

ขบวนการเกิดโรคใบจุดเหลี่ยมของถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* L)

Mechanisms of Pathogenesis of Angular Leaf Spot of Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris* L)

ปรีฉัตร จันทรปลั่ง¹ ณรงค์ สิงห์บุระอุดม² และ ไพโรจน์ จ้วงพานิช²
Parichut Junplang, Narong Singburaudom, and Pairoj Jungbhanich

ABSTRACT

The penetration of the fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris was an indirect penetration. Within 48 hours after inoculation, the conidia on red kidney bean leaf surface germinated germ tube and formed appressorium at the tip and penetrated through stomata. Infected hypha grew in substomatal cavity and expanded to reach mesophyll, parenchyma, palisade and epidermis cells. It later ramified extensively in intercellular space. Disease symptom firstly appeared in the form of pale yellowish spot ten days after inoculation and subsequent growth of infected hypha was intracellular. Hypha was aggregated to form stroma in substomatal cavity. Conidiophore was produced and emerged from stomata to produce conidia. Sporulation was completed within 4 days after disease symptom appeared.

Key words: angular leaf spot, phaeoisariopsis leaf spot, red kidney bean, *Phaseolus vulgaris* L.

บทคัดย่อ

ขบวนการเข้าทำลายพืชของเชื้อรา *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris เป็นการเข้าทำลายโดยทางอ้อม พบว่าภายใน 48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อราลงบนใบถั่วแดงหลวง โคนิเดียมจะงอกเป็น germ tube

และสร้าง appressorium ที่ปลายของ germ tube เพื่อแทงทะลุผ่านเข้าไปทางปากใบ เส้นใยของเชื้อราจะเข้าไปเจริญอยู่ในช่องว่างของปากใบ และเจริญแผ่เข้าไปยังเซลล์ชั้น mesophyll, parenchyma, palisade และ epidermis โดยเจริญอยู่ในช่องว่าง ระหว่างเซลล์ ใบพืชจะแสดงอาการเริ่มแรกหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ubolrachthanee University, Ubolrachthanee 34000, Thailand.

² ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

10 วัน โดยปรากฏเป็นจุดสี เหลืองซีด หลังจากนั้น การเจริญของเส้นใยภายในเนื้อเยื่อพืชจะเป็นแบบ ภายในเซลล์ เส้นใยที่เจริญอยู่ใน เนื้อเยื่อพืชบริเวณ ช่องว่างของปากใบจะรวมตัวกันเพื่อสร้างเป็น stroma ซึ่งจะสร้างก้านชูโคนินเดี่ยวโผล่ออกมาทางปากใบและ สร้างโคนินเดี่ยวต่อไป การสร้างสปอร์จะเสร็จสมบูรณ์ ภายในระยะเวลา 4 วัน หลังจากปรากฏอาการของโรค

คำนำ

โรคใบจุดเหลี่ยมของถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* L.) เกิดจากเชื้อรา *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris เริ่มมีการระบาดในประเทศไทยเมื่อปี 2523 และระบาดรุนแรงมากในปีต่อ ๆ มา (สมบัติ, 2525; ณรงค์, 2528) เชื้อราสาเหตุสามารถถ่ายทอด ไปกับเมล็ดได้โดยเชื้อราสามารถมีชีวิตอยู่ได้นานถึง 1 ปี ในสภาพเส้นใยที่พื้กตัว ทำให้เมล็ดที่มีเชื้อรา สาเหตุนี้ติดไปปลูกทำลายขณะเมล็ดงอกเป็นต้นกล้า และเป็นแหล่งเพิ่มปริมาณของเชื้อต่อไป นอกจากนี้ เชื้อราสาเหตุยังสามารถมีชีวิตอยู่ข้ามฤดูปลูกพืชได้ โดยอาศัยอยู่ในดินในรูปของ stroma ได้นานถึง 2 ปี และตามเศษซากพืชที่เป็นโรคที่ตกค้างอยู่ในแปลง เพาะปลูกในสภาพธรรมชาติได้นานถึง 8 เดือน (Sohi and Sharma, 1974, Sindhan and Bose, 1979; Correa and Saettler, 1987).

โรคใบจุดเหลี่ยมก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตถั่วแดงหลวง โดยไปมีผลต่อจำนวนฝักต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อฝัก และน้ำหนักของเมล็ดลดลง เนื่องจากใบที่เป็นโรคร่วงก่อนกำหนด (Santos et al, 1979) อาการของโรคพบได้ทุกส่วนของต้นถั่วแดงหลวง แต่อาการที่เป็นแบบเฉพาะของโรคนี้คืออาการที่ ใบ เป็นแผลรูปเหลี่ยมจำกัดขอบเขตอยู่ในระหว่างเส้นใบ แผลมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ที่บริเวณด้านใต้ใบ ที่อยู่ตรงข้ามแผลจะเห็นเป็นจุดดำเล็ก ๆ เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า coremia ซึ่งเป็นที่สร้างสปอร์ ของเชื้อ

รา (Miles, 1971; Cardona and Walker, 1956; Hagedorn and Wade, 1974) Elanos (1959) และ Santos et al. (1976) รายงานว่าเชื้อรา *P. griseola* สามารถสร้าง สปอร์ได้ดีเมื่อมีแสง 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด การสร้างสปอร์ของเชื้อราบนใบพืชต้องการ ความชื้นสัมพัทธ์ 90-100 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการสร้างสปอร์ 72 ชั่วโมงหลังจากบ่มเชื้อ Cardona and Walker (1956) ได้รายงานการสร้างสปอร์ของเชื้อราไว้ว่า ภายหลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เชื้อราจะเริ่มสร้าง coremium และโผล่ออกมาจากปากใบ ของพืชที่ 8 ชั่วโมงหลังบ่มเชื้อ การสร้าง coremium จะเสร็จสมบูรณ์ที่ 24 ชั่วโมง เกิดผนังกันของ ก้านชูโคนินเดี่ยวที่ 48 ชั่วโมง เกิดการบวมที่ปลายของเส้นใยและสร้าง สปอร์เสร็จสมบูรณ์ที่ 72-96 ชั่วโมง Miles (1917) รายงานว่าสปอร์ของเชื้อ *P. griseola* สามารถงอกได้ดี ในสภาพที่มีแสง โดยที่สปอร์จะงอกออกมาจาก เฉพาะเซลล์หัวและเซลล์ท้ายเท่านั้น ซึ่งถือว่าเป็น ลักษณะที่สำคัญของเชื้อราชนิดนี้ และสปอร์งอกได้ดี ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตาม Elanos (1959) ได้รายงานไว้ว่า แสงไม่มีอิทธิพลต่อการงอก ของสปอร์ และพบว่าโคนินเดี่ยวของเชื้อรามีความคงทน และมีความสามารถในการ งอกสูงกว่า เมื่ออยู่ด้านใต้ ใบของพืชอาศัย โคนินเดี่ยวสามารถคงทนอยู่บนผิวใบ และสามารถงอกได้ภายใน 12 ชั่วโมง เมื่อมีสภาพ แวดล้อมบนผิวใบเหมาะสม (Cardona and Walker, 1956)

Cardona and Walker (1956) ได้ศึกษาการ แทะผ่านเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา *P. griseola* พบว่าเชื้อราสร้าง germ tube แทะผ่านผิวใบเข้าไป หลังจากปลูกเชื้อลงบนใบพืช 24 ชั่วโมง โดยทะ แทะผ่านเข้าไปโดยทางอ้อมทางปากใบ และทะผ่าน เข้าไปโดยตรงทางผนังเซลล์ เส้นใยของเชื้อราเมื่อผ่าน เข้าไปในชั้นผิวของเนื้อเยื่อพืชแล้วจะเจริญและเพิ่ม ปริมาณอยู่ในบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ การแผ่ขยาย

ของเชื้อราจะเริ่มลุกลามเซลล์บริเวณช่องว่างของปากใบไปยัง guard cell, mesophyll cell, spongy parenchyma, palisade cell และไปถึงชั้นของ upper epidermis ตามลำดับ หลังจากนั้นการเจริญของเส้นใยในเนื้อเยื่อพืชจะเป็นแบบเจริญอยู่ภายในเซลล์ อาการของโรคจะเริ่มปรากฏในวันที่ 9 หลังจากเชื้อที่แทงผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช และหลังจากนั้นเชื้อ จะเริ่มสร้างโครงสร้างสำหรับสร้างสปอร์ต่อไป Correa and Saettler (1986) ได้ให้ข้อสังเกตเกี่ยวกับการพัฒนาการของโรคใบจุดเหลี่ยมไว้ว่า บนพันธุ์ที่ต้านทานเชื้อราจะใช้เวลาในการพัฒนาการเกิดโรคนานกว่าบนพันธุ์ที่อ่อนแอ จำนวนและขนาดของแผลโรคบนใบของพันธุ์ที่ต้านทานจะมีน้อยกว่าและมีขนาดเล็กกว่าบนพันธุ์ที่อ่อนแออย่างเห็นได้ชัด Correa and Saettler (1987) ได้ศึกษาการเข้าทำลายพันธุ์ถั่ว *Phaseolus vulgaris* จำนวน 24 พันธุ์ จาก 5 กลุ่ม ได้แก่ navy, tropical black, kidney, pinto และ cranberry โดยใช้เชื้อราจำนวน 3 isolates พบว่าพันธุ์ถั่วใน กลุ่มของ navy, tropical black และ pinto ก่อนข้างมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา ในขณะที่พันธุ์ถั่วในกลุ่ม red kidney และ cranberry จะอ่อนแอต่อเชื้อรา

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรคในขั้นตอนของการติดเชื้อ และขบวนการพัฒนาการของเชื้อในเนื้อเยื่อพืช เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษากลไกของความต้านทานโรคของพืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมพืชทดสอบ: ในการศึกษาใช้ถั่วแดงหลวงพันธุ์คอกคำเป็นพืชทดลองโดยใช้ต้นกล้าที่มีอายุ 7-10 วันหลังออก นำต้นกล้าถั่วแดงหลวงไปใส่ไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C ปรับความชื้นสัมพัทธ์ภายในตู้ให้อยู่ในช่วง 90-100 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงก่อนทำการปลูกเชื้อราลงบนใบพืช

การปลูกเชื้อ: ทำการเก็บตัวอย่างใบถั่วแดงหลวงที่แสดงอาการของแผลโรคใบจุดเหลี่ยมที่ปลูกในสภาพไร่นามาเชื้อสปอร์ของเชื้อราลงในน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อและปรับให้มีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 1×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ haemocytometer ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ นำเชื้อราที่เตรียมได้บรรจุลงในกระบอกฉีดยาแล้วนำไปฉีดพ่นลงบนใบพืชโดยฉีดเข้าทางด้านใต้ใบให้ทั่วใบพืช กลุ่มต้นพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยถุง polyethylene ชนิดใสเพื่อรักษาความชื้นสัมพัทธ์ให้อยู่ในระดับ 95-100 เปอร์เซ็นต์ ทำการบ่มต้นพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ในสภาพที่มีแสง 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด เพื่อให้เชื้อมีการพัฒนาการในการเข้าทำลายและก่อให้เกิดโรคกับต้นพืช

1. การศึกษาขบวนการเข้าทำลายพืชของเชื้อรา: ภายหลังจากฉีดเชื้อราลงบนใบพืชแล้ว ทำการบ่มต้นพืชไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ในสภาพที่มีแสง 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด เป็นเวลา 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อครบกำหนดแล้วนำไปพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อมาผ่านขั้นตอน การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจดูการพัฒนาการของเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังนี้

1.1 นำชิ้นส่วนตัวอย่างพืชที่ต้องการศึกษา แช่วในสารละลาย glutaraldehyde 2.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมโดยละลายใน 0.1 M phosphate buffer แล้วนำไปเข้าเครื่อง vacuum เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้ชิ้นส่วนตัวอย่างพืชจมลงในสารละลายได้ดีขึ้น หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนตัวอย่าง ที่แช่วในสารละลาย glutaraldehyde 2.5 เปอร์เซ็นต์ ไปใส่ไว้ใน incubator เป็นเวลานาน ประมาณ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิประมาณ 20°C เพื่อให้สารละลาย glutaraldehyde ทำปฏิกิริยากับเชื้อสาเหตุโรค และเนื้อเยื่อของชิ้นส่วนตัวอย่างพืชได้ดียิ่งขึ้น

1.2 ล้างตัวอย่างพืชด้วยสารละลาย 0.1 M phosphate buffer ที่ระดับ pH โดยล้าง 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที

1.3 นำตัวอย่างพืชที่ผ่านการล้างด้วย phosphate buffer มาแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ โดยใช้ความเข้มข้น 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แช่ตัวอย่าง 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 10-15 นาทีในแต่ละความเข้มข้น ยกเว้นในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์จะแช่ 2 ครั้ง

1.4 นำตัวอย่างพืชมาแทนที่แอลกอฮอล์ด้วย amyl acetate ใช้เวลานาน 7-10 นาที

1.5 ทำตัวอย่างพืชให้แห้งโดยใช้เครื่อง critical point dryer-HCP-2

1.6 ติดตัวอย่างพืชที่ทำให้แห้งแล้วบน stud ด้วยยาทาเล็บหรือเทป 2 หน้า

1.7 นำไป coat ด้วยอนุภาคทองในเครื่อง ion-coater-18-2 2 ครั้ง ๆ ละ 6-8 นาที โดยสลับด้านของตัวอย่างพืชในระหว่างครั้งแรกและครั้งที่สอง เพื่อให้ได้รับการ coat ด้วย อนุภาคทองอย่างสม่ำเสมอทั้ง 2 ด้าน

1.8 นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด Hitachi Alpha-9 เพื่อที่จะตรวจดูการงอกของสปอร์ของเชื้อ ลักษณะของผิวใบปากใบ และโครงสร้างผิวด้านนอกของใบ ถั่วแดงหลวง และโครงสร้างที่เชื้อสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการแทงผ่านเข้าไปในพืช

2. การศึกษาการเจริญของเชื้อราในเนื้อเยื่อพืช: ทำการปลูกเชื้อราลงบนใบถั่วแดงหลวง ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น นำต้นพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อแล้วไปบ่มไว้เป็นเวลา 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 วันตามลำดับ เมื่อครบกำหนดแล้วนำตัวอย่างใบพืชมาผ่านขั้นตอนการ เตรียมตัวอย่าง จากขั้นที่ 1.1 ถึง 1.3 คือการแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 1 หลังจากแทนที่น้ำด้วยแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 1 แล้วนำตัวอย่างพืช (specimen) ดังกล่าว มาหั่นในไนโตรเจนเหลวที่บรรจุใน foam ตามวิธีการที่เรียกว่า Freeze structure วิธีการหั่นตัวอย่างพืชทำโดยการใช้มีดผ่าตัดกดลงบนตัวอย่างที่

ผ่านการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว แล้วเคาะมีดผ่าตัดด้วย tweezer เบา ๆ จนตัวอย่างหักออกจากกัน จากนั้นนำตัวอย่างมาผ่านแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ครั้งที่ 2 แล้วจึงนำมาแทนที่แอลกอฮอล์โดยผ่าน amylacetate เป็นเวลา 7-10 นาที ตามขั้นตอนที่ 1.4 ทำให้แห้งด้วยเครื่อง critical point dryer ตามขั้นตอนที่ 1.5 แล้วนำตัวอย่างไป ติดบน stud เพื่อทำการ coat ด้วยอนุภาคทองก่อนนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราดเพื่อตรวจดูลักษณะการเจริญของเส้นใยของเชื้อราในเนื้อเยื่อพืชและโครงสร้างต่าง ๆ ภายในใบถั่วแดงหลวง

3. การศึกษาการสร้างสปอร์ของเชื้อราบนใบพืช: หลังจากปลูกเชื้อราลงบนใบพืชแล้ว ทำการบ่มต้นพืชไว้เป็นเวลา 15 วัน เพื่อให้อาการของแผลโรคแสดงออกมาให้เห็นชัดเจน หลังจากนั้นนำตัวอย่างแผลโรคไปผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างตามข้อ 1.1-1.8 เพื่อนำไปตรวจดูขบวนการสร้างสปอร์ของเชื้อราบนแผลโรค โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ผล

ในการศึกษาพัฒนาการของโรคใบจุดเหลี่ยมของถั่วแดงหลวง โดยการปลูกเชื้อราลงบนใบถั่วแดงหลวงพันธุ์ดอยคำ แล้วตรวจดูการเข้าทำลายพืชของเชื้อราโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ระยะของการพัฒนาการของเชื้อโรคนบนใบพืช คือ การงอกของสปอร์ (germination) การแทงผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช (penetration) การเจริญของ เชื้อราภายในเนื้อเยื่อพืช (colonization) และการสร้างสปอร์ของเชื้อราบนแผลโรค (sporulation) ซึ่งผลการศึกษามีดังต่อไปนี้

การงอกของสปอร์: พบว่าโคนเดียวของเชื้อราจะงอก germ tube 2 อัน ออกมาจากเซลล์ หัวท้ายของโคนเดียว หลังจากปลูก เชื้อราลงไปในใบพืชเป็นเวลา 12

ชั่วโมง และจะเจริญยาวออกไปเรื่อย ๆ จนถึง 36 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ โดยที่เส้นใยที่เจริญต่อออกไปจาก germ tube นั้นสามารถที่จะแตกแขนงออกไปได้ (Figure 1A and 1B)

การแทงผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช: จากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด พบว่าเชื้อราจะแทงผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชทางอ้อม โดยเข้าทางปากใบ โดยเชื้อราจะเริ่มแทงผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชเมื่อเวลา 24 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อ (Figure 1B) โดยที่ germ tube ที่งอกออกมาจากโคนิเดียสามารถแทงทะลุเข้าไปทางปากใบพืชได้โดยตรง (Figure 1C) หรือ germ tube จะเจริญยาวออกไปแล้วแตกแขนงเพื่อหาทางเข้าทำลายพืชโดยการสร้าง appressorium (Figure 1D) เพื่อใช้ในการแทงผ่านไปทางปากใบ จากผลการศึกษาการแทงผ่านเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชของเชื้อรา ไม่พบว่าเชื้อรามีการเข้าทำลายพืชโดยตรง (direct penetration)

การเจริญของเชื้อราในเนื้อเยื่อพืช: เมื่อโคนิเดียของเชื้อรางอกและแทงผ่านปากใบเข้าไปในผิวใบของพืชแล้ว เส้นใยของเชื้อราจะเข้าไปเจริญอยู่ในบริเวณช่องว่างของปากใบ จากการศึกษาการ เจริญของเส้นใยของเชื้อราในเนื้อเยื่อพืชพบว่าเมื่อ 48 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อเส้นใยของเชื้อราจะเริ่ม เจริญและแผ่ขยายไปตามชั้นต่าง ๆ ของเซลล์ผิวใบพืช โดยเริ่มต้นจากเซลล์ที่อยู่ติดกับ guard cell ใน ชั้นของ mesophyll แล้วเจริญลุกลามต่อไปยังชั้นของ spongy parenchyma, palisade cell และในที่สุดก็จะเจริญไปยังชั้นของ epidermis cell พบว่า ในระยะก่อนที่พืชจะแสดงอาการของแผล โรค เส้นใยของเชื้อราจะมีการเจริญในช่องว่างระหว่างเซลล์พืช (Figure 2A, 2B)

การสร้างสปอร์ของเชื้อราบนใบพืช: หลังจากปลูกเชื้อราลงบนใบพืชเป็นเวลา 9-10 วัน ใบถั่วแดงหลวงจะเริ่มแสดงอาการเป็นจุดเล็ก ๆ สีเหลืองซีด มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-4 มิลลิเมตร โดยจุดแผลจะจำกัดขอบเขตอยู่ในระหว่างเส้นใบ และพบ

ว่าเส้นใยที่เจริญอยู่ในเซลล์ (Figure 2C) จะเริ่มสร้าง stroma อยู่ในบริเวณส่วนของ substomatal cavity (Figure 2D) เมื่อ 11 วันหลังการปลูกเชื้อลงบนใบพืช พบว่าเชื้อราจะเริ่มสร้างก้านชูโคนิเดียงอกโผล่ออกมาทางปากใบ (Figure 3A, 3B) และจะเริ่มสร้าง coremia เมื่อ 12 วันหลังปลูกเชื้อ (Figure 3C) ซึ่งจะเจริญพัฒนาเป็นโครงสร้างโดยสมบูรณ์ พร้อมทั้งจะสร้างโคนิเดียต่อไป ในวันที่ 13 หลังปลูกเชื้อจะพบว่า เชื้อราสร้างโคนิเดียที่ปลายก้านชูโคนิเดีย โดยการเกิดรอยคอดที่ปลายของก้านชู (Figure 3D) แยกเอาส่วนปลายของก้านชูออกจากกัน ซึ่งจะพัฒนาเป็นโคนิเดีย และ coremia ก็จะพัฒนาเป็นโครงสร้างของเชื้อโดยสมบูรณ์เจริญปกคลุมอยู่บนแผลโรค (Figure 4)

วิจารณ์

จากผลการศึกษาขบวนการพัฒนาการของเชื้อรา *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris บนใบถั่วแดงหลวง ซึ่งประกอบด้วย การงอกของสปอร์บนใบพืช การแทงทะลุผ่านเข้าไปในผิวใบพืช การเจริญเติบโตภายในเนื้อเยื่อพืชและการสร้างสปอร์บนใบพืชโดยใช้เทคนิคการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า โคนิเดียของเชื้อรางอกเป็น germ tube 2 อันออกมาจากเซลล์หัวและเซลล์ท้ายของโคนิเดีย ซึ่งสอดคล้องกับการงอกของโคนิเดียบนอาหารที่ได้มีการรายงานไว้ว่า โคนิเดียของเชื้อรานี้นี้จะงอก germ tube ออกมาจากเฉพาะเซลล์หัวท้ายเท่านั้น และเส้นใยที่เจริญต่อออกมาสามารถแตกออกเป็นกิ่งก้านได้ (Miles, 1917) Cardona and Walker 1956) ได้รายงานเกี่ยวกับการงอกบนใบพืชและการเข้าทำลายพืชของเชื้อรา *P. griseola* ไว้ว่า โคนิเดียของเชื้อราสามารถงอกได้ดีเมื่ออยู่ด้านใต้ใบพืชอาศัย และสามารถงอกได้ภายใน 12 ชั่วโมง หลังจากตกลงบนใบพืชที่มีความชื้นสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าโคนิเดียของเชื้อราสามารถ งอกเป็น germ tube

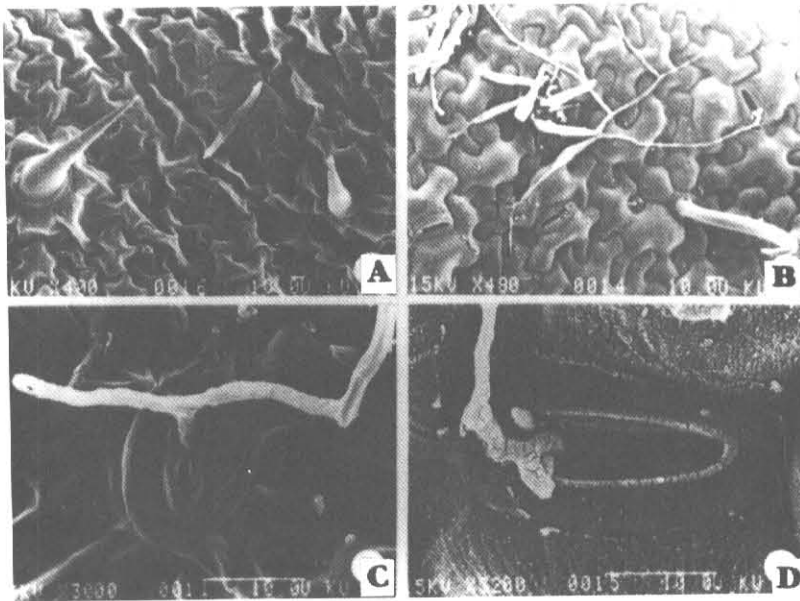


Figure 1 Germination and penetration of conidia of the fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris.

- A. Conidia on leaf surface B. Germ tube germinated from both tips of conidia
C. Stomata penetration D. Appressoria

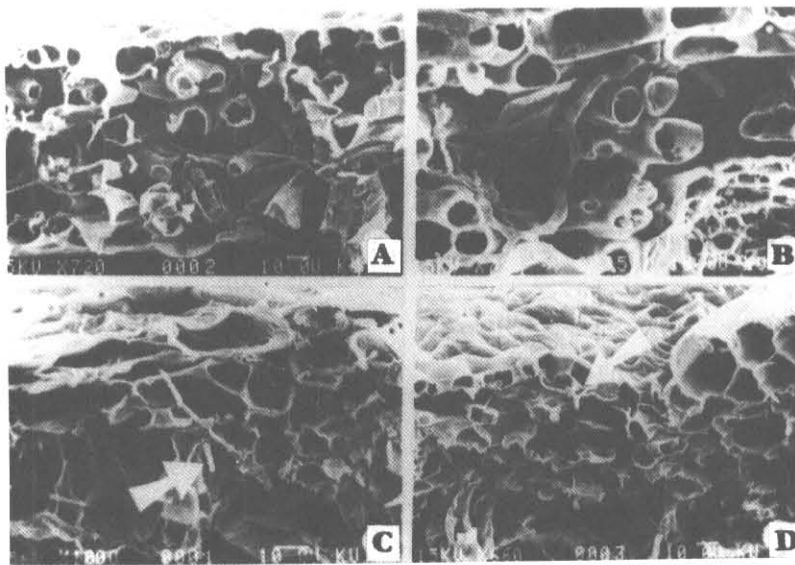


Figure 2 Growth of infection hypha of *Phaeoisariopsis griseola* in host tissue.

- A, B. Infection hypha in intercellular space, at early stage of penetration
C. Infection hypha in intracellular space at 10 days after inoculation
D. Aggregated of infection hypha to form stroma

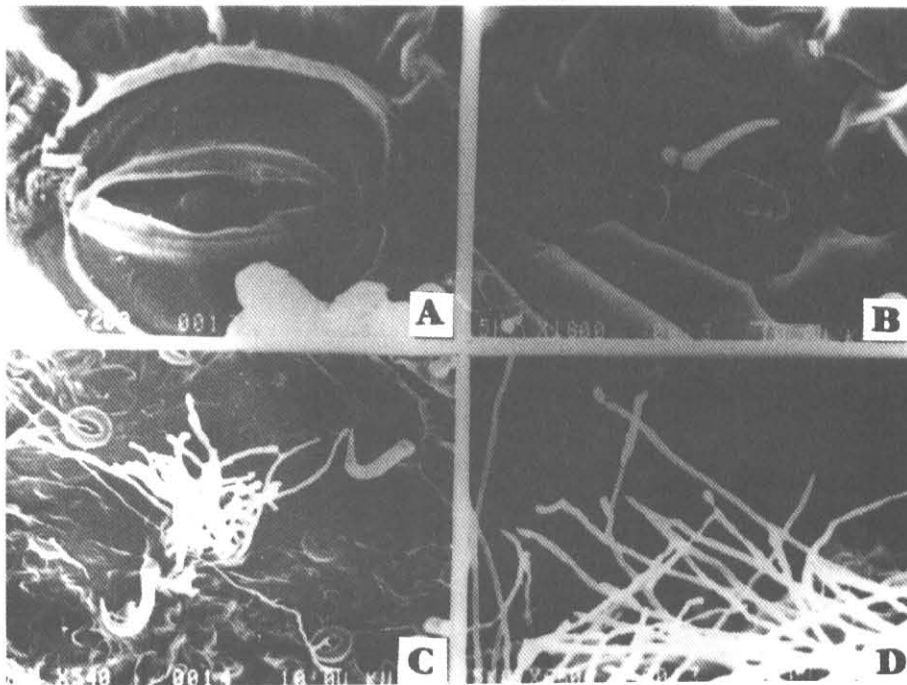


Figure 3 Sporulation of the fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris
 A. Initial emerged conidiophore from stomata (11 days after inoculation)
 B. Emerged conidiophore (11 days after inoculation)
 C. Profuse conidiophores to form coremium (12 days after inoculation)
 D. Constriction at the tip of conidiophore to form conidia (13-14 days after inoculation)

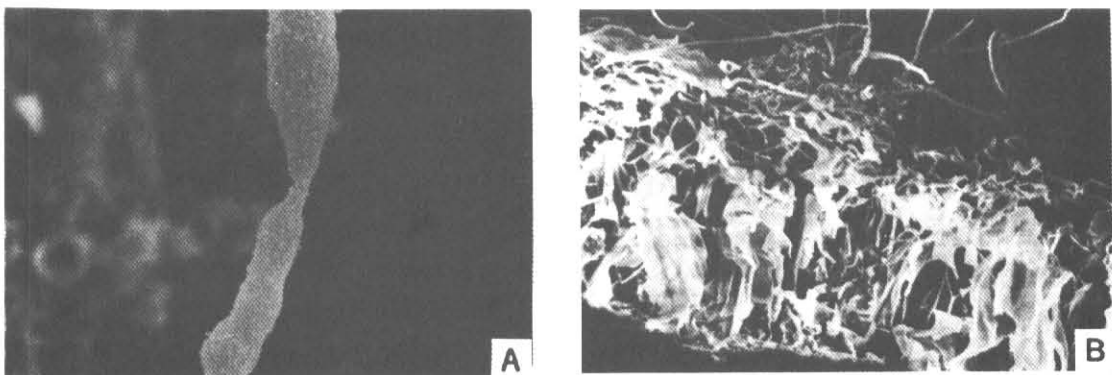


Figure 4 Morphology of the fungus *Phaeoisariopsis griseola* after successfully development on lesion.
 A. Conidia shows constriction at the tip of conidiophore.
 B. Profused colony growth of the fungus covered on infected tissue, included stroma, coremia, conidiophore and conidia.

ภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากปลูกเชื้อลงบนใบพืช และ germ tube ที่งอก สามารถเจริญเติบโตเป็นเส้นใยและแตกกิ่งก้านต่อไปอีกจนถึง 36 ชั่วโมงหลังจากปลูกเชื้อ เชื้อราจะ เข้าทำลายพืชเมื่อ 24 ชั่วโมงหลังจากปลูกเชื้อ การเข้าทำลายของเชื้อราเป็นการเข้าทำลายโดยทางอ้อม โดยเชื้อราจะสร้าง germ tube แทะผ่านเข้าไปทางปากใบ จากผลการทดลองนี้พบโครงสร้าง appressorium ที่เชื้อราสร้างขึ้นมาเพื่อใช้ในการเข้าทำลายพืช ซึ่งโครงสร้างนี้ยังไม่เคยมีรายงานว่าพบมาก่อนในการเข้าทำลายพืชของเชื้อราชนิดนี้

สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรารายในเนื้อเยื่อพืช เป็นทั้งแบบเจริญอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์และเจริญอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Cardona and Walker (1956) ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ในเนื้อเยื่อพืชมีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ เชื้อราส่วนมากจะทะลุผ่านเข้าไปทางปากใบ เข้าไปเจริญอยู่ในช่องว่างของปากใบ แล้วเจริญแผ่กระจายไปยังชั้นต่างๆ ของเนื้อเยื่อในพืช จากชั้นของ mesophyll ไปยังชั้นของ spongy parenchyma, palisade cell และชั้นของ epidermis โดยในระยะแรก ๆ ของการเข้าทำลายพืช เชื้อราจะเจริญเติบโตอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ แต่เมื่อถึงระยะท้าย ๆ ของการพัฒนาการของโรคแล้วเชื้อราจะเจริญเติบโตอยู่ภายในเซลล์พืช ภายในระยะเวลา 10-11 วันหลังปลูก อาการของแผลโรคจะเริ่มปรากฏเป็นจุดสีเหลืองซีดก่อน ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม และเป็นแผลรูปเหลี่ยมจำกัดขอบเขตอยู่ในระหว่างเส้นใบ ขอบแผลเรียบ อาจมีบริเวณสีเหลืองล้อมรอบแผล หรือไม่มีก็ได้

จากการใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดตรวจดูขบวนการสร้างสปอร์ของเชื้อรา พบว่าการสร้างสปอร์จะเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ภายใน 13 วัน หลังจากปลูกเชื้อราลงบนใบถั่วแดงหลวง และเมื่อพิจารณาระยะเวลาที่เริ่มสร้างสปอร์ จนสร้างเสร็จโดยสมบูรณ์ จะเห็นว่าในวันที่ 10 เชื้อราจะเริ่มสร้าง stroma

ในวันที่ 11 เชื้อราเริ่มสร้างก้านชูโคนิเดียไหลออกมาจากปากใบ ในวันที่ 12 เชื้อราเริ่มสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า coremia และในวันที่ 13 เชื้อราจะสร้างโคนิเดียเสร็จโดยสมบูรณ์ รวมเป็นระยะเวลาที่ใช้ในขบวนการสร้างสปอร์ 4 วัน หลังจากเกิดแผลโรคแล้ว เมื่อเปรียบเทียบกับ การศึกษาของ Cardona and Walker (1956) ซึ่งรายงานไว้ว่า เชื้อราจะสร้างสปอร์เสร็จโดยสมบูรณ์ใช้เวลา 72-96 ชั่วโมงหรือ 3-4 วัน หลังจากนำใบพืชที่ปรากฏแผลโรคไปบ่มเชื้อไว้ ซึ่งจะเห็นว่าขบวนการการสร้างสปอร์ของเชื้อราชนิดนี้ใกล้เคียงกัน

สรุป

ผลการศึกษาขบวนการเกิดโรคใบจุดเหลี่ยมของถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* L.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc) Ferraris ในขั้นตอนของขบวนการติดเชื้อ ซึ่งประกอบด้วยการงอกของสปอร์เมื่อตกลงมาสัมผัสกับผิวพืช การแทงทะลุผ่านเข้าไปในผิวพืช และขั้นตอนของขบวนการพัฒนาการของเชื้อราในเนื้อเยื่อพืช ได้แก่การเจริญของเชื้อราในเนื้อเยื่อพืช และการสร้างสปอร์ของเชื้อราบนแผลโรค ผลการศึกษารูปได้ดังต่อไปนี้ เมื่อสปอร์ของเชื้อราตกลงมาสัมผัสผิวใบถั่วแดงหลวง จะงอกเป็น germ tube 2 อันออกมาจากปลายทั้ง 2 ข้างของสปอร์ แล้วเจริญเติบโต สร้างโครงสร้างพิเศษ (appressorium) สำหรับใช้แทงทะลุผ่านผิวพืชเข้าไปโดยตรง หรือแทงผ่านเข้าไปทางปากใบพืช เส้นใยของเชื้อราเมื่อผ่านเข้าไปในใบพืชแล้วจะเจริญเติบโตอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ และเจริญอยู่ภายในเซลล์พืช แล้วเจริญลุกลามไปยังเนื้อเยื่อชั้นต่าง ๆ ของใบพืช และก่อให้เกิดแผลมีลักษณะเป็นเหลี่ยมจำกัดขอบเขตอยู่ในระหว่างเส้นใบ หลังจากนั้นเชื้อราจะเริ่มสร้างโครงสร้างที่ใช้ในการสร้างส่วนขยายพันธุ์ได้แก่ stroma corremia ก้านชูสปอร์ และสปอร์ไหลออกมาทางปาก

ใบ รวมเวลาที่ใช้ในการพัฒนาการเกิดโรคโดยเริ่มตั้งแต่สปอร์มาสัมผัสผิวใบพืชจนปรากฏอาการและสร้างสปอร์ทั้งสิ้น 13 วัน

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ สิงห์ระอุดม. 2528. โรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตถั่วแขกฝักสดเพื่ออุตสาหกรรม แช่แข็ง. วารสารโรคพืช 5 : 150-159.
- สมบัติ ศรีช่วงศ์. 2525. โรคของถั่วแดงหลวง, น. 94-96. ใน รายงานเสนอในการประชุมสัมมนา ทางวิชาการ สาขาพืช. วันที่ 1-5 กุมภาพันธ์ 2525. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Cardona-Alvarez, C. and J.C. Walker. 1956. Angular leaf spot of bean. *Phytopathology* 46:610-615.
- Chupp, C. 1953. A Monograph of the Fungus Genus *Cercospora*. The Ronald Press Company, New York. 667 p.
- Correa, F.L. and A.W. Saettler. 1986. Pathogenic variation in *Isariopsis griseola* cause of angular leaf spot of bean. *Phytopathology* 76: 679. (Abstr.).
- Coorea, F.L. and A.W. Saettler. 1987. Angular leaf spot of red kidney beans in Michigan. *Plant Dis.* 71: 915-918.
- Ellis, M.B. 1971. Demataceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycol. Inst. Survey, English. 603 p.
- Ferraris, A.G. 1909. *Phaeoisariopsis griseola*. *Annales Mycologici* 7: 280.
- Hagedorn, D.J. and E.K. Wade. 1974. Bean rust and angular leaf spot in Wisconsin. *Plant Dis. Rept.* 58: 330-332.
- Elanos, M. 1959. Pathogenecity of *Isariopsis griseola* Sacc. for beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Rev. Appl. Mycol.* 39: 691-692.
- Miles, L.E. 1917. Some diseases of economic plants in Porto Rico. *Phytopathology* 7: 345-351.
- Saccardo, P.A. 1877. *Isariopsis griseola* (Sacc.). *Sylloge Fungorum* 4:630.
- Santos Filho, H.P., S. Ferrasz, and C.S. Sediama. 1976. Isolation and sporulation in vitro of *Isariopsis griseola* Sacc. *Rev. Plant Pathol.* 58 : 473-474.
- Sindhan, G.S. and S.K. Bose. 1979. Perpetuation of *Phaeoisariopsis griseola* causing angular leaf spot of french beans. *Indian Phytopathology.* 32:252-254.
- Sohi, H.S. and R.D. Sharma. 1974. Mode of survival of *Isariopsis griseola* Sacc. the causal agent of angular leaf spot of beans. *Indian J. Hort.* 31: 110-113.