

ศึกษากลไกความต้านทานของพริกต่อโรคลำต้นไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา

Phytophthora capsici

Resistance Mechanism of chilli pepper to *Phytophthora capsici*

ศรีสุข พูนผลกุล ศิริพงษ์ คุ่มภัย

กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Phytophthora capsici*, สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกทำความเสียหายต่อการปลูกพริกทั่วโลก การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพด้วยการจำแนกสายพันธุ์ (pathotypes) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพิจารณาคัดเลือกพันธุ์ต้านทานที่มีประสิทธิภาพ เชื้อรา 6 ไอโซเลทเป็นตัวแทนเชื้อราที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จาก 5 จังหวัด ราคเชื้อราอัตรา 50,000 สปอร์/ มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อต้น บนพริกทดสอบ 11 สายพันธุ์ ได้แก่ PI 2301232, CM 331, CNPH 703, PI 2301238, PI 2301234, CM 334, PI 189550, Early calwonder,, PBC 602, PBC 137 และพริกพันธุ์จินดา เมื่อมีอายุ 6 สัปดาห์ ตรวจสอบการเป็นโรคลำต้นไหม้หลังการปลูกเชื้อ 21 วัน ผลการทดสอบพบว่าเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกที่พบในประเทศไทยจัดไว้ได้ 3 pathotypes

การศึกษากายทอดลักษณะความต้านทานโรคได้ดำเนินการผสมพันธุ์พริก โดยใช้พันธุ์แม่ 7 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ พิจิตร 1 (พันธุ์อ่อนแอ) พิจิตร 05 พิจิตร 06 พิจิตร 15-1-1-1 พิจิตร 18 -1 - 1 - 1 พิจิตร 27-1-2-1 และ PBC 743 ผสมกับพันธุ์พ่อ PI 2301234 พบว่ายีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคลำต้นไหม้ของพริกสายพันธุ์ PI 2301234 เป็นยีนลักษณะเด่น 3 คู่ ถ่ายทอดแบบบังคับไม่ให้ยีนต่างคู่กันแสดงออกเมื่อมีการถ่ายทอดไปยังคู่ผสมที่มียีนด้อยอย่างน้อย 1 คู่ ปรากฏอยู่

คำนำ

เชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริก ได้รับการจำแนกสายพันธุ์โดยการใช้พีชอาศัย แต่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทำให้เกิดโรคและพีชอาศัย (Polach and Webster, 1972) เชื้อราสร้าง oospores เมื่อมีการผสมพันธุ์แบบใช้เพศโดยสามารถผสมพันธุ์กับ Strain ทั้งที่เป็น type เดียวกัน หรือต่าง type กันได้ ซึ่งเป็นเหตุที่ทำให้เชื้อรามีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมขึ้นในธรรมชาติ (Chowdappa and Chandramohan, 1997) เชื้อราสร้าง zoospores เพื่อการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศภายในเวลา 48-96 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 20-23 องศาเซลเซียส โดย zoospores จะแพร่กระจายไปทางน้ำ (Tlapal Bolanos et al, 1995) นอกจากนี้เชื้อราสามารถติดไปกับผลพริก ลำต้น ใบ และรากของพีชอาศัย

ลักษณะอาการของโรคลำต้นไหม้ของพริก พบรอยไหม้สีดำบนลำต้นในระดับความรุนแรงของสายพันธุ์ ของเชื้อสาเหตุ ซึ่งรอยไหม้สีดำนี้เกิดจากการสะสมของสาร phytoalexin(capsidiol) เป็นกลไกการต้านทานแบบ hypersensitivity reaction (Egea *et al.*,1996)

การป้องกันกำจัดด้วยการใช้สารเคมี metalaxyl หรือ chlorothalonil ฟันบนใบและลำต้น จะป้องกันโรคได้ วิธีการทางเกษตรกรรม เช่น การตากดินก่อนการปลูกพืช Yucel (1995) พบว่าอุณหภูมิ ดินสูงถึง 47 องศาเซลเซียสจะกำจัดเชื้อราสาเหตุของโรค ในขณะที่ Rista *et al.* (1995) พบว่าการให้น้ำต้นพริกที่ปลูกในโรงเรือนด้วยวิธีการต่างๆ ทำให้การแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคแตกต่างกัน ด้าน การคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน Yang *et al.* (1996) พบว่าพริกหวานพันธุ์ Zhongjiao 7 ต้านทานปาน กลางต่อเชื้อสาเหตุ ส่วนการควบคุมโรคโดยชีววิธี พบเชื้อปฏิปักษ์ที่เป็นศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ เชื้อรา *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium virens* และ *Streptomyces griiseoviridis* และเชื้อ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Nemec *et al.* , 1996)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์พริกที่ใช้ทดสอบ 11 พันธุ์ ได้แก่ PI 2301232, CM 331, CNPH 703, PI 2301238, PI 2301234, CM 334, PI 189550, Early calwonder,, PBC 602, PBC 137 และพริกพันธุ์จินดา พันธุ์ พริกสำหรับเป็นพันธุ์แม่ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ พิจิตร 1 (พันธุ์อ่อนแอ) พิจิตร 05 พิจิตร 06 พิจิตร 15-1-1-1 พิจิตร 18 – 1 – 1 – 1 พิจิตร 27-1-2-1 และ PBC 743 พันธุ์ต้านทานสำหรับใช้เป็นพันธุ์ พ่อได้แก่ PI 2301234
2. เชื้อรา 6 ไอโซเลท ได้แก่ PPB 1 (อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์), PCM 14 และ PCM 17 (อ.สันทราย จังหวัดเชียงใหม่), PSM (อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่), PSK 16 (อำเภอพรหมนาณิกม จังหวัดสกลนคร) และ PCR (อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย)
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
4. อุปกรณ์ในเรือนทดลอง

วิธีการ

งานทดลองที่ 1 ศึกษา physiological race ของเชื้อรา *Phytophthora capsici* ไอโซเลท ต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย

การสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกจากแปลงปลูกของเกษตรกร ในท้องที่ปลูกพริกจังหวัดต่างๆ ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (RNV) เพิ่ม ปริมาณเชื้อและเก็บรักษาเชื้อราด้วยอาหารพีดีเอ เตรีียมสปอร์แขวนลอยโดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารพีดี เอนาน 5 วัน ตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย นำไปลอยในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อในงานเลี้ยงเชื้อ นาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบ sporangium ที่เชื้อราสร้างขึ้น นำงานเลี้ยงเชื้อราไปวางในตู้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ก่อนนำออกมาวางในอุณหภูมิห้องเพื่อให้เชื้อราผลิต zoospore ตรวจสอบ

ปริมาณ zoospore ก่อนเติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงผสมให้จำนวนสปอร์แขวนลอยมีจำนวน 20,000 สปอร์/มิลลิลิตร นำไปใช้เพื่อการปลูกเชื้อภายใน 1 ชั่วโมง

เตรียมปลูกพริกพันธุ์ทดสอบ (differential hosts) จำนวน 11 สายพันธุ์ เมื่อกล้าพริกมีอายุ 4 สัปดาห์ ย้ายลงปลูกในกระถางกระถางละ 5 ต้น จำนวนสายพันธุ์ละ 4 กระถาง เพาะเลี้ยงไว้ 2 สัปดาห์ ก่อนทำการทดลอง ใช้ pipette ดูดสารแขวนลอยเชื้อราแต่ละไอโซเลทที่เตรียมไว้ ราวลงในกระถางพริกทดสอบกระถางละ 25 มิลลิลิตร เก็บพืชทดสอบไว้ในเรือนทดลอง บันทึกข้อมูลการเป็นโรคทุกวัน 4 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยให้คะแนนการเป็นโรคระดับต่างๆ ดังนี้

ระดับ 0 = ไม่พบอาการของโรค

ระดับ 1 = รอยแผลสีดำ 1 –10 % ของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง ต้นพริกแสดงอาการเหี่ยวเล็กน้อย

ระดับ 2 = รอยแผลสีดำ 11 –50 % ของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง ต้นพริกแสดงอาการเหี่ยว

ระดับ 3 = รอยแผลสีดำ 51 –100 % ของลำต้นส่วนใต้ใบเลี้ยง ต้นพริกแสดงอาการเหี่ยวใบร่วง

ระดับ 4 = รอยแผลสีดำของลำต้นส่วนเหนือใบเลี้ยง ต้นพริกแสดงอาการตาย

งานทดลองที่ 2 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคลำต้นไหม้ของพริกสายพันธุ์

เตรียมลูกผสมพันธุ์พริก โดยใช้พันธุ์แม่ 7 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ พิจิตร 1 (พันธุ์อ่อนแอ) พิจิตร 05 พิจิตร 06 พิจิตร 15-1-1-1 พิจิตร 18 – 1 – 1 – 1 พิจิตร 27-1-2-1 และ PBC 743 ผสมกับ พันธุ์พ่อ ได้แก่ PI 2301234 เพื่อสร้าง ลูกผสมชั่วที่ 1 และลูกผสมชั่วที่ 2 ใช้ในการเปรียบเทียบการเป็นโรคระดับต่างๆ ร่วมกับ พันธุ์พ่อ-พันธุ์แม่ รวมทั้งสิ้นประมาณ 500 ต้น

ปลูกพริกลูกผสมชั่วที่ 2 และพริกสายพันธุ์พ่อและแม่ในถาดเพาะกล้าขนาด 14X22 นิ้ว ซึ่งมีจำนวนต้นกล้า 104 ต้นต่อถาด ปลูกเลี้ยงในโรงเรือนจนต้นกล้ามีอายุ 1 เดือน

เลี้ยงเชื้อรา *P. capsici* ไอโซเลทเชียงใหม่ PCM 17 (สายพันธุ์รุนแรง) บนอาหาร PDA เป็นเวลา 6 วัน ชักนำให้เชื้อราสร้าง zoospores เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ตรวจนับและปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอย zoospores ที่ความเข้มข้น 20,000 สปอร์ ต่อ มิลลิลิตร

ปลูกเชื้อสาเหตุบนพืชทดสอบโดยใช้ pipette ดูดสารแขวนลอยเชื้อรารดโคนต้นด้วยปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อต้น ตรวจสอบปฏิกิริยาของพันธุ์พริกที่มีต่อเชื้อราสาเหตุ บันทึกข้อมูล เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และการคำนวณลักษณะถ่ายทอดความต้านทานด้วยกฎของเมนเดล

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2551 - กันยายน 2553

กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานทดลองที่ 1 ศึกษา physiological race ของเชื้อรา *Phytophthora capsici* ไอโซเลทต่างๆ ที่พบในประเทศไทย

พันธุ์พริกทดสอบที่อ่อนแอต่อเชื้อรา ทุกไอโซเลทได้แก่ พันธุ์จินดา แสดงอาการของโรคลำต้นไหม้ ระหว่าง 4.0 -5.0 คะแนน พันธุ์ Early calwonder อ่อนแอต่อทุกไอโซเลท อาการของโรคระหว่าง 3.5 – 5.0 ยกเว้นด้านทานปานกลางต่อไอโซเลท PCM 17 คะแนนของโรคบันทึกได้ 2.0 คะแนน พันธุ์ CNPH 703 อ่อนแอต่อไอโซเลท PCM17, PSK16 PSM1 และ PCR บันทึกคะแนนได้ 3.2 – 4.0 คะแนน และด้านทานปานกลางต่อไอโซเลท PPB1 และ PCM 14 บันทึกคะแนนได้ 2.0 - 2.8 (Table 1)

พันธุ์พริกที่แสดงอาการด้านทานต่อเชื้อราทุกไอโซเลทได้แก่พันธุ์ CM 331, CM 334, PI 201238, PI 201232, PI 201234 คะแนนของโรคระหว่าง 0 – 0.8 คะแนน สำหรับพันธุ์ PI 189550 แสดงอาการของโรคปานกลางระหว่าง 0.4 – 1.6 คะแนน (Table 1)

พริกทดสอบพันธุ์ PBC 602 อ่อนแอต่อไอโซเลท PCM 14 บันทึกคะแนนได้ 3.4 คะแนน แสดงอาการด้านทานปานกลางต่อไอโซเลท PCM17 และ PSM1 คะแนนระหว่าง 2.3 – 2.5 คะแนน และด้านทานต่อไอโซเลท PPB1 และ PCR (Table 1)

พริกทดสอบพันธุ์ PBC 137 แสดงอาการอ่อนแอต่อทุกไอโซเลท มีคะแนน ระหว่าง 3.5 – 4.5 ยกเว้น ไอโซเลท PSK 16 และ PCR (Table 1)

เมื่อเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาอาการลำต้นไหม้ของพริกซึ่งเกิดบนพืชทดสอบ ทั้ง 11 ชนิดแสดงว่าเชื้อราทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นเชื้อราต่าง pathotype กัน โดยเชื้อราไอโซเลท PCM 17, PSK 16 และ PCR เป็น pathotype 1, PPB 1 เป็น pathotype 2 PCM 14 และ PSM 1 เป็น pathotype (Table 2)

งานทดลองที่ 2 ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคลำต้นไหม้ของพริกสายพันธุ์

การผสมพันธุ์พริกเพื่อสร้างลูกผสมสำหรับการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคลำต้นไหม้ของพริก ได้ดำเนินการผสมพันธุ์พริก จำนวน 7 คู่ผสม โดยใช้พริกสายพันธุ์ PI 2301234 เป็นพันธุ์พ่อ ผลการทดลองได้ผสมพันธุ์พริกและสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งสิ้น 67 สายพันธุ์ และได้ปลูกพริกลูกผสมทั้งหมดปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อเก็บผลผลิตลูกผสมชั่วที่ 2

หลังการรูดสารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริก นับจำนวนต้นพริกลูกผสมที่แสดงอาการของโรคและต้นพริกที่ไม่แสดงอาการ คำนวณข้อมูลตามกฎของเมนเดลสัดส่วนต้นพริกลูกผสมต้านทานและอ่อนแอต่อดังแสดงในตาราง (ตารางที่ 3)

Table 1 Disease severity rating, based on root and crown reactions, 21 days after inoculation.

Differential Host	Fungal Isolates / DSR					
	PPB 1	PCM 14	PCM 17	PSK 16	PSM 1	PCR
Early calwonder	4.5	4	2	3.5	5	4
PBC 137	3.5	4	4	0	4.5	0
PBC 602	1.0	3.4	2.3	0	2.5	0
PI 2301234	0.8	0	0	1	0	0
PI 2301232	0	0.5	0	0	0	0
CM 331	0	0	0	0.8	0	0
CNPH 703	2	2.8	3.9	3.2	4	3.4
PI 2301238	0	0	0.4	0.8	0.4	0
CM 334	0	0	0	0	0	0
PI 189550	0.4	1.2	1.2	2	1.6	0.8
Chinda	4	5	5	5	4.8	4
Pathotype	2	3	1	1	3	1

Note :

PPB 1	=	Kao Koh District,	Petchaboon Province
PCR	=	Muang District,	Chiang Rai Province
PCM 14, PCM 17	=	Sansai District,	ChiangMai Province
PSM 1	=	Sameuang District,	ChiangMai Province
PSK 16	=	Pannanikom District,	Sakol Nakorn Province

Table 2 Pathotype identification for *Phytophthora capsici* on 4 differential hosts

Differential hosts	pathotype 1	pathotype 2	pathotype 3
Early calwonder	S	S	S
PBC 137	R	S	S
PBC 602	R	R	S
PI 2301234	R	R	R

Table 3 Resistance : susceptible reaction of F2 chili pepper (PI2301234 X Females) after inoculated with zoospores of *Phytophthora capsici* at concentration 20,000 sp/ ml.

PBC 734 (S)	P15 (R)	P 05 (R)	P 27 (R)	P 06 (R)	P18 (R)	P 1 (S)
3:1	4:0	4:0	13:3	4:0	15:1	13:3

Table 4 Genotypes for chili pepper against *Phytophthora capsici*

chili pepper cultivars	Genotype	Pathogenic reaction
PI2301234 (M)	Rpc1Rpc1 Rpc2 Rpc2 Rpc3 Rpc3	R
Pichit 1 (F)	Rpc1Rpc1 rpc2 rpc2 rpc3 rpc3	S
Pichit 05 (F)	Rpc1Rpc1 Rpc2 Rpc2 Rpc3 Rpc3	R
Pichit 06 (F)	Rpc1Rpc1 Rpc2 Rpc2 Rpc3 Rpc3	R
Pichit 15-1-1-1 (F)	Rpc1Rpc1 rpc2 rpc2 rpc3 rpc3	R
Pichit 18-1-1-1 (F)	Rpc1Rpc1 Rpc2 Rpc2 rpc3 rpc3	R
Pichit 27-1-2-1 (F)	Rpc1Rpc1 rpc2 rpc2 rpc3 rpc3	R
PBC 743 (F)	rpc1rpc1 rpc2 rpc2 rpc3 rpc3	S

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาพบว่า เชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกที่พบในประเทศไทยจัดไว้ได้ 3 pathotype โดยพบเชื้อราที่ได้จากอำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ เป็นเชื้อราสายพันธุ์รุนแรงที่สุด (pathotype 3) เชื้อราจากจังหวัดเพชรบูรณ์เป็นสายพันธุ์รุนแรงปานกลาง (pathotype 2) และเชื้อราจากจังหวัดเชียงรายและจังหวัดสกลนคร มีความรุนแรงต่ำกว่า (pathotype 1)

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคได้ดำเนินการผสมพันธุ์พริก โดยใช้พันธุ์แม่ 7 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ พิจิตร 1 (พันธุ์อ่อนแอ) พิจิตร 05 พิจิตร 06 พิจิตร 15-1-1-1 พิจิตร 18 – 1 – 1 – 1 พิจิตร 27-1-2-1 และ PBC 743 ผสมกับพันธุ์พ่อ PI 2301234 ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 และชั่วที่ 2 เมื่อทดสอบการเกิดโรคพบว่า ยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคลำต้นไหม้ของพริกสายพันธุ์ PI 2301234

เป็นยีนลักษณะเด่น 3 คู่ ถ่ายทอดแบบบังคับไม่ให้ยีนต่างคู่กันแสดงออกเมื่อมีการถ่ายทอดไปยังคู่ผสมที่มียีนด้อยอย่างน้อย 1 คู่ ปรากฏอยู่ (ตารางที่ 4)

เอกสารอ้างอิง

- ศรีสุข พูนผลกุล 2548. โรคลำต้นไหม้ของพริกที่พบระบาดใหม่ ชาวอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 ตุลาคม 2548.
- Bracy R.P., H.A. Hobbs, D.Dufresne, 1996. Phytophthora blight in bell pepper – can it be controlled? Louisiana Agriculture, 39: 18-19.
- CAB International, 2003. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International.
- Chowdappa P. and R. Chandramohan, 1997. Occurrence and distribution of mating types of Phytophthora species causing black pod disease of cacao, Indian Phytopathology, 50: 256-260.
- Egea C., M.D.Alcazar and M.E. Candela 1996. Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annum* to *Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum. 98:737-742.
- Nemec S. L.E. Datnoff and J. Strandberg , 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. Crop Protection. 15:735-742.
- Polach, F.T. and R.K. Webster. 1972. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capsici* . Phytopathology. 62:20-26.
- Rista, L.M. , M. Sillon and L. Fornasero. 1995. Effect of different irrigation strategies on the mortality of pepper by *Phytophthora capsici* Leonian in greenhouses. Horticultura Argentina. 14:44-51.
- Tlupal Bolanos, B. , S. Osada Kawasoe, F. Gonzalez Cossio, and C. Mendoza Zamora.1995. Physiological behaviour of 30 isolates of *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatologia. 13:41-51.
- Yang, Gui Mei, Guo Jia Zhen and Bao Xi Zhang,1996. Breeding of early maturing sweet pepper cultivar Zhongjiao 7. China Vegetables. 3:4-6.
- Yucel, S. 1995. A study on soil solarization and combined with fumigant application to control Phytopathora crown blight (*Phytophthora capsici* Leo) on peppers in the East Mediterranean region of Turkey. Crop Protection. 14:653-655.