การศึกษาโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่ในประเทศไทย

Study on Crown Rot of Strawberry in Thailand

สุรชาติ คูอาริยะกุล[1] ชัยณรงค์ จันทร์แสนตอ[1]
Surachart Kooariyakul[1] Chainarong Chansaentor[1]

ABSTRACT

During 1992-1993, Strawberry (*Fragaria* x *ananassa* Duchesne) crown rot of cultivars Tioga and Florida 90 were observed and collected at the fruit production fields in Chiang Mai province (Mae Rim and Samoeng District) and Chiang Rai province (Mae Sai District). Infected plants were studied the symptom and isolated in laboratory. Potato dextrose agar (PDA) medium for isolating general fungi, selective medium N_5ARP (cornmeal agar amended with 5 ppm nystatin, 250 ppm sodium ampicillin, 10 ppm rifampicin and 100 ppm PCNB) and RNV (cornmeal agar amended with 500 ppm sodium ampicillin, 10 ppm rifampicin, 10 ppm benomyl, 25 ppm PCNB and 50 ppm nystatin) for isolating pythiaceous fungi were used. The infected plants, after being planted in fruit production fields, grew normally for some time, then wilted suddenly and died. A reddish brown, firm rot or reddish brown streaking occured in portions of the interiors of crowns of wilted plants. Isolations of the fungi with PDA medium from crown rot, the predominant fungal genera were *Colletotrichum* and *Fusarium*, the frequency of *Colletotrichum* associated with crown rot tissue were high. Isolations of the fungi from crown rot and root rot with N_5ARP medium, predominantly without fungal growth but found some *Colletotrichum* and *Pythium*. With RNV medium, either no fungal growth but also found some *Pythium*. Pathogenicity tests of the fungi isolated from crown rot, *Colletotrichum* 3 isolates on strawberry cv. Tioga confirmed the pathogenicity of *Colletotrichum*. The methods were plant spray with conidial suspensions and putting mycelial disc on the side of unwounded stem tissue. Some morphological studies of *Colletotrichum*, the causal organism of strawberry crown rot was *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.

บทคัดย่อ

ในปีพ.ศ. 2535-36 ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นสตรอเบอร์รี่ (*Fragaria* x *ananassa* Duchesne) พันธุ์ไทโอก้าและพันธุ์เมล็ดพริก ซึ่งแสดงอาการโรคกอเน่า จากสวนเกษตรกรในท้องที่ อ. แม่ริม อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่ และ อ. แม่สาย จ. เชียงราย มาศึกษาลักษณะอาการและแยกเชื้อเพื่อหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ โดยใช้อาหาร PDA สำหรับแยกเชื้อราทั่วไป และอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (selective medium) N_5ARP และ RNV สำหรับแยก Pythiaceous fungi ผลปรากฏว่าต้นสตรอเบอร์รี่ที่เป็นโรคกอเน่าใบแสดงอาการเหี่ยวอย่างรวดเร็วและตายในที่สุด เนื้อเยื่อส่วนกอด้านในมีลักษณะเน่าแห้ง (dry rot) และมีสีน้ำตาลแดง หรือเนื้อเยื่อบางส่วนเป็นแผลขีดและ *Fusarium* โดยพบเชื้อรา *Colletotrichum* มีความสัมพันธ์กับเนื้อเยื่อแผลกอเน่าในปริมาณสูง การแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อกอเน่าและรากเน่าด้วยอาหาร N_5ARP ส่วนใหญ่เชื้อไม่เจริญ และพบเชื้อรา *Colletotrichum* กับ *Pythium* อาหาร RNV ส่วนใหญ่เชื้อไม่เจริญ และพบเชื้อรา *Pythium* เมื่อนำ

(1) ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย 57000
Chiang Rai Horticultural Research Center, Muang District, Chiang Rai 57000

เชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 3 isolates ที่แยกได้จากแผลโรคกอเน่าดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับต้นสตรอเบอร์รี่พันธุ์ไทโอก้า โดยวิธีการพ่นสารละลายสปอร์ของเชื้อบนต้นสตรอเบอร์รี่ และวิธีใช้ mycelial disc ปลูกเชื้อบริเวณด้านข้างลำต้นโดยไม่ทำแผล เชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 isolates ทำให้ต้นสตรอเบอร์รี่แสดงอาการโรคกอเน่าได้ และมีลักษณะอาการเหมือนที่เกิดตามธรรมชาติ การแยกเชื้อซ้ำ (re-isolation) ได้เชื้อรา *Colletotrichum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคกอเน่าได้จำแนกเป็น *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. และ Sacc.

คำนำ

สตรอเบอร์รี่ (*Fragaria* x *ananassa* Duchesne) เป็นไม้ผลจัดอยู่ในวงศ์ Rosaceae ที่มีการนำเอาเข้ามาปลูกในประเทศไทยเป็นเวลานานหลายสิบปีแล้ว ปีหนึ่งๆ ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรนับเป็นเงินหลายสิบล้านบาท บริเวณพื้นที่ที่เหมาะสมในการปลูกสตรอเบอร์รี่ ได้แก่ จังหวัดทางภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย และจังหวัดใกล้เคียง เนื่องจากมีสภาพอากาศในฤดูหนาวเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตดี นอกจากนี้ยังมีการขยายพื้นที่การปลูกสตรอเบอร์รี่ไปปลูกในภาคอีสานตอนบนเช่นในท้องที่จังหวัดเลย เป็นต้น ซึ่งสตรอเบอร์รี่สามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตไม่น้อยกว่าในภาคเหนือ

อย่างไรก็ตาม การปลูกสตรอเบอร์รี่มักประสบปัญหาโรคกอเน่า (crown rot) อยู่เสมอ ซึ่งโรคกอเน่าดังกล่าวนี้พบเป็นกับสตรอเบอร์รี่ตั้งแต่ระยะผลิตต้นไหลบนดอยสูง และจะระบาดทำความเสียหายอย่างรุนแรงเมื่อเกษตรกรนำเอาต้นไหลมาปลูกเพื่อผลิตผลสตรอเบอร์รี่ในแปลงปลูกบริเวณพื้นล่างในราวปลายเดือนตุลาคม โดยจะเริ่มพบอาการภายหลังจากปลูกต้นไหลเป็นระยะเวลาหนึ่ง ทำให้เกษตรกรมีต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น เนื่องจากต้องเสียเงินเพื่อซื้อต้นไหลมาปลูกซ่อมต้นที่ตายไป

ในช่วงเดือนธันวาคมเป็นต้นไปจะพบสตรอเบอร์รี่เป็นโรคกอเน่าน้อยลง และจะพบโรคเน่าระบาดอย่างรุนแรงอีกครั้งหนึ่งในช่วงปลายฤดูปลูกราวเดือนมีนาคม ซึ่งสภาพอากาศเริ่มอบอุ่นขึ้น โดยเฉพาะภายหลังจากที่มีฝนตกหนักซึ่งสภาพอากาศทั่วไปมีความชุ่มชื้นสูง ทำให้ต้นสตรอเบอร์รี่ที่กำลังออกดอกติดผลเกิดความเสียหายเป็นจำนวนมาก

โรคที่มักพบเสมอ ก่อให้เกิดความเสียหายที่รากและกอของต้นสตรอเบอร์รี่ที่มีรายงานในต่างประเทศ ได้แก่ โรคไส้แดง (red stele root rot) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora fragariae* Hickman (Hickman, 1939) โรคกอเน่า (crown rot หรือ vascular collapse) มีสาเหตุจากเชื้อรา *P. cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet. (Rose, 1924)

- โรคกอเน่า (crown rot) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum fragariae* Brooks (Brooks, 1935)

- โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อรา *Verticillium* (Verticillium Wilt) มีสาเหตุจากเชื้อรา *V. albo-atrum* Reinke & Berth. (Thomas, 1931)

- โรครากเน่าดำ (Black root rot) มีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด (Coons,1924 ; Frank, 1920)

นอกจากนี้ยังมีโรคกอและตาเน่า (crown and bud rots) ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) d By. หรือ เชื้อรา *Rhizoctonia solani* Kuhn (Wilhelm, 1957) และโรค Aster yellows ที่มีสาเหตุจาก Aster yellow virus ซึ่งมีรายงานว่าทำให้ต้นสตรอเบอร์รี่เหี่ยวอย่างรวดเร็วและตายในช่วงที่มีอากาศร้อน (Fulton, 1957)

สำหรับในประเทศไทย วิชัย และธีระ (2518) รายงานโรคเหี่ยวของสตรอเบอร์รี่ที่เกิดจาเชื้อรา *Fusarium* sp. และโรครากเน่าและโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาโรคไส้แดงของสตรอเบอร์รี่ แต่ไม่พบเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรค (สมสิทธิ์ และคณะ, 2523; Suzui *et al.*, 1976) และในปี 2527 วิเชียรและคณะรายงานผลการศึกษาโรคลำต้นเน่าของสตรอเบอร์รี่ในภาคเหนือว่ามีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* Dastur. แต่ยังไม่เคยมีผู้ใดรายงานว่า

โรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่ที่พบระบาดอย่างกว้างขวางมีสาเหตุเนื่องจากเชื้ออะไร

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาลักษณะอาการ และหาสาเหตุของโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่ ชนิดที่พบระบาดก่อให้เกิดความเสียหายอย่างกว้างขวางต่อเกษตรกรผู้ปลูกสตรอเบอร์รี่ในประเทศไทย สำหรับเป็นแนวทางในการศึกษาเพื่อหาวิธีในการป้องกันกำจัดต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ต้นสตรอเบอร์รี่ที่เป็นโรคกอเน่า
2. ต้นไหลสตรอเบอร์รี่พันธุ์ไทโอก้าที่สมบูรณ์ปกติ
3. ดินปลูกผสมปุ๋ยคอกและขี้เถ้าแกลบ
4. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการโรคพืช
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) สำหรับแยกเชื้อราทั่วไป และอาหารเลี้ยงเฉพาะ (selective medium) สำหรับแยก Pythiaceous fungi N_5ARP (corn meal agar เติมด้วย nystatin 5 ppm, Sodium ampicillin 250 ppm, rifampicin 10 ppm และ PCNB 100 ppm) ดัดแปลงจาก P_5ARP ของ Jeffers and Martin (1986) โดยใช้ nystatin แทน pimaricin (Frank *et al.*, 1958; Struyk *et al.*, 1958) และ RNV (corn meal agar เติมด้วย Sodium ampicillin 500 ppm, rifampicin 10 ppm, benomyl 10 ppm, PCNB 25 ppm และ nystatin 50 ppm (Fujisawa and Masago, 1975)
6. ถุงพลาสติกสีดำ ขนาด 5x8 นิ้ว 18x30 นิ้ว

วิธีการ

1. การศึกษาลักษณะอาการของโรค ศึกษาลักษณะอาการของโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่พันธุ์ไทโอก้า และพันธุ์เมล็ดพริก ในสวนสตรอเบอร์รี่ของเกษตรกร

2. การแยกเชื้อเพื่อหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคกอเน่า สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นสตรอเบอร์รี่ที่เป็นโรคกอเน่าพันธุ์ไทโอก้า และพันธุ์เมล็ดพริก จากสวนสตรอเบอร์รี่ของเกษตรกรในท้องที่ อ. แม่สาย จ. เชียงราย จำนวน 11 แห่ง ออกเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง เมื่อวันที่ 13, 20 พฤศจิกายน 2535 และ 18 ธันวาคม 2535 ที่ อ. แม่ริม และอ. สะเมิง จ. เชียงใหม่ จำนวน 4 แห่ง ออกเก็บตัวอย่าง 1 ครั้ง เมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2535

นำตัวอย่างต้นสตรอเบอร์รี่ที่เป็นโรคมาแยกเชื้อ เพื่อหาเชื้อที่มีความสัมพันธ์กับแผลโรคกอเน่าโดยวิธี tissue transplanting ในห้องปฏิบัติการโรคพืช ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย โดยนำตัวอย่างต้นสตรอเบอร์รี่มาล้างน้ำเพื่อเอาดินออก แล้วล้างเนื้อเยื่อส่วนกอและรากในน้ำไหลต่อไปอีก เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นหั่นเนื้อเยื่อส่วนกอบริเวณรอยต่อของเนื้อเยื่อที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ขนาด 3-5 มม.

แบ่งตัวอย่างเนื้อเยื่อส่วนกอเป็น 2 ส่วนหนึ่งฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเนื้อเยื่อด้วยสารละลาย sodium hypochlorite 0.525% เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA อีกส่วนหนึ่งซับน้ำออกด้วยกระดาษซับแล้วนำไปเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเฉพาะ N_5ARP และ RNV พร้อมกับเนื้อเยื่อส่วนรากที่มีอาการเน่าโดยตัดให้ยาว 5 มม. และซับน้ำออกด้วยกระดาษซับ

บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหาร PDA ภายใต้อุณหภูมิ 25-30°C เป็นเวลา 3-5 วัน ส่วนจานเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ N_5ARP และ RNV บ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 22°C เป็นเวลา 5 วัน เมื่อเชื้อราเจริญบนอาหาร PDA ตัดปลายเส้นใยของเชื้อบริเวณขอบโคโลนีไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ในหลอดเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป ส่วนจานเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ตรวจลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใย ลักษณะ oospores และ sporangia (เฉพาะ Pythiaceous fungi) และเชื้อราชนิดอื่นที่อาจเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ N_5ARP ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราบริเวณขอบโคโลนีไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ในหลอดเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

3. จำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากแผลเนื้อเยื่อส่วนกอและราก ของสตรอเบอร์รี่ที่เป็นโรคกอ

เน่า จากแหล่งปลูกต่างๆ เพื่อประเมินชนิดและจำนวนของเชื้อราที่แยกได้โดยส่วนใหญ่เป็นร้อยละโดยใช้สูตร

$$\text{จำนวนเชื้อที่พบ (\%)} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่พบแต่ละชนิด}}{\text{จำนวนเนื้อเยื่อพืชทั้งหมดที่แยกเชื้อ}} \times 100$$

4. การพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรค (Proof of pathogenicity)

นำเชื้อรา *Colletotrichum* ที่แยกได้จากแผลโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่พันธุ์ไทโอก้าจากแหล่งปลูกใน อ. แม่สาย จ. เชียงราย จำนวน 3 isolates ได้แก่ isolate CR-11, CR-21 CR-22 มาแยกให้ได้สปอร์เดี่ยวโดยวิธี single spore isolation นำ culture ที่ได้จากสปอร์เดี่ยว (monoconidial culture) ไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกอเน่า (ดัดแปลงวิธีของ Delp and Milholland (1980) และ Smith and Black (1987))

การเตรียม inoculum เลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 3 isolates ที่เตรียมไว้บนอาหาร PDA:OMA =1:1 ในจานเลี้ยงเชื้อนาน 10 วัน ในสภาพอุณหภูมิ 25-28°C ภายใต้แสงฟลูโอเรสเซนต์+แสงใกล้เหนือม่วง นาน 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด เตรียม conidial suspension ให้มีความเข้มข้น 1.64 x10^6 conidia/ml และผสมสารจับใบ Tween 20, 0.1%v/v (2 หยด/ลิตร) ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย hemacytometer

การเตรียมต้นสตรอเบอร์รี่ ปลูกต้นไหลสตรอเบอร์รี่พันธุ์ไทโอก้า จำนวน 40 ต้น ในดินปลูกที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 90°C นาน 20 นาที บรรจุในถุงพลาสติกดำขนาด 5x8 นิ้ว ปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลานาน 6-8 สัปดาห์ก่อนปลูกเชื้อเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีเชื้อรา *Colletotrichum* ติดมากับต้นสตรอเบอร์รี่และดินปลูก ก่อนปลูกเชื้อ 1 วันตัดใบแก่ออกให้เหลือใบอ่อนจำนวน 2-4 ใบ เตรียมต้นสตรอเบอร์รี่สำหรับปลูกเชื้อ isolate ละ 5 ต้น

วิธีการปลูกเชื้อ มี 2 วิธี คือ

ก. การพ่นสารละลายสปอร์ของเชื้อบนพืช ใช้กระบอกพ่นมือ พ่น conidial suspension ของเชื้อแต่ละ isolate บนใบจนโชก ต้นที่ใช้เปรียบเทียบ (check) พ่นด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

ข. การใช้ mycelial disc ปลูกเชื้อบริเวณด้านข้างลำต้นโดยไม่ทำแผล ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ตัดเส้นใยของเชื้อบริเวณขอบโคโลนี นำ mycelial disc ของเชื้อไปแปะบริเวณข้างลำต้นของต้นสตรอเบอร์รี่ต้นละ 2 ชิ้นในทิศทางตรงกันข้ามให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อราสัมผัสกับเนื้อเยื่อลำต้นสตรอเบอร์รี่ ต้นที่ใช้เปรียบเทียบ (check) แปะด้วยชิ้นอาหาร PDA บริสุทธิ์

นำต้นสตรอเบอร์รี่ที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* และต้นที่ใช้เปรียบเทียบ (check) ทั้งสองวิธีการไปบ่มไว้ในถุงพลาสติกสีดำขนาด 18x30 นิ้ว ที่พ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อภายในถุงเพื่อให้มีความชื้นสัมพัทธ์ 95-100% อุณหภูมิภายในถุง 27-31°C ภายหลังการปลูกเชื้อทันที เมื่อบ่มไว้เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง นำออกจากถุงแล้วมาเลี้ยงไว้ในเรือนกระจก กลางวันเวลา 7:00 น. อุณหภูมิ 16.5-20.5°C (เฉลี่ย 18.6°C) และเวลา 16:00 น. อุณหภูมิ 22-31°C (เฉลี่ย 26.4°C) ในช่วงระยะเวลาภายหลังการปลูกเชื้อ 21 วัน

การแยกเชื้อซ้ำ (re-isolation) ฝ่าเนื้อเยื่อส่วนกอของต้นสตรอเบอร์รี่ที่แสดงอาการเหี่ยวและกอเน่าในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum* แต่ละ isolate แล้วตัดเป็นชิ้นจำนวนต้นละ 4 ชิ้น เพื่อแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อส่วนกอด้านใน วิธีการเช่นเดียวกับการแยกเชื้อเพื่อหาเชื้อสาเหตุจากเนื้อเยื่อกอเน่าของต้นสตรอเบอร์รี่โดยใช้อาหาร PDA

การบันทึกข้อมูล

4.1 ศึกษาอาการของต้นสตรอเบอร์รี่ ภายหลังการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 3 isolates เป็นระยะทุกสัปดาห์ไปจนกระทั่งต้นสตรอเบอร์รี่แสดงอาการเหี่ยว สังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏภายนอก และลักษณะอาการของเนื้อเยื่อส่วนกอด้านใน โดยผ่ากอของต้นสตรอเบอร์รี่ตามความยาว

4.2 จำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกเชื้อซ้ำได้ คำนวณปริมาณของเชื้อราแต่ละชนิดเป็นร้อยละเพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อกับเนื้อเยื่อส่วนกอของต้นสตรอเบอร์รี่ที่เป็นโรค

5.การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum*

นำเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่ isolate CR-11, CR-21 และ CR-22 มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ตามวิธีการของ Smith and Black. (1990) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนก species ของเชื้อรา *Colletotrichum* ดังนี้

5.1 ลักษณะ culture ย้ายชิ้น mycelial disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. วางกลับให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อสัมผัสกับอาหาร PDA บริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงเชื้อภายใต้แสงฟลูโอเรสเซ็นต์+แสงใกล้เหนือม่วงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง สลับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±1 °C ศึกษาลักษณะ culture ของเชื้อรา *Colletotrichum* แต่ละ isolate บนพื้นสีขาว ภายหลังเลี้ยงเชื้อนาน 8 วัน

5.2 ลักษณะ conidia เลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ภายใต้แสงฟลูโอเรสเซนต์+แสงใกล้เหนือม่วง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สลับความมืด 12 ชั่วโมง นาน 9-12 วัน จากนั้นเตรียม conidial suspension ในน้ำกลั่น ดูรูปร่างของ conidia จากจำนวน 100 conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งแบ่งเป็น 3 แบบ ได้แก่

ก) รูปกระสวย (fusiform)

ข) รูปทรงกระบอก (cylindrical) ปลายด้านหนึ่งมนด้านหนึ่งแหลม

ค) รูปทรงกระบอก ด้านหัวและท้ายมน

5.3 ขนาด conidia เลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* บนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ภายใต้แสงฟลูโอเรสเซนต์+แสงใกล้เหนือม่วง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สลับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±1 °C นาน 7 วัน วัดขนาดกว้าง x ยาว จำนวน 25 conidia จากการ subculture จำนวน 4 ครั้ง รวมเป็น 100 conidia ของเชื้อแต่ละ isolate

5.4 ลักษณะ appressoria เลี้ยงเชื้อบน slide ตามวิธีการของ Sutton (1980) ทำ slide culture โดยตัดอาหาร potato carrot agar (PCA) ขนาด 4 x 4 มม. วางบน slide ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายเส้นใยบนชิ้นอาหารวุ้นหรือใช้เข็มเขี่ยที่มี conidia ของเชื้อราแตะด้านข้างของชิ้นอาหาร PCA ทั้ง 4 ด้าน ปิดทับด้วย cover slipe เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อนาน 6-8 วัน ภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกับการศึกษาขนาดและรูปร่างของ conidia ตรวจดู appressoria อย่างน้อย 25 appressoria วัดขนาดกว้าง x ยาว และสังเกตรูปร่าง

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2535 - กันยายน 2536

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการของโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่

ต้นสตรอเบอร์รี่ที่ปลูกเพื่อผลิตผลสตรอเบอร์รี่ในบริเวณพื้นล่างระหว่างปลายเดือนตุลาคมถึงต้นเดือนเมษายน ภายหลังจากที่ปลูกต้นไหล พืชอาจเจริญเติบโตตามปกติเป็นระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นพืชจะเป็นโรคกอเน่า โดยเริ่มแรกใบสตรอเบอร์รี่จะแสดงอาการเฉา ต่อมาใบจะเหี่ยวอย่างรวดเร็วและตายในที่สุด

เมื่อผ่าส่วนกอของต้นสตรอเบอร์รี่ที่แสดงอาการเหี่ยว พบเนื้อเยื่อส่วนกอด้านในมีลักษณะเน่าแห้ง (dry rot) และมีสีน้ำตาลแดง (reddish brown discoloration) หรือเนื้อเยื่อของส่วนกอด้านในบางส่วนเป็นแผลขีดสีน้ำตาลแดง (Fig. 1) โรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่ที่ปรากฏในแหล่งปลูกสตรอเบอร์รี่ในภาคเหนือ มีลักษณะอาการเช่นเดียวกับโรคกอเน่าและเหี่ยวของสตรอเบอร์รี่ที่ Brooks เคยรายงานไว้ในปี ค.ศ.1935 ซึ่งในปี ค.ศ. 1931 Brooks ได้รายงานการพบโรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอร์รี่เป็นครั้งแรกว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum fragariae* Brooks เชื้อราดังกล่าวจะเข้าทำลายทุกส่วนของต้นสตรอเบอร์รี่ที่อยู่เหนือดิน ทำให้เกิดโรคหลายลักษณะอาการ

ได้แก่ ทำให้เกิดแผลบนก้านไหล ก้านใบ และกอ และทำให้พืชตายในที่สุด (Brooks, 1931 และ 1935, Carver and Horn, 1960; Horn and Carver, 1962 และ 1963) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดโรคผลเน่า (Howard, 1972) และโรคใบจุดดำ (Howard and Albregts, 1983)

ลักษณะอาการของเนื้อเยื่อส่วนกอด้านในที่มีแต้มสีแดงนี้ใช้เป็นลักษณะสำคัญในการวินิจฉัยโรคกอเน่า ซึ่งเป็นระยะหนึ่งของโรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอร์รี่ (Howard and Albregts, 1984b; Howard *et al.*, 1992) ซึ่งโดยปกติแล้วเนื้อเยื่อส่วนกอของสตรอเบอร์รี่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ไม่ว่าอะไรก็ตามที่ทำให้พืชตาย รวมทั้งที่ตายเนื่องจากโรคชนิดอื่นนอกจากโรคแอนแทรคโนสแล้วจะมีสีน้ำตาลเข้มและไม่มีแต้มสีแดง

อย่างไรก็ตามก็มีรายงานโรคเหี่ยวของสตรอเบอร์รี่ในประเทศไทย ว่ามีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* sp. (วิชัย และธีระ, 2518) โดยเนื้อเยื่อส่วนกอด้านในของต้นสตรอเบอร์รี่ที่เป็นโรค มีลักษณะเป็นวงสีน้ำตาลแดง ลักษณะอาการดังกล่าวคล้ายคลึงกับอาการโรคกอเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum fragariae* การศึกษาเพียงลักษณะอาการโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเกิดจากสาเหตุใด

2. การแยกเชื้อเพื่อหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคกอเน่า

การแยกเชื้อจากต้นสตรอเบอร์รี่พันธุ์ไทโอก้าและเมล็ดพริก ที่เป็นโรคกอเน่าจากเนื้อเยื่อพืชทั้งหมด 967 ชิ้น เป็นเนื้อเยื่อส่วนกอจำนวน 637 ชิ้น และเนื้อเยื่อส่วนรากจำนวน 330 ชิ้น ได้เชื้อราทั้งหมดจำนวน 11 ชนิด ยกเว้นที่ไม่สามารถจำแนกชนิด ชนิดของเชื้อราที่แยกได้โดยส่วนใหญ่จากจำนวนเชื้อราทั้งหมด แสดงไว้ใน Table 1

จากเนื้อเยื่อส่วนกอทั้งหมดจำนวน 637 ชิ้น เป็นเนื้อเยื่อส่วนกอที่แยกด้วยอาหาร PDA จำนวน 323 ชิ้น เชื้อราที่แยกได้เป็นจำนวนมากได้แก่ *Colletotrichum* เป็นจำนวน 51.7% รองลงมาได้แก่ *Fusarium* เป็นจำนวน 13.3% เป็นเนื้อเยื่อส่วนกอที่แยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ N_5ARP จำนวน 154 ชิ้น เชื้อราที่แยกได้จำนวนมากได้แก่ *Colletotrichum*, *Pythium* โคโลนีเรียบ และ *Pythium* โคโลนีแฉกรูปดาว จำนวน 29.2%, 11.0% และ 9.7% ตามลำดับ และเชื้อไม่เจริญเป็นจำนวน 38.9% เป็นเนื้อเยื่อส่วนกอที่แยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ RNV จำนวน 160 ชิ้น เชื้อราที่แยกได้เป็นจำนวนมากได้แก่ *Pythium* โคโลนีแฉกรูปดาว และ *Pythium* โคโลนีเรียบ เป็นจำนวน 20.6% และ 3.1% ตามลำดับ และเชื้อไม่เจริญเป็นจำนวน 73.1%

จากเนื้อเยื่อส่วนรากทั้งหมดจำนวน 330 ชิ้น เป็นเนื้อเยื่อส่วนรากที่แยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ N_5ARP จำนวน 170 ชิ้น เชื้อราที่แยกได้จำนวนมากได้แก่ *Pythium* โคโลนีเรียบ และ *Pythium* โคโลนีแฉกรูปดาว จำนวน 35.9% และ 23.5% ตามลำดับ และเชื้อไม่เจริญจำนวน 32.4% เป็นเนื้อเยื่อส่วนรากที่แยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ RNV จำนวน 160 ชิ้น เชื้อราที่แยกได้จำนวนมาก ได้แก่ *Pythium* โคโลนีเรียบ และ *Pythium* โคโลนีแฉกรูปดาวเป็นจำนวน 26.9% และ 25.0% ตามลำดับ และเชื้อไม่เจริญจำนวน 44.4%

การแยกเชื้อด้วยอาหาร PDA จากเนื้อเยื่อส่วนกอทั้งหมดที่เป็นโรคกอเน่า ได้เชื้อรา *Colletotrichum* เป็นจำนวนมากที่สุดสอดคล้องกับที่ Howard and Albregts (1984b) ได้อธิบายลักษณะอาการของโรคกอเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum fragariae* และใช้แต้มสีแดงบนเนื้อเยื่อแผลสีน้ำตาลของส่วนกอด้านในเป็นลักษณะสำคัญในการวินิจฉัยโรค ส่วนการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อเน่าและรากเน่าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ N_5ARP และ RNV มีจุดประสงค์เพื่อแยก Pythiaceous fungi ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ N_5ARP ได้ดัดแปลงมาจากสูตรอาหาร P_5ARP ของ Jeffers and Martin (1986) ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเอนกประสงค์ในการแยกเชื้อรา *Phytophthora* และ *Pythium* ได้หลาย species จากเนื้อเยื่อพืชและดิน โดยการดัดแปลงใช้สารปฏิชีวนะ nystatin แทน pimaricin ซึ่งสารปฏิชีวนะทั้งสองเป็นสารอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และมี

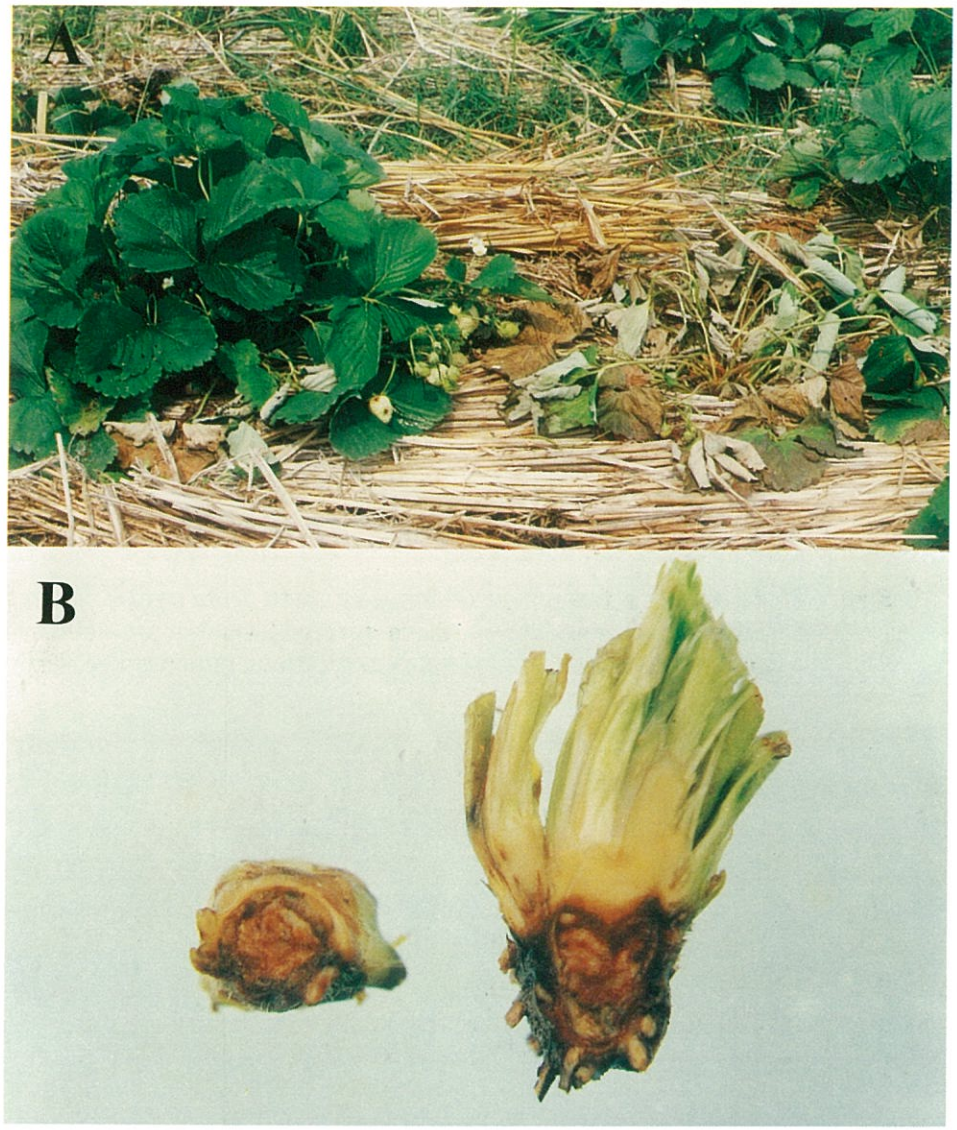

Figure 1. Symptoms of strawberry crown rot of cultivar Tioga

A : Healthy plant and wilted, dead plant in the field

B : Dry rot, reddish brown discoloration in interior of crown with cross and longitudinal sections

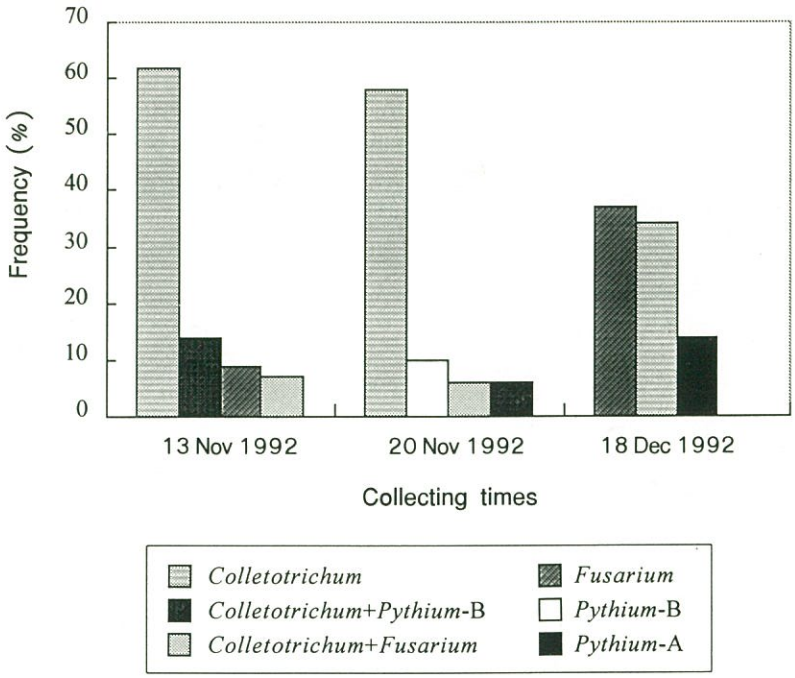

Figure 2. Percentage frequency of fungi isolated from crown tissues of strawberry crown rot cv. Tioga during November-December 1992 with PDA medium in Mae Sai District, Chiang Rai province growing areas.

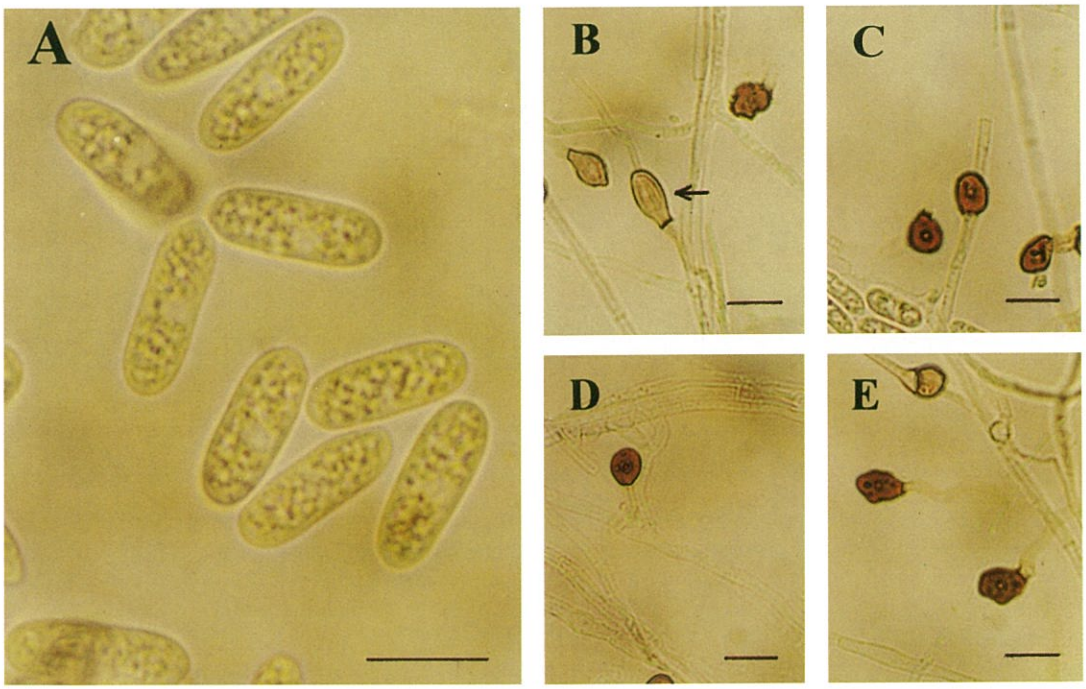

Figure 3. Conidial and appressorial shapes of *Colletotrichum gloeosporioides*
(A) Conidia formed in straight, cylindrical, apex obtuse and base truncate
(B) Appressoria formed in clavate
(C) Appressoria formed in ovate
(D) Appressoria formed in obovate
(E) Appressoria formed in lobed; Scale bars A-E = 10 micron

Table 1. Isolates number and percent frequency of fungi obtained from crown rot and root rot strawberry tissue cvs. Tioga and Florida 90. The plants came frome fruit production field in Chiang Rai and Chiang Mai provinces.

Cultivar	Location (Date)	Isolated part	Medium	No. of tissues	Fungal genera	Isolates (no.)	Frequency (%)
Tioga	Chiang Rai (13 Nov 1992)	crown	PDA	63	*Colletotrichum*	39	61.9
					Colletotrichum+Pythium-B	9	14.3
					Fusarium	6	9.5
					Colletotrichum+Fusarium	4	6.3
		crown	N_5ARP	58	*Colletotrichum*	18	13.0
					Pythium-A	8	13.8
					Pythium-B	7	12.1
					Colletotrichum+Pythium-A	4	69
					not growth	17	29.3
		root	N_5ARP	70	*Pythium*-A	33	47.1
					Pythium-B	22	31.4
					not growth	10	14.3
Tioga	Chiang Rai (20 Nov 1992)	crown	PDA	80	*Colletotrichum*	47	58.8
					Pythium-B	8	10.0
					Colletotrichum+Fusarium	5	6.3
					Colletotrichum+Pythium-B	5	6.3
		crown	N_5ARP	80	*Colletotrichum*	19	23.8
					Pythium-A	9	11.3
					Pythium-B	9	10.0
					not growth	39	48.8
		root	N_5ARP	80	*Pythium*-A	18	22.5
					Pythium-B	11	13.8
					not growth	45	56.3
Florida	Chiang Rai (1 Dec 1992)	crown	PDA	20	*Colletotrichum*	8	40.0
					Colletotrichum+Rhizoctonia	4	20.0
					Colletotrichum+Fusarium	3	15.0
		crown	N_5ARP	16	*Colletotrichum*	8	50.0
					not growth	4	25.0
		root	N_5ARP	20	*Pythium*-A	10	50.0
					Pythium-B	7	35.0
Tioga	Chiang Mai (1 Dec 1992)	crown	PDA	80	*Colletotrichum*	46	57.5
					Fusarium	7	8.8
					Colletotrichum+Pythium-B	6	7.5
		crown	RNV	80	*Pythium*-B	19	23.8
					not growth	58	72.5
		root	RNV	84	*Pythium*-A	29	34.5
					Pythium-B	18	21.4
					not growth	32	38.1
Tioga	Chaing Rai (18 Dec 1992)	crown	PDA	80	*Fusarium*	30	37.5
					Colletotrichum	27	33.8
					Pythium-A	11	13.8
		crown	RNV	80	*Pythium*-B	14	17.5
					Pythium-A	5	6.3
					not growth	59	73.8
		root	RNV	76	*Pythium*-B	22	28.9
					Pythium-A	14	18.4
					not growth	39	51.3

Pythium - A = *Pythium* smooth type colony
Pythium - B = *Pythium* chrysanthemum type colony

คุณสมบัติเหมือนกันในการยับยั้งเชื้อราส่วนใหญ่ที่เป็น non-pythiaceous fungi ในความเข้มข้นต่ำ แต่ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม Pythiaceous (Frank *et al.*, 1958; Struyk *et al.*, 1958) เนื่องจากสารปฏิชีวนะ nystatin สามารถหาได้ง่ายกว่า

การแยกเชื้อเพื่อหา Pythiaceous fungi จากเนื้อเยื่อส่วนกอและรากของสตรอเบอร์รี่ เนื่องจากโดยปกติแล้วรากและกอของสตรอเบอร์รี่มักจะถูกทำลายโดยเชื้อราหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่นเชื้อรา *Phytophthora fragariae, P. cactorum, Colletotrichum fragariae* และ *Verticillium albo-atrum* นอกจากนี้ยังมีโรคอื่นๆ อีกหลายโรค เช่นโรครากเน่าดำ ซึ่งเป็นโรคที่ไม่เกิดจากสาเหตุเฉพาะเพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดสภาพแวดล้อมเช่นน้ำท่วม หรืออุณหภูมิของดินถึงจุดเยือกแข็ง เกิดจากเชื้อรา ไส้เดือนฝอยรากแผลหรือหลายสาเหตุรวมกัน จุดประสงค์การแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะในครั้งนี้เพื่อหาเชื้อรา *P. cactorum* ที่อาจเป็นสาเหตุของโรคกอเน่า โดยไม่น่าจะเป็นโรคไส้แดง (red stele root rot) ที่เกิดจากเชื้อรา *P. frgariae* (Hickman, 1939) และโรครากเน่าดำที่เกิดจากสาเหตุหลายอย่างร่วมกัน เนื่องจากลักษณะอาการของโรคไม่เหมือน (Coons,1984; Frank, 1920)

ผลการแยกเชื้อทั้งเนื้อเยื่อกอเน่าและรากเน่าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะทั้ง N_5ARP และ RNV ไม่พบเชื้อรา *Phytophthora* แต่ได้เชื้อรา *Pythium* และยังได้เชื้อรา *Colletotrichum* จากเนื้อเยื่อส่วนกอที่แยกโดยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ N_5ARP ซึ่งโคโลนีเติบโตได้ช้ามาก และมีลักษณะไม่สมบูรณ์ อันเป็นผลมาจากสารปฏิชีวนะ nystatin ที่ยับยั้งเชื้อราชนิดนี้ไม่สมบูรณ์นัก นอกนั้นเป็นเนื้อเยื่อพืชที่เชื้อไม่เจริญมีจำนวน 32.4% ถึง 73.1%

ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับที่ Suzui *et al.* (1976) รายงานผลการแยกเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ RNV จากเนื้อเยื่อโรคกอเน่าและรากเน่าของสตรอเบอร์รี่ในประเทศไทย ที่พบแต่เชื้อรา *Pythium* และไม่พบ *Phytophthora* เลย การที่รากสตรอเบอร์รี่เน่าตาย และมีการพบเชื้อรา *Pythium* จากแผลรากสตรอเบอร์รี่ที่แยกเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะทั้ง N_5ARP และ RNV นอกจากที่พบว่าไม่มีเชื้อเจริญจากแผลรากสตรอเบอร์รี่ที่เน่าเป็นจำนวนมาก เชื้อรา *Pythium* น่าจะเป็นเชื้อราที่อาศัยโดยทั่วไปในดินบริเวณรอบๆ ราก (rhizosphere) ของสตรอเบอร์รี่ รากสตรอเบอร์รี่ที่เน่าตายจึงเป็นการเน่าตายตามธรรมชาติ ซึ่งโดยปกติแล้วรากฝอยของสตรอเบอร์รี่จะเน่าตายและสร้างรากขึ้นใหม่ทดแทนทุกๆ 2 สัปดาห์ (Wilhelm, 1984) ดังรายงานของ Watanabe *et al.* (1977) ที่แยกเชื้อจากรากของสตรอเบอร์รี่ ทั้งต้นที่เป็นโรคแสดงอาการแคระแกร็นและต้นที่สมบูรณ์ปกติ พบเชื้อรา *Fusarium*, *Pythium* และ *Rhizoctonia* เป็นจำนวน 60% ของเชื้อราทั้งหมด 58 สกุล โดยพบเชื้อรา *Pythium* ที่เป็นสาเหตุของโรคต้นแคระแกร็นจำนวน 7 species จากเชื้อรา *Pythium* จำนวน 14 species นอกนั้นเป็น saprophyte

นอกจากนี้ยังมีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกาว่าเชื้อราที่แยกได้จากรากสตรอเบอร์รี่ที่เป็นแผลพันธุ์ Surecrop มีเชื้อรา *Fusarium* spp., *Pythium* spp., และ *Rhizoctonia* spp. จำนวน 10.0, 25.1 และ 5.7% ตามลำดับ และพันธุ์ Cyclone เป็นจำนวน 11.6, 5.0 และ 25.9% ตามลำดับ (Nemec, 1970) แต่ในประเทศแคนาดาเชื้อรา *Fusarium* เป็นเชื้อที่พบมากจากเชื้อราจำนวน 38 สกุลที่มีความสัมพันธ์กับรากสตรอเบอร์รี่ที่สมบูรณ์ปกติจำนวน 9 พันธุ์ แต่แยกไม่ได้เชื้อรา *Pythium* เลย (Gourley, 1969)

การศึกษาปริมาณของเชื้อราที่แยกได้แต่ละชนิด จากเนื้อเยื่อกอเน่าของสตรอเบอร์รี่พันธุ์ไทโอก้าด้วยอาหาร PDA เฉพาะในท้องที่ อ. แม่สาย จ. เชียงราย ในระยะเวลาต่างๆ กันระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม (Fig. 2) ผลปรากฏว่าแยกได้เชื้อรา *Colletotrichum* ปริมาณมากที่สุด และจะค่อยๆ ได้น้อยลงในเดือนธันวาคม (ปริมาณแยกได้ตั้งแต่ 33.8% ถึง 61.9%) นอกจากนั้นยังแยกได้เชื้อรา *Colletotrichum* ร่วมกับเชื้อราชนิดอื่น ได้แก่ การแยกเชื้อเมื่อวันที่ 13 พฤศจิกายน 2535 ได้เชื้อรา *Colletotrichum+Pythium* โคโลนีแฉกรูปดาว และ

Colletotrichum+Fusarium จำนวน 14.3 และ 6.3% ตามลำดับ และแยกได้เชื้อรา *Fusarium* จำนวน 9.5% ซึ่งเชื้อรา *Fusarium* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลานานขึ้น ดังผลการแยกเชื้อเมื่อวันที่ 18 ธันวาคม 2535 พบเชื้อรา *Fusarium* มีจำนวนถึง 37.5% จะเห็นได้ว่าเชื้อรา *Colletotrichum* มีความสัมพันธ์กับแผลของโรคกอเน่ามากในระยะแรก ทั้งที่พบเดี่ยวๆ และพบร่วมกับเชื้อราชนิดอื่นๆ

นอกจากเชื้อรา *Fusarium* แล้วยังแยกได้เชื้อรา *Pythium* โคโลนีเรียบและโคโลนีแฉกรูปดาว ทั้งที่แยกได้เดี่ยวๆ และแยกได้ร่วมกับเชื้อรา *Colletotrichum* ซึ่งจากผลการแยกทั้ง 3 ครั้งได้เชื้อรา *Pythium* ปริมาณที่ไม่มากนัก (ปริมาณแยกได้ตั้งแต่ 13.8% ถึง 16.3%) เชื้อรา *Fusarium* และ *Pythium* ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อแผลกอเน่าของสตรอเบอร์รี่ โดยได้เชื้อรา *Fusarium* ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับเมื่อเวลานานขึ้น และได้เชื้อรา *Pythium* ในปริมาณสม่ำเสมอและไม่มากนัก เชื้อราทั้งสองชนิดดังกล่าวน่าจะเป็นเชื้อที่อาศัยโดยทั่วๆ ไป ในดินบริเวณรอบๆ รากพืช เมื่อสตรอเบอร์รี่เป็นโรคกอเน่าแล้วจึงเข้าร่วมทำลายในภายหลัง เนื่องจากส่วนกอของสตรอเบอร์รี่อยู่ติดหรือสัมผัสกับดินที่ปลูกมาก

3. การพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรค

การปลูกเชื้อต้นสตรอเบอร์รี่พันธุ์ไทโอก้าด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* โดยวิธีการพ่นสารละลายเชื้อบนพืช และการใช้ mycelial disc ของเชื้อแปะบริเวณลำต้นด้านข้างโดยไม่ทำแผลภายหลังการทดลองเป็นเวลา 5 วัน

วิธีการพ่นสารละลายเชื้อบนพืช เชื้อรา *Colletotrichum* ทุก isolates ทำให้ใบอ่อนสตรอเบอร์รี่แสดงอาการแผลจุดกลมเล็กๆ สีดำจำนวนมากมายบนใบ ต่อมาแผลจะขยายออกมีขนาด 0.5-2 มม. โดยไม่ทำให้ใบอ่อนนั้นตาย นอกจากนี้ยังเกิดอาการแผลสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำบริเวณขอบใบขนาดไม่แน่นอน มีรูปร่างค่อนข้างยาวไปตามขอบใบ และเกิดแผลบนก้านใบ (petiole lesion) แผลมีลักษณะสีดำยุบตัวลงเล็กน้อย ขนาดของรูปร่างไม่แน่นอน ต่อมาทำให้ก้านใบหักพับ ส่วนวิธีการใช้ mycelial disc ของเชื้อแปะบริเวณด้านข้างลำต้น เนื้อเยื่อบริเวณที่ปลูกเชื้อจะเป็นแผลสีน้ำตาลดำยุบตัวลงเล็กน้อย รูปร่างไม่แน่นอน การปลูกเชื้อทั้งสองกรรรมวิธีจะทำให้ต้นสตรอเบอร์รี่แสดงอาการเหี่ยวเมื่อเวลานานขึ้น โดยสตรอเบอร์รี่ที่จะทยอยแสดงอาการเหี่ยวตามความยาว เนื้อเยื่อส่วนกอด้านในมีลักษณะเน่าแห้ง และมีสีน้ำตาลแดง ลักษณะอาการของโรคเหมือนที่ปรากฏในธรรมชาติ

ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคต้นเหี่ยวและกอเน่าครั้งนี้ ได้ศึกษาโดยใช้วิธีการปลูกเชื้อ 2 วิธีได้แก่

ก) การพ่นสารละลายเชื้อบนพืช

ข) การใช้ mycelial disc ปลูกเชื้อบริเวณด้านข้างลำต้น

วิธีการพ่นสารละลายเชื้อบนพืชสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum* จะไหลเข้าไปในส่วนกอของต้นสตรอเบอร์รี่ ทำให้ต้นสตรอเบอร์รี่แสดงอาการเหี่ยวตายภายในเวลา 14-28 วัน ซึ่งเวลาในการพัฒนาอาการของโรคมีลักษณะใกล้เคียงกันที่ปรากฏในธรรมชาติ ส่วนการใช้ mycelial disc ปลูกเชื้อบริเวณด้านข้างลำต้นทำให้ต้นสตรอเบอร์รี่แสดงอาการเหี่ยวตายภายในเวลา 21-63 วัน ซึ่งช้ากว่าวิธีแรก แม้ว่าในการศึกษาทดลองอุณหภูมิในขณะบ่มใน moist chamber และในเรือนกระจก จะไม่สามารถควบคุมให้คงที่ได้ ซึ่ง Smith and Black (1987) ได้รายงานว่าเมื่อปลูกเชื้อแล้วควรบ่มต้นสตรอเบอร์รี่ไว้ใน moist chamber เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32-35°C จากนั้นเลี้ยงไว้ในเรือนเพาะชำที่อุณหภูมิ 32°C จะทำให้เกิดโรคได้ดีที่สุด

การปลูกเชื้อวิธีพ่นสารละลายเชื้อบนใบสตรอเบอร์รี่ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคจึงเป็นวิธีที่สามารถปฏิบัติได้ง่ายและใกล้เคียงกับการเกิดโรคกอเน่าของต้นสตรอเบอร์รี่ในสภาพธรรมชาติมากที่สุด

ผลการแยกเชื้อซ้ำจากเนื้อเยื่อกอเน่าด้านในของต้นสตรอเบอร์รี่ ที่ปลูกเชื้อโดยวิธีการพ่นสารละลายสปอร์บนพืช (Table 2) พบว่า

Table 2. Fungi re-isolated from internally crown rot tissue in pathogenicity tests of *Colletotrichum* isolated from strawberry crown rot, each isolate was carried on 5 plants.

Colletotrichum isolate	Fungal gener isolates									
	C	*C+Cm*	*C+F*	*C+Py*	*C+R*	*Cm*	*F*	*F+R*	*R*	*R+Cm*
.Conidial suspensions spraying method										
CR-11	13	-	-	-	3	-	2	-	2	-
CR-21	11	-	2	-	2	1	2	1	-	1
CR-22	9	1	2	4	3	-	-	-	1	-
Total	33	1	4	4	8	1	4	1	3	1
Frequency (%)	55.0	1.7	6.7	6.7	13.3	1.7	6.7	1.7	5.0	1.7
Mycelial disc on unwounded stem tissues method										
CR-11	7	2	3	-	4	2	-	1	-	1
CR-21	13	-	1	-	2	1	2	1	-	-
CR-22	12	3	-	-	3	1	1	-	-	-
Total	32	5	4	-	9	4	3	2	-	1
Frequency (%)	53.3	8.3	6.7	-	15.0	6.7	5.0	3.3	-	1.7

**C = Colletotrichum* *C+Cm = Colletotrichum+Cylindrocladium*
C+F = Colletotrichum+Fusarium *C+Py = Colletotrichum+Pythium*
C+R = Colletotrichum+Rhizoctonia *Cm = Cylindrocladium*
F = Fusarium *F+R = Fusarium+Rhizoctonia*
R = Rhizoctonia *R+Cm = Rhizoctonia+Cylindrocladium*

การปลูกเชื้อโดยการพ่นสารละลายสปอร์บนพืช เชื้อราที่แยกได้มากที่สุดได้แก่ *Colletorichum* เป็นจำนวน 55.0% รองลงมาได้แก่ *Colletotrichum+Rhizoctonia*, *Colletotrichum+Fusarium*, *Colletotrichum+Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Colletotrichum+Cylindrocladium*, *Cylindrocladium*, *Fusarium+Rhizoctonia* และ *Rhizoctonia+Cylindrocladium* เป็นจำนวน 13.3, 6.7, 6.7 ,6.7, 5.0, 1.7, 1.7, 1.7 และ 1.7% ตามลำดับ

การใช้ mycelial disc ของเชื้อ ปลูกเชื้อบริเวณด้านข้างลำต้นโดยไม่ทำแผล เชื้อราที่แยกได้มากที่สุดได้แก่ *Colletotrichum* เป็นจำนวน 53.3% รองลงมาได้แก่ *Colletotrichum+Rhizoctonia*, *Colletotrichum+Cylindrocladium*, *Colletotrichum+Fusarium*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Fusarium+Rhizoctonia* และ *Rhizoctonia+Cylindrocladium* เป็นจำนวน 15.0, 8.3, 6.7, 6.7, 5.0, 3.3 และ 1.7% ตามลำดับ

การแยกเชื้อซ้ำจากต้นสตรอเบอร์รี่ที่แสดงอาการต้นเหี่ยวและกอเน่าที่ปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้งสองกรรมวิธีได้เชื้อรา *Colletotrichum* เป็นจำนวนมากที่สุด สรุปว่า เชื้อรา *Colletotrichum* เป็นสาเหตุของโรคกอเน่า

4. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum*

ผลการศึกษาลักษณะ culture รูปร่างและขนาดของ conidia และ appressoria ของเชื้อรา *Colletotrichum* ที่เป็นสาเหตุของโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่ จำนวน 3 isolates (Table 3 และ Fig. 3) เชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 isolates ดังกล่าวมีลักษณะ culture ไม่เหมือนกัน isolate CR-11 มีสีแดงปนเทาส้ม และขาว isolate CR-21 มีสีส้มและเทา และ isolate CR-22 มีสีส้ม เทาแก่ และขาว conidia ของ

Table 3. Some morphological and cultural characteristics of 3 isolates *Colletotrichum* isolated from strawberry crown rot cv. Tioga compared with *C. gloeosporioides* and *C. fragariae*.

Colletotrichum solate	Location	Colony color	conidia		appressoria	
			size (micron)	shape	size (micron)	shape
CR-11	Mae Sai Dist., Chiang Rai	Beige, orange, white	12.8-16.8x4.8-6.0 (Ave. 14.3x5.6)	Cylindrical	7.2-15.6x4.8-7.2 (Ave. 9.6x5.5)	Clavate, ovate, obovate and lobed
CR-21	Mae Sai Dist., Chiang Rai	Orange, grey	12.0-15.2x4.4-6.0 (Ave. 13.4x5.4)	Cylindrical	6.4-13.6x4.0-8.0 (Ave. 10.3x6.5)	Clavate, ovate, obovate and lobed
CR-22	Mae Sai Dist., Chiang Rai	Orange, dark grey, white	12.0-15.6x4.0-6.0 (Ave. 13.8x5.3)	Cylindrical	8.0-12.8x4.0-8.4 (Ave. 9.6x6.1)	Clavate, ovate, obovate and lobed
Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. and Sacc. (Bailey and Jeger, 1992)		colonies variable, greyish white to dark grey reverse unevenly white to grey or darker especially with age	12-17x3.5-6	Cylindrical	6-20x4-12	Clavate, ovate, obovate sometimes lobed
Colletotrichum fragariae Brooks (Bailey and Jeger, 1992)		Colonies olive, grey, dark grey or black, rarely white or beige, reverse dark olive to dark grey	12.5-16.5x4.5-5	Cylindrical	-	Clavate to ovate sometimes lobed

เชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 isolates มีรูปร่างตรง ทรงกระบอก (cylindrical) ปลายมน (apex obtuse) ฐานตัด (base truncate) ขนาด conidia isolate CR-11 มีขนาด 12.8-16.8x4.8-6.0 ไมครอน (เฉลี่ย 14.3x5.6 ไมครอน) isolate CR-21 มีขนาด 12.0-15.2x4.4-6.0 ไมครอน (เฉลี่ย 13.8x5.3 ไมครอน) รูปร่าง appressoria ของเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 3 isolates มีหลายแบบรวมกันได้แก่ รูปกระบอง (clavate) รูปไข่ (ovate) รูปไข่หัวกลับ (obovate) และรูปเป็นลอน (lobed) ขนาด appressoria isolate CR-11 มีขนาด 7.2-13.6x4.0-7.2 ไมครอน (เฉลี่ย 9.6x5.5 ไมครอน) isolate CR-21 มีขนาด 6.4-13.6x4.8-8.0 ไมครอน (เฉลี่ย 10.3x6.5 ไมครอน) isolate CR-22 มีขนาด 8.0-12.8x4.0-8.0 ไมครอน (เฉลี่ย 9.6x6.1 ไมครอน)

จากลักษณะดังกล่าว ได้จำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่ในประเทศไทย ที่ศึกษาครั้งนี้เป็น *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. และ Sacc. ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยาเชื้อรา *C. gloeosporioides* ดังกล่าวสอดคล้องกับที่ Bailey and Jeger (1992) ได้รวบรวมไว้

อย่างไรก็ตาม Brooks (1931, 1932) รายงานว่าโรคแอนแทรคโนส กับโรคเหี่ยวและกอเน่าของสตรอเบอร์รี่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum fragariae* Brooks นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโรคแอนแทรคโนสของสตรอเบอร์รี่ เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* หลาย species (Maas, 1984) แต่ที่ทำให้เกิดโรคอาการกอเน่าได้ คือ *C. acutatum* Simmonds, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. และ Sacc. และ *C. fragariae* Brooks นอกจากที่ทำให้เกิดโรคกับส่วนต่างๆ ของพืชที่อยู่เหนือดินของต้นสตรอเบอร์รี่ สำหรับเชื้อรา *C. acutatum* สามารถจำแนกได้ชัดเจน เนื่องจาก conidia มีรูปร่างที่แตกต่างจาก 2 species หลัง จึงเกิดความสับสนในการจำแนก species ของเชื้อรา *C. fragariae* กับ *C. gloeosporioides* ในปี ค.ศ. 1970 von Arx จัดเชื้อรา *C. fragariae* อยู่ใน group species ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. และ Sacc. (teleomorph : *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. และ Schrenk ต่อมาในปี 1981 von Arx ยืนยันว่าไม่ใช่ชนิดเดียวกัน และมีนักวิจัยหลายท่านที่สนับสนุนว่า species แตกต่างกัน (Howard and Albregts, 1984 a, b; Maas and Howard, 1985)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาโรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่ในท้องที่จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดเชียงราย ในปี พ.ศ. 2535-2536 พบต้นสตรอเบอร์รี่ที่เป็นโรคในระยะเริ่มแรกใบสตรอเบอร์รี่จะแสดงอาการเฉาต่อมาจะเหี่ยวอย่างรวดเร็วและตายในที่สุด โดยเนื้อเยื่อส่วนกอด้านในมีลักษณะเน่าแห้งและมีสีน้ำตาลแดงหรือบางส่วนเป็นแผลขีดสีน้ำตาลแดง

ในการศึกษาครั้งนี้โรคกอเน่าของสตรอเบอร์รี่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. และ Sacc. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดที่พบกระจายทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่อยู่ในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน เช่นประเทศไทย เพราะฉะนั้นการป้องกันกำจัดโรคกอเน่าในฤดูการผลิตผลสตรอเบอร์รี่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนเมษายน ควรวางแผนจัดการในการผลิตต้นไหล สตรอเบอร์รี่ให้ปราศจากเชื้อโรคทั้งที่เป็นอาการแบบต่างๆ ของโรคแอนแทรคโนส ที่ปรากฏให้เห็นได้แก่อาการโรคใบจุดดำ ขอบใบไม้ แผลที่ก้านใบ และแผลที่ก้านไหลตลอดจนต้นไหลที่มีการติดเชื้อแบบแฝง (latent infection) โดยที่พืชยังแสดงอาการปกติและจะทำให้พืชตายเมื่อมีการย้ายลงมาปลูกบริเวณพื้นราบเมื่อสภาพอากาศเหมาะสม นอกจากนี้ไม่ควรใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากเกินไปในช่วงที่ต้นสตรอเบอร์รี่กำลังตั้งตัว และควรพ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชจนกระทั่งสภาพอากาศหนาวเย็นลง ซึ่งเป็นสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการติดเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล และธีระ สูตะบุตร. 2518. โรคของสตรอเบอร์รี่ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 8 : 485-491.

วิเชียร กำจายภัย, ศุภชัย ลีจีรจำเนียร, พัฒน์พงศ์ ภัทรโกศล และสมสิทธิ์ ชำนาญศิลป์. 2527. โรคลำต้นเน่าของสตรอเบอร์รี่. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 17(4) : 235-244.

สมสิทธิ์ ชำนาญศิลป์, วิเชียร กำจายภัย และขจรศักดิ์ ภวกุล. 2523. การศึกษาหาสาเหตุโรคไส้แดงของสตรอ-เบอร์รี่. รายงานผลการทดลองและวิจัยประจำปี กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร (เอกสารฉบับอัดสำเนา) 3 หน้า.

Bailey, J.A., and M.J. Jeger. 1992. *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control. British Society for Plant Pathology. Redwood Press Ltd., Melksham, UK. 388 p.

Brooks, A.N. 1931. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*, n.sp. Phytopathology 21 : 739-744.

Brooks, A.N. 1932. A study of strawberry wilt or crown rot. Pages 144-145 in : Florida Agric. Exp. Stn. Annu. Rep.

Brooks, A.N. 1935. Anthracnose and wilt of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*. Phytopathology 25 : 973-974.

Carver, R.G., and N.L. Horn. 1960. Summer killing of strawberry plants caused by *Colletotrichum fragariae*. Phytopathology 50 : 575.

Coons, G.H. 1924. Black root rot of strawberry. Michigan Agr. Expt. Sta. Quart. Bull. 7 : 25-26.

Delp. B.R., and R.D. Milholland. 1980. Evaluating strawberry plants for resistance to *Colletotrichum fragariae*. Plant Dis. 65 : 421-423.

Frank, A. 1920. Diseases and insect pests of blackberries, loganberries, and strawberries. Western Washington Agr. Expt. Sta. Monthly Bull. 8 : 14-16.

Frank, Eleanora, F.E. Pansy, and J.F. Pagano. 1958. Nystatin in the control of fungal infections of orchids. Antibiotics Ann. 1958-59 : 898-902.

Fujisawa, T., and H. Masago. 1975. Studies on selective medium for *Phytophthora*. J. Ann. Phytopatho. Soc. Jap., 41(3), 267. (in Japanese)

Fulton, J.P. 1957. Aster yellows virus affecting strawberries in Arkansas. Plant Disease Reptr. 41 : 521-523.

Gourley, C.O. 1969. Microfungi of crowns and roots of apparently healthy dormant strawberry roots. Can. J. Bot. 47 : 945-949.

Hickman, C.J. 1939. Contributions to the study of strawberry root rot. Brt. Mycol. Soc. Trans. 23 : 210-211.

Horn, N.L., and R.B. Carver. 1962. Anthracnose and powdery mildew on strawberry plants in Louisiana. Plant Dis. Rep. 46 : 591-592.

Horn, N.L., and R.B. Carver. 1963. A new crown rot of strawberry plants caused by *Colletotrichum fragariae*. Phytopathology 53 : 768-770.

Howard, G.M. 1972. A Strawberry fruit rot caused by *Colletotrichum fragariae*. Phytopathology 62 : 600-602.

Howard, C.M., and E.E. Albregts. 1983. Black leaf spot phase of strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (= *C. fragariae*). Plant Dis. 67 : 1144-1146.

Howard, C.M., and E.E. Albregts. 1984a. Anthracnose of Strawberry fruit caused by *Glomerella cingulata* in Florida. Plant Dis. 68 : 824-825.

Howard, C.M., and E.E. Albregts. 1984b. Anthracnose. Page 85-87. *In* : Compendium of Strawberry Diseases. J.L.maas. ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 138 p.

Howard, C.M., J.L. Maas, C.K. Chandler, and E.E. Albregts. 1992. Anthracnose of Strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. Plant Dis. 76 : 976-981.

Jeffers, S.N., and S.B. Martin. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Disease 70 : 1038-1043.

Maas, J.L., ed. 1984. Compendium of Strawberry Diseases. American Phytopthological Society, St. Paul, MN. 138 p.

Maas, J.L., and C.M. Howard. 1985. Variation of several anthracnose fungi in virulence to strawberry and apple. Plant Dis. 69 :164-166.

Nemec, S. 1970. Fungi associated with strawberry root rot in Illinois. Mycopathol. Myco. Appl. 41 : 331-346.

Rose, D.H. 1924. Leather rot of strawberries. J. Agric. Res 28 : 357-375.

Smith, B.J., and L.L. Black. 1987. Resistance of strawberry plants to *Colletotrichum fragariae* affected by environmental conditions. Plant Dis. 71 : 834-837.

Smith, B.J., and L.L. Black. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Dis. 74 : 69-76.

Struyk, A.P., I. Hoette, G. Drost, J.M. Waisvisz, T. van Eek, and J.C. Hoogerheide. 1958. Pimaricin, a new antifungal antibiotic. Antibiotics Ann. 1957-58 : 878-885.

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes : Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 696 p.

Suzui, T.,U. Kueprakone, and T. Kamhangridthirong. 1976. Phytophthora Disease on Some Economic Plants in Thailand. Plant Pathology Division, Department of Agriculture, Thailand. Technical Bull. 133 p.

Thomas, H.E. 1931. Verticilliosis of Strawberries. (Abstr.) Phytopathology 21 : 996.

von Arx, J.A. 1970. A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. Bibl. Mycol. 24 : 1-203.

von Arx, J.A. 1981. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture, 3rd edn. J. Cramer, Vaduz.

Watanabe, T., K. Hashimoto, and M. Sato. 1977. Pythium species associated with strawberry roots in Japan, and their role in the strawberry stunt disease. Phytopathology 67 : 1324-1332.

Wilhelm, S. 1957. Rhizoctonia bud rot of strawberry. Plant Disease Reptr. 41 : 941-944.