

การศึกษาโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อฟิวซาเรียม

Fusarium Wilt of Tomato in Thailand

เสนต์ นิลมนี และ อุดม ภูพิพัฒน์

คณะกสิกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคเหี่ยวของมะเขือเทศเกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum f. lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen. เป็นโรคที่ร้ายแรงโรคหนึ่งซึ่งทำความเสียหายให้กับมะเขือเทศในประเทศไทยในท้องที่ที่มีการปลูกมากจากบันทึกครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2501 ของแผนกโรควิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรมพบว่าโรคนี้อมีระบาดที่จังหวัดพระนคร ธนบุรี สระบุรี นครราชสีมา เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และเชียงใหม่ ส่วนจังหวัดอื่น ๆ เข้าใจว่าคงจะมี แต่ยังไม่มีการสำรวจพบในต่างประเทศได้มีรายงานพบครั้งแรกที่เกาะ Channel ในช่องแคบอังกฤษ เมื่อราวปี ค.ศ. 1892 - 1893 (2) โรคนี้อเป็นที่รู้จักกันดีในแถบอบอุ่นของโลก และมีผู้สนใจทดลองค้นคว้ากันอย่างกว้างขวางมาก Moore และ Chupp (1) ได้ศึกษาทางสรีรของเชื้อรานี้อพบว่าสามารถใช้ธาตุคาร์บอนจาก carbon source ต่าง ๆ ย่อยแบ่งและใช้ ammonium-ion ได้ ใช้ไนโตรเจนจาก nitrogen

source จำพวก urea, peptone, proteose-peptone และ asparagine ได้ แต่ไม่สามารถสร้างสารอินโดลจาก tryptophan หรือซัลไฟด์จากกำมะถันที่มีอยู่ในโปรตีนและยังสามารถย่อยเจลาติน reduced pectate และทำให้ casein ตกตะกอนได้ Walker (2) กล่าวว่าเชื้อรานี้อเจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มี pH 3.6 - 8.0 ในดินที่เป็นกรด pH ที่เหมาะแก่การงอกของสปอร์บนอาหารมีอยู่ 2 ระยะ คือ ประมาณ 4.5 และ 7.0 อาหารที่มีธาตุโปแตสเซียมต่ำ และไนโตรเจนสูง จะทำให้เกิดการเจริญของเชื้อราเพิ่มขึ้น และเขายังกล่าวถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดการเหี่ยวว่าเนื่องจากเชื้อรานี้อทำให้การเคลื่อนที่ของน้ำและธาตุอาหารในลำต้นไม่สะดวก หรือหยุดชะงักลงโดยเมื่อเชื้อราเข้าไปอยู่ในท่ออาหารแล้วจะสร้าง enzyme พวก pectin methyl-esterase (PME) และ depolymerase (DP) enzymes ทั้งสองชนิดนี้จะทำลาย pectic substances ที่อยู่ในผนังเซลล์แล้วเข้าไปใน

xylem parenchyma และในท่อ xylem แล้ว จะเกิด colloidal mass ออกอยู่ ในระยะนี้จะเกิดการเหี่ยวขึ้นแรก คือ ต้นมะเขือเทศจะเหี่ยวในเวลากลางวันที่มีแดดร้อนและจะฟื้นในเวลากลางคืน ที่มี น้ำค้าง หรืออากาศเย็น เรียกว่า "temporary wilting" เมื่อไปเชื้อราจะสามารถสร้างสาร lycomarasin และ fusaric acid ขึ้น ทำให้เกิดอาการเหี่ยวตลอดไป เรียกว่า "permanent wilting"

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำต้นมะเขือเทศที่เป็นโรคน้ำตาล้ำน้ำแล้วเช็ดให้แห้ง ใช้แอลกอฮอล์ 95% เช็ดรอบๆ ต้นให้ทั่วอีกทีหนึ่ง ใช้มีดคมๆ และฆ่าเชื้อโรคโดยจุ่มแอลกอฮอล์แล้ววนไฟให้ร้อน ผ่าลำต้นตามยาว พยายามให้ขาดในที่เดียว จะสังเกตเห็นรอยสีน้ำตาลตามส่วนของท่ออาหาร ใช้ปลายมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วนั้นค่อยๆ ตัดเอาส่วนรอยสีน้ำตาลออกเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 3-4 มม. นำไปเลี้ยงใน Petri-dish ที่มีอาหาร PDA (ซึ่งทำเป็นกรดด้วย lactic acid 25% 2-3 หยด) จานละ 4 ชิ้น ห่างเท่าๆ กัน 4 มม. เก็บใส่ในอุณหภูมิห้อง ประมาณ 48 ชม. เส้นใยของเชื้อราจะงอกออกมาจากส่วนของพีชนั้น เชียเส้นใยด้วยเข็มเขี่ย (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA

ที่ slant ไว้ในหลอดทดสอบ เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องให้เชื้อราเจริญเพื่อเก็บไว้เป็นเชื้อบริสุทธิ์สำหรับทดลองต่อไป

ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา

เส้นใย (mycelium) เส้นใยจะเจริญเป็นโคโลนีสีม่วงแดง มีลักษณะเป็นเส้นยาวแตกกิ่งก้านสาขา เมื่อยังอ่อนอยู่จะมี septa ทางใส (hyaline) จะเข้มขึ้น และ septa จะถึสนเมื่อมีอายุนาน จากการวัดด้วย micrometer จำนวน 100 ครั้ง กับเส้นใยของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร bean agar อายุ 1 วัน พบว่ามีขนาดเฉลี่ย 4.9×42.6 ไมครอน

Conidiophores เกิดแยกออกมาจากเส้นใย อาจเกิดเดี่ยวๆ หรือแยกออกเป็นกิ่งก้านสาขาก็มี มีทั้ง septate และ non-septate มีขนาดเฉลี่ย 3.2×17.5 ไมครอน

Conidia เกิดที่ปลาย conidiophores มีอยู่ 2 ชนิดคือ

Microconidia มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ใส มีทั้งเซลล์เดี่ยว (unicellular) และสองเซลล์ (bicellular) ชนิดเซลล์เดี่ยวมีขนาดเฉลี่ย 4.1×14.8 ไมครอน

Macroconidia มีลักษณะยาวรี โค้งที่ปลายเล็กน้อยคล้ายรูปเคียว ใส ส่วนมากพบมี 2 และ 3 septa ส่วน 4 และ 5 septa นั้นไม่ค่อยพบเกิดขึ้นทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ

และเนื้อเยื่อของพืชที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (sterilized plant tissues) ต่างๆ ชนิด 2 septa มีขนาดเฉลี่ย 3.5×21.2 ไมครอน ชนิด 3 septa มีขนาดเฉลี่ย 4.2×29.0 ไมครอน

Chlamydospores มีผนังเซลล์หนา สี่ เข้มกว่าเส้นใย มีลักษณะค่อนข้างกลมเกิดได้ทั้งระหว่างเส้นใย (intercalary) และที่ปลายเส้นใย (terminal) พวกที่เกิดระหว่างเส้นใยมีขนาดเฉลี่ย 9.9 ไมครอน พวกที่เกิดปลายเส้นใยมีขนาดเฉลี่ย 9.1 ไมครอน

ลักษณะทางสรีระของเชื้อรา

การทดลองการเจริญของ เชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

จุดประสงค์เพื่อการศึกษาถึงการเจริญเติบโตและลักษณะต่างๆ ของเชื้อรา ตลอดจนศึกษาการเกิด และระยะเวลาการเกิดของ conidia chlamydospores ของเชื้อรา

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 9 ชนิดคือ water agar, corn-meal agar, corn-meal with dextrose agar, PDA, bean agar, sabouraud agar, basal semisynthetic medium for C-source deficiency และ basal semisynthetic medium for N-source deficiency ชนิดละ 5 จาน ทิ้งไว้ให้แข็ง ใช้ biscuit cutter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ซม. ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ตักเชื้อรารวมทั้งวันนำมาวางตรง

กลางจานที่เทอาหารทิ้ง 6 ชนิด แล้วทุกๆ จานเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง แล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราใน 3 วัน และ 7 วัน ปรากฏว่าเชื้อราเจริญได้ดีที่สุดใน bean agar และจากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อเชื้อราอายุ 7 วัน พบว่าเกิด microconidia และ macroconidia มากในอาหาร PDA และ corn-meal agar แต่ใน Czapek's solution agar ไม่พบ macroconidia เลย พบ chlamydospores มากที่สุดใน bean agar รองลงมาได้แก่ PDA และจะเกิดประมาณวันที่ 8-12 นับจากวันเลี้ยงเชื้อ

การทดลองการเจริญของเชื้อราบนเนื้อเยื่อของพืชที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

ใช้เข็มเขี่ย (loop) ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเอาเชื้อราที่บริสุทธิ์ไปปลูกบนเนื้อเยื่อของพืช ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่ใส่ไว้ในหลอดทดสอบจำนวน 16 ชนิด คือ มันฝรั่ง พักเขียว แตงร้าน ถั่วฝักยาว มะเขือยาว ถั่วลิ้นเต่า มะระ ก้านมะเขือเทศ ผักกาดหัว แตงกวา มันเทศ พริกขี้หนู พริกหยวก บวบ มะเขือเปราะ และผักทอง ชนิดละ 5 หลอด นำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง จากการสังเกตการเจริญของเชื้อราที่เลี้ยงนี้เมื่ออายุ 2 วัน พบว่าเจริญได้ดีในมันฝรั่ง ในผักทองเจริญได้เร็วที่สุด จากการตรวจ conidia หลังจาก

เลี้ยงเชื้อได้ 3 วัน พบว่าเชื้อราสร้าง macroconidia บนมะเขือเทศ ยาวมากที่สุด ส่วนมะระ พักทอง ถั่วลิ้นเต่า ถั่วฝักยาวและแตงกวาไม่เกิด macroconidia เลยแต่ microconidia นั้น พบในมันเทศและพริกเขียวมากที่สุด พบ chlamydospores บนทุก ๆ ชนิด แต่พบมากในผักกาดหัว การเกิด chlamydospores จะอยู่ในระยะประมาณ 10 - 15 วันหลังจากปลูกเชื้อ การทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา

ใช้ biscuit cutter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 ซม. ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเชื้อบริสุทธิ์นำไปวางบนอาหาร bean agar ใน Petri-dish เก็บไว้ใน incubator ที่อุณหภูมิ 25° 28° 30° 32° และ 34° ซ. เปรียบเทียบความเจริญของเชื้อราในอุณหภูมิต่าง ๆ กันนี้โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทุก ๆ 3, 5 และ 7 วัน ปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 28° ซ. เชื้อราเจริญได้ดีที่สุด (ดังตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium oxysporum f. lycopersici* ที่เลี้ยงในอาหาร bean agar ในระดับอุณหภูมิต่าง ๆ กัน เมื่ออายุ 1 วัน 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน

อุณหภูมิ (°ซ.)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา (ซม.) ±/			
	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
26	0.6	3.	5.4	7.7
28	1.4	3.4	5.8	เต็มจาน
30	1.3	3.0	4.7	7.4
32	0.6	2.1	4.4	6.1
34	0.5	0.9	2.3	3.6

±/ ผลเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

การทดลองพิษุนโรคร

ได้ทำการ ทดลอง พิษุนโรคร ใน ระยะ ต่าง ๆ ของมะเขือเทศเป็น 4 ระยะ โดย

ปลูกมะเขือเทศ 60 ต้น ในกะถางที่มีดินที่ หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 60 กระถาง แบ่งออกเป็น 4 พวก ๆ ละ 15 กระถาง แต่ละพวก

แบ่งเป็นที่ใช้ปลูกเชื้อ 10 กระถาง และ พวก control 5 กระถาง

ก. ในระยะเป็นต้นกล้า

ต้นมะเขือเทศที่มีอายุประมาณ 15 - 20 วันที่ปลูกในดินที่ฝังฆ่าเชื้อแล้ว จุ่ม ส่วนรากลงใน mycelium และ spore suspension ของเชื้อรา *F. oxysporum f. lycopersici* แล้วนำไปปลูกในกระถางที่มีดิน ฝังฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 10 กระถาง ส่วน พวกที่ใช้เป็น control นั้นก็นำส่วนรากจุ่ม ลงในน้ำกลั่นที่ฝังฆ่าเชื้อแล้ว ปลูกในกระ ถางที่มีดินฝังฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 5 กระถาง ทั้งไว้คอยสังเกตอาการต่อไป (ตั้งตาราง ที่ 4)

ข. ในระยะก่อนมีดอก ระยะมีดอก และระยะมีผล

ใช้มีดที่สะอาดซึ่งฆ่าเชื้อโดยจุ่ม แอลกอฮอล์ 65 % แล้วลนไฟ ชุดดินรอบๆ โคนออก นำเชื้อรา *F. oxysporum lycopersici* ที่เลี้ยงบน corn-meal sand medium

ผสมกับดินที่ฝังฆ่าเชื้อแล้วอายุ 7 วัน ประมาณ 100 กรัม โรยรอบๆ โคนต้นแล้ว กลบดินไว้อย่างเดิม ทำเช่นนี้จนครบ 10 กระถางของแต่ละพวกที่ใช้ปลูกเชื้อ ส่วน พวกที่เป็น control ทำเช่นเดียวกัน แต่ใช้ corn-meal sand medium ที่มีได้ปลูกเชื้อ แทน (ภาพที่ 5 และ 6)

ผลการทดลอง .

จากการทดลองปลูกเชื้อ (inoculate) เชื้อรา *F. oxysporum f. lycopersici* กับต้น มะเขือเทศใน ระยะต่าง ๆ กันปรากฏว่าเกิด อาการของโรคกับทุกระยะของมะเขือเทศ แต่ ระยะเวลาและจำนวนการเกิดโรคนั้นแตกต่างกันไป กล่าวคือ ระยะเป็นต้นกล้าใช้ระยะ ที่ทำให้เกิดโรค 12 วัน และจำนวนมะเขือเทศเป็นโรคได้ 100 % ระยะก่อนมีดอกใช้ เวลาที่ทำให้เกิดโรค 12 วัน มะเขือเทศ เป็นโรค 40 % ระยะมีดอกใช้เวลา ที่ทำให้เกิดโรค 15 วัน มะเขือเทศเป็นโรค 100% และระยะมีผลใช้เวลาที่ทำให้เกิดโรค 10 วัน มะเขือเทศเป็นโรค 40% (ตั้ง ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงผลการทดลองปลูกเชื้อรา *Fusarium oxysporum f. lycopersici* กับ
ต้นมะเขือเทศในระยะต่าง ๆ กัน

อายุของต้นมะเขือเทศ	ผลการทดลอง	incubation period	% infection
ระยะเป็นต้นกล้า	positive	12	100
ระยะก่อนมีดอก	positive	12	40
ระยะมีดอก	positive	13	100
ระยะมีผล	positive	10	40

วิจารณ์ผล

จากผลการทดลองปลูกเชื้อรากับต้นมะเขือเทศในระยะต่าง ๆ กันนั้น ระยะเวลาที่เชื้อราใช้เข้าทำลายและเปอร์เซ็นต์ความเสียหายแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากปัจจัยของสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับความสามารถที่ทำให้เกิดโรคนั้น อาทิเช่น อุณหภูมิของดิน ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ฯลฯ เป็นต้น สำหรับอุณหภูมินั้นในขณะทำการทดลองได้ทำในระยะเวลาต่างกัน กล่าวคือในระยะเป็นต้นกล้าและระยะมีดอกได้ทดลองในระหว่างเดือนมกราคม อุณหภูมิเฉลี่ยของดินอยู่ในระหว่าง 20°-30°ซ. ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค (อุณหภูมิที่โรคนั้นจะเกิดได้คือ 12°ซ. และอุณหภูมิสูงสุดคือ 33°ซ. หรือสูงกว่าเล็กน้อย

น้อย อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 28°ซ.) ส่วนในระยะก่อนมีดอกและระยะมีผลนั้นได้ทำในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ อุณหภูมิเฉลี่ยของดินสูงกว่า optimum temperature ของการเกิดโรคคือ 28°ซ. แต่ก็ยังคงอธิบายไม่ได้ ในขณะที่ต้นมะเขือเทศเจริญเติบโตอยู่ ณ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum f. lycopersici* ส่วนปัจจัยอื่น ๆ เช่นความเข้มข้นของ balanced nutrient ของดิน หากว่าเข้มข้นขึ้นก็จะทำให้เกิดโรคน้อยลงได้

สรุป

จากการศึกษาโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดระบาดขึ้นในบริเวณ แปลงทดลองของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน พบว่า

เกิด *Fusarium oxysporum f. lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen เส้นใยไม่มีสี แต่มี septate มีขนาดเฉลี่ย $4.9 \times 4.2.6$ ไมครอน เส้นใยเจริญแตกกิ่งก้านได้ดี มีความยาวของ เซลล์แตกต่างกันมาก conidiophores มีทั้ง septate และไม่มี septate เกิดเป็นกลุ่ม เตี้ยๆ หรือแตกเป็นกิ่งก้านมีขนาดเฉลี่ย 3.19×17.50 ไมครอน conidia ใสมี 2 ชนิดคือ microconidia มีลักษณะกลมหรือยาวรี เซลล์เดี่ยว หรือสองเซลล์ เซลล์เดี่ยวมีขนาดเฉลี่ย 4.6×2.4 ไมครอน สองเซลล์มีขนาดเฉลี่ย 4.1×14.8 ไมครอน macroconidia มีลักษณะยาวรี โค้งปลายเล็กน้อย ส่วนมากพบมี 2 และ 3 septa ชนิด 2 septa มีขนาดเฉลี่ย 3.5×21.2 ไมครอน ชนิด 3 septa มีขนาดเฉลี่ย 4.5×29.0 ไมครอน chlamydospore มีผนังเซลล์หนา สองชั้นมีลักษณะกลมเกิดทั้งในระหว่างเส้นใย และที่ปลายเส้นใยมีขนาดเฉลี่ย 9.06 ไมครอน เกิดมากในอาหาร bean agar และผักกาดหัว เชื้อราขึ้นได้ดีที่สุดในอาหาร bean agar และ sterilized plant tissues ของมันฝรั่ง macroconidia เกิดมากในอาหาร PDA, corn-meal agar ในมันเทศและผักเขียว microconidia

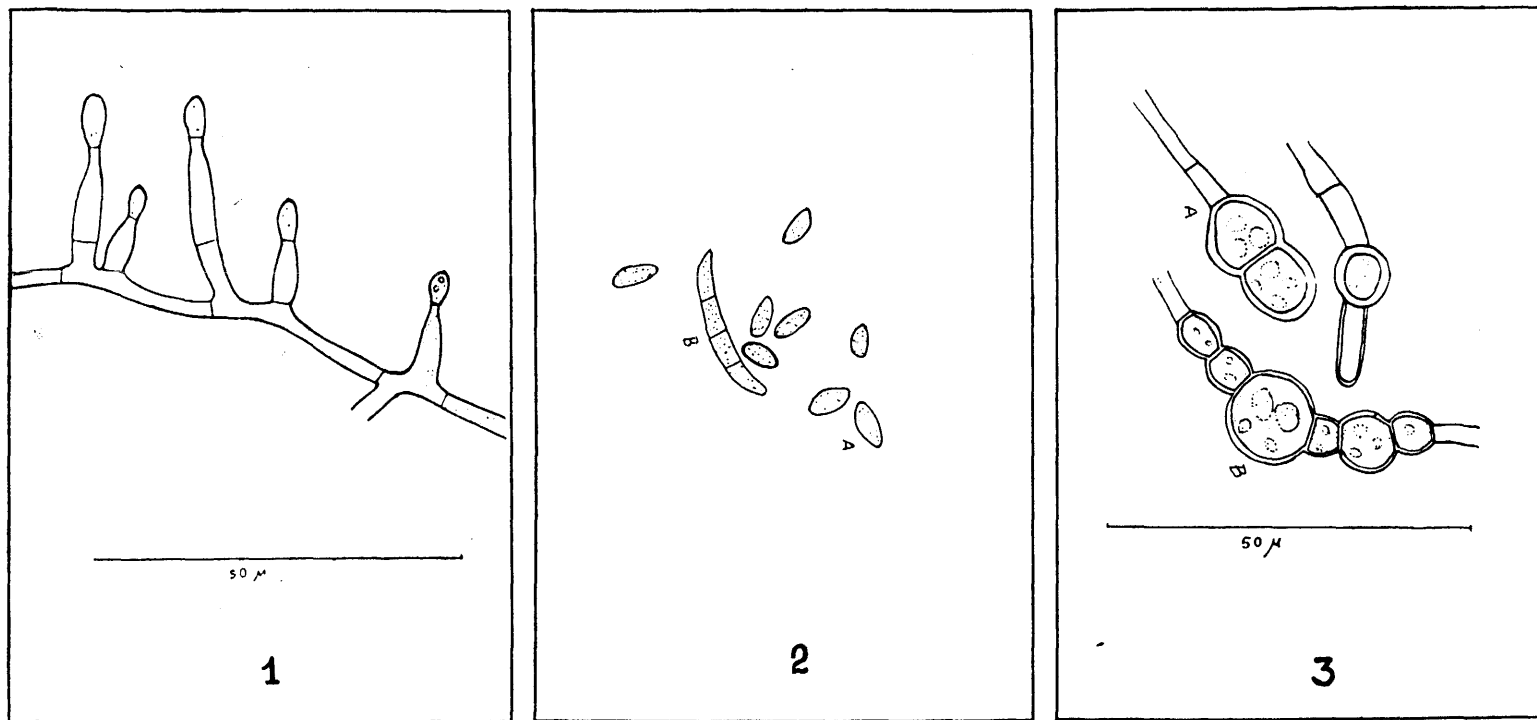
เกิดมากในอาหาร PDA และมะเขือยาว อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา คือ 28°C . เชื้อราทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศได้ทุกระยะ แต่ระยะเวลาการเข้าทำลายของเชื้อโรคไม่เท่ากัน และเปอร์เซ็นต์ความเสียหายในระยะเป็นต้นกล้ากับระยะมีดอกมากกว่าในระยะก่อนมีดอกกับระยะมีผล

SUMMARY

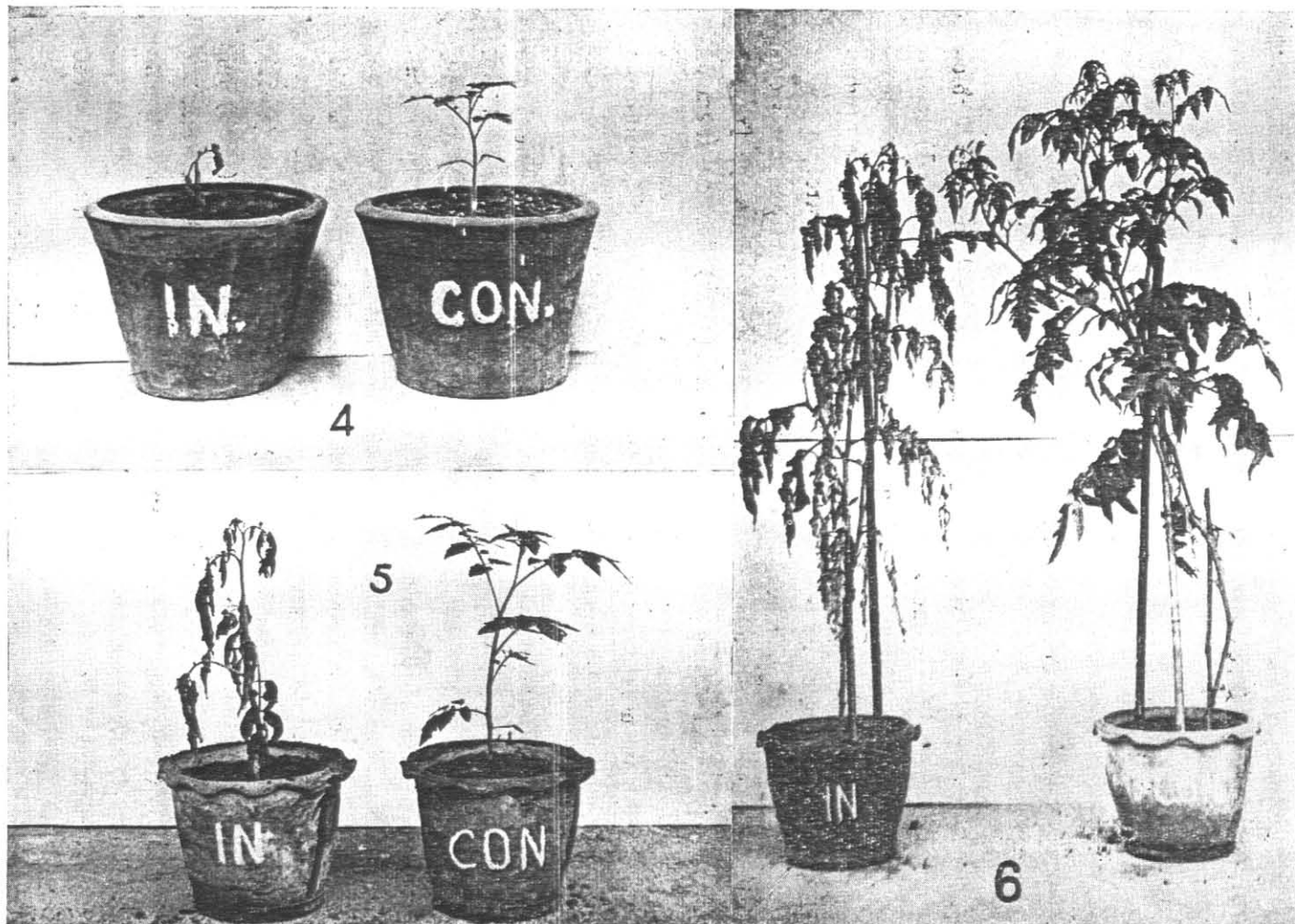
Fusarium wilt of tomato which causes considerable damage to the crop has been widely distributed in many provinces. Thus a comprehensive disease-research program of this *Fusarium* infection was conducted. The species of this fungus was *Fusarium oxysporum f. lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansan. Morphology, physiology, and cultural characteristics of the incitant was studied intensively. The optimum temperature for growth was found to be 28°C , it infected every stage of plant, but the time of infection and losses varied. Seedling and flowering stages were more susceptible than pre-flowering and fruiting stage.

REFERENCES

1. Moore, H., and C. Chupp, 1952. A physiological study of Fusaria causing tomato, cabbage, and muskmelon wilts. *Mycologia* 44:523-532.
2. Walker, J.C., 1957. *Plant pathology*. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 699p.



ภาพที่ ๑-๓ แสดงลักษณะของเชื้อรา *F. oxysporum f. lycopersici* 1. conidiophores และการติดของ microconidia, 2. conidia แสดง micronidia (A) และ macroconidia (B), 3. chlamydospores แสดง terminal (A) และ intercalary (B)



ภาพที่ ๔-๖ แสดงลักษณะของต้นมะเขือเทศพันธุ์ Ponderosa ในระยะต้นกล้า (๔) ก่อนมีดอก (๕) มีผล (๖) ที่เป็นโรคเหี่ยวเกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum f. lycopersici* หลังจากปลูกเชื้อได้ ๑๒ วัน