

ความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Sphaceloma* spp. สาเหตุโรคสแคบของงู
กับพืชชนิดอื่น

นางสาวมธุกร สมพงษ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2553

**DIFFERENCES AMONG *Sphaceloma* spp. CAUSING
SCAB DISEASE IN GRAPES AND
OTHER PLANTS**

Mathukorn Sompong



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Crop Production Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2010**

มธุกร สมพงษ์ : ความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Sphaceloma* spp. สาเหตุโรคสแคบขององุ่น
กับพืชชนิดอื่น (DIFFERENCES AMONG *Sphaceloma* spp. CAUSING SCAB
DISEASE IN GRAPES AND OTHER PLANTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.โสภณ
วงศ์แก้ว, 71 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Sphaceloma* spp. สาเหตุโรคสแคบขององุ่นกับพืชชนิดอื่น ทำการศึกษาเชื้อทั้งหมด จำนวน 52 ไอโซเลต คือ จากองุ่น 24 ไอโซเลต หนุ่ยยาง (*Euphorbia heterophylla* L.) 3 ไอโซเลต ชงโค (*Bauhinia purpurea* Linn.) 3 ไอโซเลต ข่อย (*Streblus asper* Lour.) 2 ไอโซเลต ส้มโอ (*Citrus maxima* Merr.) 2 ไอโซเลต และฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) 1 ไอโซเลต พบว่า ลักษณะโคโลนีของไอโซเลตที่แยกได้จากองุ่นที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มีความแตกต่างกัน และแตกต่างจากไอโซเลตที่แยกได้จากพืชชนิดอื่น ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ได้แก่ ลักษณะของผิว ความหนา การสร้าง arial mycelium ขนาดและสี ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะสีได้ 12 กลุ่ม คือ สีเหลือง เหลือง – ส้ม เหลือง – น้ำตาล น้ำตาล น้ำตาลเข้ม ขาว แดง น้ำตาลเข้ม – เขียว ดำ น้ำตาล – เหลือง เหลืองขาว และ น้ำตาล – ขาว สำหรับขนาดของโคโลนีบนอาหาร PDA วัดที่อายุ 35 วัน พบว่าไอโซเลตที่แยกได้จากองุ่นมีขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุด คือ $3.70 \pm 0.10 \times 3.82 \pm 0.08$ เซนติเมตร ขณะที่เชื้อที่แยกได้จาก ข่อย ชงโค หนุ่ยยาง และส้มโอ มีขนาดโคโลนีใกล้เคียงกัน คือ $3.04 \pm 0.48 \times 3.22 \pm 0.50$ $2.48 \pm 0.39 \times 2.86 \pm 0.02$ $2.22 \pm 0.40 \times 2.41 \pm 0.39$ และ $2.04 \pm 0.36 \times 2.16 \pm 0.42$ เซนติเมตร ตามลำดับ โดยส่วนเชื้อที่แยกได้จากฝรั่งมีขนาดเล็กที่สุด คือ $1.60 \pm 0.10 \times 1.74 \pm 0.11$ เซนติเมตร สำหรับลักษณะของโคนีเดีย พบว่าแต่ละไอโซเลต มีลักษณะของโคนีเดียคล้ายกันคือ เป็นเชลล์เดี่ยว ใส รูปทรงกระบอก มีขนาดเล็ก หัวท้ายมน และมีวงกลมใส (guttule) อยู่ภายในเชลล์ และพบว่าขนาดของโคนีเดียของเชื้อที่แยกได้จากองุ่น และส้มโอมีขนาดใกล้เคียงกัน คือ $2.1 - 3.6 \times 3.4 - 6.7 \mu\text{m}$ ขณะที่เชื้อจากหนุ่ยยางมีขนาดใหญ่ที่สุด คือ $3.6 - 4.2 \times 6.6 - 7.2 \mu\text{m}$ และเชื้อจากชงโคมีขนาดเล็กที่สุด คือ $1.7 - 2.9 \times 2.8 - 5.3 \mu\text{m}$ อย่างไรก็ตามขนาดโคนีเดียของเชื้อที่แยกได้จากองุ่น มีความแตกต่างกันค่อนข้างมากในแต่ละไอโซเลต การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์เพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ITS4 และ ITS5 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อที่แยกได้จากองุ่นและพืชอื่นได้เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 648 bp ได้แก่ ไอโซเลต GMei1 Nk 4-1 GSH และ BR8851 กลุ่มที่ 2 ไอโซเลตที่มีจำนวนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 608 และ 648 bp ได้แก่ Cb 1 - 1 และ GPTY_F_R4 ซึ่งเหมือนกับหนุ่ยยางไอโซเลต ESS_PPR_S และ ชงโคไอโซเลต CCS_SW2 กลุ่มที่ 3 แถบดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากับ 1,374 bp ได้แก่ ไอโซเลต Pr 4-1 และชงโคไอโซเลต CCS_SW กลุ่มที่ 4 คือ ไอโซเลต Rc 5 - 1 ไม่พบ แถบดีเอ็นเอ ซึ่งเหมือนกับ

ไอโซเลตของส้มโอ และฝรั่ง กลุ่มที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ 608 คือไอโซเลตจากหนุ่ยยาง ESS_PPR_S ซึ่งเหมือนไอโซเลตจากข่อย และกลุ่มสุดท้ายมีแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาดเท่ากับ 608 และ 1,374 bp คือไอโซเลตจากชงโค และเมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *MspI* และ *HhaI* พบว่า ให้ผลแตกต่างกับการใช้เทคนิค PCR ในการจัดกลุ่ม โดยเชื้อไอโซเลต GSH ที่เคยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ GMei1 Nk 4-1 และ BR8851 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอแตกต่างออกไป แต่กลับไปเหมือนกับอองุ่นไอโซเลต Cb 1 – 1 และ ไอโซเลตจากข่อย สำหรับไอโซเลต ESS และ ESS_PPR_S ที่ได้จากหนุ่ยยางไม่พบแถบดีเอ็นเอ แต่ ไอโซเลต CCS_SW CCS และ CCS204 จากชงโค ให้แถบแตกต่างจากอองุ่นและพืชชนิดอื่นอย่าง ชัดเจน ส่วนอองุ่นไอโซเลต GMei1 และ Nk 4-1 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับอองุ่นไอโซเลต GPTY_F_R4 และไอโซเลตจากส้มโอ จึงเป็นไปได้ว่า *Sphaceloma* บางไอโซเลตที่เข้าทำลายอองุ่นเป็นชนิดเดียวกับที่เข้าทำลายส้มโอ เช่นเดียวกับไอโซเลตที่ Sb จาก ข่อย มีดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบเหมือนกับอองุ่น ไอโซเลต GSH และ Cb 1 – 1 การคัดเลือกตัวแทนของเชื้อจากความแตกต่างทาง สัณฐานวิทยา จำนวน 22 ไอโซเลต มาศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชทดสอบ พบว่าเชื้อจากอองุ่น บางไอโซเลตสามารถก่อให้เกิดโรคกับ ส้มโอ ข่อย หนุ่ยยาง ชงโค และฝรั่ง ขณะที่เชื้อที่แยกได้จาก พืชทดสอบบาง ไอโซเลต สามารถเข้าทำลายอองุ่นได้ ยกเว้นไอโซเลตที่แยกได้จากฝรั่ง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เชื้อ *Sphaceloma* ที่พบในอองุ่น อาจไม่ใช่เชื้อ *Sphaceloma ampelinum* ทั้งหมด และเชื้อที่ทำให้เกิดโรคสแคบในอองุ่นสามารถก่อโรคในพืชอื่นได้เช่นกัน

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

MATHUKORN SOMPONG : DIFFERENCES AMONG *Sphaceloma* spp.

CAUSING SCAB DISEASE IN GRAPES AND OTHER PLANTS. THESIS

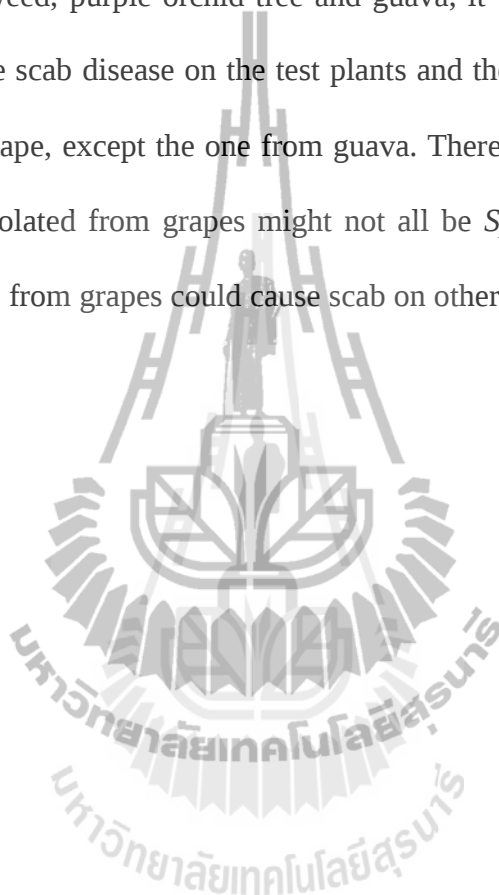
ADVISOR : SOPONE WONGKAEW, Ph.D., 71 PP.

Sphaceloma spp./SCAB/GRAPES

The objective of this research is to compare the differences among *Sphaceloma* spp. causing scab disease in grapes with that of other plant species. Fifty two *Sphaceloma* isolates were studied. Twenty four isolates were from grapes, 3 from milk weed (*Euphorbia heterophylla* L.), 3 from purple orchid tree (*Bauhinia purpurea* Linn.), 3 from Siamese rough bush (*Streblus asper* Lour.), 2 from pomelo (*Citrus maxima* Merr.) and 1 from guava (*Psidium guajava* L.) It was found that the colony morphology of the cultures on PDA were different among the grape isolates and those isolated from other plant species. The colony characteristics under the study were surface texture, elevation arial mycelium production, size and coloration which could be divided into 12 groups as yellow, yellow – orange, yellow – brown, brown, dark – brown, white, red, darkbrown – green, black, brown – yellow, yellow – white and brown – white. The averaged colony size measured at 35 days of grape isolates was the largest having the size of $3.70 \pm 0.10 \times 3.82 \pm 0.08$ cm while those of purple orchid tree, Siamese rough bush, milk weed and pomelo had a medium size of $3.04 \pm 0.48 \times 3.22 \pm 0.50$ $2.48 \pm 0.39 \times 2.86 \pm 0.02$ $2.22 \pm 0.40 \times 2.41 \pm 0.39$ and $2.04 \pm 0.36 \times 2.16 \pm 0.42$ cm respectively. The isolate from guava had the smallest colony size of $1.60 \pm 0.10 \times 1.74 \pm 0.11$ cm. The study of conidium characteristics found that most isolates had similar conidium morphology which were single – celled, hyaline, cylindrical shaped with rounded ends and contained cellular guttule. Conidial size of

isolates from grapes were about the same size of those from pomelo which were $2.1 - 3.6 \times 3.4 - 6.7 \mu\text{m}$ while those from milk weed were the biggest of $3.6 - 4.2 \times 6.6 - 7.2 \mu\text{m}$. Isolates from purple orchid tree appeared to have the smallest conoidal size of $1.7 - 2.9 \times 2.8 - 5.3 \mu\text{m}$. Great differences in terms of conidial size were observed among the isolates from grapes. PCR amplification of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA of representative isolates from grapes and other plant species using the ITS4 and ITS5 primers yielded DNA of different sizes which could be divided into 6 groups. First group the grape isolates, Gmei1, Nk 4 – 1, GSH and BR8851 yielded 1 DNA band of 648 bp. Second group, the grape isolates Cb 1 – 1 and GPTY_F_R4, the milk weed isolate ESS_PPR_S and the purple orchid tree isolate CCS_SW2 yielded 2 DNA bands of 608 and 648 bp. Third group, the grape isolate Pr 4 – 1 and the purple orchid tree CCS_SW isolate yielded 1 DNA band of 1,374 bp. Fourth group, the grape isolate Rc 5 – 1 and the guava isolate did not yield any DNA band. Fifth group, the milk weed ESS_PPR_S and the Siamese rough bush isolates yield 1 DNA band of 608 bp. And the last group, were those from purple orchid tree isolate CCS204 and some grape isolates yielded 3 DNA bands of 608, 648 and 1,374 bp. After being digested with the restriction enzymes *MspI* and *HhaI*, the PCR products from each isolates gave different results from that of the PCR grouping. Most of the grape isolates still remained in the same group except GSH. For isolates ESS and ESS_PPR_S from milk weed, there were no bands observed. But the digested PCR product of this isolate became similar to those of Cb 1 – 1 grape isolate and the Siamese rough bush isolate. Those from purple orchid tree CCS_SW, CCS and CCS204 gave DNA band distinctive from those of the grape and other plant isolates while OLSY, the pomelo isolate gave 3 DNA bands similar to those from Gmei1 and

Nk 4 – 1, the grape isolates indicating that some of the *Sphaceloma* isolates from grape could infect pomelo. By selecting 22 isolates representing those that showed similar morphological characters for pathogenicity test on grapes, pomelo, Siamese rough bush, milk weed, purple orchid tree and guava, it was found that some grape isolates could cause scab disease on the test plants and the isolates from other plants could also infect grape, except the one from guava. Therefore, it could be concluded that *Sphaceloma* isolated from grapes might not all be *Sphaceloma ampelinum* and some of the isolates from grapes could cause scab on other plants as well.



School of Crop Production Technology

Academic Year 2010

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความเมตตากรุณา ให้ความสนับสนุนการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา นอกจากนั้นยังคอยให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง และให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านการวิจัย พร้อมทั้งอบรมสั่งสอนให้ศิษย์ประพฤติดนเป็นคณบดีของสังคม ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สุทธล วันประเสริฐ ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกว ที่กรุณาให้คำปรึกษาและช่วยแก้ไขปัญหาระหว่างการทำวิจัย และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ให้ความเมตตาและคอยอบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษา และสถาบันวิจัยและพัฒนาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณกิติมา ชาญกิจ โกศลและเจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไปที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงานและการเตรียมเอกสารต่าง ๆ ขอขอบพระคุณคุณเอกวิวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาชิน คุณกิริติ กิริติเลขา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้านและ ขอขอบคุณคุณอ้อยทิพย์ พลูสวัสดิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Sphaceloma* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ผู้ร่วมเรียนในระดับบัณฑิตศึกษา ที่คอยให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์ สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอนและส่งเสริมการศึกษา เป็นอย่างดีตลอดมา

มธุกร สมพงษ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ

บทที่

1. บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	2

2. ปรัชญาวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปขององุ่น.....	3
2.2 โรคสแคบในองุ่น.....	4
2.2.1 ความสำคัญและประวัติการระบาด.....	4
2.2.2 การศึกษาโรคสแคบขององุ่นในประเทศไทย.....	5
2.3 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อ <i>Sphaceloma ampelinum</i>	7
2.4 การควบคุมโรค.....	9
2.5 โรคสแคบของพืชอื่น.....	10

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 การจำแนกความแตกต่างของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp.....	12
2.6.1 การจำแนกความแตกต่างโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	13
2.6.2 การจำแนกความแตกต่างโดยใช้ปฏิกิริยาบนพืชอาศัย.....	17
2.6.3 การจำแนกความแตกต่างโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล.....	17
3. วิธีดำเนินงานวิจัย	
3.1 การแยกเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. จากชิ้นส่วนอ่อนและพืชอาศัยที่แสดงอาการ โรคสแคบ.....	22
3.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากโคโคนีเดียเดี่ยว.....	22
3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp.....	22
3.3.1 อัตราการเจริญเติบโตของโคโคนี23	
3.3.2 สีของโคโคนีบนอาหาร PDA23	
3.3.3 ลักษณะและขนาดของโคโคนีเดีย23	
3.3.4 ความสามารถในการสร้างสปอร์23	
3.4 การศึกษาความแตกต่างทางชีวโมเลกุล.....	23
3.4.1 การสกัด Genomic DNA ของเชื้อรา.....	23
3.4.2 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ (DNA) ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ เพิ่มปริมาณ DNA ใน ส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยเทคนิคPCR.....	24
3.4.3 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอของเชื้อ หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ25	
3.5 ศึกษาความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดโรกับพืชทดสอบ.....	25
3.5.1 การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp.25	
3.5.2 การเตรียมใบอ่อน.....	25
3.5.3 การปลูกเชื้อลงบนใบอ่อน.....	26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.4 การเตรียมพืชทดสอบชนิดอื่น.....	26
3.5.5 การปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัยชนิดอื่น.....	26
4. ผลการทดลอง	
4.1 การแยกเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. จากชิ้นส่วนใบอ่อนและพืชอาศัยที่แสดงอาการโรคสแคบ.....	27
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp.....	29
4.2.1 การเจริญเติบโตของโคโคนี.....	29
4.2.2 สีของโคโคนี.....	30
4.2.3 ลักษณะและขนาดของโคโคนีเดี่ยว	30
4.3 การจำแนกความแตกต่างทางชีวโมเลกุล.....	47
4.3.1 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ (DNA) ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์เพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยเทคนิค PCR.....	47
4.3.2 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอของเชื้อหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	49
4.4 ศึกษาความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ.....	50
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	58
รายการอ้างอิง.....	63
ภาคผนวก.....	67
ประวัติผู้เขียน.....	71

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

2.1 ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. จากพืชชนิดต่าง ๆ.....	14
4.1 ไอโซเลตของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่แยกจากงุ่น ชงโค ข่อย หน้อย่าง ส้มโอ และ ฝรั่ง จากแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทย.....	31
4.2 ขนาดโคโลนีของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่อายุ 14 วัน บนอาหาร PDA	32
4.3 ขนาดโคโลนีของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่อายุ 35 วัน บนอาหาร PDA	34
4.4 ความหลากหลายของสี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีของ. เชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ.....	38
4.5 ขนาดโคโลนีเดียวของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ของเชื้ออายุ 28 วัน.....	43
4.6 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่แยกได้จากงุ่นและ พืชชนิดอื่น ในการทำให้เกิดโรคบนงุ่นพันธุ์เบลคควิน.....	52
4.7 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> ที่แยกได้จากข่อยไอโซเลต stb1808 ในการทำให้เกิดโรคบนพืชทดสอบ.....	53
4.8 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> ที่แยกได้จากชงโคไอโซเลต CCS_SW ในการทำให้เกิดโรคบนงุ่นและพืชทดสอบ.....	53
4.9 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> ที่แยกได้จากส้มโอไอโซเลต OLSY ในการทำให้เกิดโรคบนงุ่นและพืชทดสอบ.....	54
4.10 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่แยกได้จากหน้อย่าง ไอโซเลต ESS_PPR_S ในการทำให้เกิดโรคบนงุ่นและพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ.....	54
4.11 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลของตัวอย่างเชื้อ <i>Sphaceloma</i> ที่แยกได้จากงุ่นและพืชอื่น.....	57

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR.....	20
2.2 แบบจำลองการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA).....	21
4.1 แสดงอาการโรคสแคบบนผลองุ่น ใบองุ่น ใบหญ้ายาง ลำต้นหญ้ายาง ใบข่อย และ ใบชงโค.....	30
4.2 แสดงการเจริญของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. อายุ 10 วันบนอาหาร WA จากใบองุ่น ใบชงโค ใบหญ้ายาง และ ใบข่อย.....	31
4.3 สีโคโลนีของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. 12 กลุ่ม.....	39
4.4 ลักษณะโคโลนีเดียวของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อายุ 28 วัน ไอโซเลต จากองุ่น ชงโค และ ข่อย.....	47
4.5 ลักษณะโคโลนีเดียวของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อายุ 28 วัน จากชงโค องุ่น หญ้ายาง และ ส้มโอ.....	48
4.6 ลักษณะโคโลนีเดียวของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	49
4.7 เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5.....	50
4.8 DNA fingerprints ของเชื้อ <i>Sphaceloma</i> spp. ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS 5 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด <i>MspI</i> และ <i>HhaI</i>	52
4.9 อาการที่เกิดจากการปลูกเชื้อ <i>Spaceloma</i> spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ ลงบนใบองุ่นพันธุ์ แบลควิน.....	57
4.10 อาการที่เกิดจากการปลูกเชื้อ <i>Spaceloma</i> spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ ลงบนใบชงโค.....	58

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

องุ่น (*Vitis vinifera* Linn.) เป็นผลไม้ที่ตลาดมีความต้องการในปริมาณสูง ในช่วงก่อนปี พ.ศ. 2503 ประเทศไทยมีการปลูกองุ่นมากในแถบภาคตะวันตกของประเทศ ได้แก่ อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอสามพราน อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม และอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งสามารถให้ผลผลิตได้ดี การผลิตองุ่นในปี พ.ศ. 2543 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกองุ่นในภาคกลาง ประมาณ 20,620 ไร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2,700 ไร่ รวมทั้งประเทศประมาณ 23,000 ไร่ องุ่นสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ คาร์ดินาล (Cardinal) ไวท์มะละกา (White Malaga) ไวท์โกโก้ (White Gogo) โกลเด้นมัสเกต (Golden Muscat) และอัลมาเรีย (Almaria) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีเมล็ด นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ไม่มีเมล็ด ได้แก่ ทอมสันซีดเลส (Thomson Seedless) ลูสเพิลเล็ต (Loose Perlette) ดีไลท์ (Delight) และเฟรมซีดเลส (Flame Seedless) เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้รับประทาน ผลสดและทำไวน์แล้ว ยังสามารถนำไปแปรรูปในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้หลายลักษณะ เช่น แยม ลูกเกด และน้ำองุ่น เป็นต้น ในปัจจุบันมีการปลูกองุ่นเพื่อการท่องเที่ยวกันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ประเทศไทยมีแนวโน้มการนำเข้าองุ่นสูงขึ้นทุกปี จากสถิติการนำเข้าองุ่นในปี พ.ศ. 2553 มีการนำเข้าองุ่น 1,417 ตัน คิดเป็นมูลค่า 74.4 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมศุลกากร, 2553) เหตุที่ทำให้ประเทศไทยมีการนำเข้าองุ่นเพิ่มขึ้น เนื่องจากความต้องการใช้บริโภคสูงขึ้น ขณะที่ผลผลิตที่ได้ไม่เพียงพอต่อการใช้ในประเทศ ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ ตั้งแต่ปัญหาสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ได้แก่ สภาพภูมิอากาศมีลักษณะร้อนสลับกับอากาศเย็นในบางพื้นที่ทำให้องุ่นมีการพักตา และดินที่มีสภาพความเป็นกรด – ด่าง ไม่เหมาะสมซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นองุ่น และปัญหาสำคัญ คือ โรคระบาด ซึ่งสร้างความเสียหายต่อผลผลิตองุ่นเป็นจำนวนมาก โรคที่พบระบาดรุนแรง ได้แก่ โรคราน้ำค้าง เกิดจากเชื้อ *Plasmopara viticola* โรคสแคบ (อินบู) เกิดจากเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* โรคกิ่งแห้ง เกิดจากเชื้อ *Greeneria uvicola* โรคราสนิม เกิดจากเชื้อ *Physopella ampelopsidis* และโรคแอนแทรกโนส (เตาเผา) เกิดจากเชื้อ *Collectotricum ampelinum*

โรคสแคบ หรือที่ชาวบ้านเรียกว่าโรคอินบู เป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตขององุ่นเป็นอย่างมาก และในปัจจุบันมีรายงานพบโรคนี้นับพันชนิดอีกหลายชนิด ได้แก่ กระจวน กุหลาบชา ถั่วลิสง น้อยหน้า ฝรั่ง มะละกอ มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ยางพารา ละหุ่ง หน้วว ส้ม สัก และ

อะโวคาโด (กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ, 2545) อาการของโรคที่พบทั้งในองุ่นและพืชชนิดต่างๆ มีลักษณะที่คล้ายกัน สำหรับอาการที่พบบนองุ่นคือ เชื้อจะเข้าทำลายบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ โดยเฉพาะส่วนที่อยู่เหนือดิน และผลอ่อน โดยจะเกิดเป็นจุดขนาดเล็ก และแผลจะขยายโตขึ้นเมื่อสภาพอากาศร้อนและชื้น หรืออากาศร้อนในเวลากลางวันและเย็นชื้นหรือน้ำค้างลงจัดในเวลากลางคืน เมื่ออาการรุนแรงใบหรือผลจะแห้งแตกและหลุดร่วงไปในที่สุด (กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ, 2545) จากรายงานของ กรรณิการ์ เพียนภักตร์ และคณะ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา ปี 2544 พบอาการของโรคสแคบเช่นเดียวกับองุ่น ใน ฝรั่ง มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ และปทุมมา โดยพบว่าโรคนี้นำสร้างความเสียหายมากขึ้นกับมะม่วง แก้วมังกร และกระเจี๊ยบเขียว จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าสถานการณ์ของโรคสแคบได้กลายเป็นปัญหาสำคัญ เนื่องจากเชื้อสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิด แต่ยังไม่มีข้อมูลที่ชี้ชัดว่า เชื้อ *Sphaceloma* ที่พบในองุ่นเป็นเชื้อชนิดเดียวกันทั้งหมด หรือเป็นเชื้อ *Sphaceloma* จากพืชชนิดอื่น ข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง ที่จะใช้กำหนดแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคสแคบในองุ่น โดยเฉพาะในเรื่องที่เกี่ยวกับการป้องกันกำจัดพืชอาศัย หรือการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้มีความต้านทานต่อโรคสแคบ

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่พบในองุ่นและพืชชนิดอื่น

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1. เชื้อ *Sphaceloma ampelinum*. ที่พบในองุ่นอาจไม่ใช่เชื้อ *S. ampelinum* ทั้งหมด
2. เชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่พบบนพืชอื่นอาจเข้าทำลายองุ่นได้ ขณะที่ *Sphaceloma* spp. ที่พบในองุ่นสามารถเข้าทำลายพืชชนิดอื่นได้เช่นกัน

1.4 ขอบเขตการวิจัย

เป็นการศึกษาความแตกต่างในระดับสัณฐานวิทยา ขอบเขตของพืชอาศัย และความหลากหลายของขนาด DNA จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่รวบรวมได้จากองุ่นและพืชอื่นอย่างน้อย 50 ไอโซเลต

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ใช้กำหนดแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคสแคบในองุ่น โดยเฉพาะการป้องกันกำจัดพืชอาศัย และการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานโรคสแคบ

บทที่ 2

ปรัทัศนัวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปขององุ่น

องุ่น มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vitis vinifera* Linn. อยู่ในวงศ์ Vitaceae ซึ่งมีอยู่ประมาณ 11 สกุล รวม 600 ชนิด สกุล *Vitis* เป็นสกุลเดียวที่รับประทานได้ (นันทกร บุญเกิด, 2543) ในประเทศไทย จากรายงานของกรมวิชาการเกษตร มีการนำองุ่นเข้ามาปลูกในสมัยรัชการที่ 5 โดยพระองค์ท่านได้นำพันธุ์ไม้แปลก ๆ จากต่างประเทศที่ได้เสด็จประพาสมาปลูกในประเทศไทย และเชื่อว่าในจำนวนพันธุ์ไม้เหล่านั้นน่าจะมีองุ่นรวมอยู่ด้วย ในสมัยรัชกาลที่ 7 มีหลักฐานยืนยันว่าเริ่มมีการปลูกองุ่นบ้างแต่ผลองุ่นที่ได้ยังมีรสเปรี้ยว การปลูกองุ่นจึงซบเซาไป ต่อมาในปี พ.ศ. 2493 ได้เริ่มมีการปลูกองุ่นอย่างจริงจัง โดย หลวงสมานวนกิจ ได้นำพันธุ์องุ่นมาจาก มลรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำการปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และกรมวิชาการเกษตร ต่อมาในปี พ.ศ. 2497 ดร.พิศ ปัญญาลักษณ์ ได้นำพันธุ์องุ่นมาจากทวีปยุโรปซึ่งสามารถปลูกได้ผลเป็นที่น่าพอใจ และในปี 2506 อาจารย์ปวิณ ปุณณศรีและคณะ ได้นำองุ่นยุโรปหลายสายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์คาร์ดินาล พันธุ์มัสแคทฮัมเบิร์ก พันธุ์โกลเดนมัสแคท พันธุ์เอ็มเพอเรอร์ มาปลูกในประเทศไทย ซึ่งให้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจ จึงขยายผลทดลองปลูกในแปลงเกษตรกร และขยายผลในเชิงการค้าออกไปอย่างกว้างขวาง ต่อมาองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาซึ่งมีขนาดผลใหญ่และมีความหวานสูงกว่าได้เข้ามาแทนที่พันธุ์เอ็มเพอเรอร์ที่มีขนาดผลเล็กและเมล็ดมาก องุ่นมัสแคทฮัมเบิร์ก ที่มีขนาดช่อเล็ก และโกลเดนมัสแคทที่มีกลิ่นไม่ถูกอุปนิสัยคนไทย ในระยะดังกล่าวการปลูกองุ่นได้รับความนิยมเฉพาะในแถบภาคตะวันตก เช่น อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอสามพราน อำเภอ นครชัยศรี จังหวัดนครปฐม และอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตได้ดี แต่ในปัจจุบันการปลูกองุ่นได้แพร่หลายไปในเกือบทุกภาคของประเทศ สายพันธุ์องุ่นรับประทานผลสดที่นิยมปลูกในปัจจุบันมีหลากหลายสายพันธุ์ ได้แก่ การ์ดินาล (Cardinal), เอ็มเพอเรอร์ (Emperor), มัสคัต ออฟ อะเล็กซานเดรีย (Muscat of Alexandria), เพอร์เลต (Perlette) และ ซูกานินา (Sukanina) เป็นต้น (นันทกร บุญเกิด, 2543)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปขององุ่น

องุ่นเป็นไม้เลื้อยประเภทไม้ยืนต้น มีมือจับเพื่อเกาะยึด เป็นพืชที่ขึ้นได้ดีทั้งในเขตหนาว เขตกึ่งร้อน และเขตร้อน โดยในเขตหนาวองุ่นจะมีลักษณะเป็นพืชผลัดใบในฤดูใบไม้ร่วง

พักตัวในฤดูหนาว และแตกใบในฤดูใบไม้ผลิ และเจริญเติบโตไปจนผลแก่ในฤดูร้อน ส่วนองุ่นที่นำมาปลูกเขตร้อนจะมีลักษณะใบเขียวตลอดปี ไม่มีการพักตัวตามธรรมชาติ แต่องุ่นที่ปลูกในเขตร้อนนั้นจะพบปัญหาของโรคและแมลงระบาดรุนแรงกว่าในเขตอบอุ่น เนื่องจากความชื้นในอากาศสูงตลอดปี (วัฒนา สวรรยาธิปิติ, 2531)

2.1.2 โรคและแมลงศัตรูองุ่น

1. แมลงศัตรูองุ่น

1.1 หนอนกระทู้หอม เป็นหนอนที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ชาวสวนเรียกว่า "หนอนหนังเหนียว" ทำความเสียหายต่อทุกส่วนขององุ่นทั้งใบ ดอก ผลและยอดที่จะเจริญไปเป็นดอกและผลในฤดูถัดไป หนอนกระทู้หอมตัวเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็กกว้างไข่เป็นกลุ่ม 20-80 ฟอง บริเวณด้านหลังใบ ไข่ปกคลุมด้วยขนสีขาว หนอนวัยอ่อนจะแทะผิวใบพรุนเป็นรูแห่งทำให้ใบแห้งตายและเมื่อหนอนโตเต็มที่จะกัดกินใบอ่อน ช่อดอกหรือผลอ่อนขององุ่นเสียหายสามารถป้องกันกำจัดโดยใช้เชื้อไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม หรือเชื้อแบคทีเรีย บาซิลลัส ทรูริงเจนซิส (*Bacillus thuringiensis*) หรือใช้กับดักแสงไฟ (Black light) หรือกาบดักเหนียวเพื่อดักผีเสื้อตัวผู้และตัวเมีย ก่อนจะขยายพันธุ์ในรุ่นต่อไป และฉีดพ่นด้วยสารเคมีกลุ่มคาร์บาเมท

1.2 หนอนเจาะสมอฝ้าย ทำลายองุ่นโดยกัดกินส่วนดอกและเมล็ดภายในผลองุ่น ตั้งแต่ระยะติดดอกจนถึงดอกบาน จะพบช่อดอกถูกกัดกินเป็นแถบและระยะช่อดอกอ่อนอายุระหว่าง 10-14 วัน หลังจากดอกบานแล้วจะเจาะกินเมล็ดภายในหมุดและย้ายไปกัดกินผลอื่นต่อไป ผลที่ถูกทำลายจะเป็นรู ใช้เชื้อไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้ายฉีดพ่น หรือนิพ่นสารเคมีกลุ่มคาร์โบซัลเฟน

1.3 เพลี้ยไฟ เพลี้ยไฟเป็นแมลงขนาดเล็กใช้ปากเขี่ยดูดกินน้ำเลี้ยงจากยอดใบอ่อน ทำให้ยอดใบอ่อนหักงอ ใบแห้งกรอบไม่เจริญเติบโตและตายในที่สุด ถ้าทำลายระยะดอกทำให้ดอกร่วงไม่เกิดผลหรือทำให้ผลมีตำหนิ (วิชญ์ อุทโยภาส และคณะ, 2536)

2. โรคองุ่น

องุ่นมีโรคที่สามารถเข้าทำลายได้หลายชนิด ตั้งแต่ระยะที่องุ่นแตกใบจนถึงระยะที่เป็นผล องุ่นที่ปลูกในประเทศไทยมีโรคระบาดรุนแรงหลายชนิด เนื่องจากสภาพอากาศร้อนชื้น มีฝนตกชุก และมีการตัดแต่งกิ่งองุ่นให้ออกดอกติดผลตลอดปีจึงมีส่วนทำให้เกิดโรคระบาดได้ง่ายเกือบตลอดทั้งปี ปัญหาเรื่องโรคจึงเป็นปัญหาที่สำคัญของสวนองุ่นอย่างมาก โรคองุ่นที่สำคัญได้แก่

2.1 โรคราน้ำค้าง (Downy mildew) เกิดจาก เชื้อรา *Plasmopara viticola* ลักษณะอาการ เป็นกลุ่มสปอร์แรงเจียม (sporangium) สีขาวขึ้นอยู่บริเวณใต้ใบองุ่น ทำให้ด้านหน้าใบเป็นสีเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในเวลาต่อมา ในขณะที่ผงฟูสีขาวบริเวณใต้ใบลดลงเมื่อ

เนื้อเยื่อบริเวณที่ถูกทำลายตายไป จะเป็นแผลไหม้สีน้ำตาล และเมื่ออาการรุนแรงจะทำให้ใบเหลือง และร่วงหล่น การกระจายของเชื้อจะกระจายตามลม และเข้าทำลายพืชในช่วงใบอ่อน โรคนี้จะระบาดรุนแรงในฤดูฝนและฤดูหนาวในระยะเวลาที่มีความชื้นสูง (เตือนใจ กาหลง, 2545)

2.2 โรคสแคบ หรือ แอนแทรคโนส หรือ อีบูบ สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Elsinoe ampelina* (De Bery) (Shear 1929 อ้างถึงในกานต์ คำทรัพย์) ระยะ anamorph คือเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* De Bery อาการเริ่มแรกบนใบจะเห็นเป็นจุดฉ่ำน้ำเล็ก ๆ ต่อมาจุดเหล่านั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลกระจายทั่วใบ จุดดังกล่าวเมื่อใบขยายขนาดใหญ่ขึ้นทำให้เกิดรอยฉีกขาดบนเนื้อเยื่อใบที่ถูกทำลายทำให้เห็นแผลมีลักษณะเป็นรูพรุน การทำลายที่ยอดและเถาทำให้ยอดเน่าดำ การทำลายบนผลอ่อน ทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลลักษณะค่อนข้างกลม แผลจะแห้งแข็งและยุบตัวลงไปเล็กน้อย การแพร่ระบาด สปอร์ของเชื้อราจะแพร่ระบาดตามลมและละอองน้ำฝน และเข้าทำลายพืชได้ดีในช่วงฝนชุกในขณะที่อุณหภูมิเย็นชื้นและออกดอกติดผล

2.3 โรคเถาแห้ง (Dead arm disease) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Melanconium fuliginium* ระยะ teleomorph คือ *Greeneria uvicola* ลักษณะ เริ่มสังเกตอาการได้เมื่อใบขององุ่นแสดงอาการใบสลดในช่วงแรกต่อมา ใบจะเหี่ยวหรือเหลือง ปลายกิ่งเริ่มแห้งลงมา ผลที่อยู่ในช่อที่มีอาการเหี่ยวจะนิ่มและเหี่ยวในเวลาต่อมา เมื่อตรวจสอบบริเวณรอยตัดของกิ่งที่เถานั้นแตกออกจะพบแผลแห้งแข็งสีน้ำตาล อาการที่ใบมักพบแผลสีน้ำตาลอ่อนคล้ายถูกน้ำร้อนลวก การแพร่ระบาด เชื้อจะแพร่กระจายทางลมและละอองน้ำฝน และเข้าทำลายหลังตัดแต่งกิ่ง

2.4 โรคราสนิม (Rust) เกิดจากเชื้อ *Phakosora ampelopsidis* หรือ *Physopella vitis* หรือ *Uredo vitis* อาการจะพบผงสีเหลืองส้มใต้ใบเป็นกระจุก กระจายทั่วใบ ด้านบนใบที่ตรงกับบริเวณที่แสดงอาการจะแห้งเป็นจุดสีเหลืองและต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง ใบที่แสดงอาการมาก ๆ จะทำให้ใบร่วงหล่น แพร่ระบาดโดยลม มีระบาดกับใบแก่ช่วงใกล้เก็บเกี่ยว

2.2 โรคสแคบในองุ่น

2.2.1 ความสำคัญและประวัติการระบาด

โรคสแคบ หรือแอนแทรคโนสขององุ่นมีรายงานการพบครั้งแรกในทวีปยุโรป โดยในปี ค.ศ.1839 Viala ได้ทำการเก็บตัวอย่างโรคไว้เป็นตัวอย่างที่เมือง Montpellier ในปี ค.ศ. 1881 Burril รายงานการพบโรคในสหรัฐอเมริกา (Shear, 1929 อ้างถึงในกานต์ คำทรัพย์, 2546) ต่อมาได้มีรายงานการเข้าทำลายองุ่นในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล คิวบา ออสเตรเลีย โรดีเชีย นิวกีนิ แคมเปีย และอินเดีย ในประเทศไทยมีรายงานการพบโรคนี้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2506 ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ, 2537) ปัจจุบันโรคนี้พบระบาดในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกองุ่น ได้แก่ นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี เชียงราย ลำปาง พิจิตร

และนครราชสีมา การระบาดรุนแรงมากในสภาพที่มีอากาศค่อนข้างร้อนและมีฝนตกปรอย ๆ หรือ มีน้ำค้างลง (กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ, 2536)

2.2.2 การศึกษาโรคสแคบขององุ่นในประเทศไทย

1. อาการวิทยา

โรคสแคบ หรือชาวสวนเรียกว่า โรคอีบุบ เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* เป็นโรคที่ทำความเสียหายเป็นอันดับสองรองจากโรคราน้ำค้าง (นันทกร บุญเกิด, 2543) เชื้อ *S. ampelinum* สามารถเข้าทำลายองุ่นได้ทุกส่วนที่อยู่เหนือดิน โดยเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) ได้แก่ ใบ ก้านใบ มือจับ ยอดอ่อน และผลอ่อน อาการบนใบหรือส่วนยอดมักจะเห็นเป็นจุดน้ำน้ำ สีน้ำตาลอ่อน หรือสีเทา มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 – 5 มิลลิเมตร ลักษณะกลมต่อมาจุดเหล่านั้นจะกลายเป็นสีน้ำตาล เมื่อใบขยายใหญ่ขึ้นจะขาดเป็นรูพรุน (shot – hole) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมแผลจะขยายใหญ่ขึ้น และรวมกันจนเนื้อเยื่อใบขาด ใบบิดงอหรือม้วนงอลงด้านล่าง (เดือนใจ บุญหลงและคณะ, 2545) ถ้าอาการรุนแรงอาจทำให้ใบหลุดร่วงได้ การทำลายบนผลมักเกิดในช่วงที่ผลอายุประมาณ 2 เดือน (กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ, 2536) จะเห็นเป็นแผลสีน้ำตาลอ่อน ค่อนข้างกลม แผลจะดูแห้งแข็งและยุบตัวลงไปเล็กน้อยและไม่ขยายขนาดมากนัก แผลจะมีขนาดประมาณ $\frac{1}{4}$ นิ้ว บริเวณกลางแผลมีสีขาวเทา ส่วนบริเวณรอบ ๆ แผลจะมีสีน้ำตาลแดงหรือดำ เมื่อแผลพัฒนาเต็มที่ เชื้อจะสร้าง acervulus บนแผล และเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมโคนิเดียของเชื้อจะถูกปล่อยออกจาก acervulus และเข้าทำลายส่วนอื่น ๆ ต่อไป (ขนิษฐา มารุ่ง, 2548) อาการบนเถาอ่อนและมือเกาะ บริเวณที่เชื้อเข้าทำลายจะปรากฏเป็นแผลสีน้ำตาลแดงถึงสีดำมีลักษณะเป็นตะปุ่มตะป่ำกลางแผลที่ยุบตัวของแผลที่มีสีเข้ม (กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ, 2537)

2. เทคนิคการแยกเชื้อรา *Sphaceloma* spp.

การศึกษาในระยะเริ่มแรก มักมีปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อ *Colletotrichum* เชื้อมักเจริญรวมอยู่กับเชื้อ *Sphaceloma* spp. (กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ, 2544) จึงได้พัฒนาเทคนิคการแยกเชื้อ *Sphaceloma* spp. โดยมีรายละเอียดดังนี้ เก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคสแคบ ในช่วงเวลาที่เหมาะสม คือ ระยะที่พืชกำลังผลิดอกออกผล สภาพอากาศร้อนและชื้นหรืออากาศร้อนในเวลากลางวันและเย็นชื้นหรือน้ำค้างลงจัดในเวลากลางคืน โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรคชัดเจนปราศจากอาการร่วมอื่น ๆ ตัวอย่างที่ดีสำหรับการแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ควรอยู่ในสภาพสดและเก็บนานไม่เกิน 2 วันและปราศจากเชื้อปนเปื้อน เพราะเชื้อ *Sphaceloma* spp. เจริญช้าในห้องปฏิบัติการ เชื้ออื่น ๆ เจริญแข่งขันได้ดีกว่า จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่เป็นโรคมานำให้เชื้อราปล่อยสปอร์ออกจาก acervulus ในน้ำกลั่น เริ่มจากทำความสะอาดผิวน้ำกลั่นหนึ่งภาชนะ จากนั้นใช้มีดผ่าตัดเนื้อบริเวณที่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 2×2 มิลลิเมตร ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่ง

ฆ่าเชื้อแล้ว พักให้แห้งใน plate วางแผ่นสไลด์บนวงแหวนหรือแท่งแก้ว V – shape ใน plate ที่อบฆ่าเชื้อ แล้วใช้ pasteur pipette ดูดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อหยดบนแผ่นสไลด์ 2 จุดห่างกันพอสมควร และใส่น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อใน plate เล็กน้อย นำชิ้นพืชที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ใส่ในหยดน้ำบนสไลด์ 3 – 4 ชิ้น ปิดฝา plate และเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงสุด ทุก ๆ 2 – 3 ชั่วโมง เมื่อปรากฏกลุ่มของสปอร์จึงใช้ปากคีบ (forceps) หยิบชิ้นพืชออก ปิดด้วย cover slip ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี serial dilution method และย้ายสปอร์เดี่ยวเลี้ยงบนอาหาร WA เมื่อสปอร์งอกจึงย้ายลงอาหาร PDA เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

3. วงจรการเกิดโรค

เชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูได้ โดยอาศัยอยู่ในซากขององุ่นที่เคยเป็นโรค เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เชื้อจะสร้าง inoculum ขึ้นมาใหม่ในรูปของโคนิเดีย ซึ่งเป็น primary inoculum โคนิเดียจะแพร่กระจายโดยลมและละอองน้ำฝน เมื่อมีความชื้นสูงเชื้อจะงอก germ tube เข้าทำลายพืช ไปเจริญอยู่ในเซลล์และเข้าทำลายส่วนต่าง ๆ ขององุ่น โคนิเดียจะงอกได้เมื่อได้รับความชื้นเป็นเวลานาน 4 – 7 ชั่วโมง และมีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อการงอกของโคนิเดียคือ ระยะเวลาที่ใบพืชเปียก อาการของโรคจะเริ่มปรากฏภายใน 3 – 5 วัน หลังจากปลูกเชื้อลงบนพืชแล้วนำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 12 – 13 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บไว้ในที่แห้งที่อุณหภูมิ 12 – 13 องศาเซลเซียสนาน 17 วัน โคนิเดียจะปรากฏบนใบใหม่ภายใน 12 – 14 วัน หลังจากการเข้าทำลาย (Brook, 1973 อ้างถึงใน ขนิษฐา มากรุ่ง, 2548)

Burkholder (1917) ได้ศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อ *Elsinoe veneta* ซึ่งเป็นระยะ Teleomorph ของเชื้อ *Sphaceloma* ซึ่งเริ่มวงจรชีวิตเมื่อ ascospores ใส่ 4 เซลล์ แก่จัดช่วงปลายฤดูใบไม้ร่วงหรือต้นฤดูใบไม้ผลิ ภายใน asci ที่มีลักษณะกลม ซึ่งกระจายตัวอยู่ในช่องว่างของ stromatic ascocarp เมื่อผนังส่วนบนของ stroma เปิด asci จะถูกดันออกมาภายนอก เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ascospores ที่ถูกหุ้มด้วยเมือกใส (gelatinous substance) จะสร้าง sterigma สั้น ๆ เป็นที่เกิดของ conidia เมื่อ conidia งอก mycelium จะแทรกตัวเจริญอยู่บน cuticle ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของ acervulus และสร้าง conidia ต่อไป

Gable and Tiffany (1987) อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์ (2546) รายงานว่า stroma เป็นแหล่งกำเนิดของ reproductive spores ของเชื้อ *Elsinoe panici* เมื่อมีอายุมากผนังจะหนาประกอบด้วยเนื้อเยื่อ pseudoparenchyma อัดตัวกันแน่น และส่วนใหญ่พัฒนาไปเป็น acervulus ซึ่งจะฝังตัวอยู่ในชั้น subepidermis ของเซลล์พืช ภายใน acervulus จะสร้างชั้น conidiogenous cells (ซึ่งสังเกตได้ยาก) บริเวณชั้นนี้มีกลุ่มของเส้นใยอัดตัวกันแน่น ทำให้มองเห็นเหมือน pycnidium จากนั้น conidium จะถูกสร้างขึ้นเหนือ conidiogenous cells conidium มีรูปไข่ ขนาด $5 - 9 \times 2 - 3$

μm ซึ่งเมื่อหลุดออกจาก conidiogenous cells จะรวมกลุ่มอยู่ในสารเมือก (mucous matrix) ในสภาวะที่อากาศเย็น stroma จะพัฒนาเป็น ascocarp และจะสร้าง ascus และ ascospore

Mirica (1988) ได้ศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum*. เริ่มสร้าง sclerotia ที่อยู่ข้ามฤดูหนาว สร้าง conidia เมื่อมีสภาพอากาศร้อนขึ้นติดต่อกัน 24 ชั่วโมง การกระจายของ conidia ไปยังส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ ถ้าในขณะนั้นมีน้ำ primary infection จะเกิดขึ้นภายใน 12 ชั่วโมง แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมของการเจริญของโรคคือ 24 – 26 องศาเซลเซียส conidia และ ascospores ของเชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูได้ และเมื่อมีสภาพฝนตกหนักและมีลูกเห็บในฤดูร้อนจะทำให้เชื้อสามารถระบาดได้มากขึ้น ในประเทศไทยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคคือ ต้นและปลายฤดูฝนโดยเฉพาะช่วงที่ฝนตกและมีอากาศร้อนอบอ้าว

2.3 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum*.

เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในสกุล *Sphaceloma* เป็นระยะ Anamorph มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งจำแนกตามหมวดหมู่ได้ดังนี้ (Alexopoulos, 1962; Sutton, 1973)

Anamorph : Subdivision Deuteromycotina

Class Deuteromycetes

Order Melanconiales

Family Melanconiaceae

Genus *Sphaceloma*

Species depend on host

เชื้อ *S. ampelinum* มี teleomorph stage คือเชื้อ *Elsinoe ampelinua* เชื้อ *E. ampelinua* สามารถจัดจำแนกตามหมวดหมู่ดังนี้

Teleomorph : Subdivision Ascomycotina

Class Ascomycetes

Order Myriangiales

Family Elsinoaceae

Genus *Elsinoe*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อพบว่า เชื้อขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสร้าง asexual spore เรียกว่า conidium ซึ่งเกิดขึ้นบนส่วนปลายของก้านชูที่เรียกว่า conidiophore ภายใน fruiting body ที่เรียกว่า acervulus ที่ฝังตัวอยู่ในชั้น epidermis หรือ subepidermal เชื้อจะสามารถสร้าง conidia ได้อย่างรวดเร็ว และมีจำนวนมาก ถ้ามีสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เหมาะสม ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ แสง ความชื้น อาหารและความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของอาหาร (ประสาทร ะสมิตะมาน, 2534 อ้างถึงใน ขนิษฐา มารุ่ง, 2548) ลักษณะของสปอร์ มีลักษณะใส มีเซลล์เดียวทรงกระบอกหัวท้ายมน เมื่อสปอร์แก่เต็มที่จะเห็นวงกลมใสอยู่ทางด้านหัวและท้ายเซลล์ผนังเซลล์ด้านนอกมีวุ้นใสหุ้ม (wall mucilaginous) (กรรณิการ์ เพียนภักตร์, 2536) สปอร์มีขนาด $6.37 - 8.75 \times 2.61 - 4.77 \mu$ (กรรณิการ์ เพียนภักตร์, 2536) สปอร์ที่หลุดออกจาก conidiophore มักอยู่รวมกลุ่มกัน (spore mass) ทำให้มองเห็นเป็นสีชมพู (Singh, 2000 อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์, 2546)

เชื้อ *E. ampelinum* สร้าง fruiting body ที่เรียกว่า ascostroma ซึ่งมีช่องว่าง (locul) อยู่ต่างระดับกัน และมีเพียง ascus เดียวในแต่ละช่อง (monoascus) ascus มีรูปร่างกลม ascospore เกิดภายใน ascus มีลักษณะสปอร์เป็นแบบ dictyoseptate มี 3 septa อาจพบได้ 4 – 5 septa โดยสองเซลล์ข้างบนจะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ข้างล่าง ascospore มีสีใส ascostroma ไม่มีปากเปิด ascospore จะถูกปล่อยออกเมื่อ ascostroma เกิดการยุบตัว (softening) และสลายตัว (Singh, 2000 อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์, 2546) เชื้อรา *Sphaceloma* มีความแตกต่างกันตามชนิดของพืชอาศัย Sutton (1980) รายงานว่า *Sphaceloma* มีการตั้งชื่อไว้มากกว่า 150 species ทั้งๆ มีความใกล้เคียงกันทางด้านสัณฐานวิทยาอย่างมาก

2.4. การควบคุมโรค

มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมโรคสแคบในองุ่นดังต่อไปนี้

2.4.1 การควบคุมโรคด้วยวิธีเขตกรรม

กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ (2533) ให้คำแนะนำการควบคุมโรคด้วยวิธีเขตกรรมโดยทำความสะอาดสวนองุ่น ด้วยการนำส่วนที่เป็นโรค ตลอดจนซากพืชออกไปทำลายเพื่อลดแหล่งแพร่เชื้อ และหลีกเลี่ยงการปลูกองุ่นในช่วงที่มีอากาศร้อนชื้น หรือช่วงฤดูฝนซึ่งเป็นระยะเวลาที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อรุนแรงและรวดเร็ว หลีกเลี่ยงการปลูกองุ่นในพื้นที่ที่เคยมีประวัติการระบาดของโรคมามาก่อน กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ (2547) แนะนำให้เตรียมส่วนขยายพันธุ์ให้สมบูรณ์แข็งแรง เช่น การใช้ปุ๋ย nitrate หรือ potash ประมาณ 3 สัปดาห์ก่อนทาบกิ่งหรือตอนกิ่ง รวมถึงการตัดแต่งกิ่ง ทรงพุ่ม หรือเถา ให้อากาศถ่ายเท และแสงแดดสามารถส่องผ่านได้ และควรให้น้ำโดยระบบน้ำหยด หลีกเลี่ยงการให้น้ำระบบน้ำฝอยเหนือทรงพุ่ม (Overhead sprinkler irrigation) โดยเฉพาะช่วงที่พืชอ่อนแอ

2.4.2 การควบคุมโรคโดยใช้ระบบพยากรณ์ล่วงหน้า

ในปี ค.ศ. 1997 ได้มีการคิดค้นสมการ Multiple linear regression model เพื่อใช้ในการทำนายการแพร่ระบาดของโรคล่วงหน้า (Thind et.al., 1997 อ้างถึงโดย ขนิษฐา ปรากฏ, 2548) ซึ่งสมการต้องสอดคล้องกับข้อมูลทางอุตุนิยมวิทยา ดังนี้

$$Y = -225.10 + 2.62 (\text{temp.}) + 3.35(\text{RH}) - 0.9 (\text{rainfall}) R^2 = 0.94$$

โดยสมการนี้ต้องใช้ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิในแต่ละวัน ความชื้นสัมพัทธ์และปริมาณน้ำฝนประจำเดือน ถ้าค่าที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 94% แสดงว่ามีโอกาสที่โรคจะระบาด ต้องทำการป้องกันกำจัดทันที

2.4.3 การควบคุมโรคโดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติ

กานต์ คำทรัพย์ (2546) ได้ศึกษาสารสกัดจากสมุนไพร 19 ชนิด พบว่าสารสกัดมะตูมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ ขณะที่สารสกัดจากผลของแก้วมังกรมีฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะการสร้างสปอร์ของเชื้อ *S. ampelinum*.

2.4.4 การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมี

คาร์เบดาซิมเป็นสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของโคโคนิถลักษณะที่เป็นเส้นใยได้ดีที่สุด แต่ไม่ยับยั้งการสร้างโคโคนิถของเชื้อที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ (yeast like colony) แสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของคาร์เบดาซิมต่อเชื้อ *S. ampelinum* ยับยั้งการสร้างเส้นใยแต่ไม่ยับยั้งการสร้างสปอร์ ส่วนสารคอปเปอร์ออกซิคโลไรด์และแคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. ampelinum* ได้ (กานต์ คำทรัพย์, 2546) จากการทดสอบประสิทธิภาพของ iminoctadine tris (albesilate) 40WP เพื่อป้องกันโรคสแคบ (*Sphaceloma ampelinum*) ขององุ่นโดยใช้สาร iminoctadine tris (albesilate) ที่อัตราต่างๆ เปรียบเทียบกับ สาร difenoconazole 25EC, สาร propineb 70WP และสาร kasugamycin+carbendazim พบว่า สาร iminoctadine tris (albesilate) ทุกอัตราให้ผลการควบคุมโรคสแคบได้ดีไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากสาร difenoconazole (กนิษฐ์ ฐนเทพ, 2545)

กรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ (2544) ได้ให้คำแนะนำการป้องกันที่เหมาะสมก่อนการแพร่ระบาดของโรค โดยการใช้ Bordeaux mixture 1% ฉีดพ่นยอดอ่อนที่แตกใหม่ขององุ่นในช่วงฤดูฝน และจากรายงานของ Rahim (1988) การควบคุมโรคสแคบของมะม่วงในบังกลาเทศ โดยฉีดพ่นด้วย cupravit (2%) หรือ Bordeaux mixture (1%) 2 – 3 ครั้งทุก ๆ 15 วันสามารถควบคุมโรคสแคบของมะม่วงในระยะที่อ่อนแอต่อโรคได้ มีรายงานว่า การจัดการศัตรูส้มในรัฐฟลอริดา โดยใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช ได้แก่ คอปเปอร์ Gem และ Headline สามารถควบคุมโรคสแคบในส้มใน

หลายสายพันธุ์ได้ แต่หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดการดื้อยาของโรคได้ สารเคมีชนิดอื่นที่แนะนำใช้ในการป้องกันกำจัดโรคสแคบส้ม เช่น Ferbam, Granufflo, Abound, Gem 25WG และ Gem 500 SC (Dewdney and Timmer, 2010)

2.5 โรคสแคบของพืชอื่น

นอกจากองุ่นแล้วโรคสแคบ จากเชื้อ *Sphaceloma* spp. ยังสามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจอีกหลายชนิด ได้แก่ กระจวาน กุหลาบ คริสต์มาส ชา ถั่วลิสง ถั่วเหลือง น้อยหน่า ฝรั่ง มะละกอ มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ มันสำปะหลัง ยางพารา ละหุ่ง หน้วว ส้ม สัก และอะโวคาโด (Weber, 1973; Cook, 1975; Holiday, 1980; Aferi et al, 1994 and Rahim, 1988 อ้างถึงใน วรรณิการ์ เพ็ญพัทธ์และคณะ, 2545)

โรคสแคบของน้อยหน่า เกิดจากเชื้อ *Elsinoe annonae* Bitoncourt แสดงอาการเป็นจุดสีดำนบนใบ บริเวณรอบจุดเป็นสีน้ำตาล บริเวณกลางจุดมักมีสีจางเห็นได้ชัดเจนบริเวณด้านบนใบมากกว่าด้านใต้ใบ จุดอาจเชื่อมกันทำให้เห็นเป็นรูปร่างไม่แน่นอน เชื้อจะระบาดโดยลมและน้ำฝน โดยผ่านเข้าทำลายโดยตรงทางแผลที่เกิดจากแมลงหรือรูเปิดธรรมชาติ (นิพนธ์ วิสารทนนท์, 2542)

โรคสแคบของส้ม เกิดจากเชื้อ *Elsinoe fawcetti* Bitoncourt & Jenk., *E. australis*, *E. fawcetti* var. *scabiosa* ระยะ anamorph คือ *Sphaceloma fawcetti* Jenkins จะทำให้ใบของส้มแสดงอาการจุดสีดำน จุดดำนจะแข็งและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อใบแก่มากขึ้น ใบอ่อนส้มจะบิดเบี้ยวเนื่องจากการเจริญของใบที่เป็นโรคไม่สม่ำเสมอ ส่วนในใบแก่ค่อนข้างด้านทานโรค จุดดำนจะเกิดด้านใดด้านหนึ่งของใบ ส่วนด้านตรงข้ามจะนูนเข้าไป ผลส้มที่เป็นโรคจะมีผิวหยาบผิวขรุขระแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของส้ม ผลที่กำลังเจริญเติบโตจะบิดเบี้ยว กิ่งอ่อนแสดงอาการเป็นจุดดำนสีน้ำตาลของโรคได้เช่นกัน เชื้อจะสร้างสปอร์จากกิ่งที่เป็นโรคตาย แพร่ระบาดทางลมและฝนและเข้าสู่ใบอ่อน เมื่อใบเป็นโรคมักก็จะแพร่ระบาดสู่ผลส้ม (นิพนธ์ วิสารทนนท์, 2542) การงอกและการเข้าทำลายของโคนิเดีย ต้องอาศัยความชื้นสูง ซึ่งอาจเกิดจากน้ำค้างหรือหมอก อุณหภูมิเฉลี่ยที่เหมาะสมต่อการงอกและการเข้าทำลายของโคนิเดียประมาณ 14 – 25°C เชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูได้โดยแฝงตัวบนส่วนต่างๆ ของพืชชนิดอื่น เพื่อเป็นแหล่ง inoculum ในฤดูต่อไป (Whiteside, 1975)

โรคสแคบในฝรั่งเกิดจากเชื้อ *Sphaceloma psidii* พบได้บนผลฝรั่งในหลายจังหวัดทั่วประเทศ ลักษณะอาการของโรค จะแสดงอาการบนใบ ผล ก้านผล ค่อนข้างแตกต่างกัน และเป็นเฉพาะส่วนที่เนื้อเยื่อกำลังเจริญ อาการบนผล เป็นจุดสีน้ำตาล แห้ง แข็ง ยุบตัว ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณใกล้เคียงหดตัวเป็นตะปุ่มตะป่ำกระจายทั่วผล บ่อยครั้งที่แผลเหล่านี้แห้งแตกและยุบตัวรวมกันอาการที่เกิดกับใบยอดอ่อนที่ติดช่อดอกซึ่งกำลังติดผลอ่อนที่ยังไม่สมบูรณ์ ใบจะแห้งแตกบิดเบี้ยว

และร่วงในที่สุด อาการบนก้านผล เป็นแผลสีน้ำตาลกระจายรอบก้านข้อผล บริเวณรอบนอกเป็นสีน้ำตาลแดง หากแผลเหล่านี้เชื่อมถึงกันจะทำให้ผลร่วงก่อนกำหนด อาการที่พบทั้งหมดไม่ปรากฏ fruiting body ใด ๆ ให้เห็นเพราะมีขนาดเล็กมาก (กรรณิการ์ เพียรภักดิ์และคณะ, 2544)

โรคสแคบของอะโวคาโด เกิดจากเชื้อ *Sphaceloma persea* Jenk. ทำให้ใบของอะโวคาโดเป็นจุดบวมด้านใดด้านหนึ่งของใบ มักเกิดเป็นกลุ่มบนใบทำให้ใบหงิกงอ กลางจุดมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลหรือดำและอาจแตกเป็นรู เชื้อทำลายผลทำให้เป็นจุดกลมบนสีน้ำตาลหรือม่วง เนื้อเยื่อกลางจุดจะแห้งและฟ้าม มักรวมกันเป็นจุดใหญ่เกิดเป็นปื้นหยาบและแผลแตกที่ผิวเป็นหย่อม ๆ หรือคลุมทั่วทั้งผล โดยโรคนี้ไม่ทำให้ผลของอะโวคาโดเน่าหลังเก็บเกี่ยว (นิพนธ์ วิจารณ์, 2542)

Jenkins (1933) อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์ (2546) รายงานการระบาดของโรคสแคบบนถั่ว Lima bean ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ *Elsinoe canavaliae* โดยพบระบาดในหลายประเทศ เช่น คอสตาริกา นิการากัว กัวเตมาลา คิวบา และเม็กซิโก เป็นต้น โดยพบว่าสามารถแยกเชื้อจากตัวอย่างฝักสดได้

Jenkins และ Mewhorter (1938) (อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์, 2546) รายงานการพบโรคแอนแทรคโนสของกุหลาบในประเทศสหรัฐอเมริกา ว่ามีเชื้อสาเหตุ คือ *Sphaceloma rosarum* และในปีเดียวกันมีรายงานว่าพบโรคแอนแทรคโนสของใบชาพันธุ์ Labrador ว่ามีเชื้อสาเหตุ คือ *Elsinoe ledi* และมีรายงานการพบโรคสแคบของ lemon จากประเทศปารากวัยว่ามีเชื้อสาเหตุคือ *Elsinoe australis* โดยพบในระยะ conidial stage และรายงานจากประเทศบราซิลพบโรคแอนแทรคโนสของพีช *Hicoria pecan* ว่าเกิดจากเชื้อ *Elsinoe randii* ในปี ค.ศ. 1941 มีรายงานการพบโรคสแคบของพีช *Poinsetta (Euphorbia pulcherima)* ในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าเกิดจากเชื้อ *Sphaceloma* ซึ่งยังไม่พบ Perfect stage และในรายงานกล่าวว่าลักษณะแผลบนใบ คล้ายกับผลของโรคสแคบบนพืชตระกูลส้ม และในปี ค.ศ. 1944 มีรายงานการพบโรคสแคบในสหรัฐอเมริกาบนพีช *Aralia (Aralia spinosa)* ว่าเกิดจาก *Sphaceloma araliae* และในพีช *Salix lasiandra* เกิดจาก *Sphaceloma murrayae* จากนั้นในปี ค.ศ. 1949 Arnaud และ Bitancourt รายงานว่าพบ perfect stage ของเชื้อ *Sphaceloma mattisolanum* สาเหตุโรค spot anthracnose ของต้นสตรอเบอร์รี่โดยพบ Ascocarp บนแผล

ช่วงเดือนกรกฎาคม ปี ค.ศ. 2006 พบการระบาดของโรคสแคบในต้น snowberry *Symphoricarpos albus* var. *laevigata* ครั้งแรกในประเทศเชกโกสโลวะเกีย โดยพบอาการที่เกิดกับส่วนของใบ ยอด และผล สามารถสรุปได้ว่าเกิดจากเชื้อ *Sphaceloma symphoricarpi* อาการที่พบบนใบ จะเกิดเป็นจุดกลมหรือกลมรี สีม่วงถึงสีดำขนาด 1 – 5 มิลลิเมตร บางครั้งพบอาการซีดรอบแผล มีสีขาวเทาเมื่อใบขยายใหญ่ขึ้นแผลดังกล่าวจะขยายขนาดตาม และเกิดจุดทะลุเมื่อทำการแยกเชื้อพบว่า โคนิเดียมี 1 – 2 เซลล์ ใสไม่มีสี และมีเส้นแบ่ง (Vaclav Kudela and Vaclav Krejzer, 2006)

โรคสแคบในมันเทศ สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Sphaceloma batatas* ซึ่งเข้าทำลายส่วนใบและลำต้นของมันเทศโดยเข้าทำลายส่วนที่อยู่เหนือพื้นดิน เมื่อเชื้อเข้าทำลายจะทำให้เกิดแผลสะเก็ดบนใบ ก้านใบ และลำต้น มีผลทำให้ส่วนที่เชื้อเข้าทำลายรูปร่างผิดปกติ และทำให้ต้นแคระแกร็น หรือทำให้ลำต้นตั้งตรงแทนที่จะเลื้อยไปบนพื้นดินเหมือนกับพืชปกติ ถ้าอาการรุนแรงมากจะทำให้ผลผลิตลดลงหรือต้นตายได้ (Nayga and Gapasin, 1986, Pongol, 1982)

โรคสแคบในมะม่วง เกิดจากเชื้อ *Sphaceloma mangiferae* Bit & Jenkins มีรายงานว่าพบครั้งแรกในฟลอริดาและคิวบาในปี 1942 โดยทำความเสียหายต่อผลผลิตของมะม่วงในสภาพสวนมากกว่าสภาพไร่ (Rahim อ้างถึงใน กรรณิการ์ เพียนภักตร์, 2541) ส่วนในประเทศไทยพบโรคนี้ครั้งแรกในมะม่วงเขียวเสวย ที่จังหวัดสมุทรสาครในปี พ.ศ. 2538 จากการรายงานของกรรณิการ์ เพียนภักตร์และคณะ (2541)

โรคตากบของกุหลาบ เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma rosarum* โดยลักษณะของแผลเป็นจุดที่ใบ ตรงกลางมีรูโหว่ดูเหมือนตากบ ระยะแรกแผลที่ใบจะเป็นสีน้ำตาลแก่และจะเปลี่ยนสีเป็นสีดำต่อมาเนื้อเยื่อตรงกลางจุดจะตาย และบริเวณนั้นจะเปลี่ยนเป็นจุดสีขาวหรือสีจืดๆ และแผลตรงกลางจะหลุดไปทำให้เกิดเป็นรู ใบที่เป็นโรคบางครั้งอาจบิดเบี้ยว รอบจุดอาจเป็นสีเหลืองหรือสีขาว ในที่สุดใบก็จะร่วง นอกจากนี้ยังเกิดแผลที่หนามและกลีบเลี้ยงด้วย เชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูได้บนแผลบนกิ่งแก่

โรคสแคบในมะม่วงหิมพานต์ เกิดจากเชื้อ *Sphaceloma anacardii* Wani & Thirum อาการจะเกิดบนส่วนที่เป็นผลเทียมอ่อนและเมล็ดที่ยังไม่เจริญเต็มที่ โดยมีอาการเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนนํ้า และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ยุบตัวลงไป ล้อมรอบด้วยบริเวณนํ้าสีเหลืองใส เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะแห้งแข็งและเป็นแผลตกสะเก็ด หากเชื้อเข้าบริเวณก้านข้อผลเทียม และเมล็ด จะทำให้ผลร่วงก่อนกำหนด (กรรณิการ์ เพียนภักตร์, 2547)

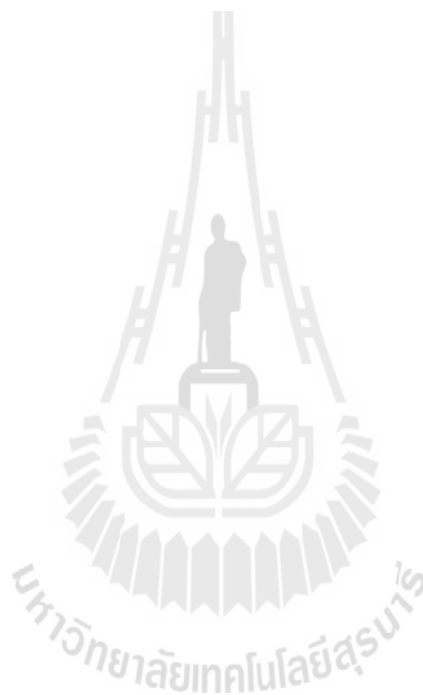
2.6 การจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *Sphaceloma* spp.

2.6.1 การจำแนกความแตกต่างโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะที่ใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดของเชื้อ *Sphaceloma* โดยทั่วไปพิจารณาจากลักษณะและสีของโคโคนีที่เจริญบนอาหาร ลักษณะของโคนิเดีย และขนาดของโคนิเดีย ซึ่งอาจสรุปได้ตามตารางที่ 2.1

ในการศึกษาโรค Superelongation ในมันสำปะหลัง Zeigler (1983) ได้ใช้ลักษณะของโคนิเดียในการแยกเชื้อ *S. krugii* ออกจากเชื้อ *S. manihoticola* เนื่องจาก *S. krugii* มีโคนิเดียสีเข้มและมีขนาดใหญ่กว่าโคนิเดียของ *S. manihoticola* เชื้อ *S. krugii* โดยทั่วไปเข้าทำลายหญ้ายาง (milk weed) แต่สามารถเข้าทำลายมันสำปะหลังได้ด้วย อย่างไรก็ตาม Alvarez, Mejia และ Valle

(2003) มีความเห็นว่าไม่ควรใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการแบ่งแยกชนิดของเชื้อ *Sphaceloma* แต่เพียงอย่างเดียว เพราะลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันมากระหว่างเชื้อในแต่ละไอโซเลต



ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Sphaceloma* spp. จากพืชชนิดต่าง ๆ

<i>Sphaceloma</i> species	พืชอาศัย	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา				Reference
		ลักษณะของโคโคนี	สีของโคโคนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคนิเดีย	ขนาดของโคนิเดีย (กว้าง × ยาว) μm	
<i>S. ampelinum</i>	องุ่น	ขยายขนาดค่อนข้างช้า ขนาด 2.5 ซม. เมื่ออายุ 1 – 2 เดือน	แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ สีเหลืองอ่อน สีเหลือง เข้มถึงส้ม และสีแดง	ใส เซลล์เดี่ยว รูปร่าง ทรงกระบอก เมื่อแก่เต็มที่ จะเห็นวงกลมใสอยู่หัวและ ท้ายเซลล์ผนังของโคนิเดีย มีเมือกใสหุ้ม	2.17 – 3.35 × 5.24 – 6.83 และ 2.61 – 4.77 × 6.37 – 8.75	-กรรณิการ์ เพียนภักตร์ และคณะ (2537) -ขนิษฐา มากรุง (2548)
<i>S. psidii</i>	ฝรั่ง	มีลักษณะมันเลื่อม เมื่อ เลี้ยงบน PDA เจริญทั้ง แนวราบและแนวตั้ง ขนาด 3.5 ซม. เมื่ออายุ 2 เดือน	สีขาวปนครีมจนถึง ครีมปนส้ม	เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมรี หัว ท้ายมนมีวงกลมใส 1 อันอยู่ ภายในผนังเซลล์ มีเมือกใส หุ้ม	2.87 – 6.22 × 5.84 – 8.87	-กรรณิการ์ เพียนภักตร์ และคณะ (2544)
<i>S. manihoticola</i>	มันสำปะหลัง	เจริญในแนวตั้งและแนว ระนาบ ขยายขนาด ค่อนข้างช้า และสร้างเมือก หรือลักษณะคล้ายวุ้นหุ้ม ขนาด 2.08×1.78 ซม.	แบ่งออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ ดำ, น้ำตาล, เหลืองอ่อน, สีแดงเข้ม, เขียวและเลือง	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	Alvarez and Molina (2000)

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Sphaceloma* spp. จากพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

<i>Sphaceloma</i> species	พืชอาศัย	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา				Reference
		ลักษณะของโคโคนี	สีของโคโคนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคนิเดีย	ขนาดของโคนิเดีย (กว้าง × ยาว) μm	
<i>S. symphoricarpi</i>	Snowberry	โคโคนีเจริญช้า และมี เมือกใส เคลือบ	สีน้ำตาลอ่อนในระยะ แรก และเปลี่ยน เป็นสี เหลืองจนถึงสีน้ำตาล เมื่อ อายุ 1 เดือนมีสีค่อนข้าง แดงจนถึงน้ำตาลเข้ม	ใส รูปร่างกลมรี	8×4 (one cell) 17×3 (two – cell)	Kudela and Krejza (2006)
<i>S. anacardii</i>	มะม่วงหิม พานต์	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ใส และกลมรี มี mucilaginous cell wall หุ้มคล้าย วุ้นใส	$4.5 - 5.6 \times 2.75$	กรรณิการ์ เพียนภักตร์ และคณะ (2547)
<i>S. annoae</i>	น้อยหน่า	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ใส เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม ถึงกลมรีผนังมีลักษณะ เป็นวุ้นใส	$3 - 4.5$	กรรณิการ์ เพียนภักตร์ และคณะ (2547)
<i>S. fawcettii</i>	ส้ม	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	Acervulus เกิดบริเวณ epidermal หรือ subepidermal โคนิเดีย ใส เซลล์เดี่ยว มีจุดกลม อยู่กลางเซลล์ ผนังเซลล์ มีลักษณะคล้ายวุ้นใส	$9 - 13.5 \times 5.2 - 8.5$	กรรณิการ์ เพียนภักตร์ และคณะ (2547)

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Sphaceloma* spp. จากพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

<i>Sphaceloma</i> species	พืชอาศัย	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา				Reference
		ลักษณะของโคโคนี	สีของโคโคนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคนีเดี่ยว	ขนาดของโคนีเดี่ยว (กว้าง × ยาว) μm	
<i>S. heveae</i>	ยางพารา	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	Acervulus เกิดบริเวณ epidermal โคนีเดี่ยวใส รูป ร่างกลมรีถึงยาวรี เซลล์เดี่ยว มีจุดกลมใสตรงกลาง 1 อัน	10.5 -12.4 × 3.7 – 5.3	กรรณิการ์ เพ็ชรนัทธ์ และคณะ (2547)
<i>S. magiferae</i>	มะม่วง	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	Acervulus เกิดบริเวณ epidermal หรือ subepidermal ใส กลมรีถึง ยาวรี หัวท้ายมน 1 – 2 เซลล์ แต่ส่วนใหญ่พบเซลล์เดี่ยว ผนังเซลล์เป็นวุ้นใส	6.6 – 12.4 × 2.78 – 4.3	กรรณิการ์ เพ็ชรนัทธ์ และคณะ (2547)
<i>S. perseae</i>	อะโวคาโด	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	ใส เซลล์เดี่ยว รูปร่างกลมรี หรือยาวรี ผนังเซลล์มี ลักษณะคล้ายวุ้นใสหุ้ม	5.2 – 9.4 × 2.6	กรรณิการ์ เพ็ชรนัทธ์ และคณะ (2547)
<i>S. poinsettiae</i>	คริสต์มาส	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	Acervulus ใส กลม หรือ กลมรี เซลล์เดี่ยว ผนังเซลล์ มีลักษณะคล้ายวุ้นใส	ไม่มีข้อมูล	กรรณิการ์ เพ็ชรนัทธ์ และคณะ (2547)

2.6.2 การจำแนกความแตกต่างโดยใช้ปฏิกิริยาบนพีชอาสัย

จากการศึกษาของ ขนิษฐา มากรุง (2548) พบว่าเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จาก องุ่นแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการเข้าทำลายองุ่นแต่ละพันธุ์แตกต่างกัน โดยได้ทำการ ทดลองปลูก เชื้อ *S. ampelinum* 12 ไอโซเลต ลงบนองุ่น 6 พันธุ์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มตามลักษณะ การเกิดโรคได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เชื้อทำให้เกิดโรครกับองุ่นได้ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ กลุ่มที่ 2 เชื้อไม่ทำให้เกิดโรครกับองุ่นพันธุ์ Shiraz กลุ่มที่ 3 เชื้อไม่ทำให้เกิดโรครกับองุ่นพันธุ์ Centenail และ Delight กลุ่มที่ 4 เชื้อไม่ทำให้เกิดโรครกับองุ่นพันธุ์ Crimson seedless และ Centenail กลุ่มที่ 5 เชื้อ ไม่ทำให้เกิดโรครกับองุ่นพันธุ์ Maroo seedless และ Delight กลุ่มที่ 6 เชื้อไม่ทำให้เกิดโรครกับองุ่น พันธุ์ Black queen และ Crimson seedless จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. ampelinum* มีความสามารถในการเข้าทำลายองุ่นได้แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต

การศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Alvarez และคณะ (2003) ใน การศึกษาความแตกต่างของเชื้อ *S. manihoticola* จำนวน 19 ไอโซเลต เพื่อปลูกเชื้อลงบนมัน ลำปะหลัง 2 สายพันธุ์ คือ MBRA 703 พันธุ์อ่อนแอ และ MBRA 12 พันธุ์ต้านทาน พบว่า 58% ของ ไอโซเลตสามารถเข้าทำลายพันธุ์ MBRA 703 ได้ในระดับรุนแรง ขณะที่เพียง 12% ที่สามารถเข้า ทำลายพันธุ์ MBRA 12 ได้ในระดับรุนแรง

2.6.3 การจำแนกความแตกต่างโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล

1. เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็น เอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จากดีเอ็นเอ ต้นแบบใน หลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation เทคนิค PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและ ใช้เวลาน้อย ดังแสดงในภาพที่ 2.1

2. หลักการของ PCR

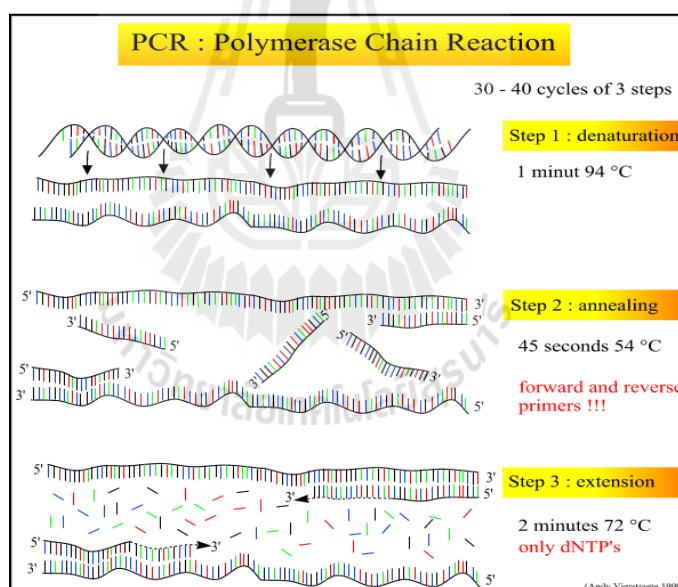
ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่จากสายดีเอ็นเอ ที่เป็น ต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการดัดลอกดีเอ็นเอ และ การศึกษาวิเคราะห์ ลำดับเบส แต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน โดย ใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยา PCR มี 3 ขั้นตอน และหมุนเวียน ต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะ ที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นที่ 1 denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้น คู่ ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92 – 95 °C

ขั้นที่ 2 annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอ สายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 14 – 13 เบส ที่มีลำดับ เบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37 – 60 °C

ขั้นที่ 3 extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72 – 75 °C เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรสที่ใช้ควรจะสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา ตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1 – 3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมาย ประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า



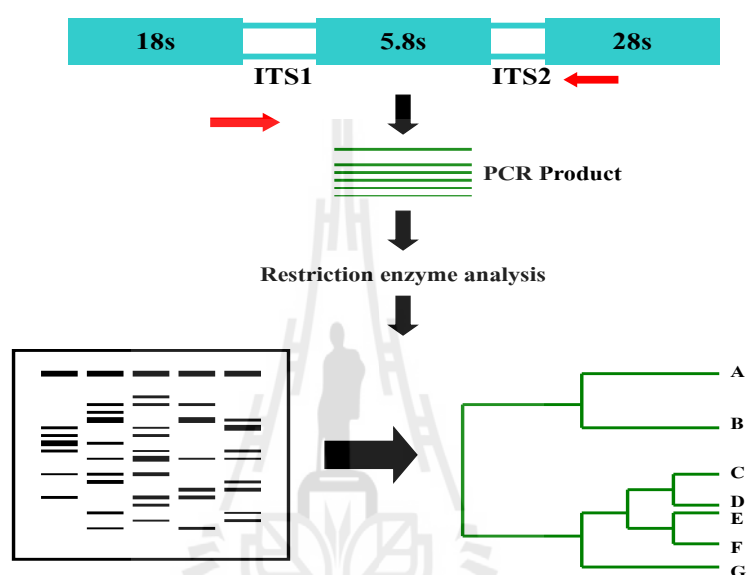
ภาพที่ 2.1 หลักการและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR

ที่มา : ดัดแปลงจาก PE applied Biosystems, 1999

3. เทคนิค Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) เป็นเทคนิคที่ใช้ไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่อยู่ระหว่าง 18S หรือ -5.8S rDNA (ITS1) และ 5.8s – 28s rDNA (ITS2) แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น *AluI*, *HaeIII*, *HinfI* และ *MspI* เป็นต้น

จากนั้นนำมาแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis และวิเคราะห์ DNA fingerprint โดยวิธี unweighted pair group method of using arithmetic mean (UPGMA) เทคนิค ARDRA สามารถบ่งชี้ความแตกต่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตถึงในระดับ subspecies (วารสาร สุนธิสา, 2553) ซึ่งได้แสดงแบบจำลองของขั้นของวิธี ARDRA ไว้ในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แบบจำลองการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) (ดัดแปลงจาก Louws et al.1998, อ้างถึงในมนัสวี, 2548)

ในการทดลองของ Alvarez, Mejia และ Valle (2003) ใช้ Polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ DNA บริเวณ Internal transcribed spaces (ITS) ของ ribosomal DNA โดยใช้ ITS4 และ ITS5 primers พบว่าเฉพาะ *S. manihoticola* เท่านั้นที่ให้ชิ้น DNA ขนาด 645 bp ขณะที่เชื้อไอโซเลตที่ได้จากหญ้าทำให้ DNA ขนาด 600 bp และเมื่อนำ DNA ที่ได้ไปตัดจำเพาะด้วย restriction enzymes *MspI* และ *CfoI* พบว่าไอโซเลตของเชื้อในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคกับมันสำปะหลังให้ชิ้นของ DNA ที่ได้จากการตัดเหมือนกัน แต่ต่างจากเชื้อในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคกับหญ้า การใช้เทคนิค Random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) โดยใช้ primers 15 ชนิด ให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทำ amplified ribosomal DNA restriction

analysis (ARDRA) แต่สามารถนำมาใช้แยกกลุ่มย่อยของเชื้อ *S. manihoticola* ที่ทำให้เกิดโรคมันสำปะหลังได้เป็น 5 กลุ่ม

มนัสวี ฉายผาด (2548) ใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลบ่งชี้สายพันธุ์ (race) ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ โดยการศึกษา รูปแบบลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) ในการแยกความแตกต่างของเชื้อรา FoI จำนวน 3 race และใช้ไพรเมอร์ จำนวน 20 ชุด พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทำให้เกิดโรค และกลุ่มที่ไม่ทำให้เกิดโรค และไพรเมอร์ OPE – 03 และ OPH – 20 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ race 3 ออกจาก race 1 และ 2 ได้อย่างชัดเจน เมื่อทำการศึกษา DNA fingerprint ของเชื้อราทั้ง 3 race ด้วยเทคนิค ARDRA โดยการเพิ่ม DNA ในส่วนของ ITS1-5.8s-ITS2 region rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau* 3A I และ *Rsa* I พบว่า เอนไซม์ *Sau* 3A I สามารถแบ่งเชื้อราได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มี DNA ขนาด 320 bp และกลุ่มที่มี DNA ขนาด 250 bp และ ITS1-5.8 s - ITS2 region rDNA ได้ DNA ขนาด 450 bp ซึ่งยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อในระดับ race ได้ และได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1-5.8s-ITS2 region rDNA ของเชื้อราทั้ง 3 race พบว่ามีขนาด 580 bp

วราภรณ์ สุทธิสา (2553) ได้ทำการศึกษากำเนิดโรครากเน่าของหม่อนสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium* species และการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจหาสาเหตุของโรคซึ่งทำการศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อรา *Fusarium* 11 species 30 ไอโซเลตด้วยเทคนิค RAPD และศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ARDRA โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 region DNA โดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 แล้วย่อย PCR product (590 คู่เบส) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HinfI* และ *MspI* ทั้งสองวิธีสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *F. solani* สาเหตุหลักของโรครากเน่าออกจากเชื้อรา *Fusarium* spp. อื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน

จากการศึกษาความแตกต่างของเชื้อรา *Aspergillus* โดยเทคนิค RAPD และ ISSR โดยใช้ primers ITS4 and ITS5 พบว่า ได้ชิ้น DNA ของเชื้อ *Aspergillus* ขนาดประมาณ 600 bp และเมื่อทำการศึกษาลายพิมพ์ DNA ด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ primer (GTG) 5 ทดสอบในตัวอย่างเชื้อ *Aspergillus* 20 สายพันธุ์ ได้จำนวนชิ้น DNA ประมาณ 12 ชิ้น ขนาดของ DNA ระหว่าง 0.4 – 2.0 kb และได้ทำการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA โดยเทคนิค RAPD พบว่า DNA จาก strain A10 เติบโตโดยใช้วิธีการของ Chow and Käfer (1993) ซึ่งพัฒนามาจากเชื้อ *Aspergillus* เพิ่มจำนวน DNA ในส่วน internal transcribed spacer (ITS) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4 and ITS5 ของ White et al. (1990) สามารถแยกความแตกต่างของ *Aspergillus* ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การแยกเชื้อ *Sphaceloma* spp. จากชิ้นส่วนองุ่นและพืชอาศัยที่แสดงอาการโรคสแคบ

รวบรวมใบองุ่นและพืชชนิดอื่น ที่แสดงอาการโรคสแคบ จากบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และจากแหล่งปลูกอื่น ๆ นำมาแยกเชื้อด้วยวิธี Tissue transplanting ในอาหาร water agar (WA) ทำความสะอาดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรค โดยนำไปล้างด้วยน้ำสบู่และน้ำเปล่าให้สะอาด และตัดเอาเนื้อเยื่อพืชส่วนที่เป็นส่วนต่อระหว่างเนื้อเยื่อดีและเนื้อเยื่อที่เป็นโรค โดยให้มีส่วนที่เป็นโรคติดมาน้อยที่สุด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่น ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ (clorox) 10% (NaOCl 1%) เวลาในการฟอกแตกต่างกันตามชนิดของพืช จากนั้นใช้ปากกิบีบชิ้นส่วนพืชที่ตัดไว้ลงลงในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำชิ้นส่วนที่ได้วางลงบนอาหาร WA 4 – 5 จุด ต่อ จานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 – 7 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอาศัย จากนั้นเมื่อเชื้อเริ่มสร้างเส้นใย ย้ายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยตัดเอาส่วนปลายสุดของเส้นใย วางบน PDA จำนวน 1 ชิ้นต่อ จานเลี้ยงเชื้อ

3.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากโคนิเดียเดียว

หลังจากแยกเชื้อ *Sphaceloma* spp. และย้ายเส้นใยไปเลี้ยงบนอาหาร PDA แล้ว ปล่อยให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปแยกโคนิเดียเดียว ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

3.2.1 กระตุ้นให้เชื้อสร้างโคนิเดียโดยเทน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ วางลงในจานเลี้ยงที่มีเชื้อเจริญอยู่ในอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 – 72 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop และน้ำกลั่นวางลงบนแผ่นสไลด์เพื่อตรวจดูการสร้างโคนิเดีย เมื่อพบโคนิเดียของเชื้อ *Sphaceloma* และไม่พบเชื้ออื่นปนเปื้อน ใช้ loop และโคนิเดียจากหยดน้ำกลั่น นำไปเพาะลง บนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นระยะ

3.2.2 หลังจากโคนิเดียจากข้อ 3.2.1 เริ่มงอกใช้เข็มเข็มปลายแหลมเขี่ยชิ้นงุ่นบริเวณที่มีโคนิเดียเดียว นำไปวางบน PDA slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งเชื้อมีการเจริญของเส้นใยที่มีลักษณะเฉพาะตัว คือ เส้นใยกระจุกตัวกันแน่น และฝังลงบนเนื้ออาหาร และเส้นใยจะให้สีแตกต่างกันออกไปแต่ละไอโซเลต จึงนำไปศึกษารายละเอียดทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติอื่น ๆ ต่อไป

3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Sphaceloma* spp.

นำเชื้อที่แยกได้จากโคนิเดียเดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังต่อไปนี้

3.3.1 อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนี

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเมื่อเลี้ยงเชื้อไว้ 14, 21, 28 และ 35 วันบนอาหาร PDA โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำต่อ ทรีตเมนต์ วางแผนการทดลองแบบ CRD

3.3.2 สีของโคโลนีบนอาหาร PDA

ย้ายเชื้อจาก slant ลงเลี้ยงบนอาหาร PDA 1 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14, 21, 28, และ 35 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของโคโลนี บันทึกภาพและลักษณะของโคโลนี

3.3.3 ลักษณะและขนาดของโคนิเดีย

ย้ายเชื้อจาก slant ลงเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA 1 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้เชื้อเจริญและสร้างโคนิเดียที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 24 – 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างโคนิเดียโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ แต่ละบริเวณโคโลนีแล้วนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X สำหรับเชื้อที่ไม่สร้างโคนิเดีย ทำการชักนำให้เชื้อสร้างโคนิเดีย โดยย้ายเส้นใยของเชื้อเลี้ยงบนอาหาร PDA 4 – 5 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรตัดโคโลนีของเชื้อ ใส่ลงในน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในขวด Vial บ่มทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตัดโคโลนีให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก เพื่อให้โคนิเดียหลุดออกจากโคโลนี ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์ของเชื้อ นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X คำนวณขนาดของโคนิเดียด้วย ไมโครมิเตอร์ (Micrometer) จำนวน 100 โคนิเดีย/ไอโซเลต บันทึกภาพเพื่อเปรียบเทียบลักษณะโคนิเดียของแต่ละไอโซเลต

3.3.4 ความสามารถในการสร้างสปอร์

ใช้ข้อมูลในข้อ 3.3.3 ในการตรวจความสามารถในการสร้างโคนิเดียของแต่ละไอโซเลต

3.4 การศึกษาความแตกต่างทางชีวโมเลกุล

หลังจากศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อแต่ละไอโซเลตแล้วจึงจัดกลุ่มของไอโซเลตที่มีลักษณะคล้ายกันให้อยู่กลุ่มเดียวกัน แล้วสุ่มเลือกตัวแทนจากแต่ละกลุ่มเพื่อใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางชีวโมเลกุลตามวิธีของ Alvarez, Mejia และ Valle (2003)

3.4.1 การสกัด Genomic DNA ของเชื้อรา

สกัด DNA ของเชื้อ *Sphaceloma* spp. โดยดัดแปลงวิธีการของ Lee และ Tylor โดยตัดเส้นใยของเชื้อที่เจริญบน PDA ด้วย cork borer ขนาด 5 มม. นำเส้นใยไปบดให้เป็นผง ในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งบดที่เย็นจัด ตักเส้นใยที่บดละเอียดแล้วด้วยช้อนตักสารที่แช่ในไนโตรเจนเหลวใส่ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (2:2:1) ปริมาตร 450 μ l ผสมให้เข้ากับผงเส้นใย โดยพลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนขึ้นส่วน เซลล์ออกจากส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) นำส่วนที่เป็นของเหลวใส่ใน eppendorf หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 12 – 14 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนสู่ก้นหลอด เทส่วนใส (supernatant) ที่ค้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้งให้เหลือเฉพาะดีเอ็นเอที่ติดอยู่ก้นหลอด ทิ้งให้แห้งโดยวางคว่ำลงบนกระดาษกรอง 15 นาที ก่อนนำไปทำให้แห้งต่อในสภาพสุญญากาศนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นละลาย DNA ที่ได้ใน TE buffer (0.1 mM Tris – HCl; 10 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 50 μ l กำจัด RNA ด้วย RNase ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 10 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ปรับให้ได้ความเข้มข้นของ DNA 5ng/ μ l นำไปเก็บไว้ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

3.4.2 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ (DNA) ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์เพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยเทคนิค PCR

ดัดแปลงวิธีการของ Lee และ Tylor โดยเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา *Sphaceloma* spp. จำนวน 16 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') และ ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')

PCR reaction ประกอบด้วย 10X Tag buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) 0.2 mM ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5 (50 ng/ μ l) อย่างละ 0.625 ไมโครลิตร MgCl_2 (25 mM) ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร และ Genomic DNA ของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบ (5ng/ μ l) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ enzyme Taq polymerase 0.5 mM ปริมาตร 0.5 μ l แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 ไมโครลิตร ด้วย bi-distillate water และใช้ส่วนผสมของสารละลายทั้งหมดที่ไม่เติม DNA เป็น negative control นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยใช้ช่วงอุณหภูมิดังนี้

ขั้นที่ 1 denatured	อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที	} 35 รอบ
ขั้นที่ 2 denatured	อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 45 วินาที	
ขั้นที่ 3 annealing	อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 45 วินาที	
ขั้นที่ 4 extension	อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที	
ขั้นที่ 5 extension	อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที	

เมื่อได้ PCR product เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้

นำ PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร นำมาแยกขนาดบน 1% Agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer (Trisborate EDTA) วางใน electrophoresis chamber ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 – 45 นาที แล้วจึงนำ gel ไปตรวจสอบขนาด DNA ภายใตแสงอุลตราไวโอเลต เปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp marker

3.4.3 การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอของเชื้อ หลังจากตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตัด PCR product ที่ได้จาก 3.4.2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *MspI* และ *HhaI* โดยเติมเอนไซม์ชนิดละ 0.05 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่ 37°C นาน 16 ชั่วโมง แล้วเติม tracking dye (bromophenol blue, 0.25% และ glycerol 30%) ในน้ำปริมาตร 1 μ l นำมาแยกขนาดบน 1% Agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer (Trisborate EDTA) วางใน electrophoresis chamber ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 - 45 นาที แล้วจึงนำ gel ไปตรวจสอบขนาด DNA ภายใตแสงอุลตราไวโอเลต นำ DNA fingerprint ที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

3.5 ศึกษาความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ

หลังจากศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ แล้วได้ทำการจัดกลุ่ม และคัดเลือกตัวแทนจากแต่ละกลุ่มจำนวน 22 ไอโซเลต ได้แก่ GSH GF901 GTC MJ_KC 2-1 GM_KC 3-1 GM_KC 4-1 ESS ESS_S_PPR OLSY GEmb Mei1 CCS204 CCS_SW GFC GUV GF8851 ช่อย 1808 ESS1909 Pr5-1 Cb1-1 Nk4-1 และ GPTY-F R4 เพื่อทำการศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.5.1 การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อ *Sphaceloma* spp.

ย้ายเชื้อที่ได้จากการสุมตัวแทนของกลุ่ม มาเลี้ยงลงบนอาหาร PDA โดยวาง 4 – 5 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ตรวจสอบการสร้างโคนิเดียด้วยกล้องจุลทรรศน์ หากพบว่าเชื้อสร้างโคนิเดีย เทน้ำกลั่นหนึ่งหม้อเชื้อจนท่วมโคนิเดียให้โคนิเดียแตกออก จากนั้นใช้ปิเปตดูดโคนิเดียที่แขวนลอยอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปตรวจสอบความเข้มข้นของโคนิเดียด้วย Hemacytometer ภายใตกล้องจุลทรรศน์ปรับความเข้มข้นของโคนิเดียให้มี

ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^6 โคโคนีเดียต่อมิลลิลิตร กรณีที่เป็นไอโซเลตที่ไม่สร้างสปอร์ นำไปกระตุ้นการสร้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นตามวิธีที่ระบุไว้ใน 3.3.3

3.5.2 การเตรียมใบอ่อน

คัดเลือกใบอ่อนขององุ่นพันธุ์แบลควิน ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคสแคบ โดยใช้ใบที่สะอาดและไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อ นำมาล้างด้วยน้ำสบู่ จากนั้นนำไปแช่ใน สารละลายคลอโรกซ์ 10 % เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นตัดใบอ่อนให้มีขนาดประมาณ 1×1 เซนติเมตร นำมาวางบนอาหาร WA จำนวน 5 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อเพื่อรอการปลูกเชื้อต่อไป

3.5.3 การปลูกเชื้อลงบนใบอ่อน

ปลูกเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.1 ลงบนใบอ่อนโดยแช่หลอดที่มีสารแขวนลอยของโคโคนีเดียเพื่อให้กระจายตัว ทำการปลูกเชื้อโดยหยด สารแขวนลอยโคโคนีเดียของเชื้อแต่ละไอโซเลต ความเข้มข้น 1×10^6 โคโคนีเดียต่อมิลลิลิตร ลงบนชิ้นใบอ่อนที่เตรียมไว้ จำนวน 10 หยด ต่อชิ้น ปริมาตรหยดละ $2 \mu\text{l}$ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสภายใต้แสงฟลูออเรสเซนส์บันทึกผลการทดลอง หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน

3.5.4 การเตรียมพืชทดสอบชนิดอื่น

หนุ่ยยาง (*Euphorbia heterophylla* L.) – ขยายต้นกล้าจากแหล่งที่ขึ้นตามธรรมชาติ โดยเลือกต้นที่แตกใบอ่อน 3 – 4 ใบและไม่พบร่องรอยการเข้าทำลายของโรค นำไปปลูกลงกระถางด้วยดินปลูก รอให้มีใบจริง 5 – 10 ใบ คัดเลือกต้นที่มีความแข็งแรง เพื่อใช้สำหรับการทดสอบ

ข่อย (*Streblus asper* Lour.) ชงโค (*Bauhinia purpurea* Linn.) และฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) – ทดสอบในสภาพขึ้นใบเหมือนองุ่น

ส้มโอ (*Citrus maxima* Merr.) – ทดสอบในสภาพใบตัด (detached leaf) โดยใช้ใบอ่อนที่เพิ่งแตกใหม่ นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่ จากนั้นแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ 10% เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง หุ้มรอยตัดด้วยสำลีและน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ นำมาวางบนอาหาร WA 1 ใบต่อจานเลี้ยงเชื้อ

3.5.5 การปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัยชนิดอื่น

ใน ข่อย ส้มโอ ชงโค และ ฝรั่ง ทำเช่นเดียวกับการปลูกเชื้อบนใบอ่อน ในหนุ่ยยาง หลังจากต้นกล้าที่ย้ายปลูกมีใบจริง 5 – 10 ใบแล้ว ทำการปลูกเชื้อ วางกระถางไว้ในโรงเรือน โดยใช้แสงธรรมชาติ จากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำถุงพลาสติกออก สังเกตอาการที่เกิดขึ้นบนใบติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน

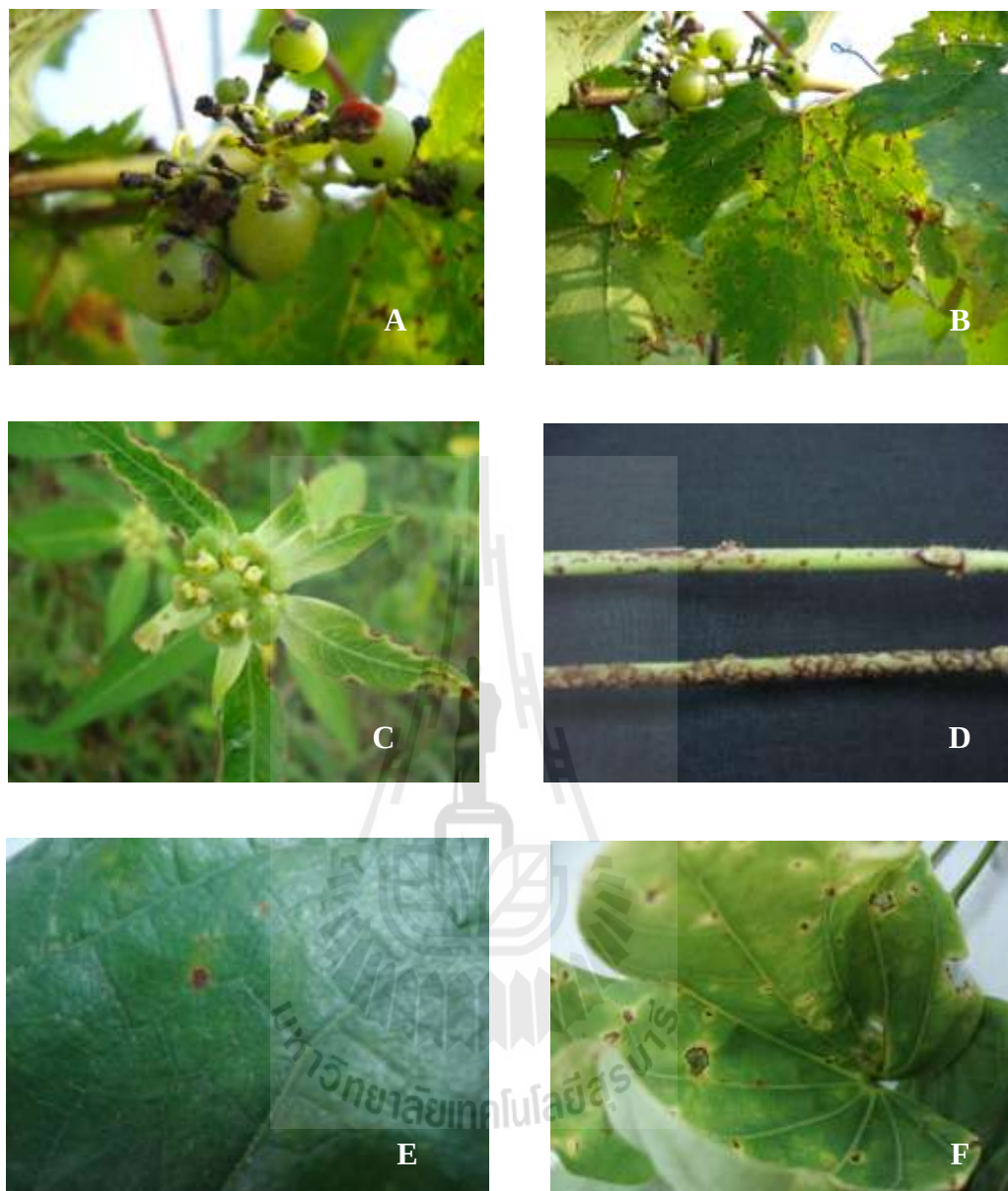
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อ *Sphaceloma* spp. จากชิ้นส่วนใบอ่อนและพืชอาศัยที่แสดงอาการโรคสแคบ

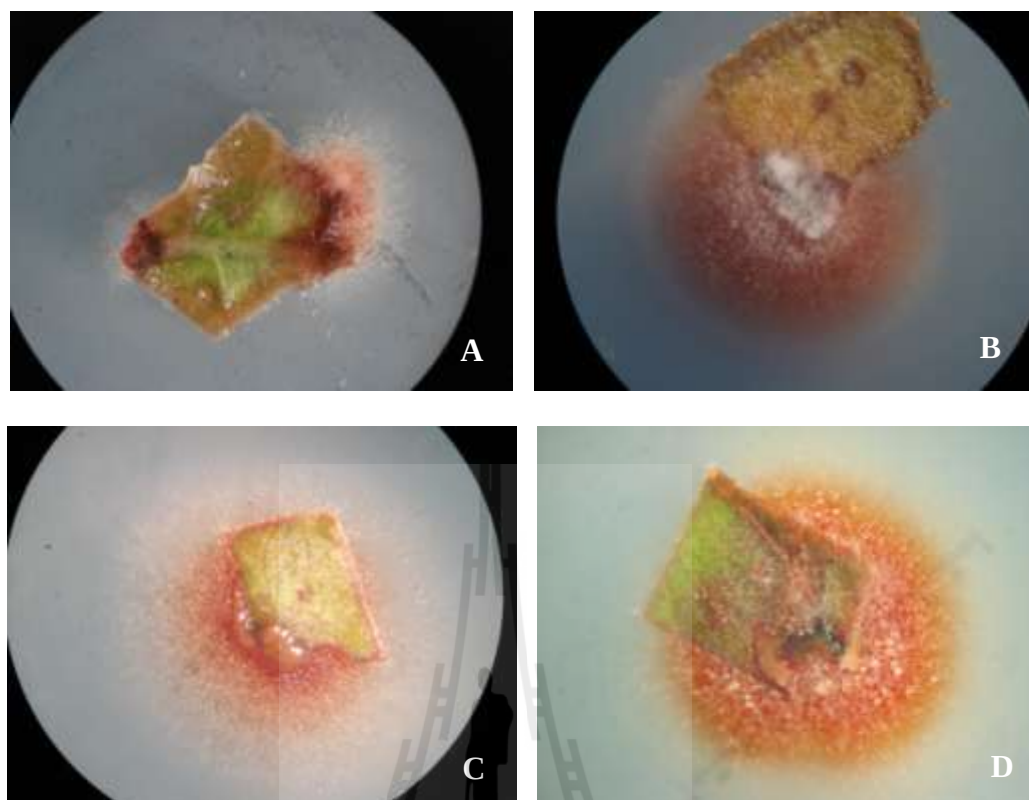
การเก็บตัวอย่างอ่อนและพืชที่แสดงอาการโรคสแคบ ได้ตัวอย่างโรคจากหลายพื้นที่ ได้แก่ อ่อน จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก ศูนย์วิจัยพืชสวน จังหวัดกาญจนบุรี ไร่อ่อนซิลเวอร์เลค จังหวัดชลบุรี และพืชชนิดอื่น ได้แก่ ชงโค อาคารบรรณสารและหอพักสุรนารี 7 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ข่อย จากอำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย หน้อย่าง จากอำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก และ แปลงเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ส้มโอ จากอำเภอหนองฉาง จังหวัดอุทัยธานี และฝรั่ง จากจังหวัดขอนแก่น ลักษณะของอาการสแคบบนพืชชนิดต่างๆ แสดงไว้ในภาพที่ 4.1 สามารถแยกเชื้อได้จำนวนทั้งหมด 50 ไอโซเลต ดังนี้เชื้อที่แยกได้จากอ่อน 22 ไอโซเลต จากตัวอย่าง 32 ไอโซเลต (80 %) ชงโค 3 ไอโซเลต จากตัวอย่าง 6 ไอโซเลต (50 %) ข่อย 2 ไอโซเลต จากตัวอย่าง 4 ไอโซเลต (50%) หน้อย่าง 3 ไอโซเลต จากตัวอย่าง 12 ไอโซเลต (25%) ส้มโอ 2 ไอโซเลต จากตัวอย่าง 3 ไอโซเลต (67%)และฝรั่ง 1 ไอโซเลต จากตัวอย่าง 1 ไอโซเลต (100 %) สาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างทั้งหมด เนื่องจากเชื้อชนิดนี้โตช้า ทำให้มีการปนเปื้อนจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ จากเนื้อเยื่อใบ โดยเชื้อที่แยกได้จากอ่อนและหน้อย่างมีเปอร์เซ็นต์สูงที่สุด เนื่องจากมีอัตราการเจริญเร็วที่สุด และเชื้อจากฝรั่งและส้มโอมีเปอร์เซ็นต์ต่ำสุด เนื่องจากมีอัตราการเจริญค่อนข้างช้า ลักษณะการเจริญของเชื้อที่แยกได้แสดงไว้ในภาพที่ 4.2

นอกจากเชื้อที่แยกได้จากพืชโดยตรงแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ใช้ตัวอย่างที่ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช อาคารเครื่องมือ 3 ที่เก็บจากจังหวัดแพร่ เชียงราย ราชบุรี ชลบุรี และจากนครราชสีมา ชื่อของไอโซเลตที่แยกได้และในการศึกษาทั้งหมด แสดงในตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 แสดงอาการ โรคสแคบบน

- | | |
|--------------|----------------|
| A ผลงุ่น | B ใบงุ่น |
| C ใบหฐ์ย่าง | D ลำต้นหฐ์ย่าง |
| E ใบข่อย และ | F ใบขงโค |



รูปที่ 4.2 แสดงการเจริญของเชื้อ *Sphaceloma* sp. อายุ 10 วันบนอาหาร WA

A จากใบบองุ่น

B จากใบชงโค

C จากใบบัวอย่าง และ D จากใบข่อย

4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Sphaceloma* spp.

4.2.1 การเจริญเติบโตของโคโลนี

ผลการวัดอัตราการเจริญของโคโลนี ของเชื้อบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลต มีการเจริญช้ามากในช่วงอายุ 7 - 14 วัน ซึ่งโคโลนีที่แยกได้จากฝรั่งมีขนาดเล็กที่สุด เท่ากับ $0.78 \pm 0.16 \times 1.04 \pm 0.15$ เซนติเมตร ในขณะที่โคโลนีที่แยกได้จากองุ่น ไอโซเลต Rc2 - 1 มีขนาดใหญ่ที่สุด เท่ากับ $2.78 \pm 0.20 \times 3.12 \pm 0.13$ เมื่อเชื้ออายุ 21 วัน ผลของการวัดขนาดโคโลนีที่ 28 วัน มีลักษณะเหมือนกับการวัดที่ 21 วัน คือเชื้อจากฝรั่งและองุ่น ไอโซเลต Rc 2 - 1 มีขนาดเท่ากับ $1.30 \pm 0.12 \times 1.50 \pm 0.12$ เซนติเมตร และ $3.74 \pm 0.18 \times 3.92 \pm 0.19$ ตามลำดับ ที่เชื้ออายุ 28 วัน โคโลนีของเชื้อจากฝรั่งมีขนาดเล็กที่สุด เท่ากับ $1.44 \pm 0.11 \times 1.56 \pm 0.11$ เซนติเมตร และของเชื้อจากองุ่น ไอโซเลต Rc 2 - 1 มีขนาด $3.98 \pm 0.19 \times 4.12 \pm 0.19$ ขณะที่เชื้ออายุ 35 วัน โคโลนีที่แยกได้จากฝรั่งยังคงมีขนาดเล็กที่สุด เท่ากับ $1.60 \pm 0.10 \times 1.74 \pm 0.11$ เซนติเมตร แต่ไอโซเลต Rc3 - 1

ที่แยกได้จากอุ้งมีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุด เท่ากับ $4.16 \pm 0.17 \times 4.34 \pm 0.15$ ลักษณะของโคโลนีส่วนใหญ่จะเจริญทั้งแนวตั้งและแนวระนาบกับอาหาร มีการรวมตัวของเส้นใยจนแข็งและแน่น ขนาดของโคโลนีของแต่ละไอโซเลต แสดงในตารางที่ 4.2

4.2.2 สีของโคโลนี

เชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มีสีแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต และเมื่อ นำมาจัดกลุ่มสามารถแบ่งได้เป็น 12 กลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ได้แก่ สีเหลือง เหลือง – ส้ม เหลือง – น้ำตาล น้ำตาล น้ำตาลเข้ม ขาว แดง น้ำตาลเข้ม – เขียว ดำ น้ำตาล – เหลือง เหลืองขาว และ น้ำตาล – ขาว ลักษณะของโคโลนีมีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลตและแตกต่างจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ คือ เส้นใยจะกระจุกตัวกันแน่น จนเป็นก้อน เจริญทั้งแนวระนาบกับผิวอาหารและฝังตัวลงในผิวอาหาร บางไอโซเลตมีการสร้างเส้นใยสีขาว ตื้น ๆ ปกคลุมบริเวณตรงกลางโคโลนี รายละเอียดของแต่ละไอโซเลตแสดงในตารางที่ 4.3

4.2.3 ลักษณะและขนาดของโคนิเดีย

ผลการวัดขนาดของโคนิเดียของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างที่เป็นโรคจากแหล่งปลูกต่าง ๆ จำนวน 50 ไอโซเลต พบว่าขนาดโคนิเดียแต่ละไอโซเลตมีขนาดใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ลักษณะของโคนิเดียของแตกต่างกันออกไปแต่ละไอโซเลต ดังแสดงในภาพที่ 4.4 และ 4.5 ลักษณะโคนิเดียที่พบส่วนใหญ่ มีเซลล์เดี่ยว ใสไม่มีสี หัวท้ายมน คล้ายรูปไข่ และพบจุดกลมใส อยู่บริเวณหัวและท้ายของเซลล์ แต่บางไอโซเลตมีรูปร่างค่อนข้างกลม นอกจากนี้โคนิเดียของเชื้อบางไอโซเลตที่ต้องกระตุ้นด้วยน้ำ พบว่ามีรูปร่างคล้ายยีสต์ (Yeast form) คือ มีการแตกตา (budding) คล้ายกับที่พบในยีสต์ ลักษณะของโคนิเดียแต่ละไอโซเลตแสดงในภาพที่ 4.7

ตารางที่ 4.1 ไอโซเลตของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกจากองุ่น ชงโค ข่อย หน้อย่าง ส้มโอ และฝรั่ง จากแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทย

พืชอาศัย	สถานที่เก็บ	ไอโซเลต
องุ่น ¹	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	GBQ GFC BR8851 BR8851-2 CBR GSH GF901 GTC Mei3 GBR Mei1 Mei2 GEmb
	ศูนย์วิจัยพืชสวน กาญจนบุรี	GPTY-F R2 GM_KC 3-1 GM_KC 3-2 GM_KC 3-3 GM_KC 4-1 GM_KC 4-2
	ไร่องุ่นซิลเวอร์เลค พัทยา จ.ชลบุรี	GPTY-F R4 GPTY-F R3 MJ_KC 2-1 GPTY-2
	จังหวัดแพร่	Pr4-1 Pr5-1
	จังหวัดเชียงราย	Cr1-1 Cr2-1
	จังหวัดราชบุรี	Rc1-1 Rc2-1 Rc3-1 Rc4-1 Rc5-1
	จังหวัดชลบุรี	Cb1-1 Cb3-1 Cb4-1
	จังหวัดนครราชสีมา	Nk2-1 Nk3-1 Nk4-1 Nk5-1
	อาคารบรรณสาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	CCS204 CCS
	หอพักสุรนีสวน 7 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	CCS_SW
หน้อย่าง	แปลงเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	ESS ESS1909
	แปลงเกษตรกร อ.พรหมพิราม จ.พิษณุโลก	ESS_PPR_S
	อ. เมือง จ.เชียงราย	Stb, Stb 1808
ส้มโอ	อ. หนองฉาง จ.อุทัยธานี	OLSY OSUF

¹ ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พืชอาศัย	Isolate	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร ¹)
----------	---------	--------------------------------------

		กว้าง	ยาว
อรุณ	GSH	1.62 ± 0.08	1.70 ± 0.07
	GF901	1.60 ± 0.23	1.90 ± 0.12
	GTC	1.48 ± 0.13	1.82 ± 0.08
	MJ_KC 2-1	1.32 ± 0.16	1.56 ± 0.11
	GM_KC 3-1	1.52 ± 0.16	1.68 ± 0.18
	GM_KC 3-2	1.36 ± 0.11	1.54 ± 0.11
	GM_KC 3-3	1.24 ± 0.11	1.52 ± 0.13
	GM_KC 4-1	1.36 ± 0.13	1.56 ± 0.17
	GM_KC 4-2	1.22 ± 0.08	1.42 ± 0.08
	GEmb	1.56 ± 0.17	1.80 ± 0.10
	GBR	1.66 ± 0.09	1.98 ± 0.08
	Mei1	1.46 ± 0.09	1.88 ± 0.16
	Mei2	$1.50 \pm 0.12g$	1.76 ± 0.13
	Mei3	1.44 ± 0.11	1.68 ± 0.23
	GBQ	1.28 ± 0.13	1.54 ± 0.15
	CBR	1.34 ± 0.17	1.58 ± 0.15
	BR8851-2	1.38 ± 0.20	1.52 ± 0.26
	BR8851	1.56 ± 0.09	1.86 ± 0.11
	Pr5-1	1.98 ± 0.08	2.24 ± 0.11
	Pr4-1	1.66 ± 0.09	2.28 ± 0.13
	Cr1-1	1.72 ± 0.19	1.94 ± 0.13
	Cr2-1	0.86 ± 0.11	1.66 ± 0.15
	Cb1-1	2.64 ± 0.26	2.94 ± 0.29

ตารางที่ 4.2 ขนาดโคโลนีของเชื้อ *Spaceloma* spp. ที่อายุ 14 วัน บนอาหาร PDA

ตารางที่ 4.2 ขนาดโคโลนีของเชื้อ *Spaceloma* spp. ที่อายุ 14 วัน บนอาหาร PDA (ต่อ)

พืชอาศัย	Isolate	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร ¹)
----------	---------	--------------------------------------

		กว้าง	ยาว
อู่	Cb4-1	2.06 ± 0.11	2.84 ± 0.15
	Cb5-1	1.00 ± 0.07	1.20 ± 0.12
	Rc1-1	1.94 ± 0.09	2.12 ± 0.08
	Rc2-1	2.78 ± 0.20	3.12 ± 0.13
	Rc3-1	2.10 ± 0.12	2.32 ± 0.08
	Rc4-1	1.14 ± 0.13	1.28 ± 0.11
	Rc5-1	1.14 ± 0.13	1.36 ± 0.09
	Nk2-1	1.22 ± 0.04	1.54 ± 0.11
	Nk3-1	1.06 ± 0.13	1.32 ± 0.13
	Nk5-1	1.68 ± 0.23	2.14 ± 0.17
	GPTY-F R4	1.18 ± 0.11	1.36 ± 0.15
	GPTY-F R3	1.90 ± 0.16	2.14 ± 0.13
	GPTY_S R1	1.48 ± 0.15	1.84 ± 0.17
	GPTY-2	1.98 ± 0.11	2.18 ± 0.13
	GPTY_F R5	1.90 ± 0.12	2.10 ± 0.17
	Nk4-1	1.34 ± 0.17	1.60 ± 0.10
หญา	ESS	1.18 ± 0.13	1.42 ± 0.16
	ESS_S_PPR	1.32 ± 0.11	1.62 ± 0.08
	ESS1909	0.88 ± 0.16	1.24 ± 0.09
ส้ม	OSUF	0.96 ± 0.13	1.10 ± 0.14
	OLSY	1.38 ± 0.16	1.66 ± 0.13
ชง	CCS204	1.16 ± 0.13	1.26 ± 0.09
	CCS	1.54 ± 0.09	1.82 ± 0.13
	CCS_SW	1.52 ± 0.13	1.80 ± 0.14

ตารางที่ 4.2 ขนาดโคโลนีของเชื้อ *Spaceloma* spp. ที่อายุ 14 วัน บนอาหาร PDA (ต่อ)

พืชอาศัย	Isolate	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร ¹)
----------	---------	--------------------------------------

		กว้าง	ยาว
ข้อ	Stb	1.46 ± 0.15	1.66 ± 0.11
	Stb 1808	2.24 ± 0.38	2.54 ± 0.33
ฝรั่ง	GUV	0.78 ± 0.16	1.04 ± 0.15
F - test		**	**
LSD _{0.05}		0.0879	0.0923

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 5 โคโลนีต่อไอโซเลต

** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.01

ตารางที่ 4.3 ขนาดโคโลนีของเชื้อ *Spaceloma* spp. ที่อายุ 35 วัน บนอาหาร PDA

พืชอาศัย	ไอโซเลต	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร ¹)	
		กว้าง	ยาว
องุ่น	GSH	2.88 ± 0.08	3.08 ± 0.11
	GF901	3.58 ± 0.58	3.80 ± 0.56
	GTC	3.62 ± 0.35	3.82 ± 0.36
	MJ_KC 2-1	2.38 ± 0.13	2.58 ± 0.16
	GM_KC 3-1	2.76 ± 0.27	2.80 ± 0.31
	GM_KC 3-2	2.64 ± 0.13	2.88 ± 0.16
	GM_KC 3-3	2.72 ± 0.13	2.98 ± 0.16
	GM_KC 4-1	3.00 ± 0.07	3.18 ± 0.08
	GM_KC 4-2	2.24 ± 0.23	2.34 ± 0.23
	GEmb	2.50 ± 0.07	2.66 ± 0.05
	GBR	2.66 ± 0.05	2.84 ± 0.09
	Mei1	2.60 ± 0.10	2.84 ± 0.05
	Mei2	2.72 ± 0.11	2.86 ± 0.11
	Mei3	2.52 ± 0.26	2.66 ± 0.22
	GBQ	2.28 ± 0.22	2.42 ± 0.23

ตารางที่ 4.3 ขนาดโคโลนีของเชื้อ *Spaceloma* spp. ที่อายุ 35 วัน บนอาหาร PDA (ต่อ)

พืชอาศัย	Isolate	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร ¹)
----------	---------	--------------------------------------

อุณหภูมิ		กว้าง	ยาว
อุณหภูมิ	CBR	2.12 ± 0.15	2.30 ± 0.12
	BR8851	2.36 ± 0.11	2.48 ± 0.08
	BR8851-2	2.64 ± 0.05	2.76 ± 0.09
	Pr5-1	3.06 ± 0.13	3.24 ± 0.17
	Pr4-1	2.52 ± 0.15	2.70 ± 0.10
	Cr1-1	1.86 ± 0.11	2.00 ± 0.16
	GFC	2.24 ± 0.05	2.40 ± 0.10
	Cr2-1	2.60 ± 0.24	2.76 ± 0.22
	Cb1-1	3.12 ± 0.11	3.22 ± 0.16
	Cb4-1	2.74 ± 0.15	2.90 ± 0.20
	Cb5-1	1.84 ± 0.11	1.92 ± 0.18
	Rc1-1	2.76 ± 0.11	2.86 ± 0.11
	Rc2-1	4.12 ± 0.16	4.30 ± 0.10 r
	Rc3-1	4.16 ± 0.17	4.34 ± 0.15
	Rc4-1	2.36 ± 0.11	2.56 ± 0.13
	Rc5-1	3.10 ± 0.10	3.22 ± 0.08
	Nk2-1	2.12 ± 0.22	2.28 ± 0.19
	Nk3-1	2.24 ± 0.21	2.38 ± 0.22
	Nk5-1	2.56 ± 0.17	2.68 ± 0.19
	GPTY-F R4	2.26 ± 0.11	2.40 ± 0.10
	GPTY-F R3	2.80 ± 0.23	3.04 ± 0.22
	GPTY_S R1	2.50 ± 0.20	2.72 ± 0.22
	GPTY_F R5	2.88 ± 0.22	3.02 ± 0.25
	GPTY-2	3.70 ± 0.10	3.82 ± 0.08
	Nk4-1	2.26 ± 0.17	2.38 ± 0.08

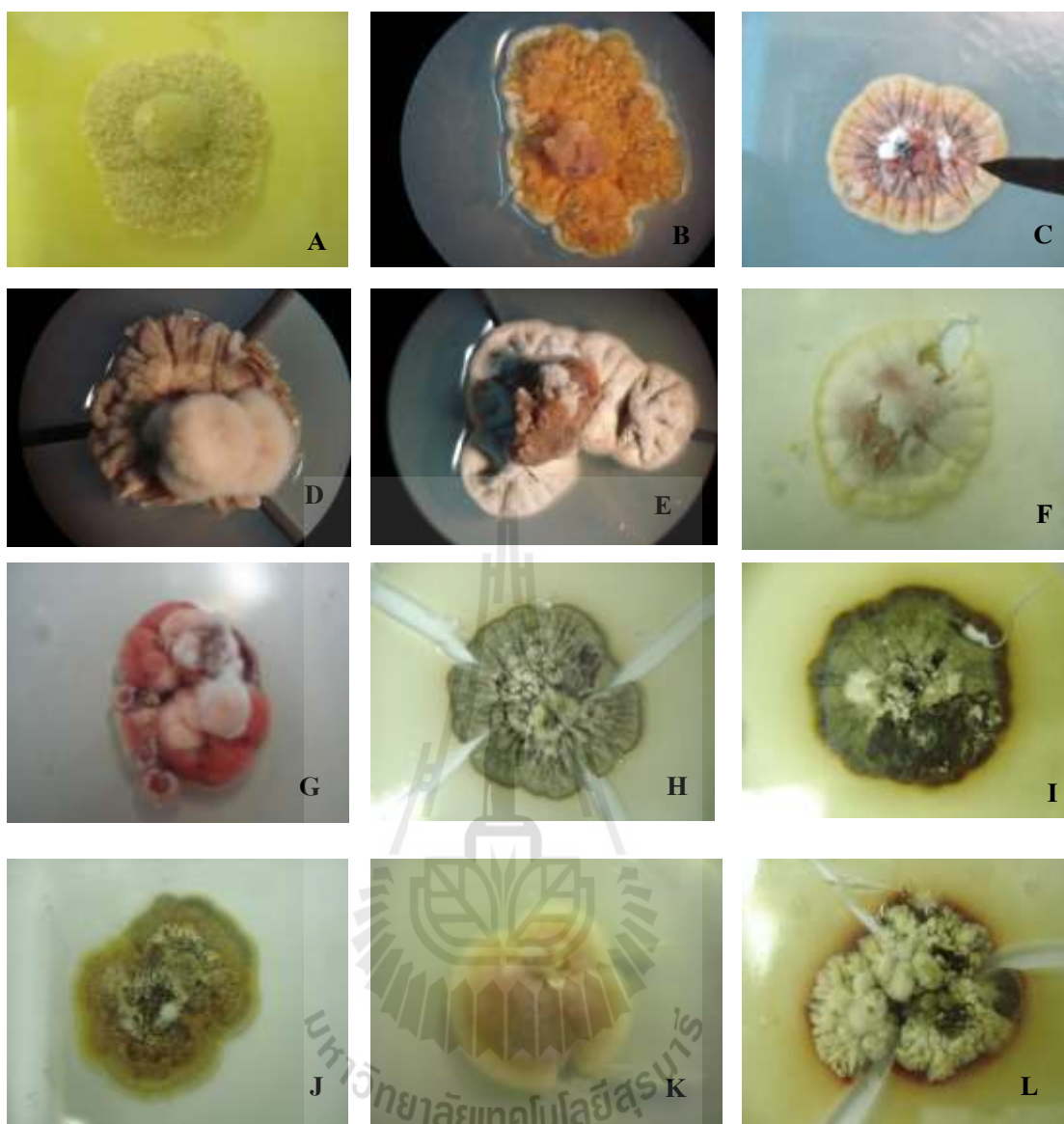
ตารางที่ 4.3 ขนาดโคโลนีของเชื้อ *Spaceloma* spp. ที่อายุ 35 วัน บนอาหาร PDA (ต่อ)

พืชอาศัย	Isolate	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร ¹)
----------	---------	--------------------------------------

		กว้าง	ยาว
หญ้า	ESS	3.02 ± 0.08	3.18 ± 0.08
	ESS_S_PPR	2.06 ± 0.09	2.24 ± 0.13
	ESS1909	2.68 ± 0.08	2.86 ± 0.11
ส้มโอ	OSUF	1.92 ± 0.08	2.14 ± 0.13
	OLSY	1.78 ± 0.16	1.86 ± 0.13
ชงโค	CCS204	2.30 ± 0.27	2.46 ± 0.22
	CCS	2.02 ± 0.28	2.14 ± 0.31
	CCS_SW	2.74 ± 0.18	2.88 ± 0.18
ข่อย	Stb	2.68 ± 0.19	2.84 ± 0.21
	Stb 1808	3.38 ± 0.15	3.58 ± 0.15
ฝรั่ง	GUV	2.70 ± 0.16	2.86 ± 0.17
F - test		**	**
LSD _{0.05}		0.0145	0.0149

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 5 โคโลนีต่อไอโซเลต

** ค่าเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ 0.01



ภาพที่ 4.3 สัโคโลนิของเชื้อ *Sphaceloma* spp. 12 กลุ่ม

- | | |
|-------------------|----------------------|
| A สี่เหลี่ยม | B เหลือง – ส้ม |
| C เหลือง – น้ำตาล | D น้ำตาล |
| E น้ำตาลเข้ม | F ขาว |
| G แดง | H น้ำตาลเข้ม – เขียว |
| I ดำ | J น้ำตาล – เหลือง |
| K เหลืองขาว และ | L น้ำตาล – ขาว |

ตารางที่ 4.4 ความหลากหลายของสี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ โคลินีของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ

สี	พืชอาศัย	ไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
เหลือง	อรุณ	GF901	โคลินีค่อนข้างขรุขระ เจริญทั้งแนวราบ และ ค่อนข้างนูน
		GTC	ผิวขรุขระมาก เจริญราบไปบนผิวอาหาร นูน เล็กน้อย
		GM_KC 4-1	โคลินีขรุขระ กลางโคลินีค่อนข้างนูน บริเวณ ขอบของโคลินีเรียบ
		GEmb	แผ่ราบไปบนผิวอาหาร และเจริญลงไปในอาหาร เล็กน้อย โคลินีค่อนข้างเรียบ
		GBR	ตรงกลางค่อนข้างขรุขระ และนูน ขอบเรียบ
เหลือง – ส้ม	อรุณ	CBR	ค่อนข้างขรุขระ โคลินีนูนขึ้น และเจริญลงใน เนื้ออาหารเล็กน้อย
		GM_KC 4-2	โคลินีขรุขระ กลางโคลินีค่อนข้างนูน บริเวณ ขอบของโคลินีเรียบ
		Nk3-1	ผิวขรุขระมาก ค่อนข้างนูน
		Nk4-1	ผิวนูนค่อนข้างขรุขระ เจริญราบไปบนผิวอาหาร นูน เล็กน้อย
		BR8851	ค่อนข้างขรุขระ กลางโคลินีนูน ขอบค่อนข้าง เรียบ
เหลือง – ขาว	ชงโค	CCS_SW	ค่อนข้างนูน ผิวนูนเรียบ บริเวณรอบๆ โคลินีมีสีแดง และฝังตัวในอาหารเล็กน้อย
	อรุณ	Cr2-1	โคลินีเจริญไปกับผิวอาหาร บริเวณกลางโคลินี นูนเล็กน้อย มีเส้นใยสีขาวสั้นปกคลุมเล็กน้อย
		Cb1-1	โคลินีเจริญไปกับผิวอาหาร บริเวณกลางโคลินี นูนเล็กน้อย มีเส้นใยสีขาวสั้นปกคลุมเล็กน้อย

ตารางที่ 4.4 ความหลากหลายของสี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

สี	พืชอาศัย	ไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
เหลือง – น้ำตาล	องุ่น	GM_KC 3-1	โคโลนีขรุขระ กลางโคโลนีค่อนข้างนูน บริเวณขอบของโคโลนีเรียบ
		GM_KC 3-2	โคโลนีขรุขระ กลางโคโลนีค่อนข้างนูน บริเวณขอบของโคโลนีเรียบ
		GM_KC 3-3	โคโลนีขรุขระ กลางโคโลนีค่อนข้างนูน บริเวณขอบของโคโลนีเรียบ
		Mei1	โคโลนีเจริญราบบนผิวอาหาร และฝังตัวลงในอาหารเล็กน้อย ผิวขรุขระ
		Mei2	โคโลนีเจริญราบบนผิวอาหาร และฝังตัวลงในอาหารเล็กน้อย ผิวขรุขระ
		BR8851	ค่อนข้างขรุขระ กลางโคโลนีนูน ขอบค่อนข้างเรียบ
ขาว	องุ่น	Rc1-1	เจริญราบไปบนผิวอาหาร บริเวณกลางโคโลนีนูนเล็กน้อย ผิวค่อนข้างขรุขระ
		Rc2-1	เจริญราบไปบนผิวอาหาร บริเวณกลางโคโลนีนูนเล็กน้อย ผิวค่อนข้างขรุขระ
		Rc3-1	โคโลนีนูนเล็กน้อย ผิวค่อนข้างขรุขระ มีเส้นใยสีขาว สั้น ปกคลุมส่วนที่เจริญเหนือผิวอาหาร
		Rc4-1	โคโลนีนูนเล็กน้อย ผิวค่อนข้างขรุขระ มีเส้นใยสีขาว สั้น ปกคลุมส่วนที่เจริญเหนือผิวอาหารเหนียว
		Rc5-1	โคโลนีนูนเล็กน้อย ผิวค่อนข้างขรุขระ มีเส้นใยสีขาว สั้น ปกคลุมส่วนที่เจริญเหนือผิวอาหารเหนียว

ตารางที่ 4.4 ความหลากหลายของสี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ โคลินีของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

สี	พืชอาศัย	ไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
เหลือง – น้ำตาล	องุ่น	Mei3	โคลินีเจริญราบบนผิวอาหาร และฝังตัวลงในอาหารเล็กน้อย ผิวขรุขระ
		CCS	นูน และเจริญค่อนข้างช้า ผิวโคลินีค่อนข้างเรียบ ฝังตัวลงในอาหารเล็กน้อย
		CCS204	ค่อนข้างนูน และเจริญค่อนข้างช้า ผิวโคลินีค่อนข้างขรุขระ และมีเส้นใยสีขาวสั้นๆ ปกคลุมบริเวณที่เจริญเหนือผิวอาหาร ฝังตัวลงในอาหารเล็กน้อย
	ส้มโอ	OLSY	ค่อนข้างเรียบ ผิวหยาบเล็กน้อย เจริญราบบนผิวอาหาร
น้ำตาล	องุ่น	GBQ	ค่อนข้างขรุขระ กลางโคลินีนูน เจริญราบบนกับผิวอาหารมากกว่าเจริญขึ้นด้านบน
		GFC	ค่อนข้างขรุขระ กลางโคลินีนูน เจริญราบบนกับผิวอาหารมากกว่าเจริญขึ้นด้านบน
		GSH	ค่อนข้างขรุขระ กลางโคลินีนูน ขอบเรียบ เจริญราบบนกับผิวอาหารมากกว่าเจริญขึ้นด้านบน
		Nk2-1	กลางโคลินีค่อนข้างขรุขระ และนูนแต่บริเวณรอบๆ ค่อนข้างเรียบ
		Pr5-1	โคลินีเจริญไปกับผิวอาหาร นูนเล็กน้อย บริเวณกลางโคลินีสีเข้มกว่าบริเวณขอบของโคลินี เมื่อทดลองตัดด้วยเข็มเย็บเส้นใยเหนียว
ดำ		GPTY-F R2	โคลินีค่อนข้างขรุขระ เจริญราบบนผิวอาหาร มีลักษณะคล้ายผงสีเขียวเข้มปกคลุมผิวโคลินี
		GPTY_F R5	ค่อนข้างนูน และเจริญลงในเนื้ออาหาร ผิวขรุขระมาก บริเวณขอบของโคลินีมีสีแดง

ตารางที่ 4.4 ความหลากหลายของสี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

สี	พืชอาศัย	ไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
น้ำตาลเข้ม – เขียว	องุ่น	GPTY-2	โคโลนีค่อนข้างขรุขระ เจริญราบไปบนผิวอาหาร
		GPTY-F R4	โคโลนีค่อนข้างขรุขระ เจริญราบไปบนผิวอาหาร มีลักษณะคล้ายผงสีเขียวเข้มปกคลุมผิวโคโลนี
		GPTY-F R3	โคโลนีค่อนข้างขรุขระ เจริญราบไปบนผิวอาหาร มีลักษณะคล้ายผงสีเขียวเข้มปกคลุมผิวโคโลนี
		MJ_KC 2-1	ผิวเรียบและเจริญราบไปกับผิวอาหารมากกว่า ที่จะนูนขึ้น
น้ำตาล – ขาว	องุ่น	Pr4-1	โคโลนีเจริญไปกับผิวอาหาร นูนเล็กน้อย บริเวณกลางโคโลนีสีเข้มกว่าบริเวณขอบของโคโลนี เมื่อตัดด้วยเข็มเจาะเส้นใยเหนียว มีเส้นใยสีขาวสั้นๆ ปกคลุม
		Cr1-1	โคโลนีเจริญไปกับผิวอาหาร บริเวณกลางโคโลนีนูนเล็กน้อย
น้ำตาล – เหลือง – ขาว	องุ่น	Cb4-1	โคโลนีเจริญไปกับผิวอาหาร บริเวณกลางโคโลนีนูนเล็กน้อย
		Cb5-1	โคโลนีเจริญไปกับผิวอาหาร บริเวณกลางโคโลนีนูนเล็กน้อย
น้ำตาลเข้ม	ข่อย	Stb 1808	โคโลนีขรุขระ โคโลนีนูน และฝังตัวลงในอาหารจนทำให้อาหารแยกตัว มีเส้นใยสีขาวสั้นๆ ปกคลุมส่วนที่อยู่เหนือผิวอาหาร
		Stb	โคโลนีขรุขระ โคโลนีนูน และฝังตัวลงในอาหารจนทำให้อาหารแยกตัว มีเส้นใยสีขาวสั้นๆ ปกคลุมส่วนที่อยู่เหนือผิวอาหาร

ตารางที่ 4.4 ความหลากหลายของสี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

สี	พืชอาศัย	ไอโซเลต	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
แดง	หญ้ายาง	ESS_F3_S	โคโลนีนูนขึ้นมาเหนือผิวอาหารมาก มีสีแดงชัดเจน ผิวขรุขระ ฝังตัวลงในอาหารเล็กน้อย มีเส้นใยสีขาว สั้น ปกคลุมส่วนที่อยู่เหนือผิวอาหาร
		ESS1909	โคโลนีค่อนข้างนูน มีสีแดงชัดเจน ผิวขรุขระมาก ฝังตัวลงในอาหารเล็กน้อย มีเส้นใยสีขาว สั้น ปกคลุมส่วนที่อยู่ตรงกลาง
		ESS_S_PPR	โคโลนีเจริญราบไปกับผิวอาหาร นูนเล็กน้อย มีสีแดงชัดเจน ผิวขรุขระมาก ฝังตัวลงในอาหารเล็กน้อย มีเส้นใยสีขาวและเขียว สั้น ปกคลุมส่วนที่อยู่เหนือผิวอาหาร
แดง	ส้มโอ	OSUF	เจริญราบไปกับผิวอาหาร ผิวเรียบ บริเวณขอบโคโลนีมีสีแดงชัดเจน
	ฝรั่ง	GUV	เจริญชันมาก และเจริญราบไปกับผิวอาหาร นูนเล็กน้อยเท่านั้น

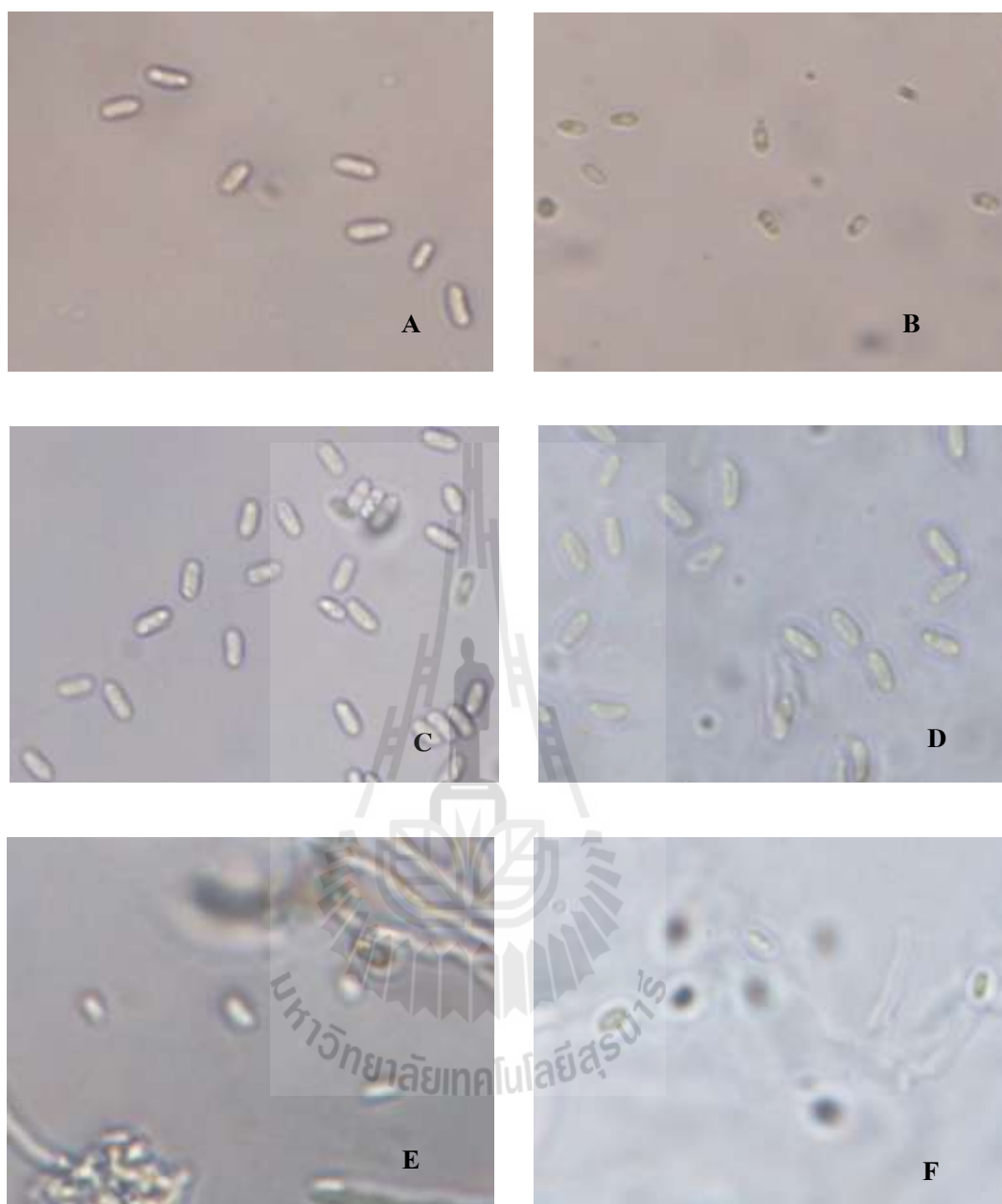
ตารางที่ 4.5 ขนาดโคนี้เดียของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ของเชื้ออายุ 28 วัน

พืชอาศัย	ไอโซเลต	ขนาด (กว้าง × ยาว) ไมโครเมตร*
องุ่น	GSH	$2.668 \pm 0.04 \times 5.983 \pm 0.26$
	GF901	$3.031 \pm 0.16 \times 6.734 \pm 0.20$
	GTC	$3.220 \pm 0.16 \times 7.234 \pm 0.17$
	MJ_KC 2-1	$2.287 \pm 0.14 \times 4.588 \pm 0.29$
	GM_KC 3-1	$2.273 \pm 0.19 \times 5.291 \pm 0.21$
	GM_KC 3-2	$1.908 \pm 0.12 \times 4.772 \pm 0.13$
	GM_KC 3-3	$3.359 \pm 0.15 \times 6.716 \pm 0.25$
	GM_KC 4-1	$2.454 \pm 0.18 \times 5.748 \pm 0.29$
	GEmb	$3.190 \pm 0.12 \times 6.766 \pm 0.23$
	GBR	$3.603 \pm 0.15 \times 5.338 \pm 0.18$
	GMei1	$2.584 \pm 0.13 \times 6.092 \pm 0.23$
	GMei2	$2.415 \pm 0.16 \times 5.179 \pm 0.34$
	GMei3	$2.592 \pm 0.15 \times 6.648 \pm 0.34$
	GBQ	$2.883 \pm 0.14 \times 5.938 \pm 0.21$
	GFC	$3.329 \pm 0.16 \times 6.574 \pm 0.36$
	BR8851	$2.502 \pm 0.16 \times 3.406 \pm 0.23$
	CBR	$2.996 \pm 0.14 \times 4.027 \pm 0.18$
	BR8851-2	$2.532 \pm 0.10 \times 3.448 \pm 0.21$
	GPTY-F R4	$3.163 \pm 0.16 \times 6.303 \pm 0.21$
	GPTY_S R3	$3.368 \pm 0.16 \times 5.215 \pm 0.19$
	GPTY-F R2	$3.721 \pm 0.16 \times 5.821 \pm 0.20$
	GPTY-2	$2.758 \pm 0.18 \times 6.199 \pm 0.24$
	GTm	$2.251 \pm 0.13 \times 5.836 \pm 0.14$
	GM_KC 4-2	$2.114 \pm 0.17 \times 4.661 \pm 0.51$

ตารางที่ 4.5 ขนาดโคนีเดียของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ของเชื้ออายุ 28 วัน (ต่อ)

พืชอาศัย	ไอโซเลต	ขนาด (กว้าง × ยาว) ไมโครเมตร*
อุน	Pr 5 – 1	$2.830 \pm 0.17 \times 6.416 \pm 0.23$
	Pr 4 – 1	$2.618 \pm 0.16 \times 5.763 \pm 0.25$
	Cr 2 – 2	$2.207 \pm 0.13 \times 5.217 \pm 0.20$
	Cr 1 – 1	$2.421 \pm 0.11 \times 5.701 \pm 0.24$
	Cb 1 – 1	$1.709 \pm 0.14 \times 4.680 \pm 0.20$
	Rc 5 – 1	$2.110 \pm 0.20 \times 6.182 \pm 0.14$
	Nk 2 – 1	$2.905 \pm 0.14 \times 5.980 \pm 0.24$
	Nk 3 – 1	$2.890 \pm 0.18 \times 5.841 \pm 0.25$
	Nk 4 – 1	$2.959 \pm 0.12 \times 6.056 \pm 0.14$
หญ้าหาง	ESS	$3.710 \pm 0.15 \times 6.670 \pm 0.31$
	ESS1909	$3.645 \pm 0.15 \times 6.802 \pm 0.22$
	ESS_S_PPR	$4.193 \pm 0.11 \times 7.236 \pm 0.15$
ส้มโอ	OSUF	$2.258 \pm 0.16 \times 5.248 \pm 0.14$
	OLSY	$2.538 \pm 0.10 \times 4.730 \pm 0.16$
ชงโค	CCS204	$1.887 \pm 0.13 \times 2.892 \pm 0.23$
	CCS	$1.718 \pm 0.10 \times 3.354 \pm 0.13$
	CCS_SW	$1.740 \pm 0.16 \times 3.288 \pm 0.24$
ข่อย	Stb 1808	$2.990 \pm 0.13 \times 4.764 \pm 0.17$
	Stb	$2.250 \pm 0.12 \times 5.332 \pm 0.17$

* ค่าเฉลี่ยจาก 100 โคนีเดียต่อไอโซเลต



ภาพที่ 4.4 ลักษณะ โคนิเดียของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อายุ 28 วัน

A ไอโซเลต GM-KC 3-2 จากอู่น

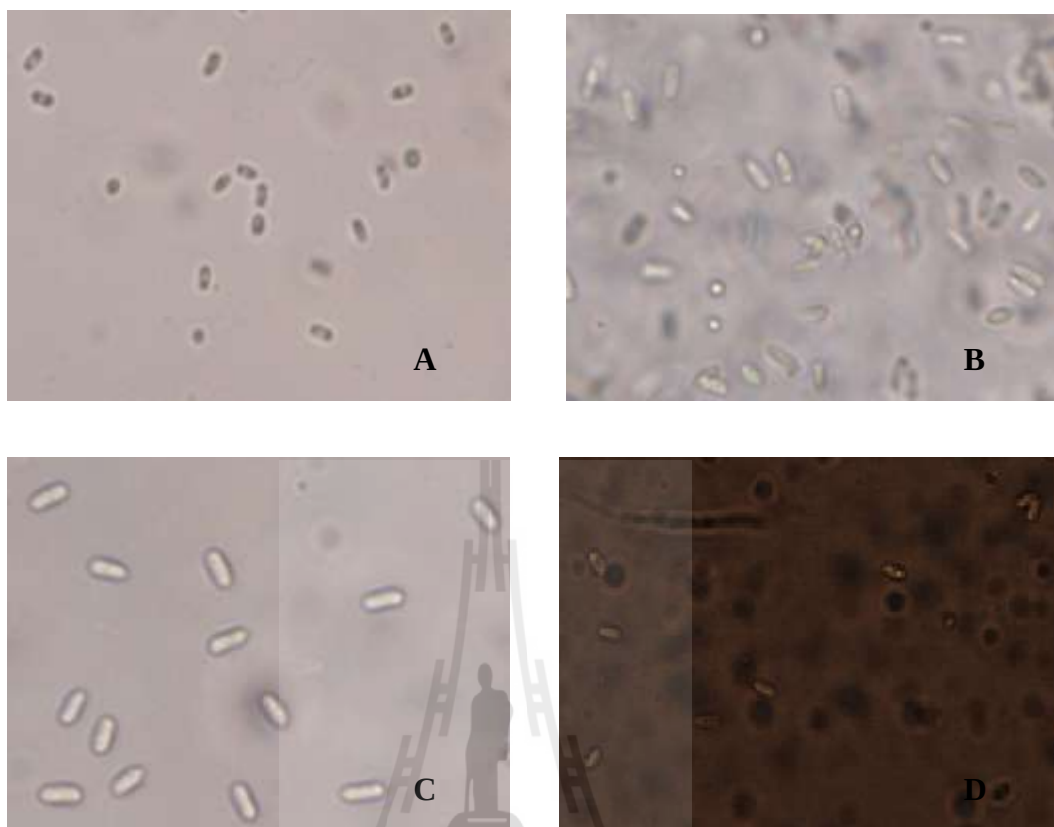
B ไอโซเลต CCS จากขงโค

C ไอโซเลต GPTY-F R3 จากอู่น

D ไอโซเลต GPTY_F_R4

E ไอโซเลต Nk 4 – 1 จากอู่น และ

F ไอโซเลต Stb จากข่อย (กำลังขยาย 1,200 เท่า)



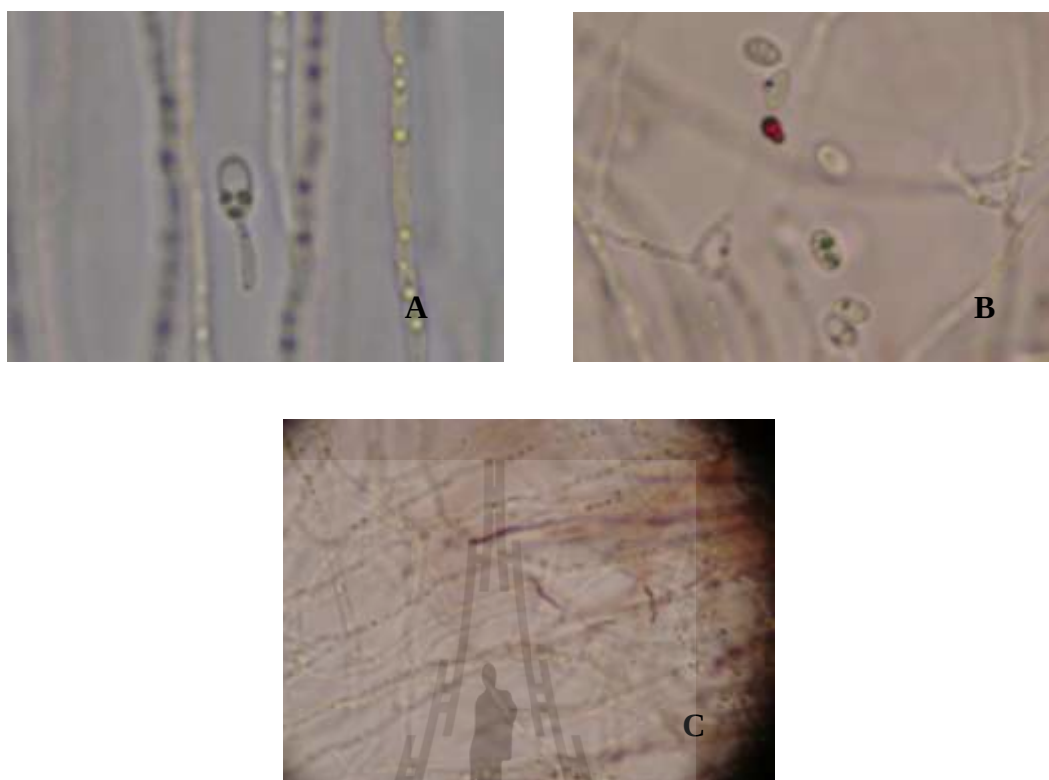
ภาพที่ 4.5 ลักษณะ โคนิเดียมของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อายุ 28 วัน

A ไอโซเลต CSS_SW จากชงโค

B ไอโซเลต Gmei1 จากอู่ฉิน

C ไอโซเลต ESS_PPR_S จากหน้อยยาง และ

D ไอโซเลต OLSY จากส้มโอ (กำลังขยาย 1200 เท่า)



ภาพที่ 4.6 ลักษณะของโคนิเดียและเส้นใยของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

A โคนิเดียที่แยกได้จากกองุ่นที่กระตุ้นด้วยน้ำ รูปร่างคล้ายยีสต์ (Yeast form)

มีการแตกตา (budding)

B ลักษณะโคนิเดียที่สร้างขึ้นโดยการกระตุ้นด้วยน้ำของไอโซเลต ESS

ที่แยกได้จากหญ้ายาง (กำลังขยาย 1200 เท่า)

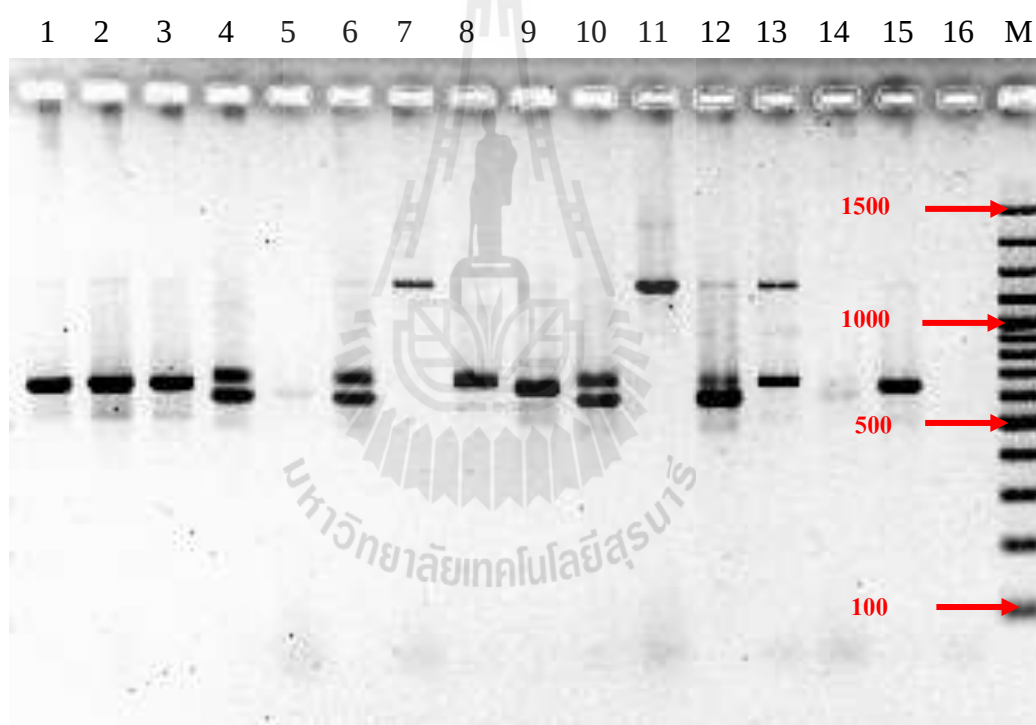
C ลักษณะเส้นใยของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่กระตุ้นด้วยน้ำ (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.3 การจำแนกความแตกต่างทางชีวโมเลกุล

4.3.1 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ (DNA) ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์เพิ่มปริมาณ DNA ใน ส่วน ของ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยเทคนิค PCR

จากการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ITS4 และ ITS5 พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไอโซเลตที่แยกได้จากกองุ่นและพืชชนิดต่าง ๆ ได้ (รูปที่ 4.7) ไอโซเลตที่แยกได้จากกองุ่นสามารถแบ่งออกเป็น สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อที่แยกได้จากกองุ่นและพืชอื่นได้ เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีขนาด ดีเอ็นเอเท่ากับ 648 bp ได้แก่ ไอโซเลต GMei1 Nk 4-1 GSH และ BR8851 กลุ่มที่ 2 ไอโซเลตที่มี จำนวน ดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 608 และ 648 bp ได้แก่ Cb 1 – 1 และ GPTY_F_R4 ซึ่งเหมือนกับ

หนัวยาง ไอโซเลต ESS_PPR_S และ ชงโคไอโซเลต CCS_SW2 กลุ่มที่ 3 แอบริเอ็นเอมีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 1,374 bp ได้แก่ ไอโซเลต Pr 4-1 และชงโคไอโซเลต CCS_SW กลุ่มที่ 4 คือไอโซเลต Rc 5 – 1 ไม่พบ แอบริเอ็นเอ ซึ่งเหมือนกับไอโซเลตของส้มโอ และฝรั่ง กลุ่มที่ 5 มีแอบริเอ็นเอขนาดเท่ากับ 608 คือไอโซเลตจากหนัวยางไอโซเลต ESS_PPR_S ซึ่งเหมือนไอโซเลตจากข่อย และกลุ่มสุดท้ายมีแอบริเอ็นเอ 2 ขนาดเท่ากับ 608 และ 1,374 bp คือไอโซเลตจากชงโค จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไอโซเลตที่แยกได้จากองุ่นมีความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อ *Sphaceloma* ที่เข้าทำลายองุ่นนั้น ไม่ใช่ *Sphaceloma ampelinum* ทั้งหมด เช่นเดียวกับไอโซเลตจากพืชชนิดอื่น ซึ่งพบว่ามีคล้ายกันกับเชื้อจากองุ่นไอโซเลต Nk 4-1 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเชื้อที่เข้าทำลายพืชชนิดอื่นอาจจะเป็นเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* ได้



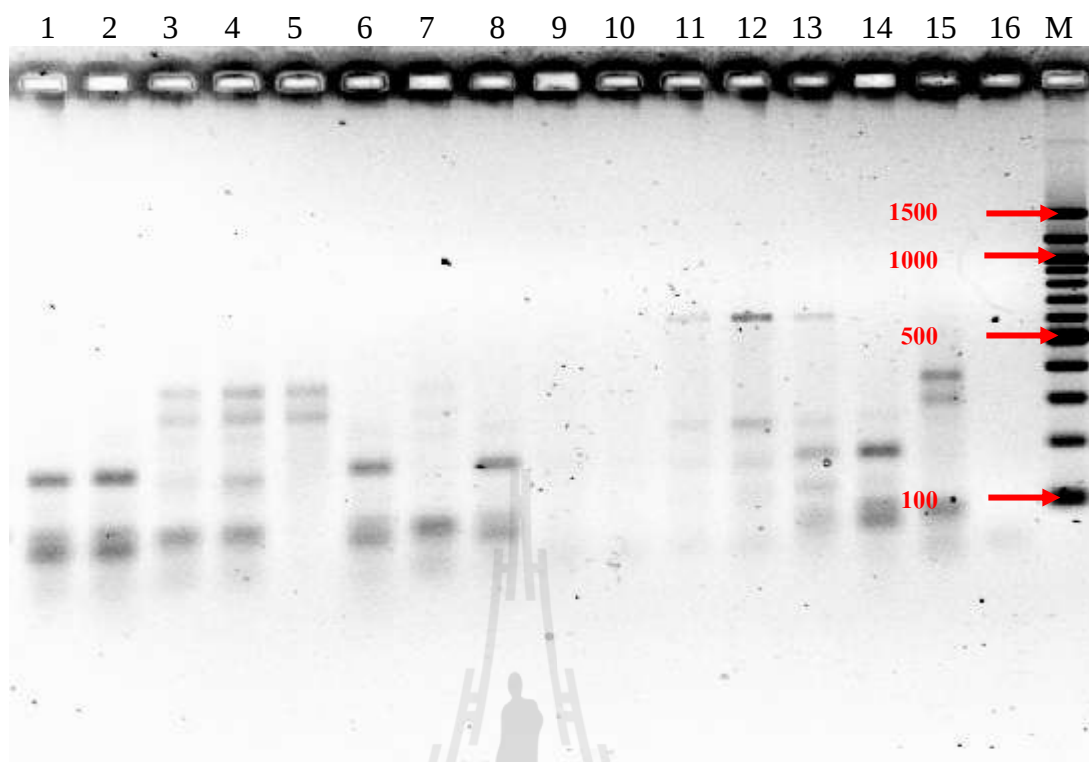
ภาพที่ 4.7 แอบริเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4

และ ITS 5 lane 1 – 8 จากองุ่น GMei1, Nk 4-1, GSH, Cb 1-1, Rc 5 -1, GPTYF_R4, Pr 4 – 1 และ BR8851, ตามลำดับ lane 9 – 10 = ไอโซเลตจากหนัวยาง ESS_F3 และ ESS_PPR_S lane 11 – 13 = ไอโซเลตจากชงโค CCS_SW, CCS_SW2 และ CCS 204 lane 14 = ไอโซเลตจาก ส้มโอ (OLSY) lane 15 = ไอโซเลตจาก ข่อย (Stb) lane16 = ไอโซเลต จากฝรั่ง (GUV) lane M = 100 bp marker DNA ladder

4.3.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอของเชื้อ หลังจากตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ

หลังจากตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *MspI* และ *HhaI* พบว่า เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ของไอโซเลตที่แยกได้จากอู่นและพืชชนิดอื่นได้ ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการใช้เทคนิค PCR เชื้อไอโซเลต GSH ที่เคยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ GMei1 Nk 4-1 และ BR8851 เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้จำนวนแถบดีเอ็นเอแตกต่างออกไป แต่พบว่าให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกับอู่นไอโซเลต Cb 1 – 1 และ ไอโซเลตจากข่อย ส่วนอู่นไอโซเลต GMei1 และ Nk 4-1 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับอู่นไอโซเลต GPTY_F_R4 และไอโซเลตจากส้มโอ สำหรับไอโซเลต ESS และ ESS_PPR_S ที่ได้จากหญ้าขจรสี ไม่พบ แถบดีเอ็นเอ และไอโซเลต CCS_SW CCS และ CCS204 จากขงโค ให้แถบแตกต่างจากอู่นและพืชชนิดอื่นอย่างชัดเจน จึงเป็นไปได้ว่า *Sphaceloma* ที่เข้าทำลาย อู่นเป็นชนิดเดียวกับที่เข้าทำลายส้มโอ เช่นเดียวกับไอโซเลตที่ Stb จาก ข่อย มีดีเอ็นเอจำนวน 4 แถบเหมือนกับอู่นไอโซเลต GSH และ Cb 1 – 1 (ภาพที่ 4.8)





ภาพที่ 4.8 DNA fingerprints ของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR

โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS 5 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด *MspI* และ *HhaI* โดย lane 1 – 8 = ไอโซเลตจากอุนุ่น GMei1, Nk 4-1, GSH, Cb 1-1, BR8851, GPTYF_R4 ตามลำดับ lane 9 – 10 = ไอโซเลตจากหญ้ายาง ESS_F3 และ ESS_PPR_S lane 11 – 13 = ไอโซเลตจากชงโค CCS_SW, CCS_SW2 และ CCS 204 lane 14 = ไอโซเลตจาก ส้มโอ (OLSY) lane 15 = ไอโซเลตจาก ข่อย (Stb) lane 16 = ไอโซเลต จากฝรั่ง (GUV) lane M = 100 bp marker DNA ladder

4.4 การศึกษาความสามารถของเชื้อในการทำให้เกิดโรครากับพืชทดสอบ

จากการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากอุนุ่น ลงบนพืชทดสอบจำนวน 4 ชนิด คือ ชงโค ข่อย หญ้ายาง และ ส้มโอ โดยอุนุ่นเป็นตำรับทดลองควบคุม (control) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทดลอง 4 ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง จากการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* spp. จำนวน 23 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุนุ่น (13 ไอโซเลต) พืชชนิดอื่น ซึ่งได้แก่ ชงโค (2 ไอโซเลต) หญ้ายาง (3 ไอโซเลต) ฝรั่ง (1 ไอโซเลต) ข่อย (1 ไอโซเลต) และ ส้มโอ (1 ไอโซเลต) พบว่าเชื้อจากอุนุ่นจำนวน 4 ไอโซเลตไม่สามารถก่อให้เกิดโรคบนใบอุนุ่นเช่นเดียวกับ เชื้อที่แยกได้จากฝรั่ง ข่อย และหญ้ายาง ไอโซเลต ESS1909 ดังแสดงในตารางที่ 4.6 สำหรับลักษณะของอาการที่ปรากฏบนใบอุนุ่นเป็นตามที่ได้แสดง

ในภาพที่ 4.9 และผลการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากข่อยไอโซเลต Ssb1808 ลงบนองุ่นและพืชชนิดต่าง ๆ พบว่า เชื้อจากข่อย สามารถก่อให้เกิดโรคกับองุ่น และชงโคได้ แต่ไม่สามารถก่อโรคกับหนุ่ยยาง ส้มโอ และฝรั่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ผลการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากชงโค ไอโซเลต CCS_SW ลงบนองุ่นและพืชชนิดต่าง ๆ พบว่า เชื้อที่สามารถแยกได้จากชงโค สามารถก่อให้เกิดโรคกับองุ่น หนุ่ยยาง และส้มโอได้ แต่ไม่สามารถก่อโรคในฝรั่ง และข่อย ดังแสดงในตารางที่ 4.8 และลักษณะแผลที่ปลูกเชื้อ *Sphaceloma* ลงบนใบชงโคเป็นตามที่ได้แสดงในภาพที่ 4.10 ผลการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากส้มโอไอโซเลต OLSY พบว่า เชื้อสามารถก่อให้เกิดโรคได้กับองุ่น แต่ไม่ก่อโรคกับพืชทดสอบชนิดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ผลการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากหนุ่ยยางไอโซเลต ESS_PPR_S ลงบนองุ่นและพืชชนิดต่าง ๆ พบว่า เชื้อที่สามารถแยกได้จากหนุ่ยยาง สามารถก่อให้เกิดโรคกับองุ่น ชงโค และข่อยได้ แต่ไม่สามารถ ก่อโรคในฝรั่ง และส้มโอ ดังแสดงในตารางที่ 4.10



ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากอู่นและพืชชนิดอื่น ในการทำให้เกิดโรคบนอู่นพันธุ์เบลคควิน

พืชอาศัย	ไอโซเลต	จำนวนใบที่แสดงอาการในการปลูกเชื้อแต่ละครั้ง ¹		
		1	2	3
อู่น	GSH	4/4	4/4	4/4
	GF901	2/4	2/4	3/4
	GTC	0/4	1/4	2/4
	MJ_KC 2-1	3/4	1/4	4/4
	GM_KC 3-1	0/4	0/4	0/4
	GM_KC 4-1	0/4	0/4	0/4
	GEmb	1/4	1/4	1/4
	Mei1	0/4	2/4	0/4
	GFC	0/4	0/4	0/4
	GF8851	1/4	1/4	1/4
	Pr5-1	3/4	3/4	2/4
	Cb1-1	0/4	0/4	0/4
	Nk4-1	2/4	3/4	3/4
	GPTY-F R4	1/4	0/4	2/4
หญ้ายาง	ESS	1/4	3/4	1/4
	ESS1909	0/4	0/4	0/4
	ESS_S_PPR	2/4	2/4	1/4
ส้มโอ	OLSY	1/4	1/4	0/4
ชงโค	CCS204	0/4	0/4	2/4
	CCS_SW	4/4	2/4	4/4
ฝรั่ง	GUV	0/4	0/4	0/4
ข่อย	stb 1808	0/4	0/4	0/4

¹จำนวนใบที่แสดงอาการ/จำนวนใบที่ได้ปลูกเชื้อ

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากข้อไขโอโซเลต stb1808 ในการทำให้เกิดโรคบนพืชทดสอบ

พืชทดสอบ	จำนวนใบที่แสดงอาการในการปลูกเชื้อแต่ละครั้ง ¹		
	1	2	3
องุ่น	2/4	0/4	2/4
หญ้ายาง	0/4	0/4	0/4
ส้มโอ	0/4	0/4	0/4
ชงโค	1/4	1/4	1/4
ฝรั่ง	0/4	0/4	0/4
ข่อย	3/4	1/4	1/4

¹จำนวนใบที่แสดงอาการ/จำนวนใบที่ได้ปลูกเชื้อ

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากชงโคโอโซเลต CCS_SW ในการทำให้เกิดโรคบนองุ่นและพืชทดสอบ

พืชทดสอบ	จำนวนใบที่แสดงอาการในการปลูกเชื้อแต่ละครั้ง ¹		
	1	2	3
องุ่น	2/4	3/4	3/4
หญ้ายาง	2/4	1/4	1/4
ส้มโอ	1/4	0/4	1/4
ชงโค	4/4	4/4	4/4
ฝรั่ง	0/4	0/4	0/4
ข่อย	0/4	0/4	0/4

¹จำนวนใบที่แสดงอาการ/จำนวนใบที่ได้ปลูกเชื้อ

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากส้มโอไอโซเลต OLSY ในการทำให้เกิดโรคบนองุ่นและพืชทดสอบ

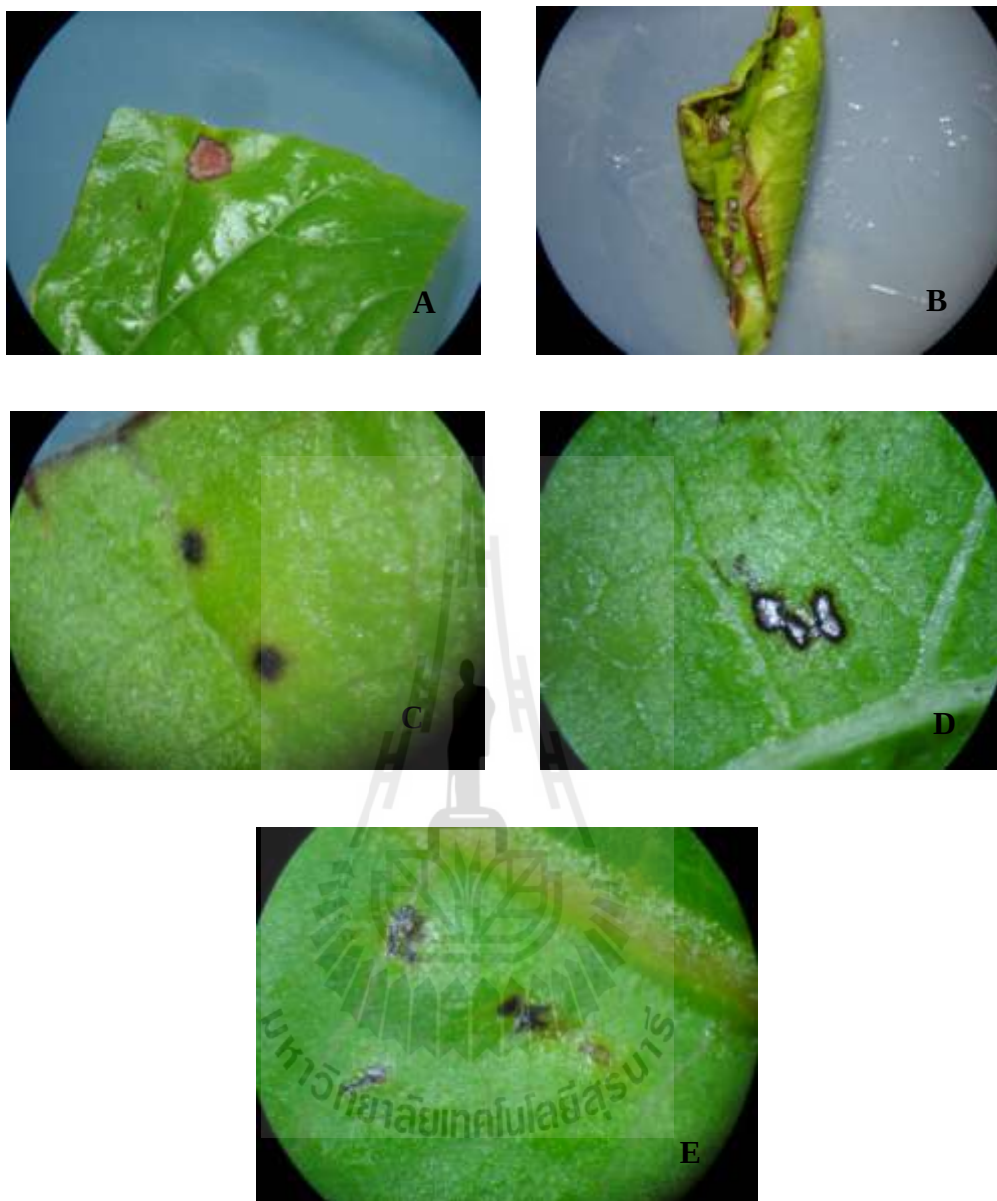
พืชทดสอบ	จำนวนใบที่แสดงอาการในการปลูกเชื้อแต่ละครั้ง ¹		
	1	2	3
องุ่น	1/4	0/4	1/4
ส้มโอ	1/4	2/4	0/4
ชงโค	0/4	0/4	0/4
ฝรั่ง	0/4	0/4	0/4
ข่อย	0/4	0/4	0/4
หญ้ายาง	0/4	0/4	0/4

¹จำนวนใบที่แสดงอาการ/จำนวนใบที่ได้ปลูกเชื้อ

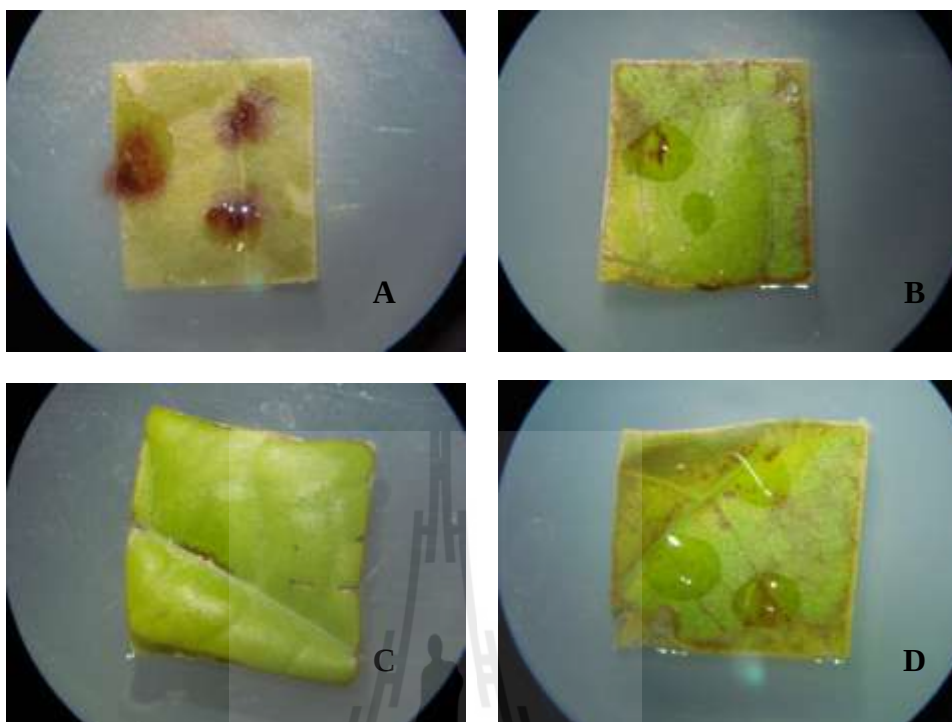
ตารางที่ 4.10 ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากหญ้ายางไอโซเลต ESS_PPR_S ในการทำให้เกิดโรคบนองุ่นและพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ

พืชทดสอบ	จำนวนใบที่แสดงอาการในการปลูกเชื้อแต่ละครั้ง ¹		
	1	2	3
องุ่น	2/4	2/4	1/4
หญ้ายาง	2/4	2/4	3/4
ส้มโอ	0/4	0/4	0/4
ชงโค	1/4	1/4	1/4
ฝรั่ง	0/4	0/4	0/4
ข่อย	1/4	0/4	1/4

¹จำนวนใบที่แสดงอาการ/จำนวนใบที่ได้ปลูกเชื้อ



ภาพที่ 4.9 อาการที่เกิดจากการปลุกเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ
 ลงบนใบองุ่นพันธุ์แบลคควิน
 A ไอโซเลต GFC901 ที่แยกได้จากองุ่น
 B ไอโซเลต GSH ที่แยกได้จากองุ่น
 C ไอโซเลต CCS ที่แยกได้จากชงโค
 D ไอโซเลต OLSY ที่แยกได้จากส้มโอ และ
 E ไอโซเลต EES_PPR_S ที่แยกได้จากหญ้ายาง



ภาพที่ 4.10 อาการที่เกิดจากการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ
ลงบนใบขงโค

A ปลูกเชื้อไอโซเลต CCS_SW ที่แยกได้จากขงโค (control)

B ผลการปลูกเชื้อไอโซเลต ESS_PPRS ที่แยกได้จากหน้อย่าง

C ผลการปลูกเชื้อไอโซเลต OLSY ที่แยกได้จากส้มโอ

D ผลการปลูกเชื้อไอโซเลต GPTY-S R1 ที่แยกได้จากองุ่น

จากผลการศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวโมเลกุล และความ
สามารถของเชื้อในการทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ได้สรุปและ
เปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลของตัวอย่างเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากงุ่นและพืชอื่น

พืชอาศัย	ไอโซเลต	ขนาดโคโลนี (ซ.ม.)		สี	ขนาดโคโลนีเดี่ยว (μm)		ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วย เอนไซม์ <i>MspI</i> และ <i>HhaI</i>
		กว้าง	ยาว		กว้าง	ยาว	
งุ่น	Gme1	2.60	2.84	เหลือง – น้ำตาล	2.584	6.092	180, 95, 82
	Nk 4 – 1	2.26	2.38	เหลือง	2.959	6.056	180, 95, 82
	GSH	2.88	3.08	น้ำตาล	2.668	5.983	372 , 299, 168, 92
	Cb 1 – 1	3.12	3.22	เหลือง – ขาว	1.709	4.680	372, 299, 168, 92
	Pr 4 – 1	2.52	2.70	น้ำตาล – ขาว	2.618	5.763	372, 299
	BR8851	2.64	2.76	เหลือง – น้ำตาล	2.502	3.406	262, 181, 86
	GPTY_F_R4	2.26	2.40	น้ำตาล – เหลือง – เขียว	3.163	6.303	262, 181, 86
	GEmb	2.50	2.66	เหลือง	3.190	6.766	95
ชงโค	CCS_SW	2.68	2.84	เหลือง	1.740	3.288	628, 257, 175, 123, 94
	CCS	2.74	2.88	เหลือง – น้ำตาล	1.718	3.354	628, 257, 175, 123, 94
	CCS204	2.02	2.14	เหลือง – น้ำตาล	1.887	2.892	628, 257, 175, 123, 94
หญ้ายาง	ESS	2.06	2.24	แดง	3.710	6.670	-
	ESS_PPR_S	2.68	2.86	แดง	4.193	7.236	-
ส้มโอ	OLSY	1.78	1.86	เหลือง – น้ำตาล	2.538	2.538	180, 95, 82
ข่อย	Stb	2.70	2.86	น้ำตาลเข้ม	2.250	5.332	377, 305, 94
ฝรั่ง	GUV	1.60	1.84	แดง	-	-	-

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิธีการแยกเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของเชื้อ *Sphaceloma* spp. และความสามารถในการเข้าทำลายพืชทดสอบของเชื้อ *Sphaceloma* spp. พบว่า

1. การแยกเชื้อจากใบองุ่นและพืชอาศัยที่แสดงอาการโรคสแคบ มักมีปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อ *Colletotrichum* ซึ่งมักเจริญอยู่ร่วมกับเชื้อ *Sphaceloma* กรรณิการ์ เพ็ญพักตร์ (2537) ได้ศึกษาการแยกเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* จากส่วนต่าง ๆ ขององุ่นที่แสดงอาการโรคสแคบจากหลายพื้นที่ปลูกในประเทศไทย ด้วยวิธี Tissue transplanting method วิธีดังกล่าวไม่เหมาะสมเนื่องจากเชื้อเจริญได้ช้า ทำให้มีการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่น กรรณิการ์ เพ็ญพักตร์ (2545) จึงได้พัฒนาเทคนิคการแยกเชื้อโดยใช้วิธี ชักนำให้เชื้อราปล่อยสปอร์ออกจาก acervulus ในน้ำกลั่น จากนั้นจึงใช้วิธี serial dilution ในการแยก อย่างไรก็ตาม อังสนา อัครพิศาล และคณะ (มปป) ได้ใช้เทคนิค Tissue transplanting method ในการแยกเชื้อ *Sphaceloma rosarum* เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในกุหลาบ โดยชักนำให้เชื้อเจริญออกจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค และวางลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman No.1) ที่นิ่งมาเชื้อแล้วเพื่อซับขึ้นกุหลาบให้แห้ง จึงย้ายมาวางบนอาหาร PDA ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicillin นอกจากนี้จากรายงานของ ขนิษฐา มากรุ่ง (2548) ได้ใช้วิธี Tissue transplanting method ในการแยกเชื้อได้จากองุ่น เช่นเดียวกัน แต่ชักนำให้เชื้อเจริญจากส่วนที่เป็นโรคโดยวางบนอาหาร WA นาน 3 วันเพื่อให้สร้าง เส้นใยก่อนนำไปเลี้ยงต่อบนอาหาร PDA วิธีดังกล่าวสามารถลดการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่นได้ และจากรายงานของอ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์ (2553) ได้ใช้ Tissue transplanting method เช่นกันโดยบ่มเชื้อบนอาหาร WA เป็นเวลา 3 – 5 วัน สามารถแยกเชื้อได้สำเร็จ 80 เปอร์เซ็นต์ จากการแยกเชื้อโดยเทคนิค Tissue transplanting method สามารถแยกได้จำนวน 52 ไอโซเลต จากองุ่น 41 ไอโซเลต ชงโคและ หญ้าขามชนิดละ 3 ไอโซเลต ข่อยและส้มโอ ชนิดละ 2 ไอโซเลต และฝรั่ง 1 ไอโซเลต ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกองุ่นที่สำคัญของประเทศไทย ในการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชชนิดต่างๆ มีเทคนิคในการแยกแตกต่างกันออกไป แต่จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่สด และควรทำการแยกเชื้อทันที

2. เชื้อแต่ละไอโซเลตมีลักษณะการเจริญ สีของโคโลนี และความสามารถในการสร้างโคโคนีแตกต่างกัน การเจริญของโคโลนีบนอาหาร WA จะเจริญเป็นเส้นใยบาง ๆ และมีสีแดงเกิดขึ้นบนผิวอาหาร เมื่อย้ายลงเลี้ยงบนอาหาร PDA ในระยะแรกจะเจริญช้ามาก แต่ละไอโซเลตมี

ลักษณะการเจริญแตกต่างกัน โดยลักษณะการเจริญของโคโลนีมีทั้งการเจริญในแนวราบกับผิวอาหารและการเจริญแบบพอกพูนขึ้นด้านบน (gummy growth) ซึ่งสอดคล้องกับศึกษาลักษณะของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ของกรรณิการ์ เพียนพัทธ์และคณะ (2536) และ กานต์ คำทรัพย์ (2546) กล่าวว่าโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA เส้นใยอัดตัวแน่น จนทำให้เกิดรอยหยักที่ผิวโคโลนี จากการศึกษาพบว่าบางโคโลนีมีการเจริญแบบฝังตัวลงไปในเนื้ออาหาร จนทำให้มีการแยกของเนื้ออาหาร โดยเชื้ออายุ 35 วันโคโลนีของงุ่นมีการเจริญเร็วที่สุด มีขนาดเท่ากับ $3.70 \pm 0.10 \times 3.82 \pm 0.08$ เซนติเมตร ขณะที่เชื้อที่แยกได้จาก ข่อย ชงโค หนุ่ยยาง และส้มโอ มีขนาดโคโลนีใกล้เคียงกันคือเท่ากับ $3.04 \pm 0.48 \times 3.22 \pm 0.50$, $2.48 \pm 0.39 \times 2.86 \pm 0.02$, $2.22 \pm 0.40 \times 2.41 \pm 0.39$ และ $2.04 \pm 0.36 \times 2.16 \pm 0.42$ เซนติเมตร ส่วนเชื้อที่แยกได้จากฝรั่งมีขนาดโคโลนีเล็กที่สุด คือ $1.60 \pm 0.10 \times 1.74 \pm 0.11$ เซนติเมตร

เมื่อจัดกลุ่มโดยสังเกตลักษณะสีของโคโลนี พบว่าเชื้อที่แยกได้จากงุ่นและพืชทดสอบชนิดต่าง ๆ มีสีโคโลนีแตกต่างกันสามารถจัดกลุ่มได้ 12 กลุ่มสี ได้แก่ สีเหลือง เหลือง – ส้ม เหลือง – น้ำตาล น้ำตาล น้ำตาลเข้ม ขาว แดง น้ำตาลเข้ม – เขียว ดำ น้ำตาล – เหลือง เหลืองขาว และ น้ำตาล – ขาว ซึ่งโคโลนีของเชื้อที่แยกได้จากงุ่นมีความแตกต่างกันในกลุ่มของงุ่นเอง และ ยังแตกต่างจากโคโลนีของเชื้อที่สามารถแยกได้จากพืชอื่นอีกด้วย โดยโคโลนีของเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากใบชงโคที่เก็บจากบริเวณอาคารบรรณสารมีสีเหลือง – น้ำตาลซึ่งมีสีเข้มกว่าเชื้อที่แยกได้จากใบชงโคที่เก็บจากบริเวณหอพักสุรนิเวศ และมีเจริญในอาหาร PDA ได้เร็วกว่า โคโลนีของเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกจากใบหนุ่ยยางที่เก็บจากสถานที่แตกต่างกันแต่พบว่ามีสีแดง และลักษณะของโคโลนีแตกต่างกัน ส่วนลักษณะและสีของโคโลนีที่แยกได้จากข่อย ส้มโอ และฝรั่งนั้นแต่ละชนิดมีลักษณะและสีของโคโลนีเหมือนกัน เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่ได้กล่าวมาแล้ว พบว่าลักษณะของโคโลนีของเชื้อมีความแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืชอาศัย และพืชชนิดเดียวก็พบความหลากหลายของลักษณะโคโลนี แต่เนื่องจากลักษณะโคโลนีนั้นไม่คงที่สามารถเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์และคณะ (2551) ได้ทำการศึกษาไว้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ กานต์ คำทรัพย์ (2546) พบว่าสีของโคโลนีนั้นมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งน่าจะใช้แยกความแตกต่างของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ได้ และผลการศึกษาลักษณะและขนาดของโคโคนี้เดียว พบว่าโคโคนี้เดียวของเชื้อที่แยกได้จากงุ่นและพืชชนิดต่างๆ มีขนาดและรูปร่างค่อนข้างแตกต่างกัน โคโคนี้เดียวที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะใสไม่มีสี เซลล์เดี่ยว รูปร่างทรงกระบอก หรือบางไอโซเลตค่อนข้างกลม หัวท้ายมน และในโคโคนี้เดียวที่แก่เต็มที่จะพบวงกลมใส (guttule) อยู่ที่บริเวณหัวและท้ายเซลล์ และยังพบเชื้อบางไอโซเลตไม่สร้างโคโคนี้เดียว จึงทำการชักนำให้สร้างโคโคนี้เดียว โดยใช้น้ำเป็นตัวกระตุ้น พบว่าโคโคนี้เดียวที่เจริญโดยวิธีการกระตุ้นด้วยน้ำมี 2 ลักษณะคือ ใส เซลล์เดี่ยว หัวมนท้ายมน และอีก

ลักษณะคือ โคนิเดียที่ลักษณะคล้ายยีสต์ (Yeast form) แต่พบลักษณะของโคนิเดียที่แตกต่างกันชัดเจนจากพืชชนิดอื่นคือ โคนิเดียของเชื้อ ที่แยกได้จากหญ้ายางมีลักษณะค่อนข้างกลมและพบวงกลมใส 2 อันอยู่ภายในเซลล์และโคนิเดียมีขนาดใหญ่กว่าโคนิเดียของเชื้อ *Sphaceloma* ในพืชชนิดอื่น และโคนิเดียของเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากขงโคมีขนาดเล็ก มีขนาดของโคนิเดียมีขนาดอยู่ในช่วง $1.72 - 4.19 \times 3.35 - 7.24$ ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าที่ขนิษฐา มากรุง (2548) รายงานไว้คือ เท่ากับ $2.17 - 3.35 \times 5.24 - 6.83$ ไมโครเมตร และโคนิเดียของเชื้อที่แยกได้จากหญ้ายางไอโซเลต ESS_PPR_S มีขนาดใหญ่ที่สุด เท่ากับ $4.19 \pm 0.11 \times 7.24 \pm 0.15$ ไมโครเมตร รองลงมาคือโคนิเดียที่แยกได้จากส้มโอ มีขนาดเฉลี่ย เท่ากับ $2.40 \pm 0.13 \times 4.99 \pm 0.15$ ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าในรายงานของ กรรณิการ์ เพี้ยนพักตร์ (2547) มีขนาดเท่ากับ $5.2 - 8.5 \times 9 - 13.5$ ไมโครเมตร และโคนิเดียของเชื้อที่แยกได้จากขงโคไอโซเลต CCS204 มีขนาดเล็กที่สุด เท่ากับ $1.72 \pm 0.10 \times 3.35 \pm 0.13$ ไมโครเมตร

3. ความสามารถในการสร้างสปอร์ แต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการสร้างสปอร์แตกต่างกัน ไอโซเลตที่สามารถสร้างสปอร์บนอาหาร PDA ได้มีจำนวน 15 ไอโซเลต ซึ่งส่วนใหญ่เป็นไอโซเลตของเชื้อ *Sphaceloma* ออ่ง สำหรับไอโซเลตที่เหลือไม่สามารถสร้างสปอร์บนอาหาร PDA ได้ จึงทำการกระตุ้นการสร้างสปอร์ โดยใช้น้ำเป็นตัวชักนำให้เชื้อมีการสร้างสปอร์ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าเชื้อไอโซเลตที่สามารถสร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้มากกว่าเชื้อที่ สร้างสปอร์โดยวิธีการกระตุ้นด้วยน้ำ โดยความสามารถในการสร้างสปอร์นั้นไม่ขึ้นอยู่กับชนิดเชื้อ *Sphaceloma* ที่มีพืชอาศัยแตกต่างกัน เห็นได้จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหารชนิดเดียวกัน และมีวิธีการแยกเชื้อและบ่มเชื้อในสภาพที่ควบคุมแสง ความชื้นและอุณหภูมิเหมือนกันทุกไอโซเลต แต่พบว่าเชื้อที่สร้างสปอร์ส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากอองุ่น เนื่องจากเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้มาจากอองุ่นมีจำนวนมากที่สุด

4. การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์เพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ ITS1-5.8S - ITS2 rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ITS4 และ ITS5 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อที่แยกได้จากอองุ่นได้ เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 648 bp ได้แก่ ไอโซเลต GMei1 Nk 4-1 GSH และ BR8851 กลุ่มที่ 2 ไอโซเลตที่มีจำนวนดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 608 และ 648 bp ได้แก่ Cb 1 - 1 และ GPTY_F_R4 ซึ่งเหมือนกับหญ้ายางไอโซเลต ESS_PPR_S และ ขงโคไอโซเลต CCS_SW2 กลุ่มที่ 3 แถบดีเอ็นเอมีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 1,374 bp ได้แก่ ไอโซเลต Pr 4-1 และขงโค ไอโซเลต CCS_SW กลุ่มที่ 4 คือไอโซเลต Rc 5 - 1 ไม่พบ แถบดีเอ็นเอ ซึ่งเหมือนกับไอโซเลตของ ส้มโอ และฝรั่ง กลุ่มที่ 5 มีแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ 608 คือไอโซเลตจากหญ้ายางไอโซเลต ESS_PPR_S ซึ่งเหมือนไอโซเลตจากข่อย และกลุ่มสุดท้ายมีแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาดเท่ากับ 608 และ 1,374 bp คือ ไอโซเลตจากขงโค และเมื่อเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว

พบว่า สีของโคโลนีเหมือนโคโลนีของเชื้อในอู่น และมิขนาดโคนีเดียใกล้เคียงกัน จึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อที่เข้าทำลายอาจเป็น *Sphaceloma* ตัวเดียวกับที่เข้าทำลายอู่น และเชื้อที่แยกได้จากข่อย พบขนาดดีเอ็นเอ เท่ากับ 608 และ 648 bp ซึ่งเหมือนกับเชื้อที่แยกได้จากอู่นบางไอโซเลต และเมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า สีของโคโลนี และขนาดของโคนีเดียต่างกัน จึงอาจสรุปได้ว่าเชื้อที่เข้าทำลายข่อย อาจเป็นเชื้อ *Sphaceloma* คนละตัวกับที่เข้าทำลายอู่น และไอโซเลตจากฝรั่งไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ อาจเกิดจากการที่สกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณ ดีเอ็นเอน้อยมาก หรือขั้นตอนในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไม่เหมาะสมกับเชื้อที่แยกได้จากฝรั่ง ดังนั้นการศึกษาขนาดของ DNA โดยใช้ไพรเมอร์เพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยเทคนิค PCR เป็นวิธีการที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของเชื้อ *Sphaceloma* ในกลุ่มของหญ้ายาง ชงโค และฝรั่งได้ แต่อาจใช้แยกเชื้อ *Sphaceloma* จากข่อยและส้มโอได้ยาก จากผลการทดลองของ Alvarez E. (2003) ซึ่งได้ใช้ ITS 4 และ ITS5 แยกความแตกต่างของ *Sphaceloma manihoticola* สาเหตุโรค superreelongation ในมันสำปะหลังให้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 545 bp ซึ่งมีขนาดแตกต่างกับขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถแยกได้ ดังนั้นการใช้ primer ITS4 และ ITS5 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อที่แยกได้จากอู่น และหญ้ายางได้ และจากการศึกษาของ มนัสวี ฉายผาด (2548) ได้ศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในส่วนของ ITS-5.8S-ITS2 Region โดยใช้ ไพรเมอร์ ITS4 และ ITS5 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hae III และ Msp I พบว่าสามารถจำแนกเชื้อรา *Fusarium* ได้ 3 กลุ่ม ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ วราภรณ์ สุทธิสา (2553) ซึ่งได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Fusarium* ด้วยเทคนิค ARDRA โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS-5.8S-ITS2 Region rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าไพรเมอร์ทั้งคู่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *Fusarium solani* สาเหตุหลักของโรครากเน่าจาก *Fusarium* spp. อื่นได้

5. จากผลการศึกษาโดยใช้ primer ITS4 และITS5 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ MspI และ HhaI พบว่า ให้ผลแตกต่างกับการใช้เทคนิค PCR ในการจัดกลุ่ม โดยเชื้อไอโซเลต GSH ที่เคยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ GMei1 Nk 4-1 และ BR8851 เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้จำนวนแถบดีเอ็นเอแตกต่างออกไป แต่พบว่าให้แถบดีเอ็นเอเหมือนกับอู่น ไอโซเลต Cb 1 – 1 และ ไอโซเลตจากข่อย ส่วนอู่นไอโซเลต GMei1 และ Nk 4-1 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับอู่นไอโซเลต GPTY_F_R4 และไอโซเลตจากส้มโอ สำหรับไอโซเลต ESS และ ESS_PPR_S ที่ได้จากหญ้ายาง ไม่พบ แถบดีเอ็นเอ และไอโซเลต CCS_SW CCS และ CCS204 จากชงโค ให้แถบแตกต่างจากอู่นและพืชชนิดอื่นอย่างชัดเจน และไอโซเลตจากฝรั่งไม่พบแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากปริมาณ PCR product ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR มีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ นอกจากนี้เชื้อที่แยกได้จากส้ม

โอให้แถบดีเอ็นเอ เหมือนกับของบางไอโซเลต ดังที่กล่าวข้างต้นผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอโดยเทคนิค ARDRA ให้ผลการศึกษาแตกต่างจากการใช้เทคนิค PCR และหากต้องการผลการศึกษาที่แม่นยำยิ่งขึ้น จะต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษา และหากพบว่าเชื้อที่แยกได้ให้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากันเป็นจำนวนมากที่สุด และเป็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากของเป็นส่วนใหญ่ จึงจะสามารถสรุปได้ว่า เชื้อที่เข้าทำลายนั้นเป็นเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* ส่วนไอโซเลตที่พบรูปแบบดีเอ็นเอต่างออกไป อาจเป็น *Sphaceloma* ที่มาจากพืชอาศัยชนิดอื่น

6. การศึกษาความแตกต่างของความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนองุ่นและพืชชนิดอื่น ๆ จากการทดสอบความสามารถในการทำให้องุ่นเกิดโรคของเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากพืชชนิดอื่น ๆ ซึ่งได้คัดเลือกตัวแทนของเชื้อจากความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจำนวน 22 ไอโซเลต จากการทดสอบการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากองุ่น ลงบนพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ชงโค ข่อย หน้อย่าง ส้มโอ และองุ่น พบว่าเชื้อจากองุ่นจำนวน 4 ไอโซเลตไม่สามารถก่อให้เกิดโรคบนใบองุ่นได้เช่นเดียวกับ เชื้อที่แยกได้จากข่อย และหน้อย่างบางไอโซเลตไม่สามารถก่อให้เกิดโรคกับองุ่นได้ และผลการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากข่อยลงบนองุ่นและพืชชนิดต่าง ๆ พบว่า เชื้อจากข่อย สามารถก่อให้เกิดโรคกับองุ่น และชงโคได้ แต่ไม่สามารถก่อโรคกับหน้อย่าง ส้มโอ และฝรั่ง ผลการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากชงโค ลงบนองุ่นและพืชชนิดต่าง ๆ พบว่า เชื้อที่สามารถแยกได้จากชงโค สามารถก่อให้เกิดโรคกับองุ่น หน้อย่าง และส้มโอ แต่ไม่สามารถก่อโรคในฝรั่ง และข่อย การปลูกเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากส้มโอ พบว่า เชื้อสามารถก่อให้เกิดโรคได้กับองุ่นเท่านั้น และปลูกเชื้อ *Sphaceloma* spp. ที่แยกได้จากหน้อย่าง ลงบนองุ่นและพืชชนิดต่าง ๆ พบว่า เชื้อที่สามารถแยกได้จากหน้อย่าง สามารถก่อให้เกิดโรคกับองุ่น ชงโค และข่อยได้ แต่ไม่สามารถก่อโรคในฝรั่ง และส้มโอ ซึ่งในการทดลองของ Alvarez E., (2003) พบว่าเชื้อ *Sphaceloma* จากหน้อย่างสามารถเข้าทำลาย มันสำปะหลังได้ ดังนั้นจากการผลการทดลองปลูกเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ ลงในองุ่น และการปลูกเชื้อ *Sphaceloma* ที่แยกได้จากองุ่นลงพืชทดสอบ สรุปได้ว่า เชื้อที่แยกได้จากพืชชนิดต่าง ๆ สามารถเข้าทำลายองุ่นได้ จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อ *Sphaceloma* ที่พบในองุ่น ไม่ใช่เชื้อ *Sphaceloma ampelinum* ทั้งหมด และเชื้อที่ทำให้เกิดโรคสแคบในพืชชนิดอื่น อาจเป็นเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* ได้เช่นกัน

รายการอ้างอิง

- กนิษฐ หนูเทพ, สุนทร เสียงชอบ, ทรงพันธ์ กุลคิดกรัตน์. (2545). การทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชเบลคัท® (iminotadine tris[albesilate]) 40% WP ในการป้องกันกำจัดโรคสแคบ. [ออนไลน์]. <http://plantpro.doae.go.th/disease-research>
- กานต์ คำทรัพย์. (2546). ชีววิทยา ความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และการควบคุมโดยใช้สารเคมี ของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 134 หน้า.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. (2533). โรคเชื้อราขององุ่นที่พบใหม่. *หนังสือพิมพ์กสิกร*. 63(5): 444 – 447.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. (2536). โรคสแคบขององุ่น. *วารสารวิชาการเกษตร*. 11(2): 66 – 72.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. (2537). อีบุบไม้ไข่เตาเผา. *หนังสือพิมพ์กสิกร*. 67(2): 124 – 126.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอภิรชน์ สมฤทธิ์. (2541). มะม่วงกับโรคสแคบ. *วารสารเกษตรเกษตร*. 22(10): 101 – 104.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอภิรชน์ สมฤทธิ์. (2544). การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคสแคบของฝรั่งในประเทศไทย. *ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา*. 11(3): 2 – 13.
- กรรณิการ์ เพียนภักตร์, อภิรชน์ สมฤทธิ์ และชนิดย์ ปล่องบรรจง. (2545). การแยกเชื้อราโรคสแคบจากพืชต่าง ๆ ในประเทศไทย. *ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา*. 12(1): 14 – 20
- ขนิษฐา มากรุ่ง. (2548). การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 77 หน้า.
- ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. (2547). ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของสารพิษสกัดหยาบของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร บางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42*. 18 – 27.

- เดือนใจ กาหลง, สุชาติ วิจิตรานนท์ และแสงมณี ชิงดวง. (2545). **โรคไม้ผล**. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. 119 หน้า.
- นันทกร บุญเกิด. (2545). **คู่มือการสร้างสวนองุ่น**. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยี การเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 122 หน้า.
- นิพนธ์ วิสารทนนท์. (2542). **โรคองุ่น**. เอกสารการเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตรหมอฟืช – ไม้ผล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 45 หน้า.
- ประสาทพร สมิตะมาน. (2537). **โรคพืชวิทยา**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่. 338 หน้า.
- ไพโรจน์ จั้วพานิช. (2525). **หลักวิชาโรคพืช**. บริษัทสารมวลชน จำกัด. กรุงเทพฯ. 393 หน้า.
- วัฒนา สวรรยาธิปิติ. (2531). **การปลูกองุ่น**. โครงการคู่มือประกอบอาชีพสำหรับประชาชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 42 หน้า.
- วราภรณ์ สุทธิสา. (2553). การศึกษาการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Fusarium* species กับโรครากเน่าของหม่อนและการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรค. **วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช**. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 120 หน้า.
- วิชญ์ อุทโยภาส. (2536). **การปลูกองุ่น**. กรมส่งเสริมการเกษตร. 38 หน้า.
- มนัสวี ฉายผาด. (2548). การพัฒนาทางชีวโมเลกุลเพื่อป้องกัน race ของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช**. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 65 หน้า.
- อังสนา อัครพิศาล, ถัดดาวัลย์ ผดุงโอบฐ และ Kazuya Akimitsu. (2548). การต้านทานของ *Sphaceloma rosarum*. ต่อการเบนดาซิมในแปลงปลูกกุหลาบ. **การประชุมวิชาการอารักขาพืชครั้งที่ 7**. หน้า 1050 – 1057.
- Alvarez, E. and Molina, M.L. (2000). Characterizing the *Sphaceloma* fungus, causal agent of superelongation disease in cassava. **Plant Dis.** 84(4): 423 – 428
- Algerico, M. (1998). **Problems and subjects of performance decline of sweetpotato in the Philippines**. Philippine Root Crop Research and Training Center : 70 – 80.
- Alvarez, E., Mejia, J.F. and Valle, T.L. (2003). Molecular and pathogenicity characterization of *Sphaceloma manihoticola* isolates form South – Central Brazil. **Plant Dis.** 87: 1322 – 1328.

- Alvarez, E., Mejia, J.F. and Losada T. (2003). Pathogenic and molecular characterization of Brazilian isolates of *Sphaceloma manihoticola*. [online]. <http://apsjournals.apsnet.org>
- Burnett H. (1974) Avocado scab. **Florida Department of Agriculture and Consumer Services Plant Pathology Circular** 141: pp 2.
- Brook P.J. (1973). Epidemiology of grapevine anthracnose, caused by *Elsinoe ampelina*. **New Zealand Journal of Agricultural Research** 16. 333 – 342.
- Burkholder, W. (1917). The histology of lesion development in raspberry canes infected by *Elsinoe veneta*. **Annals of Applied Biology** 114(1): 35 – 44.
- Dewdney, M.M. and Timmer, L.W. (2010). Florida citrus pest management guide citrus scab. **University of Florida IFAS Extension**: pp 146.
- Emechebe, A.M. (1980). Scab disease of cowpea (*Vigna unguiculata*) caused by *Sphaceloma* a species of the fungus. **Annals of Applied Biology** 96(1): 11 – 16.
- Gable, A.W. and Tiffany, L.H. (1987). Host parasite relation and development of *Elsinoe panici*. **Mycologia** 79: 734 – 774.
- Hyun, J.W., Timmer, L.W., Lee, S.H., Yun, S.H., Ko, S.W., and Kim, K.S. (2001). Pathological characterization and molecular analysis of *Elsinoe* isolates causing scab diseases of citrus in Jeju Island in Korea. **Plant Dis.** 85: 1013 – 1017.
- Jenkins, A.E. (1933). A *Sphaceloma* attacking navel orange from Brazil. **Phytopathology** 23: 538 – 545.
- Jenkins, A.E. and Mcwhorter, FP. (1938). Addition records of rose anthracnose in the United States. **Phytopathology** 28: 360 – 362.
- Kudela, V. and Krejza, V. (2006). First report of anthracnose of common snowberry caused by *Sphaceloma symphoricarpi* in the Czech Republic. **Plant Protect. Sci.**, 42: 139 – 146.
- Magarey, R.D., Emmett, R.W. and Roberts, G.S.. (2006). Residues of fungicide applied for control of grapevine anthracnose caused by *Sphaceloma ampelinum* in budburst to flowering spray program. **Australasian Plant Pathology** 24(3): 209 – 214.
- Nayga, J. and R. M. Gapasin. (1986). Effects of stem and foliage scab disease on the growth and yield of VSP-1 sweetpotato variety. **Ann.Trop. Res.** 8: 115-122.

- Poolsawat, O., Tharapreuksapong, A., Jenweerawat, S., Wongkeaw, S. and Thipayapong, P. (2008). Diversity of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. **Proceeding of International Workshop on Tropical and Subtropical Fruit**. 345 – 353.
- Ramsav M.D., Vawdrey LL. and Hardy J. (2000). Scab (*Sphaceloma batatas*) a new disease of sweet potatoes in Australia: fungicide and cultivar evaluation. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 28(1): 137 – 141.
- Shear, C.L., (1929). The life history of *Sphaceloma ampelina*. de Bary and *Gloeosporium ampelophagum* Sac. **Phytopathology**, 19(7) : 673 – 679.
- Singh, R.S. (2000). Diseases of fruit crop. **Plant Pathology Department, G. B. Pant University, Pantnagar, India**. pp 130.
- Sutton, B.C. and Pollack, F.G. (1973). *Gloeosporium cercocarpi* and *Sphaceloma cercocarpi*. **Mycologia** 65: 1125 – 1134.
- Thind, S.K., Monga, P.K., Kaur, N., Arora, P.K. and Kamur, H. (1997) Evaluation of promising grape varieties against anthracnose and its fungicide control. **Plant Diseases Research**, 12(1): 99 – 100.
- Timmer, L.W. and Chung, K.R., (2008). **Florida citrus pest management guide: Citrus Scab**. University of Florida IFAS Extension : 146 – 150.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: InnesMA, GelfandDH, SninskyJJ, WhiteTJ. (eds). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego, CA, USA, Academic Press. pp 315–322.
- Whiteside, J.O. (1975). Biological characteristics of *Elsinoe fawcetti* pertaining to the epidemiology of sour orange scab. **Phytopathology** 65: 1170 – 1175.
- Zeigler, R. S., Alvarez, E., and Lozano, J. C. (1983). Characteristics of cassava resistance to superelongation disease (*Elsinoe brasiliensis*). **Trop. Pest Manage.** 29: 148-150.



ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

1.1 Water Agar (WA)

วุ้นผง (Agar)	18	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ผสมวุ้นผงกับน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง นำไปต้มจนรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะ เพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 – 20 นาที

1.2 Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose หรือ Glucose	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	18	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ล้างทำความสะอาดหัวมันฝรั่ง ปอกเปลือกออกแล้วหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำกลั่นหรือน้ำกรองปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำสกัด นำมาผสมกับ dextrose และวุ้นผง ต้มต่อจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะ เพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 – 20 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของเชื้อ *Spaceloma* spp.

2.1 Lysis buffer

400 mM Tris-base (M.W. = 121.14) (pH 8.0)

60 mM EDTA (M.W. = 372.24) (pH 8.0)

150 mM NaCl (M.W. = 58.44)

2.2 Extraction Buffer

400 mM Tris-base (M.W. = 121.14) (pH 8.0)

200 mM EDTA (M.W. = 372.24) (pH 8.0)

1.42 mM NaCl (M.W. = 58.44)

2% (w/v) CTAB

1% PVP – 40

2.3 Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1 v/v) (100 ml)

Chloroform	96	ml
Isoamyl alcohol	4	ml

2.4 70% ethanol

2.5 TE buffer

10 mM Tris-base (M.W. = 121.1) (pH 8.0)

1 mM EDTA (M.W. = 372.24) (pH 8.0)

2.6 1X TBE buffer

89 mM Tris-base (M.W. = 121.1) (pH 8.0)

89 mM boric acid (M.W. = 61.83)

2 mM EDTA (M.W. = 372.24) (pH 8.0)

2.7 Restriction enzyme

1. MspI (5'...C[^]CGG...3')

(3'...GGC[^]C...5')

2. HhaI (5'...GCG[^]C...3')

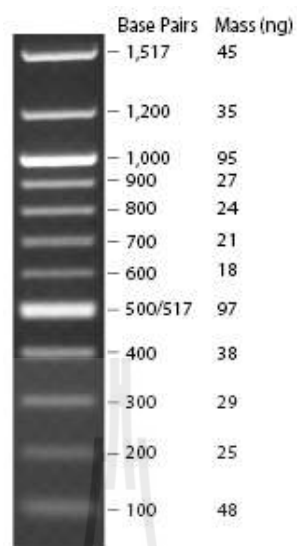
(3'...C[^]GCG...5')

2.8 Ethidium bromide (10 mg/ml)

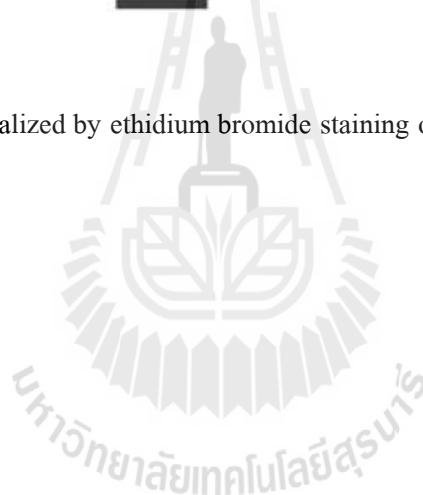
ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บรรจุในขวดที่ห่อด้วย Aluminium foil

ข้อควรระวัง เนื่องจาก ethidium bromide มีคุณสมบัติเป็น strong mutagen จึงควรใช้ความระมัดระวังในการเตรียม ควรสวมถุงมือ และระวังไม่สูดดมผง ethidium bromide ในระหว่างการชั่ง

3. DNA size marker



100 bp DNA Ladder visualized by ethidium bromide staining on a 1.3% TAE agarose gel. Mass values are for 0.5 µg/lane



ประวัติผู้เขียน

นางสาวมธุกร สมพงษ์ เกิดวันที่ 14 ตุลาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และในปีการศึกษา 2549 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และสำเร็จการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2554 สถานที่ติดต่อได้สะดวก บ้านเลขที่ 148 หมู่ 5 ตำบลเสม็ด อำเภอสูงเนิน จังหวัดนครราชสีมา 30170

