วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 34 : 1 (59 - 67)

การเข้าทำลายแฝงของเชื้อรา *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคใบจุดของทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) พันธุ์หมอนทอง

Latent Infection of *Phomopsis* sp., the Causal Agent of Leaf Spot on Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Cultivar Monthong

วีระณีย์ ทองศรี[1] และสมศิริ แสงโชติ[1]

บทคัดย่อ

โรคใบจุดของทุเรียน มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phomopsis* sp. เป็นโรคที่ไม่ได้ก่อความเสียหายต่อทุเรียนโดยตรง แต่การสะสมของโรคที่ใบจะเป็นแหล่งของเชื้อและก่อให้เกิดโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาระยะเข้าทำลายแฝง และปัจจัยภายในพืชที่ก่อให้เกิดการเข้าทำลายแฝงของเชื้อสาเหตุโรค โดยเมื่อปลูกเชื้อรา *Phomopsis* sp. ด้วยวิธีพ่นสปอร์แขวนลอย (เข้มข้น 10^6 สปอร์/มล.) ลงบนต้นกล้าทุเรียนที่หลังหรือท้องใบ พบว่าบริเวณท้องใบเกิดการติดเชื้อมากกว่า และเมื่อปลูกเชื้อโดยวิธีวางชิ้นวุ้นลงบนแผลจะพบลักษณะจุดตายสีน้ำตาลบนเนื้อเยื่อใบ และมีการสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา เรียกว่า pycnidium ที่ 20 วันหลังจากปลูกเชื้อ และยังพบลักษณะเข้าทำลายแฝงของเชื้อก่อโรค โดยมีการปรากฏแผลใหม่ซึ่งมีลักษณะอาการแผลจุดสีน้ำตาลเข้มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. และมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบหลังจากปลูกเชื้อที่ 32 วัน รวมทั้งยังพบการเข้าทำลายแฝงในสภาพธรรมชาติ โดยสามารถตรวจพบการติดเชื้อของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ทั้งบนใบและดอกที่ปราศจากอาการโรคสูงถึง 95 และ 70% ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นการที่สารสกัดหยาบจากใบทุเรียนสามารถลดการงอกและความยาวของ germ tube ของสปอร์เชื้อรา และการปรากฏของสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคบนแผ่น TLC ที่ retention factor 0.29-0.88 แสดงถึงเนื้อเยื่อใบทุเรียนมีสารบางชนิดที่ยับยั้งไม่ให้เชื้อก่อโรคเจริญเติบโตได้ในช่วงหนึ่ง ดังนั้นการป้องกันกำจัดโรคบนใบในระยะที่มีการเข้าทำลายแฝงน่าจะเป็นวิธีที่จะช่วยลดประชากรของเชื้อก่อโรคลงได้อีกทางหนึ่ง

คำสำคัญ : ใบจุดทุเรียน ระยะเข้าทำลายแฝง การติดเชื้อ การพัฒนาโรค สารที่มีอยู่แล้วในพืช

Abstract

Durian leaf spot caused by *Phomopsis* sp., is a minor disease which indirectly decreases quality of durian yield. Disease symptoms on the leaves acted as source of inoculum further affecting fruit rot after harvest. The objectives of this study were to investigate latent infection and factors affecting latent period of plant pathogenic fungus *Phomopsis* sp. on durian leaf. Pathogen inoculation by spraying spore suspension (10^6 spore/ml) on abaxial or adaxial surface of the leaf was conducted on seedlings. The results showed that the most infection area was on the lower side of leaf. The inoculated seedling by an agar plug on the wound site was also investigated. It was shown that browning necrotic spots appeared on the leaf and pycnidial formation was expressed at 20 days after inoculation. Consequently, numerous new browning spots with 1 mm in diameter surrounded by yellow halo were visible at 32 days after inoculation.

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

07--[illegible]- [illegible] Phomopsis [illegible] [illegible](ก).indd 59 23/3/2559 15:53:46

In addition, natural latent infection by *Phomopsis* spp. was also established on durian leaves and flowers by 95 and 70% infection, respectively. Moreover, crude extract of durian leaf could reduce pathogen spore germination and germ tube elongation. It also showed inhibition zone of pathogen growth on TLC plate by retention factor of 0.29-0.88. This indicated that durian leaf tissues presented preformed substances which acted as antifungal compounds while the pathogen was in a latent period. This investigation benefits durian growers to control this disease by reduction of pathogen population at symptomless period.

Keywords : Phomopsis leaf spot, latent period, pathogen infection, disease development, preformed substance

คำนำ

เชื้อรา *Phomopsis* species เป็นเชื้อราที่เข้าทำลายทุเรียนและก่อให้เกิดโรคใบจุดได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงต้นโต ถึงแม้ที่ผ่านมา โรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อราดังกล่าวจะเป็นโรคที่นักวิชาการและเกษตรกรไม่ค่อยให้ความสนใจมากนัก เนื่องจากไม่ได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลิตผลโดยตรง แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าลักษณะอาการของโรคดังกล่าวมีการแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้าง โดยเฉพาะในแหล่งปลูกทุเรียนแถบภาคตะวันออกของประเทศไทย เช่น จังหวัดจันทบุรีและตราด โดยเชื้อราสาเหตุโรคจะทำให้เกิดลักษณะอาการจุดตายสีน้ำตาล (necrotic spots) รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. ขอบแผลมีสีเข้มและปรากฏวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ (yellow halos) กระจายอยู่ทั่วไปบนใบที่มีอายุค่อนข้างแก่ โดยอาการแผลจุดดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อพืชในลักษณะรบกวนกระบวนการสังเคราะห์แสง หรือกระบวนการเมตาบอลิซึมอื่นๆ ของพืชได้ (Hwang *et al.,* 2006) อาการของโรคที่ปรากฏบนใบนับได้ว่าเป็นแหล่งของเชื้อ (source of inoculum) ที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคที่อยู่บริเวณใบสามารถแพร่กระจายไปสู่บริเวณอื่นๆ โดยเฉพาะในส่วนของผลได้ ซึ่งจะทำให้เกิดอาการผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวตามมา ดังเช่นที่พบในไม้ผลหลายๆ ชนิด ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ที่ถูกเชื้อรา *Phomopsis obscurans* เข้าทำลายที่ใบและทำให้เกิดอาการใบไหม้ ก็ส่งผลให้เกิดอาการผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวได้เช่นเดียวกัน (Ellis and Nita, 2008) หรือเชื้อรา *Phomopsis* sp. ที่เข้าทำลายต้นท้อและเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการกิ่งไหม้ก็มักทำให้เกิดอาการผลเน่าทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวตามมาภายหลัง (Fenn, 2011) นอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Phomopsis* spp. กับพืชอื่นๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Diaporthe helianthi* teleomorph เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์ของทานตะวัน *P. oblonga* anamorph (*Diaporthe eres* teleomorp) เป็นสาเหตุของโรค black line ในต้นเอล์ม members of the Diaporthe-Phomopsis complex เป็นสาเหตุของโรคลำต้นไหม้ ฝักเน่า และเมล็ดเน่าของถั่วเหลือง *P. juniperovora* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในพืชตระกูลสน *P. viticola* เป็นสาเหตุโรคใบจุดและเครือไหม้ขององุ่น และ *Phomopsis* sp. เป็นสาเหตุโรคผลเน่าในมะละกอ เป็นต้น (Brayford, 1990; Nita *et al.*, 2007; Debaeke and Estragnat, 2009; Soto-Arias and Munkvold, 2011) ซึ่งเชื้อรา *Phomopsis* บางชนิดเมื่อเข้าทำลายพืชจะมีการสร้างสารพิษร่วมด้วย ดังเช่นที่พบในเชื้อรา *P. helianthi* ที่เข้าทำลายต้นทานตะวัน และมีการผลิตสารพิษ phomozin ซึ่งทำให้เกิดการตายของเซลล์พืชขึ้น (Mazars *et al.,* 1991) อย่างไรก็ตาม การเข้าทำลายของเชื้อรา *Phomopsis* แต่ละชนิด มักมีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และมีความต้องการสภาพแวดล้อมในการงอกหรือติดเชื้อบนพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังจากการศึกษาของ Ortiz-Ribbing and Williams (2006) รายงานว่า สปอร์ของเชื้อรา *P. amaranthicola* สามารถงอกและสร้าง germ tube บนใบวัชพืชใน genus *Amaranthus* ทั้ง 7 species ได้แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้มีความสามารถในการก่อโรคแตกต่างกันด้วย นอกจากนี้ เชื้อรา *Phomopsis* spp. ยังมีคุณลักษณะในการเข้าทำลายแฝง กล่าวคือ เนื้อเยื่อพืชมีการเข้าทำลายของเชื้อแต่ยังไม่ปรากฏอาการของโรคให้เห็น ซึ่ง

07--[illegible]- [illegible] Phomopsis [illegible] [illegible](ก).indd 60 23/3/2559 15:53:46

Rawnsley (2003) รายงานว่า เชื้อรา *P. viticola* เข้าทำลายอุ่นและทำให้ปรากฏอาการใบจุดหลังจากติดเชื้อที่ 21 วัน ในขณะที่ในส่วนของลำต้นจะใช้เวลามากขึ้นถึง 28 วัน ซึ่งระยะการเข้าทำลายแฝงของเชื้อก่อโรคจะเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญในการจัดการโรคทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากการไม่ปรากฏอาการของโรคจะทำให้เกิดความล่าช้าในการวางแผนป้องกันกำจัด ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการสะสมของเชื้อก่อโรคและอาจเกิดการแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆ ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้ศึกษาการมีระยะเข้าทำลายแฝงของเชื้อรา *Phomopsis* sp. สาเหตุโรคใบจุดของทุเรียน รวมถึงศึกษาปัจจัยภายในพืชที่มีต่อระยะการเข้าทำลายแฝงนั้น อันจะเป็นประโยชน์ในการหาแนวทางเพื่อจัดการโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาการเข้าทำลายแฝงของเชื้อราบนต้นกล้าทุเรียน

คัดเลือกเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C10 ที่ก่อให้เกิดโรค นำมาปลูกเชื้อบนต้นกล้าทุเรียนพันธุ์หมอนทองโดยวิธีวางชิ้นวุ้นลงบนใบที่มีอายุ 10 วันหลังใบคลี่ที่ผ่านการทำแผล บ่มใบในถุงพลาสติกชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปิดถุงออกและบ่มต่อในสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่ 80% อุณหภูมิ 25-35ºC บันทึกระยะเวลาที่ปรากฏแผลใหม่ นอกจากนั้นทำการปลูกเชื้อโดยวิธีเลียนแบบธรรมชาติ โดยพ่นสปอร์แขวนลอย (สปอร์ชนิดแอลฟาที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ลงบนใบทุเรียนที่ตำแหน่งหลังใบหรือท้องใบ บ่มใบที่ผ่านการปลูกเชื้อแล้วในถุงพลาสติกชื้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบ่มต่อในสภาพเดิมข้างต้นเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting หลังจากปลูกเชื้อทุกๆ 1 สัปดาห์ โดยตัดเนื้อเยื่อใบเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 ตารางมิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอกด้วย 10% clorox ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชวางลงบนอาหาร half PDA จำนวน 10 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25-32ºC) เป็นเวลา 7 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเชื้อราบนเนื้อเยื่อพืช

2. ศึกษาการเข้าทำลายแฝงของเชื้อราในสภาพธรรมชาติ

ศึกษาแหล่งของเชื้อ (source of inoculum) ในส่วนต่างๆ ของต้นทุเรียน ได้แก่ ใบ และดอกที่ไม่ปรากฏอาการของโรคในแปลงปลูกทุเรียนพันธุ์หมอนทอง อ.มะขาม จ.จันทบุรี และ อ.เขาสมิง จ.ตราด โดยเก็บใบที่มีอายุต่างกัน 2 ระยะ คือ ใบอ่อน และใบแก่ และดอกในระยะต่างๆ มาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเชื้อรา *Phomopsis* spp. วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ

3. ศึกษาปัจจัยภายในเนื้อเยื่อพืชที่มีผลต่อการเข้าทำลายแฝงของเชื้อ

เก็บตัวอย่างใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ปราศจากอาการของโรคมาสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol และกรองเอาเฉพาะสารละลายมาเพิ่มความเข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator (Buchi, Rotavapor R110) เพื่อให้ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Chirawut (2005) จากนั้นนำสารสกัดหยาบมายับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ตามวิธีการดังต่อไปนี้

3.1 ทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์บนอาหาร water agar (WA)

หยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราลงบนจานอาหาร WA ที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหยดสารสกัดหยาบใบทุเรียน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรตามลงไป ใช้แท่งเกี่ยวสามเหลี่ยมเกลี่ยสปอร์ให้กระจายทั่วจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้เป็นเวลา 10 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกและความยาว germ tube ของสปอร์

3.2 ทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์บนแผ่น thin layer chromatography (TLC)

หยดสารสกัดหยาบบนแผ่น TLC นำไป develop ด้วย running solvent (dichloromethane : methanol 98 : 2 v/v) ประมาณ 1 ชั่วโมง ผึ่งแผ่น TLC ให้แห้ง จากนั้นเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา

07--[illegible]- [illegible] Phomopsis [illegible] [illegible](ม.indd 61 23/3/2559 15:53:46

Phomopsis sp. ในอาหารเหลว half potato dextrose broth นำมาพ่นลงบนแผ่น TLC ด้วย airbrush (BADGER AIR-BRUSH™, U.S.A.) บ่มแผ่น TLC ไว้ในกล่องพลาสติกชื้น เป็นเวลา 3 วันเพื่อให้เชื้อราเจริญเติบโต สังเกตการปรากฏบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (inhibition zone หรือ clear zone) และวัดค่า retention factor (Rf) ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อนั้น เปรียบเทียบกับ Rf ของ inhibition zone ของเชื้อรา *Cladosporium oxysporum* ซึ่งใช้เป็น indicator fungus เนื่องจากสปอร์มีสีเข้ม โดยจะทำให้การปรากฏบริเวณยับยั้งบนแผ่น TLC มีความชัดเจนมากขึ้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาการเข้าทำลายแฝงของเชื้อราบนต้นกล้าทุเรียน

จากการปลูกเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C10 โดยวิธีทำแผลบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง พบว่า บริเวณที่ปลูกเชื้อจะเกิดลักษณะจุดสีน้ำตาล ซึ่งต่อมาแผลขยายขนาดและแสดงเนื้อเยื่อแห้งตายบริเวณกลางแผล และปรากฏวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ (yellow halo) โดยที่บริเวณกลางแผลจะปรากฏโครงสร้างสีดำขนาดเล็กมองเห็นได้ด้วยตาเปล่ากระจายอยู่ทั่วไป เรียกว่า pycnidium ซึ่งเป็นโครงสร้างสำหรับห่อหุ้มสปอร์ของเชื้อราที่อยู่ในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยจะพบการสร้าง pycnidium หลังจากปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลา 20 วัน และหลังจากปลูกเชื้อที่ 32 วัน จะปรากฏแผลใหม่ที่มีลักษณะอาการแผลจุดสีน้ำตาลแดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร และมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบกระจายอยู่ข้างแผลที่ผ่านการปลูกเชื้อนั้น (Figure 1) ซึ่งแผลใหม่ที่ได้ยังคงมีลักษณะเหมือนแผลเริ่มต้นที่ได้ทำการแยกเชื้อมา และสอดคล้องกับลักษณะแผลจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis durionis* ของทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ได้รายงานไว้โดย Lim and Sangchote ในปี 2003 ในการทดลองนี้เชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C10 มีระยะเข้าทำลายแฝงบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ 32 วัน ซึ่งมีความแตกต่างจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. viticola* ในองุ่น โดยเชื้อดังกล่าวมีระยะเข้าทำลายแฝงบนเนื้อเยื่อใบองุ่นที่ 21 วันจึงจะปรากฏอาการของโรคให้เห็น ในขณะที่บนเนื้อเยื่อของลำต้น จะแสดงอาการของโรคที่ 28 วันหลังจากติดเชื้อ (Rawnsley, 2003) ซึ่งแสดงถึงเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ได้แก่ ใบมีอายุมากขึ้นหรือสภาพของเนื้อเยื่อพืชเริ่มเสื่อมลง อาการของโรคจึงจะปรากฏ นอกจากนี้ เมื่อใบทุเรียนเกิดการติดเชื้อและแสดงอาการโรคจะปรากฏวงสีเหลืองล้อมรอบแผล เนื่องจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. ผลิตสารพิษออกมาทำลายเนื้อเยื่อพืช ดังเช่นจากการรายงานของ Patwardhanr *et al.* (1974) รายงานว่าเชื้อรา *P. paspalli* เมื่อเข้าทำลายธัญพืชจะสามารถผลิตสารพิษ ชื่อ cytochalasins ออกมา และสารพิษดังกล่าวพบว่าเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคด้วย ในขณะที่ Girish *et al.* (2009) รายงานว่าเชื้อรา *P. azadirachtae* เมื่อเข้าทำลายสะเดาจะปลดปล่อยสารพิษออกมาทำลายเนื้อเยื่อพืช โดยทำให้เกิดอาการแห้งตายลามจากยอด (die back)

จากการปลูกเชื้อโดยพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Phomopsis* sp. บนหลังใบ (adaxial surface) และท้องใบ (abaxial surface) ของต้นกล้าเพื่อศึกษาการติดเชื้อและการมีชีวิตรอดของเชื้อราหลังจากปลูกเชื้อแล้วทุกๆ สัปดาห์ พบการเข้าทำลายของเชื้อราสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 และยังคงพบการเข้าทำลายของเชื้อราตลอด 8 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ แต่พบในปริมาณที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการปลูกเชื้อที่ท้องใบก่อให้เกิดการติดเชื้อได้มากกว่าการปลูกเชื้อที่หลังใบ (Figure 2) อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากตำแหน่งหลังใบมีชั้น wax หนาจึงเกิดการติดเชื้อได้น้อย ตรงกันข้ามกับท้องใบซึ่งมี wax น้อย และมีเพียงโครงสร้าง trichome ที่เรียงซ้อนกันอย่างหลวมๆ และมีปากใบจำนวนมาก (O'Gara *et al.*, 2004) ซึ่งเปิดโอกาสให้เชื้อราเข้าทำลายและเกิดการติดเชื้อได้ง่ายกว่า

07--[illegible]- [illegible] Phomopsis [illegible] [illegible](ม.indd 62 23/3/2559 15:53:46

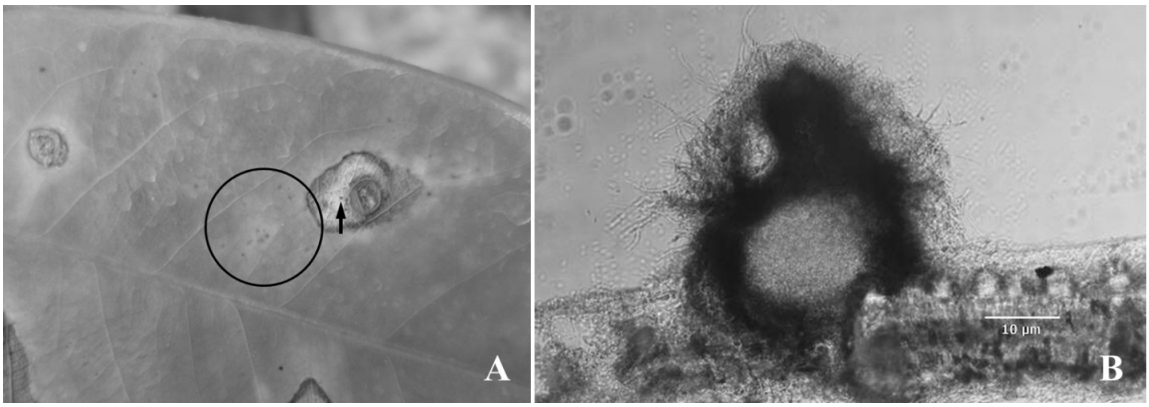

Figure 1 Artificial inoculation of *Phomopsis* sp. Isolate C10 on wounded leaf of durian cultivar Monthong. (A) New red-brown spots with yellow halos at 32 days after inoculation (circled) and tiny black pycnidia expressed on necrotic lesion on durian leaf (arrow).(B) Free hand section of a Phomopsis pycnidium.

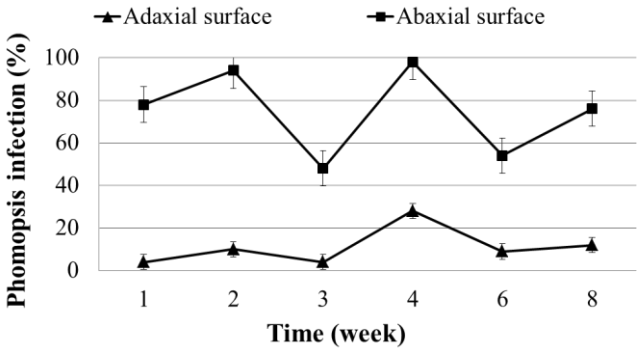

Figure 2 Infection of *Phomopsis* sp. Isolate C10 on adaxial or abaxial surface of durian leaves cultivar Monthong. Bars represent standard deviations of the mean.

2. ศึกษาการเข้าทำลายแฝงของเชื้อราในสภาพธรรมชาติ

จากการตรวจหาเชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่เข้าทำลายแฝงบนใบในแหล่งปลูกทุเรียนพันธุ์หมอนทองทั้งระยะใบอ่อนและแก่ พบว่า เนื้อเยื่อพืชเกิดการติดเชื้อในใบแก่มากที่สุดถึง 95% (Figure 3) ในขณะที่เมื่อตรวจหาการติดเชื้อในดอกที่มีความสมบูรณ์และไม่เป็นโรคที่อายุแตกต่างกัน 3 5 และ 8 สัปดาห์ในช่วงปลายเดือนธันวาคมจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ (ทุเรียนอยู่ในระยะออกดอก) โดยนำมาแยกเชื้อในส่วนของกลีบเลี้ยง กาบหุ้มกลีบดอก กลีบดอก และเกสรตัวผู้ พบว่า เชื้อรา *Phomopsis* spp. มักถูกตรวจพบบริเวณกลีบเลี้ยงหรือกาบหุ้มกลีบดอก แต่เมื่อดอกมีอายุมากขึ้นจะพบการติดเชื้อเป็นจำนวนมากที่บริเวณกลีบเลี้ยง ซึ่งเป็นบริเวณรอบนอกของดอก โดยเฉพาะจากแหล่งปลูกจังหวัดตราด ที่พบได้มากถึง 70% แต่บางครั้งอาจพบตรงบริเวณเกสรตัวผู้ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุเนื่องจากบางเกสรเกิดการติดเชื้ออยู่ก่อนแล้ว (Table 1)

07--[illegible]- [illegible] Phomopsis [illegible] [illegible](ม.indd 63 23/3/2559 15:53:46

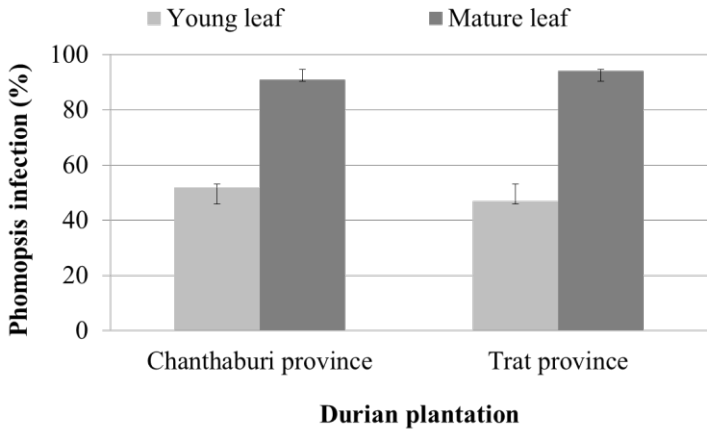

Figure 3 Infection of *Phomopsis* spp. on two stages of durian leaves cultivar Monthong obtained from two locations of durian plantation. Bars represent standard deviations of the mean.

Table 1 Percentage of Phomopsis latent infection obtained from various stages of durian floral parts.

Durian plantation	Floral parts	Latent infection of *Phomopsis* spp. (%)		
		3 weeks old	5 weeks old	8 weeks old (initial blooming)
Makham district, Chanthaburi province	Epicalyx	15 b	1.7 a	20 b
	Calyx	24.7 a	0 c	0 cd
	Petal	0 c	0 c	0 cd
	Stamen	0 c	0 c	5 c
Khaowsaming district, Trat province	Epicalyx	-	0.6 b	70 a
	Calyx	-	0 c	0 cd
	Petal	-	0 c	0 cd
	Stamen	-	1.5 a	0 cd

- = not studied

Means followed by different letters are significant difference at *P=0.05*, according to Duncan's Multiple Range Test.

3. ศึกษาปัจจัยภายในเนื้อเยื่อพืชที่มีผลต่อการเข้าทำลายแฝงของเชื้อ

จากการนำสารสกัดหยาบใบทุเรียนมาทดสอบการงอกของสปอร์เชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C10 บนอาหาร WA ที่ 10 ชั่วโมง พบว่า สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และลดความยาวของ germ tube ได้ 12 และ 23% ตามลำดับ (Figure 4A) และหลังจากการทำ bioassay บนแผ่น TLC พบว่าทั้งการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Phomopsis* sp. และ *C. oxysporum* ทำให้ปรากฏบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่ retention factor (Rf) 0.29-0.88 ซึ่งการพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อรา *C. oxysporum* จะทำให้บริเวณยับยั้งมีความคมชัดกว่าการใช้เชื้อรา

07--[illegible]- [illegible] Phomopsis [illegible] [illegible](ม.indd 64 23/3/2559 15:53:46

Phomopsis sp. (Figure 4B) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงตัวทำละลาย methanol สามารถละลายสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค (antifungal compounds) ออกมาจากเนื้อเยื่อใบทุเรียนได้หลายชนิด ได้แก่ hydroxytryptamines, mustard oils, saponin, fats และ formic acid โดยสารเคมีบางชนิดมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Brown, 1997) อย่างไรก็ตาม สารสกัดหยาบที่ได้ควรจะทำการแยกส่วน (fractionation) ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมอีกครั้ง เพื่อจะทำให้ได้เป็นสารกึ่งบริสุทธิ์และปรากฏบริเวณยับยั้งที่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน ตลอดจนควรทำการวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์เป็นลำดับถัดไป และจากผลการทดลองนี้ที่สารสกัดสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราสาเหตุโรคได้ แสดงถึงสารที่มีอยู่แล้วในพืชได้ยับยั้งไม่ให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตต่อไปจนพัฒนาให้เกิดอาการของโรคในขณะนั้นได้ ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีของ Prusky (1996) ที่กล่าวว่าเชื้อราที่มีคุณลักษณะในการเข้าทำลายแฝง เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกับสารประกอบที่มีอยู่แล้วในพืชบางชนิด โดยสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคได้ในช่วงหนึ่ง จึงทำให้ไม่ปรากฏอาการของโรคให้เห็น ในขณะที่จากการทดลองของ Melanson and Brant (1999) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis viticola* งอกและแทงเข้าสู่เนื้อเยื่อใบอ่อน ซึ่งในระยะแรกจะมีการเจริญของเส้นใยเฉพาะบริเวณใต้ชั้น epidermis โดยไม่มีการเจริญเข้าสู่ภายในเซลล์พืช จนกระทั่งเนื้อเยื่อพืชมีอายุมากขึ้น และเชื้อราเจริญลุกลามเข้าสู่ภายใน จึงทำให้ปรากฏอาการของโรคขึ้น รวมทั้งเชื้อราชนิดอื่นที่มีคุณลักษณะการเข้าทำลายแฝงและมีรายงานอย่างแพร่หลาย คือ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งเมื่อเข้าทำลายเนื้อเยื่อของผลอะโวกาโดในช่วงแรก จะยังไม่มีการพัฒนาอาการของโรค เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชดังกล่าวสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในกลุ่ม dienes ขึ้น จนกระทั่งเมื่อผลสุก สาร dienes เสื่อมสลาย จึงจะแสดงอาการของโรคให้เห็นได้ (Everett,1997)

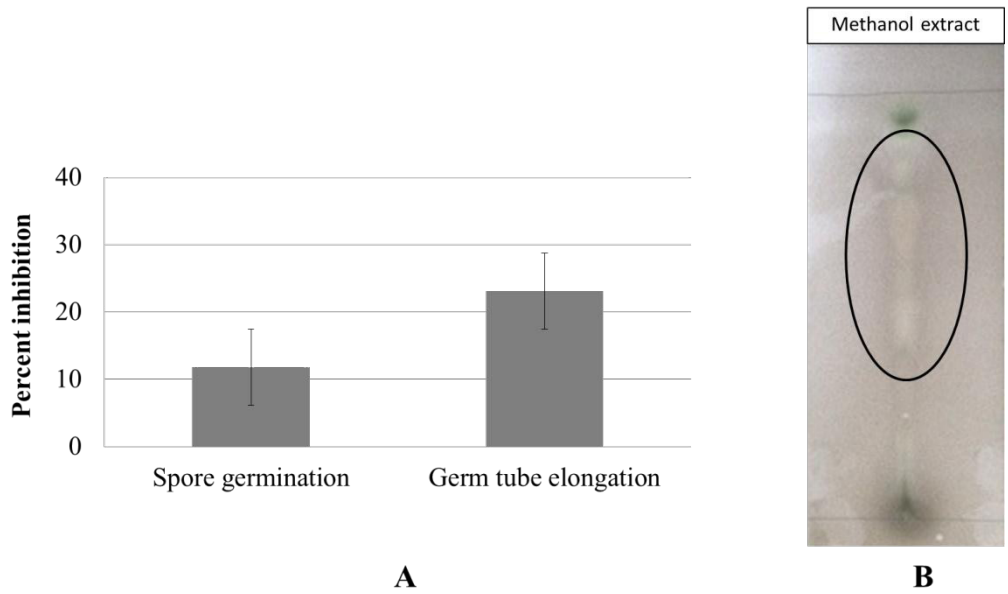

Figure 4 Effect of methanol crude extract from Monthong durian leaf on latent infection of *Phomopsis* sp isolate C10. (A) Inhibition of spore germination and germ tube elongation of *Phomopsis* sp. at 10 hours after treatment on water agar medium incubated at room temperature (25-32ºC). (B) Wide range of Inhibition zone at Rf 0.29-0.88 of indicator fungus *Cladosporium oxysporum* (circled) by TLC assay. Bars represent standard deviations of the means.

07--[illegible]- [illegible] Phomopsis [illegible] [illegible](ม.indd 65 23/3/2559 15:53:47

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เชื้อรา *Phomopsis* sp. เป็นเชื้อราที่มีคุณลักษณะในการเข้าทำลายแฝงในเนื้อเยื่อของใบทุเรียน โดยเชื้อราสามารถเจริญครอบคลุมภายในเนื้อเยื่อพืชได้เป็นเวลา 1 เดือนโดยที่ไม่ปรากฏอาการ และสามารถสร้างส่วนขยายพันธุ์ คือ pycnidium บนเนื้อเยื่อใบที่ตายแล้วที่ 20 วันหลังจากปลูกเชื้อ และส่วนมากเชื้อราจะทำให้เนื้อเยื่อเกิดการติดเชื้อได้ที่บริเวณท้องใบ นอกจากนี้ เนื้อเยื่อใบและดอกที่มีการติดเชื้อเป็นจำนวนมากในแหล่งปลูก จะเป็นแหล่งของเชื้อที่มีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากเชื้อดังกล่าวสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ในส่วนของผลได้ตลอดเวลา ซึ่งอาจก่อให้เกิดอาการผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการที่จะได้ทราบช่วงระยะแฝงของเชื้อก่อโรค อันจะเกิดประโยชน์ต่อการหาแนวทางในการป้องกันกำจัดได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เพื่อไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อเป็นบริเวณกว้างต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Brayford, D. 1990. Variation in Phomopsis isolates from *Ulmus* species in the British Isles and Italy. Mycological Research 94: 691-697.

Brown, M. J. 1997. Durio – A Bibliographic Review. International Plant Genetic Resources Institute for South Asia, New Delhi.

Chirawut, B. 2005. Antifungal compounds and mechanism of resistance of mango peel against *Colletotrichum gloeosporioides*. Ph D. Thesis, Kasetsart University.

Debaeke, P. and A. Estragnat. 2009. Crop canopy indicators for the early prediction of Phomopsis stem canker (*Diaporthe helianthi*) in sunflower. Crop Protection 28: 792-801.

Ellis, M.A. and M. Nita. 2008. Phomopsis Leaf Blight and Fruit Rot of Strawberry. Agriculture and Natural Resources, the Ohio State University.

Everett, K.R. 1997. Progress in managing latent infections A Review. Proceedings from Conference: Searching for Quality. 23-26 September 1997. J. G. Cutting (Ed.). P.55-68.

Fenn, P. 2011. Phomopsis Twig Blight and Fruit Rot. Department of Plant Pathology University of Arkansas. http://www.ent.uga.edu/peach/peachhbk/fungal/phomopsis.pdf

Girish, K., B.S. Shankara and K.A. Raveesha. 2009. Crude toxin extract from culture filtrate of *Phomopsis azadirachtae* infecting neem and its phytotoxicity. International Journal of Integrative Biology 6: 79-84.

Hwang, S.F., H. Wang, B.D. Gossen, K.F. Chang, G.D. Turnbull and R.J. Howard. 2006. Impact of foliar diseases on photosynthesis, protein content and seed yield of alfalfa and efficacy of fungicide application. European Journal of Plant Pathology 115: 389–399.

Lim, T.K., and S. Sangchote. 2003. Diseases of Durian. *In*: Ploetz, R.C. (ed.), Diseases of Tropical Fruit Crops, CABI Publishing, Wallingford, pp. 241-251.

Mazars, C., E. Canivenc, M. Rossignol and P. Auriol. 1991. Production of phomopzin in sunflower following artificial inoculation with *Phomopsis helianthi*. Plant Science 75: 155-160.

Melanson, D. and B. Brant. 1999. Phomopsis/grapevine disease interaction; a molecular investigation. SA Research and Development Institute and Cooperative Research Centre for Viticulture.

07--[illegible]- [illegible] Phomopsis [illegible] [illegible](ม.indd 66 23/3/2559 15:53:47

Nita, M., M.A. Ellis, L.L. Wilson and L.V. Madden. 2007. Evaluation of the curative and protectant activity of fungicides and fungicide–adjuvant mixtures on Phomopsis cane and leaf spot of grape: A controlled environment study. Crop Protection 26: 1377-1384.

O'Gara, E., S. Sangchote, L. Fitzgerald, D. Wood, A.C. Seng and D.I. Guest. 2004. Infection biology of *Phytophthora palmivora* Butl. in *Durio zibethinus* L. (Durian) and responses induced by phosphonate. In: Drenth, A. and Guest, D.I., (eds.) Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, pp. 42-52.

Ortiz-Ribbing, L. and M.M. Williams. 2006. Conidial germination and germ tube elongation of *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthi* on leaf surfaces of seven *Amaranthus* species: Implications for biological control. Biological Control 38: 356–362.

Patwardhanr, S.A., C. Pandey and Dev. Sukh. 1974. Toxic cytochalasins of *Phomopsis paspalli,* a pathogen of Kodo millet. Phytochemistry 97: 1985-1988.

Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 34: 413–34.

Rawnsley, B. 2003. Phomopsis cane and leaf spot of grapevine. FACT SHEET, www.pir.sa.gov.au/factsheets.

Soto-Arias, J.P. and G.P. Munkvold. 2011. Impacts of foliar fungicides on infection of soybean by *Phomopsis* spp. in Iowa, USA. Crop Protection 30: 577-580.

07--[illegible]- [illegible] Phomopsis [illegible] [illegible](ก.indd 67 23/3/2559 15:53:47