รุ่งทิพย์ สังข์เผือก : การศึกษาชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง
(IDENTIFICATION OF CASSAVA ANTHRACNOSE CAUSAL FUNGI)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ, 127 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิด และพัฒนาวิธีการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมันสำปะหลัง ทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกใน 10 อำเภอ ของ 8 จังหวัด นำมาแยกเชื้อบนอาหาร Water agar (WA) และ Half potato dextrose agar (HPDA) จากนั้นแยกเชื้อจากสปอร์เดี่ยวนำมาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา โดยวิธีพื้นฐาน และศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนดีเอนเอของเชื้อที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ด้วย *universal primers* ITS3 และ ITS4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genebank ผลการศึกษาพบว่าจากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 38ไอโซเลต สามารถแบ่งได้ตามลักษณะของสีโคโลนีเป็น 5 กลุ่ม โดยเชื้อจำนวน 34 ไอโซเลต อยู่ในกลุ่มเจริญเติบโตเร็วและ 4 ไอโซเลต อยู่ในกลุ่มเจริญเติบโตช้า เชื้อส่วนใหญ่ (35 ไอโซเลต) ไม่สร้าง setae ขณะที่มีเพียง 3 ไอโซเลต คือ SRTLF01 SLC032 และ KBSF02 ที่สร้าง setae การตรวจดูลักษณะโคนีเดียด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สร้างโคนีเดียรูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) ขณะที่มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ SRTLF01 จากสุราษฎร์ธานี ที่สร้างโคนีเดียรูปเสี้ยวพระจันทร์ (falcate) การทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคพบว่า เชื้อทั้ง 38 ไอโซเลต สามารถก่อโรคได้ทั้งกับใบมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และผลพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮอต แต่ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอนเอ โดยวิธี PCR พบว่า เชื้อเกือบทุกไอโซเลตให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ขนาด 450 bp เท่ากับขนาดที่ได้จากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) จากพริกที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ยกเว้นไอโซเลต SLC032 SRTLF01 NKSTKBS02 NKSTKBS05 NKSTKLS02 NKSTFBS01 และKBSF01 ที่ได้ชิ้นส่วนดีเอนเอขนาดประมาณ 490 bp เท่ากับชิ้นส่วนที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อ *C. capsici* (CC) จากพริกที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อนำชิ้น ส่วนดีเอนเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันกับเชื้อ *C. gloeosporioides* แต่มี 1 ไอโซเลตที่คล้ายกับเชื้อ *C. capsici* (*truncatum*) และ 1 ไอโซเลต คล้ายกับเชื้อ *C. lindemuthianum* การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอนเอด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ *primers* 3 ชนิด พบว่า เฉพาะ *primer* OPA13 เท่านั้นที่ให้ผลวิเคราะห์สอดคล้องกับการใช้วิธีอื่น ๆ ในการระบุชนิด เมื่อสรุปผลการวิเคราะห์จากทุกวิธีร่วมกัน พบว่า เชื้อที่แยกได้จากมันสำปะหลัง 38 ไอโซเลตเป็นเชื้อในกลุ่ม *C. gloeosporioides* ที่มีอัตราการเจริญเร็ว 34 ไอโซเลต ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามขนาด

ของโคนีเดียได้เป็นชนิดย่อย (sub species) *manihotis* จำนวน 2 ไอโซเลต *aeschynomene* จำนวน 4 ไอโซเลต และ *boninense* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่เหลือเป็นเชื้อ *C. capsici* (*truncatum*) จำนวน 1 ไอโซเลต *C. lindemuthianum* จำนวน 1 ไอโซเลต และ 4 ไอโซเลต มีลักษณะเหมือนกับ *C. gloeosporioides* แต่มีอัตราการเจริญช้า ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดย่อยได้ การศึกษา absorbance profile ของเชื้อโดยวิธี FTIR microscopy เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบชนิดพบว่าให้รูปแบบที่มีความเหมือนในระดับ 92-100% เมื่อใช้ตัวอย่างเดิมในการวิเคราะห์ แต่เมื่อใช้ตัวอย่างของเชื้อที่ระบุว่าเป็นเชื้อเดียวกันที่ผ่านการระบุชนิดโดยวิธีอื่นมาทำการวิเคราะห์ พบว่า ให้รูปแบบที่มีความเหมือนในระดับ 64-76% เท่านั้น การศึกษาพบเชื้อ *C. capsici* (*truncatum*) และ *C. lindemuthianum* ในครั้งนี้นับเป็นการรายงานครั้งแรกของการพบในมันสำปะหลัง ขณะที่การพบชนิดย่อย *aeschynomene* และ *boninense* นับเป็นข้อมูลเพิ่มเติมจากเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

RUNGTHIP SANGPUEAK: IDENTIFICATION OF CASSAVA ANTHRACNOSE CAUSAL FUNGI. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. NATTHIYA BUENSANTEAI, Ph.D., 127 PP.

Colltotrichum sp./ANTHRACNOSE/CASSAVA

The objectives of this study was to identify the cassava anthracnose causal fungi. The study was carried out by collecting cassava samples with anthracnose symptoms from various planting areas covering those in 10 districts of 8 provinces in Thailand. The causal fungi were subsequently isolated from the diseased materials using water agar (WA) and half potato dextrose agar (HPDA). After obtaining single-spore isolates, the fungi were subjected to a standard morphological study protocol. Their molecular biological characters were studied by comparing their nucleotide sequences of the PCR amplified DNAs, using the universal ITS3 and ITS4 as primers, with those in the Genebank. From the 38 isolates obtained, they could be divided into 5 groups according to the colony colors and 2 groups according to their growth rates of which 34 isolates were fast growing, while the other 4 were slow growing. Thirty five isolates out of 38 did not produce setae except SRTLF01, SLC032, and KBSF02 that did. By microscopic examination, most isolates produced cylindrical conidia except SRTLF01 from Surathani that produced falcate conidia. From pathological test, all 38 isolates could cause anthracnose symptoms on inoculated Kasetsart 50 cassava leaves and Super Hot chili fruits but the disease severities were different depending on the isolates. With the PCR, DNAs of most isolates gave the amplified DNAs that were 450 bps in size which was the same as that of reference chili *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) obtained from Kasetsart University (KU), except the isolates

SLC032, SRTLF01, NKSTKBS02, NKSTKBS05, NKSTKLS02, NKSTFBS01 and KBSF01 that gave 490 bp DNAs comparable to that obtained from reference chili *C. capsici* (CC) from KU. After being analyzed, sequences of the amplified DNAs of most isolates had a very high similarity to that of CG, except one that was similar to that of CC and *C. lindemuthianum* (CL). By using 3 primers to amplify the DNAs from the 38 isolates and 2 reference isolates using the random amplified polymerase polymorphism (RAPD) technique, only the OPA13 primer was effective in differentiating the isolates and had an agreeable result with that identified by other techniques. When results from all techniques were combined and co-analyzed, it could be concluded that from the 38 isolates obtained, 32 were fast growing CG which could be subdivided, according to the conidial size, to 2 *manihotis*, 4 *aeschynomene* and 4 *boninense* subspecies, 1 isolate was identified as CC and 1 isolate as CL. The remaining 4 isolates shared high similarity to CG but were slow growing. By studying the absorbance profiles of the fungal cultured mycelia from FTIR microscopy and used as identification character, 92-100% similarity was obtained when the same culture samples were repeatedly analyzed, but only 64-76% similarity was observed when the cultures of the same fungal species, identified by other methods, were used. The finding that CC and CL could infect cassava in this study can be claimed as the first report and the finding of *aechynomene* and *boninense* subspecies should add more information on subspecies of CG that can attack cassava in Thailand.

School of Crop Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2014 Advisor's Signature_____