Agricultural Sci. J. 49 : 4 (Suppl.) : 171-174 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 4 (พิเศษ) : 171-174 (2561)

เชื้อรา *Pythium* sp. สาเหตุโรครากเน่าของทุเรียน และประสิทธิภาพของสารเคมีในการควบคุม

Pythium sp. Causing Root of Durian and Efficacy of Chemical Fungicides to Control

กนกพร ฉัตรไชยศิริ[1] รัติยา พงศ์พิสุทธา[1] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1] และ สัณฐิติ บินคาเดอร์[1]

KanokphornChatchaisiri[1] , Ratiya Pongpisutta[1] , Chainarong Rattanakreetakul[1] and Santiti Bincader[1]

Abstract

Durian, especially Monthong cultivar is susceptible to root and stem rot diseases affecting to product decline. Apart from that, some fungal pathogens isolated from soil may infect root, branch and stem of durian. This study, was identified fungal pathogen isolate SSK01, which isolated from soil of durian field in Srisaket province. Identification of the fungus was based on morphological and molecular markers. The fungus was cultured on potato dextrose agar (PDA) representing white fluffy mycelium with petallate type, mycelium was tough. Mycelial growth showed colony diameter at the rank of 9.0 centimeter, 3d after incubation (3DAI). Whilst, molecular technique using PCR on ITS region and sequencing analysis compared with NCBI database showed 97% similarity to accession number HQ643955.1 was identified into *Pythium vexans*. Mycelial growth inhibition using chemical fungicides such as etridiazole, fosetyl-aluminium, mancozeb combined with valifenalate and metalaxyl was investigated. Three days after incubation, the result showed that etridiazole, mancozeb combined with valifenalate and metalaxyl at concentration of 250 ppm upward could inhibit fungal mycelial growth, completely.

Keywords: Durian, *Pythium*, fungicide

บทคัดย่อ

ทุเรียนพันธุ์หมอนทองจัดเป็นพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อโรครากเน่าและโคนเน่า ทำให้ผลผลิตทุเรียนมีปริมาณลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราบางชนิดที่แยกได้จากดินจะสามารถเข้าทำลายบริเวณราก กิ่ง และลำต้นของทุเรียนได้ งานวิจัยในครั้งนี้ ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อราไอโซเลท SSK01 ซึ่งแยกได้จากดินรอบโคนต้นทุเรียนในเขตจังหวัดศรีสะเกษ โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา และอณูชีวโมเลกุล พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราดังกล่าวบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) มีลักษณะโคโลนีสีขาว ฟูเล็กน้อย คล้ายกลีบดอกไม้ (petallate) เส้นใยค่อนข้างเหนียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 9.0 เซนติเมตร หลังการบ่มนาน 3 วัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลโดยเทคนิค PCR บริเวณ ITS-region และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อรา *Pythium vexans* 97% (accession number HQ643955.1) การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อราจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ etridiazole fosetyl-aluminium mancozeb ผสม valifenalate และ metalaxyl ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา พบว่าหลังบ่มเชื้อนาน 3 วัน สารเคมีกำจัดเชื้อรา 3 ชนิด คือ etridiazole mancozeb ผสม valifenalate และ metalaxyl ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250 ppm ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุด

คำสำคัญ: ทุเรียน, เชื้อรา *Pythium*, สารเคมีกำจัดเชื้อรา

คำนำ

จากรายงานของกรมส่งเสริมการเกษตรปี พ.ศ. 2547 พบว่าโรครากเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler เป็นโรคที่มีความสำคัญ และส่งผลกระทบต่อการผลิตทุเรียนเป็นอย่างมาก อาการของทุเรียนที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายนั้น ใบจะมีลักษณะเหี่ยว โคนต้นและกิ่งแสดงอาการแผลจุดฉ่ำน้ำ เปลือกล่อนเน่าเป็นสีน้ำตาล เนื้อไม้ด้านในเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงถึงน้ำตาลเข้ม ทำให้ต้นทุเรียนทรุดโทรมและตายในที่สุด นอกจากเชื้อราดังกล่าวแล้ว ยังพบว่ามีเชื้อราอีกหลายชนิดที่พักตัวอยู่บริเวณดินรอบต้น ก่อให้เกิดโรคกับทุเรียนได้เช่นกัน จากรายงานของ Thompson (1938) พบว่าเชื้อรา *P. vexans* เข้าทำลายบริเวณรากทุเรียน ก่อให้เกิดโรครากเน่า พบในประเทศสิงคโปร์

[1]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1]Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

นอกจากนี้ Vawdrey *et al.* (2005) ได้ทำการแยกเชื้อราจากดินบริเวณสวนทุเรียนจำนวน 13 แปลง ในรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย และพบว่าโรครากเน่าของทุเรียนเกิดจากเชื้อรา 2 ชนิดด้วยกัน คือ *P. vexans* และ *P. palmivora*

การควบคุมในปัจจุบัน พบว่ามีการใช้ชีวภัณฑ์ เช่น เชื้อรา *Trichoderma* sp. หรือแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. (จิระเดช และ วรรณวิไล, 2534) นอกจากนี้สารเคมีกำจัดเชื้อราก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่จะช่วยในการควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อราสาเหตุโรคในทุเรียนได้ เนื่องจากสารเคมีกำจัดเชื้อราเป็นวิธีการใช้ที่ง่าย และเห็นผลรวดเร็ว งานวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาและตรวจสอบเชื้อราที่เข้าทำลายต้นทุเรียนซึ่งก่อให้เกิดอาการรากเน่า รวมไปถึงศักยภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อราในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค เพื่อนำข้อมูลดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการจัดการโรคของทุเรียนในแปลงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การจำแนกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของทุเรียน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคอณูชีวโมเลกุล

เชื้อราไอโซเลท SSK01 แยกได้จากดินบริเวณรอบโคนต้นทุเรียนที่แสดงอาการรากเน่าและโคนเน่าในจังหวัดศรีสะเกษ ได้รับอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มภายใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน บันทึกลักษณะโคโลนี และส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ที่กำลังขยาย 100x จากนั้นทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA) โดยดัดแปลงวิธีการจาก วรานันท์ (2554) เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเหลว Spezieller Nahrstoffamer Broth (SNB) และใช้ Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ phenol chloroform isoamyl alcohol (25:24:1) ในการตกตะกอนโปรตีนแล้วทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ specific primer (Ratiya, 2005) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Laboratories ประเทศมาเลเซีย ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่างเทียบกับฐานข้อมูล Genebank ของ NCBI

ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของทุเรียน

เลี้ยงเชื้อราไอโซเลท SSK01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มภายใต้แสง near UV สลับ มืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ตัดบริเวณปลายเส้นใย ย้ายลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 3 วัน จากนั้นนำไปราดบริเวณรอบโคนต้นกล้าทุเรียนอายุ 5 เดือน บันทึกผลการเกิดโรค

การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของทุเรียนโดยใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา

ศึกษาความสามารถในการควบคุมเชื้อราสาเหตุของสารเคมีควบคุมเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ etridiazole fosetyl-aluminium mancozeb ผสม valifenalate และ metalaxyl ความเข้มข้น 0 250 500 750 1000 และ 2000 ppm โดยผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดบริเวณปลายโคโลนีย้ายลงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารเคมีกำจัดเชื้อรา ย้าย mycelium dice ลงบนอาหารโดยให้ด้านเส้นใยสัมผัสอาหาร จากนั้นนำไปบ่มภายใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกวัน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ

ผล

การจำแนกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของทุเรียน โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคอณูชีวโมเลกุล

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราไอโซเลท SSK01 บนอาหาร PDA คล้ายกลีบดอกไม้ (petallate) มีสีขาว ฟูเล็กน้อย เส้นใยค่อนข้างเหนียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่อายุ 3 วัน วัดได้ประมาณ 9.0 เซนติเมตร (Figure 1C) พบการสร้าง sporangium รูปร่าง ellipsoids ovoid มีการสร้าง tube สั้นๆ ยื่นออกจาก sporangium ขนาดประมาณ 10-15x15-22 ไมโครเมตร (Figure 1H-L) พบการสืบพันธุ์อาศัยเพศ แบบ homothallic thallus มีการจับของ antheridium และ oogonium แบบ paragynous ให้กำเนิด oospore รูปร่างกลม ผนังเรียบหนา ขนาดประมาณ 12-17 ไมโครเมตร (Figure 1D-G) จำแนกเชื้อราอ้างอิงจากหนังสือ Monograph of the genus *Pythium* (Plaats-Niterink, 1981) ได้เป็นเชื้อรา *P. vaxans* (Figure 1C-1K) จากนั้นตรวจสอบข้อมูลทางอณูชีวโมเลกุลโดยเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่าผลิตผล PCR มีขนาดประมาณ 850 bp. ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายเชื้อรา *P. vexans* 97 % (accession number HQ643955.1)

ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของทุเรียน

จากการปลูกเชื้อราไอโซเลท SSK01 โดยวิธีการราดเชื้อราบริเวณรอบโคนต้นทุเรียนอายุ 5 เดือน พบว่าเชื้อรา *P. vexans* เข้าทำลายรากของต้นกล้าทุเรียนได้ โดยแสดงอาการรากถอดปลอก สีน้ำตาลเข้ม พบการแตกของรากฝอย ลักษณะสั้นกุด ใบมีขนาดเล็ก ซีดเหลือง

Figure 1 Pathogenicity assay of *Pythium vexans* isolate SSK01 conducted on durian seedling (A) control, (B) infected root, (C) colony type of isolate SSK01 on PDA with petallate pattern, (D-G) antheridium attaching oogonium, (H-J) sporangia in various shapes with papillate and, (K-L) sporangia with discharge tubes

การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของทุเรียนโดยใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา

การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ไอโซเลท SSK01 โดยใช้สารเคมี 4 ชนิด ได้แก่ etridiazole fosetyl-aluminium mancozeb ผสม valifenalate และ metalaxyl ที่ความเข้มข้น 250 500 750 1000 และ 2000 ppm พบว่าสารเคมีetridiazol mancozeb ผสม valifenalate และ metalaxyl ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่สารเคมี fosetyl-aluminium พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ความเข้มข้น 250 500 750 และ 1000 ppm มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 4.52 3.10 2.79 และ 0.96 เซนติเมตร ตามลำดับ LSD= 0.34566 และที่ความเข้มข้น 2000 ppm สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยได้โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา เมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดทดลองควบคุม ซึ่งมีการเจริญของเส้นใยที่อายุ 3 วัน เท่ากับ 9.0 เซนติเมตร (Table 1)

Table1 Chemical fungicides using to control isolate SSK01 causing root rot of durian

Chemicals fungicide	Colony diameter (cm)				
	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm	2000 ppm
etridiazole	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
fosetyl-aluminium	4.52 b	3.10 c	2.79 c	0.96 d	0.00 e
mancozeb + valifenalate	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
metalaxyl	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
control	9.0 a				
CV	14.53908				
LSD	0.34566				

[1/]Column values followed by the same letter are not significantly different with (P = 0.05)

วิจารณ์ผล

เชื้อราไอโซเลท SSK01 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบโคนต้นทุเรียนที่แสดงอาการรากเน่าและโคนเน่าในจังหวัดศรีสะเกษ เมื่อทำการจำแนกโดยอาศัยสัณฐานวิทยา พบว่ามีการเจริญแบบ homothallic มีการสร้าง sporangium รูปร่างตั้งแต่ globose ovoid ไปจนถึง pyriform ส่วนของ sporangium มีการสร้าง papilla และ discharge tube (Plaats-Niterink,

1981) จากนั้นทำการศึกษาด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณ DNA เทียบกับฐานข้อมูล NCBI สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *P. vexans* โดยเชื้อราดังกล่าวนั้น มีรายงานการเข้าทำลายทุเรียนในพื้นที่หลายประเทศ เช่น อินโดนีเซีย สิงคโปร์ และออสเตรเลีย เป็นต้น สอดคล้องกับจากรายงานของ Ploetz (2003) ที่ทำการศึกษาโรคในไม้ผลเขตร้อน และเขตกึ่งร้อน พบว่าเชื้อรา *P. vexans* เป็นสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าในทุเรียน นอกเหนือจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ในหลายพื้นที่ และนอกจากนี้เชื้อราดังกล่าวยังเป็นสาเหตุโรคเน่าของพืชอีกหลายชนิด เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย ยางพารา สับปะรด ปาล์มน้ำมัน เป็นต้น (Yonghong *et al*., 2011) สำหรับวิธีการควบคุม พบว่าการใช้สารเคมี etridiazole mancozeb ผสม valifenalate และ metalaxyl ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี ในขณะที่ fosetyl-aluminium นั้นต้องใช้ในอัตราความเข้มข้นที่สูงถึง 2000 ppm จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ สอดคล้องกับ Chase (1987) ที่ทำการศึกษาและแนะนำให้ใช้สารเคมี etridiazole, fosetyl-aluminium และ metalaxyl ในการควบคุมเชื้อราดังกล่าว

สรุป

จากการจำแนกเชื้อราไอโซเลท SSK01 ที่แยกได้จากดินบริเวณรอบโคนต้นทุเรียนที่เป็นสาเหตุอาการรากเน่า ได้เป็นเชื้อรา *P. vexans* เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิดโรค พบว่าเชื้อรา *P. vexans* เข้าทำลายรากของต้นกล้าทุเรียนได้ โดยแสดงอาการรากถอดปลอก สีน้ำตาลเข้ม พบการแตกของรากฝอย ลักษณะสั้นกุด ใบมีขนาดเล็ก ซีดเหลืองแสดงว่า *P. vexans* เป็นสาเหตุโรคที่แท้จริง สำหรับการควบคุมเชื้อราดังกล่าว พบว่าสารเคมี etridiazole mancozeb ผสม valifenalate และ metalaxyl ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราในระดับห้องปฏิบัติการได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ผสมสารเคมีดังกล่าว การทดลองนี้จะนำไปสู่การศึกษาเชื้อราในดินที่สามารถก่อให้เกิดโรครากเน่ากับทุเรียน นอกเหนือจากเชื้อรา *P. palmivora* ที่รู้จักกันมาช้านานเพื่อจะได้หาวิธีการควบคุมที่เหมาะสมต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้การสนับสนุนในเรื่องของสถานที่ และอุปกรณ์ที่ใช้ทำการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. มปพ. โรคทุเรียน. สำนักงานส่งเสริมและฝ่ายอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

จิระเดช แจ่มสว่าง และ วรรณวิไล อินทนู. 2534. การผลิตและการทดลองทดสอบคุณภาพของผงเชื้อรา *Trichoderma harzianum*. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์). 25:169-176.

วรานันท์ วิญญรัตน์. 2554. การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ.

Chase, A.R. 1987. Compendium of Ornamental Foliage Plant Diseases. American Phytopath, USA.

Plaats-Niterink, A.J. van der. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21: 1-244.

Ploetz, R.C. 2003. Diseases of tropical fruit crops. CABI Publishing, UK.

Thompson, A. 1938. A root disease of the durian tree caused by *Pythium compectans* Braun. Malayan Agriculture Journal 26: 460-464.

Vawdrey, L.L., Langdon, P. and Martin, T. 2005. Incidence and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* and *Pythium vexans* associated with durian decline in far northern Queensland. Australasian Plant Pathology 34(1): 127-128.

Yonghong, T., F. Zeng, H. Ho, J. Wei, Y. Wu, L. Yang and Y. He. 2011. *Pythium vexans* Causing Stem Rot of *Dendrobium* in Yunnan Province, China. Journal of Phytopathology 159:255-259.