

สุทธิสา คัชณีย์: การระบุเชื้อราสาเหตุโรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลัง
(IDENTIFICATION OF THE CAUSAL FUNGI OF STEM AND ROOT BLACK
ROT DISEASE IN CASSAVA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิญา
เป็อนสันเทียะ, 130 หน้า.

โรคต้นและรากเน่าดำของมันสำปะหลังเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายรุนแรงในประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสาเหตุของโรคดังกล่าว โดยเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการหลากหลายลักษณะจากแหล่งปลูกใน 6 อำเภอ ของ 3 จังหวัด จำนวน 139 ตัวอย่างนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา 3 ชนิด คือ WA, HPDA และ PDA+BRANP จากนั้นนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อรา 5 สกุล คือ *Lasiodiplodia* spp. พบมากที่สุด 54 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Fusarium* spp., *Neoscytalidium* sp., *Phytophthora* spp., *Sclerotium* sp. และเชื้อราชนิดอื่น จำนวน 29, 7, 4, 1 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทำการศึกษารายละเอียดเฉพาะเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia* spp. และ *Neoscytalidium* sp. เนื่องจากเป็นเชื้อราที่พบมากที่สุด ผลการศึกษาพบว่า หัวมันสำปะหลังที่ถูกเข้าทำลายจากเชื้อราทั้งสองสกุลมีลักษณะอาการแผลสีดำร่วมกับอาการ เน่าเปียก เน่าละ และเน่าแห้ง ในบริเวณโคนต้น และท่อนพันธุ์พบเม็ด pycnidia สีดำ และท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีดำในทุกส่วนของมันสำปะหลัง จากนั้นแยกเชื้อจากสปอร์เดี่ยวนำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่า เชื้อราทั้ง 33 ไอโซเลตสามารถก่อโรคได้ทั้งกับหัวและท่อนพันธุ์มันสำปะหลังพันธุ์ CMR 89 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและโรงเรือน โดยไอโซเลต L11HSR2 ก่อให้เกิดโรครุนแรงที่สุด จึงนำไอโซเลตนี้ไปทดสอบในสภาพแปลงปลูก ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ วิธีการปลูก 2 วิธีร่วมกับวิธีการปลูกเชื้อ 3 วิธี ผลการศึกษาเมื่อมันสำปะหลังมีอายุ 8 เดือนหลังปลูก ในสภาพที่มีเชื้อผสมอยู่การปลูกแวนอนให้ผลผลิตน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยสูงสุด 4.03 ± 0.71 กิโลกรัมต่อต้น ขณะที่ในสภาพที่ไม่มีเชื้อสาเหตุโรค (กรรมวิธีควบคุม) พบว่าการปลูกแนวตั้งให้ผลผลิตน้ำหนักหัวสดเฉลี่ยสูงสุด 6.80 ± 0.35 กิโลกรัมต่อต้น โดยการปลูกแบบแนวตั้งร่วมกับการผสมเชื้อสาเหตุโรคลงในดิน อัตราส่วนโดยปริมาตร 1:100 ให้ผลผลิตต่ำสุด 2.63 ± 0.21 กิโลกรัมต่อต้น การศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลและการวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการ โดยนำตัวแทนของเชื้อจำนวน 8 ไอโซเลต ประกอบด้วย L6HRD, L11HSR2, L12SHRD, L13SRTF, L18KBSH, L20FHTB1, L27SRBT และ N3DTD2 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ใช้ *universal primers* 3 บริเวณ คือ ไพร์เมอร์ ITS1/ITS4, ไพร์เมอร์ Ef1-688F/Ef1-1251R และ ไพร์เมอร์ Bt2a/Bt2b แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อในฐานข้อมูล Genbank พบว่า บริเวณ EF1- α สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนที่สุด จากนั้นนำข้อมูลมาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ และวิเคราะห์แผนภูมิ

วิวัฒนาการ ด้วยวิธี NJ, UPGMA และ ML พบว่าสามารถจัดกลุ่มเหมือนกันทั้ง 3 วิธี ผลการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลทั้ง 3 บริเวณร่วมกัน สามารถจำแนกเชื้อรา คือ *L. theobromae*, *L. euphorbicola* และ *N. hyalinum* การรายงาน *L. euphorbicola* และ *N. hyalinum* เข้า ทำลายมันสำปะหลังในประเทศไทยครั้งนี้ นับเป็นรายงานครั้งแรก เพิ่มเติมจากเชื้อ *L. theobromae* ซึ่งเคยมีรายงานไว้แล้ว



สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

SUTTISA DUCHANEE : IDENTIFICATION OF THE CAUSAL FUNGI
OF STEM AND ROOT BLACK ROT DISEASE IN CASSAVA.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. NATTHIYA BUENSANTEAI, Ph.D.,
130 PP.

Lasiodiplodia spp./STEM AND ROOT BLACK ROT/CASSAVA

Cassava stem and root rot is one of the most serious diseases of cassava in Thailand. The objective of this study was to identify the causal agent of this disease. The study was carried out by collecting a total of 139 diseased cassava samples with various stem and root rot symptoms from cassava planting areas covering those in 6 districts of 3 provinces in Thailand. The causal fungi were subsequently isolated from the diseased samples using 3 different media, including WA, HPDA and PDA+BRANP. The 139 samples obtained could be classified into 5 genera according to the colony and spore morphology using a standard morphological study protocol. *Lasiodiplodia* spp. was the most frequently found fungus, constituting approximately 54 % of the total, followed by *Fusarium* spp., *Neoscytalidium* sp., *Phytophthora* spp., *Sclerotium* sp. and other fungal genera which were found at 29, 7, 4, 1 and 5%, respectively. Because of their high frequency, the 33 isolates in the family of Botryosphaeriaceae, *Lasiodiplodia* spp. and *Neoscytalidium* sp. were subsequently studied for more details. Results of the study indicated that both genera could cause black necrosis to the cassava tubers. The necrosis was often accompanied by wet, soft or dry rot symptoms, and black pycnidia were found on the stalk and propagative stakes. The fungi could infect all parts of the cassava plant and cause discoloration in the vascular tissue. The pathogenicity test of all 33 single-spore isolates showed that

they could cause stem and root black rot symptoms on the inoculated susceptible cassava cv. CMR 89 under both moist chamber and green house conditions, but the disease severities were different depending on the fungal isolates. Among them, the isolate L11HSR2 was the most virulent. This isolate was further tested under a field condition consisting of two factors, i.e. two planting methods and three pathogen inoculation techniques. At 8 months after planting under the inoculated soil condition, cassava with the stakes planted horizontally gave a higher average yield of 4.03 ± 0.71 kg/plant while those planted vertically gave only 2.63 ± 0.21 kg/plant. However in the uninoculated soil (control), planting the stakes vertically gave the highest yield of 6.03 ± 0.87 kg/plant. By using 3 primers including ITS1/ITS4, Ef1-688F/Ef1-1251R and Bt2a/Bt2b primers to amplify the DNAs from 8 representative isolates including: L6HRD, L11HSR2, L12SHRD, L13SRTE, L18KBSH, L20FHTB1, L27SRBT and N3DTD2, only the primer of the EF1- α region was effective in differentiating the isolates at species level and had an agreeable result with that identified by the standard morphological technique. When the 8 isolates was compared against GenBank's database using the Mega BLAST program, and the alignment data using the NJ, UPGMA and ML methods, could be identified as *L. theobromae*, *L. euphorbicola* and *N. hyalinum*. The finding that *N. hyalinum* and *L. euphorbicola* could infect cassava in this study can be claimed as the first report in Thailand.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2015

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____