bangkok

ส่งผลรบกวนกระบวนการสังเคราะห์แสง หรือกระบวนการเมตาบอลิซึมอื่นๆ ของพืชได้ (Hwang *et al.*, 2006) อาการโรคที่ปรากฏบนใบนับได้ว่าเป็นแหล่งสะสมของเชื้อที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเชื้อราสามารถแพร่กระจายไปสู่ส่วนอื่นๆ รวมทั้งในส่วนของผลซึ่งจะทำให้เกิดอาการผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ ซึ่งสมศิริ และคณะ (2555) รายงานว่าเชื้อราที่แยกได้จากอาการผลเน่าพบเปอร์เซ็นต์ประชากรของเชื้อรา *Phomopsis* มากเป็นอันดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราดังกล่าวในทุเรียนยังมีน้อยมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงตัวเชื้อสาเหตุโรค เริ่มตั้งแต่การสำรวจลักษณะอาการโรค การเจริญของเชื้อบนอาหารต่างชนิด และการสร้าง pycnidium เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับนักวิจัยที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *Phomopsis* ของทุเรียนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจโรคและแยกเชื้อราสาเหตุโรค

ทำการสำรวจโรคใบจุดและเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกทุเรียนพันธุ์หมอนทอง อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรีและเก็บตัวอย่างผลเน่าภายหลังเก็บในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 15°C เป็นเวลา 15 วัน ทำการแยกเชื้อรา *Phomopsis* โดยวิธี Tissue Transplanting Technique สังเกตลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ half potato dextrose agar (half PDA) ซึ่งได้เชื้อแตกต่างกัน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท C10 C11 (แยกได้จากใบจุด) และ C12 C13 (แยกได้จากผลเน่า)

2. ทดสอบการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน

เนื่องจากเชื้อรา *Phomopsis* ใช้เวลาในการสร้าง pycnidia ค่อนข้างนาน (ประมาณ 1 เดือนขึ้นไป) จึงต้องการหาสภาพที่สามารถสร้าง pycnidium ได้เร็วขึ้น โดยทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ carrot agar (CA) potato carrot agar (PCA) half potato dextrose agar (half PDA) และ durian leaf extract agar (DLA) และย้ายเชื้อรา 4 ไอโซเลทจากข้อ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. มาวางตรงกลางจานอาหารแต่ละชนิด บ่มเชื้อแตกต่างกัน 2 สภาพ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (28-32°C) และตู้ควบคุมอุณหภูมิ (25ºC สว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง) บันทึกการเจริญเติบโตของเส้นใยทุกวัน ระยะเวลาเริ่มสร้างและความหนาแน่นของการสร้าง pycnidia โดยให้คะแนน ดังนี้ 0 = ไม่พบการสร้าง 1 = พบการสร้างเล็กน้อย 2 = พบการสร้างปานกลาง และ 3 = พบการสร้างมาก

3. ทดสอบการสร้าง pycnidia บนเนื้อเยื่อใบทุเรียน

เลือกชนิดของอาหารจากการทดสอบในข้อ 2 ที่เชื้อรามีการเจริญเติบโตดีที่สุด วางชิ้นส่วนใบทุเรียนขนาด 1 ตร.ซม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงบนผิวหน้าอาหาร จำนวน 6 ชิ้น ย้ายเชื้อรา *Phomopsis* แต่ละไอโซเลทขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. วางลงตรงกลางจาน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะเห็นการสร้าง pycnidia

ผล

1. สำรวจโรคและแยกเชื้อราสาเหตุโรค

ลักษณะอาการแผลจุดบนใบมีความหลากหลาย กล่าวคือ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1-10 มม. โดยแผลจุดขนาดเล็กมีรูปร่างกลม ขอบแผลสีน้ำตาลเข้มและปรากฏวงสีเหลืองล้อมรอบ (halos) และมักพบกระจัดกระจายทั่วไปบนใบแก่ แต่อาจพบลักษณะอาการดังกล่าวบนใบเพสลาดและใบอ่อนได้ ส่วนอาการแผลจุดขนาดใหญ่ กลางแผลมีสีเทา ขอบแผลสีน้ำตาลแดงเข้มและมี halos สีเหลืองล้อมรอบ ซึ่งยังไม่พบการรายงานมาก่อน ในขณะที่อาการบนผล แผลมีสีน้ำตาล รูปร่างค่อนข้างกลม (Figure 1) อย่างไรก็ตามอาการผลเน่าที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่น ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae* หรือ *Colletotrichum* sp. มักจะพบเชื้อรา *Phomopsis* spp. ร่วมด้วยเสมอ และเมื่อแยกเชื้อจากอาการใบจุดและผลเน่า พบว่าเชื้อรา *Phomopsis* มีความหลากหลายในลักษณะสีของโคโลนี ลักษณะของเส้นใย และการเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อแผลมีลักษณะเป็นส่วนๆ (sector)

Figure 1 Leaf spot and fruit rot of durian caused by *Phomopsis* spp. (A) small necrotic leaf spots with narrow yellow halos, (B) large necrotic leaf spots with wider yellow halos and (C) dark brown lesion on durian fruit

2. ทดสอบการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Phomopsis* จำนวน 4 ไอโซเลทบนอาหาร 4 ชนิด พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลทที่บ่มในอุณหภูมิห้อง (28-32°C) มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าเชื้อราที่บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (25ºC สว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง) เนื่องจากในสภาพแรกเชื้อรามีรัศมีการเจริญประมาณ 40 มม. โดยใช้เวลาเพียง 4 วัน ในขณะที่ในสภาพหลังเชื้อราใช้เวลาถึง 5 วัน และเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีรัศมีการเจริญในแต่ละวันใกล้เคียงกัน ยกเว้นไอโซเลท C13 ที่มีการเจริญเร็วที่สุดบนอาหารเกือบทุกชนิด (Figure 2) และเมื่อตรวจสอบปริมาณ pycnidium หลังจากบ่มเป็นเวลา 13 วัน พบว่ามีบางไอโซเลทอยู่ในช่วงระยะเริ่มสร้าง โดยสังเกตเห็นโครงสร้างขนาดเล็กนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร และเชื้อที่บ่มในอุณหภูมิห้องจะพบโครงสร้างดังกล่าวเป็นจำนวนมากกว่าเชื้อที่บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25°C โดยเฉพาะบนอาหาร CA และ PCA ในขณะที่บนอาหาร half PDA ไม่พบการสร้างเลย (Figure 3) แต่อย่างไรก็ตามกว่าที่ pycnidium เหล่านั้นจะมีความสมบูรณ์และสร้าง conidia พร้อมที่จะนำไปใช้ได้ ก็ใช้เวลาค่อนข้างนานประมาณ 1 เดือน ซึ่งจะสังเกตเห็นกลุ่มสปอร์ (conidial mass) สีครีมหรือขาวขุ่นถูกดันออกมาเป็นสายทาง ostiole ของ pycnidium

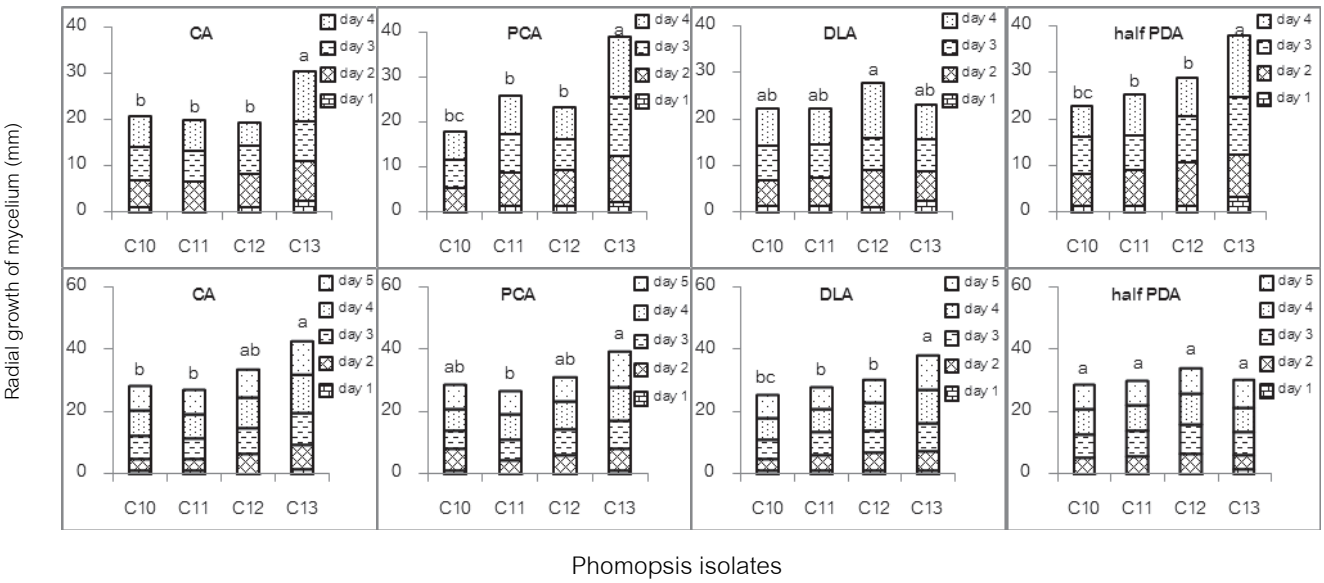

Figure 2 Radial mycelial growth of *Phomopsis* 4 isolates grown on different culture media. Upper : incubated at room temperature (28-32°C). Lower : incubated at 25°C dark/light 12/12h. CA = carrot agar, PCA = potato carrot agar, DLA = durian leaf extract agar, half PDA = half potato dextrose agar. Different letters in each graph are significant difference (P=0.05), according to DMRT

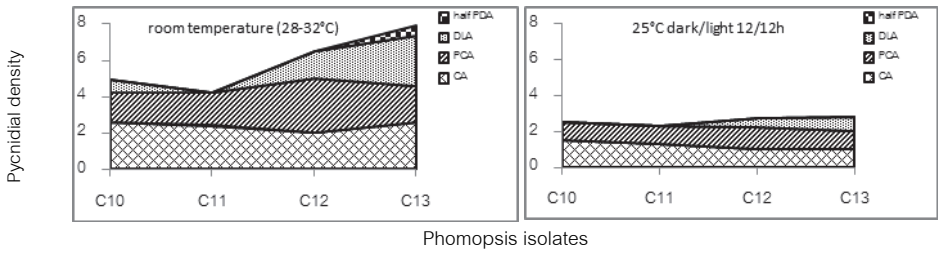

Figure 3 Pycnidial density of *Phomopsis* 4 isolates on different culture media incubated at room temperature (28-32°C) and 25°C dark/light 12/12h for 13 days. CA = carrot agar, PCA = potato carrot agar, DLA = durian leaf extract agar, half PDA = half potato dextrose agar. Pycnidial density score determined by 0 = no pycnidium, 1=small amount of pycnidium, 2=moderate amount of pycnidium, 3=large amount of pycnidium

3. ทดสอบการสร้าง pycnidia บนเนื้อเยื่อใบทุเรียน

เนื่องจากบนอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลาในการสร้าง pycnidium ค่อนข้างนาน จึงทดสอบการสร้างบนเนื้อเยื่อใบทุเรียนซึ่งวางอยู่บนอาหาร PCA พบว่าเมื่อเชื้อราเจริญครอบคลุมใบพืช บางไอโซเลทจะเริ่มสร้างโครงสร้างขนาดเล็กบนเนื้อเยื่อใบที่เวลาประมาณ 5-6 วัน และโครงสร้างดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็น pycnidium และสร้าง conidia ที่สมบูรณ์พร้อมนำไปใช้ได้ประมาณ 7-10 วัน และพบว่าไอโซเลท C13 มีปริมาณการสร้าง pycnidium หนาแน่นที่สุด (Figure 4)

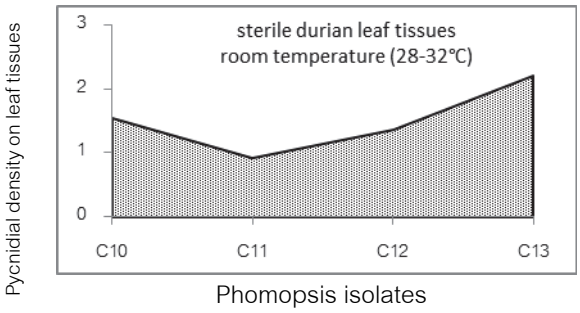

Figure 4 Pycnidial density of *Phomopsis* 4 isolates on sterile durian leaf tissues incubated at room temperature (28-32°C) for 7 days.

วิจารณ์ผล

ในปี 2003 Lim and Sangchote ได้รายงานลักษณะอาการใบจุดของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis* ไว้ว่ามีลักษณะเป็นแผลจุดตายขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 1 มม. มี haloes สีเหลืองล้อมรอบ ซึ่งเกิดกระจัดกระจายทั่วไปเฉพาะบนใบแก่ ซึ่งมีความแตกต่างจากงานวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากอาการแผลจุดดังกล่าวนอกจากจะพบบนใบแก่แล้ว ยังสามารถพบได้ทั่วไปทั้งบนใบเพสลาดและใบอ่อน รวมทั้งยังพบอาการแผลจุดขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-10 ซม.) และเชื้อราที่แยกได้จากอาการแผลจุดทั้ง 2 แบบมีความแปรปรวนมากในลักษณะสีของโคโลนี และการเจริญของเส้นใย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Brayford (1990) ว่าเชื้อรา *Phomopsis* ที่แยกได้จากต่างแหล่งปลูกได้ถูกแบ่งเป็นกลุ่มๆ ตามความต่างกันของเส้นใย สีโคโลนี และ mating type และจากการที่เชื้อรา *Phomopsis* มีการเจริญเติบโตดีที่อุณหภูมิห้อง จึงทำให้เกิดการสร้าง pycnidium เป็นจำนวนมากเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เนื้อเยื่อใบทุเรียนที่ฆ่าเชื้อแล้วจะเป็นการกระตุ้นให้เชื้อรา *Phomopsis* เกิดการสร้าง pycnidium ได้เร็วขึ้นและสามารถสร้าง conidia ให้มีปริมาณมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brayford (1990) ที่พบว่าเชื้อรา *Phomopsis* บางกลุ่มจะสร้าง pycnidium บนกิ่งเอล์มที่ฆ่าเชื้อแล้วเท่านั้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สมศิริ แสงโชติ, สิทธ์ ใจสงฆ์, ศศิวิมล ลักษณพิสุทธิ์ และธัญมน สังข์ศิริ. 2555. โรคผลเน่าของทุเรียน การดื้อต่อสารเคมีและการควบคุม. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 10, 22-24 กุมภาพันธ์ 2555 ณ คุ้มภูคำ เรสซิเดนซ์ จังหวัดเชียงใหม่.

Brayford, D. 1990. Variation in Phomopsis isolates from *Ulmus* species in the British Isles and Italy. Mycological Research 94: 691-697.

Hwang, S.F., H. Wang, B.D. Gossen, K.F. Chang, G.D. Turnbull and R.J. Howard. 2006. Impact of foliar diseases on photosynthesis, protein content and seed yield of alfalfa and efficacy of fungicide application. European Journal of Plant Pathology 115: 389–399.

Lim, T.K. and S. Sangchote. 2003. Diseases of Durian pp. 241-251. *In*: R.C. Ploetz (ed.). Diseases of Tropical Fruit Crops, CABI Publishing, Wallingford.