การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm.

Study on Biology and Ecology of *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm.

ทัศนาพร ทัศคร ธารทิพย ภาสบุตร วัชรี วิทยวรรณกุล
อภิรัชต์ สมฤทธิ์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาการเจริญของเชื้อสาแหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลทบนอาหารสูตรต่างๆ และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคสามารถเจริญได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท ในทุกสูตรอาหาร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และจากนั้นจึงได้ทำการบ่มเชื้อต่อเพื่อศึกษาสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง pycnidia ของเชื้อราสาเหตุ ซึ่งหลังการทดลอง 40 วัน พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อราสามารถสร้าง pycnidia ได้ทุกสูตรอาหาร และสร้างได้เป็นจำนวนมากบนอาหาร สูตร MEA และ PCA และได้ศึกษาการติดเชื้อบนเมล็ดของแตงเมล่อน แคนตาลูป เทียบกับพันธุ์การค้า โดยการเก็บเมล็ดจากผลที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค มาวางทดสอบบนอาหาร WA และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อบนเมล็ดและเปอร์เซ็นต์การงอก ผลการทดลองพบว่า เมล็ดแตงที่เก็บมามีทั้งการปนเปื้อนและการติดเชื้อที่เมล็ดทั้งในผลที่เป็นโรคและผลไม่เป็นโรค ซึ่งการปนเปื้อนที่มีการติดเชื้อบนเปลือกหุ้มเมล็ดนั้น เมล็ดสามารถงอกและเจริญได้ปกติ และเชื้อราเข้าทำลายต้นอ่อนทีหลัง ซึ่งพบมีเพียง 2-6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการติดเชื้อบนเมล็ดนั้น ทำให้เมล็ดไม่งอกและเชื้อรามีการเจริญคลุมเมล็ด ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมล็ดแตงทั้งสองชนิดที่เก็บมามีการติดเชื้อและเมล็ดไม่งอก 23- 71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับเมล็ดพันธุ์การค้าที่พบเพียง 9 เปอร์เซ็นต์

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-06-54

คำนำ

โรคยางไหล (Gummy Stem Blight) เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. เป็นโรคสำคัญที่พบมีการระบาดและเข้าทำลายในพืชตระกูลแตง ประเทศไทยพบมีการระบาดในพืชตระกูลแตง ในพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ลักษณะอาการของโรคเริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง ลักษณะสำคัญของโรคคือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ซึ่งด้วยลักษณะอาการของโรคเช่นนี้ จึงได้มีการตั้งชื่อโรคตามอาการโรคที่พบ คือ โรคยางไหล ถ้าโรคมีการระบาดในระยะที่ติดผล จะทำให้ต้นแตงมีการเจริญเติบโตช้า ผลโตไม่เต็มที่ และในต้นที่อาการรุนแรงมาก ต้นจะเหี่ยวแห้งและยืนต้นตาย ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง บางครั้งเกษตรกรจึงรีบเก็บผลผลิตก่อน ทั้งที่แตงยังสุกไม่เต็มที่ทำให้ผลผลิตของแตงไม่ได้คุณภาพ (ทัศนาพรและพีระวรรณ, 2552)

ลักษณะอาการของโรคยางไหล เริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง หลังจากนั้นส่วนทีเป็นแผลจะบุ๋มลึก และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง ลักษณะสำคัญของโรคคือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ส่วนอาการที่ใบก็จะพบใบเป็นแผลฉ่ำน้ำก่อนจากนั้นแผลที่ใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลุกลามไปตามเส้นกลางใบทำให้ใบไหม้ วงจรการเกิดโรคของเชื้อรา *D. bryoniae* สามารถอาศัยและติดไปได้ทั้งในเมล็ดพันธุ์และดิน (seed borne , soil borne) และอยู่ข้ามฤดูได้เป็นเวลานานในเศษซากพืชที่เป็นโรค โดยอาศัยอยู่ใน perithecium เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมคือ มีความชื้นสูง perithecium ที่อยู่บนเศษซากพืชก็จะเจริญแล้วสร้างและปล่อย conidia ออกมา และ conidia นี้สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำฝน หรือระบบการให้น้ำ จากรายงานการสำรวจโรคของ พริพมล, 2552 พบว่า โรคยางไหลนี้เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Ascochyta cucumis*

เนื่องจากเชื้อรา *D. bryoniae* เป็นเชื้อราที่สามารถอาศัยและติดไปได้ทั้งในเมล็ดพันธุ์และดิน (seed borne , soil borne) และอยู่ข้ามฤดูได้เป็นเวลานานในเศษซากพืชเพื่อแพร่กระจายโรคได้ในฤดูปลูกถัดไป ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดโรคในแปลง เกษตรกรจึงต้องมีการย้ายพื้นที่ปลูกไปเรื่อย ๆ เพราะถ้าปลูกซ้ำที่ติดต่อกัน 2-3 ปี โรคในแปลงจะมีการระบาดที่รุนแรงขึ้น การแก้ปัญหานี้ด้วยการจัดการโรคทั้งระบบการปลูกจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เพราะถ้ามีการจัดการโรคที่ถูกต้องเหมาะสมเกษตรกรสามารถควบคุมการเกิดโรคในแปลงได้ และลดการสะสมเชื้อสาเหตุโรคในแปลงปลูกได้

ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลนี้ยังขาดข้อมูลทางด้านชีววิทยา การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ การเข้าทำลายพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรค และการถ่ายโรคทางเมล็ดพันธุ์ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรค ดังนั้นเพื่อให้การป้องกันกำจัดโรคยางไหลมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปสู่การจัดการโรคแบบผสมผสานได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันกำจัดโรคต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ
2. กล้องจุลทรรศน์
3. อุปกรณ์เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ
4. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก กล่องเก็บความเย็น ปากกา กรรไกร ฯลฯ
5. กล้องถ่ายภาพ
6. วัสดุการเกษตร ดิน กระถาง เมล็ดพันธุ์ กระบะเพาะกล้า

วิธีการ

1.การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคยางไหลของพืชตระกูลแตง

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคยางไหลจากแหล่งปลูกพืชตระกูลแตงที่สำคัญ บันทึกข้อมูลต่างๆที่สำคัญในพื้นที่ปลูก ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง ที่เป็นแหล่งปลูกสำคัญ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างในลักษณะการเดินซิกแซกตามแบบของ Barker (1985) จำนวน 10 % ต่อพื้นที่เพาะปลูก เมื่อพบต้นที่เป็นโรค ควรเก็บตัวอย่างโรคในระยะต่างๆ โดยห่อตัวอย่างด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์และใส่ในถุงพลาสติก บรรจุลงในกล่องเก็บความเย็นเพื่อนำกลับไปศึกษาแยกเชื้อสาเหตุและจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุของโรคในห้องปฏิบัติการ บันทึกข้อมูลตามลักษณะอาการของโรคและถ่ายภาพส่วนที่เป็นโรค ประเมินเปอร์เซ็นต์การเป็นโรค (disease incidence)

2. การศึกษาชนิดเชื้อสาเหตุโรคยางไหล

2.1 การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะของเชื้อสาเหตุโรค โดยทำการตัดชิ้นส่วนพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค (section) และทำสไลด์ เพื่อตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อราที่สำคัญเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา เช่น ลักษณะของเส้นใย และสปอร์ ภายใต้กล้อง Compound microscope และเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราที่พบกับเอกสารที่ใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อรา ILLUSTRATED GENERA of IMPERFECT FUNGI และหนังสือดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย

2.2 การแยกเชื้อสาเหตุโรคโดยวิธี Tissue transplanting

แยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคยางไหลที่พบ โดยตัดชิ้นตัวอย่างที่บริเวณส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) แล้วบ่มไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereomicroscope แยก hyphal tip ของเชื้อราที่เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช วางลงบนอาหาร PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บไว้เพื่อศึกษาลักษณะรายละเอียดของเชื้อประกอบกับเอกสารอ้างอิงเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรค

3. **การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยและการสร้าง pycnidia ของรา *D. bryoniae***

ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราและการสร้าง perithecium โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีคือ สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Corn Meal Agar (CMA) Oat Meal Agar (OMA) Malt Extract Agar (MEA) Potato Sucrose Agar และ V-8 Agar เมื่อเตรียมอาหารตามสูตรต่างๆแล้ว จึงย้ายเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.2 มาเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ จำนวน 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1 ชนิด บันทึกข้อมูลโดยวัดขนาดโคโลนีเมื่อเชื้อราอายุ 9 วัน บันทึกลักษณะสีของเส้นใย การเจริญของเส้นใย การสร้าง perithecium เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

4 **การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยและการสร้าง pycnidia ของรา *D. bryoniae***

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราและการสร้าง pycnidia ของรา *D. bryoniae* 3 ไอโซเลท คือ สระแก้ว สุพรรณบุรี และพะเยา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีคือ อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส และทดสอบกับสูตรอาหาร 7 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Corn Meal Agar (CMA) Oat Meal Agar (OMA) Malt Extract Agar (MEA) Potato Sucrose Agar และ V-8 Agar Potato Dextrose เมื่อเตรียมอาหารตามสูตรต่างๆ แล้ว จึงย้ายเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2.2 มาเลี้ยงบนอาหารที่เตรียมไว้ จำนวน 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อต่ออาหาร 1 ชนิด และนำจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ไปบ่มเชื้อที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิโดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นบันทึกข้อมูลโดยวัดขนาดโคโลนีเมื่อเชื้อราอายุ 9 วัน บันทึกลักษณะสีของเส้นใย การเจริญของเส้นใย การสร้าง perithecium เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ

5. ศึกษาการอยู่อาศัยและเข้าทำลายของรา *D. bryoniae* ในเมล็ดแตงเมล่อนและแคนตาลูป

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างผลแตงเมล่อนในระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต ที่แสดงอาการผลเน่า และเป็นแผล จากแปลงเกษตรกร อ.อู่ทอง และ อ.หนองหญ้าไซ จ. สุพรรณบุรี นำผลที่ได้มาผ่า ล้างแยกเมล็ด และ ผึ่งลมให้แห้ง ตรวจนับจำนวนเมล็ดและเก็บใส่ถุงพลาสติก เปรียบเทียบกับเมล็ดจากผลแตงปกติ และเมล็ดพันธุ์แตงจากบริษัทที่นำเข้าเมล็ดพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2.ในการทดลองครั้งที่ 1 นำเมล็ดแตงเมล่อนและแคนตาลูปที่เก็บมาได้มาตรวจสอบการติดเชื้อบนเมล็ด ตามวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ โดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนอาหารวุ้น (Agar-Plate method) โดยแช่เมล็ดแตงในคลอรอกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ซับเมล็ดแล้วนำเมล็ดแตงไปวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA จำนวน 10 เมล็ดต่อจาน จำนวน 30 จาน ตรวจนับเมล็ดที่มีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญของเชื้อสาเหตุบนเมล็ดแตง

3. ในการทดลองครั้งที่ 2 ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับข้อ 2. แต่เมล็ดแตงที่ใช้ในการทดสอบเป็นเมล็ดแตงเมล่อนที่ปกติ และที่เป็นโรคจากแปลงเกษตรกร เปรียบเทียบกับเมล็ดแตงเมล่อนพันธุ์การค้า จำนวน 7 พันธุ์ มาตรวจสอบการติดเชื้อบนเมล็ด โดยเปลี่ยนแช่เมล็ดแตงในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ซับเมล็ดแล้วนำเมล็ดแตงไปวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA จำนวน 10 เมล็ดต่อจาน จำนวน 10 จาน ตรวจนับเมล็ดที่มีการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การงอกและการเจริญของเชื้อสาเหตุบนเมล็ดแตง และนำเชื้อราที่ตรวจพบในเมล็ดแตง มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และจัดจำแนกชนิดของเชื้อราว่าเป็นเชื้อราสาเหตุโรคยางไหลหรือไม่

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2553
สิ้นสุด กันยายน 2558
ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
แปลงเกษตรกรปลูกแตงที่สำคัญ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคยางไหลของพืชตระกูลแตง

ในปี 2554 ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างแตงกวา แตงร้าน แตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่แสดงอาการโรคในพื้นที่ปลูกแตง จ. กาญจนบุรี สุพรรณบุรี สระแก้ว และพะเยา เพื่อแยกหาเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ จากการเก็บตัวอย่างโรคในแตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนนั้น พบว่าลักษณะอาการของโรคยางไหล เริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง หลังจากนั้นส่วนทีเป็นแผลจะบุ๋มลึก และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หรือน้ำตาลแดง ลักษณะสำคัญของโรคคือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ส่วนอาการที่ใบก็จะพบใบเป็นแผลฉ่ำน้ำก่อน จากนั้นแผลที่ใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลุกลามไปตามเส้นกลางใบทำให้ใบไหม้ และที่บริเวณแผลที่แห้ง จะพบเชื้อราสร้างเม็ดสีดำ ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วแผล ซึ่งถ้าพบลักษณะอาการของโรคในช่วงระยะที่แตงติดผลหรือระยะที่กำลังเก็บเกี่ยวจะทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตของเกษตรกรเป็นอย่างมาก

2. การศึกษาชนิดเชื้อสาเหตุโรคยางไหล

จากการแยกเชื้อสาเหตุจากลักษณะอาการดังกล่าวโดยวิธี Tissue transplanting ซึ่งเมื่อศึกษาเส้นใยเชื้อราที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า สามารถแยกได้เชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยเชื้อรามีสีขาว ฟู ละเอียดในช่วง 3 วันแรก จากนั้นเส้นใยเชื้อราจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นเมื่อเชื้อรามีอายุมากขึ้น และการเจริญของโคโลนีเชื้อราจะพบมีการเจริญของเส้นใยไม่เท่ากัน ทำให้ขอบโคโลนีเกิดเป็นขอบหยัก เมื่อศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อจากชิ้นส่วนพืชที่มีการสร้างส่วนขยายพันธุ์สีดำที่เชื้อสร้างขึ้น ก็พบว่าเชื้อรามีการสร้าง pycnidia ขนาดเล็กสีดำ ฝังที่บริเวณแผล และภายใน pycnidia มีสปอร์ขนาดเล็กบรรจุอยู่ มีลักษณะรูปร่าง กลมรี เล็ก ใส มี 1-2 septate เมื่อเปรียบลักษณะเชื้อราดังกล่าวที่แยกได้กับเอกสารที่ใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อรา ILLUSTRATED GENERA of IMPERFECT FUNGI และหนังสือดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย ก็พบว่า โรคยางไหลจากแตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่เก็บตัวอย่างได้จาก จ. พะเยา จ. สระแก้ว และ จ. สุพรรณบุรี จำนวน 3 ไอโซเลท นั้น คือเชื้อรา *D. bryoniae* ซึ่งตรงกับรายงานต่างประเทศ ที่พบว่าลักษณะที่พบในระยะนี้เป็นเชื้อรา *Phoma cucurbitacearum* เพราะเชื้อราในระยะนี้จะสังเกตพบว่า เชื้อราจะมีการสร้าง pycnidia สีดำเล็กๆกระจายอยู่ทั่วบริเวณแผล และ pycnidia นี้สามารถสร้าง conidia ที่ไม่มี septate หรือมี septate เพียงอันเดียว (Keinath และคณะ,1995) ซึ่งเชื้อสาเหตุโรคยางไหล (Gummy Stem Blight) ที่เกิดจากเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. ซึ่งเป็นราชั้นสูง มีการระยะการสืบพันธุ์ 2 แบบ คือ ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage,teleomormp) เชื้อราจะมีการสร้าง perithecia ที่มี ascospores อยู่ภายในถุง ascus ดังนั้นเชื้อราที่แยกได้จึงพบอยู่ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage,

anamorph) เพราะพบการสร้าง เชื้อรามีการสร้าง pycnidia ขนาดเล็กสีดำ ฝังที่บริเวณแผล และภายใน pycnidia มีสปอร์ขนาดเล็กบรรจุอยู่ มีลักษณะรูปร่าง กลมรี เล็ก ใส มี 1-2 septate

3. **การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเส้นใยของรา *D. bryoniae***

จากการทดสอบเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลท ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ จำนวน 7 สูตร ได้แก่ PDA PSA PCA MEA CMA OMA และ V8 agar สูตรๆละ 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และทำการบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อและลักษณะของเส้นใยทุกวัน เป็นเวลา 9 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสาเหตุโรคสามารถเจริญได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท ในสูตรอาหาร PDA OMA และ V8 agar ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญแต่ละไอโซเลทแล้วพบว่าไอโซเลท สุพรรณบุรี มีการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่าไอโซเลท สระแก้ว และ พะเยา (ตารางที่ 1)

ส่วนการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคนั้น ได้ทำการแยกเลี้ยงเชื้อสาเหตุจำนวน 3 ไอโซเลท ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร จำนวน 7 สูตร ได้แก่ PDA PSA PCA MEA CMA OMA และ V8 agar สูตรๆละ 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ และได้นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส และทำการบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อและลักษณะของเส้นใยทุกวัน หลังการทดลอง 9 วัน ได้เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในอาหารแต่ละสูตร พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีในทุกสูตรอาหารที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และรองลงมาคือ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคทุกไอโซเลทเจริญได้ไม่ดี (ตารางที่ 2)

4. **การศึกษาสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการการสร้าง pycnidia ของรา *D. bryoniae***

เมื่อทำการบันทึกข้อมูลสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแล้ว จึงได้นำจานเลี้ยงเชื้อทดสอบทั้งหมดไปบ่มเชื้อต่อ เพื่อศึกษาสูตรอาหารและที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง pycnidia เมื่อครบ 20 วัน เชื้อราเริ่มมีการสร้างกลุ่มเส้นใยสีดำอัดแน่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ จึงได้ทำการบันทึกการสร้าง pycnidia ในแต่ละสูตร จนถึง 45 วัน ซึ่งผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่มีการสร้าง pycnidia ในทุกสูตรอาหาร ยกเว้นสูตรอาหาร MEA ที่ไอโซเลท สระแก้ว และพะเยา มีการสร้างเพียงเล็กน้อย และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อสาเหตุโรคไอโซเลท สระแก้ว สร้าง pycnidia ได้ดีในสูตรอาหาร PCA รองลงมาคือ V8 agar และในไอโซเลท พะเยา มีการสร้างเล็กน้อยบนสูตรอาหาร PDA, V8 agar และ OMA ส่วนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อสาเหตุโรคทั้ง 3 ไอโซเลท มีการสร้าง pycnidia ได้ในทุกสูตรโดยเฉพาะสูตรอาหาร PCA และ MEA ที่ไอโซเลท สระแก้ว และสุพรรณบุรี มีการสร้างได้จำนวนมาก ส่วน ไอโซเลท พะเยา นั้นเชื้อราสร้างได้เล็กน้อยถึงปานกลาง ในสูตรอาหารทั้งสองชนิด (ตารางที่ 3)

5. ศึกษาการอยู่อาศัยและเข้าทำลายของรา *D. bryoniae* ในเมล็ดแตงเมล่อนและแคนตาลูป

ผลการทดสอบการตรวจเมล็ดครั้งที่ 1 พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อรา *Rhizopus* sp. และ *Aspergillus* sp. ที่บริเวณรากของแตงเป็นจำนวนมาก ทำให้การตรวจเช็คประเมินค่อนข้างลำบาก เนื่องจากมีเส้นใยเชื้อราอื่นเจริญคลุมทับ หลังการวางเมล็ด 3 วัน จากการตรวจนับเมล็ดทั้งหมด 300 เมล็ด และนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดพันธุ์การค้ามีเปอร์เซ็นต์การงอกดี 85 เปอร์เซ็นต์ และพบเมล็ดที่งอกมีเชื้อราเจริญที่เปลือกหุ้มเมล็ด 6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่ไม่งอกและมีการเจริญของเชื้อราที่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ด พบ 9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดแตงเมล่อนที่ปกติและเป็นโรค มีเปอร์เซ็นต์

การงอก 34 และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบเมล็ดที่งอกมีเชื้อราเจริญที่เปลือกหุ้มเมล็ด 2 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเมล็ดที่ไม่งอกและมีการเจริญของเชื้อราที่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ด พบ 64 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในเมล็ดแตงแคนตาลูปที่ปกติและเป็นโรค มีเปอร์เซ็นต์การงอก 30 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบเมล็ดที่งอกมีเชื้อราเจริญที่เปลือกหุ้มเมล็ด 2 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน ส่วนเมล็ดที่ไม่งอกและมีการเจริญของเชื้อราที่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ด พบ 55 และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบมีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนเมล็ดแตงแคนตาลูปที่ปกติ 13 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในเมล็ดชนิดอื่นไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 4)

ดังนั้นในการทดลองครั้งที่ 2 จึงได้มีการเปลี่ยนวิธีการฆ่าเชื้อที่ผิวเป็นการแช่แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เพื่อป้องกันเชื้อราชนิดอื่นที่ไม่ใช่เชื้อสาเหตุเจริญก่อนที่จะทำการตรวจผลการทดลอง โดยการนับจำนวนเมล็ดที่งอกและติดเชื้อไม่ติดเชื้อ จำนวนเมล็ดที่ไม่งอกและติดเชื้อไม่ติดเชื้อ ซึ่งหลังการทดลอง 3 วัน พบว่า เมล็ดเมล่อนจากผลที่ปกติ มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 19 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 79 เมล็ด และติดเชื้อแบคทีเรีย 2 เมล็ด ส่วนเมล็ดเมล่อนจากผลที่เป็นโรคมีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 1 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 99 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรียขึ้นปะปน 2 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 328น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 53 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 1 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 46 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 329น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 68 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 2 เมล็ด และพบมีเชื้อแบคทีเรีย 30 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 330น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 64 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 2 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 34 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 331น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 75 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 14 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 11 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 332 น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 71 เมล็ด ไม่มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา แต่พบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 29 เมล็ด ในเมล็ดพันธุ์การค้า 333น มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 72 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 21 เมล็ด และพบมีติดเชื้อแบคทีเรีย 7 เมล็ด และสุดท้าย ในเมล็ดพันธุ์การค้า 523บ มีจำนวนเมล็ดงอกทั้งหมด 42 เมล็ด มีจำนวนเมล็ดไม่งอกและติดเชื้อรา 18 เมล็ด และพบมีเชื้อแบคทีเรีย 40 เมล็ด (ตารางที่ 5)

จากการทดสอบการติดเชื้อบนเมล็ดแตงทั้ง 2 การทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เมล็ดแตงเมล่อน แตงแคนตาลูปจากแปลงเกษตรกร และเมล็ดแตงเมล่อน พันธุ์การค้า พบมีการติดเชื้อราสาเหตุโรคมากับเมล็ดได้ โดยเฉพาะเป็นเมล็ดที่เก็บจากผลที่เป็นโรคจะพบการติดเชื้อบนเมล็ดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และ จากการศึกษาภายใต้จุลทรรศน์แบบสเตริโอ พบว่า การติดเชื้อบนเมล็ดมี 2 แบบ คือ แบบแรกคือเชื้อราสาเหตุโรคมีการเจริญอยู่บนเปลือกหุ้มเมล็ดแตงเท่านั้น และเมื่อเมล็ดมีการงอกเจริญส่วนของรากและใบเลี้ยงออกมาจะมีลักษณะปกติ แต่หลังจากเส้นใยเชื้อราเจริญและมีการเข้าทำลายรากและใบเลี้ยง จึงทำให้ต้นอ่อนตาย ส่วนแบบที่สองคือ เชื้อราเจริญคลุมเมล็ด ทำให้เมล็ดตายและไม่มีการงอกของเมล็ด

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สำรวจและเก็บตัวอย่างแตงกวา แตงร้าน แตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่แสดงอาการโรคยางไหล ที่ จ.สุพรรณบุรี แพร่ สระแก้ว และพะเยา เพื่อแยกหาเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ สามารถแยกได้รา *D. bryoniae* จำนวน 3 ไอโซเลท ทดสอบการเจริญของเชื้อสาแหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลทบน

อาหารสูตรต่างๆ จำนวน 7 สูตร ได้แก่ PDA PSA PCA MEA CMA OMA และ V8 agar ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสาเหตุโรค *D. bryoniae* ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีบนสูตรอาหาร PDA OMA และ V8 agar ส่วนอาหารสูตรอื่น ๆ สามารถเจริญได้ดีปานกลาง จากการทดสอบเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 3 ไอโซเลท ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร จำนวน 7 สูตร ได้แก่ PDA PSA PCA MEA CMA OMA และ V8 agar สูตรๆละ 10 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10, 20 และ 25 องศาเซลเซียส ทำการบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อและลักษณะของเส้นใยทุกวัน เป็นเวลา 9 วัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อราสาเหตุโรคสามารถเจริญได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท ในทุกสูตรอาหารที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เมื่อทำการศึกษาสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้าง pycnidia ของเชื้อราสาเหตุโรค ผลการทดลองก็พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อราสามารถสร้าง pycnidia ได้ ในทุกสูตรอาหาร และเชื้อราจะสร้างมากในสูตรอาหาร MEA และ PCA

จากการศึกษาการติดเชื้อบนเมล็ดและการเข้าทำลายเมล็ด โดยทำการศึกษาในเมล็ดแตงเมล่อน แคนตาลูป ผลที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคจากแปลงเกษตรกร เปรียบเทียบกับเมล็ดพันธุ์การค้า ผลการทดลองพบว่า เมล็ดแตงที่เก็บมามีทั้งการปนเปื้อนและการติดเชื้อที่เมล็ดทั้งในผลที่เป็นโรคและผลไม่เป็นโรค ซึ่งการปนเปื้อนที่มีการติดเชื้อบนเปลือกหุ้มเมล็ดนั้น เมล็ดสามารถงอกและเจริญได้ปกติและเชื้อราเข้าทำลายต้นอ่อนทีหลัง ซึ่งพบมีเพียง 2-6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการติดเชื้อบนเมล็ดนั้น ทำให้เมล็ดไม่งอกและเชื้อรามีการเจริญคลุมเมล็ด ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมล็ดแตงทั้งสองชนิดที่เก็บมามีการติดเชื้อและเมล็ดไม่งอก 23- 71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงมากเมื่อเทียบกับเมล็ดพันธุ์การค้าที่พบเพียง 9 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

ทัศนาพร ทัศคร และ พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2552. โรคยางไหลในแคนตาลูป. จดหมายข่าวผลิใบ ปีที่ 12 ฉบับที่ 3 ประจำเดือน เมษายน 2552. หน้า 2 - 3.

พรพิมล อธิปัญญาคม และ ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2552. อนุกรมวิธานราสาเหตุโรคพืช Class Ascomycetes. เอกสารวิชาการ *ใน* รายงานการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช ณ โรงแรมเมธาวลัย อ. ชะอำ จ. เพชรบุรี วันที่ 1-3 มิถุนายน 2552. หน้า 73 – 77.

Keinath, A. P.,Farnham, M. W.., and Zitter, T. A. 1995. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. Isolated from cucurbits. Phytopathology 85: 364-369.

การตรวจสุขภาพของเมล็ดพันธุ์ (Seed Health Testing), http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning47/PP300/0003html/chapter014.htm **เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2557**

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จำนวน 3 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิห้อง หลังการทดลอง 9 วัน

สูตรอาหาร	Isolate		
	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี
PDA	6.75	6.65	8.52
V8	6.06	5.90	6.72
MEA	5.74	5.90	5.74
OMA	5.15	5.65	5.78
PCA	6.11	6.15	6.78
CMA	5.10	5.50	6.59
PSA	5.90	4.95	6.64

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากอาหารแต่ละสูตรๆละ 10 ซ้ำ

ตารางที่ 2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จำนวน 3 ไอโซเลท หลังการทดลอง 9 วัน

สูตรอาหาร	10 °C			20 °C			25 °C		
	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี	สระแก้ว	พะเยา	สุพรรณบุรี
PDA	1.64	4.34	1.83	9.00	8.93	9.00	6.08	5.76	8.20
V8	1.85	2.30	2.08	8.28	8.60	9.00	5.41	6.66	6.38
MEA	2.71	1.89	1.04	7.73	8.10	8.28	6.16	6.19	7.01
OMA	2.11	2.30	2.30	8.27	8.07	8.83	7.70	6.95	7.85
PCA	1.64	1.60	0.98	8.48	6.36	8.75	5.73	6.04	7.02
CMA	1.85	1.57	1.14	6.35	7.45	8.92	4.42	3.59	5.71
PSA	1.59	1.41	0.96	9.00	9.00	8.73	6.65	6.70	7.86

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากอาหารแต่ละสูตรๆละ 10 ซ้ำ

ตารางที่ 3 การศึกษาสูตรอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญต่อการสร้าง pycnidia ของเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จำนวน 3 ไอโซเลท

สูตรอาหาร	10 °C			20 °C			25 °C		
	สระแก้ว	**พะเยา**	**สุพรรณบุรี**	**สระแก้ว**	**พะเยา**	**สุพรรณบุรี**	**สระแก้ว**	**พะเยา**	**สุพรรณบุรี**
PDA	-	-	-	+	+	+	+	+	++
V8	-	-	-	++	+	-	+	+	+
MEA	+	+	-	-	-	+	+++	+	+++
OMA	-	-	-	+	+	+	+	+	+
PCA	-	-	-	+++	-	++	+++	++	+++
CMA	-	-	-	-	-	+	++	+	+
PSA	-	-	-	+	-	-	+	+	+

หมายเหตุ : +++ เชื้อรามีการสร้าง pycnidia จำนวนมาก
++ เชื้อรามีการสร้าง pycnidia ปานกลาง
+ เชื้อรามีการสร้าง pycnidia เล็กน้อย
- เชื้อราไม่มีการสร้าง pycnidia

ตารางที่ 4 การตรวจสอบการติดเชื้อราสาเหตุโรคที่เมล็ดแตงเมล่อน แคนตาลูป และเมล็ดพันธุ์การค้าโดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนอาหารวุ้น (Agar-Plate method) ครั้งที่ 1

เมล็ดพันธุ์	**เมล็ดงอก (%)**	**เมล็ดงอกและมีเชื้อราติดที่เมล็ด (%)**	**เมล็ดไม่งอกและมีเชื้อราติดที่เมล็ด (%)**	**เมล็ดไม่งอกและเชื้อแบคทีเรียติดที่เมล็ด (%)**
เมล็ดพันธุ์การค้า	85	6	9	0
เมล็ดเมล่อนผลปกติ	34	2	64	0
เมล็ดเมล่อนผลเป็นโรค	23	6	71	0
เมล็ดแคนตาลูปผลปกติ	30	2	55	13
เมล็ดแคนตาลูปผลเป็นโรค	75	2	23	0

หมายเหตุ : คิดค่าเปอร์เซ็นต์จากการตรวจนับเมล็ด จำนวน 300 เมล็ด /ชุดเมล็ดทดสอบ

ตารางที่ 5 การตรวจสอบการติดเชื้อราสาเหตุโรคที่เมล็ดแตงเมล่อนและเมล็ดพันธุ์การค้า 7 พันธุ์ๆละ 100 เมล็ด โดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนอาหารวุ้น (Agar-Plate method) ครั้งที่ 2

เมล็ดพันธุ์	จำนวนเมล็ดที่งอก	จำนวนเมล็ดไม่งอก/ เชื้อราติดที่เมล็ด	จำนวนเมล็ดไม่งอก/ เชื้อแบคทีเรียติดที่เมล็ด
เมล็ดเมล่อนผลปกติ	19	79	2
เมล็ดเมล่อนผลเป็นโรค	1	99	46
พันธุ์ 328 น	53	1	46
พันธุ์ 329 น	68	2	30
พันธุ์ 330 น	64	2	34
พันธุ์ 331 น	75	14	11
พันธุ์ 332 น	71	0	29
พันธุ์ 333 น	72	21	7
พันธุ์ 523 บ	42	18	40

หมายเหตุ : ทำการตรวจนับเมล็ด จำนวน 100 เมล็ด /พันธุ์