KHON KAEN AGR. J. 48 (4): 703-714 (2020)./doi:10.14456/kaj.2020.65.

การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุของโรคกิ่งแห้งของทุเรียน

Detection of fungal pathogen causing durian dieback disease

รัติยา พงศ์พิสุทธา[1*], ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1], สัณฐิติ บินคาเดอร์[1], กนกพร ฉัตรไชยศิริ[1] และพัชรี บุญเรืองรอด[1]

Ratiya Pongpisutta[1*], Chainarong Rattanakreetakul[1], Santiti Bincader[1], Kanokphorn Chatchaisiri[1] and Patcharee Boonruangrod[1]

บทคัดย่อ: จากความเข้าใจว่าโรคกิ่งแห้งของทุเรียนนั้นเกิดจากเชื้อสาเหตุคือ เชื้อรา Phytophthora palmivora เกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนจึงใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ผิดเป้าหมายมาโดยตลอดเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน โรคกิ่งแห้งยังคงเกิดขึ้นในแปลงและส่งผลกระทบให้ทุเรียนใบเหลืองและหลุดร่วงในที่สุด งานวิจัยนี้เพื่อหาสาเหตุของโรคกิ่งแห้งของทุเรียนที่แท้จริง เพื่อหาทางป้องกันการระบาดของโรคนี้ได้ การเก็บตัวอย่างโรคกิ่งแห้ง อาการแผลสีน้ำตาลจากต้น และดิน จากพื้นที่ปลูกทุเรียนในเขตจังหวัดชุมพร จันทบุรี และตราด แยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ BNCRA selective medium ได้เชื้อราจำนวน 28 ไอโซเลท จำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคอณูชีวโมเลกุล พบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 และ TEF1-alpha ยาวประมาณ 800 และ 1,000 คู่เบส ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำแนกได้เป็นเชื้อรา *Fusarium solani* ส่วนการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยการปลูกเชื้อแบบทำแผลและไม่ทำแผลลงบนต้นทุเรียนหมอนทองอายุ 6 เดือน พบว่ากิ่งทุเรียนแสดงอาการเริ่มต้น หลังการปลูกเชื้อ 3 วัน จากการปลูกเชื้อทั้งสองแบบพบอาการแผลแห้งสีน้ำตาลอ่อนเนื้อแผลด้านในสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ใบมีสีเหลือง และหลุดร่วง

คำสำคัญ: โรคกิ่งแห้ง, ทุเรียน, *Fusarium solani*, ITS, TEF1-alpha

ABSTRACT: Misconception of a fungal pathogen causing durian die back was Phytophthora palmivora, durian growers have been conducted inaccurate fungicides to eliminate the target fungus likely started a long time ago. Die back still be scattered in the durian orchards causing yellow leaves and will fall-off, then leaving absolutely. The aim of this research was to investigate the certain causal agent of durian die back disease for outbreak prevention. Dieback symptom of durian branches, brown lesion of stem and soil samples were collected from the orchards in Chumphon, Chanthaburi, Trat provinces. Fungal pathogens of 28 isolates were identified and isolated by using tissue transplanting technique with potato dextrose agar (PDA) and BNCRA selective medium based on morphological characteristics including molecular markers inspection. The ITS region (ITS1-5.8s-ITS2) and TEF1-alpha contained sequences approximately 800 and 1,000 bp, respectively. Nucleotide sequences were analyzed and identified as *Fusarium solani*. Also, pathogenicity test was investigated on 6-month-old durian seedlings by artificial inoculation with wounded and non-wounded inoculations. The results showed that disease symptom occurring after 3 days of both inoculations with light brown lesion outside and light brown to dark brown inside of inoculated durian branches.

Keywords: dieback, durian, *Fusarium solani*, ITS, TEF1-alpha

Received October 10, 2019

Accepted December 18, 2019

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author: agrryp@ku.ac.th

แก่นเกษตร 48 ฉบับที่ 4: 703-714 (2563)./doi:10.14456/kaj.2020.65.

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกทุเรียนมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยเฉพาะทุเรียนสายพันธุ์หมอนทอง (*Durio zibthinus* murray) ซึ่งในปีพ.ศ. 2561 พบว่าปริมาณการส่งออกทุเรียนรวมของประเทศสูงถึง 530,226 ตัน มากกว่าปี พ.ศ. 2560 ในช่วงเวลาเดียวกันถึง 16,343 ตัน แสดงให้เห็นถึงการขยายตัวของตลาดทุเรียนไทยมีมูลค่าสูงขึ้น โดยคิดเป็นสัดส่วน 80% ของส่วนแบ่งตลาดโลก สำหรับคู่แข่งทางการตลาดที่สำคัญของไทย ได้แก่ เวียดนาม และมาเลเซีย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561)

ปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตทุเรียนของไทย คือศัตรูพืช โดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งสร้างความเสียหาย มีผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิตทุเรียน อีกทั้งเป็นปัญหาที่สำคัญทั้งในระยะปลูก ระยะการให้ผลผลิตก่อนเก็บเกี่ยว และหลังเก็บเกี่ยว (นิพนธ์, 2542) นอกจากนี้สภาพแวดล้อมของสวนทุเรียนที่มีความชื้นค่อนข้างสูง ประกอบกับในบางพื้นที่มีฝนตกชุก ทำให้สภาพดังกล่าวเหมาะแก่การแพร่กระจาย และเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคได้ จากรายงานของ Lim and Sangchote (2003) พบว่ามีเชื้อราหลายชนิดที่เข้าทำลายและก่อให้เกิดโรคกับทุเรียน โดยเชื้อราที่สำคัญและเป็นที่รู้จักกันดี เช่น *Phytophthora palmivora* Butler (Butler) สาเหตุโรครากและโคนเน่า เชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. สาเหตุโรคผลเน่า หรือเชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kühn สาเหตุโรคใบติดของทุเรียน เป็นต้น

เชื้อรา *Fusarium* เป็นเชื้อราอีกสกุลหนึ่งที่มีข้อสงสัยในการก่อให้เกิดโรคกิ่งแห้ง พบมีรายงานเป็นเชื้อราสาเหตุโรค (plant pathogenic fungi) และเชื้อราที่เข้าทำลายซ้ำเติม (secondary fungal infection agent) จึงทำให้ข้อมูลการศึกษาการก่อโรคของเชื้อรานี้ในทุเรียนยังไม่ชัดเจนเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามเชื้อรา *Fusarium* ส่วนมากพบเป็น soil borne fungi เข้าทำลายพืชบริเวณที่อยู่เหนือดิน และลำต้นใต้ดิน สามารถแพร่กระจายได้ทุกพื้นที่ทั่วโลก ทั้งในเขตอบอุ่น เขตร้อนชื้น และเขตหนาว (Booth, 1971; Nelson *et al*., 1983)

รายงานที่เกี่ยวข้องกับเชื้อรา *Fusarium* ในทุเรียน พบว่ามีความสอดคล้องกับข้อมูลของเชื้อราที่สามารถเป็นได้ทั้งราสาเหตุโรคและเชื้อเข้าทำลายซ้ำเติม เช่น รายงานของ วีระณีย์ (2560) ได้อธิบายถึงอาการ dieback ของทุเรียนที่มีอาการใบบิดเบี้ยว บริเวณปลายยอด และเมื่อสภาพอากาศร้อน ส่งผลให้เกิดลักษณะไหม้ที่บริเวณปลาย หรือขอบใบ จากนั้นใบจะร่วง กิ่งแห้ง และลามมายังส่วนล่างของกิ่ง หากอาการรุนแรง จะส่งผลให้ต้นทุเรียนโทรม โดยการสันนิษฐานเบื้องต้น พบว่าอาจเกิดจากเพลี้ยไฟที่เข้าทำลาย โดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบอ่อน ทำให้เกิดอาการใบบิดเบี้ยว และเกิดแผล ทำให้เชื้อราเข้าทำลายซ้ำเติม หนึ่งในนั้นคือเชื้อรา *Fusarium* spp. และเชื้อราในกลุ่มอื่นๆ อาทิ *Colletotrichum* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Phomopsis* spp. เป็นต้น แต่จากรายงานของ Hoa et al. ในปี ค.ศ. 2013 ศึกษาเชื้อราที่เข้าทำลาย และส่งผลกระทบต่อการผลิตทุเรียนในประเทศเวียดนามตอนใต้ ผลการทดลองพบว่าจากการแยกเชื้อจากตัวอย่างอาการโรคจากต้นทุเรียนที่แสดงอาการยืนต้นตาย (sudden death หรือ quick decline) พบเชื้อราสาเหตุได้แก่ *Phytophthora* sp. *Phytophthora palmivora* และ *Fusarium solani* โดยพบจากเขตพื้นที่ Ngu Hiep 33.17% และในเขตพื้นที่ Tam Binh สูงถึง 57.41% เมื่อทำการพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch's postulation พบว่าเชื้อรา *F. solani* สามารถก่อโรคกับผลทุเรียนได้ โดยทำให้ทุเรียนสายพันธุ์ Kho qua xanh แสดงอาการแผลแห้งสีน้ำตาล ถึงดำ มีความรุนแรงของโรคอยู่ที่ 28.25% เพื่อพิสูจน์ทราบสถานการณ์โรคของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในพื้นที่ปลูกทุเรียนในประเทศไทย และจำแนกชนิดรวมทั้งยืนยันการก่อโรคของเชื้อรา จึงได้ศึกษาวิจัยโดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium* ที่แยกได้จากพื้นที่ปลูกทุเรียนที่สำคัญทางภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย โดยอาศัยเทคนิคทางสัณฐานวิทยา และอณูชีวโมเลกุลในการจำแนก และยืนยันความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกิ่งแห้งกับทุเรียนตามวิธีการของ Koch's postulation เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาและหาวิธีการในการป้องกัน ควบคุม และเฝ้าระวังต่อไป

วิธีการศึกษา

การแยกเชื้อสาเหตุจากอาการกิ่งแห้ง แผลจากต้นของทุเรียน และดินปลูก

เก็บตัวอย่างกิ่งทุเรียนที่แสดงอาการแผลแห้ง สีน้ำตาลเข้ม ถึงน้ำตาลอ่อน เนื้อแผลด้านในสีน้ำตาล

อ่อน อาการแผลสีน้ำตาลบริเวณต้น และดินปลูกจากจังหวัดชุมพร จันทบุรี และตราด จำนวน 15, 12 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ นำมาแยกเชื้อด้วยวิธีการ tissue transplanting โดยตัดกิ่งและต้นทุเรียนที่แสดงอาการขนาดประมาณ 1x1 ซม. นำไปแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 1.2% นาน 3 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 – 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และอาหาร BNPRA selective medium ที่ใช้สาร carboxin ทดแทนสาร pentachloronitrobenzene (PCNB) (กนกพร และคณะ, 2560) บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 – 7 วัน ทำให้เชื้อราบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ single spore isolation (SSI) บนอาหาร water agar (WA) เก็บเชื้อราที่บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato carrot agar (PCA) ที่บรรจุในหลอดอาหารแบบเอียง ที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุ

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน ตรวจสอบลักษณะโคโลนี การสร้าง pigmentation ส่วนอาหาร carnation leaf agar (CLA) นั้น ซึ่งวางใบคาร์เนชั่นที่อบฆ่าเชื้อบนผิวหน้าอาหาร water agar (WA) ใช้สำหรับตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยารูปร่างและขนาดสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound microscope) ที่กำลังขยาย 20 และ 40 เท่า จำแนกเชื้อโดยอาศัยลักษณะพื้นฐาน อาศัยหนังสือ The Fusarium Laboratory Manaul (Leslie and Summerell, 2006)

การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนี ย้ายลงอาหารเหลว Spezieller Nährstoffamer Broth (SNB) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 วัน กรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1) จากนั้นบดเส้นใยด้วยไนโตรเจนเหลว

การสกัดดีเอ็นเอของ Pongpisutta et al. (2013) และ Zimand et al. (1994) โดยการกำจัดโปรตีนด้วย proteinase K และสารละลาย phenol chloroform isoamyl alcohol (PCI) และตกตะกอนสารพันธุกรรมด้วย absolute alcohol จากนั้นทำความสะอาดตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปล่อยให้ตะกอนของดีเอ็นเอแห้ง โดยวิธีการ air drying method นาน 20-30 นาที เติมสารละลาย 1xTE buffer (10 mm Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัยความสามารถในการจับของไพรเมอร์ บริเวณ internal transcribed spacer (ITS1-5.8s-ITS2) และ translation elongation factor 1 alpha (TEF1-alpha) ดังแสดงใน **Table 1** เตรียมดีเอ็นเอของเชื้อราความเข้มข้น 20 นาโนกรัม ผสมกับสารทำปฏิกิริยา (master mix) ดังแสดงใน **Table 2**

Table 1 List of primers and their nucleotide sequences for analysis and identification of *Fusarium solani*

Gene/region	Primer	Sequence (5' – '3)	Reference
ITS region	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White et al. (1990)
	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	
TEF1-alpha	Ef1-F	ATG GGT AAG GAR GAC AAG AC	O'Donnell et al. (1998)
	Ef2-R	GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT	

Table 2 Configuration of master mix for PCR

Element	Concentration	Final concentration	Volume/ 1 reaction (µl)
1. DNA template	20 ng/ µl	20 ng	2.0
2. *Taq* buffer	25 µM	2.5X	2.5
3. Mg^{2+}	25 µM	2.5X	2.5
4. dNTPs	10 mM	0.4 mM	1.0
5. Primer forward	10 µM	400 nm	1.0
6. Primer reverse	10 µM	400 nm	1.0
7. *Taq* polymerase	5 U/µl	0.5 U	0.2
8. Distilled water	-	-	14.8
Total			25

จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR machine รุ่น T professional Standard Gradient ตั้งระบบสำหรับบริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 ดังนี้: pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ และปฏิกิริยารอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ส่วนปฏิกิริยาสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ TEF1-alpha ดังนี้: pre-denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที denature ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ และปฏิกิริยารอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ส่วนวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น ได้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) โดยนำไปแยกขนาดด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.2% agarose gel ใน 1xTBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ บันทึกการเกิดแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยเครื่อง Gel Documentation นำ PCR product ที่ได้ไปส่งตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Base laboratories ประเทศมาเลเซีย จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn ผ่านเครือข่ายทางอินเตอร์เน็ต (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) และศึกษา

ความสัมพันธ์ของเชื้อราโดยการสร้าง phylogenetic tree ตามวิธี maximum parsimony โดยคำนวณค่าความน่าเชื่อถือที่ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง โดยโปรแกรม MEGA version X (Kumar et al., 2018)

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนี ย้ายเชื้อราลงบนกิ่งของต้นกล้าทุเรียนสายพันธุ์หมอนทองอายุ 6 เดือน แบ่งกรรมวิธีการปลูกเชื้อ 2 แบบ คือ ทำแผล และไม่ทำแผล จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ (moist chamber) นาน 24 ชั่วโมง นำออกมาไว้ในสภาพโรงเรือนปกติ ตรวจสอบการเกิดโรค บันทึกผล อาการโรคที่เกิดขึ้นและถ่ายภาพ พร้อมทั้งแยกเชื้อกลับตามวิธีการพิสูจน์โรคของ Koch's postulation เพื่อตรวจสอบ และยืนยันเชื้อสาเหตุโรค

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การแยกเชื้อสาเหตุจากอาการกิ่งแห้ง แผลจากต้นของทุเรียน และดินปลูก

จากการเก็บตัวอย่างกิ่งทุเรียน นำมาแยกเชื้อด้วยวิธีการ tissue transplanting บนอาหาร PDA สามารถแยกเชื้อราได้จำนวน 28 ไอโซเลท สำหรับชิ้นส่วนพืชที่แยกเชื้อบนอาหาร BNCRA selective medium นั้น ไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหารดังกล่าว จากงานวิจัยของ กนกพร และคณะ (2561) และ รัติยา (2535) ที่พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ BNCRA selective medium มีประสิทธิภาพในการใช้แยกเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของทุเรียน โดยสาเหตุที่นำอาหารเลี้ยงเชื้อ BNCRA medium มาใช้ในการจำแนกเชื้อด้วยนั้น เนื่องจากมีการรายงานว่าเชื้อรา *P. palmivora* สามารถเข้าทำลาย และก่อให้เกิดอาการกิ่งแห้งกับทุเรียนได้เช่นกัน (สมศิริ และปัญจมา, 2546; Thompson, 1934; Bhavakul and Jaengsri, 1969) ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงแยกเชื้อด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (general medium) และอาหารเฉพาะ (selective medium) เพื่อเป็นการยืนยันถึงเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริงที่แยกได้ จึงได้ทำการใช้อาหาร selective medium เป็นชุดทดลองควบคุมเพื่อตรวจสอบให้การแยกเชื้อสาเหตุโรคนั้นมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุ

จำแนกเชื้อรา โดยสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยา และโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามคำอธิบายของหนังสือ the Fusarium laboratory manual (Leslie and Summerell, 2006) พบเชื้อรา 28 ไอโซเลท มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อรา *F. solani* พบการสร้างเส้นใย ในช่วง 3-4 วันแรก ลักษณะฟูจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย เส้นใยมีสีขาว ครีม ต่อมาพัฒนาเป็นสีขาวอมเหลือง เทาอมม่วง และแดงอิฐปนน้ำตาล บางไอโซเลทพบการเจริญเป็นวง (zonation) พบการสร้าง sporodochium สีครีม หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 5 วัน บางไอโซเลทมีสีเขียวอมฟ้า ส่วนบริเวณด้านล่างโคโลนี (reverse) หลายไอโซเลท ไม่พบการสร้างรงควัตถุ (pigment) แต่พบบางไอโซเลทที่สร้าง pigment สีม่วง และสีเหลืองปนน้ำตาล (**Figure 1 - 2**) พบการสร้างสปอร์ (conidia) 2 รูปแบบ คือ macroconidia รูปร่างเรียวยาว (fusiform) ถึงทรงกระบอก (cylindrical) มี septum กั้น 4-6 septum ขนาดประมาณ 5.75 – 6.44 x 41.58 – 57.70 ไมครอน ใส ไม่มีสี (hyaline) บริเวณ apical cell มีลักษณะมน (blunt) ส่วน basal cell มีลักษณะเป็น foot-shape ไปจนถึงมีลักษณะหยักที่ชัดเจน (distinctly notched) สำหรับ microconidia ส่วนใหญ่พบมีรูปร่างรูปไข่ (oval) 1-2 เซลล์ ขนาดประมาณ 2.95 – 4.01 x 8.32 – 18.82 ไมครอน ใส ไม่มีสี อยู่รวมกันเป็นกลุ่มแบบ false heads บนก้านชูสปอร์ สำหรับก้านชูสปอร์นั้นมีจุดที่ให้กำเนิดสปอร์เพียงจุดเดียว เป็นแบบ monophialides อย่างไรก็ตามพบการสร้าง intercalary chlamydospore ของเชื้อรา *F. solani* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงเล็กน้อย เนื่องจากตรวจสอบหลังการบ่มเชื้อ 7 วัน มีรายงานว่าเชื้อราสปีชีส์นี้สร้าง chlamydospores ได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหาร CLA อายุ 2-4 สัปดาห์ (Leslie and Summerell, 2006) (**Figure 3**)

การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์

คัดเลือกเชื้อราจำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ DCHA102, DCHA408, DCHA902, DCHA904,

DCHA1708, DCHU107, DCHU303, DCHU403, DCHU801 และ DCHU1404 จาก 28 ไอโซเลท โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเมื่อตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.2% agarose gel ใน 1XTBE buffer จากนั้นนำไปส่องด้วยแสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation พบว่าได้แถบดีเอ็นเอความเข้มข้นประมาณ 100 ng เทียบกับ 100 bp Plus DNA Ladder

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อรา บริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 และ TEF1-alpha ทำการตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของผลผลิต PCR (PCR product) บน 1.2% agarose gel electrophoresis ใน 1XTBE buffer ได้แถบ PCR product ขนาด 800 และ 1,000 bp ตามลำดับ สำหรับการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท บริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 และ TEF1-alpha เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) พบว่าเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท มีความเหมือนกับเชื้อรา *F. solani* (percent identity 99.26 – 100%) เมื่อนำมาสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อรา พบว่าในส่วนของบริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 เชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลทถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *F. solani* isolate Cym001, *F. solani* isolate KED9 และ *F. solani* isolate AV1 โดยมีค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มอยู่ที่ 88% แยกออกจากเชื้อรา Fusarium จำนวน 5 สปีชีส์ (*F. equiseti, F. incarnatum, F. mangiferae, F. oxysporum* และ *F. proloferatum*) และ out group (*Rhizoctonia solani* isolate Ro227) อย่างชัดเจน (**Figure 4**)

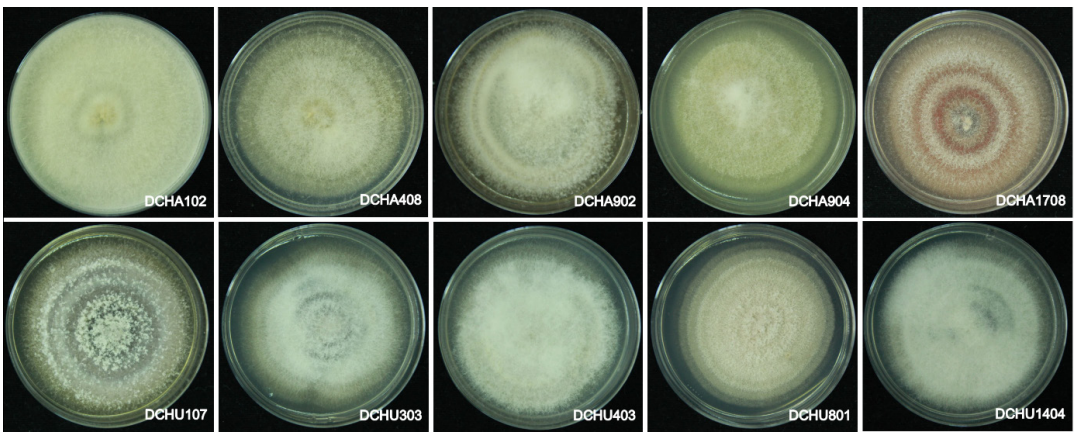

Figure 1 Colony surface characteristics of *Fusarium solani* isolated from dieback and stem rot symptoms, and planted soil from Chumphon, Chanthaburi and Trat provinces on PDA after 5 days of incubation at 25 °C under near UV alternate darkness 12 hr

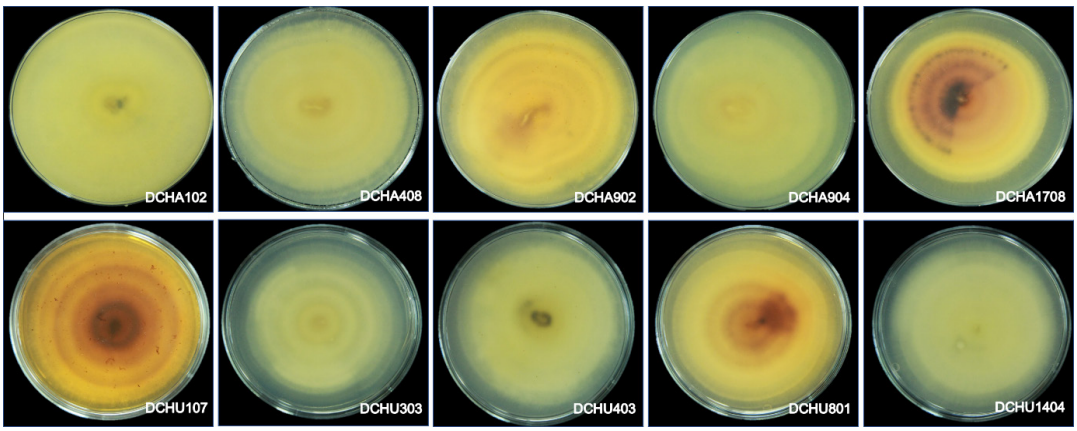

Figure 2 Colony reverse characteristics of *Fusarium solani* isolated from dieback and stem rot symptoms, and planted soil from Chumphon, Chanthaburi and Trat provinces on PDA after 5 days of incubation at 25 °C under near UV alternate darkness 12 hr

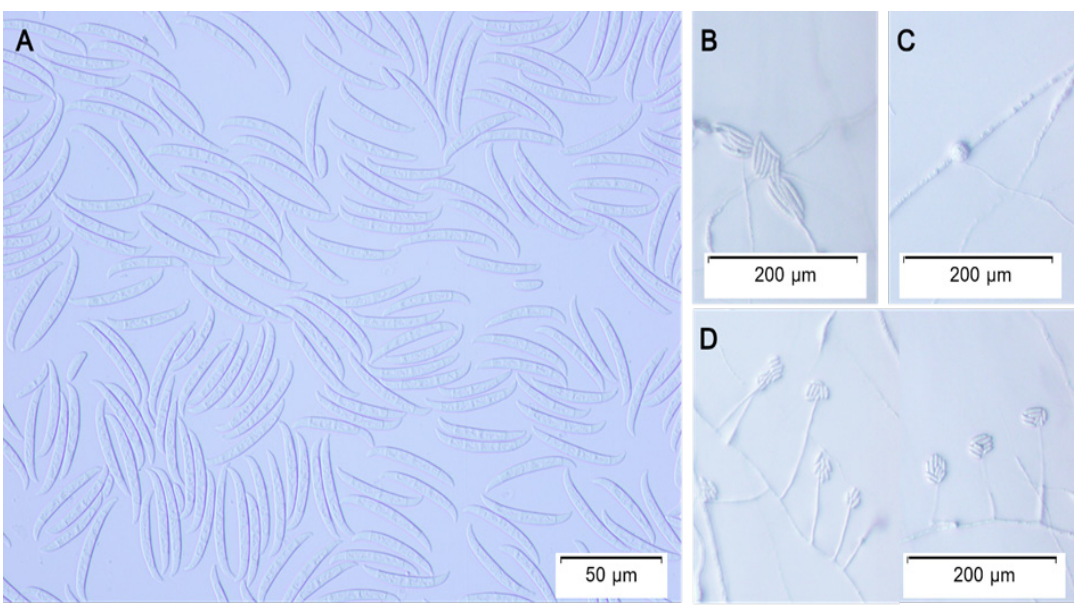

Figure 3 Morphological characteristics of *Fusarium solani* isolate DCHU107 isolated from dieback symptom of durian from Chumphon province was observed under compound microscope at 20X – 40X (A) macroconidium at 40X (B) macroconidia at 20X (C) intercalary chlamydospore at 20X and (D) microconidia in false heads at 20X

ในส่วนของ TEF1-alpha เมื่อศึกษา phylogenetic tree พบว่าให้ผลสอดคล้องกับข้อมูลของบริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 ซึ่งเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลทถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *F. solani* culture ICMP: 2256, *F. solani* culture ICMP: 2257 และ *F. solani* isolate DI5 โดยมีค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มอยู่ที่ 100% แยกออกจากเชื้อรา *Fusarium* ชนิดอื่นจำนวน 5 สปีชีส์ (*F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. mangiferae*, *F. oxysporum* และ *F. proloferatum*) และ out group (*Rhizoctonia solani* isolate MIAE00164) อย่างชัดเจน (**Figure 5**) สอดคล้องกับรายงานของ Gebremariam et al. (2018) ที่ได้จำแนกเชื้อรา *Fusarium* species สาเหตุโรคเหี่ยวของข้าวสาลี (*Triticum* spp.) ในประเทศตุรกี โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และเทคนิคอณูชีวโมเลกุล เมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ TEF1-alpha พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราจำนวน 339 ไอโซเลท แบ่งเป็น 17 สปีชีส์ นอกจากนี้ในเว็บไซต์ mycology online (https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/ hyphomycetes/fusarium/) ของ The University of Adelaide (2016) ได้แนะนำวิธีการจำแนกเชื้อราในสกุล *Fusarium* โดยวิธีการ multi-locus sequence analysis ซึ่ง

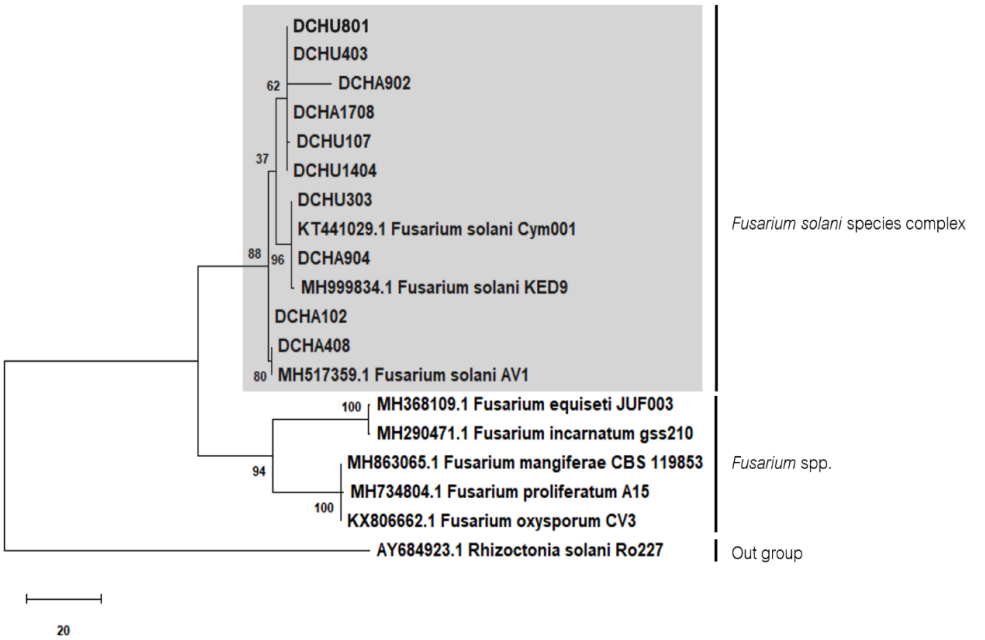

Figure 4 Maximum parsimony phylogenetic tree of the ITS1-5.8s-ITS2 sequences. A bootstrap analysis was performed with 1,000 repetitions with MEGA version X software

หนึ่งในส่วนของตำแหน่งที่ใช้นั้น มี TEF1-alpha เป็นองค์ประกอบ สามารถแยกเชื้อราในสกุลดังกล่าวออกจากกันได้อย่างชัดเจน มีรายงานอื่นที่มีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคอณูชีวโมเลกุลในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 และ TEF1-alpha ในการจำแนกเชื้อราในสกุล *Fusarium* และพบว่าผลการทดลองสามารถจำแนกเชื้อราในสกุลดังกล่าวได้อย่างแม่นยำ (Brasileiro et al., 2004; Rahjoo et al., 2008: Lazarotto et al., 2014) อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบและจำแนกเชื้อราควรศึกษาข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับอณูชีวโมเลกุล เพื่อให้การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุมีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

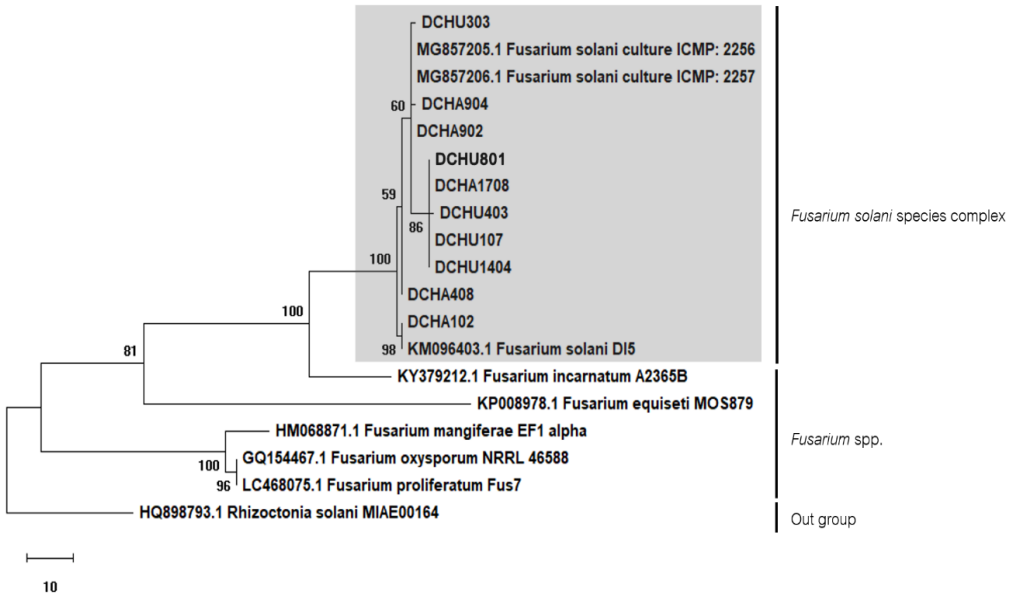

Figure 5 Maximum parsimony phylogenetic tree of the TEF1-alpha sequences and a bootstrap analysis with 1,000 repetitions by MEGA version X software

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

การปลูกเชื้อกับต้นทุเรียนที่มีการทำแผล พบว่าเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท สามารถก่อให้เกิดอาการเบื้องต้น กับกิ่งทุเรียนได้ หลังการปลูกเป็นเวลา 3 วัน ทุเรียนแสดงอาการแผลสีน้ำตาลเข้ม ถึงน้ำตาลแดง ขอบแผลไม่แน่นอน สีน้ำตาลอ่อน ถึงน้ำตาลเข้ม พบกลุ่มเส้นใยสีขาวเจริญบริเวณแผล (Figure 6A-B) และสำหรับการปลูกเชื้อบนกิ่งทุเรียนโดยไม่ทำแผล พบว่าเชื้อราสามารถก่อให้เกิดอาการแผลสีน้ำตาลเข้ม ถึงน้ำตาลแดง ขอบแผลไม่แน่นอน กับกิ่งทุเรียนได้เช่นกัน (Figure 6C-D) และหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน กิ่งที่ปลูกเชื้อสังเกตว่าใบของต้นกล้าทุเรียนเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและหลุดร่วง กิ่งบริเวณที่ปลูกเชื้อเริ่มแสดงอาการแห้ง เปราะและหักง่าย เมื่อนำมาแยกเชื้อกลับด้วยวิธี tissue transplanting พบโคโลนีเชื้อรามีลักษณะเหมือนเดิมสอดคล้องกับรายงานของ Hoa et al. (2013) ที่พบว่าเชื้อรา *F. solani* สามารถก่อโรคกับทุเรียนสายพันธุ์ Kho qua xanh ในเขตพื้นที่ทางตอนใต้ของประเทศเวียดนามได้ โดยทำให้ทุเรียนแสดงอาการแผลแห้งสีน้ำตาลถึงดำ มีความรุนแรงของโรคอยู่ที่ 28.25% นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าเชื้อรา *F. solani* สามารถก่อให้เกิดโรคกิ่งแห้ง (dieback) กับพืชอื่นอีกหลายชนิด เช่น ทองหลางลาย (*Erythrina variegata*) มะม่วง (*Mangifera indica*) ประดู่ลาย (*Dalbergia sissoo* Roxb.) เมเปิล (*Acer negundo*) เป็นต้น (Khanzada et al., 2004; Demirci and Maden. 2006; Rajput et al., 2008; Kuroda et al., 2017)

แก่นเกษตร 48 ฉบับที่ 4: 703-714 (2563)./doi:10.14456/kaj.2020.65.

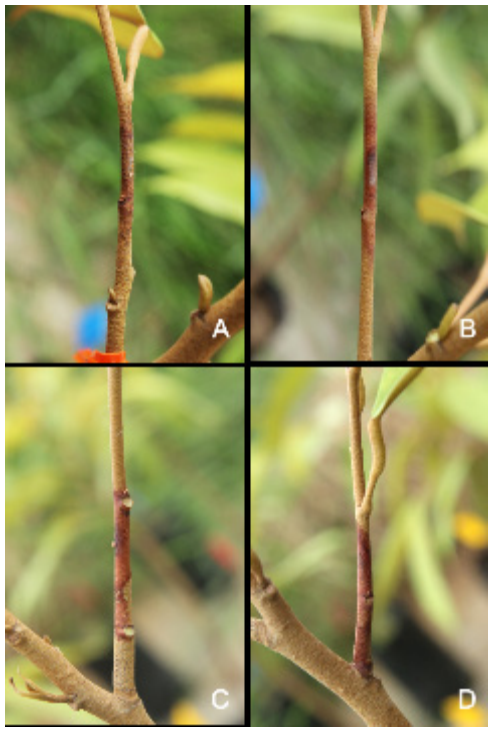

Figure 6 Brown symptom of durian seedling after inoculation for 3 days with mycelial disc of *Fusarium solani* isolate DCHU107 and DCHU206. (A-B) wounded inoculation and (C-D) non-wounded inoculation

สรุป

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคกิ่งแห้งของทุเรียนในพื้นที่จังหวัดชุมพร จันทบุรี และตราด ด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้จำนวนทั้งสิ้น 28 ไอโซเลท และไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหาร BNCRA selective medium จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและใช้เทคนิคอณูชีวโมเลกุล บริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 และ TEF1-alpha วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ phylogenetic tree สามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคกิ่งแห้งเกิดจากเชื้อรา *F. solani* เมื่อพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch's postulation โดยปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าทุเรียนสายพันธุ์หมอนทองอายุ 6 เดือน พบอาการกิ่งทุเรียนเป็นแผลสีแดงอมม่วง ขอบแผลสีน้ำตาลเข้มหลังการปลูกเชื้อ 3 วัน และเมื่อผ่านไป 7 วัน อาการพัฒนาเป็นกิ่งแห้ง แผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลสีน้ำตาลเข้ม ใบบริเวณกิ่งที่เกิดโรคเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และร่วงตามลำดับ งานวิจัยในครั้งนี้ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อรา *F. solani* เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคกิ่งแห้งกับต้นทุเรียน รวมถึงการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับอณูชีวโมเลกุล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่มีรายงานถึงการเข้าทำลายของเชื้อราดังกล่าว โดยข้อมูลนี้เป็นประโยชน์อย่างมากต่อการวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริงของโรค รวมไปถึงการติดตาม ตรวจสอบ อันนำไปสู่การพัฒนาวิธีการป้องกัน ควบคุม และลดการแพร่ระบาด เพื่อให้กระบวนการผลิตทุเรียนของประเทศมีคุณภาพที่ดีและเป็นที่ยอมรับต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการราวิทยา

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กนกพร ฉัตรไชยศิริ, รัติยา พงศ์พิสุทธา, และ ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล. 2561. การพัฒนาสูตรอาหารที่จำเพาะต่อการแยกเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าของทุเรียน. น. 31-38. ใน: การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 56 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2 กุมภาพันธ์ 2561. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542. โรคทุเรียน. ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอ พลัส ทรี มีเดียม, กรุงเทพฯ.

รัติยา พงศ์พิสุทธา. 2535. โรคผลเน่าของทุเรียนหมอนทองที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. และการควบคุม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วีระณีย์ ทองศรี. 2560. โรคตายลามจากยอด (die-back) และโรคราสีชมพู (pink disease) ในทุเรียน. เคหการเกษตร. 41: 89-91.

สมศิริ แสงโชติ, และ ปัญจมา กวางติ๊ด. 2546. การจัดการเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler สาเหตุโรครากเน่าและผลเน่าของทุเรียนในจังหวัดจันทบุรี. วิทยาศาสตร์เกษตร. 33 (พิเศษ): 45-48.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้า ปี 2561. แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/assets/portals/1/ebookcategory/38_commodity2561/. ค้นเมื่อ 30 กันยายน 2562.

Bhavakul, K., and V. Jaengsri. 1969. Root rot of durian. P. 60–61. In: Plant Diseases Control. Agricultural Science Society, Bangkok.

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. The Eastern Press Limited, London.

Brasileiro, B.T.R.V., M.R.M. Coimbra, J. M.A. Morais, and N.T. Oliveira. 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. Braz. J. Microbiol. 35: 205-210.

Demirci, E., and S. Maden. 2006. A severe die-back of box elder (*Acer negundo*) caused by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. in Turkey. Australas. Plant Dis. Notes 1: 13-15.

Gebremariam, E.S., D. Sharma-Poudyal, T.C. Paulitz, G. Erginbas-Orakci, A. Karakaya, and A. A. Dababat. 2018. Identity and pathogenicity of *Fusarium* species associated with crown rot on wheat (*Triticum* spp.) in Turkey. Eur. J. Plant Pathol. 150: 387–399.

Hoa N.V., D. T. K. Uyen, N. T. Hieu, and N. M. Chau. 2013. A new finding pathogen on durian in south Vietnam and preliminary results on varieties screen against *Phytophthora* spp. Southern Horticultural Research Institute, Vietnam.

Khanzada, M.A., A.M. Lodhi, and S. Shahzad. 2004. Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. Pak. J. Bot. 36: 181-189.

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: 1547-1549.

Kuroda, K., I. Chuma, T. Kihara, T. Murakami, K. Takashina, D. Hiraoka, and N. Kameyama. 2017. First report of *Fusarium solani* species complex as a causal agent of *Erythrina variegata* decline and death after gall formation by *Quadrastichus erythrinae* on Okinawa Island, Japan. J. Gen. Plant Pathol. 83: 344-357.

Lazarotto, M., P.M. Milanesi, M.F. Muniz, L.R. Reiniger, R. Beltrame, R. Harakava,

and E. Blume. 2014. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. pathogenic to pecan tree in Brazil. Genet. Mol. Res. 13: 9390-9402.

Leslie, J.F., and B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Hoboken.

Lim, T.K., and S. Sangchote. 2003. Diseases of durian. P. 241–252. In: R. C. Ploetz. Diseases of Tropical Fruit Crops. Cambridge, MA: CABI Publishing, Wallingford.

Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.

O'Donnell, K., E. Cigelnik, and H. I. Nirenberg. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia. 90: 465 –493.

Pongpisutta, R., W. Winyarat, and C. Rattanakreetakul. 2013. RFLP identification of *Colletotrichum* species isolated from chilli in Thailand. Acta Hortic. 973: 181-186.

Rahjoo, V., J. Zad, M. Javan-Nikkhah, A. M. Gohari, S.M. Okhovvat, M.R. Bihamta, J. Razzaghian, and S.S. Klemsdal. 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. Plant Pathol. 90: 463-468.

Rajput, N.A., M.A. Pathan, M.M. Jiskani, A.Q. Rajput, and R.R. Arain. 2008. Pathogenicity and host range of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causing dieback of shisham (*Dalbergia sissoo* Roxb.). Pak. J. Bot. 40: 2631-2639.

The University of Adelaide. 2016. Mycology Online. Available: https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/ hyphomycetes/fusarium/. Accessed Oct. 2, 2019.

Thompson, A. 1934. A disease of durian tree. Malay. Agric. J. 22: 369–371.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal RNA gene for phylogenetics. P. 315-322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfend, J.J. Sninsky, and T.J. White. PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.

Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet, and S. Manulis. 1994. Use of RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* stains. Mycol. Res. 98: 531-534.