Agric. Sci. Innov. J. 55 : 1 (Suppl.) : 88 - 91 (2024) ว. วิทย. นวัต. กษ. 55 : 1 (พิเศษ) : 88 - 91 (2567)

การจัดการโรคดอกสนิมของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* โดยใช้สารเคมีเพื่อลดการก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยว

Management of Orchid Rusty Spot Disease Caused by *Curvularia eragrostidis* Using Fungicides to Reduce Postharvest Pathogenesis

รัติยา พงศ์พิสุทธา[1] สัณฐิติ บินคาเดอร์[2] ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1] อาภัสรา หีดรอด[1] ธนวรรณ พรมขลิบนิล[2] และศิโรรัตน์ เขียนแม้น[2]

Ratiya Pongpisutta[1], Santiti Bincader[2], Chainarong Rattanakreetakul[1], Arphatsara Heedrod[1], Tanawan Promkhlibnil[2] and Sirorat Khienman[2]

Abstract

Orchid (*Dendrobium* spp.) is one of the most popular ornamental plants in Thailand. The species is native to a tropical region of Asia. Nowadays, it is commonly planted in residential areas to decorate the landscape. One of the problems with orchids is rusty spots that can affect the quality of the plant. The aim of this research was to investigate orchids showing brown spots at the sepal and petal from Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom province. The fungal isolates were obtained by using the tissue transplanting technique. Based on morphological characteristics and molecular technique using ITS1–5.8s–ITS2 amplification, they were identified as *Curvularia eragrostidis*. A pathogenicity test using Koch's postulate technique was investigated on *Dendrobium* sp. The finding indicated that disease symptoms occurred after 10 days of inoculation. The responsiveness of 10 different fungicides to control indicated that azoxystrobin mixed with difenoconazole, carboxyl, difenoconazole, prochloraz, and propiconazole could absolutely inhibit fungal mycelium on their culture medium, and according to the field, it reduced the disease incidence between 57.40 – 100.00 %, and orchids 7 days old after cutting showed no symptoms of the disease. This research is a rusty spot disease diagnosis of orchids and using fungicide application to reduce damage and sustain disease protection.

Keywords: plant disease diagnosis, plant pathogenic fungi, *Dendrobium* sp.

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium spp.) เป็นไม้ประดับที่ได้รับความนิยมชนิดหนึ่งของไทย มีถิ่นกำเนิดในพื้นที่เขตร้อนของทวีปเอเชีย ปัจจุบันนิยมปลูกในพื้นที่อาศัยเพื่อตกแต่งภูมิทัศน์ ปัญหาหนึ่งของดอกกล้วยไม้ คืออาการดอกสนิม ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพของต้นไม้ได้ งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบดอกกล้วยไม้ที่แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลบริเวณกลีบเลี้ยง และกลีบดอกจากอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting ระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคอณูชีวโมเลกุลด้วยการเพิ่มปริมารสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 สามารถระบุได้เป็นเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* ตรวจสอบความสามารถในการเกิดโรคตามวิธีของ Koch's postulate กับดอกกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่าเชื้อราสามารถก่อให้เกิดอาการจุดสนิมหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 10 วัน เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี 10 ชนิด ในการควบคุม พบว่าสารเคมี azoxystrobin ผสมกับ difenoconazole, carboxyl, difenoconazole, prochloraz และ propiconazole ที่อัตราแนะนำ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อทดสอบกับดอกกล้วยไม้ในสภาพแปลง พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน คือสามารถลดการเกิดโรคได้สูงถึง 57.40 – 100.00 เปอร์เซ็นต์ และดอกกล้วยไม้อายุ 7 วัน หลังการตัด ยังไม่พบอาการของโรคดังกล่าว งานวิจัยนี้เป็นการระบุเชื้อราสาเหตุโรคดอกสนิมของกล้วยไม้ และประยุกต์ใช้สารเคมีในการควบคุมเพื่อลดความเสียหาย รวมถึงป้องกันการเกิดโรคและความผิดปกติในระยะยาวได้ต่อไป

คำสำคัญ: การวินิจฉัยโรคพืช เชื้อราสาเหตุโรค *Dendrobium* sp.

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

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

[2] สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา 13000

[2] Program Plant Science, Faculty of Agricultural Technology and Agro-industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Phra Nakhon Si Ayutthaya, 13000

คำนำ

จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2565) พบว่าผลผลิตกล้วยไม้ตัดดอกของประเทศไทยมีปริมาณลดลง ส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากสถานการณ์ของโรคโควิด-19 ทำให้ความต้องการซื้อของตลาดทั้งในและต่างประเทศลดลง รวมถึงต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น ส่งผลให้การระบาดของโรคและแมลงมีเพิ่มขึ้น และทำให้คุณภาพของดอกกล้วยไม้ไม่สมบูรณ์เท่าที่ควร อีกทั้งช่วงปลายปี 2564 จังหวัดนครปฐมและสมุทรปราการซึ่งถือว่าเป็นแหล่งปลูกกล้วยไม้ที่สำคัญ ประสบปัญหาน้ำท่วม ทำให้ต้นกล้วยไม้บางส่วนอ่อนแอ และให้ผลผลิตน้อยลง นอกจากปัญหาสภาพแวดล้อม และความต้องการซื้อของผู้บริโภคแล้วนั้น โรคและแมลงถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้การผลิตกล้วยไม้ ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร โดยโรคที่พบได้บ่อยในกล้วยไม้มักมีสาเหตุจากการเข้าทำลายของเชื้อรา โดยอาจส่งผลให้เกิดอาการใบไหม้ ใบจุด รากเน่า รวมถึงอาการบริเวณดอก ซึ่งมีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อปริมาณรวมถึงคุณภาพของกล้วยไม้เป็นอย่างมาก (Srivastava *et al*., 2018) ข้อมูลในปัจจุบันได้มีการจำแนกชนิดเชื้อราที่เข้าทำลายกล้วยไม้โดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล เพื่อให้การระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้นและสามารถหาวิธีการจัดการได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป โดยการควบคุมในปัจจุบัน นอกจากการใช้วิธีการทางชีวภาพ เช่นเชื้อรา *Trichoderma* spp. (Zhang *et al*., 2022) แล้วนั้น การใช้สารเคมี ถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรนิยมใช้ เนื่องจากมีรูปแบบการใช้ที่หลากหลาย และประสิทธิภาพดี อีกทั้งสารเคมีบางชนิดสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคได้มากกว่า 1 สกุลอีกด้วย งานวิจัยนี้จึงได้ทำการจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคของกล้วยไม้ โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคอณูชีวโมเลกุล และตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคมีสำหรับการควบคุมเชื้อราให้มีความเป็นปัจจุบันมากขึ้น เพื่อให้การผลิตกล้วยไม้ทั้งในระดับประเทศ และส่งออกไปยังต่างประเทศกลับมามีคุณภาพและเป็นที่น่าเชื่อถือของผู้บริโภคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อราสาเหตุโรค สัณฐานวิทยา และวิวัฒนาการความสัมพันธ์

ดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลบริเวณกลีบเลี้ยง และกลีบดอก จากอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยตัดชิ้นพืชขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย 1.2 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite นาน 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 - 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่ ย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ทำเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค single spore isolation บนอาหาร water agar (WA) และย้ายลงหลอดอาหารเอียง potato carrot agar (PCA) เก็บที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบและเปรียบเทียบสัณฐานวิทยาของเชื้อราตามคำอธิบายของ Barnett and Hunter (1972) ในหนังสือ Illustrated Genera of Imperfect Fungi จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด DNAsecure Plant Kit และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5/ITS4 (White *et al*., 1990) ด้วยวิธี dPCR (direct polymerase chain reaction) โดยใช้ชุด Phire Plant Direct PCR Master Mix นำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank ด้วยโปรแกรม BLASTn ผ่านครือข่ายทางอินเตอร์เน็ต(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) วิเคราะห์และจัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม MEGA version X (Kumar *et al*., 2018) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information จากนั้นสร้างแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์ ด้วยวิธี Neighbor-Joining ที่ค่า bootstrap value เท่ากับ 1,000 ซ้ำ ตามคำอธิบายของ Rattanakreetakul *et al*. (2023)

2. ศักยภาพของสารเคมีในการควบคุม

ทดสอบศักยภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยวิธี poisoned food โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนี ย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีแตกต่างกัน 10 ชนิดที่ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำ โดยให้ด้านที่มีเส้นใยสัมผัสหน้าอาหาร บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกวัน จนครบ 5 วัน จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีทั้ง 10 ชนิดที่ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำ โดยนำมาฉีดพ่นบนช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายอายุ 3 วันนับจากวันดอกบาน ที่ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และบ่มในสภาพชื้น 24 ชั่วโมง ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคตามคำอธิบายของ อารีรัตน์ (2550) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ เปรียบเทียบ ค่าความแตกต่างของข้อมูลโดยวิธี least significant difference test (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$ โดยใช้โปรแกรม R-stat X64 version 3.5.2

ผล

1. เชื้อราสาเหตุโรค สัณฐานวิทยา และวิวัฒนาการความสัมพันธ์

เชื้อราที่แยกได้จากดอกกล้วยไม้ที่แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาล (ไอโซเลท SBDB01) พบการสร้างโคโลนีสีเขียวมะกอกปนเทา เส้นใยเจริญค่อนข้างรวดเร็ว (5.00 เซนติเมตร/วันที่ 5) ฟูจากผิวหน้าอาหาร ด้านหลังโคโลนีมีสีดำ (Figure 1A) ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบการสร้างสปอร์ 4 เซลล์ (phragmospores) ลักษณะโค้งมน เซลล์บริเวณตรงกลางมีสีน้ำตาลเข้ม ขนาดใหญ่กว่าเซลล์หัวท้ายซึ่งมีสีน้ำตาลสว่าง ขนาดประมาณ 6.38 – 12.12 x 17.00 – 21.29 ไมโครเมตร (Figure 1B) เปรียบเทียบสัณฐานวิทยาระบุได้เป็นเชื้อราในสกุล *Curvularia* sp. เมื่อทำวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ NCBI และสร้างแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์แบบ Neighbor-Joining พบว่าเชื้อรา ไอโซเลท SBDB01 มีความเหมือนกับเชื้อรา *C. eragrostidis* ที่ค่าความเหมือน (% identify) เท่ากับ 98.33 – 100.00 เปอร์เซ็นต์ ตรวจดูแผนผังวิวัฒนาการ พบว่าเชื้อราดังกล่าวถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *C. eragrostidis* ไอโซเลท CBS215.65, CBS536.70 และ CBS189.48 ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1C)

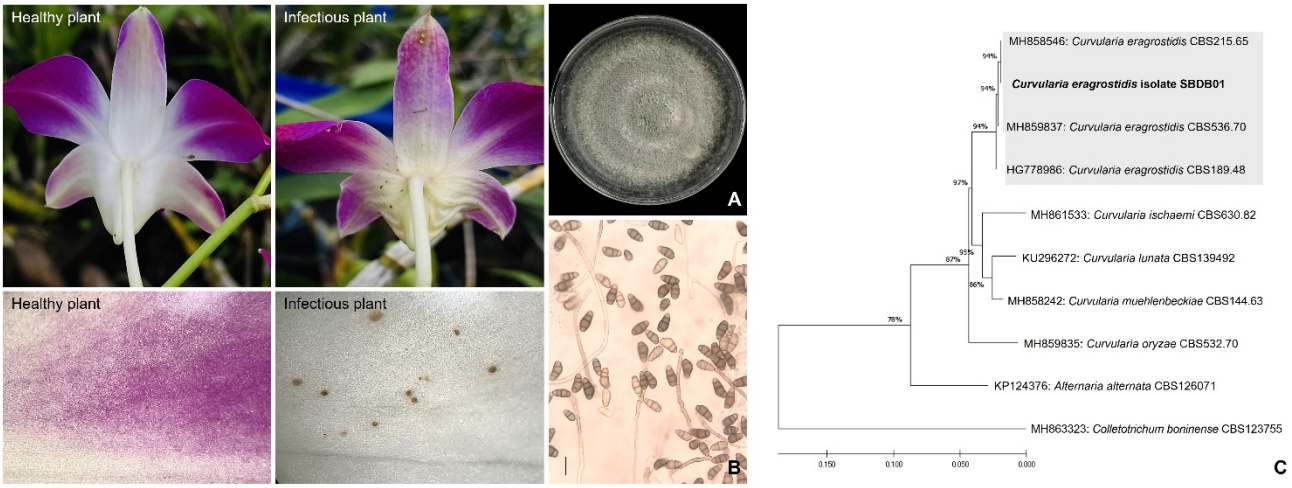

Figure 1 *Curvularia eragrostidis* isolate SBDB01. Colony characteristics on PDA medium at day 5 (A), Conidia and conidiophore under compound microscope at 200X (scale bar= 20 µm) (B), and ITS phylogenetic tree based on ITS sequences of *Curvularia* species including the ex-type/epitype sequence. Bootstrap values higher than 10% are displayed above the node. Strains isolated in this study are shown in bold (C).

2. ศักยภาพของสารเคมีในการควบคุม

ผลการทดสอบศักยภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 10 ชนิด พบว่าสารเคมี 5 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin ผสมกับ difenoconazole, carboxyl, difenoconazole, prochloraz และ propiconazole ที่อัตราแนะนำ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีการเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อายุ 5 วัน เท่ากับ 1.08, 2.78, 2.95, 0.00 และ 0.22 เซนติเมตร และเมื่อทำการฉีดพ่นสารเคมีดังกล่าว บนช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายอายุ 3 วันนับจากวันดอกบาน พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน คือสารเคมีดังกล่าวทั้ง 5 ชนิด สามารถลดการเกิดโรคได้สูงเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเกิดโรคเท่ากับ 78.40, 57.40, 95.60, 100.00 และ 79.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1)

วิจารณ์ผล

เชื้อรา *C. eragrostidis* มีรายงานการเข้าทำลายดอกกล้วยไม้ในหลายพื้นที่ทั่วโลก ส่งผลให้ดอกกล้วยไม้หลังการเก็บเกี่ยวแสดงอาการจุดสีน้ำตาล การใช้สารเคมีเป็นหนึ่งในทางเลือกที่ช่วยในการลดความเสียหาย โดยสารเคมีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ตั้งแต่การยับยั้งกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอน ไปจนถึงยับยั้งการแบ่งเซลล์ และยับยั้งการสร้างสารพันธุกรรม (Fungicide Resistance Action Committee, 2022) ซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงของเชื้อราในการพัฒนาตนเองเพื่อต้านทานสารเคมี และทำให้การควบคุมไม่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้สารเคมีบางชนิด ยังมีกระบวนการรบกวนการเข้าทำลาย ส่งผลให้เชื้อราไม่สามารถเจาะแทงผ่านเนื้อเยื่อพืช และตกค้างในลักษณะของเชื้อราเข้าทำลายแฝงได้ ซึ่งวิธีการดังกล่าวถือเป็นประโยชน์ในการลดการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว และการแพร่ระบาดของเชื้อราไปยังพื้นที่อื่นๆ ทำให้คุณภาพของการผลิตกล้วยไม้ไทยสูงขึ้นและเป็นที่ยอมรับในตลาดทั้งในและต่างประเทศต่อไป (FRAC, 2022)

Table 1 Potential of 10 different fungicides to control rusty spot disease caused by *Curvularia eragrostidis*.

Treatment	Concentration (ppm)	Colony diameter at day 5 (cm)	%Disease inhibition
Control	-	5.00±0.09a	-
Azoxystrobin	250	3.85±0.53bc	37.00±0.08c
Azoxystrobin mixed with Difenoconazole	325	1.08±0.15cd	78.40±0.08b
Carbendazim	500	5.00±0.00a	0.00±0.00d
Carboxyl	562.5	2.78±0.35c	57.40±0.01bc
Chlorothalonil	750	5.00±0.00a	0.00±0.00d
Copper hydroxide	1,540	5.00±0.00a	0.00±0.00d
Difenoconazole	125	2.95±0.13c	95.60±0.05ab
Prochloraz	675	0.00±0.00e	100.00±0.00a
Propiconazole	250	0.22±0.13d	79.40±0.06b
Propineb	2,100	4.65±0.09b	47.90±0.06bc
C.V. (%)		0.6619	16.5467
F-test		***	***
MSE		0.043	27.135

*Column values followed by the same letter are not significantly different (P<0.05)

สรุป

จำแนกเชื้อราสาเหตุโรคจุดสนิมโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคอณูชีวโมเลกุลระบุได้เป็นเชื้อรา *C. eragrostidis* ทำการทดสอบประสิทธิภาพสารเคมี พบว่าสารเคมีมากกว่า 5 ชนิด ที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราและลดการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ และดร.สรรเสริญ รังสุวรรณ สำหรับข้อมูลการใช้สารเคมี พื้นที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2565. สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้าปี 2564 (ออนไลน์). แหล่งที่มา: https://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/journal/ 2565/commodity2564.pdf. (27 กรกฎาคม 2566).

อารีรัตน์ เทียนขาว. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 241p.

Fungicide Resistance Action Committee [FRAC]. 2022. FRAC Code List ©*2022: Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). [Online]. Available source: https://www.frac.info/. (27 July 2023).

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 35(6): 1,547-1,549.

Rattanakreetakul, C., P. Keawmanee, S. Bincader, O. Mongkolporn, V. Phuntumart, S. Chiba and R. Pongpisutta. 2023. Two newly identified *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in central Thailand. Plants 12(5): 1130.

Srivastava, S., C. Kadooka and J.Y. Uchida. 2018. *Fusarium* species as pathogen on orchids. Microbiol Res. 207: 188–195.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In* M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. Sninsky and T. J. White (eds.). PCR protocols: A Guide to Method and Application. Academic Press, New York, USA.

Zhang, Y., W. Huo, J. Hou, L. Liu, X. Yu and L. Xu. 2022. Effects and benefits of orchid mycorrhizal symbionts on *Dendrobium officinale*. Horticulturae 8(10): 861.