

ฮิสโตวิทยาของเมล็ดและส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพดที่เป็นโรค เกิดจากเชื้อรา *Sclerospora sorghi* Weston & Uppal

Histology of Corn Seeds and Plant Parts Infected by *Sclerospora sorghi* Weston & Uppal

ธรรมศักดิ์ สมมาตย์ อุดม ภูพิพัฒน์ สิริพงษ์ อินทรามะ และ B.L. Renfro
Tharmmasak Sommartaya, Udom Pupipat, Siriphong Intrama and B.L. Renfro

ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

The presence of *Sclerospora sorghi* Weston & Uppal was generally found in all examined parts of infected plants, especially in seed. The coenocytic hyphae invades the scutellum of the embryo and colonized well. During the seed germination hyphae development progressed mainly upward to the mesocotyl and after 6-8 days, the coenocytic hyphae could be detected in the first leaf of seedlings. Abundant conidia were found on both sides of this leaf during the nights when the dew point was reached.

การนำเมล็ดข้าวโพดติดเชื้อ ไปทำพันธุ์ปลูกนั้น จะเป็นสาเหตุสำคัญอันหนึ่ง ที่ทำให้โรคแพร่ระบาดไปสู่แหล่งปลูกที่มีอยู่เดิม และแหล่งปลูกที่บุกเบิกใหม่เพิ่มขึ้น ในกรณีโรคราน้ำค้างของข้าวโพดที่พบในประเทศไทย เกิดจากเชื้อ *Sclerospora sorghi* Weston & Uppal ซึ่งเป็นที่เข้าใจว่า สามารถถ่ายทอดติดไปกับเมล็ดได้ด้วยแล้ว เมื่อนำเมล็ดที่เป็นโรคไปปลูก ก็จะทำให้เชื้อแพร่ขยายและระบาดติดต่อไปยังต้นอื่นๆ ทำให้ข้าวโพดได้รับความเสียหายมาก การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการมุ่งที่จะนำเอาเมล็ดข้าวโพดที่เก็บจากต้นที่เป็นโรค มาตรวจสอบสภาพของเชื้อรา *S. sorghi* ที่อาศัยอยู่ในเมล็ด การเจริญเติบโตของเชื้อไปสู่ต้นอ่อน และการแผ่ขยายของเชื้อไปยังส่วนต่างๆ ของต้นข้าวโพดที่เป็นโรคเป็นสำคัญ

จากการที่เชื้อโรคราน้ำค้าง สามารถดำรงชีพอยู่ในเมล็ดข้าวโพดได้ จึงทำให้มีผู้พยายามที่จะศึกษาว่า เชื้อราอยู่ในเมล็ดข้าวโพดลักษณะไร และบริเวณไหน

เช่น Purakusumah (8) ในปี 1955 ได้พบเส้นใยของ *S. maydis* ในบริเวณฝัก funiculus และ seed coat ของข้าวโพดพันธุ์ metro, Ullstrup (13) รายงานในปี 1969 ว่า *Sclerophthora macrospora* มักจะมีเส้นใยใน embryo ของเมล็ด ในปี 1972 Jones กับคณะ (4) ยังได้รายงานว่า aleurone layer เป็นชั้นของเนื้อเยื่อที่ป้องกันไม่ให้เชื้อราเจริญเข้าไปยังส่วน embryo ได้

เนื่องจาก *S. sorghi* เป็นเชื้อราใน Peronosporales และอยู่ใน class Phycomycetes ดังนั้นจึงมีเส้นใยเป็น coenocytic ปรากฏในเนื้อเยื่อพืช (4) มีปริมาณเส้นใยไม่แน่นอนแล้วแต่ว่าอยู่ตรงส่วนไหนของเนื้อเยื่อ (12) มีการเจริญเติบโตเป็นได้ทั้งแบบ intercellular และ intracellular (1, 4, 7, 11, 12) นอกจากนี้ Ullstrup ในปี 1969 และ Fredericksen ในปี 1973 ยังได้พบว่าเส้นใยของราน้ำค้างมักอยู่ติดกับ phloem เสมอ และอีกลักษณะหนึ่งที่พบบ่อยคือ haustoria ซึ่งพบหนาแน่น

บนใบและส่วนอื่น นอกจากนี้ยังพบใน nucellus ด้วย (3,4)

อุปกรณ์และวิธีการ

Histopathology: นำเอาก้านฝัก ฝัก ดอกตัวเมีย โห่ และเมล็ดข้าวโพดจากต้นที่เป็นโรคราน้ำค้างอย่างรุนแรงมาแช่ในน้ำยา F.A.A. (formalin acetic acid) เพื่อฆ่าเนื้อเยื่อของพืชให้คงสภาพไว้ จากนั้นนำไป dehydrate ด้วยลำดับต่าง ๆ ของน้ำยา N.B.A. (normal butyl alcohol) และ infiltrate เพื่อนำไป embeded tissue เหล่านี้ลงใน paraffin แล้วตัด section ขนาดหนา 10-12 ไมครอน ด้วยเครื่อง rotary microtome (9) และย้อมด้วยสี Safranin และ Fast green จากนั้น mount ด้วย canada balsam เพื่อทำ permanent slide (5) แล้วตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่าง ๆ กัน เพื่อศึกษารายละเอียดและวาดภาพส่วนของพืชที่ถูกทำลายจาก camera lucida.

การศึกษากาการเจริญเติบโตของ *S. sorghi* จากเมล็ดที่เป็นโรคไปแสดงอาการยังต้นอ่อน: นำเมล็ดข้าวโพดพันธุ์พระพุทธรบาท 5 จากต้นที่เป็นโรคอย่างรุนแรง (มีเมล็ดติดฝักละ 1-10 เมล็ด) มาปลูกและทำการ fixed เมล็ดที่กำลังงอกอายุ 2 วัน และ 4 วัน ตรงส่วน mesocotyl, coleoptile และ growing point ของต้นกล้าเหล่านี้ โดยใช้วิธีเดียวกันกับการทดลองครั้งแรก

ผลการทดลอง

Histopathology: จากการย้อม section ด้วยสี Safranin และ Fast green พบว่าเนื้อเยื่อของพืชติดสีเขียวของ Fast green ส่วนเส้นใยของเชื้อรา *S. sorghi* ติดสีแดงของ Safranin และมีบางตอนที่ nucleus ของ *S. sorghi* ติดสีแดงเข้ม จนสังเกตได้ว่าเส้นใยเป็นแบบ coenocytic hyphae (ภาพที่ 1-4)

จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กับเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ พบว่ามีเส้นใยของ *S. sorghi* อยู่ที่ซังข้าวโพด

(ภาพที่ 1-4) และมักพบว่าเส้นใยของรานี้อยู่ติดกับเซลล์ที่อาหารด้วย (ภาพที่ 3) และมีการเจริญแบบ intercellular ระหว่างเซลล์ parenchyma (ภาพที่ 1, 2, 4)

เนื้อเยื่อข้าวโพดส่วนอื่น ๆ ที่พบว่า *S. sorghi* เข้าทำลายคือก้านฝัก (ภาพที่ 6) โห่ (ภาพที่ 7) และส่วนต่าง ๆ ของดอกตัวเมีย (ภาพที่ 5) คือ pericarp (ภาพที่ 8) ในส่วนของ integument (ภาพที่ 9) nucellus (ภาพที่ 11) และผนัง ovary (ภาพที่ 5)

จาก permanent slide ของเมล็ดนั้น เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตามเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดพบว่าเส้นใยของเชื้อรา *S. sorghi* มีอยู่อย่างหนาแน่นมากที่ scutellum ของต้นอ่อน (embryo) (ภาพที่ 12-14) และไม่พบว่ามีเส้นใยของราใน endosperm หรือ aleurone layer เลย นอกจากนี้ยังไม่พบ *S. sorghi* ในเนื้อเยื่อของ plumular leaf ของ embryo กับที่ radicle (ภาพที่ 12)

ผลการศึกษากาการเจริญเติบโตของ *S. sorghi* ในต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดที่เป็นโรค: จากผลการทดลองที่ผ่านมาทำให้พบว่า โดยทั่ว ๆ ไปเชื้อรา *S. sorghi* จะใช้เวลาในการเจริญเติบโตจนสามารถสร้าง conidia บนใบแรก ของต้นอ่อนได้ ภายในระยะเวลา 6-8 วัน หลังจากที่ถูกเมล็ดแล้ว การเจริญของราจะเริ่มจากในใบเลี้ยง (ภาพที่ 15 - 19) ออกมาก่อน แล้วเติบโตขึ้นไปใน mesocotyl เท่านั้น (ภาพที่ 16-19) ไม่ปรากฏเลยว่า *S. sorghi* เติบโตลงสู่ราก (ภาพที่ 19) นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นใยจะมาอยู่ส่วนของใบเลี้ยงติดกับ mesocotyl มากในระยะเวลาที่เมล็ดงอกแล้ว 2-3 วัน (ภาพที่ 16-19) เชื้อราจะเจริญเติบโตเข้าไปใน ground tissue ของ mesocotyl (ภาพที่ 15 และ 19) ซึ่งประกอบด้วย protoderm กับ protovascular tissue (ภาพที่ 17 และ 18) ลักษณะของเส้นใยจะยืดยาวและตรงขนานไปกับ การเรียงตัวของเซลล์พืช และอาจมีการแตกแขนงด้วย (ภาพที่ 18) หลังจากนั้นเส้นใย *S. sorghi* จะเจริญเข้าสู่ apical meristem หรือส่วนยอดที่กำลังเจริญเติบโต (ภาพที่ 20-24) ต่อมาจะส่งเส้นใยเข้าไปในส่วนของ

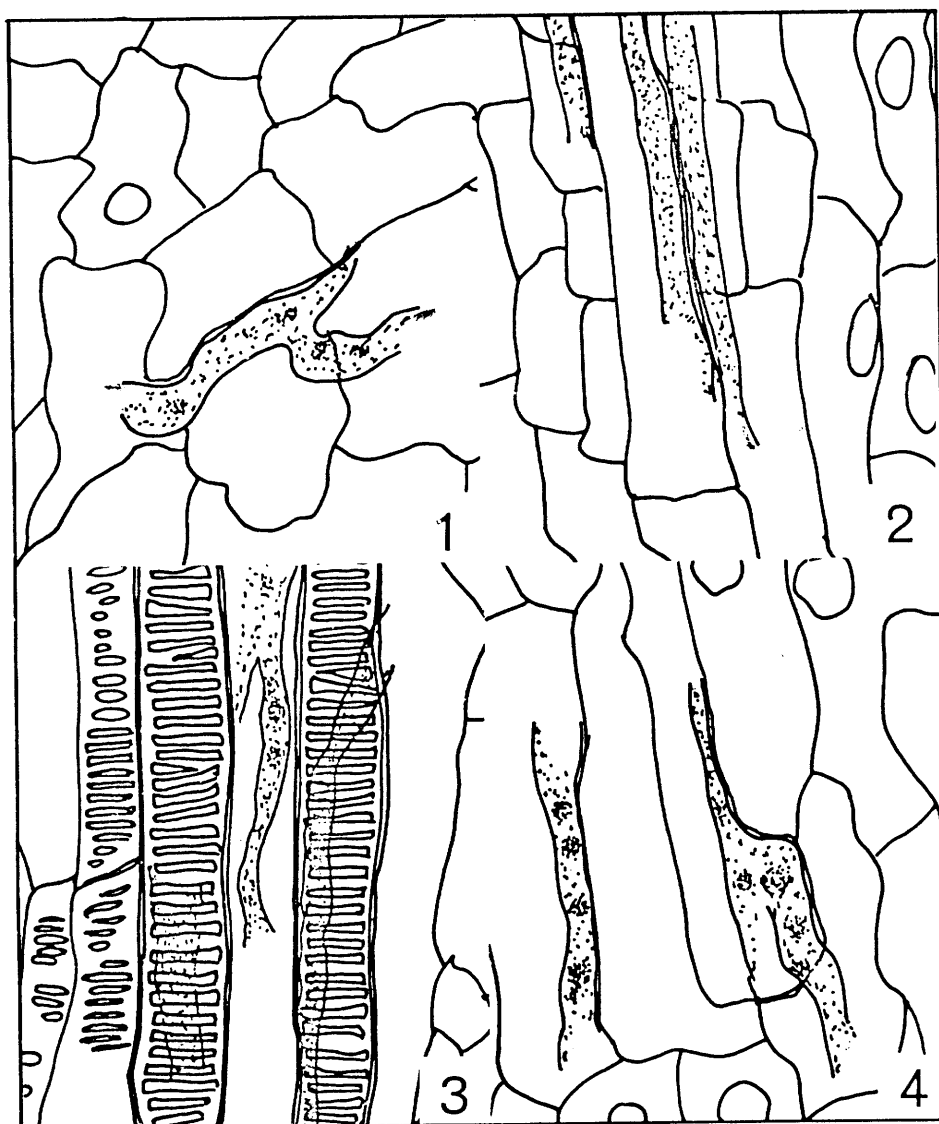


Fig. 1-4. Characteristic of *S. sorghi* in infected tissue of the cob. (400X) 3) Association of coenocytic hypha of *S. sorghi* and phloem of cob. (400X) (camera lucida drawing).

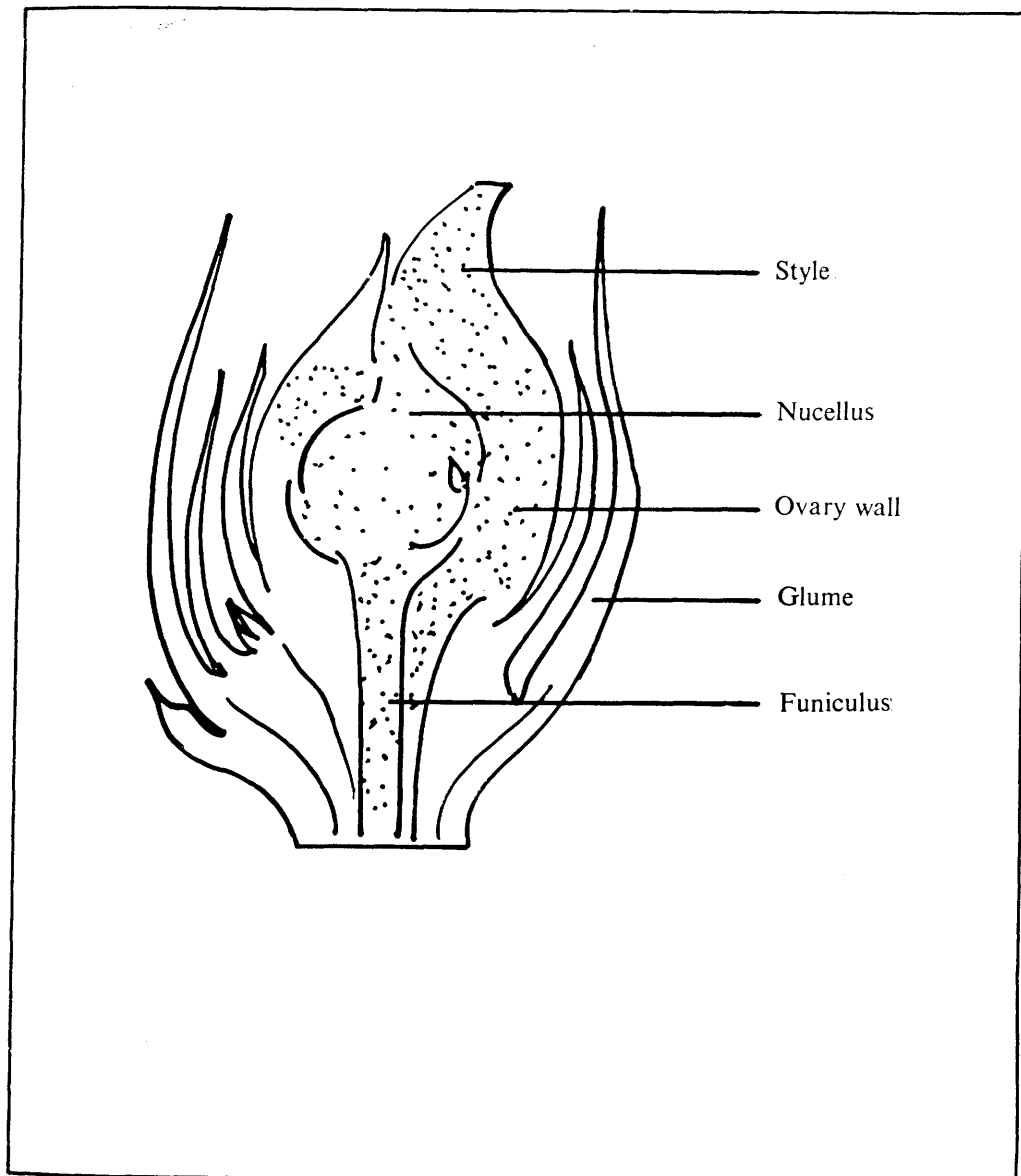


Fig. 5. Longitudinal section of infected distillated spikelet.

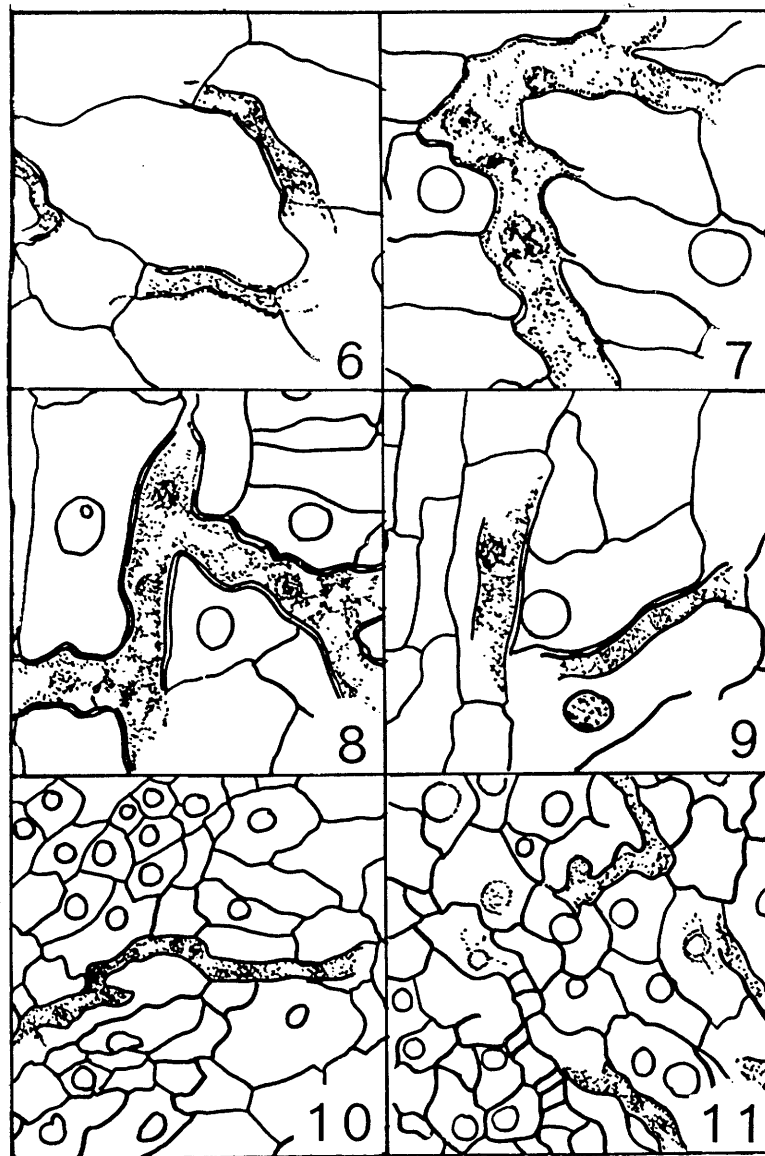


Fig. 6-11. Characteristic of *S. sorghi* mycelia in infected tissue of corn. 6) Localized in shank (100X camera lucida drawing), 7) Invaded to silk (400X camera lucida drawing), 8) Associated in pericarp (400X camera lucida drawing), 9) Mycelium in integument of nucellus (400X camera lucida drawing), 10) Coenocytic hyphae in ovary wall (100X), and 11) In nucellus. (100X) i = integument, a = aleurone layer, p = pericarp, e = endosperm

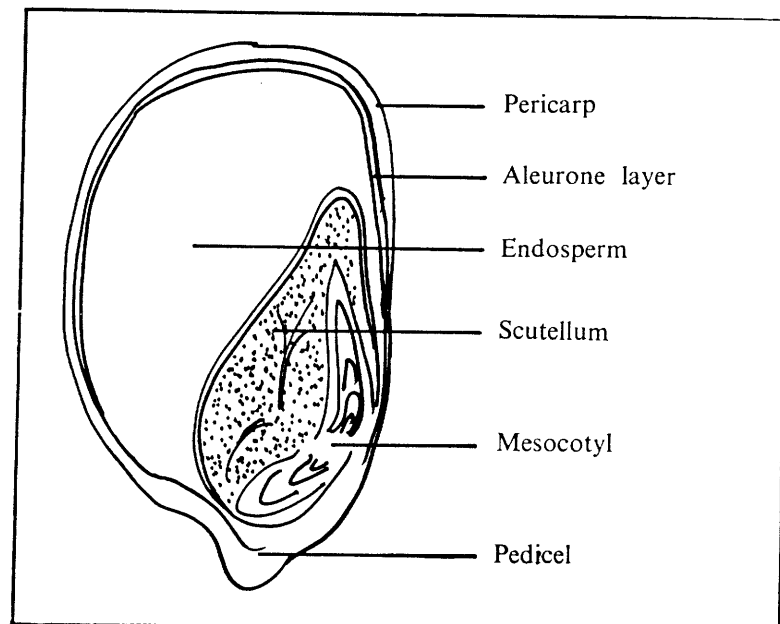


Fig. 12. Longitudinal of infected corn seed.

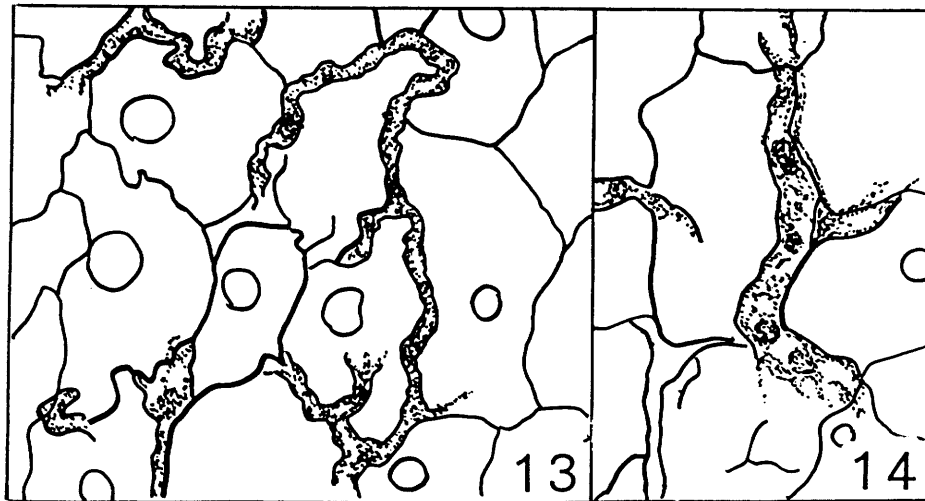


Fig. 13-14. Camera lucida drawing of the intercellular coenocytic hyphae of *S. sorghi* in scutellum (400X).

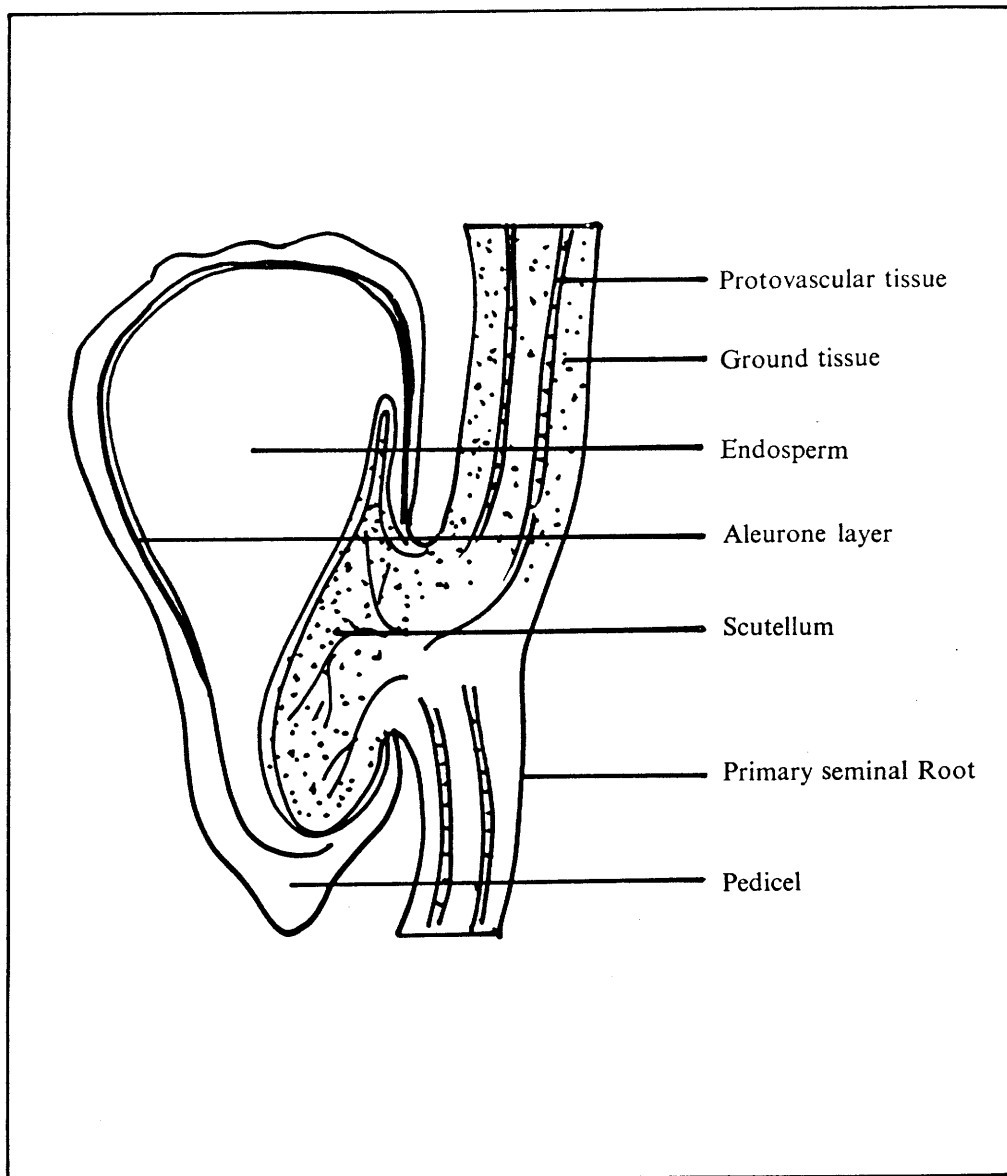


Fig. 15. Longitudinal section of 2 day-old germinated seed.

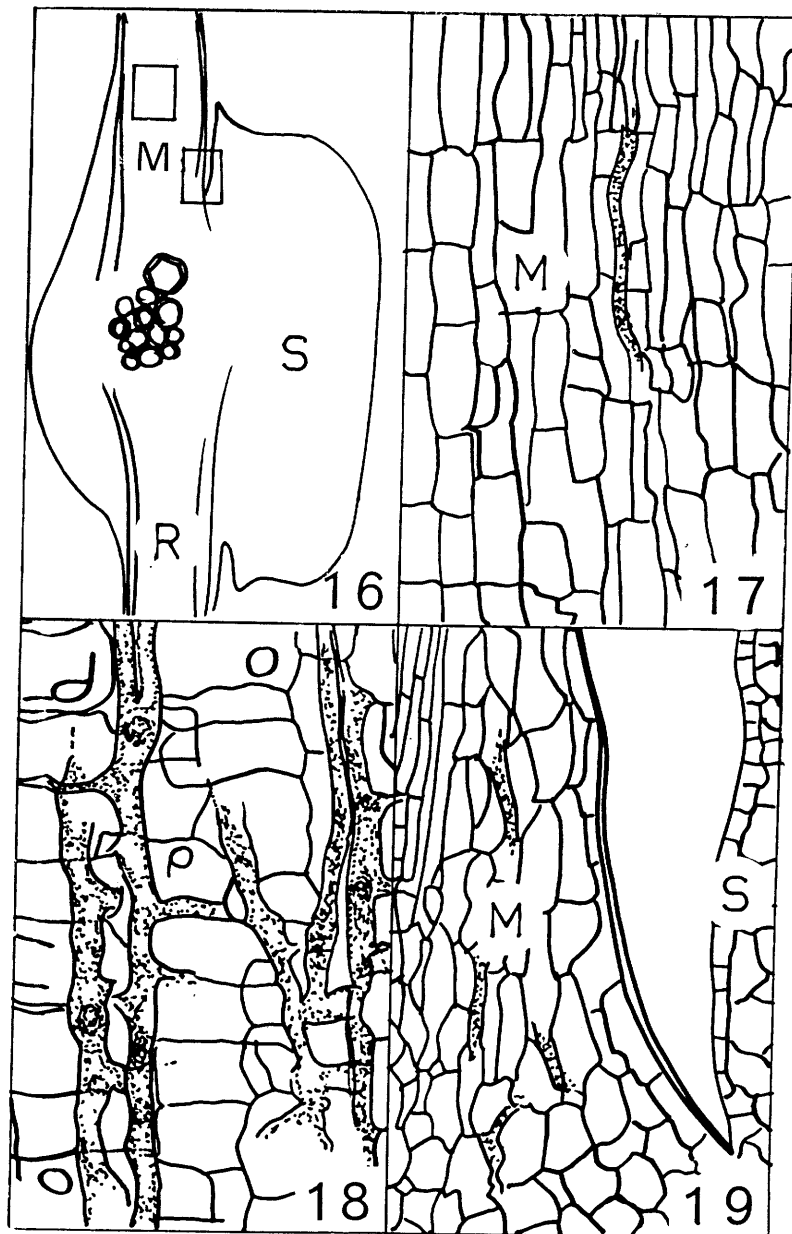


Fig. 16-19. Development of *S. sorghi* in a corn seedling. 16) Schematic drawing of a 2 day-old seedling, 17) *S. sorghi* in mesocotyl (100X camera lucida drawing), 18) Branched hyphae in mesocotyl camera lucida drawing (400X), 19) Attachment of scutellum to mesocotyl, which hyphae grow upward to shoot (100X camera lucida drawing). s = scutellum, m = mesocotyl, r = root

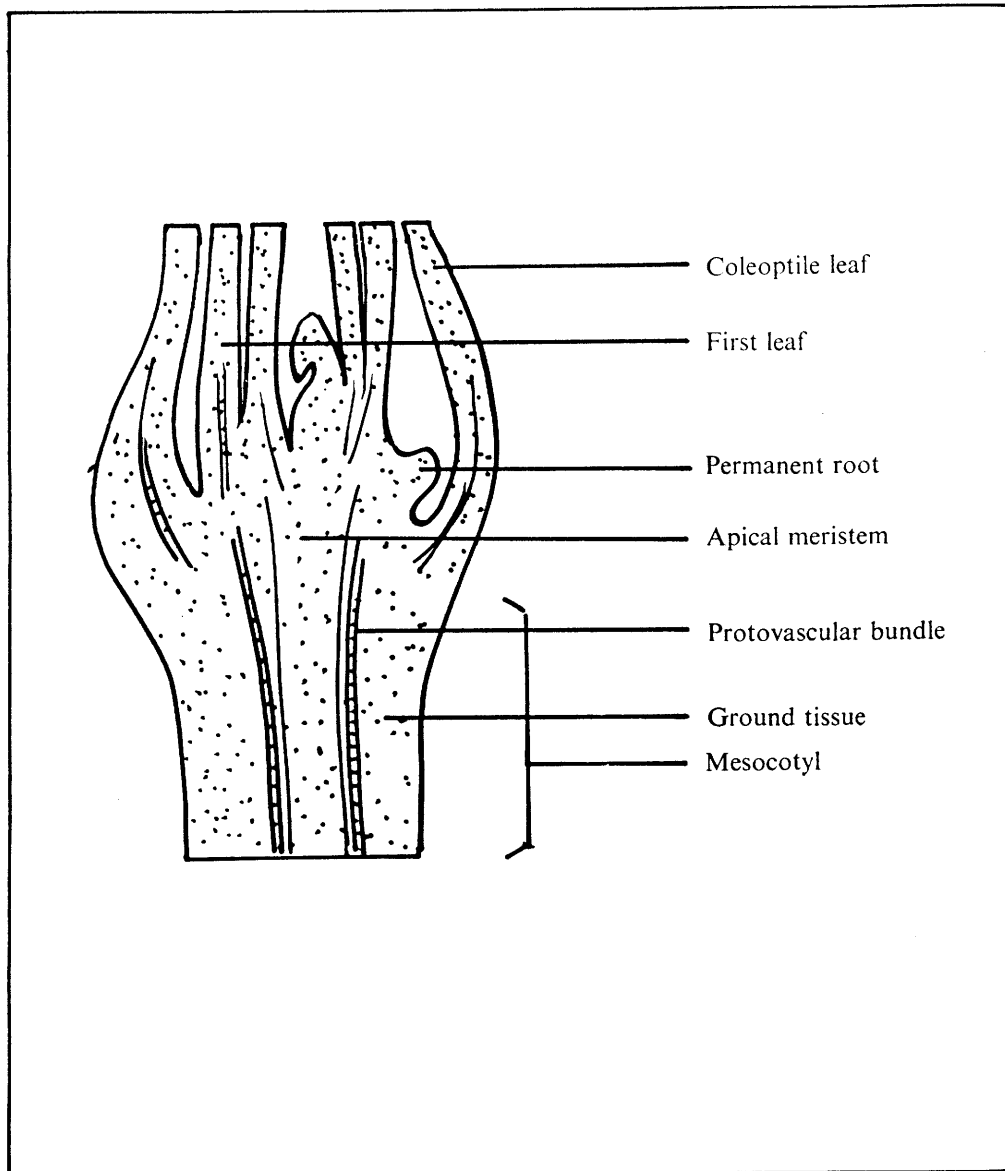


Fig. 20. Longitudinal section of the shoot apex of a 6 day-old seedling.

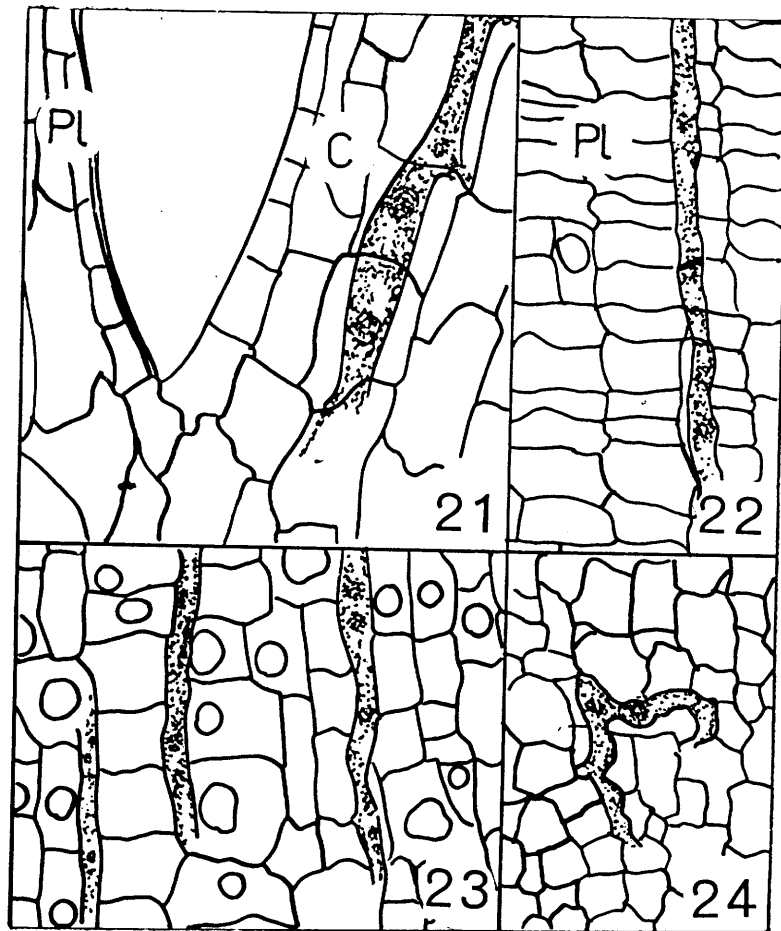


Fig. 21-24. Invasion of *S. sorghi* in tissue of shoot of 6 day-old seedling arising from downy mildew infected seed. 21) Mycelium in coleoptile of seedling (100X) camera lucida drawing), 22), 23 Coenocytic hyphae in plumular leaf sheath (100X), 24) *S. sorghi* mycelia in the apical meristem (100X camera lucida drawing). c = coleoptile, pl = plumular leaf sheath

coleoptile (ภาพที่ 21) และจะมีเส้นใยมากตรงส่วนใบอ่อนใน growing point (ภาพที่ 22 และ 23) ซึ่งต่อมาในวันที่ 6-8 เชื้อ *S. sorghi* จะสามารถสร้าง conidia บนใบแรกได้

วิจารณ์

จากการศึกษาทาง histopathology ยืนยันได้ว่าเชื้อ *S. sorghi* เป็น seedborne fungi กับเมล็ดข้าวโพดได้จริง เพราะจากการตรวจและศึกษาแล้วพบว่าเส้นใยแบบ coenocytic ของ *S. sorghi* เป็นจำนวนมากในเนื้อเยื่อของ scutellum หรือใบเลี้ยงของ embryo ซึ่งจากรายงานของ Jones กับคณะในปี 1971 ไม่พบว่า *S. sorghi* เข้าไปใน embryo ได้ เนื่องจากถูกกีดกันด้วย aleurone layer (3) (ภาพที่ 12-14) นอกจากนี้การเจริญเติบโตของ *S. sorghi* แบบ intercellular ยังพบได้ในเนื้อเยื่อพืชส่วนต่างๆ คือช่ข้าวโพด (ภาพที่ 3) ก้านฝัก (ภาพที่ 6) โห่ (ภาพที่ 7) และส่วนต่างๆ ของดอกตัวเมีย (ภาพที่ 5) ซึ่งเหมือนกับรายงานที่เกี่ยวกับเชื้อโรคราน้ำค้างชนิดอื่นๆ (2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13)

ส่วนการเจริญเติบโตของ *S. sorghi* ในลำต้นข้าวโพดพบว่าจะมีการเติบโตขึ้นสู่ด้านบนเท่านั้น โดยมีเส้นใยหนาแน่นที่ mesocotyl (ภาพที่ 18) และมักพบว่าเส้นใยของ *S. sorghi* อยู่ใน apical meristem ของต้นกล้า (ภาพที่ 20-24) อายุ 3-4 วัน และยังพบว่าเส้นใยใน coleoptile กับใบอ่อนด้วย (ภาพที่ 21-24) โดยเส้นใยเจริญขนานไปกับการเรียงตัวของเซลล์ parenchyma และเชื้อ *S. sorghi* จะสามารถสร้าง conidia บนต้นอ่อนของข้าวโพดได้ภายในเวลา 7-8 วัน

การศึกษาครั้งนี้จึงกล่าวสาระสำคัญได้ว่า เนื้อเยื่อของข้าวโพดส่วนต่างๆ พบ มีเส้นใยของ *S. sorghi* ทำลายทุกส่วนโดยเฉพาะที่ใบเลี้ยง (scutellum) ของต้นอ่อน ในเมล็ดที่เก็บจากต้นเป็นโรค ซึ่งไม่พบว่ามีเส้นใยใน endosperm เลย ส่วนการเจริญเติบโตของ *S. sorghi* จากเมล็ดเป็นโรค จะแสดงอาการบนใบแรกของต้นอ่อนระหว่าง 6-8 วัน หลังจากงอก จากการ

ย้อมสีเนื้อเยื่อ พบว่ามีเส้นใยของเชื้อโรคหนาแน่นที่ mesocotyl และ apical meristem

เอกสารอ้างอิง

1. FREDERICKSEN, R.A. 1969. Problem and progress of sorghum downy mildew in the United States. Indian Phytopath. 23:321-338.
2. FREDERICKSEN, R.A. et. al. (Ed.) 1973. Sorghum downy mildew a diseases of maize and sorghum. Proc. of the workshop on the Downy Mildew of Sorghum and Corn. Corpus Christi, Texas. 69 p. (Mimeographed).
3. JONES, B.L. 1971. The mode of *Sclerospora sorghi* infection of Sorghum bicolor. Phytopathology. 61:406-408.
4. JONES, B.L. et. al. 1972. *Sclerospora sorghi* in corn, its location in capeltate flower and mature seed. Phytopathology. 62:817-819.
5. JOHANSEN D.A. 1940. Plant microtechniques. McGraw-Hill Book Co., Inc., N.Y. 523 p.
6. Nicholson, J.E. and J.B. Sinclair. 1973. Effect of planting dates, storage condition and seed borne fungi on soybean seed quality. Pl. Dis. Repr. 57:770-774.
7. PUPIPAT, U., B.L. RENFRO, V. KORPRADITS-KUL, K. CHOONHAVONGSE, B. WONGSIN-CHUAN, T. SOMMARTAYA, P. WATANAVANICH, T. VINITSANOND, N. SINGBURA UDOM, P. JUTAWANTANA, and B. PAIS-UWAN. 1973. Research in plant pathology. Ann Rept. Thailand National Corn and Sorghum Program. (In press)
8. PURAKUSUMAH, H. 1955. Seed borne primary infection in downy mildew (*Sclerospora maydis*). Nature 207:1312-1313.

9. RICHARD, O.W. 1971. Effective use and proper care of the microtome. American Optical Corp., Buffalo, N.Y. 44 p.
10. SHULTZ, O.E. 1972. Evaluation of Chloroneb for control of Philippine downy mildew of corn (*Sclerospora philippinensis*). Proc. Seventh IACP. Workshop, U.R. Los Banos, Philippines 274 p.
11. SHAW, C.G. 1969. Morphology and physiology of downy mildew significance in taxonomy and pathology. Indian Phytopath. 23:364-370.
12. SINGH, J.P. 1972. Pathological and histological studies of brown stripe downy mildew of maize. Indian J. Exp. Biol. 9:493-495.
13. ULLSTRUP, A.J. 1969. Crazytop of maize. Indian Phytopath. 23:250-261.