รหัสโครงการ SUT3-302-60-24-03

รายงานการวิจัย

การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS)

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-302-60-24-03

รายงานการวิจัย

การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS)

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

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2562

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา 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 เพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังที่พบในพื้นที่ปลูกที่สำคัญ โดยทำการเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากแหล่งปลูกใน 6 อำเภอ ของ 3 จังหวัด ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย จำนวน 139 ตัวอย่าง จากนั้นนำเชื้อสาเหตุโรคที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการศึกษาพบว่า โรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังถูกเข้าทำลายจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. ที่อยู่ในวงศ์ Botryosphaeriaceae ซึ่งเชื้อราทั้งสองสกุลเมื่อเข้าทำลายมันสำปะหลังจะมีอาการ เน่าเปียก เน่าเละ เน่าแห้ง และมีสีดำ ในบริเวณโคนต้น จากนั้นแยกเชื้อจากสปอร์เดี่ยวนำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่า เชื้อราทั้ง 33 ไอโซเลต สามารถก่อให้เกิดโรคได้ทั้งกับท่อนพันธุ์ และหัวสำปะหลังพันธุ์ระยอง 89 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอในสภาพกล่องชื้น โดยไอโซเลต L11HSR2 สามารถก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด นอกจากนี้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเติบโตเร็ว และสามารถเจริญได้เต็มจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) ภายในวันที่ 1-3 หลังจากเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อราจะมีเส้นใยสีขาวในวันที่ 1 และมีสีเทาในวันที่ 3 โดยในวันที่ 3-4 จะเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวมะกอกดำ หรือน้ำตาลดำ ซึ่งในแต่ละไอโซเลตมีลักษณะสีของโคโลนีที่แตกต่างกัน และสีของโคโลนีจะเข้มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น และจากผลการทดลองพบว่าไอโซเลตที่เจริญเติบโตเร็วที่สุดได้แก่ ไอโซเลต L8HDBB สามารถเจริญบนจานอาหาร PDA หลังวางเชื้อ 1 วัน มีขนาดเฉลี่ย 84.00x84.25 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลตที่เจริญช้าสุด ได้แก่ L10BBLB สามารถเจริญบนจานอาหารหลังวางเชื้อ 1 วัน ขนาดเฉลี่ย 43.00x43.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ทำการศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลและการวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการ โดยนำตัวแทนของเชื้อจำนวน 8 ไอโซเลต ประกอบด้วย L6HRD, L11HSR2, L12SHRD, L13SRTF, L18KBSH, L20FHTB1, L27SRBT และ N3DTD2 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ใช้ universal primers 3 บริเวณ คือ ไพร์เมอร์ ITS1/ ITS4, ไพร์เมอร์ Ef1-688F/Ef1-1251R และไพร์เมอร์ Bt2a/Bt2b แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อในฐานข้อมูล Genbank พบว่า บริเวณ EF1-α สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุด ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลร่วมกัน พบว่าสามารถจำแนกเชื้อรา คือ *L. theobromae, L. euphorbicola* และ *N. hyalinum* เข้าทำลายมันสำปะหลังในประเทศไทย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Cassava root rot disease is an important disease of cassava in Thailand. The objective of this study was to identify the causal agent of cassava root rot pathogens in important planting areas. The study was carried out by collecting cassava samples with root rot symptoms from cassava planting areas covering those in 6 districts of 3 provinces in central and northeastern, Thailand. A total of 139 isolates of cassava stem and root rot causal fungi were isolated. The isolated pathogens were morphology studied. The results showed that cassava root rot is infected by *Lasiodiplodia* spp. and *Neoscytalidium* sp. in the family Botryosphaeriaceae. When both pathogens' infections showed the symptoms of wet rot, rotten, dry rot, and black color in the cassava root area. The pathogenicity test of all 33 fungal isolates could cause root rot symptoms on inoculated cassava CMR 89, susceptible cassava cultivar in a moist chamber, and greenhouse conditions but the disease severity was different depending on the fungal isolates. Among the isolate, L11HSR2 was the most virulent. Nevertheless, study to morphological of isolate fungal pathogen. The result found that isolate L8HDBB in PDA at 1 day has higher mycelium growth at 84.00x84.25 mm, and lower is isolate L10BBLB at 43.00x43.00 mm respectively, a significant difference. In addition, biomolecular characterization and phylogenetic analyses were performed. Eight representative isolates including L6HRD, L11HSR2, L12SHRD, L13SRTF, L18KBSH, L20FHTB1, L27SRBT, and N3DTD2 were used to quantify DNA fragments by PCR technique using 3 universal primers including ITS1/ITS4, Ef1-688F/Ef1-1251R, and Bt2a/Bt2b primers. The resulting nucleotide sequences were compared with the nucleotide sequences in the Genbank database showed that the EF1-α region was the most distinctly differentiated. The results of the study of morphology and biomolecules together. It was found that *L. theobromae, L. euphorbicola* and *N. hyalinum*, infested cassava in Thailand.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญภาพ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 วิธีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา 6

2.2 วิธีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล 7

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย 10

3.1 การสำรวจการแพร่ระบาดเบื้องต้นและเก็บตัวอย่าง 10

3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรค 10

3.3 การเก็บ Stock เชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง 12

3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าใน
มันสำปะหลัง 12

3.5 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง
ด้วยวิธีชีวโมเลกุล 13

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย 15

4.1 เก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคโคนเน่าและหัวเน่า จากจังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดใกล้เคียง 15

4.2 แยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคโคนเน่าและหัวเน่า 16

4.3 ทดสอบความสามารถในการก่อโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อ 20

4.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ 24

4.5 การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง 27

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 31

รายการอ้างอิง 34

ภาคผนวก 39

ประวัติผู้เขียน 42

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังที่พบในจังหวัดนครราชสีมา 6

ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังในแปลง (A) มีอาการยืนต้นตาย ใบเหี่ยว หลุดร่วง สภาพแปลงในอำเภอเสิงสาง จังหวัดนครราชสีมา (B) มีอาการยืนต้นตาย ใบเหี่ยว หลุดร่วง สภาพแปลงในอำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา 15

ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลัง (A) มีอาการใบล่างเหี่ยว หลุดร่วง ในมันอายุ 5-7 เดือน (B-C) ท่อนพันธุ์ไม่งอก เจริญเติบโตช้า แคระแกร็น ใบเรียวเล็ก มีสีซีด ใบล่างเหี่ยวช้ำ กิ่งมีอาการช้ำสีดำ ในมันอายุ 2-5 เดือน (D-E) หัวมันมีอาการเน่า เนื้อเยื่อบริเวณหัวมันเปื่อยยุ่ยเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง น้ำตาล และดำ (F) บริเวณขั้วหัวมันมีเส้นใยเชื้อราสีขาว (G) บริเวณขั้วของรากมีอาการเน่าดำ รากไม่เจริญเติบโต (H-I) มี fruiting body สีดำของเชื้อราเจริญบริเวณเปลือกของลำต้น (J) บริเวณใต้เปลือกท่อนพันธุ์พบเนื้อเยื่อตายเป็นสีดำ (necrotic symptoms on vascular system) 16

ภาพที่ 4.3 แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่า บริเวณหัวและขั้วหัวมันสำปะหลัง (A) อาการหัวเน่าช้ำ มีการเปลี่ยนสีจากขาวเป็นสีเทาจนถึงสีดำแยกได้เชื้อไอโซเลต L6HRD, L8HDBB, L11HSR2 และ L15HDBB (B) อาการหัวเน่าช้ำมีเส้นดำ เส้นสีเขียวมะกอก แยกได้เชื้อไอโซเลต L22HRW, L24HRWH และ N3DTD2 (C) อาการหัวเน่าช้ำเขียวมะกอก โดยเน่าบริเวณกลางหัวมันสำปะหลัง แยกได้เชื้อไอโซเลต L20FHTB1 และ L26HRWB (D) อาการหัวเน่าเละสีดำแยกได้เชื้อไอโซเลต L18KBSH3 (E) อาการหัวเน่าเละสีดำโดยแยกบริเวณขั้วหัวติดกับโคนต้นแยกได้เชื้อไอโซเลต L4STR1 และ L5KBSH1 (F) อาการหัวเน่าช้ำสีดำโดยแยกบริเวณขั้วหัวติดกับโคนต้น แยกได้เชื้อ ไอโซเลต L2SHSR1, L12SHRD และ N2SHCA 17

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 4.4 แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่า บริเวณโคนต้นและท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง (A) อาการโคนต้นบวมแตกเป็นริ้วมีเชื้อราสีดำเจริญอยู่ภายในมีเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญปกคลุมแยกได้เชื้อไอโซเลต L17STRB, L19KBSH2, L21SRE, L25SRC และ L27SRBT (B) อาการโคนต้นบวมแตกเป็นริ้ว มีเชื้อราสีดำเจริญอยู่ภายในแต่ไม่มีเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญปกคลุม แยกได้เชื้อไอโซเลต L9STR2 และ L23STWH, ท่อนพันธุ์แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน้ามันสำปะหลัง (C-D) มีตุ่มเม็ดของเชื้อรา สีดำเจริญท่อนพันธุ์ แยกได้เชื้อไอโซเลต L13SRTF, N1SRTTC, N4BBPM, N5STRST, L1STRM, L3BSR และ L7STRW 18

ภาพที่ 4.5 แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่า บริเวณกิ่ง ใบและก้านใบมันสำปะหลัง (A) อาการกิ่งไหม้ช้ำมีสีดำ แยกได้เชื้อไอโซเลต L10BBLB (B) อาการกิ่งไหม้ช้ำสีน้ำตาลแดงเข้ม และเหี่ยวแห้ง แยกได้เชื้อไอโซเลต L28SBB (C) อาการใบไหม้เน่าช้ำสีดำ แยกได้เชื้อไอโซเลต L14LSR (D) อาการก้านใบไหม้มีแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แยกได้เชื้อไอโซเลต L16BLSR 19

ภาพที่ 4.6 ลักษณะของหัวมันสำปะหลังที่หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วันในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการหัวเน่าช้ำ เนื้อเยื่อยุบตัวลง บริเวณปลูกเชื้อเนื้อเยื่อเปลี่ยนสีเป็นน้ำตาลดำถึงดำและแห้ง ส่วนบริเวณรอบ ๆ เปลี่ยนสีเป็นเหลืองถึงสีน้ำตาล เปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในแยกแตกและออกจากกัน (A) ไอโซเลต L11HSR2 ความรุนแรงระดับ 5 (B) ไอโซเลต L6HRD ความรุนแรงระดับ 4 (C) ไอโซเลต L18KBSH3 ความรุนแรงระดับ 3 (D) ไอโซเลต L14LSR ความรุนแรงระดับ 2 และ (E) หัวมันในกรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค 21

ภาพที่ 4.7 ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 15 วันในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น ถูกทำลายเปลี่ยนเป็นสีดำ เทา และน้ำตาล แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต (A) ไอโซเลต L12SHRD ความรุนแรงระดับ 3 (B) ไอโซเลต L24HRWH ความรุนแรงระดับ 2 และ (C) ท่อนพันธุ์กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค 22

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีของไอโซเลต L11HSR2 (A) เชื้อราจะมีเส้นใยสีขาวถึงสีเทาในวันที่ 1-3 (B) เปลี่ยนสีเป็นสีเขียวมะกอกดำ (greenish olivaceous to black) ในวันที่ 3-4 (C) โคโลนีจะมีสีเข้มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่ออายุมากขึ้น 25

ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราทั้ง 6 กลุ่ม (A) ไอโซเลต L4STR1, L8HDBB, L9STR2, L19KBSH2 L23STWH, L24HRWH, L27SRBT และ L28SBB (B) L2SHSR1, L6HRD, L12SHRD, L14LSR, L16BLSR, L17STRB และ L20FHTB1 (C) L11HSR2 (D) L1STRM, L5KBSH1, L7STRW, L15HDBB, L18KBSH3, L21SRE และ L26HRWB (E) L3BSR, L10BBLB, L13SRTF, L22HRW และ L25SRC (F) N1SRTTC, N2SHCA, N3DTD2, N4BBPM และ N5STRST 27

ภาพที่ 4.10 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ βt lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = L6HRD, lane 2 = L11HSR2, lane 3 = L12SHRD lane 4 = L13SRTF, lane 5 = L18KBSH3, lane 6 = L20FHTB1, lane 7 = L22HRW, lane 8 = L27SRBT และ lane 9 = N1SRTTC 28

ภาพที่ 4.11 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ EF1-α lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = L6HRD, lane 2 = L11HSR2, lane 3 = L12SHRD lane 4 = L13SRTF, lane 5 = L18KBSH3, lane 6 = L20FHTB1, lane 7 = L22HRW, lane 8 = L27SRBT และ lane 9 = N1SRTTC 29

ภาพที่ 4.12 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ ITS lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = L6HRD, lane 2 = L11HSR2, lane 3 = L12SHRD lane 4 = L13SRTF, lane 5 = L18KBSH3, lane 6 = L20FHTB1, lane 7 = L22HRW, lane 8 = L27SRBT และ lane 9 = N1SRTTC 29

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่า ที่เก็บได้จากจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง 19
ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ ในห้องปฏิบัติการบนมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 89 22
ตารางที่ 4.3 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อายุ 1 2 และ 3 วัน 25
ตารางที่ 4.4 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบส (DNA sequencing) ของเชื้อราที่แยกได้ จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนเน่าเละหัวเน่า ทั้ง 3 บริเวณ ได้แก่ ITS EF1-α และ beta-tubulin (βt) ในฐานข้อมูล Genbank 30

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหาการวิจัย

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) มีชื่อสามัญเรียกชื่อตามท้องถิ่นได้แก่ มันสำปะหลัง, cassava, yuca, mandioa, manioc, tapioca (Lemaire, 1950; Rao et al., 2017) ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกมากที่สุดในโลก ในรูปของมันอัดเม็ดส่งออกไปที่ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส) จีน เกาหลีใต้และญี่ปุ่น สำหรับแป้งมันสำปะหลังจะส่งออกไปที่ประเทศญี่ปุ่น จีน รองลงมาคือฮ่องกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์และไต้หวัน ส่วนการใช้มันสำปะหลังในประเทศใช้ทำมันเส้นและมันอัดเม็ดร้อยละ 45 - 50 ใช้แปรรูปเป็นแป้งร้อยละ 50 - 55 (จักรพงษ์ ชาตะรักษ์, 2554) ปัจจุบันการปลูกมันสำปะหลังเริ่มประสบปัญหาเรื่องแมลงศัตรูพืช และโรคพืช โดยแมลงศัตรูมันสำปะหลังที่สำคัญ 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; Zárate-Chaves et al., 2021) และในปัจจุบันมีโรคที่สร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตของเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังโดยตรง คือ โรคหัวเน่ามันสำปะหลัง (Root rot disease) สำหรับในประเทศไทยมีการเรียกชื่อโรคหลากหลายชื่อ อาทิ โรคหัวมันสำปะหลังเน่า (เคหะการเกษตรออนไลน์, ม.ป.ป.) โรคโคนเน่ามันสำปะหลัง โรคลำต้นเน่า (เกษตรกรง่ายๆ ดอทคอม, 2557) โรครากและหัวเน่ามันสำปะหลัง โรครากหรือหัวเน่า (คร็อพมาสเตอร์ เกษตรปลอดภัย, 2551) เนื่องจากมีการเรียกชื่อที่หลากหลายก่อให้เกิดความสับสน ดังนั้นในการวิจัยนี้จะเรียกชื่อที่มี ความสัมพันธ์กับลักษณะอาการที่พบคือชื่อ “โรคโคนเน่าและหัวเน่ามันในสำปะหลัง” ในปี2557 พบการระบาดของโรคนี้ในหลายพื้นที่ ในเขตพื้นที่ อ.เสิงสาง และ อ.ครบุรี และพื้นที่อื่นของจังหวัดนครราชสีมากกว่า 4 พันไร่ โดยเฉพาะในแหล่งดินระบายน้ำยาก และฝนตกชุกเกินไปในบางพื้นที่สามารถพบได้ในแหล่งที่ดินมีการให้น้ำในระบบน้ำหยด เนื่องจากดินมีความชื้นสูง ลักษณะอาการของโรคที่พบ ยอดจะเหลืองและใบเหี่ยวแล้วร่วงเมื่อถอนต้นจะพบโคนต้นบวมและแตก รากจะเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลและเน่า ถ้าเกิดกับหัวจะทำให้หัวเน่าอย่างรวดเร็ว และมีกลิ่นเหม็น เชื้อสาเหตุของโรคนี้มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีในดิน และมีพืชอาศัยมากชนิดทำให้ยากต่อการป้องกันกำจัด โรคนี้สามารถเกิดได้ทั้งระยะกล้า และระยะที่มันสำปะหลังลงหัวแล้ว มีรายงานว่าโรคโคนเน่าและหัวเน่าเกิดจากสาเหตุหลายชนิด ปัจจุบันในประเทศไทยตรวจพบว่าเชื้อสาเหตุ คือ เชื้อรา *Phytophthora* sp. หากโรคดังกล่าวนี้ระบาดรุนแรงอาจทำความเสียหายกับผลผลิตมันสำปะหลังถึง 80 เปอร์เซ็นต์ โรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลังต่างประเทศมี 2 ลักษณะอาการหลักคือ อาการของโรคที่เป็นชนิด wet root rot และ root dry rot ซึ่งมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *Botryodiplodia theobromae, Fusarium* sp., *Sclerotium rolfsii* และ *Pythium* sp. (Blanco-Ulate et al., 2013;

Rujirawat et al., 2015) ในประเทศไทยได้มีการรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* sp. ต่อมามีรายงานเพิ่มเติมว่าเกิดจากเชื้อรา *Rigidoporus* (Fomes) *lignosus* และ *S.rolfsii* (รังษี เจริญสถาพร และ อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว, 2553) เทคโนโลยีเอ็นจีเอสหรือ Next Generation Sequencing มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาลำดับเบสทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการหาลำดับเบสแบบขนานที่ทำได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพซึ่งจะได้ข้อมูลลำดับเบสจำนวนมหาศาล ปัจจุบันเครื่องมือของเทคโนโลยีเอ็นจีเอส มีสามรูปแบบหลักที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางได้แก่ 454/Roche, Illumina, และ SOLiD/Life Technology (ABI) โดยเครื่องมือต่าง ๆ เหล่านี้มีหลักการหาลำดับเบสรูปแบบของข้อมูลลำดับเบสสายสั้น (reads) และจำนวนของข้อมูล reads ที่ออกมาแตกต่างกันไปรวมถึงประโยชน์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโอมิกส์ได้หลากหลายเช่น การทำ De novo sequencing, target resequencing, RNA sequencing และ metagenomics เป็นต้น (อลิษา วิลันโท และคณะ, 2555; ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, 2556; Zeyimo et al., 2020) ทั้งนี้ในทางด้านโรคพืชมีการนำเทคโนโลยี NGS ในการศึกษา complex microbial population microbial ecology และมีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ใน การวินิจฉัยด้านโรคพืชและโรคชนิดใหม่ที่พบ (Ma et al., 2014; Lecuit and Eloit, 2014) เพื่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับการเข้าทำลายพืชของเชื้อสาเหตุโรคชนิด complex pathogens อย่างไรก็ตาม ข้อมูลด้านนี้ยังมีการศึกษาไม่แพร่หลาย (Ma et al., 2010; Amselem et al., 2011) ทั้งนี้การศึกษาการเรียงลำดับเบสที่ได้จากเทคโนโลยีเอ็นจีเอสเพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของลำดับเบสที่เกิดขึ้นและนำไปสู่การตอบโจทย์ในงานวิจัยด้านโรคพืชและ การป้องกันกำจัดต่อไป ดังนั้นเพื่อค้นหาแนวทางในการแก้ปัญหาอย่างถูกต้อง จำเป็นต้องมีข้อมูลของชนิดเชื้อที่ก่อโรคแต่ละประเภทที่แน่ชัด เพื่อหาแนวทางในการป้องกันและจัดการกับเชื้อสาเหตุโรคอย่างเหมาะสม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันในมันสำปะหลังที่พบในพื้นที่ปลูกสำคัญ
2. ศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันมันในสำปะหลังด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS)

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงชนิดเชื้อสาเหตุ ลักษณะอาการ การแพร่ระบาดของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังสำคัญ และศึกษาพันธุกรรมของเชื้อก่อโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันมันในสำปะหลังด้วยเทคนิค Next Generation Sequencing (NGS) ในโครงการนี้จะเน้นการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae* สาเหตุโรคเน่าดำของมันสำปะหลังซึ่งเป็นโรคหนึ่งที่มีความสำคัญในกลุ่มโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันมันในสำปะหลัง

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลสำเร็จที่เป็นองค์ความรู้หรือรูปแบบ หรือวิธีการที่จะนำไปสู่การวิจัย อาจจะถูกนำไปต่อยอดการวิจัยต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์ในด้าน ด้านวิชาการ

ผู้ที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผู้ใช้	การใช้ประโยชน์
บริษัทซีเอส ทาปีโอก้า วิจัยและนวัตกรรม จำกัด	สามารถใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดโรคมันสำปะหลังในระบบการปลูกมันสำปะหลังอินทรีย์ในอนาคตอันใกล้นี้
เกษตรกรที่ประกอบอาชีพปลูกมันสำปะหลัง	ทราบถึงสาเหตุของเชื้อก่อโรคโคนเน่าและหัวเน่าและการป้องกันกำจัด
หน่วยงานภาครัฐ	ทราบถึงชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังและวิธีการป้องกันกำจัด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) มีถิ่นกำเนิดในประเทศเขตร้อน (Lowland tropics) ปลูกในประเทศโคลัมเบีย 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 ของประเทศรองจากข้าวและยางพารา โดยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลังมากที่สุด รองลงมาคือ ภาคกลางและภาคเหนือ มันสำปะหลัง ปี 2563 คาดว่ามีพื้นที่เก็บเกี่ยว 8.75 ล้านไร่ ผลผลิต 31.104 ล้านตัน ผลผลิตต่อไร่ 3.56 ตัน เมื่อเทียบกับปี 2562 ที่มีพื้นที่เก็บเกี่ยว 8.67 ล้านไร่ ผลผลิต 31.080 ล้านตัน และผลผลิตต่อไร่ 3.59 ตัน พบว่า พื้นที่เก็บเกี่ยว และผลผลิต เพิ่มขึ้นร้อยละ 0.93 และร้อยละ 0.08 ตามลำดับ แต่ผลผลิตต่อไร่ลดลงร้อยละ 0.84 (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2564) ปัจจุบันการปลูกมันสำปะหลังเริ่มประสบปัญหาเรื่องแมลงศัตรูพืชและโรคพืช ได้แก่ เพลี้ยแป้ง ไรแดง โรคใบจุด โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบไหม้ โรคแอนแทรคโนส เป็นต้น ในปัจจุบันโรคมันสำปะหลังที่สำคัญและสร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตของเกษตรกรมันสำปะหลังโดยตรง คือ โรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลัง (สุดใจ สูนาสวน และคณะ, 2554) เป็นโรคที่มีความสำคัญโรคหนึ่งของผู้ปลูกมันสำปะหลังทั่วโลก ในประเทศไทยมีการเรียกชื่อโรคหลากหลายชื่อ อาทิ โรคหัวมันสำปะหลังเน่า โรคโคนเน่ามันสำปะหลัง โรคลำต้นเน่า โรครากและหัวเน่ามันสำปะหลัง โรครากหรือหัวเน่า (ครือพมาสเตอร์ เกษตรปลอดภัย, 2551) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงต่อผลผลิตมันสำปะหลัง ซึ่งในปี 2557 พบการระบาดของโรครากและหัวมันเน่าในหลายพื้นที่ ในเขตพื้นที่ อ.เสิงสาง และครบุรี และพื้นที่อื่นของจังหวัดนครราชสีมากกว่า 4 พันไร่ โดยเฉพาะในแหล่งดินระบายน้ำยาก และฝนตกชุกเกินไปในบางพื้นที่สามารถพบได้ในแหล่งที่ดินมีการให้น้ำในระบบน้ำหยด เนื่องจากดินมีความชื้นสูง ลักษณะอาการของโรคที่พบ ยอดจะเหลืองและใบเหี่ยวแล้วร่วงเมื่อถอนต้นจะพบโคนต้นบวมและแตก รากจะเป็นรอยช้ำ สีน้ำตาลและเน่าถ้าเกิดกับหัวจะทำให้หัวเน่าอย่างรวดเร็ว และมีกลิ่นเหม็น ยากต่อการป้องกันกำจัด เนื่องจากเชื้อสาเหตุของโรคนี้มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีในดิน และมีพืชอาศัยมากชนิด โรคนี้สามารถเกิดได้ทั้งระยะกล้าและระยะที่มันสำปะหลังลงหัวแล้ว โรคโคนเน่าและหัวเน่าเกิดจากสาเหตุหลายชนิด ปัจจุบันในประเทศไทยตรวจพบว่าเชื้อสาเหตุ คือ เชื้อรา Phytophthora อย่างไรก็ตามในต่างประเทศมีรายงานว่าโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลัง (Cassava root rot disease: CRRD) เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Phytophthora* spp., *Scytalidium* spp., *Botryodiplodia 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) โดยในประเทศบราซิลมีรายงานว่า โรคหัวเน่าเละมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *P. drechsleri* และโรคหัวเน่าแห้งมันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. สำหรับในประเทศแอฟริกามีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *B. theobromae, N. mangiferae* และ *Fusarium* spp. (Msikita et al., 1998, 2005; Onyeka et al., 2004) ในประเทศไนจีเรีย มีรายงานว่า เกิดจากเชื้อ *B. theobromae* สร้างความเสียหายมากกว่า 70% ของพื้นที่ (Onyeka, 2002) นอกจากนี้ มีรายงานว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. เป็นอีกสาเหตุของโรคโคนและหัวเน่าเช่นกัน โรคนี้สร้างความเสียหายต่อผลผลิตมันสำปะหลังเป็นอันดับต้นๆ ในทวีปแอฟริกา และอเมริกาใต้ ในทวีปแอฟริกา และอเมริกาใต้ โรคนี้ทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังลดลงถึง 80% ของผลผลิตรวม (Msikita et al., 2005) ในประเทศไนจีเรีย และแคมมารูน ผลผลิตมันสำปะหลังลดลงมากกว่า 25% เมื่อถูกโรคนี้เข้าทำลาย โดยจะพบการแพร่ระบาดในช่วงฤดูฝน บริเวณที่ดินระบายน้ำไม่ดี ลักษณะอาการหลักที่พบส่วนใหญ่ที่พบจะมีกลิ่นเหม็น ถ้าเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. เนื้อเยื่อจะมีสีชมพูหรือสีเหลือง แต่ถ้าเกิดจากเชื้อรา *B. theobromae* เนื้อเยื่อจะมีสีเทาดำ ในบางอาการจะพบเส้นใย sclerotia หรือ pycnidia บริเวณรอบโคนต้น (Bandyopadhyay et al., 2006) ในประเทศไทยเริ่มพบการระบาดของโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลังในเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมาและหลายพื้นที่ปลูกสำคัญ โดยพบลักษณะอาการ 4 ลักษณะของโรค คือ โรคหัวเน่าเละ เกิดจากเชื้อรา ต้นเหี่ยวเฉาใบล่าง ๆ มีสีเหลือง และเหี่ยวแห้งหลุดร่วงลงมา ส่วนใบยอดมีขนาดเล็ก ต้นแคระแกรน ไม่เจริญเติบโต เมื่อขุดรากดูพบรากเน่าเละสีน้ำตาล มีกลิ่นเหม็น โรคหัวเน่าแห้ง เกิดจากเชื้อเห็ดรา ที่หัวมันสำปะหลังจะมีเส้นใยของเชื้อราปกคลุม อาจพบบริเวณโคนต้นด้วย เนื้อในหัวจะเน่าแห้งและเส้นใยของเชื้อราจะก่อตัวเป็นดอกเห็ดสีต่าง ๆ ได้ เช่น สีขาว สีเหลือง หรือส้ม นอกจากนี้โคนต้นจะบวม เนื่องจากมีการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาทดแทนส่วนที่ถูกทำลายไปและอาจเกิดรากใหม่ตรงบริเวณเนื้อเยื่อที่บวม ทำให้เกิดหัวมันสำปะหลังใหม่ขึ้นมา แต่มีขนาดเล็ก โรคหัวเน่าดำ เกิดจากเชื้อรา จะมีลักษณะหัวเน่าสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากเป็นสีที่เกิดจากเส้นใยของเชื้อรา หรือส่วนขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา โรคเน่าคอดิน เกิดจากเชื้อรา มักพบอาการในต้นกล้า ลักษณะต้นมันสำปะหลังจะเหี่ยวเฉาตายและมีเม็ดผักกาดพร้อมกับเส้นใยสีขาวปกคลุมส่วนของโคนต้นที่ติดอยู่กับผิวดิน โรคโคนและหัวเน่าสามารถทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังสูญเสียโดยตรงโดยเฉพาะในแหล่งที่ดินระบายน้ำได้ยากฝนตกชุกเกินไป โรคนี้สามารถเกิดได้ทั้งระยะต้นกล้าและระยะที่ลงหัวแล้วโรคนี้อาจทำความเสียหายถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (ยุกติ สาริกะภูติ, 2526) ถ้าเกิดกับกล้ามันสำปะหลังจะแสดงอาการรากเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลและเน่าต้นจะเหี่ยวเฉาหากเกิดกับหัวจะสังเกตเห็นอาการหัวเน่าอย่างรวดเร็วและมีกลิ่นเหม็นใบเหี่ยวแล้วร่วง หากมีอาการรุนแรง มันสำปะหลังจะยืนต้นตายและจะพบเส้นใยสีขาวของเชื้อรารวมกันคล้ายเส้นด้ายปกคลุมบริเวณหัวและบริเวณโคนต้นมันสำปะหลัง ส่งผลให้เนื้อภายในหัวเน่าแห้งมีกลิ่นคล้ายมันสำปะหลังเน่าที่เราคุ้นเคยและได้กลิ่นจากลานมันฯ หรือโรงงานอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง ใบเหี่ยวอาจถึงตายได้ ดังภาพที่ 1 แต่ส่วนใหญ่จะยังไม่ตายและจะสร้างรากใหม่ที่โคนต้นในดินเหนือบริเวณ

หัวที่เน่าในดินที่แห้ง หัวที่เน่าจะเป็นสีดำ (mummified) บางครั้งมีเห็ด (*Armillariwlla mellea* Vahl.) ขึ้นอยู่ที่โคนต้น

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังที่พบในจังหวัดนครราชสีมา

แต่เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าสามารถพบในพืชอาศัยหลายชนิด อีกทั้งในปัจจุบันมีการระบาดของโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลังอย่างรุนแรง และมีลักษณะอาการที่หลากหลาย รวมทั้งยังไม่มีการจัดจำแนกชนิดและสปีชีส์ของเชื้อสาเหตุโรคอย่างชัดเจนในมันสำปะหลัง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลัง การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งด้วยวิธีการพื้นฐาน วิธีทางชีวโมเลกุล และวิธีทางชีวเคมี ดังนี้

2.1 วิธีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สีของโคโลนี ขนาดและรูปร่างของโคนีเดีย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ลักษณะของเส้นใย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดย Smith and Black (1990) ปัจจุบันมีการพบเชื้อราสาเหตุโรคหัวเน่าเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีพืชอาศัยกว้างและยังมีเชื้อราอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ หรือจัดจำแนกได้แต่ไม่ชัดเจน (Cano et al., 2004) ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการหาวิธีอื่นมาช่วยในการจัดจำแนกและศึกษาความหลากหลายของเชื้อร่วมกับวิธีศึกษาทางสัณฐานวิทยา โดยวิธีที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบันมีอยู่หลายเทคนิค เช่น เทคโนโลยีด้านชีวโมเลกุลและชีวเคมีเพื่อให้การศึกษามีความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น

2.2 วิธีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

ปัจจุบันมีการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุล โดยการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA sequence) ซึ่งดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครโมโซมอยู่ใน nucleus ของเซลล์โดยทำหน้าที่ส่งผ่านข้อมูลทางพันธุกรรม มีองค์ประกอบทางเคมีเฉพาะตัวและโครงสร้างโมเลกุลเป็นสายคู่ของ 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 ร่วมกับการใช้ primer หรือ dNTPs ที่ถูก labelled ด้วยสาร fluorescent เพื่อความสะดวกต่อการอ่านผลด้วยเครื่อง automated DNA sequencer ผลลัพธ์ที่ได้คือสาย DNA ที่มีขนาดสั้นยาวแตกต่างกัน เมื่อนำสาย DNA เหล่านี้ไปแยกขนาดในสนามกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer จะได้รูปแบบของสาย DNA ที่มีการเรียงลำดับตามขนาดความยาวของ DNA fragment ซึ่งมีความสัมพันธ์กับรหัสพันธุกรรมบนสาย DNA โดยสายรหัสพันธุกรรม DNA เหล่านี้อาจจะเป็นส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีน (gene) หรือเป็นส่วนที่ไม่ได้กำหนดการสร้างโปรตีนก็ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน DNA ที่นำมาหาลำดับ nucleotide ถ้าหากชิ้นส่วน DNA เป็น genomic DNA ก็จะพบส่วนของ exon และ intron ได้แต่ถ้าหากนำเอา RNA หรือ cDNA มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ก็จะพบเฉพาะส่วนของ exon เท่านั้นซึ่งประกอบด้วยรหัสพันธุกรรม (genetic code) ที่กำหนดการสร้างกรดอะมิโน โดยทั่วไปข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกจะถูกนำไปเก็บไว้ที่ฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่เรียกว่า GenBank (http://www.ncbi.nlm. nih.gov) ซึ่งเป็นข้อมูลสาธารณะที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีการถอดรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อราเพื่อศึกษาถึงชนิดและความหลากหลายจำนวนมาก

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีด้านชีวโมเลกุลและชีวเคมีมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกระบุชนิดและตรวจสอบจุลินทรีย์เชื้อสาเหตุโรคพืชอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเทคนิคนี้มีความรวดเร็ว แม่นยำ มีความจำเพาะเจาะจงสูงและมีราคาไม่แพง จึงมีการนำเทคนิคต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (Polymerase chain reaction: 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 ในสารละลายที่มีกลุ่ม

ของ sequence DNA เป็นจำนวนมากปะปนกันอยู่แล้วเพิ่มปริมาณส่วน targeted sequence ขึ้นมาเป็นล้านเท่าโดยผ่านวิธีกึ่งอัตโนมัติซึ่งใช้เวลาเพียง 1 หรือ 2 ชั่วโมงเท่านั้น จุดเด่นของเทคนิค PCR คือสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อย รวดเร็ว แม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงสูงในปัจจุบัน PCR ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ซึ่งสำหรับงานตรวจจำแนกดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณ DNA งานด้านการโคลนนิ่ง (gene cloning) การทำแผนที่ยีน (gene mapping) การทำพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในทางการเกษตร PCR ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ และการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของโรคพืช โดยสามารถใช้ตรวจหา DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยในพืชได้และยังเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำเฉพาะเจาะจงและมีความไวในประเทศเวียดนามมีการศึกษาลายพิมพ์ DNA ของเชื้อรา *B. theobromae* สาเหตุโรคในยางพาราจำนวน 20 ไอโซเลตโดยใช้ universal primers ITS1 (5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) และ ITS4 (5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) (Nghia et al., 2012) และมีการใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ ISSR Marker เพื่อหาความหลากหลายของเชื้อ *Fusarium* sp. และ *Lasiodiplodia* สาเหตุโรค dieback ในโกโก้ จำนวน 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)

เทคโนโลยีเอ็นจีเอสหรือ Next Generation Sequencing เป็นเทคโนโลยีการหาลำดับเบสที่พัฒนาขึ้นใหม่มีความสามารถในการเรียงลำดับเบสจำนวนมากในการทำงานของเครื่องเพียงครั้งเดียว โดยสามารถใช้หาลำดับเบสของจีโนมซึ่งมีความยาว 3 พันล้านเบสการหาลำดับเบสเอ็กโซม (Exome Sequencing) ซึ่งมีความยาว 50 ล้านเบสหรือการหาลำดับเบสของบริเวณเฉพาะของจีโนมหลายๆ บริเวณหรือยีนหลายยีนที่สนใจ (Panel or Targeted sequencing) จากหลายตัวอย่างที่มีความยาวรวมกันเป็นล้านเบสได้โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาลำดับเบสทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการหาลำดับเบสแบบขนานที่ทำได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพซึ่งจะได้ข้อมูลลำดับเบสจำนวนมหาศาล ปัจจุบันเครื่องมือของเทคโนโลยีเอ็นจีเอสมีสามรูปแบบหลักที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางได้แก่ 454/Roche, Illumina และ SOLiD/Life Technology (ABI) โดยเครื่องมือต่าง ๆ เหล่านี้มีหลักการหาลำดับเบสรูปแบบของข้อมูลลำดับเบสสายสั้น (reads) และจำนวนของข้อมูล reads ที่ออกมาแตกต่างกันไปรวมถึงประโยชน์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโอมิกส์ได้หลากหลายเช่นการทำ *de novo* sequencing, target resequencing, RNA sequencing และ metagenomics เป็นต้นปัจจุบันการศึกษาหาลำดับเบสทั้งหมดของสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA sequence) ถือได้ว่าเป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่สำคัญที่สุดในการศึกษาทางด้านจีโนมิกส์ (Genomics) ซึ่งก็คือการศึกษาจีโนม (genome) ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั่นเอง (อลิษา วิลันโท และคณะ,

2555) ทั้งนี้ในทางด้านโรคพืชมีการนำเทคโนโลยีเอ็นจีเอส ในการศึกษา complex microbial ได้มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการวินิจฉัยด้านโรคพืชและโรคชนิดใหม่ที่พบ เพื่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับการเข้าทำลายพืชของเชื้อสาเหตุโรคชนิด complex pathogens (Adams et al., 2013) อย่างไรก็ตามข้อมูลด้านนี้ยังมีการศึกษาไม่แพร่หลายทั้งนี้การศึกษาการเรียงลำดับเบสที่ได้จากเทคโนโลยีเอ็นจีเอสเพื่อให้ทราบถึงความหลากหลายของลำดับเบสที่เกิดขึ้นและนำไปสู่การตอบโจทย์ในงานวิจัยด้านโรคพืชและการป้องกันกำจัดต่อไป

ดังนั้นเพื่อค้นหาแนวทางในการแก้ปัญหาอย่างถูกต้อง จำเป็นต้องมีข้อมูลของชนิดเชื้อที่ก่อโรคแต่ละประเภทที่แน่ชัด เพื่อหาแนวทางในการป้องกันและจัดการกับเชื้อสาเหตุโรคอย่างเหมาะสม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสำรวจการแพร่ระบาดเบื้องต้นและเก็บตัวอย่าง

สำรวจในพื้นที่ปลูกที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง 6 อำเภอ 3 จังหวัด ได้แก่ อำเภอตากฟ้าและตาคลี จังหวัดนครสวรรค์ อำเภอเทพสถิตย์ จังหวัดชัยภูมิ อำเภอเมือง อำเภอเสิงสาง และอำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ประเมินเฉพาะ Disease incidence (อัตราการ แพร่ระบาด เปอร์เซ็นต์ต้นที่เป็นโรค) โดยดูจากอาการเป็นหลัก (เน่าเละ/ เน่าแห้ง/ ลำต้น, ราก, โคน และหัว) ยังไม่ต้องระบุชนิด เก็บตัวอย่างโคนต้น, ราก, หัว และดิน (บางตัวอย่าง) รอบต้นที่เป็นโรค และจากต้นข้างเคียง

3.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าจากตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรค

3.2.1 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยวิธี tissue transplanting

นำตัวอย่างบริเวณ ดิน ลำต้น โคน รากและหัวมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนและหัวเน่า ที่เก็บได้ในข้อที่ 13.1 มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Tissue transplanting บนอาหาร Water agart (WA), Half potato dextrose agar (HPDA) และ PDA+BRANP ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (Selective media) สำหรับแยกเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. (ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์,2553; Cilliers et al., 1994) โดยทำความสะอาดตัวอย่างมันสำปะหลังที่เก็บมาด้วยน้ำสบู่หรือน้ำเปล่าให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดบริเวณเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นส่วนต่อระหว่างเนื้อเยื่อดีกับส่วนที่เป็นโรค จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ (NaOCl 1%) เป็นเวลา 1–2 นาที ขึ้นอยู่กับขนาดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อ ใช้ปากคีบ คีบย้ายชิ้นใบมันสำปะหลังมาล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลาประมาณ 1 นาที ซับชิ้นส่วนด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อจากนั้นใช้เข็มเขี่ย เขี่ยชิ้นใบมันสำปะหลังวางบนอาหาร WA และ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นย้ายเส้นใยที่เจริญออกมารอบ ๆ เนื้อเยื่อพืชไปเลี้ยงบนอาหาร HPDA เป็นเวลา 10 วันเพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าสร้างสปอร์ (Azad et al., 2011).

3.2.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยวิธีการใช้เหยื่อล่อ (Modified baiting technique)

ปลูกท่อนพันธุ์มันสำปะหลังสายพันธุ์อ่อนแอ (พันธุ์ ระยอง 89) ลงบนดินที่เก็บมาจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคเปรียบเทียบกับดินปลูก มทส. โดย กรรมวิธีที่ 1 ทำแผลยาวประมาณ 1 นิ้ว 4 รอยรอบท่อนพันธุ์ กรรมวิธีที่ 2 ไม่ทำแผล ปลูกท่อนพันธุ์ลงในถุงปลูกขนาด 8 นิ้ว จำนวน 2 ท่อนต่อ 1 ถุงปลูก สุ่มตรวจพัฒนาการของการเกิดโรค ทุก 1 เดือนจากทั้ง 2 ดินปลูก หากปรากฏแผลหรือสังเกตเห็นอาหารของโรคให้ทำการแยกเชื้อโดยใช้ PDA

3.2.3 การแยกสปอร์เดี่ยว (Single spore) ของเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

นำเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่า ที่แยกด้วยวิธี Tissue transplanting และ modified baiting technique ในข้อที่ 3.2.1 และ 3.2.2 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)

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรค (Pathogenicity and virulence test) ในสภาพห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 4 ซ้ำ เตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ คือ พันธุ์ระยอง 89 โดยเตรียมท่อนพันธุ์มันสำปะหลังความยาว 20 เซนติเมตรต่อท่อน ปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว ที่มีดินทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย formalin (นำทรายใส่ลงในถังพลาสติก แล้วราดด้วย formalin อัตรา 500 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ปิดฝาถังทิ้งไว้นาน 1 สัปดาห์เพื่ออบฆ่าเชื้อ และเปิดฝาทิ้งไว้อีก 1 สัปดาห์ นำไปใช้การปลูกมันสำปะหลังต่อไป) ปลูกท่อนพันธุ์ 1 ท่อนต่อกระถางและปลูก Inoculum ของเชื้อซึ่งเตรียมโดยนำเชื้อราจากข้อ 3.2.3 เพิ่มปริมาณลงใน Grain Medium (เมล็ดข้าวโพดบดนึ่ง หรือ เปลือกมันผสมเมล็ดข้าวโพดบดนึ่ง) ใส่ Inoculum ของเชื้อรอบโคนท่อนพันธุ์ เปรียบเทียบระหว่างท่อนพันธุ์ที่ไม่ทำแผล ท่อนพันธุ์ที่ทำแผล และท่อนพันธุ์ที่ไม่ปลูกเชื้อสาเหตุโรค (control) การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลังต้องทำการทดสอบ Combination ระหว่างเชื้อสาเหตุที่แยกได้ เช่น สามารถแยกเชื้อสาเหตุได้ 3 ชนิด อาทิ A B และ C ดังนั้นจะมีกรรมวิธีทดสอบดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใส่ Inoculum ของเชื้อ A รอบโคนท่อนพันธุ์

กรรมวิธีที่ 2 ใส่ Inoculum ของเชื้อ B รอบโคนท่อนพันธุ์

กรรมวิธีที่ 3 ใส่ Inoculum ของเชื้อ C รอบโคนท่อนพันธุ์

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ Inoculum ของเชื้อ A + B รอบโคนท่อนพันธุ์

กรรมวิธีที่ 5 ใส่ Inoculum ของเชื้อ A + C รอบโคนท่อนพันธุ์

กรรมวิธีที่ 6 ใส่ Inoculum ของเชื้อ B + C รอบโคนท่อนพันธุ์

กรรมวิธีที่ 7 ใส่ Inoculum ของเชื้อ A + B + C รอบโคนท่อนพันธุ์

กรรมวิธีที่ 8 Negative control ใส่เฉพาะ media (grain media) โดยไม่มีเชื้อสาเหตุโรค

ตรวจผลการเกิดโรคโดยประเมินความรุนแรง ให้โดยให้คะแนน 1 – 5 คะแนน ดัดแปลงจาก Wokocha et al. (2010) ดังนี้ 1 = พืชไม่แสดงอาการ, 2 = เกิดแผลน้อยกว่า 25% บริเวณโคนต้น

และหัวมันสำปะหลัง, 3 = เกิดแผล 25-50% บริเวณโคนต้นและหัวมันสำปะหลัง, 4 = เกิดแผล 50 - 75% บริเวณโคนต้นและหัวมันสำปะหลัง, 5 = เกิดแผลมากกว่า 75% บริเวณโคนต้นและหัวมันสำปะหลัง

3.3 การเก็บ Stock เชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

นำเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่า ที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคและการทดสอบความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคได้มาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนแขวนลอยสปอร์ ดูดใส่หลอด Micro centrifuge ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหาร PDB ที่มีส่วนผสมของ 100 เปอเซ็นต์ Glycerol ในอัตราส่วน 1:1 ละลายตะกอนสปอร์ด้วย Vortex mixer แล้วเก็บไว้ที่ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสตามวิธีของ Huertas-Gonzalez et al.(1999) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองระยะยาวต่อไป

3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

นำเชื้อที่แยกได้จากโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราและผ่านการทดสอบว่ามีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงแต่ละไอโซเลตมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังต่อไปนี้

3.4.1 การเจริญเติบโตของโคโลนี

เลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตบนอาหาร PDA ไอโซเลตละ 4 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่อายุ 3, 5 และ 7 วัน บนอาหาร PDA วางแผนการทดลองแบบ CRDวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS V.14.0 เพื่อหาความแตกต่างและค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ/ไอโซเลต (ขนิษฐา มากรุง, 2548)

3.4.2 สีของโคโลนีบนอาหาร PDA

เลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตลงบนอาหาร PDA 1 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนีบันทึกภาพและลักษณะของโคโลนีตามวิธีของ Abang et al. (2002)

3.4.3 ลักษณะและขนาดโคนีเดีย

ย้ายเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่ามันสำปะหลังจาก slant ลงบนอาหาร PDA 1 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ตรวจดูการสร้างโคนีเดีย โดยนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X สำหรับเชื้อที่ไม่สร้างโคนีเดีย ทำการชักนำโดยปล่อยให้เชื้อเจริญและสร้างโคนีเดียที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X อีกครั้ง สุ่มวัดขนาดของโคนีเดียด้วยไมโครมิเตอร์ (Micrometer) จำนวน 100 โคนีเดียต่อไอโซเลต (ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553) บันทึกภาพและเปรียบเทียบขนาดและลักษณะโคนีเดียของเชื้อราสาเหตุโรคแต่ละไอโซเลต ทำการจัดกลุ่มของเชื้อรา

สาเหตุโรคโคนและหัวเน่ามันสำปะหลัง โดยดัดแปลงจากวิธีการจัดกลุ่มเชื้อรา โดยดัดแปลงวิธีของ Abang et al. (2002) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริงและใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล

3.5.1 การสกัด genomic DNA ของเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่าในมันสำปะหลัง

สกัด genomic DNA ของเชื้อราสาเหตุโรคโคนและหัวเน่ามันสำปะหลังที่ผ่านการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โคโลนี โคนิเดีย การก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของโรคในมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 89 โดยดัดแปลงวิธีการของ มธุกร สมพงษ์ (2553) โดยใช้เส้นใยของเชื้อที่เจริญบน PDA ไปบดเป็นผงในไนโตรเจนเหลว โดยใช้โกร่งบดที่เย็นจัด ตักเส้นใยที่บดละเอียดแล้วด้วยช้อนตักสารที่แช่ไนโตรเจนเหลวใส่ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย Chloroform: Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับผงเส้นใย จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนชิ้นส่วนเซลล์ออกจากส่วนที่เป็นของเหลว นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปใส่ในหลอด Eppendorf หลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอนสู่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอน DNA ออกด้วย Ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้งให้เหลือ เฉพาะ DNA ติดอยู่ที่ก้นหลอดจากนั้นทิ้งให้แห้งโดยวางคว่ำลงบนกระดาษกรอง 15 นาทีก่อนนำไปทำให้แห้งในสภาพสูญญากาศนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ DNA ที่ได้ใน TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer ปรับให้ได้ความเข้มข้นของ DNA 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

3.5.2 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ (DNA) ที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.5.1 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง (universal primers) คือ primer ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Nghia et al., 2012) จากนั้นนำเชื้อแต่ละชนิดที่ผ่านการทดสอบด้วย universal primers มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคด้วย specific primer ของเชื้อสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิดที่พบ ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ดัดแปลงจาก มธุกร สมพงษ์ (2553) ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคมันสำปะหลัง 1 ไมโครลิตร, 10X Amplifier buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ DNTP, Mix ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร, 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 ไมโครลิตรด้วย Distillate water นำไปใส่เครื่อง PCR Thermocycler (รุ่น T100 ยี่ห้อ BIO-RAD Berkeley, California, USA) กำหนด

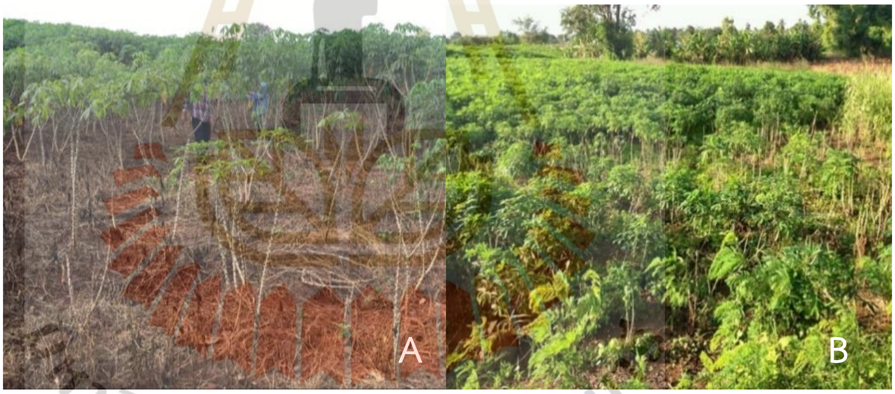
อุณหภูมิเป็นรอบตามโปรแกรมที่เหมาะสมกับ Primer โดยอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนของ PCR คือ Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 35 รอบและจากนั้นปรับอุณหภูมิ Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาทีเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป นำ PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมกับ Loading dye 2 ไมโครลิตรและ Novel Juice 6X Loading Buffer ของบริษัท Gene DireX 1 ไมโครลิตร นำมาตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis) บน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่ความต่างศักย์100 โวลต์นาน 25 นาทีหรือเมื่อแถบสีล่างของ Loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่างจากด้านล่างถาดประมาณ 1 เซนติเมตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 เก็บรวบรวมตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคโคนเน่าและหัวเน่า จากจังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดใกล้เคียง

จากการเก็บรวบรวมมันสำปะหลังที่แสดงอาการเน่าจากแปลงปลูก ได้แก่ อำเภอตากฟ้าและตาคลี จังหวัดนครสวรรค์ อำเภอเทพสถิตย์ จังหวัดชัยภูมิ อำเภอเมือง อำเภอเสิงสาง และอำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา โดยทำการเก็บลักษณะอาการเน่าต่าง ๆ ทั้งหมดจำนวน 139 ตัวอย่าง ดังนี้ มีอาการยืนต้นตาย ดังแสดงในภาพที่ 4.1 (A-B) มีอาการใบล่างเหี่ยว หลุดร่วง ในมันอายุ 5-7 เดือน ดังแสดงในภาพที่ 4.2 (A) ท่อนพันธุ์ไม่งอก เจริญเติบโตช้า แคระแกร็น ใบเรียวเล็กมีสีซีดใบล่างเหี่ยวช้ำกิ่งมีอาการช้ำสีดำ ในมันอายุ 2-5 เดือน ดังแสดงในภาพที่ 4.2 (B-C) หัวมันมีอาการเน่า เนื้อเยื่อบริเวณหัวมันเปื่อยยุ่ย เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง น้ำตาล และดำ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 (D-E) บริเวณขั้วหัวมันมีเส้นใยเชื้อราสีขาว ดังแสดงในภาพที่ 4.2 (F) บริเวณขั้วของรากมีอาการเน่าดำรากไม่เจริญเติบโต ดังแสดงในภาพที่ 4.2 (G) มี fruiting body สีดำของเชื้อราเจริญบริเวณเปลือกของลำต้น ดังแสดงในภาพที่ 4.2 (H-I) บริเวณใต้เปลือกท่อนพันธุ์พบเนื้อเยื่อตายเป็นสีดำ ดังแสดงในภาพที่ 4.2 (J)



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังในแปลง (A) มีอาการยืนต้นตาย ใบเหี่ยว หลุดร่วง สภาพแปลงในอำเภอเสิงสาง จังหวัดนครราชสีมา (B) มีอาการยืนต้นตาย ใบเหี่ยว หลุดร่วง สภาพแปลงในอำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

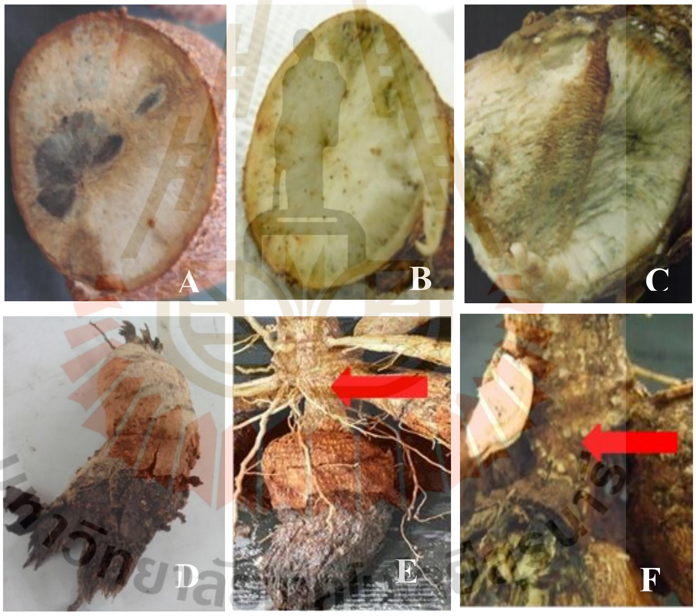
ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลัง (A-B) ท่อนพันธุ์ไม่งอก เจริญเติบโตช้า แคระแกร็น ใบเรียวเล็ก มีสีซีด ใบล่างเหี่ยวช้ำ กิ่งมีอาการช้ำสีดำ ในมันอายุ 2-5 เดือน (C) มีอาการใบล่างเหี่ยว หลุดร่วง ในมันอายุ 5-7 เดือน (D-E) หัวมันมีอาการเน่า เนื้อเยื่อบริเวณหัวมันเปื่อยยุ่ย เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลือง น้ำตาล และดำ (F) บริเวณขั้วหัวมันมีเส้นใยเชื้อราสีขาว (G) บริเวณขั้วของรากมีอาการเน่าดำ รากไม่เจริญเติบโต (H-I) มี fruiting body สีดำของเชื้อราเจริญบริเวณเปลือกของลำต้น (J) บริเวณใต้เปลือกท่อนพันธุ์พบเนื้อเยื่อตายเป็นสีดำ (necrotic symptoms on vascular system)

4.2 แยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคโคนเน่าและหัวเน่า

ลักษณะอาการโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลังที่พบคือ อาการเน่าดำ โดยมีแผลสีดำร่วมกับอาการเน่าเละ เน่าเปียก และเน่าแห้ง เมื่อทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคพบว่าเกิดจากเชื้อรา *Neoscytalidium* sp และ *Lasiodiplodia* spp.

ในการแยกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าในมันสำปะหลัง สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 33 ไอโซเลต จากตัวอย่างใน จ.นครราชสีมา 29 ไอโซเลต จ.นครสวรรค์ 3 ไอโซเลต และ จ.ชัยภูมิ 1 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1) โดยไอโซเลตส่วนใหญ่ที่แยกได้มาจากบริเวณขั้วหัวมันและหัวมัน จำนวน 15 ไอโซเลต แยกจากหัวมัน 10 ไอโซเลต ได้แก่ L6HRD, L8HDBB, L11HSR2, L15HDBB, L18KBSH3, L20FHTB1, 22HRW, L24HRWH, 26HRWB และ N3DTD2 โดยหัวจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลือง

ปนเขียว เขียวมะกอก เทา แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต และจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นเรื่อย ๆ จนกลายเป็นสีดำ (ภาพที่ 4.3 A-D) ส่วนจากขั้วหัวมัน 5 ไอโซเลต ได้แก่ L2SHSR1, L4STR1, L5KBSH1, L12SHRD และ N2SHCA โดยหัวมันมีอาการเน่าเปียก เน่าเละ และเน่าแห้งร่วมกันไม่สามารถแยกจากหัวมันได้จึงแยกจากขั้วหัวมัน (ภาพที่ 4.3 E-F) รองลงมา คือบริเวณโคนต้นเหนือดิน จำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ L9STR2, L17STRB, L19KBSH2 L21SRE, L23STWH, L25SRC และ L27SRBT โดยโคนต้นแตก เป็นริ้วสีดำและมีเส้นใยสีขาวปกคลุม (ภาพที่ 4.4 A-B) บริเวณท่อนพันธุ์ จำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ L1STRM, L3BSR, L7STRW, L13SRTF, N1SRTTC, N4BBPM และ N5STRST โดยท่อนพันธุ์ เจริญเติบโตช้า แคระแกร็น และมีตุ่มเม็ดสีดำเกาะกระจายทั่วท่อนพันธุ์ (ภาพที่ 4.4 C-D) บริเวณกิ่งมัน จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ L10BBLB และ L28SBB มีอาการกิ่งช้ำมีสีดำ และสีน้ำตาลไหม้ (ภาพที่ 4.5 A-B) บริเวณใบมัน 1 ไอโซเลต คือ L14LSR ใบช้ำ ใบม้วนงอ ใบเปลี่ยนสีจากเขียวเป็นสีดำ (ภาพที่ 4.5 C) และบริเวณก้านใบ 1 ไอโซเลต คือ L16BLSR ก้านใบช้ำมีสีดำ (ภาพที่ 4.5 D)



ภาพที่ 4.3 แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่า บริเวณหัวและขั้วหัวมันสำปะหลัง (A) อาการหัวเน่าช้ำ มีการเปลี่ยนสีจากขาวเป็นสีเทาจนถึงสีดำแยกได้เชื้อไอโซเลต L6HRD, L8HDBB, L11HSR2 และ L15HDBB (B) อาการหัวเน่าช้ำมีเส้นดำ เส้นสีเขียวมะกอก แยกได้เชื้อไอโซเลต L22HRW, L24HRWH และ N3DTD2 (C) อาการหัวเน่าช้ำเขียวมะกอก โดยเน่าบริเวณกลางหัวมันสำปะหลัง แยกได้เชื้อไอโซเลต L20FHTB1 และ L26HRWB (D) อาการหัวเน่าเละสีดำแยกได้เชื้อไอโซเลต L18KBSH3 (E) อาการหัวเน่าเละสีดำโดยแยกบริเวณขั้วหัวติดกับโคนต้น แยกได้เชื้อไอโซเลต L4STR1 และ L5KBSH1 (F) อาการหัวเน่าช้ำสีดำโดยแยกบริเวณขั้วหัวติดกับโคนต้น แยกได้เชื้อ ไอโซเลต L2SHSR1, L12SHRD และ N2SHCA

ภาพที่ 4.4 แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่า บริเวณโคนต้นและท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง (A) อาการโคนต้นบวมแตกเป็นริ้วมีเชื้อราสีดำเจริญอยู่ภายในมีเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญปกคลุมแยกได้เชื้อไอโซเลต L17STRB, L19KBSH2, L21SRE, L25SRC และ L27SRBT (B) อาการโคนต้นบวมแตกเป็นริ้ว มีเชื้อราสีดำเจริญอยู่ภายในแต่ไม่มีเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญปกคลุม แยกได้เชื้อไอโซเลต L9STR2 และ L23STWH, ท่อนพันธุ์แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลัง (C-D) มีตุ่มเม็ดของเชื้อรา สีดำเจริญท่อนพันธุ์ แยกได้เชื้อไอโซเลต L13SRTF, N1SRTTC, N4BBPM, N5STRST, L1STRM, L3BSR และ L7STRW

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 4.5 แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่า บริเวณกิ่ง ใบและก้านใบมันสำปะหลัง (A) อาการกิ่งไหม้ช้ำมีสีดำ แยกได้เชื้อไอโซเลต L10BBLB (B) อาการกิ่งไหม้ช้ำสีน้ำตาลแดงเข้ม และเหี่ยวแห้ง แยกได้เชื้อไอโซเลต L28SBB (C) อาการใบไหม้เน่าช้ำสีดำ แยกได้เชื้อไอโซเลต L14LSR (D) อาการก้านใบไหม้มีแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แยกได้เชื้อไอโซเลต L16BLSR

ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่า ที่เก็บได้จากจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดใกล้เคียง

บริเวณที่แยกได้	ไอโซเลต	จำนวน (ไอโซเลต)	สถานที่เก็บ
ขั้วหัว	L2SHSR1 L4STR1 L5KBSH1	3	อ.เสิงสาง นม.
	L12SHRD N2SHCA	2	อ.ครบุรี นม.
หัว	L20FHTB1	1	อ.เมือง นม.
	L6HRD L8HDBB L11HSR2 L15HDBB L18KBSH3 22HRW L24HRWH 26HRWB N3DTD2	9	อ.เสิงสาง นม.
โคนต้น	L9STR2 L19KBSH2 L23STWH, L25SRC L27SRBT	5	อ.เสิงสาง นม.
	L17STRB L21SRE	2	อ.ครบุรี นม.
ท่อนพันธุ์	L1STRM L3BSR L7STRW	3	อ.เมือง นม.
	L13SRTF	1	อ. ตากฟ้า นว.
	N1SRTTC N5STRST	2	อ. ตาคลี นว.

บริเวณที่แยกได้	ไอโซเลต	จำนวน (ไอโซเลต)	สถานที่เก็บ
	N4BBPM	1	อ. เทพสถิตย์ ชย.
กิ่ง	L10BBLB	1	อ.เมือง นม.
	L28SBB	1	อ.เสิงสาง นม.
ใบ	L14LSR	1	อ.เมือง นม.
ก้านใบ	L16BLSR	1	อ.เสิงสาง นม.

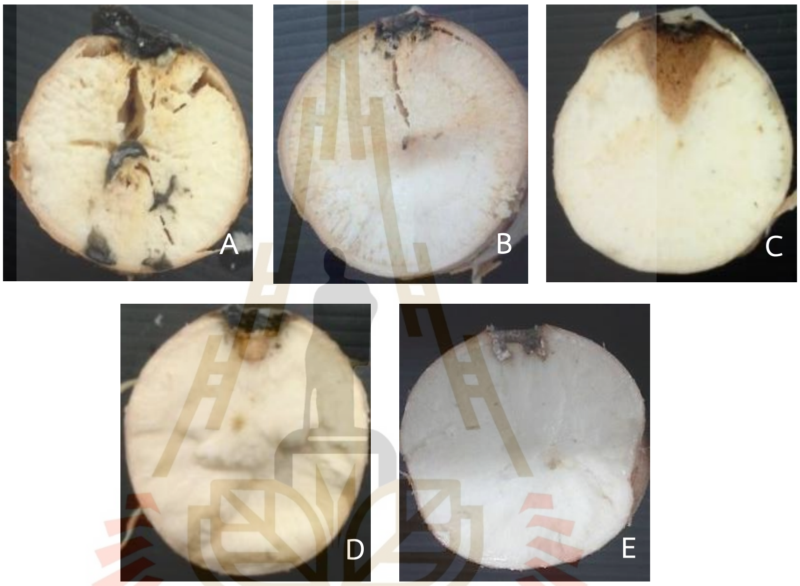
หมายเหตุ: สถานที่เก็บ: นม.= จังหวัดนครราชสีมา; นว.= จังหวัดนครสวรรค์; ชย.= จังหวัดชัยภูมิ

4.3 ทดสอบความสามารถในการก่อโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อ (Pathogenicity and virulently test)

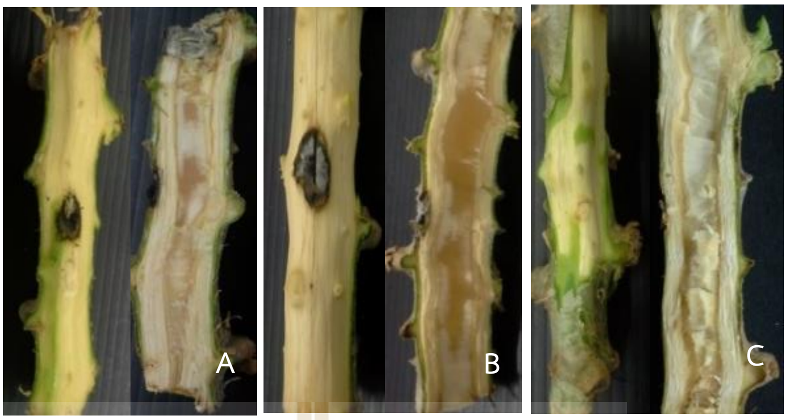
4.3.1 ทดสอบความสามารถในการก่อโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าที่แยกได้ในหัวและท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง ผลการทดสอบพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 33 ไอโซเลตสามารถก่อโรคให้ทั้งหัวและท่อนพันธุ์มันสำปะหลังได้ และทำการวัดขนาดแผลเฉลี่ยจากเส้นผ่านศูนย์กลางของหัวมันในวันที่ 7 หลังการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่า (ตารางที่ 4.2) หัวมันแสดงอาการเน่าและช้ำ เนื้อเยื่อยุบตัวลงและบริเวณปลูกเชื้อเนื้อเยื่อเปลี่ยนสีเป็นน้ำตาลและสีดำมีลักษณะของแผลแห้ง ส่วนบริเวณรอบ ๆ เปลี่ยนสีเป็นเหลืองไปจนถึงสีน้ำตาล เปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในแยกแตกและแยกออกจากกัน ซึ่งจากการประเมินระดับความรุนแรงของโรคในหัวมันสำปะหลังพบความรุนแรงทั้งหมด 5 ระดับ ซึ่งความรุนแรงมากที่สุดระดับ 5 คือ เกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L11HSR2 มีขนาดแผลเฉลี่ย 46.63±2.09 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.6 A) ความรุนแรงระดับ 4 คือเกิดแผล 50-75 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L6HRD, L1 2 SHRD, L13SRTF, L17STRB, L19KBSH,2 L20FHTB1, L22HRW, L27SRBT และ L28SBB มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ 33.50±2.02-42.38±1.32 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.6 B) ความรุนแรงระดับ 3 คือเกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L1STRM, L2SHSR1, L3BSR, L4STR1, L5KBSH1, L7STRW, L8HDBB, L9STR2, L10BBLB, L16BLSR, L18KBSH3, L21SRE, L24HRWH, L25SRC, L26HRWB, N1SRTTC, N2SHCA, N3DTD2, N4BBPM และ N5STRST มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ 21.13±2.50-31.60±3.93 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.6 C) ความรุนแรงน้อยที่สุดระดับ 2 คือเกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L14LSR, L15HDBB และ L23STWH มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ 13.88±1.94-17.50±1.25 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.6 D) กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค (ภาพที่ 4.6 E) และท่อนพันธุ์แสดงอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น ถูกทำลายมีลักษณะอาการเป็นสีเทา สีน้ำตาล และสีดำ เทา ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต และจากการประเมินระดับความรุนแรงของโรคในท่อนพันธุ์หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 15 วัน พบความรุนแรงทั้งหมด 3 ระดับ ซึ่งความรุนแรงมากที่สุดระดับ 3 คือ

เกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L3BSR, L4STR1, L11HSR2, L12SHRD, L14LSR, L21SRE, L27SRBT, N1SRTTC, N3DTD2 และ N4BBPM มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ 33.50±2.90-41.25±1.25 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.7 A) ความรุนแรงน้อยที่สุดระดับ 2 คือ เกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ L1STRM, L2SHSR1, L5KBSH1, L6HRD, L7STRW, L8HDBB, L9STR2, L10BBLB, L13SRTF, L15HDBB, L16BLSR, L17STRB, L18KBSH3, L19KBSH2, L20FHTB1, L22HRW, L23STWH, L24HRWH, L25SRC, L26HRWB, L28SBB, N2SHCA และ N5STRST มีขนาดแผลเฉลี่ยตั้งแต่ 7.00±0.46-30.75±8.10 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4.7 B) กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค (ภาพที่ 4.7 C)



ภาพที่ 4.6 ลักษณะของหัวมันสำปะหลังที่หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วันในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการหัวเน่าช้ำ เนื้อเยื่อยุบตัวลง บริเวณปลูกเชื้อเนื้อเยื่อเปลี่ยนสีเป็นน้ำตาลดำถึงดำและแห้ง ส่วนบริเวณรอบ ๆ เปลี่ยนสีเป็นเหลืองถึงสีน้ำตาล เปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในแยกแตกและออกจากกัน (A) ไอโซเลต L11HSR2 ความรุนแรงระดับ 5 (B) ไอโซเลต L6HRD ความรุนแรงระดับ 4 (C) ไอโซเลต L18KBSH3 ความรุนแรงระดับ 3 (D) ไอโซเลต L14LSR ความรุนแรงระดับ 2 และ (E) หัวมันในกรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค



ภาพที่ 4.7 ลักษณะของท่อนพันธุ์มันสำปะหลังหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 15 วัน ในสภาพห้องปฏิบัติการ แสดงอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น ถูกทำลายเปลี่ยนเป็นสีดำ เทา และน้ำตาล แตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต (A) ไอโซเลต L12SHRD ความรุนแรงระดับ 3 (B) ไอโซเลต L24HRWH ความรุนแรงระดับ 2 และ (C) ท่อนพันธุ์กรรมวิธีควบคุมไม่แสดงอาการของโรค

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ ในห้องปฏิบัติการบนมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 89

ไอโซเลต	หัวมันสำปะหลัง		ท่อนพันธุ์ในกล่องชื้น	
	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับความรุนแรง[2/]	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับความรุนแรง
L1STRM	$27.50 \pm 0.90^{d-g}$[1/]	3	$24.00 \pm 2.27^{c-g}$	2
L2SHSR1	$28.00 \pm 1.06^{c-g}$	3	$29.00 \pm 6.75^{b-e}$	2
L3BSR	$29.25 \pm 3.13^{c-g}$	3	37.60 ± 1.92^{ab}	3
L4STR1	$23.75 \pm 2.72^{e-h}$	3	34.50 ± 3.75^{ab}	3
L5KBSH1	21.13 ± 2.50^{fgh}	3	11.00 ± 2.35^{hij}	2
L6HRD	$34.25 \pm 2.81^{b-e}$	4	$15.63 \pm 1.57^{g-j}$	2
L7STRW	$23.88 \pm 0.67^{e-h}$	3	$14.38 \pm 2.19g^{-j}$	2
L8HDBB	$30.38 \pm 3.01^{b-f}$	3	$20.00 \pm 5.40^{e-i}$	2
L9STR2	$27.00 \pm 2.62^{d-g}$	3	$30.25 \pm 4.27^{a-e}$	2

ไอโซเลต	หัวมันสำปะหลัง		ท่อนพันธุ์ในกล่องชื้น	
	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับความรุนแรง$^{2/}$	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับความรุนแรง
L10BBLB	$26.25\pm1.29^{d-h}$	3	$22.75\pm1.31^{d-g}$	2
L11HSR2	46.63 ± 2.09^{a}	5	41.25 ± 1.25^{a}	3
L12SHRD	40.08 ± 4.04^{abc}	4	37.50 ± 6.61^{ab}	3
L13SRTF	$35.25\pm4.75^{a-e}$	4	$27.75\pm1.25^{b-e}$	2
L14LSR	17.00 ± 2.47^{ghi}	2	$33.50\pm2.90^{a-d}$	3
L15HDBB	17.50 ± 1.25^{ghi}	2	$30.75\pm8.10^{a-e}$	2
L16BLSR	$26.25\pm4.80^{d-h}$	3	8.75 ± 2.14^{j}	2
L17STRB	$35.00\pm4.68^{a-e}$	4	$16.75\pm1.18^{f-j}$	2
L18KBSH3	$26.25\pm4.80^{d-h}$	3	9.50 ± 2.02^{ij}	2
L19KBSH2	$35.00\pm4.68^{a-e}$	4	10.50 ± 1.66^{hij}	2
L20FHTB1	42.38 ± 1.32^{ab}	4	$15.00\pm2.04^{g-j}$	2
L21SRE	$31.6\pm3.93^{b-f}$	3	$33.75\pm3.75^{a-d}$	3
L22HRW	$38.13\pm1.04^{a-d}$	4	$20.50\pm1.55^{e-i}$	2
L23STWH	13.88 ± 1.94^{hi}	2	$16.25\pm0.52^{f-j}$	2
L24HRWH	$28.5\pm6.23^{c-g}$	3	$0.63\pm2.13^{e-h}$	2
L25SRC	$31.5\pm2.02^{b-f}$	3	8.75 ± 0.52^{j}	2
L26HRWB	$22.50\pm6.73^{e-h}$	3	7.00 ± 0.46^{j}	2
L27SRBT	40.25 ± 5.09^{abc}	4	$33.75\pm3.15^{a-d}$	3
L28SBB	$33.50\pm2.02^{b-f}$	4	10.63 ± 1.49^{hij}	2
N1SRTTC	$26.5\pm1.95^{d-g}$	3	36.00 ± 4.20^{ab}	3
N2SHCA	$26.3\pm1.67^{d-h}$	3	$26.50\pm3.30^{b-f}$	2
N3DTD2	$22.75\pm0.41^{e-h}$	3	36.00 ± 4.85^{ab}	3
N4BBPM	$25.50\pm1.89^{d-h}$	3	36.75 ± 2.69^{ab}	3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ไอโซเลต	หัวมันสำปะหลัง		ท่อนพันธุ์ในกล่องชื้น	
	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับความรุนแรง[2/]	ขนาดแผล (มิลลิเมตร)	ระดับความรุนแรง
N5STRST	24.15±0.31^{e-h}	3	30.00±3.11^{b-e}	2
Control	6.50±0.56^{i}	1	6.03±0.02^{j}	1
F-test[3/]	**		**	
%C.V.	25.87		28.33	

[1/]ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± S.E. ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05 โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

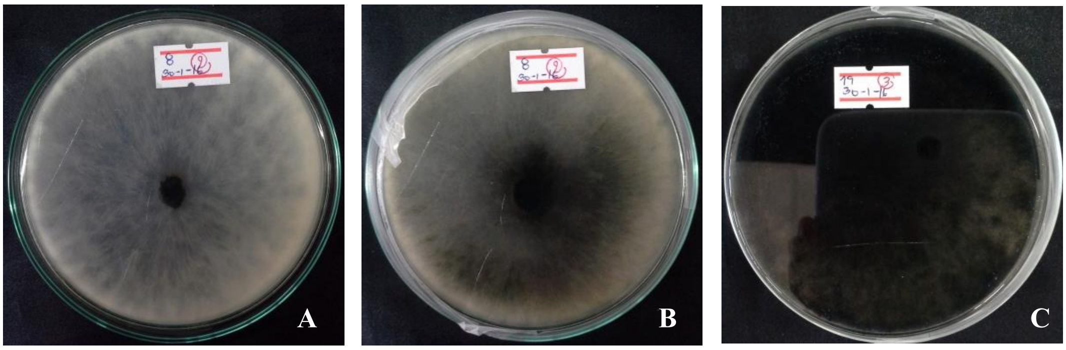
[2/]การประเมินความรุนแรงของโรค (disease scores) โดยให้คะแนน 1-5 ดังนี้ 1 = ไม่แสดงอาการ, 2 = เกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน, 3 = เกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน, 4 = เกิดแผล 50-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่หัว/ท่อน, 5 = เกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่หัว/ท่อน

[3/]** = มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (P<0.01)

4.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้

4.4.1 การเจริญเติบโตของโคโลนี

ผลการทดลองจากการวัดอัตราการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA ผลการทดลองพบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเติบโตเร็ว และสามารถเจริญเต็มจานอาหาร PDA ภายในวัน 1-3 หลังจากเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อราจะมีเส้นใยสีขาวในวันที่ 1 และมีสีเทาในวันที่ 3 (ภาพที่ 4.8 A) โดยในวันที่ 3-4 จะเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวมะกอกดำ (greenish olivaceous to black) (ภาพที่ 4.8 B) หรือน้ำตาลดำ (brown to black) ซึ่งในแต่ละไอโซเลตมีลักษณะสีของโคโลนีที่แตกต่างกัน และสีของโคโลนีจะเข้มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น (ภาพที่ 4.8 C) และจากผลการทดลองพบว่าไอโซเลตที่เจริญเติบโตเร็วสุดได้แก่ ไอโซเลต L8HDBB สามารถเจริญบนจานอาหาร PDA หลังวางเชื้อ 1 วัน มีขนาดเฉลี่ย 84.00x84.00 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลตที่เจริญช้าสุด ได้แก่ L10BBLB สามารถเจริญบนจานอาหารหลังวางเชื้อ 1 วัน ขนาดเฉลี่ย 43.00x43.00 มิลลิเมตร แต่ทั้งนี้ในวันที่ 3 หลังวางเชื้อสามารถเจริญเต็มจานอาหารเท่ากับไอโซเลตอื่น ๆ ขนาดของโคโลนีแสดงในตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะการเจริญเติบโตของโคโลนีของไอโซเลต L11HSR2 (A) เชื้อราจะมีเส้นใยสีขาวถึงสีเทาในวันที่ 1-3 (B) เปลี่ยนสีเป็นสีเขียวมะกอกดำ (greenish olivaceous to black) ในวันที่ 3-4 (C) โคโลนีจะมีสีเข้มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่ออายุมากขึ้น

ตารางที่ 4.3 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อายุ 1 2 และ 3 วัน

ไอโซเลต	**อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)**		
	วันที่ 1	**วันที่ 2**	**วันที่ 3**
L1STRM	74.00×74.00	84.80×84.80	90.00×90.00
L2SHSR1	73.00×73.40	86.00×86.00	90.00×90.00
L3BSR	53.00×53.50	80.00×80.00	90.00×90.00
L4STR1	59.00×59.00	84.00×84.00	90.00×90.00
L5KBSH1	75.00×75.00	82.20×82.20	90.00×90.00
L6HRD	65.00×65.00	85.20×85.20	90.00×90.00
L7STRW	74.00×74.00	86.00×86.00	90.00×90.00
L8HDBB	84.00×84.00	89.00×89.00	90.00×90.00
L9STR2	59.00×59.00	84.60×84.60	90.00×90.00
L10BBLB	43.00×43.00	72.80×72.80	90.00×90.00
L11HSR2	70.00×70.00	84.00×84.00	90.00×90.00
L12SHRD	59.80×59.80	84.80×84.80	90.00×90.00
L13SRTF	52.00×52.00	74.20×74.20	90.00×90.00
L14LSR	55.00×55.00	75.80×75.80	90.00×90.00
L15HDBB	54.80×54.80	84.40×84.40	90.00×90.00
L16BLSR	56.20×56.20	84.80×84.80	90.00×90.00

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต กว้างxยาว (มิลลิเมตร)		
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
L17STRB	43.40×43.40	78.80×78.80	90.00×90.00
L18KBSH3	66.00×66.00	84.60×84.60	90.00×90.00
L19KBSH2	75.00×75.00	84.20×84.20	90.00×90.00
L20FHTB1	72.40×72.40	84.80×84.80	90.00×90.00
L21SRE	75.00×75.00	85.40×85.40	90.00×90.00
L22HRW	62.40×62.40	83.80×83.80	90.00×90.00
L23STWH	68.80×68.80	85.00×85.00	90.00×90.00
L24HRWH	82.00×82.00	83.40×83.40	90.00×90.00
L25SRC	65.80×65.80	82.80×82.80	90.00×90.00
L26HRWB	59.00×59.00	83.20×83.20	90.00×90.00
L27SRBT	71.20×71.20	84.00×84.00	90.00×90.00
L28SBB	62.00×62.00	85.40×85.40	90.00×90.00
N1SRTTC	65.80×65.80	85.00×85.00	90.00×90.00
N2SHCA	52.00×52.00	81.00×81.00	90.00×90.00
N3DTD2	61.40×61.40	85.00×85.00	90.00×90.00
N4BBPM	51.40×51.40	83.20×83.20	90.00×90.00
N5STRST	64.80×64.80	83.80×83.80	90.00×90.00

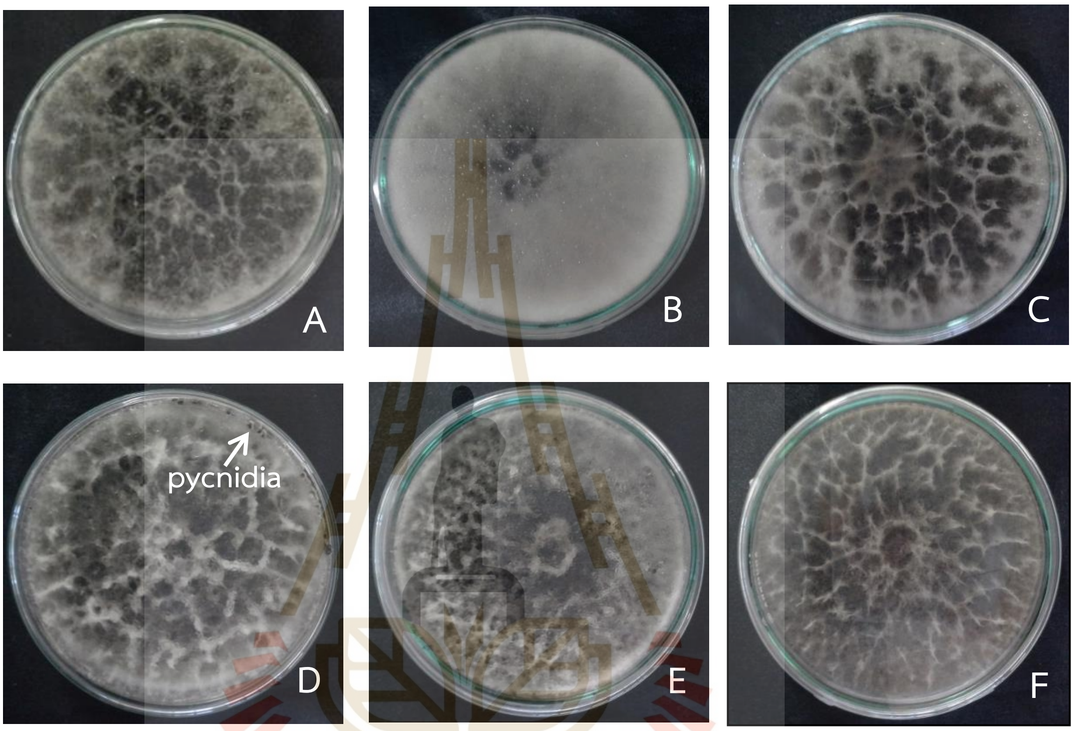
หมายเหตุ: วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ/ไอโซเลต

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.4.2 ลักษณะและสีของโคโลนี

เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. แต่ละไอโซเลตที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มีลักษณะสีโคโลนีคล้ายกัน คือ โคโลนีมีสีเทาดำปนเขียวมะกอก เส้นใยละเอียดและฟู สามารถจัดกลุ่มโดยแยกจากลักษณะของเส้นใย ได้ 5 กลุ่มคือ 1) เส้นใยมีขนาดเล็กมาก ฟูละเอียดหนาแน่นน้อยกว่ากลุ่ม 1 คือ ไอโซเลต L4STR1, L8HDBB, L9STR2, L19KBSH2 L23STWH, L24HRWH, L27SRBT และ L28SBB ดังแสดงในภาพที่ 4.9 (A) 2) เส้นใยมีขนาดเล็กมาก ฟูละเอียดหนาแน่น ได้แก่ ไอโซเลต L2SHSR1, L6HRD, L12SHRD, L14LSR, L16BLSR, L17STRB และ L20FHTB1 ดังแสดงในภาพที่ 4.9 (B) 3) เส้นใยเหมือนกลุ่ม 3 แต่ไม่มีสร้าง pycnidia คือ ไอโซเลต L11HSR2 ดังแสดงในภาพ 4.9 (C) 4) เส้นใยมีขนาดเล็กมาก ฟูละเอียด บริเวณปลายเส้นใยมีการรวมกลุ่มของเส้นใยเป็นกระจุก และมีการสร้าง pycnidia บริเวณขอบจานอาหารคือ ไอโซเลต L1STRM, L5KBSH1, L7STRW, L15HDBB, L18KBSH3, L21SRE และ L26HRWB ดังแสดงในภาพที่ 4.9 (D) 5) เส้นใยมีขนาดเล็กมาก ฟูปาน

กลาง ไม่มีการสร้าง pycnidia คือ ไอโซเลต L3BSR, L10BBLB, L13SRTF, L22HRW และ L25SRC ดังแสดงในภาพที่ 4.9 (E) ส่วนเชื้อรา *Neoscytalidium* sp. มีโคโลนีสีน้ำตาลดำ ลักษณะเส้นใยมีขนาดเล็กมาก ฟูเล็กน้อยถึงปานกลาง การจัดเรียงตัวของเส้นใยไม่หนาแน่น และไม่มีการสร้าง pycnidia บริเวณของจานอาหารเลี้ยง คือ ไอโซเลต N1SRTTC, N2SHCA, N3DTD2, N4BBPM และ N5STRST ดังแสดงในภาพที่ 4.9 (F)

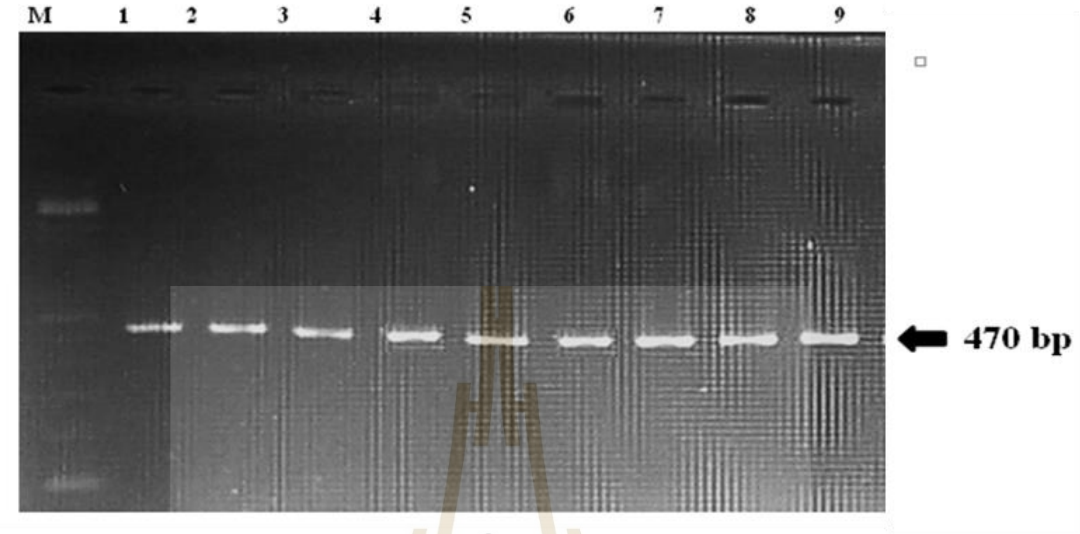


ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราทั้ง 6 กลุ่ม (A) ไอโซเลต L4STR1, L8HDBB, L9STR2, L19KBSH2 L23STWH, L24HRWH, L27SRBT และ L28SBB (B) L2SHSR1, L6HRD, L12SHRD, L14LSR, L16BLSR, L17STRB และ L20FHTB1 (C) L11HSR2 (D) L1STRM, L5KBSH1, L7STRW, L15HDBB, L18KBSH3, L21SRE และ L26HRWB (E) L3BSR, L10BBLB, L13SRTF, L22HRW และ L25SRC (F) N1SRTTC, N2SHCA, N3DTD2, N4BBPM และ N5STRST

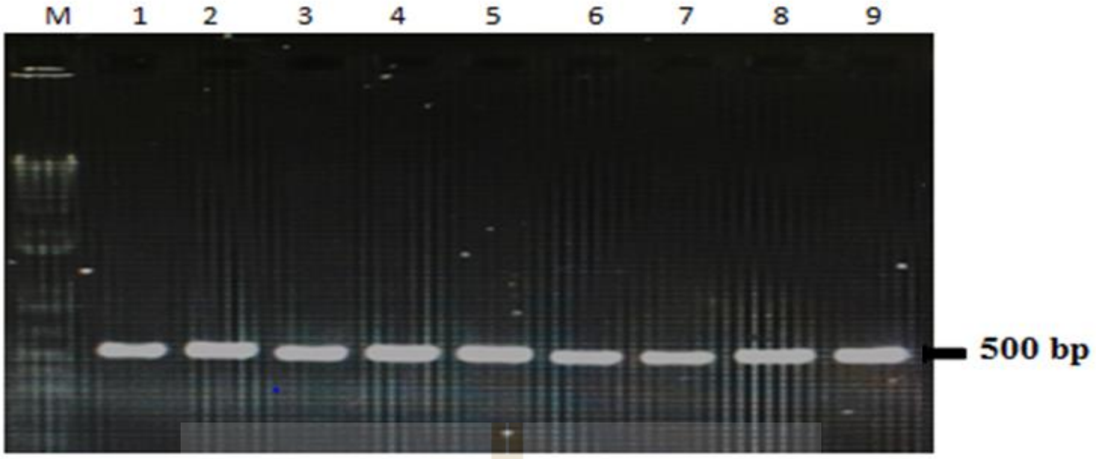
4.5 การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 33 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค PCR ไพร์เมอร์ทั้ง 3 คู่ สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคได้ (ตารางที่ 4.4) คือ 1) บริเวณ βt ไพร์เมอร์ Bt2a/Bt2b (Glass and Donalson, 1995; Machado et al., 2014; O'Donnell and Cigelnik, 1997) มีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 470 bp (ภาพที่ 4.10) 2) บริเวณ EF1-α ไพร์เมอร์ Ef1-688F/Ef1-1251R (Abdollahzadeh et al., 2010; Alves et al., 2008) มีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 500 bp (ภาพที่ 4.11) 3) บริเวณ ITS ไพร์เมอร์ ITS1/ITS4 (Alves et

al., 2008; Li et al., 2015; Chen et al., 2016) มีขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ ประมาณ 550 bp เท่ากัน (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.10 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ βt lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = L6HRD, lane 2 = L11HSR2, lane 3 = L12SHRD lane 4 = L13SRTF, lane 5 = L18KBSH3, lane 6 = L20FHTB1, lane 7 = L22HRW, lane 8 = L27SRBT และ lane 9 = N1SRTTC



ภาพที่ 4.11 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ EF1-α lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = L6HRD, lane 2 = L11HSR2, lane 3 = L12SHRD lane 4 = L13SRTF, lane 5 = L18KBSH3, lane 6 = L20FHTB1, lane 7 = L22HRW, lane 8 = L27SRBT และ lane 9 = N1SRTTC

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพที่ 4.12 แสดงตัวอย่างของผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลต บริเวณ ITS lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = L6HRD, lane 2 = L11HSR2, lane 3 = L12SHRD lane 4 = L13SRTF, lane 5 = L18KBSH3, lane 6 = L20FHTB1, lane 7 = L22HRW, lane 8 = L27SRBT และ lane 9 = N1SRTTC

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบส (DNA sequencing) ของเชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคโคนเน่าและหัวเน่าทั้ง 3 บริเวณ ได้แก่ ITS EF1-α และ beta-tubulin (βt) ในฐานข้อมูล Genbank

ไอโซเลต	ITS				EF1-α				βt			
	เชื้อที่มีความใกล้เคียงกัน (genus and species)	Accession No.	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	เชื้อที่มีความใกล้เคียงกัน (genus and species)	Accession No.	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	เชื้อที่มีความใกล้เคียงกัน (genus and species)	Accession No.	ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
L6HRD	*L. theobromae*	HG917932	446/486	92%	*L. euphorbicola*	KT325581	475/475	100%	*L. euphorbicola*	KF254926	323/383	84%
L11HSR2	*L. euphorbicola*	KT325568	451/451	100%	*L. euphorbicola*	KT325581	475/475	100%	-			
L12SHRD	*L. euphorbicola*	KT325568	458/458	100%	*L. euphorbicola*	KT325581	475/475	100%	*L. euphorbicola*	KF254926	382/384	99%
L13SRTF	*L. euphorbicola*	KT325568	453/453	100%	*L. euphorbicola*	KT325581	467/467	100%	*L. euphorbicola*	KF254926	367/369	99%
L18 KBSH	*L. theobromae*	KT325578	456/456	100%	*L. theobromae*	KM401971	479/479	100%	*L. theobromae*	KP823018	381/381	100%
L20FHTB1	*L. euphorbicola*	KT325568	450/450	100%	*Lasiodiplodia* sp.	GQ471779	495/496	99%	*L. euphorbicola*	KF254926	362/362	100%
L27SRBT	*L. euphorbicola*	KT325568	424/425	99%	*L. euphorbicola*	KT325581	499/500	99%	-			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเนาของมันสำปะหลังโดยวิธีการจำแนกเชื้อราทางด้านสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลพบว่า

1. การเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคโคนเน่าและหัวเน่าจากแหล่งปลูกใน 6 อำเภอ ของ 3 จังหวัด สามารถรวบรวมตัวอย่างได้ทั้งหมด 139 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา 3 ชนิด คือ WA, HPDA และ PDA+BRANP จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่าส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ซึ่งสอดคล้องกับ Msikita และคณะ (1998) ซึ่งพบว่าโรคหัวและต้นเน่าของมันสำปะหลังในประเทศเบนินเกิดจากเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Neoscytalidium hyalinum*, และ *L. theobromae* จำนวน 56.2 และ 7.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้รายงานว่าในประเทศไนจีเรีย เกิดจากเชื้อราหลายชนิดได้แก่ *N. hyalinum, L. theobromae, M. phaseolina* และ *Fusarium* spp. จำนวน 40.6, 28.1, 18.7 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และในปี 2002 Onyeka รายงานว่าโรครากเน่ามันสำปะหลังในประเทศไนจีเรียเกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* 25 เปอร์เซ็นต์ ในปี 2005 Msikita และคณะ รายงานว่า พบโรคหัวและต้นเน่าของมันสำปะหลังในฤดูฝน ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. และ *L. theobromae* จำนวน 11.8 และ 7.7. เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สอดคล้องกับ Banito และคณะ (2010) พบว่าโรครากและต้นเน่าของมันสำปะหลังในประเทศโตโก เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* และ *Fusarium* spp. จำนวน 51.3 และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ในปี 2011 Bua และ Okello รายงานว่าโรครากเน่ามันสำปะหลังในประเทศอูกานดา เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. และ *L. theobromae* จำนวน 87 และ13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปัจจุบันในประเทศไทย โรคหัวเน่าและโคนเน่ามันสำปะหลังยังมีการศึกษาเพื่อระบุชนิดเชื้อสาเหตุที่ชัดเจนค่อนข้างน้อย ทั้งนี้ในปี พ.ศ. 2553 รังษี เจริญสถาพร และ อมรรัชฏ์ คิดใจเดียว รายงานว่าโรคโคนเน่า หัวเน่ามันสำปะหลัง เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* spp., *Rigidoporus lignosus* และ *S. rolfsii* และมีรายงานว่า โรคลำต้นเน่ามันสำปะหลังเกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* (Buensanteai and Athinuwat, 2012) อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาโรคโคนและรากเน่าของพืชอื่น อาทิ โรคโคนและรากเน่าของหม่อนโดยในปี พ.ศ. 2553 วราภรณ์ สุทธิสา และ นิวัฒ เสนาะเมือง พบว่าโรคโคนและรากเน่าของหม่อนเกิดจากเชื้อราหลายชนิดเข้าทำลายร่วมกัน ได้แก่เชื้อรา *L. theobromae, Fusarium* spp.,ซึ่งจากการรายงานต่าง ๆ เหล่านี้แสดงให้เห็นว่าโรคพืชที่เกิดบริเวณโคนต้นและรากพืชมีแนวโน้มพบการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคคือ *L. theobromae*

2. ทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าแต่ละไอโซเลตมีความรุนแรงแตกต่างกัน และเชื้อสามารถก่อโรคได้ทั้งบนหัวและท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 89 โดยไอโซเลต L11HSR2 รุนแรงที่สุด ลักษณะอาการหัวมันหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน แสดงอาการหัวมันเน่าและเนื้อเยื่อยุบตัวลง เปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีเหลืองถึงสีน้ำตาล เนื้อเยื่อแตกยุย บริเวณเปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นในแยกออกจากกัน โดยมีขนาดแผล 46.63 มิลลิเมตร นอกจากนี้ลักษณะอาการในท่อนพันธุ์พบอาการเนื้อเยื่อบริเวณใต้เปลือก เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลรอบ ๆ บริเวณที่ปลูกเชื้อ เมื่อผ่าตามแนวยาว พบเนื้อเยื่อบริเวณแกนกลางลำต้น เปลี่ยนเป็นสีดำ เทา และน้ำตาล บริเวณที่ปลูกเชื้อแสดงอาการเนื้อเยื่อตาย บริเวณเนื้อไม้เปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลดำยาวตามท่อลำเลียง โดยมีขนาดแผล 41.25 มิลลิเมตร สอดคล้องกับ Machado และ

คณะ (2014) พบว่าเชื้อรา *L. psudotheobromae, L. euphrobicola* และ *N. hyalinum* ก่อให้เกิดลักษณะอาการเนื้อเยื่อบริเวณหัวมันสำปะหลังเน่า ยุบตัว และเปลี่ยนจาก สีขาว เป็นสีน้ำตาลแดง น้ำตาลเข้มและสีดำในประเทศบราซิล และในปี 2010 Banito และคณะ ทำการทดสอบความสามารถการเกิดโรครากและลำต้นเน่ามันสำปะหลังในประเทศโตโก พบว่าเชื้อรา *L. theobromae,* ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด รองลงมา คือ *Fusarium* spp. นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าเชื้อราบางไอโซเลตมีความรุนแรงในการเกิดโรคบนหัวและท่อนพันธุ์ในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ไม่รุนแรงในระดับโรงเรือน ซึ่งสอดคล้องกับ Alves et al. (2008); Phillips et al. (2013); Machado et al. (2012) และMachado et al. (2014) ที่รายงานว่า เชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในเศษซากพืช (saprophytic) อาศัยอยู่ในพืชที่มีชีวิตแต่ไม่ก่อให้เกิดโรค (endophtic) และเมื่อมีสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมยังสามารถก่อให้เกิดโรค (paraphytic) ซึ่งการก่อให้เกิดโรคนั้นขึ้นกับสิ่งแวดล้อมเป็นสำคัญ ทั้งนี้เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. ในอดีตมีความสำคัญและพบน้อยกว่าโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่น (week parasite) แต่ในปัจจุบันพบการระบาดของเชื้อราดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นซึ่งอาจเกิดจากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราดังกล่าว (กลุ่มอนุรักษ์ดินและน้ำ, 2545; Machado et al., 2014; Phillips et al., 2013; Trakunyingcharoen et al., 2014)

3. ทำการศึกษาทางลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่า โดยศึกษาจากลักษณะของ โคนิเดีย (conidia) พิคนิเดีย (pycnidia) และพาราไฟซิส (paraphysis) โดยแยกจากมันสำปะหลังด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหาร WA และ HPDA และกระตุ้นให้เชื้อราสาเหตุโรคหัวเน่าและโคนเน่าสร้างพิคนิเดีย โดยการนำเชื้อราไปเลี้ยงบนไม้จิ้มฟันในอาหาร WA จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดสลับกับที่สว่าง วันละ12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการของ Latha et al. (2009); Marques et al. (2013); Machado (2012); Machado et al. (2014) และ Trakunyingcharoen et al. (2014) ซึ่งนำเชื้อราดังกล่าวเลี้ยงบน กิ่งของสน และ แกนข้าวโพด สามารถชักนำให้เชื้อสร้างพิคนิเดียได้ นอกจากนี้ การศึกษาครั้งนี้พบเชื้อราบางไอโซเลตสามารถสร้างพิคนิเดีย บนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วันหลังการย้ายเชื้อ ในการศึกษาเชื้อราครั้งนี้ พบว่าสามารถกระตุ้นให้เชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่า และหัวเน่าสร้างพิคนิเดีย โดยการนำมาเลี้ยงบนไม้จิ้มฟันที่วางในอาหาร WA ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เชื้อราสร้างพิคนิเดียได้ดี สำหรับผลการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาครั้งนี้พบเชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. มีลักษณะโคนิเดียระยะอ่อนเซลล์เดียว มีรูปร่างค่อนข้างรีจนถึงกลม ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย ไม่มีสี ระยะแก่ มีสีน้ำตาลเข้ม มีผนังเซลล์ตามขวาง 1 ชั้นตรงกลางแบ่งเป็น 2 เซลล์ มีรูปร่างรีคล้ายไข่ ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลลานินบนผิวเซลล์ด้านในเรียงตัวเป็นริ้วในแนวยาว สอดคล้องกับ Latha et al. (2009); Marques et al. (2013); Machado (2012); Machado et al. (2014); Phillips et al. (2013); Trakunyingcharoen et al. (2014)

4. ผลการยืนยันชนิดเชื้อสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่า ทั้ง 33 ไอโซเลต ด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วย universal primers 3 บริเวณ ได้แก่ ITS1/ITS4 Ef1-688F/Ef1-1251R และ Bt2a/Bt2b มีขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 550, 500 และ 470 bp ตามลำดับ จากนั้นนำ PCR product ของเชื้อราไอโซเลตตัวแทนที่มีความสามารถในการเกิดโรครุนแรงจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ L6HRD, L11HSR2 L12SHRD, L13SRTF, L18KBSH3, L20FHTB1, L27SRBT และ N3DTD2 มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูล Genbank พบว่าบริเวณ EF1-α สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุด ยังเป็นบริเวณที่สามารถเปรียบเทียบความคล้ายคลึงสูง 99-100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่บริเวณ ITS และ บริเวณ βt สามารถจำแนกเชื้อราได้

เพียงบางสปีชีส์ สามารถเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันถึง 92-100 และ 84-100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากพบว่า สามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคได้ 2 สกุล คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia* ประกอบด้วย ไอโซเลต L6HRD, L11HSR2, L12SHRD, L13SRTF และ L27SRBT มีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *L. euphorbicola* ที่ระดับความค่าความเชื่อมั่นที่ 86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความเชื่อมั่นในระดับสูง ทั้งนี้ไอโซเลต L20FHTB1 มีความใกล้ชิดกับ *Lasiodiplodia* sp. มีค่าความเชื่อมั่นที่ 87 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราไอโซเลต L18KBSH3 มีความใกล้ชิด *L. theobromae* มีค่าความเชื่อมั่นที่ 81 เปอร์เซ็นต์ และ *Neoscytalidium* ประกอบด้วย ไอโซเลต N3DTD2 มีความใกล้ชิดกับ *N. dimidiatum* มีค่าความเชื่อมั่นที่ 71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในระดับมีความเชื่อมั่นในระดับปานกลาง

5. จากการทดลองนี้แนวทางการใช้ประโยชน์ในอนาคต สามารถแนะนำข้อมูลของการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังที่มีการยืนยันแล้วให้เกษตรกรใช้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลังเบื้องต้น โรคดังกล่าวสามารถแพร่ระบาดพบทั่วไปในท่อนพันธุ์ที่กองไว้หรือตัดทิ้งไว้ในแปลงเป็นระยะเวลานานเป็นแหล่งสะสมของเชื้อสาเหตุโรค (กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน, 2545) ซึ่งในปี 2526 ชาญ ถิรพร และกำพล นรินทราพร รายงานว่าเมื่อนำต้นมันสำปะหลังปลูกทันทีพบว่า มีเปอร์เซ็นต์รอดสูงถึง 95.79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาท่อนพันธุ์นาน 1 เดือน มีเปอร์เซ็นต์อยู่รอด 83.52 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บท่อนพันธุ์นาน 4 เดือน มีเปอร์เซ็นต์อยู่รอดเพียง 28.86 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงไม่ควรเก็บท่อนพันธุ์มันสำปะหลังเป็นระยะเวลานาน ไม่ควรเก็บนานเกิน 30 วันก่อนนำไปปลูก นอกจากนี้ในปี 2014 Trakunyingcharoen และคณะ แนะนำหลีกเลี่ยงการปลูกมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกเดียวกันหรือใกล้เคียงกับพืชอาศัยอื่นเพื่อลดปริมาณการสะสมของเชื้อสาเหตุโรคและลดปริมาณการแพร่ระบาดของโรคโคนเน่าและหัวเน่ามันสำปะหลัง ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคได้อย่างถูกต้อง เป็นการลดต้นทุนการผลิตมันสำปะหลัง และสามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคต้นและรากเน่าดำมันสำปะหลังของในบางพื้นปลูกประเทศไทย ทั้งนี้งานวิจัยครั้งนี้ยังเป็นการศึกษาเพียงพื้นฐานของเชื้อสาเหตุโรค อีกทั้งการทดลองนี้ใช้วิธีดั้งเดิมในการระบุเชื้อราสาเหตุโรคซึ่งใช้ระยะเวลานาน ในการวินิจฉัย ดังนั้นจึงได้มีการทำวิจัยต่อเนื่องเพื่อศึกษาในระดับเทคนิคขั้นสูง ที่มีความสะดวก รวดเร็ว และแม่นยำ ในการตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรค เช่น เทคนิค NGS เป็นต้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

กลุ่มอนุรักษ์น้ำและดิน. 2545. มันสำปะหลัง ใน เอกสารวิชาการมันสำปะหลัง. 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.

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

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

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.

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์. 2550. ประวัติความเป็นมาของมันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก: 108 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.

ชาญ ถิรพร และ กำพล นรินทราพร. 2526. การเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 113-118.

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

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.

สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร. 2564. มันสำปะหลังโรงงาน. (ออนไลน์) http://mis-app.oae.go.th/product/%E0%B8%A1%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B8%AA%E0%B8%B3%E0%B8%9B%E0%B8%B0%E0%B8%AB%E0%B8%A5%E0%B8%B1%E0%B8%87%

E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%87%E0%B8%87%E0%B8%B2%E0%B8%99. 12 กรกฎาคม 2564.

สุดใจ สูนาสวน, ยรรยง สมบัติวิชาธร, สิริมา ธนพงศ์พิพัฒน์, คนางค์ ดวงมณี, และเสาวณิต วรดิษฐ์. 2554. รายงานผลการศึกษาสินค้าเกษตรประเภทมันสำปะหลัง. ใน: รายงานผลการศึกษาสินค้าเกษตรประเภทมัน สำปะหลังสำนักงานคณะกรรมการกำกับการซื้อขายสินค้าเกษตรล่วงหน้า. 5 – 15 หน้า. 18.

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.

Abang M.M., Winter S., Green K.R., Hoffmann P., Mignouna H.D. and Wolf G.A. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose of yam in Nigeria. Plant Pathol. 51:63-71.

Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi, G.E., Zare, R. and Phillips, A.J.L. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of Lasiodiplodia from Iran. Persoonia. 25: 1-10.

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.

Adams, R. I., Miletto, M., Taylor, J. W., & Bruns, T. D. 2013. Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances. The ISME journal, 7(7), 1262-1273.

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

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.

Azad, A., Gharakhanlou, R., Niknam, A., & Ghanbari, A. (2011). Effects of aerobic exercise on lung function in overweight and obese students. Tanaffos, 10(3), 24.

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.

Banito, A., Kpemoua, K. E., Bissang, B. and Wydra, K. 2010. Assessment of cassava root and stem rots in ecozones of Togo and evalution of the pathogen virulence. Pak. J. Bot. 42(3): 2059-2068.

Bua, B. and Okello, C. 2011. Isolation and identification of cassava root rot of cassava disease causal pathogens from Lira district, Uganda. African crop science conference proceeding. 10: 183-186.

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

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.

Chen, S.F., Li, G.Q., Liu, Q.L., Li, J.Q. and Liu, F.F. 2016. Characteristics of Lasiodiplodia theobromae from Rosa rugosa in South China. Crop Protection. 79: 51-55.

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

Glass, N.L. and Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Appl Environ Microb 61: 1323-1330.

Huertas-Gonzalez, M.D., Ruiz-Roldan, M.C., Garcia Maceira, F.I., Roncero, M.I. and Di Pietro, A. 1999. Cloning and characterization of pl1 encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. Curr. Genet. 35, 36– 40.

Latha, P., Prakasam, V., Kamalakannan, A., Gopalakrishnan, C., Raguchande T., Paramathma M. and Samiyappan R. 2009. First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot and collar rot disease of physic nut (Jatropha curcas L.) in India. Australasian Plant Disease Notes. 4: 19-20.

Lemaire, M. E. (1950). Manioc. Journal of Geography, 49(9), 376-385.

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.

Li, G.Q., Arnold, R.J., Liu, F.F., Li, J.Q. and Chen, S.F. 2015. Identification and pathogenicity of Lasiodiplodia Species from *Eucalyptus urophylla* X *grandis*, *Polyscias balfouriana* and *Bougainvillea spectabilis* in Southern China. Journal of Phytopathology**.** 163: 956-967.

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.

Machado, A.R., Pinho, D.B., Dutra, D.C. and Pereira O.L. 2012. Collar and root rot caused by Neoscytalidium dimidiatum in the biofuel plant Jatropha curcas. Plant Dis. 96:1697

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Machado, A. R., Pinho, D. B., and Pereira, O. L. 2014. 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 Lasodiplodia. Fungal Diversity. 67: 231-247.

Marques, M.W., Lima, N.B. and de Morais, Jr. M.A. 2013. Species of Lasiodiplodia associated with mango in Brazil. Fungal Diversity. 61: 181–193.

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.

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.

O'Donnell, K. and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus Fusarium are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution. 7: 103-116.

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.

Rao, B. B., Swami, D., Ashok, P., Babu, B. K., Ramajayam, D., & Sasikala, K. 2017. Correlation and path coefficient analysis of cassava (*Manihot esculenta*. Crantz) genotypes. Int. J. Current MicroBiol. And Applied Sci, 6(9), 549-557.

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.

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

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.

Wokocha, R., Nneke, C. and Umechuruba, C.I. 2010. Screening *Colletotrichum gloeosporiodies* f.sp. *manihotis* isolates for virulence on cassava in Akwa Ibom State of Nigeria. Agro-Science Journal of Tropical Agriculture. 9: 56-63.

Zárate-Chaves, C.A., Gómez de la Cruz, D., Verdier, V., López, C. E., Bernal, A. and Szurek, B. 2021. Cassava diseases caused by Xanthomonas phaseoli pv. manihotis and Xanthomonas cassava. Mol Plant Pathol. 2021:1–18.

Zeyimo B., Boykin, L. M.Kehoe, M., Pita, J., Godefroid, M., Nzola, M., Munseki, L., Kanana, T. and Mbuyi, K. 2020. Cassava Root Necrosis Disease (CRND): A new crop disease spreading in western democratic republic of congo and in some central African countries. J. Agric. Sci.12(3): 1-12.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 สำหรับอาหารPDA (potato dextrose agar) +. BRNAP (benomyl, rafarpicin, nystatin, ampicillin, PCNB) มีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับ PDA แต่เติม Antibiotic (benomyl, rafarpicin, nystatin, ampicillin, PCNB) ก่อนใช้

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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)

2% CTAB	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

95% ethanol	736 มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

2.9 Absolute ethanol

Absolute ethanol แช่เย็นอย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำไปใช้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวณัฐธิญา เบือนสันเทียะ เกิดวันที่ 7 กรกฎาคม พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาระดับ มัธยมศึกษาตอนต้น และมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนครบุรี อ. ครบุรี จ. นครราชสีมา เริ่มเขาศึกษาระดับ ปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปีการศึกษา 2542 ขณะที่ศึกษาในระดับปริญญาตรี ได้ศึกษาการตรวจสอบโปรตีน โดยศึกษาและตรวจหาการสะสม โพลีฟีนอลออกซิเดซในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของมะเขือเทศ และจากนั้นจึงมีความสนใจนำเทคนิคทาง เซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลมาใชใน การตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืช ภายหลังสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีในปีการศึกษา 2/2545 ได้เขาศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปีการศึกษา 3/2545 และสำเร็จการศึกษาระดับมหาบัณฑิตศึกษา ในปีการศึกษา 2547 ภายหลังสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิตศึกษา ได้เขาศึกษาต่อในระดับดุษฎีบัณฑิต ในหลักสูตร ปร.ด. (โ ร ค พื ช) ,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2550 และเข้าทำงานในปี พ.ศ. 2553 เป็นอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีจนถึงปัจจุบัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี