

การจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเขียวและการเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญบางชนิด

Identification of fungal pathogen causing charcoal rot disease of Mung Bean and infection to economically important plants

ประภาพร แพงดา^{1,2}, รัตติยา พงศ์พิสุทธิธ^{1*} และ ชัยณรงค์ รัตนกริธากุล¹

Prapaporn Paengda^{1,2}, Ratiya Pongpisutta^{1*} and Chainarong Rattanakreetakul¹

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

² ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี, สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, อุบลราชธานี 34190

² Ubon Ratchathani Field Crops Research Center (UBFCRC), Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Ubon Ratchathani 34190

บทคัดย่อ: โรคเน่าดำส่งผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของถั่วเขียวในประเทศไทยเป็นอย่างมาก เชื้อราสาเหตุสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะของการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว อีกทั้งสามารถอาศัยอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเขียว และศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญบางชนิด โดยนำเชื้อราจำนวน 26 ไอโซเลท ที่เก็บมาจาก 6 พื้นที่ปลูก ได้แก่จังหวัดชัยนาท อุทัยธานี นครสวรรค์ ลพบุรี เพชรบูรณ์ และน่าน มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม นำตัวแทนแต่ละกลุ่มมาศึกษาทางอนุชีวโมเลกุล โดยการจำแนกชนิดของเชื้อราอาศัยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (ITS1-5.8s-ITS2) และ TEF1-alpha พบความยาวประมาณ 800 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ จำแนกได้เป็นเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 ถั่วลิสงพันธุ์กาฬสินธุ์ 2 ถั่วพุ่มเมล็ดดำพันธุ์อุบลราชธานี ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์บิ๊กไวท์ 852 F1 และงาคั่วพันธุ์อุบลราชธานี 3 ด้วยวิธีการปลูกเชื้อรา *M. phaseolina* NAN203 บนเมล็ดและราก พบอาการบนพืชทั้ง 5 ชนิดคล้ายคลึงกัน โดยในระยะเริ่มต้นบริเวณต้นและรากเป็นแผลจุดดำ น้ำตาล ต่อมาแผลขยายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน และใบเหลืองยังคงติดกับต้น ต่อมาแผลเปลี่ยนเป็นสีดำเข้ม ต้นเหี่ยวและพบว่าเชื้อราเจริญบนเนื้อเยื่อส่วนที่เหลืองอย่างรวดเร็ว พบการสร้าง microsclerotium บริเวณส่วนที่เชื้อเข้าทำลายซึ่งเป็นสีดำ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความสามารถของเชื้อรา *M. phaseolina* ชนิดเดียว สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด ดังนั้นการวางแผนในการจัดการโรคในแปลงจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ

คำสำคัญ: พืชเศรษฐกิจ; *Macrophomina phaseolina*; การจัดจำแนก; พืชอาศัย

ABSTRACT: Charcoal rot disease affects to mung bean product and quality in Thailand. The fungal pathogen infects mung bean all growth stages from seedling to harvesting. Moreover, it can survive in the soil for a long period of time. The aims of this research were to identify the fungal pathogen causing charcoal rot of mung bean and to investigate aggressiveness on other economically important plants. Twenty-six isolates of the pathogen collected from 6 areas in Chai Nat, Uthai Thani, Nakhon Sawan, Lopburi, Phetchabun and Nan provinces. Morphological and colony characteristics were investigated, then all isolates were grouped into 5 groups. Representative isolates of each group were considered using molecular technique. Identification was based on sequencing of ITS region (ITS1-5.8s-ITS2) and TEF1-alpha contained sequences approximately 800 and 900 bp, respectively, then identified as *Macrophomina phaseolina*. Pathogenicity test on 5 different economically plant crops such as mungbean cv. Chai Nat

* Corresponding author: agrryp@ku.ac.th

72, peanuts cv. Thainan, cowpea black grain cv. Ubon Ratchathani, waxy corn cv. Big white 852 F1 and black sesame cv. Ubon Ratchathani 3 were examined using unwounded inoculation by *M. phaseolina* NAN203 on seed coat and root. Diseased symptoms occurred on all crops, similarly. Stem and root lesions first appeared water soaked but then turn a dull light brown with senesced leaves still attached to the plants, later turn to be dark brown necrotic symptom. The infected plants wilted and the fungus rapidly colonized the remaining tissues. The dead tissues turned black as microsclerotia were abundantly produced. This research indicated aggressiveness of the single fungus, *M. phaseolina* which can infect various hosts, it is very crucial to develop disease management program in the field, absolutely.

Keywords: economically plants; *Macrophomina phaseolina*; identification; host

บทนำ

ถั่วเขียวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยมาอย่างยาวนาน ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้เพื่อการบริโภคภายในประเทศโดยตรง เช่นนำมาเพาะเป็นถั่วงอก การแปรรูปเป็นวันเส้น การนำมาประกอบอาหารและขนมหวาน และการนำไปผสมเป็นอาหารสัตว์ เป็นต้น ในปี 2562 มีความต้องการใช้ถั่วเขียวภายในประเทศ 113,291 ตัน ผลผลิตรวมทั้งหมดของประเทศผลิตได้ 92,472 ตัน ส่งออกประมาณ 16,753 ตัน นำเข้าถั่วเขียวจากต่างประเทศ 26,617 ตัน มีพื้นที่ปลูก 803,522 ไร่ สำหรับประเทศคู่แข่งทางการตลาดที่สำคัญของไทย ได้แก่ เมียนมา จีน และอุซเบกิสถาน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562)

อย่างไรก็ตามการผลิตถั่วเขียวในประเทศไทยยังคงประสบกับปัญหาของโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพที่สภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (climate change) ทำให้โรคพืชบางชนิดมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นในสภาพอากาศที่มีอุณหภูมิสูง โรคที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดความเสียหายกับถั่วเขียวได้ทั้งในระยะต้นกล้าและระยะต้นโต คือ โรคเน่าดำ (charcoal rot) เกิดจากเชื้อรา *Macrophomina* สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดนี้ คืออุณหภูมิที่สูง ประมาณ 28-34°C (Smith and Wyllie., 1999; Radwan et al., 2014) และความชื้นในดินต่ำ (Dhingra and Sinclair., 1978; Manici et al., 1995; Saleh et al., 2010) เมื่อปลูกถั่วเขียวในสภาพดังกล่าว พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายและแพร่กระจายได้ ทำให้ต้นตายและผลผลิตที่ได้ไม่มีคุณภาพ เนื่องจากเชื้อราสาเหตุนั้นติดไปกับเมล็ด ทำให้เมล็ดเน่าเสียหาย เมื่อนำไปแปรรูปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีคุณภาพ

เชื้อรา *Macrophomina* เป็นสาเหตุของโรคเน่าดำที่มีพืชอาศัยกว้าง เช่น ถั่ว ถั่วเหลือง ถั่วพุ่ม ถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าวฟ่างและฝ้าย เป็นต้น (Su et al., 2001, Ndiaye et al., 2010, Sarr et al., 2014, Sun et al., 2015) มีรายงานของ Ndiaye et. al. (2015) พบว่ามี 2 สปีชีส์ ที่สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ *Macrophomina phaseolina* และ *M. pseudophaseolina* จากการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในถั่ว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ Apagbaala (ด้านทาน) สายพันธุ์ IT93k-503-1 (ด้านทานปานกลาง) และ สายพันธุ์ Mouride (อ่อนแอ) พบว่าที่อุณหภูมิ 36°C เชื้อรา *M. pseudophaseolina* ก่อให้เกิดโรครกับถั่วพันธุ์ที่อ่อนแอ (สายพันธุ์ Mouride) ได้รุนแรงมากกว่าเชื้อรา *M. phaseolina* ในขณะที่อุณหภูมิ 34°C เชื้อรา *M. pseudophaseolina* จะเข้าทำลายถั่วได้ลดลง โดยมีการเข้าทำลายใกล้เคียงกับเชื้อรา *M. phaseolina* ส่วนลักษณะอาการที่พบหลังจากปลูกเชื้อรา *Macrophomina* ทั้ง 2 สปีชีส์ บนต้นถั่ว นั้น พบว่ามีลักษณะอาการเหมือนกัน เนื่องจากเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ มีความคล้ายคลึงกันมาก จึงไม่สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานได้เพียงอย่างเดียว เพื่อช่วยให้การจำแนกเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ มีความแม่นยำและถูกต้องมากยิ่งขึ้น จึงได้มีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกันกับเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุล Sarr et al. (2014) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *M. phaseolina* สาเหตุโรคเน่าดำของ ถั่ว ถั่วลิสง กระเจี๊ยบ และกระเจี๊ยบแดง โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคอนุชีวโมเลกุล (ITS region, TEF1-alpha, ACT, TUB และ CAL) พบว่าสามารถจำแนกเชื้อรา *M. phaseolina* ออกจาก *M. pseudophaseolina* ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ในงานวิจัยของ รัตยา (ข้อมูลส่วนตัว) ได้จำแนกเชื้อรา *Fusarium incarnatum* กับ *F. equiseti* เมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำมาสร้าง phylogenetic tree พบว่าไม่สามารถจำแนกเชื้อรา 2 สปีชีส์ออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเปลี่ยนมาศึกษาบริเวณ TEF1-alpha สามารถจำแนกเชื้อราทั้งสองออกจากกันได้อย่างชัดเจน

จากที่กล่าวข้างต้นจะเห็นว่าเชื้อรา *Macrophomina* สามารถเข้าทำลายกล้วยได้หลายชนิด และสร้างความเสียหายต่อผลผลิต ซึ่งเกษตรกรมักปลูกพืชเศรษฐกิจหลายชนิดร่วมกันกับพืชตระกูลกล้วย วัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้เพื่อจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำของกล้วย และศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญบางชนิด เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดการโรคในแปลงต่อไป

วิธีการศึกษา

แยกเชื้อราสาเหตุ

เก็บตัวอย่างลำต้นและกิ่งแห้งของกล้วยที่แสดงอาการเน่าดำ แผลสีน้ำตาลปนดำและพบโครงสร้าง microsclerotium ของเชื้อราสาเหตุโรค จากพื้นที่ปลูกกล้วยในจังหวัดชัยนาท อุทัยธานี นครสวรรค์ ลพบุรี เพชรบูรณ์ และน่าน นำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยวิธีการ tissue transplanting โดยตัดชิ้นส่วนของกล้วยที่แสดงอาการของโรคขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 ซม. ฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวด้วยสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 3% นาน 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 1-2 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวางบนอาหาร water agar (WA) บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 วัน ทำเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วย hyphal tip method (Narayanasamy, 2001) เลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเชื้อราที่บริสุทธิ์บนอาหาร potato carrot agar (PCA) ที่อุณหภูมิ 14°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุ

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุบนอาหาร PDA บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 7 วัน ตรวจสอบลักษณะของโคโลนี จากนั้นกระตุ้นการสร้างสปอร์เชื้อราโดยการวางใบทุเรียนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อบนอาหาร ½ potato dextrose agar (½PDA) บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15-20 วัน ตรวจสอบรูปร่างและขนาดของสปอร์เชื้อราสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound microscope) ที่กำลังขยาย 10 - 100 เท่า จากนั้นจำแนกเชื้อราสาเหตุจากการศึกษาข้อมูลพื้นฐานเทียบกับหนังสือ The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata (Sutton, 1980)

การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์

เลือกตัวแทนของเชื้อราสาเหตุอย่างละ 1 ไอโซเลท จากลักษณะของโคโลนีทั้ง 5 แบบ ที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเลือกเพิ่มเติมมาอีก 2 ไอโซเลท ที่สร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เลี้ยงเชื้อราสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม. เจาะบริเวณขอบของโคโลนี แล้วย้ายลงอาหารเหลว spezieller nährstoffamer broth (SNB) นำไปเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 วัน กรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Pongpisutta et. al. (2013) และ Zimand et. al. (1994) โดยบดเส้นใยร่วมกับไนโตรเจนเหลว จากนั้นกำจัดโปรตีนด้วย proteinase K และสารละลาย phenol chloroform isoamyl alcohol (PCI) ทำการตกตะกอนสารพันธุกรรมด้วย absolute alcohol และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol จากนั้นปล่อยให้แห้ง โดย air drying method นาน 20-30 นาที เติมสารละลาย 1xTE buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 60 µl เพื่อละลายตะกอน และเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้สำหรับการศึกษาต่อไป

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัยความสามารถของการจับกันของไพรเมอร์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS1-5.8s-ITS2) และ translation elongation factor 1-alpha (TEF1-alpha) ดังตาราง Table 1 ทำการเตรียมดีเอ็นเอเชื้อราความเข้มข้น 2 µl ผสมสารทำปฏิกิริยา (master mix) สำหรับการเตรียม master mix ดังแสดงใน Table 2

Table 1 List of primers and their nucleotide sequences for analysis and identification

Gene/ region	Primer	Sequence (5'-3')	Ta (°C)	References
ITS region	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	56	White et al. (1990)
	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G		
TEF1-alpha	EF1-728F	CAT CGA GTT CGA GAA GG	55.4	Carbone and Kohn. (1999)
	EF2R	AGC ATG TTG TCG CCG TTG AAG		Jacobs et al. (2004)

Table 2 Configuration of master mix for PCR

Element	Concentration	Final concentration	Volume/1 reaction (µl)
1. DNA template	25 µl	2 µl	2.0
2. Sterile dH ₂ O	-	-	14.2
3. <i>Taq</i> buffer	10X	1X	2.5
4. Mg ²⁺	10X	1X	2.5
5. dNTPs	1 mM	0.04 mM	1.2
6. Forward primer	10 µM	400 nM	1.2
7. Reverse primer	10 µM	400 nM	1.2
8. <i>Taq</i> polymerase	5 U/µl	0.5 U	0.2
Total			25.0

นำตัวอย่างเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยตั้งระบบดังนี้ pre-denature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที ส่วน annealing นั้นมีความแตกต่างกันระหว่างบริเวณ ITS และยีน TEF1-alpha ที่ต้องใช้อุณหภูมิ 56 และ 55.6°C ตามลำดับ (Table 1) โดยใช้เวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1.30 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 35 รอบ และปฏิกิริยารอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที นำผลิตภัณฑ์ของ PCR (PCR product) ไปแยกขนาดโดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis บน 1.2% agarose gel ใน 1XTBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ บันทึกการเกิดแถบ PCR product ภายใต้แสง UV โดยเครื่อง Gel Documentation จากนั้นนำ PCR product ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท 1st Base laboratories ประเทศมาเลเซีย นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจาก GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLASTn <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> และศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา โดยการสร้าง phylogenetic tree ตามวิธี maximum parsimony ที่ค่าความเชื่อมั่น (Bootstrap value) เท่ากับ 1,000 ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 (Kumar et. al., 2016)

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ

จากการทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคกับพืชของเชื้อราสาเหตุทั้ง 26 ไอโซเลท เบื้องต้น เลือกเชื้อรา *M. phaseolina* NAN 203 มีความรุนแรงสูงสุด ทดสอบความสามารถในการเกิดโรคกับพืชอาศัยทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ถั่วเขียวพันธุ์ชยันนาท 72 ถั่วลิสงพันธุ์ภาพสินธุ์ 2 ถั่วพุ่มเมล็ดดำพันธุ์อุบลราชธานี ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์บีบีไวท์ 852 F1 และงาคั่วพันธุ์อุบลราชธานี 3 โดยทดสอบกับเชื้อรา *M. phaseolina* NAN 203 ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 ซม. เจาะขอบโคโคนี้นำ mycelial disc ไปใช้ในการปลูกเชื้อ โดยแบ่งการทดสอบตามการเข้าทำลายของเชื้อออกเป็น 2 ระยะ คือ

ระยะก่อนงอก (pre-emergence) ปลุกพืชทดสอบในกล่องพลาสติกขนาด 10 x 14 x 2.5 ซม. วางเมล็ดพันธุ์จำนวน 6 เมล็ด/กล่อง จากนั้นนำ mycelial disc จำนวน 1 ชิ้น/เมล็ด วางบริเวณใกล้เคียงกับเมล็ด กลบด้วยดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และรดน้ำให้ชุ่ม

ระยะหลังงอก (post-emergence) ปลุกพืชทดสอบแต่ละชนิดในกล่องพลาสติกขนาดเดียวกันโดยใช้กระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วใส่ในกล่องพลาสติก เทน้ำใส่เพื่อให้ความชื้น วางเมล็ดพันธุ์จำนวน 6 เมล็ด/กล่อง วางกล่องพืชทดสอบไว้เป็นเวลา 7 วัน จนรากงอก จากนั้นปลูกเชื้อราสาเหตุด้วย mycelial disc จำนวน 1 ชิ้น/เมล็ด วางไว้บริเวณราก ใช้ดินที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ กลบ แล้วรดน้ำให้ชุ่ม

บันทึกลักษณะอาการของโรค หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุ 21 วัน และถ่ายภาพ พร้อมทั้งแยกเชื้อกลับตามวิธีการพิสูจน์โรคของ Koch's postulation เพื่อยืนยันถึงความสามารถในการเป็นเชื้อราสาเหตุโรค

ผลการศึกษาและวิจารณ์

แยกเชื้อราสาเหตุ

จากการแยกเชื้อราสาเหตุของถั่วเขียวที่แสดงอาการบนกิ่ง และลำต้นเน่า มีแผลสีน้ำตาลปนดำ พบการสร้าง microsclerotium บริเวณแผล ในพื้นที่ปลูกถั่วเขียวที่สำคัญ 5 จังหวัด พบว่าสามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท โดยแบ่งเป็นเชื้อราสาเหตุจากจังหวัดชัยนาท (CNT) อุทัยธานี (UTI) นครสวรรค์ (NSN) ลพบุรี (LRI) เพชรบูรณ์ (PNB) และน่าน (NAN) จำนวน 1 (CNT101), 8 (UTI101, UTI102, UTI103, UTI203, UTI301, UTI302, UTI402 และ UTI403), 5 (NSN101, NSN103, NSN104, NSN301 และ NSN502), 2 (LRI101 และ LRI102), 8 (PNB201, PNB202, PNB301, PNB304, PNB501, PNB502, PNB503 และ PNB504) และ 2 (NAN101, NAN203) ไอโซเลท ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราทั้ง 26 ไอโซเลท ที่เจริญบนอาหาร PDA พบในระยะ 1 – 2 วัน เชื้อราเหล่านี้มีลักษณะของโคโลนี คล้ายคลึงกัน คือสร้างเส้นใยสีขาวเจริญแผ่ราบบนผิวหน้าอาหาร ต่อมาหลังการบ่มเป็นเวลา 4 วัน มีการพัฒนาเป็นเส้นใยลักษณะโคโลนีและสีแตกต่างกัน โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 โคโลนีสีเขียวอมเทา เจริญแผ่ราบบนผิวหน้าอาหาร ขอบโคโลนีเรียบเส้นใยสีขาวถึงเขียวมะกอก จำนวน 11 ไอโซเลท (**Figure 1A**) กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีเทาถึงดำ บริเวณกลางโคโลนีเส้นใยแผ่ราบไปกับผิวหน้าอาหาร ขอบโคโลนีสร้างเส้นใยสีขาวถึงขาวปนเทาเจริญฟูจากผิวหน้าอาหาร อัดตัวกันแบบหลวม ๆ จำนวน 8 ไอโซเลท (**Figure 1B**) กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีเทาถึงดำ สร้างเส้นใยสีขาวเทา เจริญฟูจากผิวหน้าอาหาร ขอบโคโลนีเรียบ เส้นใยอัดตัวกันแบบหลวม ๆ จำนวน 3 ไอโซเลท (**Figure 1C**) กลุ่มที่ 4 โคโลนีมีลักษณะคล้ายกับกลุ่มที่ 3 พบการสร้างเส้นใยสีขาวถึงขาวปนเทา เจริญฟูจากผิวหน้าอาหาร แต่มีการอัดตัวของเส้นใยค่อนข้างแน่น ขอบโคโลนีเรียบสร้างเส้นใยสีเทา ถึงดำ จำนวน 3 ไอโซเลท (**Figure 1D**) และ กลุ่มที่ 5 โคโลนีสร้างเส้นใยสีเขียวมะกอกถึงเทา เจริญฟูจากผิวหน้าอาหาร ขอบโคโลนีเรียบสร้างเส้นใยสีเขียวมะกอก จำนวน 1 ไอโซเลท (**Figure 1E**) สำหรับลักษณะโคโลนีได้ผิวดำ (reverse) พบว่ามีสีดำที่บิในทุกไอโซเลท

เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเชื้อราทั้ง 26 ไอโซเลท มีการสร้างองค์ประกอบที่คล้ายคลึงกัน โดยทุกไอโซเลทมีการสร้าง microsclerotia ผืนหนา เรียบ สีน้ำตาลเข้มถึงดำ รูปร่างตั้งแต่ globose ถึง oval ขนาด 78.30-95.88 x 106.93-144.97 ไมโครเมตร (**Figure 1F**) พบการสร้างส่วนขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า pycnidium รูปร่าง globose ผืนหนา มี ostiole เป็นแบบ non-papillate (**Figure 1G**) ภายในสร้าง conidiogenous cell โส ไมมีสี ผืนเรียบ มีรูปร่างที่ฐานขยายส่วนปลายเรียว (lageniform) ถึงรูปร่างค่อนข้างทรงแท่ง (subcylindrical) (**Figure 1H**) สร้างสปอร์ (spore) ค่อนข้างยาวบนอาหาร PDA ยกเว้นไอโซเลท LRI101 และ CNT101 สามารถสร้างสปอร์บนอาหาร PDA บ่มได้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15-20 วัน สำหรับการสร้างสปอร์นั้น พบ 2 รูปแบบ คือ microconidia มี 1 เซลล์ โส ไมมีสี ผืนบางและเรียบ มีหยดไขมัน (guttulate) รูปร่างกลม (spherical) รี (ellipsoid) ถึงมีลักษณะตรง (straight) ขนาด 6.53-7.37 x 8.53-9.24 ไมโครเมตร และ macroconidia มีเซลล์เดียว โส ไมมีสี ผืนบาง เรียบ มีหยดไขมันขนาดเล็กภายในสปอร์ รูปร่าง ellipsoid ถึงรูปร่างตรงข้ามกับรูปไข่ที่ส่วนฐานแคบแต่ส่วนปลายกว้าง (obovoid) ขนาด 6.99-7.63 x 18.62-21.35 ไมโครเมตร (**Figure 1I**) จะพบแผ่นเมือกโดยรอบสปอร์

(Figure 1J) และยังพบแผ่นเมือกคล้ายยางค์บริเวณส่วนปลายของสปอร์ (apical mucoid appendages) มีลักษณะใส (Figure 1K) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุดังกล่าว สามารถจำแนกเบื้องต้นได้เป็นเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* โดยทำการเปรียบเทียบข้อมูลจากหนังสือ The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata (Sutton, 1980)

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *M. phaseolina* มีลักษณะของโคโลนีที่หลากหลาย โดยทั่วไปแล้วเชื้อราดังกล่าวมักมีโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อม พืชอาศัย รวมไปถึงปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อราในระดับห้องปฏิบัติการจึงเกิดความแตกต่าง (variation) นอกจากนี้มีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในพืชอาศัยชนิดอื่น Satpathi and Gohel (2018) ได้จำแนกเชื้อรา *M. phaseolina* สาเหตุโรคต้นและรากเน่าของงาในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อราที่แยกได้ 5 ไอโซเลท มีลักษณะของโคโลนีแตกต่างกัน ตั้งแต่เจริญราบบนผิวหน้าอาหารจนถึงเจริญฟูบนผิวหน้าอาหาร อีกทั้งงานวิจัยของ Huda-Shakirah et. al. (2019) ที่แยกเชื้อ *M. phaseolina* จากต้นพลับพลึง และพลับพลึงดินเปียกในประเทศมาเลเซีย พบโคโลนีสร้างเส้นใยลักษณะอัดตัวกันแน่น สีดำ ดำปนเทา เทา จนถึงสีเขียวมะกอก และบางไอโซเลทเส้นใยมีการอัดตัวค่อนข้างน้อย เป็นต้น

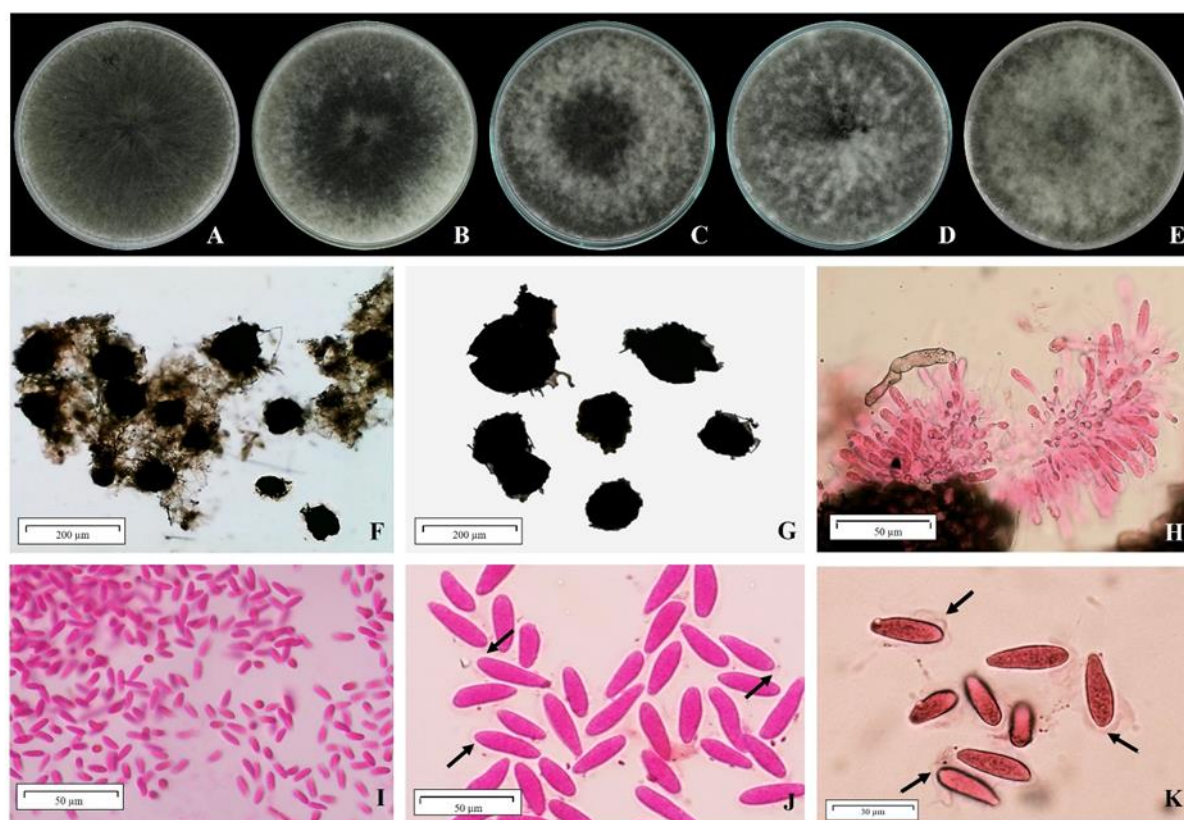


Figure 1 Morphological characteristics of *Macrophomina* isolated from charcoal rot of mungbean on PDA after 4 days of incubation (A-E) 5 colony types, (F) microsclerotia, (G) pycnidia, (H) conidiogenous cells, (I) microconidia and (J) macroconidia with mucous sheath and (K) macroconidia with apical mucoid appendages (arrows).

การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์

เชื้อราสาเหตุโรค จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ LRI101, NSN101, PBN201, UTI102, PBN101, UTI402 และ CNT101 ซึ่งเป็นตัวแทนจากการคัดเลือกโดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะโคโลนีและการสร้างสปอร์บนอาหาร PDA เมื่อนำมาศึกษาข้อมูลทางอนุชีวโมเลกุล พบว่าหลังการสกัดดีเอ็นเอเชื้อราได้ดีเอ็นเอความเข้มข้นประมาณ 100 ng ไม่พบการปนเปื้อนของโปรตีนและอาร์เอ็นเอ เมื่อ

นำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 และ TEF1-alpha พบว่าหลังการตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ให้แถบ PCR product ขนาดประมาณ 800 และ 900 bp ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 เปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 7 ไอโซเลท มีความเหมือนกับเชื้อรา *M. phaseolina* และ *M. pseudophaseolina* เท่ากับ 99 – 100 % identity เมื่อทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) พบว่าเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *M. phaseolina* HND36 และ MpOc01 และยังอยู่ในกลุ่ม *M. pseudophaseolina* Por-Lea, CDA1111 และ CPC21528 มีค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 67% นอกจากนี้ยังแยกออกจากเชื้อรา *M. phaseolina* ไอโซเลท PKS10 (ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 99%) อย่างไรก็ตามทุกไอโซเลทแยกออกจาก out group (*Lasiodiplodia theobromae* MAZ111 และ *Fusarium oxysporum* KKK20) อย่างชัดเจน (Figure 2)

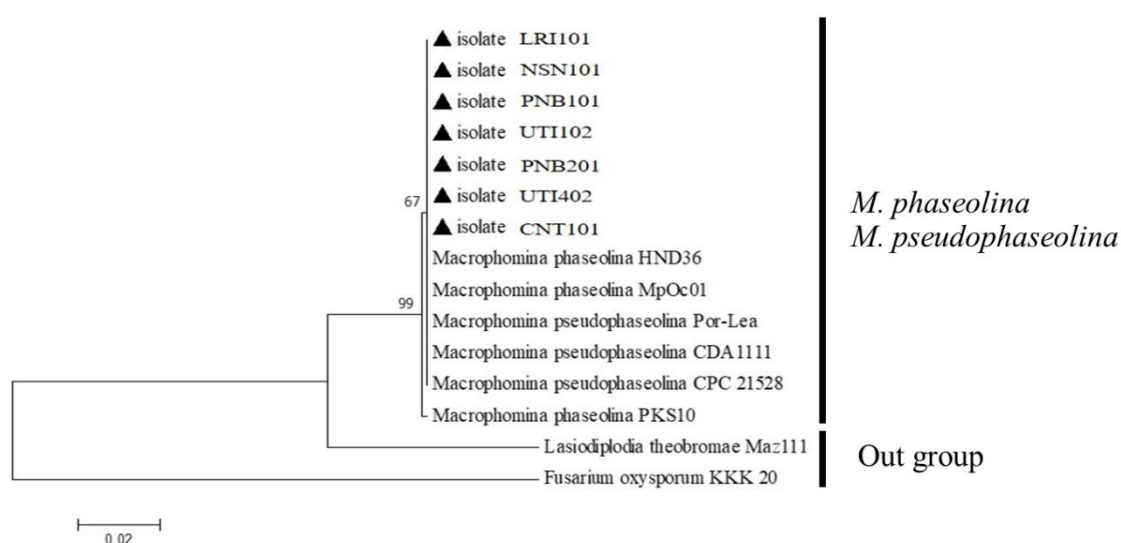


Figure 2 Maximum parsimony phylogenetic tree of the ITS1-5.8s-ITS2 sequences. A bootstrap analysis was performed with 1,000 repetitions with MEGA version 7 software.

สำหรับบริเวณ TEF1-alpha พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank สามารถจำแนกเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท ได้เป็นเชื้อรา *M. phaseolina* ที่ค่าความเหมือนเท่ากับ 99.09 – 100.00% ทำการสร้างแผนภูมิ phylogenetic tree พบว่าให้ผลสอดคล้องกันคือ เชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *M. phaseolina* CDA1086, gi และ CMM3650 โดยมีค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 99% แยกออกจากเชื้อรา *M. pseudophaseolina* CDA1095, CDA1111 และ URM8032 (ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 100%) และยังแยกออกจากเชื้อรา *M. euphobicola* ARM497 และ URM8041 (ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 50%) และทั้งหมดแยกออกจาก out group (*Lasiodiplodia theobromae* VSBa1.2 และ *Fusarium oxysporum* NRRL45975) อย่างชัดเจน (Figure 3)

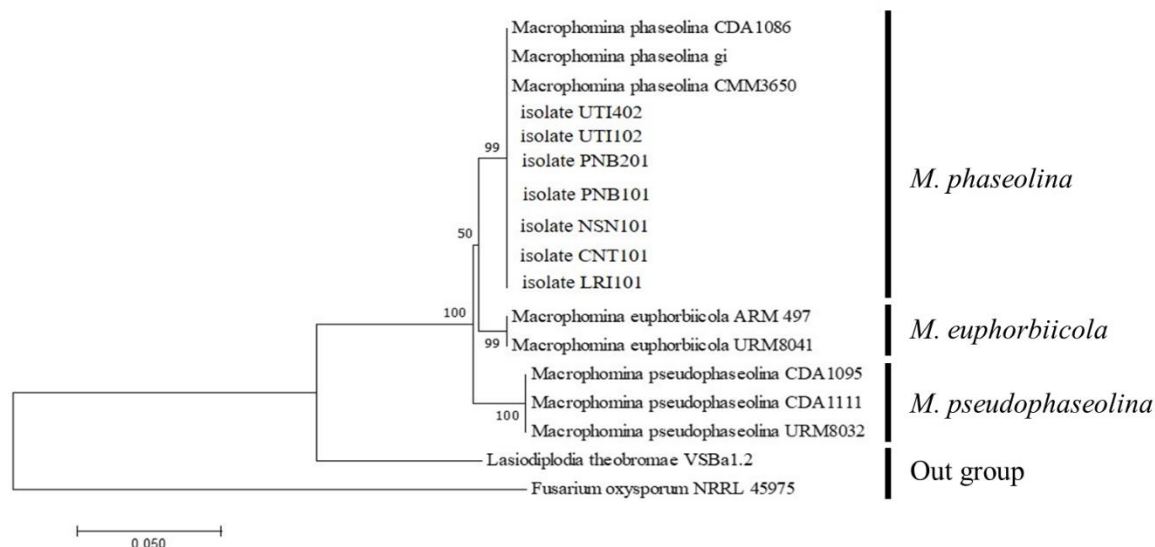


Figure 3 Maximum parsimony phylogenetic tree of the TEF1-alpha sequences. A bootstrap analysis was performed with 1,000 repetitions with MEGA version 7 software.

ผลการศึกษาการจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบความแตกต่างของเชื้อรา *Macrophomina* แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม อย่างไรก็ตามลักษณะของโคโลนีและลักษณะของสปอร์มีความคล้ายคลึงกัน เมื่อใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลพบว่าการเพิ่มสารพันธุกรรมบริเวณ ITS จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จาก phylogenetic tree พบว่าไม่สามารถแยกเชื้อรา *M. phaseolina* และ *M. pseudophaseolina* ออกจากกัน แต่เมื่อศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้บริเวณ TEF1-alpha ทำให้การจำแนกเชื้อรา 2 สปีชีส์ แยกออกจากกันอย่างชัดเจน ในการจำแนกเชื้อราจำเป็นต้องใช้ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สนับสนุนร่วมกัน เพื่อช่วยให้การจำแนกมีความแม่นยำและถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Machado et. al. (2018) ศึกษาและจำแนกเชื้อรา *Macrophomina* สาเหตุโรคเน่าดำของพืชน้ำมันในประเทศบราซิล พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความคล้ายคลึงกันมาก จึงได้นำเทคนิคอณูชีวโมเลกุลในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ITS, TEF1-alpha, ACT, TUB และ CAL มาประยุกต์ใช้ พบว่าสามารถจำแนกเชื้อรา *Macrophomina* สาเหตุโรคเน่าดำของพืชน้ำมันได้ 3 สปีชีส์ ได้แก่ *M. phaseolina*, *M. pseudophaseolina* และ *M. euphorbiicola* นอกจากนี้ Sarr et al. (2014) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Macrophomina* สาเหตุโรคเน่าดำจำนวน 189 ไอโซเลท จากพืชอาศัยจำนวน 23 ชนิด และดินตัวอย่างจำนวน 30 ตัวอย่าง ในประเทศเซเนกัล พบความหลากหลายของลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและขนาดของสปอร์ค่อนข้างสูง แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS, TEF1-alpha, ACT, TUB และ CAL สามารถจำแนกเชื้อราได้ 2 สปีชีส์ ได้แก่ *M. phaseolina* และ *M. pseudophaseolina*

จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสกุล *Macrophomina phaseolina* ที่แยกมาจากถั่วเขียวในพื้นที่ปลูกแตกต่างกัน แต่กลับพบลักษณะโคโลนีที่มีความหลากหลาย อย่างไรก็ตามลักษณะของสปอร์นั้นมีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้นการจำแนกเชื้อราในสกุลดังกล่าวควรมีการนำข้อมูลทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและอณูชีวโมเลกุลเข้ามาสนับสนุนการศึกษาจากข้อมูลพื้นฐาน เพื่อทำให้การจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเกิดความแม่นยำและถูกต้องมากยิ่งขึ้น

การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคในพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ

เมื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคเบื้องต้น พบว่าเชื้อรา *M. phaseolina* NAN203 จากจังหวัดน่าน มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับถั่วเขียวได้รุนแรงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราสาเหตุอื่น 25 ไอโซเลท จึงได้นำเชื้อราไอโซเลท NAN203 มาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 ถั่วพุ่มเมล็ดดำพันธุ์อุบลราชธานี

งาดำพันธุ์อุบลราชธานี 3 ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์บี๊ไวท์ 852 และถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ผลการทดลองในระยะก่อนงอก พบว่าเมล็ดพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การงอก 100, 100, 100, 100 และ 98 ตามลำดับ และไม่พบเชื้อรา *M. phaseolina* เข้าทำลายพืชทุกชนิด อย่างไรก็ตามในเมล็ดถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 พบไม่งอก 2% เนื่องจากเมล็ดถูกเชื้อรา *Aspergillus* sp. เข้าทำลายทำให้เกิดการเน่าก่อนเมล็ดงอก อีกทั้งวัสดุปลูกบริเวณนั้นมีความชื้นมากกว่าบริเวณอื่น ส่งผลให้เชื้อรา *Aspergillus* sp. เจริญได้ดีเมื่อมีความชื้นสูง 85-100 % (Shehu and Bello, 2011) ในระยะก่อนงอกไม่พบเชื้อรา *M. phaseolina* เข้าทำลายพืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด เพราะพืชทดสอบทั้งหมดใช้เวลาในการงอกเพียง 3-7 วัน ทำให้ไม่สามารถพบอาการของโรค อาจเนื่องมาจากช่วงเวลาเวลานั้นๆ เชื้อรา *M. phaseolina* นั้น ยังไม่สร้าง microscerotium จึงยังไม่งอกเป็นเส้นใยเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืช มีรายงานของ Dhingra and Sinclair (1978) พบว่า microscerotium จะสามารถงอกและเข้าทำลายพืชได้นั้น หลังจากได้รับสารกระตุ้นประเภทกรดอะมิโนบางชนิดที่หลั่งออกมาจากบริเวณรากพืช ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะมีการกระตุ้นการงอกของ microscerotium ที่แตกต่างกัน และระยะเวลาที่เชื้อเข้าทำลายพืชนั้น ก็แตกต่างกันไปด้วย เช่น ในถั่วเหลือง microscerotium จะถูกกระตุ้นให้งอกเป็นเส้นใย หลังจากถั่วเหลืองงอกแล้ว 3 วัน จากงานวิจัยของ Ryley (2015) พบว่าหลังการงอกและต้นกล้าถั่วเหลือง มีการเจริญเติบโต หากรากของต้นกล้าที่อยู่ใกล้หรือสัมผัสกับ microscerotium มีการหลั่งสารบริเวณราก (root exudates) ออกมา จะกระตุ้นให้ microscerotium งอกเป็นเส้นใยและเข้าทำลายพืช ส่วน Rani (2014) พบว่าเมื่อปลูกเชื้อรา *M. phaseolina* โดยการใช้สารแขวนลอยของเส้นใย (mycelial suspension) กับถั่วลิสง แสดงอาการของโรคภายใน 13-18 วัน หลังจากปลูกเชื้อรา พบจุดสีดำขนาดเล็กบริเวณเปลือกชั้นนอก จากนั้นแผลก็จะขยายอย่างรวดเร็วทำให้ต้นพืชเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ใบร่วง และตาย

แต่ในระยะหลังงอก 7 วัน แล้วทำการปลูกเชื้อราสาเหตุ พบว่างาดำพันธุ์อุบลราชธานี 3 เริ่มแสดงอาการแผลจุดดำ ฉ่ำน้ำบริเวณใบเลี้ยงและลำต้นเหนือดิน ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้นส่งผลให้ลำต้นพับ เที้ยว และตาย พบการสร้างโครงสร้าง microscerotia สีดำ บริเวณแผล (เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 100%) สำหรับพืชทดสอบอีก 4 ชนิด ได้แก่ ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 ถั่วพุ่มพันธุ์อุบลราชธานี ข้าวโพดข้าวเหนียวพันธุ์บี๊ไวท์ 852 และถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 พบหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 21 วัน จึงเริ่มแสดงอาการ พบมีลักษณะอาการคล้ายคลึงกับที่พบในงาดำพันธุ์อุบลราชธานี 3 มีการสร้าง microscerotia สีดำ บริเวณแผลเช่นกัน (Figure 4A-E) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 67, 73, 87 และ 87 ตามลำดับ งานวิจัยนี้พบว่าเชื้อรา *M. phaseolina* สามารถเข้าทำลายพืชที่นำมาทดสอบได้ทั้ง 5 ชนิด จากรายงานหลายฉบับทั่วโลก พบว่าพืชอาศัยของเชื้อรา *M. phaseolina* มีมากถึง 500 สายพันธุ์ และมีความหลากหลายมากถึง 100 สกุล (Mehan and McDonald, 1997) สำหรับประเทศไทย พจนา และคณะ (2552) รายงานว่าเชื้อรา *M. phaseolina* ส่วนมากพบการเข้าทำลายพืชไร่เศรษฐกิจ เช่น ข้าวฟ่าง งาขาว งาดำ ถั่วลิสง และถั่วเขียว เป็นต้น อีกทั้งยังพบว่าเข้าทำลายไม้ดอก ไม้ประดับ พืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงคู่ อีกด้วย (กรมวิชาการเกษตร, 2545; Karibasappa et al., 2018; Partridge, 2021) ทั้งนี้เชื้อรา *M. phaseolina* นั้นเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยซากพืชที่ตายแล้วเป็นอาหาร หรือที่เรียกว่า necrotrophic pathogen หลังจากเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชอาศัยแล้ว ยังคงเจริญได้ แต่ไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอาศัย (Khan et al., 2017)

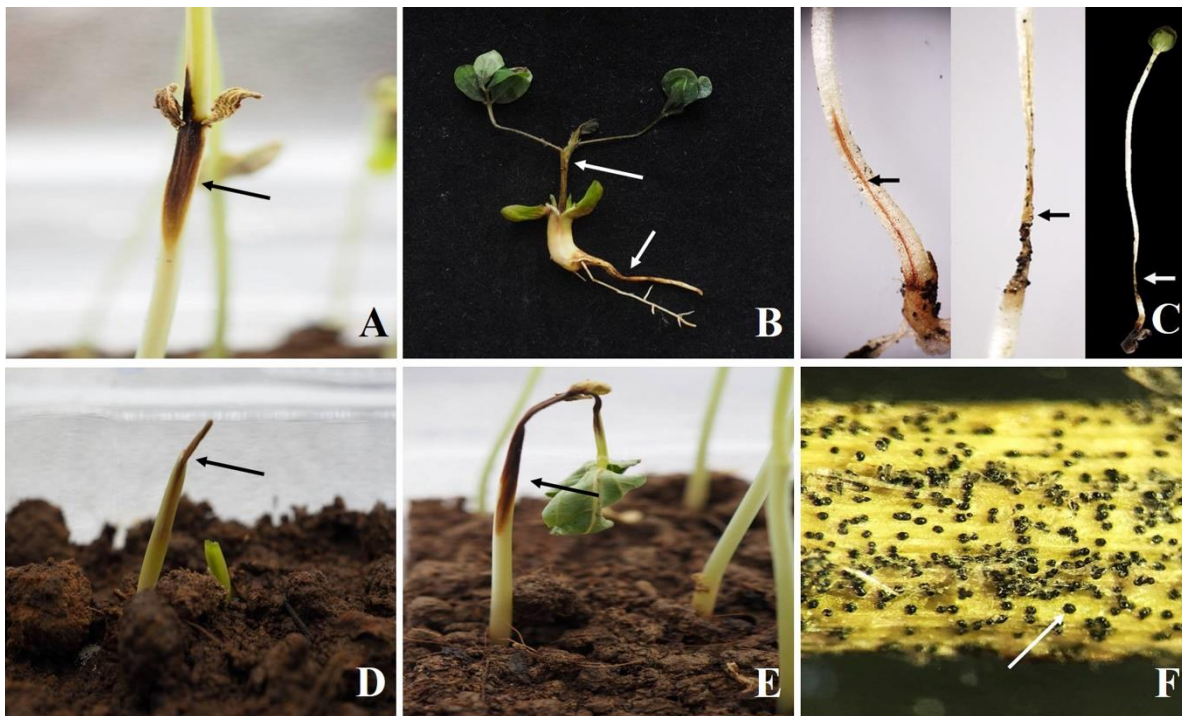


Figure 4 Charcoal rot symptom on host seedlings showing reddish brown discoloration and black streaks (arrows on A-E) after 21 days of inoculation which inoculated with mycelial disc of *Macrophomina phaseolina* NAN203 (A) Mungbean cv. Chai Nat 72, (B) Cowpea black grain cv. Ubon Ratchathani, (C) Black sesame cv. Ubon Ratchathani 3, (D) Waxy Corn cv. Big white 852 F1, (E) Peanuts cv. Thainan 9 and (F) microsclerotia (arrows).

ถึงแม้ว่า การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคนั้น เมื่อทำการปลูกเชื้อรา *M. phaseolina* NAN203 แยกจากถั่วเขียวจากจังหวัดน่าน กลับทำให้เกิดโรคได้รุนแรงกับงาพันธุ์อุบลราชธานี 3 (100%) ในขณะที่ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 เกิดโรคได้น้อยกว่า (67%) เท่านั้น ทั้งนี้อาจเกิดจากถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 มีโครงสร้างที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา strain ที่รุนแรง ได้ดีกว่าถั่วเขียวพันธุ์ที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดน่าน และงาพันธุ์อุบลราชธานี 3 ก็อาจเป็นได้ ถั่วเขียวผิวมันที่มีความต้านทานต่อโรคเน่าดำ มีทั้งหมด 3 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ IPM99-125, EC693368 และ EC693369 พันธุ์/สายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคเน่าดำ ได้แก่ VC3960-88 และ KPS1 (กำแพงแสน 1) (Pandey, 2020) สำหรับเชื้อรา strain ที่รุนแรงนั้น Khan et al. (2017) รายงานว่าเชื้อรา *M. phaseolina* ทำให้เซลล์ของพืชอาศัยเกิดภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) พบปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอนุมูลอิสระออกซิเจน [Reactive oxygen species (ROS)] สูงมากขึ้นก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระอันมีความไวต่อชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ถูกทำลายง่ายขึ้น (Anthony et al., 2017; Yu et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราปล่อยเอนไซม์ประเภท hydrolytic enzyme มาย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ของพืช เช่น เพคติน (pectin) ไขมัน (lipid) เซลลูโลส (cellulose) และโปรตีน (proteins) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่เป็นโมเลกุลใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำ (Wheeler, 1975) มีรายงานเชื้อรา *M. phaseolina* สร้างเอนไซม์อะไมเลส (amylase) (Sohail et al., 2009)

สรุป

แยกเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเขียว จากพื้นที่ปลูกถั่วเขียวในจังหวัดชัยนาท อุทัยธานี นครสวรรค์ ลพบุรี เพชรบูรณ์ และน่าน ได้ทั้งหมด 26 ไอโซเลท จากนั้น นำเชื้อราตัวแทนจาก 5 กลุ่ม มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลบริเวณ ITS1-5.8s-ITS2 และ TEF1-alpha พบว่าเชื้อราสาเหตุมีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาซึ่งสามารถแบ่ง ออกเป็น 5 กลุ่ม เมื่อใช้ลักษณะของโคโลนี แต่ไม่มีความสอดคล้องกับลักษณะทางพันธุศาสตร์ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล เชื้อราสาเหตุไม่มี

ความแปรผันลักษณะทางพันธุศาสตร์ การจำแนกเชื้อราสาเหตุได้เป็น *Macrophomina phaseolina* เพียงสปีชีส์เดียวเท่านั้น จากการใช้อินโฟลราทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับอนุชีวโมเลกุลร่วมกันสามารถระบุได้ว่าเชื้อราสาเหตุโรคเน่าดำของถั่วเขียวในประเทศไทย ยังคงเป็น *M. phaseolina* และยังไม่พบการเข้าทำลายของสปีชีส์ใหม่เหมือนต่างประเทศตามที่มียารายงาน อย่างไรก็ตามการจำแนกเชื้อราในสกุลดังกล่าว ควรมีการนำข้อมูลในหลายๆ ด้านทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและอนุชีวโมเลกุลเข้ามาสนับสนุน เนื่องจากเชื้อราสาเหตุมีความหลากหลายของลักษณะทางโคโลนีและสปอร์ที่มีความคล้ายคลึงกัน เพื่อให้การจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคพืชเกิดความแม่นยำและถูกต้องมากยิ่งขึ้น สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคนั้น พบว่าเชื้อรา *M. phaseolina* NAN203 มีการสร้าง microsclerotia สีดำ บริเวณแผล สามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ ถั่วเขียวพันธุ์ชัยนาท 72 ถั่วลิสงพันธุ์กำแพง 2 ถั่วพุ่มเมล็ดดำพันธุ์อุบลราชธานี ข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมพันธุ์บิ๊กไวท์ 852 F1 และงาดำพันธุ์อุบลราชธานี 3 ได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี และศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน และกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สำหรับการเอื้อเฟื้อเมล็ดพันธุ์ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2545. คู่มือโรคพืชไร่. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว, กรุงเทพฯ.
- พจนานา ตระกูลสุพรรณ, อมรรัตน์ ภูไพบูลย์ และพรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. สำรวจ รวบรวม และจำแนกราสกุล *Macrophomina* สาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ. กลุ่มวิจัยโรคพืช, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้า ปี 2562. แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/assets/portals/1/ebookcategory/38_commodity2562/#page=30. ค้นเมื่อ 15 มกราคม 2564.
- Anthony, K.K., D.S. George, H.K.B. Singh, S.M. Fung, V. Santhirasegaram, and Z. Razali. 2017. Reactive oxygen species activity and antioxidant properties of *Fusarium* infected bananas. *Phytopathology*. 165: 213-222.
- Carbone, I., and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91: 553-556.
- Dhingra, O.D., and J.B. Sinclair. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Minas Gerais Universidade Federal de Vicosa, Brazil.
- Huda-Shakirah, R.A., Y.J. Kee, A.B.M. Hafifi, N.N.M. Azni, L. Zakaria, and M.H. Mohd. 2019. Identification and characterization of *Macrophomina phaseolina* causing leaf blight on white spider lilies (*Crinum asiaticum* and *Hymenocallis littoralis*) in Malaysia. *Mycobiology*. 47: 408-414.
- Jacobs, K., D.R. Bergdahl, M.J. Wingfield, S. Halik, K.A. Seifert, D.E. Bright, and B.D. Wingfield. 2004. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research*. 108: 411-418.
- Karibasappa, C.S., B.N. Bhat, and S.C. Rao. 2018. Survey for the disease incidence of root rot of sesame caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid, in major sesame growing areas of Telangana. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7: 655-657.
- Khan, A.N., F. Shair, K. Malik, Z. Hayat, M.A. Khan, F.Y. Hafeez, and M.N. Hassan. 2017. Molecular identification and genetic characterization of *Macrophomina phaseolina* strains causing pathogenicity on sunflower and chickpea. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1309.

- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874.
- Machado, R.A., D.B. Pinho, D.J. Soares, A.A.M. Gomes, and O.L. Pereira. 2018. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 153: 89–100.
- Manici, L.M., F. Caputo, and C. Cerato. 1995. Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climatic regions of sunflower production in Italy. *Plant Disease*. 79: 834-838.
- Mehan, V.K., and D. McDonald. 1997. Charcoal rot. *In* Compendium of peanut diseases, 2nd ed. N. Kokalis-Burelle et al. eds. APS Press. St. Paul, MN, USA.
- Narayanasamy, P. 2001. Plant pathogen detection and disease diagnosis. 2nd Edition Marcel Dekker, Inc. USA. Available. <https://books.google.co.th/books?id>. Accessed Jan. 10, 2021.
- Partridge, D. 2021. *Macrophomina phaseolina*. Online Available: https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Macrophomina/macrophominia_phaseolinia.HTM. Accessed Jan. 4, 2021.
- Ndiaye, M., A.J. Termorshuizen, and A.H.C. van Bruggen. 2010. Effects of compost amendment and the biocontrol agent *Clonostachys rosea* on the development of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea. *Journal of Plant Pathology*. 92: 173–180.
- Ndiaye, M., M.P. Sarr, N. Cisse, and I. Ndiaye. 2015. Is the recently described *Macrophomina pseudophaseolina* pathogenically different from *Macrophomina phaseolina*?. *African Journal of Microbiology Research*. 9: 2232-2238.
- Pandey, K.A., R.R. Burlakoti, A. Rathore, and R.M. Nair. 2020. Morphological and molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* isolated from three legume crops and evaluation of mungbean genotypes for resistance to dry root rot. *Crop Protection*. 127: 104962.
- Pongpisutta, R., W. Winyarat, and C. Rattanakreetakul. 2003. RFLP identification of *Colletotrichum* species isolated from chilli in Thailand. *Acta Horticulturae*. 937: 181-186.
- Radwan, O., L.V. Rouhana, G.L. Hartman, and S.S. Korban. 2014. Genetic mechanisms of host-pathogen interactions for charcoal rot in soybean. *Plant Molecular Biology Reporter*. 32: 617-629.
- Rani, N. 2014. Studies on *Macrophomina* root rot of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). available: <https://www.semanticscholar.org/paper/Studies-on-macrophomina-root-rot-of-groundnut-L.-Rani/79c1cdd36008aab619172b01f2eec070b30553bd>. Accessed Mar. 16, 2021.
- Ryley, M.J. 2015. Charcoal rot of soybean. Online available: http://www.australianoilseeds.com/data/assets/pdf_file/0020/10298/Charcoal_rot_of_soybean_Feb_2015.pdf. Accessed Mar. 16, 2021.
- Saleh, A.A., H.U. Ahmed, T.C. Todd, S.E. Travers, K.A. Zeller, J.F. Leslif, and K.A. Garrett. 2010. Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. *Molecular Ecology*. 19: 79-91.
- Sarr, P.M., M.B. Ndiaye, J.Z. Groenewald, and P.W. Crous. 2014. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathologia Mediterranea*. 53: 250-268.
- Satpathi, K.A., and N.M. Gohel. 2018. Cultural and morphological variability among the isolates of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. causing stem and root rot of sesame (*Sesamum indicum* L.). *International Journal of Chemical Studies*. 6: 2890-2893.

- Shehu, K., and M.T. Bello. 2011. Effect of environmental factors on the growth of *Aspergillus* Species Associated with stored millet grains in Sokoto. Nigerian Journal of Basic and Applied Science. 19(2): 218-223.
- Smith, G.S., and T.D. Wyllie. 1999. Charcoal rot, Compendium of soybean disease. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Sohail, M., S. Naseeb, S.K. Sherwani, S. Sultana, S. Aftab, and S. Shahzad. 2009. Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. Pakistan Journal of Botany. 41: 2567–2582.
- Su, G., O.S. Suh, R.W. Schneider, and J.S. Rusin. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology. 92: 120-126.
- Sun, S., X. Wang, Z. Zhu, B. Wang, and M. Wang. 2015. Occurrence of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*, an emerging disease of adzuki bean in China. Phytopathology. 164: 1-5.
- Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, UK.
- Wheeler, H. 1975. "Mechanisms of pathogenesis". In Plant Pathogenesis. New York.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal RNA gene for phylogenetics. P. 315-322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. PCR protocol: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.
- Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet, and S. Manulis. 1994. Use of RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. Mycological Research. 98: 531-534.
- Yu, S.-X., Q.-N. Feng, H.-T. Xie, S. Li, and Y. Zhang. 2017. Reactive oxygen species mediate tapetal programmed cell death in tobacco and tomato. BMC Plant Biology. 17: 76.