

การจำแนกเชื้อรา *Embellisia allii* สาเหตุโรคเป็นด่างของกระเทียม
ที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน และการควบคุมด้วยน้ำโอโซน

Identification of *Embellisia allii* Causing Skin Blotch on Garlic Bulbs
Imported from The People's Republic of China and Controlling by Ozonated water

เทอดพันธุ์ ธรรมรัตน์พงษ์^{1/} สยาม ภพลือชัย^{2/} ศรัณย์ภัทร บุญมี^{3/} เควิน เดวิด ไฮด์^{3/}
Thurdpun Tummarattanapong^{1/} Siam Popluechai^{2/} Saranyaphat Boonmee^{3/} Kevin D. Hyde^{3/}

ABSTRACT

The study of skin blotch pathogen of garlic bulb imported from The People's Republic of China was carried out at Chiangsaen Plant Quarantine Station, Chiang Rai Province during January-August 2016. Symptom of skin blotch was detected in 15 of 187 samples of imported garlic bulbs. *Embellisia allii* was isolated as a key pathogen caused skin blotch symptom in all 15 defected samples using morphological and molecular characteristics. The molecular characteristic was investigated by a PCR and run with gel electrophoresis. The results showed that fungal DNA of 15 isolates were consisted of 315 base pairs. Obtained base sequence was compared to the Genbank database. It was found that skin blotch fungi from garlic base shared the same *E. allii* for 100 % identity. The *E. allii* is quarantine pest in Thailand, therefore control of *E. allii* must be concerned. Application of ozonated water at 1 g/h for 30, 45 and 60 min could reduce the spores germination of *E. allii* after 24 h of incubation at 0.75, 0 and 0% respectively. Moreover, application of ozonated water at 1 g/h for 30 min was completely inhibited skin blotch disease in garlic blub.

Key words: *Embellisia allii*, Skin blotch, Garlic, ozone

^{1/} สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Agricultural Regulatory Office, Department of Agriculture, Bangkok 10900

^{2/} สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย 57100

^{2/} School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100

^{3/} ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านการวิจัยเชื้อรา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย 57100

^{3/} Center of Excellence in Fungal Research, Mae Fah Luang University, Chiang Rai 57100

บทคัดย่อ

การศึกษาโรคเนื้องอกของกระเทียมที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ณ ด้านตรวจพืชเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมกราคม-สิงหาคม ปีพ.ศ.2559 โดยเก็บตัวอย่างกระเทียมที่นำเข้าทั้งหมด 187 ตัวอย่าง ตรวจพบกระเทียมที่แสดงอาการโรคเนื้องอก 15 ตัวอย่าง เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคเนื้องอก โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อราสาเหตุคือ *Embellisia allii* เพื่อยืนยันความถูกต้องจึงได้ทำการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 15 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค PCR และ ทำการแยกด้วย gel electrophoresis พบว่าเชื้อราทั้ง 15 ตัวอย่าง มีลำดับเบส DNA ขนาด 315 คู่เบส เมื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ปรากฏว่าเชื้อราที่แยกได้ของกระเทียมมีลำดับเบส ตรงกับเชื้อรา *E. allii* 100% และการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเนื้องอก โดยการแช่สปอร์ของเชื้อรา *E. allii* ในน้ำไอโซนที่ความเข้มข้น 1 ก./ชม. เป็นเวลา 30 45 และ 60 นาที หลังบ่มเชื้อไว้ 24 ชม. พบการงอกของสปอร์เชื้อรา *E. allii* เท่ากับ 0.75, 0 และ 0% ตามลำดับ ขณะที่การแช่หัวกระเทียมลงในน้ำไอโซนเป็นเวลา 30 45 และ 60 นาที พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคเนื้องอกได้ถึง 100%

คำสำคัญ: *Embellisia allii* โรคเนื้องอกกระเทียม น้ำไอโซน

คำนำ

กระเทียม (*Allium sativum* L.) เป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของประเทศไทย เพราะเป็นเครื่องเทศและสมุนไพรที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในอาหารไทยหลายชนิด และมีสรรพคุณทางยามากมาย เช่น สารอัลลิซินในน้ำมันหอมระเหยของกระเทียมช่วยลดระดับคอเรสเตอรอลในเลือด ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ และทำหน้าที่ต่อต้านแบคทีเรีย (Cetron *et al.*, 1996) ประเทศไทยมีความต้องการบริโภคกระเทียมสดและมีการนำไปแปรรูปกันมาก แต่การปลูกกระเทียมของประเทศไทย จะได้ผลผลิตดีในพื้นที่ทางภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีอากาศหนาวเย็นเป็นเวลาหลายเดือนต่อกัน ส่วนใหญ่จะปลูกได้เฉพาะช่วงเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน และเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ (นิรนาม, 2559) ดังนั้นปริมาณกระเทียมที่ผลิตได้ภายในประเทศจึงไม่เพียงพอสำหรับโรงงานแปรรูปที่ต้องการกระเทียมตลอดทั้งปี จึงได้มีการนำเข้ากระเทียมจากสาธารณรัฐประชาชนจีนในปริมาณที่มาก

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้กระเทียมเป็นสิ่งกักกัก (Restricted material) ดังนั้นในการนำเข้ากระเทียมเข้ามายังประเทศไทย ผู้นำเข้าต้องแจ้งการนำเข้า และต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary certificate) จากประเทศต้นทางกำกับมาด้วย ทั้งนี้สถิติการนำเข้ากระเทียมสดจากสาธารณรัฐ

ประชาชนจีน ในปี พ.ศ. 2558 ณ ด้านตรวจพืช เชียงแสน มีปริมาณการนำเข้าสูงถึง 28,704 ตัน คิดเป็นมูลค่า 159,934,715 บาท ซึ่งการนำเข้า กระเทียมปริมาณสูงเช่นนี้ มีโอกาสปนเปื้อนศัตรู พืชกักกัน หรือเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏ ในประเทศไทย เข้ามาแพร่ระบาดก่อความเสียหายให้กับผลิตผลทางการเกษตรภายในประเทศ ได้ เช่นที่ ประเทศอินเดีย Latha et al. (2007) ตรวจพบโรคเหี่ยวดำ สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Embellisia allii* (Campan.) E.G. Simmons ในกระเทียมที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ทั้งนี้เชื้อรา *E. allii* จัดเป็นเชื้อรากักกันในประเทศ อินเดีย สำหรับประเทศไทย เชื้อรา *E. allii* (Campan.) E.G. Simmons 1971 (ชื่อเดิมคือ *Helminthosporium allii* Campan. 1924) จัดเป็นเชื้อรากักกันในลำดับที่ 27 ตามประกาศ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรู พืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช ปี พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) ปี พ.ศ. 2550

เชื้อรา *E. allii* (*H. allii*) เป็นสาเหตุของ โรคเหี่ยวดำ (Skin blotch) หรือโรคแคงเกอร์ (Canker) ในพืชสกุลหอมและกระเทียม เชื้อรา ดังกล่าวพบแพร่ระบาดในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น (Taniguchi et al., 1994) เกาหลี (Hyang et al., 2002) และสาธารณรัฐประชาชนจีน (Latha et al., 2007) สำหรับประเทศไทยยังไม่พบรายงานการระบาดกับพืชปลูกภายในประเทศ Latha et al. (2007) ศึกษาอาการของโรคเหี่ยวดำที่ตรวจพบในกระเทียมนำเข้าจากสาธารณรัฐ ประชาชนจีน มายังประเทศไทย พบว่า

บริเวณกาบหุ้มกลีบ (sheathing leaf) ของ กระเทียมมีลักษณะเป็นปื้นสีดำ หรือพบอาการ ยุบตัวลงของเนื้อเยื่อบริเวณฐานของหัวกระเทียม เมื่ออาการของโรครุนแรงขึ้น เชื้อราจะเข้าไป เจริญบริเวณผิวของกลีบกระเทียม ทำให้มองเห็น ลักษณะเป็นพวงแป้งสีดำเกาะบริเวณผิว เมื่อนำ เชื้อรา *E. allii* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) พบลักษณะโคโลนี (Colony) เชื้อรา มีสีน้ำตาลดำ โคนิดิโอฟอร์ (Conidiophore) ไม่แตกแขนงหรือแตกแขนง (Branched) มีความกว้างตั้งแต่ 5-10 ไมโครเมตร และมีความยาวตั้งแต่ 100 ไมโครเมตร ขึ้นไป โคนิดิเอดีย (Conidia) มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาล เข้ม ผงงหนา ลักษณะรีหรือ รูปไข่ ขนาดความ กว้างตั้งแต่ 10-15 x 25-45 ไมโครเมตร และ Corlett (1996) พบเชื้อรา *E. allii* มีผนังกัน โคนิดิเอดียตามขวาง (Transverse septa) จำนวน 4-8 อัน อาจพบผนังกันโคนิดิเอดียตามยาว (Longitudinal septa) จำนวน 1-2 อัน นอกจากนี้ Koike and Rooney-Latham (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคเหี่ยวดำซึ่ง แยกได้จากกระเทียมที่ปลูกเป็นการค้าในรัฐ แคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยวิธีเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) บน Ribosomal DNA (rDNA) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS2 และเมื่อนำลำดับเบสของยีนเชื้อราที่ได้ไป วิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank สามารถจำแนกได้เป็น เชื้อรา *E. allii*

การควบคุมและการกำจัดศัตรูพืชมิให้เข้ามาระบาดภายในประเทศ ปัจจุบันด้านตรวจพืชนิยมใช้สารรมประเภท Methyl bromine เพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช และโรคหลังการเก็บเกี่ยว แต่เนื่องจากสาร Methyl bromine ผู้ใช้ที่สูดดมเข้าไปแม้ความเข้มข้นต่ำ จะก่อให้เกิดอาการเวียนศีรษะ ง่วงนอน สูญเสียการทรงตัว สายตาพร่ามัว เกิดภาวะปอดและไตวาย เพื่อความปลอดภัยของผู้เกี่ยวข้องปัจจุบันมีการศึกษาสารรมประเภทโอโซน (Ozone) ซึ่งเป็นก๊าซที่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์อย่างแรงกับจุลินทรีย์ และมีการสลายตัวอย่างรวดเร็ว จึงไม่มีปัญหาเกี่ยวกับสารพิษตกค้าง (Hibben and Stotzky, 1969) กลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยโอโซน เกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ คือ โมเลกุลของโอโซนเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารเคมีที่อยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ (Hunt and Marinas, 1999, Minasa *et al.*, 2010) หรือ อนุมูลตัวกลางอิสระ (Free radical-mediated) เป็นตัวเข้าทำลายทำให้เซลล์โป่งพองและแตก บางครั้งพบว่า โอโซนจะเข้าทำลายระบบหายใจ (Respiratory system) ของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโต (สิริพร, 2543; กานดาและคณะ, 2547) ดังนั้นเพื่อให้เป็นไปตามเจตนารมณ์ของพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2551 ในการสกัดกั้นการเคลื่อนย้ายของศัตรูพืชกักกัน หรือเป็นศัตรูพืชร้ายแรงที่ไม่มีปรากฏในประเทศไทย จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาชนิดของเชื้อราที่มีโอกาสติดมากับกระเทียมนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน มิให้เข้ามาระบาดภายใน

ประเทศ รวมทั้งศึกษาการใช้น้ำไอโซนในการควบคุมเชื้อรา เพื่อทดแทน methyl bromine ซึ่งเป็นสารรมที่ใช้ในการกำจัดศัตรูพืชในปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวดำของกระเทียมที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน

1.1 จำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สุ่มเก็บตัวอย่างกระเทียมสดทุกรุ่น (Lot.) ที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนตั้งแต่เดือนมกราคม-สิงหาคม 2559 จำนวน 5 กก. ต่อ Lot. คัดแยกกระเทียมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวดำในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Tissue transplanting โดยวางชิ้นส่วนของกระเทียมที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวดำลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) จำนวน 4 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ ภายหลังเมื่อเชื้อราเจริญแล้ว ศึกษาขนาด รูปร่างสปอร์ และลักษณะก้านชูสปอร์ ด้วยเทคนิค Slide culture โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5-7 วัน นำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound microscope บันทึกผลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวดำที่พบ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา *E. allii* (Campan.) E.G. Simmons 1971 ที่ Campanile (1924) และ Simmons (1971) ได้เคยรายงานไว้

1.2 จำแนกโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม

1.2.1 การเตรียมเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคเห็ดโคนดำกระเทียม

นำตัวอย่างกระเทียมสด ที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ที่ตรวจพบอาการโรคเห็ดโคนดำจากข้อ 1.1 มาแยกเชื้อราสาเหตุด้วยวิธี Tissue transplanting โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7-10 วัน ภายหลังเมื่อเชื้อราเจริญบนผิวหน้าอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลชุบเอาเส้นใยเชื้อรา เพื่อนำไปสกัด DNA ในขั้นตอนต่อไป

1.2.2 การสกัด DNA ของเชื้อราสาเหตุโรคเห็ดโคนดำ และสังเคราะห์ DNA ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และ gel electrophoresis

ดำเนินการสกัด DNA เชื้อราโรคเห็ดโคนดำตามวิธี Rapid Mini-Preparation of Fungal DNA for PCR ของ Liu *et al.* (2000) และสังเคราะห์ DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ primer (ITS1F-CTTGGTCATTTAGAGGAA GTAA และ ITS2R-GCTGCGTTCTTCATC GATGC) ประกอบด้วย 17 μ l, 10x buffer 2.5 μ l, 50 mM $MgCl_2$ 1.5 μ l, dNTP 0.5 μ l, primer 1 μ l, Tag DNA polymerase 0.5 μ l และ DNA ของเชื้อรา 2 μ l (รวมปฏิกิริยา 25 μ l) เริ่มขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที ภายหลังให้อุณหภูมิที่ 95 °C จำนวน 35 รอบ ๆ ละ 30 วินาที เมื่อเสร็จสิ้นแล้ว เริ่มขั้นตอน Annealing temperature ที่ 48 °C เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยขั้นตอน

Elongation ที่ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Final extension ที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดของ DNA product ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel กระแสไฟฟ้า ที่ 100V เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นย้อมด้วย Ethidium Bromide ส่องดูปฏิกิริยาด้วย Transluminator

1.2.3 การเปรียบเทียบลำดับเบสของผลผลิต DNA ของเชื้อรากับฐานข้อมูลใน GenBank

นำผลผลิต DNA ที่ได้จากข้อ 1.2.2 มาทำการตัดเจลที่แสดงผลของแต่ละตัวอย่างไปสกัด DNA ออกจากเจล โดยใช้ ชุดสกัดสำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction (Real Biotech Corp; RBC) ส่งตัวอย่าง DNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน ITS ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสกับบริษัท First Base Laboratories Sdn Bhd ประเทศสิงคโปร์ ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องมือ ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using ABI BigDye terminator chemistry นำลำดับเบส DNA ของเชื้อราโรคเห็ดโคนดำที่ได้ มาวิเคราะห์โคมาโตแกรม (Chromatogram) ด้วยโปรแกรม Chromas program และวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของรูปแบบยีน ด้วย SnapGene program หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจสอบข้อมูลใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ด้วยโปรแกรม Blast N (White *et al.*, 1990)

2. ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้น้ำโอโซนควบคุมโรคเห็บดำของกระเทียมที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน

2.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้น้ำโอโซนเพื่อยับยั้งการเจริญของสปอร์เชื้อรา

นำเชื้อราสาเหตุโรคเห็บดำ ที่แยกได้จาก ข้อ 1. เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 °C เป็นเวลา 7 วัน เติมน้ำกลั่นลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ ใช้แท่งแก้วชุดเฮาส์สปอร์ของเชื้อราให้หลุดออกจากอาหารแล้วใช้ผ้าขาวบางกรองเส้นใยเชื้อราออก ปรับความเข้มข้นของ Spore suspension ให้อยู่ที่ระดับ 1×10^6 สปอร์/มล. เตรียม Spore suspension จำนวน 20 มล. ใส่ลงในขวดทดลอง แล้วจุ่มสายยางเพื่อปล่อยก๊าซโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 1 ก./ชม. ลงใน Spore suspension เพื่อให้กลายเป็นน้ำโอโซน (Ozonated water) เป็นเวลา 0 นาที (ชุดควบคุม) 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 27 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจนับจำนวนสปอร์ที่งอกของแต่ละกรรมวิธีทดสอบ ด้วย Hemacytometer เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใช้น้ำโอโซน

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำโอโซนในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเห็บดำของกระเทียม

คัดเลือกหัวกระเทียมที่มีขนาดสม่ำเสมอ ไม่มีโรคและแมลงทำลาย จำนวน 20 หัว แกะกาบหุ้มกระเทียมออก นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง ใส่กระเทียมลงในน้ำปริมาตร 500 มล. ที่มี Spore suspension ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มล. อยู่แล้ว แล้วปล่อยก๊าซโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 1 ก./ชม. ลงใน Spore suspension เป็นเวลา 0 นาที (ชุดควบคุม) 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 ± 2 °C เป็นระยะเวลา 15 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่พบโรคเห็บดำทั้ง 2 ด้าน วัดทำมุมตั้งฉากกัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ/กรรมวิธี และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม สูตรคำนวณ ดังนี้

$$100 \left\{ \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางอาการโรคเห็บดำบนกระเทียมที่ควบคุมด้วยน้ำโอโซน} \times 100}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโรคเห็บดำบนกระเทียมที่เกิดจากชุดควบคุม}} \right\}$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคเห็บดำที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน

1.1 การจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการสุ่มเก็บตัวอย่างกระเทียมสดที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนโดยเรือขนส่งสินค้าตั้งแต่เดือนมกราคม-เดือนสิงหาคม ปี พ.ศ. 2559 พบว่ากระเทียมที่นำเข้าทุกตัวอย่างมีแหล่งปลูกอยู่ที่มณฑลยูนนาน (Yunnan) สามารถเก็บตัวอย่าง

กระเทียมได้ทั้งหมด 187 ตัวอย่าง ตรวจพบอาการโรคเน่าดำของกระเทียมจำนวน 15 ตัวอย่าง (8.03 %) โดยพบอาการบริเวณกาบหุ้มกลีบ (sheathing leaf) ของกระเทียมมีลักษณะเป็นปื้นสีดำ หรือพบอาการยุบตัวลงของเนื้อเยื่อบริเวณฐานของหัวกระเทียม และพบลักษณะเป็นผงแป้งสีดำเกาะบริเวณผิวของกลีบกระเทียม สอดคล้องกับรายงานของ Latha *et al.* (2007)

เมื่อนำเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบลักษณะโคโคนีเชื้อรามีสีน้ำตาลดำ ลักษณะโคนิดิโอฟอร์แตกแขนง มีความยาวตั้งแต่ 30-50 ไมโครเมตร มีความกว้างตั้งแต่ 5-10 ไมโครเมตร และมีความยาวตั้งแต่ 100 ไมโครเมตร ขึ้นไป ลักษณะ

โคโคนีเดียวมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม พนังหนา รูปร่างรีหรือทรงกระบอก หัวท้ายมน ขนาดความกว้างตั้งแต่ 10-15 x 25-45 ไมโครเมตร นอกจากนี้ สามารถพบผนังกันโคโคนีเดียวตามขวาง (Transverse septa) จำนวน 4-8 อัน และพบผนังกันโคโคนีเดียวตามยาว (Longitudinal septa) จำนวน 1-2 อัน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราโรคเน่าดำที่แยกได้จากกระเทียมนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน กับลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา *E. allii* (Campan.) E.G. Simmons 1971 ที่ Campanile (1924) และ Simmons (1971) ที่รายงานไว้พบว่ามีความคล้ายกัน (Figure 1 and Table 1)

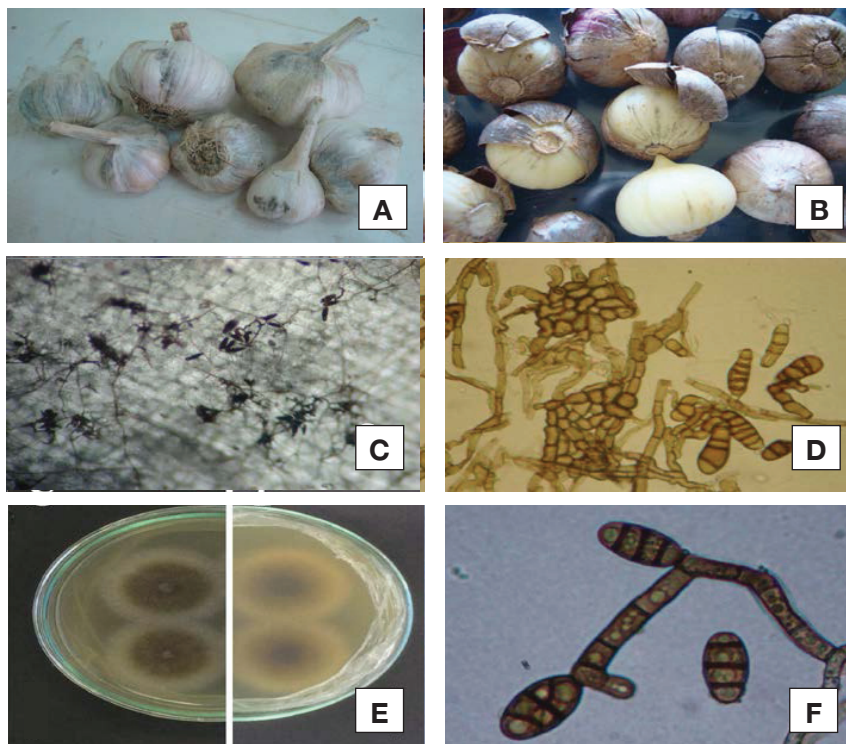


Figure 1 (A) Skin blotch on outer scale of garlic bulbs. (B) *Embellisia allii* infection on inner garlic clove. (C) Conidia on conidiophores in culture (x40). (D) Early multicellular chlamydospores present in culture. (x100) (E) Colonies on PDA from surface and reverse (5 Days) (F) Conidia and conidiophores of *E. allii*. (x400)

Table 1 Morphological characteristics of *Embellisia allii* isolated from garlic bulbs imported from the People's Republic of China

Characteristics	G. Campanile*	E. G. Simmons**	Present isolate
Colony	dark brown to black, velvety or powdery	blackish brown to black powdery	dark brown to black velvety or powdery
Conidiophores	simple or branched up to 100 μ m long and 5-10 μ m thick	simple or branched, mostly 30-45 μ m long, up to 100 μ m long, more long, solitary or in groups of two or more	simple or branched, mostly 30-50 μ m long, up to 100 μ m long, solitary or in groups of two or more
Conidia	ellipsoidal or subcylindrical, 10-15 $\times$ 2.5-4.5 μ m, very dark 3-6 transverse and 1 or 2 longitudinal septa	ellipsoidal or somewhat cylindrical, 9-12 $\times$ 2.4-3.6 μ m, thick walled 4 to 8 transverse and 0 to 2 longitudinal septa	ellipsoidal or subcylindrical, dark and thick walled 1 to 8 transverse and 1 or 2 longitudinal septa
Secondary conidiophores	short secondary conidiophores which bear conidia	secondary sporulation present in culture	secondary conidiophores which bear conidia
Chlamydospores	present on host plant, not so frequently in culture	present in culture	frequently present in culture

Source : * Campanile(1924) ** Simmons(1971)

1.2 การจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม

เมื่อนำเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวดำกระเทียม จำนวน 15 ตัวอย่าง ที่ผ่านการวินิจฉัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว พบว่า มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *E. allii* (Campan.) E.G. Simmons 1971 มาจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม พบว่า DNA ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาด 315 คู่เบส (Figure 2) และลำดับเบสของ DNA ของเชื้อราทั้ง 15 ตัวอย่าง ได้ผลดังแสดงใน Table 2 เมื่อนำลำดับเบสของเชื้อราทั้ง 15 ตัวอย่างไปเทียบกับข้อมูลของ GenBank พบว่ามีความ

คล้ายกับลำดับเบสของ เชื้อรา *E. allii* (Campan.) E.G. Simmons 1971 ที่ระดับ 100 % identity ทั้งนี้การจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวดำได้ผลเช่นเดียวกับ Koike and Rooney-Latham (2012) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคเหี่ยวดำ ซึ่งแยกได้จากกระเทียมที่ปลูกเป็นการค้าในรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) บน Ribosomal DNA (rDNA) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS2 และเมื่อนำลำดับ

เบสของยีนเชื้อราที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ
ฐานข้อมูลใน Genbank สามารถจำแนกได้เป็น
เชื้อรา *E. allii* โดยเชื้อรา *E. allii* (Campan.)
E.G. Simmons 1971 (ชื่อเดิมคือ *Helminthos*
porium allii Campan. 1924) ซึ่งจัดเป็นเชื้อรา

กักกันในลำดับที่ 27 ตามประกาศกระทรวง
เกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่ง
ต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507
(ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550

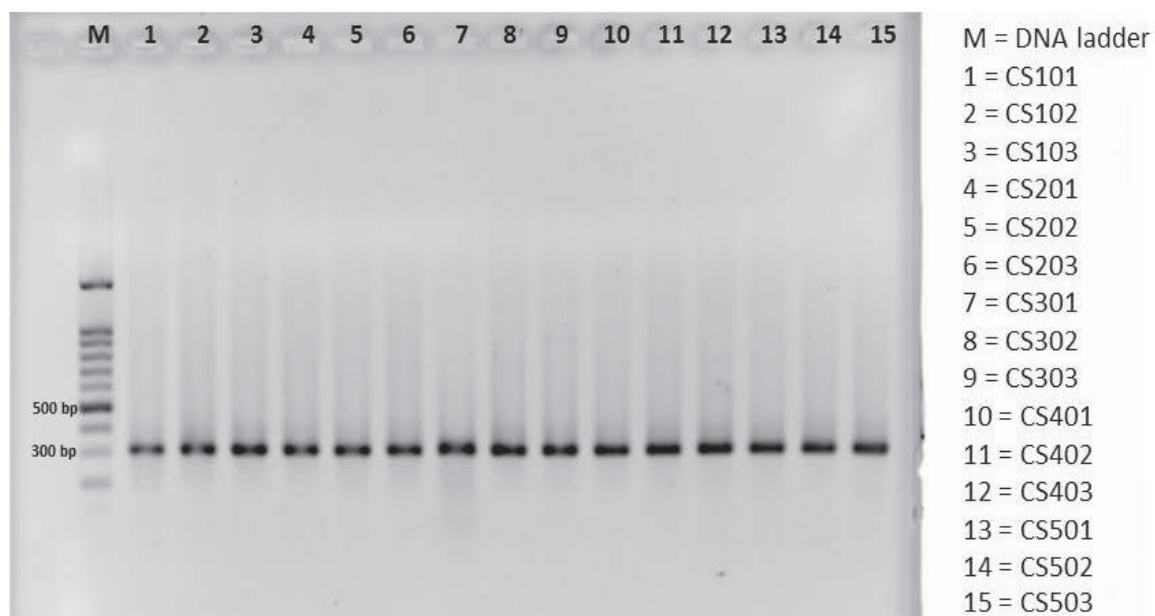


Figure 2 DNA fragments of the ITS regions of rDNA from fungal 15 isolates obtained after amplified with the pair of primers ITS1 and ITS2, Lane M was 100 bp-ladder DNA size markers, Lane 1-15 were DNA tissue of fungal 15 isolates (Product size = 315 bp)

Table 2 DNA sequencing of fungal causing skin blotch isolated from garlic bulbs imported from the People's Republic of China

Sequencing	Target size	NCBI BLAST*
5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCTCCGTAGGTG AACCTGCGGAGGGATCATTACACAATATGAAAGCGGGCTGGATACTCTG TAGTAGTGCAATTGCTGTACGGCGTGCCTGCTGGAGAGCCTGGCCTTGC TGAATTATTCACCCGTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGCT CGCCCGCCACATGGACAACCTATAAACCTTTTGTAAATAGCAATCAGCGT CAGTAACAACATAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTG GCATCGATGAAGAACGCAGC3'	315	<i>E. allii</i> (100% Iden.)

*NCBI = National Center for Biotechnology Information

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

2. ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้น้ำโอโซนควบคุมโรคเหี่ยวดำของกระเทียมที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน

2.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้น้ำโอโซนเพื่อยับยั้งการเจริญของสปอร์เชื้อรา

ประสิทธิภาพน้ำโอโซน (Ozonated water) ในการยับยั้งความงอกของสปอร์เชื้อรา *E. allii* สาเหตุโรคเหี่ยวดำที่แยกได้จากกระเทียมสดที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน พบว่าภายหลังการแช่สปอร์เชื้อรา *E. allii* ในน้ำโอโซนเป็นเวลา 30, 45 และ 60 นาที สามารถยับยั้งความงอกของสปอร์เชื้อรา *E. allii* ได้ คือ สปอร์ของเชื้อราสามารถงอกได้เพียง 0.75, 0 และ 0 % ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างทางด้านสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จากชุดควบคุมที่ไม่ได้แช่สปอร์เชื้อราในน้ำโอโซน และแช่สปอร์เชื้อราในน้ำ

โอโซน 15 นาที ที่พบว่า สปอร์ของเชื้อรา *E. allii* สามารถงอกได้สูงถึง 95.50 และ 94.50% (Table 3) สปอร์ที่แช่ในน้ำโอโซนเป็นเวลา 24 ชม. จะพบของเหลวภายในเซลล์ต้นสปอร์ของเชื้อราจนแตกเมื่อเส้นใยเชื้อรางอก จะมีลักษณะโป่งพองและผิดปกติ (Figure 3) ส่งผลให้เชื้อราไม่สามารถงอกเส้นใยตามปกติเพื่อเข้าทำลายพืชได้ Hunt and Marinas, 1999 และ Minasa *et al.*, 2010 รายงานว่า โมเลกุลของโอโซนเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารเคมีที่อยู่ในเซลล์จุลินทรีย์ หรืออนุมูลตัวกลางอิสระเป็นตัวเข้าทำลายทำให้เซลล์โป่งพองและแตกออก นอกจากนี้ (สิริพร, 2543 และ กานดาและคณะ, 2547) พบว่าโอโซนเข้าทำลายระบบหายใจ (Respiratory system) ของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญเติบโต

Table 3 Spore germination (%) of *Embellisia allii* after treated with ozonated water for 0 (Control), 15, 30, 45 and 60 min. then incubated at 27 °C for 24 hr

Time of exposure to Ozonated water (min.)	Spore germination (%)
0	95.50 b ^{1/}
15	94.50 b
30	0.75 a
45	0.00 a
60	0.00 a

^{1/} Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by DMRT

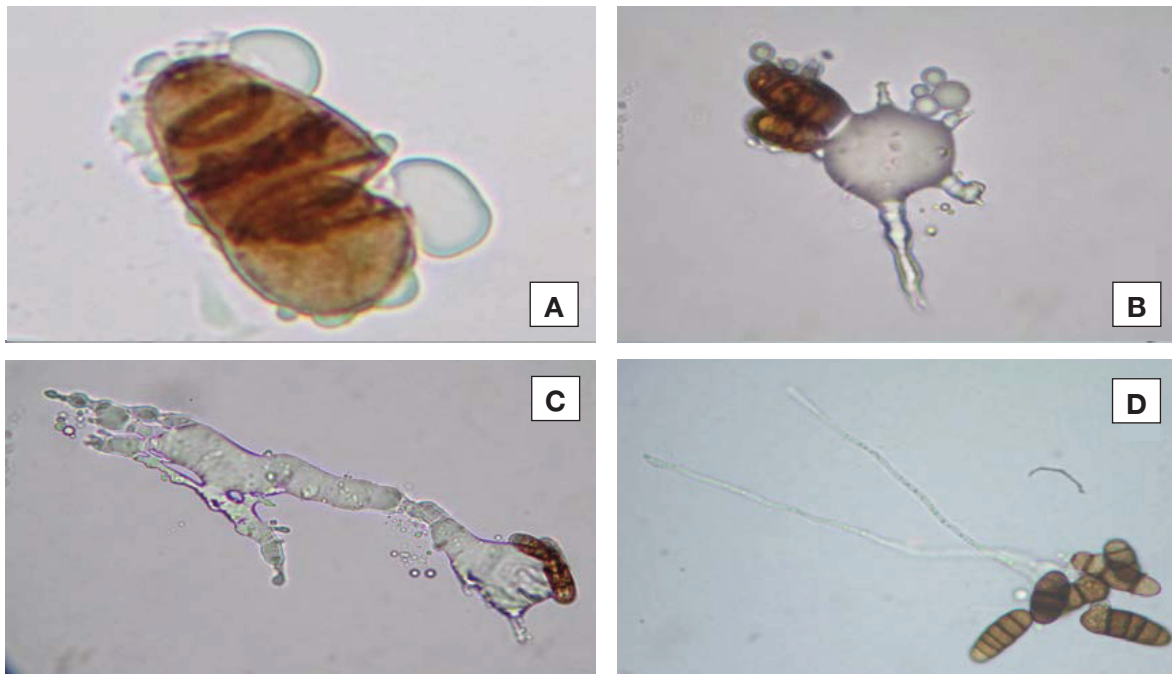


Figure 3 Swollen and abnormal hyphae of *Embellisia allii*, after treated by ozonated water at 30 (A), 45 (B), and 60 min. (C) after incubated at 27 °C for 24 hr compared to non-treated by ozonated water (normal hyphae) (D)

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้น้ำ โอโซนในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำ ของกระเทียม

กระเทียมสดที่แช่ในน้ำโอโซน ผสมสารแขวนลอยสปอร์ (Spore suspension) ของเชื้อ *E. allii* พบว่ากระเทียมสดที่แช่ในน้ำโอโซนเป็นเวลา 30 45 และ 60 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคได้ 100 % คือ ไม่พบอาการโรคเน่าดำบนหัวกระเทียม ซึ่งให้ผลแตกต่างทางสถิติจากการแช่กระเทียมสดลงในน้ำโอโซน เป็นเวลา 15 นาที ที่ยับยั้งการเกิดโรคได้เพียง 14.28 % โดยพบขนาดของโรคเน่าดำบนหัวกระเทียม เท่ากับ 2.10 ซม. ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติ จากชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่าน

โอโซนลงไปในน้ำ โดยพบขนาดของโรคเน่าดำบนหัวกระเทียมเท่ากับ 2.45 ซม. (Table 4, Figure 4) การแช่กระเทียมลงในน้ำโอโซน ระยะเวลาตั้งแต่ 30 นาที ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเกิดโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อรา *E. allii* ได้ เมื่อเพิ่มระยะเวลาการให้โอโซนกับน้ำมากขึ้น จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และสปอร์ของเชื้อราได้มากขึ้น (กานดาและคณะ, 2547) การผ่านโอโซนลงไปในน้ำ ทำให้อโอโซนเปลี่ยนคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์อย่างแรง มีความว่องไวในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้โอโซนยังสามารถสลายตัวเป็นออกซิเจนได้รวดเร็ว จึงทำให้อโอโซนเป็นสารกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปลอดภัยในอาหาร สำนักงานคณะกรรมการ

อาหารและยาของประเทศไทยสหรัฐอเมริกา (USDA)
จึงรับรองว่าโอโซนเป็นสารที่มีความปลอดภัย

ต่อผู้บริโภค จัดอยู่ในกลุ่ม Generally Recognized
as Safe (GRAS) (สิริพร, 2543)

Table 4 Disease inhibition (%) of *Embellisia allii* on artificially inoculated garlic bulbs when exposed to ozonated water for 0 (Control), 15, 30, 45 and 60 min. after stored at 10 °C for 15 days

Time of exposure to ozonated water (min.)	Diameter of lesion (cm.)	Disease inhibition %
0	2.45 b ^{1/}	-
15	2.10 b	14.28 b
30	0.00 a	100.00 a
45	0.00 a	100.00 a
60	0.00 a	100.00 a

^{1/} Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5 % level by DMRT

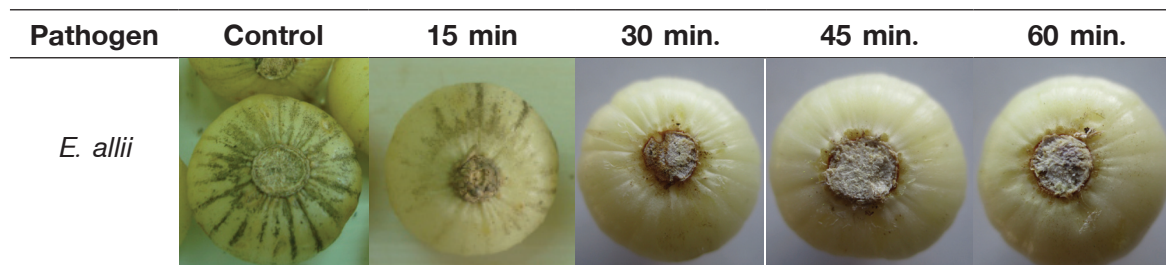


Figure 4 Effectiveness of ozonated water at 0 (Control), 15, 30, 45 and 60 min. for controlling *E. allii* causing skin blotch on garlic bulbs imported from the People's Republic of China after stored at 10 °C for 15 days

สรุปผลการทดลอง

กระเทียมที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ณ ด่านตรวจพืชเชียงใหม่ ตรวจพบโรคเนื้องาของกระเทียม ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Embellisia allii* (Campan.) E.G. Simmons 1971 จำนวน 8.02% (15/187) โดย

อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา และการจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางพันธุกรรม พบว่า DNA ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาด 315 คู่เบส ซึ่งเชื้อราชนิดนี้จัดเป็นเชื้อรากลุ่มในลำดับที่ 27 ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราช

บัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมไม่ให้เชื้อราเข้ามาระบาดในประเทศไทย โดยใช้วิธีการที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค ด้วยการแช่กระเทียมลงในน้ำโอโซนเป็นเวลา 30 45 หรือ 60 นาที พบว่าสามารถยับยั้งการเกิดโรคเน่าดำได้ เท่ากับ 100 % เนื่องจากโอโซนทำให้สปอร์เชื้อรา *E. allii* เกิดการแตก เส้นใยที่งอกจะมีลักษณะผิดปกติ จนไม่สามารถเจริญเพื่อเข้าทำลายพืชได้ตามปกติ ดังนั้นการใช้โอโซนจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการควบคุมโรคเน่าดำกระเทียม นอกจากนี้มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแล้วยังเป็นสารที่ใช้ได้อย่างปลอดภัย เป็นที่ยอมรับในระดับสากล

เอกสารอ้างอิง

- กานดา หวังชัย กอบเกียรติ แสงนิล และจำนงค์ อุทัยบุตร. 2547. การใช้โอโซนร่วมกับกรดอินทรีย์บางชนิดเพื่อทดแทนการรมด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในการควบคุมโรคลำไย. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 93 หน้า
- สิริพร สธนเสาวภาคย์. 2543. การใช้โอโซนเพื่อควบคุมความปลอดภัยของผักผลไม้สด. ว. วิทยาศาสตร์ 55: 20-22.
- Cetron, M.J., J.A. William and F.J. DeMicco. 1996. Restaurant renaissance : current and trends in food service. *The Futurist* 30 : 8-12.
- Campanile, G. .1924. Richerche sopra le conidizioni di attacco e di sviluppo di *Helminthosporium allii* su Aglio. *Staz. Sperm. Agrar. Ital.* 57:413–428.
- Corlett, M. 1996. *Embellisia allii*. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 486-487.
- GenBank. 2016. Available at : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed. Feb. 28, 2016.
- Hibben, C. R. and G. Stotzky. 1969. Effects of ozone on the germination of fungus spores. *Canad. J. of Micro.* 15(10): 1187-1196.
- Hunt, N. K. and B.J. Marinas. 1999. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. *Water Res.* 33: 2633-2641.
- Hyang, B. L., J. K. Chang and H. Y. Seung. 2002. First report of bulb canker of garlic caused by *Embellisia allii* in Korea. *Mycobiol.* 30:240-243.
- Koike, S.T and S. Rooney-Latham. 2012. First report of *Embellisia allii* causing skin blotch and bulb canker on garlic in california. *Plant Dis.* 96:291.

- Latha, S., N. Sathyanarayana and O.R. Reddy. 2007. Interception of *Embellisia allii* in garlic bulbs imported from China. *Indian Phytopath.* 60: 126-127.
- Liu, D., S. Coloe, R. Baird and J. Pedersen. 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J. Clinical Microbio.* 38: 471-471.
- Minasa, S.I., S. Oannis, K.S. George, M.A. George and V. Miltiadis. 2010. Effect of ozone application during cold storage of kiwifruit on the development of stem-end rot caused by *Botrytis cinerea*. *Post. Biol. Technol* 58: 203–210 .
- Simmons E.G. 1971. *Helminthosporium allii* as the type of a new genus. *Mycologia*. 63: 380–386.
- Taniguchi, Tadashi, Tohyama, Akira and A. Tsuda, T. Mitsuya. 1994. Bulb canker of garlic caused by *Embellisia allii*, newly found in Japan. *Mycosci.* 35: 421-424
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Page 315-322. In: Innis M.A., D.H. Gelfand. J.J. Sninsky and T.J. White. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc.