

# การศึกษานิตเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันลำปะหลัง



นางสาวรุ่งทิพย์ สังข์เผือก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพืชศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
ปีการศึกษา 2557

**IDENTIFICATION OF CASSAVA ANTHRACNOSE  
CAUSAL FUNGI**

**Rungthip Sangpueak**



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the  
Degree of Master of Science Program in Crop Science  
Suranaree University of Technology  
Academic Year 2014**

## การศึกษาชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นักศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายเข้าศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร. รุจ มรกต)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)

กรรมการ

(ดร. กาญจนา ชรรมนู)

กรรมการ

(ศ. ดร. ชูกิจ ติมปีจันงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

(ผศ. ดร. สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

รุ่งทิพย์ สังข์เผือก : การศึกษาชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง

(IDENTIFICATION OF CASSAVA ANTHRACNOSE CAUSAL FUNGI)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ, 127 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิด และพัฒนาวิธีการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง ทำการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนสจากแหล่งปลูกใน 10 อำเภอ ของ 8 จังหวัด นำมาแยกเชื้อบนอาหาร Water agar (WA) และ Half potato dextrose agar (HPDA) จากนั้นแยกเชื้อจากสปอร์เดียนำมาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา โดยวิธีพื้นฐาน และศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ โดยวิธี PCR ด้วย *universal primers* ITS3 และ ITS4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากฐานข้อมูล Genebank ผลการศึกษาพบว่าจากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 38 ไอโซเลต สามารถแบ่งได้ตามลักษณะของสปีโคโลนีเป็น 5 กลุ่ม โดยเชื้อจำนวน 34 ไอโซเลต อยู่ในกลุ่มเจริญเติบโตเร็วและ 4 ไอโซเลต อยู่ในกลุ่มเจริญเติบโตช้า เชื้อส่วนใหญ่ (35 ไอโซเลต) ไม่สร้าง setae ขณะที่มีเพียง 3 ไอโซเลต คือ SRTLF01 SLC032 และ KBSF02 ที่สร้าง setae การตรวจดูลักษณะโคโคนีเดี่ยวด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สร้างโคโคนีเดี่ยวรูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) ขณะที่มีเพียง 1 ไอโซเลต คือ SRTLF01 จากสุราษฎร์ธานี ที่สร้างโคโคนีเดี่ยวรูปเสี้ยวพระจันทร์ (falcate) การทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคพบว่า เชื้อทั้ง 38 ไอโซเลต สามารถก่อโรคได้ทั้งกับใบมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และผลพริกพันธุ์ชูปเปอร์ฮอต แต่ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR พบว่า เชื้อเกือบทุกไอโซเลตให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ขนาด 450 bp เท่ากับขนาดที่ได้จากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) จากพริกที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ยกเว้น ไอโซเลต SLC032 SRTLF01 NKSTKBS02 NKSTKBS05 NKSTKLS02 NKSTFBS01 และ KBSF01 ที่ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 490 bp เท่ากับชิ้นส่วนที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อ *C. capsici* (CC) จากพริกที่ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อนำชิ้น ส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันกับเชื้อ *C. gloeosporioides* แต่มี 1 ไอโซเลตที่คล้ายกับเชื้อ *C. capsici* (*truncatum*) และ 1 ไอโซเลต คล้ายกับเชื้อ *C. lindemuthianum* การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ *primers* 3 ชนิด พบว่า เฉพาะ *primer* OPA13 เท่านั้นที่ให้ผลวิเคราะห์สอดคล้องกับการใช้วิธีอื่น ๆ ในการระบุชนิด เมื่อสรุปผลการวิเคราะห์จากทุกวิธีร่วมกัน พบว่า เชื้อที่แยกได้จากมันสำปะหลัง 38 ไอโซเลตเป็นเชื้อในกลุ่ม *C. gloeosporioides* ที่มีอัตราการเจริญเร็ว 34 ไอโซเลต ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามขนาด

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



RUNGTHIP SANGPUEAK: IDENTIFICATION OF CASSAVA

ANTHRACNOSE CAUSAL FUNGI. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.

NATTHIYA BUENSANTEAI, Ph.D., 127 PP.

*Colletotrichum* sp./ANTHRACNOSE/CASSAVA

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

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

School of Crop Production Technology

Academic Year 2014

Student's Signature \_\_\_\_\_

Advisor's Signature \_\_\_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ และการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี อันได้แก่

ผศ. ดร. ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ชี้แนะแนวทาง อบรมสั่งสอน ช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ดร. โสภณ วงศ์แก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ดร. กาญจนา ธรรมนุ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยดูแลและให้คำแนะนำติดตามงานอย่างสม่ำเสมอ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. รุจ มรกต ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ให้ความเมตตาและคอยอบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนาบัณฑิตมหาวิทาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาบางส่วน

ขอขอบคุณ คุณกิตติมา ซาญกิจโกศล เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไป ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงาน และเตรียมเอกสารต่าง ๆ ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงศ์ คุณอรทัย นาซิน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอบคุณ คุณมธุกร สมพงษ์ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ และน้อง ๆ ผู้ร่วมเรียนในระดับบัณฑิตศึกษา ที่ให้คำปรึกษา คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอนและส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดี อีกทั้งให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจที่ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี

รุ่งทิพย์ สัจจ์เผือก



# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
<b>บทที่</b>	
<b>1 บทนำ</b>	
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	
2.1 ความสำคัญและปัญหาของการปลูกมันสำปะหลัง.....	4
2.2 ประวัติการปลูกมันสำปะหลัง.....	6
2.3 อนุกรมวิธานและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง.....	7
2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	7
2.3.2 การปลูกมันสำปะหลัง.....	9
2.4 โรคของมันสำปะหลังที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ.....	10
2.4.1 โรคลำไ้หม้ (Cassava bacterial blight : CBB).....	10
2.4.2 โรคลำไ้จุดสีน้ำตาล (Brown leaf spot).....	11
2.4.3 โรคลำไ้หม้ (Leaf blight).....	13
2.4.4 โรครากเน่าและหัวเน่า (Root rot or Tuber rot disease).....	14
2.4.5 โรคแอนแทรกคโนส (Cassava anthracnose disease, CAD).....	15

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5	ข้อมูลทั่วไปของโรคแอนแทรกโนส.....	15
2.6	ชีววิทยาของเชื้อ <i>Colletotrichum</i> sp.....	19
2.6.1	ข้อมูลทั่วไปของเชื้อ <i>Colletotrichum</i> sp.....	19
2.6.2	วงจรการเกิดโรค.....	20
2.6.3	การควบคุมโรค.....	21
2.7	การจำแนกความแตกต่างเชื้อราสาเหตุโรคพืช.....	22
2.7.1	วิธีการจำแนกความแตกต่างเชื้อราสาเหตุโรคพืช ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	22
2.7.2	การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	28
2.7.3	วิธีการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคพืช.....	29
2.7.3.1	การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์.....	29
2.7.3.2	การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (Polymerase chain reaction : PCR).....	30
2.7.3.3	วิธีการศึกษาความหลากหลายเชื้อราสาเหตุโรคพืช ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	32
2.7.4	การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคโดยใช้เทคนิคอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy).....	34
<b>3</b>	<b>วิธีดำเนินงานวิจัย</b>	
3.1	การเก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสจากพื้นที่ปลูกสำคัญใน ประเทศไทย.....	40
3.2	การแยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนส.....	40
3.3	แยกสปอร์เดี่ยว (Single spore) ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส มันสำปะหลัง.....	41
3.4	การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและประเมินความรุนแรง ของเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโนส (Pathogenicity and virulence test).....	41
3.4.1	การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค	

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

แอนแทรกโนสในมันสำปะหลัง(Pathogenicity test).....	41
3.4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคแอนแทรกโนส ในพืชอาศัยอื่น.....	41
3.4.3 การเก็บ Stock เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง .....	42
3.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรก โนสมันสำปะหลัง .....	42
3.5.1 อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนี .....	42
3.5.2 สีของโคโลนีบนอาหาร HPDA .....	43
3.5.3 ลักษณะและขนาดโคนีเดีย .....	43
3.6 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล	
3.6.1 การสกัด genomic DNA ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส มันสำปะหลัง.....	43
3.6.2 การศึกษานาฬิกาของดีเอ็นเอ (DNA) ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์เพิ่ม ปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ) .....	44
3.6.3 การยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส มันสำปะหลังโดยการเปรียบเทียบด้วยวิธี DNA sequencing.....	44
3.7 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fringerprint) ด้วยเทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) .....	45
3.8 การพัฒนาวิธีการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (FTIR micro spectroscopy) .....	46
3.8.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	46
3.8.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างของเชื้อ <i>Colletotrichum</i> sp. สาเหตุโรค แอนแทรกโนสมันสำปะหลังโดยใช้เครื่อง FTIR micro spectroscopy .....	46
<b>4 ผลการทดลอง .....</b>	<b>49</b>
4.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อราจากตัวอย่างมันสำปะหลัง ที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส .....	49

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2	การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ ที่แยกได้จากโรคแอนแทรกซิส (pathogenicity and virulency test).....	57
4.2.1	การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแอนแทรกซิส ในมันสำปะหลัง.....	57
4.2.2	การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคแอนแทรกซิส ในพืชอาศัยอื่น.....	59
4.3	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกซิส มันสำปะหลัง.....	63
4.3.1	การเจริญของโคโคนี.....	63
4.3.2	ลักษณะและสีของโคโคนี.....	63
4.3.3	ลักษณะและขนาดของโคโคนีเดี่ยว.....	71
4.4	การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกซิสมันสำปะหลัง ด้วยวิธีชีวโมเลกุล.....	74
4.4.1	การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง.....	74
4.4.4.1	การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR.....	74
4.4.2	การยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกซิสมันสำปะหลัง ด้วยวิธี DNA sequencing.....	78
4.4.3	การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยเทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA).....	80
4.5	การพัฒนาเทคนิค FTIR micro spectroscopy ในการระบุเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> sp. สาเหตุโรคแอนแทรกซิสมันสำปะหลัง.....	81
5	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	101
	รายการอ้างอิง.....	107
	ภาคผนวก.....	117
	ประวัติผู้เขียน.....	127

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ความแตกต่างของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> sp. จากพืชชนิดต่าง ๆ.....24
2.2	ลักษณะของการคุกกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล.....38
4.1	เชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส ที่เก็บได้จากแหล่งปลูกที่สำคัญและเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงใช้ในการศึกษาครั้งนี้.....55
4.2	การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้ บนมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ พริกชี้ฟ้าพันธุ์ชูปเปอร์ฮอต.....61
4.3	แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ HPDA ที่อายุ 3 วัน 5 วัน และ 7 วัน .....64
4.4	ขนาดโคนีเดียของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสไอโซเลตต่าง ๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร HPDA ของเชื้ออายุ 14 วัน .....72
4.5	ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบส (DNA sequencing) ของเชื้อราที่แยก ได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส.....79
4.6	สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลของตัวอย่างเชื้อ <i>Colletotrichum</i> spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง .....84
4.7	แสดงผลการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง จำนวน 4 ไอโซเลตกับฐานข้อมูล (Model) SEL8 และ ฐานข้อมูล (Model) CC.....100

## สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	แสดงองค์ประกอบของต้นมันสำปะหลัง .....8
2.2	แสดงลักษณะอาการของโรคใบไหม้มันสำปะหลัง..... 11
2.3	แสดงลักษณะอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันสำปะหลัง .....13
2.4	แสดงลักษณะอาการของโรครากเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง ..... 15
2.5	แสดงลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง ..... 18
2.6	วงจรการเกิดโรคจากเชื้อรา <i>C gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง.....21
2.7	ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR .....32
2.8	แสดงลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล .....35
2.9	หลักการทำงานของเทคนิค FT-IR .....36
3.1	แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยโปรแกรม The Unscrambler X 10.1 .....47
4.1	ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังที่เปลี่ยนแปลงปลูกของเกษตรกร อำเภอสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมาที่อายุ 6-8 เดือน .....50
4.2	แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังจากตัวอย่างมันสำปะหลัง ที่นำมาใช้ในการศึกษา .....51
4.3	อาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง .....52
4.4	ข้าวใบที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง .....53
4.5	ก้านใบที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง .....53
4.6	แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง .....54
4.7	ลักษณะของมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส หลังปลูกเชื่อเป็นเวลา 5 วัน .....58
4.8	แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส บนพริกชี้หูพันธุ์ชูปเปอร์ฮอต หลังปลูกเชื่อเป็นเวลา 5 วัน .....60
4.9	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่มที่ 1 โคโลนีสีเทา จำนวน 13 ไอโซเลต.....66
4.10	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่มที่ 2 โคโลนีสีเทาปนเขียว จำนวน 4 ไอโซเลต.....67
4.11	แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่มที่ 3 โคโลนีสีส้ม จำนวน 4 ไอโซเลต .....67

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12	แสดงลักษณะ โคลนินของเชื้อราในกลุ่มที่ 4 โคลนินสีเขียวมะกอก จำนวน 5 ไอโซเลต.....68
4.13	แสดงลักษณะ โคลนินของเชื้อราในกลุ่มที่ 5 โคลนินสีขาว จำนวน 14 ไอโซเลต.....69
4.14	แสดงลักษณะของ setae ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังไอโซเลต SRTLF01 ที่อายุ 10 วันบนอาหาร HPDA .....70
4.15	แสดงการสร้าง setae ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังไอโซเลต SLC032 ที่อายุ 14 วันบนอาหาร HPDA .....70
4.16	แสดงลักษณะ โคลนินเดี่ยวของเชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส .....71
4.17	แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละ ไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR.....74
4.18	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา <i>Colletotrichum</i> spp. ที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA13 รูป.....82
4.19	ผลการทำ averaged spectra ของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง .....92
4.20	ผลการทำ Second derivative ของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง ไอโซเลต SEL8 เปรียบเทียบกับเชื้อรา <i>C. capsici</i> ไอโซเลตอ้างอิง (CC) ในช่วงความยาวคลื่น 1850-650 $\text{cm}^{-1}$ .....93
4.21	ผลการวิเคราะห์ Partial least squares (PLS) เพื่อสร้างแบบจำลองของฐานข้อมูลของเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> สาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง ไอโซเลต SEL8 โดยใช้สเปกตรัมในกลุ่มของ Training set เพื่อสร้างแบบจำลองของชุดข้อมูล .....94
4.22	ผลการวิเคราะห์ Partial least squares (PLS) เพื่อสร้างแบบจำลองของฐานข้อมูลของเชื้อรา <i>C. capsici</i> สายพันธุ์อ้างอิง ไอโซเลต CC โดยใช้สเปกตรัมในกลุ่มของ Training set เพื่อสร้างแบบจำลองของชุดข้อมูล.....95
4.23	การตรวจสอบฐานข้อมูลโดยการทำ Predict regression ฐานข้อมูล SEL8 ( <i>C. gloeosporioides</i> ไอโซเลต SEL8) โดยใช้สเปกตรัมของชุดข้อมูล Validated set ของเชื้อราไอโซเลต SEL8 และ ไอโซเลตอ้างอิง CC ในการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรค พบว่าเชื้อราไอโซเลต SEL8 มีค่า predicted Y เข้าใกล้ 1 แสดงว่า ฐานข้อมูล SEL8 ( <i>C. gloeosporioides</i> ไอโซเลต SEL8) มีความน่าเชื่อถือ.....96

## สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.24 การตรวจสอบฐานข้อมูลโดยการทำ Predict regressionของฐานข้อมูล CC ( <i>C. capsici</i> ไอโซเลต CC) โดยใช้สเปคตรัมของชุดข้อมูล Validated set ของเชื้อรา ไอโซเลต SEL8 และ ไอโซเลตอ้างอิง CC ในการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรค พบว่าเชื้อราไอโซเลต CC มีค่า predicted Y เข้าใกล้ 1 แสดงว่าฐานข้อมูล CC ( <i>C. capsici</i> ไอโซเลต CC) มีความน่าเชื่อถือ.....	97
4.25 แสดงผลการทำ Prediction testing ของฐานข้อมูล SEL8 ( <i>C. gloeosporioides</i> ) โดยใช้สเปคตรัมของชุดข้อมูล Validated set ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังและเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงไอโซเลต CC, SEL8, SRTL01 และ CHTM11 ในการเปรียบเทียบ .....	98
4.26 แสดงผลการทำ Prediction testing ของฐานข้อมูล CC ( <i>C. capsici</i> ) โดยใช้สเปคตรัมของชุดข้อมูล Validated set ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังและเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงไอโซเลต CC, SEL8, SRTL01 และ CHTM11 ในการเปรียบเทียบ .....	99



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) มีชื่อสามัญเรียกชื่อตามท้องถิ่น ได้แก่ มันสำปะหลัง, cassava, yuca, mandioa, manioc, tapioca (ยุคติ สารีกะภูติ, 2526; Stephen and O'Hair, 1998) มีถิ่นกำเนิดแถบที่ลุ่มเขตร้อน (Lowland tropics) หลักฐานพบว่า ปลูกในประเทศโคลัมเบียและเวเนซุเอลา มานานกว่า 3,000-7,000 ปี สันนิษฐานว่าแหล่งกำเนิดมันสำปะหลังมี 4 แหล่งด้วยกันคือ 1. แถบประเทศกัวเตมาลาและเม็กซิโก 2. ทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของทวีปอเมริกาใต้ 3. ทางทิศตะวันออกของประเทศโบลิเวียและทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศอาร์เจนตินา 4. ทางทิศตะวันออกของประเทศบราซิล (จักรพงษ์ ชาตะรักษ์, 2554) โดยทวีปเอเชียมีการปลูกครั้งแรกที่ประเทศฟิลิปปินส์ในคริสต์ศตวรรษที่ 17 ต่อมามีการปลูกที่ประเทศอินโดนีเซีย และเมื่อ พ.ศ. 2337 ได้มีการนำมันสำปะหลังจากทวีปแอฟริกามาปลูกในประเทศอินเดีย เพื่อใช้ในการทดลอง (กัญญารัตน์ ว่องวิทย์เดชา, 2552; Theberge, 1985) สำหรับประเทศไทย ไม่มีหลักฐานที่แน่นอนว่า มีการนำเข้ามาปลูกเมื่อใด สันนิษฐานว่านำเข้ามาในระยะเดียวกันกับการเข้าสู่ประเทศศรีลังกาและฟิลิปปินส์ คือประมาณ พ.ศ. 2329-2383 ปัจจุบันประเทศไทย ผลิตมันสำปะหลังส่งออกมากเป็นอันดับที่ 2 ของโลกรองจากประเทศไนจีเรีย โดยในปี 2556 มีการส่งออกผลผลิตของมันสำปะหลังประมาณ 28.28 ล้านตันต่อปี (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013) ปัจจุบันประเทศไทย มีเนื้อที่ปลูกมันสำปะหลัง 7.98 ล้านไร่ และมีผลผลิตประมาณ 28.75 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2557) โดยประเทศไทย ส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกในรูปแบบของมันอัดเม็ดส่งออกไปที่ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส) จีน เกาหลีใต้และญี่ปุ่น สำหรับแป้งมันสำปะหลังจะส่งออกไปที่ประเทศญี่ปุ่น รองลงมาคือฮ่องกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน ตามลำดับ ส่วนการใช้มันสำปะหลังในประเทศใช้ทำมันเส้นและมันอัดเม็ดร้อยละ 45-50 ใช้แปรรูปเป็นแป้งร้อยละ 50-55 (จักรพงษ์ ชาตะรักษ์, 2554) โดยในปี 2556 ปริมาณการส่งออก 7.88 ล้านตัน มูลค่า 84,290 ล้านบาท เมื่อเทียบกับปี 2555 ที่ส่งออกได้ 7.78 ล้านตัน มูลค่า 83,542 ล้านบาท พบว่า ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.31 และร้อยละ 0.90 ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2557) และในปี 2557 คาดว่าการส่งออกจะเพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมา เนื่องจากความต้องการของตลาดทั้งในรูปแบบของมันเส้น และแป้ง

มันสำปะหลัง ขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะประเทศจีน ซึ่งเป็นประเทศผู้นำเข้าหลัก ซึ่งยังคงมีความต้องการผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังของไทย เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2557) ซึ่งผู้ผลิตรายใหญ่ 5 อันดับแรก คือ ไนจีเรีย ไทย อินโดนีเซีย บราซิล และคองโก ปัจจุบันในประเทศไทย เริ่มประสบปัญหาเรื่องแมลงศัตรูและโรคมันสำปะหลัง ได้แก่ เพี้ยแป้ง ไรแดง เป็นต้น นอกจากนี้โรคมันสำปะหลังที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ โรคหัวเน่า (Root rot or Tuber rot disease) มันสำปะหลัง โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown leaf spot) โรคใบไหม้ (Cassava bacterial blight, CBB) และโรคแอนแทรกคโนส (Cassava anthracnose disease, CAD) (รังษิ เจริญสถาพร และอมรรักษ์ กิจใจเดียว, 2553; Banito et al., 2010) ส่งผลให้ผลผลิตลดลงมากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ (Frison and Feliu, 1991; ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์, 2551; กรมวิชาการเกษตร, 2553)

โรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลังมีรายงานในต่างประเทศว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis* และ *C. graminicola* (Frison and Feliu, 1991; Theberge, 1985; Fokunang et al., 2001; Wokocha et al., 2010) ประเทศไทย ในอดีตมีรายงานว่า เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ฐิติมา วีระศิลป์, 2542; ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์, 2554) ต่อมา มีรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis* (รังษิ เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ กิจใจเดียว, 2553; ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์, 2553) แต่เนื่องจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนส มีพืชอาศัยกว้างพบในพืชอาศัยหลายชนิด เช่น มะม่วง มะละกอ พริก ขนุน ชมพู ฝรั่ง เงาะ พืชตระกูลถั่ว อะโวคาโด สตรอเบอร์รี่ องุ่น กัญชง มะเขือเทศ ข้าวโพด ทูเรียนและมันสำปะหลัง (หทัยชนก คงแก้ว, 2546; สุชาติณี ชัยชนะ, 2550; Cook, 1975; Smith and Black, 1990) อีกทั้งในปัจจุบันพบการระบาดของโรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลังอย่างรุนแรงโดยเฉพาะมันสำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ เช่น พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 โดยจะมีลักษณะอาการที่หลากหลายขึ้นอยู่กับพันธุ์มันสำปะหลัง โดยอาการที่พบส่วนใหญ่ ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้มีการใช้เทคนิคดั้งเดิมร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการศึกษาเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลัง ทั้งยังไม่มี การจัดจำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลังในประเทศไทย อย่างชัดเจน จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษา โดยตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวโมเลกุล และพัฒนาวิธีการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลัง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัด โรคดังกล่าวอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลัง

## 2. เพื่อพัฒนาวิธีการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง

### 1.3 สมมติฐานการวิจัย

1. เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังน่าจะเป็นเชื้อรา *Colletotrichum* spp. หลายชนิด
2. วิธีการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ น่าจะสามารถใช้ยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังได้

### 1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงชนิดของเชื้อสาเหตุ ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังในบางพื้นที่ปลูก โดยใช้วิธีมาตรฐานของการศึกษาเชื้อรา สำหรับวิธีการระบุชนิดเชื้อสาเหตุจะมุ่งเน้นเฉพาะวิธีทางด้านสัณฐานวิทยา ชีวโมเลกุล และเทคนิค Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังในบางพื้นที่ปลูกของประเทศไทย
2. สามารถพัฒนาวิธีการที่อาจใช้เพื่อการยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง
3. สามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการจัดการโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกของประเทศไทย

## บทที่ 2

### ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ความสำคัญและปัญหาของการปลูกมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (*Manihotes culenta* Crantz) มีถิ่นกำเนิดในประเทศเขตร้อน (Lowland tropics) ปลูกในประเทศโคลัมเบีย และเวเนซุเอลา 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 สุนาสวน และคณะ, 2554) ในประเทศไทยมันสำปะหลังเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอันดับที่ 3 ของโลกรองจากข้าวและยางพารา (ไพบุลย์ พุวัตนศิลป์, 2551) โดยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังมากที่สุด รองลงมาคือ ภาคกลาง และภาคเหนือ แหล่งผลิตมันสำปะหลังที่สำคัญ 5 อันดับแรก ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา กำแพงเพชร สระแก้ว ชัยภูมิ และกาญจนบุรี (สุดใจ สุนาสวน และคณะ, 2554) ปัจจุบันประเทศไทยผลิตมันสำปะหลังส่งออกมากเป็นอันดับที่ 2 ของโลกรองจากประเทศไนจีเรีย (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013) และเนื้อที่ปลูกมันสำปะหลัง 7.98 ล้านไร่ และมีผลผลิตประมาณ 28.75 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2557) โดยประเทศไทยส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออก ในรูปของมันอัดเม็ดส่งออกไปที่ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส) จีน เกาหลีใต้และญี่ปุ่น สำหรับแป้งมันสำปะหลังจะส่งออกไปที่ประเทศญี่ปุ่น รองลงมาคือฮ่องกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน ตามลำดับ ส่วนการใช้มันสำปะหลังในประเทศใช้ทำมันเส้นและมันอัดเม็ดร้อยละ 45-50 ใช้แปรรูปเป็นแป้งร้อยละ 50-55 (จักรพงษ์ ชาตะรักษ์, 2554) โดยในปี 2556 ปริมาณการส่งออก 7.88 ล้านตัน มูลค่า 84,290 ล้านบาท เมื่อเทียบกับปี 2555 ที่ส่งออกได้ 7.78 ล้านตัน มูลค่า 83,542 ล้านบาท พบว่าปริมาณและมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.31 และร้อยละ 0.90 ตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2557) และในปี 2557 คาดว่าการส่งออกจะเพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมาเนื่องจากความต้องการของตลาดทั้งในรูปของมันเส้น และแป้งมันสำปะหลัง ขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะประเทศจีน ซึ่งเป็นประเทศผู้นำเข้าหลัก ซึ่งยังคงมีความต้องการผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังของไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร, 2557) โดยชนิดของมันสำปะหลังที่นิยมปลูกเชิงเกษตรกรรมมีสองชนิด คือ 1.) ชนิดขม มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกสูง

ต้องนำไปแปรรูปก่อนนำไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ พันธุ์มันสำปะหลังของกรมวิชาการเกษตร มีทั้งหมด 9 พันธุ์ คือ ระยะเวลา 1 ระยะเวลา 3 ระยะเวลา 60 ระยะเวลา 90 ระยะเวลา 5 ระยะเวลา 72 ระยะเวลา 7 ระยะเวลา 9 และระยะเวลา 11 นอกจากนี้พันธุ์มันสำปะหลังของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มี 3 พันธุ์ คือ เกษตรศาสตร์ 50 หัวยบง 60 และหัวยบง 80 (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2553) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังสายพันธุ์ใหม่ขึ้นมาหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์เกลือค้มกรจัมโบ้ และใจแอนท์ พัฒนาพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยะของ รับรองพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2553) และพันธุ์พิรุณ 1 พัฒนาโดยกรมวิชาการเกษตรและมหาวิทยาลัยมหิดล เป็นต้น (หนังสือพิมพ์มติชนเทคโนโลยีเกษตร, 2557) 2.) ชนิดหวานเป็นมันที่ใช้สำหรับบริโภคโดยตรง มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิกต่ำ ไม่มีรสขมและสามารถใช้ทำอาหารได้โดยตรงได้แก่ พันธุ์ระยะของ 2 และพันธุ์ห่านาที เป็นต้น การปลูกมันสำปะหลังนิยมปลูกเป็นแนวตรงเพื่อสะดวกในการบำรุงรักษาและกำจัดวัชพืช โดยใช้ระยะระหว่างแถว 1.20 เมตร ระยะระหว่างต้น 80 เซนติเมตร และปักท่อนพันธุ์ให้ตั้งตรงลึกในดินประมาณ 10 เซนติเมตร ใช้ท่อนพันธุ์มันที่สดอายุ 10-12 เดือน ตัดทิ้งไว้ไม่เกิน 15 วัน โดยแต่ละท่อนมีความยาวประมาณ 20 เซนติเมตร (ฐิติมา วิระศิลป์, 2542; ยุคติ สาริกะภูติ, 2526)

ในปัจจุบันการปลูกมันสำปะหลังเริ่มประสบปัญหาเรื่องแมลงศัตรูและโรครันมันสำปะหลัง โดยโรครันมันสำปะหลังที่สำคัญในประเทศไทยได้แก่ โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown leaf spot) โรคใบไหม้ (Cassava bacterial blight, CBB) โรครากหรือหัวเน่า (Root and Tuber Rot Diseases) และโรคแอนแทรกคโนส (Cassava anthracnose disease, CAD) (รังษิณี เจริญสถาพร และอมรรักษ์ ภูคิจใจเดียว, 2010) โดยโรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลังต่างประเทศมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides* f. sp. *manihotis* และ *C. graminicola* (Frison and Felio, 1991) ประเทศไทยในอดีตมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ต่อมา มีรายงานว่า เป็นเชื้อ *C. gloeosporioides* (รังษิณี เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ ภูคิจใจเดียว, 2010) แต่เนื่องจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสสามารถพบในพืชอาศัยหลายชนิดเช่น มะม่วง มะละกอ พริก ขนุน ชมพู ฝรั่ง เงาะ พืชตระกูลถั่ว อะโวคาโด สตรอเบอร์รี่ องุ่น กว๊าย มะเขือเทศ ข้าวโพด ทูเรียน และมันสำปะหลัง (หทัยชนก คงแก้ว, 2546; สุธาสิณี ชัยชนะ, 2550; Cook, 1975; Smith and Black, 1990) อีกทั้งในปัจจุบันมีการระบาดของโรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลังอย่างรุนแรงในมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ระยะเวลา 90 และระยะเวลา 72 และพบการระบาดมากในเดือนกรกฎาคม-กันยายน ซึ่งมีปริมาณน้ำฝนมาก (กรมวิชาการเกษตร, 2553) ลักษณะอาการที่พบโดยทั่วไปจะแสดงอาการบนลำต้นแก่ เป็นแผลที่มีขอบเขตแน่นอน สีน้ำตาลหรือสีดำ อาการบนลำต้นอ่อน แผลมีขอบเขตไม่แน่นอน สีน้ำตาลอ่อน อาการบนก้านใบ เป็นรอยไหม้ที่โคนก้านใบติดกับลำต้น และก้านใบส่วนที่ติดกับตัวใบหักถ่วง และหลุดร่วงทั้งต้น อาการบนใบ มีอาการไหม้ที่ขอบใบและปลายใบ ขยายตัวเข้าสู่กลางใบ ใบไหม้

หมอดและหลูดร่ว (Fokunang et al., 2001; Van der Bruggen and Maraite, 1987) สร้างความเสียหายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทั้งหมด (ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์, 2552; กรมวิชาการเกษตร, 2553; Frison and Feliu, 1991) ซึ่งในประเทศไทยยังไม่มีการจัดจำแนกสปีชีส์อย่างชัดเจนในมันสำปะหลัง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวโมเลกุล และพัฒนาวิธีการระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง เพื่อหาแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคดังกล่าวได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

## 2.2 ประวัติการปลูกมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชหัวชนิดหนึ่งมีชื่อสามัญเรียกทั่วไปว่า Cassava หรือ Tapioca ประเทศแถบทวีปอเมริกาใต้ใช้ภาษาสเปนเรียกว่า Yuca ภาษาโปรตุเกสในประเทศบราซิลเรียกว่า Mandioca แถบประเทศในทวีปแอฟริกาที่พูดภาษาฝรั่งเศส เรียกว่า Manioc (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, ม.ม.ป.) ในประเทศไทยมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เดิมเรียกว่า มันไม้ มันสำโรง มันต้นเดี่ยว มันเทศ ปัจจุบันนิยมเรียก มันสำปะหลัง มันสำปะหลังมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz มีถิ่นกำเนิดแถบที่ลุ่มเขตร้อน (Lowland tropics) หลักฐานพบว่าปลูกในประเทศโคลัมเบียและเวเนซุเอลา มานานกว่า 3,000-7,000 ปี (จักรพงษ์ ชาตะรักษ์, 2554; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, ม.ม.ป.) มันสำปะหลังมีการแพร่กระจายในสมัยที่มีการล่าอาณานิคมในคริสต์ศตวรรษที่ 15 โดยพวกนักค้าทาสได้นำมันสำปะหลังจากบราซิลไปปลูกในทวีปแอฟริกา ต่อมา พ.ศ. 2282 มี ชาวโปรตุเกสนำมันสำปะหลัง ไปปลูกที่เกาะรียูเนียน (Reunion) และแพร่กระจายไปยังมาดากัสกา (ศูนย์วิจัยมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์, ม.ม.ป.) ต่อมาได้ขยายไปสู่แหล่งต่างๆของโลก โดยชาวโปรตุเกส และสเปน นำมันสำปะหลังจากเม็กซิโก มายังฟิลิปปินส์ ประมาณ ค.ศ.17 และในเวลาต่อมามีการปลูกที่อินโดนีเซีย ประมาณ ค.ศ.18 (ยุคติ สาริกะภูติ, 2526) นอกจากนี้ มีหลักฐานว่า เมื่อ พ.ศ. 2377 ได้มีการนำมันสำปะหลังจากแอฟริกาไปปลูกที่อินเดียเพื่อใช้ในการทดลอง (ศูนย์วิจัยมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์, ม.ม.ป.) สำหรับประเทศไทยนั้นไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดว่ามีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกเมื่อใด สันนิษฐานว่านำเข้ามาในระยะเดียวกันกับการเข้าสู่ประเทศศรีลังกาและฟิลิปปินส์คือประมาณ พ.ศ. 2329-2383 (ยุคติ สาริกะภูติ, 2526; สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, ม.ม.ป.) ซึ่งมีการปลูกมันสำปะหลังเป็นการค้าเพื่อใช้ทำแป้งและสาธูในภาคใต้ โดยปลูกระหว่างแถวของต้นยางพารากันมากกว่า 70 ปีแล้ว โดยเฉพาะที่จังหวัดสงขลามีอุตสาหกรรมทำแป้งและสาธูจำหน่ายไปยังปีนังและสิงคโปร์ แต่การปลูกมันสำปะหลังทางภาคใต้ค่อยๆ ลดลงเมื่อมีการขยายการปลูกยางพารา ต่อมาได้มีการปลูกมันสำปะหลังในภาคตะวันออก คือ จังหวัดชลบุรี ระยอง และจังหวัดใกล้เคียง และเมื่อความต้องการของตลาดในด้านผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังเพื่อใช้

ในการเลี้ยงสัตว์และอุตสาหกรรมมีเพิ่มมากขึ้น ทำให้พื้นที่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีการขยายพื้นที่ปลูกไปยังจังหวัดอื่น ๆ โดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จนในปัจจุบันภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดของประเทศไทย (สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร, ม.ม.ป.) นักวิทยาศาสตร์ได้มีการจัดมันสำปะหลังออกเป็นหมวดหมู่ ดังนี้ (เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, 2519)

Class Dicotyledonea

Subclass Archichlamydeae

Order Geraniales or Euphorbiales

Family Euphorbiaceae

Genus *Manihot*

Species *Esculenta*

## 2.3 อนุกรมวิธานและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลัง

### 2.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลังมีดังแสดงในภาพที่ 1

ราก ระบบรากเป็นแบบรากฝอย (fibrous root system) รากเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูก และขยายใหญ่เป็นหัว (thickened root) หัวมันสำปะหลังเมื่อตัดตามขวางมีส่วนประกอบตามภาพที่ 2.1A-B ดังนี้

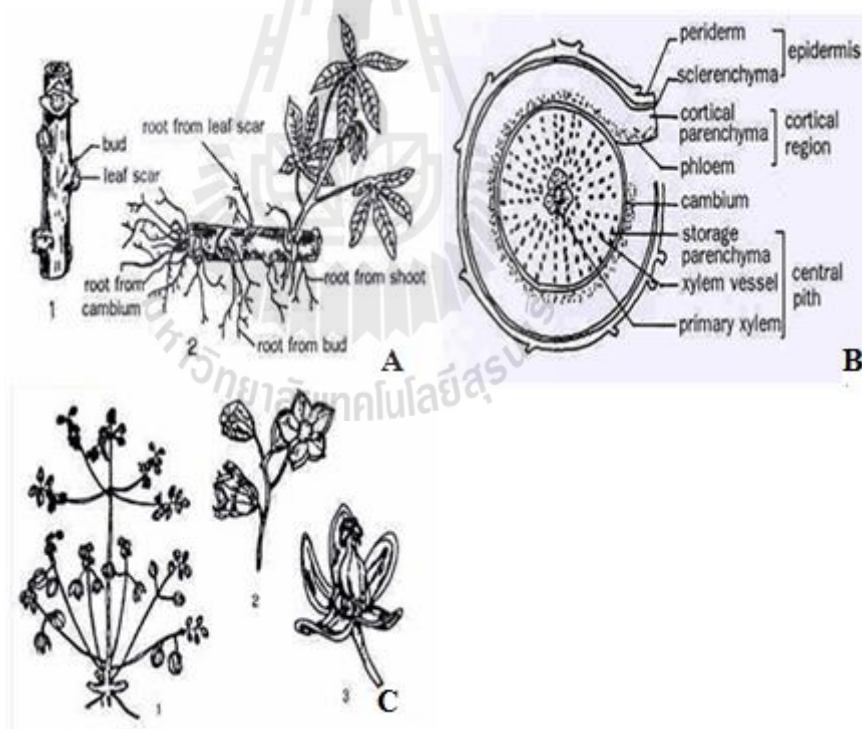
1. เปลือกชั้นนอก (periderm) เป็นชั้นของเซลล์ผิวชั้นนอก (epidermal cell) และชั้นของคอร์ค (cork layer) รวมกัน
2. เปลือกชั้นใน (cortical region) เป็นส่วนของคอร์เทกซ์ (cortex) และกลุ่มท่ออาหาร (phloem bundle) เปลือกชั้นนอกและเปลือกชั้นใน เรียกรวมกันว่า peel
3. ส่วนสะสมแป้งหรือไส้กลาง (starchy flesh หรือ central pith) ประกอบด้วยเซลล์พาราไคมา (parenchyma cell) กลุ่มท่อน้ำ (xylem bundle) และท่อน้ำยาง (latex tube) (จำลอง เจียมจันรรจา, 2541)

ลำต้น ลำต้นตั้งตรง เป็นไม้เนื้อแข็ง สูง 1-5 เมตร มีการแตกกิ่ง กิ่งที่แตกจากลำต้นหลักเรียกว่า กิ่งชุดแรก (primary branch) และกิ่งที่แตกจากกิ่งชุดแรกเรียกว่า กิ่งชุดที่สอง (secondary branch) มันสำปะหลังจะแตกกิ่งเป็นแบบ 2 กิ่ง (dichotomous branching) หรือ 3 กิ่ง (trichotomous branching) บนลำต้นจะเห็นรอยของก้านใบที่หลุดร่วงไปเรียกว่า รอยแผลใบ (leaf scar) ระหว่างรอยแผลใบเรียกว่า ความยาวของซัน (storey length) เหนือรอยแผลใบมีตา (bud) (दनัย สุภาหาร, 2537)

**ใบ** ใบเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) เกิดเวียนสลับรอบลำต้น (spiral) มีการจัดเรียงตัว (phyllotaxy) เท่ากับ 2/5 แผ่นใบเว้าลึกเป็นแฉก (lobe) แบบ palmate ใบมีก้านใบ (petiole) ที่โคนก้านใบติดกับลำต้นมีหูใบ (stipule) (วิจารณ์ วิชชุกิจ, 2527)

**ช่อดอกและดอก** มันสำปะหลังเป็นพืชที่มีช่อดอกตัวผู้และช่อดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่อยู่คนละตำแหน่ง เรียกว่า monoecious plant ช่อดอกเป็นแบบ panicle ดอกตัวผู้มีก้านดอก (pedicel) กลีบเลี้ยง (sepal) ไม่มีกลีบดอก (petal) ภายในดอกมีเกสรตัวผู้ (stamen) ประกอบด้วย ก้านเกสรตัวผู้ (filament) อับละอองเกสรตัวผู้ (anther) ดอกตัวเมียมีก้านดอก มีกลีบเลี้ยง ไม่มีกลีบดอก เกสรตัวเมีย (pistil) ประกอบด้วยรังไข่ (ovary) 3 คาร์เพล (carpel) แต่ละคาร์เพลมี 1 ออวูล (ovule) ดังแสดงในภาพ 2.1C (दनัย सुकाहार, 2537)

**ผลและเมล็ด** ผลเป็นแบบ capsule เมล็ดมีสีน้ำตาลลายดำ คล้ายเมล็ดละหุ่งแต่เล็กกว่า รอยของก้านออวูลที่เหลืออยู่ (raphe) มีลักษณะเป็นสันนูนขึ้นทางด้านหนึ่งของเมล็ด ด้านล่างของเมล็ดมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ (caruncle) มีสีขาว ชมพู หรือม่วง (จำลอง เจียมจันรรจา, 2541)



ภาพที่ 2.1 แสดงองค์ประกอบของต้นมันสำปะหลัง (ที่มา : จำลอง เจียมจันรรจา, 2541)

A แสดงระบบรากเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูก

B แสดงองค์ประกอบของลำต้นมันสำปะหลังที่ทำการตัดขวาง

C แสดงลักษณะช่อดอกของมันสำปะหลัง



มันสำปะหลังเป็นพืชที่ใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วนตั้งแต่ยอดจนถึงราก (หัวมัน) มีการนำมาใช้ประโยชน์ในครัวเรือน เพื่อการบริโภคเป็นอาหารมนุษย์ และอาหาร สัตว์ และใช้แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ในหลายรูปแบบตลอดทั้งใช้ในอุตสาหกรรมแป้งแปรรูป (Modified Starch) เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ และใช้ในวงการแพทย์ จึงกล่าวได้ว่าการใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลังแยกได้ 3 ประเภท คือ บริโภคโดยตรง แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ (มันเส้น มันอัดเม็ด และแป้งมัน) และแป้งมันสำปะหลังแปรรูป (ทางเคมีและกายภาพใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม) (คณัย สุภาพาร, 2537)

### 2.3.2 การปลูกมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้นมีอายุอยู่ได้หลายปี การปลูกมันสำปะหลัง จะใช้ส่วนของลำต้นตัดเป็นท่อนปักไปในดิน ตรงบริเวณรอยตัดที่ปักอยู่ในดินจะแตกเป็นราก ฝอย หลังจากปลูกได้ประมาณ 2 เดือนรากจะค่อย ๆ สะสมแป้ง และมีขนาดโตขึ้น เรียกว่า หัวมันสำปะหลัง และสามารถเก็บเกี่ยวหัวมันสำปะหลังหลังจาก 6 เดือน ผ่านไปแล้ว โดยจะยืดอายุเก็บเกี่ยวไปได้ถึง 16 เดือน โดยส่วนตาที่อยู่ด้านข้างท่อนมันจะเจริญเติบโตออกมาเป็นลำต้นต่อไป (คณัย สุภาพาร, 2537) มันสำปะหลังสามารถปลูกได้ในดินแทบทุกชนิด แต่จะเจริญได้ดีในดินร่วนปนทราย ไม่มีน้ำขัง สำหรับประเทศไทย สามารถปลูกมันสำปะหลังได้ทั่วประเทศ โดยแหล่งที่ปลูกมันสำปะหลังมากที่สุดอยู่ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ตลอดปี เกษตรกรจึงนิยมทำการปลูกในช่วงต้นฤดูฝน คือประมาณเดือนมีนาคม ถึง พฤษภาคม อีกร้อยละ 20 ปลูกในช่วงฤดูแล้ง ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ถึง กุมภาพันธ์ ส่วนที่เหลือร้อยละ 13 จะปลูกในช่วงเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม สำหรับการปลูกในช่วงต้นฤดูฝนนี้ ผลผลิตหัวสดที่ได้จะสูงกว่าการปลูกในช่วงอื่น แต่ในดินที่มีลักษณะเนื้อดินค่อนข้างหยาบ การปลูกในช่วงฤดูแล้งจะให้ผลผลิตสูงที่สุด ดังนั้นในการตัดสินใจเลือกช่วงการปลูกมันสำปะหลังที่เหมาะสม จึงต้องพิจารณาทั้งปริมาณน้ำฝน และลักษณะของดิน (จำลอง เจริญจรรย์จรูญ, 2541) โดยวิธีการปลูกมันสำปะหลังมี 2 วิธีคือการปลูกแบบนอน และการปลูกแบบปัก โดยการปลูกแบบปักจะให้ผลดีกว่าการปลูกแบบนอน เนื่องจากมันสำปะหลังจะงอกได้เร็วกว่า สะดวกต่อการปลูกซ่อม และกำจัดวัชพืช การปลูกแบบปักสามารถปลูกได้ทั้งปักตรงและปักเอียง โดยปักลึกลงไปดินประมาณ 10-15 เซนติเมตร (ยุคติ สาริกะภูติ, 2526) โดยพันธุ์ที่นิยมปลูกทั้งไปในปัจจุบันได้แก่ พันธุ์มันสำปะหลังของกรมวิชาการเกษตร มีทั้งหมด 9 พันธุ์ คือ ระวังง 1 ระวังง 3 ระวังง 60 ระวังง 90 ระวังง 5 ระวังง 72 ระวังง 7 ระวังง 9 และระวังง 11 พันธุ์มันสำปะหลังของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์มี 3 พันธุ์ คือ เกษตรศาสตร์ 50 หัวยบง 60 และหัวยบง 80 (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2553) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังสายพันธุ์ใหม่ขึ้นมาหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์เกลือดม้งกรจัมโบ้ และใจแอนท์ พัฒนาพันธุ์โดยศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง รับรองพันธุ์โดย

กรมวิชาการเกษตร (ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย, 2553) เป็นต้น แต่ในสภาพการปลูกทั่วไป ในช่วง 3-4 ปี ที่ผ่านมามันสำปะหลังมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายโดยแมลงศัตรูที่เข้าทำลายมันสำปะหลังที่สำคัญได้แก่ เพลี้ยแป้ง และไรแดง เป็นต้น ส่วนโรคที่พบได้แก่ โรคใบไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรครากเน่าโคนเน่า และโรคแอนแทรกโนส เป็นต้น

## 2.4 โรคของมันสำปะหลังที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ

### 2.4.1 โรคใบไหม้ (Cassava bacterial blight : CBB)

เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* มีรายงานการพบครั้งแรกที่ประเทศบราซิล ในปี พ.ศ. 2455 (สถาบันวิจัยพืชไร่, ม.ม.ป.) หลังจากนั้น มีรายงานการแพร่ระบาดเกือบทุกประเทศที่มีการปลูกมันสำปะหลังทั้งทวีปเอเชีย และลาตินอเมริกา ในประเทศไทยพบครั้งแรกที่จังหวัดระยอง เมื่อปี พ.ศ. 2518 (สถาบันวิจัยพืชไร่, ม.ม.ป.) และต่อมาพบทั่วทุกภาคของประเทศ ระดับความเสียหายเนื่องจากโรคนี้นี้ มีตั้งแต่ 30 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (สถาบันวิจัยพืชไร่, ม.ม.ป.) เมื่อใช้ท่อนพันธุ์จากต้นที่เป็นโรค และมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรครวมถึงใช้ต้นพันธุ์ที่เป็นโรค (contaminated cutting) ติดต่อกัน 3-4 ปี โดยไม่มีการป้องกันกำจัด ความเสียหายอาจรุนแรงถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโรคใบไหม้สร้างความเสียหายต่อผลผลิตคือ ทำให้ผลผลิตลดลงสำหรับประเทศทางแถบเอเชีย เช่น ประเทศจีน และประเทศไทย ความเสียหายจัดอยู่ในระดับปานกลาง (ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, 2552; กรมวิชาการเกษตร, 2553; ญัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ และคณะ, 2555)

**ลักษณะอาการ** เริ่มแรกแสดงอาการใบจุดเหลี่ยม ฉ่ำน้ำ ใบไหม้ ใบเหี่ยว ขางไหลจนถึงอาการยอดเหี่ยว และแห้งตายดังแสดงในภาพที่ 2.2A (Maraitte, 1993) นอกจากนี้ ยังทำให้ระบบท่อน้ำอาหารของลำต้นและรากเน่า ท่อนพันธุ์ที่เป็นโรค แสดงอาการ คือ ยอดที่ผลิตใหม่ เหี่ยว มีขางไหล และมีอาการแห้งตายจากยอดอย่างรวดเร็ว และแพร่ระบาดไปยังต้นข้างเคียง ซึ่งมักจะแสดงอาการเป็นแผลช้ำขนาดเล็ก แล้วขยายใหญ่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มลุกลามเป็นแผลใหญ่ บางครั้งจะพบวงสีเหลือง (yellow halo) ลามเป็นใบไหม้ และร่วง ลำต้นแห้งตายดังแสดงในภาพที่ 2.2B เมื่อผ่าดูระบบท่อน้ำและอาหารทั้งของลำต้น และราก จะมีสีคล้ำ เนื่องจากเนื้อเยื่อส่วนนี้ ถูกทำลาย ในบางครั้งจะพบอาการขางไหลบนส่วนลำต้นอ่อนหรือก้านใบ และแผลจุดบนใบ เป็นโรคที่ระบาดมากได้ในช่วงฤดูฝน (Verdier et al., 1994)

**การแพร่ระบาดของโรค** เกิดขึ้นโดยติดไปกับท่อนพันธุ์ที่เป็นโรค แพร่กระจายไปโดยน้ำฝนดิน (Verdier et al., 1994) หรือติดไปกับเครื่องมือที่ใช้ในการเกษตร เช่น มีดที่ใช้ในการตัด

ท่อนพันธุ์ ในบางประเทศมีรายงานว่า แมลงเป็นตัวการในการแพร่ระบาด เชื้อสาเหตุของโรค สามารถอยู่รอดในดินบนเศษซากพืชได้นานกว่า 2 ปี (สถาบันวิจัยพืชไร่, ม.ม.ป.)

**การป้องกันกำจัด** ใช้พันธุ์ต้านทาน ได้แก่ พันธุ์ระยอง 1, 2, 3, 60, 72 (สถาบันวิจัยพืชไร่, ม.ม.ป.) ใช้ท่อนพันธุ์ที่ปลอดโรค ปลูกพืชอายุสั้นเป็นพืชหมุนเวียน และหลีกเลี่ยงการปลูกมันสำปะหลังในแปลงที่ระบาดรุนแรงนาน 6 เดือน หรือใช้ชีววิธี (biological control) การฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Pseudomonas fluorescens* บนใบมันสำปะหลังพันธุ์ Mco122 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคใบไหม้ (สถาบันวิจัยพืชไร่, ม.ม.ป.) พบว่าสามารถทำให้จำนวนจุดบนใบ และจำนวนใบไหม้ต่อต้นลดลง และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 2.7 เท่า (ฐิติมา วีระศิลป์, 2542) ในพื้นที่ที่มีการระบาดรุนแรงควรหลีกเลี่ยงการปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ ระยอง 5, 7 เนื่องจากเป็นพันธุ์ไม่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ (ฐิติมา วีระศิลป์, 2542)



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะอาการของโรคใบไหม้มันสำปะหลัง

(ที่มา : ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, 2552)

A แสดงลักษณะอาการใบจุดเหลี่ยมฉ่ำน้ำ

B แสดงลักษณะอาการใบไหม้สีน้ำตาล และเหี่ยว ร่วง

#### 2.4.2 โรคใบจุดสีน้ำตาล (Brown leaf spot)

เกิดจากเชื้อรา *Cercosporidium henningsii* พบครั้งแรกในประเทศแทนซาเนีย ในปี พ.ศ. 2438 หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2468 (กรมพัฒนาที่ดิน, ม.ม.ป.) พบว่าในประเทศไทยมันสำปะหลังเกือบทุกพันธุ์เป็นโรคใบจุดสีน้ำตาล ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับพันธุ์ อายุของมันสำปะหลังและสภาพแวดล้อม มันสำปะหลังที่มีอายุ 3-5 เดือน จะมีความต้านทานต่อโรคนี้นี้มากกว่ามันสำปะหลังที่มีอายุ 14-16 เดือน และพบว่า โรคนี้ระบาดรุนแรงในแหล่งที่มีความชื้นต่ำและแห้งแล้ง โรคใบจุดสีน้ำตาลนี้ จะไม่ทำให้ผลผลิตของมันสำปะหลังลดลงมากนัก ผลผลิตจะแตกต่างกันเฉพาะในพันธุ์ที่

อ่อนแอต่อโรค สำหรับในพันธุ์ระยอง 1 ซึ่งมีความต้านทานปานกลาง พบว่า ทำให้ผลผลิตลดลง ตั้งแต่ 14-20 เปอร์เซ็นต์ (กรมพัฒนาที่ดิน, ม.ม.ป.) เนื่องจากทำให้ใบร่วงเร็วกว่าปกติ พุ่มใบ (canopy) เปิดเป็นโอกาสให้วัชพืชเจริญได้ดี อันเป็นผลทางอ้อมทำให้ผลผลิตของมันสำปะหลัง ลดลง (วานิช คำพานิช, 2547)

**ลักษณะอาการ** โดยทั่วไปต้นที่เป็นโรคมักการเจริญเติบโตเป็นปกติจะพบอาการของโรคบน ใบล่าง มากกว่าใบบนซึ่งมีอายุน้อยกว่า มีรายงานว่าใบมันสำปะหลังอายุ 5-15 วัน จะทนทานต่อการ เกิดโรค และจะอ่อนแอเมื่อมันสำปะหลังอายุ 25 วันขึ้นไป โดยเกิดอาการใบจุดก่อนข้างเหลี่ยมตาม เส้นใบ มีความสม่ำเสมอ สีน้ำตาล ขนาด 3-15 มิลลิเมตร มีขอบชัดเจนดังแสดงในภาพ 2.3A จุดแผล ด้านหลังใบมีสีเทา เนื่องจากมีเส้นใยและส่วนขยายพันธุ์ (fruiting bodies) ของเชื้อสาเหตุในพันธุ์ที่ อ่อนแอต่อโรค แผลจะล้อมรอบด้วยวงสีเหลือง (yellow halo) และตรงกลางแผลอาจจะแห้งและ หลุดเป็นรู เมื่อเป็นมากแผลจะลามติดกันคล้ายอาการใบไหม้ดังแสดงในภาพ 2.3B (ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, 2552)

**การแพร่ระบาด** เชื้อราสาเหตุของโรคสามารถอาศัยอยู่ได้บนใบมันสำปะหลังที่ร่วงอยู่ใน พื้นที่ปลูก และจะขยายปริมาณ โดยการสร้างสปอร์ เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สปอร์เหล่านี้จะ แพร่กระจายไปโดยลม หรือเมื่อดฝนพาไปตกบนใบปกติ ทำให้เกิดการแพร่โรคได้ต่อไป (ศูนย์วิจัยพืช ไร่นครสวรรค์, 2552)

สภาพแวดล้อมซึ่งได้แก่ ความชื้น อุณหภูมิ อายุของพืช และความอุดมสมบูรณ์ของดินมี ความสำคัญต่อการแพร่ระบาดของเชื้อมากกว่าคือ การสร้างสปอร์ (spores) หรือโคนิเดีย (conidia) จะ เกิดที่ความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-90 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่ทำให้สปอร์งอกดีที่สุดอยู่ระหว่าง 39- 43°C ดังนั้นจึงสามารถพบโรคใบจุดสีน้ำตาลในแหล่งที่มีความชื้นต่ำและแห้งแล้ง (ฐิติมา วิระศิลป์, 2542)

**การป้องกันกำจัด** ในประเทศไทยพบว่ามันสำปะหลังเกือบทุกสายพันธุ์เป็น โรคใบจุดสี น้ำตาล โดยมันสำปะหลังที่อายุ 3-5 เดือนจะมีความต้านทานโรคมกกว่าช่วงอื่น พันธุ์ที่มีความ ต้านทานปานกลางคือพันธุ์ ระยอง 1, 5, และ 72 การปลูกพืชหมุนเวียน การใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรค การใช้ชีววิธีและการเลื้อนฤดูปลูกสามารถลดปริมาณการเกิดโรคได้ เมื่อพบโรคระบาดมากอาจใช้ สารเคมีในกลุ่ม inorganic เช่น copper oxychloride และ สารเคมีในกลุ่ม benzimidazole เช่น benomyl, carbendazim เป็นต้น (ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, 2552)



ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะอาการของโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันสำปะหลัง

(ที่มา : ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, 2552)

A แสดงลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาล มีขอบชัดเจนดัง

B แสดงลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาล เมื่อเป็นมากแผลจะลามติดกัน คล้ายอาการใบไหม้

#### 2.4.3 โรคใบไหม้ (Leaf blight)

เกิดจากเชื้อรา *Cercospora viscosae* มักพบควบคู่ไปกับโรคใบจุดสีน้ำตาล โรคนี้สามารถทำให้ผลผลิตลดลงได้ 12-30 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการสูญเสียพื้นที่ใบ ใบเหลืองและร่วงเร็วกว่าปกติ และอาจเป็นผลกระทบ เนื่องมาจากการเปิดโอกาสให้วัชพืชเจริญได้ดี เมื่อใบร่วงและพุ่มใบเปิด (วานิช คำพานิช, 2547)

**ลักษณะอาการ** อาการของโรคพบบนใบเป็นจุดกว้างไม่มีขอบเขตที่แน่นอนเหมือนกับโรคใบจุดสีน้ำตาล จุดแผลจะกว้างมาก แต่ละจุดอาจกว้างถึง 1 ใน 5 ของแฉกใบ หรือมากกว่าด้านบนใบ มักเห็นจุดแผลสีน้ำตาลค่อนข้างสม่ำเสมอ ขอบแผลมีสีเหลืองอ่อน ด้านใต้ใบมักเห็นเป็นวงสีเทา เนื่องจากส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรคเช่นเดียวกับโรคใบจุดสีน้ำตาล ลักษณะแผลในบางครั้งจะคล้ายกับโรคใบจุดวงแหวน ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Phoma* sp. (*Phyllosticta* sp.) (สถาบันวิจัยพืชไร่, ม.ม.ป.) แต่โรคใบจุดวงแหวนจะเห็นวงแหวนด้านบนของใบ เมื่อแผลลามติดต่อกัน ทำให้ใบเหลืองทั้งใบ และร่วงไปในที่สุด ในพันธุ์ที่อ่อนแอ ใบจะร่วงอย่างรุนแรง ในมันสำปะหลังที่มีอายุมากกว่า 6 เดือน อาการของโรคจะรุนแรงมากกว่ามันสำปะหลังที่มีอายุน้อยการแพร่ระบาด การป้องกันกำจัดคล้ายกับโรคใบจุดสีน้ำตาล (ฐิติมา วีระศิลป์, 2542)

**การแพร่ระบาด** เชื้อราสาเหตุของโรคสามารถอาศัยอยู่ได้บนใบมันสำปะหลังที่ร่วงอยู่ในไร่ และจะขยายโดยการสร้างสปอร์ เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สปอร์เหล่านี้จะแพร่กระจายไปโดยลม หรือเมล็ดฝนพาไปตกบนใบปกติ ทำให้เกิดการแพร่โรคได้ต่อไป

การป้องกันกำจัด ใช้พันธุ์แนะนำ ซึ่งมีความต้านทานโรคปานกลางได้แก่ ระยะของ 1, 5, 72 และ หัวบง 60 การปลูกพืชหมุนเวียน การใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรค การใช้ชีววิธี และการเลือกปลูกสามารถลดปริมาณการเกิดโรคได้ เมื่อพบโรคระบาดมากอาจใช้สารเคมีในกลุ่ม inorganic เช่น copper oxychloride และสารเคมีในกลุ่ม benzimidazole เช่น benomyl, carbendazim เป็นต้น (สถาบันวิจัยพืชไร่, ม.ม.ป.)

#### 2.4.4 โรครากเน่าและหัวเน่า (Root rot or Tuber rot disease)

เกิดจากเชื้อราในสกุล *Fusarium* sp., *Diplodia* sp., *Phytophthora* sp. (กรมวิชาการเกษตร, 2553)

ลักษณะอาการถ้าเกิดกับต้นยังเล็กอยู่จะทำให้รากเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลและเน่า ต้นจะเหี่ยวเฉาแสดงในภาพ 2.4A ถ้าเกิดกับหัวจะทำให้หัวเน่าอย่างรวดเร็วและมีกลิ่นเหม็น ใบเหี่ยวแล้วร่วง ถ้าเกิดรุนแรงต้นจะตายแสดงในภาพ 2.4B-C สังเกตได้โดยจะพบเส้นใยสีขาวของเชื้อราวมกันคล้ายเส้นด้ายปกคลุมบนหัว และบริเวณโคนต้นใต้ดิน ทำให้เนื้อภายในหัวเน่าแห้ง มีกลิ่นเหม็นคล้ายไม้เน่า ใบเหี่ยวอาจถึงตายได้ ดังแสดงในภาพ 2.4D แต่ส่วนใหญ่จะยังไม่ตายและจะสร้างรากใหม่ที่โคนต้นในดินเหนือบริเวณหัวที่เน่าในดินที่แห้งหัวที่เน่าจะเป็นสีดำ (mummified) บางครั้งมีเห็ด (*Armillariella mellea* Vahl.) ขึ้นอยู่ที่โคนต้นและอาจจะเป็นสาเหตุทำให้หัวเน่าได้ด้วย (ชาติชาย ศิริพัฒน์, 2557; กรมวิชาการเกษตร, 2553)

**การแพร่ระบาด** พบการแพร่ระบาดในช่วงฤดูฝน บริเวณที่ดินระบายน้ำไม่ดี

**การป้องกันกำจัด** ก่อนทำการปลูกควรไถดินและตากแดดไว้ประมาณ 10-15 วัน ถ้าเป็นพื้นที่ระบาดแล้ว ให้เก็บเศษแห้งมันๆ ไปเผาทิ้งให้หมด เนื่องจากเป็นแหล่งเพาะเชื้อโรคที่สามารถอยู่ค้างได้เป็นปี ควรปรับสภาพดินให้มีความเป็นด่างสูงขึ้น โดยใช้ปูนขาว หรือปูนมาร์ล เนื่องจากเชื้อราจะเจริญเติบโตได้ดีในที่ที่มีความเป็นกรดสูง หรือใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma*) อัตรา 15 กิโลกรัม ผสมปุ๋ยอินทรีย์ประมาณ 1 พันกิโลกรัม คลุกกลงไปในดิน ซึ่งเป็นการป้องกันด้วยชีววิธีที่ได้ผลดี นอกจากนี้ หากพบอาการโรครากเน่าเกินกว่า 10% และได้อายุเก็บเกี่ยว ให้ทำการเก็บกุ่มออกทั้งหมด และควรคงปลูกมันสำปะหลังนานอย่างน้อย 6 เดือน หรือปลูกพืชอื่นแทน เพื่อเป็นการตัดวงจรการแพร่กระจายเชื้อไม่ให้ลุกลามต่อไป (ชาติชาย ศิริพัฒน์, 2557)



ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะอาการของโรครากเน่าหัวเน่ามันสำปะหลัง

A แสดงลักษณะอาการต้นเหี่ยวเฉา

B แสดงลักษณะอาการใบเหี่ยวแล้วร่วง ถ้าเกิดรุนแรงต้นจะตาย

C แสดงลักษณะอาการหัวเน่าอย่างรวดเร็วและมีกลิ่นเหม็น

D พบเส้นใยสีขาวของเชื้อรารวมกันคล้ายเส้นด้ายปกคลุมบนหัว และบริเวณ โคนต้นใต้ดิน

#### 2.4.5 โรคนแอนแทรกโนส (Cassava anthracnose disease, CAD)

เนื่องจากเป็นโรคที่จะทำการศึกษาในการวิจัยครั้งนี้จึงจะนำเสนอรายละเอียดในหัวข้อถัดไป

### 2.5 ข้อมูลทั่วไปของโรคนแอนแทรกโนส

โรคนแอนแทรกโนสเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นโรคที่สำคัญชนิดหนึ่งทำให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น เช่น มะม่วง มะละกอ พริก ขนุน ชมพู ฝรั่ง เงาะ พืชตระกูลถั่ว อะโวคาโด สตรอเบอร์รี่ องุ่น กัลยัม มะเขือเทศ ข้าวโพด ทูเรียน และมันสำปะหลัง (Bailey and Jeger, 1992) และสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืชตั้งแต่ต้นกล้าจนถึงผล (หทัยชนก คงแก้ว, 2546) โดยความรุนแรงของโรคมี่ 2 ลักษณะ คือหากเกิดโรคในระยะก่อนเก็บเกี่ยวจะส่งผล

ต่อการเจริญของผล แต่หากเกิดโรคในช่วงระยะการเก็บรักษาจะทำให้ผลผลิตเสียหาย ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการผลิต ส่วนใหญ่การเกิดโรคมักเกิดกับส่วนของพืชที่อยู่เหนือดิน บางครั้งส่วนที่อยู่ใต้ดิน เช่น ราก หรือ หัว ก็มีโอกาสดำเนินการรับผลกระทบเช่นกัน (Freeman et al., 1998) โดยพบการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรคโนสได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศเขตอบอุ่นจนถึงเขตร้อน และในประเทศไทยพบความหลากหลายของเชื้อ *Colletotrichum* spp. มากกว่าในประเทศในแถบอื่นๆของโลก (นิพนธ์ วิจารณ์, 2535) อาการโดยทั่วไปเกิดแผลสีน้ำตาลเข้ม กลุ่มของโคนิเดียมีสีส้มลักษณะคล้ายหยดน้ำเกาะอยู่บริเวณแผล (Freeman et al., 1998; รัฐกร ศรีสุทธิ, 2549)

มีรายงานในต่างประเทศกล่าวถึงการเกิดโรคแอนแทรคโนสกับพืชอาศัยหลายชนิด บางชนิดสร้างความเสียหายมากถึง 50% ของผลผลิต (Freeman et al., 1998) โดยพืชที่พบการเข้าทำลายของ โรคแอนแทรคโนส ได้แก่ อะโวคาโด มีรายงานการเกิดโรคแอนแทรคโนสในหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย (Fitzell, 1987) อิสราเอล (Binyamini and Schiffmann-Nadel, 1972) แอฟริกาใต้ (Darvas and Kotze, 1987) เป็นต้น ทำให้เกิดความเสียหายทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยอาการจะเริ่มแสดงบริเวณขอบใบ แผลสีน้ำตาล และลูกกลมทำให้ใบร่วง เมื่อเป็นมากจะมีอาการยืนต้นตาย อาการบริเวณผลจะมีจุดแผลสีน้ำตาลขนาดไม่เท่ากัน และขยายใหญ่ขึ้นจนเป็นแผลน้ำ กลุ่มของโคนิเดียจะแพร่ระบาดไปกับฝน (รัฐกร ศรีสุทธิ, 2549) กล้าย โรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญชนิดหนึ่งในกล้วยในช่วงระยะก่อนเก็บเกี่ยว พบในหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย อินเดีย และฟิลิปปินส์ แต่ไม่พบในเขตหนาวหรือแอฟริกา (Cook, 1975) โดยอาการเกิดขึ้นบริเวณเปลือกและขั้วผล ลักษณะอาการเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กและขยายใหญ่ขึ้นจนเป็นสีดำไปทั่วทั้งผล ทำให้ผลเน่าหรือเน่าแห้ง และมีการสร้างโคนิเดียสีส้มบนแผล (Ploetz, 2003) มะม่วง โรคแอนแทรคโนสมะม่วงพบครั้งแรกในปี 1893 ที่รัฐฟลอริดา ประเทศอเมริกา ต่อมา มีรายงานการเกิดโรคที่ประเทศคิวบา ฮาวาย อินเดีย ฟิลิปปินส์ เปอร์โตริโก เป็นต้น (Cook, 1975) อาการที่พบบริเวณใบมีลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กพบในช่วงฤดูฝน อาการที่พบบนผล เป็นจุดแผลสีน้ำตาลขนาดเล็กและขยายใหญ่ขึ้นเป็นแผลสีน้ำตาลถึงสีดำ เนื้อเยื่อบริเวณแผลจะแห้ง โดยอาการจะเห็นชัดในช่วงผลเริ่มสุก มีความชื้นสูง กลุ่มของโคนิเดียมีสีส้ม โดยเชื้อจะแพร่กระจายโดยอาศัยน้ำฝน (Ploetz, 2003) มันสำปะหลัง มีรายงานการเกิดโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังในหลายประเทศ ได้แก่ ไนจีเรีย (Onyeka et al., 2008) แอฟริกา (Fokunang et al., 2001) โคลัมเบีย (Wokocha, 2010) และแทนซาเนีย (Magdalena et al., 2012) โดยเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *manihotis* และ *C. graminicola* (Frison and Feliu, 1991) ลักษณะอาการแผลมีขอบเขตไม่แน่นอน สีน้ำตาลอ่อน อาการบนก้านใบ เป็นรอยไหม้ที่โคนก้านใบติดกับลำต้น และก้านใบส่วนที่ติดกับตัวใบหักงอ และหลุดร่วง กลุ่มของโคนิเดียมีสีส้ม (Magdalena et al., 2012) การแพร่ระบาดจะอาศัยน้ำฝน และติดไปกับท่อนพันธุ์



ในประเทศไทย พบว่าโรคแอนแทรกโนสสร้างความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น เงาะ มะม่วง มะละกอ ขนุน กล้วย องุ่น สตรอเบอร์รี่ ฝรั่ง และมันสำปะหลัง เป็นต้น ส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพลดลง และไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ จึงจัดเป็นโรคที่สำคัญอย่างยิ่งในประเทศไทย (รัฐกร ศรีสุทธิ, 2549) โดยชารทิพย์ ภาสบุตร และคณะ (2547) รายงานการเกิดโรคแอนแทรกโนสในสตรอเบอร์รี่พบว่า มีลักษณะเป็นแผลขนาดเล็กกลมรี บนไหล (stolon) ขอบแผลสีม่วงแดง ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อนขยายไปตามไหล ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ผลจะมีสีน้ำตาลเข้ม เนื้อเยื่อขรุขระ ของแผลไม่ชัดเจน และยังพบเชื้อเกิดขึ้นกับพืชอาศัยอีก 25 ชนิด เช่น หอม กาแฟ มะม่วง ส้ม หน่อไม้ฝรั่ง องุ่น อะโวคาโด กล้วยไม้ เป็นต้น ต่อมา รัฐกร ศรีสุทธิ (2549) ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนส พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 4 สปีชีส์ ดังนี้ *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. acutatum* และ *C. capsici*

โรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง (Cassava anthracnose disease, CAD) เป็นโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจโรคหนึ่งในทวีปแอฟริกาและในพื้นที่เขตร้อน (IITA, 1987; Theberge, 1985; Hahn et al., 1989) มีรายงานว่าเกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides* f. sp. *manihotis* ลักษณะ โคลโคนิมีสีเทาถึงสีดำ โคลโคนิเดียมีรูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมนมีขนาด โคลโคนิเดียอยู่ที่ 3.5-6.00x23.55 ไมโครเมตร (Theberge, 1985; Frison and Feliu, 1991; Fokunang et al., 2001; Wokocho, 2010; Magdalena et al., 2012) ในประเทศไทยมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (ฐิติมา วิระศิลป์, 2542) ต่อมา มีรายงานว่าเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* หรือ *C. gloeosporioides* f. sp. *manihotis* (รังษิ เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ กิจใจเดียว, 2553; ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์, 2552) โรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังจัดเป็นโรคที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 3 ลักษณะอาการของโรค ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ มันสำปะหลัง สภาพแวดล้อม ได้แก่ ความชื้นหรือปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ และบริเวณส่วนต่างๆ ของต้นมันสำปะหลัง (รังษิ เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ กิจใจเดียว, 2553) ลักษณะอาการทั่วไปพบว่า อาการบนลำต้นแก่ เป็นแผลที่มีขอบเขตแน่นอน สีน้ำตาลหรือสีดำดังแสดงในภาพ 2.5A อาการบนลำต้นอ่อน แผลมีขอบเขตไม่แน่นอน สีน้ำตาลอ่อน อาการบนก้านใบ เป็นรอยไหม้ที่โคนก้านใบติดกับลำต้น และก้านใบส่วนที่ติดกับตัวใบหักลุ่ลง และหลุดร่วงทั้งต้นดังแสดงในภาพ 2.5 B อาการบนใบ มีอาการ ใบจุดไหม้ที่ขอบใบ และปลายใบ ขยายตัวเข้าสู่กลางใบ ใบไหม้และหลุดร่วงดังแสดงในภาพ 2.5C (ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์, 2552; Fokunang et al., 2001; Van der Bruggen and Maraite, 1987) ถ้าความชื้นสูง แผลจะขยายตัวลามขึ้นสู่ส่วนยอดดังแสดงในภาพ 2.5D ในพันธุ์อ่อนแอจะยืนต้นตายทำให้เสียหายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์, 2552; กรมวิชาการเกษตร, 2553; Frison and Feliu, 1991) ส่วนพันธุ์ที่ค่อนข้างทนทานต่อโรค ยอดจะหัก ทำให้มีการแตกกิ่งหรือยอดใหม่ขึ้นมาทดแทน และบางพันธุ์จะพบโคนลำต้นที่ติดกับพื้นดิน

มีลักษณะบวมพอง เปลือกลำต้นแตกเป็นริ้ว เมื่อลมพัดจะเปราะหักลงได้ง่ายโดยโรคนี้อาจสามารถระบาดและมีอาการรุนแรงในช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนมากโดยส่วนใหญ่ติดไปกับท่อนพันธุ์ น้ำฝน (จิตติมา วีระศิลป์, 2542) และยังพบว่าท่อนพันธุ์จากต้นมันสำปะหลังที่เป็นโรคแอนแทรกโนส เมื่อนำไปปลูกในฤดูกาลต่อไปอัตราการงอกต่ำเพียง 40-60 เปอร์เซ็นต์ และระยะเวลาการงอกจะช้ากว่าปกติ 7-8 วัน (Fokunang et al., 2001) การป้องกันกำจัดสามารถทำได้โดย การใช้พันธุ์ต้านทานโรค เท่าที่มีรายงานจากเอกสารต่าง ๆ พบว่า สายพันธุ์ TME 30001, 30211, 91/00684 และ 91/00313 สามารถต้านทานต่อโรคนี้อาจได้ในประเทศไทย การปลูกมันสำปะหลังที่ผ่านมาจึงไม่มีรายงานการระบาดของโรคนี้อย่างรุนแรงจึงยังมิได้ดำเนินการคัดพันธุ์ต้านทานต่อโรคนี้อีก แต่มีรายงานการระบาดของโรคแอนแทรกโนสอย่างรุนแรงในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 ถึงปัจจุบัน พันธุ์มันสำปะหลังที่แสดงอาการโรครุนแรง คือ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ระยะของ 90 ระยะของ 72 และสายพันธุ์ CMR 35-22-196 จึงต้องควรเฝ้าระวังการระบาดของโรคในพันธุ์หรือสายพันธุ์ดังกล่าวรวมทั้งพันธุ์หรือสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกัน



**ภาพที่ 2.5** แสดงลักษณะอาการของโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง (ที่มา : รังษิ เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ คิดใจเดียว, 2553) A อาการบนลำต้นแก่ เป็นแผลที่มีขอบเขตแน่นอน สีน้ำตาลหรือสีดำ B ก้านใบ เป็นรอยไหม้ที่โคนก้านใบติดกับลำต้น และก้านใบส่วนที่ติดกับตัวใบหักลุ่ลง และหลุดร่วง C ใบ มีอาการใบจุดไหม้ที่ขอบใบและปลายใบ ขยายตัวเข้าสู่กลางใบ ใบไหม้ D แสดงอาการยอดไหม้

## 2.6 ชีววิทยาของเชื้อ *Colletotrichum* spp.

### 2.6.1 ข้อมูลทั่วไปของเชื้อ *Colletotrichum* spp.

เชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบรายงานครั้งแรกโดย Tode ในปี ค.ศ. 1790 มีชื่อเดิมว่า *Vermicularia* ต่อมาในปี ค.ศ. 1837 Corda ได้เปลี่ยนจากสกุล *Vermicularia* เป็นชื่อ *Colletotrichum* และเป็นที่ยอมรับมาจนถึงปัจจุบัน (Sutton, 1992) จำแนกตามหมวดหมู่ได้ดังนี้

Sub-division Deuteromycotina

Form-class Coelomycetes

Form-order Melanconiales

Form-family Melanconialesae

Form-Genus *Colletotrichum*

มีระยะ teleomorph (perfect stage) อยู่ในสกุล *Glomerella* ซึ่งเป็นเชื้อราใน

Class Ascomycetes

Order Sphaeriales

Family Phyllachoraceae

Genus *Glomerella*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่สำคัญคือ สร้าง fruiting body แบบ acervulus พบกระจายทั่วไปบนพืชอาศัยที่เป็นผล มีการสร้าง setae สีน้ำตาลดำ สปอร์ เมื่ออยู่รวมกันมีสีเหลืองอ่อนถึงสีชมพูอมส้ม (salmon pink) โคนิเดียมี 2 ลักษณะคือ เป็นเซลล์เดี่ยวรูปโค้งงอคล้ายเคียว (falcate) และรูปทรงกระบอกปลายมน (straight) หลังจากงอก germ tube แล้วพบว่าการสร้าง appressorium รูปทรงหลายลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา บางชนิดมีรูปทรงไม่แน่นอน มีขอบเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวไม่สม่ำเสมอ และตรงกลางของ appressorium มีการสร้างรงควัตถุสีน้ำตาล บางครั้งพบการสร้างเม็ด sclerotia บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลถึงสีดำ โดยสามารถแบ่งเชื้อรา *Colletotrichum* ออกเป็น 2 ลักษณะตามรูปร่างของโคนิเดีย คือ โคนิเดียทรงกระบอกปลายมน (straight-spored) ได้แก่ *C. acutatum*, *C. coccodes*, *C. kahawae*, *C. destructivum* (teleo.G. *glycines*), *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* (teleo. *G. cingulata*), *C. lindemuthianum* (teleo.G. *lindemuthiana*), *C. musae* (teleo.G. *musarum*), *C. malvarum* และ *C. orbiculare* (teleo.G. *lagenaria*) และ โคนิเดียรูปโค้งงอคล้ายเคียว (falcate-spored) ได้แก่ *C. caudatum*, *C. capsici*, *C. circinans*, *C. dematium*, *C. falcatum* (teleo.G. *tucumanensis*), *C. graminicola* (teleo.G. *graminicola*), *C. sublineolum* และ *C. truncatum* เนื่องจากเชื้อราสกุลนี้มีพืชอาศัยกว้าง ชนิดของเชื้อราจึงต่างกันไป

ตามพีชอาศัย (Sutton, 1992; หทัยชนก คงแก้ว, 2546) เชื้อราสกุล *Glomerella cingulata* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorphic state) ของรา *C. gloeosporioides* เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด (วิจัย รัทวิทยศาสตร์, 2551) ลักษณะโคโคนีโดยทั่วไป มีการเจริญเติบโตเป็นลักษณะวงแหวนหลายชั้น เส้นใยมีสีเทาอ่อนถึงเทาแก่ กลุ่มของสปอร์สีส้มโคนีเดี่ยวรูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมนหรือแหลม ขนาดเฉลี่ย 3.23 x 13.4 ไมโครเมตร เกิดบนก้านชูสปอร์ภายใน fruiting body เรียกว่า acervulus ซึ่งมีขนาด 39.5 x 41.2 ไมโครเมตร (Sharma, 1998; Shivas and Beasley, 2003)

### 2.6.2 วงจรการเกิดโรค

เชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถอาศัยอยู่บนเศษซากพืชได้นาน เมื่อเชื้อได้รับอุณหภูมิเหมาะสมจะสร้างกลุ่ม acervulus รูปร่าง cushion-shaped กลมเป็นมันอยู่ใต้ชั้น epidermis ของพืช แล้วสร้าง conidiophores (Jeffries et al., 1990) ให้กำเนิด conidium มีลักษณะเซลล์เดี่ยว ไม่มีสิรูปร่างรูปไข่ หรือยาวรี ตรงหรือโค้ง เมื่อเชื้อสัมผัสกับพืช conidium จะงอก germ tube ออกมาแล้วสร้าง appressorium เป็นส่วนช่วยยึดเกาะผิวพืชชั้น cuticle ภายใน 48 ชั่วโมง (Jeffries et al., 1990) จากนั้นจึงสร้าง infection peg และเส้นใยเชื้อราออกไปตามช่องว่างระหว่าง cell (intercellular space) ภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง (Coates et al., 1993) แล้วแฝงตัวอยู่ระหว่างเซลล์ในชั้น epidermis และ sub-epidermis หรือในช่วง 2-5 ชั้นเซลล์จากผิวบนออกไป เชื้อราระบาดโดย แมลงพาหะน้ำฝน และสามารถเข้าทำลายโดยไม่มีบาดแผล หรือมีบาดแผลที่ใบและลำต้น โดยมีน้ำและแมลงช่วยในการแพร่ระบาด (ภาพที่ 2.4) โรคจะระบาดและมีอาการโรครุนแรงในช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนมาก และติดต่อกันเป็นเวลานาน (Dodd et al., 1992; วิจัย รัทวิทยศาสตร์, 2551)



## 2.7 การจำแนกความแตกต่างเชื้อราสาเหตุโรคพืช

การศึกษาจำแนกความแตกต่างของเชื้อราสาเหตุโรคสามารถทำได้หลายวิธี ทั้งด้วยวิธีการพื้นฐานและวิธีทางชีวโมเลกุล ดังนี้

### 2.7.1 วิธีการจำแนกความแตกต่างเชื้อราสาเหตุโรคพืชตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Colletotrichum* spp. โดยทั่วไปพิจารณาจากลักษณะสีของโคโคนี ขนาดและรูปร่างของโคโคนีเดียว การเจริญเติบโต ลักษณะของเส้นใย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืชซึ่งอาจสรุปได้ตามตารางที่ 2.1

โดย Smith and Black (1990) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. 24 ไอโซเลตที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในสตอร์เบอร์รี่ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ พบว่ารูปร่างของ conidia ของเชื้อรา *C. acutatum* เป็นแบบ fusiform มีลักษณะหัวท้ายแหลม ซึ่งแตกต่างกับ conidia ของเชื้อรา *C. fragariae* และ *C. gloeosporioides* ที่เป็นแบบ cylindrical มีลักษณะหัวท้ายมน ส่วนการแยกความแตกต่างของเชื้อรา *C. fragariae* และ *C. gloeosporioides* ใช้อัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 32<sup>o</sup>C ในวันที่ 5 พบว่าเชื้อรา *C. fragariae* เจริญได้ 69 มิลลิเมตร และ *C. gloeosporioides* เจริญได้ 63 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *C. fragariae* จะเกิดโรคบนสตอร์เบอร์รี่ได้ต้องมีการทำให้เกิดบาดแผลก่อน ในขณะที่เชื้อรา *C. gloeosporioides* สามารถทำให้ผลเน่าได้โดยไม่ต้องมีการทำให้เกิดบาดแผล

Charthiphat และคณะ (2547) ได้ทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชอาศัยหลายชนิดจำนวน 10 ไอโซเลต และจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ พบว่าสามารถจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ออกได้ 5 ชนิด ดังนี้ *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. circinans* และ *C. truncatum*

Charthiphat และคณะ (2547) รายงานการเกิดโรคแอนแทรคโนสในสตอร์เบอร์รี่ พบว่ามีลักษณะเป็นแผลขนาดเล็กกลมรี บนไหล (stolon) ขอบแผลสีม่วงแดง ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อนขยายไปตามไหล ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ผลจะมีสีน้ำตาลเข้ม เนื้อเยื่อยุบตัวของแผลไม่ชัดเจน และยังพบเชื้อเกิดขึ้นกับพืชอาศัยอีก 25 ชนิด เช่น หอม กาแฟ มะม่วง ส้ม หน่อไม้ฝรั่ง องุ่น อะโวคาโด กล้วยไม้

Magdalena et al. (2012) ได้ทำการศึกษาการระบาดของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในสมันสำปะหลังพบว่า เชื้อที่แยกได้จำนวน 39 ไอโซเลตรูปร่างของ conidia เป็นแบบ cylindrical มีลักษณะหัวท้ายมนเหมือนกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในสมันสำปะหลัง

ปัจจุบันมีการพบเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีพืชอาศัยกว้าง และยังมีเชื้อรา *Colletotrichum* spp. อีกหลายชนิดที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ หรือจัดจำแนกได้แต่ไม่ชัดเจน (Cano et al., 2004) ดังนั้นจึงมีการหาวิธีอื่นมาช่วยในการจัดจำแนก ระบุชนิดและศึกษาความหลากหลายของเชื้อร่วมกับวิธีศึกษาทางสัณฐานวิทยาโดยวิธีที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบันมีอยู่หลายเทคนิคเช่นเทคโนโลยีด้านชีวโมเลกุลและชีวเคมีเพื่อให้การศึกษามีความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น



ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชชนิดต่าง ๆ

<i>Colletotrichum</i> species	พืชอาศัย	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา				ที่มา
		ลักษณะของ โคโคนี	สีของโคโคนีบน อาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคนีเดี่ยว	ขนาดของโคนีเดี่ยว (กว้าง x ยาว) $\mu\text{m}$	
<i>C. capsici</i> (new name <i>C. truncatum</i> )	พริก	ไม่มีข้อมูล	สีเทาอ่อน	รูปร่างของโคนีเดี่ยวมีลักษณะโค้งงอ คล้ายเคียว (falcate)	3.00x19.00	หทัยชนก คงแก้ว (2546)
<i>C. capsici</i> (new name <i>C. truncatum</i> )	มะเขือเทศ	ไม่มีข้อมูล	เทาดำ	รูปร่างของโคนีเดี่ยวมีลักษณะโค้งงอ คล้ายเคียว (falcate)	2.57-3.31x 17.6-21.6	Diao et al., (2014)
<i>C. dematium</i>	ถั่วเหลือง	ไม่มีข้อมูล	สีเทาปนดำ	acervulus มีขนาดเล็กเจริญเป็นวง ซ้อนกัน สร้าง seta ก้านยาว โคนี เดี่ยวมีลักษณะโค้งงอคล้ายเคียว ส่วน ปลายของสปอร์แหลมปลายแคบ กว่าเชื้อรา <i>C. capsici</i>	2.00x12.00	หทัยชนก คงแก้ว (2546)
<i>C. gloeosporioides</i>	พริก	ไม่มีข้อมูล	สีส้มอ่อน	รูปร่างของโคนีเดี่ยวมีลักษณะ ทรงกระบอกปลายมน	2.00x25.00	หทัยชนก คงแก้ว (2546)
<i>C. gloeosporioides</i>	พริก	ไม่มีข้อมูล	สีขาวปนเทา	โคนีเดี่ยวรูปร่างตรงปลายมน ฐานตัด ตรง (cylindrical)	2.5-5.0 x 3.75-23.75	รัตติยา พงศ์พิสุทธิธาและ คณะ (2553)



ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

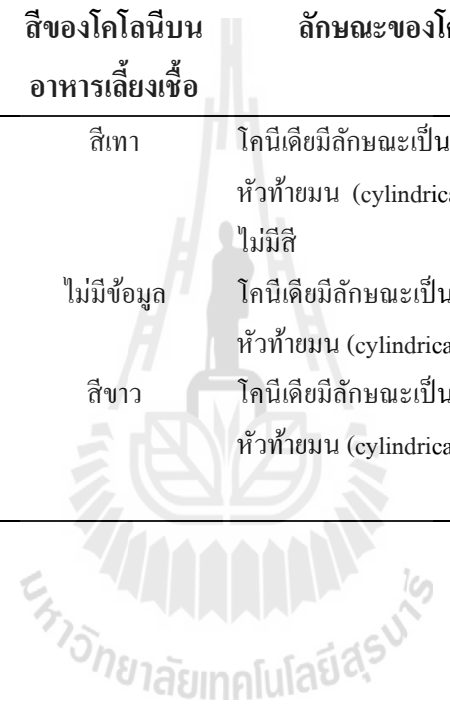
species	พืชอาศัย	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา				
		ลักษณะของโคโคนี	สีของโคโคนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคนีเดี่ยว	ขนาดของโคนีเดี่ยว (กว้าง x ยาว) $\mu\text{m}$	ที่มา
<i>C. gloeosporioides</i>	มันเทศ	ไม่มีข้อมูล	สีส้มอมเทา	โคนีเดี่ยวมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดี่ยว ไม่มีสี	3.60 x 12.6	Abang et al., (2002)
<i>C. gloeosporioides</i>	มะม่วง	ไม่มีข้อมูล	สีเทา	โคนีเดี่ยวมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) มี guttulate ไม่มีสี	5.0 x 10.0-20.0	สุรชาติณี ชัยชนะ(2550)
<i>C. gloeosporioides</i>	ฝรั่ง	ไม่มีข้อมูล	สีเทาแกมเขียว	โคนีเดี่ยวมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดี่ยว ไม่มีสี	2.5-5.0 x 7.5-15.0	สุรชาติณี ชัยชนะ(2550)
<i>C. gloeosporioides</i>	มะละกอ	ไม่มีข้อมูล	สีขาว	โคนีเดี่ยวมีลักษณะเป็นทรงกระบอก (cylindrical) เซลล์เดี่ยว มี guttulate ไม่มีสี	5.0 x 8.75-15.0	สุรชาติณี ชัยชนะ(2550)
<i>C. gloeosporioides</i>	ส้ม	ไม่มีข้อมูล	สีขาวอมเทา	โคนีเดี่ยวมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดี่ยว ไม่มีสี	2.5-5.0 x 7.5-15.0	สุรชาติณี ชัยชนะ(2550)
<i>C. gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschynomene</i>	ถั่ว ( <i>Aeschynomene</i> <i>Virginica</i> )	ไม่มีข้อมูล	สีขาว	โคนีเดี่ยวมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical)	4.10x17.60	Weir et al., (2012)

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

<i>Colletotrichum</i>		ลักษณะทางสัณฐานวิทยา				
species	พืชอาศัย	ลักษณะของโคโลนี	สีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคนิเดีย	ขนาดของโคนิเดีย (กว้าง x ยาว) $\mu\text{m}$	ที่มา
<i>C. graminicola</i>	หญ้า	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	รูปร่างของโคนิเดียมีลักษณะโค้งงอคล้ายเคียว (falcate)	3.00–6.00 x 19.00–32.00	Smith, (1954)
<i>C. graminicola</i>	ข้าวโพด	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	รูปร่างของโคนิเดียมีลักษณะโค้งงอคล้ายเคียว (falcate)	5.00-6.00 x 28.00-43.00	Khan A. and Hsiang T. (2003)
<i>C. acutatum</i>	แอปเปิล	ไม่มีข้อมูล	สีชมพูอมเทา	โคนิเดียมีลักษณะเป็นรูปกระสวยหัวท้ายแหลม (fusiform) เซลล์เดี่ยวไม่มีสี	2.5-5.0 x 7.5-13.75	สุธาสิณี ชัยชนะ(2550)
<i>C. acutatum</i>	พริก	ไม่มีข้อมูล	สีขาวปนเทา	โคนิเดียรูปร่างตรง หรือ ปลายเรียว ด้านใดด้านหนึ่งหรืออาจพบทั้งสองด้าน (fusiform) อาจพบรอยคอดกลางโคนิเดีย	1.25-3.75 x 7.5-32.5	รัตติยา พงศ์พิศุทธาและคณะ (2553)

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

<i>Colletotrichum</i>		ลักษณะทางสัณฐานวิทยา				
species	พืชอาศัย	ลักษณะของโคโคนี	สีของโคโคนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	ลักษณะของโคนีเดี่ยว	ขนาดของโคนีเดี่ยว (กว้าง x ยาว) $\mu\text{m}$	ที่มา
<i>C. musae</i>	กล้วย	ไม่มีข้อมูล	สีเทา	โคนีเดี่ยวมีลักษณะเป็นทรงกระบอก หัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดี่ยว ไม่มีสี	4.5-5.5 x 10.0-17.50	สุชาติณี ชัยชนะ(2550)
<i>C. lindemuthianum</i>	ถั่ว ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.).	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	โคนีเดี่ยวมีลักษณะเป็นทรงกระบอก หัวท้ายมน (cylindrical)	4.90-6.91x14.46-18.93	Pinto et al., (2012)
<i>C. boninense</i>	พริกไทย, ถั่ว, เมล่อน	ไม่มีข้อมูล	สีขาว	โคนีเดี่ยวมีลักษณะเป็นทรงกระบอก หัวท้ายมน (cylindrical)	5.80x13.20	Damm et al., (2012)



## 2.7.2 การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล โดยการถอดรหัสพันธุกรรม (DNA sequence) ซึ่งดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครโมโซม อยู่ใน nucleus ของเซลล์ โดยทำหน้าที่ส่งผ่านข้อมูลทางพันธุกรรม มีองค์ประกอบทางเคมีเฉพาะตัว และโครงสร้างโมเลกุลเป็นสายคู่ของ double helix ในแต่ละสายของ DNA เกิดจากการเรียงตัวของ nucleotide มีโครงสร้างโมเลกุลที่แตกต่างกัน 4 แบบ ซึ่งประกอบด้วย adenine (A), thymine (T), guanine (G) และ cytosine (C) 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 เพียงสายใดสายหนึ่ง ก็จะทราบลำดับ nucleotide ที่เป็นคู่ complementary กันได้เช่นกัน (พัชรีย์ วิทยานุกิต, 2543)

การถอดรหัสทางพันธุกรรม หรือการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในปัจจุบันนี้นิยมใช้ปฏิกิริยาทางเคมีที่ถูกค้นพบโดย Sanger et al. (1997) ที่เรียกว่า Sanger method หรือ dideoxy or chain-terminating method และใช้เครื่อง automated DNA sequencer เป็นตัวช่วยอ่านรหัสพันธุกรรมซึ่งสามารถทำได้ในเวลาอันรวดเร็ว หลักการถอดรหัสพันธุกรรม จะอาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction, PCR) ร่วมกับการใช้ primer หรือ dNTPs ที่ถูก labeled ด้วยสาร fluorescent เพื่อความสะดวกต่อการอ่านผลด้วยเครื่อง automated DNA sequencer ผลลัพธ์ที่ได้ คือ สาย DNA ที่มีขนาดสั้นยาวแตกต่างกัน เมื่อนำสาย DNA เหล่านี้ ไปแยกขนาดในสนามกระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer จะได้รูปแบบของสาย DNA ที่มีการเรียงลำดับตามขนาดความยาวของ DNA fragment ซึ่งมีความสัมพันธ์กับรหัสพันธุกรรมบนสาย DNA ข้อมูลที่ได้คือสายรหัสพันธุกรรมของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) A, C, G, T หรือ N โดยสายรหัสพันธุกรรม DNA เหล่านี้ อาจจะเป็นส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีน (gene) หรือเป็นส่วนที่ไม่ได้กำหนดการสร้างโปรตีนก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วน DNA ที่นำมาหาลำดับ nucleotide ถ้าหากชิ้นส่วน DNA เป็น genomic DNA ก็จะพบส่วนของ exon และ intron ได้ แต่ถ้าหากนำเอา RNA หรือ cDNA มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ก็จะพบเฉพาะส่วนของ exon เท่านั้น ซึ่งประกอบด้วยรหัสพันธุกรรม (genetic code) ที่กำหนดการสร้างกรดอะมิโน (พัชรีย์ วิทยานุกิต, 2543) โดยทั่วไปข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก จะถูกนำไปเก็บไว้ที่ฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่เรียกว่า GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งเป็นข้อมูลสาธารณะที่สามารถ

นำมาใช้ประโยชน์ได้โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย ในหลายปีที่ผ่านมาได้มีการการถอดรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อราเพื่อศึกษาถึงความหลากหลายบ้างแล้ว

โดย Hsiang and Goodwin (2001) ได้ทำการเปรียบเทียบลำดับ Ribosomal DNA sequence ของเชื้อรา *C. graminicola* ใน turfgrasses และพืชอาศัยอื่น พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้จาก turfgrass มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สายพันธุ์อื่น เช่น *C. coccodes*, *C. dematium* และ *C. graminicola* ที่เข้าทำลายพืชอาศัยอื่น

Guerber et al. (2003) ได้ศึกษาลักษณะความหลากหลายของเชื้อรา *C. acutatum* ด้วยวิธี sequence analysis พบว่า เชื้อรา *C. acutatum* ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายนั้นมีความสัมพันธ์กันกับเชื้อรา *Colletotrichum* sp.

Prihastuti et al. (2003) ได้ศึกษาลักษณะของสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ของกาแฟในภาคเหนือของประเทศไทย จากการวิเคราะห์ DNA sequence analysis สามารถจัดกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ *C. asianum*, *C. fructicola* และ *C. Siamense* แต่ละกลุ่มมีความสอดคล้องกันในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและข้อมูล DNA sequence

### 2.7.3 วิธีการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคพืช

#### 2.7.3.1 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยทั่วไปพิจารณาจากลักษณะและสีของโคโคนีที่เจริญบนอาหาร ลักษณะของโคโคนีเดี่ยว และขนาดของโคโคนีเดี่ยว (ขนิษฐา มารุ่ง, 2548) โดย Smith and Black (1990) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสใน สตรอเบอร์รี่ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบ พบว่ารูปร่างของ conidia ของเชื้อรา *C. acutatum* เป็นแบบ fusiform คือ มีลักษณะหัวท้ายแหลม ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae* ที่เป็นแบบ cylindrical คือ มีลักษณะหัวท้ายมนส่วนการแยกความแตกต่างของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae* สามารถแยกได้โดยใช้อัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน พบว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 63 มิลลิเมตร ส่วนเชื้อ *C. fragariae* เจริญได้ 69 มิลลิเมตร ต่อมา ชารทิพย์ ภาสบุตรและคณะ (2547) ได้ทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากพืชอาศัยหลายชนิด โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์ พบว่าสามารถจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ 5 ชนิด คือ *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. circinans* และ *C. truncatum* แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นมีความผันแปรสูงอีกทั้งยังคงมีเชื้อรา *Colletotrichum* อีกหลายชนิดที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ หรือจัดจำแนกได้ไม่ชัดเจนจึงมีการใช้เทคนิคอื่นมาช่วยในการศึกษาร่วมกับการลักษณะทางสัณฐานวิทยา

### 2.7.3.2 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว

#### (Polymerase chain reaction : PCR)

Polymerase chain reaction หรือ PCR เป็นกระบวนการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยอาศัย DNA polymerases ในการทำปฏิกิริยาร่วมกับการใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจง ซึ่งเทคนิค PCR ถูกพัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะ นักชีวเคมี ของบริษัท Cetus Corporation (มาลินี อัสวดิษฐเลิศ, 2553) จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยรวดเร็ว แม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงสูง ในปัจจุบัน PCR ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านเทคโนโลยี ชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ซึ่งสำหรับงานตรวจจำแนกดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณ DNA งานด้านการโคลนนิ่ง (gene cloning) การทำแผนที่ยีน (gene mapping) การทำพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในทางการเกษตร PCR ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์และการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของโรคพืช เป็นต้น (มธุกร สมพงษ์, 2553)

หลักการและเทคนิค PCR มีองค์ประกอบที่สำคัญ สำหรับการทำให้ PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่แบบ (Template DNA), DNA Polymerase คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสาย DNA มีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถทนความร้อน 93-95 องศาเซลเซียส, Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์เป็น DNA สายใหม่, บัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ DNA Polymerase (PCR Buffer) เป็นสารละลายที่ควบคุมสถานะของการทำ PCR ให้เหมาะสม, primer คือ DNA เส้นเดี่ยวสั้น ๆ จำนวนตั้งแต่ 10-20 เบสต่อกัน โดย DNA polymerases นำนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (A, T, C, G) มาต่อกันเป็นสาย DNA โดยใช้ primer เป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ ซึ่ง primer เป็น DNA สายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม (complementary) กับ DNA แม่แบบ ซึ่งจะเข้าคู่กับด้าน 3' ของ DNA แม่แบบจากนั้นเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง PCR (thermalcycler) ซึ่งเป็นเครื่องเปลี่ยนอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ (ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ, 2547)

ปฏิกิริยาของ PCR ในแต่ละรอบมีขั้นตอน คือ ปฏิกิริยาการแยกคู่ของสาย DNA (denaturation) เป็นการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพเพื่อเปิดโอกาสให้ primer สามารถเข้าไปจับกับบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณบนสายดีเอ็นเอต้นแบบได้ ขั้นตอนนี้ทำได้โดยการใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 94-95<sup>o</sup> C เพื่อทำลายพันธะที่ใช้ในการจับคู่กันของเส้น DNA ปฏิกิริยาการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ (annealing) หลังจาก DNA แยกเป็นเส้นเดี่ยวแล้วแล้ว จะลดอุณหภูมิลงเหลือ 40-62<sup>o</sup> C เพื่อให้ primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวท่อนสั้น ๆ จะเข้าไปเกาะบริเวณที่เป็นคู่สมกันบนเส้นดีเอ็นเอต้นแบบ, ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) หลังจาก primer เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ

เรียบร้อย จะเพิ่มอุณหภูมิขึ้นประมาณ 68-72<sup>0</sup> C เอนไซม์ DNA polymerase จะเริ่มทำงานด้วยการเชื่อมต่อบেসทั้งสี่ชนิด โดยจะจัดลำดับการเรียงตัวของเบส ตามเบสที่เป็นคู่สมกันบนเส้นดีเอ็นเอ ต้นแบบจากขั้นตอนนี้ การสร้างสายดีเอ็นเอเส้นใหม่จึงเกิดขึ้น หลังจากเสร็จสิ้นสามขั้นตอนนี้ถือเป็นหนึ่งรอบของปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการมากพอ เมื่อมีการทำซ้ำในขั้นตอนนี้ 1-3 ของ PCR ให้มีจำนวนรอบมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนของสายดีเอ็นเอขึ้นเป็นจำนวนมาก กล่าวได้ว่าเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคพืช โดยสามารถใช้ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยในพืชได้ และยังเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ เฉพาะเจาะจง และมีความไว (ดังภาพที่ 3)(มธุกร สมพงษ์,2553)

Stanley et al. (2000) ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อรา *C. acutatum* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสใน *Anemone coronaria* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *C. acutatum* คือ CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCGCGG-3') และไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* คือ CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') ร่วมกับ universal primer ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') พบว่าเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกคโนสใน *Anemone coronaria* เกิดจากเชื้อรา *C. acutatum*

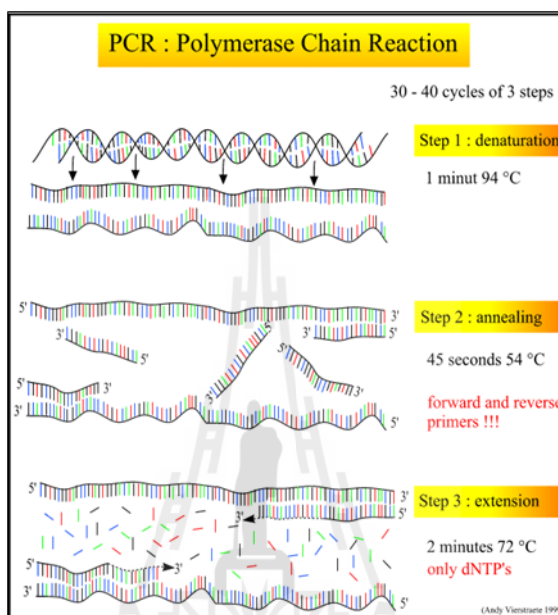
Erika et al. (2009) ได้ทำการระบุชนิดเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนส มะนาว มะเขือเทศ และมะม่วง โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* เช่นเดียวกับ Stanley (2000) พบว่าเชื้อสาเหตุโรค anthracnose ในมะนาวและมะเขือเทศ เกิดจากเชื้อรา *C. acutatum* ภายในส่วนที่ DNA เพิ่มปริมาณได้ มีขนาดเบสอยู่ที่ 490 bp ส่วนเชื้อสาเหตุโรค anthracnose ในมะม่วงเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีขนาดเบสอยู่ที่ประมาณ 450 bp

Svetlana et al. (2010) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวโมเลกุลของเชื้อรา *C. acutatum* ในมะเขือเทศ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* คือ CgInt (5'-GGCCTCCCG CCTCCGGGCGG-3') และไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *C. acutatum* คือ CaInt2 (5'-GGCGCCGGCCCCGTCACGGGG-3') ร่วมกับ universal primer ITS1 พบว่าเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมะเขือเทศส่วนใหญ่เป็น *C. acutatum* มีขนาดเบสอยู่ที่ 490 bp

โชติรส รอดเกตุ และคณะ (2554) ได้ทำการศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสพริกด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides*

Stanley (2000) และ Erika et al. (2009) พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสพริกมีขนาดเบสที่ 450 bp

อย่างไรก็ตามความไวและความจำเพาะเจาะจงของการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคมักมีข้อจำกัด เนื่องจากประสิทธิภาพการตรวจถูกจำกัดด้วยสารยับยั้งการเพิ่มปริมาณ DNA (PCR inhibitor) เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) และกรดฮิวมิก (humic acid) เป็นต้น



ภาพที่ 2.7 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR (ที่มา : Andy, 1999)

### 2.7.3.3 วิธีการศึกษาความหลากหลายเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

เป็นวิธีตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ แบบหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) ถูกพัฒนาขึ้น โดย Williams et al. (1990) โดยมีพื้นฐานมาจากเทคนิค PCR ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ เทคนิค RAPD-PCR จะใช้ไพรเมอร์เพียง 1 ไพรเมอร์ (Single primer) ที่มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 10 นิวคลีโอไทด์ (10-mer) เพื่อใช้ในการเพิ่มขยาย genomic DNA ในตำแหน่งที่ primer นั้น สามารถไปจับได้ ชิ้นส่วนที่ได้รับการเพิ่มขยายปริมาณแล้วจะถูกนำไปแยกขนาดโดยใช้ agarose gel จากแถบดีเอ็นเอที่ได้ สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง และบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างได้ด้วย โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ให้สัญลักษณ์เป็น "+" หรือให้คะแนนเป็น "1" ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน



นั้นให้สัญลักษณ์เป็น "-" หรือให้คะแนนเป็น "0" ในการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอเกิดปัญหาได้บ่อย ๆ เช่น แถบดีเอ็นเอในบางแถวอาจหรือไม่ชัดเจน หรือตำแหน่งอาจคลาดเคลื่อนจากกัน เนื่องจากเจดเกิด smile อันมีสาเหตุจากแถบดีเอ็นเอแถวที่อยู่ด้านนอกเคลื่อนที่ไปช้ากว่าแถบดีเอ็นเอที่อยู่แถวกลาง เป็นต้น ในกรณีดังกล่าวนี้ถ้าแถบดีเอ็นเอในแถวใดไม่ชัดเจน ไม่อาจบอกได้แน่ชัดให้ตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวออกไปไม่ต้องนำมาคิด การให้คะแนนหรือตรวจดูแถบดีเอ็นเอนี้อาจดูด้วยสายตา หรือใช้เครื่องอ่านก็ได้ เปรียบเทียบความเหมือนของแถบของดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละคู่โดยใช้ค่า similarity index (S) โดย S จะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดย 0 คือ ทั้งสองตัวอย่างไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันเลย และ S=1 หมายถึง ทั้งสองตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมดซึ่งความแตกต่างในประชากรนั้น เกิดจาก addition, deletion หรือ mutation ในตำแหน่งที่นั้น ๆ คุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมายโมเลกุลก็คือ ความง่าย และความประหยัดต้นทุนในการดำเนินการ เนื่องจากการสร้าง primer นั้นเป็นแบบสุ่มไม่จำ เป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบส อีกทั้งใช้ปริมาณของ DNA เริ่มต้นน้อยมากเนื่องจากอาศัยระบบของ PCR ซึ่งความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ก่อให้เกิดความแตกต่างของการจำลองตัวและขนาดของดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัวทำให้สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้

โดย Malathi et al. (2002) ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *C. falcatum* สาเหตุโรค red rot ในอ้อย โดยใช้วิธี RAPD พบว่า จากการใช้ไพรเมอร์ 80 ไพรเมอร์ สามารถจัดกลุ่มของเชื้อได้ทั้งหมด 7 กลุ่มใหญ่

Weeds et al. (2003) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เข้าทำลายถั่วสไตโลในประเทศบราซิล โคลัมเบีย ออสเตรเลีย จีน และอินเดีย โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าเชื้อที่พบในประเทศบราซิล และอินเดียมีความหลากหลายสูงมาก เช่นเดียวกับเชื้อที่พบในประเทศจีน และ อินเดีย เนื่องจากมีการปลูกอย่างกว้างขวางและอาจเป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากอเมริกาได้ แต่ความหลากหลายของเชื้อที่พบในประเทศออสเตรเลีย ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการกักกันพืชเข้าประเทศได้ดี

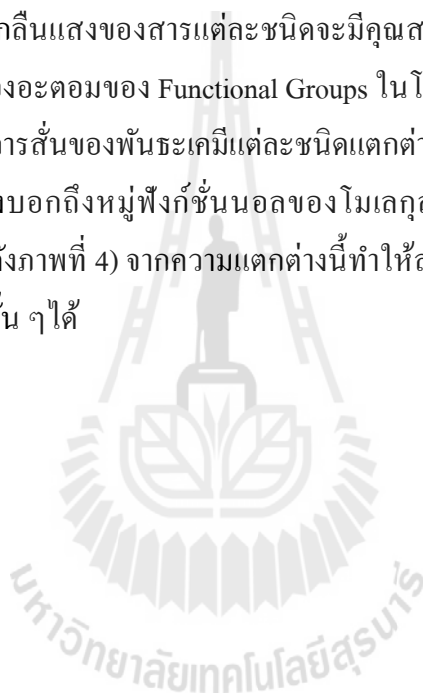
Yi et al. (2003) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เข้าทำลายถั่วสไตโลในประเทศจีน โดยใช้วิธี RAPD พบว่ามี 8 ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอออกมาอยู่ระหว่าง 0.3-2.8 kb โดยสามารถแบ่งได้ 4 กลุ่มที่มีความใกล้ชิดกันมาก

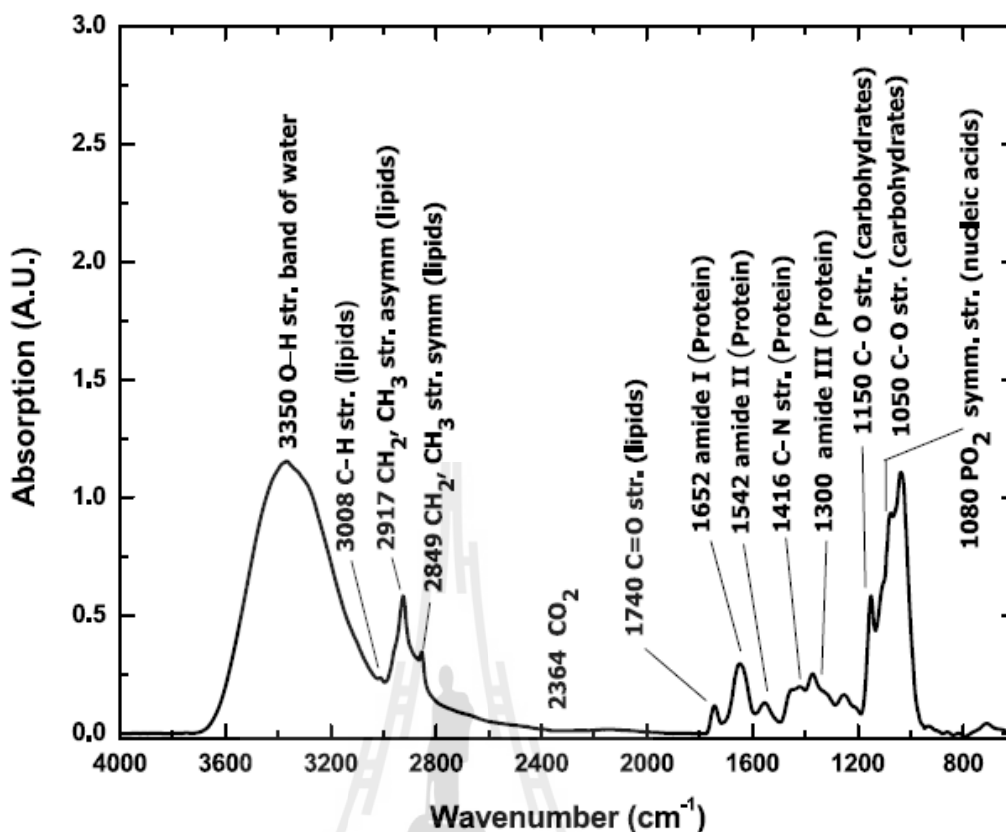
รัฐกร ศรีสุทธี (2549) ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนส พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 4 สปีชีส์ ดังนี้ *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. acutatum* และ *C. capsici*

## 2.7.4 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคโดยใช้เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

### (Infrared spectroscopy)

ปัจจุบันเทคนิค Infrared (IR) Spectroscopy และ Infrared microspectroscopy เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในศึกษาองค์ประกอบทางเคมี การวิเคราะห์และตรวจสอบเกี่ยวกับโมเลกุลของสาร และศึกษาโครงสร้างขนาดเล็กของสารชีวโมเลกุล โดยทำการตรวจวัดการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของตัวอย่างที่ความถี่ต่าง ๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละพันธะโดยอาศัยหลักการสั่น (Vibration) ของโมเลกุล ทำให้โมเลกุลเกิดการดูดกลืนแสงแล้ววัดแสงที่ส่งผ่านออกมาแสดงผลเป็นความสัมพันธ์ของความถี่หรือ Wave Number กับค่าการส่งผ่านของแสง เรียกว่า IR Spectrum ซึ่งลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของพันธะและน้ำหนักของอะตอมของ Functional Groups ใน โมเลกุลนั้นๆ ซึ่งช่วง wave numbers 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  จะมีผลต่อการสั่นของพันธะเคมีแต่ละชนิดแตกต่างกันไป เช่น พลังงานในช่วง 4000-1500  $\text{cm}^{-1}$  จะเป็นช่วงที่บ่งบอกถึงหมู่ฟังก์ชันนอลของโมเลกุลดังนี้ hydroxyl (-OH) methyl และ carbonly (-CO) เป็นต้น (ดังภาพที่ 4) จากความแตกต่างนี้ทำให้สามารถจำแนกชนิดของหมู่ฟังก์ชันในองค์ประกอบของสารนั้น ๆ ได้

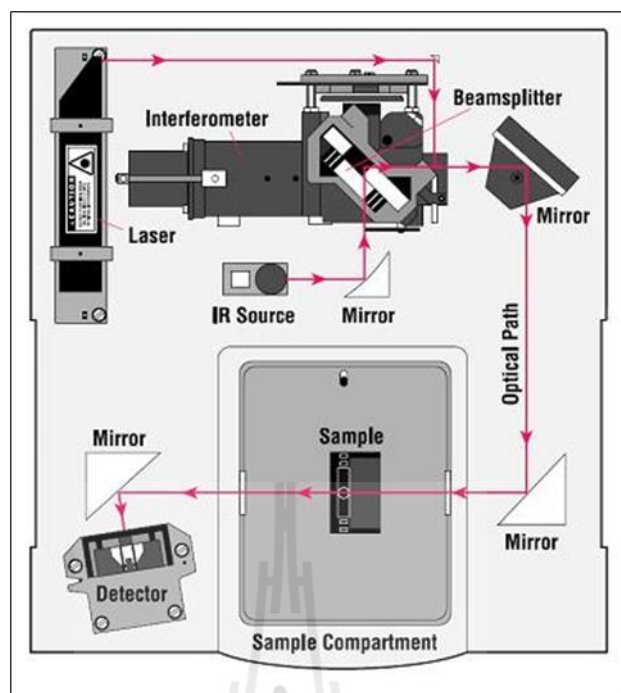




ภาพที่ 2.8 แสดงลักษณะสเปกตรัมการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล

(ที่มา : Salman, 2010)

หลักการของเทคนิค FT-IR เป็นเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปีที่ใช้ อินเตอร์เฟอโรมิเตอร์ (Michelson Interferometer) ทำหน้าที่แยกแสงที่ผ่านออกจากเซลล์บรรจุสารตัวอย่างออกเป็นความยาวคลื่นต่าง ๆ โดย Interferometer จะประกอบไปด้วยกระจกแบนราบ (planar mirrors) 2 แผ่นที่วางทำมุมตั้งฉากกัน โดยจะมี 1 แผ่นวางอยู่กับที่ (fixed mirror) ในขณะที่กระจกอีกหนึ่งแผ่นจะเคลื่อนที่กลับไปกลับมาด้วยความเร็วคงที่ ในทิศทางที่ตั้งฉากกับระนาบของผิวกระจก และมีตัวแยกลำแสง (beam splitter) ซึ่งวางทำมุม 45 องศา อยู่ระหว่างกระจกทั้ง 2 ซึ่ง beam splitter นี้ จะทำหน้าที่แบ่งแยกลำแสงที่ออกมาจากแหล่งกำเนิดแสงให้แยกออกเป็น 2 ส่วน กล่าวคือ 50 % ของลำแสงจะทะลุผ่าน beam splitter เข้าไปสู่ fixed mirror ในขณะที่อีก 50 % ของลำแสงที่เหลือจะหักเหไปสู่กระจกที่เคลื่อนที่ ทำให้เกิด Path difference ระหว่างลำแสง แล้วทำการรวมสัญญาณการแทรกสอดซึ่งเป็นฟังก์ชันกับ Path difference โดยเครื่องตรวจวัด (ดังภาพที่ 5) (จตุพร วุฒิกนกกาญจน์, 2553)



ภาพที่ 2.9 หลักการทำงานของเทคนิค FT-IR (จตุพร วุฒิกนกกาญจน์, 2553)

ปัจจุบันนี้การนำเอาเทคนิค IR spectroscopy มาใช้ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งนิยมเรียกว่า Infrared micro spectroscopy จะขยายขอบเขตการใช้งานได้อย่างมากมาย ซึ่งสามารถวัดตัวอย่างที่มีขนาดเล็กที่ไม่สามารถวัดได้โดยใช้ spectroscopy ข้อดีอีกประการหนึ่งของการใช้เทคนิคนี้ คือ การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ที่ไม่มีความยุ่งยากซับซ้อน ทำให้สามารถใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างแบบไม่ทำลาย (non-destructive) ได้ เพราะแสงที่ใช้อยู่ในย่านพลังงานที่ค่อนข้างต่ำเกินกว่าที่จะทำให้เกิดการทำลายพันธะทางเคมี หรือการทำให้เกิดปฏิกิริยาการแตกตัวของโมเลกุล (ionization) การใช้งานเทคนิคนี้สามารถประยุกต์ใช้ในงาน ด้านวัสดุศาสตร์ เช่น พอลิเมอร์ช่วยในการจำแนกชนิดของพอลิเมอร์ ด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ และวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เช่น การตรวจสอบโครงสร้างของเนื้อเยื่อ เส้นผม ผิวหนัง กระดูก เนื่องจากเครื่องมือนี้มีค่าใช้จ่ายไม่แพง มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก ใช้ตัวอย่างน้อย มีความแม่นยำสูง และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้เกือบทุกชนิด (กาญจนา ธรรมนู, 2555) และได้มีการนำเทคนิคนี้ มาใช้ในด้านการศึกษา เนื่องจากสามารถตรวจวัดตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย และสามารถนำมาศึกษาองค์ประกอบของการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลจากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่สนใจ โดยสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมี ของตัวอย่างไบโפיซ โดยลักษณะสเปกตรัมจาก IR จะให้ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันนอล เช่น Amide I, Amide II, lipid, และ carbohydrate เป็นต้น ที่เป็นลักษณะสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดในสารแต่ละชนิด การใช้เทคนิคนี้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการ

สะสมของสารในกระบวนการชีวเคมีของพืชที่เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งเสริมการเจริญเติบโต การสร้างภูมิต้านทานในพืช และกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในตรวจความแตกต่างของจุลินทรีย์และการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช เนื่องจากมีความแม่นยำ ไม่ยุ่งยาก (ณัฐธิญา เป็อนสันเทียะและคณะ, 2555) ลักษณะสเปกตรัมที่ได้จากตัวอย่างทางด้านชีวภาพจะบ่งบอกถึงลักษณะสารประกอบของสารชีวเคมีภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อเช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ฟอสโฟลิปิด (ดังภาพที่ 5) จากตารางที่ 2.2 สามารถแบ่งกลุ่มของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้

1. ช่วง  $4000-3100\text{ cm}^{-1}$  ส่วนใหญ่เกิดจากการดูดกลืนแสงของ OH ( $3400\text{ cm}^{-1}$ ) และ NH Stretching mode (Amide A  $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$  และ Amide B  $\sim 3030\text{ cm}^{-1}$ )
2. ช่วง  $3100-2800\text{ cm}^{-1}$  การดูดกลืนแสงของ C-H Stretching vibration ของ  $\text{CH}_3$   $\text{CH}_2$  ซึ่งเกิดจากการดูดกลืนแสงของกลุ่มไขมัน
3. ช่วง  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$  การดูดกลืนแสงของ Amide I และ Amide II ของกลุ่มโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถบอกถึง secondary structure ของโปรตีน เช่น alpha-helix , beta-sheet, turn รวมไปถึงหมู่  $\text{C}=\text{O}$  จาก ester group ของไขมัน
4. ช่วง  $1300-1500\text{ cm}^{-1}$  การดูดกลืนแสงของ C-H bending vibration ของ  $\text{CH}_3$   $\text{CH}_2$  ซึ่งเกิดจากการดูดกลืนแสงของกลุ่มไขมัน รวมไปถึง Stretching vibration  $\text{COO}^-$  จาก Amino acid side chains
5. ช่วง  $1230\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการดูดกลืนแสงของ P=O asymmetric stretching vibrations ของ phosphodiester, free phosphate และ monoester phosphate ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการดูดกลืนแสงของ DNA/RNA Polysaccharide backbone structures
6. ช่วง  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  เกิดจากการดูดกลืนแสงของ  $\text{PO}_4^{2-}$  จาก nucleic acid และ พวกร C-O-C C-O-P Stretching vibrations ของพวกร oligo-polysaccharide

ตารางที่ 2.2 แสดงลักษณะของการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของสารชีวโมเลกุล

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Assignment
~ 3307	N-H and O-H stretching vibration : polysaccharides, protein
~2959	CH <sub>3</sub> asymmetric stretch :mainly lipids
~2927	CH <sub>2</sub> asymmetric stretch: mainly lipids, with the little contribution from proteins, carbohydrates, nucleic acids
~2876	CH <sub>3</sub> symmetric stretch: mainly proteins, with the little contribution from lipids, carbohydrates, nucleic acids
~2857	CH <sub>2</sub> symmetric stretch: mainly lipids, with the little contribution from proteins, carbohydrates, nucleic acids
~1739-1744	Ester C=O stretch: lipid, triglycerides
~ 1700-1600	Mainly $\gamma$ (C=O) associated with protein as the amide I band
~1631	$\beta$ -sheet protein secondary structure
~1653	$\alpha$ -helix protein secondary structure
~1682	turn
~1541	Amide II (protein N-H bend, C-N stretch)
~1452	CH <sub>2</sub> Bending: lipids
~ 1391	COO <sup>-</sup> symmetric stretch: amino acid side chains, fatty acids
~1236	Asymmetric stretching: mainly nucleic acids with the little contribution from phospholipids
~1152	CO-O-C asymmetric stretching: glycogen and nucleic acids
~1080	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> symmetric stretching: nucleic acids and phospholipids

ปัจจุบันนิยมนำเทคนิค FTIR microspectroscopy นี้ มาใช้ในการวิเคราะห์ทางด้านจุลชีววิทยาเช่นใช้ในการจัดจำแนก จัดกลุ่ม และแยกแยะชนิดของจุลินทรีย์ในสายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น การตรวจวัดองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ การวิเคราะห์สารสะสมในเซลล์ การศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เมื่อมีการเติมสารเคมี เป็นต้น เทคนิค FTIR microspectroscopy นี้เป็นเทคนิคใหม่ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของตัวอย่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ อีกทั้งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์และจำแนกความแตกต่างของตัวอย่างที่สภาวะการทดลองที่แตกต่างกันได้โดยเทคนิคนี้มีต้นทุนต่ำรวมไปถึงใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์สั้น และไม่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยากตัวอย่างไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการการใช้สารเคมีใด ๆ

Szeghalmi et al. (2006) ได้ใช้เทคนิค FTIR micro spectroscopy ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกันพบว่า เชื้อรา *Aspergillus*, *Neurospora*, and *Rhizopus* มีความไวต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน

Salman (2010) ได้ทำการระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิค FTIR spectroscopy โดยทำการศึกษาเชื้อรา 4 ชนิด คือ *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* spp., *Verticillium* sp. และ *Fusarium oxysporum* ในการทดสอบด้วยวิธี FTIR spectroscopy เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่าเทคนิค FTIR spectroscopy สามารถใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวโมเลกุล

Elsayed (2010) ได้ทำการระบุชนิดของยีสต์และเชื้อราสาเหตุโรคโดยใช้เทคนิค FTIR spectroscopy พบว่า สามารถใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคได้แม่นยำเช่นกัน

Buensanteai et al. (2012) ได้ใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ในการตรวจสอบองค์ประกอบของมันสำปะหลัง หลังจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 พบว่า มันสำปะหลังที่ถูกกระตุ้นมีการสร้างไขมันเพิ่มสูงขึ้น

Erukhimovitch et al. (2013) ได้ทำการระบุชนิดของเชื้อ ไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อราที่ปนเปื้อนใน Vero cells ด้วยเทคนิค FTIR micro spectroscopy พบว่า เทคนิค FTIR micro spectroscopy สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อที่แตกต่างกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ



## บทที่ 3

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การเก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสจากพื้นที่ปลูกสำคัญในประเทศไทย

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างใบ ก้านใบ และต้นมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนส โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ ๆ มีการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง จาก 8 จังหวัด 10 อำเภอ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา อำเภอเมือง อำเภอสีคิ้วและอำเภอโชคชัย จังหวัดปราจีนบุรี อำเภอประจันตคาม จังหวัดชลบุรี อำเภอศรีราชา จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอเมือง จังหวัดนครสวรรค์ อำเภอดงพญาเย็น และอำเภอตากฟ้า จังหวัดลพบุรี อำเภอบ้านหมี่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง และจังหวัดชัยภูมิ อำเภอจัตุรัส นำมาแยกเชื้อสาเหตุโรค ณ ห้องปฏิบัติการ โรคพืชและชีวโมเลกุลพืช อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคต่อไป

#### 3.2 การแยกเชื้อราจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนส

นำตัวอย่างใบ ก้านใบ และต้นมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง ที่เก็บได้ในข้อที่ 3.1 มาทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Tissue transplanting technique บนอาหาร Water agar (WA) โดยทำความสะอาดใบมันสำปะหลังที่เก็บมาด้วยน้ำสบู่หรือน้ำเปล่าให้สะอาด เช็ดให้แห้ง ใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดบริเวณเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นส่วนต่อระหว่างเนื้อเยื่อดี กับส่วนที่เป็นโรค จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย clorox 10 เปอร์เซ็นต์ (NaOCl 1%) เป็นเวลา 1-2 นาที ขึ้นอยู่กับขนาดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อใช้ปากกิบ คีบย้ายชิ้นใบมันสำปะหลังมาล้างในน้ำกลั่น นิ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา ประมาณ 1 นาที ซับชิ้นส่วนด้วยกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อจากนั้นใช้เข็มเย็บ เย็บชิ้นใบมันสำปะหลัง วางบนอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วันหลังจากนั้นย้ายเส้นใยที่เจริญออก มารอบ ๆ เนื้อเยื่อพืช ไปเลี้ยงบนอาหาร Half potato dextrose agar (HPDA) เป็นเวลา 10 วัน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังสร้างสปอร์ (ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553; Azad et al., 2011)



### 3.3 การแยกสปอร์เดี่ยว (Single spore) ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมัน ลำปะหลัง

นำเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันลำปะหลังที่แยกด้วยวิธี Tissue transplanting technique ในข้อที่ 3.2 มาเลี้ยงบนอาหาร HPDA เป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ ทำการแยกให้ได้สปอร์เดี่ยว (Single spore) โดยนำสปอร์ของเชื้อราที่ได้มาผสมกับน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ วัดความเข้มข้นของสปอร์ด้วย Hemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น  $10^4$ - $10^5$  โคનીเดียต่อมิลลิลิตร นำสารแขวนลอยเชื้อ Spread plate ด้วยแท่งแก้วรูปตัว L ลงบนอาหาร WA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการย้ายโคโคนีเดียลงบนอาหาร HPDA ให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป (ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553)

### 3.4 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและประเมินความรุนแรงของเชื้อ สาเหตุโรคแอนแทรกโนส (Pathogenicity and virulency test)

นำเชื้อราที่ได้จากในข้อ 3.3 มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและประเมินความรุนแรงของโรคกับพืชทดสอบ (Abang et al., 2002) ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

#### 3.4.1 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนสในมันลำปะหลัง

เตรียมท่อนพันธุ์มันลำปะหลังพันธุ์อ่อนแอ คือ พันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 ความยาว 20 เซนติเมตรต่อท่อน หรือมีจำนวนตา 5 ตา ปลูกในกระถางขนาด 8 นิ้ว โดยปลูกท่อนพันธุ์ 1 ท่อนต่อกระถาง เมื่อต้นมันลำปะหลังมีอายุ 4 สัปดาห์ เก็บใบและก้านใบ มาล้างด้วยน้ำสบู่และเช็ดให้แห้ง ก่อนนำมาใช้เป็นพืชทดสอบ จากนั้นนำเชื้อราสาเหตุโรคที่เลี้ยงได้บนอาหาร HPDA อายุ 14 วัน เตรียมเป็นสารแขวนลอยในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ นับด้วย Hemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น  $10^6$ - $10^8$  โคનીเดียต่อมิลลิลิตร นำสารแขวนลอยที่ได้ไปทำการปลูกเชื้อ (Inoculate) โดยฉีดพ่นลงบนใบมันลำปะหลังที่วางในกล่องชื้น (moist chamber) (Magdalena, 2012) ทำการให้ความชื้นเพื่อให้สภาพเหมาะสมต่อการเกิดโรค เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการเกิดโรควันแรกที่มันลำปะหลังแสดงอาการของโรค และประเมินความรุนแรง (disease scores) ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยให้คะแนน 1-5 คะแนน ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Wokocho et al. (2010) ดังนี้ 1 = ใบพืชไม่แสดงอาการ, 2 = เกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ, 3 = เกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ, 4 = เกิดแผล 50-75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ, 5 = เกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ

#### 3.4.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคแอนแทรกโนสในพืชอาศัยอื่น

นำผลพริกขี้หนู มาล้างด้วยน้ำสบู่และเช็ดให้แห้งก่อนนำมาใช้เป็นพืชทดสอบ โดยนำเชื้อราที่เลี้ยงได้บนอาหาร HPDA อายุ 14 วัน เตรียมเป็นสารแขวนลอยนับด้วย Hemacytometer ให้ได้

ความเข้มข้น  $10^6$ - $10^8$  โคเน็คติวต่อมิลลิลิตร นำสารแขวนลอยที่ได้ไปปลูกเชื้อ (Inoculate) บนผลพริก จีหนูปันธุ์ซูปเปอร์ฮอต โดยใช้เข็มฉีดยาฉีดสารแขวนลอยเชื้อราลงบนผลพริกจำนวน 3 จุด/ผล ตามวิธีของ Magdalena et al. (2012) ในสภาพกล่องชื้น (moist chamber) เพื่อให้สภาพเหมาะสมต่อการเกิดโรค เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลการเกิดโรควันทันทีที่พริกแสดงอาการของโรค และประเมินความรุนแรง (disease scores) ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยให้คะแนน 1-5 คะแนน ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Wokocha et al. (2010) ดังนี้ 1 = ไม่แสดงอาการ, 2 = เกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของผลพริก, 3 = เกิดแผล 25-50 เปอร์เซ็นต์ของผลพริก, 4 = เกิดแผล 50-75 เปอร์เซ็นต์ของผลพริก, 5 = เกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของผลพริก

### 3.4.3 การเก็บ Stock เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง

นำเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคและการทดสอบความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรคได้มาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนแขวนลอยสปอร์ ใส่อัตราส่วน 1:1 ลงในหลอด Micro centrifuge tube ปริมาตร 1.5 ml หลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมอาหาร PDB ที่มีส่วนผสมของ 100% Glycerol ในอัตราส่วน 1:1 ละลายตะกอนสปอร์ด้วย Vortex mixer แล้วเก็บไว้ที่ ตู้เย็นที่ -80 องศาเซลเซียส ตามวิธีของ Huertas-Gonzalez et al. (1999) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองระยะยาวต่อไป

## 3.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง

นำเชื้อที่แยกได้จากโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราและผ่านการทดสอบว่ามีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงแต่ละไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหาร HPDA เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังต่อไปนี้

### 3.5.1 การเจริญเติบโตของโคโลนี

เลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตบนอาหาร HPDA ไอโซเลตละ 4 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่อายุ 3, 5 และ 7 วัน บนอาหาร HPDA วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS V.14.0 เพื่อหาความแตกต่างและค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ/ไอโซเลต (ชนิษฐา มากรุง, 2548)

### 3.5.2 สีของโคโลนีบนอาหาร HPDA

เลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลตลงบนอาหาร HPDA 1 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของโคโลนี บันทึกภาพและลักษณะของโคโลนีตามวิธีของ Abang et al. (2002)

### 3.5.3 ลักษณะและขนาดโคนีเดีย

ย้ายเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังจาก slant ลงบนอาหาร HPDA 1 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการสร้างโคนีเดีย โดยนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X สำหรับเชื้อที่ไม่สร้างโคนีเดีย ทำการชักนำโดยปล่อยให้เชื้อเจริญและสร้างโคนีเดียที่อุณหภูมิห้องภายใต้แสงฟลูออเรสเซนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X อีกครั้ง สุ่มวัดขนาดของโคนีเดียด้วยไมโครมิเตอร์ (Micrometer) จำนวน 100 โคนีเดียต่อไอโซเลต (ขนิษฐา มากรุง, 2548; มธุกร สมพงษ์, 2553) บันทึกภาพและเปรียบเทียบขนาดและลักษณะโคนีเดียของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังแต่ละไอโซเลต

ทำการจัดกลุ่มของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง โดยดัดแปลงจากวิธีการจัดกลุ่มเชื้อราโดยดัดแปลงวิธีของ Abang et al. 2002 เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริงและใช้ในการศึกษาต่อไป

## 3.6 การตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล

### 3.6.1 การสกัด genomic DNA ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง

สกัด genomic DNA ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังที่ผ่านการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โคโลนีโคนีเดีย การก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของโรคในมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 โดยนำมาเป็นตัวแทนกลุ่ม กลุ่มละ 2 ไอโซเลต โดยดัดแปลงวิธีการของมธุกร สมพงษ์ (2553) โดยตัดเส้นใยของเชื้อที่เจริญบน HPDA ด้วย Cork borer ขนาด 5 มิลลิเมตร นำเส้นใยไปบดเป็นผงในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งบดที่เย็นจัด ตักเส้นใยที่บดละเอียดแล้วด้วยช้อนตักสารที่แช่ในไนโตรเจนเหลวใส่ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิเมตร ผสมสารละลาย Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากับผงเส้นใย จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนชิ้นส่วนเซลล์ออกจากส่วนที่เป็นของเหลว นำส่วนที่เป็นของเหลวใส่ไปใส่ในหลอด Eppendorf หลอดใหม่ แล้วเติม Isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอนสู่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอน DNA ออกด้วย Ethanol 70

เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทส่วนใส่ที่เป็นสารละลายทิ้งให้เหลือเฉพาะ DNA ติดอยู่ที่ก้นหลอด จากนั้นทิ้งให้แห้งโดยวางคว่ำลงบนกระดาษกรอง 15 นาที ก่อนนำไปทำให้แห้งในสภาพสุญญากาศนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ DNA ที่ได้ใน TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปวัดความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer ปรับให้ได้ความเข้มข้นของ DNA 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

### 3.6.2 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ (DNA) ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.6.1 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ร่วมกับไพรเมอร์ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง (Universal primers) คือ Primer ITS3 (5'-GCATCGA TGAAGAACGCAGC-3') และ Primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') ตามลำดับ (Medeiros et al., 2010) ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร คัดแปลงจาก มธุกร สมพงษ์ (2553) ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคมันสำปะหลัง 1 ไมโครลิตร, 10X Amplifier buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10 มิลลิโมลาร์ DNTP Mix ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl<sub>2</sub> ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 ไมโครลิตร ด้วย Distillate water นำไปใส่เครื่อง PCR Thermocycler (ยี่ห้อ BIO-RAD) กำหนดอุณหภูมิเป็นรอบตามโปรแกรมที่เหมาะสมกับ 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 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading dye 2 ไมโครลิตร และ Novel Juice 6X Loading Buffer ของบริษัท Gene DireX 1 ไมโครลิตร นำมาตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช่วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) บน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาทีหรือเมื่อแถบสีล่างของ Loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่าง จากด้านล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพ

### 3.6.3 การยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังโดยการเปรียบเทียบด้วยวิธี DNA sequencing

นำ PCR product บริสุทธิ์ที่ได้ในข้อที่ 3.6.2 ส่งตรวจโดยใช้บริการของบริษัท แปซิฟิคไซเอนซ์ จำกัด แล้วนำผลการตรวจที่ได้มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (Identity) หรือความคล้ายคลึง (Similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (Homology or similarity search) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำนายลักษณะ เพื่อหาชนิดและความหลากหลายของเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรกโคโนสมันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้โปรแกรม BLASTS บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

### 3.7 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยเทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

ในการทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (Random oligonucleotide primer) ขนาด 10 เบส จำนวน 3 ไพรเมอร์คือ OPA13 (5'CAGCACCCAC'3); OPB07 (5'GGTGACGCAG'3) และ OPQ16 (5'AGTGCAGCCA'3) (Rothan, et al., 2003) ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ตามวิธีของหทัยชนก คงแก้ว (2546) และ อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์ (2553) ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA Template) ที่สกัดได้ (25 นาโนกรัม) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> (50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, dNTPs (2.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (10 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (Distillate water) ปริมาตร 16.5 ไมโครลิตร นำไปใส่เครื่อง PCR Thermocycler (ยี่ห้อ BIO-RAD) กำหนดอุณหภูมิเป็นรอบตามเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนของ PCR ดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที, Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที, Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จำนวน 35 รอบ จากนั้นปรับอุณหภูมิ Final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป

นำ PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading dye 1 ไมโครลิตร และ Novel Juice 6X Loading Buffer ของบริษัท Gene Dire X 1 ไมโครลิตร นำมาตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้วิธีการ อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ใน 0.5 X TBE buffer ที่ความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพ

### 3.8 การพัฒนาวิธีการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโคโนสมันลำปะหลังด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (FTIR microspectroscopy)

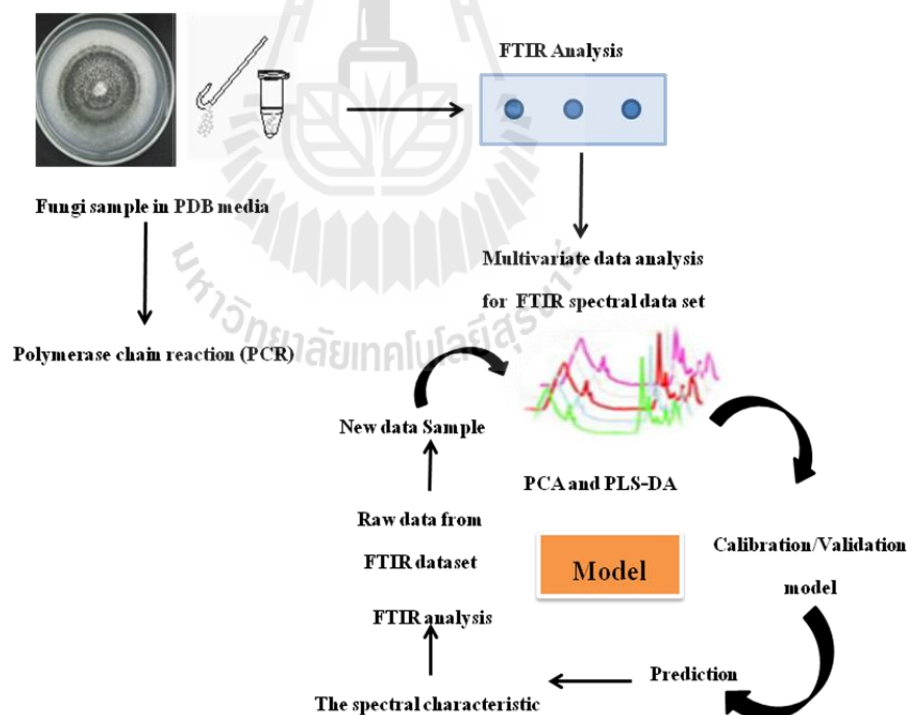
#### 3.8.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโคโนสมันลำปะหลังไอโซเลต SEL8 ที่ผ่านการยืนยันสปีชีส์ด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลว่าเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากการศึกษาครั้งนี้ และเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโคโนสพริกจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ไอโซเลต CC (*C. capsici*) มาใช้เป็นฐานข้อมูลในการวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งการพัฒนาวิธีการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกโคโนสมันลำปะหลังจะใช้เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโคโนสมันลำปะหลังจำนวน 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต CHTM11 และ SRTLF01 มาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา โดยเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลตจะต้องผ่านการจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR มาแล้ว นำเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหาร PDB เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 4,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นเติม 0.85% NaCl นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 4,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่นมาเขย่า นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 4,900 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง ปั่นให้สิ้นใยแตกตัวด้วยเครื่อง Vortex เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดเส้นใยของเชื้อรา 3 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น IR slide ทำให้แห้งโดยใช้ Vacuum desiccator เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์

#### 3.8.2 การวิเคราะห์ตัวอย่างของเชื้อ *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรกโคโนสมันลำปะหลังโดยใช้เครื่อง FTIR micro spectroscopy

โดยใช้โปรแกรม OPUS 7.0 (Bruker optic, German) ร่วมกับการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Multivariate data analysis โดยใช้โปรแกรม The Unscrambler X 10.1 (CAMO, Norway) ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) โดยใช้เครื่อง IR microscope (Vertec70, Bruker optic) ที่ต่อกับ Hyperion 2000 Microscope ที่มีระบบตรวจวัดแบบ Mercury Cadmium Telluride (MCT) สามารถวัดการดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ตั้งแต่ช่วง  $800-4000\text{ cm}^{-1}$  (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) โดยการวัดสเปกตรัมจะวัดแบบสะท้อนกลับ วัดที่ค่า resolution  $6\text{ cm}^{-1}$ , 64 scans (กาญจนา ชรรมนู, 2555) และเปิดรูรับแสง (aperture) ให้มีค่าเท่ากับ  $50\times 50$  ไมโครเมตร โดยข้อมูลที่ได้อาจจะถูกประมวลผลออกมาด้วยโปรแกรม OPUS 7.0 (Bruker optic) โดยจะทำการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีค่า Absorbance ไม่ต่ำ (amide I มีค่า Absorbance  $< 0.35$  units) หรือสูงเกินไป (amide I มีค่า Absorbance  $< 0.8$  units) จากนั้นทำการคัดเลือก สเปกตรัมของเชื้อรา ไอโซเลต CC SEL8 CHTM11 และ SRTLF01 จำนวน 300 สเปกตรัม ก่อนทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม The

Unscrambler X 10.1 (CAMO, Norway) จะทำการสุ่มเลือกข้อมูลในอัตราส่วน 2/3 เพื่อใช้ในการสร้างฐานข้อมูลของ S.Golay ในกลุ่ม Training set และ สุ่มเลือกข้อมูลในสัดส่วน 1/3 ในกลุ่ม Validated set เพื่อใช้ทำนายผล จากนั้นนำมาวิเคราะห์ข้อมูล สเปกตรัมจะนำมาทำ Second derivative และ extended multiplicative signal correction (EMSC) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ โดยการทำ Multivariate data analysis แบบ Principal Component analysis (PCA) และ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) โดยใช้สเปกตรัมในกลุ่มของ Training set เพื่อสร้างแบบจำลองของชุดข้อมูล จากนั้นทำการทำนายผลโดยใช้สเปกตรัมของชุดข้อมูล Validated set จากนั้นนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ extended multiplicative signal correction (EMSC) และนำข้อมูลที่ผ่านการทำ PCA แล้วมาวิเคราะห์ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) เพื่อสร้างแบบจำลองของชุดข้อมูลเพื่อทำนายผล จากนั้นทำการทดสอบฐานข้อมูลที่ได้โดยการ Prediction testing เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของฐานข้อมูลดังแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แสดงขั้นตอนการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยโปรแกรม The Unscrambler X 10.1

(ดัดแปลงจาก Thumanu et al., 2014)

นอกจากนั้น มีการนำชุดข้อมูลของ Prospective data set ของกลุ่มข้อมูลที่ได้จากไอโซเลต SEL8 SRTL01 CHTM11 และ CC มาใช้ในการทำนายค่าความถูกต้องโดยใช้ฐานข้อมูล (Model) ของ ข้อมูลที่ได้จากไอโซเลต SEL8 และข้อมูลที่ได้จากไอโซเลต CC จากนั้นนำมาคำนวณหา เปอร์เซ็นต์ความเหมือนคล้ายของตัวอย่างแต่ละไอโซเลต





## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อราจากตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส

จากการเก็บรวบรวมชิ้นส่วนมันสำปะหลัง ได้แก่ ใบ ก้านใบ และลำต้นมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส (ภาพ 4.1) จากหลายพื้นที่ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา อำเภอโชคชัย อำเภอสีคิ้วและอำเภอเมืองจังหวัดปราจีนบุรี อำเภอประจันตคามจังหวัดชลบุรี อำเภอสรีราชาจังหวัดกาญจนบุรี อำเภอเมืองจังหวัดนครสวรรค์ อำเภอดงพญาไฟ และอำเภอตากสินจังหวัดลพบุรี อำเภอบ้านหมี่จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอเมืองและจังหวัดชัยภูมิ อำเภอจัตุรัสสามารถแบ่งลักษณะอาการได้ 4 ลักษณะ คือ 1. ลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลขอบแผลด้านนอกมีสีเหลืองดังแสดงในภาพ 4.2 (A) 2. ลักษณะอาการขั้วใบใหม่มีสีน้ำตาล-ดำ เมื่อเป็นรุนแรงจะทำให้ใบหลุดร่วงดังแสดงในภาพ 4.2 (B) 3. ลักษณะก้านใบเป็นจุดสีน้ำตาล ดังแสดงในภาพ 4.2 (C) และ 4. ลักษณะอาการลำต้นใหม่ ดังแสดงในภาพ 4.2 (D)

ในการแยกเชื้อราสาเหตุโรคสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 38 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1) โดยไอโซเลตที่แยกได้ทั้งหมดมาจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบจุดสีน้ำตาลขอบแผลด้านนอกมีสีเหลืองดังแสดงในภาพ 4.3 ยกเว้นไอโซเลต SRTLF01 และ SRTLF02 แยกได้จากลักษณะอาการขั้วใบใหม่มีสีน้ำตาล-ดำ ดังแสดงในภาพ 4.4 ไอโซเลต SRTLF03 และ SRTLSY03 แยกได้จากลักษณะก้านใบเป็นจุดสีน้ำตาล ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ไอโซเลต SEL8 แยกได้จากอาการลำต้นใหม่ ดังแสดงในภาพ 4.6

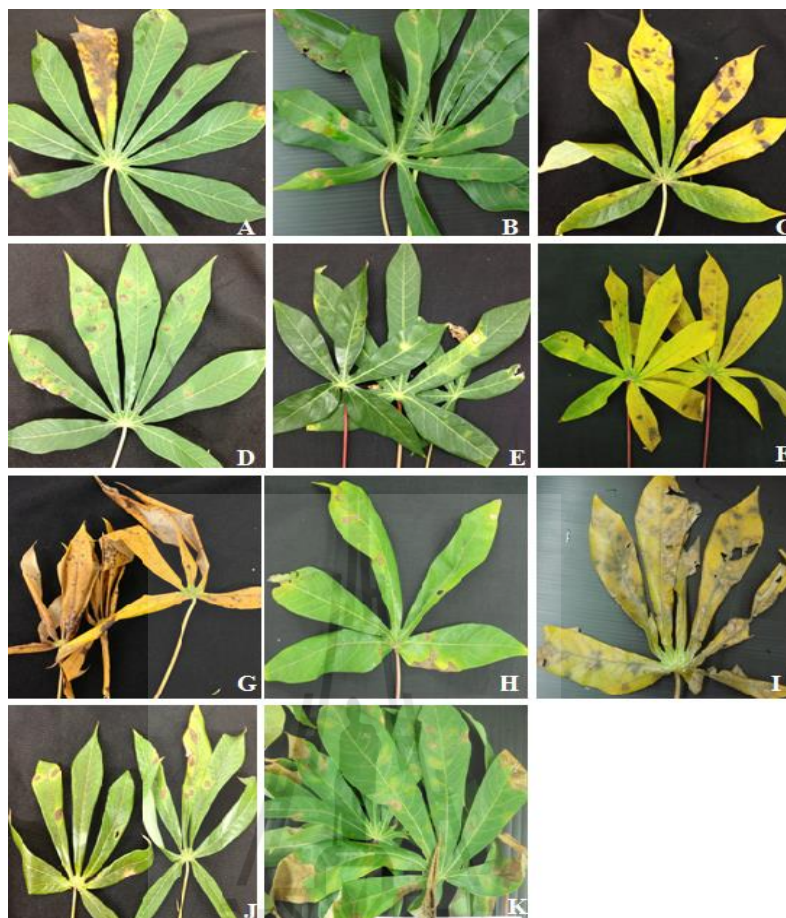
นอกจากนี้ ยังได้นำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 2 ชนิด คือ *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) และเชื้อรา *C. capsici* (CC) ชนิดละ 1 ไอโซเลต จากภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง (Reference strains) รวมเชื้อทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนี้จำนวน 40 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1



**ภาพที่ 4.1** ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังที่โนแปลงปลูกของเกษตรกรอำเภอ  
 สี่คิ้ว จังหวัดนครราชสีมาที่อายุ 6-8 เดือน (A) แสดงอาการลำต้นใหม่เกิดแผลสีน้ำตาลตาม  
 ทิวลำต้น (B) แสดงอาการใบจุด เหลือง (C) แสดงอาการก้านหลุดร่วงในมันสำปะหลัง (D)  
 แสดงอาการยืนต้นตายในมันสำปะหลัง



ภาพที่ 4.2 แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังจากตัวอย่างมันสำปะหลังที่นำมาใช้ในการศึกษา (A) อาการใบจุดสีน้ำตาลขอบแผลด้านนอกมีสีเหลือง (B) อาการขั้วใบใหม่มีสีน้ำตาลหรือดำและเมื่อเป็นรุนแรงจะทำให้ใบหลุดร่วง (C) อาการก้านใบเป็นจุดสีน้ำตาลหรือดำขนาดเล็ก (D) อาการแผลสีน้ำตาลบริเวณลำต้นเมื่อเป็นมากจะมีอาการลำต้นใหม่



**ภาพที่ 4.3** อาการของโรคแอนแทรกโนสมันดำปะหลัง (A) อาการใบจุดใหม่น้ำตาลสีดำแยกได้เชื้อไอโซเลต PCBB02 และ PCBB03 (B) อาการใบจุดสีน้ำตาลมีวงสีเหลืองล้อมรอบแยกได้เชื้อไอโซเลต SLC032 และ SLC071 (C) อาการใบจุดเหลี่ยมน้ำตาลสีดำแยกได้เชื้อไอโซเลต NKSTFBS01 และ NKSTFBS02 (D) อาการใบจุดสีน้ำตาลมีวงสีเหลืองล้อมรอบแยกได้เชื้อไอโซเลต NKSTKLS01 NKSTKLS02 NKSTKLS03 NKSTKBS02 และNKSTKBS05 (E) อาการใบจุดสีขาว แยกได้เชื้อไอโซเลต LBBS01 และ LBLB02 (F) อาการใบจุดสีน้ำตาลแยกได้เชื้อไอโซเลต KBSLY01 ถึง KBSLY05 (G) อาการใบจุดเหลี่ยมน้ำตาลแยกได้เชื้อไอโซเลต KBSF01 ถึง KBSF05 (H) อาการใบจุดสีน้ำตาลมีวงสีเหลืองล้อมรอบแยกได้เชื้อไอโซเลต SRTL04 (I) อาการใบจุดสีน้ำตาลไม่มีขอบชัดเจนแยกได้เชื้อไอโซเลต SRTLSY ถึง SRTLSY03 (J) อาการใบจุดสีน้ำตาลมีวงสีเหลืองล้อมรอบแยกได้เชื้อไอโซเลต CPSF02 และ CPSF05 (K) อาการใบจุดสีน้ำตาลมีวงสีเหลืองล้อมรอบ ปลายใบไหม้แยกได้เชื้อไอโซเลต SCA03 CHTM11 LSS และC13



ภาพที่ 4.4 ข้าวใบที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง (A) และ (B) แสดงอาการข้าวใบไหม้มีสีน้ำตาล-ดำ เมื่อเป็นมากใบจะหลุดร่วงแยกได้เชื้อราไอโซเลต SRTLF01 และ SRTLF02



ภาพที่ 4.5 ก้านใบที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง (A) ก้านใบเป็นแผลสีน้ำตาลขนาดเล็ก แยกได้เชื้อไอโซเลต SRTLSY03 (B) ก้านใบเป็นแผลสีน้ำตาลถึงสีดำแยกได้เชื้อไอโซเลต SRTLF03



ภาพที่ 4.6 แสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลัง (A) และ (B) แสดงอาการลำต้นไหม้เกิด  
แผลสีน้ำตาลตามทั่วลำต้นแยกได้เชื้อไอโซเลต SEL8 (C) อาการลำต้นไหม้เมื่อเป็นมากมัน  
สำปะหลังจะยืนต้นตาย



ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เก็บได้จากแหล่งปลูกที่สำคัญและเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ลำดับที่	ไอโซเลต	สถานที่เก็บ	ชิ้นส่วนที่แยกได้
1	CHTM11	อ. โขกชัย จ.นครราชสีมา	ใบมันสำปะหลัง
2	SCA03	อ.เมือง จ.นครราชสีมา	ใบมันสำปะหลัง
3	SEL8	อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา	ลำต้นมันสำปะหลัง
4	LSS	อ.เมือง จ.นครราชสีมา	ใบมันสำปะหลัง
5	C13	อ.เมือง จ.นครราชสีมา	ใบมันสำปะหลัง
6	SLC032	อ. ศรีราชา จ.ชลบุรี	ใบมันสำปะหลัง
7	SLC071	อ. ศรีราชา จ.ชลบุรี	ใบมันสำปะหลัง
8	PCBB02	อ. ประจันตคาม จ.ปราจีนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
9	PCBB03	อ. ประจันตคาม จ.ปราจีนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
10	NKSTFBS01	อ. ดากฟ้า จ.นครสวรรค์	ใบมันสำปะหลัง
11	NKSTFBS02	อ. ดากฟ้า จ.นครสวรรค์	ใบมันสำปะหลัง
12	NKSTKLS01	อ. ดากฟ้า จ.นครสวรรค์	ใบมันสำปะหลัง
13	NKSTKLS02	อ. ดากฟ้า จ.นครสวรรค์	ใบมันสำปะหลัง
14	NKSTKLS03	อ. ดากฟ้า จ.นครสวรรค์	ใบมันสำปะหลัง
15	NKSTKBS02	อ. ดากฟ้า จ.นครสวรรค์	ใบมันสำปะหลัง
16	NKSTKBS05	อ. ดากฟ้า จ.นครสวรรค์	ใบมันสำปะหลัง
17	LBLB02	อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี	ใบมันสำปะหลัง
18	LBBS01	อ.บ้านหมี่ จ.ลพบุรี	ใบมันสำปะหลัง
19	CPSF02	อ. จัดตุรัส จ.ชัยภูมิ	ใบมันสำปะหลัง
20	CPSF05	อ. จัดตุรัส จ.ชัยภูมิ	ใบมันสำปะหลัง
21	SRTLF01	อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ข้าวใบมันสำปะหลัง
22	SRTLF02	อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ข้าวใบมันสำปะหลัง
23	SRTLF03	อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ก้านมันสำปะหลัง
24	SRTLF04	อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ใบมันสำปะหลัง
25	SRTLSY	อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ใบมันสำปะหลัง
26	SRTLSY01	อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ใบมันสำปะหลัง
28	SRTLSY03	อ. เมือง จ.สุราษฎร์ธานี	ก้านมันสำปะหลัง

ตารางที่ 4.1 เชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสที่เก็บได้จากแหล่งปลูกที่สำคัญและเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลต	สถานที่เก็บ	ชิ้นส่วนที่แยกได้
29	KBSF01	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
30	KBSF02	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
31	KBSF03	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
32	KBSF04	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
33	KBSF05	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
34	KBLSY01	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
35	KBLSY02	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
36	KBLSY03	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
37	KBLSY04	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
38	KBLSY05	อ. เมือง จ.กาญจนบุรี	ใบมันสำปะหลัง
39	CC	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	สายพันธุ์อ้างอิง
40	CG	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	สายพันธุ์อ้างอิง



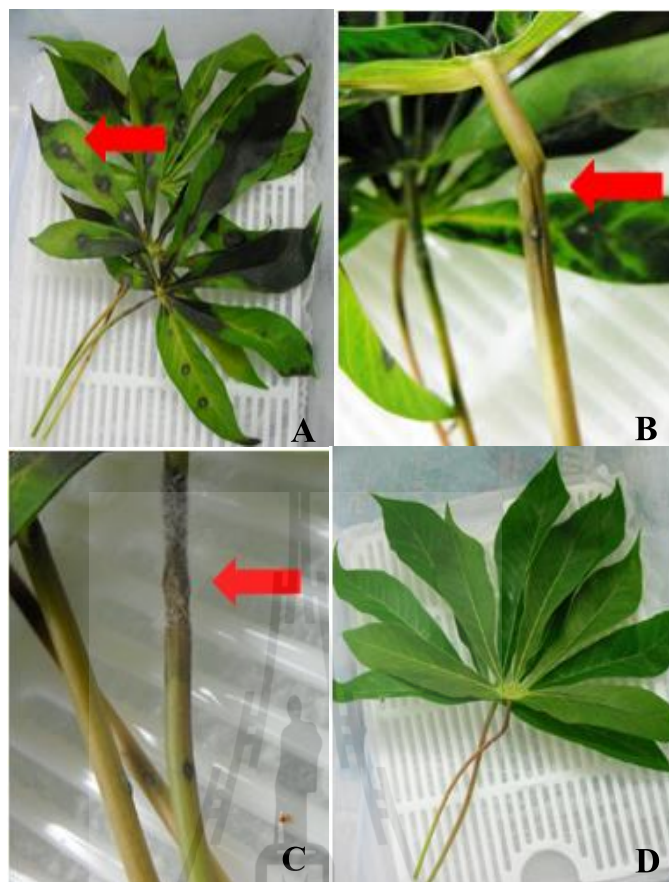


## 4.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรกคโนส (pathogenicity and virulency test)

### 4.2.1 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแอนแทรกคโนสในมันสำปะหลัง

จากการปลูกเชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังจำนวน 38 ไอโซเลตและเชื้อราที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงจำนวน 2 ไอโซเลต คือ *C. gloeosporioides* (CG) และ *C. capsici* (CC) จากภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมเชื้อทั้งหมด 40 ไอโซเลต โดยเตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ความเข้มข้น  $10^6$ – $10^8$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตรให้กับมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 พบว่า เชื้อราทั้ง 38 ไอโซเลตเป็นเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกคโนส โดยแสดงอาการของโรคครั้งแรกในวันที่ 2 หลังทำการปลูก เชื้อลักษณะอาการที่พบ คือ 1. อาการใบจุดสีน้ำตาลถึงสีดำดังแสดงในภาพ 4.7 (A) 2. อาการก้านมันสำปะหลังแสดงอาการก้านเหี่ยวและหักดังแสดงในภาพ 4.7 (B) 3. อาการก้านใบเกิดแผลสีน้ำตาลเมื่อเป็นมากจะมีขนาดแผลกว้างขึ้นดังแสดงในภาพ 4.7 (C)

เชื้อสาเหตุโรคที่มีระดับความรุนแรงสูงที่สุดในวันที่ 5 หลังการปลูกเชื้อที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 5 คือเกิดแผลมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ คือ ไอโซเลต SEL8, Sca03, SRTLF02, SRTLSY, SRTLSY01, NKSTKLS01, NKSTKBS02, NKSTFBS02, LBLB02, KBLSY05, KBSF05 และ KBLSY01 ส่วนไอโซเลตที่มีความรุนแรงน้อยที่สุดที่ระดับ 2 คือ เกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ ได้แก่ ไอโซเลต NKSTKLS03, SRTLSY03 และ KBSF01 (ตารางที่ 4.2) ส่วนกรรมวิธีที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (Control) ไม่แสดงอาการของโรคดังแสดงในภาพที่ 4.7 (D)



ภาพที่ 4.7 ลักษณะของมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสหลังปลูกลงเป็นเวลา 5 วัน (A) ใบมันสำปะหลังที่แสดงลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลถึงสีดำหลังปลูกลงไอโซเลต NKSTFBS02 (B) ก้านมันสำปะหลังที่แสดงลักษณะอาการก้านเหี่ยวและหักหลังปลูกลงไอโซเลต SRTL01 (C) ก้านมันสำปะหลังที่แสดงลักษณะอาการแผลไหม้สีน้ำตาลถึงสีดำหลังปลูกลงไอโซเลต SEL8 (D) มันสำปะหลังที่ไม่ได้ทำการปลูกลง (Control) ไม่แสดงอาการของโรค

#### 4.2.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในพืชอาศัยอื่น

จากการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนสำปะหลังจำนวน 38 ไอโซเลต และเชื้อราที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงจำนวน 2 ไอโซเลต คือ *C. gloeosporioides* (CG) และ *C. capsici* (CC) จากภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รวมเชื้อทั้งหมด 40 ไอโซเลต โดยเตรียมสารละลายสปอร์เชื้อราที่มีความเข้มข้น  $10^6 - 10^8$  โคนิเดียต่อมิลลิลิตรลงบนผลพริกพันธุ์ซูเปอร์ฮอต ตามวิธีของ Magdalena et al. (2012) พบว่าเชื้อราทั้ง 38 ไอโซเลต สามารถก่อให้เกิดโรคในแอนแทรคโนสในผลพริกได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ Reference isolate ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.8 (A) และ (C) โดยเริ่มแสดงอาการของโรคครั้งแรกในวันที่ 2 หลังทำการปลูกเชื้อลักษณะอาการแผลสีน้ำตาลเป็นวงกลม และยุบตัวลงบนผลพริก เมื่อเป็นมากจะมีขนาดแผลกว้างขึ้นดังภาพ 4.8 (A) มีระดับความรุนแรงสูงที่สุดในวันที่ 5 หลังการปลูกเชื้อ โดยไอโซเลตที่มีความรุนแรงที่สุดอยู่ในระดับ 4 ดังภาพ 4.8 (B) คือ ไอโซเลต SEL8, PCBB02, PCBB03 และ NKSTKLS01 ส่วนไอโซเลต ที่มีความรุนแรงน้อยที่สุดที่ระดับที่ 2 คือ เกิดแผลน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของผล ดังภาพ 4.8 (D) คือ ไอโซเลต SLC032, C13, SRTLF01, SRTLF02, SRTLSY03, NKSTKLS03, NKSTKBS02, NKSTKBS05, NKSTFBS02, LBLB02, CPLB02, CPSF05, KBSF01, KBSF02, KBSF03, KBSF04, KBSF05 และ KBLSY01 (ตารางที่ 4.2) ส่วนกรรมวิธีที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อ (Control) ไม่แสดงอาการของโรค ดังภาพที่ 4.8 (E)





ภาพที่ 4.8 แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส บนพริกชี้หนูพันธุ์ซูเปอร์ฮอต หลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 วัน(A) เชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลต CG สายพันธุ์อ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (B) เชื้อราไอโซเลต PCBB02 เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง (C) เชื้อราไอโซเลต SRTLF01 เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง (D) เชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต CC สายพันธุ์ อ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (E) ชุดควบคุม (Control) ไม่แสดงอาการของโรค

ตารางที่ 4.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้บนมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ พริกขี้หนูพันธุ์ซูเปอร์ฮอต

ไอโซเลต	ระดับความรุนแรงของเชื้อ	
	มันสำปะหลัง	พริกขี้หนู
SEL8	5	4
SLC032	3	2
SLC071	4	3
CHTM11	4	3
C13	4	2
LSS	4	3
Sca03	5	3
PCBB02	4	4
PCBB03	4	4
SRTLF01	4	2
SRTLF02	5	2
SRTLF03	4	3
SRTLF04	4	3
SRTLSY	5	3
SRTLSY01	5	3
SRTLSY02	3	3
SRTLSY03	2	2
NKSTKLS01	4	4
NKSTKLS02	4	3
NKSTKLS03	2	2
NKSTKBS02	3	2
NKSTKBS05	4	2

หมายเหตุ : การประเมินความรุนแรงของโรค (disease scores) โดยให้คะแนน 1-5 ดังนี้ 1 = ไม่ก่อให้เกิดโรค, 2 = เกิดโรคน้อยกว่า 25% ของพื้นที่ใบ/ผล 3 = เกิดโรค 25-50% ของพื้นที่ใบ/ผล 4 = เกิดโรคมากกว่า 50-75% ของพื้นที่ใบ/ผล 5 = เกิดโรคมากกว่า 75% ของพื้นที่ใบ/ผล

ตารางที่ 4.2 การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อที่แยกได้บนมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และ พริกขี้หนูพันธุ์ชูปเปอร์ฮอต (ต่อ)

ไอโซเลต	ระดับความรุนแรงของเชื้อ	
	มันสำปะหลัง	พริกขี้หนู
NKSTFBS01	4	3
NKSTFBS02	5	2
LBLB02	5	2
LBBS01	4	3
CPLB02	4	2
CPSF05	3	2
KBSF01	2	2
KBSF02	3	2
KBSF03	3	2
KBSF04	3	2
KBSF05	5	2
KBLSY01	5	2
KBLSY02	4	3
KBLSY03	4	3
KBLSY04	3	3
KBLSY05	5	3
CG	1	3
CC	1	3
Control (distilled water)	1	1

หมายเหตุ : การประเมินความรุนแรงของโรค (disease scores) โดยให้คะแนน 1-5 ดังนี้ 1= ไม่ก่อให้เกิดโรค, 2 = เกิดโรคน้อยกว่า 25% ของพื้นที่ใบ/ผล 3 = เกิดโรค 25-50% ของพื้นที่ใบ/ผล 4 = เกิดโรคมากกว่า 50-75% ของพื้นที่ใบ/ผล 5 = เกิดโรคมากกว่า 75% ของพื้นที่ใบ/ผล

### 4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลัง

#### 4.3.1 การเจริญของโคโคนี

ผลการวัดอัตราการเจริญของโคโคนี ของเชื้อบนอาหาร HPDA พบว่าเชื้อแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเร็วในช่วง 3, 5 และ 7 วัน โดยเชื้อราไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญมากที่สุด คือ ไอโซเลต CHTM 11 มีขนาดของโคโคนีเท่ากับ  $8.97 \pm 0.05 \times 8.97 \pm 0.05$  เซนติเมตรและเชื้อราไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญน้อยที่สุด คือ ไอโซเลต SRTLF01 มีขนาดของโคโคนีเท่ากับ  $6.8 \pm 0.08 \times 6.8 \pm 0.14$  เซนติเมตรแสดงในตารางที่ 4.3

#### 4.3.2 ลักษณะและสีของโคโคนี

เชื้อราแต่ละไอโซเลตที่เลี้ยงบนอาหาร HPDA มีลักษณะสีโคโคนีแตกต่างกัน และเมื่อนำมาจัดกลุ่มตามสีของโคโคนีหลังจากเลี้ยงบนอาหาร HPDA เป็นเวลา 14 วัน สามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 โคนีเดี่ยวมีสีเทา (gray) จำนวน 13 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต NKSTFBS02, NKSTKLS01, SRTLSY, SRTLSY02, KBSF02, KBSF03, KBSF04, KBSF05, CHTM11, SCA03, C13, SLC032 และ KBLSY05 (ดังภาพที่ 4.9) กลุ่มที่ 2 โคนีสีเทาปนเขียว (gray/green) จำนวน 4 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต SRTLF03, SRTLF04, LSS และ SRTLF01 (ดังภาพที่ 4.10) กลุ่มที่ 3 โคนีมีสีส้ม (orange) จำนวน 4 ไอโซเลตคือไอโซเลต LBBS01, CPSF05, PCBB03 และ PCBB02 (ดังภาพที่ 4.11) กลุ่มที่ 4 โคนีมีสีเขียวมะกอก (olive) จำนวน 5 ไอโซเลตคือ ไอโซเลต SRTLSY01, CG, CC, CPSF02 และ SRTLF02 (ดังภาพที่ 4.12) กลุ่มที่ 5 โคนีมีสีขาว (white) จำนวน 14 ไอโซเลตคือไอโซเลต SEL8, SLC071, NKSTFBS01, NKSTKLS02, NKSTKLS03, NKSTKBS02, NKSTKBS05, LBLB02, SRTLSY03, KBSF01, KBLSY01, KBLSY02, KBLSY03 และ KBLSY04 (ดังภาพที่ 4.13) ลักษณะโคโคนีจะมีความแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลตและแตกต่างจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ คือ เส้นใยจะมีลักษณะฟูละเอียด เจริญแนบไปกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อบางไอโซเลตจะมีการสร้าง setae ดังภาพที่ 4.14 และบางไอโซเลตมีการสร้างกลุ่มเส้นใยลักษณะคล้าย Sclerotia ดังภาพที่ 4.15

ตารางที่ 4.3 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HPDA ที่อายุ 3,5 และ 7 วัน

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต (วัน)			สรุปลักษณะการเจริญ
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	
SRTLF01	3.3x3.27	4.97x4.97	6.8x6.8	S
SRTLF04	4.43x4.46	6.75x6.77	8.87x8.90	F
SRTLSY	4.12x4.20	6.60x6.67	8.70x8.97	F
SRTLSY02	4.26x4.35	6.65x6.77	8.87x8.92	F
SRTLF02	3.60x3.61	5.37x5.4	7.42x7.35	S
SRTLSY01	3.87x3.92	6.12x6.12	8.42x8.37	F
SRTLF03	4.15x4.12	6.25x6.32	8.70x8.62	F
SRTLSY03	4.55x4.50	6.72x6.77	8.95x8.82	F
NKSTKBS02	4.15x4.12	6.32x6.32	8.52x8.65	F
NKSTKLS03	3.90x4.00	6.17x6.25	8.45x8.60	F
NKSTFBS02	4.27x4.32	6.40x6.52	8.97x8.97	F
NKSTKBS05	4.30x4.35	6.60x6.55	8.65x8.72	F
NKLTKLS01	4.20x4.17	6.37x6.37	8.62x8.60	F
NKSTKLS02	4.15x4.12	6.40x6.52	8.65x8.72	F
NKSTFBS01	4.55x4.67	7.20x7.25	8.95x8.97	F
PCBB02	4.42x4.52	6.72x6.72	8.72x8.75	F
PCBB03	4.42x4.50	6.42x6.47	8.57x8.70	F
SCA03	4.00x3.97	6.32x5.95	7.55x7.22	F
SLC032	4.57x4.60	7.30x7.22	8.92x9.00	F
SLC071	4.55x4.62	7.37x7.4	8.95x8.97	F
SEL8	4.75x4.70	7.22x7.65	8.97x8.95	F
CHTM11	4.75x4.72	7.57x7.57	8.97x8.97	F
LSS	4.37x4.35	6.75x6.85	8.95x8.97	S

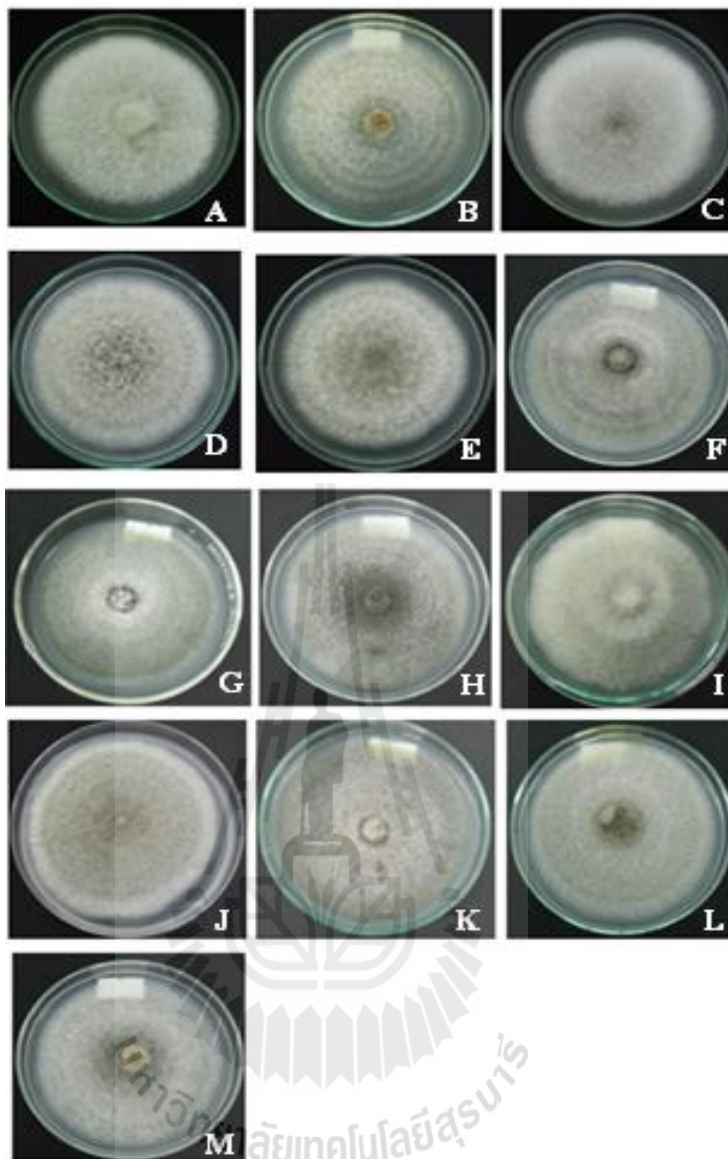
หมายเหตุ : F (Fast) = โคนีของเชื้อรามี้อัตราการเจริญเติบโตเร็ว โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน, S (Slow) = โคนีของเชื้อรามี้อัตราการเจริญเติบโตช้า โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 14 วัน



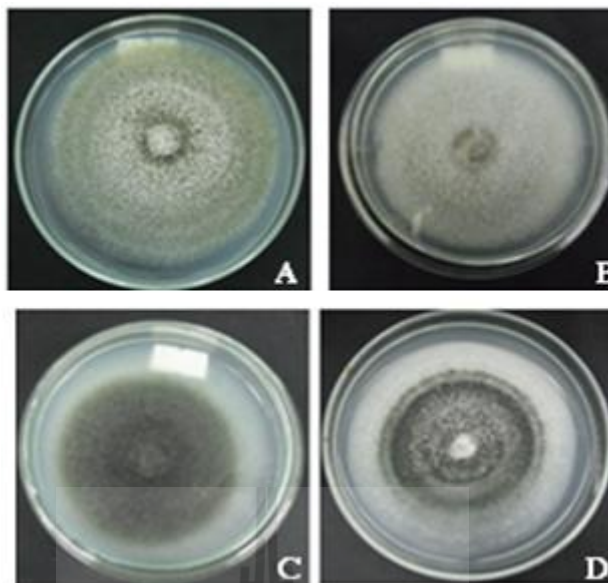
ตารางที่ 4.3 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังบนอาหารเลี้ยงเชื้อ HPDA ที่อายุ 3, 5 และ 7 วัน (ต่อ)

ไอโซเลต	อัตราการเจริญเติบโต (วัน)			สรุปลักษณะการเจริญ
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	
C13	4.87x4.90	7.60x7.57	8.95x8.97	F
LBBS01	4.05x4.02	6.70x6.55	8.67x8.55	F
LBLB02	4.10x4.12	6.55x6.52	8.62x8.60	F
KBLSY05	4.15x4.17	6.77x6.77	8.87x8.82	F
KBSF05	3.90x4.05	7.00x7.00	8.97x8.87	F
KBLSY02	4.7x4.77	6.82x6.82	8.92x8.97	F
KBSF03	4.12x4.17	6.92x6.92	8.97x8.97	F
KBLSY03	4.22x4.27	6.72x6.70	8.47x8.57	F
KBSF02	3.87x3.92	6.47x6.50	8.80x8.67	F
KBLSY01	4.50x4.40	7.52x7.52	8.95x8.97	F
KBSF04	3.47x3.52	6.40x6.35	8.77x8.82	F
KBSF01	4.15x4.12	6.72x6.77	8.97x8.97	F
KBLSY04	4.07x4.07	6.37x6.35	7.52x7.60	S
CPSF05	4.1x4.1	6.77x6.55	8.87x8.85	F
CPSF02	4.42x4.37	6.57x6.42	7.57x7.56	S
CG	4.35x4.3	7.00x6.87	8.87x8.75	F
CC	3.87x3.82	5.85x5.95	7.62x7.67	S

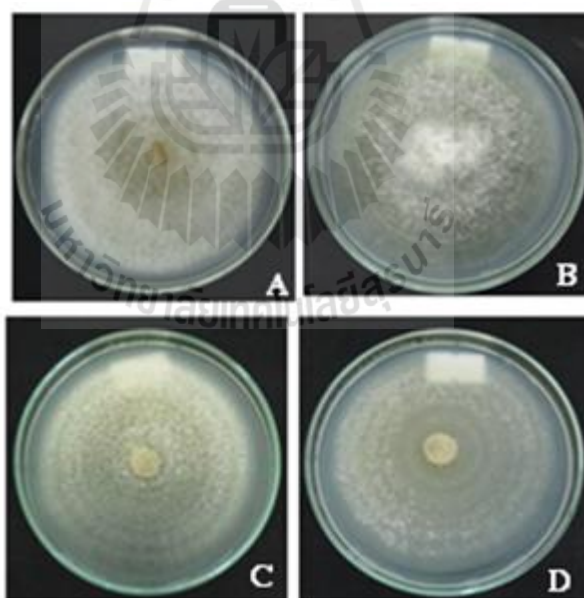
หมายเหตุ : F (Fast) = โคลนของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว โดยจะเจริญเต็มงานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน, S (Slow) = โคลนนี้ของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า โดยจะเจริญเต็มงานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 14 วัน



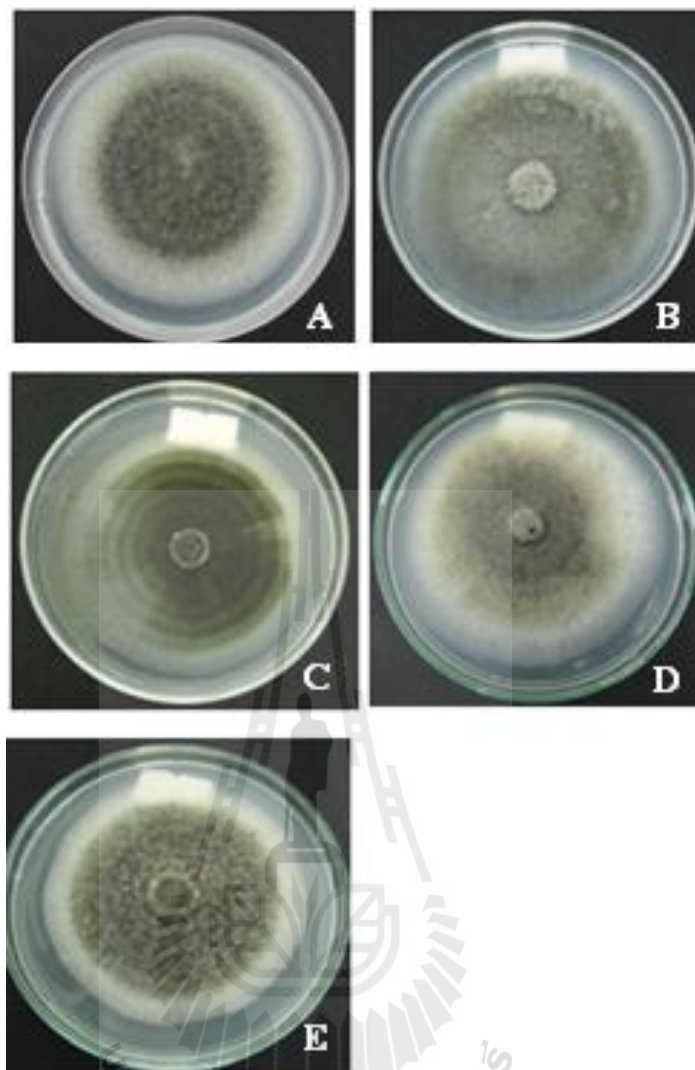
ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่มที่ 1 โคโลนีสีเทา จำนวน 13 ไอโซเลต (A) ไอโซเลต NKSTFBS02 (B) ไอโซเลต NKSTKLS01 (C) ไอโซเลต SRTLSY (D) ไอโซเลต SRTLSY02 (E) ไอโซเลต KBSF02 (F) ไอโซเลต KBSF03 (G) ไอโซเลต KBSF04 (H) ไอโซเลต KBSF05 (I) ไอโซเลต CHTM11 (J) ไอโซเลต SCA03 (K) ไอโซเลต C13 (L) ไอโซเลต SLC032 (M) ไอโซเลต KBLSY05



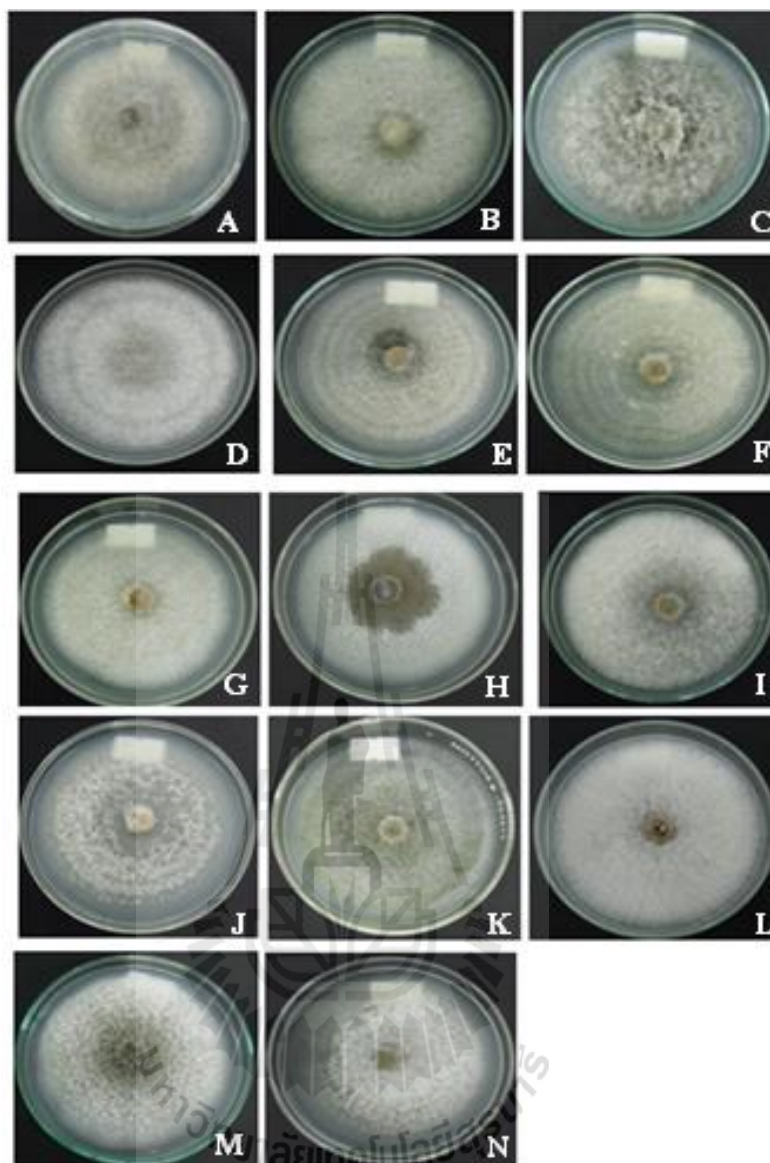
ภาพที่ 4.10 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่มที่ 2 โคโลนีสีเทาปนเขียว จำนวน 4 ไอโซเลต (A) ไอโซเลต SRTLF03 (B) ไอโซเลต SRTLF04 (C) ไอโซเลต LSS (D) ไอโซเลต SRTLF01



ภาพที่ 4.11 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่มที่ 3 โคโลนีสีส้ม จำนวน 4 ไอโซเลต (A) ไอโซเลต LBBS01 (B) ไอโซเลต CPSF05 (C) ไอโซเลต PCBB03 (D) ไอโซเลต PCBB02



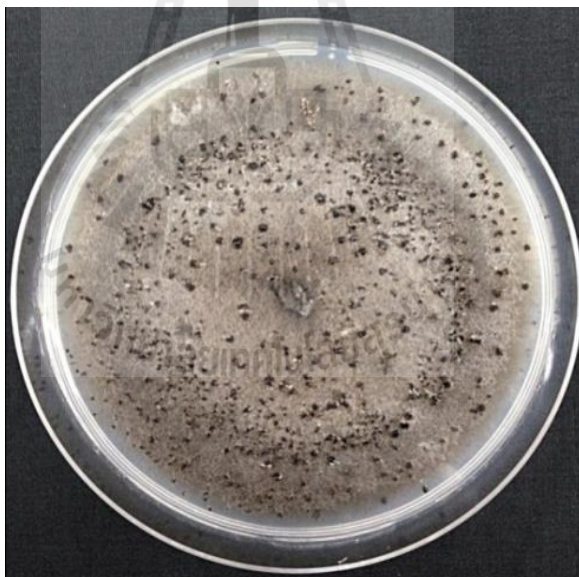
ภาพที่ 4.12 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่มที่ 4 โคโลนีสีเขียวมะกอก จำนวน 5 ไอโซเลต (A) ไอโซเลต SRTL5Y01 (B) ไอโซเลต CG (C) ไอโซเลต CC (D) ไอโซเลต CPSF02 (E) ไอโซเลต SRTL5F02



ภาพที่ 4.13 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อราในกลุ่มที่ 5 โคโลนีสีขาว จำนวน 14 ไอโซเลต (A) ไอโซเลต SEL8 (B) ไอโซเลต SLC071 (C) ไอโซเลต NKSTFBS01 (D) ไอโซเลต NKSTKLS02 (E) ไอโซเลต NKSTKLS03 (F) ไอโซเลต NKSTKBS02 (G) ไอโซเลต NKSTKBS05 (H) ไอโซเลต LBLB02 (I) ไอโซเลต SRTLSY03 (J) ไอโซเลต KBSF01 (K) ไอโซเลต KBLSY01 (L) ไอโซเลต KBLSY02 (M) ไอโซเลต KBLSY03 (N) ไอโซเลต KBLSY04



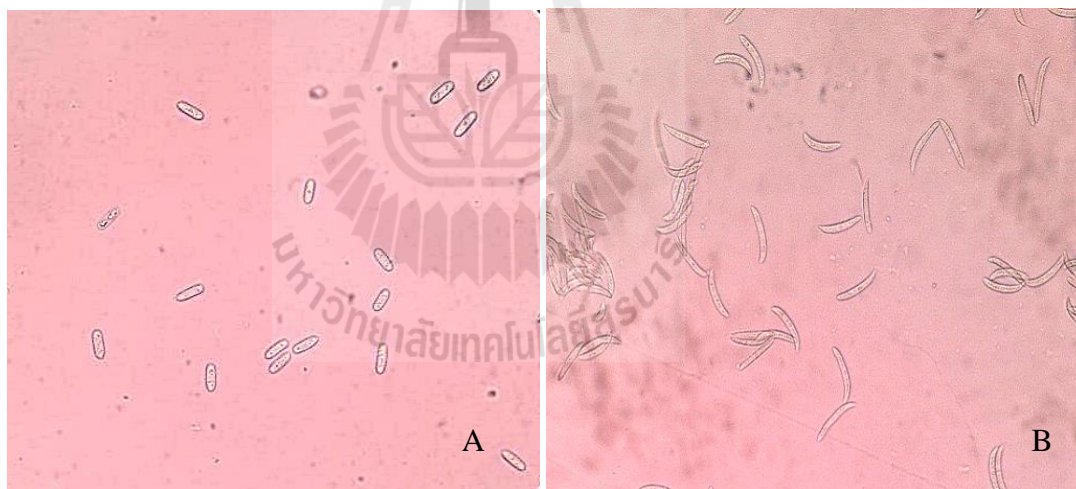
ภาพที่ 4.14 แสดงลักษณะของ setae ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังไอโซเลต SRTL01 ที่อายุ 10 วันบนอาหาร HPDA



ภาพที่ 4.15 แสดงการสร้าง setae ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังไอโซเลต SLC032 ที่อายุ 14 วันบนอาหาร HPDA

### 4.3.3 ลักษณะและขนาดของโคนิเดีย

ผลการวัดขนาดของโคนิเดียของเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลังที่รวบรวมได้จากแหล่งปลูกต่าง ๆ จำนวน 38 ไอโซเลต พบว่าขนาดของโคนิเดียแต่ละไอโซเลตส่วนใหญ่มีขนาดใกล้เคียงกัน จะมีเพียงบางไอโซเลตที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกันออกไปโดยลักษณะโคนิเดียที่พบมี 2 ลักษณะรูปร่างแตกต่างกันดังนี้ 1. โคนิเดียมีรูปร่างทรงกระบอก หัวท้ายมน (Cylindrical) เช่น ไอโซเลต SEL8 ดังแสดงในภาพ 4.16 (A) ขนาดเฉลี่ยประมาณ  $4.75 \pm 0.54 \times 13.75 \pm 0.50$  ไมครอน 2. โคนิเดีย มีรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (Falcate) เช่น ไอโซเลต SRTL01 ดังแสดงในภาพ 4.16 (B) ขนาดเฉลี่ยประมาณ  $3.50 \pm 0.49 \times 27.75 \pm 0.7$  ถึง  $3.50 \pm 0.49 \times 28.00 \pm 0.60$  ไมครอน และพบว่า เชื้อไอโซเลต SRTL01, CC, SLC032 และ KBSF02 ที่เลี้ยงบนอาหาร HPDA ที่อายุ 7-10 วัน มีการสร้าง setae ดังแสดงในภาพ 4.14 นอกจากนี้ ยังพบว่า เชื้อราไอโซเลต C13, SLC032, SLC071, SRTL01, SRTL02, SRTL03, SRTL04, SRTLSY, SRTLSY02, KBSF03 และ CC ที่เลี้ยงบนอาหาร HPDA ที่อายุ 14 วัน มีการสร้าง Sclerotiasetae บนกลุ่มเส้นใยคล้ายเม็ด Sclerotia ดังแสดงในภาพ 4.15 โดยรูปร่างและขนาดโคนิเดียทั้งหมดแสดงในตารางที่ 4.4



ภาพที่ 4.16 แสดงลักษณะโคนิเดียของเชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส (A) ลักษณะรูปทรงกระบอก หัวท้ายมน (Cylindrical) (B) ลักษณะรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว (Falcate)

ตารางที่ 4.4 ขนาดโคนี้เดียของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังและสายพันธุ์อ้างอิง  
ไอโซเลตต่าง ๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร HPDA เป็นเวลา 14 วัน

ไอโซเลต	ลักษณะโคนี้เดีย	
	รูปร่างของโคนี้เดีย	ขนาด(กว้าง xยาว) ไมโครเมตร*
SRTLF01	Falcate	3.50±0.49 x 27.75±0.7
SRTLSY02	Cylindrical	4.25±0.64 x 13.50±0.49
SRTLSY01	Cylindrical	4.90±0.54 x 13.30±0.46
SRTLF04	Cylindrical	3.75±0.5 x 27.50±0.63
SRTLSY	Cylindrical	4.75±0.54 x 13.50±0.66
SRTLF02	Cylindrical	4.46±0.49 x 22.32±0.54
NKSTKLS01	Cylindrical	4.75±0.54 x 14.00±0.49
SRTLF03	Cylindrical	5.75±0.46 x 21.50±0.80
SRTLSY03	Cylindrical	4.25±0.64 x 14.25±0.46
NKSTKBS05	Cylindrical	4.75±0.54 x 14.00±0.49
NKSTKBS02	Cylindrical	4.75±0.54 x 13.50±0.80
NKSTKLS03	Cylindrical	4.50±0.40 x 12.25±0.54
KBSF01	Cylindrical	4.25±0.46 x 14.25±0.46
CPSF05	Cylindrical	4.50±0.40 x 13.12±0.68
KBLSY03	Cylindrical	5.25±0.30 x 14.25±0.46
LBLB02	Cylindrical	5.00±0.44 x 12.75±0.94
LBBS01	Cylindrical	4.75±0.30 x 13.50±0.49
KBLSY04	Cylindrical	5.00±0.63 x 13.00±0.40
KBSF03	Cylindrical	9.75±0.30 x 18.25±0.46
KBLSY01	Cylindrical	9.50±0.46 x 18.50±0.49

\*ค่าเฉลี่ยจากการวัดขนาดโคนี้เดียจำนวน 100 โคนี้เดียต่อไอโซเลต



ตารางที่ 4.4 ขนาดโคนี้เดี่ยวของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังและสายพันธุ์อ้างอิง  
ไอโซเลตต่าง ๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร HPDA เป็นเวลา 14 วัน (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะโคนี้เดี่ยว	
	รูปร่างของโคนี้เดี่ยว	ขนาด(กว้างxยาว) ไมโครเมตร*
KBLSY05	Cylindrical	9.25±0.46 x 18.25±0.64
KBLSY02	Cylindrical	9.25±0.46 x 17.87±0.63
SCA03	Cylindrical	5.25±0.54 x 13.50±0.66
CHTM11	Cylindrical	4.75±0.54 x 13.75±0.50
SEL8	Cylindrical	5.00±0.63 x 13.5±0.66
SLC071	Cylindrical	5.00±0.44 x 13.25±0.64
SLC032	Cylindrical	5.00±0.44 x 14.00±0.49
CPSF02	Cylindrical	4.75±0.54 x 13.50±0.49
PCBB02	Cylindrical	5.00±0.44 x 13.75±0.50
PCBB03	Cylindrical	4.25±0.46 x 13.25±0.64
CL003	Cylindrical	3.75±0.50 x 6.50±0.49
KBSF02	Cylindrical	4.75±0.54 x 13.5±0.66
KBSF04	Cylindrical	5.12±0.47 x 13.62±0.57
KBSF05	Cylindrical	5.25±0.54 x 13.75±0.50
NKSTFBS01	Cylindrical	4.75±0.30 x 13.50±0.49
NKSTFBS02	Cylindrical	4.875±0.47 x 13.5±0.49
NKSTKLS02	Cylindrical	4.75±0.47 x 13.00±0.54
LSS	Cylindrical	4.87±0.47 x 13.25±0.64
C13	Cylindrical	5.25±0.54 x 13.25±0.64
CG	Cylindrical	5.12±0.47 x 13.75±0.50
CC	Falcate	3.50±0.49 x 28.00±0.60

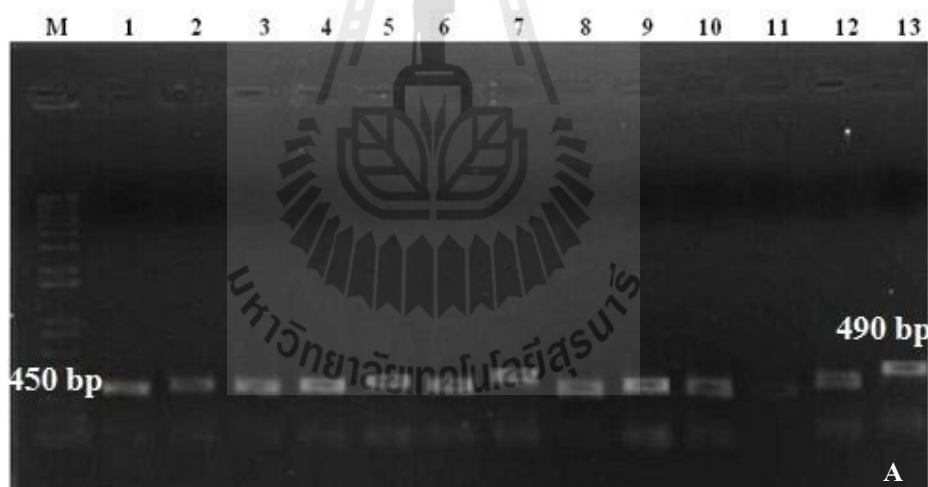
\*ค่าเฉลี่ยจากการวัดขนาดโคนี้เดี่ยวจำนวน 100 โคนี้เดี่ยวต่อไอโซเลต

#### 4.4 การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังด้วยวิธีชีวโมเลกุล

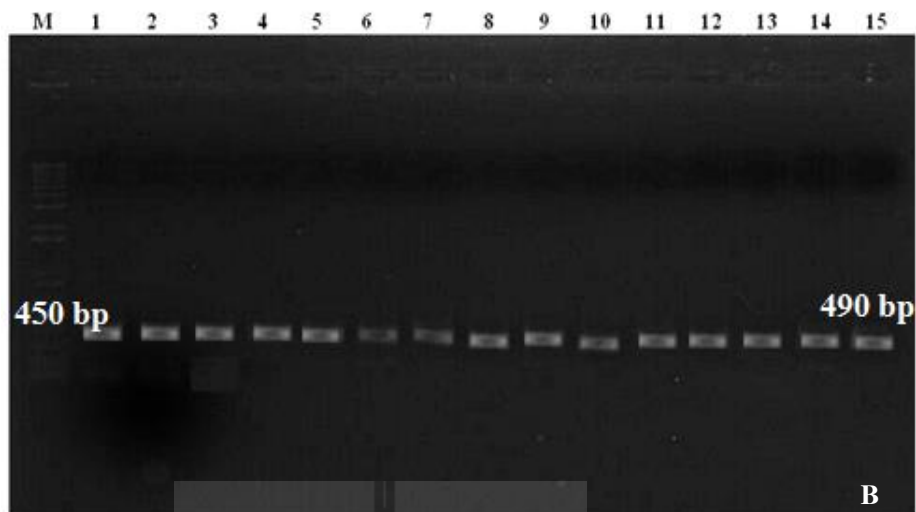
##### 4.4.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

##### 4.4.1.1 การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR

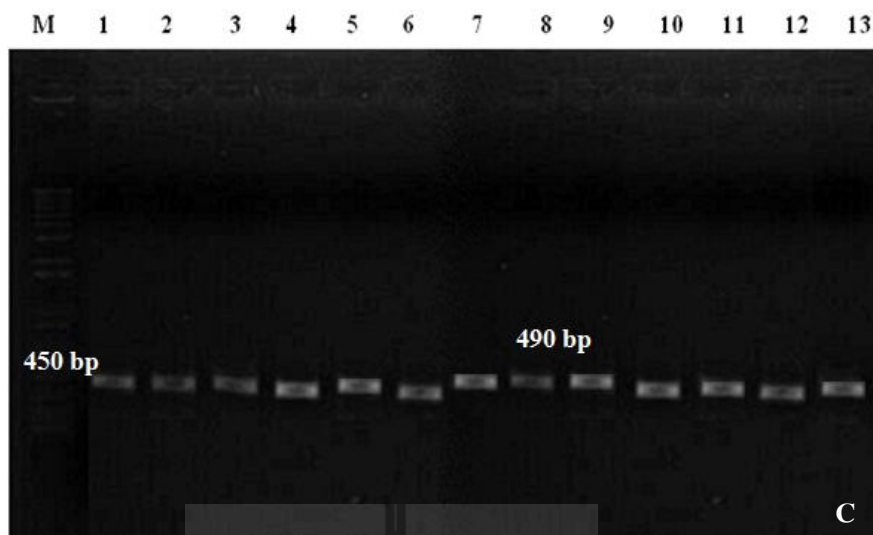
จากเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง (universal primers) คือ ไพรเมอร์ ITS3 และ ITS4 (Medeiros et al., 2010) พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังได้ โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาดคือ ขนาด 450 bp และ 490 bp โดยเชื้อเกือบทุกไอโซเลตมีดีเอ็นเอขนาด 450 bp เท่ากับขนาดที่ได้จากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) จากพริกที่ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ยกเว้นไอโซเลต SLC032, SRTLF01, NKSTKBS02, NKSTKBS05, NKSTKLS02, NKSTFBS01 และKBSF01 ที่ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 490 bp เท่ากับชิ้นส่วนที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อ *C. capsici* (CC) จากพริกที่ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ดังแสดงในภาพที่ 4.17 (A), (B), (C) และ D



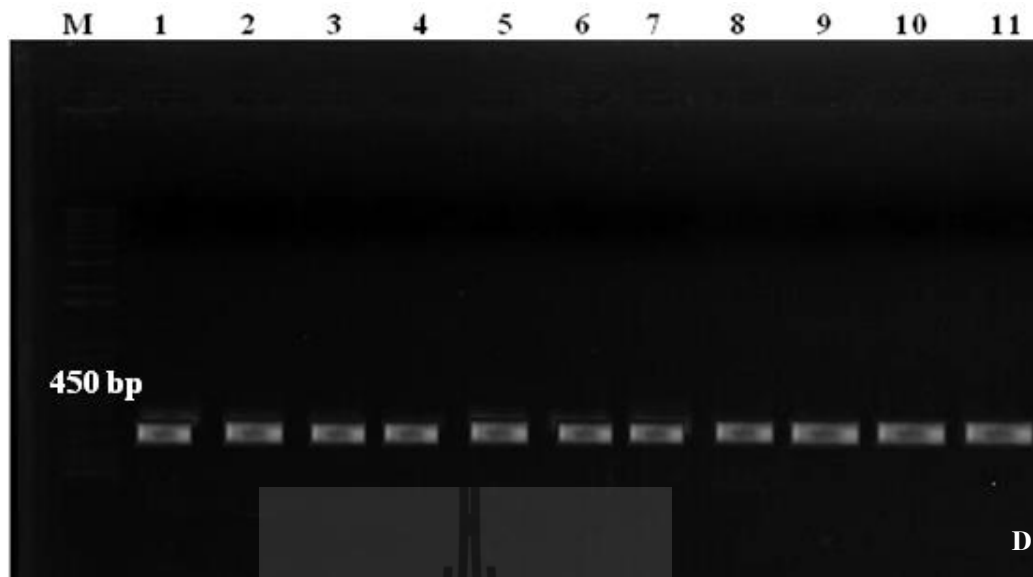
ภาพที่ 4.17 (A) แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = เชื้อราไอโซเลตอ้างอิง CG, lane 2 = เชื้อราไอโซเลต CHTM11, lane 3 = เชื้อราไอโซเลต SEL8, lane 4 = เชื้อราไอโซเลต SCA03, lane 5 = เชื้อราไอโซเลต LSS, lane 6 = เชื้อราไอโซเลต C13, lane 7 = เชื้อราไอโซเลต SLC032, lane 8 = เชื้อราไอโซเลต SLC071, lane 9 = เชื้อราไอโซเลต PCBB02, lane 10 = เชื้อราไอโซเลต PCBB03, lane 11 = เชื้อราไอโซเลต LBLB02, lane 12 = เชื้อราไอโซเลต LBBS01, lane 13 = เชื้อราไอโซเลตอ้างอิง CC



ภาพที่ 4.17 (B) แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = เชื้อราไอโซเลตอ้างอิง CG, lane 2 = เชื้อราไอโซเลต CPLB02, lane 3 = เชื้อราไอโซเลต CPSF05, lane 4 = เชื้อราไอโซเลต NKSTKLS03, lane 5 = เชื้อราไอโซเลต LBBS01, lane 6 = เชื้อราไอโซเลต NKSTKBS05, lane 7 = เชื้อราไอโซเลต SRTLFO2, lane 8 = เชื้อราไอโซเลต SRTLFO3, 9 = เชื้อราไอโซเลต SRTLFO4, lane 10 = เชื้อราไอโซเลต KBSFO2, lane 11 = เชื้อราไอโซเลต SRTLFSY, lane 12 = เชื้อราไอโซเลต SRTLFSY01, lane 13 = เชื้อราไอโซเลต SRTLFSY02, lane 14 = เชื้อราไอโซเลต SRTLFO1, lane 15 = เชื้อราไอโซเลตอ้างอิง CC



ภาพที่ 4.17 (C) แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลตด้วยเทคนิคPCR lane M= Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = เชื้อราไอโซเลตอ้างอิง CG, lane 2 = เชื้อราไอโซเลต SRTLSY01, lane 3 = เชื้อราไอโซเลต SRTLSY03, lane 4 = เชื้อราไอโซเลต NKSTKLS01, lane 5 = เชื้อราไอโซเลต NKSTKLS02, lane 6 = เชื้อราไอโซเลต NKSTKLS03, lane 7 = เชื้อราไอโซเลต NKSTKBS02, lane 8 = เชื้อราไอโซเลต NKSTKBS05, 9 = เชื้อราไอโซเลต NKSTFBS01, lane 10 = เชื้อราไอโซเลต NKSTFBS02, lane 11 = เชื้อราไอโซเลต KBSF01, lane 12 = เชื้อราไอโซเลต LBLB02, lane 13 = เชื้อราไอโซเลตอ้างอิง CC



ภาพที่ 4.17 (D) แสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR lane M = Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = เชื้อราไอโซเลตอ้างอิง CG, lane 2 = เชื้อราไอโซเลต KBSF03, lane 3 = เชื้อราไอโซเลต KBSF04, lane 4 = เชื้อราไอโซเลต KBSF05, lane 5 = เชื้อราไอโซเลต KBLSY01, lane 6 = เชื้อราไอโซเลต KBLSY02, lane 7 = เชื้อราไอโซเลต KBLSY03, lane 8 = เชื้อราไอโซเลต KBLSY04, 9 = เชื้อราไอโซเลต KBLSY05, lane 10 = เชื้อราไอโซเลต KBSF01, 11 = เชื้อราไอโซเลตอ้างอิง CC

#### 4.4.2 การยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังด้วยวิธี DNA sequencing

จากการยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง โดยนำ PCR product บริสุทธิ์ ส่งตรวจโดยใช้บริการของบริษัทแปซิฟิกไบโอเทคโนโลยีแล้วนำผลการตรวจที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือน (identity) หรือความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล (homology or similarity search) เพื่อวิเคราะห์และทำนายลักษณะเพื่อหาชนิดและความหลากหลายของเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้โปรแกรม BLASTS บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) จากผลการหาลำดับเบส (DNA Sequencing) ของเชื้อสาเหตุโรคแล้ว พบว่า เชื้อส่วนใหญ่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene* และ *C. boninense* (ภาคผนวก ข) โดยมีความคล้ายคลึงกันถึง 93-100 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 4.5

โดยเชื้อราไอโซเลต SEL8, NKSTFBS02, LBLB02 และ KBLSY01 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. gloeosporioides* Accession number KF773863, DQ454002, GU222369 และ KF773852 ตามลำดับเชื้อราไอโซเลต KBLSY05 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. boninense* 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. boninense* Accession number DQ286167 ในฐานข้อมูล GeneBank เชื้อราไอโซเลต SLC032 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. lindemuthianum* 98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. lindemuthianum* Accession number KJ939273 ในฐานข้อมูล GeneBank เชื้อราไอโซเลต SRTLF01 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. capsici* 99 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. capsici* Accession number AB859751 ในฐานข้อมูล GeneBank และเชื้อราไอโซเลต NKSTKBS02, NKSTKLS02, NKSTKBS05 และ NKSTKLS03 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene* 99-100 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene* Accession number JX139578, JX131331, JX258732 และ KC816043 ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* แต่ละสปีชีส์จะสามารถเข้าทำลายมันสำปะหลังที่ระดับความรุนแรงแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.5 ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบส (DNA sequencing) ของเชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส

ไอโซเลต	รหัสของเชื้อที่ใช้ในการเปรียบเทียบ (accession number)	การเปรียบเทียบความเหมือน (Sequence alignment)		เชื้อที่มีความใกล้เคียงกัน (genus and species)
		ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์	เปอร์เซ็นต์ ความ เหมือน	
		SEL8	KF773863.1	
CG	JQ922131.1	302/308	98%	<i>C. gloeosporioides</i>
SLC032	KJ939273.1	120/122	98%	<i>C. lindemuthianum</i>
CC	HQ271467.1	308/311	99%	<i>C. capsici</i>
CHTM11	HQ328013.1	312/316	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
SLC071	HM855214.1	432/436	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
Sca03	JF710571.1	209/224	93%	<i>C. gloeosporioides</i>
SRTLFO1	AB859751.1	231/257	99%	<i>C. capsici</i>
C13	JF710571.1	215/227	95%	<i>C. gloeosporioides</i>
PCBB02	KF180163.1	311/314	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
PCBB03	KC172072.1	298/302	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
NKSTKLS02	JX131331.1	301/304	99%	<i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i>
NKSTKLS01	FJ972604.1	298/305	98%	<i>C. gloeosporioides</i>
SRTLFO4	JQ936123.1	302/304	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
KBSFO4	EU781669.1	224/241	93%	<i>C. gloeosporioides</i>
NKSTFBS01	KC492469.1	209/224	93%	<i>C. gloeosporioides</i>
SRTLSY02	JX902426.1	301/303	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
SRTLSY03	JQ936218.1	261/267	98%	<i>C. gloeosporioides</i>
SRTLFO3	KC662170.1	305/314	97%	<i>C. gloeosporioides</i>
SRTLFO2	GU066701.1	282/288	98%	<i>C. gloeosporioides</i>
KBLSY02	KF780157.1	247/255	97%	<i>C. gloeosporioides</i>
KBSFO4	KC010546.1	269/272	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
LBLB02	GU222369.1	300/304	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
KBLSY01	KF773852.1	283/286	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
NKSTKBS02	JX139578.1	259/259	100%	<i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i>

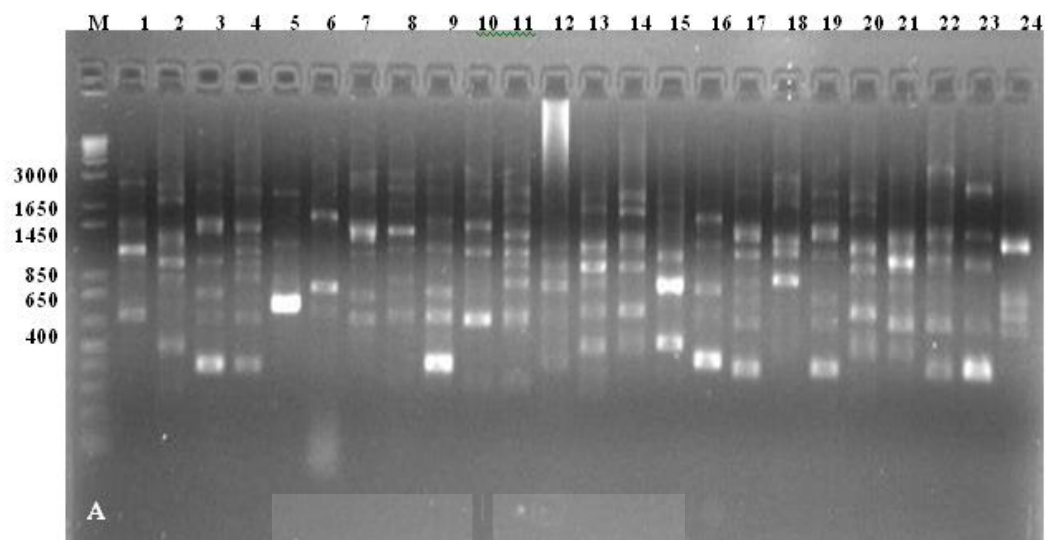
ตารางที่ 4.5 ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบส (DNA sequencing) ของเชื้อราที่แยกได้จากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส (ต่อ)

ไอโซเลต	รหัสของเชื้อที่ใช้ในการเปรียบเทียบ (accession number)	การเปรียบเทียบความเหมือน (Sequence alignment)		ชื่อที่มีความใกล้เคียงกัน (genus and species)
		ความเหมือน ของลำดับ นิวคลีโอไทด์	เปอร์เซ็นต์ ความเหมือน	
NKSTFBS02	DQ454002.1	299/303	99%	<i>C. gloeosporioides</i>
LBBS01	JQ936225.1	265/274	97%	<i>C. gloeosporioides</i>
NKSTKLS 03	KC816043.1	254/270	94%	<i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschynomene</i>
SRTL5Y 01	KC816043.1	253/266	95%	<i>C. gloeosporioides</i>
KBSF 02	DQ286167.1	221/227	95%	<i>C. boninense</i>
KBSF 03	JX258687.1	209/219	95%	<i>C. boninense</i>
KBLSY 05	FJ010200.1	224/241	93%	<i>C. boninense</i>
KBLSY03	KC816043.1	261/273	96%	<i>C. gloeosporioides</i>
KBLSY04	KF938897.1	221/227	97%	<i>C. gloeosporioides</i>
KBSF 05	JX416066.1	259/265	98%	<i>C. gloeosporioides</i>
CPSF02	JX867216.1	206/225	92%	<i>C. gloeosporioides</i>
KBSF01	FJ968583.1	226/228	93%	<i>C. boninense</i>
CPSF05	JQ936218.1	261/271	96%	<i>C. gloeosporioides</i>
SRTL5Y	KC572106.1	298/304	98%	<i>C. gloeosporioides</i>
LSS	KF938897.1	264/278	95%	<i>C. gloeosporioides</i>

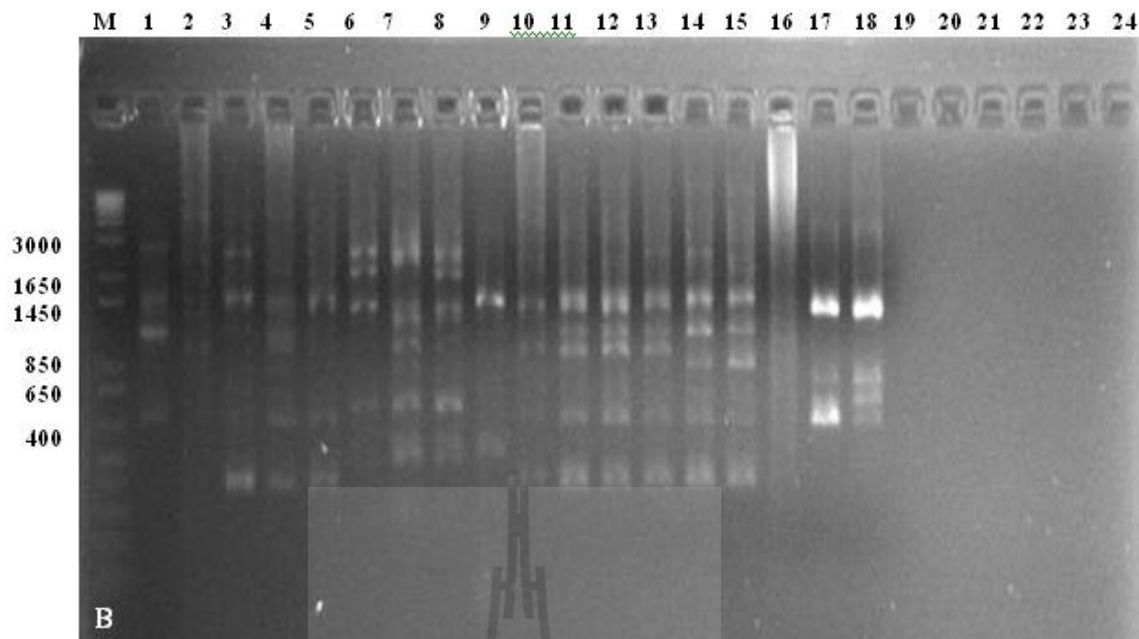


#### 4.4.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยเทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

จากเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชุด คือ OPA13 (5'CAGCACCCAC'3) OPB07 (5'GGTGACGCAG'3) และ OPQ16 (5'AGTGCAGCCA'3) พบว่า ไพรเมอร์ OPA13 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. แต่ละไอโซเลตได้อย่างชัดเจนโดยไพรเมอร์ OPA13 ให้แถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลตส่วนใหญ่ใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลต CG ที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงจำนวน 5 แถบ โดยแต่ละแถบมีขนาด 3000 bp, 1650 bp, 1400 bp, 650 bp และ 400 bp ยกเว้นเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลต SRTLFO1 ให้แถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลต CC ที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงจำนวน 4 แถบ โดยแต่ละแถบมีขนาด 3000 bp, 1650 bp, 850 bp, และ 650 bp ดังภาพที่ 4.18 (A) และ 4.18 (B) นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ OPA13 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลต SLC032 จำนวน 3 แถบ โดยแต่ละแถบมีขนาด 1700 bp, 1400 bp, และ 500 bp ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลของการจัดลำดับเบสด้วยเทคนิค DNA sequencing พบว่า มีความเหมือนคล้ายกับเชื้อรา *C. lindemuthianum* และสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลต NKSTKLS02, NKSTKLS03, NKSTKBS02 และ NKSTKBS05 จำนวน 4 แถบ โดยแต่ละแถบมีขนาด 1650 bp, 1400 bp, 650 bp, 400 bp เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลของการจัดลำดับเบสด้วยเทคนิค DNA sequencing พบว่า มีความเหมือนคล้ายกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* นอกจากนี้ ไพรเมอร์ OPA13 ยังสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลต KBSF01, KBSF02, KBSF03 และ KBLSY05 จำนวน 5 แถบ โดยแต่ละแถบมีขนาด 3000 bp, 1650 bp, 1400 bp, 1000 bp, และ 650 bp เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลของการจัดลำดับเบสด้วยเทคนิค DNA sequencing พบว่า มีความเหมือนคล้ายกับเชื้อรา *C. boninense* ดังตารางที่ 4.6



ภาพที่ 4.18 (A) ทรายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA13รูป A แสดง lane M= Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = โยโซเลต CG, lane 2= โยโซเลต SLC032, lane 3 = โยโซเลต SLC071, lane 4 = โยโซเลต LBBS01, lane 5 = โยโซเลต LBBS02, lane 6 = โยโซเลต PCBB02, lane 7 = โยโซเลต PCBB03, lane 8 = โยโซเลต SRTLSY, lane 9 = โยโซเลต SRTLSY01, lane 10 = โยโซเลต SRTLSY02, lane 11 = โยโซเลต SRTLSY03, lane 12 = โยโซเลต SRTLFO2, lane 13 = โยโซเลต SRTLFO3, lane 14 = โยโซเลต SRTLFO4, lane 15 = โยโซเลต CPSFO2, lane 16 = โยโซเลต CPSFO5, lane 17 = โยโซเลต CHTM11, lane 18 = โยโซเลต SCA03, lane 19 = โยโซเลต SEL8, lane 20= โยโซเลต C13, lane 21 = โยโซเลต LSS, lane 22 = โยโซเลต KBLSY01, lane 23 = โยโซเลต KBLSY02, lane 24= โยโซเลต CC



ภาพที่ 4.18 (B) ทรายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA13รูป B แสดง lane M= Marker 1 Kb DNA Ladder, lane 1 = ไอโซเลต CG, lane 2 = ไอโซเลต KBLSY03, lane 3 = ไอโซเลต KBLSY04, lane 4 = ไอโซเลต KBLSY05, lane 5 = ไอโซเลต KBSF01, lane 6 = ไอโซเลต KBSF02, lane 7 = ไอโซเลต KBSF03, lane 8 = ไอโซเลต KBSF04, lane 9 = ไอโซเลต KBSF05, lane 10 = ไอโซเลต NKSTKLS02, lane 11 = ไอโซเลต NKSTKLS03, lane 12 = ไอโซเลต NKSTKBS02, lane 13 = ไอโซเลต NKSTKBS05, lane 14 = ไอโซเลต NKSTFBS01, lane 15 = ไอโซเลต NKSTFBS02, lane 16 = ไอโซเลต NKSTKLS01, lane 17 = ไอโซเลต SRTLF01, lane 18 = ไอโซเลต CC

ตารางที่ 4.6 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลของตัวอย่างเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง

กลุ่ม ที่	ไอโซเลต	อัตรา การ เจริญ	สี	รูปร่าง โคนินทรีย์	ขนาดโคนินทรีย์ (ไมโครเมตร)	Setae	บริเวณที่ เข้าทำลาย	ระดับความรุนแรง		สถานที่เก็บ	เปอร์เซ็นต์ ความเหมือน คล้าย (Genbank)	ผลการศึกษาลาย พิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี RAPO PCR	เปอร์เซ็นต์ความ เหมือนคล้ายของ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
								Me	Cf				
1.	SRTLF01	S	Gray/Green	Fal.	3.50x27.50	มี	ข้อใบ	4	2	สุราษฎร์ธานี	99%	3000, 1650, 850, 650	100%
	CC	S	Olive	Fal.	3.50x28.00	มี	Ref.	1	3	Ref.	99%	3000, 1650, 850, 650	100%
2.	SLC032	F	Gray/white	Cyl.	5.00x14.00	มี	ใบ	3	2	ชลบุรี	98%	1700, 1400, 500	20%
	<i>C. lindemuthian.</i>	F	-	Cyl.	4.90-6.91x14.46- 18.93	มี	Ref.	N.T.	N.T.	Ref. (Pinto et.al., 2012)	-	-	-
3.	SRTLF03	F	Gray/Green	Cyl.	5.75x21.50	ไม่มี	ก้านใบ	4	3	สุราษฎร์ธานี	97%	1650, 1400, 1000, 650, 500	60%
	SRTLF04	F	Gray/Black	Cyl.	3.75x27.50	ไม่มี	ใบ	4	3	สุราษฎร์ธานี	99%	2000,1650,1400,650, 500	60%
	<i>C. gloeosporioid</i> f.sp. <i>manihotis</i>	F	Gray/Black	Cyl.	3.5-6.00x23.55	ไม่มี	N.T.	N.T.	N.T.	Ref. (Wokocho et.al., 2010)	-	-	-

หมายเหตุ : F (Fast) = โคนินทรีย์ของเชื้อรามีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน, S (Slow) = โคนินทรีย์ของเชื้อรามีอัตราการเจริญเติบโตช้า โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 14 วัน, Fal. (Falcate) = รูปร่างโคนินทรีย์คล้ายพระจันทร์เสี้ยว, Cyl. (Cylindrical) = รูปร่างโคนินทรีย์ทรงกระบอกหัวท้ายมน, N.T. (not) = ไม่มีข้อมูล, Ref. (Reference) = อ้างอิง, Me (*Manihot esculenta*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของมันสำปะหลัง, Cf (*Capsicum frutescens*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของพริก

ตารางที่ 4.6 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลของตัวอย่างเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง (ต่อ)

กลุ่ม ที่	ไอโซเลต	อัตรา การ เจริญ	สี	รูปร่าง โคนินเดีย	ขนาดโคนินเดีย (ไมโครเมตร)	Setae	บริเวณที่ เข้าทำลาย	ระดับความรุนแรง		สถานที่เก็บ	เปอร์เซ็นต์ ความเหมือน คล้าย (Genbank)	ผลการศึกษาลาย พิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี RAPO PCR	เปอร์เซ็นต์ความ เหมือนคล้ายของ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
								Me	Cf				
4.	C13	F	Gray/white	Cyl.	5.25x13.25	ไม่มี	ใบ	4	2	นครราชสีมา	95%	2000, 1650, 1000, 650, 500	40%
	CHTM11	F	Gray	Cyl.	4.75x13.75	ไม่มี	ใบ	4	3	นครราชสีมา	99%	1650, 1400, 650, 400	80%
	CPSF05	F	White/Orange	Cyl.	4.50x13.12	ไม่มี	ใบ	3	2	ชัยภูมิ	96%	1650, 1400, 650, 600, 500	60%
	KBSF01	F	White	Cyl.	4.25x14.25	ไม่มี	ใบ	2	2	กาญจนบุรี	93%	3000, 1650, 400	60%
	KBSF04	F	Gray	Cyl.	5.12x13.62	ไม่มี	ใบ	3	2	กาญจนบุรี	99%	3000, 2000, 1650, 650, 500	60%
	KBSF05	F	Gray/white	Cyl.	5.25x13.75	ไม่มี	ใบ	5	2	กาญจนบุรี	98%	1650, 500	40%
	KBLSY03	F	White	Cyl.	5.25x14.25	ไม่มี	ใบ	4	3	กาญจนบุรี	100%	3000, 1650	40%
	LBBS01	F	Orange	Cyl.	4.75x13.12	ไม่มี	ใบ	4	3	ลพบุรี	97%	1650, 1400, 600, 400	60%
	LBLB02	F	White	Cyl.	5.00x12.75	ไม่มี	ใบ	5	2	ลพบุรี	99%	3000, 1650, 1400, 650	80%

หมายเหตุ F (Fast) = โคลนินของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน, S (Slow) = โคลนินของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 14 วัน, Fal. (Falcate) = รูปร่างโคนินเดียคล้ายพระจันทร์เสี้ยว, Cyl. (Cylindrical) = รูปร่างโคนินเดียทรงกระบอกหัวท้ายมน, N.T. (not) = ไม่มีข้อมูล, Ref. (Reference) = อ้างอิง, Me (*Manihot esculenta*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของมันสำปะหลัง, Cf (*Capsicum frutescens*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของพริก

ตารางที่ 4.6 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลของตัวอย่างเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง (ต่อ)

กลุ่ม ที่	ไอโซเลต	อัตรา การ เจริญ	สี	รูปร่าง โคนินทรีย์	ขนาดโคนินทรีย์ (ไมโครเมตร)	Setae	บริเวณที่ เข้าทำลาย	ระดับความรุนแรง		สถานที่เก็บ	เปอร์เซ็นต์ ความเหมือน คล้าย (Genbank)	ผลการศึกษาลาย พิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี RAPO PCR	เปอร์เซ็นต์ความ เหมือนคล้ายของ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
								Me	CF				
4.	NKSTFBS01	F	white	Cyl.	4.75X13.05	ไม่มี	ใบ	4	3	นครสวรรค์	100%	1650, 1400, 650, 400	80%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	NKSTFBS02	F	Gray/white	Cyl.	4.87X13.50	ไม่มี	ใบ	5	2	นครสวรรค์	99%	1650, 1400, 650, 400	80%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	NKSTKLS01	F	Gray/white	Cyl.	4.75x14.00	ไม่มี	ใบ	4	4	นครสวรรค์	98%	1650, 1400, 650, 400	80%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	PCBB02	F	White/Orange	Cyl.	5.00x13.75	ไม่มี	ใบ	4	4	ปราจีนบุรี	99%	1650, 650	40%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	PCBB03	F	White/Orange	Cyl.	4.25x13.25	ไม่มี	ใบ	4	4	ปราจีนบุรี	99%	3000, 1650, 1400, 650	80%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	SCA03	F	Gray	Cyl.	5.00x13.75	ไม่มี	ใบ	5	3	นครราชสีมา	93%	1650,650	40%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	SEL8	F	white	Cyl.	5.00x13.75	ไม่มี	ลำต้น	5	4	นครราชสีมา	99%	3000, 1650, 1400, 650,400	100%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	SLC071	F	white	Cyl.	5.00x13.75	ไม่มี	ใบ	4	3	ชลบุรี	99%	3000, 1650, 1400, 650, 500,400	100%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	SRTL5Y	F	Gray/white	Cyl.	4.75X13.50	ไม่มี	ใบ	5	3	สุราษฎร์ธานี	98%	3000, 1650, 650	60%
											<i>C. gloeosporioides</i>		

หมายเหตุ : F (Fast) = โคนินทรีย์ของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน, S (Slow) = โคนินทรีย์ของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 14 วัน, Fal. (Falcate) = รูปร่างโคนินทรีย์คล้ายพระจันทร์เสี้ยว, Cyl. (Cylindrical) = รูปร่างโคนินทรีย์ทรงกระบอกหัวท้ายมน, N.T. (not) = ไม่มีข้อมูล, Ref. (Reference) = อ้างอิง, Me (*Manihot esculenta*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของมันสำปะหลัง, CF (*Capsicum frutescens*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของพริก

ตารางที่ 4.6 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลของตัวอย่างเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง (ต่อ)

กลุ่มที่	ไอโซเลต	อัตรา การ เจริญ	สี	รูปร่าง โคนินเดีย	ขนาดโคนินเดีย (ไมโครเมตร)	Setae	บริเวณที่ เข้าทำลาย	ระดับความรุนแรง		สถานที่เก็บ	เปอร์เซ็นต์ ความเหมือน คล้าย (Genbank)	ผลการศึกษาลาย พิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี RAPO PCR	เปอร์เซ็นต์ความ เหมือนคล้ายของ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
								Me	Cf				
4.	KBLSY01	F	white	Cyl.	9.50x18.50	ไม่มี	ใบ	5	2	กาญจนบุรี	99%	3000, 1650, 1400, 650, 400	100%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	KBLSY02	F	white	Cyl.	9.25x17.87	ไม่มี	ใบ	4	3	กาญจนบุรี	97%	3000, 1650, 1400, 650, 400	100%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	SRTLSY01	F	olive	Cyl.	4.90X13.30	ไม่มี	ใบ	5	3	สุราษฎร์ธานี	95%	3000, 1650, 1400, 650, 500,400	100%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	SRTLSY02	F	Gray/white	Cyl.	4.25X13.50	ไม่มี	ใบ	3	3	สุราษฎร์ธานี	99%	3000, 1650, 1400, 650	80%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	SRTLSY03	F	white	Cyl.	4.25X14.25	ไม่มี	ก้านใบ	2	2	สุราษฎร์ธานี	98%	1650, 1500, 1400, 650	60%
											<i>C. gloeosporioides</i>		
	CG	F	olive	Cyl.	5.12x13.75	ไม่มี	N.T.	1	3	Ref.	98%	3000, 1650, 1400, 650, 400	100%
											<i>C. gloeosporioides</i>		

หมายเหตุ : F (Fast) = โคนินของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน, S (Slow) = โคนินของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 14 วัน, Fal. (Falcate) = รูปร่างโคนินเดียคล้ายพระจันทร์เสี้ยว, Cyl. (Cylindrical) = รูปร่างโคนินเดียทรงกระบอกหัวท้ายมน, N.T. (not) = ไม่มีข้อมูล, Ref. (Reference) = อ้างอิง, Me (*Manihot esculenta*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของมันสำปะหลัง, Cf (*Capsicum frutescens*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของพริก

ตารางที่ 4.6 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลของตัวอย่างเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง (ต่อ)

กลุ่ม ที่	ไอโซเลต	อัตรา การ เจริญ	สี	รูปร่าง โคนี้เดีย	ขนาดโคนี้เดีย (ไมโครเมตร)	Setae	บริเวณที่ เข้าทำลาย	ระดับความรุนแรง		สถานที่เก็บ	เปอร์เซ็นต์ ความเหมือน คล้าย (Genbank)	ผลการศึกษาลาย พิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี RAPO PCR	เปอร์เซ็นต์ความ เหมือนคล้ายของ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
								Me	Cf				
5.	KSTKLS02	F	white	Cyl.	4.75x13.00	ไม่มี	ใบ	4	2	นครสวรรค์	99%	1650, 1400, 650, 400	80%
											<i>C. gloeosporioidesaes</i> f.sp.aeschynomene		
	KSTKLS03	F	white	Cyl.	4.50x12.25	ไม่มี	ใบ	2	2	นครสวรรค์	94%	1650, 1400, 650, 400	80%
											<i>C. gloeosporioides</i> f.sp. aeschynomene		
	bKSTKBS02	F	white	Cyl.	4.75x13.50	ไม่มี	ใบ	3	2	นครสวรรค์	100%	1650,1400, 650, 400	80%
											<i>C. gloeosporioides</i> f.sp. aeschynomene		
	NKSTKBS05	F	white	Cyl.	4.75x14.00	ไม่มี	ใบ	4	2	นครสวรรค์	99%	1650, 1400, 650, 400	80%
											<i>C. gloeosporioides</i> f.sp. aeschynomene		

หมายเหตุ : F (Fast) = โคลนินของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน, S (Slow) = โคลนินของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 14 วัน, Fal. (Falcate) = รูปร่างโคนี้เดียคล้ายพระจันทร์เสี้ยว, Cyl. (Cylindrical) = รูปร่างโคนี้เดียทรงกระบอกหัวท้ายมน, N.T. (not) = ไม่มีข้อมูล, Ref. (Reference) = อ้างอิง, Me (*Manihot esculenta*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของมันสำปะหลัง, Cf (*Capsicum frutescens*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของพริก



ตารางที่ 4.6 สรุปความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา และชีวโมเลกุลของตัวอย่างเชื้อ *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้จากมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง (ต่อ)

กลุ่มที่	ไอโซเลต	อัตรา การ เจริญ	สี	รูปร่าง โคนี้เดีย	ขนาดโคนี้เดีย (ไมโครเมตร)	Setae	บริเวณที่ เข้าทำลาย	ระดับความรุนแรง		สถานที่เก็บ	เปอร์เซ็นต์ ความเหมือน คล้าย (Genbank)	ผลการศึกษาลาย พิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี RAPO PCR	เปอร์เซ็นต์ความ เหมือนคล้ายของ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
								Me	Cf				
6.	KBSF01	F	white	Cyl.	4.25x14.25	ไม่มี	ใบ	2	2	กาญจนบุรี	93%	3000, 1650, 400	60%
	KBSF02	F	Gray/white	Cyl.	4.75x13.50	มี	ใบ	3	2	กาญจนบุรี	97%	3000, 2000, 1650, 650	60%
	KBSF03	F	Gray/white	Cyl.	9.75x18.25	ไม่มี	ใบ	3	2	กาญจนบุรี	95%	3000, 1650, 1400,1000, 650	80%
	KBLSY05	F	Gray/white	Cyl.	9.75x18.25	ไม่มี	ใบ	5	3	กาญจนบุรี	93%	1650, 1400, 650, 400	80%
<i>C. boninense</i>	F	white	Cyl.	5.80x13..20	มี	N.T.	N.T.	N.T.	Ref. (Damm et.al., 2012 )	-	-	-	
	CPSF02	S	olive	Cyl.	4.75X13.50	ไม่มี	ใบ	4	2	ชัยภูมิ	92%	1400, 800. 500	20%
	KBLSY04	S	Gray/white	Cyl.	5.00x13.00	ไม่มี	ใบ	3	3	กาญจนบุรี	97%	3000, 1650, 400	60%
	LSS	S	Gray/Green	Cyl.	4.87x13.25	ไม่มี	ใบ	4	3	นครราชสีมา	95%	3000, 1650, 1400, 650	80%
	SRTLFO2	S	olive	Cyl.	4.46x22.32	ไม่มี	ข้าวใบ	5	2	สุราษฎร์ธานี	98%	1400, 650, 400	60%

หมายเหตุ : F (Fast) = โคลนินของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 7 วัน, S (Slow) = โคลนินของเชื้อราที่มีอัตราการเจริญเติบโตช้า โดยจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 14 วัน, Fal. (Falcate) = รูปร่างโคนี้เดียคล้ายพระจันทร์เสี้ยว, Cyl. (Cylindrical) = รูปร่างโคนี้เดียทรงกระบอกหัวท้ายมน, N.T. (not) = ไม่มีข้อมูล, Ref. (Reference) = อ้างอิง, Me (*Manihot esculenta*) = ชื่อวิทยาศาสตร์ของมันสำปะหลัง, Cf (*Capsicum frutescens*) = ชื่อ วิทยาศาสตร์ของพริก

#### 4.5 การพัฒนาเทคนิค FTIR microspectroscopy ในการระบุชนิดเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

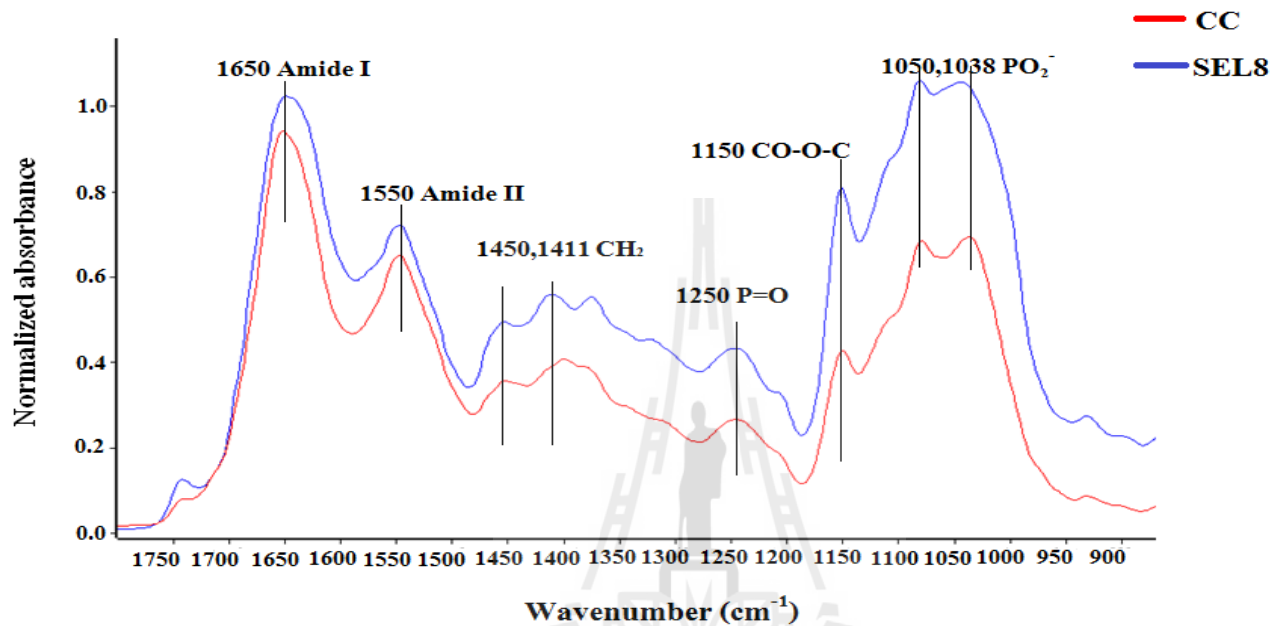
##### สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง

จากการจัดทำฐานข้อมูลในการศึกษาความแตกต่างของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง โดยใช้เครื่อง FTIR microspectrometer (Vertec70, Bruker optic) ในการวิเคราะห์ชนิดเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยนำเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง *C. gloeosporioides* ไอโซเลต SEL8 และเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลตอ้างอิง CC อ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรที่ผ่านการยืนยันชนิดและสปีชีส์ของเชื้อด้วยเทคนิคด้านสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลมาใช้เป็นฐานข้อมูล (Model) และนำเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ไอโซเลต SEL8, CC, CHTM11 และ SRTLFO1 มาใช้ในการพัฒนาวิธีการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง เพื่อเปรียบเทียบกันฐานข้อมูล โดยทำการคัดเลือกสเปกตรัมจำนวน 300 สเปกตรัมและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม OPUS 7.0 (Bruker optic, German) ร่วมกับการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Multivariate data analysis โดยใช้โปรแกรม The Unscrambler X (CAMO, Norway)

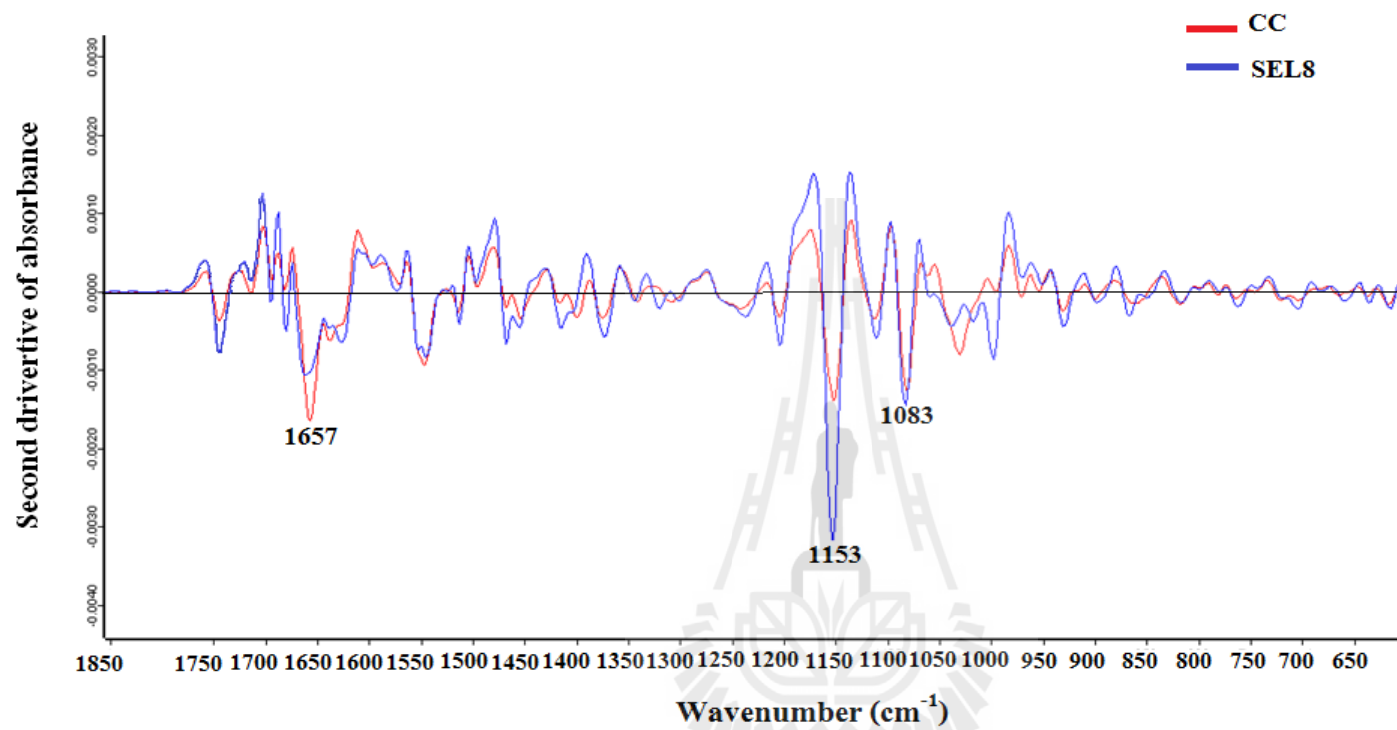
การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม OPUS 7.0 โดยการทำ averaged spectra ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง ไอโซเลต SEL8 เปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลตอ้างอิง CC ในช่วงความยาวคลื่น  $1750-900\text{ cm}^{-1}$  โดยช่วงความยาวคลื่น  $1650\text{ cm}^{-1}$  ดูดกลืนแสงของ Amide I, ความยาวคลื่น  $1550\text{ cm}^{-1}$  ดูดกลืนแสงของ Amide II, ความยาวคลื่น  $1450-1400\text{ cm}^{-1}$  ดูดกลืนแสงของ  $\text{CH}_2$  (ไขมัน), ความยาวคลื่น  $1250-900\text{ cm}^{-1}$  ดูดกลืนแสงของ P=O (โพลีแซคคาไรด์) แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 4.19

จากนั้นนำสเปกตรัมที่คัดเลือกไว้ในโปรแกรม OPUS 7.0 มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม The Unscrambler X จะทำการสุ่มเลือกข้อมูลในอัตราส่วน 2/3 เพื่อใช้ในการสร้างฐานข้อมูลของ S.Golay ในกลุ่ม Training set และ สุ่มเลือกข้อมูลในสัดส่วน 1/3 ในกลุ่ม Validated set เพื่อใช้ทำนายผล จากนั้นนำมาวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมจะนำมาทำ Second derivative และ extended multiplicative signal correction (EMSC) ผลการทำ Second derivative ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง ไอโซเลต SEL8 เปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลตอ้างอิง CC พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตมีค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกันในช่วงความยาวคลื่น  $1657\text{ cm}^{-1}$  (Amide I) ในช่วงความยาวคลื่น  $1153\text{ cm}^{-1}$  (Amide II) และในช่วงความยาวคลื่น  $1083\text{ cm}^{-1}$  ดูดกลืนแสงของ P=O (โพลีแซคคาไรด์) ดังแสดงในภาพ 4.20 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ โดยการทำ Multivariate data analysis แบบ Principal Component analysis (PCA) และ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) โดยใช้สเปกตรัมในกลุ่มของ Training set เพื่อสร้างแบบจำลองของชุดข้อมูล จากนั้นทำการทำนายผลโดยใช้สเปกตรัมของชุดข้อมูล Validated set จากนั้นนำข้อมูลที่ได้อาวิเคราะห์ extended multiplicative signal correction (EMSC) และนำข้อมูลที่ผ่านการทำ PCA แล้วมาวิเคราะห์ Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) เพื่อสร้างแบบจำลองของชุดข้อมูลเพื่อทำนายผล จากนั้นทำการ

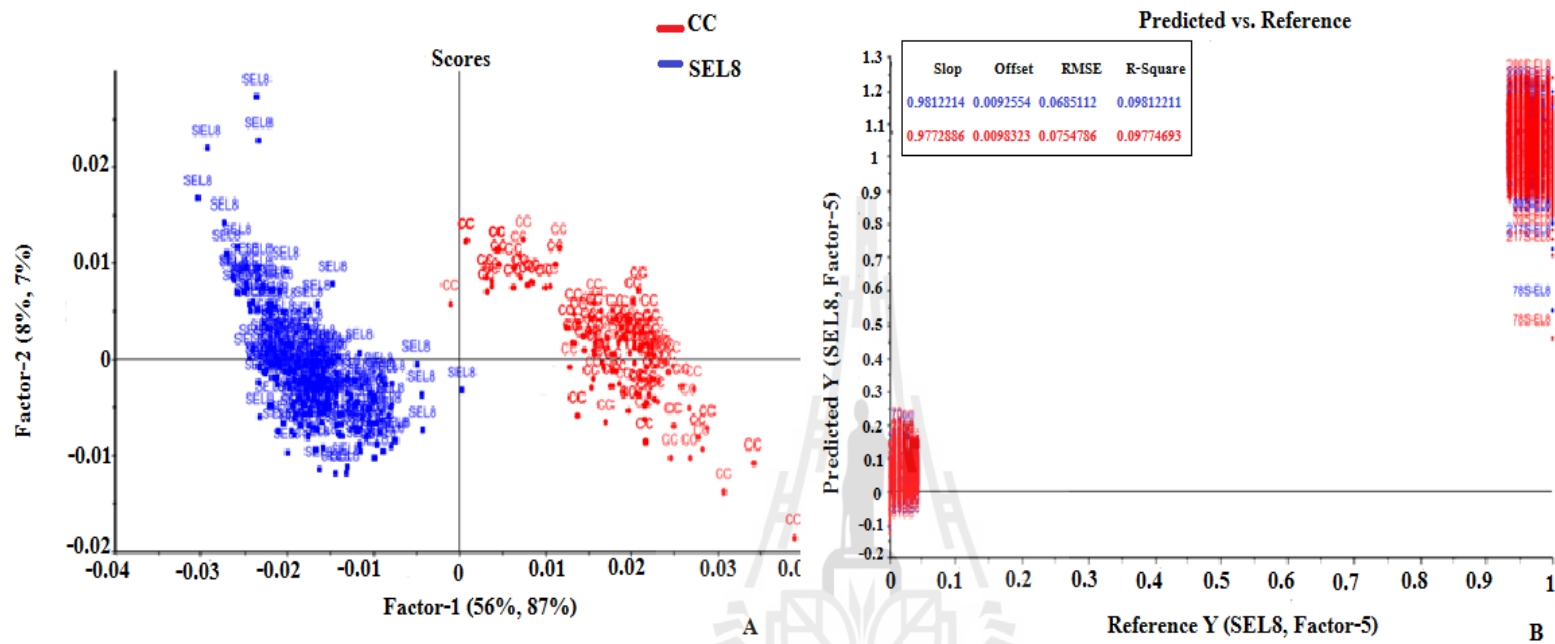
ทดสอบฐานข้อมูลที่ได้โดยการ Prediction testing สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตที่นำมาใช้เป็นฐานข้อมูลได้อย่างชัดเจน โดยฐานข้อมูล SEL8 (*C. gloeosporioides*) มีค่า R-square 98% ดังแสดงในภาพ 4.21 โดยฐานข้อมูล CC (*C. capsici*) มีค่า R-square 96% ดังแสดงในภาพ 4.22 ทำการตรวจสอบฐานข้อมูลโดยการทำ Predict regression ฐานข้อมูล (Model) SEL8 พบว่าเชื้อราไอโซเลต SEL8 มีค่าเข้าใกล้ 1 มาก แสดงว่าฐานข้อมูล SEL8 มีความแม่นยำดังแสดงในภาพ 4.23 และเมื่อทำการทำ Predict ฐานข้อมูล (Model) CC พบว่าเชื้อราไอโซเลตอ้างอิง CC มีค่าเข้าใกล้ 1 มาก แสดงว่าฐานข้อมูล CC มีความแม่นยำดังแสดงในภาพ 4.24 จากนั้นในกลุ่ม Validated set ของเชื้อราไอโซเลต SEL8, CC, CHTM11 และ SRTL01 มา Predict regression ลงในฐานข้อมูลข้างต้น พบว่า ฐานข้อมูลทั้ง 2 ฐานข้อมูลสามารถระบุชนิดเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลตได้ดังแสดงในภาพ 4.25 และ 4.26 เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความเหมือนคล้ายในโปรแกรม Excel พบว่าฐานข้อมูลทั้ง 2 ฐานข้อมูลสามารถระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ โดย CHTM11 มีความเหมือนกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* 75% และเชื้อราไอโซเลต SRTL01 มีความเหมือนกับเชื้อรา *C. capsici* 63% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลดังข้อมูลในตารางที่ 4.7



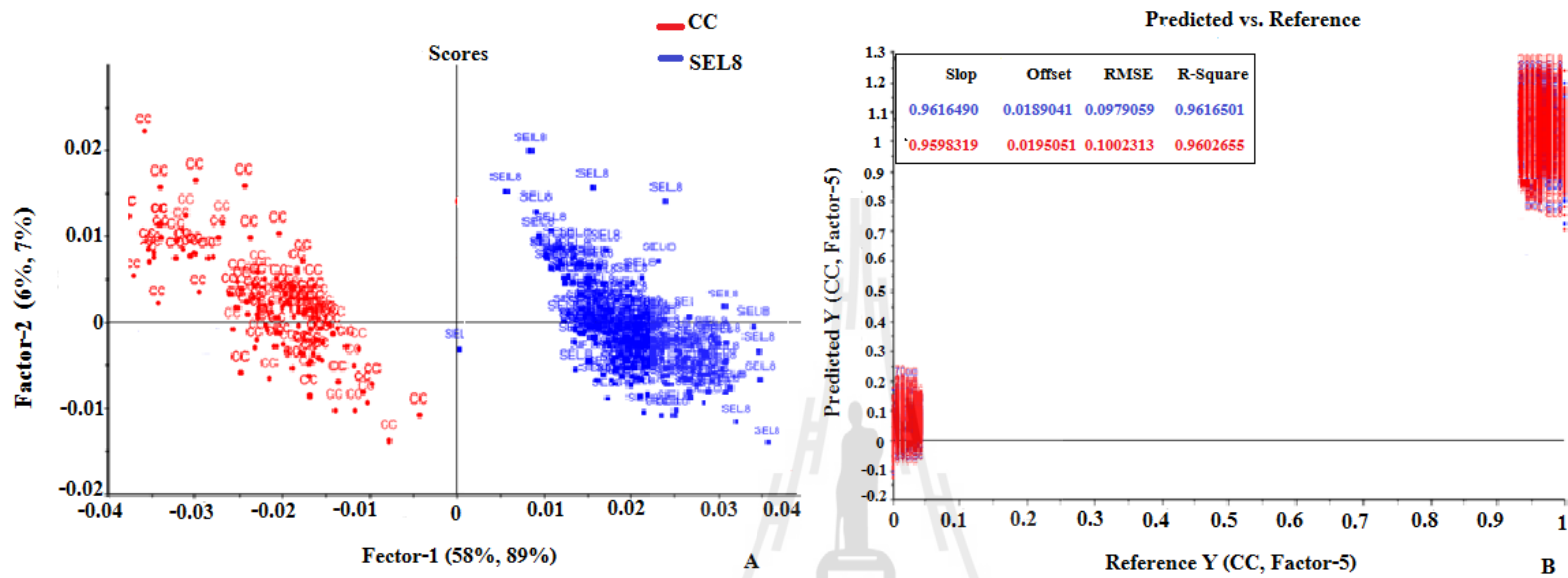
ภาพที่ 4.19 ผลการทำ averaged spectra ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันลำปะหลัง ไอโซเลต SEL8 เปรียบเทียบกับ เชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลตอ้างอิง (CC) ในช่วงความยาวคลื่น 1750-900  $\text{cm}^{-1}$  โดยช่วงความยาวคลื่น 1650  $\text{cm}^{-1}$  ดูดกลืนแสงของ Amide I, ความยาวคลื่น 1550  $\text{cm}^{-1}$  ดูดกลืนแสงของ Amide II, ความยาวคลื่น 1450-1400  $\text{cm}^{-1}$  ดูดกลืนแสงของ  $\text{CH}_2$  (ไขมัน), ความยาวคลื่น 1250-900  $\text{cm}^{-1}$  ดูดกลืนแสงของ P=O (โพลีแซคคาไรด์)



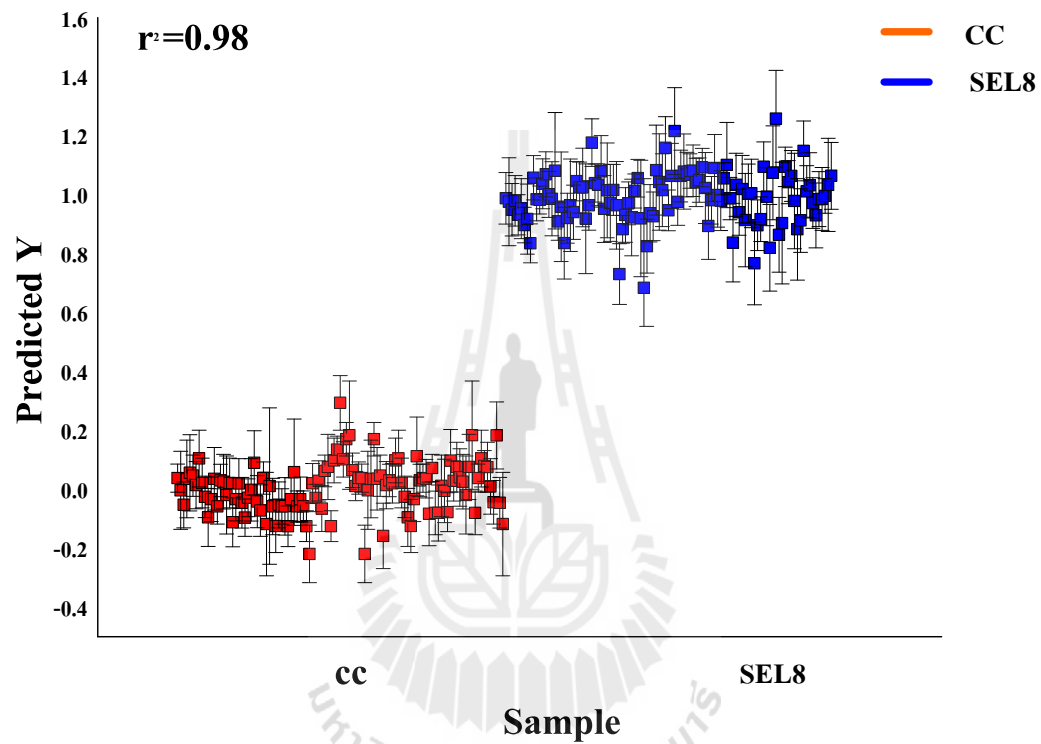
ภาพที่ 4.20 ผลการทำ Second derivative ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนลำปะหลังไอโซเลต SEL8 เปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลตอ้างอิง (CC) ในช่วงความยาวคลื่น 1850-650 cm<sup>-1</sup>



ภาพที่ 4.21 (A) และ (B) ผลการวิเคราะห์ Partial least squares (PLS) เพื่อสร้างแบบจำลองของฐานข้อมูลของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังไอโซเลต SEL8 โดยใช้สเปกตรัมในกลุ่มของ Training set เพื่อสร้างแบบจำลองของชุดข้อมูล

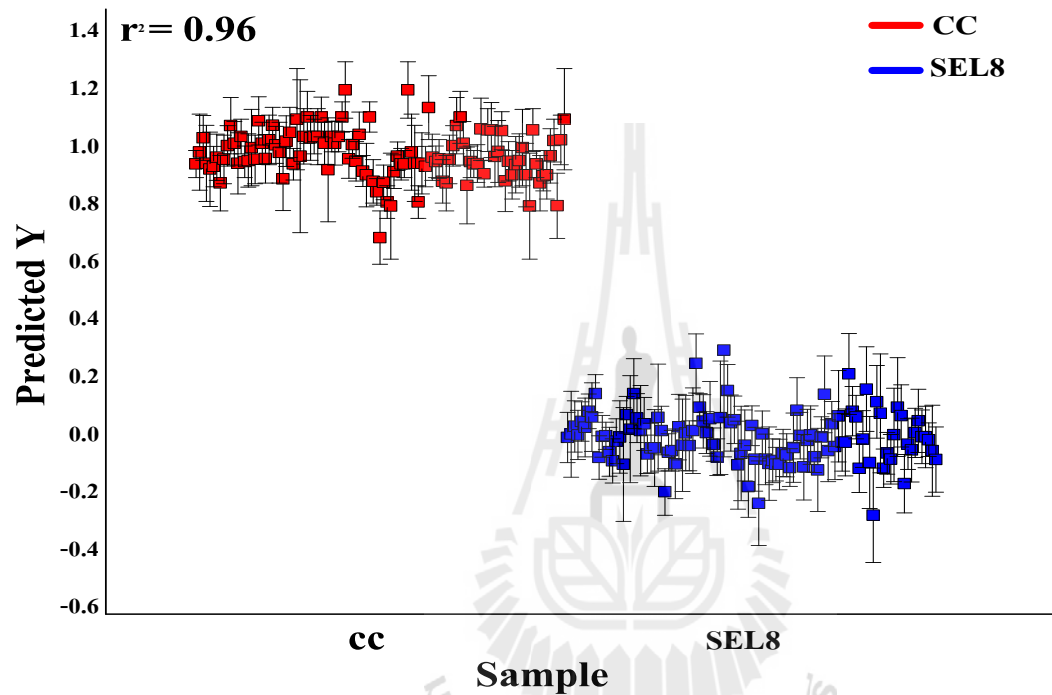


ภาพที่ 4.22 (A) และ (B) ผลการวิเคราะห์ Partial least squares (PLS) เพื่อสร้างแบบจำลองของฐานข้อมูลของเชื้อรา *C. capsici* สายพันธุ์อ้างอิง ไอโซเลต CC โดยใช้สเปกตรัมในกลุ่มของ Training set เพื่อสร้างแบบจำลองของชุดข้อมูล

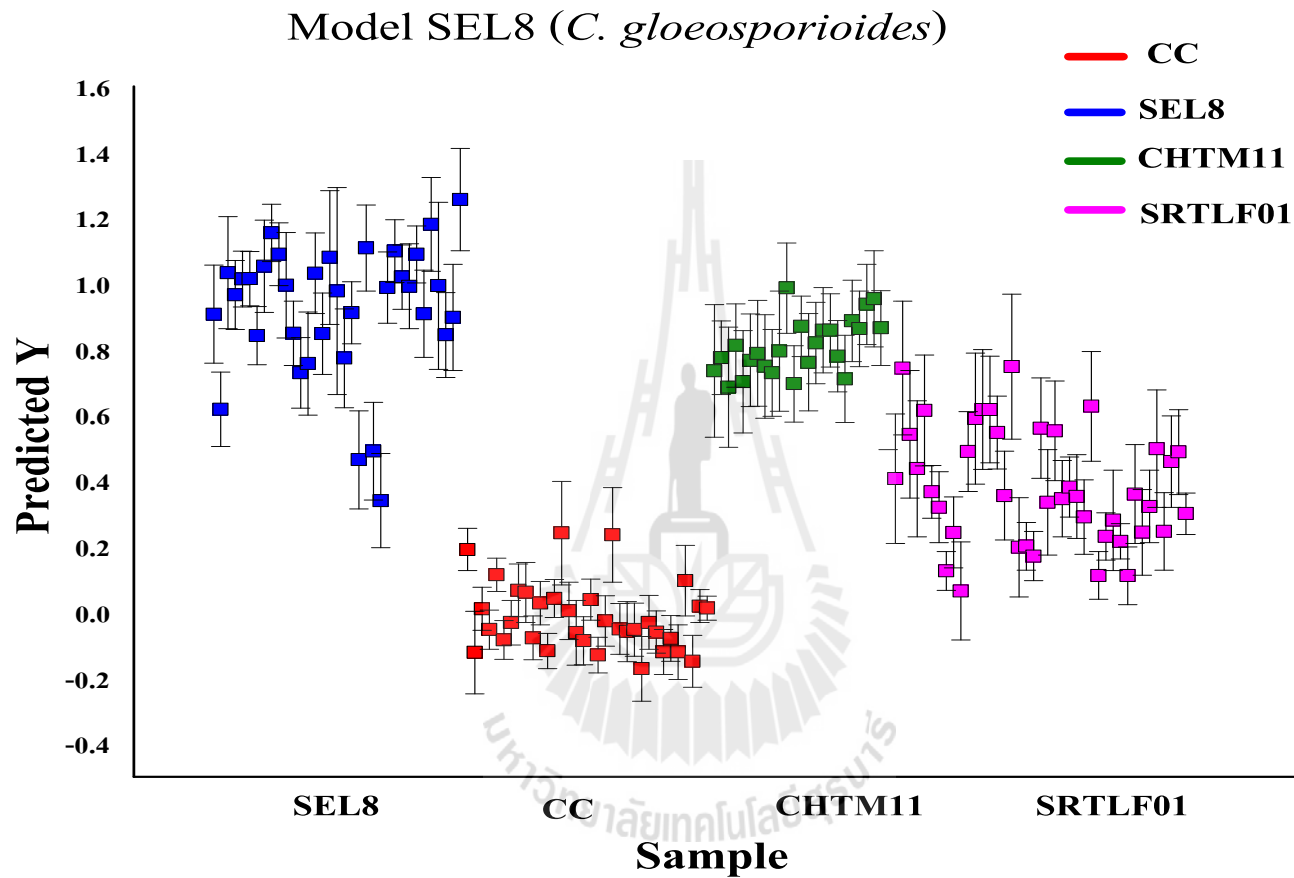


ภาพที่ 4.23 การตรวจสอบฐานข้อมูล โดยการทำ Predict regression ฐานข้อมูล SEL8 (*C. gloeosporioides* ไอโซเลต SEL8) โดยใช้สเปกตรัมของชุดข้อมูล Validated set ของเชื้อราไอโซเลต SEL8 และ ไอโซเลตอ้างอิง CC ในการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรค พบว่าเชื้อราไอโซเลต SEL8 มีค่า predicted Y เข้าใกล้ 1 แสดงว่า ฐานข้อมูล SEL8 (*C. gloeosporioides* ไอโซเลต SEL8) มีความน่าเชื่อถือ

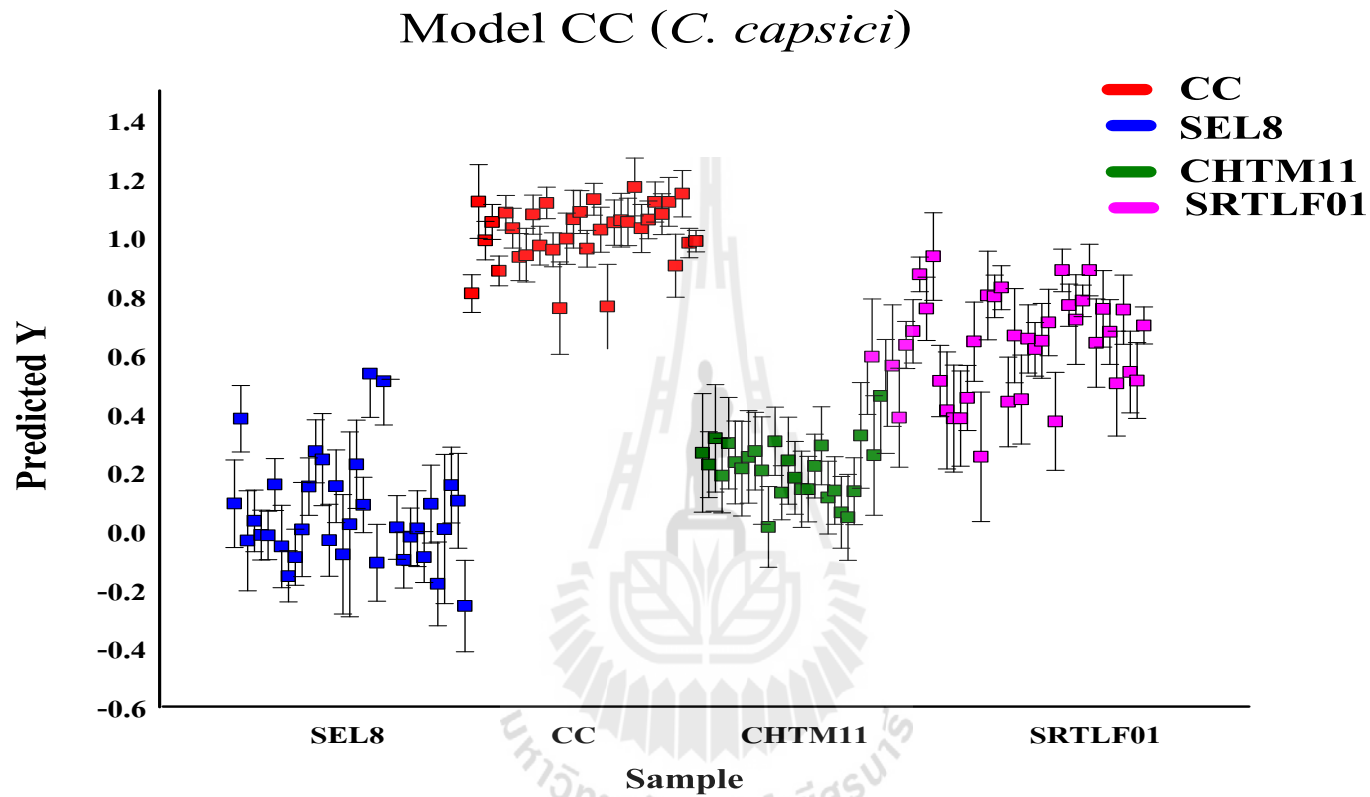




ภาพที่ 4.24 การตรวจสอบฐานข้อมูลโดยการทำ Predict regressionของฐานข้อมูล CC (*C. capsici* ไอโซเลต CC) โดยใช้สเปกตรัมของชุดข้อมูล Validated set ของเชื้อราไอโซเลต SEL8 และ ไอโซเลตอ้างอิง CC ในการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรค พบว่าเชื้อราไอโซเลต CC มีค่า predicted Y เข้าใกล้ 1 แสดงว่าฐานข้อมูล CC (*C. capsici* ไอโซเลต CC) มีความน่าเชื่อถือ



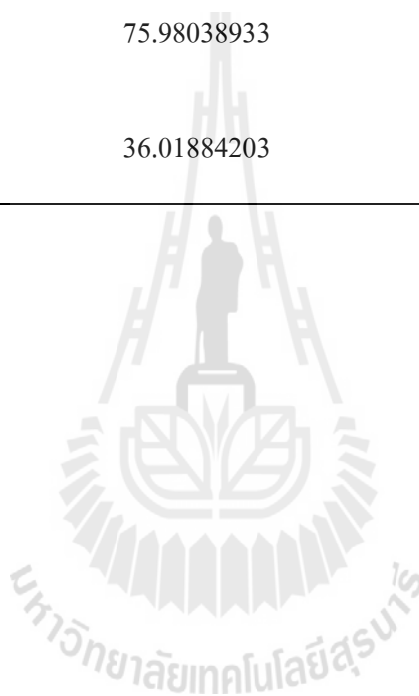
ภาพที่ 4.25 แสดงผลการทำ Prediction testing ของฐานข้อมูล SEL8 (*C. gloeosporioides*) โดยใช้สเปคตรัมของชุดข้อมูล Validated set ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังและเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงไอโซเลต CC, SEL8, SRTLFO1 และ CHTM11 ในการเปรียบเทียบ



ภาพที่ 4.26 แสดงผลการทำ Prediction testing ของฐานข้อมูล CC (*C. capsici*) โดยใช้สเปคตรัมของชุดข้อมูล Validated set ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังและเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงไอโซเลต CC, SEL8, SRTLF01 และ CHTM11 ในการเปรียบเทียบ

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมันสำปะหลังจำนวน 4 ไอโซเลตกับ  
ฐานข้อมูล (Model) SEL8 และ ฐานข้อมูล (Model) CC

ไอโซเลต	ฐานข้อมูล SEL8	ฐานข้อมูล CC
	( <i>C. gloeosporioides</i> สายพันธุ์ SEL8)	( <i>C. capsici</i> สายพันธุ์อ้างอิง CC)
	% ความเหมือนคล้าย	% ความเหมือนคล้าย
SEL8 ( <i>C. gloeosporioides</i> )	92.31674771	7.683254017
CC ( <i>C. capsici</i> )	0	100
CHTM11 ( <i>C. gloeosporioides</i> )	75.98038933	24.01961433
SRTL01 ( <i>C. capsici</i> )	36.01884203	63.98116111



## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาชนิดและการพัฒนาวิธีการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมัน-  
ลำปะหลังพบว่า

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันลำปะหลัง จากใบมันลำปะหลัง ก้านใบ และบริเวณลำต้น ด้วยวิธี tissue transplanting บนอาหาร water agar (WA) สามารถแยกเชื้อราได้ จำนวน 38 ไอโซเลต และเชื้อราดังกล่าวเจริญเติบโตบนอาหาร Half potato dextrose agar (HPDA) สามารถชักนำให้เชื้อสร้างสปอร์ได้ 14 วันในอาหาร HPDA สามารถจำแนกเชื้อจากลักษณะทาง สัณฐานวิทยา สีของโคโลนี ลักษณะสปอร์และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละไอโซเลต

เชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้แต่ละไอโซเลตมีอัตราการเจริญของโคโลนีของเชื้อบนอาหาร HPDA ใกล้เคียงกันซึ่งสอดคล้องกับวิธีที่ วรรณิการ์ เพ็ญพัทธ์ และคณะ (2545); ขนิษฐา มากรุง (2548); มรุกร สมพงษ์ (2553) แนะนำ โดยในการแยกเชื้อราสาเหตุโรคนั้น ควรแยกจากตัวอย่างพืช ที่สดและควรทำการแยกทันที และเลี้ยงบนอาหาร HPDA เชื้อแต่ละไอโซเลตมีการเจริญเร็วในช่วง 3-7 วัน โดยเชื้อราไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญมากที่สุดคือ ไอโซเลต CHTM11 มีอัตราการเจริญของ โคโลนีเท่ากับ  $8.97 \pm 0.05 \times 8.97 \pm 0.05$  เซนติเมตร และเชื้อราไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญน้อยที่สุดคือ ไอโซเลต SRTLF01 มีอัตราการเจริญของโคโลนีเท่ากับ  $6.8 \pm 0.08 \times 6.8 \pm 0.14$  เซนติเมตร นอกจากนี้ ได้ทำการศึกษาลักษณะสีโคโลนีของเชื้อราที่แยกได้จากมันลำปะหลังที่แสดงอาการของโรคแอน แทรกโนส จำนวน 38 ไอโซเลต เมื่อนำมาจัดกลุ่มสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ตามวิธีการของ Abang et al. (2002) สามารถแบ่งได้ตามลักษณะของสีโคโลนีเป็น 5 กลุ่ม โดยเชื้อจำนวน 34 ไอโซเลต อยู่ในกลุ่มเจริญเติบโตเร็ว และ 4 ไอโซเลต อยู่ในกลุ่มเจริญเติบโตช้า เชื้อส่วนใหญ่ 35 ไอโซเลต ไม่ สร้าง setae ขณะที่เพียง 3 ไอโซเลต คือ SRTLF01 SLC032 และ KBSF02 ที่สร้าง setae สอดคล้อง กับการทดลองของ Sharma et al. (2005) ที่ทำการจัดกลุ่มเชื้อรา *C. capsici* จำนวน 37 ไอโซเลต ออกเป็น 5 กลุ่ม โคโลนีมีสีขาวอมเทา ขาวอมเขียว จนถึงสีเทาเข้ม นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ งานวิจัยของวรานันท์ วิทยุรัตน์ (2554) ที่สามารถจัดกลุ่มของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ตาม ลักษณะโคโลนีออกเป็น 7 กลุ่ม โคโลนีมีสีขาวอมเทา ขาว ขาวอมชมพู ไปจนถึงสีเขียวมะกอก

สำหรับการศึกษาลักษณะโคโคนีเดี่ยวได้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อส่วนใหญ่สร้างโคโคนีเดี่ยว รูปร่างทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) ขนาดเฉลี่ยประมาณ  $4.75 \times 13.75$  ถึง  $3.75 \times 27.50$  ไมโครเมตร ขณะที่เพียง 1 ไอโซเลต คือ SRTLF01 จากสุราษฎร์ธานี ที่มีการสร้างโคโคนีเดี่ยว

พระจันทร์ (falcate) ขนาดเฉลี่ยประมาณ 3.50x27.75 ถึง 3.50x28.00 ไมโครเมตร สอดคล้องกับ เชื้อสายพันธุ์อ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ไอโซเลต CC มีขนาดโคนี่เดียวเท่ากับ 3.50x28.00 ไมโครเมตร สอดคล้องกับการทดลองของ Wokocho et al. (2010) ที่กล่าวว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *manihotis* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังมีขนาดโคนี่เดียว 3.5-6.00x23.55 ไมโครเมตร นอกจากนี้ รัตยา พงศ์พิสุทธา และคณะ (2553) กล่าวว่า เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกมีขนาดโคนี่เดียวอยู่ที่ 2.5-5.0 x 3.75-23.75 ไมโครเมตร และ Sutton (1980) สปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* รูปร่างใส ทรงกระบอก หัวท้ายมน มีขนาดอยู่ที่ 3.50-6.0x12.0x17.0 ไมโครเมตร แสดงว่าเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมันสำปะหลังที่พบในการศึกษาครั้งนี้ มีความหลากหลาย โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับเชื้อราทั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. capsici*

2. การทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค พบว่าเชื้อทั้ง 38 ไอโซเลต สามารถก่อโรคได้ทั้งกับใบมันสำปะหลังพันธุ์เกษตรศาสตร์ 50 และผลพริกพันธุ์ซูเปอร์ฮอต แต่ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคแตกต่างกันไปในแต่ละไอโซเลต สอดคล้องกับการทดลองของ Wokocho et al. (2010) กล่าวว่าเมื่อทำการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *manihotis* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังลงบนต้นมันสำปะหลัง พบว่ามันสำปะหลังแสดงอาการแผลสีน้ำตาลไหม้บริเวณลำต้นมันสำปะหลัง และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของหทัยชนก คงแก้ว (2546) ที่กล่าวว่าจากการปลูกเชื้อบนผลพริกที่ทำให้เกิดแผล เพื่อวัดความสามารถในการก่อให้เกิดโรค ผลพริกที่ปลูกเชื้อ *C. capsici* อาการเป็นแผลยุบลง รูปร่างของแผลเป็นวงกลมหรือวงรีเห็นเป็นจุดดำ ๆ เป็นกลุ่มของ acervulus ที่กระจายอยู่บนแผล สปอร์เมื่ออยู่รวมกันเป็นกลุ่มจะมีสีเหลืองอ่อนถึงสีส้ม และนอกจากนี้ ยังพบว่า Than et al. (2008) กล่าวว่าเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* เป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญในการก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสพริก และสุภารัตน์ สุดพันธ์ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล (2552) กล่าวว่าสามารถจำแนกเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกได้ 4 สปีชีส์ คือ *C. gloeosporioides* *C. acutatum* *C. coccodes* และ *C. capsici* และในปีต่อมา รัตยา พงศ์พิสุทธา และคณะ (2553) กล่าวว่าเชื้อสาเหตุหลักของโรคแอนแทรคโนสพริกมีทั้งหมด 3 สปีชีส์ คือ *C. gloeosporioides* *C. acutatum* และ *C. capsici* ซึ่งแสดงให้เห็นความเป็นไปว่าโรคแอนแทรคโนสของพืช สามารถมีเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายมากกว่า 1 สปีชีส์

3. ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR ด้วย universal primers ITS3 (GCATCGATGAAGAACGCAGC) และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') พบว่าเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังเกือบทุกไอโซเลตมีดีเอ็นเอ ขนาด 450 bp เท่ากับขนาดที่ได้จากเชื้อ *C. gloeosporioides* (CG) จากพริกที่ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ยกเว้น ไอโซเลต SLC032 SRTL01 NKSTKBS02 NKSTKBS05 NKSTKLS02

NKSTFBS01 และ KBSF01 ที่ได้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 490 bp เท่ากับชิ้นส่วนที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อ *C. capsici* (CC) ที่ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า เชื้อสาเหตุโรคแอนแทรก-โนสมันสำปะหลังส่วนใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันกับเชื้อ *C. gloeosporioides* แต่มีเพียง อย่างละ 1 ไอโซเลตที่คล้ายกับเชื้อ *C. capsici* (*truncatum*) และ 1 ไอโซเลต คล้ายกับเชื้อ *C. lindemuthianum* ซึ่งผลการทดลองเหล่านี้ สอดคล้องกับการทดลองของ Erika et al. (2009) ได้ทำการระบุชนิดเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสมะนาว มะเขือเทศ และมะม่วง โดยใช้ไพรเมอร์ CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3') ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อรา *C. acutatum* ร่วมกับไพรเมอร์ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') เช่นเดียวกับ Stanley (2000) พบว่าเชื้อสาเหตุโรค anthracnose ในมะนาวและมะเขือเทศ เกิดจากเชื้อรา *C. acutatum* ซึ่ง DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ มีขนาดเบสอยู่ที่ 490 bp ส่วนเชื้อสาเหตุโรค anthracnose ในมะม่วงเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีขนาดเบสอยู่ที่ประมาณ 450 bp

และสำหรับผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ด้วยเทคนิค DNA Sequencing เพื่อหาชนิด และประเมินความหลากหลายของเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังในประเทศไทย โดยใช้โปรแกรม BLASTS บนเครือข่ายอินเทอร์เน็ตของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) พบว่า เชื้อราไอโซเลต C13 CHTM11 CPSF05 KBSF01 KBSF04 KBSF05 KBLSY03 LBBS01 LBLB02 NKSTFBS01 NKSTFBS02 NKSTKLS01 PCBB02 PCBB03 SCA03 SEL8 SLC071 SRTLSY SRTLSY01 SRTLSY02 SRTLSY03 CPSF02 KBLSY04 LSS และไอโซเลตอ้างอิง CG มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* อยู่ที่ 92-99% เชื้อราไอโซเลต SRTLF01 และไอโซเลตอ้างอิง CC มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. capsici* 99% เชื้อราไอโซเลต SLC032 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. lindemuthianum* เชื้อราไอโซเลต NKSTKLS02 NKSTKLS03 NKSTKBS02 NKSTKBS05 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* 99% 94% 100% และ 99% ตามลำดับ และเชื้อราไอโซเลต KBSF01 KBSF02 KBSF03 KBLSY05 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. boninense* 93% 97% 95% และ 93% ตามลำดับ และนอกจากนี้ พบว่าเชื้อราไอโซเลต SRTLF03 และ SRTLF04 มีความคล้ายคลึงกับ *C. gloeosporioides* 97 และ 99% แต่เนื่องจากมีลักษณะของโคนิเดียที่มีรูปร่างยาวทรงกระบอกหัวท้ายมนและมีขนาด 3.75-5.75x21.50-27.50 ไมโครเมตร ซึ่งมีความใหญ่กว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* แสดงว่า มีความเป็นไปได้สูงที่จะเป็นเชื้อ *C. gloeosporioides* f. sp. *manihotis* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wokocho et.al. (2010) ที่กล่าวว่า *C. gloeosporioides* f. sp. *manihotis* จะมีโคนิเดียขนาดใหญ่กว่า *C. gloeosporioides* โดยโคนิเดียที่มีรูปร่าง 3.5-6.00x23.55 ไมโครเมตร อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบ

ลักษณะโคโลนี โคนีเดีย การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอและการยืนยันชนิดเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อ *C. graminicola* ดังที่ Frison and Feliu, (1991) ได้รายงานไว้ เนื่องจาก เชื้อ *C. graminicola* มีขอบเขตการเข้าทำลายพืชอาศัยที่จำกันเฉพาะในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Khan and Hsiang, 2003) และเมื่อตรวจสอบขนาดของโคนีเดียพบว่า เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสที่พบในมันสำปะหลังมีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อ *C. capsici* (new name *C. truncatum*) และเมื่อทำการยืนยันชนิดของเชื้อด้วยเทคนิค DNA Sequencing พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *C. capsici* 99% จึงยืนยันได้ว่าเป็นเชื้อ *C. capsici* (new name *C. truncatum*) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังในประเทศไทย เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum* หลายสปีชีส์ประกอบด้วยเชื้อ *C. gloeosporioides* หรือ *C. gloeosporioides* f.sp. *manihotis* นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อ *C. capsici*, *C. lindemuthianum*, *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* และ *C. boninense* สามารถก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังในประเทศไทย ได้เช่นเดียวกัน สอดคล้องกับการทดลองของรัฐกร ศรีสุทธิ (2549) ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนส พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 4 สปีชีส์ ดังนี้ *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. acutatum* และ *C. capsici* ต่อมา Prihastuti et al. (2003) ได้ศึกษาลักษณะของสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. ของกาแฟในภาคเหนือของประเทศไทย จากการวิเคราะห์ DNA sequence analysis สามารถจัดกลุ่มของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ *C. asianum*, *C. fructicola* และ *C. siamense* แต่ละกลุ่มมีความสอดคล้องกันในลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และข้อมูล DNA sequence และต่อมา Anderson et al. (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในพริกไทย โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ITS1 และ ITS2 ร่วมกับ ITS4 และ ITS5 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ด้วยเทคนิค DNA Sequencing พบว่าเชื้อสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกไทยเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* นอกจากนี้ Weir et al. (2012) ได้รายงานว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* ยังมีความซับซ้อนทางพันธุกรรมเป็นอย่างมาก โดยพบว่ามี 22 ชนิดย่อย (sup species) ที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้แก่ *C. asianum*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. horii*, *C. kahawae* subsp. *kahawae*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C. psidii*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*, and *C. xanthorrhoeae*, *C. aenigma*, *C. aeshynomenes*, *C. alatae*, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C. clidemiae*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C. salsolae*, and *C. queenslandicum* ซึ่งยังไม่มีการกำหนดข้อมูลทางพันธุกรรมที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อได้อย่างแท้จริง อีกทั้ง Hyde et.al. (2009) ยังได้รายงานถึงความสับสนในการจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราในจีนัส *Colletotrichum* ในฐานข้อมูล Genebank ในปัจจุบันทำให้เกิดความผิดพลาดในการยืนยันชนิดของเชื้อ *Colletotrichum*



แต่เนื่องจากเทคนิคนี้ ยังไม่สามารถที่จะใช้แยกความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ชัดเจน ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ จึงได้ทำการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยเทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) เพิ่มเติม

4. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ primers 3 ชนิด พบว่า เฉพาะ primer OPA13 เท่านั้นที่ให้ผลวิเคราะห์สอดคล้องกับการใช้วิธีอื่น ๆ ในการระบุชนิด เมื่อสรุปผลการวิเคราะห์จากทุกวิธีร่วมกัน พบว่าเชื้อที่แยกได้จากมันสำปะหลัง 38 ไอโซเลตเป็นเชื้อในกลุ่ม *C. gloeosporioides* ที่มีอัตราการเจริญเร็ว 34 ไอโซเลต ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามขนาดของโคไนด์เดี่ยวได้เป็นชนิดย่อย (sub species) *manihotis* จำนวน 2 ไอโซเลต *aeschynomene* จำนวน 4 ไอโซเลต และ *boninense* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่เหลือเป็นเชื้อ *C. capsici* (*truncatum*) จำนวน 1 ไอโซเลต *C. lindemuthianum* จำนวน 1 ไอโซเลต และ 4 ไอโซเลต มีลักษณะเหมือนกับ *C. gloeosporioides* แต่มีอัตราการเจริญช้า ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดย่อยได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Sharma et al. (2007) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *C. lindemuthianum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในถั่วโดยใช้เทคนิค RAPD PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ OPA OPB OPC และ OPQ ในการศึกษา พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ 9 ชนิด คือ OPA02, OPA04, OPA11, OPA13, OPC14, OPD02, OPD03, OPD18 และ OPQ18 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *C. lindemuthianum* ได้ ต่อมา Gupta et al. (2010) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสสมะม่วง โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 8 ชนิดในการศึกษา ดังนี้ OPA01, OPA03, OPA05, OPA09, OPA11, OPA15, OPA16, OPA18 พบว่า ไพรเมอร์ OPA1, OPA3 และ OPA18 สามารถจำแนกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้อย่างชัดเจน ต่อมา Adhipathi et al. (2013) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคใบจุดในขมมันด้วยวิธี RAPD PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 18 ชนิด พบว่าโรคใบจุดขมมันเกิดจากเชื้อ ไพรเมอร์ OPA02, OPA09, OPA13 และ OPF01 สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ได้อย่างชัดเจนเช่นกัน

5. การพัฒนาเทคนิค FTIR micro spectroscopy ในการระบุชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลัง เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบชนิดของเชื้อพบว่าให้รูปแบบที่มีความเหมือนในระดับ 92-100% เมื่อใช้ตัวอย่างเดิมในการวิเคราะห์ แต่เมื่อใช้ตัวอย่างของเชื้อที่ระบุว่าเป็นเชื้อเดียวกันที่ผ่านระบุชนิดโดยวิธีอื่นมาทำการวิเคราะห์ พบว่าให้รูปแบบที่มีความเหมือนในระดับ 64-76% เท่านั้น ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Salman, (2010) ได้ทำการระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยเทคนิค FTIR spectroscopy โดยทำการศึกษาเชื้อรา 4 ชนิด คือ *Rhizoctonia* sp., *Colletotrichum* sp., *Verticillium* sp. และ *Fusarium oxysporum* ในการทดสอบด้วยวิธี FTIR spectroscopy เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR พบว่า เทคนิค FTIR spectroscopy สามารถ

ใช้ในการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างถูกต้องและแม่นยำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางชีวโมเลกุล และ Szeghalmi et al. (2006) ได้ใช้เทคนิค FTIR micro spectroscopy ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน พบว่า เทคนิค FTIR micro spectroscopy สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *Aspergillus*, *Neurospora* และ *Rhizopus* ที่มีความไวต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกันได้อย่างแม่นยำ ผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาเทคนิค FTIR micro spectroscopy ที่ใช้ในการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส เนื่องจากเป็นวิธีที่มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างง่าย ใช้สารเคมีในการตรวจสอบน้อย และมีความเป็นไปได้ที่จะให้ผลแม่นยำหากมีฐานข้อมูลที่เพียงพอและชัดเจน วิธีนี้จึงถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้ในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ในอนาคต

6. แนวทางการใช้ประโยชน์ในอนาคต สามารถแนะนำข้อมูลของการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังที่มีการยืนยันแล้วให้เกษตรกรใช้ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังเบื้องต้น ซึ่งจะเป็ประโยชน์ต่อการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคได้อย่างถูกต้อง เป็นการลดต้นทุนการผลิตมันสำปะหลัง และสามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังของในบางพื้นที่ปลูกประเทศไทย และนอกจากนี้จากการทดลองข้างต้นพบว่า เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังนั้นมีพืชอาศัยกว้าง เช่น มะม่วง มะละกอ พริก ขนุน ชมพู ฝรั่ง เงาะ พืชตระกูลถั่ว อะโวคาโด สตรอเบอร์รี่ องุ่น กัญชง มะเขือเทศ ข้าวโพด ทูเรียน และมันสำปะหลัง (หทัยชนก คงแก้ว, 2546; สุชาติณี ชัยชนะ, 2550; Cook, 1975; Smith and Black, 1990) จึงควรหลีกเลี่ยงการปลูกมันสำปะหลังในพื้นที่ปลูกเดียวกันหรือใกล้เคียงกับพืชอาศัยอื่นเพื่อลดปริมาณการสะสมของเชื้อสาเหตุโรคและลดปริมาณการแพร่ระบาดของโรคแอนแทรกโนสมันสำปะหลังอีกด้วย

## รายการอ้างอิง

- กรมพัฒนาที่ดิน. (ม.ม.ป.). เอกสารทางวิชาการวิชาการ มันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก:  
[http://www.ddd.go.th/Lddwebsite/web\\_ord/Technical/pdf/P\\_Technical06013.pdf](http://www.ddd.go.th/Lddwebsite/web_ord/Technical/pdf/P_Technical06013.pdf).
- กรมวิชาการเกษตร. (2553). มันสำปะหลัง โรคแอนแทรคโนส. [ออนไลน์]. ได้จาก:  
<http://soclaimon.wordpress.com/2010/0611/%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%84%E0%B9%81%E0%B8%AD%E0%B8%99%E0%B9%81%E0%B8%97%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B9%82/>.
- กรรณิกา เพ็ชรภักตร์, อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และธนิตย์ ปล่องบรรจง. (2545). การแยกเชื้อราโรคสแคบจากพืชต่างๆ ในประเทศไทย. *ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา*. 12(1): 14-20.
- กัญญารัตน์ ว่องวิทย์เดชา. (2552). มันสำปะหลัง. *วารสารเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงาน เศรษฐกิจการเกษตร* 2552. 1-58 หน้า.
- กาญจนา ธรรมนุ. (2555). เทคนิค FTIR Spectroscopy และ Microscope ในงานวิเคราะห์และวิจัย. *Technology*. 37(212): 95-96.
- ขนิษฐา มากรุง. (2548). การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ. *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*. 1-91 หน้า.
- จักรพงษ์ ชาตะรักษ์. (2554). มันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://50010210339.blogspot.com/>
- จำลอง เจียมจันรรจา. (2541). มันสำปะหลัง. *พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ . ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 47-51
- ฐิติมา วีระศิลป์. (2542). โรคมันสำปะหลัง. *พืชทองคำได้แผ่นดิน มันสำปะหลัง*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 41-121.
- จตุพร วุฒิกนกกาญจน์. (2553). การวิเคราะห์พอลิเมอร์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโคปี. [ออนไลน์]. ได้จาก:  
<http://www.seem.kmutt.ac.th/research/pentec/download/MTT656Chapter%20%20Polymer%20Spectroscopy.pdf>.
- 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](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).

โชติรส รอดเกตุ, รัตติยา พงศ์พิสุทธา และ ชัยณรงค์ รัตนกริธากุล. (2554). ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 42(3) (พิเศษ): 331-334.

ชาติชาย ศิริพัฒน์. (2557). รากเน่า..หัวเน่า ระบาดหนักไร่มันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก:

<http://www.thairath.co.th/content/442798>.

ดนัย สุภาพหาร. (2537). พฤกษศาสตร์และพันธุศาสตร์ของมันสำปะหลัง. มันสำปะหลัง. เอกสารวิชาการ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 14-29

ธารทิพย์ ภาสบุตร, ธนิตย์ ปล่องบรรจง และ กรรณิการ์ เพ็ชรนภักตร์. (2547). การรวบรวมและจำแนกชนิดเชื้อสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของไม้ผล และพืชเศรษฐกิจ. รายงานผลการวิจัย พ.ศ. 2548 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 894-909

ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ. (2547). การระบุชนิดเชื้อสาเหตุ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ และการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 1-102 หน้า.

ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ, กาญจนา ชรรมนู, คุณิต อธิณูวัฒน์ และ ขนิษฐา กุ์โบราณ. (2555). การส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นระบบความต้านทานของมันสำปะหลังให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนสด้วยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ CaSUT007. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ณัฐธิญา เบื่อนสันเทียะ และคณะ (2555). การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการควบคุมการเกิดโรคใบไหม้มันสำปะหลังด้วยเทคนิค IR. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.slri.or.th/th/index.php?option=com>.

นิพนธ์ วิสารทนนท์. (2535). โรคผลเน่าของมะม่วงและวิธีการควบคุม. เกษะเกษตร 16: 72-75

พัชรีย์ วิชยานุวัติ. (2543). เทคนิคทางอนุชีววิทยา. [ออนไลน์]. ได้จาก:

<http://www.si.mahidol.ac.th>.

ไพบุลย์ ฟูวัฒนศิลป์. (2551). การเพาะปลูกมันสำปะหลังไทยในปี 2552 มีความเสี่ยงสูงขึ้น. [ออนไลน์]. ได้จาก :

<http://www.ktb.co.th/ktb/Download/economyresources/EconomyResources>.

- มธุกร สมพงษ์. (2553). ความแตกต่างระหว่างเชื้อ *Spahceloma* spp. สาเหตุโรคสแคบองุ่นกับพืชชนิดอื่น. *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี*. 1-71 หน้า.
- มาลินี อัสวดิษฐเลิศ. (2553). เทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.biotec.or.th/Guru/>.
- ยุกติ สาริกะภูติ. (2526). มันสำปะหลัง. *เอกสารวิชาการ เล่มที่ 7. กรมวิชาการเกษตร*. 83-87.
- รังษิ เจริญสถาพร และ อมรรักษ์ กิจใจเดียว. (2010). โรคแอนแทรคโนสมันสำปะหลังและแนวทางการป้องกันกำจัด. *สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร*. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://soclaimon.wordpress.com/2010/06/11>.
- รัตยา พงศ์พิสุทธา, วรณันท์ วิญญูรัตน์, โชติรส รอดเกตุ และ เทพพนม แสงเพลิง. (2553). ความผันแปร ทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41(1) พิเศษ*: 318-321.
- รัฐกร ศรีสุทธิ. (2549). การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*. 1-138 หน้า.
- วานิช คำพานิช, นิพนธ์ ทวีชัย, อติศักดิ์ บัวนภิกษาพันธุ์ และ วิจารย์ วิชชุกิจ. (2547). การศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Cercospora henningsii* Allescher สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของมันสำปะหลัง. *ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 388-395.
- วิจารย์ วิชชุกิจ. (2527). มันสำปะหลัง. *พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ เล่ม 1. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 94-100
- วิชัย รักวิทยาศาสตร์. (2551). *ราวิทยาเบื้องต้น*. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตรกำแพงแสน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 247 หน้า.
- วรณันท์ วิญญูรัตน์. (2554). การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. *วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. 1-136.
- สุธาสินี ชัยชนะ และ สรัญญา ณ ลำปาง. (2550). การตรวจสอบความทนทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 38(5) พิเศษ*: 205-208.
- สุคใจ สุนาสวน, ชรรยง สมบัตวิชาธร, สิริมา ธนพงศ์พิพัฒน์, คณางค์ ดวงมณี, และเสาวณิต วรดิษฐ์. (2554). รายงานผลการศึกษาลินค้ำเกษตรประเภทมันสำปะหลัง. *รายงานผลการศึกษาลินค้ำ*

เกษตรประเภทมันสำปะหลัง สำนักงานคณะกรรมการกำกับและส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร  
ล่วงหน้า. 5-15.

สุดารัตน์ สุตพันธ์ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. (2553). การเก็บรวบรวมและจำแนกเชื้อรา Colletotrichum  
สปีชีส์สาเหตุโรคน้ำเน่าในพริก. ใน การประชุมวิชาการอัครกาฬแห่งชาติ  
ครั้งที่ 9. อุบลราชธานี.

สถาบันวิจัยพืชไร่. (ม.ม.ป.). โรคน้ำเน่ามันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก:

[http://www.doa.go.th/fcri/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5&Itemid=23](http://www.doa.go.th/fcri/index.php?option=com_content&view=article&id=5&Itemid=23).

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร. (ม.ม.ป.). ประวัติความเป็นมาของมันสำปะหลัง. [ออนไลน์].  
ได้จาก: [http://kasetinfo.arda.or.th/arda/cassava/?page\\_id=206](http://kasetinfo.arda.or.th/arda/cassava/?page_id=206).

สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร. (2557). มันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://www.oae.go.th/more\\_news.php?cid=12.-hv](http://www.oae.go.th/more_news.php?cid=12.-hv).

สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร. (2557). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2557.  
[ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.oae.go.th/morenews.php?cid=12.-hv>.

ศูนย์ส่งเสริมพัฒนาการผลิตมันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. (2553). พันธุ์มันสำปะหลัง และการ  
จำแนกชนิดพันธุ์. [ออนไลน์]. ได้จาก:

<http://www.cassava-devlp-center.com/index.php?lay=show&ac=article&Ntype=6>.

ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์. (2552). โรคน้ำเน่ามันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก:

[http://nsfrcnews.blogspot.com/2010/10/blog-post\\_15.html](http://nsfrcnews.blogspot.com/2010/10/blog-post_15.html).

ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์. (2554). ระวัง...การระบาดของโรคในมันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก:

<http://nsfrcnews.blogspot.com/2011/06/blog-post.html>.

ศูนย์วิจัยมันสำปะหลังและผลิตภัณฑ์. (ม.ม.ป.). ประวัติของมันสำปะหลัง. [ออนไลน์]. ได้จาก:

[http://web.sut.ac.th/cassava/cassava/index.php?name=1cas\\_source/cas\\_inthailand/.29](http://web.sut.ac.th/cassava/cassava/index.php?name=1cas_source/cas_inthailand/.29)

หทัยชนก คงแก้ว. (2546). การพัฒนาชุดไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจ *Colletotrichum* spp. บน  
เมล็ดพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-77  
หน้า.

หนังสือพิมพ์มติชนเทคโนโลยีเกษตร. (2557). “พิรุณ1” มันสำปะหลังพันธุ์ใหม่. [ออนไลน์]. ได้จาก :

[http://www.technologychaoban.com/news\\_detail.php?tnid=919](http://www.technologychaoban.com/news_detail.php?tnid=919). เทคโนโลยีชาวบ้าน.

อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์. (2553). ความหลากหลายของเชื้อ ความต้านทาน และการพัฒนาเครื่องหมาย  
โมเลกุลสำหรับยืนยันต้นตอเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ (แอนแทรคโนส)

ในอุ้งน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 1-174 หน้า.

- Abang, M.M., Winter, S.T, Green, K.R., Hoffmann, P., Mignouna, H.D. and Wolf, G.A. (2002). Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. **Plant Pathology**. 51: 63-71.
- Anderson, J. M., Aitken, E.A. B., Dann, E. K. and Coates L. M. (2012). Morphological and molecular diversity of *Colletotrichum* spp. causing pepper spot and anthracnose of lychee (*Litchi chinensis*) in Australia. **Plant Pathology**. 10: 1365-3059.
- Adhipathi, P., Nakkeeran, S. and Chandrasekaran, A. (2013). Morphological characterization and molecular phylogeny of *colletotrichum capsici* causing leaf spot disease of Turmeric. **The Bioscan**. 8(1): 331-337.
- Azad, R. and Shamsi, S. (2011). Identification and Pathogenic potentialty of fungi associated with *Houttuynia cordata* thumb. **J. Biol. Sci**. 20(2): 131-138
- Bailey, J.A. and Jeger, M.J. ( 1992) . *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control. CAB International, Kew. 370-380.
- Banito, A., Kpémoua, K.E., Bissang, B. and Wydra, K. (2010). Assessment of cassava root and stem rots in ecozones of Togo and evaluation of the pathogen virulence. **Pak.J. Bot**. 42: 2059-2068.
- Buensanteai, N., Thumanu, K., Sompong, M., Athinuwat, D., Brauman, A., and Prathuangwong, S. (2012) . The FTIR spectroscopy investigation of the cellular components of cassava after sensitization with plant growth promoting rhizobacteria, *Bacillus subtilis* CaSUT007. **Afr. J. Microbiol. Res**. 6(3): 603-610.
- Buensanteai, N., Thumanu, K., Sompong, M., Athinuwat, D., Brauman, A., and Plassard, C. ( 2013) . The plant growth promoting bacterium *Bacillus* sp. CaSUT007 produces phytohormone and extracellular proteins for enhanced growth of cassava. **Afr. J. Microbiol. Res**. 7(42): 4949-4954.
- Binyamini, N. and Schiffmann, N.M. ( 1972) . Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**. 62: 592 – 594.
- 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.

- Coates, L.M., Muirhead, I. F., Irwin, J.A.G. and Gowanlock, D. (1993). Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. **Mycol. Res.** 97: 1363-1370.
- Cook, A.A. (1975). Diseases of tropical and subtropical fruit and nuts. **Hafner Press**, New York.
- Darvas, J.M. and Kotze, J.M. (1987). Avocado fruit diseases and their control in South Africa. **South Africa Avocado Growers' Association Yearbook.** 10: 117-119
- Damm, U., et al. (2012). The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology.** 73: 1-36.
- Dodd, J.C., Estrada, A. and Jeger, M.J., (1992). Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the Tropics. In: Bailey, J.A., Jeger, M.J. (Eds.), **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control.** CAB International, Wallingford. 308-325.
- Diao, Y.Z., Zhang, C., Lin, D. and Liu, X.L. (2014). First Report of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Tomato in China. **Plant disease.** 98(5): 678-687.
- Elsayed, Z.S., et al. (2010). Applicability of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for rapid identification of some yeasts and dermatophytes isolated from superficial fungal infections. **J. Egypt Women Dermatol Soc.** 7(2): 105-110.
- Erika, P.M., Hío, J.C., Osorio, J.A. and Torres, M.F. (2009). Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. **Agronomía Colombiana.** 27(2): 211-218.
- Erukhimovitch, V., Huleihil, M. and Huleihel, M. (2013). Identification of Contaminated Cells with Viruses, Bacteria, or Fungi by Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. **Journal of Spectroscopy.** 1-6.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. (1998). Characterization *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Dis.** 82: 596-605.
- Frison, E.A. and Feliu, E. (1991). FAO/IBPGR Technical guidelines for the safe movement of cassava germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 48.
- Fizell, R.D. (1987). Epidemiology of anthracnose disease of avocado. **South African Avocado Growers' Association Yearbook.** 10: 113-116.
- Fokunang, C.N., Dixon, A.G.O., Ikotun, T., Tombe, E.A., Akem, C.N. and Asiedu, R. (2001). Anthracnose : an economic disease of cassava in africa. **Pakistan Journal of Biological Sciences.** 4(7): 920-925.

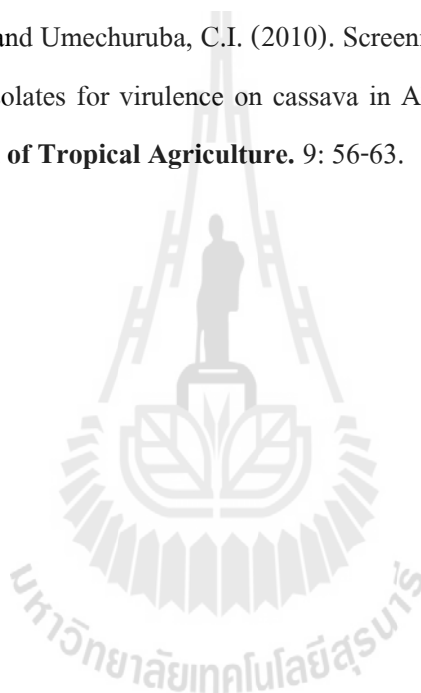


- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). **Cassava Thailand**. [On-line]. Available: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
- Guerber, J.C., Liu, B. and Correll, J.C. (2003). Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. **Mycological Society of America**. 95(5): 872-895.
- Gupta, V.K., et al. (2010). Genetic characterization of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. By random amplified polymorphic DNA analysis. **Afr. J. Biotechnol.** 9 : 4009-4013.
- Gonzalez, H.M.D., Ruiz-Roldan, 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.
- Hsiang, T. and Goodwin, P.H. (2001). Ribosomal DNA sequence comparisons of *Colletotrichum graminicola* from turfgrasses and other hosts. **European Journal of Plant Pathology**. 107: 593-599.
- Hahn, S.K., Isoba, J.C.G. and Ikotun, T. (1989). Resistance breeding in root and tuber crops at International Institute of tropical agriculture, Ibadan, Nigeria. **Crop Protection**. 35: 147-168.
- Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. and Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**. 39: 1-17.
- IITA. (1990). Cassava in Tropical Africa. A Reference Manual. IITA, Ibadan, Nigeria, 108.
- Jeffries, P., Dodd, J.C., Jeger, M.J. and Plumbley, R.A. (1990). The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology** 39: 343-366.
- Khan, A. and Hsiang, T. (2003). The infection process of *Colletotrichum graminicola* and relative aggressiveness on four turfgrass species. **Can. J. Microbiol.** 49: 433-442.
- Magdalena, N.M.W., Mbega, E.R. and Mabagala, R.B. (2012). An outbreak of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *manihotis* in cassava in North Western Tanzania. **American Journal of Plant Sciences**. 3: 596-598.
- Maraite, H. (1993). *Xanthomonas campestris* pathovars on cassava: cause of bacterial blight and bacterial necrosis. In J.G. Swings & E.L. Civerolo (Eds.), *Xanthomonas*, (pp. 18-24). Chapman and Hall, Ltd., London.

- Malathi, P., Viswanathan, R., Padmanaban, P., Mohanraj, D. and Sundar, R.A. (2002). Microbial detoxification of *Colletotrichum falcatum* toxin. **Current Science**. 83: 745-749.
- Medeiros, A.O., Duarte, S., Pascoal, C., Cássio, F. and Grana, M. A. S. (2010). Effects of Zn, Fe and Mn on leaf litter breakdown by aquatic fungi: a microcosm study. **International Review of Hydrobiology**. 95: 12-26
- Onyeka, T.J., et al. (2008). Prevalence and severity of bacterial blight and anthracnose diseases of cassava in different agroecological zones of Nigeria. **African Journal of Agricultural Research**. 3(4): 297-304.
- Owolade, O.F., Dixon, A.G.O., Adeoti, A.A. and Osunlaja, S.O. (2005). Sources of resistance to cassava anthracnose disease. **African Journal of Biotechnology**. 4(6): 570 - 572.
- Pinto, J.M.A., Pereira, R., Mota, S.F., Ishikawa, F.H. and Souza, E.A. (2012). Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**. 102: 490-497.
- Ploetz, R.C. (2003). **Diseases of tropical fruit crops**. CAB International, Wallingford. UK. 544.
- Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2009). Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**. 39: 89-109.
- Rothan, D.B., et al. (2003). Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *Colletotrichum* species from strawberry. **Phytopathol**. 93(2): 219-228.
- Sharma, O.P. (1989). **Textbook of Fungi**. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, New Delhi, 365.
- Sharma, P.N., Padder, B.A., Pathania, A. and Sharma, P. (2007). Pathological and molecular diversity in *colletotrichum lindemuthianum* (bean anthracnose) across Himachal Pradesh, a north Western Himalayan state of India. **Australasian Plant Pathology**. 36: 191-197.
- Salman, A., Tsrer, L., Pomerantz, A., Moreh, R., Mordechai, S. and Huleihel, M. (2010). FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes. **Spectroscopy**. 24: 261 -267.
- Shivas, R., and Beasley D. (2003). Workshop Manual & Reference: Plant Pathogenic Ascomycetes, In Plant Pathogenic Ascomycetes Workshop, Dunwich, North Strabroke Island. Sivanesan, A. 1984. The Bitunicate Ascomycetes and Their Anamorphs. Germany, Braunschweig, **J. Cramer**. 710.

- Smith, B.J. and Black, L.L. (1990). Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolate from strawberry. **Plant disease**. 74: 69-76.
- Smith, J.D. (1954). A disease of *Poa annua*. **J. Sports Turf Res. Inst.**30: 344-353.
- Stanley, f., Shabi, E. and Katan, T. (2000). Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronaria* L.). **Applied and Environmental Microbiology**. 66(12): 5267-5272.
- Stephen, K. and O'Hair, (1998). Cassava. [online] <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/CropFactSheets/cassava.html>.
- Sutton, B.C. (1992). The Genus *Glomerella* and Its Anamorph *Colletotrichum*. pp 1–26 In: J.A., Bailey and M.F. Jeger. (eds.). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. C.A.B. International, Wallingford.
- Svetlana, ž., et al. (2010). Morphological and molecular identification of *Colletotrichum acutatum* from tomato fruit. **Pestic. Phytomed.** 25(3): 231-239.
- Szeghalmi, A., and Kaminskyj, S. (2006). A synchrotron FTIR microspectroscopy investigation of fungal hyphae grown under optimal and stressed conditions. **Anal Bioanal Chem**. DOI 10.1007/s00216-006-0850-2.
- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasami, S., Mongkolporn, O. and Taylor, P.W.J. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. **Plant Pathology**. 57: 562-572.
- Theberge, R.L., (1985). Common African Pest and Diseases of Cassava, Yam, Sweet Potato and Cocoyam. International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan Nigeria, 107 pp.
- Thumanu, K., et al. (2014). Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cell–derived hepatocytes using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**. 16(5): 057005.
- Van der Bruggen, P. and Maraite, H. (1987). Histopathology of Cassava Anthracnose Disease cause *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis*. **Parastica**. 43: 3-21.
- Verdier, V., Boher, B., Henri, M. and Jean, P.G. (1994). Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*), **Applied and Environmental Microbiology**. 60(12): 4478-4486.

- Yi, K.X., Huang, J.S., Liu, G.D., Weeds, P. and Chakraborty, S. (2003). Genetic diversity analysis of stylo anthracnose pathogens using random amplified polymorphic DNA. **Acta Microbiol Sin**, 3: 379-387.
- Weeds, P.L., Chakraborty, S., Fernandes, C.D., Charchar, M.J.dA., Ramesh, C.R., Kexian, Y. and Kelemu, S. (2003). Genetic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes* spp. at centers of origin and utilization. **Phytopathology** 93: 176-185.
- Weir, B.S., Johnston, P.R., and Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**. 73: 115-180.
- Wokocha, R., Nneke, C. and Umechuruba, C.I. (2010). Screening *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *manihotis* isolates for virulence on cassava in Akwa Ibom State of Nigeria. **Agro-Science Journal of Tropical Agriculture**. 9: 56-63.





## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

### 1.1 Water Agar (WA)

วุ้นผง (Agar)	18	กรัม
น้ำกลั่นหรือน้ำกรอง	1,000	มิลลิลิตร

ผสมวุ้นผงกับน้ำกลั่น หรือน้ำกรอง นำไปต้มจนรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

### 1.2 Potato Dextrose Agar (PDA)

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

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลบ. ซม. ต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตร จนนุ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำสกัดผสม dextrose ทั้งหมดลงในน้ำสกัด นำไปผสมกับวุ้นผงที่ต้มจนละลายแล้ว ด้วยน้ำส่วนที่เหลือ คนให้เข้ากัน เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำเข้านึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

## 2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางชีวโมเลกุลของเชื้อ *Colletotrichum* sp.

### 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 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 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 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 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% 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

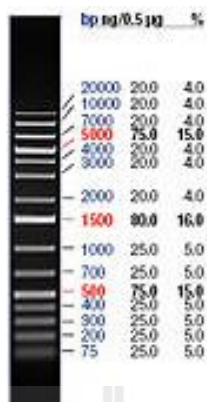
**2.7 Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1)**

Chloroform	48	มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	2	มิลลิลิตร

**2.8 70% ethanol****2.9 Absolute ethanol**

Absolute ethanol แช่เย็นอย่างน้อย 30 นาที ก่อนนำไปใช้

### 3. DNA size marker



1 Kb DNA Ladder visualization by ethidium bromide staining on 1% agarose gel. Mass values are for 0.5 μg/lane

### 4. สารเคมีที่ใช้ศึกษาความแตกต่างด้วยวิธี FTIR micro spectroscopy

#### 4.1 0.85 % Sodium Chloride

Sodium Chloride 8.5 กรัม

น้ำ DI นึ่งฆ่าเชื้อ 1 ลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที





ภาคผนวก ข

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Colletotrichum* sp. โดยพื้นฐานข้อมูล Genbank  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

**Sequence ID:** gb|KF773863.1|Length: 413Number of Matches: 1

*Colletotrichum gloeosporioides* isolate OV4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

Range 1: 4 to 398 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
706 bits(382)	0.0	391/395(99%)	2/395(0%)	Plus/Minus

```

Query 35  AATTGGGGG-TTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGACGTAAAGTTACTAC 93
          |||
Sbjct 398  AATTGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGACGTAAAGTTACTAC 339

Query 94  GCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGC 153
          |||
Sbjct 338  GCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGC 279

Query 154  CCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA 213
          |||
Sbjct 278  CCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA 219

Query 214  TGCTGGCGGGGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGTGAATTCTGCAATTCACA 273
          |||
Sbjct 218  TGCTGGCGGGGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGTGAATTCTGCAATTCACA 159

Query 274  TTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTAA 333
          |||
Sbjct 158  TTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTAA 99

Query 334  AAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGTTA 393
          |||
Sbjct 98   AAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGTTA 39

Query 394  TCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCGGAG-CGGGG 427
          |||
Sbjct 38   TCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCGGAGGGGG 4

```

ภาพที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ไอโซเลต OV4 กับ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ไอโซเลต SEL8

**Sequence ID:** gb|KJ939273.1|Length: 544Number of Matches: 1

*Colletotrichum lindemuthianum* isolate CL05 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial

Range 1: 236 to 357 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
213 bits(115)	1e-51	120/122(98%)	1/122(0%)	Plus/Minus

```

Query 192 CCCCAACGCCAAGCGGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGA 251
Sbjct 357 CCCCAACGCCAAGCGGTGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGA 298
Query 252 ATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAAT-CAC 310
Sbjct 297 ATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACGGAATTCTGCAATTCAC 238
Query 311 AT 312
Sbjct 237 AT 236

```

**ภาพที่ 2** แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทล์ของเชื้อ *Colletotrichum lindemuthianum* ไอโซเลต CL05 กับ เชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* ไอโซเลต SLC032 ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

**Sequence ID:** gb|JX131331.1|Length: 1161Number of Matches: 1

*Colletotrichum aeshynomenes* isolate Clar-5A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Range 1: 287 to 590 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
544 bits(294)	3e-151	301/304(99%)	2/304(0%)	Plus/Minus

```

Query 1 TTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAAC 60
Sbjct 590 TTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAAC 531
Query 61 CTTTGGAAAATTGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCAGACGTAA 120
Sbjct 530 CTTTGGAAAATTGGGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCAGACGTAA 471
Query 121 AGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAG 180
Sbjct 470 AGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAG 411
Query 181 CTGTAGGGCCCCAACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGC 240
Sbjct 410 CTGTAGGGCCCCAACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGC 351
Query 241 CCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGT-CAAAGATTTCGATGAT-CACTGAATGCTG 298
Sbjct 350 CCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGT-CAAAGATTTCGATGAT-CACTGAATGCTG 291
Query 299 CAAT 302
Sbjct 290 CAAT 287

```

**ภาพที่ 3** แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทล์ของเชื้อ *Colletotrichum aeshynomenes* ไอโซเลต Clar-5A 18S กับ เชื้อรา *Colletotrichum aeshynomenes* ไอโซเลต NKSTKLS02 ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

**Sequence ID:** gb|JX910365.1|Length: 558Number of Matches: 1

Colletotrichum capsici isolate KUAB1CC3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Range 1: 250 to 558 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
558 bits(302)	1e-155	307/309(99%)	2/309(0%)	Plus/Minus

```

Query 2  TTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAAC 61
          |||
Sbjct 558 TTCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAAC 499

Query 62  CTTAGTAAAATTGGGGGTTTTACGGCTAGAGTCCCTCCGAATCCCAATGCGAGACGAAAT 121
          |||
Sbjct 498 CTTAGTAAAATTGGGGGTTTTACGGCTAGAGTCCCTCCGAATCCCAATGCGAGACGAAAT 439

Query 122 GTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGAGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCCTACGTCAAC 181
          |||
Sbjct 438 GTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGAGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCCTACGTCAAC 379

Query 182  CGTAGAGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCC 241
          |||
Sbjct 378 CGTAGAGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCC 319

Query 242  CGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAAT-CTGC 300
          |||
Sbjct 318 CGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGC 259

Query 301  AAT-CACAT 308
          |||
Sbjct 258 AATTCACAT 250
  
```

ภาพที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Colletotrichum capsici* ไอโซเลต KUAB1CC3 กับ เชื้อรา *Colletotrichum capsici* ไอโซเลต SRTL01 ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

**Sequence ID:** gb|JX258687.1|Length: 593Number of Matches: 1

*Colletotrichum boninense* strain C2.2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Range 1: 374 to 592 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
344 bits(186)	4e-91	208/219(95%)	0/219(0%)	Plus/Minus

```

Query 30 TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACC 89
          |||
Sbjct 592 TCCTCCGCTTATTGATATGATTAAGTTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACC 533

Query 90 TTTGGAAAATTGGGGGGTTTTACGGCAGGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGGTGGTAT 149
          |||
Sbjct 532 TTTGGAAAATTGGGGGGTTTTACGGCAGGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGGTGGTAT 473

Query 150 GTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTGTATTTTCGCTTCTACGGAATC 209
          |||
Sbjct 472 GTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTGTATTTTCGCGGCTACGGAAGC 413

Query 210 CGTAGGGCCACCACCCAAGCGGTGCTTCATGCTTGAAA 248
          |||
Sbjct 412 CGTAGGGCCCAACGCAAGCGGTGCTTGAGGGTTGAAA 374

```

ภาพที่ 5 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทล์ของเชื้อ *Colletotrichum boninense* ไอโซเลต C 2.2 18S กับ เชื้อรา *Colletotrichum boninense* ไอโซเลต KBSF03 ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง



**Sequence ID:** emb|AJ301945.1|Length: 2874Number of Matches: 1

*Colletotrichum truncatum* 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), internal transcribed spacer 1 (ITS1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2), strain CBS 710.70

Range 1: 2001 to 2310 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
560 bits(303)	3e-156	308/310(99%)	2/310(0%)	Plus/Minus

```

Query 1  TTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAA 60
          |||
Sbjct 2310 TTTCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAA 2251

Query 61  CCTTAGTAAAATTGGGGGTTTTACGGCTAGAGTCCCTCCGAATCCAATGCGAGACGAAA 120
          |||
Sbjct 2250 CCTTAGTAAAATTGGGGGTTTTACGGCTAGAGTCCCTCCGAATCCAATGCGAGACGAAA 2191

Query 121 TGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGAGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCTACGTCAA 180
          |||
Sbjct 2190 TGTTACTACGCAAAGGAGGCTCCGAGAGGGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCTACGTCAA 2131

Query 181  CCGTAGAGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGC 240
          |||
Sbjct 2130 CCGTAGAGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGC 2071

Query 241  CCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAAT-CTG 299
          |||
Sbjct 2070 CCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTG 2011

Query 300  CAAT-CACAT 308
          |||
Sbjct 2010 CAATCACAT 2001

```

**ภาพที่ 6** แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Colletotrichum truncatum* ไอโซเลต CBS 710.70 กับ เชื้อรา *Colletotrichum capsici* ไอโซเลต SRTL01 ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวรุ่งทิพย์ สังข์เผือก เกิดเมื่อวันที่ 3 พฤษภาคม พ.ศ. 2532 ที่ อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี ได้สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2554

ในปี พ.ศ. 2554 ได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาพืชศาสตร์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยระหว่างการศึกษาได้รับทุนผู้ช่วยสอนและผู้ช่วยวิจัย และทุนวิจัยจากแหล่งทุนภายนอก

