

บทที่ 1

บทนำ

จากการที่มีเชื้อราสาเหตุโรคหลายชนิดสามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับทุเรียนทั้งในสภาพแปลงปลูก และหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งเชื้อราบางชนิดเมื่อก่อให้เกิดโรคในสภาพไร่แล้ว มักทำให้ผลผลิตเกิดการเน่าเสียตามมา ภายหลัง จากรายงานของ Lim and Sangchote (2003) ที่ได้รวบรวมโรคของทุเรียนและพบว่าในสภาพแปลง ปลูกมีโรคที่เกิดขึ้นทางใบมากมาย ได้แก่ โรคใบจุดสาหร่าย (algal leaf spot : *Cephaleuros virescens*) โรค เน่าสีชมพู (pink disease : *Erythriscium salmonicolor*) โรคใบไหม้ (*Rhizoctonia* leaf blight : *Rhizoctonia solani*) โรคคราดำ (sooty mold : *Meliola durionis*) โรคแอนแทรคโนส (anthracnose : *Colletotrichum gloeosporioides*) และโรคใบจุด (Phomopsis leaf spot : *Phomopsis durionis*) นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งเป็น soilborne fungi และเป็นสาเหตุโรครากและ โคนเน่าของทุเรียน ยังสามารถก่อให้เกิดโรคทางใบโดยทำให้เกิดอาการใบไหม้ (leaf blight) ได้เช่นเดียวกัน สำหรับชนิดของเชื้อราที่เมื่อเข้าทำลายและก่อให้เกิดโรคที่ใบแล้วสามารถทำให้เกิดโรคกับผลทุเรียนได้ เช่น *Colletotrichum gloeosporioides* *Meliola durionis* *Phytophthora palmivora* และ *Phomopsis durionis* (Lim and Sangchote, 2003) โดยเชื้อราบางชนิดทำให้ผลเน่าตั้งแต่ก่อนเก็บเกี่ยว และบางชนิดทำให้ ปรากฏอาการเน่าเมื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตแล้ว ถึงแม้ว่าที่ผ่านมา *Phomopsis* leaf spot จะเป็นโรคที่นักวิชาการ และเกษตรกรไม่ค่อยให้ความสนใจมากนัก แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าโรสดังกล่าวมีการแพร่กระจายเป็นบริเวณ กว้าง โดยเฉพาะในแหล่งปลูกทุเรียนแถบภาคตะวันออกของประเทศไทย เช่น จังหวัดจันทบุรีและตราด โดยเชื้อ ราสาเหตุโรคจะทำให้เกิดอาการเป็นจุดแผลขนาดเล็กจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไปบนใบที่มีอายุค่อนข้างแก่ ซึ่งอาการจุดแผลดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อพืชในลักษณะรบกวนกระบวนการสังเคราะห์แสง หรือกระบวนการเม ตาบอลิซึมอื่นๆ ของพืชได้ (Hwang *et al.*, 2006) อาการของโรคที่ปรากฏบนใบนับได้ว่าเป็นแหล่งของเชื้อ (source of inoculum) ที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคที่อยู่บริเวณใบดังกล่าวสามารถ แพร่กระจายไปสู่บริเวณอื่นๆ และส่วนของผล จึงทำให้เกิดอาการผลเน่าภายหลังได้ ดังเช่นที่พบในไม้ผล หลายๆ ชนิด ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ที่ถูกเชื้อรา *Phomopsis obscurans* เข้าทำลายที่ใบและทำให้เกิดอาการใบไหม้ ก็ส่งผลให้เกิดอาการผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวได้เช่นเดียวกัน (Ellis and Nita, 2008) หรือเชื้อรา *Phomopsis* sp. ที่เข้าทำลายต้นท้อและเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการกิ่งไหม้ ก็มักทำให้เกิดอาการผลเน่าทั้งก่อน และหลังการเก็บเกี่ยวตามมาภายหลัง (Fenn, 2011) อย่างไรก็ตาม การที่เชื้อราสาเหตุโรสดังกล่าวจะสามารถ เข้าทำลายพืชและทำให้พืชแสดงอาการของโรคได้นั้น จำเป็นจะต้องมีองค์ประกอบที่สมบูรณ์ทั้งในส่วนของเชื้อ สาเหตุโรคจะต้องมีความรุนแรง สภาพแวดล้อมจะต้องมีความเหมาะสมต่อการเจริญและการพัฒนาการของเชื้อ และ พืชอาศัยจะต้องมีความเข้ากันได้กับเชื้อสาเหตุ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการคัดเลือกไอโซเลทของเชื้อราที่ สามารถก่อโรคใบจุดบนต้นกล้าทุเรียนพันธุ์หมอนทอง และศึกษาการมีระยะเข้าทำลายแฝงของเชื้อราสาเหตุโรค รวมถึงศึกษาปัจจัยที่มีต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. เพื่อจะเป็นประโยชน์ต่อ การศึกษาหาพันธุ์ต้านทาน และหาแนวทางในการจัดการโรคอย่างมีประสิทธิภาพในลำดับต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อรา *Phomopsis* spp. สามารถเข้าทำลายทุเรียนและก่อให้เกิดโรคใบจุดตั้งแต่ระยะต้นกล้า โดยอาการแผลที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นจุดตายสีน้ำตาล (necrotic spots) รูปร่างกลม แผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มม. ขอบแผลมีสีเข้มและปรากฏวงสีเหลืองล้อมรอบ (halos) บริเวณกลางแผลมักพบเชื้อราสร้าง pycnidium ซึ่งเป็นอวัยวะห่อหุ้มสปอร์ และสามารถมองเห็นเป็นจุดสีดำเล็กๆ ขนาดเท่าปลายเข็ม เชื้อรา *Phomopsis* spp. สร้างสปอร์ได้ 2 ชนิด คือ สปอร์ชนิดแอลฟา (α -conidia) และชนิดเบต้า (β -conidia) โดยสปอร์ชนิดแรกมีรูปร่างรีถึงรูปไข่ ใสไม่มีสี ส่วนสปอร์ชนิดเบต้ามักมีลักษณะโค้งเรียวยาว ใสไม่มีสีถึงสีน้ำตาลอ่อน (Lim and Sangchote, 2003) สปอร์ทั้งสองชนิดถูกสร้างขึ้นและมีสารเมือกห่อหุ้มอยู่ภายใน pycnidium และพบว่าเฉพาะสปอร์ชนิดแอลฟาเท่านั้นที่รายงานว่าสามารถงอกและก่อให้เกิดโรคกับพืชได้ (Sergeeva *et al.*, 2003) นอกจากทุเรียนแล้ว เชื้อรา *Phomopsis* ยังสามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดโรคกับพืชชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ เป็นสาเหตุโรคแคงเกอร์ของทานตะวัน (*Diaporthe helianthi* teleomorph) โรค black line ของต้นเอลม์ (*Phomopsis oblonga* anamorph; *Diaporthe eres* teleomorph) โรคลำต้นไหม้ฝักเน่า และเมล็ดเน่าของถั่วเหลือง (members of the *Diaporthe-Phomopsis* complex) โรคไหม้ของพืชตระกูลสน (*Phomopsis juniperovora*) โรคผลเน่าของมะละกอ (*Phomopsis* sp.) และโรคใบจุดและเครือไหม้ขององุ่น (*Phomopsis viticola*) (Brayford, 1990b; Nishijima, 1993; Alabama Cooperative Extension System, 2004; Nita *et al.*, 2007; Debaeke and Estragnat, 2009; Soto-Arias Munkvold, 2011) ซึ่งเชื้อรา *Phomopsis* บางชนิดเมื่อเข้าทำลายพืชจะมีการสร้างสารพิษร่วมด้วย ดังเช่นที่พบในเชื้อรา *P. helianthi* ที่เข้าทำลายต้นทานตะวัน พบว่ามีการผลิตสารพิษ 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 บนใบพืชใน genus *Amaranthus* ทั้ง 7 species ได้แตกต่างกันทั้งที่บ่มใน 2 ระดับอุณหภูมิคือ 21 และ 28°C ซึ่งส่งผลให้มีความสามารถในการก่อโรคแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อรา *P. amaranthicola* ดังกล่าวยังต้องการระยะเวลาในการงอกและทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการติดเชื้อในบาง species ของวัชพืช *Amaranthus* ยาวนานถึง 15-24 ชั่วโมง (Wyss and Charudattan, 2000) แต่ในกรณีของเชื้อรา *P. convolvulus* Ormeno ต้องการระยะเวลาเพียง 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20-30°C จึงจะทำให้วัชพืช *Convolvulus arvensis* L. เกิดโรครุนแรงได้ (Ormeno-Nuez *et al.*, 1988)

โดยทั่วไปแล้ว เชื้อรา *Phomopsis* มีความแปรปรวนค่อนข้างสูงโดยเฉพาะทางด้านลักษณะสัณฐานวิทยา Brayford (1990a) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis* ที่แยกได้จากต้นเอลม์ในประเทศอังกฤษและอิตาลีถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกสร้าง pycnidium และสปอร์เป็นจำนวนมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนอีกกลุ่มไม่สร้างบนอาหารแต่สร้างบนกิ่งเอลม์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างทางด้านลักษณะการเจริญของเส้นใย และสีของโคโลนี รวมถึงลักษณะ mating type ในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ นอกจากนั้น มีรายงานว่าเชื้อรา

Phomopsis บาง species ที่มีคุณลักษณะเป็น endophytes ได้ถูกนำมาศึกษาหาสารออกฤทธิ์เพื่อต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคในพืชและในคน (Rukachaisirikul *et al.*, 2008; Adelin *et al.*, 2011)

บทที่ 3

วิธีวิจัย

1. เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราสาเหตุโรค

เก็บตัวอย่างใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่แสดงอาการโรคใบจุดซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. จากแหล่งปลูก 2 พื้นที่ ได้แก่ อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี และอำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด จากนั้นทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี tissue transplanting บนอาหารเลี้ยงเชื้อ half potato dextrose agar (half PDA ประกอบด้วย มันฝรั่ง 100 กรัม dextrose 10 กรัม วุ้น 15 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ไว้สำหรับศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดบนต้นกล้าทุเรียนพันธุ์หมอนทอง

2.1 ทดสอบการเกิดโรคโดยวิธี detached leaf

ตัดใบทุเรียนออกจากต้นกล้า เลือกใบที่มีอายุ 10 วันหลังใบคลี่ ปลูกเชื้อโดยหยดสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. จากแต่ละไอโซเลท ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อ มล. ลงบนใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มในกล่องพลาสติกขึ้นที่อุณหภูมิห้อง (28-32°C) เป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะแผลที่เกิดขึ้น

2.2 ทดสอบการเกิดโรคบนต้นกล้า

เลือกระยะใบที่มีอายุ 10 วันหลังใบคลี่ หยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราตามความเข้มข้นข้างต้นลงบนหลังใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มใบที่ถูกปลูกเชื้อด้วยถุงพลาสติกขึ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิในสภาพโรงเรือนแบบเปิด (30-40°C) โดยสภาพดังกล่าวทำการติดตั้งเครื่องมือ data logger เพื่อบันทึกอุณหภูมิอากาศและความชื้นสัมพัทธ์ สังเกตระยะเวลาที่เริ่มปรากฏอาการของโรค

3. ศึกษาการมีระยะเข้าทำลายแฝง (latent infection) ของเชื้อรา *Phomopsis* spp.

เชื้อราที่มีระยะเข้าทำลายแฝง หมายถึง เชื้อราที่ทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการติดเชื้อแล้วมีการเจริญลุกลามภายในเนื้อเยื่อพืช แต่ยังไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น จนกระทั่งเนื้อเยื่อพืชเข้าสู่ระยะแก่ หรือค่อนข้างแก่ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่ตรวจพบในระยะแฝง จะมีความสัมพันธ์กับการปรากฏอาการของโรคในเวลาต่อมา (Lou and Michailides, 2003)

3.1 ศึกษาการเข้าทำลายแฝงของเชื้อราบนต้นกล้า

ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคบนต้นกล้าทุเรียนโดยพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนใบที่มีอายุ 10 วันหลังใบคลี่ บ่มใบในถุงพลาสติกขึ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting หลังจากปลูกเชื้อทุกๆ 1 สัปดาห์ โดยตัดเนื้อเยื่อใบเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 ตร. มม. ฆ่าเชื้อที่ผิวรอบนอกด้วย 10% Clorox ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชวางลงบนอาหาร half PDA จำนวน 10 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเชื้อราบนเนื้อเยื่อพืช

3.2 ศึกษาการเข้าทำลายแฝงของเชื้อราในสภาพพื้นที่จริง

ศึกษาแหล่งของเชื้อ (source of inoculum) ในส่วนต่างๆ ของต้นทุเรียน ได้แก่ ใบ ดอก และผลอ่อนที่ไม่ปรากฏอาการของโรคในแปลงปลูกทุเรียนพันธุ์หมอนทอง และพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ พวงมณี จากทั้ง 2 แหล่งปลูก โดยเก็บใบที่มีอายุต่างกัน 3 ระยะ ได้แก่ ใบอ่อน ใบเพสลาด และใบแก่ และดอกในระยะต่างๆ รวมถึงผลอ่อนมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเชื้อรา *Phomopsis* spp. วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมลสภาพภูมิอากาศจากสถานีตรวจวัดอากาศบริเวณใกล้เคียงแหล่งปลูก

3.3 ศึกษาปัจจัยภายในเนื้อเยื่อพืชที่มีผลต่อการเข้าทำลายแฝงของเชื้อ

จากทฤษฎีของ Prusky (1996) กล่าวว่าเชื้อราที่มีลักษณะการเข้าทำลายแฝง เนื่องจากเกี่ยวข้องกับทฤษฎี 4 ข้อดังนี้ 1) ขาดสารอาหารที่จำเป็นสำหรับเชื้อราที่ใช้ในการเจริญเติบโต 2) ขาดการชักนำให้เชื้อราสร้างปัจจัยในการก่อโรค 3) สารประกอบที่มีอยู่แล้วในพืชขัดขวางการเจริญของเชื้อรา และ 4) สารประกอบที่ถูกชักนำให้สร้างขึ้นใหม่ในพืชขัดขวางการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาทฤษฎีในข้อ 3) โดยเก็บตัวอย่างใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ปราศจากอาการของโรค มาสกัดด้วยตัวทำละลาย methanol และ dichloromethane กรองเอาเฉพาะสารละลาย และเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator (Buchi, Rotavapor R110) จะได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Chirawut (2005) จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทดสอบการมีคุณสมบัติยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. 2 วิธีการ ดังนี้

3.3.1 ทดสอบการยับยั้งการงอกบนแผ่น thin layer chromatography (TLC)

หยดสารสกัดหยาบบนแผ่น TLC นำไป develop ด้วย running solvent (dichloromethane : methanol 98 : 2 v/v) ประมาณ 1 ชั่วโมง ผึ่งแผ่น TLC ให้แห้ง จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ในอาหารเหลว half potato dextrose broth ฟันสารแขวนลอยสปอร์ดั่งกล่าวบนแผ่น TLC ด้วย airbrush (BADGER AIR-BRUSH™, U.S.A.) บ่มแผ่น TLC ไว้ในกล่องพลาสติกขึ้น เป็นเวลา 3 วันเพื่อให้เชื้อราเจริญเติบโต โดยทำการทดลองตามวิธีการของ Chirawut (2005) สังเกตการปรากฏของแถบยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (inhibition zone หรือ clear zone) และวัดค่า retention factor (Rf) ของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา นั้นเปรียบเทียบกับ Rf ของ inhibition zone ของเชื้อรา *Cladosporium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สร้างสปอร์สีเข้ม และจะทำให้ inhibition zone ที่ปรากฏบนแผ่น TLC เด่นชัดมากกว่าที่พ่นด้วยสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ซึ่งสปอร์สีไม่มีสี

3.3.2 ทดสอบการยับยั้งการงอกบนอาหาร water agar (WA)

หยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราลงบนจานอาหาร WA ที่เข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อ มล. ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหยดสารสกัดหยาบใบทุเรียน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรตามลงไป ใช้แท่งเกี่ยวสามเหลี่ยมเกลี่ยสปอร์ให้กระจายทั่วจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้เป็นเวลา 10 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง บันทึกเปอร์เซ็นต์การงอกและความยาว germ tube ของสปอร์

4. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phomopsis* spp.

เชื้อรา *Phomopsis* spp. เป็นเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตค่อนข้างเร็ว (ยกเว้นบางไอโซเลท) แต่ใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานในการสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (หนึ่งเดือนขึ้นไป) และปริมาณสปอร์ที่ได้ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ศึกษา จึงได้นำอาหารต่างชนิดกันมาเพื่อทดสอบการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราดังกล่าว

4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใย

เลี้ยงขยายปริมาณเชื้อราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ half PDA ตัดส่วนรอบนอกโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ย้ายเชื้อรามาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ half PDA carrot agar (CA) potato carrot agar (PCA) และ durian leaf extract agar (DLA) เปรียบเทียบการเจริญของเส้นใยของเชื้อราที่บ่มในสภาพแตกต่างกัน 2 สภาพ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (28-32°C) และตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C แสงสว่างสลบมืด 12/12 ชั่วโมง บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อรา เป็นเวลา 5 วัน

4.2 ศึกษาการสร้างสปอร์ของเชื้อรา

4.2.1 การสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

หลังจากวัดการเจริญของเส้นใยของเชื้อแล้ว บ่มเชื้อต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งเริ่มมีการสร้าง pycnidium บนผิวหน้าอาหาร บันทึกระยะเวลาที่เชื้อราเริ่มสร้าง และความหนาแน่นของการสร้าง

4.2.2 การสร้างสปอร์บนเนื้อเยื่อพืช

วางชิ้นส่วนของใบทุเรียนที่ถูกตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดพื้นที่ 1 ตร.ซม. ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปบนผิวหน้าอาหาร จำนวน 6 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ โดยแต่ละชิ้นมีระยะห่างเท่ากัน บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25°C แสงสว่างสลบมืด 12/12 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน บันทึกระยะเวลาที่เริ่มมีการสร้าง pycnidium เปรียบเทียบกับการสร้างบนอาหารสังเคราะห์โดยตรง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ

4.2.3 วัดขนาดสปอร์ของเชื้อรา

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อ มล. สุ่มวัดขนาดสปอร์จำนวน 400 สปอร์ เปรียบเทียบขนาดสปอร์เฉลี่ยในแต่ละไอโซเลท วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ

4.3 ศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* spp.

4.3.1 ศึกษาการงอกของสปอร์บนอาหาร water agar (WA)

ดูดสารแขวนลอยสปอร์ (ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อ มล.) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยสปอร์ให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกการงอกของสปอร์เป็นเวลา 6 8 10 และ 12 ชั่วโมง ตรวจจับปริมาณการงอกของสปอร์ในแต่ละไอโซเลท และวัดความยาวของ germ tube โดยสุ่มนับจาก 400 สปอร์

4.3.2 ศึกษาการงอกของสปอร์บนใบทุเรียน

ตัดใบทุเรียน (อายุ 10 วันหลังใบคลี่) พันธุ์หมอนทอง และพวงมณีมาวางลงในกล่องขึ้น ฟนสารแขวนลอยสปอร์ลงหลังใบให้ได้ความหนาแน่นของสปอร์ 10^5 สปอร์ต่อ ตร.มม. (เทียบค่าจากการพ่นสปอร์

ลงบน hemacytometer) บ่มใบทุเรียนเป็นเวลา 6 8 10 และ 12 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณการงอกของสปอร์ และวัดความยาวของ germ tube เปรียบเทียบกับการงอกบนอาหาร WA

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราสาเหตุโรค

จากการสังเกตลักษณะอาการเกิดโรคใบจุดที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. บนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองจากพื้นที่ปลูกทั้งสองแหล่ง คือ อำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด และอำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี เป็นเวลา 2 ปีที่ผ่านมา (ระหว่างปี 2554-2555) พบว่ามีข้อสังเกตที่น่าสนใจทั้งลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏ และลักษณะโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรค ดังต่อไปนี้

1.1 ลักษณะอาการใบจุดมีความหลากหลาย

จากการสำรวจลักษณะอาการของโรคใบจุดในสวนทุเรียนทั้งสองแหล่งปลูก พบลักษณะอาการจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลแดงถึงแดงเข้ม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มม. มีวงแหวน (halos) สีเหลืองล้อมรอบแผล กระจัดกระจายอยู่ทั่วไปบนใบแก่ (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lim and Sangchote (2003) ที่กล่าวว่า แผลที่ปรากฏบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองมีลักษณะเป็นจุดตายสีน้ำตาล (necrotic spot) รูปร่างกลมขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางแผลประมาณ 1 มม. ขอบแผลมีสีเข้มและปรากฏวงสีเหลืองล้อมรอบ (halos) และมักพบลักษณะอาการเหล่านี้บนใบแก่ แต่อย่างไรก็ตาม จากการสำรวจลักษณะอาการใบจุดในช่วงหลัง กลับพบอาการของโรคที่ปรากฏลักษณะแตกต่างกันออกไป กล่าวคือ อาการแผลจุดมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2-10 มม. รูปร่างค่อนข้างกลม กลางแผลมีสีเทา ขอบแผลหนา มีสีน้ำตาลแดงเข้ม และมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบแผล บางครั้งสามารถมองเห็น fruiting body (pycnidium) สีดำ ขนาดเท่าปลายเข็ม ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อพืชกระจัดกระจายอยู่บริเวณกลางแผล (ภาพที่ 2) ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวส่วนมากมักพบได้จากแหล่งปลูกที่จังหวัดจันทบุรี นอกจากนี้ ยังสังเกตเห็นอาการแผลจุดปรากฏอยู่ในระยะใบอ่อนและใบเพสลาด โดยแผลดังกล่าวมีสีน้ำตาลเข้ม และมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ โดยจำนวนแผลจุดบนใบอ่อนจะพบเพียง 1-3 จุดต่อใบเท่านั้น (ภาพที่ 3) ซึ่งอาการแผลจุดทั้งบนใบอ่อนและใบเพสลาดนั้นสามารถสังเกตเห็นได้ทั่วไปแต่ยังไม่มากนักจากทั้งสองแหล่งปลูก



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการแผลจุดที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. บนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง แผลมีขนาดเล็กสีน้ำตาลเข้ม มีวงแหวน (halos) สีเหลืองล้อมรอบ และเกิดกระจัดกระจายทั่วไปในระยะใบแก่



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการแผลจุดขนาดใหญ่บนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองในระยะใบแก่ที่เกิดตามธรรมชาติ (เส้นผ่าศูนย์กลางแผล 2-10 มม.) ขอบแผลหนาสีน้ำตาลแดงเข้ม กลางแผลมีสีเทา และมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ



ภาพที่ 3 (ซ้าย) ลักษณะอาการแผลจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลเข้ม มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบในระยะใบอ่อน (ขวา) ลักษณะอาการแผลจุดในระยะใบเปสลาดของทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่เกิดตามธรรมชาติ

นอกจากจะพบอาการใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. ในต้นทุเรียนที่โตเต็มที่แล้ว ยังสามารถพบอาการดังกล่าวบนต้นกล้าที่กำลังรอการจำหน่ายได้อีกด้วย โดยจะพบลักษณะอาการแผลจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลแดงเข้ม มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบแผล ซึ่งโดยทั่วไปมักมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลไม่เกิน 1 มม. (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 (ซ้าย) ต้นกล้าทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ได้จากการเสียบตายอดและตาข้างในระยะรอจำหน่าย
(ขวา) อาการใบจุดสาเหตุจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. ในระยะต้นกล้าทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่เกิดตามธรรมชาติ

1.2 ลักษณะสีโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคมีความหลากหลาย

จากการแยกเชื้อรา *Phomopsis* spp. โดยตัดเนื้อเยื่อใบทุเรียนจากอาการแผลจุดขนาดเล็ก ตามลักษณะอาการในภาพที่ 1 โดยวิธี tissue transplanting บนอาหาร half PDA บ่มเนื้อเยื่อพืชเป็นเวลา 5 วัน พบว่าจากทุกแผลมีการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ออกมาเสมอ แต่มีข้อที่น่าสังเกตคือ ในบางแผลถึงแม้จะเป็นแผลเดียวกันแต่จะมีการเจริญของเชื้อราซึ่งให้สีของโคโลนีที่มีความแตกต่างกันออกไป ดังเช่น พบทั้งโคโลนีสีเทาอ่อน โคโลนีสีเทาเข้ม หรือโคโลนีสีน้ำตาลอมเขียว เป็นต้น (ภาพที่ 5) นอกจากนั้น เมื่อทำการแยกเชื้อจากจุดแผลที่มีขนาดใหญ่ ตามลักษณะอาการในภาพที่ 2 ก็ยังคงได้เชื้อราที่มีสีโคโลนีแตกต่างกันในการแยกจากหนึ่งแผลเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 5) และเนื่องจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. มีความแปรปรวนทางด้านลักษณะสีของโคโลนีดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จึงได้แบ่งเชื้อราออกเป็นไอโซเลตต่างๆ ตามกลุ่มสีที่ปรากฏในครั้งแรกที่ทำการแยกเชื้อได้ ซึ่งพบว่าเชื้อราที่แยกได้จากจังหวัดตราดมีความแปรปรวนของสีโคโลนีมากกว่าเชื้อราที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี



ภาพที่ 5 (ซ้าย) เชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่แยกได้จากแผลจุดขนาดเล็ก และโคโลนีของเชื้อราที่มีสีต่างกันเจริญออกมาจากแผลเดียวกัน และ (ขวา) เชื้อราที่แยกได้จากแผลจุดขนาดใหญ่เจริญอยู่บนอาหาร half PDA ที่อายุ 5 วันที่บ่มในอุณหภูมิห้อง (28-32°C)

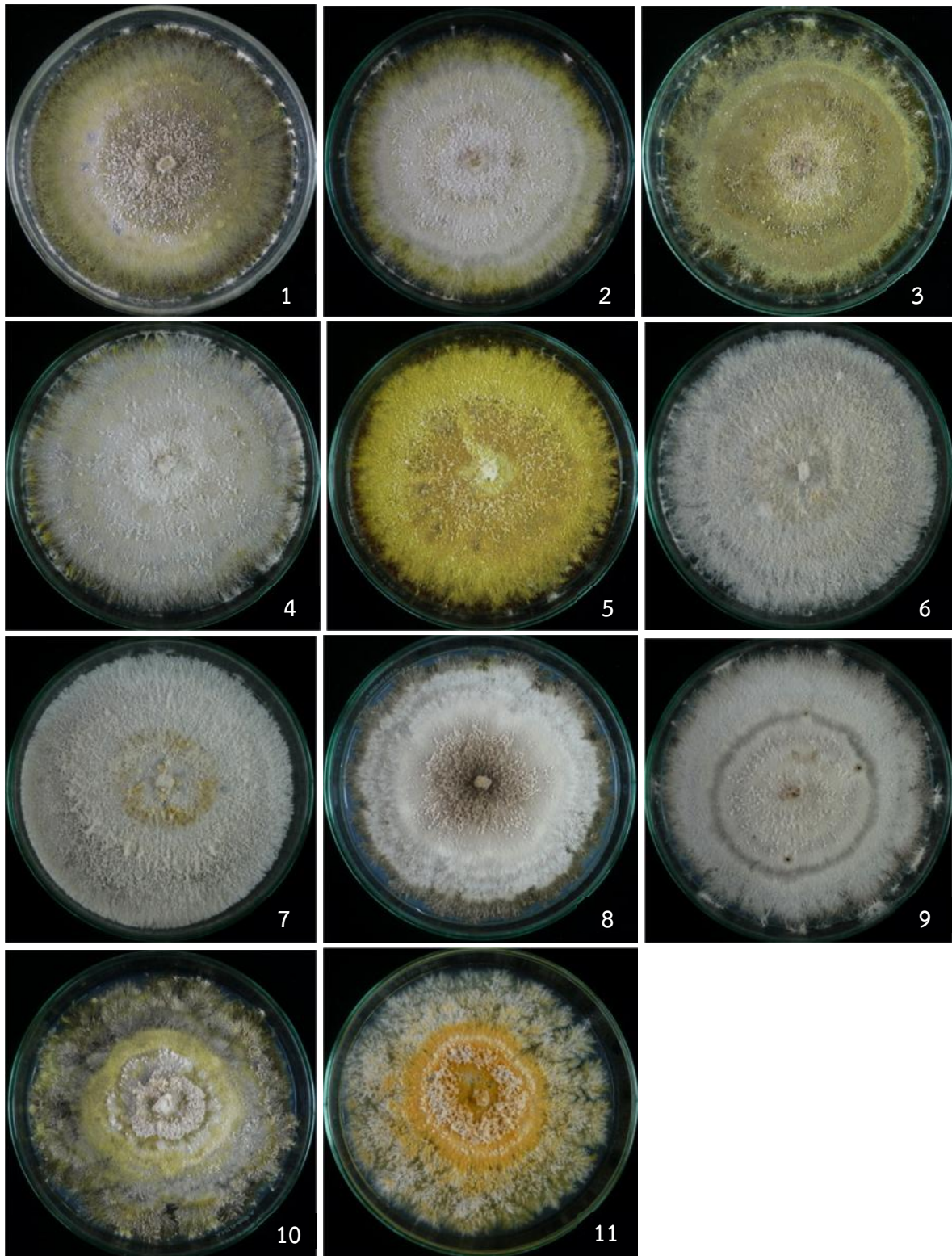
เชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่แยกได้จากจังหวัดตราด

เชื้อราที่แยกได้จากจังหวัดตราดถูกแบ่งออกเป็น 11 ไอโซเลทตามกลุ่มของสีโคโลนีที่ต่างกัน (ภาพที่ 6) ได้แก่

ไอโซเลท TP01-1 TP01-2 TP01-3 TP01-4 TP01-5 จัดอยู่ในกลุ่มโคโลนีสีน้ำตาล
สีน้ำตาลอมเขียว สีเทาปนน้ำตาล

ไอโซเลท TP02-1 TP02-2 TP02-3 TP02-4 จัดอยู่ในกลุ่มโคโลนีสีเทาหรือขาว

ไอโซเลท TP03-1 TP03-2 จัดอยู่ในกลุ่มโคโลนีสีเหลือง หรือสีส้ม



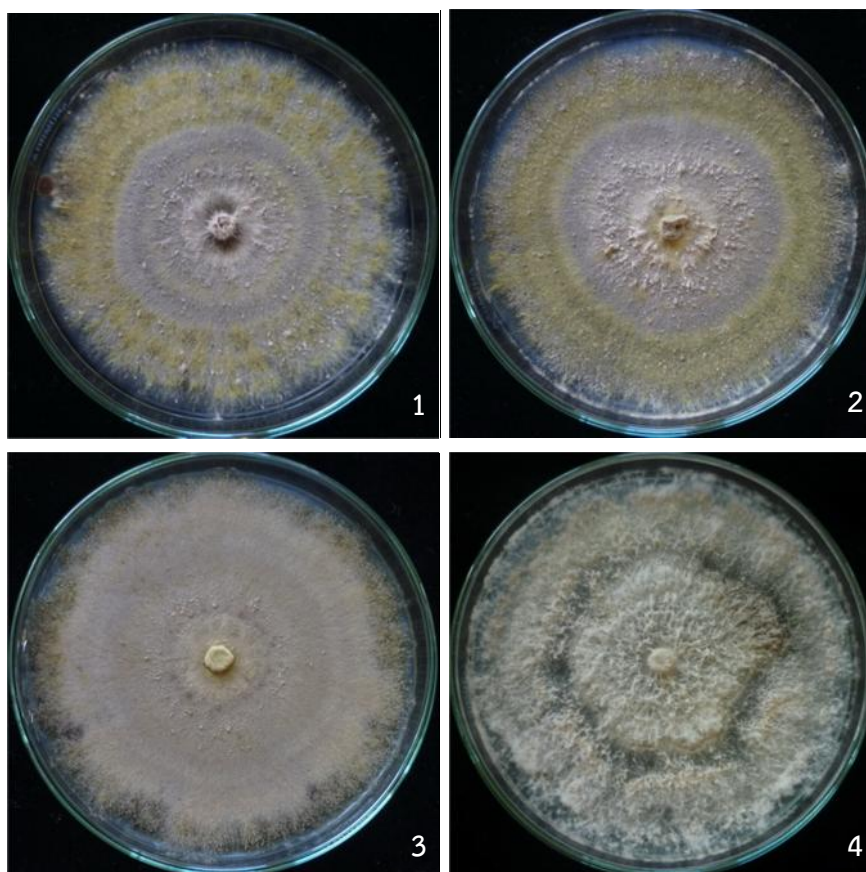
ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Phomopsis* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท ที่แยกได้จากอาการใบจุดของทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ในแหล่งปลูกอำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด : ไอโซเลท TP01-1 (1), TP01-2 (2), TP01-3 (3), TP01-4 (4), TP01-5 (5), TP02-1 (6), TP02-2 (7), TP02-3 (8), TP02-4 (9), TP03-1 (10) และ TP03-2 (11)

เชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี

เชื้อราที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรีมีความแปรปรวนในลักษณะสีของโคโลนีค่อนข้างน้อย จึงแบ่งออกเป็น 4 ไอโซเลท (ภาพที่ 7) ได้แก่

ไอโซเลท C10 C11 C12 โคโลนีสีเทาปนน้ำตาล

ไอโซเลท C13 โคโลนีสีขาว



ภาพที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Phomopsis* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท ที่แยกได้จากอาการใบจุดของทุเรียน พันธุ์หมอนทองในแหล่งปลูก อำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี : ไอโซเลท C10 (1), C11 (2), C12 (3) และ C13 (4)

อย่างไรก็ตาม นอกจากสีโคโลนีที่มีความแตกต่างกันแล้ว ลักษณะของเส้นใยที่เจริญบนผิวหน้าอาหารก็มีความแตกต่างกันในบางไอโซเลท กล่าวคือ บางไอโซเลทมีเส้นใยละเอียดและมีการเจริญเรียบไปกับผิวหน้าอาหาร แต่บางไอโซเลทมีเส้นใยค่อนข้างหยาบทำให้โคโลนีมีผิวหน้าขรุขระ เหล่านี้เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Brayford (1990) ว่าเชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่แยกได้จากต่างแหล่งปลูกได้ถูกแบ่งเป็นกลุ่มๆ ตามความต่างกันของเส้นใย สีโคโลนี และ mating type รวมทั้ง Islam *et al.* (2010) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis vexans* จำนวน 44 ไอโซเลทที่แยกได้จากมะเขือ สามารถแบ่งเป็น 5 กลุ่มแตกต่างกัน ตามการปรากฏของแถบ DNA โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

2. การทดสอบการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดบนต้นกล้าทุเรียนพันธุ์หมอนทอง

2.1 ทดสอบการเกิดโรคโดยวิธี detached leaf

หลังจากปลูกเชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี ลงบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ตัดออกมาจากต้น โดยใช้เข็มเย็บเย็บทำแผลบนใบทุเรียนก่อน จำนวน 1 แผล แล้วค่อยวางชิ้นวั่นที่มีเชื้อรา *Phomopsis* spp. ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ลงไป คั่วด้านที่มีเชื้อราลงไปทับบนแผล แล้วบ่มในกล่องพลาสติกขึ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นค่อยๆ เปิดฝากล่องเพื่อระบายความชื้นออกมาทีละน้อยในแต่ละวัน เพื่อป้องกันไม่ให้ใบทุเรียนเน่า ผลปรากฏว่า ไอโซเลท C13 เริ่มสังเกตเห็นอาการบนใบตั้งแต่วันที่ 3 หลังจากปลูกเชื้อ โดยอาการเริ่มแรกจะมีลักษณะคล้ายจุดช้ำน้ำ ต่อมาแผลสีน้ำตาลจะค่อยๆ ขยายลามออกไปเป็นบริเวณกว้าง (ภาพที่ 8) ในขณะที่ไอโซเลท C12 ไม่ทำให้เกิดลักษณะอาการดังกล่าว หากจะพบแต่การเจริญของเส้นใยบริเวณแผลเท่านั้น (ภาพที่ 9) สำหรับการปลูกเชื้อราไอโซเลท C10 และ C11 พบว่าเกิดแผลสีน้ำตาลเล็กน้อย ส่วนการปลูกเชื้อจากไอโซเลทจังหวัดตราด มีบางไอโซเลทเท่านั้นที่ก่อให้เกิดแผลสีน้ำตาล แต่รุนแรงน้อยกว่า ซึ่ง Rawnsley and Wicks (2002) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis viticola* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคใบและลำต้นจุดขององุ่นมีบางไอโซเลทเท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรค โดยจัดให้เป็น *Phomopsis* type 2 ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับการฉีดพ่นสารเคมีในการป้องกันกำจัด ส่วน type 1 ถึงแม้จะพบว่ามีอาการติดเชื้อก็ไม่ได้ก่อให้เกิดความเสียหายแต่อย่างใด

นอกจากวิธีการปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นวั่นตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้น ยังได้ทดลองปลูกเชื้อโดยวิธีหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราลงบนแผล ซึ่งได้ทดลองโดยใช้เชื้อราไอโซเลท C10 พบว่าทำให้เกิดลักษณะอาการแผลช้ำน้ำสีน้ำตาลได้เช่นเดียวกับการปลูกเชื้อโดยวิธีใช้ชิ้นวั่น แต่รุนแรงมากกว่า (ภาพที่ 10) และได้ทำการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) จากอาการแผลช้ำน้ำดังกล่าว เพื่อยืนยันว่ายังคงเป็นไอโซเลท C10 หรือไม่ พบว่า เชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่แยกได้ยังคงให้ลักษณะโคโลนีสีเขียวยอมเทา เหมือนกับโคโลนีแรกเริ่มในไอโซเลท C10 ที่ใช้ปลูกเชื้อ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 8 วิธีการปลูกเชื้อรา *Phomopsis* sp. ลงบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองโดยวิธีทำแผลและปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นวั่น

(บน) ลักษณะอาการจากการปลูกเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C13 ที่อายุ 5 วัน

(ล่าง) ลักษณะอาการจากการปลูกเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C13 ที่อายุ 7 วัน



ภาพที่ 9 ปลุกเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C12 เป็นเวลา 11 วัน โดยใช้ชิ้นวัชรวงบนแผลจะพบว่าไม่ทำให้เกิดลักษณะอาการแผลสีน้ำตาล จะพบเพียงการเจริญของเส้นใยที่ปกคลุมบนแผล



ภาพที่ 10 ลักษณะอาการแผลช้ำน้ำน้ำตาลหลังจากปลุกเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C10 บนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองด้วยการหยดสารแขวนลอยสปอร์ลงบนแผล เป็นเวลา 7 วัน

(บน) เกิดแผลสีน้ำตาล มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบบนใบในระยะเพสลาด

(ล่าง) เกิดแผลสีน้ำตาล ไม่มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบบนใบในระยะใบอ่อน

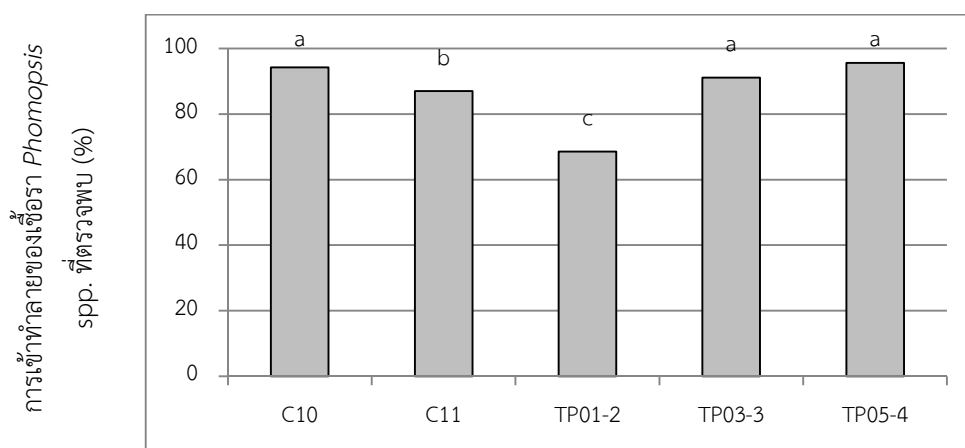


ภาพที่ 11 เชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลต C10 ได้จากการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) จากอาการแผลซ้ำน้ำ สีนํ้าตาลบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน

2.2 ทดสอบการเกิดโรคบนต้นกล้า

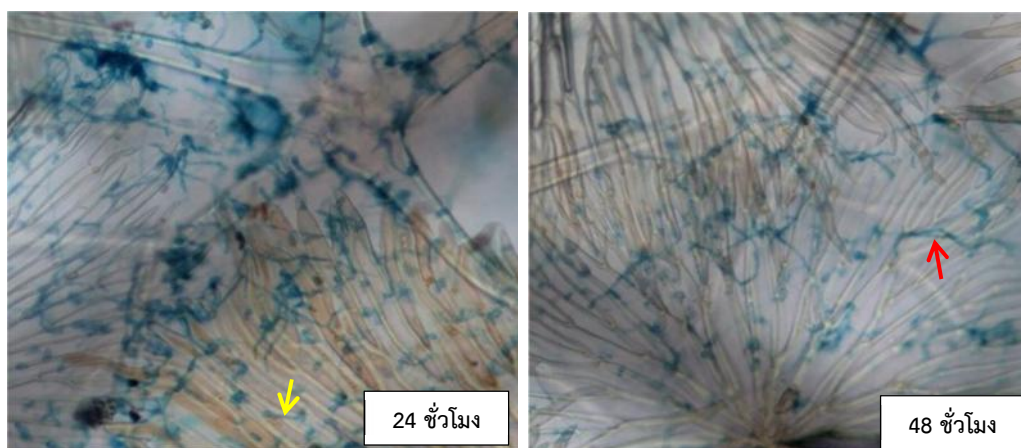
จากการนำเชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลตที่แยกได้จากจังหวัดตราด และจันทบุรีมาทดสอบการเกิดโรคบนต้นกล้าทุเรียนพันธุ์หมอนทองโดยวิธีพ่นสารแขวนลอยสปอร์ (10^5 สปอร์ต่อ มล.) ลงบนใบ พบว่าไม่แสดงอาการใบจุดแต่อย่างใด หากแต่เมื่อทำการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) จากใบที่ถูกปลูกเชื้อดังกล่าว พบว่าเนื้อเยื่อพืชเกิดการติดเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยยืนยันได้จากพบการเข้าทำลายมากกว่า 60% (ภาพที่ 12)

และเมื่อตัดเนื้อเยื่อใบทุเรียนที่ติดเชื้อเพื่อนำไปสกัดสีของคลอโรฟิลล์ออก (decolorization) ในสารละลาย phenol : glycerin : lactic acid : H₂O : ethyl alcohol (1:1:1:1:8 v/v) เพื่อให้เนื้อเยื่อพืชใส ตามวิธีการของ Yonghong and Guest (2011) พบว่า สปอร์มีการงอก germ tube และพัฒนาเป็นเส้นใยเจริญภายในเนื้อเยื่อนั้น (ภาพที่ 13)



เชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลตต่างๆ

ภาพที่ 12 เปอร์เซนต์การเข้าทำลายของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่ได้จากการแยกเชื้อกลับ (re-isolation) หลังจากปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าทุเรียนพันธุ์หมอนทองโดยวิธีพ่นสารแขวนลอยสปอร์ (10^5 สปอร์ต่อ มล.) และบ่มในถุงพลาสติกขึ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบ่มในสภาพปกติต่อไปอีกเป็นเวลา 30 วัน (ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT)

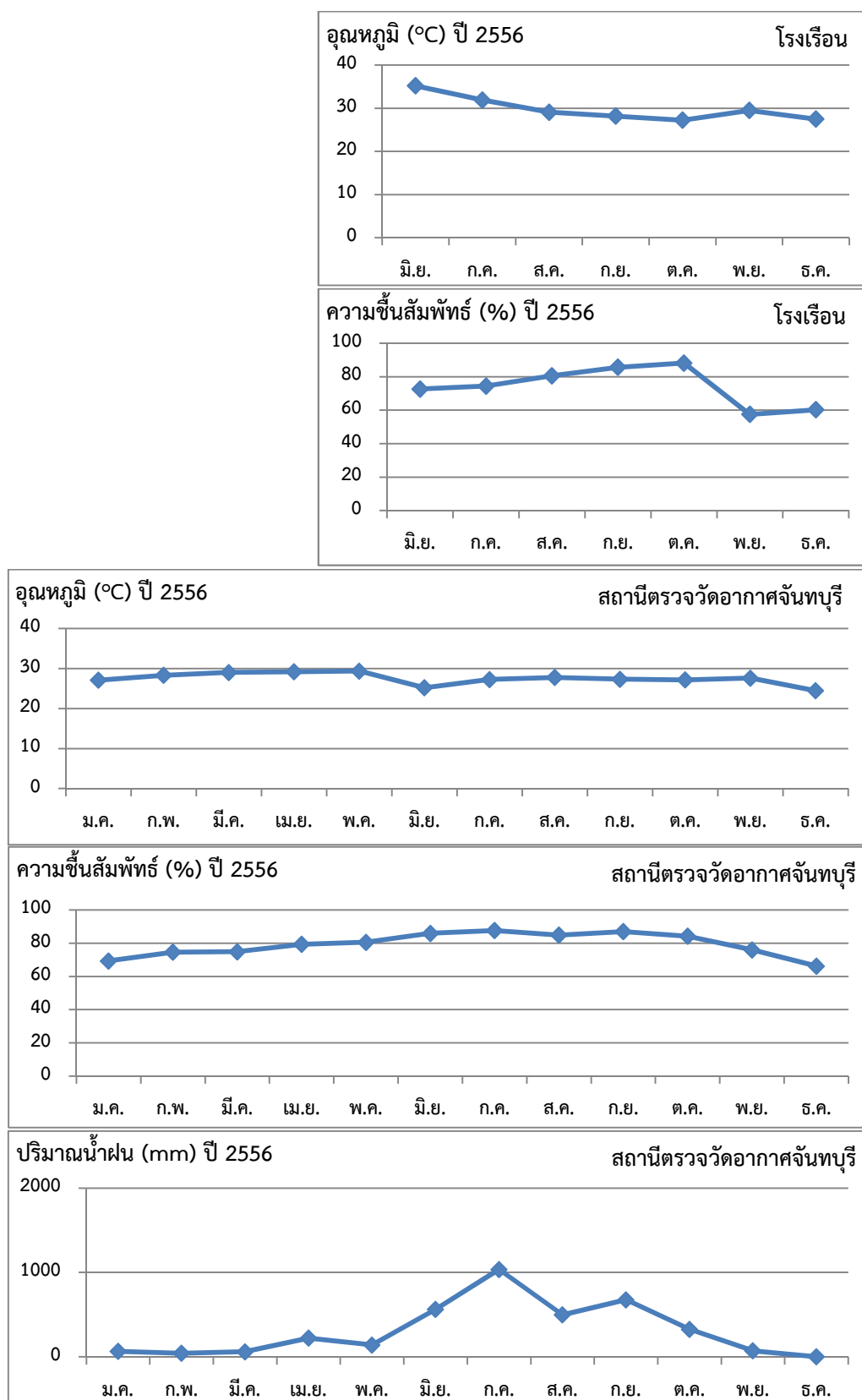


ภาพที่ 13 สปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. อก germ tube และพัฒนาเป็นเส้นใยเจริญภายในเนื้อเยื่อพืชที่กำลังขยาย 200 เท่า (ย้อมสีด้วย cotton blue)

ลูกศรสีเหลือง : สปอร์อก germ tube

ลูกศรสีแดง : germ tube พัฒนาเป็นเส้นใยเจริญภายในเนื้อเยื่อพืช

จากการที่ปลูกเชื้อราโดยวิธีพ่นสปอร์ลงบนใบพืชในช่วงเดือนมิถุนายนถึงธันวาคม 2556 แล้วไม่ปรากฏอาการของโรคนั้น อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากสภาพแวดล้อมในโรงเรือนไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาการของโรค ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพอากาศภายในโรงเรือนกับสภาพอากาศในพื้นที่จังหวัดจันทบุรีที่มีการปรากฏหรือแพร่กระจายของโรคใบจุด (*Phomopsis* leaf spot) เป็นบริเวณกว้างนั้น พบว่า อุณหภูมิเฉลี่ยของโรงเรือนในช่วงดังกล่าวอยู่ในช่วง 27-35°C ซึ่งสูงกว่าสถานีตรวจวัดอากาศจังหวัดจันทบุรี (23-28°C) และความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือน (57-88%) มีค่าน้อยกว่าในจังหวัดจันทบุรี (68-92%) ดังได้แสดงในภาพที่ 14 ซึ่ง Ormeno-Nuez *et al.* (1988) รายงานว่า วัชพืช *Convolvulus arvensis* L. เมื่อถูกเชื้อรา *Phomopsis convolvulus* Ormeno เข้าทำลายจะต้องถูกบ่มอยู่ที่อุณหภูมิ 20-30°C จึงจะทำให้เกิดโรครุนแรงได้ นั้นแสดงว่าต้นทุเรียนที่ถูกปลูกเชื้อที่อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 30°C ก็น่าจะไม่สามารถพัฒนาให้เกิดอาการของโรคหรืออาจเกิดการพัฒนาของโรคน้อยได้นั่นเอง ซึ่งในช่วงที่อุณหภูมิสูงกว่า 30°C นี้ ยังมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phomopsis* spp. โดยตรง จึงส่งผลให้เชื้อราลดความสามารถในการก่อโรคลง (Rawnsley, 2008) แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากอุณหภูมิที่ต้องเหมาะสมในการพัฒนาการเกิดโรคแล้ว ยังขึ้นอยู่กับความชื้นของบรรยากาศ ณ ขณะนั้น โดยเฉพาะเชื้อรา *Phomopsis* บาง species มีความต้องการระยะเวลาเปียกใบ 24 ชั่วโมง และระยะเวลาติดเชื้อในเนื้อเยื่อพืช 15-24 ชั่วโมง จึงจะก่อให้เกิดโรคได้ (Ormeno-Nuez *et al.*, 1988; Wyss and Charudattan, 2000) รวมถึงเชื้อรา *Phomopsis* spp. มีความต้องการความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศตั้งแต่ 96% ขึ้นไป เป็นเวลาอย่างน้อย 10 ชั่วโมง จึงจะทำให้เชื้อราปลดปล่อยสปอร์ออกจาก pycnidium และแพร่กระจายไปกับหยดน้ำเพื่อเข้าทำลายในส่วนต่างๆ ของพืช ซึ่งจะก่อให้เกิดอาการของโรคให้เห็นเป็นลำดับถัดมา (Rawnsley, 2008) โดยจากการทดลองในครั้งนี้ สภาพโรงเรือนมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 57-88% ซึ่งเป็นสภาพที่มีความชื้นค่อนข้างต่ำ จึงไม่เหมาะสมต่อการปลดปล่อยสปอร์และพัฒนาการของโรค ถึงแม้จะมีการติดเชื้อของเนื้อเยื่อพืชอยู่แล้วก็ตาม

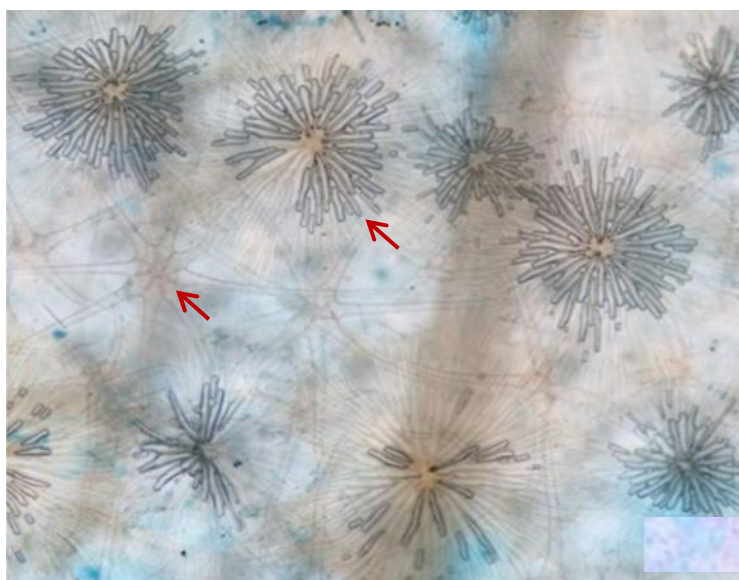


ภาพที่ 14 สภาพอากาศในโรงเรียน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน และสถานีตรวจวัดอากาศ อำเภอมือง จังหวัดจันบุรี

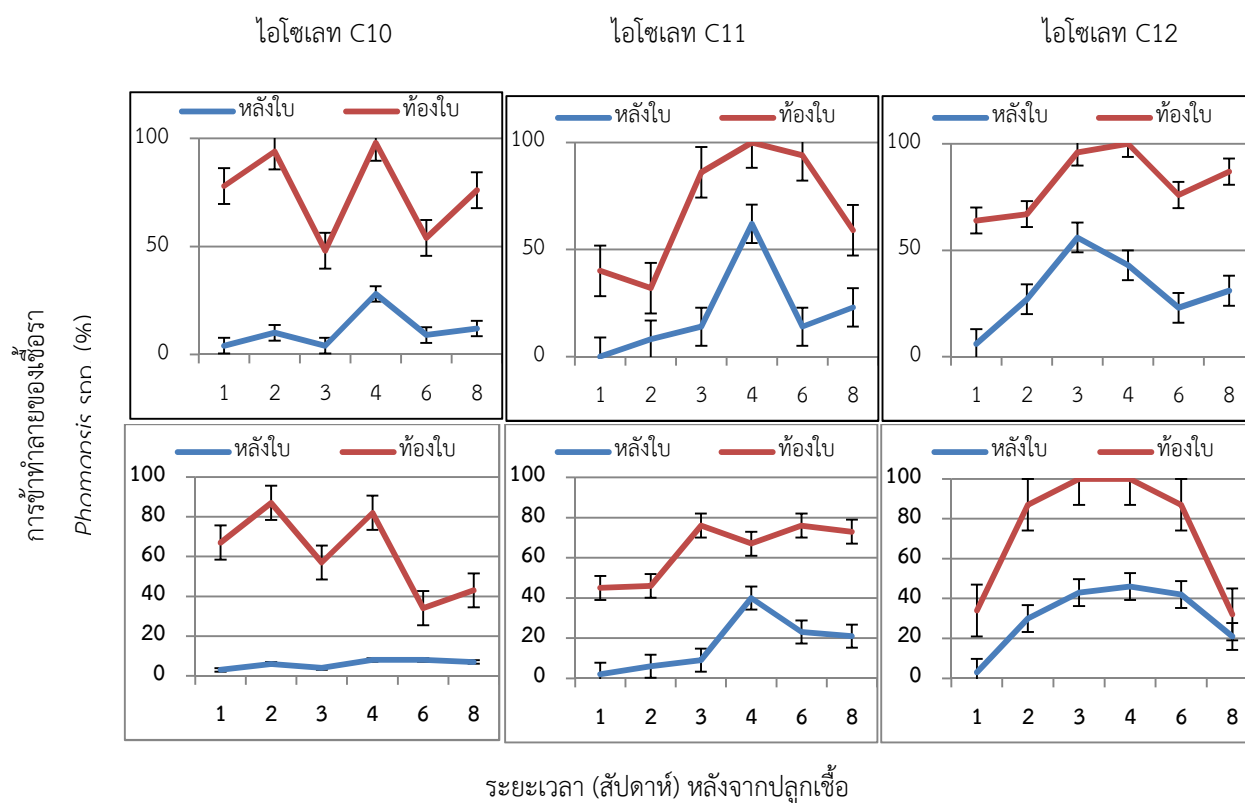
3. ศึกษาการมีระยะเข้าทำลายแฝง (latent infection) ของเชื้อรา *Phomopsis* spp.

3.1 ศึกษาการเข้าทำลายแฝงของเชื้อราบนต้นกล้า

โดยทำการศึกษานทุเรียน 2 พันธุ์ ได้แก่ หมอนทองและพวงมณี และจากการพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ทั้ง 3 ไอโซเลต คือ C10 C11 และ C12 ที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์ / ตร. มม. บนหลังใบ (adaxial surface) และท้องใบ (abaxial surface) ของต้นกล้าเพื่อศึกษาการติดเชื้อและการมีชีวิตรอดของเชื้อราหลังจากปลูกเชื้อแล้วทุกๆ สัปดาห์ พบว่า จำนวนการเข้าทำลายของเชื้อราทุกไอโซเลตพบสูงสุดอยู่ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 และยังคงพบการเข้าทำลายของเชื้อราตลอด 8 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ หากแต่พบในปริมาณที่ลดลง นอกจากนั้นยังพบว่าการปลูกเชื้อที่ท้องใบก่อให้เกิดการติดเชื้อได้มากกว่าการปลูกเชื้อที่หลังใบ อาจจะมีสาเหตุเนื่องมาจากตำแหน่งหลังใบมีชั้น wax หนาจึงเกิดการติดเชื้อได้น้อย ตรงกันข้ามกับท้องใบซึ่งไม่มี wax แต่จะมีเพียงโครงสร้าง trichome ที่เรียงซ้อนกันอย่างหลวมๆ และมีช่องว่าง (O’Gara *et al.*, 2004) ดังแสดงไว้ในภาพที่ 15 ซึ่งเปิดโอกาสให้เชื้อราเข้าทำลายและเกิดการติดเชื้อได้ง่าย จึงสามารถพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่ตำแหน่งดังกล่าวเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 16 และ 17) แต่อย่างไรก็ตาม ก็ยังไม่พบการปรากฏของอาการแผลจุดบนใบทุเรียนทั้ง 2 พันธุ์แต่อย่างใด



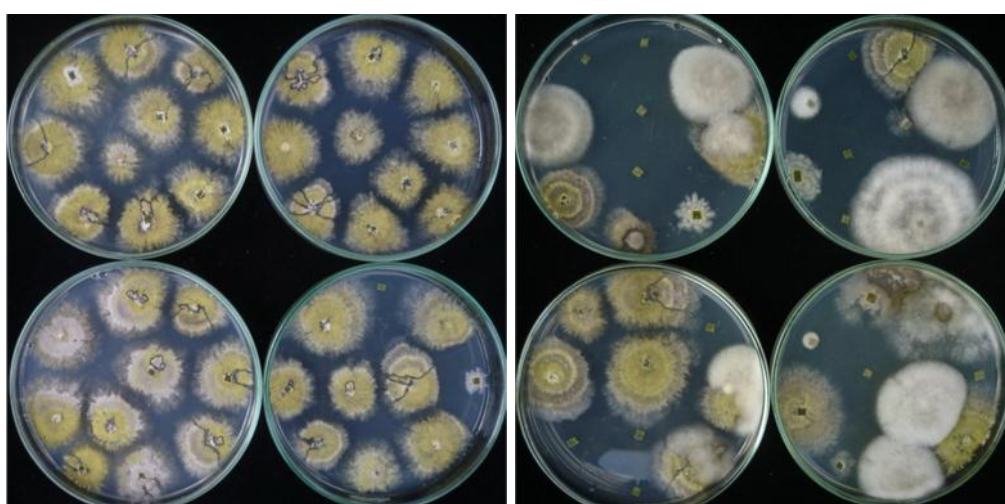
ภาพที่ 15 โครงสร้าง trichome สองชนิด (ลูกศรชี้) ด้านท้องใบของเนื้อเยื่อใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ที่วางซ้อนกันอย่างหลวมๆ



ภาพที่ 16 การเข้าทำลาย (infection) ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลต C10 C11 และ C12 หลังจากปลูกเชื้อโดยวิธีพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนหลังใบและท้องใบของต้นกล้าทุเรียน (แสดงแถบค่าคาดเคลื่อนโดยใช้ค่าคาดเคลื่อนมาตรฐาน)

(บน) พันธุ์หมอนทอง

(ล่าง) พันธุ์พวงมณี



ภาพที่ 17 เชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลต C10 (โคโลนีสีเขียวปนเทา) เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองหลังจากปลูกเชื้อโดยวิธีพ่นสารแขวนลอยสปอร์เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ซ้าย) ปลูกเชื้อที่ท้องใบ

(ขวา) ปลูกเชื้อที่หลังใบ พบมีการเจริญของเชื้อราชนิดอื่นอยู่ก่อนแล้ว

แต่เมื่อทำการปลูกเชื้อรา *Phomopsis* spp. โดยการหยดสารแขวนลอยสปอร์ลงบนใบที่ทำแผล บ่มเชื้อในถุงพลาสติกชั้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วค่อยเจาะรูระบายความชื้นต่อไปอีกเป็นเวลา 14 วัน จนปรากฏอาการแผลสีน้ำตาลบริเวณปลูกเชื้อ จึงเปิดถุงออก และบ่มต่อในสภาพปกติ ซึ่งต่อมาอาการแผลจะขยายขนาดและกลางแผลแสดงอาการเนื้อเยื่อแห้งตาย และปรากฏวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบแผล โดยบริเวณกลางแผลจะปรากฏตุ่มสีดำขนาดเล็กเท่าปลายเข็มหมุดกระจายอยู่ทั่วไป เรียกว่า pycnidium ซึ่งเป็นโครงสร้างสำหรับห่อหุ้มสปอร์ของเชื้อราที่อยู่ในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยปรากฏ pycnidium หลังจากปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลาประมาณ 20 วัน หลังจากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 32 วันหลังจากปลูกเชื้อ จะสังเกตเห็นลักษณะอาการแผลจุดสีน้ำตาลแดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. และมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบกระจายอยู่ข้างแผลที่ผ่านการปลูกเชื้อนั้น (ภาพที่ 18)

ซึ่งจากการศึกษาของ Pscheidt and Pearson (1991) และ Rawnsley (2003) รายงานว่า เมื่ออุณหภูมิเกิดการติดเชื้อ *Phomopsis viticola* จะปรากฏอาการจุดสีน้ำตาลและมี halo สีเหลืองล้อมรอบทั้งที่ใบและลำต้น โดยอาการที่ใบจะเริ่มปรากฏหลังจากติดเชื้อประมาณ 21 วัน หรือส่วนมากอาจจะไม่ปรากฏอาการ รอยจนกระทั่งเข้าสู่ระยะใบแก่หรือ senescent ก็จะมีอาการให้เห็น ส่วนที่ลำต้นจะแสดงอาการหลังจากติดเชื้อตั้งแต่ 28 วันเป็นต้นไป และที่ผลจะปรากฏอาการตั้งแต่ 7-21 วันก่อนการเก็บเกี่ยว นั้นแสดงถึงเนื้อเยื่อพืชมีการติดเชื้อมาแล้วในระยะหนึ่งจึงค่อยแสดงอาการของโรคให้เห็น ดังเช่นจากการทดลองในครั้งนี้ที่เชื้อราต้องการการเจริญครบคร่อมอยู่ในเนื้อเยื่อพืชระยะหนึ่งก่อน และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น ใบแก่ขึ้นหรือสภาพของเนื้อเยื่อพืชเริ่มเสื่อมลง จึงจะปรากฏอาการจุดสีน้ำตาลให้เห็น ประกอบกับบริเวณเนื้อเยื่อพืชที่ถูกทำลายจะยังส่งผลให้เนื้อเยื่อพืชเกิดความอ่อนแอหรือเสื่อมลงมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ เมื่อใบทุเรียนเกิดการติดเชื้อและแสดงอาการโรค จะปรากฏวงสีเหลืองล้อมรอบแผล เนื่องจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. ผลิตสารพิษออกมาทำลายเนื้อเยื่อพืช ดังเช่นจากการรายงานของ Patwardhan et al. (1974) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis paspalli* เมื่อเข้าทำลายธัญพืชจะสามารถผลิตสารพิษ ชื่อ cytochalasins ออกมา และสารพิษดังกล่าวพบว่าเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคด้วย ในขณะที่ Girish et al. (2009) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis azadirachtae* เมื่อเข้าทำลายสะเดาจะปลดปล่อยสารพิษออกมาทำลายเนื้อเยื่อพืช โดยทำให้เกิดอาการแห้งตายลามจากยอด (die back)



ภาพที่ 18 ลักษณะอาการแผลสีน้ำตาลที่เกิดจากการปลุกเชื้อรา *Phomopsis* sp. โดยวิธีการทำแผลบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง

ลูกครีสีแดง : วงแหวนสีเหลืองล้อมรอบแผล

ลูกครีสีน้ำเงิน : pycnidia สีดำขนาดเท่าปลายเข็มหมุดปรากฏกลางแผลบนเนื้อเยื่อที่แห้งตาย

ลูกครีสีดำ : pycnidia จากบริเวณเนื้อเยื่อแห้งตายที่ผ่านการตัดเนื้อเยื่อตามขวาง มีการสร้างสปอร์ใสไม่มีสีจำนวนมากอยู่ภายใน

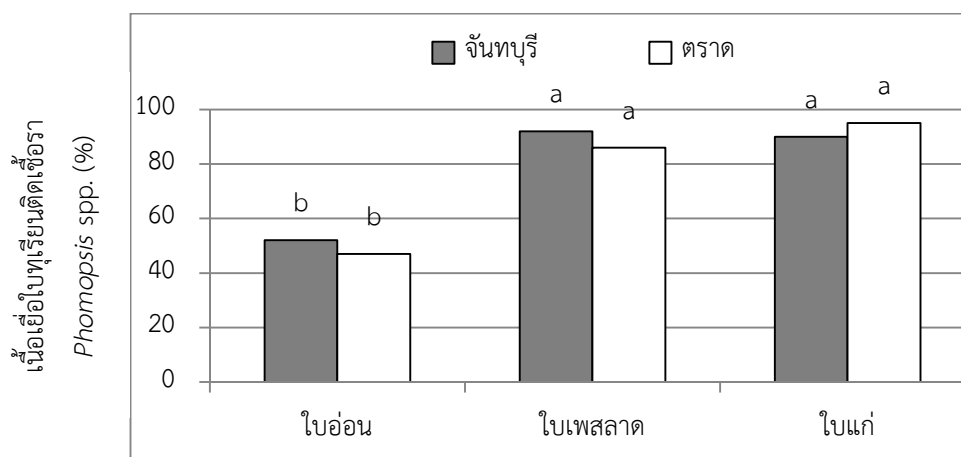
วงกลม : อาการแผลจุดเท่าปลายเข็มหมุดสีน้ำตาลแดงเข้ม และมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบแผล ปรากฏรอบเนื้อเยื่อแห้งตายที่ผ่านการปลุกเชื้อโดยวิธีทำแผล

จากการที่ใบทุเรียนเกิดการติดเชื้อของเชื้อรา *Phomopsis* และมีการเจริญของเชื้ออยู่ในเนื้อเยื่อพืชระยะหนึ่ง โดยปราศจากการปรากฏอาการของโรค จนกระทั่งเนื้อเยื่อพืชเข้าสู่ระยะแก่หรือเสื่อมสลาย จึงปรากฏอาการของโรคให้เห็น ซึ่งเรียกปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้ว่า เชื้อราจะมีระยะการเข้าทำลายแฝง (latent period) โดย Prusky (1996) กล่าวว่าเวลาที่เชื้อราจะมีระยะการเข้าทำลายแฝงนั้นจะต้องมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้ คือ ขาดสารอาหารที่จำเป็นสำหรับเชื้อสาเหตุโรค สารที่มีอยู่แล้วในพืชยับยั้งการเจริญของเชื้อ สารที่มีอยู่แล้วหรือยังไม่มีในพืชถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ และสภาพอื่นๆ ขาดการส่งเสริมให้เชื้อสร้างปัจจัยในการก่อโรคขึ้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะมีความเกี่ยวเนื่องโดยตรงกับระยะต่างๆ ในการเข้าทำลายของเชื้อราบนเนื้อเยื่อพืช ตั้งแต่ขั้นตอนที่สปอร์เริ่มงอกและพัฒนาไปเป็นเส้นใย และขั้นตอนการสร้าง appressorium ตลอดจนถึงขั้นตอน appressorium งอกและสร้างเส้นใยเจริญอยู่ในชั้น epidermis ซึ่งเรียกว่า subcuticular hyphae และจากการรายงานของ Williamson *et al.* (1991) ที่พบว่าเชื้อรา *Phomopsis leptostromiformis* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของถั่วลันเตาจะมีการงอก germ tube และสร้างเส้นใยที่เรียกว่า subcuticular coralloid hyphae ที่ชั้น cuticle ซึ่งต่อเชื่อมกับเนื้อเยื่อ epidermis หลังจากปลุกเชื้อไปแล้ว 7 วัน และเชื้อราจะคงอยู่ลักษณะเช่นนี้โดยไม่ปรากฏอาการของโรคเป็นเวลา 20 วัน

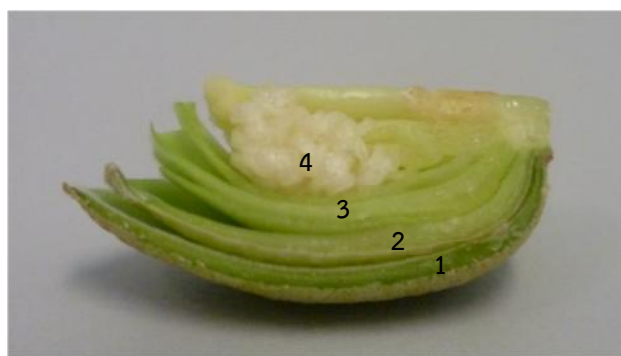
3.2 ศึกษาการเข้าทำลายแฝงของเชื้อราในสภาพพื้นที่จริง

จากการตรวจหาเชื้อรา *Phomopsis* spp. ในสภาพแปลงปลูกทั้งสองแหล่งจากใบที่ไม่ปรากฏอาการของโรคของทุเรียนพันธุ์หมอนทองในระยะต่างๆ พบว่า เนื้อเยื่อพืชเกิดการติดเชื้อในทุกๆ ระยะการเจริญเติบโตของใบ โดยระยะใบเปสลาดและใบแก่ พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมากที่สุดถึง 95% (ภาพที่ 19) ในขณะที่เมื่อตรวจหาการติดเชื้อในดอกที่มีความสมบูรณ์และไม่เป็นโรคที่มีอายุแตกต่างกัน 3 5 และ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 20) ในช่วงปลายเดือนธันวาคมจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ซึ่งเป็นช่วงที่ทุเรียนอยู่ในระยะออกดอก โดยนำมาแยกเชื้อในส่วนของกลีบเลี้ยง กาบหุ้มกลีบดอก กลีบดอก และเกสรตัวผู้ พบว่า เชื้อรา *Phomopsis* spp. มักถูกตรวจพบบริเวณกลีบเลี้ยงหรือกาบหุ้มกลีบดอก แต่เมื่อดอกมีอายุมากขึ้นจะพบการติดเชื้อเป็นจำนวนมากที่บริเวณกลีบเลี้ยง ซึ่งเป็นบริเวณรอบนอกของดอก โดยเฉพาะจากแหล่งปลูกจังหวัดตราด ที่พบได้มากถึง 70% แต่บางครั้งอาจพบตรงบริเวณเกสรตัวผู้ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุเนื่องจากบางเกสรเกิดการติดเชื้ออยู่ก่อนแล้ว (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 21)

เชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่ตรวจพบทั้งบนใบและที่ดอกที่ไม่ปรากฏอาการของโรค นับได้ว่าเป็นแหล่งของเชื้อที่มีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากเชื่อดังกล่าวสามารถแพร่กระจายเข้าสู่ในส่วนของผลได้ตลอดเวลา จึงอาจก่อให้เกิดอาการผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ ดังนั้นการตรวจหาเชื้อราสาเหตุโรคในระยะแฝงเช่นนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการที่จะได้ทราบปริมาณของเชื้อล่องหน อันจะสามารถทำการป้องกันกำจัดได้ทันทั่วทั้งพื้นที่เพื่อไม่ให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อเป็นบริเวณกว้าง



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายแฝง (latent infection) ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่แยกได้จากใบทุเรียนปกติในระยะต่างๆ จากแหล่งปลูกอำเภอมะขาม จังหวัดจันทบุรี และอำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด (ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT)



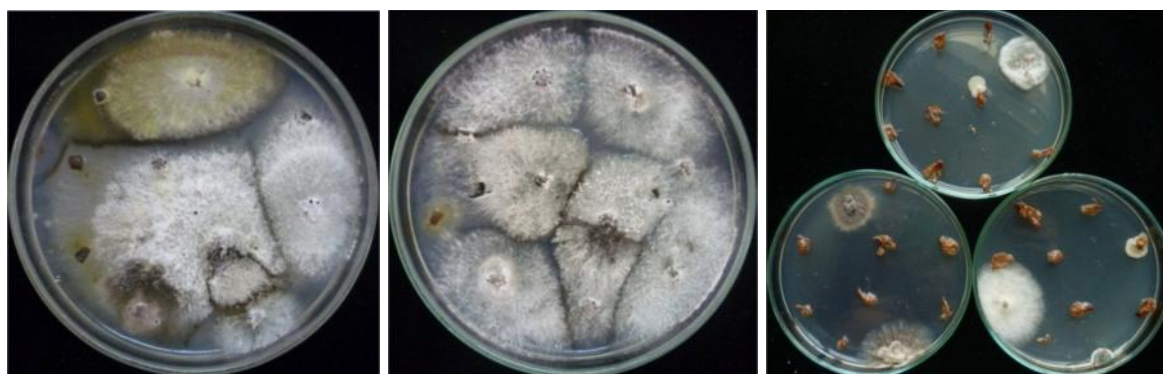
ภาพที่ 20 ดอกทุเรียนพันธุ์หมอนทอง อายุ 5 สัปดาห์ที่ปราศจากโรค (ซ้าย) ที่นำมาแยกเชื้อเพื่อหาการเข้าทำลายแฝงของเชื้อรา *Phomopsis* spp. และ ส่วนประกอบของดอกที่นำมาแยกเชื้อ (ขวา) โดยที่ 1 = กลีบเลี้ยง 2 = กาบหุ้มกลีบดอก 3 = กลีบดอก 4 = เกสรตัวผู้

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายแฝง (latent infection) ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของดอกทุเรียนที่มีอายุต่างกัน

แหล่งปลูก	ส่วนของดอก	การเข้าทำลายแฝงของเชื้อรา <i>Phomopsis</i> spp. (%)		
		อายุ 3 สัปดาห์	อายุ 5 สัปดาห์	อายุ 8 สัปดาห์ (ดอกเริ่มบาน)
อำเภอมะขาม	กลีบเลี้ยง	15 b	1.7 a	20 b
จังหวัดจันทบุรี	กาบหุ้มกลีบดอก	24.7 a	0 c	0 cd
	กลีบดอก	0 c	0 c	0 cd
	เกสรตัวผู้	0 c	0 c	5 c
อำเภอเขาสมิง	กลีบเลี้ยง	nd	0.6 b	70 a
จังหวัดตราด	กาบหุ้มกลีบดอก	nd	0 c	0 cd
	กลีบดอก	nd	0 c	0 cd
	เกสรตัวผู้	nd	1.5 a	0 cd

nd ไม่ได้ทำการศึกษา

(ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันในแนวตั้งเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT)



ภาพที่ 21 เชื้อรา *Phomopsis* spp. แยกได้จากส่วนของดอกทุเรียนจากแหล่งปลูกอำเภอเขาสมิง จังหวัดตราด (ซ้าย) แยกได้จากกลีบเลี้ยงของดอกที่มีอายุ 8 สัปดาห์ พบการติดเชื้อจำนวนมาก (ขวา) แยกได้จากเกสรตัวผู้อายุ 5 สัปดาห์ พบการติดเชื่อน้อย

นอกจากนี้ ได้ทำการสำรวจการเข้าทำลายแฝงของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ในทุเรียนพันธุ์ต่างๆ จำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ หมอนทอง กบตาท่อม เมล็ดคชสาร ก้านยาวสีนวล ปิ่นทอง กบดำ อีหนัก พวงมณี นกหยิบ และกบพิกุล ที่หน่วยรวบรวมพันธุ์ทุเรียน ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี ซึ่งมีเนื้อที่ประมาณ 20 ไร่ โดยพบว่าพันธุ์หมอนทองยังคงมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในเนื้อเยื่อใบมากที่สุดถึง 73% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายแฝง (latent infection) เชื้อรา *Phomopsis* spp. ในใบทุเรียนพันธุ์ต่างๆ จากศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี อำเภотаใหม่ จังหวัดจันทบุรีที่ปราศจากการใบจุด

ทุเรียนพันธุ์ต่างๆ	การเข้าทำลายแฝงของเชื้อรา <i>Phomopsis</i> spp. (%)
หมอนทอง	73.2 a
กบตาห้วม	23.1 d
เมล็ดคชสาร	10.3 e
ก้านยาวสินวล	8.5 e
ปิ่นทอง	12.0 e
กบดำ	31.0 c
อีหนัก	17.0 de
พวงมณี	32.5 c
นกหยิบ	19.7 de
กบพิกุล	45.4 b

(ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT)

3.3 ศึกษาปัจจัยภายในเนื้อเยื่อพืชที่มีผลต่อการเข้าทำลายแฝงของเชื้อ

การทดลองนี้ต้องการพิสูจน์ทฤษฎีว่าสารที่มีอยู่แล้วในพืชสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ซึ่งสนับสนุนถึงการมีระยะเข้าทำลายแฝงของเชื้อราดังกล่าวหรือไม่ โดยสกัดสารจากใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ปราศจากการใบจุดด้วยตัวทำละลาย methanol และ dichloromethane ให้ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) จากนั้นนำมาทดสอบยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C10 2 วิธี ดังนี้

3.3.1 ทดสอบยับยั้งการงอกบนแผ่น TLC

หลังจากทำ bioassay บนแผ่น TLC และพ่นด้วยสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. และ *Cladosporium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อราเปรียบเทียบกับ เนื่องจากสปอร์มีสีเข้ม ทำให้การปรากฏตำแหน่งยับยั้ง หรือ inhibition zone มีความคมชัดกว่าการใช้เชื้อราสาเหตุโรคโดยตรง พบว่า สารที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลาย methanol ให้ผลในการปรากฏ inhibition zone ที่คมชัดและบริเวณกว้างกว่าสารที่สกัดด้วย dichloromethane โดยมี retention factor (Rf) ตั้งแต่ 0.29-0.88 ในขณะที่แผ่น TLC ที่พ่นด้วยสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ให้ความคมชัดของ inhibition zone ที่น้อยกว่า (ภาพที่ 22) ซึ่งแสดงถึงตัวทำละลาย methanol สามารถละลายสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค (antifungal compounds) ออกมาจากเนื้อเยื่อใบทุเรียนได้มากกว่าตัวทำละลาย dichloromethane ซึ่งควรจะทำการแยกส่วน (fractionation) ของสารสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมอีกครั้ง เพื่อให้ได้ตำแหน่งยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (inhibition zone) ที่แยกออกจากกันและมีความคมชัดมากขึ้น

อย่างไรก็ตาม จากการทดลองนี้ได้พิสูจน์แล้วว่าเมื่อใบทุเรียนเกิดการติดเชื้อจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. สารที่มีอยู่แล้วในพืชได้ยับยั้งไม่ให้เชื้อรามีการเจริญเติบโตต่อไปจนพัฒนาให้เกิดอาการของโรคในขณะนั้นได้ ดังเช่นจากการรายงานของ Everett (1997) ที่พบว่าเนื้อเยื่อของอะโวคาโดเกิดการติดเชื้อจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. แต่ยังไม่พัฒนาโรคให้เห็น เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชดังกล่าวสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในกลุ่ม *dienes* ขึ้น จนกระทั่งเมื่อผลสุก สาร *dienes* เสื่อมสลาย จึงจะแสดงอาการของโรคให้เห็น



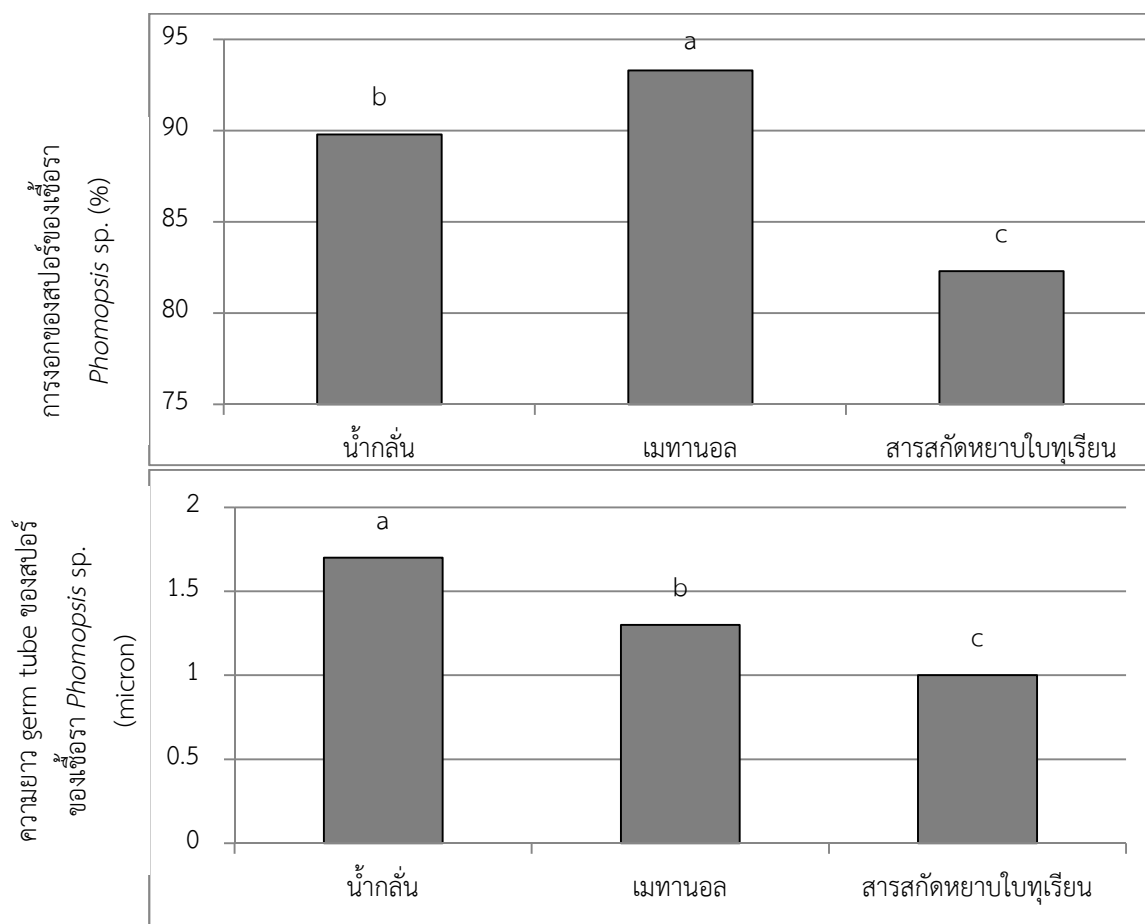
ภาพที่ 22 Inhibition zone ของสารสกัดหยาบจากใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองหลังจากผ่านสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Cladosporium oxysporum* (บน) และ *Phomopsis* sp. (ล่าง) ลงบนแผ่น TLC

วงกลม : ตำแหน่งยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (inhibition zone)

Retention factor (Rf) = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่ / ระยะทางที่ตัวทำละลาย (running solvent) เคลื่อนที่

3.3.2 ทดสอบยับยั้งการงอกบนจานเลี้ยงเชื้อ water agar

เนื่องจากสารสกัด methanol ให้ inhibition zone บนแผ่น TLC ที่คมชัดกว่า จึงนำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบในการทดลองนี้ โดยดูดสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงบนจานอาหาร และดูดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ปริมาตร 20 ไมโครลิตรตามลงไป ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยสปอร์ให้กระจายทั่วจาน บ่มไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 ชั่วโมง นับเปอร์เซ็นต์การงอกและวัดความยาว germ tube ของสปอร์ พบว่า สารสกัดจากใบทุเรียนสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และลดความยาวของ germ tube ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ได้ โดยพบการงอกของสปอร์เพียง 82% และ germ tube มีความยาวเพียง 1 ไมครอน (ภาพที่ 23)

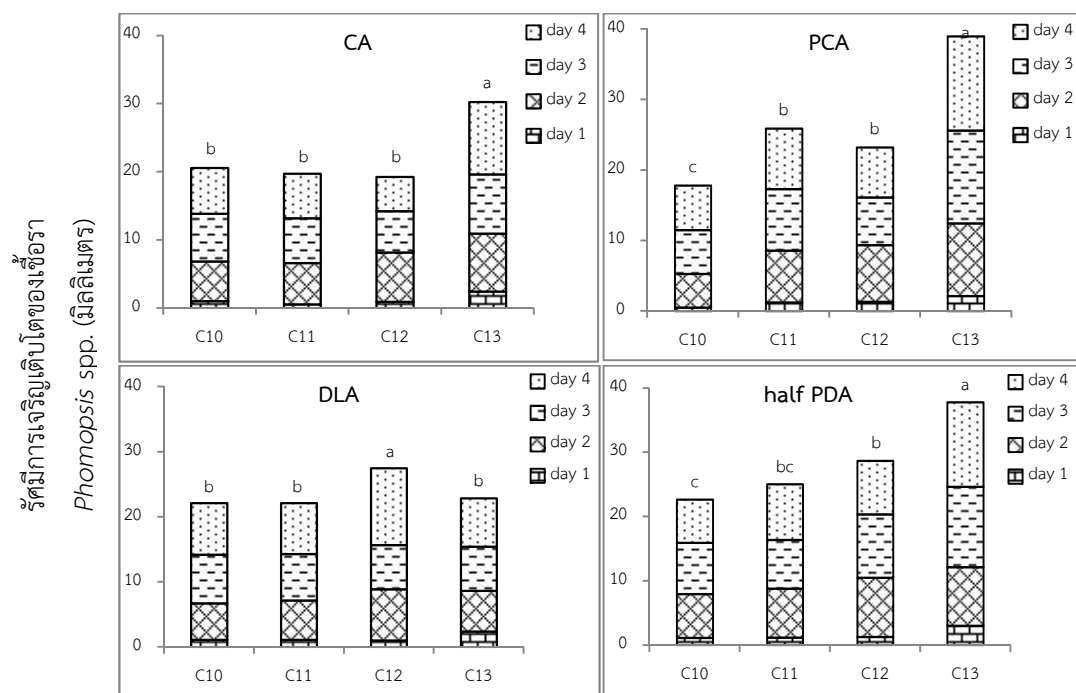


ภาพที่ 23 ผลของสารสกัดหยาบใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol ต่อการงอกของสปอร์และความยาวของ germ tube ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C10 บนอาหาร water agar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 ชั่วโมง (ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT)

4. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phomopsis* spp.

4.1 ศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใย

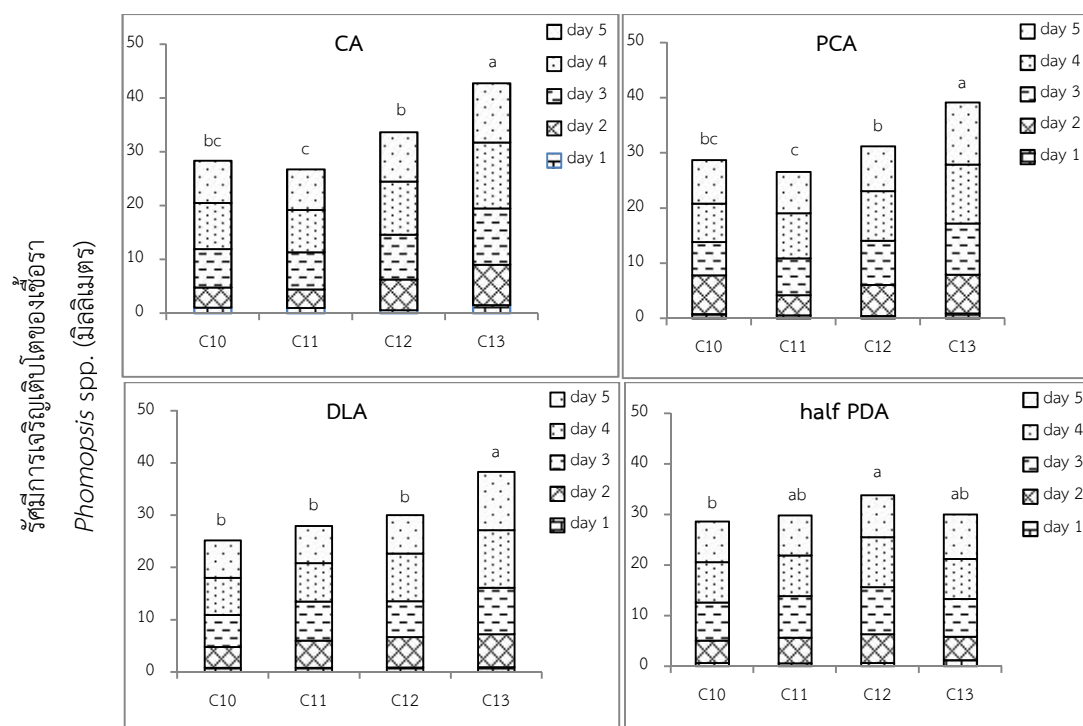
เลือกเชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลทจากจังหวัดจันทบุรีเป็นตัวแทนในการศึกษา โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน 4 ชนิดได้แก่ half potato dextrose agar (half PDA), potato carrot agar (PCA), carrot agar (CA) และ durian leaf extract agar (DLA) และบ่มเชื้อราที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 2 ระดับ ได้แก่ ที่อุณหภูมิห้อง (25-32°C) และในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C แสงสว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อรา *Phomopsis* spp. ในทุกไอโซเลทที่บ่มในอุณหภูมิห้องมีการเจริญของเส้นใยเร็วกว่าเชื้อราที่บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25°C โดยเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรเพียง 4 วัน ในขณะที่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิเชื้อรามีการเจริญ 5 วันจึงเต็มจาน (ภาพที่ 24 และ 25)



เชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลตต่างๆ

ภาพที่ 24 รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-32°C) เป็นเวลา 4 วัน

(ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT)



เชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลตต่างๆ

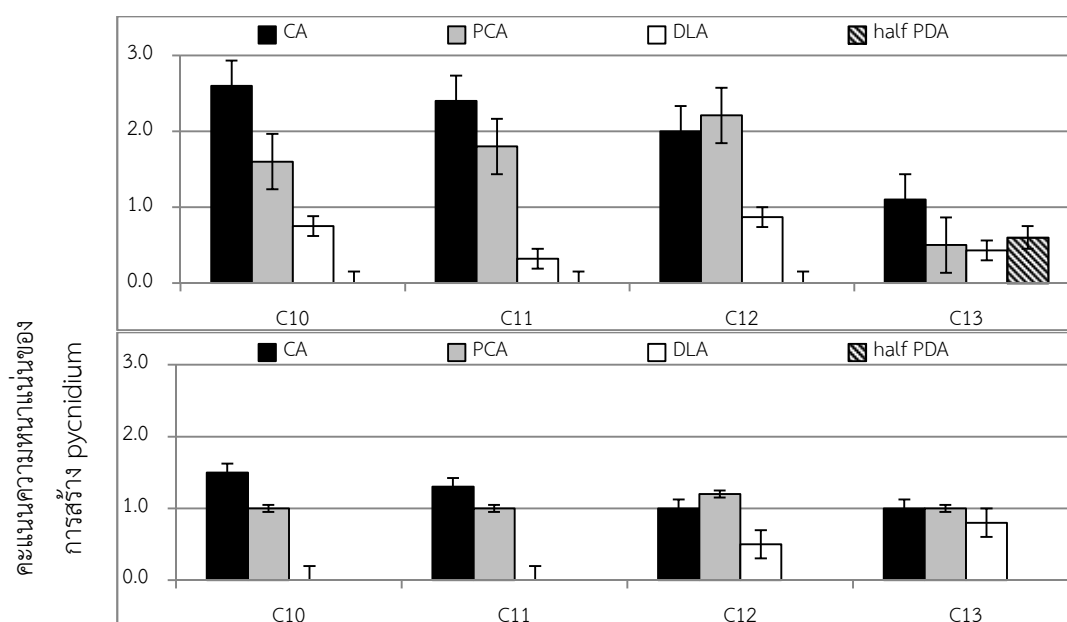
ภาพที่ 25 รัศมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด บ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิห้อง (25°C แสงสว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง) เป็นเวลา 5 วัน

(ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT)

4.2 ศึกษาการสร้างสปอร์ของเชื้อรา

4.2.1 การสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

หลังจากวัดการเจริญของเส้นใยในข้อ 4.1 เรียบร้อยแล้ว บ่มเชื้อต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งเริ่มมีการสร้าง pycnidium บนผิวหน้าอาหาร บันทึกระยะเวลาที่เริ่มสร้าง และความหนาแน่นของการสร้าง พบว่า เชื้อราทุกไอโซเลทที่บ่มในอุณหภูมิห้อง (28-32°C) มีการสร้าง pycnidium มากกว่าที่บ่มในอุณหภูมิต่ำ (25°C แสงสว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง) ซึ่งพบบนอาหาร CA และ PCA มากที่สุด (ภาพที่ 26) และเมื่อตรวจสอบปริมาณ pycnidium หลังจากบ่มเป็นเวลา 13 วัน พบว่ามีบางไอโซเลทอยู่ในช่วงระยะเริ่มสร้าง โดยสังเกตเห็นโครงสร้างขนาดเล็กนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร แต่อย่างไรก็ตามกว่าที่ pycnidium เหล่านั้นจะมีความสมบูรณ์และสร้างสปอร์พร้อมที่จะนำไปใช้ในการศึกษาได้ ใช้เวลาค่อนข้างนานประมาณ 30 วันขึ้นไป ซึ่งจะสังเกตเห็นกลุ่มสปอร์ (spore mass) สีครีมหรือขาวขุ่นถูกดันออกมาเป็นสายทาง ostiole ของ pycnidium (ภาพที่ 27) Sua *et al.* (2012) ได้กระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. บนอาหารหลายชนิด พบว่ามีอาหาร 3 ชนิดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ได้ คือ pine needle extracts plus 1/10-strength PDA medium, 1/10-strength PDA medium และ CaCO₃ water agar



เชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลทต่างๆ

ภาพที่ 26 ความหนาแน่นของการสร้าง pycnidium บนอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 30 วัน

(บน) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (28-32°C)

(ล่าง) บ่มที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (25°C แสงสว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง)

คะแนนความหนาแน่นของการสร้าง pycnidium

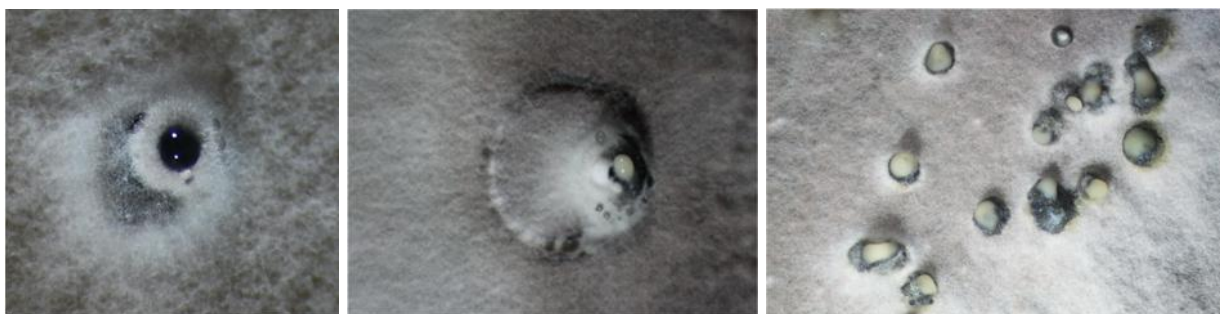
0 = ไม่พบการสร้าง pycnidium

1 = พบการสร้าง pycnidium เล็กน้อย

2 = พบการสร้าง pycnidium ปานกลาง

3 = พบการสร้าง pycnidium มาก

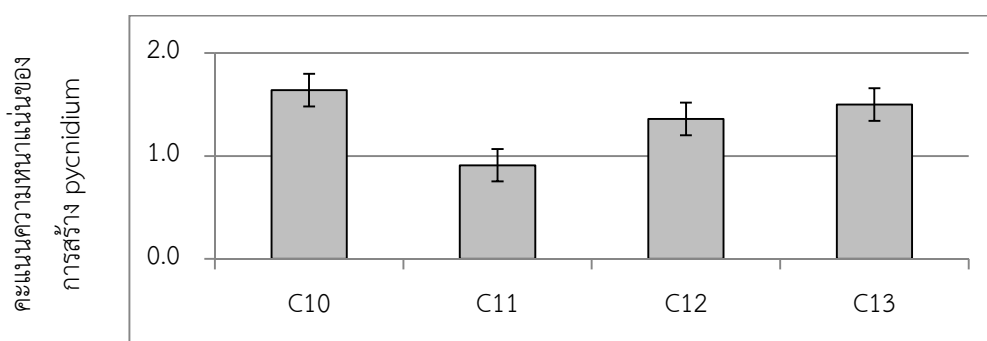
(เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



ภาพที่ 27 Pycnidia ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลต C10 บนอาหาร carrot agar ที่อายุ 30 วัน
(ซ้าย) pycnidium กำลังเริ่มสร้างสปอร์ภายใน จะมีน้ำใสๆ ถูกขับออกมาทางช่องเปิด (ostiole)
(กลาง, ขวา) กลุ่มสปอร์สีขาวพุ่งถูกปล่อยออกมาทาง ostiole

4.2.2 การสร้างสปอร์บนเนื้อเยื่อพืช

วางชิ้นส่วนของใบทุเรียนที่ถูกตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดพื้นที่ 1 ตร.ซม. ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปในจานอาหาร CA และ PCA (เป็นอาหารที่มีการสร้าง pycnidium มากที่สุด) บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32°C) ซึ่งเป็นสภาพที่มีการสร้าง pycnidium บนอาหารเลี้ยงเชื้อมากที่สุด เป็นเวลา 15 วัน พบว่า เชื้อราเริ่มมีการสร้าง pycnidium ที่ 5-6 วัน โดยไอโซเลต C10 มีการสร้างมากที่สุด (ภาพที่ 28) และกลุ่มสปอร์สีขาวพุ่งจะถูกดันออกมาจาก ostiole ได้ตั้งแต่วันที่ 10 เป็นต้นไป (ภาพที่ 29) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว พบว่าบนเนื้อเยื่อพืชจะทำให้เชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้เร็วขึ้นประมาณ 3 สัปดาห์ Onesirosan (1978) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis phaseolorum* ที่แยกได้จากกล้วยไม้ cymbidium สามารถกระตุ้นให้สร้างสปอร์ได้เป็นจำนวนมากบนชิ้นส่วนพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์



เชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลตต่างๆ

ภาพที่ 28 คะแนนการสร้าง Pycnidia ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลตต่างๆ บนเนื้อเยื่อใบพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ถูกวางบนอาหาร carrot agar ที่อายุ 15 วัน

คะแนนความหนาแน่นของการสร้าง pycnidium

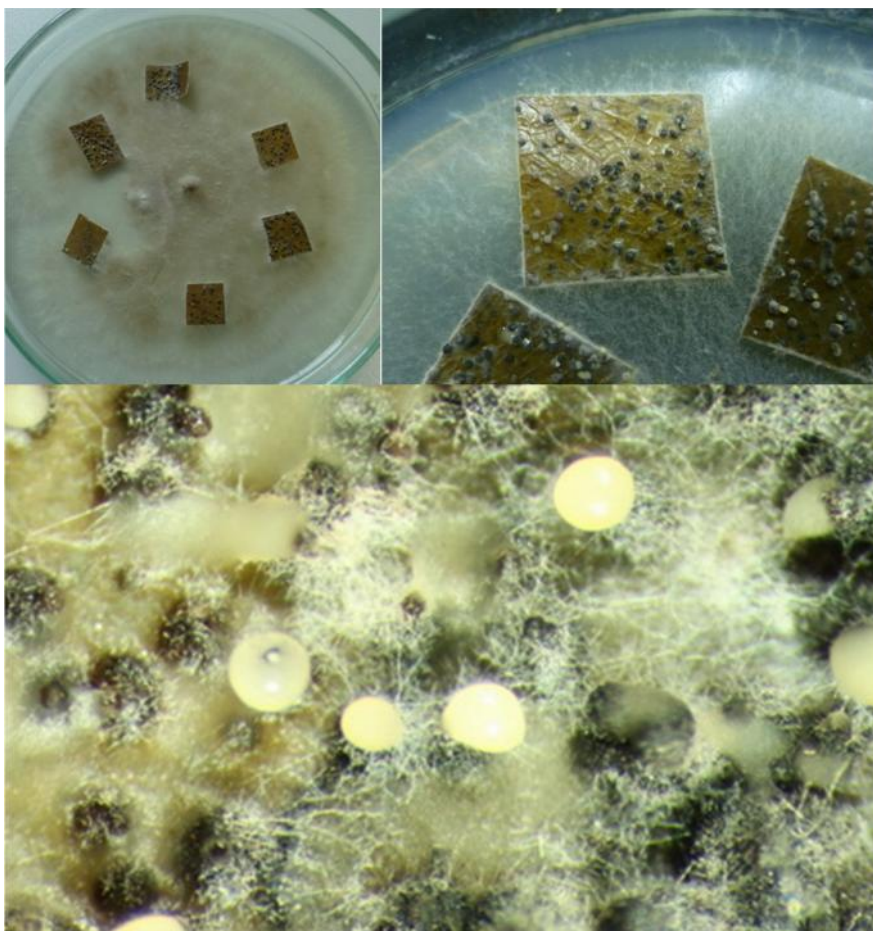
0 = ไม่พบการสร้าง pycnidium

1 = พบการสร้าง pycnidium เล็กน้อย

2 = พบการสร้าง pycnidium ปานกลาง

3 = พบการสร้าง pycnidium มาก

(เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



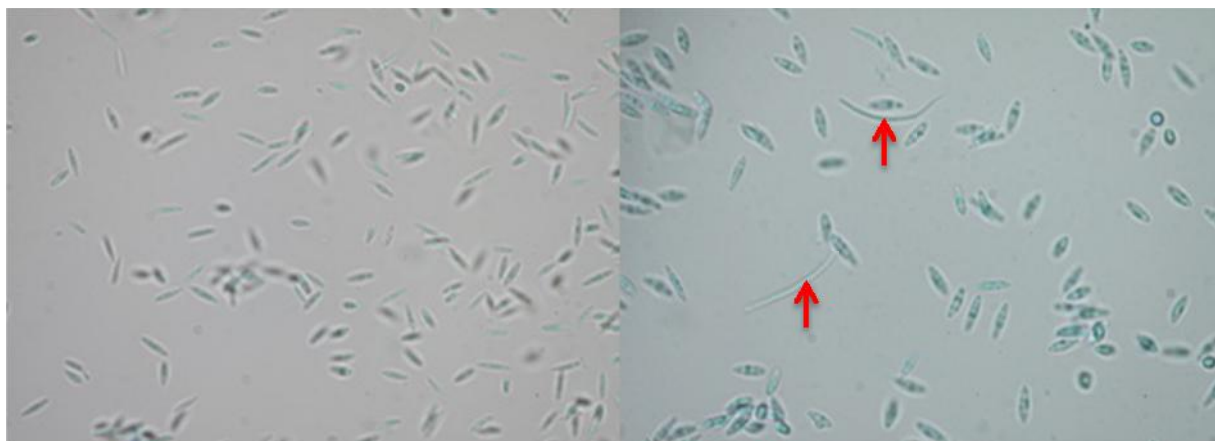
ภาพที่ 29 Pycnidia ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C10 ที่สร้างบนเนื้อเยื่อใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

(บน) บนอาหาร carrot agar ที่อายุ 10 วัน

(ล่าง) บนอาหาร half potato dextrose agar ที่อายุ 15 วัน

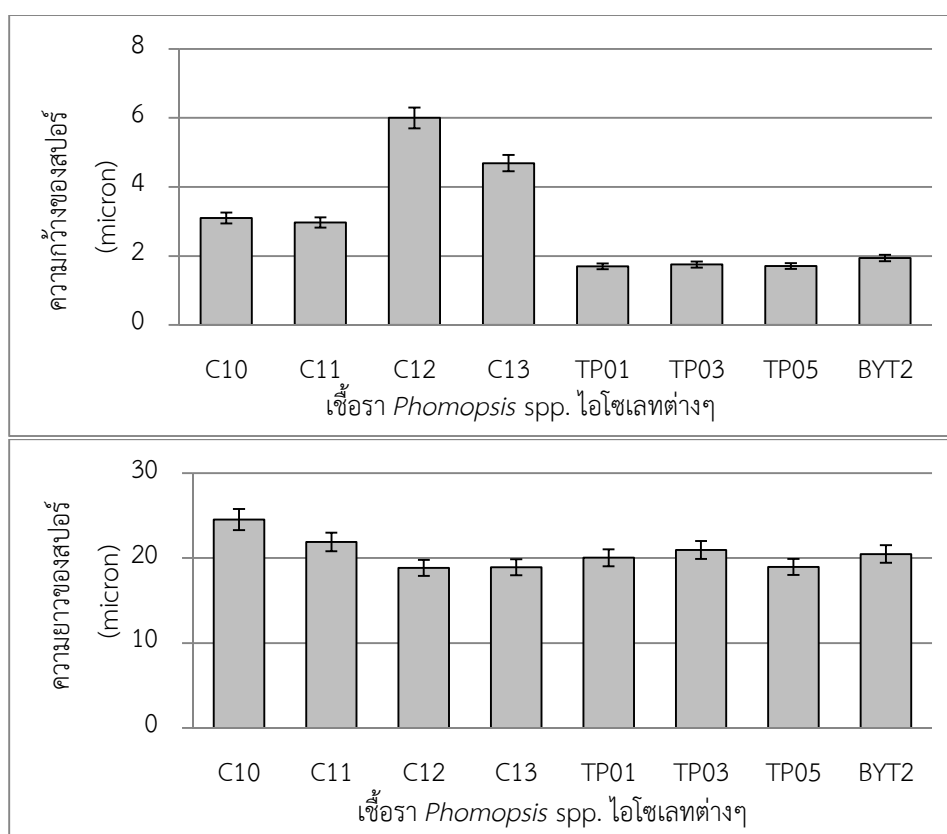
4.2.3 ขนาดสปอร์ของเชื้อรา

จากการวัดขนาดสปอร์ชนิดแอลฟา (α -conidia) ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. (ภาพที่ 30) ซึ่งเป็นชนิดของสปอร์ที่เชื้อรามีการผลิตมากที่สุด จำนวน 8 ไอโซเลทที่แยกได้จากอาการแผลจุดบนใบทุเรียนในเขตจังหวัดจันทบุรีและตราดด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป AxioVision Rel.4.8 พบว่า ขนาดสปอร์ที่วัดได้มีความหลากหลาย โดยไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี (ไอโซเลท C10 C11 C12 และ C13) มีขนาดสปอร์เฉลี่ยตั้งแต่ 3×18 ไมครอน ถึง 6×25 ไมครอน ส่วนไอโซเลทที่แยกจากจังหวัดตราด (ไอโซเลท TP01 TP03 TP05 และ BYT2) มีขนาดตั้งแต่ 1.7×19 ไมครอน ถึง 2×21 ไมครอน ซึ่งไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัดตราดจะมีขนาดแคบกว่าไอโซเลทที่แยกได้จากจันทบุรีอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 31) อย่างไรก็ตาม Sankaran *et al.* (1987) รายงานถึงขนาดสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis micheliae* มีความแปรปรวนค่อนข้างมากถึงแม้จะแยกได้จากพืชอาศัยชนิดเดียวกันก็ตาม



ภาพที่ 30 ลักษณะสปอร์ชนิดแอลฟาของเชื้อรา *Phomopsis* spp. (ซ้าย) ไอโซเลท TP01 จากจังหวัดตราด และ (ขวา) ไอโซเลท C10 จากจังหวัดจันทบุรี (100x)

ลูกศร : ลักษณะสปอร์ชนิดเบต้า (β -conidia) ซึ่งพบจำนวนน้อยมากหรือไม่พบเลยในหลายไอโซเลท

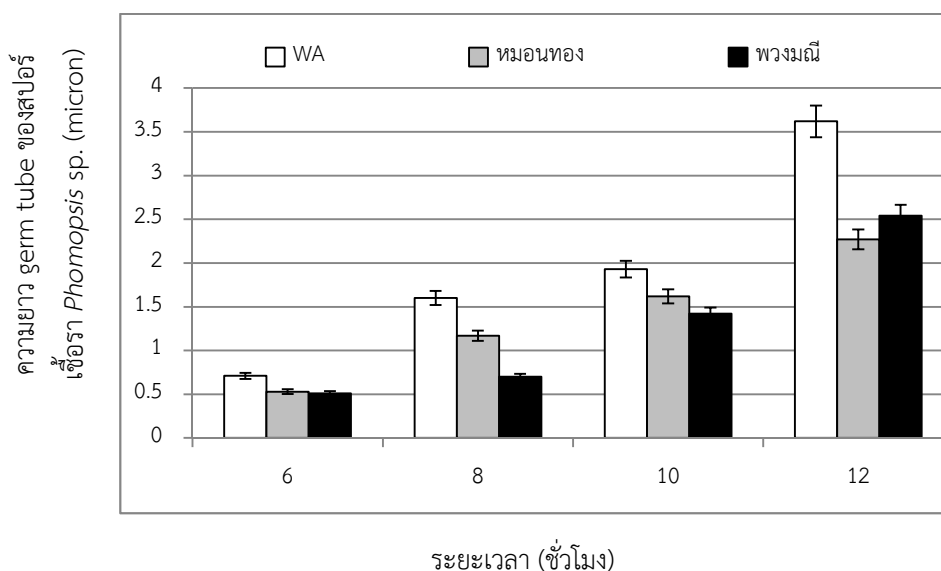


ภาพที่ 31 ขนาดความกว้าง (บน) และยาว (ล่าง) ของสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ไอโซเลทต่างๆ ที่แยกจากอาการใบจุดของทุเรียนพันธุ์หมอนทอง

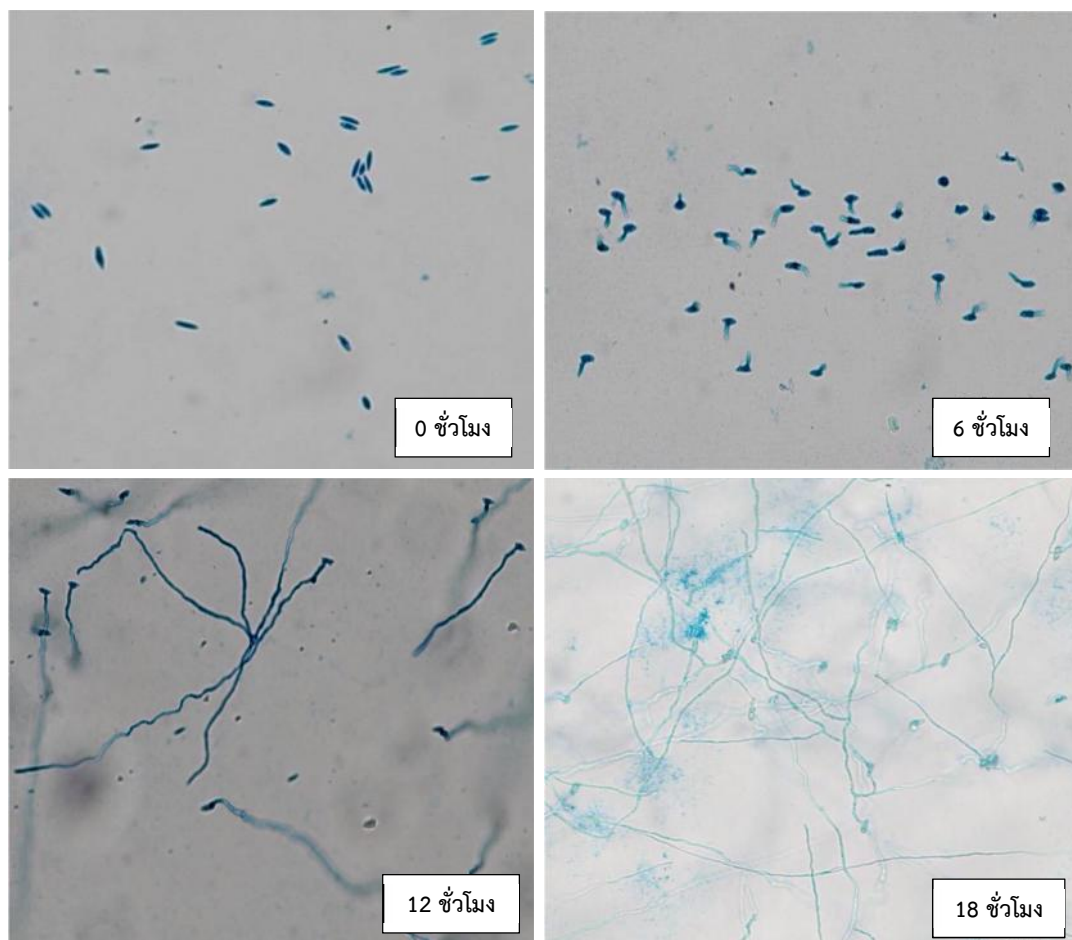
(เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าคลาดเคลื่อน 5 เปอร์เซ็นต์)

4.3 ศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* spp.

จากการทดสอบการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* sp. บนอาหาร WA และบนเนื้อเยื่อใบทุเรียน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์หมอนทองและพวงมณีในระยะเวลาต่างๆ พบว่า บนอาหาร WA เชื้อราสามารถงอก germ tube ได้เร็วกว่าบนใบทุเรียนทั้ง 2 พันธุ์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 โดยเฉพาะในชั่วโมงที่ 12 จะพบการยืดยาวของ germ tube บนอาหาร WA โดยพร้อมจะพัฒนาไปเป็นเส้นใยได้เร็วกว่าบนเนื้อเยื่อพืช (ภาพที่ 32 และ 33) ซึ่ง Yivkovi *et al.* (2007) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis* sp. ที่แยกได้จากต้นพลัม มีการเจริญของเชื้อและมีการงอกของสปอร์ได้ดีที่ระดับ pH 5.5 บนอาหาร PDA ที่บ่มในอุณหภูมิ 25°C ในขณะที่ Melanson and Brant (1999) รายงานว่าเชื้อรา *Phomopsis viticola* งอกและแทงเข้าสู่เนื้อเยื่อใบองุ่น ซึ่งในระยะแรกจะมีการเจริญของเส้นใยเฉพาะที่บริเวณใต้ชั้น epidermis โดยไม่มีการเจริญเข้าสู่ภายในเซลล์ และเนื่องจากเนื้อเยื่อใบทุเรียนมีการผลิตสารในกลุ่ม antifungal compound ตามผลการทดลองข้างต้น จึงมีโอกาที่เชื้อรา *Phomopsis* sp. จะถูกยับยั้งการเจริญเนื่องจากสารดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีการมีคุณลักษณะเข้าทำลายแฝงของเชื้อราชนิดนี้ในเนื้อเยื่อใบทุเรียน และสารในกลุ่ม antifungal compound ดังกล่าว จำเป็นต้องได้รับการวิเคราะห์ชนิดของสารต่อไป ซึ่ง Brown (1997) รายงานว่าในใบทุเรียนมีองค์ประกอบของสารเคมี hydroxytryptamines, mustard oils, saponin, fats และ formic acid โดยสารเคมีบางชนิดมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์



ภาพที่ 32 ความยาว germ tube ของสปอร์เชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลท C10 ที่งอกบนอาหาร water agar และบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง และพวงมณีที่ระยะเวลาต่างๆ (เครื่องหมายที่ปรากฏบนกราฟแสดงแถบค่าคลาดเคลื่อน 5 เปอร์เซ็นต์)



ภาพที่ 33 ลักษณะการงอกของสปอร์เชื้อรา *Phomopsis* sp. ไอโซเลต C10 บนอาหาร water agar ที่ 400X ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยที่

6 ชั่วโมง : สปอร์เริ่มงอก มี germ tube สั้น

12 ชั่วโมง : germ tube ยืดยาวมากขึ้น

18 ชั่วโมง : germ tube พัฒนาเป็นเส้นใย

บทที่ 5

สรุปและเสนอแนะ

ลักษณะการเกิดแผลจุดบนใบทุเรียนที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. มีความหลากหลาย โดยพบทั้งจุดขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลตั้งแต่ 1-10 มม. และเชื้อราสาเหตุโรคมีความแปรปรวนสูงในลักษณะสีของโคโลนี และการเจริญของเส้นใย ตลอดจนมีเชื้อราบางไอโซเลทเท่านั้นที่มีความสามารถในการก่อโรคบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ซึ่งส่วนมากเชื้อราจะทำให้พืชติดเชื้อได้ตรงบริเวณท้องใบมากกว่าหลังใบ นอกจากนี้ เชื้อรา *Phomopsis* spp. ยังมีคุณลักษณะในการเข้าทำลายแฝง โดยหลังจากเนื้อเยื่อใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองเกิดการติดเชื้อเป็นเวลา 32 วัน จะปรากฏอาการแผลจุดใหม่ซึ่งมีสีน้ำตาลแดงขนาด 1 มม. และมีวงแหวน (halos) สีเหลืองล้อมรอบแผล ซึ่งในสภาพธรรมชาติก็ยังพบการเข้าทำลายแฝงของเชื้อรา *Phomopsis* spp. ทั้งที่ใบ และดอกในทุกระยะการเจริญเติบโต เนื่องจากใบทุเรียนมีสารเคมีบางชนิดเป็นองค์ประกอบซึ่งสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์และลดความยาวของ germ tube ได้ เชื้อรา *Phomopsis* spp. แต่ละไอโซเลทมีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดแตกต่างกัน และเชื้อราที่บ่มในอุณหภูมิห้อง (28-32°C) มีการเจริญและสร้าง pycnidium ได้ดีกว่าที่บ่มในอุณหภูมิคงที่ (25°C) โดยบนอาหาร carrot agar และ potato carrot agar จะพบการสร้าง pycnidium มากที่สุด และ pycnidium ที่ถูกสร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจะสร้างสปอร์และปล่อยออกมาทาง ostiole ใช้เวลาประมาณ 30 วัน ส่วนการสร้าง pycnidium บนเนื้อเยื่อใบทุเรียนจะมีการสร้างสปอร์และปลดปล่อยออกมา ใช้เวลาเพียง 10 วันเท่านั้น เชื้อรา *Phomopsis* spp. ส่วนมากผลิตสปอร์ชนิดแอลฟาภายใน pycnidium และสปอร์ดังกล่าวมีการงอก germ tube บนอาหาร water agar ได้ดีกว่าบนเนื้อเยื่อใบทุเรียนทั้ง 2 พันธุ์ คือ หมอนทองและพวงมณี สำหรับขนาดของสปอร์ของเชื้อรา *Phomopsis* spp. พบว่าสปอร์ชนิดแอลฟาของเชื้อราที่แยกได้จากจังหวัดตราดมีลักษณะรูปร่างแคบกว่าเชื้อราที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี

อย่างไรก็ตาม การติดเชื้อจากเชื้อรา *Phomopsis* spp. ในใบทุเรียนทั้งพันธุ์หมอนทองและพวงมณี จะต้องได้รับการพิสูจน์อีกครั้งเพื่อยืนยันความแตกต่างถึงความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อดังกล่าว รวมทั้งควรมีการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารเคมีที่อยู่ในใบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค

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.
- 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.
- Islam, M.M., M. Asaduzzaman and M.B. Meah. 2010. Molecular characterization of *Phomopsis vexans* isolates of eggplant of Bangladesh. *J. Sci. Foundation*, 8(1&2): 131-140.
- 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.
- Luo, Y. and T.J. Michailides. 2003. Threshold conditions that lead latent infection to prune fruit rot caused by *Monilinia fructicola*. *Phytopathology* 93:102-111.
- Melanson, D. and B. Brant .1999. *Phomopsis*/grapevine disease interaction; a molecular investigation. SA Research and Development Institute and Cooperative Research Centre for Viticulture.
- 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.

- Onesirosan, P.T. 1978. Factors affecting sporulation by *Phomopsis phaeolorum*. Mycopathol. 64:23–27.
- Ormeno-Nuez, J., R.J. Reeleder and A.K. Watson. 1988. A foliar disease of Weld bindweed (*Convolvulus arvensis*) caused by *Phomopsis convolvulus*. Plant Disease 72: 338–342.
- 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.
- Pscheidt, J.W. and R.C. Pearson. 1991. *Phomopsis* cane and leaf spot of grape. Cornell Cooperative Extension, Department of Plant Pathology, NYS Agricultural Experiment station. 2 p.
- Rawnsley, B. 2003. *Phomopsis* cane and leaf spot of grapevine. FACT SHEET, www.pir.sa.gov.au/factsheets.
- Rawnsley, B. 2008. *Phomopsis* cane and leaf spot of grapevine. FACT SHEET, www.pir.sa.gov.au/factsheets.
- Rawnsley, B. and T. Wicks. 2002. *Phomopsis viticola*: pathogenicity and management. Grape and wine research and development corporation, South Australian Research and Development Institute (SARDI). 89 p.
- Sankaran, K.V., E. J.M. Florence and J. K. Shara. 1987. Two new species of *Phomopsis* from India. Trans. Br. mycol. Soc. 89: 404–405.
- Sua, Y.Y., Y.L. Qib and L. Cai. 2012. Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. Mycology 3: 195–200.
- Williamson, P.M., K. Sivasithamparam and W.A. Cowling. 1991. Formation of subcuticular coralloid hyphae by *Phomopsis leptostromiformis* upon latent infection of narrow-leafed lupins. Plant Disease 75: 1023–1026.
- Wyss, G.S. and R. Charudattan. 2000. Infection process of *Phomopsis amaranthicola* on *Amaranthus* spp. and implications for their biological control. In: Alfoldi, T., Lockeretx, W. (Eds.), The World Grows Organic. Proceedings of the 13th International IFOAM ScientiWc Conference, 28–31 August 2000, Basel, Switzerland, p. 187.
- Yivkovi, S.T., Stojanovi, S.D. and J. Bala. 1997. Characteristics of *Phimopsis* sp. isolates of plum trees origin. Matica Srpska Novi Sad, 113, 83–91.
- Yonghong, G. and D.I. Guest. 2011. Light and scanning electron microscopy studies on the infection process of melon leaves by *Colletotrichum lagenarium*. Physiological and Molecular Plant Pathology 76: 67–74.