รหัสโครงการ SUT3-302-62-12-05

รายงานการวิจัย

การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS) ระยะที่ 2

(Study genetic of the causal agents of cassava root rot disease using Next Generation Sequencing (NGS) phase 2)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-302-62-12-05

รายงานการวิจัย

การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS) ระยะที่ 2

(Study genetic of the causal agents of cassava root rot disease using Next Generation Sequencing (NGS) phase 2)

หัวหน้าโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อันได้แก่

ดร.สิทธิโชค ตั้งภัสสรเรือง ดร. ปิยะพร พันธุ์ศักดิ์ ดร.สุพัชรี ศิริวงศ์ และ นางสาวรุ่งทิพย์ สังข์เผือก ผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่คอยดูแล ให้คำแนะนำ ตรวจสอบ และติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ ส่งผลให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณกิตติมา ชาญกิจโกศล เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาชิน และคุณณัฐพล ประเสริฐเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ

ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

โรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการเพาะปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังที่พบในพื้นที่ปลูกสำคัญ และศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันในสำปะหลังด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS) โดยทำการเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากแหล่งปลูกใน 4 อำเภอ ได่แก่ อำเภอเมืองนครราชสีมา เสิงสาง ครบุรี จังหวัดนครราชสีมา และอำเภอศรีมหาโพธิ จังหวัดปราจีนบุรี จำนวน 150 ตัวอย่าง จากนั้นนำเชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการศึกษาพบว่า โรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังถูกเข้าทำลายจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ที่อยู่ในวงศ์ Botryosphaeriaceae ซึ่งเชื้อราสกุลนี้เมื่อเข้าทำลายมันสำปะหลังจะมีอาการ เน่าเละ มีสีน้ำตาลไปจนถึงสีดำ ในบริเวณหัวและโคนต้น จากนั้นแยกเชื้อจากสปอร์เดี่ยวนำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่า เชื้อราทั้ง 96 ไอโซเลต สามารถก่อให้เกิดโรคกับท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 (พันธุ์อ่อนแอ) โดยไอโซเลต SSBR301-2, SSNM05, SSBR1403-4, HT901-1, SSBR1403-1, HT401-2, HT701-1, HT401-1, SS-R4.1, SSBR701-4, SSBR301-3, HT703-3, SSBR1402-5, SS-S4.56, SP-S1.2, SS-R3.14, SS-S3.39, SS-S3.32.1, SP601-1, SSNM46 และ SS-R3.18 สามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด นอกจากนี้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเติบโตเร็ว และสามารถเจริญได้เต็มจานอาหาร PDA ภายใน 1-3 วันหลังจากเลี้ยงเชื้อ ซึ่งไอโซเลตที่เจริญเติบโตเร็วสุด ได้แก่ ไอโซเลต L12SHRD และ ไอโซเลต SP-R1.44 สามารถเจริญบนจานอาหาร PDA โดยมีขนาดเฉลี่ย 83.00×83.00 มิลลิเมตร หลังวางเชื้อ 1 วัน ส่วนไอโซเลตที่เจริญช้าสุด ได้แก่ ไอโซเลต SP-R1.38 ไอโซเลต HT902-2 และ ไอโซเลต SS-S4.54 สามารถเจริญบนจานอาหาร โดยมีขนาดเฉลี่ย 43.00x43.00 มิลลิเมตร หลังวางเชื้อ 1 วัน โดยเชื้อราแต่ละไอโซเลตจะเจริญเต็มจานอาหาร PDA ในวันที่ 3 หลังจากวางเชื้อ นอกจากนี้การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล โดยการทำ map ลำดับเบสเข้ากับจีโนมอ้างอิงของเชื้อรา *L. theobromae* ที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง จากการตรวจสอบทั้งหมด 96 ไอโซเลต พบว่าแต่ละไอโซเลทมี read ที่สามารถ map กับจีโนมอ้างอิงได้ 3.83-29.35 % จำนวน 18 ไอโซเลท มีไอโซเลทที่มี read ที่สามารถ map ได้ 39.74-64.04 % จำนวน 16 ไอโซเลต และมีไอโซเลทที่ read สามารถ map ได้ตั้งแต่ 72.25-86.39 % จำนวน 62 ไอโซเลต ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลร่วมกัน พบว่าสามารถยืนยันว่าเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าที่เข้าทำลายมันสำปะหลังในประเทศไทย เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae*

Abstract

Root rot disease is an important disease of cassava cultivation in Thailand. The objectives of this study were to identify the causal agent of root rot disease and to study the genetic of the causal agents of root rot diseases using Next Generation Sequencing (NGS) technique. The study was carried out by collecting a total of 150 diseased cassava isolates with various root rot symptoms from cassava growing areas covering those in 4 districts including Mueang Nakhon Ratchasima, Soeng Sang, khon Buri district of Nakhon Ratchasima province and Si Maha Phot district of Prachinburi province in Thailand. Then, the causal fungal pathogen was studied on morphological characteristics. The result found that root rot disease in cassava infected by *Lasiodiplodia* spp. in the family of Botryosphaeriaceae this of the fungal pathogen after infected cassava could cause soft rot symptoms, and brown to black necrosis to the cassava tubers and stem. The pathogenicity test of all 96 single-spore isolates showed that they could cause stem and root black rot symptoms on the inoculated susceptible cassava cv. CMR 89, and the disease severities were different depending on the fungal isolates. The result found the isolate SSBR301-2, SSNM05, SSBR1403-4, HT901-1, SSBR1403-1, HT401-2, HT701-1, HT401-1, SS-R4.1, SSBR701-4, SSBR301-3, HT703-3, SSBR1402-5, SS-S4.56, SP-S1.2, SS-R3.14, SS-S3.39, SS-S3.32.1, SP601-1, SSNM46 and SS-R3.18 were the most virulent. Moreover, the study on morphological characteristics of isolate fungal pathogen. The result found that isolate L12SHRD and SP-R1.44 have highest mycelium growth in PDA by 83.00x83.00 mm at 1 day after culture on plate, and lowest are isolate HT902-2 and SS-S4.54 at 43.00x43.00 mm. However, each isolated fungal pathogen is growing faster in PDA medium at 3 days after culture on plate. Nevertheless, identification of cassava root rot disease caused by *L. theobromae* found that 96 isolates can read map with genome referent at 3.83–29.35 %, 18 isolates at 39.74–64.04 %, 16 isolates and 72.25–86.39 %, 62 isolates. The results of the study of morphological characteristics and biomolecules confirm that the causal agent of the cassava root rot disease in Thailand is *L. theobromae*.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 วิธีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา 5
2.2 วิธีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล 6
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย 9
3.1 สำรวจและเก็บรวบรวมมันสำปะหลังที่แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากพื้นที่ปลูกสำคัญ 9
3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรค 9
3.3 การเจริญเติบโตของโคโลนี 10
3.4 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล 11

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย 13

4.1 สำรวจและเก็บรวบรวมมันสำปะหลังที่แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากพื้นที่ปลูกสำคัญ 13

4.2 แยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคโคนเน่าและหัวเน่า 14

4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่า 17

4.4 ทดสอบความสามารถในการก่อโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อ (pathogenicity and virulently test) ในสภาพห้องปฏิบัติการ 26

4.5 การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล 30

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 38

รายการอ้างอิง 40

ภาคผนวก 46

ประวัติผู้เขียน 49

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 เชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่าที่เก็บได้จากจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง 14

4.2 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อายุ 1 2 และ 3 วัน 19

4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการบนท่อนมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 26

4. 4 ชื่อตัวอย่างและ DNA barcode ที่ใช้ในการทำห้องสมุด 31

4.5 แสดงจำนวนชิ้นของลำดับเบสที่อ่านได้ (Number of reads) และเปอร์เซ็นต์การ map ในราแต่ละตัวอย่าง 33

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

4.1 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังในแปลง มีอาการต้นโทรม ต้นเหี่ยว และเนื้อเยื่อบริเวณหัวมันเปื่อยยุ่ย สภาพแปลงในอำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา 13

4.2 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง (A-B) หัวมันมีอาการเน่าเนื้อเยื่อบริเวณหัวมันเปื่อยยุ่ย เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง น้ำตาล และดำ (C) โคนต้นใต้ดินเน่า (D) บริเวณขั้วของเชื้อรากมีอาการเน่าดำ (E) บริเวณใต้เปลือกท่อนพันธุ์พบเนื้อเยื่อตายเป็นสีดำ 14

4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ทั้ง 4 กลุ่ม (A) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ เส้นใยขนาดเล็ก ฟู บริเวณปลายเส้นใยมีการรวมกลุ่มของเส้นใยเป็นกระจุกสีขาว (B) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเทาปนเขียวมะกอก เส้นใยขนาดเล็ก ฟู (C) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำเส้นใยขนาดเล็ก (D) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำปนเทา เส้นใยมีขนาดเล็ก และฟู 18

4.4 แสดงลักษณะสปอร์ หรือ conidia ของเชื้อราที่แยกได้จากต้นและรากของมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่า (A-B) conidia ของ *Lasiodiplodia* spp. 19

4.5 ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 15 วัน ในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น ถูกทำลายเปลี่ยนเป็นสีดำ เทา และน้ำตาล แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต (A) ไอโซเลต HT401-1 ความรุนแรงระดับ 5 (B) ไอโซเลต SP202-2 ความรุนแรงระดับ 4 และ (C) ไอโซเลต SS-R3.1 ความรุนแรงระดับ 3 (D) ไอโซเลต SS-S3.38 ความรุนแรงระดับ 2 (E) ไอโซเลต SP-R1.30 ความรุนแรงระดับ 1 30

4.6 Phylogenetic tree ของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง (*Lasiodiplodia theobromae*) กลุ่มที่อยู่ในกรอบสีแดงคือกลุ่มที่เปอร์เซ็นต์ map ต่ำกว่า 70% และตัวอย่างที่อยู่ในกรอบสีส้มคือกลุ่มที่เปอร์เซ็นต์ map อยู่ที่ 70% - 80% 35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.7 Phylogenetic tree ที่สร้างโดยตัดตัวอย่างที่มี %map น้อยกว่า 70% ออก และรวมไปถึงตัวอย่าง LD_13 และ LD_36 ที่มีจำนวน reads ตั้งต้นน้อยทำให้ SNPs หายไปเป็นจำนวนมาก Phylogenetic tree ที่นำมาแสดงนี้ใช้การกรอง SNPs ด้วย condition: Sample missing per SNP site less than or equal to 30%, minimum depth 10, minor allele frequency at least 5%, number of alleles is 2. ได้ค่า log likelihood -9296.26 ตัวเลขที่กระจายอยู่ตรงจุดที่กิ่งแตกแขนงคือค่า bootstrap ที่บอกความมั่นใจของการจับกลุ่มนั้นๆ..... 37

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) มีชื่อสามัญเรียกชื่อตามท้องถิ่นได้แก่ มันสำปะหลัง, cassava, yuca, mandioa, manioc, tapioca (ยุกติ สาริกะภูติ, 2526) ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังมากที่สุดในโลก ในรูปของมันอัดเม็ด ส่งออกไปประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส) จีน เกาหลีใต้และญี่ปุ่น สำหรับแป้งมันสำปะหลังจะส่งออกไปที่ประเทศญี่ปุ่น จีน รองลงมาคือฮ่องกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์และไต้หวัน ส่วนการใช้มันสำปะหลังในประเทศใช้ทำมันเส้นและมันอัดเม็ดร้อยละ 45 - 50 ใช้แปรรูปเป็นแป้งร้อยละ 50 - 55 (จักรพงษ์ ชาตะรักษ์, 2554) ปัจจุบันการปลูกมันสำปะหลังเริ่มประสบปัญหาเรื่องแมลง ศัตรูพืชและโรคพืช โดยแมลงศัตรูมันสำปะหลัง ได้แก่ เพลี้ยแป้ง ไรแดง เป็นต้น สำหรับโรคมันสำปะหลังที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown leaf spot) โรคใบไหม้ (Cassava bacterial blight, CBB) โรคแอนแทรคโนส (Cassava anthracnose disease, CAD) (รังสี เจริญสถาพร และอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว, 2553) และโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตของเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังโดยตรง คือ โรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลัง (Root rot disease) สำหรับในประเทศไทยมีการเรียกชื่อโรคหลากหลายชื่อ อาทิ โรคหัวมันสำปะหลังเน่า (เคหะการเกษตรออนไลน์, ม.ป.ป.) โรคโคนเน่ามันสำปะหลัง (วิศรุต เศรษฐชุ่ม, 2557) โรคลำต้นเน่า (เกษตรกรง่ายๆ ดอทคอม, 2557) โรครากและหัวเน่ามันสำปะหลัง (ชาติชาย ศิริพัฒน์, 2557) โรครากหรือหัวเน่า (ครอ็พมาสเตอร์ เกษตรปลอดสาร, 2551) เนื่องจากมีการเรียกชื่อที่หลากหลายก่อให้เกิดความสับสน ดังนั้นในการวิจัยนี้จะเรียกชื่อที่มี ความสัมพันธ์กับลักษณะอาการที่พบคือชื่อ “โรคโคนเน่าและหัวเน่ามันในสำปะหลัง” ในปี 2557 พบการระบาดของโรคนี้ในหลายพื้นที่ ในเขตพื้นที่ อ.เสิงสาง และ อ.ครบุรี และพื้นที่อื่นของจังหวัดนครราชสีมา มากกว่า 4,000 ไร่ โดยเฉพาะในแหล่งดินระบายน้ำยาก และฝนตกชุกเกินไปในบางพื้นที่สามารถพบได้ในแหล่งที่ดินมีการให้น้ำในระบบน้ำหยด เนื่องจากดินมีความชื้นสูง ลักษณะอาการของโรคที่พบ ยอดจะเหลืองและใบเหี่ยวแล้วร่วงเมื่อถอนต้นจะพบโคนต้นบวมและแตก รากจะเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลและเน่า ถ้าเกิดกับหัวจะทำให้หัวเน่าอย่างรวดเร็ว และมีกลิ่นเหม็น เชื้อสาเหตุของโรคนี้มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีในดิน และมีพืชอาศัยมากชนิดทำให้ยากต่อการป้องกันกำจัด โรคนี้สามารถเกิดได้ทั้งระยะกล้าและระยะที่มันสำปะหลังลงหัวแล้ว มีรายงานว่าโรคโคนเน่าและหัวเน่าเกิดจากสาเหตุหลายชนิด ปัจจุบันในประเทศไทยตรวจพบว่าเชื้อสาเหตุ คือ เชื้อรา *Phytophthora* หากโรคดังกล่าวนี้ระบาดรุนแรงอาจทำความเสียหายกับผลผลิตมันสำปะหลังถึง 80 เปอร์เซ็นต์ โรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังต่างประเทศมี 2 ลักษณะอาการหลักคืออาการของโรคที่เป็นชนิด wet root rot และ dry root rot ซึ่งมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *Botryodiplodia theobromae, Fusarium* sp., *Sclerotium rolfsii* และ *Pythium* sp. (Banito et al.,2010; Blanco-Ulate et al., 2013; Adhikri et al., 2013; Rujirawat et al., 2015) ในประเทศไทยได้มีการรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ต่อมามีรายงานเพิ่มเติมว่าเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus* (Fomes) *lignosus* และ *S. rolfsii* (รังษี เจริญสถาพร และ อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว, 2553)

ปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกและระบุชนิดของเชื้อ โดยเทคโนโลยีเอ็นจีเอสหรือ Next Generation Sequencing ถือเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีความแม่นยำสูงในการจัดลำดับเบสทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการหาลำดับเบสแบบขนานที่ทำได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะได้ข้อมูลลำดับเบสจำนวนมหาศาล ปัจจุบันเครื่องมือของเทคโนโลยีเอ็นจีเอส มีสามรูปแบบหลักที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ 454/Roche, Illumina, และ SOLiD/Life Technology (ABI) โดยเครื่องมือต่าง ๆ เหล่านี้มีหลักการหาลำดับเบสรูปแบบของข้อมูลลำดับเบสสายสั้น (reads) และจำนวนของข้อมูล reads ที่ออกมาแตกต่างกันไป รวมถึงประโยชน์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโอมิกส์ได้หลากหลายเช่น การทำ De novo sequencing, target resequencing, RNA sequencing และ metagenomics เป็นต้น (อลิษา วิลันโท และคณะ, 2555; ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, 2556) ทั้งนี้ในทางด้านโรคพืชมีการนำเทคโนโลยีเอ็นจีเอส (Next Generation Sequencing technology) ในการศึกษา complex microbial population (reviewed by van Dijk et al., 2014) microbial ecology (Haas et al., 2009) และมีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ใน การวินิจฉัยด้านโรคพืชและโรคชนิดใหม่ที่พบ (Adams et al., 2009; Adamsa et al., 2013; Ma et al., 2014; Lecuit and Eloit, 2014) เพื่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับการเข้าทำลายพืชของเชื้อสาเหตุโรคชนิด complex pathogens อย่างไรก็ตาม ข้อมูลด้านนี้ยังมีการศึกษาไม่แพร่หลาย (Ma et al., 2010; Amselem et al., 2011) ทั้งนี้การศึกษาการเรียงลำดับเบสที่ได้จากเทคโนโลยีเอ็นจีเอสเพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของลำดับเบสที่เกิดขึ้นและนำไปสู่การตอบโจทย์ในงานวิจัยด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดต่อไป ดังนั้นเพื่อค้นหาแนวทางในการแก้ปัญหาอย่างถูกต้อง จำเป็นต้องมีข้อมูลของชนิดเชื้อที่ก่อโรคแต่ละประเภทที่แน่ชัด เพื่อหาแนวทางในการป้องกันและจัดการกับเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างเหมาะสม และมีประสิทธิภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังที่พบในพื้นที่ปลูกสำคัญ
2. ศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันในสำปะหลังด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุโรค ลักษณะอาการ การแพร่ระบาดของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังสำคัญ และศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันในสำปะหลังด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS) ในโครงการนี้จะเน้นการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคเน่าดำของมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นโรคหนึ่งที่มีความสำคัญในกลุ่มโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันในสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลสำเร็จที่เป็นองค์ความรู้หรือรูปแบบ หรือวิธีการที่จะนำไปสู่การวิจัย อาจจะถูกนำไปต่อยอดการวิจัยต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์ในด้าน ด้านวิชาการ

ผู้ที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผู้ใช้	การใช้ประโยชน์
บริษัทซีเอส ทาปีโอก้า วิจัยและนวัตกรรม จำกัด	สามารถใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดโรคมันสำปะหลังในระบบการปลูกมันสำปะหลังอินทรีย์ในอนาคตอันใกล้นี้
เกษตรกรที่ประกอบอาชีพปลูกมันสำปะหลัง	ทราบถึงสาเหตุของเชื้อก่อโรคโคนเน่าหัวเน่าและการป้องกันกำจัด
หน่วยงานภาครัฐ	ทราบถึงชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าหัวเน่ามันสำปะหลังและ วิธีการป้องกันกำจัด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) มีถิ่นกำเนิดในแถบที่ลุ่มเขตร้อน (Lowland tropics) มีการเพาะปลูกในประเทศ โคลัมเบีย และเวเนซูเอลา มานานกว่า 3,000 - 7,000 ปี ปัจจุบันมันสำปะหลังถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลกรองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2550) ซึ่งผลผลิตมันสำปะหลังส่วนใหญ่กว่าร้อยละ 80 ใช้บริโภคเป็นอาหารและร้อยละ 20 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ ในด้านการค้าจะอยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์แปรรูปขั้นพื้นฐาน ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง มันเส้น หรือมันอัดเม็ด (สุดใจ สูนาสวน และคณะ, 2554) ในประเทศไทยมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอันดับที่ 3 ของประเทศรองจาก ข้าวและยางพารา (ไพบูลย์ ฟูวัฒนศิลป์, 2551) โดยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังมากที่สุด รองลงมาคือ ภาคกลางและภาคเหนือ แหล่งผลิตมันสำปะหลังที่สำคัญ 5 อันดับแรก ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ กำแพงเพชร กาญจนบุรีและอุบลราชธานี) มีมูลค่าการส่งออก พ.ศ. 2560 กว่า 85,278 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ในปี 2561 มีผลผลิตมันออกสู่ตลาด ประมาณ 7,721 ล้านตัน เป็นมูลค่า 592,178 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร , 2561; สมาคมโรงงานผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังไทย, 2561)

ปัจจุบันการปลูกมันสำปะหลังเริ่มประสบปัญหาเรื่องแมลงศัตรูพืชและโรคพืช ได้แก่ เพลี้ยแป้ง ไรแดง โรคใบจุด โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบไหม้ โรคแอนแทรคโนส เป็นต้น ในปัจจุบันโรคมันสำปะหลังที่สำคัญและสร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตของเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังโดยตรง คือ โรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง (สุดใจ สูนาสวน และคณะ, 2554) เป็นโรคที่มีความสำคัญโรคหนึ่งของผู้ปลูกมันสำปะหลังทั่วโลก โรคโคนเน่าและหัวเน่าเกิดจากสาเหตุหลายชนิด ปัจจุบันในประเทศไทยตรวจพบว่าเชื้อสาเหตุ คือ เชื้อรา *Phytophthora* sp. อย่างไรก็ตามในต่างประเทศมีรายงานว่าโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลัง (Cassava root rot disease: CRRD) เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Phytophthora* spp., *Scytalidium* spp., *B.theobromae*, *Armillaria mellea*, *S. rolfsii*, *Nattrassia mangiferae*, *Diplodia* sp. และ *Fusarium* spp. (Okechukwu et al., 2009; Msikita et al., 1998, 2005; Onyeka et al., 2002, 2004) โดยในประเทศบราซิลมี รายงานว่า โรคโคนเน่าและหัวเน่าเละมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *P.drechsleri* และโรคโคนเน่าและหัวเน่าแห้งมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. สำหรับในประเทศแอฟริกามีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *B. theobromae*, *N. mangiferae* และ *Fusarium* spp. (Msikita et al., 1998, 2005; Onyeka et al., 2004) ในประเทศไนจีเรีย มีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *B. theobromae* สร้างความเสียหายมากกว่า 70% ของพื้นที่ (Onyeka, 2002) นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. (Bandyopadhyay et al., 2006) เป็นอีกสาเหตุของโรคโคนเน่าและหัวเน่าเช่นกัน โรคนี้สร้างความเสียหายต่อผลผลิตมันสำปะหลังเป็นอันดับต้น ๆ ในทวีปแอฟริกาและอเมริกาใต้ ในทวีปแอฟริกาและอเมริกาใต้ โรคนี้ทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังลดลงถึง 80% ของผลผลิตรวม (Msikita et al., 2005) ในประเทศไนจีเรียและแคมมารูน ผลผลิตมันสำปะหลังลดลงมากกว่า 25% เมื่อถูกโรคนี้เข้าทำลาย โดยจะพบการแพร่ระบาดในช่วงฤดูฝน

บริเวณที่ดินระบายน้ำไม่ดี ลักษณะอาการหลักที่พบส่วนใหญ่ที่พบจะมีกลิ่นเหม็น ถ้าเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. เนื้อเยื่อจะมีสีชมพูหรือสีเหลือง แต่ถ้าเกิดจากเชื้อรา *B. theobromae* เนื้อเยื่อจะมีสีเทาดำ ในบางอาการจะพบเส้นใย sclerotia หรือ pycnidia บริเวณรอบโคนต้น (Bandyopadhyay et al., 2006) ในประเทศไทยเริ่มพบการระบาดของโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังในเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและหลายพื้นที่ปลูกสำคัญโดยพบลักษณะอาการ 4 ลักษณะของโรคคือ โรคโคนเน่าและหัวเน่าเละเกิดจากเชื้อรา ต้นเหี่ยวเฉา ใบล่างๆ มีสีเหลือง และเหี่ยวแห้งหลุดร่วงลงมาส่วนใบยอดมีขนาดเล็ก ต้นแคระแกรน ไม่เจริญเติบโต เมื่อขุดรากดูพบรากเน่าเละสีน้ำตาล มีกลิ่นเหม็น โรคโคนเน่าและหัวเน่าแห้งเกิดจากเชื้อเห็ดรา ที่หัวมันสำปะหลังจะมีเส้นใยของเชื้อราปกคลุมอาจพบบริเวณโคนต้นด้วย เนื้อในหัวจะเน่าแห้งและเส้นใยของเชื้อราจะก่อตัวเป็นดอกเห็ดสีต่าง ๆ ได้เช่น สีขาว สีเหลือง หรือส้ม นอกจากนี้โคนต้นจะบวม เนื่องจากมีการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาทดแทนส่วนที่ถูกทำลายไปและอาจเกิดรากใหม่ตรงบริเวณเนื้อเยื่อที่บวม ทำให้เกิดหัวมันสำปะหลังใหม่ขึ้นมาแต่มีขนาดเล็ก โรคโคนเน่าและหัวเน่าดำ เกิดจากเชื้อราจะมีลักษณะหัวเน่าสีดำหรือสีน้ำตาลเข้มเนื่องจากเป็นสีที่เกิดจากเส้นใยของเชื้อรา หรือส่วนขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราโรคเน่าคอดิน เกิดจากเชื้อรา มักพบอาการในต้นกล้าลักษณะต้นมันสำปะหลังจะเหี่ยวเฉาตายและมีเม็ดผักกาดพร้อมกับเส้นใยสีขาวปกคลุม ส่วนของโคนต้นที่ติดอยู่กับผิวดิน (สันติ พรมคำ, ม.ม.ป.) โรคโคนเน่าและหัวเน่าสามารถทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังสูญเสียโดยตรง โดยเฉพาะในแหล่งที่ดินระบายน้ำได้ยากฝนตกชุกเกินไป โรคนี้สามารถเกิดได้ทั้งระยะต้นกล้าและระยะที่ลงหัวแล้ว โรคนี้อาจทำความเสียหายถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (ยุกติ สาริกะภูติ, 2526) ถ้าเกิดกับกล้ามันสำปะหลังจะแสดง อาการรากเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลและเน่าต้นจะเหี่ยวเฉา หากเกิดกับหัวจะสังเกตเห็นอาการหัวเน่าอย่างรวดเร็วและมีกลิ่นเหม็นใบเหี่ยวแล้วร่วงหากมีอาการรุนแรงมันสำปะหลังจะยืนต้นตาย และจะพบเส้นใยสีขาวของเชื้อรารวมกัน คล้ายเส้นด้ายปกคลุมบริเวณหัวและบริเวณโคนต้นมันสำปะหลังส่งผลให้เนื้อภายในหัวเน่าแห้งมีกลิ่นคล้ายมันสำปะหลังเน่าที่เราคุ้นเคยและได้กลิ่นจากลานมันฯ หรือโรงงานอุตสาหกรรมมันสำปะหลังใบเหี่ยวอาจถึงตายได้ แต่ส่วนใหญ่จะยังไม่ตายและจะสร้างรากใหม่ที่โคนต้นในดินเหนือบริเวณหัวที่เน่าในดินที่แห้งหัวที่เน่าจะเป็นสีดำ (mummified) บางครั้งมีเห็ด (*Armillariwlla mellea* Vahl.) ขึ้นอยู่ที่โคนต้นแต่เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าสามารถพบในพืชอาศัยหลายชนิด อีกทั้งในปัจจุบันมีการระบาดของโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง อย่างรุนแรง และมีลักษณะอาการที่หลากหลายรวมทั้งยังไม่มีการจัดจำแนกชนิด และสปีชีส์ของเชื้อสาเหตุโรคอย่างชัดเจนในมันสำปะหลัง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคสามารถทำได้หลายวิธีทั้งด้วยวิธีการพื้นฐานทางสัณฐานวิทยา วิธีทางชีวโมเลกุล และวิธีทางชีวเคมีดังนี้

1. วิธีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สีของโคโลนี ขนาด และรูปร่างของโคนีเดีย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ลักษณะของเส้นใย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (Smith and Black .,1990) ปัจจุบันมีการพบเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีพืชอาศัยกว้างและยังมีเชื้อราอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้หรือจัดจำแนกได้แต่ไม่ชัดเจน (Cano et al.,

2004) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการหาวิธีอื่นมาช่วยในการจัดจำแนกและศึกษาความหลากหลายของเชื้อร่วมกับวิธีศึกษาทางสัณฐานวิทยา โดยวิธีที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบันมีอยู่หลายเทคนิค เช่น เทคโนโลยีด้านชีวโมเลกุลและชีวเคมีเพื่อให้การศึกษามีความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น

2. วิธีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล ปัจจุบันมีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุลโดยการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA sequence) ซึ่งดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครโมโซมอยู่ใน nucleus ของเซลล์โดยทำหน้าที่ส่งผ่านข้อมูลทางพันธุกรรม มีองค์ประกอบทางเคมีเฉพาะตัวและโครงสร้างโมเลกุลเป็นสายคู่ (double helix) ในแต่ละสายของ DNA เกิดจากการเรียงตัวของ nucleotide โดยการเรียงตัวของ nucleotide ในแต่ละสายของ DNA จะต่อกันด้วยพันธะ phosphodiester bond ซึ่งเกิดจากการต่อระหว่าง phosphate ที่ carbon ตำแหน่ง 5´ ของ nucleotide กับหมู่ OH ของ carbon ตำแหน่ง 3´ ของ nucleotide ซึ่งเป็น complementary ซึ่งกันและกันมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) จากความสัมพันธ์ดังกล่าว เมื่อทราบลำดับ nucleotide เพียงสายใดสายหนึ่งก็จะสามารถบอกลำดับ nucleotide ที่เป็นคู่ complementary กันได้เช่นกัน หลักการถอดรหัสพันธุกรรมจะอาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction, PCR) ร่วมกับการใช้ primer หรือ dNTPs ที่ถูก labelled ด้วยสาร fluorescent เพื่อความสะดวกต่อการอ่านผลด้วยเครื่อง automated DNA sequencer ผลลัพธ์ที่ได้คือสาย DNA ที่มีขนาดสั้นยาวแตกต่างกันเมื่อนำสาย DNA เหล่านี้ไปแยกขนาดในสนามกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer จะได้รูปแบบของสาย DNA ที่มีการเรียงลำดับตามขนาด ความยาวของ DNA fragment ซึ่งมีความสัมพันธ์กับรหัสพันธุกรรมบนสาย DNA โดยสายรหัสพันธุกรรม DNA เหล่านี้ อาจจะเป็นส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีน (gene) หรือเป็นส่วนที่ไม่ได้กำหนดการสร้างโปรตีนก็ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน DNA ที่นำมาหาลำดับ nucleotide ถ้าหากชิ้นส่วน DNA เป็น genomic DNA ก็จะพบส่วนของ exon และ intron ได้แต่ถ้าหากนำเอา RNA หรือ cDNA มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ก็จะพบเฉพาะส่วนของ exon เท่านั้นซึ่งประกอบด้วยรหัสพันธุกรรม (genetic code) ที่กำหนดการสร้างกรดอะมิโนโดยทั่วไปข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจะถูกนำไปเก็บไว้ที่ฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่เรียกว่า GenBank (http://www.ncbi.nlm. nih.gov) ซึ่งเป็นข้อมูลสาธารณะที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีการถอดรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อราเพื่อศึกษาถึงชนิดและความหลากหลายจำนวนมาก ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีด้านชีวโมเลกุลและชีวเคมีมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกระบุชนิดและตรวจสอบจุลินทรีย์เชื้อสาเหตุโรคพืชอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเทคนิคนี้มีความรวดเร็วแม่นยำ มีความจำเพาะเจาะจงสูงและมีราคาไม่แพง จึงมีการนำเทคนิคต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCR เป็นกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วน DNA ในหลอดทดลองโดยอาศัย DNA polymerases ในการทำปฏิกิริยาร่วมกับการใช้ primer ที่จำเพาะ ขบวนการนี้เลียนแบบขบวนการสังเคราะห์ DNA ในสิ่งมีชีวิต เทคนิค PCR พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะ นักชีวเคมีของบริษัท Cetus Corporation (มาลินี อัศวดิษฐเลิศ, 2553) เพื่อใช้ในการจำแนก specific DNA sequence ในสารละลายที่มีกลุ่มของ sequence DNA เป็นจำนวนมากปะปนกันอยู่แล้วเพิ่ม

ปริมาณส่วน targeted sequence ขึ้นมาเป็นล้านเท่าโดยผ่านวิธีกึ่งอัตโนมัติซึ่งใช้เวลาเพียง 1 หรือ 2 ชั่วโมงเท่านั้น จุดเด่นของเทคนิค PCR คือสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อย รวดเร็ว แม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงสูง ในปัจจุบัน PCR ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ซึ่งสำหรับงานตรวจจำแนกดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณ DNA งานด้านการโคลนนิ่ง (gene cloning) การทำแผนที่ยีน (gene mapping) การทำพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในทางการเกษตร PCR ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ และการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของโรคพืชโดยสามารถใช้ตรวจหา DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยในพืชได้ และยังเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำเฉพาะเจาะจงและมีความไว ในประเทศเวียดนามมีการศึกษาลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *B.theobromae* สาเหตุโรคในยางพาราจำนวน 20 ไอโซเลตโดยใช้ universal primers ITS (5’- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) และ ITS4 (5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) (Nghia et al., 2012) และมีการใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ ISSR Marker เพื่อหาความหลากหลายของเชื้อ *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* สาเหตุโรค dieback ในโกโก้จำนวน 117 ไอโซเลต โดยใช้ Universal primer: ITS ในการหาความแตกต่างของลำดับเบส พบว่าส่วนใหญ่สามารถจำแนกได้เชื้อ *Fusarium* sp. หลาย species ได้แก่ *F. chlamydosporum*, *F. solani*, *F. oxysporum* และ *F. proliferatum*. และพบว่าเป็นเชื้อรา *Lasiodiplodia* ได้แก่ *L. Pseudotheobromae* หรือ *L. Theobromae* (Acheampong and Archer, 2011) เทคโนโลยีเอ็นจีเอส เป็นเทคโนโลยีการหาลำดับเบสที่พัฒนาขึ้นใหม่มีความสามารถในการเรียงลำดับเบสจำนวนมากในการทำงานของเครื่องเพียงครั้งเดียวโดยสามารถใช้หาลำดับเบสของจีโนมซึ่งมีความยาว 3 พันล้านเบส การหาลำดับเบสเอ็กโซม (Exome Sequencing) ซึ่งมีความยาว 50 ล้านเบสหรือการหาลำดับเบสของบริเวณเฉพาะของจีโนมหลาย ๆ บริเวณหรือยีนหลายยีนที่สนใจ (Panel or targeted sequencing) จากหลายตัวอย่างที่มีความยาวรวมกันเป็นล้านเบสได้ โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาลำดับเบสทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการหาลำดับเบสแบบขนานที่ทำได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพซึ่งจะได้ข้อมูลลำดับเบสจำนวนมหาศาล ปัจจุบันเครื่องมือของเทคโนโลยีเอ็นจีเอสสมีสามรูปแบบหลักที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ 454/Roche, Illumina และ SOLiD/Life Technology (ABI) โดยเครื่องมือต่าง ๆ เหล่านี้มีหลักการหาลำดับเบสรูปแบบของข้อมูลลำดับเบสสายสั้น (reads) และจำนวนของข้อมูล reads ที่ออกมาแตกต่างกันไป รวมถึงประโยชน์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโอมิกส์ได้หลากหลายเช่นการทำ de novo sequencing, target re-sequencing, RNA sequencing และ metagenomics เป็นต้น ปัจจุบันการศึกษาหาลำดับเบสทั้งหมดของสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA sequence) ถือได้ว่าเป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในการศึกษาทางด้านจีโนมิกส์ (Genomics) ซึ่งก็คือการศึกษาจีโนม (genome) ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั่นเอง (อลิษา วิลันโท และคณะ, 2555) ทั้งนี้ในทางด้านโรคพืชมีการนำเทคโนโลยีเอ็นจีเอส ในการศึกษา complex microbial population (reviewed by van Dijk et al., 2014) microbial ecologyและ มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการวินิจฉัยด้านโรคพืชและโรคชนิดใหม่ที่พบ (Adams et al., 2009, Adamsa et al., 2013) เพื่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับการเข้าทำลายพืชของเชื้อสาเหตุโรคชนิด complex pathogens อย่างไรก็ตามข้อมูลด้านนี้ยังมีการศึกษาไม่แพร่หลาย (Adams et al., 2009, Adamsa

et al., 2013) ทั้งนี้การศึกษาการเรียงลำดับเบสที่ได้จากเทคโนโลยีเอ็นจีเอส เพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของลำดับเบสที่เกิดขึ้นและนำไปสู่การตอบโจทย์ในงานวิจัยด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดต่อไป ดังนั้นเพื่อค้นหาแนวทางในการแก้ปัญหาอย่างถูกต้องจำเป็นต้องมีข้อมูลของชนิดเชื้อที่ก่อโรคแต่ละประเภทที่แน่ชัด เพื่อหาแนวทางในการป้องกันและจัดการกับเชื้อสาเหตุโรคอย่างเหมาะสม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สำรวจและเก็บรวบรวมมันสำปะหลังที่แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากพื้นที่ปลูกสำคัญ

สำรวจพื้นที่ปลูกที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ อำเภอเมืองนครราชสีมา เสิงสาง ครบุรี จังหวัดนครราชสีมา และอำเภอศรีมหาโพธิ จังหวัดปราจีนบุรี ทำการประเมินเฉพาะ Disease incidence (อัตราการ แพร่ระบาด เปอร์เซ็นต์ต้นที่เป็นโรค) โดยดูจากอาการเป็นหลัก (เน่าเละ/ เน่าแห้ง/ ลำต้น, ราก, โคน และหัว) และยังไม่ต้องระบุชนิด จากนั้นเก็บตัวอย่างโคนต้น, ราก, หัว และดิน (บางตัวอย่าง) รอบต้นที่เป็นโรค และจากต้นข้างเคียง

3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรค

3.2.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยวิธี tissue transplanting

นำตัวอย่างบริเวณ ดิน ลำต้น โคน รากและหัวมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่าที่เก็บได้ในข้อที่ 3.1 มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Tissue transplanting บนอาหาร water agar (WA) และอาหาร potato dextrose agar (PDA) สำหรับแยกเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. (Cilliers et al., 1994) โดยทำความสะอาดตัวอย่างมันสำปะหลังที่เก็บมาด้วยน้ำสบู่หรือน้ำเปล่าให้สะอาด เช็ดให้แห้งใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดบริเวณเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นส่วนต่อระหว่างเนื้อเยื่อดีกับส่วนที่เป็นโรค จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl 1% เป็นเวลา 1–2 นาที ขึ้นอยู่กับขนาดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อใช้ปากคีบ คีบย้ายชิ้นใบมันสำปะหลังมาล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลาประมาณ 1 นาที ซับชิ้นส่วนด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเขี่ยชิ้นใบมันสำปะหลังวางบนอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วันหลัง จากนั้นย้ายเส้นใยที่เจริญ ออกมารอบๆ เนื้อเยื่อพืชไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าสร้างสปอร์ (ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553; Azad et al., 2011)

3.2.2 การแยกสปอร์เดี่ยว (Single spore) ของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

นำเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่า ที่แยกด้วยวิธี Tissue transplanting ในข้อที่ 3.1.2 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ ทำการแยกให้ได้สปอร์เดี่ยว (Single spore) โดยนำสปอร์ของเชื้อราที่ได้มาผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ วัดความเข้มข้นของสปอร์ด้วย Hematocytometer ให้ได้ความเข้มข้น 10^4-10^5 โคนีเดียต่อมิลลิลิตร นำสารแขวนลอยเชื้อ Spread plate ด้วยแท่งแก้วรูปตัว L ลงบนอาหาร WA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 24 – 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการย้ายโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหาร PDA ให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป (ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์,2553)

3.2.3 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรค (Pathogenicity and virulence test) ในสภาพห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำเตรียมท่อนพันธุ์มัน/หัวสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ คือ พันธุ์ CMR 89 โดยเตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังความยาว 20 เซนติเมตร ต่อท่อน นำมาล้างด้วยน้ำเปล่า ผึ่งให้แห้ง จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย NaOCl 1% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างน้ำเปล่านึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นานครั้งละ 1 นาที ผึ่งให้แห้ง ทำแผลโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณกึ่งกลางของหัวมันสำปะหลังให้ลึก 5 มิลลิเมตร โดยเจาะ 1 แผลต่อหัว จากนั้นนำเชื้อราจากข้อ 3.2เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา วางลงบนบริเวณแผลที่ทำการเจาะไว้ 1 ชิ้นวุ้นต่อหัว เก็บในสภาพกล่องชื้น (moist chamber) (Machado, 2012) ทำการให้ความชื้นเพื่อให้สภาพเหมาะสมต่อการเกิดโรค เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลการเกิดโรควันแรกที่มันสำปะหลังแสดงอาการของโรค เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลการเกิดโรคโดยประเมินความรุนแรง ให้โดยให้คะแนน 1 – 5 คะแนนดัดแปลงจาก Wokocha et al. (2010) ดังนี้ 1 = พืชไม่แสดงอาการ, 2 = เกิดแผลน้อยกว่า 25% บริเวณโคนต้นและหัวมันสำปะหลัง, 3 = เกิดแผล 25-50% บริเวณโคนต้นและหัวมันสำปะหลัง, 4 = เกิดแผล50 -75% บริเวณโคนต้นและหัวมันสำปะหลัง, 5 = เกิดแผลมากกว่า 75% บริเวณโคนต้นและหัวมันสำปะหลัง

3.2.4 การเก็บ Stock เชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

นำเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคและการทดสอบความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคได้มาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนแขวนลอยสปอร์ ดูดใส่หลอด Micro centrifuge tube ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาทีเทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหาร PDB ที่มีส่วนผสมของ 100 เปอร์เซ็นต์ Glycerol ในอัตราส่วน 1:1 ละลายตะกอนสปอร์ด้วย Vortex mixer แล้วเก็บไว้ที่ตู้ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสตามวิธีของ Huertas-Gonzalez et. al. (1999) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองระยะยาวต่อไป

3.2.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

นำเชื้อที่แยกได้จากโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราและผ่านการทดสอบว่ามีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงแต่ละไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังต่อไปนี้

3.3 การเจริญเติบโตของโคโลนี

เลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตบนอาหาร PDA ไอโซเลตละ 4 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่อายุ 3, 5 และ 7 วัน บนอาหาร PDA วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยทำการทดลอง 3ซ้ำ/ไอโซเลต (ขนิษฐา มากรุง, 2548)

3.4 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล

3.4.1 การสกัด genomic DNA ของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

สกัด genomic DNA ของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังที่ผ่านการจัดกลุ่ม ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โคโลนี โคนิเดีย การก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของโรคในมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 โดยดัดแปลงวิธีการของ มธุกร สมพงษ์ (2553) โดยใช้เส้นใยของเชื้อที่เจริญบน PDA ไปบดเป็นผงในไนโตรเจนเหลว โดยใช้โกร่งบดที่เย็นจัด ตักเส้นใยที่บดละเอียดแล้วด้วยช้อนตักสารที่แช่ไนโตรเจนเหลวใส่ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับผงเส้นใย จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนชิ้นส่วนเซลล์ออกจากส่วนที่เป็นของเหลว นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปใส่ในหลอด Eppendorf หลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอนสู่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอน DNA ออกด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้งให้เหลือ เฉพาะ DNA ติดอยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นทิ้งให้แห้งโดยวางคว่ำลงบนกระดาษกรอง 15 นาทีก่อนนำไปทำให้แห้งในสภาพ สุญญากาศนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ DNA ที่ได้ใน TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดความเข้มข้นของDNA ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer ปรับให้ได้ความเข้มข้นของ DNA 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

3.4.2 การสร้างห้องสมุดสำหรับการทำ sequencing ของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

นำ genomic DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ *Lasiodiplodia theobromae* ปริมาณ 300 ng ปริมาตร 14 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง มาทำการตัดชิ้นส่วน DNA ด้วย enzyme ประกอบด้วย fragmentation enzyme 4 µl และ fragmentation buffer 2 µl บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 นาที และนำเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ต่อมาทำการเติม TE buffer 31 µl และทำการเลือกขนาดของชิ้น DNA ที่ยาวประมาณ 300-500 bp ด้วย DNA clean bead 40 µl แล้วจึงต่อลำดับเบสสายสั้นหรือ DNA barcode เข้าไปที่ชิ้นส่วน DNA ที่เลือกไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส 30 นาที เมื่อครบเวลาจึงเติม TE buffer 20 µl ลงไปแล้วทำความสะอาดชิ้น DNA ด้วย DNA clean bead เมื่อได้ชิ้น DNA ที่ต่อกับ DNA barcode เรียบร้อยแล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธี PCR และทำการตรวจวัดคุณภาพดีเอนเอด้วยเครื่อง Bio analyzer การต่อ DNA barcode ทำให้สามารถระบุตัวอย่างแต่ละตัวในห้องสมุด

3.4.3 การทำ sequencing ด้วยเครื่อง MGI sequencer

ทำการแยก DNA สายคู่ (double-stranded DNA) จากการทำ DNA libraries ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว(single-stranded DNA) ด้วยวิธี DNA nanoball จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์แบบ

2x150 PE ด้วยเครื่อง MGI sequencer (MGI Tech, Australia) ทำการ load ห้องสมุด DNA ทั้งสิ้น 1 lane จะได้ read ในลักษณะ pair-ends ข้างละ 147 bp

3.4.4 การ mapping ลำดับเบสเข้ากับจีโนมอ้างอิงของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

จากการทำ sequencing ด้วยเครื่อง MGI sequencer จะได้ read จำนวนมากจากทั่วทั้งจีโนมของตัวอย่างเชื้อรา ซึ่ง read ดังกล่าวจะถูก mapping เข้ากับจีโนมอ้างอิงซึ่งได้มาจากฐานข้อมูลงานวิจัยสาธารณะ (NCBI) ด้วยโปรแกรม BWA (Li H. and Durbin R., 2009) algorithm MEM (Li H., 2013) และใช้ค่าพารามิเตอร์ตั้งต้น (http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml) ผลที่ได้จากการ map จะถูกนำไปวิเคราะห์เพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างต่อไป

3.4.5 การค้นหาเครื่องหมายลำดับโมเลกุล (SNP calling) ของตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

นำผลที่ได้จากการ mapping มาวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลด้วยโปรแกรม GATK (Broad Institute, USA) ด้วยวิธี Haplotype Caller (Poplin et al., 2017) โดยกำหนดลักษณะจีโนมเป็นแบบ haploid จะได้ข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุลของทุกตัวอย่างในรูปแบบของไฟล์ vcf (variance calling file) จากนั้นทำการคัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความหลากหลายในเบสเพียงตำแหน่งเดียวหรือ Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) และทำการกรองหาตำแหน่ง SNPs ที่น่าเชื่อถือด้วยโปรแกรม vcftools (Danecek et al., 2011) และนำข้อมูลดังกล่าวไปสร้างเป็น Phylogenetic tree ต่อไป

3.4.6 การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังโดยการสร้าง Phylogenetic tree

ทำการแปลงไฟล์ vcf ที่ได้ให้เป็นไฟล์ fasta ด้วยชุดคำสั่ง python จากนั้นนำไปสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA-X (Kumar et al., 2018) ด้วยวิธี maximum likelihood โดยใช้ Tamura-nei model แบบ GTR-G-I (Tamura and Nei 1993) ในการสร้าง ใช้ heuristic model แบบ Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) และใช้ algorithm แบบ Neighbor-Join และ BioNJ กำหนดค่า bootstrapping เท่ากับ 1000 รอบ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 สำรวจและเก็บรวบรวมมันสำปะหลังที่แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากพื้นที่ปลูกสำคัญ

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างต้นมันสำปะหลังที่แสดงอาการเป็นโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากแปลงปลูกของเกษตรกรในอำเภอเมือง อำเภอเสิงสาง อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา และอำเภอศรีมหาโพธิ จังหวัดปราจีนบุรี โดยเลือกเก็บตัวอย่างที่มีลักษณะอาการ ต้นโทรม ต้นเหี่ยว ลำต้นแห้ง โคนต้นบวมแตกเป็นริ้ว โคนต้นใต้ดินเน่า รากและหัวเน่า ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และมีลักษณะอาการ คือ หัวมันมีอาการเน่า เนื้อเยื่อบริเวณ หัวมันเปื่อยยุ่ย เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลืองและน้ำตาล บริเวณขั้วรากมันสำปะหลังมีลักษณะอาการเน่าดำ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ซึ่งรวบรวมได้ทั้งหมดจำนวน 150 ตัวอย่าง และนำมาแยกเชื้อสาเหตุโรค ณ ห้องปฏิบัติการโรคพืชและชีวโมเลกุลพืช อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังในแปลง มีอาการ ต้นโทรม ต้นเหี่ยว และเนื้อเยื่อบริเวณ หัวมันเปื่อยยุ่ย สภาพแปลงในอำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลัง (A-B) หัวมันมีอาการเน่าเนื้อเยื่อบริเวณ หัวมันเปื่อยยุ่ย เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง น้ำตาล และดำ (C) โคนต้นใต้ดินเน่า (D) ลักษณะอาการเน่าดำบริเวณขั้วของรากมันสำปะหลัง (E) บริเวณใต้เปลือกท่อนพันธุ์พบเนื้อเยื่อตายเป็นสีดำ

4.2 แยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคโคนเน่าและหัวเน่า

ผลการคัดเลือกเชื้อสาเหตุโรค โดยคัดเลือกโคโลนีของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะมีสีดำ ดำเทา ดำเขียวมะกอก และมีลักษณะฟู ซึ่งเป็นลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. สาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่า ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 191 ไอโซเลต จากพื้นที่ต่างๆ (ตารางที่ 4.1) และจากนั้นนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล

ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่าที่เก็บได้จากจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดปราจีนบุรี

บริเวณที่แยกได้	ไอโซเลต	จำนวน (ไอโซเลต)	สถานที่เก็บ
หัว	HT701-1, HT703-1, HT703-2 และ HT703-3	4	อ.เสิงสาง นม.

บริเวณที่แยกได้	ไอโซเลต	จำนวน (ไอโซเลต)	สถานที่เก็บ
	SSBR1401-1, SSBR1402-1, SSBR1402-2, SSBR1402-3, SSBR1402-4, SSBR1402-5, SSBR1403-1, SSBR1403-3, SSBR1403-4 และ SSBR1403-7	10	อ.เสิงสาง นม.
	SP101-2, SP101-3, SP102-1, SP201-1, SP202-1 และ SP202-2	6	อ. ศรีมหาโพธิ ปจ.
	L20FHTB1	1	อ. เมือง นม.
	L6HRD, L11HSR2 และ L22HRW	3	อ.เสิงสาง นม.
	SS-R3, SS-R3.1, SS-R3.2.1, SS-R3.3, SS-R3.4, SS-R3.6, SS-R3.7, SS-R3.8, SS-R3.8.1, SS-R3.10, SS-R3.11, SS-R3.14, SS-R3.15, SS-R3.16, SS-R3.18, SS-R3.24 และ SS-R3.27	17	อ.เสิงสาง นม.
	SS-R4, SS-R4.1, SS-R4.5, SS-R4.13, SS-R4.15, SS-R4.19, SS-R4.21, SS-R4.22, SS-R4.23 SS-R4.24, SS-R4.26 และ SS-R4.27	12	อ.ครบุรี นม.
	SP-R1.11, SP-R1.13, SP-R1.14, SP-R1.15, SP-R1.17, SP-R1.18, SP-R1.19, SP-R1.21, SP-R1.22, SP-R1.23, SP-R1.25, SP-R1.26, SP-R1.27, SP-R1.28 และ SP-R1.29	15	อ. ศรีมหาโพธิ ปจ.
ขั้วหัว	HT401-1, HT401-2, HT401-4, HT402-2, HT503-1, HT503-2, HT603-1 และ HT605-1	8	อ.เสิงสาง นม.
	SSBR701-2, SSBR701-4, SSBR801-1, SSBR801-2, SSBR801-5 และ SSBR802-2	6	อ.เสิงสาง นม.
	SP401-1, SP402-2, SP501-1, SP502-1 และ SP601-1	5	อ. ศรีมหาโพธิ ปจ.
	L2SHSR1, L4STR1 และ L5KBSH1	3	อ.เสิงสาง นม.

บริเวณที่แยกได้	ไอโซเลต	จำนวน (ไอโซเลต)	สถานที่เก็บ
	L12SHRD	1	อ.ครบุรี นม.
	SP-R1.30, SP-R1.31, SP-R1.32, SP-R1.33, SP-R1.34, SP-R1.35, SP-R1.37, SP-R1.38, SP-R1.39, SP-R1.40, SP-R1.41, SP-R1.42, SP-R1.43, SP-R1.44, SP-R1.46, SP-R1.48, SP-R1.49 และ SP-R1.50	18	อ. ศรีมหาโพธิ ปจ.
โคนต้น	HT901-1, HT901-3, HT902-2, HT902-4, HT903-1 และ HT904-2	6	อ.เสิงสาง นม.
	SSBR301-1, SSBR301-2, SSBR301-3, SSBR302-1 และ SSBR302-2	5	อ.เสิงสาง นม.
	SP301-1, SP301-3, SP801-1, SP101-3, SP801-3, SP301-2 และ SP801-6	7	อ. ศรีมหาโพธิ ปจ.
	L9STR2, L19KBSH2 และ L27SRBT	3	อ.เสิงสาง นม.
	L17STRB	1	อ.ครบุรี นม.
ท่อนพันธุ์	SS-S3.32, SS-S3.32.1, SS-S3.33, SS-S3.38, SS-S3.39, SS-S3.40, SS-S3.42, SS-S3.44, SS-S3.49, SS-S3.50, SS-S3.52, SS-S3.53, SS-S3.54, SS-S3.55, SS-S3.56, SS-S3.58 และ SS-S3.59	17	อ.เสิงสาง นม.
	SS-S4.30, SS-S4.32, SS-S4.35, SS-S4.42, SS-S4.47, SS-S4.48, SS-S4.50, SS-S4.52, SS-S4.54, SS-S4.55 และ SS-S4.56	11	อ.ครบุรี นม.
	SP-S1, SP-S1.1, SP-S1.2, SP-S1.3, SP-S1.4, SP-S1.5, SP-S1.6, SP-S1.6.1, SP-S1.7, SP-S1.8 และ SP-S1.10	11	อ. ศรีมหาโพธิ ปจ.
ก้านใบ	SSNM002, SSNM05, SSNM13, SSNM13-3, SSNM40 และ SSNM46	6	อ.เสิงสาง นม.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บริเวณที่แยกได้	ไอโซเลต	จำนวน (ไอโซเลต)	สถานที่เก็บ
	SP-L2, SP-L2.1, SP-L2.2, SP-L2.3, SP-L2.4, SP-L2.5, SP-L2.6, SP-L2.7, SP-L2.9, SP-L2.10, SP-L2.10.1, SP-L2.11, SP-L2.12, SP-L2.29 และ SP-L2.31	15	อ. ศรีมหาโพธิ ปจ.

หมายเหตุ: สถานที่เก็บ: นม.= จังหวัดนครราชสีมา; ปจ.= จังหวัดปราจีนบุรี

4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่า

4.3.1 ลักษณะและสีของโคโลนี

นำเชื้อราที่แยกได้จากต้นมันสำปะหลังจากข้อ 4.2 จำนวน 191 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) หลังจากเชื้อราเจริญเต็มจานอาหาร นำมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถจัดกลุ่มจากลักษณะของเส้นใยได้ 4 กลุ่มดังนี้

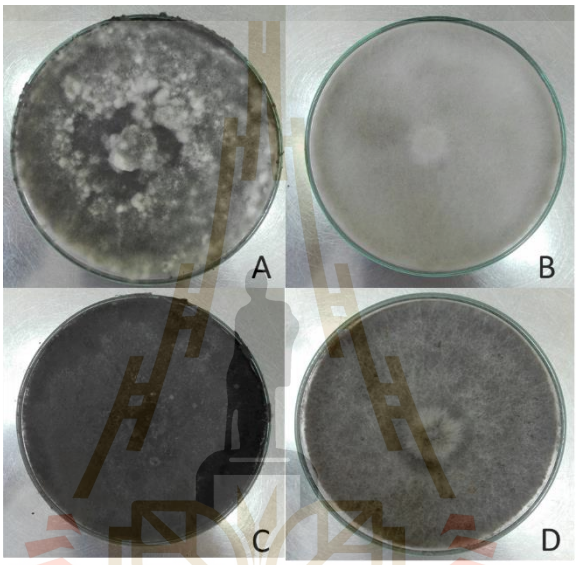
1) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ เส้นใยขนาดเล็ก ฟู บริเวณปลายเส้นใยมีการรวมกลุ่มของเส้นใยเป็นกระจุกสีขาว จำนวน 32 ไอโซเลต ได้แก่ไอโซเลต L11HSR2, L22HRW, L4STR1, L5KBSH1, SSBR1401-1, L9STR2, L19KBSH2, L27SRBT, SSBR1402-1, SSBR1402-2, SSBR1402-3, SSBR1402-4, SSBR1402-5, SSBR1403-1, SSBR1403-3, SSBR1403-4, SSBR1403-7, HT701-1, HT703-1, HT703-2, HT703-3, HT901-1, HT901-3, HT902-2, HT902-4, HT903-1, HT904-2, SSBR301-1, SSBR301-2, SSBR301-3, SSBR302-1 และ SSBR302-2 ดังแสดงในภาพ 4.3 (A)

2) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเทาปนเขียวมะกอก เส้นใยขนาดเล็ก ฟู จำนวน 62 ไอโซเลต ได้แก่ไอโซเลต L20FHTB1, L6HRD, L2SHSR1, L12SHRD, L17STRB, SP101-2, SP101-3, SP102-1, SP201-1, SP202-1, SP202-2, SP-R1.11, SP-R1.13, SP-R1.14, SP-R1.15, SP-R1.17, SP-R1.18, SP-R1.19, SP-R1.21, SP-R1.22, SP-R1.23, SP-R1.25, SP-R1.26, SP-R1.27, SP-R1.28, SP-R1.29, SP-R1.30, SP-R1.31, SP-R1.32, SP-R1.33, SP-R1.34, SP-R1.35, SP-R1.37, SP-R1.38, SP-R1.39, SP-R1.40, SP-R1.41, SP-R1.42, SP-R1.43, SP-R1.44, SP-R1.46, SP-R1.48, SP-R1.49, SP-R1.50, SP301-1, SP301-3, SP801-1, SP101-3, SP801-3, SP301-2, SP801-6, SP-S1, SP-S1.1, SP-S1.2, SP-S1.3, SP-S1.4, SP-S1.5, SP-S1.6, SP-S1.6.1, SP-S1.7, SP-S1.8 และ SP-S1.10 ดังแสดงในภาพ 4.3(B)

3) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ เส้นใยขนาดเล็ก จำนวน 51 ไอโซเลต ได้แก่ไอโซเลต SP-L2, SP-L2.1, SP-L2.2, SP-L2.3, SP-L2.4, SP-L2.5, SP-L2.6, SP-L2.7, SP-L2.9, SP-L2.10, SP-L2.10.1, SP-L2.11, SP-L2.12, SP-L2.29, SP-L2.31, SS-R3, SS-R3.1, SS-R3.2.1, SS-R3.3, SS-R3.4, SS-R3.6, SS-R3.7, SS-R3.8, SS-R3.8.1, SS-R3.10, SS-R3.11, SS-R3.14, SS-R3.15, SS-R3.16, SS-R3.18, SS-R3.24, SS-R3.27, HT401-1, HT401-2, HT401-4, HT402-2, HT503-1, HT503-2, HT603-1, HT605-1,

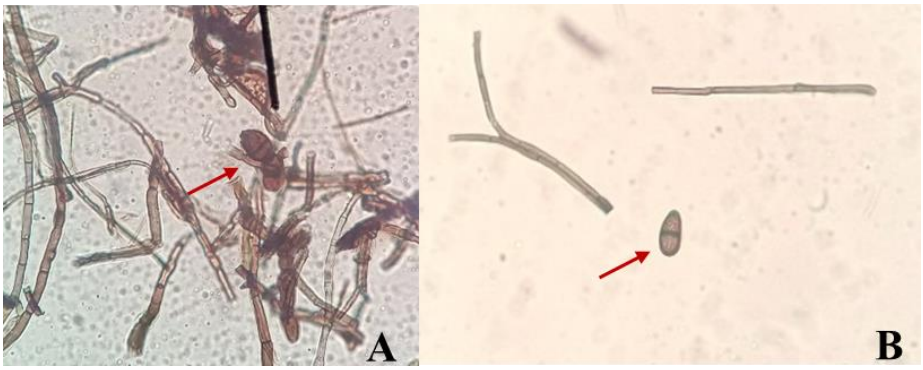
SSBR701-2, SSBR701-4, SSBR801-1, SSBR801-2, SSBR801-5, SSBR802-2, SP401-1, SP402-2, SP501-1, SP502-1 และ SP601-1 ดังแสดงในภาพ 4.3(C)

4) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำปนเทา เส้นใยมีขนาดเล็ก ฟู จำนวน 46 ไอโซเลต ได้แก่ไอโซเลต SS-R4, SS-R4.1, SS-R4.5, SS-R4.13, SS-R4.15, SS-R4.19, SS-R4.21, SS-R4.22, SS-R4.23, SS-R4.24, SS-R4.26, SS-R4.27, SS-S3.32, SS-S3.32.1, SS-S3.33, SS-S3.38, SS-S3.39, SS-S3.40, SS-S3.42, SS-S3.44, SS-S3.49, SS-S3.50, SS-S3.52, SS-S3.53, SS-S3.54, SS-S3.55, SS-S3.56, SS-S 3.58, SS-S3.59, SS-S4.30, SS-S4.32, SS-S4.35, SS-S4.42, SS-S4.47, SS-S4.48, SS-S4.50, SS-S4.52, SS-S4.54, SS-S4.55, SS-S4.56, SSNM002, SSNM05, SSNM13, SSNM13-3, SSNM40 และ SSNM46 ดังแสดงในภาพ 4.3(D)



ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ทั้ง 4 กลุ่ม (A) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ เส้นใยขนาดเล็ก ฟู บริเวณปลายเส้นใยมีการรวมกลุ่มของเส้นใยเป็นกระจุกสีขาว (B) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเทาปนเขียวมะกอก เส้นใยขนาดเล็ก ฟู (C) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ เส้นใยขนาดเล็ก (D) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำปนเทา เส้นใยมีขนาดเล็ก และฟู

ซึ่งเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ สีโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA จะปรากฏสีเทาดำ หรือดำเขียวมะกอก สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ถึงยาวรีจนถึงค่อนข้างกลม ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย ในระยะแก่ (mature conidia) จะสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเห็นเป็นริ้วในแนวยาว และมีผนังกั้น (septum) ชั้น ตรงกลางทำให้แบ่งเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างคล้ายไข่ ดังแสดงในภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะสปอร์ หรือ conidia ของเชื้อราที่แยกได้จากต้นและรากของมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่า (A-B) conidia ของ *Lasiodiplodia* spp.

4.3.2 การเจริญเติบโตของโคโลนี

จากการวัดอัตราการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA ผลการทดลองพบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเติบโตเร็ว และสามารถเจริญเต็มจานอาหาร PDA ภายในวัน 1-3 หลังจากเลี้ยงเชื้อ จากผลการทดลองพบว่าไอโซเลตที่เจริญเติบโตเร็วสุดได้แก่ ไอโซเลต L12SHRD และ ไอโซเลต SP-R1.44 สามารถเจริญบนจานอาหาร PDA หลังวางเชื้อ 1 วัน มีขนาดเฉลี่ย 83.00×83.00 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลตที่เจริญช้าสุด ได้แก่ ไอโซเลต SP-R1.38 ไอโซเลต และ ไอโซเลต SS-S4.54 สามารถเจริญบนจานอาหารหลังวางเชื้อ 1 วัน ขนาดเฉลี่ย 43.00x43.00 มิลลิเมตร โดยวางเชื้อราแต่ละไอโซเลตในอาหาร PDA ในวันที่ 3 เชื้อสามารถเจริญเต็มจานอาหารเท่ากับไอโซเลตอื่น ๆ โดยขนาดของโคโลนีแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อายุ 1 2 และ 3 วัน

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
HT701-1	74.00×74.00	86.00×86.00	90.00×90.00
HT703-1	73.00×73.40	86.00×86.00	90.00×90.00
HT703-2	75.00×75.20	88.00×88.00	90.00×90.00
HT703-3	74.80×74.80	83.80×83.80	90.00×90.00
SSBR1401-1	71.40×71.40	88.00×88.30	90.00×90.00
SSBR1402-1	79.00×79.00	88.50×88.00	90.00×90.00
SSBR1402-2	61.40×61.40	73.20×73.20	90.00×90.00
SSBR1402-3	62.20×62.10	81.00×81.00	90.00×90.00
SSBR1402-4	66.70×66.60	84.60×84.60	90.00×90.00
SSBR1402-5	54.00×54.20	74.00×74.20	90.00×90.00

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
SSBR1403-1	55.30×55.10	76.00×76.00	90.00×90.00
SSBR1403-3	58.80×58.50	82.00×82.20	90.00×90.00
SSBR1403-4	52.00×52.00	75.00×75.20	90.00×90.00
SSBR1403-7	52.00×52.00	81.00×81.00	90.00×90.00
SP101-2	81.00×81.00	88.40×88.40	90.00×90.00
SP101-3	73.00×73.50	88.00×88.60	90.00×90.00
SP102-1	69.00×69.00	84.20×84.00	90.00×90.00
SP201-1	65.00×65.00	83.60×83.60	90.00×90.00
SP202-1	52.70×52.70	79.00×79.00	90.00×90.00
SP202-2	67.40×67.40	82.00×82.00	90.00×90.00
L20FHTB1	62.20×62.50	87.00×87.30	90.00×90.00
L6HRD	71.00×71.50	88.00×88.00	90.00×90.00
L11HSR2	63.00×63.50	79.50×79.50	90.00×90.00
L22HRW	73.00×73.20	87.00×87.20	90.00×90.00
SS-R3	53.00×53.50	80.00×80.00	90.00×90.00
SS-R3.1	64.00×64.40	78.00×78.00	90.00×90.00
SS-R3.2.1	52.00×52.00	68.40×68.30	90.00×90.00
SS-R3.3	62.00×62.00	71.40×71.40	90.00×90.00
SS-R3.4	64.40×64.40	73.20×73.20	90.00×90.00
SS-R3.6	70.00×70.00	83.00×83.00	90.00×90.00
SS-R3.7	75.00×75.00	88.00×88.10	90.00×90.00
SS-R3.8	72.30×73.00	79.00×79.20	90.00×90.00
SS-R3.8.1	65.70×65.70	79.80×80.00	90.00×90.00
SS-R3.10	64.80×64.80	83.80×83.80	90.00×90.00
SS-R3.11	52.80×52.80	82.00×82.00	90.00×90.00
SS-R3.14	77.40×77.40	880×88.20	90.00×90.00
SS-R3.15	72.00×72.20	87.30×87.30	90.00×90.00
SS-R3.16	77.00×77.50	87.40×87.40	90.00×90.00
SS-R3.18	74.60×74.60	88.30×88.30	90.00×90.00
SS-R3.24	74.50×74.50	86.30×86.40	90.00×90.00
SS-R3.27	61.40×61.40	85.00×85.00	90.00×90.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
SS-R4	54.00×54.00	76.00×76.00	90.00×90.00
SS-R4.1	63.00×63.40	82.00×82.20	90.00×90.00
SS-R4.5	75.20×75.20	88.00×88.00	90.00×90.00
SS-R4.13	74.60×74.60	85.80×85.80	90.00×90.00
SS-R4.15	52.40×52.40	74.20×74.20	90.00×90.00
SS-R4.19	59.00×59.00	80.00×80.00	90.00×90.00
SS-R4.21	57.00×57.00	80.00×80.00	90.00×90.00
SS-R4.22	63.40×63.00	76.00×76.00	90.00×90.00
SS-R4.23	68.00×68.10	85.00×85.00	90.00×90.00
SS-R4.24	63.60×63.60	83.00×83.00	90.00×90.00
SS-R4.26	67.40×67.40	85.80×85.80	90.00×90.00
SS-R4.27	68.80×68.80	87.00×87.00	90.00×90.00
SP-R1.11	71.20×71.20	83.00×83.00	90.00×90.00
SP-R1.13	77.00×77.00	86.00×86.00	90.00×90.00
SP-R1.14	56.20×56.20	84.80×84.80	90.00×90.00
SP-R1.15	74.00×74.00	86.00×86.00	90.00×90.00
SP-R1.17	59.00×59.00	83.20×83.20	90.00×90.00
SP-R1.18	64.00×64.00	86.70×86.70	90.00×90.00
SP-R1.19	62.40×62.40	76.20×76.20	90.00×90.00
SP-R1.21	71.20×71.20	84.00×84.00	90.00×90.00
SP-R1.22	69.00×69.00	81.40×81.40	90.00×90.00
SP-R1.23	51.40×51.40	83.20×83.20	90.00×90.00
SP-R1.25	58.00×58.00	69.00×69.00	90.00×90.00
SP-R1.26	65.30×65.30	79.00×79.00	90.00×90.00
SP-R1.27	64.00×64.00	76.00×76.20	90.00×90.00
SP-R1.28	72.00×72.00	88.10×88.10	90.00×90.00
SP-R1.29	55.00×55.00	75.70×75.70	90.00×90.00
HT401-1	71.00×71.00	86.00×86.10	90.00×90.00
HT401-2	65.00×60.80	82.00×82.00	90.00×90.00
HT401-4	63.40×63.40	83.80×83.80	90.00×90.00
HT402-2	57.00×57.00	79.00×79.30	90.00×90.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
HT503-1	60.00×60.00	84.00×84.00	90.00×90.00
HT503-2	58.00×58.00	75.00×75.00	90.00×90.00
HT603-1	76.00×76.00	80.20×80.20	90.00×90.00
HT605-1	63.60×63.60	80.00×80.00	90.00×90.00
SSBR701-2	65.80×65.80	82.80×82.80	90.00×90.00
SSBR701-4	63.40×63.40	82.00×82.00	90.00×90.00
SSBR801-1	68.00×68.20	78.30×78.30	90.00×90.00
SSBR801-2	73.00×73.00	85.00×85.00	90.00×90.00
SSBR801-5	54.80×54.80	84.40×84.40	90.00×90.00
SSBR802-2	73.00×73.00	86.00×86.20	90.00×90.00
SP401-1	69.40×69.40	82.20×82.00	90.00×90.00
SP402-2	75.00×75.00	87.60×87.60	90.00×90.00
SP501-1	63.00×63.00	73.60×73.60	90.00×90.00
SP502-1	65.70×65.70	86.60×86.60	90.00×90.00
SP601-1	66.00×66.00	84.60×84.60	90.00×90.00
L2SHSR1	54.00×54.00	77.00×77.00	90.00×90.00
L4STR1	52.00×52.00	68.00×68.00	90.00×90.00
L5KBSH1	58.00×58.00	74.00×74.00	90.00×90.00
L12SHRD	83.00×83.00	88.50×88.50	90.00×90.00
SP-R1.30	74.00×74.00	88.00×88.00	90.00×90.00
SP-R1.31	71.20×71.20	84.00×84.00	90.00×90.00
SP-R1.32	56.00×56.00	75.00×75.00	90.00×90.00
SP-R1.33	67.00×67.00	85.00×85.00	90.00×90.00
SP-R1.34	61.00×61.00	74.00×74.00	90.00×90.00
SP-R1.35	62.00×62.00	85.40×85.40	90.00×90.00
SP-R1.37	53.00×53.00	72.80×72.80	90.00×90.00
SP-R1.38	43.00×43.00	75.00×75.00	90.00×90.00
SP-R1.39	68.00×68.00	86.00×86.00	90.00×90.00
SP-R1.40	56.20×56.20	84.80×84.80	90.00×90.00
SP-R1.41	55.00×55.00	75.80×75.80	90.00×90.00
SP-R1.42	75.00×75.00	82.20×82.20	90.00×90.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
SP-R1.43	43.40×43.40	78.80×78.80	90.00×90.00
SP-R1.44	83.00×83.00	87.00×87.00	90.00×90.00
SP-R1.46	74.00×74.00	89.00×89.00	90.00×90.00
SP-R1.48	64.00×64.00	78.00×78.00	90.00×90.00
SP-R1.49	59.80×59.80	81.00×81.00	90.00×90.00
SP-R1.50	56.00×56.00	79.00×79.00	90.00×90.00
HT901-1	73.00×73.20	78.00×78.30	90.00×90.00
HT901-3	77.00×77.00	88.00×88.00	90.00×90.00
HT902-2	51.00×51.00	76.00×76.00	90.00×90.00
HT902-4	55.30×55.30	73.00×73.00	90.00×90.00
HT903-1	64.00×64.00	77.00×77.20	90.00×90.00
HT904-2	52.00×52.00	68.10×68.10	90.00×90.00
SSBR301-1	48.00×48.00	74.10×74.00	90.00×90.00
SSBR301-2	43.00×43.00	72.80×72.80	90.00×90.00
SSBR301-3	55.00×55.00	75.80×75.80	90.00×90.00
SSBR302-1	67.40×67.40	85.80×85.80	90.00×90.00
SSBR302-2	66.00×66.00	84.60×84.60	90.00×90.00
SP301-1	71.20×71.20	87.00×87.00	90.00×90.00
SP301-3	65.80×65.80	85.00×85.00	90.00×90.00
SP801-1	64.00×64.00	83.70×83.70	90.00×90.00
SP101-3	51.80×51.80	78.00×78.00	90.00×90.00
SP801-3	70.00×70.00	83.00×83.00	90.00×90.00
SP301-2	71.00×71.00	88.00×88.10	90.00×90.00
SP801-6	65.40×65.40	86.00×86.00	90.00×90.00
L9STR2	55.00×55.00	75.80×75.80	90.00×90.00
L19KBSH2	74.00×74.00	84.80×84.80	90.00×90.00
L27SRBT	70.00×69.80	85.00×85.00	90.00×90.00
L17STRB	71.20×71.20	84.00×84.00	90.00×90.00
SS-S3.32	58.00×58.00	74.00×74.00	90.00×90.00
SS-S3.32.1	79.00×79.00	88.00×88.00	90.00×90.00
SS-S3.33	61.00×61.00	80.00×80.00	90.00×90.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
SS-S3.38	62.00×62.00	85.40×85.40	90.00×90.00
SS-S3.39	56.00×56.00	72.80×72.80	90.00×90.00
SS-S3.40	75.00×75.00	84.20×84.20	90.00×90.00
SS-S3.42	67.00×67.00	88.00×88.00	90.00×90.00
SS-S3.44	53.00×53.00	74.00×74.00	90.00×90.00
SS-S3.49	65.80×65.80	80.00×80.30	90.00×90.00
SS-S3.50	48.40×48.40	68.70×68.70	90.00×90.00
SS-S3.52	84.00×84.00	89.00×89.00	90.00×90.00
SS-S3.53	74.00×74.00	88.50×88.50	90.00×90.00
SS-S3.54	69.10×69.00	84.30×84.00	90.00×90.00
SS-S3.55	69.00×69.00	83.20×83.20	90.00×90.00
SS-S3.56	75.80×75.80	84.00×84.00	90.00×90.00
SS-S3.58	69.00×69.00	83.00×83.00	90.00×90.00
SS-S3.59	64.00×64.00	77.00×77.00	90.00×90.00
SS-S4.30	65.80×65.80	80.00×80.00	90.00×90.00
SS-S4.32	70.00×70.00	84.00×84.00	90.00×90.00
SS-S4.35	65.00×65.00	86.00×86.00	90.00×90.00
SS-S4.42	71.00×71.00	81.00×81.10	90.00×90.00
SS-S4.47	54.40×54.40	71.00×71.00	90.00×90.00
SS-S4.48	75.00×75.50	86.70×86.70	90.00×90.00
SS-S4.50	65.00×65.00	75.00×75.00	90.00×90.00
SS-S4.52	59.00×59.00	84.60×84.60	90.00×90.00
SS-S4.54	43.00×43.00	72.00×72.00	90.00×90.00
SS-S4.55	69.80×69.80	81.00×81.00	90.00×90.00
SS-S4.56	66.00×66.00	79.80×79.80	90.00×90.00
SP-S1,	73.00×73.00	89.00×89.30	90.00×90.00
SP-S1.1	65.80×65.80	81.00×81.00	90.00×90.00
SP-S1.2	43.40×43.40	67.60×67.60	90.00×90.00
SP-S1.3	75.80×75.80	89.00×89.00	90.00×90.00
SP-S1.4	69.00×69.00	80.00×80.00	90.00×90.00
SP-S1.5	72.40×72.40	84.80×84.80	90.00×90.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
SP-S1.6	60.70×60.70	74.00×74.30	90.00×90.00
SP-S1.6.1	52.80×52.80	70.20×70.20	90.00×90.00
SP-S1.7	57.00×57.00	75.00×75.00	90.00×90.00
SP-S1.8	76.00×76.00	88.00×88.00	90.00×90.00
SP-S1.10	59.80×59.80	84.80×84.80	90.00×90.00
SSNM002	64.00×64.00	77.00×77.00	90.00×90.00
SSNM05	60.80×60.80	81.00×81.00	90.00×90.00
SSNM13	76.00×76.00	88.00×88.00	90.00×90.00
SSNM13-3	63.00×63.00	83.00×83.00	90.00×90.00
SSNM40	57.00×57.00	81.00×81.30	90.00×90.00
SSNM46	60.00×60.00	82.00×82.00	90.00×90.00
SP-L2	65.00×65.00	85.20×85.20	90.00×90.00
SP-L2.1	73.00×73.20	78.00×78.30	90.00×90.00
SP-L2.2	57.00×57.00	76.00×76.00	90.00×90.00
SP-L2.3	58.00×58.00	76.30×73.30	90.00×90.00
SP-L2.4	75.00×75.00	85.40×85.40	90.00×90.00
SP-L2.5	64.00×64.00	79.00×79.20	90.00×90.00
SP-L2.6	62.00×62.00	78.10×78.10	90.00×90.00
SP-L2.7	50.00×50.00	74.10×74.00	90.00×90.00
SP-L2.9	45.00×45.00	72.00×72.00	90.00×90.00
SP-L2.10	65.00×65.00	75.40×75.40	90.00×90.00
SP-L2.10.1	67.00×67.00	85.00×85.00	90.00×90.00
SP-L2.11	66.00×66.00	84.50×84.50	90.00×90.00
SP-L2.12	52.00×52.00	74.20×74.20	90.00×90.00
SP-L2.29	71.00×71.00	88.00×88.00	90.00×90.00
SP-L2.31	67.20×67.20	81.00×81.00	90.00×90.00

หมายเหตุ: วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ/ไอโซเลต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4 ทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรค (pathogenicity and virulently test) ในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการแยกเชื้อราในมันสำปะหลังที่แสดงอาการโคนเน่าและหัวเน่า 191 ไอโซเลต พบว่า 96 ไอโซเลต สามารถก่อโรคในท่อนพันธุ์มันสำปะหลังได้ โดยแสดงอาการของโรคครั้งแรกในวันที่ 2 หลังทำการปลูกเชื้อบนท่อนพันธุ์ โดยวัดขนาดแผลเฉลี่ยตามยาวจากการผ่าตรงกลางแผลของท่อนพันธุ์ ในวันที่ 15 ท่อนพันธุ์แสดงอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น ถูกทำลายเปลี่ยนเป็นสีดำ เทา และน้ำตาล แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต ซึ่งจากการประเมินระดับความรุนแรงของโรคพบความรุนแรงทั้งหมด 5 ระดับ ได้แก่ 5 คือเกิดแผลมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.5 A), ความรุนแรงระดับ 4 คือเกิดแผล 90-80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.5B), ความรุนแรงระดับ 3 คือเกิดแผล 80-70 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.5C), ความรุนแรงระดับ 2 คือเกิดแผล 70-50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.5D) และ ความรุนแรงน้อยที่สุดระดับ 1 คือเกิดแผลน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.5E) (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ ในห้องปฏิบัติการบนท่อนมันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89

ไอโซเลต	ท่อนพันธุ์ในกล่องชื้น	
	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค[1/]	ระดับความรุนแรง[2/]
SSBR301-2	100.00±0.00	5.00
L17STRB	50.00±0.00	2.00
SP101-3	91.67±14.43	5.00
SP101-2	75.00±0.00	3.00
SP-R1.26	58.33±14.43	2.00
L20FHTB1	58.33±28.87	2.00
SP-R1.30	41.67±14.43	1.00
SP202-2	83.33±14.43	4.00
SSNM05	100.00±0.00	5.00
SS-R4.27	83.33±14.43	4.00
SP-R1.13	75.00±0.00	3.00
SSBR801-2	91.67±14.43	5.00
SS-S3.32	91.67±14.43	5.00
SP-R1.25	58.33±14.43	2.00
HT603-1	66.67±28.87	2.00
SS-R3.1	91.67±14.43	5.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ไอโซเลต	ท่อนพันธุ์ในกล่องชื้น	
	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค[1/]	ระดับความรุนแรง[2/]
L11HSR2	75.00±0.00	3.00
L27SRBT	91.67±14.43	5.00
SP-L2	91.67±14.43	5.00
L12SHRD	50.00±0.00	2.00
L19KBSH2	66.67±28.87	2.00
SS-R3	83.33±14.43	4.00
L9STR2	83.33±14.43	4.00
L6HRD	50.00±0.00	2.00
L4STR1	83.33±28.87	4.00
L5KBSH1	83.33±28.87	4.00
SSBR1403-4	100.00±0.00	5.00
HT901-1	100.00±0.00	5.00
SS-R4.24	66.67±14.43	2.00
SP-R1.50	91.67±14.43	5.00
SSNM13	75.00±0.00	3.00
HT401-4	58.33±14.43	2.00
SSBR1403-1	100.00±0.00	5.00
HT904-2	58.33±14.43	2.00
HT401-2	100.00±0.00	5.00
HT701-1	100.00±0.00	5.00
HT605-1	50.00±0.00	2.00
SS-R4.25	91.67±14.43	5.00
SSBR1403-7	83.33±14.43	4.00
SP-S1.6.1	91.67±14.43	5.00
SP801-6	50.00±0.00	2.00
SSBR1403-3	91.67±14.43	5.00
SP-R1.18	83.33±14.43	4.00
HT401-1	100.00±0.00	5.00
SS-R3.27	83.33±14.43	4.00
SP-S1.5	75.00±0.00	3.00
SS-R3.11	91.67±14.43	5.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

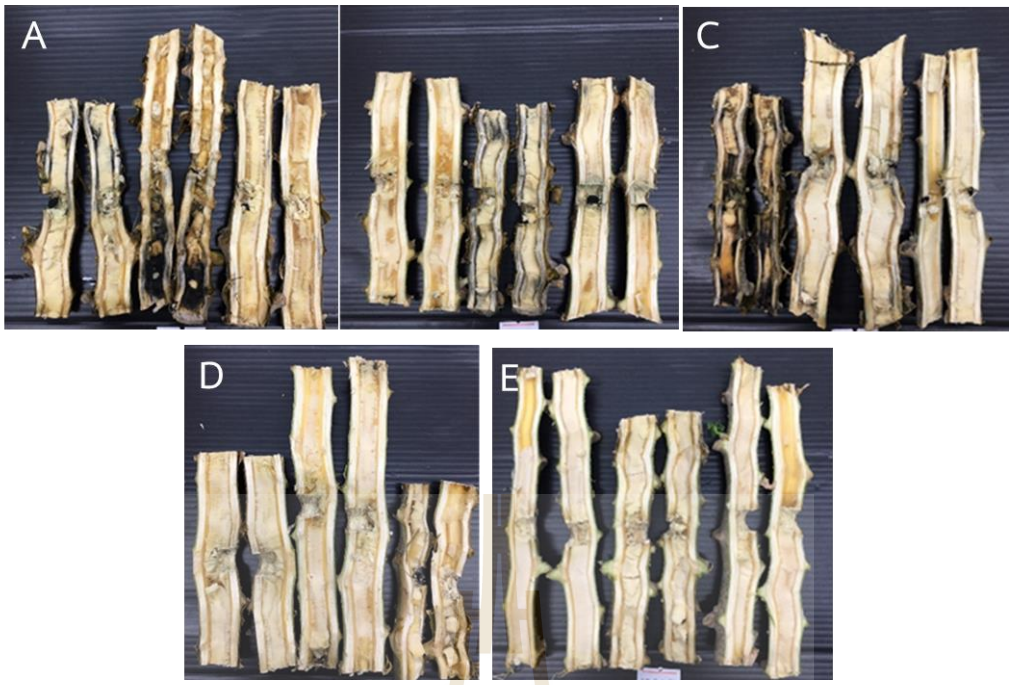
ไอโซเลต	ท่อนพันธุ์ในกล่องชื้น	
	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค[1/]	ระดับความรุนแรง[2/]
SP-R1.29	83.33±14.43	4.00
HT703-2	75.00±0.00	3.00
SS-R4.1	100.00±0.00	5.00
SSBR701-4	100.00±0.00	5.00
SP202-1	91.67±14.43	5.00
SS-S3.52	91.67±14.43	5.00
SP-S1.3	91.67±14.43	5.00
SSBR301-3	100.00±0.00	5.00
HT703-3	100.00±0.00	5.00
SSBR1402-5	100.00±0.00	5.00
SS-S4.56	100.00±0.00	5.00
SP-S1.8	91.67±14.43	5.00
SP-S1.2	100.00±0.00	5.00
SS-R3.15	91.67±14.43	5.00
SSNM40	91.67±14.43	5.00
L2SHSR1	75.00±0.00	3.00
SS-S3.33	91.67±14.43	5.00
SS-R3.16	75.00±0.00	3.00
SP-S1	91.67±14.43	5.00
SS-R3.14	100.00±0.00	5.00
SS-S3.39	100.00±0.00	5.00
SP201-1	83.33±28.87	4.00
SSBR1402-1	83.33±28.87	4.00
SP-S1.6	91.67±14.43	5.00
SS-S4.48	66.67±14.43	2.00
SP-R1.48	91.67±14.43	5.00
SP-R1.50	91.67±14.43	5.00
SSBR1401-1	75.00±0.00	3.00
SS-S3.38	66.67±28.87	2.00
SP-L2.1	83.33±28.87	4.00
SS-S3.50	75.00±0.00	3.00

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ไอโซเลต	ท่อนพันธุ์ในกล่องชื้น	
	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค[1/]	ระดับความรุนแรง[2/]
SP-L2.31	83.33±28.87	4.00
SP-L2.6	83.33±14.43	4.00
SS-S3.32.1	100.00±0.00	5.00
SP601-1	100.00±0.00	4.00
SP-L2.3	75.00±0.00	3.00
SSNM46	100.00±0.00	5.00
SP801-1	83.33±28.87	4.00
SS-S3.53	83.33±28.87	4.00
SSBR302-2	91.67±14.43	5.00
SSNM002	91.67±14.43	5.00
SP301-3	83.33±28.87	4.00
SSBR801-5	83.33±14.43	4.00
SS-S3.40	83.33±14.43	4.00
SS-R3.1	66.67±14.43	2.00
L22HRW	91.67±14.43	5.00
SS-R3.3	66.67±28.87	2.00
SP-R1.28	91.67±14.43	5.00
SS-R3.18	100.00±0.00	5.00
F-test	**	
%CV	17.09	

[1/] ** คือ ความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $P < 0.0$

[2/]การประเมินความรุนแรงของโรค (disease scores) โดยให้คะแนน 5 คือเกิดแผลมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์, ความรุนแรงระดับ 4 คือเกิดแผล 90-80 เปอร์เซ็นต์, ความรุนแรงระดับ 3 คือเกิดแผล 80-70 เปอร์เซ็นต์, ความรุนแรงระดับ 2 คือเกิดแผล 70-50 เปอร์เซ็นต์ และ ความรุนแรงน้อยที่สุดระดับ 1 คือเกิดแผลน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ/ไอโซเลต



ภาพที่ 4.5 ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 15 วันในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น ถูกทำลายเปลี่ยนเป็นสีดำ เทา และน้ำตาล แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต (A) ไอโซเลต HT401-1 ความรุนแรงระดับ 5 (B) ไอโซเลต SP202-2 ความรุนแรงระดับ 4 และ (C) ไอโซเลต SS-R3.1 ความรุนแรงระดับ 3 (D) ไอโซเลต SS-S3.38 ความรุนแรงระดับ 2 (E) ไอโซเลต SP-R1.30 ความรุนแรงระดับ 1

4.5 การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล

4.5.1 การสร้างห้องสมุดสำหรับการทำ sequencing ของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

นำ genomic DNA ของเชื้อราสายพันธุ์ *Lasiodiplodia theobromae* จำนวน 96 ไอโซเลต มาต่อกับ DNA barcode เรียบร้อยแล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธี PCR และทำการตรวจวัดคุณภาพด้วยเครื่อง Bio analyzer การต่อ DNA barcode ทำให้สามารถระบุตัวอย่างแต่ละตัวในห้องสมุด ซึ่งตัวอย่างแต่ละตัวต่อกับ DNA barcode ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ชื่อตัวอย่างและ DNA barcode ที่ใช้ในการทำห้องสมุด

name	organism	barcode	name	organism	barcode
SSBR301-2	Lasiodiplodia	100	HT703-2	Lasiodiplodia	15
L17	Lasiodiplodia	46	SS-R4.1	Lasiodiplodia	34
SP101-3	Lasiodiplodia	82	SSBR701-4	Lasiodiplodia	103
SP101-2	Lasiodiplodia	63	SS-S-3.52_2	Lasiodiplodia	56
SP-R1.26	Lasiodiplodia	80	SP-502-1	Lasiodiplodia	70
L20	Lasiodiplodia	47	SP-S-1.3	Lasiodiplodia	88
SP-R9	Lasiodiplodia	85	SSBR301-3	Lasiodiplodia	101
SP202-2	Lasiodiplodia	65	HT703-3	Lasiodiplodia	16
SSNM15	Lasiodiplodia	124	SS-S-1.4	Lasiodiplodia	38
SS-R4.27	Lasiodiplodia	37	SSBR-1402-5	Lasiodiplodia	96
SP-R301-1	Lasiodiplodia	84	SP-S-1.18	Lasiodiplodia	86
SSBR801-2	Lasiodiplodia	104	SP-S-1.2	Lasiodiplodia	87
SS-S-3.49_1	Lasiodiplodia	116	SS-R3.15	Lasiodiplodia	28
SP-R1.25	Lasiodiplodia	79	SSNM-40	Lasiodiplodia	127
HT603-1	Lasiodiplodia	4	L15	Lasiodiplodia	45
SS-R3.11	Lasiodiplodia	25	SS-S-3.3.3	Lasiodiplodia	115
L11	Lasiodiplodia	43	SS-R3.16	Lasiodiplodia	29
L27	Lasiodiplodia	58	SP-S-1	Lasiodiplodia	92
SP-L2	Lasiodiplodia	77	SS-R3.14	Lasiodiplodia	117
L12	Lasiodiplodia	44	SS-S-3.39_1	Lasiodiplodia	52
L24	Lasiodiplodia	57	SP201-1	Lasiodiplodia	64
SS-R3	Lasiodiplodia	33	SSBR-1402-1	Lasiodiplodia	95
L9	Lasiodiplodia	62	SP-S-1.6.1	Lasiodiplodia	90
L6	Lasiodiplodia	61	SS-S-1.7	Lasiodiplodia	39
L4	Lasiodiplodia	59	SSBR802-3	Lasiodiplodia	122

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

name	organism	barcode	name	organism	barcode
L5	Lasiodiplodia	60	SP-801-3	Lasiodiplodia	73
SSBR-1403-4	Lasiodiplodia	93	SS-S-3.38_1	Lasiodiplodia	51
HT901-1	Lasiodiplodia	41	SSBR-1401-1	Lasiodiplodia	94
SS-R4.24	Lasiodiplodia	35	SP-L-2.1	Lasiodiplodia	75
SP-R1.50	Lasiodiplodia	83	SS-S-3.50_1	Lasiodiplodia	55
SSNM13	Lasiodiplodia	123	SP-L-2.31	Lasiodiplodia	66
HT-401-4	Lasiodiplodia	3	SP-L-2.6	Lasiodiplodia	67
SSBR-1403-1	Lasiodiplodia	97	SS-S-3.32.1_2	Lasiodiplodia	49
HT904-2	Lasiodiplodia	42	SP-601-1	Lasiodiplodia	71
HT-401-2	Lasiodiplodia	2	SP-L-2.3	Lasiodiplodia	76
HT701.1	Lasiodiplodia	14	SSNM46	Lasiodiplodia	125
HT605-1	Lasiodiplodia	13	SP-801-1	Lasiodiplodia	72
SS-R4.25	Lasiodiplodia	36	SS-S-3.32_2	Lasiodiplodia	50
SSBR-1403-7	Lasiodiplodia	99	SSBR302-2	Lasiodiplodia	102
SP-S-1.6_4	Lasiodiplodia	91	SSNM002	Lasiodiplodia	126
SP-801-6	Lasiodiplodia	74	SP-301-3	Lasiodiplodia	68
SSBR-1403-3	Lasiodiplodia	98	SSBR801-5	Lasiodiplodia	121
SP-R1.18	Lasiodiplodia	78	SS-S-3.40_3	Lasiodiplodia	53
HT-401-1	Lasiodiplodia	1	SS-R-3.1	Lasiodiplodia	128
SS-R3.27	Lasiodiplodia	114	L22	Lasiodiplodia	48
SP-S-1.5	Lasiodiplodia	89	SS-R3.34	Lasiodiplodia	32
SS-R3.12	Lasiodiplodia	26	SP-R1.28	Lasiodiplodia	81
SP-401-1	Lasiodiplodia	69	SS-R3.18	Lasiodiplodia	30

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.5.2 การ mapping ลำดับเบสเข้ากับจีโนมอ้างอิงของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

ผลจากการทำ sequencing ด้วยเครื่อง MGI sequencer จากตัวอย่างเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง (*Lasiodiplodia theobromae*) ทั้งสิ้น 96 ไอโซเลต พบว่าได้จำนวน read ทั้งสิ้น 126,497,233 reads โดยมีจำนวน reads ต่อตัวอย่างตั้งแต่ 56,632 ถึง 3,963,473 reads ผลการ mapping read กับจีโนมอ้างอิงนั้นมีผลที่ค่อนข้างหลากหลาย โดยตัวอย่างที่สามารถ map ได้ที่ 72.25 – 86.39 % มีทั้งสิ้น 62 ไอโซเลต ตัวอย่างที่สามารถ map ได้ที่ 39.74 – 64.04 % มีอยู่ 16 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่สามารถ map ได้ที่ 3.83 – 29.35 % มีอยู่ 18 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.5)

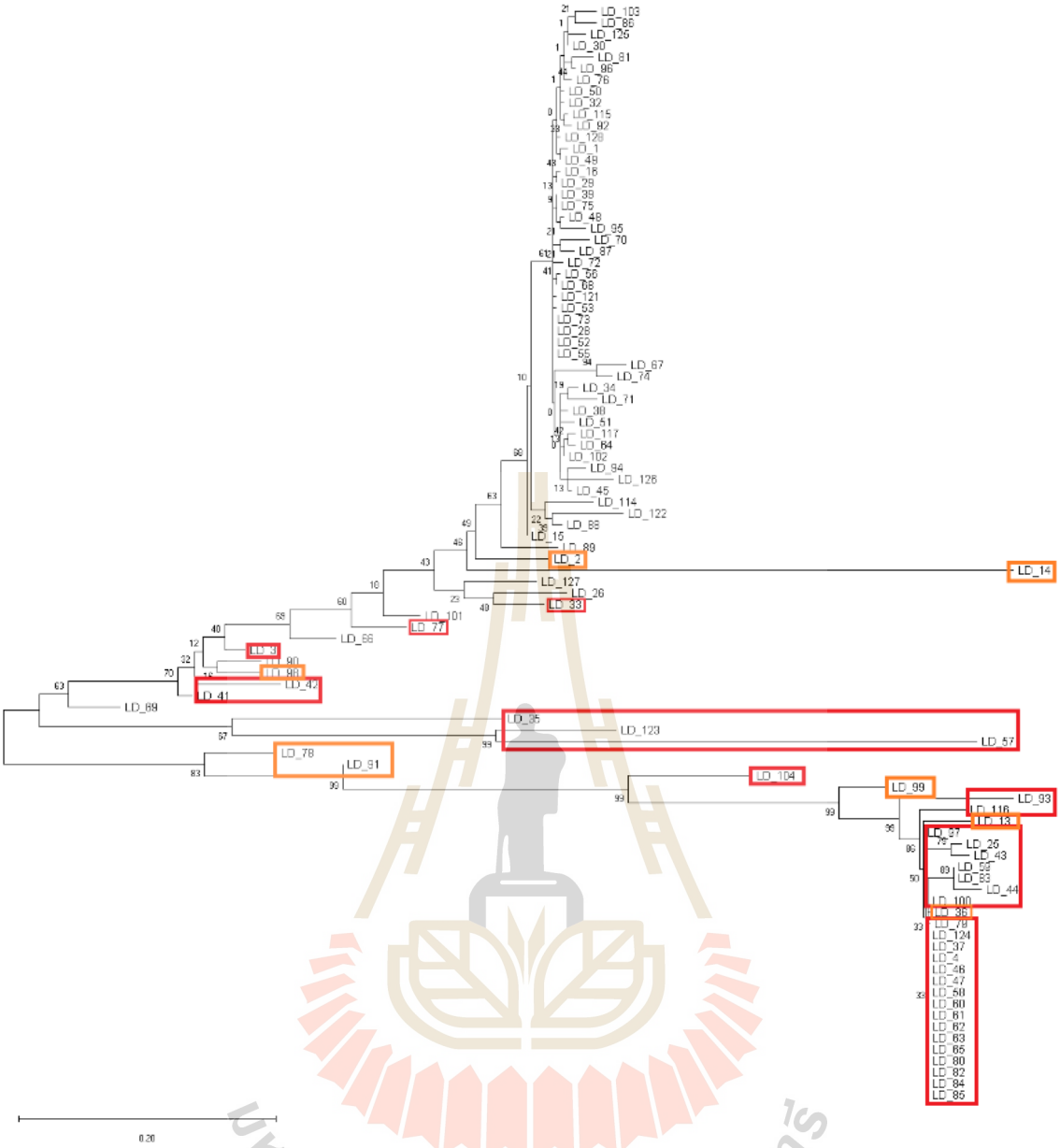
ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนชิ้นของลำดับเบสที่อ่านได้ (Number of reads) และเปอร์เซ็นต์การ map ในเชื้อราแต่ละตัวอย่าง

name	ID	ReadNum	mapped %	name	ID	ReadNum	mapped %
SSBR301-2	LD_100	2320670	3.83	HT703-2	LD_15	2728542	82.61
L17	LD_46	1732432	6.25	SS-R4.1	LD_34	3451650	82.61
SP101-3	LD_82	2428992	6.33	SSBR701-4	LD_103	2181572	82.88
SP101-2	LD_63	2238880	7.41	SP-502-1	LD_56	2405786	82.93
SP-R1.26	LD_80	1896100	7.99	SS-S-3.52_2	LD_70	3262668	82.93
L20	LD_47	3911096	8.21	SP-S-1.3	LD_88	2144526	82.97
SP-R9	LD_85	2789334	8.62	SSBR301-3	LD_101	1594500	82.98
SP202-2	LD_65	1857094	9.07	HT703-3	LD_16	4283930	83.23
SSNM15	LD_124	3314954	9.8	SSBR-1402-5	LD_38	2728320	83.3
SS-R4.27	LD_37	1542118	10.31	SS-S-1.4	LD_96	3904224	83.3
SP-R301-1	LD_84	901660	13.28	SP-S-1.18	LD_86	2237664	83.38
SSBR801-2	LD_104	3102718	14.26	SP-S-1.2	LD_87	2266904	83.4
SS-S-3.49_1	LD_116	2927722	14.82	SS-R3.15	LD_28	4271682	83.46
SP-R1.25	LD_79	4506904	15	SSNM-40	LD_127	1673140	83.55
HT603-1	LD_4	1337044	18.05	L15	LD_45	3166228	83.64
SS-R3.11	LD_25	2021712	20.46	SS-S-3.3.3	LD_115	5375466	83.73
L11	LD_43	1790222	24.67	SS-R3.16	LD_29	3884516	83.74
L27	LD_58	1775724	29.35	SP-S-1	LD_92	2161784	83.75
SP-L2	LD_77	3324330	39.74	SS-R3.14	LD_117	4318020	83.79
L12	LD_44	2030262	47.49	SS-S-3.39_1	LD_52	4857074	83.88
L24	LD_57	4904976	48.6	SP201-1	LD_64	2888598	83.94
SS-R3	LD_33	2798300	49.09	SSBR-1402-1	LD_95	2598030	83.95
L9	LD_62	113264	51.26	SP-S-1.6.1	LD_90	1310232	84.04
L6	LD_61	234826	51.3	SS-S-1.7	LD_39	4390768	84.16
L4	LD_59	1976096	51.71	SSBR802-3	LD_122	1550386	84.19
L5	LD_60	520154	52.45	SP-801-3	LD_73	3533640	84.2
SSBR-1403-4	LD_93	2889138	52.61	SSBR-1401-1	LD_51	2733788	84.21
HT901-1	LD_41	1879176	53.85	SS-S-3.38_1	LD_94	3896146	84.21

name	ID	ReadNum	mapped %	name	ID	ReadNum	mapped %
SS-R4.24	LD_35	2421988	55.66	SP-L-2.1	LD_75	4258182	84.25
SP-R1.50	LD_83	3739646	58.66	SS-S-3.50_1	LD_55	4342268	84.27
SSNM13	LD_123	2534912	59.57	SP-L-2.31	LD_66	1390590	84.28
HT-401-4	LD_3	1842890	59.8	SP-L-2.6	LD_67	2607170	84.5
SSBR-1403-1	LD_97	1604304	60.57	SS-S-3.32.1_2	LD_49	2958922	84.52
HT904-2	LD_42	1553094	64.04	SP-601-1	LD_71	2721972	84.77
HT-401-2	LD_2	1961390	72.25	SP-L-2.3	LD_76	3877824	84.83
HT701.1	LD_14	2174982	74.22	SSNM46	LD_125	2115444	84.91
HT605-1	LD_13	445934	77.36	SP-801-1	LD_72	4499086	84.94
SS-R4.25	LD_36	174572	77.58	SS-S-3.32_2	LD_50	4385122	84.97
SSBR-1403-7	LD_99	581010	78.59	SSBR302-2	LD_102	2756158	85.08
SP-S-1.6_4	LD_91	718568	78.85	SSNM002	LD_126	2764040	85.1
SP-801-6	LD_74	1813764	79.21	SP-301-3	LD_68	2367664	85.19
SSBR-1403-3	LD_98	962402	79.4	SSBR801-5	LD_121	2759606	85.31
SP-R1.18	LD_78	1152618	79.53	SS-S-3.40_3	LD_53	7926946	85.69
HT-401-1	LD_1	4655982	80.1	SS-R-3.1	LD_128	3309012	86.07
SS-R3.27	LD_114	1989072	81.57	L22	LD_48	3940098	86.08
SP-S-1.5	LD_89	1830656	81.64	SS-R3.34	LD_32	3717660	86.16
SS-R3.12	LD_26	1517784	82.31	SP-R1.28	LD_81	2315362	86.23
SP-401-1	LD_69	1100920	82.56	SS-R3.18	LD_30	4339170	86.39

4.5.3 การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Phylogenetic tree จากลักษณะความแตกต่างกันของเครื่องหมายพันธุกรรมแบบ SNPs

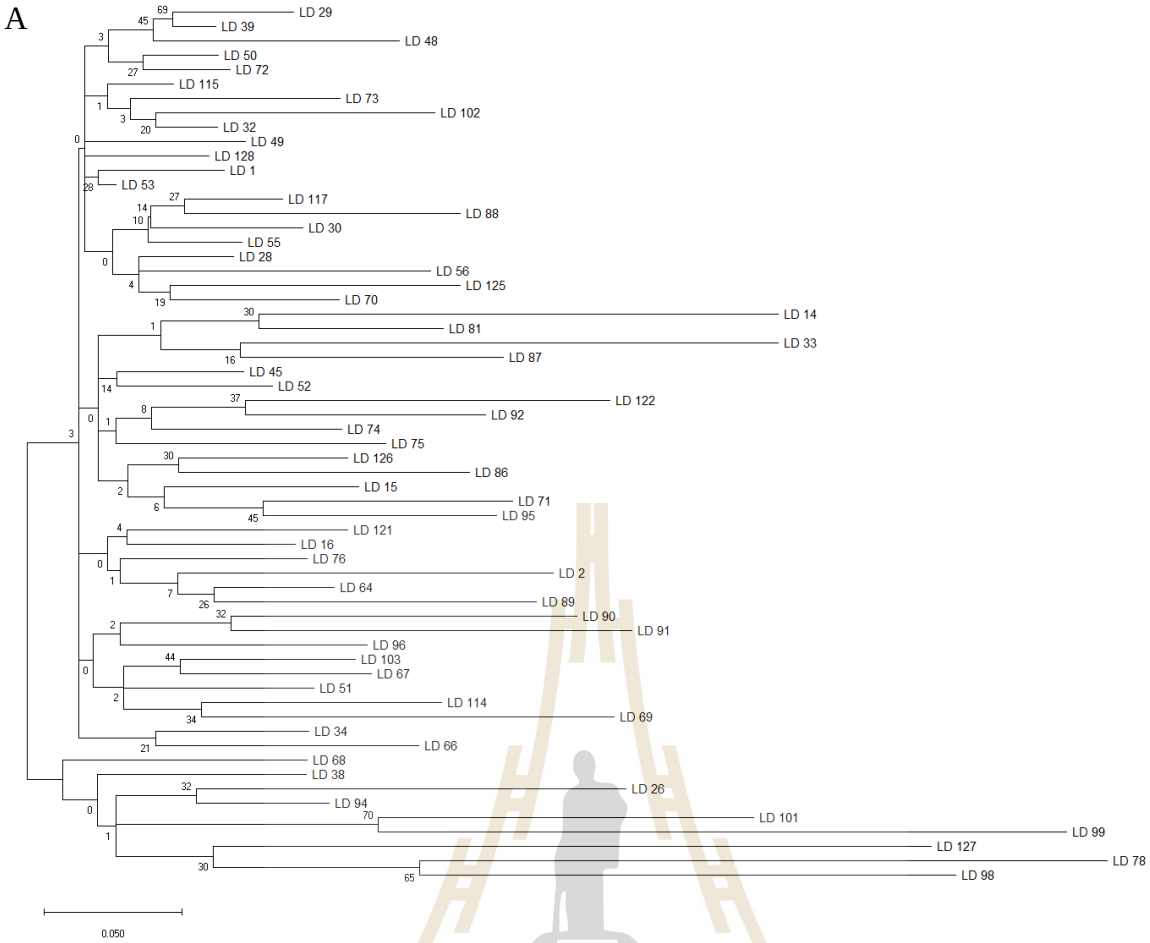
ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง (*Lasiodiplodia theobromae*) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SNPs โดยตั้งค่าการกรองให้ SNPs แต่ละตำแหน่งจะต้องมีจำนวน reads ที่ map ในตำแหน่งนั้น ๆ ไม่ต่ำกว่า 20 reads และมีข้อมูล missing ไม่เกิน 50% หลังจากกรองพบว่ามี SNPs ที่ผ่านเกณฑ์ดังกล่าว 408 ตำแหน่ง จากนั้นจึงนำ SNPs ที่ได้ไปสร้างเป็น phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood โดยใช้ Tamura-Nei model แบบ GTR-G-I (Tamura and Nei 1993) และใช้ heuristic model แบบ Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) และตั้งค่า Gamma distribution (+G) = 5 และมี evolutionarily invariable (+I) และใช้ bootstrap 1000 ครั้ง ซึ่งจาก phylogenetic tree ที่ได้จะสังเกตได้ว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีเปอร์เซ็นต์ map ต่ำจะถูกแยกออกมาอย่างชัดเจนจากกลุ่มตัวอย่างอื่น (ภาพที่ 4.6) และตัวอย่างอื่นๆไม่สามารถแบ่งกลุ่มได้อย่างชัดเจนนัก



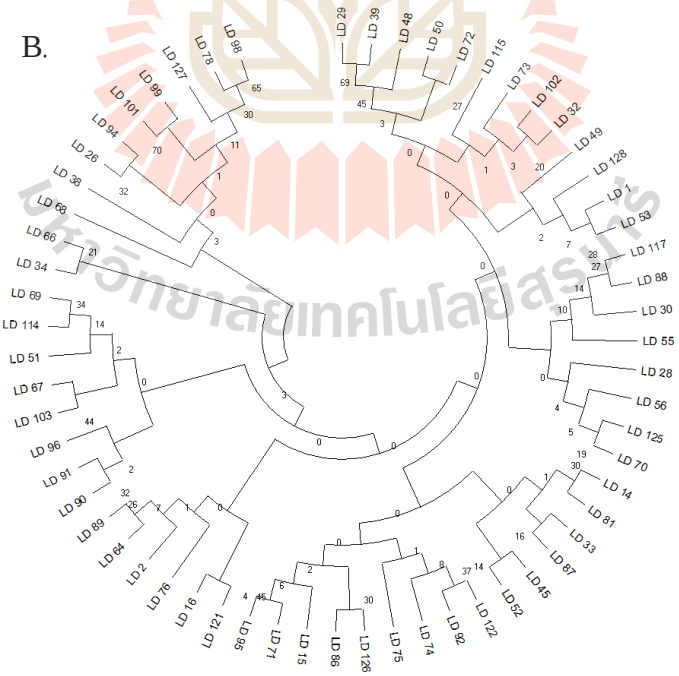
ภาพที่ 4.6 Phylogenetic tree ของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง (*Lasiodiplodia theobromae*) กลุ่มที่อยู่ในกรอบสีแดงคือกลุ่มที่เปอร์เซ็นต์ map ต่ำกว่า 70% และตัวอย่างที่อยู่ในกรอบสีส้มคือกลุ่มที่เปอร์เซ็นต์ map อยู่ที่ 70% - 80%

เนื่องจาก phylogenetic tree ที่สร้างจากตัวอย่างทั้ง 96 ไอโซเลต นั้นไม่สามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างได้อย่างชัดเจน ทีมวิจัยจึงได้ทำการตัดกลุ่มตัวอย่างที่มีผล map ต่ำกว่า 70% ออกและสร้าง phylogenetic tree ขึ้นมาใหม่ด้วยอีกหลาย condition พบว่าในทุก condition ที่ทำตัวอย่างถูกแบ่งออกเป็น 1 กลุ่มใหญ่และ 1 กลุ่มย่อยเสมอ โดยในกลุ่มย่อยนั้นจะประกอบด้วยตัวอย่าง LD98, LD78, LD127, LD99, LD101, LD94, LD26, LD38 และ LD68 เสมอ (ภาพที่ 4.7)

A

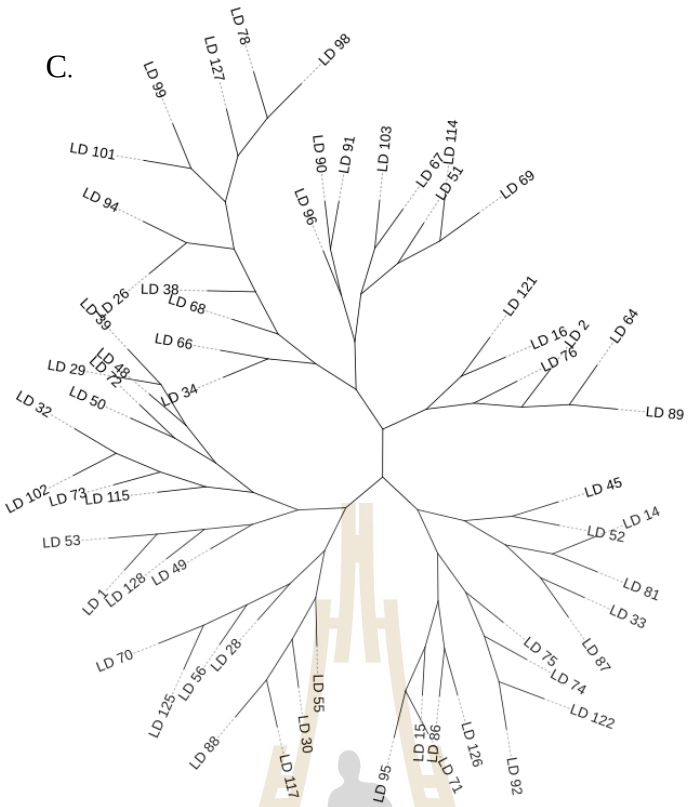


B.



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

C.



ภาพที่ 4.7 Phylogenetic tree ที่สร้างโดยตัดตัวอย่างที่มีเปอรเซ็นต์ map น้อยกว่า 70% ออก และรวมไปถึงตัวอย่าง LD_13 และ LD_36 ที่มีจำนวน reads ตั้งต้นน้อยทำให้ SNPs หายไปเป็นจำนวนมาก Phylogenetic tree ที่นำมาแสดงนี้ใช้การกรอง SNPs ด้วย condition: Sample missing per SNPs site less than or equal to 30%, minimum depth 10, minor allele frequency at least 5%, number of alleles is 2. ได้ค่า log likelihood -9296.26 ตัวเลขที่กระจายอยู่ตรงจุดที่กิ่งแตกแขนงคือค่า bootstrap ที่บอกความมั่นใจของการจับกลุ่มนั้นๆ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นการเพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังที่พบในพื้นที่ปลูกสำคัญพบว่า

1. การเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากแหล่งปลูกใน 4 อำเภอ ของ 2 จังหวัด สามารถรวบรวมตัวอย่างได้ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา 2 ชนิด คือ Water agar (WA) และ potato dextrose agar (PDA) จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าโคนเน่า *Lasiodiplodia* spp. ซึ่งสอดคล้องกับ Msikita และคณะ (1998) และ ประเทศไทยในปัจจุบัน โรคโคนเน่าและหัวเน่าและโคนเน่ามันสำปะหลังยังมีการศึกษาเพื่อระบุชนิดเชื้อสาเหตุที่ชัดเจนค่อนข้างน้อย ซึ่งในปี พ.ศ. 2553 รังษี เจริญสถาพร และ อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว พบว่าโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลัง เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp., *Rigidoporus lignosus* และ *S. rolfsii* และในปีพ.ศ. 2555 มีรายงานว่า โรคลำต้นเน่ามันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* (Buensanteai andAthinuwat, 2012) ซึ่งจากการรายงานต่าง ๆ เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าโรคพืชที่เกิดบริเวณโคนต้นและรากพืชมีแนวโน้มพบการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคคือ *L. theobromae* จากนั้นทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่า ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราที่แยกได้จากต้นมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่าโคนเน่า จำนวน 191 ไอโซเลต สามารถจัดกลุ่มจากลักษณะของเส้นใยได้ 4 กลุ่มดังนี้ 1) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ เส้นใยขนาดเล็ก ฟู บริเวณปลายเส้นใยมีการรวมกลุ่มของเส้นใยเป็นกระจุกสีขาว จำนวน 32 ไอโซเลต 2) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเทาปนเขียวมะกอก เส้นใยขนาดเล็ก ฟู จำนวน 62 ไอโซเลต 3) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ เส้นใยขนาดเล็ก จำนวน 51 ไอโซเลต และ 4) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำปนเทา เส้นใยมีขนาดเล็ก ฟู จำนวน 46 ไอโซเลต นอกจากนี้สีโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA จะปรากฏสีเทาดำ หรือดำเขียวมะกอก สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ถึงยาวรีจนถึงค่อนข้างกลม ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย ในระยะแก่ (mature conidia) จะสร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวเซลล์ด้าน ในเรียงตัวเห็นเป็นริ้วในแนวยาว และมีผนังกั้น (septum) ชั้น ตรงกลางทำให้แบ่งเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างคล้ายไข่ และผลการทดลองพบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเติบโตเร็ว และสามารถเจริญเต็มจานอาหาร PDA ภายในวัน 1-3 หลังจากเลี้ยงเชื้อ ที่แตกต่างกัน ซึ่งไอโซเลตที่เจริญเติบโตเร็วสุด ได้แก่ ไอโซเลต L12SHRD และ ไอโซเลต SP-R1.44 สามารถเจริญบนจานอาหาร PDA มีขนาดเฉลี่ย 83.00×83.00 มิลลิเมตร หลังวางเชื้อ 1 วัน ส่วนไอโซเลตที่เจริญช้าสุด ได้แก่ ไอโซเลต SP-R1.38 ไอโซเลต HT902-2 และ ไอโซเลต SS-S4.54 สามารถเจริญบนจานอาหาร ขนาดเฉลี่ย 43.00x43.00 มิลลิเมตร หลังวางเชื้อ 1 วัน โดยเชื้อราแต่ละไอโซเลตจะเจริญเต็มจานอาหาร PDA ในวันที่ 3

2. ทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าแต่ละไอโซเลตมีความรุนแรงแตกต่างกัน และเชื้อสามารถก่อโรคในท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 โดยไอโซเลต SSBR301-2 SSNM05 SSBR1403-4 HT901-1 SSBR1403-1 HT401-2 HT701-1 HT401-1 SS-R4.1 SSBR701-4 SSBR301-3 HT703-3 SSBR1402-5 SS-S4.56 SP-S1.2 SS-R3.14 SS-S3.39 SS-S3.32.1 SP601-1 SSNM46 และ SS-R3.18 รุนแรงที่สุด ลักษณะอาการหัวมันหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน สามารถก่อความรุนแรงของโรคได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงลักษณะอาการในท่อนพันธุ์ เนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนเป็นสี

น้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น เปลี่ยนเป็น น้ำตาลเทา และเปลี่ยนเป็นสีดำ บริเวณที่ปลูกเชื้อ และมีการแสดงอาการเนื้อเยื่อตาย บริเวณเนื้อไม้ เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลถึงดำยาวตามท่อลำเลียง Bonito et al. (2010) ทำการทดสอบความสามารถการเกิดโรคโคนเน่าและหัวเน่าโคนเน่ามันสำปะหลังในประเทศโตโก พบว่าเชื้อรา *L. theobromae*, ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าเชื้อราบางไอโซเลตมีความรุนแรงในการเกิดโรคบนหัวและท่อนพันธุ์ในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ไม่รุนแรงในระดับโรงเรือน (Alves et al. 2008) ที่ผ่านมาเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. มีความสำคัญแต่พบน้อยกว่าโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่น แต่ในปัจจุบันพบการระบาดของเชื้อราดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นซึ่งอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราดังกล่าว (กลุ่มอนุรักษ์ดินและน้ำ, 2545; Machado et al., 2014a; 2014b; Phillips et al., 2013; Trakunyingcharoen et al., 2014; 2015a; 2015b)

3. การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล ด้วยการ map ลำดับเบสเข้ากับจีโนมอ้างอิงของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรครากเน่าในมันสำปะหลัง *L. theobromae* จากการตรวจสอบทั้งหมด 96 ตัวอย่าง มีจำนวนลำดับเบสที่อ่านได้ทั้งหมด (จำนวนreads) 26,497,233 reads และการอ่านลำดับเบส (reads) ที่ได้มาจากเครื่องอ่านลำดับเบส MGI ของทั้ง 96 ตัวอย่าง พบว่าแต่ละตัวอย่างมี reads ที่สามารถ map กับจีโนมอ้างอิงได้ 3.83 – 29.35 % อยู่ทั้งสิ้น 18 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่มี reads ที่สามารถ map ได้ 39.74 – 64.04 % อยู่ 16 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างที่ reads สามารถ map ได้ตั้งแต่ 72.25 – 86.39 % อยู่ทั้งหมด 62 ตัวอย่าง นอกจากนี้ จากตัวอย่างที่ map ได้ต่ำกว่า 70 % ทั้งหมด 34 ตัวอย่าง จากข้อมูลดังกล่าวสามารถช่วยในการจัดกลุ่มความหลากหลายของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* ออกเป็น 1 กลุ่มใหญ่และ 1 กลุ่มย่อย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน. 2545. มันสำปะหลังในเอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน.กรมพัฒนาที่ดิน.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 1001: 46.01.

เกษตรกรง่ายๆ ดอทคอม.2557. โรคลำต้นเน่ามันสำปะหลัง. (ออนไลน์). http://angsila.informatics.buu.ac.th/~54230008/index.php?p=page&id=63

ขนิษฐา มากรุง. 2548. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี. 77 หน้า.

ครอ็อพมาสเตอร์เกษตรปลอดสาร. 2551. (ออนไลน์) http://www.weloveshopping.com/template/a13. 25 กรกฎาคม 2551.

เคหะเกษตร ออนไลน์. ม.ป.ป. แก้ไขปัญหาโรคหัวมันสำปะหลังเน่าด้วยชีววิธี. (ออนไลน์). 9 ตุลาคม 2557.

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2550. ประวัติความเป็นมาของมันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://guru.sanook.com/search/knowledge_search.php?qID=&wi=&hnl=&ob=&asc=&q=%BB%C3%D0%C7%D1%B5%D4%A4%C7%D2%C1%E0%BB%E7%B9%C1%D2%A2%CD%A7%C1%D1%B9%CA%D3%BB%D0%CB%C5%D1%A7&select=1.

จักรพงษ์ ชาตะรักษ์.2554. มันสำปะหลัง. (ออนไลน์) http://50010210339.blogspot.com/: พืชเศรษฐกิจของไทย. 23 พฤศจิกายน 2557. เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2550. ประวัติความเป็นมาของมันสำปะหลัง. (ออนไลน์) http://guru.sanook.com/search/knowledge_search.php: สารานุกรมไทยฉบับเยาวชนฯ เล่มที่ 5. 23 ธันวาคม 2554.

ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์. 2556. การศึกษาอณูพันธุศาสตร์และระบาดวิทยาของแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS). Thai J. Genet.S (1): 46-51.

ชาติชาย ศิริพัฒน์. 2557. รากเน่าหัวเน่า ระบาดหนักไร่มันสำปะหลัง. ไทยรัฐออนไลน์. [ออนไลน์]. ได้จาก: https://www.thairath.co.th/content/442798

ไพบูลย์ ฟูวัฒนศิลป์. 2551. การเพาะปลูกมันสาปะหลังไทยในปี2552 มีความเสี่ยงสูงขึ้น. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.ktb.co.th/ktb/Download/economyresources/EconomyResources.

มธุกร สมพงษ์. 2553. ความแตกตางระหว่างเชื้อ *Sphaceloma* spp. สาเหตุโรคสแคบขององุ่นกับพืชชนิดอื่น. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 71 หน้า

มาลินี อัศวดิษฐเลิศ. 2553. เทคนิคพีซีอาร์เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว. (ออนไลน์) http://www.biotec.or.th/Guru/. 18 มกราคม 2556.

ยุกติ สาริกะภูติ. 2526. มันสำปะหลัง. เอกสารวิชาการ เล่มที่ 7. กรมวิชาการเกษตร. 83 - 87.

รังสี เจริญสถาพร และ อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว. 2553. โรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังและแนวทางการป้องกันกำจัด. สถาบันวิจัยพืชไร่กรมวิชาการเกษตร. (ออนไลน์) http://soclaimon.wordpress.com/2010/06/11. 25 ธันวาคม 2555.

วิศรุต เศรษฐชุ่ม. 2557. โรคโคนเน่าระบาด. (ออนไลน์) https://www.facebook.com/133258390067918/posts/748041708589580/

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. ภาวะเศรษฐกิจการเกษตร ปี 2561. (ออนไลน์) https://www.oae.go.th/view/1/%E0%B8%A3%E0%B8%B2%E0%B8%A2%E0%B8%A5%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0%B8%B5%E0%B8%A2%E0%B8%94%E0%B8%A0%E0%B8%B2%E0%B8%A7%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%A8%E0%B8%A3%E0%B8%A9%E0%B8%90%E0%B8%81%E0%B8%B4%E0%B8%88%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0%B8%81%E0%B8%A9%E0%B8%95%E0%B8%A3/%E0%B8%A0%E0%B8%B2%E0%B8%A7%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%A8%E0%B8%A3%E0%B8%A9%E0%B8%90%E0%B8%81%E0%B8%B4%E0%B8%88%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0%B8%81%E0%B8%A9%E0%B8%95%E0%B8%A3-27465/TH-TH

สมาคมโรงงานผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังไทย .2561. ผลการสำรวจทบทวนภาวะการผลิตมันสำปะหลังปี 2561/62. (ออนไลน์) http://thaitapioca.org/2019/%E0%B8%9C%E0%B8%A5%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%AA%E0%B8%B3%E0%B8%A3%E0%B8%A7%E0%B8%88%E0%B8%97%E0%B8%9A%E0%B8%97%E0%B8%A7%E0%B8%99%E0%B8%A0%E0%B8%B2%E0%B8%A7%E0%B8%B0%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3-4/

สุดใจ สูนาสวน, ยรรยง สมบัติวิชาธร, สิริมา ธนพงศ์พิพัฒน์, คนางค์ ดวงมณี, และเสาวณิต วรดิษฐ์. 2554. รายงานผลการศึกษาสินค้าเกษตรประเภทมันสำปะหลัง. ใน: รายงานผลการศึกษาสินค้าเกษตรประเภทมัน สำปะหลังสำนักงานคณะกรรมการกำกับการซื้อขายสินค้าเกษตรล่วงหน้า. 5 – 15 หน้า. 18. สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร. (2557). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2557.[ออนไลน์]. ได้ จาก: http://www.oae.go.th/morenews.php?cid=12.-hv.

สันติ พรมคำ. มมป. โรคและแมลงศัตรูของมันส าปะหลัง .กรมวิชาการเกษตร. (ออนไลน์). https://www.doa.go.th/share/attachment.php?aid=2912

อลิษา วิลันโท, อรนุช ประดิษฐ์ทรัพย์, วรรณวิสาข์ เจริญฉิม, ศุภศักดิ์ กุลวงศ์อนันชัย, อนันต์ชัย อัศวเมฆิน 22 และ ศิษเฎศ ทองสิมา. 2555. เทคโนโลยีเอ็นจีเอสและการประยุกต์ในงานวิจัยโอมิกส์ Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. Thai J. Genet. 5(2):104-129.

Alves, A., Crous, P.W., Correia, A. and Phillips, A.J.L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic species in Lasiodiplodia theobromae. Fungal Divers. 28:1–13.

Acheampong A.R. and Archer S. 2011. Diversity of Fungi Associated with Mirid (Hemiptera: Miridae) feeding lesions and dieback disease of Cocoa in Ghana. International Journal of Agri. Res. 6(9): 660 – 672.

Adhikari B.N., Hamilton J.P., Zerillo M.M., Tisserat N., Lévesque C.A. and Buell C.R. 2013. Comparative Genomics Reveals Insight into Virulence Strategies of Plant Pathogenic Oomycetes. PLoS ONE 8(10): 1-15

Adams I.P., Glover R. H., Monger W.A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinskiene M., Samuitiene M. And Boonham N. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. MOLECULAR PLANT PATHOLOGY. 10(4): 537-545

Amselem J. et al., 2011. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens Sclerotinia sclerotiorum and Botrytis cinerea. PLOS Genetics.7(8):1-27.

Azad R. and Shamsi S. 2011. IDENTIFICATION AND PATHOGENIC POTENTIALITY OF FUNGI ASSOCIATED WITH HOUTTUYNIA CORDATA THUNB. Dhaka University Journal of Biological Sciences. 20(2): 131-138

Adamsa I.P., Mianob D.W., Kinyuab Z.M., Wangaib A., Kimanic E., Phirid N., Reedere R., Harjua V., Glovera R., Hanya U., Souza-Richardsaf R., Deb Nathag P., Nixona T., Foxa A., Barnesa A., Smitha J., Skeltona A., Thwaitesa R., Mumfordа R. and N. Boonham. 2013. Use of next-generation sequencing for the identification andcharacterization of Maize chlorotic mottle virus andSugarcane mosaic virus causing maize lethal necrosis inKenya. lant Pa thology. 62, 741–749

Blanco-Ulate B, Rolshausen P, and Cantu D. 2013. Draft Genome Sequence of *Neofusicoccum parvum* Isolate UCR-NP2, a Fungal Vascular Pathogen Associated with Grapevine Cankers. Gonome Announcements. 1(3):1-2.

Bandyopadhyay R., Mwngi M., Aigbe S.O. and Leslie J.F. 2006. Fusarium speciese from the cassava root rot complex in West Africa. 96: 673 – 676.

Bonito G., Isikhuemhenb O.S. and Vilgalysa R. 2010. Identification of fungi associated with municipal compost using DNA-based techniques. Bioresource Technology. 101(3):1021-1027

Buensanteai N. and Athinuwat D. 2012. The antagonistic activity of Trichoderma virens strain TvSUT10 against cassava stem rot in Thailand. African Journal of Biotechnology. 11(84): 14996-15001

Blanco-Ulate B., Rolshausen P. and Dario Cantu. 2013. Draft Genome Sequence of Neofusicoccum parvum Isolate UCR-NP2, a Fungal Vascular Pathogen Associated with Grapevine Cankers. GENOME ANNOUNCEMENT. 1(3)

Cano J., Guarro J. and Gene J. 2004. Molecular and morphological identification of Colletotrichum species of clinical interest. Journal of Clinical Microbiology. 42(6): 2450-2454.

Cilliers A.J., Swart W.J. and Wingfield M.J. 1994. Selective medium for *isolating Lasiodiplodia theobromae*. Plant Dis. 78: 1052 – 1055.

Danecek P., Auton A., Abecasis G., Albers C.A., Banks E., DePristo M. A., Handsaker R.E., Lunter G., Marth G.T., Sherry S.T., McVean G. and Durbin R. 2011. The variant call format and VCFtools. Bioinformatics. 27(15): 2156–2158

Huertas-Gonzlez M.D., Ruiz-Roldal M.C., Di Pietro A. and Roncero M. I. G. 1999. Cross protection provides evidence for race-specific avirulence factors in Fusarium oxysporum. Physiological and Molecular Plant Pathology. 54: 63–72

Haas B.J., et al. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen Phytophthora infestans. Nature. 461:393-398

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol. 35(6): 1547–1549.

Li H. and Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. Bioinformatics. 25(14): 1754–1760

Li H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. Vol. 00 no. 00 2013 Pages 1–3

Lecuit M. and Eloit M. 2014. The diagnosis of infectious diseases by whole genome next generation sequencing: a new era is opening. Front Cell Infect Microbiol. 4 (25): 1-3.

Ma L.J. et al., 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in fusarium. Nature. 464: 367-373.

Ma L.J., Shea t., Young S., Zeng O. and Kistler C. 2014. Genome Sequence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Strain NRRL 26406, a Fungus Causing Wilt Disease on Melon. Gonome Announcements. 2(4): 1-2.

Msikita W., James B., Ahounou M., Baimey H., Facho B.G. and Fagbemisi R. 1998. Discoveries of new diseases of cassava in West Africa. Trop Agric. 75: 58–63.

Msikita W., Bissang B., JamesB.D., BaimeyH., WilkinsonH.T., Ahounou M. and FagbemissiR. 2005. Prevalence and severity of Nattrassia mangiferae root and stem rot pathogen of cassava in B´ enin. Plant Dis 89: 12–16.

Machado, A.R. 2012. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant Jatropha curcas in Brazil, with a description of new species of Lasiodiplodia. M.S. thesis. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa. Brazil. 57.

Machado, A.R., Pinho, D.B., Oliveira, S.A.S. and Pereira, O.L. 2014a. New occurrences of Botryosphaeriaceae causing black root rot of cassava in Brazil. Tropical Plant Pathology. 39(6): 464-470.

Machado, A. R., Pinho, D. B., and Pereira, O. L. 2014b. Phylogeny, Identification and Pathogenicity of The Botryosphaeriaceae Associated with Collar and Root Rot of the Biofuel Plant Jatropha curcas In Brazil, with A Description of New species of Lasiodiplodia. Fungal Diversity. 67: 231-247.

Nghia A. N., Quynh V. T., and Dong N. X. 2012. Molecular Analysis of *Botryodiplodia theobromaeIsolates* from Rubber in Vietnam Using rDNA ITS Sequencing and ISSR Markers. IRRDB International Rubber Conference 2012, 28-31 October 2012.

Onyeka T.J. 2002. Cassava root rot pathogens in Nigeria: Variability in *Botryodiplodia theobromaeisolates* and evaluation of the cassava germplasm collection for resistance to root rot disease. Ph.D. thesis, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria.

Onyeka T.J., Ekpo E.J.A. and Dixon A.G.O. 2004. Cassava root rot disease in West Africa: Review of recent literature and the field situation in Nigeria. In: M.O. Akoroda (Ed.), The small processor and development of local food industries for market economy. Proceedings of the 8th Symposium of the International Society for Tropical Root Crops-Africa Branch (ISTRC-AB), 12–16 November 2001, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria, 584–588.

Okechukwu R.U., Dlxon A.G.O., Akoroda M.O., Mwamgi M. and Bandyopadhyarr R. 2009. Root rot resistance in new cassava varieties introduced to farmers in Nigeria. Experimental Agriculture. 45: 15-24.

Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. Studies in Mycology. 76: 51-167.

Poplin, R. et al. 2017. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. bioRxiv, 201178.

Rujirawat T., Patumcharoenpol P., Lohnoo T., Yingyong W., Lerksuthirat T., Tangphatsornruang S., Suriyaphol P., Grenville-Briggs L.J., Garg G., Kittichotirat W. and Krajaejun T. 2015. Drafe Genome Sequence of the Pathogenic Oomycete *Phythium Insidiosum* Strain Pi-S, Isolate from a Patient with Pythiosis. Gonome Announcements. 3:1-2.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Smith B.J. and Black L.L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colltotrichum* species isolate from strawberry. Plant disease.74:69 – 76.

Tamura K. and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution. 10(3): 512–526

Trakunyingcharoen T, Cheewangkoon, R., To-anun, C., Crous, P.W., van Niekerk, J.M. and Lombard, L. 2014. Botryosphaeriaceae associated with diseases of mango (Mangifera indica). Australasian Plant Pathology. 43: 425–438.

Trakunyingcharoen, T., Cheewangkoon, R. and To-anun, C. 2015a. Phylogenetic Study of the Botryosphaeriaceae Species Associated with Avocado and Par rubber in Thailand. Chiang Mai Journal of Science 42(1): 104-116.

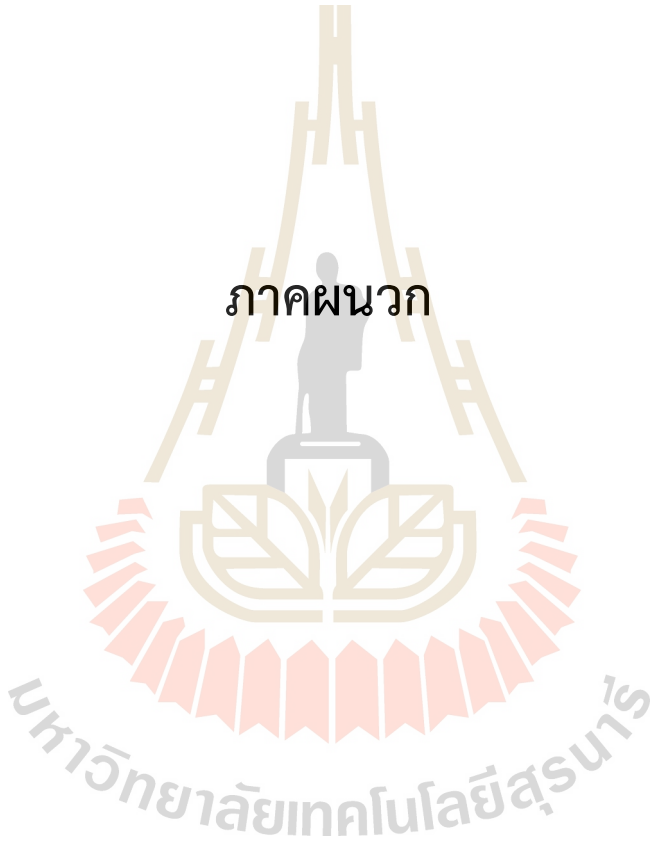
Trakunyingcharoen, T., Lombard, L., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., To-anun, C. and Crous, P.W. 2015b. Caulicolous Botryosphaeriales from Thailand. Persoonia. 34: 87–99.

van Dijk L.E, Auger H., Jaszczyszyn Y. and Thermes C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. National Center for Biotechnology InformationSearch database

Wokocha, R.C., Nneke, N.E. and Umechurba, C.I. 2010. Screening *Colletotrichun gloeospoeioides* f.sp. *manihotis* isolates for virulence on cassava in Akwa Ibom State of Nigeria. Journal of Agricultural Science and Technology. 9: 56–63.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก



1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

1.1 Water Agar (WA)

วุ้นผง (Agar)	18 กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000 มิลลิลิตร

ผสมวุ้นผงกับน้ำกลั่น หรือน้ำกรอง นำไปต้มจนรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะ เพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 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

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลบ. ซม. ต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตร จนนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำสกัดผสม dextrose ทั้งหมดลงในน้ำสกัด นำไปผสมกับวุ้นผงที่ต้มจนละลายแล้ว ด้วยน้ำส่วนที่เหลือ คนให้เข้ากัน เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำเข้านึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตำรางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของเชื้อรา

2.1 1% Agarose gel (100 ml)

Agarose gel	1.00 กรัม
1x TBE Buffer	100 มิลลิลิตร

2.2 1.5% Agarose gel (100 ml)

Agarose gel	1.50 กรัม
1x TBE Buffer	100 มิลลิลิตร

2.3 TE Buffer (1000 ml)

Tris-HCL	1.211 กรัม
EDTA	9.306 กรัม

ละลายในน้ำ DI ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

2.4 10x TBE Buffer (1000 ml)

Tris base	108 กรัม
Boric acid	55 กรัม
0.5 M EDTA	40 มิลลิลิตร

เติมน้ำ DI ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15-20 นาที

2.5 1x TBE Buffer (1000 ml)

10x TBE Buffer	100 มิลลิลิตร
น้ำ DI นึ่งฆ่าเชื้อ	900 มิลลิลิตร

2.6 Extraction Buffer (100 ml)

CTAP	2 กรัม
5 M NaCl (1.4 M)	28 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (20 mM)	4 มิลลิลิตร
1 M Tris-HCL (100 mM)	10 มิลลิลิตร
2- Mercaptoethonal (2%)	2 มิลลิลิตร
น้ำ DI นึ่งฆ่าเชื้อ	54 มิลลิลิตร

2.7 Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)

Chloroform	48 มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	2 มิลลิลิตร

2.8 70% ethanol

2.9 Absolute ethanol

Absolute ethanol แช่เย็นอย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำไปใช้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวณัฐธิญา เบือนสันเทียะ เกิดวันที่ 7 กรกฎาคม พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต่น และมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนครบุรี อ. ครบุรี จ. นครราชสีมา เริ่มเข่าศึกษาระดับ ปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปการศึกษา 2542 ขณะที่ศึกษาในระดับปริญญาตรี ได้ศึกษาการตรวจสอบโปรตีน โดยศึกษาและตรวจหาการสะสม โพลีฟนอลออกซิเดซในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศ และจากนั้นจึงมีความสนใจนำเทคนิคทาง เซรุมวิทยาและชีวโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืช ภายหลังสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีในปการศึกษา 2/2545 ได้เข่าศึกษาตอในระดับมหาบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปการศึกษา 3/2545 และสำเร็จการศึกษาระดับมหาบัณฑิตศึกษา ในปการศึกษา 2547 ภายหลังสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิตศึกษา ได้เขาศึกษาตอในระดับดุษฎีบัณฑิต ในหลักสูตร ปร.ด. (โรคพืช), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำเร็จการศึกษาในปการศึกษา 2550 และเข้าทำงานในปี พ.ศ. 2553 เป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จนถึงปัจจุบัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี