การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Exserohilum turcicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

Study of corn seed born caused by *Exserohilum turcicum*

พีระวรรณ พัฒนวิภาส[1/] ศิวิไล ลาภบรรจบ[2/] สุริพัฒน์ ไทยเทศ[2/]

[1/] **กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

[2/] **ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน**

บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวโพดพืชที่มีลักษณะอาการใบไหม้และจุดแผลสีคล้ายฟ่างข้าวจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทยตรวจลักษณะอาการของโรคในแปลงปลูก นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคมาจำแนกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ถ่ายรูปตัวอย่างโรคแล้วจัดทำ permanent slide เพื่อการวินิจฉัยโรค สามารถจำแนกเป็นเชื้อรา *Exserohilum turcicum* จำนวน 4 ไอโซเลท คือ อ. เมือง จ. กาญจนบุรี อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่ อ. แม่สอด จ. ตาก แล อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา ปลูกข้าวโพดจำนวน 1 สายพันธุ์ สุ่มเก็บเมล็ดพันธุ์จากข้าวโพด นำมาศึกษาเชื้อในเมล็ดพันธุ์ โดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษซึ้น (Blotter method) ผลการทดลองพบว่าไม่พบเชื้อรา *Exserohilum turcicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-15-56

คำนำ

โรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Exerohilum turcic*um และเป็นโรคหนึ่งที่ระบาดรุนแรงในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะในเขตภาคตะวันตก และภาคเหนือ เช่น จ.กาญจนบุรี จ.เพชรบุรี จ.ราชบุรี และ จ.เชียงใหม่ โรคนี้พบได้ตลอดฤดูเพาะปลูก โดยเฉพาะในช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำและความชื้นสูงโรคจะระบาดรุนแรงมาก (กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2545) นอกจากนี้ปัจจุบันยังพบการเกิดโรคเพิ่มขึ้นในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคและเชื้อสาเหตุโรคของข้าวโพดเพื่อการนำเข้า ในปี 2547 พีระวรรณ และคณะ (2549) ได้ทำการสำรวจโรคในแหล่งปลูกข้าวโพดในเขตภาคกลาง ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 4 จังหวัด พบการระบาดของโรคใบไหม้แผลใหญ่ใน จ.นครราชสีมา จ.นครพนม และ จ.ตาก และในปี 2548 ได้ทำการสำรวจโรคในเขตภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 4 จังหวัด พบการระบาดของโรคใน จ.สุโขทัย จ.ตาก และ จ.นครราชสีมา ในปีการผลิต 2549 พบว่า โรคใบไหม้แผลใหญ่มีการระบาดรุนแรงและทำความเสียหายต่อผลผลิตและคุณภาพข้าวโพดหวานในแหล่งผลิตที่สำคัญอย่างรุนแรง (สมาคมปรับปรุงพันธุ์พืชและขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย และคณะ, 2549) โรคใบไหม้แผลใหญ่มักเริ่มพบเมื่อข้าวโพดอายุประมาณ 45 วัน หรือก่อนข้าวโพดออกดอก อาการเริ่มแรกพบแผลขนาดเล็กสีคล้ายฟ่างข้าวบนใบข้าวโพดต่อมาแผลจะขยายมีขนาดใหญ่ยาวตามใบข้าวโพด เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะพบอาการแผลบนใบข้าวโพดหลายแผลต่อใบและแผลขยายรวมกันมากๆ ทำให้ใบข้าวโพดแห้งตาย สามารถพบอาการของแผลได้บนกาบฝัก ข้าวโพดที่เป็นโรครุนแรงโดยเฉพาะเมื่อพบอาการบนกาบฝักจะทำให้ฝักไม่สมบูรณ์ (ชุติมันต์ และเตือนใจ, 2545; พีระวรรณและคณะ, 2549) ทำให้มีผลต่อการผลิตข้าวโพดซึ่งจะมีผลต่อเนื่องถึงอุตสาหกรรมอื่นๆเช่น การเลี้ยงสัตว์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ปากกาเคมี หนังยาง
2. สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), water agar (WA)
4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ กระบอกตวง ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม สไลด์ cover slip
5. ตู้ปลอดเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบความร้อน เครื่องชั่ง
6. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. การแยกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่

เก็บใบข้าวโพดที่เป็นโรค นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue Transplanting โดยตัดใบที่เป็นแผลเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อก 10 เปอร์เซ็นต์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงวางบนอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิ

25-30 องศาเซลเซียส หลังจากที่มีเชื้อเจริญออกมาจากขอบแผล ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture

2. การเพิ่มปริมาณเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่

นำเมล็ดของข้าวฟ่าง มาแช่น้ำนาน 18 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำที่แช่เมล็ด 3-4 ครั้ง เพื่อให้เมล็ดสะอาดหลังจากนั้นนำมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำแล้วบรรจุเมล็ดข้าวฟ่างลงในถุงพลาสติกทนความร้อนปริมาณ 2 ใน 3 ของภาชนะ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งในวันถัดมา เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ลงไปในถุงข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเริ่มมีการเจริญของเส้นใยบนเมล็ดข้าวฟ่าง เขย่าถุงเพื่อให้เชื้อกระจาย ไม่เกาะเป็นก้อนแข็ง บ่มไว้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อเจริญอยู่ออกมาผึ่งในที่ร่มให้ความชื้นลดลง นำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อเจริญอยู่มาบุบให้แตกเพื่อให้มีขนาดเล็กลงและมีความสม่ำเสมอ นำไปปลูกเชื้อให้กับต้นข้าวโพดที่ปลูกในแปลงทดลอง

3 การเตรียมแถวแพร่เชื้อ

ปลูกข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอ ไฮบริกซ์ 3 เป็นแถวสำหรับแพร่เชื้อ (spreader row) รอบนอกพื้นที่ทดลองในลักษณะตาราง โดยมีระยะระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ระยะระหว่างต้น 20 เซนติเมตร จำนวน 2 เมล็ดต่อหลุม จากนั้นจึงถอนแยกให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม

4 การปลูกเชื้อ

หลังจากที่ข้าวโพดในแถวแพร่เชื้องอกได้ 2 สัปดาห์ ปลูกเชื้อโดยการหยอดเมล็ดข้าวฟ่างที่มีสปอร์ของเชื้อลงในใบยอดของข้าวโพด แล้วพ่นน้ำตาม

- เมื่อข้าวโพดในแถวแพร่เชื้ออายุได้ 4 สัปดาห์ ปลูกข้าวโพดทดสอบลงในแปลงที่เตรียมไว้

5. การประเมินระดับความรุนแรงโรคใบไหม้แผลใหญ่

เมื่อข้าวโพดเริ่มแสดงอาการของโรคใบไหม้แผลใหญ่(ข้าวโพดอายุ ประมาณ 45 วัน ประเมินโรคโดยให้ระดับความรุนแรง 1-5 ตามพื้นที่ใบที่ปรากฏแผล โดยสุ่มต้นข้าวโพดจำนวน 10 ต้น จาก 2 แถวกลาง ดังนี้

ระดับ 1 = ไม่เกิดแผล
'' 2 = เกิดแผล ตั้งแต่ 1 - 25 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ
'' 3 = เกิดแผล ตั้งแต่ 26 - 50 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ
'' 4 = เกิดแผล ตั้งแต่ 51 – 75 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ใบ
'' 5 = เกิดแผล ทุกใบ ตั้งแต่ 76 - 100 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ ใบไหม้ ต้นแห้งตาย

6 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *E. turcicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

สุ่มเก็บเมล็ดพันธุ์จากข้าวโพดโดยวิธีการสุ่มเป็นไปตามกฎมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association) นำมาทดสอบมาศึกษาเชื้อในเมล็ดพันธุ์ ดังนี้

1. วิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษชื้น (Blotter method) โดยวางเมล็ดพันธุ์ลงบนกระดาษกรอง No.1 1 แผ่น (หรือกระดาษเพาะ 2 แผ่น)

2. ซ้อนอยู่บนกระดาษฟาง 3 แผ่น ที่ชุ่มน้ำซึ่งวางอยู่ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มในตู้เพาะที่อุณหภูมิ 280 ซ ภายใต้แสง NUV (near ultra violet) ตรวจดูเชื้อราภายใต้กล้องสเตอริโอ

7. เก็บข้อมูล วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติที่เหมาะสม รายงานผลการทดลอง

ระยะเวลา

ตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่

เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่มีลักษณะอาการแผลสีคล้ายฟ่างข้าวบนใบข้าวโพดจากจังหวัดเชียงใหม่นำมาศึกษาบันทึกลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธี tissues transplanting method โดยตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคขนาด 3 x 5 ซม. ฆ่าเชื้อภายนอกด้วยคลอร็อกซ์ 10 % เป็นเวลา 2 – 4 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้งวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในสภาพปลอดเชื้อบ่มเชื้อไว้นาน 2 - 3 วัน ทำ hyphal tip isolation นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้เลี้ยงบนอาการเลี้ยงเชื้อ PDA ศึกษารูปร่าง และการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เขี่ยเชื้อทำสไลด์ตรวจดูลักษณะรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถแยกได้เชื้อ *E. turcicum* ต่อจากนั้นพิสูจน์โรคโดยวิธีของ Koch (Kock ‘ s postulate) โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาปลูกบนต้นข้าวโพดแล้วแยกเชื้อซ้ำอีกครั้ง พบว่าเชื้อที่เจริญบนอาหารเหมือนเดิม คือเชื้อ *E. turcic*um

2. การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *E. turcicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

ปลูกข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอ ไฮบริกซ์ 3 เป็นแถวสำหรับแพร่เชื้อ (spreader row) รอบนอกพื้นที่ทดลองในลักษณะตาราง โดยมีระยะระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ระยะระหว่างต้น 20 เซนติเมตร จำนวน 2 เมล็ดต่อหลุม จากนั้นจึงถอนแยกให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม ปลูกเชื้อโดยการหยอดเมล็ดข้าวฟ่างที่มีสปอร์ของเชื้อลงในใบยอดของข้าวโพด ปลูกข้าวโพดทดสอบภายใน สุ่มเก็บเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด นำมาศึกษาโดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษชื้น (Blotter method) ตรวจดูเชื้อราภายใต้กล้องสเตอริโอผลการทดลองพบว่าไม่พบเชื้อรา *Exserohilum turcicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Exserohilum turcicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด โดยได้สำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวโพดพืชที่มีลักษณะอาการใบไหม้และจุดแผลสีคล้ายฟ่างข้าวจากแหล่งปลูกข้าวโพดที่สำคัญในประเทศไทยตรวจลักษณะอาการของโรคในแปลงปลูก นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคมาจำแนกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ถ่ายรูปตัวอย่างโรคแล้วจัดทำ permanent slide เพื่อการวินิจฉัยโรค สามารถจำแนกเป็นเชื้อรา *Exserohilum turcicum* จำนวน 4 ไอโซเลท คือ อ. เมือง จ. กาญจนบุรี อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่ อ. แม่สอด จ. ตาก แล อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา

ปลูกข้าวโพดจำนวน 1 สายพันธุ์ สุ่มเก็บเมล็ดพันธุ์จากข้าวโพด นำมาศึกษาเชื้อในเมล็ดพันธุ์ โดยวิธีเพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษชื้น (Blotter method) ผลการทดลองพบว่าไม่พบเชื้อรา *Exserohilum turcicum* บนเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

เอกสารอ้างอิง

กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 2545. คู่มือโรคพืชไร่. เอกสารวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 105 หน้า.

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และเตือนใจ บุญ-หลง. 2545. โรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.69 หน้า.

พีระวรรณ พัฒนวิภาส อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย และณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2549. การจัดทำบัญชีรายชื่อโรคและเชื้อสาเหตุโรคของข้าวโพดเพื่อการนำเข้า. *ใน* : เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดข้าวฟ่างมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 2. วันที่ 9-11 มีนาคม 2549. ณ สีดารีสอร์ท อ.เมือง จ.นครนายก.

สมาคมปรับปรุงพันธุ์พืชและขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท และสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5. 2549. การสัมมนาเชิงปฏิบัติการ ระบบการส่งเสริมและวิเคราะห์ปัญหาในการผลิตข้าวโพดหวานเพื่ออุตสาหกรรม. วันที่ 1-3 มีนาคม 2549. ณ โรงแรมมนตรี จ.ชัยนาท.

Tzeng, T.F., L.K. Lyngholm, C.F. Ford and C.R. Bronson. 1992. A RFLP maps and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. Genetics 130: 81-92.

พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2546. โรคกาบและใบไหม้ข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* . หน้า 260-263. ใน : รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 31. 11-15 พฤษภาคม 2546. ณ โรงแรมโรสการ์เดนท์ เอไพรม รีสอร์ท อ. สามพราน จ. นครปฐม.