การเจริญของเชื้อ *Macrophomina phaseolina* ในส่วนต่างๆ ของพืช ภายหลังการติดเชื้อของราก

Systemic Development of the Pathogen from Root Infection

มัทนา ศรีหัตถกรรม[1] จรัส กิจบำรุง[2] พรพุฒิ ประเสริฐกุล[1]
Matana Srihuttagum[1] Charas Kitbamroong[2] Pornpudh Prasertkul[1]

ABSTRACT

The experiment was conducted in the glasshouse in order to investigate systemic development of the pathogen from diseased roots through the stem to infect seeds. Five-day-old blackgram seedlings var. Pitsanuloke 2 were inoculated by transplanting them in soil incorporated with 2% inoculum of *M. phaseolina* (5 seedlings per pot) and were watered frequently to keep soil moisture at 60% water holding capacity (WHC) for 52 days (3 days after the first pod turned black). Soil moisture was then gradually reduced to 57%WHC and finally to 56% WHC as planned. Fourteen replications were made. Six replications were for investigating the systemic development of the pathogen from diseased roots through the stem and seeds under the microscope at 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 and 17 weeks after transplanting. The remaining replications were for detecting the infection of the roots, stem and seeds by the pathogen on a potato dextrose agar medium at the same investigating times to ensure that it was *M. phaseolina* invading or infecting inside plant parts. A location, growth and the incidence of mycelia of the pathogen inside the stem were recorded. The severity of root rot was evaluated by using a 0-5 scale.

Results revealed that *M. phaseolina* from diseased roots invaded the stem tissues systemically and intracellularly at the rate of 4.4 centimeters a day. Its mycelia were located mostly in the xylem, phoem and pith but rarely in cortex. They could invade upward the top end of the plant and some pod stalks since soil moisture was reduced to 57% WHC. However, no seed was found infected at any investigating times. The reduction of soil moisture to 57% WHC had an overwhelming effect to the diseased plants and made them succumb to the disease. At this stage, pathogen mycelia could spread throughout the stem resulted in abrupt death of the entire diseased plants within 1-2 days. The abrupt death of the entire diseased plants at the same time terminated growth and activities of the pathogen. Mycelia formed sclerotia and could not infect the pod, therefore, seeds were free from infection. In contrast, under soil water which was flavoured to growth of the plants, at 60% WHC, the plants grew vigorously and could highly resist to the onset of the pathogen mycelia. So they could not reach the pod and seeds before they were mature and dry out.

บทคัดย่อ

งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ตรวจสอบการเจริญอย่างต่อเนื่อง (systemic development) ของเชื้อ *M. phaseolina* จากการติดเชื้อที่รากเข้าไปในลำต้นและเมล็ด ดำเนินการโดยการปลูกต้นกล้าถั่วเขียวผิวดำพันธุ์พิษณุโลก 2 อายุ 5วัน ในดินที่คลุกด้วย

(1) ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท อ. เมือง จ. ชัยนาท 17000
Chai Nat Field Crops Research Center, Chai Nat 17000, Thailand
(2) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 จ. พิษณุโลก
Office of the Agricultural Research and Development Region 2, Phitsanulok

inoculum ของเชื้อ *M. phaseolina* อัตรา 2% w/w 5 ต้น/กระถาง ดูแล รดน้ำ เพื่อรักษาระดับความชื้นของดินให้อยู่ที่ 60% WHC เป็นเวลา 52 วัน (หลังฝักแรกดำ 3 วัน) จากนั้นค่อยๆ ลดระดับความชื้นของดินลงเหลือ 57% WHC ตามลำดับ ตัดต้นไปตรวจสอบ การเจริญอย่างต่อเนื่องของเชื้อในลำต้นเข้าไปในเมล็ดใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ระยะเวลา 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 และ 17 สัปดาห์หลังปลูก และตรวจสอบการติดเชื้อที่ราก ลำต้น และเมล็ด บนอาหาร potato dextrose agar ที่ระยะเวลาเดียวกัน ทำการบันทึกส่วนของต้นที่พบเส้นใย ลักษณะการเจริญ (Inter หรือ Intracellular mycelium) และความหนาแน่นของเส้นใยในต้นถั่วเขียวผิวดำ และบันทึกความรุนแรงของโรคที่รากโดยใช้ระดับ 0-5

ผลการทดลองพบว่า เชื้อ *M. phaseolina* เจริญอย่างต่อเนื่องจากแผลที่ราก เข้าไปภายในลำต้น จากโคนต้นขึ้นไปสู่ส่วนยอดและกิ่งก้าน พบเส้นใยของเชื้อนี้หนาแน่นบริเวณท่อน้ำท่ออาหาร และแก่นกลางลำต้น บริเวณ cortex พบน้อยมาก เส้นใยมีลักษณะการเจริญแบบ intracellular (เจริญอยู่ภายในเซลล์พืช จากเซลล์หนึ่งเข้าไปในเซลล์ข้างเคียง และในเซลล์ที่สูงขึ้นไป ด้วยอัตรา 4.4 ซม./สัปดาห์ แต่เมื่อตรวจสอบตั้งแต่ถั่วเขียวผิวดำเริ่มติดเมล็ดจนถึงเมล็ดแก่ (11 สัปดาห์หลังปลูก) และจนถึง 17 สัปดาห์หลังปลูก ไม่พบการติดเชื้อในเมล็ด ทั้งนี้เพราะว่า ในระยะที่ถั่วเขียวผิวดำมีการเจริญเติบโตดี แข็งแรง ถั่วเขียวผิวดำมีความต้านทานต่อการรุกรานของเส้นใยของเชื้อ *M. phaseolina* สูง ทำให้เชื้อเจริญขึ้นไปสู่ส่วนยอดช้าลง ไม่สามารถขึ้นไปถึงฝักได้ก่อนการสุกแก่ของเมล็ด แต่เมื่อใดที่ถั่วเขียวผิวดำอ่อนแอต่อโรค เชื้อสามารถเจริญในต้นได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ถั่วเขียวผิวดำยืนต้นแห้งตาย ภายใน 1-2 วัน การตายอย่างรวดเร็วของต้น ถั่วเขียวผิวดำ ในขณะเดียวกัน ไม่มีผลทำให้เชื้อหยุดการเจริญเติบโตและเข้าสู่ระยะฟักตัวสร้างเมล็ด sclerotia ไม่สามารถเข้าทำลายเมล็ดและฝักได้ และสามารถสรุปได้ว่า การติดเชื้อของเมล็ดไม่ได้เกิดจากการเจริญอย่างต่อเนื่องของเชื้อ จากรากผ่านลำต้นเข้าไปสู่เมล็ด

คำนำ

M. phaseolina สามารถเข้าทำลายพืชไร่ได้หลายชนิด เช่น ถั่วเขียว ถั่วเขียวผิวดำ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง และงา เป็นต้น ทำให้พืชเป็นโรคเน่าดำ ที่เรียกว่า charcoal rot อาการของโรคคือ รากเน่าดำเปื่อยยุ่ย มีเม็ด sclerotia เล็กๆ สีดำ ปรากฏอยู่มากมายภายในราก ต่อมาพืชจะแสดงอาการใบเหลืองแห้งตาย ลามขึ้นข้างบน และจะยืนต้นแห้งตายในที่สุด เมื่อตรวจดูบริเวณลำต้น จะพบเม็ด sclerotia และ pycnidia เล็กๆ สีดำ ปรากฏอยู่มากมาย บนส่วนของลำต้นที่แห้งตายนั้น

สำหรับในถั่วเขียวผิวดำ จะพบเชื้อนี้เข้าทำลายบนใบ กิ่งก้าน และบางส่วนของลำต้นด้วย ทำให้เป็นโรคใบจุดและโรคไหม้บนกิ่งก้านและบางส่วนของลำต้น มีเม็ด sclerotia และ pycnidia ปรากฏอยู่บนแผล นอกจากนี้ เชื้อยังสามารถติดไปกับเมล็ด ทำให้เมล็ดเน่าดำ เมื่อนำไปเพาะเป็นถั่วงอก เป็นปัญหาสำคัญในการส่งออกเมล็ดถั่วเขียวผิวดำ

ในทุกฤดูปลูกจะพบโรคเน่าดำของถั่วเขียวผิวดำ แต่อาการของโรคจะรุนแรงมาก ถ้าถั่วเขียวผิวดำขาดน้ำ หรือเมื่อความชื้นของดินลดลง ส่วนอาการโรคใบจุด และโรคไหม้บนกิ่งก้านและบางส่วนของลำต้น จะพบมากในช่วงฤดูฝน ฤดูอื่นๆ ไม่ค่อยพบ

การติดเชื้อของเมล็ดถั่วเขียวผิวดำนั้น จนถึงปัจจุบันนี้ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่ามีการติดเชื้อได้อย่างไร แต่จากลักษณะอาการของโรค โดยเฉพาะลักษณะอาการใบเหลืองแห้งตายลามขึ้นข้างบน สันนิษฐานว่าอาจจะเกิดจากการเจริญอย่างต่อเนื่องของเชื้อ จากแผลที่ใบเข้าไปในลำต้นและเมล็ด อย่างไรก็ตาม มัทนา และคณะ (2534) พบว่า ไม่มีความแตกต่างในเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ *M. phaseolina* ของเมล็ดถั่วเขียวผิวดำ เก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาต่างๆ เริ่มตั้งแต่หลังฝักแรกดำ 20 วัน จนถึงหลังฝักแรกดำ 55 วัน เมล็ดมีการติดเชื้อน้อยมากเฉลี่ย 0-13 เปอร์เซ็นต์ และไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคและปริมาณ pycnidia ที่ตรวจพบในอากาศ เมล็ดจากต้นที่เป็นโรคอย่างรุนแรง มีเม็ด sclerotia และ pycnidia จากโคน

ต้นถึงยอด ไม่มีการติดเชื้อ *M. phaseolina* ในเมล็ด ทำให้ไม่สามารถหาสมมุติฐาน ของการติดเชื้อในเมล็ดได้ และสมควรศึกษาเรื่องนี้อย่างจริงจัง

มัทนาและคณะ (2537) ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม เรื่อง การเข้าทำลายใบถั่วเขียวผิวดำของเชื้อ *M. phaseolina* และเรื่องการเจริญของเชื้อ *M. phaseolina* ในส่วนต่างๆ ของพืช ภายหลังการติดเชื้อบนใบ ซึ่งอาจจะนำไปสู่การติดเชื้อของเมล็ดได้ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับการติดเชื้อของเมล็ดในฝักที่ถูกปลูกเชื้อ *M. phaseolina* ผลการทดลองสรุปได้ว่า *M. phaseolina* เข้าทำลายพืชโดยตรง และเข้าทาง stomata การเข้าทำลายโดยตรง โดยทาง appressorium จะเป็นวิธีที่ทำให้มีการติดเชื้อเป็นโรคมากที่สุด โดยพบว่า เนื้อเยื่อพืชบริเวณที่ appressorium เข้าทำลาย ตายเป็นสีน้ำตาล. โอกาสที่เชื้อจะเจริญอย่างต่อเนื่องจากแผลบนใบ เข้าไปในลำต้นและเมล็ด มีน้อยมาก เนื่องจากแผลที่เกิดบนใบถั่วเขียวผิวดำของทุกพันธุ์ที่ทดสอบ มีลักษณะเป็นแบบจุด (localized lesion) มากกว่า 92 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะแผลแบบนี้ เส้นใยของเชื้อจะถูกยับยั้งให้เจริญช้าลง ด้วยความต้านทานต่างๆ ของพืช และจะถูกจำกัดให้เจริญอยู่เฉพาะบริเวณแผลเท่านั้น ไม่สามารถเจริญถึงก้านใบเข้าไปในลำต้นและเมล็ดได้ ที่สำคัญคือ ไม่พบเส้นใยของเชื้อ *M. phaseolina* เจริญถึงก้านใบของทุกใบที่ตรวจสอบ เชื้อ *M. phaseolina* สามารถเข้าทำลายฝักโดยตรง ทำให้ฝักที่ถูกปลูกเชื้อเป็นโรค มีเม็ด sclerotia และ pycnidia ปรากฏอยู่บนฝัก ในบางฝักอาการของโรคได้ลามลงไปถึงก้านชูฝัก เมล็ดในฝักกรอบแตกร่วนง่าย และมีเม็ด sclerotia มากมาย ปรากฏอยู่ทั้งภายนอกและภายในเมล็ด เมื่อนำเมล็ดไปตรวจสอบการติดเชื้อ *M. phaseolina* ของเมล็ดถั่วเขียวผิวดำ เกิดจากการที่เชื้อเข้าทำลายข้างต้นนี้ ทำให้มั่นใจว่า การติดเชื้อ *M. phaseolina* ของเมล็ดถั่วเขียวผิวดำ เกิดจากการที่เชื้อเข้าทำลายฝักและเมล็ดโดยตรง อย่างไรก็ตามอาจจะเกิดจากการเจริญอย่างต่อเนื่องของเชื้อจากแผลที่ราก เข้าไปในลำต้นและเมล็ด แล้วก่อให้เกิดการติดเชื้อของเมล็ดขึ้น ซึ่งจำเป็นต้องตรวจสอบทางวิชาการ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการเจริญอย่างต่อเนื่องของเชื้อ *M. phaseolina* จากการติดเชื้อที่รากเข้าไปในลำต้นและเมล็ด แล้วทำให้เกิดการติดเชื้อของเมล็ดขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. ถั่วเขียวผิวดำพันธุ์พิษณุโลก 2
2. inoculum ของเชื้อ *M. phaseolina*
3. น้ำยา fixative solution (Formaldehyde 5 มล., Acetic acid glacial 5 มล. และ Alcohol 95% 90 มล.)
4. water bath
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar)
6. ปุ๋ยเคมีสูตร 12-24-12 อัตรา 1 ก./ดิน แห้ง 3 กก.

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมดิน

ผสมดินนากับทรายอัตราส่วน 1:1 แล้วนำเข้าอบที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผึ่งดินให้เย็น ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง

2. การเตรียม inoculum และอัตราที่ใช้

เลี้ยงเชื้อ *M. phaseolina* บนเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121° องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 120 นาที (เมล็ดข้าวฟ่าง 106 ก. ผสมน้ำ 70 มล.) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (24-28 องศาเซลเซียส) จนเชื้อเจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างเต็มที่ จึงนำมาใช้ในการทดลอง อัตรา inoculum ที่ใช้คือ 2% w/w (น้ำหนัก inoculum/น้ำหนักดินแห้ง)

3. การเตรียมเมล็ดพันธุ์และต้นกล้า

นำเมล็ดถั่วเขียวผิวดำพันธุ์พิษณุโลก 2 ที่มีลักษณะเมล็ดสมบูรณ์ดี มีขนาดเมล็ดเท่ากัน มาฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ดด้วย sodium hypochlorite (Clorox) 5.25% นาน 5 นาที ตามด้วยน้ำประปา 5 ครั้ง เพื่อล้าง sodium hypochlorite ออกจากเมล็ด แล้วนำเมล็ดมาเพาะในทรายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

4. การปลูก

คลุก inoculum ให้เข้ากับดิน ใส่ปุ๋ย แล้วปรับระดับความชื้นของดินให้เป็น 60% WHC (Water Holding Capacity) ย้ายต้นกล้าถั่วเขียวผิวดำอายุ 5 วัน ที่มีการเจริญเติบโต แข็งแรงดีเท่ากัน ลงปลูกในดินทดลอง โดยการขุดหลุมแล้วค่อยๆ วางต้นกล้าลงไปในหลุม ระวังให้รากถูกกระทบกระเทือนน้อยที่สุด และไม่ให้ส่วนของลำต้นสัมผัสกับดิน แล้วจึงกลบหลุม ปลูก 5 ต้น/กระถาง จากนั้นใช้ทรายที่อบฆ่าเชื้อแล้วโรยทับผิวหน้าของดินในทุกกระถาง หนาประมาณ 0.3 ซม. เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากดินในแต่ละกระถาง และเพื่อปรับน้ำหนักของแต่ละกระถางให้เท่ากัน เพื่อความสะดวกในการให้น้ำ ทำทั้งหมด 14 ซ้ำ โดย 6 ซ้ำ ใช้สำหรับการตรวจสอบ การเจริญอย่างต่อเนื่องของเชื้อ *M. phaseolina* จากการติดเชื้อที่ราก เข้าไปในลำต้นและเมล็ดใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ระยะเวลา 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 และ 17 สัปดาห์หลังปลูก ส่วน 8 ซ้ำที่เหลือ มีไว้สำหรับตรวจสอบการติดเชื้อในราก ลำต้น และเมล็ด บนอาหาร PDA ที่ระยะเวลาเดียวกัน เพื่อพิสูจน์ว่า เป็นเชื้อ *M. phaseolina* ที่เข้าทำลายส่วนต่างๆ ของต้นถั่วเขียวผิวดำ

รดน้ำเช้า กลางวัน เย็น และบ่อยครั้งเมื่อพืชโตขึ้น เพื่อรักษาระดับความชื้นของดินให้อยู่ที่ 60% WHC เป็นเวลา 52 วัน (หลังฝักแรกดำ 3 วัน) แล้วจึงเริ่มลดระดับความชื้นของดินลงอย่างช้าๆ จนดินมีระดับความชื้น 57% WHC และเริ่มลดอีกครั้งเมื่อถั่วเขียวผิวดำมีอายุ 73 วันหลังปลูก (หลังฝักแรกดำ 22 วัน) ให้ได้เท่ากับ 56% WHC รักษาระดับความชื้นของดินที่ 56% WHC จนเสร็จสิ้นการทดลอง การรดน้ำแต่ละครั้ง จะพิจารณาจากความเปียกชื้น ระยะการเจริญเติบโตของพืช การใช้น้ำของพืช อุณหภูมิอากาศ ช่วงเวลาของวัน และความรุนแรงของโรค แล้วสุ่มกระถางตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก ก่อนการให้น้ำแต่ละครั้งระดับความชื้นของดินในแต่ละกระถาง จะถูกปรับให้เท่ากันหมดในตอนเช้าและเย็น และการเคลื่อนย้ายกระถาง จะกระทำด้วยความระมัดระวัง

ในการทดลองนี้ ใช้ต้นถั่วเขียวผิวดำที่ปลูกในดินที่ไม่ได้คลุกเชื้อ แต่ได้รับการปฏิบัติดูแล เช่นเดียวกันกับต้นที่ปลูกในดินที่คลุกเชื้อเป็น control

5. การตรวจสอบการเจริญอย่างต่อเนื่องของเชื้อ *M. phaseolina* จากการติดเชื้อที่ราก เข้าไปในลำต้นและเมล็ดใต้กล้องจุลทรรศน์ มีวิธีการดังนี้

ตัดต้นถั่วเขียวผิวดำตรงระดับดิน นำมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วนำมาดองในน้ำยา fixative solution เมื่อน้ำยาซึมทั่วต้น จึงนำต้นมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากโคนต้นถึงยอด (serial segment) ขนาดยาวชิ้นละ 0.5 ซม. จากนั้นนำต้นแต่ละชิ้นมาตัดตามขวางให้เป็นชิ้นบางมากๆ (cross section) แล้วย้อมสีต้นที่ถูกตัดตามขวางโดยการต้มใน 0.1% Aniline blue เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบการเจริญของเส้นใยภายในลำต้น ใต้กล้องจุลทรรศน์

6. การตรวจสอบการติดเชื้อ *M. phaseolina* ที่ราก ลำต้น และเมล็ด บนอาหาร PDA

6.1 การตรวจสอบการติดเชื้อ *M. phaseolina* ที่ราก

นำรากมาล้างน้ำให้สะอาด โดยใช้พู่กันปัดทำความสะอาด แล้วสุ่มตัดราก ทั้งรากแก้วและรากแขนง ขนาดยาวชิ้นละ 1 ซม. นำมาแช่ใน sodium hypochlorite (Clorox) 1% นาน 1 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ติดมากับผิวราก แล้วแช่น้ำ 4 ครั้งๆ ละ 30 วินาที เพื่อล้าง sodium hypochlorite ออกจากชิ้นราก ผึ่งชิ้นรากให้แห้ง ก่อนนำมาวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียน เป็นเวลา 5-7 วัน จึงนำมาตรวจสอบการติดเชื้อ *M. phaseolina* ที่ราก

6.2 การตรวจสอบการติดเชื้อ *M. phaseolina* ในลำต้นที่ระดับความสูงต่างๆ จากระดับดิน

ตัดต้นถั่วเขียวผิวดำ ตรงระดับดิน ปลิดใบและกิ่งก้านทิ้งไป นำต้นมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วใช้พู่กันเบอร์ใหญ่ปัดบริเวณโคนต้น เพื่อล้างเชื้อ *M. phaseolina* ที่อาจจะติดอยู่ตรงบริเวณผิวเปลือกของลำต้นให้สะอาดอีกครั้ง จากนั้นนำต้นมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากโคนต้นถึงยอด (serial segment) ขนาดยาวชิ้นละ 0.5 ซม. แล้วนำต้นที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แต่ละชุดมาฆ่าเชื้อที่ผิวเปลือกด้วย sodium hypochlorite 1% นาน 1 นาที ตามล้างด้วยน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้งๆ ละ 30 วินาที เพื่อล้าง sodium hypochlorite ออกจากชิ้นพืช

ผึ่งชิ้นพืชให้แห้ง ก่อนนำมาวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จึงนำมาตรวจสอบและตรวจนับชิ้นพืชที่มีเชื้อ *M. phaseolina* ขึ้นเจริญอยู่

6.3 การตรวจสอบการติดเชื้อ *M. phaseolina* ในเมล็ด

นำฝักมาลอกเนื้อเยื่อข้างฝักออก แล้วใช้ปากคีบสอดเข้าไปตามรอยแตกของฝัก คีบเอาเมล็ดออกมา แล้วเก็บรวบรวมไว้ นำเมล็ดที่เก็บรวบรวมไว้ มาฆ่าเชื้อที่ผิวเปลือกด้วย sodium hypochlorite 1% นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 4 ครั้งๆ ละ 30 วินาที เพื่อล้าง sodium hypochlorite ออก ผึ่งเมล็ดให้แห้ง ก่อนนำมาวางบนอาหาร PDA ที่กำลังแข็งตัว เพื่อให้อาหาร PDA จับยึดเมล็ดไว้ ไม่กลิ้งไปมาบนอาหาร บ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน จึงนำมาตรวจนับเมล็ดเน่าเนื่องจากเชื้อ *M. phaseolina*

7. การบันทึกผลการทดลอง

บันทึก ส่วนของต้นที่พบเส้นใย ลักษณะการเจริญ (inter หรือ intracellular mycelium) และ ความหนาแน่นของเส้นใยของเชื้อ *M. phaseolina* ในลำต้นถั่วเขียวผิวดำ จากการตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ และบันทึกความรุนแรงของโรคที่ราก

ให้คะแนนความหนาแน่นของเส้นใยของเชื้อ *M. phaseolina* ในลำต้นถั่วเขียวผิวดำดังนี้ 0 = ไม่พบเส้นใยในลำต้นถั่วเขียวผิวดำ, 1 = พบเส้นใยเพิ่มเริ่มแทงขึ้นมาจากเซลล์ท่อน้ำ และท่ออาหารน้อยกว่า 20 จุด, 2 = พบเส้นใยเพิ่งเริ่มแทงขึ้นมาจากเซลล์ท่อน้ำท่ออาหารไม่เกิน 50 จุด, 3 = พบเส้นใยเพิ่งเริ่มแทงขึ้นมา และมีเส้นใยเลื้อยชอนไชภายในเซลล์ท่อน้ำท่ออาหารบางจุด, 4 = พบเส้นใยยาวเลื้อยชอนไชในเซลล์ท่อน้ำท่ออาหารและแก่นกลางลำต้น (pith) หรือพบมากเฉพาะใน pith

ให้คะแนนความรุนแรงของโรคที่รากดังนี้ 0 = รากขาวสะอาดมีระบบรากปกติ, 1 = รากถูกเชื้อเข้าทำลายเป็นแผล 0-20%, 2 = 20-40%, 3 = 40-60%, 4 = 60-80% และ 5 = 80-100% ตามลำดับ

นำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบการติดเชื้อ *M. phaseolina* ในลำต้นถั่วเขียวผิวดำที่ระดับความสูงต่างๆ บนอาหาร PDA มาคำนวณ%การติดเชื้อ *M. phaseolina* ในลำต้นที่ระดับความสูงต่างๆ ดังนี้ ตัวอย่างเช่น

$$\%\text{การติดเชื้อในลำต้นที่ระดับความสูง 5.0 ซม.} = \frac{\text{จำนวนชิ้นพืชที่ระดับความสูง 4.5-5.0 ซม. ที่มีเชื้อขึ้นเจริญอยู่}}{\text{จำนวนชิ้นพืชที่ระดับความสูง 4.5-5.0 ซม. ทั้งหมด}} \times 100$$

8. ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

ดำเนินการทดลอง ในเรือนทดลองศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท ระหว่างเดือนมกราคม 2538 ถึง พฤษภาคม 2538 ซึ่งมีอุณหภูมิอากาศระหว่าง 15-39 องศาเซลเซียส (อากาศเย็นในตอนกลางคืน อุณหภูมิประมาณ 15 องศาเซลเซียส ตอนกลางวันมีอุณหภูมิ 20-36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน)

ผลการทดลอง

1. การเจริญเติบโตของถั่วเขียวผิวดำปลูกในดินที่คลุกเชื้อ *M. phaseolina*

ถั่วเขียวผิวดำมีการเจริญเติบโตดีในดินที่มีความชื้น 60% WHC มีดอกแรกบานที่อายุ 33 วัน ติดฝักมีเมล็ดอ่อนเล็กๆ อยู่ภายในฝักที่อายุ 35 วัน และมีฝักแรกดำที่อายุ 52 วัน รวมระยะเวลาจากดอกแรกบานถึงระยะฝักดำ 19 วัน ฝักแรกสูงจากระดับดิน 16 ซม.

2. การเจริญเติบโตของถั่วเขียวผิวดำปลูกในดินที่ไม่ได้คลุกเชื้อ *M. phaseolina*

มีการเจริญเติบโตดีในดินที่มีความชื้น 60% WHC และมีดอกแรกบาน ฝักแรกดำที่ระยะเวลาเดียวกันกับถั่วเขียวผิวดำที่ปลูกในดินที่คลุกเชื้อ เมล็ดและฝักมีลักษณะสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค และไม่มีการติดเชื้อในเมล็ด การลดระดับความชื้นของดินจาก 60% WHC เป็น 57% WHC กระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตของถั่วเขียวผิวดำพอสมควร โดยพบว่า ถั่วเขียวผิวดำแสดงอาการขอบใบแห้ง หยุดชะงักการเจริญเติบโตชั่ว

ระยะเวลาหนึ่ง ต่อมาจึงสามารถแตกยอดอ่อนได้ตามปกติ

3. การติดเชื้อที่ราก ลำต้น และเมล็ด ที่ระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ของถั่วเขียวผิวดำ

เชื้อ *M. phaseolina* เจริญอย่างต่อเนื่องจากแผลที่ราก เขาไปภายในลำต้น จากโคนต้นขึ้นไปสู่ส่วนยอดและกิ่งก้าน พบเส้นใยของเชื้อนี้หนาแน่นบริเวณท่อน้ำท่ออาหาร และแก่นกลางลำต้นบริเวณ cortex พบน้อยมาก เส้นใยมีลักษณะการเจริญแบบ intracellular (เจริญอยู่ภายในเซลล์พืชจากเซลล์หนึ่งเข้าไปในเซลล์ข้างเคียง และในเซลล์ที่สูงขึ้นไป) เจริญด้วยอัตรา 4.4 ซม./สัปดาห์ (รูปที่ 1) มีการติดเชื้อที่ราก (ตารางที่ 3) ลำต้น (ตารางที่ 1) และมีความหนาแน่นของเส้นใยภายในลำต้น (ตารางที่ 2) มากขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะช่วงหลังลดระดับความชื้นของดินลง

ความรุนแรงของโรคที่ระยะการเจริญเติบโตของถั่วเขียวผิวดำ ตั้งแต่ 3 ถึง 17 สัปดาห์หลังปลูป (รูปที่ 2) มีดังนี้ **ที่ 3 สัปดาห์หลังปลูก ความชื้นของดิน 60% WHC** เชื้อ *M. phaseolina* เข้าทำลายรากทำให้รากเป็นโรคระดับ 2.2 หรือ 44% ในระยะนี้ พบรากเป็นแผลเน่าสีน้ำตาลดำ เกิดบนบางส่วนของราก และเชื้อเจริญขึ้นไปในลำต้นได้สูง 1 ซม. ถั่วเขียวผิวดำมีการเจริญเติบโตดี สามารถสร้างรากใหม่ออกมาชดเชยความเสียหายที่เกิดขึ้น **ที่ 5 สัปดาห์หลังปลูก ความชื้นของดิน 60% WHC** เชื้อเข้าทำลายรากมากขึ้น และแผลที่รากขยายใหญ่ขึ้น ทำให้รากมีความรุนแรงของโรคระดับ 2.8 หรือ 56% ในระยะนี้ เชื้อเจริญขึ้นไปในลำต้นได้สูง 2 ซม. และไม่พบการติดเชื้อในเมล็ด ถั่วเขียวผิวดำมีการเจริญเติบโตดีและยังคงสร้างรากใหม่ออกมา **ที่ 7 สัปดาห์หลังปลูก ดินมีความชื้น 60% WHC** รากเป็นโรคระดับ 3.3 หรือ 66% แผลมีขนาดใหญ่มาก ทำให้รากเน่าดำเป็นช่วงๆ ในระยะนี้ เชื้อเจริญขึ้นไปในลำต้นได้สูง 5 ซม. และตรวจไม่พบการติดเชื้อในเมล็ด ถั่วเขียวผิวดำมีการเจริญเติบโตดี และยังคงสร้างรากใหม่ออกมา **ที่ 9 สัปดาห์หลังปลูก ดินมีความชื้น 57% WHC** ที่ระยะเวลานี้ ถั่วเขียวผิวดำมีฝักแก่แห้งดำ 80% และพบว่าถั่วเขียวผิวดำบางต้น ยืนต้นแห้งตายอย่างรวดเร็วภายใน 1-2 วัน มีเม็ด sclerotia และ pycnidia เล็กๆ สีดำ อยู่บริเวณลำต้น รากส่วนใหญ่เน่าดำทั้งราก มีเม็ด sclerotia เล็กๆ สีดำอยู่ภายใน มีความรุนแรงของโรคที่รากระดับ 5

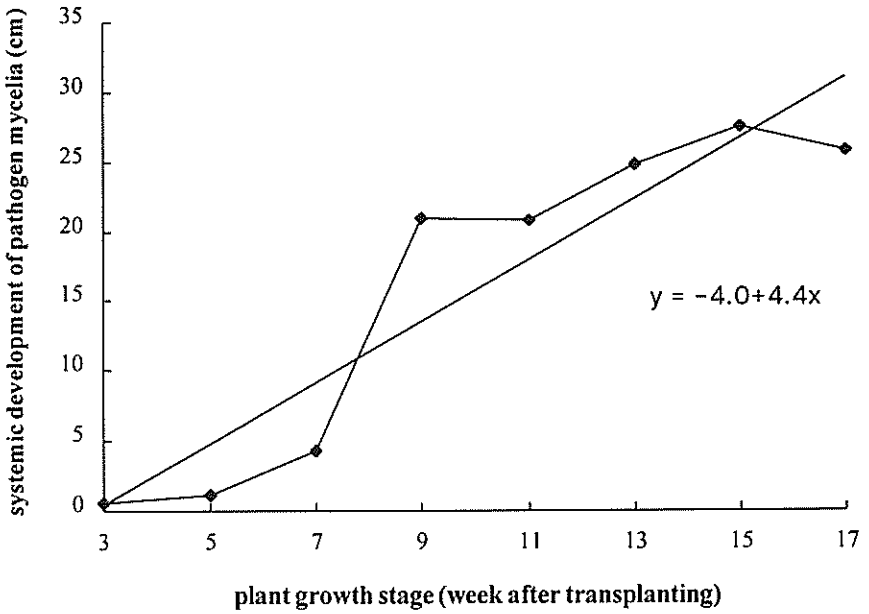

Fig. 1. Relation of plant growth stages and systemic development of pathogen mycelia through stem.

Table 1. Percentages of blackgram stems with *Macrophomina* mycelia growing systemically inside examined at various plant growth stages.

Distance above the ground level (cm)	Plant growth stage (week after transplanting)							
	3	5	7	9	11	13	15	17
0.5	33.3	40	66.7	80	93.3	100	100	100
1.0	3.3	16.7	56.7	63.3	93.3	100	100	100
1.5	-	13.3	50	60	93.3	100	100	100
2.0		6.7	46.7	56.7	90	100	100	100
2.5		-	43.3	56.7	83.3	100	100	100
3.0			33.3	53.3	70	96.7	100	100
3.5			20	46.7	70	96.7	100	100
4.0			16.7	46.7	63.3	96.7	96.7	100
4.5			10	43.3	56.7	96.7	96.7	100
5.0			3.3	43.3	56.7	96.7	96.7	100
6.0			-	43.3	53.3	96.7	96.7	100
6.5				43.3	50	96.7	96.7	100
7.0				40	46.7	96.7	96.7	100
7.5				36.7	46.7	96.7	96.7	100
8.5				33.3	46.7	93.3	96.7	100
9.5				33.3	43.3	93.3	96.7	100
10.5				30	43.3	90	96.7	100
11.0				30	40	90	96.7	100
11.5				30	40	86.7	96.7	100
12.5				30	36.7	86.7	96.7	100
13.0				30	36.7	83.3	96.7	100
13.5				30	36.7	80	96.7	100
15.5				30	36.7	73.3	96.7	96.7
16.0				30	36.7	70	96.7	96.7
17.5				30	36.7	70	93.3	96.7
18.0				30	36.7	66.7	90	96.7
18.5				30	36.7	56.7	86.7	96.7
19.0				30	36.7	53.3	86.7	93.3
19.5				30	33.3	50	86.7	83.3
20.0				26.7	33.3	46.7	80	80
20.5				23.3	30	40	80	73.3
21.0				20	30	40	76.7	66.7
21.5				16.7	26.7	40	73.3	63.3
22.0				13.3	23.3	36.7	73.3	50
22.5				13.3	23.3	26.7	66.7	50
23.0				13.3	16.7	26.7	66.7	50
23.5				10	13.3	23.3	66.7	46.7
24.0				10	10	23.3	60	46.7
24.5				10	10	20	53.3	43.3
25.0				10	3.3	16.7	53.3	33.3
25.5				10	3.3	13.3	43.3	33.3
26.0				6.7	3.3	13.3	36.7	33.3
26.5				3.3	-	13.3	30	20
27.5				-		13.3	20	13.3
28.5						13.3	13.3	10
29.5						10	10	3.3
30.0						3.3	10	3.3

Table 2. The incidence of *Macrophomina* mycelia growing systemically inside blackgram stems examined at various plant growth stages.

Distance above the ground level (cm)	Plant growth stage (week after transplanting)							
	3	5	7	9	11	13	15	17
0.5	0.3	0.4	1.0	1.8	2.0	3.8	4.0	4.0
1.0	0.03	0.2	0.7	1.6	2.0	3.6	4.0	4.0
1.5	-	0.1	0.6	1.5	2.0	3.5	4.0	4.0
2.0		0.06	0.5	1.5	1.9	3.5	3.9	4.0
2.5		-	0.5	1.5	1.8	3.4	3.9	4.0
3.0			0.3	1.5	1.7	3.4	3.9	3.9
3.5			0.2	1.4	1.7	3.4	3.9	3.8
4.0			0.2	1.4	1.6	3.3	3.8	3.8
4.5			0.1	1.4	1.5	3.3	3.8	3.7
5.0			0.03	1.3	1.5	3.3	3.8	3.7
5.5				1.3	1.5	3.2	3.8	3.7
6.0				1.3	1.5	3.1	3.7	3.7
6.5				1.3	1.4	3.0	3.7	3.7
7.0				1.3	1.4	3.0	3.6	3.7
7.5				1.3	1.4	2.9	3.5	3.7
8.0				1.2	1.4	2.9	3.5	3.7
8.5				1.2	1.4	2.8	3.5	3.7
9.0				1.2	1.4	2.8	3.4	3.6
9.5				1.2	1.4	2.7	3.4	3.6
10.0				1.2	1.3	2.7	3.4	3.6
10.5				1.2	1.3	2.5	3.3	3.6
11.5				1.2	1.3	2.4	3.2	3.5
12.0				1.1	1.3	2.3	3.1	3.5
12.5				1.1	1.2	2.3	3.0	3.5
13.0				1.1	1.2	2.2	3.0	3.5
14.0				1.1	1.2	2.1	3.0	3.5
14.5				1.1	1.2	2.0	3.0	3.4
15.0				1.1	1.2	2.0	2.9	3.4
15.5				1.0	1.2	1.8	2.8	3.2
16.0				1.0	1.2	1.7	2.7	3.2
16.5				0.9	1.2	1.5	2.7	3.2
17.5				0.9	1.2	1.4	2.5	3.1
18.0				0.9	1.2	1.3	2.1	3.1
18.5				0.9	1.2	1.2	2.0	3.1
19.5				0.8	1.1	1.0	2.0	2.6
20.5				0.5	1.0	0.9	2.0	2.3
21.5				0.4	0.9	0.9	1.8	1.9
22.5				0.3	0.8	0.7	1.6	1.4
23.0				0.3	0.5	0.7	1.6	1.4
24.0				0.2	0.3	0.6	1.4	1.3
26.0				0.1	0.1	0.4	1.0	0.9
26.5				0.03	-	0.4	0.7	0.6
29.5				-		0.2	0.2	0.1
30.0						0.03	0.2	0.1

Table 3. Severity of root rot of inoculated plants examined at various plant growth stages.

Plant growth stage (week after transplanting)	Severity of root rot						Mean
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	
3	2	2	3	2	2	2	2.2 (44%)
5	3	2	3	3	3	3	2.8 (56%)
7	3	3	3	4	4	3	3.3 (66%)
9	4	4	4	3	4	3	3.7 (74%)
11	4	4	5	4	4	5	4.3 (86%)
13	5	5	5	4	4	5	4.7 (94%)
15	5	5	4	5	5	5	4.8 (96%)
17	5	5	5	5	5	5	5.0 (100%)

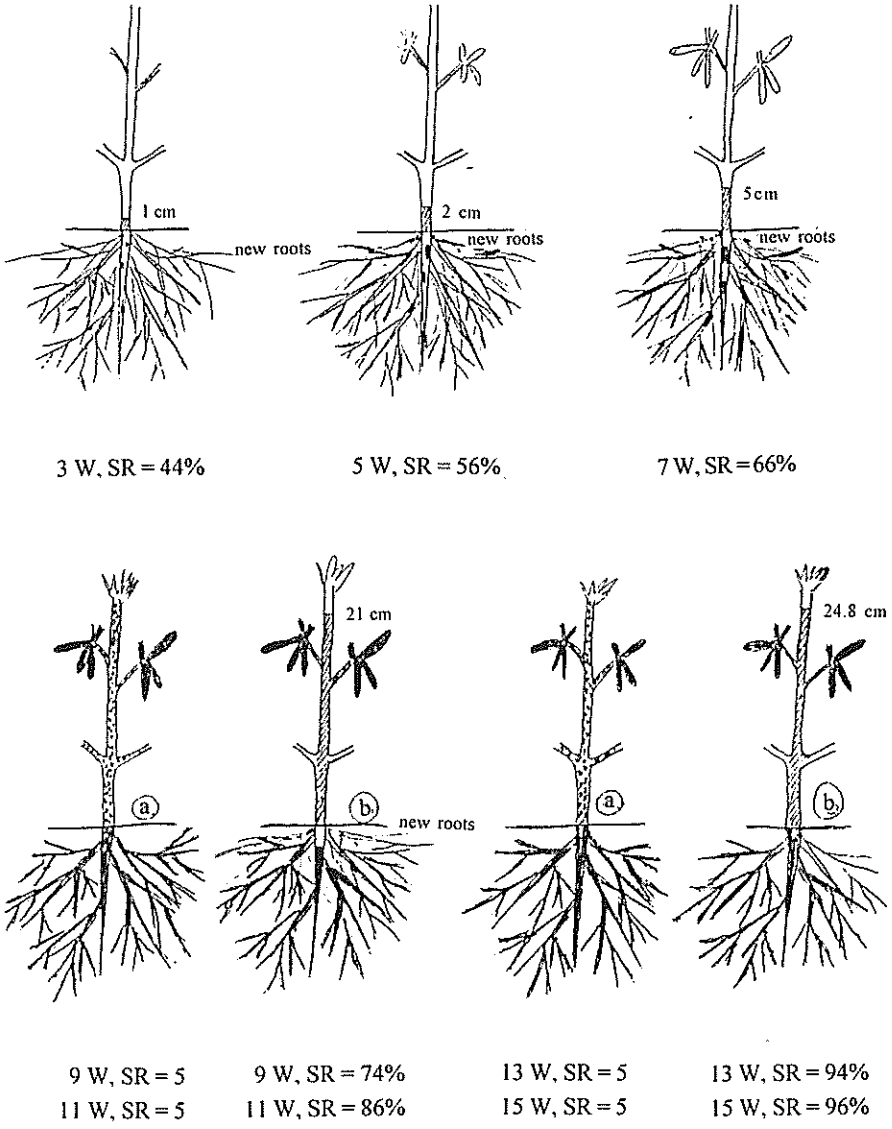

Fig. 2. Severity of root rot (SR) and stem invasion-distances of *M. phaseolina* examined at various plant growth stages.

หรือ 100% และมีรากใหม่น้อยมาก ในต้นที่แห้งตายนี้เชื้อสามารถเจริญขึ้นไปถึงยอด (สูง 26.5 ซม) และถึงก้านชูฝักบางก้าน แต่ไม่พบการติดเชื้อในเมล็ด ฝักมีลักษณะสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค ในขณะที่พืชกำลังจะตายเส้นใยของเชื้อซึ่งเลื้อยชอนไชอยู่ภายในเซลล์ท่อน้ำท่ออาหารและแก่นกลางลำต้นอย่างหนาแน่น ได้มีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ เส้นใยอ่อนสีใสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ผนังหนาขึ้น และพันกันเป็นเม็ด sclerotia เส้นใยบางเส้นใยมีผนังเซลล์เหี่ยว ส่วนต้นถั่วเขียวผิวดำที่ไม่ตาย ยังคงมีลำต้นและใบเขียวอยู่ มีความรุนแรงของโรคที่รากระดับ 3.7 หรือ 74% รากส่วนใหญ่เน่าดำทั้งราก แต่ยังคงมีรากใหม่มากพอสมควร เชื้อสามารถเจริญขึ้นไปได้สูงเฉลี่ย 21.0 ซม. (รูปที่ 1) แต่ไม่พบการติดเชื้อในเมล็ด และฝักมีลักษณะสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค **ที่ 11 สัปดาห์หลังปลูก ความชื้นของดิน 56-57% WHC** ถั่วเขียวผิวดำมีฝักแก่แห้งดำหมดแล้ว อาการของต้นถั่วเขียวผิวดำในระยะนี้ เหมือนลักษณะอาการที่พบในระยะ 9 สัปดาห์หลังปลูก ต่างกันที่มีต้นตายมากขึ้น มีความรุนแรงของโรคที่รากมากกว่า (ระดับ 4.3 หรือ 86%) และพบรากใหม่น้อยมาก เชื้อสามารถเจริญขึ้นไปได้สูงเฉลี่ย 20.8 ซม. (รูปที่ 1) แต่ไม่พบการติดเชื้อในเมล็ดและฝักมีลักษณะสมบูรณ์ไม่เป็นโรค ถั่วเขียวผิวดำเจริญเติบโตไม่ดีและแสดงอาการเหี่ยว **ที่ 13-15 สัปดาห์หลังปลูก ดินมีความชื้น 56% WHC** ถั่วเขียวผิวดำมีลักษณะอาการเหมือนกันคือ ยืนต้นแห้งตายมากกว่า 80% บางต้นมีเม็ด sclerotia และ pycnidia เล็กๆ สีดำจากโคนต้นถึงยอด แต่ไม่พบการติดเชื้อในเมล็ด ฝักมีลักษณะสมบูรณ์ไม่เป็นโรค ในระยะนี้ เชื้อเจริญขึ้นไปในลำต้นได้สูงเฉลี่ย 24.8 และ 2.75 ซม. ตามลำดับ (รูปที่ 1) และมีความรุนแรงของโรคที่รากระดับ 4.7 (94%) และ 4.8 (96%) ตามลำดับ รากเกือบทั้งหมดเน่าดำทั้งราก มีเม็ด sclerotia เล็กๆ สีดำ อยู่ภายใน และไม่พบรากใหม่ ถั่วเขียวผิวดำแสดงอาการเหี่ยว **ที่ 17 สัปดาห์หลังปลูก ดินมีความชื้น 56% WHC** ถั่วเขียวผิวดำทุกต้น ยืนต้นแห้งตาย และทุกต้นมีรากทั้งหมดเน่าดำทั้งราก เชื้อเจริญขึ้นไปในลำต้นได้ถึงยอด แต่ไม่พบการติดเชื้อในเมล็ด ฝักมีลักษณะสมบูรณ์ไม่เป็นโรค เส้นใยของเชื้อภายในลำต้น มีสีน้ำตาลเข้ม ผนังหนา และมีผนังเซลล์เหี่ยว พบเม็ด sclerotia ทั่วไปภายในลำต้น

วิจารณ์ผลการทดลอง

จะเห็นได้ว่าเชื้อ *M. phaseolina* ทำให้พืชเป็นโรคอย่างช้าๆ (weak parasite) ต้องใช้เวลาถึง 7 สัปดาห์หลังปลูก ในการทำให้รากเป็นโรค 66% และเจริญขึ้นไปในลำต้นสูง 5 ซม. ในระยะแรกของการเข้าทำลาย เชื้อนี้จะเจริญทำลายเนื้อเยื่อภายในรากก่อน เมื่อเนื้อเยื่อรากถูกทำลายมากขึ้น จึงเจริญอย่างต่อเนื่องขึ้นไปทำลายเนื้อเยื่อภายในลำต้นต่อไป

อัตราการเจริญและความหนาแน่นของเส้นใยขณะเจริญอย่างต่อเนื่องภายในลำต้นถั่วเขียวผิวดำจะมากหรือน้อย เร็วหรือช้า ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของพืช โดยพบว่า ในสภาวะที่ดินมีความชื้น 60% WHC ต้นถั่วเขียวผิวดำมีการเจริญเติบโตดี แข็งแรง สามารถต้านทานต่อการรุกรากของเชื้อโรคได้สูง ทำให้เชื้อเจริญขึ้นไปสู่ส่วนยอดช้าลง เจริญขึ้นไปไม่ถึงฝักในขณะที่ยังอ่อน ซึ่งฝักและเมล็ดอ่อนเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อมาก ในสภาวะที่ความชื้นของดินลดลงเป็น 56-57% WHC พบว่า ถั่วเขียวผิวดำไม่สามารถสร้างรากใหม่ออกมาชดเชยได้ทันต่อความเสียหาย ทำให้ถั่วเขียวผิวดำอ่อนแอต่อโรค เป็นผลให้รากเก่าเป็นโรคอย่างรุนแรง และเชื้อสามารถเจริญขึ้นไปในลำต้นได้อย่างรวดเร็ว ต้นที่มีเชื้อเจริญอย่างหนาแน่นทั่วไปภายในลำต้น ตายภายใน 1-2 วัน การตายอย่างรวดเร็วของต้นถั่วเขียวผิวดำ ในขณะเดียวกันจะไปมีผลทำให้เชื้อเจริญเข้าสู่ระยะพักตัว สร้างเม็ด sclerotia เส้นใยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ผนังหนา และไม่เข้าทำลายพืช ด้วยเหตุนี้ จึงไม่พบว่ามีการติดเชื้อในเมล็ด และฝักไม่เป็นโรค สาเหตุที่สำคัญอีกประการหนึ่ง นอกเหนือจากการตายอย่างรวดเร็วของต้นถั่วเขียวผิวดำ และการเข้าสู่ระยะพักตัวของเชื้อ ที่ทำให้ไม่มีการติดเชื้อในเมล็ดคือ ความแห้งแข็งของเมล็ดและฝัก เมื่อเชื้อเจริญขึ้นมาถึงฝัก เมล็ดและฝัก

ได้แก่แห้งไปแล้ว ไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ

ปัจจัยอื่นๆ ที่ช่วยสนับสนุนให้เชื้อเจริญขึ้นไปถึงส่วนยอดได้อย่างรวดเร็ว เมื่อลดระดับความชื้นของดินลง มีดังนี้ คือ 1. ลักษณะการเจริญของเชื้อภายในลำต้น เชื้อ *M. phaseolina* มีลักษณะการเจริญของเชื้อภายในลำต้นแบบ intracellular ในเซลล์ท่อน้ำท่ออาหารและแก่นกลางลำต้น โดยเฉพาะในแก่นกลางลำต้น ซึ่งมีลักษณะกลวงไม่มีสิ่งกีดขวางการเจริญของเส้นใย และ 2. เซลล์ของท่อน้ำท่ออาหารมีความยาวของเซลล์มากกว่าเซลล์อื่นๆ เชื้อจึงเจริญจากเซลล์หนึ่งขึ้นไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้อย่างรวดเร็ว

ด้วยเหตุที่เชื้อ *M. phaseolina* เป็น saprophytic parasite ขึ้นเจริญอยู่ในเศษซากพืชได้ เมื่อได้รับความชื้นเหมาะสม ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า เชื้อที่อยู่ในลำต้นถั่วเขียวผิวดำ มีการเจริญอีกครั้งเมื่อได้รับความชื้นจากน้ำค้าง หรือจากการกองสุมต้นและฝักไว้ในแปลงแล้วเข้าทำลายเมล็ดและฝักโดยตรงทำให้พบเมล็ดติดเชื้อมาก

การลดระดับความชื้นของดินลง 3-4% WHC ไม่ทำให้ความรุนแรงของโรคที่รากเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ความรุนแรงของโรคที่รากยังคงเพิ่มขึ้นตามปกติ แต่พบว่าถั่วเขียวผิวดำสร้างรากใหม่ออกมาชดเชยความเสียหายน้อยมาก โดยมากไม่พบว่ามีการสร้างรากใหม่ออกมา

สรุปผลการทดลอง

เชื้อ *M. phaseolina* มีการเจริญอย่างต่อเนื่องจากการติดเชื้อที่รากเข้าไปในลำต้น จากโคนต้นถึงยอด แต่ไม่สามารถเข้าทำลายเมล็ดและฝักได้ สาเหตุที่เชื้อไม่สามารถเข้าทำลายเมล็ดและฝัก สรุปได้ดังนี้

1. ขณะที่ถั่วเขียวผิวดำเริ่มติดเมล็ด ฝักและเมล็ดอ่อนมีความชื้นสูงเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ เชื้อเจริญขึ้นไปในลำต้นได้น้อยมาก ไม่ถึงฝัก เมื่อเชื้อเจริญถึงฝัก ฝักและเมล็ดได้แก่แห้งไปแล้ว ไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ

2. เมื่อเชื้อเจริญเข้าไปในทุกส่วนของลำต้น ขึ้นไปถึงฝักและยอด ถั่วเขียวผิวดำจะตายภายใน 1-2 วัน ทำให้เชื้อต้องพักตัว สร้างเม็ด sclerotia อย่างรวดเร็ว ไม่สามารถเข้าทำลายเมล็ดและฝักแห้งได้

การติดเชื้อในเมล็ดถั่วเขียวผิวดำ เกิดจากการที่เชื้อที่พักตัวอยู่ในลำต้นถั่วเขียวผิวดำ มีการเจริญอีกครั้ง เมื่อได้รับความชื้นจากน้ำค้างและจากการสุมกองไว้ในแปลง จึงเข้าทำลายฝักและเมล็ดโดยตรง ทำให้พบเมล็ดติดเชื้อมาก เมื่อสุ่มตัวอย่างเมล็ดมาตรวจโรค ดังนั้น การเก็บเกี่ยวฝักถั่วเขียวผิวดำ ควรเก็บเกี่ยวที่ระยะเวลาที่สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตรแนะนำ ไม่ควรทิ้งฝักไว้ในแปลงนานเกินไป และไม่ควรกองสุมฝักและต้นไว้ในแปลงปลูกตามวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติอยู่ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องแนะนำให้เกษตรกรเปลี่ยนวิธีการเก็บเกี่ยว เพื่อลดการติดเชื้อ *M. phaseolina* ไปกับเมล็ด

เอกสารอ้างอิง

มัทนา ศรีหัตถกรรม ไพฑูรย์ พูลสวัสดิ์ เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง และจรัสพร ถาวรสุข. 2534. การเลือกระยะเวลาเก็บเกี่ยวเพื่อลดปริมาณการติดเชื้อ *Macrophomina phaseolina* ของเมล็ดถั่วเขียวผิวดำ, น. 132-140. ใน รายงานผลงานวิจัยปี 2534 ถั่วเขียวและพืชไร่ในเขตชลประทาน. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท, ชัยนาท. 569 น.

มัทนา ศรีหัตถกรรม จรัส กิจบำรุง และพรพุฒิ ประเสริฐกุล. 2537. การศึกษาการเข้าทำลายใบถั่วเขียวผิวดำของเชื้อ *Macrophomina phaseolina*. ใน รายงานผลงานวิจัยปี 2537 ถั่วเขียวและพืชไร่ในเขตชลประทาน. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท, ชัยนาท.

มัทนา ศรีหัตถกรรม จรัส กิจบำรุง และพรพุฒิ ประเสริฐกุล. 2537. การเจริญของเชื้อ *Macrophomina phaseolina* ในส่วนต่างๆ ของพืชภายหลังการติดเชื้อที่ใบ. ใน รายงานผลงานวิจัยปี 2537 ถั่ว เขียวและพืชไร่ในเขตชลประทาน. ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท, ชัยนาท.